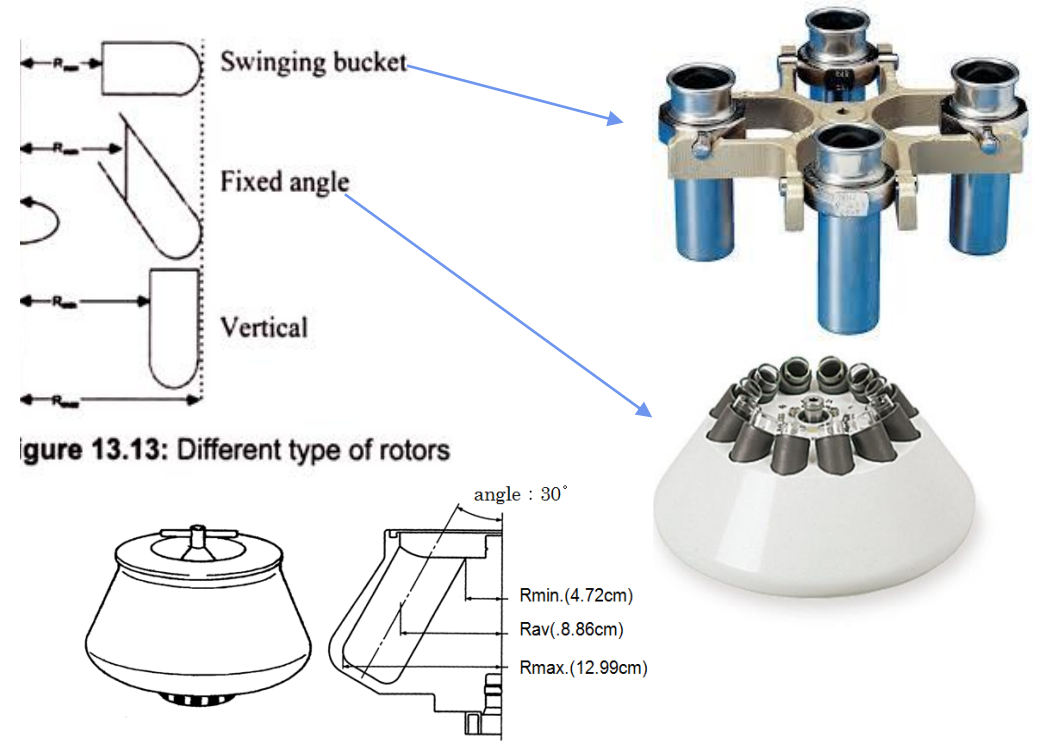


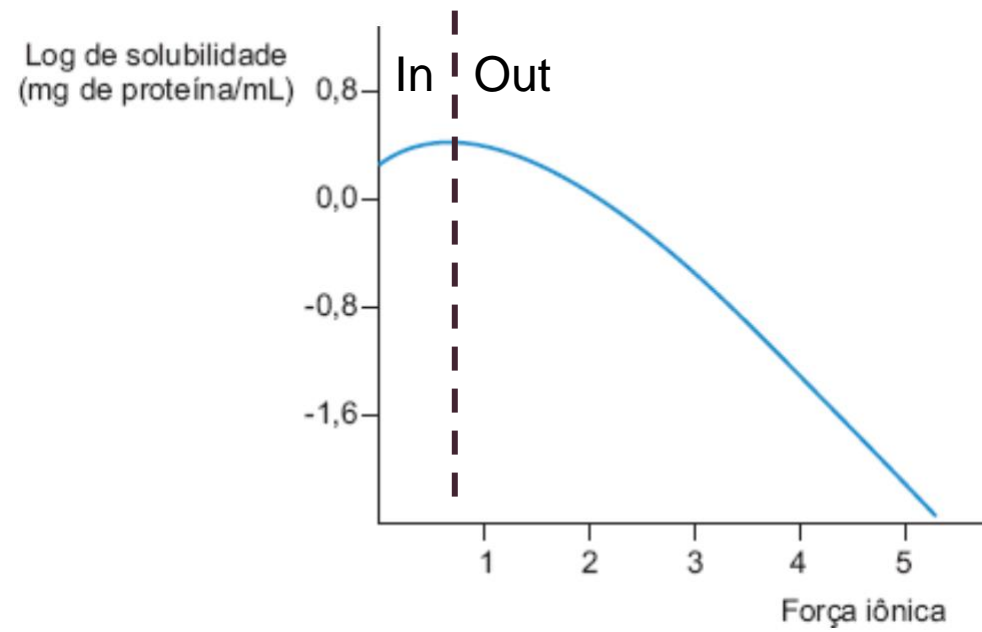
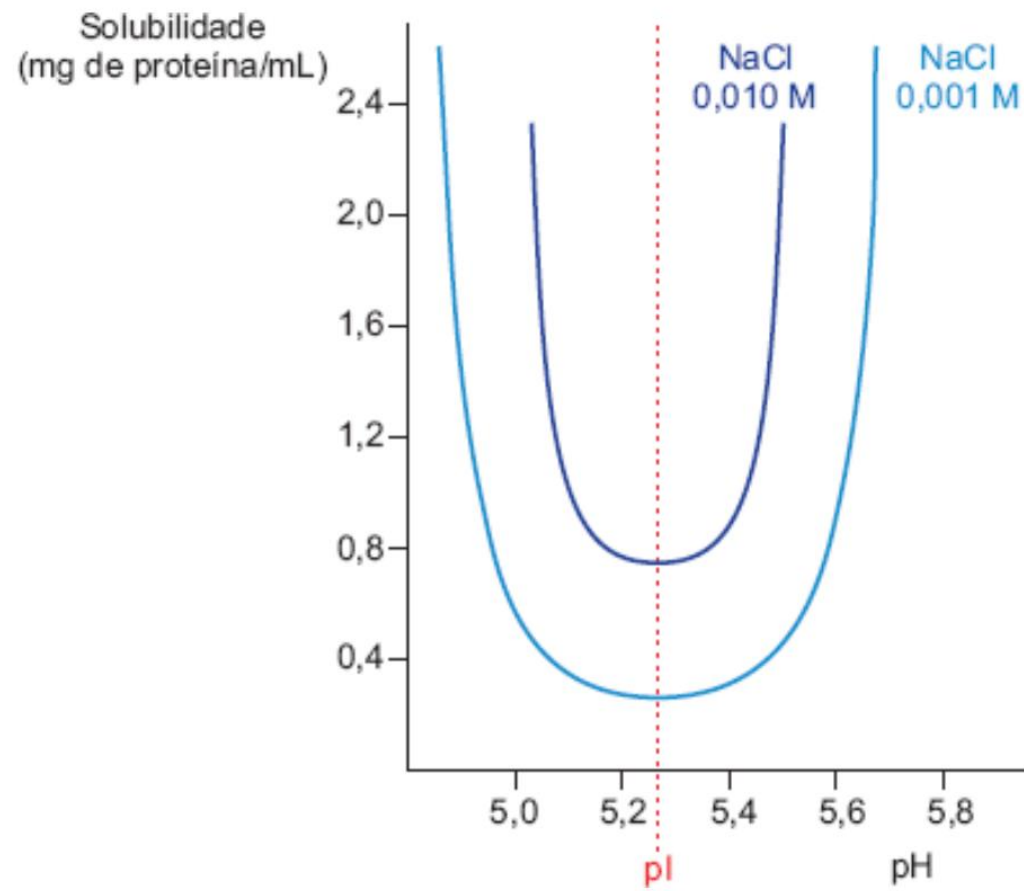
QBQ0204

Bioquímica

ESTRATÉGIAS
DE ANÁLISE DE
PROTEÍNAS

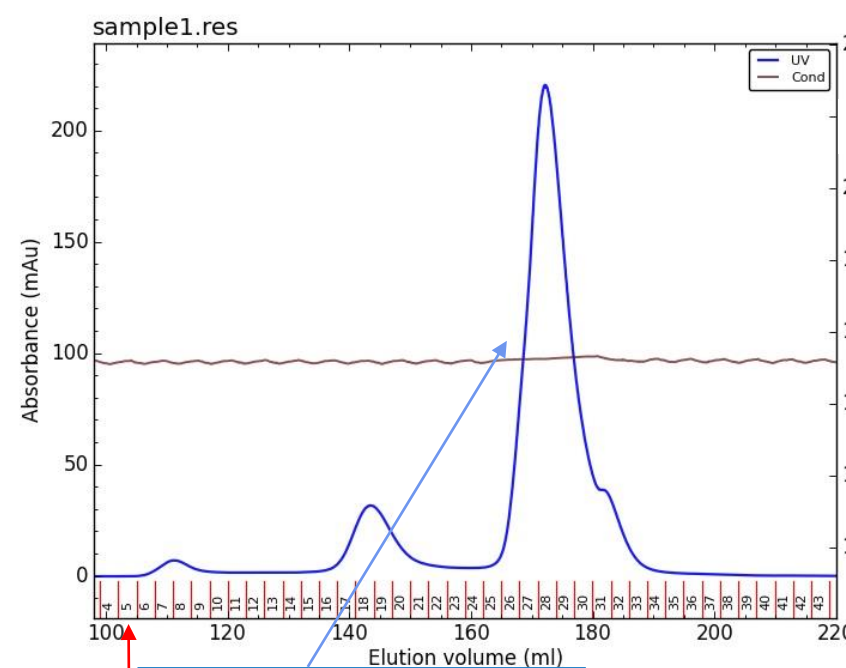
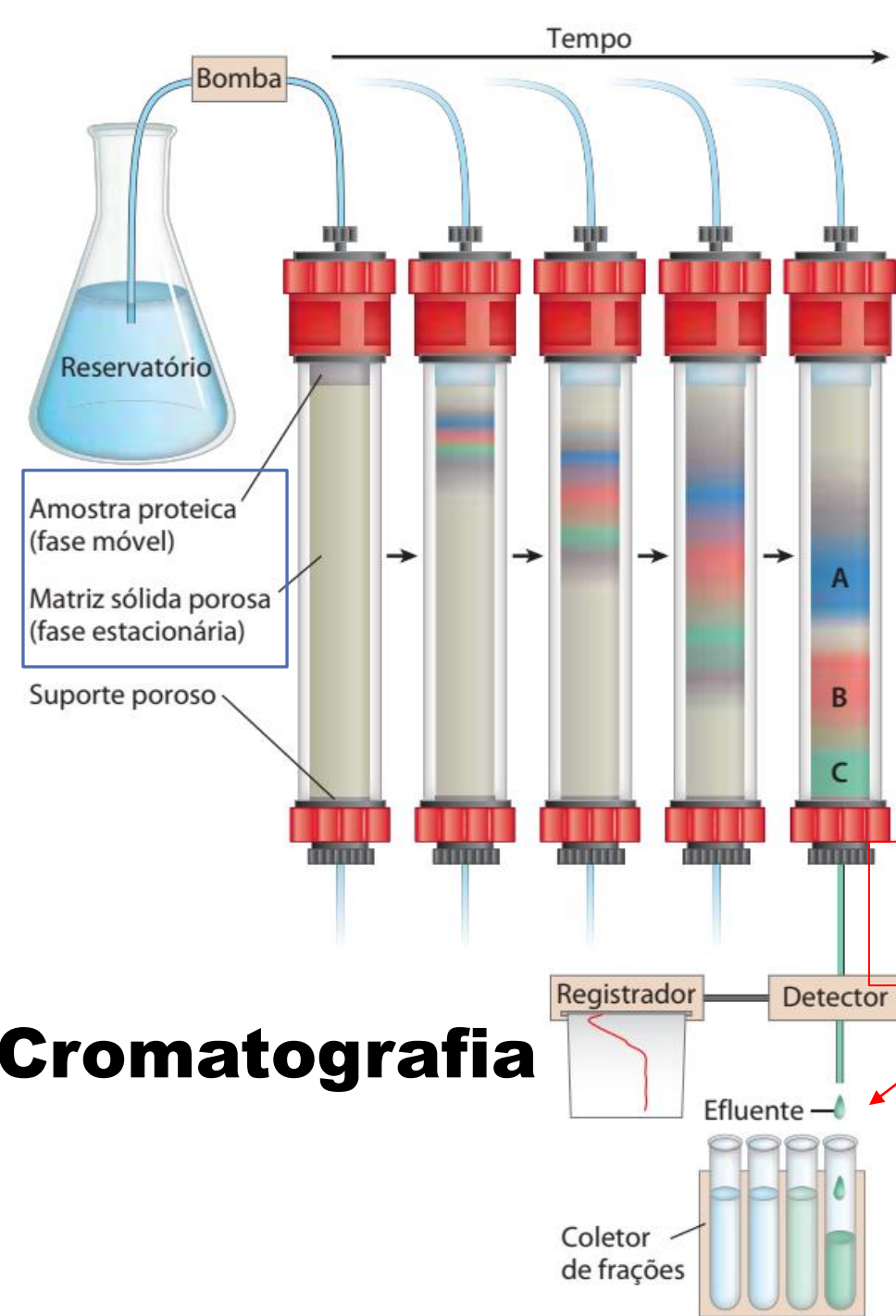
FELIPE JUN FUZITA





Efeito de salting-in e salting-out

Cromatografia



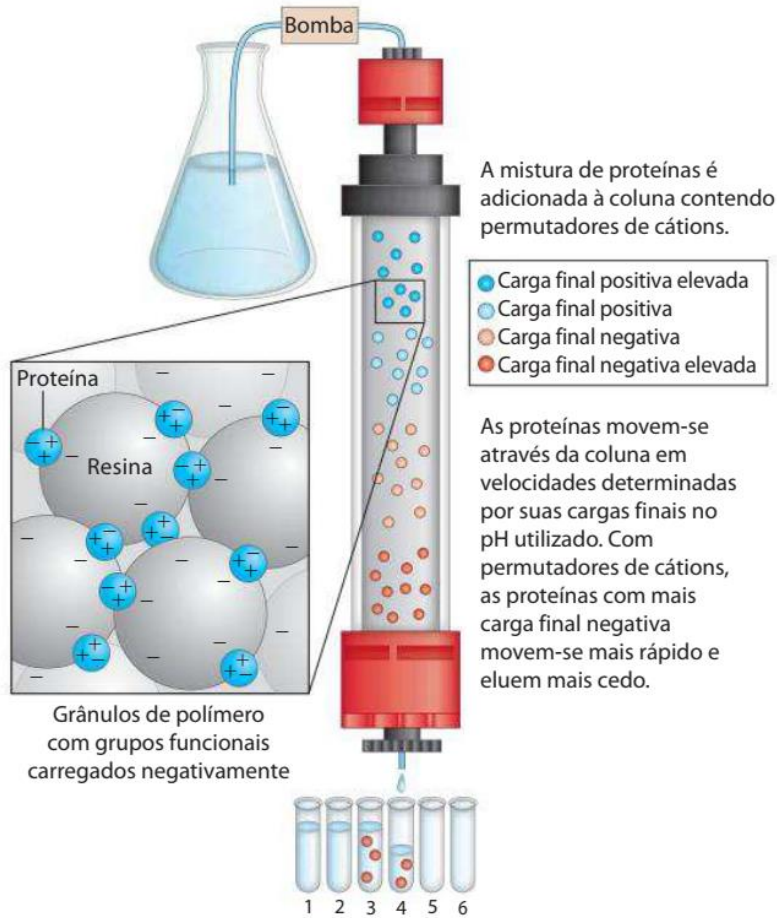
Deteção de proteína por absorvância em 280 nm (linha azul).

Os traços vermelhos indicam a coleta de uma fração

Fase móvel: amostra

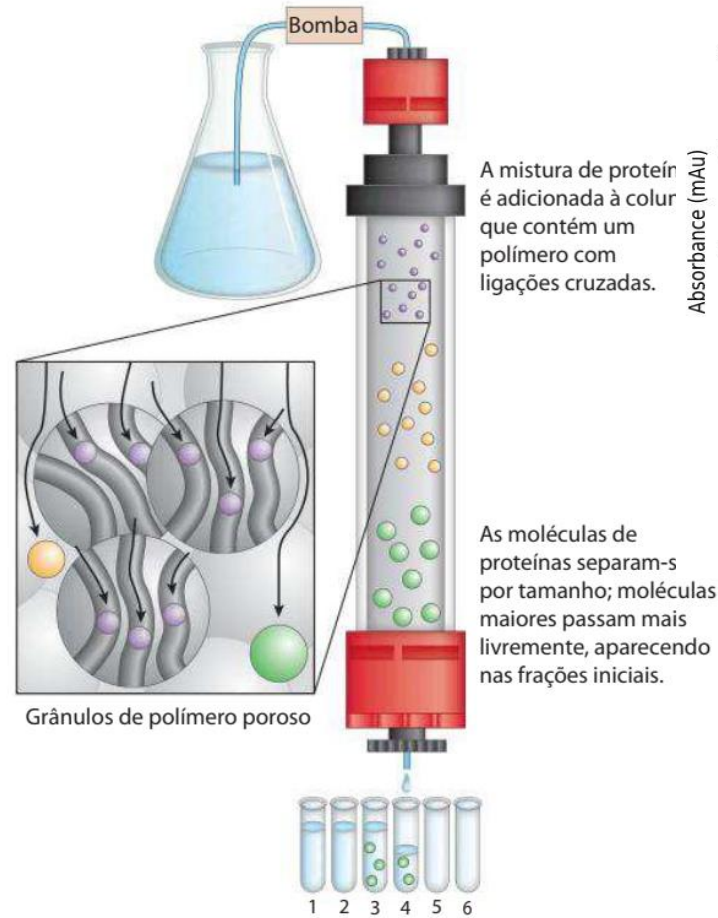
Fase estacionária: resina da coluna

Eluição: processo de passagem da amostra (fase móvel ou eluente) pela coluna (fase estacionária) através do uso de um solvente fluido (geralmente uma solução tampão de pH e concentração de sais conhecidas). Ocorre diluição da amostra.



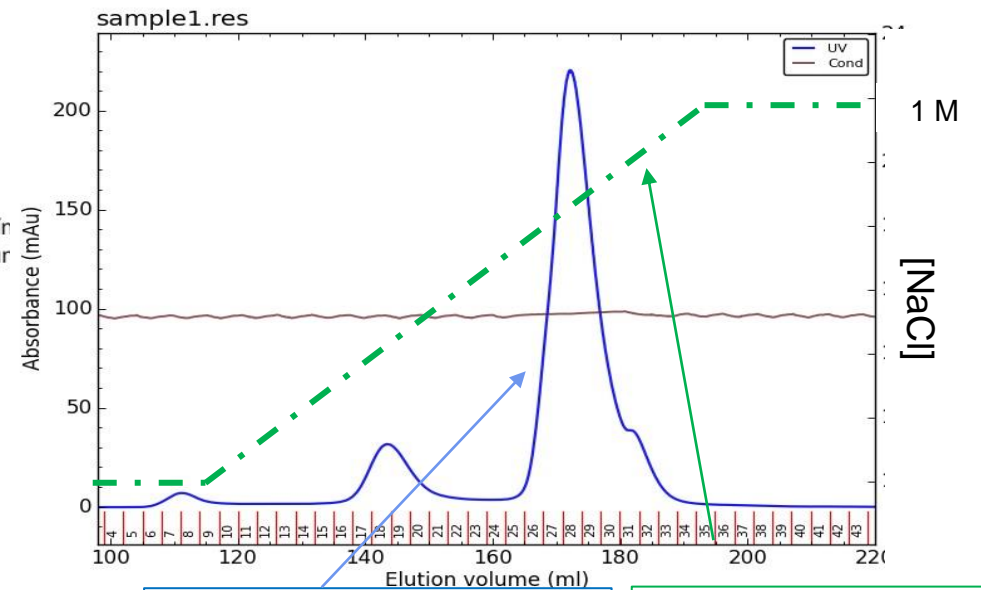
(a) Cromatografia de troca iônica

Cromatografia de Troca Iônica



(b) Cromatografia de exclusão por tamanho

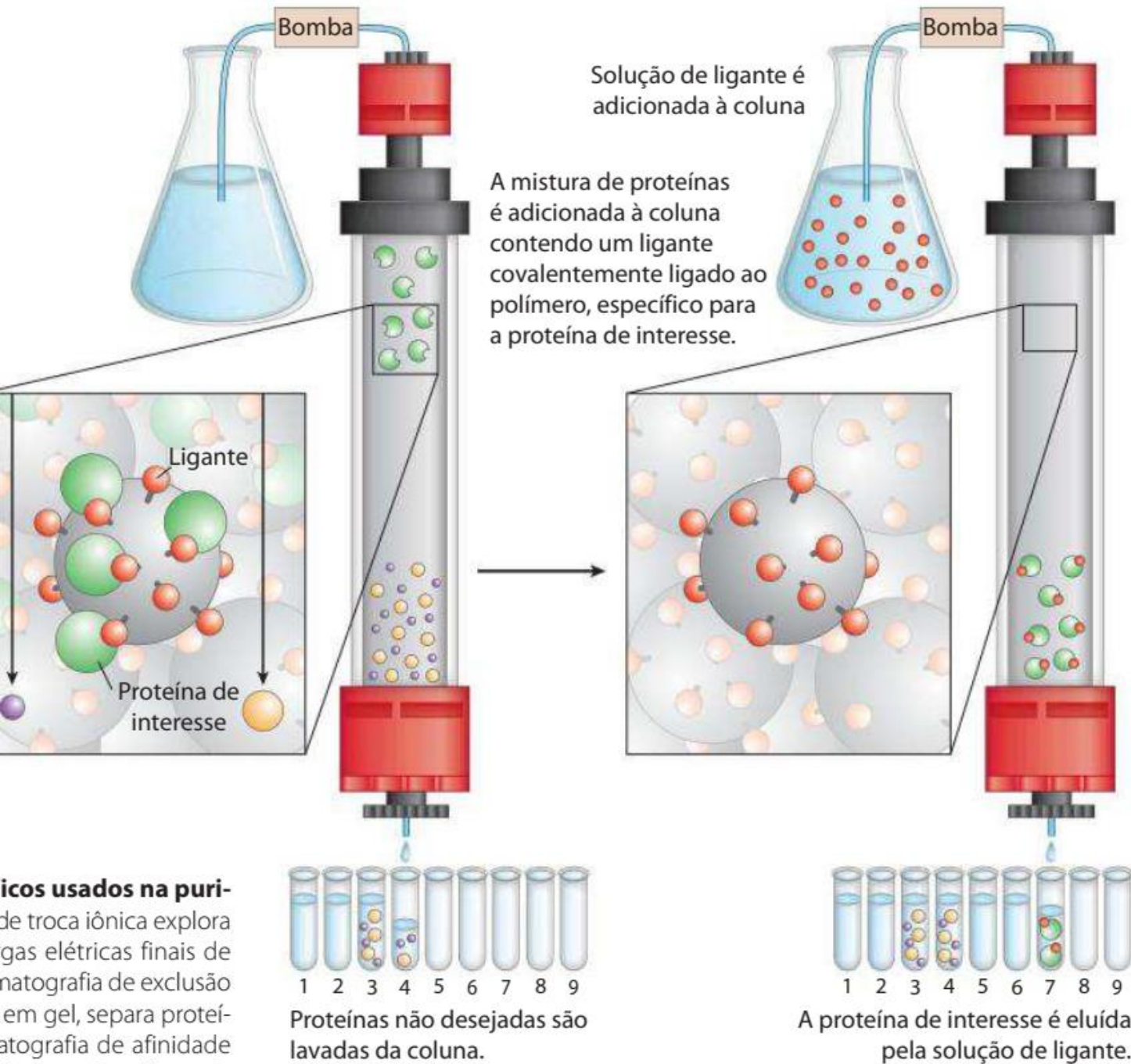
Cromatografia de filtração em gel



Detecção de proteína por absorvância em 280 nm (linha azul).

Gradiente de concentração de sal.

Cromatografia de Afinidade



(c) Cromatografia de afinidade

icos usados na puri-
de troca iônica explora
gas elétricas finais de
matografia de exclusão
em gel, separa proteí-
matografia de afinidade
ligação. Detalhes adi-
xto.

table 5-5

Medida indireta de "**concentração**" da proteína de interesse caso ela seja uma enzima.

A Purification Table for a Hypothetical Enzyme*

Procedure or step	Total protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)
1. Crude cellular extract	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	3	45,000	15,000

Medida indireta de "**concentração relativa**" da proteína de interesse caso ela seja uma enzima.

$$32/10 = 3,2$$

$$200/32 = 6,25$$

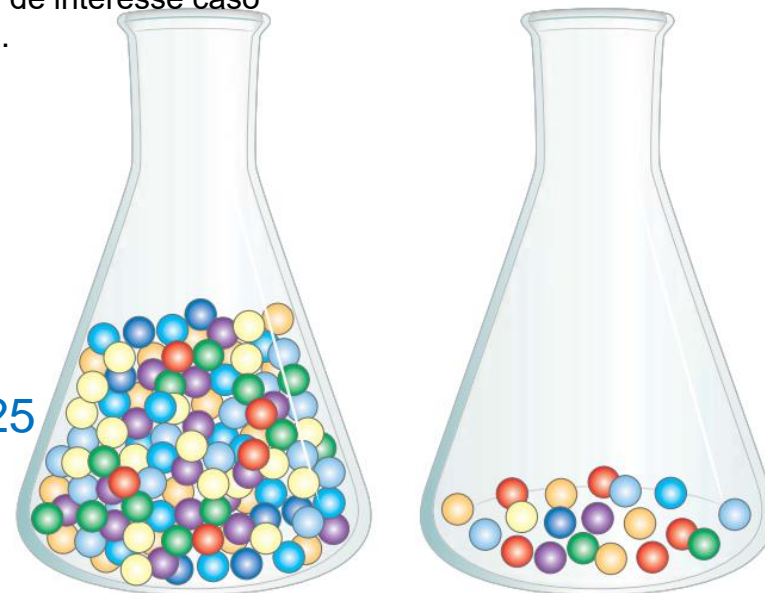


FIGURA 3-22 Atividade versus atividade específica. A diferença en-

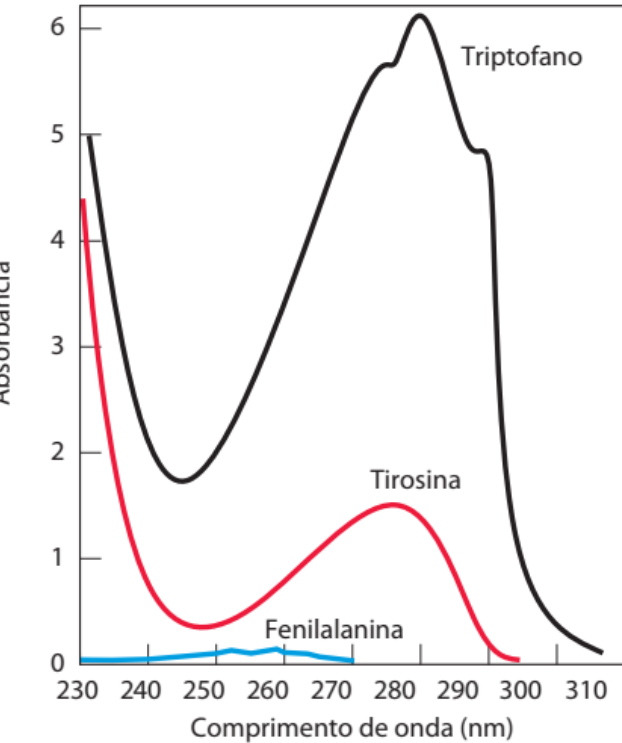
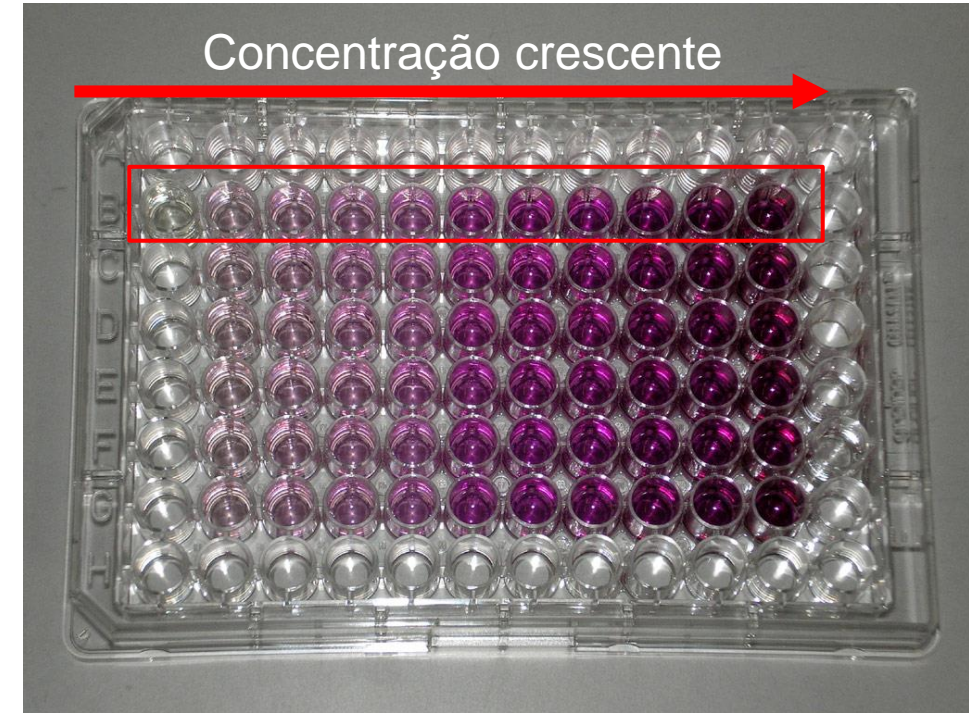
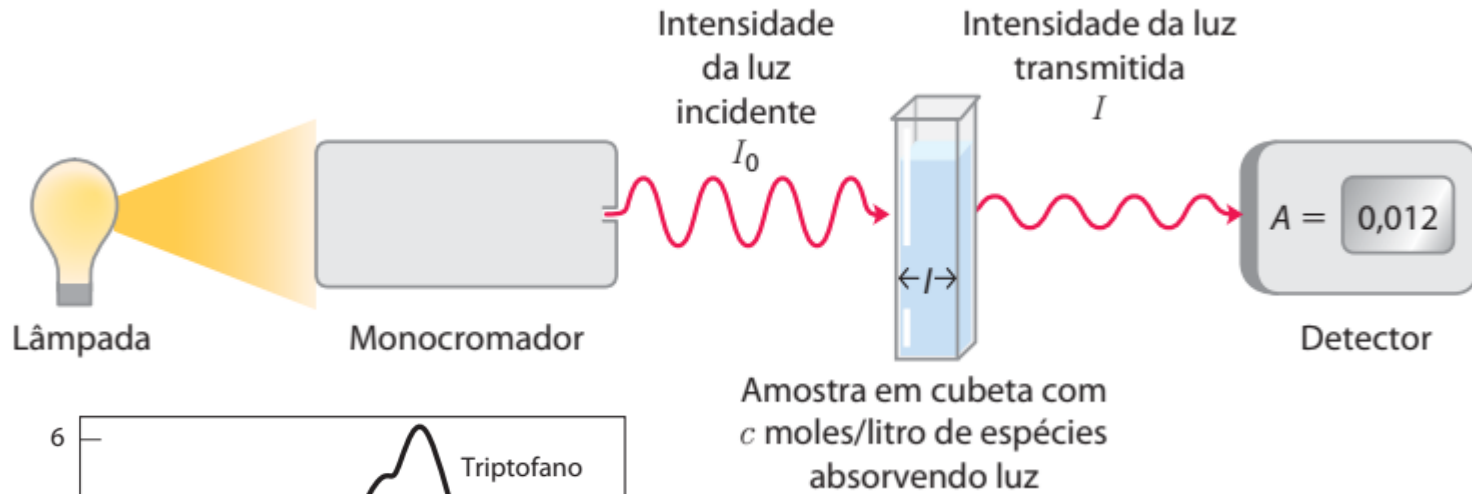
O enriquecimento do processo é calculado dividindo-se a atividade específica com relação ao passo anterior.

Portanto, no primeiro passo houve enriquecimento de **3,2 vezes** na amostra

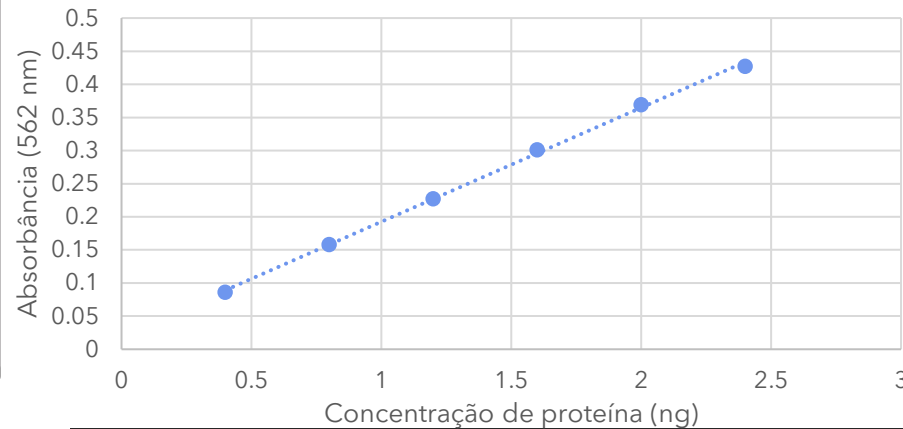
No segundo passo houve enriquecimento de **6,25 vezes** na amostra

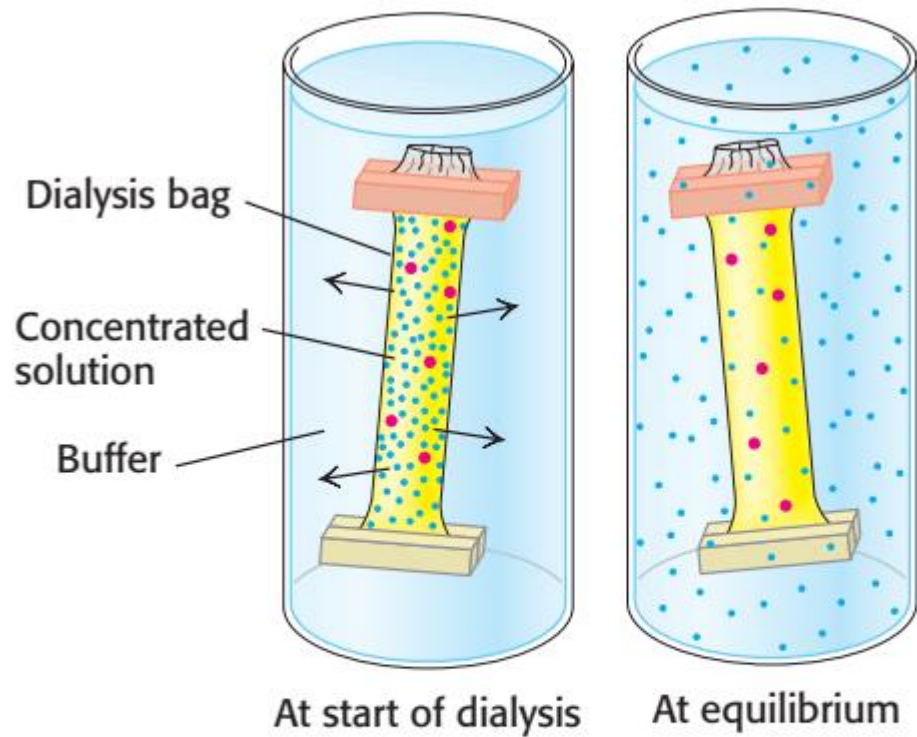
Absorbância

Ver quadro 3.8 (página 28) do guia de estudos da aula 3!!!!



O valor de absorbância é diretamente proporcional à concentração do soluto absorvente.



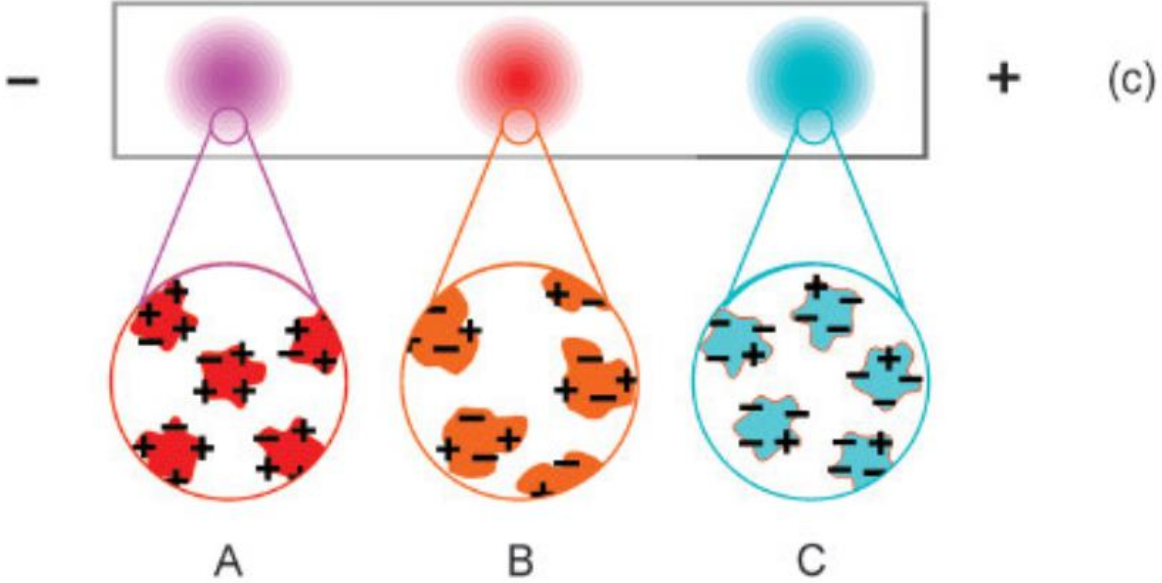
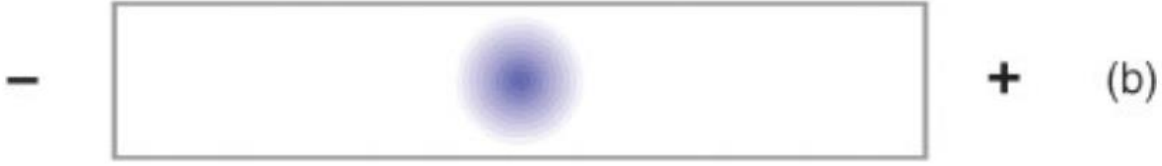
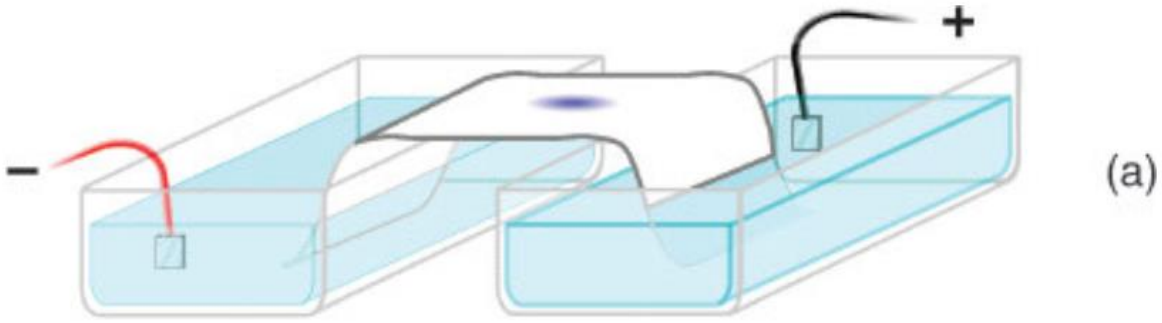


Diálise: remoção de moléculas pequenas como sais e/ou troca de solução tampão.

Figure 3.2 Dialysis. Protein molecules (red) are retained within the dialysis bag, whereas small molecules (blue) diffuse down their concentration gradient into the surrounding medium.

Eletroforese em papel:

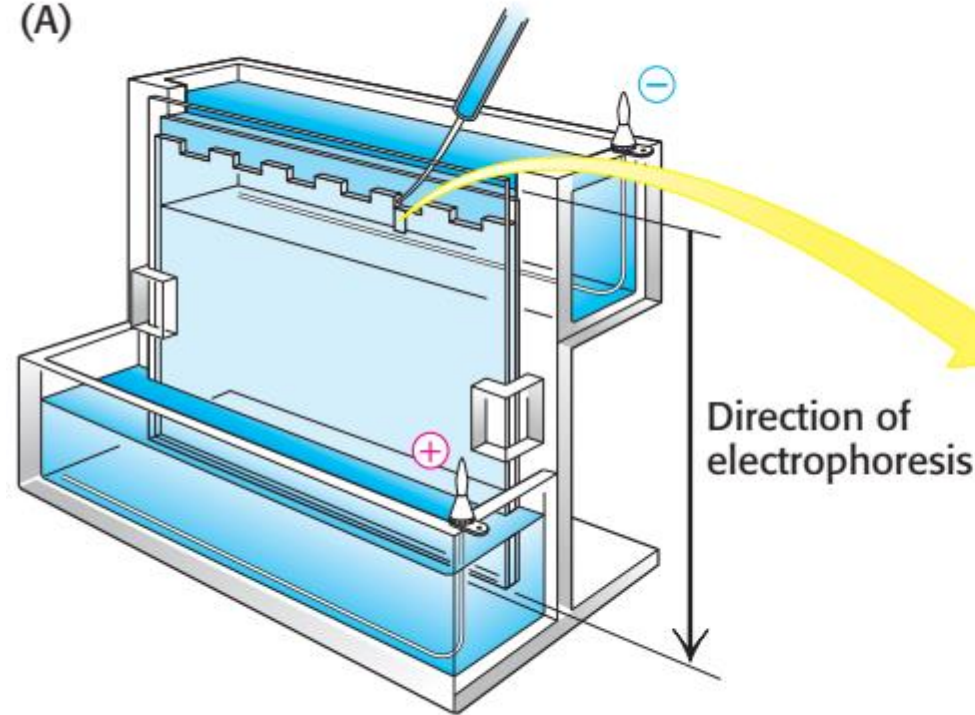
Separação de moléculas por carga.



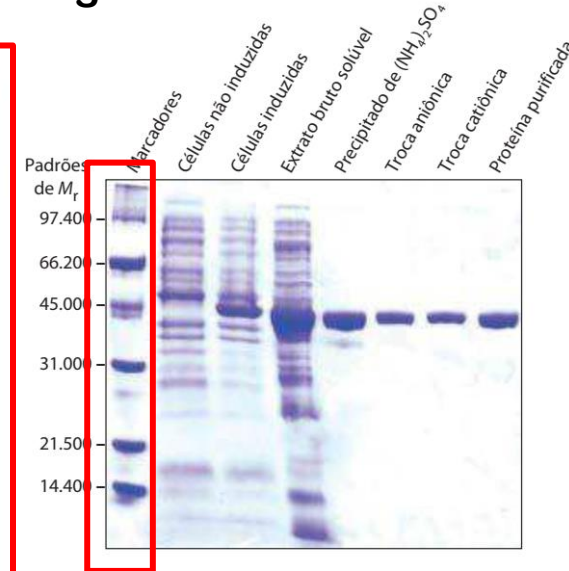
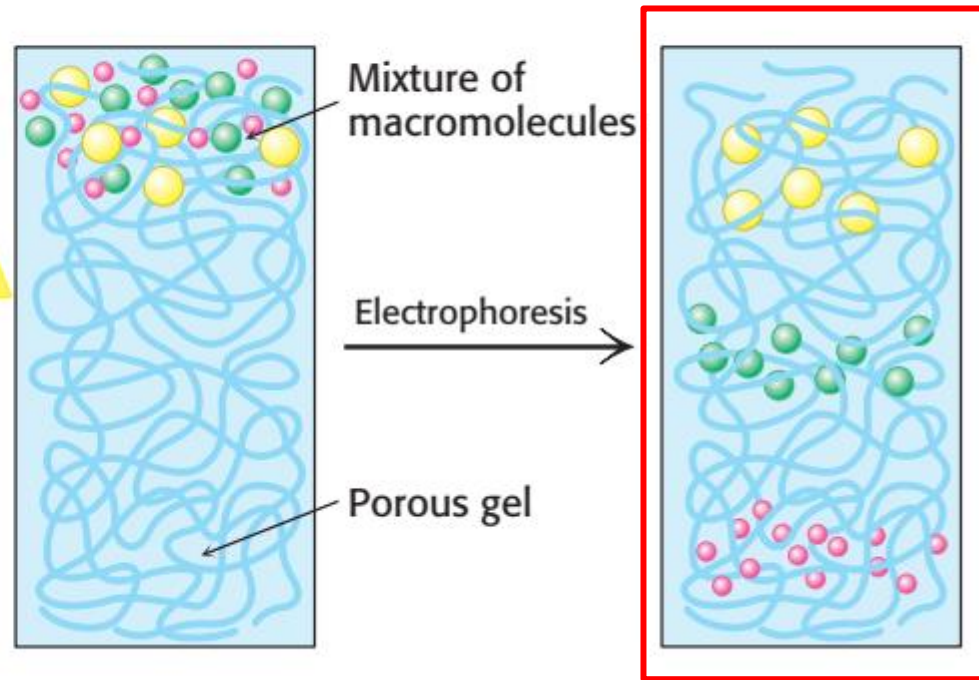
Eletroforese em gel de acrilamida.

Separação de moléculas por carga.

(A)

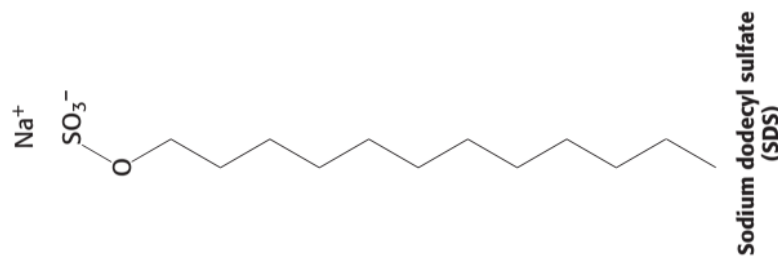
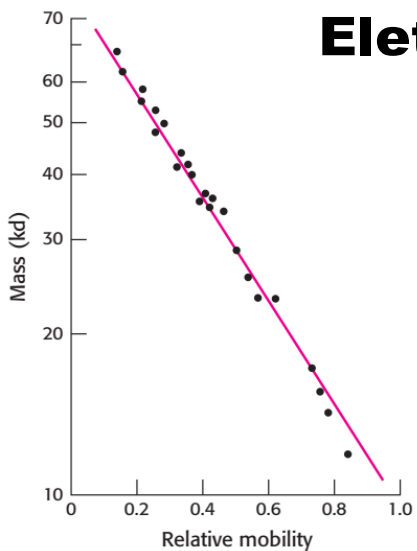


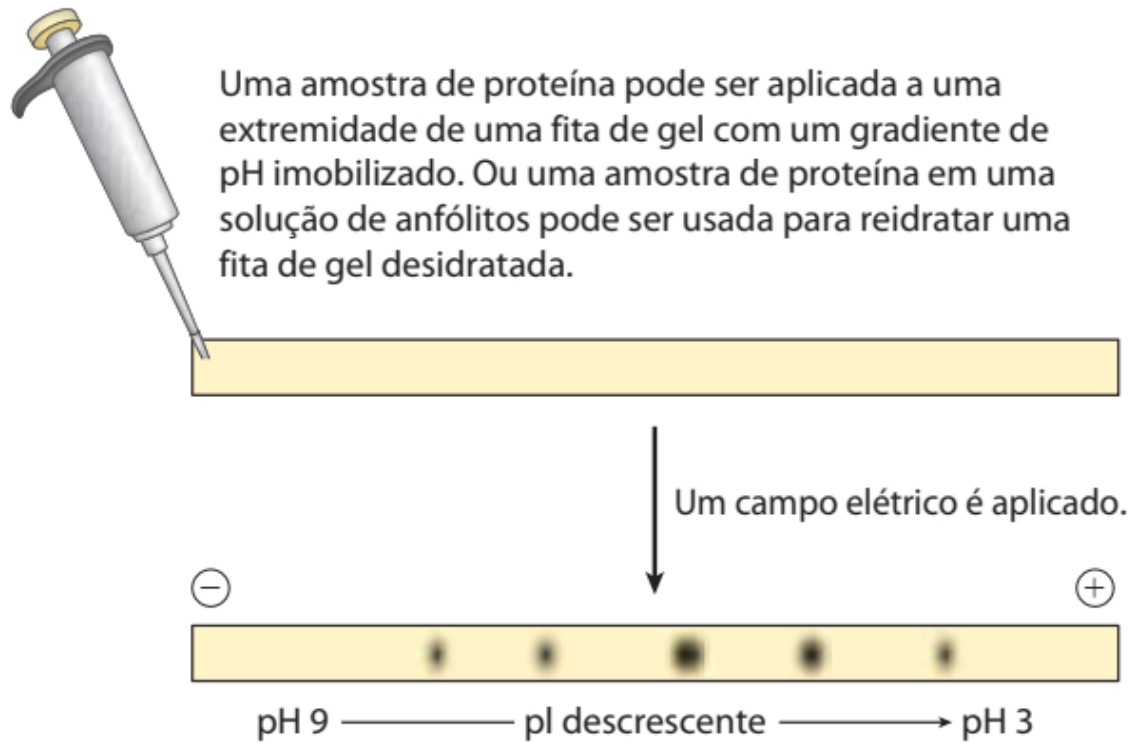
(B)



Eletroforese em gel de acrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

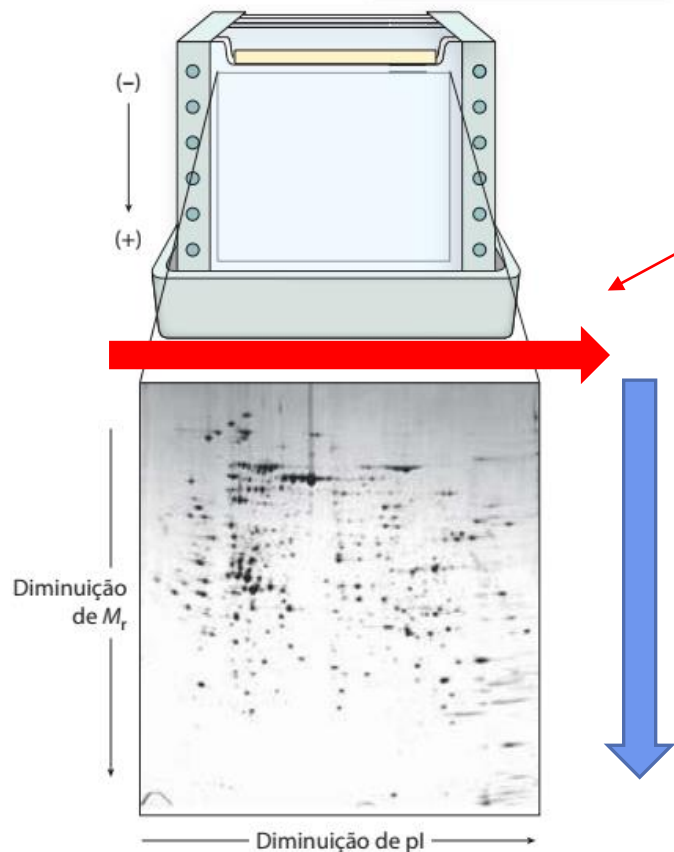
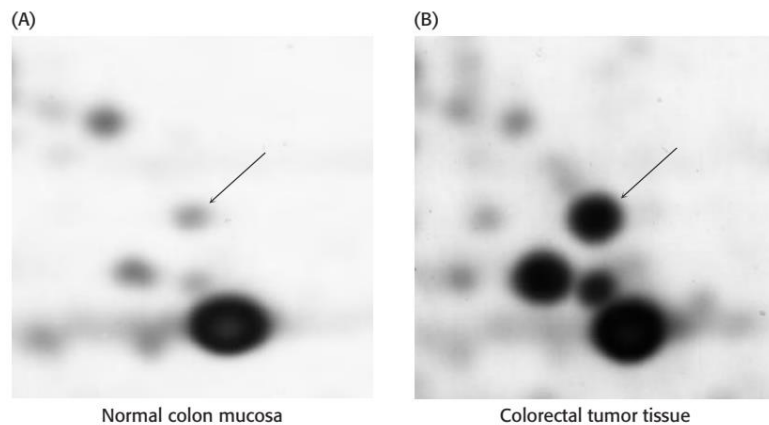
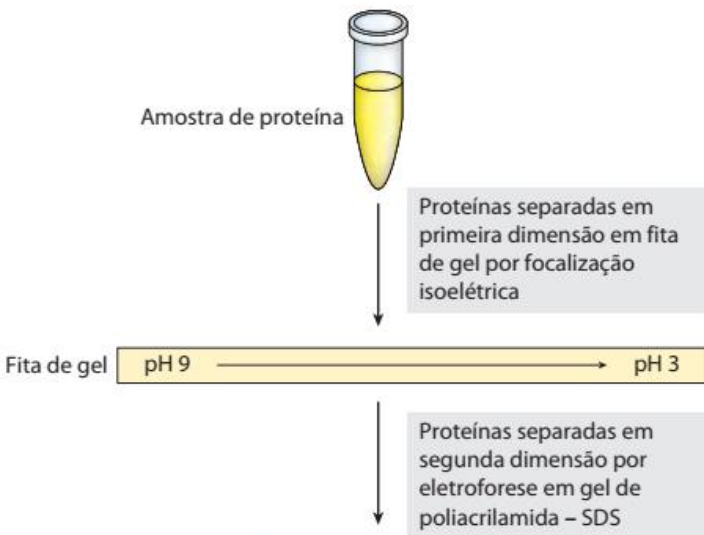
Separação de moléculas por massa molecular.





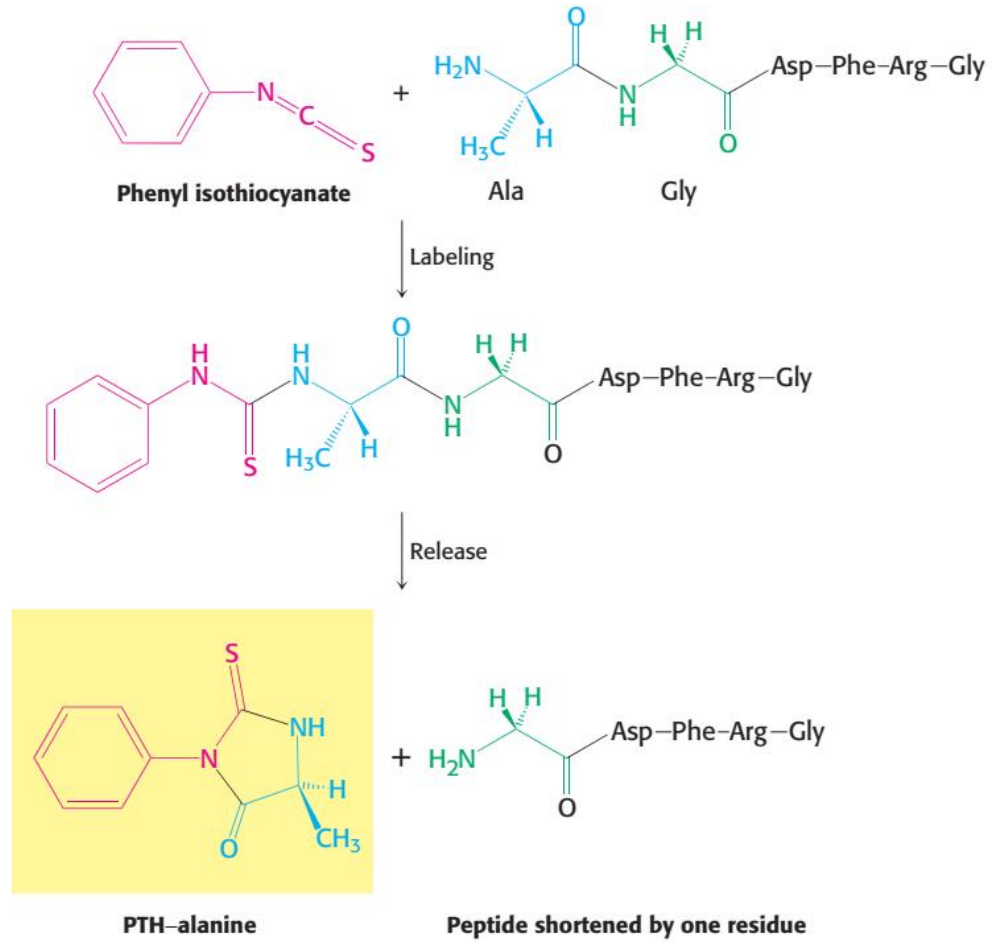
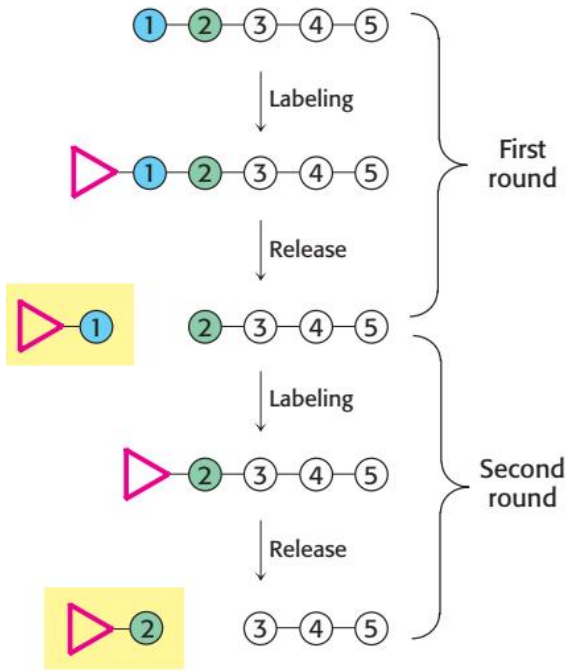
Após serem coradas, as proteínas são mostradas distribuídas ao longo do gradiente de pH segundo seus valores de pH.

FIGURA 3-20 Focalização isoeétrica. Essa técnica separa proteínas de acordo com seus pontos isoeletricos. Uma mistura de proteínas é colocada em uma fita de gel contendo um gradiente de pH imobilizado. Com a aplicação de um campo elétrico, as proteínas entram no gel e migram até que cada uma atinja um pH equivalente ao seu pI. Lembre-se que quando o pH = pI, a carga final de uma proteína é zero.



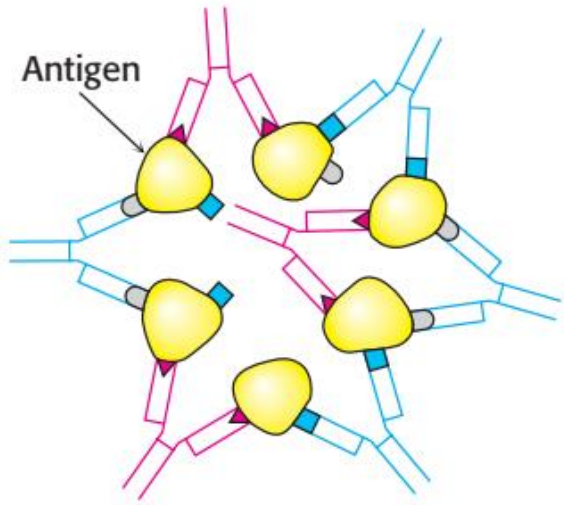
Separação bidimensional, primeiro por ponto isoelétrico, depois por massa molecular.

EDMAN DEGRADATION

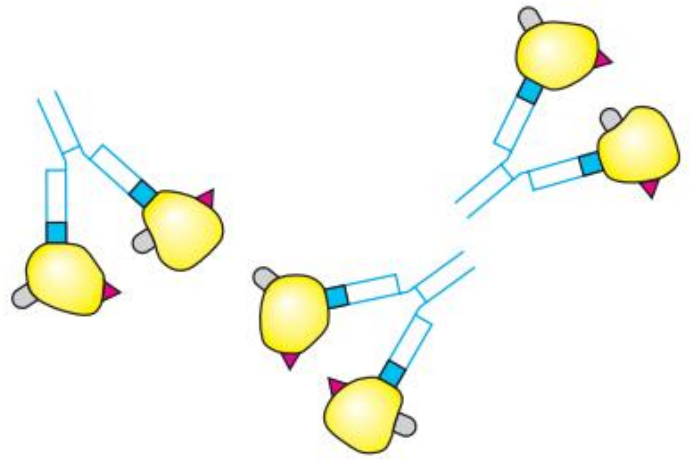


Degradação de Edman

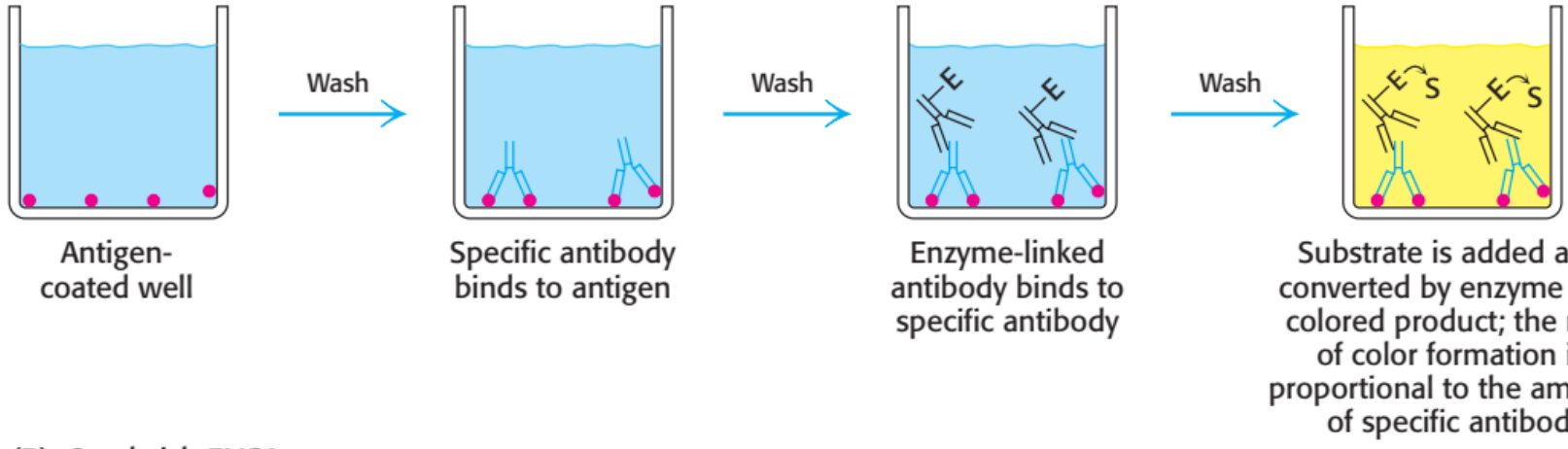
Polyclonal antibodies



Monoclonal antibodies

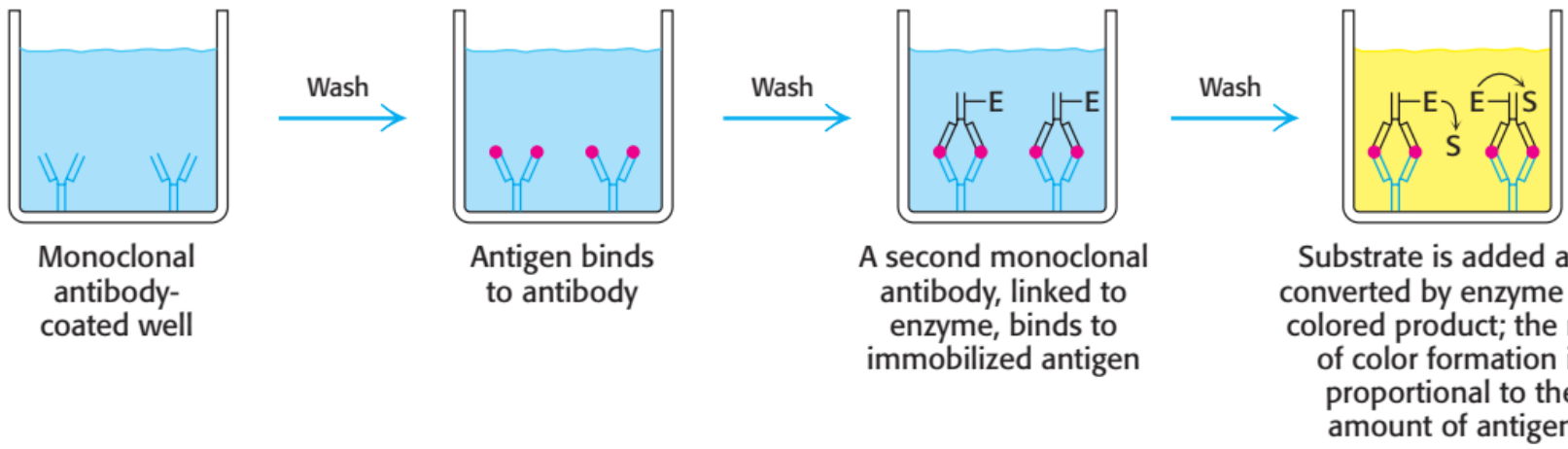


(A) Indirect ELISA



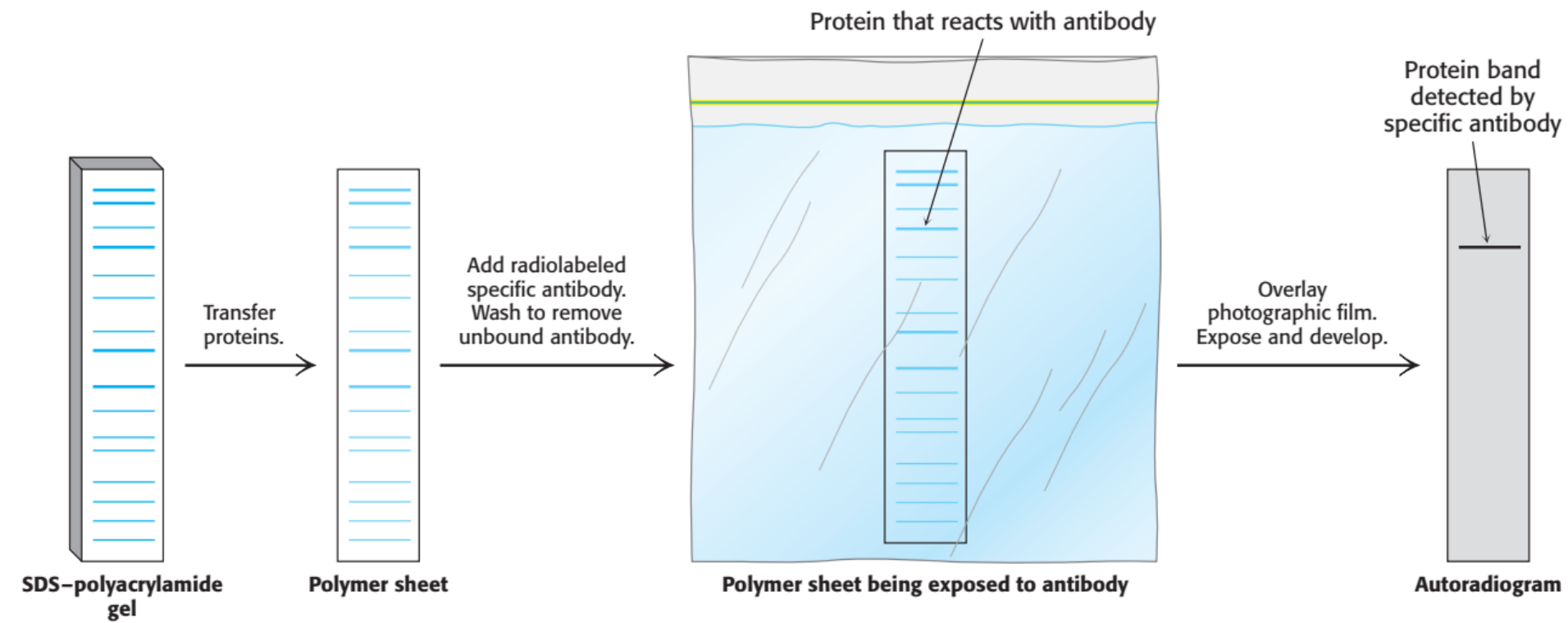
Detecção de anticorpo para uma patologia

(B) Sandwich ELISA

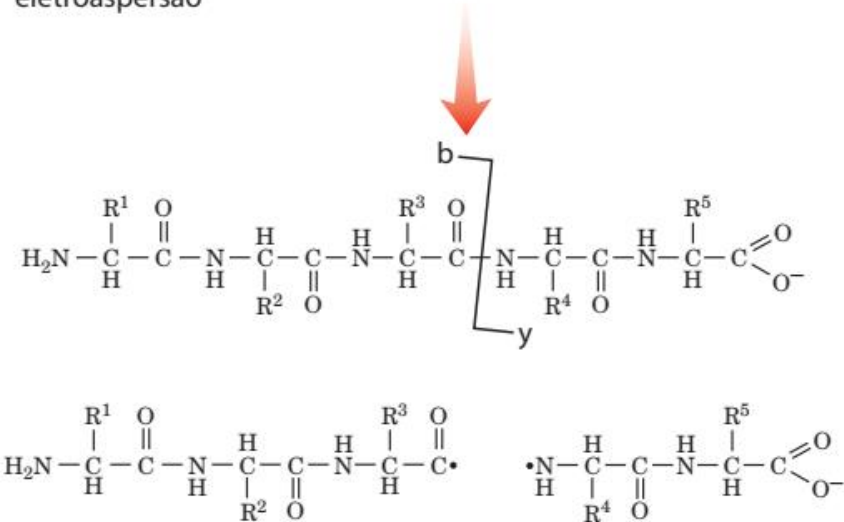
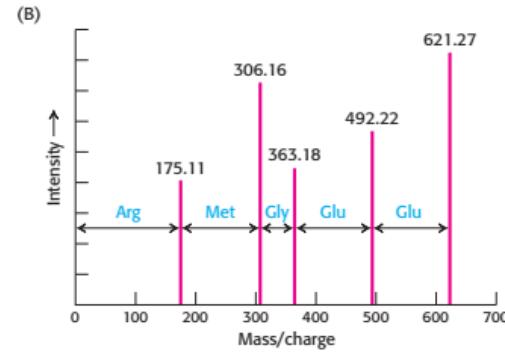
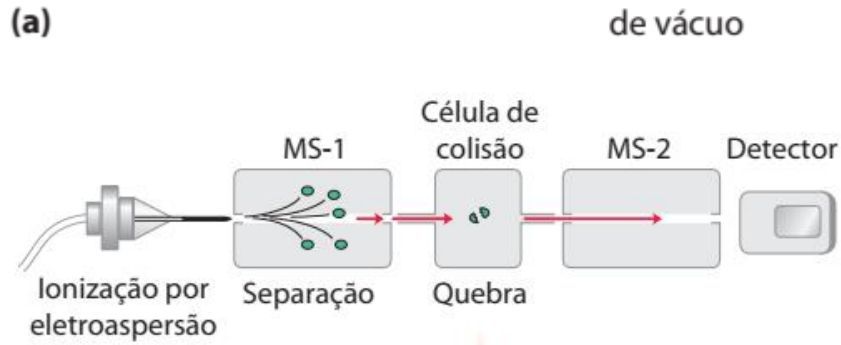
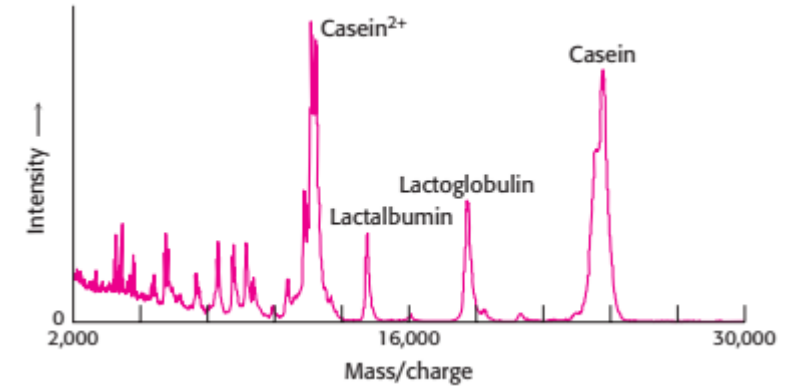
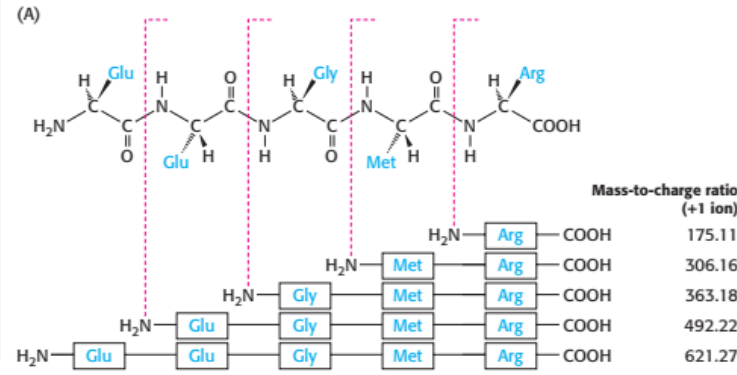
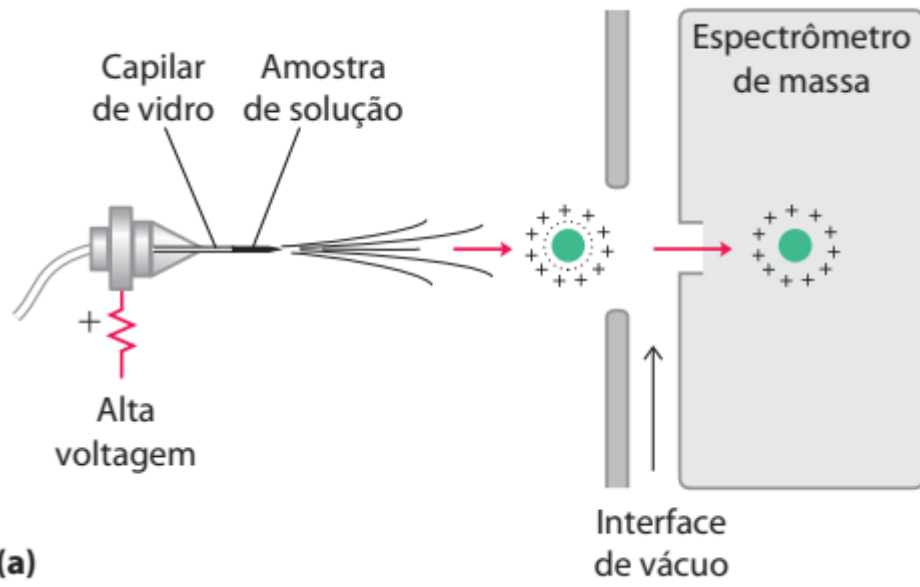


Detecção do microrganismo para uma patologia

Western blotting

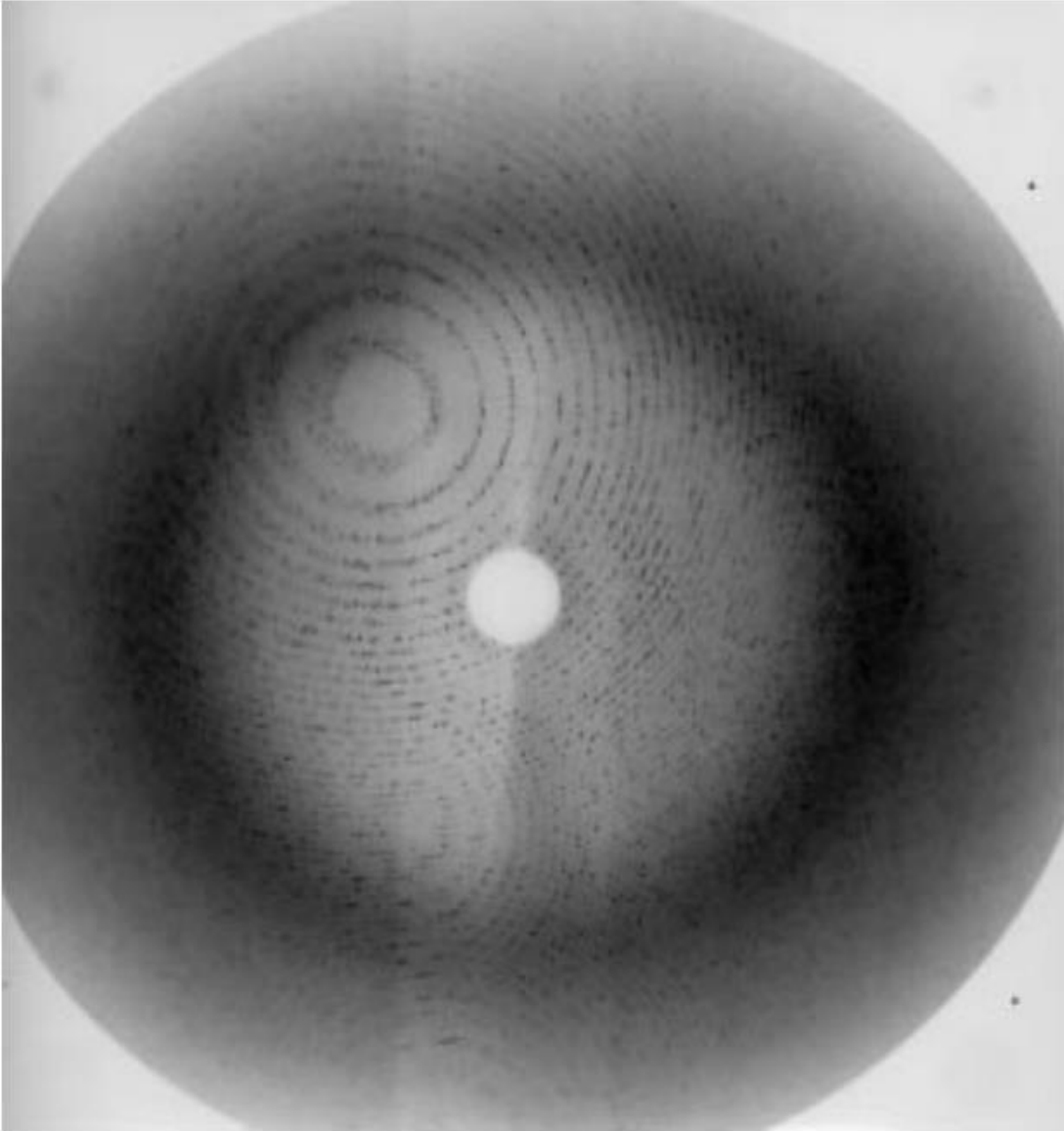


Sequenciamento de proteínas por espectrometria de massa



Cristalografia por difração de raios X

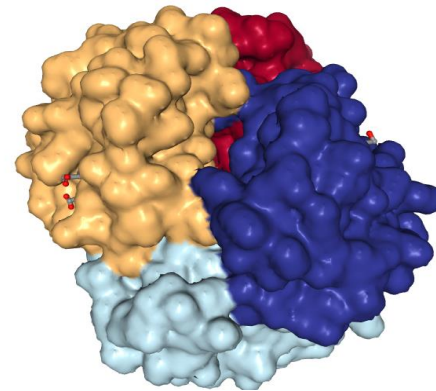
Determinação da estrutura tridimensional



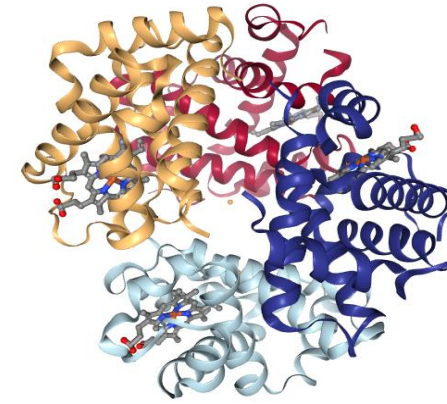
A proteína deve estar sob a forma de cristal.

Elétrons dispersam raios x proporcionalmente (densidade eletrônica).

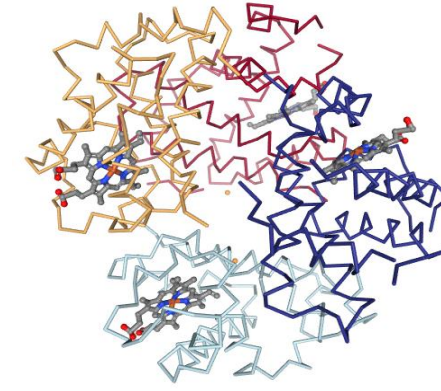
A intensidade dos reflexos e suas posições são convertidas na posição espacial dos átomos



Superfície



Desenho



Esqueleto peptídico

Figure 4 x Ray diffraction photograph taken at PX7.2, Daresbury Laboratory, Cheshire, UK, of bovine enterovirus¹⁶ with 0.5° oscillation range and maximum resolution at the edge of the film of 2.8 Å. The x ray wavelength was 1.488 Å.