

Aula de Bioquímica I

Tema:

Purificação de Proteínas

Prof. Dr. Júlio César Borges

Depto. de Química e Física Molecular – DQFM

Instituto de Química de São Carlos – IQSC

Universidade de São Paulo – USP

E-mail: borgesjc@iqsc.usp.br

Proteínas: Isolamento e Purificação

Estudos e aplicações biotecnológicas de proteínas → Amostras Puras

Proteínas → Diferentes propriedades = Diferentes formas de isolamento

Considerações Gerais:

Qual é o uso da Proteína?

Qual é o material de partida?

O que deve ser removido da solução?

Quais as condições iniciais da solução?

Qual é a estabilidade da proteína?

Qual é a escala de purificação?

Qual é o custo econômico para a purificação?

Etc...

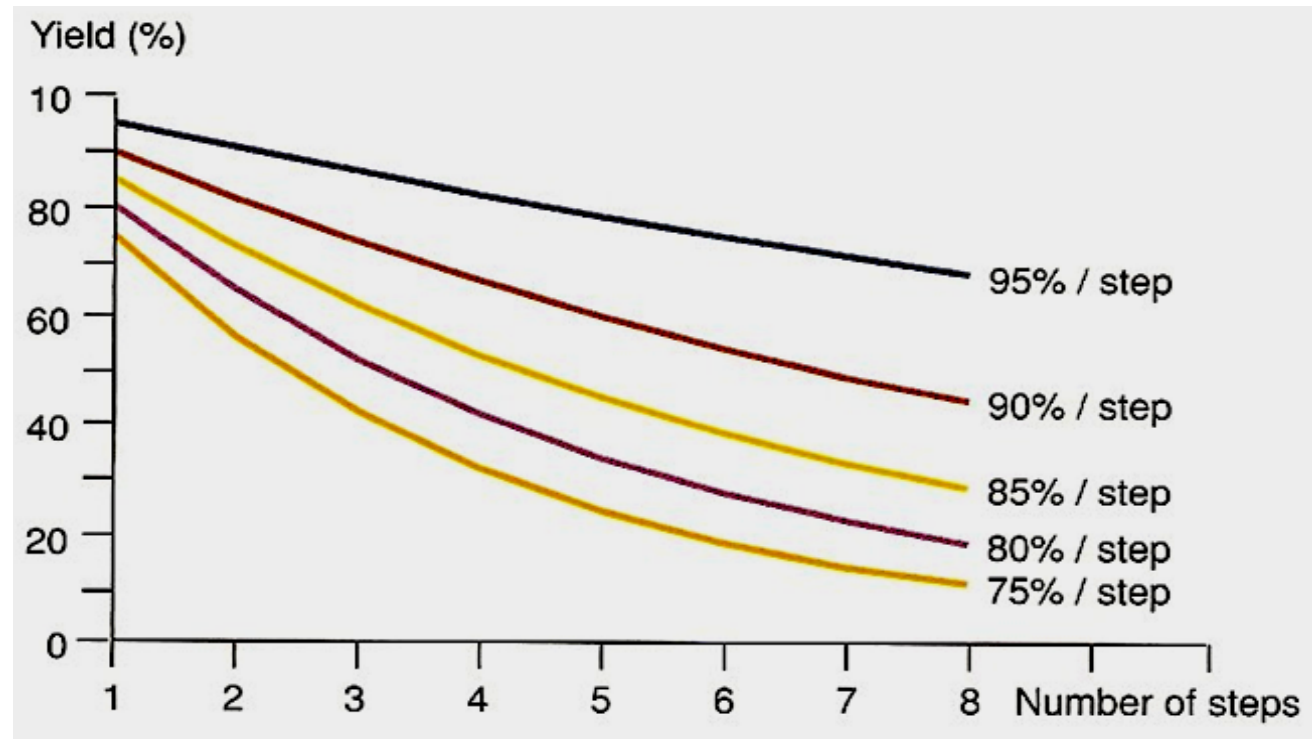
Proteínas: Isolamento e Purificação

A purificação de proteínas pode ser feita por uma série de etapas e técnicas cromatográficas diferentes que devem obedecer uma sequência lógica.

Preparação, Captura, Transferência, Acondicionamento, etc

**Múltiplas etapas ocasiona perdas inerentes de amostras:
Rendimento**

→ Uma purificação eficiente deve ser feita com o mínimo de passos possíveis considerando o uso da proteína e o custo.



Proteínas: Isolamento e Purificação

Fatores a considerar:

1) Objetivo para pureza

2) Quantidade e Rendimento

3) Manutenção da estrutura

4) Atividade biológica

5) Custo para o processo

6) Tempo

→ Obter o máximo de informações sobre as propriedades da proteína alvo e dos contaminantes.

→ Atividade;

→ *Massa Molecular*;

→ **Constituição de Aminoácidos**

→ pI teórico;

→ **Coefficiente de absorvidade molar**

→ Estabilidade;

→ Estado oligomérico;

→ Etc.

**Estrutura Primária
(cDNA → tradução)**

→ **ProtParam Toll**

→ **Sednterp**

Purificação: Combinação de técnicas que exploram as diferentes propriedades da proteína-alvo para isolá-la das demais.

Proteínas: Isolamento e Purificação

ANTES DE COMEÇAR!!!

1) Definir objetivos

→ Pureza *versus* uso da proteína alvo

→ Pureza *versus* custo

→ Pureza *versus* tempo

→ Qualidade final da amostra *versus* custo/tempo

Purity requirement examples are shown below.

Extremely high > 99%	Therapeutic use, <i>in vivo</i> studies
High 95- 99 %	X-ray crystallography and most physico-chemical characterisation methods
Moderate < 95 %	Antigen for antibody production N-terminal sequencing

“Over-purification *versus* under-purification”

Proteínas: Isolamento e Purificação

2) Definir propriedades do alvo e dos contaminantes

Tais informações guiarão a estratégia a ser montada para atingir os objetivos definidos.

→ **Contaminantes**
“chave”: eliminá-los
primeiro!!!

Sample and target protein properties	Influence on purification strategy
Temperature stability	Need to work rapidly at lowered temperature
pH stability	Selection of buffers for extraction and purification Selection of conditions for ion exchange, affinity or reversed phase chromatography
Organic solvents stability	Selection of conditions for reversed phase chromatography
Detergent requirement	Consider effects on chromatographic steps and the need for detergent removal. Consider choice of detergent.
Salt (ionic strength)	Selection of conditions for precipitation techniques, ion exchange and hydrophobic interaction chromatography
Co-factors for stability or activity	Selection of additives, pH, salts, buffers
Protease sensitivity	Need for fast removal of proteases or addition of inhibitors
Sensitivity to metal ions	Need to add EDTA or EGTA to buffers
Redox sensitivity	Need to add reducing agents
Molecular weight	Selection of gel filtration media
Charge properties	Selection of ion exchange conditions
Biospecific affinity	Selection of ligand for affinity medium
Post translational modifications	Selection of group-specific affinity medium
Hydrophobicity	Selection of medium for hydrophobic interaction chromatography

Proteínas: Isolamento e Purificação

3) Testes de avaliação e/ou acompanhamento do processo

→ Dependem dos objetivos estabelecidos

1) Testes de atividade biológica

- Teste enzimático, interação com ligantes, etc

2) Testes para avaliar a pureza

- Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS

3) Testes de quantificação

- Depende da origem da proteína

4) Testes para os contaminantes “chave”

- Idem anteriores

5) Testes estruturais

- Dicroísmo circular, fluorescência, etc.

Proteínas: Isolamento e Purificação

Estratégia de 3 fases de purificação.

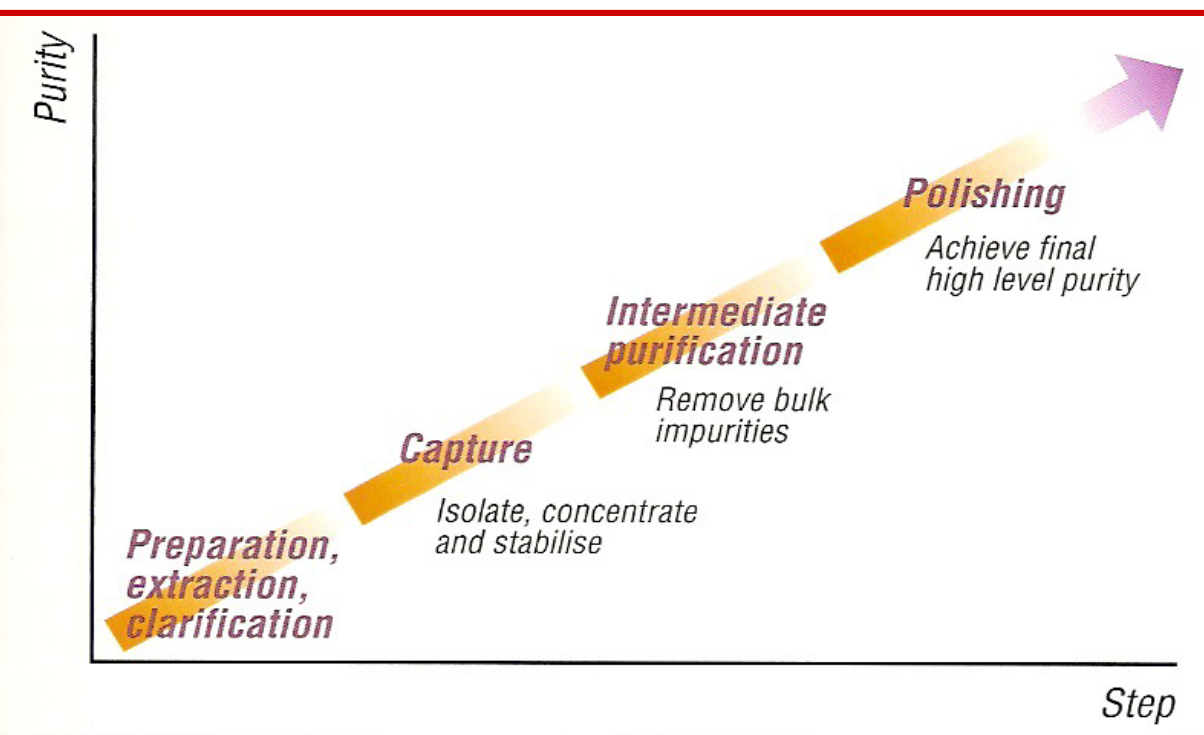
Definir objetivos para cada fase!!

→ DEPENDE DAS PROPRIEDADES DO MATERIAL!!!

Captura: isolar, concentrar e estabilizar a proteína alvo

Purificação intermediária: retirar a maior parte das impurezas

Polimento: remover traços de contaminantes



Alta Pureza!

Rapidez!

Baixo Custo!

OBS: Minimizar ao máximo o manuseio da amostra entre as fases!!!!

Proteínas: Isolamento e Purificação

Captura

- **Objetivo: Isolar, concentrar e manter atividade**
- **Principais técnicas cromatográficas: Troca Iônica e Afinidade**
 - **Resinas de alta Capacidade**
- **Separar de contaminantes críticos: DNA, proteases, etc**

Purificação intermediária

- **Objetivo: retirar a maior parte das impurezas**
- Separar contaminantes de propriedades similares**

Usar técnicas complementares: Troca iônica, afinidade ou interação hidrofóbica

Polimento

- **Objetivo: aumentar a pureza e preparar para armazenamento**
- Obs: sacrifica e dilui a amostra**
- Principal técnica: Filtração em Gel – CEM**

Proteínas: Isolamento e Purificação

INÍCIO

PREPARAÇÃO - EXTRAÇÃO - CLARIFICAÇÃO

→ Isolamento inicial da amostra protéica do material de origem;

→ Lise das células/tecido de origem:

- Lise por Sonicação

- Lise por pressão

- Trituração do tecido

→ Preparação da amostra para as etapas cromatográficas:

1) Adição de aditivos (Detergentes);

2) Ajuste do pH da amostra;

3) Adição de Sais;

4) Centrifugações;

5) Filtrações;

6) Diálises;

7) Etc...

Proteínas: Metodologias de Isolamento

CLARIFICAÇÃO

Centrifugação, Filtração, ultrafiltração e Gel filtração
Ultracentrifugação

Precipitação em sulfato de amônio

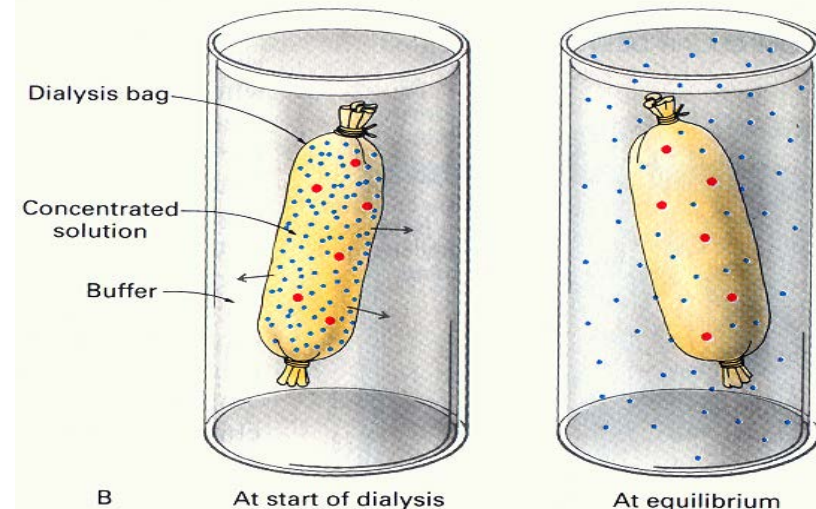
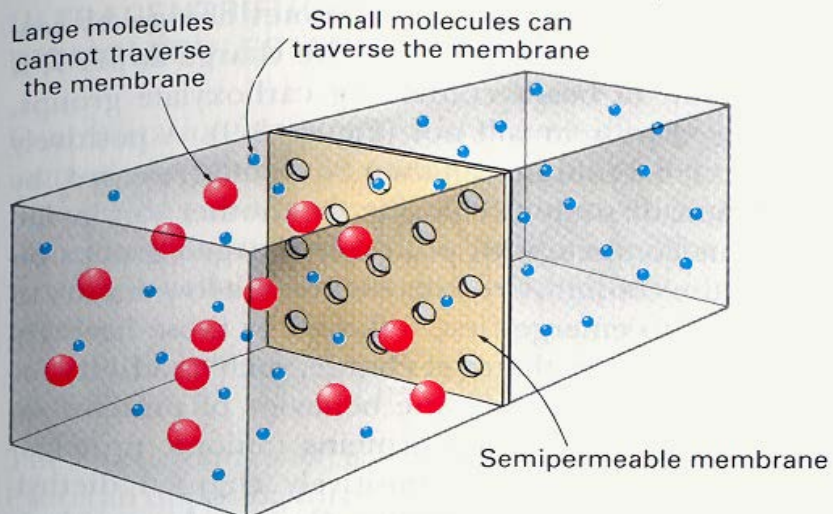
“Salting out” → estrutura da água

Diálise

Separação pela M

Preparação da amostra para etapas subsequentes

→ Somente se necessário

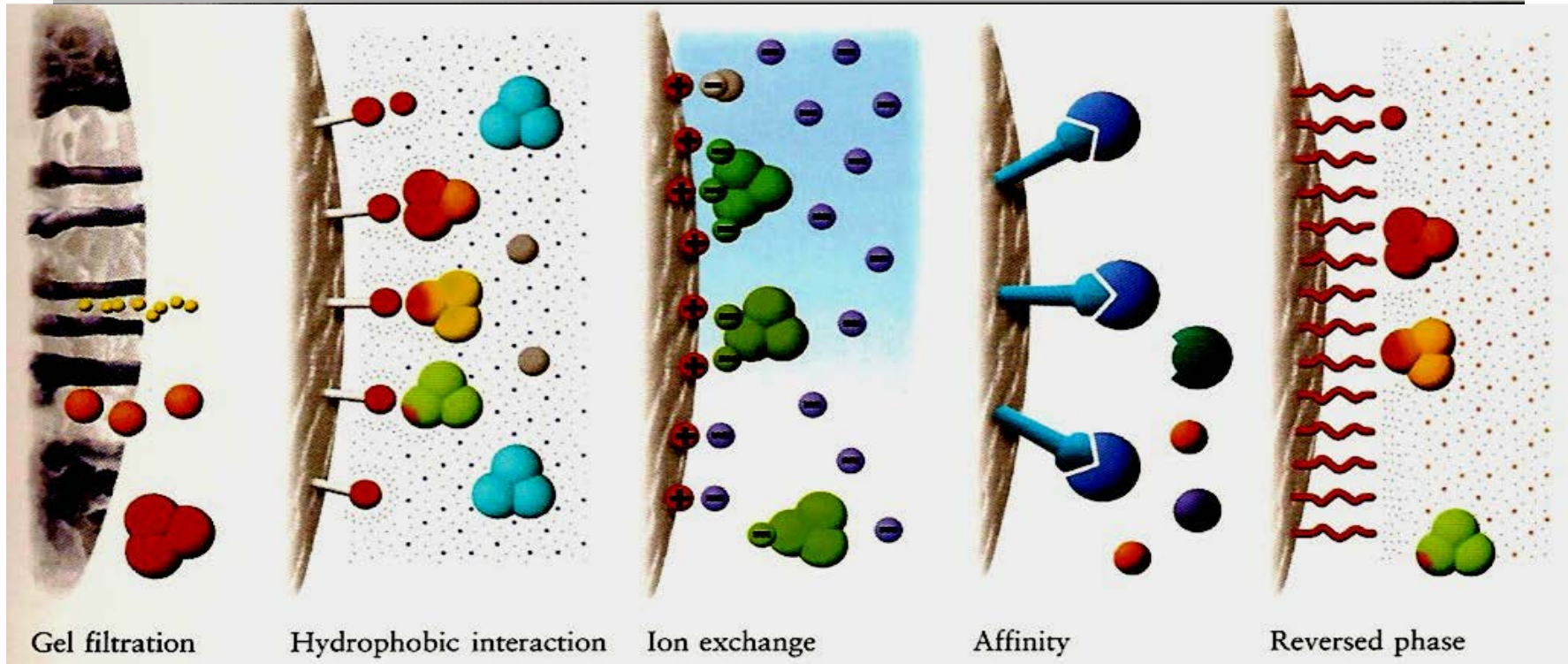


Proteínas: Isolamento e purificação

Métodos Cromatográficos → **Separação por características:**

Tamanho, solubilidade, carga e afinidade.

Property	Technique
Biorecognition (ligand specificity)	Affinity chromatography
Charge	Ion exchange chromatography
Size	Gel filtration (sometimes called size exclusion)
Hydrophobicity	Hydrophobic interaction chromatography Reversed phase chromatography

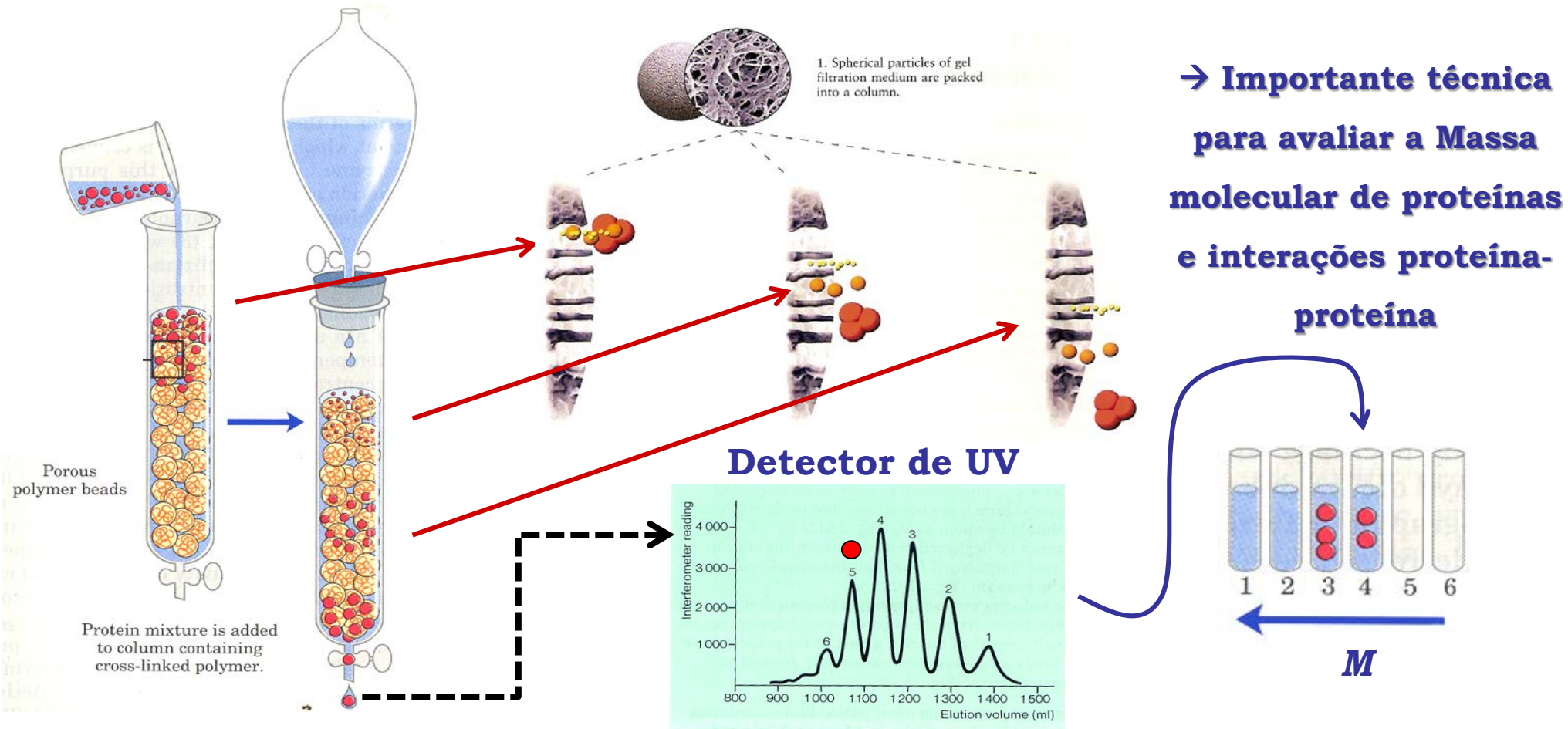


Proteínas: Metodologias de Purificação

Cromatografia de exclusão molecular

Separação pela Massa Molecular

Proteínas maiores eluem primeiro → Menor caminho a percorrer



Proteínas: Metodologias de Purificação

Cromatografia por troca iônica

Alta resolução e capacidade

Interação reversível entre proteínas com cargas opostas à da resina

→ Importante técnica de caracterização e quantificação de proteínas e peptídeos

Depende do *pI* da proteína alvo e do *pH* da solução

Troca aniônica
Resina Catiônica

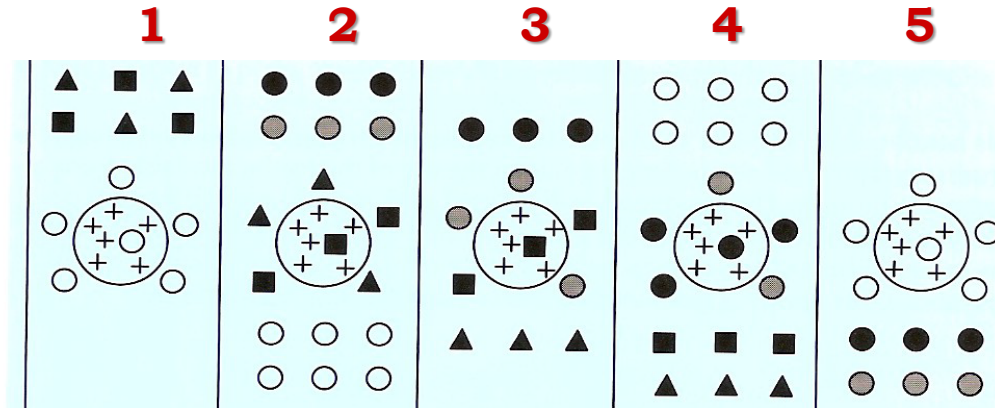


Troca catiônica
Resina Aniônica

Separação por aumento da [Sal] ou por mudanças no pH

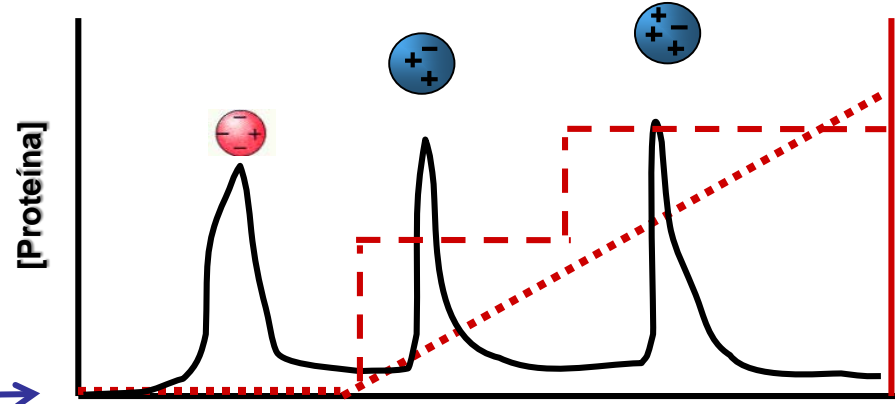
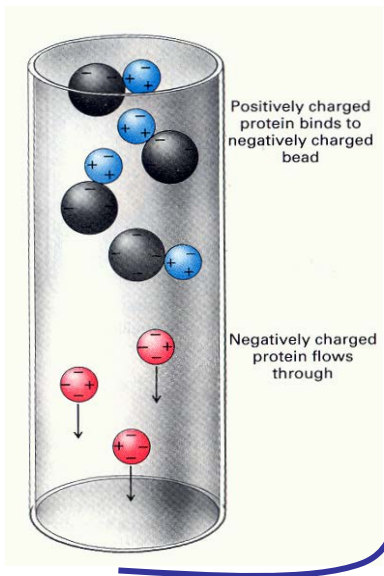
Proteínas: Metodologias de Purificação

Cromatografia por troca iônica

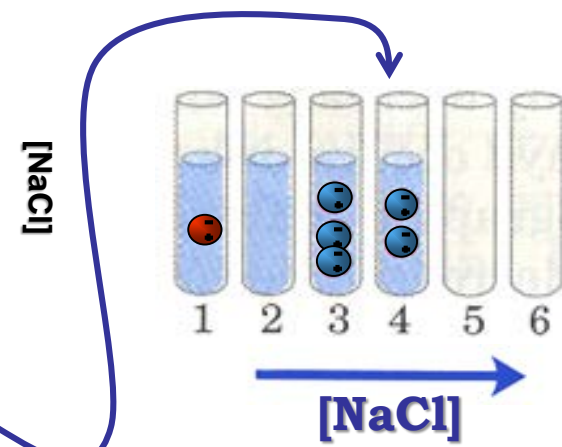


- 1 = Condições iniciais**
- 2 = Adsorção**
- 3 = Início da Eluição**
- 4 = Término da Eluição**
- 5 = Regeneração**

○ Starting buffer counter-ions
 ■ Substances to be separated
 ● Gradient ions



Cromatograma

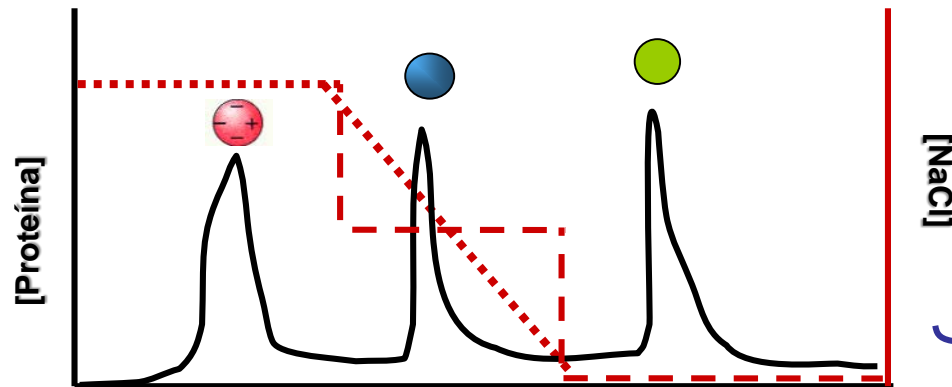
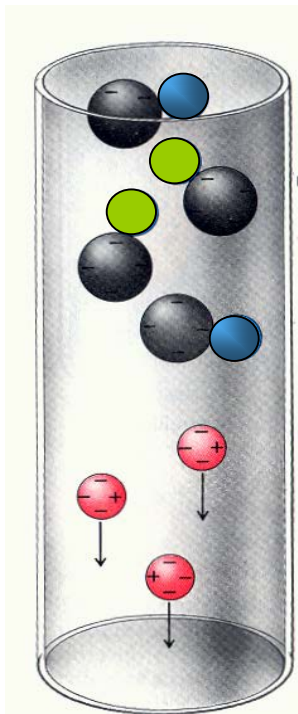


Proteínas: Metodologias de Purificação

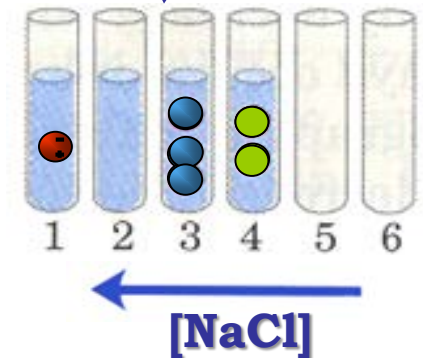
Cromatografia por interação hidrofóbica

Alta resolução e capacidade

Interação reversível entre proteínas hidrofóbicas com a resina hidrofóbica



Separação por diminuição da [Sal] ou por mudanças no pH, temperatura

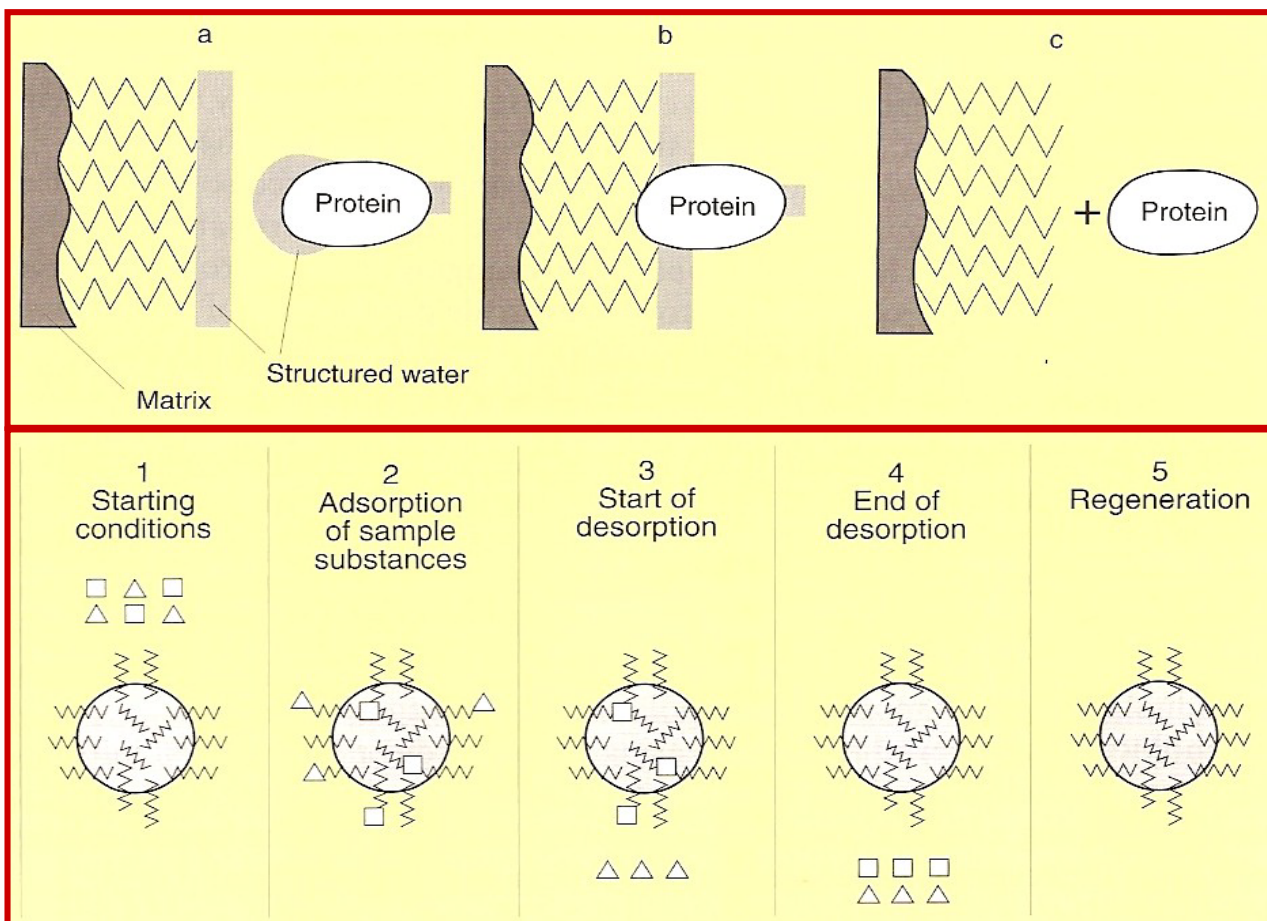


Proteínas: Metodologias de Purificação

Cromatografia por Fase Reversa

Alta resolução e capacidade

Interação reversível entre proteínas hidrofóbicas com a resina hidrofóbica

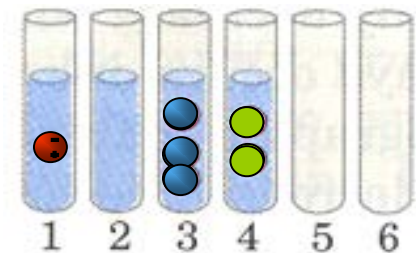
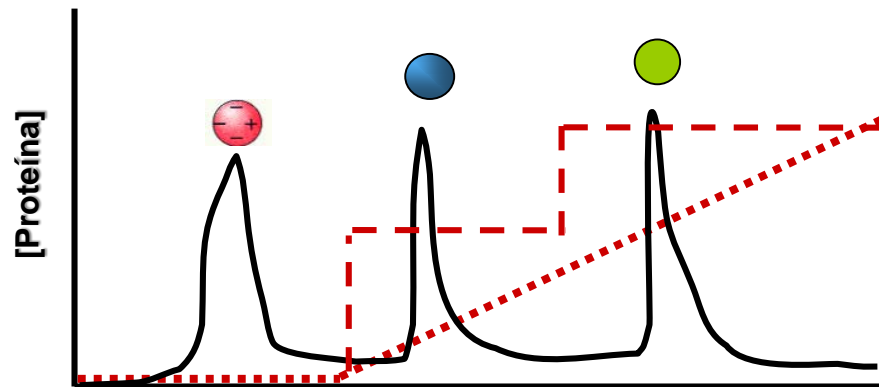
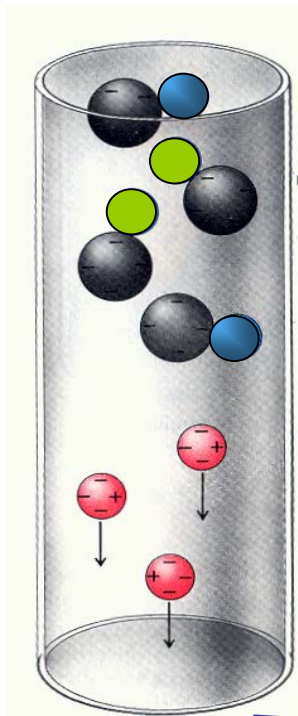


Proteínas: Metodologias de Purificação

Cromatografia por Fase Reversa

Eluição por solvente orgânico → Pode desnaturar a proteína

- Comprometimento da Estrutura 3D

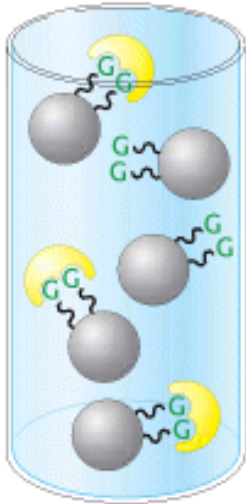


→
[Solvente Orgânico]

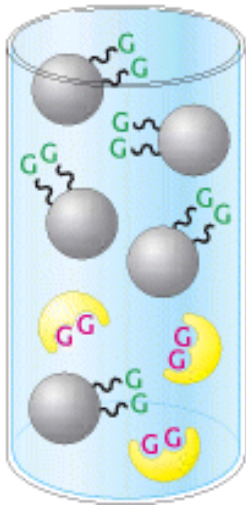
Proteínas: Metodologias de Purificação

Cromatografia de afinidade

Glucose-binding protein attaches to glucose residues (G) on beads



Addition of glucose (G)

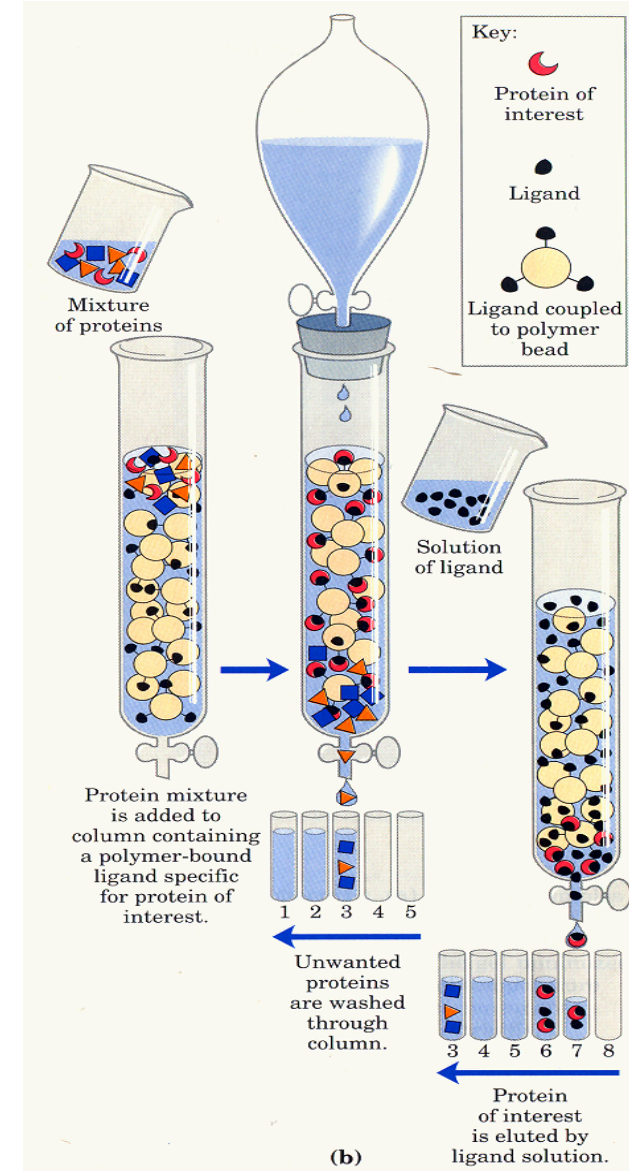


Glucose-binding proteins are released on addition of glucose

→ **Importante técnica em Tecnologia de DNA Recombinante**

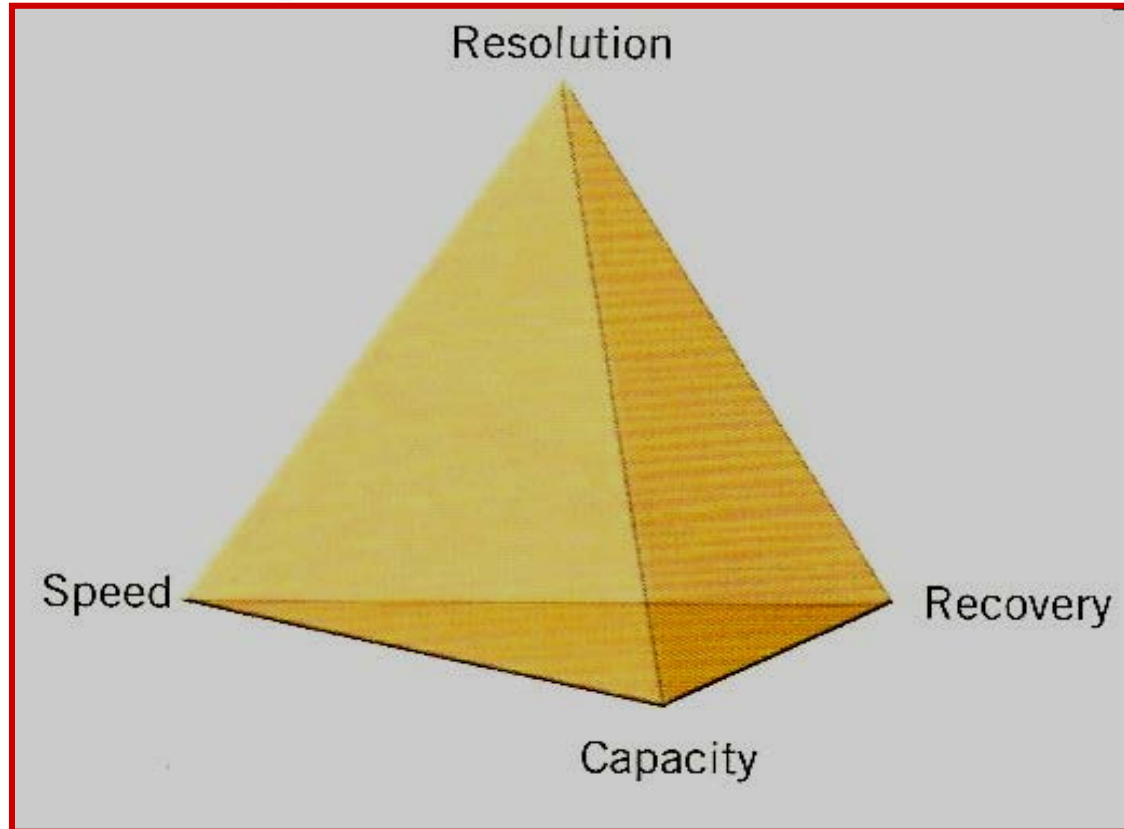
- Isolamento de mRNAs
- Isolamento de proteínas recombinantes

→ **Perfil de eluição similar à Troca Iônica**



Proteínas: Isolamento e Purificação

Técnicas de purificação oferecem um balanço entre:



As técnicas escolhidas devem suprir os objetivos definidos e as propriedades da proteína alvo

A Ordem dos “fatores” influencia o resultado

Captura → Capacidade, Velocidade e Recuperação

Purificação intermediária → Capacidade e Resolução

Polimento → Resolução e Recuperação

- Capacidade
- Velocidade
- Recuperação
- Resolução

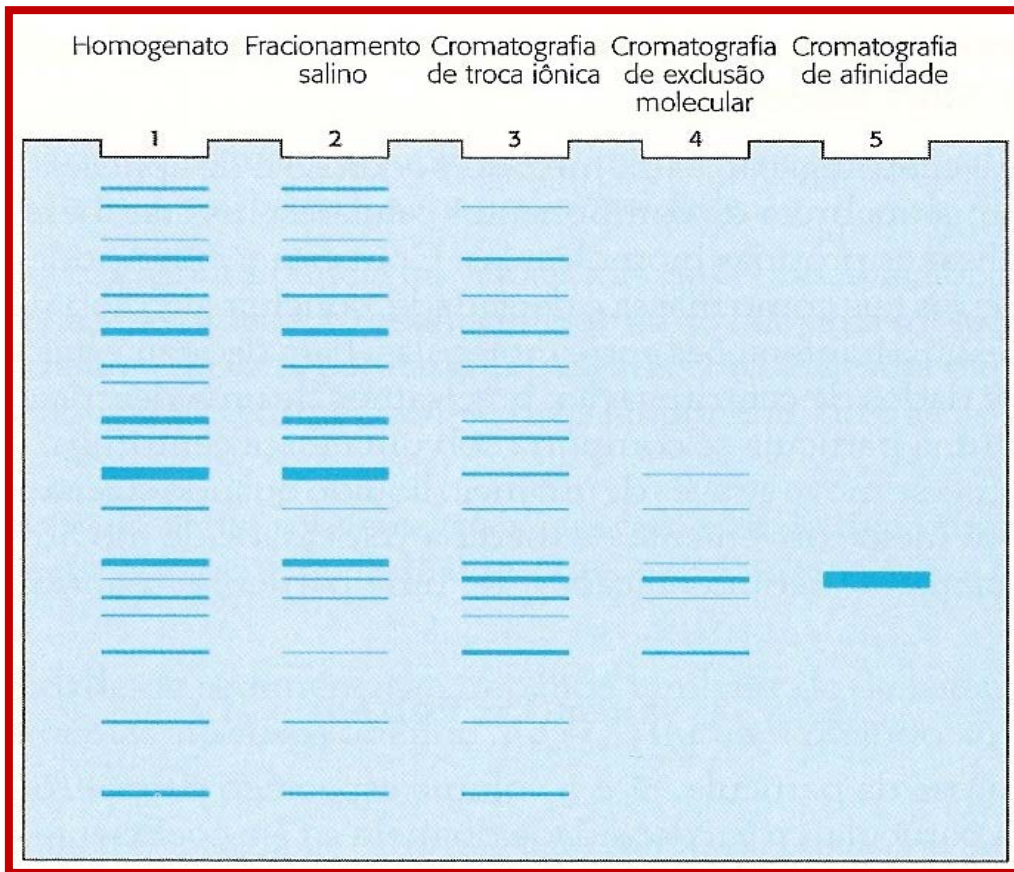
Proteínas: Metodologias de Purificação

Comparativo das técnicas cromatográficas *versus* Etapa

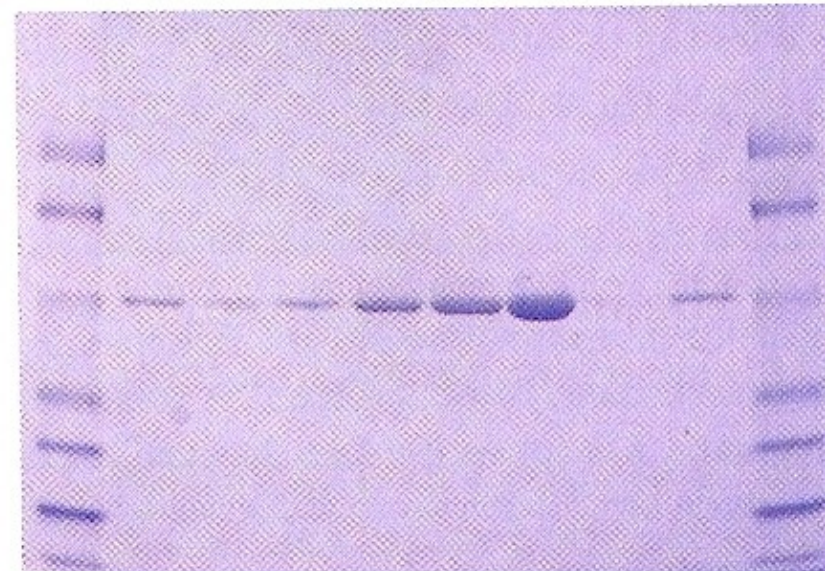
Técnica	Principais Vantagens	Captura	Pur. Intermediária	Polimento	Condição da Amostra	
					Início	Final
Troca Iônica	Capacidade Velocidade Resolução	★★★★	★★★★	★★★★	Baixa [Sal]; Sem limite de volume	Alta [Sal] ou mudança de pH; Amostra concentrada
HIC	Resolução, Capacidade Velocidade	★★★	★★★★	★	Alta [Sal]; Sem limite de volume	Baixa [sal]; Amostra Concentrada
Afinidade	Capacidade Velocidade Resolução	★★★★	★★★★	★★★	Condições específicas para a ligação; Sem limite de volume	Condições específicas – presença de competidor Amostra Concentrada
CEM	Resolução		★	★★★★	Fluxo e Volume inicial limitado (< 5% VC)	Amostra diluída
Fase Reversa	Resolução		★	★★★★	Requer Solvente Orgânico	Presença de solvente orgânico – Atividade biológica comprometida Amostra Concentrada

Proteínas: Isolamento e caracterização

A Eletroforese em gel de poli-acrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) é o principal método de acompanhamento do processo de Purificação e avaliação do grau de pureza.



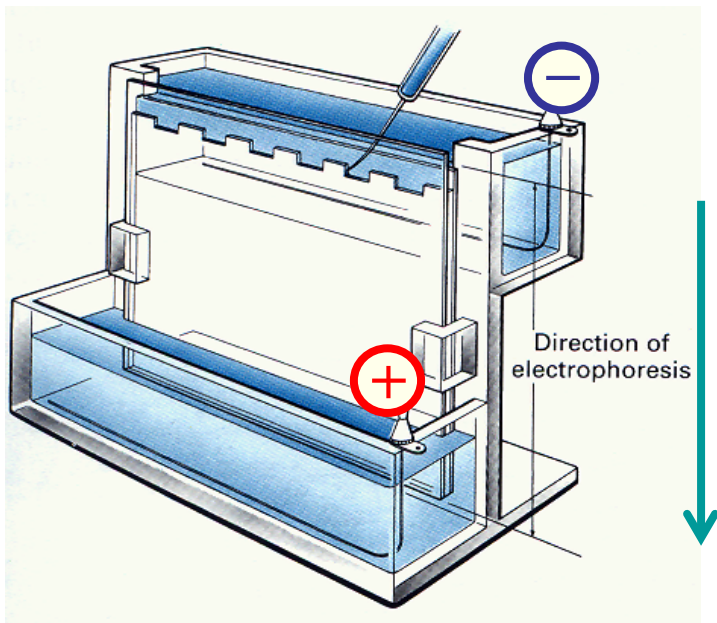
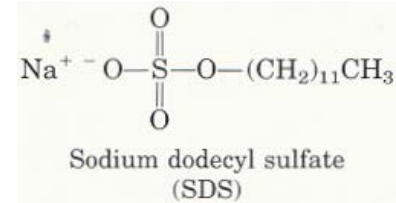
Pode requerer concentração da amostra para avaliar o grau de pureza



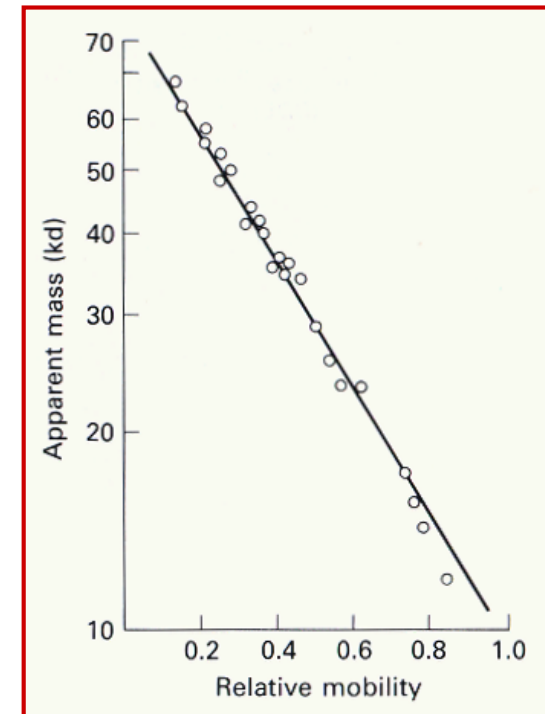
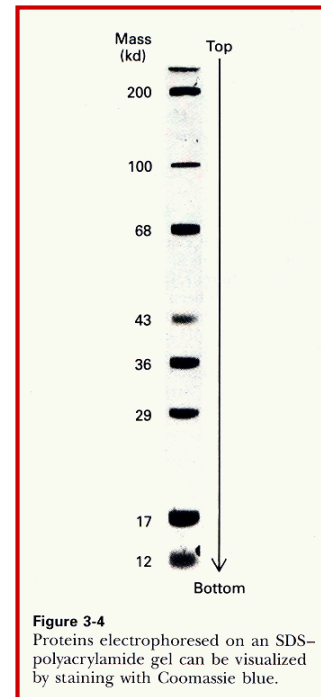
Proteínas: Isolamento e caracterização

SDS-PAGE

Separação por Massa Molecular



Influência da Z/M e forma da partícula



Proteínas: Isolamento e Purificação

- 1) Defina claramente os objetivos;**
- 2) Avalie as propriedades da proteína alvo e contaminantes;**
- 3) Desenvolva métodos de avaliação da atividade ou da estrutura;**
- 4) Minimize o manuseio da amostra;**
- 5) Minimize o uso de aditivos;**
- 6) Remova agentes de degradação;**
- 7) Usar diferentes técnicas em cada etapa;**
- 8) Minimize o número de etapas;**
- 9) Robustez e Reprodutibilidade;**
- 10) Use uma combinação lógica de etapas.**

MANTENHA A SIMPLICIDADE!!!