

Acompanhamento de expressão e purificação de proteínas

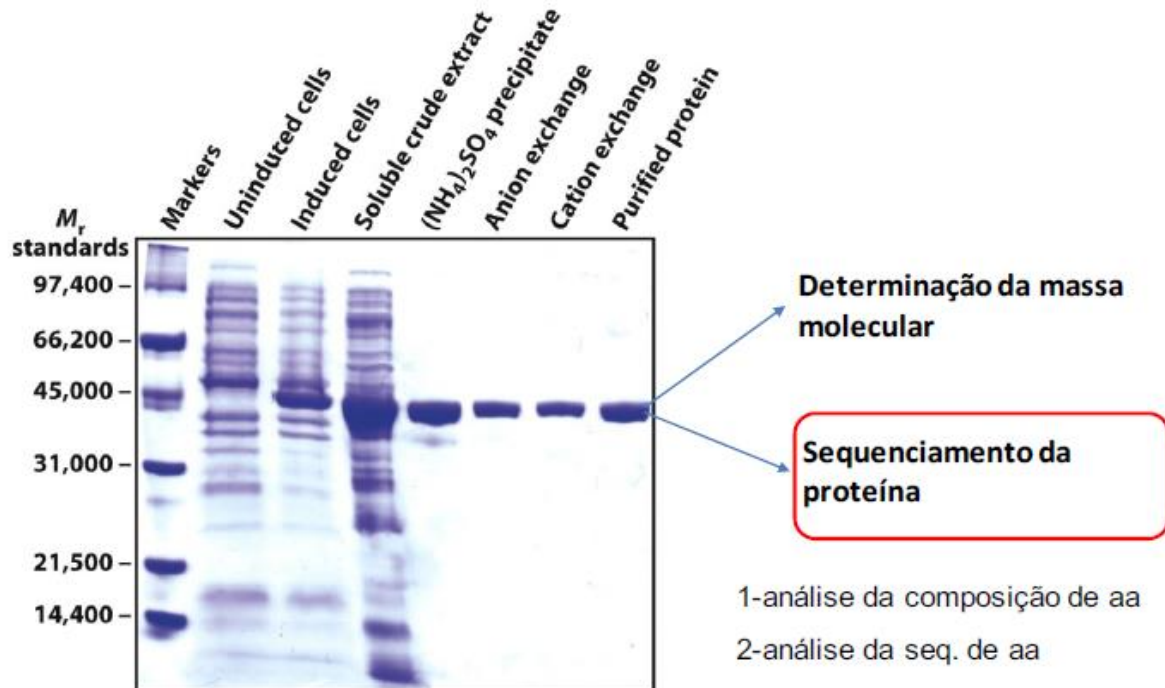
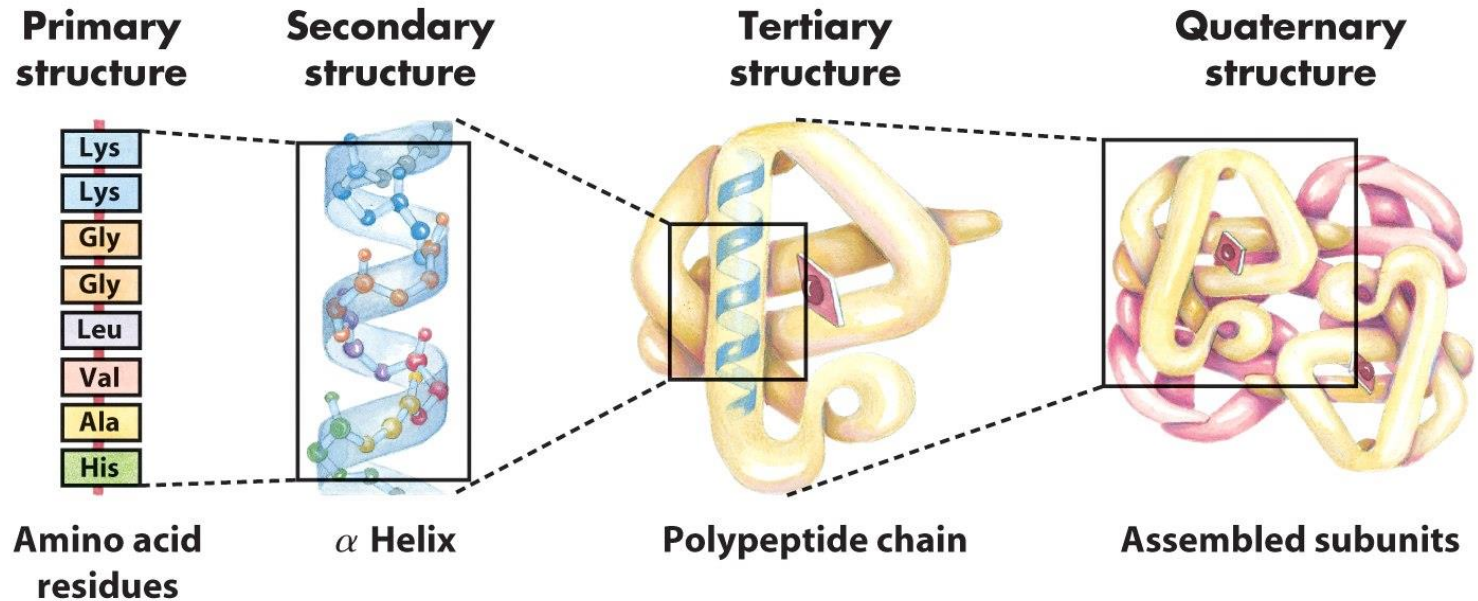


Figure 3-18b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Sayuri Miyamoto 2014

Sequenciamento de proteínas



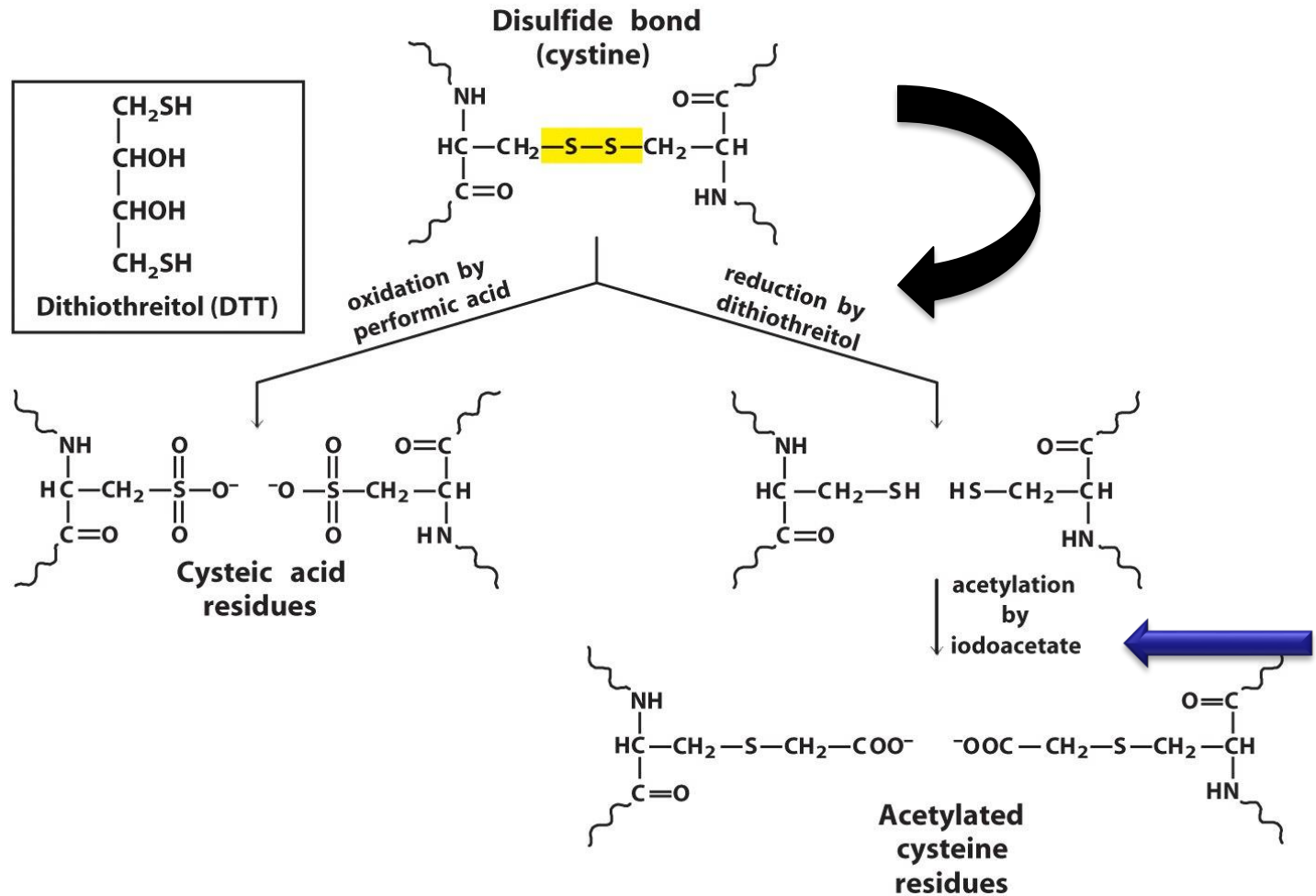
Etapas:

- 1) separar as cadeias
- 2) reduzir os grupamentos dissulfeto
- 3) hidrólise total

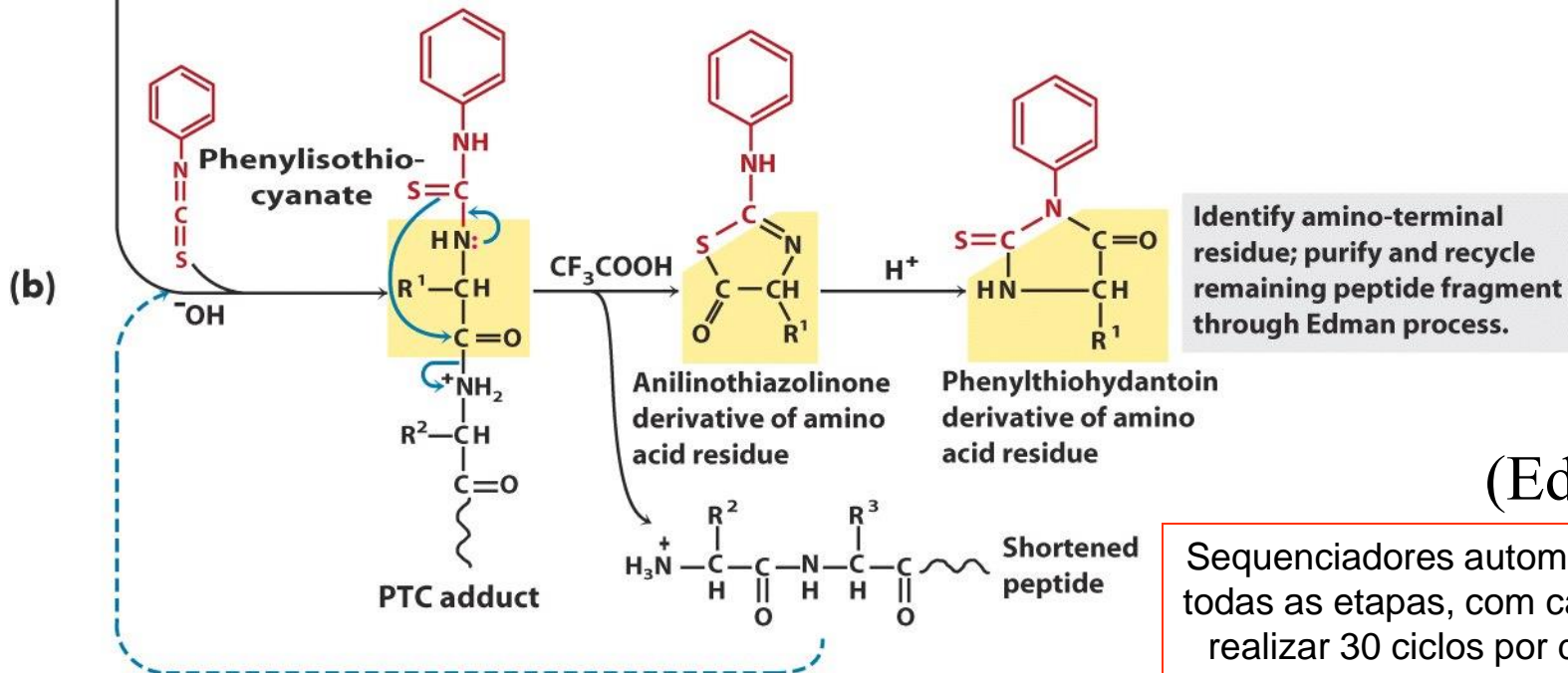
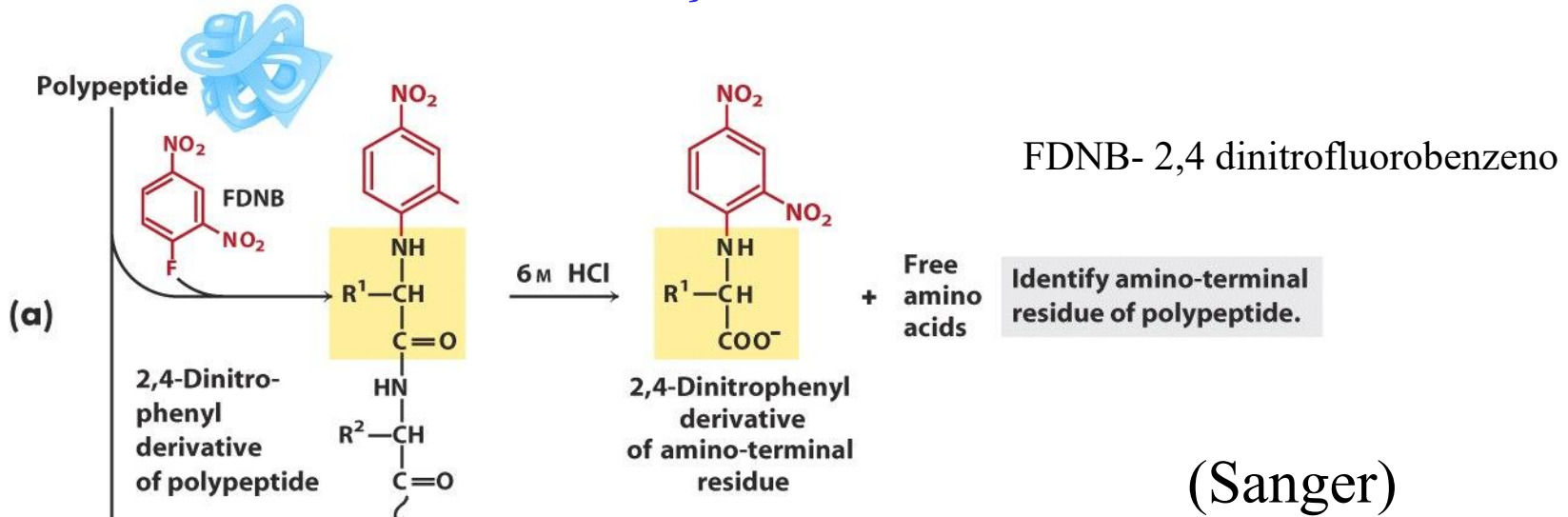
- 4) determinar os resíduos N- terminal
- 5) Hidrólise enzimática da cadeia
- 6) Determinar a sequência

1. Desdobramento da ligação dissulfeto separação das cadeias polipeptídicas

Usar agentes desnaturantes e romper as ligações dissulfeto



Identificação do N-terminal

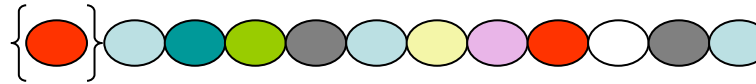


Sequenciadores automatizados fazem todas as etapas, com capacidade para realizar 30 ciclos por dia, a partir de 100-200 picomoles de proteína.

2. Análise da composição de aminoácidos

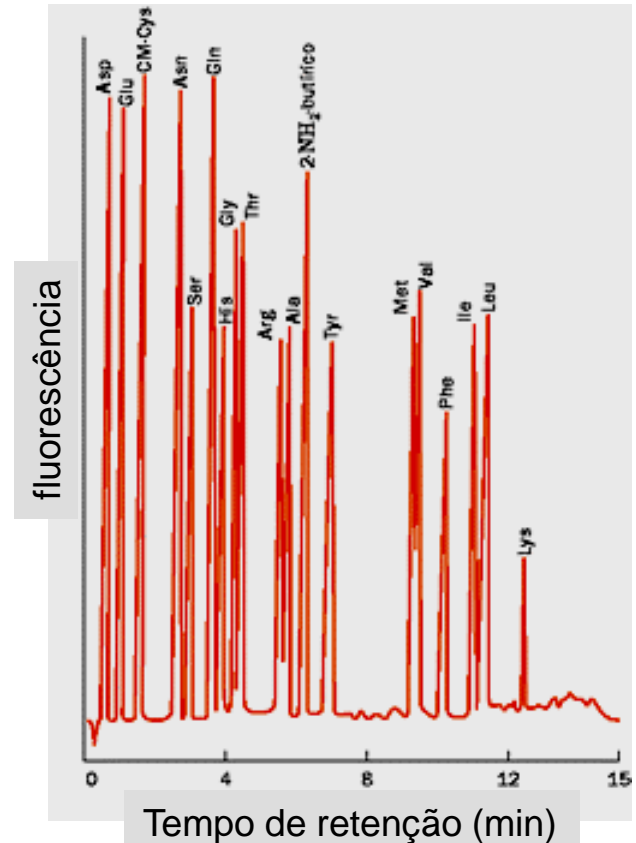


Estrutura primária: é a sequência dos aminoácidos na cadeia polipeptídica.



A proteína **pura** é tratada com HCl 6N fervente para quebrar (hidrólise) as ligações peptídica. Triptofano é destruído

A mistura resultante é submetida a métodos cromatográficos (fase reversa, troca iônica) para separar os diferentes aminoácidos.



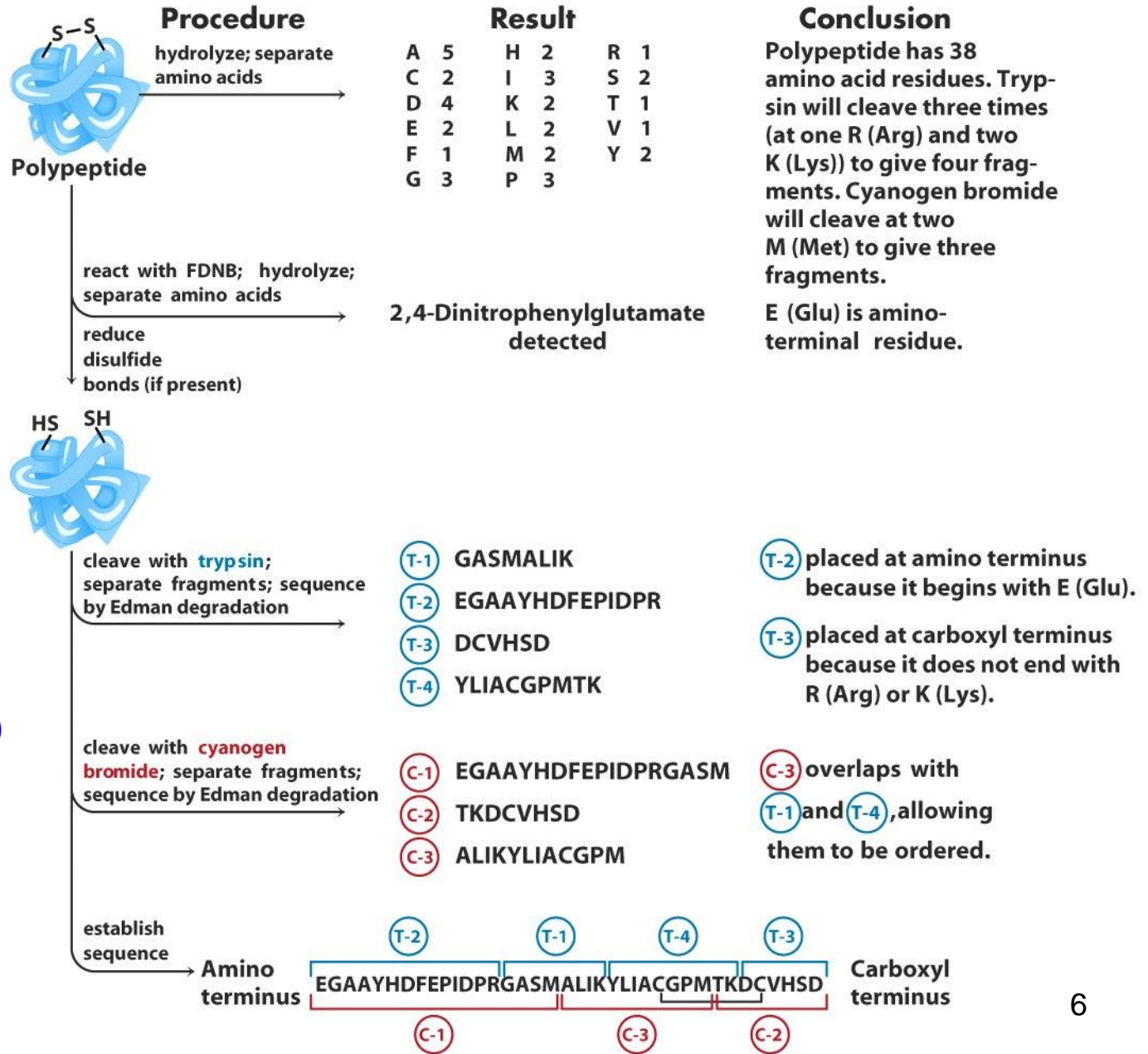
A posição do pico no cromatograma identifica o aminoácido.
A área do pico quantifica o aminoácido.

3. Separação e análise dos peptídeos

ETAPA REALIZADA

Clivagem da cadeia polipeptídica usando métodos de clivagem específicos (Proteases, CnBr)

ordenamento



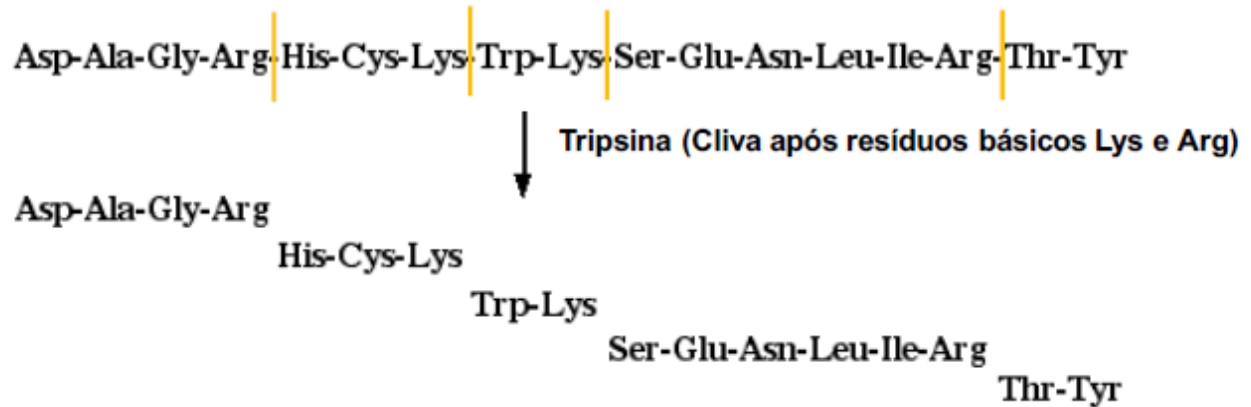
Hidrólise parcial das cadeias polipeptídicas

TABLE 3–7 The Specificity of Some Common Methods for Fragmenting Polypeptide Chains

<i>Reagent (biological source)*</i>	<i>Cleavage points†</i>
Trypsin (bovine pancreas)	Lys, Arg (C)
<i>Submaxillaris</i> protease (mouse submaxillary gland)	Arg (C)
Chymotrypsin (bovine pancreas)	Phe, Trp, Tyr (C)
<i>Staphylococcus aureus</i> V8 protease (bacterium <i>S. aureus</i>)	Asp, Glu (C)
Asp-N-protease (bacterium <i>Pseudomonas fragi</i>)	Asp, Glu (N)
Pepsin (porcine stomach)	Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinase Lys C (bacterium <i>Lysobacter enzymogenes</i>)	Lys (C)
Cyanogen bromide	Met (C)

*All reagents except cyanogen bromide are proteases. All are available from commercial sources.

†Residues furnishing the primary recognition point for the protease or reagent; peptide bond cleavage occurs on either the carbonyl (C) or the amino (N) side of the indicated amino acid residues.



Como ordenar a sequência de peptídeos??

Usar mais de um método de clivagem da cadeia polipeptídica...

Exemplo: Quimotripsina (Cliva após resíduos aromáticos)

Asp-Ala-Gly-Arg-His-Cys-Lys-Trp Lys-Ser-Glu-Asn-Leu-Ile-Arg-Thr-Tyr

Degradação de Edman

Sequenciadores Automáticos



Limitações:

Tempo de análise longo!

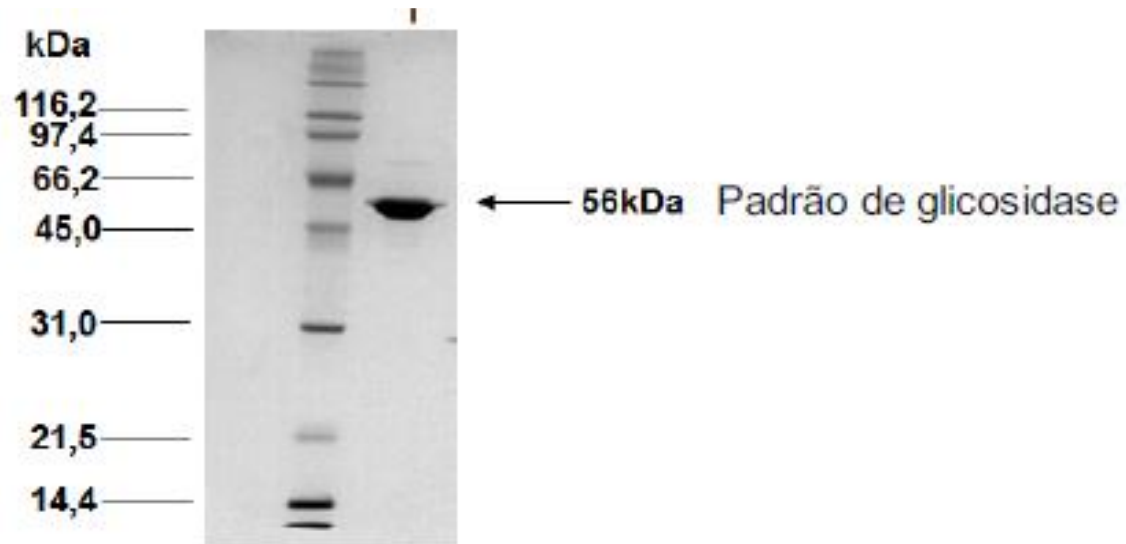
Grande quantidade de amostra!

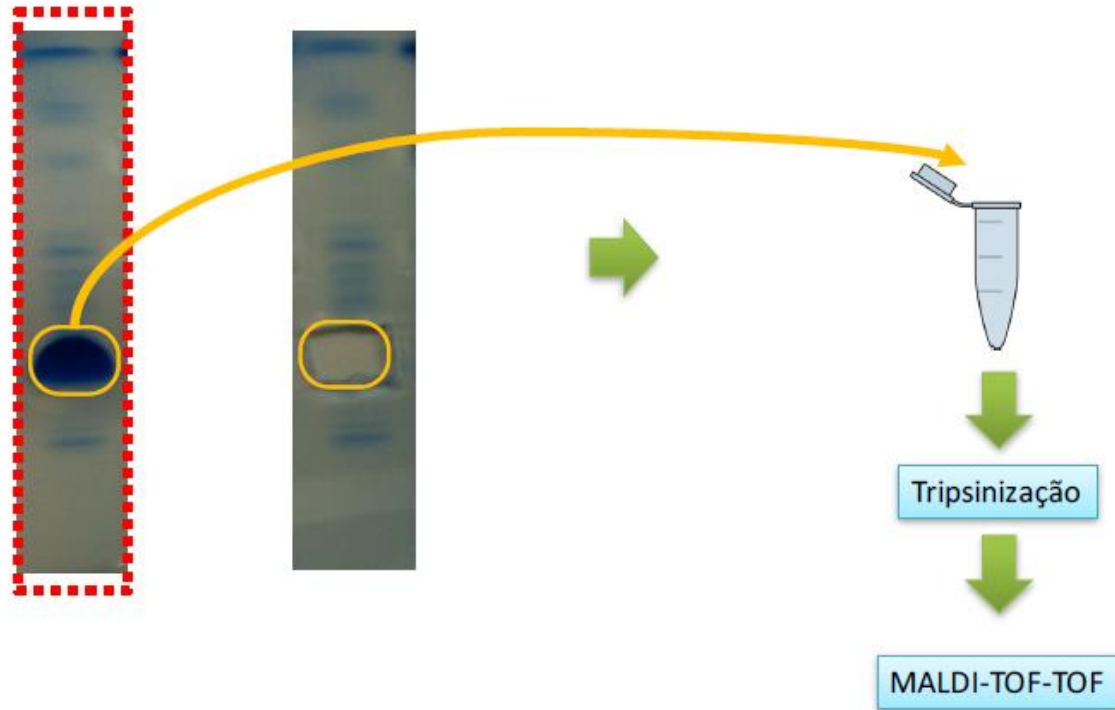
Muito lento para os padrões de hoje!!!

Hoje em dia o sequenciamento é feito
por espectrometria de massas.

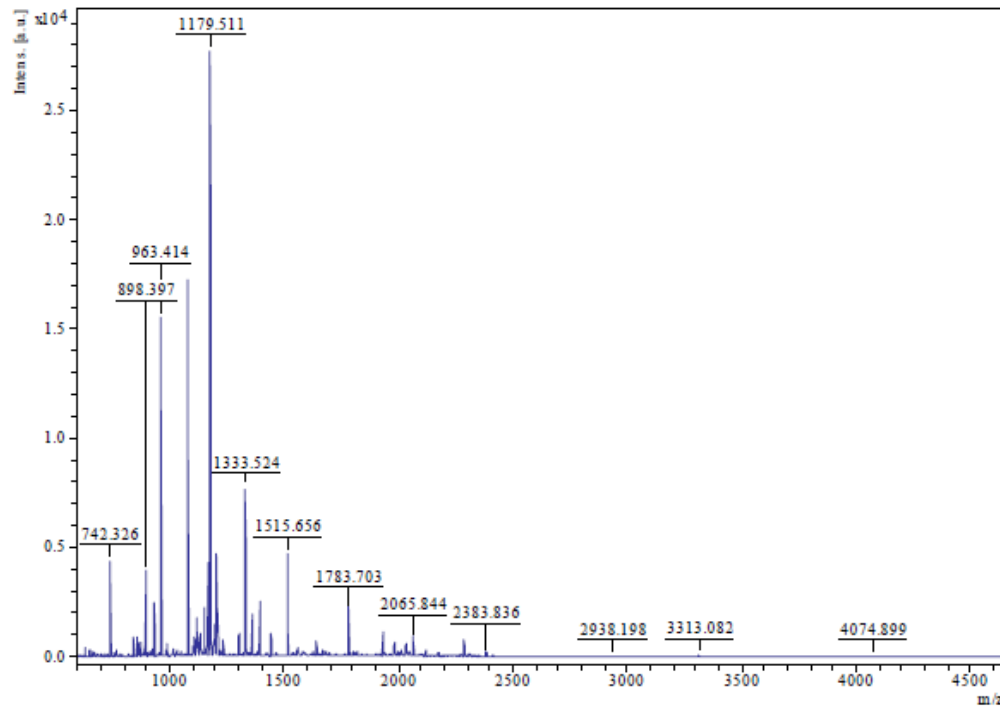
(+rápido, requer pouquíssima amostra)

Exemplo de análise de uma enzima Beta-glicosidase por SDS e Espectrometria de massas





Espetro de massa dos peptídeos da beta-glicosidase



Lista de peptídeos m/z
698.315
742.326
780.283
866.400
936.431
963.414
1034.066
1082.483
1121.502
1154.519
1170.517
1179.511
1361.555
1383.528
1515.656
1728.736
1783.703
1940.766
2089.867
2272.853
2288.853
2310.801
2938.198

Busca no Mascot utilizando as massas dos peptídeos detectados

Lista de peptídeos m/z

698.315
742.326
780.283
866.400
936.431
963.414
1034.066
1082.483
1121.502
1154.519
1170.517
1179.511
1361.555
1383.528
1515.656
1728.736
1783.703
1940.766
2089.867
2272.853
2288.853
2310.801
2938.198



MATRIX SCIENCE

Search this site

Home Mascot database search Products Technical support Training News Blog Newsletter Contact

Access Mascot Server Database search help

Mascot database search > Access Mascot Server > Peptide Mass Fingerprint

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name: Seyuri Email: miyamoto@ic.usp.br

Search title: _____

Database(s): Vertebrates_EST, organism_inerts, cRAP, NCBIprot, SwissProt

Enzyme: Trypsin

Allow up to: 2 missed cleavages

Taxonomy: All entries

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Protein mass: _____ kDa Peptide tol. #: 0.5 Da

Mass values: MH⁺ M₂ M-H⁺ Monoisotopic Average

Data input: Data file Selecionar Arquivo nenhum arquivo selecionado

Query

Decoy: Report top: AUTO Hits

Start Search ... Reset Form

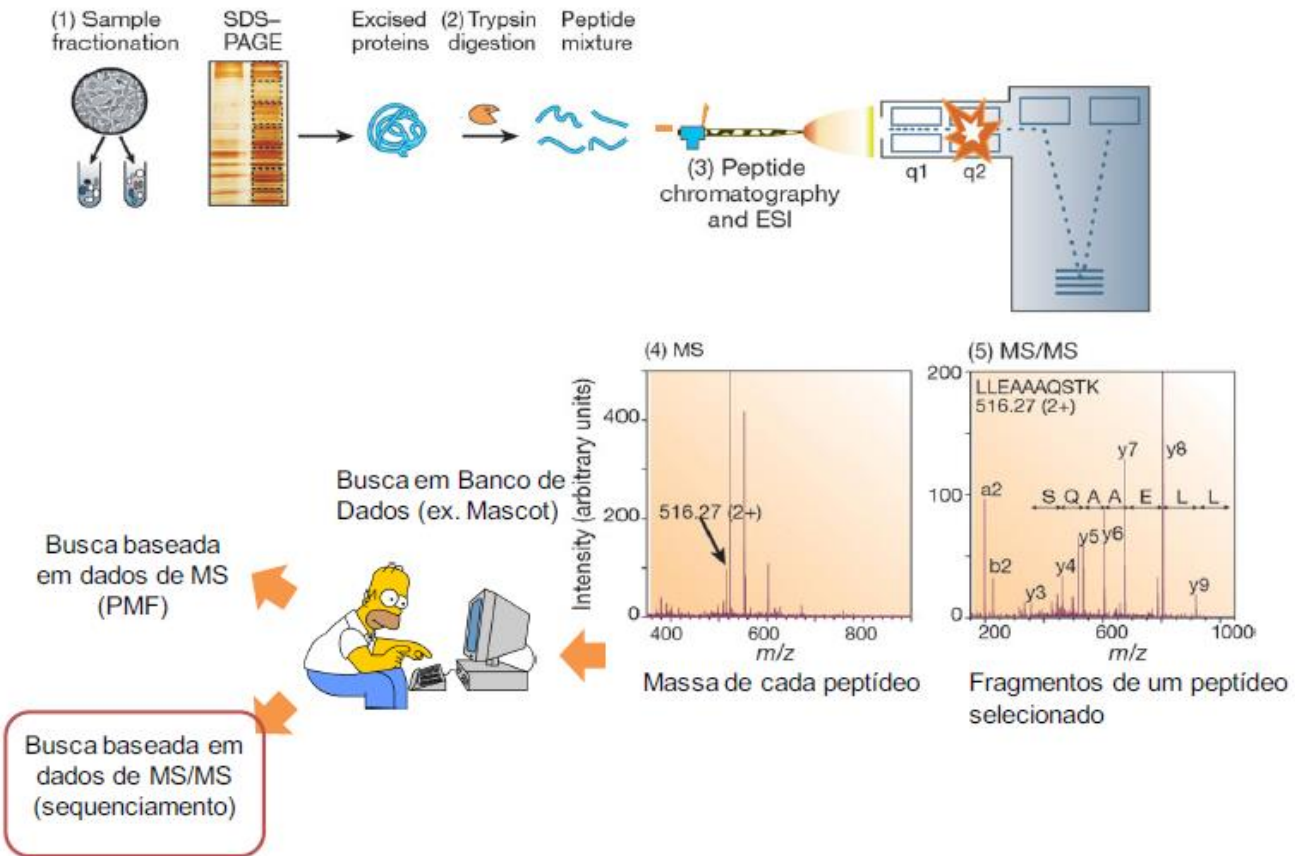
Banco de Dados (Database)

[Swiss-Prot](#)

Se a proteína é de um organismo bem caracterizado como humanos, camundongos, levedura, ou arabdopsis, o Swiss Prot é o recomendado

[NCBIprot](#)

Se a proteína é de bactéria ou planta, usar o NCBIprot, pois é um banco de dados mais amplo que o Swiss-Prot



Resumo: Identificação de Proteínas/Enzimas

1. Determinação da massa molecular
 - SDS-PAGE
 - cromatografia de exclusão molecular
 - espectrometria de massas (MALDI-TOF, Q-TOF)
2. Determinação da sequência de aminoácidos
 - Degradação de Edman
 - Espectrometria de massas

Em ambos os casos proteínas precisam ser clivadas especificamente (ex. Proteases) para gerar peptídeos menores.

A espectrometria de massas é a técnica mais precisa e mais utilizada atualmente.

A clivagem de um polipeptídeo com CNBr e quimiotripsina produz fragmentos com as sequências de aminoácidos listadas. Qual a sequência do peptídeo intacto?

Tratamento com CNBr

- 1-Arg-Ala-Tyr-Gly-Asn
2. Leu-Phe-Met
- 3- Asp-Met

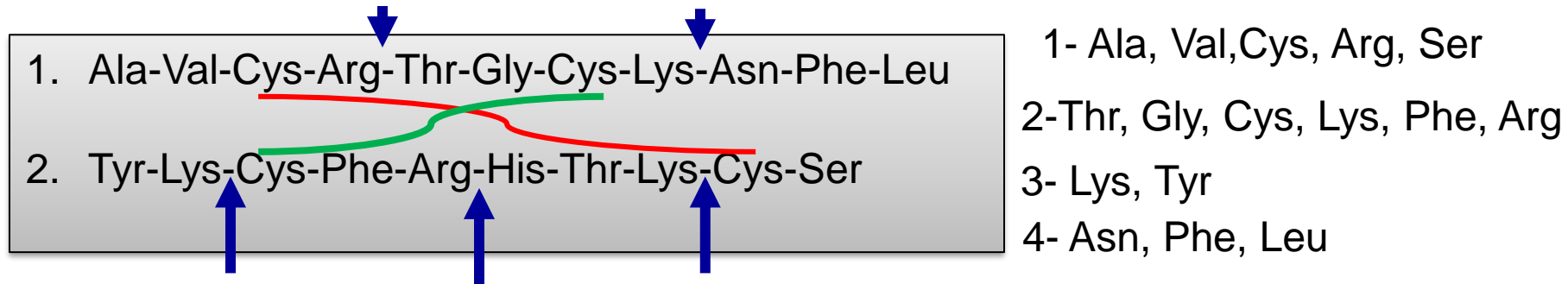
Tratamento com quimiotripsina

4. Met-Arg-Ala-Tyr
- 5- Asp-Met-Leu-Phe
- 6- Gly-Asn

Asp-Met-Leu-Phe- Met Arg-Ala-Tyr-Gly-Asn

O tratamento de um polipeptídeo com 2-mercaptoetanol produz dois polipeptídeos:

1. Ala-Val-Cys-Arg-Thr-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Leu
2. Tyr-Lys-Cys-Phe-Arg-His-Thr-Lys-Cys-Ser



O tratamento do peptídeo intacto com tripsina (cliva c-terminal de lys e Arg) produz fragmentos com a seguinte composição de aminoácidos:

3. (Ala, Arg, Cys, Ser, Val)
4. (Arg, Cys, Gly, Lys, Thr, Phe)
5. (Asn, Leu, Phe)
6. (Lys, Tyr)

Indique a posição da ponte dissulfeto no polipeptídeo intacto.

