

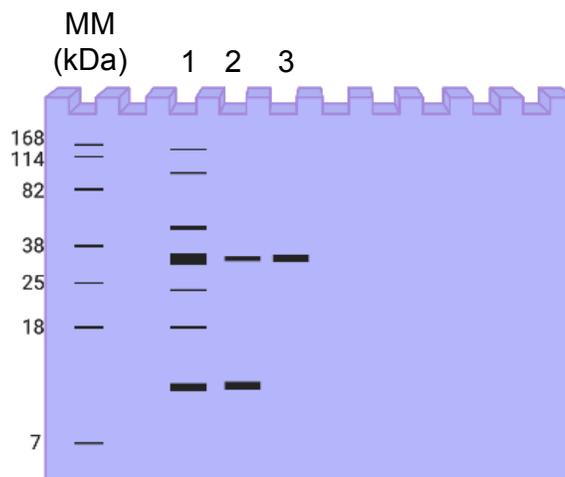
- 1) O que teria ocorrido se você tivesse purificado a alfa-glicosidase por cromatografia de troca iônica usando tampão acetato pH 5,0 ao invés de tampão fosfato pH 6,8? Por quê?
- 2) Você conseguiu purificar uma celulase em duas etapas de purificação:
  - a) Cromatografia de troca iônica em pH 10,0
  - b) Gel filtração em pH 6,0

Após cada etapa de purificação os tubos contendo atividade celulásica foram reunidos, e foi determinada a atividade celulásica total bem como a massa total de proteínas (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Atividade celulásica e massa total de proteínas obtidas em cada etapa de purificação.

Etapa	Atividade aplicada (U)	Atividade recuperada (U)	Proteína total aplicada (mg)	Proteína total recuperada (mg)
Troca iônica	500	100	1,0	0,05
Filtração em gel	100	80	0,05	0,02

As amostras purificadas foram aplicadas em um gel SDS-PAGE, corado com azul de Coomassie, e cujo resultado é mostrado abaixo. A amostra indicada por MM refere-se ao padrão de massa molar, "1" refere-se à amostra aplicada na coluna de troca iônica, "2" é a fração que eluiu da coluna de troca iônica, e "3" a fração separada por filtração em gel:



A coluna de gel filtração foi calibrada com um conjunto de amostras de massa molar conhecida, sendo que a única fração com atividade celulásica eluiu em 9,58 ml. O volume total da coluna era de 25 ml (Tabela 2).

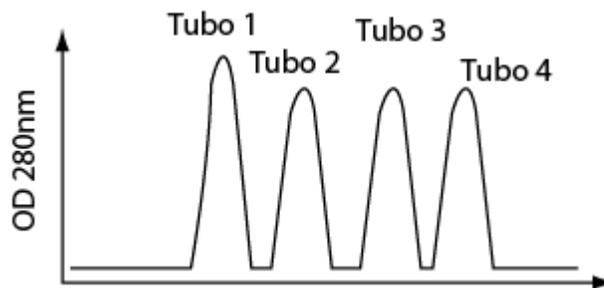
**Tabela 2.** Calibração da coluna de gel filtração. Volume total: 25 ml.

Amostra	Volume de eluição (ml)
Proteína padrão de 2000000 Da	7,53
Proteína padrão de 66000 Da	9,38
Proteína padrão de 45000 Da	10,46
Proteína padrão de 12400 Da	13,70

Proteína padrão de 6500 Da	16,22
Fração contendo atividade celulásica	9,58

Responda:

- Qual foi a recuperação da enzima após a etapa de cromatografia de troca iônica e de filtração em gel?
  - Qual é a atividade específica da enzima obtida após a cromatografia de troca iônica e de filtração em gel?
  - Qual das duas etapas foi melhor para purificar a enzima?
  - Com base nos dados de SDS-PAGE e de gel filtração, qual é a massa molar da enzima? O que explicaria a diferença entre os dados obtidos por SDS-PAGE e gel filtração?
- 3) Você recebeu uma amostra para análise. Nela havia diversas proteínas que precisavam ser separadas umas das outras. Numa primeira etapa, você utilizou uma coluna de gel filtração recomendada para proteínas de alto peso molecular (> 60 kDa) e obteve o seguinte perfil de eluição:



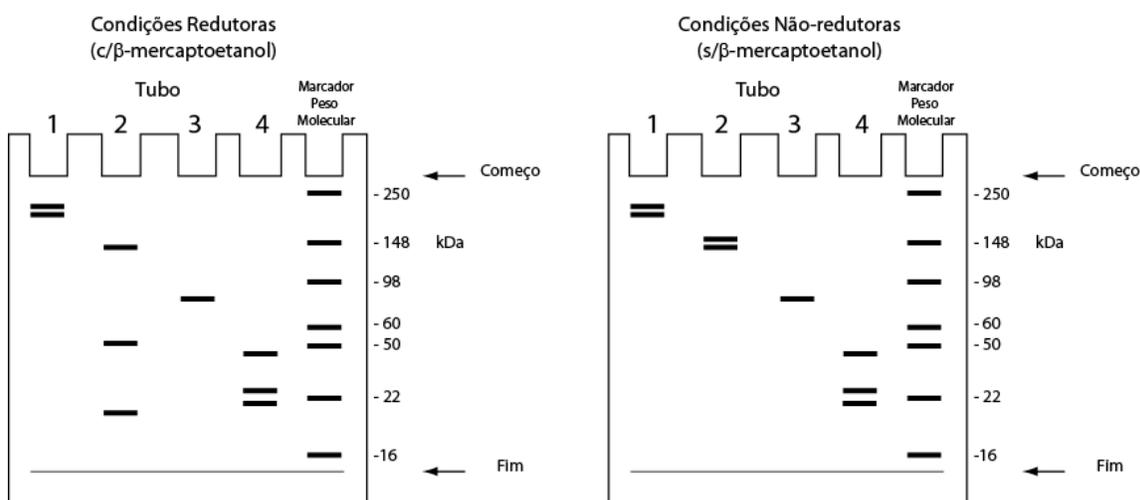
As proteínas separadas foram coletadas nos tubos 1, 2, 3 e 4 conforme indicado na figura. Os volumes aproximados de eluição para cada tubo foram:

- Tubo 1 – 10ml
- Tubo 2 – 11 ml
- Tubo 3 – 13 ml
- Tubo 4 – entre 14,5 e 15 ml

Os volumes aproximados das frações foram 0,5ml. Usando a mesma coluna e mesmas condições da corrida anterior você aplicou padrões para construir uma curva padrão da coluna de gel tendo obtido os seguintes resultados:

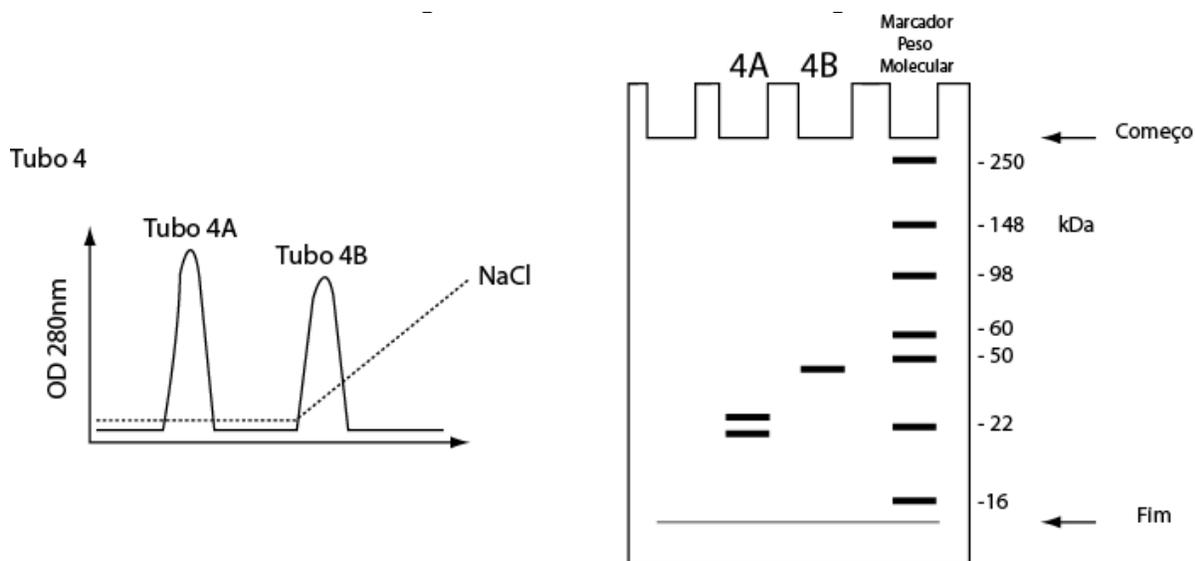
- Padrão de 2000 kDa – 7,3 ml
- Padrão de 250 kDa – 9,5 ml
- Padrão de 170 kDa – 11,0 ml
- Padrão de 65 kDa – 13,7 ml
- Padrão de 24 kDa – 16,2 ml
- Volume total da coluna – 25 ml

Os tubos marcados 1 a 4 foram analisados por SDS-PAGE em condições redutoras e não-redutoras:



**Figura** - Eletroforese de SDS-PAGE em condições redutoras (c/β-mercaptoetanol) e não redutoras das proteínas contidas nos tubos 1, 2, 3 e 4. No último poço, encontram-se os padrões de pesos moleculares.

Após analisar os dados você resolveu submeter a amostra do tubo 4 a uma cromatografia de troca de ânions (-) em pH 7, seguida de um experimento de SDS-PAGE com as frações obtidas. Os resultados da cromatografia e da eletroforese estão nas figuras abaixo:



**Figura** - Cromatografia de troca de ânions das proteínas no tubo 4 e eletroforese das proteínas presentes nos tubos 4A e 4B.

Você, finalmente, se deu por satisfeito. De acordo com as informações acima responda:

- Qual é a massa molar de cada uma das proteínas presentes na amostra, quais eram constituídas de mais de uma subunidade e qual era a massa molar de cada subunidade?
- Qual é o pI aproximado da proteína no tubo 4?