

Proteínas, determinación y detección.

Juan Santibáñez

31/07/2006

Las propiedades de las proteínas son utilizadas para su determinación y purificación.

1.- Las proteínas están formadas por aminoácidos conformando polímeros Macromoleculares.

2.- tienen carga

3.- distintos tamaños moleculares

4.- tienen propiedades hidrofílicas y/o hidrofóbicas

¿Porqué purificar las proteínas?

- 1.- Determinar su actividad (Enzimas)
 - 2.- modificaciones post-traduccionales (fosforilaciones)
 - 3.- interacciones, ensamblaje
 - 4.- determinación de su estructura tridimensional
 - 5.- análisis de su función biológica
- Desarrollo de drogas terapéuticas

Material de partida.

-Tejidos, células (vegetales o animales)

1.- homogenización (destrucción del tejido)

2.- fraccionamiento (etapas de purificación)

3.- cromatografías.

-DNA recombinante.

1.- Expresión de proteínas recombinantes en bacterias, células de insectos, Mamarias o vegetales.

¿Cómo las detectamos?

- 1- Absorbancia a 280nm, se necesita un espectrofotómetro UV
- 2- por colorimetría (por interacción con colorantes)
- 3.- por su actividad específicas sobre sustrato (Enzima).

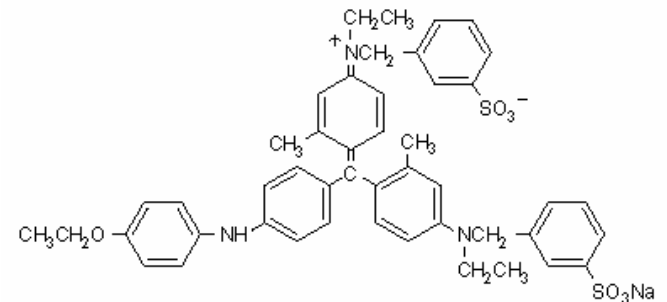
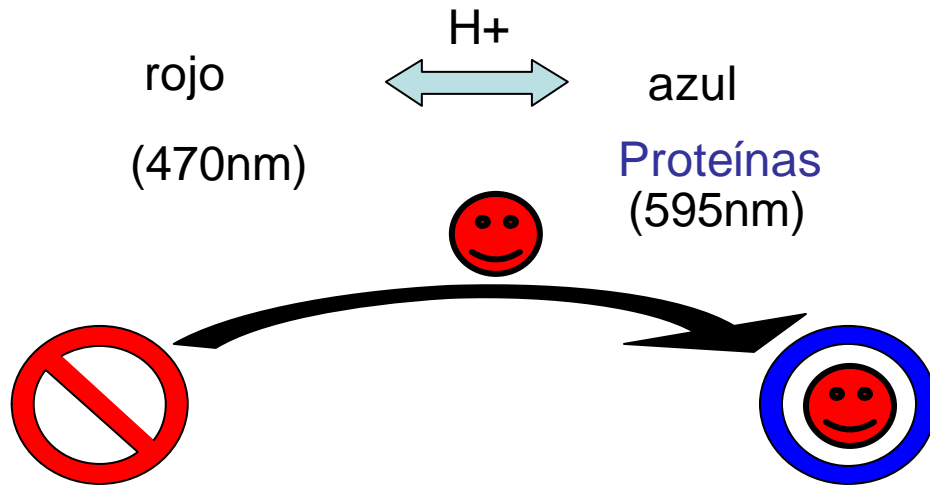
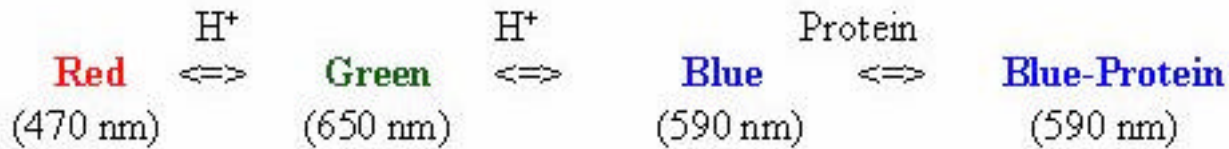
Colorimetría:

Ensayo de Bradford.

. Colorante azul de coomassie G-250.

-normalmente absorbe a 470nm

- unido a las proteínas a los residuos de arginina y aromáticos (triptofano, tirosina) absorbe con un máximo a 595nm.



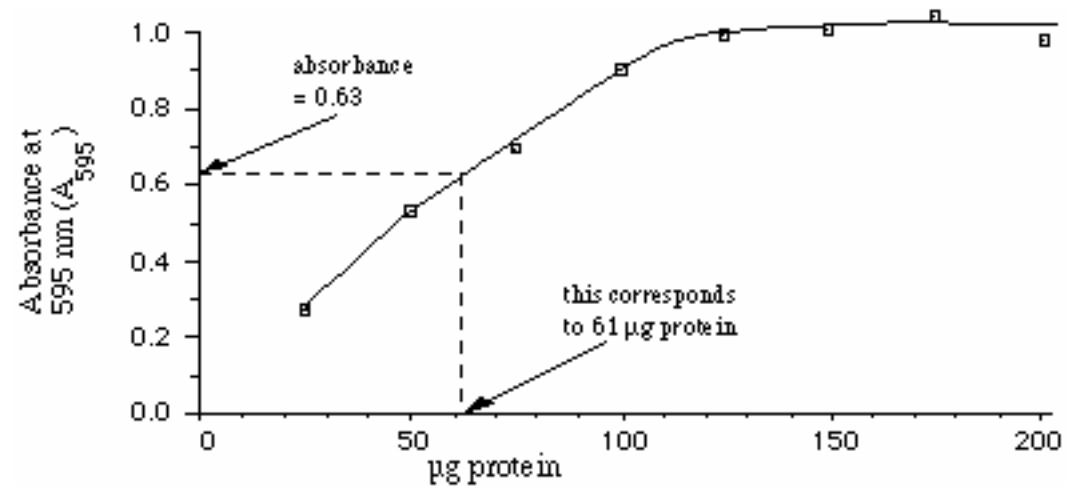
Curva estándar

Ventajas

- rápido
- barato
- sensible
- compatible

Desventajas.

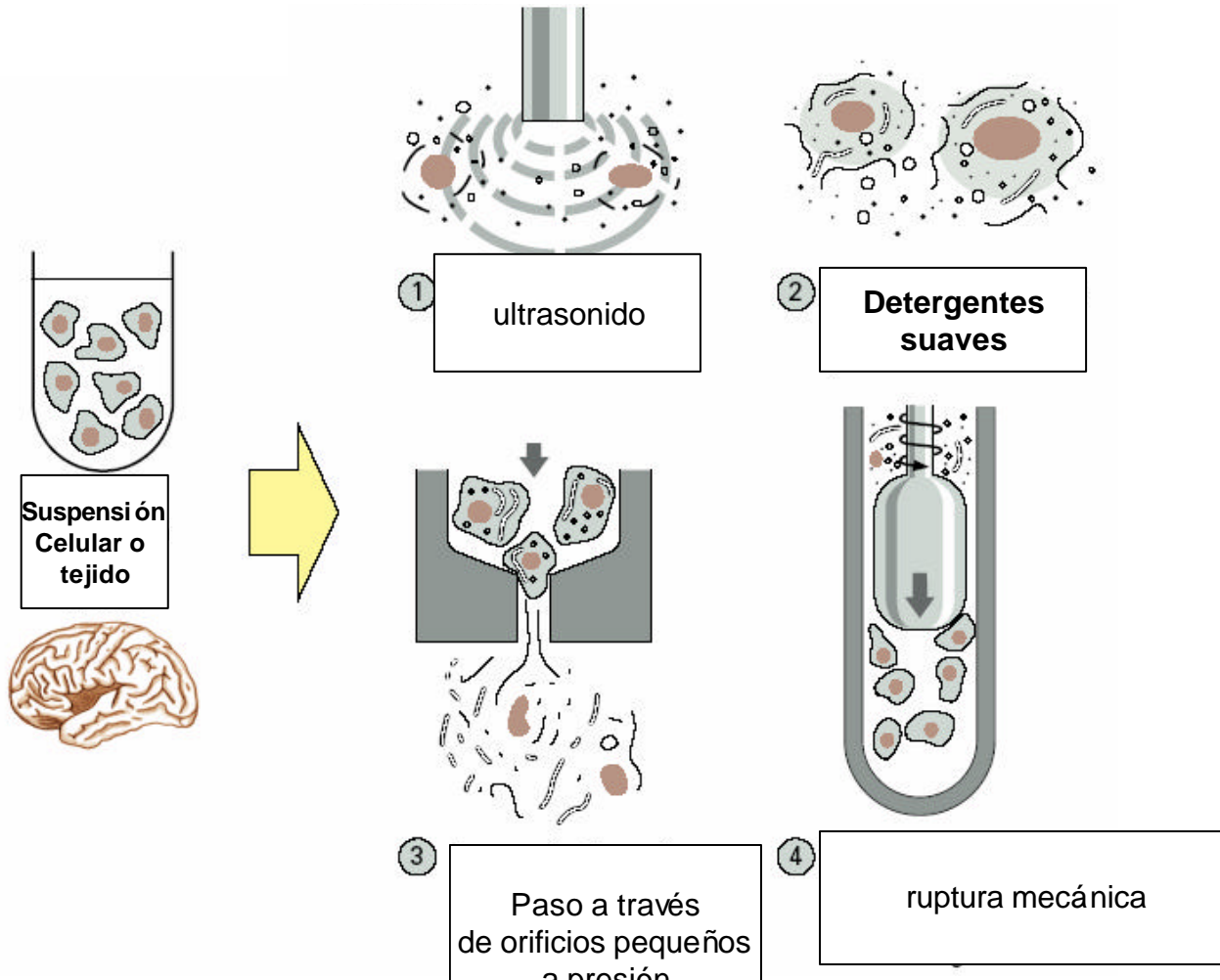
- interferencia por detergentes.



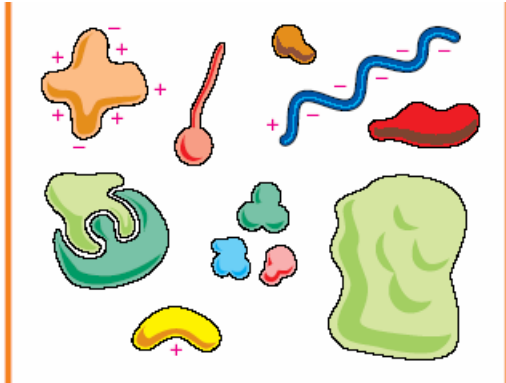
Purificación de proteínas

Ruptura de tejidos y células

-La primera etapa en la purificación de la mayoría de las proteínas es la homogenización en forma controlada.



Separación de proteínas



Cromatografía en columna

Fraccionamiento por paso de las proteínas por una fase sólida y porosa y arrastre por una fase móvil líquida.

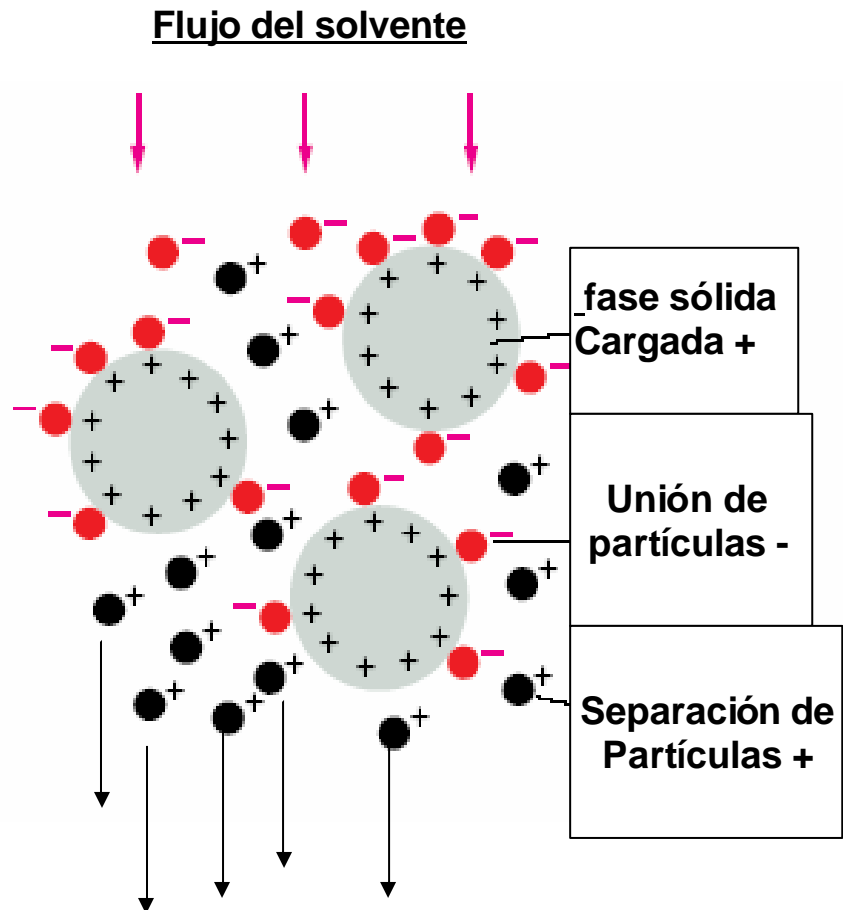


Tipos de cromatografías

-Por intercambio iónico

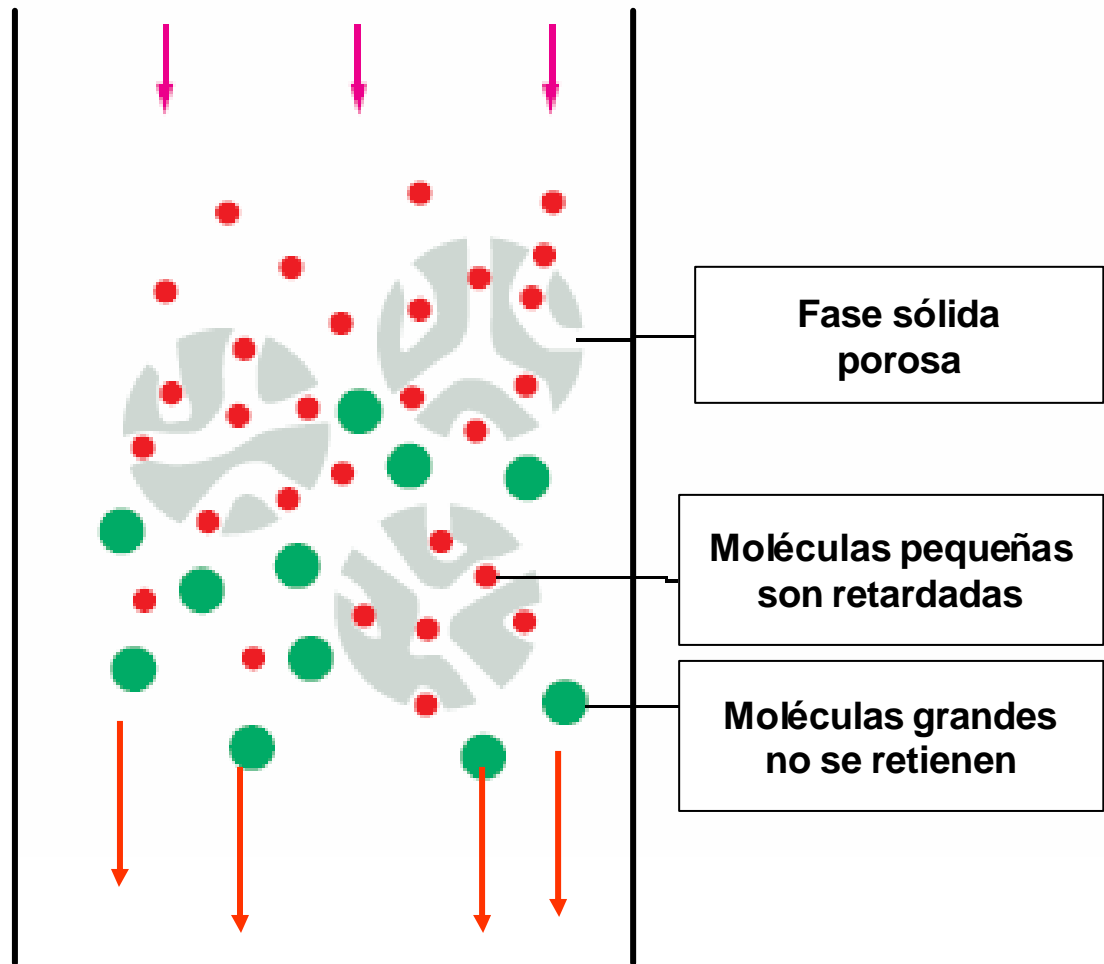
Fase sólida posee carga.

la asociación entre las proteínas
y la fase sólida depende del pH y
la fuerza iónica de la solución
de arrastre (fase móvil)



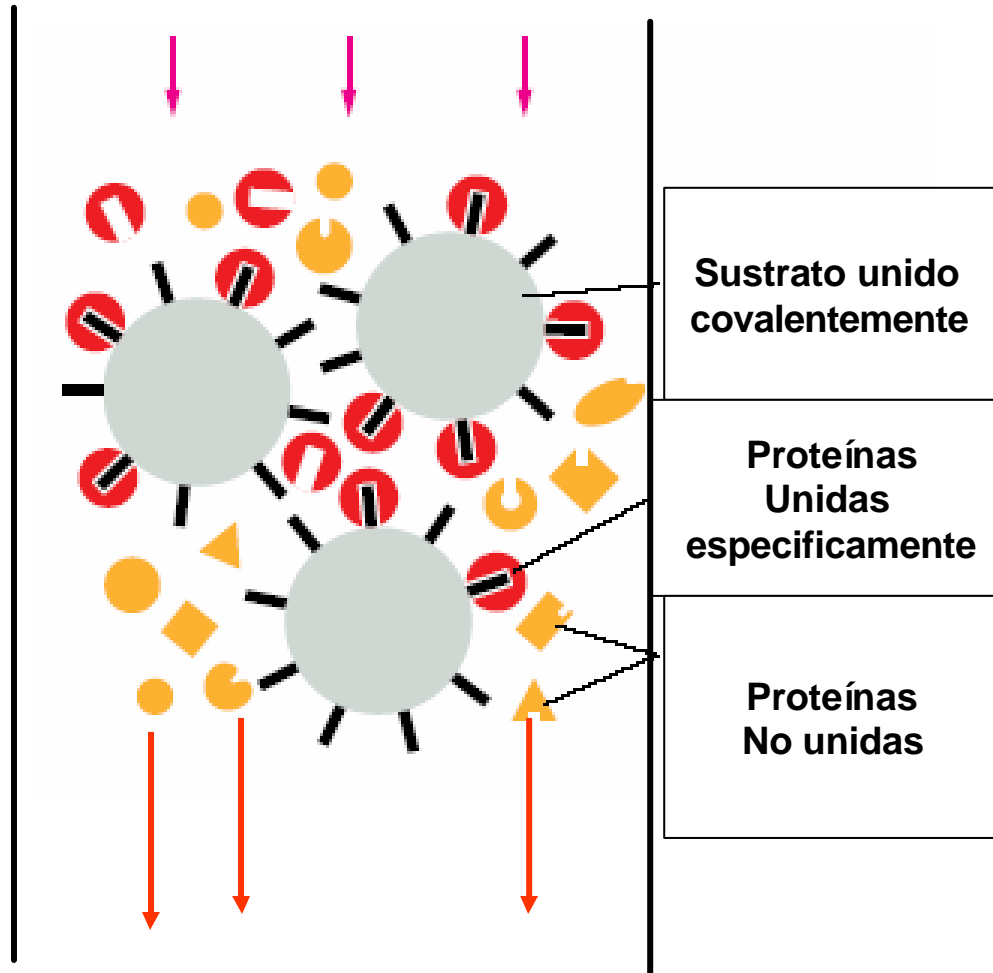
Filltración en gel

Separación de acuerdo
al tamaño de las proteínas.



Cromatografía de afinidad

La matriz posee moléculas
que interaccionan específicamente
con las proteínas de interés



Separación de proteínas por electroforesis

1.- por tamaño molecular.

Separación en un matriz de poliacrilamida.

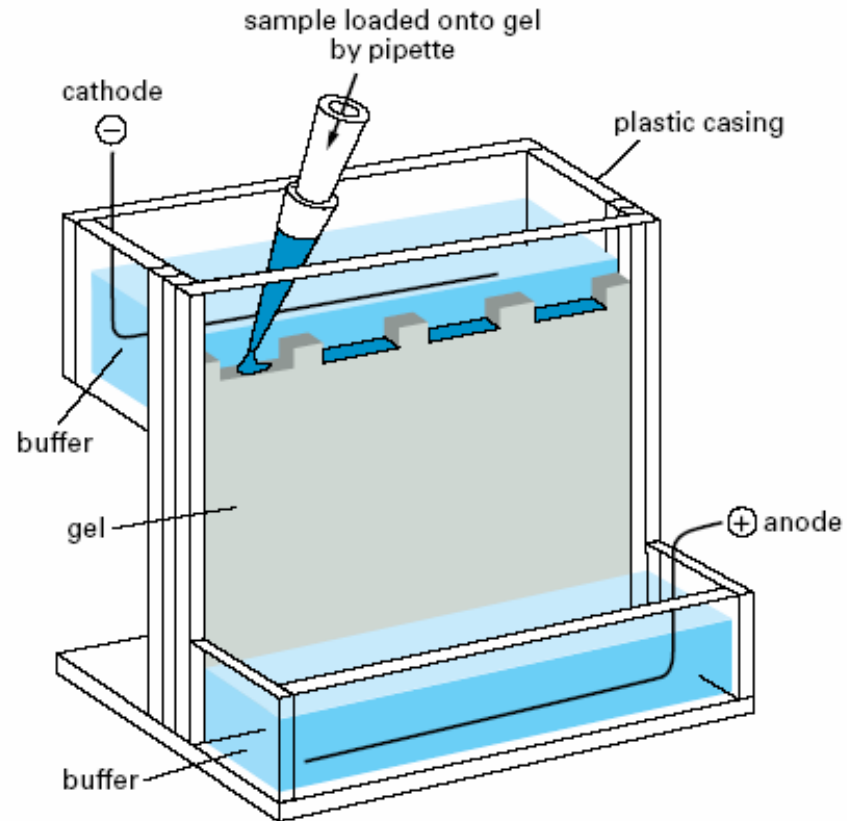
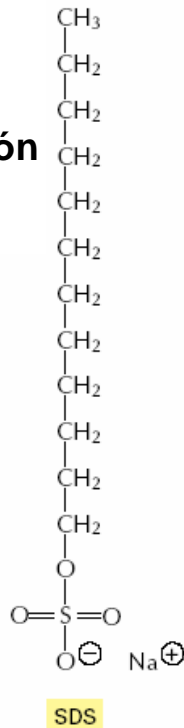
-Nativa (separación por carga y tamaño)

-SDS (dodecil sulfato de sodio)
Por tamaño.

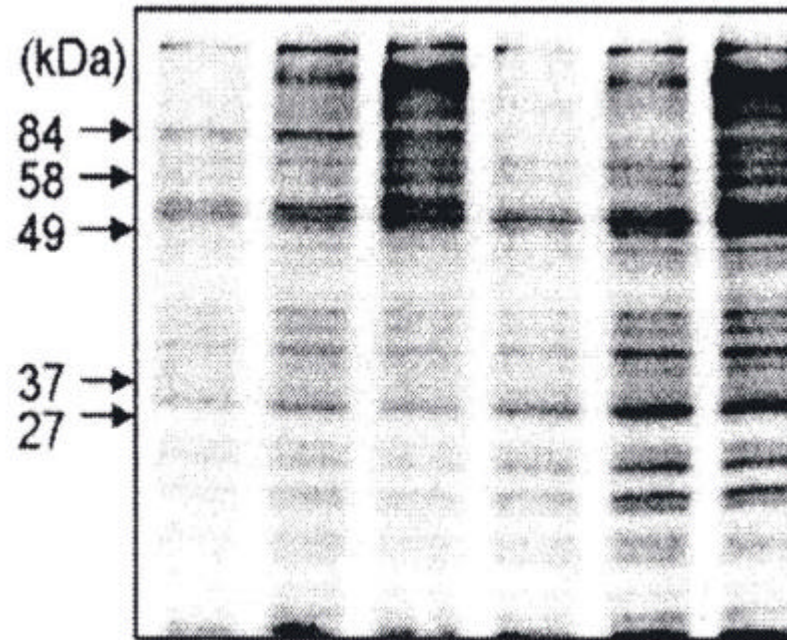
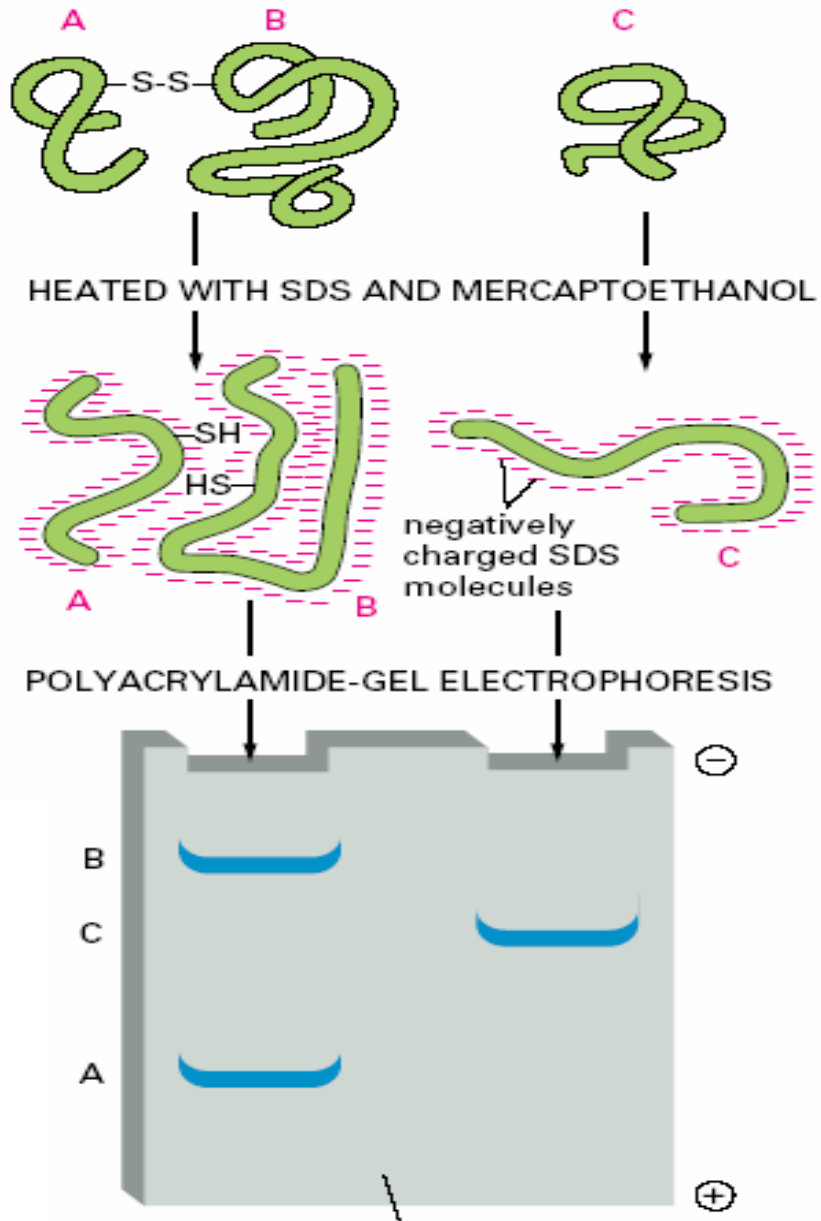
Proteínas se visualizan por tinción

Con:

Azul de coomasie
plata

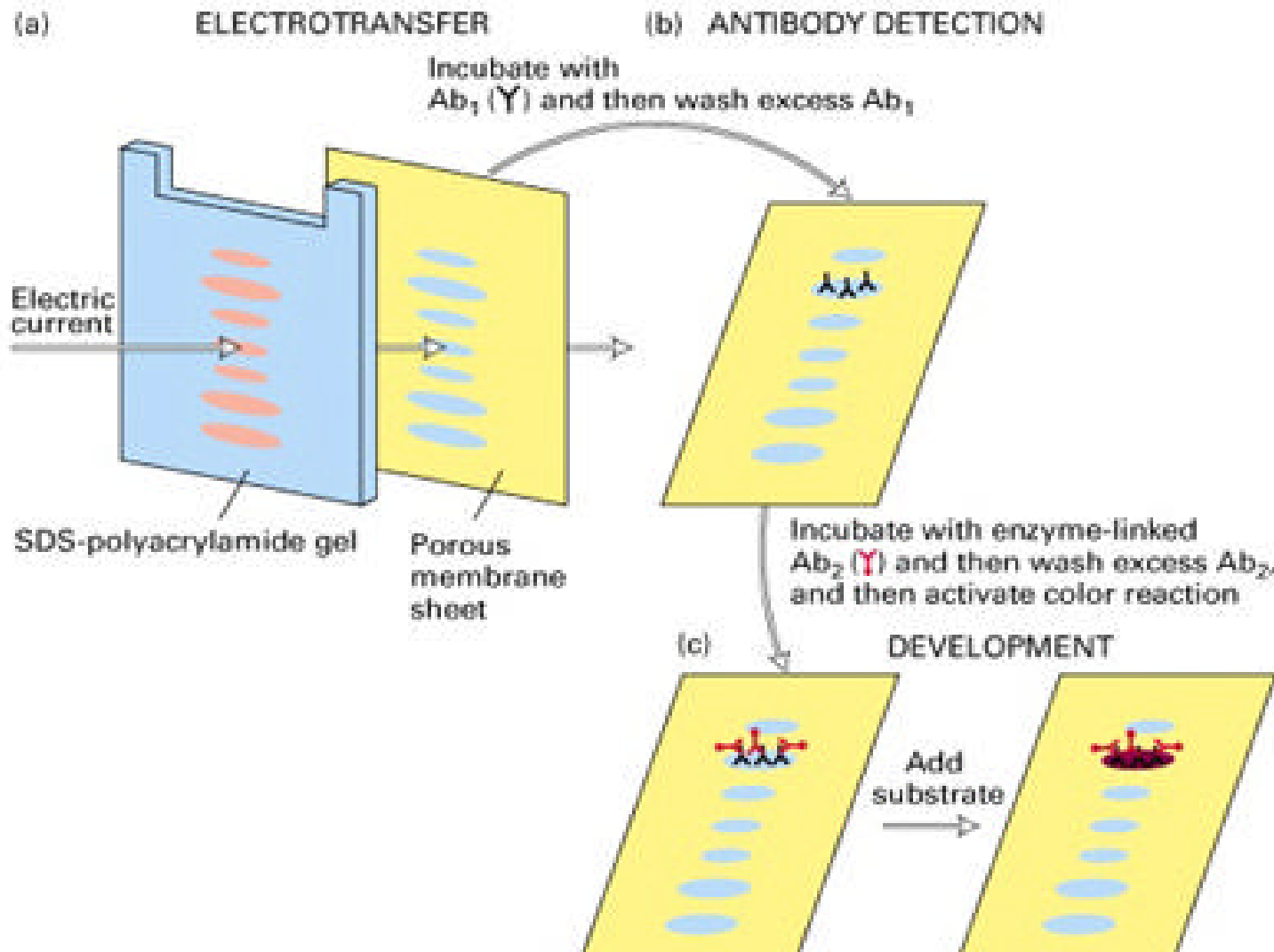


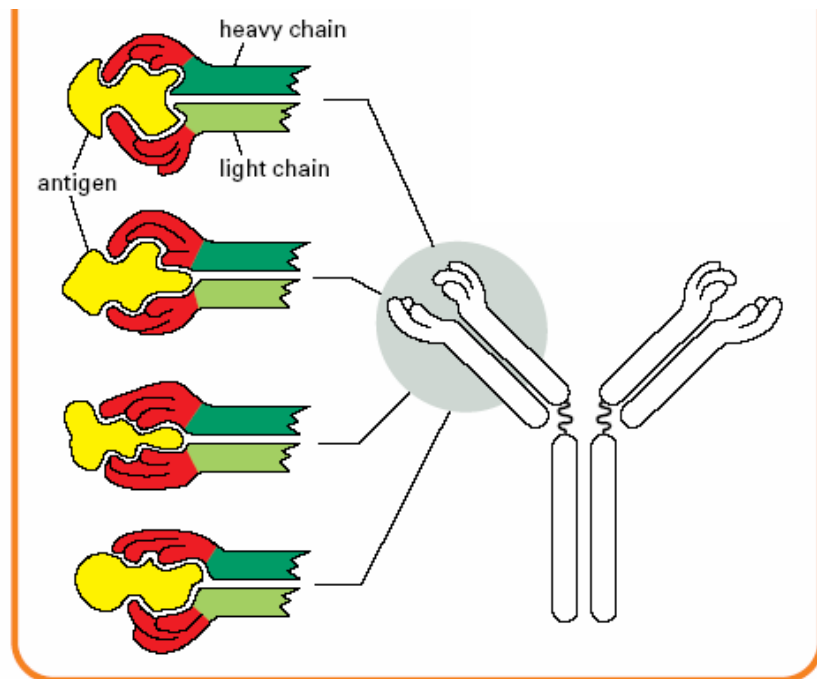
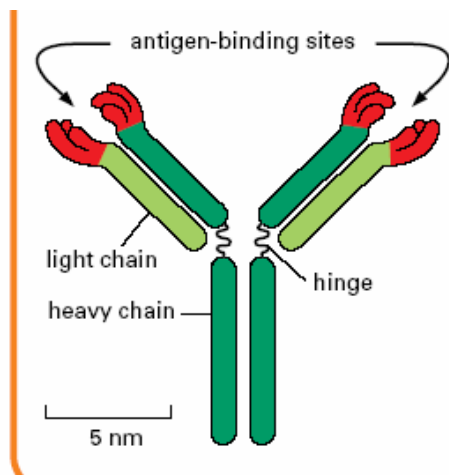
Condiciones Reductoras.



Determinación de proteínas por western blot .

Permite analizar específicamente una proteína de interés
Depende de la interacción específica de un anticuerpo.





d
a
d
o

Electroforesis bidimensional.

Dado que distintas proteínas pueden poseer el mismo tamaño molecular se desarrolló la separación electroforética en dos dimensiones o bidimensional.

- se relaciona al punto isoeléctrico (PI), que depende de la composición aminoacídica de las proteínas y su carga neta de acuerdo a un pH determinado (1ª dimensión)**
- y del tamaño (segunda dimensión)**

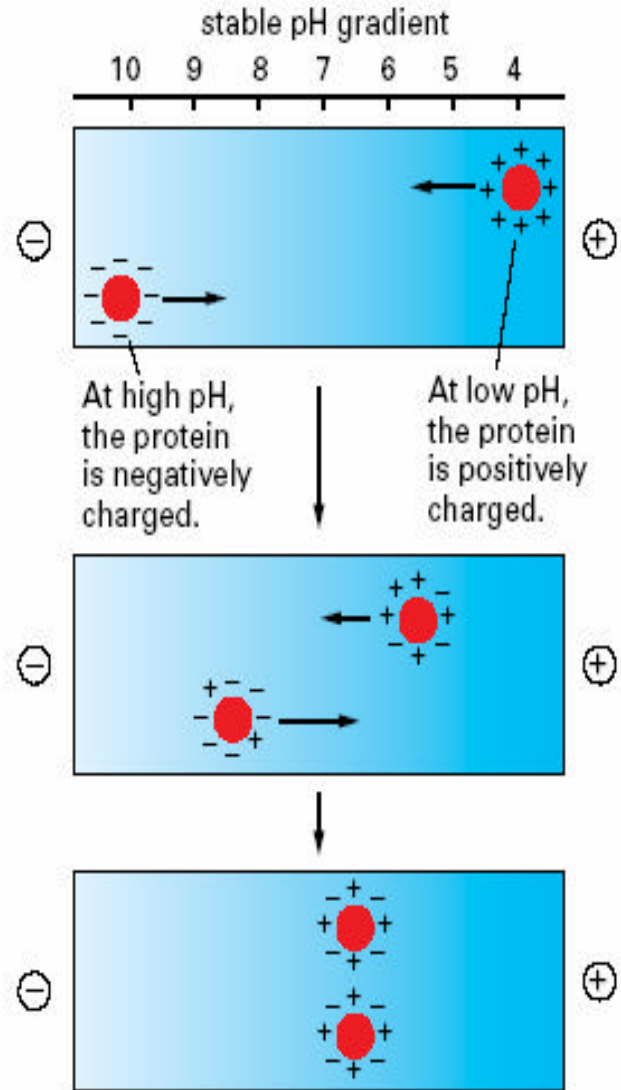
1ª dimensión.

(electroisoelectric focusing)

En el PI las proteínas no se mueven ante un campo eléctrico.

Inicialmente las proteínas se mueven en un gel

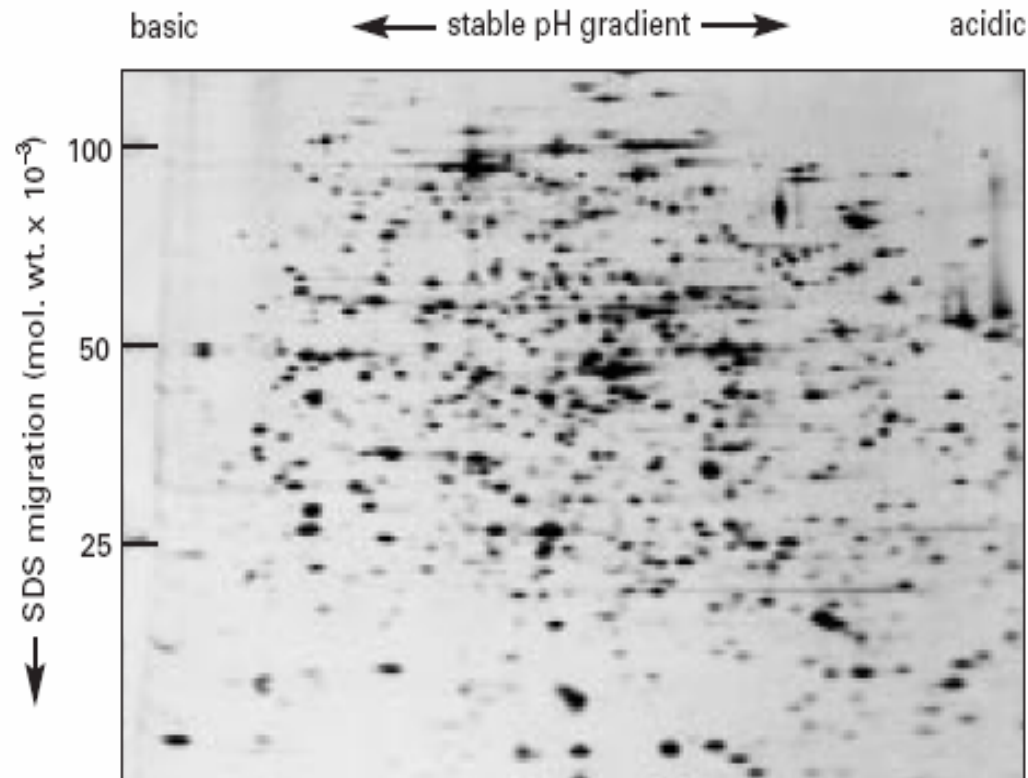
En el cual se ha establecido una gradiente de pH mediante una mezcla espacial de tampones (anfólitos), hasta que encuentran su PI (carga neta)



The protein shown here has an isoelectric pH of 6.5.

Segunda dimensión

En una segunda etapa se separan las proteínas en un gel de electrofóresis con SDS.
(SDS-PAGE)



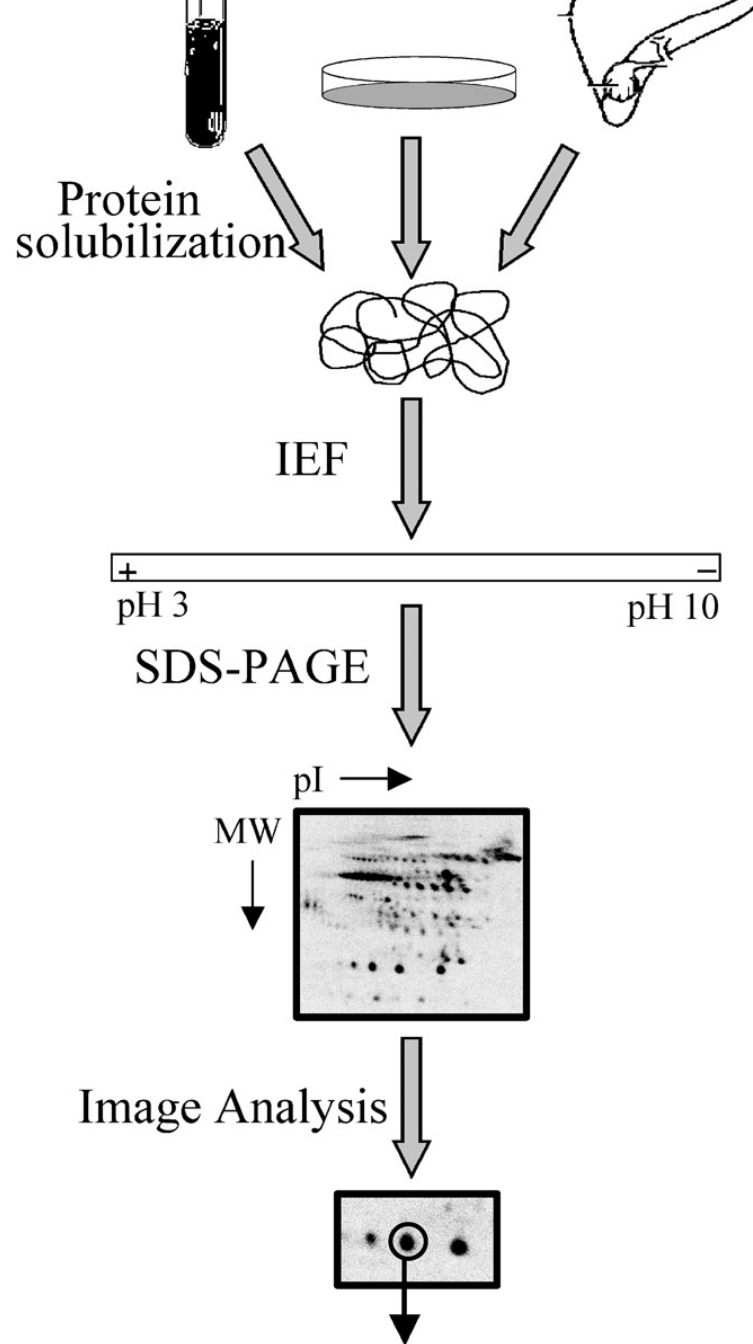


Figure 1.6: Protein identification

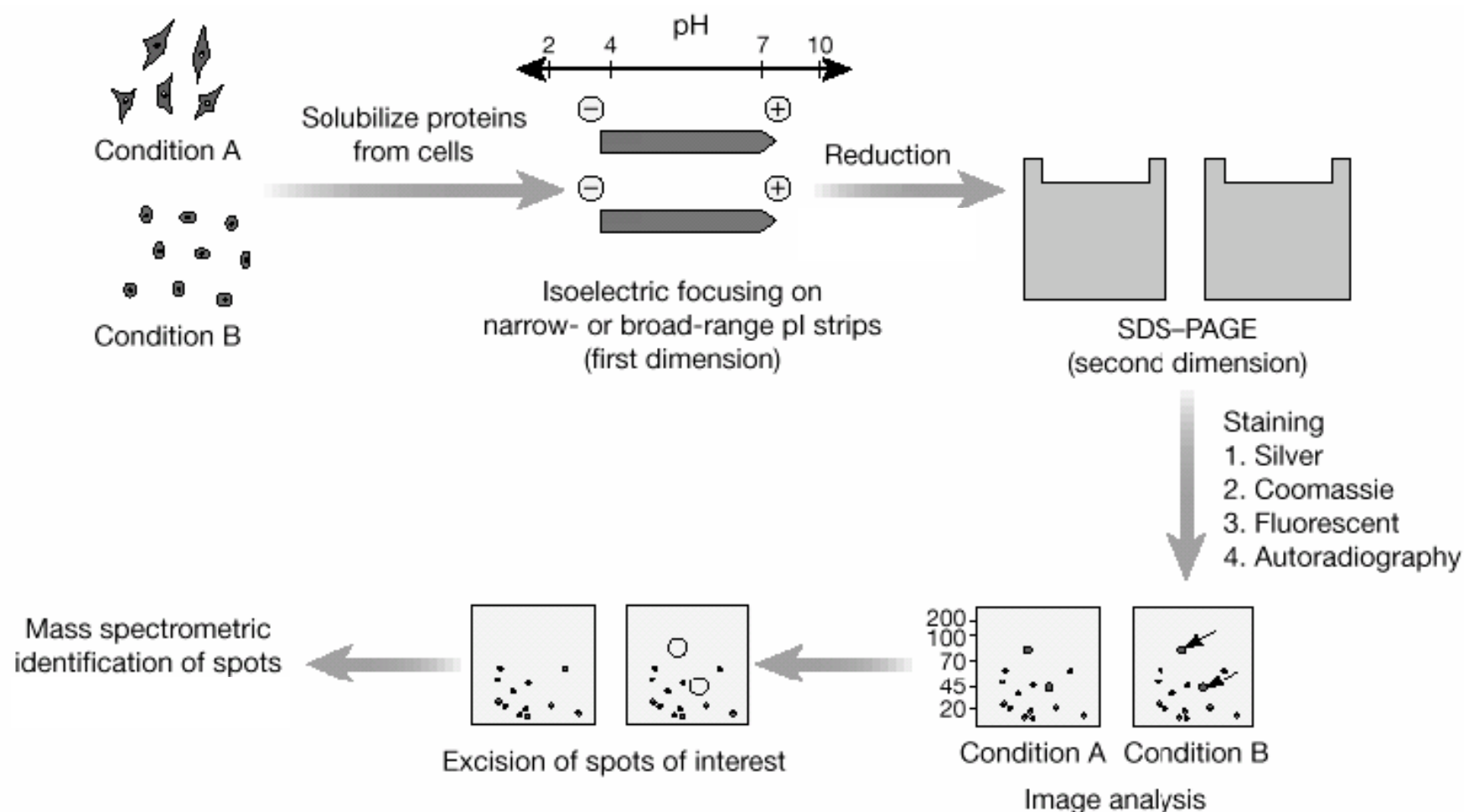
Proteómica

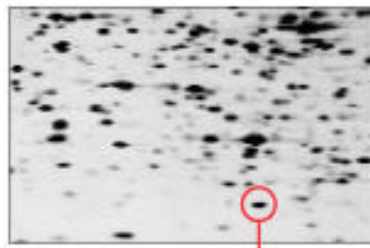
-Identificación y análisis de proteínas expresadas en células, órganos u organismos.

Requiere de:

- electrofóresis en 2 dimensiones**
- espectrometría de masas**
- Base de datos.**

Microsecuenciación de proteínas

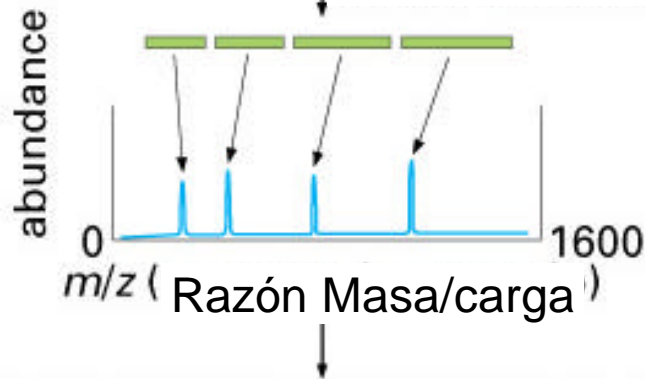




single protein spot excised from gel

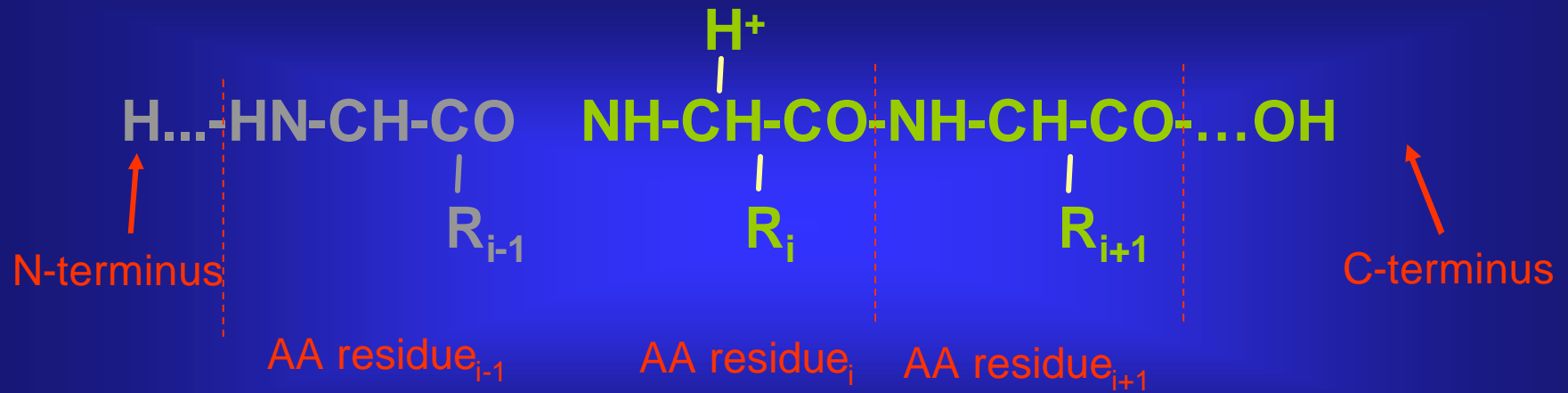
N ————— C

**Digestión trípica,
los péptidos liberados
Se analizan por
Espectrometría de masas**

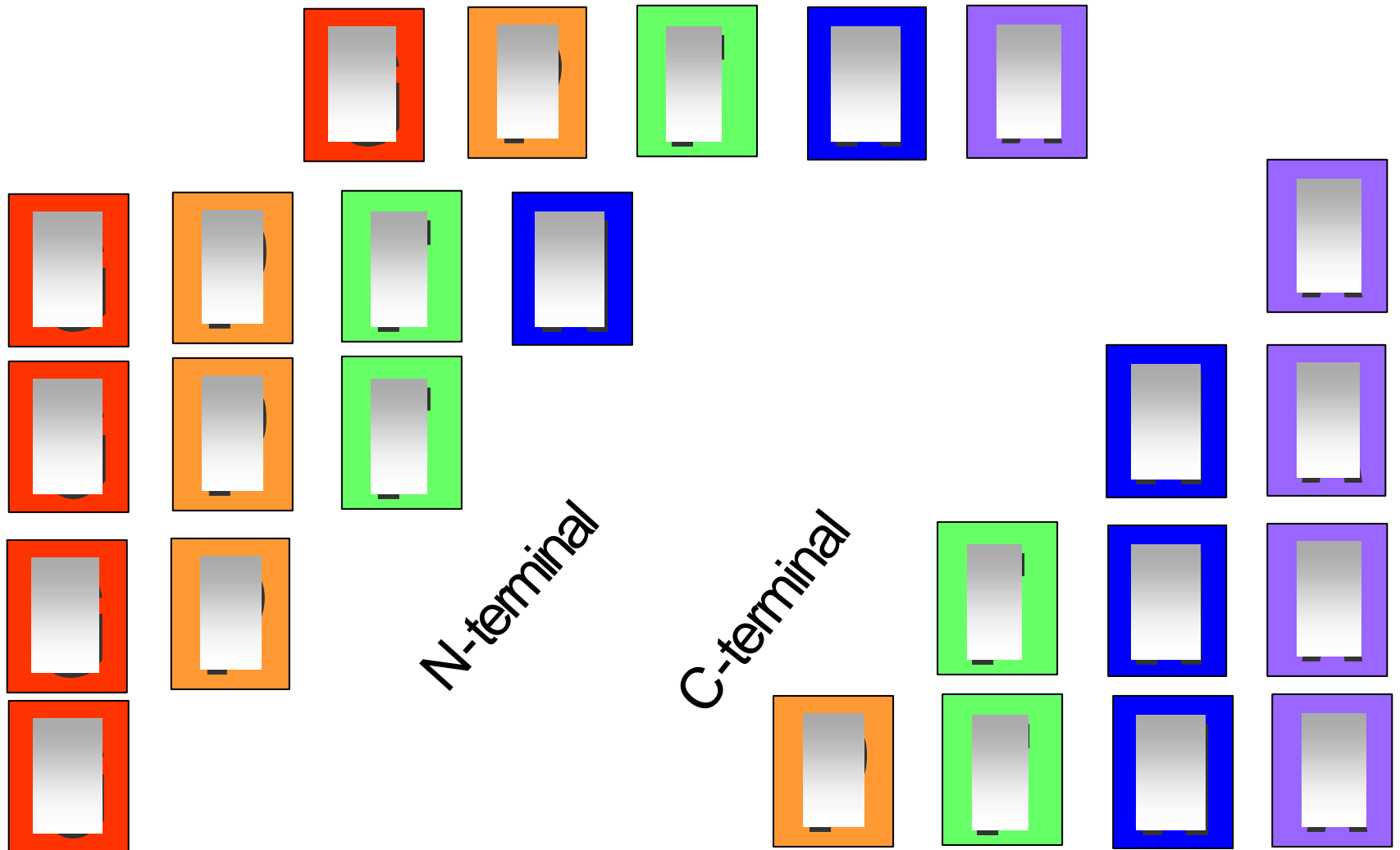


Búsqueda en las bases de datos proteicas para comparación con masas teóricas calculadas para todos los péptidos tríplicos liberados, lo que permite la identificación de nuevas proteínas de un gen correspondiente

Ruptura de los enlaces peptídicos

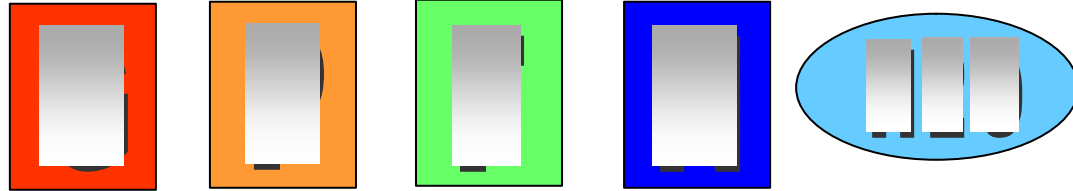


Peptidos N- y C-terminal



péptidos terminales y tipos de iones

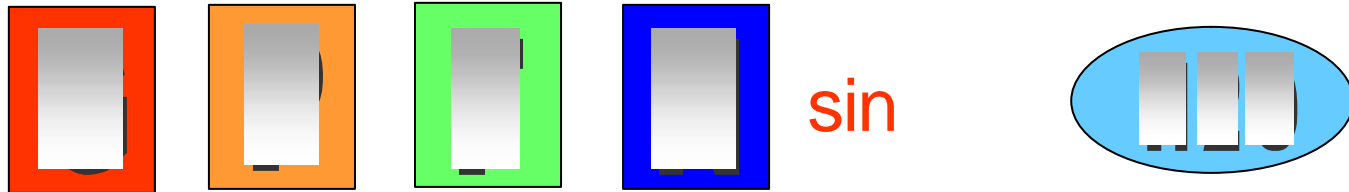
Péptido



Masa
(Daltons)

$$57 + 97 + 147 + 114 = 415$$

Peptido



Masa
(Daltons)

$$57 + 97 + 147 + 114 - 18 = 397$$

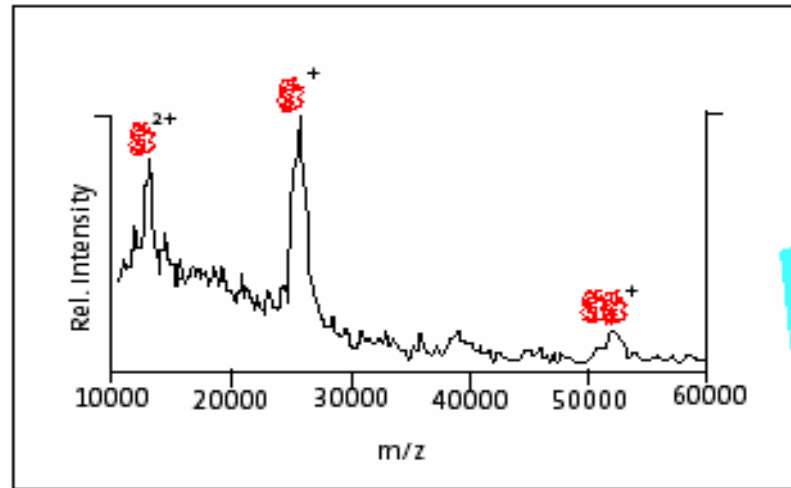
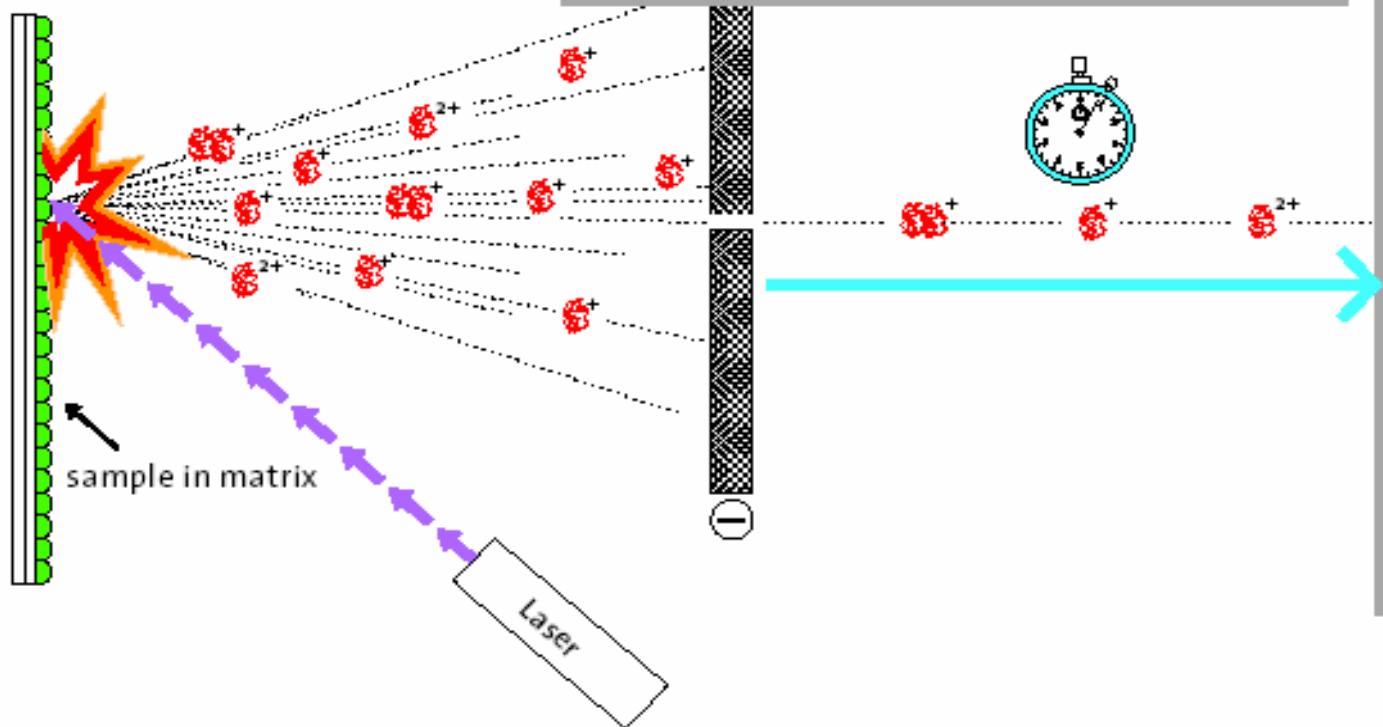
Espectrometría de masas

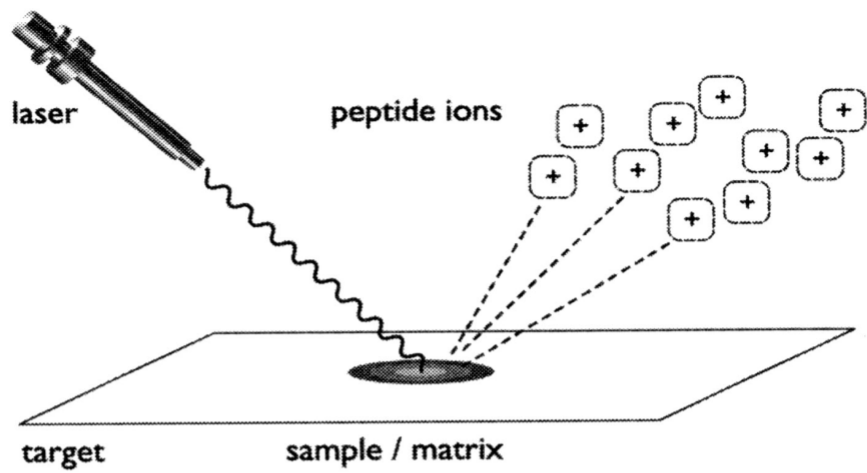
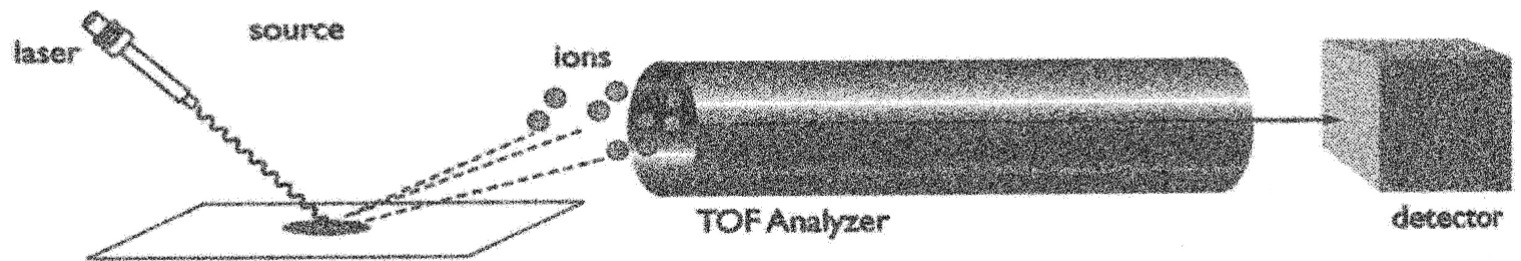
Una vez generados los péptidos, se someten al análisis por espectrometría de masas

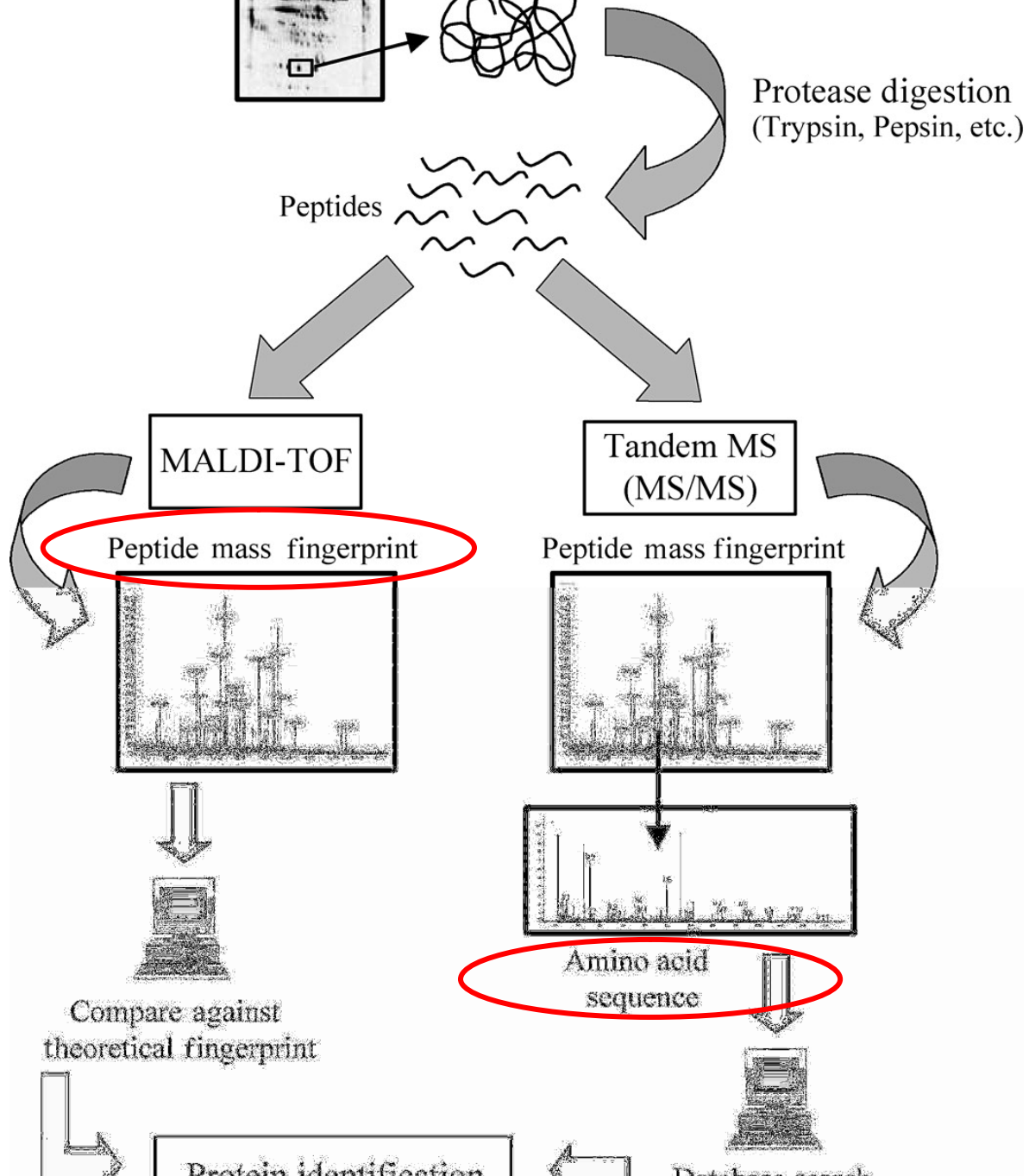
- Los péptidos son rotos en fragmentos iónicos y se determina la masas de cada fragmento**
- El espectrómetro acelera eléctricamente los iones, los que se mueven de acuerdo a su masa.**
- El espectrómetro determina la relación de la masa (m) y la carga (Z) Correspondiente a cada fragmento iónico.**
- Se genera un perfil**

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)

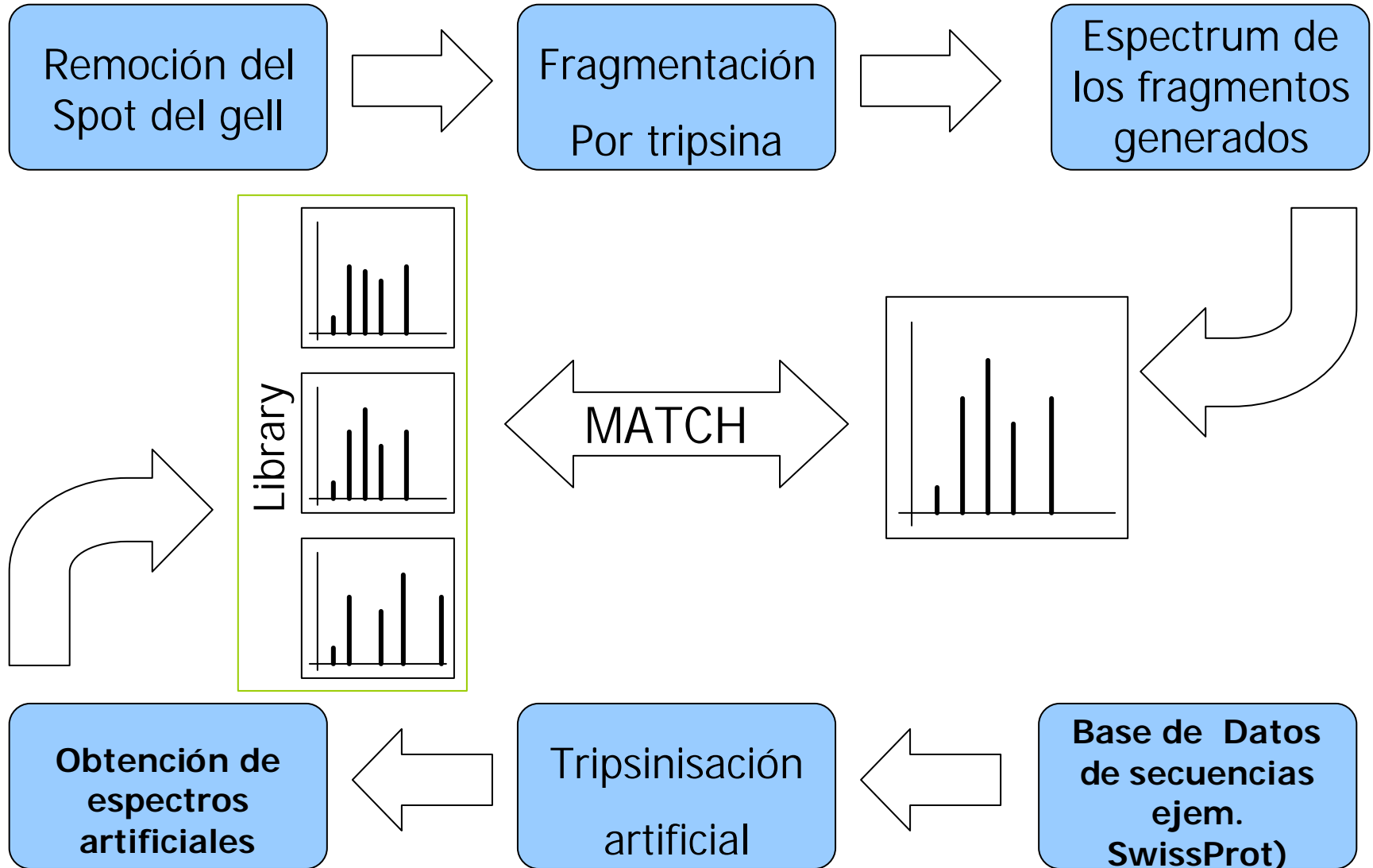
Soft Laser Desorption



A**B**



Identificación de proteínas por espectrometría de masas



- Genoma Humano = 30,000
- Proteoma Humano = 300,000 - 1,200,000
variantes de proteínas

Trío de la proteómica

