

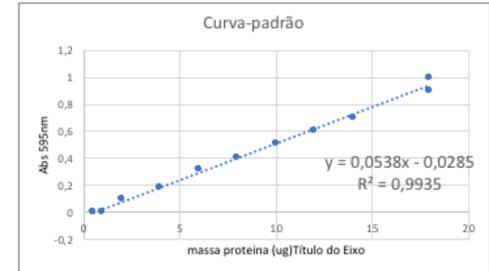
QBQ0316 - Bioquímica Experimental (2020)

## Métodos para purificação de proteínas

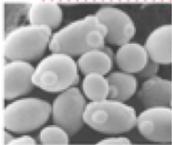
Precipitação sulfato de amônio  
cromatografias  
recuperação/enriquecimento

## Aula 2

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

## Aula 3

**Métodos de  
purificação**

**Monitoramento  
da eficiência da  
purificação**

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)

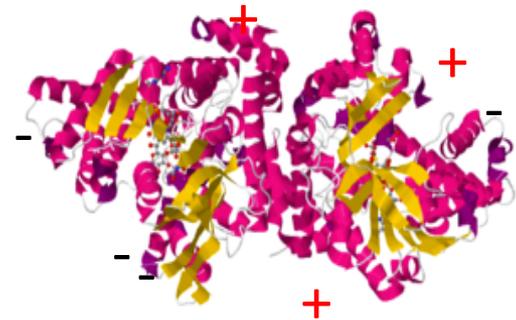
# Métodos para purificação de proteínas

Dois tipos principais:

- Baseados na **precipitação diferencial** de proteínas na presença de altas concentrações de sais iônicos (Sulfato de Amônio)
- Separação de proteínas por **métodos cromatográficos**

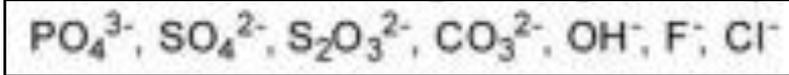
Cada método utiliza propriedades físico-químicas e biológicas únicas das proteínas, determinadas por sua estrutura primária, secundária, terciária e/ou quaternária.

**Alfa-glicosidade**



- Tamanho
- Carga em um dado pH
- Hidrofobicidade
- interações moleculares específicas (ex. afinidade por ligantes ou substratos de enzimas)

# Precipitação de proteínas com sais iônicos

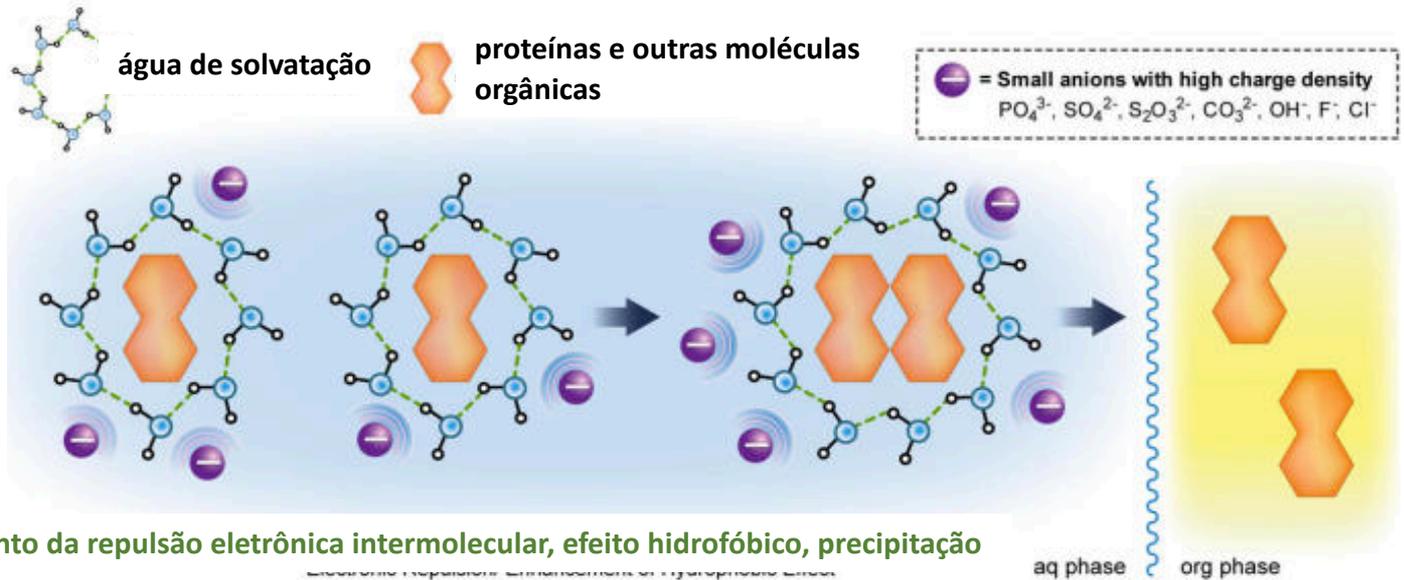


## Salting out

### “salting out”:

altas concentrações de sais com carga removem a água de solvatação das proteínas.

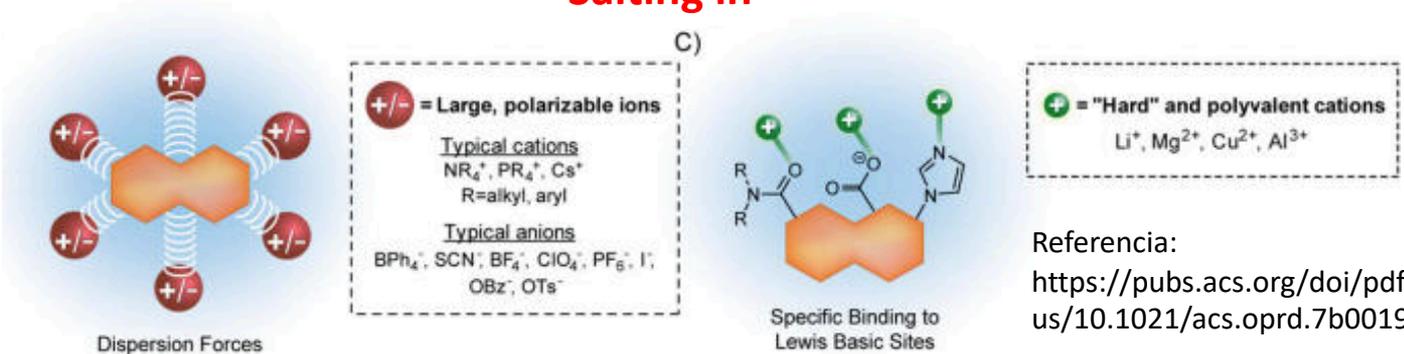
Regiões hidrofóbicas entram em contato e a proteína sai da solução aquosa e precipita



### “salting in”:

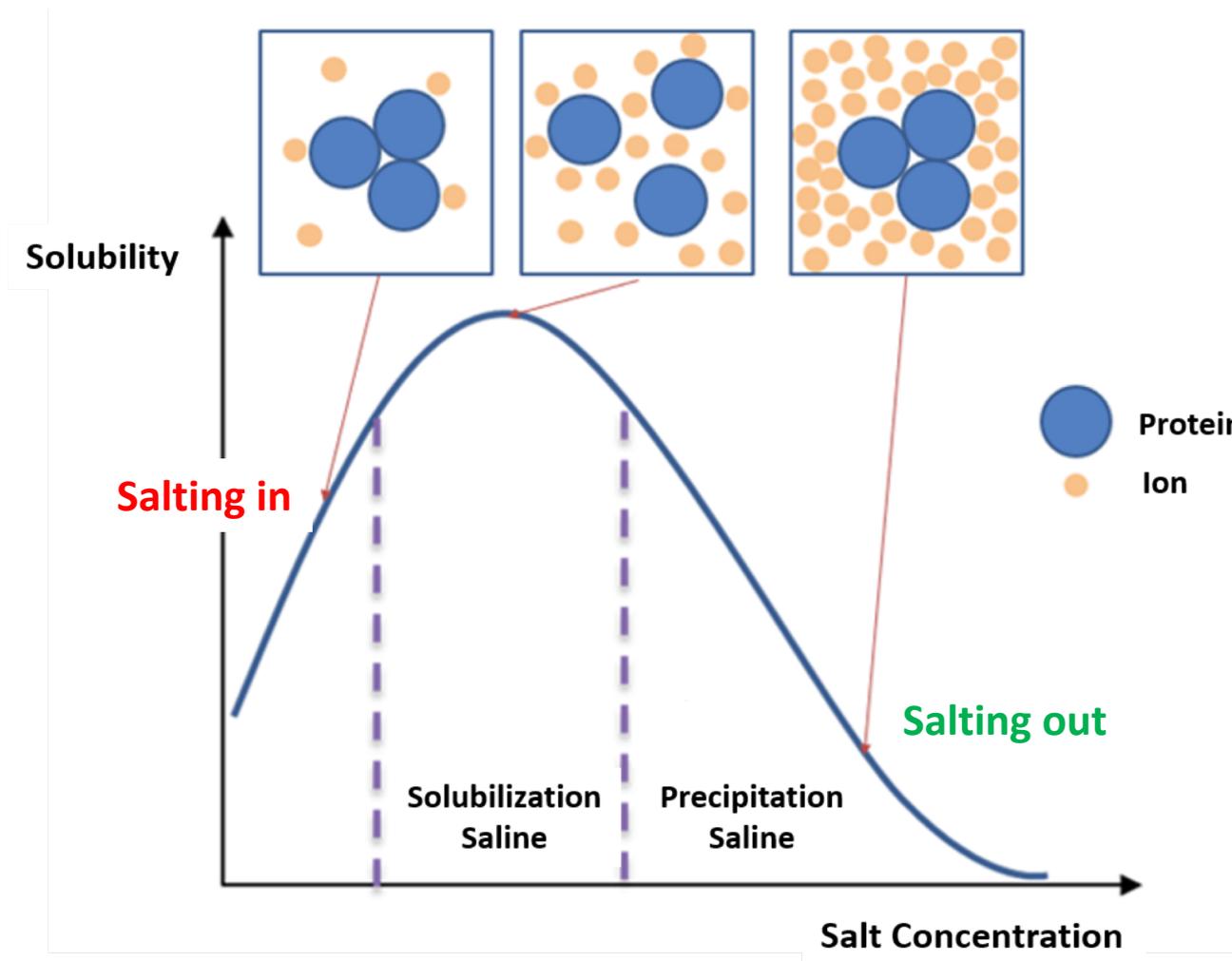
em baixas concentrações a adição de sal ao meio aquoso neutraliza cargas da proteína e aumenta a solubilidade.

## Salting in



Referencia:  
<https://pubs.acs.org/doi/pdfpl.us/10.1021/acs.oprd.7b00197>

A solubilidade das proteínas em meio aquoso aumenta até um certo ponto com o aumento da força iônica do meio

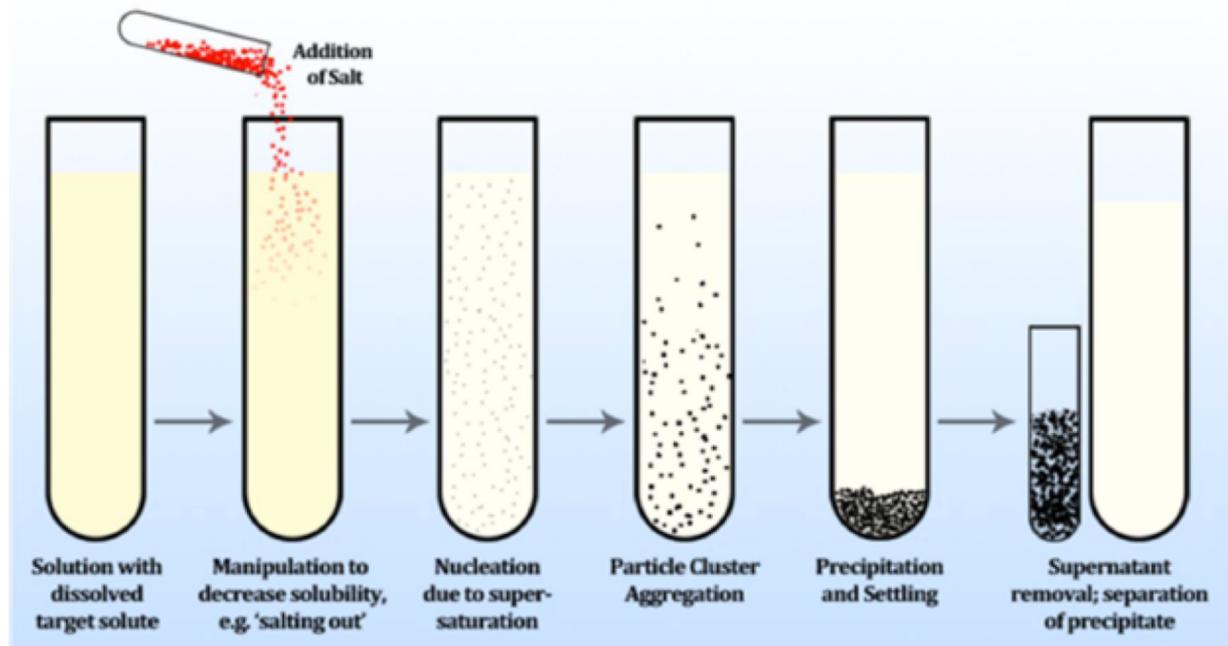


# Precipitação de proteínas com sulfato de amônio

- Baseado no efeito de “salting out”: íons carregados competem pela água de hidratação das regiões hidrofílicas das proteínas.
- Concentração que causa a precipitação depende da composição de aminoácidos das proteínas.
- Utilizada para obter frações enriquecidas nas proteínas de interesse no início do processo de purificação.
- concentrar soluções diluídas de proteínas.

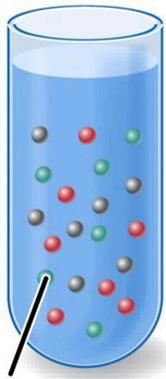
# Precipitação com sulfato de amônio

-Proteínas com maior hidrofobicidade precipitam a menores de [sal]



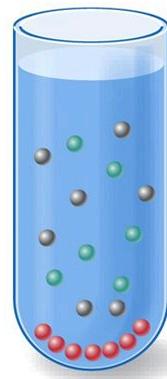
# Fracionamento de proteínas a partir de diferenças de solubilidade por “salting out”

Lisado clarificado



Target protein

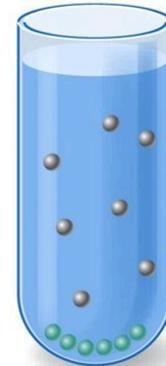
adiciona 40%  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>



Supernatant

Precipitate

adiciona 80%  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>



Supernatant

Precipitate

Etapa preparatoria em um protocolo de purificação ou para concentrar a proteína ao longo da purificação



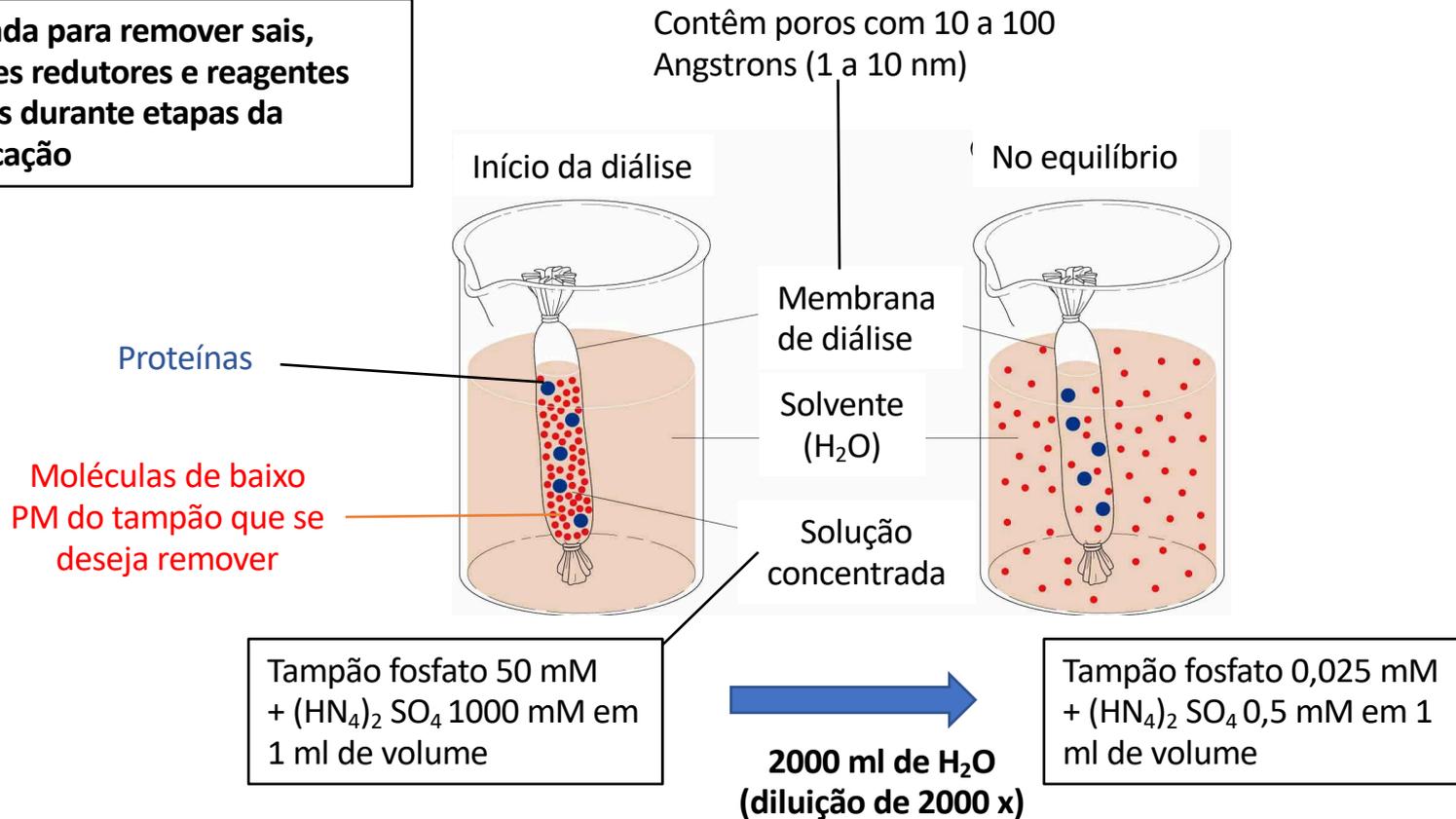
Centrífuga



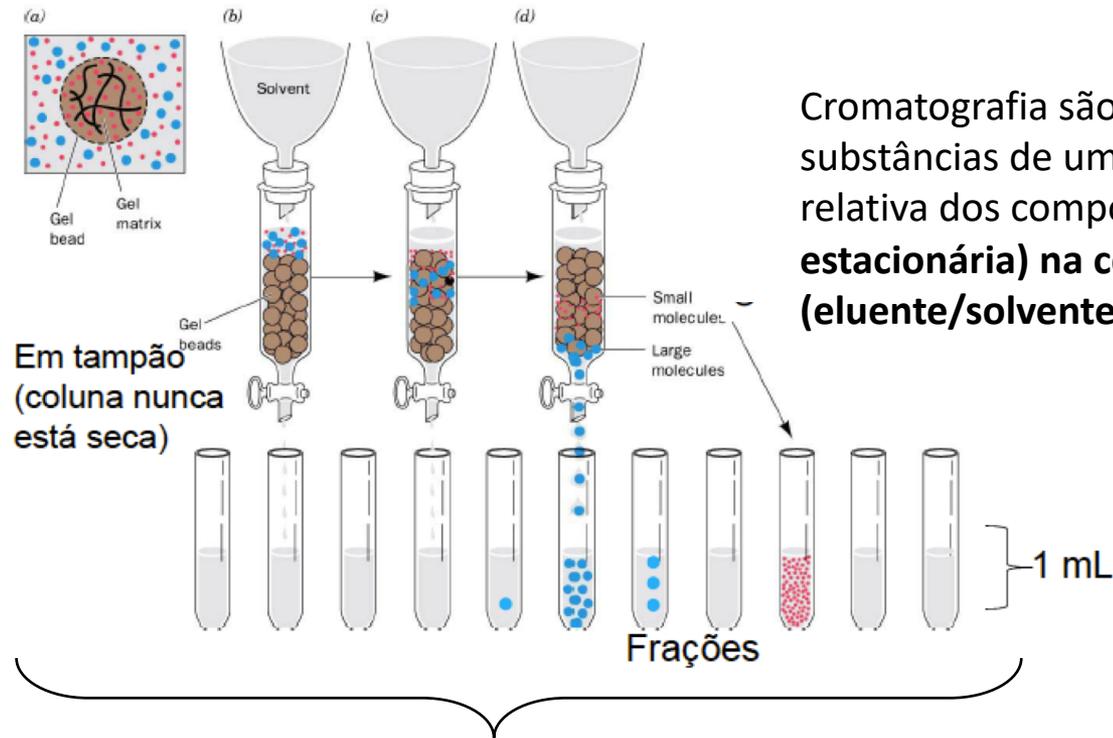
Centrífuga

A diálise é utilizada para remover o sulfato de amônio usado para precipitar a proteína de interesse antes de uma próxima etapa de purificação.

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



# Purificação de proteínas por cromatografia em coluna

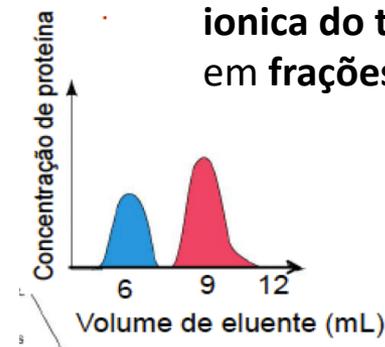


Cromatografia são técnicas de separação de substâncias de uma mistura baseada na interação relativa dos componentes com uma **fase sólida (fase estacionária) na coluna**, e uma **fase móvel (eluente/solvente) no tampão**.

Os componentes que interagem mais fortemente com a fase sólida ficam retidos, ou são eluídos mais lentamente da coluna em função do **tamanho, pH, força iônica do tampão** e coletados em **frações distintas**

## Dosagem nas frações de:

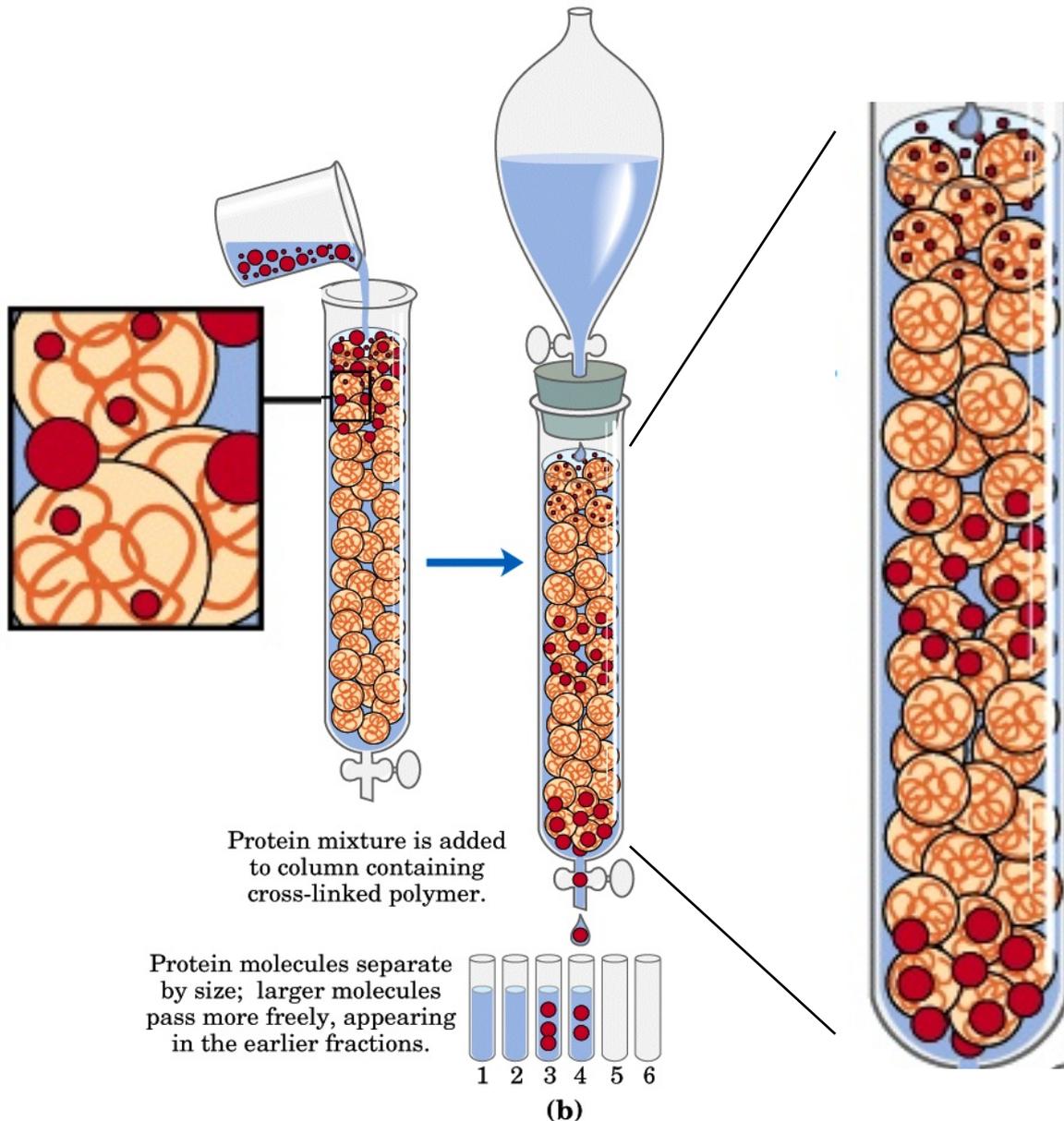
- concentração de proteínas (g/l = mg/ml = ug/ul)
- concentração de atividade enzimática (U/ml)
- atividade enzimática total no lisado (U)
- atividade específica (U/mg)



# Métodos cromatográficos utilizados para purificação de proteínas

- **cromatografia por gel filtração (ou exclusão molecular)**. diferença entre tamanho das proteínas
- **cromatografia por troca iônica**. diferenças entre carga das proteínas
- **cromatografia de hidrofobicidade**. diferenças na composição em regiões hidrofóbicas da proteínas
- **cromatografia por afinidade**: utiliza moléculas que fazem interações moleculares específicas com a proteína de interesse

# Cromatografia de gel filtração (ou exclusão molecular)

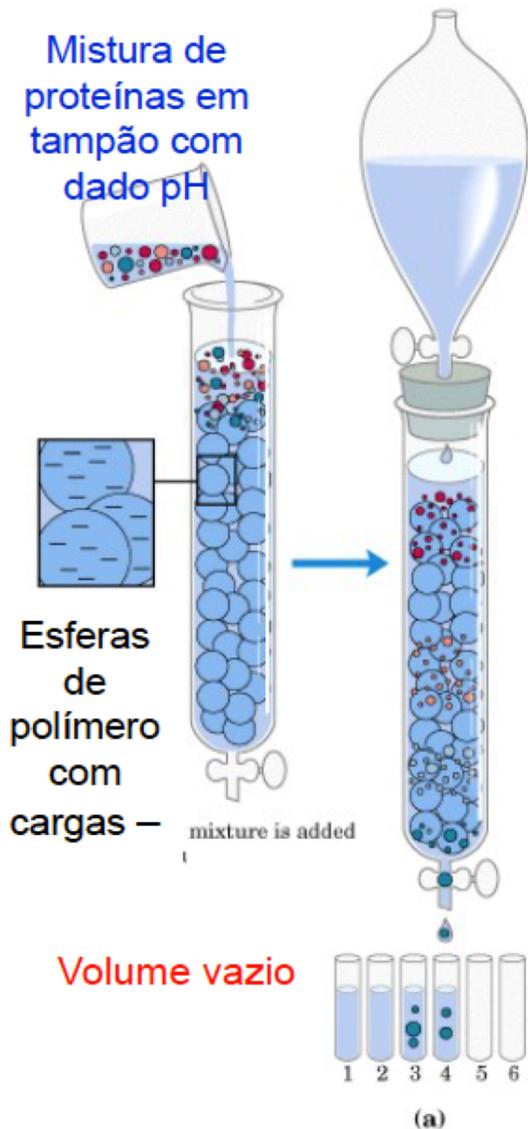


peso molecular (Da)

tempo eluição (min)

proteínas pequenas penetram nos poros da matriz da coluna.  
proteínas maiores passam entre as esferas da matriz.

# Cromatografia de troca iônica



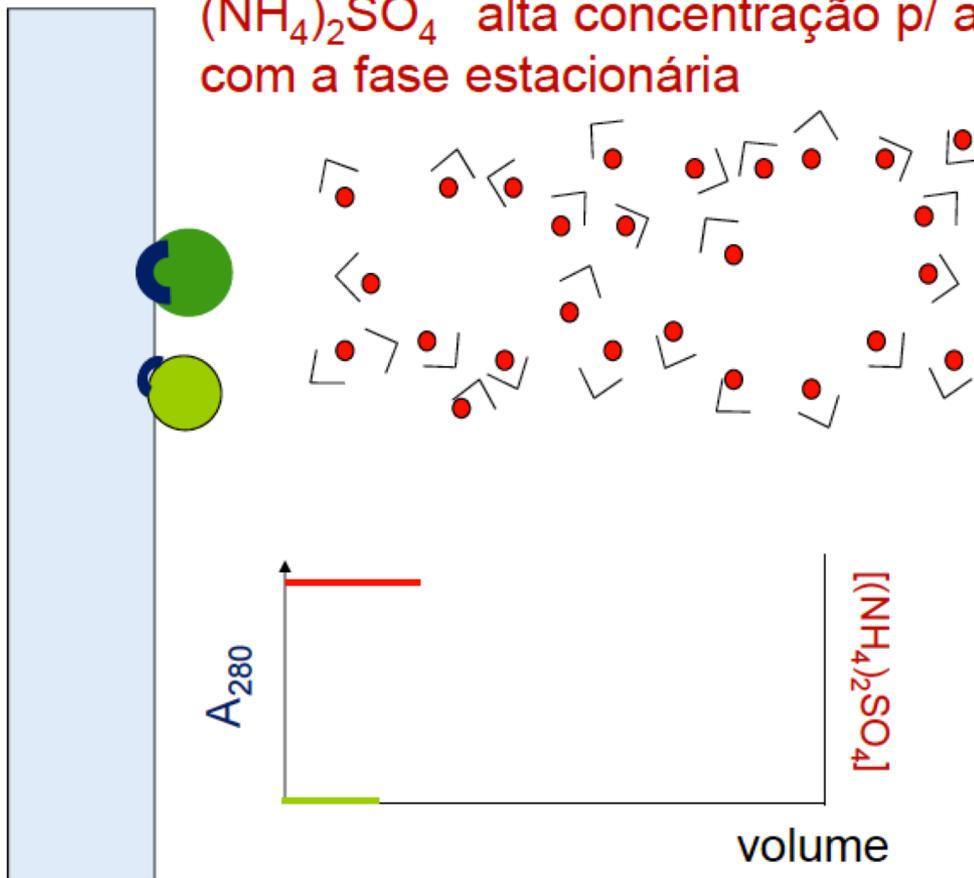
Fase estacionária: grânulos de polímeros com grupos funcionais carregados em determinado pH

Aula 5

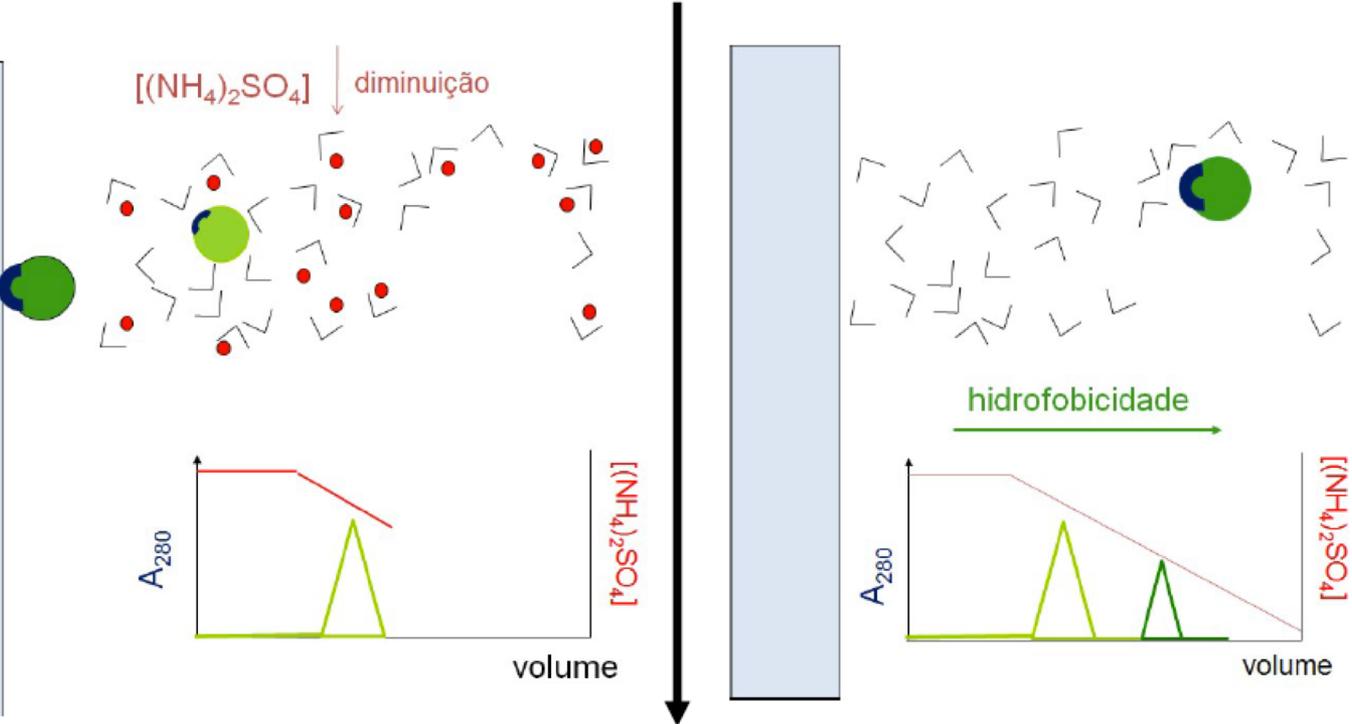
Velocidade de eluição depende da carga líquida da proteína no pH utilizado.

## CROMATOGRAFIA DE HIDROFOBICIDADE (HIC)

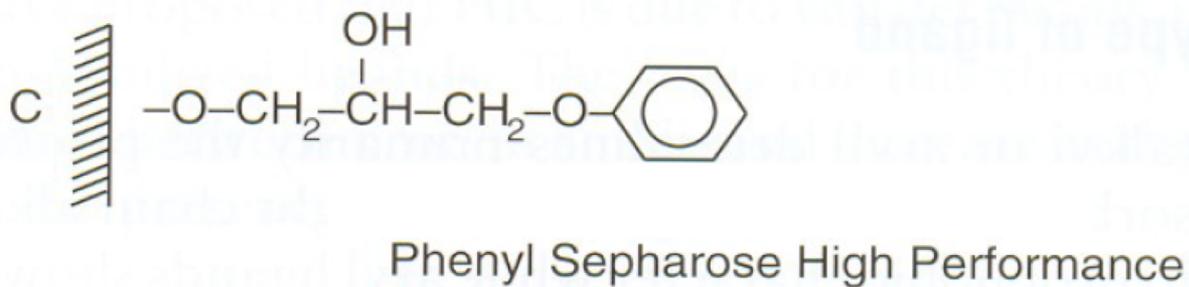
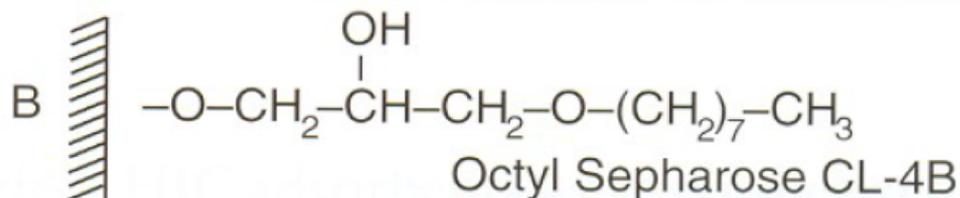
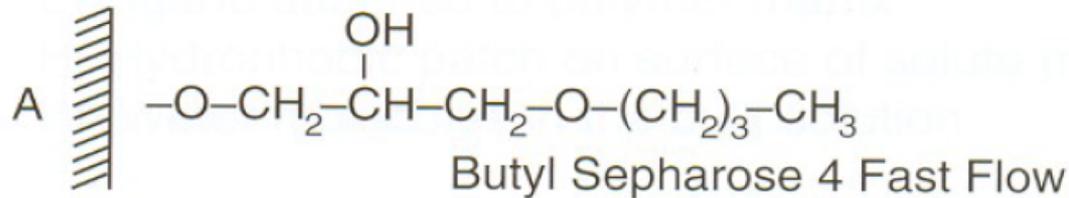
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  alta concentração p/ aumentar a interação com a fase estacionária



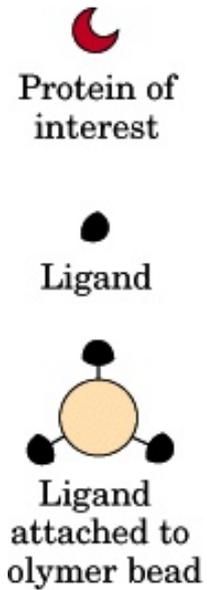
# CROMATOGRAFIA DE HIDROFOBICIDADE (HIC)



## RESINAS PARA CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA

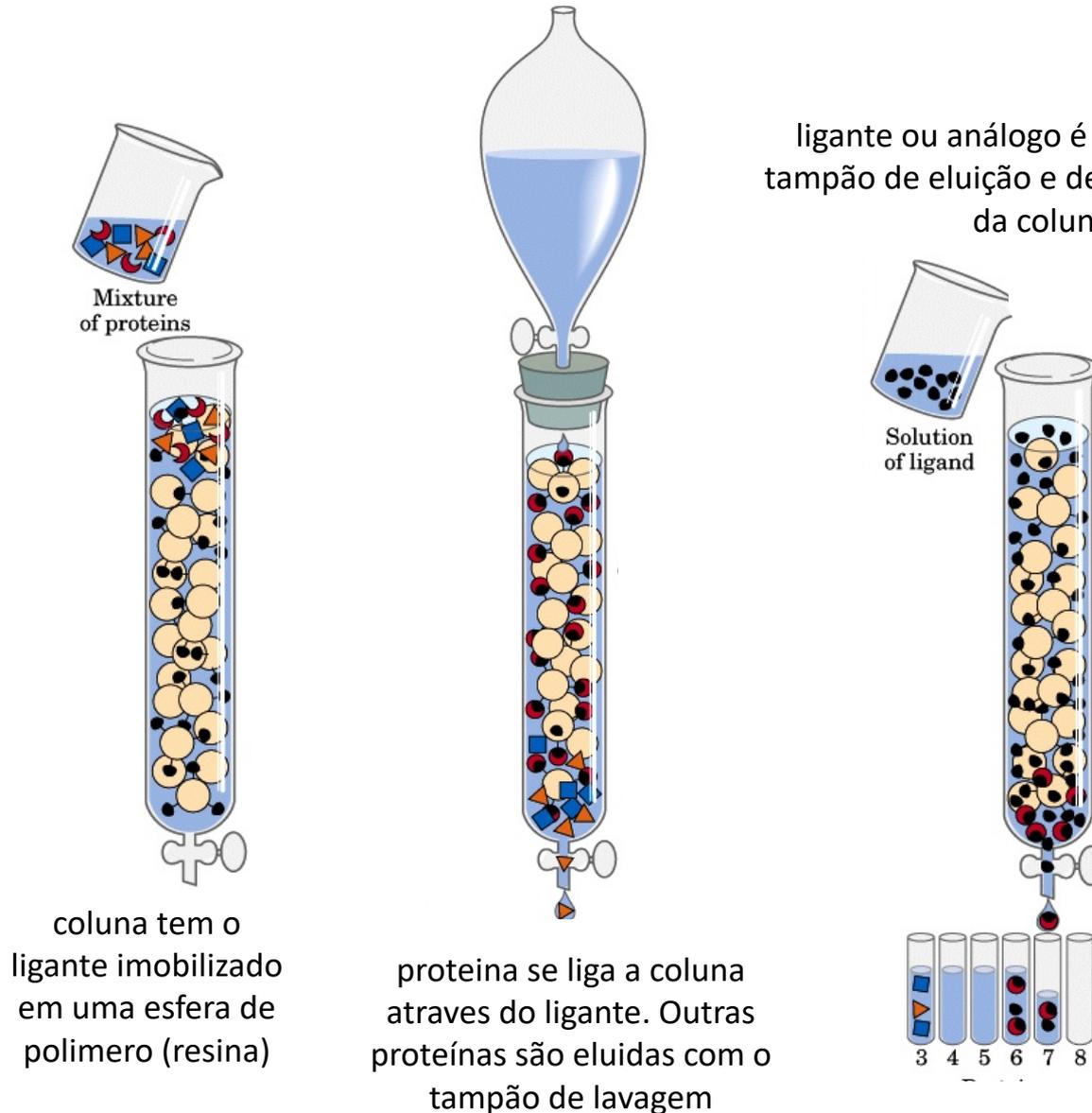


# cromatografia por afinidade



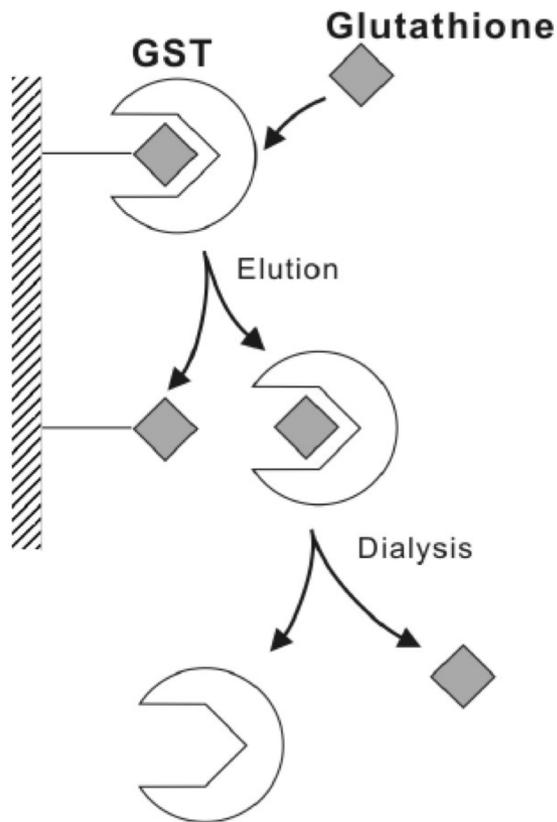
ex.de ligantes:

- anticorpo específico contra a proteína de interesse
- substrato da enzima

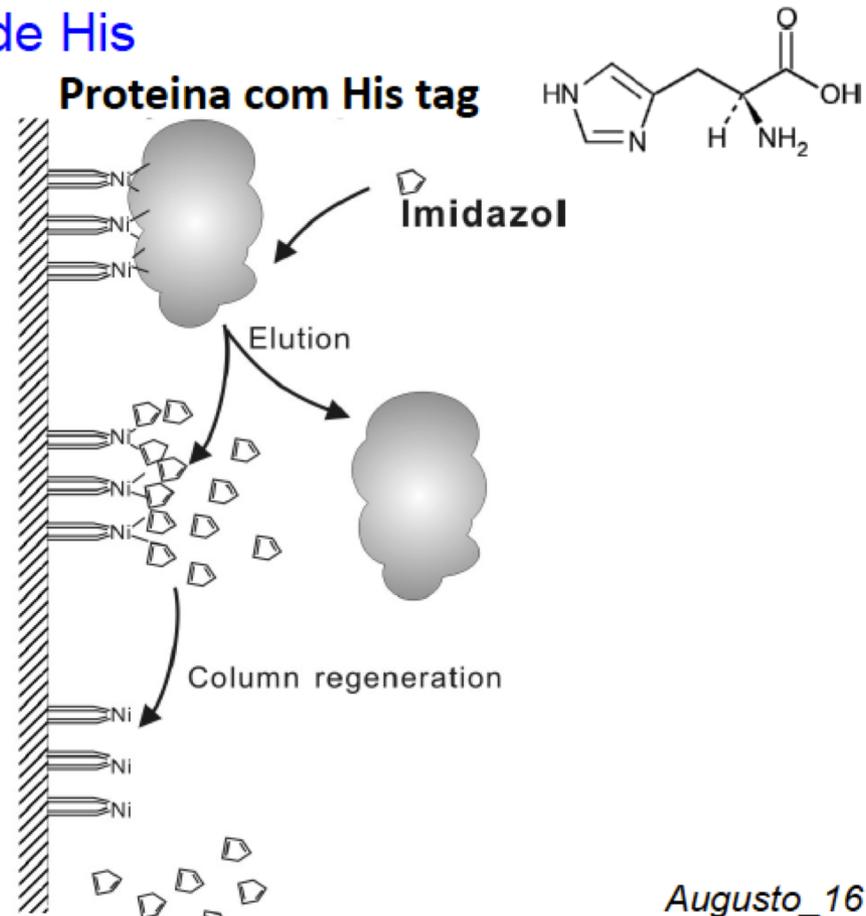


# CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

-Substrato-enzima



-Expressão de proteínas com cauda de His



# Comparação entre diferentes métodos de purificação

Método de purificação	Propriedade	Capacidade	Custo	Resolução	Comentários
Precipitação com $(\text{NH}_4^+)_2 \text{SO}_4^{-2}$	solubilidade	alta	baixo	baixa	Usada em etapas iniciais ou finais de purificação para concentrar proteínas. Pode desnaturar irreversivelmente a proteína de interesse.
<u>Cromatografias</u>					
gel filtração/ exclusão molecular	tamanho	média	médio	baixa	usado em etapas intermediárias da purificação. informa sobre o tamanho (peso molecular) da proteína de interesse.
troca iónica	carga das cadeias laterais de a.a	média	médio	média	usado em etapas intermediárias da purificação. Variação do pH aumenta ou diminui a interação com a coluna.
hidrofobicidade	conteúdo hidrofóbico		médio	alta	Frequentemente desnatura irreversivelmente a proteína de interesse.
afinidade	interações não-covalentes específicas	baixa	médio/ alto	alta	Utilizado em etapas finais da purificação. Depende da existência de um ligante específico. Eluição da coluna pode desnaturar a proteína de interesse.

# Purificação eficiente de proteínas com alto grau de pureza e atividade biológica requer diferentes métodos de separação aplicados em sequencia

table 5–5

**A Purification Table for a Hypothetical Enzyme\***

<b>Procedure or step</b>	<b>Fraction volume (ml)</b>	<b>Total protein (mg)</b>	<b>Activity (units)</b>	<b>Specific activity (units/mg)</b>
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

# Referencias

<https://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/acs.oprd.7b00197>

sobre “salting out” de proteínas e outras moléculas orgânicas

Material de apoio: purificação de proteínas

Bioquímica - Lehninger: chap. 05 - Aminoacids-Proteins