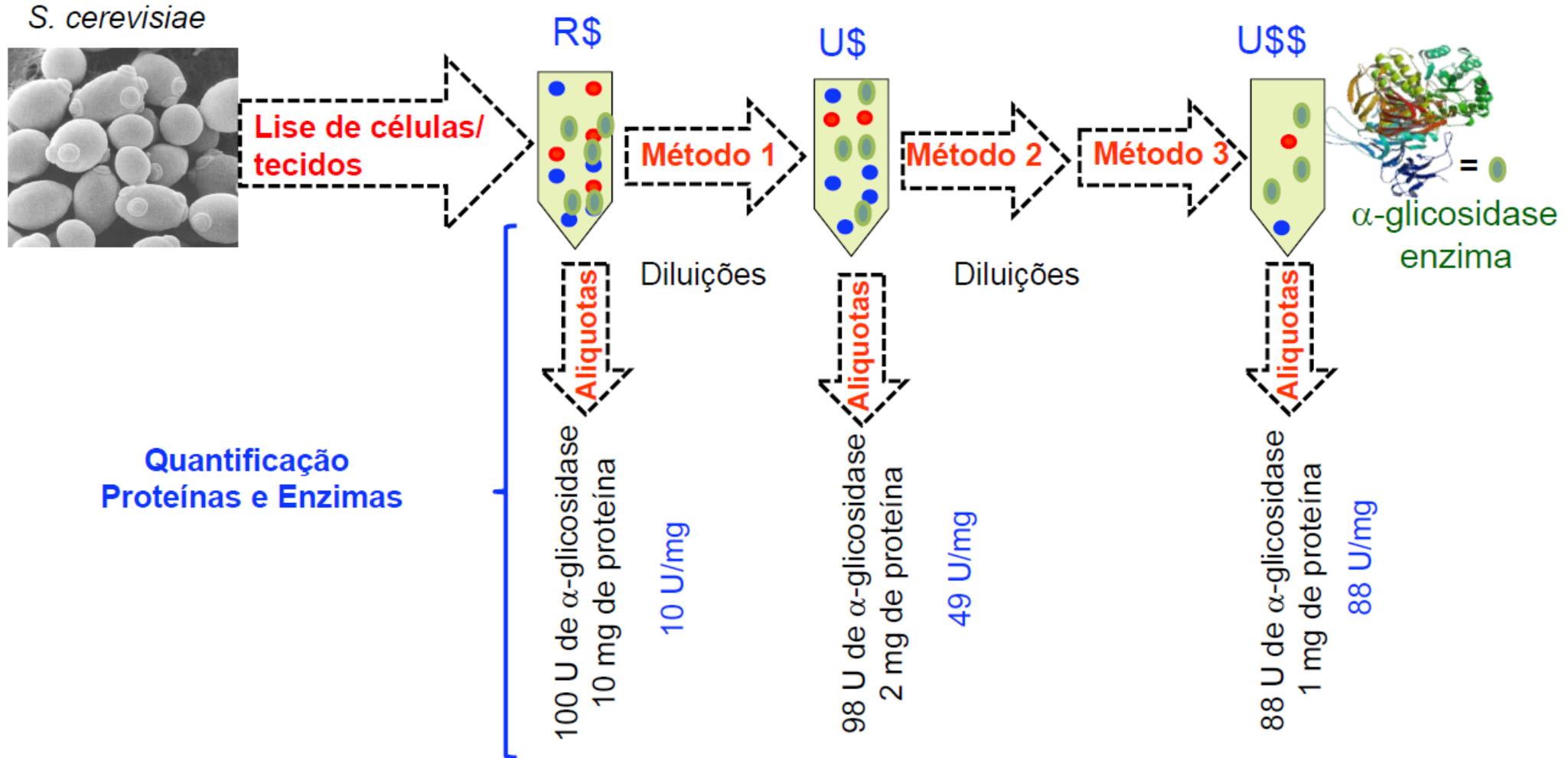


QBQ1453 – Bioquímica Experimental

Precipitação por Sulfato de Amônio

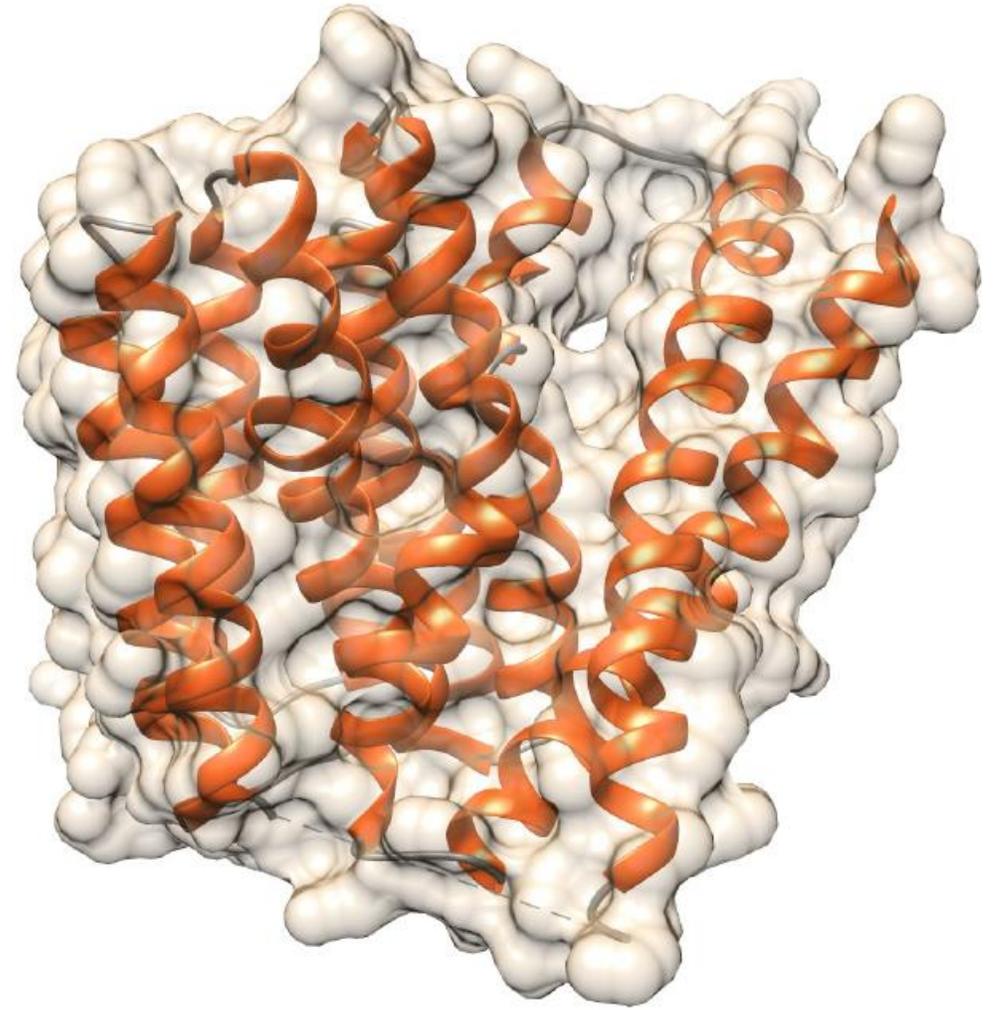
Nicolas Hoch

Purificação de proteínas

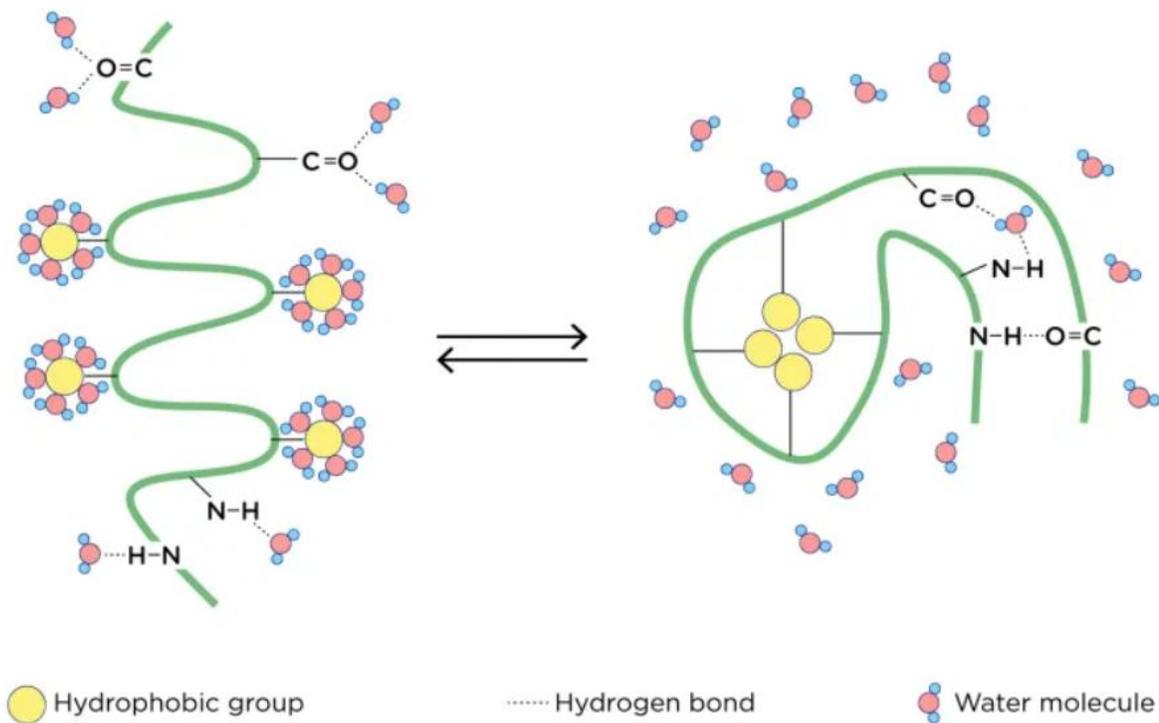


Purificação explora diferenças físico-químicas entre proteínas

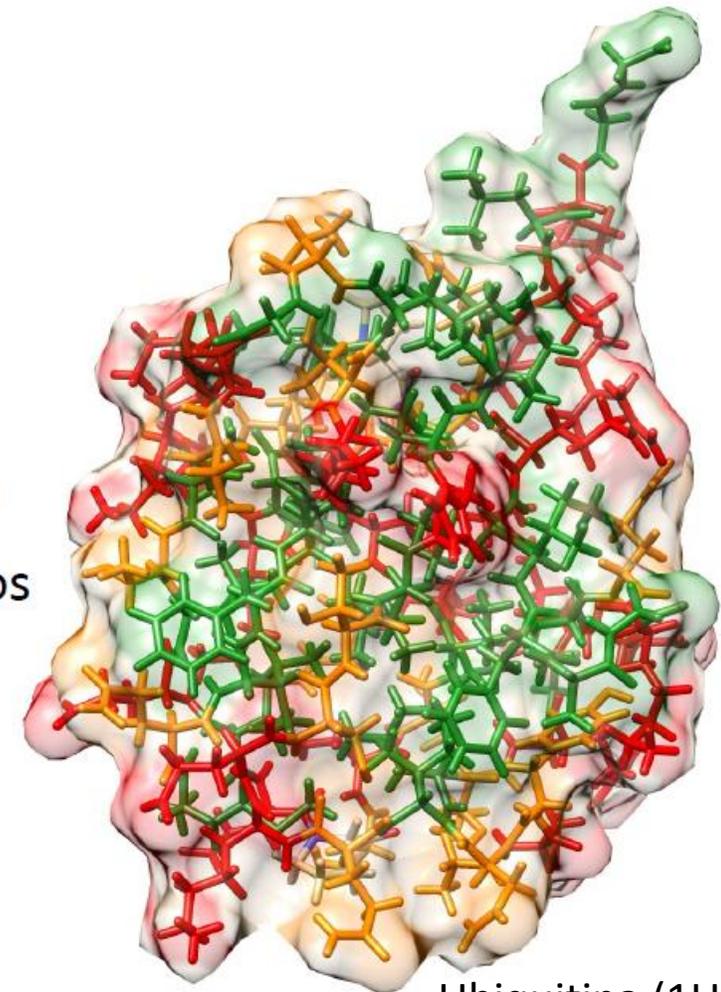
- ☞ Carga líquida em dado pH
- ☞ Tamanho: Raio hidrodinâmico (Rh)
- ☞ Solubilidade em água
- ☞ Solubilidade em solvente orgânico
- ☞ Afinidade por determinados ligantes



Solvatação de proteínas

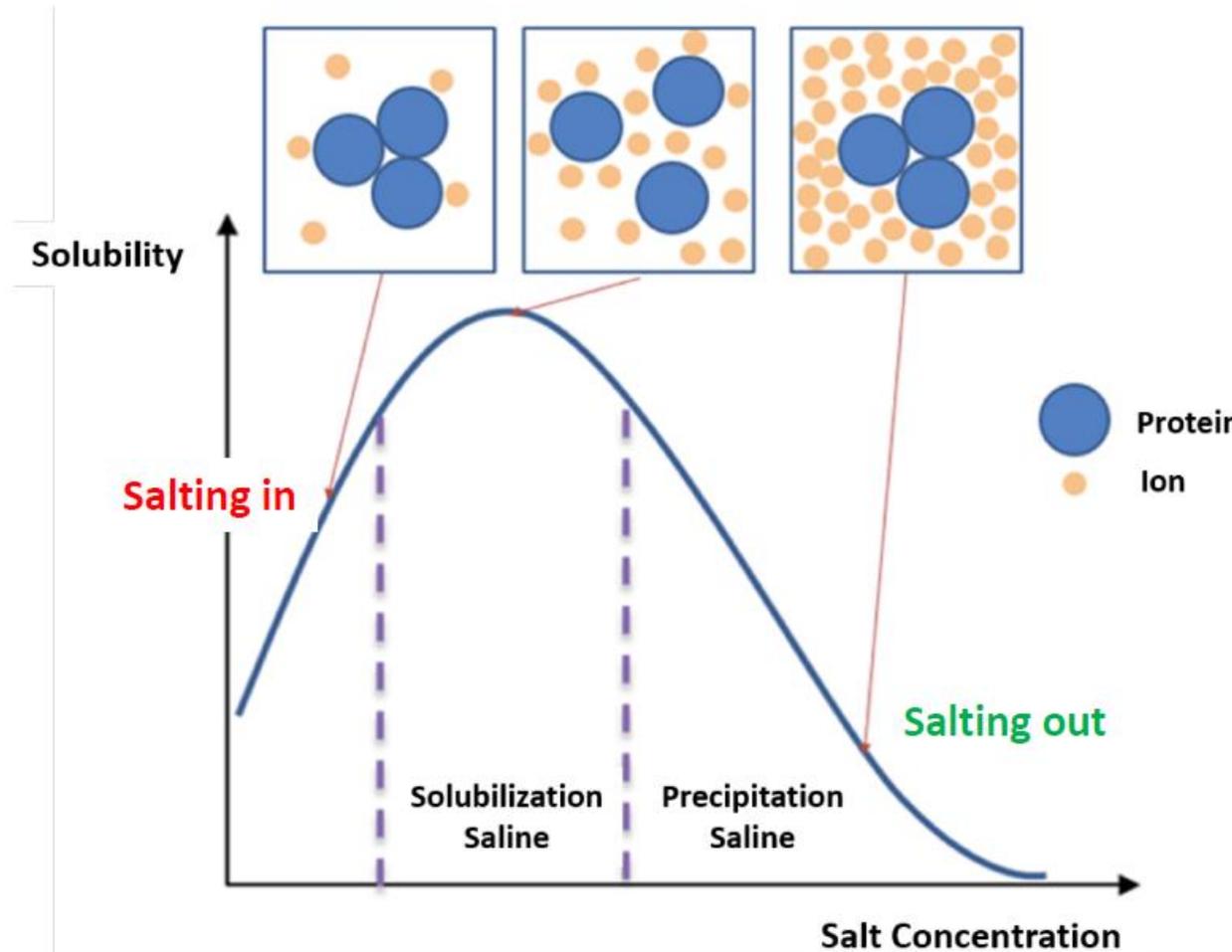


- polares
- carregados
- hidrofóbicos



Ubiquitina (1UBQ)

Efeitos do sal sobre a solubilidade de proteínas em água



Salting-in: neutralização de cargas

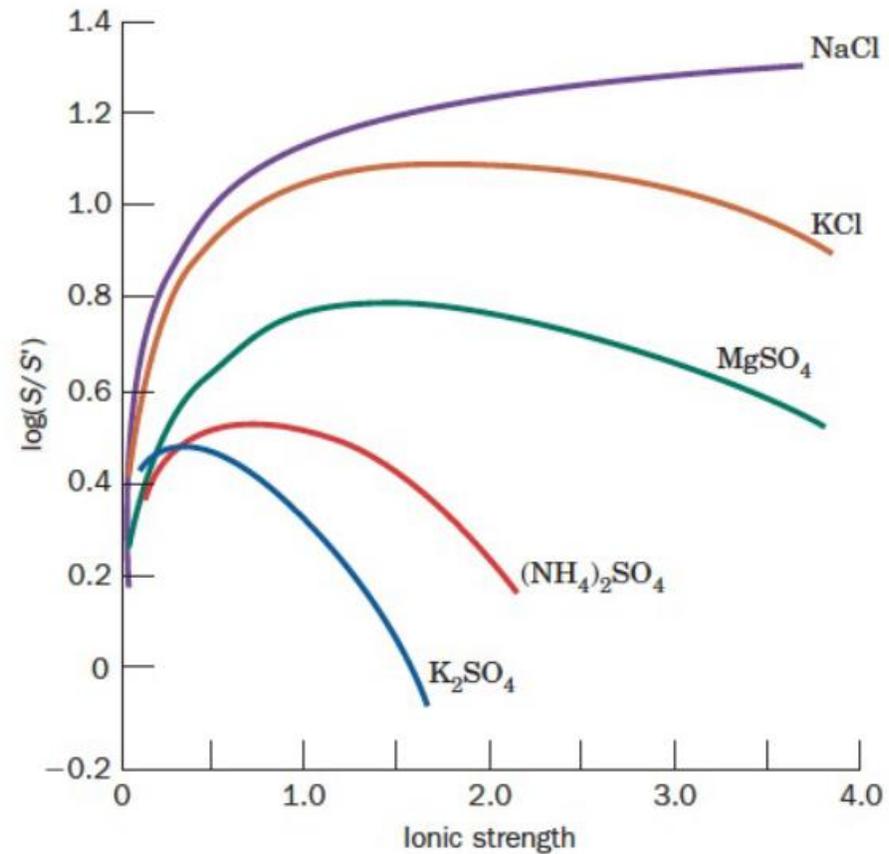
Salting-out: “dessolvatação”

<https://wou.edu/chemistry/files/2019/08/Salting-in-out-2.png>

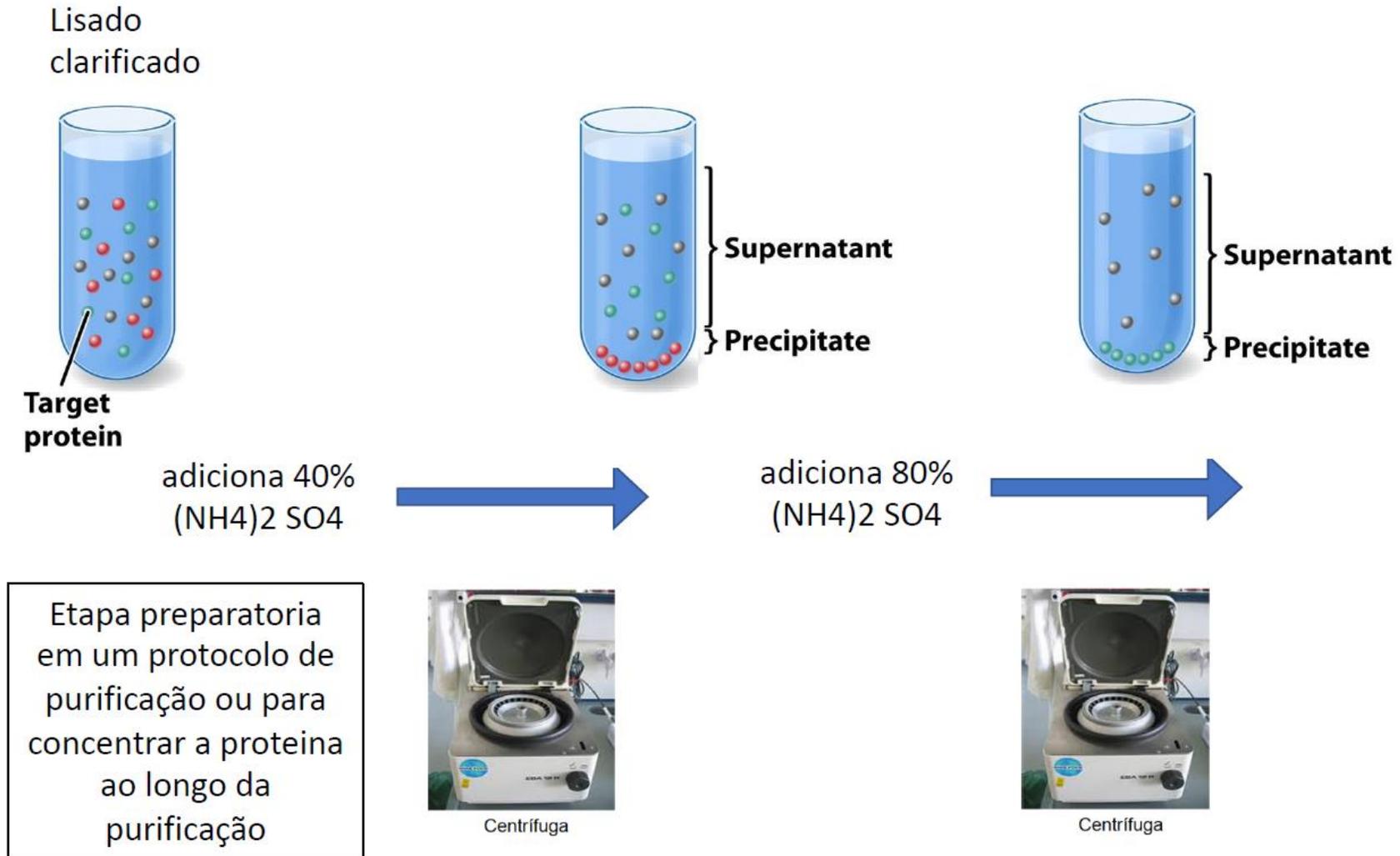
Em 100-150mM sal, usado na maioria dos tampões de lise, o efeito de salting in já ocorreu

Sais diferentes têm efeitos diferentes

Voe & Voet Biochemistry 4th edition, Wiley, 2011 , pp. 133



Precipitação por Sulfato de Amônio



Diálise

Utilizada para remover sais, agentes redutores e reagentes usados durante etapas da purificação

Contêm poros com 10 a 100 Angstrons (1 a 10 nm)

Início da diálise

No equilíbrio

Proteínas

Moléculas de baixo PM do tampão que se deseja remover

Membrana de diálise

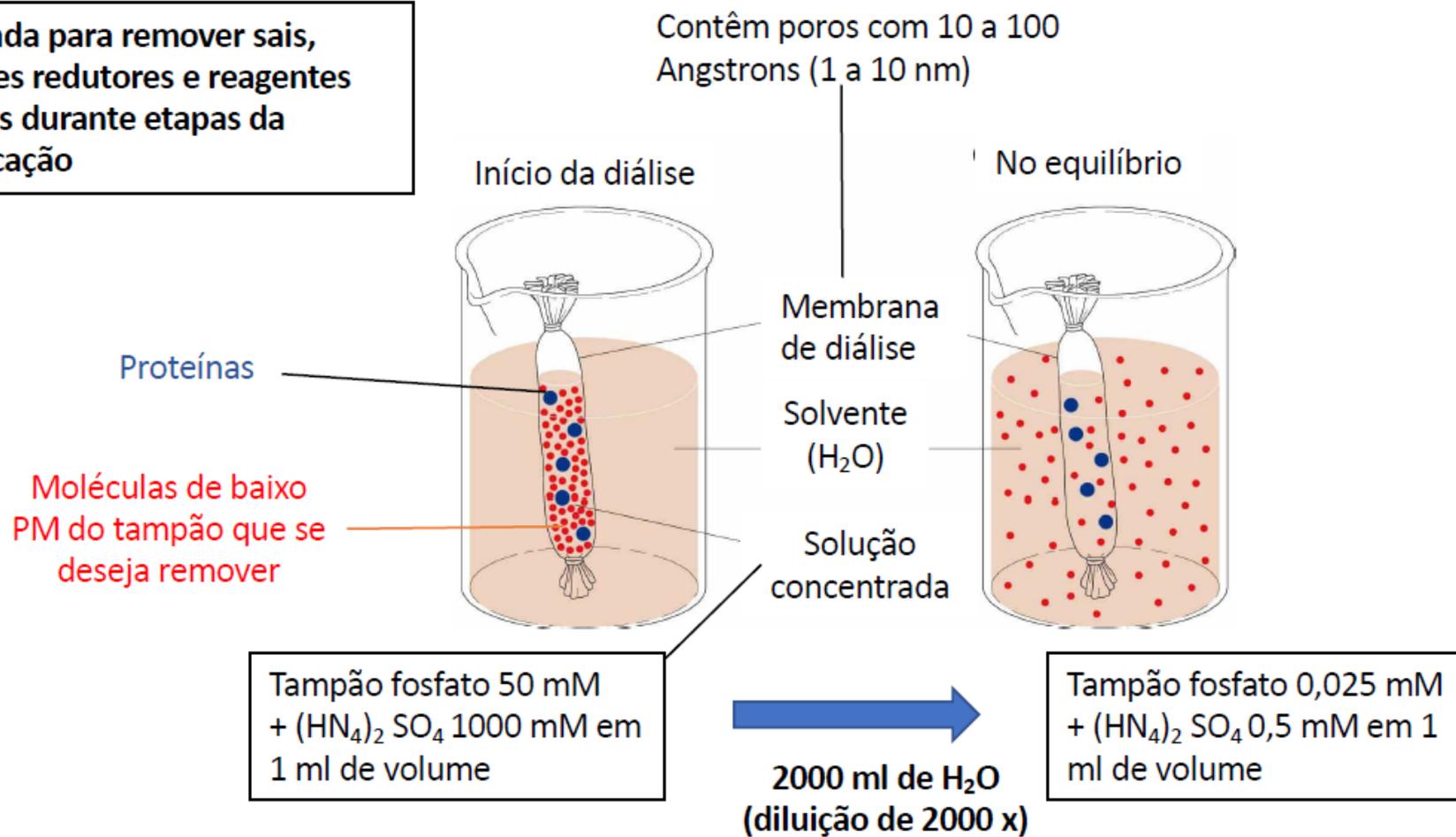
Solvente (H₂O)

Solução concentrada

Tampão fosfato 50 mM + (HN₄)₂ SO₄ 1000 mM em 1 ml de volume

2000 ml de H₂O (diluição de 2000 x)

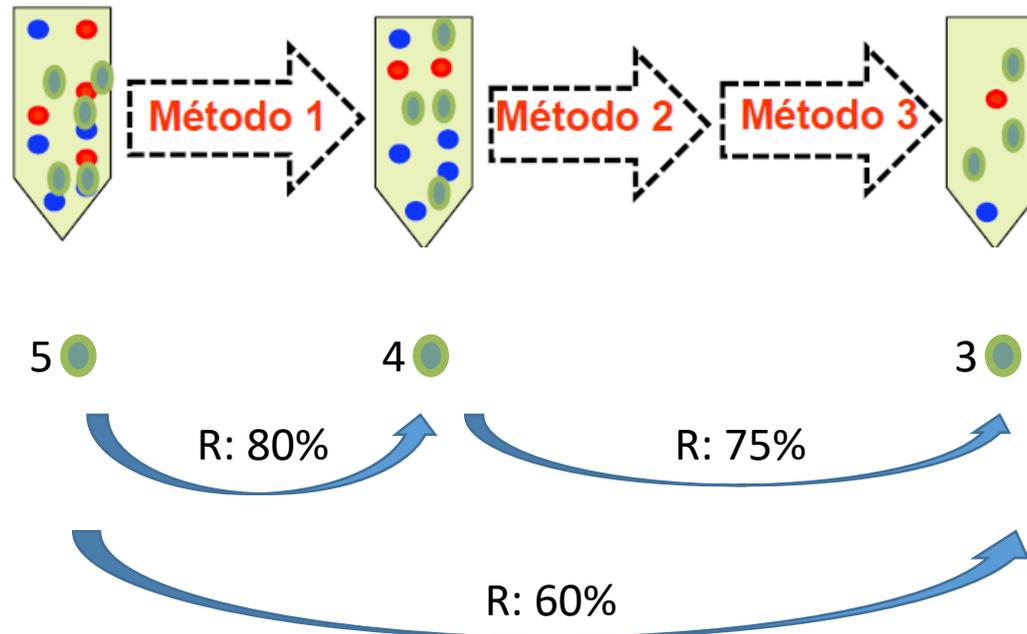
Tampão fosfato 0,025 mM + (HN₄)₂ SO₄ 0,5 mM em 1 ml de volume



Recuperação

Quanto da nossa enzima nós ainda temos?

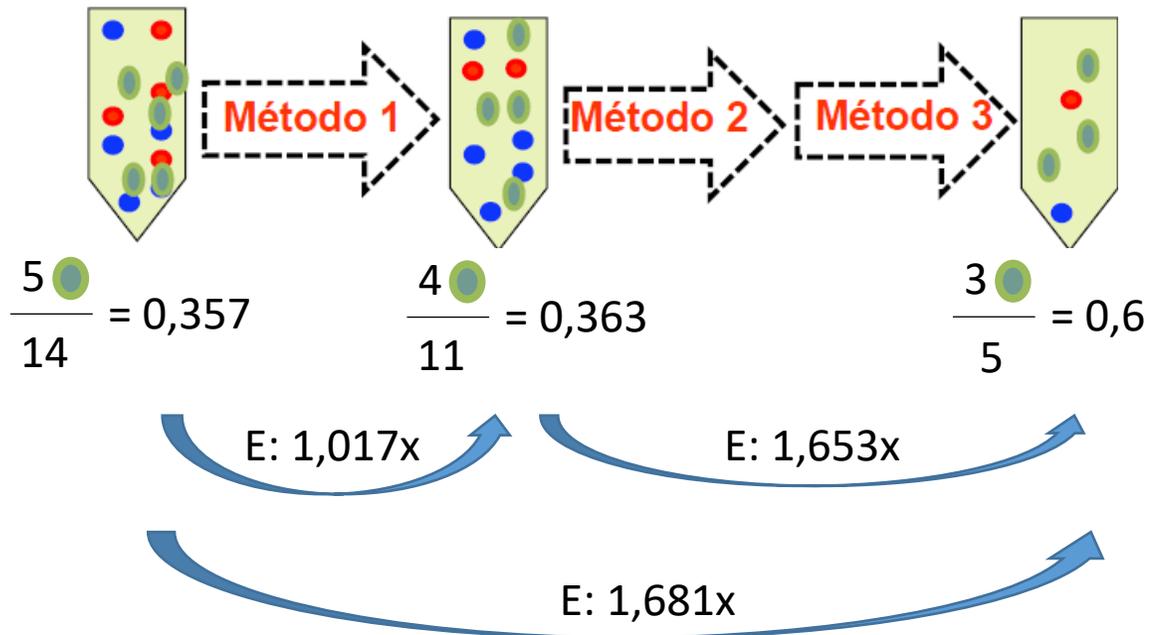
Recuperação (%): $\frac{\text{Quantidade total de enzima } \textit{final} \text{ (U)}}{\text{Quantidade total de enzima } \textit{original} \text{ (U)}} \times 100$



Enriquecimento

O quanto a nossa amostra está mais concentrada na nossa enzima de interesse?

Enriquecimento (x): $\frac{\text{Atividade específica } \textit{final} \text{ (U/mg)}}{\text{Atividade específica } \textit{original} \text{ (U/mg)}}$

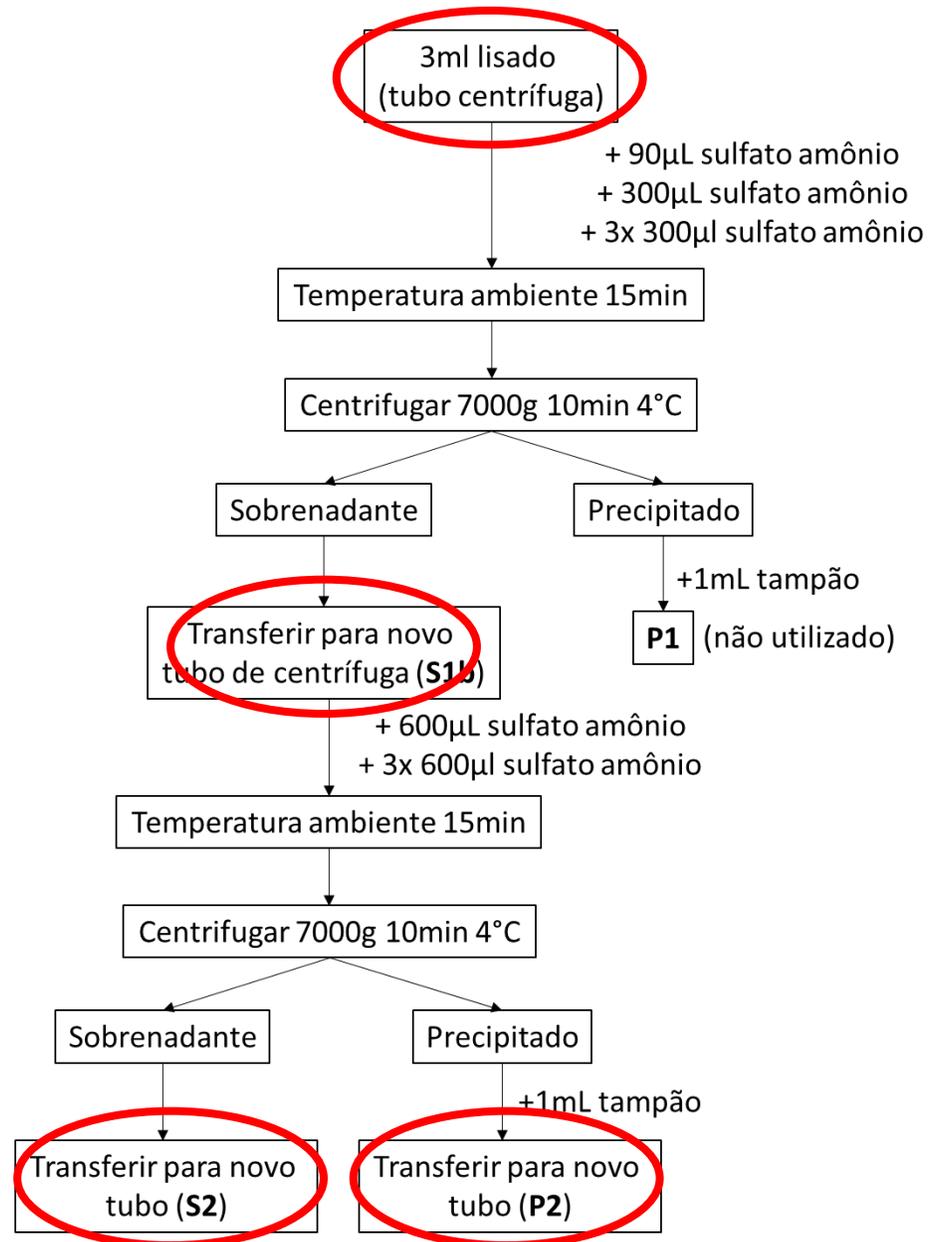


Ativ. específica (U/mg): $\frac{\text{Quantidade de enzima (U)}}{\text{Quantidade de proteínas totais (mg)}}$

ou

Ativ. específica (U/mg): $\frac{\text{Conc. de enzima (U/mL)}}{\text{Conc. de proteínas totais (mg/mL)}}$

Fluxograma



Determinar:

- Proteínas Totais (Bradford)
- Atividade Enzimática (paranitrofenolato)

Lisado, S1, S2 e P2