

QBQ1453 – Bioquímica Experimental 2023

Prof. Roberto Kopke Salinas

Data: 23/05/2023

Exercícios sobre a prática 4 – cromatografia de troca iônica

- 1) Por que foi necessário dialisar a amostra fracionada por precipitação com sulfato de amônio antes de aplicá-la na coluna de troca iônica? Qual tampão seria utilizado para essa diálise?
- 2) Suponha que você precise escolher entre duas colunas para purificar uma enzima de $pI = 8$ dissolvida em tampão fosfato de sódio a $pH 7,0$: S-sepharose e Q-sepharose. Qual das duas é mais indicada? Por quê?
- 3) Um especialista trabalhando em uma startup recebeu como tarefa avaliar o grau de recuperação e enriquecimento de uma preparação de alfa-glicosidase recombinante. A enzima foi isolada em duas etapas, primeiro uma precipitação com 50% de sulfato de amônio. Em seguida, o precipitado foi solubilizado em tampão fosfato de sódio 10 mM $pH 7,0$ (fração P2), dialisado contra o mesmo tampão e aplicado em uma coluna de troca iônica Q-sepharose. A enzima foi eluída em um gradiente de NaCl. A quantidade total de proteínas foi determinada pelo ensaio de Bradford, encontrou-se 100, 40, e 7 mg no lisado, no P2, e na fração purificada por troca-iônica, respectivamente. Os volumes das amostras de lisado, fração P2, e da fração separada por troca iônica eram 10ml. A concentração de atividade da enzima foi determinada usando o ensaio de hidrólise de PNP α Glc em um volume de reação de 0,2 ml. A equação da curva padrão de p-nitrofenolato é $y = 0,001x$, onde y refere-se à absorbância a 420nm, e x é a quantidade de p-nitrofenolato em nmol. Todas as amostras foram diluídas 1000x para medir a atividade enzimática. O ensaio de atividade resultou nos seguintes valores de A_{420} em função do tempo:

Tempo (min)	Lisado (A_{420})	P2 (A_{420})	Q-sepharose (A_{420})
5	0,5	0,4	0,35
10	1,0	0,8	0,7
15	1,5	1,2	1,05
20	2,0	1,6	1,4

Pergunta-se:

- a) Calcule a atividade enzimática em cada fração a partir de gráficos da quantidade de produto formado em função do tempo de reação;
- b) Calcule a atividade enzimática total presente no lisado, na fração P2, e na fração purificada na Q-sepharose;
- c) Calcule a recuperação e o enriquecimento nas duas etapas de purificação.

- 4) Acesse http://www.agbooth.com/pp_web/, escolha “Complex mixture”, e selecione a enzima 10.
- a) Otimize a purificação da enzima usando inicialmente cromatografia de troca-iônica, e depois cromatografia de gel filtração. Faça um “print screen” da tela demonstrando o resultado da purificação, e indique a recuperação e o enriquecimento.
 - b) Otimize a purificação da enzima usando inicialmente precipitação com sulfato de amônio, e depois cromatografia de troca-iônica. Faça um “print screen” da tela demonstrando o resultado da purificação. Compare a recuperação e o enriquecimento obtidos com essa estratégia em relação à estratégia acima.