

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Fonte: Wilson & Walker. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, 7ed. Page 316-

Etapas preliminares de purificação

O extrato inicial produzido pelo rompimento de células e tecidos, normalmente chamado de **homogenato** ou **lisado**, contém partículas ou fragmentos insolúveis. Por exemplo, para tecidos biológicos em geral o homogenato inicial contém tecido conectivo e pequenos fragmentos de tecidos não homogeneizados/rompidos. Em geral estes fragmentos são removidos por filtração ou centrifugação em baixa velocidade.

Assume-se que o extrato celular contém somente proteínas, mas é claro que várias outras biomoléculas estão presentes, como, por exemplo, DNA, RNA, carboidratos, lipídeos, além de vários outros metabólitos de tamanho pequeno.

Pequenas moléculas em geral são removidas por diálise ou cromatografia baseada em tamanho (exemplo, cromatografia de exclusão por tamanho, também conhecido como filtração em gel) e, portanto são fáceis de separar. No entanto, atenção especial deve ser dada à separação de macromoléculas, como os ácidos nucleicos e polissacarídeos. Em geral extratos de bactérias contêm muito DNA cromossomal, que aumenta bastante a viscosidade do meio. Em geral as etapas de purificação de proteínas em bactérias inclui a adição de DNase I no tampão de extração para reduzir a viscosidade. Neste caso, os pequenos fragmentos de DNA são separados posteriormente por diálise ou filtração em gel. De forma similar RNA é removido adicionando-se RNase. DNA e RNA também podem ser removidos por precipitação com sulfato de protamina. A protamina sulfato é uma mistura de proteínas pequenas carregadas positivamente que se ligam ao fosfato carregado negativamente dos ácidos nucleicos. A neutralização de cargas do ácido nucleico pela protamina sulfato induz a precipitação dos ácidos nucleicos, que podem então ser removidos por centrifugação.

Após essas primeiras etapas de pré-purificação, a amostra (homogenato ou lisado) está pronta para as próximas etapas de purificação. Em geral a concentração de proteínas no extrato inicial é baixa, principalmente por conta da grande quantidade de água utilizada no preparo do homogenato.

A primeira etapa de purificação (etapa preliminar) é frequentemente baseada em **métodos de solubilidade** (exemplo, precipitação de proteínas). Estes métodos podem ser aplicados em volumes grandes de amostras e possuem a vantagem de concentrar as proteínas. Essencialmente, proteínas que diferem consideravelmente em suas características físicas da proteína de interesse são removidas nesta etapa, deixando a amostra mais concentrada em proteínas com características similares.

As etapas posteriores de purificação envolvem técnicas de separação de maior resolução (melhor separação) capazes de separar as proteínas com características similares presentes na mistura. Em geral, essas técnicas mais refinadas são baseadas em **cromatografias**. Que técnica usar e em que ordem usar, é muitas vezes definida por tentativas e erros. O procedimento final (aquele publicado em artigos científicos), normalmente, é resultado de um trabalho árduo conduzido por meses no laboratório de pesquisa!

É claro que a compreensão das características da proteína de interesse e das técnicas cromatográficas existentes é essencial para o estabelecimento de um protocolo adequado de purificação. As técnicas de separação baseiam-se na exploração das propriedades que consigam diferenciar uma proteína da outra.

As diferentes propriedades das proteínas e as técnicas que exploram essas diferenças são descritas a seguir.

Estabilidade

Fracionamento por desnaturação de proteínas explora diferenças na estabilidade térmica das proteínas. A estrutura tridimensional de proteínas (estrutura terciária) é mantida por forças de interação hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e algumas vezes por pontes de dissulfeto. Quando dizemos que a proteína é desnaturada, significa que essas forças foram rompidas e que a proteína sofreu desenovelamento/desdobramento resultando em uma proteína desnaturada e insolúvel. A forma mais

simples de desnaturar uma proteína é através do aquecimento. Proteínas diferentes sofrem desnaturação em temperaturas diferentes. Se a proteína de interesse for particularmente estável a temperaturas elevadas, então o aquecimento pode ser útil na separação de outras proteínas menos estáveis. As proteínas precipitadas podem ser removidas por centrifugação. Outra forma de desnaturar proteínas é através da aplicação de extremos de pH (<3 ou >10). Se a proteína de interesse for estável nesses extremos de pH, então pode-se aplicar a desnaturação por pH como etapa preliminar para purificação.

Solubilidade

Proteínas diferem no balanço de cargas presentes em sua superfície. Resíduos de aminoácidos contendo grupos polares e carregados encontram-se solvatados por moléculas de água, o que os torna solúveis em meio aquoso. Por outro lado, resíduos hidrofóbicos encontram-se “escondidos” no interior da proteína.

Considerando que a solubilidade da proteína em meio aquoso é dependente da solvatação, a adição de sais ou solventes que alterem essa solvatação resultam na agregação e precipitação da proteína.

O fracionamento por adição de sal é normalmente realizado com **sulfato de amônio**. A adição de concentrações crescentes do sal faz com que os íons do sal sejam solvatados pelas moléculas de água na solução. À medida que se aumenta a concentração do sal, a quantidade de moléculas de água livre vai diminuindo. As moléculas de água que estavam solvatando a proteína são removidas. Primeiramente, são removidas moléculas de água que estavam sendo forçadas a interagir com regiões hidrofóbicas da proteína. As moléculas de água que estão solvatando grupos polares são removidos posteriormente, pois estas interagem por forças eletrostáticas e estão mais fortemente ligadas à proteína. Assim, a remoção da água de solvatação resulta em maior exposição de regiões hidrofóbicas, resultando assim na precipitação da proteína.

Em geral o fracionamento de proteínas por sulfato de amônio é realizado acrescentando-se porcentagens crescentes deste sal (10 %, 20 %, 30 %, e assim por diante). O precipitado obtido em cada etapa é separado por centrifugação e posteriormente analisado para verificar em que fração encontra-se a proteína de interesse. Importante: a técnica de precipitação é utilizada para precipitar a proteína de interesse e as proteínas que não são de interesse são descartadas juntamente com o sobrenadante.

Outra forma de induzir a precipitação de proteínas é através do pH. Esta técnica é baseada no fato de que a solubilidade da proteína é mínima no seu ponto isoelétrico (pI). Neste pH, o número de cargas positivas e negativas na proteína é igual e portanto sua carga líquida é nula. Nesta situação, as repulsões entre moléculas de proteínas são minimizadas e as proteínas se aproximam uma das outras, formando agregados proteicos que acabam precipitando.

Finalizado estas etapas iniciais de fracionamento, o próximo passo é prosseguir a purificação da proteína utilizando técnicas mais refinadas que resultam em uma melhor separação da proteína de interesse. O grau de separação em técnicas cromatográficas é expresso pelo termo resolução. Uma técnica cromatográfica de alta resolução é em outras palavras, uma técnica que permite melhor separação entre os componentes de uma mistura.

Monitoramento da purificação de proteínas

O sucesso das etapas de purificação de uma enzima é medido através da verificação de aumento de Atividade Específica da amostra. A atividade específica relaciona a atividade enzimática total com a concentração de proteína presente na amostra.

$$\text{Atividade Específica (U/mg)} = \frac{\text{Total de unidades (U) de enzima na fração}}{\text{Total de proteínas na fração}}$$

Lembrando que U é a unidade internacional para a atividade enzimática, e equivale a quantidade de enzima que converte 1 micromols substrato em produto em 1 minuto (1 U= 1 µmol/min).

Para que a etapa de purificação obtenha sucesso, a **Atividade Específica** da proteína deve ser maior do que era antes da purificação. Este aumento é mais bem representado pelo cálculo do **enriquecimento** (aumento em número de vezes, exemplo, 1x, 5x).

$$\text{Enriquecimento} = \frac{\text{Atividade Específica da fração}}{\text{Atividade Específica original}}$$

Claramente, é necessário que ocorra um aumento significativo na atividade específica para que a purificação tenha sucesso.

No entanto, outro fator importante a ser considerado é a **Recuperação** de cada etapa. Não adianta nada se o aumento na atividade específica for acompanhado de uma perda de 95 % da proteína que se quer purificar. A recuperação representa a porcentagem de enzima recuperada e é calculada da seguinte forma:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Unidades de enzima na fração} \times 100}{\text{Unidades de enzima na amostra original}}$$

Uma recuperação de 70% ou mais em qualquer etapa de purificação é normalmente considerada aceitável.

A Tabela a seguir mostra um exemplo de recuperação e enriquecimento para diferentes etapas de purificação de uma proteína arbitrária.

Procedimentos ou etapas	volume (ml)	proteína (mg)	atividade (U)	atividade específica (U/mg)
1. Lisado bruto	1400	10.000	100.000	10
2. Ppção c/ (NH ₄) ₂ SO ₄	280	3.000	96.000	32
3. Cromatografia de troca iônica	90	400	80.000	200
4. Cromatografia de filtração em gel	50	100	60.000	1200

3,2 X (entre 10 e 32)
60% (entre 100.000 e 60.000)
120 X (entre 10 e 1200)

Augusto_13

Cromatografias.

O processo de purificação de proteínas invariavelmente envolve a aplicação de uma ou mais técnicas de **cromatografia em coluna**. Nesse caso, cada cromatografia gera um número grande de tubos de ensaio (tubo 1, 2, 3, 4, 5, ...) (**frações**) contendo tampão e as proteínas eluídas da coluna.

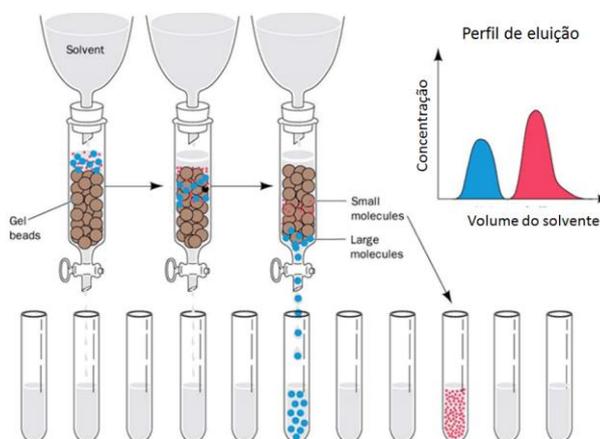


Fig. 1 Separação cromatográfica de 2 proteínas

Para saber o **perfil de eluição de proteínas** (gráfico de concentração de proteína vs número do tubo) na cromatografia pode-se medir a concentração de proteína em cada um dos tubos. Existem vários métodos apropriados para a detecção e quantificação de proteínas em solução (Exemplo: método de Bradford; método de medida direta de absorção na região do ultravioleta; Método de Lowry; etc.).

Porém, além da medida de concentração de proteínas, é necessário um método mais preciso para determinar quais tubos contem a **proteína de interesse** e assim reuni-los em um único frasco para proceder para a etapa seguinte da purificação. Se o objetivo do experimento for a **purificação de uma enzima**, isso é relativamente fácil pois basta simplesmente realizar a medida de **atividade enzimática** presente em cada tubo.

Para proteínas para as quais não se possa realizar medidas de atividade biológica, outras abordagens devem ser usadas. Por exemplo, se houver um anticorpo contra a proteína de interesse, então as amostras podem ser aplicadas em uma membrana de nitrocelulose e as frações podem ser analisadas pelo método de Dot Blot (Seção 5.9.2). Alternativamente, é possível analisar as frações por métodos de imunoensaio como ELISA ou radioimunoensaio (Seção 7.3.1).

Se não houver um anticorpo, as proteínas podem ser analisadas por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio - poliacrilamida (**SDS-PAGE**, do inglês, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel), e as frações contendo a proteína podem ser identificadas pela visualização da banda da proteína de interesse (Seção 10.3.1).

Todos os métodos para a purificação de proteínas por cromatografia exploram basicamente as seguintes propriedades:

- **Carga:** as proteínas diferem uma das outras em relação à proporção de aminoácidos carregados (Asp, Glu, Lys, Arg, His). Assim, a carga líquida da proteína irá depender do pH. As diferenças na carga líquida das proteínas são utilizadas para separar proteínas na cromatografia de troca-iônica. Nesta cromatografia a proteína de interesse se liga na coluna cromatográfica contendo uma resina com carga oposta. Proteínas com carga semelhante também irá grudar na coluna. As proteínas que ficaram retidas na coluna são gradualmente eluídas da coluna utilizando um solução contendo concentrações crescentes de uma solução salina ou passando-se um tampão com gradiente de pH. Os íons da solução salina competem com a proteína pela ligação à resina. Proteínas ligadas fracamente são eluídas primeiro. À medida que a concentração do sal aumenta, desligam-se as proteínas carregadas mais fortemente.
- **Tamanho:** diferenças no tamanho das proteínas é explorado na cromatografia de exclusão molecular, também conhecido como filtração em gel. Nesta cromatografia, a coluna é empacotada com uma resina com graus diferentes de ligações cruzadas. Essas ligações cruzadas fazem com que a resina tenham poros de tamanho diferentes. A separação depende da habilidade das proteínas de passarem através destes poros, que por sua vez, depende do tamanho da proteína. O método possui uma resolução limitada (não separa moléculas com tamanhos muito próximos), mas pode ser utilizada para realizar uma separação entre proteínas que tenham tamanhos particularmente distintos. Essa técnica cromatográfica também é utilizada para determinar a massa molecular relativa de proteínas. A Tabela 8.5 apresenta
- **Afinidade:** certas proteínas ligam-se fortemente a moléculas específicas (ligante). Essa característica é aproveitada na cromatografia de afinidade. Nesta cromatografia o ligante é preso a um suporte insolúvel (matriz). Quando uma mistura de proteínas é passada através de uma coluna contendo o ligante a proteína de interesse liga-se a essa matriz e todas as outras proteínas passam através da coluna. A proteína de interesse é removida passando-se uma solução de pH diferente, contendo concentrações crescentes de solução salina ou passando uma alta concentração do ligante livre. Por exemplo, a proteína, concavalina A ligas-se fortemente à glicose. A purificação da concavalina A é feita através de uma coluna contendo glicose como ligante. Posteriormente, a proteína é removida da coluna passando-se uma solução concentrada de glicose.

- **Hidrofobicidade:** proteínas diferem no conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos que estão presentes na superfície da proteína. Esta diferença pode ser aproveitada na cromatografia de interação hidrofóbica.

Table 8.4 **Summary of chromatographic techniques commonly used in protein purification**

Technique	Property exploited	Capacity	Resolution	Practical points	Further details
Hydrophobic interactions	Hydrophobicity	High	Medium	Can cope with high ionic strength samples, e.g. ammonium sulphate precipitates. Fractions are of varying pH and/or ionic strength. Medium yield. Commonly used in early stages of purification protocol. Unpredictable	Section 11.4.3
Ion exchange	Charge	High	Medium	Sample ionic strength must be low. Fractions are of varying pH and/or ionic strength. Medium yield. Commonly used in early stages of purification protocol	Section 11.6
Affinity	Biological function	Medium (cost limited)	High	Limited by availability of immobilized ligand. Elution may denature protein. Yield medium-low. Commonly used towards end of purification protocol	Section 11.8
Dye affinity	Structure and hydrophobicity		High	Necessary to carry out initial screening of a wide range of dye-ligand supports	Section 11.8.5
Covalent	Thiol groups	Medium-low	High	Specific for thiol-containing proteins. Limited by high cost and long (3h) regeneration time	Section 11.8.6
Metal chelate	Imidazole, thiol, tryptophan groups	Medium-low	High	Expensive	Section 11.8.4
Exclusion	Molecular size	Medium	Low	Can give information about protein molecular weight. Good for desalting protein samples	Section 11.7

Propriedades de géis para cromatografia de exclusão

Name	Fractionation Range for Proteins (daltons)	Water Retain (mL/g dry gel)	Bed Volume (mL/g dry gel)
Dextran (Sephadex)¹			
G-10	0-700	1.0 ± 0.1	2-3
G-15	0-1500	1.5 ± 0.2	2.5-3.5
G-25	1000-5000	2.5 ± 0.2	4-6
G-50	1500-30,000	5.0 ± 0.3	9-11
G-75	3000-80,000	7.5 ± 0.5	12-15
G-100	4000-150,000	10 ± 1.0	15-20
G-150	5000-300,000	15 ± 1.5	20-30
G-200	5000-600,000	20 ± 2.0	30-40
Polyacrylamide (Bio-Gels)²			
P-2	100-1800	1.5	3.0
P-4	800-4000	2.4	4.8
P-6	1000-6000	3.7	7.4
P-10	1500-20,000	4.5	9.0
P-30	2500-40,000	5.7	11.4
P-60	3000-60,000	7.2	14.4
P-100	5000-100,000	7.5	15.0
P-150	15,000-150,000	9.2	18.4
P-200	30,000-200,000	14.7	29.4
P-300	60,000-400,000	18.0	36.0
Dextran-polyacrylamide (Sephacryl)³			
S-100 HR	1000-100,000	—	—
S-200 HR	5000-250,000	—	—
S-300 HR	10,000-1,500,000	—	—
S-400 HR	20,000-8,000,000	—	—
Agarose			
Sepharose ⁴ 6B	10,000-4,000,000	—	—
Sepharose 4B	60,000-20,000,000	—	—
Sepharose 2B	70,000-40,000,000	—	—
Superose ⁵ 12 HR	1000-300,000	—	—
Superose 6 HR	5000-5,000,000	—	—
Bio-Gel ⁶ A-0.5	10,000-500,000	—	—
Bio-Gel A-1.5	10,000-1,500,000	—	—
Bio-Gel A-5	10,000-5,000,000	—	—
Bio-Gel A-15	40,000-15,000,000	—	—
Bio-Gel A-50	100,000-50,000,000	—	—
Bio-Gel A-150	1,000,000-150,000,000	—	—
Vinyl (Fractogel TSK)⁷			
HW-40	100-10,000	—	—
HW-55	1000-700,000	—	—
HW-65	50,000-5,000,000	—	—
HW-75	500,000-50,000,000	—	—