

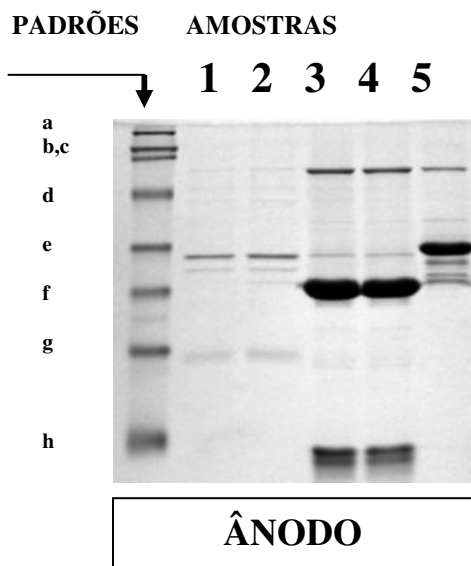
## 2. MÉTODOS DE SEPARAÇÃO E DE CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

2.1. Considere a seguinte mistura de aminoácidos sujeita a electroforese em papel:

**Ala, Ser, Fen, Arg, Asp e His**

Indique a direcção de migração de cada aminoácido a pH = 3.9. Esboce a distribuição dos aminoácidos revelados com ninidrina na tira de papel após a experiência.

2. 2 - Na electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), as proteínas são sujeitas a um tratamento com dodecil sulfato de sódio, tratamento esse que desnatura as proteínas e lhes confere a mesma densidade de carga negativa. Por consequência, na electroforese todas as proteínas se deslocam no sentido do ânodo. Os resultados de um ensaio SDS-PAGE são apresentados na figura seguinte.



2.2.1. Escolha a resposta certa.

“O SDS PAGE permite separar e ordenar as proteínas em função do seu volume molecular porque:

1. a deslocação das proteínas é tanto maior quanto menor o respectivo volume molecular.
2. a deslocação das proteínas é tanto maior quanto maior o respectivo volume molecular

3. a deslocação da proteína é tanto maior quanto maior for o respectivo ponto isoeléctrico.

### 2.2.2. Escolha a resposta certa.

“A proteína padrão g:

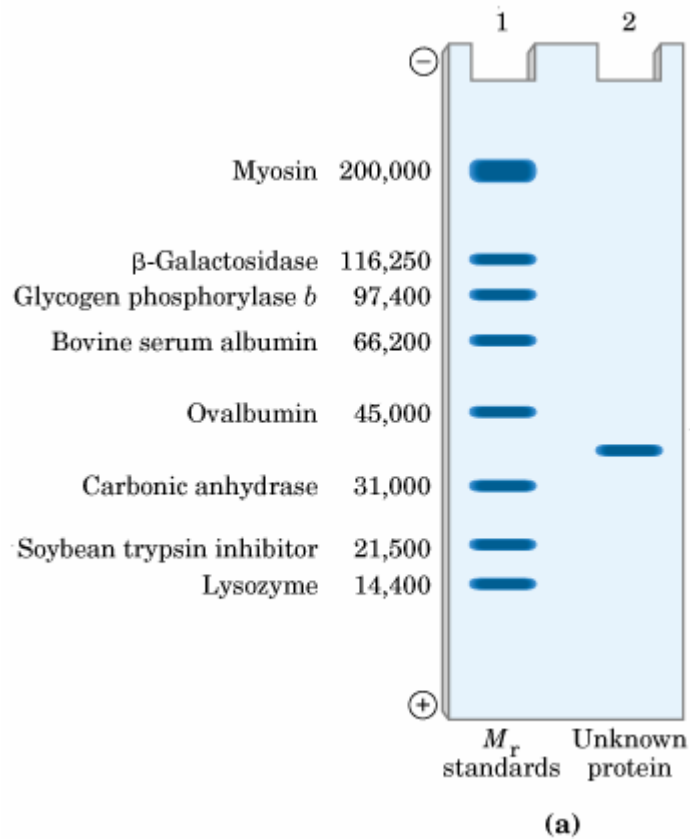
1. é menos volumosa que a proteína padrão f e mais volumosa que a proteína padrão h
2. é mais volumosa que a proteína padrão f
3. tem ponto isoeléctrico mais elevado que a proteína padrão h

### 2.2.3. Escolha a resposta certa .

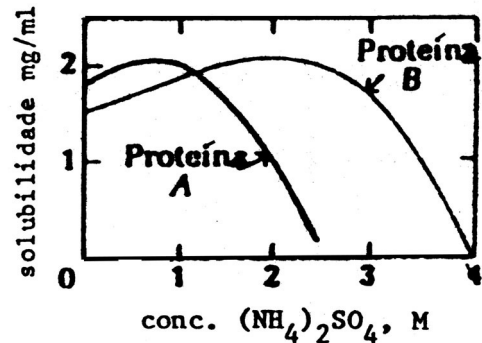
“ Quanto à composição das amostras:

1. Nos poços nº 3 e 4 existe uma proteína com volume molecular inferior ao do padrão de menores dimensões
2. Nos poços nº 3 e 4 só existe uma proteína, com ponto isoeléctrico semelhante ao do padrão f
3. No poço nº 5 é óbvio que não existe qualquer das proteínas presentes nos poços 3 e 4.

2.2.4. A partir dos dados da experiência de SDS\_PAGE indicados na figura abaixo, determine quantitativamente a massa molecular da proteína que se deslocou no poço nº 2.



**2.3 -** A maior parte das proteínas puras são pouco solúveis em água destilada, mas a sua solubilidade aumenta em soluções diluídas de sal. Contudo, a adição de elevadas concentrações de sal a uma solução aquosa de proteínas fá-las precipitar.



- Explique a variação da solubilidade das proteínas em função da concentração de sais.
- A solubilidade de duas proteínas em função de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  é apresentada na figura. Conhecendo estes dados, como é que procederia para separar as proteínas A e B?

**2.4 -** Pretende-se purificar uma solução contendo uma mistura de duas proteínas: citocromo *c* (pI = 10.6) e ferredoxina (pI = 3.2). Sabe-se que o peso molecular do citocromo *c* é 13000 Da e o da ferredoxina é 6000 Da. Que técnicas poderia escolher para poder separar estas duas proteínas? Justifique. Para cada tipo de técnica escolhida indique como se processa a separação.

**2.5 -** Por que ordem serão eluídas as seguintes proteínas de colunas de permuta iónica por um aumento de força iónica a pH 7?

- Citocromo *c*, lisozima, albumina do ovo, de uma resina catiónica;
- Citocromo *c*, pepsina, urease, hemoglobina, de uma resina aniónica.

Proteína	pI
Citocromo <i>c</i>	10.7
Lisozima	1.0
Albumina do ovo	11.0
Pepsina	<1.0
Urease	5.0
Hemoglobina	6.8

**2.6 -** Purificou-se uma proteína X cuja estrutura se pretende determinar. Realizaram-se diferentes experiências com as quais se obtiveram os seguintes resultados:

- Por cromatografia de filtração em gel, verificou-se que a proteína nativa tem uma massa molecular de 240000 Da;

- (ii) Por cromatografia de filtração em gel na presença de 6 M de hidrocloreto de guanidínio (agente desnaturante) obteve-se um único pico com massa molecular igual a 60000;
- (iii) Por cromatografia de filtração em gel na presença de hidrocloreto de guanidínio e de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) detectaram-se picos com massas moleculares iguais a 34000 e 26000.

O que é que pode concluir acerca da estrutura da proteína X?

**2.7.** Uma proteína globular contendo um único resíduo metionina foi clivado com brometo de cianogénio (clivagem do lado C do resíduo metionina), dando origem a dois fragmentos: o peptídeo A, de  $\text{PM} = 25\,000\text{ Da}$ , e um pequeno peptídeo B, cuja sequência é:

(B) Asp-Arg-His-Glu-Lis-Ser-Met

**2.7.1.** Sugira o método que utilizaria para a sequenciação total dos aminoácidos no fragmento B. Acha que esse método poderia ser usado para a sequenciação do fragmento A?

**2.7.2.** Identifique a afirmação correcta. Justifique.

- o aminoácido N-terminal da proteína intacta é o aspartato
- o aminoácido C-terminal da proteína intacta é a metionina
- o aminoácido N-terminal da proteína intacta é a metionina

**2.8.** Clivou-se uma proteína X utilizando brometo de cianogénio e obteve-se um peptídeo P que continha o resíduo N-terminal da proteína original.

O peptídeo (P) não reagiu na digestão com tripsina, mas clivou na presença de quimotripsina dando origem aos peptídeos seguintes:

C1 - (His, Asp, Tyr)

C2 - (2 Ala, Lys, Pro, Val, mais um AA não identificado)

Na degradação de Edman de C1 libertou-se His em primeiro lugar e em seguida Asn. Na degradação de Edman de C2, libertaram-se, sequencialmente, Ala, Ala, Val e Lys.

Deduz a sequência do peptídeo P. Determine o seu ponto isoeléctrico.

**2.9.** A composição de um outro peptídeo P, obtida por hidrólise ácida, é a seguinte:

(Arg, Glu, 2 Val, Gly, Lys, Tyr, Thr & Phe)

A dansilação do peptídeo originou dansil-Glu e o Thr foi o primeiro resíduo libertado após aplicação de carboxipeptidase.

A clivagem do peptídeo com tripsina originou 3 peptídeos, T1, T2 e T3, com as seguintes características:

- T-1 é um tripeptídeo com composição (Arg, Tyr, Glu )
- T-2 é um dipetídeo com N-terminal Valina (Val)
- T-3 é um tetrapeptídeo; no 1º passo de uma degradação de Edman libertou-se Phe, e o seu C-terminal é Thr.

A clivagem do peptídeo com quimotripsina originou 3 peptídeos, C-1, C-2 & C-3.

- C-1 é um tripeptídeo com N-terminal Gly e C-terminal Thr.
- C-2 é um dipeptídeo com composição (Tyr, Glu.)
- C-3 é um tetrapeptídeo com N-terminal Arg.

Deduza a sequência do peptídeo P. Determine o seu ponto isoelétrico. Determine a sua carga formal a pH 7.

## Apêndice

MÉTODOS	LOCAL	ESPECIFICIDADE	COMENTÁRIO
<i>I. Cortes Terminais</i>			
Degradação de Edman	C do terminal	N- $R_n$ = qualquer a.a.	Excepto N-terminal bloqueado
Carboxipeptidase A	N do terminal	C- $R_n$ $\square$ Arg, Lis, Pro $R_{n-1}$ $\square$ Pro	Geralmente remove 1 a 4 resíduos sequencialmente
Carboxipeptidase B	N do terminal	C- $R_n$ = Arg, Lis, AECis $R_{n-1}$ $\square$ Pro	
Hidrazinólise	N do terminal	C- $R_n$ = qualquer a.a.	Usado quando os métodos I.2 e I.3 falham.
<i>II. Cortes Internos</i>			
Brometo de Cianogénio (BrCN)	C do $R_n$	$R_n$ = Met	Altamente específico
Tripsina	C do $R_n$	$R_n$ = Lis, Arg, AECis $R_{n+1}$ $\square$ Pro	Altamente específico
Quimotripsina	C do $R_n$	$R_n$ = Fen, Trp, Tir, Leu $R_{n+1}$ $\square$ Pro	Ocasionalmente pode cortar $R_n$ = Met, Asn, outros
Termolisina	N do $R_n$	$R_n$ = Leu, Ile, Fen, Trp, Tir, Val $R_{n-1}$ $\square$ Pro	Ocasionalmente pode cortar $R_n$ = Ala
Pepsina	N do $R_n$	$R_n$ = Leu, Asp, Glu, Fen, Tir, Trp $R_{n-1}$ $\square$ Pro	Ocasionalmente pode cortar outros resíduos. Bastante não específico

-AECis = cisteína aminoetilada.