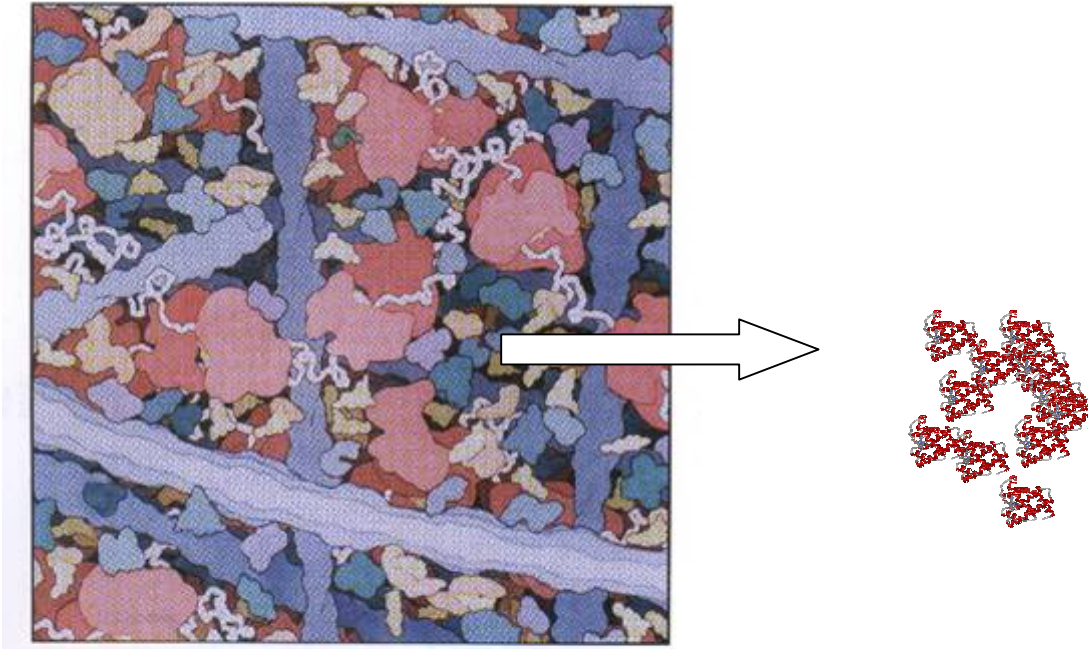


Purificación de proteínas

Purificación

Proceso que cuenta con varias etapas cuyo objetivo es lograr la concentración diferencial de la proteína o molécula de interés



Condiciones generales a evaluar

- **Calidad** (% de pureza del producto de acuerdo a mis objetivos)
 - secuenciación, cristalización
 - ensayo de actividad, productos alimenticios médicos
- **Cantidad** técnicas de alta capacidad y de baja capacidad
 - preparativas
 - analíticas
- **Costos**

Pasos a seguir en una purificación

1. Definir un ensayo específico que identifique a la proteína (actividad biológica) (*específico, sensible, rápido y barato*)
2. Elegir la fuente (*matriz biológica*)
3. Extraer la proteína de la fuente (proteínas intracelulares o extracelulares)
4. Estabilización de la molécula
5. Aislamiento y concentración (*fraccionamiento*)
6. Determinar la pureza y calidad del producto final

1 Actividad Biológica

Cantidad de proteína que produce, por su acción biológica, un determinado cambio.

Este cambio puede ser:

- Un efecto biológico (Muerte celular, hemólisis, protección inmunológica)
- Variación en la cantidad de una sustancia química (producto de una reacción)

De esta forma podemos definir a la unidad de actividad biológica como :

Una unidad de **Actividad Biológica** es la cantidad de proteína que produce una determinada cantidad de “efecto”

1. Toxina

Una unidad de AB para una toxina es la cantidad de proteína que produce la muerte del 23% de los ratones de tal especie (siguen especificaciones...)

2. Enzima

Una unidad de AB para una enzima es la cantidad de proteína que produce 5.98 moles de producto en 1 minuto en condiciones ...(siguen especificaciones...)

2 Elección de la Fuente

Matriz donde se encuentra la proteína de interés

- Concentración
- Accesibilidad
- Costo
- Facilidad de la extracción

3 Extracción de la proteína de la fuente

Lisis osmótica: técnica muy suave. Uso de sn hipotónicas + fuerzas mecánicas. Para bacterias y células vegetales: lisozimas u otras enzimas

Molienda: a. Morteros b. Batidoras. Uso de sustancias abrasivas

Ultrasonido: sonicador. Eleva mucho la temperatura de la muestra

4 Estabilización

Factores a tener en cuenta en cada etapa del fraccionamiento

1 PH

2 Grado de oxidación (-SH)

3 Presencia de Metales pesados. Sustancias Contaminantes

4 Polaridad y fuerza iónica de la solución

5 Presencia de proteasas

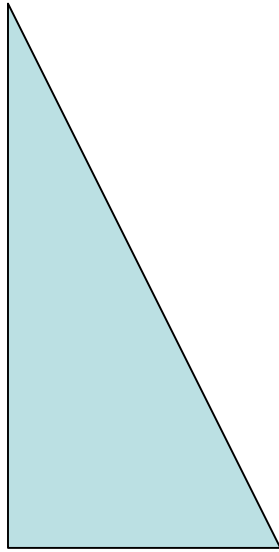
6 Temperatura

5 Actividad de la molécula

5 Aislamiento y concentración

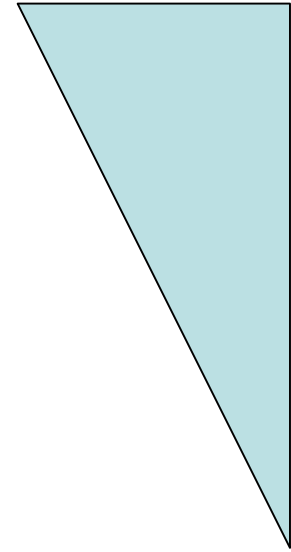
Fraccionamiento del extracto crudo

- Implica una serie de pasos en los cuales se aprovechan propiedades fisicoquímicas o biológicas de la proteína de interés para separarla del resto de las moléculas
- Cada paso debe ser monitoreado adecuadamente para evaluar el rendimiento en la purificación, pureza y actividad específica de cada fracción obtenida.
- Si bien no hay una sola secuencia de técnicas a seguir, en general se recomienda empezar por técnicas de alta capacidad y seguir con las de baja capacidad.
- En general se desea obtener una gran pureza (según los objetivos) acompañada de un gran rendimiento.



Resolución

Solubilidad diferencial
Cromatografía de intercambio iónico
Cromatografía de absorción
Cromatografía de exclusión molecular
Cromatografía de afinidad
Electroforesis
Isoelectroenfoco



Capacidad

Monitoreo del proceso de fraccionado

- **Actividad Específica** $AE = \frac{\text{Unidades totales en la fracción } i}{\text{Total de proteínas en la fracción } i}$
- **Rendimiento** $R = \frac{\text{Unidades totales en la fracción } i}{\text{Unidades totales en la fracción original}}$
- **Porcentaje de purificación** $P = \frac{AE \text{ en la fracción } i}{AE \text{ en la fracción original}}$

Actividad vs Actividad específica

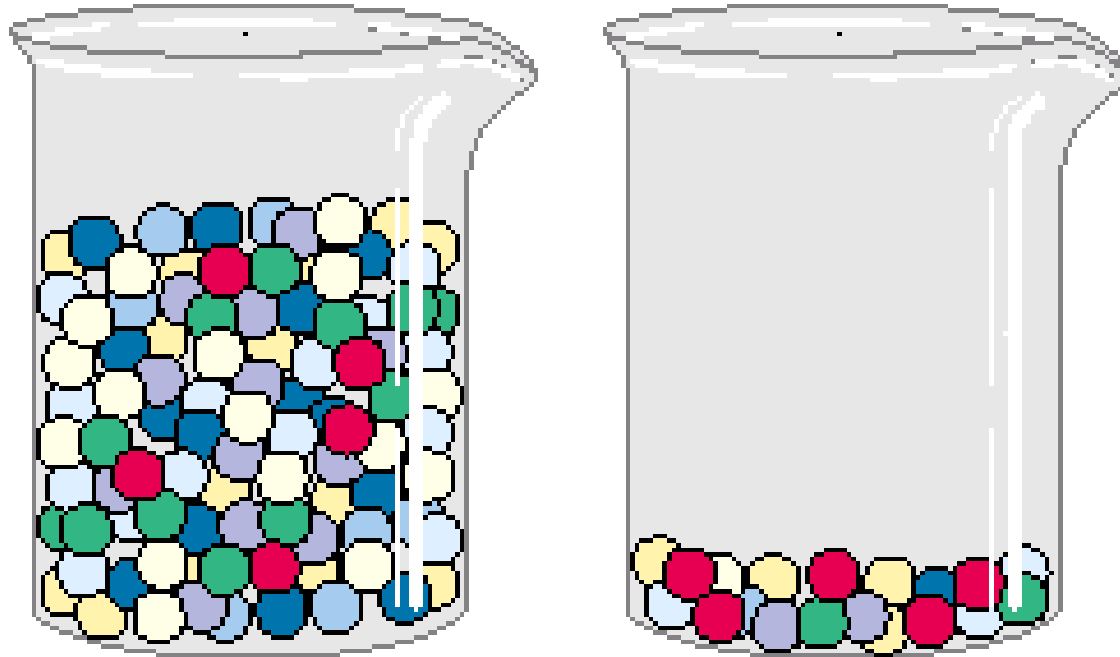


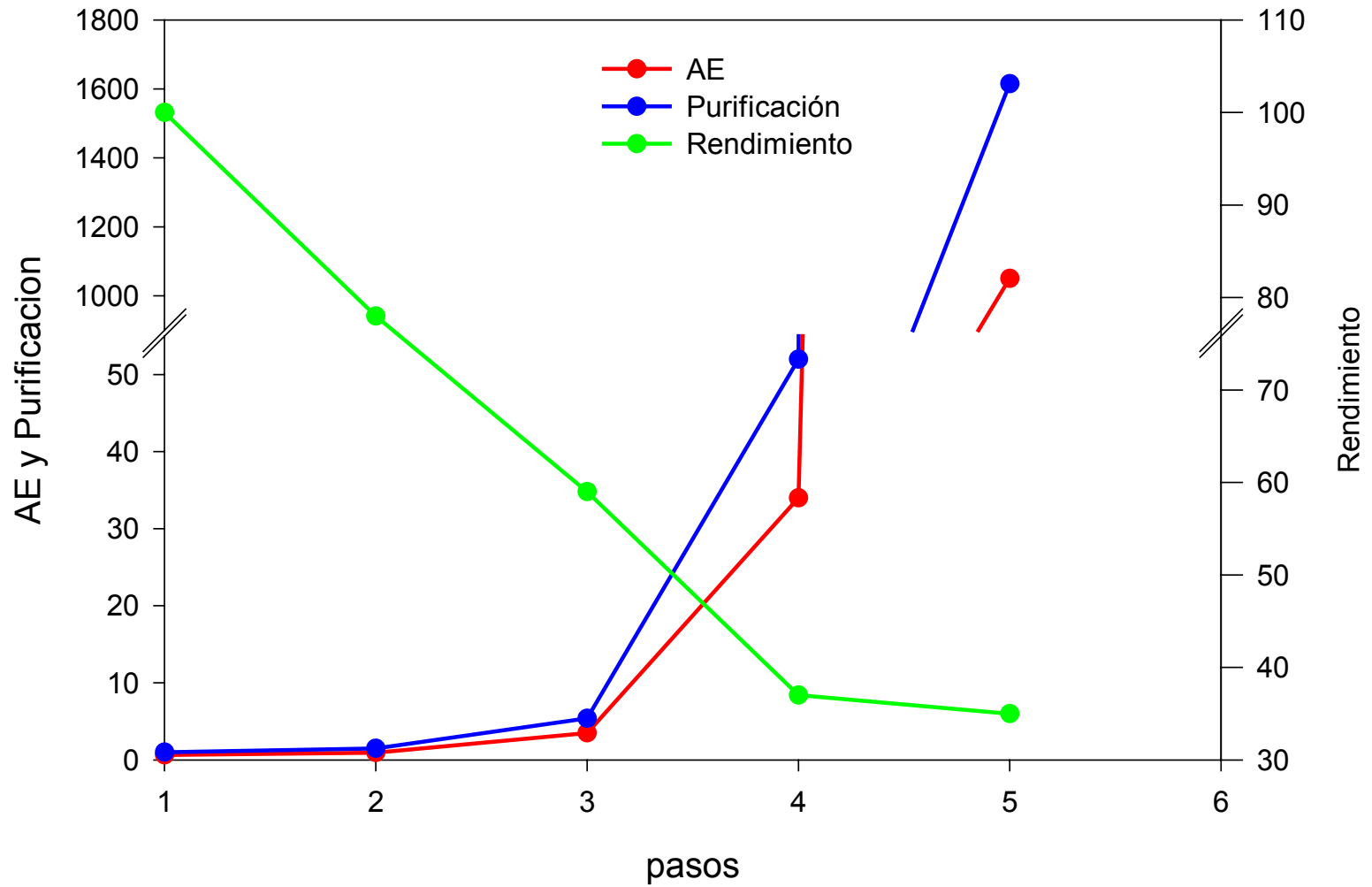
Table 1-1

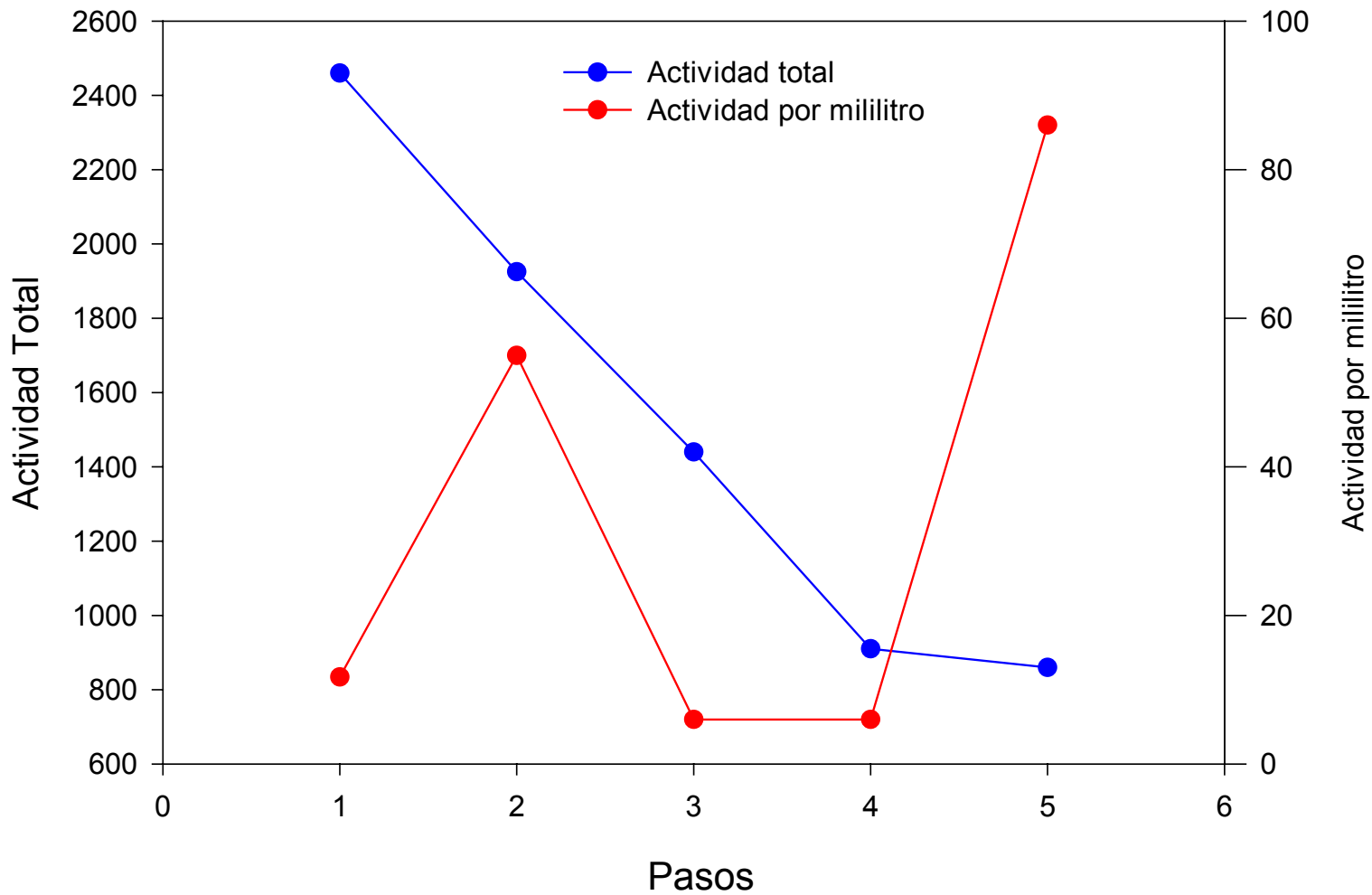
Purification of 4-nitrophenylphosphatase from 85 g of bovine liver. General aspects of each step are described in this chapter. Experimental conditions for fractionation, chromatographic columns, enzyme and protein assays, and the results obtained in each case are in Chapters 2–5. This table should be filled as the simulated purification advances

Step	Volume (mL)	[Activity] (U/mL)	[Protein] (mg/mL)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (– fold) ^a	Yield (%) ^b
1. Soluble extract (100,000 × g liver supernatant)	210	11.7	18	2460	3780	0.65	1	100
2. Ammonium sulfate fractionation (30–60% saturation precipitate)	35	55	58	1925	2030	0.95	1.5	78
3. Gel-filtration chromatography in a Sephadex G-150 column (active fractions pooled)	240	6.0	1.7	1440	410	3.5	5.4	59
4. Ion-exchange chromatography in a DEAE-cellulose column (active fractions pooled)	152	6.0	0.18	910	27	34	52	37
5. Dye-ligand affinity chromatography in a Reactive blue 2-agarose column (active fractions pooled)	10	86	0.082	860	0.82	1050	1615	35

^aIncrease of specific activity relative to that of the soluble extract.

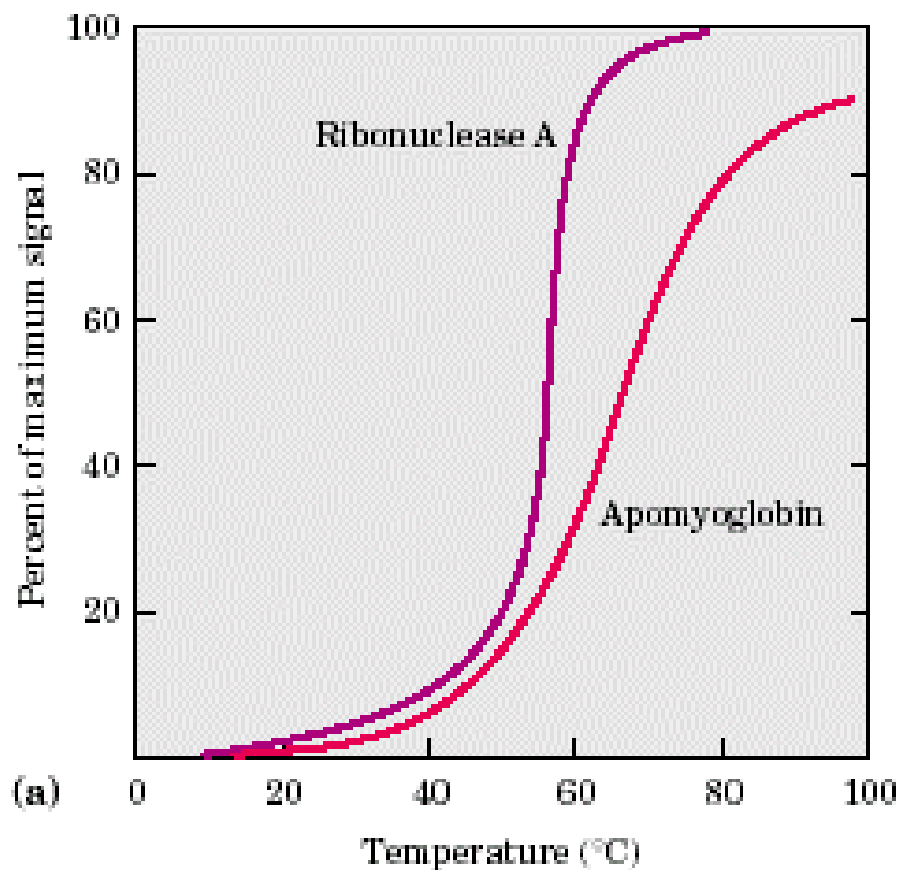
^bRecovery of enzyme activity relative to the total activity of the soluble extract.





Fraccionamiento por desnaturalización (precipitación diferencial)

- Temperatura



• PH: PI

• Fuerza iónica

$$(I = 0.5 \sum m_i Z_i^2)$$

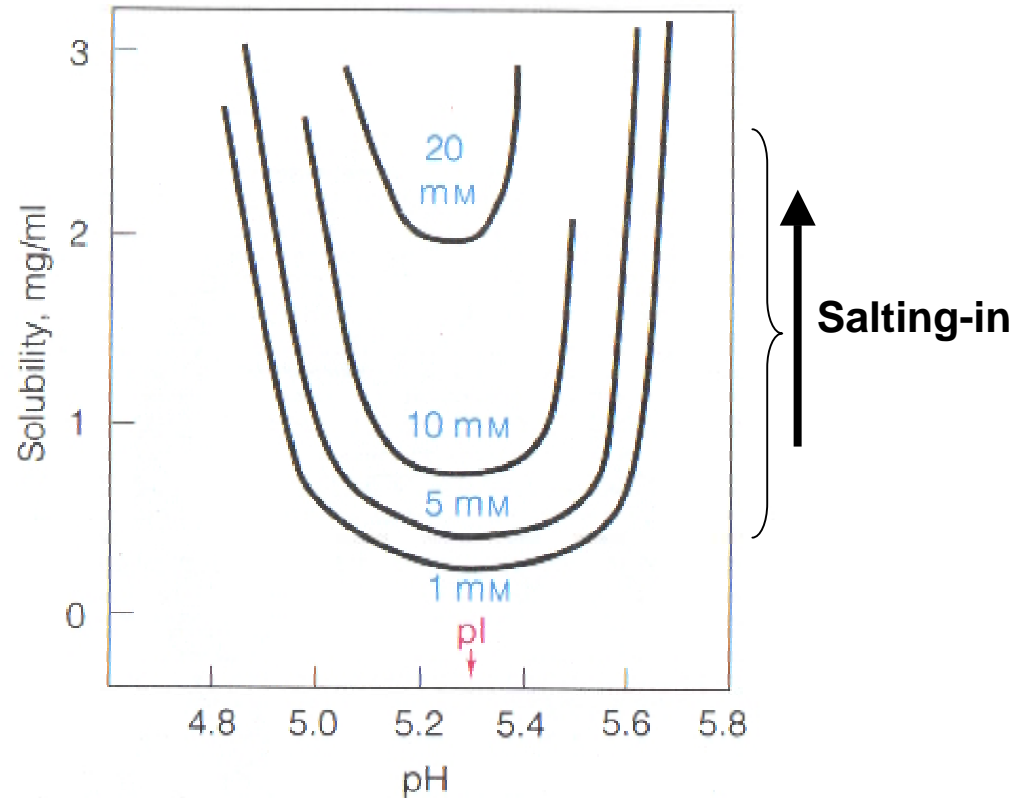


Figure 2.23

Dependence of protein solubility on both pH and ionic strength. The dependence of solubility on pH for the milk protein β -lactoglobulin is shown at four different ionic strengths of NaCl (blue). At all salt concentrations, solubility is lowest at the pI of the protein, as measured by mg/ml.

Salting-out: Sulfato de amonio

Fosfato de potasio

Formas de obtener la precipitación

- en forma de producto seco
- en forma de sn saturada de la sal

Tanto si se trabaja con el precipitado o con el sobrenadante esta técnica en general va seguida de una técnica de “*de-salado*”

• **Uso de solventes orgánicos:** modifican D (constante dieléctrica) e hidratación

Etanol

Acetona

butanol

Producen algo de desnaturalización. Requieren de bajas temperaturas

Fraccionamiento por campo eléctrico (electroforésis)

$$\text{Movilidad electroforética} = \mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f}$$

$$f = \text{coeficiente de fricción} = A \eta$$

$$\text{Para una esfera } A = 6 \pi r$$

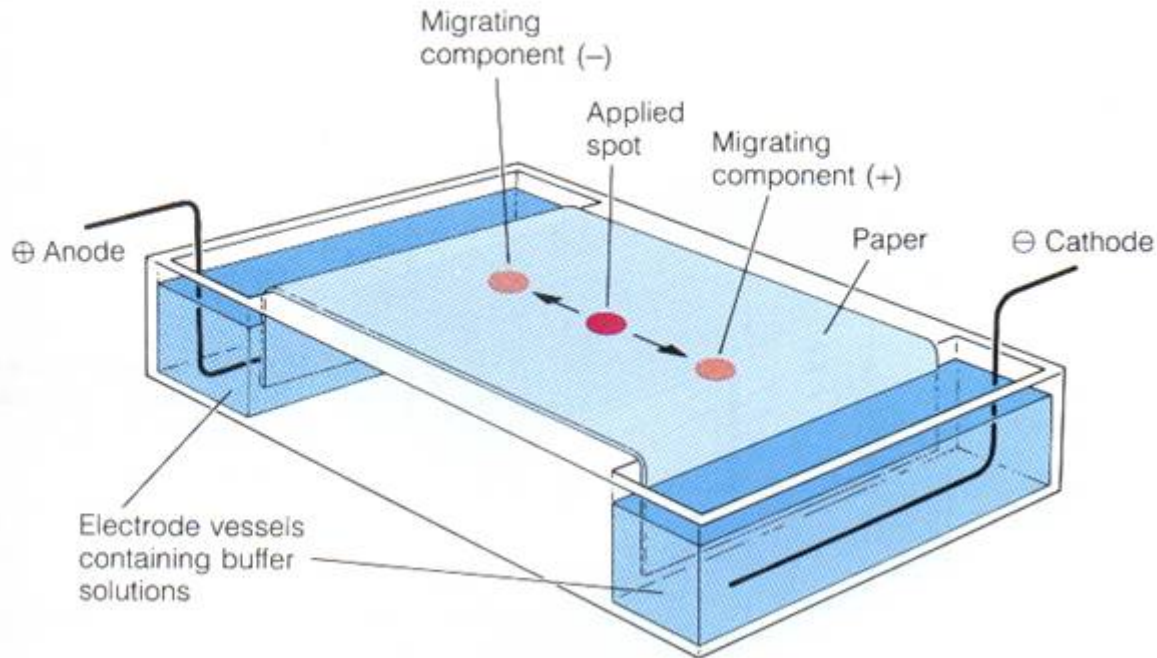
$$V = \frac{4}{3} \pi r^3$$

$$V_{\text{esp}} = V/PM$$

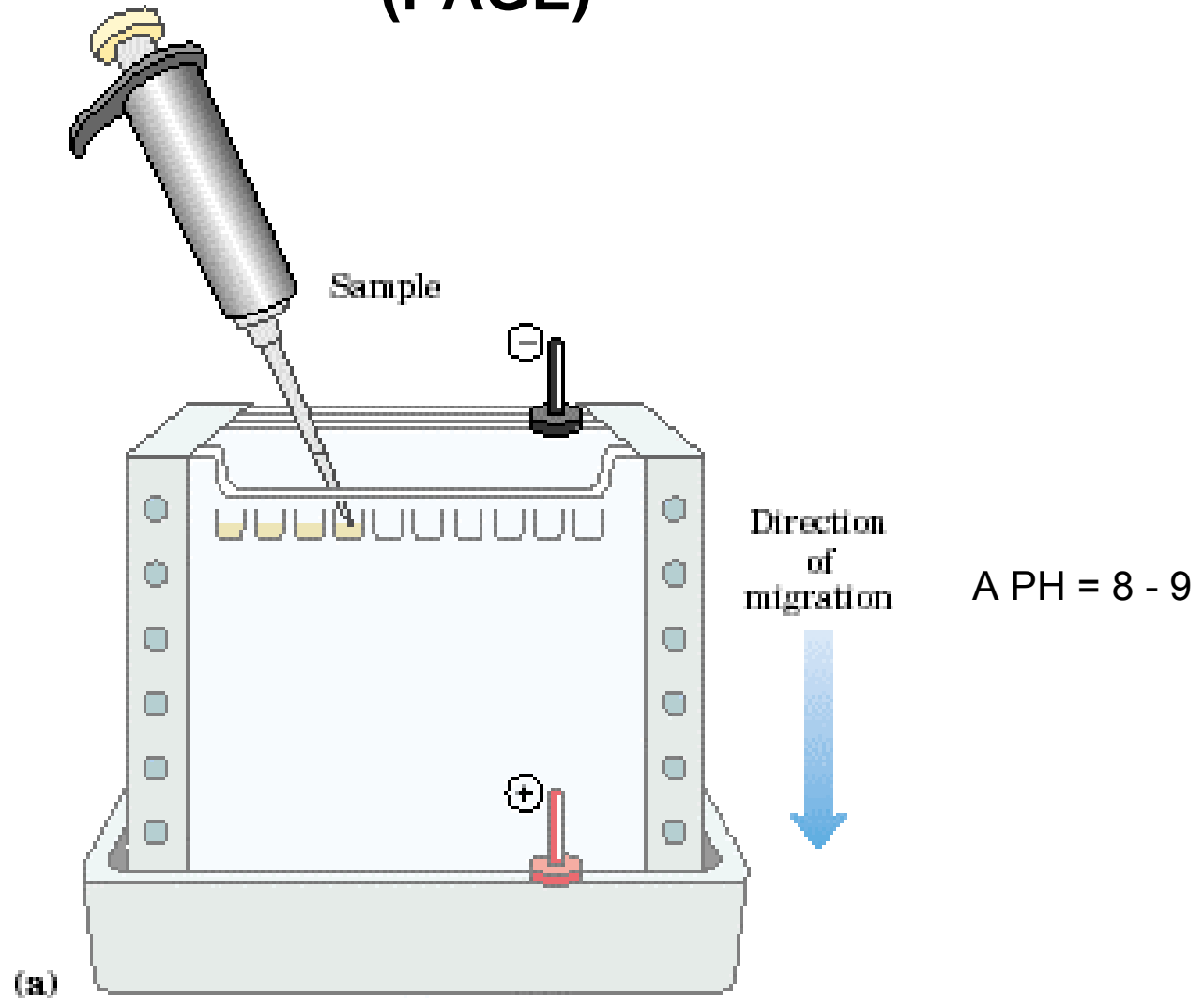
Electroforesis en papel

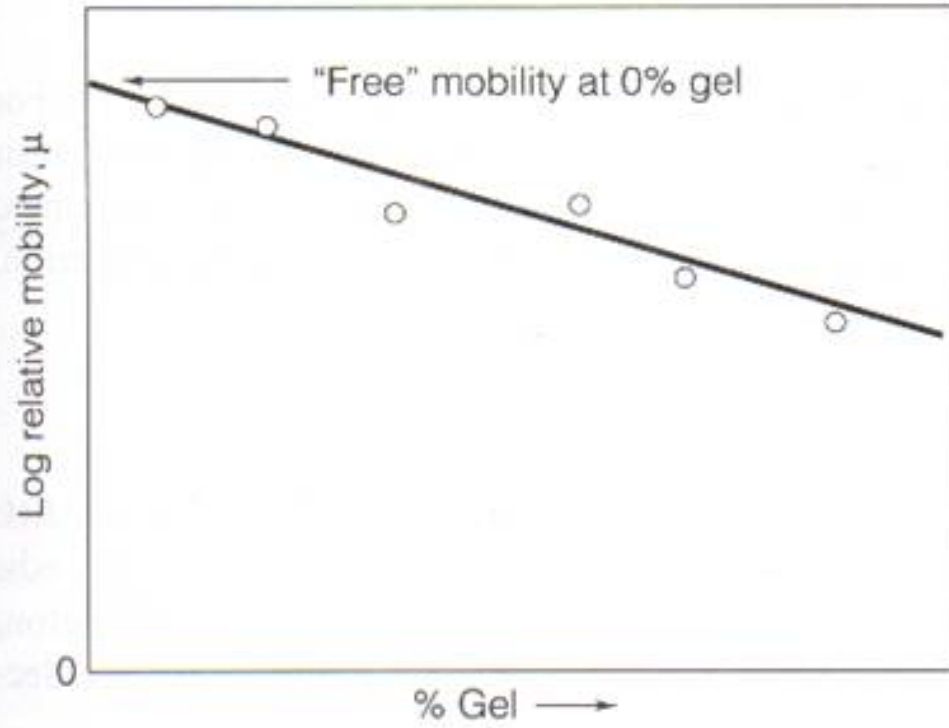
TOOLS OF BIOCH

Figure T2.1
Paper electrophoresis.

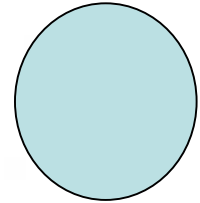


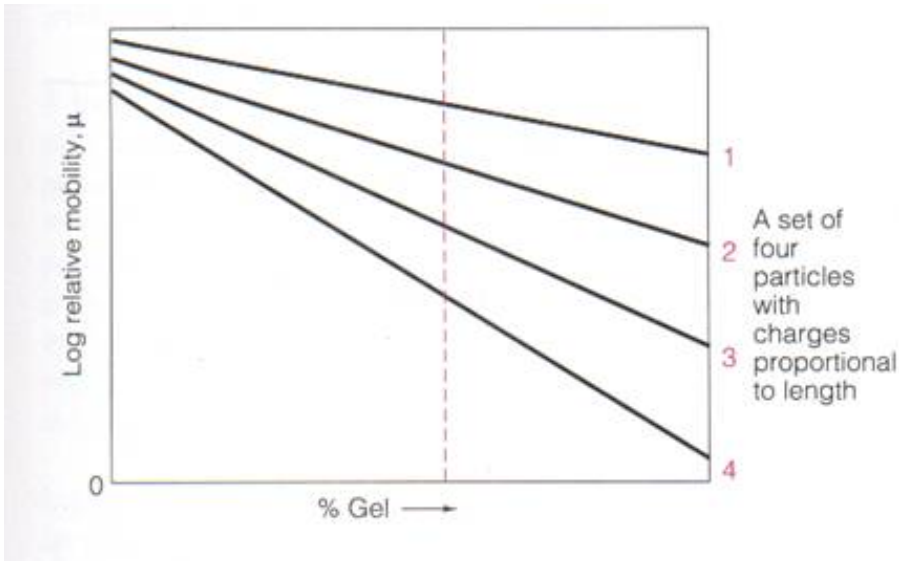
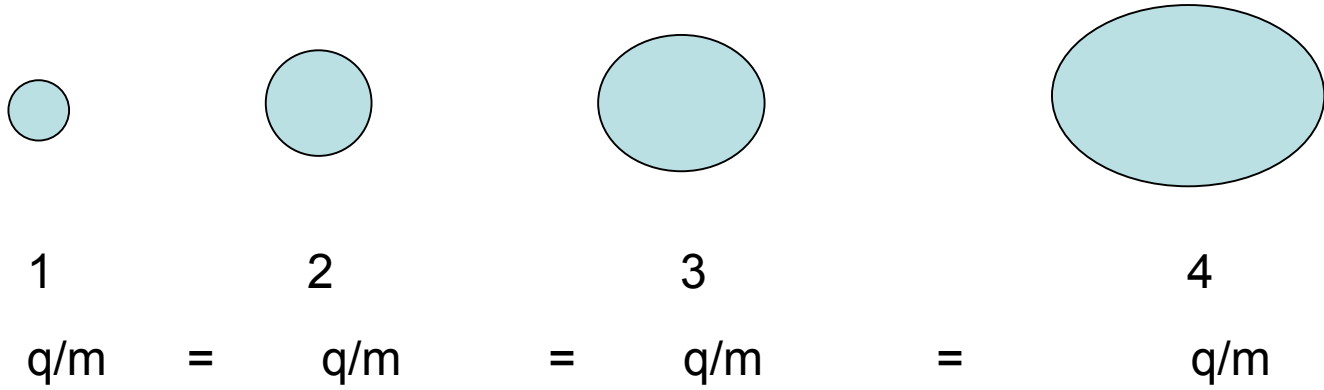
Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)



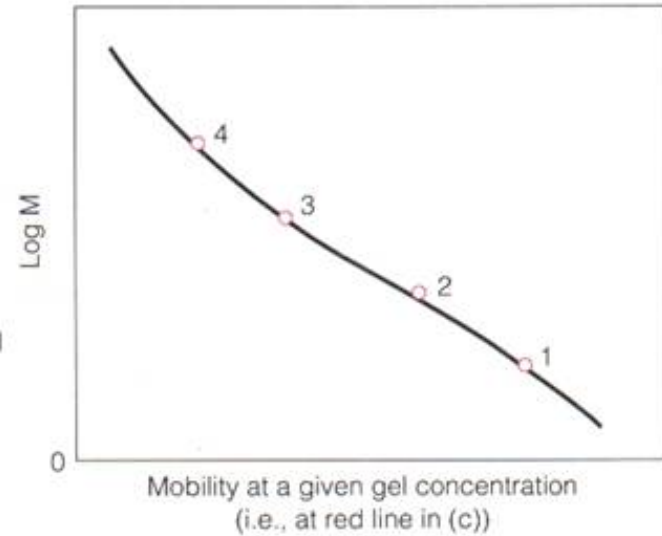


(a) Ferguson plot





(c) Ferguson plot observed when charge is proportional to length

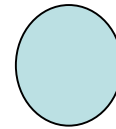
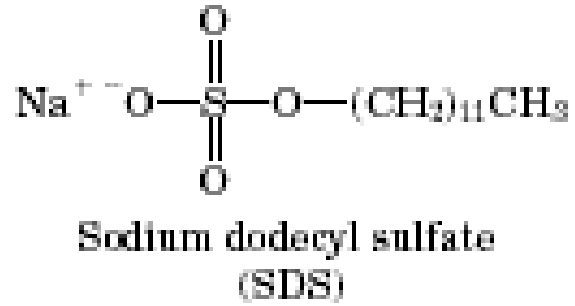


(d) Relationship between molecular weight (M) and mobility, at a given gel concentration for molecules like those shown in (c).

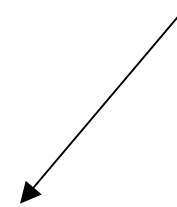
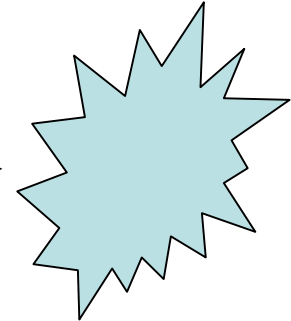
Figure T2.4

Efecto "colador"

PAGE SDS



SDS →

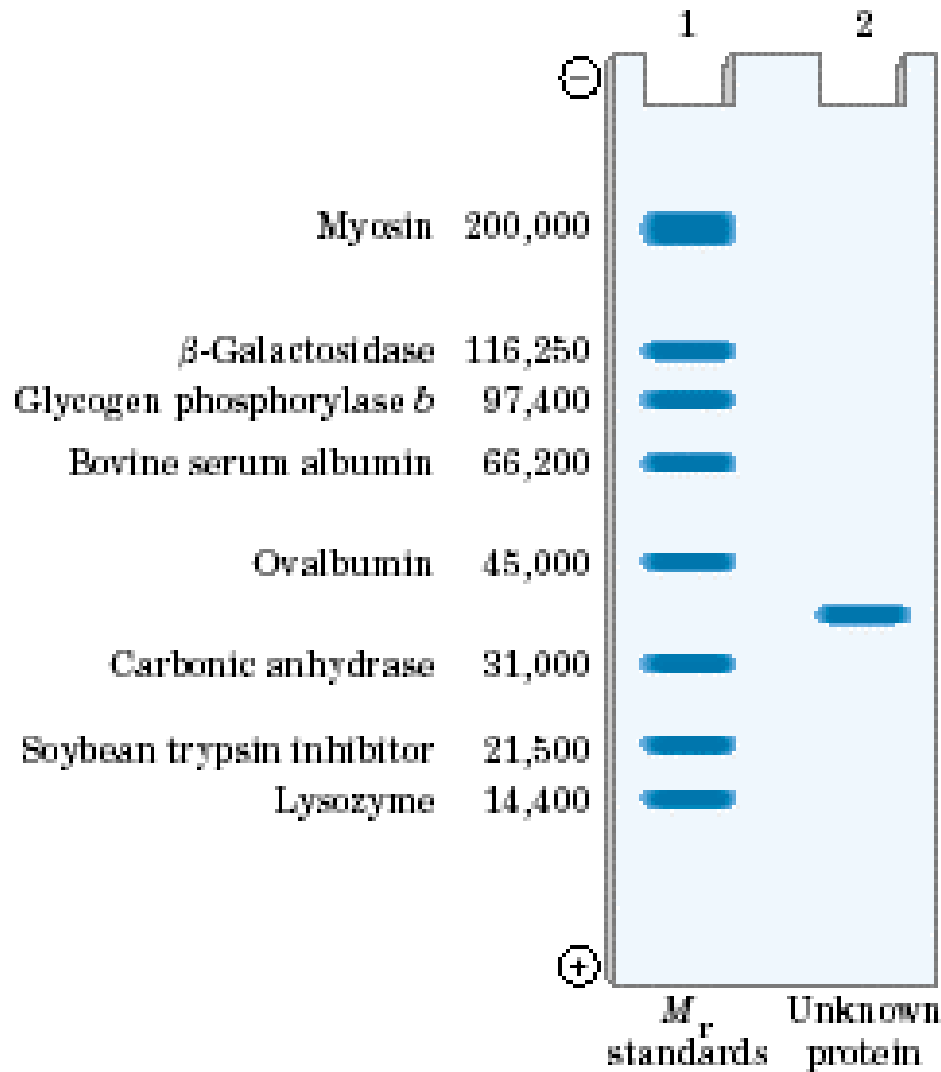


Movilidad = 1/ PM

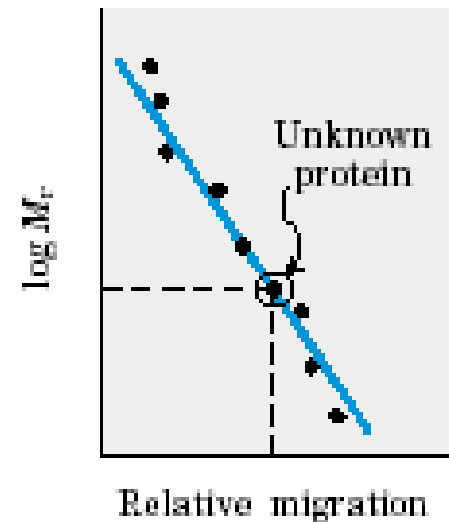
Tipos de Electroforesis

- PAGE Nativa
- PAGE SDS
- PAGE + condiciones reductoras
- Isoelectroenfoque
- Bidimensional

Determinación de PM

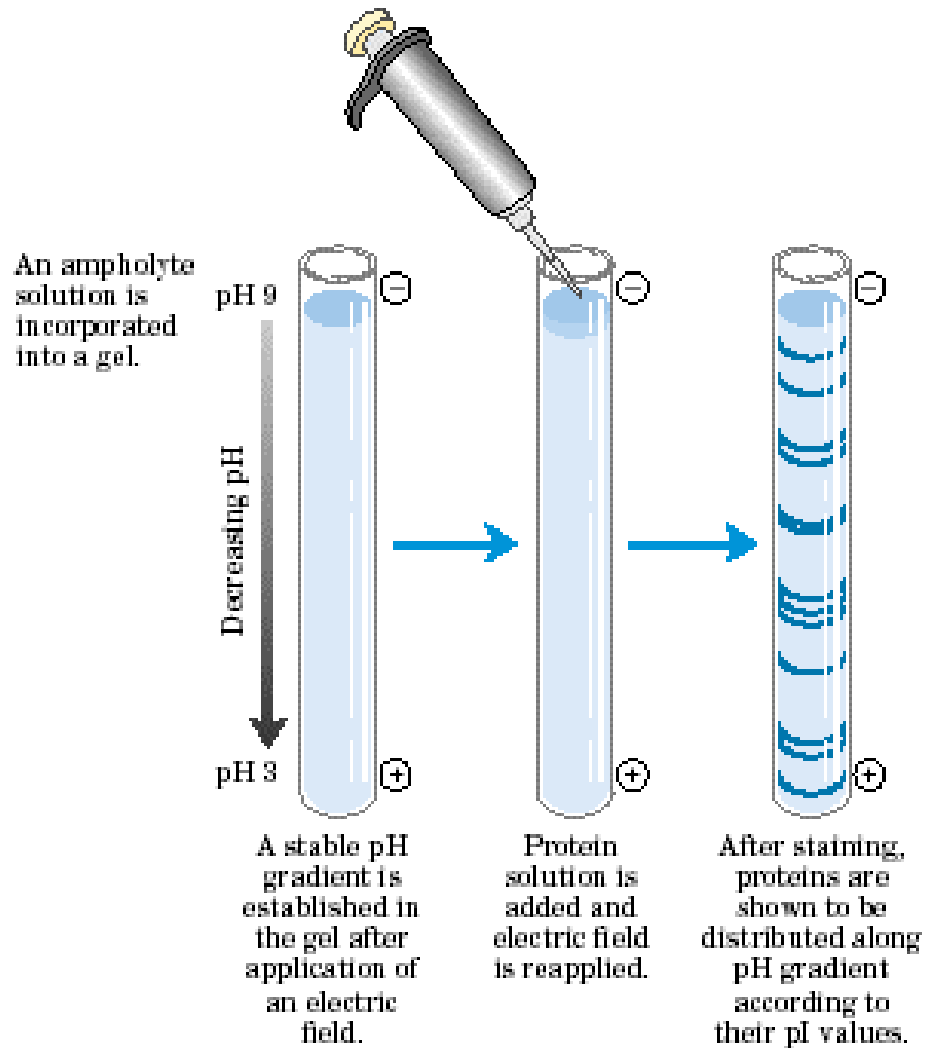


(a)



(b)

Isoelectrofocusing



Bidimensional

