

METODOS BIOQUIMICOS DE PURIFICACION Y ANALISIS

**Dr. Miguel Angel Sosa
Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales - UNCuyo**

BIOMOLÉCULAS

- **INORGÁNICAS**

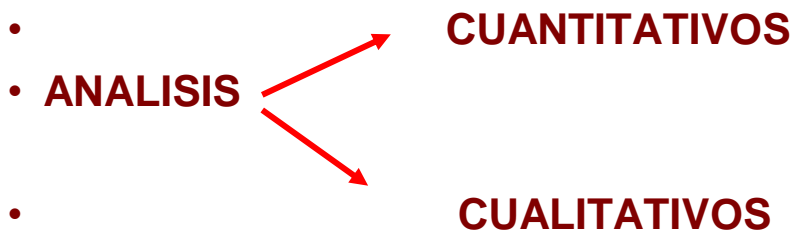
**H₂O
O₂
CO₂
PO₄³⁻
iones, etc...**

- **ORGÁNICAS**

**AZÚCARES
LÍPIDOS
PROTEÍNAS
AC. NUCLEICOS**

MÉTODOS

- **SEPARATIVOS**



PARA ELEGIR UN METODO HAY QUE.....

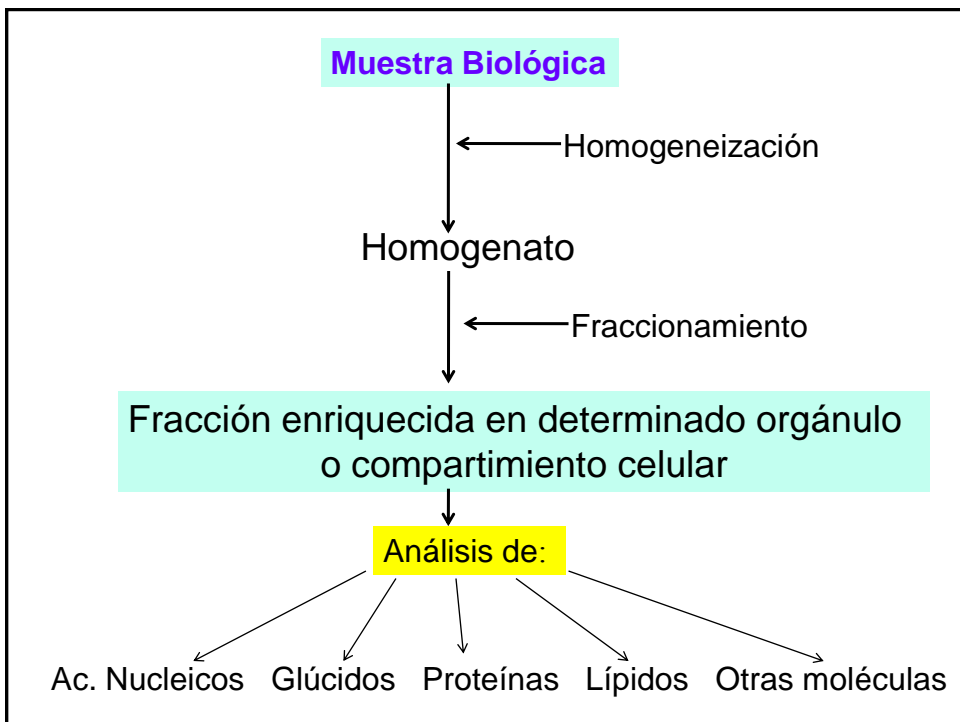
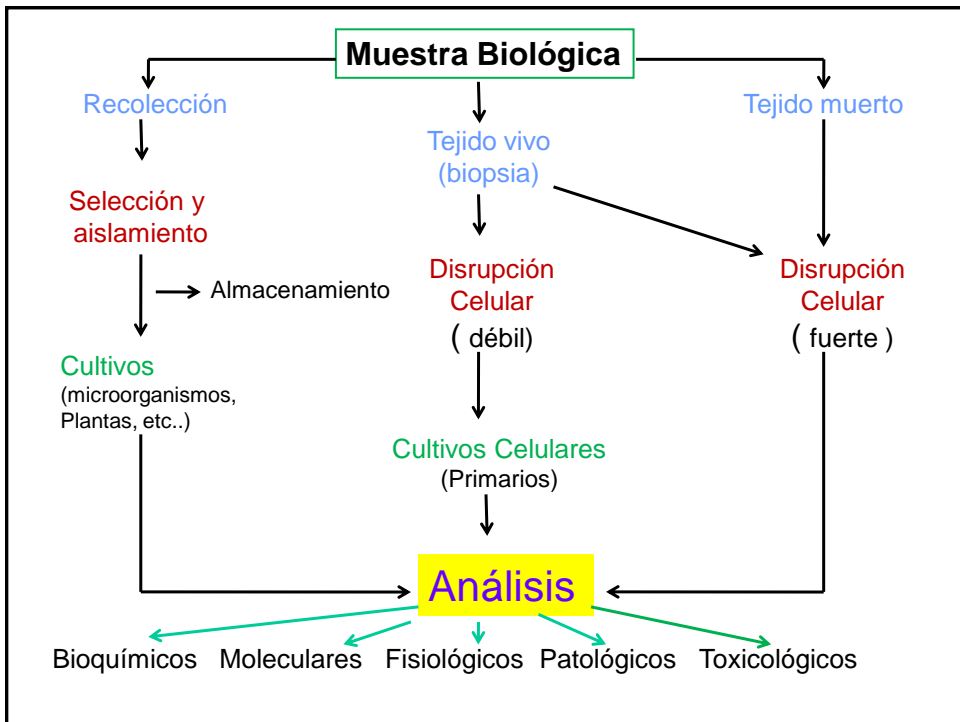
- **Conocer las propiedades físicas y químicas de las moléculas a separar y/o analizar.**
- **Aprender bien el manejo del equipamiento disponible.**
- **Conocer los fundamentos del método a utilizar.**

SEPARACIÓN DE:

- **MOLÉCULAS**

- **PARTÍCULAS SUBCELULARES**

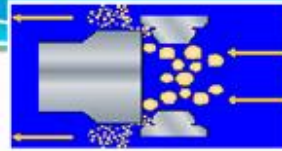
**SEPARACIÓN DE
PARTÍCULAS DE GRAN
TAMAÑO (e.g.
partículas subcelulares)**



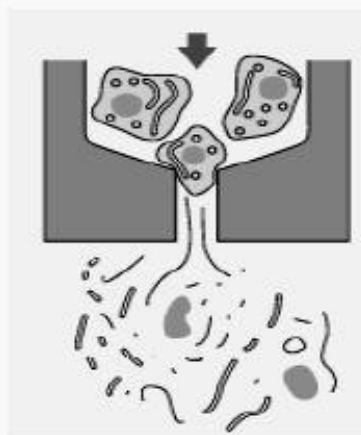
Ruptura de tejidos

Mecánicos:

- Homogenizador a presión
- Prensa francesa
- Ultrasonido
- Molino de Perlas
- Congelación
- Mortero
- Agitación con Abrasivos



Ruptura de tejidos



Prensa Francesa

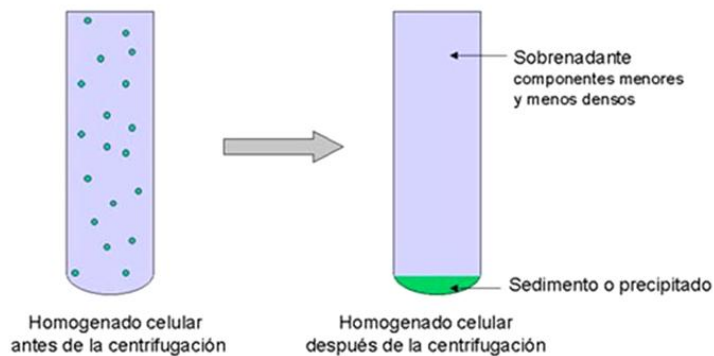
Homogenizadores



SEPARACIÓN DE PARTÍCULAS DE GRAN TAMAÑO (e.g. Partículas subcelulares)

- **CENTRIFUGACIÓN:**

Esquema básico de la Centrifugación

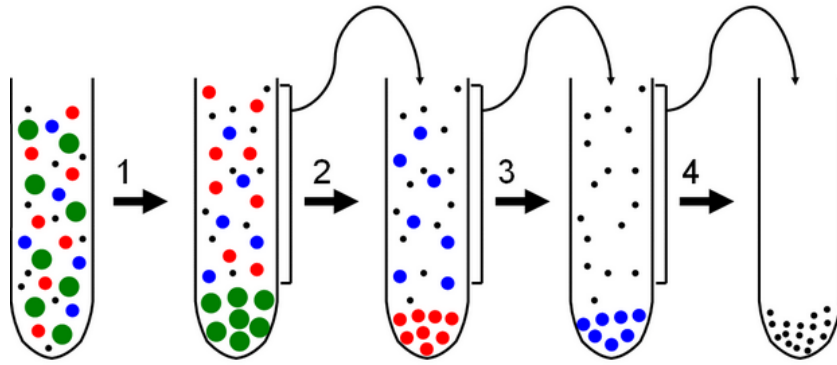


!!!Las densidades del buffer o medio SIEMPRE deben ser menores que las partículas!!!!

SEPARACIÓN DE PARTÍCULAS DE GRAN TAMAÑO (e.g. Partículas subcelulares)

- **CENTRIFUGACIÓN:**
 - **DIFERENCIAL**
 - **EN GRADIENTES.**

Centrifugación diferencial



Velocidades: $4 > 3 > 2 > 1$

PURIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS

<http://www.access Excellence.org/AB/GG/cellBreak1.html>

Suspensión de

Células ó tejidos: **Ultrasonidos**



Detergente

Émbolo rotatorio (potter ó aspas)



Homogenado



FRACCIONAMIENTO DEL HOMOGENADO CELULAR

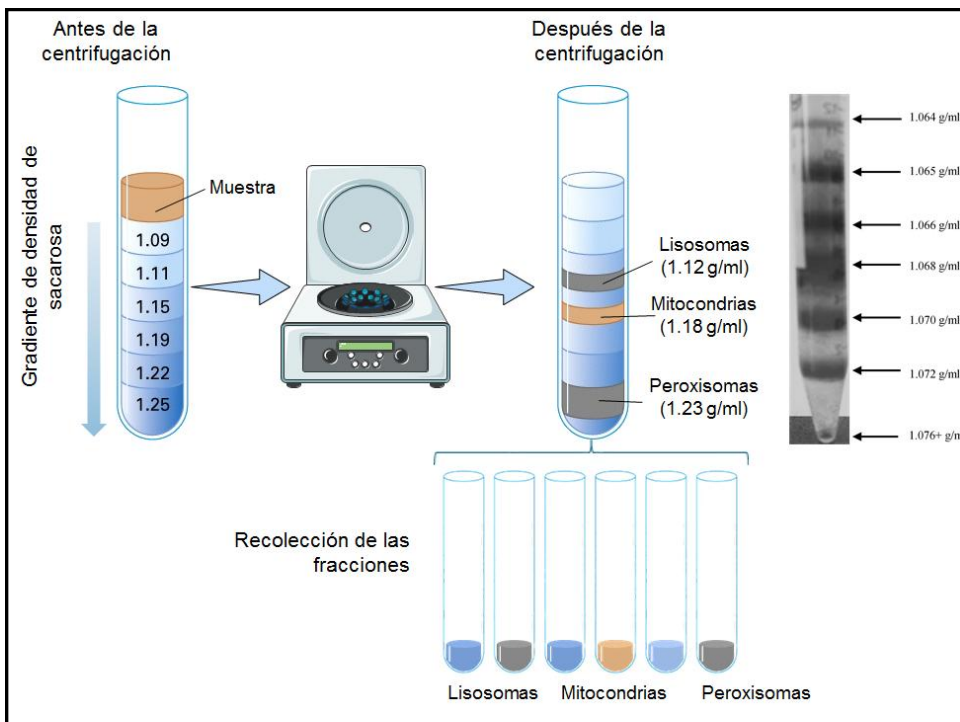
CENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL



SEPARACIÓN DE PARTÍCULAS DE GRAN TAMAÑO

(e.g. Partículas subcelulares)

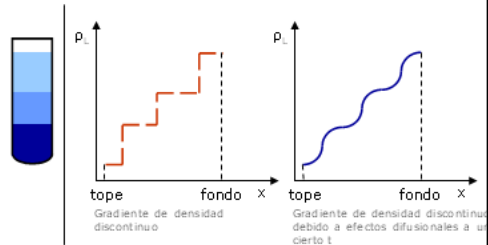
- CENTRIFUGACIÓN:
 - DIFERENCIAL
 - EN GRADIENTES.



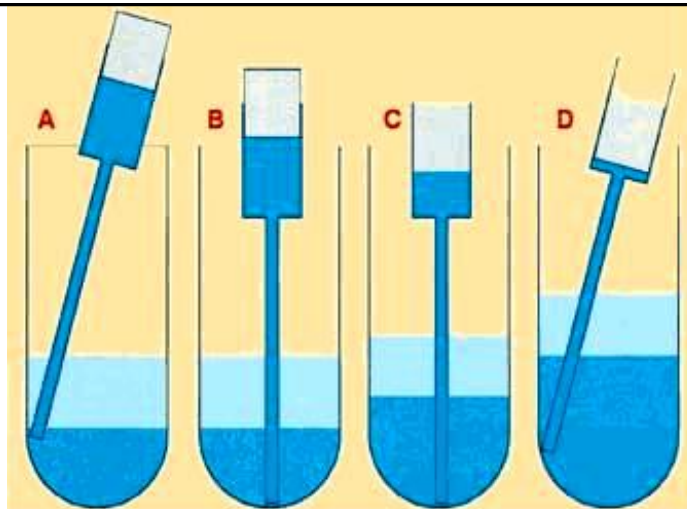
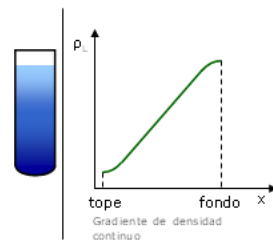
GRADIENTES DE DENSIDAD LINEALES

La densidad aumenta linealmente con el incremento en la distancia desde el centro de rotación.

DISCONTINUOS

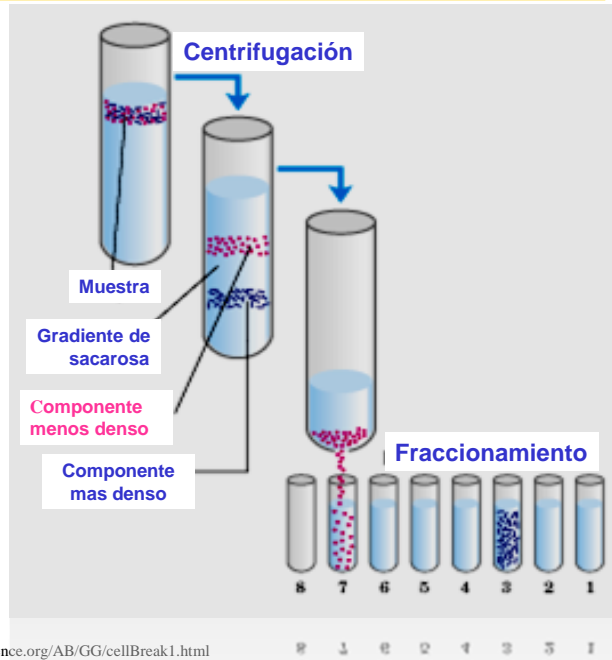


CONTINUOS



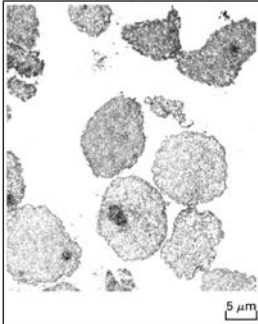
Formación de un gradiente discontinuo desde abajo (A-B) Punta de cánula de metal en jeringa hacia el fondo del tubo; (C) Solución más densa colocada lentamente por debajo de las capas más livianas; (D) La cánula es retirada contra la pared del tubo.

CENTRIFUGACIÓN ISOPÍCNICA

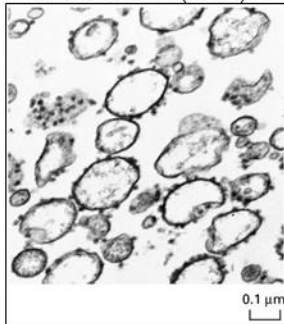


Control de calidad del fraccionamiento: Microscopía electrónica

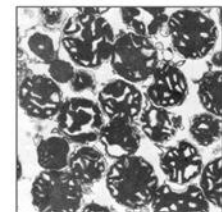
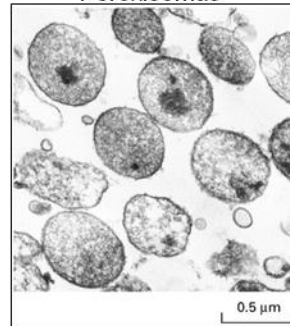
Núcleos



Microsomas (RER)

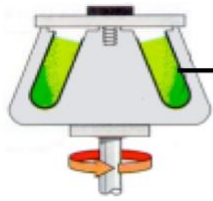


Peroxisomas



Pellet: Mitochondrial fraction

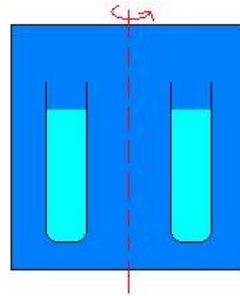
Formas de rotores



Orificio donde se colocan los tubos

Ángulo fijo

Giro

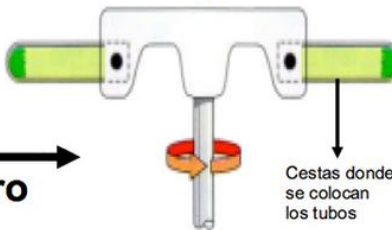


c) Rotor vertical



En posición de parada

Giro



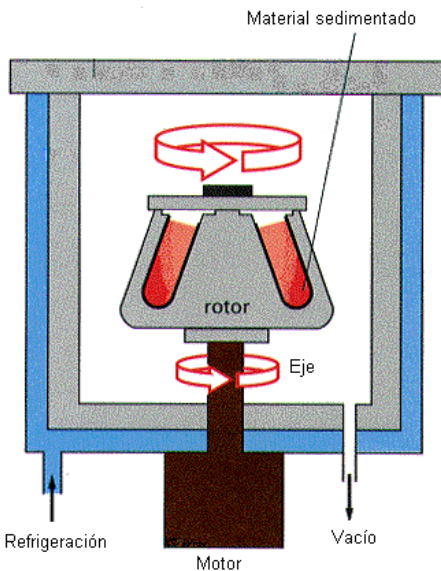
En posición de giro

Cestas donde se colocan los tubos

Brazo oscilante

oscilante

Ultracentrifugación



CENTRÍFUGAS



CENTRIFUGA DE LABORATORIO

Pequeño tamaño.
Velocidad: 5000 rpm máximo.
Sin sistemas auxiliares.
Útil para partículas grandes (células, precipitados de sales insolubles).



MICROFUGAS

Velocidad: más de 10000 rpm.
Tubos cortos.
Sin sistemas auxiliares.
Volúmenes muy pequeños.
Útiles en Biología Molecular.



CENTRIFUGA DE ALTA VELOCIDAD

Velocidad: 18000 - 25000 rpm.
Sistemas auxiliares: sistemas de refrigeración, algunas con sistema de vacío.
Útiles en la separación de fracciones celulares.
Insuficientes para la separación de ribosomas, virus o macromoléculas.



ULTRACENTRIFUGA

Velocidad: a partir de 50000 rpm.
Sistemas auxiliares: sistemas de refrigeración, sistemas de alto vacío.
Preparativas: aislamiento de partículas de bajo S (microsomas, virus, macromoléculas).

Fuerza centrífuga relativa



$$\text{F.C.R. } 1,118 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot n^{-2}$$

Siendo $1,118 \cdot 10^{-5}$ una constante
 r = radio de giro a la distancia horizontal (cm) desde el eje de rotación hasta el fondo del tubo
 n = velocidad de rotación expresada en revoluciones por minuto (r.p.m.)

SEGUNDA PARTE

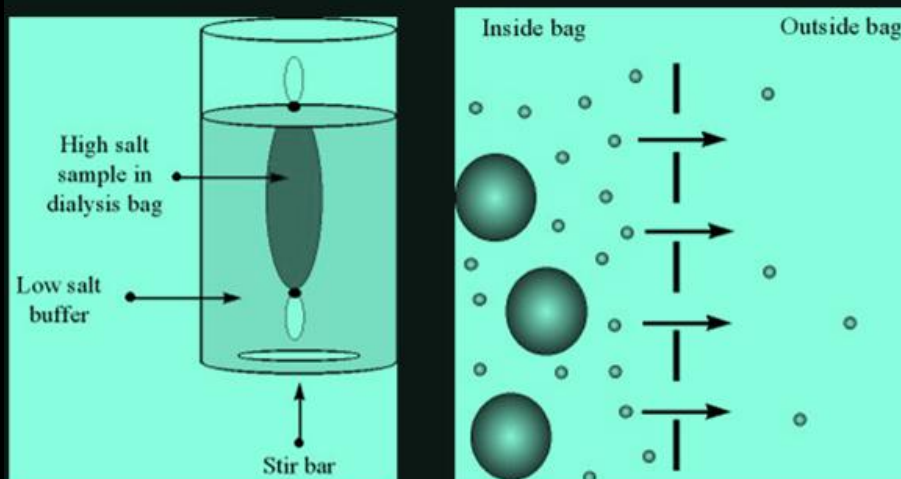
Metodos de purificación

Basado en las siguientes propiedades:

- Tamaño
- Solubilidad
- Carga
- Adsorción
- Afinidad

catedras.quimica.unlp.edu.ar

Diálisis



SEPARACIÓN DE MOLÉCULAS

- **CROMATOGRAFIA.**

CROMATOGRAFÍA

▶ Fase estacionaria: sólido o líquido fijado a un sólido

▶ Fase móvil: fluido (líquido o gas) que arrastra la muestra a través de la fase estacionaria



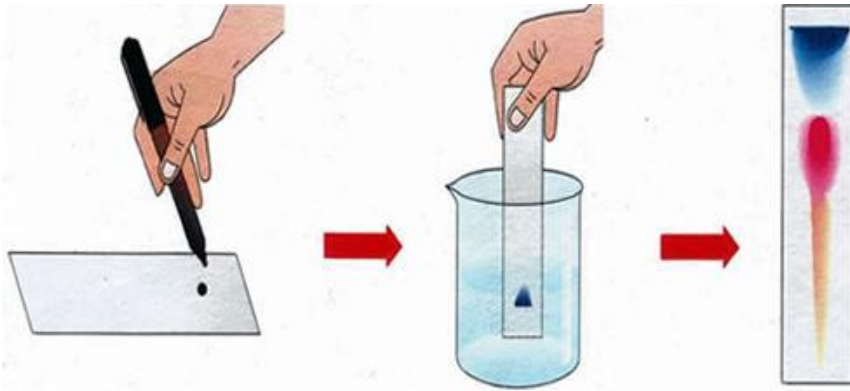
Los distintos componentes de la mezcla interaccionan de manera diferente con las dos fases estableciéndose un reparto entre ambas



Se establece un equilibrio entre partículas adsorbidas y desorbidas

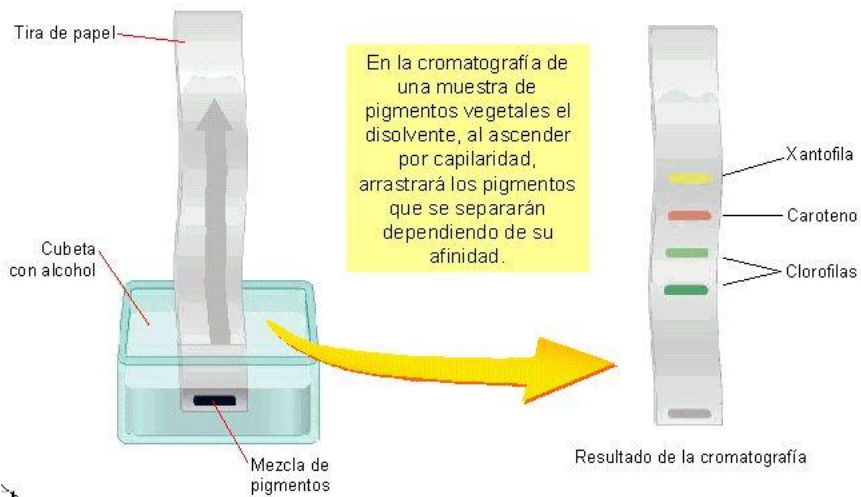
coeficiente de reparto $\alpha = \frac{[\text{moléculas adsorbidas}]}{[\text{mol. adsorbidas}] + [\text{mol. desorbidas}]}$

Cromatografía: *Chromos* (color)



Cromatografía

Se basa en la diferente afinidad de las moléculas por un disolvente y por la trama porosa de la matriz a través de la que fluyen.



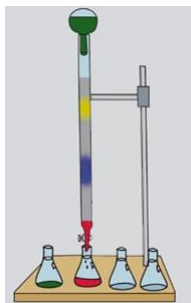
Clasificación de la cromatografía según el método de separación

Cromatografía de	Mecanismo	F. estacionaria	F. móvil
Adsorción	F. de Van der Waals	Sólido	
Reparto	Solubilidad	Líquido	
Intercambio iónico	F. Electrostáticas	Resina	Líquido
Exclusión	Tamaño de partícula	Gel	
Afinidad	Interacción bioquímica	Sólido	

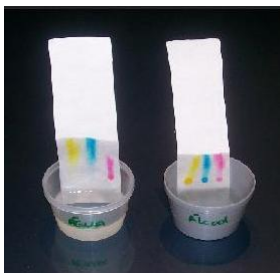
Tipos de Cromatografía

Según el soporte:

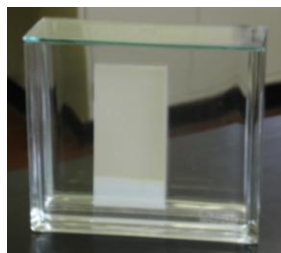
• En columna



En papel



En capa fina



Tipos de Cromatografía en Columna

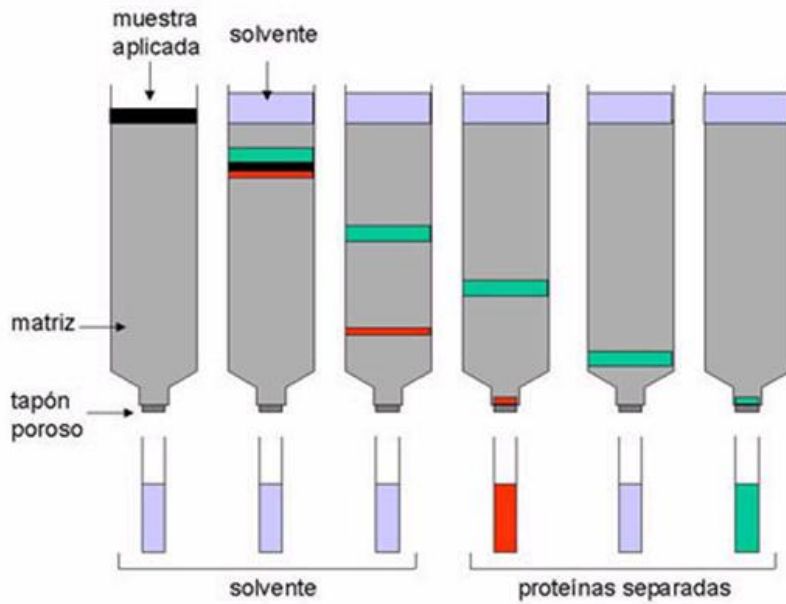


Filtración en Gel

Intercambio Iónico

Afinidad

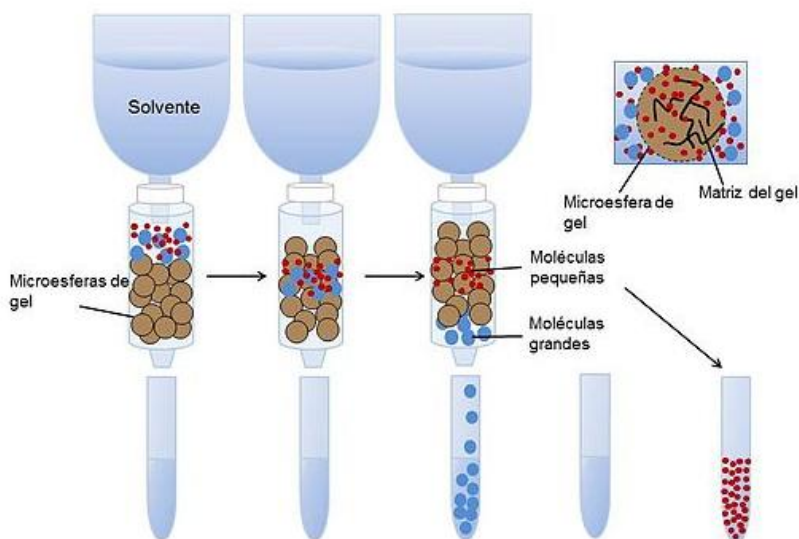
CROMATOGRAFIA



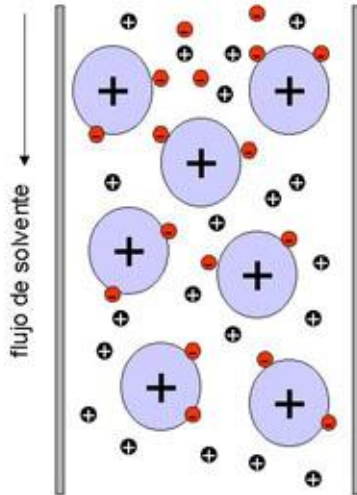
Filtración en Gel



Cromatografía de filtración (tamaños)



PRINCIPIO DE LA CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO



Las partículas cargadas negativamente se unen a la matriz sólida cargada positivamente, y son retenidas.

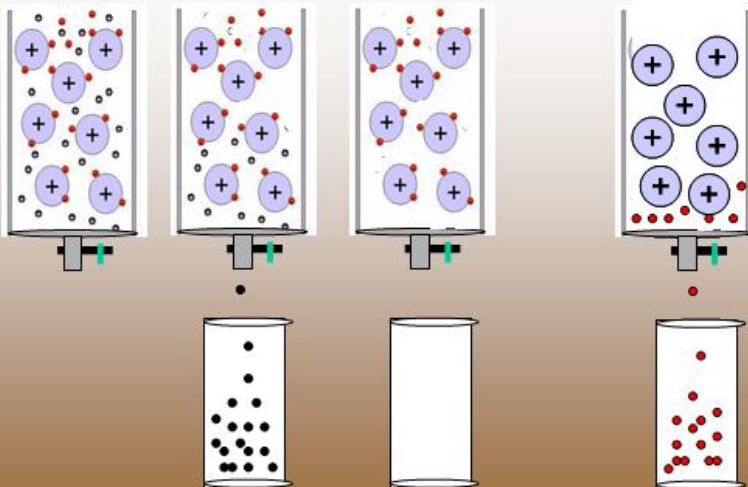
Las partículas cargadas positivamente son rechazadas por la matriz sólida cargada positivamente y son eluidas.

La elución de las partículas cargadas negativamente se consigue cambiando el pH del solvente hasta igualarlo a su punto isoelectrico o hasta invertir su carga neta.

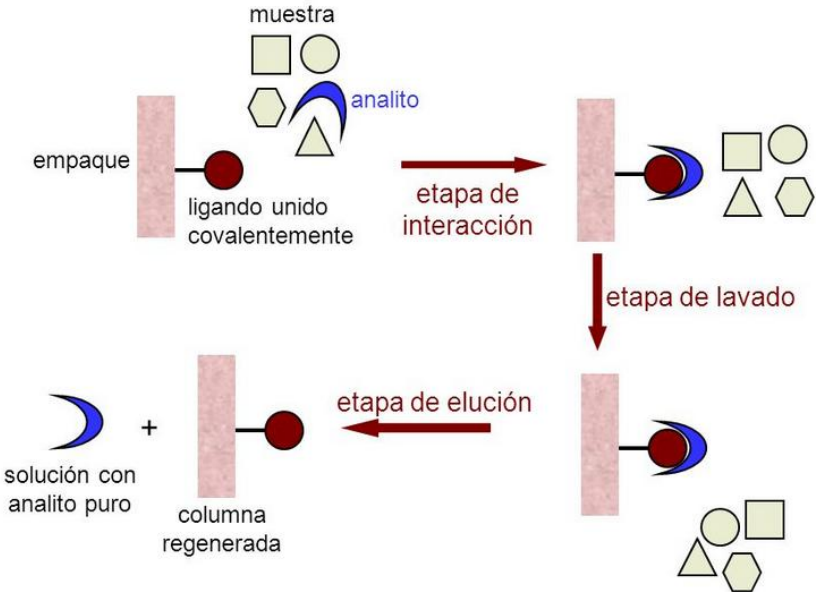
SEPARACION POR CARGAS!!!!

Elución con solvente de baja molaridad
(baja fuerza iónica)

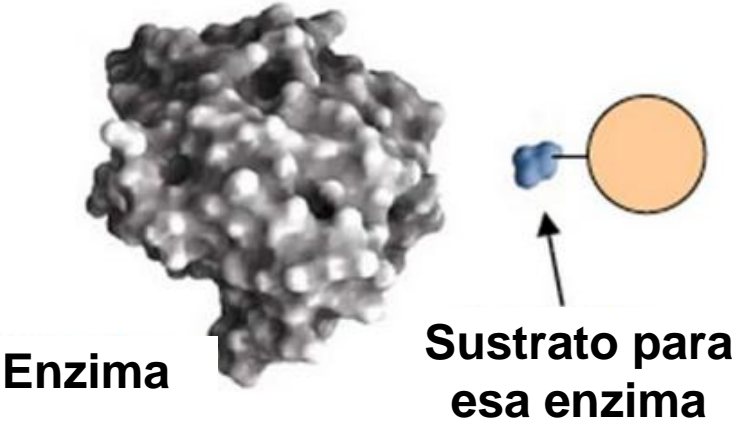
Aumentar la
molaridad del solvente



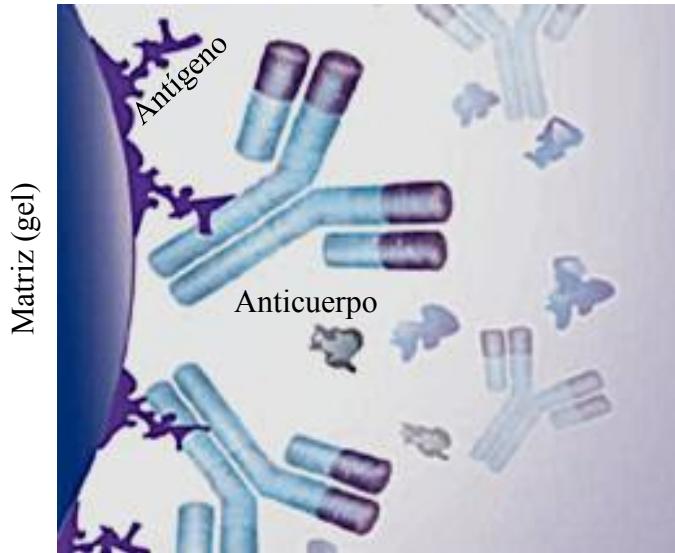
Cromatografía de Afinidad



Cromatografía de Afinidad



Cromatografía de Afinidad



SEPARACION DE MOLECULAS POR CARGAS

• ELECTROFORESIS

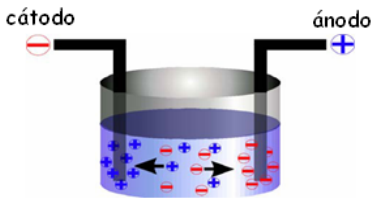
ELECTROFORESIS

Separar y analizar moléculas: proteínas
ADN/ARN



Arne Tiselius
1937
(Nobel 1948)

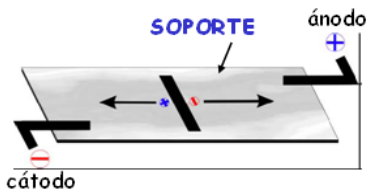
... en función de su diferente movilidad al aplicar un campo eléctrico
(dependerá de su carga eléctrica)



- * Moléc. (+) → polo (-) o **cátodo**
- * Moléc. (-) → polo (+) o **ánodo**

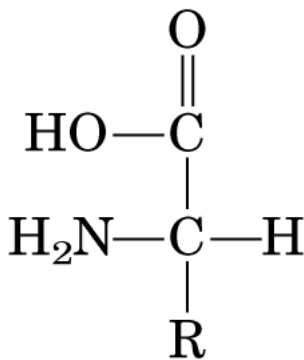
ELECTROFORESIS LIBRE

→ moléculas en disolución o suspensión:
poco resolutiva

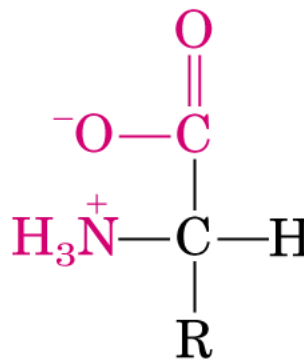


ELECTROFORESIS DE ZONA

→ SOPORTE que retiene las moléculas:
elevado poder de resolución

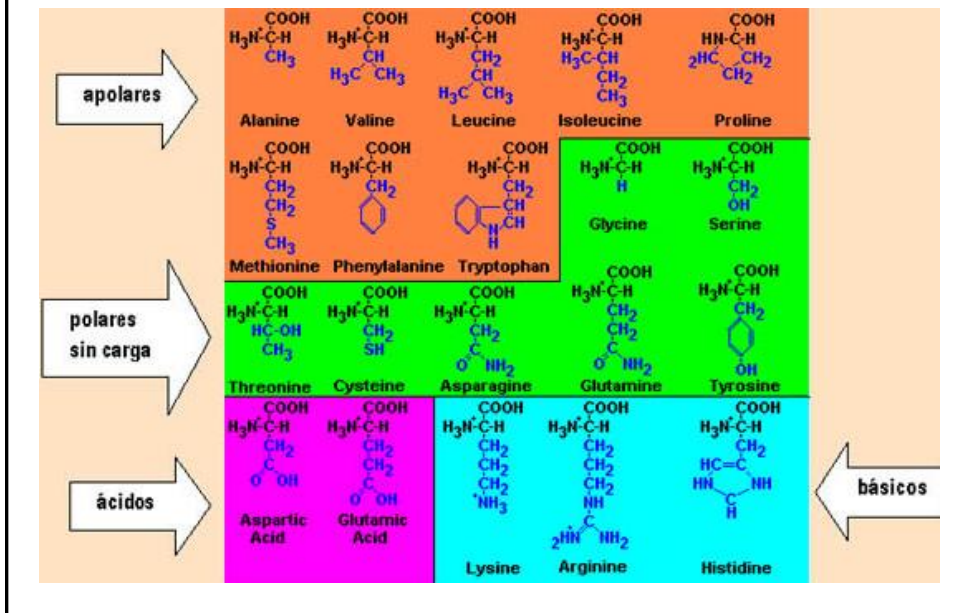


Nonionic
form



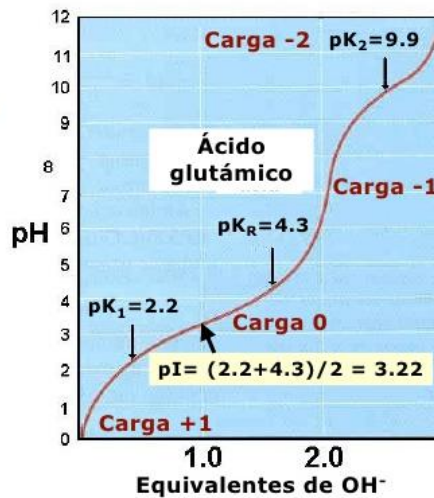
Zwitterionic
form

Grupos de aminoácidos según su carga



Punto Isoeléctrico (pI)

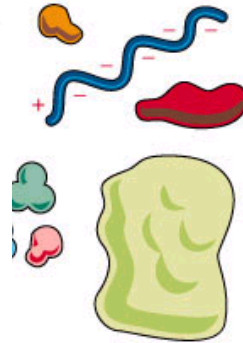
- pI es el valor de pH para el cual la carga neta del aminoácido es 0
 - Valor medio de los pK_a que flanquean la estructura isoelectrica
 - Para aminoácidos neutros es el valor medio de los pK_1 y pK_2
 - Para aminoácidos ácidos o básicos depende de cada caso
 - Cuando $\text{pH} = \text{pI}$ disminuye la solubilidad en agua



PROTEIN SEPARATION

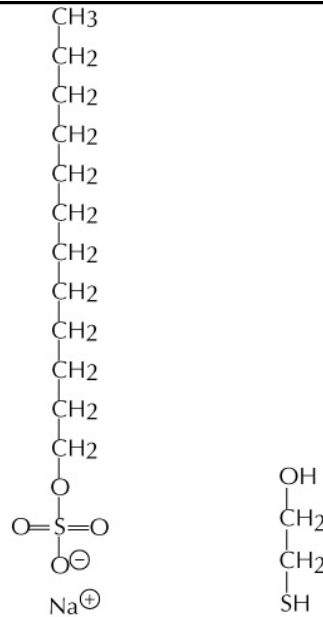
La velocidad de migración depende de:

- la carga neta
- Fuerza del campo $F=Q.V$
- Coeficiente de fricción $Fr = f . v$



...y diversas. Ellas difieren por su tamaño, forma, carga, hidrofobicidad y por su afinidad a otras moléculas. Todas estas propiedades pueden ser explotadas con el fin de separar unas de otras tal que ellas puedan ser estudiadas separadamente.

©1998 GARLAND PUBLISHING



SDS

β -mercaptoethanol

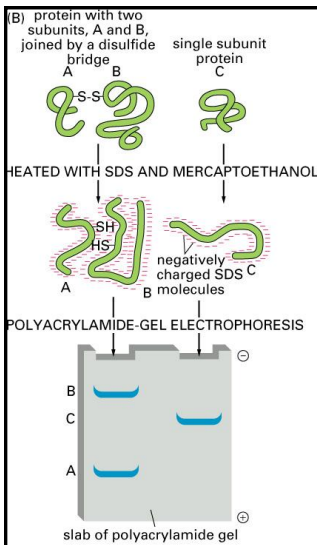


Figure 8-14 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell

Las proteínas se separan SÓLO por su PM

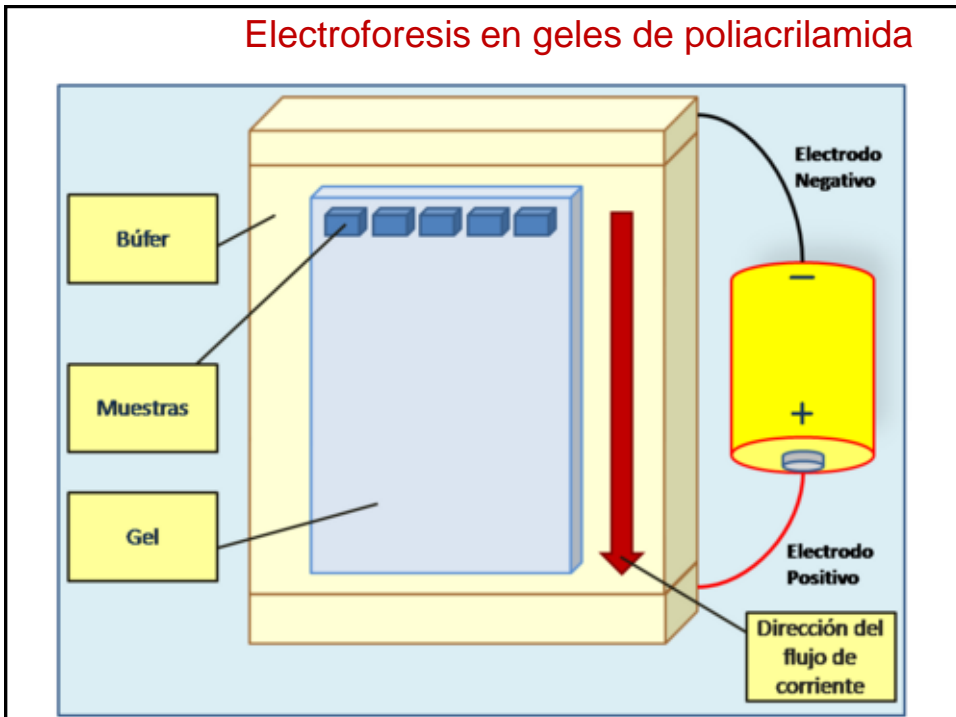
El SDS interacciona con las proteínas por interacciones hidrofobicas

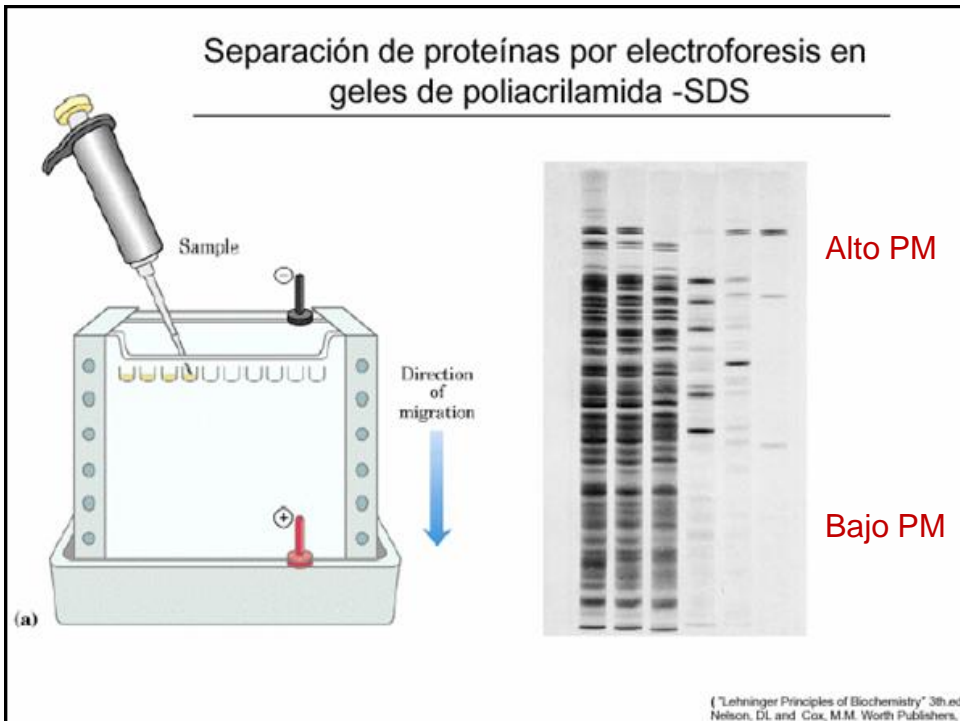
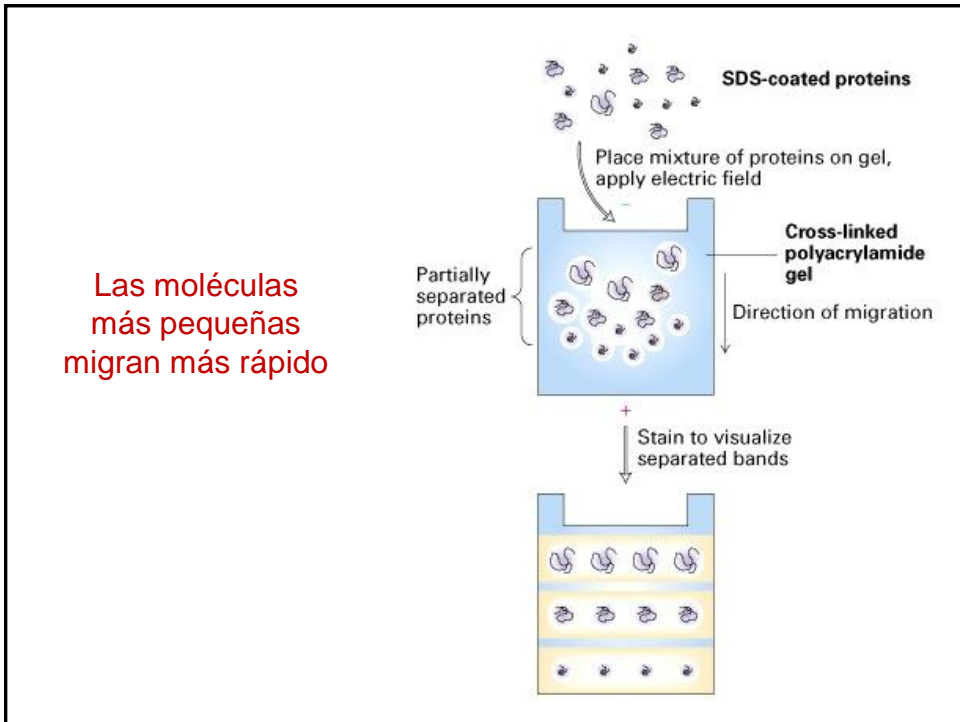
cumple 2 funciones criticas:

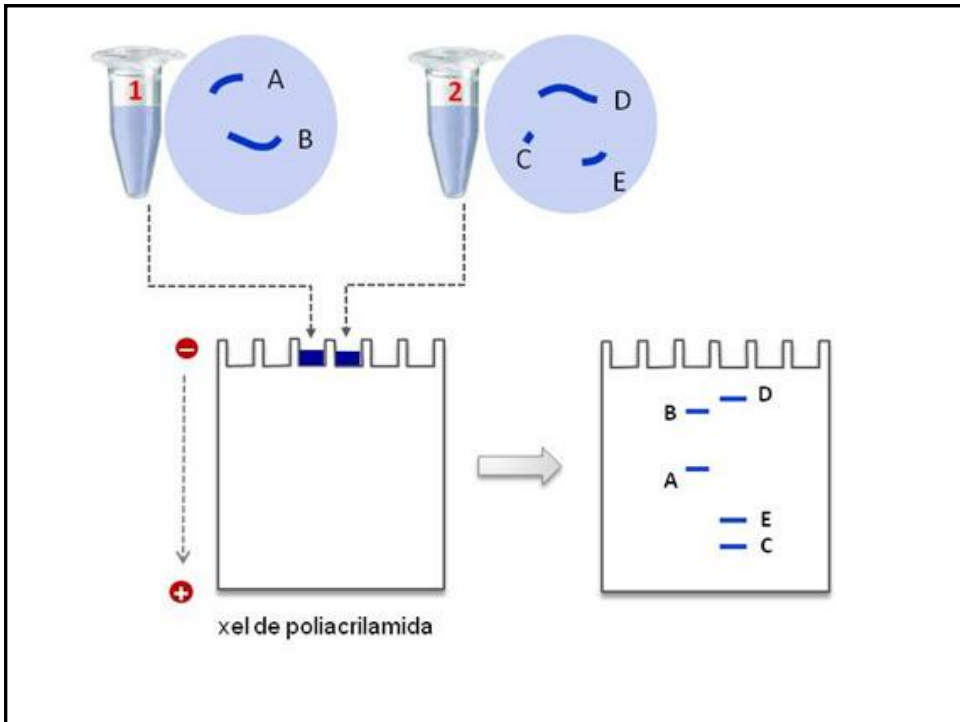
- Recubre las proteínas con carga negativa proporcional a su PM
- Desnaturaliza la estructura nativa de la proteína

β -mercaptoetanol rompe los puentes disulfuros

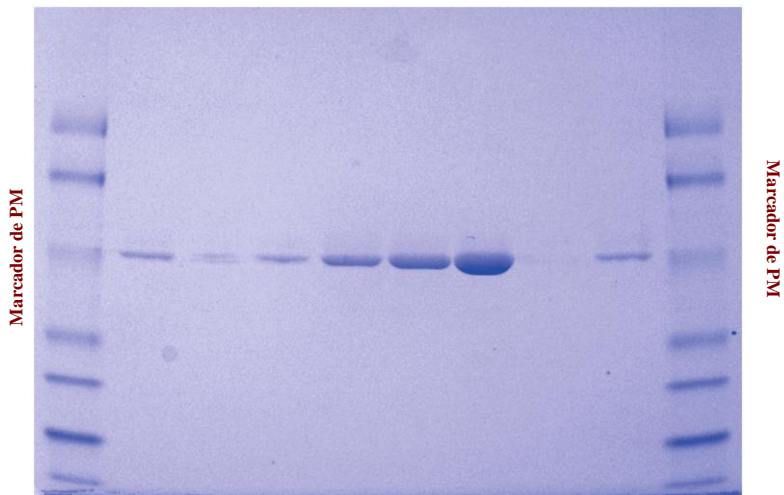
Electroforesis en geles de poliacrilamida



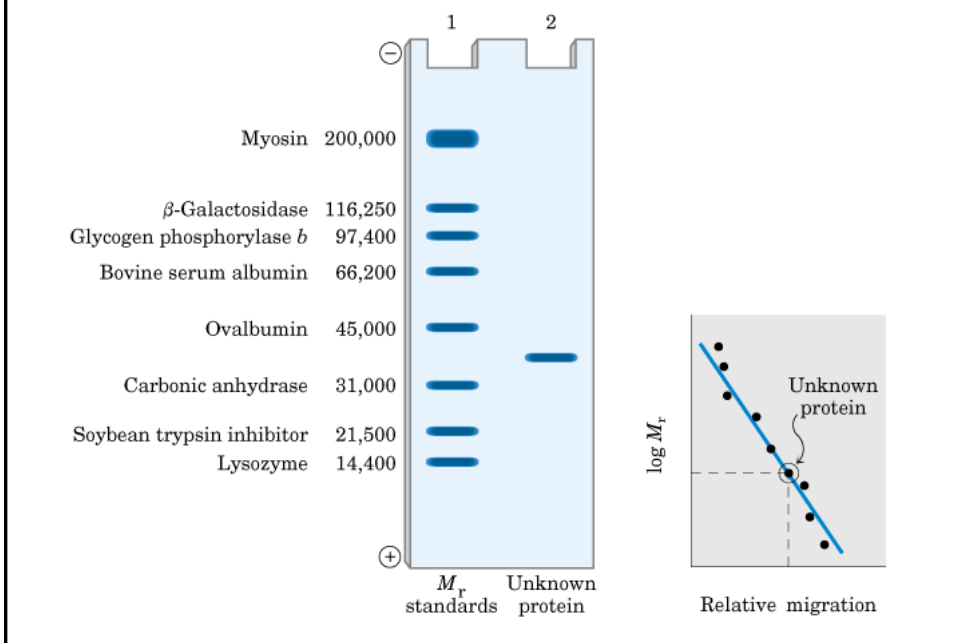




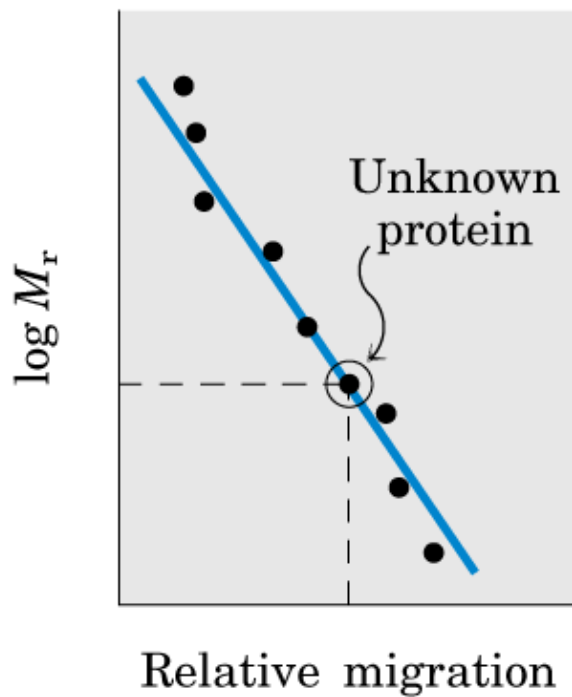
Ejemplo de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie

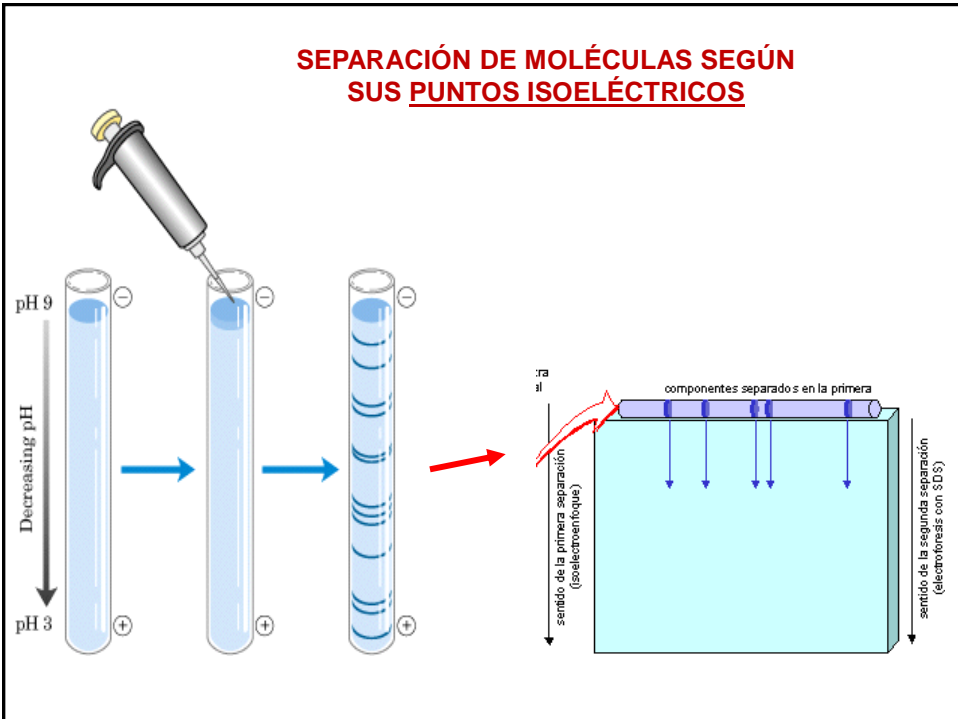
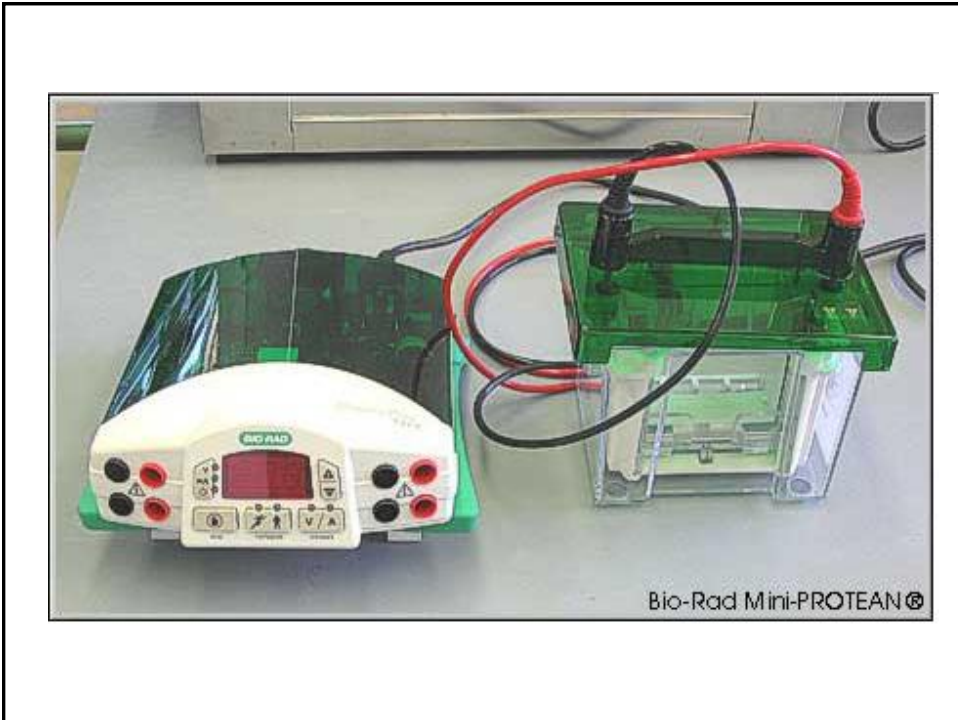


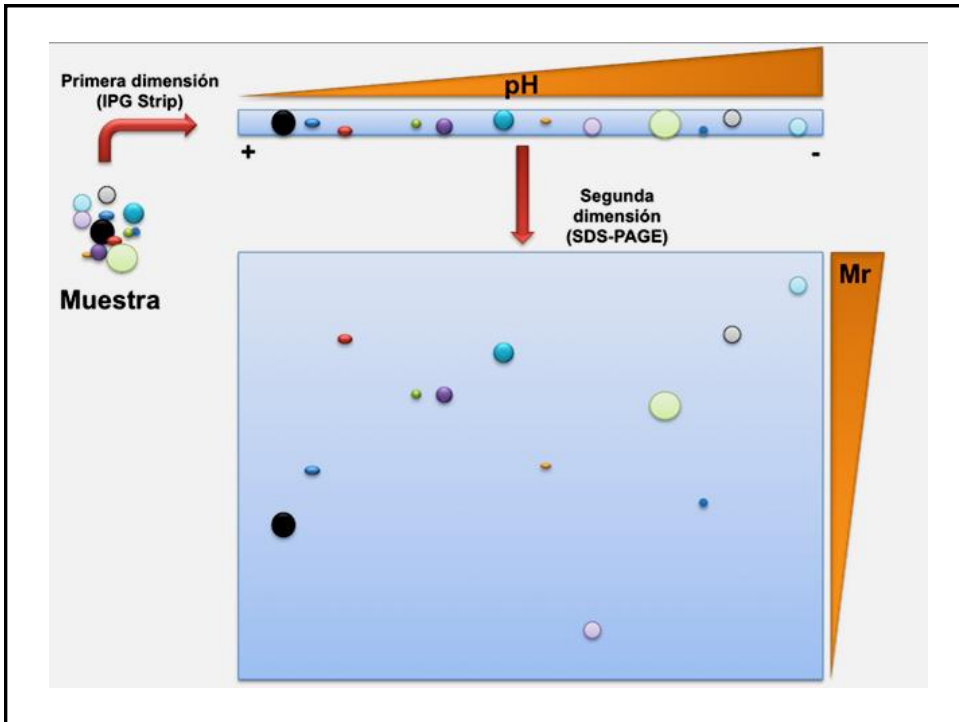
- Como calcular los pesos moleculares de las proteínas



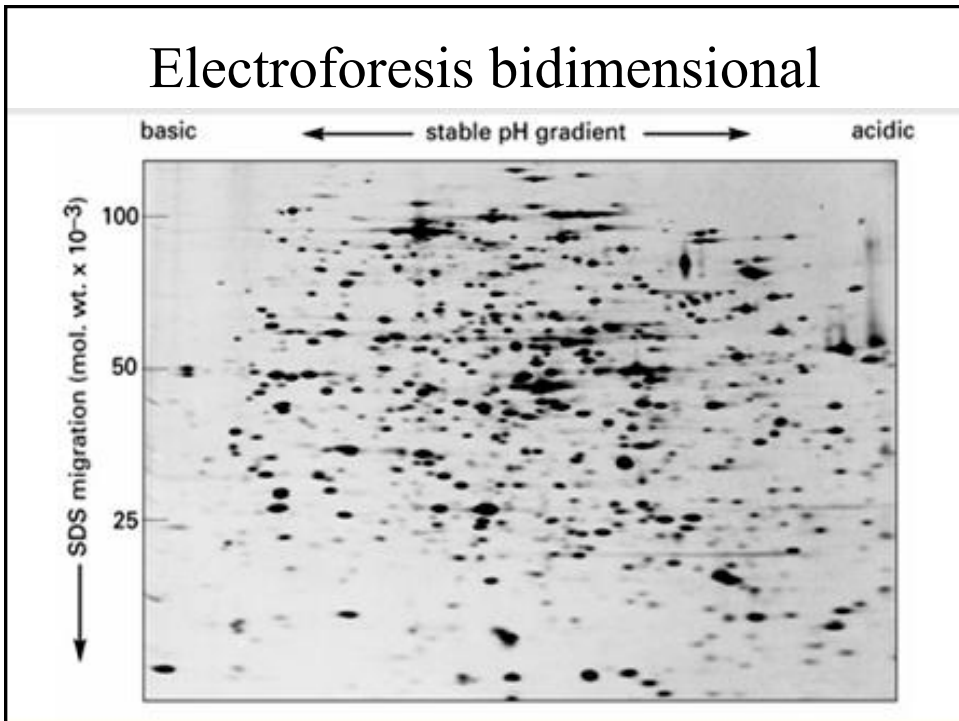
Como calcular los pesos moleculares de las proteínas







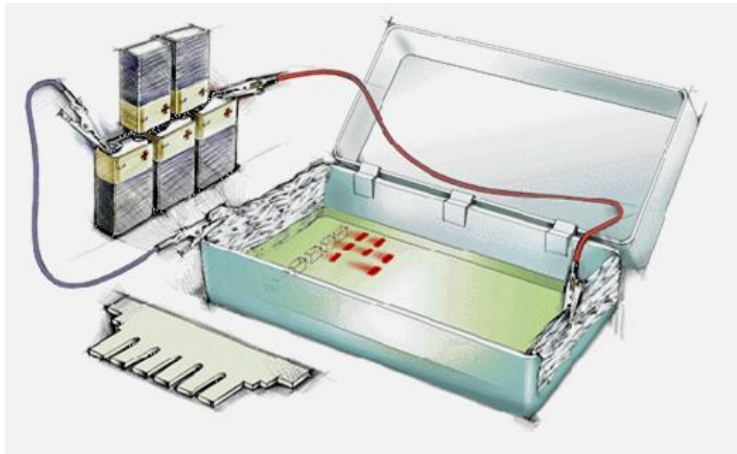
Electroforesis bidimensional



The Isoelectric Points of Some Proteins

Protein	pI
Pepsin	~1.0
Egg albumin	4.6
Serum albumin	4.9
Urease	5.0
β -Lactoglobulin	5.2
Hemoglobin	6.8
Myoglobin	7.0
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrome <i>c</i>	10.7
Lysozyme	11.0

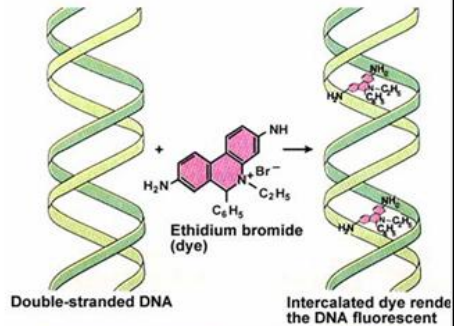
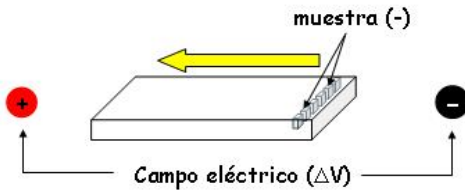
Separación de ADN en geles de agarosa



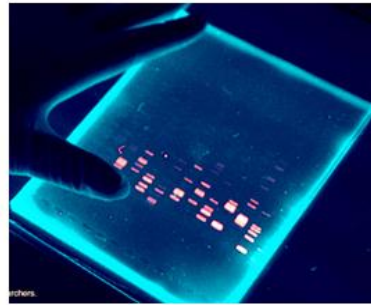
EN GEL DE AGAROSA

Soporte: (restrictivo) Gel de agarosa

Electroforesis horizontal



1. Preparación del gel
2. Aplicación de la muestra
3. Electroforesis
4. Detección por tinción con **Bromuro de Etidio (BrEt)**: se intercala en el DNA y al irradiarlo con luz UV emite fluorescencia



RESUMEN

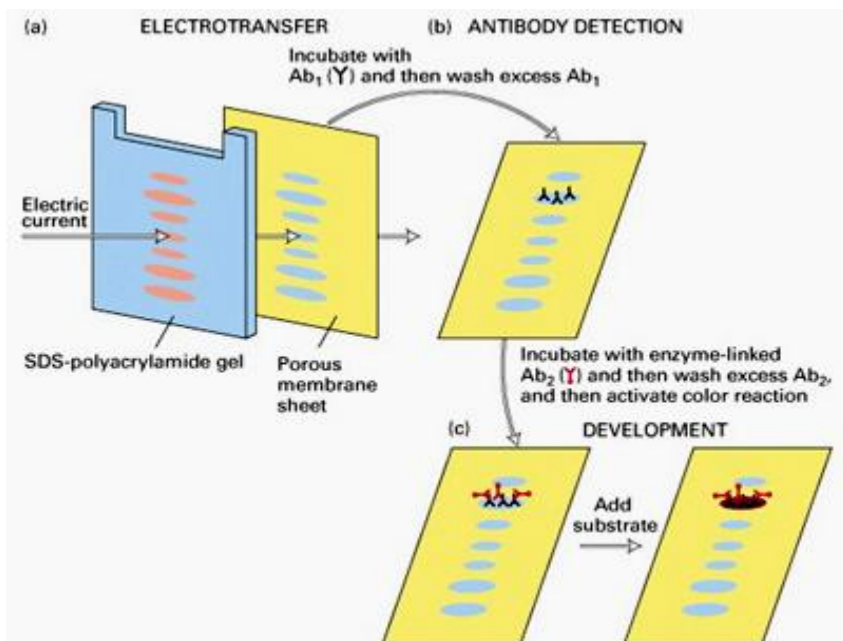
Característica	Procedimientos
Tamaño	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dialisis – ultrafiltración ➤ Electroforesis en gel ➤ Cromatografía de exclusión molecular ➤ Ultracentrifugación
Solubilidad	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Precipitación con Sales ➤ " Solventes orgánicos ➤ " por pH
Polaridad	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Cromatografía de absorción ➤ C. En papel ➤ C. En fase reversa ➤ C. De interacción hidrofóbica
Carga	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Cromatografía de intercambio iónico ➤ Electroforesis ➤ Isoelectroenfoque
Selectividad	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Cromatografía de afinidad

catedras.quimica.unlp.edu.ar

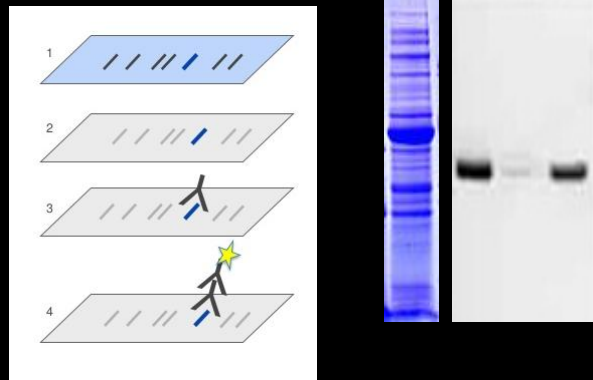
TERCERA PARTE

- **¿Cómo identificar una proteína desde una mezcla compleja?**

“Western blot”

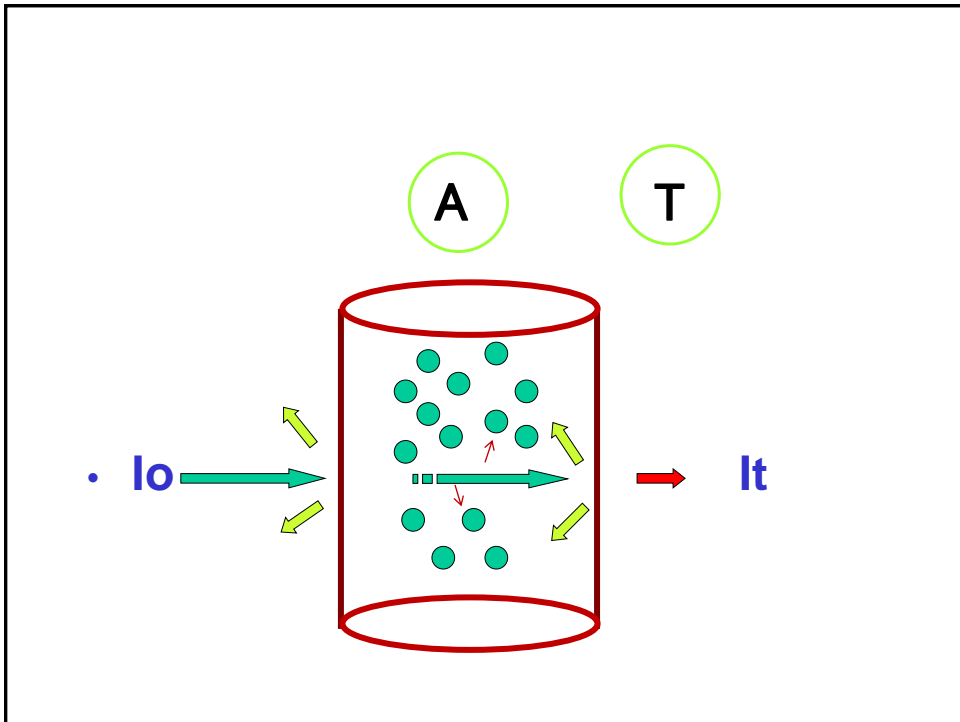


“Western blot”




Métodos de cuantificación


- ***ESPECTROFOTOMETRÍA***




Absorbancia y Transmitancia



Lámpara



Selector



Celda de muestra

Absorbancia

$A = \text{Log } I_0 / I$

Transmitancia

$T = I / I_0$

The graph plots Absorbance (A) on the left y-axis (0 to 1.0) and Transmittance (%T) on the right y-axis (0 to 100) against Concentration on the x-axis. A blue dashed line represents Absorbance (A), which increases linearly with concentration. A red solid curve represents Transmittance (%T), which decreases exponentially as concentration increases.

Absorbancia y transmitancia
 $A = \text{Log } 1/T$

Absorbancia y transmitancia
 $A = -\text{Log } T$

Obtención de absorbancia a partir de un valor de % de transmitancia

RECORDANDO:

$$A = \log_{10} 1/T$$

Ejemplo de cálculo

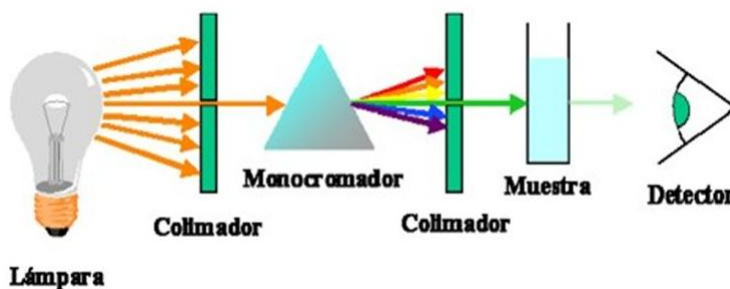
$$\%T = 30$$

$$T = 0.30$$

Sustituyendo $(1/T)$ $1/0.30 = 3.33$

$\log_{10} 3.33 = 0.523$ de absorbancia

[ESPECTROFOTÓMETRO





METODOS ESPECTROSCOPICOS

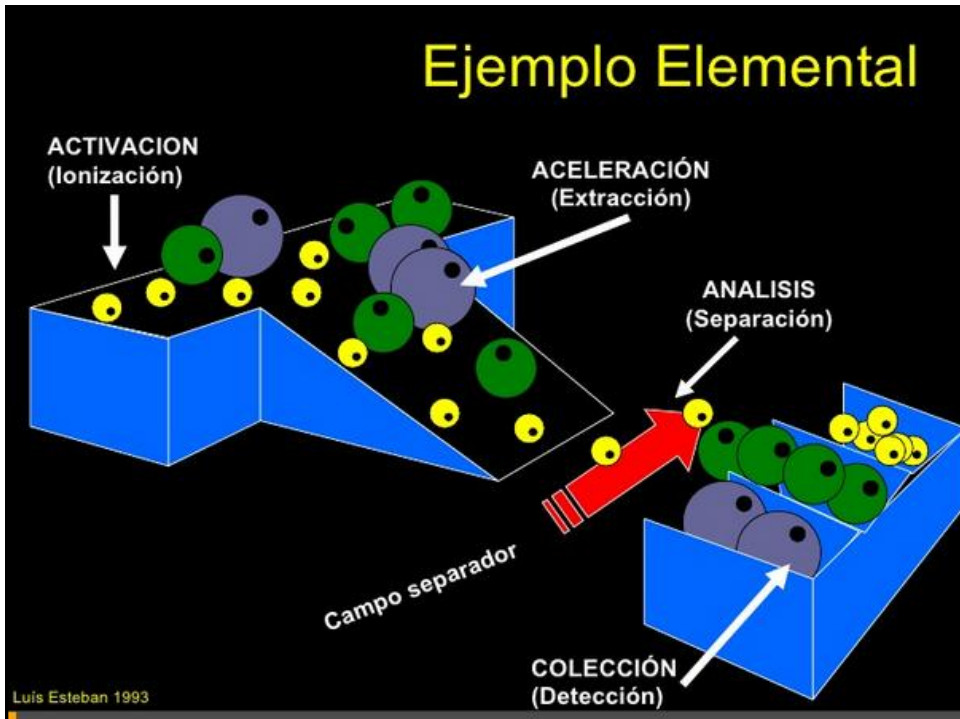
- | | |
|-----------------|-----------------|
| • INFRARROJA | INFRARROJA |
| • UV- VISIBLE | UV-VISIBLE |
| • FLUORESCENCIA | UV-VISIBLE |
| • RESONANCIA | RADIOFRECUENCIA |
| • MAGNETICA | |
| • NUCLEAR | |

METODOS NO ESPECTROSCOPICOS

- | | |
|------------------|--------------|
| • POLARIMETRIA | POLARIZACION |
| • REFRACTOMETRIA | REFRACCIÓN |
| • TURBIDIMETRÍA | DISPERSIÓN |

CONOCIENDO MEJOR LAS MOLECULAS.....

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

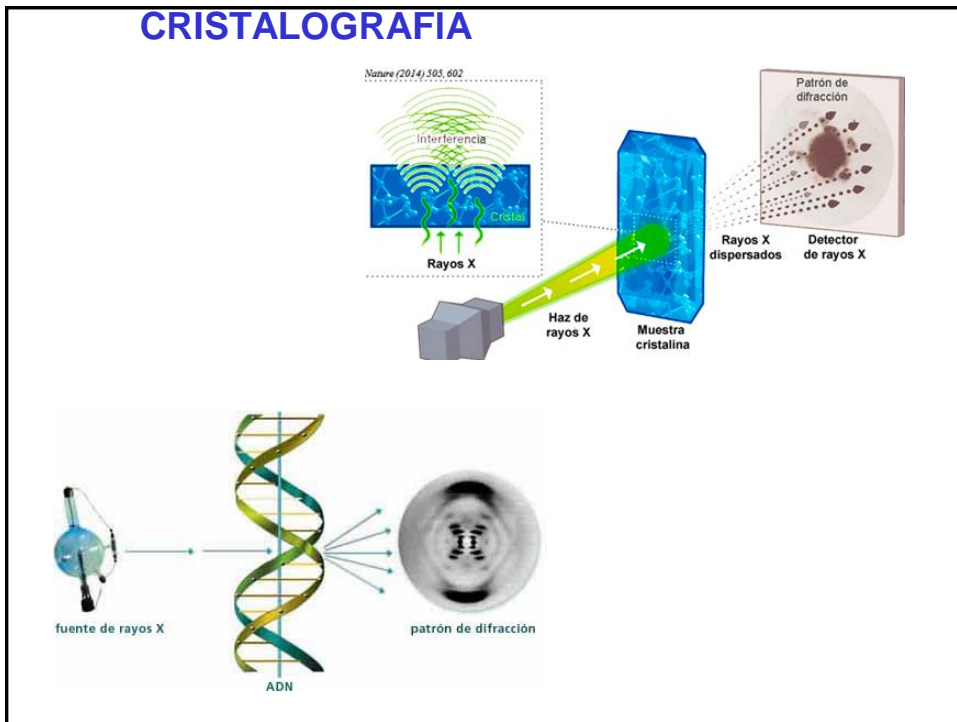




**CONOCIENDO MEJOR LAS
MOLECULAS.....**

CRISTALOGRAFÍA (DIFRACCIÓN DE Rx)

CRISTALOGRAFIA



OTROS MÉTODOS

- **ESPECTROFLUOROMETRIA**
- **RADIOQUÍMICOS (RIA, AUTORADIOGRAMAS, ETC...)**
- **ELISA**
- **BIOLOGÍA MOLECULAR**
- **MICROSCOPIA**