

Métodos de análise de aminoácidos e proteínas – Parte 2

Felipe Jun Fuzita

table 5-5

A Purification Table for a Hypothetical Enzyme*

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

Medida indireta de "**concentração**" da proteína de interesse caso ela seja uma enzima.

Medida indireta de "**concentração relativa**" da proteína de interesse caso ela seja uma enzima.

$$32/10 = 3,2$$

$$200/32 = 6,25$$

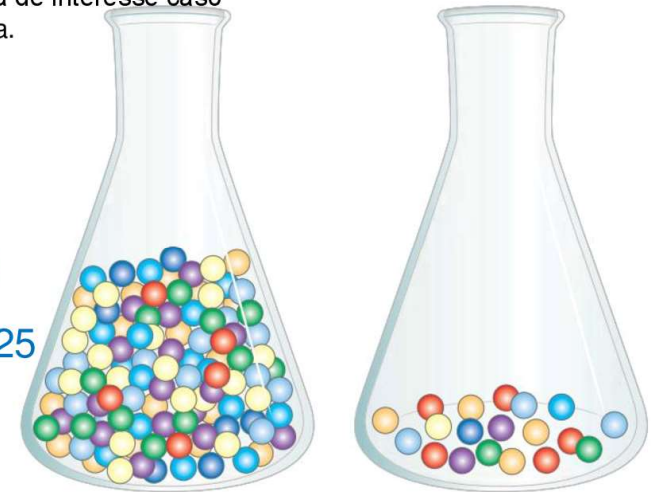


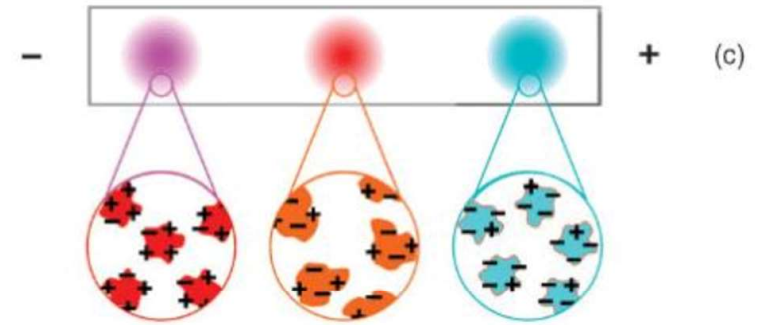
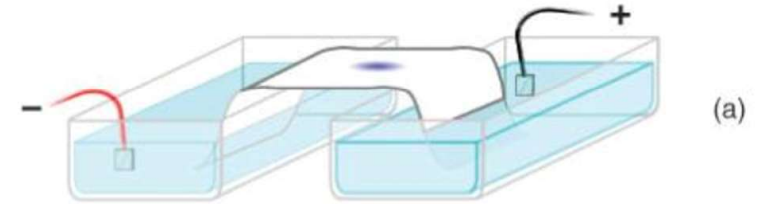
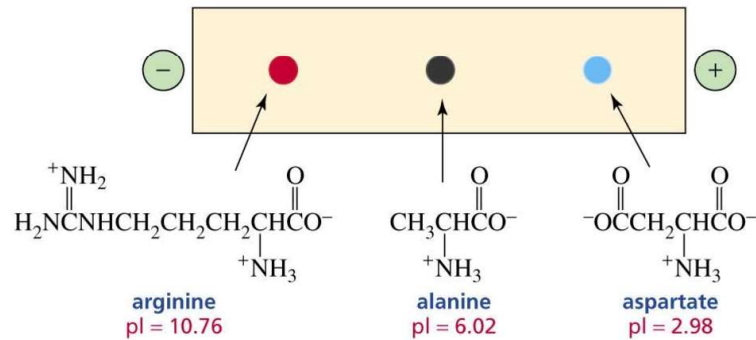
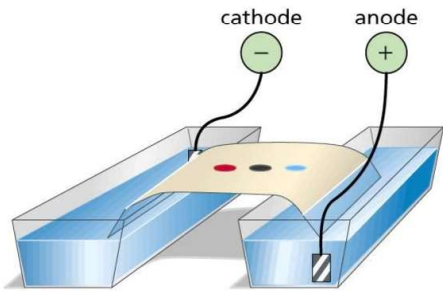
FIGURA 3-22 Atividade versus atividade específica. A diferença en-

O enriquecimento do processo é calculado dividindo-se a atividade específica com relação ao passo anterior.

Portanto, no primeiro passo houve enriquecimento de **3,2 vezes** na amostra

No segundo passo houve enriquecimento de **6,25 vezes** na amostra

Eletroforese em papel

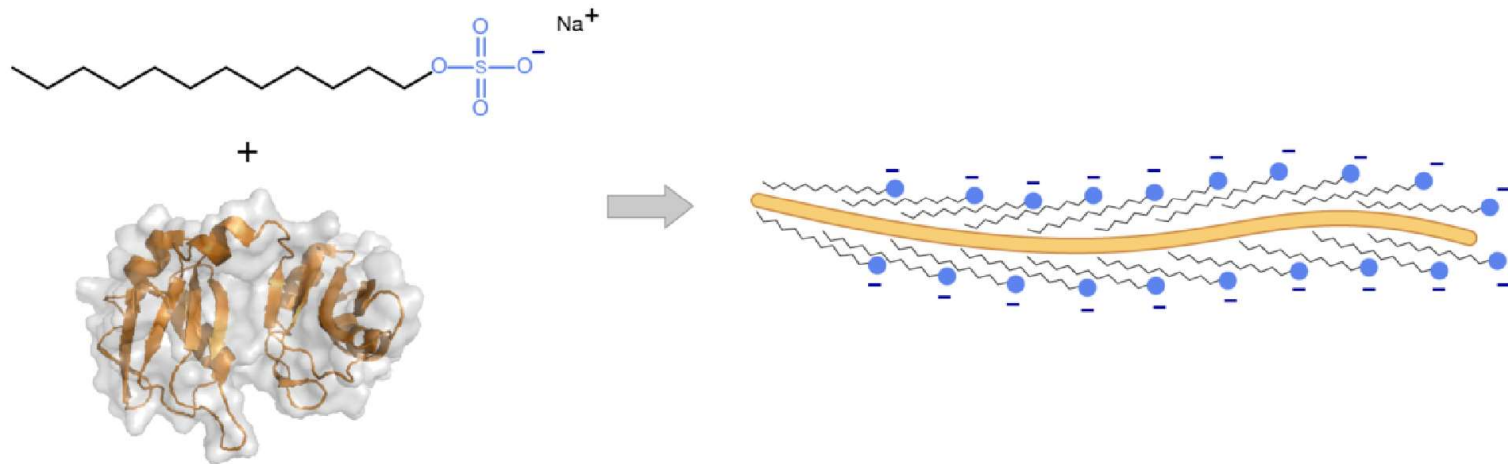
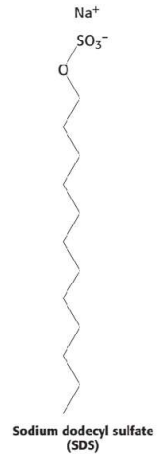


Aminoácidos ou proteínas.

Necessita de método de coloração.

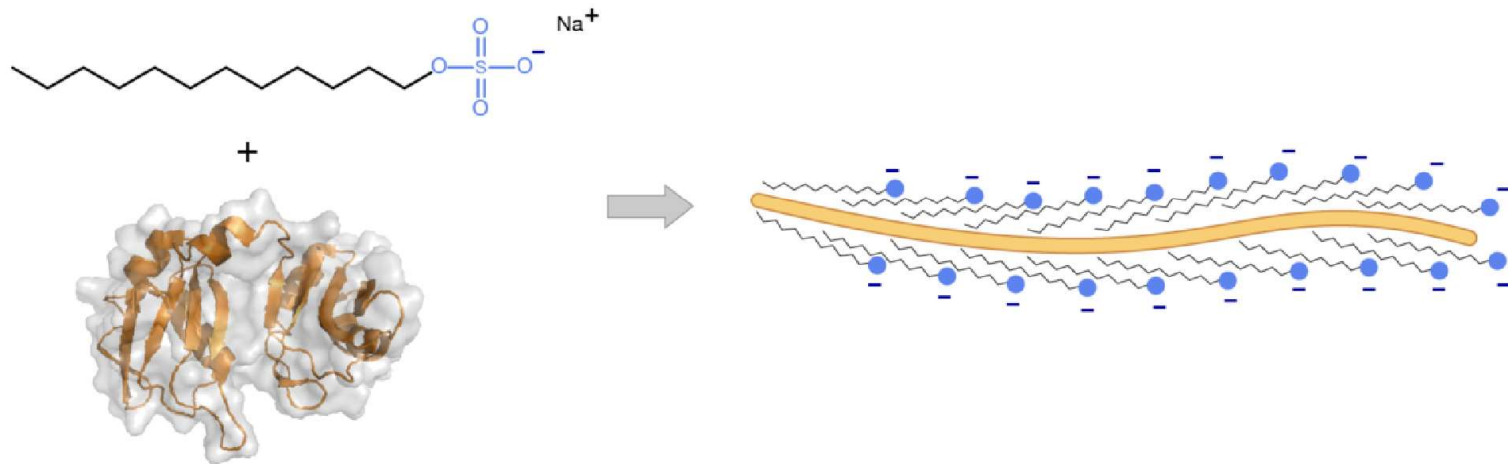
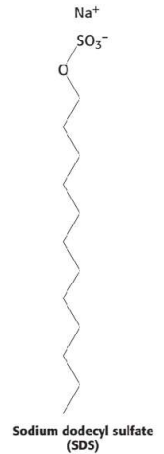
SDS-PAGE

- Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
- SDS: detergente iônico que desnatura as proteínas. Intercala-se na sequência proporcionalmente ao número de resíduos de aminoácidos (logo, proporcional à massa molecular)



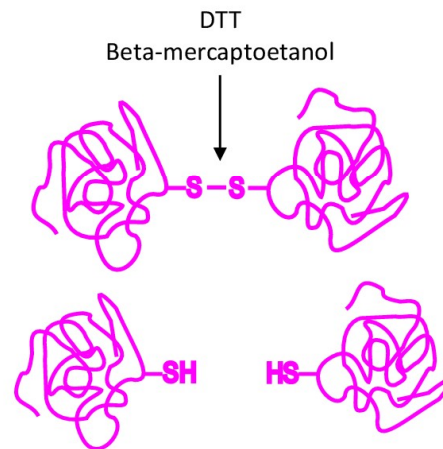
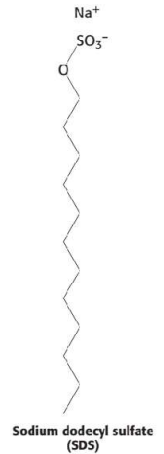
SDS-PAGE

- Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
- As proteínas passam a ter um balanço total de cargas negativo e proporcional à sua massa molecular.

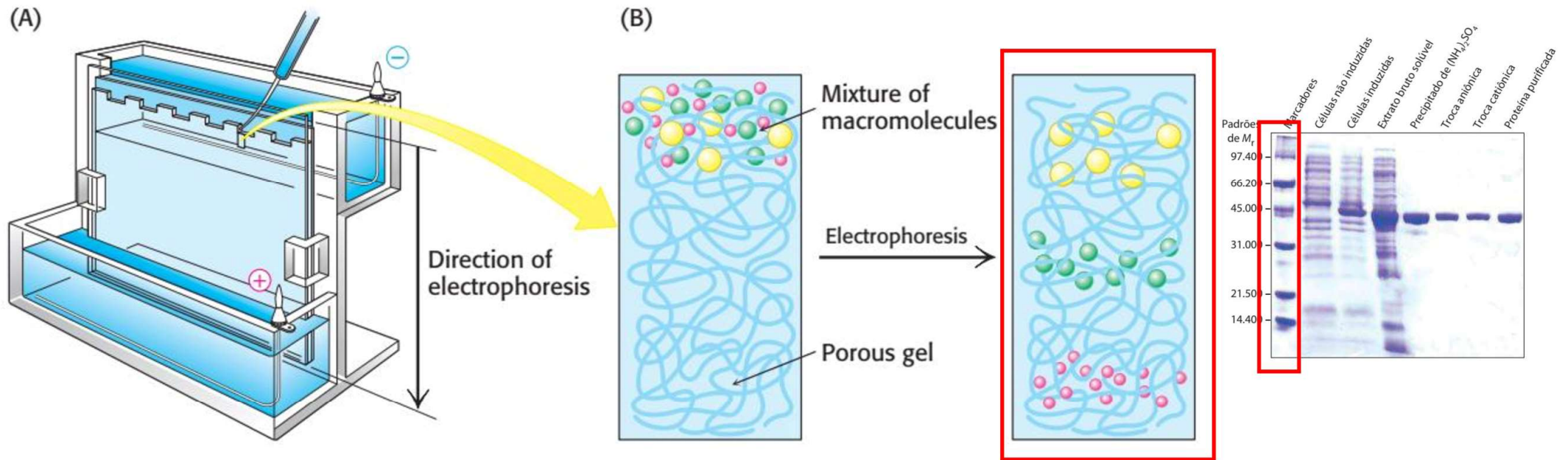


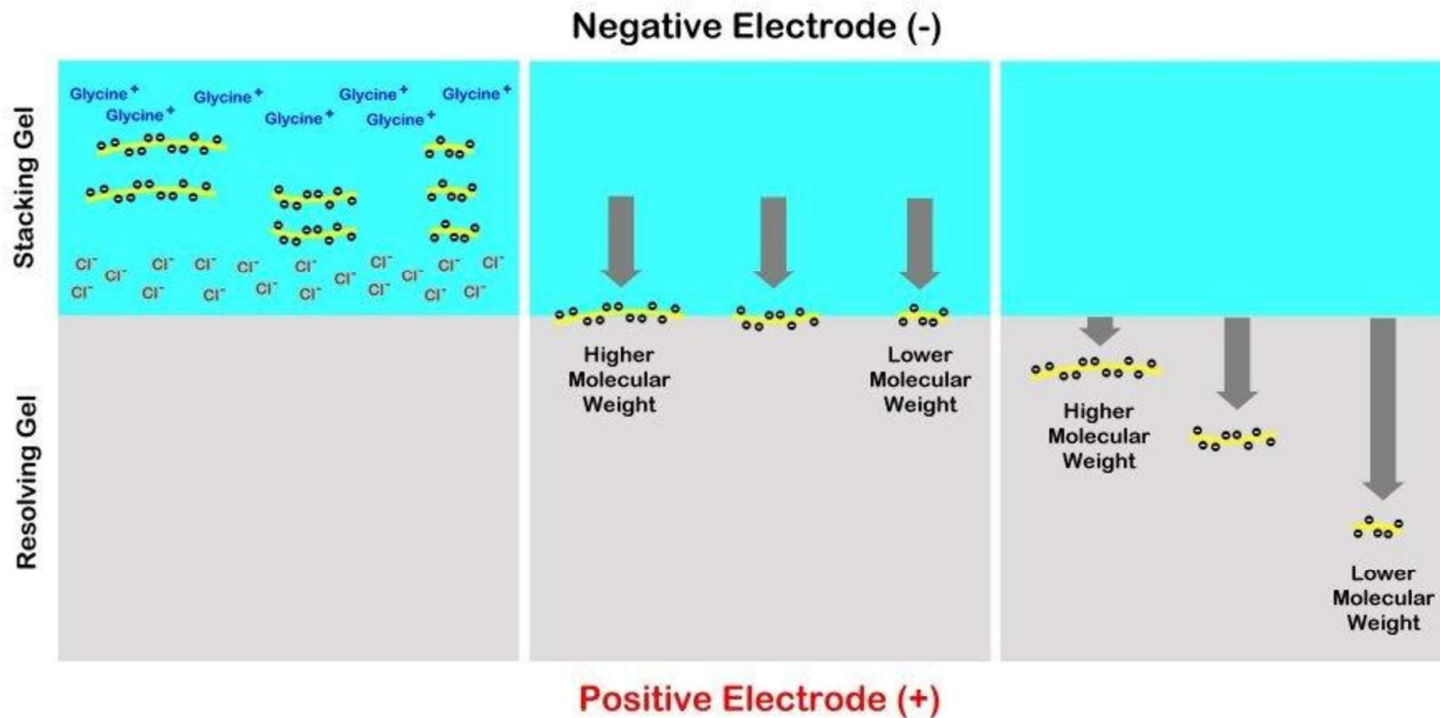
SDS-PAGE

- Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
- Uso de agentes redutores para desfazer pontes dissulfeto.
- Aquecimento da amostra a 95 °C para completa desnaturação.



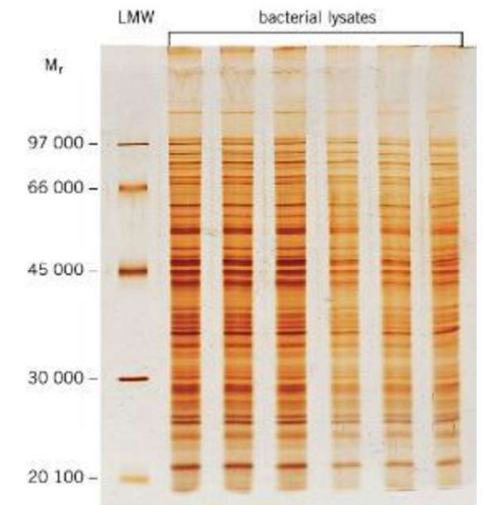
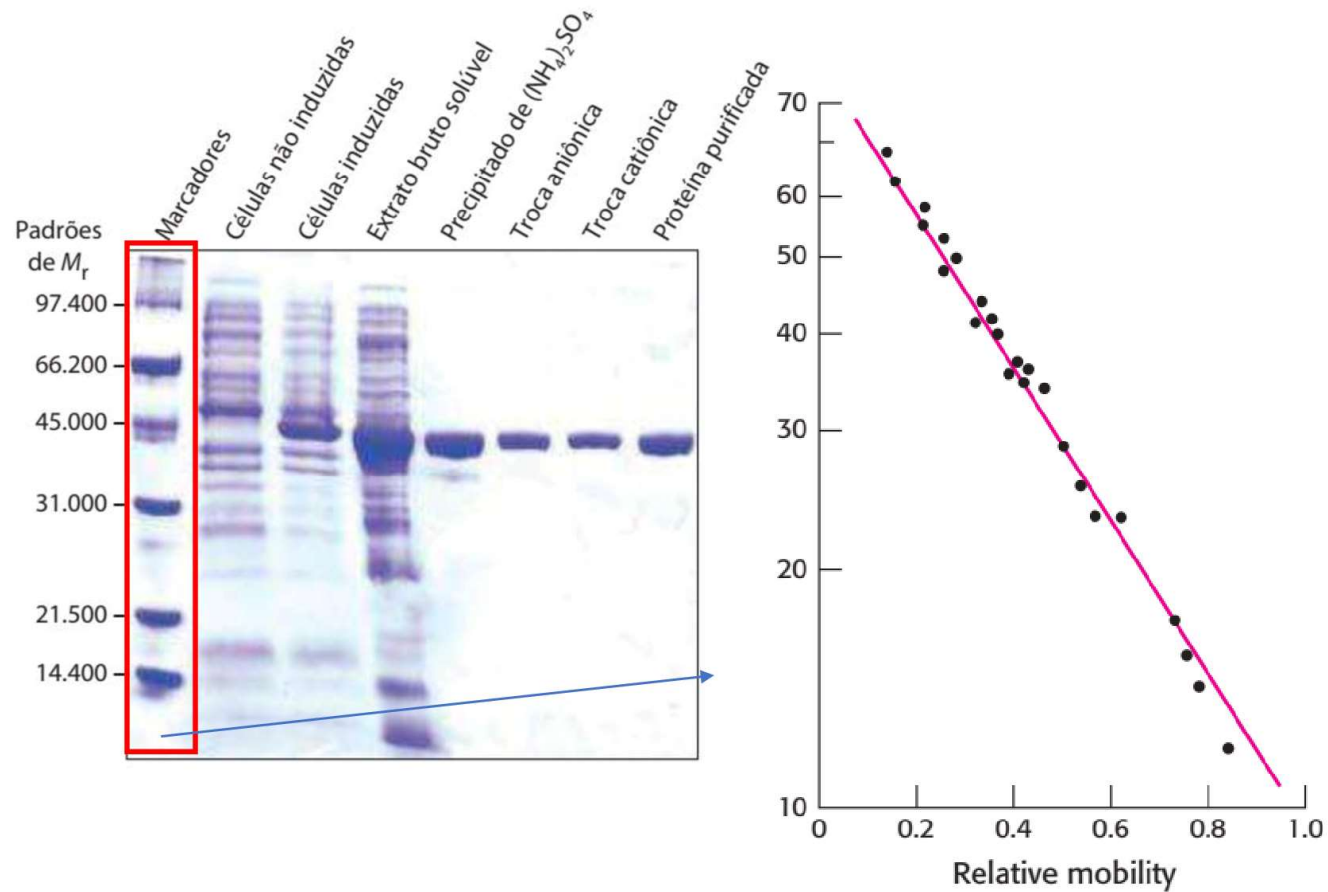
SDS-PAGE





- **Gel de empilhamento:** ordenar todas as proteínas antes de entrarem no gel de separação (isotacoforese).
- Possui pH ligeiramente ácido (6,8) e menor concentração de poliacrilamida (4%).
- **Gel de separação:** pH alcalino 8,8 e maior concentração de poliacrilamida (12%). É possível variar de acordo com necessidade.

SDS-PAGE

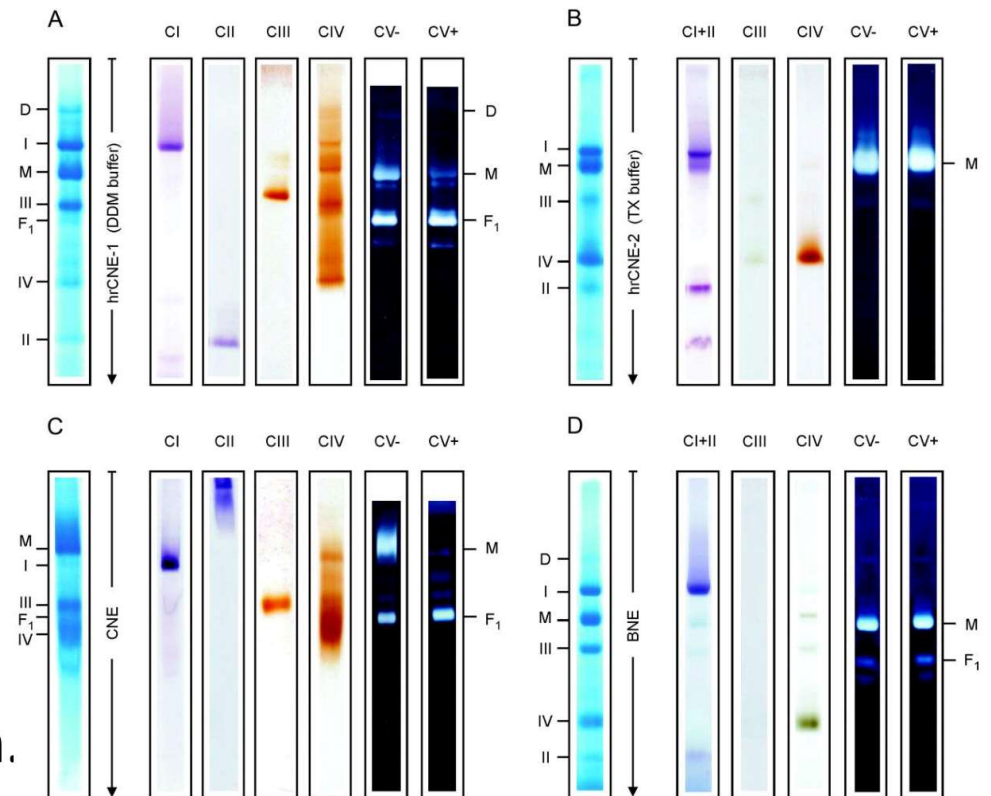


Determinação da massa molecular a partir de uma amostra padrão (marcadores).

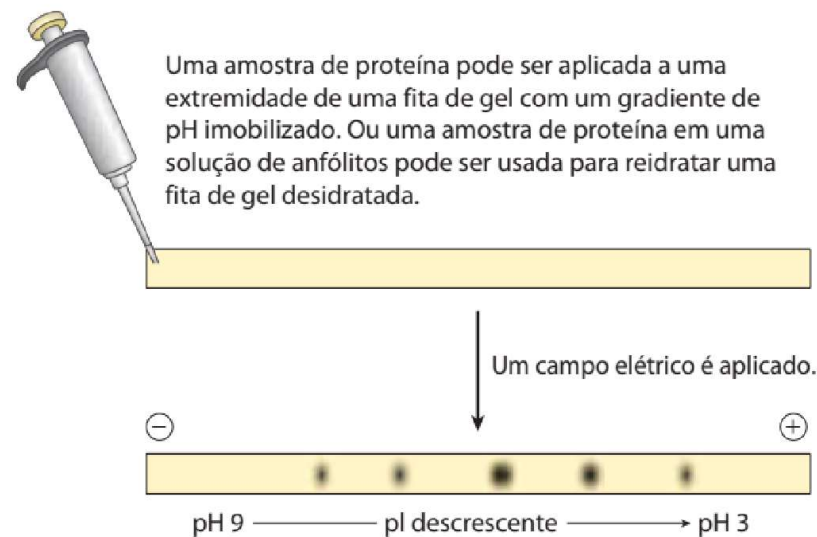
Coloração com reagentes específicos: **Coomassie Blue (esq)**, **Nitrato de Prata** (dir, mais sensível e mais trabalhosa)

Eletroforese (nativa) em gel de poliacrilamida

- Native PAGE
- Separação das moléculas por carga
- Não desnatura as proteínas.
- Atividade enzimática pode ser observada.
- Complexos de proteínas e oligômeros não são desfeitos

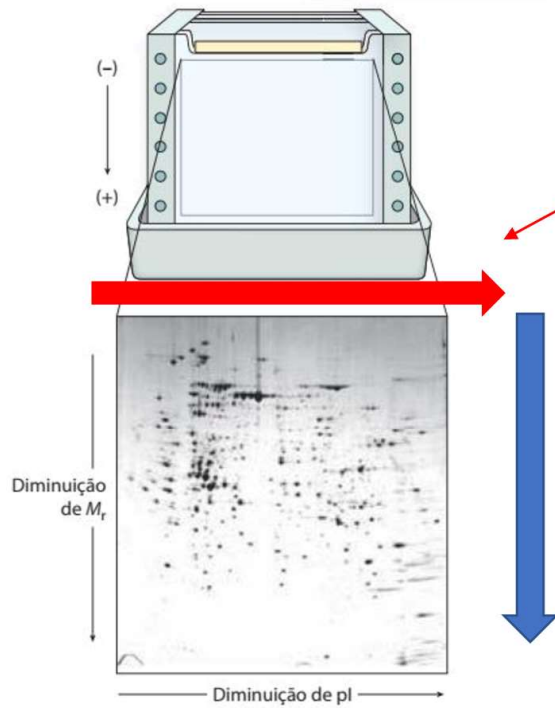
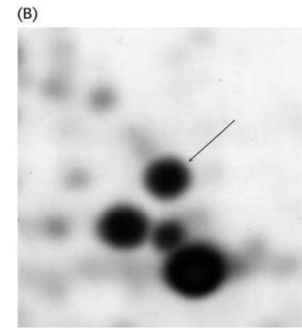
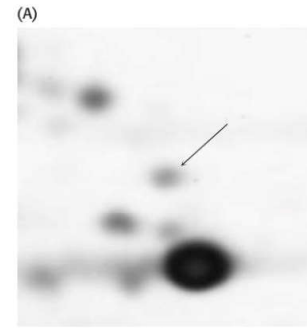
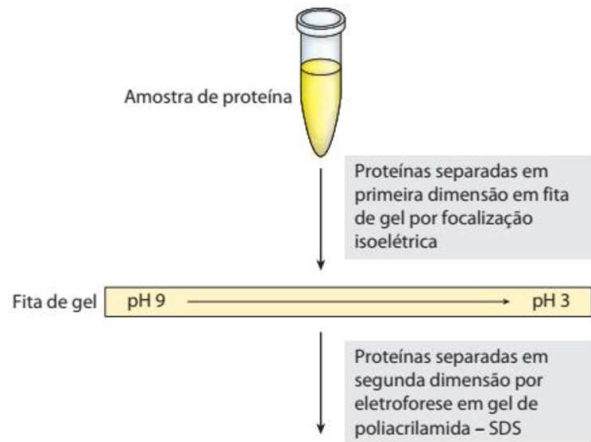


Focalização isoelétrica



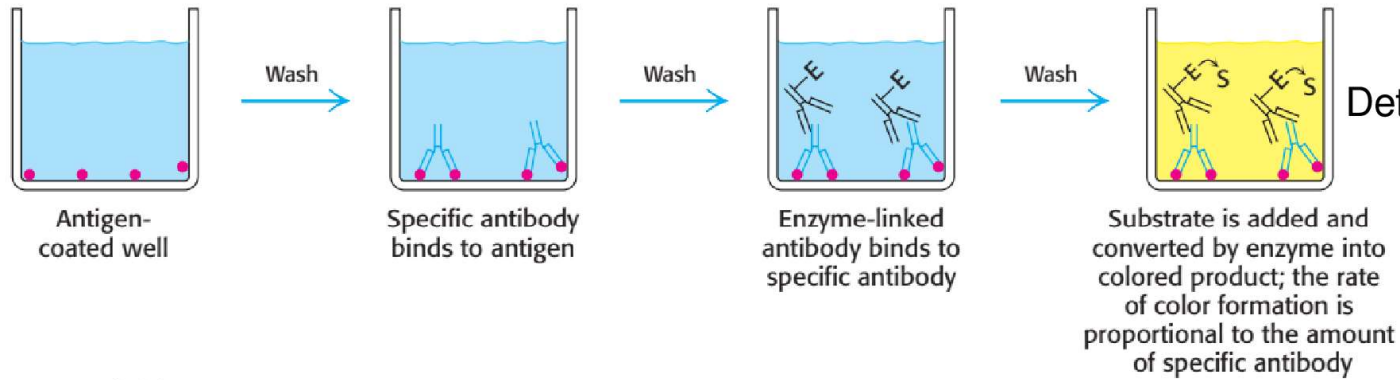
Após serem coradas, as proteínas são mostradas distribuídas ao longo do gradiente de pH segundo seus valores de pH.

FIGURA 3-20 Focalização isoelétrica. Essa técnica separa proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos. Uma mistura de proteínas é colocada em uma fita de gel contendo um gradiente de pH imobilizado. Com a aplicação de um campo elétrico, as proteínas entram no gel e migram até que cada uma atinja um pH equivalente ao seu pI. Lembre-se que quando o pH = pI, a carga final de uma proteína é zero.



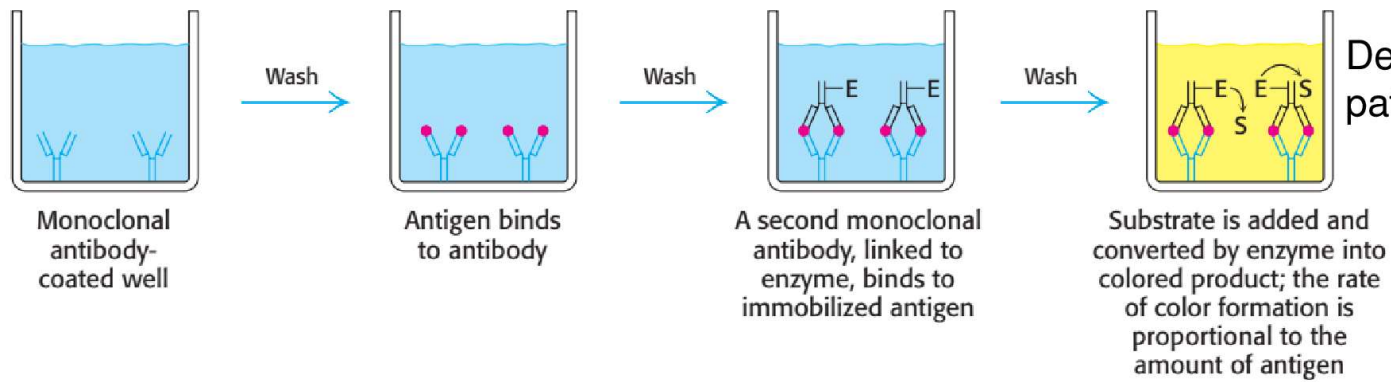
Separação bidimensional, primeiro por ponto isoeétrico, depois por massa molecular.

(A) Indirect ELISA

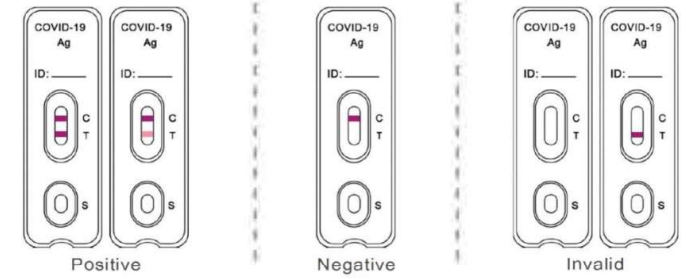
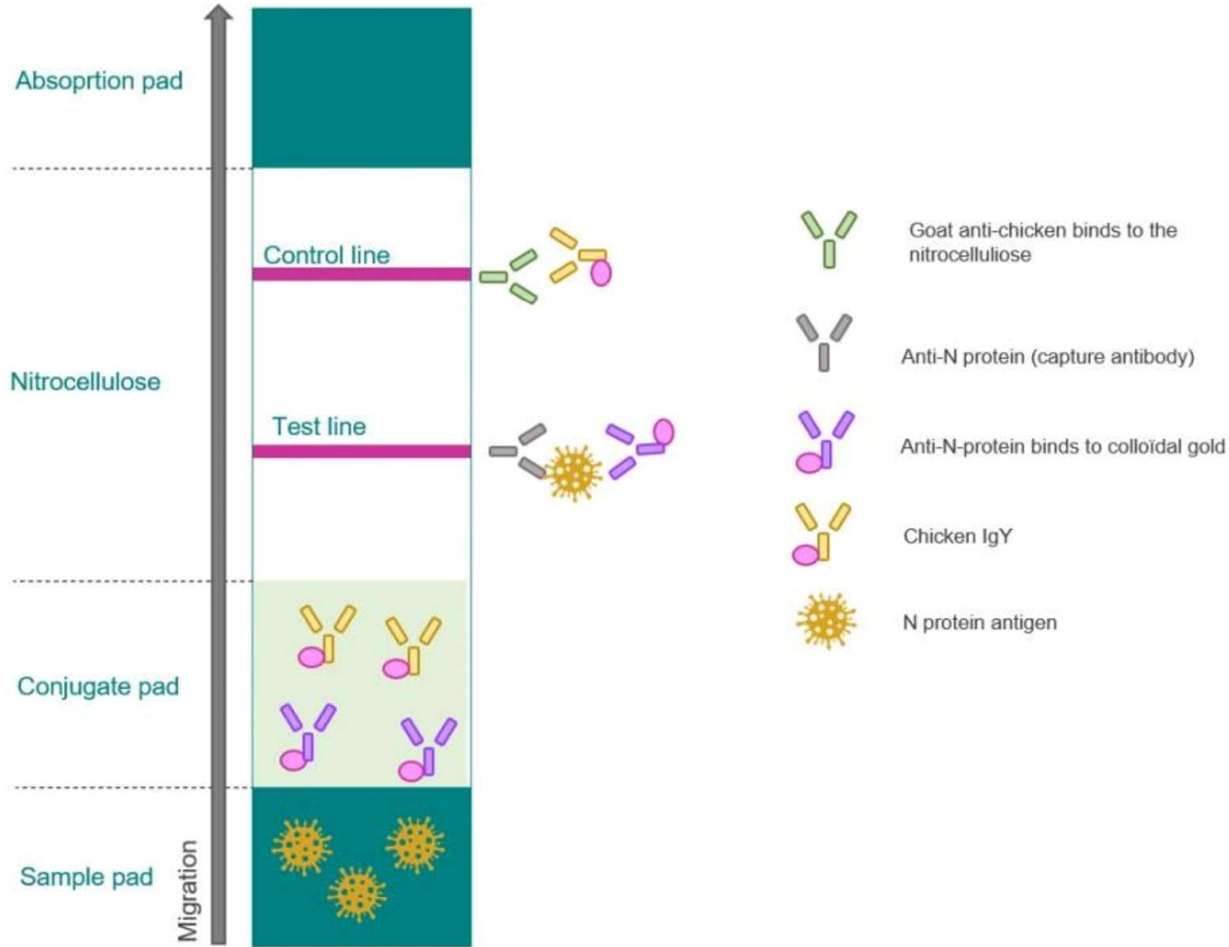


Detecção de anticorpo para uma patologia

(B) Sandwich ELISA

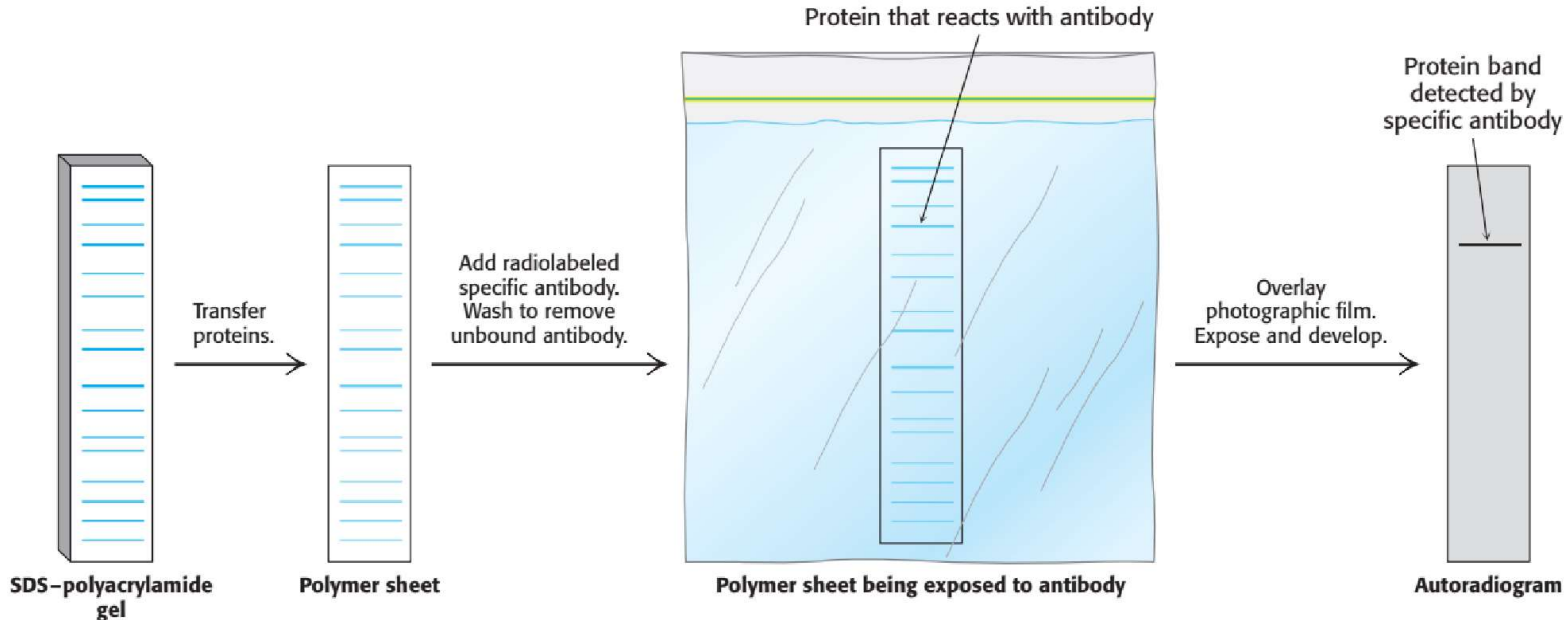


Detecção do microrganismo para uma patologia

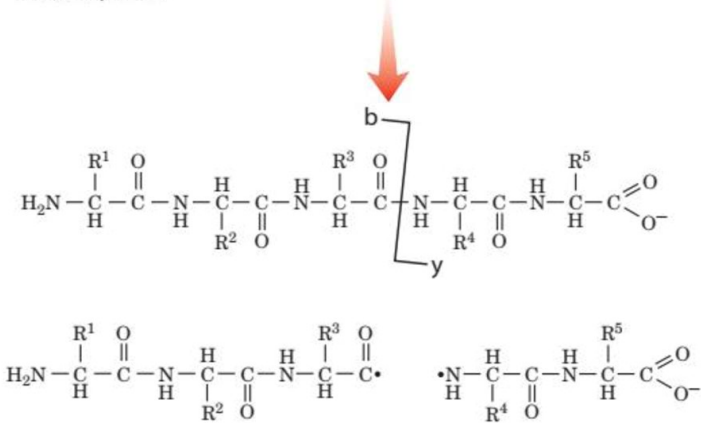
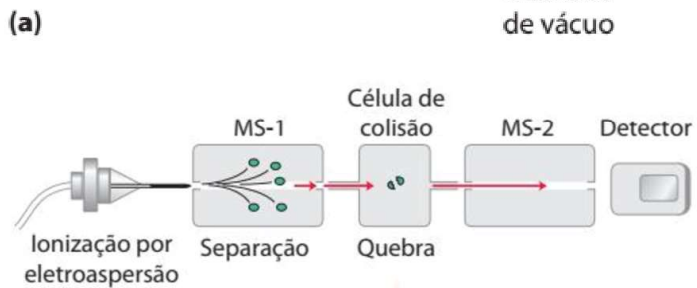
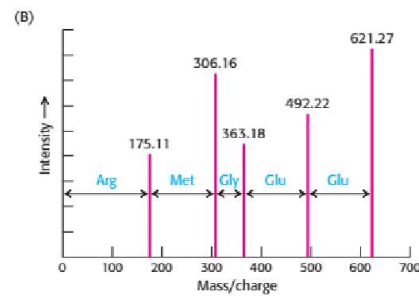
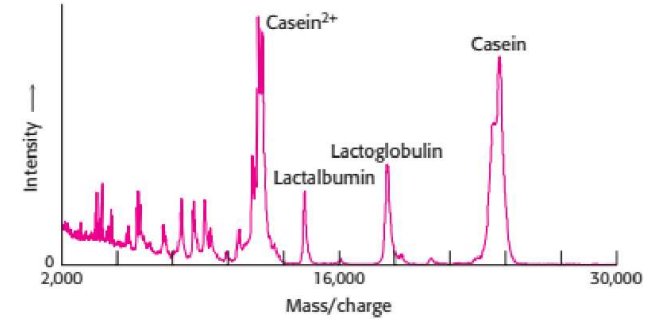
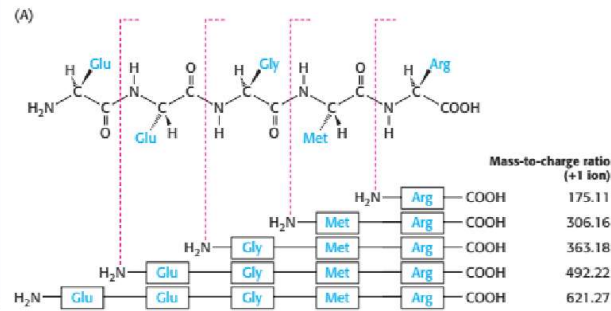
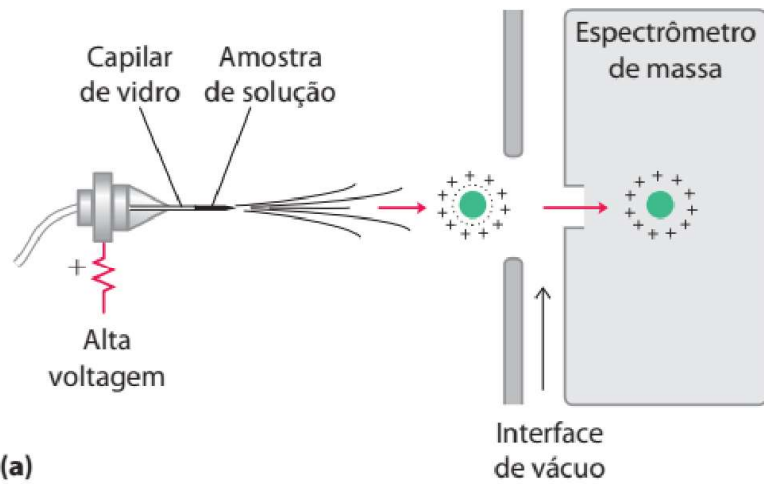


Imuno-cromatografia para detecção de antígenos de SARS-CoV 2

Western blotting



Sequenciamento de proteínas por espectrometria de massa



Cristalografia por difração de raios X

Determinação da estrutura tridimensional

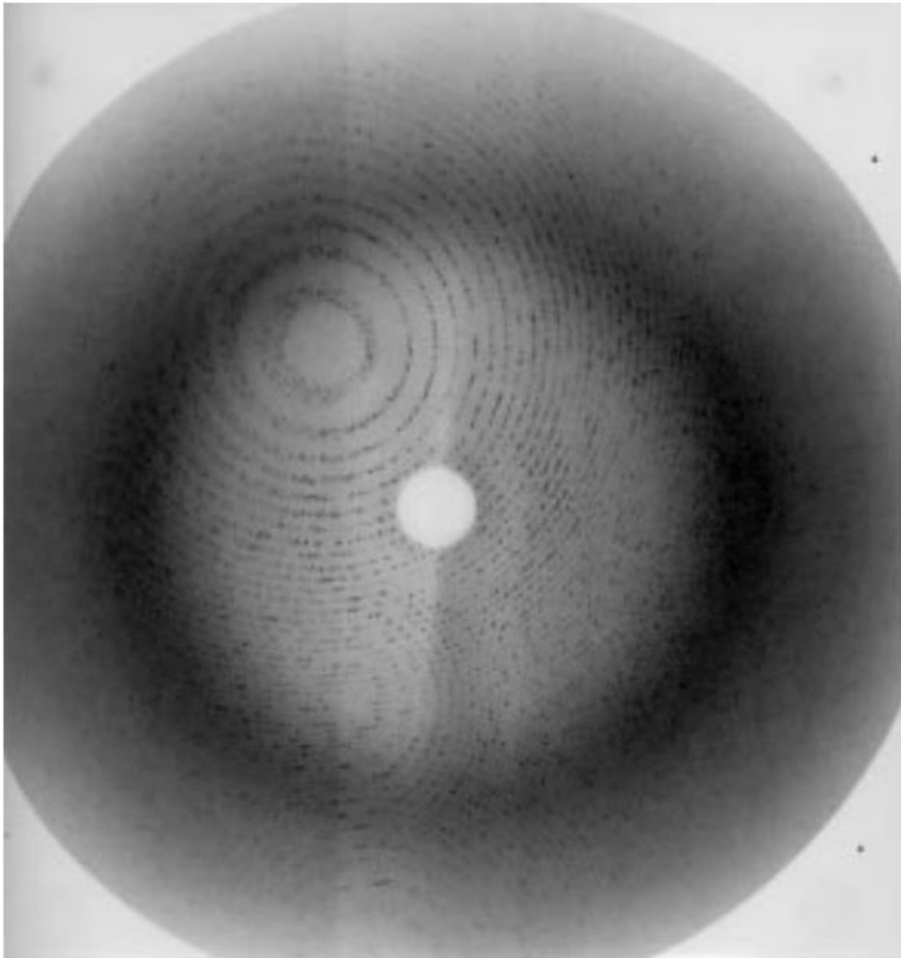
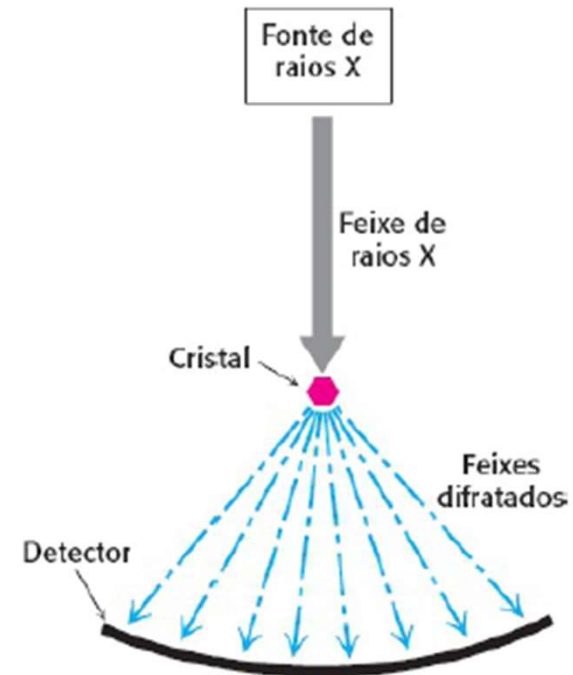
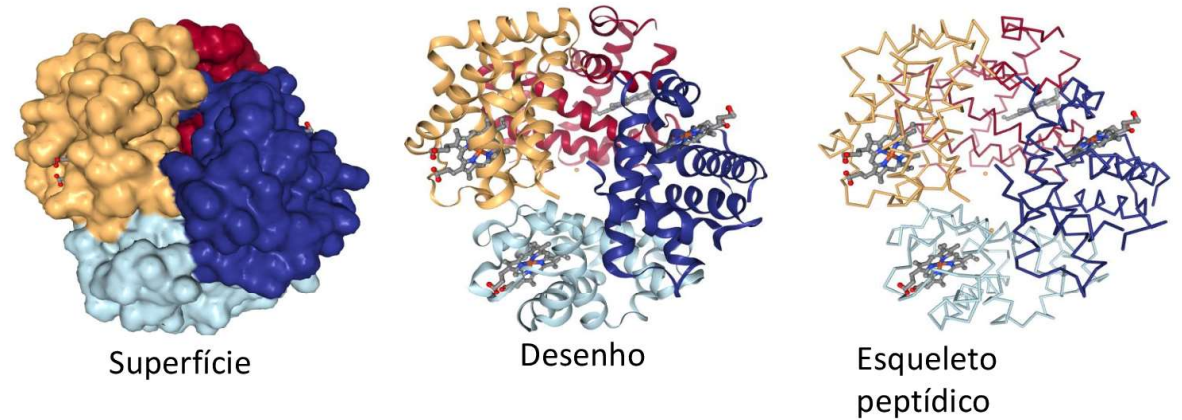


Figure 4 x Ray diffraction photograph taken at PX7.2, Daresbury Laboratory, Cheshire, UK, of bovine enterovirus¹⁶ with 0.5° oscillation range and maximum resolution at the edge of the film of 2.8 Å. The x ray wavelength was 1.488 Å.

A proteína deve estar sob a forma de cristal.

Elétrons dispersam raios x proporcionalmente (densidade eletrônica).

A intensidade dos reflexos e suas posições são convertidas na posição espacial dos átomos



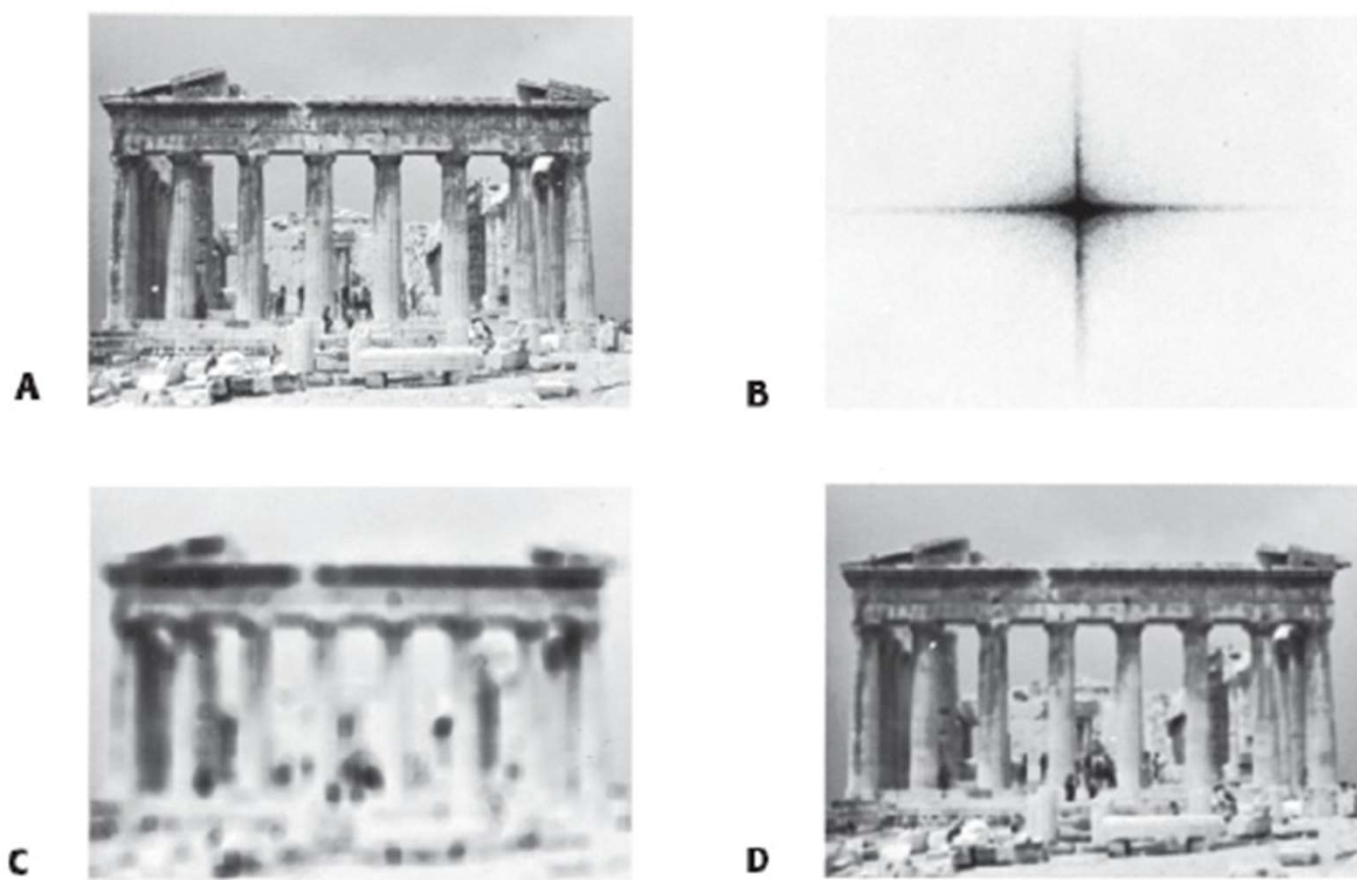


Figura 3.43 A resolução afeta a qualidade de uma imagem. O efeito da resolução sobre a qualidade de uma imagem reconstruída é mostrada por uma analogia óptica da difração de raios X: A. uma fotografia do Partenon; B. um padrão de difração óptica do Partenon; C e D. imagens reconstruídas a partir do padrão em B. Mais dados foram usados para obter a imagem D do que a C, o que explica a melhor qualidade da imagem D. [Cortesia do Dr. Thomas Steitz (parte A) e Dr. David DeRosier (parte B).]