

Universidad del sureste

Bioquímica médica

Doc. Guillermo del Solar Villarreal

Técnica de separación, purificación y

cuantificación de las proteínas

Ana luisa ortiz rodriguez

Contenido

Universidad del sureste	1
Introducción	3
Las proteínas y Los péptidos se deben purificar antes de analizarlos	4
Conclusión	8
Bibliografía	9

Introducción

Este trabajo consiste en conocer las técnicas de separación que utilizan las proteínas, así como también los métodos de purificación que emplean y las distintas formas de usarlos y que utilidad emplean.

Y como son cuantificables las proteínas y para nos servirá saber esta información.

Para definir las proteínas son macromoléculas complejas desde los puntos de vista físicos y funciona, que desempeñan múltiples funciones de importancia crucial.

Por ejemplo, una red de proteína interna, el citoesqueleto (cap. 49), mantiene la forma y la integridad física celulares. Filamentos de actina y miosina forman la maquinaria contráctil del músculo.

Las proteínas y Los péptidos se deben purificar antes de analizarlos

La proteína altamente purificada es esencial para el examen detallado de sus propiedades físicas y funcionales. Las células contienen miles de proteínas distintas, cada una en cantidades ampliamente variables. Así, el aislamiento de una proteína específica en cantidades suficientes para analizar sus propiedades plantea un formidable desafío que puede requerir la aplicación sucesiva de múltiples técnicas de purificación.

Cromatografía de columna

En la cromatografía de columna la matriz de fase estacionaria consta de cuentas pequeñas cargadas en un recipiente cilíndrico de vidrio, plástico o acero llamado una columna.

Confinan las cuentas dentro de este espacio mientras que permiten que el líquido de fase móvil fluya o se filtre a través de la columna. Por medio de procedimientos químicos se pueden preparar derivados de las cuentas de fase estacionaria para cubrir su superficie con los grupos ácido, básico, hidrofóbico o tipo ligando requeridos para cromatografía de intercambio iónico, de interacción hidrofóbica, o de afinidad.

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Para la cromatografía en columna de primera generación las matrices constaban de polímeros de oligosacárido entrelazados, largos, conformados hacia cuentas esféricas de aproximadamente una décima de milímetro de diámetro. Desafortunadamente, su tamaño relativamente grande perturbaba el flujo de fase móvil y limitaba el área de superficie disponible. La reducción del tamaño de las partículas ofreció el potencial de aumentar mucho la resolución.

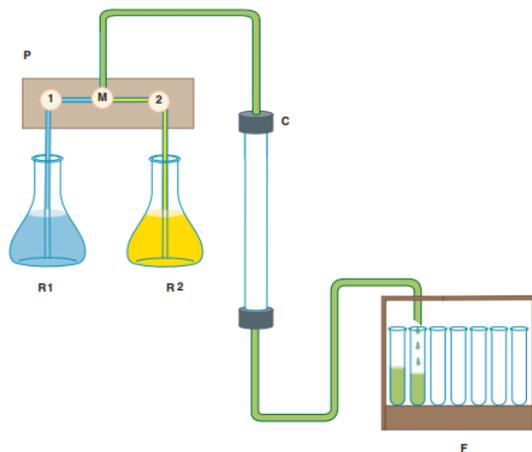
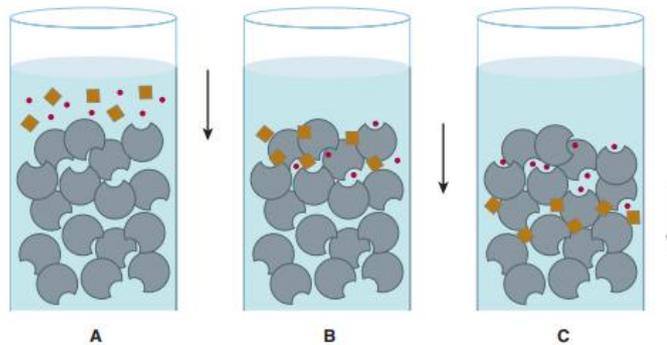


FIGURA 4-2 Componentes de un aparato de cromatografía líquida típico. R1 y

Cromatografía de exclusión de tamaño

Se separan las proteínas con base en su radio de Stokes, el radio de la esfera que ocupan a medida que entran en solución.

El radio de Stokes es una función de la masa y la forma moleculares. Una proteína alargada que cae ocupa un mayor volumen que una proteína esférica de la misma masa. En la cromatografía de exclusión de tamaño se emplean cuentas porosas. Los poros son análogos a irregularidades en una ribera de río.



Cromatografía de intercambio iónico

Las proteínas interactúan con la fase estacionaria mediante interacciones de carga. Las proteínas con una carga positiva neta a un pH dado se adherirán estrechamente a cuentas con grupos funcionales que tienen carga negativa, como carboxilatos o sulfatos (intercambiadores catiónicos).

Las proteínas no adherentes fluyen a través de la matriz y se eliminan por medio de lavado. A continuación, las proteínas unidas son desplazadas de manera selectiva al aumentar gradualmente la fuerza iónica de la fase móvil, lo que debilita interacciones entre una carga y otra.

Cromatografía de interacción hidrofóbica

Separa a proteínas con base en su tendencia a asociarse con una matriz de fase estacionaria cubierta con grupos hidrofóbicos (p. ej., fenil Sepharose, octil Sephadex). Las proteínas que tienen superficies hidrofóbicas expuestas se adhieren a la matriz por medio de interacciones hidrofóbicas que se aumentan mediante una fase móvil de fuerza iónica alta.

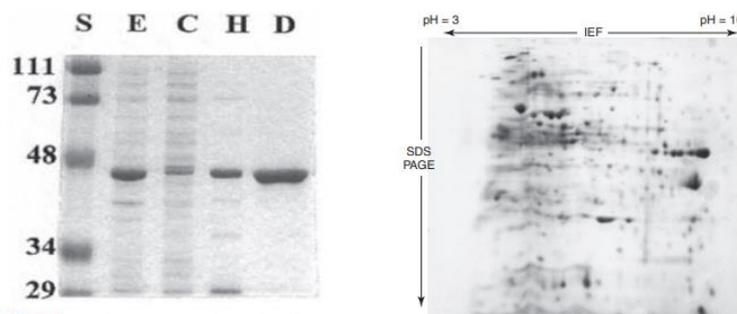
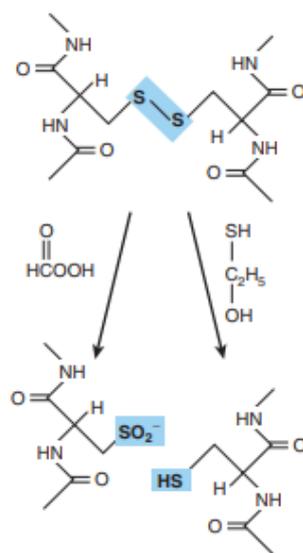
Cromatografía de afinidad

Explota la alta selectividad de casi todas las proteínas para sus ligandos. Las enzimas pueden purificarse mediante cromatografía de afinidad usando sustratos, productos, coenzimas o inhibidores, inmovilizados.

La pureza de las proteínas se evalúa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PaGe)

La electroforesis separa biomoléculas cargadas con base en los índices a los cuales migran en un campo eléctrico aplicado; en cuanto a la SDSPAGE, la acrilamida se polimeriza y se entrecruza para formar una matriz porosa.

El SDS se une a proteínas a una proporción de una molécula de SDS por cada dos enlaces peptídicos, lo que causa que el polipéptido se desdoble o se desnaturalice. Cuando es utilizada en forma conjunta con 2mercaptoetanol o ditioneitol para reducir enlaces disulfuro y romperlos, la SDSPAGE separa los polipéptidos componentes de proteínas multiméricas.



Enfoque isoeléctrico (ieF)

Se usan amortiguadores iónicos llamados anfólitos y un campo eléctrico aplicado para generar un gradiente de pH dentro de una matriz de poliacrilamida. Las proteínas aplicadas migran hasta que llegan a la región de la matriz donde el pH coincide con su punto isoeléctrico (pI), el pH al cual la carga neta de una molécula es cero.

Detección y cuantificación de las fracciones separadas

Para revelar las proteínas separadas por electroforesis, el soporte se trata con colorantes.

Las bandas de proteínas adsorben el colorante más intensamente que el soporte, de forma que se puede eludir el exceso de colorante del soporte mientras que las proteínas quedan teñidas con el colorante.

Se mide densitométricamente, integrando las áreas correspondientes a cada fracción proteica y calculando el porcentaje de cada fracción sobre el total de proteínas.

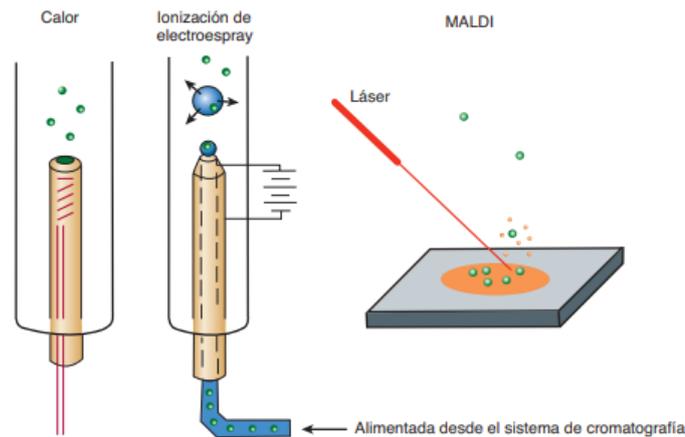
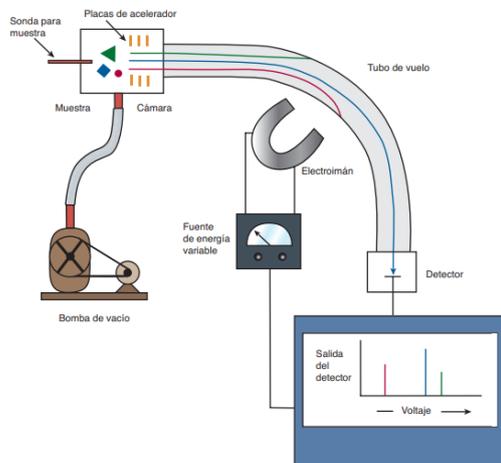


FIGURA 4-9 Tres métodos comunes para vaporizar moléculas en la cámara



Conclusión

Las técnicas de separación, purificación y cuantificación de las proteínas van de la mano ya que se encargan de realizar por partes los distintos procesos en los cuales ya mencione dentro de mi trabajo, también agregando con es que se va realizando esta separación y como llegamos a una proteína purificada y después de esto como se lleva a cabo la cuantificación de esta proteína y el valor que tendrá y la función que va desempeñar.

Bibliografía

Harper bioquímica ilustrada . (2012). En r. k. murray, *Harper bioquímica ilustrada* (págs. 40-47).
ciudad de mexico : editorial mexicana reg. num 736 .

