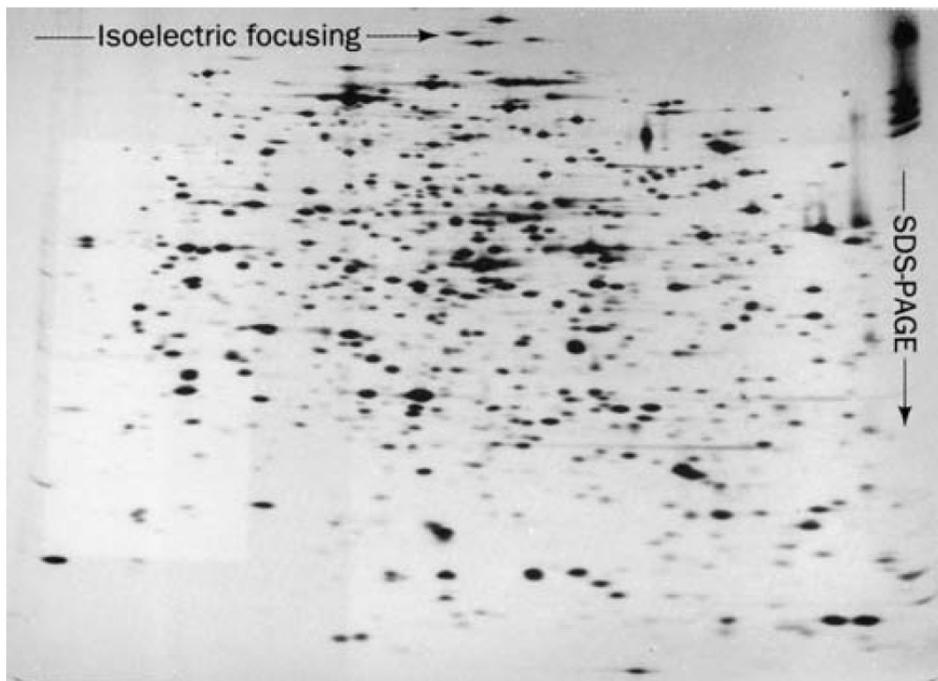


Análise e purificação de proteínas

**CCM0111: Bioquímica, Estrutura de
Biomoléculas e Metabolismo**
Dr. Danilo B. Medinas



Eletroforese bidimensional

Material de estudo para prova

Voet: Capítulos 6

Lehninger: Capítulo 3



<https://app.jove.com/science-education/v/13380/sds-page?language=pt>

<https://app.jove.com/science-education/v/13381/concepts/western-blotting>

<https://app.jove.com/science-education/v/13382/concepts/two-dimensional-gel-electrophoresis>

<https://app.jove.com/science-education/v/13376/concepts/principles-of-column-chromatography?language=pt>

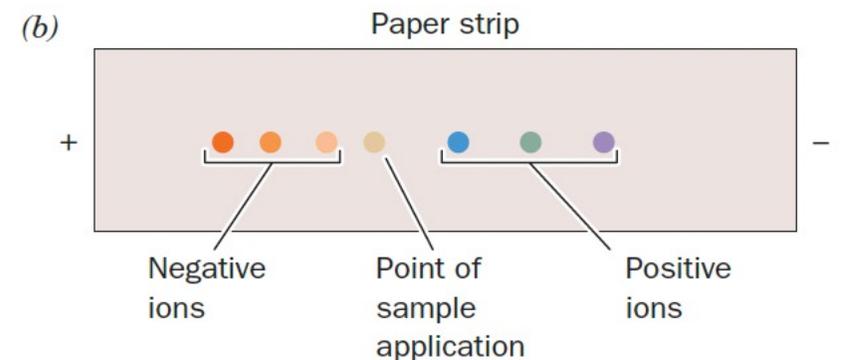
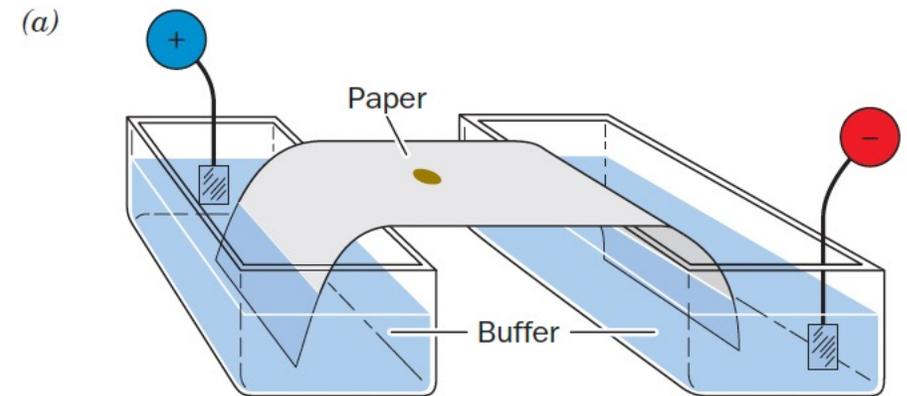
<https://app.jove.com/science-education/v/13560/concepts/types-of-column-chromatography>

Análise de proteínas

- **A determinação dos tipos e quantidades, também de estruturas, de proteínas em matrizes biológicas constitui tarefa essencial tanto na pesquisa em ciências da vida como em laboratórios clínicos e na indústria (alimentos, biotecnologia, dentre outras).**
- **Os métodos de análise de proteínas são baseados em propriedades físicas e químicas destas moléculas como tamanho, carga, atividade enzimática, interações específicas com ligantes, etc.**
- **Algumas abordagens envolvem o estudo de formas intactas de proteínas, enquanto outras empregam condições desnaturantes que rompem as estruturas terciária e secundária.**

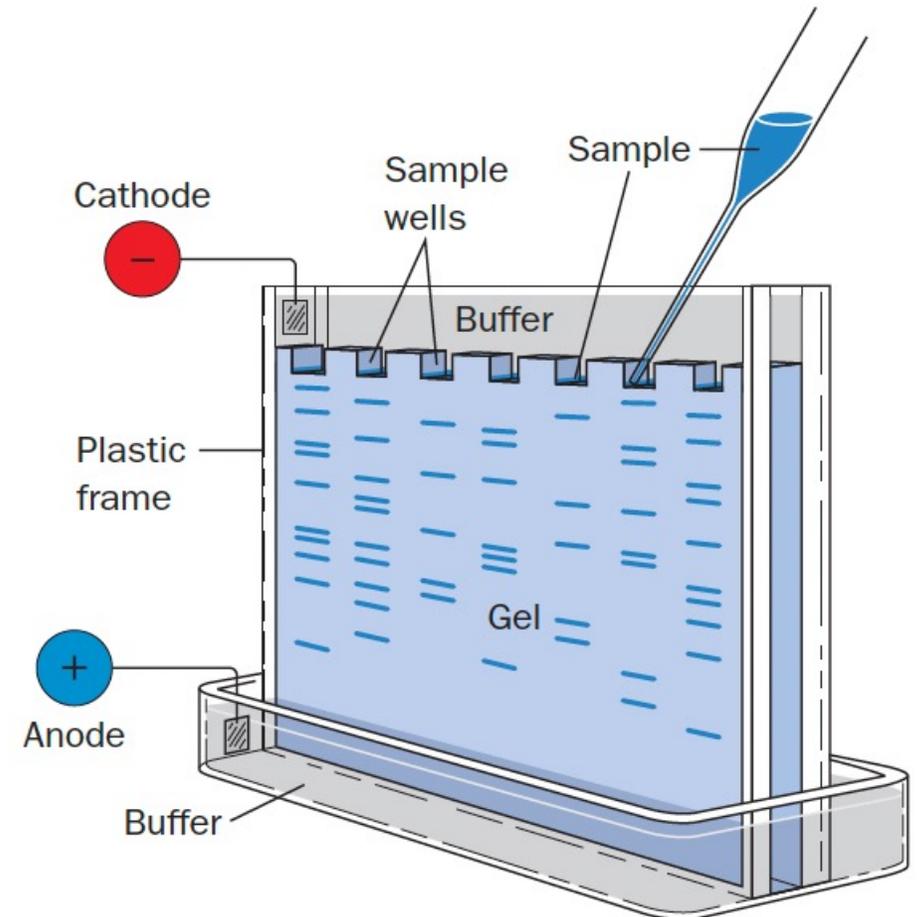
A eletroforese é um método útil para a análise de proteínas

- Eletroforese é o processo de migração de espécies carregadas em solução em direção aos eletrodos que geram um campo elétrico.
- Proteínas com carga líquida negativa migram para o ânodo (polo positivo, atrai ânions) e aquelas com carga líquida positiva migram para o cátodo (polo negativo, atrai cátions).
- Assim, proteínas com diferentes mobilidades iônicas (relação carga/massa e formas) podem ser separadas e visualizadas num substrato que permita sua migração num campo elétrico.



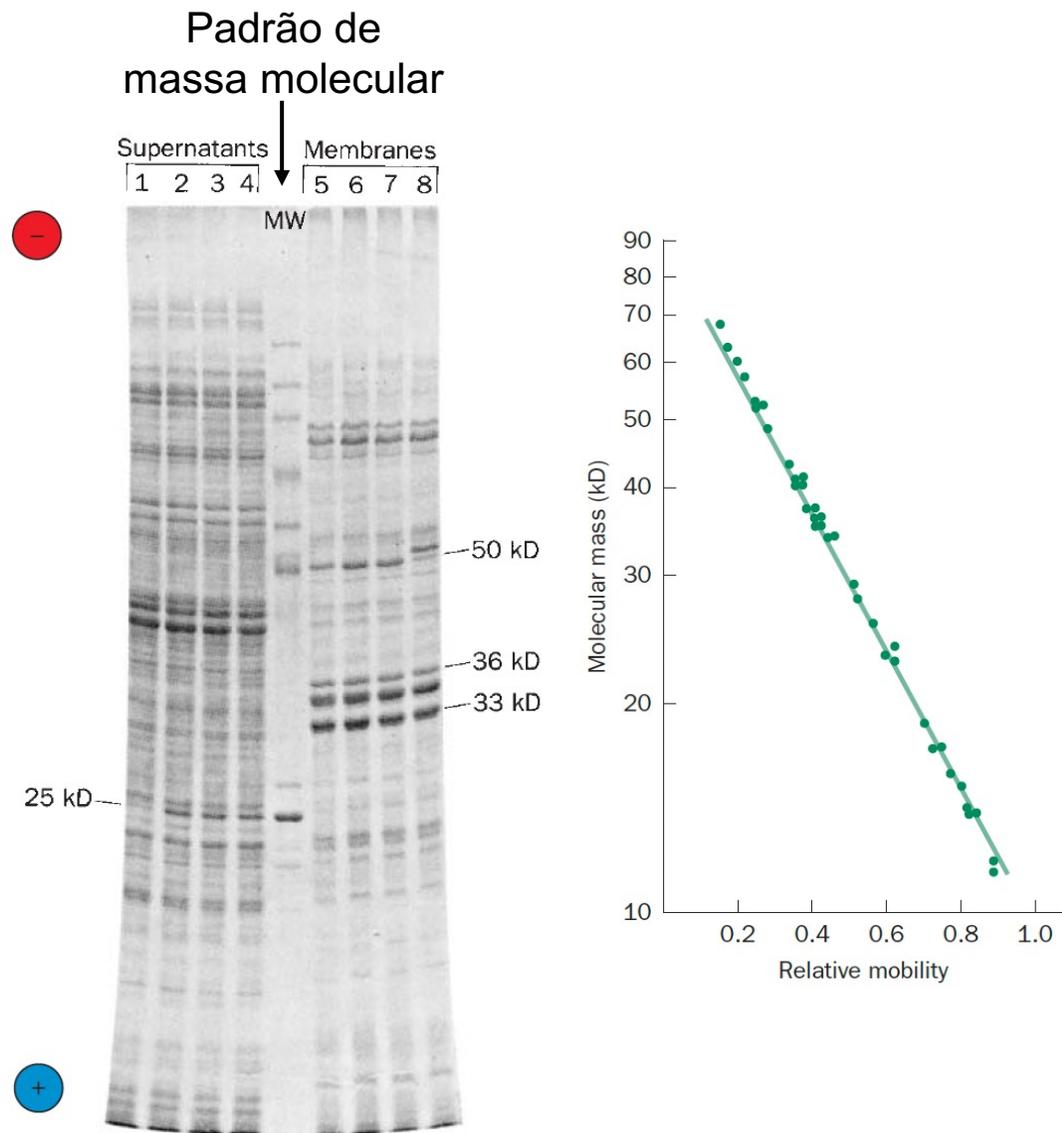
A eletroforese em gel desnaturante é um método comum para a análise de proteínas

- As proteínas são desnaturadas com um detergente iônico forte (SDS) e redutores de ligações dissulfeto. A relação carga/massa passa a ser constante para todas as proteínas do extrato.
- O gel (normalmente poliacrilamida) contém poros que funcionam como uma peneira molecular.
- A separação de proteínas ocorre por diferenças de tamanho e migração em direção ao ânodo quando estão desnaturadas por um detergente aniônico (adquirem carga -; uma molécula de SDS por resíduo de aminoácido).
- Gera um mapa claro da complexidade do extrato proteico e constitui um método simples para acompanhar etapas de purificação de proteínas.



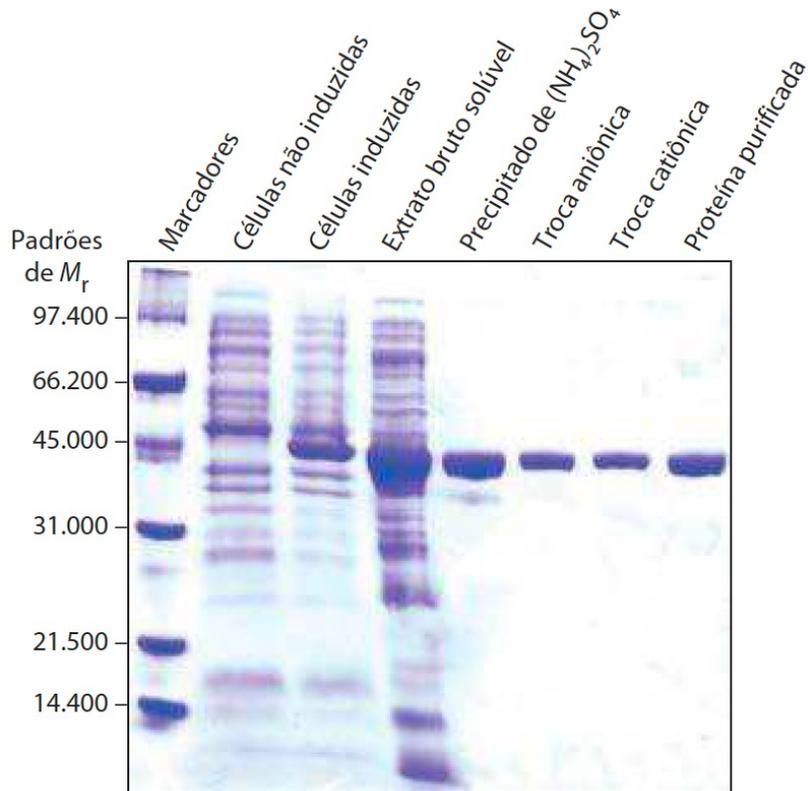
A eletroforese em gel desnaturante é um método comum para a análise de proteínas

- **As proteínas são desnaturadas com um detergente iônico forte (SDS) e redutores de ligações dissulfeto. A relação carga/massa passa a ser constante para todas as proteínas do extrato.**
- **O gel (normalmente poliacrilamida) contém poros que funcionam como uma peneira molecular.**
- **A separação de proteínas ocorre por diferenças de tamanho e migração em direção ao ânodo quando estão desnaturadas por um detergente aniônico (adquirem carga -; uma molécula de SDS por resíduo de aminoácido).**
- **Gera um mapa claro da complexidade do extrato proteico e constitui um método simples para acompanhar etapas de purificação de proteínas.**

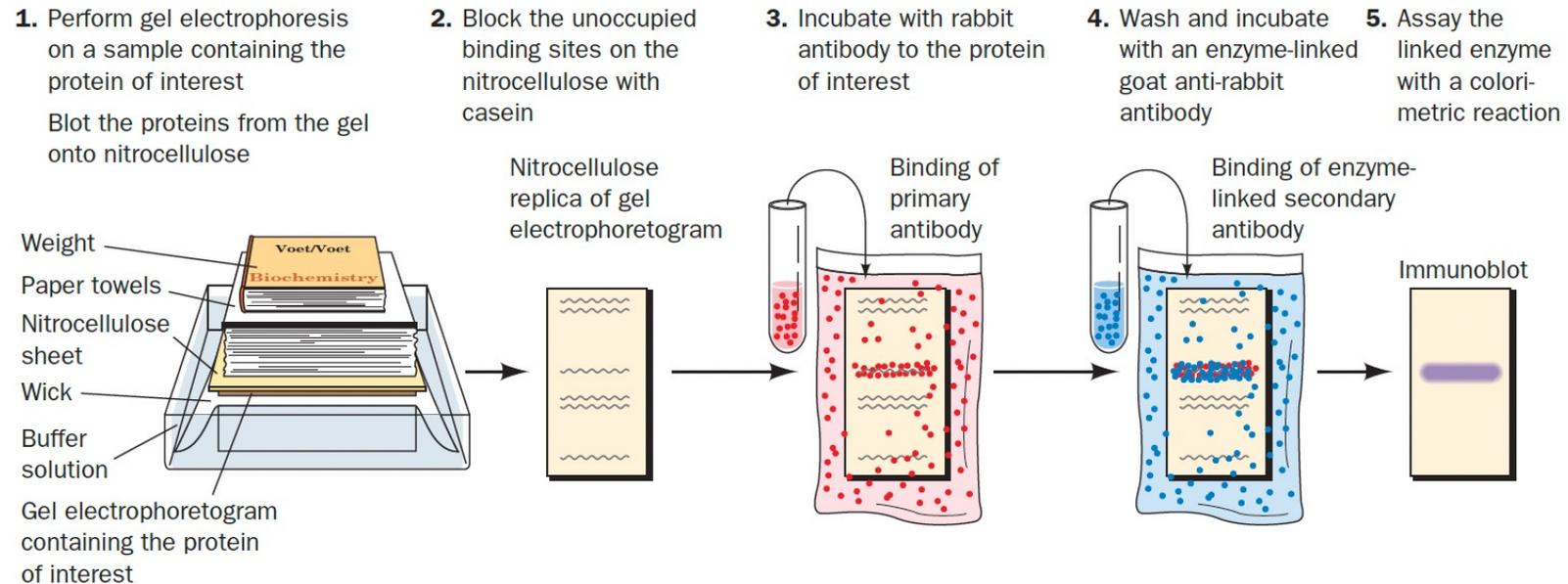


A detecção de proteínas pode ser feita através do uso de corantes ou por métodos imunológicos

- **Coomassie blue**

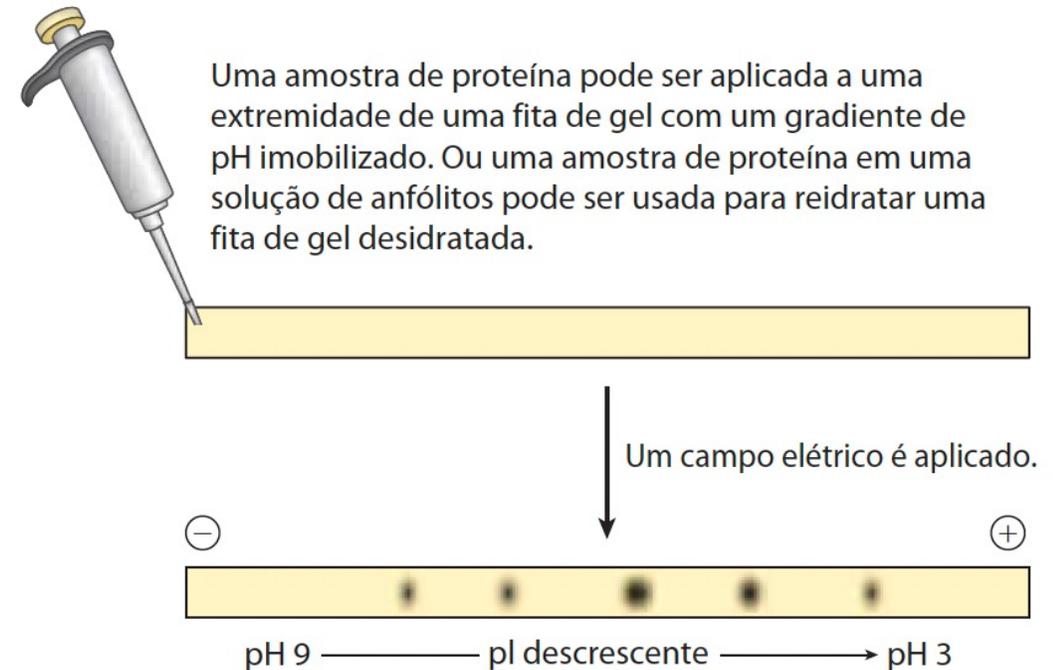
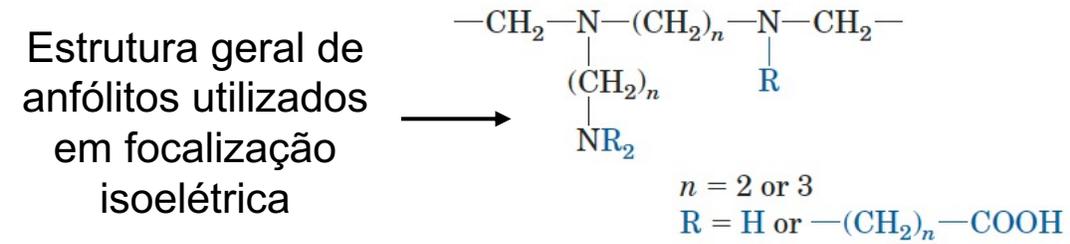


- **Western blot**



A focalização isoelétrica separa proteínas em função de seu pI

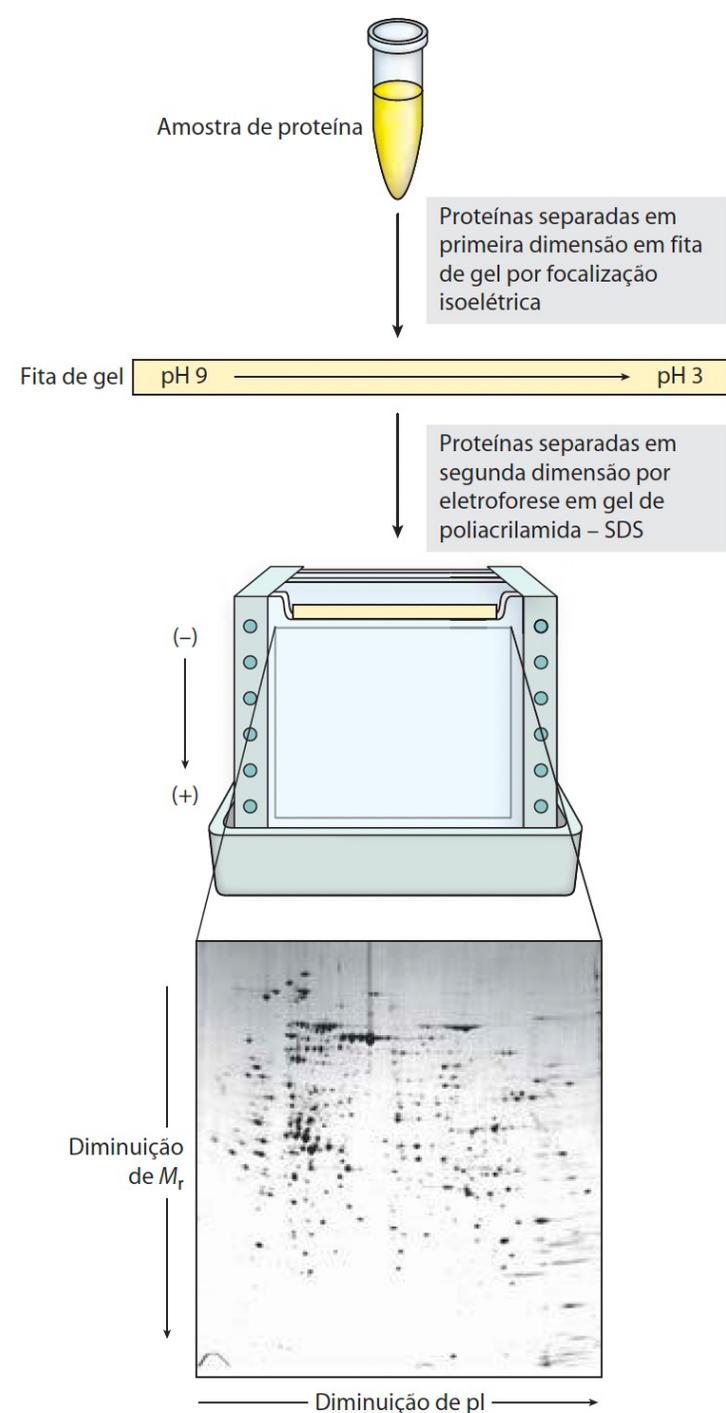
- Tira de gel com gradiente de pH, com valores crescentes em direção ao cátodo.
- O gradiente pode ser formado por uma mistura de anfólitos migrando em um campo elétrico até atingirem a posição de equilíbrio onde o pH equivale ao pI.
- O gradiente também pode ser estabelecido por anfólitos imobilizados em gel utilizando derivados conjugados a acrilamida.
- As proteínas carregadas migram em direção ao polo correspondente até passarem pela região equivalente ao seu pI, onde param de migrar.



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

Eletrforese bidimensional: focalização isoelétrica seguida de eletrforese desnaturante

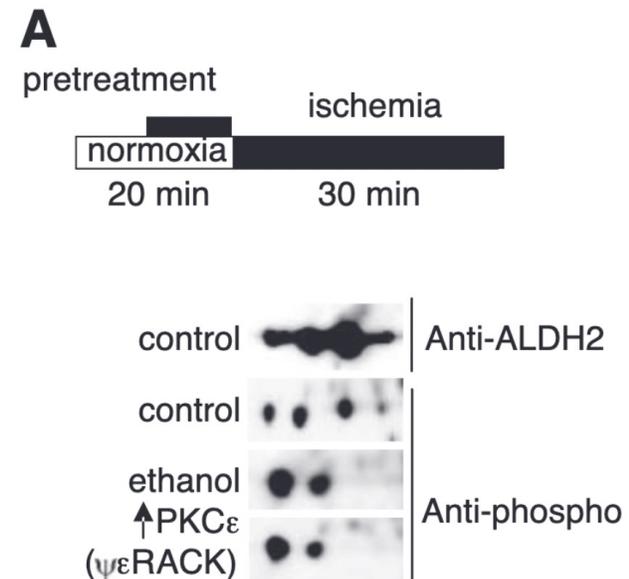
- Separa proteínas em função do pI e tamanho
- Alta resolução e poder analítico



Activation of Aldehyde Dehydrogenase-2 Reduces Ischemic Damage to the Heart

CHE-HONG CHEN, GRANT R. BUDAS, ERIC N. CHURCHILL, MARIE-HÉLÈNE DISATNIK, THOMAS D. HURLEY, AND DARIA MOCHLY-ROSEN [Authors Info & Affiliations](#)

SCIENCE • 12 Sep 2008 • Vol 321, Issue 5895 • pp. 1493-1495 • DOI: 10.1126/science.1158554

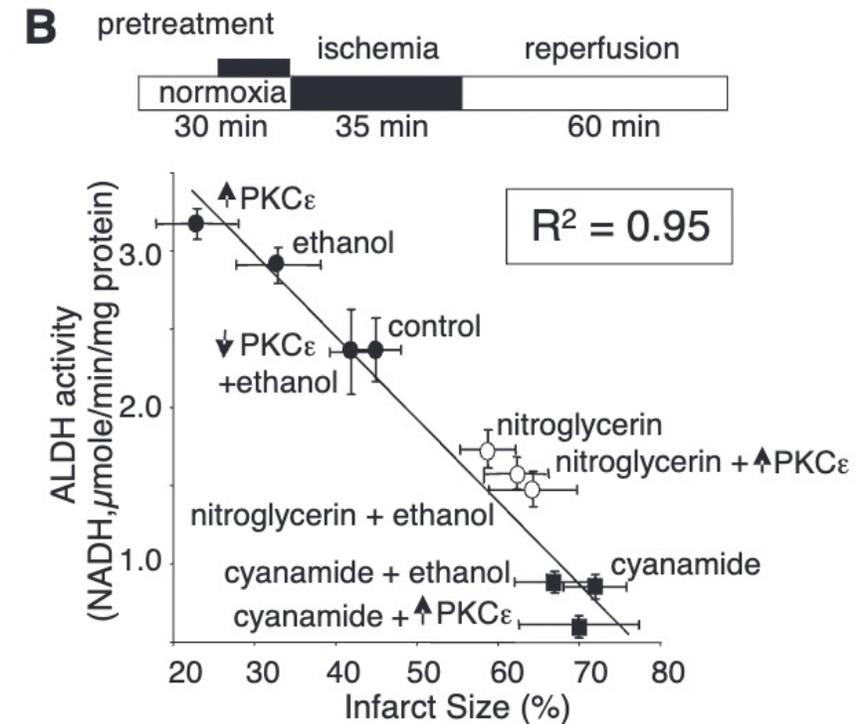


Elektroforese
bidimensional
possibilitou
descobertas muito
interessantes

Activation of Aldehyde Dehydrogenase-2 Reduces Ischemic Damage to the Heart

CHE-HONG CHEN, GRANT R. BUDAS, ERIC N. CHURCHILL, MARIE-HÉLÈNE DISATNIK, THOMAS D. HURLEY, AND DARIA MOCHLY-ROSEN [Authors Info & Affiliations](#)

SCIENCE • 12 Sep 2008 • Vol 321, Issue 5895 • pp. 1493-1495 • DOI: 10.1126/science.1158554

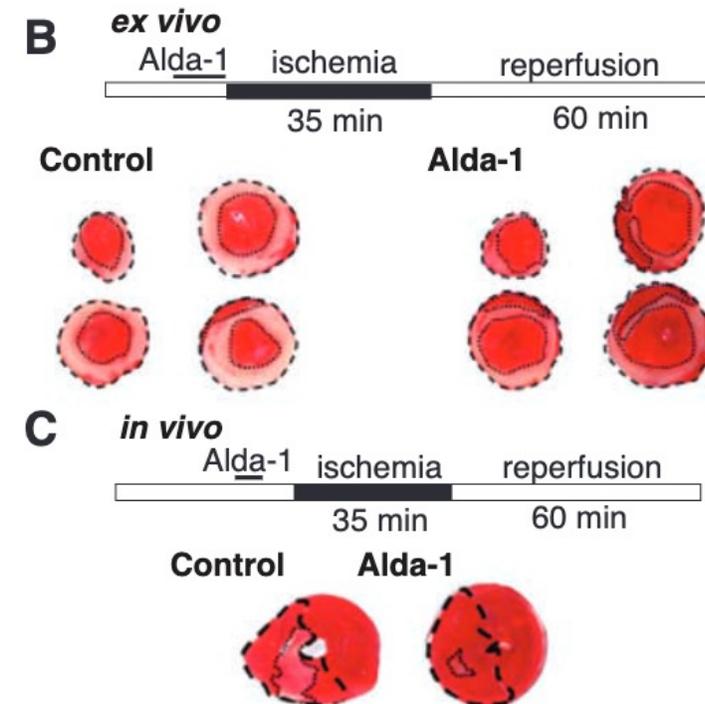


Eleetroforese
bidimensional
possibilitou
descobertas muito
interessantes

Activation of Aldehyde Dehydrogenase-2 Reduces Ischemic Damage to the Heart

CHE-HONG CHEN, GRANT R. BUDAS, ERIC N. CHURCHILL, MARIE-HÉLÈNE DISATNIK, THOMAS D. HURLEY, AND DARIA MOCHLY-ROSEN [Authors Info & Affiliations](#)

SCIENCE • 12 Sep 2008 • Vol 321, Issue 5895 • pp. 1493-1495 • DOI: 10.1126/science.1158554



Elektroforese
bidimensional
possibilitou
descobertas muito
interessantes

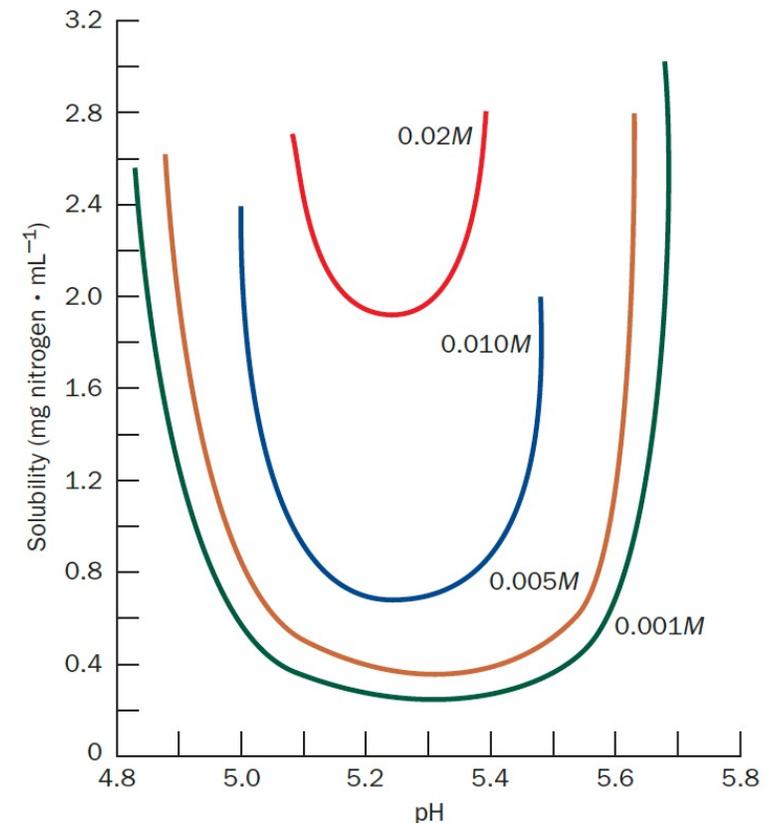
Purificação de proteínas

- Estudos de estrutura e função.
- Necessidade industrial, biomédica, etc.
- Como isolar uma proteína dentre milhares que constituem as células?
- Propriedades como estabilidade térmica, tamanho, carga, afinidade por ligantes, etc.
- A engenharia genética possibilitou o uso de estratégias adicionais baseadas na introdução de porções extra na proteína de interesse, seja na extremidade N- ou C-terminal.

Preparação da amostra

- **Extrato total? Fração subcelular?**
Muitas proteínas recombinantes são expressas em bactéria.
- **Pré-purificação. Precipitação do extrato por calor (estabilidade térmica), aumento na concentração de sais (efeito 'salting out'), variação de pH (ponto isoelétrico), etc.**
- **Métodos de troca de tampão: diálise, centrifugação por filtros de peso molecular, colunas de dessalinização, etc.**

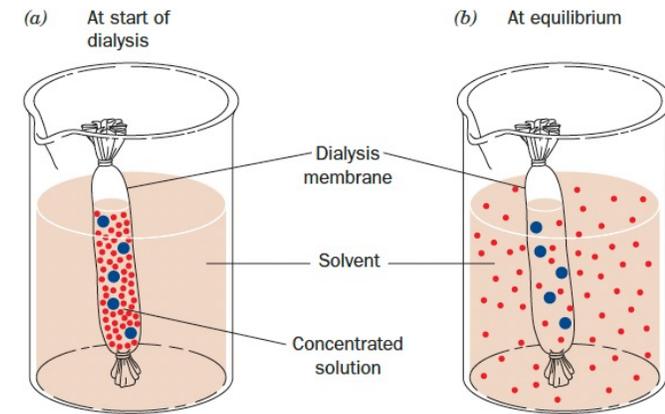
Solubilidade vs Força iônica e pH



Preparação da amostra

- **Extrato total? Fração subcelular?**
Muitas proteínas recombinantes são expressas em bactéria.
- **Pré-purificação. Precipitação do extrato por calor (estabilidade térmica), aumento na concentração de sais (efeito 'salting out'), variação de pH (ponto isoelétrico), etc.**
- **Métodos de troca de tampão: diálise, centrifugação por filtros de peso molecular, colunas de dessalinização, etc.**

Diálise

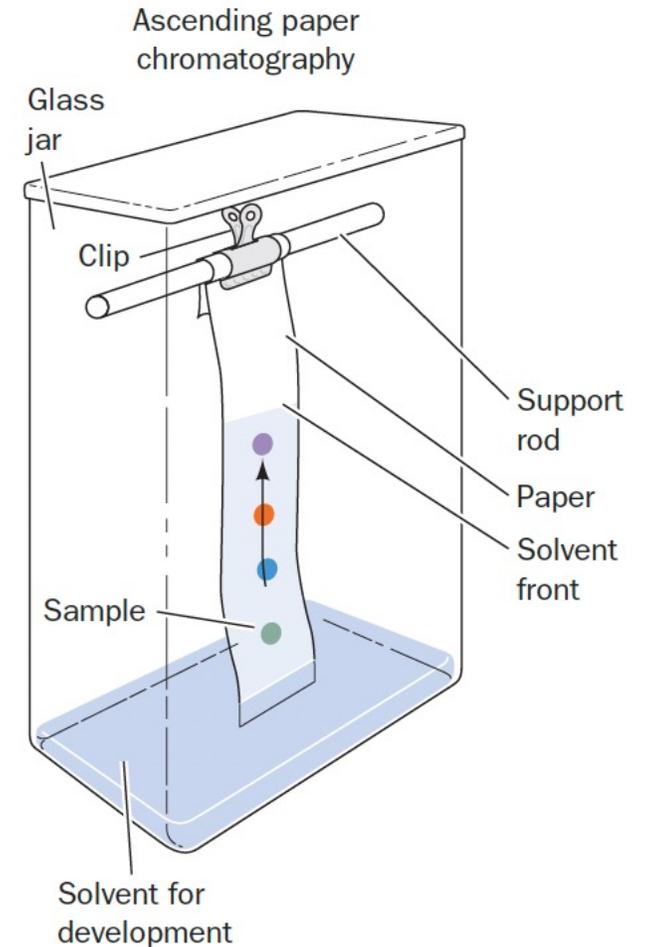


Filtração por peso molecular



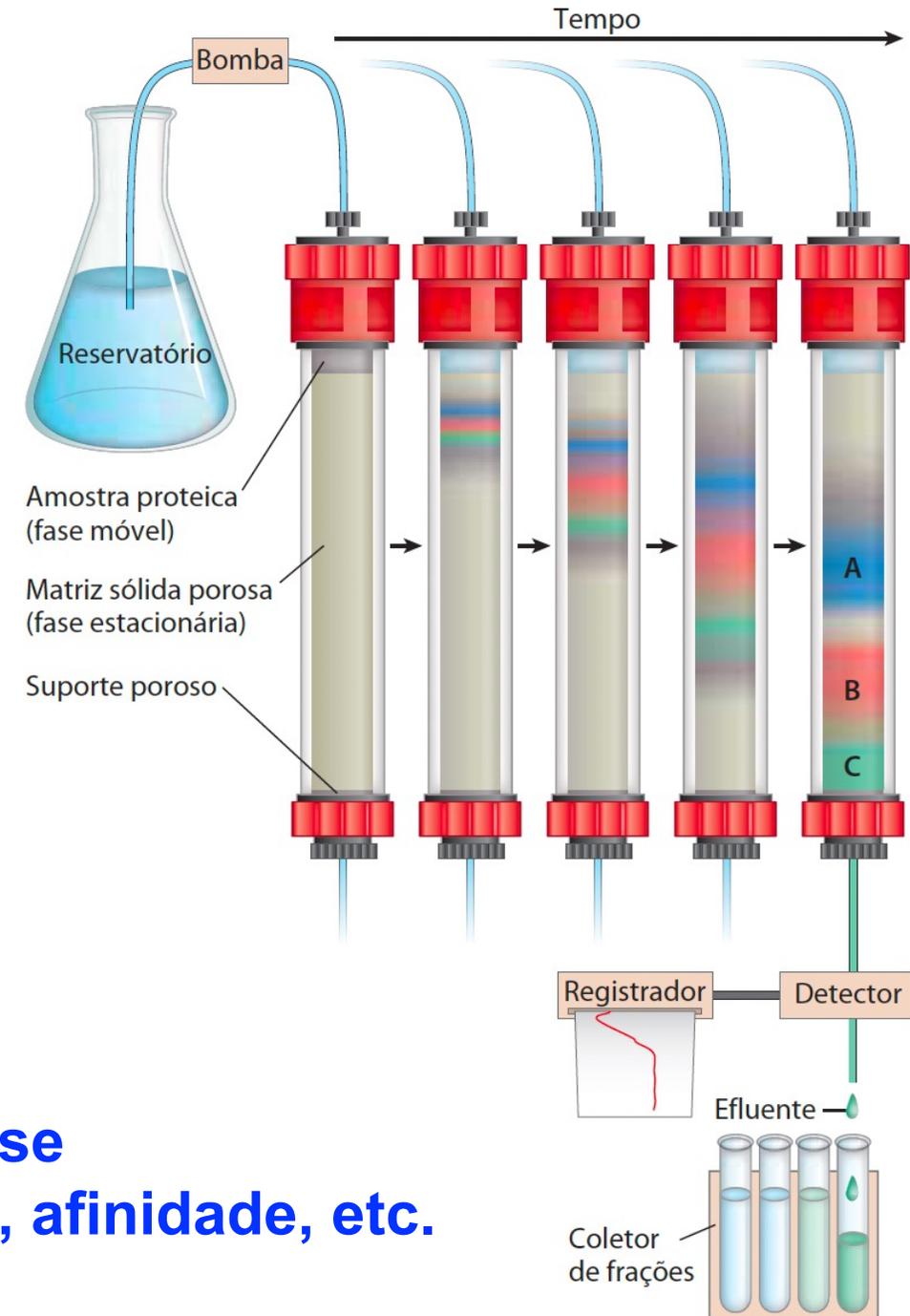
As proteínas podem ser separadas por cromatografia

- O que é cromatografia? Técnica de separação de moléculas contidas numa fase móvel através da interação e retenção diferencial numa fase estacionária.
- Para proteínas, cromatografia líquida em coluna com fase móvel aquosa.
- Diferentes tipos, variando as propriedades da fase estacionária: exclusão, troca iônica, hidrofóbica, afinidade, etc.



As proteínas podem ser separadas por cromatografia

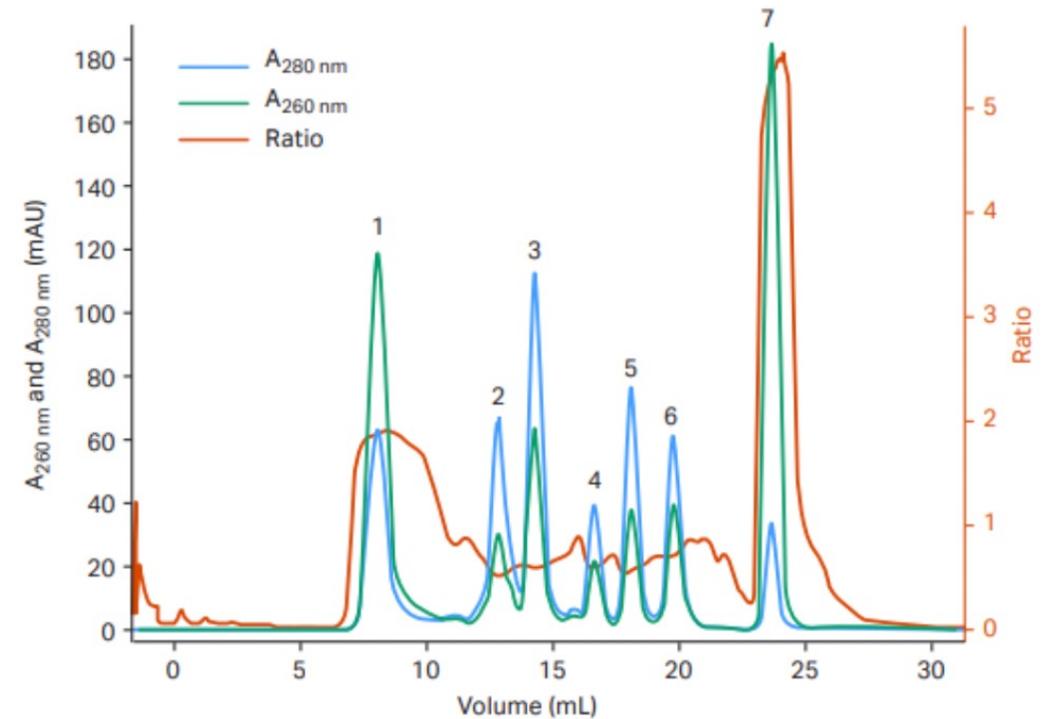
- O que é cromatografia? Técnica de separação de moléculas contidas numa fase móvel através da interação e retenção diferencial numa fase estacionária.
- Para proteínas, cromatografia líquida em coluna com fase móvel aquosa.
- Diferentes tipos, variando as propriedades da fase estacionária: exclusão, troca iônica, hidrofóbica, afinidade, etc.



A cromatografia é automatizada num equipamento que opera a alta pressão

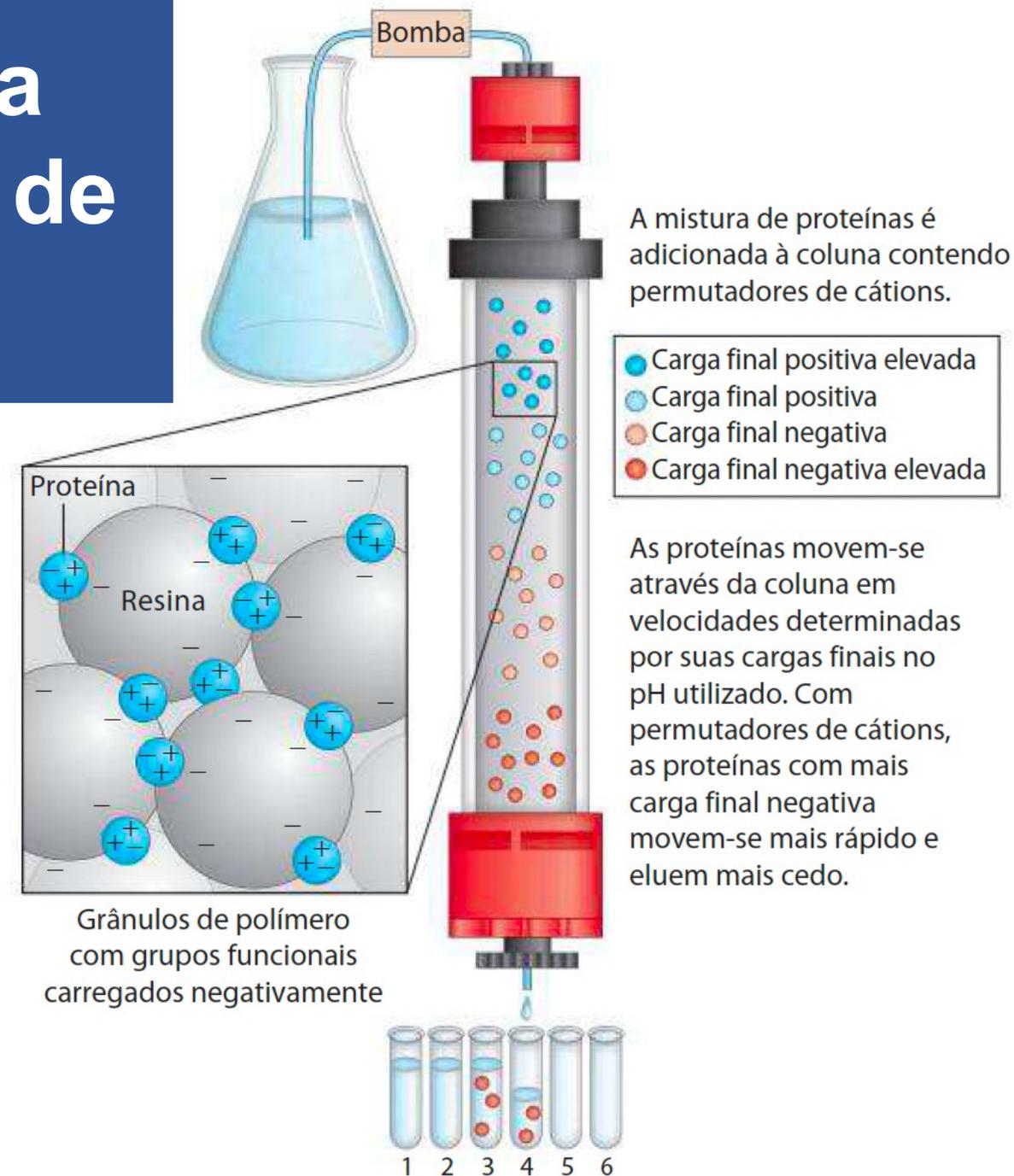


Ratio curve with Wavelength monitor U9-T



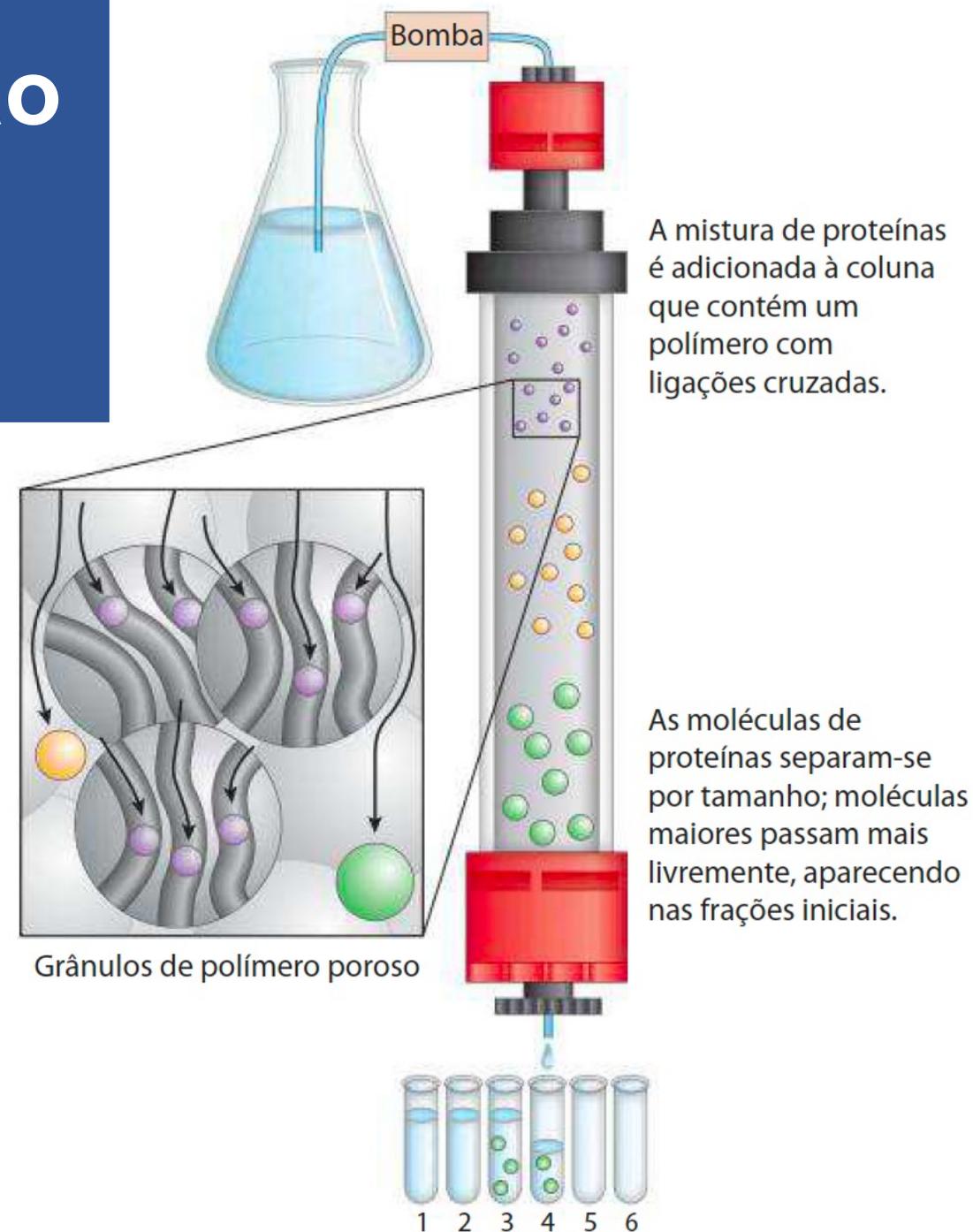
A cromatografia de troca iônica explora diferenças de cargas nas proteínas

- Troca catiônica, fase estacionária possui grupos aniônicos.
- Troca aniônica, fase estacionária possui grupos catiônicos.
- A eluição diferencial de proteínas da fase estacionária depende da variação força iônica e do pH da fase móvel.



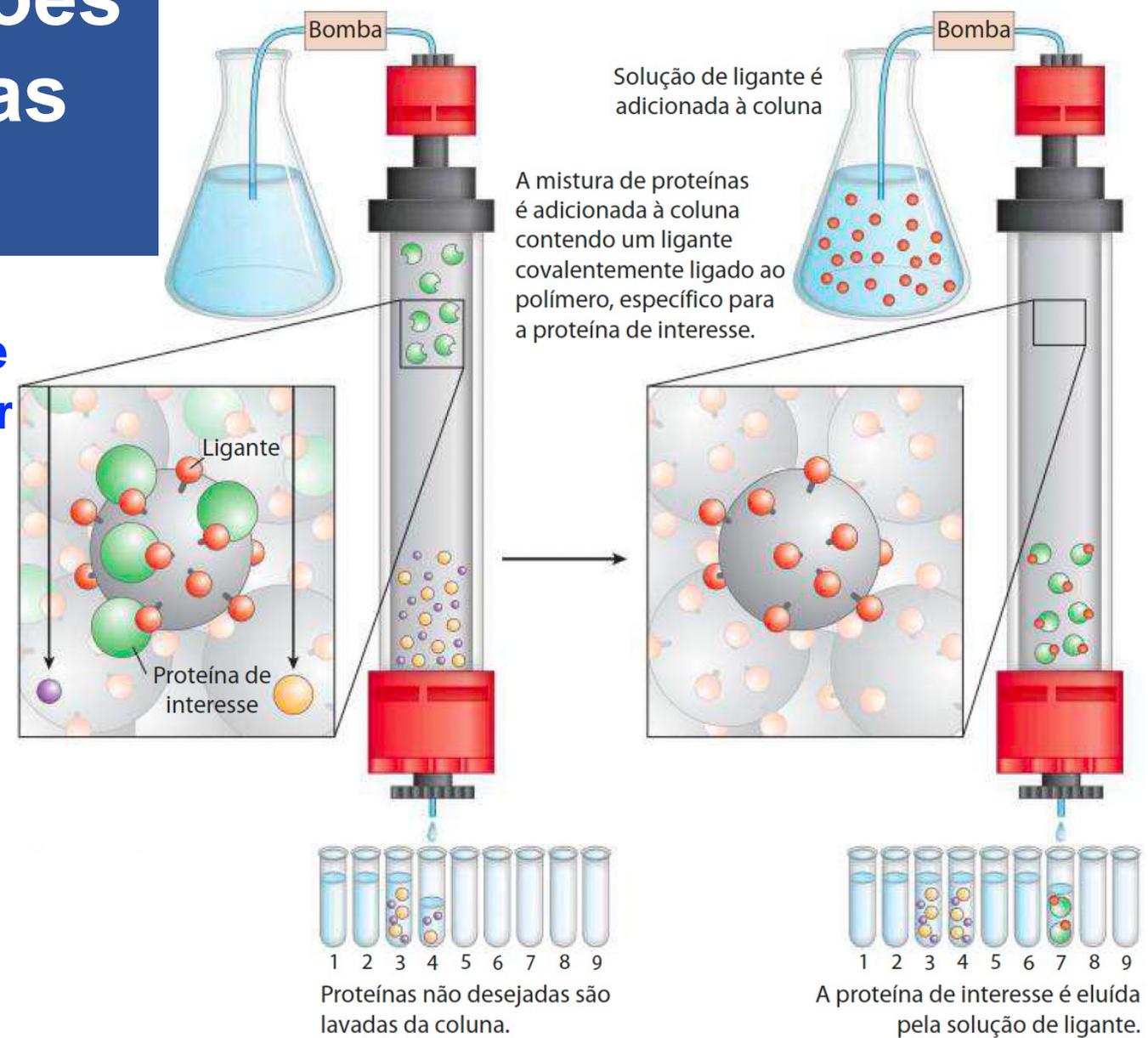
A cromatografia de exclusão explora diferenças de tamanho das proteínas

- Proteínas menores são retidas nos poros da fase estacionária.
- Proteínas maiores são excluídas, assim eluem mais rapidamente.
- Quanto maior a coluna, maior a resolução.



A cromatografia por afinidade explora interações específicas das proteínas com ligantes

- Fase estacionária contendo um ligante que sequestra proteínas do extrato por interações fortes (afinidade).
- O ligante pode ser análogos de substratos, ou mesmo um anticorpo contra a proteína de interesse.
- Eluição feita por competição adicionando o ligante livre na fase móvel, ou alterando força iônica/pH.



1 2 3 4 5 6 7 8 9
Proteínas não desejadas são lavadas da coluna.

1 2 3 4 5 6 7 8 9
A proteína de interesse é eluída pela solução de ligante.

Exercícios

Citocromo c: massa molecular = 12400; pI = 10,0

Mioglobina: massa molecular = 16700; pI = 6,8

Albumina: massa molecular = 66000; pI = 4,7

1. Em uma eletroforese em gel com SDS, indique qual a ordem de migração das 3 proteínas, da mais lenta para a mais rápida.
2. Em uma eletroforese em papel a pH 5, indique o sentido de migração de cada proteína.
3. Em uma focalização isoelétrica em que o pH diminui de 11 para 3, descreva a distância de migração das proteínas, da menor migração para a maior.
4. Em uma filtração em gel, qual seria a ordem de eluição dessas proteínas?
5. Em uma cromatografia de troca iônica com fase estacionária com carga positiva e fase móvel em pH 9, haveria alguma proteína retida? Qual? O que poderia ser feito para remover uma proteína retida nessa situação?

Bibliografia

- **Donald Voet e Judith G. Voet, Biochemistry, 4th edition.**
- **David L. Nelson e Michael M. Cox, Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6^a edição.**