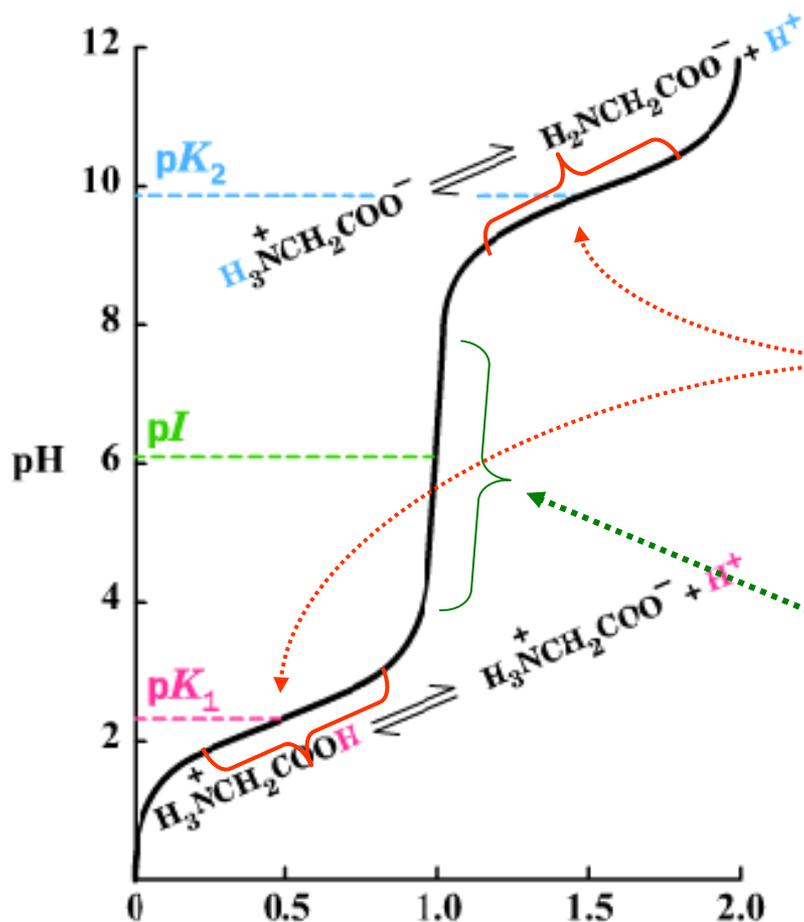


# **PROTEÍNAS: ESTRUTURA PRIMÁRIA, ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS E SEPARAÇÃO**

Prof. Dr. Henning Ulrich

# **Voltando aos valores de $pI$ e titulação de aminoácidos**

## Poder tamponante e curva de titulação da glicina



H<sup>+</sup> dissociados por molécula

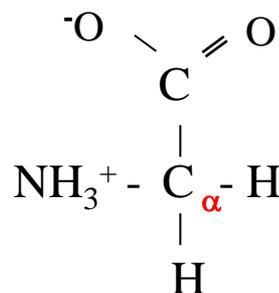
adição de NaOH (volume)

A curva mostra a variação do pH de uma solução do aminoácido glicina quando se adiciona uma base, por exemplo, NaOH.

A glicina vai se dissociando, e libera H<sup>+</sup> para o meio.

O poder tamponante da glicina pode ser observado em dois pontos da curva, em que o aumento de pH é mais lento.

Observe que o pH da solução na metade desses trechos da curva coincide com os valores de pK dos grupos ionizáveis da glicina. O efeito tampão nesses pHs ocorre por que há duas formas de glicina presentes na solução, uma dissociada (50%) e outra não, como mostra a figura.



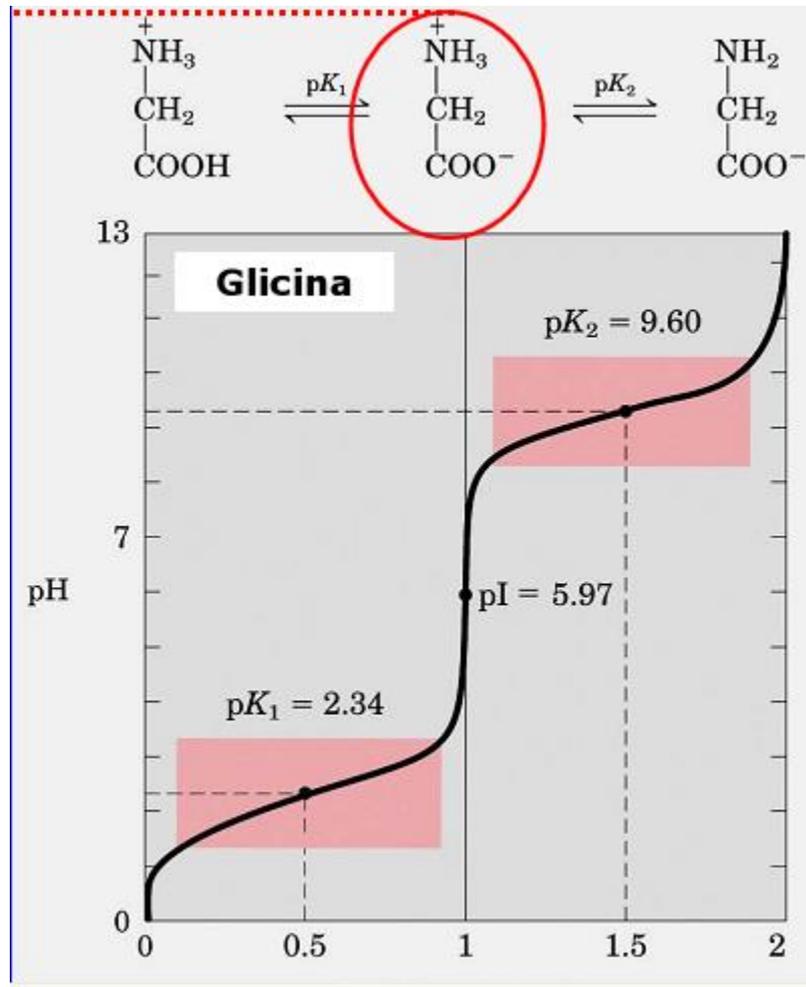
**Glicina**

(forma anfotérica – carga zero)

pK α -COOH = 2.34

pK α -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> = 9.60

# Curva de titulação de um aminoácido



-Início: AA em pH ácido

-Adição de Base

-pH aumenta e a ionização do grupo carboxila se altera

-pI: ponto isoelétrico – carga líquida = zero

-inicia a dissociação do grupo amino

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} = 5,97$$

Equivalentes de OH<sup>-</sup>

# Como o estado de ionização e a carga elétrica da glicina variam em função do pH do meio ?

Para a glicina os valores de pK são:

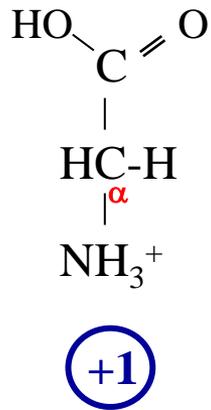
$$\text{pK } \alpha - \text{NH}_3^+ = 9.60$$

$$\text{pK } \alpha - \text{COOH} = 2.34$$

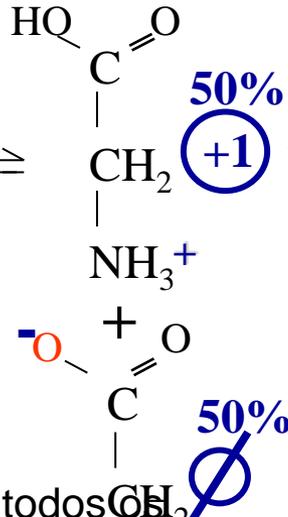
Cálculo do ponto isoelétrico

$$\text{pI} = \frac{2.34 + 9.6}{2} = 5.97$$

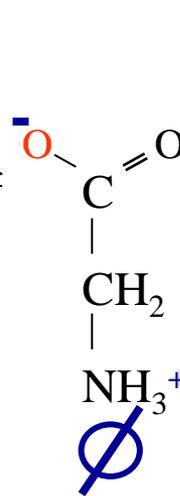
pH 0 - 2



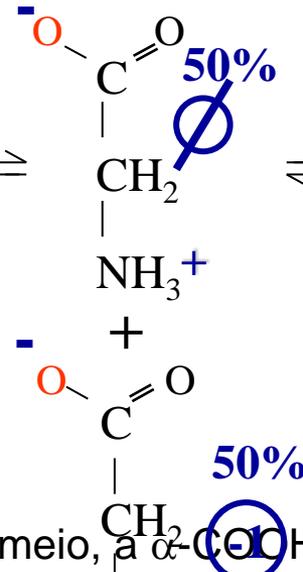
pH 2,34



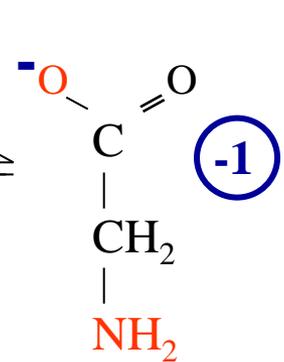
pH 3.0 - pH 9.0



pH 9.6



pH 10 - 14

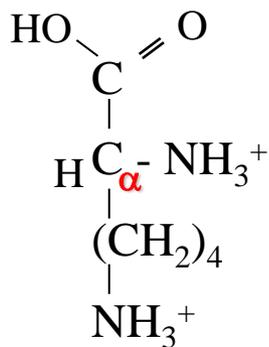


Em pH < 2,34, todos os grupos ionizáveis da glicina estão protonados. A molécula apresenta carga +1.

Diminuindo a [H+] do meio, a  $\alpha$ -COOH começa a desprotonar. No pH 2,34, metade das -COOH desprotonaram, gerando a glicina com carga zero.

Em pH > 10 predomina a forma de glicina com carga -1.

# Como o pH do meio afeta a carga de aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis ?



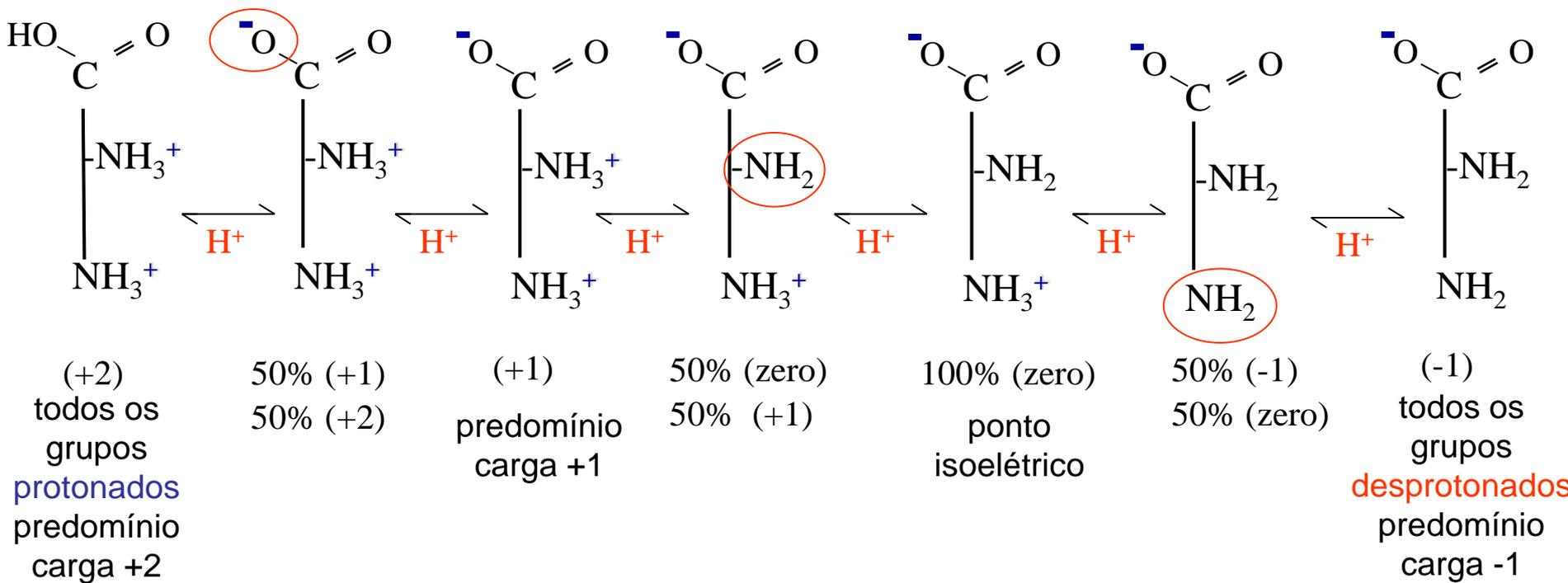
Como exemplo, veremos a ionização da **Lisina**:

$\text{pK } \alpha\text{-COOH} = 2.18$
$\text{pK } \alpha\text{-NH}_3^+ = 8.95$
$\text{pK } \text{R-NH}_3^+ = 10.53$

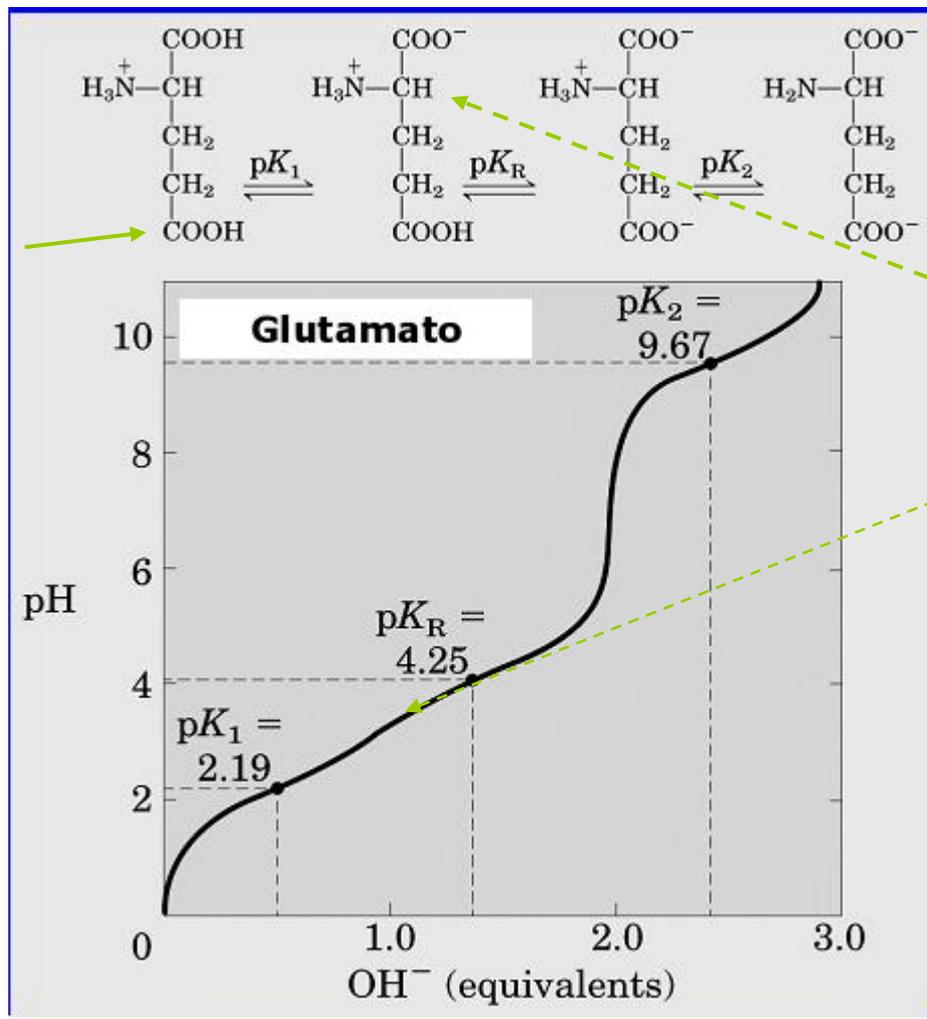
$$\text{pI} = \frac{8.85 + 10.53}{2} = 9.69$$

(ponto isoelétrico)

$\text{pH} < 2$        $\text{pH } 2.18$        $\text{pH } 3 - 8$        $\text{pH } 8.95$        $\text{pH } 9.69$        $\text{pH } 10.53$        $\text{pH} > 11$   
 $\text{pK } \alpha\text{-COOH}$        $\text{pK } \alpha\text{-NH}_3^+$        $\text{pK } \text{R-NH}_3^+$

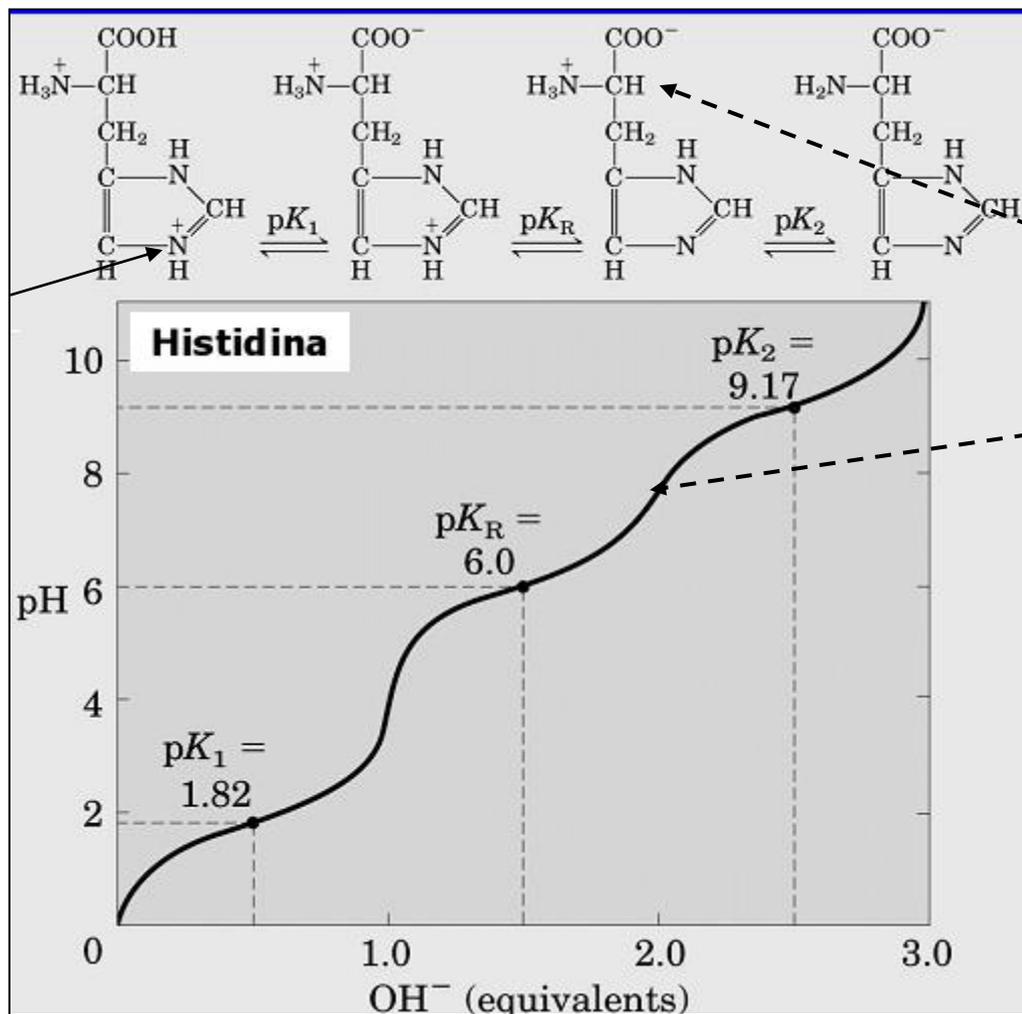


# Curva de titulação do aminoácido **ácido glutâmico**



$$pI = \frac{pK_1 + pK_R}{2} = 3,22$$

# Curva de titulação do aminoácido **histidina**



**pI**

$$\text{pI} = \frac{\text{pK}_2 + \text{pK}_R}{2} = 7,59$$

# Aminoácidos e a Ligação Peptídica: a base estrutural das proteínas

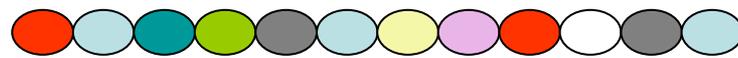
Aminoácidos proteicos:

- propriedades gerais
- classificação
- ionização e carácter anfotérico

Ligação peptídica *versus* ligação amida:

- ressonância e coplanariedade

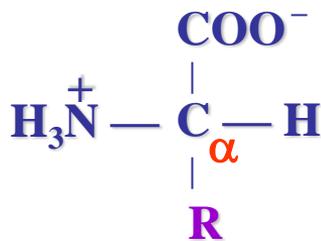
Proteínas podem ser definidas como polímeros compostos de  $n$  unidades monoméricas, os aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas



Proteína (polímero)

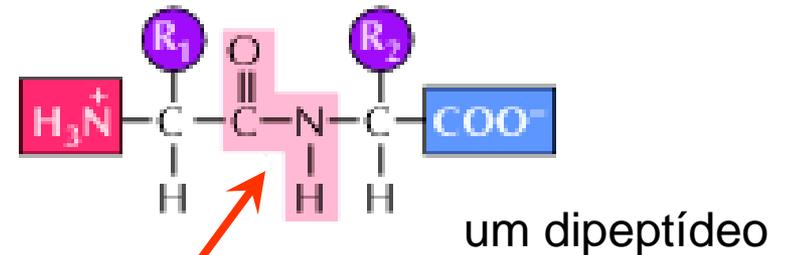
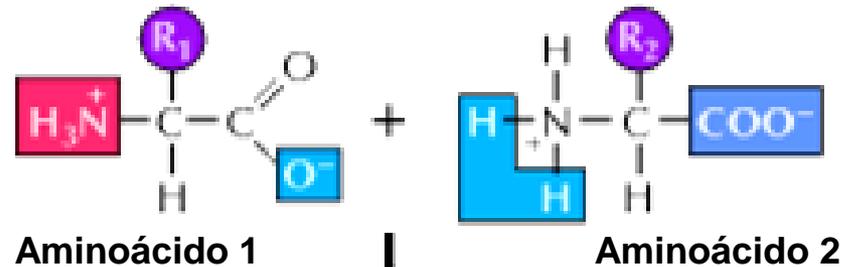
(monômero)

aminoácido



Fórmula geral de um  $\alpha$  aminoácido:  
os grupos amino e carboxila estão  
no carbono  $\alpha$ .

**R** – a cadeia lateral R diferencia os  
aminoácidos entre si



A **ligação peptídica** ocorre entre o grupo  $\alpha$ -carboxila de um aminoácido e o grupo  $\alpha$ -amino de outro aminoácido.

Até 100 aminoácidos (10 kDa)  $\rightarrow$  peptídeo  
Mais de 100 aminoácidos  $\rightarrow$  proteína

## **Aminoácidos moldam as propriedades das proteínas**

- Diferentes cadeias laterais → tamanhos, formas, cargas;
  - Capacidade de preencher o interior da proteína;
- Capacidade de formação de estruturas secundárias;
  - Capacidade de ionização e reatividade química;
    - Capacidade de interação com íons;
  - Capacidade de formar ligações de Hidrogênio.
    - INTERAÇÃO COM A ÁGUA!!!!

### **Observação**

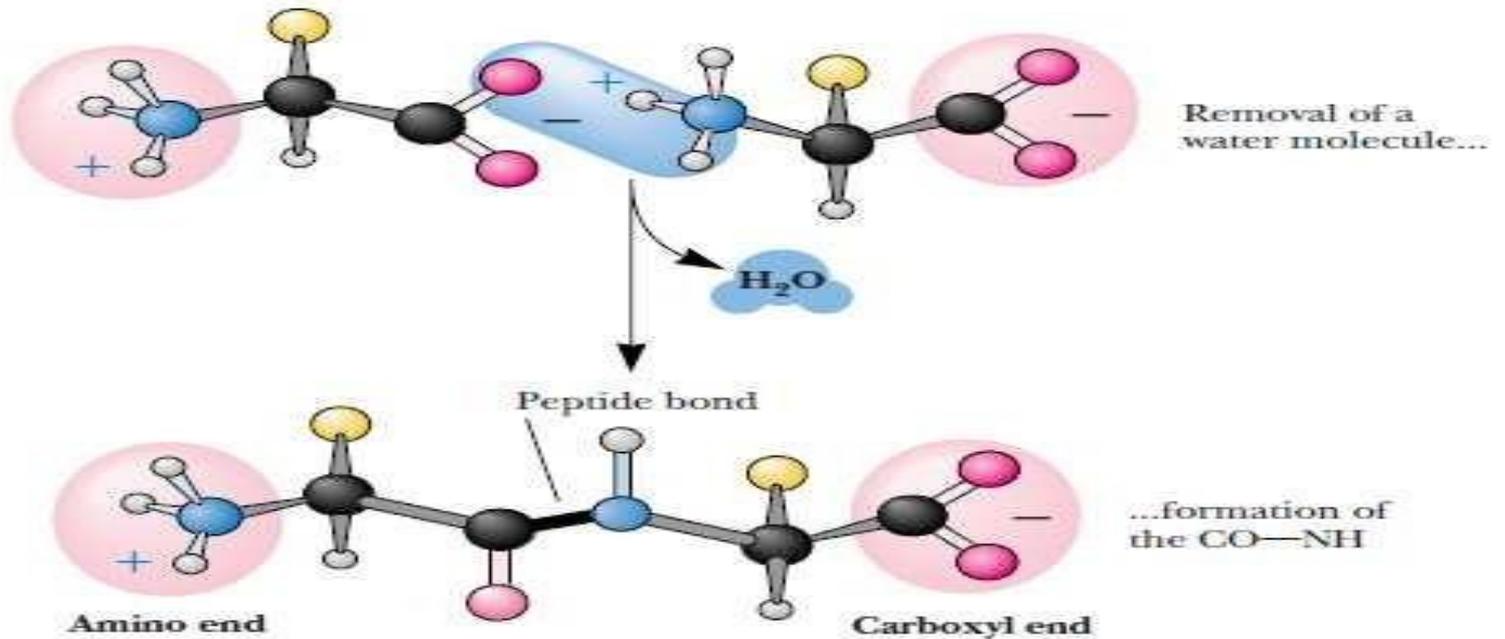
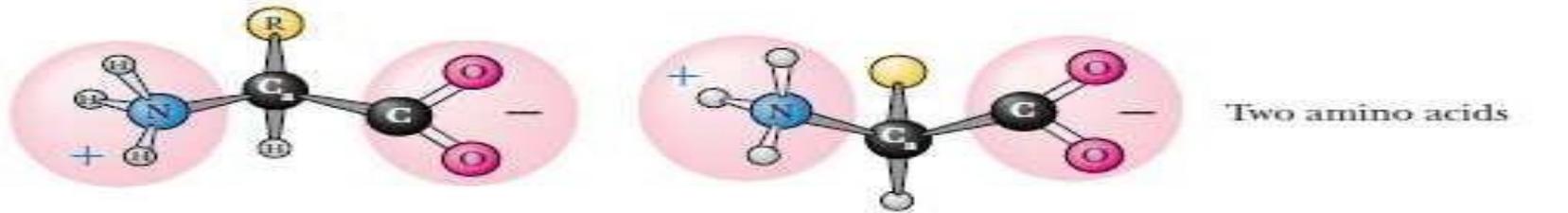
**As funções das proteínas derivam da diversidade e versatilidade dos 20 aminoácidos naturais e suas variações**

# Polímeros de aminoácidos

Resultado da união do grupo  $\alpha$ -carboxil no aminoácido  $n$  com o grupo  $\alpha$ -amino do  $n+1$

Nomenclatura:  $\text{NH}_2\text{-----COOH}$

→ Sequência de aminoácidos XYZ # XZY



# Oligopeptide vs Polypeptide

More Information Online [WWW.DIFFERENCEBETWEEN.COM](http://WWW.DIFFERENCEBETWEEN.COM)

## DEFINITION

An oligopeptide is a chain of amino acids which contains a small number of amino acids per molecule

A polypeptide is a chain of amino acid residues which contain a large number of amino acids

## STRUCTURE

Combination of a few amino acid residues

Combination of a large number of amino acids

## COMPLEXITY

Usually this category includes simple peptides

This category includes highly-networked peptides

# São as proteínas que fazem o organismo!

**TABLE 24-2** DNA, Gene, and Chromosome Content in Some Genomes

	<i>Total DNA (bp)</i>	<i>Number of chromosomes*</i>	<i>Approximate number of genes</i>
Bacterium ( <i>Escherichia coli</i> )	4,639,221	1	4,405
Yeast ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	12,068,000	16 <sup>†</sup>	6,200
Nematode ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	97,000,000	12 <sup>‡</sup>	19,000
Plant ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	125,000,000	10	25,500
Fruit fly ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	180,000,000	18	13,600
Plant ( <i>Oryza sativa</i> ; rice)	480,000,000	24	57,000
Mouse ( <i>Mus musculus</i> )	2,500,000,000	40	30,000–35,000
Human ( <i>Homo sapiens</i> )	3,200,000,000	46	30,000–35,000

**Note:** This information is constantly being refined. For the most current information, consult the websites for the individual genome projects.

\*The diploid chromosome number is given for all eukaryotes except yeast.

<sup>†</sup>Haploid chromosome number. Wild yeast strains generally have eight (octoploid) or more sets of these chromosomes.

<sup>‡</sup>Number for females, with two X chromosomes. Males have an X but no Y, thus 11 chromosomes in all.

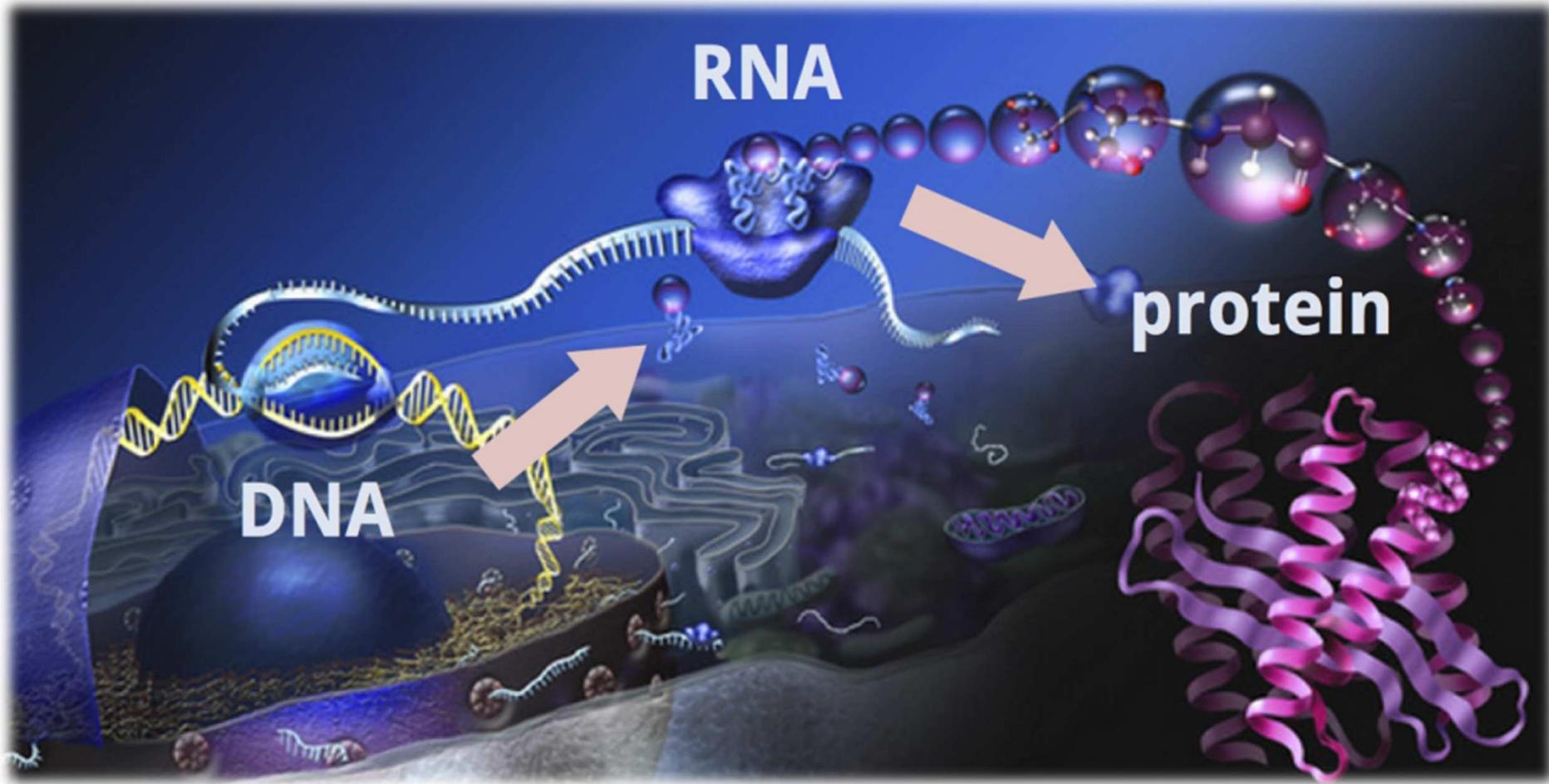
# Dogma central da Biologia A

Informação é:

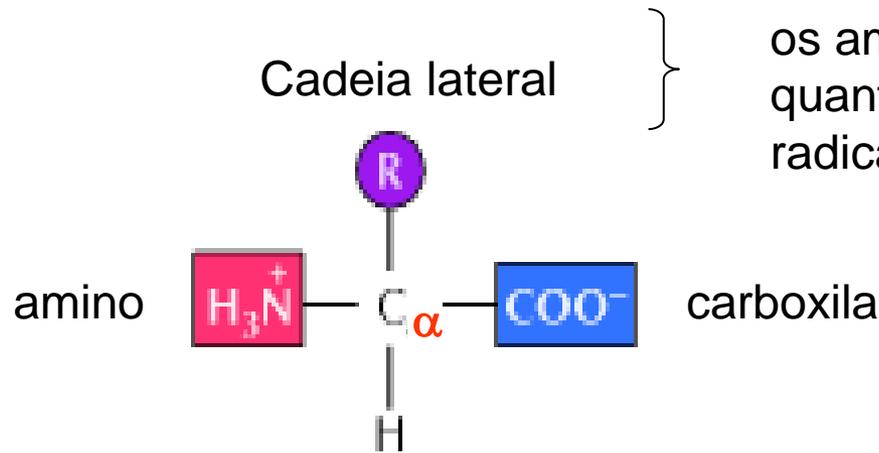
→ Decodificada →

Armazenada

Executada



# Aminoácidos protéicos são determinados geneticamente: código genético



os aminoácidos se diferenciam entre si quanto ao tipo de cadeia lateral, ou grupo radical R, que apresentam.

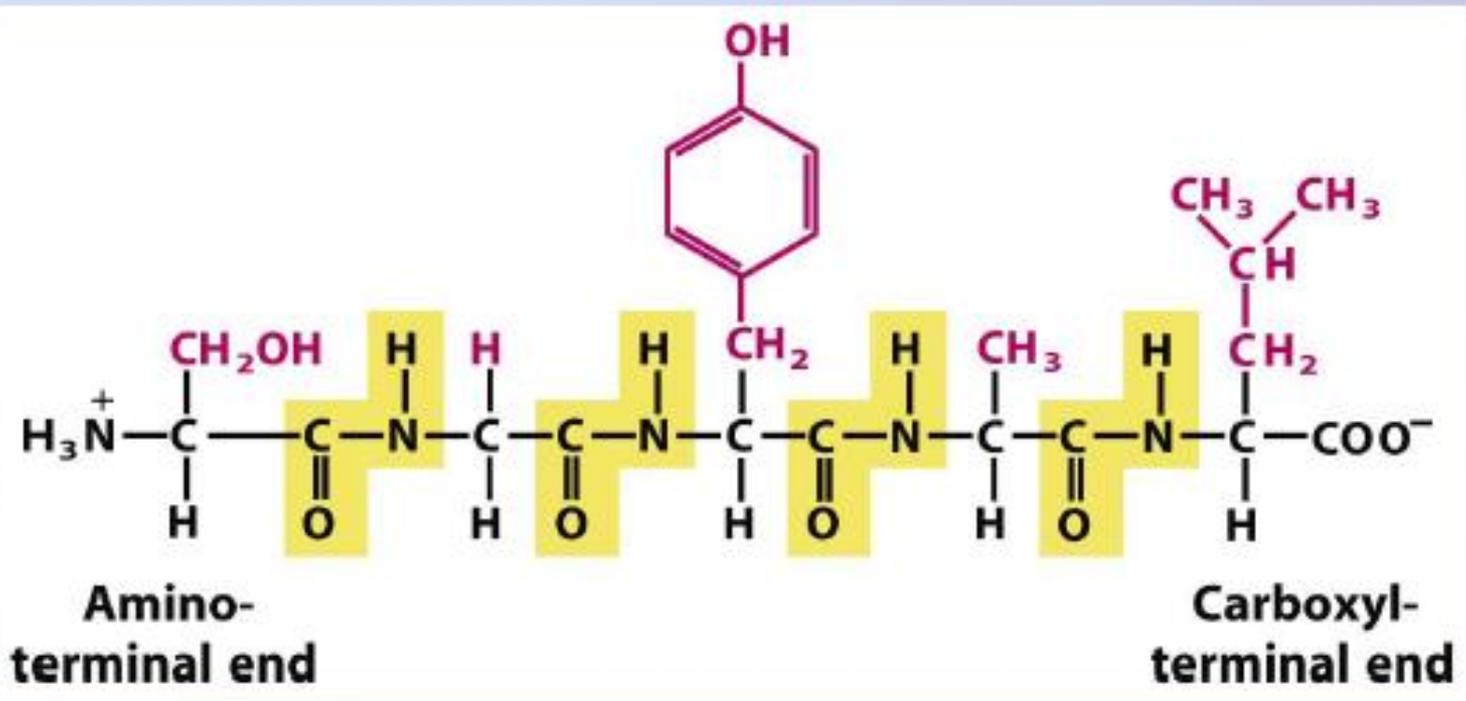
Existem 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente em proteínas de todos os tipos de organismos, e que são determinados por códonos específicos (triplets de nucleotídeos) no material genético dos seres vivos.

Os aminoácidos protéicos são **classificados** de acordo com as propriedades de suas cadeias laterais

	U		C		A		G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

# Estrutura primária das proteínas

- Seqüência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas
- Terminal amino e carboxila
- Número variável de resíduos de aminoácidos

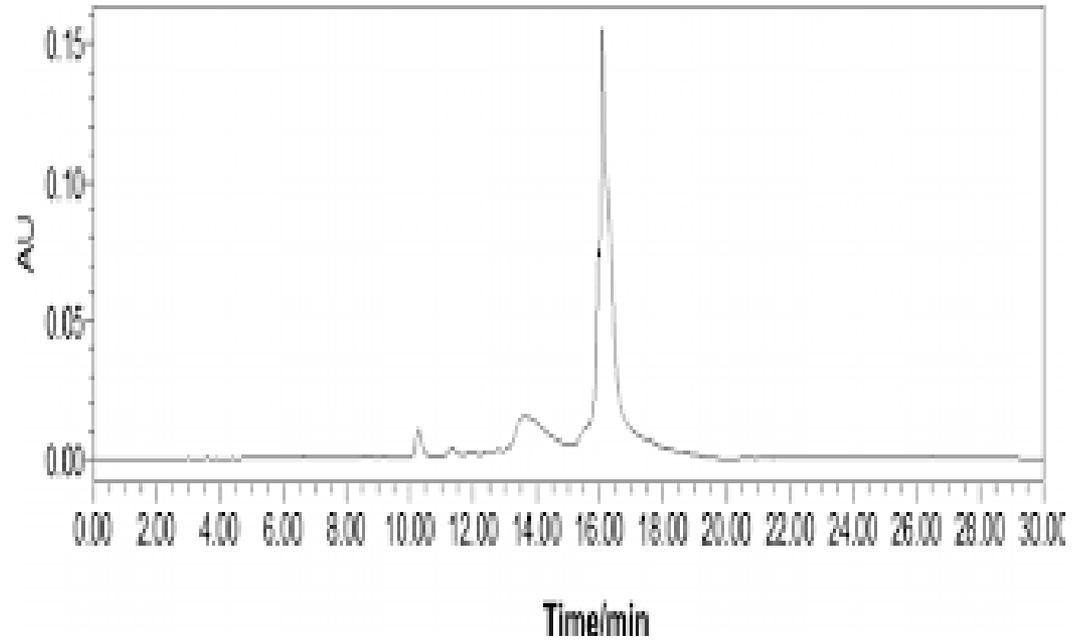
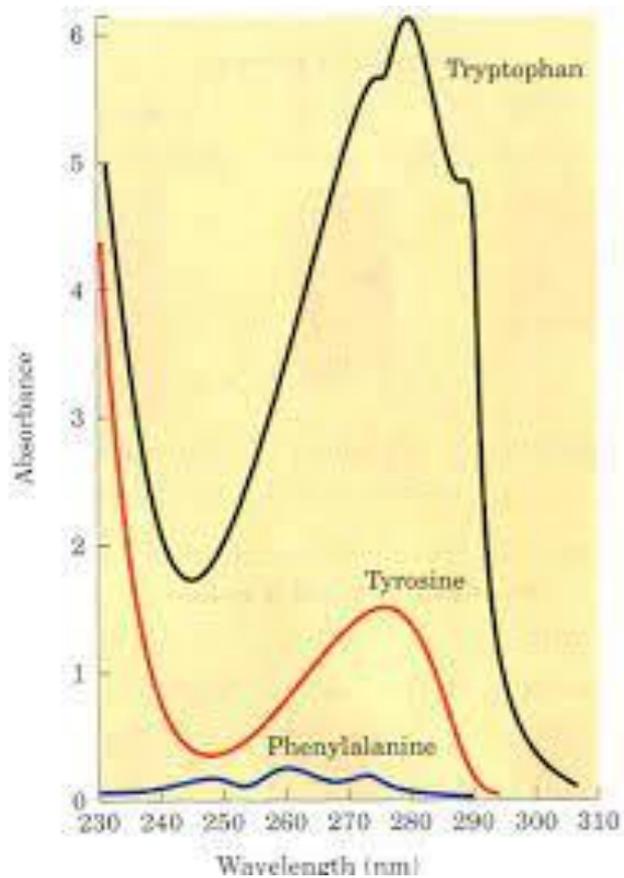


## Principais componentes moleculares da bactéria *E. coli*

Componentes	Nº de moléculas diferentes	% peso total
H <sub>2</sub> O	1	70
<b>Proteínas</b>	<b>3.000</b>	<b>15</b>
Ac. Nucléico	1 - DNA e 1000-RNA	7
Carbohidratos	50	3
Lipídeos	40	2
Outros	Íons - 12 Mol. Monoméricas - 500	3

O **isolamento ou purificação** de uma proteína é uma etapa que precede os estudos de suas características físico-químicas, de sua estrutura 3D e a compreensão de suas propriedades biológicas.

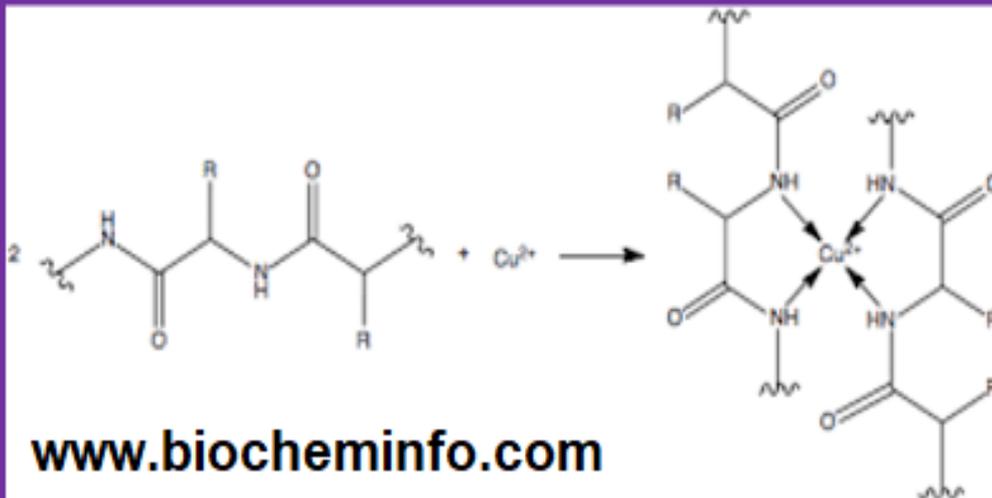
# Determinação de concentração de proteínas (absorção em 280nm)



# Determinação de concentração de proteínas (Biureto)

## Biuret test

(Detection of peptide bond)



## Métodos de Isolamento de Biomoléculas

Os métodos de separação de biomoléculas são agrupados em duas categorias:

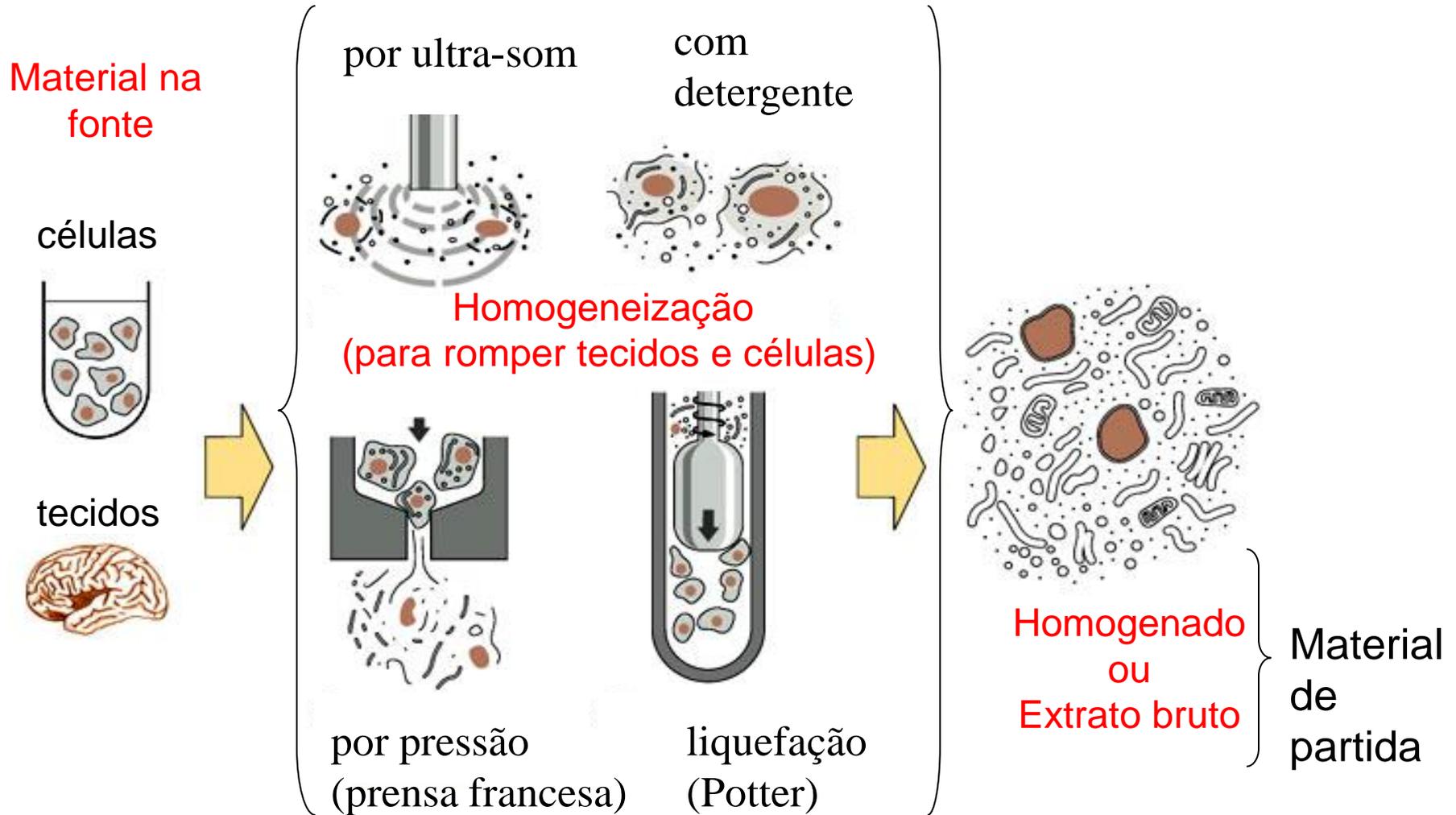
Métodos baseados em características físico-químicas das biomoléculas:

1. Tamanho – Massa – Densidade (ex: centrifugação, diálise, gel-filtração)
2. Carga elétrica (ex: cromatografia de troca iônica, eletroforese)
3. Solubilidade ou hidrofobicidade (ex: cromatografia em papel, fase reversa)

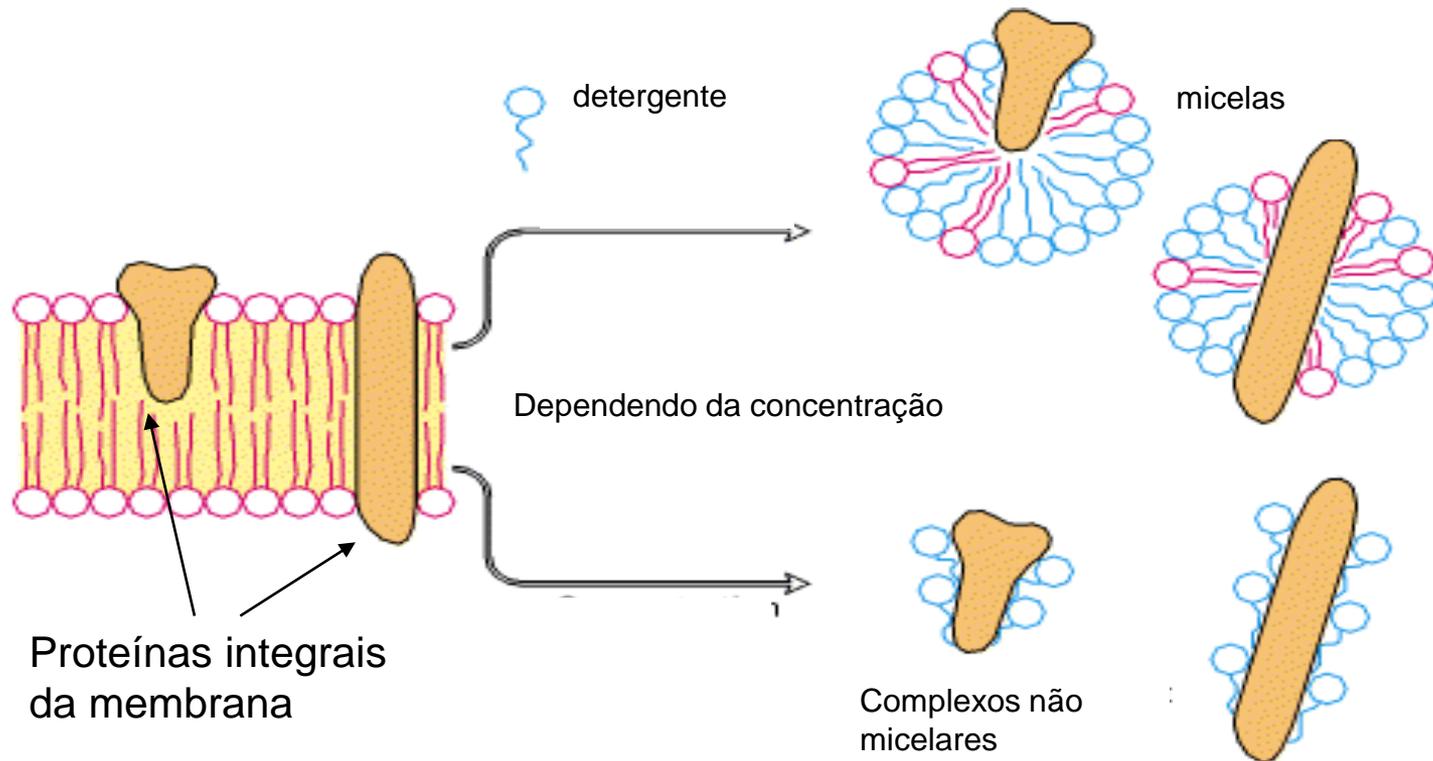
Métodos baseados em afinidade biológica, que exploram a interação entre duas moléculas:

4. Cromatografia de afinidade (pressupõe que uma das moléculas do par que interage é um “reagente” de fácil obtenção, disponível comercialmente)

Para iniciar a purificação, inicialmente é necessário **extrair** a proteína de interesse para um meio líquido, exceto se ela já estiver naturalmente presente em um meio líquido (sangue, suor, água do mar, meio de cultura, seiva de planta, etc).

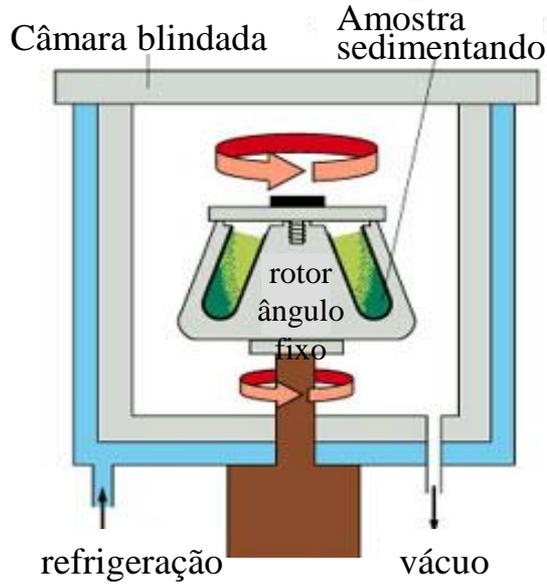


Sendo a proteína de interesse uma proteína de membrana, é necessário solubilizá-la. Para esse fim são utilizados detergentes, que dissolvem a membrana plasmática e formando complexos solúveis com as proteínas.



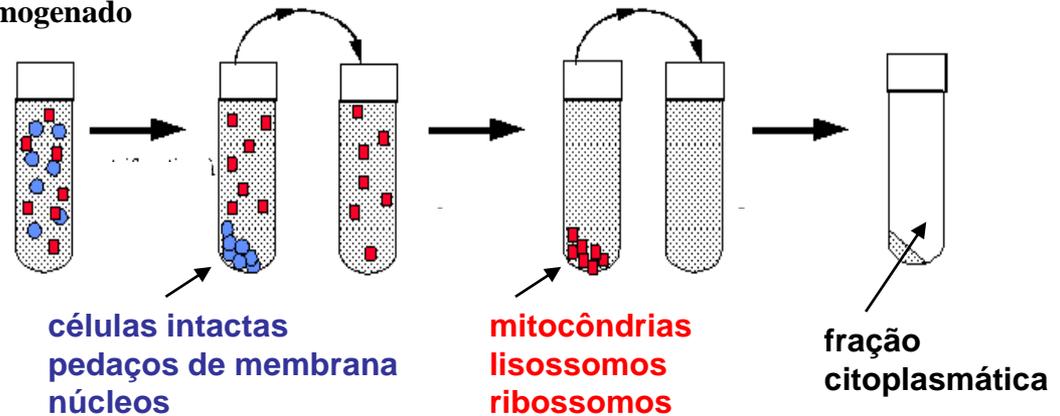
# CENTRIFUGAÇÃO

## A centrífuga



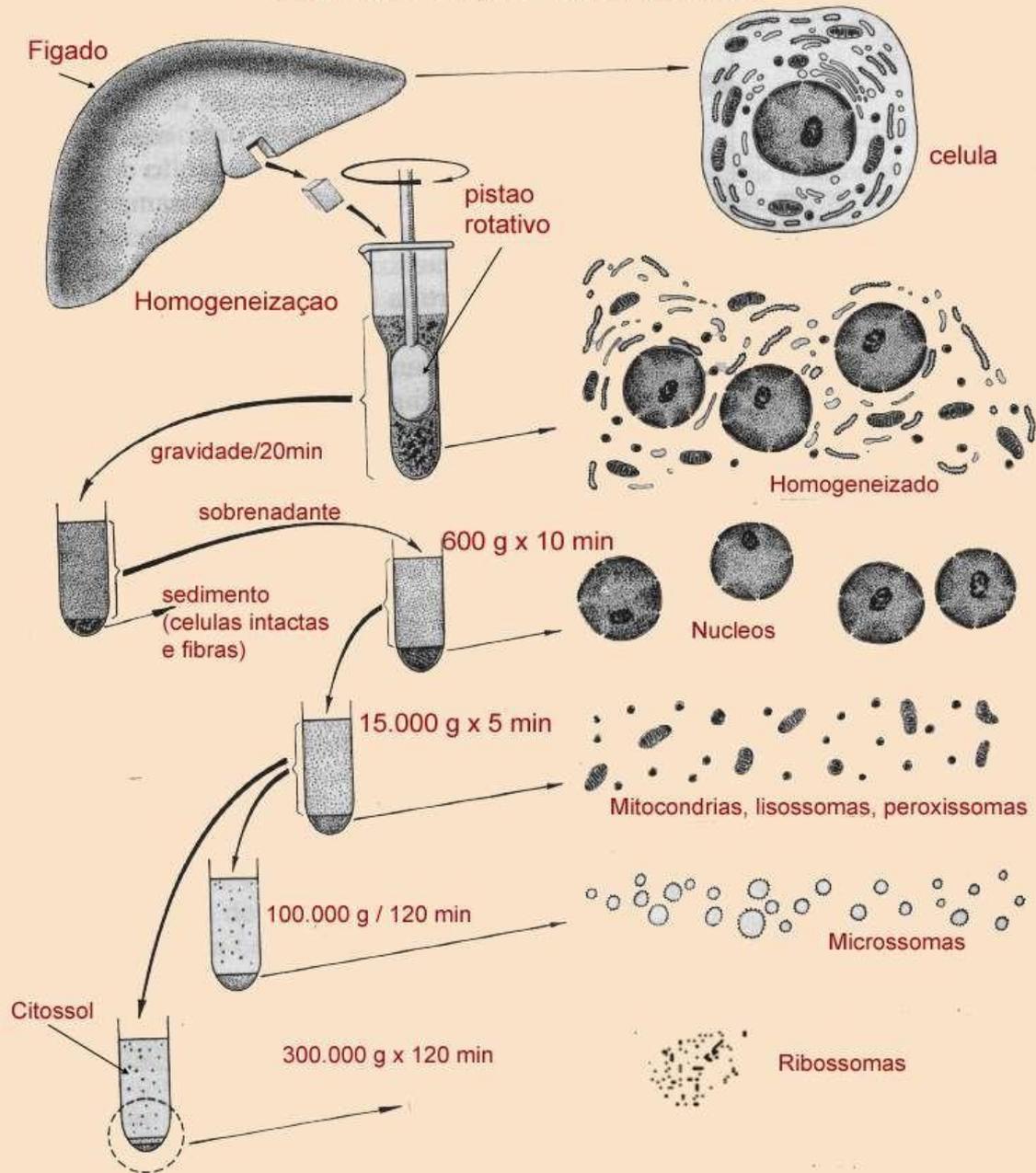
## centrifugação diferencial

homogenizado



sangue centrifugado: separação de plasma e células

# CENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL

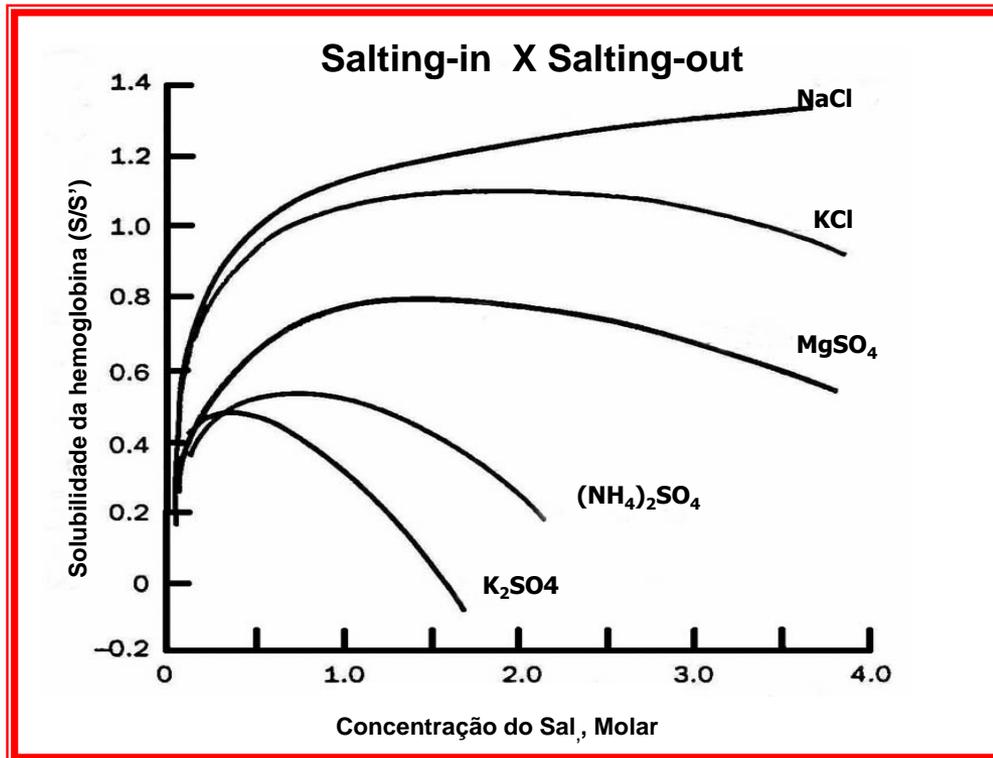


## A precipitação de proteínas pode ser induzida por:

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

Em baixa concentração salina, a solubilidade das proteínas aumenta, pois os íons do sal ajudam a reforçar a camada de solvatação.

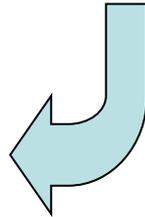
Em alta concentração salina, a solubilidade das proteínas diminui, pois os íons do sal competem pelas moléculas de água disponíveis para formar a sua própria camada de solvatação.



Proteínas também podem ser precipitadas quando colocadas em meio com pH próximo ao seu ponto isoelétrico.

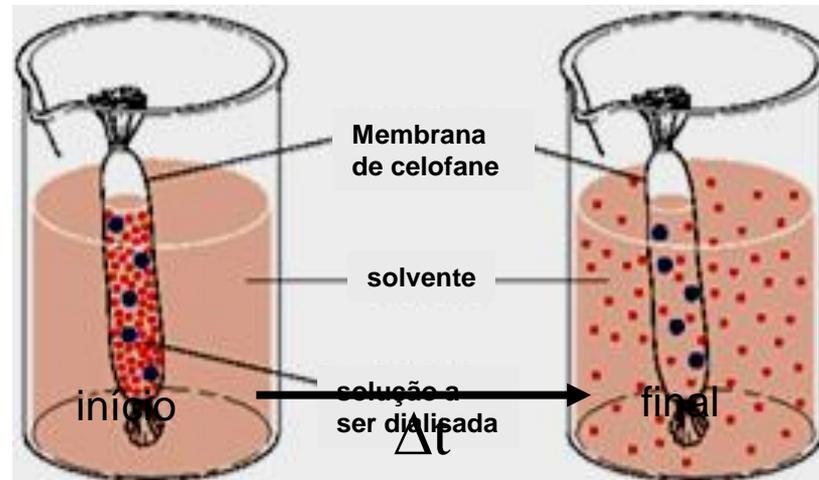
<b>Proteína</b>	<b>P.I.</b>
Pepsina	<1,0
Ovalbumina galinha	4,6
Albumina sérica humana	4,9
Tropomiosina	5,1
Insulina bovina	5,4
Fibrinogênio humano	5,8
Gama-globulina	6,6
Colágeno	6,6
Mioglobina equina	7,0
Hemoglobina humana	7,1
Ribonuclease A bovina	7,8
Citocromo C equino	10,6
Histona bovina	10,8
Lisozima, 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 e menos capacidade de competir pelas moléculas de água disponíveis para formar a sua própria camada de solvatação.



**Ponto Isoelétrico de algumas Proteínas**

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

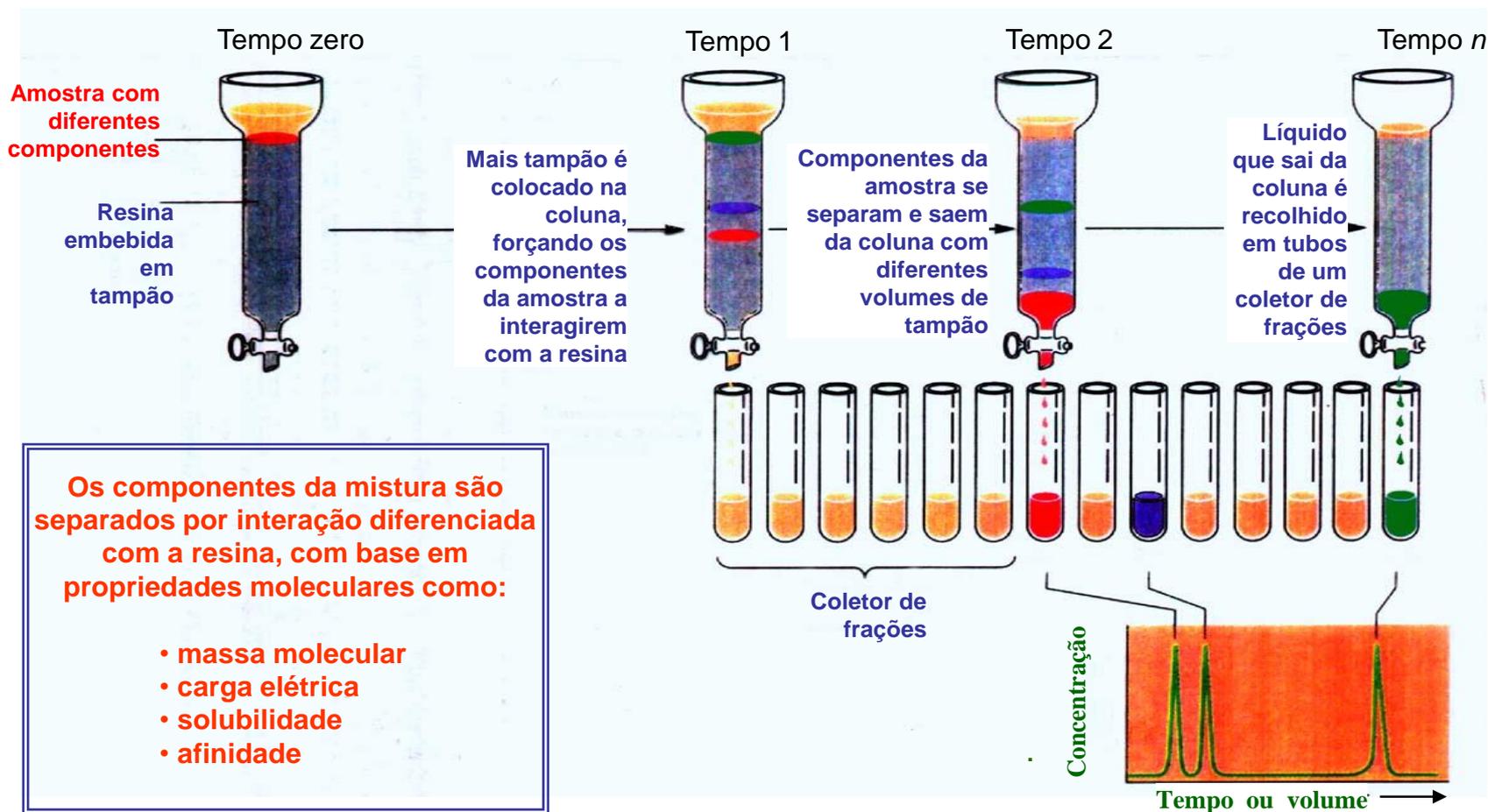


Para remover o excesso de sal ou do solvente no precipitado, utiliza-se a **diálise**.

# **CROMATOGRAFIA**

# Funcionamento Básico de uma Coluna Cromatográfica

Uma **coluna** é um tubo cilíndrico aberto nas duas extremidades e preenchido com a **resina** ou **matriz** ou **gel** cromatográfico.



Que características devem ter as resina cromatográficas para possibilitar separações de moléculas baseadas em diferentes propriedades ?

### **Cromatografia de permeação em gel ou gel-filtração:**

↳ { separação de moléculas pela massa molecular  
géis são porosos, funcionando como peneiras ou filtros

### **Cromatografia de troca iônica:**

↳ { separação de moléculas pela carga elétrica  
géis apresentam grupos carregados positiva- ou negativamente

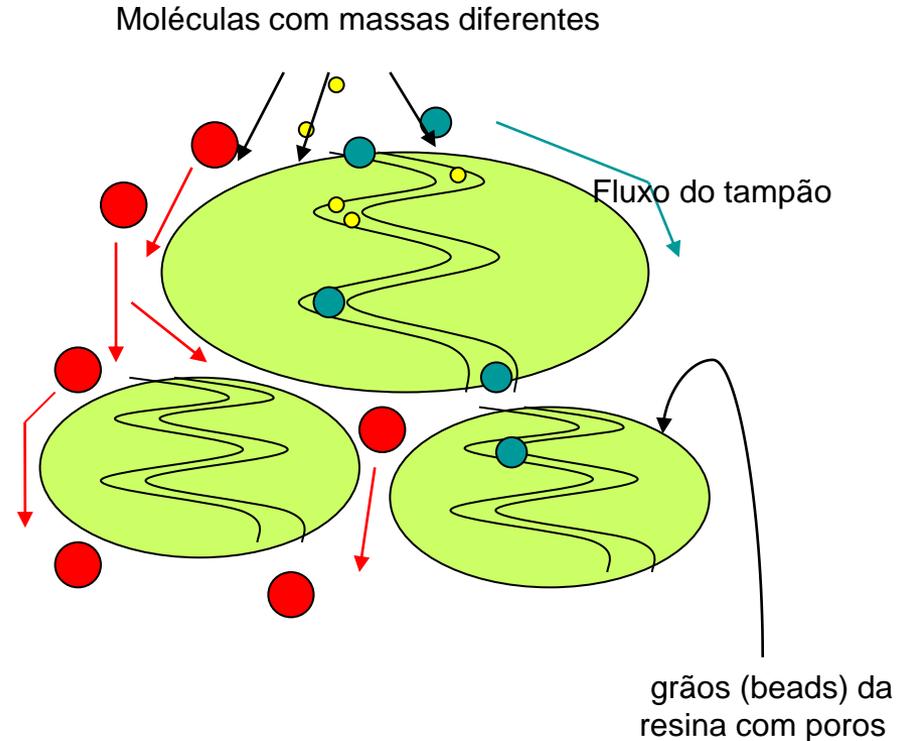
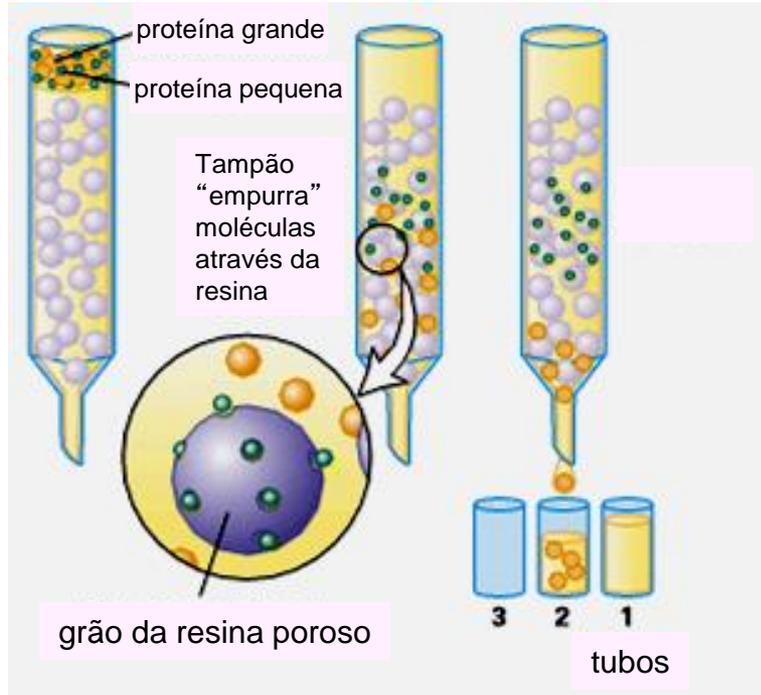
### **Cromatografia de partição (fase reversa ou hidrofóbica):**

↳ { separação de moléculas pela solubilidade relativa em meio aquoso  
géis possuem carácter hidrofóbico

### **Cromatografia de afinidade:**

↳ { separação de moléculas pela capacidade de interagir com um ligante  
géis possuem ligante específico ligado covalente à resina

# Cromatografia de gel filtração ou peneira molecular

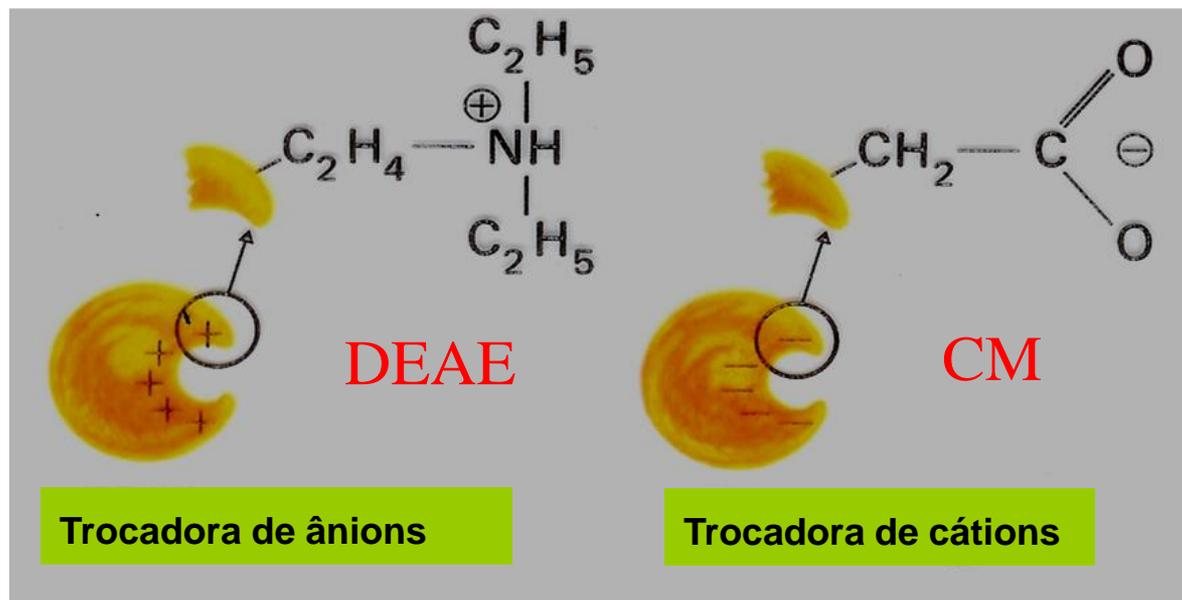


**Proteínas maiores** que o diâmetro dos poros **não são separadas** e saem da coluna com pouco tampão, correspondente apenas ao volume da coluna externo aos grãos, também chamado de volume morto ( $V_0$ ).

**Proteínas menores** que o diâmetro dos poros **não são separadas** e saem da coluna com um volume de tampão correspondente ao volume interno ( $V_i$ , volume total menos o volume do próprio gel).

## Cromatografia de troca iônica

A resina para cromatografia de troca iônica apresenta carga elétrica, positiva ou negativa, em uma ampla faixa de pH.



Existem dois tipos básicos: resinas trocadoras de ânions (possuem carga positiva), como o dietilaminoetil (DEAE)-celulose e resinas trocadoras de cátions (possuem carga negativa), como o carboxi-metil (CM)-celulose

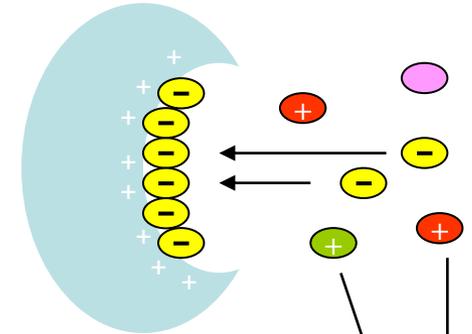
# Como funciona a Cromatografia de Troca Iônica

A cromatografia de troca iônica compreende duas etapas:

- 1) adsorção das proteínas com carga contrária à resina, e saída da coluna das proteínas com a mesma carga;
- 2) eluição das proteínas adsorvidas.

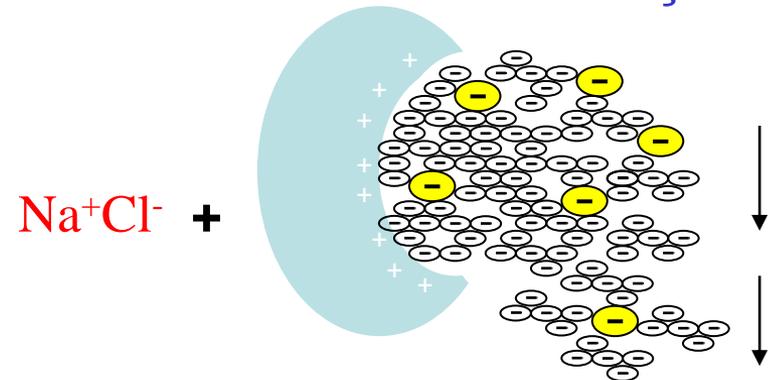
**Utiliza-se um aumento da concentração do sal no tampão**

## Adsorção



Moléculas com a mesma carga, ou sem carga, não interagem com a resina, sendo as primeiras a sair da coluna

## Eluição

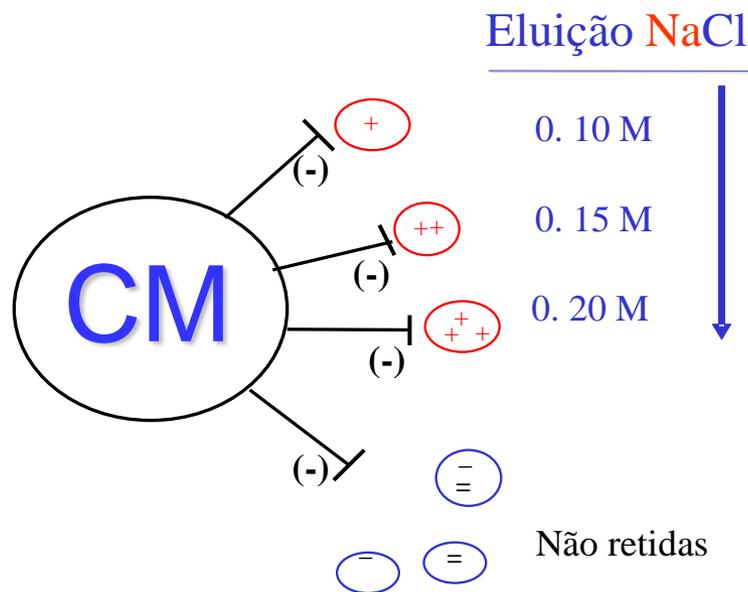


Adição de sal ao tampão resulta em competição entre os íons em solução e as moléculas adsorvidas na resina.

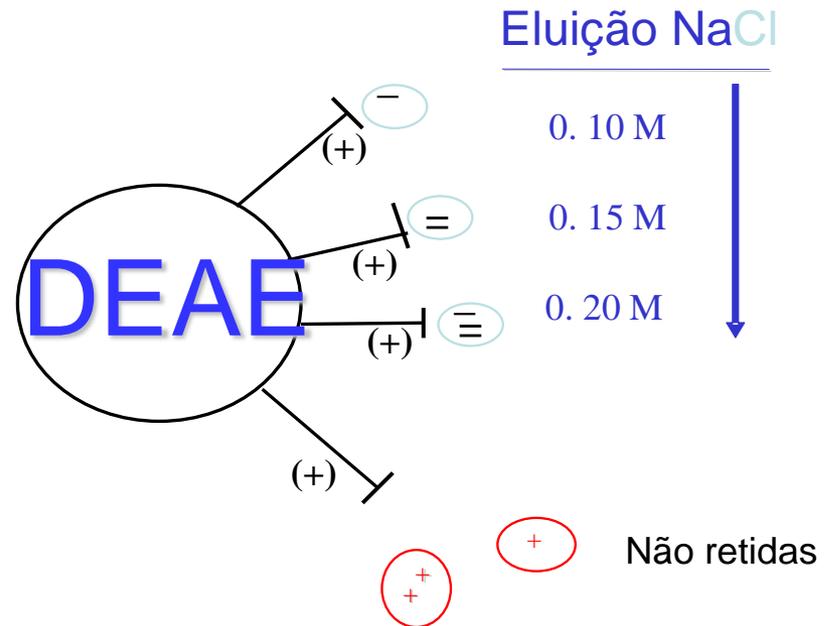
## Duas Modalidades de Cromatografia de Troca Iônica

Gradientes de sal podem fracionar as proteínas adsorvidas na resina de acordo com a intensidade de suas cargas, que é dada pela diferença entre seus PIs e o pH do tampão de eluição.

As proteínas não retidas (com a mesma carga da resina) não são separadas, sendo simplesmente “arrastadas” pelo tampão (ou seja, não são repelidas pela resina).



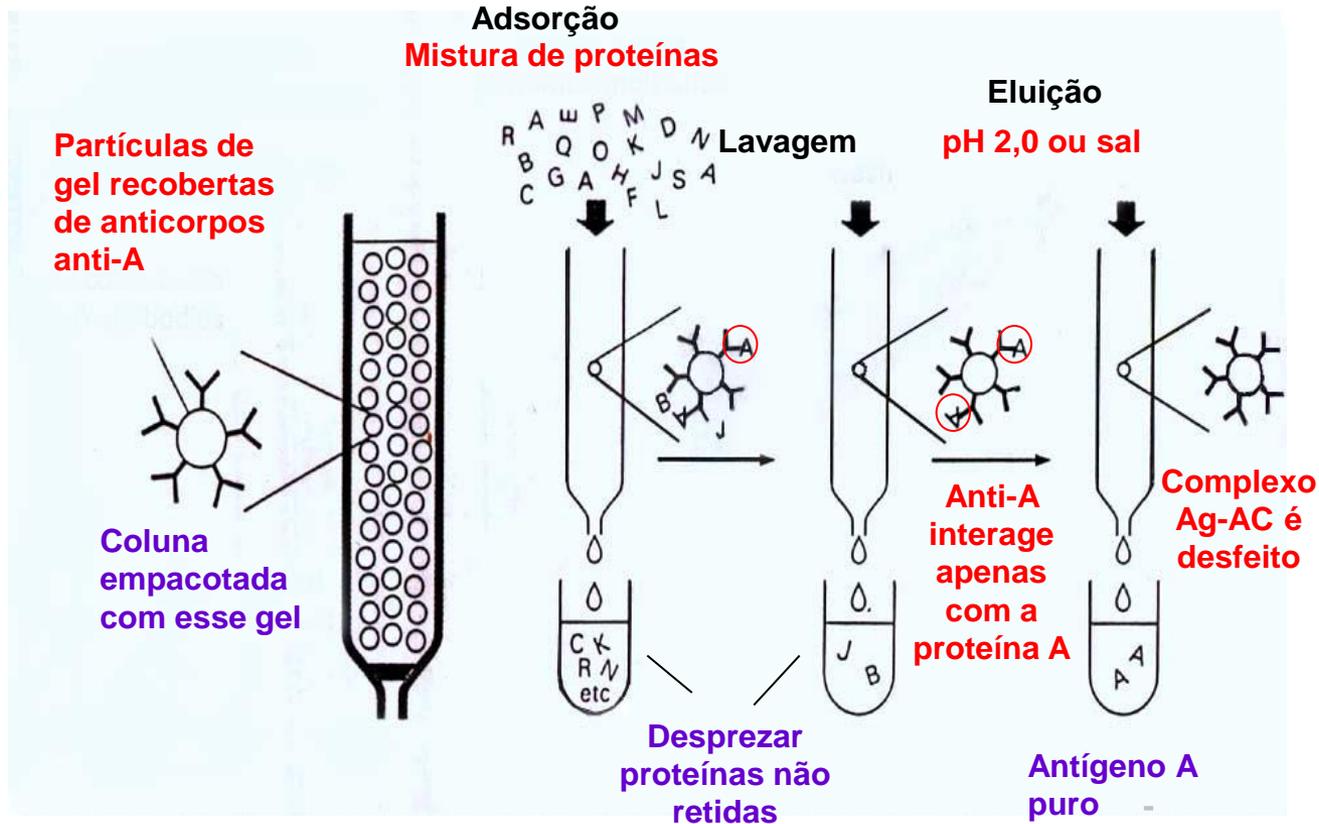
Carboximetil-celulose  
(trocadora de cátions)



Dietilaminoetil-celulose  
(trocadora de ânions)

# Cromatografia de afinidade:

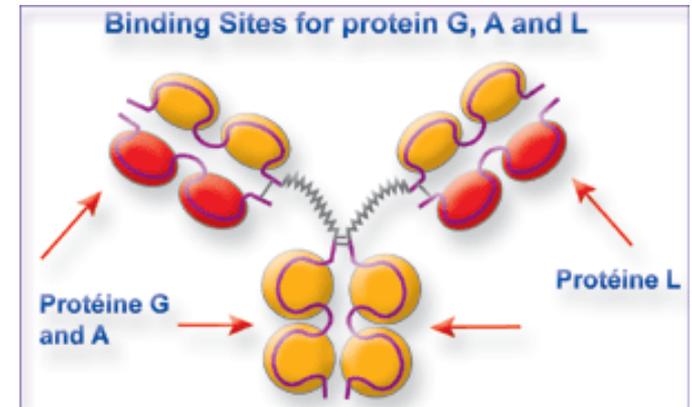
Ex: cromatografia de imunoafinidade



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

Ligante grupo-específico	Especificidade
Proteína A	Região Fc de IgG
Proteína G	Região Fc de IgG
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



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

**MATERIAL BIOLÓGICO DE PARTIDA: (100g)**

**SOBRENADANTE**

**ORGANELAS**

- Lisossomos
- Mitocôndria
- Golgi
- Núcleo

**Precipitação com Sal/Solvente**

**F<sub>1</sub> F<sub>2</sub> F<sub>3</sub> F<sub>4</sub>**

**Precipitação com Sal/Solvente**

**F<sub>2.1</sub> F<sub>2.2</sub> F<sub>2.3</sub>**

**Cromatografia Troca Iônica**

**F<sub>2.3.1</sub> F<sub>2.3.2</sub> ••••• F<sub>2.3.N</sub>**

**Cromatografia Troca Iônica  
(pH ou resina diferente)**

**F<sub>2.3.N.X</sub>**

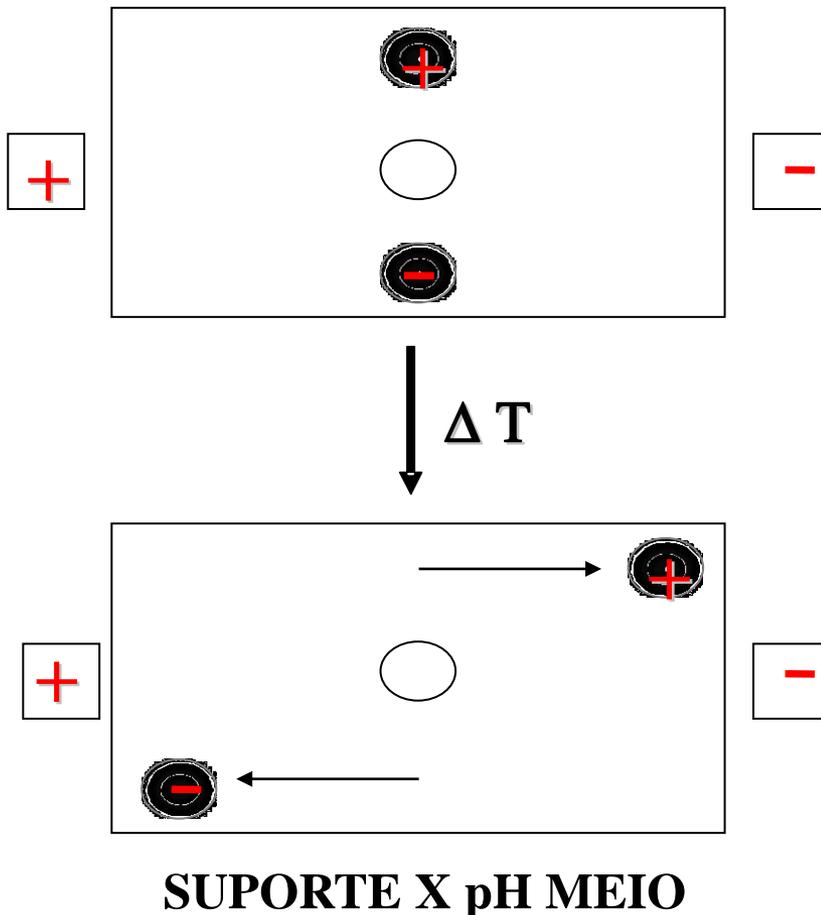
**Gel Filtração**

**1 Proteína apenas**

**(0.001g) - 0.1 a 0.5% total**

# ELETROFORESE

## CONDIÇÕES QUE DETERMINAM A SEPARAÇÃO



1. pH / tampão

2. Suporte

- papel : corrente alta (calor)  
uso para peptídeos e aminoácidos

- poliacrilamida: proteínas

ac. nucleicos

↳ não desnaturante ou nativa

↳ desnaturante e redutor

peso molecular

composição de subunidades

↳ focalização isoeétrica: PI

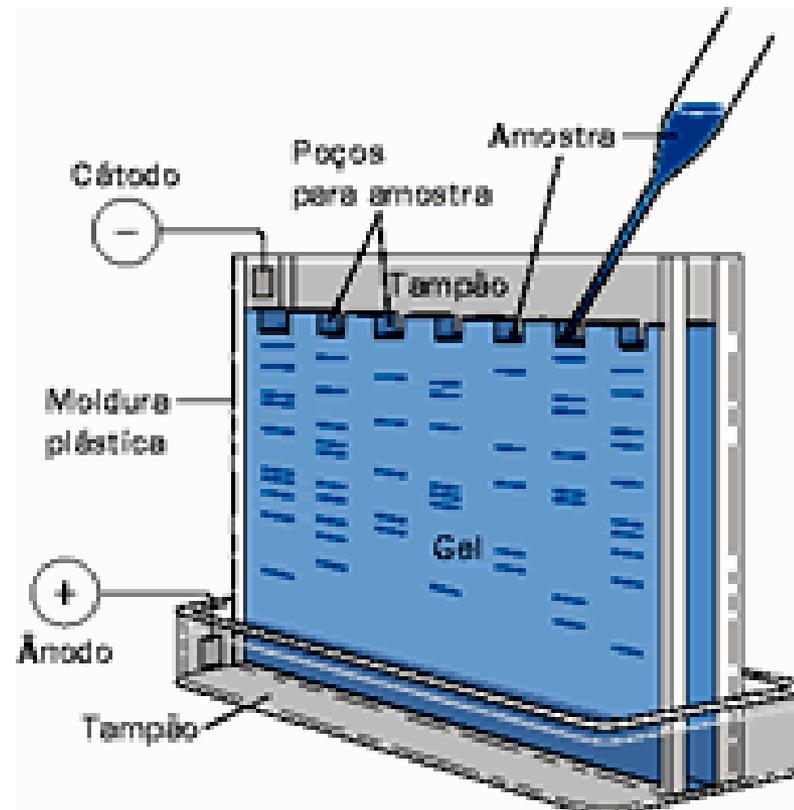
↳ bidimensional

- agarose: ácidos nucleicos

Imunoeletroforese

Proteínas nativas

## Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)



cuba vertical para mini-gel (10 X 8 cm)

## Proteína

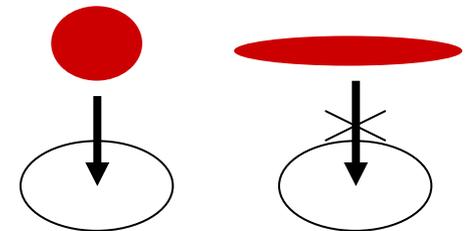
## Ponto Isoelétrico

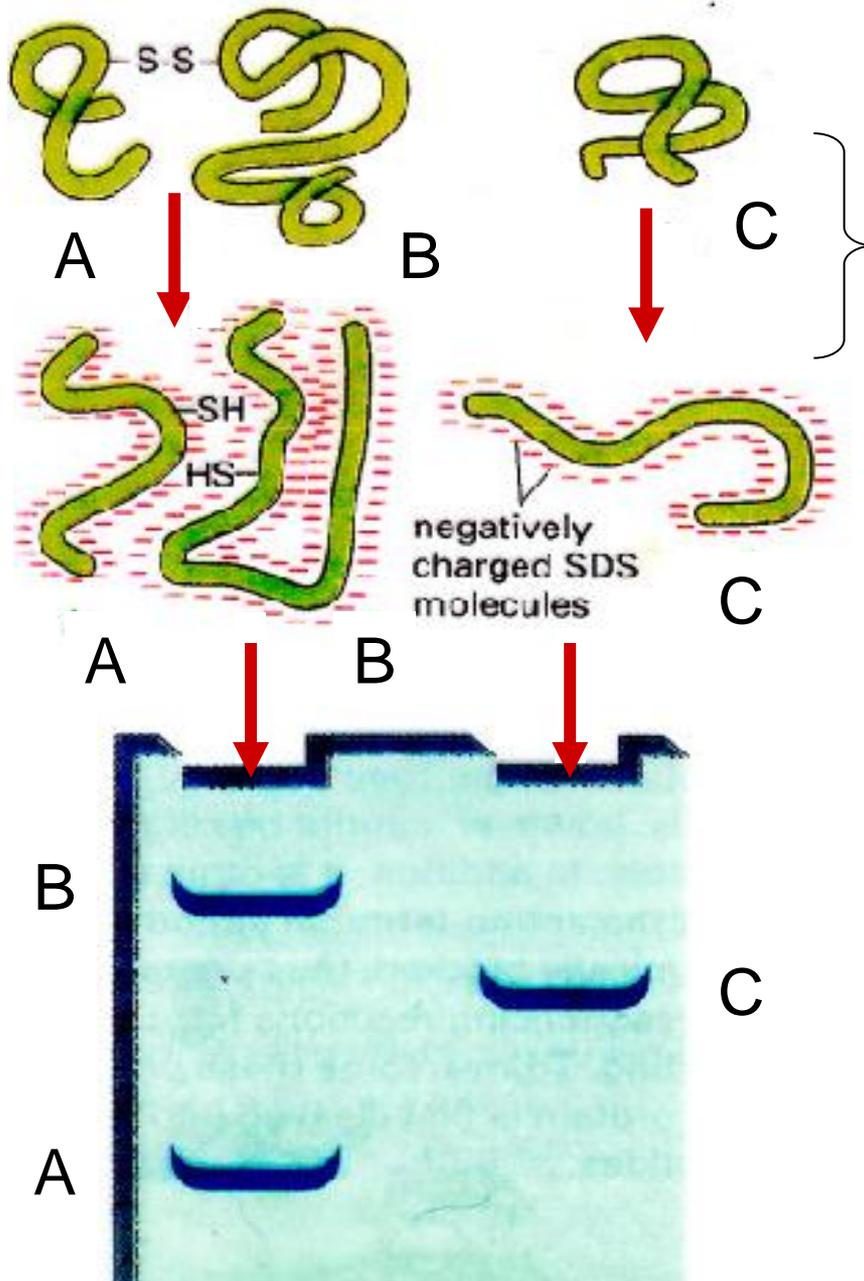
---

<b>Pepsina</b>		<b>&lt; 1.0</b>
<b>Ovalbumina (galinha)</b>		<b>4.6</b>
<b>Albumina Sérica (humana)</b>		<b>4.9</b>
<b>Tropomiosina</b>		<b>5.1</b>
<b>Insulina (bovina)</b>		<b>5.4</b>
<b>Fibrinogênio (humano)</b>		<b>5.8</b>
<b>γ-Globulina</b>	→ 155.000	<b>6.6</b>
<b>Colágeno</b>	→ 330.000	<b>6.6</b>
<b>Mioglobina (cavalo)</b>	→ 18.000	<b>7.0</b>
<b>Hemoglobina (humana)</b>	→ 64.000	<b>7.1</b>
<b>Ribonuclease A (bovina)</b>		<b>7.8</b>
<b>Citocromoc(cavalo)</b>		<b>10.6</b>
<b>Histona (bovina)</b>		<b>10.8</b>
<b>Lisozima (galinha)</b>		<b>11.0</b>
<b>Salmina(salmon)</b>		<b>12.1</b>

---

Separação na eletroforese nativa é influenciada pela carga, massa e forma da molécula

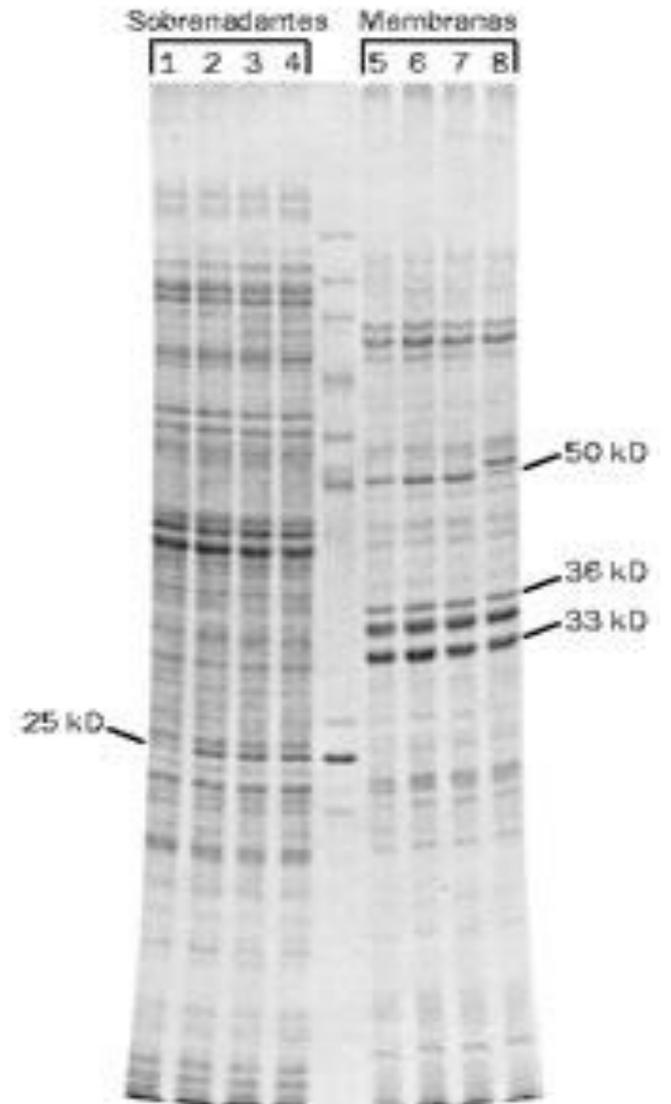
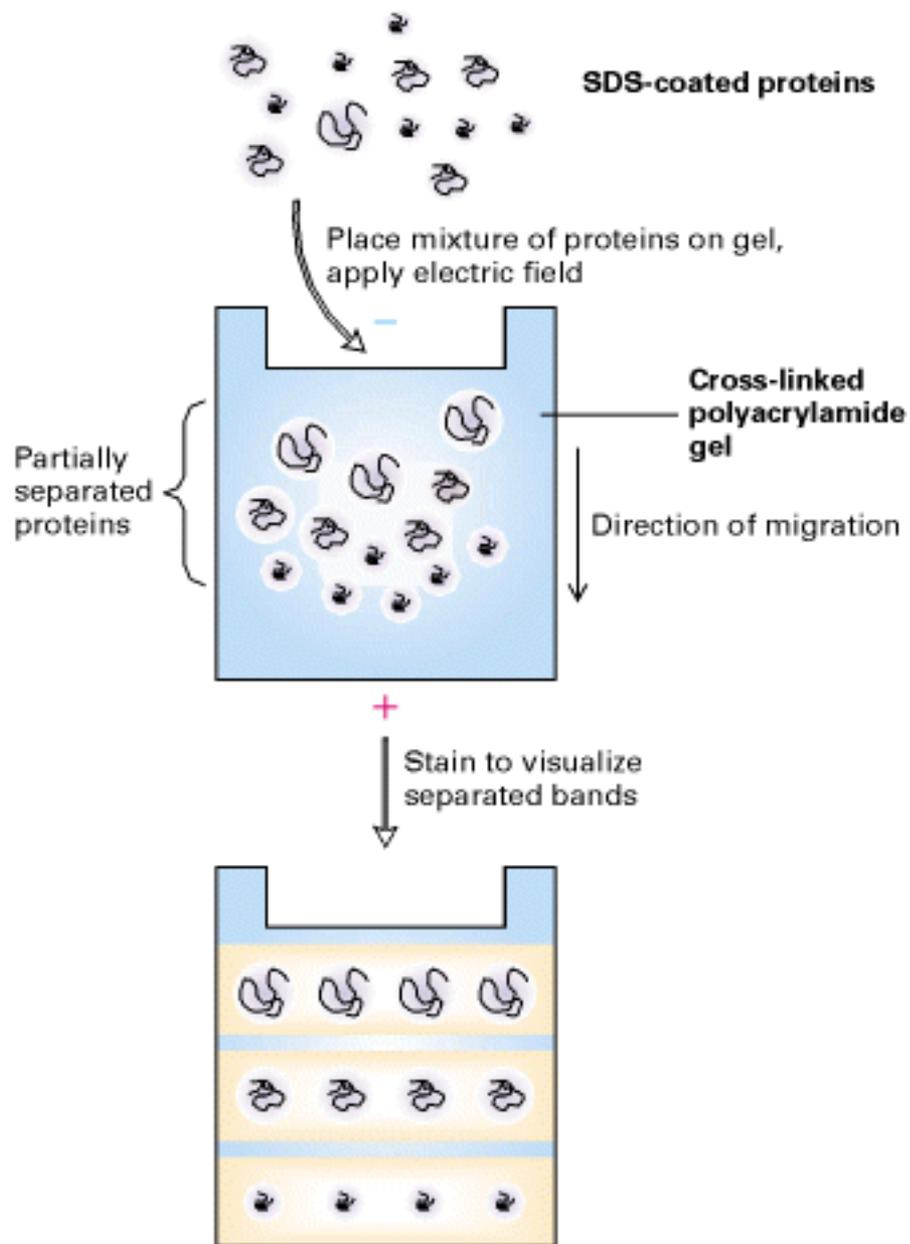




SDS (dodecil sulfato de sódio)  
+  
2-mercaptoetanol

### Efeitos do SDS

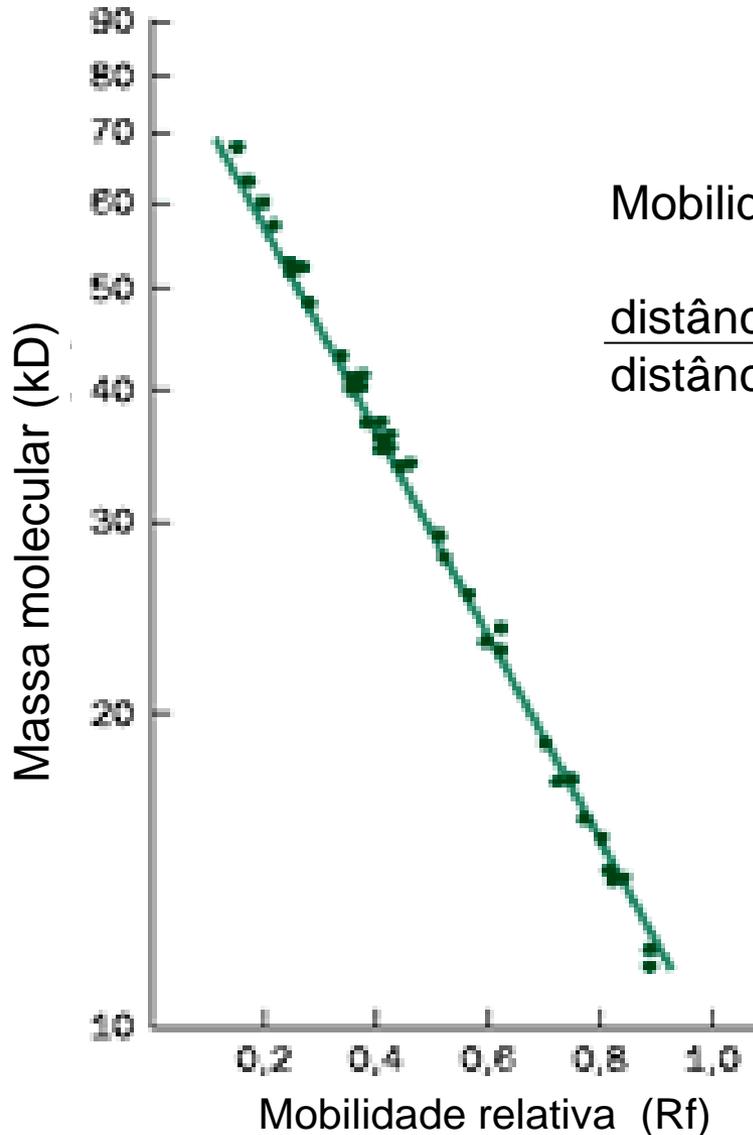
- desnaturação uniformiza a forma das proteínas;
- mascara a carga natural das proteínas no pH da corrida, fazendo com que todas moléculas migrem para o anôdo;
- facilita o efeito de redutores



**SDS-PAGE**  
*Salmonella typhimurium*

# Determinação da massa molecular de proteínas

## Curva de calibração de SDS-PAGE a 15%



Mobilidade relativa =

$$\frac{\text{distância percorrida pela banda X}}{\text{distância percorrida pelo marcador da corrida}}$$

(-)

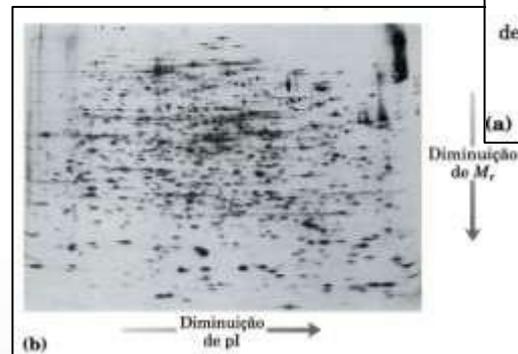
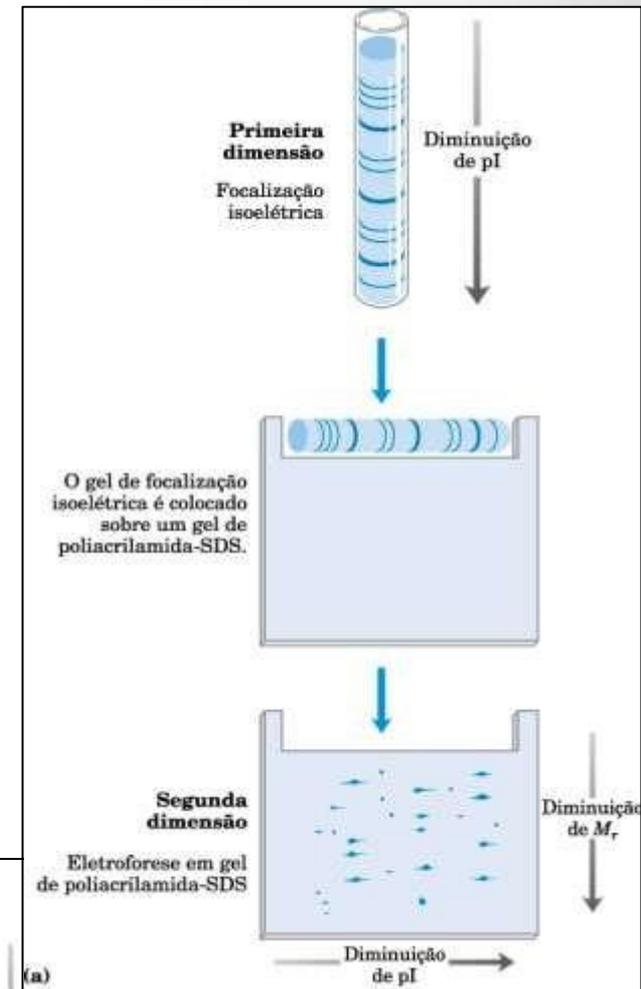


- 97.4
- 87.0
- 45.0
- 29.0
- 21.0
- 12.5
- 6.5

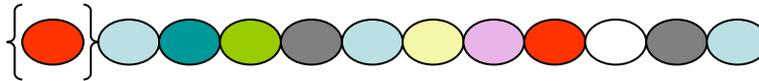
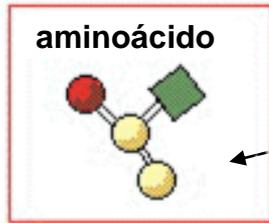
(+)

# Eletroforese Bidimensional

- Combinação sequencial da focalização isoeletrica e SDS-PAGE.
- Separação de mistura complexa proteica.
- Mais sensível que os métodos isolados.
- Massa molecular e pI.



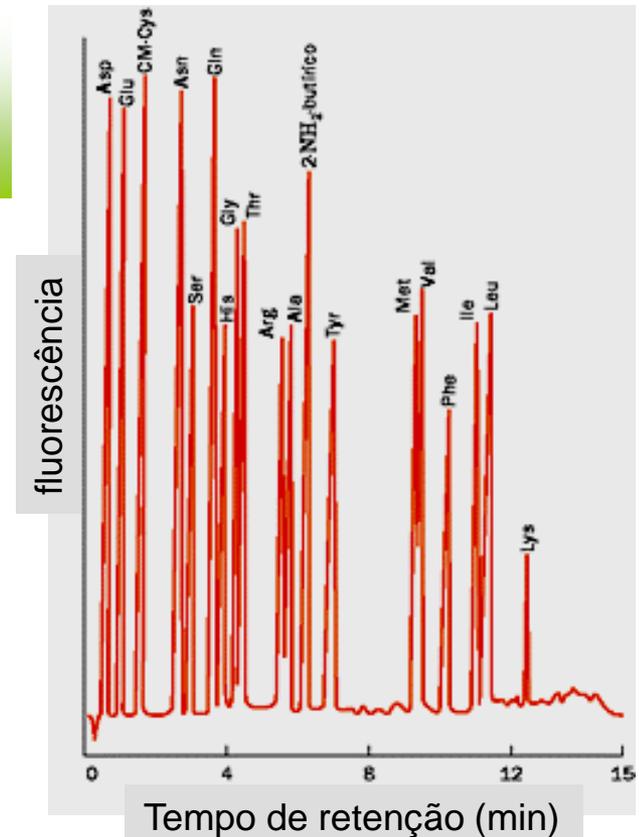
# **SECUENCIAMIENTO DE PROTEÍNAS**



Para determinar a estrutura primária de uma proteína, é necessário primeiro conhecer a **composição** (número e tipos) de seus aminoácidos.

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

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



Possível determinar o conteúdo de aminoácidos



# Método de Edman - sequenciamento de proteínas com **PITC** (fenil-isotiocianato)

**Cada ciclo de reação compreende 3 etapas:**

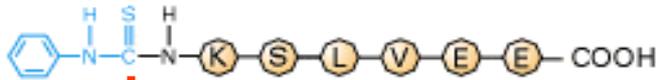
1. Reação da proteína com PITC, que se acopla ao grupo amino NH<sub>2</sub>- livre do aminoácido 1 (no exemplo, uma lisina, K);
2. Hidrólise ácida da proteína conjugada com PITC libera a feniltiohidantoína (PTH) do aminoácido 1 e o restante da proteína, tornando o aminoácido 2 o novo resíduo N-terminal (no exemplo uma serina, S);
3. Análise cromatográfica do PTH-aminoácido e novo ciclo de reação com o novo N-terminal da proteína.

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

**Libera aminoácido N- terminal**

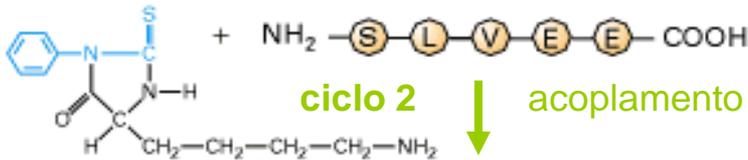


**ciclo 1 (1)** ↓ **acoplamento** (  PITC)

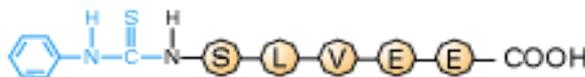


**(2)** ↓ **hidrólise com ácido trifluoroacético**

**PTH lysine**

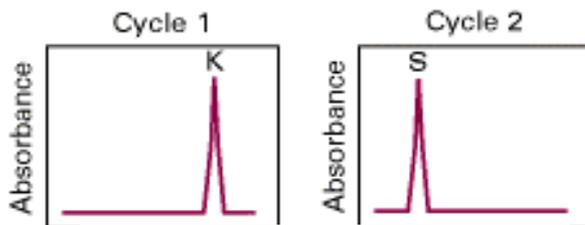
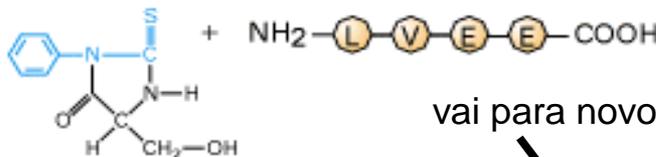


**(3)**



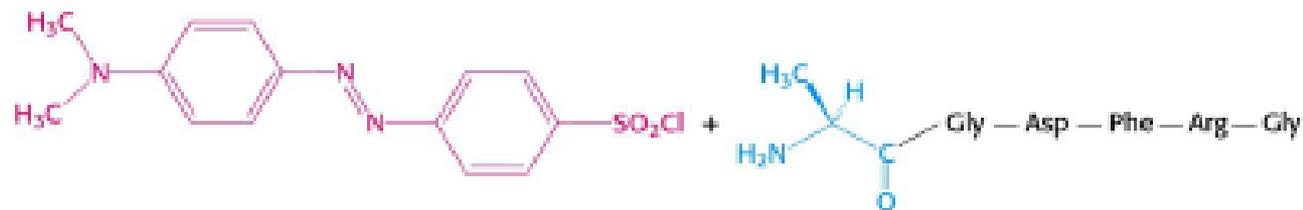
↓ **hidrólise ácida**

**PTH serine**



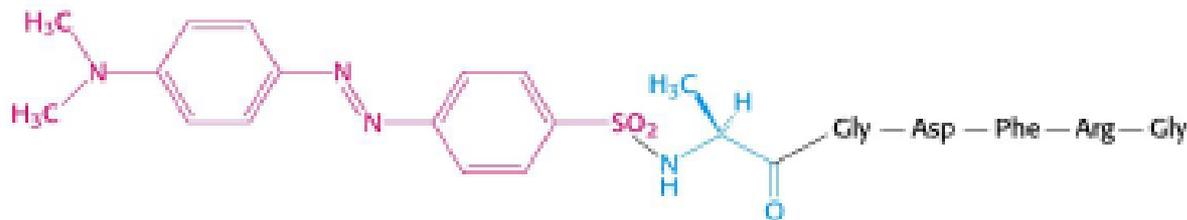
**análise cromatográfica**

# Cloreto de Dansila pode ser usado para determinar o resíduo amino terminal de uma proteína ou peptídeo

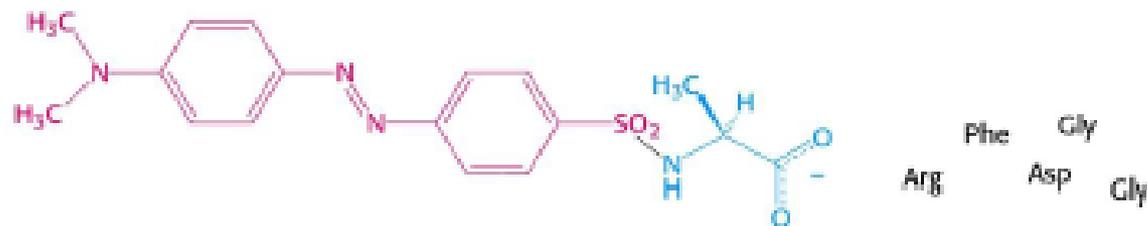


Dabsyl chloride

Labeling



Hydrolysis



Dabsyl alanine

Quando uma proteína possui mais de 20-30 resíduos de aminoácidos, não é possível sequenciá-la diretamente pelo método de Edman.

Proteína  
Total 150 a.a

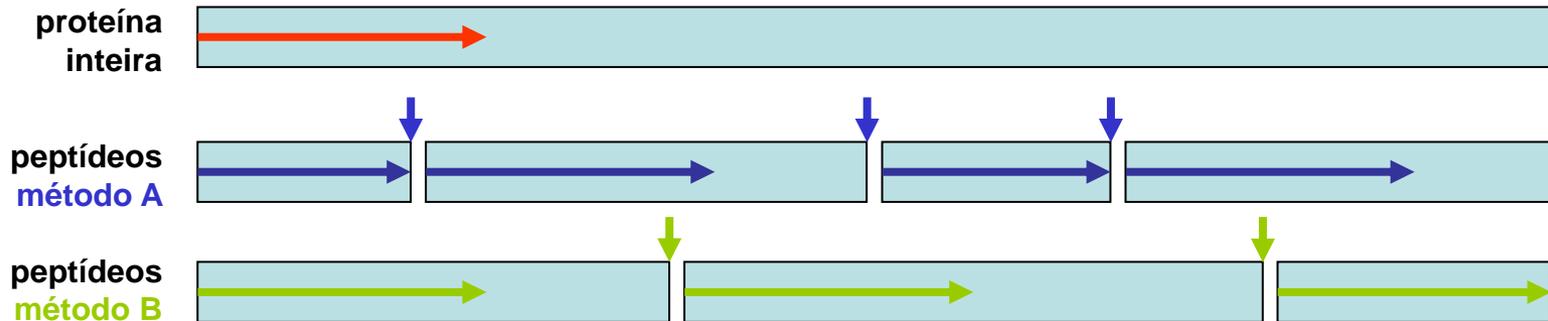


30 aa



sequência obtida a partir da proteína intacta

Para obter a sequência completa de uma proteína, é necessário sequenciar vários peptídeos da mesma proteína, obtidos por diferentes tipos de quebra da cadeia, até haver sobreposição de suas sequências.



Diferentes métodos são utilizados para obter-se diferentes peptídeos da proteína: A) enzimas proteolíticas, como tripsina (quebra em resíduos de Lys ou Arg) e quimotripsina (quebra em resíduos de Phe); B) tratamento com brometo de cianogênio (quebra em Met); e outros.

## **Exopeptidases**

Carboxipeptidase A - hidrólise de aromáticos e alifáticos de ácido amino terminal carboxila neutro. Por exemplo, tirosina, fenilalanina, alanina.

Carboxipeptidase B - hidrólise C-terminal: Lys ou Arg, exceto se o penúltimo aminoácido é Pro.

## **Endopeptidases:**

Tripsina – hidrolise depois de Arg or Lys, exceto seguido por Pro.

Quimiotripsina – cliva depois de Phe, Trp, ou Tyr, exceto seguido por Pro.

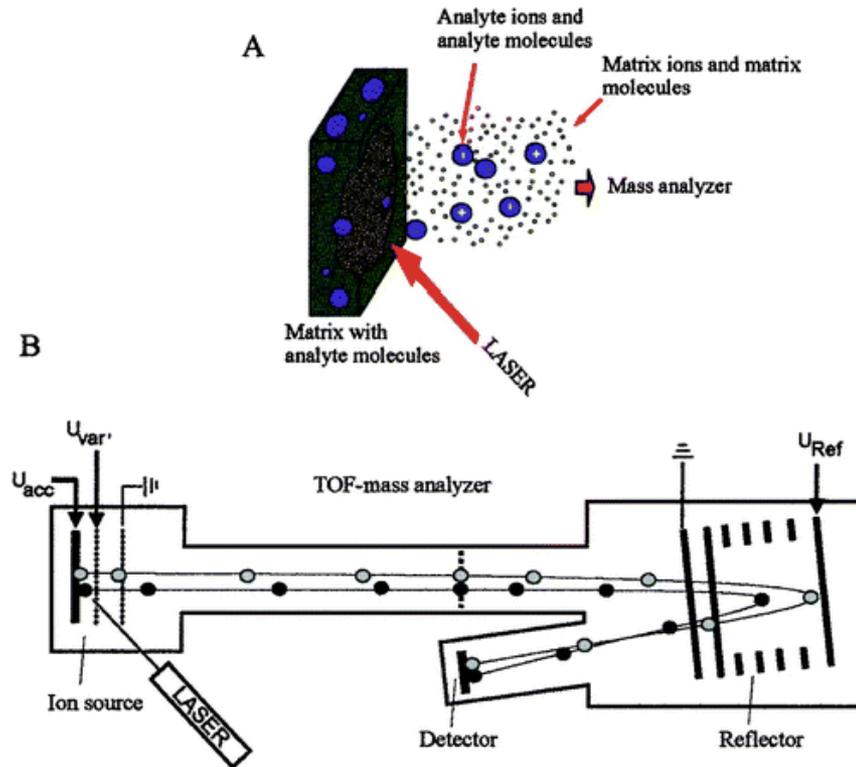
Elastase – cliva depois de Ala, Gly, Ser ou Val, exceto seguido por Pro.

Termolisina – cliva antes de Ile, Met, Phe, Trp, Tyr, ou Val, exceto precedido de Pro.

Pepsina – cliva antes de Leu, Phe, Trp ou Tyr, exceto precedido de Pro.

Endopeptidase V8 – cliva depois de Glu

# Espectrometria de massa



- Moléculas dos peptídeos são ionizadas utilizando diferentes métodos
- Moléculas ionizadas são aceleradas e diferentes métodos espectrométricos podem ser utilizados para medida da sua massa

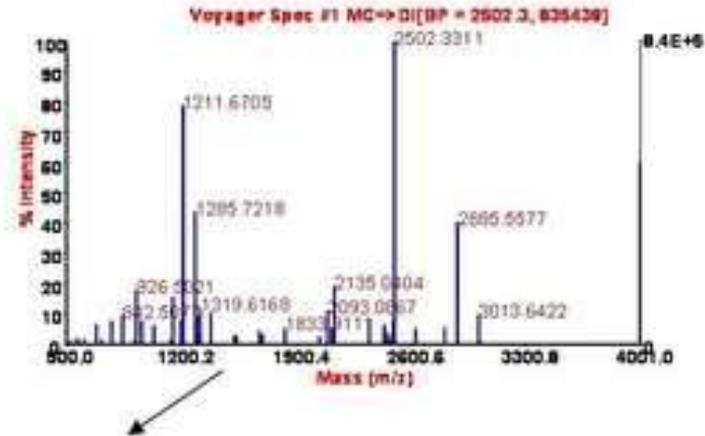
# SEQUENCIAMENTO DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

2-D



Digestão enzimática

MALDI-TOF-MS



Cruzamento dos resultados obtidos com a base de dados Mascot

## Protein View

Match to: **AAH70299** Score: 228 Expect: 3.2e-18  
 AF016791 HID: - *Pseudomonas putida* KT2440

Nominal mass (M<sub>0</sub>): 68073; Calculated pI value: 4.83  
 NCBI BLAST search of **AAH70299** against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Pseudomonas putida KT2440](#)  
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:  
[DNAE\\_PRRF](#) from [Pseudomonas putida KT2440](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Variable modifications: Oxidation (M)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Number of mass values searched: 24  
 Number of mass values matched: 18  
 Sequence Coverage: 40%

**{MATRIX}**  
**{SCIENCE}**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MGRKIDILG TINSVSELE RGNVWVENA EGARTTIPV AVANGSELV
51 GGSARKDQAVT NPHITLFAVK RUGRIIFEED WQKDM-LVP WYKAWNGD
101 AWVEAAGVEMAPPOSAEVL KSMKKTALDY LGEPNTEAW TWPAYFNDSQ
151 RQATHZAGRI AGLDW-KRRN EPTAAALAYG MDKAKGDHTV NYDLGGSTF
201 DVSVEIAEV DGEHOFVLA TNGDTFLGGE DFDMLIDYL VDFIKKESGM
251 DLKNDPLALQ RLKSAAEKAK IELSSACSTQ VNLPHYADA TGNHLLNQ
301 SRALKESLVE DLVKTREPC RALKDAGD ASVDIMLV GCGTRMPLVQ
351 HEVADFFGKE ARKIDVNPDEA VARGANQCAVL AGDVKDVL LLDVSPITLD
401 ETMGGVMTA LKHNITPT K-SQVSTAD DNGSAVTHV LGGERRGAAD
451 KSLGKDLA DFPAPRSMV QEVTFDIDA NGLHVGAKD KATKQTQSV
501 KANSGLSDE EIERMVRDAE AWAEEDKFE ELAARNQGDG ALVISTRMIV
551 ADAGQVYAE EKTAIEAAV ALEAAWQDD KAADAQVEE LSKVSAFVAQ
601 KMYAEQSAEQ PQGGADQREP EAKHCDVYDA EFEVMDNKKQ
  
```