



Quantificação de Proteínas

Graduação em Biotecnologia

Disciplina de Proteômica

Caroline Rizzi

Doutoranda em Biotecnologia -UFPEL

Metodologias para quantificar proteínas

Qualquer trabalho com proteína deve envolver a quantificação da amostra

Metodologia: espectrometria

Colorimétricos

- Amostras impuras
- Fenômeno de quantificação indireto
- Necessitam de curva padrão
- Reação entre corante-proteína proporciona cor específica

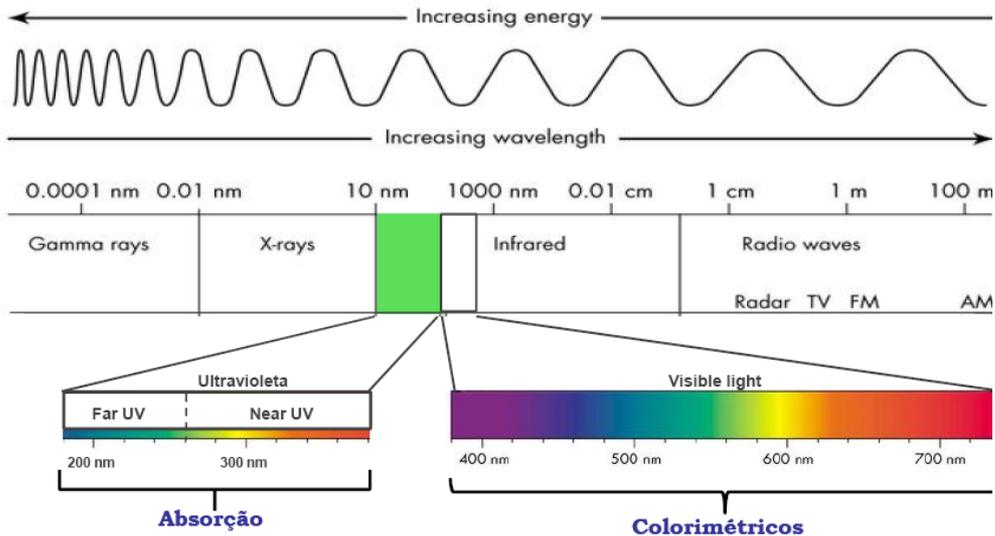
Absorção

- Amostras puras
- Fenômeno de quantificação direto: ponto único!!!
- Proteína absorve luz
- Importante método de acompanhamento de purificação de proteínas

Espectrometria - Revisão

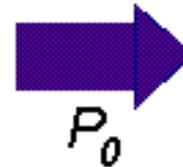
O espectro eletromagnético

Absorciometria



I_o = intensidade da luz incidente
 I_r = intensidade da luz refletida
 I_a = intensidade da luz absorvida
 I = intensidade da luz transmitida

$$I_o = I_r + I_a + I$$



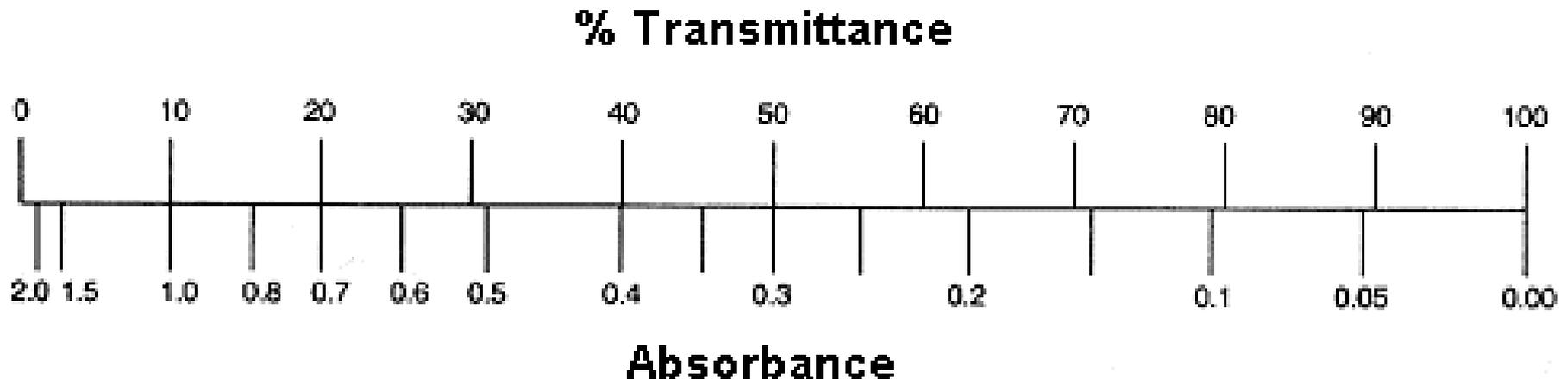
- Chama-se Transmitância (T) à razão entre a intensidade da luz transmitida (I) e a luz incidente (I_0), isto é:

$$T = I / I_0$$

- A transmitância, muitas vezes, é expressa em percentagem. Mais útil do ponto de vista experimental é assim chamada a Absorbância (A), que é definido como o logaritmo negativo da transmitância, portanto:

$$A = -\log T = \log I_0 / I$$

Transmitância: percentual de 0% a 100%
Absorbância: valores de 0 a 2



Qual é a vantagem do uso da absorbância?

A absorbância (**A**) tem a vantagem de que varia em forma linear com a concentração da amostra.

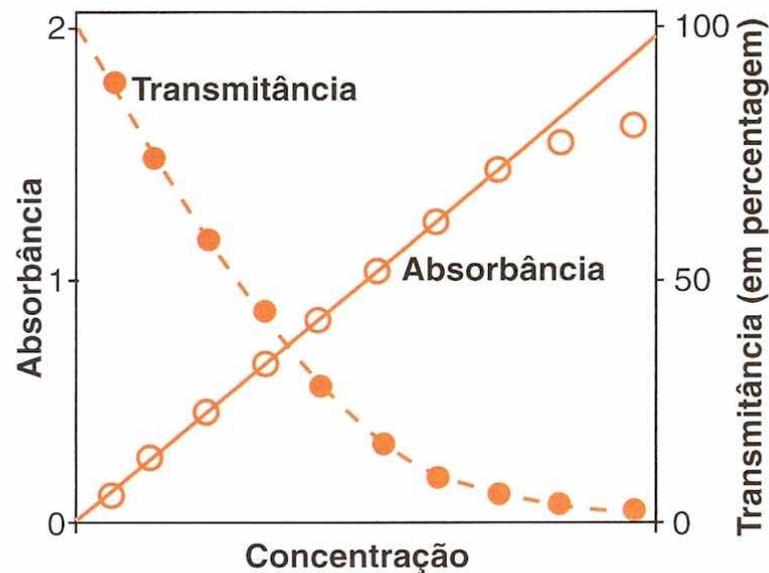


FIGURA 2.6 A absorbância e a transmitância em função da concentração.

Lei de Lambert-Beer

“Quando uma faixa de luz monocromática atravessa uma solução colorida, a quantidade de luz absorvida é diretamente proporcional à concentração da solução colorida e à espessura da camada atravessada.”

$$I_t = I_o \cdot 10^{-acd} \text{ onde}$$



I_t = quantidade de luz transmitida
 I_o = quantidade de luz incidente
 a = absorvidade ou ϵ
 c = concentração
 d = espessura da cubeta



$$A = a.c.d$$

Linearidade da reação

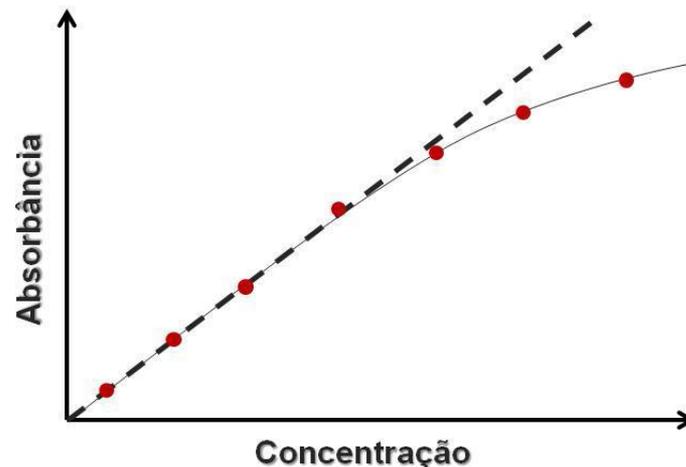
- A lei de Lambert-Beer: relação linear entre a concentração e a absorvância.
- Esta linearidade, no entanto, só existe dentro de determinados limites.
- A partir de uma determinada concentração, deixa de haver proporcionalidade entre concentração e absorvância, e a **relação entre absorvância e concentração deixa de ser linear**.
- Esta faixa de linearidade entre absorvância e concentração depende da interação entre as substâncias, mas depende também do aparelho e da metodologia empregada.
- Às vezes a reação química é proporcional até valores muito elevados, mas que ultrapassam a capacidade resolutive dos aparelhos de medida, fazendo necessária a diluição da amostra.

Existe uma faixa ótima para as medidas de transmitância

Erros altos:

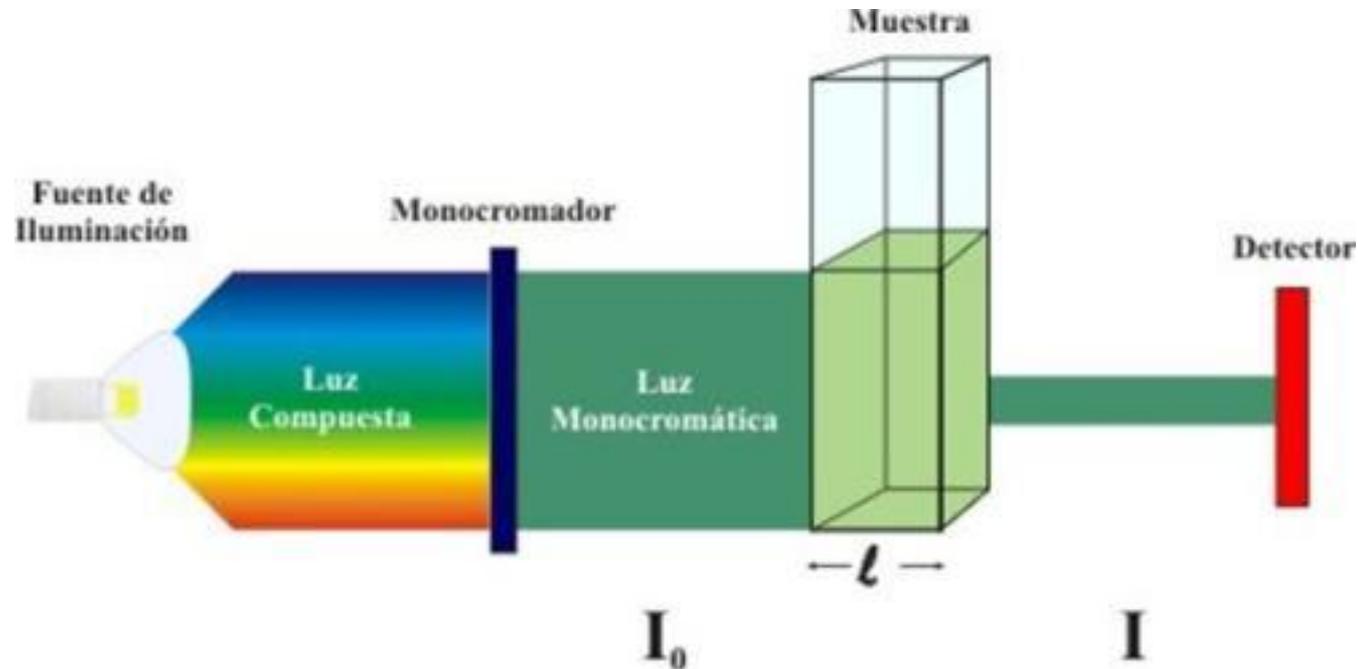
Medidas $> 90\% T$ e $< 10\%$

Ideal : $90\% < T > 10\%$



Espectrofotômetro

- Utilizado para as medidas de absorção em luz visível e ultravioleta.
- O espectrofotômetro possui uma fonte de luz (tungstênio para luz visível e deutério para luz UV).



Soluções padrões

- são soluções de **concentração** e **absorbâncias conhecidas** que são utilizadas para o cálculo da concentração de soluções com absorbâncias conhecidas.
- Há duas maneiras de se fazer a análise colorimétrica utilizando as soluções padrões:
 - Pelo método matemático ou Fator de Calibração
 - Pelo método gráfico ou Curva Padrão

Método matemático ou fator de calibração

$$\frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Absorbância do padrão}} = \frac{\text{Concentração amostra}}{\text{Absorbância da amostra}}$$

➤ Logo: *Concentração da amostra* =

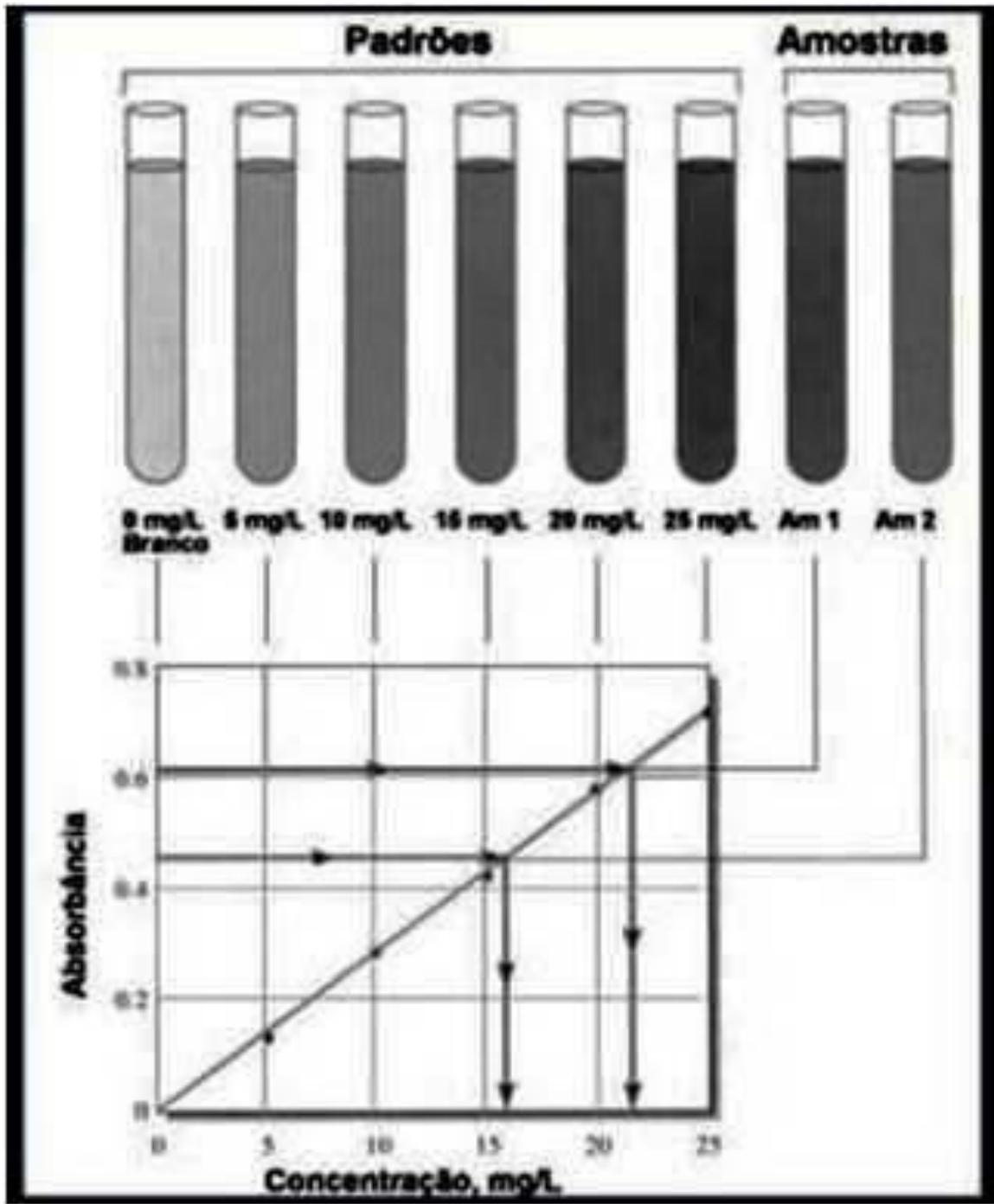
$$\frac{\text{Concentração do padrão} \times \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}}$$

➤ *Fator de calibração:*

$$\text{Concentração do padrão} / \text{Absorbância da padrão}$$

Método gráfico ou curva padrão

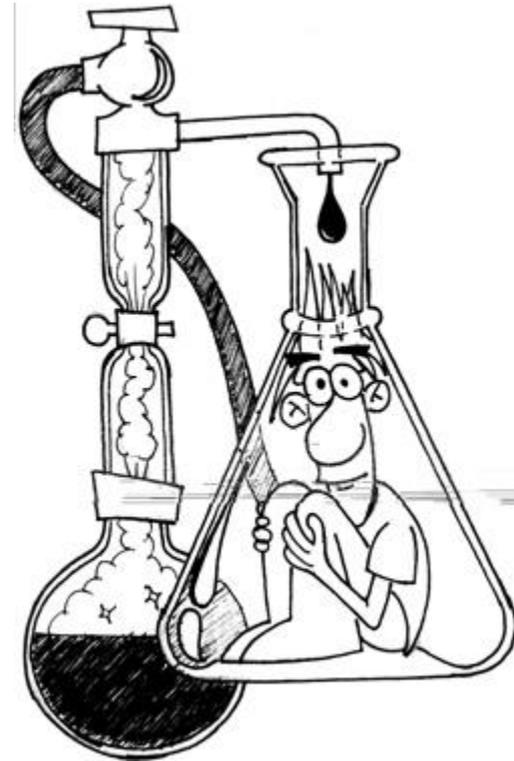
- Preparam-se alguns padrões de concentrações conhecidas e faz-se a leitura das abs.
- Duplicata ou triplicata.
- Coloca-se os dados de concentrações no eixo das abscissas e os valores de abs no eixo das ordenadas, unindo-se os pontos obtidos temos a Curva Padrão dessa substância.
- Se a substância segue exatamente a Lei de Beer, a curva é uma reta de 45° que passa pela origem e são necessários poucos marcadores para sua elaboração.
- Fazer a correlação linear e a equação da reta
- Absorbância da amostra: dentro dos valores da curva
- Diluir ou concentrar



Quantificação de proteínas

Escolha do método:

- Quantidade de proteína disponível
- Concentração de proteína
- Especificidade do ensaio
- Presença de químicos interferentes
- Facilidade e reprodutibilidade



Absorbância em 280 e 210nm

Vantagens

- Realizada diretamente na amostra sem a adição de reagentes
- Rápida (sem incubação)
- A relação entre A e concentração é linear
- Método de Pace 280 nm: proteínas enoveladas que contém aminoácidos aromáticos e cisteínas
- Absorbância a 210 nm: ligação peptídica

Desvantagens

- Necessidade de aas aromáticos
- Compostos com duplas ligações entre carbonos e carbonos e oxigênio absorvem fortemente a 210 nm
- Descontar a presença de ácidos nucleicos
- Cubetas plásticas e alguns detergentes absorvem luz UV
- Ideal:
 - $80\% < T > 20\%$
 - $0.1 < Abs > 0.7$

Absorbância em 280 nm

Absortividade molar: depende da substância, do comprimento de onda utilizado, da temperatura e do solvente.

Maior o valor de $\epsilon \rightarrow$ maior será a taxa de absorção observada e mais sensível o método espectrofotométrico

$$Abs = \epsilon \cdot l \cdot c$$

$$c = \frac{Abs}{\epsilon \cdot l}$$

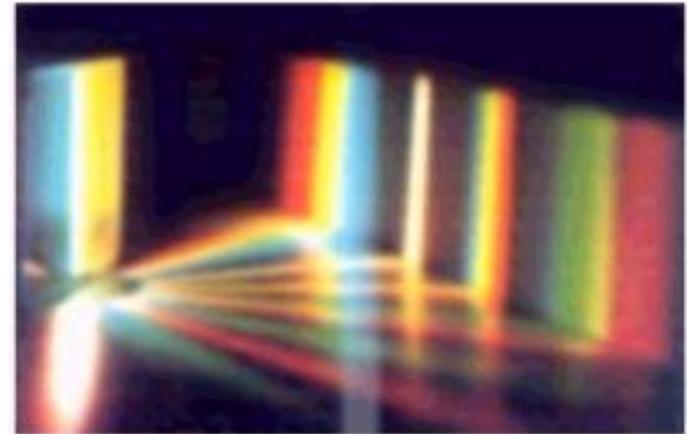
$$\text{Concentration (mg/ml)} = \text{absorbance} / A \frac{1 \text{ mg/ml}}{1 \text{ cm}}$$

Analysis	
Analysis	Entire Protein
Length	326 aa
Molecular Weight	34688.97
1 microgram =	26.828 pMoles
Molar Extinction coefficient	80870
1 A[280] corr. to	0.43 mg/ml
A[280] of 1 mg/ml	2.33 AU
Isoelectric Point	5.63
Charge at pH 7	-2.99

Métodos colorimétricos

Todos os ensaios colorimétricos:

- Diferentes proteínas produzem diferentes absorvâncias= diferente do padrão
- Observar que tipo de ensaio e padrão foi utilizado para esta proteína na literatura
- Medem todas as proteínas da amostra
- O padrão deve ser ensaiado no mesmo tempo e condições do analito desconhecido
- Em muitos casos, a solução que contém a proteína pode conter uma mistura de componentes: adição destes componentes no branco da amostra e na proteína padrão



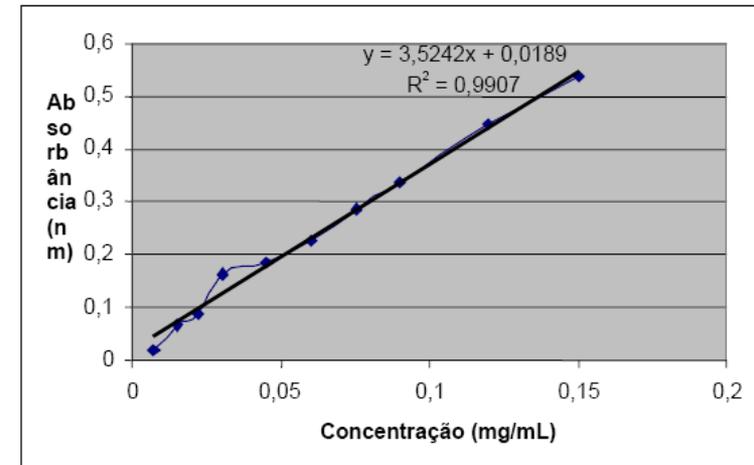
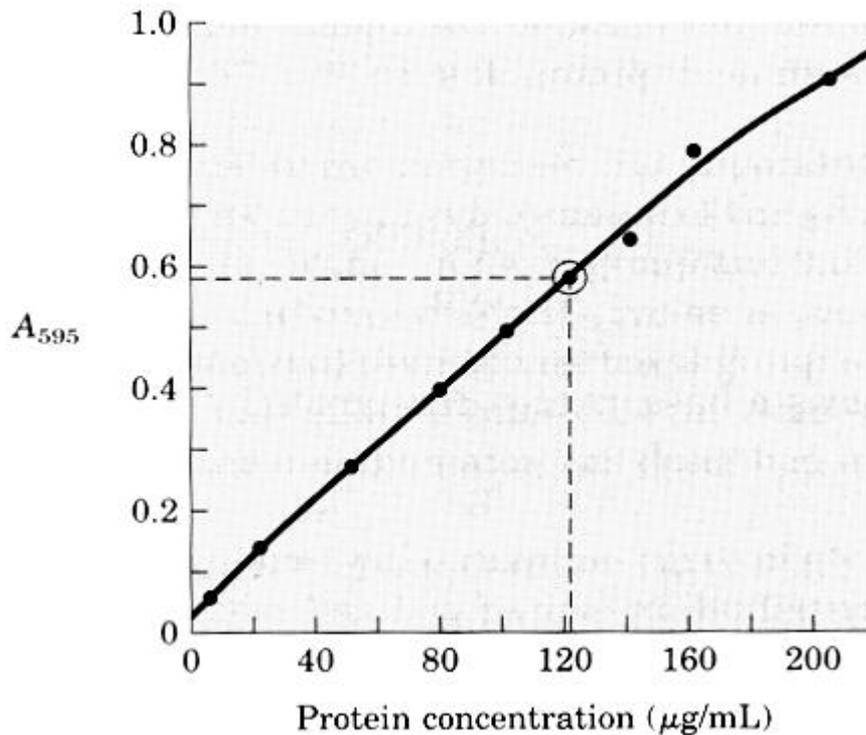
Métodos colorimétricos

Necessitam de curva padrão com BSA

Equação da reta

$$Abs = a[P] + b$$

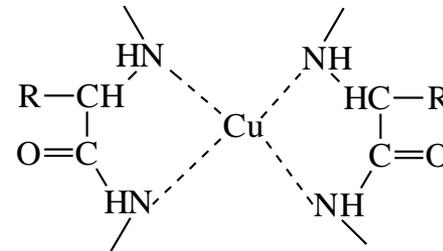
$$[P] = \frac{Abs - b}{a}$$



Métodos colorimétricos

Método do Biureto

- **1949**
- Positiva para todas as proteínas e peptídeos graças às suas ligações peptídicas.
- Estas moléculas, quando tratadas com uma solução diluída de sulfato de cobre, em meio alcalino, dão coloração púrpura característica, devido à formação do complexo de coordenação entre o átomo de cobre (íon cúprico) e 4 átomos de nitrogênio e conseqüente redução do cobre.
- $\text{Cu}^{2+} + (\text{ligações peptídicas}) \rightarrow [\text{Cu}^+ - \text{proteína}]$
- Leitura a 545 nm
- Desvantagem: interferentes que reagem com cobre



Métodos colorimétricos

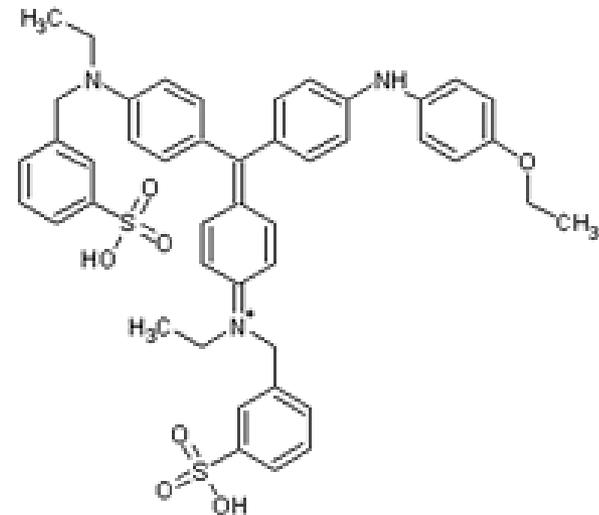
Método de Lowry

- **1951**
- Mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente de Folin-Ciocalteu) que sofre redução quando o cobre reage com proteínas
- Depende das concentrações de tirosina e triptofano
- Absorve a 750 nm
- Vantagem: alta sensibilidade
- Desvantagens:
 - pH alcalino
 - Muitos interferentes (acidificantes, quelantes ou redutores)
 - Absortividade muito variável para diferentes proteínas
 - Obedece a lei de Beer-Lambert numa pequena faixa de concentração.

Métodos colorimétricos

Método de Bradford

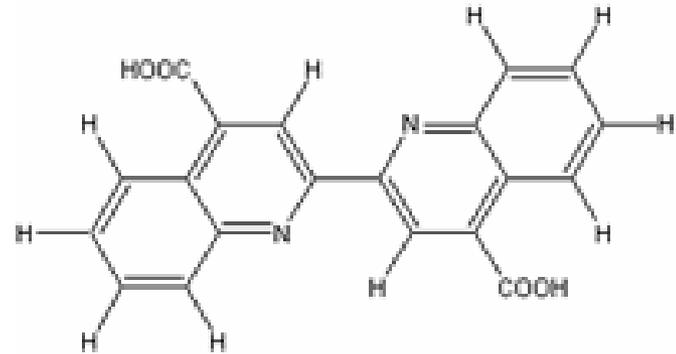
- **1976**
- *Comassie brilliant blue* BG-250 – Resíduos Aromáticos e Básicos;
- Interação com proteínas ioniza o corante;
- Vantagens:
 - Sensibilidade;
 - Rapidez;
 - Menor número de interferentes.
- Desvantagens:
 - Variação da absorvidade específica
 - Dependente da solubilidade e tamanho da proteína;



Métodos colorimétricos

Método BCA

- **1990**
- Íons Cu^{2+} reduzidos a Cu^+ em presença de proteínas reagem fortemente com o BCA formando um composto azul
- 560 nm
- Vantagens:
 - Facilidade
 - Rapidez
 - Alta sensibilidade (= Lowry)
- Desvantagens:
 - Dependência da temperatura reacional e em função do tempo
 - Absortividade muito variável para diferentes proteínas;
 - Muitos interferentes (reações com o Cu^{2+}).



BCA = ácido 2,2'-Bicinchonínico
ou 4,4'-Dicarboxy-2,2'-biquinoline