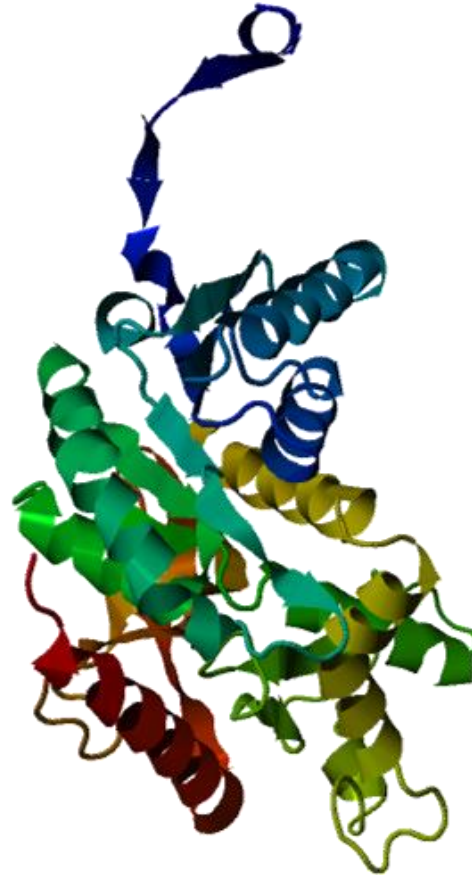
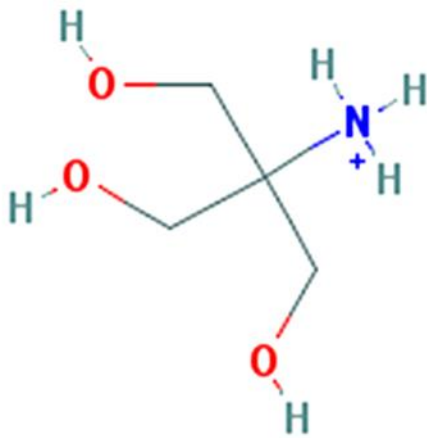


2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE PROTEÍNAS



Purificación de LDH de músculo de *Gallus gallus*

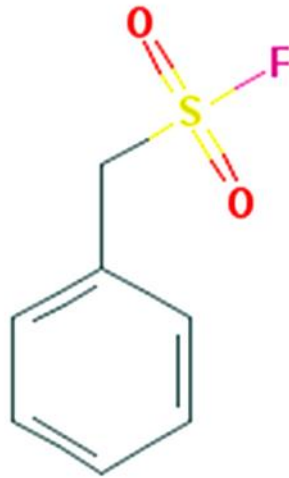


TRIS

2-amino-2-hidroximetil-
propano-1,3-diol

$pK_a = 8.07$

Buffer efectivo en un rango
de $pH = 7.07$ y 9.07

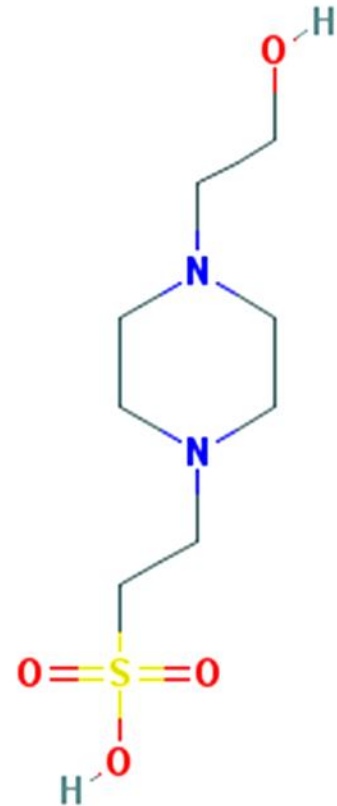


PMSF

Fluoruro de
Fenilmetilsulfonilo



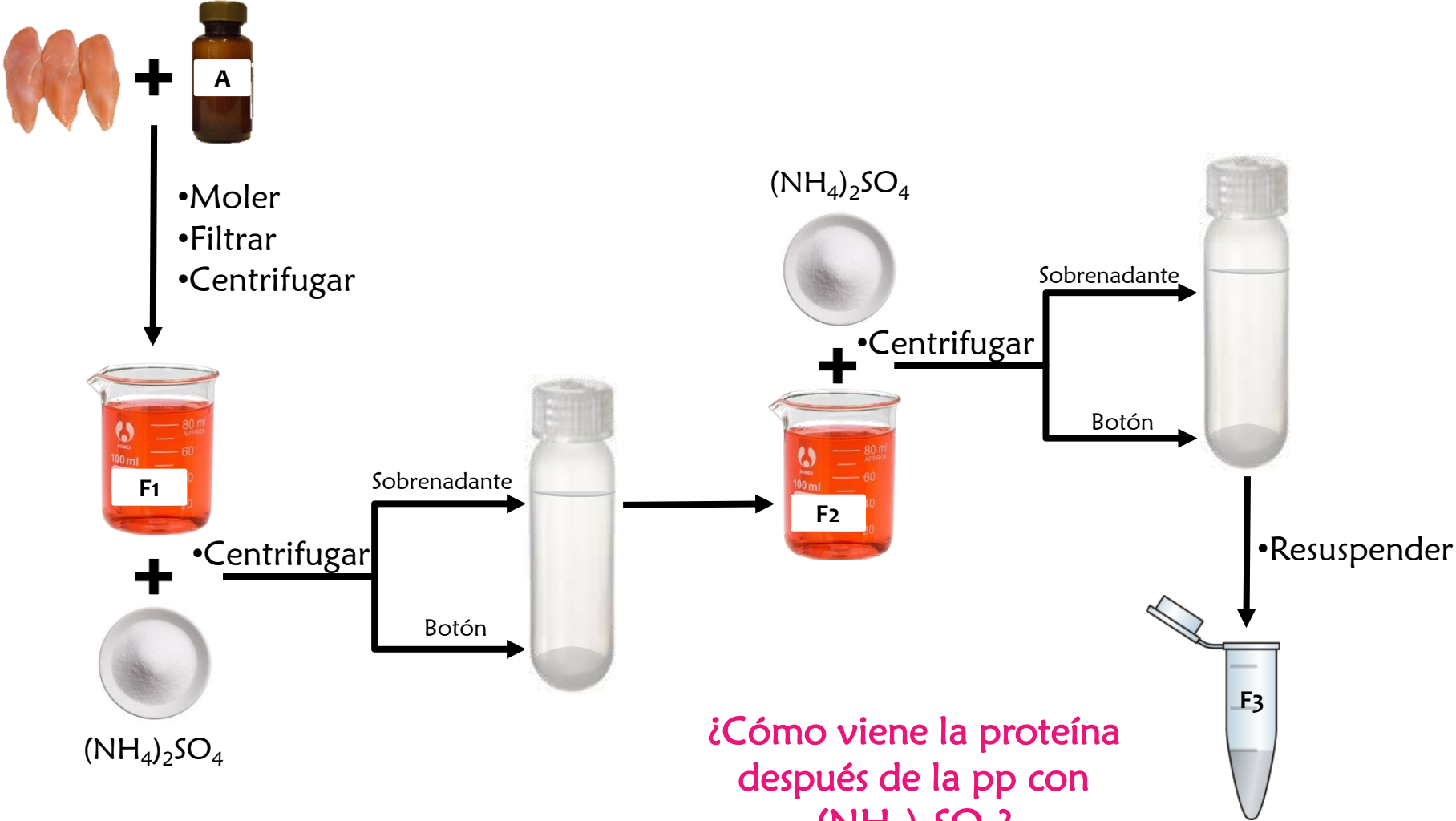
Mercaptoetanol
Agente reductor



HEPES

Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-
piperazine-etanosulfónico

PURIFICACIÓN DE LDH



¿Cómo viene la proteína después de la pp con $(NH_4)_2SO_4$?

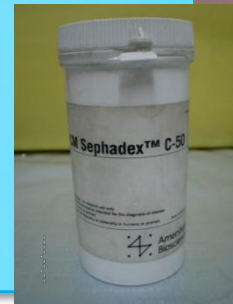
DESALAR

- Una vez que se obtiene el pp de una mezcla proteínica hay que eliminar la sal o medio utilizado para la precipitación.
- La sal puede interferir en los pasos posteriores de purificación
- La sal puede alterar las propiedades biológicas de la proteína

FILTRACIÓN. A través de una membrana porosa

DIÁLISIS. Es un método de separación basado en el tamaño de las moléculas en solución por la difusión selectiva a través de una membrana permeable.

FILTRACIÓN EN GEL.

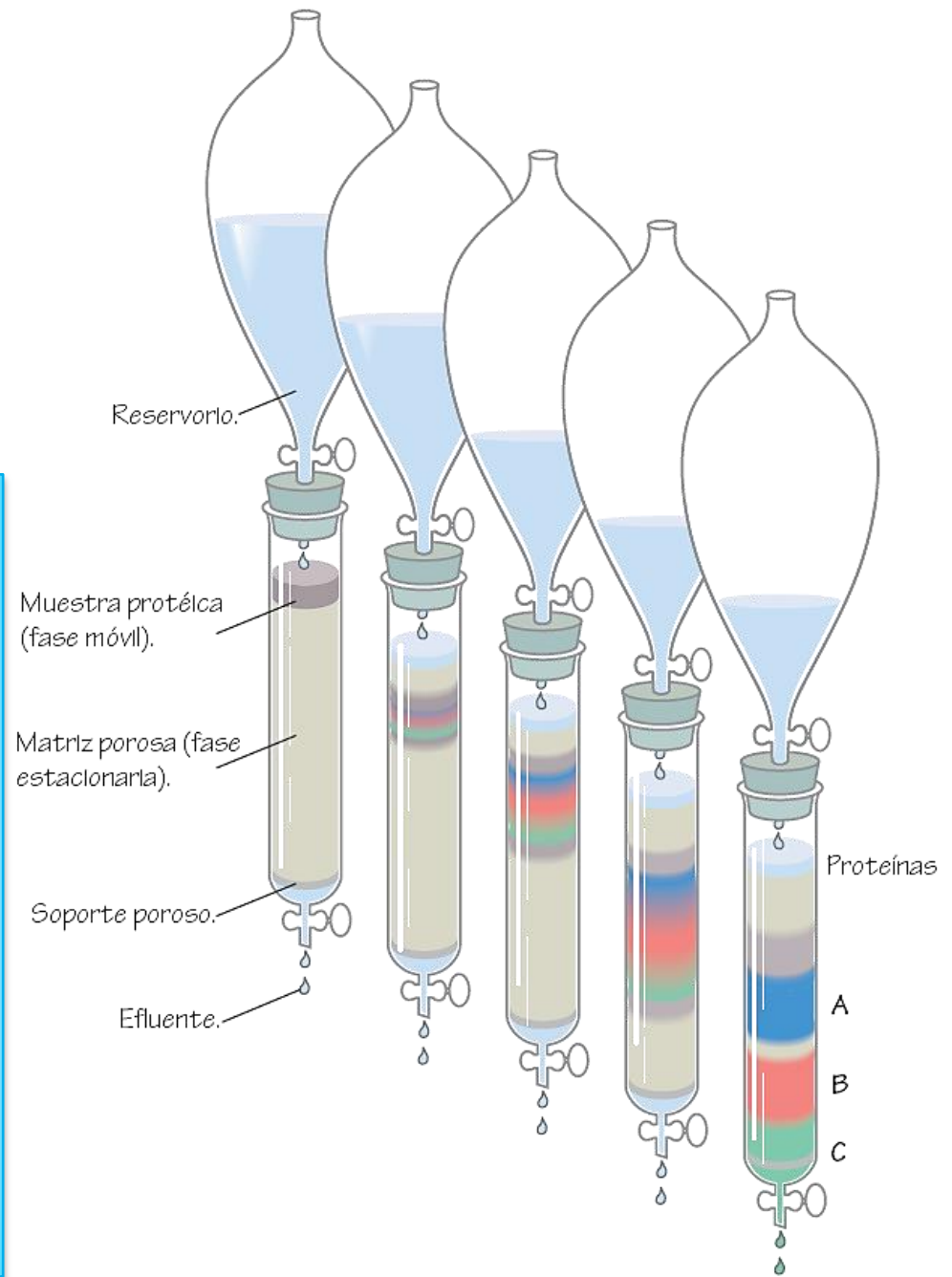


CROMATOGRAFÍA

Es un método de separación en el que entran en contacto una fase estacionaria y una fase móvil inmiscibles entre sí.

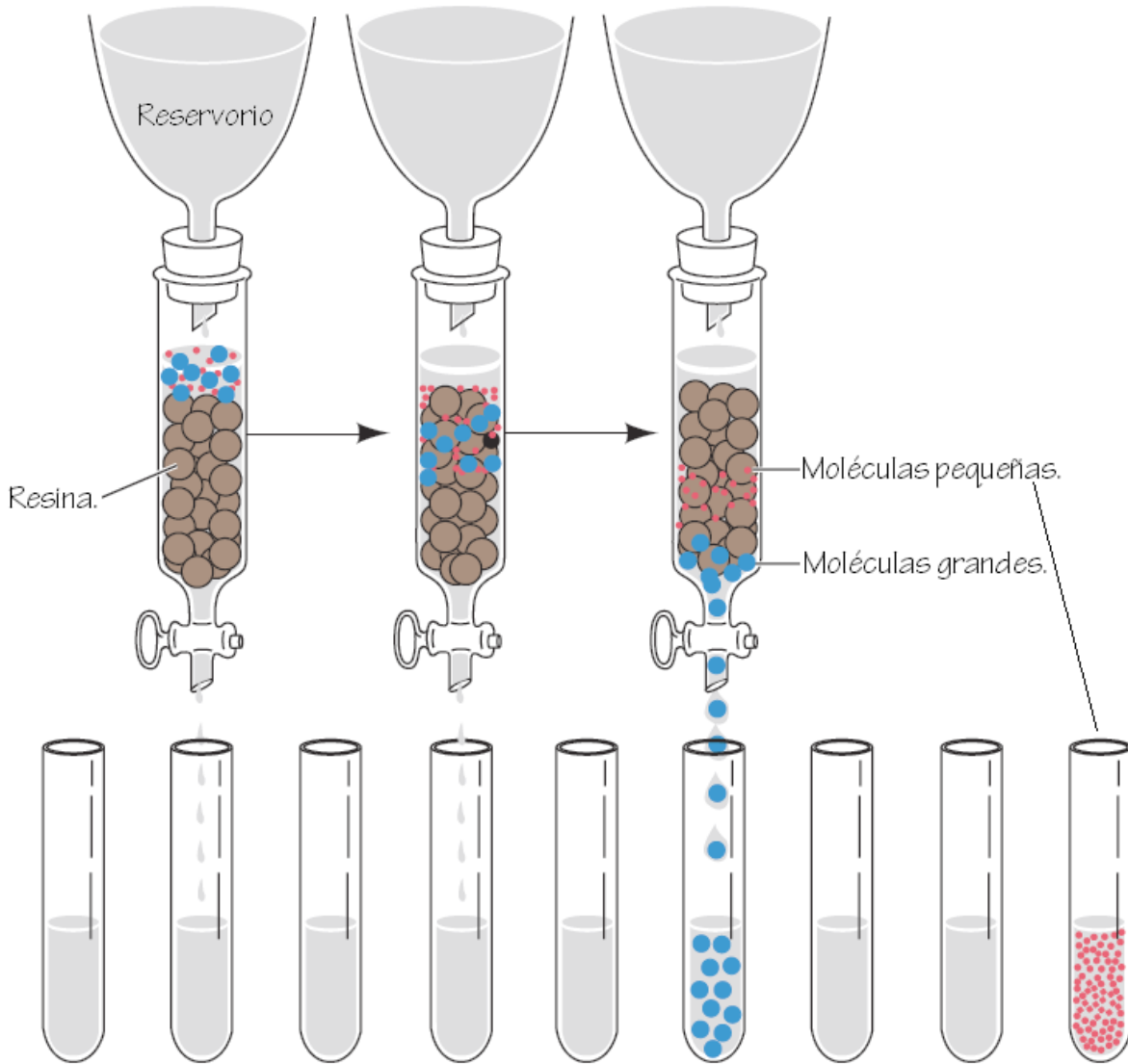
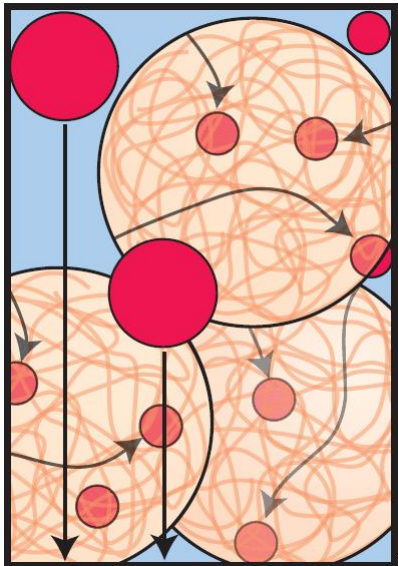
Fase estacionaria: Matriz sólida que tiene las propiedades químicas apropiadas para llevar a cabo la separación. Este material, se empaqueta en la columna.

Fase móvil: Es una solución amortiguada que contiene una mezcla de proteínas, entre ellas la que se desea separar. Esta solución es la que se hace pasar a través de la columna empacada.



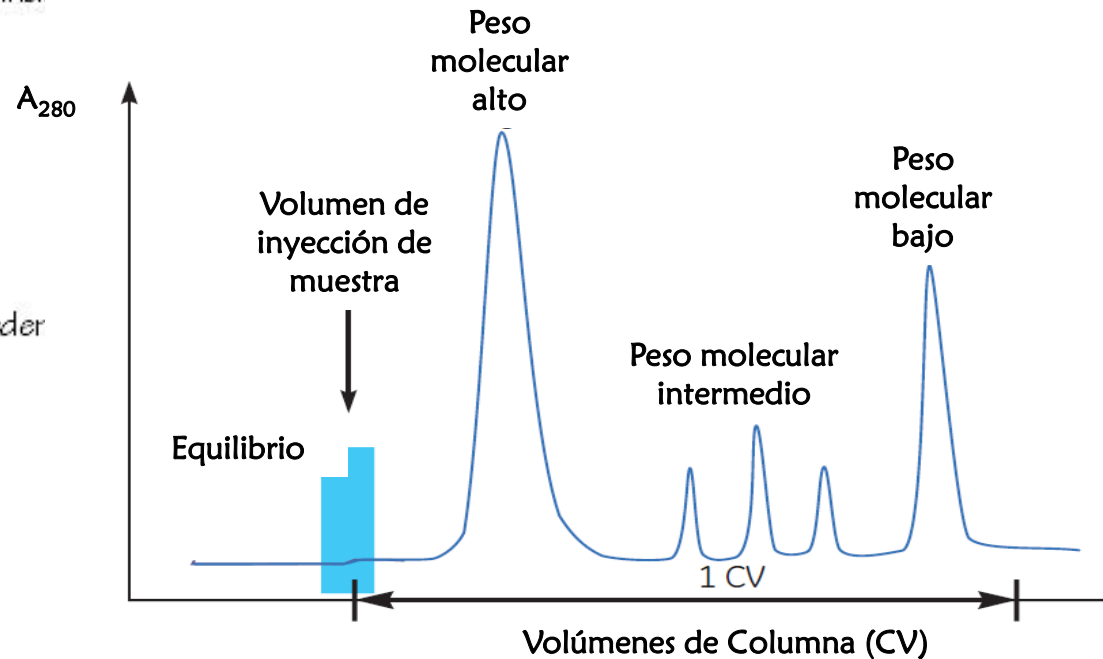
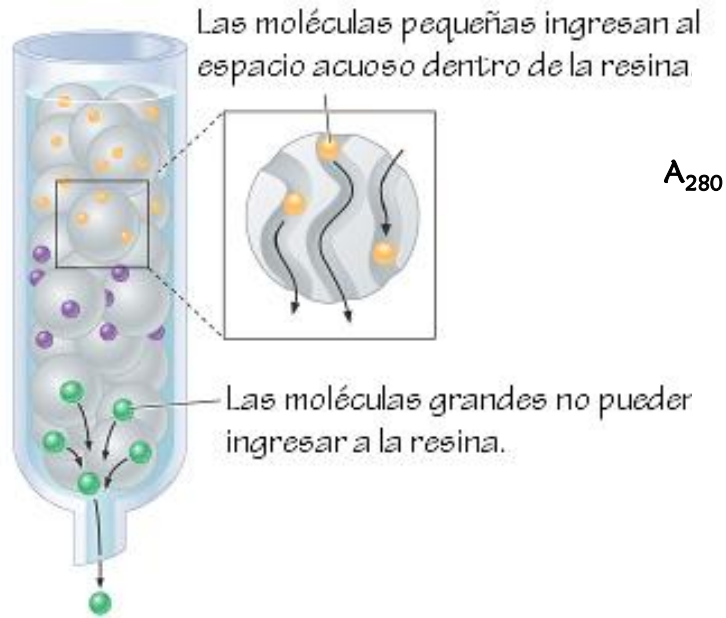
CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (FILTRACIÓN EN GEL)

- Separación de proteínas en función de su **tamaño y forma**.
- **NO** se basa en la unión de la proteína a la fase estacionaria.
- **Fase estacionaria:** Esferas de gel que contienen poros de tamaño definido, las esferas funcionan como “tamices moleculares”.



CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (FILTRACIÓN EN GEL)

Las moléculas más grandes no serán capaces de entrar en las cavidades de la resina y pasarán a través de la columna más rápido. Las moléculas pequeñas, serán capaces de entrar en los poros de las esferas y pasarán a través de la columna lentamente.



CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (FILTRACIÓN EN GEL)

La masa molecular de la molécula más pequeña incapaz de ingresar a los poros del gel, se conoce como el **límite de exclusión molecular**.

Nombre	Tipo	Rango de Fraccionamiento (kDa)
Sephadex G-10	Dextran	0.05–0.7
Sephadex G-25	Dextran	1–5
Sephadex G-50	Dextran	1–30
Sephacryl S-100	Dextran, cross-linked	1–100
Sephacryl S-200	Dextran, cross-linked	5–250
Bio-Gel P-2	Polyacrylamide	0.1–1.8
Bio-Gel P-30	Polyacrylamide	2.5–40
Bio-Gel P-100	Polyacrylamide	5–100
Sepharose 4B	Agarose	60–20,000
Sepharose 2B	Agarose	70–40,000

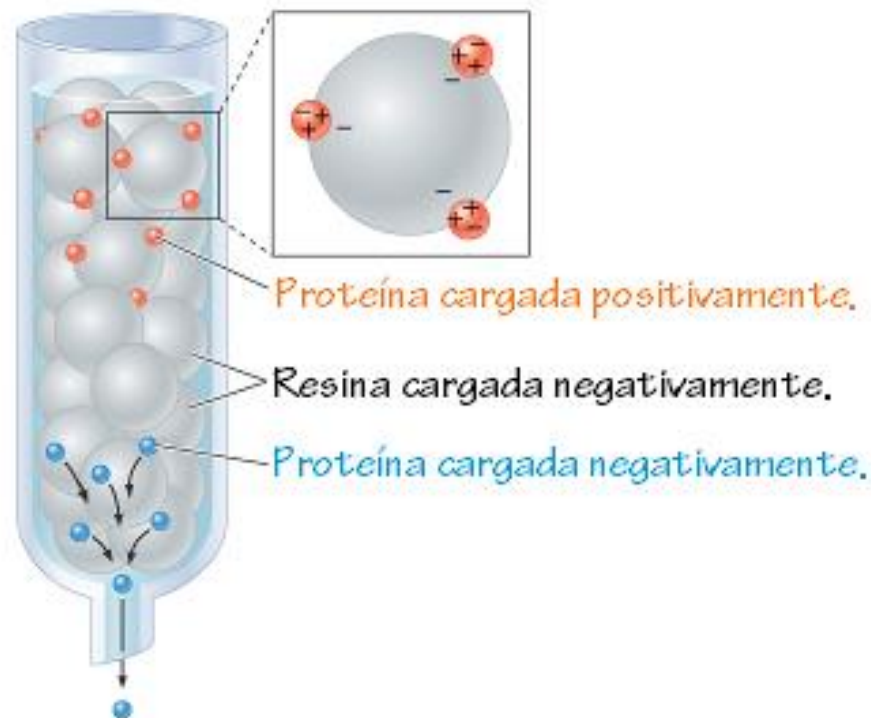
Permite trabajar con la proteína en un rango amplio de **pH, temperatura, fuerza iónica, variedad de aditivos**, ya que la composición del buffer no afecta la resolución.

¡Podemos cambiar las condiciones del buffer en este paso!

- ✓ Útil para separar sustancias de diferente tamaño, para estimar masas moleculares y para **desalar proteínas**.

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

- Separación de proteínas en función de su **carga eléctrica** a un **pH determinado**. Se basa en la unión (**no covalente y reversible**) de la proteína a la fase estacionaria.
- La **fase estacionaria** es un polímero sintético (**resina**) con una **carga eléctrica opuesta** a la de la **proteína** que se quiere purificar. Solo las proteínas de carga opuesta a la resina, quedarán unidas a ella.



CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

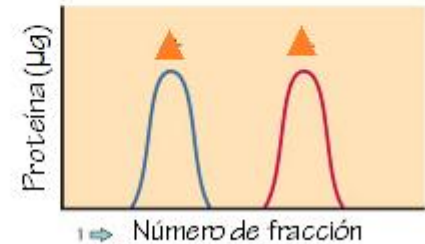
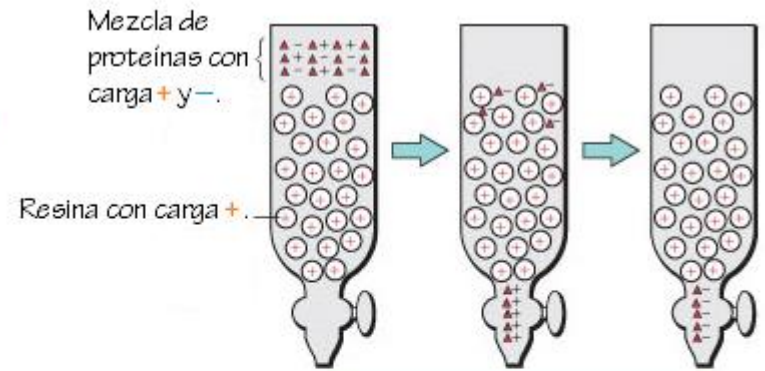
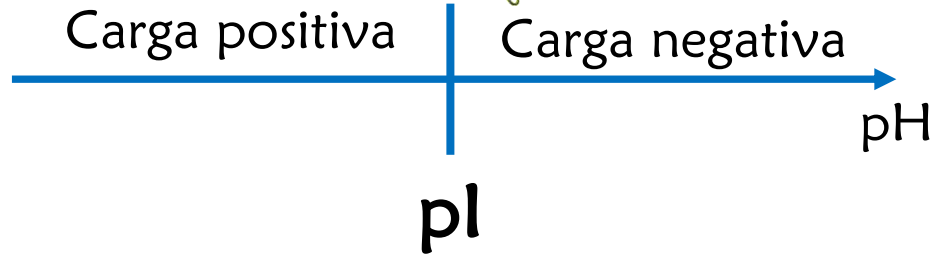
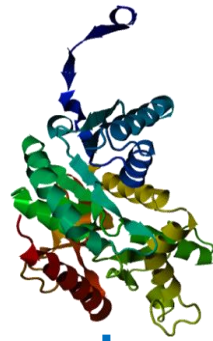
- ***Cromatografía de intercambio catiónico***, la matriz (resina) tiene una carga negativa, por lo tanto las proteínas que adsorberá son las que tienen una **carga positiva**.
- ***Cromatografía de intercambio aniónico***, la matriz (resina) tiene una carga positiva, por lo tanto las proteínas que adsorberá son las que tienen una **carga negativa**.

Nombre	Tipo	Grupo ionizable	Usos
DEAE-celulosa	Débilmente básico	Dietilaminoetil -CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Para separar proteínas ácidas y neutras
CM-celulosa	Débilmente ácido	Carboximetil -CH ₂ COOH	Para separar proteínas básicas y neutras
P-celulosa	Débil y fuertemente ácido	Fosfato -OPO ₃ H ₂	Dibásico, une fuertemente proteínas básicas
Bio-Rex 70	Débilmente ácido	Ácido carboxílico -COOH	Para separar proteínas básicas y aminas
DEAE-Sephadex	Débilmente básico	Dietilaminoetil -CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Combina filtración en gel para separar proteínas ácidas y neutras
SP-Sepharose	Fuertemente ácido	Metil sulfonato -CH ₂ SO ₃ H	Combina filtración en gel para separar proteínas básicas y neutras

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Las proteínas son moléculas con carga...

- La afinidad de cada proteína por los grupos cargados de la resina es afectada por el pH (que determina el estado de ionización de la molécula) y la concentración de iones libres que puedan competir por la unión con la resina.



CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

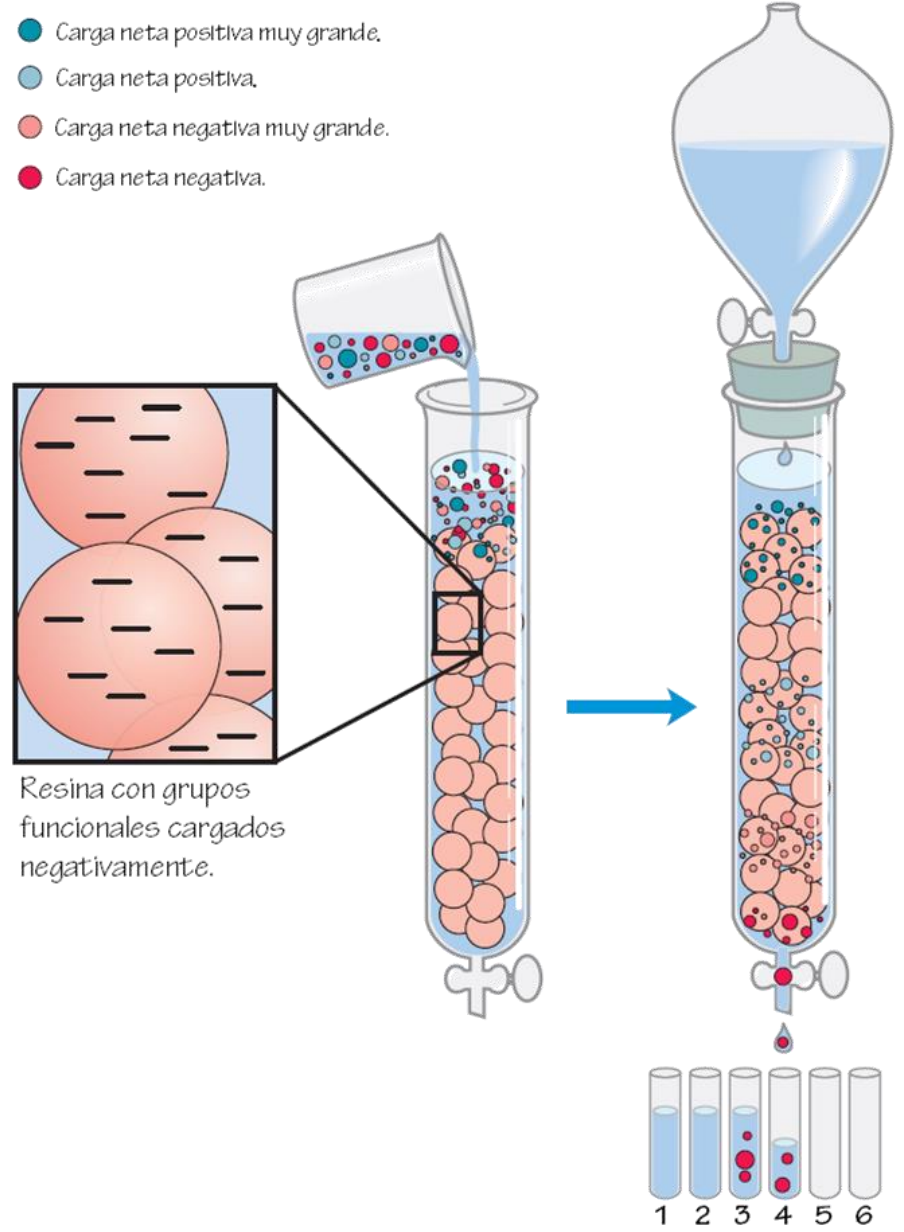
Las proteínas que no se unen se eliminan durante los lavados.

Las que se unen lo hacen con diferente afinidad: a mayor carga de la proteína, mayor será la retención en la resina.

¿Cómo sacamos a la proteína de la columna?

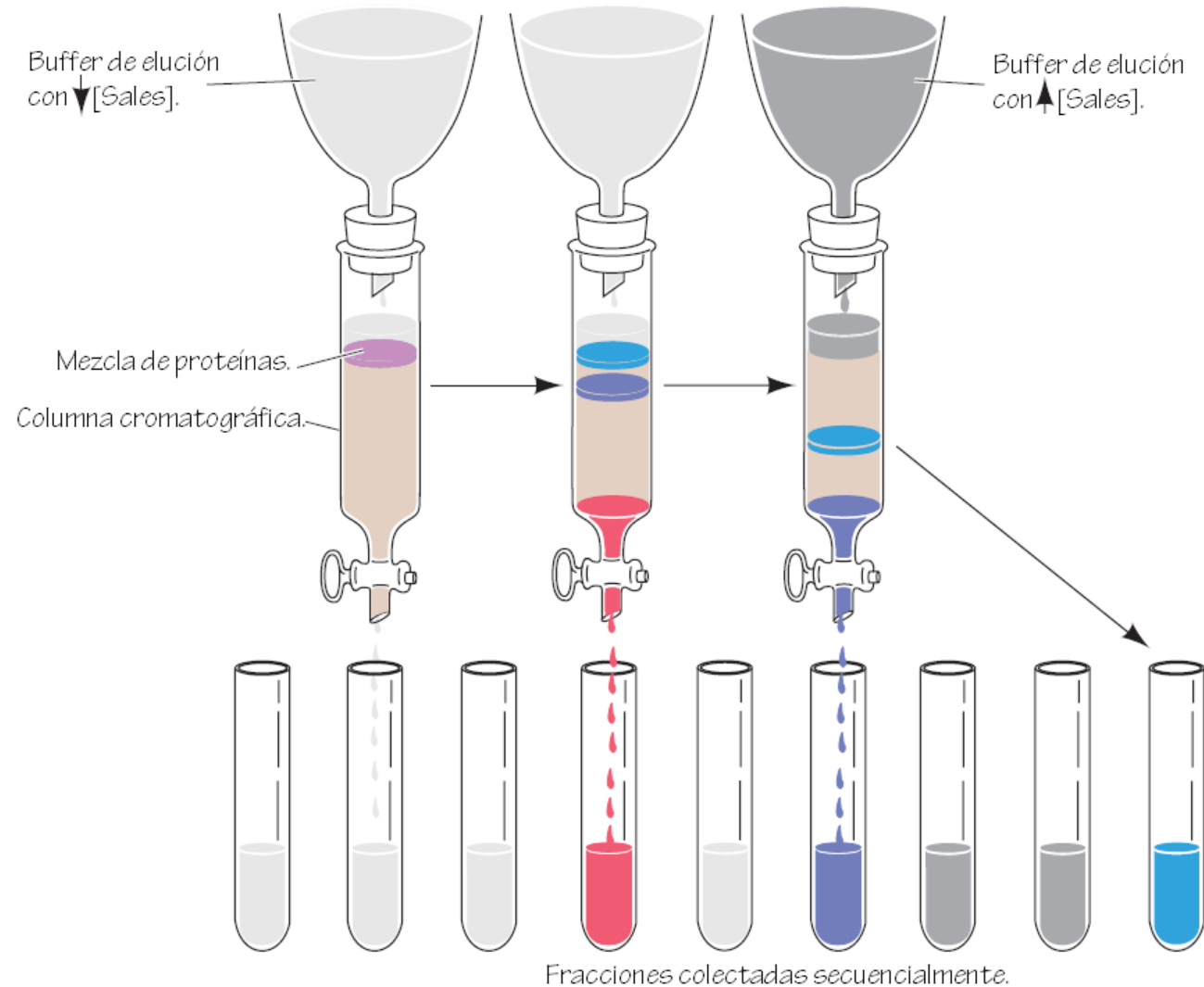
Elución: Desorción de la muestra desfavoreciendo la generación del enlace iónico entre la proteína y la matriz

- Carga neta positiva muy grande.
- Carga neta positiva.
- Carga neta negativa muy grande.
- Carga neta negativa.



CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

- Elevando la concentración de sales o cambiando el pH.
- NaCl, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, CH₃COO⁻, SO₄²⁻, I⁻, Br⁻.
- Separar una proteína de otros contaminantes
- Separar aa's, péptidos, nucleótidos y compuestos iónicos.
- En la clínica para separar hemoglobina, isoenzimas y esteroides.



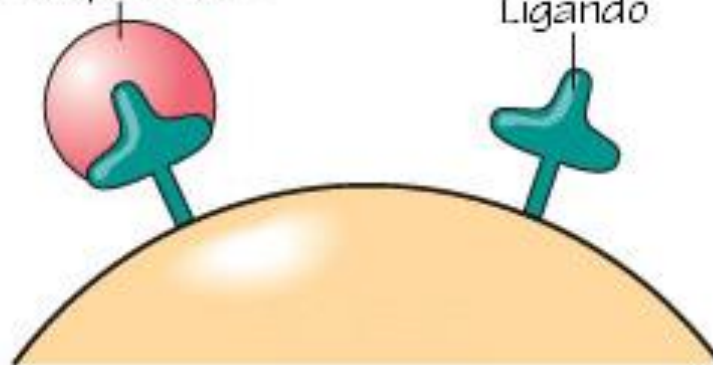
CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

- Separación de proteínas en función de la capacidad que tienen de **unirse biospecíficamente** y de modo **no covalente** a un **ligando**. Se basa en la unión **biospecífica (no covalente y reversible)** de la proteína a la fase estacionaria.

- ✓ Enzima-Sustrato, inhibidor, cofactor
 - ✓ Ag-Ac
- ✓ Proteína-Secuencia de ácido nucleico
 - ✓ Hormona-Receptor
- ✓ Proteína de fusión GST-Glutatión-S-transferasa
- ✓ Proteínas de fusión con poli (Hys)-Iones metálicos

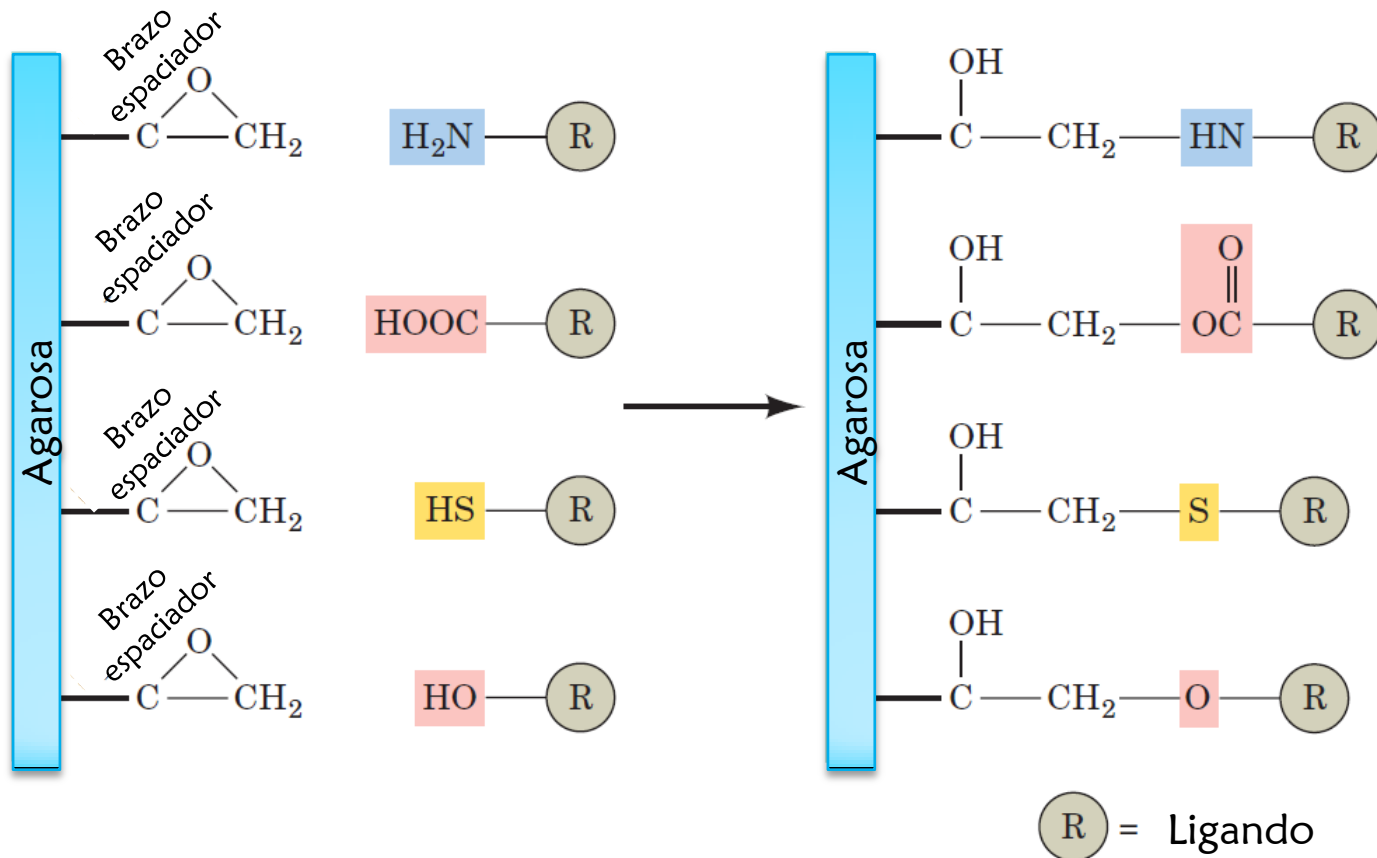
Proteína que se desea purificar.

Ligando



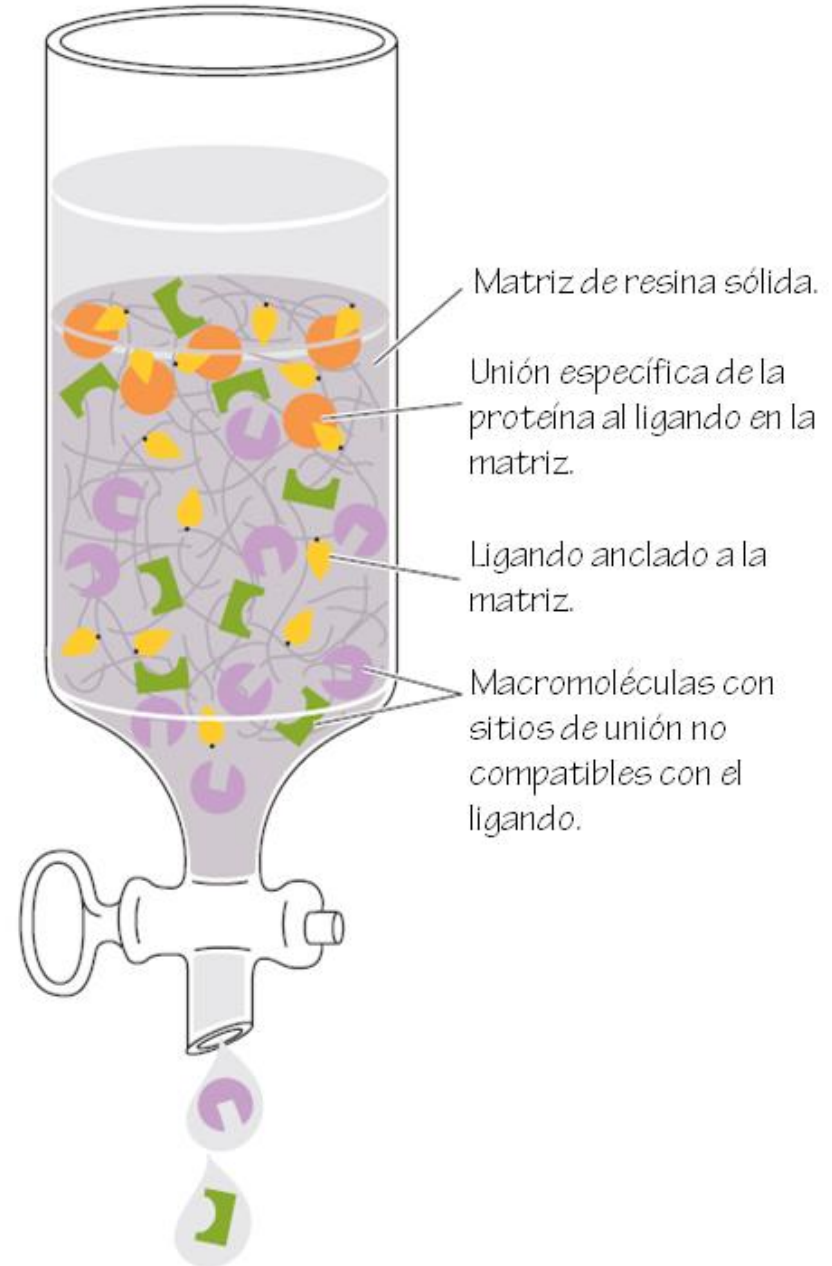
CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

- La **fase estacionaria** es una **resina** químicamente inerte, porosa, con un gran número de grupos funcionales capaces de formar **enlaces covalentes** con los **ligandos**.



CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

- **Unión proteína-ligando:** Interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, fuerzas de van der Waals, puentes de H. **NO COVALENTE.**
- Unión **específica y fuerte**; pero no tan elevada para que se pueda liberar posteriormente a la proteína de la resina.
- La muestra se aplica bajo condiciones que **favorezcan** la **unión** de la **proteína** al **ligando**.
- El material que no se une, se elimina durante los **lavados**.

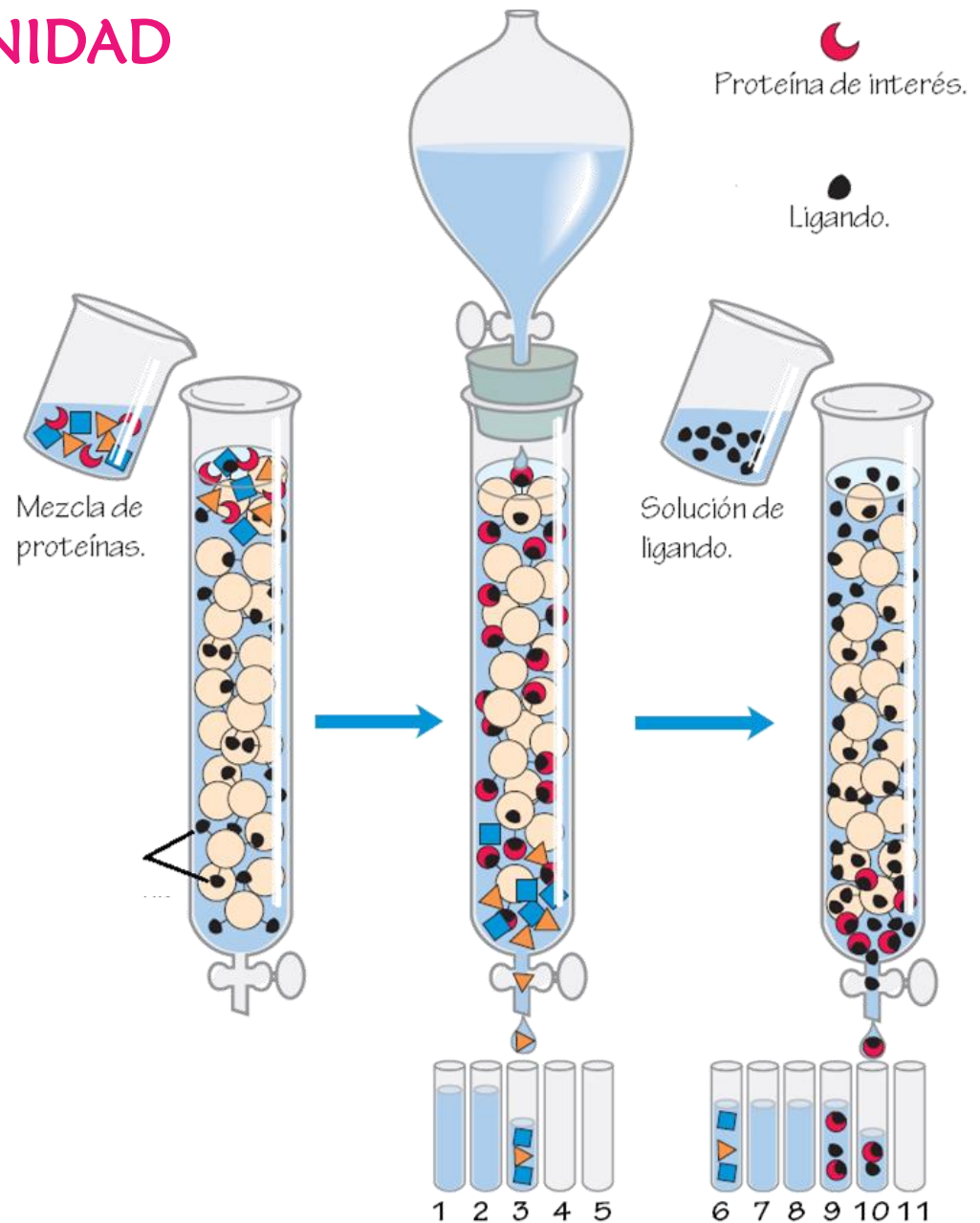


CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

- **Elución específica:** ligando competitivo,
- **Elución inespecífica:** cambiando el pH, la fuerza iónica o la polaridad del medio.

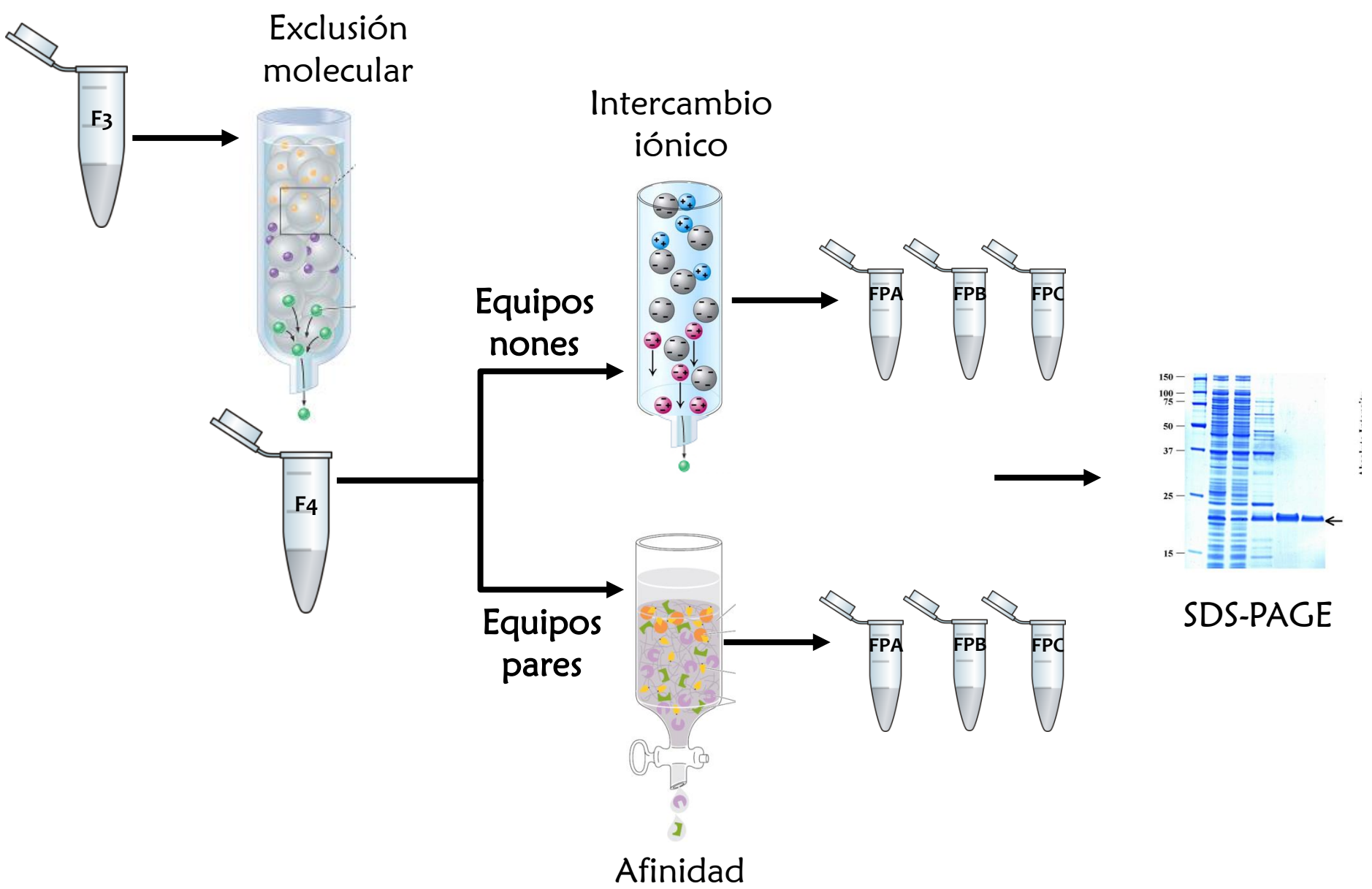
Ventajas:

- Explora propiedades bioquímicas únicas
- Se evitan varios pasos de purificación.
- Se obtienen altos rendimientos y alta actividad específica



EN RESUMEN....

Propiedad de la proteína	Tipo de cromatografía	Orden de elución	¿Cómo se puede eluir?
Tamaño y forma	Exclusión molecular (Filtración en gel)	Moléculas más grandes: salen primero	Se puede trabajar con cualquier buffer, pH, fuerza iónica, temperatura
Carga	Intercambio iónico	Misma carga de la resina: salen primero	Cambiando el pH, agregando un exceso de sal
Reconocimiento ligando específico	Afinidad	Sin reconocimiento: salen primero	Cambiando el pH, agregando un exceso de sal o ligando



Propiedades de LDH de *Gallus gallus*

	LDH A	LDH B
Numero de aminoácidos	332	333
Peso molecular (Da)	36514.4	36318.0
Punto isoeléctrico	7.75	7.07
Promedio general de hidropaticidad (GRAVY)	-0.004	0.087
Localización celular	Citoplasma	Citoplasma
Forma activa	Homotetrámero	Homotetrámero
Superfamilia	LDH/MDH	LDH/MDH
Tipo de enzima	Oxidoreductasa	Oxidoreductasa
Cofactor	NAD ⁺	NAD ⁺

