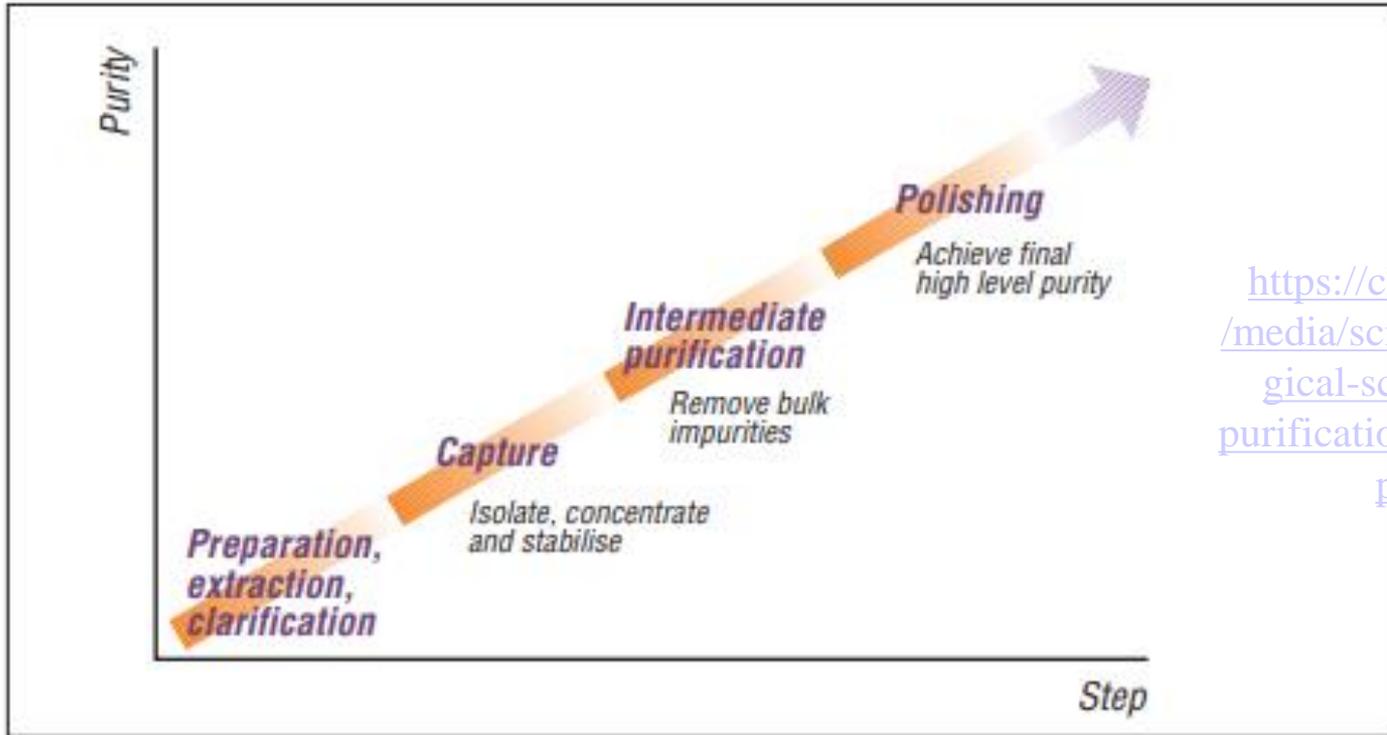


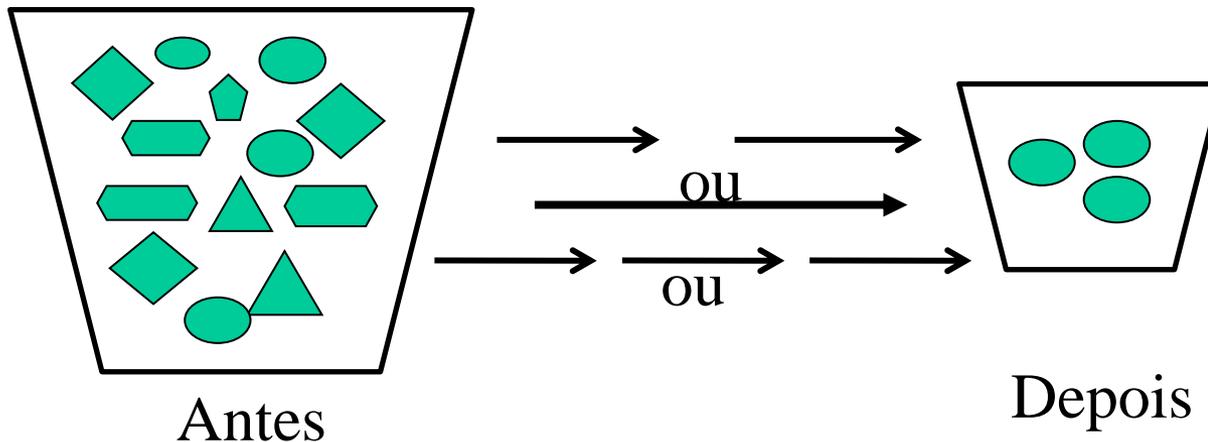
Purificação de proteínas

QBQ-1453/2019



<https://cloudfront.ualberta.ca/-/media/science/departments/biological-sciences/mbsu/protein-purification-and-fplc/gen-protein-purification.pdf>

Fig. 2. Preparation and the Three Phase Purification Strategy



Como fazer?
1. Fundamentos
2. Prática

Separações Cromatográficas

Origem → cromatografia de adsorção → 1903
botânico russo Mikhail Tswett → separação de
pigmentos de folhas vegetais em solução através do uso
de adsorventes sólidos ($CaCO_3$, *inulina*, *alumina*/ Al_2O_3)
→ bandas coloridas de pigmentos

cromatografia (do grego *croma* = cor
graphein = escrever)



Mikhail Tswett

(russo + turca = italiano)

Indicação: **Prêmio Nobel**
em Química de 1918 pela
pesquisa com clorofilas

<http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n1a1.pdf>

Cromatografia em papel unidimensional

Separa compostos polares de baixa MW

Aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e oligonucleotídeos

Ascendente e descendente

papel → polar → fase estacionária

Solvente apolar → fase móvel

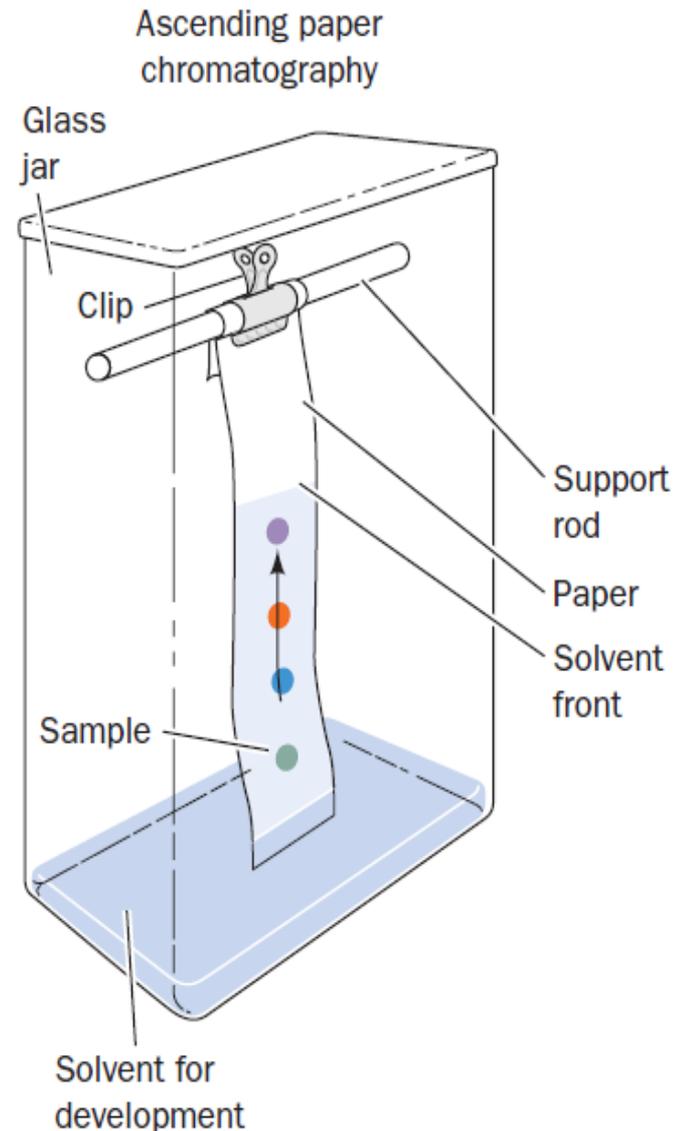
Interação química predominante:

partição dos compostos entre as fases

Detecção/Revelação → fluorescência, reação com compostos que gerem produtos coloridos.

Taxa de migração, fator de retenção:

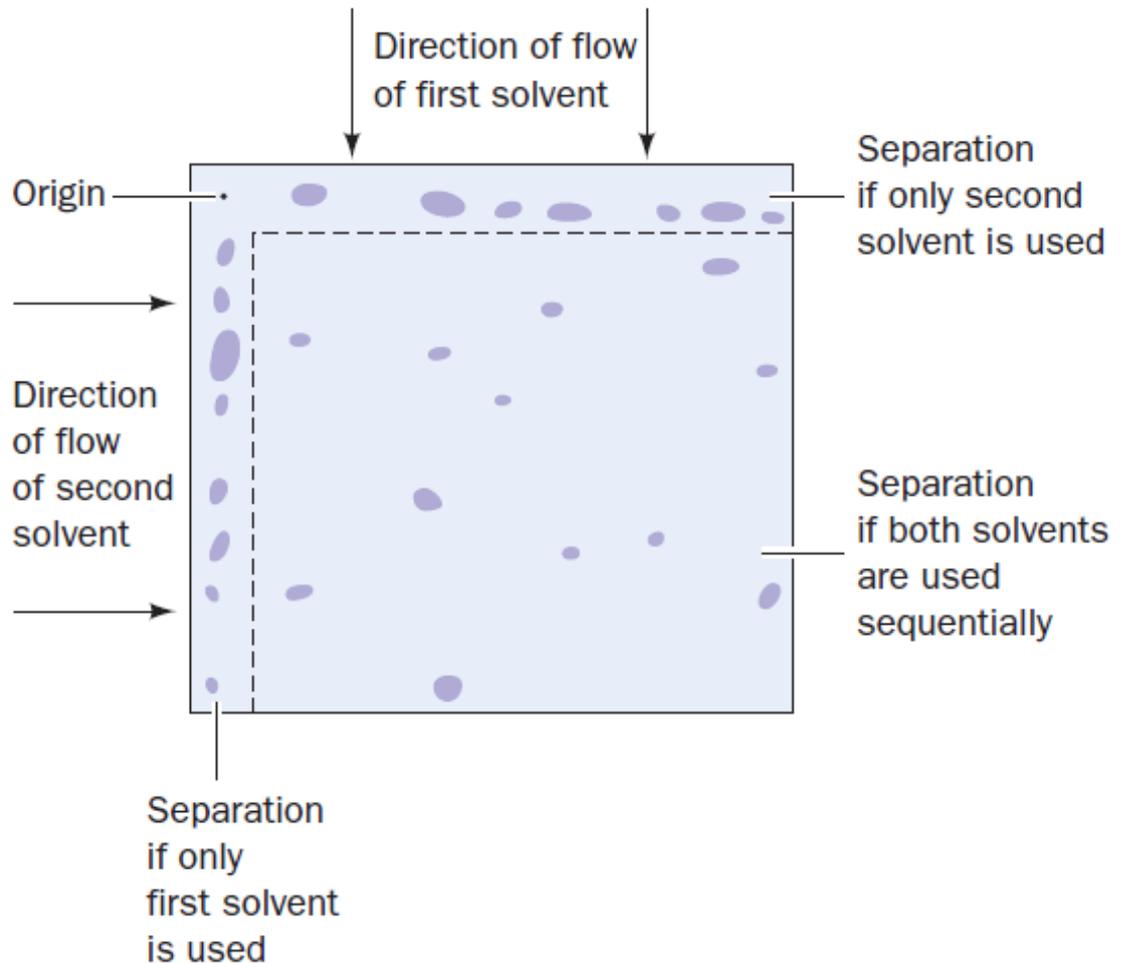
$$R_f = \frac{\text{distance traveled by substance}}{\text{distance traveled by solvent front}}$$



Cromatografia em papel bidimensional

Amostra aplicada em um canto do papel

Após secagem da 1ª cromatografia, papel é girado a 90° e uma nova corrida é feita utilizando outra mistura de solventes



Cromatografia em camada delgada unidimensional (CCD ou TLC)

Separação de compostos orgânicos

Lipídeos, aminoácidos e os seus derivados

Sólido (sílica, celulose, alumina) espalhado sobre placa de vidro ou plástico → fase estacionária

Solvente mais apolar → fase móvel

Interação química predominante: **adsorção na fase estacionária**

Também se faz a TLC ou CCD bidimensional



Além de separar, pode identificar só se forem usados padrões que permitam comparações diretas

Para purificar proteínas:

1ª. Etapa: Precipitação desses biopolímeros

(propriedade explorada para a separação: solubilidade)

Série de Hofmeister

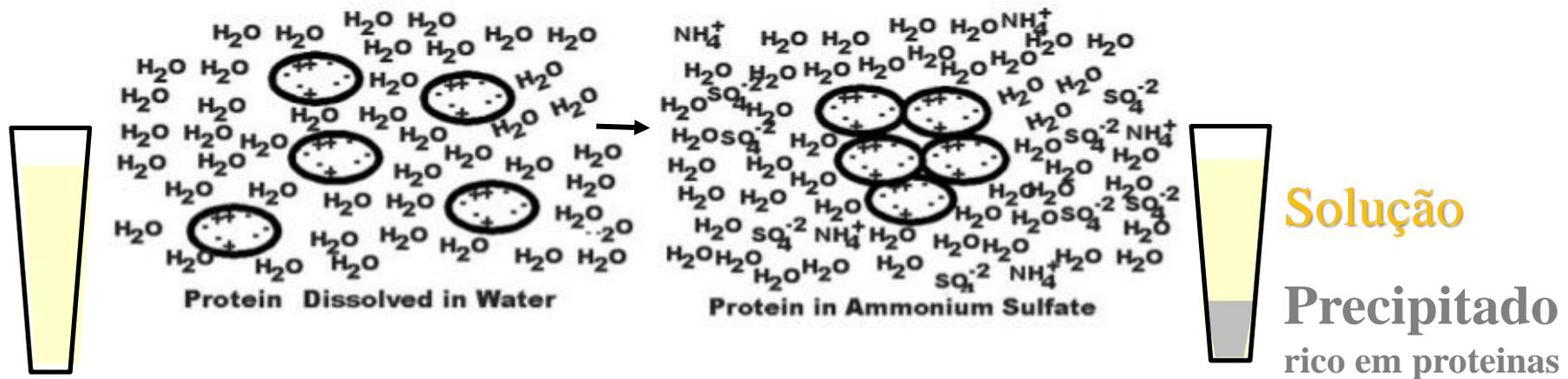
Cátions:

NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Li^+ > Mg^{+2} > Ca^{+2} > guanidina

Efeito precipitante

Ânions:

SO_4^{-2} > HPO_4^{-2} > acetato > citrato > tartarato > Cl^- > NO_3^- > SCN^-

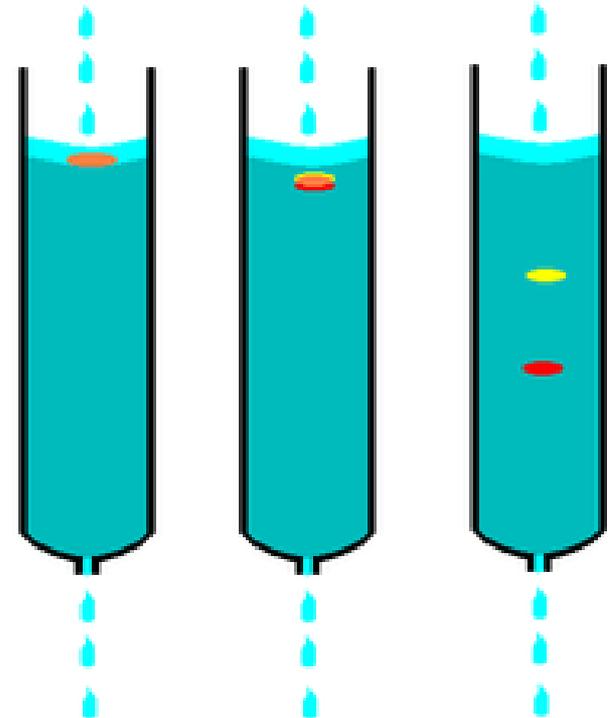
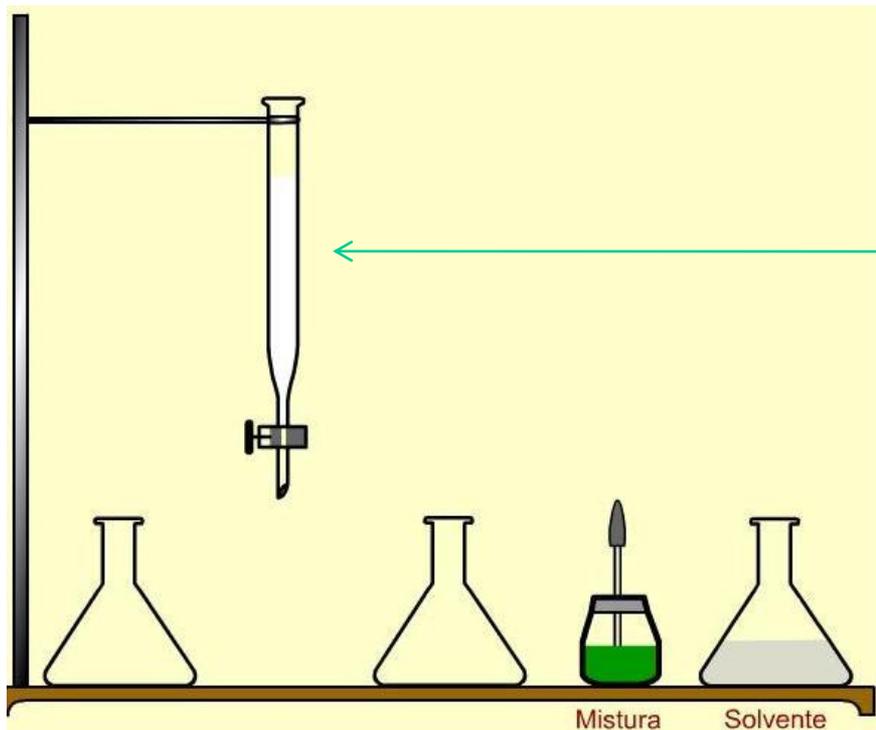


“Salting-out”

2ª. Etapa: Cromatografia em coluna

A amostra contendo a **mistura de proteínas** é **dissolvida em solução aquosa**. Esta é colocada em contato com um **suporte sólido poroso** (fase estacionária) e os seus componentes proteicos são **eluídos do suporte com uma solução aquosa** (fase móvel ou eluente).

A **separação** ocorre devido a diferenças entre as **propriedades das diferentes proteínas** contidas na amostra cromatografada.



Propriedades exploradas para a separar proteínas (*peptídeos*) em coluna:

Tamanho (massa molar)

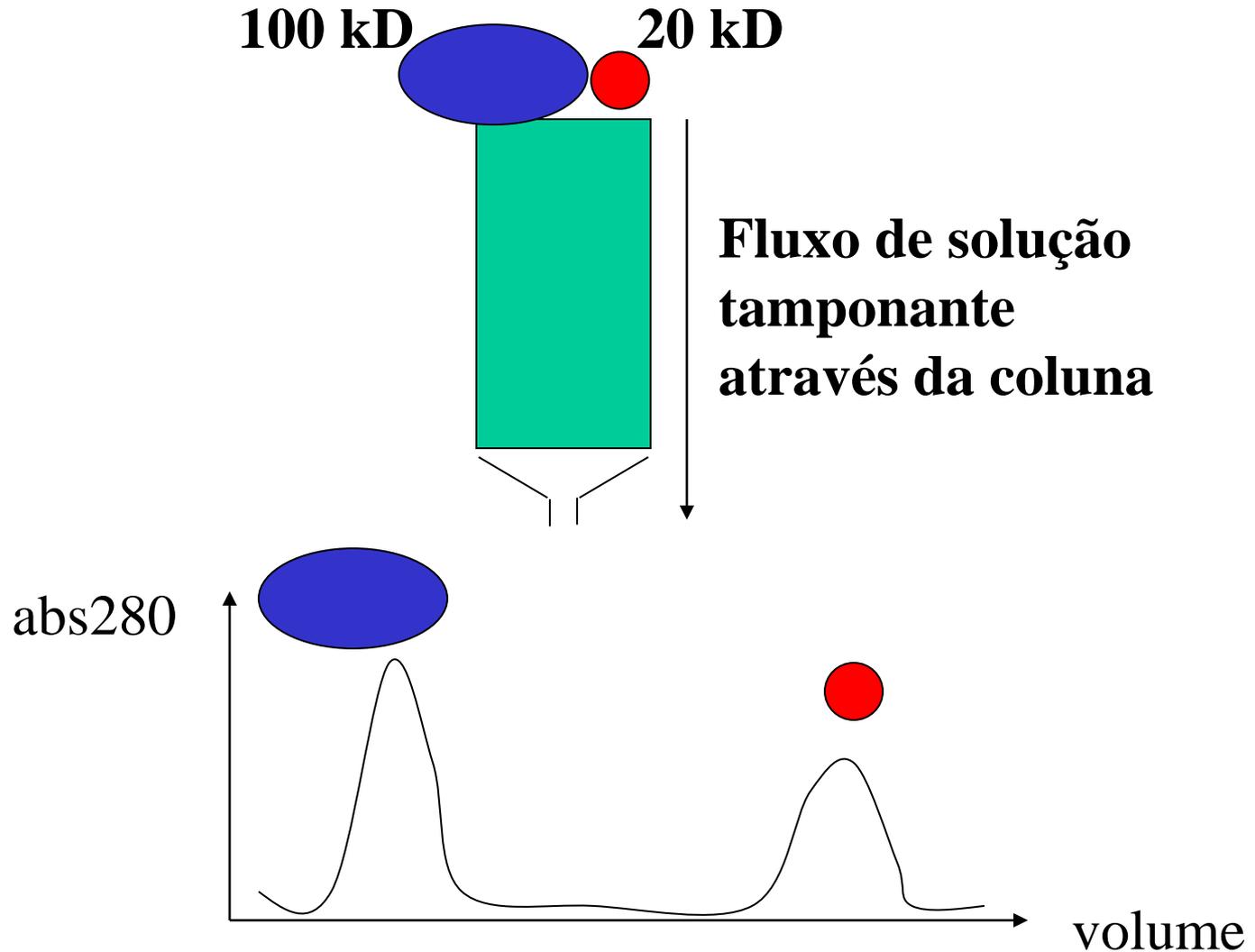
Carga líquida

Polaridade (hidrofobicidade)

Afinidade química (especificidade)

Filtração em Gel ou Cromatografia de Exclusão Molecular

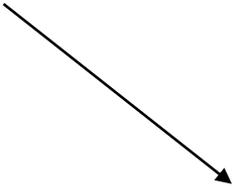
Propriedade: tamanho



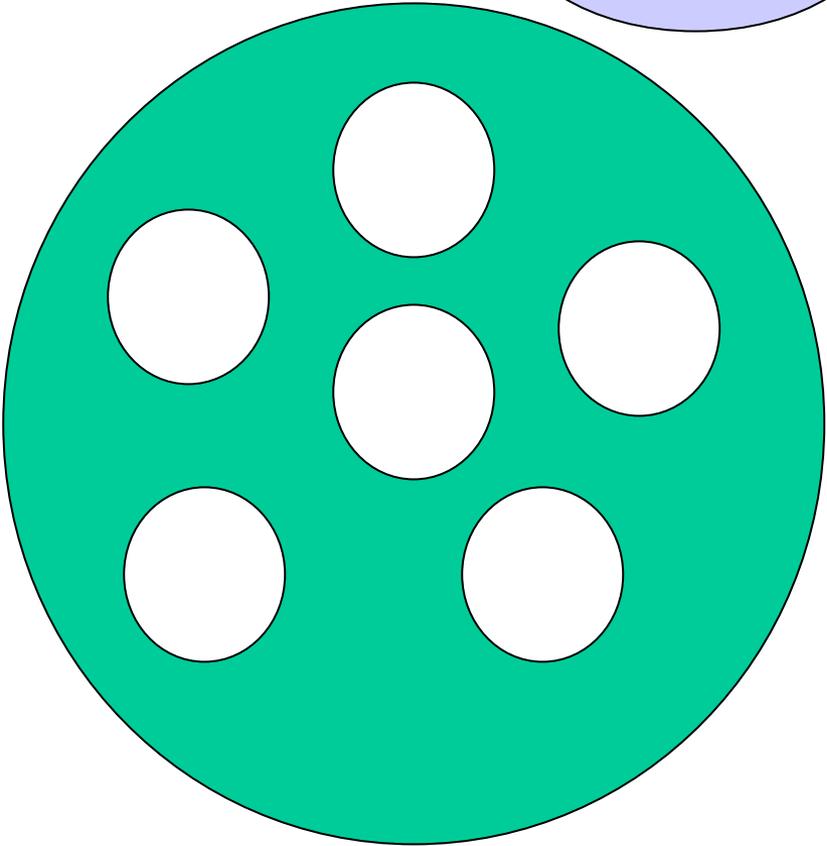
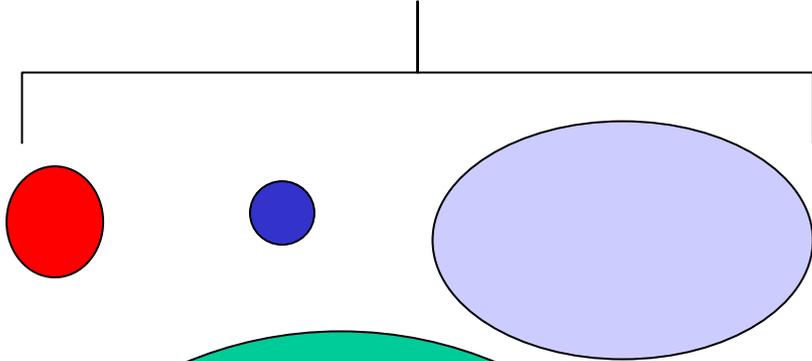
Resina ou suporte
colocado na coluna



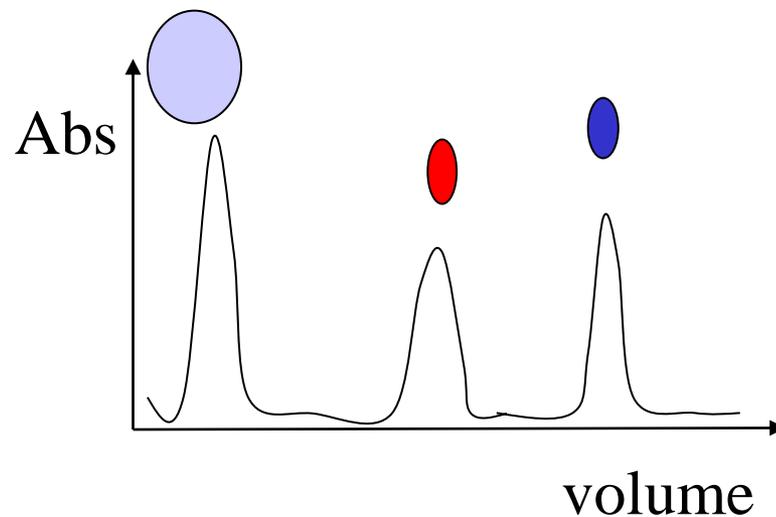
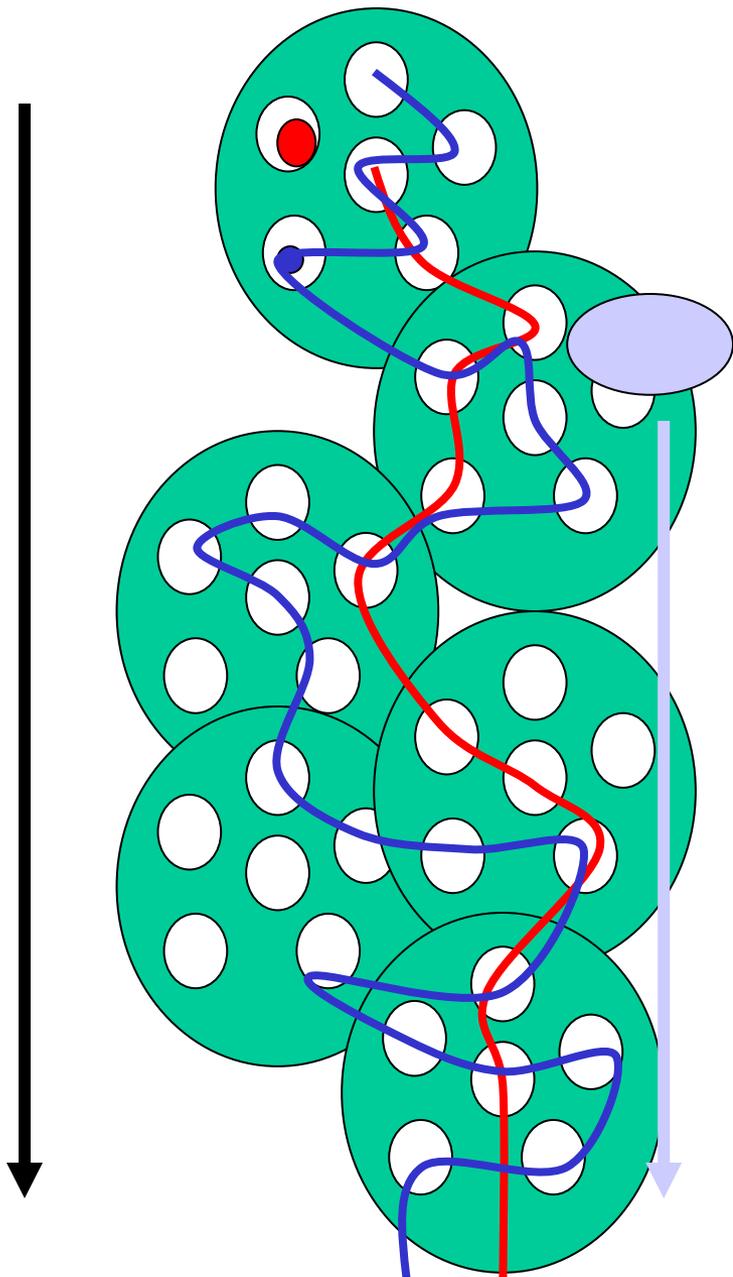
5 μm



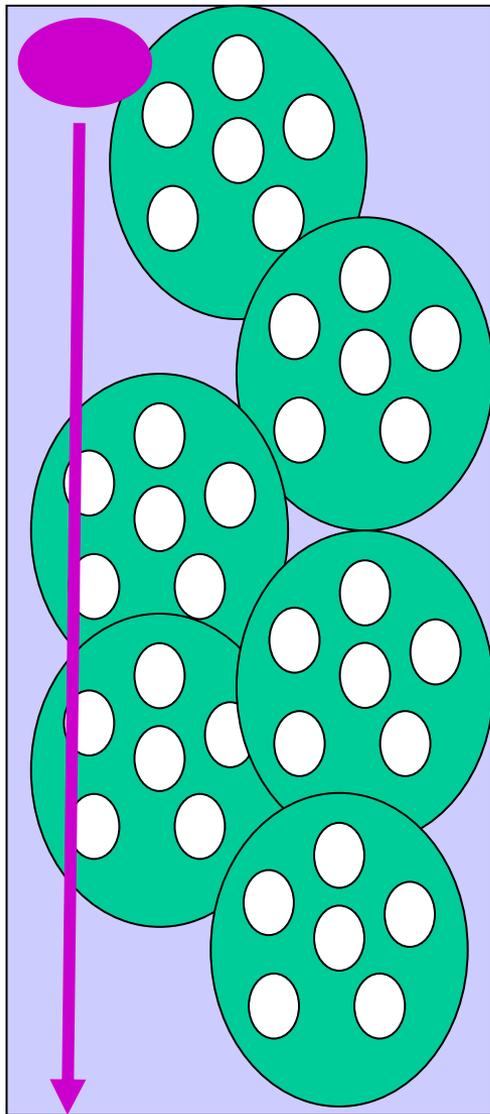
amostra



fluxo



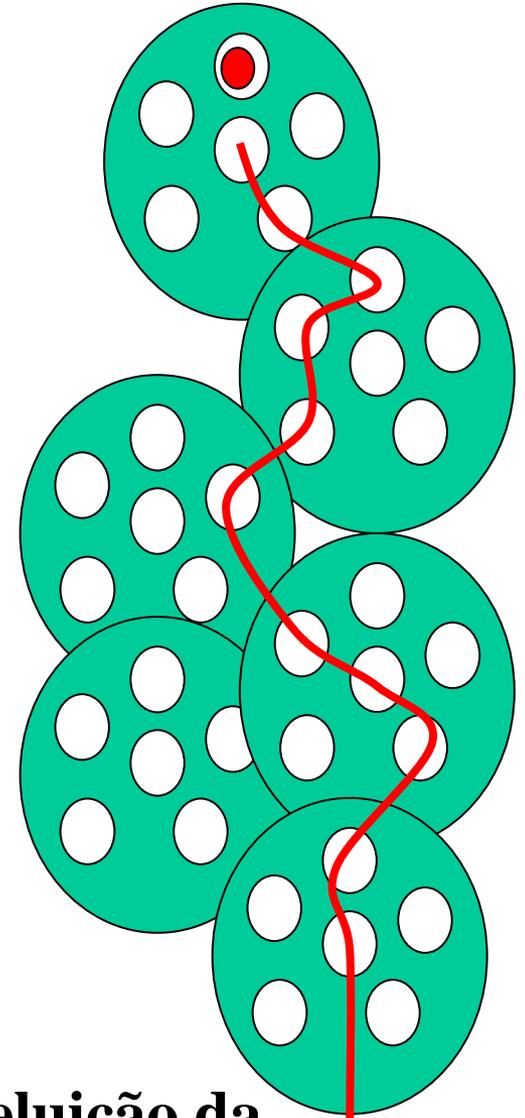
- Análise das frações obtidas (eletroforese)
- Ensaio funcional das frações



$v_0 =$ volume morto ou “void”.

Volume no qual são eluídas proteínas totalmente excluídas dos poros das resinas. Corresponde ao **volume externo aos grãos da resina**

Pode ser medido usando macromoléculas muito grandes, em geral “blue dextrana” (*massa molar na ordem de milhões de Daltons*)



$v_e =$ volume de eluição da amostra (proteína de interesse)

Tipos de resinas comerciais e sua seletividade:

As dimensões dos poros da matriz determinam a faixa de massa molar das proteínas que podem ser separadas na cromatografia

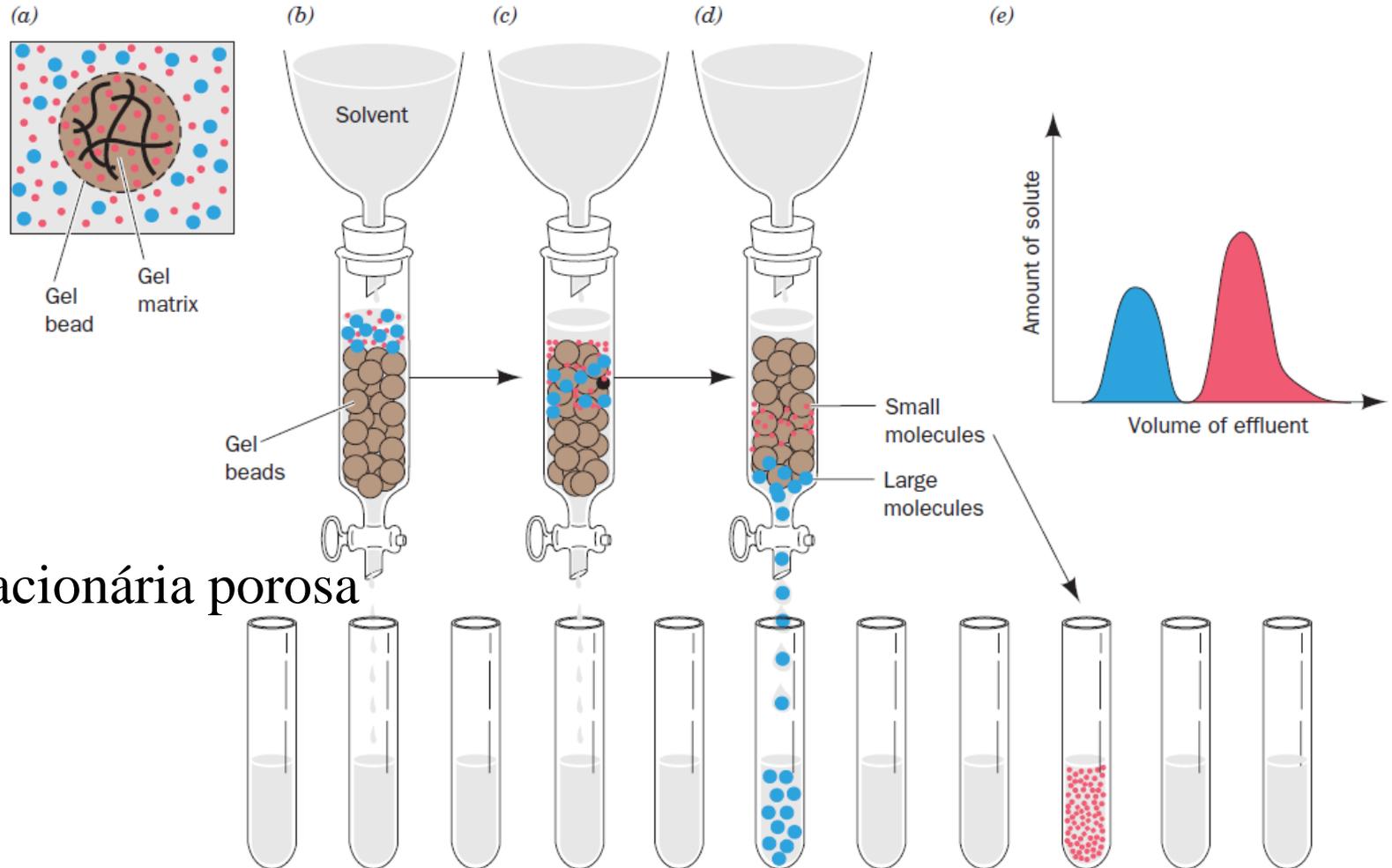
Table 6-3 Some Commonly Used Gel Filtration Materials

Name ^a	Type	Fractionation Range (kD)
Sephadex G-10	Dextran	0.05–0.7
Sephadex G-25	Dextran	1–5
Sephadex G-50	Dextran	1–30
Sephadex G-100	Dextran	4–150
Sephadex G-200	Dextran	5–600
Sephacryl S-100	Dextran, cross-linked	1–100
Sephacryl S-200	Dextran, cross-linked	5–250
Sephacryl S-300	Dextran, cross-linked	4–150
Sephacryl S-400	Dextran, cross-linked	20–8000
Bio-Gel P-2	Polyacrylamide	0.1–1.8
Bio-Gel P-6	Polyacrylamide	1–6
Bio-Gel P-10	Polyacrylamide	1.5–20
Bio-Gel P-30	Polyacrylamide	2.5–40
Bio-Gel P-100	Polyacrylamide	5–100
Sepharose 6B	Agarose	10–4,000
Sepharose 4B	Agarose	60–20,000
Sepharose 2B	Agarose	70–40,000

^aSephadex, Sephacryl, and Sepharose are products of GE Healthcare; Bio-Gel gels are products of BioRad Laboratories.

Resumo: Cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel ou peneira molecular em gel ou peneira molecular

Separação por tamanho (e forma tb conta)



Fase estacionária porosa

Nesta modalidade: separa e identifica pela determinação de massa molar das proteínas separadas.

Como?

Definições

v_e = volume de eluição de proteínas de PM conhecidos ou da amostra/proteína de interesse

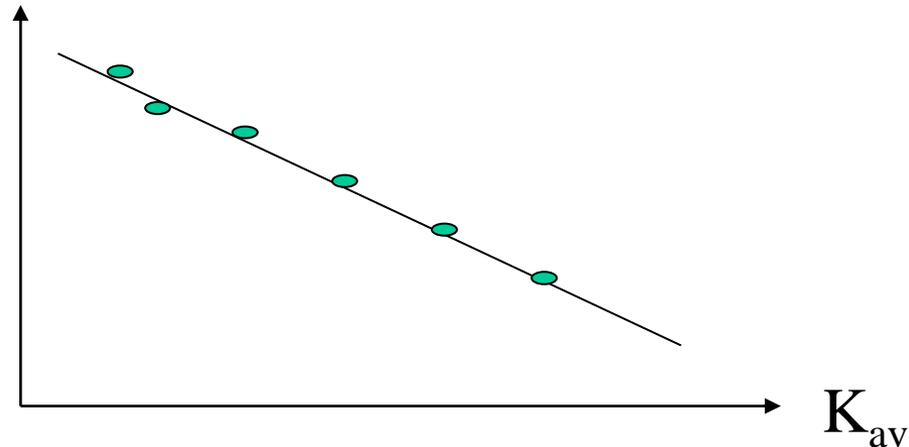
v_o = volume morto ou “void”. Volume no qual são eluídas proteínas totalmente excluídas dos poros das resinas. Corresponde ao volume externo aos grãos da resina

v_t = volume total da coluna. Pode ser calculado geometricamente a partir das dimensões da coluna.

“razão de eluição”

$$K_{av} = (v_e - v_o)/(v_t - v_o)$$

Log PM

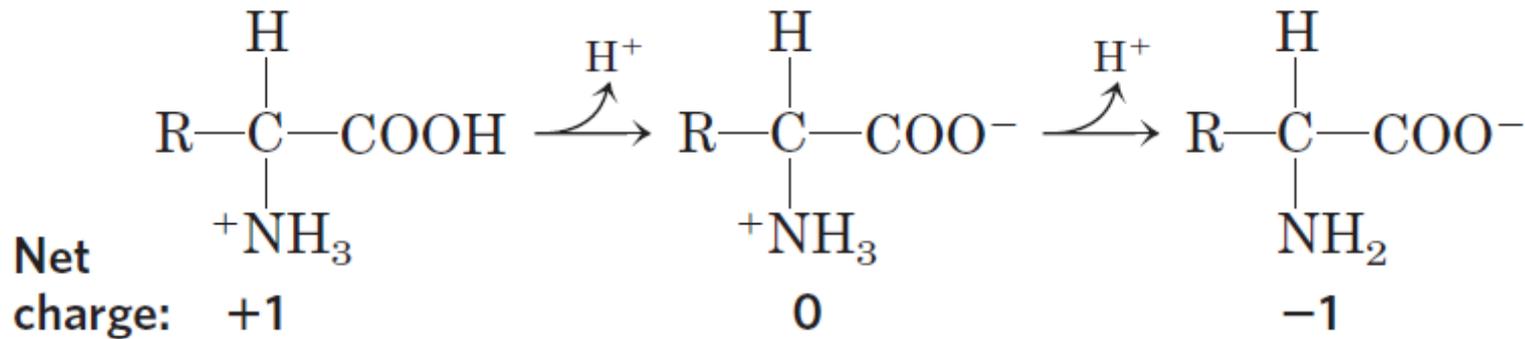


1. Calcula log PM de proteínas conhecidas
2. Faz cromatografia de todas e
3. Calcula Kav de cada uma
2. Constrói curva-Padrão e
3. ira equação de reta
4. Faz o mesmo com a amostra e usa equação de reta para saber PM

Cromatografia de Troca Iônica

Propriedade: carga líquida

Aminoácidos possuem cadeias laterais ionizáveis;
Proteínas possuem terminais C e N ionizáveis.



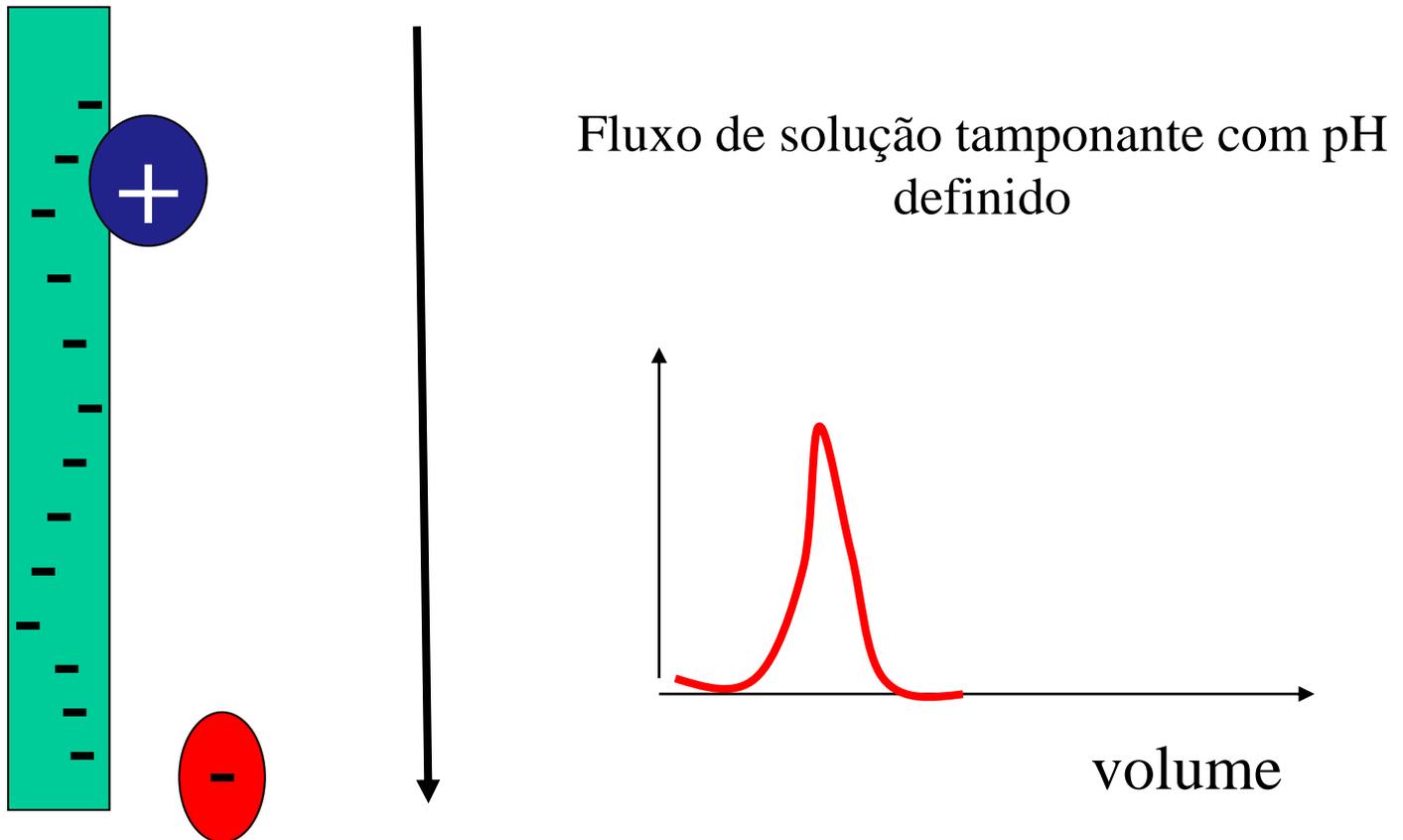
pI (ponto isoelétrico) = pH no qual o número total de cargas positivas é igual ao número total de cargas negativas. Logo, a proteína não tem carga líquida.

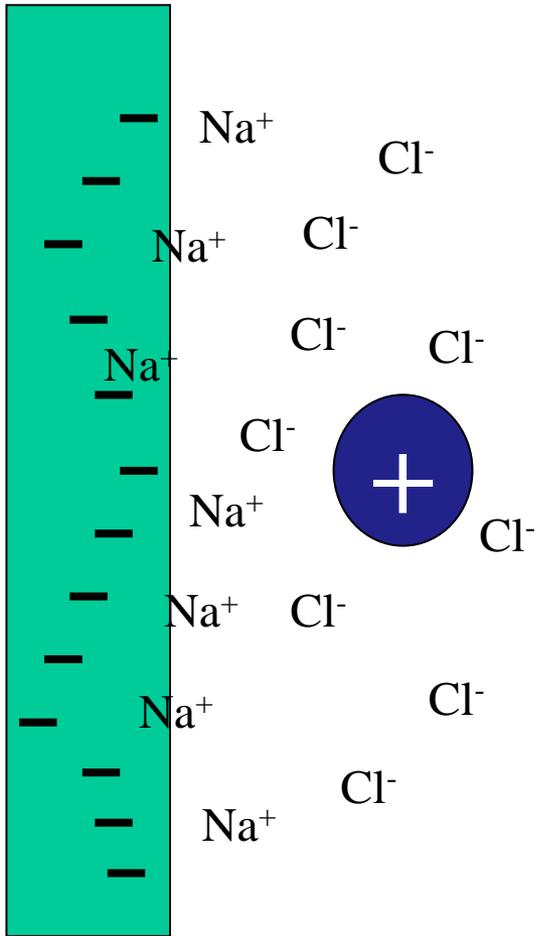
Se o $pH > pI$, a carga líquida da proteína é **negativa**

Se o $pH < pI$, a carga líquida da proteína é **positiva**

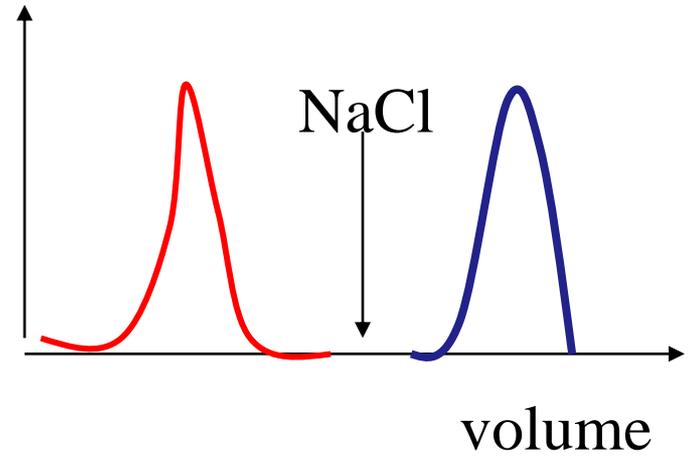
troca catiônica, **matriz** tem grupos carregados **negativamente**

Proteínas + → **interação** com a fase estacionária migram através da matriz mais lentamente do que proteínas -.

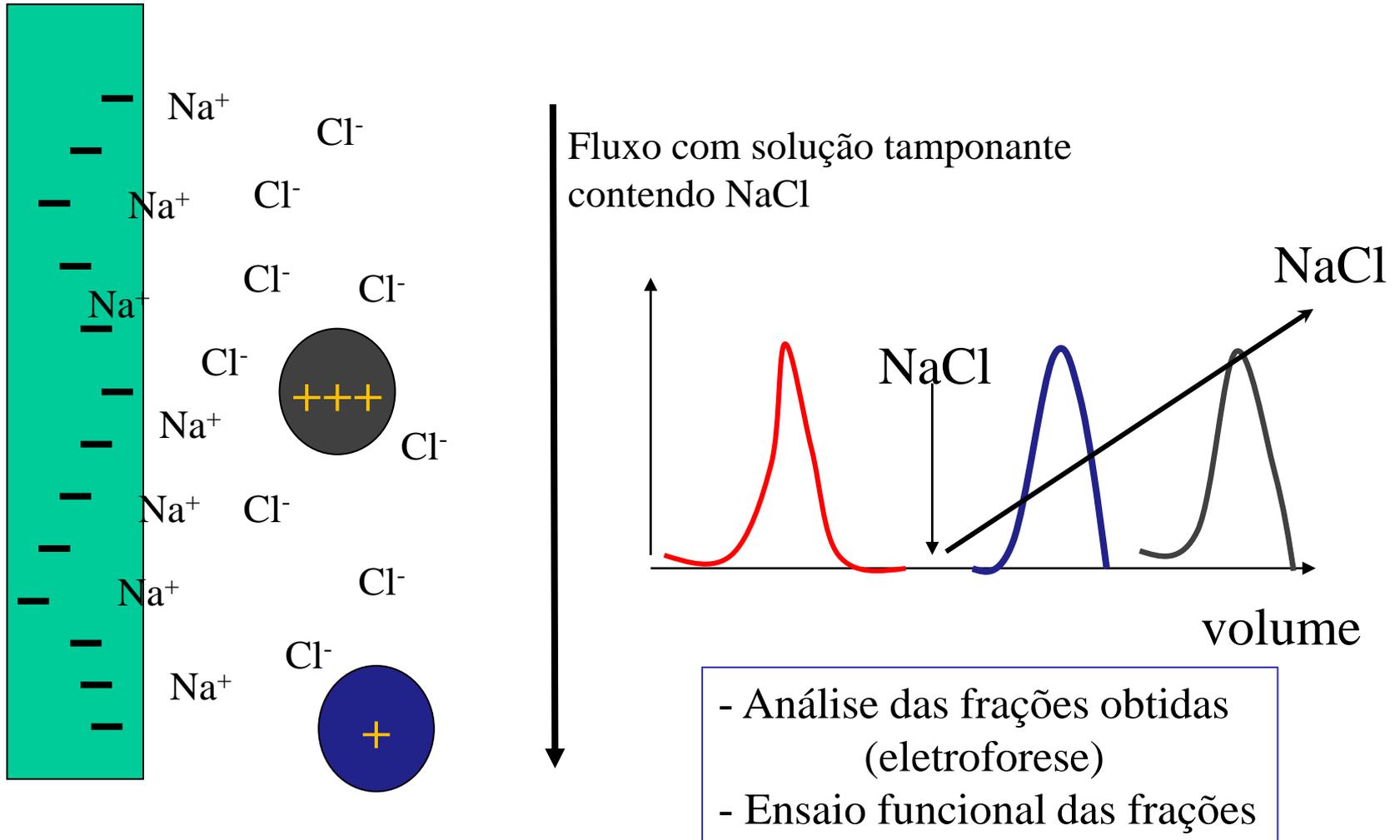




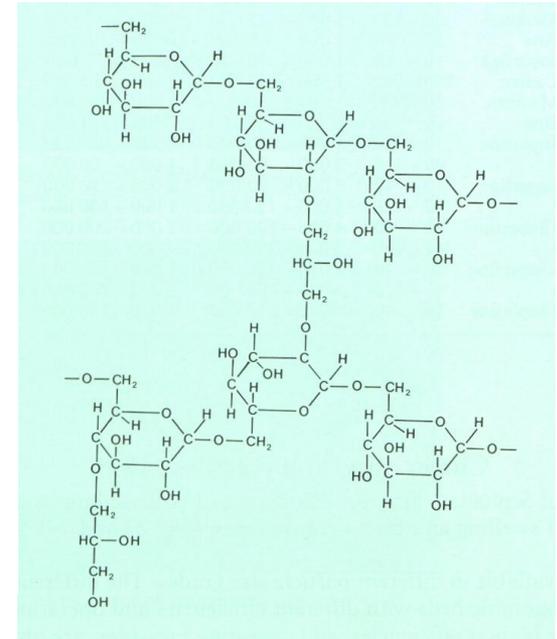
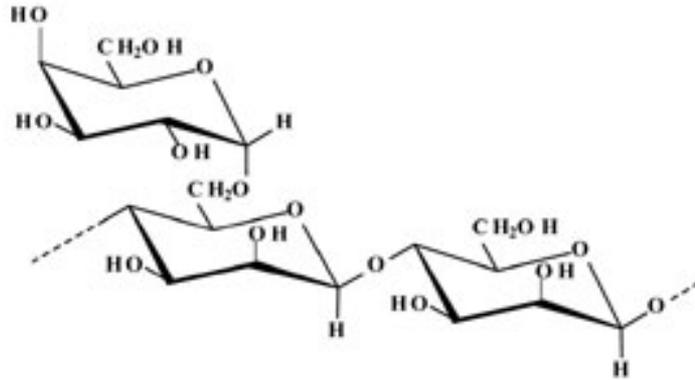
Fluxo com solução tamponante
contendo NaCl



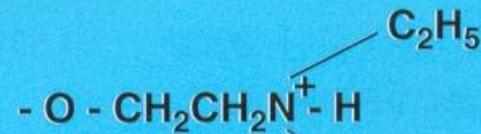
Proteínas +++ → interagem mais que proteínas + → eluem depois



Tipos de resina empregadas



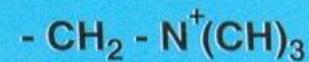
DEAE Sepharose Fast Flow



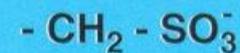
CM Sepharose Fast Flow

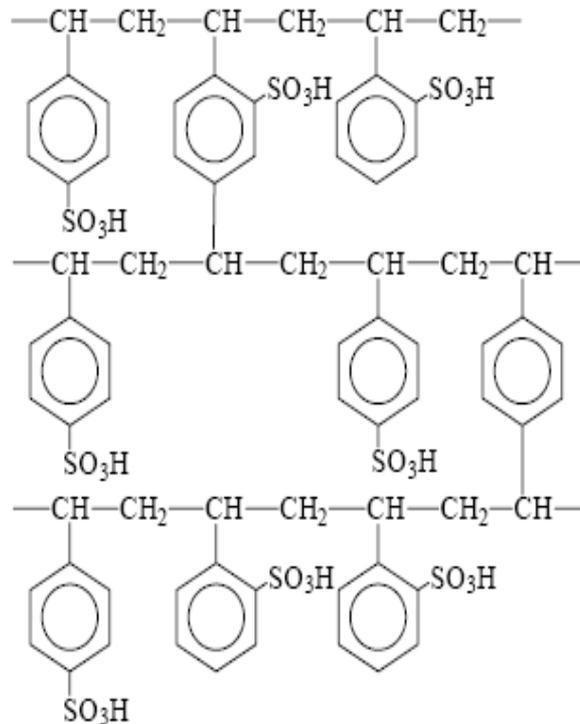


Q Sepharose Fast Flow

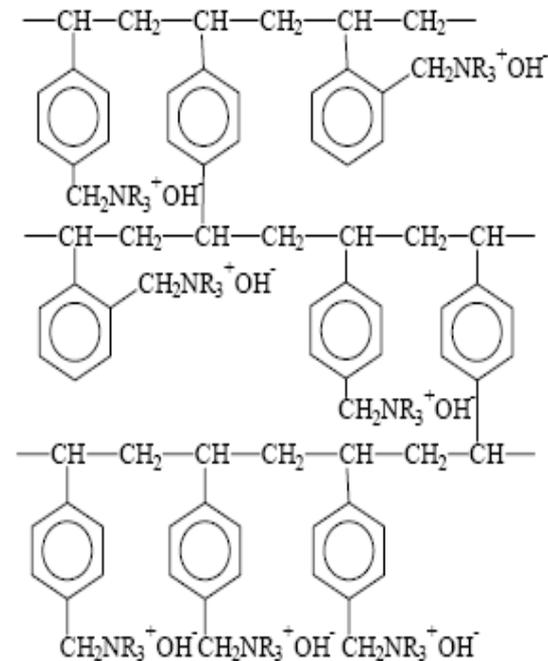


SP Sepharose Fast Flow





**res. trocadora de cátions:
poliestireno sulfonado**



**res. trocadora de ânions:
poliestireno-amônio quaternário**

Cromatografia de troca iônica

Resinas comerciais e características:

Table 6-2 Some Biochemically Useful Ion Exchangers

Name ^a	Type	Ionizable Group	Remarks
DEAE-cellulose	Weakly basic	Diethylaminoethyl —CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Used to separate acidic and neutral proteins
CM-cellulose	Weakly acidic	Carboxymethyl —CH ₂ COOH	Used to separate basic and neutral proteins
P-cellulose	Strongly and weakly acidic	Phosphate —OPO ₃ H ₂	Dibasic; binds basic proteins strongly
Bio-Rex 70	Weakly acidic, polystyrene-based	Carboxylic acid —COOH	Used to separate basic proteins and amines
DEAE-Sephadex	Weakly basic cross-linked dextran gel	Diethylaminoethyl —CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Combined chromatography and gel filtration of acidic and neutral proteins
SP-Sepharose	Strongly acidic cross-linked agarose gel	Methyl sulfonate —CH ₂ SO ₃ H	Combined chromatography and gel filtration of basic proteins

^aSephadex and Sepharose are products of GE Healthcare; Bio-Rex resins are products of BioRad Laboratories.

Resumo: Cromatografia de troca iônica

Princípio → sinal e magnitude da carga elétrica líquida de proteínas em um determinado pH

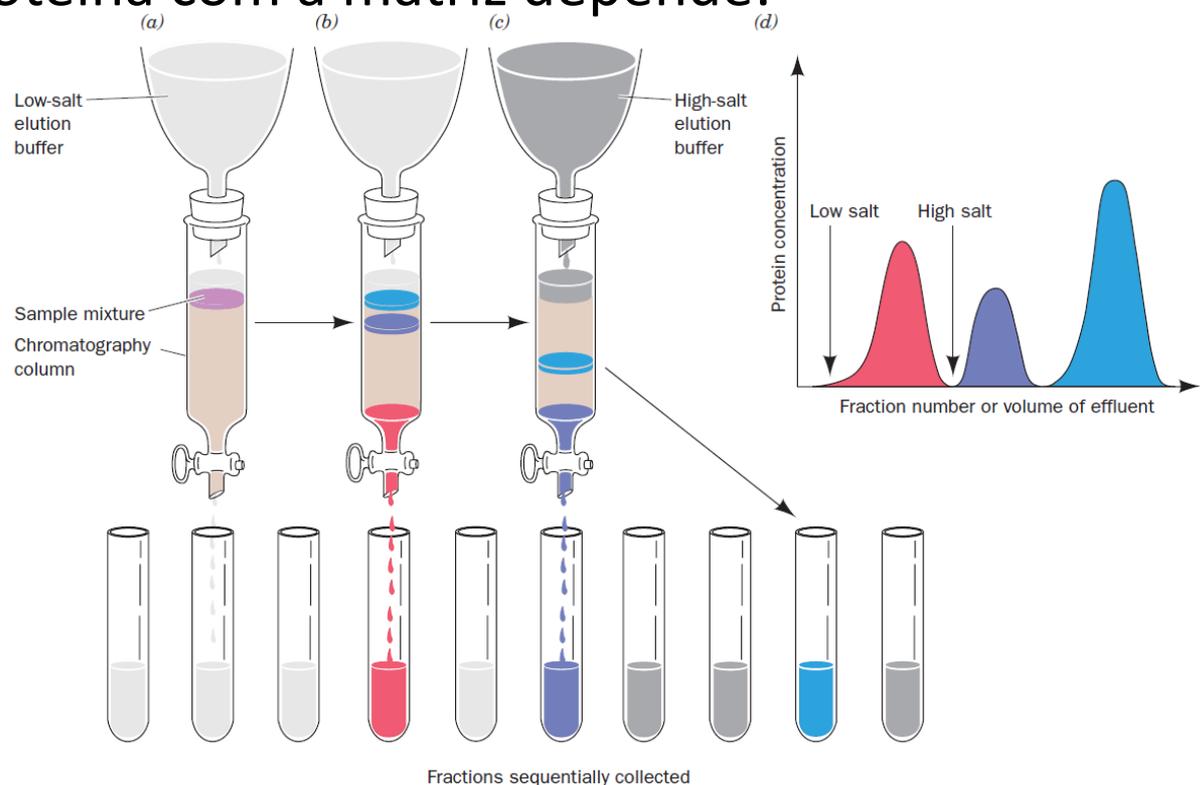
matriz ou fase estacionária → resina, carregada + ou -

A afinidade de cada proteína com a matriz depende:

pH (ionização da molécula)

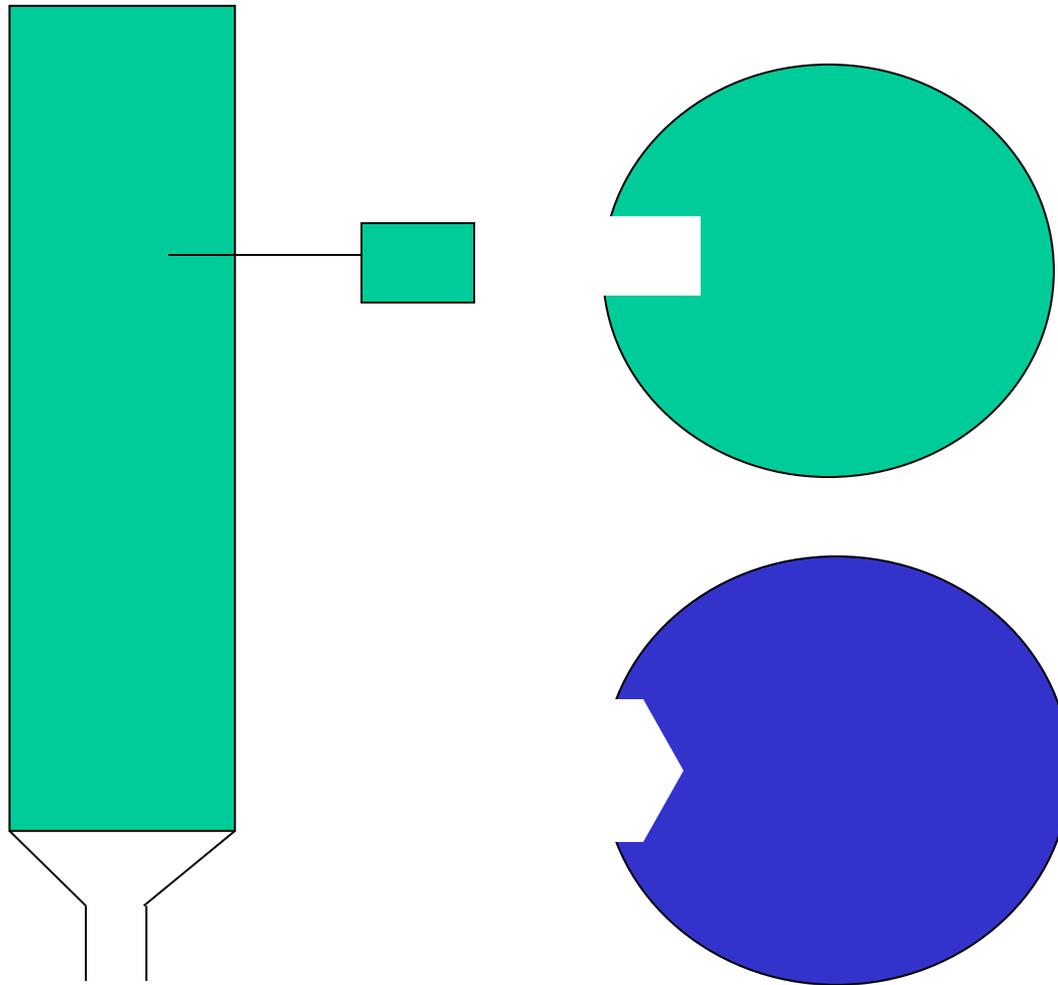
concentração de sal na solução

Pode-se usar a combinação dos dois para separar

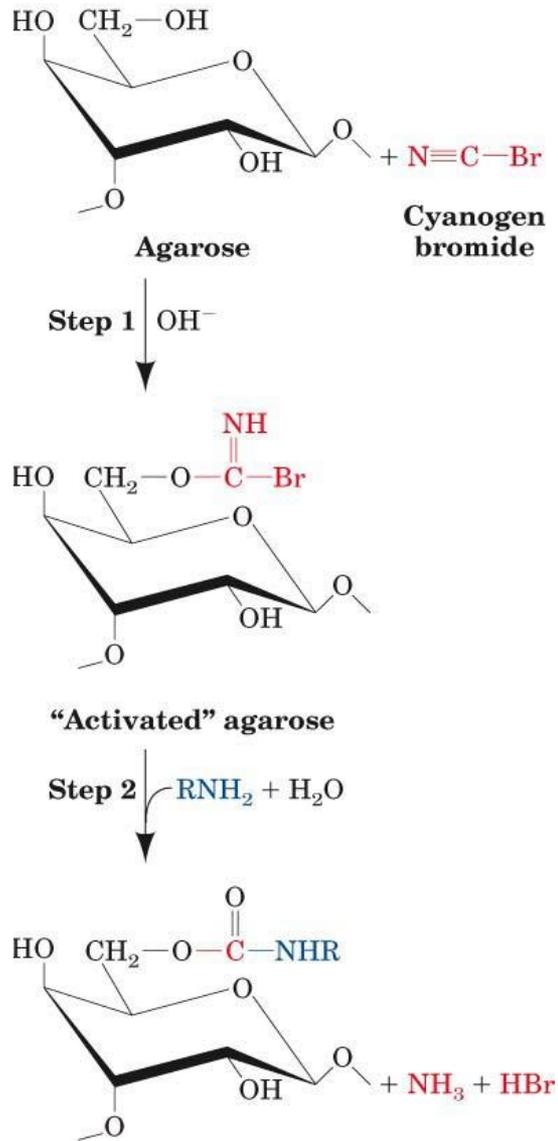


Cromatografia de Afinidade

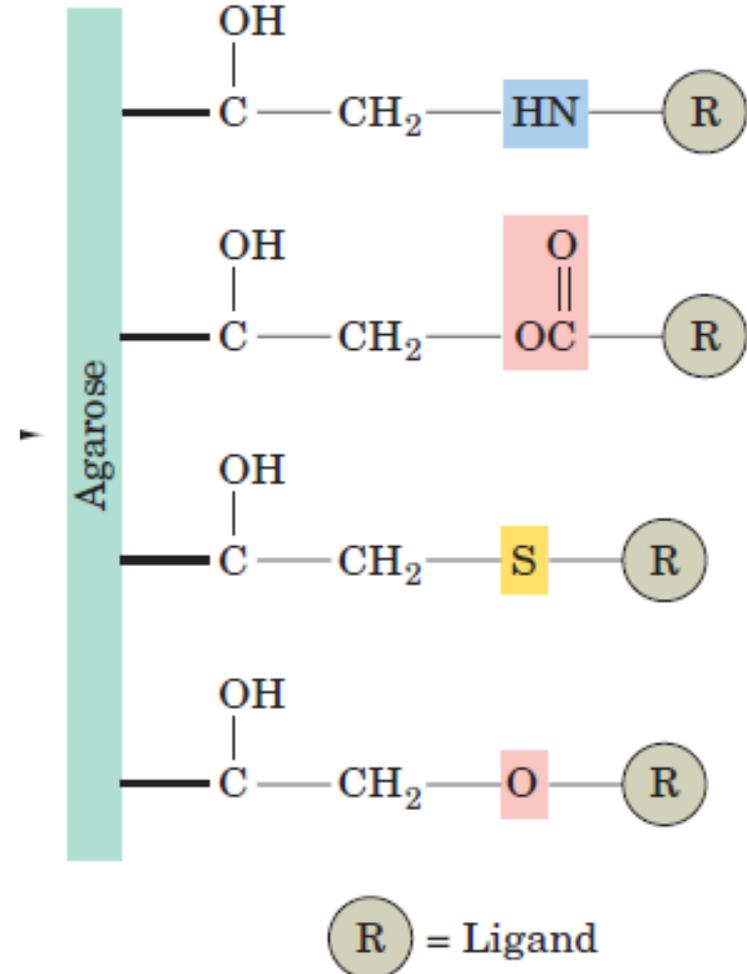
Propriedade: afinidade química → reconhecimento



Separação por afinidade



Ligante é covalentemente ligado a matrix porosa **Agarose: polímero composto de subunidades de galactose**

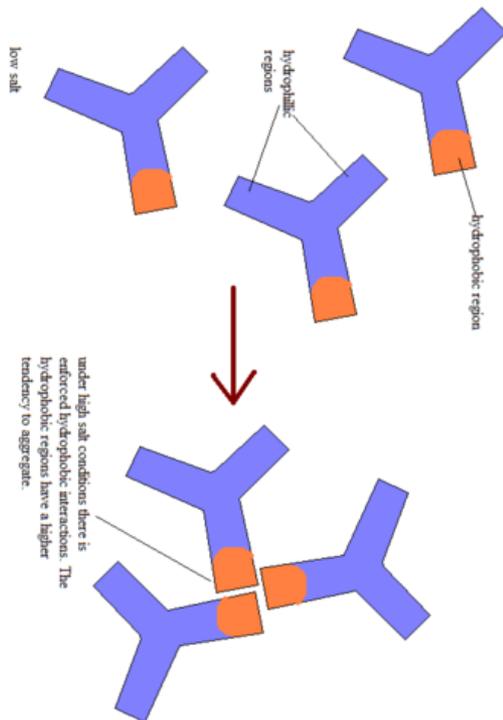


Cromatografia de Hidrofobicidade

Propriedade: polaridade

Ex. de proteína a ser purificada

- Parte hidrofílica da proteína
- Parte hidrofóbica dela

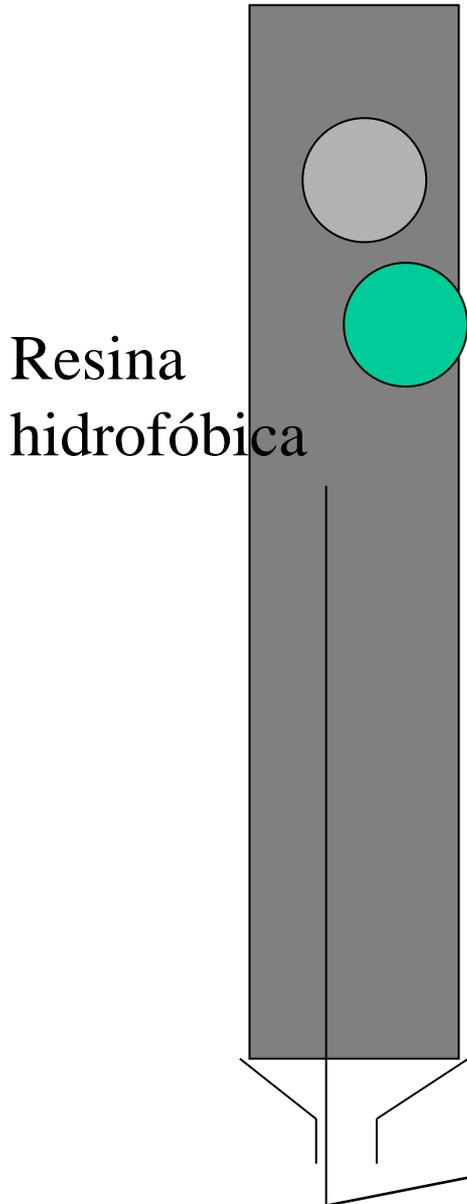


Sabe-se:

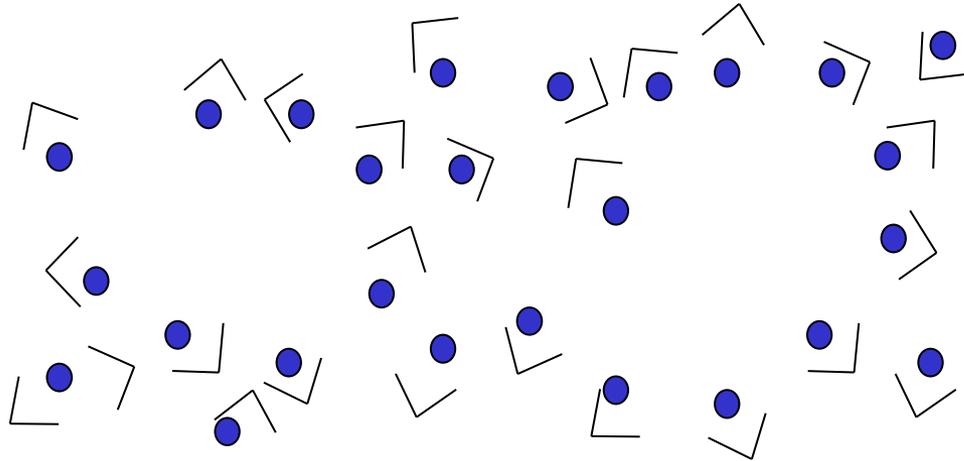
proteína em presença de solução aquosa **salina**



1. Interação por polaridade



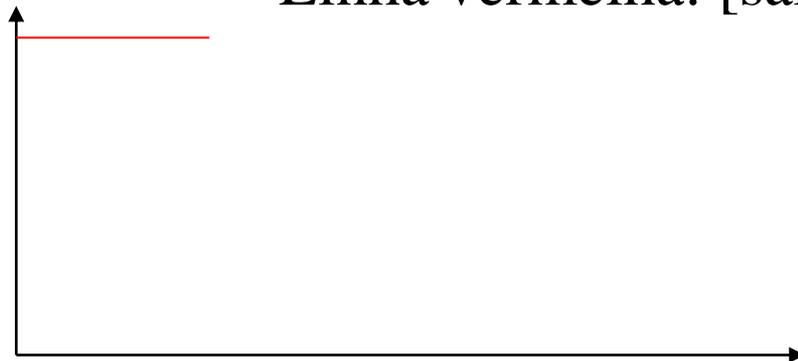
2. Alto $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



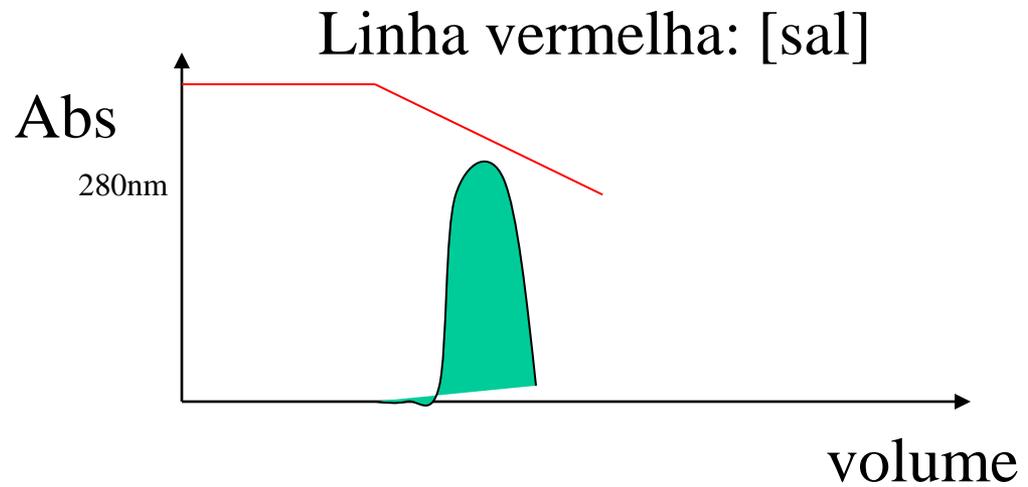
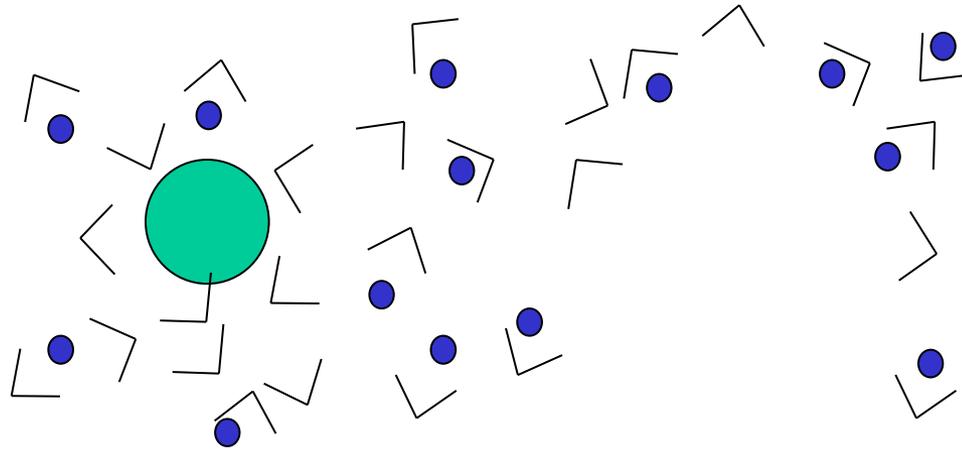
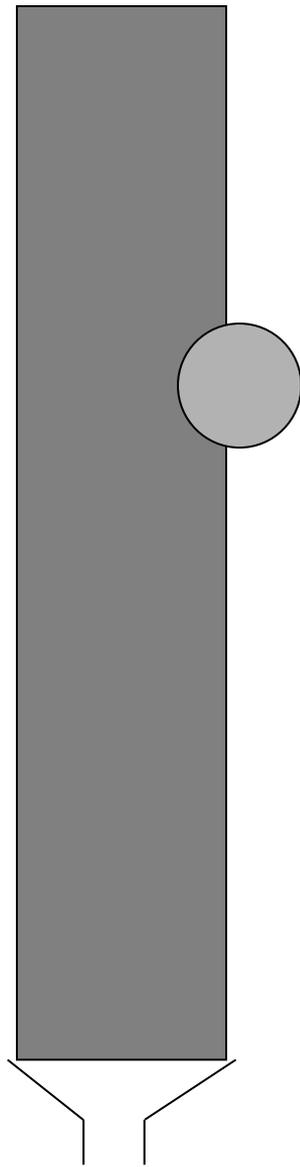
Abs
280nm

Linha vermelha: [sal]

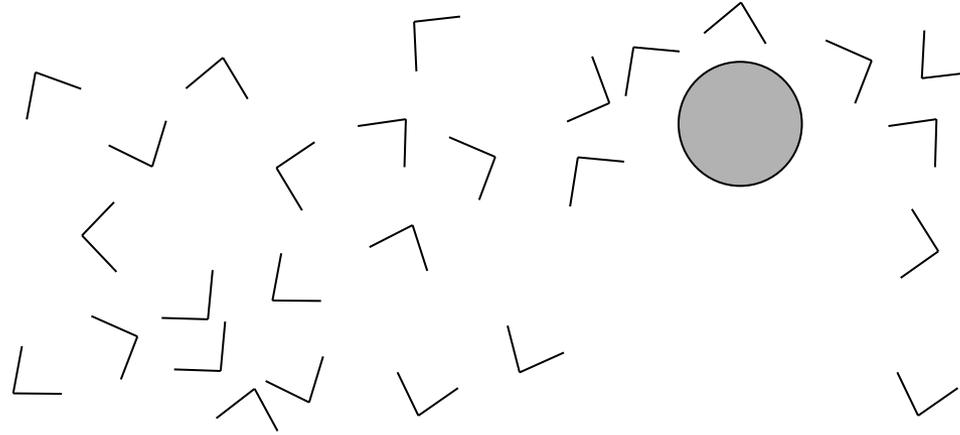
volume



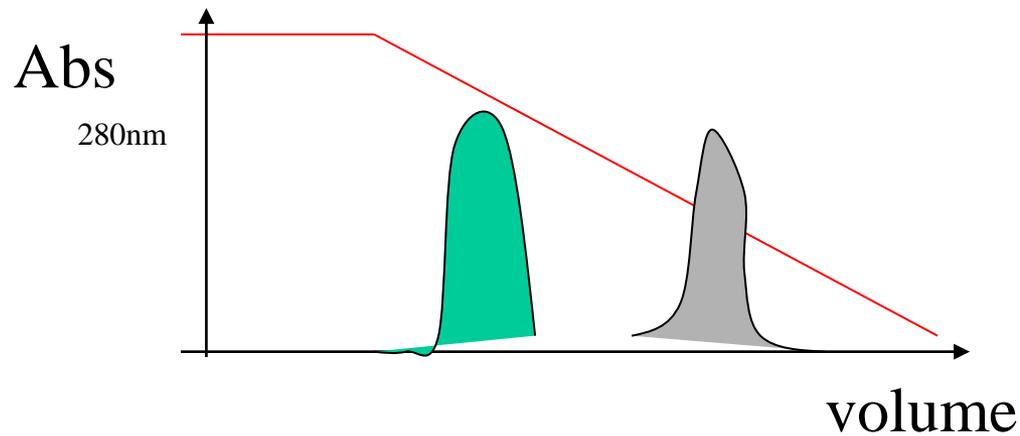
3. Baixo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



4. Sem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

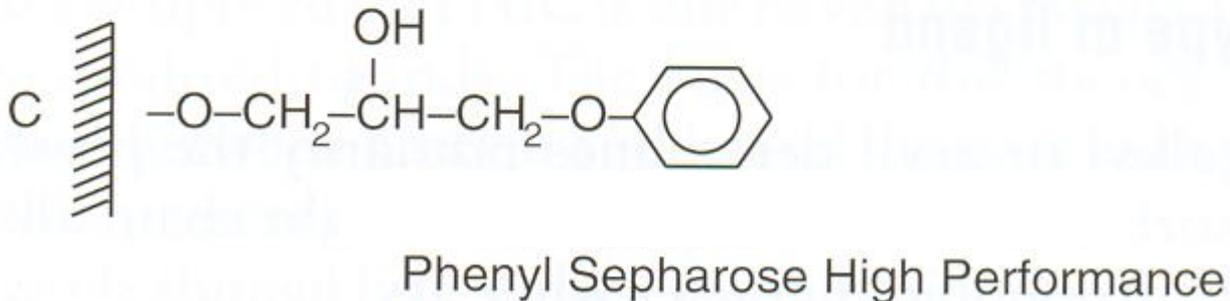
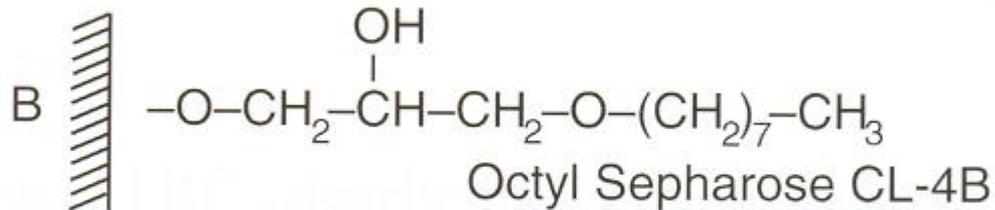
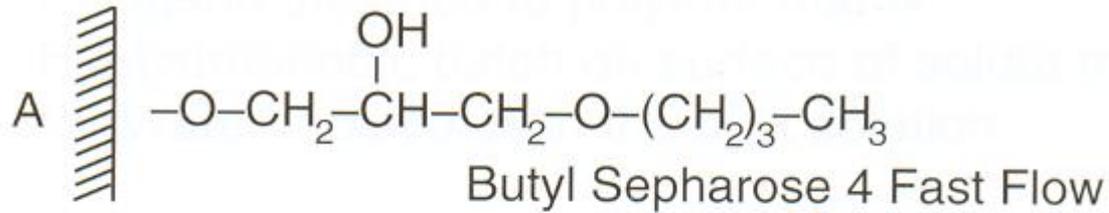


Muitas vezes:
modificadores orgânicos ou detergentes são adicionados



- Análise das frações obtidas (**eletroforese**)
- Ensaio funcional das frações

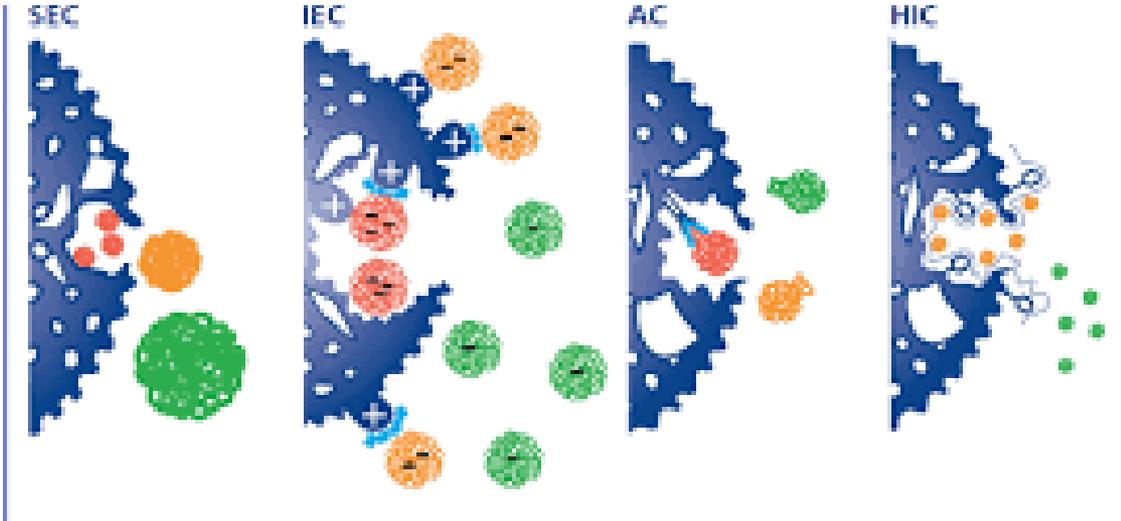
Tipos de resina empregadas:



Cromatografias em coluna em: **pressão atmosférica, média ou alta**
(discutidas) **FPLC** **HPLC**

FPLC: fase estacionária não resiste à pressão alta

Size-exclusion Ion-Exchange Affinity Hydrophobic interaction

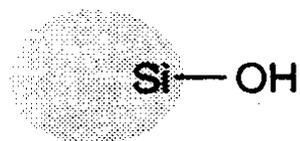


Fase estacionária

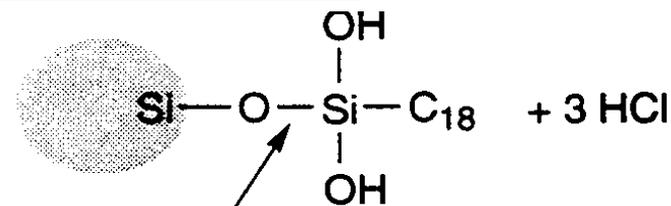
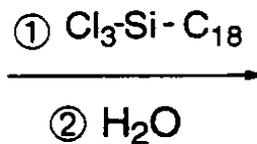
de fase **normal (HPLC)**

ou

reversa (RP-HPLC)



Silica support particle

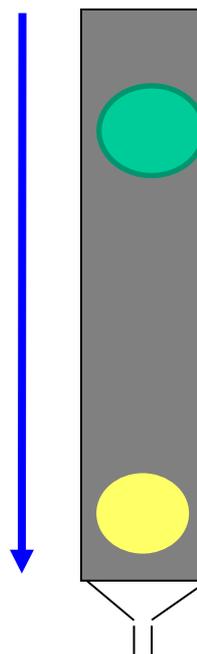


Covalent bond

- Ion-Exchange
- Affinity
- Hydrophobic interaction

aumenta % de solvente orgânico (MeOH ou ACN)
no eluente, que contém ácido + H₂O:

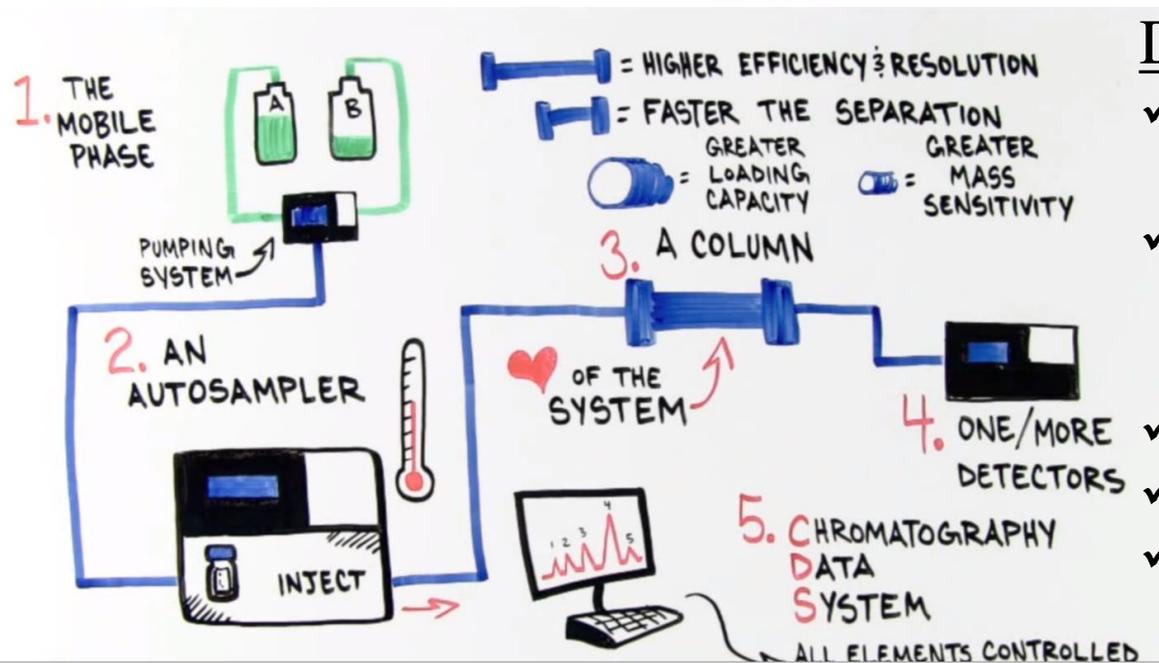
Desvantagem → denaturação (uso limitado)



Proteína ricas
em aminoácidos
mais apolares

Proteínas ricas em
aminoácidos mais
polares

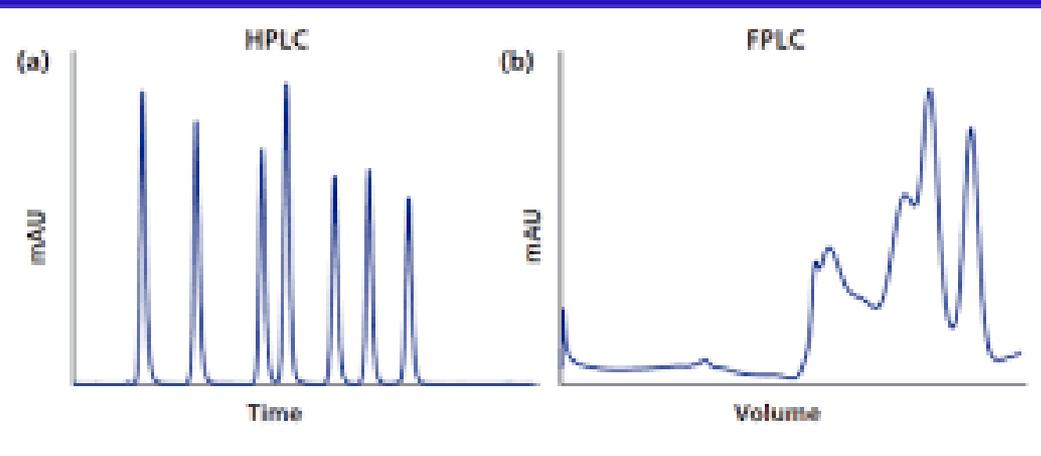
HPLC de fase reversa:



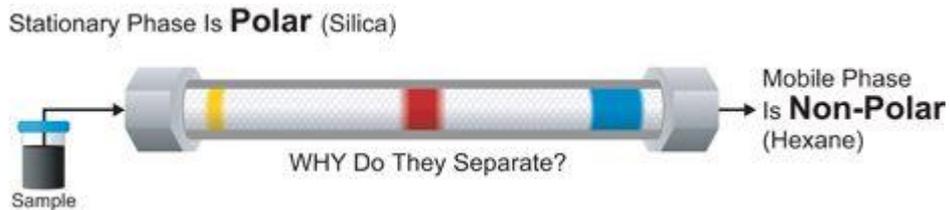
Detector:

- ✓ UV-visível – detecta em 1 ou mais comprimentos de ondas
- ✓ UV-visível de varredura: tira espectros de uv-vis das moléculas que estão eluindo
- ✓ Fluorescência
- ✓ Espectrometria de massas (MS)
- ✓ Detectores acoplados (ex. HPLC-UV-Vis/ MS)

Figure 3: Comparison of HPLC and FPLC chromatograms. (a): A typical time-based HPLC run. (b): A typical volume-based FPLC run.

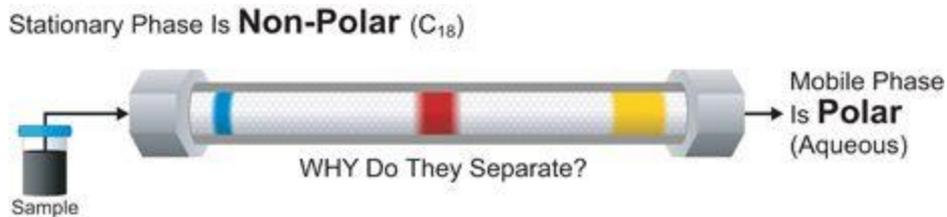


Fase normal:



Aminoácidos, Lipídeos
Compostos mais apolares
eluem primeiro

Fase reversa (RP-HPLC):



Peptídeos, proteínas,
carboidratos
Compostos mais polares
eluem primeiro

<https://www.youtube.com/watch?v=MLoitPJQH3g>

Separation Mode	Stationary Phase [particle]	Mobile Phase [solvent]
Normal phase	Polar	Non-polar
Reversed phase	Non-polar	Polar

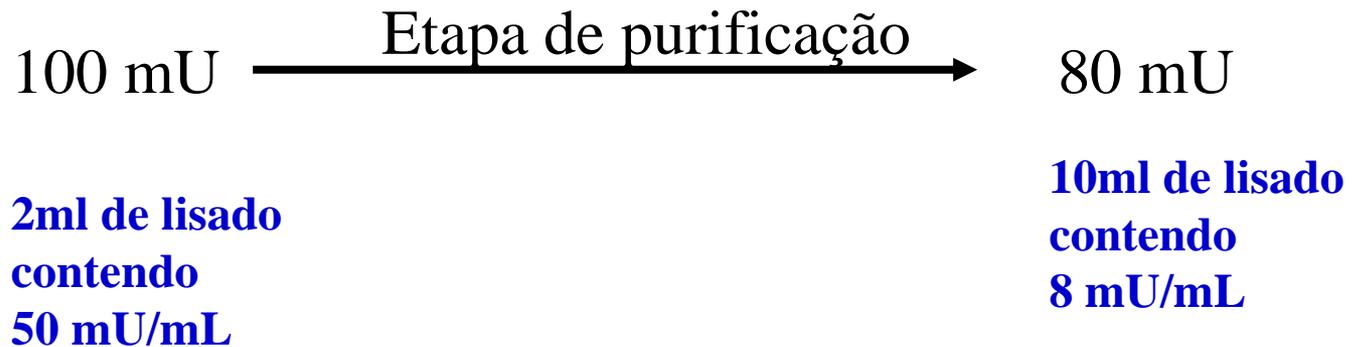
E se dentre as proteínas existir uma enzima?

E quando as proteínas são enzimas?



Ensaio de atividade enzimática específico

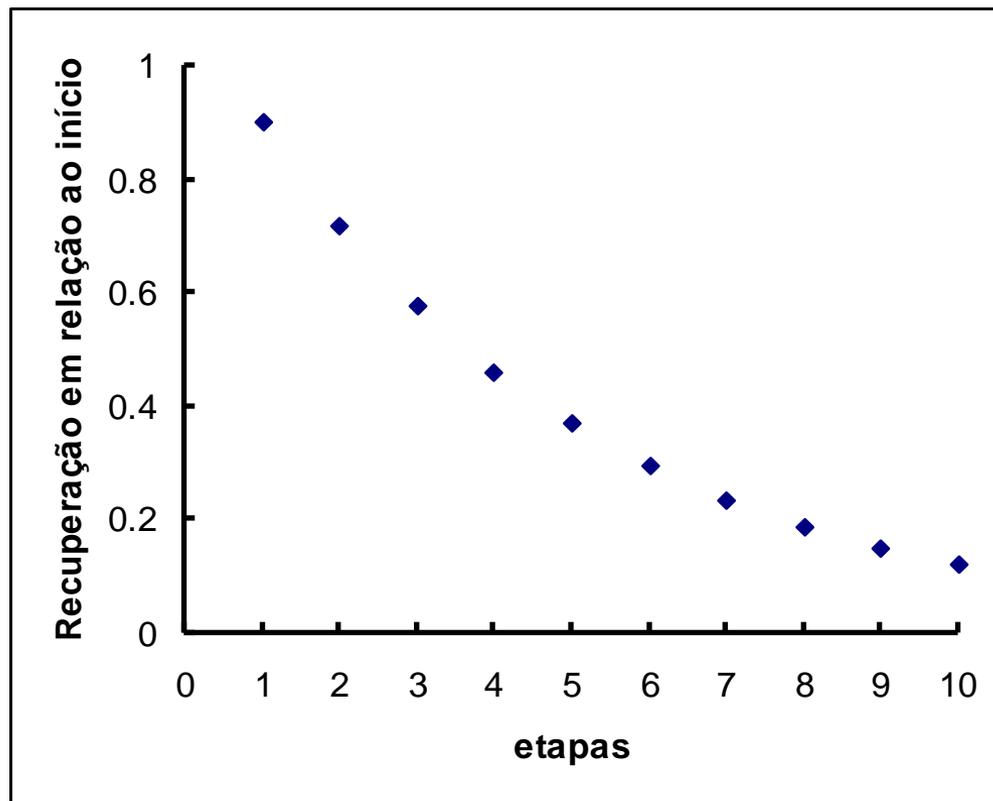
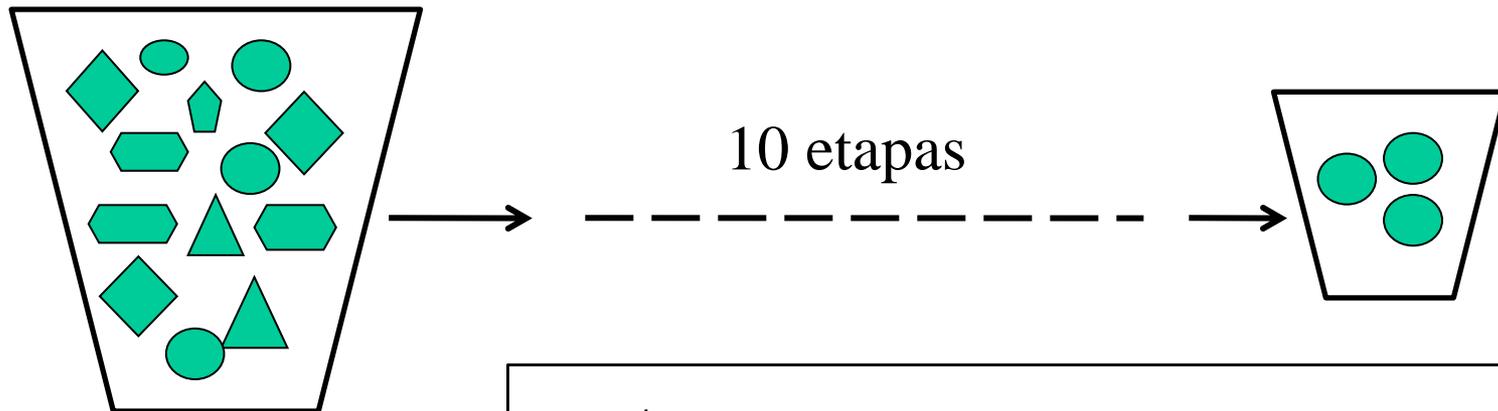
Recuperação da atividade enzimática



$$\text{Recuperação} = 80\% = 80 \text{ mU}/100 \text{ mU}$$

Recuperação:

porcentagem de atividade enzimática recuperada após o procedimento de purificação



Recuperação de 90% em cada etapa

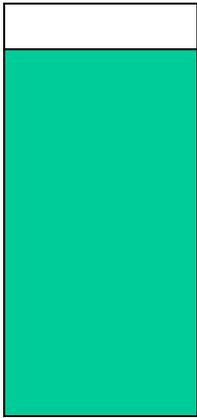
Enriquecimento

100 mU/mg $\xrightarrow{\text{Etapa de purificação}}$ 200 mU/mg

$$\text{Enriquecimento} = 2 = 200/100$$

Enriquecimento: indica o aumento da atividade específica após o procedimento de purificação.

Exemplos



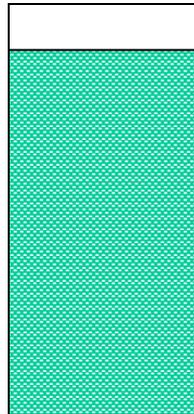
100 U de alfa-glicosidase
1 mg de proteína

100U/mg



100 U de alfa-glicosidase
2 mg de proteína

50U/mg



100 U de alfa-glicosidase
10 mg de proteína

10U/mg

Exemplo prático

A Purification Table for a Hypothetical Enzyme*

Procedure or step	Fraction volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

Métodos empregados:

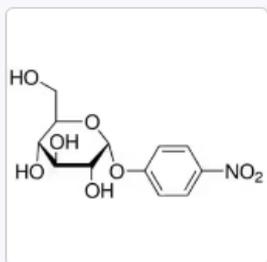
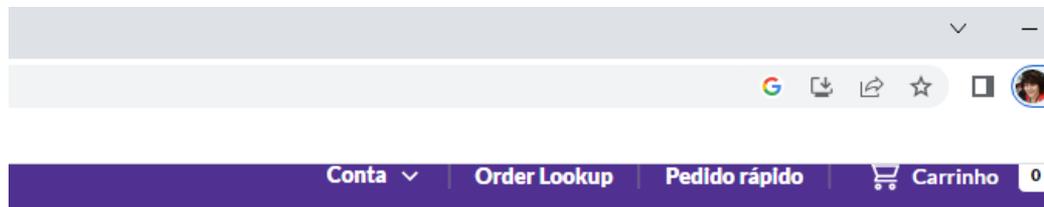
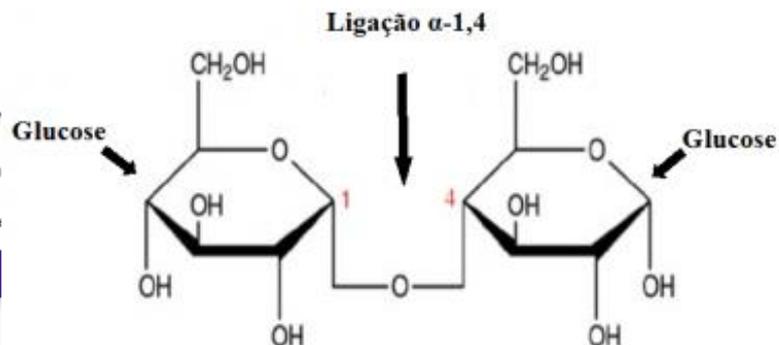
Filtração/centrifugação, cromatografia em coluna

Monitoramento via eletroforese ou ensaio enzimático

Maltose (α - D - glicopiranosil - (1 \rightarrow 4) - D - glicopiranosose \rightarrow 2 D-glucose

Maltose

α -glicosidase



N1377 [Sigma-Aldrich](#).

4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside

★★★★★ (0) [Write a review](#)

$\geq 99\%$

Sinônimo(s):

p-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside

Empirical Formula (Hill Notation):

C₁₂H₁₅NO₈

Número CAS: [3767-28-0](#)

Peso molecular: 301.25

Beilstein: 92212

Número EC: [223-189-3](#)

Número MDL: [MFCD00064088](#)

ID de substância PubChem: [24897484](#)

NACRES: NA.32

SKU	Tamanho da embalagem	Disponibilidade	Preço	Quantidade
N1377-1G	1 G	✓ Only 5 left in stock (more on the way) Detalhes...	R\$ 811,00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/>
N1377-5G	5 G	✓ Previsão de entrega em 07 de junho de 2023	R\$ 2.117,00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/>
N1377-25G	25 G	✓ Previsão de entrega em 17 de maio de 2023	R\$ 9.239,00	<input type="text" value="-"/> <input type="text" value="+"/>

Todas as fotos (1)

Documentos

[SDS](#)

[COO/COA](#)

[Folha de especificação](#)

[Mais documentos >>](#)

Pesquisar

22°C Nublado