

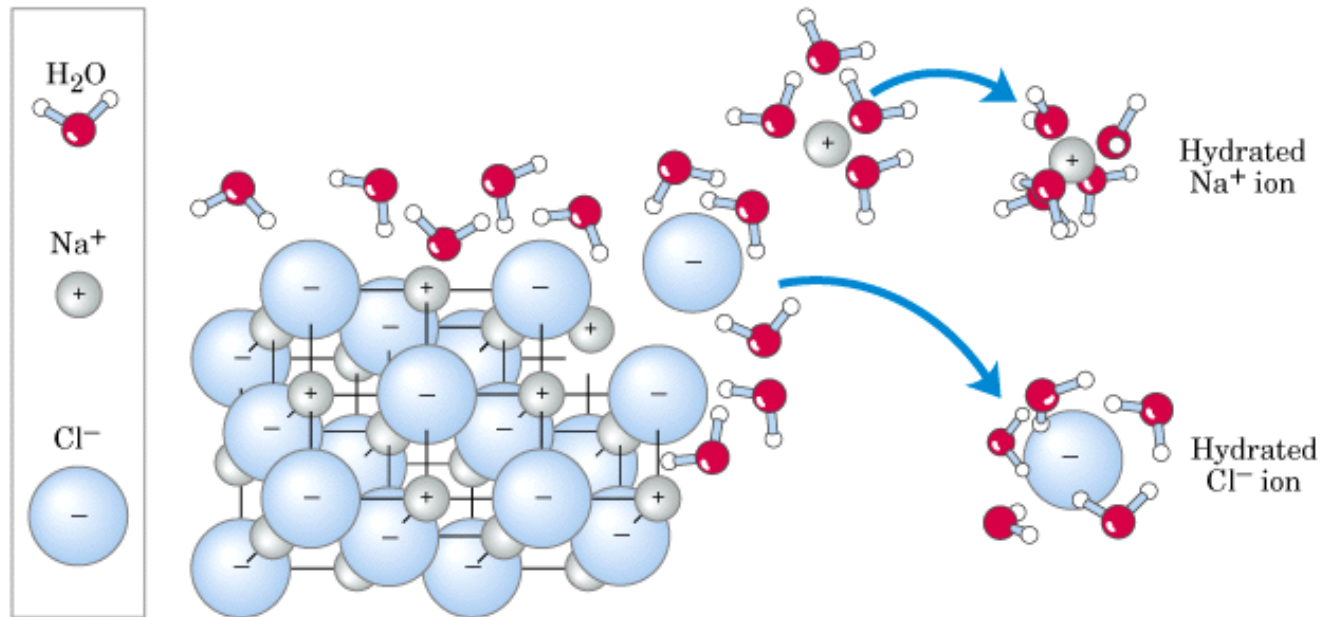
ELETROFOROSE DE PROTEÍNAS

23-AGO-2018

QBQ 0230 – Biologia Noturno

'SALTING IN & SALTING OUT'

A solubilidade de proteínas depende de um balanço entre os resíduos polares/carregados e os resíduos hidrofóbicos. Sais, competem pela solvatação dos resíduos carregados, alterando a solubilidade de uma proteína.



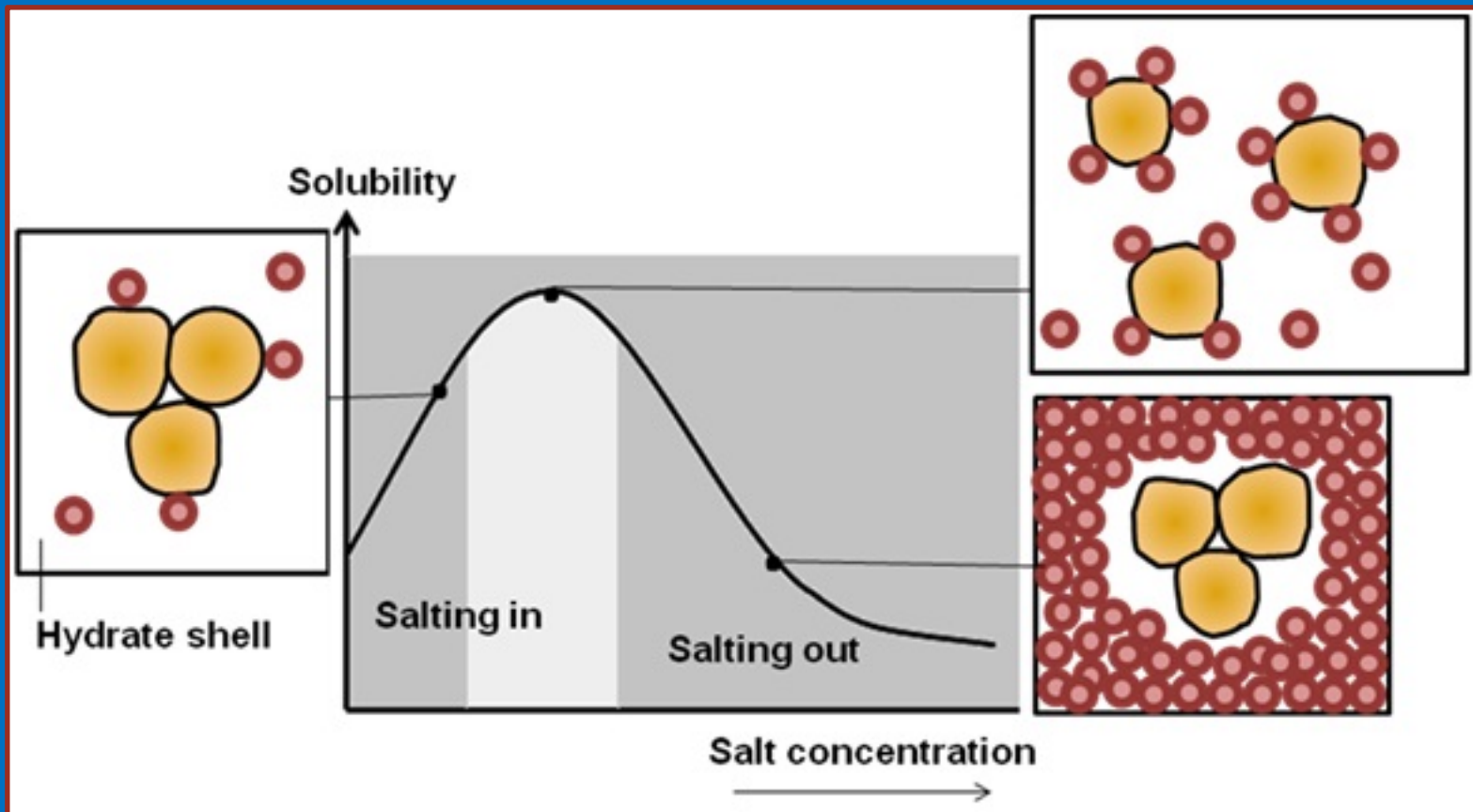
Série de Hofmaister:

Anions: $\text{SO}_4^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$

Cátions: $\text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$

'SALTING IN & SALTING OUT'

A solubilidade de proteínas depende de um balanço entre os resíduos polares/carregados e os resíduos hidrofóbicos. Sais, ajudam na solubilização e, ao mesmo tempo, competem pela solvatação dos resíduos carregados, alterando a solubilidade de uma proteína.



Série de Hofmaister

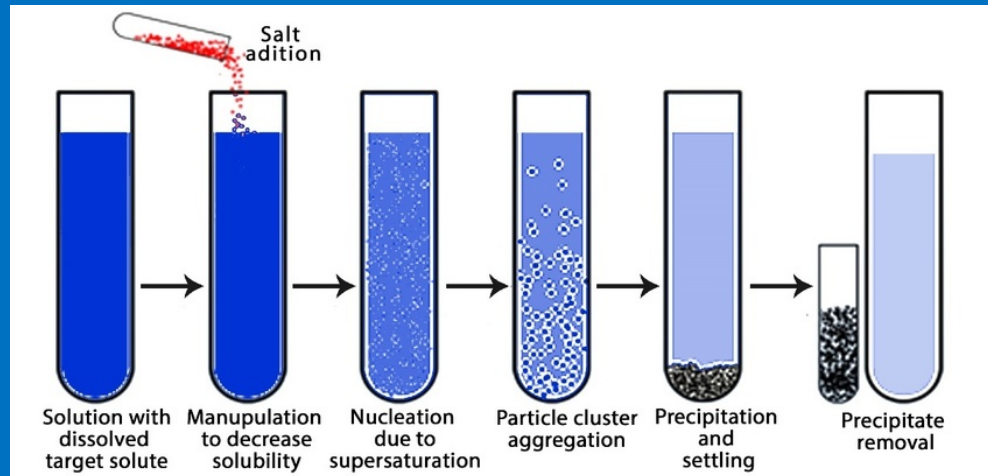
Anions: $\text{SO}_4^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$

Efeito solubilizante



Efeito precipitante

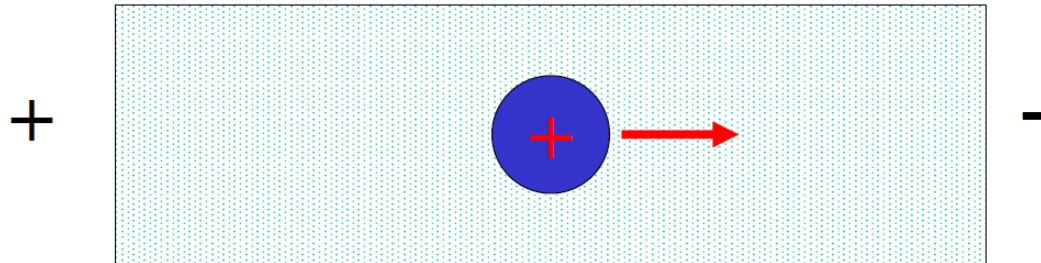
Cátions: $\text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{guanidina}$



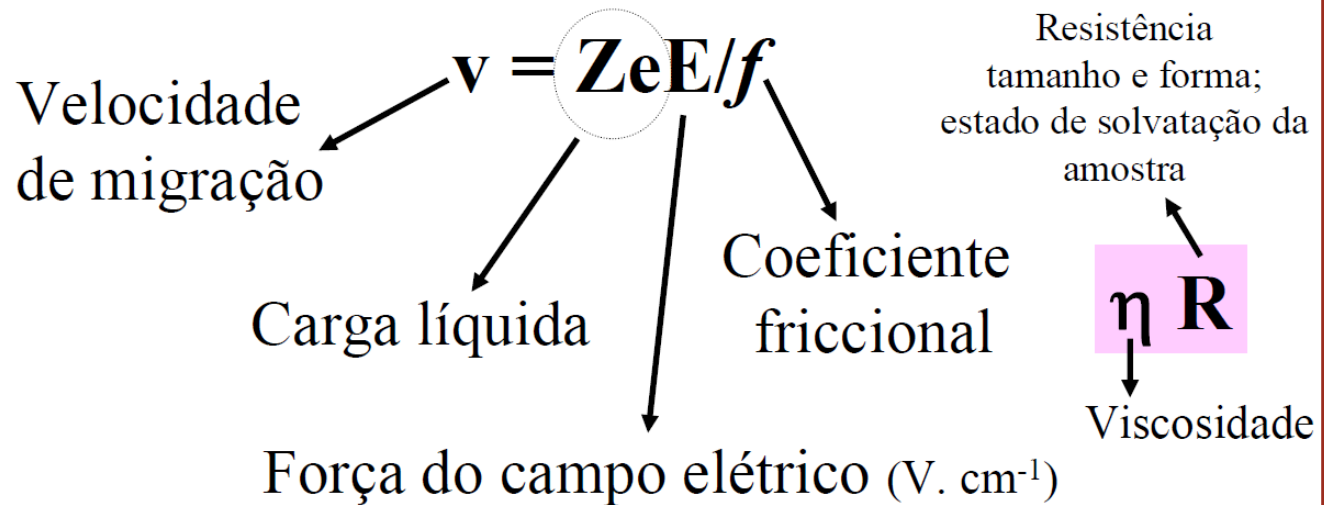
Eletroforese de proteínas

- Electro + phórēsis (grego) = movimento
- Eletroforese refere-se ao movimento de moléculas frente a um campo elétrico.
- A eletroforese em gel ou papel é uma técnica muito útil em laboratório para analisar e separar proteínas (e outras macromoléculas...).

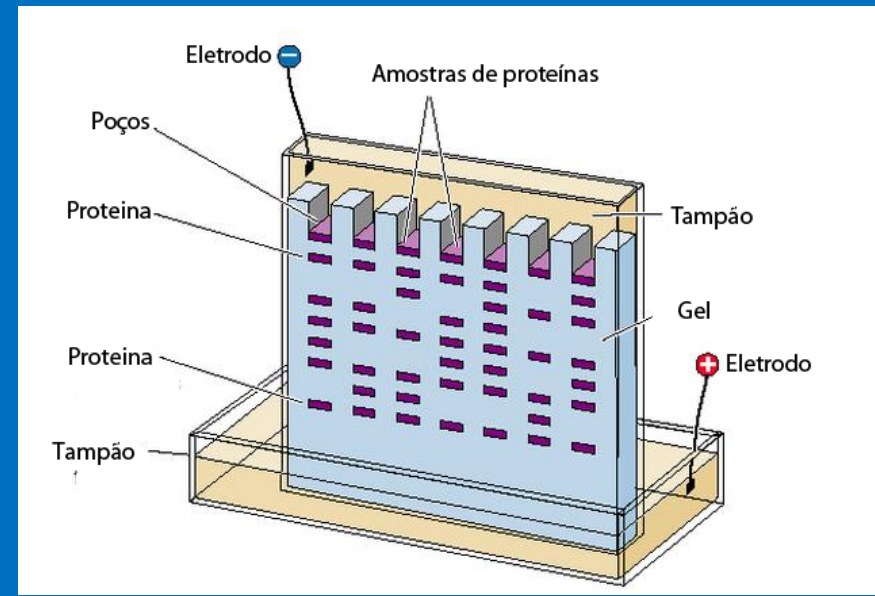
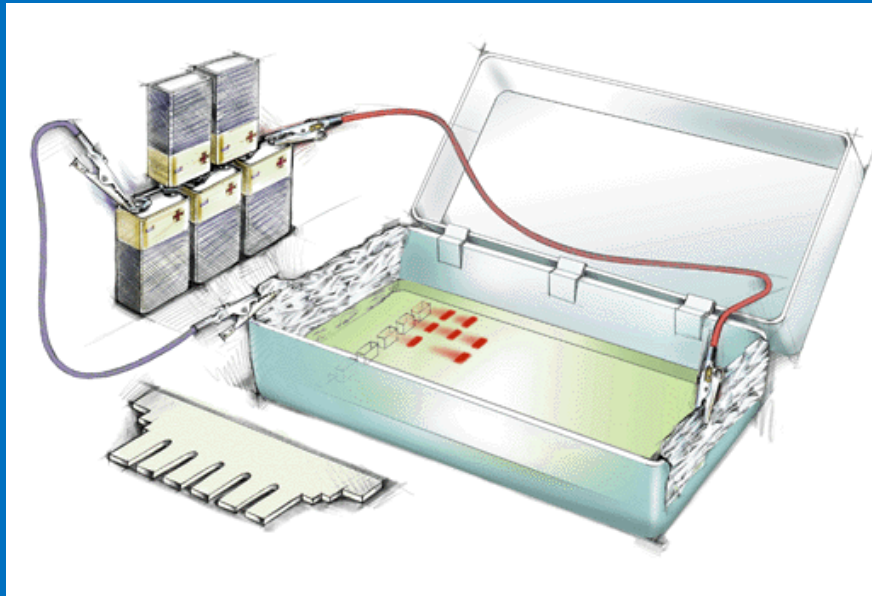
Teoria



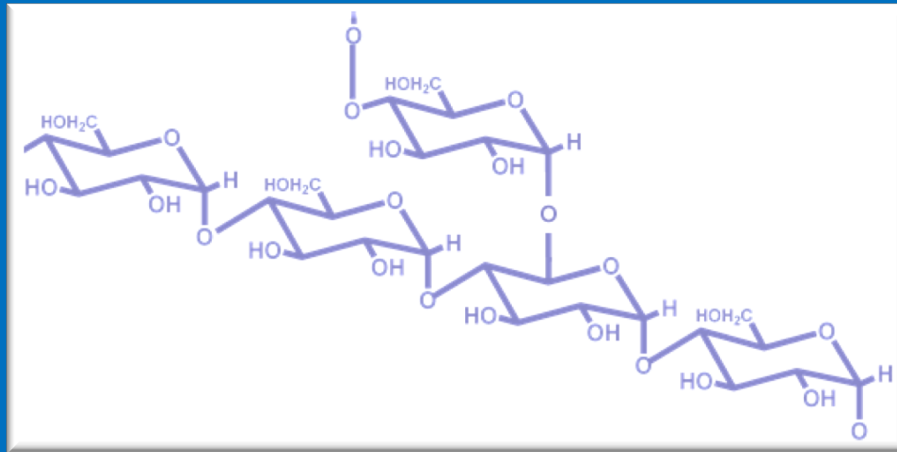
Mobilidade eletroforética (μ) = $v/E = Z/f$



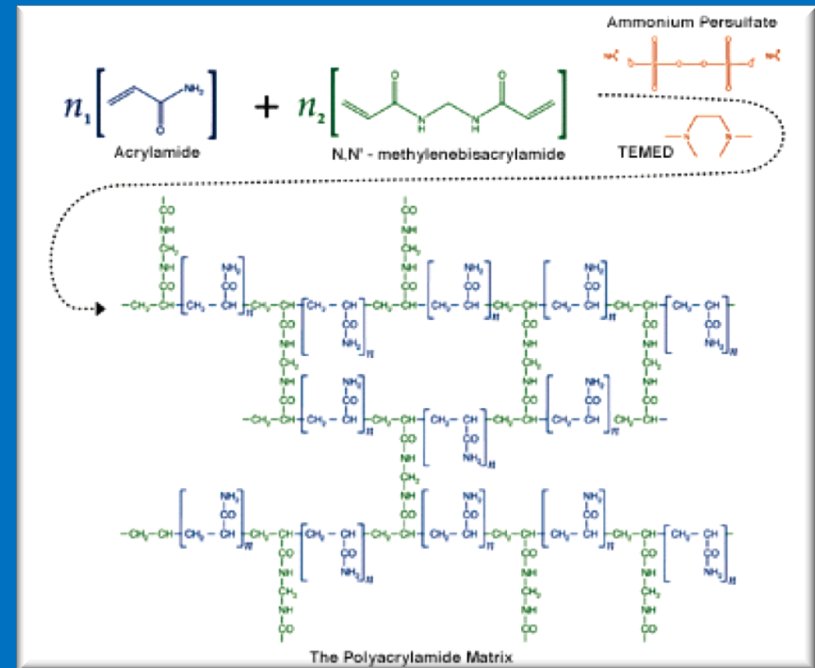
Eletroforese Vertical ou Horizontal



O meio: papel, agarose, acrilamida



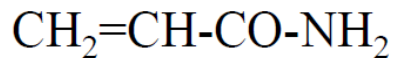
Agarose



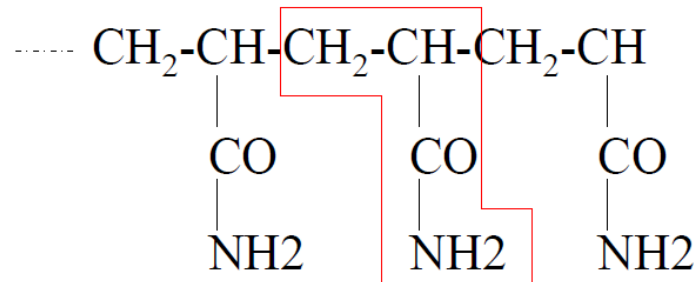
Acrilamida + bis-acrilamida

Geis de poliacrilamida

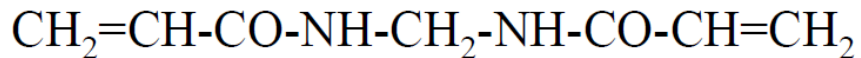
acrilamida



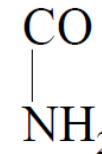
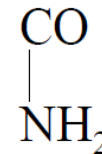
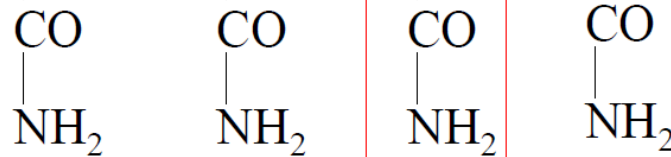
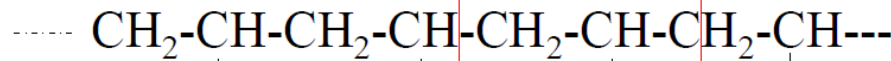
poliacrilamida



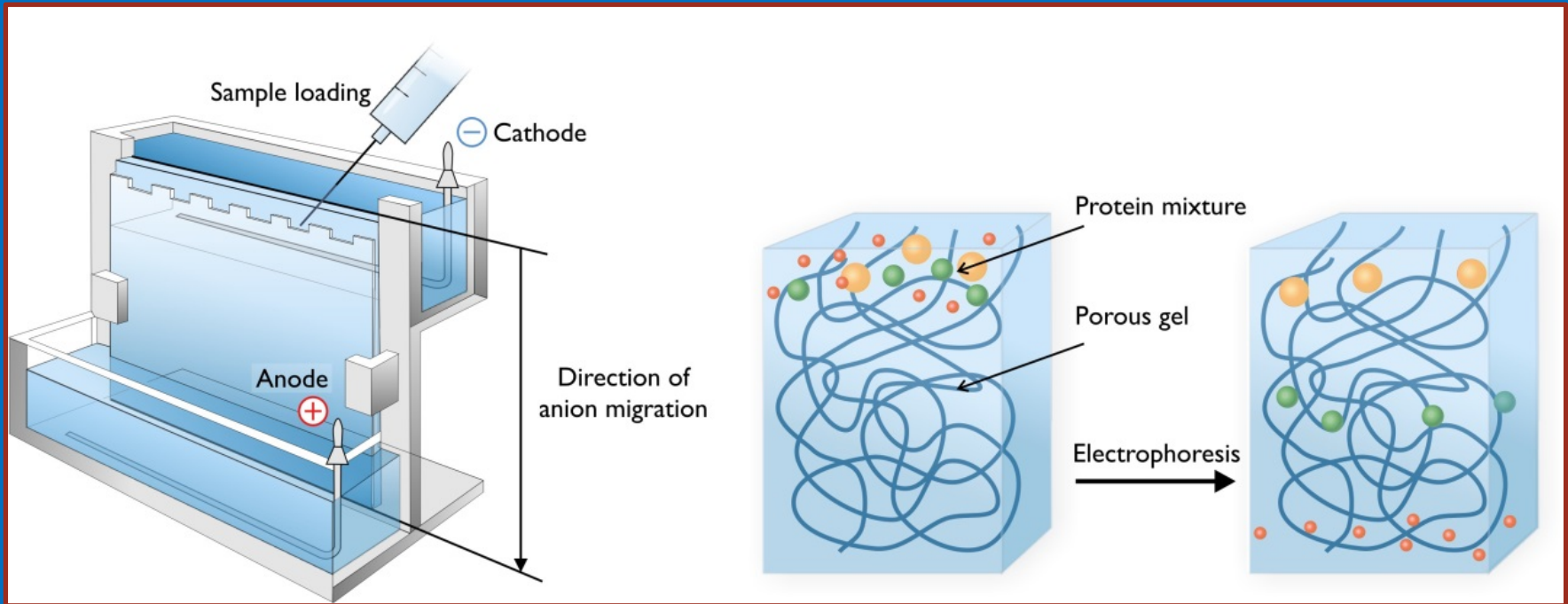
Bis-acrilamida



A concentração e a relação acrilamida:bis-acrilamida determinam o tamanho dos poros do gel



O gel poroso, separa as proteínas por tamanho



- As proteínas são atraídas pelo campo elétrico
- Porém, os gel poroso funciona como uma barreira
- Proteínas menos "migram" mais rapidamente
- Proteínas grandes, migram lentamente

Como as proteínas migram num gel de poliacrilamida?

As propriedades que afetam a migração num gel de poliacrilamida:

1. Tamanho (massa molecular)
2. Carga (pI)

$$\text{Log } V = \text{Log } V_0 - kC$$

k = constante proporcional ao peso molecular
 C = concentração do gel

Migração no gel

Migração sem o gel

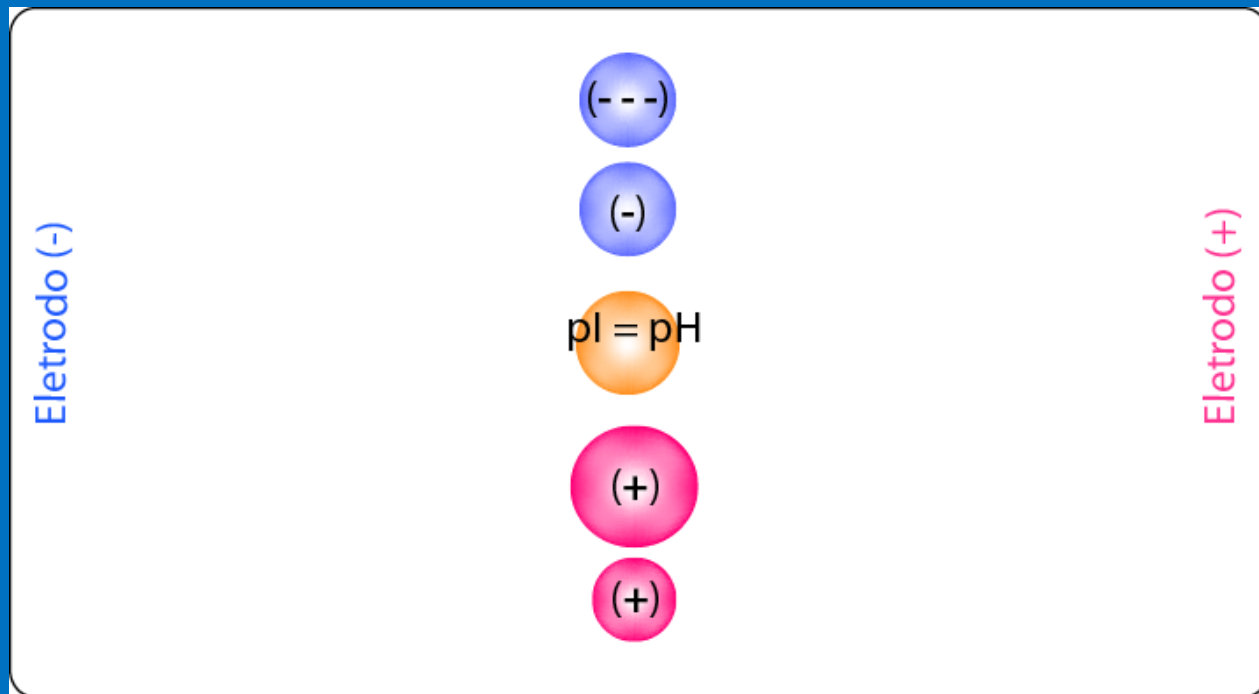
Porém, V é proporcional a carga (Z) e proteínas apresentam diferentes cargas...

Eletroforese de proteínas em condições nativas

Eletroforese em condições **não-denaturantes** (nativas)



separação por carga e peso molecular (simultaneamente)

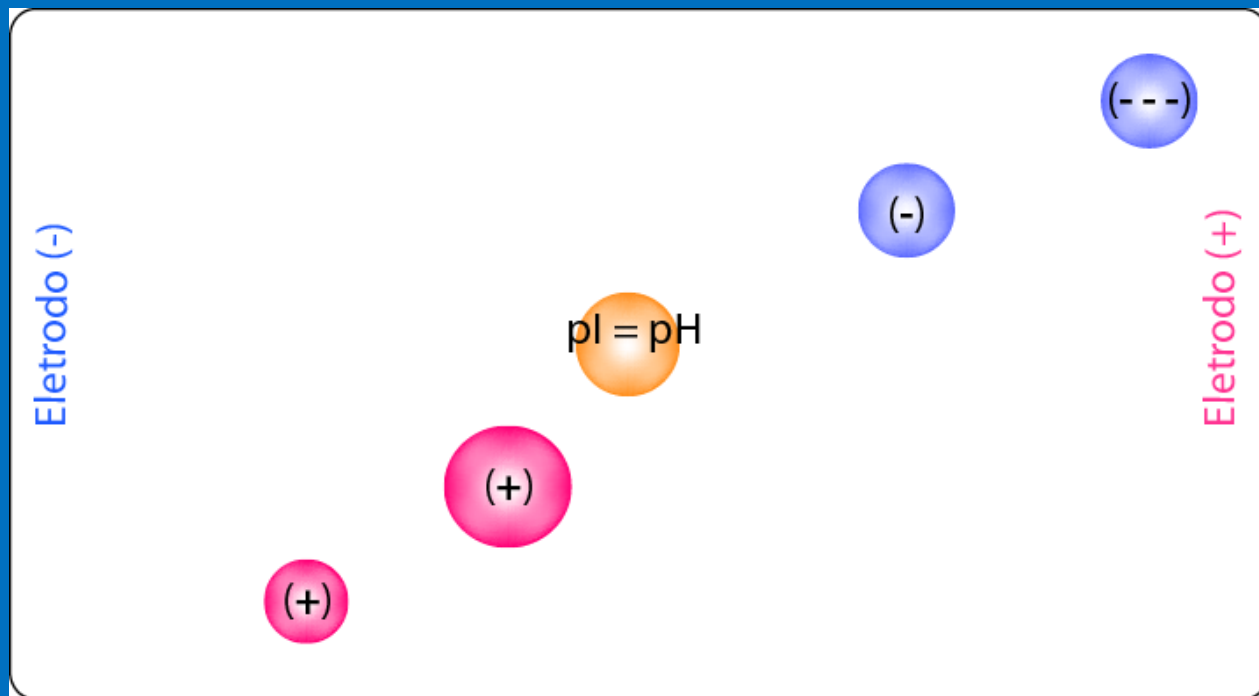


Eletroforese de proteínas em condições nativas: muitas variáveis...

Eletroforese em condições **não-denaturantes** (nativas)

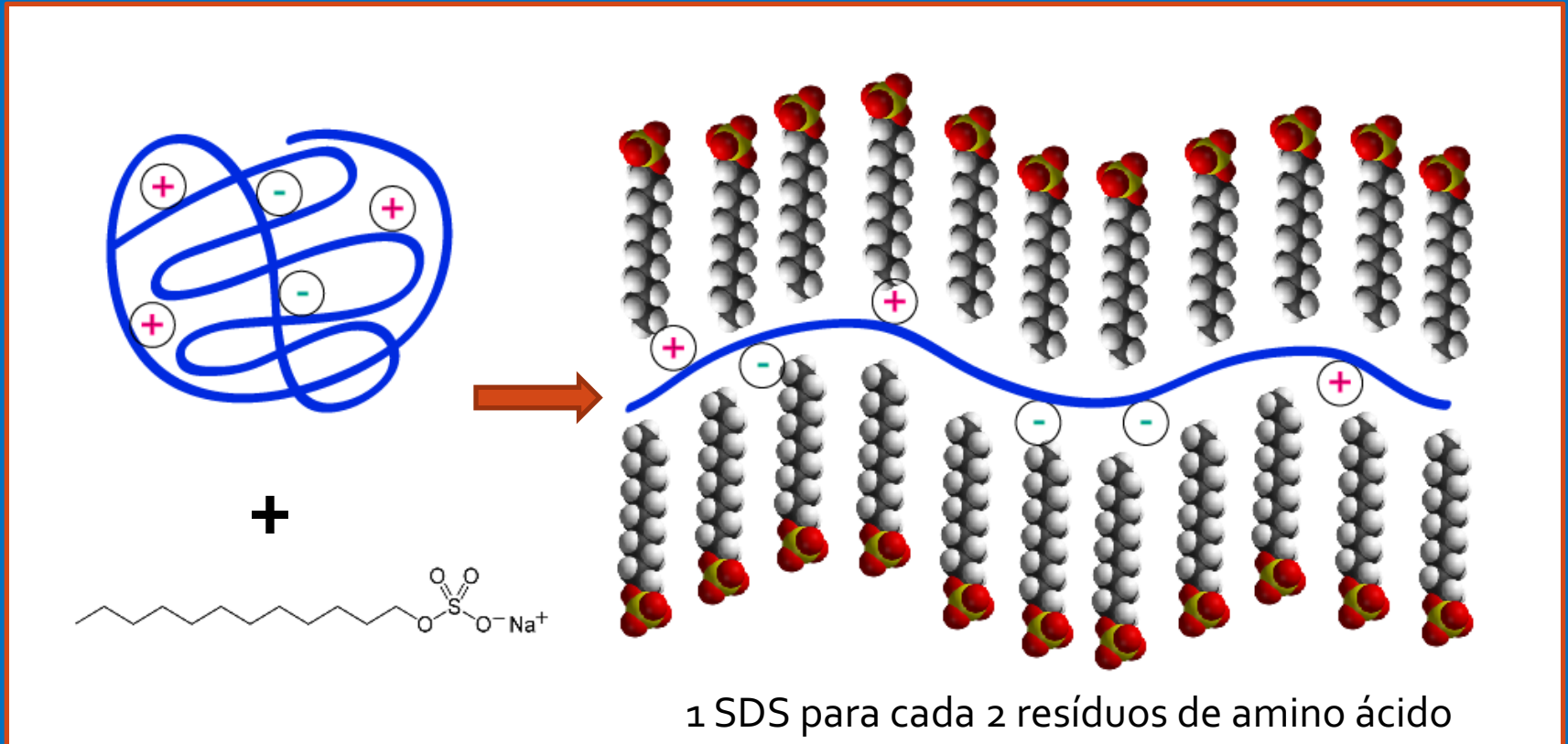


separação por carga e peso molecular (simultaneamente)

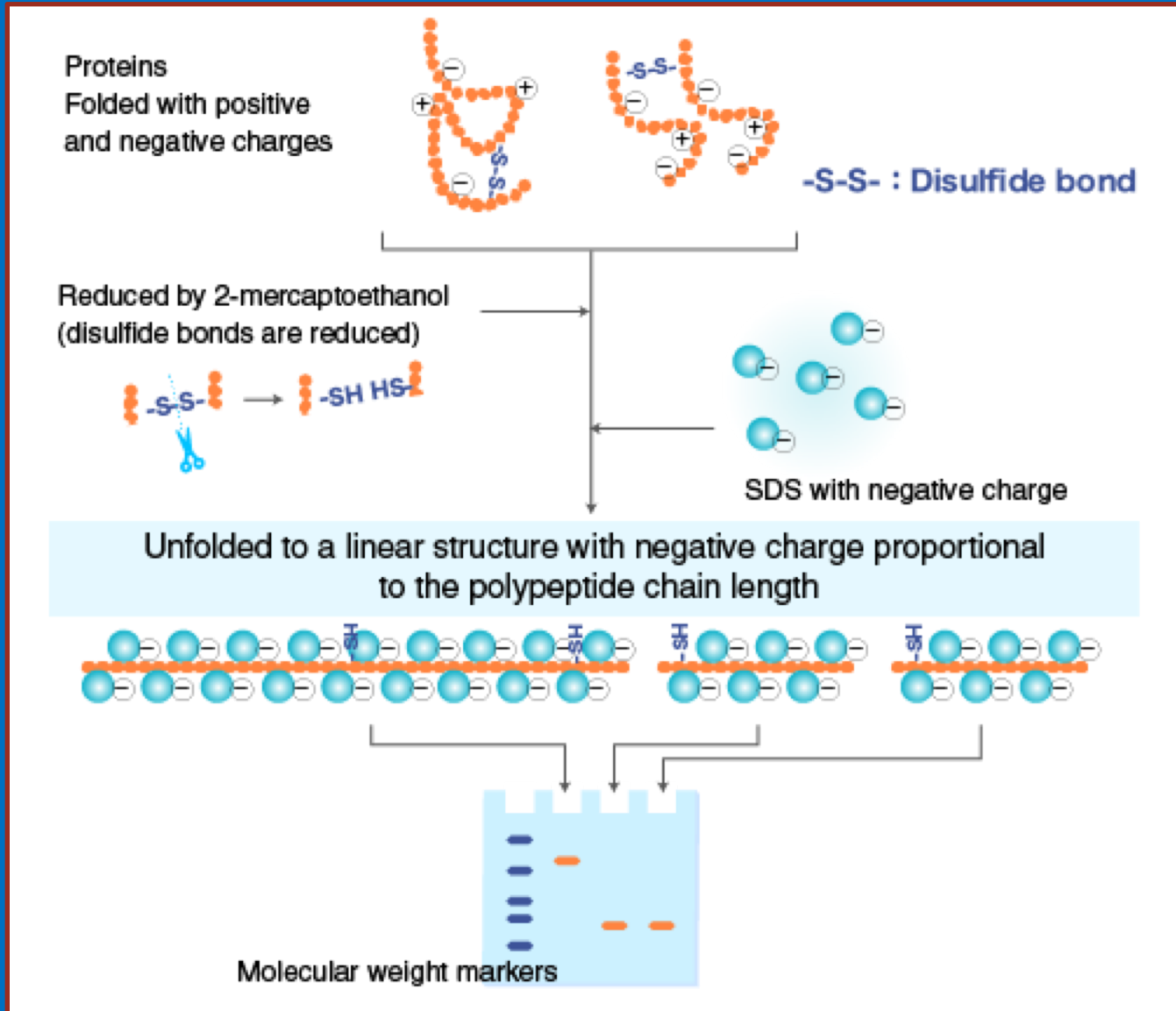


Eletroforese de proteínas em condições denaturantes

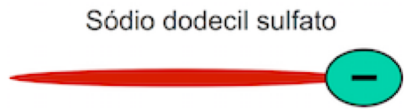
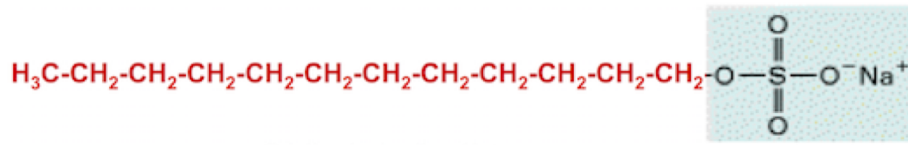
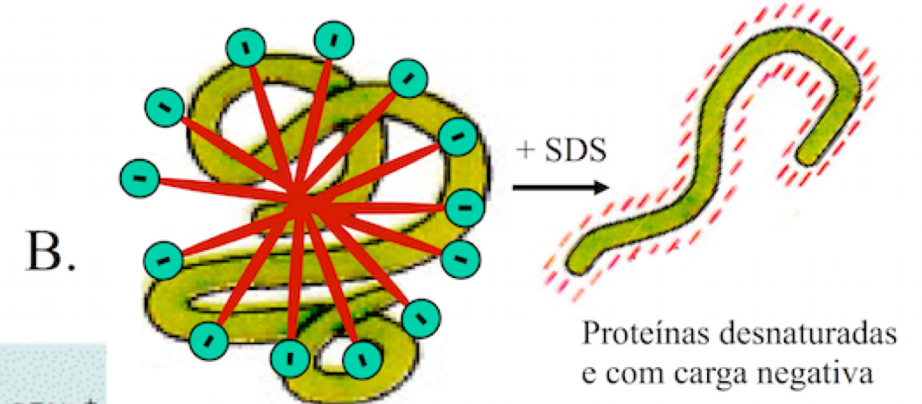
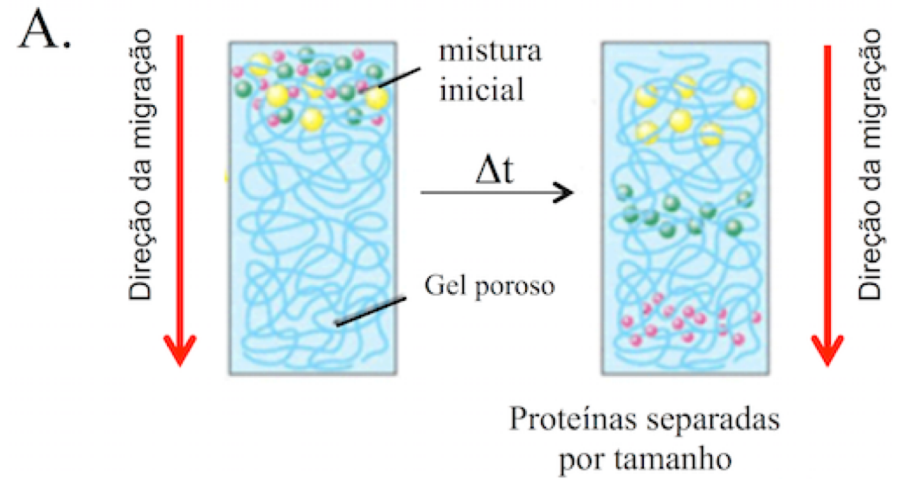
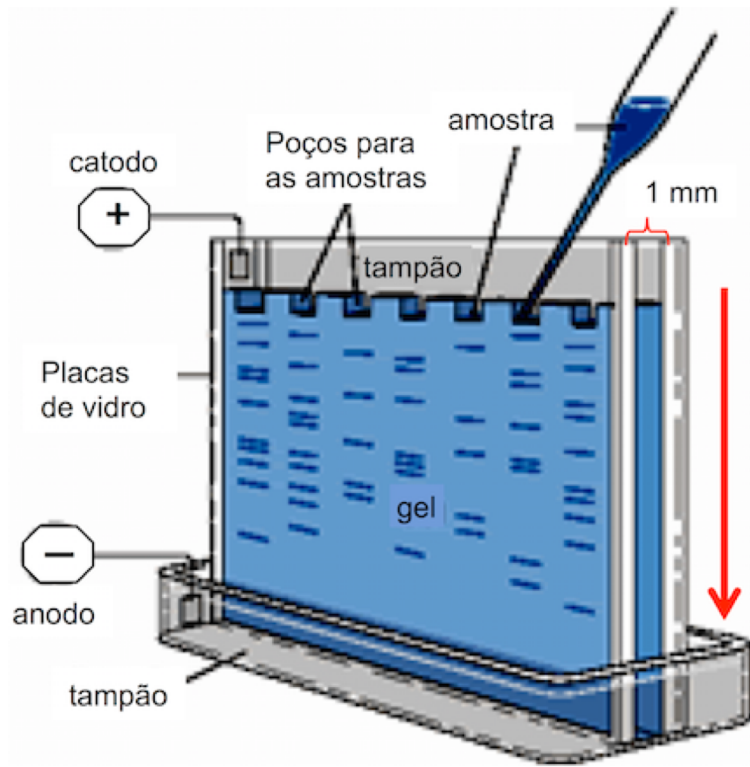
Proteínas denaturadas com SDS (dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio) podem ter o mesmo V_o !



O SDS faz com que as proteínas tenham a mesma relação carga/massa



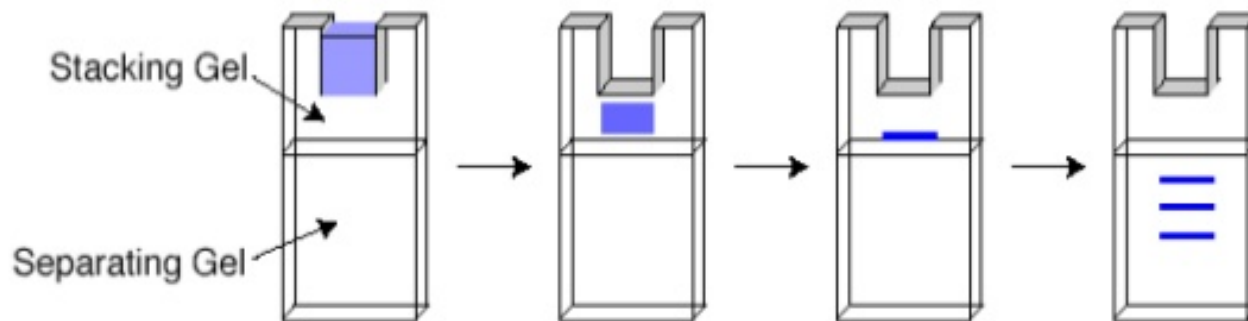
Por isso, a migração no gel agora depende do tamanho da proteína!



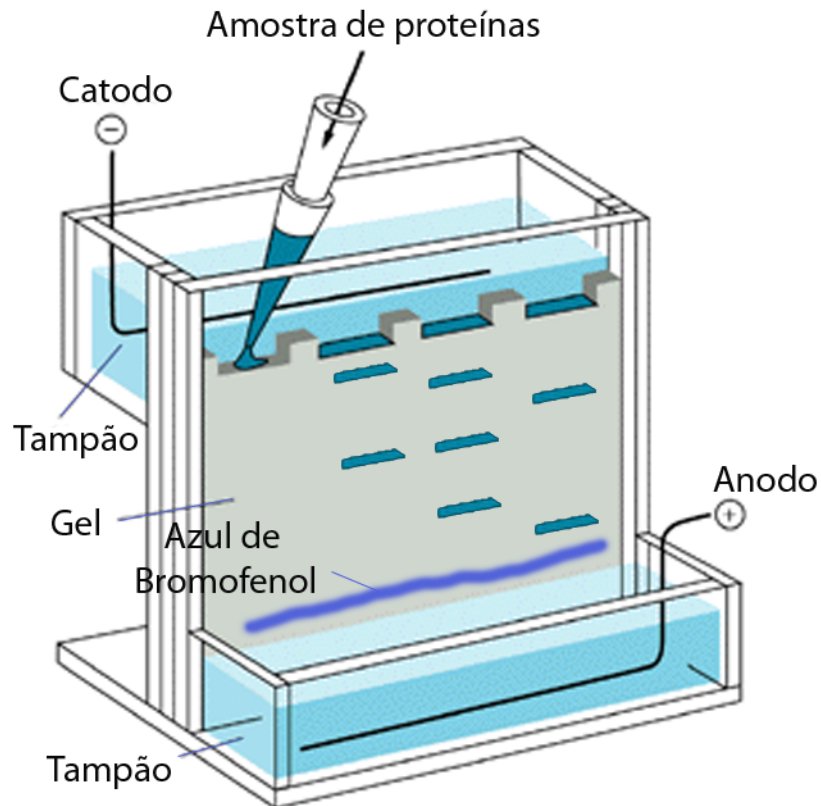
SDS-PAGE: o gel de empacotamento

Purpose of using two layers of gel

- **Stacking gel (5 %)** needed to concentrate all the proteins in one band, so that they will start migrating in running gel all at the same time
- **separating gel (12 %)** or running gel allows to separate the proteins based on their molecular weight



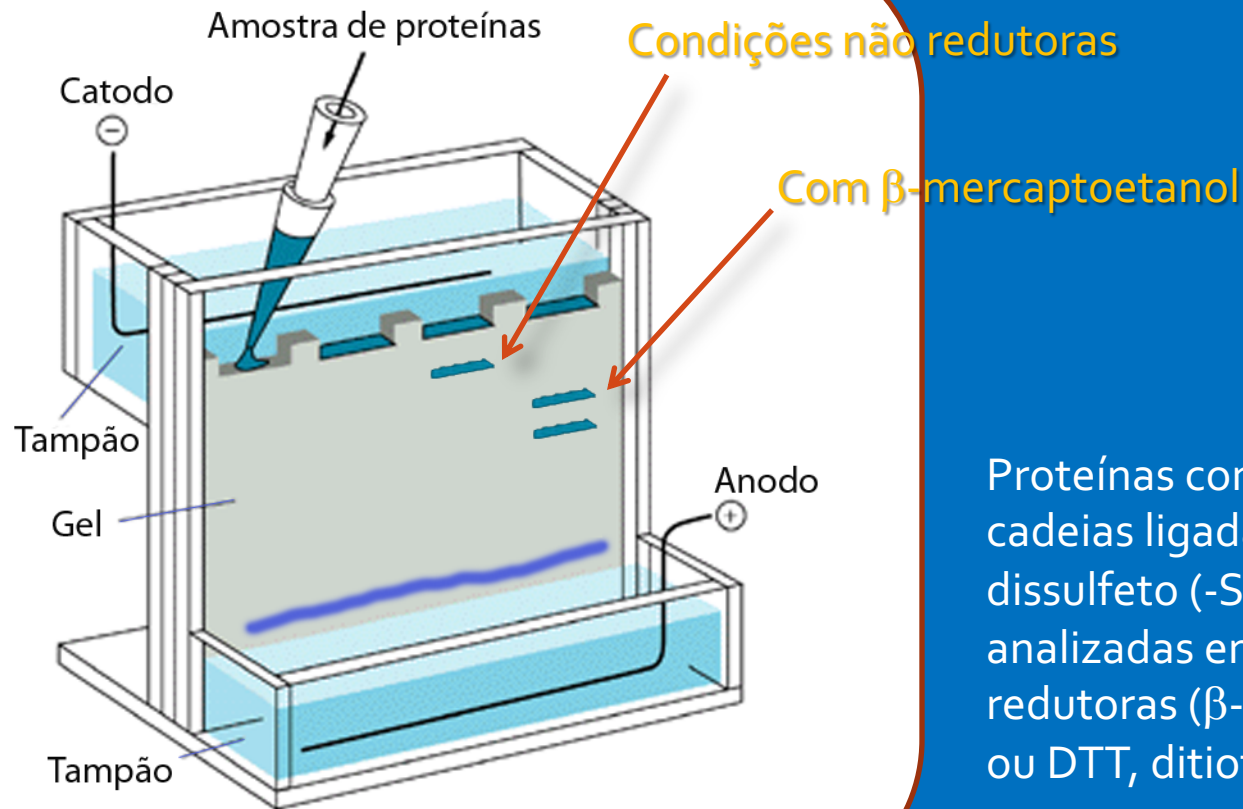
A migração das proteínas é proporcional ao peso molecular



$$\text{Log } V = \text{Log } V_0 - kC$$

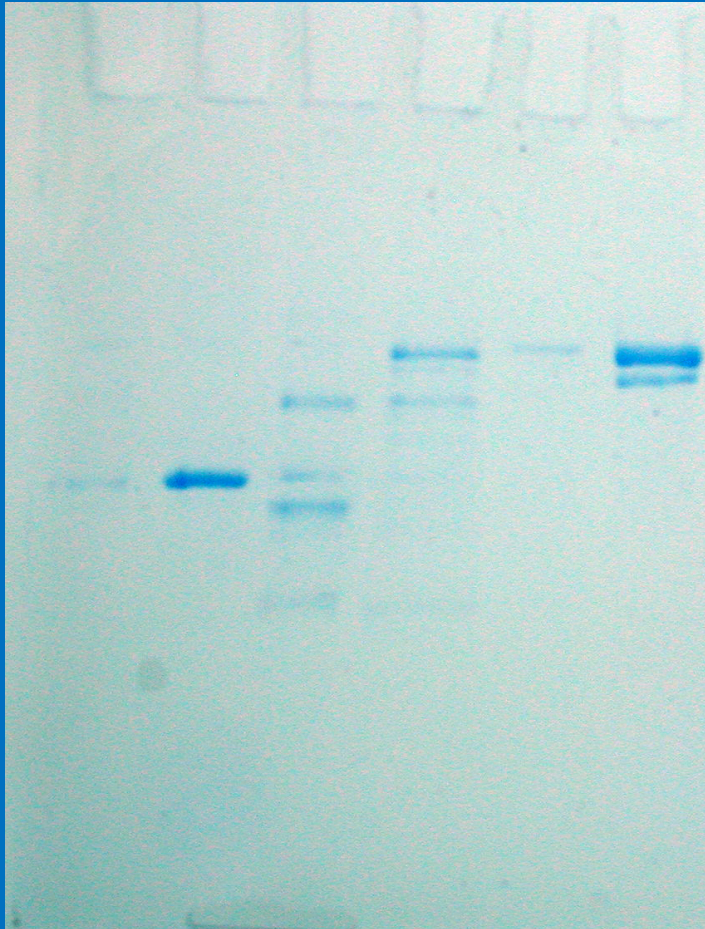
V_0 igual para todas as proteínas, portanto, $\text{Log } V$ é proporcional a massa da proteína

Estrutura quaternária da proteína: quantas cadeias?



Proteínas contendo múltiplas cadeias ligadas por pontes de dissulfeto (-S-S-) podem ser analisadas em condições redutoras (β -mercaptoetanol ou DTT, ditioneitol).

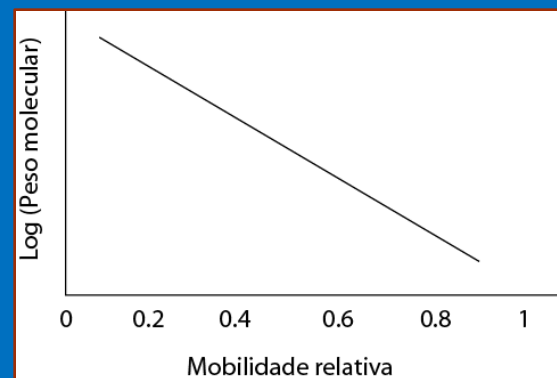
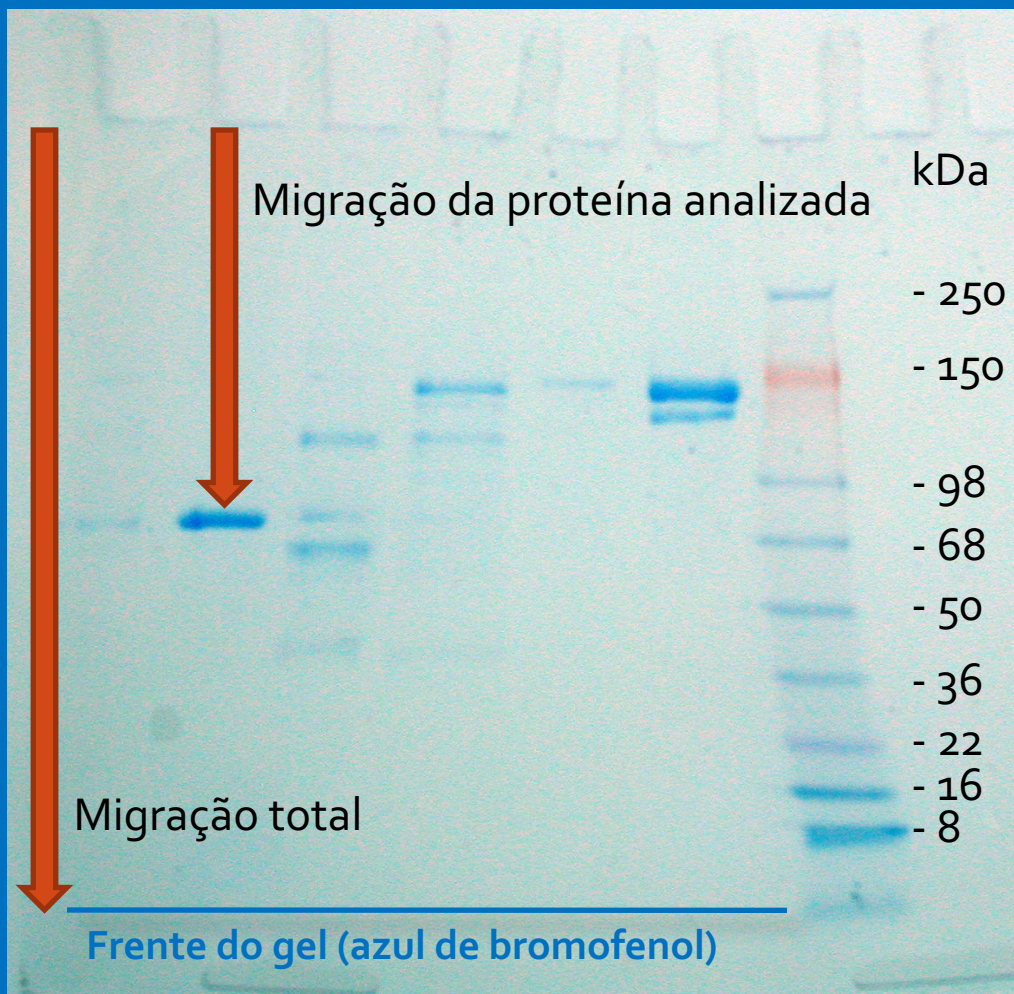
As proteínas podem ser visualizadas com coomassie ou coloração com prata

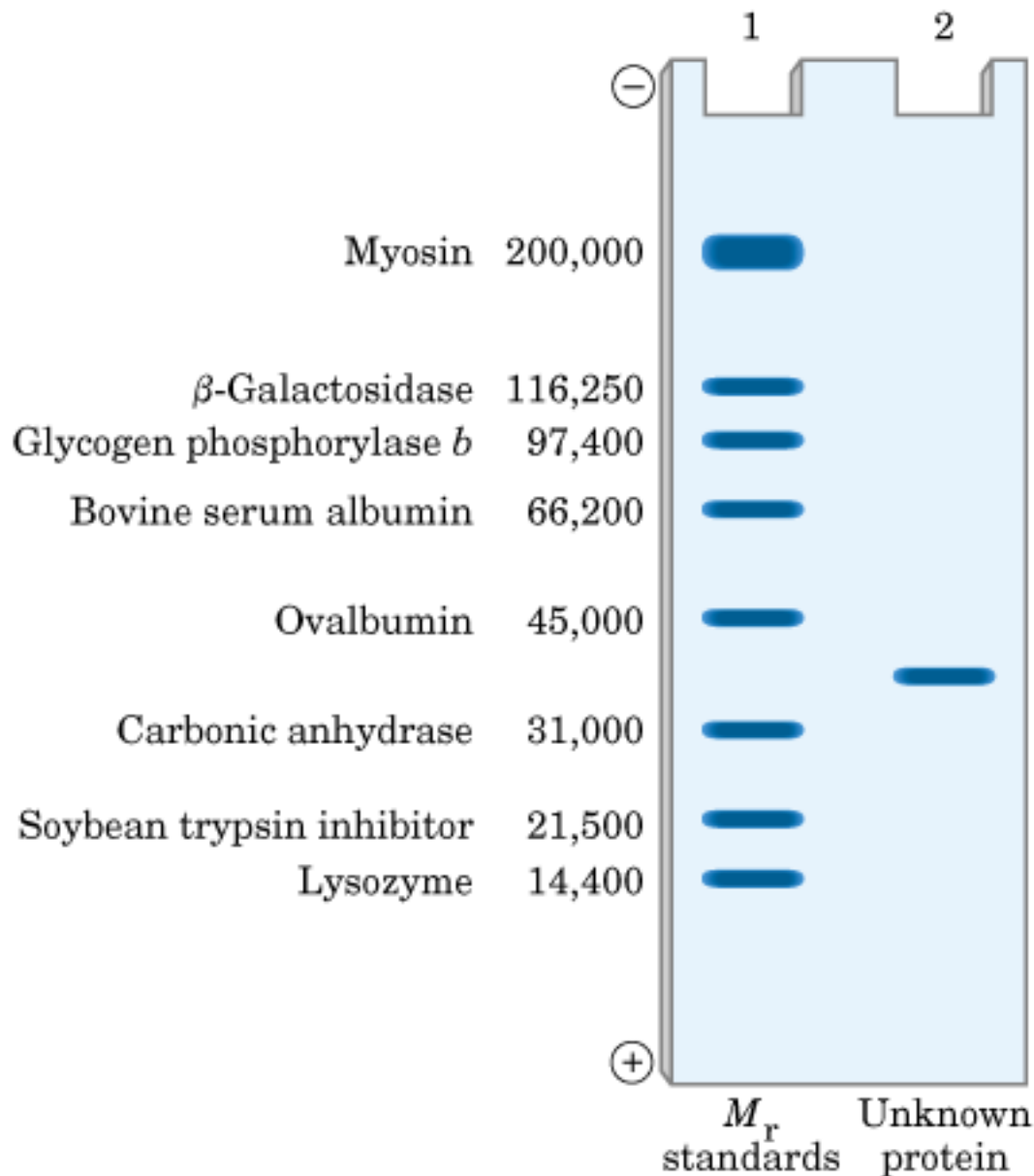


As proteínas são fixadas ao gel com metanol e coradas com coomassie R (reagente de Bradford).

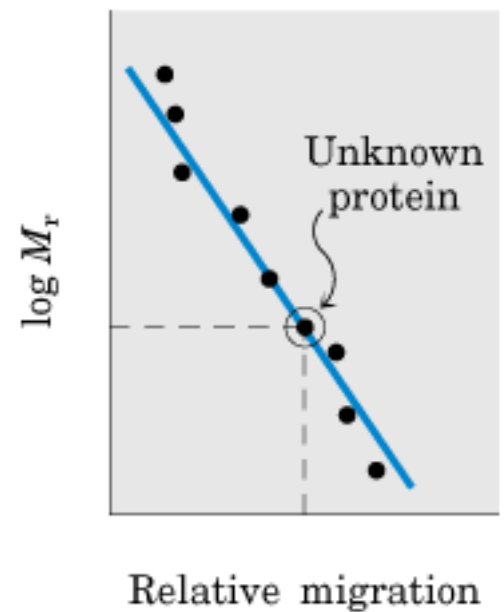
Íons de prata formam um complexo com proteínas e podem ser utilizados para coloração de geis.

Mobilidade relativa = migração proteína/migração total





(a)



(b)