

Proteínas: de onde e como extraí-las ?

Amostras biológicas (células, tecidos animais ou vegetais) são misturas complexas de biomoléculas com milhares de proteínas distintas



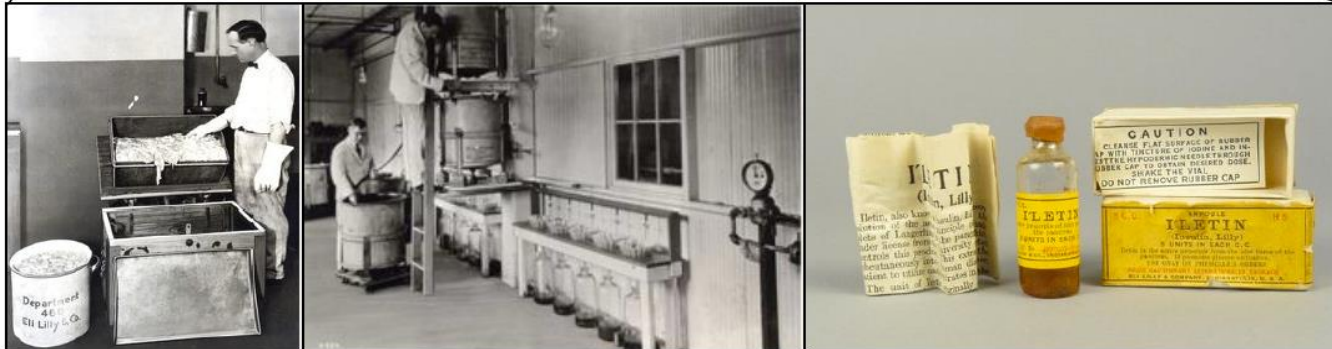
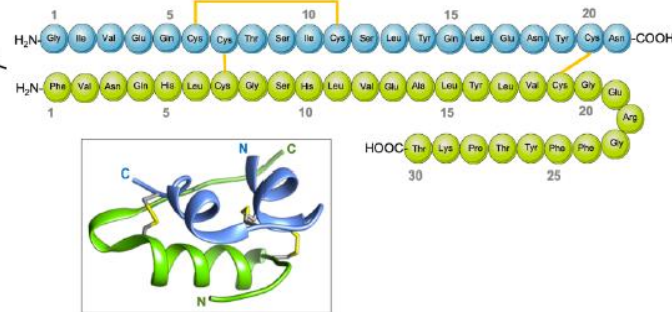
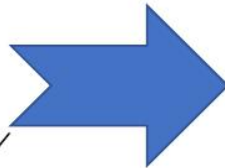
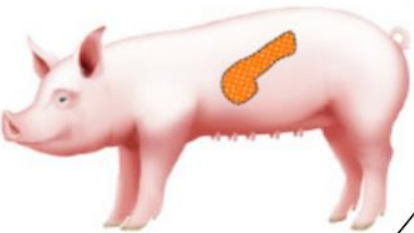
purificação de proteínas

Purificação de Insulina

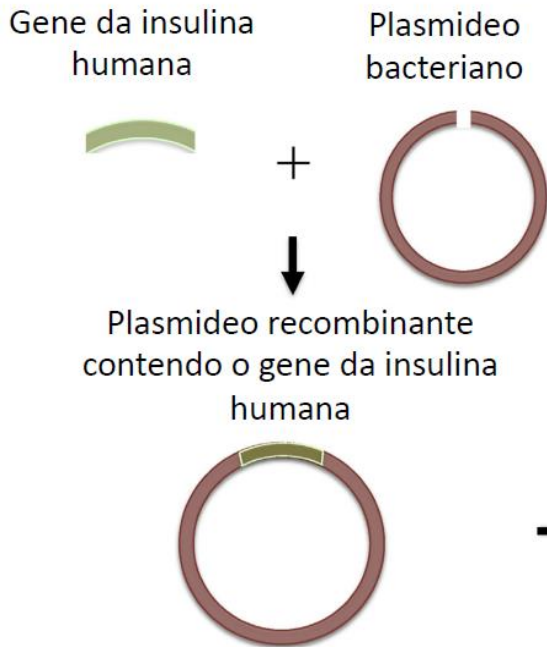
2 toneladas de pâncreas de porcos

200 gramas de cristais de insulina
(51 a.a)

Prêmio Nobel de
Medicina em 1923 pela
descoberta da insulina no
tratamento do diabetes



Insulina produzida em bactéria recombinante

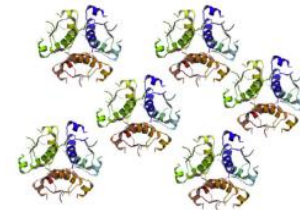


Planta industrial para produção de insulina recombinante

Transformação de bactérias
expressão de insulina humana

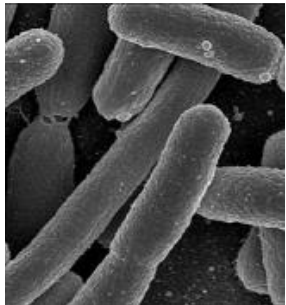
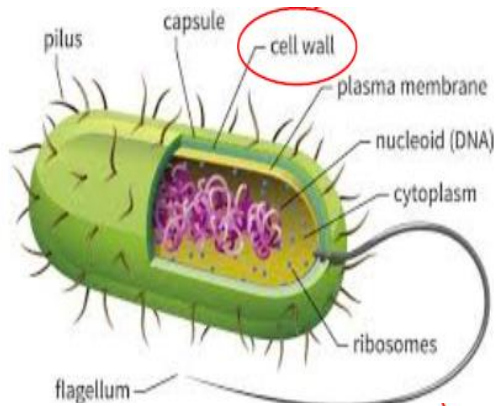


Lise de bactérias
Purificação de insulina recombinante

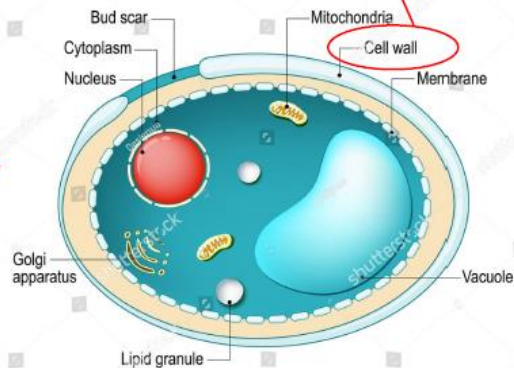


Lise celular

bactérias



fungos



Químicos – detergentes

Mecânicos – esferas de vidro, congelamento/descongelamento, pressão, ultrassom

Enzimáticos – lisozima (bactérias), Zimoliase (fungos), celulase (plantas)

Cuidados:

Temperatura baixa, tampão de lise, inibidores de proteases

Centrifugação



Lisado bruto



c



Lisado clarificado



Sobrenadante
contém
proteínas
solúveis

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Dependendo do objetivo final do estudo, o processo de purificação pode ser parcial (semi-purificação) ou completo

PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS E SEU EFEITO NO DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO

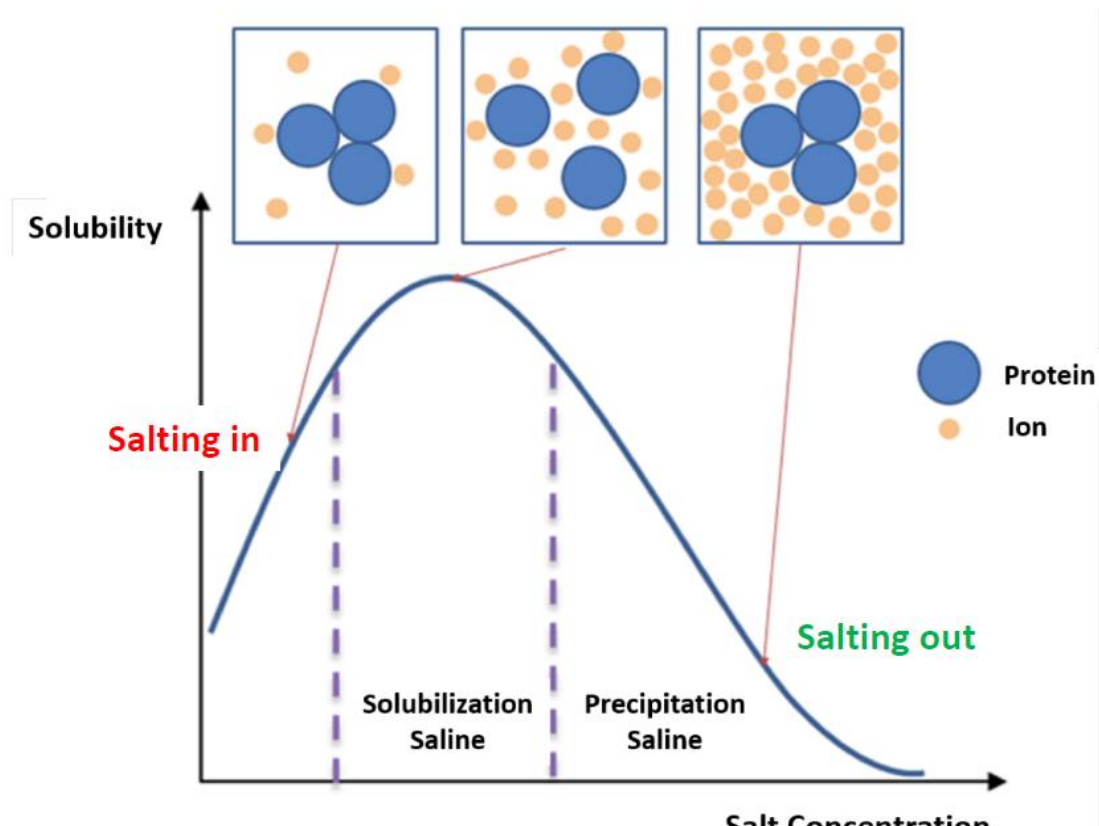
1. Tamanho
2. Carga elétrica
3. Solubilidade ou hidrofobicidade
4. Afinidade biológica

1. PRECIPITAÇÃO

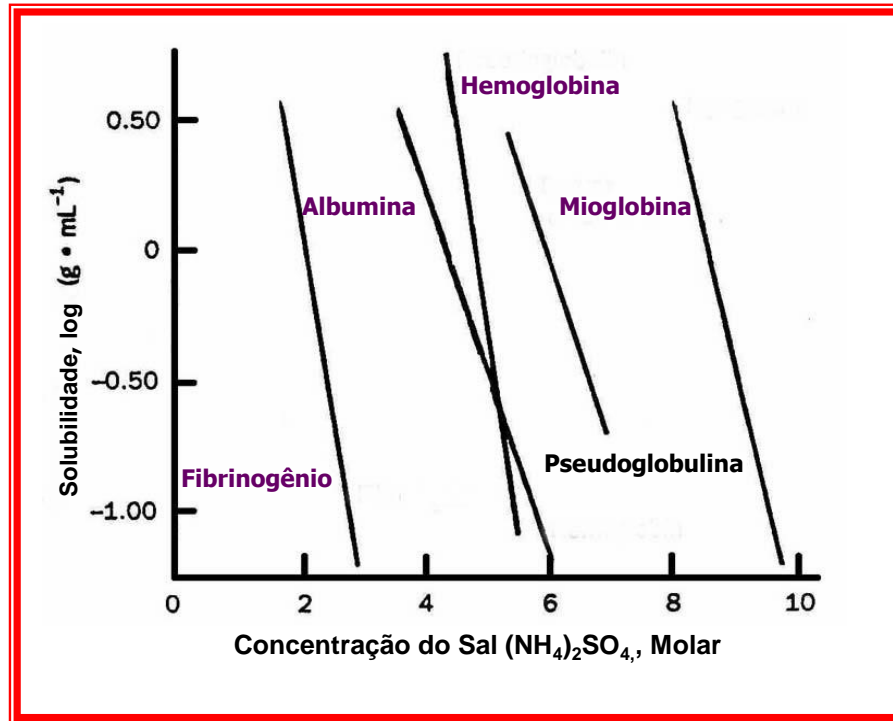
A precipitação de proteínas pode ser induzida por:

- adição de sais (Precipitação salina)
- adição de solventes
- variação de pH (Precipitação isoelétrica)

1.1 Precipitação salina



Proteínas apresentam diferente sensibilidade para a precipitação salina.

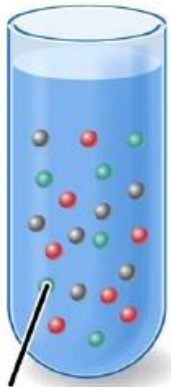


solubilidade do sulfato de amônio a 0°C é 706 g/1000 g água

- precipitam primeiro:
 - proteínas maiores
 - proteínas mais hidrofóbicas

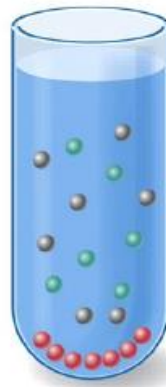
Precipitação fracionada

Lisado
clarificado



**Target
protein**

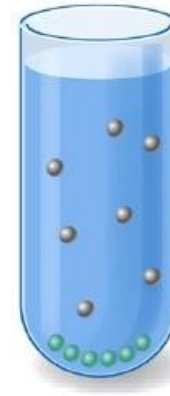
adiciona 40%
(NH₄)₂ SO₄



Supernatant

Precipitate

adiciona 80%
(NH₄)₂ SO₄



Supernatant

Precipitate

Etapa preparatoria
em um protocolo de
purificação ou para
concentrar a proteína
ao longo da
purificação



Centrífuga



Centrífuga

1.2 Precipitação com solvente orgânico

Acetona, etanol, metanol, n-propanol, dioxano, etc.

- Tamanho da molécula
- pI

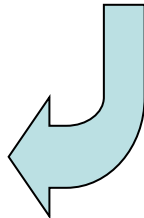
Solventes miscíveis com a água diminuem a constante dielétrica do meio e desorganizam a camada de solvatação das proteínas.

Solvente	Constante Momento	
	Dielétrica	Dipolar
Água	78.5	1.85
Dimetilformamida	48.9	3.96
Metanol	32.6	1.66
Etanol	24.3	1.68
Acetona	20.7	2.72
Clorofórmio	4.8	1.15
Benzeno	2.3	0.00

1.3 Precipitação isoeletrica

Proteína	P.I.
Pepsina	<1,0
Ovalbumina galinha	4,6
Albumina sérica humana	4,9
Tropomiosina	5,1
Insulina bovina	5,4
Fibrinogênio humano	5,8
Gama-globulina	6,6
Colágeno	6,6
Mioglobina equina	7,0
Hemoglobina humana	7,1
Ribonuclease A bovina	7,8
Citocromo C equino	10,6
Histona bovina	10,8
Lisozima, galinha	11,0
Salmina, salmão	12,1

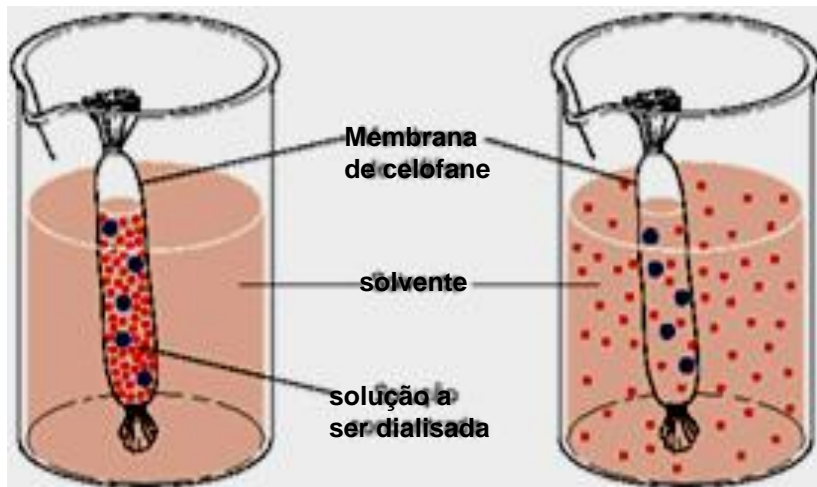
Proteínas colocadas em meio com pH igual ao seu PI tendem a precipitar, pois tendo carga neutra, apresentam a camada de solvatação menos organizada.



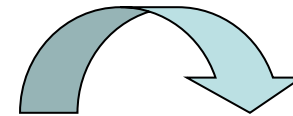
Ponto Isoeletrico de algumas Proteínas

Para obter as proteínas precipitadas em solução novamente, é necessário reverter as condições que levaram à precipitação.

Exemplo: Para remover o excesso de sal ou do solvente no precipitado, utiliza-se a diálise.



início $\xrightarrow{\Delta t}$ final



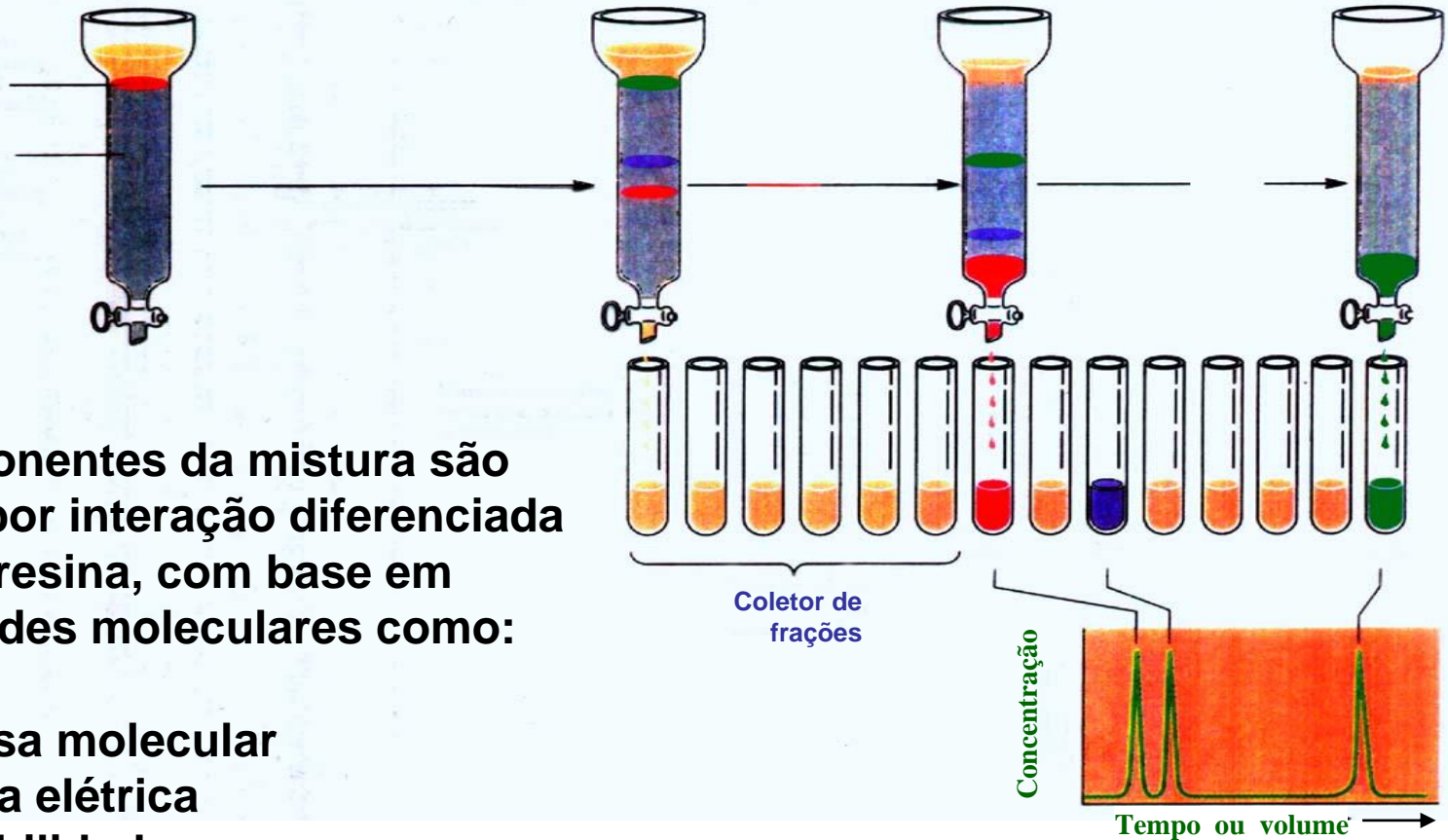
Aos precipitados obtidos com sal ou solvente, adiciona-se água.

Ao precipitado obtido com variação de pH, retornar ao pH original.

PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA

TIPO	PRINCIPIO
EXCLUSÃO MOLECULAR OU FILTRAÇÃO EM GEL	Separação física das proteínas em função do tamanho molecular Técnica permite determinar Massa Molar das proteínas no estado nativo
TROCA IÔNICA	Separação das proteínas em função da sua carga . Através de interações eletrostáticas as proteínas se ligam em forma reversível a um suporte carregado
INTERAÇÃO HIDROFÓBICA	Separação de proteínas em função da interação entre aminoácidos apolares de uma proteína e uma matriz de carácter hidrofóbico
AFINIDADE	Separação de proteínas em função das propriedades de afinidade da proteína de interesse por um ligante específico unido à fase estacionária da coluna

FUNCIONAMENTO BÁSICO DE UMA COLUNA CROMATOGRÁFICA



CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL

PROPRIEDADES IMPORTANTES

Volume de Vazio

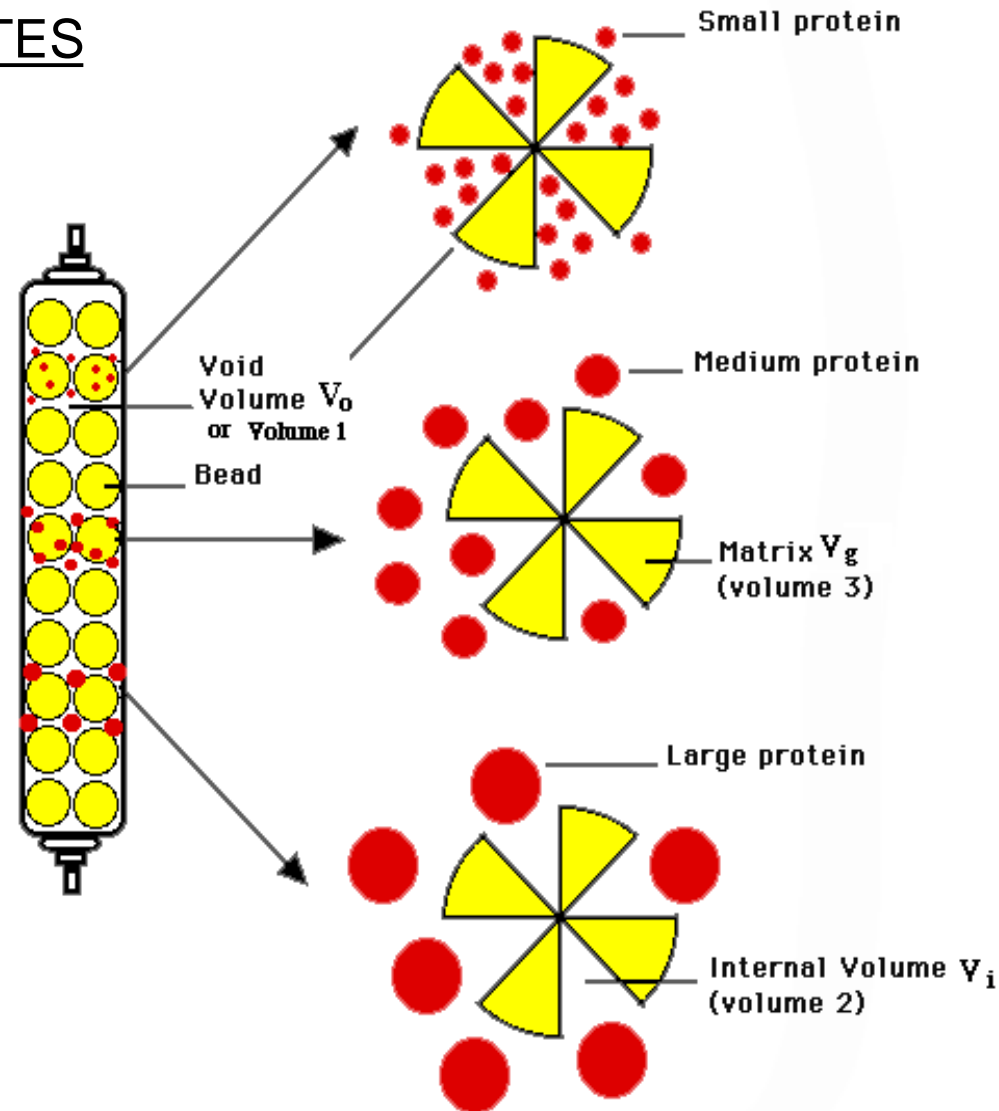
Espaço total que rodeia as partículas do gel na coluna empacotada Ex.: Blue Dextran (MM= 2.000.000)

Faixa de Separação

Sephadex G-50
faixa de : 1.500-30.000
Moléculas dentro dessa faixa serão separadas neste gel

Limite de Exclusão

Ex: *Sephadex G-50*
Limite de exclusão = 30.000
Moléculas com MM > 30.000
eluiram diretamente sem entrar nas partículas do gel



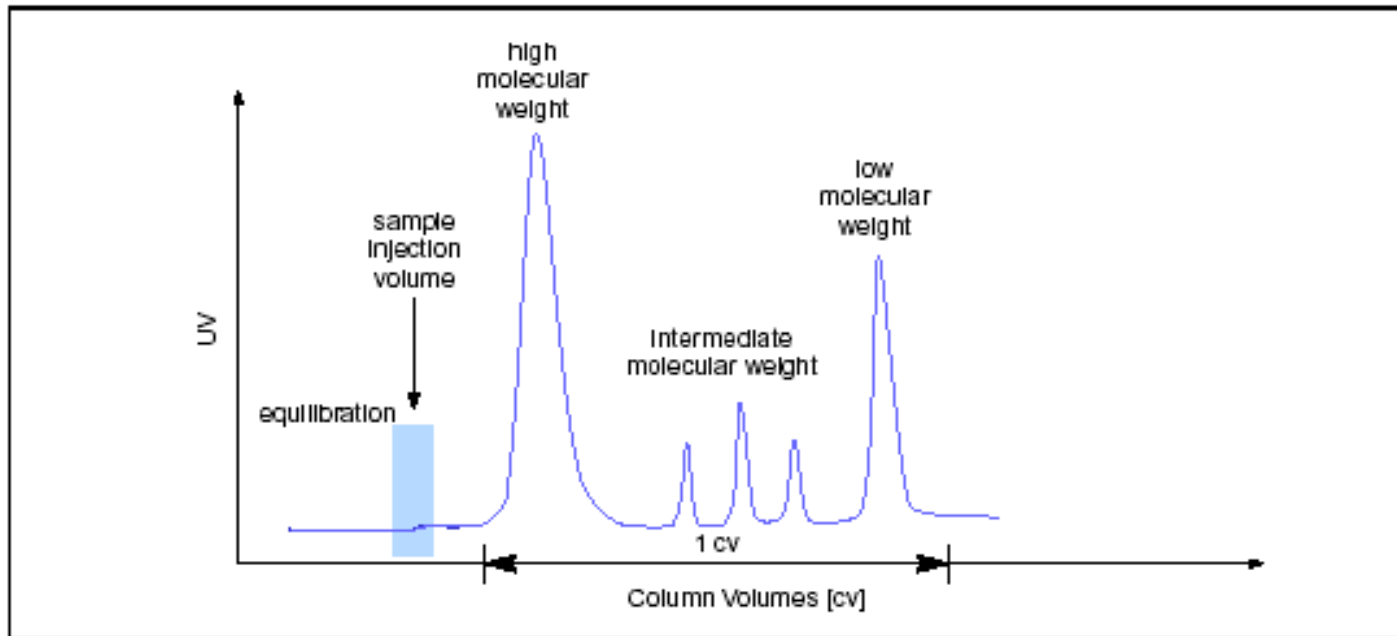
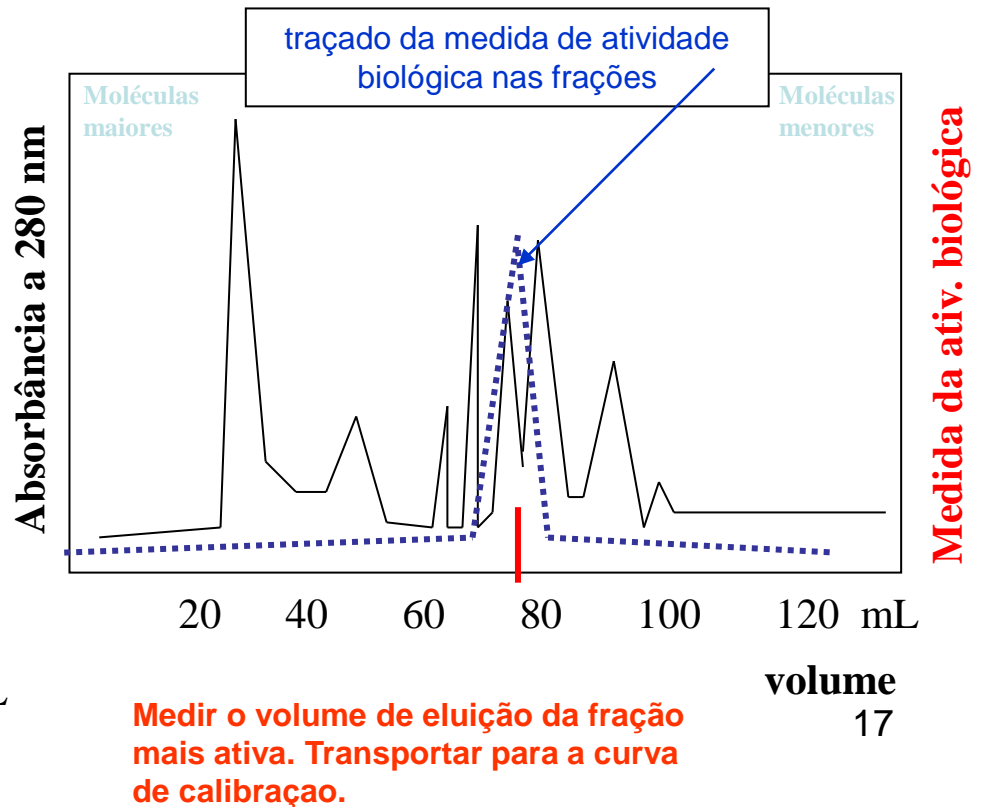
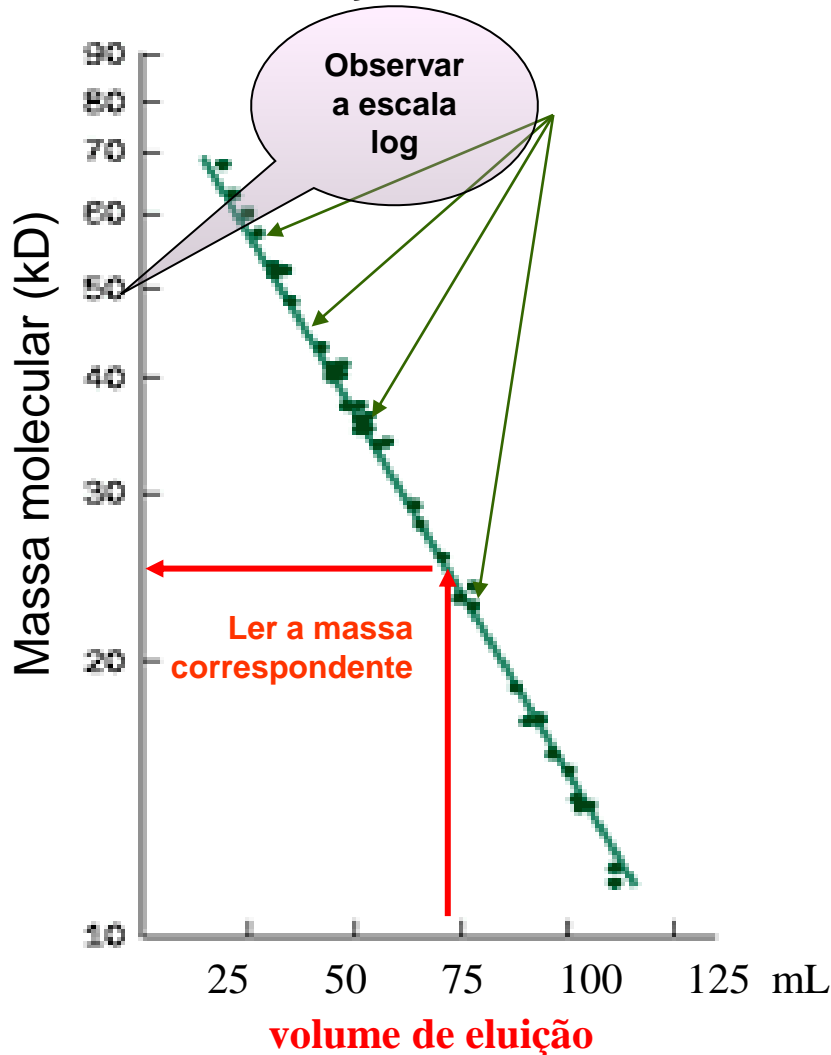


Fig. 41. Typical GF elution.

Como usar a cromatografia de filtração em gel para determinar a massa molar de proteínas?

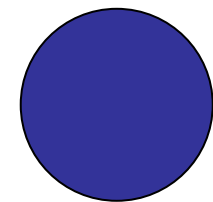
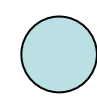
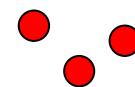
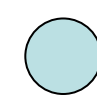
Curva de calibração



Existem diferentes tipos de resinas para gel-filtração, conforme o tipo de moléculas ou partículas a serem separadas

Resinas para Gel-Filtração

NOME	TIPO	FAIXA DE RESOLUÇÃO (kD)		
Sephadex G-10	Dextrana	0.05 - 0.70	}	Moléculas pequenas
Sephadex G-25	Dextrana	1 - 5		
Sephadex G-50	Dextrana	1 - 30	}	Proteínas
Sephadex G-100	Dextrana	4 - 150		
Sephadex G-200	Dextrana	5 - 600		
Bio-Gel P- 2	Policrilamida	0.1 - 1.8	}	Moléculas pequenas
Bio-Gel P- 6	Policrilamida	1 - 6		
Bio-Gel P- 10	Policrilamida	1.5 - 20	}	Proteínas
Bio-Gel P- 30	Policrilamida	2.4 - 40		
Bio-Gel P-100	Policrilamida	5 - 100		
Bio-Gel P-300	Policrilamida	60 - 400		
Sepharose 6B	Agarose	10 - 4.000	}	Células, partículas sub-celulares
Sepharose 4B	Agarose	60 - 20.000		
Sepharose 2B	Agarose	70 - 40.000		



*Sephadex e Sepharose: Amersham Pharmacia Biotech; Bio -Gel: Bio-Rad Laboratories

•Prever a seqüência em que as proteínas seguintes serão eluídas de uma coluna de exclusão molecular com uma faixa de fracionamento de 5 mil a 400 mil Da: mioglobina, catalase, citocromo C, miosina, quimotripsinogênio e soroalbumina

Proteína	Massa Molar (Da)
Citocromo C	13370
catalase	221600
mioglobina	16900
miosina	524800
quimotripsinogênio	23240
soroalbumina	68500

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

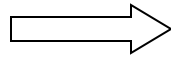
PROPRIEDADES

- As colunas de troca iônica podem apresentar carga (+) ou (-)

Ex.

DEAE-Celulose : dietilaminoetil

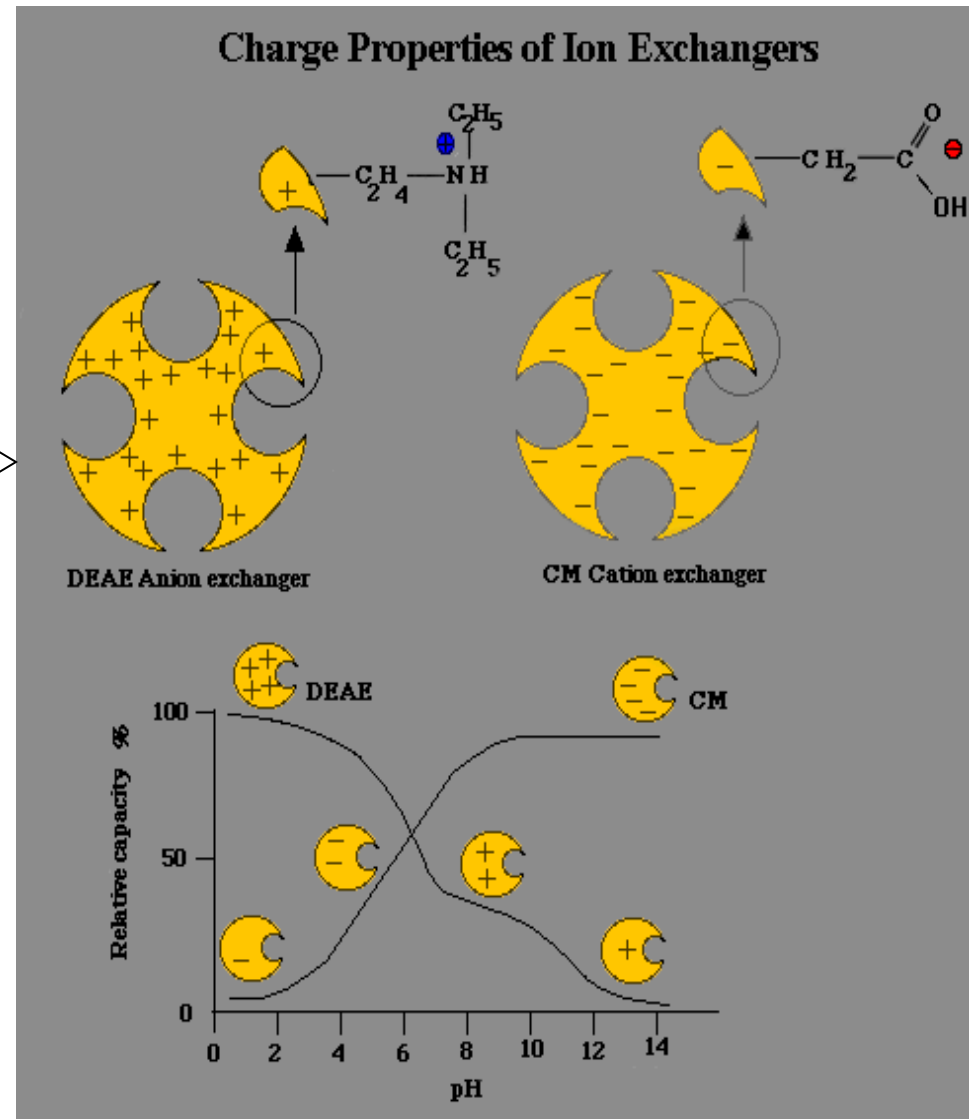
CM-Celulose : carboximetil

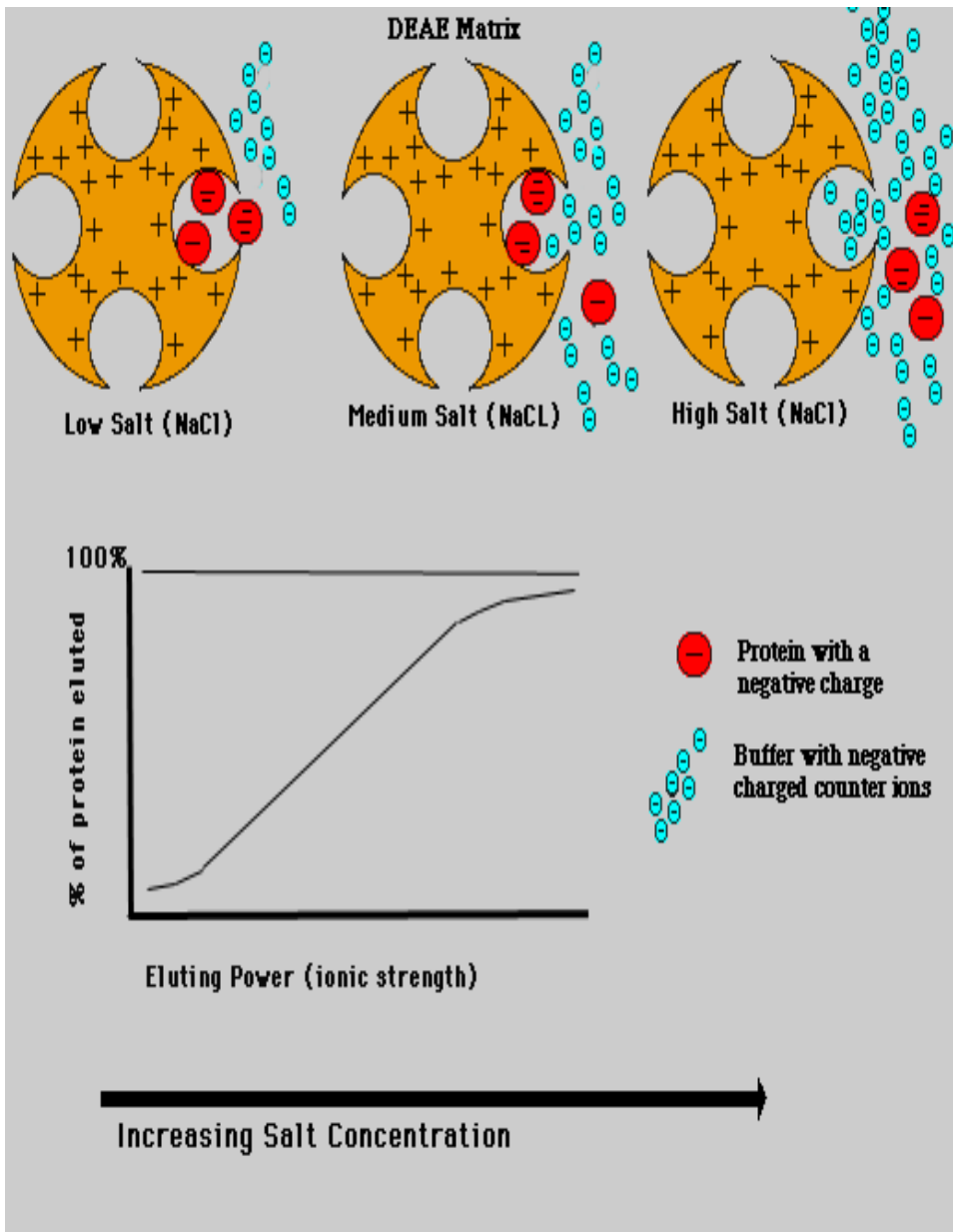


- Resina aniônica (+) : troca anions
- Resina cationica (-) : troca cátions
- Resinas trocadoras podem ser fortes ou fracas

- Proteína ligada reversivelmente na resina

Como eluir?





- Método de eluição mais utilizado é o gradiente de NaCl
Logo da eluição a proteína de interesse encontra-se purificada e concentrada

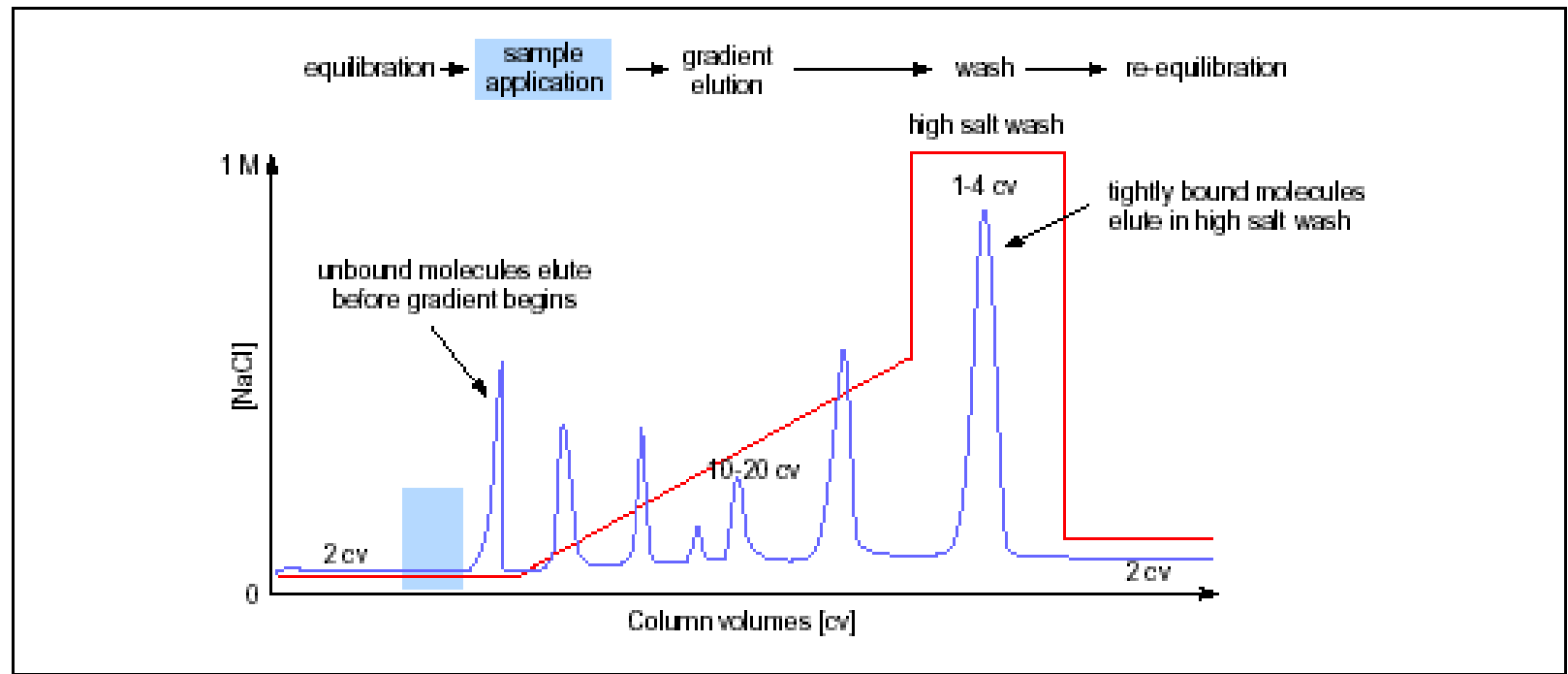


Fig. 31. Typical IEX gradient elution.

Para escolher o tipo de resina, anionica ou cationica, deve se considerar o **pl** da proteína de interesse

Tipos de Resina de troca Iônica

NOME	TIPO	GRUPO IONIZÁVEL	OBSERVAÇÕES
Dowex 1	Fortemente básica resina de polistireno	$\emptyset - \text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Troca aniônica
Dowex 50	Fortemente básica resina de polistireno	$\emptyset - \text{SO}_3\text{-H}$	Troca Catiônica
DEAE-celulose	Básica	Dietilaminoetil - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Fracionamento de proteínas ácidas e neutras
CM-celulose	Ácida	Carboximetil - CH_2COOH	Fracionamento de proteínas básicas e neutras
DEAE -Sephadex	Gel de dextrano básico	Dietilaminoetil - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Combinação de gel filtração e troca iônica de proteínas ácidas e neutras
CM - Sephadex	Gel de dextrano ácido	Carboximetil - CH_2COOH	Combinação de gel filtração e troca iônica de proteínas básicas e neutras

* Dowex: Dow Chemical Co.; Sephadex: Amersham Pharmacia Biotech; BioGel: Bio Rad Laboratories

Existem vários tipos de resinas de troca iônica disponíveis no mercado.

3) Em qual ordem as proteínas listadas a seguir deverão eluir em uma coluna de CM-celulose percolada a pH 7,0: fibrinogênio, hemoglobina, lisozima, pepsina e ribonuclease A?

Pontos isoelétricos de algumas proteínas

Proteína	Ponto isoelétrico
Pepsina	<1,0
Albumina do ovo	4,6
Albumina do soro sanguíneo humano	4,9
Tropomiosina	5,1
Insulina bovina	5,4
Fibrinogênio humano	5,8
Gama-globulina	6,6
Colágeno	6,6
Mioglobina de cavalo	7,0
Hemoglobina humana	7,1
Ribonuclease A bovina	7,8
Citocromo c	10,6
Histona bovina	10,8
Lisozima	11,0
Salmina de salmão	12,1

Fibrinogenio - -1,2
Hb - + 0,1
Lisozima - +4
Pepsina - -6
Ribonuclease + 0,8

Cromatografia de interação hidrofóbica

É um processo de partição

Proteínas em solução salina concentrada “perdem” parte da camada de solvatação para os sais, expondo na superfície regiões ricas em aminoácidos apolares, que interagem com uma matriz hidrofóbica

Três estratégias para eluição:

1. diminuir a concentração de sal
2. diminuir a polaridade da fase móvel
3. adicionar detergente

matriz hidrofóbica



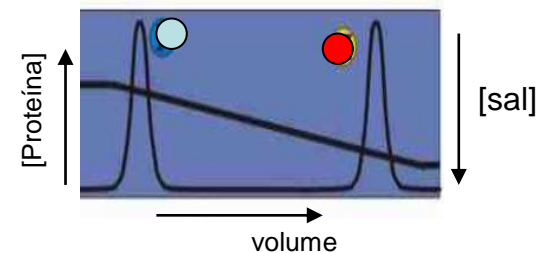
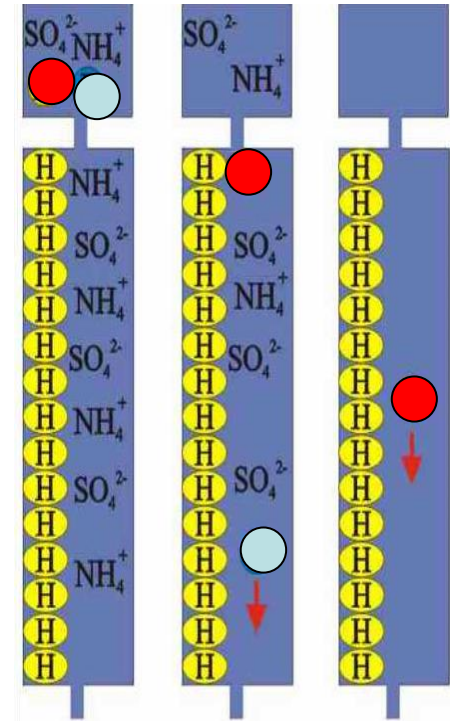
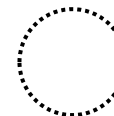
Proteína altamente hidrofílica



Proteína menos hidrofílica

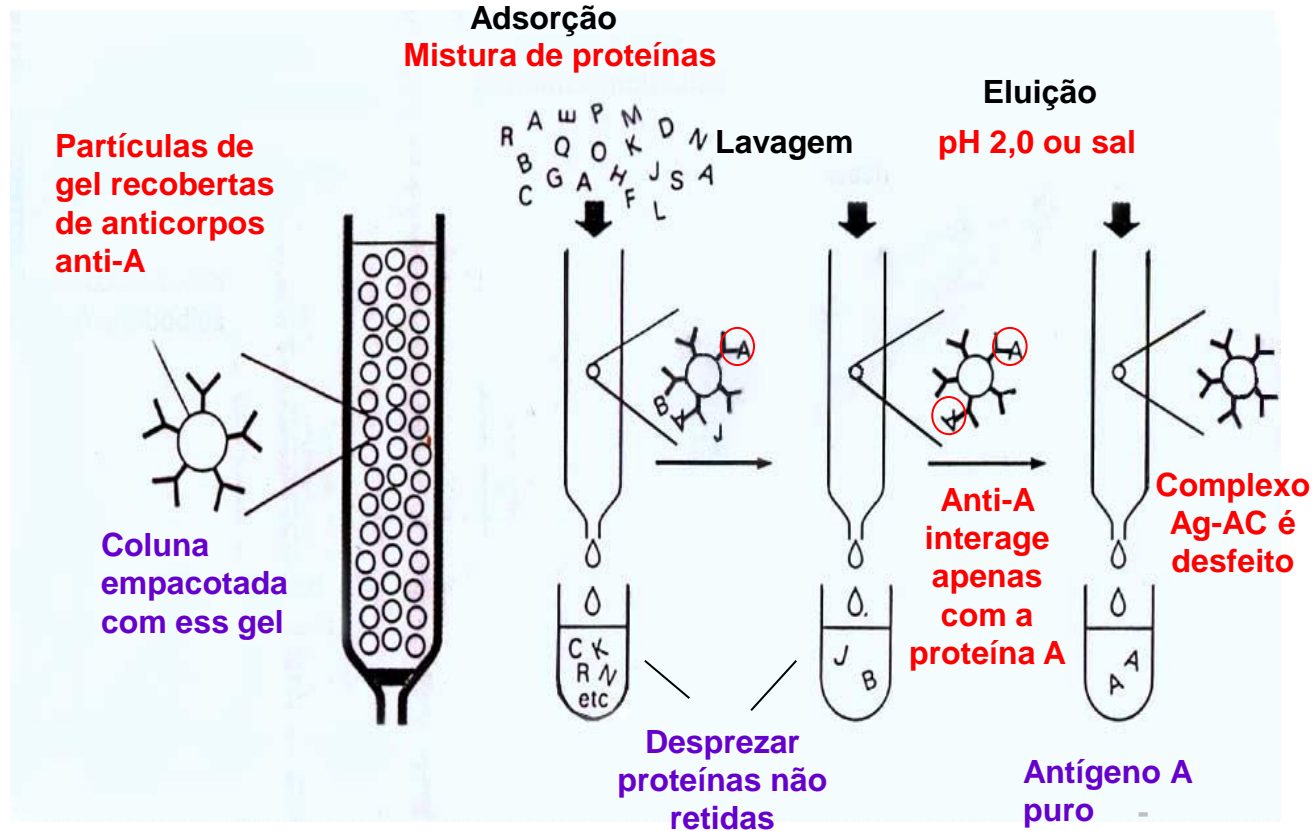


camada de H₂O solvatação



Cromatografia de afinidade:

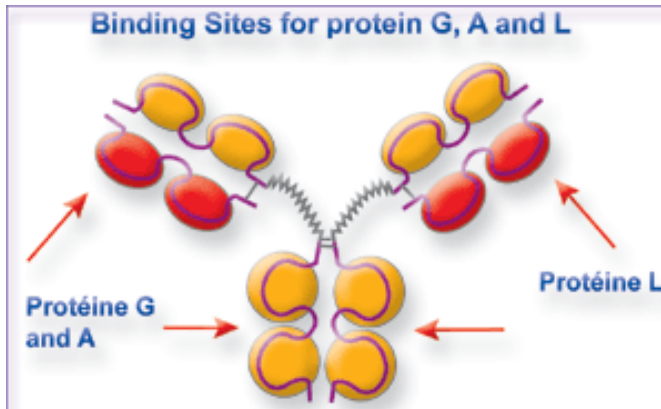
Ex: cromatografia de imunoafinidade



Eluição: condições que interferem na ligação da proteína ao ligante, como mudanças no pH e/ou força iônica, ou por competição com o ligante livre

Tipo de ligantes em cromatografia de afinidade

1. Mono-específicos - ligação específica da molécula-alvo
 - análogos de substratos ou inibidores de enzimas
 - agonistas ou antagonistas de receptores
 - determinantes antigênicos de anticorpos
 - ligantes com “tag” ou “marcação”
 - glutationa-S-transferase
 - poli-Histidina



Sítios de ligação das proteínas A, G e L à imunoglobulina, que permitem a purificação de anticorpos por cromatografia de afinidade

2. Grupo-específico:
ligantes para separação de grupos:

Ligante grupo-específico	Especificidade
Concanavalina A	Grupos glicosil- ou manosil-
Cibacron Blue	Várias enzimas, albumina
lisina	Plasminogênio, RNA ribossomal
arginina	proteínases tipo tripsina
benzamidina	proteínases tipo tripsina
calmodulina	Proteínas reguladas por calmodulina
heparina	Fatores de coagulação, lipases, hormônios, receptores esteróides, etc
Metais de transição	Proteínas e peptídeos com resíduos de His expostos

CARATERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES ELUIDAS DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

- Quantificação de proteínas nos volumes eluídos das colunas por espectrofotometria
Leitura da Abs em 280 nm (UV), rápido e simples
- Determinação das atividades enzimáticas
Nas frações que apresentam proteína (Abs_{280nm}) são determinadas as atividades enzimáticas de interesse
- Algumas proteínas apresentam propriedades espectrais características que permitem seu seguimento durante a cromatografia
Peroxidases : Banda Soret (Abs em 406-409 nm)
Lacases : Abs em 600 nm (cor azul)

Como se avalia se o processo de purificação de uma proteína foi eficiente ?

parâmetros:

- a) Atividade específica (AE);
- b) Índice de purificação
- c) Rendimento

TABELA DE PURIFICAÇÃO

ETAPA	ATIVIDADE (UI)	PROTEÍNA (mg)	A.E. (U/mg)	RENDIM. (%)	PURIFICAÇÃO (Veze)
Extrato Inicial	5.300	295	18	100	1
Precipitação (Acetona)	5.215	183	29	99	1.6
DEAE-Sepharose	3.281	55	59	62	3.3
Sephacryl S-200 HR	3.021	45	67	57	3.7
Mono S	1.708	6.6	259	32	14.5

No site do programa http://www.agbooth.com/pp_web/ Selecione a mistura padrão (Default mixture) com 20 proteínas diferentes.