

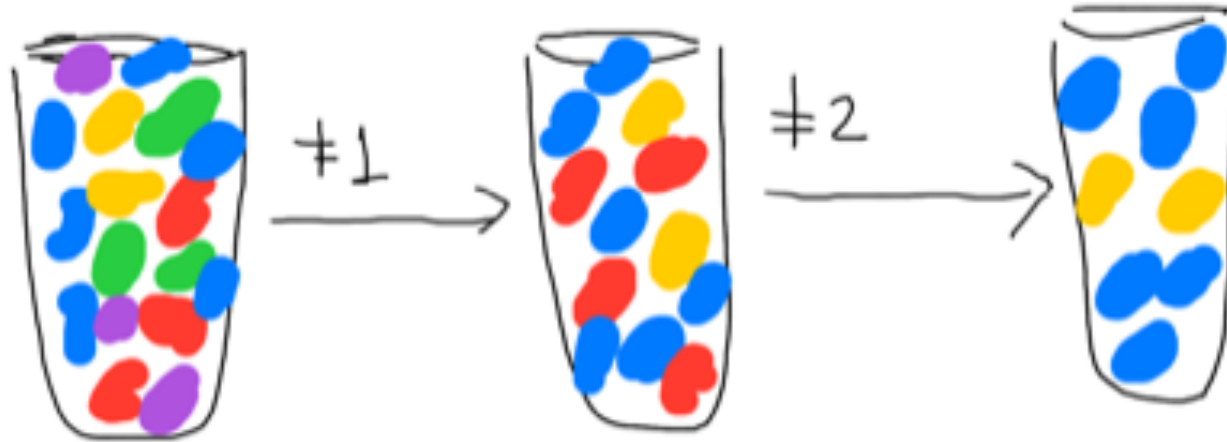
Cromatografia de exclusão por tamanho e determinação do pH ótimo

Prof. Dr. Roberto Kopke Salinas

Departamento de Bioquímica

IQ – USP

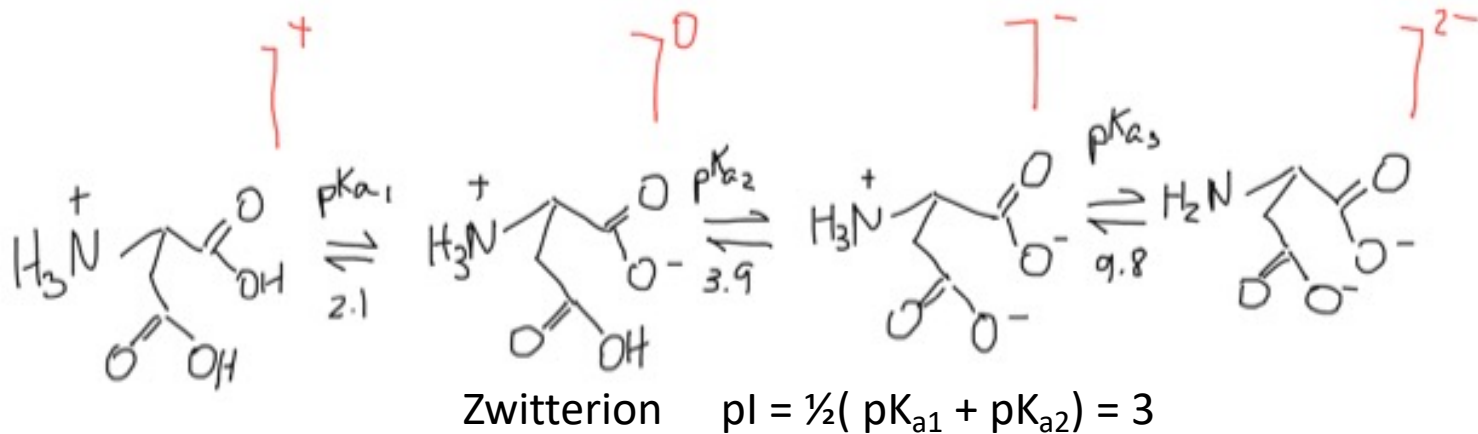
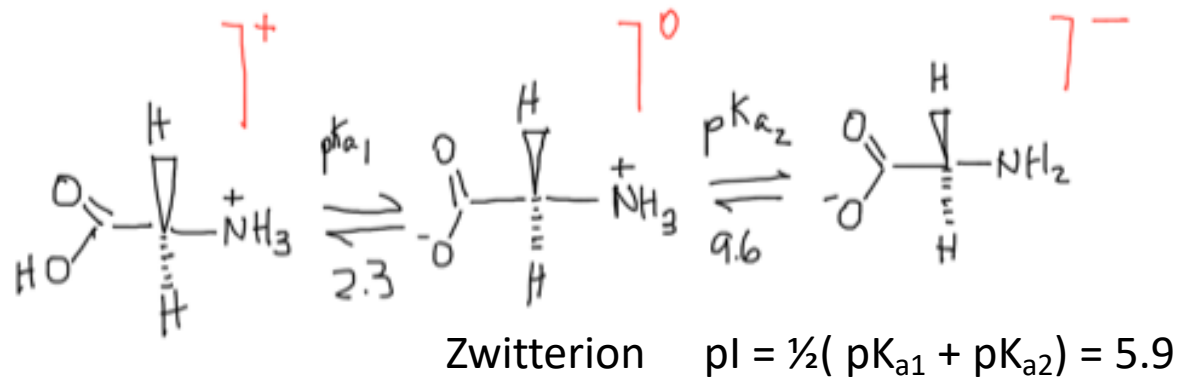
Como proteínas ser isoladas?



Enriquecimento

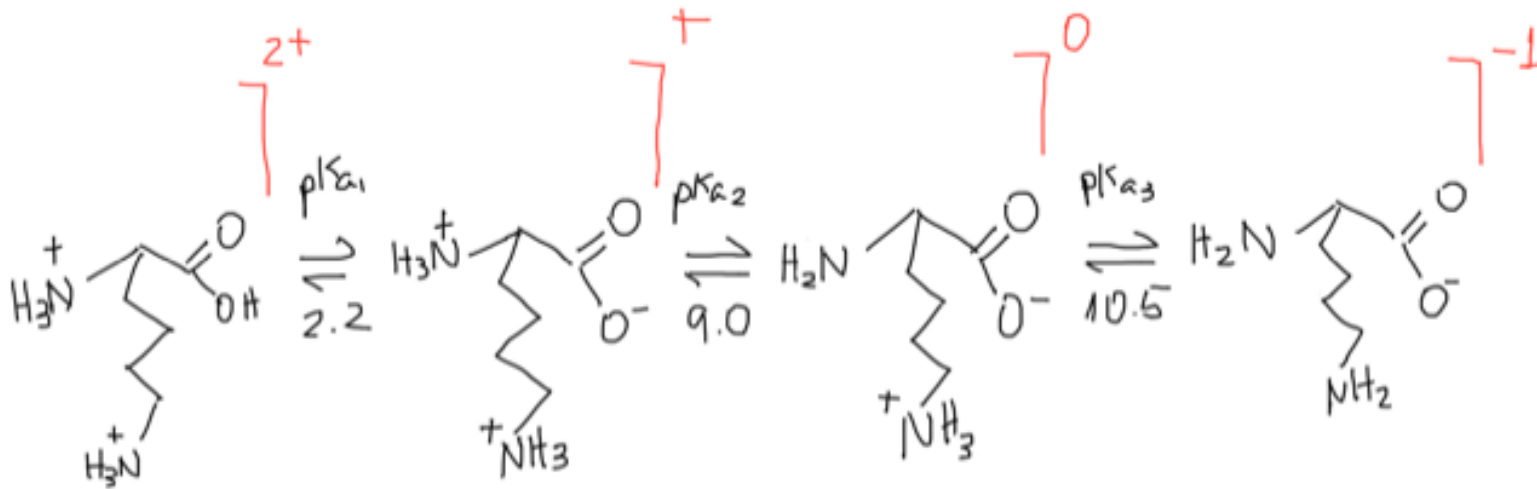
Ponto isoelétrico (pI)

- Grupos ionizáveis em um aminoácido
- Formas negativa, positiva, e zwitterion
- pI: pH no qual a carga líquida é zero, logo a mobilidade eletroforética é nula



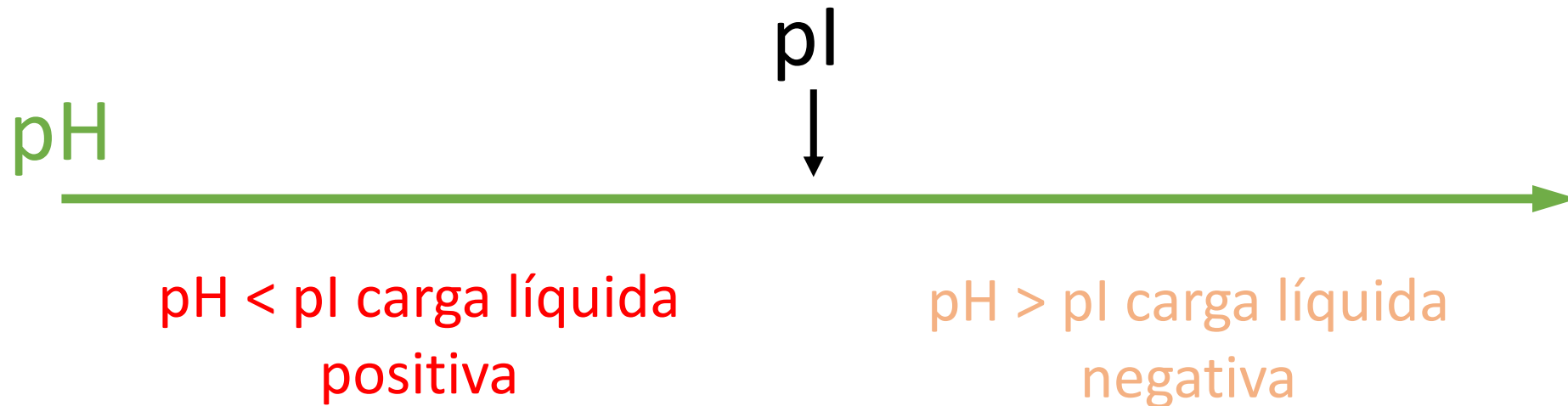
Ponto isoelétrico (pI)

- Grupos ionizáveis em um aminoácido
- Formas negativa, positiva, e zwitterion
- pI: pH no qual a carga líquida é zero, logo a mobilidade eletroforética é nula

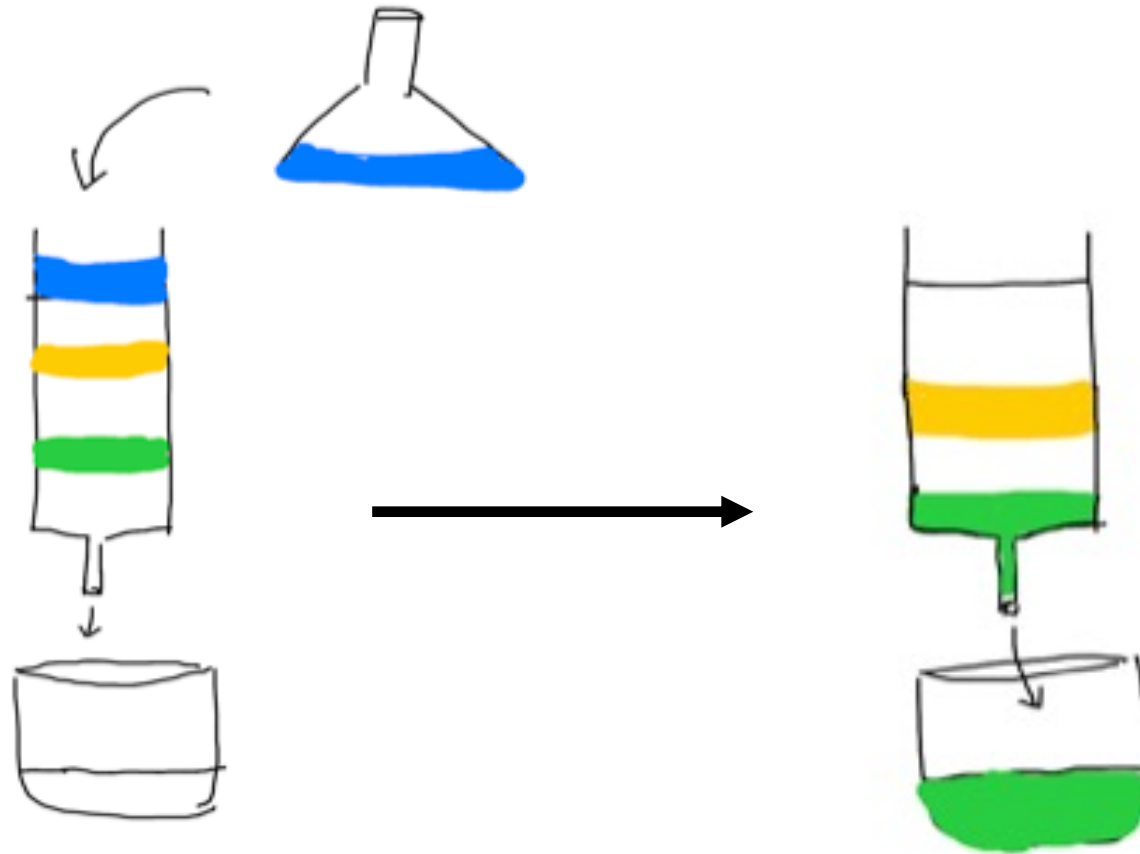


Zwitterion $\text{pI} = \frac{1}{2}(\text{pK}_{a2} + \text{pK}_{a3}) = 9.7$

- O ponto isoelétrico em uma proteína dependerá da composição das cadeias laterais que contém grupos ionizáveis
- Grupos ionizáveis em proteínas: Fenol (tirosina), guanidino (arginina), imidazol (histidina), sulfidril (cisteína), amino (lisina), carboxila (aspártico)



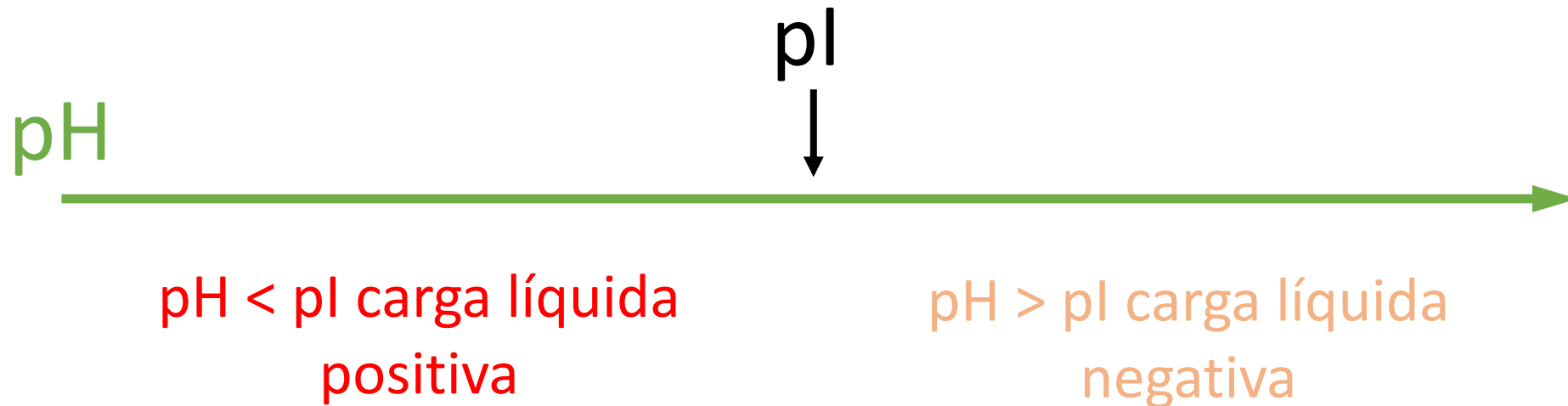
Cromatografia



- Mistura de moléculas está dissolvida na fase móvel
- Mistura de moléculas é arrastada pela fase móvel
- A interação de cada molécula com a fase sólida determinará a velocidade com a qual cada molécula atravessará a coluna

Cromatografia de troca iônica

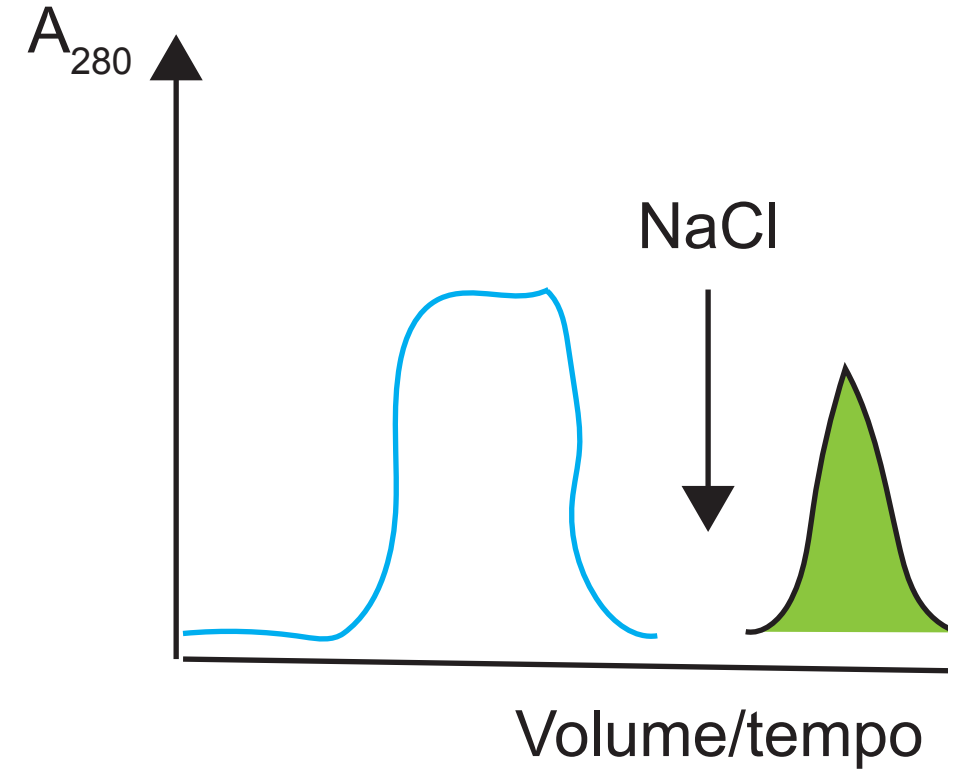
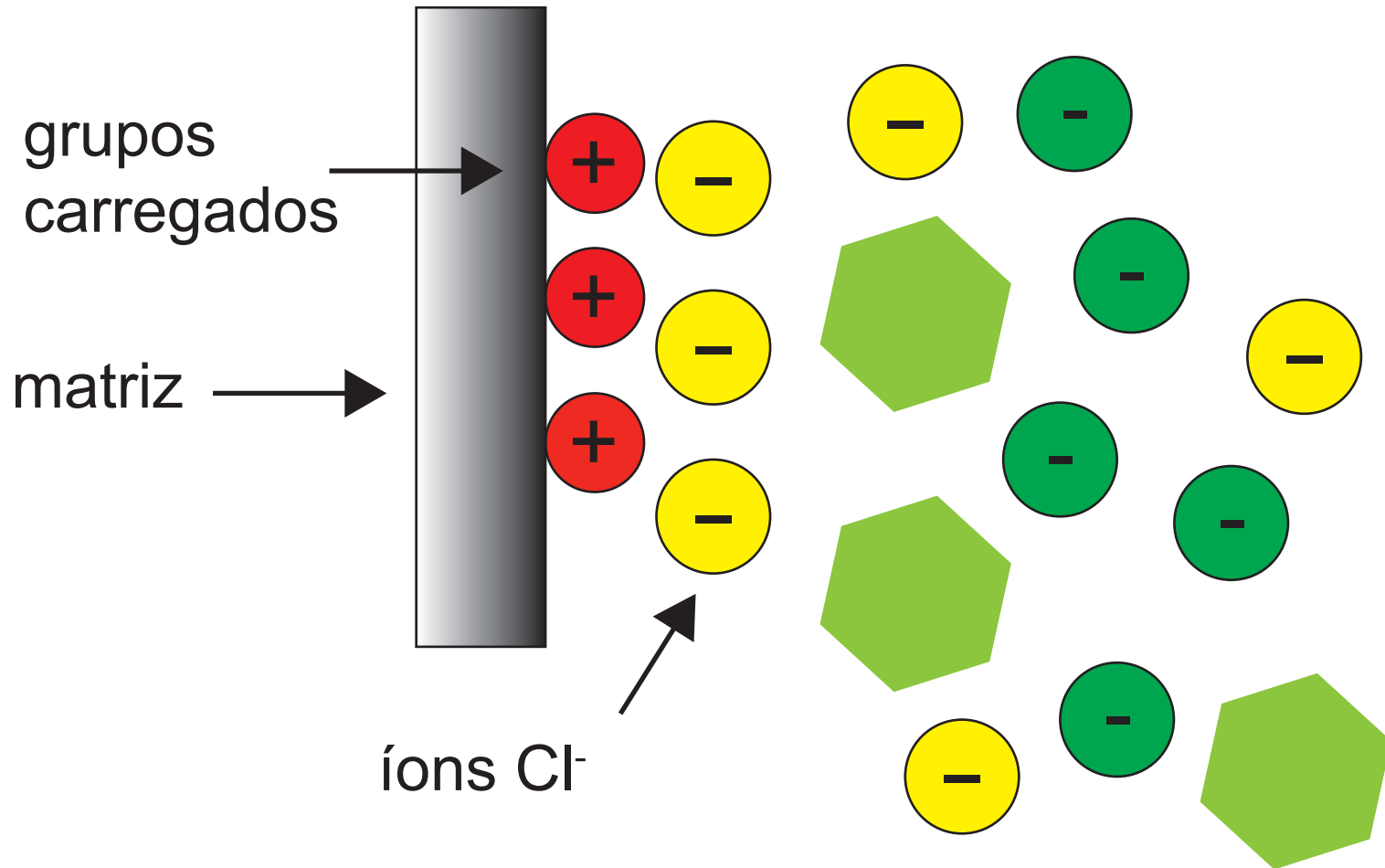
- A separação se dá pela carga líquida da enzima
- A carga líquida da enzima depende, por sua vez, do pH do meio e do pI da enzima
- pI é o pH no qual a carga líquida de uma proteína é zero



- Fase sólida: resina de agarose coberta de grupos carregados
- Fase móvel: solução tampão de pH adequado
- Força da interação depende da carga líquida da enzima, ou seja, do pH do tampão e do pI da enzima

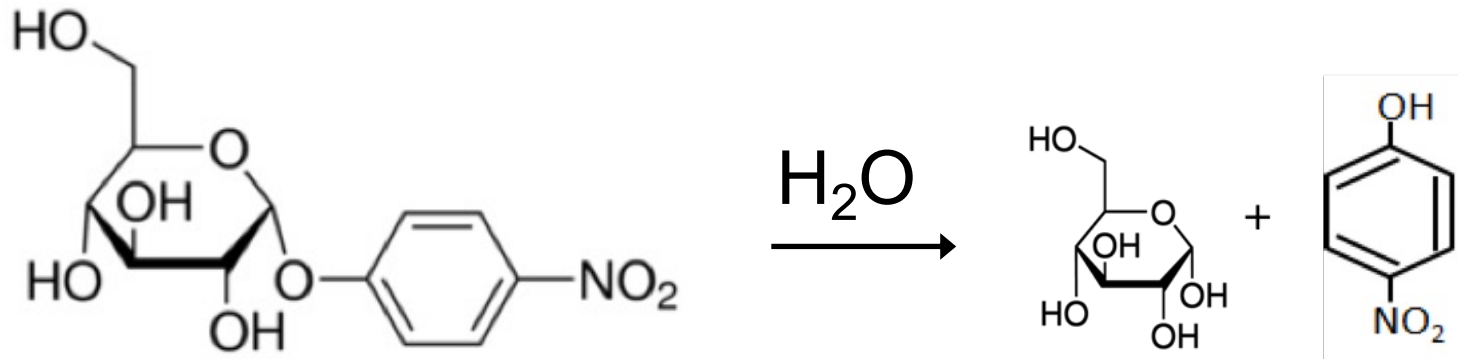
Cromatografia de troca iônica

3) A proteína adsorvida é eluída a partir da aplicação de um tampão com alta força iônica, que age como competidor



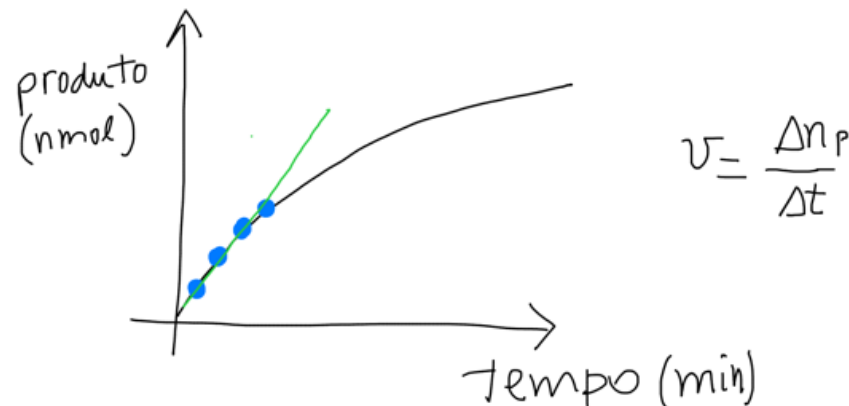
Enzimas

- Enzimas aceleram reações químicas
- A hidrólise do substrato (p-nitrofenil- α -glicosídeo) virtualmente não ocorre em água, isto é, na ausência da enzima

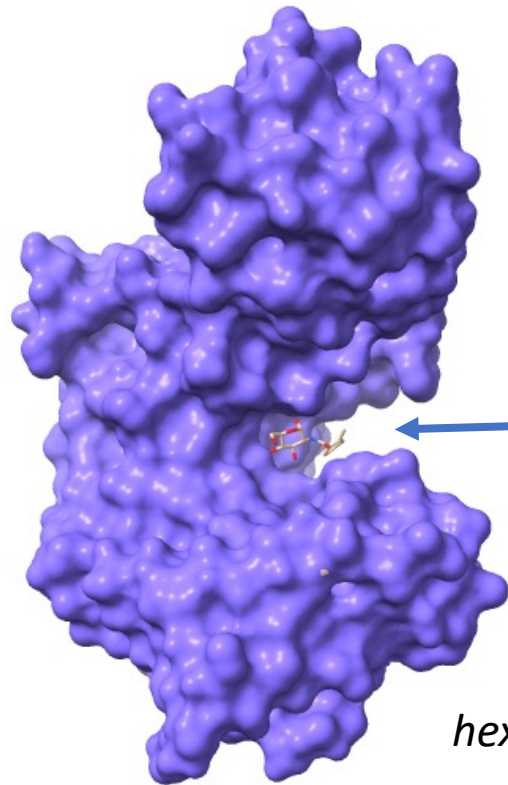
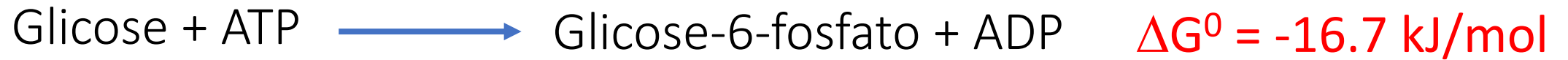


- Na presença da enzima, foi possível detectar a formação do produto, p-nitrofenolato

Medida da velocidade inicial



Os substratos se ligam ao sítio ativo da enzima



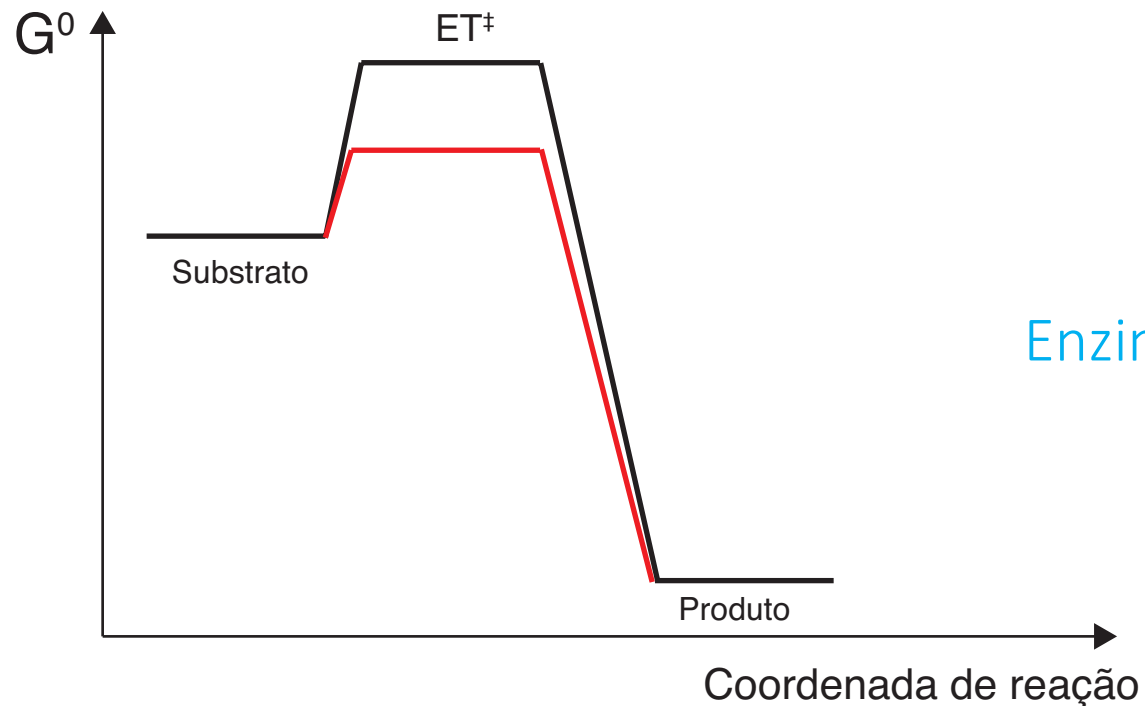
hexoquinase

$$\frac{v_{catalisada}}{v_{n\tilde{a}o-catalisada}} = 10^6$$

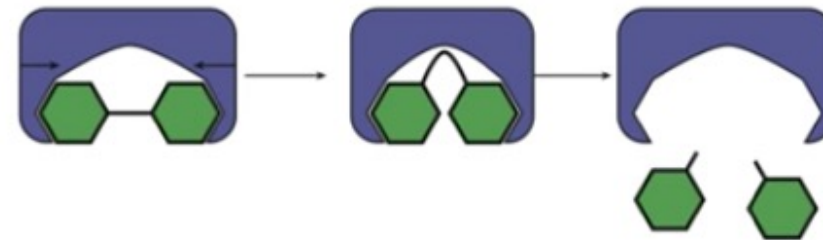
Sítio ativo: é a região da enzima onde a reação química ocorre

Por que enzimas são bons catalisadores?

- Interações fracas (iônica, van der Waals, ligações de hidrogênio) ocorrem entre o substrato e a enzima
- Algumas dessas interações ocorrem preferencialmente no estado de transição

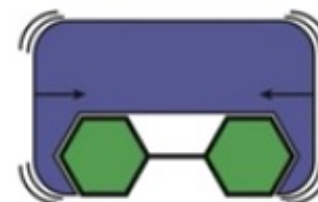


Enzyme complimentary to transition state



Enzimas estabilizam o estado de transição

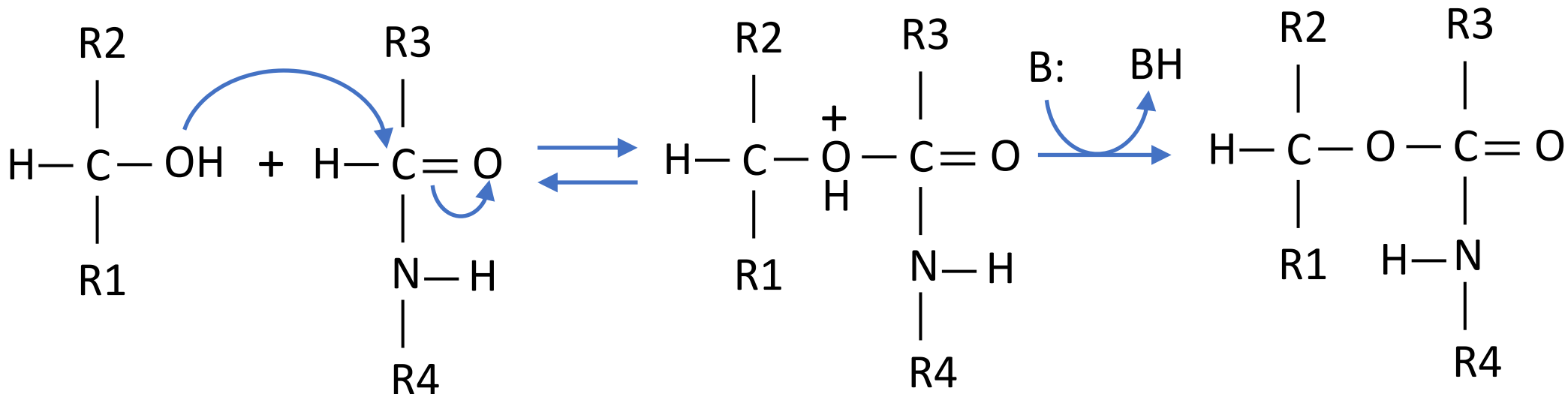
Enzyme complementary to substrate



Doesn't enhance catalysis

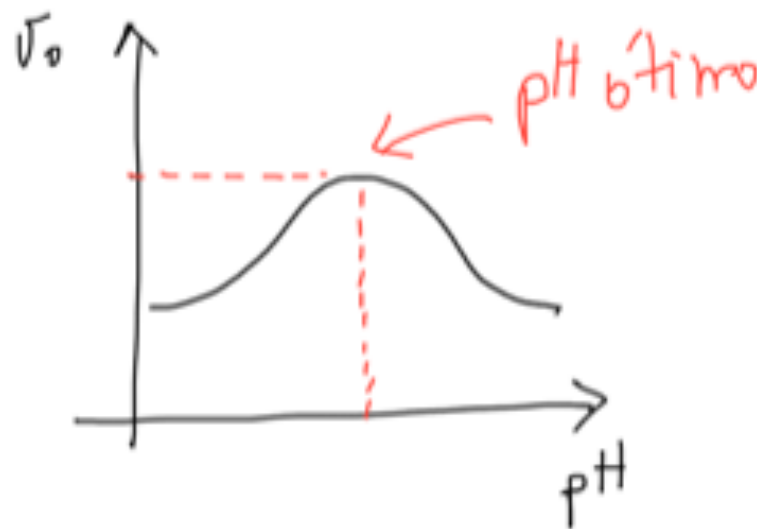
Características do sítio ativo

- Após a ligação dos substratos no sítio ativo, cadeias laterais adequadamente posicionadas auxiliam a quebra e formação de ligações
- O mecanismo de catálise pode ser classificado como ácido-base, covalente, ou catálise por íons metálicos
- Alguns mecanismos envolvem transferência de grupos (ex. protons) entre substrato e enzima, ou a formação de intermediários covalentes

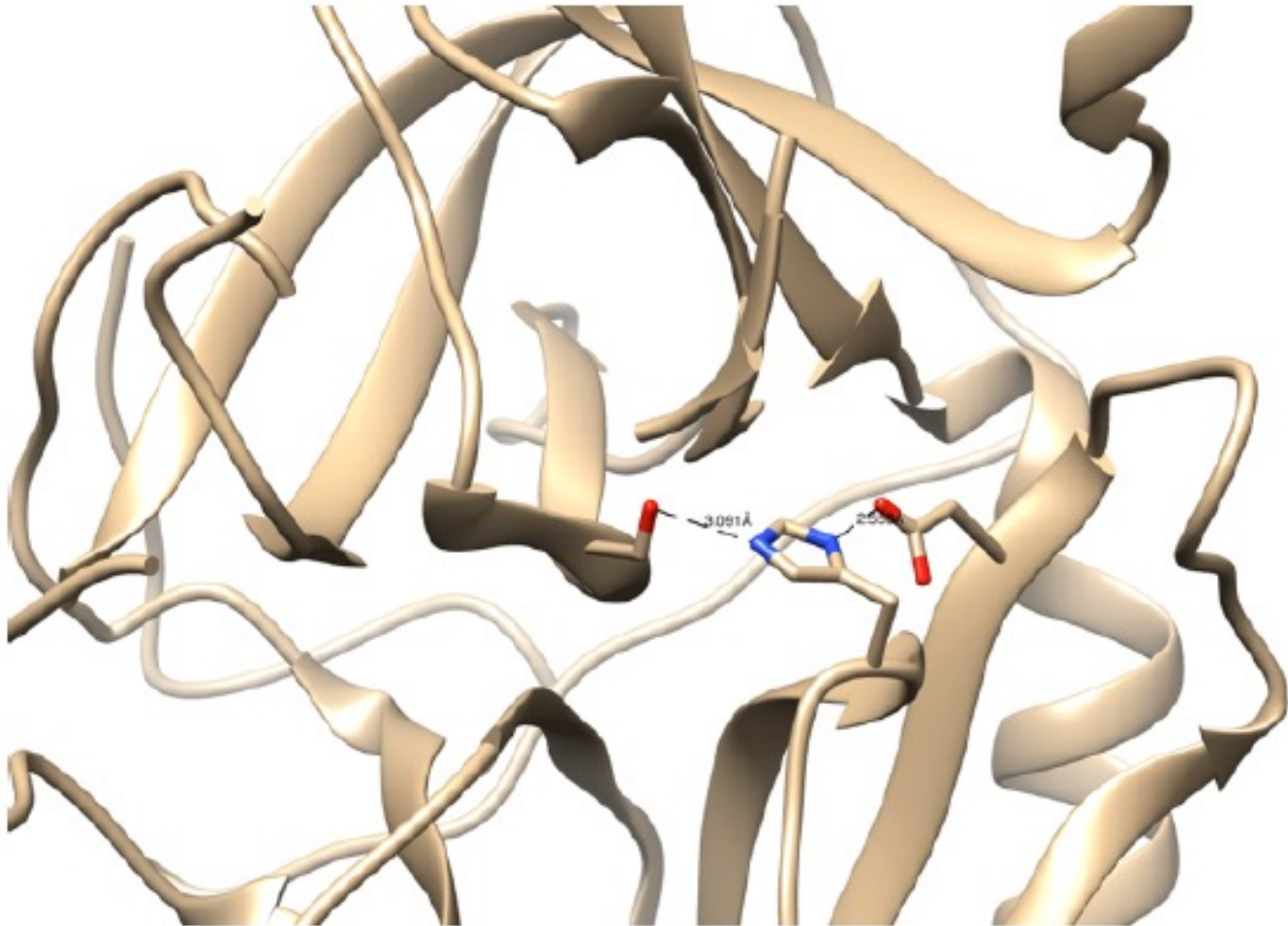


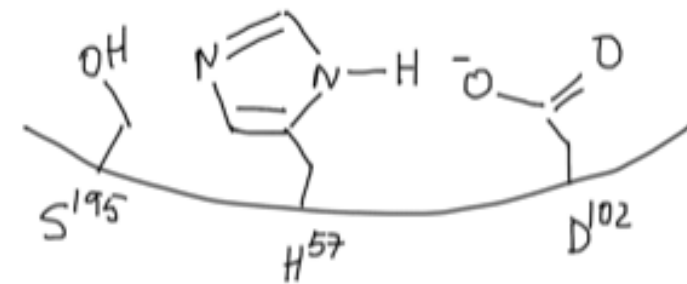
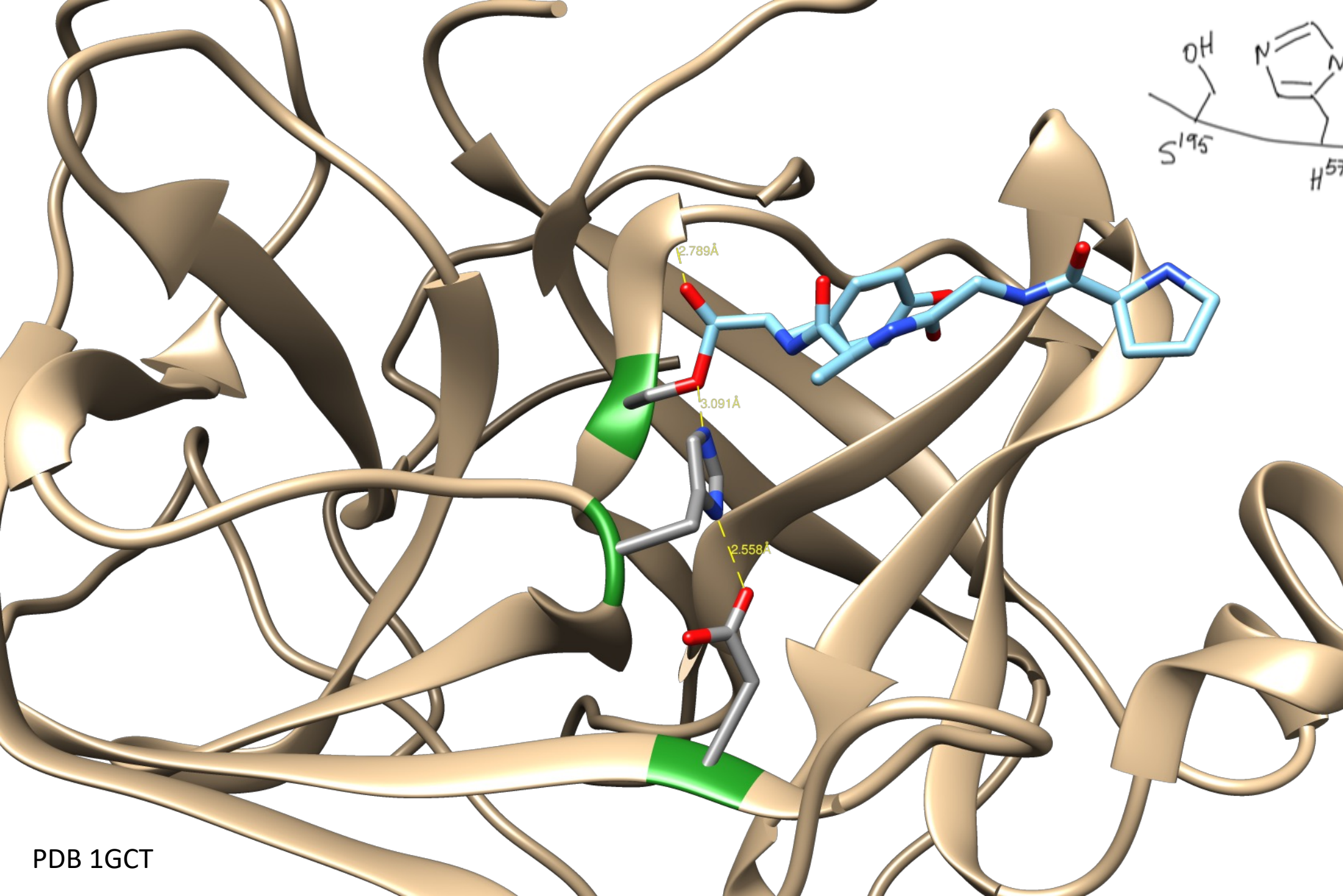
pH ótimo

- O mecanismo de catálise envolve reações de transferência de proton
- A carga líquida de uma determinada cadeia lateral é determinante para o seu papel na catálise
- Conseqüentemente, as enzimas são mais ativas em um determinado pH, chamado pH ótimo



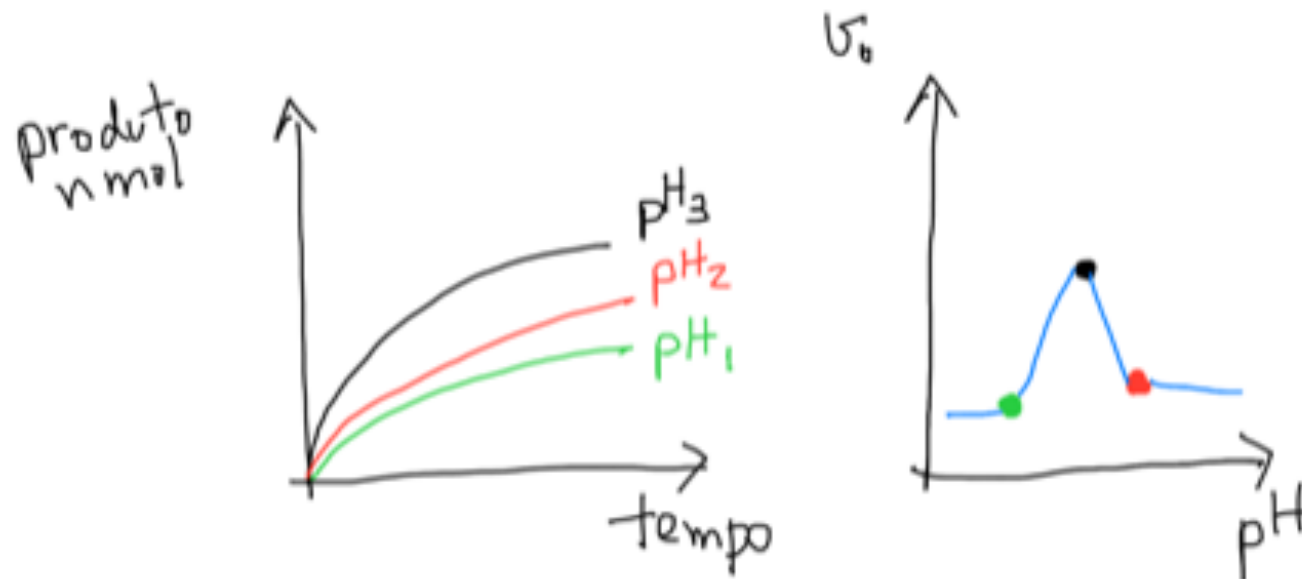
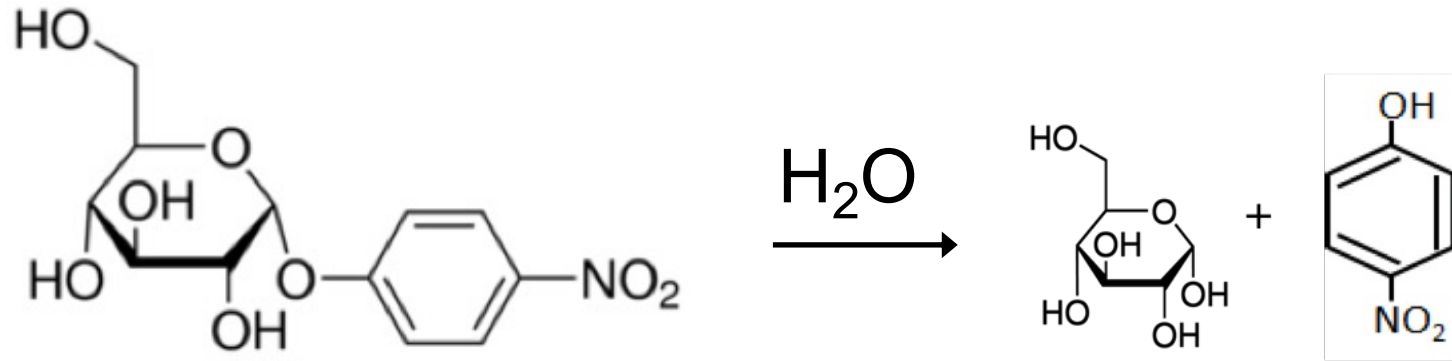
Serino proteases





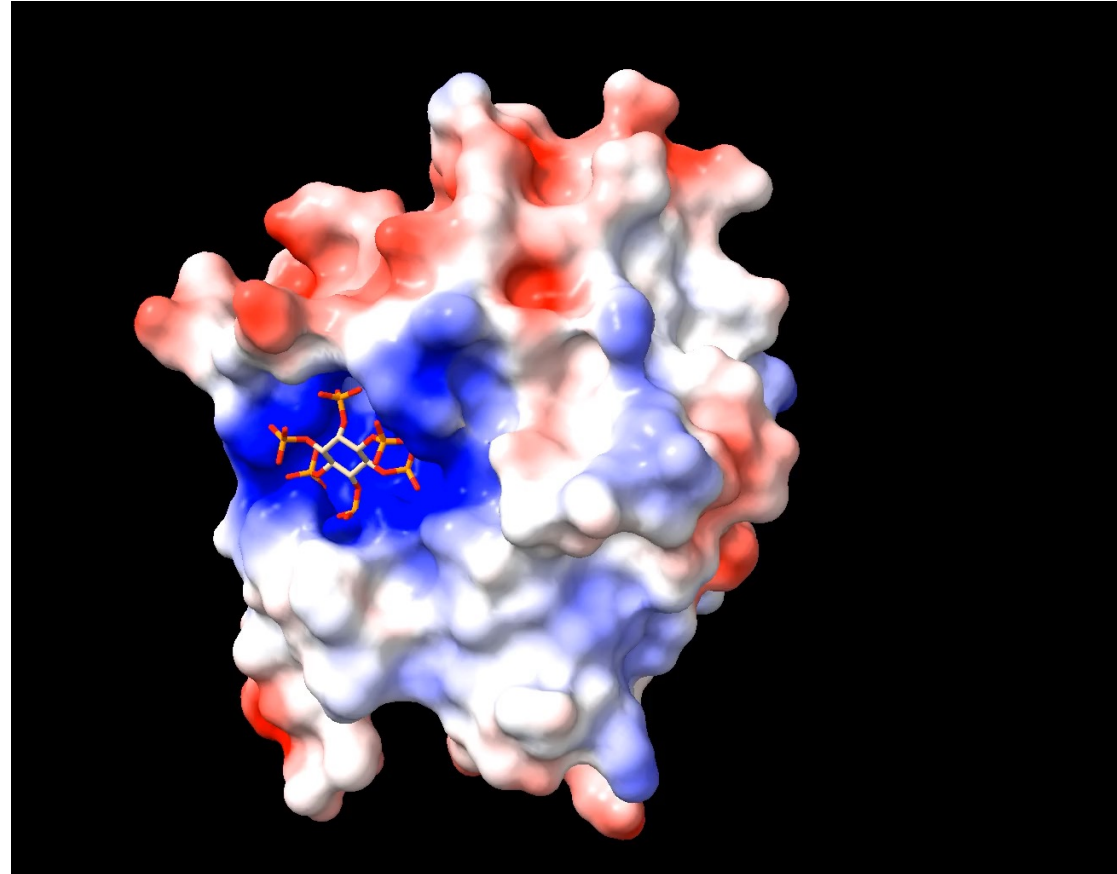
PDB 1GCT

Prática 5: Determinação do pH ótimo da alfa-glicosidase



Os métodos de separação dependem das características físico químicas das proteínas

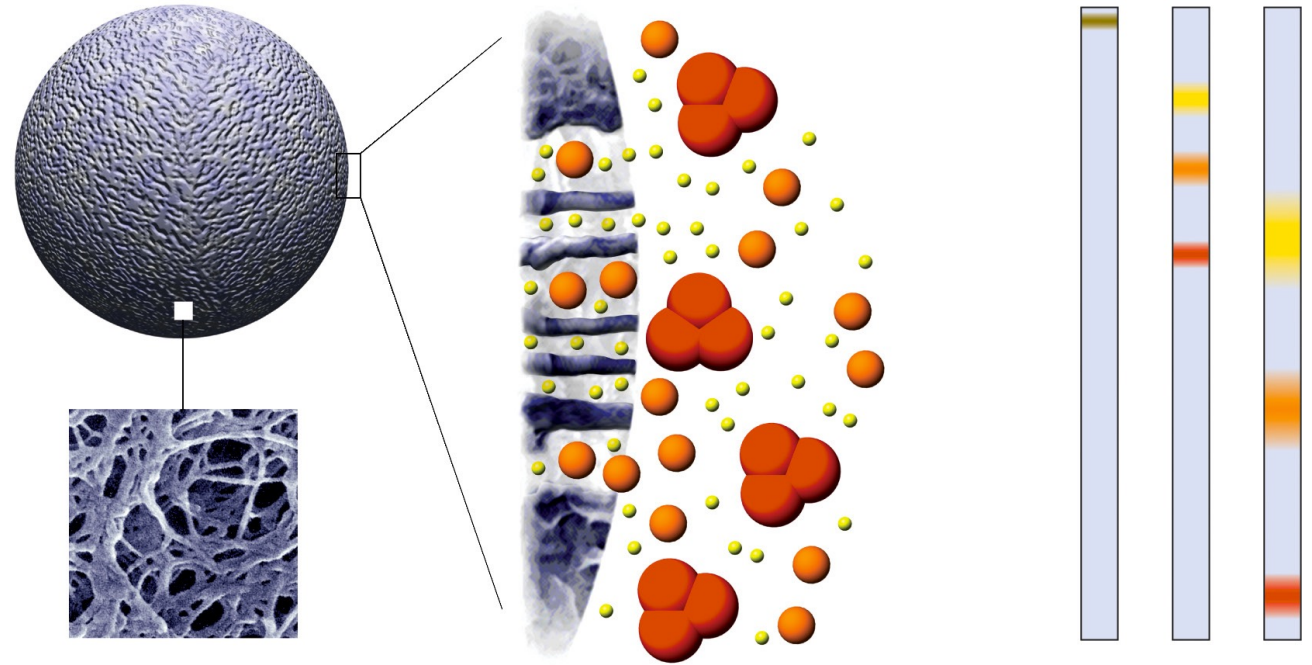
- Solubilidade em água ou em solvente orgânico (hidrofobicidade)
- Carga líquida em dado pH
- **Tamanho (raio hidrodinâmico)**
- Afinidade por determinado ligante



PDB: 3eeb
ChimeraX

Cromatografia de exclusão por tamanho (filtração em gel)

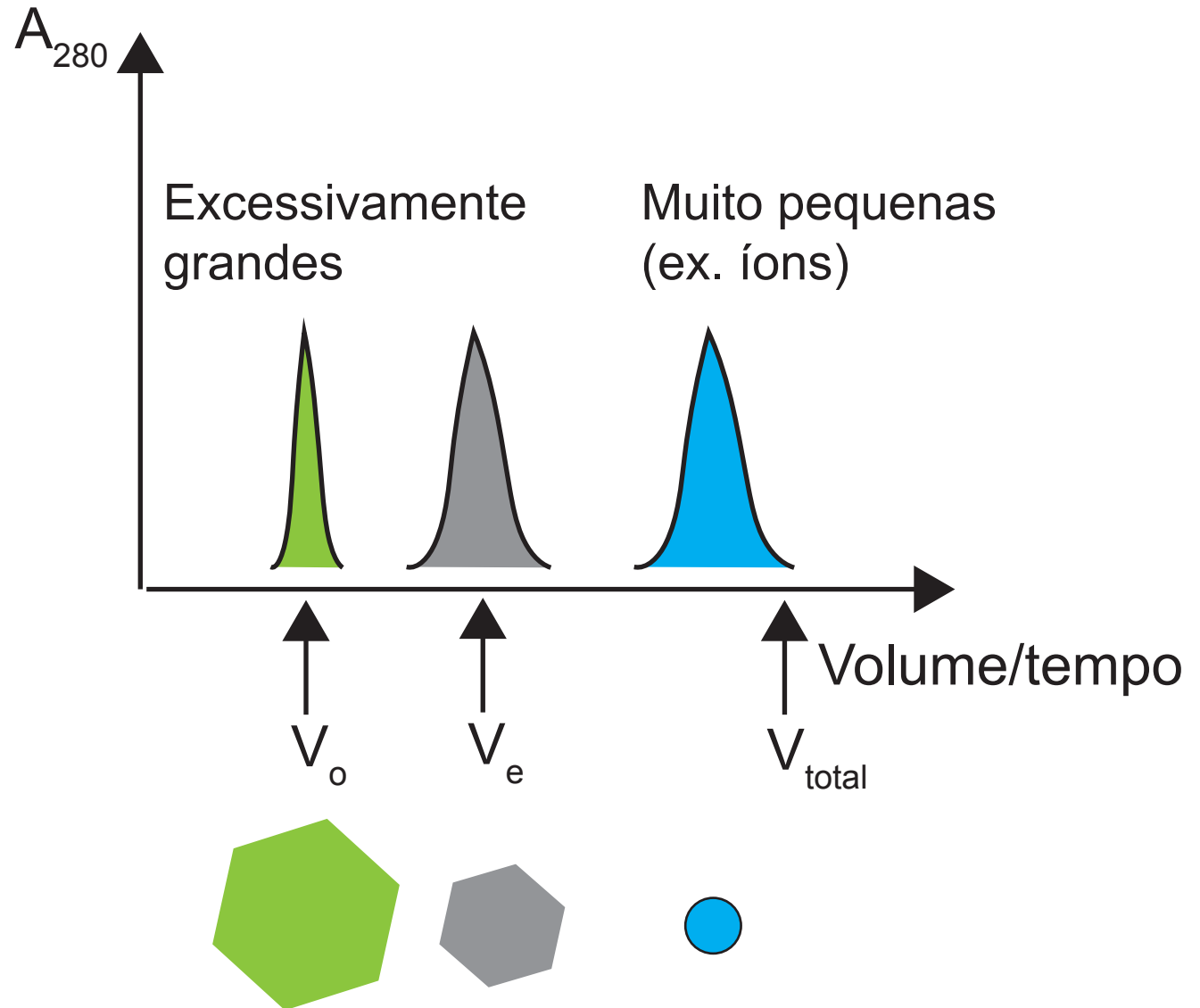
- Separação por tamanho: partículas maiores eluem primeiro, partículas menores eluem depois;
- A matriz é formada por partículas esféricas, que contém poros, dentro dos quais o tampão e as macromoléculas podem difundir
- Partículas muito grandes não conseguem entrar nos poros, e eluem no volume excluído (V_e)



Cytiva, Handbook

Cromatografia de exclusão por tamanho

- Proteínas que são muito grandes não entram nos poros do gel, e eluem no volume excluído (V_o)
- Proteínas ou partículas muito pequenas não são separadas, eluem no volume final



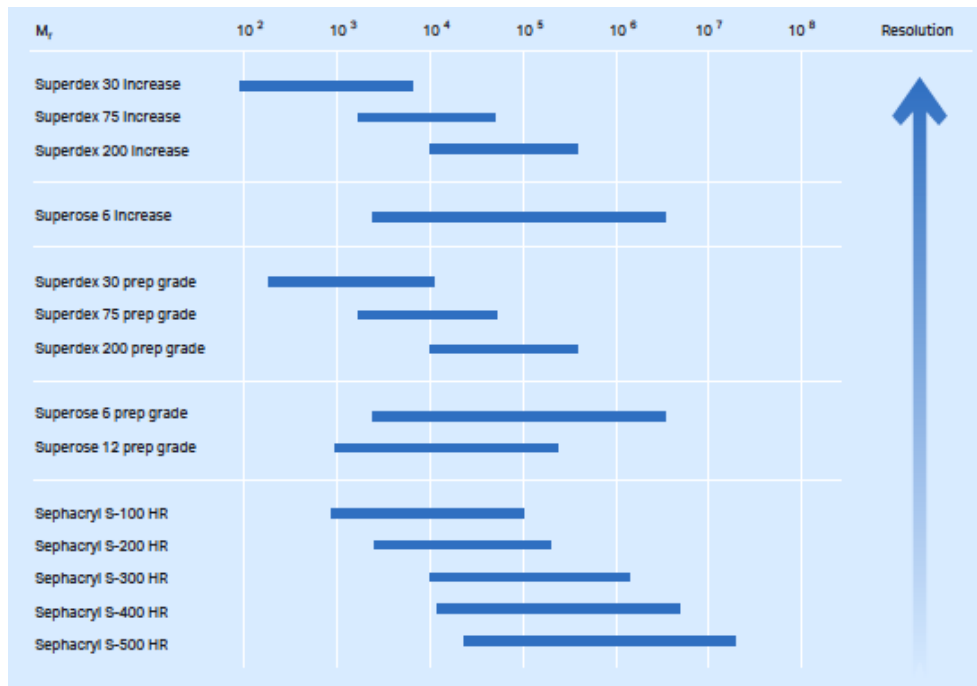
Cromatografia de exclusão por tamanho

- Exemplos de resinas (Cytiva)

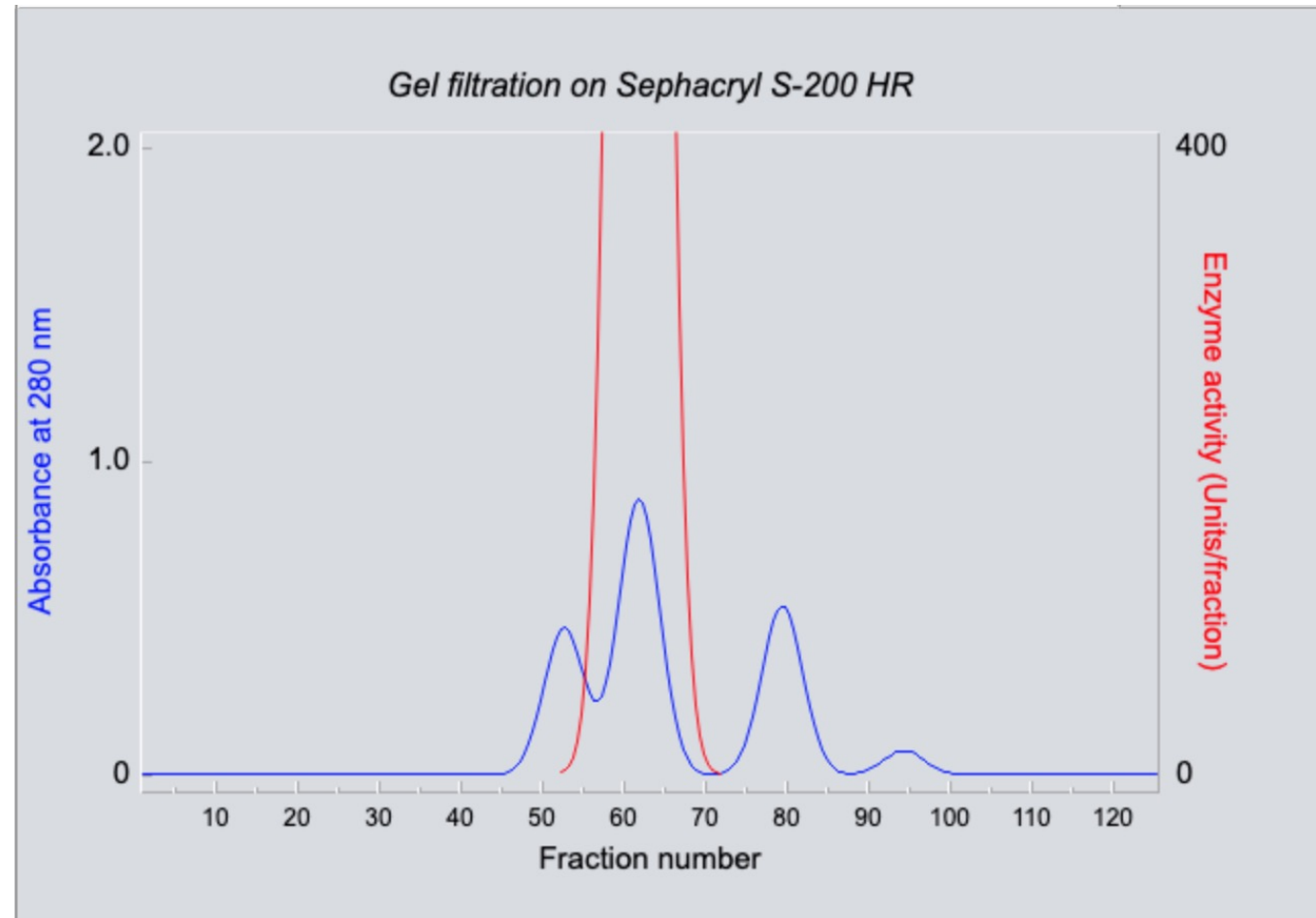
Superdex 200, Superdex 75

Superose 6, Superose 12

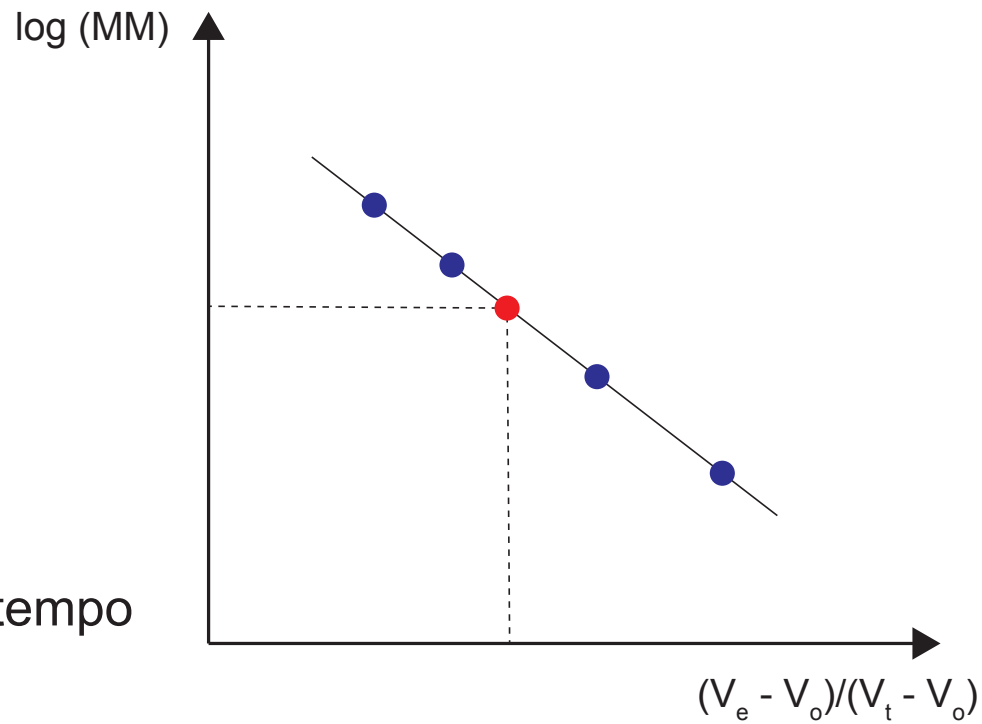
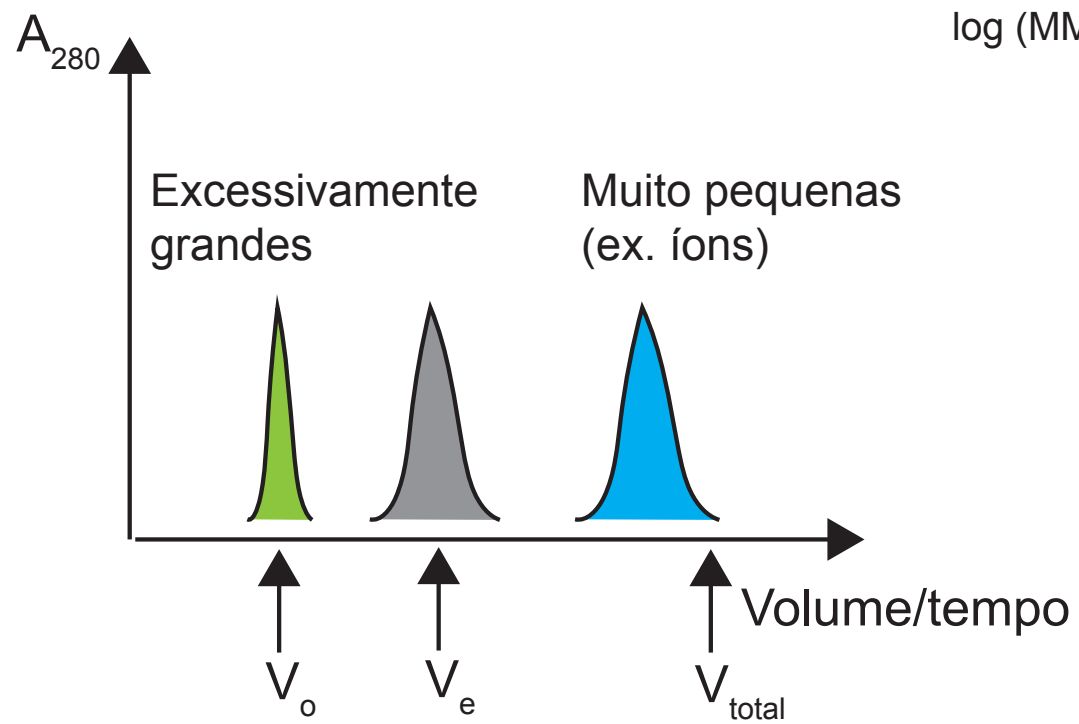
Sephacryl 200, Sephacryl 300



Cytiva Handbook



Determinação da massa molar (raio hidrodinâmico)



Resumo

- Métodos de purificação dependem das características físico-químicas das enzimas, e da capacidade de interagir com ligantes
- Revisão da definição de pI
- Revisão da cromatografia de troca iônica
- Revisão sobre enzimas: sítio ativo e pH ótimo
- Determinação da massa de uma proteína por cromatografia de filtração em gel
- Bibliografia: livros de bioquímica (Lehninger, Voet), e *handbooks* da Cytiva

Simulador de purificação de proteínas: http://www.agbooth.com/pp_web/