

MÉTODOS BIOQUÍMICOS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS

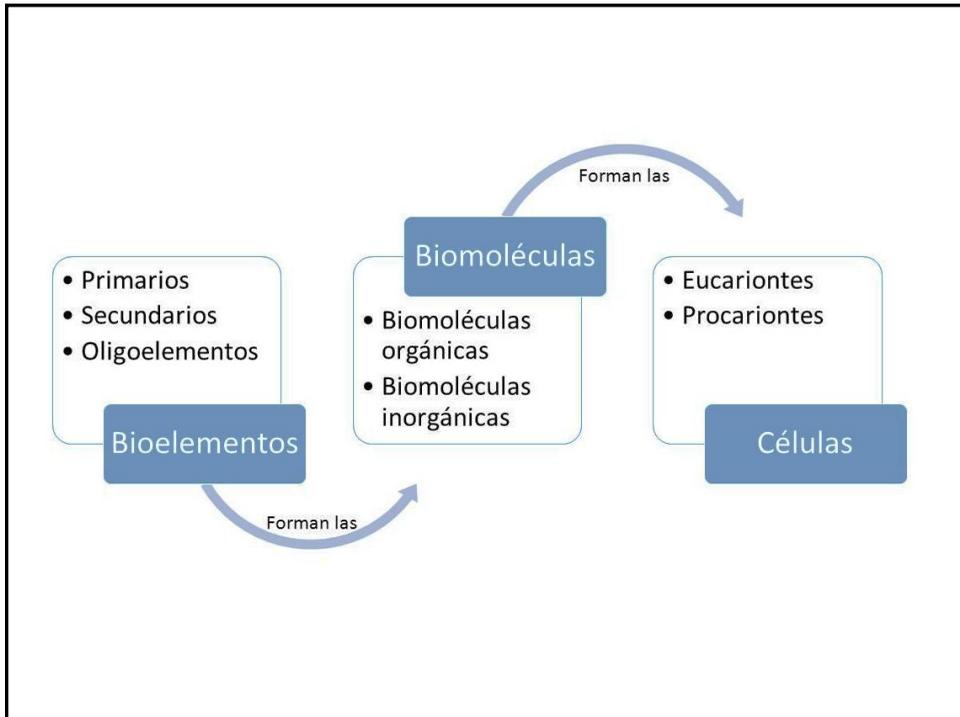
**Dr. Miguel Angel Sosa
FCEN - UNCuyo**

Objetivos

Entender los fundamentos de las metodologías y equipos usados en bioquímica.

Aprender a decidir el método y equipos que se necesitan para cada estudio

Interpretar los resultados que se obtienen con estos métodos



BIOMOLÉCULAS

• INORGÁNICAS

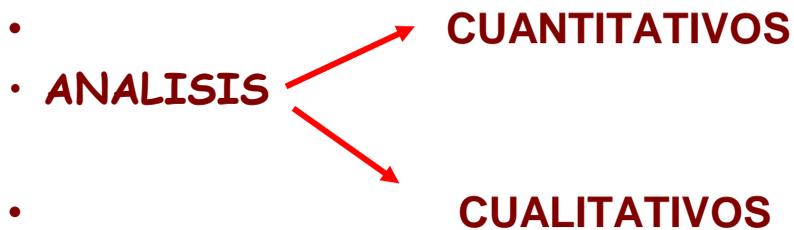
H₂O
 O₂
 CO₂
 PO₄³⁻
 iones, etc...

• ORGÁNICAS

AZÚCARES
 LÍPIDOS
 PROTEÍNAS
 AC. NUCLEICOS

MÉTODOS

- SEPARATIVOS



SEPARACIÓN DE:

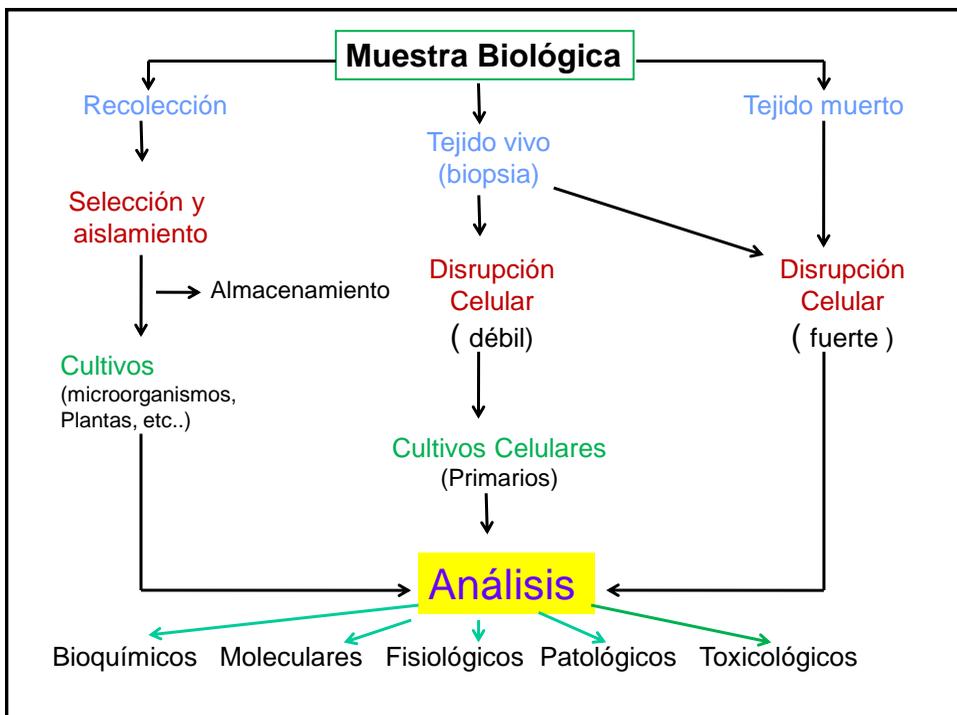
- MOLÉCULAS

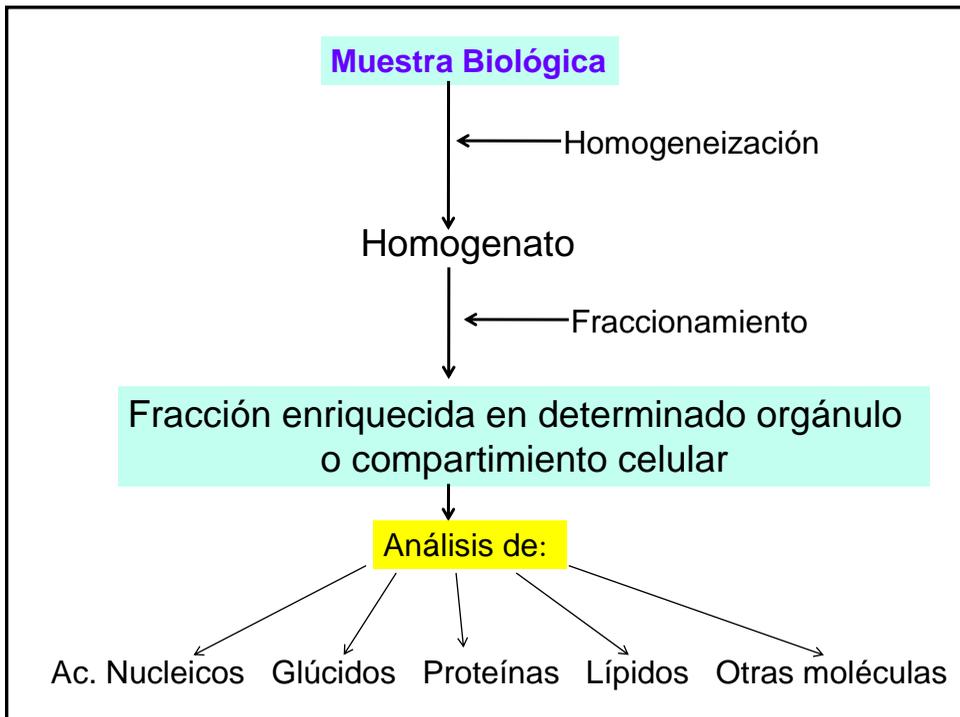
- PARTÍCULAS SUBCELULARES

Métodos Separativos

SEPARACIÓN DE PARTÍCULAS DE GRAN TAMAÑO (partículas subcelulares)

Métodos Separativos

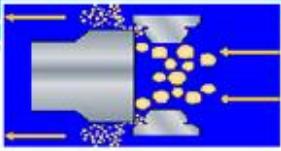




Ruptura de tejidos

Mecánicos:

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

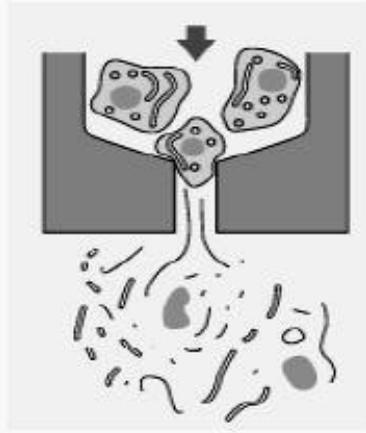






Métodos Separativos

Ruptura de tejidos



Prensa Francesa

Métodos Separativos

Homogenizadores



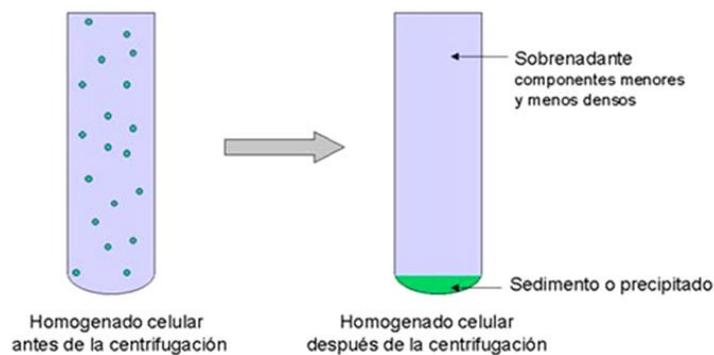
Métodos Separativos

SEPARACIÓN DE PARTÍCULAS DE GRAN TAMAÑO (Partículas subcelulares)

• **CENTRIFUGACIÓN:**

Métodos Separativos

Esquema básico de la Centrifugación



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

Métodos Separativos

SEPARACIÓN DE PARTÍCULAS DE GRAN TAMAÑO

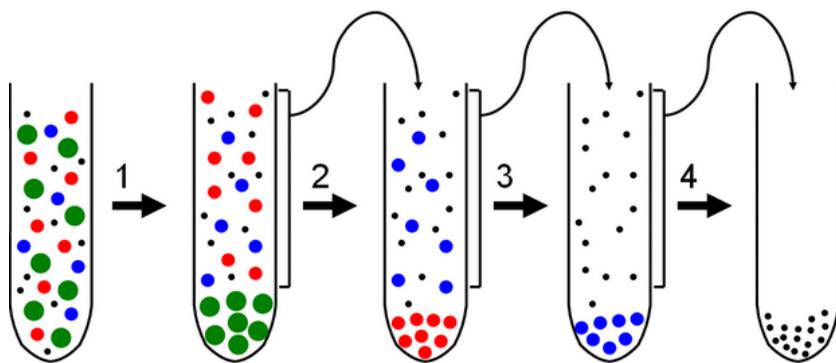
- CENTRIFUGACIÓN:

- DIFERENCIAL

- EN GRADIENTES.

Métodos Separativos

Centrifugación diferencial



Velocidades: $4 > 3 > 2 > 1$

Métodos Separativos

PURIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS

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

Suspensión de

Células ó tejidos: **Ultrasonidos**



Detergente

Émbolo rotatorio (potter ó aspas)



Homogenado



FRACCIONAMIENTO DEL HOMOGENADO CELULAR

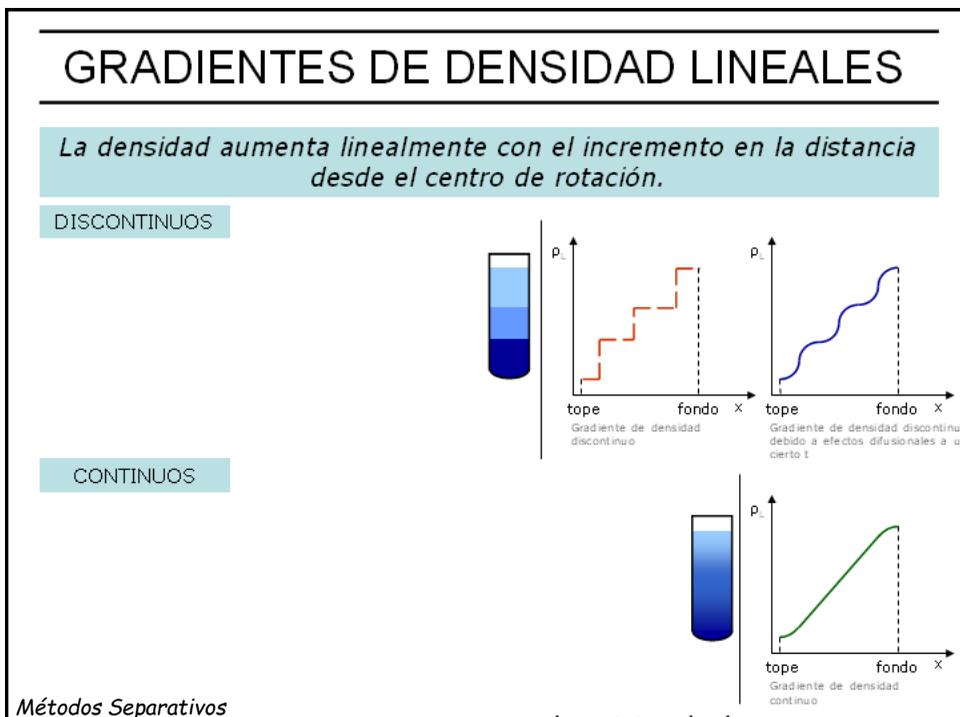
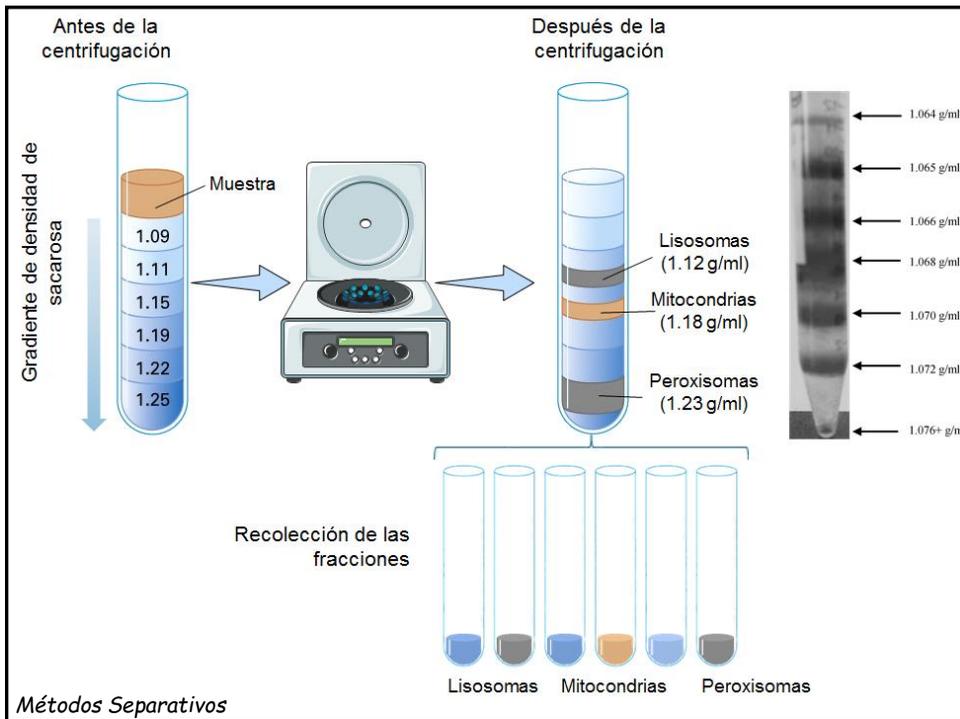
CENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL

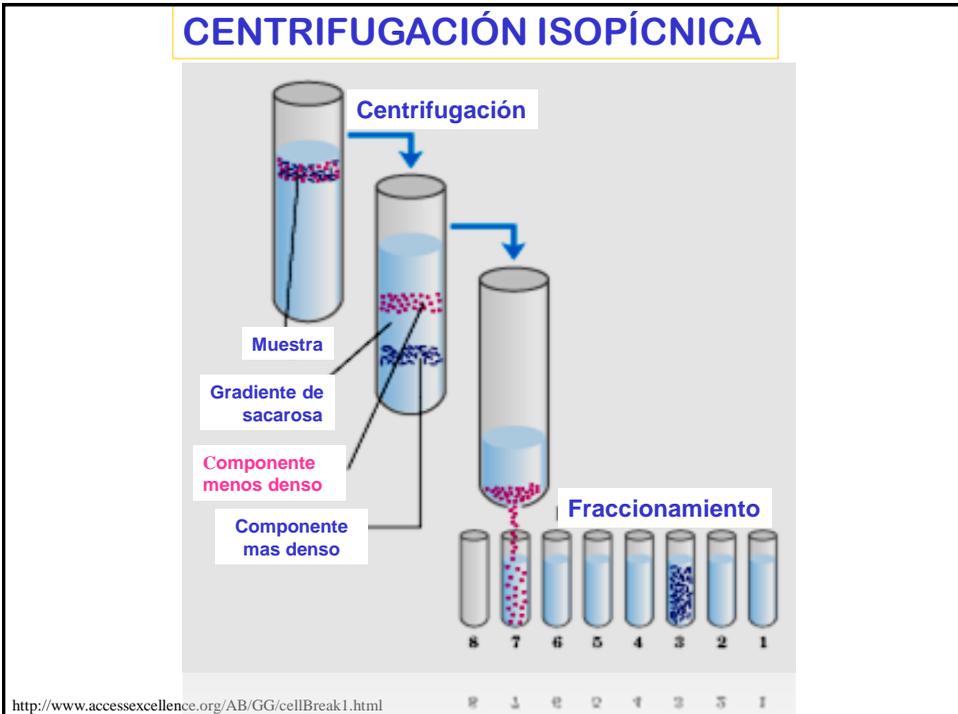
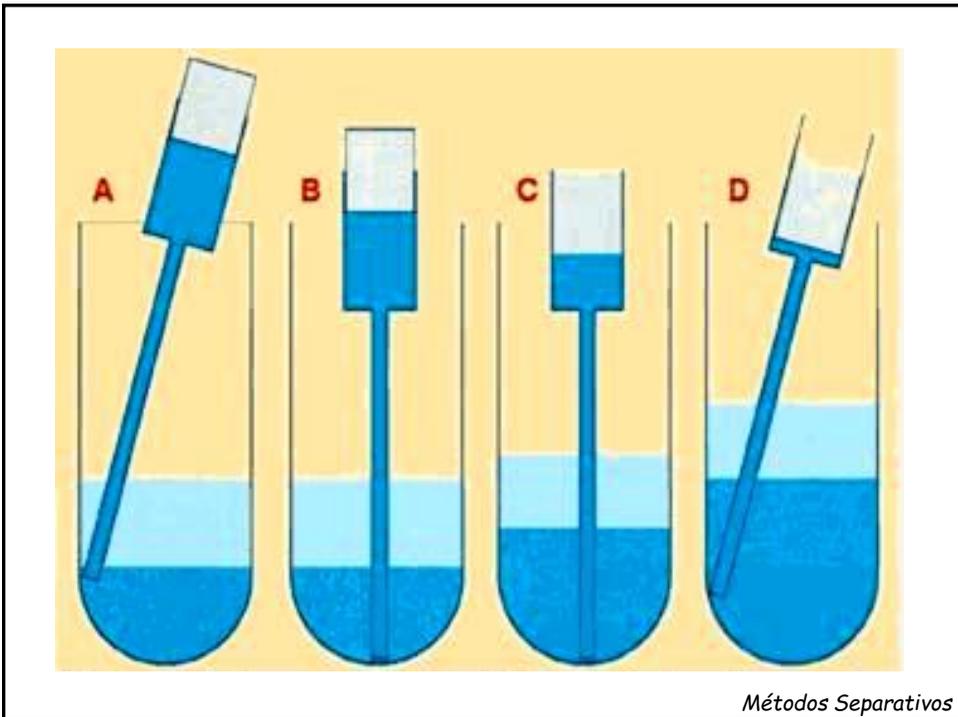


SEPARACIÓN DE PARTICULAS DE GRAN TAMAÑO

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

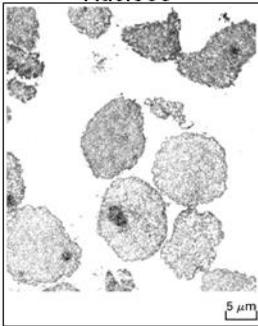
Métodos Separativos



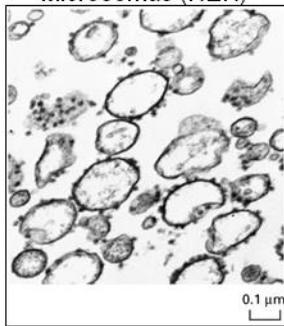


Control de calidad del fraccionamiento: Microscopía electrónica

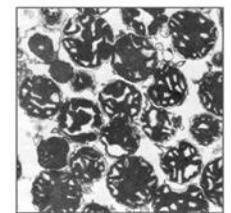
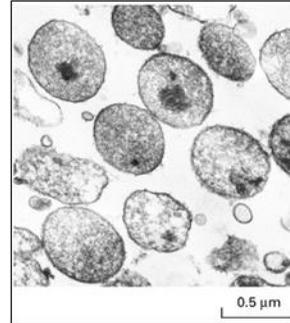
Núcleos



Microsomas (RER)



Peroxisomas



Pellet: Mitochondrial fraction

Métodos Separativos

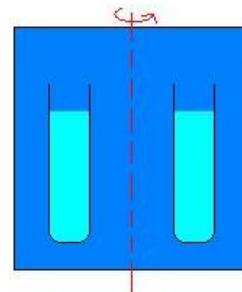
Formas de rotores



Orificio donde se colocan los tubos

Ángulo fijo

Giro

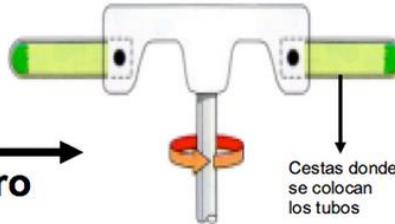


c) Rotor vertical

En posición de parada



En posición de giro

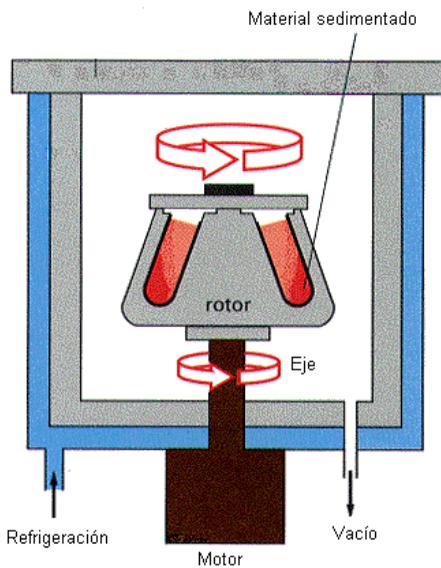


Giro

Brazo oscilante

Cestas donde se colocan los tubos

Ultracentrifugación



Métodos Separativos

CENTRÍFUGAS



CENTRÍFUGA 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.



CENTRÍFUGA 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.

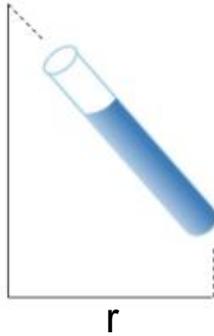


ULTRACENTRÍFUGA

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.)

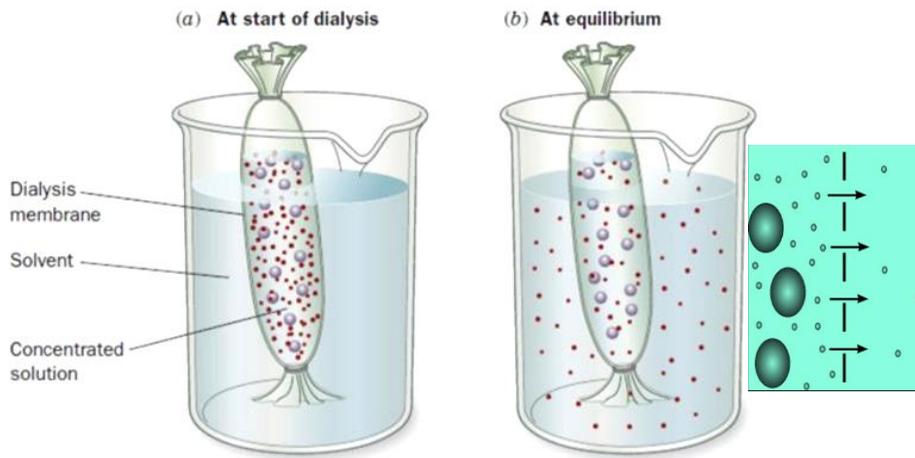
Segunda parte

Métodos de purificación de moléculas

- Basados en las siguientes propiedades:
 - Tamaño
 - Solubilidad
 - Carga
 - Adsorción
 - Afinidad

Métodos Separativos

Diálisis



Se usa para eliminar moléculas pequeñas

Métodos Separativos

SEPARACIÓN DE MOLÉCULAS

- CROMATOGRAFIA.

Métodos Separativos

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



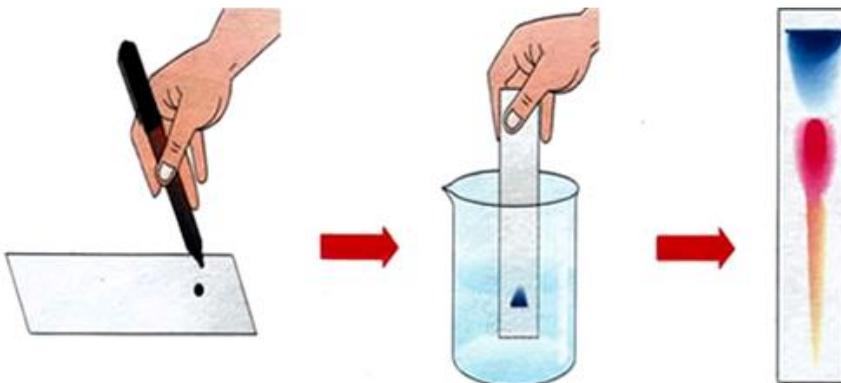
Los distintos componentes de la mezcla interactúan de manera diferente con las dos fases estableciéndose un reparto entre ambas



Se establece un equilibrio entre partículas adsorbidas y desorbidas

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

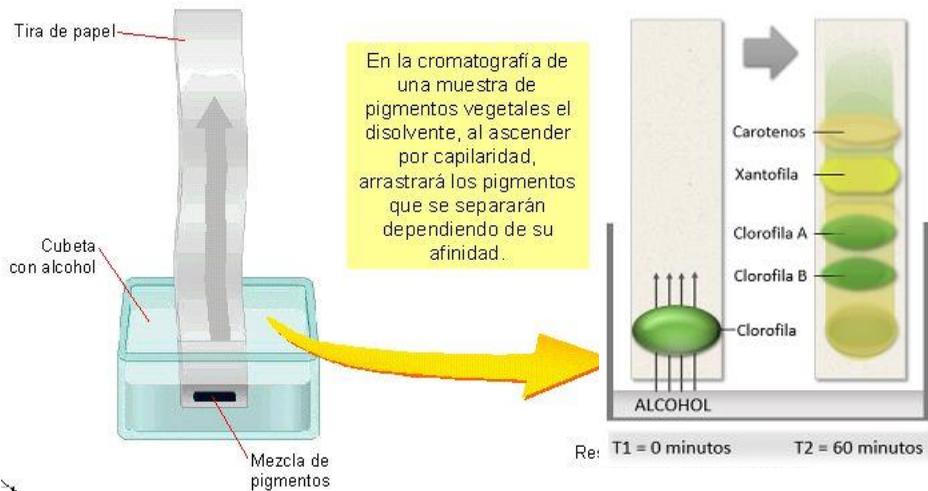
Cromatografía: *Chromos* (color)



Métodos Separativos

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.



Métodos Separativos

Clasificación de la cromatografía según el método de separación

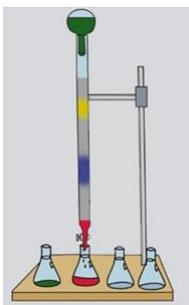
Cromatografía de	Mecanismo	F. estacionaria	F. móvil
Adsorción	F. de Van der Waals	Sólido	
Reparto	Solubilidad	Líquido	
Intercambio iónico	F. Electrostáticas	Resina	Líquido
Exclusión	Tamaño de partícula	Gel	
Afinidad	Interacción bioquímica	Sólido	

Métodos Separativos

Tipos de Cromatografía

Según el soporte:

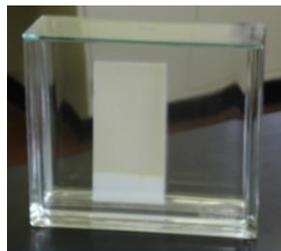
• En columna



En papel

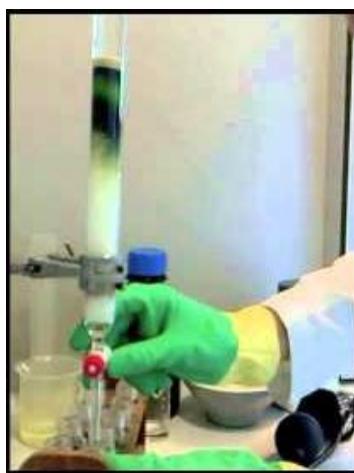


En capa fina



Métodos Separativos

Tipos de Cromatografía en Columna



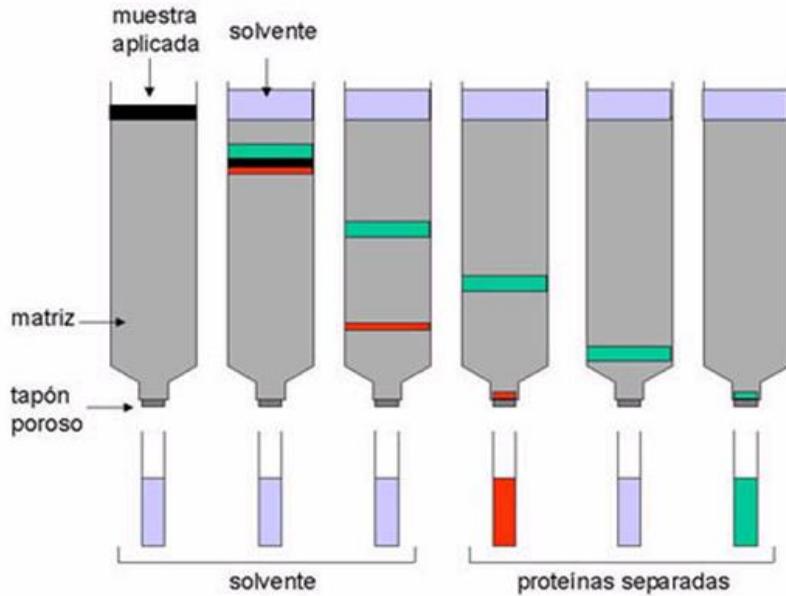
Filtración en Gel

Intercambio Iónico

Afinidad

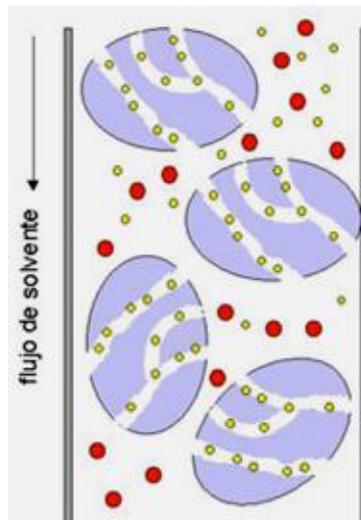
Métodos Separativos

CROMATOGRAFIA



Métodos Separativos

Filtración en Gel



Las moléculas pequeñas penetran en los pequeños conductos que presentan las bolas de gel, donde la velocidad de flujo de solvente es menor.

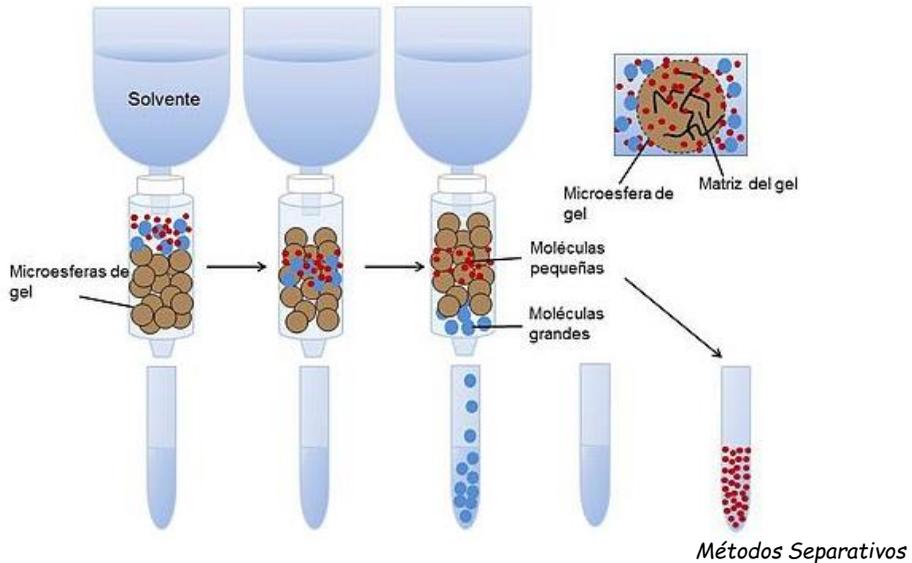
Las moléculas grandes, incapaces de penetrar en los pequeños conductos de las bolas de gel se mueven entre ellas, donde la velocidad de flujo de solvente es superior.

Como consecuencia, las moléculas de mayor peso molecular son eluidas antes que las de menor peso molecular.

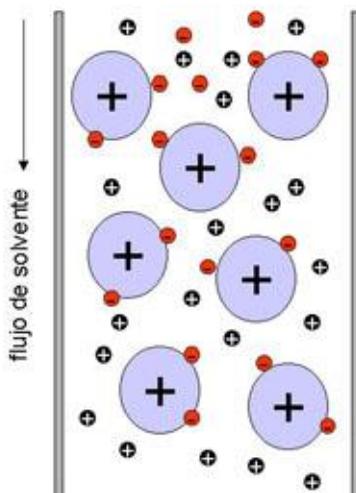
SEPARACION POR TAMAÑOS!!!!!!

Métodos Separativos

Cromatografía de filtración (tamaños)



PRINCIPIO DE LA CROMATOGRFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO



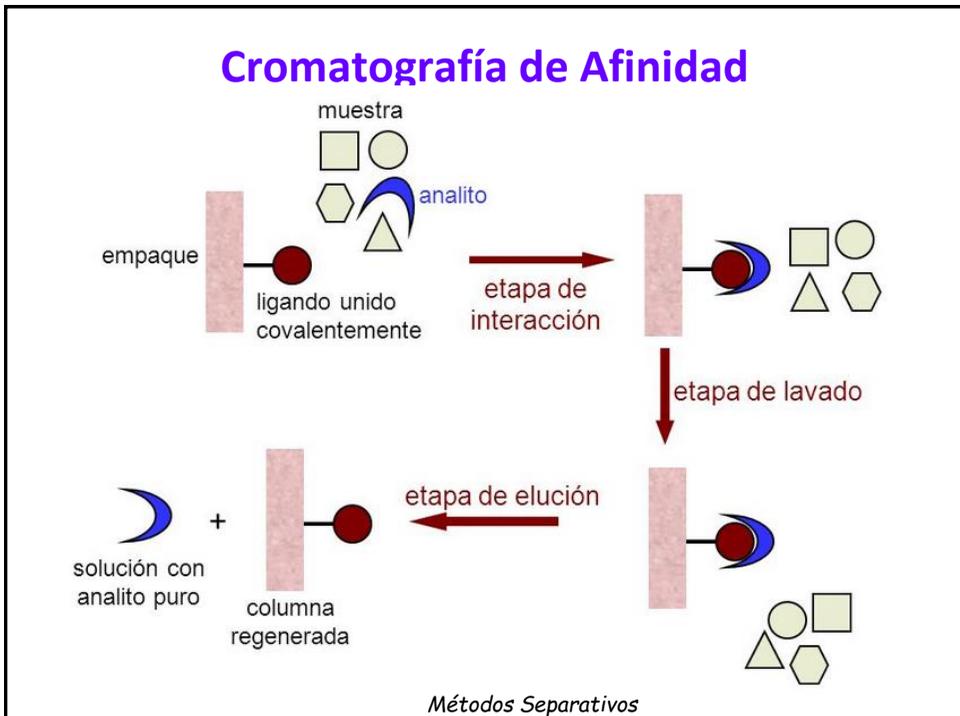
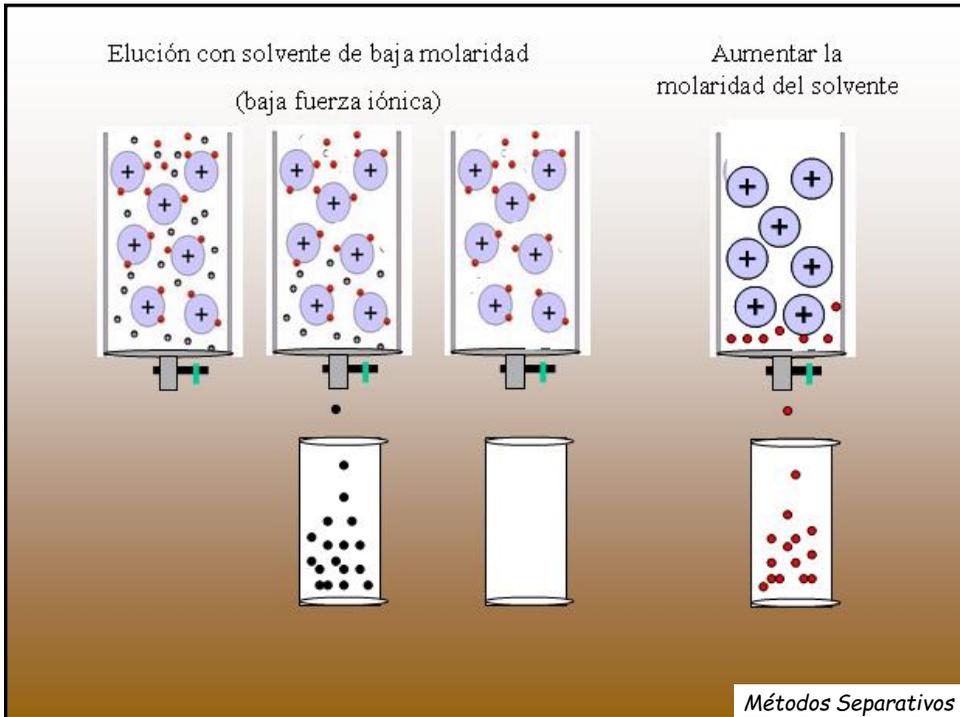
Las partículas cargadas negativamente se unen a la matriz sólida cargada positivamente, y son retenidas.

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

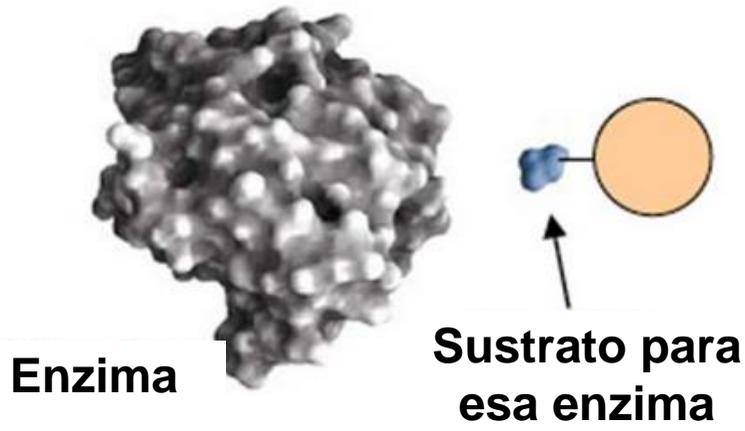
La elución de las partículas cargadas negativamente se consigue cambiando el pH del solvente hasta igualarlo a su punto isoeléctrico o hasta invertir su carga neta.

SEPARACION POR CARGAS!!!!

Métodos Separativos



Cromatografía de Afinidad

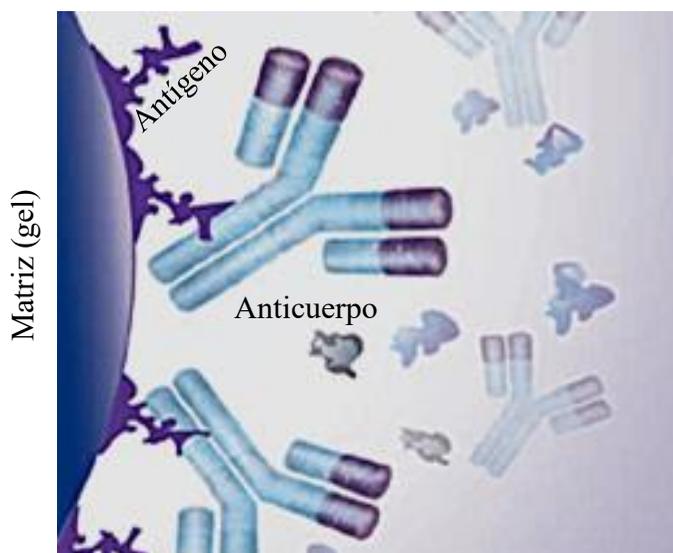


Enzima

Sustrato para
esa enzima

Métodos Separativos

Cromatografía de Afinidad



Matriz (gel)

Antígeno

Anticuerpo

Métodos Separativos

SEPARACION DE MOLECULAS POR CARGAS

• ELECTROFORESIS

Métodos Separativos

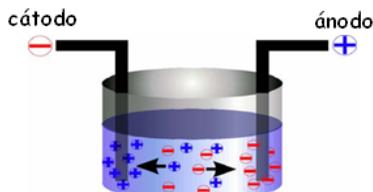
ELECTROFORESIS

Separar y analizar moléculas: proteínas
ADN/ARN



Arne Tiselius
1937
(Nobel 1948)

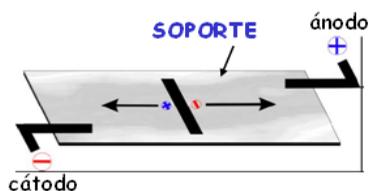
... en función de su diferente movilidad al aplicar un campo eléctrico
(dependerá de su carga eléctrica)



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

ELECTROFORESIS LIBRE

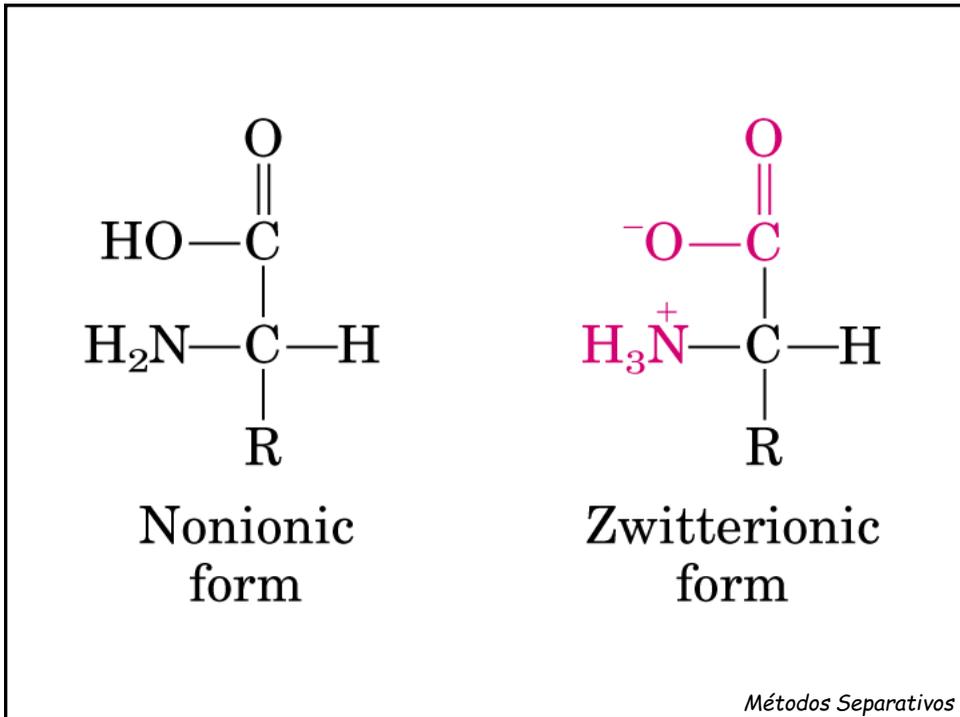
→ moléculas en disolución o suspensión:
poco resolutiva



ELECTROFORESIS DE ZONA

→ SOPORTE que retiene las moléculas:
elevado poder de resolución

Métodos Separativos

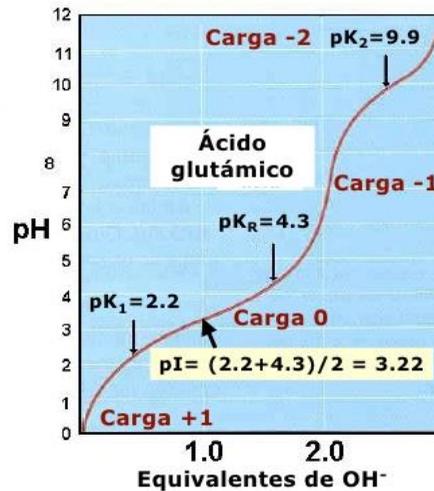


Grupos de aminoácidos según su carga

apolares	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ Alanine	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_3 \end{array}$ Valine	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_3 \end{array}$ Leucine	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ Isoleucine	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{HN}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HC} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$ Proline
polares sin carga	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ Methionine	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ Phenylalanine	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ Tryptophan	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$ Glycine	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ Serine
ácidos	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ Aspartic Acid	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ Glutamic Acid	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_3 \end{array}$ Lysine	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Arginine	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HC}=\text{C} \\ \quad \backslash \\ \text{NH} \quad \text{NH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ Histidine
	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ Threonine	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$ Cysteine	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Asparagine	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Glutamine	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ Tyrosine
					básicos

Punto Isoeléctrico (pI)

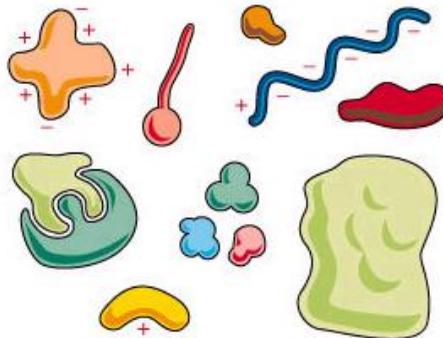
- pI es el valor de pH para el cual la carga neta del aminoácido es 0
 - Valor medio de los pK_a que flanquean la estructura isoelectrica
 - Para aminoácidos neutros es el valor medio de los pK_1 y pK_2
 - Para aminoácidos ácidos o básicos depende de cada caso
 - Cuando $pH = pI$ disminuye la solubilidad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



Bioquímica pD Tema 2 (UVES)

14

PROTEIN SEPARATION



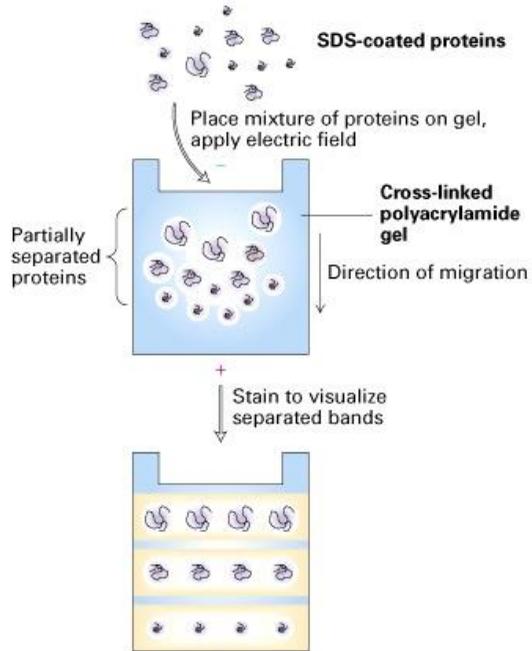
La velocidad de migración depende de:

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

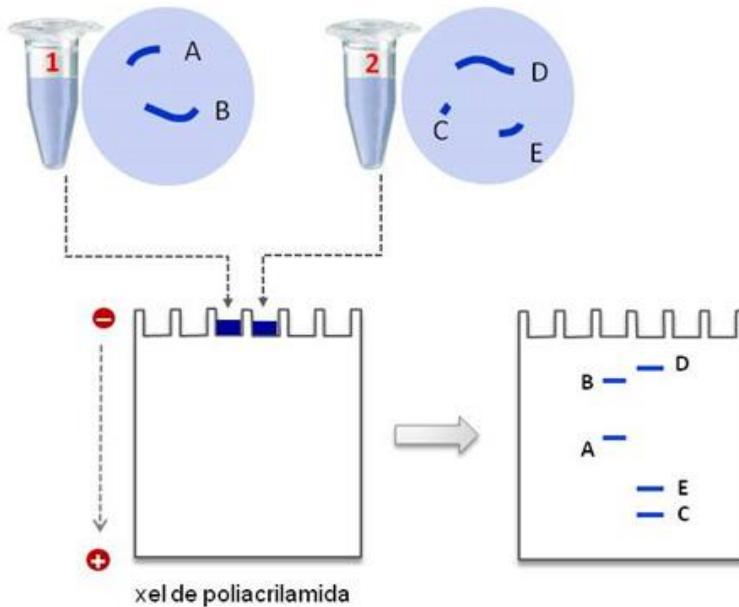
Métodos Separativos

Electroforesis en geles de poliacrilamida

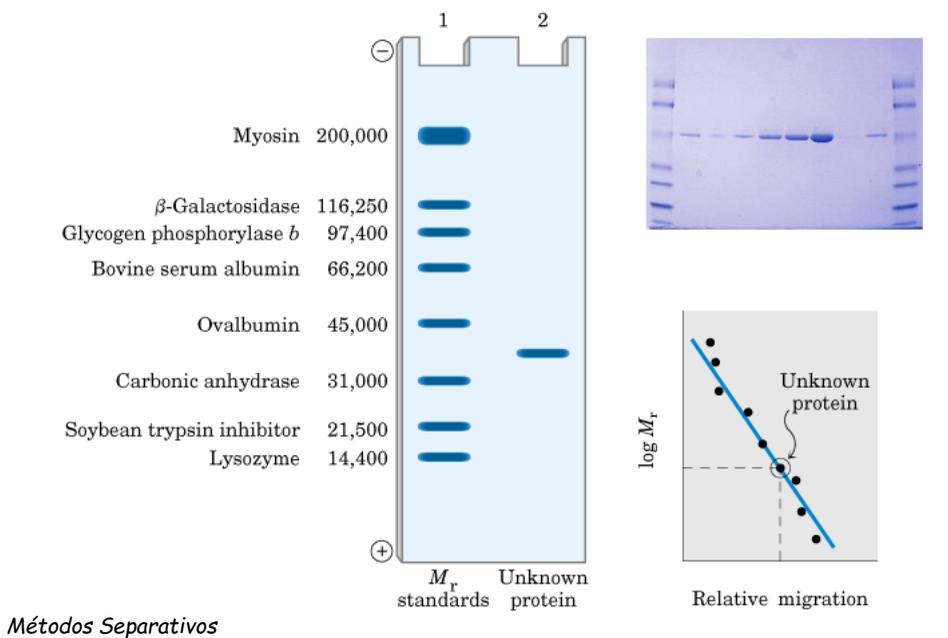
Las moléculas más pequeñas migran más rápido



Electroforesis en geles de poliacrilamida



- Como calcular los pesos moleculares de las proteínas



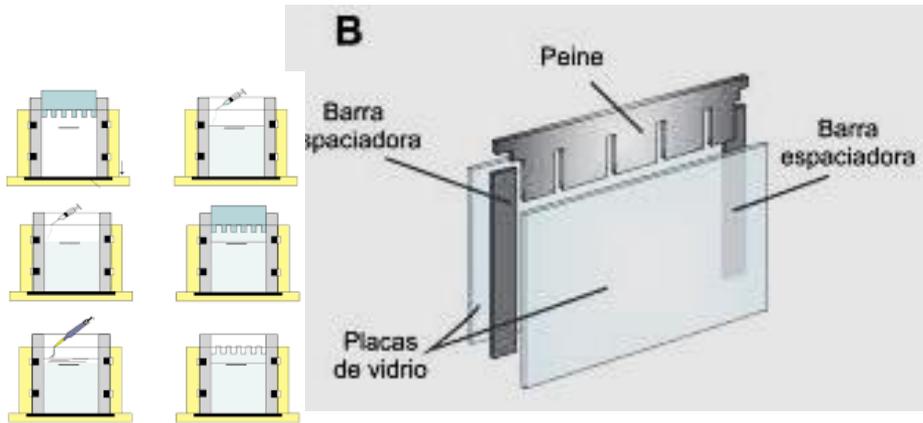
Como calcular los pesos moleculares de las proteínas

Proteína desconocida

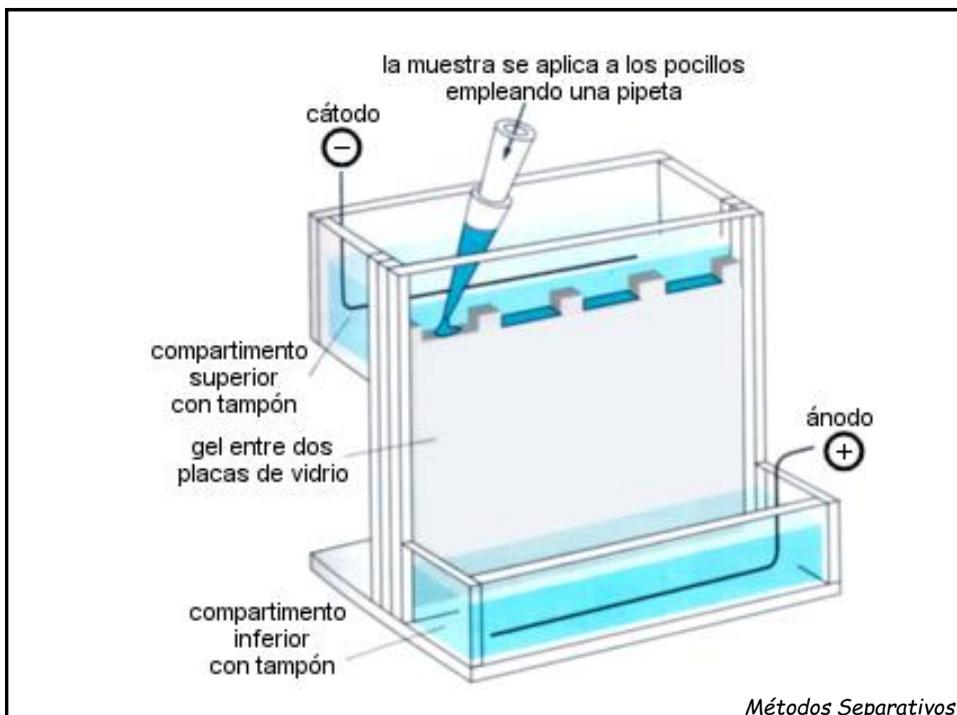
Migración relativa (mm)

Métodos Separativos

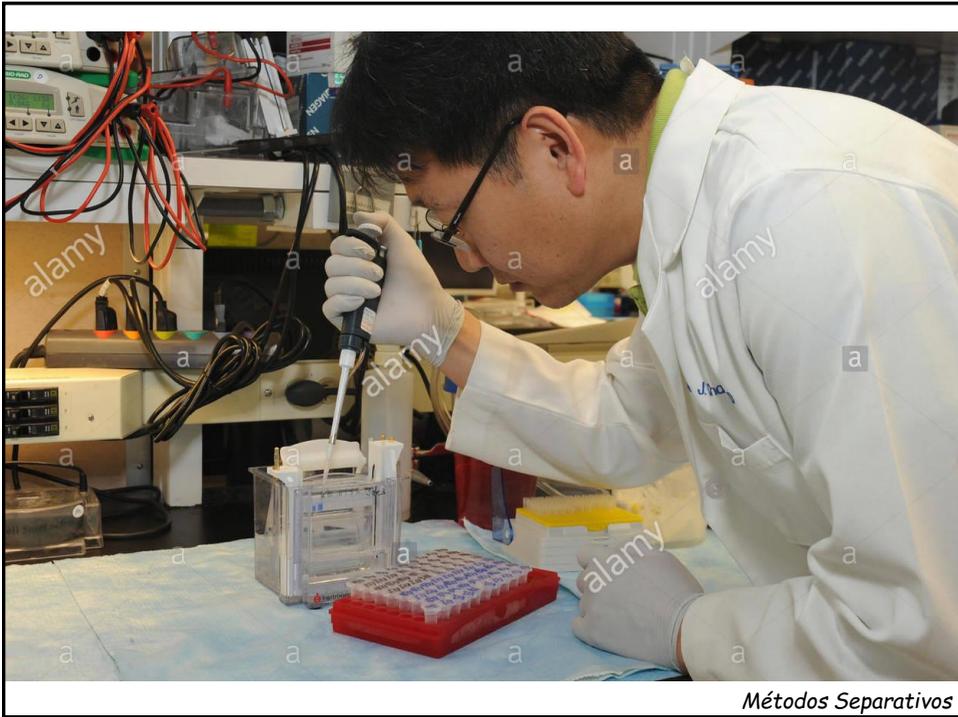
Como se arma el gel



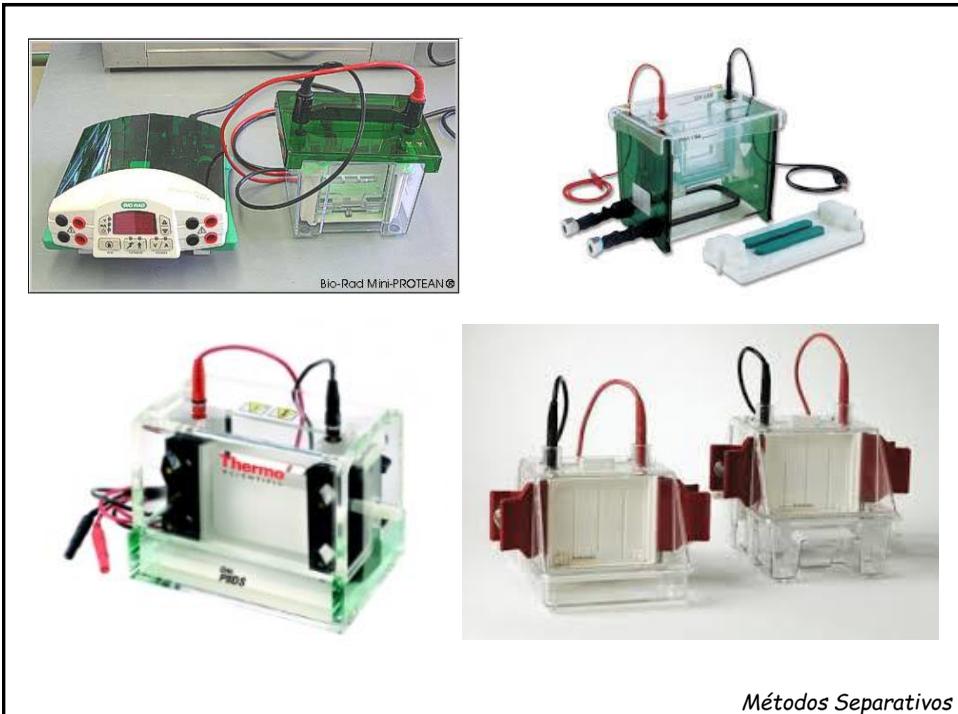
Métodos Separativos



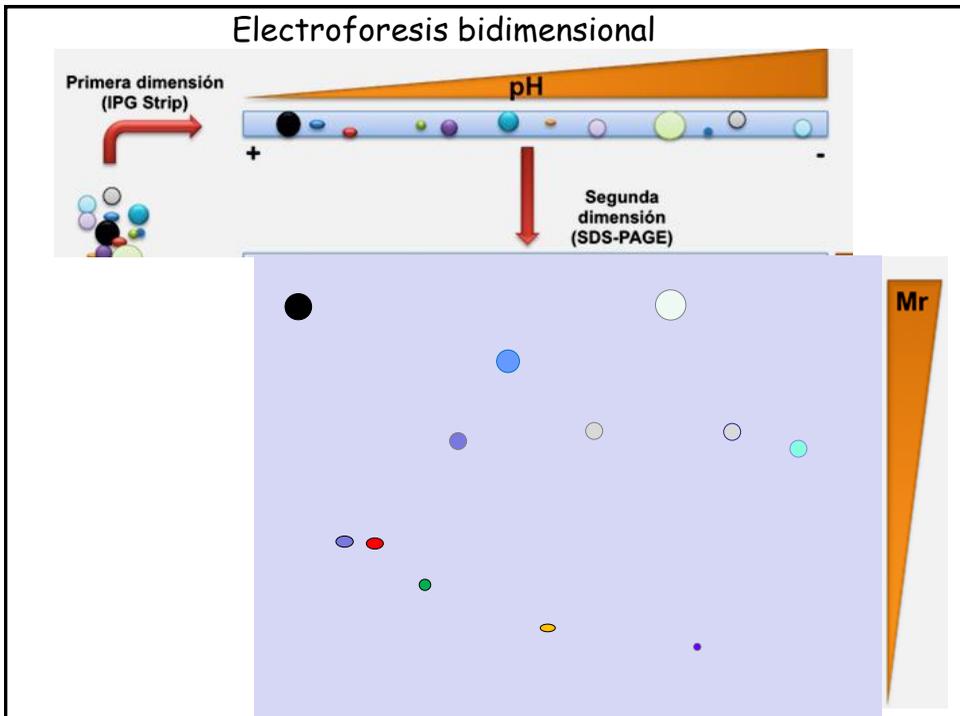
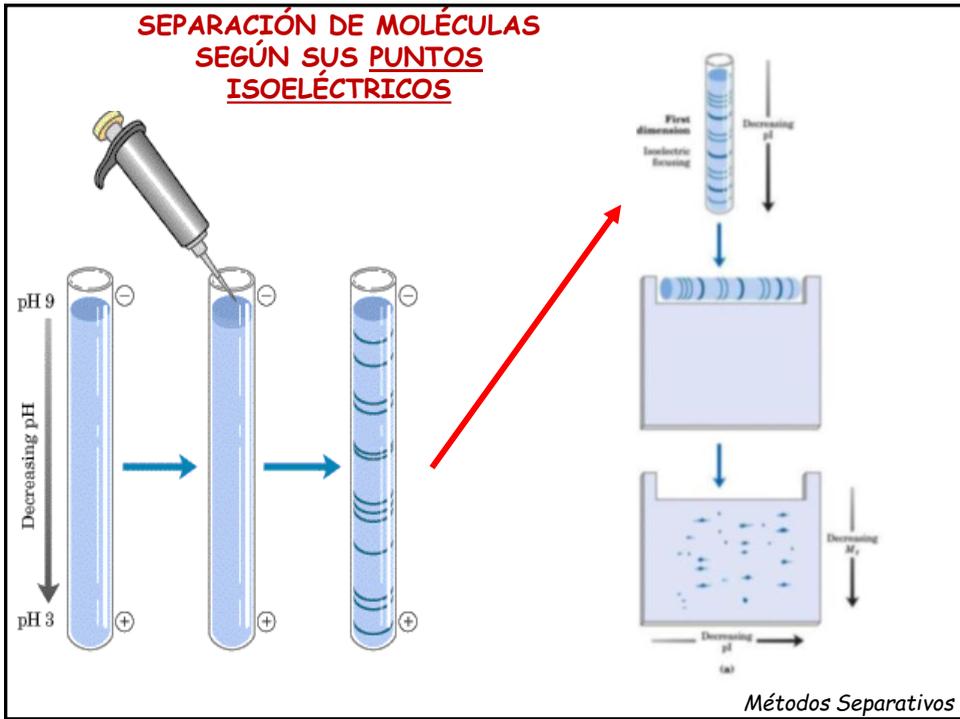
Métodos Separativos



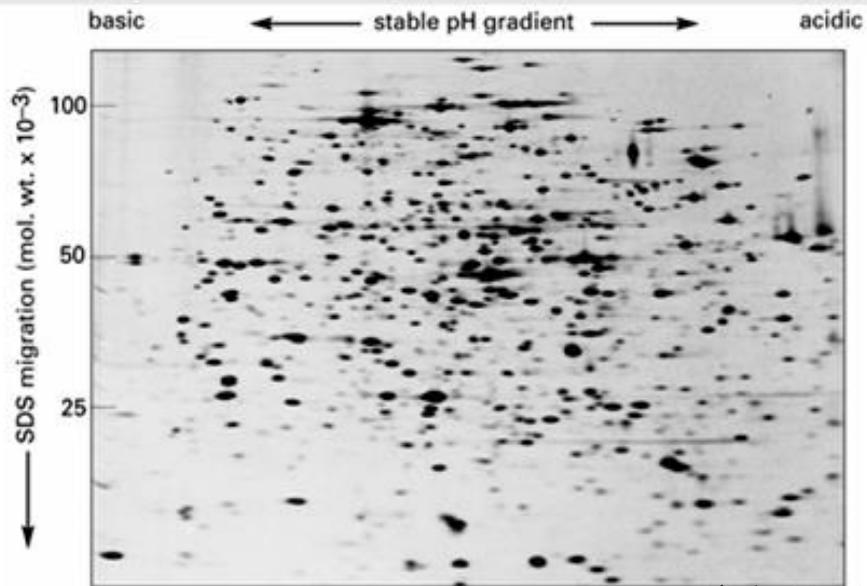
Métodos Separativos



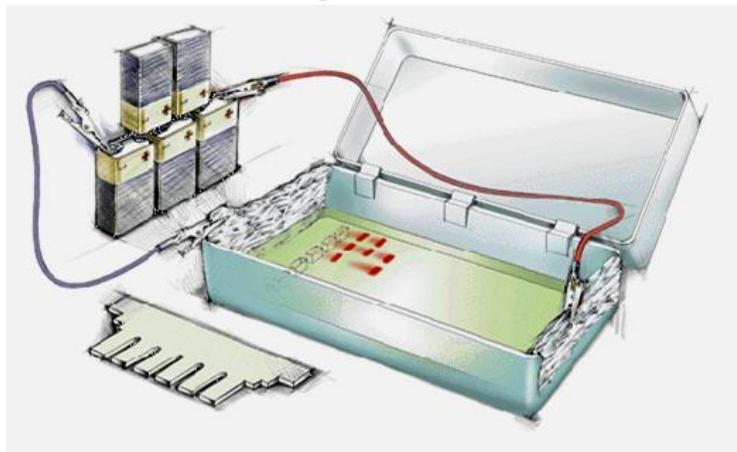
Métodos Separativos



Electroforesis bidimensional



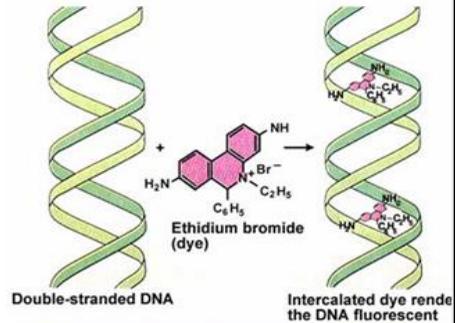
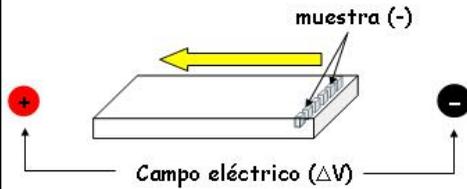
Separación de ADN en geles de agarosa



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

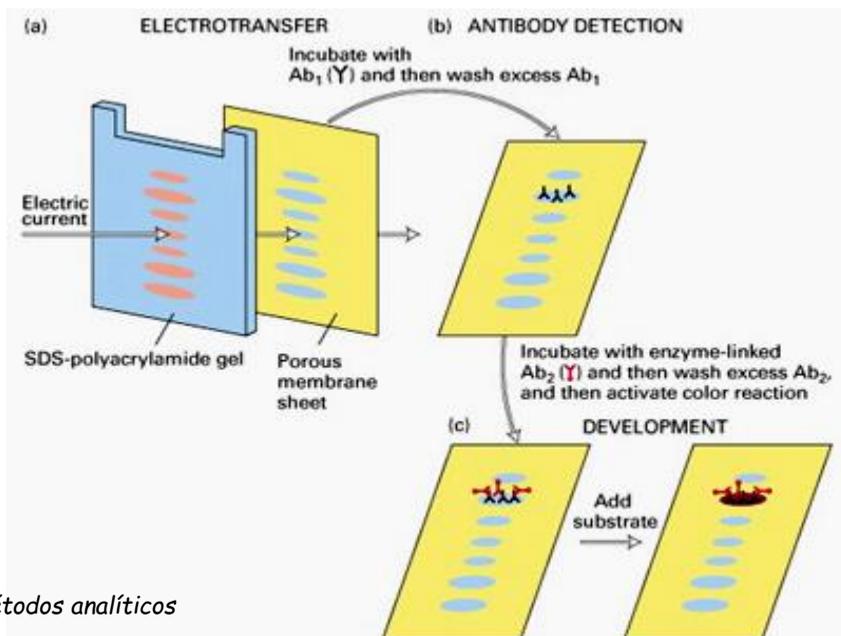
Característica	Procedimientos
Tamaño	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dialisis – ultrafiltración ➤ Electroforesis en gel ➤ Cromatografía de exclusión molecular ➤ Ultracentrifugación
Solubilidad	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Precipitación con Sales ➤ “ Solventes orgánicos ➤ “ por pH
Polaridad	<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

TERCERA PARTE

• ¿Cómo identificar una proteína desde una mezcla compleja?

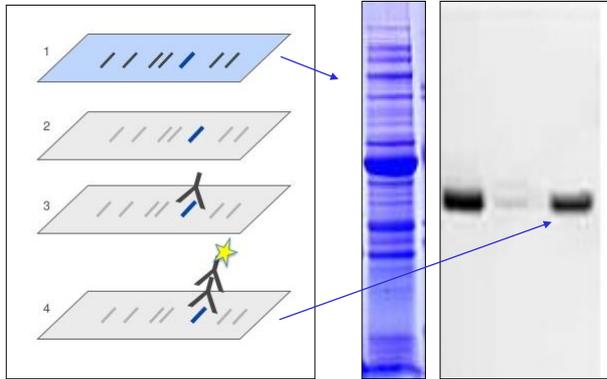
Métodos analíticos

“Western blot”



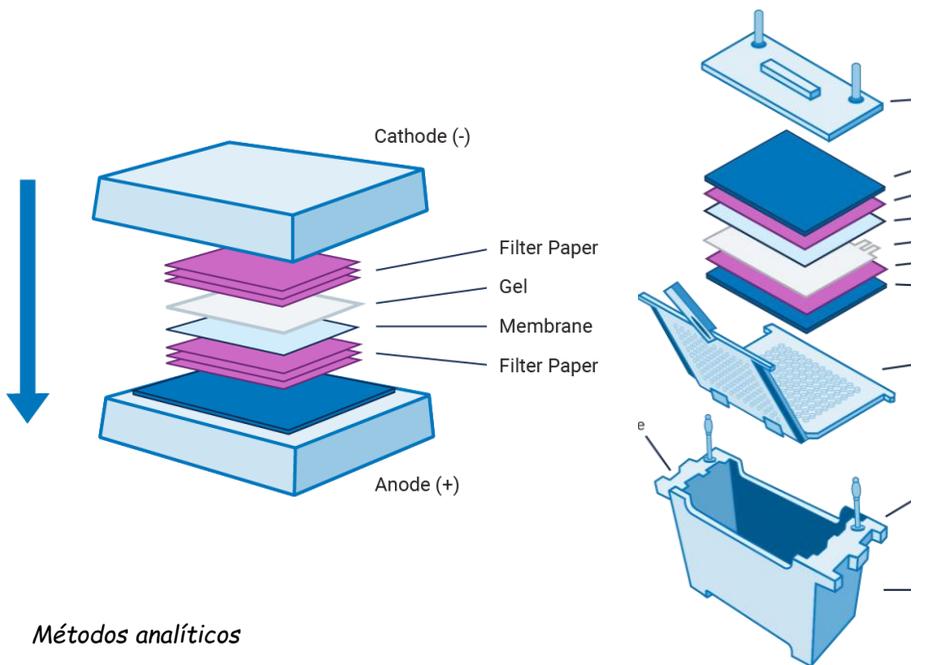
Métodos analíticos

“Western blot”



Métodos analíticos

Western blot

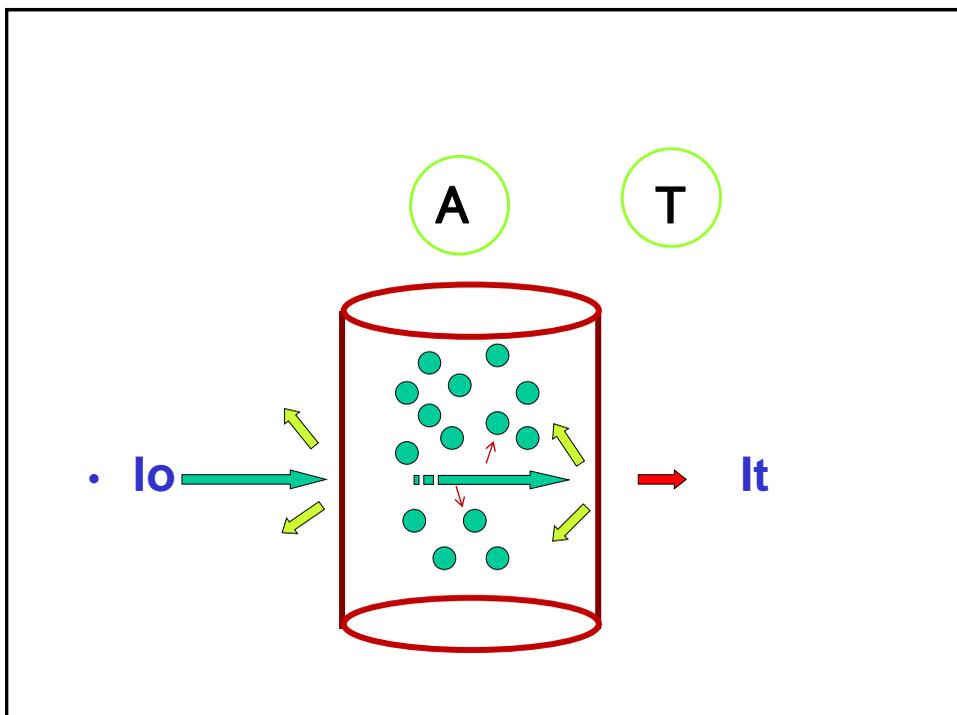


Métodos analíticos

Métodos de cuantificación

• ESPECTROFOTOMETRÍA

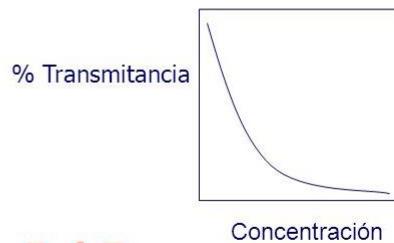
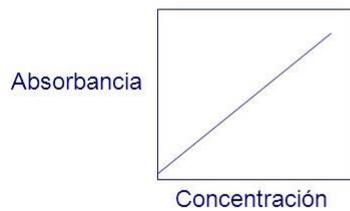
Métodos analíticos



Ley de Lambert Beer:

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

$$= -\log_{10} T$$



Transmitancia (T): $T = I / I_0$
Se expresa como % T

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

RECORDANDO:

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

Ejemplo de cálculo

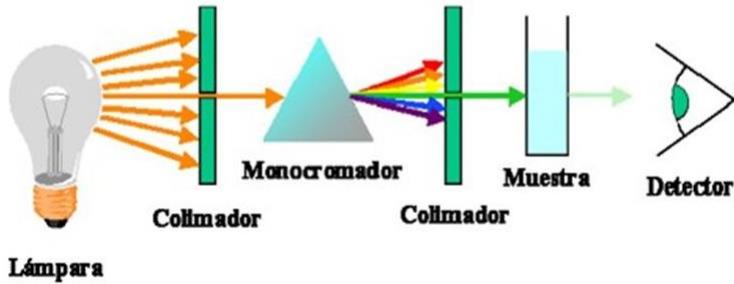
$$\%T = 30$$

$$T = 0.30$$

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

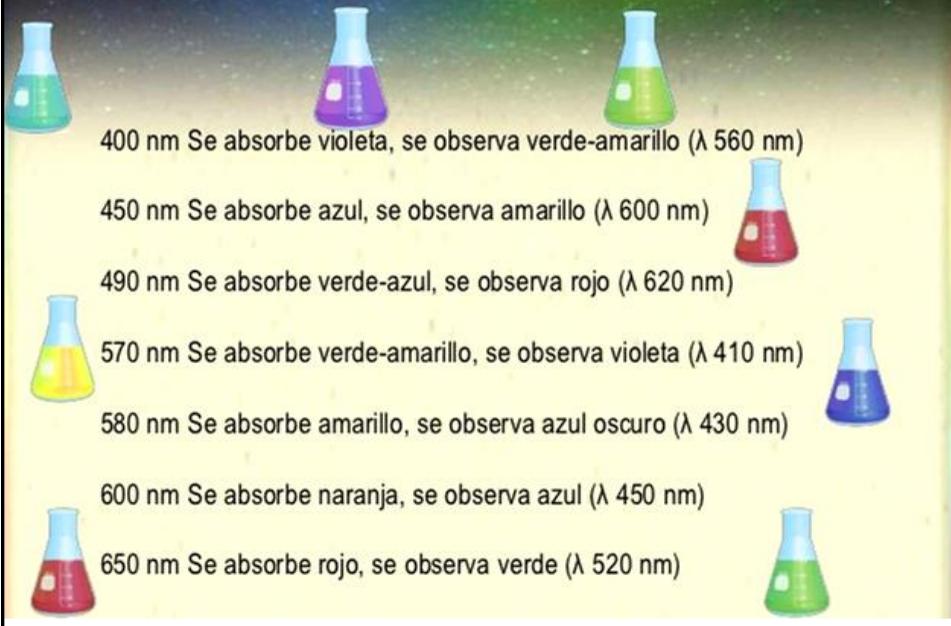
$\log_{10} 3.33 = 0.523$ de absorbancia

ESPECTROFOTÓMETRO



Métodos analíticos

λ absorbida versus color observado



Espectrofotómetro



MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

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

Métodos analíticos

MÉTODOS NO ESPECTROSCÓPICOS

- POLARIMETRÍA POLARIZACIÓN
- REFRACTOMETRÍA REFRACCIÓN
- TURBIDIMETRÍA DISPERSIÓN

Métodos analíticos

CONOCIENDO MEJOR LAS MOLÉCULAS.....

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

CRISTALOGRAFÍA (DIFRACCIÓN DE Rx)

Prácticos de Laboratorio

Qué vamos a usar

