

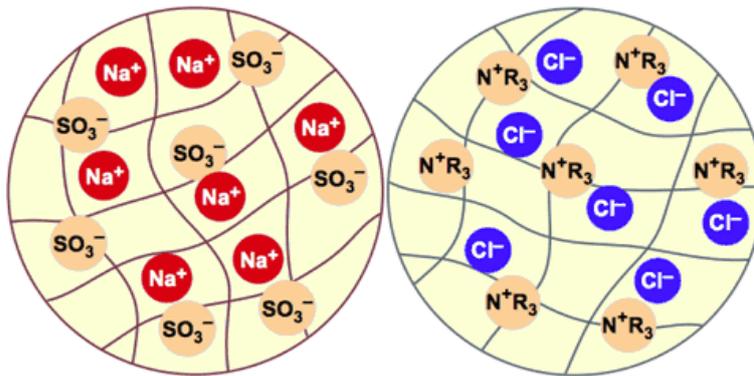
PRÁCTICA 1

PURIFICACIÓN DE ENZIMAS

OBJETIVO: Extraer y purificar enzimas mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando SP Sepharose y Q Sepharose, para posteriormente cuantificarlas en las diferentes fracciones y ver sus actividades.

Se van a purificar dos proteínas, una de origen animal, la lisozima de la clara de huevo y otra vegetal la galactosidasa de hojas de espinaca.

La cromatografía de intercambio iónico se fundamenta en las propiedades ácido-base de las proteínas. **Una proteína, a pH menor de su pI (punto isoeléctrico), tendrá carga positiva y a pH mayor de su pI presentará carga negativa.** Por lo que, en el primer caso, se unirá a una resina con carga negativa (SP Sepharose) y en el segundo a una resina con carga positiva (Q Sepharose).



Una vez unida la proteína a las resinas, estas se pueden **eluir** de dos formas distintas:

- 1) **variando el pH** del medio hasta alcanzar el pI
- 2) **mediante un gradiente iónico** añadiendo el contraión correspondiente (Na^+ en el caso de intercambio catiónico o Cl^- para el intercambio aniónico)

A.- PURIFICACIÓN DE LA LISOZIMA

Dado que **el pI de la lisozima es de 11**, dos unidades de pH superior al del resto de las proteínas de la clara del huevo, **a un pH de 9,5 - 10 la lisozima es prácticamente la única proteína con carga positiva neta**. Ello permite separar esta enzima del resto de proteínas mediante la utilización de resinas **intercambiadoras de cationes**.

Materiales:

*Huevos de gallina

*Tampón A: glicina/NaOH 100 mM, pH 10

* Tampón B: glicina/NaOH 100 mM, pH 10, conteniendo 0.6 M NaCl

Protocolo:

1.- Recoger la clara procedente de un huevo. Diluirla 1/5 (vol/vol) con Tampón A. Tomar 10 mL de la muestra anterior en un tubo de 15 mL (Fracción 0, F0). Se separa 1 mL para cuantificar.

2.- Al resto del extracto proteico, añadir 4 mL de SP Sepharose y agitar suavemente durante 15 minutos para que la lisozima se adhiera a la resina.

3.- Al finalizar la incubación, centrifugar la muestra a 1500 g durante 3 minutos. Guardar el sobrenadante (F1).

4.- Añadir a la resina 10 mL de tampón. Agitar suavemente y centrifugar de nuevo. Recoger el sobrenadante (F2).

5.- Repetir el lavado anterior y desechar el sobrenadante.

6.- Resuspender la SP Sepharose con 3 mL de tampón B e incubar, agitando suavemente durante 10 minutos. Centrifugar y recoger el líquido (F3 que correspondería con la lisozima purificada).

B.- PURIFICACIÓN DE GALACTOSIDASA

En las plantas podemos encontrar distintos tipos de galactosidasas con diferentes pesos moleculares (entre 38 y 58 kD) y también con pI que varían entre 6.9 y 5.2.

En esta práctica vamos a intentar purificar distintas fracciones proteicas del extracto de hojas de espinacas utilizando en este caso una **resina de intercambio aniónico** (Q Sepharose), de manera que las proteínas estén **ionizadas negativamente por medio de un pH superior al pI**.

Materiales:

- *3 g de hojas de espinacas
- *Tampón A: Fosfato Sódico 50 mM, pH 7.5
- * Tampón B: Fosfato Sódico 50 mM, pH 6
- * Tampón C: Acético/Acetato Sódico 50 mM, pH 4.5

Protocolo:

- 1.- Se homogenizan las hojas en un mortero (puede emplearse N₂ líquido que facilita este proceso).
- 2.- Añadir 10 mL de Tampón A, recoger la mezcla y filtrarla a vacío con ayuda de una muselina o de papel de filtro (F0). Separar 1 mL para cuantificar.
- 3.- A los 9 mL restantes se le añaden 4 mL de resina Q Sepharose y se continúa el proceso igual que en el apartado A (purificación de lisozima), pero lavando una sola vez y eluyendo con los tampones B y C sucesivamente.

PRÁCTICA 2

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

OBJETIVO: Calcular la concentración total de proteínas contenida en una disolución. Con este fin, utilizaremos las muestras obtenidas en la práctica de purificación y seguiremos dos métodos, el colorimétrico Bradford y el espectrofotométrico.

A.- MÉTODO BRADFORD

Basado en la unión directa del colorante azul de Coomassie Blue G-250 a la estructura terciaria de las proteínas y aminoácidos específicos. Esta unión se realiza a través de grupos ionizados y consiste en la medición de la extinción provocada por el cambio en el espectro visible del colorante cuando éste se une a la proteína (absorbiendo a 595 nm), así el colorante cambiaría de color de marrón a azul proporcionalmente en función del contenido proteico de la muestra.

Para determinar la cantidad de proteína, es necesaria la comparación del valor de la absorbancia de la muestra con los valores obtenidos a partir de cantidades conocidas de proteínas, con lo que se construye una curva de calibración.

Recta de Calibrado

Se realiza en microplacas con BSA comercial (Seroalbúmina Bovina).

1.- La concentración de la que partimos es 2 mg/mL y se hacen diluciones con el tampón de elución empleado en cada caso de 1 y 0.5 mg/mL , en tubo eppendorf.

2.- Hacer un blanco con 5L del tampón y por triplicado.

3.- Se pipetea 5L de cada dilución de BSA y se añaden a un pocillo de la microplaca por triplicado.

Muestras

Añadir, por triplicado, volúmenes variados de cada muestra, entre 1 y 5 L. Los extractos crudos al tener mucha concentración de proteína probablemente saturan el ensayo con lo que se aconseja hacer una dilución ó variar el volumen.

Ensayo

1.- A todos los pocillos de le añaden 300L de Reactivo Bradford, repipeteando con cuidado para que la mezcla quede bien homogenizada.

2.- Esperar 15 minutos para que desarrolle el color.

3.- Medir la absorbancia a 595nm.

4.- Calcular la concentración de proteína en la muestra. Se puede emplear una hoja de cálculo como la que se adjunta.

B.- MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Desarrollado en múltiples variantes, aunque la más recomendada es la de Scopes. Se basa en la propiedad de las proteínas de tener un máximo de absorción a 280 nm debido al contenido en los aminoácidos tirosina y triptófano y fenilalanina. La variabilidad en estos aminoácidos en diferentes proteínas obliga a añadir un factor de corrección aportado por la absorbancia del enlace peptídico a 205 nm. Así:

$$[\text{Prot}](\text{mg/mL}) = \frac{A_{205}}{[27 + 120 \left(\frac{A_{280}}{A_{205}} \right)]}$$

La mayoría de equipos modernos ya actualizan el factor de corrección.

CALCULOS:

1. **Actividad** de cada fracción

2. **% Retención de la resina:**

$$\frac{\text{Actividad } F_0 - \text{Actividad } F_1}{\text{Actividad } F_0} \times 100$$

3. **% de Recuperación:**

$$\frac{\text{Actividad } F_3}{\text{Actividad } F_0} \times 100$$

PRÁCTICA 4

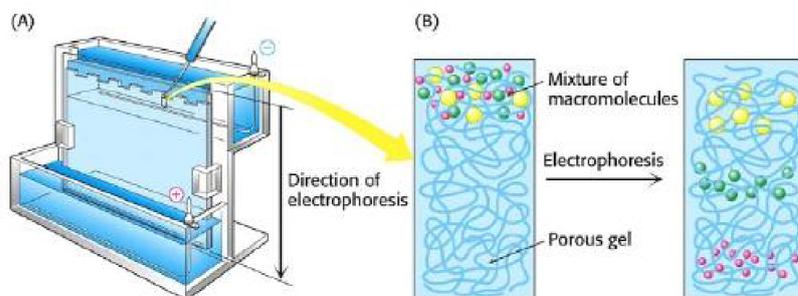
ELECTROFORESIS: Separación de proteínas en geles de poliacrilamida

OBJETIVO: utilizar la técnica de la **electroforesis en gel** para analizar la **purificación** de la enzima lisozima. Se analizará la composición proteica de las distintas fracciones y se constatará el **grado de pureza de la lisozima**.

FUNDAMENTO

La electroforesis es la migración de iones en un campo eléctrico. Es una de las técnicas analíticas más importantes dentro de la Bioquímica. Las moléculas biológicas (ADN, proteínas, vitaminas, etc.) poseen cargas eléctricas, y por tanto poseen esta propiedad de movilidad en un campo eléctrico. La movilidad dependerá de la carga que presentan al pH que trabajemos. **La electroforesis en gel** es el método más conveniente para realizar separaciones de macromoléculas (ADN y Proteínas). El soporte de la electroforesis (el gel) es un entramado tridimensional que impide o reduce la difusión. Este gel ha de ser compatible con los tampones usados y debe permitir la entrada del líquido en los poros (reticulados hidratables).

Los soportes pueden ser más o menos restrictivos según que el tamaño de poros limite o impida el paso de las moléculas. Los más restrictivos, como los geles de **acrilamida- bisacrilamida**, oponen impedimento al paso de las moléculas, participando así en el proceso de separación. Entre los menos restrictivos está la agarosa. El tamaño de poro que da unas dimensiones moleculares de criba de los geles puede ser establecido previamente. El gel en la electroforesis retarda, en mayor o menor medida, a las moléculas mayores respecto a las de menor tamaño. Las separaciones moleculares están pues basadas en el **tamizado molecular** junto a la **movilidad electroforética** de las moléculas que van a ser separadas.

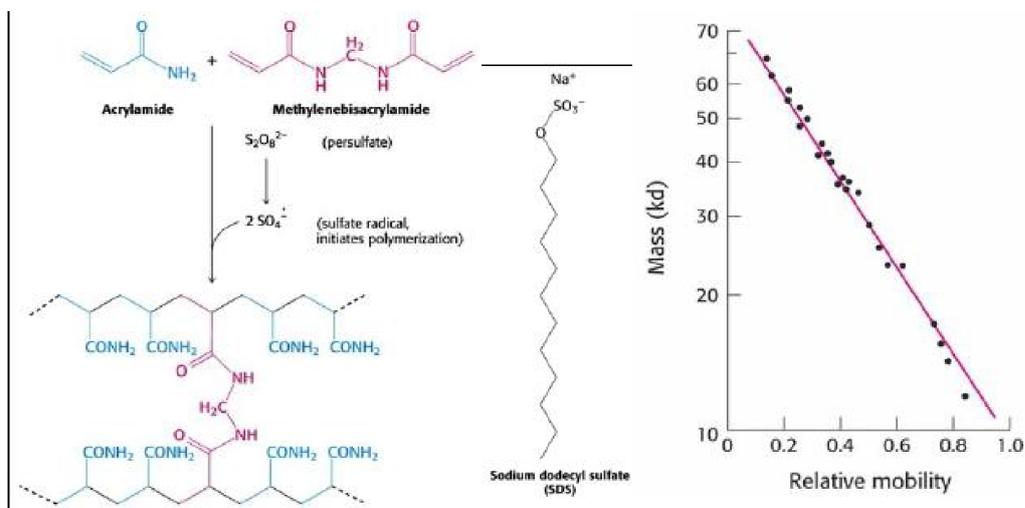


Para llevar a cabo la electroforesis se necesita:

- Una **fuerza de Tensión** que proporciona campo eléctrico, mediante dos electrodos, positivo (ánodo) y negativo (cátodo), entre los que se establece la diferencia de potencial.
- Una **cuibeta** o recipiente, en cuyos extremos se sitúan los electrodos.
- Un **soporte electroforético**.
- El **tampón** de electroforesis: durante la electroforesis se produce electrolisis del agua, generándose protones en la proximidad del ánodo e iones hidroxilos en la proximidad del cátodo; el tampón evitará que el entorno anódico se acidifique y el catódico se haga más básico a lo largo de la electroforesis

El polímero utilizado para la formación del gel es la **acrilamida** y la **bis-acrilamida**, los cuales se polimerizan mediante la adición de catalizadores (**persulfato amónico, TEMED**).

En nuestro caso, la separación de las proteínas se verá condicionada **sólo por su tamaño** y no por su carga ya que previamente las proteínas serán desnaturalizadas utilizando un **detergente (SDS)**, el cual despliega a las proteínas y se queda pegado a su superficie confiriéndole una gran carga negativa. Esa gran carga negativa enmascara la carga intrínseca de la proteína, y **las proteínas una vez tratadas con SDS presentan todas la misma carga, y la separación será debida solamente a la masa molecular de la proteína.**



PROTOCOLO

La separación electroforética se lleva a cabo según el método descrito por **Laemmli** en geles de poliacrilamida

Gel de separación: poliacrilamida 15% (Para 2 geles)

- Acrilamida- Bis-acrilamida(40%)(37.5:1) 4.32 ml
- Tampón 1.5 m TrisHCl pH8.3+ 0.4%SDS 2.8 ml
- H2O 3.76 ml
- TEMED 9.2 µl
- Persulfato amónico 10% 40 µl

Verter, cuidadosamente, la acrilamida entre los cristales.

Cubrir, cuidadosamente con 2-Butanol (utilizar una pipeta Pasteur) para delimitar el frente.

Esperar a que el gel polimerice.

Gel concentrador: poliacrilamida 3%

- Acrilamida- Bis-acrilamida (40%) 0.75 ml
- Tampón 0.5MTrisHCl pH6.8+ 0.4%SDS 2.5 ml
- H2O 6.6 ml
- TEMED 10 µl
- Persulfato amónico 10% 100 µl

Retirar el agua. Verter, cuidadosamente, la acrilamida entre los cristales.

Colocar los peines y esperar a que polimerice.

Retirar los peines.

El volumen final de los geles es aproximadamente 11 ml, para la preparación de 2 cristales.

A 25 μ l de cada fracción de la Práctica 1 se le añaden, en un eppendorf, 5 μ l de tampón de carga 4X y 0.4 μ l de agente reductor DTT 1M

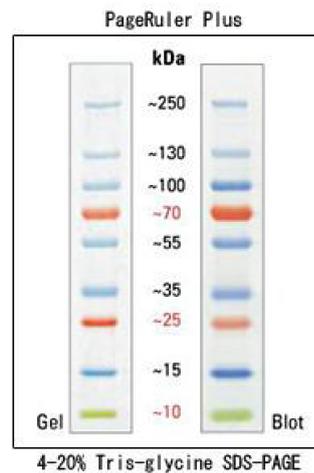
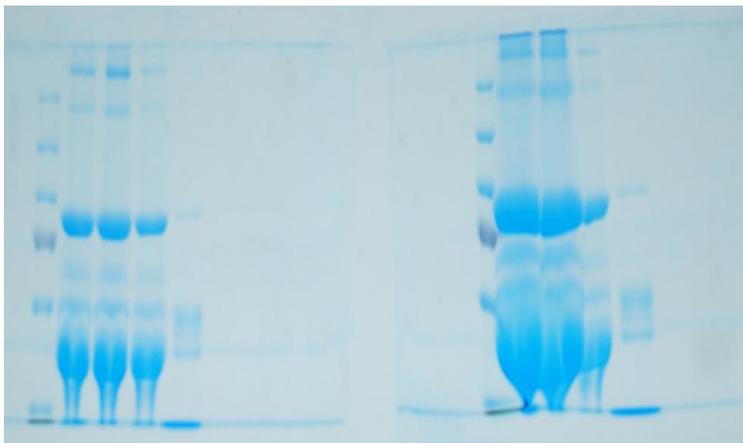
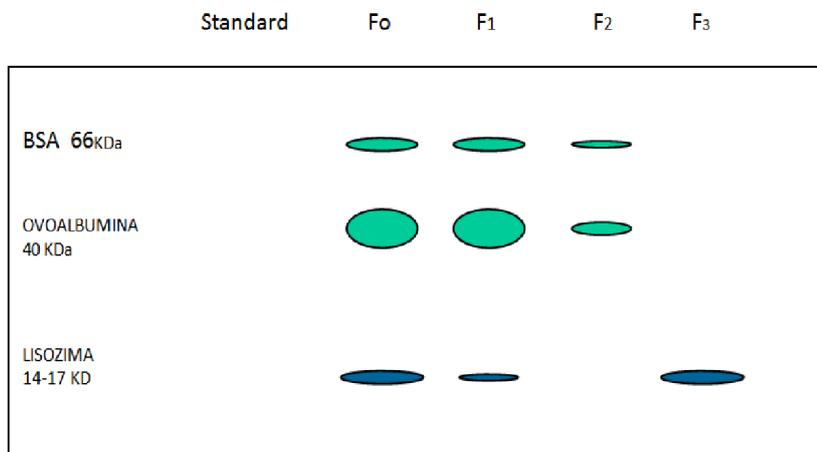
Calentar las muestras a 90°C durante 5 min.

Cargar en pocillos 20 μ l de F y 10 μ l del estándar de proteínas

Correr la electroforesis en tampón Tris-HCl 0,025 M, pH 8,8, glicina 0,192 M y SDS 0,1% (TGS), a una voltaje constante de 30 mA hasta que el azul de bromofenol esté aproximadamente, a 1 mm del extremo inferior del gel.

Desmontar el gel y teñirlo con metanol/acético/H₂O (5/1/5) con azul de Coomassie (1 g/l).

Destefir el gel en metanol/acético/H₂O (10/10/80).



PRÁCTICA 5

ELECTROFORESIS DE HEMOGLOBINAS

Existen muchos tipos diferentes de hemoglobina (Hb) y los más comunes son HbA, HbA₂, HbF, HbS, HbC, Hb H y Hgb M. Los adultos sanos sólo tienen niveles significativos de HbA y HbA₂.

Algunas personas también pueden tener pequeñas cantidades de HbF (que es el tipo principal de hemoglobina en el cuerpo de un recién nacido). Asimismo, ciertas enfermedades están asociadas con niveles altos de HbF (cuando la HbF corresponde a más del 2% de la hemoglobina total).

La HbS es una forma anormal de hemoglobina asociada con la anemia drepanocítica. En las personas con esta afección, los glóbulos rojos algunas veces tienen una forma de luna creciente o falciforme. Estas células se descomponen fácilmente o pueden obstruir pequeños vasos sanguíneos.

La HbC es una forma anormal de hemoglobina asociada con una anemia hemolítica y los síntomas son mucho más leves que los de la anemia drepanocítica.

Reactivos

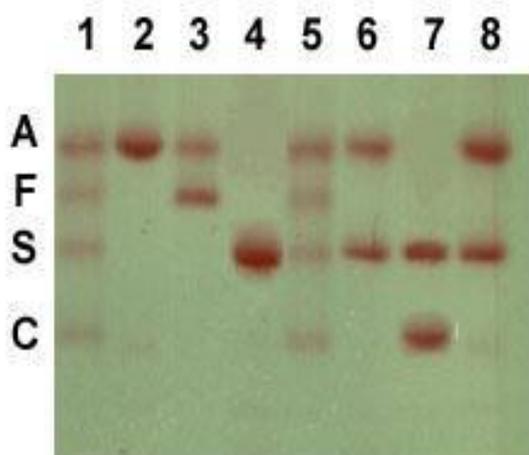
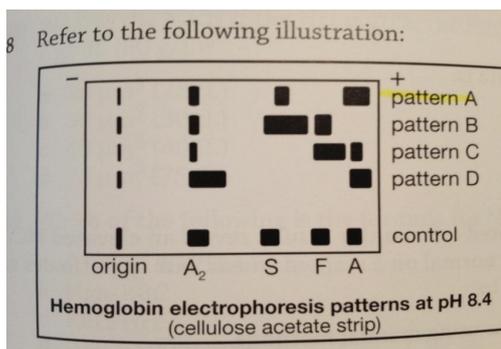
- **Solución salina:** 0.85% w/v NaCl
- **Reactivo de hemolisis:** 0.005M EDTA, 0.175% w/v saponina y 0.1% azida sódica como conservante; almacenar a RT; cuidado con la azida!!!
- **50 mL de 1.5M Tris pH 9.2 (MW Tris 121.14):** Pesar 9.086 g de Tris, añadir 40 mL de agua. Agitar y ajustar a pH 9.2 con HCl. Completar hasta 50 mL.
- **Tampón de muestra 4X:** 8 mL glicerol, 4 mL de 1.5 M Tris pH 9.2, 14 mL de agua destilada, 0.01 g de azul de bromofenol (670 Da).
- **Tampón de electroforesis 5X** (sólo hay que diluirlo a 1x para ser utilizado): Para 2L pesar 160 g de Tris y 72 g de glicina. Añadir 1800 mL de dH₂O, disolver y completar hasta 2 L. El pH debe de quedar entre 8.9 y 9.2.

Preparación del gel:

1. Preparar y sellar un molde del tamaño apropiado.
2. Mezclar 1 g de agarosa en 100 mL de 1X tampón de electroforesis.
3. Disolver la agarosa en microondas.
4. Dejar enfriar a 55 °C.
5. Depositar la agarosa en el molde.
6. Insertar el peine y dejar solidificar.
7. Una vez solidificado colocar el gel en la carcasa de electroforesis horizontal.
8. Rellenar con 1X tampón de electroforesis hasta 1-2 mm por encima del gel.

Electroforesis de hemoglobinas:

1. Sangre completa tratada con anticoagulante (heparinizada, EDTA) o buffy coat (se observará mejor la banda de leucocitos). Puede almacenarse la sangre completa o las células empaquetadas de 1-2 semanas a 6°C.
2. Centrifugar 200 L de la sangre anticoagulada durante 10 minutos 2500 xg (5500 rpm) para separar las células del plasma. Eliminar el plasma y la capa superior del pellet, que se corresponderá con los leucocitos (apenas visible en sangre normal, pero muy evidente en muestras de buffy coats).
3. Lavar las células empaquetadas (pellet) con 5 volúmenes de solución salina (0.85% w/v NaCl). Centrifugar a 3500 rpm (1000xg) 5 minutos y aspirar el sobrenadante como antes. Repetir 2-3 veces para eliminar todas las proteínas del suero.
4. Preparar los hemolisados mezclando 10 l de eritrocitos empaquetados con 100 L de reactivo de hemolisis. Vortex vigoroso durante 15 segundos. Centrifugar a 10,000 xg durante 15 min para eliminar los fantasmas eritrocitarios. El sobrenadante preaclarado, que contiene la Hb (y por ello será de color rojo), se pasa a un tubo nuevo y se le añade 37 L de tampón de muestra 4X. Se cargarán sólo 20 l de lisado con tampón de muestra en cada canal.
5. **Electroforesis:** 100 voltios.



Resultado de la electroforesis de hemoglobinas:

- 1 y 5: estándares de hemoglobina
- 2: Sangre de adulto normal
- 3: Sangre de recién nacido
- 4: Paciente #2
- 6: Padre paciente #2
- 7: Paciente #3
- 8: Madre paciente

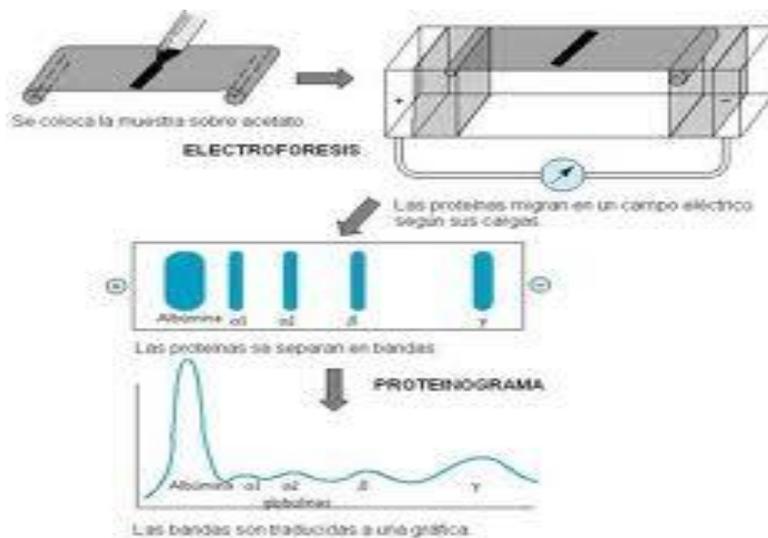
PRÁCTICA 6

Electroforesis de proteínas del plasma

El plasma sanguíneo es una solución muy compleja que contiene un gran número de proteínas, su concentración media es de 70g/L. Entre las funciones principales están el mantenimiento de la volemia, la capacidad amortiguadora, transporte de sustancias endógenas y exógenas, participación en la coagulación e inmunidad.

La técnica más común para la separación de proteínas del suero es la electroforesis. En el caso del proteinograma electroforético, las proteínas migran en función de su carga, independientemente de su tamaño. Para ello los soportes comúnmente usados son la agarosa y el acetato de celulosa.

Empleando la técnica de separación con agarosa se pueden separar 6 bandas: prealbúmina y albúmina (que por ser la molécula más pequeña y con mayor número de grupos cargados negativamente, migra con mayor rapidez) seguida por las globulinas α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , y γ



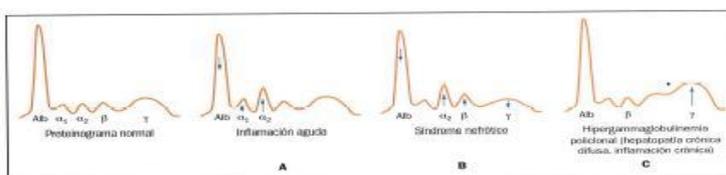
Electroforesis:

Valores normales

Proteína total:	6.4 a 8.3 g/dL
Albúmina:	3.5 a 5.0 g/dL
Alfa-1 globulina:	0.1 a 0.3 g/dL
Alfa-2 globulina:	0.6 a 1.0 g/dL
Beta globulina:	0.7 a 1.2 g/dL
Gammaglobulina:	0.7 a 1.6 g/dL

La mayor parte de proteínas corresponde a la albúmina.

Proteinograma:



OBJETIVO: Preparar el suero fisiológico normal y patológico de manera tal que la electroforesis nos permita identificar las diferentes proteínas que encontramos en estos.

MATERIALES

Muestras de suero.
Solución tampón TBE (TRIS, Borato EDTA).
Tampón de carga.
Gel de agarosa al 0,8%.
Tinción Coomassie .

PROTOCOLO

Hacer dos diluciones en el tampón TBE de cada una de las distintas muestras de suero, de manera que la cantidad de cada una sea de 30 y 100µg
Añadir el tampón de carga 4x
Correr el gel
Teñir con Coomassie.