



UNIVERSIDAD DEL SURESTE (UDS).

DOCENTE: DR. GUILLERMO DEL SOLAR VILLARREAL.

ALUMNA: EVELIN SAMIRA ANDRES VELAZQUEZ.

LICENCIATURA: MEDICINA HUMANA.

MATERIA: BIOQUÍMICA.

TEMA: TÉCNICAS DE SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEINAS.

En este trabajo describiremos las técnicas de separación, purificación y cuantificación de las proteínas.

Las proteínas son una clase importante de moléculas que se encuentran en todas las células vivas. Una proteína se compone de una o más cadenas largas de aminoácidos, cuya secuencia corresponde a la secuencia de ADN del gen que la codifica.

Un proceso de separación se usa para distintos tipos de productos. Los productos separados podrían diferir en propiedades químicas o algunas propiedades físicas, tales como el tamaño o tipo de cristal.

La purificación se emplean métodos basados en sus propiedades de solubilidad. Cada proteína tiene una composición de aminoácidos específica que las hace diferentes unas de otras y, por lo tanto, su comportamiento en disoluciones también es diferente.

Una cuantificación de proteínas exacta y sensible es necesaria, y esto es, precisamente lo que se busca con los diversos métodos; aunque se debe tener en cuenta que la elección de cada uno de ellos se basa en el resultado que se desea obtener.

TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Técnicas de separación y análisis de las proteínas, la proporción de las fracciones proteicas individuales cambia en el transcurso de un gran número de enfermedades lo que conlleva que, la cuantificación de las mismas sea de valor considerable en el diagnóstico clínico. Los procedimientos más utilizados actualmente en el laboratorio clínico para el estudio de las proteínas son los siguientes:

1. Turbidimetría y nefelometría
2. Inmunodifusión
3. Electroforesis
4. Inmunolectroforesis
5. Inmunolectroforesis en cohete
6. Inmunofijación
7. Cromatografía

LA TURBIDIMETRÍA mide la disminución de la luz transmitida a través de una suspensión de partículas utilizando para ello un espectrofotómetro (detector en la misma dirección del haz de luz, se mide A o T). Se suele utilizar para soluciones concentradas (para que haya una buena disminución de la luz transmitida) ej. determinación de proteínas totales en suero, LCR u orina (haciendo que las proteínas precipiten con TCA o ácido sulfosalicílico).

LA NEFELOMETRÍA: mide la luz dispersada en dirección distinta a la luz emitida (generalmente con ángulos que oscilan entre 15 y 90°). Utiliza como instrumento el nefelómetro (en el que el detector se ubica con un ángulo que oscila entre 15 y 90° ej. a 90°). Se suele utilizar para concentraciones más diluidas.

LA INMUNODIFUSIÓN se basa en la formación de bandas de precipitación Ag-Ac en medios semisólidos (generalmente de agarosa). La formación de inmunocomplejos se ve afectada por variables como: pH, temperatura, fuerza iónica del medio, características propias del Ac como afinidad y avidéz y, la más importante, la concentración relativa de Ag y Ac. La zona óptima de concentración para la formación del precipitado Ag-Ac se llama zona de equivalencia. La inmunodifusión puede ser simple (sólo se mueve el Ag o el Ac) o doble (se mueven Ag y Ac). Para visualizar el resultado de la inmunodifusión, una vez terminada la difusión se lava el gel y se tiñe con colorantes para proteínas. La inmunodifusión se puede clasificar atendiendo a distintos criterios. Entre otras modalidades podemos hablar de:

Inmunodifusión radial: en este caso se añade un antisuero específico a la agarosa que, a su vez, se vierte sobre placas. Se forman pozos en el gel y se colocan en ellos estándares de proteínas y problemas (antígenos). El antígeno difunde en el gel durante varias horas y va reaccionando con el Ac. En la zona de equivalencia se produce un anillo de precipitación.

Inmunodifusión doble o técnica de Ouchterlony: se forman pozos en el gel de agarosa, generalmente en patrón de roseta. Se depositan antisueros específicos en los pozos centrales y los estándares de proteínas y los problemas en los pozos circundantes. Al difundir las muestras en el gel, donde el anticuerpo y el antígeno alcanzan la equivalencia, se forman bandas de precipitados insolubles. La posición y forma de la banda se determinan según la concentración del antígeno y del anticuerpo, y sus tamaños. La distancia de las bandas con respecto al anticuerpo es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente.

ELECTROFORESIS, una de las técnicas más sencillas para la separación (y posterior cuantificación) de proteínas es la electroforesis (técnica en la cual una partícula cargada se hace desplazar a través de un medio aplicando un campo eléctrico). Cuando se aplica un campo eléctrico a un medio que contiene partículas cargadas, las partículas cargadas negativamente migran hacia el ánodo o polo positivo mientras que, las cargadas positivamente migran hacia el electrodo negativo (cátodo).

Este principio se puede aplicar para separar las fracciones de proteínas puesto que los aminoácidos (aa) constituyentes de la proteínas, y por tanto las proteínas, son compuestos anfóteros que se comportan como ácidos (ceden protones y quedan con carga negativa) o bases (captan protones y quedan con carga positiva) dependiendo del medio en el que estén.

Los pasos a seguir en una electroforesis se pueden resumir en:

1. Separación electroforética mediante un campo eléctrico
2. Fijación de las proteínas sobre el soporte.
3. Revelado de las proteínas para identificar su presencia y separación. Se realiza mediante colorantes ácidos, negro amido, rojo Ponceau, que se fijan sobre las funciones básicas de las proteínas. El exceso de colorante se arrastra con mezclas acético-agua, o metanol-acético, según el colorante utilizado con tal de que se decolore el soporte sin elución del colorante fijado a las proteínas.
4. Cuantificación de las fracciones electroforéticas mediante fotómetros especiales (densitómetros) que permiten cuantificar el colorante fijado a diferentes distancias del punto de aplicación, y con ello la representación gráfica de la separación.

LA INMUNOELECTROFORESIS es una inmunodifusión en la que se aplica una corriente eléctrica para separar las proteínas de la muestra. Esta técnica se realiza en dos fases:

Electroforesis para separar las proteínas de la muestra en función de su carga.

Aplicación de un antisuero, mono o poliespecífico, en un surco paralelo a la dirección del campo eléctrico. El o los anticuerpos difunden durante 18-24h. Si se produce el reconocimiento Ag-Ac se forman bandas de precipitación.

Se utiliza fundamentalmente para analizar, cualitativamente, alteraciones de distintas proteínas, especialmente inmunoglobulinas en suero, orina o líquido cefalorraquídeo.

LA INMUNOELECTROFORESIS en cohete es una técnica cuantitativa equivalente a la inmunodifusión radial pero, a en la que la placa se expone a un campo eléctrico. Al igual que en la inmunodifusión radial, el antisuero (Ac) se incorpora al gel de manera que el Ac no pueda migrar. En el gel se realizan unos pocillos (generalmente en el cátodo) que se rellenarán con la muestra o con diluciones patrón. Una vez depositadas éstas se activa el campo eléctrico. El Ag se desplaza en la agarosa y precipita al encontrarse con el Ac. La precipitación va produciéndose a medida que el Ag avanza hacia el ánodo de manera que al ir disminuyendo la concentración de Ag los bordes laterales se van acercando hasta unirse. Así, se produce una precipitación triangular (en estela de cohete). La concentración de Ag de la muestra es directamente proporcional al área y altura del triángulo. Comparando los resultados de la muestra con los obtenidos en las diluciones patrón obtendremos un resultado cuantitativo.

LA INMUNOFIJACIÓN consiste en la separación electroforética de las proteínas de una muestra seguida del contacto del gel con una tira de acetato de celulosa impregnada con antisuero. La unión Ag-Ac da lugar a la formación de bandas de precipitación visulalizadas tras lavar y teñir. Es una técnica muy rápida que se utiliza especialmente en le detección de bandas oligoclonales en líquido cefalorraquídeo.

Las técnicas de purificación de la proteína son una parte esencial de modificar o de producir las proteínas para requisitos particulares con las propiedades específicas que se pueden aplicar en diversos procesos industriales. Así son cruciales a la investigación biotecnológica.

Sin embargo, estos métodos dependen pesado de poder aislar y purificar las proteínas deseadas para poder entender sus propiedades físicas y químicas, junto con sus estructuras terciarias y acciones recíprocas con ligands y substratos.

PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Paso 1: Crear un extracto de la proteína cruda

Los extractos crudos de proteínas intracelulares son preparados lysing la célula usando procesos químicos o mecánicos. Los escombros entonces son quitados por la centrifugación. El resultar supernatent es a lejos de la forma pura, siendo mezclado con muchos otra macro y micromolecules.

Las proteínas extracelulares son obtenidas centrifugando la solución y quitando las células. Un método específico para obtener un extracto crudo de enzimas termoestables es calentar la mezcla para desnaturalizar otras proteínas, y después la enfría para reformar las proteínas termoestables del interés, finalmente centrifugándola para quitar las proteínas desnaturalizadas.

Paso 2: Purificación intermedia

Salazón, las proteínas en un extracto crudo son purificadas después precipitándolas en una solución de sal altamente concentrada, tal como sulfato del amonio. Esto trabaja en base de la solubilidad más inferior de la proteína en las altas concentraciones de sal. Sin embargo, todas las proteínas no se precipitan en la misma concentración de sal, que significa que la salazón también ayuda a fraccionar las proteínas. Puede también ser utilizada para concentrar las proteínas en la solución. Este paso aumenta la pureza tres veces y el 92% de la proteína en la solución se recupera.

Diálisis, las proteínas son moléculas grandes, y ésta significa que las sales de las proteínas serán conservadas pasando la solución a través de una membrana semipermeable. La celulosa es una membrana típica de la diálisis. La diálisis no se puede utilizar para separar las proteínas de diversos pesos moleculares.

Cromatografía, otras técnicas usadas para quitar fuera saladas las proteínas incluyen la cromatografía y la filtración de la exclusión del gel. Éstos están disponibles ahora como estuches preformados para muchas proteínas estándar, y son a menudo convenientes para los procesos en grande.

La filtración de gel trabaja en base de la separación de talla a través de una olumna de las molduras porosas del polímero, tales como dextrano o agarosa. Las moléculas grandes pueden fluir solamente a través de los espacios entre las molduras, mientras que las más pequeñas ocupan estos espacios y el espacio dentro de las molduras, reduciéndolas. Así el eluyente contiene las moléculas

que emergen en orden de su talla, de la más grande a la más pequeño. la Reverso-fase o las técnicas de intercambio iónico de la cromatografía también se utiliza, operando en base de propiedades hidrofóbicas diferenciadas y carga respectivamente. La cromatografía inversa se puede limitar en su uso debido a la desnaturalización posible de la proteína por los disolventes orgánicos.

Diálisis y resultado de intercambio iónico en una solución que es 9 veces tan puras, pero con el solamente 77% de la proteína original que está ahora disponible. Después de cromatografía de la exclusión del gel, el rendimiento es el solamente 50% pero la pureza es de cien veces.

Paso 3: Purificación final

Cromatografía de afinidad, este proceso depende de usar los ligands limitados a las molduras que atan específicamente a la proteína del interés que se puede entonces enjuagar fuera con otra solución de ligands libres. Esto da lugar a las muestras extremadamente puras de la proteína que tienen la actividad específica más alta entre todas las técnicas de uso corriente. Un ejemplo es la purificación de la concanavilina A usando los residuos de la glucosa sujetos a las molduras en una columna. La solución ahora es el doblez 3000 más puro pero el rendimiento es el solamente 35% de la proteína original.

Electroforesis del gel de poliacrilamida, la electroforesis del gel de poliacrilamida se utiliza para descubrir la pureza de la muestra de la proteína después de cada paso basado en la talla. La carga neta en la molécula hace que baja la columna o la hoja del gel en un campo eléctrico, permitiendo separar las proteínas basadas en su velocidad de la migración, que a su vez depende de su carga, así como la fricción y la fuerza de campo. El gel actúa como filtro químicamente inerte y fácilmente formado, con las moléculas de proteína estando casi inmóviles en la columna porque se adhieren entre los poros mucho más pequeños entre las moléculas del gel. Una serie de bandas se visualiza inicialmente que representen diversas proteínas en la mezcla, que reducen gradualmente en gran número hasta que el paso final muestra solamente una banda.

Immunoblotting, es otra técnica útil combinada a menudo con cromatografía de afinidad. Utiliza los anticuerpos para que la proteína sea aislada como ligands en la columna. El anticuerpo se sujeta a veces a los isótopos o a los tintes para etiqueta los y para hacer la detección más fácil después de la separación.

Cualquier técnica cromatográfica se perfecciona usando la presión para forzar la solución a través de una columna de materiales fino divididos, está cargada o las molduras ligand-bajo fianza. La superficie creciente da lugar a la mayor acción recíproca que empuja hacia arriba la resolución y la velocidad de la técnica. Esto se refiere como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Todos estos pasos se incluyen en el esquema ideal, que debe concentrar en niveles del rendimiento y de la purificación para ofrecer cantidades adecuadas de proteína a la corrida con un experimento así como ofrecer suficiente pureza para hacer la interpretación relativamente directa.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Los principales métodos empleados para la determinación de proteínas totales son los siguientes:

- Método del Biuret, en solución alcalina el Cu^{+2} reacciona con el enlace peptídico de las proteínas dando un color purpúreo que se cuantifica espectrofotométricamente (540nm). Como estándar se utiliza una solución de albúmina. Proteína + Cu^{+2} Complejo Cu-Proteína (púrpura)

Muestra: suero o plasma (heparina o EDTA). Separar el suero del coágulo o el plasma de las células antes de 3h. Si el paciente está acostado durante la extracción el resultado será menor.

- Método de Lowry Dependen de la concentración de tirosina y triptófano de la muestra. Consiste en dos reacciones:
 - ✓ Reacción de Biuret.
 - ✓ Reacción de Folin: característica de los grupos $-\text{OH}$ reductores de los aminoácidos tirosina y triptófano que, junto con los complejos Cu^{+2} , reducen el reactivo de Folin generando un color azul. Está sujeto a muchas interferencias. Se utiliza fundamentalmente en orina.
- Turbidimetría: Medición de la turbidez resultante de la precipitación de proteínas.
- Absorción en el ultravioleta: Se mide la absorbancia a 270nm originada fundamentalmente por los anillos aromáticos de triptófano y tirosina.
- Métodos de unión a colorantes.

NOTA: para semicuantificar la concentración de proteínas en orina se utilizan tiras reactivas.

- Kjeldahl: Este método de cuantificación de proteínas se basa en la determinación de nitrógeno total. Así mismo, se muestra la digestión de H_2SO_4 , y la existencia de NH_2OH .

- Absorción en ultravioleta: En este caso, las proteínas son absorbidas mediante rayos ultravioleta a 280nm. Esto se logra gracias a grupos presentes de triptófano y tirosina en las muestras.
- Biuret: En este método de cuantificación de proteínas, se toman como muestra sustancias que contienen al menos dos enlaces peptídicos; que se encuentran en conjunto con soluciones alcalinas y sales de cobre. Generalmente, toman un color violeta o morado.
- Lowry: El método de cuantificación de proteínas de Lowry se basa en el método de Biuret y, posteriormente, en la reducción del reactivo obtenido de fosfomolibdeno-volfrato; gracias a los aminoácidos triptófano y tirosina. Suele presentar un color azul en los resultados.

Para concluir, las proteínas son fundamentales en nuestro organismo, ya que algunas de ellas fabrican tejidos, algunas son regeneradoras y renovadoras, promueven el crecimiento.

Ahora conocimos que se pueden separar, purificar y cuantificar.

Las separación y la cuantificación de las proteínas son puntos isoeléctricos similares y diferentes.

La purificación de las proteínas van a ser una serie de procesos que permiten aislar un solo tipo de proteína de una mezcla compleja, al igual que la purificación es vital para la caracterización de la función, estructura de la proteína.

BIBLIOGRAFIA

- De Pablo, L. R., & de Análisis Clínicos, F. E. A. Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.
- Clasificación fue desarrollada por Osborne, E. (2009). Proteínas de la harina de trigo: clasificación y propiedades funcionales. *Temas de Ciencia y Tecnología*, Villanueva, O., & Arnao, I. (2007,
- December). Purificación de una proteína de 35 kDa rica en lisina, de la fracción albúmina de *amaranthus caudatus* (kiwicha). In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 68, No. 4, pp. 344-350). UNMSM. Facultad de Medicina.

