



Cartilha

Eletroforese e Cromatografia de Proteínas

Cartilha

Eletroforese e Cromatografia de Proteínas

Pesquisadores: Sonia A. de Andrade Chudzinski, Gisele Picolo e Fernanda Portaro

Colaboradoras: Karina Grazielle Guimarães Cruz, Gloria Maria da Silva

Estudantes de pós-graduação em Toxinologia - Instituto Butantan:

Cristiane Ferreira Graça de Lima, Tereza Cristina Barbosa, Rosange-la Ap. dos Santos Passos, Camila Lima Neves, Rayssa Oliveira Araújo, Tiago Henrique Moretto Del Rei, Barbara Behr Martins, Wellington da Silva Santos

Apoio Pedagógico: Linda Bernardes

Coordenação: Sonia A. de Andrade Chudzinski

Realização: Instituto Butantan

Apoio: CENTD/FAPESP e Fundação Butantan

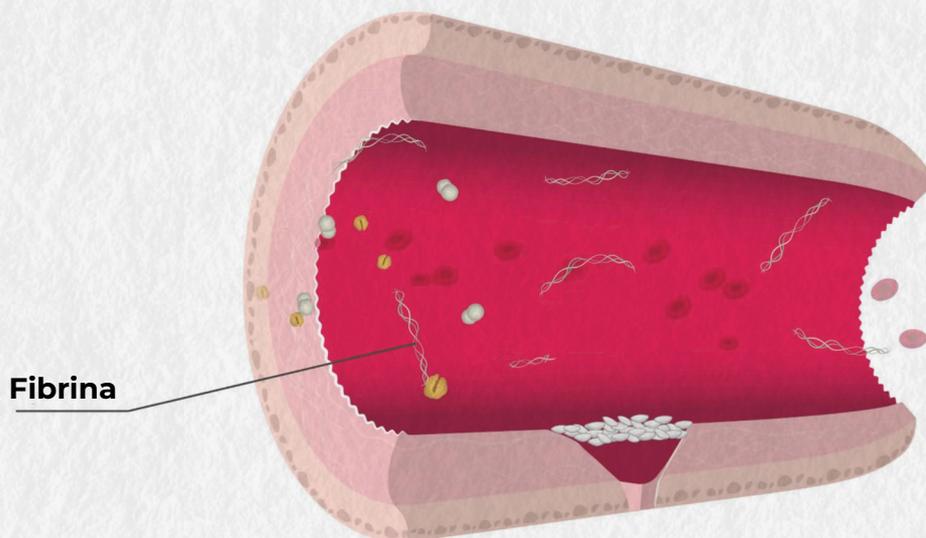


Sumário

- 04** Proteínas: o que são?
- 05** Objetivo da técnica
- 06** Como separar as proteínas por SDS-PAGE
- 07** Realização da eletroforese
- 08** Vantagens e desvantagens
- 09** Aplicações no dia a dia
- 10** Cromatografia
- 11** Tipos de cromatografia líquida
- 13** Atividades
- 17** Referências bibliográficas

Proteínas: o que são?

Proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes, ocorrendo em todas as células e em todas as partes das células. A partir desses blocos de construção, diferentes organismos podem gerar produtos tão diversos como enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, fibras musculares, proteínas das lentes dos olhos, penas, teias de aranha, chifres de rinocerontes, proteínas do leite, antibióticos, venenos de cogumelos e uma miríade de outras substâncias com atividades biológicas distintas.



Estas macromoléculas também constituem diferentes misturas. A massa seca do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, por exemplo, é constituída por cerca de 90% de proteínas.

E como as proteínas de uma mistura podem ser separadas?

As proteínas, biomoléculas formadas por aminoácidos e que tem carga total positiva ou negativa, podem ser separadas e caracterizadas por uma técnica denominada eletroforese.

Objetivo da técnica

Esta técnica se baseia na migração de proteínas carregadas em um campo elétrico.

As proteínas com carga total positiva migram para o polo negativo, enquanto aquelas com carga total negativa (cátodo) migram para o polo positivo (ânodo).

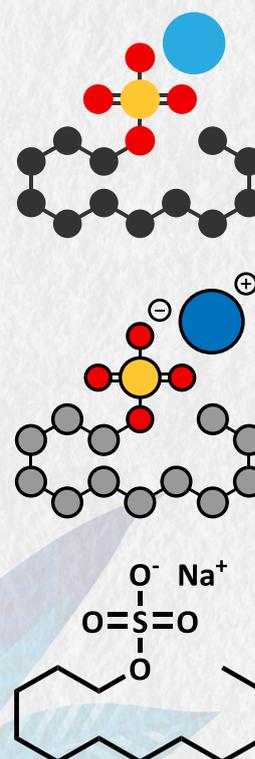
Em geral, a eletroforese de proteínas é realizada em géis compostos de polímeros reticulados de poli(acrilamida), que age como uma peneira molecular (ver vídeo), retardando a migração de proteínas aproximadamente em proporção à sua razão carga/massa.

Um método eletroforético comumente empregado para estimar a pureza e a massa molecular utiliza o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) (“dodecil” significa uma cadeia de 12 carbonos) e é chamado de SDS PAGE = eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS. O SDS liga-se às proteínas, deixando-as com carga total negativa e de forma proporcional a suas massas moleculares.

Assim, ao aplicarmos o campo elétrico, todas as proteínas com SDS irão migrar para o polo positivo e, então, as separaremos pela massa molecular. As proteínas menores migram mais rapidamente, enquanto as maiores têm menor velocidade de migração (mobilidade).

Após a separação por eletroforese, as proteínas são visualizadas pela adição de um corante, como o azul de Coomassie, que se liga a elas, mas não ao gel em si.

Em todo processo de eletroforese emprega-se uma solução-tampão apropriada, pois qualquer variação no pH pode alterar a carga da molécula e sua mobilidade.



Como separar as proteínas por SDS-PAGE?

Preparação da amostra

À amostra previamente aquecida, adiciona-se o SDS, um corante para visualização das proteínas, visto que o gel de poliacrilamida é incolor (figura 1) e um padrão de massa molecular é usado para a estimativa da massa das proteínas da mistura.

Aplicação das amostras

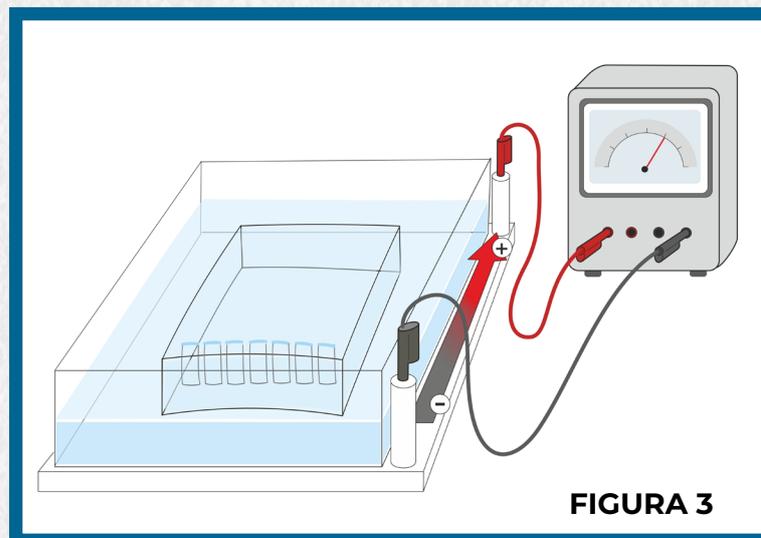
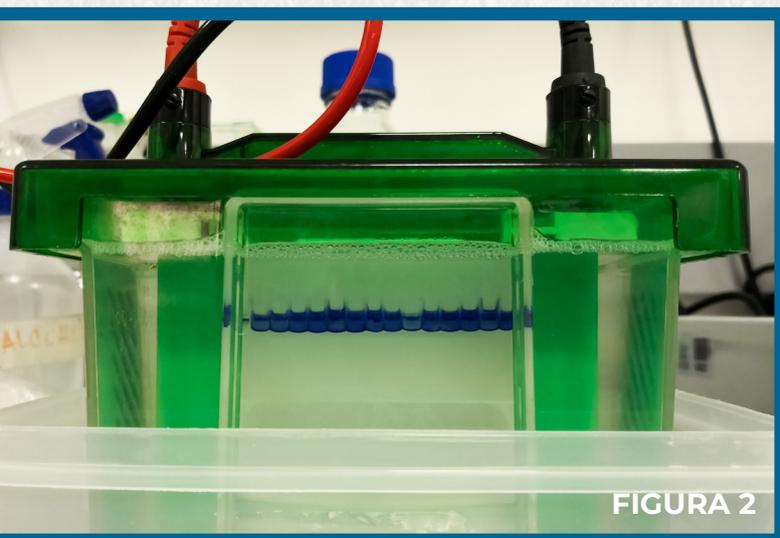
No primeiro poço sempre é aplicado este padrão de massa molecular e, em seguida, as amostras de estudo.



FIGURA 1

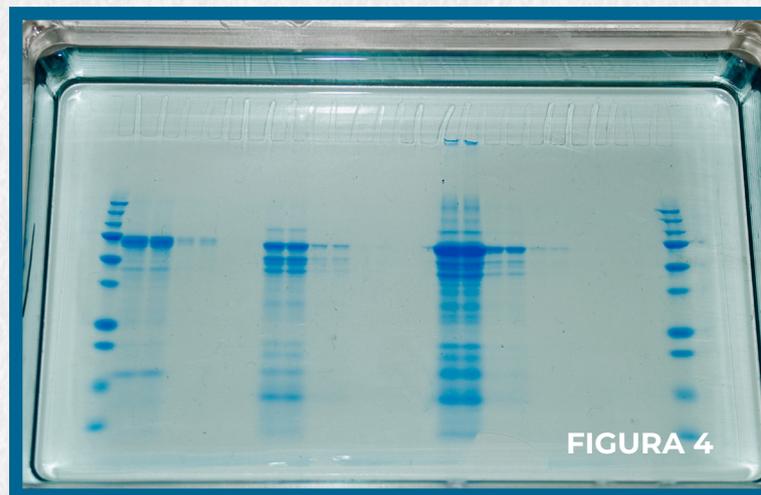
Realização da eletroforese

Após a aplicação das amostras, a cuba eletroforética deve ser fechada e um campo elétrico aplicado para que ocorra a migração e separação das proteínas (figura 2 e 3).



Visualização das proteínas

Após a eletroforese, o gel é colocado em uma solução, como de azul de Coomassie, uma substância química que se liga às proteínas de forma a permitir sua visualização (figura 4).



“Coomassie Blue ou Azul de Coomassie é uma substância química que se liga às proteínas de forma a permitir a visualização destas macromoléculas.”

Vantagens e desvantagens

Vantagens

- **Baixo custo** para desenvolvimento da técnica
- **Versatilidade** de aplicações
- **Facilidade** de execução
- **Precisão** de resultados

Desvantagens

- **Separa** as proteínas por suas diferenças, mas **não identifica** sem um método complementar
- **Não quantificável** sem um método complementar

Roteiro

Para um melhor entendimento, recomendamos este vídeo:

Eletroforese e Cromatografia de Proteínas



Escaneie o QR code!



Aplicações no dia a dia



Monitorar a expressão de proteínas recombinantes

Deteção de proteínas específicas (*western-blot*)

Há formas mais eficazes de
separar proteínas e determinar
suas massas moleculares?

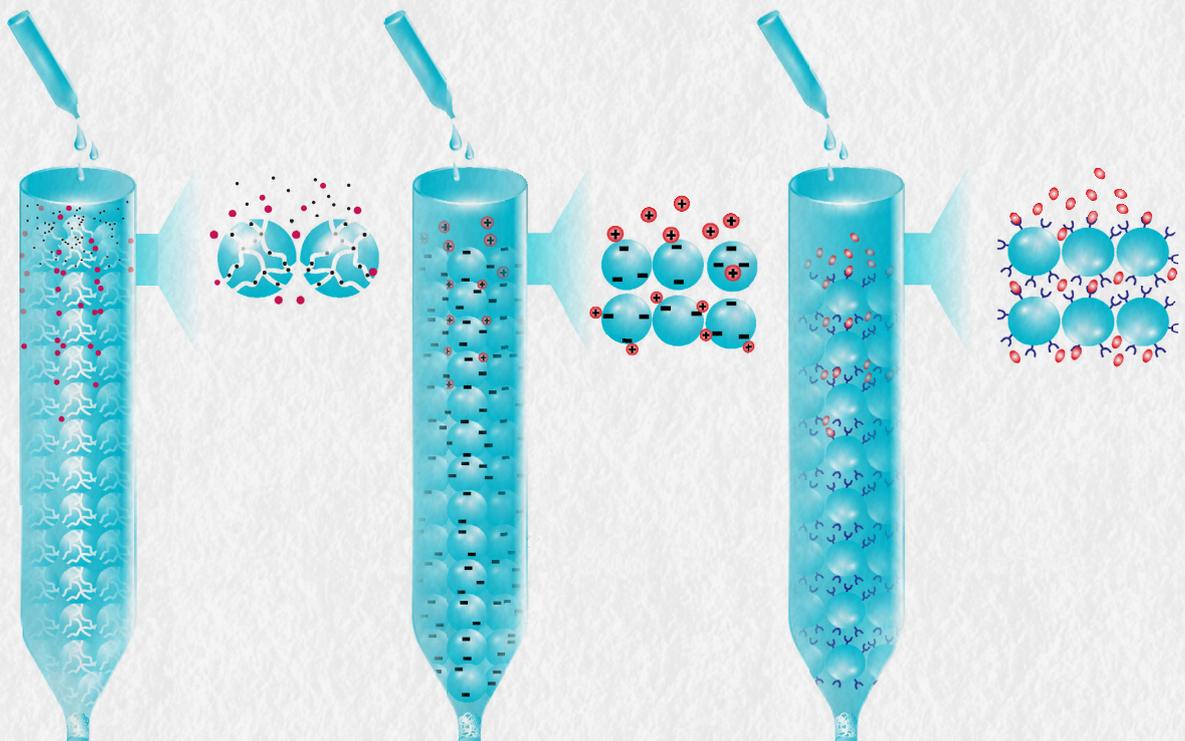


SIM!

Para saber mais, confira o próximo capítulo!

Cromatografia

O método de cromatografia é mais eficiente para separar proteínas e se baseia nas diferenças de tamanho, carga, afinidade de ligação e outras propriedades.



Princípio da técnica de cromatografia

Método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes.

Tipos de cromatografia líquida



Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular promove uma seletiva e dinâmica distribuição de moléculas do soluto entre duas fases líquidas separadas e dependentes de uma estrutura estacionária contendo poros de tamanho controlado.

Cromatografia de troca iônica

Na cromatografia de troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada, sendo que os solutos com sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel.

Os solutos adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos, por deslocamento com outros íons, com mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária.

Os diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador e os íons da fase móvel regem este tipo de cromatografia.

A separação de materiais por cromatografia por troca iônica está baseada na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz.

A diferença de afinidade entre os íons da fase móvel e a matriz é devido a diferença de carga, sendo possível controlá-la utilizando fatores como pH e força iônica.

Tipos de cromatografia líquida



Cromatografia de interação hidrofóbica e de fase reversa

A cromatografia de fase reversa (RPC) é uma técnica de cromatografia líquida que envolve a separação de moléculas com base em interações hidrofóbicas entre as moléculas de soluto na fase móvel e os ligantes fixados na fase estacionária. A eluição ocorre via utilização de fase móvel com moderada polaridade.

Cromatografia de bioafinidade

A metodologia da cromatografia de afinidade envolve a preparação de uma fase estacionária seletiva, por imobilização covalente de ligantes específicos à matriz ou ao suporte sólido. A amostra é aplicada à coluna contendo ligante específico da amostra ligado ao suporte sólido.

As amostras que não possuem apreciável afinidade pelo ligante passam pela coluna sem serem ligadas, enquanto as macromoléculas capazes de unirem-se a este são retidas. A eluição das moléculas retidas pode ser realizada pela alteração do pH e da força iônica do meio.

Atividades

Complementares



Caçando na OBB



As palavras deste caça palavras estão escondidas na horizontal, vertical e diagonal, sem palavras ao contrário.

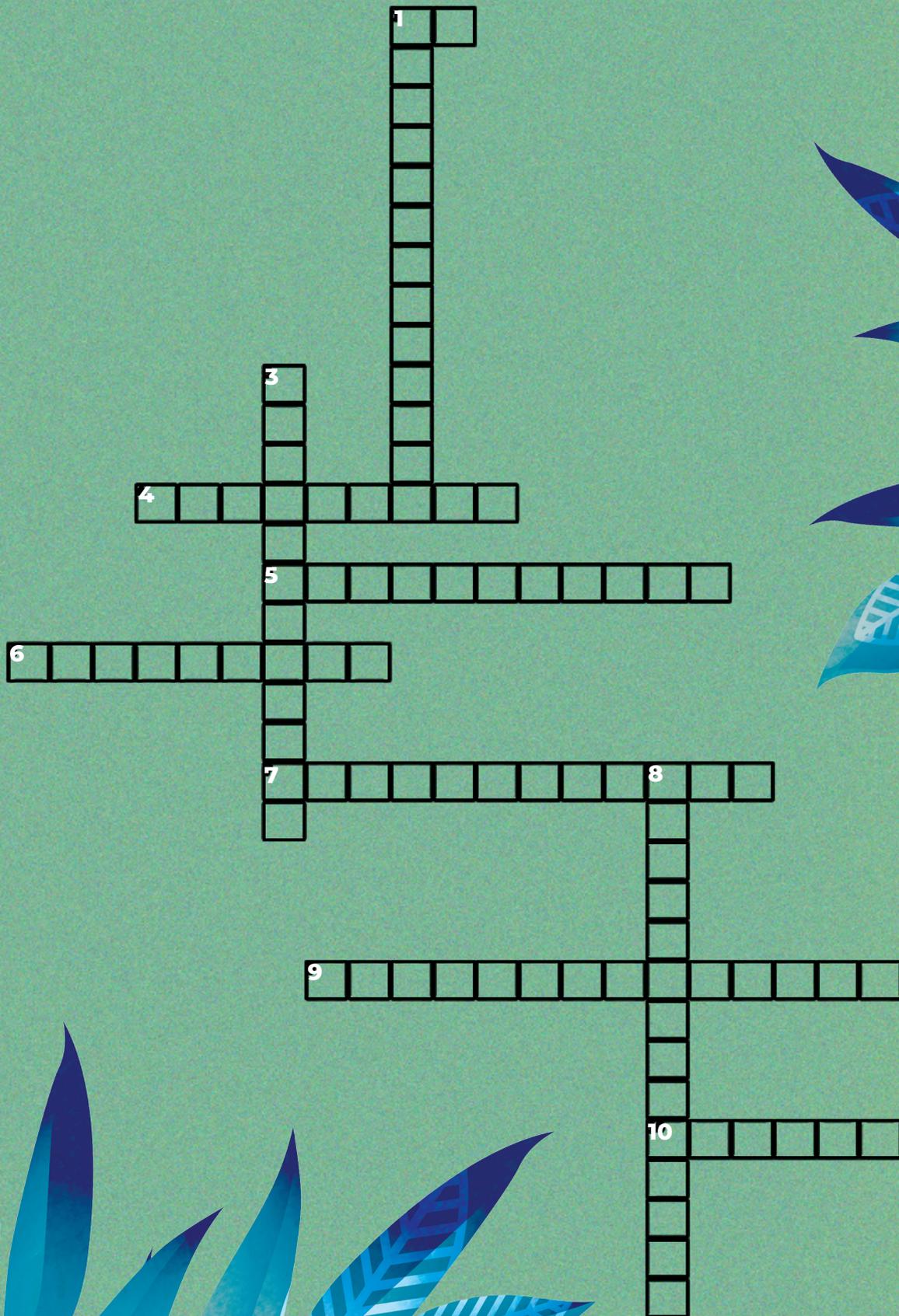
B P O L I M E R A S E D
W E O R D B A N D A O E
E N D O K D M O H R T S
D N R I E L I Y Y E I N
P R O T E I N A G A H A
R S W A F S O L R G E T
O T D N C E Á I R E S U
I S D N T T C N A N P R
N H E R N M I I S T O A
M N C L T R D N R E A Ç
A E C I R H O I A S O Ã
H H J N I I S E U M G O

ACTINA
AMINOÁCIDOS
BANDA
DESNATURAÇÃO
LISE
POLIMERASE
PROTEÍNA
REAGENTES

Caçando na OBB



olimpíada
brasileira
de biologia



Caçando na OBB



Palavras na horizontal

- 1** - Logaritmo negativo da concentração dos íons de hidrogênio em uma solução aquosa
- 4** - Composto específico sobre o qual uma enzima age
- 5** - Tipo de inibição enzimática revertida pelo aumento da concentração do substrato
- 6** - Conformação tridimensional de um polímero no seu estado de enovelamento nativo (ESTRUTURA)
- 7** - Permite separar fragmentos de proteínas e ácidos nucleicos por tamanho e carga elétrica
- 9** - Sistema capaz de resistir às mudanças de pH, consistindo em um par acidobásico conjugado no qual proporção
- 10** - Biomolécula, seja proteína, seja RNA, que catalisa uma reação química

Palavras na vertical

- 1** - Formado pela polimerização de monômeros de acrilamida e bis-acrilamida
- 3** - Carboidrato formado por duas unidades monossacarídicas, unidas de forma covalente
- 8** - Emissão de luz por moléculas excitadas quando retomam ao estado mais estável

Referências bibliográficas



Collins, C.H.; Braga, G.L., Bonato, P.S (1997) Introdução a métodos cromatográficos, Editora da Unicamp, 6ª ed.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. cap. 3. p. 75-114.

WESTERMEIER, R. Electrophoresis in practice: a guide to theory and practice. John Wiley, 2005. 4.





olimpíada
brasileira
de biologia

**Parabéns por
chegar até aqui!**

Agradecemos o seu
interesse na OBB