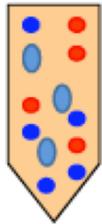


QBQ0316 - Bioquímica Experimental (2020)

**Monitoramento das etapas
de purificação de proteínas**

Determinação do Enriquecimento e
Recuperação da atividade enzimática



0,92 U/mg

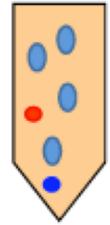
(>1000 proteínas diferentes)

purificar α -glicosilase

Métodos baseados nas diferentes propriedades das proteínas



Carga, tamanho, hidrofobicidade, interações específicas (estrutura 3a e 4a/)



100 U/mg

enriquecer a preparação em α -glicosidase

PARÂMETROS P/ ACOMPANHAR A PURIFICAÇÃO DE 1 ENZIMA

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/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	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



Proteína total decresce mas proteína de interesse aumenta

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

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

PARÂMETROS P/ ACOMPANHAR A PURIFICAÇÃO DE 1 ENZIMA

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

Proteína total decresce mas proteína de interesse aumenta

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{atividade enzimática após p/purificação}}{\text{atividade enzimática antes p/purificação}} \times 100 = 96\%$$

$$\text{Enriquecimento} = \frac{\text{atividade específica após p/purificação}}{\text{atividade específica antes p/purificação}} = \frac{32}{10} = 3,2 \times$$

Procedimentos ou etapas	volume (ml)	proteína (mg)	atividade (U)	atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Enriquecimento (vezes)
1. Lisado bruto	1400	10.000	100.000	10		
2. Ppção c/ (NH ₄) ₂ SO ₄	280	3.000	96.000	32	96	3,2x
3. Cromatografia de troca iônica	90	400	80.000	200	80	20 x
4. Cromatografia de filtração em gel	50	100	60.000	1200	60	120 x

O monitoramento da eficiência de recuperação da atividade enzimática e de enriquecimento da atividade específica permite escolher a **melhor estratégia de purificação**

Objetivos:

- Alto rendimento e atividade específica (maior recuperação e enriquecimento)
- Menor número de etapas de purificação
- Metodologia com melhor custo-benefício

O ajuste de parâmetros nas condições afetam a eficiência da purificação:
pH do tampão, concentração de sais, carga da coluna, tamanho do poro da resina de gel filtração

Como descobrir a melhor estratégia de purificação de uma proteína de interesse?

Protein Purification

Programa online que permite simular e modificar um protocolo de purificação de uma proteína a partir de um mistura inicial (lisado) para obter o melhor rendimento e enriquecimento.

http://www.agbooth.com/pp_ajax/

Referencias

material de apoio: teoria de purificação de proteínas

Bioquímica - Lehninger: chap. 05 - Aminoacids-Proteins