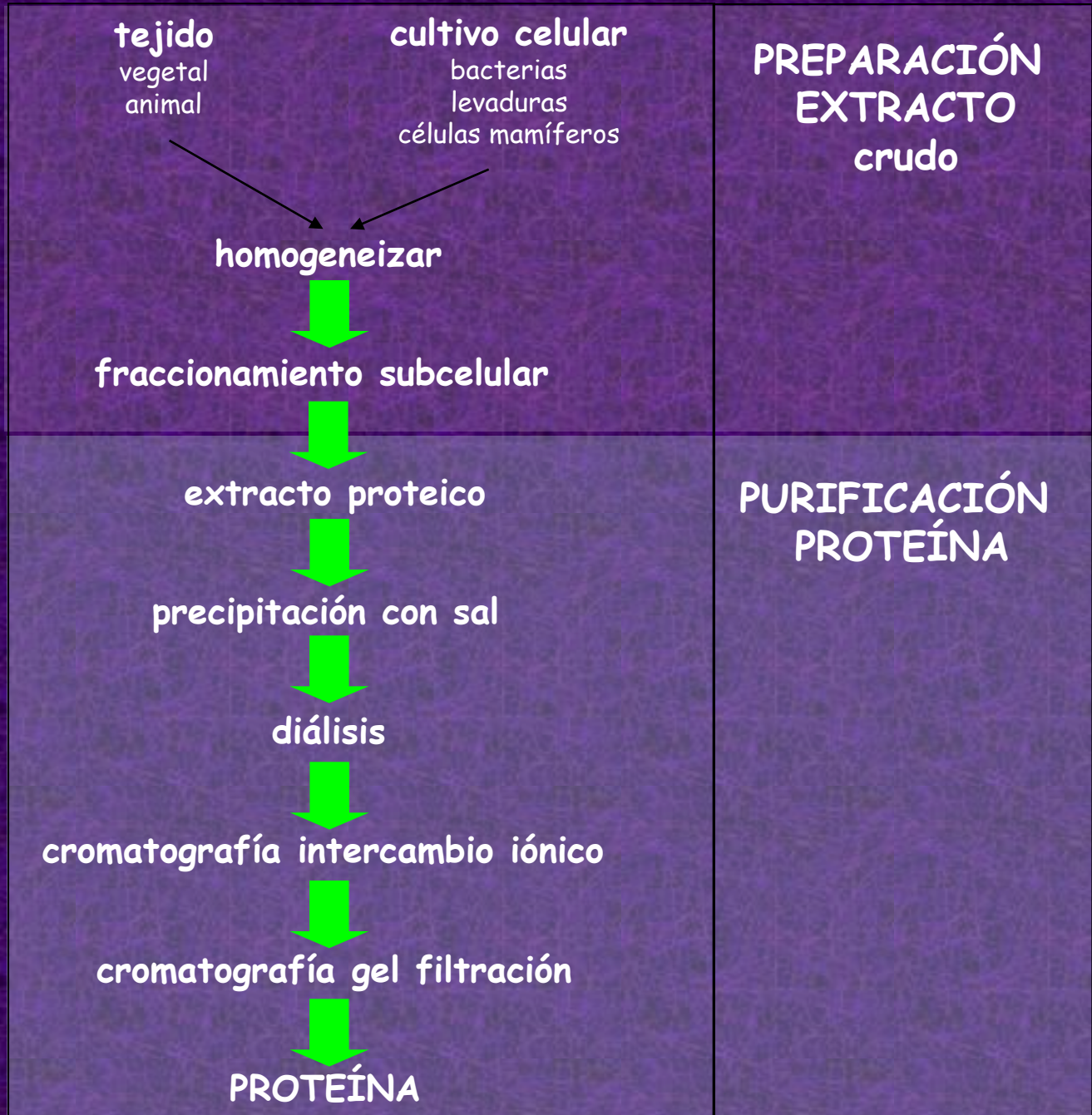


PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

ESQUEMA DE PURIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA



HOMOGENEIZACIÓN

TEJIDO:	Animal →	homogeneizador (politron) N ₂ líquido + mortero
	Vegetal →	arena + mortero
CULTIVO:	Bacterias →	detergente + sonicar (ultrasonidos)
	Levaduras →	bolas de vidrio + vórtex (agitación fuerte)
	Células mamífero →	detergente + rascar (scraper)

Tejido animal



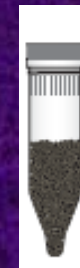
Tejido vegetal



Bacterias



Levaduras



Células mamífero

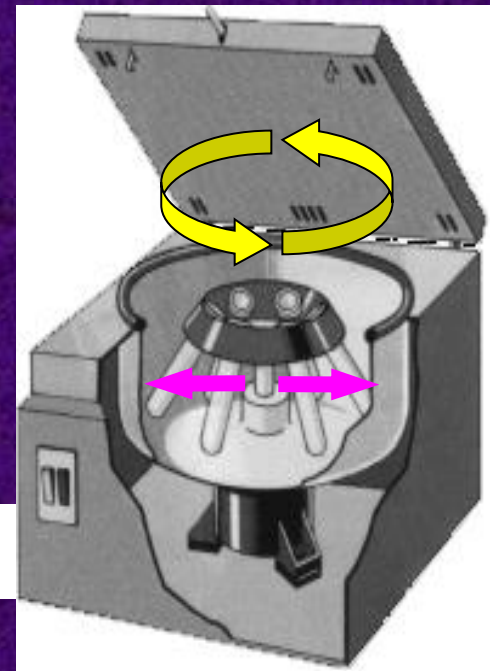


FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

CENTRIFUGACIÓN



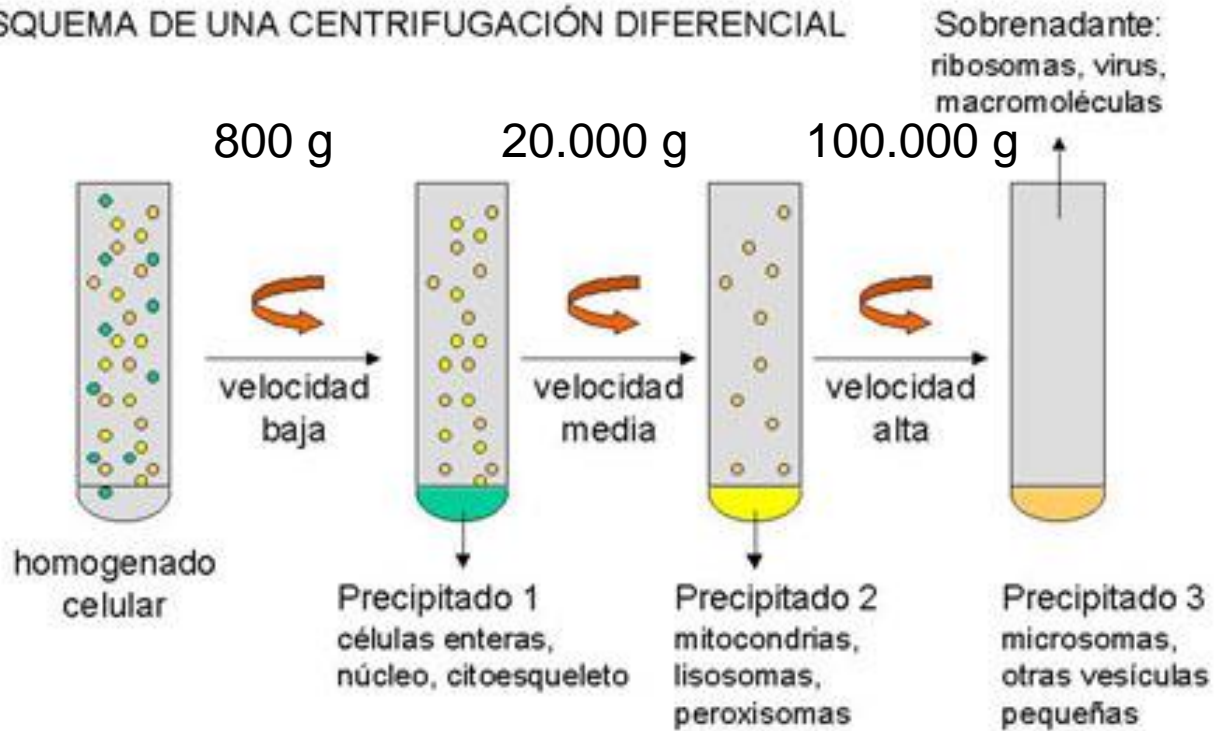
Ultracentrifugación



CENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL

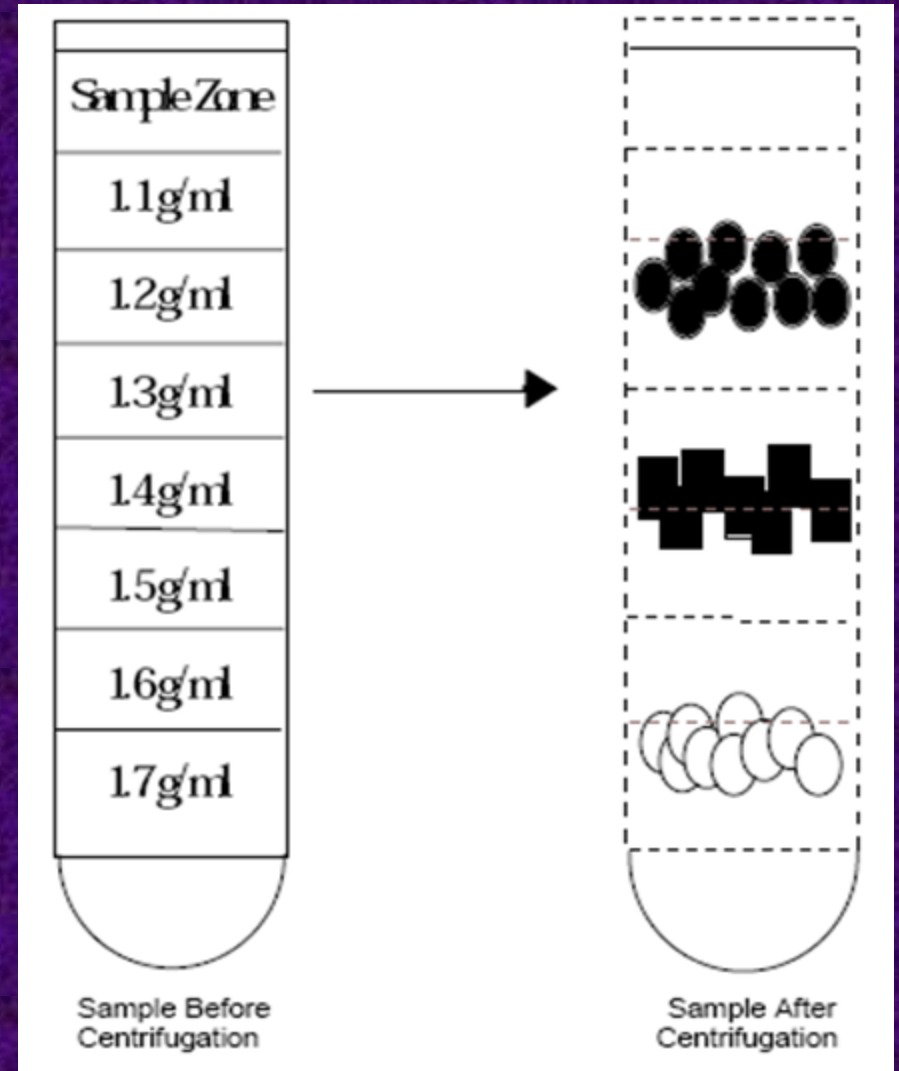
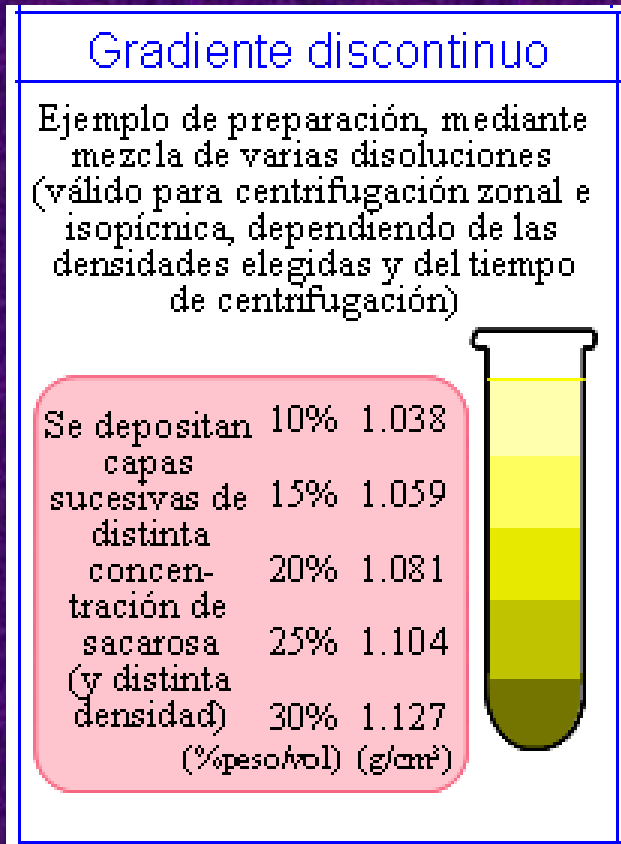
El homogenato es centrifugado repetidas veces a velocidades crecientes sedimentándolo progresivamente y realizando un fraccionamiento diferencial de sus componentes.

ESQUEMA DE UNA CENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL



ZONAL:

El homogenato se aplica sobre un gradiente de densidad (sacarosa, cloruro de cesio) y al aplicar la fuerza centrífuga, cada componente se desplaza hasta la zona de densidad igual a la suya.



PRECIPITACIÓN CON SAL

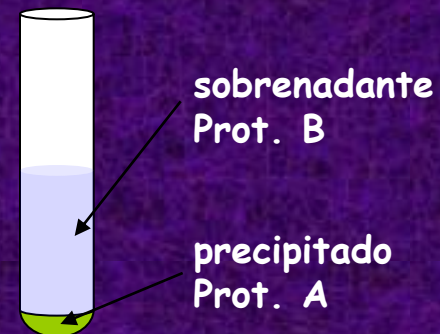
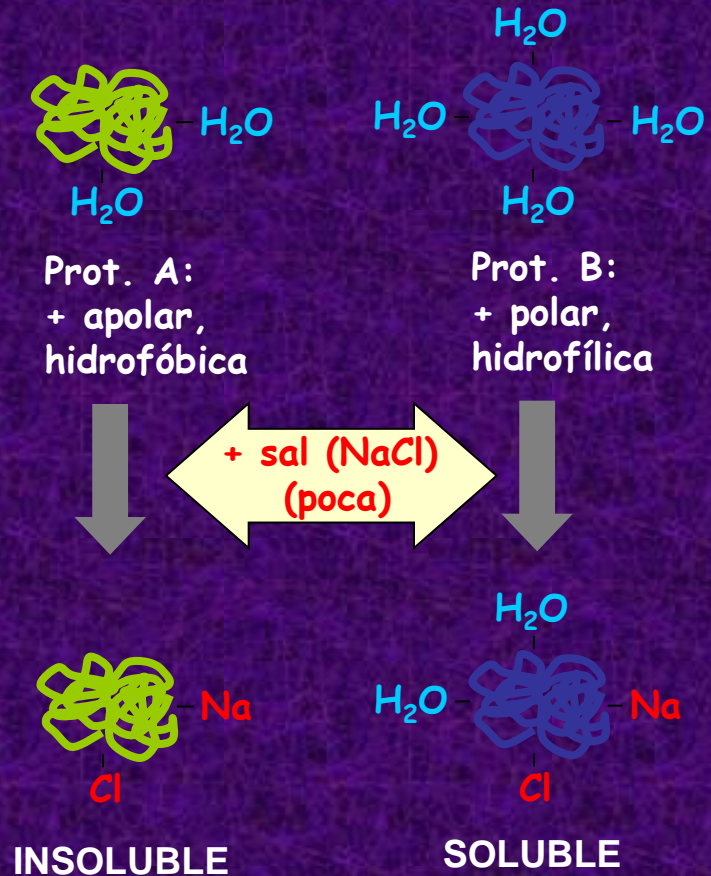
Sales: **Sulfato amónico** $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$
Cloruro sódico NaCl

Deshidratación \rightarrow **precipitación de proteínas.**

Separar proteínas por **polaridad.**

Permite concentrar las proteínas.

Se usa mucho en los **primeros pasos** de la purificación de proteínas.



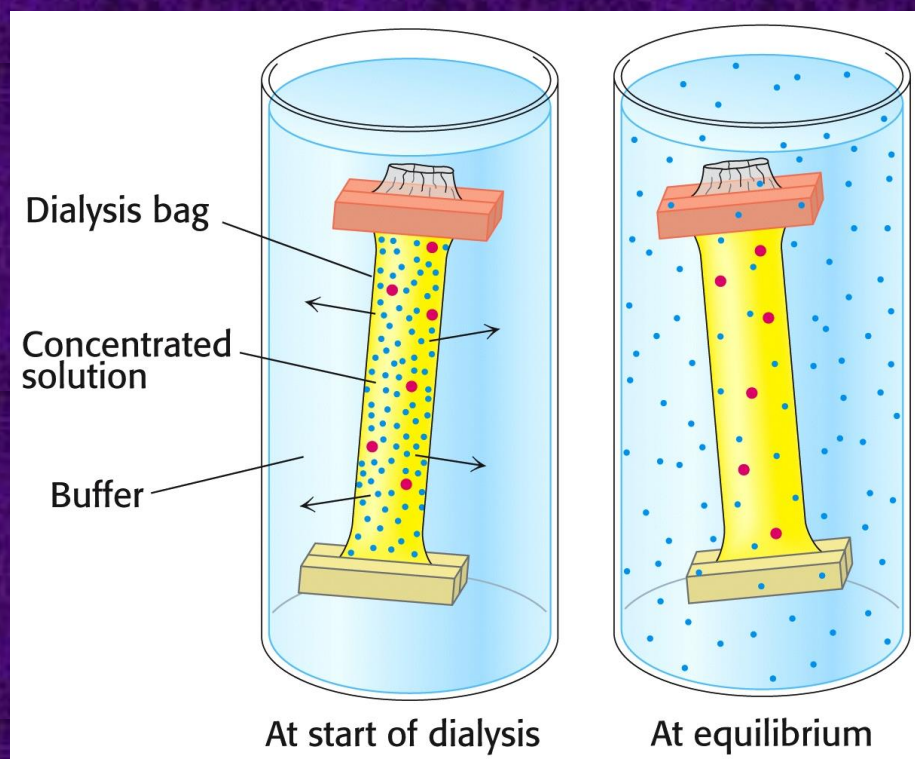
DIÁLISIS

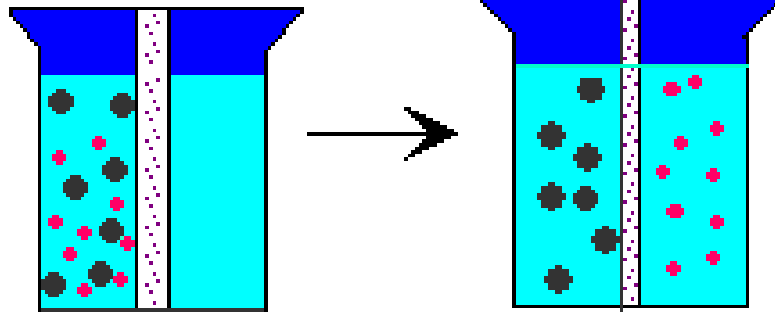
Membrana semipermeable (poros de diámetro determinado)

moléculas menores que el poro → fuera
moléculas mayores que el poro → dentro

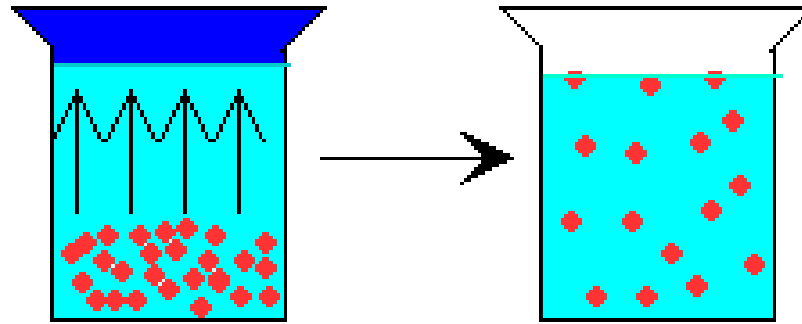
Desalar muestras por **diferencia de presión osmótica** dentro y fuera del saco de diálisis.

sal → fuera (< poro)
proteínas → dentro (> poro)

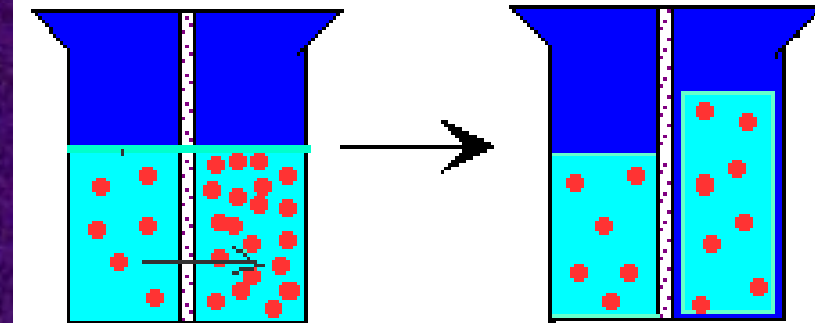




DIÁLISIS



DIFUSIÓN



membrana
semipermeable

OSMOSIS

- **SEPARACION y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS**
- Masa o tamaño de la proteína
- Carga eléctrica
- Afinidad
- **Cromatografía:** diferentes compuestos pueden distribuirse en distinto grado entre diferentes fases: una estacionaria y una móvil.

CROMATOGRAFÍA DE GEL FILTRACIÓN

PROPIEDAD: Tamaño (y forma)

SOPORTE → Resina de micropartículas esféricas formadas por **polímeros hidrofílicos**: dextrano, agarosa, poliacrilamida o mezcla de ellos

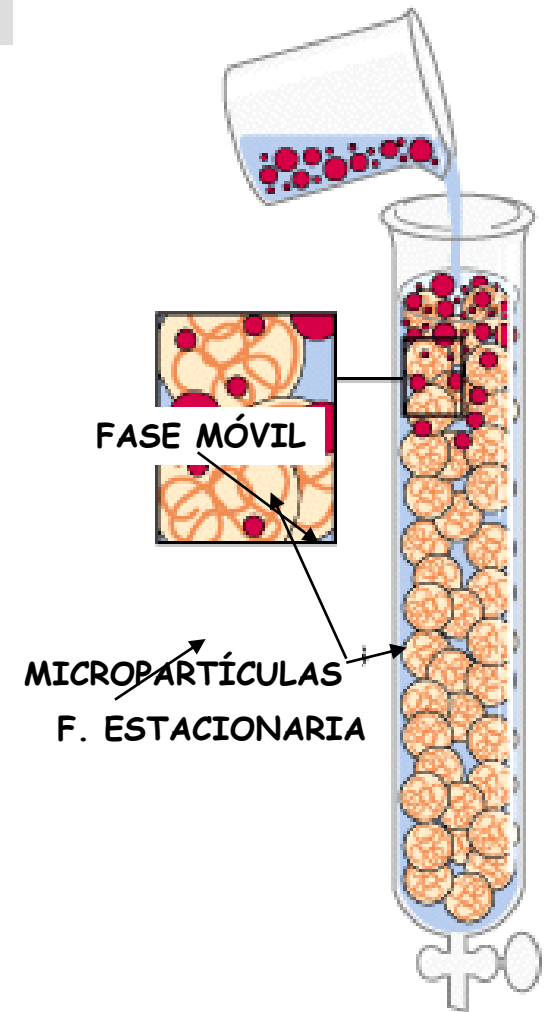
Tamaños de poro → intervalo o rango de fraccionamiento.

Sephadex G25: 1000 - 5000 Da

Sephadex G200: 5000 - 250000 Da

F. ESTACIONARIA → **LÍQUIDA** solvente acuoso (el mismo que el de la fase móvil) que se encuentra dentro de micropartículas.

F. MÓVIL → **LÍQUIDA** solvente acuoso que atraviesa la columna por los espacios intersticiales (entre las micropartículas).



CROMATOGRAFÍA DE GEL FILTRACIÓN

Molec. GRANDES → RÁPIDAS

No penetran en los poros, avanzan con mayor velocidad a través de los espacios intersticiales (con f. móvil) y eluyen primero

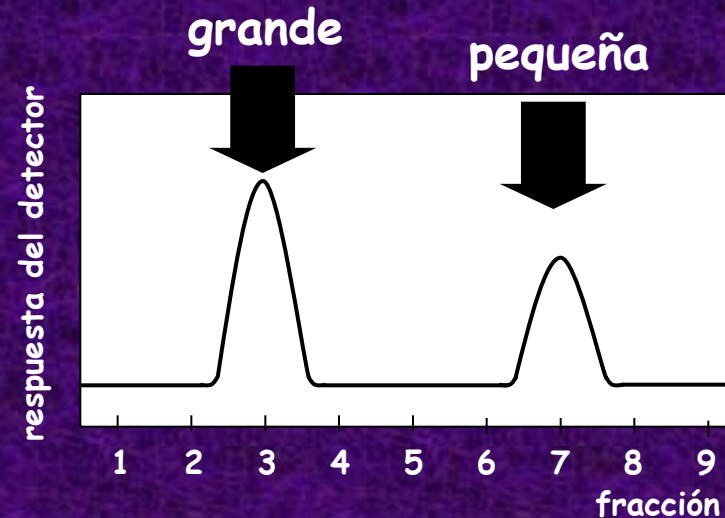
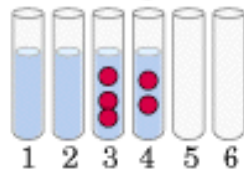
Molec. PEQUEÑAS → LENTAS

Penetran por los poros por lo que el recorrido que han de realizar a través de la columna es mayor y avanzan con menor velocidad (con f. estacionaria).

PERFIL DE ELUCIÓN

APLICACIÓN MUESTRA

ELUCIÓN



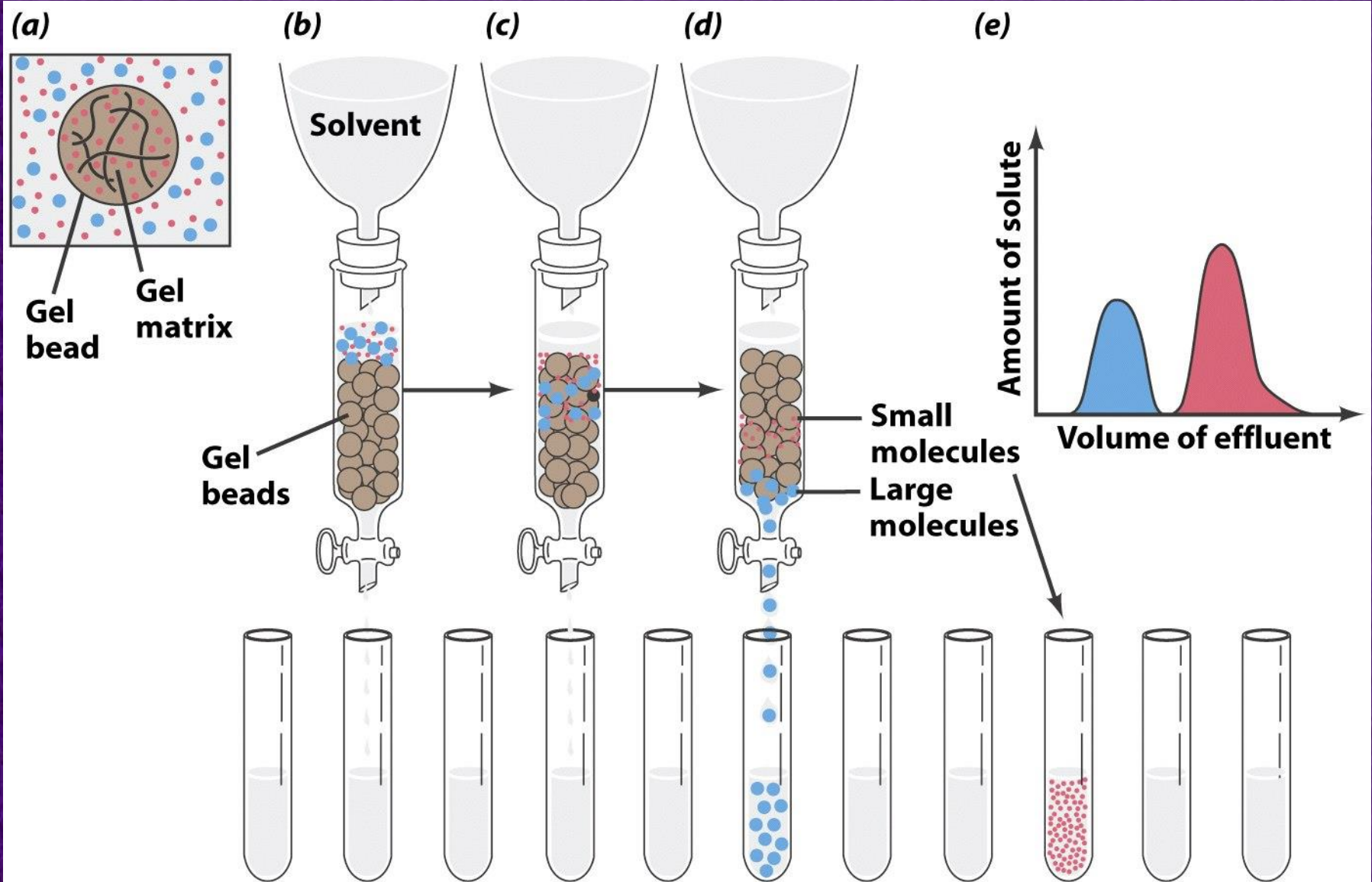


Figure 5-7 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
 © 2006 John Wiley & Sons

Myosin	200,000
β -Galactosidase	116,250
Glycogen phosphorylase <i>b</i>	97,400
Bovine serum albumin	66,200
Ovalbumin	45,000
Carbonic anhydrase	31,000
Soybean trypsin inhibitor	21,500
Lysozyme	14,400

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

PROPIEDAD: Interacciones electrostáticas (carga)

SOPORTE → Resina de micropartículas formadas por polímeros sintéticos o naturales (dextranos, celulosas, agarosa).

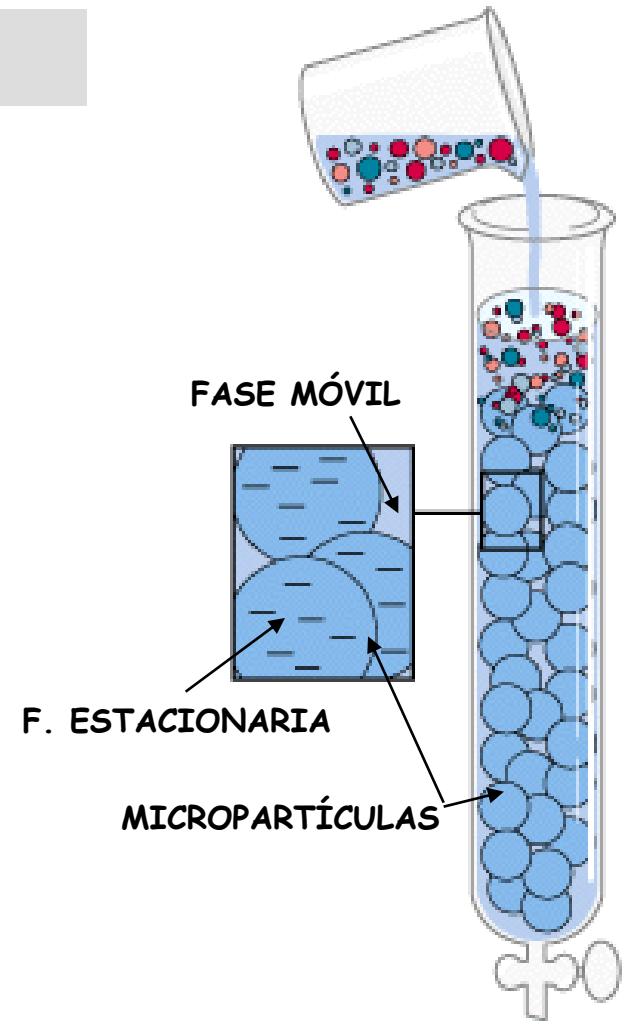
F. ESTACIONARIA → **SÓLIDA** Grupos con cargas iónicas unidos al soporte

Carga positiva (+) → intercambiadores de aniones (-):
cromatografía intercambio aniónica

Carga negativa (-) → intercambiadores de cationes (+):
cromatografía intercambio catiónica

F. MOVIL → **LÍQUIDA** Solvente que anula la interacción electrostática.

2 posibilidades: **Gradientes de pH** → cambio de carga de las moléculas de la muestra
Gradientes iónicos (salinos) → competencia por grupos electrófilos



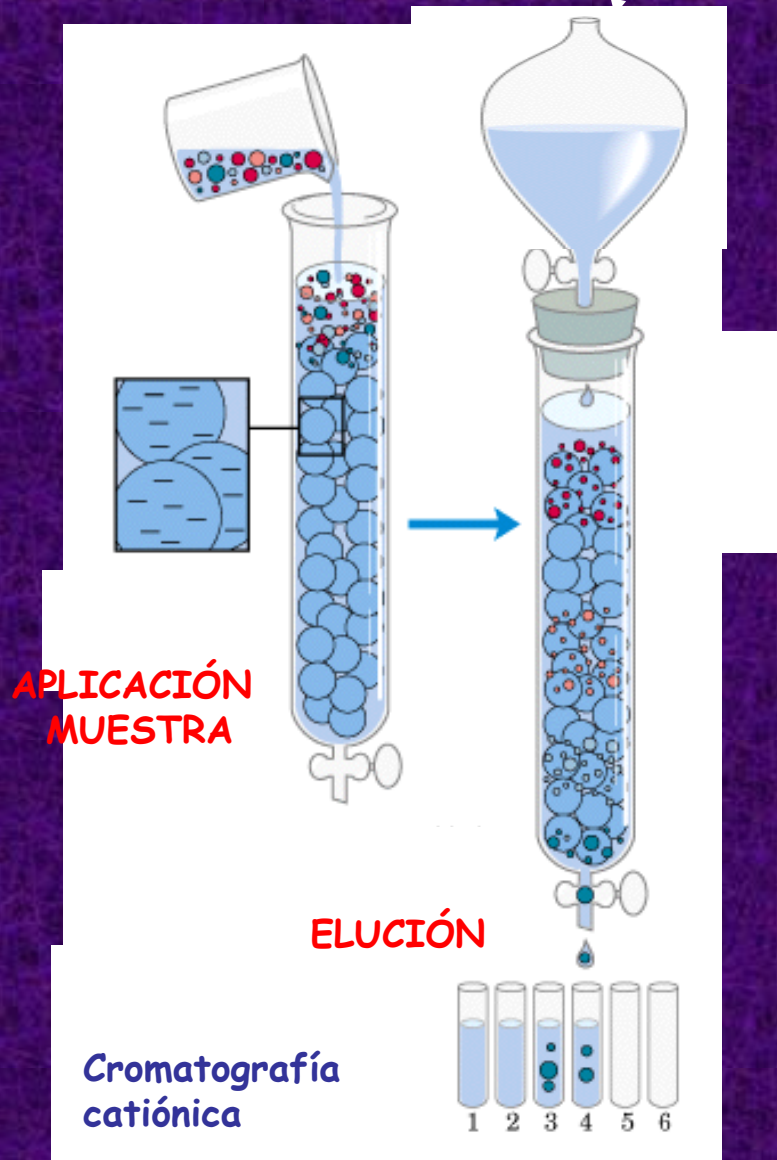
Las proteínas
presentan carga a
distintos pH
debido a sus pI

Table 5-2 Isoelectric Points of Several
Common Proteins

Protein	pI
Pepsin	<1.0
Ovalbumin (hen)	4.6
Serum albumin (human)	4.9
Tropomyosin	5.1
Insulin (bovine)	5.4
Fibrinogen (human)	5.8
γ -Globulin (human)	6.6
Collagen	6.6
Myoglobin (horse)	7.0
Hemoglobin (human)	7.1
Ribonuclease A (bovine)	9.4
Cytochrome <i>c</i> (horse)	10.6
Histone (bovine)	10.8
Lysozyme (hen)	11.0
Salmine (salmon)	12.1

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

- Gradiente de pH
- Gradiente salino



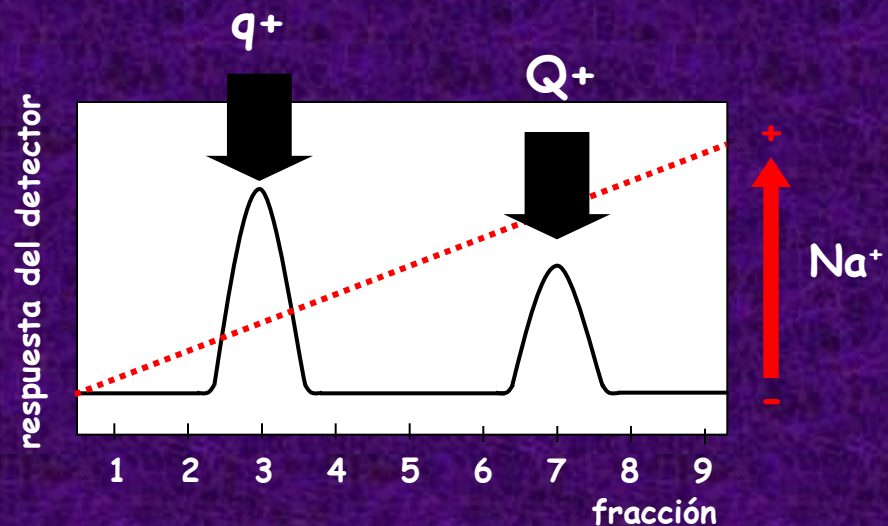
Molec. MENOR CARGA (+) → RÁPIDAS

Son desplazadas más fácilmente por la f.móvil.

Molec. MAYOR CARGA (+) → LENTAS

Son retenidas por los grupos cargados iónicamente de la f. estacionaria.

PERFIL DE ELUCIÓN



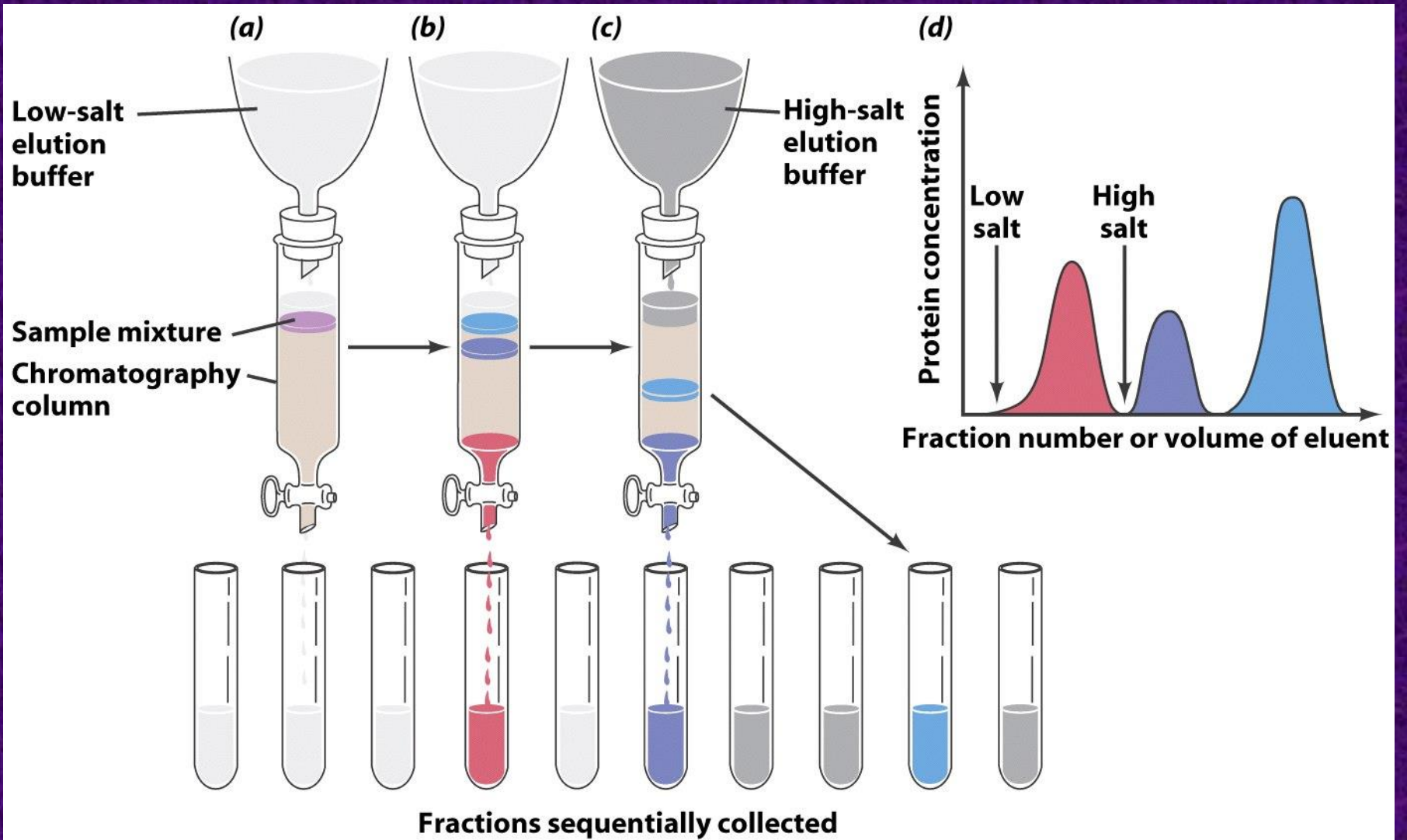


Figure 5-6 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
 © 2006 John Wiley & Sons

CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

PROPIEDAD: Interacciones específicas entre dos moléculas
hormona-receptor
proteína-metal o cofactores como ATP
antígeno-anticuerpo

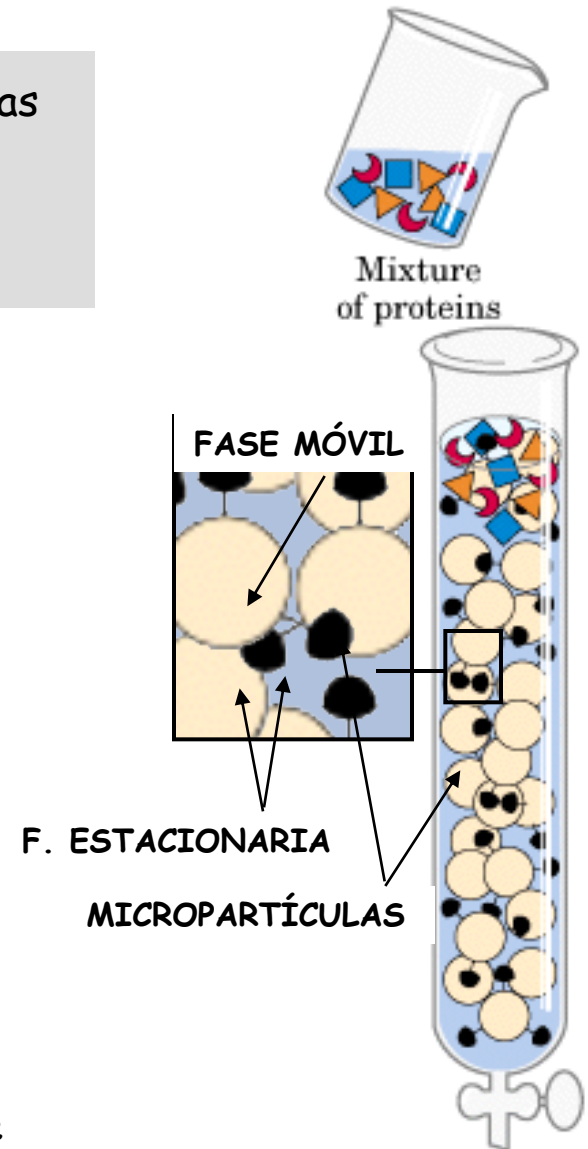
SOPORTE → Matriz de micropartículas hidrofílicas sin carga, con rigidez, inerte y estable (agarosa, acrílica).

F. ESTACIONARIA → **SÓLIDA** Ligandos (grupos químicos) específicos unidos a la matriz

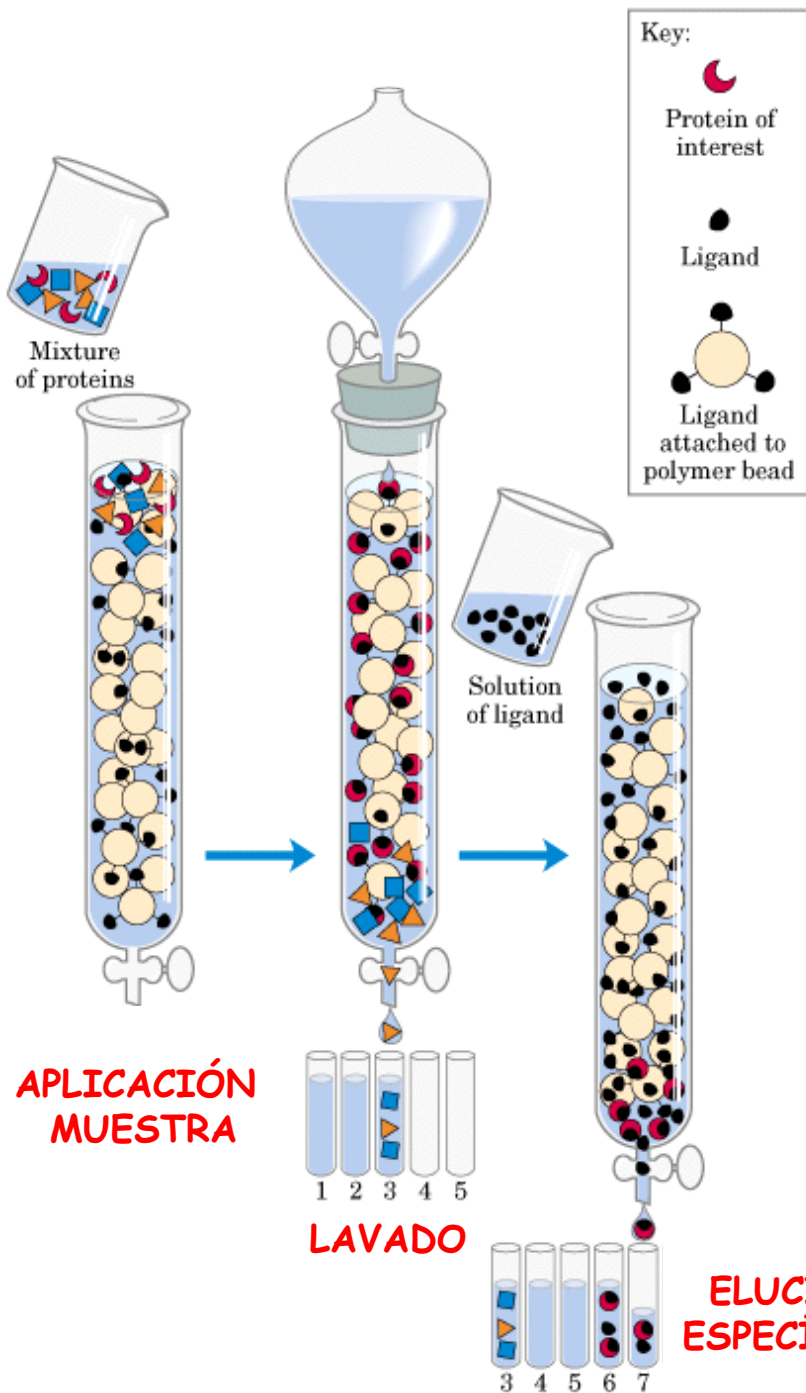
- Comerciales: Concavalina A → une glicoproteínas
 Proteína A → une IgG (anticuerpos)
- No comerciales: anclaje covalente ligando - matriz

F. MÓVIL → **LÍQUIDA** Solución que anula o disminuye la afinidad con el ligando de la fase estacionaria.

- Solución con el propio ligando → Molécula + ligando libre
- Solución con algo que interacciona con el ligando → Molécula



CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD



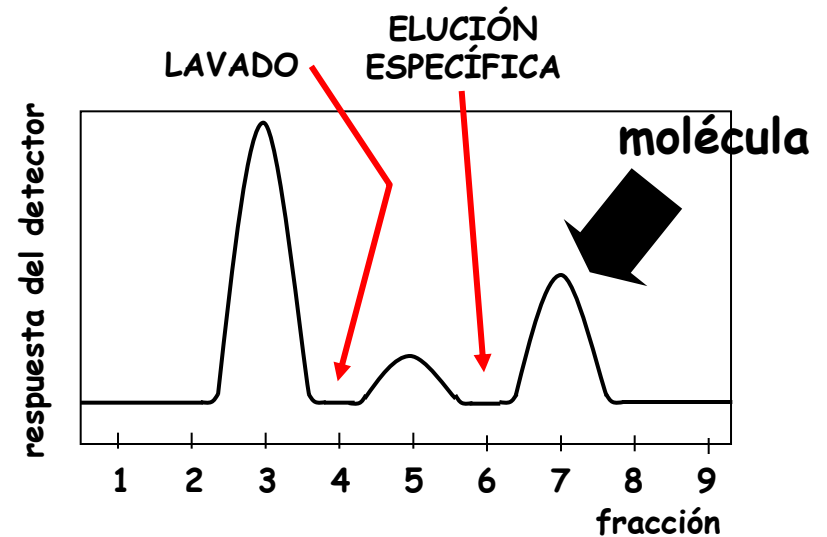
Molec. NO INTERACCIÓN → RÁPIDAS

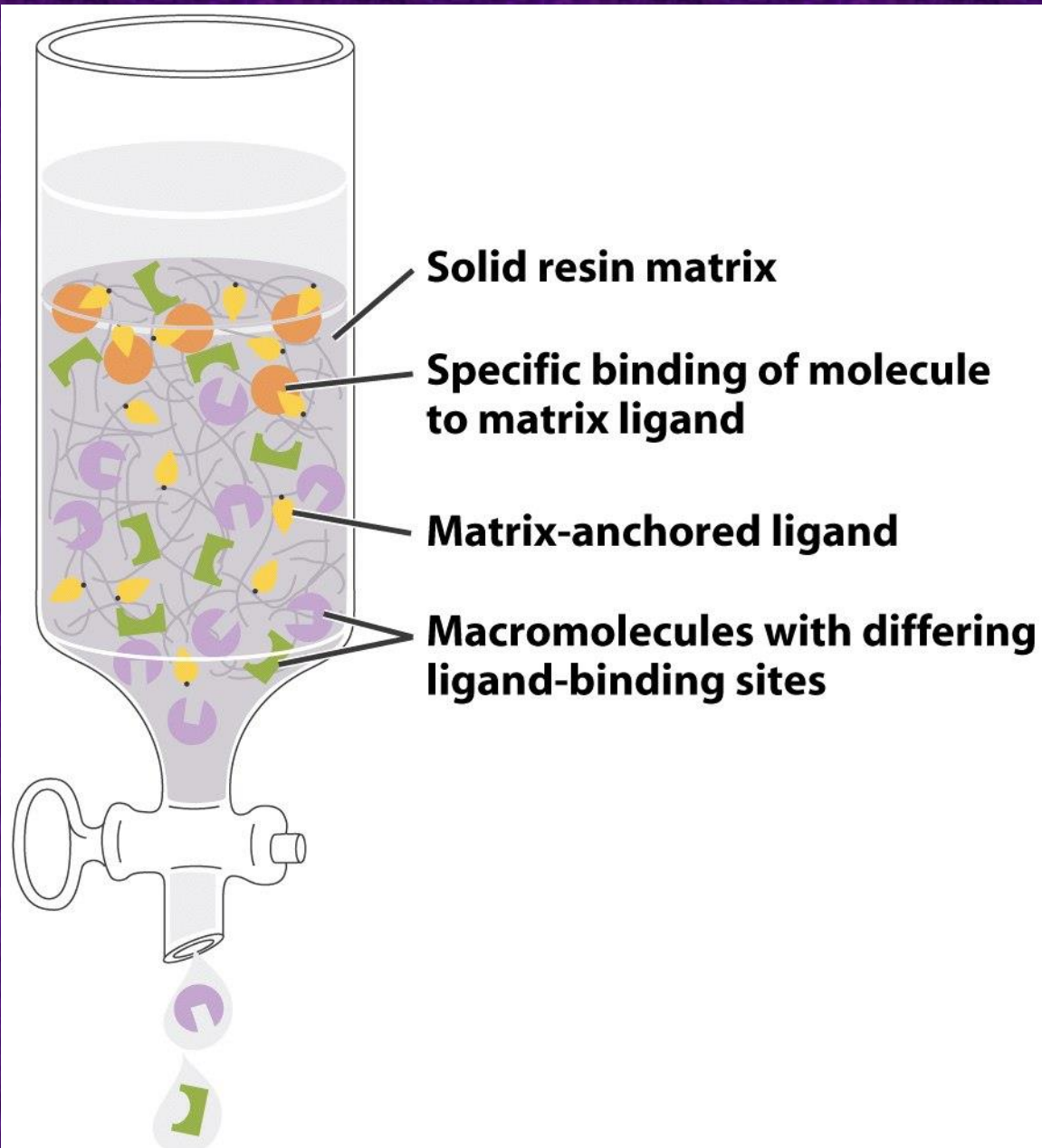
No se unen al ligando de la fase estacionaria

Molec. INTERACCIÓN → LENTAS

Se unen al ligando de la fase estacionaria
Elución específica.

PERFIL DE ELUCIÓN





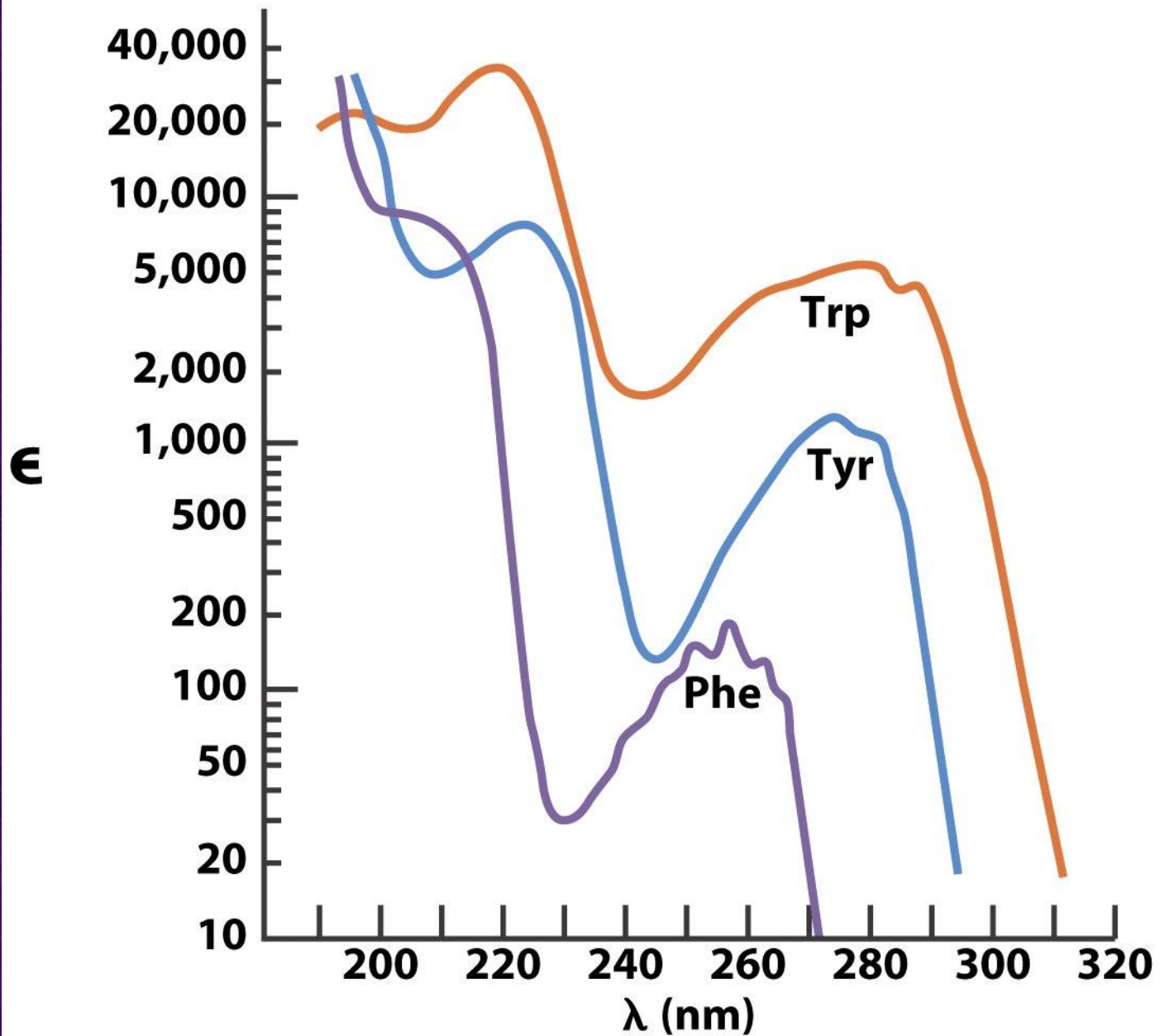


Figure 5-4 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons