

QBQ0316 - Bioquímica Experimental (2020)

Purificação de proteínas

Proteínas: moléculas essenciais para a vida:

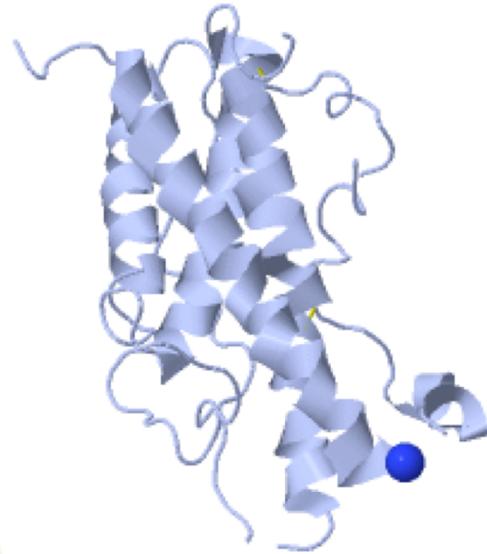
Enzimas

(ex. Alfa glicosidase
584 aminoácidos)



Hormônios

(ex. hormônio do crescimento
191 a.a)



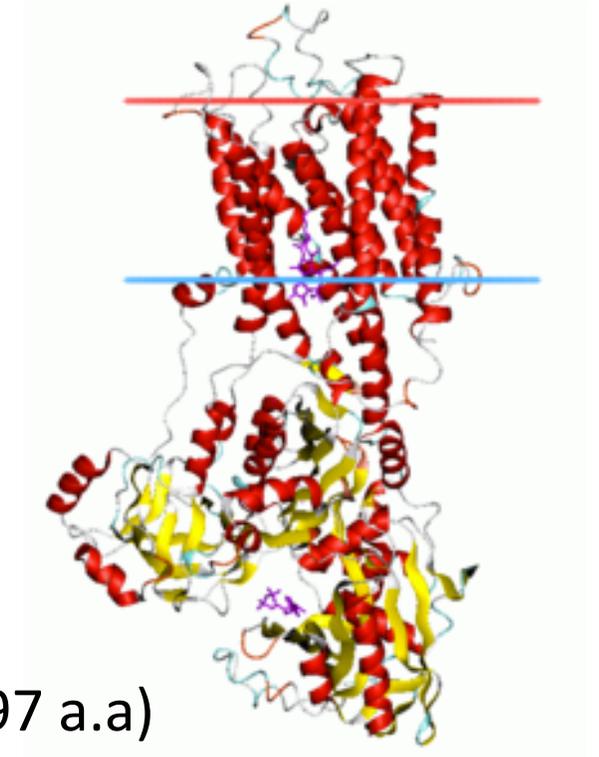
Anticorpos

IgG (2 cadeias leves,
2 pesadas, ~1500 a.a)



Transportadores

(ex. Ca²⁺ATPase, 997 a.a)

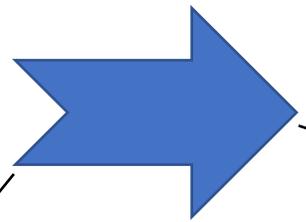
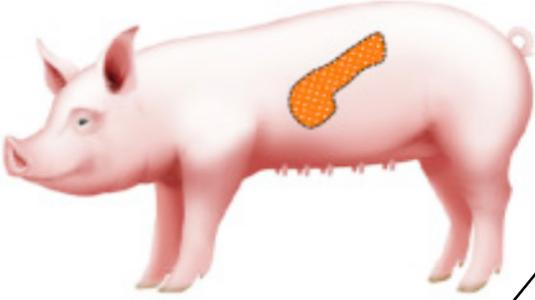


Proteínas: de onde e como extraí-las ?

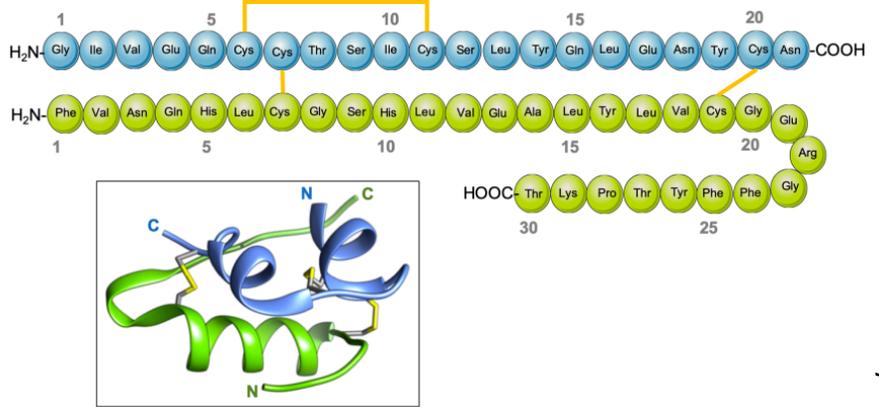
- A obtenção da proteína em forma pura (ou quase pura) é necessária para desvendar a sua estrutura e função através de métodos analíticos.
- Amostras biológicas (células, tecidos animais ou vegetais) são misturas complexas de biomoléculas com milhares de proteínas distintas.
- A **purificação de proteínas** é uma etapa importante nos processos de produção de fármacos, insumos alimentares e industriais.

Purificação de insulina a partir do pâncreas de animais – o início

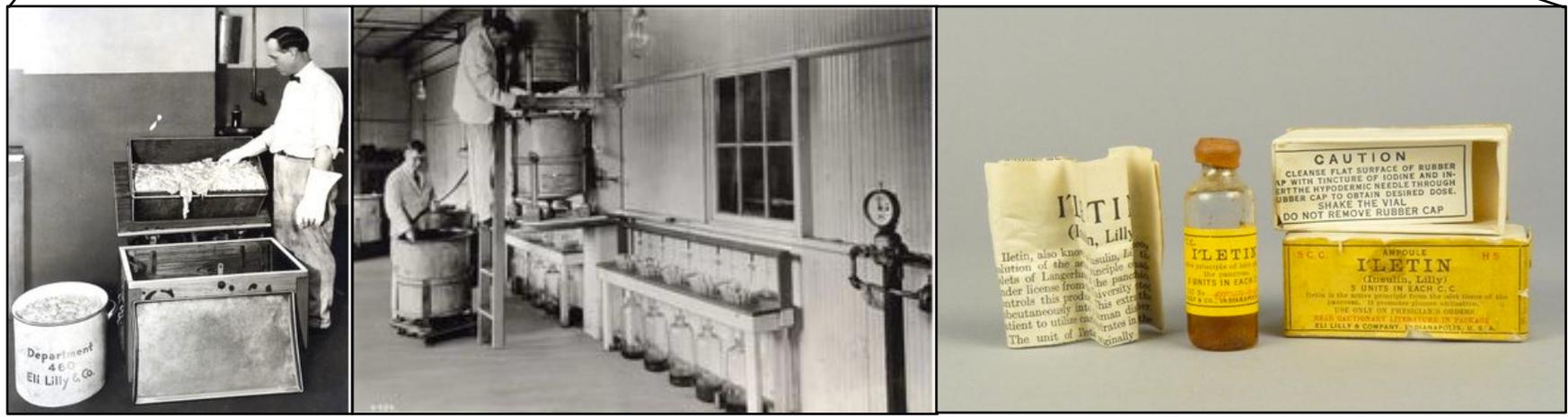
2 toneladas de pâncreas de porcos



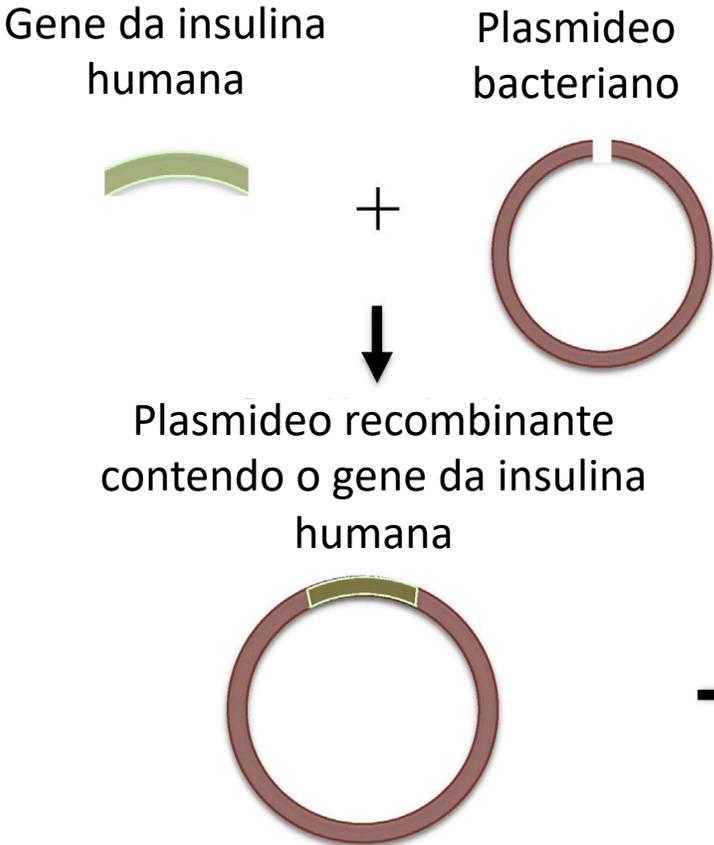
200 gramas de cristais de insulina
(51 a.a)



Prêmio Nobel de Medicina em 1923 pela descoberta da insulina no tratamento do diabetes

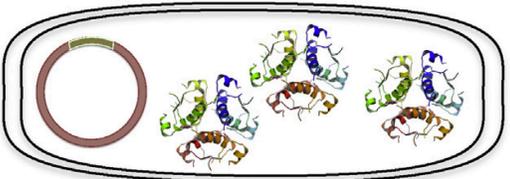


Purificação de insulina humana produzida em bactéria pela tecnologia do DNA recombinante – hoje em dia

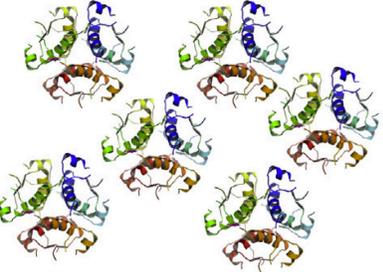


Planta industrial para produção de insulina recombinante

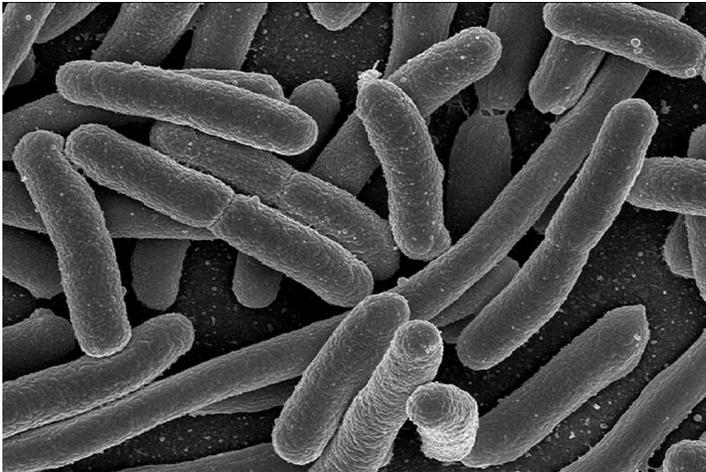
Transformação de bactérias expressão de insulina humana



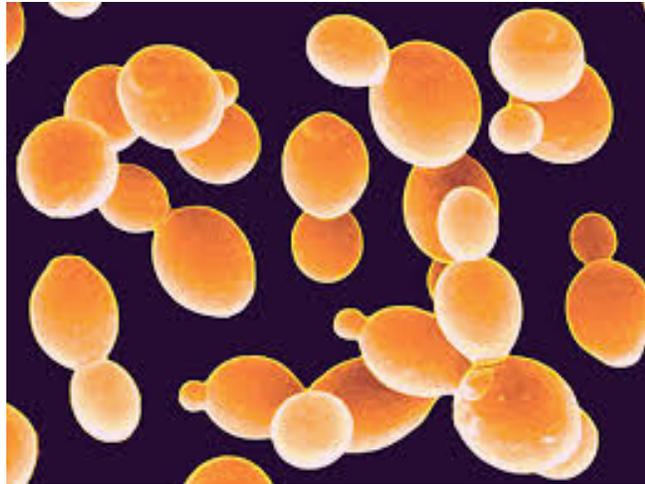
Lise de bactérias
Purificação de insulina recombinante



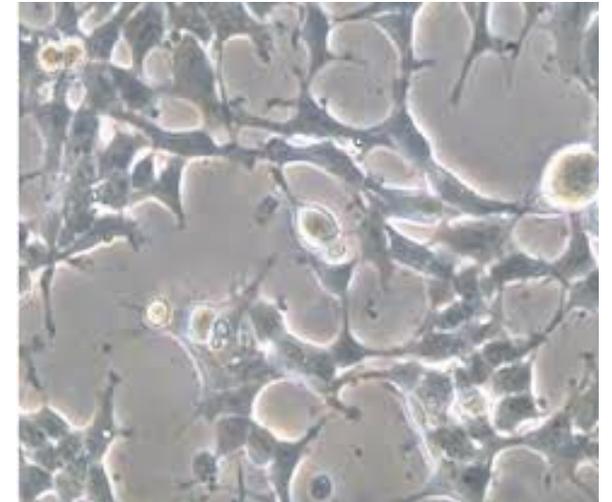
Diferentes tipos celulares utilizados para obtenção de proteínas endógenas ou recombinantes



Bactérias (0,1 – 5,0 μm)



Leveduras (3,0 - 5,0 μm)

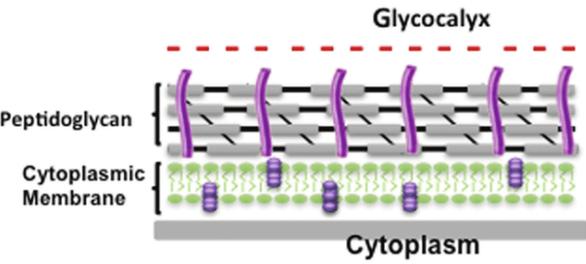


Células animais (10 - 100 μm)

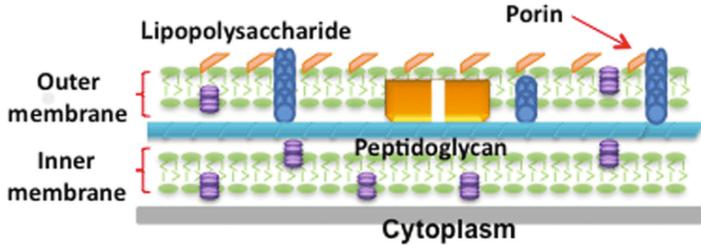
Lise celular

- interrupção da membrana da célula através de métodos **físicos, químicos ou enzimáticos**.
- Resulta em um fluido, o “**lisado**” ou “**homogenato**” que é uma mistura de fragmentos celulares e componentes moleculares.
- Etapa que **antecede a purificação** de componentes moleculares (proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos) ou organelas celulares.

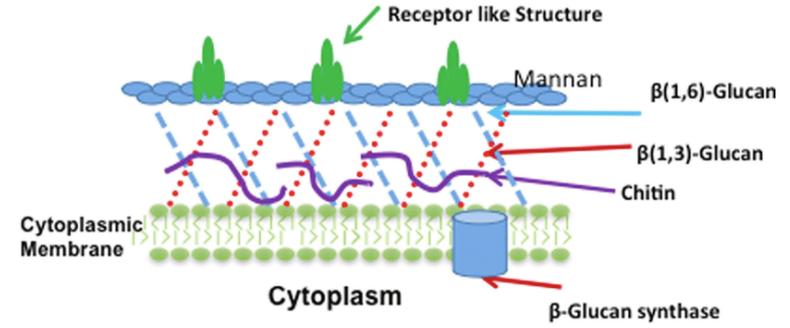
Bactérias e fungos possuem além da membrana plasmática uma **parede celular** rígida que dificulta a lise da célula.



Gram positiva

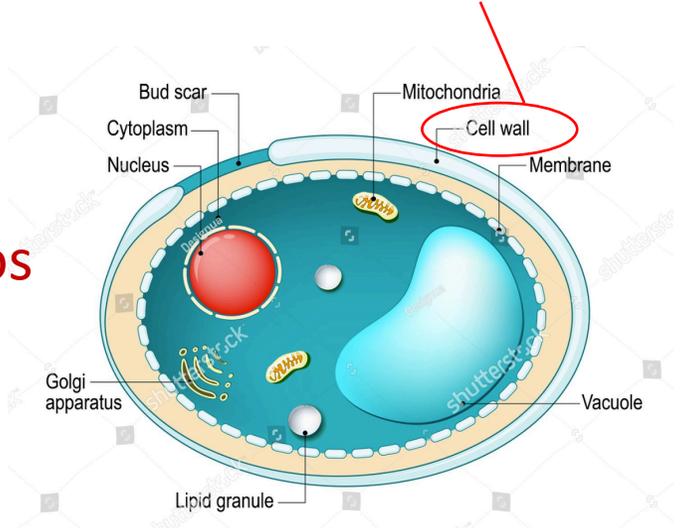
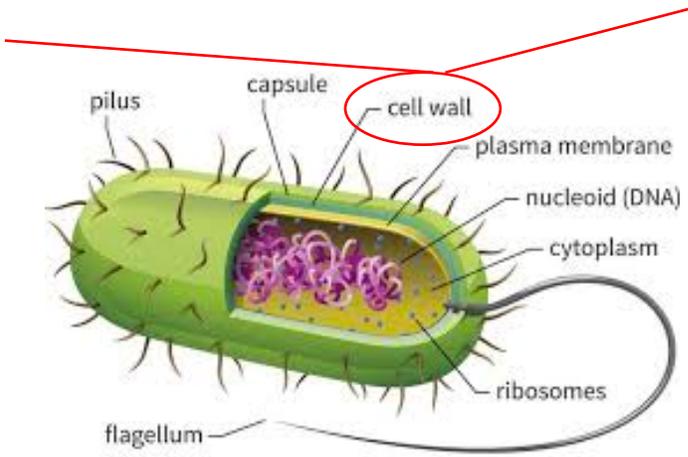


Gram negativa



fungos

bactérias



Métodos usados para lise celular

Químicos

detergentes que solubilizam os lipídios da membrana plasmática (membranas de organelas intracelulares

Mecânicos

homogenização com esferas de vidro, **ultrasom** (cavitação), **pressão**, **congelamento/descongelamento**, entre outros

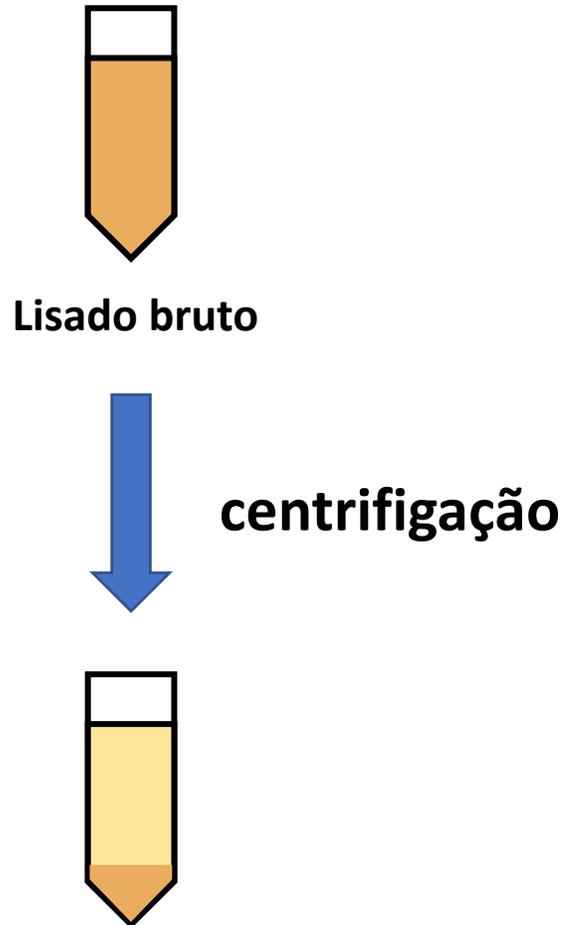
Enzimáticos

enzimas que degradam a parede celular de bactérias (lisozima), fungos (zimoliase) e plantas (celulase)

Métodos para obtenção de lisado a partir de células/tecidos



Fracionamento do lisado por centrifugação



Lisado clarificado

Sobrenadante: moléculas em solução no citoplasma

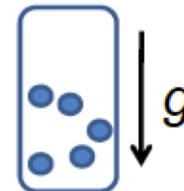
Precipitado: células íntegras, fragmentos de células/tecidos, organelas



Centrífuga

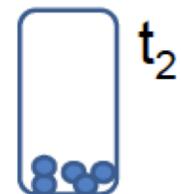
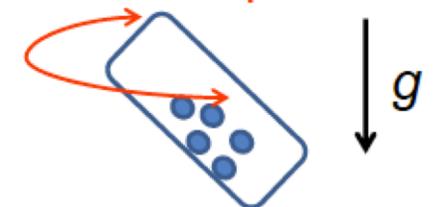
Centrifugação-usa força centrífuga para separar e purificar misturas de partículas biológicas em um meio líquido

grãos de areia

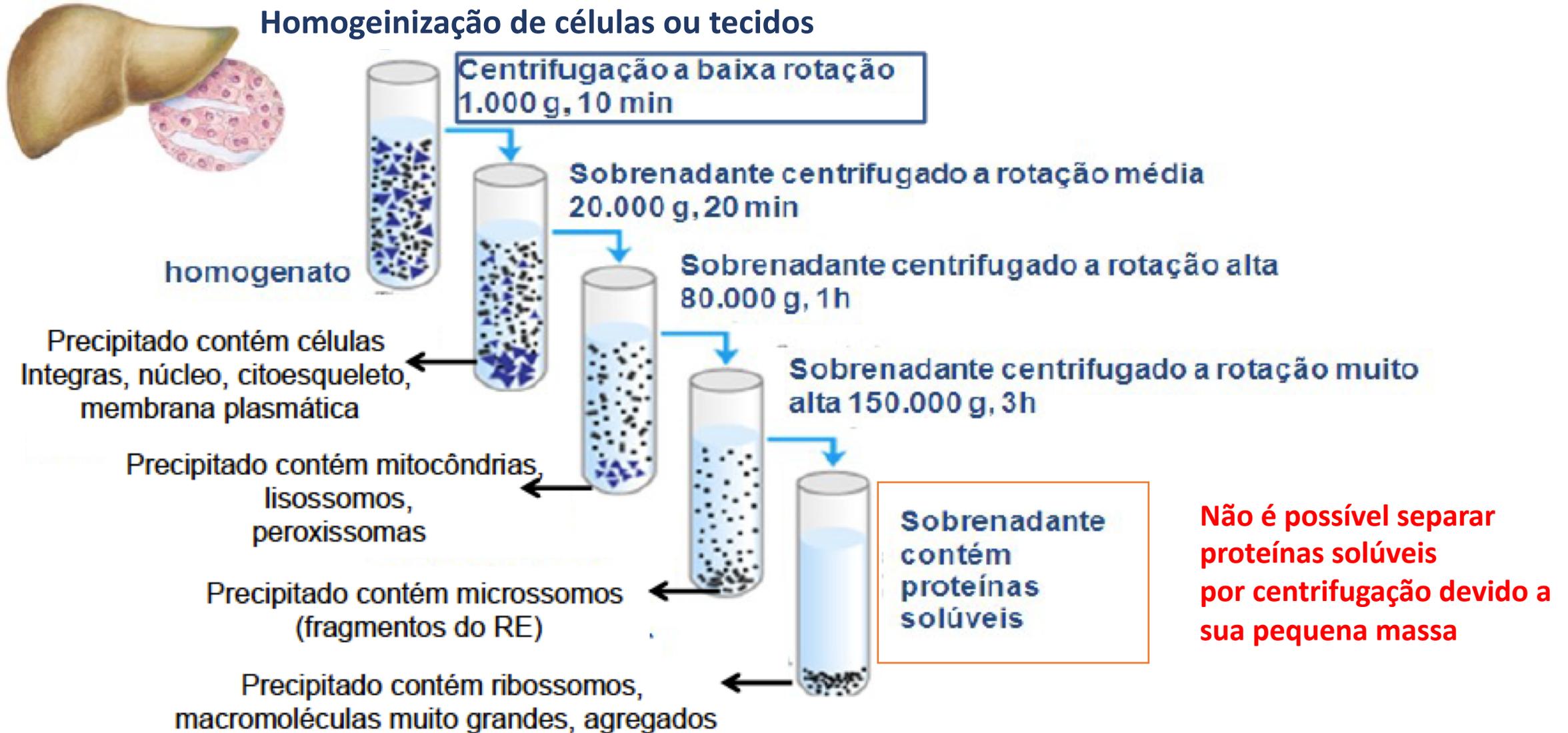


$t_2 \ll t_1$

$G =$ campo centrífugo



Fracionamento de componentes celulares por centrifugação diferencial



Como expressar a massa de uma proteína?

- O peso molecular de proteínas e outras macromoléculas é expresso em Daltons (Da).
- 1 Da corresponde a 1/12 da massa de um átomo de carbono.
- 1.000 Da = 1 kDa
- 1.000.000 Da = 1000 kDa = 1 MDa
- Quanto maior for o número de resíduos de aminoácidos que compõe a proteína, maior será o seu peso molecular

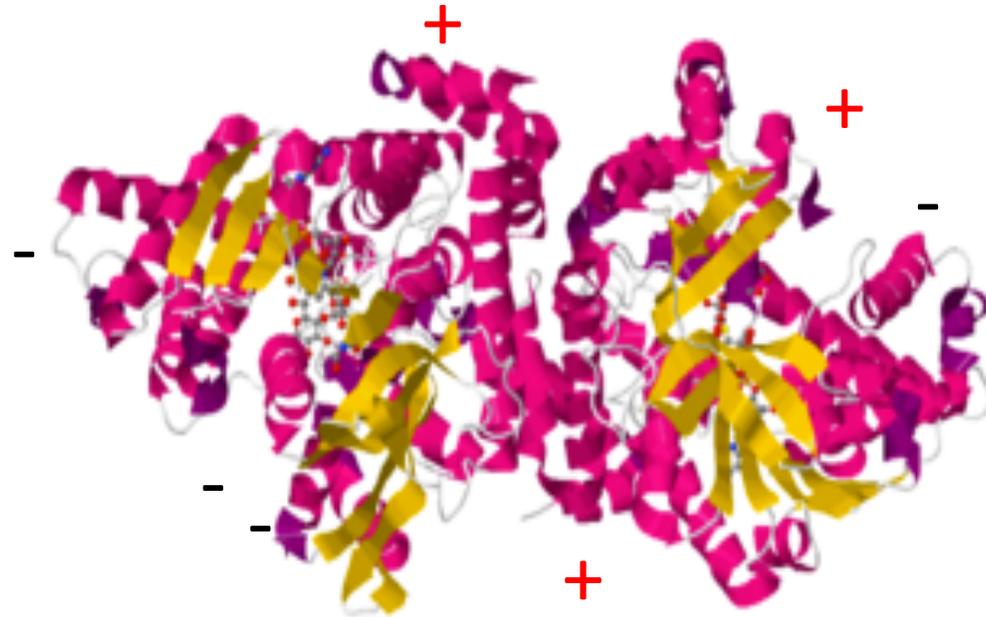
TABLE 3-2 Molecular Data on Some Proteins

	<i>Molecular weight</i>	<i>Number of residues</i>	<i>Number of polypeptide chains</i>
Cytochrome c (human)	13,000	104	1
Ribonuclease A (bovine pancreas)	13,700	124	1
Lysozyme (chicken egg white)	13,930	129	1
Myoglobin (equine heart)	16,890	153	1
Chymotrypsin (bovine pancreas)	21,600	241	3
Chymotrypsinogen (bovine)	22,000	245	1
Hemoglobin (human)	64,500	574	4
Serum albumin (human)	68,500	609	1
Hexokinase (yeast)	102,000	972	2
RNA polymerase (<i>E. coli</i>)	450,000	4,158	5
Apolipoprotein B (human)	513,000	4,536	1
Glutamine synthetase (<i>E. coli</i>)	619,000	5,628	12
Titin (human)	2,993,000	26,926	1

Métodos para separação de proteínas

Utilizam-se propriedades físico-químicas e biológicas das proteínas determinadas por sua estrutura primária, secundária, terciária e/ou quaternária.

- Tamanho
- Carga (em um dado pH)
- Hidrofobicidade
- Afinidade por ligantes
- Localização celular



Diálise: separação de proteínas de compostos com baixo peso molecular

Utilizada para remover sais, agentes redutores e reagentes usados durante etapas da purificação

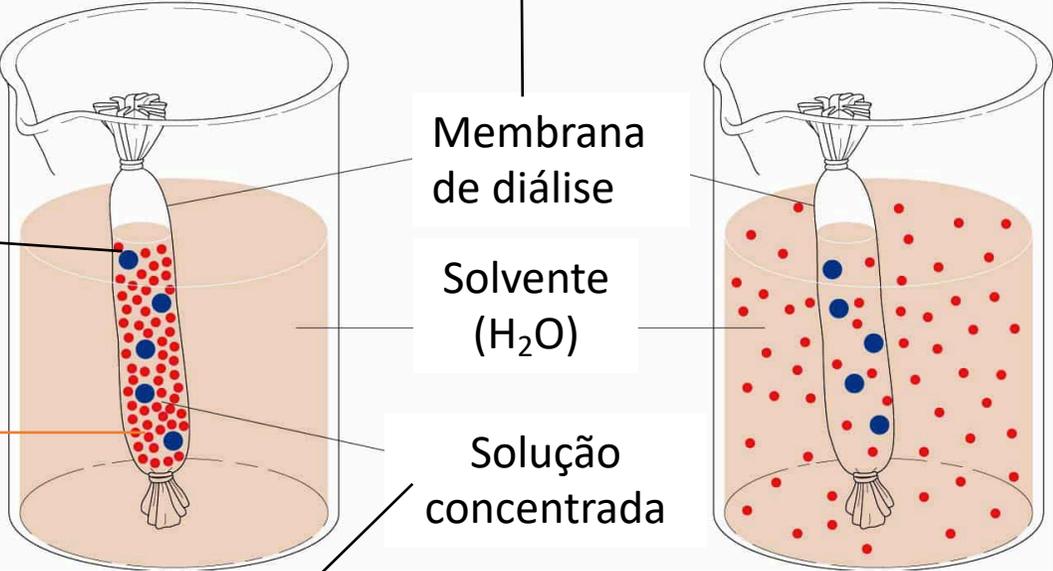
Contêm poros com 10 a 100 Angstrons (1 a 10 nm)

Início da diálise

No equilíbrio

Proteínas

Moléculas de baixo PM do tampão que se deseja remover



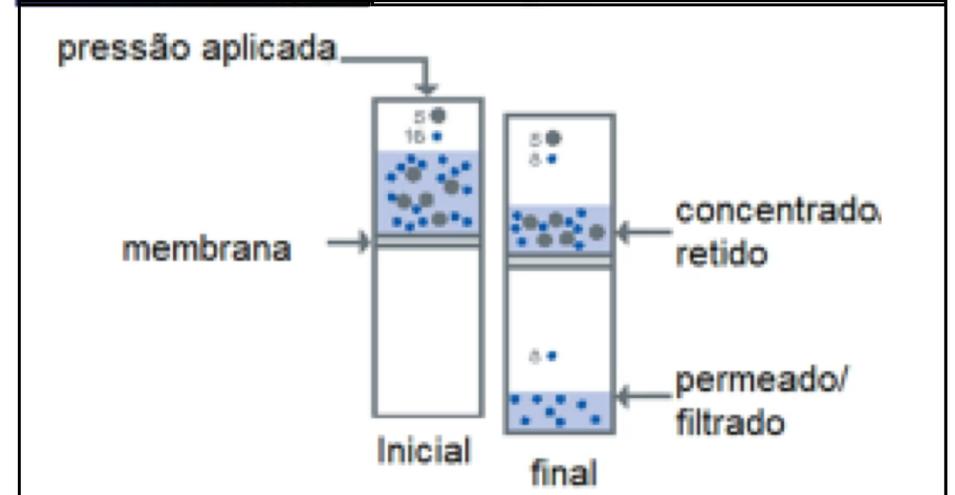
Tampão fosfato 50 mM + $(\text{HN}_4)_2 \text{SO}_4$ 1000 mM em 1 ml de volume

2000 ml de H_2O (diluição de 2000 x)

Tampão fosfato 0,025 mM + $(\text{HN}_4)_2 \text{SO}_4$ 0,5 mM em 1 ml de volume

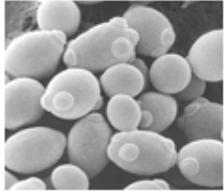
Outras maneiras de separar proteínas de solutos com baixo peso molecular

- Filtro com membranas contendo poros com diferentes tamanhos: corte de 5.000/10.000/20.000 Da
- Usados para trocar o tampão da amostra ou concentrar proteínas.
- Uso de pressão (seringa) ou centrifugação para forçar a passagem do líquido através do filtro.
- cromatografia de filtração em gel /exclusão molecular. Separa também proteínas com diferentes tamanhos (* próximas aulas)



O que será feito na parte experimental: extração, purificação, quantificação e caracterização da alfa-glicosidase (maltase) de levedura.

Cultura de
leveduras
S. cerevisiae

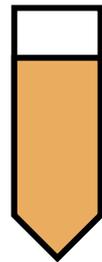


lise

Agitação por vortex com
pérolas de vidro



Lisado
bruto



centrifugação

Lisado
clarificado



Remover alíquota da amostra
Quantificar proteína e atividade enzimática

Purificar a proteína de interesse:

- Precipitação com Sulfato de amônio
- Cromatografia troca iônica
- SDS-PAGE

Obter fração enriquecida e caracterizar a atividade enzimática (pH ótimo, inibição)