

Lista de exercícios: Aula 01/04, métodos de análise de aminoácidos e proteínas parte 1

1. Definir os termos fase estacionária e fase móvel. Dar exemplos de fases móvel e estacionária em casos de a) cromatografia em camada delgada e b) cromatografia em coluna.
2. Explique brevemente os seguintes tipos de cromatografia: a) troca iônica; b) filtração em gel; c) afinidade.
3. A precipitação de proteínas com sulfato de amônio é um passo largamente empregado na purificação de proteínas. Explique o princípio do método. Seria melhor trabalhar com a proteína de interesse na forma precipitada ou solúvel? Por quê?
4. Leia o texto abaixo (resumo do artigo colocado como leitura complementar no moodle):

Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for Quantitative Amino Acid Analysis

A semi-automated method for **amino acid derivatization** and analysis has been validated for use in analysis of protein biopharmaceuticals. The method includes protein hydrolysis, o-phthalaldehyde derivatization, and **reversed-phase high-performance liquid chromatography** analysis in a general-purpose UV-visible high-performance liquid chromatography system. Amino-acid derivatization is performed automatically by the high-performance liquid chromatography autosampler right before injection. The required validation parameters, i.e., specificity, linearity, accuracy, precision, limit of detection, and limit of quantification, were studied for bovine serum albumin and for a recombinant human Fab fragment. The method can be employed as an absolute quantification method for determination of extinction coefficients of recombinant proteins.

Responda:

- a) Por que a proteína foi hidrolisada?
 - b) Explique os dois termos marcados em negrito no texto.
 - c) Cite as vantagens do uso de HPLC para análise de aminoácidos em contraste à cromatografia de camada delgada.
5. São dadas as seguintes informações sobre as proteínas A-F.

	P.I	Massa molecular (kDa)	Carga elétrica em pH 7	pI	Concentração de sal a partir da qual precipita (%)
A	3	20	+5	9	20
B	5	47	-5	6	35
C	5	33	+9	11	40
D	7	47	+7	10	35
E	9	60	-3	6	60

F	5	47	0	7	35
---	---	----	---	---	----

- a) Explicar a relação entre o pI de uma proteína e seu estado de cargas dado na tabela.
- b) Propor uma marcha de purificação (sequência de técnicas a serem utilizadas) para a proteína B. Utilizando as seguintes técnicas (as quais julgar necessárias):

Cromatografia de filtração em gel (exclusão por tamanho).

Cromatografia de troca catiônica (indicar o valor de pH)

Cromatografia de troca aniônica (indicar o valor de pH)

Focalização isoelétrica

Precipitação por salting-out (indicar a escolha da fração, precipitado ou sobrenadante).