
Entre no programa Protein Purification online
http://www.agbooth.com/pp_web/

1) Selecione a mixture padrão (Default mixture) com 20 proteínas diferentes
A purificação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é usada como etapa inicial na purificação. O objetivo é diminuir a presença de proteínas contaminantes com o mínimo de perda de atividade enzimática da proteína que se quer purificar.

A concentração de sal ótima para precipitar as proteínas dependem de sua solubilidade, que varia de proteína para proteína. Dependendo da solubilidade relativa em concentrações crescentes de íon sulfato, a atividade específica da proteína de interesse pode ser enriquecida na fração solúvel ou precipitada.

Para as proteínas abaixo você deve determinar a concentração de sulfato de amônio mais apropriada para recuperar a atividade enzimática.

Dica:

Para alterar a a proteína ou a concentração $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ usada na precipitação clique em "Abandon scheme and start again"

1) proteína 4

Proteína 4

45 % sulfato- precipita 30% proteína, 0 % atividade pegar sobrenadante (enriquecimento 1.4, recupera 99,8%)

30% precipita 0% atividade, 12% proteína

60% precipita ~85% atividade e proteína (não enriquece)

2) proteína 20

50% sulfato-: 83% enzima, 45% Proteína

35% sulfato, 72% enzima, 16% Proteína , pegar precipitado (enriquecimento 4,3 recupera 71,6%)

40% sulfato, 76%, 21%

agora selecione a mistura com 60 proteínas (Complex mixture).

Qual a concentração de sulfato de amônio mais apropriada para recuperar a atividade enzimática nas proteínas abaixo?

3) proteína 22

50% sulfato-: 25% enzima, 52% Proteína

60% sulfato-: 82% enzima, 85% Proteína

47% sulfato-: 0% enzima, 42% Proteína, pegar sobrenadante

40% sulfato-: 0% enzima, 27% Proteína

4) proteína 53

50% sulfato: precipita 83% em enzima e 52% proteína. recuperação de 83% no precipitado. Enriquecimento de 1,6. Maior parte da enzima no precipitado, usar essa fração.

Testar o efeito de concentrações mais baixas e mais altas para otimizar a recuperação da atividade enzimática (% U) e enriquecimento (U/mg proteína) após a precipitação com $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. O tempo em horas para obter 100U de enzima purificada fornece uma estimativa do custo de produção. Em 50% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ o custo é de 0,096h/100U

Diminuindo a concentração de sulfato para

45%: recuperação de 80% da atividade no precipitado. Enriquecimento de 2,2 (custo mais alto, 0,100 h/100U).

40%: recuperação de 76% no precipitado. Enriquecimento de 2,8 (custo mais alto, 0,105 h/100U)

Nessas condições de precipitação com $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ observa-se o enriquecimento da enzima (2,2 a 2,8 vezes) porém a custa de uma menor recuperação de atividade enzimática, e um aumento no custo de purificação de unidades da enzima.

Aumentando a concentração de sulfato até 60% aumenta a precipitação de proteínas mas não de atividade enzimática:

Recuperação 88%, enriquecimento 1, custo 0,090 h/100U.

Não contribui para o enriquecimento da atividade enzimática. Mas tem recuperação máxima (88%) e menor custo de produção. Boa estratégia para concentrar a atividade enzimática para uma próxima etapa de purificação e eliminação de contaminantes.

Do ponto de vista prático, é necessário que a atividade e pureza da proteína seja aumentada em muitas vezes, pela separação de outras proteínas presentes na mistura. Não se espera que o enriquecimento na primeira etapa de purificação seja suficiente para atingir o nível de enriquecimento necessário. Serão necessárias etapas adicionais de purificação usando técnicas de cromatografia em coluna.

Portanto a opção mais correta seria usar 50 % ou mais de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ e seguir com o precipitado para as próximas etapas de purificação.