

Prácticas de Metodología

Y

Bioquímica estructural

• *Cromatografía de cambio ionico*

Se basa en el proceso de intercambio de iones, en disolución, de la misma naturaleza, sobre una matriz o resina cargada con iones de signo contrario. El intercambio puede ser entre aniones o entre cationes, dando nombre a las resinas que promueven uno y otro proceso. Las fuerzas que actúan son de tipo electrostático y, por tanto, la preferencia de la resina por el contraión (aquel de la misma naturaleza, signo, que el inicial que rodeaba las cargas de la matriz), será la base para la separación diferencial.

Las dos tipos de resinas pueden ser débiles o fuertes dependiendo del equilibrio de disociación de los grupos unidos covalentemente a las mismas, como se muestra en la tabla.

	FUERTES	DÉBILES
CATIÓNICOS	$\text{SO}_3^* \text{H}^+$	$\text{COO}^* \text{H}^+$
ANIÓNICOS	$+\text{NH}_3^*(\text{CH}_3) \text{X}^*$	$\text{NH}_3 \text{X}^*$
Iones a intercambiar. Fijado covalentemente		

La gran utilidad de esta técnica es el poder separar compuestos cargados selectivamente, dependiendo de la naturaleza de los mismos en distintas condiciones (pH, fuerza iónica, tamaño, posición de los grupos cargados, temperatura).

La cromatografía de intercambio ionico se realiza en dos partes:

- **Retención estable de los componentes a separar por parte de la resina.** Hay que añadir la muestra a la columna, de modo que la muestra presente más o menos las mismas probabilidades de quedar retenida en la columna.
- **Cambio selectivo de las condiciones del medio.** Con lo que eluirán los componentes de forma diferencial.

1.1.Separación de la muestra

Una de las mayores utilidades que se le dan a este tipo de cromatografía es la separación de aminoácidos. Esta separación se basa en las propiedades de estas moléculas, sobre todo en que son anfipáticos, lo que implica que presentan diferente carga a valores de pH diferentes.

Los tres tipos de aminoácidos son los reflejados arriba, de los cuales exponemos sus equilibrios de disociación, haciendo hincapié en la carga que flanquea a cada uno de ellos. En este tipo de cromatografía utilizaremos el equilibrio entre la forma cargada +1 y la neutra o *zwitterion* 0, de modo que en el paso que definimos antes como 1 todos estarían cargados positivamente, y por lo tanto a un pH inferior al menor de los puntos isoeléctricos (pI) de los aminoácidos de la muestra. Recordemos que el pI es aquel pH para el cual la molécula (aminoácido o proteína) se encuentra en toda su concentración con carga **net**a 0. Al estar en un principio cargados positivamente todos quedarán retenidos por la resina (utilizaremos una resina intercambiadora de cationes). En el paso dos iremos variando el pH, de modo, que se vaya acercando a los pI de los aminoácidos, y como éstos son distintos irán eluyendo a diferentes pH, lo que implica que podremos recogerlos en distintas fracciones.

En éste experimento contamos con una muestra a separar compuesta por un azúcar y dos aminoácidos con pI distintos. Las variaciones del medio, las realizaremos con tampones citrato a distinto pH y finalmente con hidróxido sódico (NaOH). Se irán recogiendo fracciones y analizando para localizar, en primer lugar la salida del azúcar, con carga 0 y, por tanto, no retenido por la resina en el paso 1. Para ello utilizaremos el ensayo con licor de Fehling. Para la detección de los aminoácidos a distintos pH utilizaremos la ninhidrina.

Material

- Resina Dowex 50
- Tampón citrato 50 mM, pH = 3
- Tampón citrato 50 mM. pH = 5
- Solución de ninhidrina (0,2 % p/v) de ninhidrina en 95 % de etanol)
- Papel indicador de pH
- NaOH 2M
- HCl 2M

Mezcla problema

Mezclar 0,5 ml de glucosa 4 %, 1ml de lisina 2% y 1 ml de aspártico 2%. Todas estas sustancias se disuelven inicialmente en HCl 0,1 M. Añadir 2,5 ml de tampón citrato 50 mM (pH = 3), con lo que finalmente tendremos un volumen de 5 ml. Utilizar 0,25 ml de la muestra por columna.

Preparación de la columna

- Pesar 7 g de resina Dowex 50 y disolverla en 25 ml de ClH 2M. agitar y dejar decantar.
- Retirar la fase acuosa superior y lavar la resina con 25 ml de H₂O(destilada), tantas veces como sea necesario para que el pH sea igual al del agua (* 6). Obtuvimos unas medidas de:

Lavados	1er	2º	3er	4º
PH medido	* 1	* 2	4 – 5	* 6

- Una vez con el pH del agua añadir 25 ml de NaOH 2M, agitar y dejar decantar.
- Retirar la fase acuosa superior y añadir agua destilada igual que antes, hasta que el pH vuelva a ser el del agua. Las medidas obtenidas fueron:

Lavados	1er	2º	3er	4º	5º
PH medido	* 10	* 9	* 8	* 7 – 8	* 6

- Finalmente resuspender la resina en 25 ml de tampón citrato 50 mM (pH = 3).

Una vez preparada la resina (se trataba de limpiarla de posibles contaminantes de anteriores experimentos y de calibrarla), se añade en una columna de vidrio, en la cual habíamos añadido un tapón de lana de vidrio en el fondo, para evitar la elución de la resina. El vertido de la resina en la columna implica que esta se encuentra con la salida cerrada por la presión de la pinza sobre la goma, y éste debe de hacerse con cuidado, en el caso de necesitar eliminar tampón para terminar de echar la resina, se abre la pinza, teniendo en cuenta que la resina nunca debe estar seca. Cerrar la salida de la columna cuando quede aproximadamente 1 cm de tampón sobre el frente de empaquetado de la resina.

Separación de los componentes de la muestra.

Del mililitro de muestra que tenemos, compuesta de glucosa, aspártico y lisina, cogemos 250 l y los añadimos con cuidado en la columna, donde previamente hemos dejado con 1 mm de tampón sobre la resina, dejamos que entre y con mucho cuidado vamos añadiendo tampón citrato pH 3 para que no se seque la resina.

Una vez añadida la muestra debemos recoger las fracciones, cinco exactamente, que serán de unos 2ml. Cuando tengamos las cinco fracciones, procederemos al análisis de las mismas. Ya que el único componente que no tiene carga es el azúcar (Glucosa), no quedará retenido al no entrar en el intercambio de cationes, donde sí estarán los aminoácidos.

Detección de la glucosa

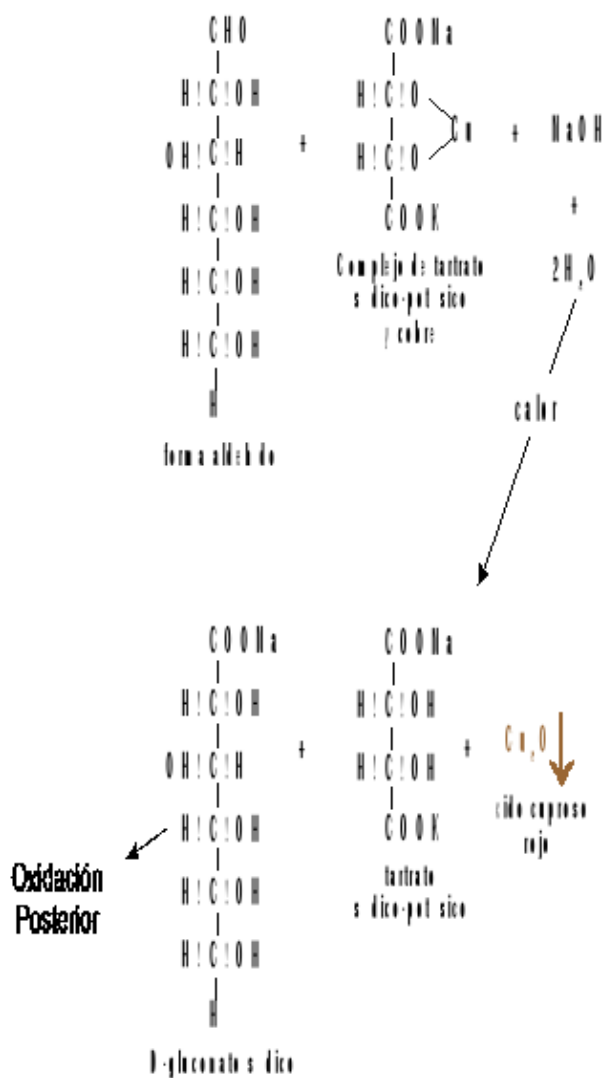
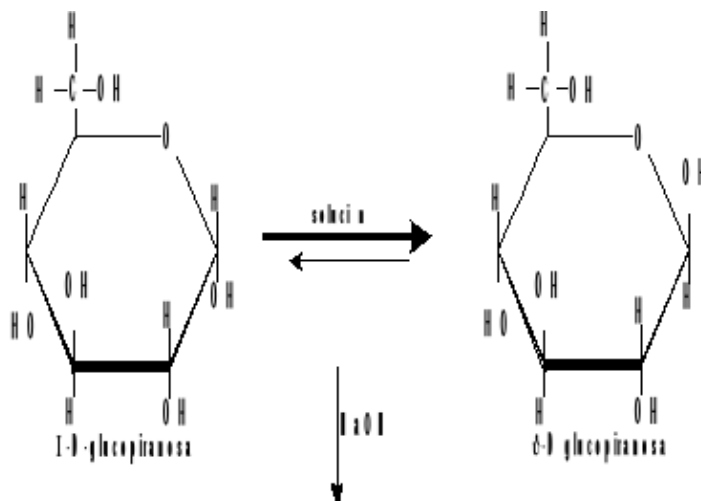
La detección se realiza mediante el licor de Fehling.

- Añadir a los 2 ml de fracción 2 ml de **solución A**.
- Agitar en el vortex.
- Añadir 2 ml de **solución B**.
- Agitar en el vortex.
- Poner en un baño a 80 °C y esperar 10 minutos.

Se espera ver un precipitado rojo ladrillo en aquella fracción que contenga la glucosa. Si no aparece en las 5 fracciones habrá que seguir eluyendo hasta que aparezca. Hay que realizar un control, y para ello cogeremos 250 l y les añadiremos los 2ml de solución A y de la B, al igual que las fracciones dejaremos que reaccione en el baño a 80 °C.

Principio del licor de Fehling para la detección de azúcares reductores

Muchos reactivos oxidan el grupo aldehído (reductor) de los azúcares. En esto se basa la reacción o prueba de Fehling para distinguir los azúcares reductores.



El tartrato, al unirse al cobre formando un complejo soluble, impide la forma de hidróxido cúprico insoluble que tendría lugar si existiese cobre libre en la solución. La oxidación de la glucosa por este método es más intensa que en el estado de ácido glucónico debido al aporte de cantidades apreciables de Cu_2O a a partir de los grupos alhído disponibles. Como criterio de positividad de la reacción se utiliza la formación de óxido

cruposo rojo insoluble. La prueba de Fehling no es específica. Otras sustancias dan reacción positiva son: fenoles, aminofenoles, benzoína, ácido úrico, catecol, ácido fórmico, hidrazobenceno, fenilhidracina, pirogalol y resorcinol.

Composición

Solución A: sulfato de cobre

Solución B: tartrato sódico-potásico, hidróxido sódico.

Resultado

Control	F1	F2	F3	F4	F5
+			+		

Detección de los aminoácidos

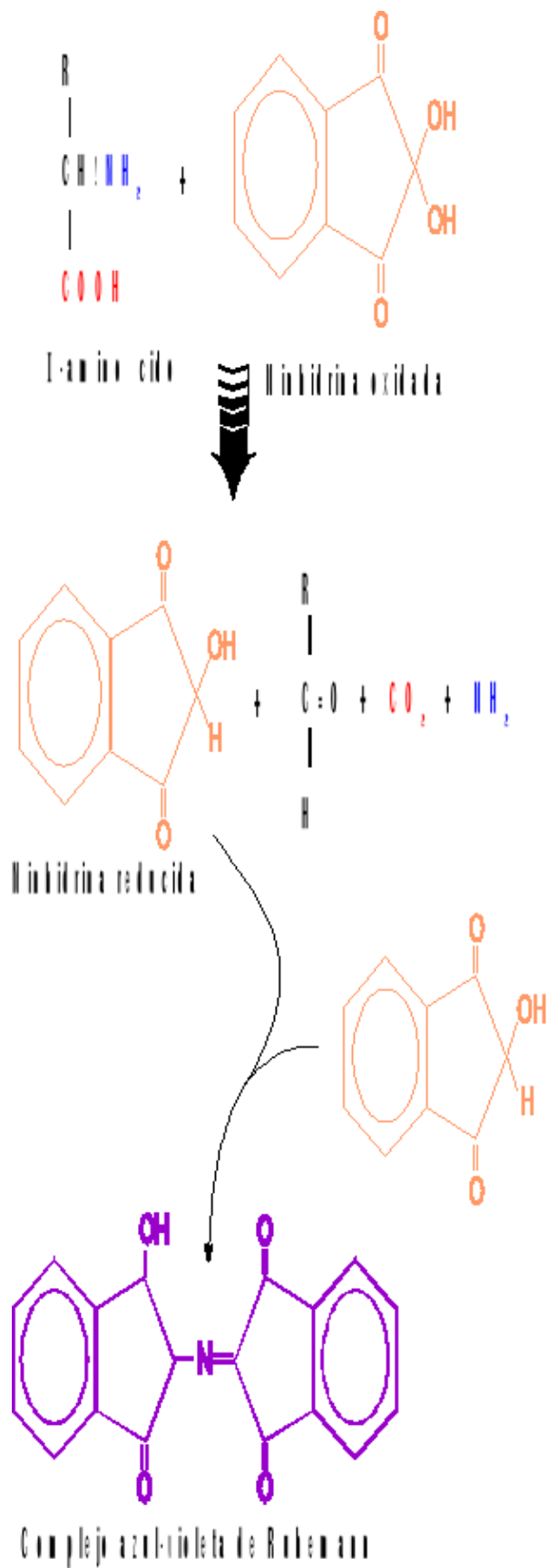
Una vez eluída la glucosa, hay que entrar en la fase 2, separar los aminoácidos selectivamente de la resina. Para ello añadimos ahora tampón citrato a pH 5, abriendo la pinza y recogiendo fracciones. Al añadir el tampón se forma en la columna un gradiente de pH que hará que eluya aquel de los dos aminoácidos que nos quedan retenidos que tenga el pI más cercano a 3 y menor que 5.

En esta tabla se reflejan los puntos isoeléctricos de los dos aminoácidos, y en ellos resalta el del aspártico, con 2,77, ¿no podría ser que hubiera eluído a pH 3?. Teóricamente tendría que haberlo hecho, y posiblemente algo halla salido, pero hay que tener en cuenta que se trata de un equilibrio y, por tanto, para que el aspártico tenga carga neta 0 en gran concentración, el pH de la solución debe ser algo mayor de 3, algo que demostramos haciéndolo eluir cuando añadimos citrato a pH 5, eso si en las primeras fracciones.

Base de la reacción de detección de aminoácidos con ninhidrina

El método se basa en la reacción entre la ninhidrina y el grupo –amino de aminoácidos, péptidos y proteínas, dando un compuesto coloreado azul o azul – violeta.

Calentar en presencia de ninhidrina produce la desaminación oxidativa de los grupos amino en , lo que implica la reducción asociada de la molécula de ninhidrina.



La ninhidrina reducida reacciona con el amonio y con otra ninhidrina oxidada para dar lugar a un compuesto coloreado llamado azul – violeta de Ruhemann.

La prolina y la oxiprolina reaccionan con la ninhidrina, pero dan un positivo de color amarillo. La reacción de la ninhidrina puede dar positivo con ciertas aminas, aminas ácidas y algunos otros compuestos.

Una vez eluidas tres fracciones se añaden a 250 l de cada una otros 250 de citrato 5, se agita en el vortex y se añaden 500 l de ninhidrina. Se dejan los tubos en un baño a 80 °C durante 10 minutos.

Incidencias

Según las indicaciones del guión, al comenzar a añadir el citrato a pH 5, no recogimos fracciones, sino que medimos el pH de lo que eluía sin recogerlo, esperando a que fuera de 5 para comenzar a recogerlo. Evidentemente, y como ya hemos dicho el aspártico tiene un pI de 2,77 y, por tanto, coge carga 0 en cuanto el pH sube algo por encima de 3, lo que ocurre nada más añadir el citrato a pH 5 porque se forma un gradiente de pH en la columna.

El resultado fue que no pudimos detectar de forma fiable la salida del aspártico, en las fracciones, pero si en el líquido que se recogió en un vaso de precipitados y sobre el que efectuamos la detección. El resultado fue un intenso azul-púrpura, que indicaba la presencia de algo en gran cantidad, pero que la escasa limpieza del recipiente no permite afirmar que fuera aspártico.

Según los resultados de otras parejas y de acuerdo con la teoría expuesta, el aspártico eluyó en la primera fracción recogida, y por supuesto el control dio positivo.

Una vez sabido que ya había eluido al aspártico hay que continuar con la fase 2, lo que implica variar de nuevo el pH de la columna, esta vez lo haremos con sosa, ya que el pI de la lisina es de 9,74. Al igual que con los demás tampones, vamos añadiendo el NaOH a la vez que recogemos las fracciones y con cuidado no se seque la resina.

Recogidas 4 fracciones se efectúa la detección del aminoácidos mediante el método de la ninhidrina, con las mismas cantidades de componentes que con el aspartico, salvo que ahora hay que medir el pH con un papel medidor para asegurarnos que no suera las 8 unidades, ya que la ninhidrina se desactiva por encima de ese pH. En nuestro caso ninguna salió con un pH superior.

Resultados

Control	F1	F2	F3	F4
+				
	Algo verdoso	Marrón muy clarito	Marrón muy oscuro	Marrón claro

Limpiado de la columna

Para ello hacemos eluir por la misma 5 ml de HCl, de H₂O, de NaOH y de nuevo de H₂O, con el fin de eliminar posibles restos y dejar un pH lo más cercano a 7.

2. Cromatografía de filtración molecular.

En este tipo de cromatografía los componentes de una muestra se **separan de acuerdo a su tamaño y forma molecular**. La base de esta cromatografía es el reparto que sufren las moléculas entre un solvente y una fase estacionaria contenida en una matriz de porosidad definida. La columna se prepara con partículas de una sustancia inerte que contienen poros pequeños. Al pasar una disolución con moléculas de distintas dimensiones a través de la columna, las moléculas con un tamaño mayor que el de los poros se moverán sólo

en el espacio que queda entre las partículas, y, por tanto, no sufrirán retraso en su recorrido a través del material de la columna. Sin embargo, las moléculas con un tamaño menor que el de los poros difunden hacia el interior y el exterior de las partículas con una probabilidad que aumenta a medida que disminuye el tamaño molecular. Por lo tanto, **las moléculas son eluidas de la columna por orden de tamaños decrecientes**.

Para un determinado tipo de columna o matriz se puede calcular un **parámetro Kav** de elución de una determinada molécula. La representación gráfica de Kav con respecto al logaritmo del peso molecular da una línea recta. Este parámetro se define como:

Kav = (Ve-Vo)/(Vt-Vo) donde,

Ve = volumen de disolvente necesario para eluir las moléculas de interés.

Vo= volumen vacío o volumen necesario para eluir una molécula que nunca entra en la fase estacionaria.

Vt = volumen total de columna.

Material de la práctica.

- Tampón PBS (0,1 M de tampón fosfato; 0,15 M de NaCl pH 7.2).
- Sephadex G-100.
- Azul dextrano (10 mg/ml). 2.106 Da
- Rojo fenol (10 mg/ml). 345 Da
- Lana de vidrio.
- Columnas de vidrio.

2.1.Preparación de la columna de Sephadex G-100.

Nombre comercial de una matriz comercial constituida por polímeros de dextrano entrecruzados por epíclorihidrina. El grado de entrecruzamiento va a determinar el tamaño poro y éste va a determinar el rango de fraccionamiento de tamaños moleculares. Esta resina permite separar proteínas globulares cuyo peso molecular esté entre 4.000 y 150.000 Da. **Esto último quiere decir que moléculas mayores de 150.000 Da serán incapaces de entrar en el poro de la matriz.**

Preparación de la columna en la práctica.

- Previamente, a 1,5 gramos de resina sephadex G-100 se le añaden 50ml de tampón PBS y se deja esponjar 72 horas. Paso realizado por los profesores de prácticas.

El esquema de la columna es:

Los pasos que se siguen para preparar la columna para la filtración molecular son:

- Se añaden a la columna, con la pinza cerrada, 25 ml de PBS y se hace una señal de la altura a la que llegan en la columna esos 25 ml. Esta marca será la altura hasta la que debe llegar la resina en la columna.
- Poner lana de vidrio en la parte de debajo de la columna, para que, al añadir la resina, esta última quede retenida por la lana.
- El sephadex suspendido en PBS se echa en la columna, al principio en grandes cantidades y después poco a poco con pipeta Pasteur, hasta que la resina llegue a la marca anteriormente mencionada. Hay que tener extremo cuidado de que la columna no pierda demasiado PBS y se seque, de modo que siempre tiene que haber algo de PBS por encima del frente de compactación de la resina. También hay que tener cuidado al echar la suspensión de la resina para que no se formen burbujas en la columna, ya que estas burbujas

dificultarían la elución de la muestra a través de la columna.

Lo que sucede al echar la resina en suspensión y abrir la pinza es que el PBS pasa a través de la lana de vidrio y se pierde, mientras que la resina queda retenida por la lana y se va empaquetando poco a poco.

Terminado el empaquetamiento, siempre poniendo más PBS por encima del frente del empaquetamiento para que la resina no se seque, se añaden unos ml de PBS por encima de la marca que hicimos. Después se pone parafilm y se deja hasta el día siguiente.

Incidencias.

- Rotura de una pipeta Pasteur. Fragmento de unos 4 ó 5 cm que quedó incluido en la resina, por debajo de la mitad de la columna.
- A la altura de ese fragmento de la pipeta hay unas burbujas no demasiado grandes y no en demasiada cantidad.
- En la parte superior de la columna se observan algunas burbujas pero muy separadas y pequeñas. Creemos que no estaban en un número suficiente ni tenían un tamaño suficiente para que la separación de proteínas se viera muy perturbada.
- Suciedades y partículas, (pelillos o fibras), podrían haber entrado en la columna por falta de limpieza en el material del que disponíamos.

2.2. Equilibrado de la columna.

Después del empaquetamiento tenemos que equilibrar la columna.

Procedimiento.

- Abrimos la llave para que salga el PBS sobrante hasta que queden 1 ó 2 mm por encima del frente de la resina.
- Se procede a la colocación en la superficie de la resina de 200 l de una mezcla con 40 gr de azul dextrano, cuyo peso molecular es 2 millones g/mol, y 20 gr de rojo fenol, cuyo peso molecular es de 345 g/mol.
- Se abre la pinza para que entre la muestra en la resina pero teniendo cuidado de que no se seque la resina, puesto que al eluir la muestra estamos eluyendo también el PBS. Tenemos que añadir PBS para que la resina no se seque, pero esperando a que hallan entrado los colorantes. Esta adición de PBS se debe realizar poco a poco, pues si echamos mucho PBS o lo echamos a destiempo podemos diluir la muestra de colorantes, de modo que no entre todo a la vez en la resina y, como consecuencia, la elución no sería correcta.
- Una vez que se abre la pinza y la muestra ha entrado en la resina comenzamos a recoger fracciones de 1,5 ml en tubos de ensayo hasta que salga la fracción con más cantidad de rojo fenol.
- Después se cuenta el número de fracciones hasta que salga el azul, que debería salir en una sola fracción (que fue lo que nos pasó), y se multiplica ese número de fracción por 1,5, obteniéndose así el volumen de elución del azul dextrano, que tomaremos como el volumen inicial, V_0 , el que nos marcará el volumen a partir del cual podremos obtener proteínas al eluir la muestra problema.
- La misma operación se hace con el rojo fenol, con la única diferencia de que el rojo se recoge en un volumen de elución mucho mayor que el del azul, puesto que al ser el rojo una molécula mucho menor pasa por la columna más despacio. Al multiplicar por 1,5 el número de la fracción con más cantidad de rojo fenol tenemos el volumen de elución del rojo, que nos dice el volumen total, V_t , que nos marcará el volumen hasta el que las proteínas problema pueden eluir, por encima del cual no deberían eluir proteínas.

Los colorantes nos sirven para delimitar el intervalo de volúmenes entre los que deben eluir nuestras proteínas, puesto que sus pesos moleculares se encuentran entre los del azul y los del rojo, y la columna

separa las proteínas en función de su peso molecular.

Aunque cogimos 2 ml por encima y por debajo de esos V_o y V_t para estar seguros de que recogemos las proteínas, esto no debería ser necesario si la elución es correcta.

Resultados del equilibrado de la columna.

$V_{eA} = V_o = 6 \times 1,5 \text{ ml} = 9 \text{ ml}$, pues recogimos el azul en la fracción 6.

$V_{bR} = V_t = 16 \times 1,5 \text{ ml} = 24 \text{ ml}$, pues recogimos el rojo en la fracción 16.

Según estos datos tendremos que recoger $15+2+2 \text{ ml}$ de nuestra muestra para recoger las proteínas.

2.3.Separación de proteínas.

Procedimiento.

- Después de recoger el rojo, hay que lavar con PBS la columna para eliminar el resto de rojo y limpiar la columna. La teoría decía que teníamos que lavar con 20 ml de PBS, pero no lo hicimos así, simplemente lavamos con lo que íbamos echando para eluir el rojo y luego añadimos sólo algunos ml de PBS (por indicación del profesor).
- La metodología para la separación de proteínas es la misma que para el equilibrado. Dejamos eluir el PBS que quedaba después del equilibrado hasta que queden 1 ó 2 mm por encima del frente de la resina. Después aplicamos 200 μ l de la muestra problema con proteínas. Abrimos la pinza y dejamos que entre la muestra en la resina sin que esta última se seque y sin echar demasiado PBS que diluya mucho la muestra.
- De esta muestra hay que recoger fracciones de 1 ml en tubos eppendorf, estos últimos debidamente marcados con su número de fracción y pareja de prácticas. La columna separará las proteínas en función de su tamaño, de modo que las de mayor tamaño eluirán antes y estarán en las primeras fracciones, y las menores estarán en las últimas. Esto último siempre dentro del intervalo V_o-V_t .

Según los volúmenes calculados en el equilibrado nosotros teníamos que recoger la primera fracción 7 ml después de aplicar la muestra en la columna, con lo que recogimos 19 fracciones de 1 ml en el intervalo de volúmenes 7–26 ml.

Una vez que recogimos estas 19 fracciones, los eppendorf se colocaron en una gradilla y se llevaron las fracciones al frigorífico. El dejar las proteínas a 4°C se realiza para evitar que las proteínas se desnaturalicen y pierdan su actividad, ya que la filtración molecular separa las proteínas en su estado nativo. El que las proteínas estén en su estado nativo y que conserven su funcionalidad nos sirve para poder identificar en las fracciones determinadas actividades enzimáticas.

Valores de K_{av}					
A	0	F6	0,2	F12	0,67
F3	0	F7	0,333	F13	0,733
F4	0,066	F10	0,53	F14	0,8
F5	0,133	F11	0,6	R	1

Incidencias.

- Quedo algo de rojo fenol entre la lana de vidrio y eluyó junto con las primeras fracciones de la muestra. Como consecuencia de esto en las dos primeras fracciones recogidas había algo de rojo, pero este colorante al no tener naturaleza proteica no interfiere o falsea los datos de la absorbancia obtenida

en la prueba de Bradford.

- La elución del rojo y del azul se hizo bien, pero el rojo al llegar a la altura del trozo de Pasteur rota difundió un poco y no iba tan junto o compacto que al principio, en cambio el azul no sufrió ninguna difusión. No sabemos si la punta pudo influir negativamente en la separación de las proteínas por la columna de resina.

2.4.Regeneración de columna.

Paso realizado por los profesores, consistente en vaciar la columna con ayuda de PBS, para que la resina no se seque, para ser reutilizada. Después se quita la lana de vidrio y se lava la columna.

3. Determinación de proteínas y actividades enzimáticas.

3.1. Método de Bradford.

Este es uno de los métodos con mayor sensibilidad para la determinación de proteínas.

Una de las cuestiones que se nos pedían para este punto es la de encontrar el fundamento de este método, pero a pesar de disponer del artículo original de Bradford y del libro de instrucciones del reactivo de Bradford comercializado por Bio-Rad, nos ha sido imposible saber cuál es el tipo de interacción que le permite al azul brillante de Coomassie unirse a las proteínas, lo cual sí se sabe en los otros métodos de este tipo conocidos (Lowry, Biuret). Está claro que al unirse a la proteína, este reactivo, sufre un cambio en su máximo de absorbancia que es el que medimos con el espectrofotómetro, y que es proporcional, por tanto, a la cantidad de proteína. Así, cuánto más proteína halla en la disolución más cambio en la absorbancia habrá, es decir, más absorción habrá en el nuevo máximo que es 595 nm. El cambio es de 465 a 595 nm.

Según lo encontrado en la bibliografía utilizada, podemos decir de este método que:

- Es un ensayo de unión proteína colorante basado en el diferencial cambio de color de un colorante en respuesta a varias concentraciones de proteína. Este es un método de determinación de proteínas que implica la unión de Azul Brillante de Coomassie G-250 con las proteínas. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, se basa en la observación de que el Azul Brillante de Coomassie G-250 existe en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando se une el colorante a la proteína.
- El complejo colorante-proteína tiene un alto coeficiente de extinción lo cual es imprescindible aumentar la sensibilidad en la medición de proteínas.
- La unión colorante-proteína es un proceso muy rápido (2min) y el complejo permanece estable durante un tiempo relativamente largo, una hora. Haciendo de este un proceso muy rápido, y que no requiere un tiempo crítico para el ensayo.
- Se pueden utilizar un gran número de muestras (muy reproducible) y es adaptable a la automatización.
- Es un ensayo que elimina casi todos los problemas que había anteriormente con es tipo de ensayos.
- Las interferencias o no existen o son mínimas por cationes tanto sodio como potasio y carbohidratos como la sacarosa. Otras sustancias que interfieren en el ensayo son los agentes fuertemente alcalinos (cuestión fácilmente solventable con la utilización de tampones). Los únicos componentes encontrados que dan una excesiva interferencia en el color del ensayo, son grandes cantidades de detergentes como el SDS, Triton X-100, etc.
- Preparación del colorante. Azul Brillante de Coomassie G-250 (100mg) es disuelto en 50 ml de etanol 95%. A esta disolución se le añade 100ml de ácido fosfórico 85% p/v. La solución resultante se diluye llevándola hasta un litro de volumen final. La concentración en la disolución final es 0,01% p/v de azul, 4,7% p/v de etanol y 8,5 % p/v de ácido fosfórico.
- Una dificultad observada en la realización del ensayo es la tendencia del complejo colorante-proteína

a unirse a las cubetas. Esto resulta en una cubeta coloreada de azul: la cantidad de unión es poco importante en lo que se refiere al resultado del ensayo. Se suele lavar el tubo o cubeta con agua destilada entre medidas de diferentes muestras. Este azul se puede quitar y las cubetas se reutilizan sin problemas.

- La sensibilidad del ensayo depende de la naturaleza de la proteína, y en muestras complejas (aunque no es nuestro caso), en las cuales las proteínas se diferencian ampliamente en su respuesta al ensayo, puede ser difícilmente cuantificable. Sin embargo, recientes modificaciones en el ensayo han mejorado su eficacia en estas aplicaciones. Se aplica una cierta cantidad de SDS, el cual por si mismo causa una falta de desarrollo de color, es añadido a la muestra o al colorante. El SDS iguala la reactividad de las distintas proteínas, así que el ensayo puede ser utilizado para mezclas de proteínas. Esta igualdad produce tanto una disminución de la reactividad de proteínas con alta respuesta, como la albúmina, como un incremento en la reactividad en las proteínas con baja respuesta.
- Aplicaciones: Cromatografía, electroforesis, soluciones de proteínas complejas, química clínica, adaptable a la automatización.

Material de la práctica.

- Reactivo de Bradford
- PBS
- Albúmina bovina.
- Fracciones de proteína.
- Espectrofotómetro.
- Tubos de espectrofotómetro.

Procedimiento.

- Preparar las muestras que tenemos que medir para la determinación de proteínas. Tenemos que tomar alícuotas de 500 l de cada fracción.(5).
- Añadir a esas alícuotas 3,5 ml de PBS.
- Añadir 1ml de reactivo de Bradford. (6). Después de esto tenemos en cada tubo 5 ml. Esto último es importante, ya que todos los tubos deben tener la misma concentración para que la medida de la concentración de proteína sea correcta.
- *Después ésta disolución se mezcla bien en el vortex.*
- *Preparar una curva patrón en la que conocemos las cantidades de proteína que ponemos y medimos su absorbancia. Esta nos servirá para interpolar, a partir de la curva, los valores de concentración de proteína en las fracciones, sabiendo sus valores de absorbancia. La curva se prepara a partir de una disolución stock que tiene 100 gr/ml, de modo que preparamos seis tubos con cantidades crecientes de albúmina(uno sin nada que utilizaremos como nuestro cero), y los llevamos a 4 ml con PBS y después les añadimos 1 ml de reactivo Bradford.*
- *Es muy importante añadir el Bradford a la vez en todos los tubos, tanto en los tubos de la curva patrón como en los de las fracciones. Así todos los tubos se disparan a la vez y la medición de la absorbancia es fiable y correcta. Este hecho es una consecuencia de la cinética característica de esta reacción, ya que cuanto más tiempo transcurre más intenso es el color de la disolución. Por eso, se preparan todos los tubos y después se añade a todos los tubos el reactivo.*
- *Medir los valores de absorbancia de los distintos tubos.*
- *Representar con los datos de D.O.: 1. D.O. frente nº fracción; 2. D.O. frente [prot]; 3. [prot] frente nº fracción.*

Resultados del patrón obtenidos a partir de la mesa 3C.

Tubo	Concentración Albúmina	ABS595
1	0	0

2	20 g/ml, 200 l de stock	0,336
3	40 g/ml, 400 l de stock	0,542
4	60 g/ml, 600 l de stock	0,662
5	80 g/ml, 800 l de stock	0,701
6	100 g/ml, 1000 l de stock	1,02

Resultados de absorbancia de las muestras.

Tubo	Absorbancia	Tubo	Absorbancia
1	-0,123	11	0,370
2	-0,212	12	0,313
3	0,783	13	0,272
4	-0,192	14	0,178
5	-0,182	15	-0,014
6	-0,197	16	-0,062
7	0,82	17	-0,125
8	-0,011	18	-0,158
9	0,074	19	-0,183
10	0,280		

Incidencias.

- Problemas con los espectrofotómetros, pues algunos no funcionaban (incomprensiblemente) y otros daban medidas extrañas e ilógicas. Además de la falta de aparatos disponibles. Al final medimos en uno que medía perfectamente, aparentemente.
- Fallo al preparar las muestras de las fracciones 4,5, y 6. Este fallo nos impidió ver si tenían proteína esas fracciones y complicó mucho la realización del cuaderno. Deducimos que debían tener proteínas a partir de la gráfica D.O. frente al número de fracción, pues estas fracciones quedaban dentro del primer pico que aparecía en esta gráfica. Después comprobamos que si tenían proteínas al correr el gel de acrilamida.
- Entendimos mal la aclaración del profesor, en la que decía que había que diluir 1/10 las muestras de la curva patrón si la segunda (la primera después del blanco) daba un valor de absorbancia de 1,3 o 1,4, aproximadamente. Pero nosotros al entender mal, diluimos las muestras patrón, 1/10, al obtener en la tercera muestra 1,2. Después de esta dilución, las medidas resultaron totalmente incoherentes. Por la falta de tiempo y por los nervios, no fuimos capaces de resolver este problema y decidimos tomar, como nuestra, la recta patrón de la mesa 3C, y medir con su mismo aparato y con el mismo tubo.

3.2. Determinación de la actividad catalasa.

Un método rápido para la determinación de la proteína catalasa es la observación de su actividad por la formación de burbujas en una solución que contiene H₂O₂.

Procedimiento.

- Preparar un tubo con 1 ml de una solución constituida por 1 ml de PBS + 10% de H₂O₂.
- Añadir 100 l de las fracciones que, después de la realización del método de Bradford, sepamos que contienen un alto contenido en proteínas.
- Aquellas fracciones que contengan catalasa producirán un burbujeo instantáneo en la solución.

Resultados de la prueba de la catalasa.

<i>Tubo</i>	<i>Actividad Catalasa</i>	<i>Tubo</i>	<i>Actividad catalasa</i>
Muestra	+	10	–
3	+	11	–
4	+	12	–
5	+	13	–
6	+	14	–
7	+		

Según los resultados obtenidos en la prueba tenemos que la catalasa se encuentra en las primeras fracciones sobre todo en la 3 y en la 4 que se corresponde con el mililitro 9 y 10. Esto nos dice que la catalasa es una proteína de gran peso molecular al eluir pronto en la columna. Con la columna separamos las proteínas en fracciones según su peso y después con experimentos como este y como el siguiente de la lisozima, identificamos la presencia de determinadas proteínas en esas fracciones.

3.3. Determinación de la presencia de lisozima.

Un método rápido para la determinación de la actividad lisozima es la medida de la disminución de turbidez de una suspensión de pared bacteriana al agregar dicha proteína. Al incubar la suspensión con lisozima la pared celular se hidroliza originando fragmentos pequeños, reduciéndose la dispersión de la luz lo que se manifiesta en una reducción de la absorbancia a la longitud de onda de 450 nm. Así, la actividad enzimática será, por lo tanto, proporcional a la disminución en absorbancia.

En nuestro caso concreto se va a analizar la presencia de esta enzima en las mismas fracciones en las que realizamos el ensayo de la catalasa.

Procedimiento.

- Colocar 100 l de la fracción sobre un tubo que contenga 5 ml de suspensión de pared bacteriana, mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 15 min.
- Como tubo blanco tomamos uno solamente con la suspensión que nos dará el máximo de absorbancia. Para el ajuste a 0 del densiómetro o espectrofotómetro se utilizará el tubo en el que se colocaron 100 l de la muestra inicial, que lógicamente tendrá un máximo de actividad lisozima (sí es que esta proteína existiera en la muestra).
- Medir DO450.

La suspensión de pared bacteriana se prepara a partir de la pared del microorganismo *Micrococcus lysodeikticus* (preparado comercial). 20 mg de este preparado se mezclan con 100 ml de tampón fosfato (100 mM; pH 6.2). (A nosotros se nos dio la suspensión ya preparada).

Los resultados de este ensayo.

<i>Tubo</i>	<i>Absorbancia</i>	<i>Actividad</i>	<i>Tubo</i>	<i>Absorbancia</i>	<i>Actividad</i>
Muestra	0,00	100%	Blanco	0,38	0%
3	0,38	0%	10	0,285	25%
4	0,378	0,52%	11	0,28	26,3%
5	0,373	1,8%	12	0,242	36,3%
6	0,375	1,3%	13	0,28	26,3%

7	0,377	0,78%	14	0,307	19,21%
---	-------	-------	----	-------	--------

Para calcular la actividad de cada fracción tenemos que utilizar una regla de tres inversa.

Se puede ver como en este caso la actividad lisozima se encuentra en las fracciones 10, 11, 12, 13, 14 que se corresponden con los mililitros 16, 17, 18, 19, 20. Esta es, por tanto, una proteína de menor tamaño que la catalasa. El hecho de identificar en estos dos grupos de fracciones dos proteínas, mediante los ensayos de actividad, no quiere decir que no pueda haber más proteínas en esas fracciones, pues al separar las proteínas en función del peso molecular, puede haber en esas fracciones otras proteínas a parte de las ya mencionadas, con pesos parecidos. Los dos grupos de fracciones se corresponden, como ya vimos, con dos picos en la gráfica de D.O. frente a número de fracción, que son las fracciones donde hay mayor concentración de proteínas y con las que tenemos que trabajar para ver cuántas y cuáles son las proteínas presentes en ellas.

5. Electroforesis en geles de Poliacrilamida–SDS

El principio básico de la electroforesis es el movimiento que experimenta una partícula cargada en un determinado medio cuando se ve sometida a la acción de un campo eléctrico. Dada una partícula de carga neta Q sometida a un campo eléctrico de intensidad E , se moverá por acción de una fuerza igual a:

La técnica se utiliza para separar proteínas y ácidos nucleicos, y uno de los medios soporte más utilizados es el gel de poliacrilamida.

Geles de acrilamida

Permite gran cantidad de tratamientos

Permiten regular el tamaño de poro.

Muy estables.

Permite separaciones más rápidas.

Casi no presenta endósmosis.

Son transparentes, con lo que permiten hacer estudios de densidometría.

Para realizar estos geles se parte de cuatro componentes líquidos:

– Acrilamida



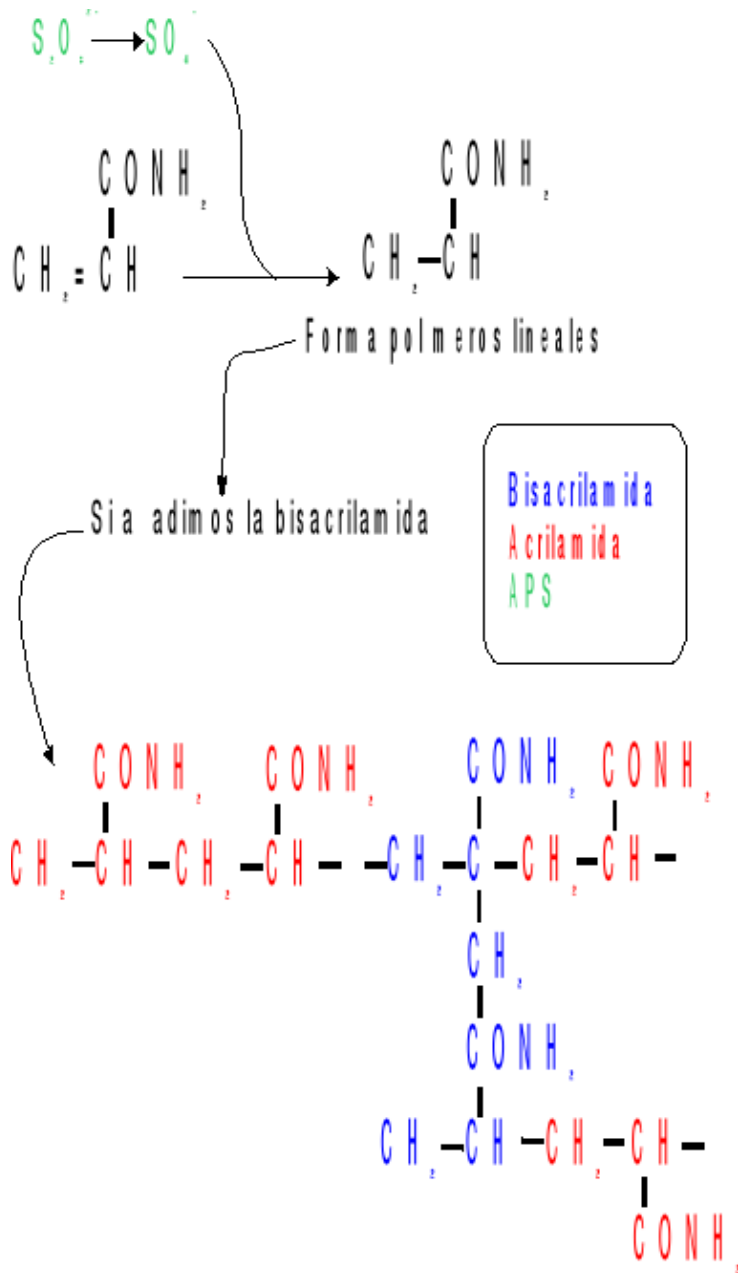
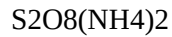
– Agente entrecruzante: bisacrilamida



– TEMED (Tetrametilen, etilen diamina)



– APS (Persulfato amónico)



Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes, se basa en añadir compuestos que alteren las condiciones nativas de las proteínas y que se agrupan en el llamado **tampón de carga** que se añade antes de cargar las muestras en el gel y después se incuban a unos 100 °C durante 4 minutos para que tenga su efecto. El tampón de carga consiste en un agente reductor, **Me** (mercapto etanol) que se encarga de eliminar los puentes disulfuro. El **SDS** (dodecil sulfato sódico) es el detergente derivado del ácido de doce carbonos, se une a las proteínas y las desnaturaliza. Esa unión es constante, 1,4 gramos de SDS por gramo de proteína. Además, el detergente está cargado negativamente, y por lo tanto es el que se ocupa de dar carga a las proteínas. En el tampón también se incluye el **azul de bromofenol**, que se trata de un colorante con carga negativa (por eso se utiliza) y con una movilidad electroforética que equivaldría a pequeños polipéptidos. Su función es la de ir por delante de las proteínas para ir marcando el frente de electroforesis y que podamos visualizar como se va realizando la corrida (recordemos que tanto el gel como las proteínas son

transparentes). El **glicerol** lo que hace es aumentar la densidad de la muestra, de modo que al echarla en el pocillo no difunda ni se pase a los pocillos de al lado. Con todo esto nos encontramos con **todas las proteínas cargadas negativamente**, con la relación q/m constante se consigue **que las proteínas se separen por su tamaño**, no por su carga.



4.1. Determinación del peso molecular de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida

Determinación del peso molecular mediante electroforesis con SDS

Este tipo de electroforesis permite separar entonces las proteínas por tamaño, lo que implica que podemos conocer la relación existente entre R_f y el peso molecular de las moléculas, o lo que es lo mismo calcular el P_m de distintas subunidades de proteínas, ya que recordemos que en condiciones desnaturalizantes se eliminan los conjuntos de monómeros. La relación se consigue poniendo en el gel unos marcadores de P_m , y una vez corrido el gel medimos R_f (como distancia al pocillo) y representamos la gráfica ($\log P_m / R_f$).

Una vez representados los marcadores, medimos R_f de las distintas bandas y las hacemos corresponder un valor del P_m a través del antilogaritmo como se ve en la gráfica.

Preparación del gel de poliacrilamida

- Stock de acrilamida 30 % (29,2 g de acrilamida: 0,8 g de bisacrilamida).
- Tris-HCl 1M. pH 6,8.
- Tris-HCl 1M. pH 8,8.
- SDS 10 %.
- Persulfato amónico (APS) 10 %
- TEMED
- Tampón de electroforesis (Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; SDS 0,1%; pH 8,3).
- Tampón de carga 2x (Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8; SDS 4 %; glicerol 20 %; 2--mercaptoetanol 10 %; EDTA 15 nM; azul de bromofenol 0,008 %).

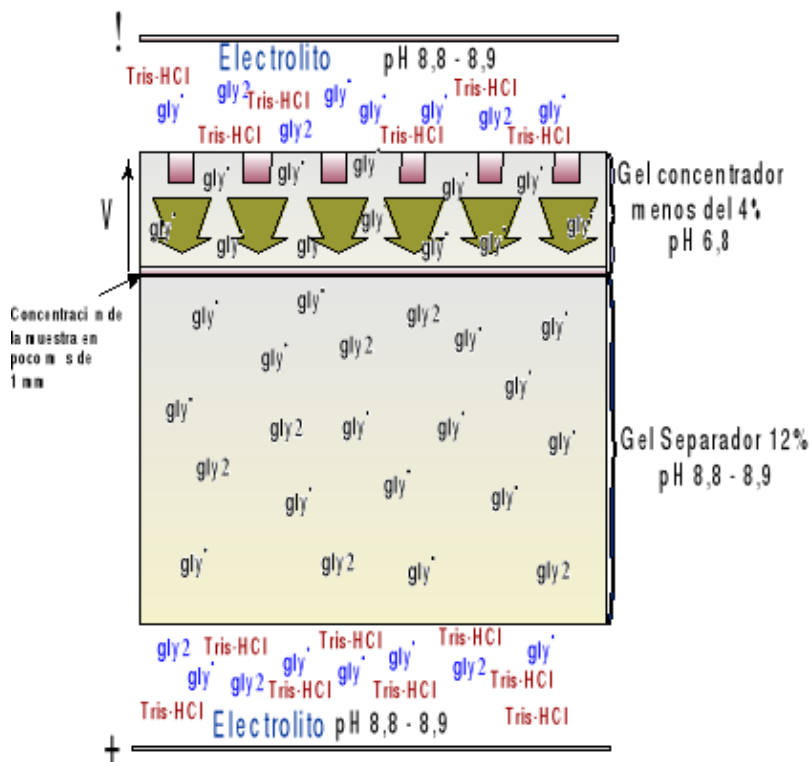
Limpiar los cristales con agua y etanol, colocar los separadores con algo de vaselina en la mitad que se orientará hacia fuera, montar los cristales y sellarlos bien con vaselina. Antes de echar la acrilamida

comprobar que el molde no tiene escapes vertiendo un poco de agua. Haremos un gel discontinuo, con el gel separador y el de empaquetamiento.

Electroforesis Discontinua

Por esta causa se diseñó la **electroforesis discontinua**, con el fin de minimizar las diferencias de distancia en la salida para que la separación nos permita obtener la mayor resolución.

El nombre le viene del propio método, que implica la polimerización de dos geles con diferente concentración de acrilamida y distintas condiciones de pH. El electrolito se compone de una mezcla de Tris-HCl y glicina, siendo el aminoácido la clave, ya que a pH de 8,8 – 8,9 se encuentra cargado al 15% en forma de gly⁻, de modo que transmite la corriente, al entrar en el gel concentrador, el pH varía a 6,8 (en general dos unidades de pH menos que el gel separador), en esas condiciones toda la glicina está en forma gly⁰, de modo que un transmite la corriente, disminuyendo la intensidad de corriente (**I**), algo que no es termodinámicamente posible, ya que debe ser constante, con lo que se crea un gradiente de voltaje como se muestra en la figura, el resultado es una disminución de la velocidad de las proteínas conforme se alejan del pocillo, de modo, que las partículas se van reuniendo ayudadas por la baja concentración del gel. La compactación, en una anchura de unos 0,1 mm, es facilitada por la dificultad que encuentran para entrar en el gel de separación, pero una vez dentro la glicina se vuelve a cargar por el nuevo cambio de pH, y a partir de ahí con todo prácticamente entrando a la vez se comienza a separar con idénticas condiciones.



En una electroforesis podemos aislar un tipo de proteínas, pero veríamos que las muy pequeñas se escaparían y las grandes ni siquiera llegarían a entrar en el gel, pues bien, hay una forma de electroforesis discontinua que permite aislar tanto proteínas grandes como las pequeñas. La base es simple, se trata de formar un gradiente de concentración de acrilamida en el gel separador, con un formador de gradientes, de modo que la parte más baja del gel presentaría una concentración alrededor del 20% y de un 7% en la parte de arriba. Con esto las proteínas grandes, entrarían en el gel sin muchos problemas y las pequeñas se verían retenidas por el pequeño tamaño de poro del final. Los geles pueden llegar a tener unos 40 cm de alto por 16 – 18 de ancho. Las proteínas pequeñas en los geles normales si no escapan, forman bandas difusas, pero en

la separación en gradiente corremos el peligro de una gran difusión ya que durante el gel, la concentración de acrilamida tampoco es muy grande, que facilita la difusión, lo que implica que hay que llegar a un compromiso, como casi siempre.

El APS y el TEMED serán los últimos componentes que añadiremos a la poliacrilamida, para que no nos polimerice en el matraz. Primero se prepara la solución del gel separador, se vierte cuidadosamente en el molde hasta que el frente llegue como un centímetro más debajo de lo que ocupará el peine. Entonces se vierte con una pipeta pasteur un poco de agua(d) de modo que el frente quede cubierto, esto se hace porque el O₂ inhibe la polimerización de la poliacrilamida.

Cuando el gel de separación halla polimerizado eliminamos el frente de agua y añadimos la solución del gel concentrador, hasta el límite del cristal más bajo, entonces colocamos el peine, es conveniente que esto se haga introduciendo una de las puntas e ir descendiendo poco a poco, todo para evitar que se formen burbujas en el fondo de los pocillos, que haría desvirtuar la posterior electroforesis.

Una vez polimerizado totalmente el gel, se retira el peine con cuidado no romper el gel concentrador, ya que es muy frágil. El molde se coloca en el aparato de electroforesis tal y como se muestra en la figura. una vez fijo, se añade el tampón de electroforesis en las cubetas, teniendo en cuenta que en la de arriba debe entrar en contacto con el gel.

Preparación de las muestras

Como ya hemos dicho, las muestras deben incubarse con el tampón de carga para desnaturalizarse, para ello seguimos esta lista:

- **Muestra:** 60 μ l + 30 μ l de tampón de carga.
- **Fraciones:** 60 μ l + 30 μ l de tampón de carga.
- **Patrón:** 25 μ l + 30 μ l de tampón de carga.

Todo ello en eppendorf, a calentar 5 minutos a 100 °C para desnaturalizar las proteínas y luego en hielo para mantenerlas desnaturalizadas. Para que los eppendorf no se abran violentamente durante la incubación se les efectúa un orificio en la tapa y se cubre todo con parafilm, elástico y, por tanto, dará de sí y se hinchará, pero no estallará.

Cargado de las muestras en el gel

Una vez preparadas las muestras, las cargamos en el gel con este orden:

Una vez cargadas las muestras en el gel se desarrolla la electroforesis a una intensidad constante de 15 mA durante toda la noche.

Parar la electroforesis al día siguiente, cuando el azul de bromofenol esté a 1cm del final del gel. Desmontarlo y ponerlo a teñir.

Tinción del gel de proteínas

Material

- Solución fijadora: etanol + acético + agua (en proporción 5/1/5).
- Solución teñidora: 0,15 de azul de Coomassie; 40 % de etanol, y 10 % de ácido acético.
- Solución desteñidora 7 % de ácido acético.

Colocamos el gel de proteínas, con cuidado de no romperlo, en un bandeja donde se añadirá la solución fijadora. Incubamos 30 minutos a 20 °C con agitación leve. Tras retirar el fijador, añadimos al solución de tinción e incubamos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, retiramos el tinte y pasamos a destintar. Para acelerar el proceso de destintación añadimos unas bolitas de papel de filtro, que absorberá el azul de Coomassie; esto se propagará hasta que las bandas de proteínas sean claramente visibles, en este punto, el gel está listo para ser secado sobre el papel W 3MM. Para ello se utilizará un secador de geles.

Resultados

Una vez teñido el gel tenía un aspecto similar al de la figura:

Determinación de los pesos moleculares

Patrón	0,7	1,3	1,8	2,4	2,7	3,2
F3	0,7	1				
F6	0,8	1				