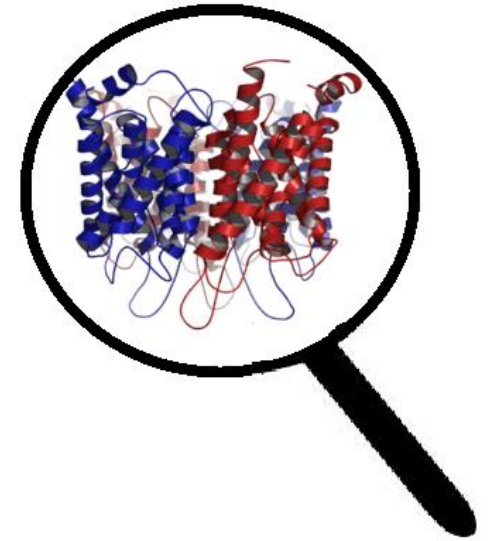


Monitoreo del proceso de purificación



Parte I: Determinación de proteínas por el método de Bradford

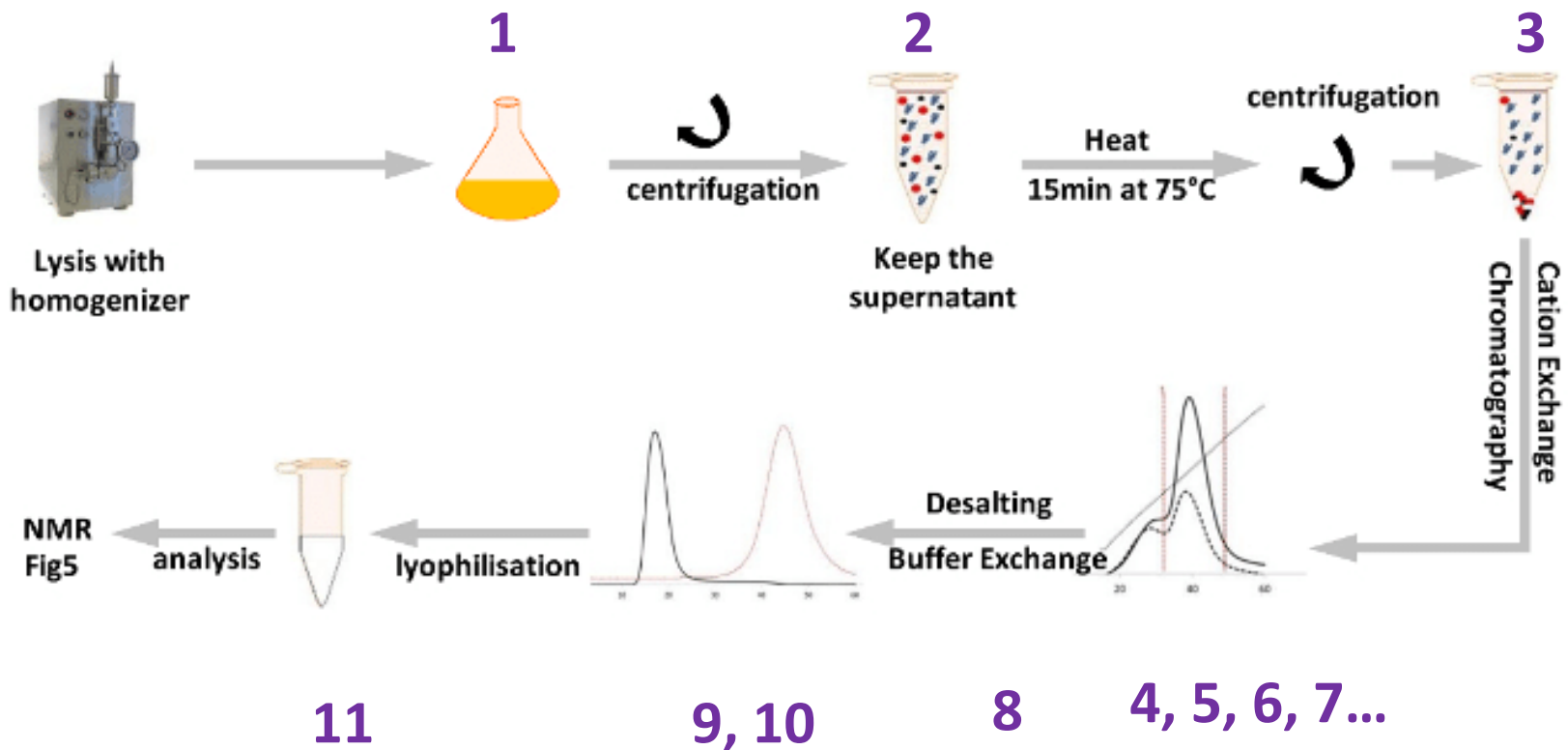
Parte II: Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Parte III: Determinación de la actividad enzimática

Objetivos

1. Conocer los métodos que se utilizan para monitorear el proceso de purificación de una proteína.
2. Adquirir la habilidad para analizar el progreso de la purificación de una proteína.
3. Aplicar un método espectrofotométrico para medir la concentración de una proteína.
4. Determinar la concentración de una proteína utilizando un método colorimétrico: Determinación de proteínas por Bradford.
5. Analizar el progreso de la purificación de una proteína.
6. Conocer algunos parámetros que se determinan durante la purificación de una proteína: rendimiento y pureza.
7. Aplicar el conocimiento adquirido para elaborar esquemas de purificación de proteínas.

En todo protocolo de purificación hay que tomar muestras a cada paso para determinar si ayudo a enriquecer en la proteína de interés



Para determinar el enriquecimiento y el nivel de purificación hay que construir una tabla de purificación

El primer paso para su construcción es conocer la concentración y contenido total de proteínas de la fracciones obtenidas durante el protocolo de purificación

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity, (units mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification level
Homogenization	15,000	150,000	10	100	1
Salt fractionation	4,600	138,000	30	92	3
Ion-exchange chromatography	1,278	115,500	90	77	9
Molecular exclusion chromatography	68.8	75,000	1,100	50	110
Affinity chromatography	1.75	52,500	30,000	35	3,000

Monitoreo del proceso de purificación

PARTE I: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR BRADFORD

Complejo de las proteínas con el Coomasié

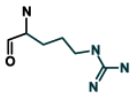
Phenylalaninyl molecule

L-phenylalanine



Arginyl molecule

L-arginine



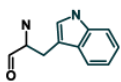
Protyl molecule

L-proline



Tryptophanyl molecule

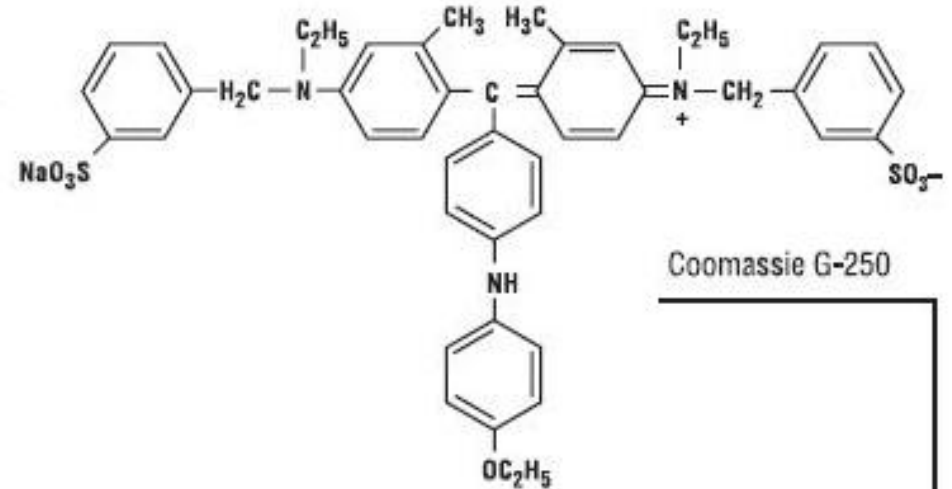
L-tryptophan



PROTEIN

Basic and Aromatic Side Chains

+



Coomassie G-250

465 nm



$A_{\max} = 595 \text{ nm}$

Protein-Dye Complex



Unión del **azul de Coomasie Brillante (G250)** a los residuos **aromáticos y arginina** cambia la absorbancia máxima del colorante

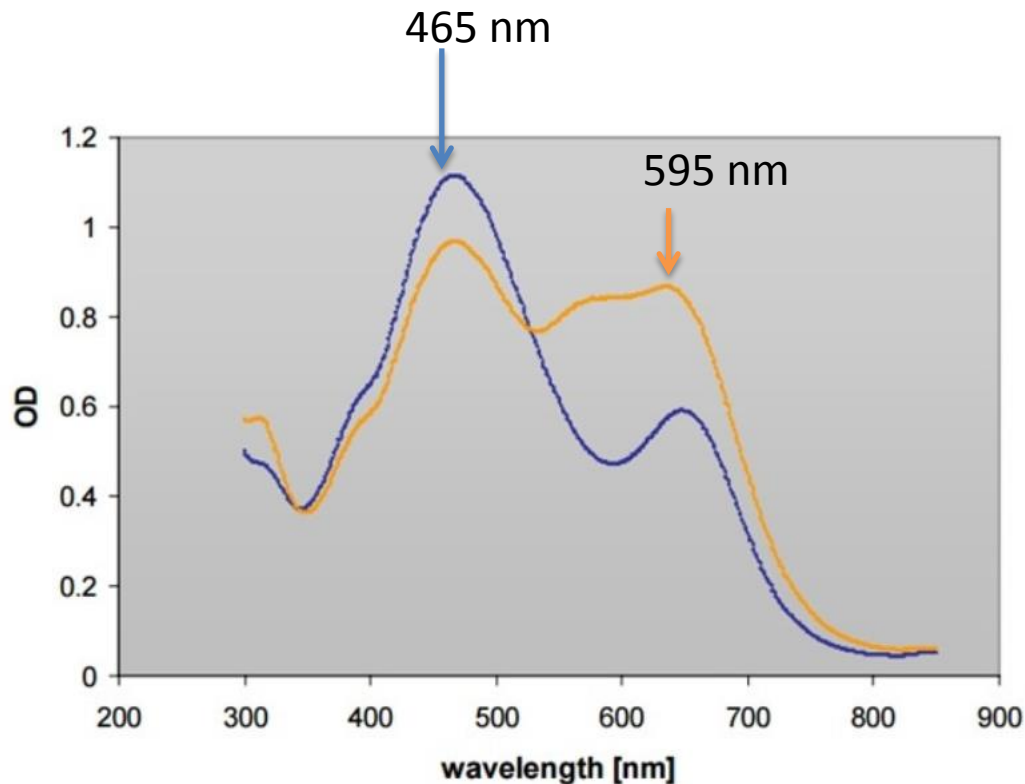


Figure 3. Absorbance scan (300-900 nm) of BioRad Protein assay reagent with (—) and without (—) BSA on Infinite M200 reader.

¿porqué hacer Bradford en nuestra práctica?

Tabla comparativa de las características de los métodos de Biuret, Lowry y Bradford para medir proteínas

Método	Sensibilidad	Precisión	Interferencia
Biuret	0-1 a 10 mg	Alta, no depende la composición de aminoácidos	Grupos amino [(NH ₄) ₂ SO ₄]
Lowry	0-0.1 mg	Parcialmente dependiente de la composición de aminoácidos	Ácidos, EDTA, DTT, fenol, (NH ₄) ₂ SO ₄
Bradford (microescala)	0-0.01 mg	Dependiente de la composición de aminoácidos	Detergentes

Vrsanska M, Kumbar V, 2015. A comparison of Biuret, Lowry and Bradford methods for measuring the egg's proteins. MenderlNet.

https://mnet.mendelu.cz/mendelnet2015/articles/62_vrsanska_1167.pdf

Orden de adición de reactivos para la determinación de proteínas del **estándar de BSA** por el método de Bradford

Tubo	B	1	2	3	4	5
H ₂ O (μL)	800	770	760	740	720	700
BSA (μL)	0	30	40	60	80	100
Reactivo	200	200	200	200	200	200
Bradford (μL)						
Absorbancia						

800 μL

BSA 0.1 mg /mL

Bradford reagent

1. Dissolve 50 mg of **Coomassie Brilliant Blue G-250** in 50 ml of methanol and add 100 ml 85% (w/v) **phosphoric acid** (H_3PO_4).
2. Add the acid solution mixture slowly into 850 ml of H_2O and let the dye dissolve completely (*note: Do not add H_2O into the acid solution*).
3. Filter using Whatman #1 paper to remove the precipitates just before use.
4. Store in a **dark bottle** at 4 °C.

Comparación de la determinación de proteínas mediante el método de **Lowry** y **Bradford**

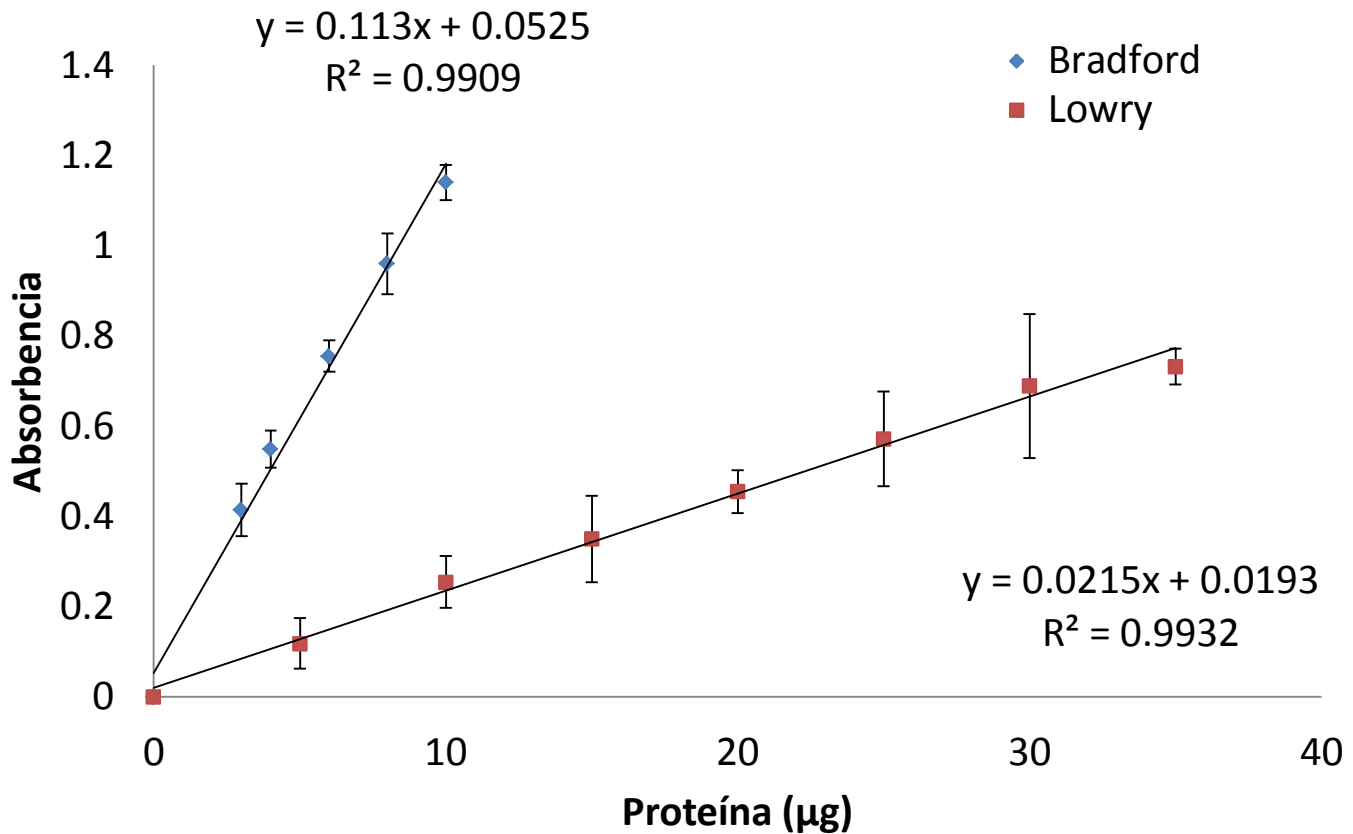


Tabla 2.3. Determinación de la concentración de proteína de las fracciones obtenidas durante los diferentes pasos de la purificación de la LDH de músculo esquelético de pollo. **F** corresponde a Fracción y conc a que la muestra se usará concentrada. Los espacios vacíos se dejaron para colocar el volumen usado de agua o fracción. A todas las fracciones se les determinará la concentración de proteína por duplicado

Tubo	H ₂ O (μL) c.b.p. 800 μL	F1 dil____ (μL)	F2 dil____ (μL)	F3 dil____ (μL)	F4 dil____ (μL)	FPA conc (μL)	FPB conc (μL)	FPB conc (μL)	Reactivo Bradford (μL)	Absorbancia 595 nm
1			----	----	----	----	----	----	200	
2			----	----	----	----	----	----	200	
3		----		----	----	----	----	----	200	
4		----		----	----	----	----	----	200	
5		----	----		----	----	----	----	200	
6		----	----		----	----	----	----	200	
7		----	----	----		----	----	----	200	
8		----	----	----		----	----	----	200	
9		----	----	----	----		----	----	200	
10		----	----	----	----		----	----	200	
11		----	----	----	----	----		----	200	
12		----	----	----	----	----	----		200	
13		----	----	----	----	----	----		200	
14		----	----	----	----	----	----		200	

12. Utilizar los parámetros de regresión obtenidos de la curva estándar para calcular el contenido de proteína de cada una de las muestras de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de proteína } (\mu\text{g}) = \left(\frac{\text{Abs}_{\lambda 595\text{nm}} - b}{m} \right) * F$$

Donde, **b** es la ordenada al origen,

m la pendiente y

F es el factor de dilución de cada muestra (recuerda el factor de dilución es adimensional y si hiciste dilución el valor es mayor a 1 y corresponde al número de veces que diluiste)

13. Dividir el valor de contenido de proteína entre el volumen de muestra que utilizaron en el ensayo para obtener la concentración de proteína expresada en **μg/μL**.
14. Posteriormente realizar los promedios por muestra (recuerda que tienes duplicados

Llenar la tabla para tener el contenido total de proteína de las fracciones del proceso de purificación de la LDH

Fracción (NOMBRE DEL PROCESO O FRACCIÓN)	Promedio (μg proteína/μL)	Volumen total en la fracción (mL)	Proteína total en la fracción (μg o mg)
1 (homogeneizado)		14	
2 (
3 (
4 (
FA (
FB (
FC (
FD (