

Gabarito: Questões – Aula prática 3

1) A maior precipitação ocorreu em temperatura ambiente, concentração de 5% da solução de leite em pó e centrifugado. com o menor pH no valor de 3,7, que estava presente na amostra 5.

2) Sim, é possível estimar o peso molecular dessa proteína, ao comparar o resultado da eletroforese da amostra com maior volume de precipitado com proteínas padrão de peso molecular conhecido. O peso molecular dessa proteína é o mesmo da indicada no resultado da eletroforese para a solução de leite em pó bruta. Houve purificação eficiente dela.

3) De acordo com os valores de pI e do peso molar, a proteína purificada a partir da solução de leite em pó é a Caseína de peso molecular 20,0 - 23,0, principal proteína do leite bovino.

4) Dada a proximidade dos valores de pI da albumina e da caseína: 4,8 e 4,7 respectivamente, esse método não seria eficaz. Porém, se a amostra fosse contaminada com hemoglobina, este método poderia ser utilizado para purificação, uma vez que seu pI equivale a 7,1.

5) Eletroforese é um método de purificação de proteínas, baseado em seus diferentes deslocamentos - ao serem submetidas a um campo elétrico-, sendo especialmente útil como método para determinação de proteínas. No gel de corrida as proteínas mais leves e de menores tamanho para se movem mais rapidamente através de seus poros, separando as proteínas em função de seu peso molecular. O gel de empilhamento serve para compactar as proteínas em uma faixa estreita (poços) para então começar o processo de eletroforese. O SDS é um detergente aplicado para desnaturar as proteínas e atribuir a todas elas carga negativa, fazendo com que sua mobilidade seja função da massa molecular apenas, já que agora a carga é proporcional ao tamanho da molécula.

6)

1. Em um tampão com pH 4,0:

- A proteína com pI 4,0 estará próxima da sua carga nula e não migrará significativamente.
- A proteína com pI 7,0 terá uma carga negativa e migrará em direção ao ânodo.
- A proteína com pI 11,0 estará muito longe do seu ponto isoelétrico (pI) e também terá uma carga negativa, migrando em direção ao ânodo.

2. Em um tampão com pH 7,0:

- A proteína com pI 4,0 estará abaixo do seu pI e terá uma carga positiva, migrando em direção ao cátodo.
- A proteína com pI 7,0 estará no seu pI e não migrará.
- A proteína com pI 11,0 estará acima do seu pI e terá uma carga negativa, migrando em direção ao ânodo.

3. Em um tampão com pH 11,0:

- A proteína com pI 4,0 estará muito abaixo do seu pI e terá uma carga positiva, migrando em direção ao cátodo.
- A proteína com pI 7,0 estará abaixo do seu pI e também terá uma carga positiva, migrando em direção ao cátodo.
- A proteína com pI 11,0 estará próxima do seu pI e não migrará.

7) A corresponde a ProC, pois há uma diferença total de cargas de +2 com a troca do glutamato (NH_3^+ , COO^- , $\text{COO}^- \rightarrow -1$) por lisina (NH_3^+ , NH_3^+ , $\text{COO}^- \rightarrow +1$), logo é a que está mais próxima do polo negativo. B corresponde a ProS, pois há uma diferença total de cargas de +1 com a troca do glutamato (NH_3^+ , COO^- , $\text{COO}^- \rightarrow -1$) por valina (NH_3^+ , $\text{COO}^- \rightarrow 0$), logo possui posição intermediária entre o meio e o polo negativo. C corresponde a ProJ, pois há uma diferença total de cargas de -1 com a troca de glicina (NH_3^+ , $\text{COO}^- \rightarrow 0$) por aspartato (NH_3^+ , COO^- , $\text{COO}^- \rightarrow -1$), logo possui posição intermediária entre o meio e o polo positivo. D corresponde a ProN, pois há uma diferença total de cargas de -2 com a troca de lisina (NH_3^+ , NH_3^+ , $\text{COO}^- \rightarrow +1$) por glutamato (NH_3^+ , COO^- , $\text{COO}^- \rightarrow -1$), logo é a que está mais próxima do polo positivo.

Obs: entre parênteses estão os grupos ionizados dos aminoácidos a pH 8,6 e carga que esses grupos conferiam à proteína.

8) Para determinar a massa aparente de uma proteína com motilidade de 0,72 em um gel de poliacrilamida com SDS, você pode usar a seguinte fórmula:

$$\text{Massa aparente (kDa)} = (\text{Massa padrão kDa}) * (\text{Motilidade da proteína alvo}) / (\text{Motilidade do padrão})$$

Neste caso, você tem duas proteínas padrão:

Proteína padrão com 40 kDa e motilidade relativa de 0,92.

Proteína padrão com 90 kDa e motilidade relativa de 0,54.

Você deseja determinar a massa aparente de uma proteína com motilidade de 0,72. Use a fórmula para calcular:

$$\text{Massa aparente} = (\text{Massa do padrão}) * (\text{Motilidade da proteína alvo}) / (\text{Motilidade do padrão})$$

$$\text{Massa aparente} = (40 \text{ kDa}) * (0,72) / (0,92)$$

Agora, calcule:

$$\text{Massa aparente} = (40 \text{ kDa}) * (0,72) / (0,92) \approx 31,52 \text{ kDa}$$

Portanto, a massa aparente da proteína alvo com motilidade de 0,72 no gel de poliacrilamida com SDS é aproximadamente 31,52 kDa.

9) Existem vários métodos que permitem a separação de proteínas distintas de acordo com as massas aparentes. Na cromatografia em coluna de gel de filtração a proteína de maior peso molecular é a primeira a ser eluída pois o gel utilizado é a fase estacionária, em que as macromoléculas carregadas pela fase móvel penetram. As proteínas de maior peso molecular penetra menos na matriz e portanto é mais facilmente eluída, enquanto que a de menor peso molecular penetra na matriz de modo efetivo e é portanto separada com dificuldade. No SDS PAGE temos que a proteína de menor peso molecular percorre mais o gel que sua contraparte, pois é **menos** restrita pelo gel, que atua de peneira molecular, ao invés de ser **mais** restrita como no caso anterior; na eletroforese, o baixo peso molecular gera maior velocidade de deslizamento por haver menos interação com a matriz.

O primeiro método, a cromatografia, é mais utilizado na separação quantitativa e purificação de proteínas, enquanto a eletroforese é mais utilizada para o mapeamento de DNA.