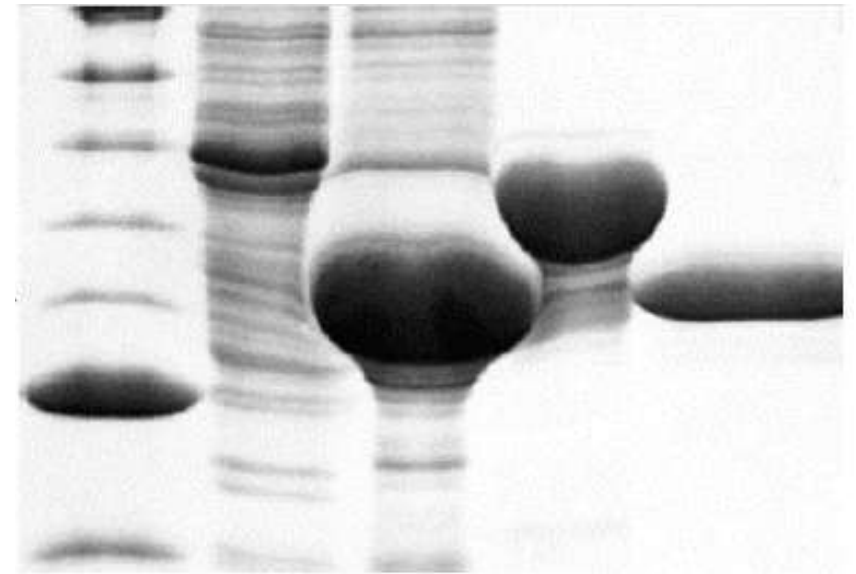
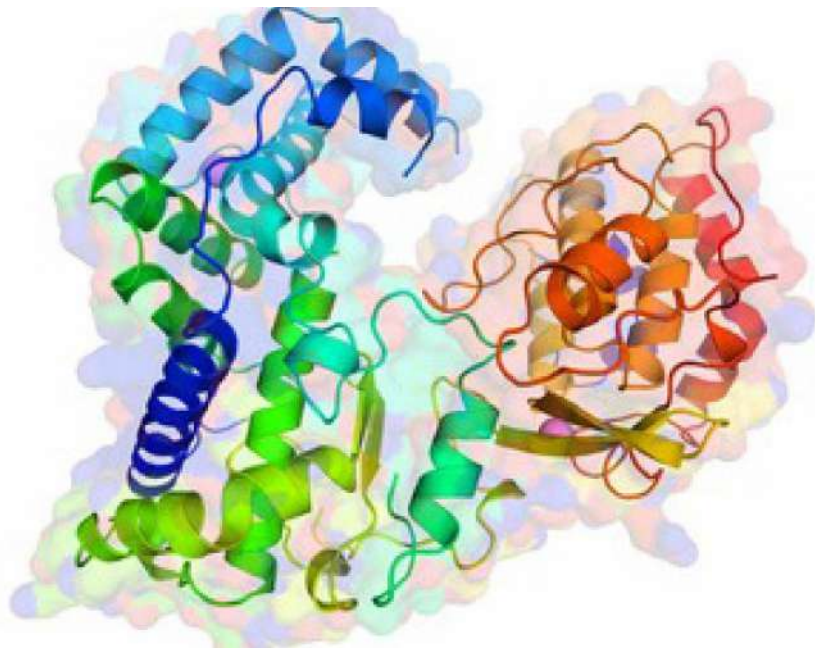
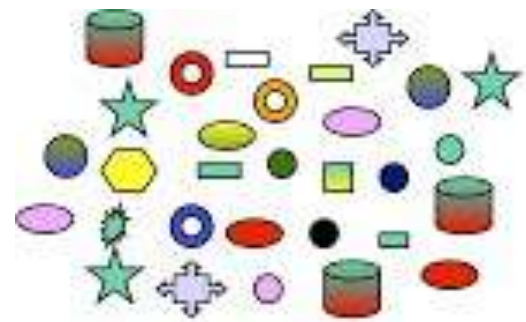


Purificação de proteínas

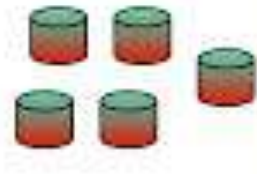


Profa. María Eugenia Guazzaroni



Proteínas de uma célula

Métodos de
purificação



Uma
proteína
isolada

Purificação de proteínas

Os métodos de purificação de proteínas consistem processos de **SEPARAÇÃO** de misturas de moléculas orgânicas/químicas com base nas **PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS** almejando, como produto final, polipeptídeos puros.

Exemplos:

Exemplos de proteínas puras de consumo humano:



Insulina
recombinante



Suplementos
alimentares



Vacinas

Proteínas

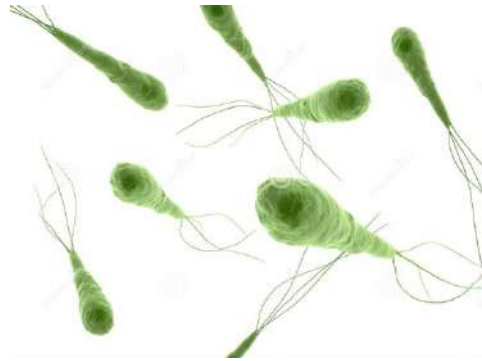
Estrutura

Propriedades

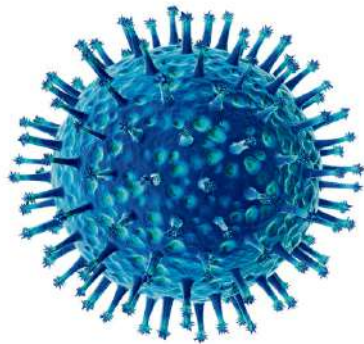
- Tamanho
- Carga
- Propriedades da ligação – ex: proteínas conjugadas = glicoproteínas, metaloproteínas, lipoproteínas etc.

Proteínas

Fontes



MICROORGANISMOS



VIRUS



**ORGANISMOS
SUPERIORES**

Purificação

Passos

- *Rompimento da célula. Exceção: proteínas secretadas por micro-organismos.*
- *Separação dos elementos (solúveis/insolúveis)*
- *Fracionamento – realizado a partir das propriedades intrínsecas da proteína de interesse.*

Rompimento das células

Ex: sonicação



EXTRATO BRUTO



Fracionamento

Ex: centrifugação diferencial



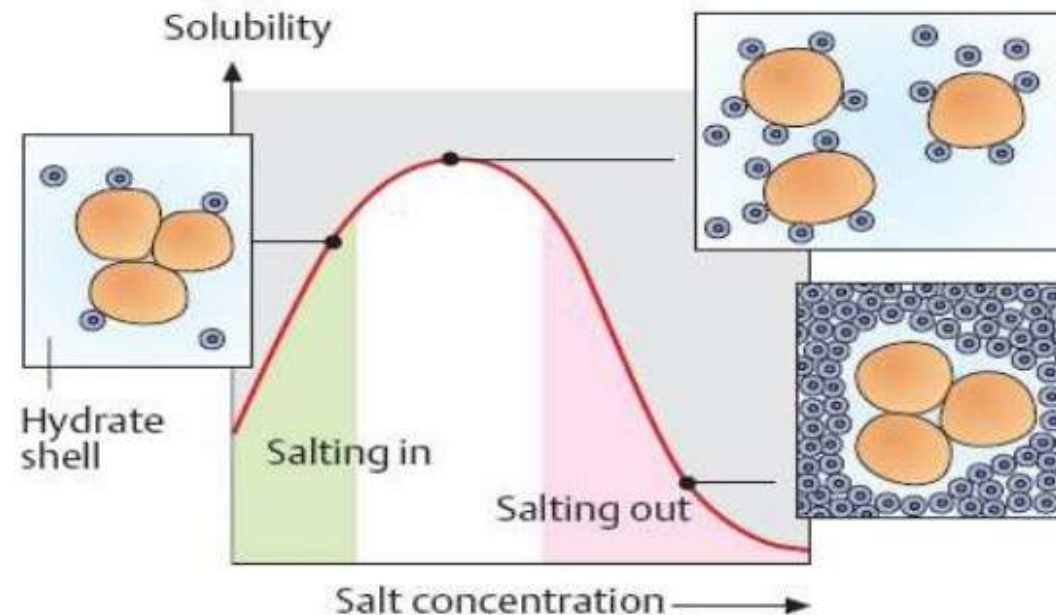
Precipitação diferencial por sulfato de amônio

Sais neutros

A adição de sulfato de amônio em quantidades adequadas pode precipitar seletivamente algumas proteínas, enquanto outras permanecem em solução. Ex: purificação da imunoglobulina IgG do soro sanguíneo.

Por que as proteínas precipitam com a adição de sais neutros?

Salting in – Salting out



Diálise (uso logo da precipitação)

(a) At start of dialysis (b) At equilibrium

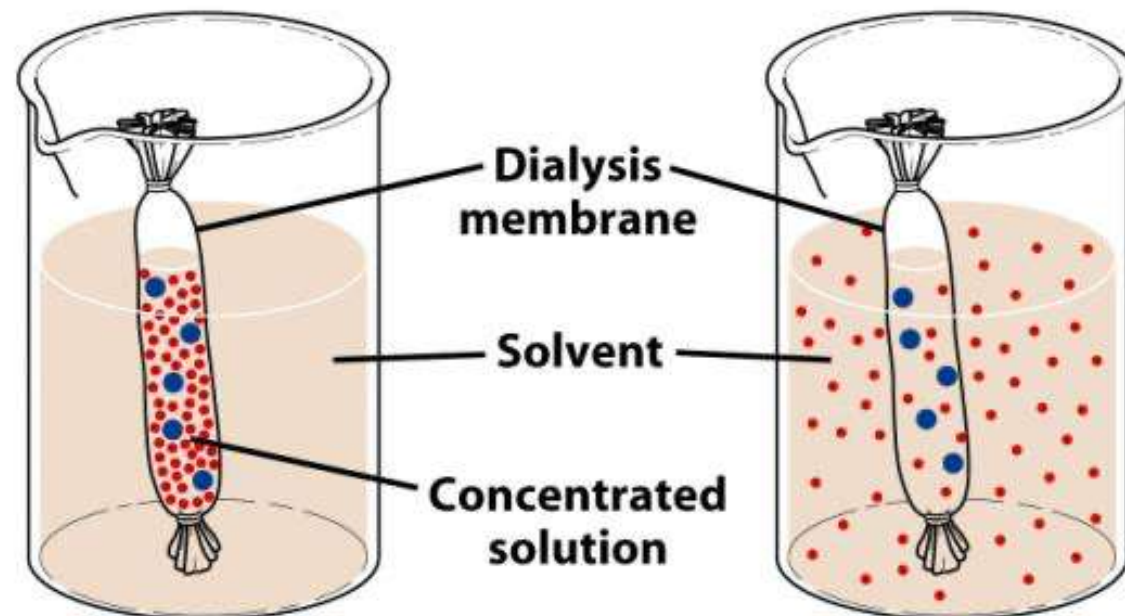


Figure 2-14 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons

A diálise separa as proteínas de outros pequenos solutos, um processo que se aproveita do tamanho das proteínas pois a membrana permite a troca de sal e tampão, mas não de proteínas.

Cromatografía

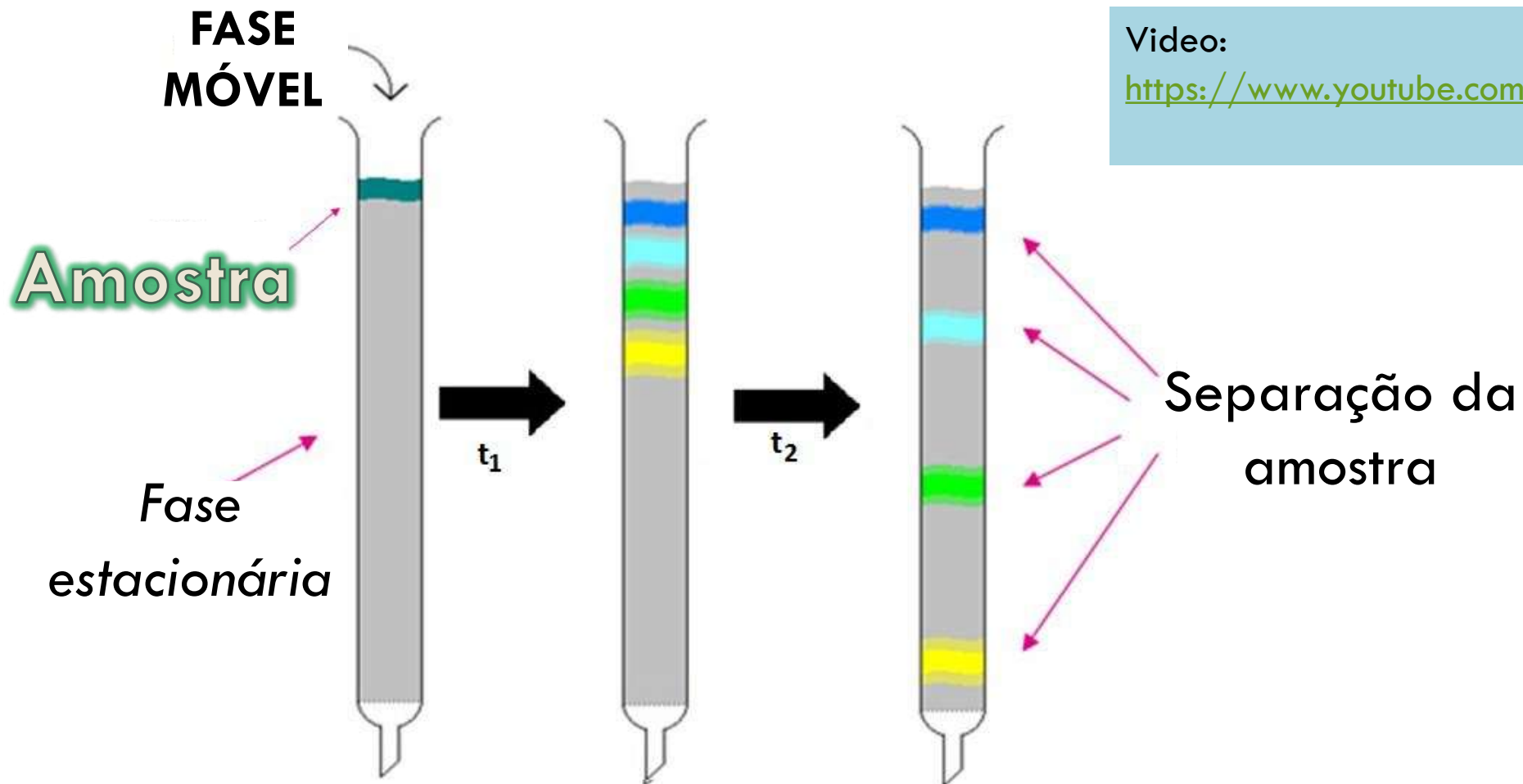
A cromatografía pode ser considerada como uma separação diferencial dos componentes de uma amostra entre uma **fase móvel** e uma **fase estacionária**

Fase estacionária: partículas esféricas de um material insolúvel empacotado em uma coluna;

- A mistura de enzimas é introduzida na coluna pela **fase móvel** e forçada a migrar através da coluna;
- As enzimas que possuem maior atração pela fase estacionaria irão migrar de forma diferenciada das que tem maior afinidade pela fase estacionária.

Cromatografia em coluna

É composta por uma fase estacionária (material sólido poroso) e uma fase móvel (solvente).

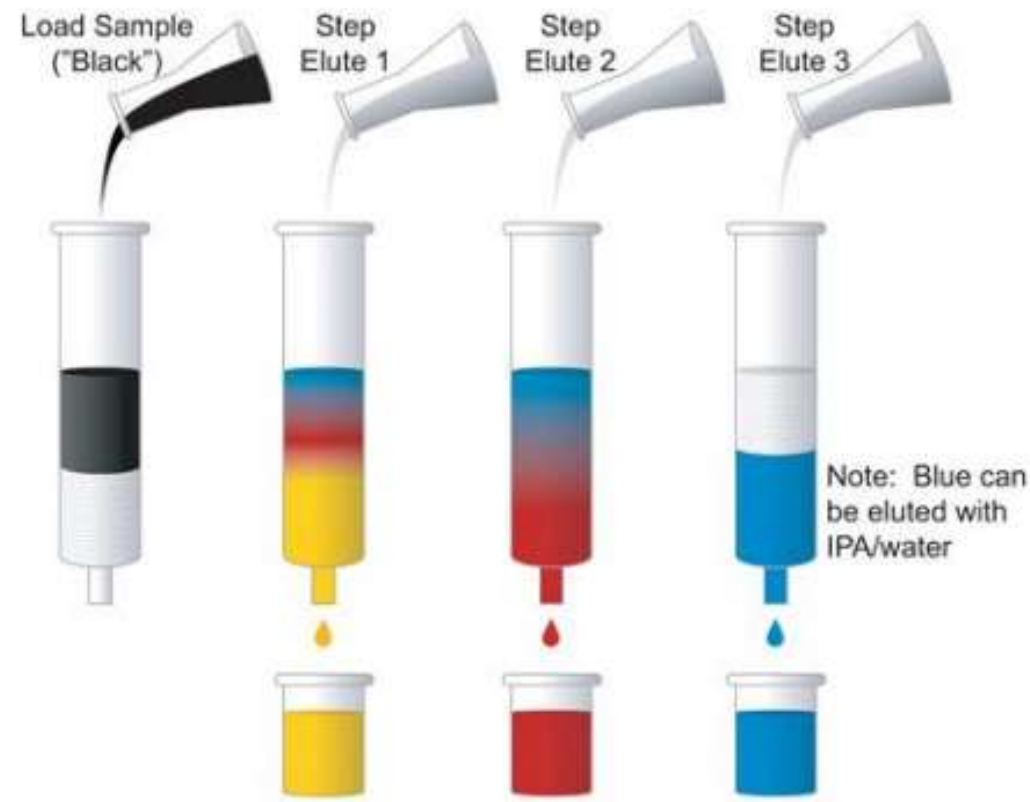


Video:

<https://www.youtube.com/watch?v=0m8bWKHmRMM>

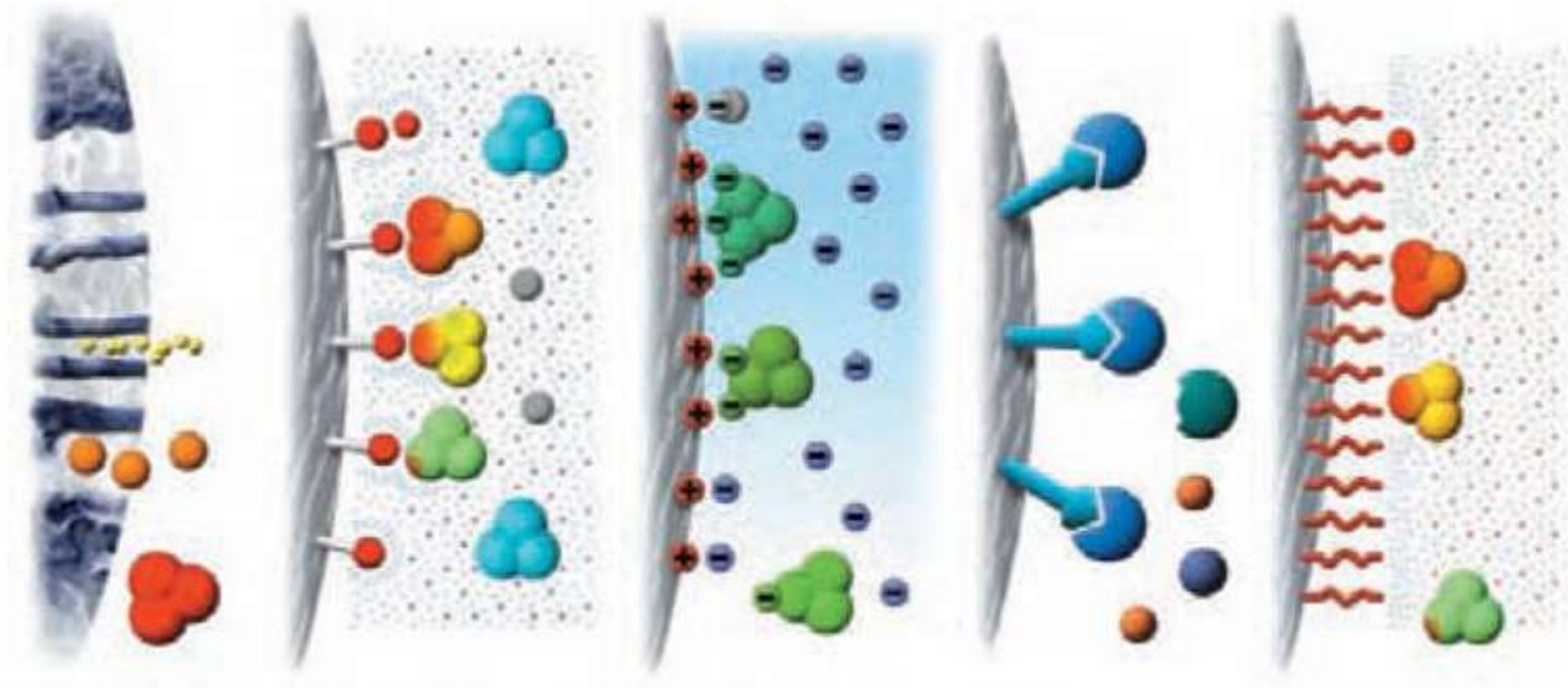
Cromatografia em coluna

À medida em que solventes são adicionados à coluna (fase móvel), são extraídas diferentes frações da mistura inicial, de acordo com as características do solvente. Ex: tampões em diferentes pHs, etc.



Proteínas individuais migram mais rápido ou mais devagar dependendo das suas propriedades.

Tipos de cromatografia



De exclusão
por tamanho
(Gel filtration)

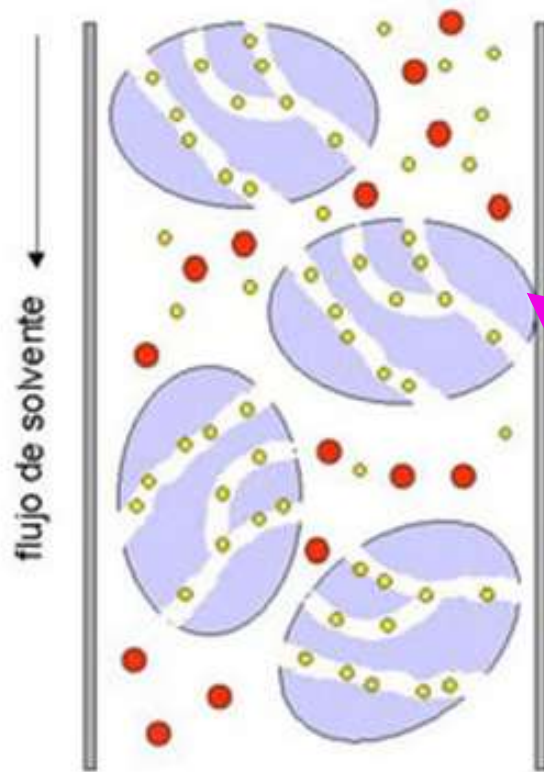
De interação
hidrofóbica

De troca
iônica

De afinidade

De fase reversa

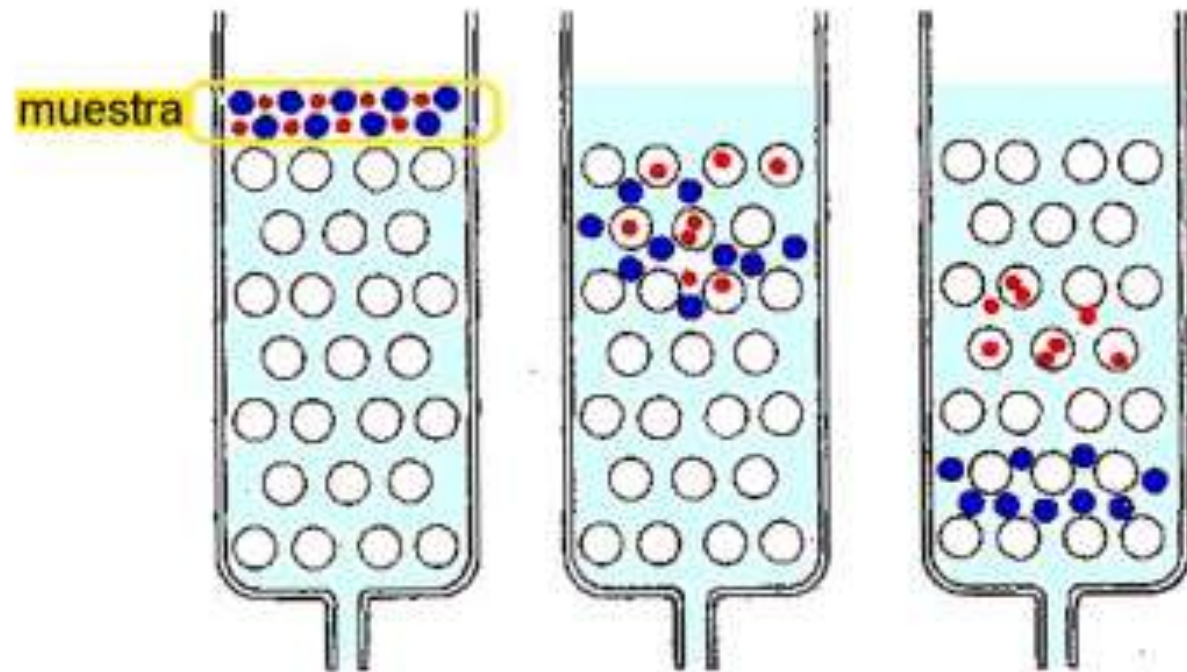
1. Cromatografia de exclusão por tamanho molecular (i)



- *Também chamada de gel-filtração. Separa as proteínas de acordo com seu tamanho.*

Fase sólida: grânulos de polímeros que apresentam ligações cruzadas, com poros ou cavidades de tamanho determinado.

1. Cromatografia de exclusão por tamanho molecular (ii)



○ = Partícula de gel

Moléculas de la muestra:

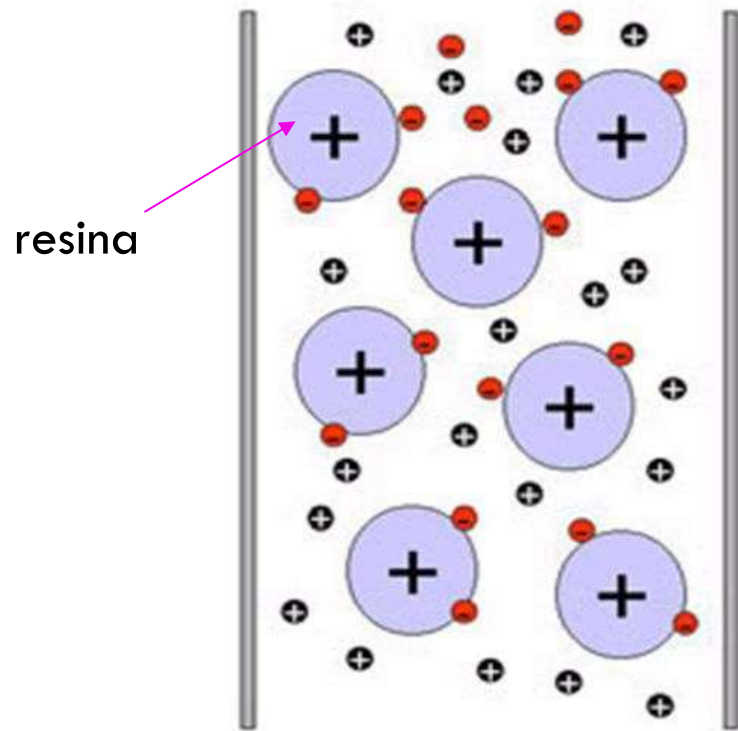
• = de tamaño menor que los poros del gel

● = de tamaño mayor que los poros del gel

- Proteínas grandes são eluídas primeiro.
- Proteínas menores ficam retidas mais tempo dentro dos poros.

2. Cromatografia de troca iônica

Matriz: polímero sintético com grupos carregados ligados



**Colunas
trocadoras de
ânions (carga -)**



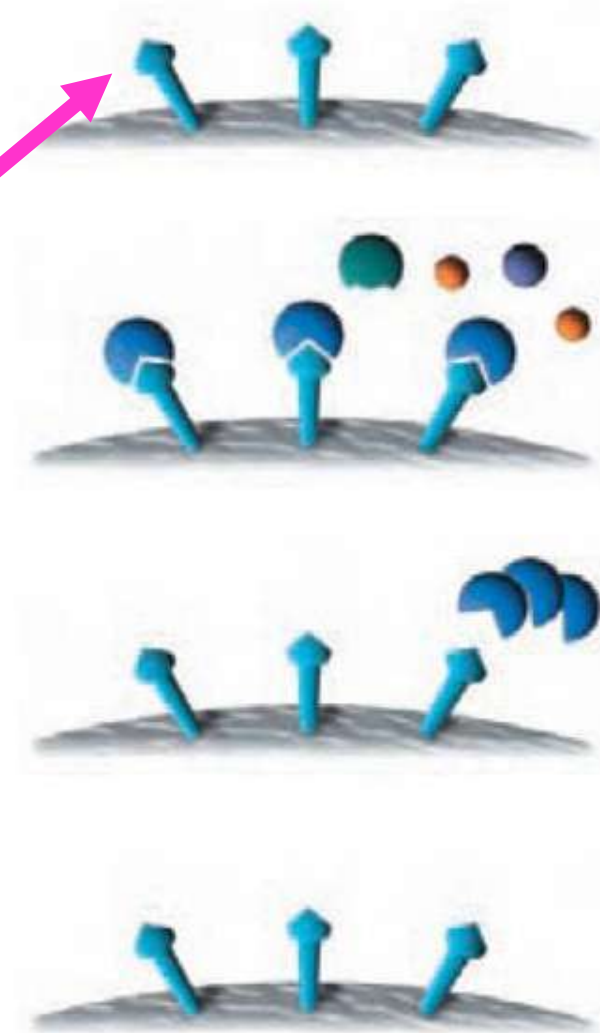
**Resinas
contém
cátions**

3. Cromatografia de afinidade (i)

- É baseada na afinidade de ligação.
- A coluna contém grupos químicos/moléculas ligadas covalentemente – LIGANTE

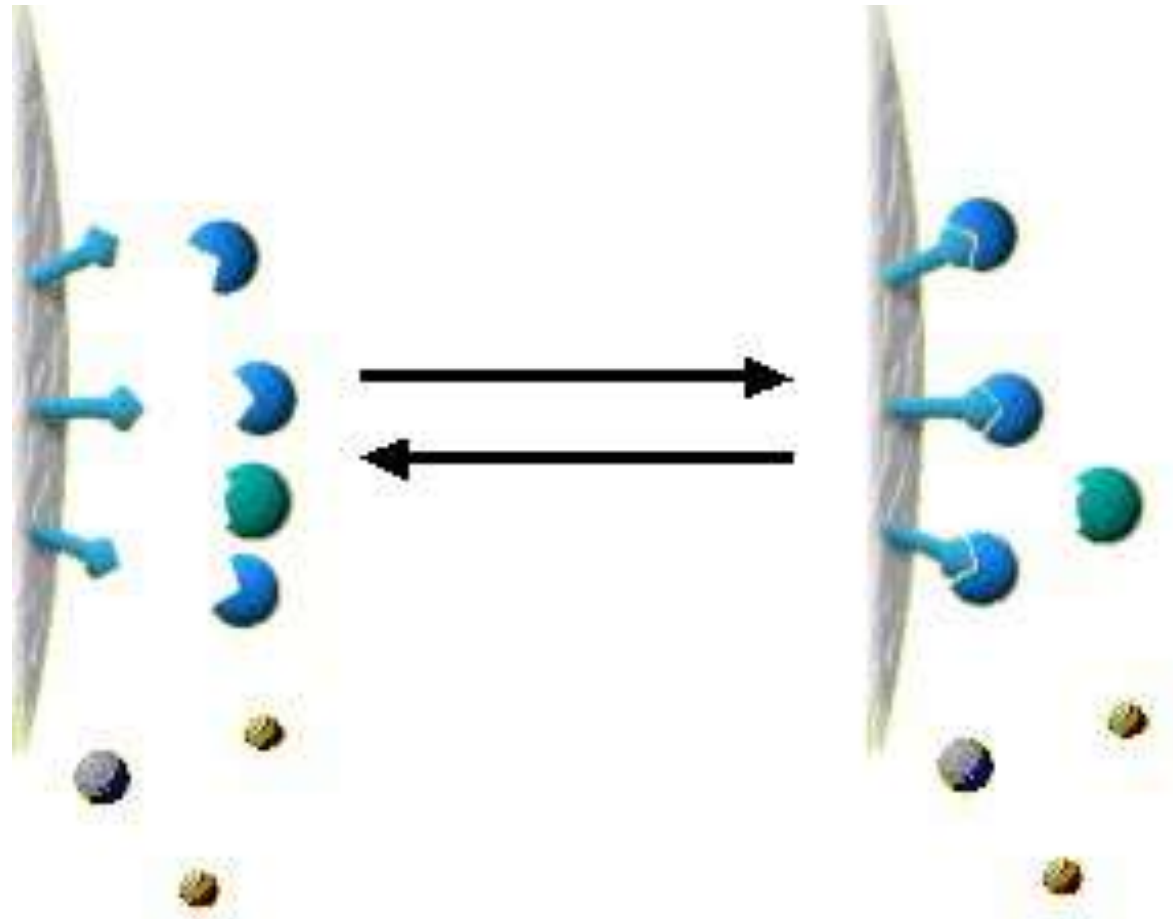
Exemplos de ligantes:

- Substratos (enzimas)
- Hormônios (proteínas ligadoras de hormônio)
- Açúcares (lectina)
- Antígeno (anticorpo).



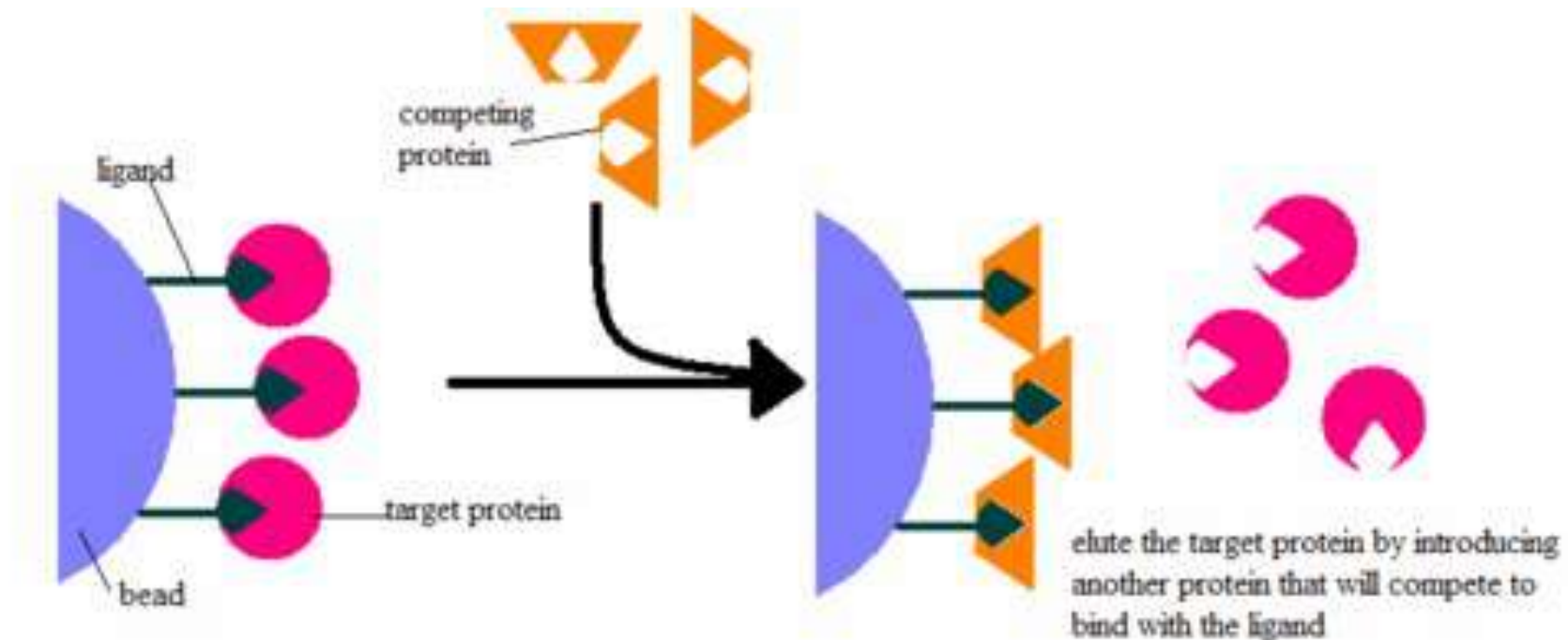
3. Cromatografia de afinidade (ii)

As proteínas são adicionadas à coluna e a proteína com **AFINIDADE** ao ligante permanece retida em sua matriz.



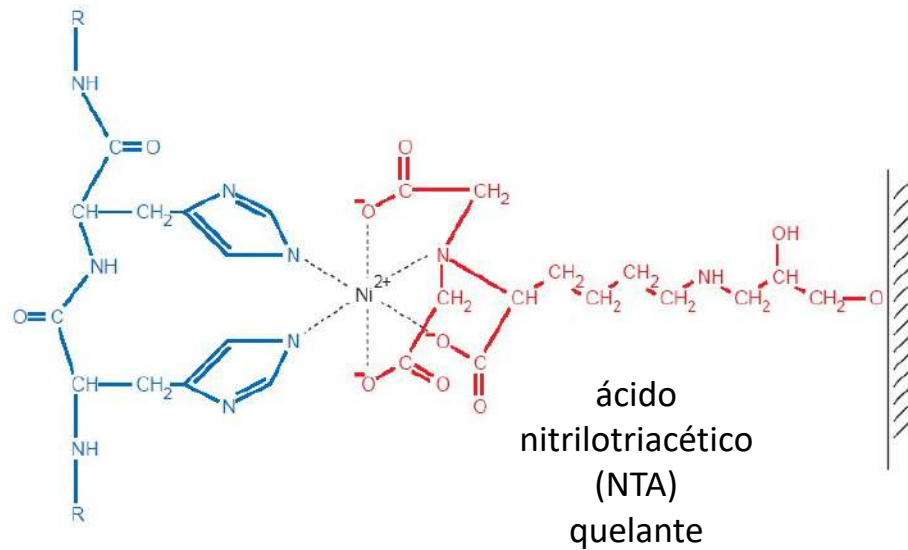
3. Cromatografia de afinidade (iii)

A eluição normalmente se dá na presença de uma concentração de sal elevada contendo ou ligante livre ou molécula competidora do ligante.



3. Cromatografia de afinidade (iv)

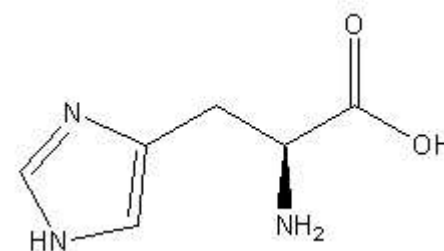
Ex: Purificação de proteína com calda de histidina
(proteína recombinante)



Ni- agarose/sepharose
chromatography

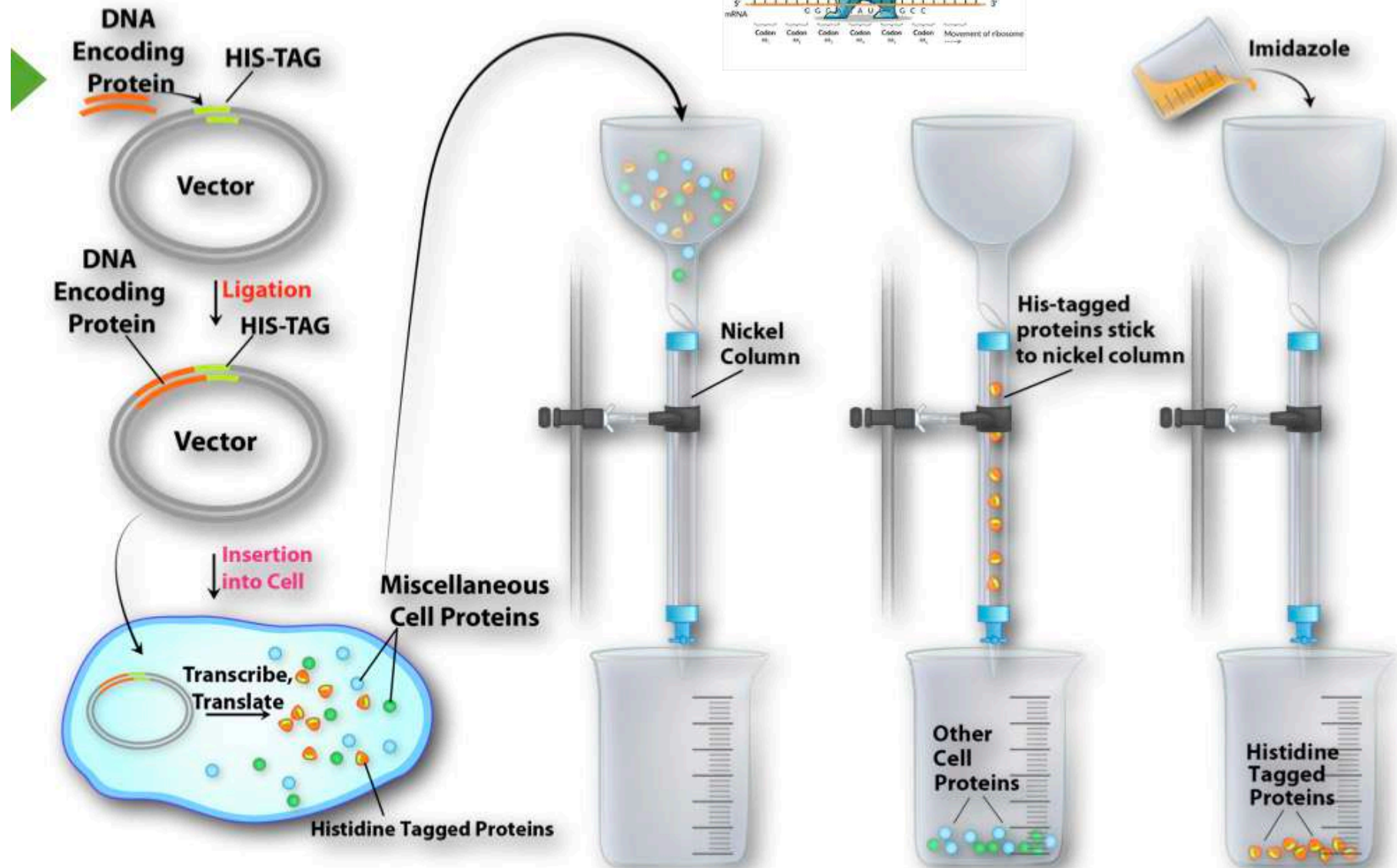
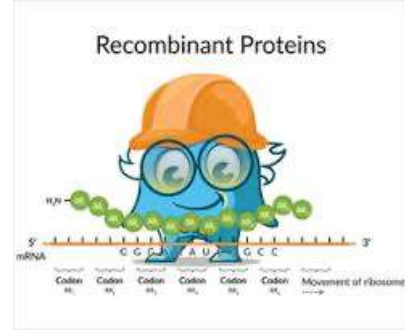


Imidazole (protonate)



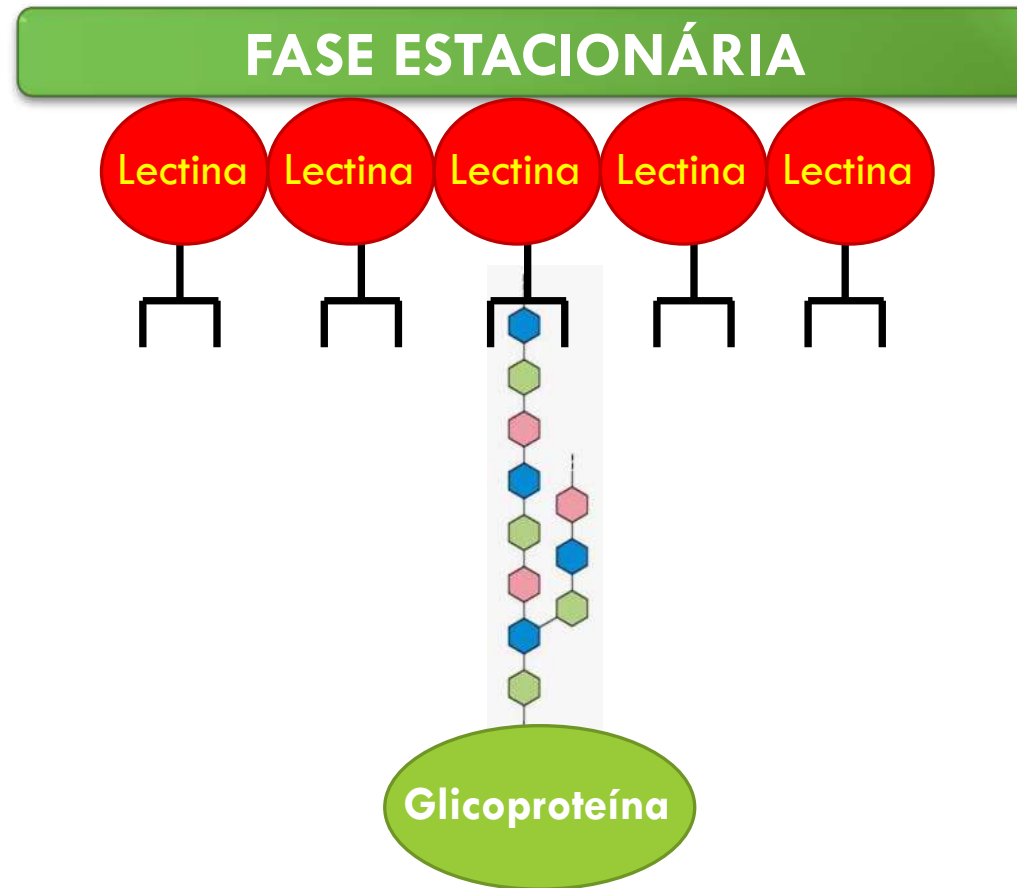
Histidine
(protonate)

Affinity Chromatography



3. Cromatografia de afinidade (v)

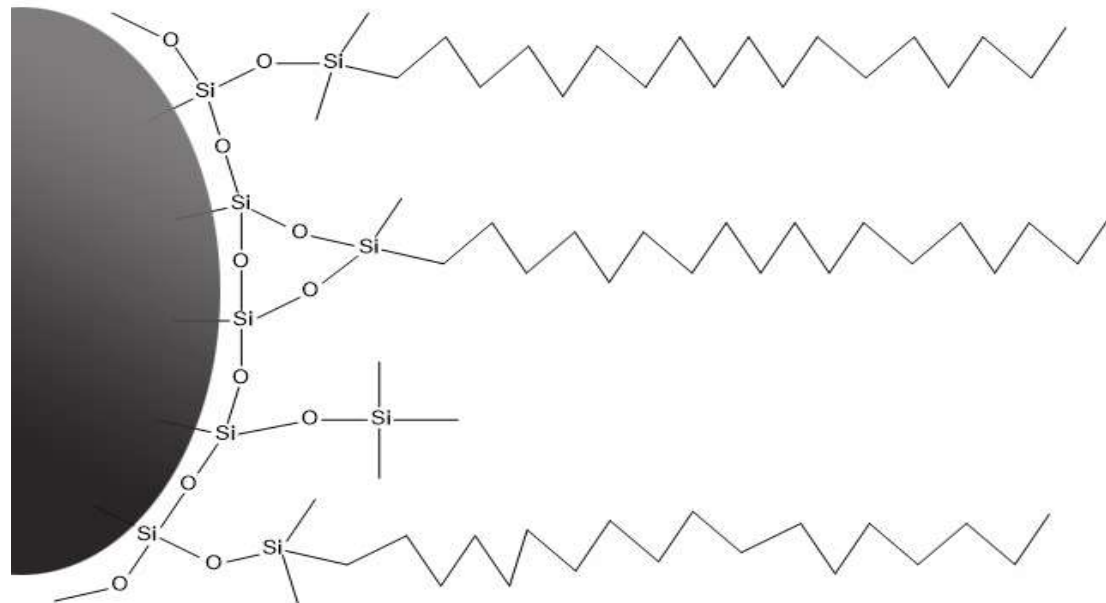
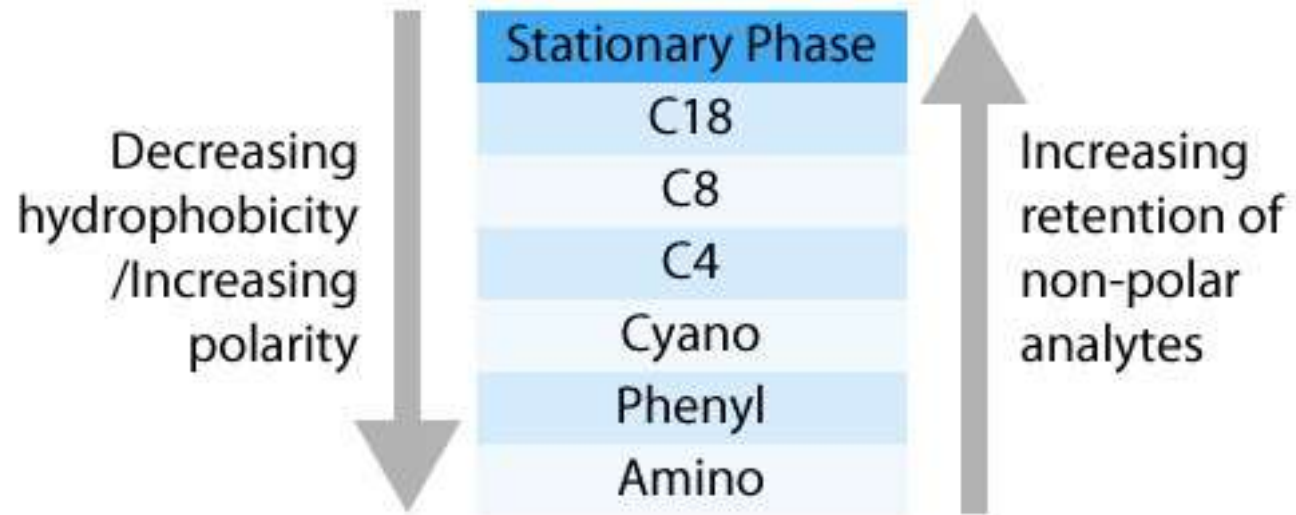
Ex: Purificação de glicoproteína



4. Cromatografia de fase reversa (i)

Se a fase estacionária for mais apolar que a fase móvel é chamada de fase reversa.

- Características: fase imóvel apolar e fase móvel moderadamente polar.
- Utilizada para purificar proteínas apolares.
- A fase estacionária hidrofóbica. Ex: C4; C6; C18.

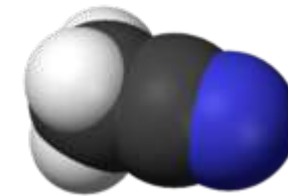


Exemplo de resina apolar

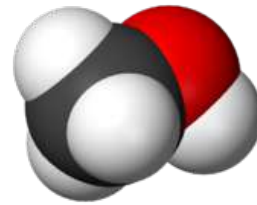
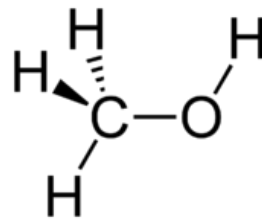
4. Cromatografia de fase reversa (ii)

➤ Fase móvel: também é hidrofóbico, pois precisa sequestrar a proteína adsorvida na matriz da coluna, mas com leve polaridade. Ex:

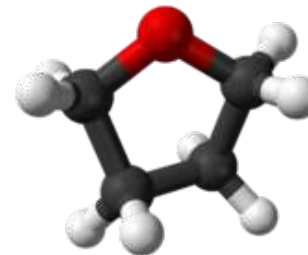
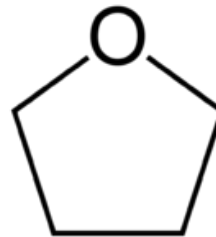
- Acetonitrila



- Metanol



- Tetraidrofurano



- Ou misturas de solventes

4. Cromatografia de fase reversa (iii)

mixture of components



column
(stationary phase)

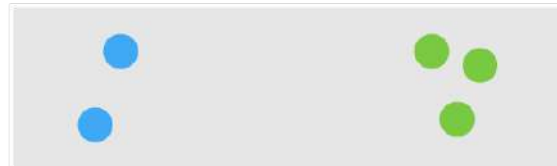
flow of mobile phase



most hydrophobic components interact with the column best



least hydrophobic components elute first



medium hydrophobic components elute



most hydrophobic components elute last



Cromatografia líquida de alta eficiência

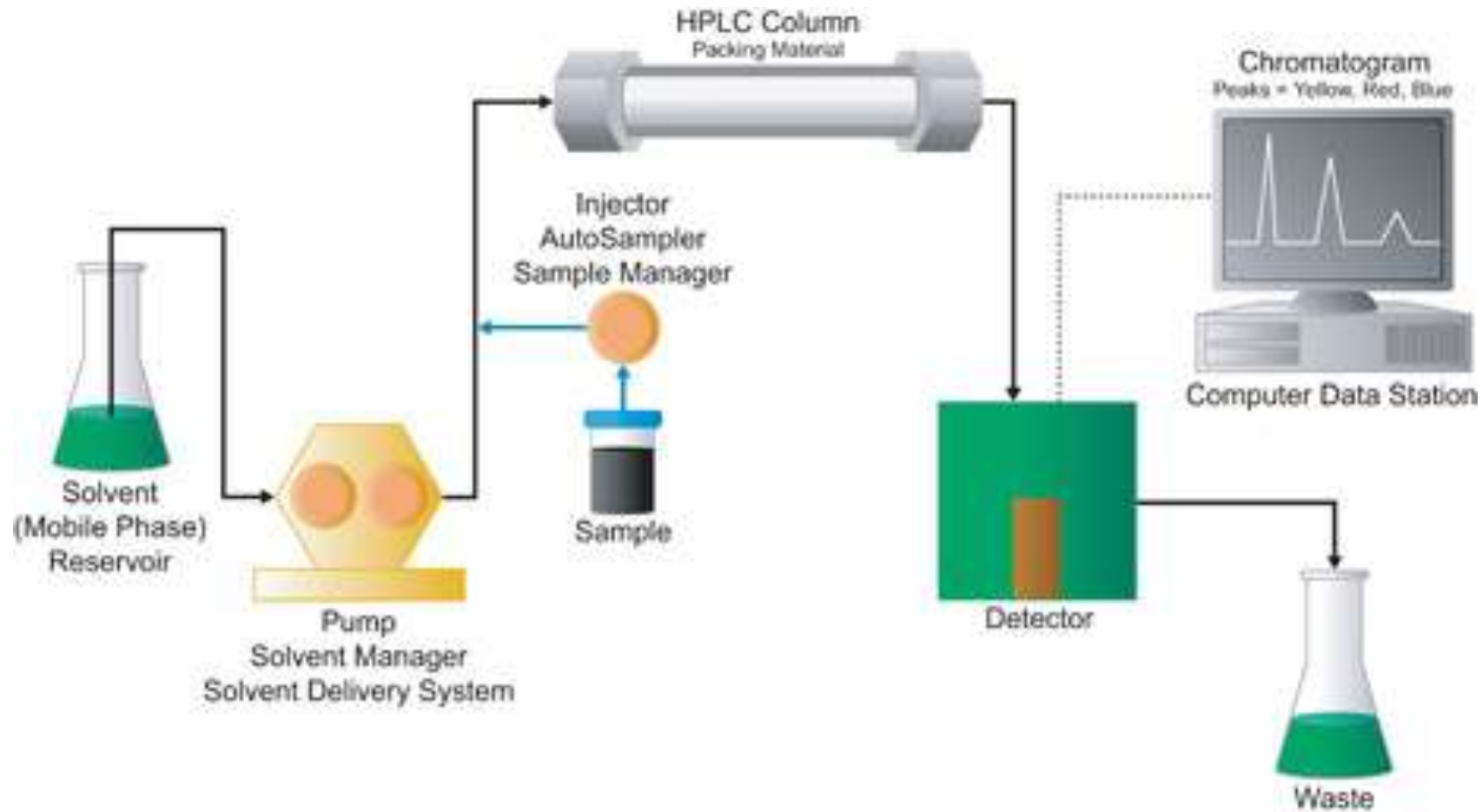
HPLC (i)

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

- ✓ Bombas de alta pressão aceleram o movimento das moléculas (são necessários materiais que aguentem a força do fluxo pressurizado).
- ✓ Diminuem o tempo de transito na coluna → diminui o espalhamento difusional da proteína na coluna → maior eficiência (pureza/rendimento).

Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC



Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC (ii)

- ✓ Características da coluna - faz a separação da amostra:
 - ✓ Exclusão molecular;
 - ✓ Troca iônica;
 - ✓ Afinidade;
 - ✓ Fase reversa
- ✓ Tipos de detectores - revela a identidade da amostra:
 - ✓ UV-Vis;
 - ✓ Fotodiodo (detecta mais de uma absorvância);
 - ✓ Fluorescência;
 - ✓ Espectroscopia de massa

Fast protein liquid chromatography (FPLC)

FPLC system components



Eletroforese (i)

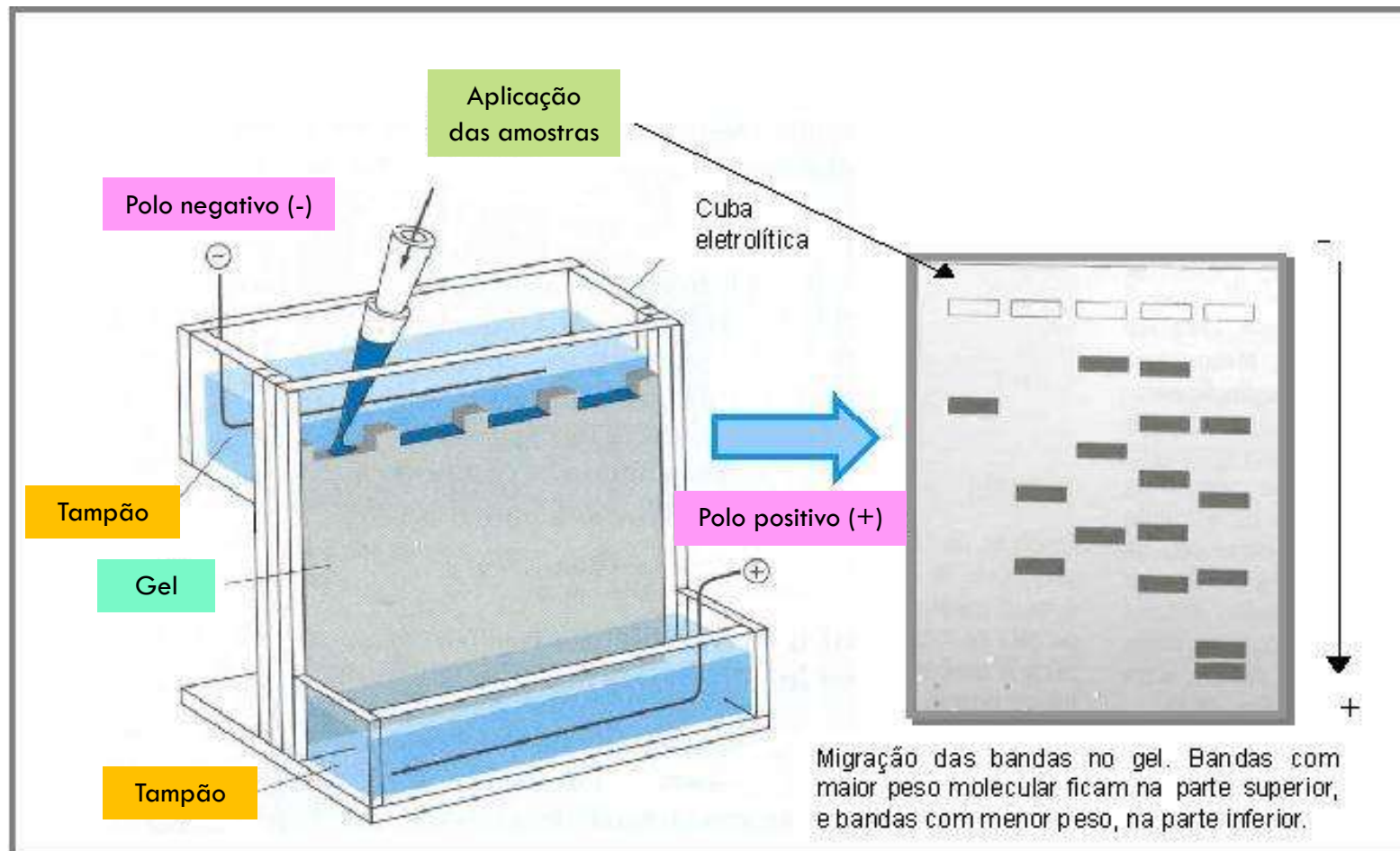
Método analítico que separa as proteínas com base em seu tamanho e na sua carga.

Proteínas são imobilizadas em uma matriz gelatinosa de poliacrilamida.

Permite determinar o grau de pureza de uma preparação protéica.

Eletroforese (iii)

A diferença de potencial separa as proteínas de acordo com sua carga.



Eletroforese (iv)

GEL DESNATURANTE:

Tanto o gel é polimerizado na presença de detergente - dodecil sulfato de sódio (SDS) - quanto a amostra é preparada na presença de detergente.

(SDS): detergente aniônico que se liga fortemente as proteínas causando sua desnaturação e fornecendo uma carga negativa constante por unidade de massa.

