

# EXPERIMENTO 1

## INTRODUCCION A LOS METODOS EMPLEADOS EN LA BIOQUIMICA EXPERIMENTAL MODERNA

### REQUISITOS

Repasar los conceptos de:  
células, tejidos, órganos y la  
organización jerárquica de la  
materia viva.  
Preparación de soluciones.

### OBJETIVOS

Describir los pasos generales a  
seguir para realizar el estudio  
de una muestra problema, en  
un laboratorio ideal  
Preparar una solución.

## 1. FUNDAMENTOS

Los investigadores bioquímicos del pasado se vieron obligados, debido a la disponibilidad de herramientas y técnicas bastante burdas, a trabajar con plantas y animales como un todo, pero las generaciones sucesivas de bioquímicos ya contaron con métodos y técnicas más finas que hicieron posible trabajar con cortes de tejidos, homogenato, organelas aisladas, cultivos celulares intactos o manipulados genéricamente y con sistemas moleculares. Esta búsqueda de sistemas cada vez más simples, nace de la creencia de que aun los sistemas más simples, pueden ser definidos y estudiados, ya que cumplen con los principios generales de la química y la física.

Para un laboratorio de bioquímica general, desafortunadamente es muy difícil lograr aplicar todas las técnicas y métodos adecuados, debido a lo extremadamente laborioso del trabajo implicado, a la limitación del tiempo disponible por los estudiantes y a lo elevado de los costos en aparatos materiales y reactivos, sin embargo, es conveniente tener una visión general sobre como seria el tratamiento ideal a aplicar.

Una célula es un ente muy pequeño que contiene una amplia variedad de distintos tipos de organelas y un citosol ricos en iones, moléculas pequeñas y moléculas sumamente complejas, las distintas asociaciones de estas, dan origen a las membranas que delimitan tanto la célula misma del medio exterior como a las propias organelas, disueltas o suspendidas, principalmente en agua. Enzimas,

receptores, transportadores, todos de naturaleza proteica pueden estar contenidas en el interior de las organelas, en las membranas de estas, en las membranas celulares o en citosol. Otras moléculas como lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, también coexisten en esa intrincada y compleja unidad vital que es la célula. La asociación de células para formar los tejidos, diversos tejidos para formar los órganos y diversos órganos para dar origen a los sistemas resultan en la extensa variedad de seres que podemos ver y palpar.

Iniciar el estudio de una enzima asociada a las membranas mitocondriales de los hepatocitos humanos, una lípido de las neuronas o un carbohidrato presente en las semillas de una planta, requieren de una observación detallada del todo, pero también un estudio a nivel celular y molecular. Preparar una muestra para realizar un estudio de esta naturaleza implica el conocimiento y manejo de técnicas, a veces altamente sofisticadas y costosas que en su mayoría no podrían ser realizadas en un laboratorio de Bioquímica general, pero deben ser conocidas y estudiadas aunque sea desde el punto de vista teórico.

Para comprender los pasos a seguir en la preparación de las muestras y las técnicas que se emplean, debemos conocer bien el objeto a estudiar, un sistema vivo: los elementos que lo conforman, las funciones que cumplen, la organización, las condiciones físicas y químicas ideales para un mejor funcionamiento, se hace entonces necesario hacer una revisión de la composición y organización de la materia viva.

## **2. COMPOSICIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LA MATERIA VIVA.**

Nuestro cuerpo, al igual que toda la materia, esta constituido por elementos, que evolutivamente hablando, fueron seleccionados y dieron origen a la materia viva, es decir las células y están presentes en nuestro organismo, cumpliendo funciones precisas, entre las cuales mencionaremos algunas de mayor importancia y que están resumidas en la tabla 1. Muchas veces el exceso o la falta de algunos de los elementos, demuestra un estado patológico, por ejemplo: la disminución de hierro es indicio de una anemia en el hombre, o la carencia del yodo en la dieta del hombre puede convertirse en enfermedades muy graves que afecten el sistema endocrino, como el retraso en el crecimiento físico y mental, especialmente importante en niños. Existe un sin número de eventos que nos obliga a conocer la composición de estos elementos.

**Tabla 1. Elementos que componen el cuerpo humano (en seco)**

ELEMENTO	PORCENTAJE p/p	FUNCION PRINCIPAL
<b>Azufre</b>	0,8	Constituyente de aminoácidos azufrados, polisacáridos.
<b>Calcio</b>	4,0	Constituyente de los huesos, dientes y músculos, participa en la coagulación sanguínea, en la contracción muscular, en el impulso nervioso y en reacciones enzimáticas.
<b>Carbono</b>	50,0	Es uno de los elementos más abundante de la materia orgánica, principal constituyente de las biomoléculas.
<b>Cloro</b>	0,4	En forma de cloruros, participa en el mantenimiento del equilibrio hídrico y en el pH sanguíneo.
<b>Fósforo</b>	2,5	Forma parte de los ácidos nucleicos ( ADN y ARN) y de la molécula de ATP
<b>Hidrogeno</b>	10,0	Junto al carbono y al oxígeno, constituyente importante de las biomoléculas
<b>Hierro</b>	0,01	Constituyente importante de la hemoglobina y mioglobina, participa en el transporte de oxígeno.
<b>Magnesio</b>	0,1	Interviene en numerosas reacciones enzimáticas, en especial las que utilizan ATP
<b>Manganeso</b>	0.001	Interviene en algunas reacciones enzimáticas
<b>Nitrógeno</b>	8,5	Constituyente importante de proteínas y ácidos nucleicos
<b>Oxígeno</b>	20,0	Constituyente de las biomoléculas y participa en la oxigenación de los tejidos, donde es el aceptor de los electrones que pasan por las cadenas respiratorias
<b>Potasio</b>	1,0	Participa en el mantenimiento del equilibrio hídrico celular, en la bomba de Na/K, conducción nerviosa, contracción muscular y en numerosas reacciones.
<b>Sodio</b>	0,4	Es el ion principal del líquido extracelular, participa en la bomba de Na/K, en el transporte activo, conducción nerviosa, contracción muscular y en el pH sanguíneo.
<b>Yodo</b>	0,00005	Constituyente de la hormona T3-T4, que interviene en el crecimiento.

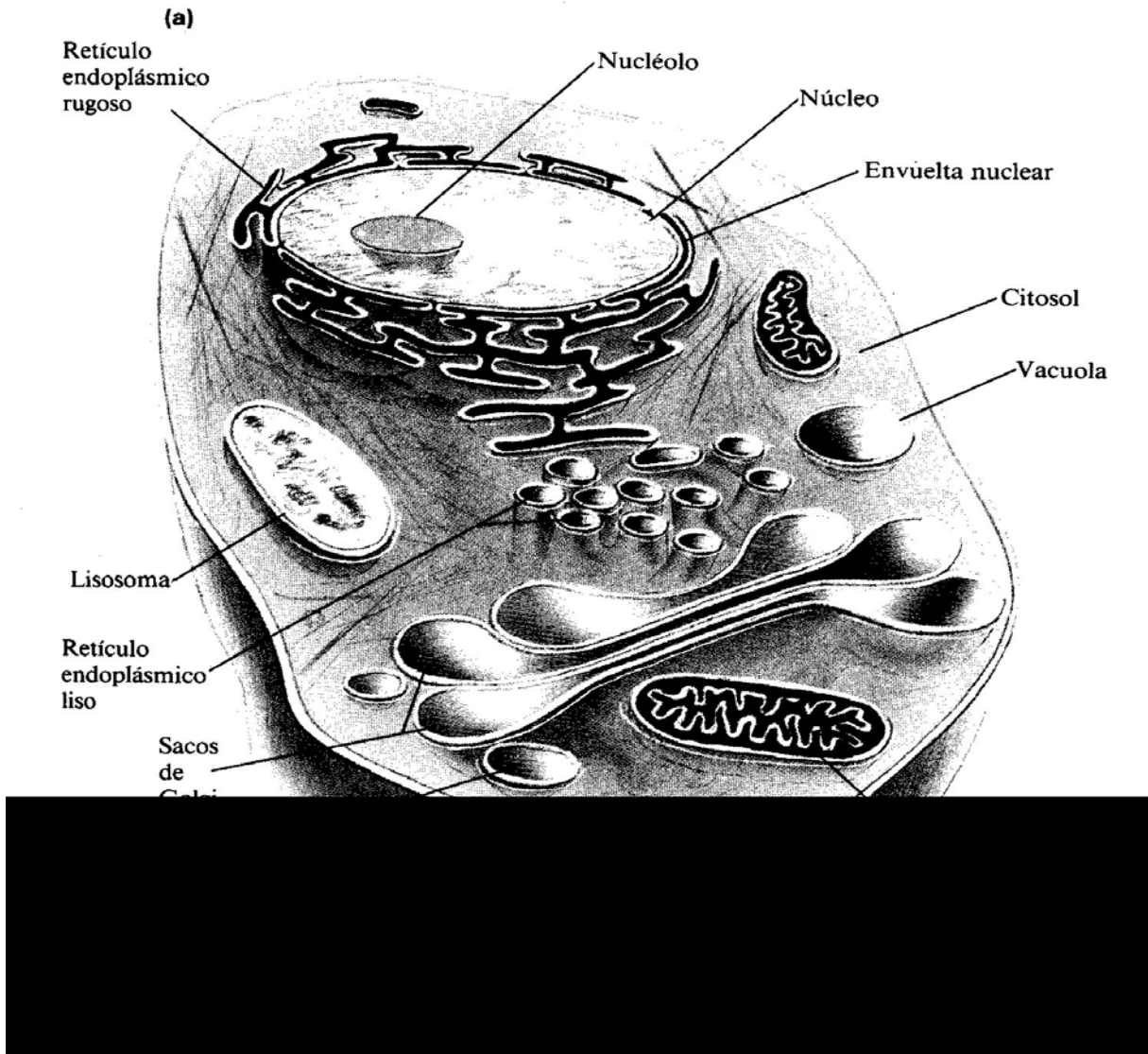
A su vez, la combinación precisa y única de los elementos antes mencionados, da origen a moléculas como: ácidos grasos, aminoácidos, nucleótidos, monosacáridos, que cumplen funciones específicas en los sistemas vivos, pero, combinaciones posteriores de ellas, pueden constituir polímeros complejos, denominados biomoléculas, entre las principales biomoléculas se encuentran: ADN, ARN, proteínas, polisacáridos y lípidos complejos, cuya función principal y sus bases estructurales se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 2. Principales biomoléculas, sus bases estructurales y funciones**

BIOMOLECULA	BASES ESTRUCTURALES	FUNCIONES PRINCIPALES
ADN	Desoxinucleótido	Material genético
ARN	Ribonucleótido	Molde para la síntesis proteica
PROTEINA	Aminoácidos	Moléculas funcionales y estructurales de las células.
POLISACARIDO	Glucosa	Reserva energética a corto plazo
LÍPIDOS	Ácidos grasos	Componentes de las membranas y reserva energética a largo plazo.

Biomoléculas, sus bases estructurales, moléculas inorgánicas, iones y elementos interactúan para formar una compleja e intrincada red que es la célula, de los diversos tipos de células las eucariotas son las que forman los tejidos, órganos y sistemas del hombre. Una célula ideal donde estén representados todos sus componentes podría ser la mostrada en la siguiente figura.

**Figura 1. Dibujo de una célula eucariota ideal. (tomada de Rawn)**



La función principal y la composición química de los principales componentes celulares se muestran en la tabla siguiente. Estos pueden variar de un tejido a otro, según el grado de especialización de la célula y el reino al cual pertenezca, como por ejemplo las dendritas, características de las neuronas o los glicosomas presentes en algunos parásitos. Algunos de los componentes son llamados frecuentemente

como organelas celulares y se caracterizan por estar delimitados por membranas. En la tabla 3, los asteriscos representan las organelas.

**Tabla 3. Componentes celulares su composición y funciones.**

<b>COMPONENTE CELULAR</b>	<b>COMPOSICIÓN MOLECULAR</b>	<b>FUNCIONES PRINCIPALES</b>
Membrana celular	Lípidos, proteínas y oligosacáridos	Delimita, selecciona y transporta moléculas, sirve de adherencia, comunicación y reconocimiento intracelular.
Citosol	Porción soluble, gran variedad de moléculas como: enzimas, iones, etc.	Asiento de reacciones de la glucólisis, síntesis de lípidos, etc.
Núcleo *	ADN básicamente, enzimas, proteínas.	Ubicación de los cromosomas, lugar de la transcripción del ADN para formar ARNm.
Ribosoma	ARN básicamente, enzimas, proteínas.	Sitio de la síntesis proteica.
Mitocondria *	Enzimas del ciclo de Krebs, $\beta$ -oxidación, cad. respiratoria.	Ciclo de Krebs, $\beta$ -oxidación, fosforilación oxidativa.
Retículo Endoplasmático *	Ribosoma, cit P-450 Enzimas para la síntesis de lípidos.	Síntesis de proteínas en los ribosomas unidos a las membranas del retículo, síntesis de varios lípidos, oxidación de xenobióticos.
Aparato de Golgi *	Variadas proteínas, carbohidratos y enzimas.	Sirve para la distribución intracelular de proteínas, reacciones de glucosilación y sulfatación.
Lisosoma *	Enzimas hidrolasas	Almacenamiento de hidrolasas, que catalizan reacciones degradativas.
Peroxisoma	Enzimas catalasa, oxidasas.	Degradación de ciertos ácidos grasos y aminoácidos, descomposición del peróxido de hidrógeno.
Citoesqueleto	Proteínas estructurales.	Brindar cierta rigidez y movilidad a la célula.

Como pudimos notar en la tabla anterior, cada uno de los componentes celulares cumplen funciones específicas dentro de la célula, esto se denomina compartimentalización, las funciones están relacionadas directamente con su composición química, estudiar los diferentes componentes celulares debe implicar entonces, el estudio de las reacciones que ocurren en ellas. La misma forma de cada

componente esta relacionada con su función y todas a su vez con los cambios metabólicos esperados normalmente, las alteraciones de estas reacciones y de las formas, repercuten en el individuo como un todo y casi siempre representan estados patológicos.

Estudiar las reacciones de los componentes celulares, que consiste en seleccionar el tejido adecuado, disgregar células, aislar moléculas intracelulares y organelas sub-celulares, usándose como herramientas para tal fin, una gran variedad de técnicas físicas.

Las preparaciones utilizadas para estudiar los procesos bioquímicos, son muy particulares, pero en general se puede seguir el siguiente plan. (tabla 4).

**Tabla 4. Preparaciones utilizadas para estudiar los procesos bioquímicos.**

METODO	COMENTARIO
Estudio a nivel del animal íntegro	1- Extirpar un órgano. 2- Alterar la alimentación 3- Administrar fármacos. 4- Administrar toxinas. 5- Animales enfermos 6- Técnicas sofisticadas como: Resonancia magnética nuclear (RMN) y tomografía con emisión de positrones.
Órgano aislado perfundido	Permite el estudio de órganos sin la influencia de otros o del sistema nervioso central.
Cortes de tejidos	Aísla los cortes tisulares de otras influencias.
Células intactas	1- Células extraídas de un organismo, como las sanguíneas, que no están alteradas. 2- Cultivos celulares.
Homogeneizados	1- Asegura una preparación sin células intactas. 2- Pueden agregarse o removerse compuestos específicos y estudiar sus efectos. 3- Pueden ser sub-fraccionados por centrifugación para producir organelos celulares individuales.
Organelas celulares aisladas	Empleadas para estudiar la función de mitocondrias, ribosomas, retículo, etc...
Sub-fraccionamiento de organelas	Usados para estudiar la función de la organela en detalle.
Aislamiento y caracterización de metabolitos y enzimas.	Usado para el análisis de las reacciones o las vías metabólicas
Clonación de genes que codifican a enzimas y proteínas.	Usado para estudiar los detalles, la estructura y la regulación de genes clonados y también puede revelar la secuencia de la enzima o proteína a la que codifica.

Nos ocuparemos principalmente de los planes comprendidos desde células intactas en adelante, pues los estudios del animal, órganos aislados y cortes de tejidos son estudios fisiológicos y citológicos.

Valiéndonos de un ejemplo hipotético, podríamos hacer un recorrido por todas las herramientas que podríamos usar para realizar nuestro estudio, digamos que deseamos saber: si la enzima malato deshidrogenasa, encargada de catalizar la oxidación del malato a oxaloacetato, está presente en las mitocondrias de los hepatocitos de una especie desconocida y si la enzima es igual a la encontrada en el hombre o en otros mamíferos.

Las técnicas actuales para aislar y purificar biomoléculas han avanzado mucho en los últimos 10 años con la ayuda de aparatos automatizados y sumamente sofisticados como la cromatografía en fase líquida a alta presión (HPLC). A continuación se describirán algunas de las técnicas arriba mencionadas.

### **3. TECNICA PARA AISLAR UNA ORGANELA EN FORMA RELATIVAMENTE PURA**

#### **3.1 Fraccionamiento diferencial:**

Para aislar la organela en forma relativamente pura, se procede los pasos siguientes:

**3.1.1 Extracción:** Para extraer la organela de la célula que la contiene, es necesario utilizar condiciones poco agresivas, para evitar la pérdida de la actividad biológica como por ejemplo realizar el procedimiento en un cuarto frío entre 0 y 4 °C y materiales mantenidos en hielo, usar soluciones acuosas a pH fisiológico, estas condiciones evitan que enzimas digestivas como proteasas y nucleasas, se liberen al romper las membranas celulares o se pierda la actividad enzimática. Una solución usada frecuentemente es sacarosa 0,25 moles/L, pH ajustado a 7,4 con un amortiguador TRIS-HCl, 0,05 moles/L que contiene  $K^+$  y  $Mg^{+2}$  a concentración casi fisiológicas, a esta solución se le conoce como STKM ( sucrosa, tris, kalium y magnesium).

**3.1.2. Homogeneización:** Para esta operación es necesario un homogeneizador que consiste en un agitador que se introduce en un recipiente de dimensiones adecuadas que contiene el órgano picado finamente en la solución tampón. La rotación controlada del agitador ejerce una fuerza mecánica en las células y las rompe, liberando, sus constituyentes en la solución de sacarosa, esta suspensión se conoce como homogenato. La toma de muestras para verificar al microscopio si las células fueron rotas es una

práctica usual. Como al romperse las membranas celulares, también se liberan las proteasas de los comportamientos sub-celulares, se hace necesario incluir inhibidores de proteasas y remover rápidamente las proteínas para garantizar que la proteína se conserve intacta. Un ejemplo de una mezcla de inhibidores a usar podría ser la mostrada en la tabla 5. Con una mezcla (denominada normalmente cocktail) como la anterior, añadida al amortiguador que contiene la proteína a estudiar, se evita la proteólisis.

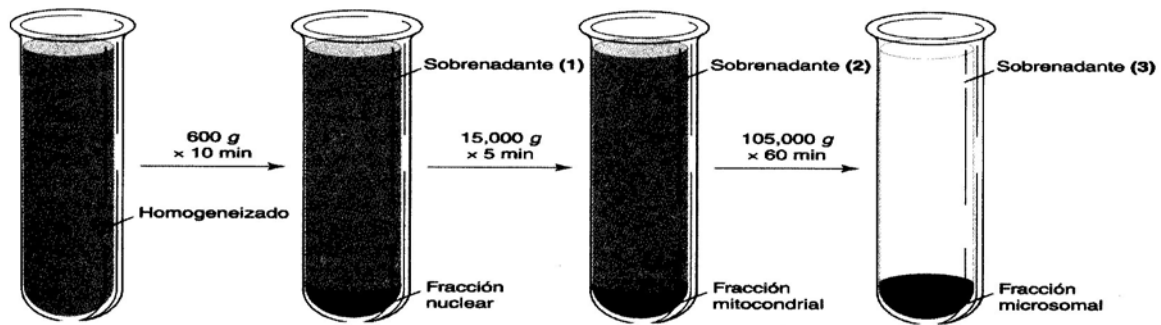
**Tabla 5      Algunos inhibidores de proteasa usados comunmente**

NOMBRE TRIVIAL	NOMBRE QUIMICO	GRUPO QUE INHIBE	CONCENTRACION
PMSF	Fenilmetano sulfonil fluoruro	Serina proteasa	35 $\mu$ /ml
EDTA	Ácido etilendiamina tetraacetico	Metaloproteasa	0,3 mg/ml
PEPTASTINA A		Ácido proteasa	0,7 $\mu$ /ml
LEUPEPTINA		Amplio espectro	0,5 $\mu$ /ml

**3.1.3. Centrifugación diferencial:** El método clásico utiliza una serie de tres pasos de centrifugación diferencial, con velocidades sucesivamente mayores, según se muestra en la figura 2, y cada uno produce un sedimento y un sobrenadante, el sobrenadante de cada paso es centrifugado en el siguiente. Este procedimiento proporciona tres sedimentos que son las fracciones nucleares, mitocondriales y microsómica. Ninguna de las fracciones está compuesta de organelas absolutamente puras, sin embargo se ha establecido que existen algunas enzimas u otro compuesto química característica de cada una de las tres fracciones, pudiendo servir como marcadores, por ejemplo el ADN en el núcleo, el marcador sirve para indicar la presencia o ausencia en una fracción determinada de la organela en el que está contenida. En la fracción microsómica se encuentran principalmente: una mezcla de retículo endoplasmático y ribosomas y en el sobrenadante de la última fracción se encuentra la savia celular es decir el citosol. El proceso de centrifugación diferencial varía de un protocolo a otro pero el principio es el mismo y las centrífugas que se encuentran en el mercado son también muy variadas en forma y tamaño, pero la característica común son sus altas revoluciones y su adaptación a las bajas temperaturas. La importancia de los estudios de fraccionamiento radica en el mejor conocimiento del funcionamiento de las organelas celulares.



**Figura 2. Esquema de separación de fracciones por centrifugación diferencial.** (tomada de Murray)



#### 4. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La fracción que nos interesa debe ser en principio separada, para posteriormente proceder a aislar y purificar la biomolécula contenida en la misma. En la tabla 5 se muestra un resumen de los principales métodos empleados para purificar y aislar biomoléculas, estos métodos normalmente se combinan para lograr la forma pura de las biomoléculas, es decir, sin contaminación de otras. El tratamiento que se utiliza para cada molécula es muy particular y debe consultarse la literatura adecuada y actualizada.

**Tabla 6. Principales métodos para separar y purificar biomoléculas.**

MÉTODO	TIPOS
Fraccionamiento Salino	Precipitación con sulfato de amonio
Diálisis	En papel
Cromatografía	Por intercambio iónico
	Por afinidad
	En capa fina
	Gas-líquido
	En fase líquida a alta presión (HPLC)
	Filtración en Geles
Electroforesis	En papel
	Con alto voltaje
	En agarosa
	En acetato de celulosa
	En gel de almidón
	En poliacrilamida
	Poliacrilamida y dodecilsulfato

Las técnicas actuales para aislar y purificar biomoléculas han avanzado mucho en los últimos 10 años con la ayuda de aparatos automatizados y sumamente sofisticados como la cromatografía en fase líquida a alta presión (HPLC). A continuación se describirán algunas de las técnicas arriba mencionadas.

#### **4.1. Precipitación Selectiva. Fraccionamiento salino.**

Dos tipos de proteínas que posean una secuencia lineal diferente de aminoácidos y una estructura terciaria distinta, inevitablemente tendrán diferentes propiedades físicas, en particular peso molecular, carga iónica, forma y solubilidad. Estas diferencias se pueden emplear para purificar un determinado tipo molecular. El primer paso en la purificación debe ser el que por lo general se emplea en preparaciones muy impuras y debe efectuarse con un gran aumento en la actividad específica. Usualmente este primer paso se vale de las diferencias de solubilidad entre las proteínas para precipitar selectivamente la proteína deseada de la solución. La solubilidad de una proteína depende del balance relativo entre las interacciones proteína-solvente, lo cual tiende a mantenerla en solución, y de las interacciones proteína- proteína, las cuales hacen que la proteína se agregue y precipite. La fuerza iónica de las soluciones es de particular importancia para especificar cual de estos tipos de interacciones predomina. Con la fuerza iónica baja, las interacciones con el solvente se incrementan, y las proteínas se hacen particularmente solubles. Se dice que están saturadas. Sin embargo, a mayores fuerzas iónicas la solubilidad de las proteínas puede disminuir con rapidez, al parecer como resultado de la disminución del agua disponible para hidratar a las proteínas, debido al aumento en la utilización del agua para la hidratación de los iones. La precipitación de las proteínas de alta fuerza iónica recibe el nombre de salado, y diferentes proteínas salan a fuerzas iónicas distintas. La sal que más se usa en la precipitación selectiva de proteínas es el sulfato de amonio, altamente soluble en agua y con una fuerza iónica muy alta. La purificación se produce agregando en forma gradual una solución de sulfato de amonio saturada al extracto proteico crudo. Conforme aumenta la adición de sal, la precipitación de proteínas también aumenta, hasta que alcanza un punto en que la proteína estudiada deja de estar en solución. Este punto se reconoce por la pérdida de actividad de la fracción soluble cuando se prueba dicha fracción en el sistema de ensayo que se emplea.

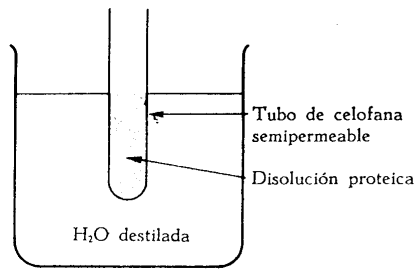
#### **4.2. Diálisis y ultracentrifugación.**

Las proteínas globulares en disolución pueden separarse fácilmente de los solutos de bajo peso molecular por diálisis (figura 3), en la cual se utiliza una membrana semipermeable para retener las

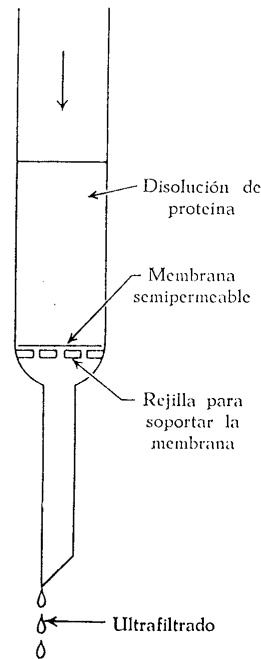
moléculas de proteína, permitiendo que las moléculas pequeñas de soluto y de agua la atraviesen. Otro método de separación de proteínas de pequeño tamaño es mediante ultrafiltración (figura 3) en la que la presión o la fuerza centrífuga se emplean para separar por filtración el medio acuoso y las moléculas de soluto de pequeño tamaño a través de una membrana semipermeable que retiene las moléculas de proteína. En estas operaciones se emplean corrientemente celofán y otros materiales sintéticos como membranas.

**Figura 3. Diálisis y ultrafiltración de una mezcla proteica (tomada de Lehninger)**

*Diálisis. Puesto que la membrana que contiene la disolución de proteína es semipermeable, el agua y los solutos tales como la glucosa o el sulfato amónico, atraviesan la membrana libremente, pero las proteínas no lo hacen. Sustituyendo varias veces la fase acuosa externa con nuevo volumen de agua destilada, la concentración de las moléculas pequeñas de soluto en la disolución de proteína puede reducirse a una cantidad despreciable.*



*Ultrafiltración de una disolución de proteína. Por aplicación de una presión positiva por arriba (o haciendo el vacío por debajo) de la membrana, puede concentrarse la proteína por filtración del agua y de las sales disueltas.*



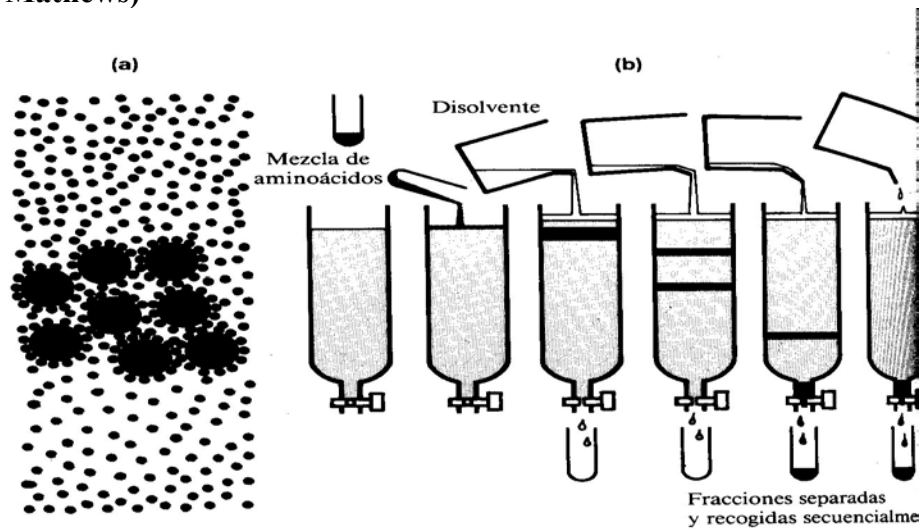
### 4.3 Cromatografía de intercambio iónico

Las proteínas son grandes electrolitos polivalentes y es muy difícil que muchas de ellas en una preparación parcialmente purificada tenga la misma carga iónica general. La carga iónica se usa como base para la purificación (o fraccionamiento analítico) en una variedad de técnicas, fundamentalmente la cromatografía de intercambio iónico y la electroforesis en zona. La carga general de una proteína es

la suma de todas las cargas individuales de los aminoácidos que la componen. Puesto que la carga de cada aminoácido depende del pH del medio, la carga de las proteínas totales también depende de dicho pH. Conforme al pH disminuye, los grupos con carga negativa se neutralizan y los grupos con carga positiva se incrementan. La condición opuesta se presenta cuando aumenta el pH. Como ya se dijo, existe un pH para cada proteína donde las cargas negativas igualan al número de cargas positivas y se denomina punto isoeléctrico, es decir, el pH en el cual la proteína es neutral. El punto isoeléctrico de la mayor parte de las proteínas está por debajo de un pH de 7 y, por lo tanto, son aniónicas a un pH neutro.

Las técnicas cromatográficas se basan en la distribución de las proteínas entre una fase móvil y una inmóvil. La fase móvil se forma por el solvente conforme éste fluye a lo largo arrastrando cierta cantidad de proteína. La fase inmóvil puede ser papel filtro, resinas cargadas, camas porosas inertes, etc; cualquiera puede proporcionar una alternativa con la cual las proteínas moleculares queden asociadas en lugar de hacerlo con el solvente. La cromatografía de intercambio iónico depende de la asociación iónica de las proteínas con grupos cargados enlazados con un material inerte de soporte, a menudo la celulosa. Las resinas que más se emplean para el intercambio iónico son la dietilaminoetil (DEAE)-celulosa y la carboximetil (CM)-celulosa. La DEAE-celulosa está cargada positivamente y por lo tanto actúa uniéndose con moléculas cargadas negativamente; constituye pues un intercambiador aniónico. La CM-celulosa tiene carga negativa y actúa como un intercambiador catiónico. La resina se empaca en una columna y la solución de proteína se pasa a través de esta columna en un amortiguador tal, que se promueva el enlace de algunas o todas las proteínas con la resina. Después, las proteínas unidas a la resina pueden ser desplazadas aumentando la fuerza iónica del amortiguador (el cual agrega pequeños iones para competir con los grupos cargados de las macromoléculas por los sitios que ocupan en la resina) o cambiando su pH. La elusión puede tener lugar en una serie de pasos sucesivos mediante la adición secuencial de amortiguadores diferentes o de forma continua mediante la adición de una solución que cambie de continuo su fuerza iónica o pH, esto es, un gradiente. La figura. 4 ilustra una representación diagramática de la separación de dos tipos de proteínas mediante una elusión por pasos de una columna de intercambio iónico.

**Figura 4. Separación de dos proteínas en DEAE-Celulosa, cargada positivamente. (Tomada de Mathews)**

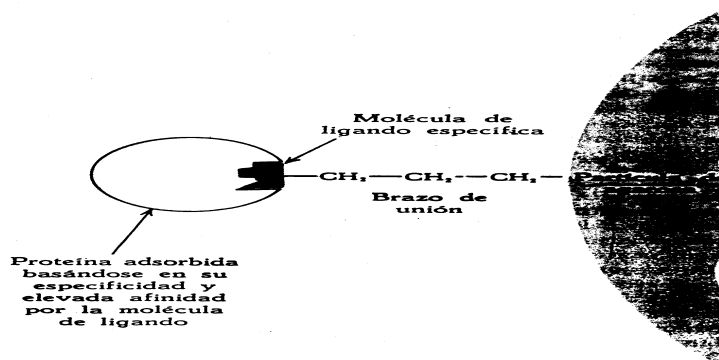


#### 4.4. Cromatografía por afinidad

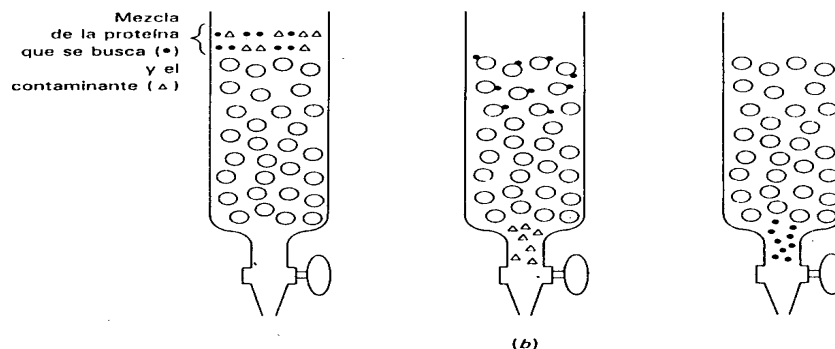
La cromatografía por afinidad puede ser un procedimiento de gran aplicación potencial siempre y cuando se disponga de la molécula adecuada para una interacción específica con la proteína que se está buscando. En otros casos, se ha purificado enzimas específicas usando inhibidores de la enzima inmovilizados para "capturar" a la molécula. En otros casos, se han empleado anticuerpos específicos a fin de formar selectivamente complejos con sus antígenos respectivos; es decir, con moléculas que han inducido la formación del anticuerpo usado. También se pueden separar proteínas aprovechando la afinidad específica de éstas a receptores (proteínas) de membranas celulares, por ejemplo, el receptor de la insulina es específico para esta hormona, ésta puede utilizarse en la purificación del receptor en cuestión. La cromatografía por afinidad (figuras 5 y 6) utiliza en este caso una columna que contiene un material inerte (una matriz) al cual se han unido covalentemente moléculas de insulina. Si una preparación de proteínas de la membrana con impurezas pasa a lo largo de esta columna, la interacción entre la hormona inmovilizada en la columna y su receptor que se encuentra en solución, es tal, que los receptores se combinan con la hormona y se separan de la solución (figura 5), purificando el receptor en un solo paso.

Otro ejemplo, es la separación de algunas proteínas ribosomales que se unen en sitios específicos a lo largo del RNA ribosomal. Cuando se preparan columnas por afinidad usando RNAr 5S de *E. coli* como factor inmovilizado, se pueden eliminar tres proteínas ribosomales de la gran subunidad (L5, L18 y L25) de mezclas no fraccionadas pasando a lo largo de la columna.

**Figura 5. Cromatografía de afinidad** (tomada de Gerald Karp).



**Figura 6. Cromatografía de afinidad: pasos en el procedimiento de cromatografía.**

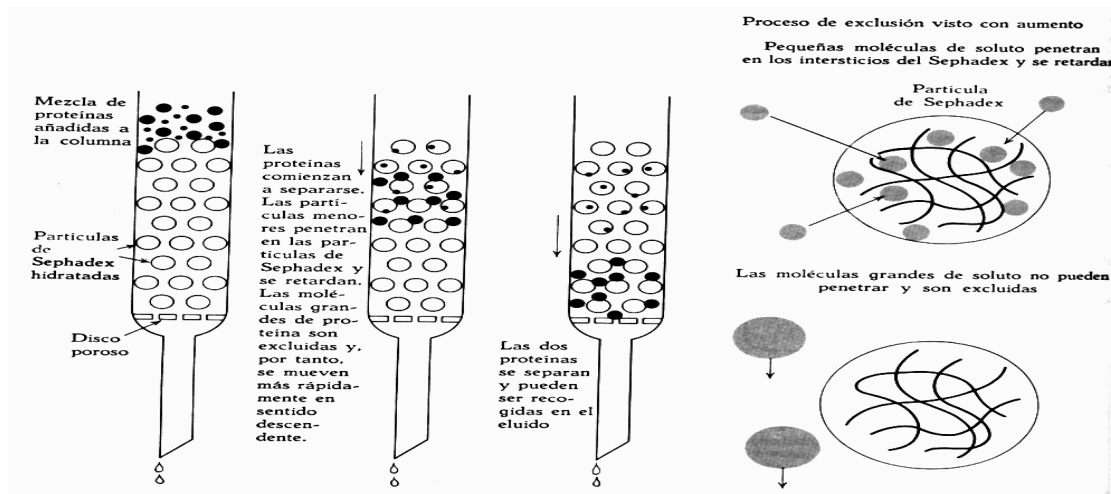


#### 4.5. Filtración en gel

La filtración en gel, conocida también como cromatografía de exclusión molecular, es un tipo de cromatografía en el que la base de la separación es el tamaño de la molécula en lugar de las propiedades ácido-base, como es el caso de la cromatografía de intercambio iónico. Se utiliza una columna empaquetada con esferas o gránulos de un gel poroso de elevado grado de hidratación, el cual es lavado y equilibrado con una tampón. Los materiales corrientes para el llenado de las columnas son el Sephadex, nombre de un derivado polisacárido con enlaces cruzados, el Bio-Gel, un derivado comercial de poliacrilamida, y la agarosa, otro polisacárido, de los cuales se puede elegir el grado de porosidad interna. La mezcla de proteínas se aplica en la parte superior de la columna, y se eluye con un tampón. A medida que la muestra desciende a lo largo de la columna, las moléculas más grandes se mueven más rápidamente, ya que no pueden entrar en las esferas del gel y sólo pueden fluir por los intersticios que hay entre ellas. Por otra parte, las moléculas más pequeñas pueden penetrar libremente en el poro del gel, ven obstaculizado su paso a través de la columna y en consecuencia se rezagan. Si se recogen las fracciones cuando se pasa la solución tampón, las primeras fracciones contendrán las moléculas más grandes (figura 7).

Considérese que la proteína que va a aislar tiene un peso molecular de aproximadamente 125.000 daltons y que se encuentran presentes dos proteínas contaminantes, una de 250.000 daltons y otra de 75.000 daltons. En este caso, puede emplearse una columna de Sephadex G-150, puesto que las partículas sólo permite que penetren moléculas con un peso molecular menor de 200.000. Cuando una solución que contiene estas proteínas pasa a lo largo de la columna, la proteína cuyo peso molecular es de 250.000 no puede penetrar en los poros del gel, y permanece disuelta en la fase móvil del solvente y puede ser eluída tan pronto como dicho solvente preexistente en la columna se agote. Por el contrario, las otras dos proteínas pueden difundir a través de los poros y se retrasan en su paso a lo largo de la columna. Conforme se agrega más y más solvente, estas proteínas son movilizadas hacia abajo. El contaminante más pequeño se retrasa en mayor grado que la proteína deseada y, por lo tanto se requiere un mayor volumen de solvente para movilizarla a lo largo de la columna. La cromatografía de exclusión molecular puede utilizarse también para separar mezclas de otras clases de macromoléculas, así como bioestructuras muy grandes, por ejemplo, los virus, los ribosomas, núcleos celulares o incluso bacterias. La capacidad de resolución es tan grande, que este sencillo método se utiliza de manera muy generalizada como método de determinación del peso molecular de las proteínas.

**Figura 7. Separación de dos proteínas de diferente tamaño mediante una columna de Sephadex. (tomada de Lehninger)**



#### 4.6. Electroforesis

Otra técnica importante y difundida para purificar, pero más empleada para fraccionar las proteínas es la electroforesis. Existen muchas y diversas variaciones de la técnicas electroforéticas, pero todas dependen de la capacidad migratoria de las moléculas cargadas cuando se les coloca en un campo

eléctrico. Las proteínas con una carga general negativa se mueven hacia el polo positivo, el ánodo, mientras que las proteínas cargadas positivamente migran en dirección opuesta. La distancia a la cual migra una proteína depende del peso molecular y de su carga, lo cual depende del pH del medio. Entre mayor sea la carga y menor el peso molecular, mayor movilidad electroforética, esto es, la distancia que se mueve por unidad de tiempo por voltio. Puesto que es muy difícil que dos proteínas presentes en una mezcla parcialmente purificada posean combinaciones de carga y tamaño que causen que migren de manera semejante, la electroforesis es una técnica muy valiosa para exhibir la diversidad de tipos de proteínas presentes en una mezcla.

#### **4.6.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).**

En esta electroforesis se utiliza la poliacrilamida como medio semisólido de soporte, a través del cual pueden migrar individualmente las moléculas de proteínas. Existen dos formas mediante las cuales se preparan los geles de poliacrilamida: como columnas cilíndricas o como placas verticales planas.

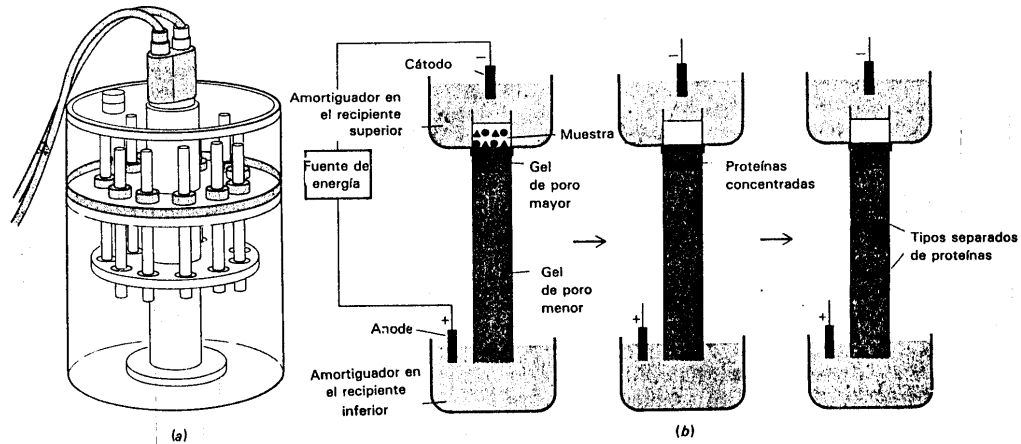
##### **4.6.1.1 Electroforesis en columnas cilíndricas:**

La figura 7 y las siguientes líneas se refieren a la electroforesis que utiliza las columnas cilíndricas, esto es la electroforesis en disco. Los mismos principios se aplican a la electroforesis en placas de poliacrilamida. Con objeto de iniciar un fraccionamiento con un disco PAGE, se llenan los tubos de vidrio muy pequeños con una solución de poliacrilamida que polimeriza en un gel semisólido al ser expuesta a la luz ultravioleta. La porosidad del gel y la facilidad con que pueda atravesarlo una macromolécula depende de la concentración de poliacrilamida: entre menor sea esta concentración, (hasta un mínimo de aproximadamente 2 %), con mayor rapidez puede migrar una molécula de proteína. El tubo que contiene al gel inserta entre dos compartimientos que contienen un amortiguador en el cual se colocan electrodos, y la solución de proteínas se coloca en el tubo sobre la poliacrilamida solidificada. En estas condiciones se aplica un voltaje entre los compartimientos que contienen el amortiguador y la corriente fluye a través de cada uno de los tubos, haciendo que las proteínas migren a lo largo de los geles como discos que se mueven a diferentes velocidades. Después de cierto tiempo, la corriente se desconecta y se sacan los tubos, extrayendo a los geles de su cubierta de vidrio. El gel que se obtiene de un tubo puede teñirse para facilitar la localización de las bandas de proteína o por otro lado, si las proteínas se encuentran radiactivamente marcadas puede determinarse su localización



presionando el gel seco contra un fragmento adyacente de película de rayos X y producir un autorradiograma.

**Figura 8. Diagrama de un aparato de gel en disco (tomada de Gerald Karp).**



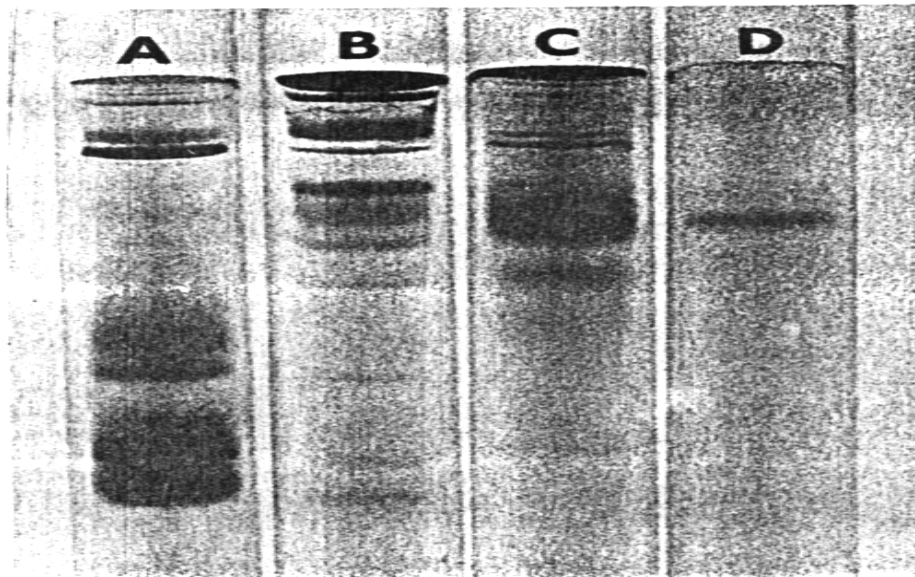
**Figura 20-30. Electroforesis en gel de poliacrilamida.** a) Diagrama de un aparato de gel en disco que muestra varios tubos de vidrio suspendidos entre una cámara de amortiguador superior y otra inferior. Las proteínas migran a través de estos tubos que contienen la poliacrilamida en gel. b) El dibujo de la izquierda muestra la mezcla de proteínas dispuesta sobre el gel de poro mayor en espera de la llegada de corriente. El dibujo del centro muestra un estadio inicial de la electroforesis. Las proteínas se han movido rápidamente a través del gel de poro mayor (el cual ofrece muy poca resistencia), de manera que todos se concentran en la parte superior del gel de poro pequeño, el cual separa los componentes con base en su carga y peso molecular (dibujo de la derecha).

La figura 8 es un ejemplo de electroforesis en gel de poliacrilamida dando el valor de los diferentes pasos que se siguen durante un proceso de purificación; en este caso se busca la proteína obtenida del suero del cangrejo azul y la purificación se supervisó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. En el primer gel se muestra la variedad de proteínas presentes en un suero no fraccionado. En el segundo, tercero y cuarto geles se indica la naturaleza de la preparación, después de diversos pasos de purificación (precipitación con sulfato de amonio, cromatografía con DEAE-celulosa y centrifugación en un gradiente de densidad de sacarosa). Al final de los pasos de purificación, se puede detectar una proteína única en el gel de poliacrilamida, una proteína que existe como tal a una concentración muy pequeña en el suero original, por lo cual no producía una banda detectable en el primer gel de la figura. Con cada paso, es posible observar el incremento de la intensidad de esta banda con una correspondiente disminución en las otras bandas.

La electroforesis en gel de poliacrilamida también puede ser un medio muy valioso para determinar el peso molecular de las diferentes proteínas que migran cuando la electroforesis se emplea en presencia de detergentes iónicos como el dodecil sulfato de sodio (SDS). La técnica con el SDS, las moléculas de detergente con carga negativa forman complejos en grandes cantidades con la proteína en un grado proporcional al peso molecular de dicha proteína. Como consecuencia, cada tipo de proteína,

cualquiera que sea su tamaño tiene una carga equivalente por unidad de peso molecular y tiene la misma movilidad electroférica en una solución libre. Sin embargo, como resultado de la naturaleza de entrecruzamiento de la poliacrilamida en el tubo, entre mayor sea el peso molecular de la proteína que se encuentra en migración, más proteína se retiene y por lo tanto su movilización es más lenta. Como resultado, las proteínas se separan con base en su peso molecular. El mayor inconveniente del empleo de los procedimientos de fraccionamiento del SDS es su tendencia a la desnaturalización irreversible de las proteínas en separación.

**Figura 9. Electroforesis de preparaciones sucesivas durante la purificación de una proteína de suero del cangrejo azul (tomada de Gerald Karp).**

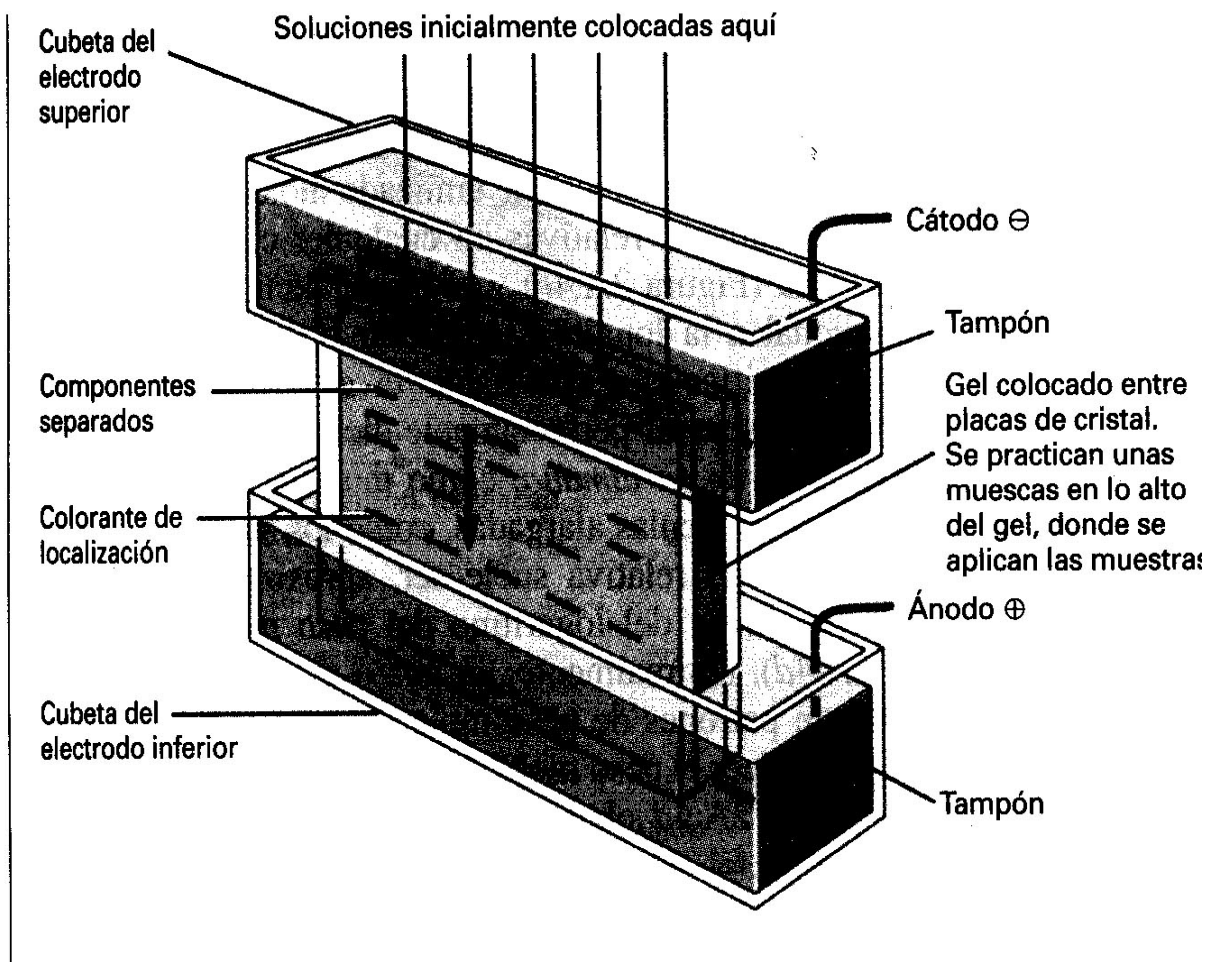


#### 4.6.1.2 Electroforesis en placas verticales planas

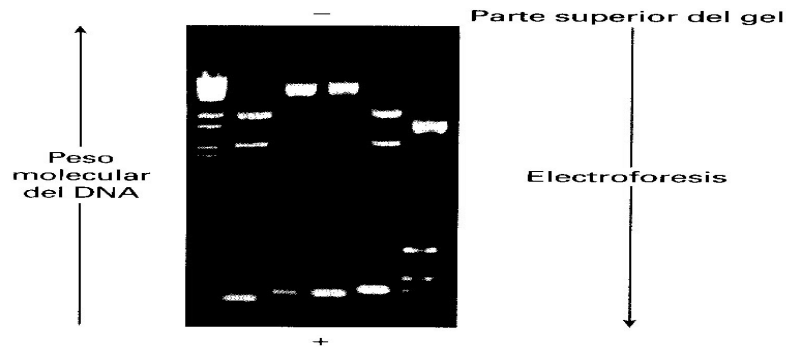
Es una técnica muy utilizada con las proteínas y los ácidos nucleicos. Se coloca un gel que contenga la solución tampón adecuada a modo de lámina entre dos placas de cristal. Los materiales más corrientes son la poliacrilamida, un polímero reticulado soluble en agua, y la garosa, un polisacárido. La lámina se coloca entre los compartimientos de los electrodos, seleccionando la parte inferior como ánodo o cátodo, dependiendo si se van a separar aniones o cationes. Con una pipeta se coloca cuidadosamente una pequeña cantidad de una solución de cada muestra en cada una de las muescas practicadas previamente en la parte superior del gel. Generalmente se añade a la muestra glicerol y un colorante “de localización” catiónico o aniónico soluble en agua. El glicerol hace que la muestra sea densa, de

modo que no se mezcle con la solución tampón de la cámara del electrodo superior. El colorante se desplaza más rápidamente que la mayoría de los macroiones, de modo que el investigador puede seguir la evolución del experimento con facilidad. La corriente se mantiene conectada hasta que la banda de colorante de localización esté cerca de la parte inferior de la lámina. Entonces se retira el gel de entre las placas de cristal y generalmente se tiñe con un colorante que se une a las proteínas o a los ácidos nucleicos. Dado que la mezcla de proteínas se aplicó en forma de banda estrecha en la parte superior del gel, los componentes que se desplazan con movilidades diferentes aparecen como bandas estrechas en el gel, aunque las bandas puedan ensancharse en cierta medida por difusión. La figura 10 muestra un ejemplo de separación de fragmentos de ADN con este método. La movilidad relativa de cada componente se calcula a partir de la distancia que se ha desplazado con relación al colorante de localización.

**Figura 10. Equipo de electroforesis vertical. (Tomada de Mathews)**



**Figura 11. Gel que muestra la separación de fragmentos de ADN. (Tomada de Mathews)**



#### 4.7 Purificación del receptor de insulina

Para ilustrar el empleo de las técnicas preparación, se describirán brevemente los pasos que tomó Pedro Cuatrecasas en la purificación del receptor de la insulina. El procedimiento se inicia con la obtención de hígados de ratas y su homogeneización en hielo seco en sacarosa al 0.25 M. Con objeto de supervisar la distribución de la proteína receptora durante los diferentes pasos de purificación, se emplea un sistema de ensayo que mide la cantidad de insulina radiactiva que se une con cada fracción, proporcionando por lo tanto una medida de la proteína receptora presente. El receptor de insulina se localiza dentro de la membrana plasmática de las células hepáticas, la cual se purifica durante la centrifugación diferencial. A fin de solubilizar la proteína receptora proveniente de las membranas de un sedimento obtenido a 40.000 g, se agrega el detergente Tritón X-100. En este caso, se hace la purificación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y cromatografía por afinidad. La purificación que se logra con cada paso se muestra en las tablas 7 y 8 a continuación.

**Tabla 7. Purificación del receptor de la insulina**

Muestra	Volumen (ml)	Proteína (g)	Actividad (cpm/mg)†
Homogeneizado crudo	2000	88 [100]*	1,800 [100]
Sobrenadante 600 x g	1650	50 [62]	3.900 [122]
Sobrenadante 12000 x g	1400	28[32]	5,750 [101]
Sedimento 40000 x g	200	4.6 [5]	37,000 [108]

\* los paréntesis representan los porcentajes del total

† Actividad de insulina [<sup>125</sup>I] unido.

**Tabla 8. Purificación del receptor de la insulina**

Preparación o procedimiento	Actividad unida a la insulina (pmol/mg de proteína)	Purificación
Homogeneizado crudo de hígado	0.008	0
Membranas hepáticas	0.15	20*
Extracto de las membranas con tritón	0.26	1.7†
Fracción 20-40% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.75	3 ‡
Cromatografía en DEAE-celulosa	14	60 ‡§
Cromatografía de afinidad ¶	Cerca 2000	Cerca 8,000‡ Cerca 250,000*

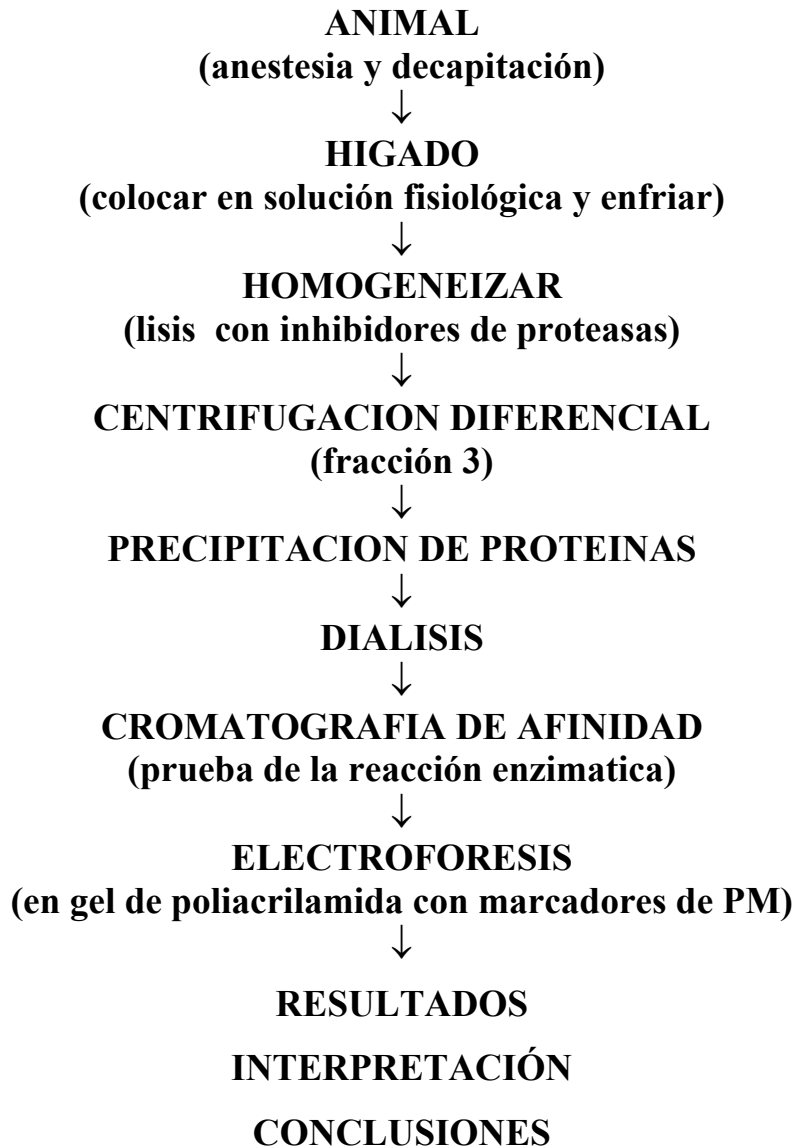
- Clave:** \* Comparación con el homogeneizado crudo de hígado  
† Comparación con las membranas del hígado  
‡ Comparación con el extracto en tritón de las membranas del hígado  
§ La diálisis de los extractos de tritón da por resultado una purificación de tres veces; la cromatografía en DEAE da como resultado una purificación adicional de cerca de 20 veces.  
¶ Estos resultados son aproximados debido a la dificultad para determinar con precisión las pequeñas cantidades de proteína obtenidas mediante estos procedimientos.

Con cromatografía por afinidad se alcanza la mayor purificación (Figura 6), lo cual ejemplifica el gran valor de este procedimiento. La preparación impura pasa a través de una columna en la cual se encuentran covalentemente enlazadas a una matriz de agarosa las moléculas de insulina. La proteína receptora queda unida mientras los contaminantes pasan de largo, luego los receptores proteicos son eluidos mediante la adición de urea, la cual rompe los enlaces no covalentes que mantienen juntas a las dos macromoléculas, lo que produce la liberación de la proteína receptora móvil hacia el eluyente. Se supone que la purificación general de un receptor por estas técnicas es de aproximadamente 250.000 veces. Ya que se requiere de una purificación de aproximadamente unas 400.000 veces para alcanzar una pureza completa; es evidente que estos procedimientos, fundamentalmente los de cromatografía por afinidad, son efectivos.

Existen otras técnicas mas para estudiar las biomoléculas, aquí solamente hemos comentado las mas usuales y sencillas, pero el avance de nuevas tecnologías es gigantesco y ha dado origen a una nueva ciencia, la Biotecnología.

Espero que con este experimento teórico podamos extraer, purificar, identificar y cuantificar la enzima malato deshidrogenasa presente en las mitocondrias de los hepatocitos de aquel animal.

## 5. PROTOCOLO



## 6. ANEXOS

### 6.1 Preparación de soluciones

El éxito en resultados de las pruebas de laboratorio, en general se debe a la correcta preparación de las soluciones a usar, es por esta razón que se incluye en este aparte un repaso sobre la preparación de soluciones, pero además quisiéramos motivar a los estudiantes a consultar los textos y apuntes en el área.

### 6.2 Soluciones

Son mezclas homogéneas de composición variable cuyas componentes son denominados soluto y solvente, en donde el solvente es el componente presente en mayor cantidad. La naturaleza y cantidad relativa de los componentes de la solución representa la concentración, la cual puede expresarse en:

Porcentaje (% p/p) = gramos de soluto en 100 gramos de solución.

Porcentaje (% p/v = gramos de soluto en 100 ml de solución

Molaridad (M) = Numero de moles de soluto en disueltos en un litro de solución

Molalidad (m) = Numero de moles de soluto en disueltos en un 1000 gramos de solvente.

Normalidad (N) = Numero de equivalentes-gramo de soluto disueltos en un litro de solución.

Peso Equivalente de una base o ácido = peso molecular dividido entre el número de oxhidrilos (OH<sup>-</sup> sustituibles) o protones (H<sup>+</sup> sustituibles) que contiene.

Peso Equivalente de una sal = peso molecular dividido entre el número de valencia.

### 6.3 Formulas de soluciones

$$M = \frac{\text{N}^\circ \text{ de moles sto}}{\text{Litros de solución}} = \frac{\text{mol}}{\text{litro}}$$

$$\text{N}^\circ \text{ de moles} = \frac{\text{masa (g)}}{\text{PM}} = \frac{\text{g}}{\text{g/mol}}$$

$$N = \frac{\text{N}^\circ \text{ Eq de sto}}{\text{Litros de solución}} = \frac{\text{eq}}{\text{litro}}$$

$$\text{N}^\circ \text{ de equivalente} = \frac{\text{masa (g)}}{\text{PE}} = \frac{\text{g}}{\text{g/eq}}$$

$$\text{PE} = \frac{\text{PM}}{\text{N}^\circ \text{ H}^+ \text{ ó OH}^-}$$

$$\% \text{ P/P} = \text{g/g} \longrightarrow 100 \text{ g de soluto} / 100 \text{ g de solución}$$

$$\% \text{ P/V} = \text{g/ml} \longrightarrow 100 \text{ g de soluto} / 100 \text{ ml de solución}$$

$$\text{Densidad} = \frac{\text{masa}}{\text{volumen}}$$

$$\text{Normalidad (N)} = 2 \text{ Molar (M)}$$

$$\text{Nconcentrado} = \frac{\% \text{ P/P} \times \text{densidad} \times 10}{\text{PE}}$$

$$\text{Mconcentrado} = \frac{\% \text{ P/P} \times \text{densidad} \times 10}{\text{PM}}$$

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$1 \text{ N} \text{ ——— PE ——— 1 litro}$$

$$1 \text{ M} \text{ ——— PM ——— 1 litro}$$

#### 6.4 Ejemplo:

Calcule la concentración porcentual (% p/v), molar (M), normal (N) y molal (m) de una solución que contiene 2 gramos de hidróxido de bario, Ba(OH)<sub>2</sub>, en 500ml. de solución. PM Ba(OH)<sub>2</sub> = 171,3 g/mol, dsol. = 1,01g/mol.

$$\%p/v = 2 \text{ g de soluto}/500\text{ml. Solución} = 0,004\%$$

$$M = 2 \text{ g de soluto}/ 171,3\text{g/mol} \times 0,5\text{litros} = 0,023\text{moles/litros.}$$

$$N = \text{equivalentes de soluto}/ \text{litros de solución.}$$

$$\text{Equiv. Solute} = \text{g. de soluto} / \text{peso Equiv.}$$

$$\begin{aligned} \text{Peso Equiv. (base)} &= \text{P.M- gramo}/ \# \text{ de unidades OH- sustituibles} \\ &= 171,3\text{g/mol} / 2\text{equiv/mol} \\ &= 85,7 \text{ g/equiv.} \end{aligned}$$

$$\text{Equiv. Solute} = 2 \text{ g}/ 85,7 \text{ g/equiv.} = 0,023 \text{ equiv.}$$

$$N = 0,023 \text{ equiv.} / 0,51 = 0,046 \text{ equiv./l.}$$

$$\begin{aligned} \text{Molalidad} = m &= \text{moles de soluto}/ \text{1kg. de solvente.} \\ \text{g. de solvente} &= \text{g solución} - \text{g soluto.} \\ &= V_{\text{sol.}} \text{ dsol} - \text{g soluto.} \\ &= 500\text{ml. } 1,01\text{g/ml.} - 2\text{g.} \\ &= 505\text{g} - 2\text{g} = 503\text{g.} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kg. De solvente} &= 0,503 \\ \text{Moles de soluto} &= 0,011\text{moles} \end{aligned}$$

$$\text{Molalidad} = m = 0,011\text{moles}/0,503\text{Kg solvente} = 0,022 \text{ g}$$



### 6.5 Problemas para resolver:

- 1.- Prepare 50 ml de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 N a partir de una solución al 96 % P/P y una densidad de 1,84 g/ml.
- 2.- Prepare 300 ml de una solución de NaOH 0,25 N a partir de una solución de NaOH 5 M.
- 3.- Realice los cálculos necesarios para preparar 500 ml de una solución 10 N de NaOH.
- 4.- Cuántos ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado de densidad 1,56 Kg/L y 98 % P/P se necesita para preparar 1 litro de una solución de dicho ácido a una concentración de 2/3 N.
- 5.- Cuántos gramos de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  son necesarios para preparar 100 ml de una solución a una concentración 0,1 N.
- 6.- En que volumen de solución deben disolverse 27 gramos de cloruro de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) para preparar una solución 0,1 M.
- 7.- Determine a que porcentaje %P/V corresponde la solución 10 N de NaOH.
- 8.- Si tenemos una solución 5 N de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ¿Cuántos ml necesitamos de ella para preparar 200 ml de solución al 1.5 M?.
- 9.- Calcular la molalidad de una solución que contiene 32 gramos de naftaleno ( $\text{C}_{10}\text{H}$ ) en 500 gramos de benceno ( $\text{C}_6\text{H}_6$ ).
- 10.- Con HCL concentrado, que contiene 37 % de ácido y una densidad de 1,18 g/ml, se preparan 100 ml de solución 0,5 N ¿ Que volumen de HCL concentrado necesitaremos?

## 7. INFORME 1

Apellidos  
Grupo de prácticas  
Fecha

Nombres  
N° del mesón  
N° del estudiante

Calificaciones

Entrada		Desarrollo		Informe		<b>Definitiva</b>	
---------	--	------------	--	---------	--	-------------------	--

1. Mencione los principales procedimientos para realizar un estudio a nivel molecular, haga una tabla para escribir su utilidad.
2. Dibuje una célula procariota y establezca comparaciones con una eucariota.
3. De los problemas que aparecen al final del manual sobre preparación de soluciones, resuelva y entregue en el informe aquellos que le indique el profesor.

**Nota: El informe debe ser entregado al finalizar la práctica y sin anexar hojas.**