

CICLO 1: Purificación de HbO₂

OBJETIVOS GENERALES : 1) Separación de glóbulos rojos a partir de una muestra de sangre total ovina por centrifugación en gradiente de densidad.
2) Purificación de oxihemoglobina a partir de los glóbulos rojos obtenidos previamente utilizando una cromatografía de intercambio iónico.

OBJETIVOS DE APRENDIZAJE : Acercamiento a las técnicas de:

- 1) centrifugación en gradiente de densidad
- 2) cromatografía de intercambio iónico
- 3) espectrofotometría, espectros diferenciales
- 4) electroforesis.

DIA 1

Objetivo específico 1: Purificación de glóbulos rojos, a partir de sangre ovina utilizando un gradiente de densidad aprovechando la diferencia de densidad existente entre los glóbulos rojos con respecto a los leucocitos y demás componentes sanguíneos.

Materiales

- FICOLL-HYPAQUE: (d = 1.077 isotónico) (6.37 %:10 %)
- Ficoll 400 = polisacarosa
- Hypaque = ditriazoato de sodio y metil glutamina
- Sangre fresca ovina
- Solución isotónica de NaCl (0.15 M)

Procedimiento

La centrifugación en gradiente de densidad será demostrativa (1 equipo por grupo), los demás equipos harán directamente el lavado de los glóbulos rojos (paso 3).

1) Diluir la sangre al medio con NaCl 0.15

a) centrifugación en gradiente de densidad (un equipo): en un tubo de centrífuga pipetear 2 mL de la solución de Ficoll – Hypaque en el fondo, y sobre éste **suavemente** 3 mL de sangre diluida.

b) el resto de los equipos: pipetear 2 mL de NaCl 0.15 M y agregar 3 mL de sangre diluida

2)Centrifugar a 800 g durante 30 min. ⇒ *¿Qué ocurriría si aumentamos el tiempo de centrifugación?*

3)Guardar en eppendorf una alícuota del sobrenadante (aproximadamente 1 mL) y descartar el resto

Resuspender los glóbulos rojos con NaCl 0.15 M (aproximadamente 2 mL) y volver a centrifugar a 800 g durante 10 minutos. Descartar sobrenadante.

--Preparación de la columna y buffers para cromatografía de intercambio iónico--
(Ver Día 2).

DIA 2

Introducción

El cuerpo humano contiene alrededor de 2.5×10^{13} eritrocitos, cada uno de los cuales posee en su interior 3×10^8 moléculas de *hemoglobina*, proteína encargada del transporte de oxígeno. La hemoglobina es un tetrámero (PM 64.000), compuesto por dos subunidades α y dos β , las cuales están enfrentadas entre sí en torno a una cavidad en el centro de la molécula. Cada subunidad contiene un *grupo hemo*, por lo cual la hemoglobina puede unir cuatro moléculas de oxígeno.

El grupo hemo consiste en un sistema anular tetrapirrólico plano, que une mediante enlaces de coordinación, Fe^{2+} . Existen seis ligandos que fijan el átomo de Fe^{2+} en su posición. Cuatro de estos ligandos son los átomos de nitrógeno del sistema tetrapirrólico, el quinto es un residuo de histidina de la porción proteica y el sexto sitio de coordinación del Fe^{2+} está vacío en la *desoxihemoglobina* mientras que en la *oxihemoglobina* (OxiHb) está ocupado por una molécula de O_2 .

La Hb puede existir en distintos estados de oxidación. La oxidación de OxiHb da lugar a O_2^- y *metahemoglobina* (MetHb) en la cual el hierro del grupo hemo se encuentra como Fe^{3+} .



Si la estructura de la globina se desestabiliza, metHb puede convertirse en *hemicromo*, en el cual un ligando externo ocupa la sexta posición de coordinación del hemo férrico. Los hemicromos precipitan rápidamente.

Otro estado de oxidación lo constituye la *ferrilhemoglobina* (ferrilHb) la cual surge de la reacción de metHb con H_2O_2 . En este estado el hierro del hemo se encuentra como Fe(IV) .

Los estados de oxidación de la hemoglobina pueden distinguirse por sus diferencias en los espectros de absorción en el rango entre 500 y 700 nm, presentando también diferencias en torno a los 400 nm donde presentan el pico de absorción denominado Banda de Soret común a todas las proteínas con grupo hemo. La concentración de las distintas formas de Hb en una solución que contiene una mezcla de ellas se puede calcular midiendo la absorbancia de la solución a más de una longitud de onda. En el caso de una solución formada por una mezcla de OxiHb y MetHb,

$$\begin{aligned} [\text{OxiHb}] (\mu\text{M}) &= 66 A_{577} - 80 A_{630} \\ [\text{MetHb}] (\mu\text{M}) &= 279 A_{630} - 3 A_{577} \end{aligned}$$

donde [OxiHb] y [MetHb] representan en realidad la concentración de grupos hemo y no la de hemoglobina. (Recordar que cada molécula de Hb posee 4 cadenas proteicas, cada una de las cuales contiene un grupo hemo).

Las ecuaciones citadas anteriormente se pueden obtener a partir de los valores de los coeficientes de extinción milimolar para las dos formas de la Hb a las distintas longitudes de onda:

	Longitud de onda (nm)	
	577	630
Oxihemoglobina	15.0	0.17
Metahemoglobina	4.45	3.63

⇒ ¿Cómo se obtienen las ecuaciones para el cálculo de concentración a partir de los coeficientes de extinción milimolar ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)?

Objetivo específico 2: Purificación de oxihemoglobina a partir de los glóbulos rojos obtenidos el día anterior utilizando una cromatografía de intercambio iónico.

Materiales

- Fracción de glóbulos rojos (GR)
- DEAE Sefarosa CL-6B equilibrada en buffer de inicio (aprox. 20 mL por columna)
- Buffer de inicio : buffer Tris 50 mM, pH 8.3 con EDTA 0.1 mM
- Buffer final : buffer Tris 50 mM, pH 7.0 con EDTA 0.1 mM
- Columna para cromatografía (15 mm x 100 mm)

Procedimiento

a) Preparación del lisado de GR

- 1) A la fracción de GR obtenidas en el día de ayer (aprox. 1.5 mL) agregar 1.5 mL de H_2O + 1.5 mL de buffer inicio y agitar.
- 2) Centrifugar durante 15 min. a 4000 g.

b) Preparación de la columna.

- 1) Mezclar 20 mL de la resina prehidratada con buffer de inicio de forma que tenga una consistencia apropiada (aprox. 75% de gel)
- 2) Montar la columna en un soporte vertical y pasar buffer para asegurarse que no hayan quedado burbujas de aire en las tubuladuras. Cerrar la salida de la columna.
- 3) Colocar la suspensión de resina dentro de la columna vertiendo sobre una varilla de vidrio para evitar que se forman burbujas de aire.
- 4) Abrir la salida de la columna para permitir que la resina se asiente. Si la suspensión no llena la columna, agregar buffer de inicio hasta 1 cm por debajo del borde de la columna.
- 5) Pinchar la tapa de la columna con una tijera o elemento punzante, colocar un tip de pipeta automática en la hendidura y conectar un tubito de goma a la punta del tip. Colocar el otro extremo del tubo en el interior de un vaso de bohemia con buffer de inicio. Con la jeringa purgar el sistema.
- 6) Tapar la columna y dejar pasar buffer de inicio (aproximadamente 20 mL) a un flujo que no exceda los 0.5 mL/min.

7) Confirmar que el pH a la salida de la columna es el deseado, es decir el del buffer de inicio.

c) Purificación de HbO₂.

- 1) Destapar la columna y dejar penetrar el buffer, pero sin dejar secar la parte superior de la resina. Sembrar cuidadosamente 0.75 mL del lisado de GR (el resto del lisado conservarlo en eppendorf), dejar entrar la muestra y entonces agregar 1.0 mL de buffer con cuidado, tratando de no perturbar demasiado el lecho de la resina. Tapar la columna y dejar pasar buffer inicio, hasta que se haya eluído todo el material que no queda retenido en la columna (aprox. 20 mL).
- 2) Eluir la muestra con un gradiente de pH que varía entre pH 8.3 (buffer inicio) y pH 7.0 (buffer final) a un flujo de 0.5 mL/min. El volumen total de gradiente debe ser aprox. 40 mL.
- 3) Para preparar el gradiente colocar en un vaso de bohemia 20 mL de buffer inicio y cada 2.0 min agregar 1.0 mL de buffer final durante 40 min. Si cuando se acaba el gradiente aún no terminó de eluir la hemoglobina, continuar la elución con buffer final.
- 4) Debido a que la Hb es coloreada no es necesario recoger el eluido hasta que la banda coloreada comience a salir. En ese momento coleccionar cada 1.0 mL.
- 5) Registrar la absorbancia a 577 nm de cada fracción eluida.
- 6) Realizar un cromatograma de la corrida (Abs.₅₇₇ vs. vol. eluído)

⇒ ¿Podría realizar un perfil cromatográfico de [HbO₂] vs. vol. eluido?

⇒ ¿Cómo son los grupos DEAE? ¿Qué regiones de la proteína espera que interaccionen con ellos? ¿De qué otra manera se pueden debilitar estas interacciones?

DIA 3

Objetivo específico 3: Obtención de espectros de oxihemoglobina y metahemoglobina. Espectros diferenciales. Puntos isobésticos.

Materiales

- Fracción más concentrada de HbO₂ obtenida el día anterior.
- Solución de NaNO₂ 10 mM.

Procedimiento

- 1) Elegir la fracción de mayor [HbO₂] obtenida en la cromatografía del día anterior.
- 2) Dividir en dos fracciones y tratar una de ellas con NO₂⁻ (Hb/NO₂⁻ 1:20).
- 3) Realizar espectro entre 450 y 700 nm a intervalos de 10 nm, cuidando de mejorar la resolución de los picos del espectro (reducir intervalo).
- 4) Diluir la muestra 1:10 para realizar el espectro entre 390 y 450 nm.

⇒ ¿Qué concentración de Hb colocaría en la cubeta del espectrofotómetro teniendo en cuenta que la oxihemoglobina (Fe⁺²) absorbe a 577 nm siendo su ϵ a dicha longitud de onda $15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y que la metahemoglobina tiene un ϵ a 630 nm de $3.63 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$?

- 1) Graficar los espectros superpuestos (entre 390 y 700 nm).
- 2) Identificar picos, valles, puntos isobésticos y analizar su significado.
- 3) Calcular y graficar el espectro diferencial entre oxi y metahemoglobina.

⇒ ¿Qué longitud de onda utilizaría para determinar un coeficiente de extinción molar para HbO₂? ¿Qué procedimiento utilizaría para determinarlo?

-- **Calcular la cantidad de proteína a sembrar en la electroforesis** --

DIA 4

Objetivo específico 4: Analizar la pureza de las muestras obtenidas en el intercambio iónico por SDS – PAGE en condiciones reductoras.

Materiales

A) Soluciones stock

1) Solución stock de acrilamida 30%

29.1 g acrilamida

0.9g N,N'-metilen bis-acrilamida

Disolver en 60 mL de agua destilada. Llevar a 100 mL con agua destilada

Filtrar con papel de filtro Whatman No.1

Almacenar en botella color ambar a 4°C hasta un mes

(la acrilamida es una potente neurotoxina acumulativa; usar guantes y tapaboca. Una vez polimerizada ya no es tóxica)

2) Buffer Tris-HCl 1.8M, pH 8.8

56.8g Tris

Disolver en 150 mL de agua destilada

Ajustar pH con HCl 5N a pH 8.8

Llevar a 250 mL con agua destilada

Almacenar a 4°C por 4 semanas

3) Buffer Tris-HCl 1.25M, pH 6.8

37.8g Tris

Disolver en 150 mL de agua destilada

Ajustar pH con HCl 5N a pH 6.8

Llevar a 250 mL con agua destilada

Almacenar a 4°C por 4 semanas

4) Solución de persulfato de amonio al 10% (PSA)

Pesar el persulfato en eppendorf.

Disolver en agua destilada hasta 10%. Se usa en el día.

5) Solución de dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS)

10g SDS

Disolver en 85 mL de agua destilada

Llevar a 100 mL con agua destilada

Almacenar a temp. ambiente hasta 4 meses.

6) TEMED (tetrametilendiamina)

Se usa tal cual

7) Buffer de electrodo Tris-glicina pH 8.3 (10x) para gel desnaturalizante

144.2g glicina

30.3g Tris

10.0g SDS

Disolver en 800 mL de agua destilada

Llevar a 1000 mL con agua destilada (el pH debería ser 8.3 sin ajustar)

Se diluye 1/10 antes de usar.

Para gel nativo, el buffer de electrodo es el mismo pero sin SDS

8) Buffer de la muestra (2x) para gel desnaturalizante

- Sin agente reductor:

2.5 mL buffer 1.25M Tris-HCl, pH 6.8

1.0g SDS

5.8 mL glicerol 87%

5 mg azul de bromofenol

35 mL agua destilada

Agitar hasta que el azul de bromofenol y SDS se disuelvan. Llevar a 50 mL.

Almacenar a temp. ambiente por 4 semanas o en alícuotas de 1 mL a -20°C por 4-6 meses

- agente reductor:

Igual al anterior pero agregando 2.5 mL de 2-mercaptoetanol

9) Buffer de la muestra (2x) para gel nativo

2.5 mL buffer 1.25M Tris-HCl, pH 6.8

5.8 mL glicerol 87%

5 mg azul bromofenol

35 mL agua destilada

Agitar hasta que el azul de bromofenol se disuelva. Llevar a 50 mL.

10) Solución colorante de Coomassie Blue

0.5g de Coomassie Blue G-250

Disolver en 100 mL de solución de desteñido

11) Solución de desteñido (destain)

450 mL de etanol

100 mL de ácido acético

450 mL de agua

Almacenar en botella color ambar a temperatura ambiente.

Procedimiento

PREPARACION DE LOS GELES

- 1) Arme el cassette para geles en placa de 1.5 mm de espesor.
- 2) Prepare el gel separador (15% en acrilamida) según lo indicado en la tabla siguiente y viértalo inmediatamente en el cassette.
- 3) Coloque 0.3 mL de agua cuidadosamente sobre la superficie del gel antes de que polimerice.
- 4) Una vez polimerizado el gel separador (aprox. 30 min), prepare el gel espaciador (stacking) según lo indicado en la siguiente tabla.
- 5) Antes de verter el gel stacking en el cassette, retire el agua y seque.
- 6) Antes de que polimerice el gel de stacking, inserte el peine (para 10 pozos).
- 7) Una vez polimerizado el gel de stacking (aprox. 30 min) retire con cuidado el peine y enjuague los pozos con agua destilada.
- 8) Desarme el cassette y coloque el gel en la cuba de electroforesis.
- 9) Llene los compartimientos de la cuba con buffer de corrida (sol. 7) y corrobore que no haya pérdidas.
- 10) Proceda al sembrado de las muestras.

GEL DESNATURALIZANTE (CON SDS)

	Gel separador (15 mL)			Gel stacking (5 mL)
% Acrilamida	7.5	10	15	5
Acrilamida (mL)	3.8	5	7.5	0.8
H ₂ O (mL)	8	6.8	4.3	3.6
Buffer pH 8.8 (mL)	3	3	3	-

Degasear la solución y luego agregar:

Buffer pH 6.8 (mL)	-	-	-	0.5
SDS (□L)	150	150	150	50
TEMED (□L)	15	15	15	10
PSA (□L)	100	100	100	17

Mezclar con cuidado y pasar al cassette inmediatamente.

PREPARACION DE LA MUESTRA

- 1) Diluir las fracciones obtenidas en la cromatografía cuya pureza deseamos estudiar con el buffer de muestra 4x (v/v). (La concentración de hemoglobina inicial en las muestras deberá ser 1 - 2 mg/mL). Considere que la cantidad total de proteína en el volumen sembrado (15 μ L) debe ser entre 2 y 10 μ g.
- 2) Considere las siguientes muestras para sembrar: plasma, lisado de glóbulo rojo, pico, cabeza y cola del cromatograma, estándares de peso molecular.
- 3) Como control, en uno de los carriles se correrá una muestra de albúmina bovina (PM 66.000 Da) debiendo ser la cantidad de proteína sembrada aprox. 2 μ g.
- 4) Calentar todas las muestras a 100°C durante 3 min.
- 5) Sembrar cuidadosamente 15 μ L en cada pozo del gel (1.5 mm de espesor).

⇒ Calcule qué concentración deberá tener la solución de albúmina a diluir con el buffer de la muestra si se deben sembrar aprox. 2 μ g de proteína pura por pocillo siendo el volumen sembrado 15 μ L.

⇒ Calcule la cantidad de proteína sembrada en los pocillos correspondientes a las distintas fracciones de hemoglobina si se siembran también 15 μ L de muestra.

⇒ En el caso de sembrar una proteína pura, la cantidad de proteína debe ser aprox. 2 μ g, mientras que si se trata de una mezcla de proteína se deberán sembrar entre 10 – 50 μ g. ¿Por qué?

CONDICIONES DE CORRIDA

Lectura en fuente de poder	Inicio	Final
mA (corriente constante)	20	25
V	100	200
W	2	2.5
Tiempo (h)		1 (mirar azul bromofenol)

TEÑIDO Y DESTENIDO DE LOS GELES

- 1) Sumergir el gel en la solución de Coomassie (sol. 10) durante 1 hora.
- 2) Retirar la solución del colorante y agregar solución de desteñido (sol. 11). Mantener en agitación.
- 3) Realizar tantos cambios de sol. de desteñido como sean necesarios.

⇒ ¿Cuál es la composición del buffer de la muestra y cuál es su función?

⇒ Analizar la calidad de la purificación a partir de los resultados de la electroforesis. Determinar el PM de la proteína de glóbulos rojos.

Problemas

- 1) Una suspensión de bacterias que contiene 400 mg de peso seco por litro tiene una absorbancia de 1.00 en una cubeta de 1 cm de paso a 450 nm. ¿Cuál será la densidad celular de una suspensión cuya transmitancia a 450 nm es del 30% en una cubeta de 3 cm de paso? ¿En qué casos considera de utilidad disminuir o aumentar el ancho de paso de las cubetas?
- 2) Una solución que contiene NAD⁺ y NADH tiene una absorbancia de 0.311 a 340 nm y de 1.2 a 260 nm en una cubeta de 1 cm de paso. Calcule las concentraciones de la forma oxidada y reducida de la coenzima en solución. (Tanto la forma oxidada como la reducida de la coenzima absorben a 260 nm, pero sólo el NADH absorbe a 340 nm).

	$\epsilon_{260 \text{ nm}} (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	$\epsilon_{340 \text{ nm}} (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$
NAD ⁺	18000	0
NADH	15000	6220

- 3) Una solución que contiene dos sustancias A y B, tiene una absorbancia de 0,36 a 350 nm y de 0.225 a 400 nm en una cubeta de 1 cm de paso. Calcule la concentración de A y B en la solución.

	$\epsilon_{350 \text{ nm}} (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	$\epsilon_{400 \text{ nm}} (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$
A	15000	3000
B	7000	6500

- 4) A una solución de 2 mL de glucosa se le adiciona 1 mL de una solución que contiene en exceso ATP, NADP⁺, MgCl₂, hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La absorbancia de la solución final a 340 nm (en una cubeta de 1 cm de paso) aumentó 0,91. Calcule la concentración de glucosa en la solución original. Nota: considerar el ϵ_{340} del NADPH es igual al del NADH.
- 5) La enzima lactato deshidrogenasa fue ensayada siguiendo la aparición de NADH espectrofotométricamente. La mezcla de ensayo (3 mL de volumen final), en buffer fosfato pH 7.4, consiste en: un exceso de lactato, 0.1 mL de preparado enzimático y semicarbazida (para atrapar el piruvato). La preparación enzimática contiene 120 µg/mL de proteína. La $A_{340 \text{ nm}}$ aumentó a una velocidad de 0.048 UAbs/min. a) ¿Cuál es el cantidad de lactato deshidrogenasa en la preparación? b) ¿Cuál es la actividad específica de la lactato deshidrogenasa en la preparación?