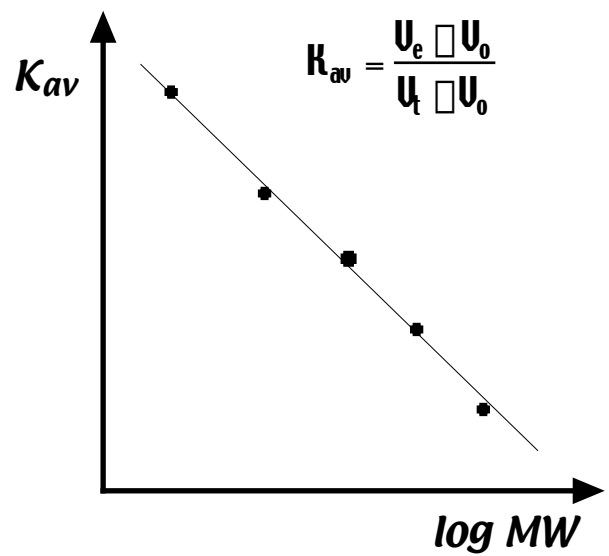
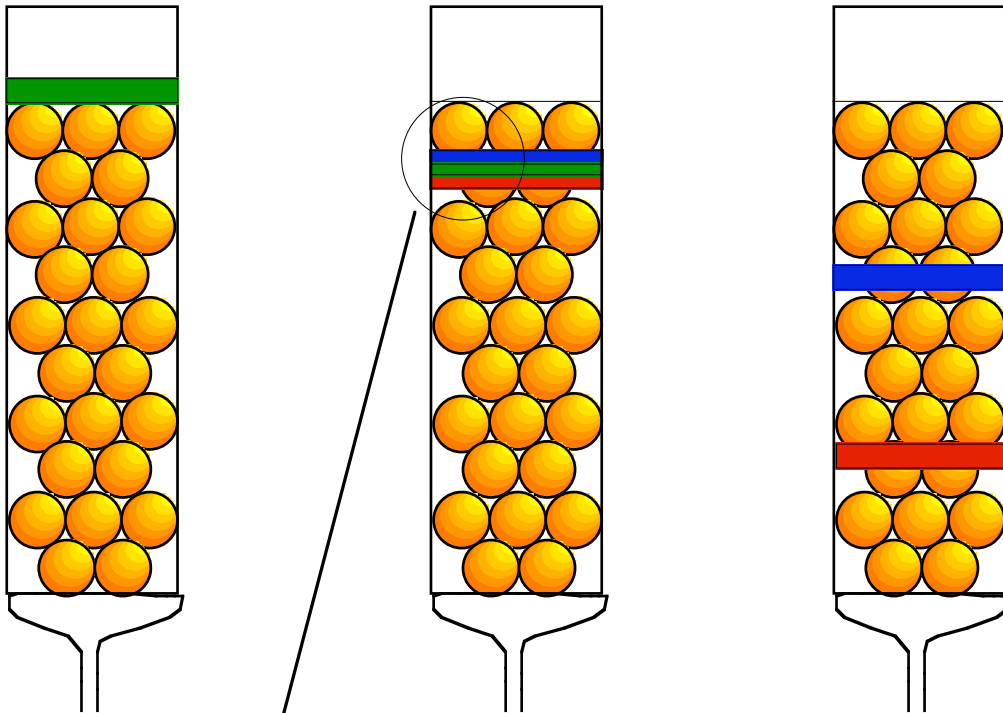


Cromatografía de exclusión molecular (filtración en gel)



Purificación de la HDC de rata recombinante

Etapa	Actividad ($\mu\text{g CO}_2/\text{h}$)	Prot. total (mg)	Actividad específica ($\text{pmol CO}_2/\text{h}\cdot\mu\text{g pr}$)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	4,6	1488	3,11	1	100
Precip. + Phenyl-seph.	1,7	243,2	7,16	2,3	36,7
DEAE-sephadex	0,87	3,45	254	81	18,9
Hidrixiapa. + filtr.	0,31	0,55	577,8	185	6,7

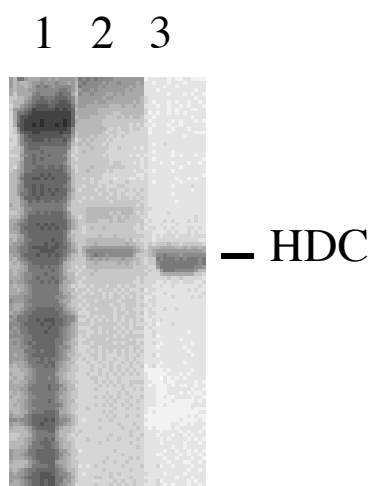


Figura 2P. Etapas de purificación de HDC recombinante.

1: Phenyl-Sepharose; 2: Macro-prep DEAE; 3: Hidroxiapatito.

Secuenciación de la ribonucleasa A

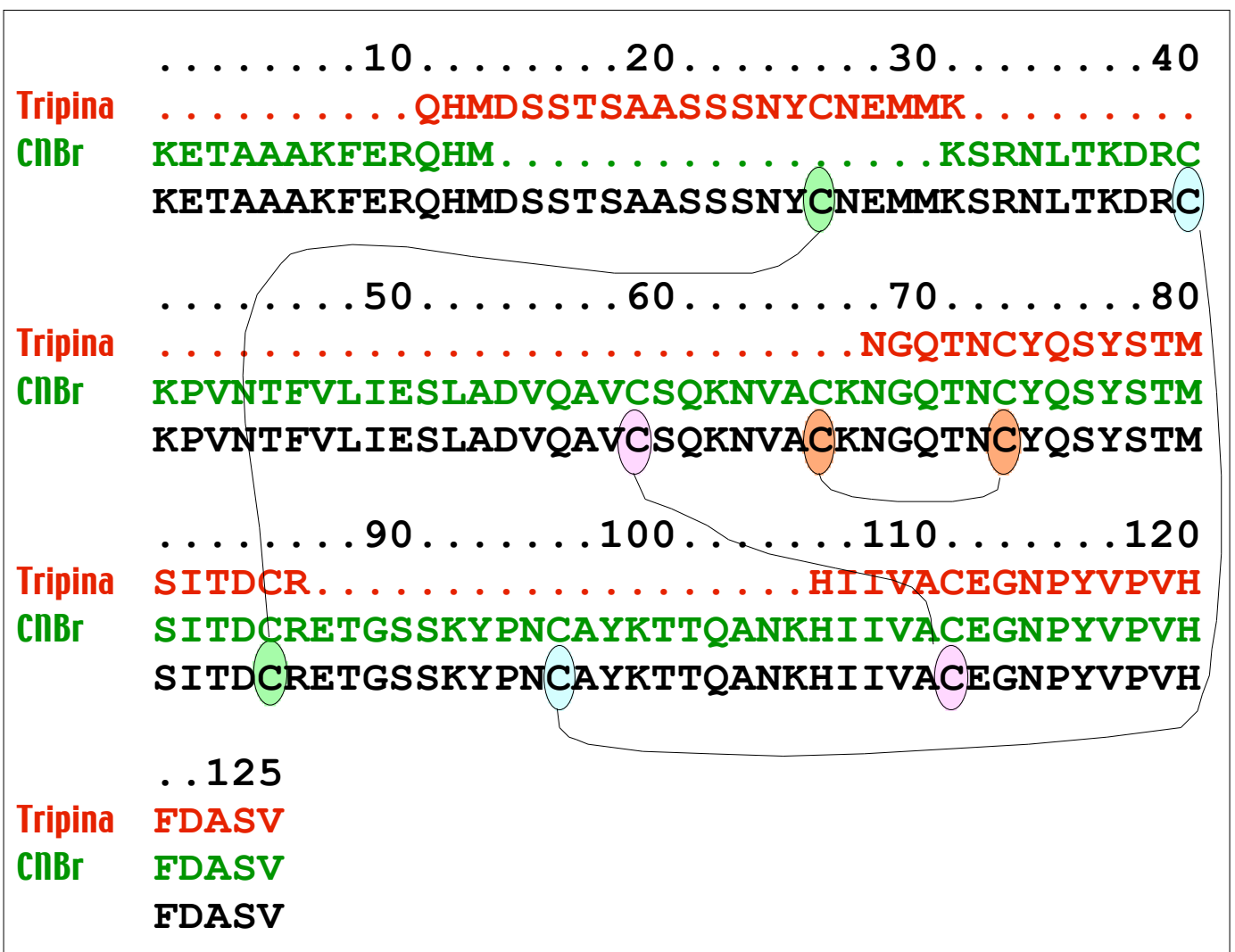
Digestión con tripsina (14 fragmentos)

1. K
2. SR
3. DR
4. FER
5. NLTK
6. NVACK
7. ATGSSK
8. TTQANK
9. ETAAAK
10. YPNCAVK
11. NGQTNCYQSYSTEMSITDCR
12. HIIVACEGPNPYVPVHFADSV
13. QHMDSSTSAASSSNYCNEEMK
14. CKPVNTFVHESLADVQAVCSQK

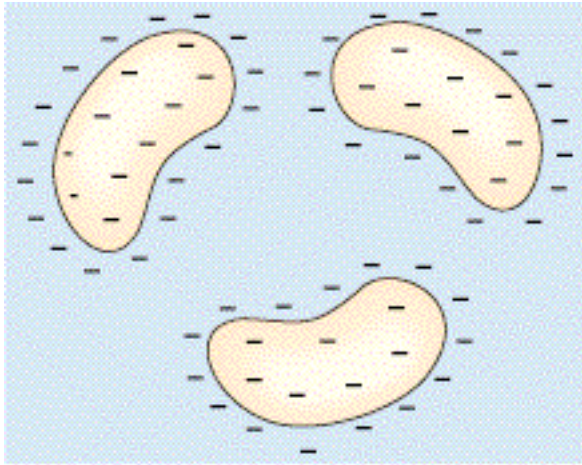
Digestión con CNBr (5 fragmentos)

1. M
2. KETAAAKFERQHM
3. DSSTSASSSNYCNEEM
4. SITDCRETGSSKYPNCAVKTTQANKHIIV
ACEGPNPYVPVHFADSV
5. KSRNLTKDRCKPVNTFVLIESLADVQAVC
SQKNVACKNGQTNCYQSYSTEM

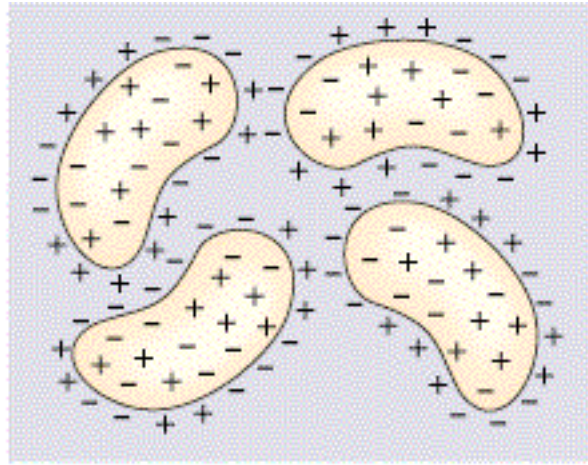
6, 11, 13 y 10, 12, 14



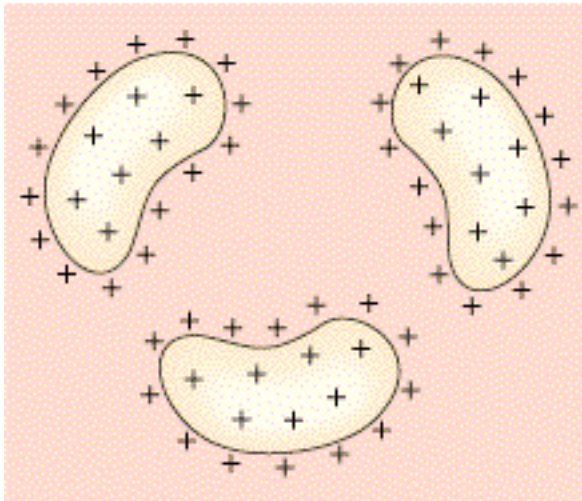
Dependencia de la solubilidad del pH



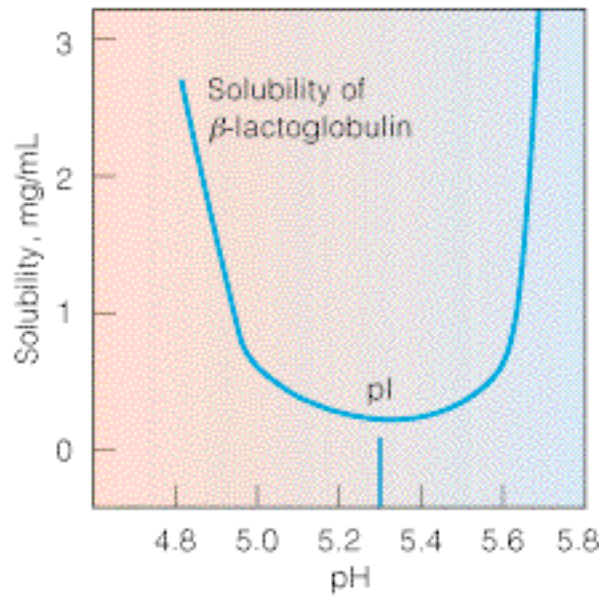
(a) High pH: protein soluble (deprotonated)



(b) Isoelectric point: protein aggregates



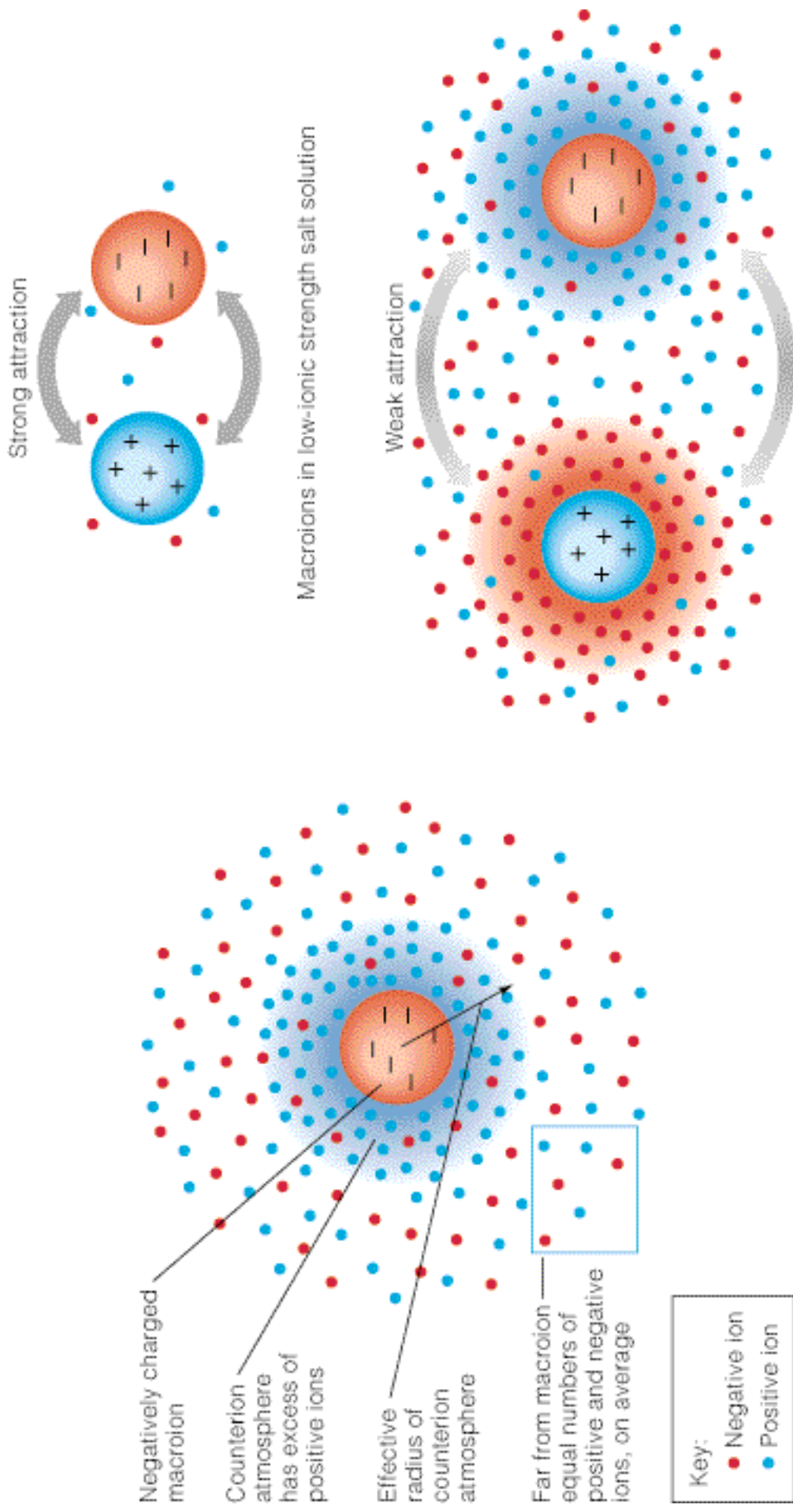
(c) Low pH: protein soluble (protonated)



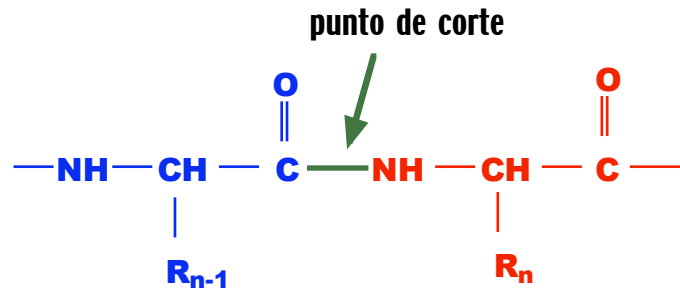
(d) Solubility of β -lactoglobulin



Influencia de los pequeños iones sobre las interacciones entre los macroiones

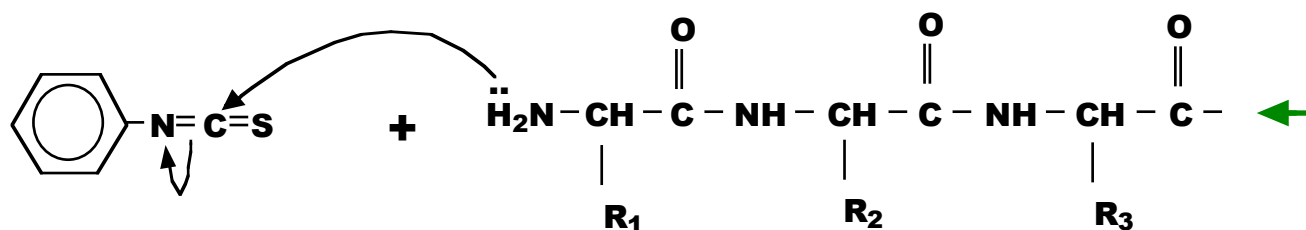


Especificidades de varias endopeptidasas



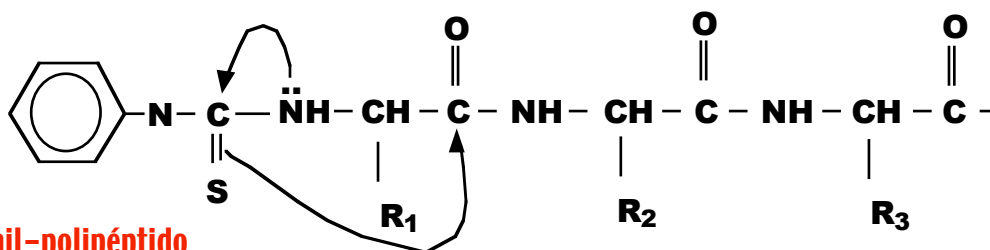
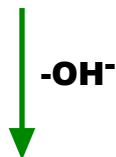
Enzima	fuelle	especificidad	Comentario
Tripsina	Pancreas bovino	$R_{n-1} = R \text{ o } K; R_n \neq P$	Altamente específico
quimiotripsina	Pancreas bovino	$R_{n-1} = F, W \text{ o } Y; R_n \neq P$	rompe más lentamente para $R_{n-1} = N, H, M \text{ o } L$
Elastasa	Pancreas bovino	$R_{n-1} = A, G, S \text{ o } V; R_n \neq P$	
Termolisina	<i>B. thermoproteolyticus</i>	$R_n = I, M, F, W, Y, V;$ $R_{n-1} \neq P$	ocasionalmente rompe cuando $R_n = A, D, H, T$; es termoestable
Pepsina	mucosa gastrica bovina	$R_n = L, F, W \text{ o } Y; R_{n-1} \neq P$	es bastante inespecífica, pH óptimo = 2
Endopeptidasa V8	<i>S. aureus</i>	$R_{n-1} = E$	

Degradación de Edman



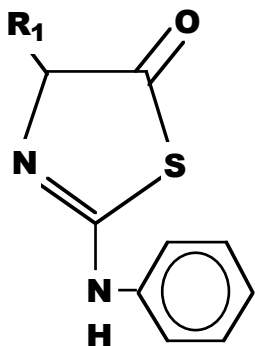
Fenilisotiocianato
(PITC)

Polipéptido

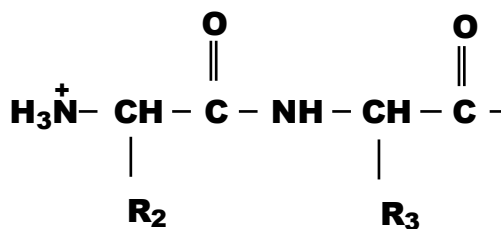


Feniltiocarbamil-polipéptido
(PTC-polipéptido)

F_3CCOOH
anhidro

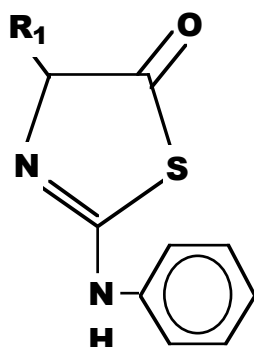


Derivado Tiazolina

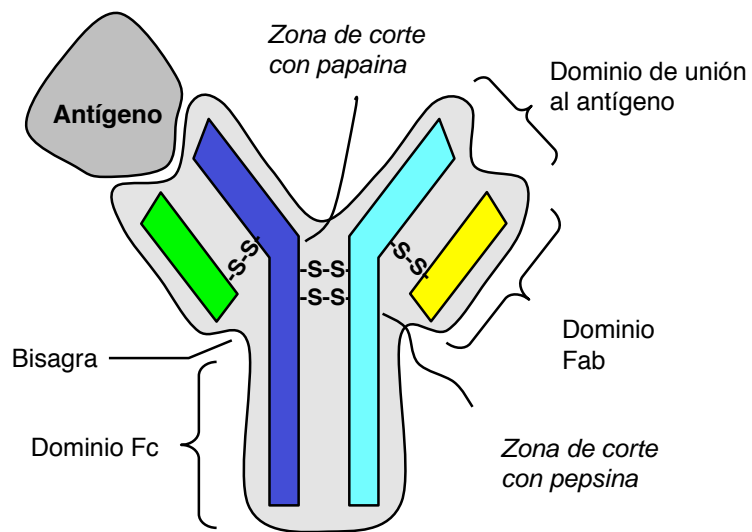
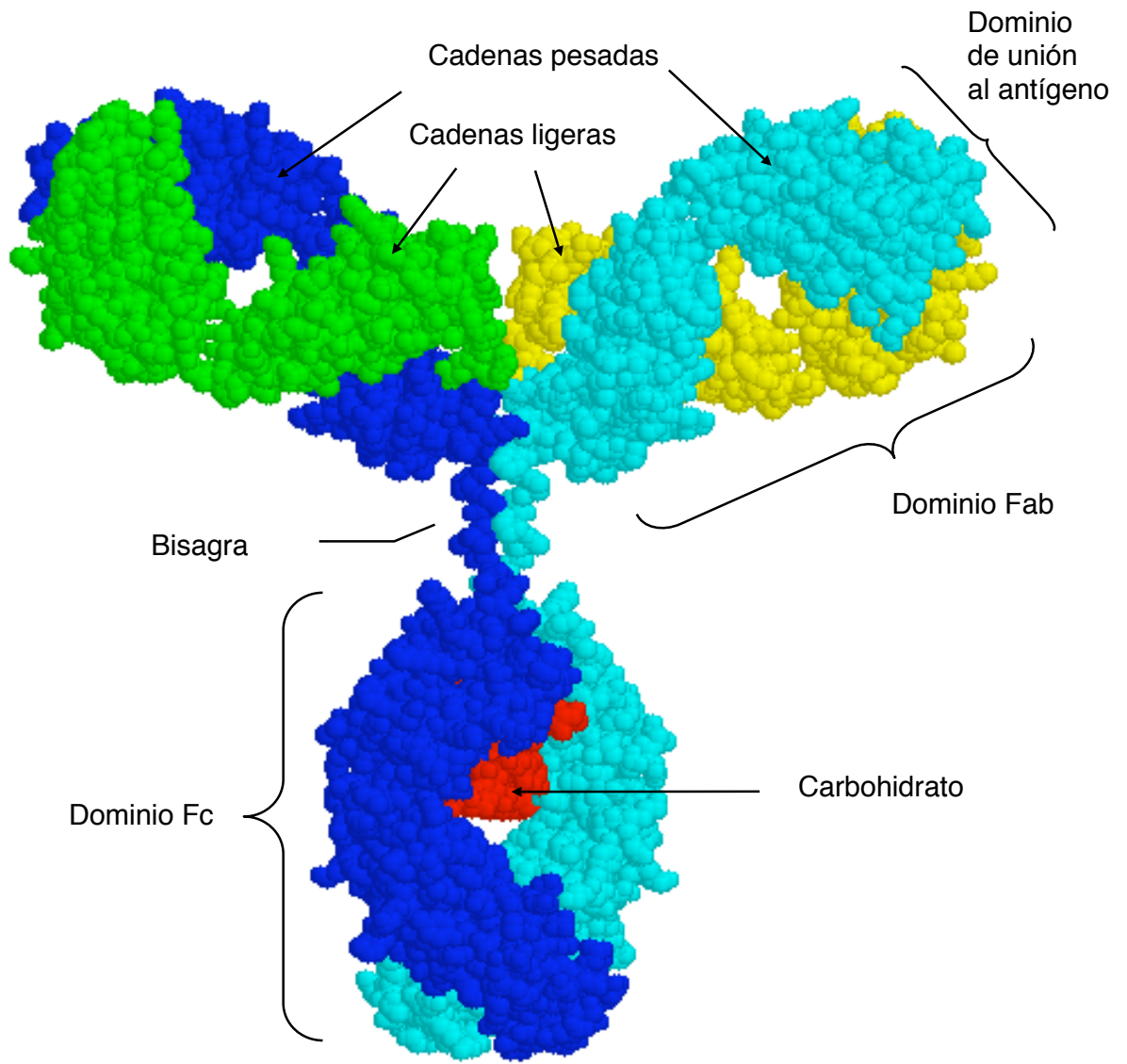


Polipéptido sin el extremo N-terminal

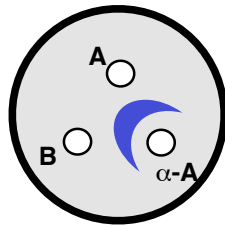
H^+



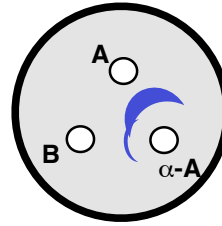
Feniltiohidantona-aminoácido
(PTH-aminoácido)



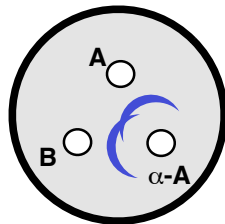
Inmunodifusión en gel (Ouchternoly)



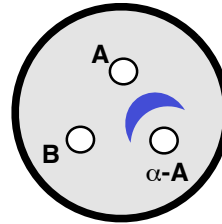
Los antígenos A y B son inmunológicamente idénticos



Los antígenos A y B están estrechamente relacionados

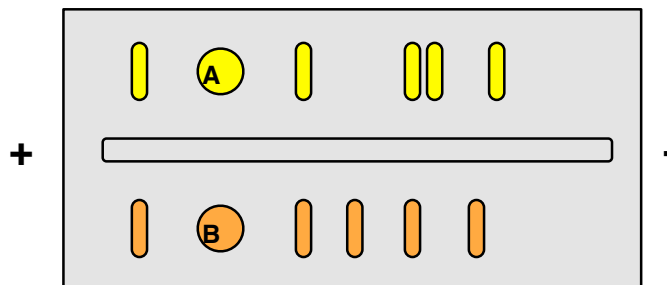


Ambos antígenos son reactivos pero con una relación lejana

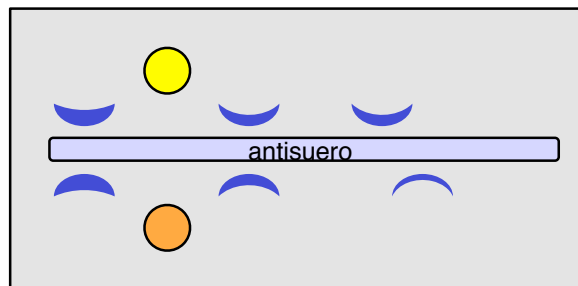


A es reactivo, pero B no lo es

Inmunoelectroforesis



En primer lugar las muestras A y B se someten a una electroforesis



El antisuero se coloca en el gel entre las dos muestras y se deja difundir. Se formaran arcos de precipitación con las bandas de cada mezcla que reaccionen con el antisuero

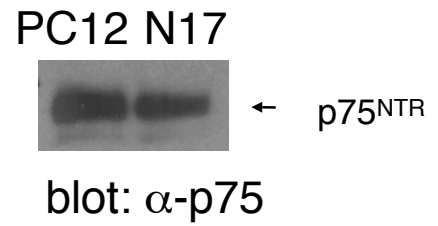
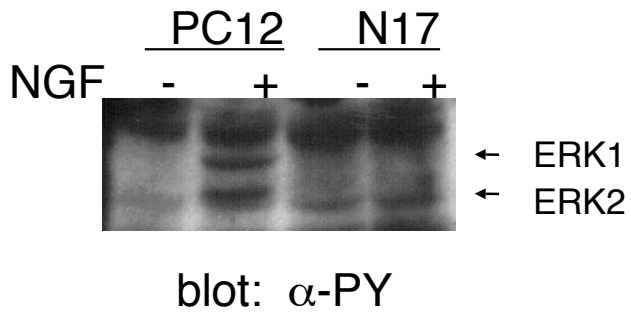
Transferencia "Western"



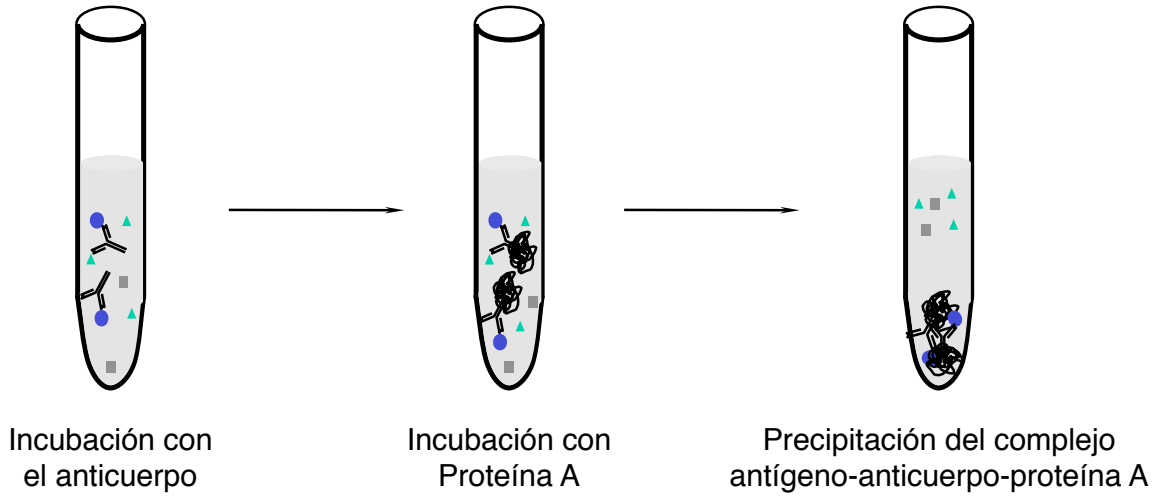
Separación de proteínas
en SDS-PAGE

Transferencia a
membrana

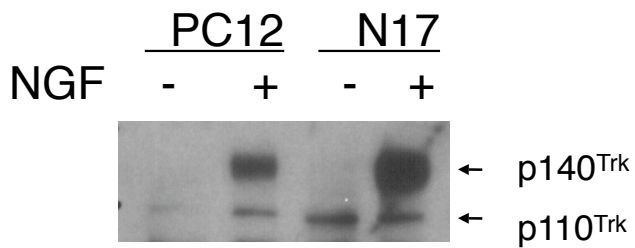
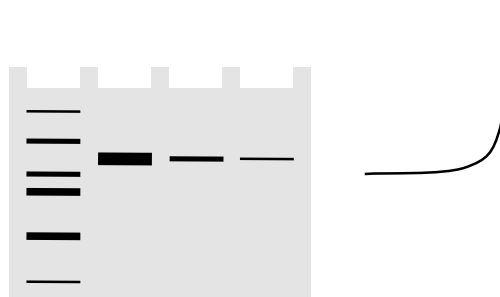
Incubación con anticuerpos
y revelado de la proteína
marcadora



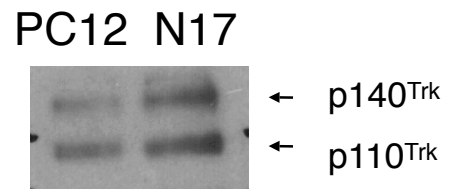
Inmunoprecipitación



Análisis de los complejos en SDS-PAGE

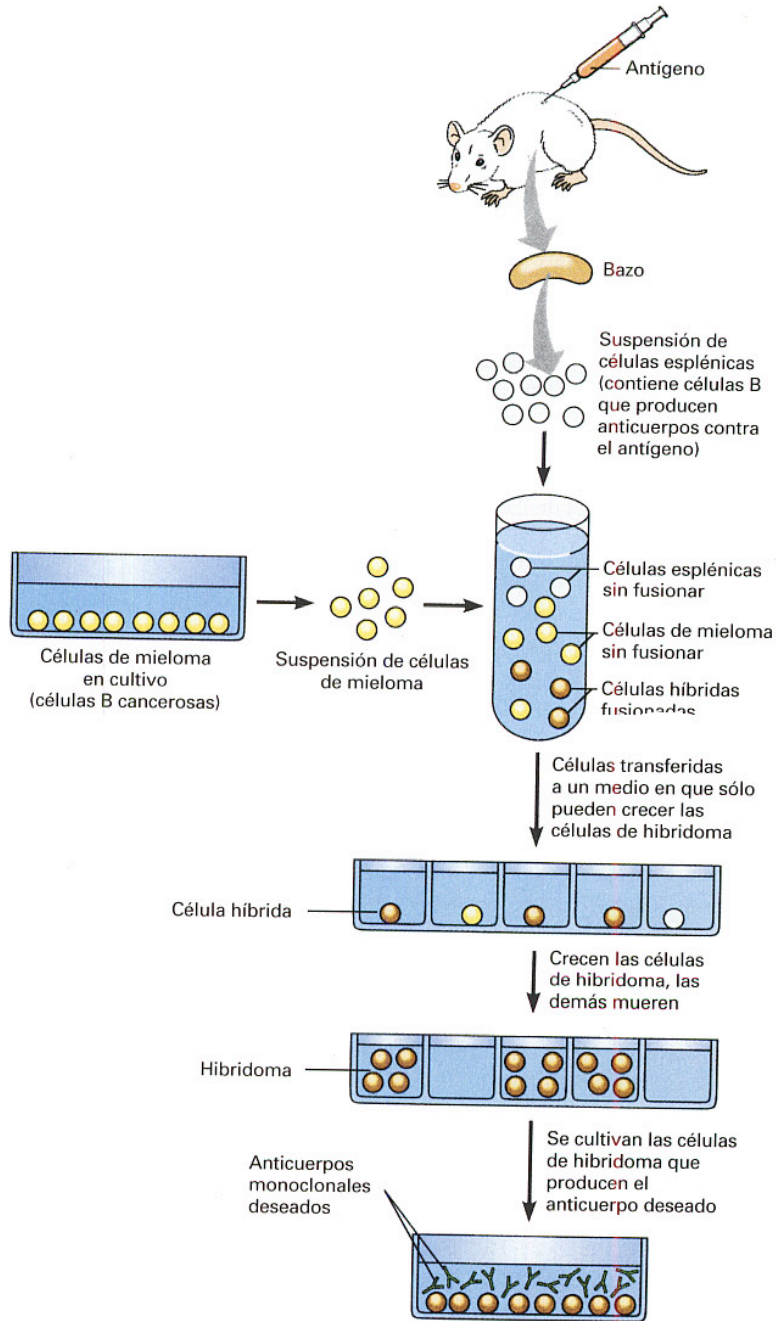


IP: 203
blot: α -PY



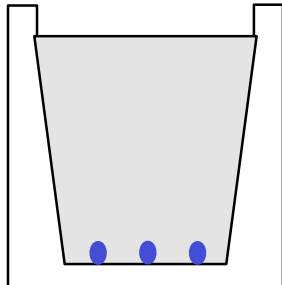
blot: RTA

Obtención de anticuerpos monoclonales

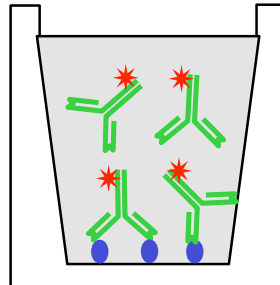


ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

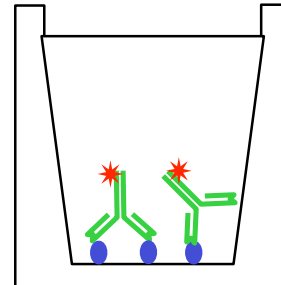
Ensayos de captura de anticuerpos



Unión del antígeno
a la fase sólida

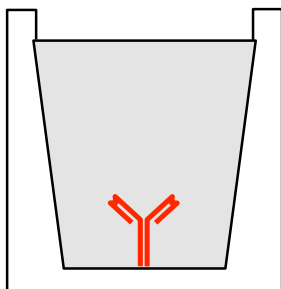


Unión del anticuerpo
marcado al antígeno

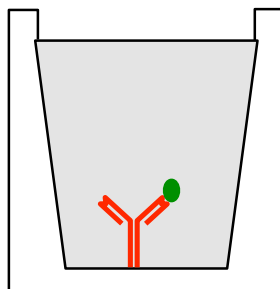


Cuantificación del
anticuerpo

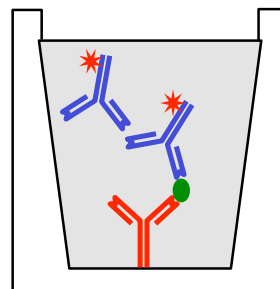
Ensayos con dos anticuerpos



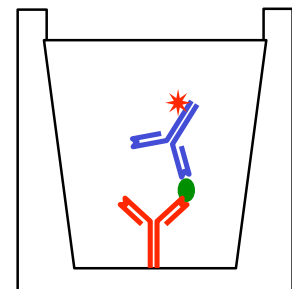
Unión del anticuerpo
a la fase sólida



Unión del antígeno
al anticuerpo

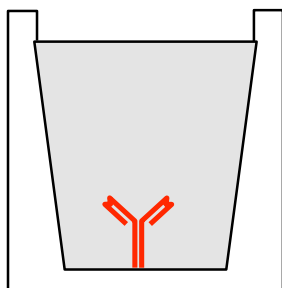


Unión del anticuerpo
secundario marcado

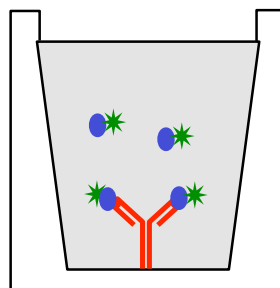


Cuantificación del
anticuerpo
secundario

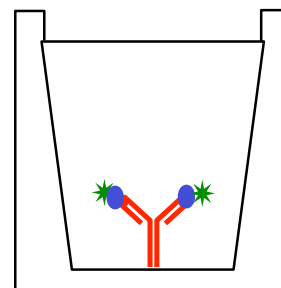
Ensayos de captura de antígeno



Unión del anticuerpo
a la fase sólida



Unión del antígeno
marcado al anticuerpo



Cuantificación del
antígeno

Radioinmunoanálisis

