

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS



SEPARAR UNA PROTEÍNA PARTICULAR DE OTRAS PROTEÍNAS Y COMPONENTES CELULARES

Hay muchas proteínas por célula (10^9).

Una proteína dada puede ser 0.001-20% de la proteína total.

Otros componentes:

Ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, pequeñas moléculas.

Proteínas podemos encontrarlas:

Solubles, insolubles, unidas a membranas, unidas a DNA, en organelos, citoplasma, en núcleo.

¿POR QUÉ SE NECESITA PURIFICAR PROTEÍNAS?

Es un paso básico para conocer su función

Secuencia de AA

Relaciones evolutivas

Función bioquímica

Estudio de la estructura secundaria terciaria: Cristalización

Se debe tratar de conocer el máximo número de características de la proteína

Tamaño

Carga eléctrica

Densidad

Afinidad por otras moléculas

¿CÓMO RECONOCER A LA PROTEÍNA QUE SE BUSCA?

Métodos para la determinación de proteínas

Determinar la cantidad total de proteínas en la muestra inicial y en cada paso del proceso de purificación.

Ensayo de actividad

Debe ser una prueba específica que permita identificar la proteína de interés en todos los pasos del proceso de purificación.

A más específico el ensayo, mejor calidad de purificación

Actividad específica = actividad de la proteína de interés / cantidad total de proteína.

OBJETIVOS EN LA PURIFICACIÓN

1.- MÁXIMA CANTIDAD POSIBLE

Porcentaje de enzima purificada respecto a la cantidad inicial.

2.- MÁXIMA ACTIVIDAD CATALÍTICA

Enzima en condiciones operativas o funcionales.

3.- MÁXIMA PUREZA

Enzima no contenga otras proteínas.

EVALUACIÓN DE LA PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA

GRADO DE PURIFICACIÓN

Incremento de actividad específica respecto a la de partida

RENDIMIENTO

Porcentaje de enzima purificada

Parámetros que se evalúan en la purificación

Concentración de proteínas

Actividad enzimática

MONITOREO DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN

Actividad Específica $AE = \frac{\text{Unidades totales en la fracción } i}{\text{Total de proteínas en la fracción } i}$

Rendimiento $R = \frac{\text{Unidades en la fracción } i}{\text{Unidades en la fracción original}}$

Porcentaje de purificación $P = \frac{AE \text{ en la fracción } i}{AE \text{ en la fracción original}}$

PASOS A SEGUIR EN UNA PURIFICACIÓN

1. Elegir la fuente (*matriz biológica*)
2. Definir un ensayo específico que identifique a la proteína (actividad biológica) (*específico, sensible, rápido y barato*)
3. Extraer la proteína de la fuente (proteínas intracelulares o extracelulares)
4. Fraccionamiento del *extracto crudo* (*seguimiento de cada paso*)
5. Determinar la pureza y calidad del producto final

FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO CRUDO

Implica una serie de pasos en los cuales se aprovechan propiedades fisicoquímicas o biológicas de la proteína de interés para separarla del resto de las moléculas.

Cada paso debe ser monitoreado adecuadamente para evaluar el rendimiento en la purificación, pureza y actividad específica de cada fracción obtenida.

Si bien no hay una sola secuencia de técnicas a seguir, en general se recomienda empezar por técnicas de alta capacidad y seguir con las de baja capacidad.

En general se desea obtener una gran pureza (según los objetivos) acompañada de un gran rendimiento.

ESQUEMA TÍPICO DE UN PROCESO DE PURIFICACIÓN

Table 1-1

Purification of 4-nitrophenylphosphatase from 85 g of bovine liver. General aspects of each step are described in this chapter. Experimental conditions for fractionation, chromatographic columns, enzyme and protein assays, and the results obtained in each case are in Chapters 2–5. This table should be filled as the simulated purification advances

Step	Volume (mL)	[Activity] (U/mL)	[Protein] (mg/mL)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (–fold) ^a	Yield (%) ^b
1. Soluble extract (100,000 × g liver supernatant)	210	11.7	18	2460	3780	0.65	1	100
2. Ammonium sulfate fractionation (30–60% saturation precipitate)	35	55	58	1925	2030	0.95	1.5	78
3. Gel-filtration chromatography in a Sephadex G-150 column (active fractions pooled)	240	6.0	1.7	1440	410	3.5	5.4	59
4. Ion-exchange chromatography in a DEAE-cellulose column (active fractions pooled)	152	6.0	0.18	910	27	34	52	37
5. Dye-ligand affinity chromatography in a Reactive blue 2-agarose column (active fractions pooled)	10	86	0.082	860	0.82	1050	1615	35

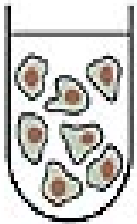
^aIncrease of specific activity relative to that of the soluble extract.

^bRecovery of enzyme activity relative to the total activity of the soluble extract.

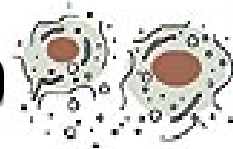
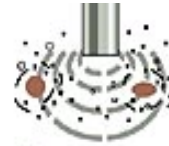
PURIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

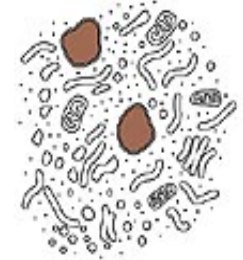
Suspensión de
Células ó tejidos:



Ultrasonidos
Detergente
Émbolo rotatorio (potter ó aspas)



} Homogenado

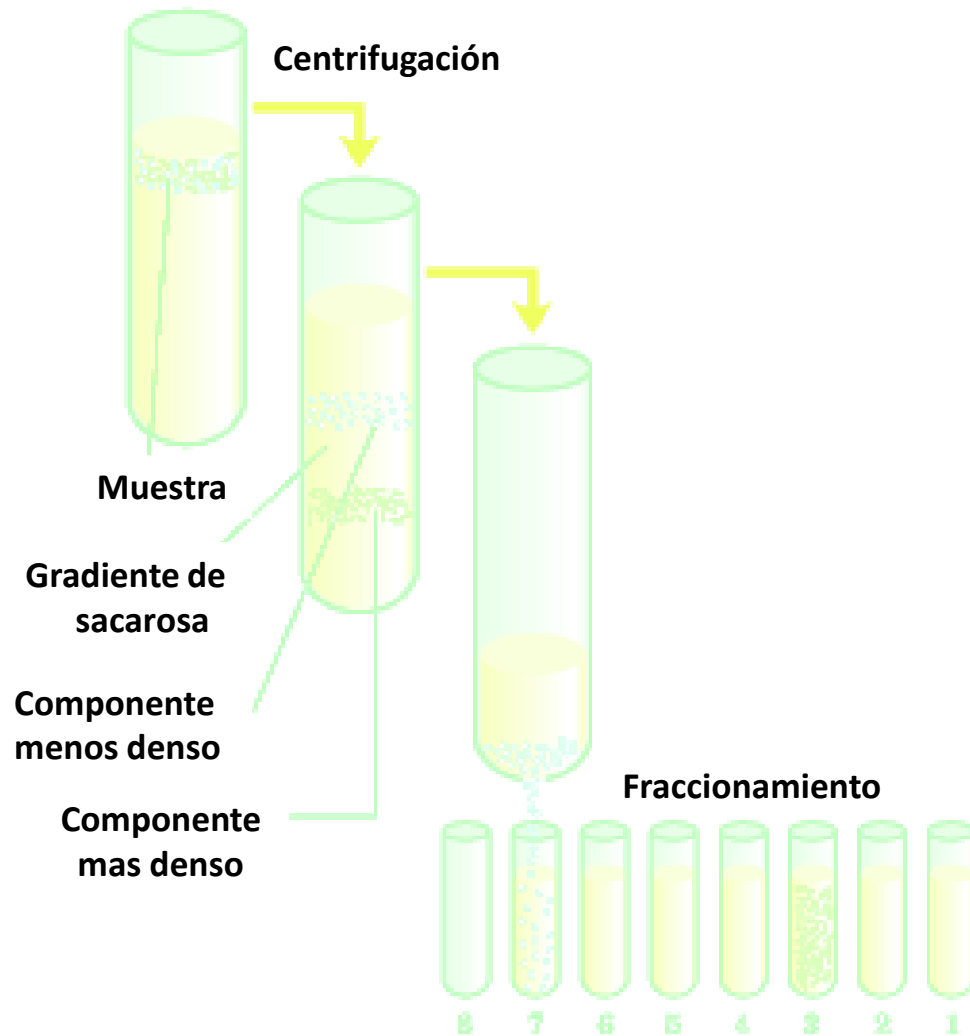


FRACCIONAMIENTO DEL HOMOGENADO CELULAR

CENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL

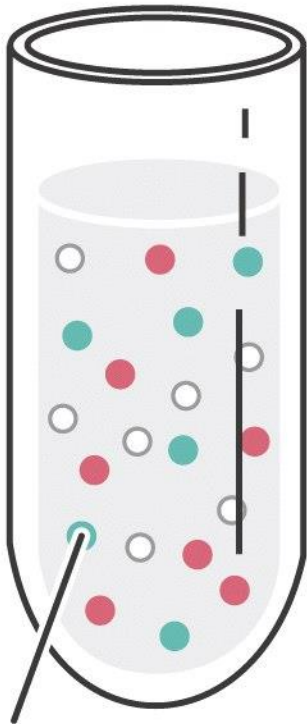


CENTRIFUGACIÓN ISOPÍCNICA



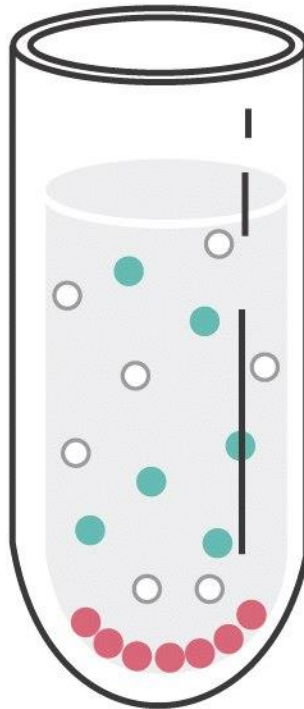
PRECIPITACIÓN CON SALES

(a)



**Target
protein**

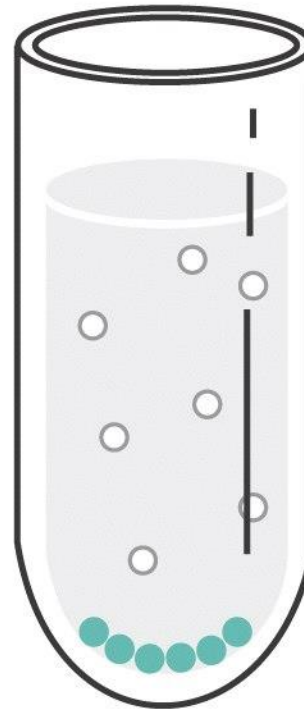
(b)



(p.e. sulfato de amonio)

(Voet)

(c)



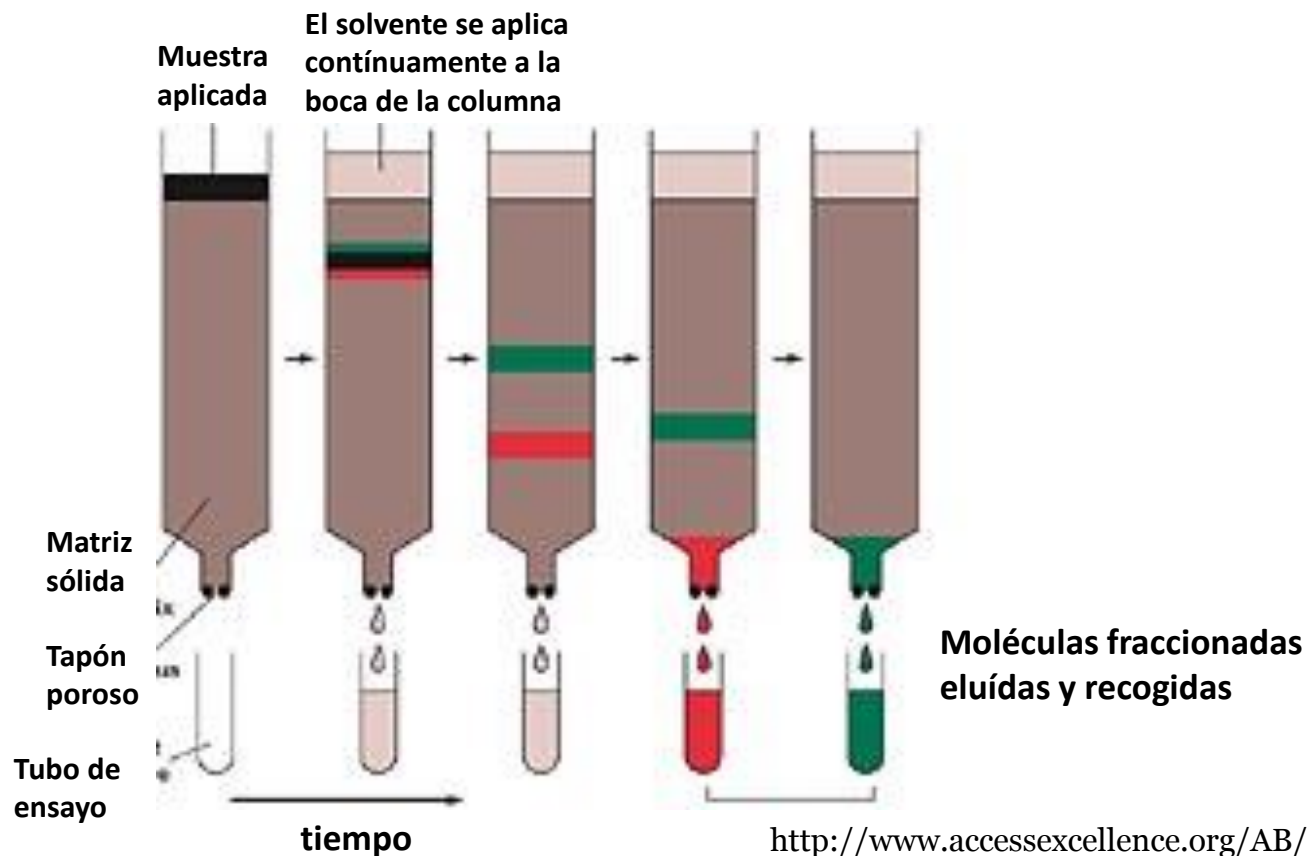
Supernatant

Precipitate

SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Las diferentes proteínas se retrasan según sus interacciones con la matriz, de acuerdo a su carga, hidrofobicidad, tamaño o unión a grupos químicos.



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

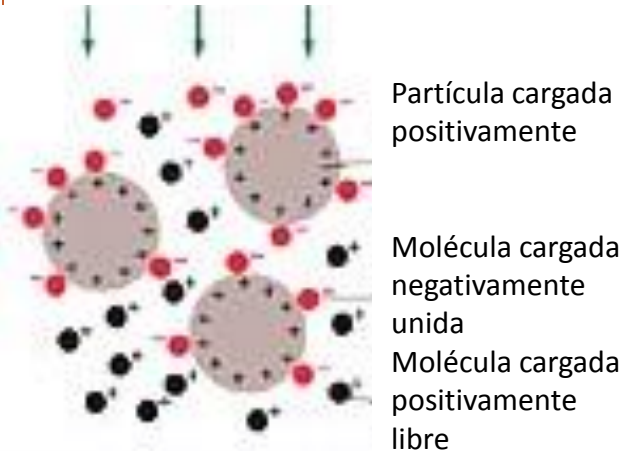
CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Intercambio iónico

la carga de la proteína permite la separación.

Se eluye usando un gradiente de pH y de la fuerza iónica

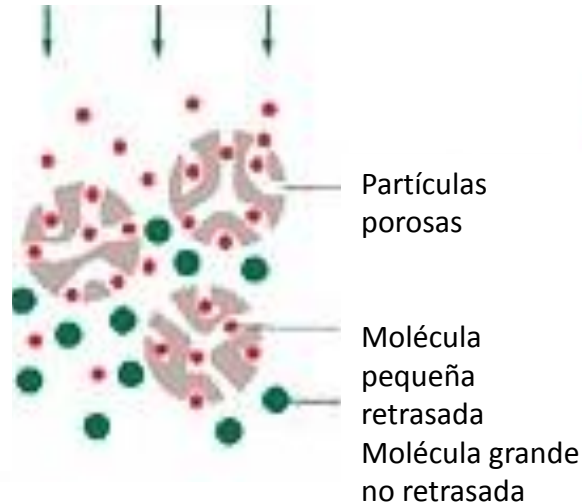
Flujo de solvente



Filtración en gel

El tamaño de la partícula proteica permite la separación

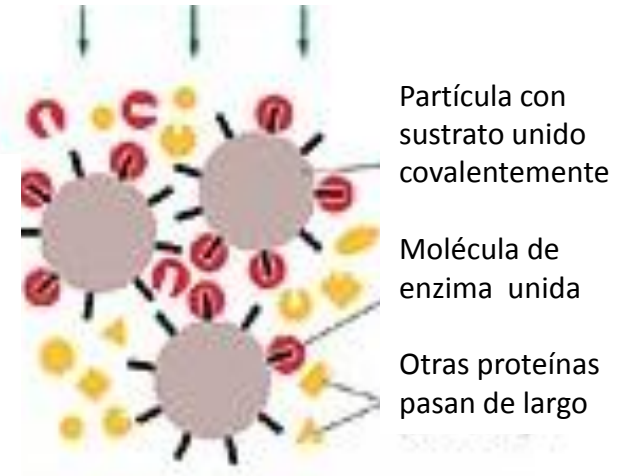
Flujo de solvente



De Afinidad

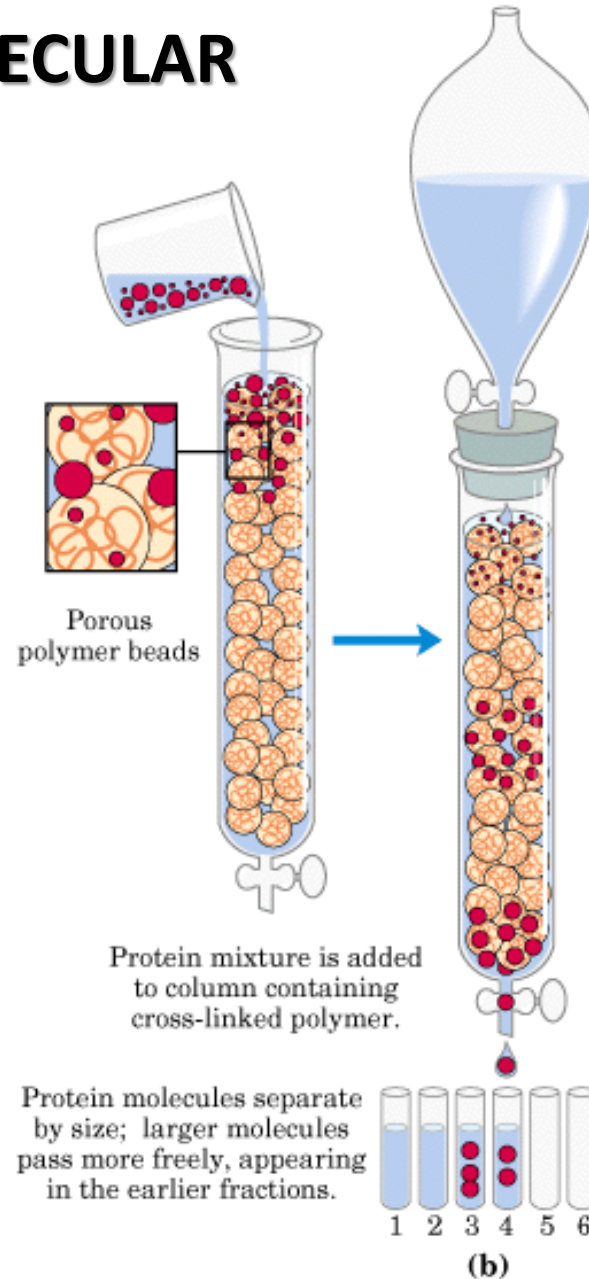
La interacción con un ligando específico con la proteína permite la separación

Flujo de solvente



CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN O EXCLUSIÓN MOLECULAR

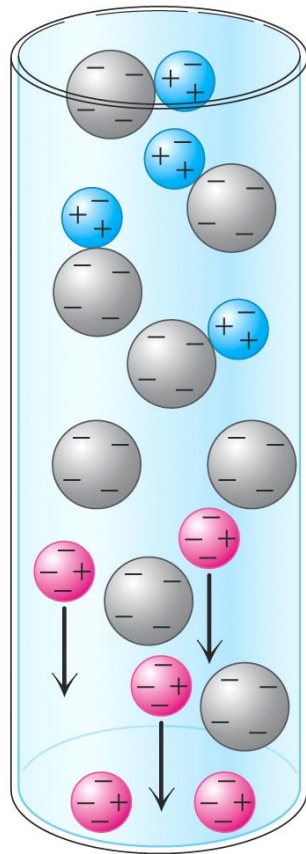
Las proteínas se separan según su tamaño



CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

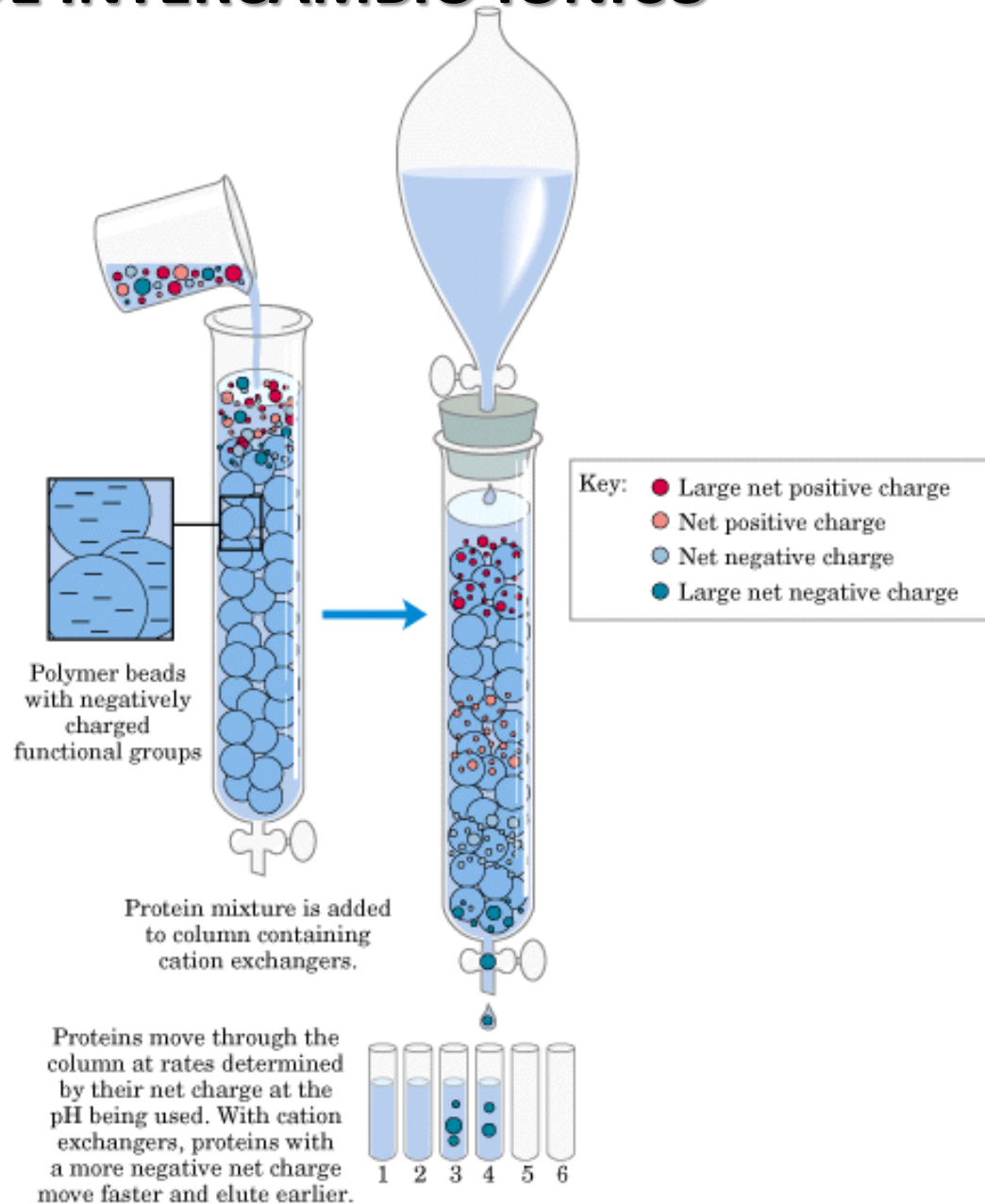
INTERCAMBIO CATIÓNICO

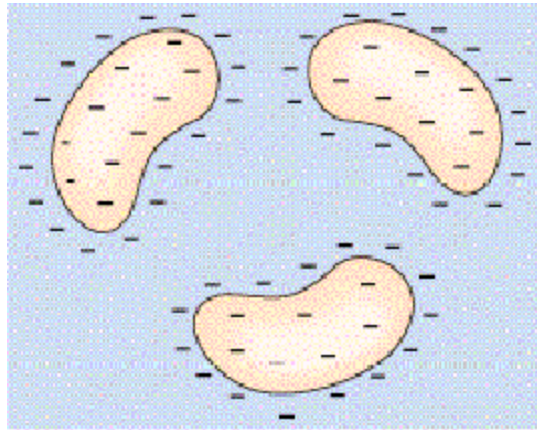
Las proteínas se separan según su carga a un pH determinado



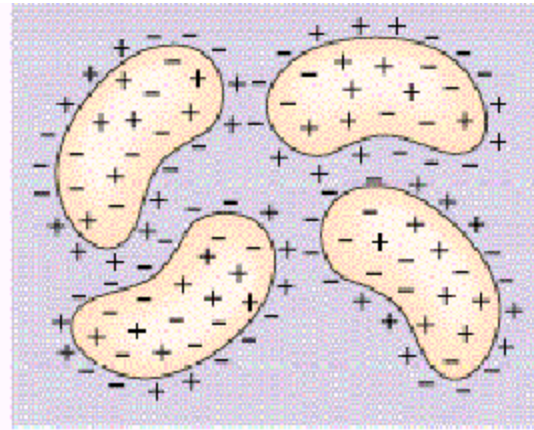
Positively charged protein binds to negatively charged bead

Negatively charged protein flows through

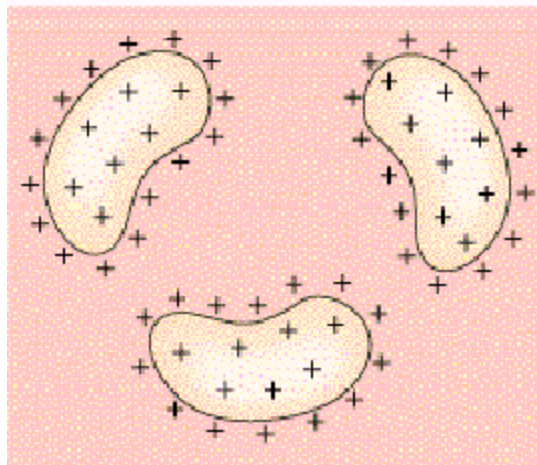




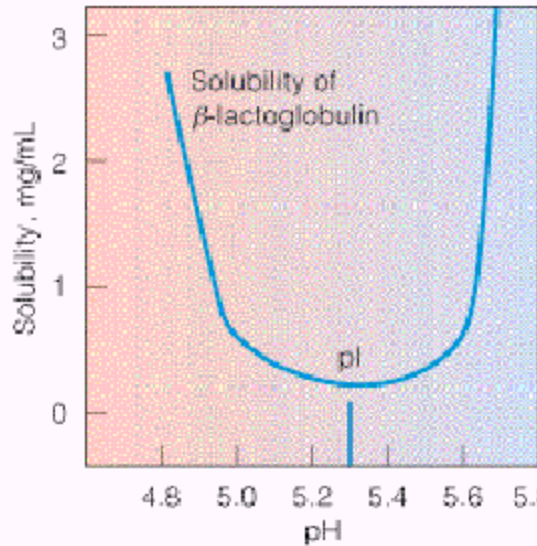
(a) High pH: protein soluble (deprotonated)



(b) Isoelectric point: protein aggregates



(c) Low pH: protein soluble (protonated)



(d) Solubility of β -lactoglobulin



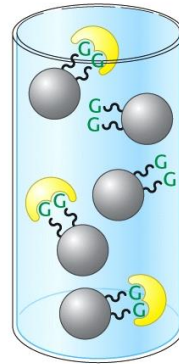
CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Las proteínas se separan en función de la especificidad de unión a un ligando.

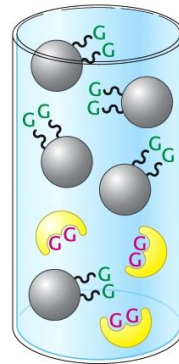
En el ejemplo , el ligando es la glucosa y se separan aquellas proteínas que se unen a ella.

Las proteínas de interés se eluyen añadiendo un exceso de ligando libre.

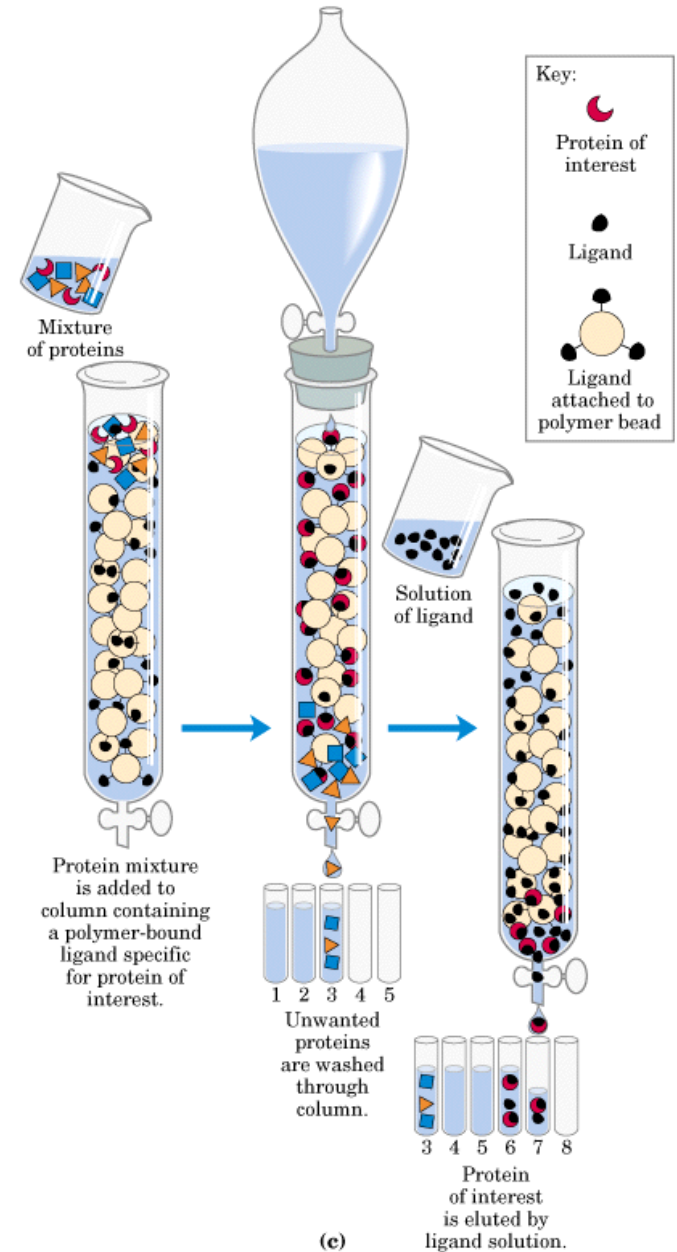
Glucose-binding protein attaches to glucose residues (G) on beads



Addition of glucose (G)



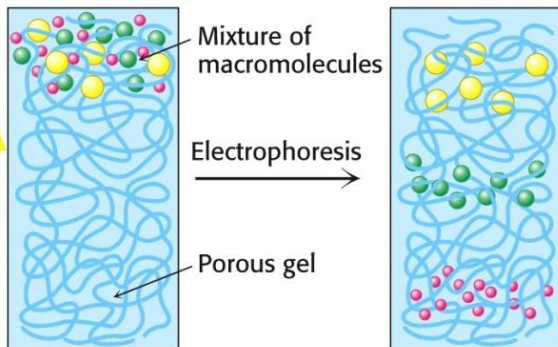
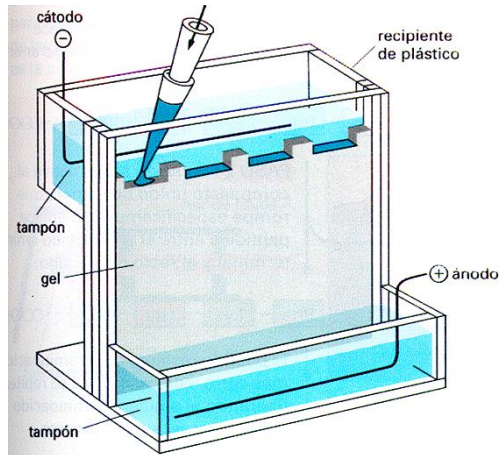
Glucose-binding proteins are released on addition of glucose



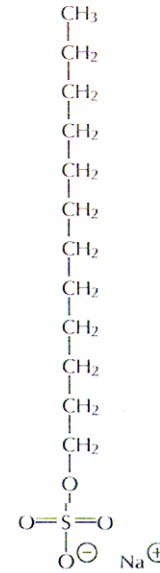
ELECTROFORESIS EN GEL

ELECTROFORESIS EN GEL:

Tras aplicar un campo eléctrico las proteínas migran en función del tamaño y de la carga

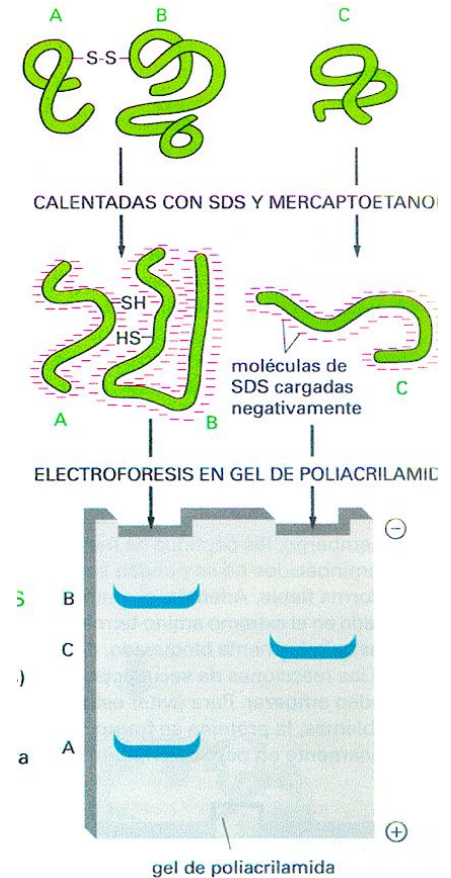


Electroforesis en SDS-PAGE

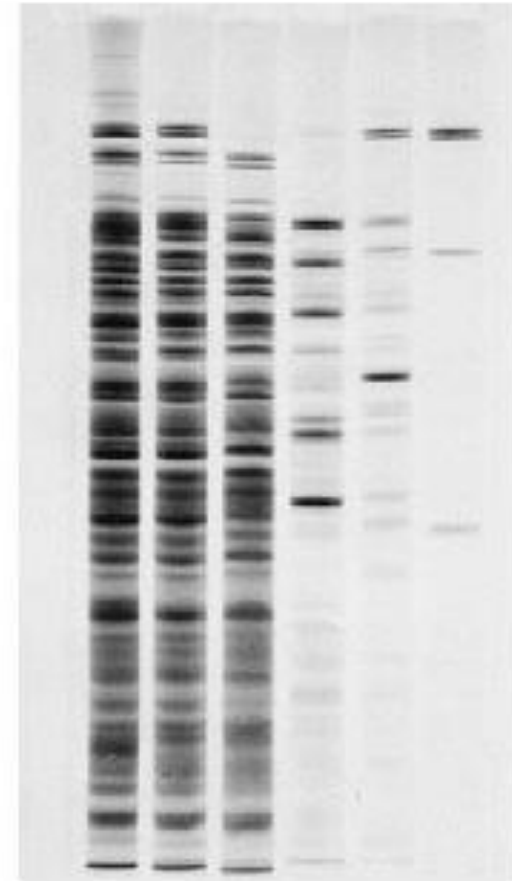
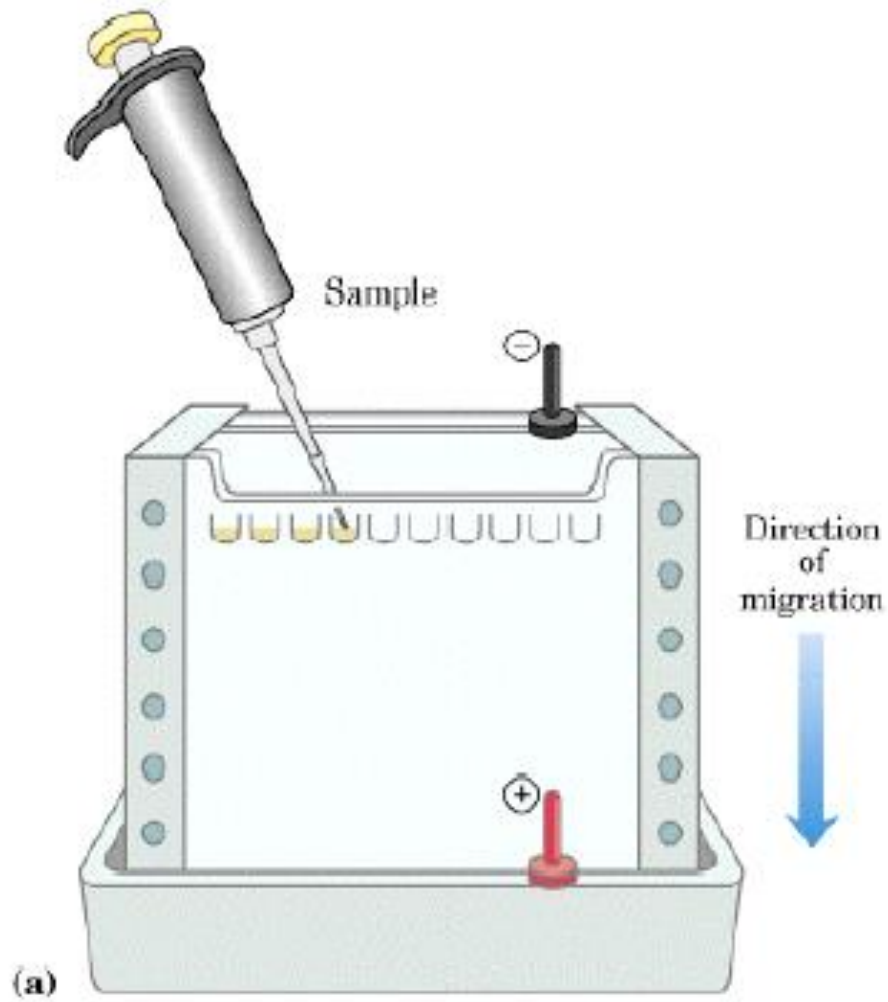


SDS

(solubiliza proteínas)

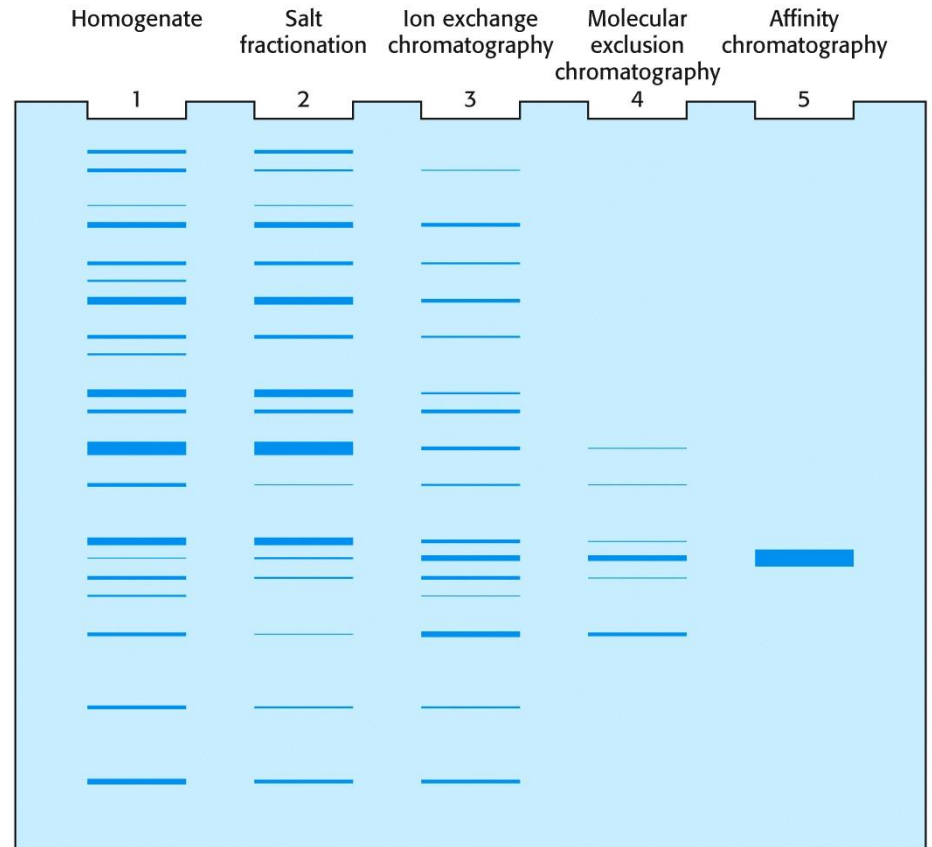


ELECTROFORESIS EN GEL

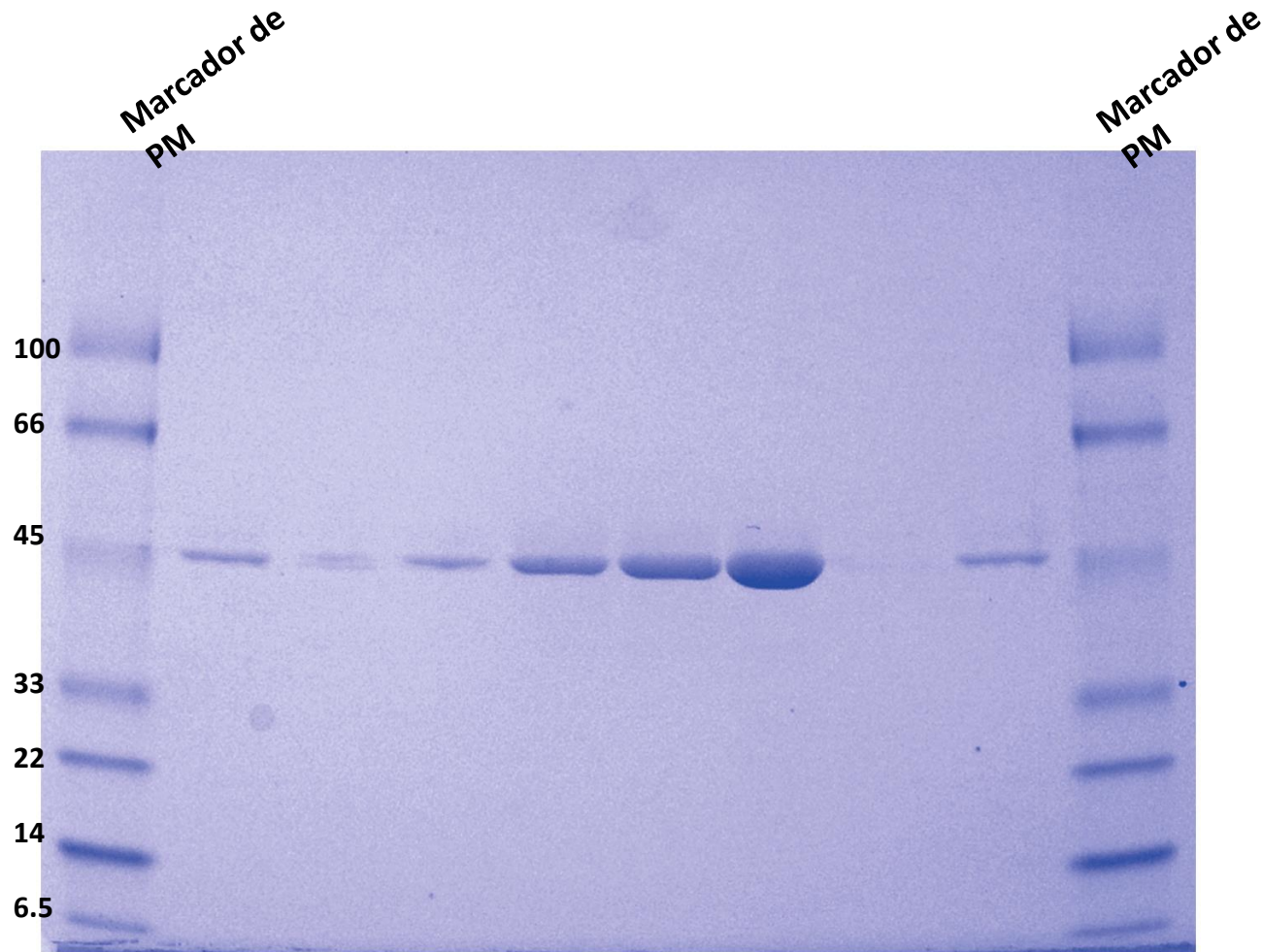


Ejemplo de análisis de proteínas por SDS-PAGE en cada paso de una purificación.

En el último paso hay una única banda, lo que indica que tenemos la proteína de interés completamente purificada

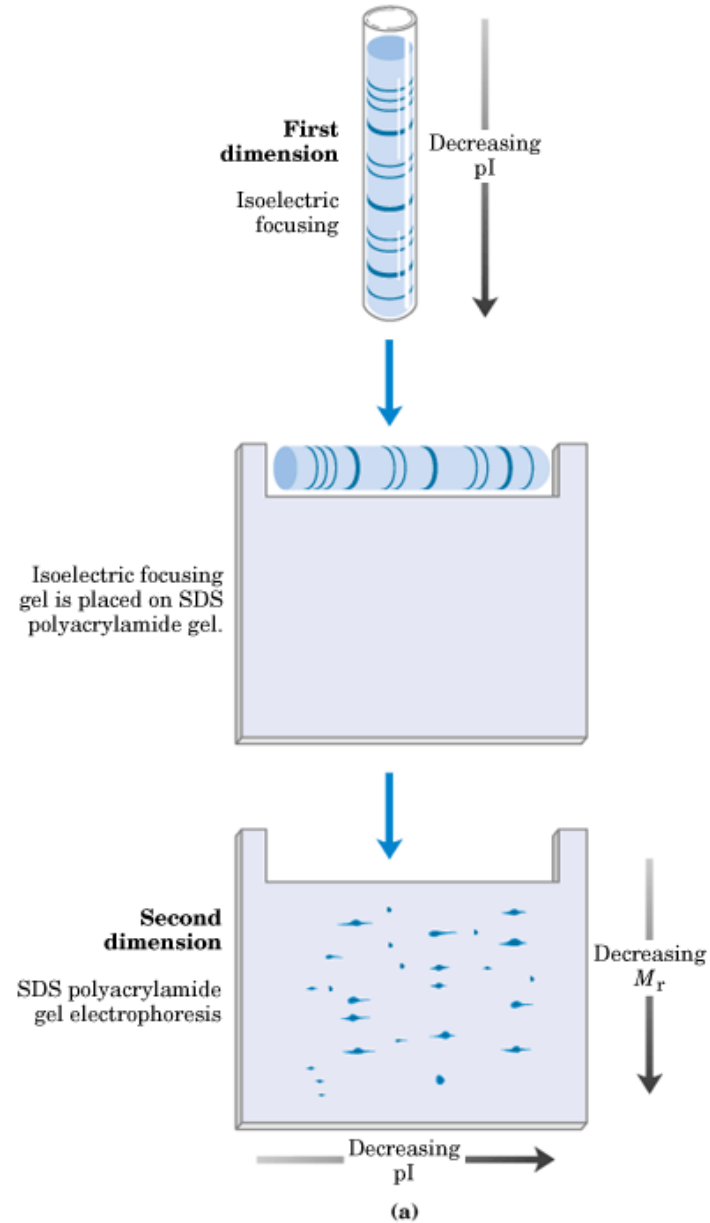


GEL SDS-PAGE TEÑIDO CON AZUL DE COOMASSIE



GELES BIDIMENSIONALES (2D)

Primero iso-electroenfoco
y luego SDS-PAGE



EJEMPLO DE GEL BIDIMENSIONAL

(B)

Isoelectric focusing

SDS-PAGE



Table 5-2 Isoelectric Points of Several Common Proteins

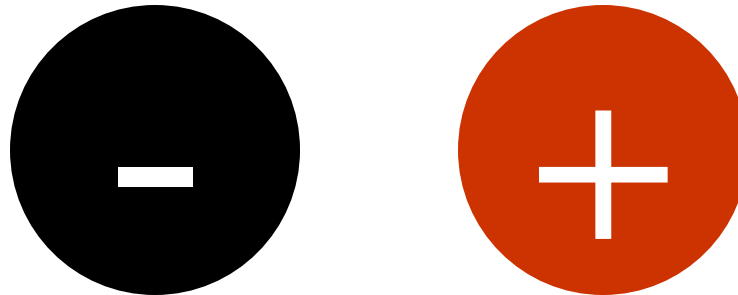
Protein	pI
Pepsin	<1.0
Ovalbumin (hen)	4.6
Serum albumin (human)	4.9
Tropomyosin	5.1
Insulin (bovine)	5.4
Fibrinogen (human)	5.8
γ -Globulin (human)	6.6
Collagen	6.6
Myoglobin (horse)	7.0
Hemoglobin (human)	7.1
Ribonuclease A (bovine)	9.4
Cytochrome <i>c</i> (horse)	10.6
Histone (bovine)	10.8
Lysozyme (hen)	11.0
Salmine (salmon)	12.1

ELECTROFORESIS: CONCEPTOS BÁSICOS

DEFINICIÓN:

1. MIGRACIÓN DE SUSTANCIAS POR LA ACCIÓN DE UN CAMPO ELÉCTRICO.
2. TÉCNICA QUE APLICA ESTE FENÓMENO.

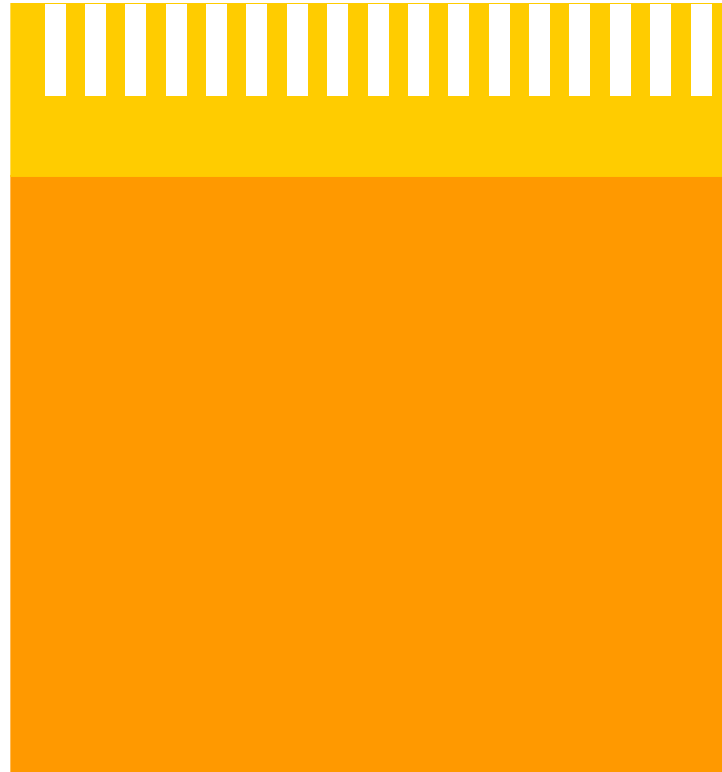
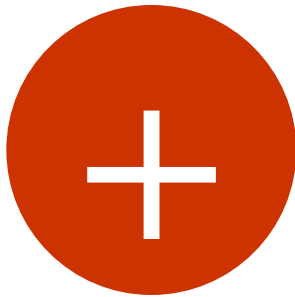
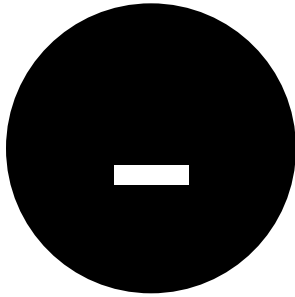
ELECTROFORESIS



CELDA/PILA ELECTROLÍTICA

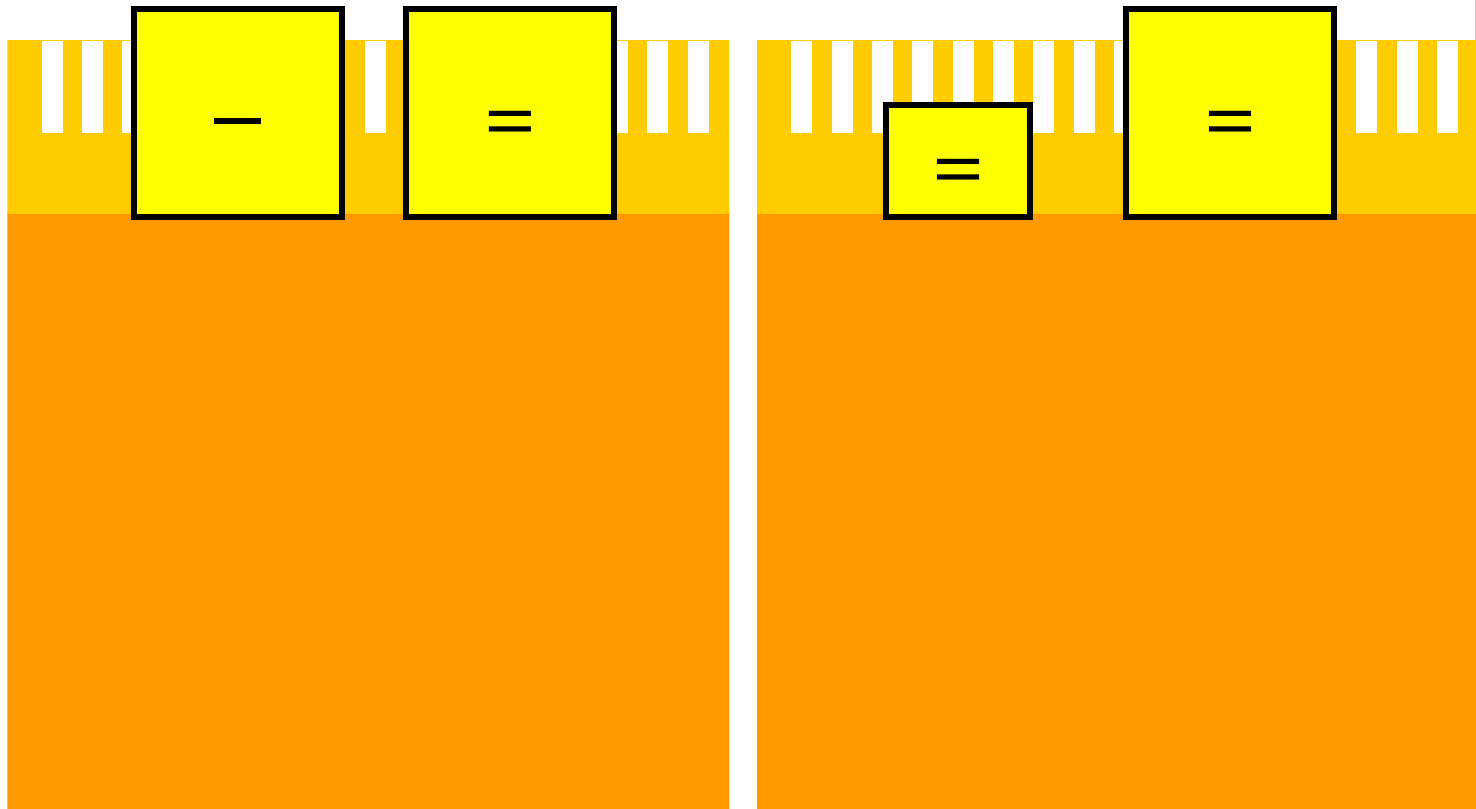
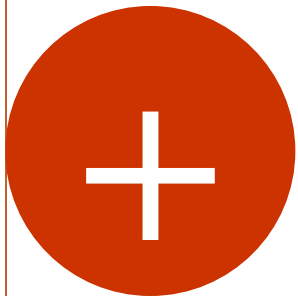
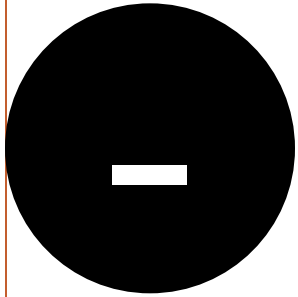
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA: NO DESNATURALIZANTE

AL APLICAR UN CAMPO
ELÉCTRICO LAS
PROTEÍNAS MIGRARÁN



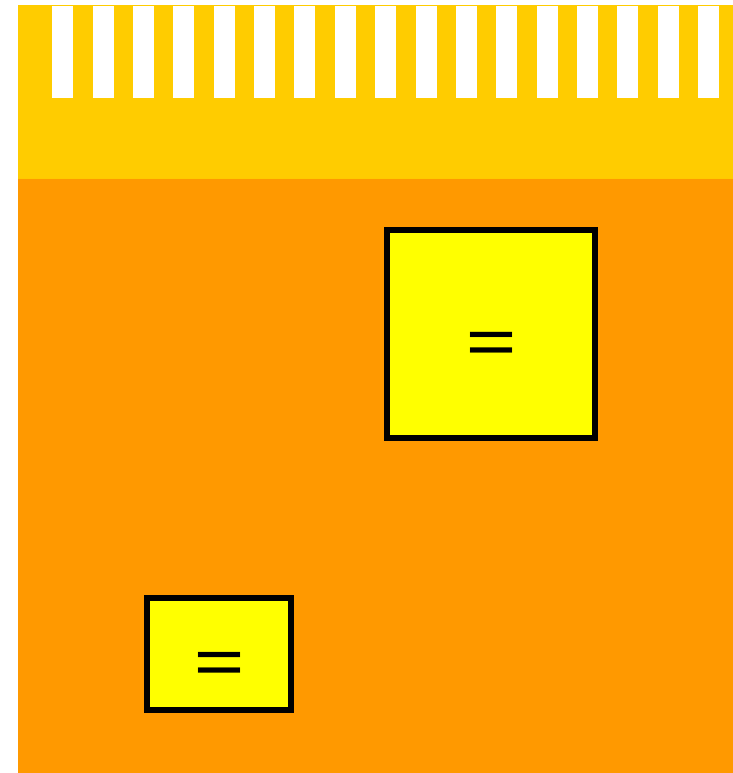
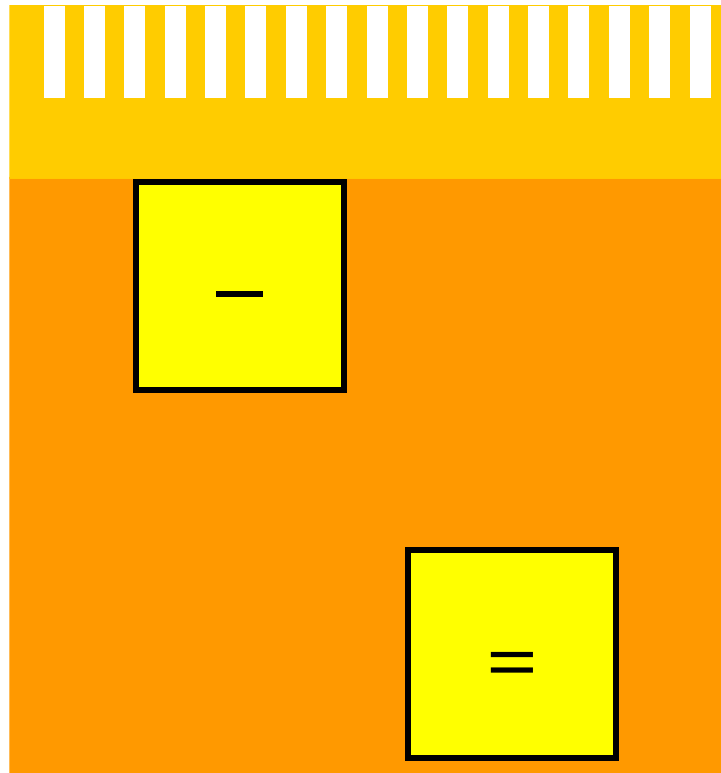
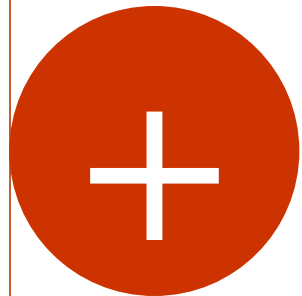
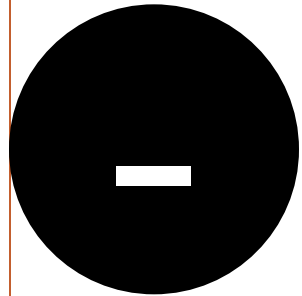
ÁNODO

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA: NO DESNATURALIZANTE

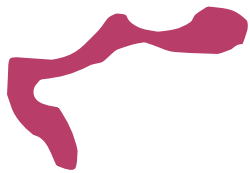


ÁNODO

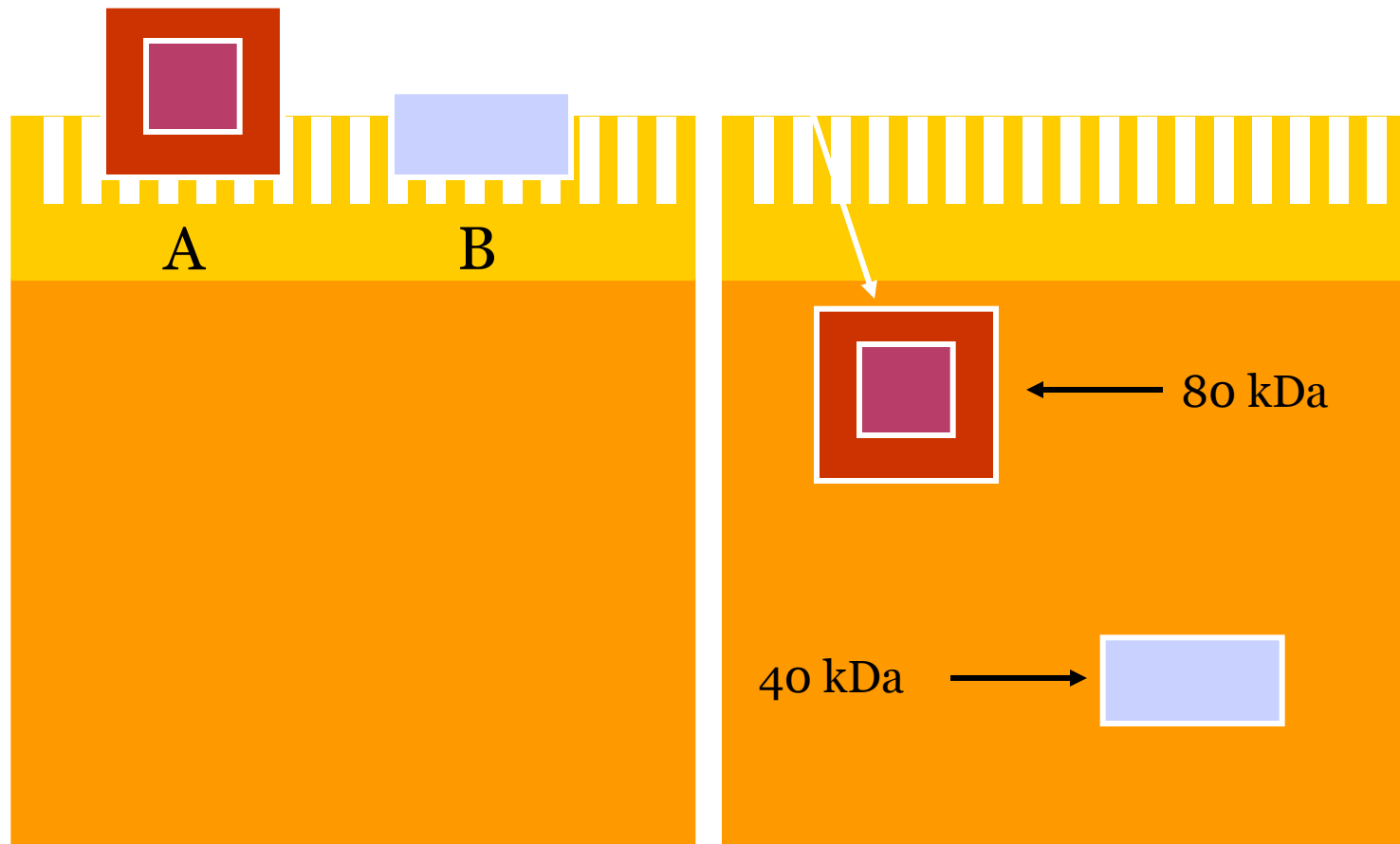
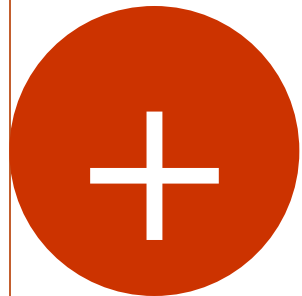
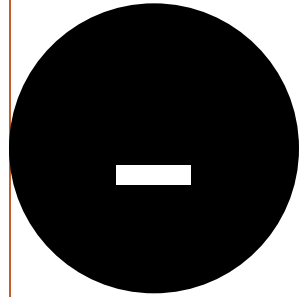
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA: NO DESNATURALIZANTE



ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA: NO DESNATURALIZANTE



ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA: NO DESNATURALIZANTE



ÁNODO

SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA NO DESNATURALIZANTE

Ventajas

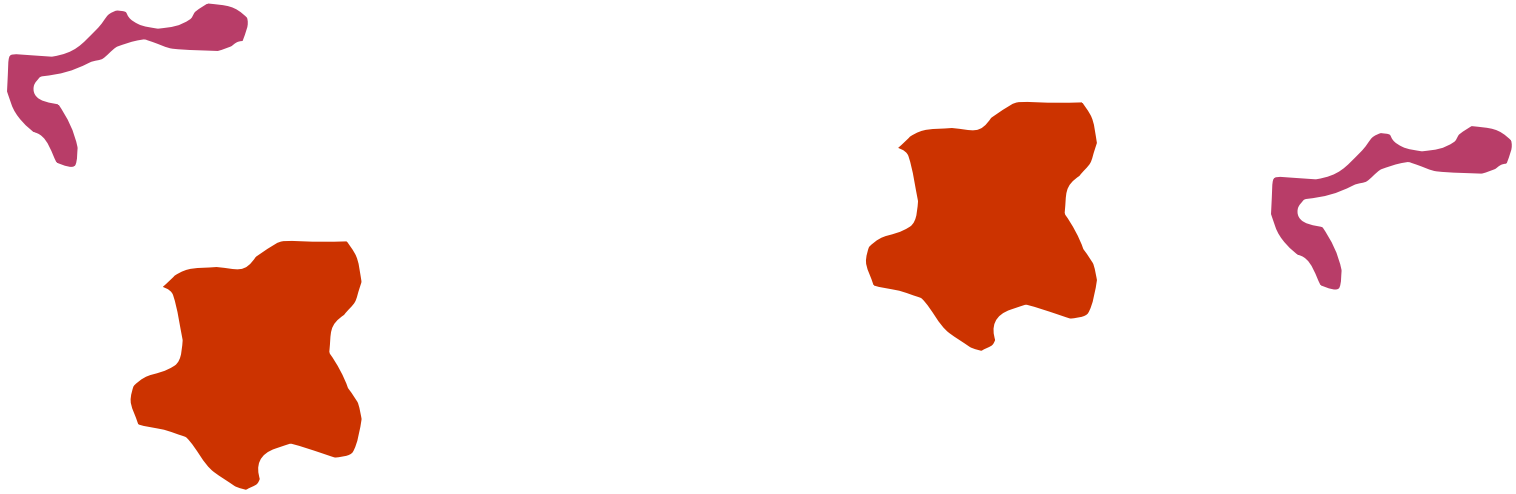
- Separa proteínas en estado nativo
- Las proteínas siguen siendo funcionales
- Permite separar complejos proteicos
O proteínas multiméricas como una unidad

Inconvenientes

- Muchas proteínas no migran por no tener carga neta o por poseer carga neta positiva
- El proceso de separación es muy lento debido a la debilidad de la carga neta de las proteínas
- El proceso de separación no sólo está afectado por el tamaño sino también por la forma de la proteína

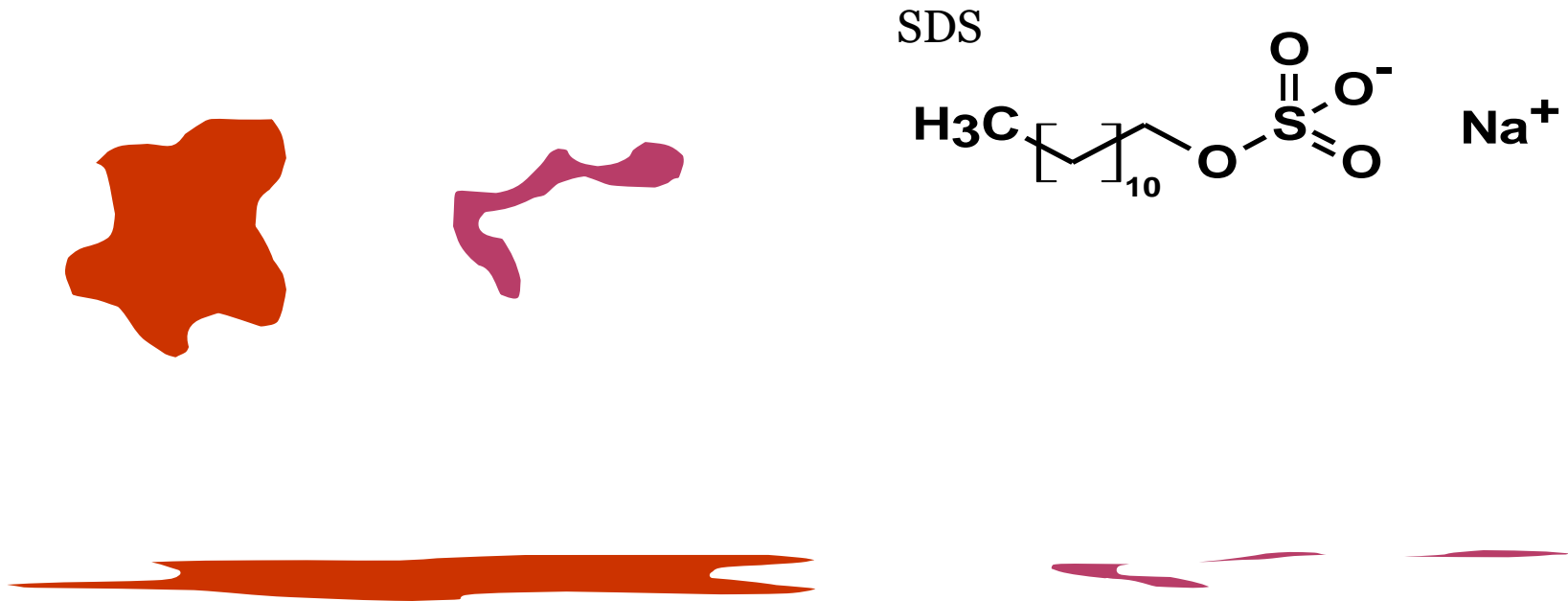
SDS-PAGE

PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

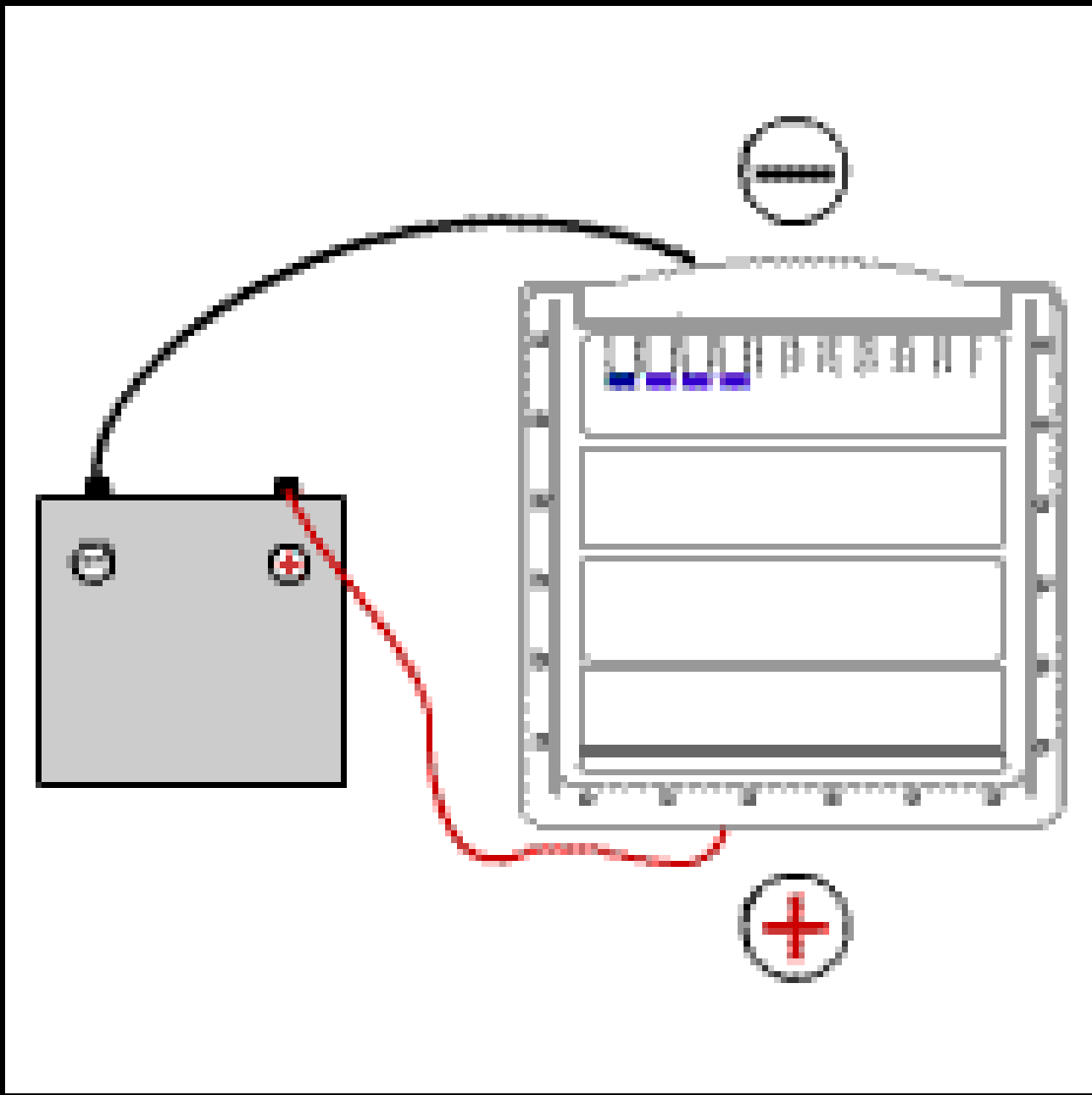


SDS-PAGE

PolyAcrylamide Gel Electrophoresis



La cantidad de SDS unido a la proteína es proporcional a su tamaño, de tal forma que la relación carga/tamaño entre todas las proteínas va a ser aprox. la misma

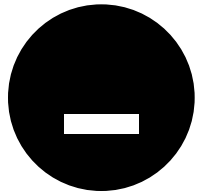


SDS-PAGE

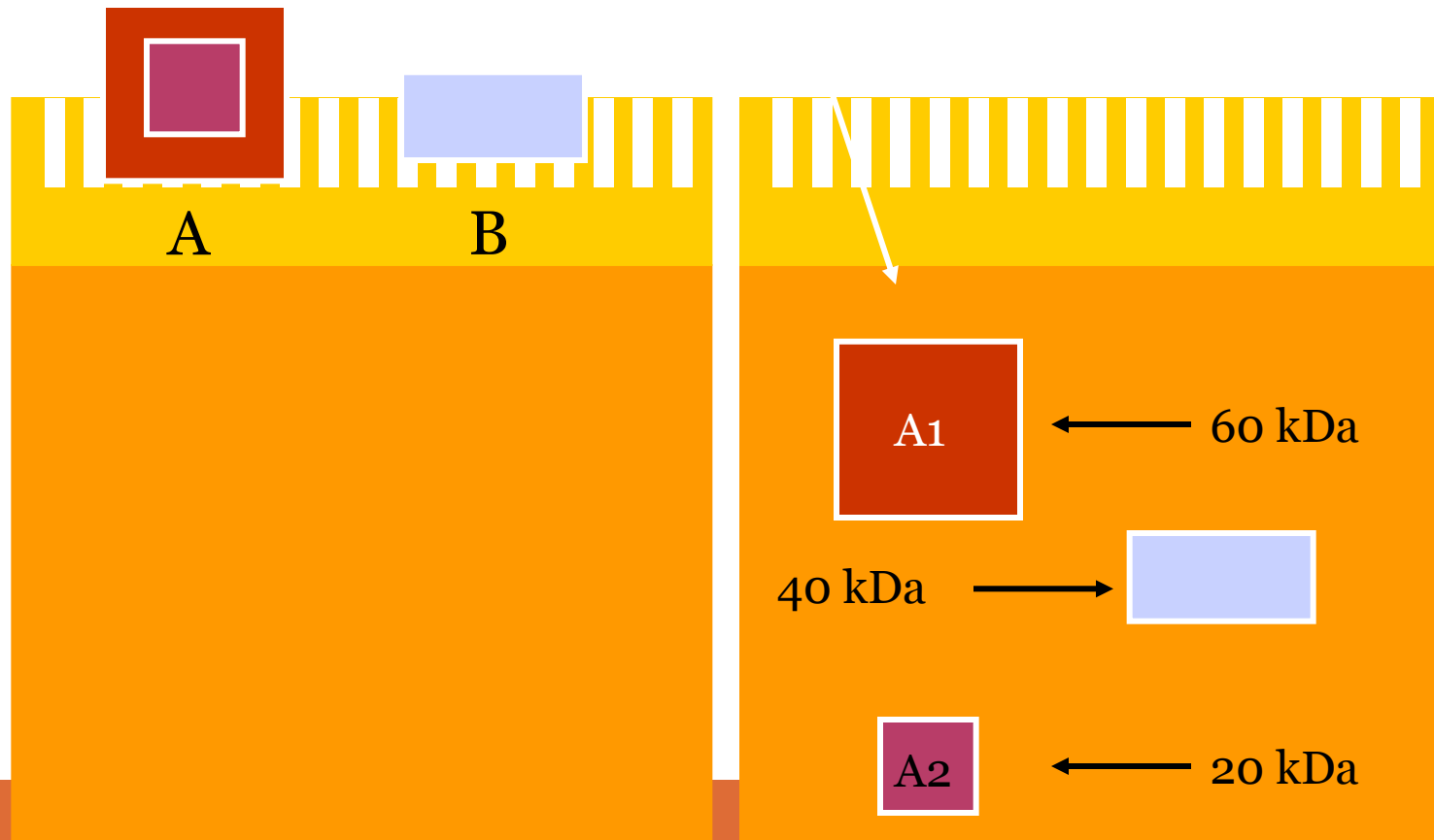
PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

LAS PROTEÍNAS SE SEPARAN POR:

- TAMAÑO



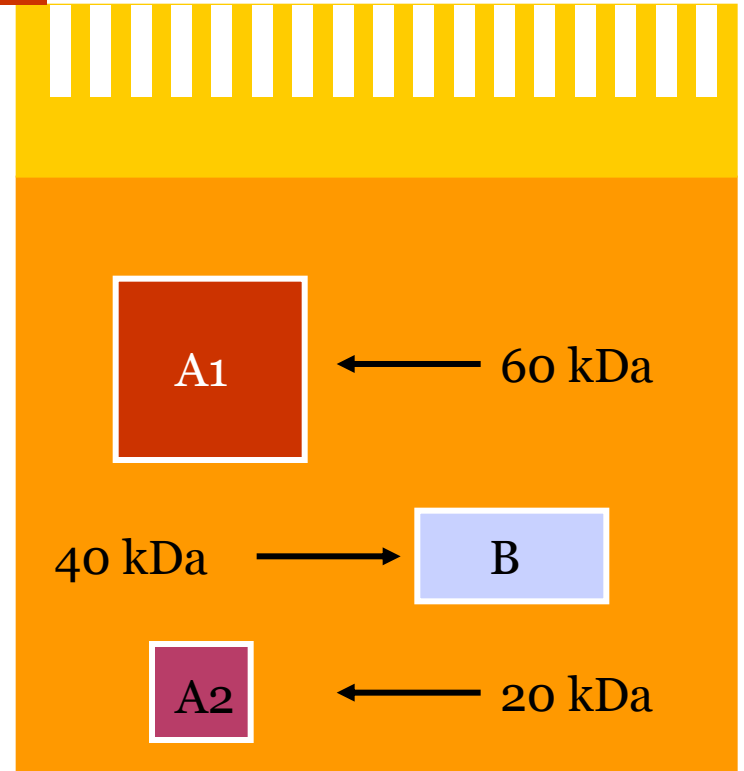
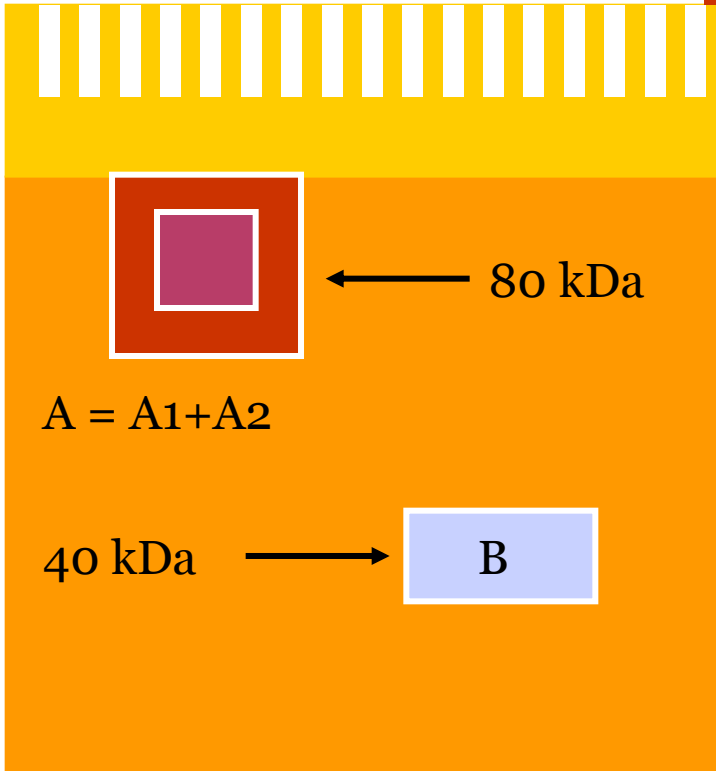
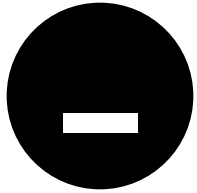
ÁNODO



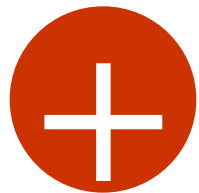
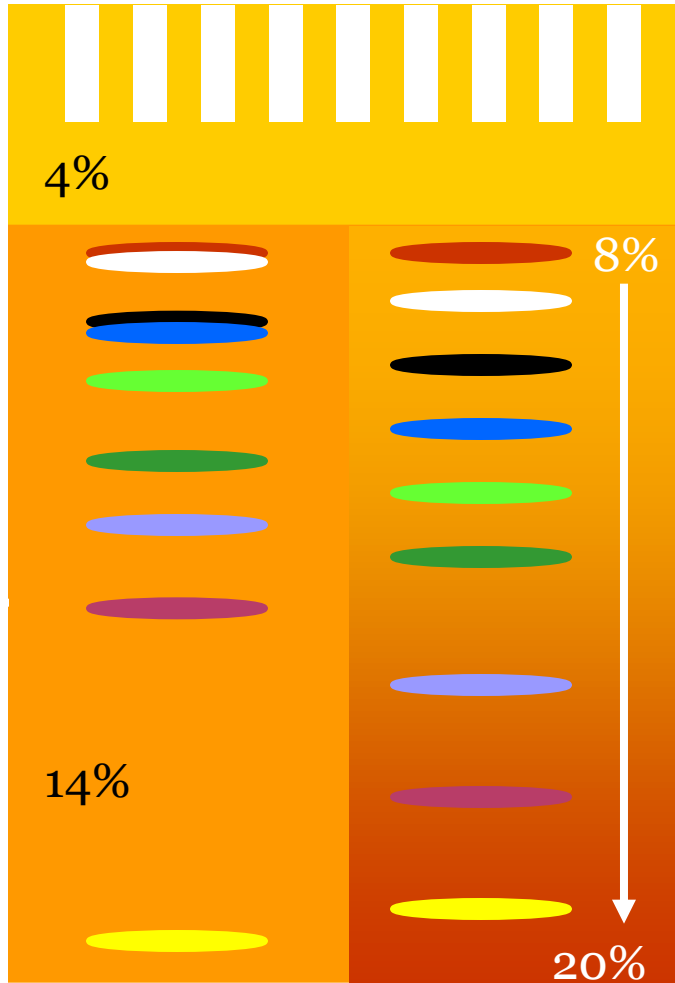
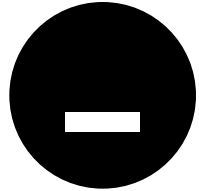
NO DESNATURALIZANTE

SDS-PAGE
(DESNATURALIZANTE)

vs.



El uso de gradientes de concentración de poliacrilamida permite una mayor resolución en un rango de peso moleculares más amplio



Para que se separen las proteínas de alto peso molecular, debemos prolongar el tiempo de electroforesis. Pero en ese caso se perderían aquellas de menor tamaño

SDS-PAGE

PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

Ventajas

- Separación rápida de las proteínas
- La separación no depende de la forma de la proteína
Nativa
- Se puede estimar el peso molecular de las proteínas
- Aunque desnaturalizadas, las proteínas pueden usarse
PARA LA FABRICACIÓN DE ANTICUERPOS (en la mayoría de los casos)

Inconvenientes

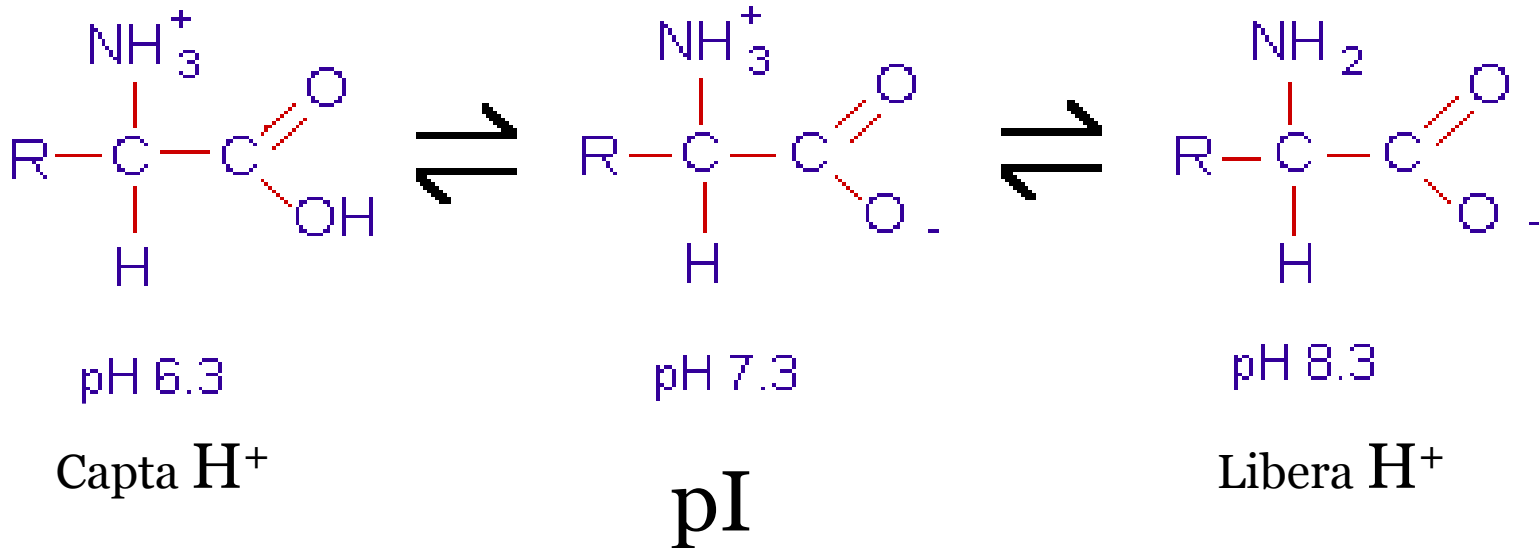
- Las proteínas separadas están desnaturalizadas
 - No son funcionales

ISOELECTROENFOQUE

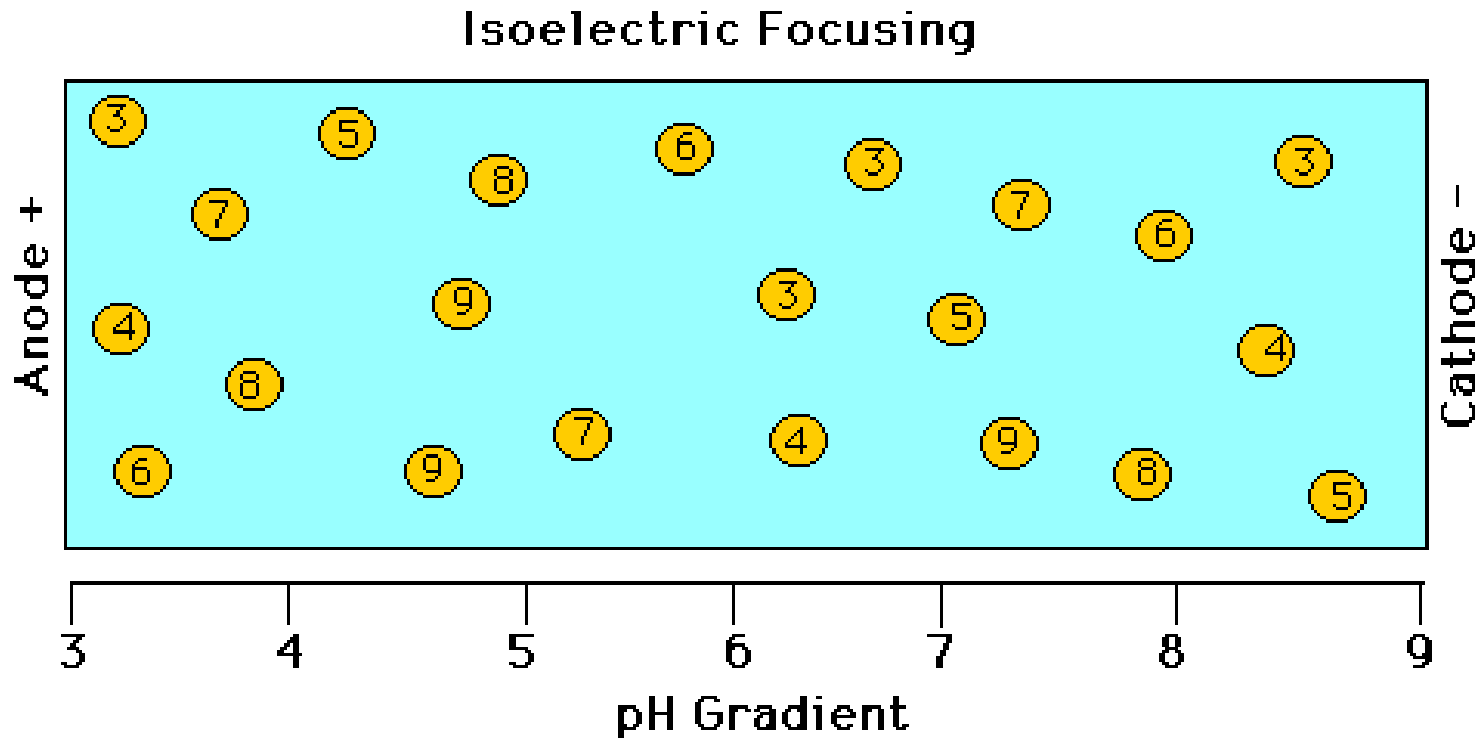
LAS PROTEÍNAS SE SEPARAN POR:

- PUNTO ISOELÉCTRICO

Carga de los aminoácidos y proteínas con los cambios de pH



ISOELECTROENFOQUE



EL GEL DE POLIACRILAMIDA CONTIENE UNAS MOLÉCULAS DENOMINADAS ANFOLITOS QUE CREAN UN GRADIENTE DE pH

ISOELECTROENFOQUE

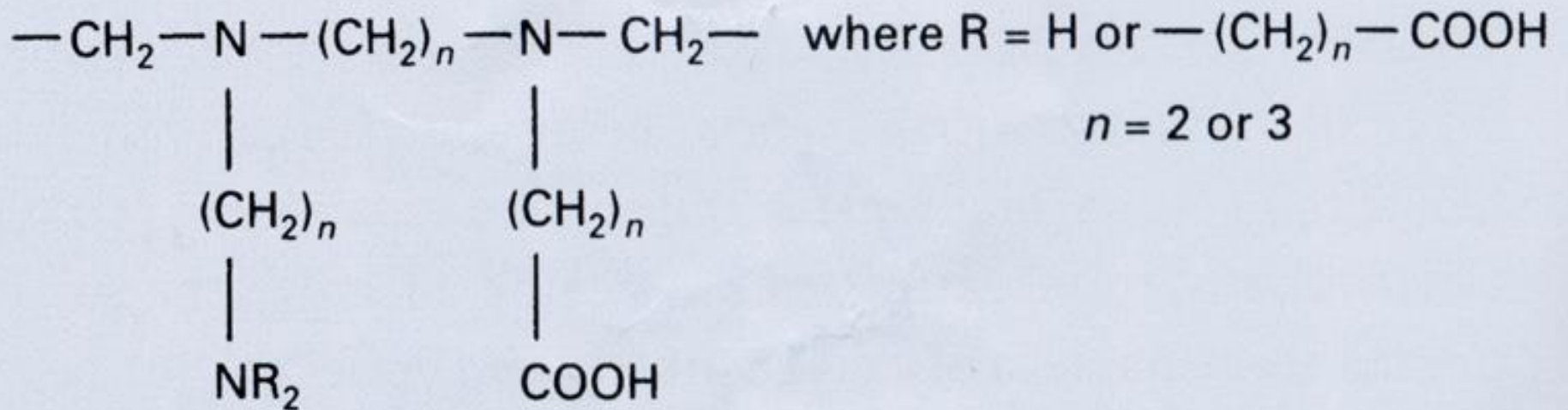
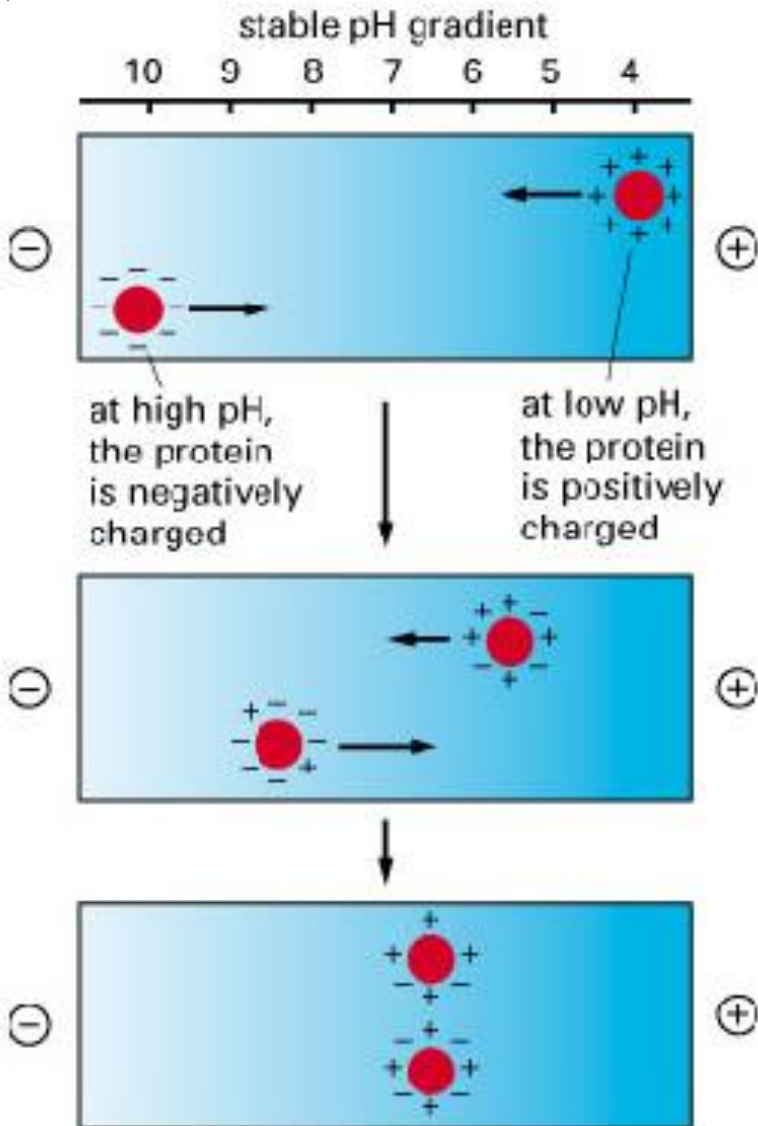


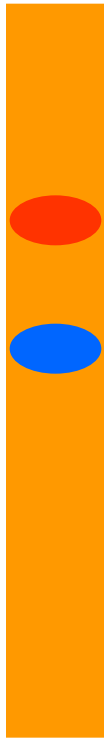
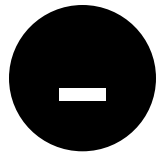
Fig. 12.7. The general formula for ampholytes.

ISOELECTROFOCUS

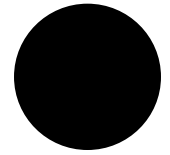
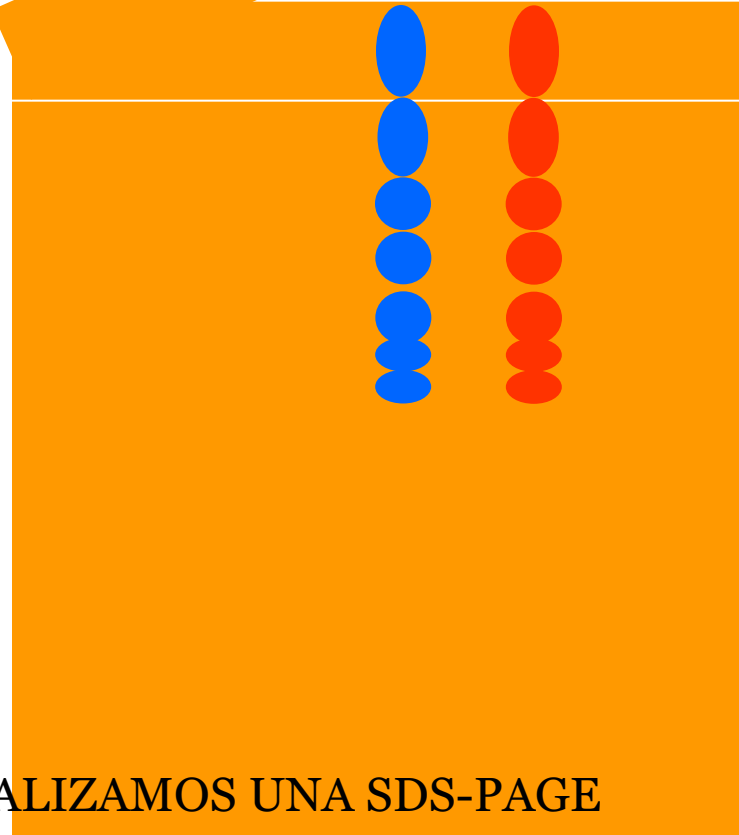
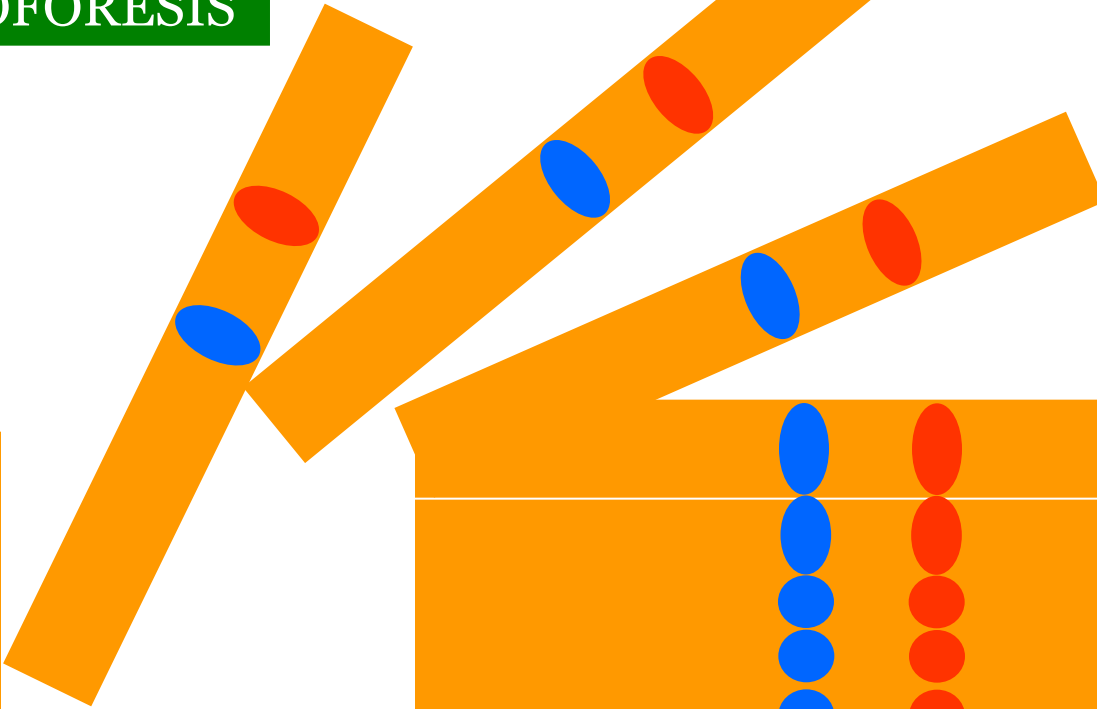


The protein shown here has an isoelectric pH of 6.5.

2D-ELECTROFORESIS



MUY MALA SUERTE
TENEMOS
QUE TENER PARA
ENCONTRARNOS
DOS PROTEÍNAS
DISTINTAS
CON IGUAL pI E
IGUAL PESO
MOLECULAR



CÁTODO



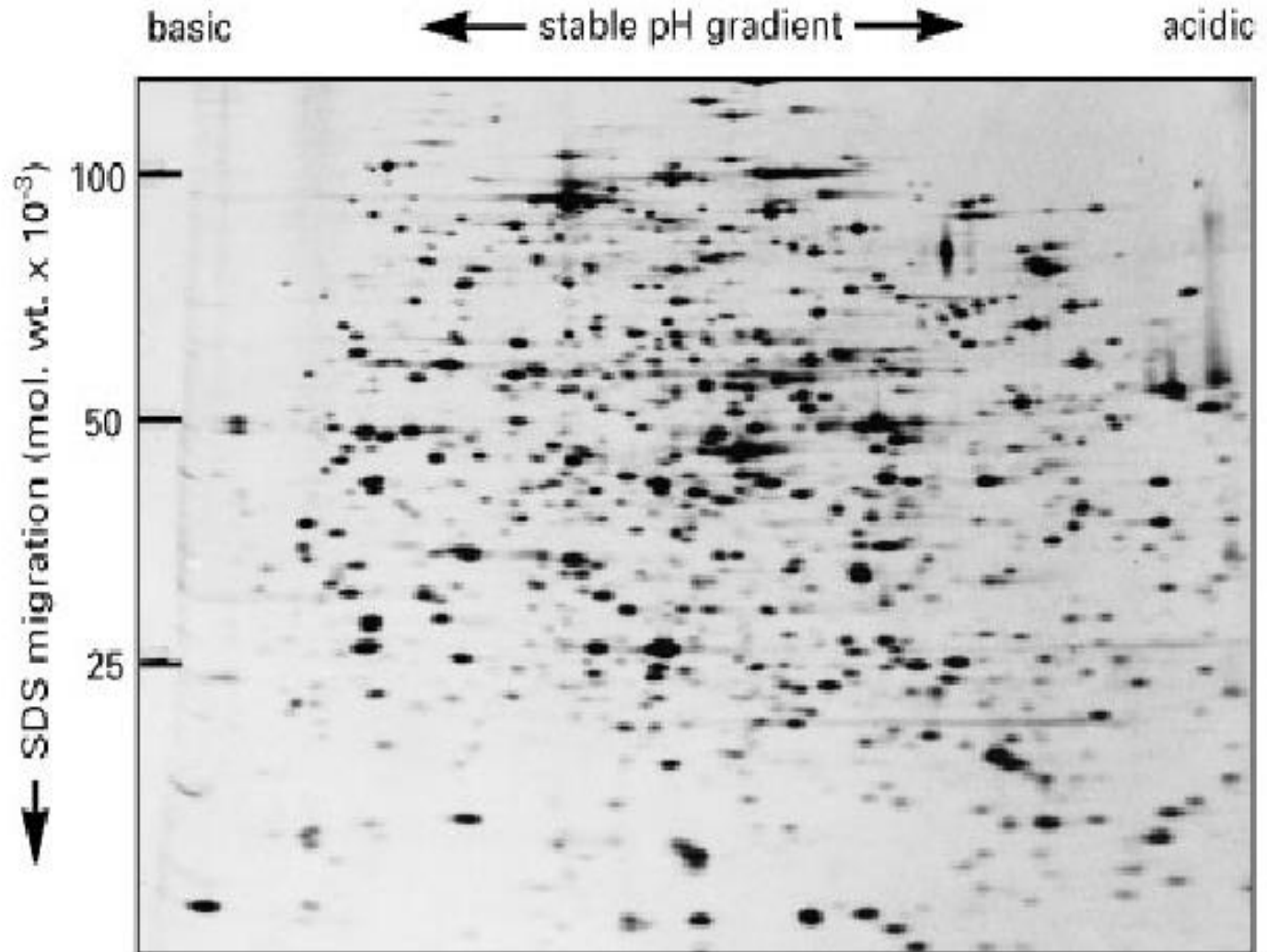
ÁNODO

2. REALIZAMOS UNA SDS-PAGE

2D-ELECTROFORESIS

UNA DE LAS HERRAMIENTAS FUNDAMENTALES EN PROTEÓMICA

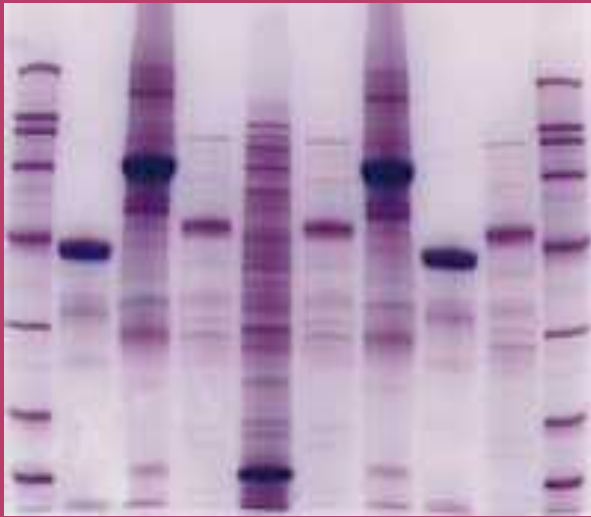
All the proteins in an *E. coli* bacterial cell are separated in this 2-D gel, in which each spot corresponds to a different polypeptide chain. They are separated according to their isoelectric point from left to right and to their molecular weight from top to bottom. (Courtesy of Patrick O'Farrell.)



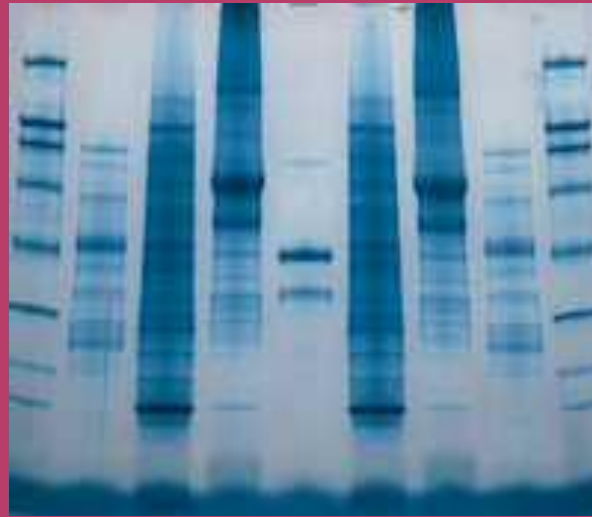
VISUALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SEPARADAS EN LA ELECTROFORESIS

- Tinción con COOMASSIE BLUE
- Tinción de PLATA
- Tinción con otros metales (COBRE, ZINC)
- Tinción con FLUOROCROMOS
- WESTERN-BLOTTING e INMUNOTINCIÓN

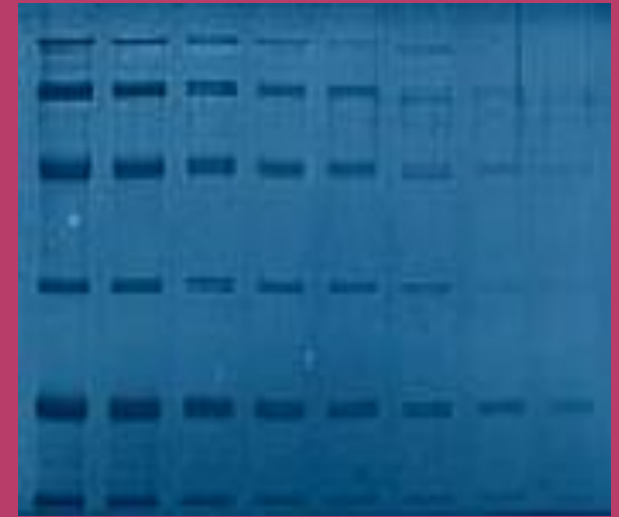
Coomassie Blue



Tinción de Zinc



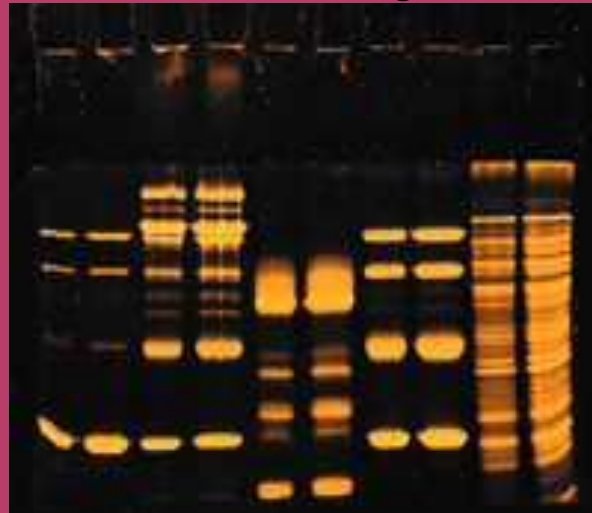
Tinción de Cobre



Tinción de Plata



Tinción con Fluorocromo
(SYPRO Orange)



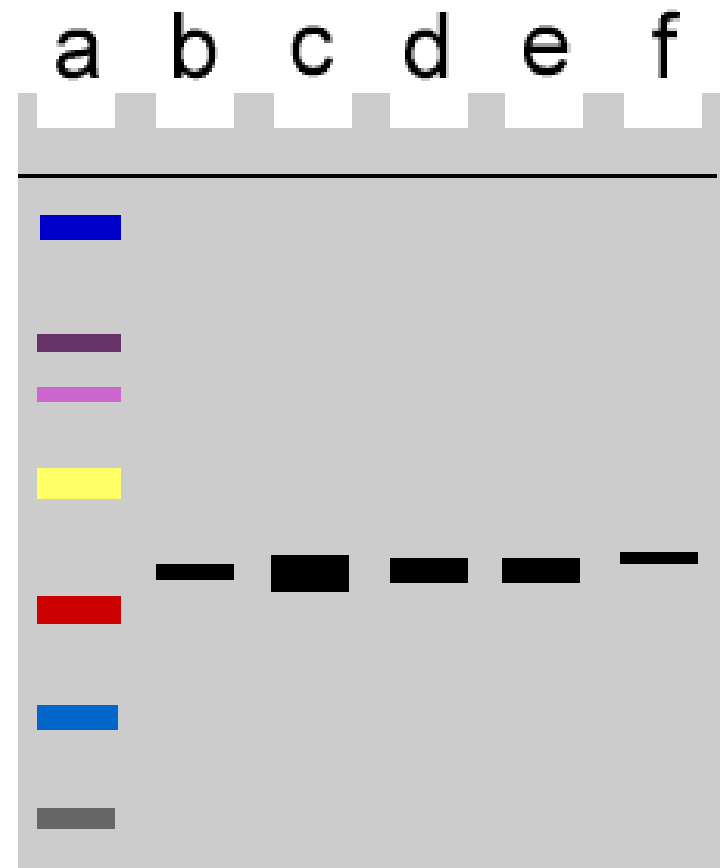
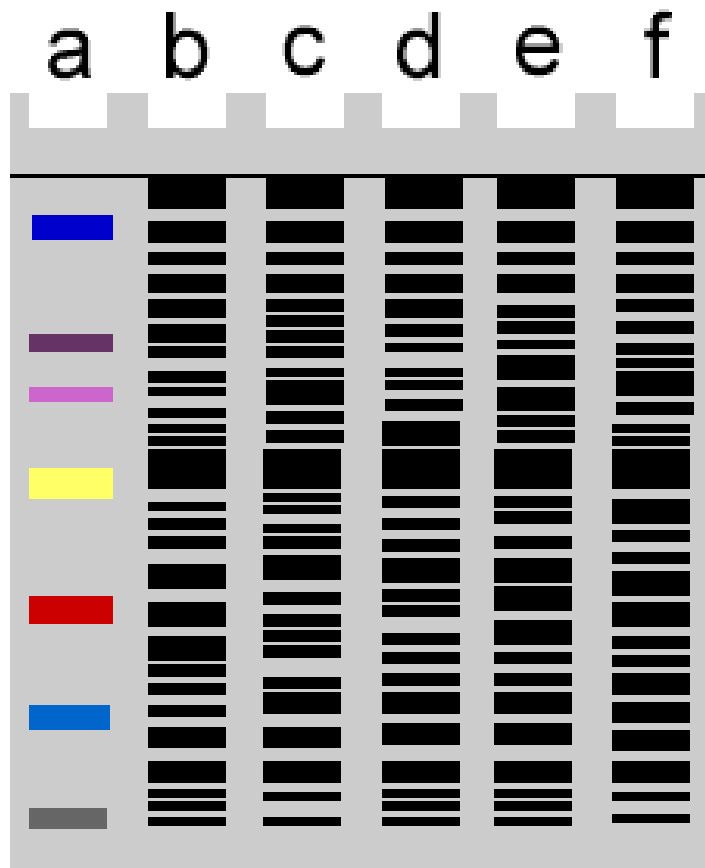
**ESTAS TINCIONES
TIENEN LUGAR
SOBRE EL PROPIO
GEL**

COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS DE TINCIÓN

Detection limits (ng/mm²)

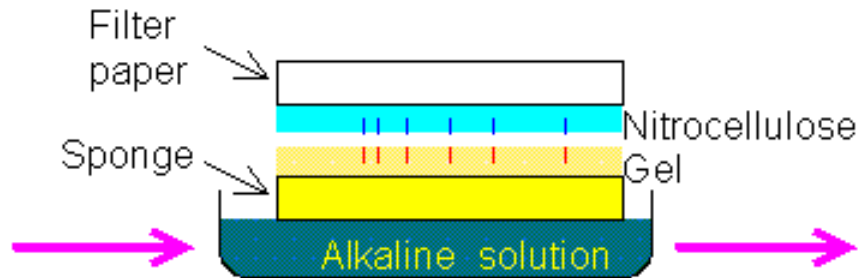
	Coomassie blue	Copper chloride	Silver stain
Phosphorylase B	11	3	4
BSA	11	3	4
Ovalbumin	12	3	5
Lysozyme	9	2	4

	Sensitivity in ng	Number of steps	Time (min)	Comments
Coomassie blue	40	2	30-60	Simple, fast and consistent
Silver stain	10	7	60-90	highly sensitive , stains all types of proteins (glyco-, lipo-) and nucleic acids
Copper stain	9	3	10	Simple, fast, reversible , subsequent elution or blotting possible



WESTERN-BLOTTING

Gel electrophoresis



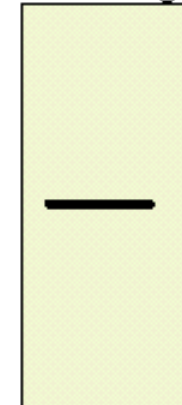
Nitrocellulose filter



Hybridize with probe



Autoradiogram



1-TRANSFERENCIA

2-INMUNODETECCION

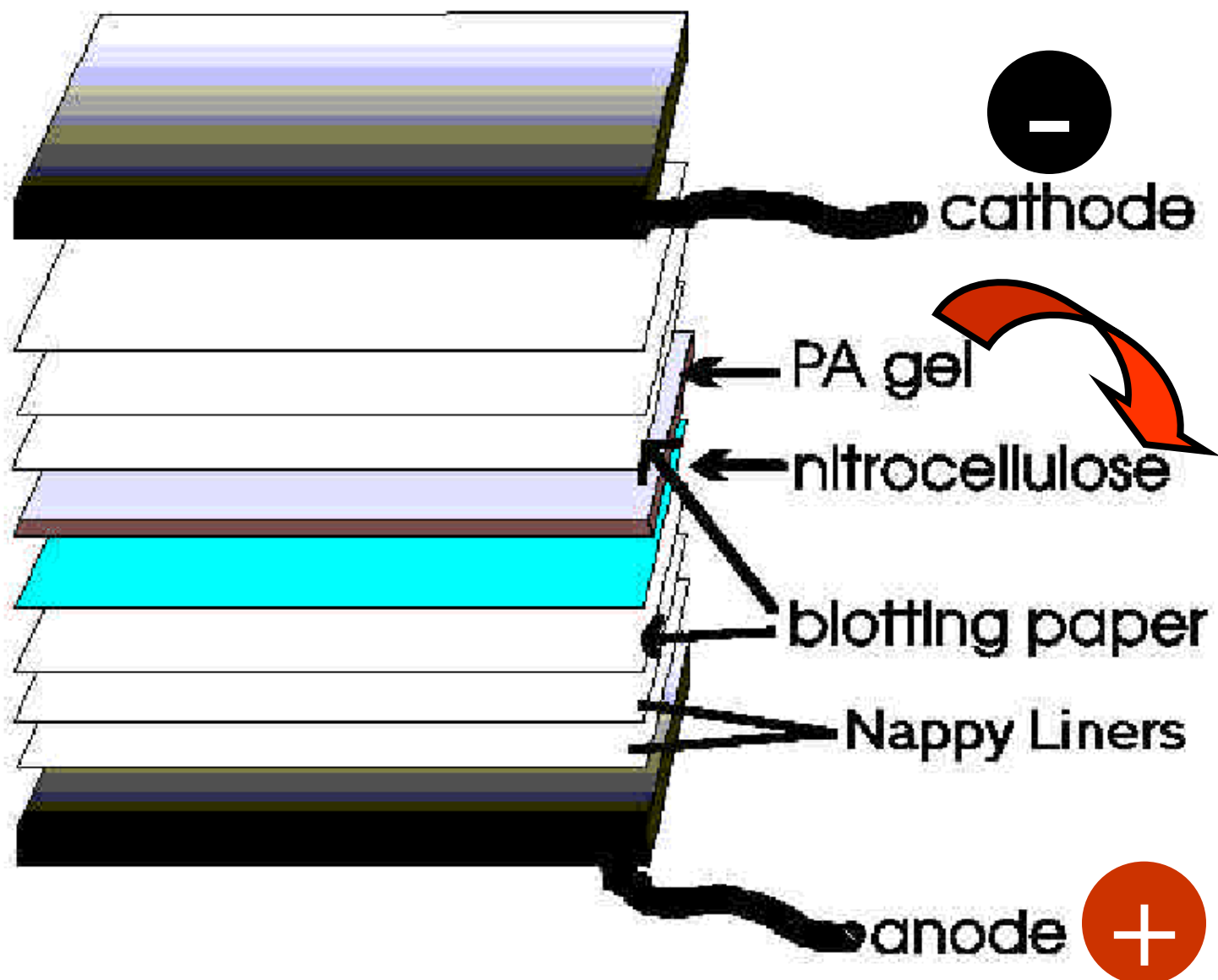
WESTERN-BLOTTING

Mediante un proceso de ELECTROTRANSFERENCIA podemos

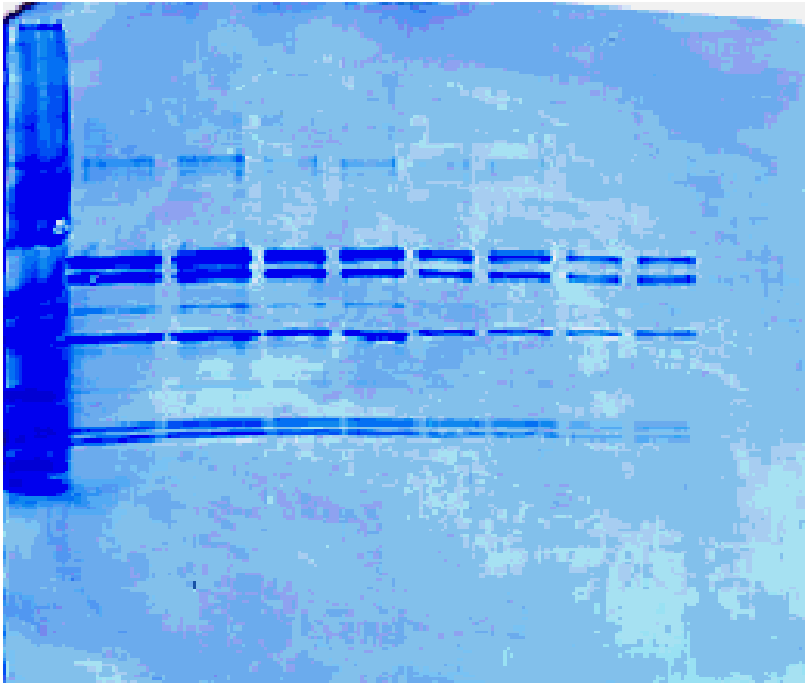
Pasar las proteínas del gel a otro soporte más conveniente

Como por ejemplo pvdf (polyvinylidene fluoride) , membrana de nitrocelulosa. En este soporte se conservan nuestros resultados mejor y por más tiempo

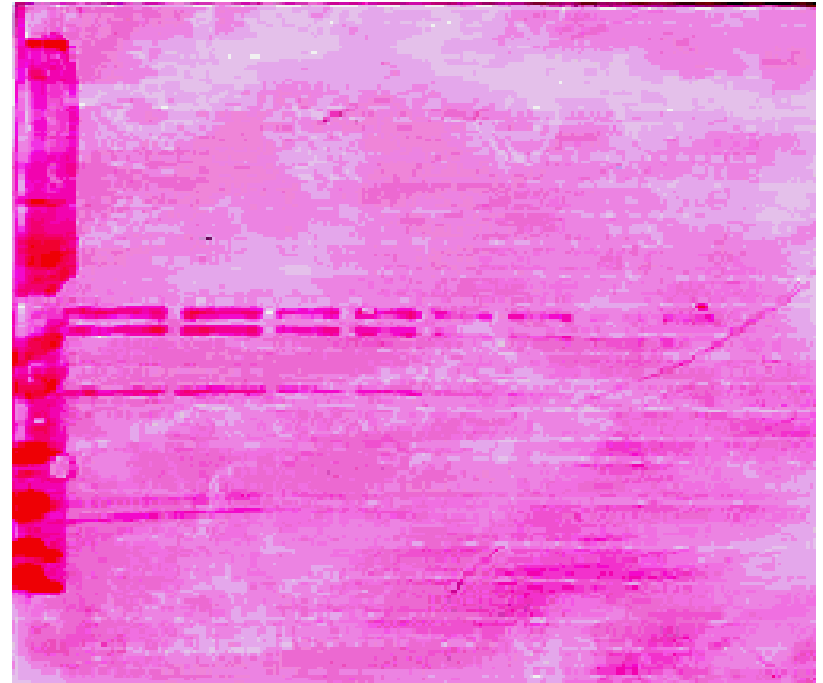
Además permite desarrollar sobre él Técnicas de inmunodetección



WESTERN-BLOTTING



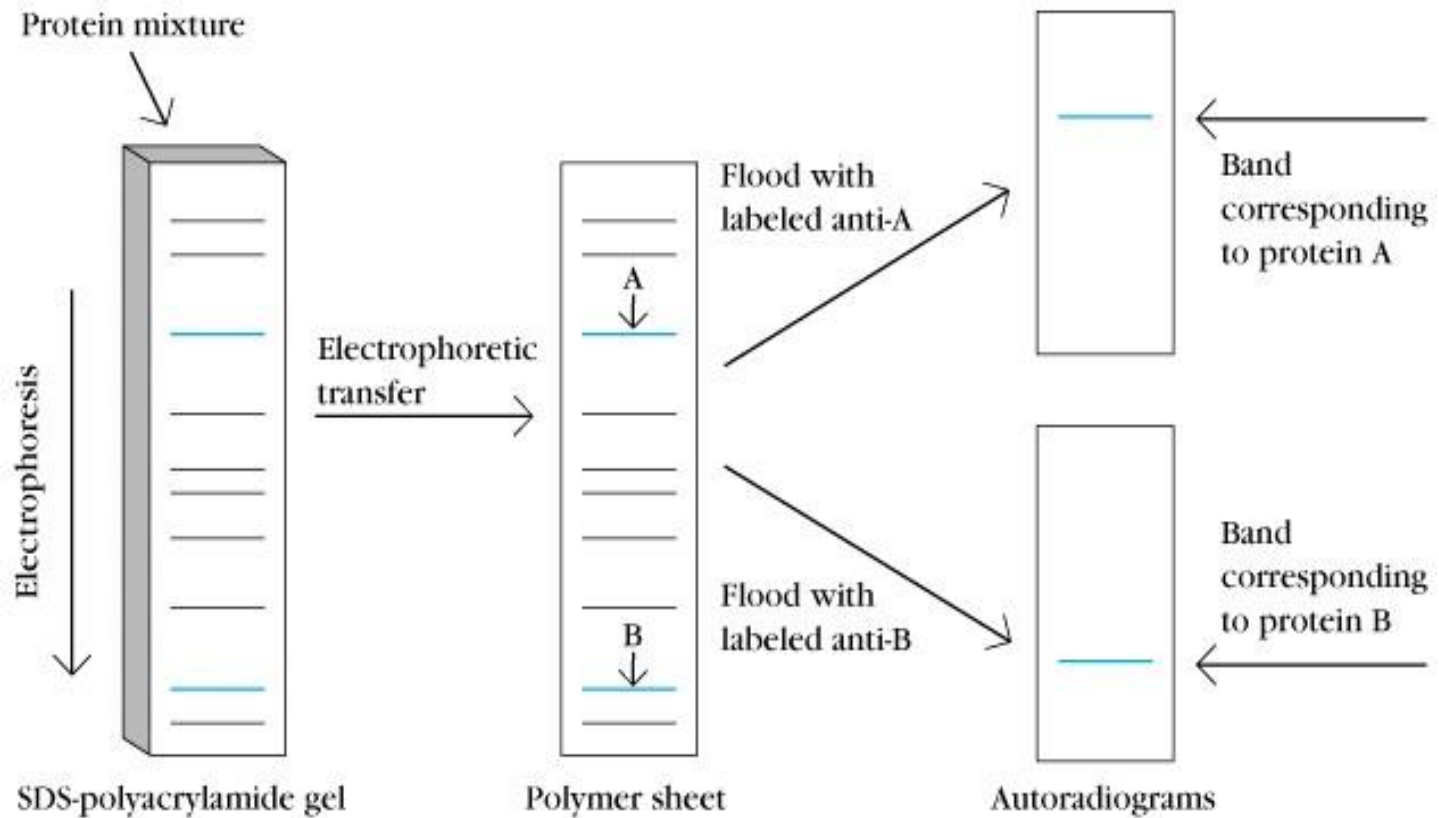
Coomassie Blue
(en Gel)



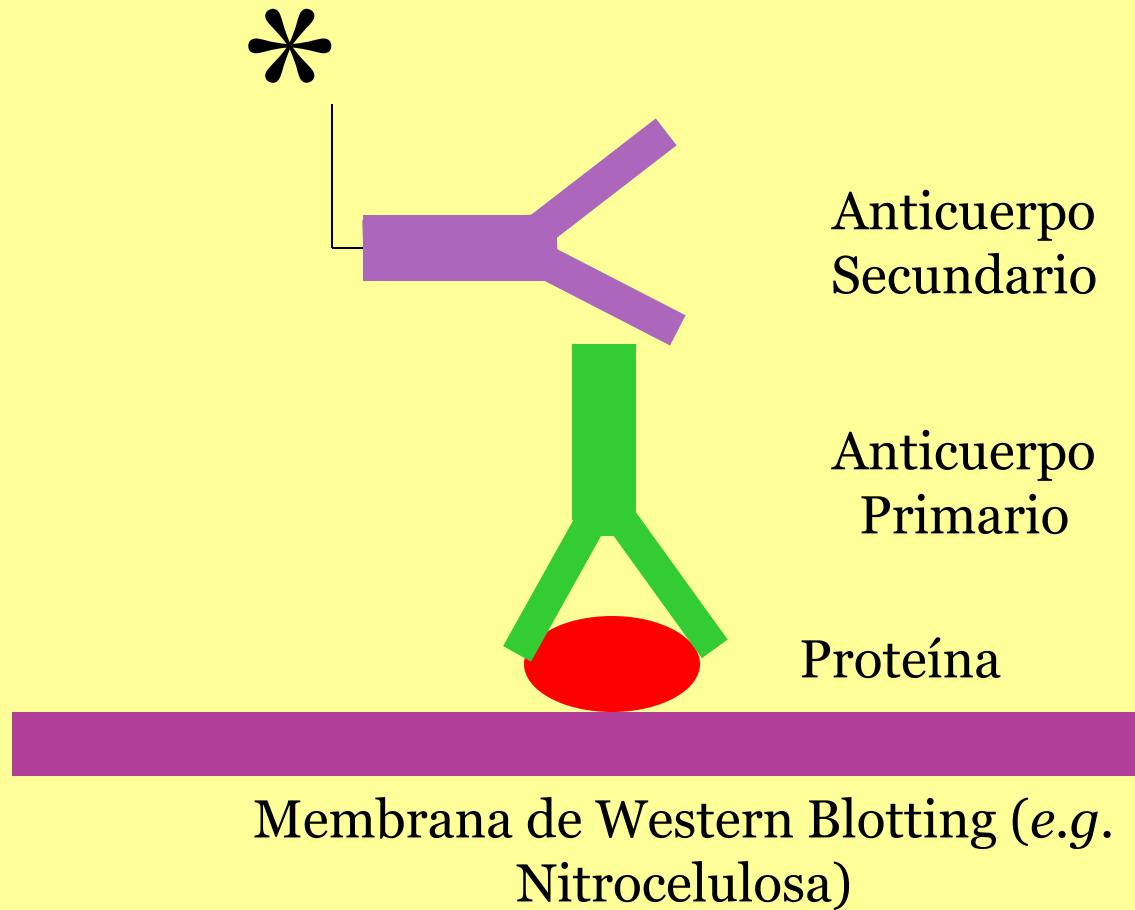
Rojo Ponceau
(en Membrana de Nitrocelulosa)

WESTERN-BLOTTING

Para la detección de una determinada proteína se utiliza
el método de la INMUNODETECCIÓN



WESTERN-BLOTTING



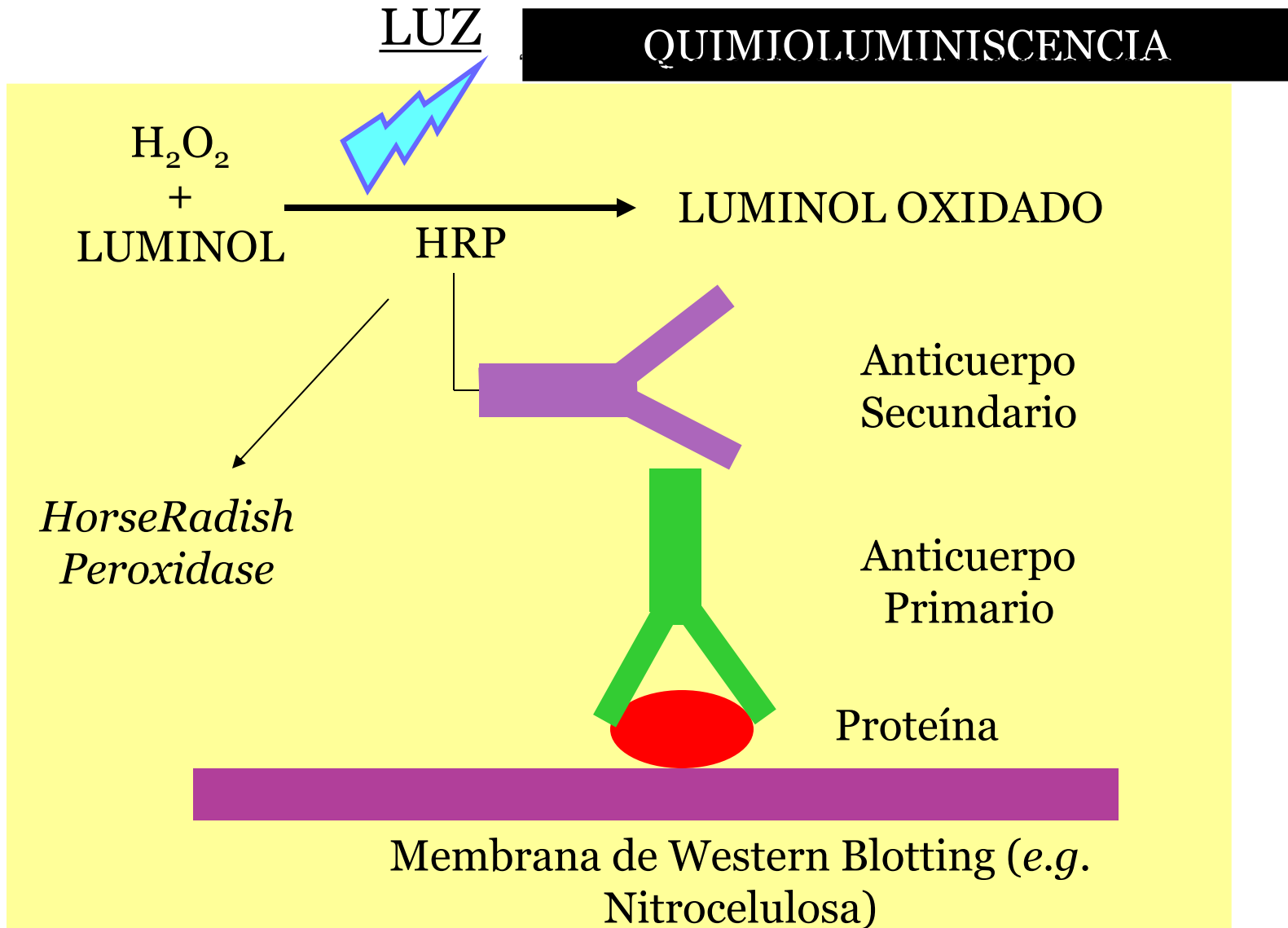
WESTERN-BLOTTING

Dependiendo del tipo de marcado que posea el

Anticuerpo Secundario, el revelado puede realizarse mediante:

- AUTORRADIOGRAFÍA
- PRECIPITACIÓN DE UN CROMÓGENO INSOLUBLE POR LA ACCIÓN DE UNA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
- FLUORESCENCIA
- QUIMIOLUMINISCENCIA

WESTERN-BLOTTING



WESTERN-BLOTTING

PONCEAU

M WT

M WT

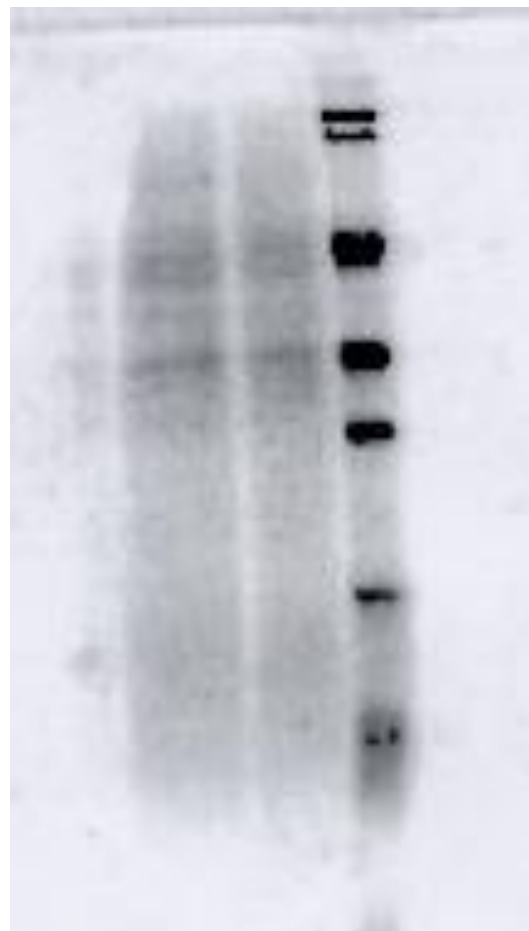
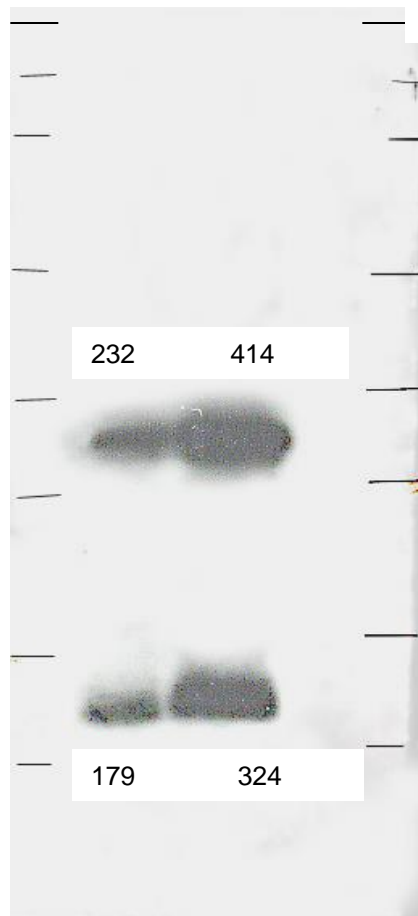
214000
118000
92000
52000
35700
28900
21800
6800

Porina

Citocromo c

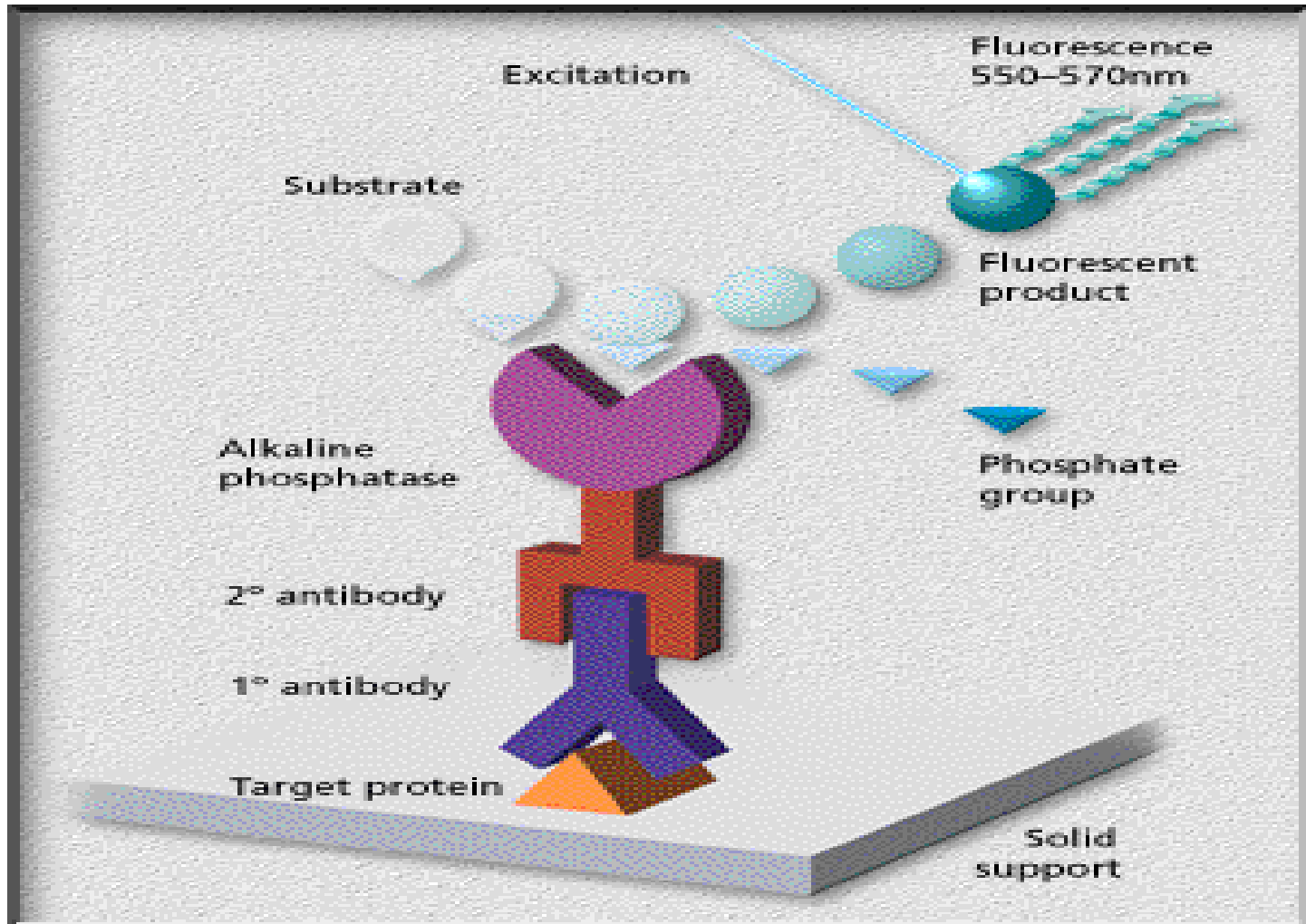
232 414

179 324



WESTERN-BLOTTING

FLUORESCENCIA



WESTERN-BLOTTING

En vez de un sustrato fluorescente podemos utilizar un sustrato que da lugar a un precipitado en la membrana de Western Blotting

Como sustrato tenemos:

*p*NPP: *p*-nitrophenyl phosphate

BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

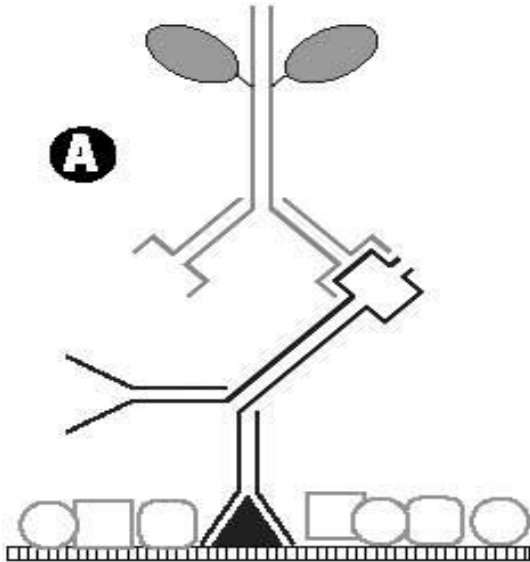
La actividad enzimática comúnmente utilizada para catalizar estas reacciones es la FOSFATASA ALCALINA

AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL: ABC (Avidin-Biotin Complex)

A. DETECCIÓN BÁSICA

El sistema de detección está directamente conjugado al anticuerpo secundario (o a proteínas A o G).

Los sistemas de detección son los ya vistos anteriormente (HRP, fosfatasa alcalina, fluorocromos, oro coloidal y radioisótopos)



B. DETECCIÓN AMPLIFICADA

Un pequeño ligando o antígeno, como la BIOTINA, está conjugado al anticuerpo secundario.

El sistema de detección terciario consiste en un componente (AVIDINA) que se une específicamente a la biotina, y en múltiples sistemas de detección como los ya vistos.

La amplificación también se da porque la avidina se une a múltiples sitios en el anticuerpo 2^{ario} .

