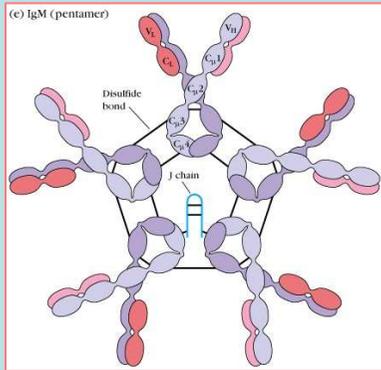


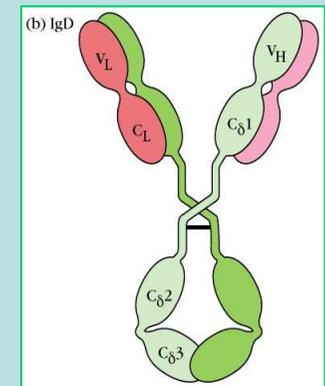
Inmunología Clínica

T.P.Nº4

2009



“Separación de Inmunoglobulinas”



Separación de Inmunoglobulinas

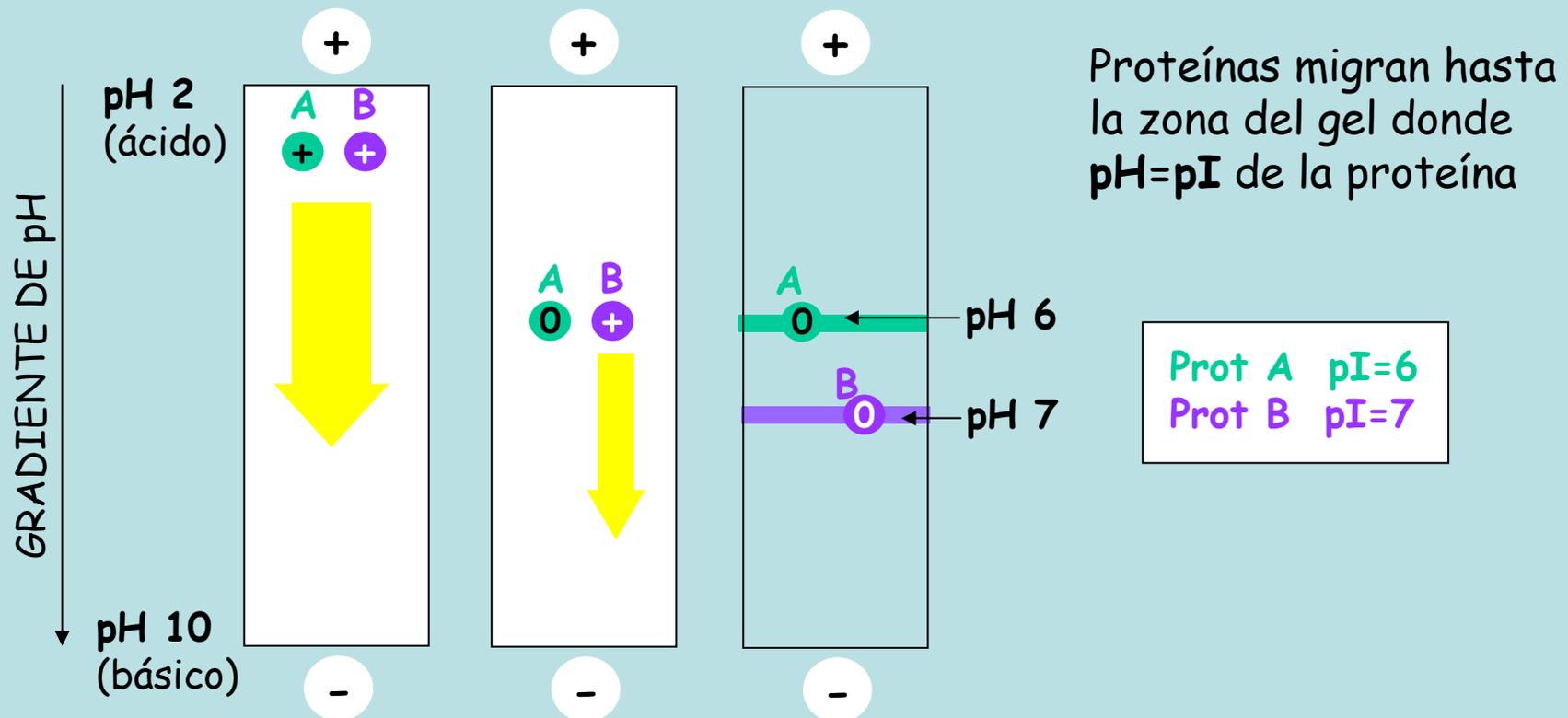
- Métodos basados en la diferencia de solubilidad
- Métodos basados en el tamaño molecular
- Métodos basados en la carga eléctrica
- Métodos basados en especificidad de ligandos

Solubilidad	Tamaño	Carga	Especificidad de unión
<ul style="list-style-type: none"> *Precipitación isoeléctrica *Salting in y salting out *Fraccionamiento del solvente *Temperatura 	<ul style="list-style-type: none"> *Diálisis (con membrana semipermeable) *Filtración en geles *Ultracentrifugación *Electroforesis en gel SDS-PAGE 	<ul style="list-style-type: none"> *Electroforesis: de zona; de disco; enfoque isoeléctrico *Cromatografía de intercambio iónico 	<ul style="list-style-type: none"> *Cromatografía de afinidad *Western blot *RIA, ELISA, IF

Métodos basados en la diferencia de solubilidad

- Precipitación isoeléctrica

Gel de poliacrilamida (PAGE) con **gradiente de pH**.

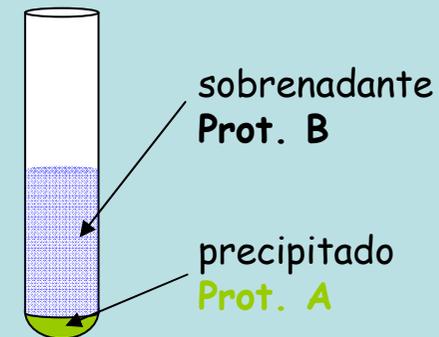
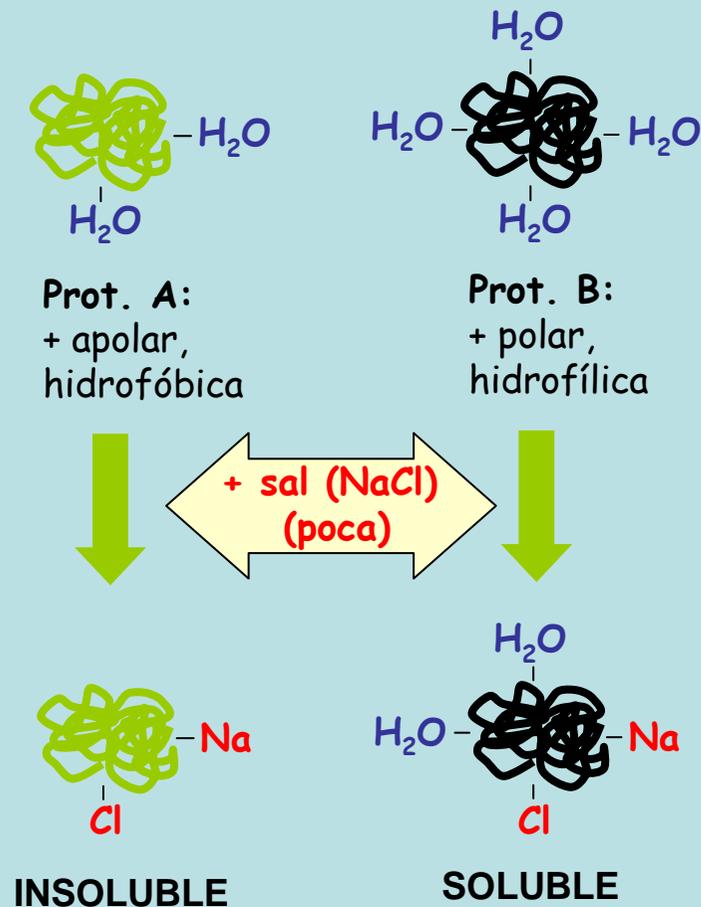


- Fraccionamiento salino

Se usa mucho en los **primeros pasos** de la purificación de proteínas.

Deshidratación → **precipitación de proteínas** (*salting-out*).

Sales: **Sulfato amónico** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Cloruro sódico NaCl



Métodos basados en el tamaño molecular

- Diálisis y ultracentrifugación

Membrana semipermeable (poros)

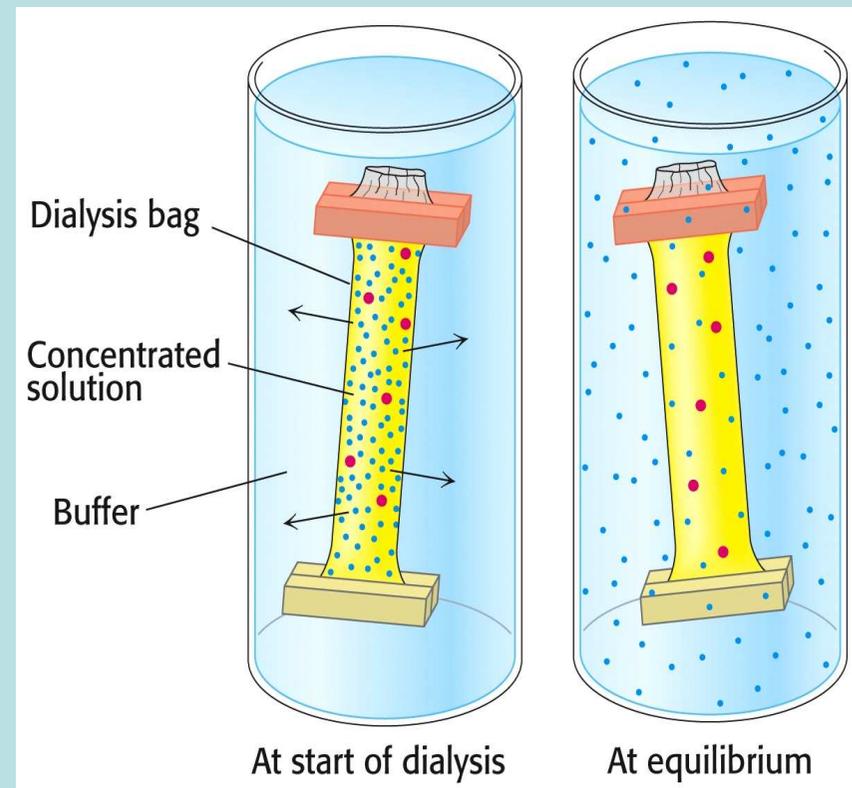
moléculas $<$ poro \rightarrow fuera

moléculas $>$ poro \rightarrow dentro

Desalar muestras por **diferencia de presión osmótica** dentro y fuera del saco de diálisis.

sal \rightarrow fuera ($<$ poro)

proteínas \rightarrow dentro ($>$ poro)



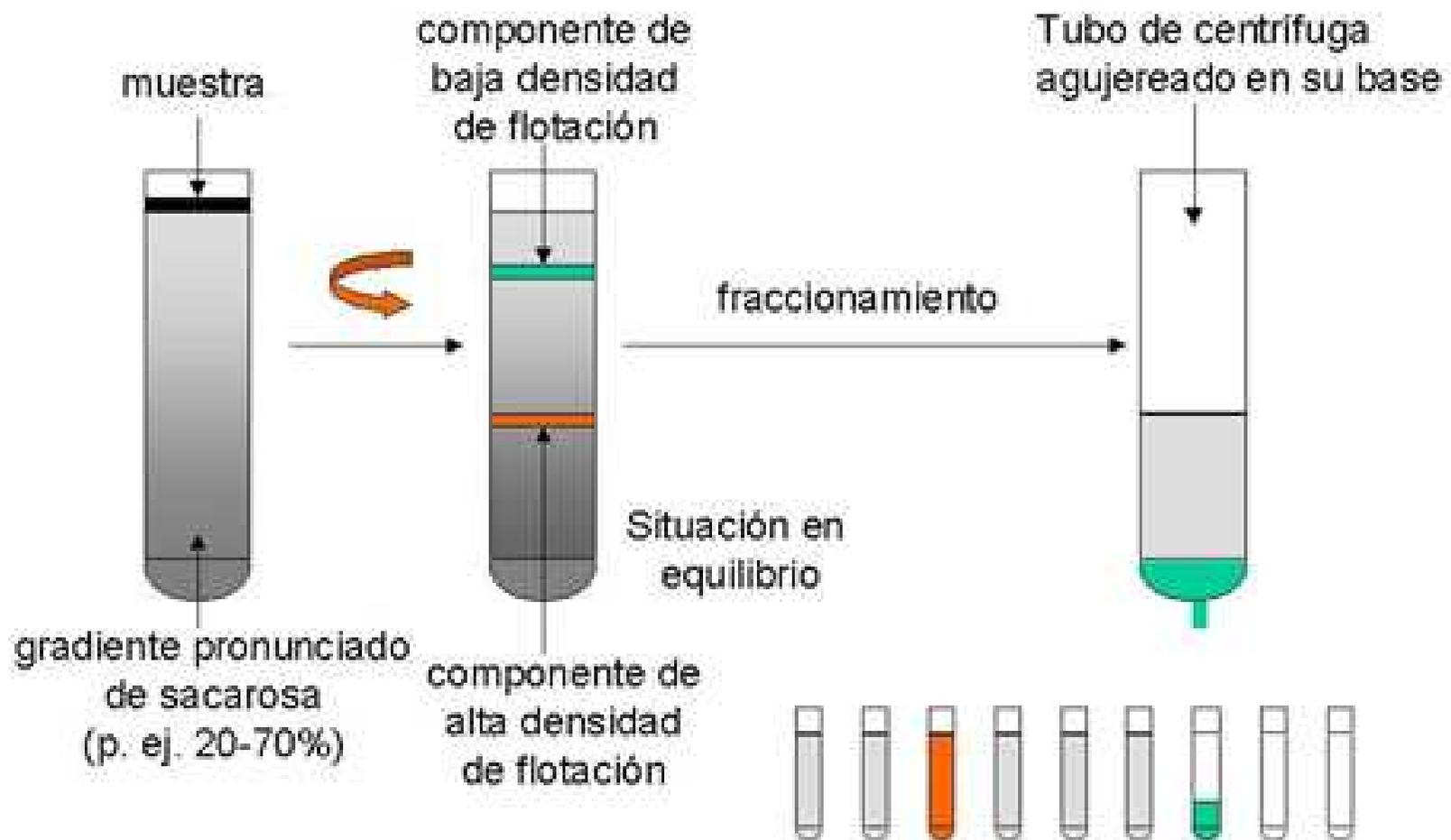
- *Centrifugación en gradiente de densidad*

Se basa en la separación de las partículas en función de su densidad de flotación.

Muestra + sacarosa o de cloruro de cesio. Al centrifugar cada componente se desplazará hacia arriba o hacia abajo hasta que alcance una posición en la que su densidad sea igual a la de su entorno (situación de flotabilidad neutra).

Como consecuencia se producirán una serie de bandas discretas, las más próximas al fondo del tubo contendrán las partículas con mayor densidad de flotación.

ESQUEMA DE UNA SEPARACIÓN EN UN GRADIENTE DE DENSIDAD



• Cromatografía de exclusión molecular

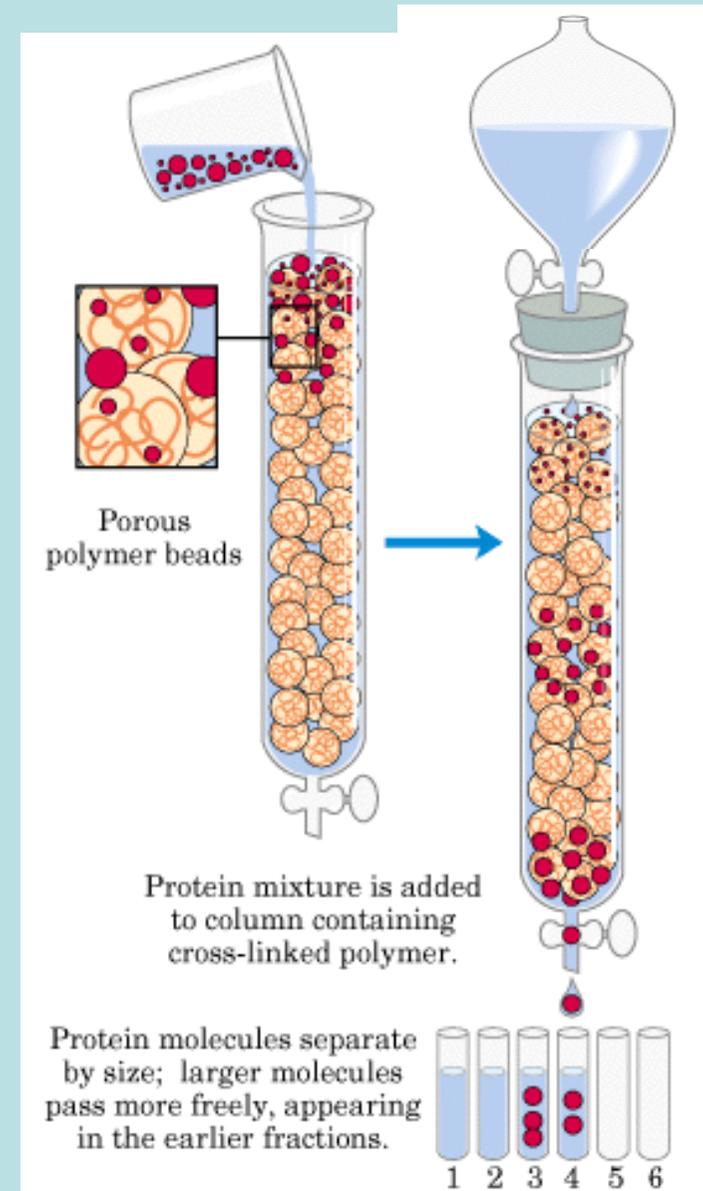
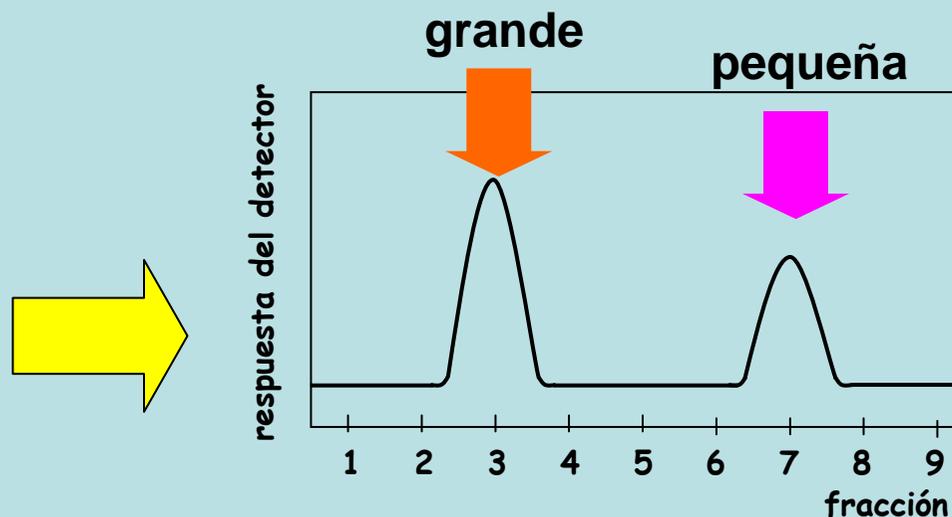
Moléculas GRANDES → RÁPIDAS

Avanzan con mayor velocidad a través de los espacios intersticiales

Moléculas PEQUEÑAS → LENTAS

Son retenidas por las fibras de las micropartículas y avanzan con menos velocidad

PERFIL DE ELUCIÓN

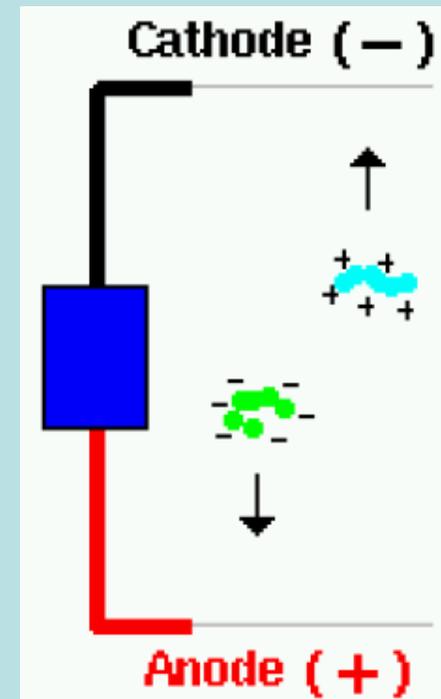


Métodos basados en la carga eléctrica

- Electroforéticos
- Migración de partículas coloidales en el seno de un campo eléctrico

Se mueven las partículas en base a:

- Su carga neta
- Tamaño
- Estructura tridimensional



Las técnicas electroforéticas son utilizadas para:

- *Separaciones efectivas*
 - Ácidos nucleicos
 - Proteínas
 - Otras biomoléculas
- *Control de pureza*
- *Separar mezclas complejas*
- *Determinar*
 - El PM de una proteína
 - pI
 - Número de cadenas polipeptídicas de una proteína

Aplicaciones

Electroforesis de proteínas en:

- suero (proteínograma),
- orina (uroproteínograma),
- y otros fluidos biológicos: LCR, líquido sinovial

Electroforesis de isoenzimas: LDH, CK

Electroforesis de lipoproteínas (lipidograma)

Las biomacromoléculas:

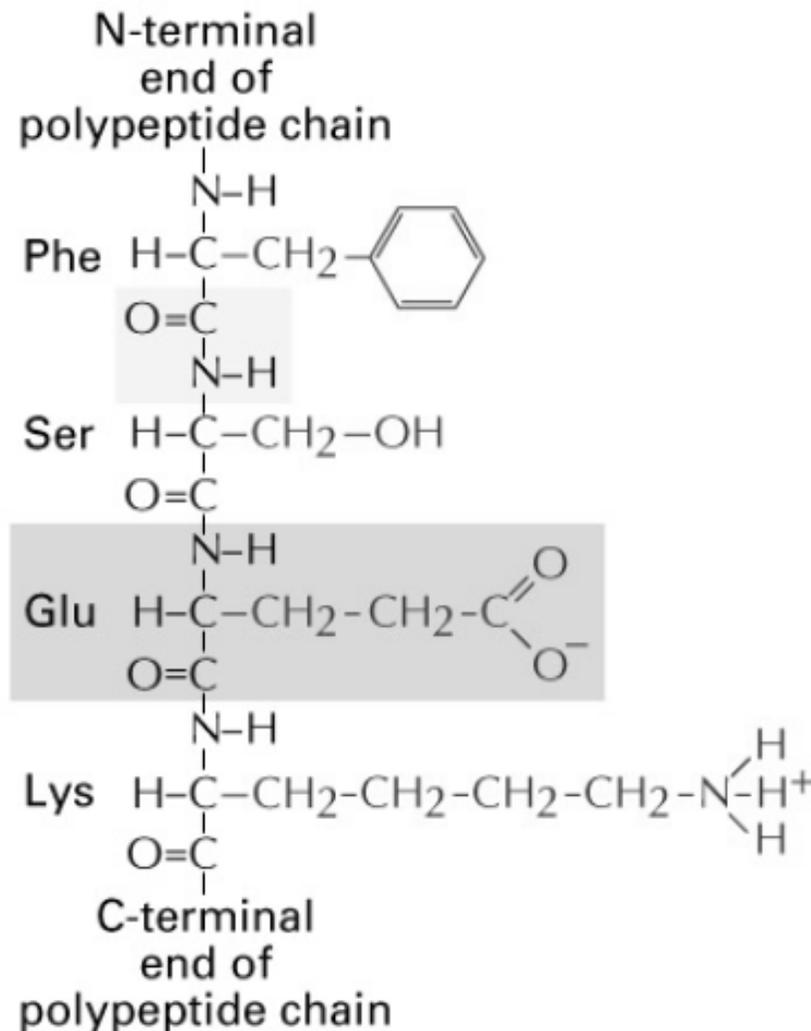
- Poseen carga eléctrica
- Grupos catiónicos y aniónicos dissociables

La carga neta de una molécula depende de:

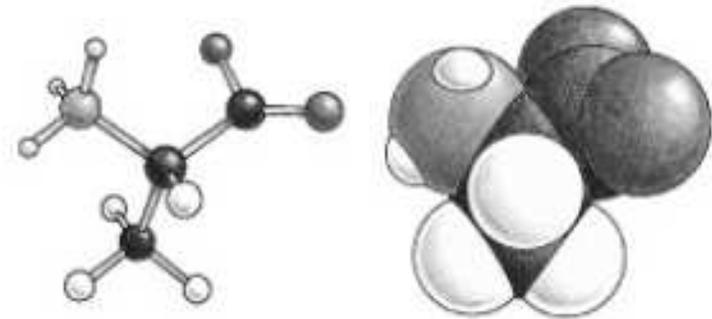
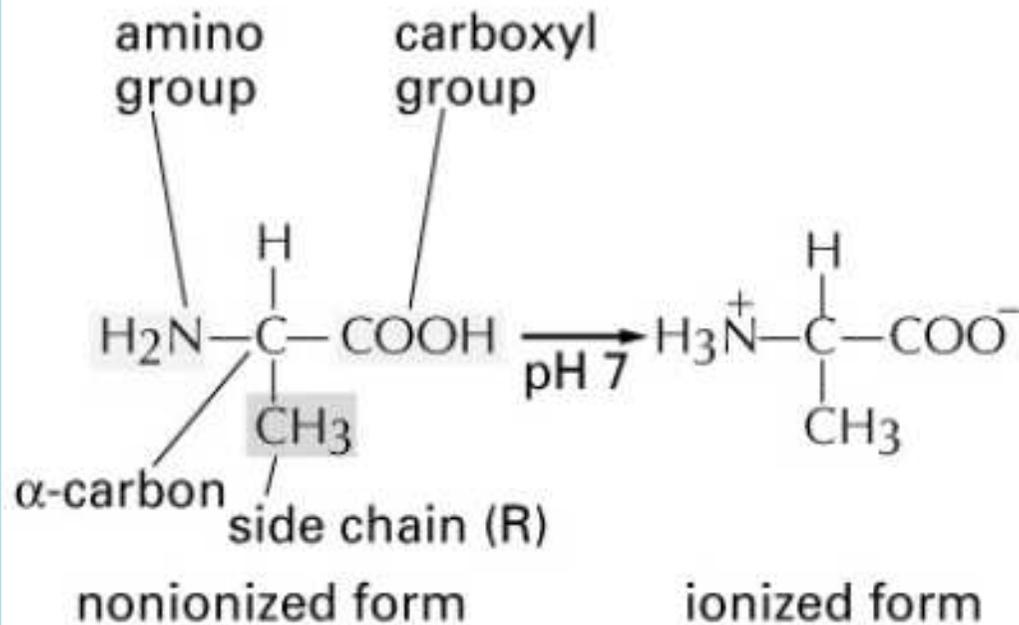
- pH del medio
- La interacción con otras pequeñas moléculas de iones
- La interacción con otras macromoléculas

- El pH influye en la migración de una molécula
- En el pI, la proteína no migra
 - Por debajo del pI migra hacia el cátodo
 - Por encima del pI migra hacia el ánodo

El enlace peptídico

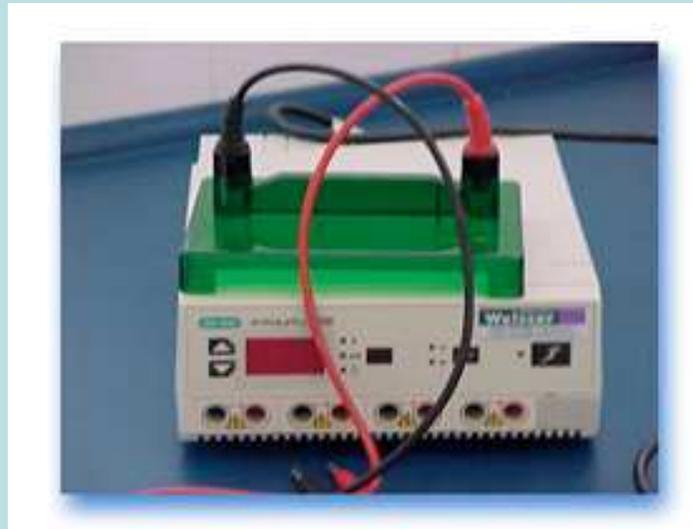


Estructura de un aminoácido



Equipo de electroforesis

- Fuente de alimentación
- Soporte para las tiras de acetato de celulosa
 - Aplicador
 - Cubeta
 - Puente
 - Reactivos



Tiras de acetato de celulosa

(Cellogel 2,5 x 17 cm)





Reactivos

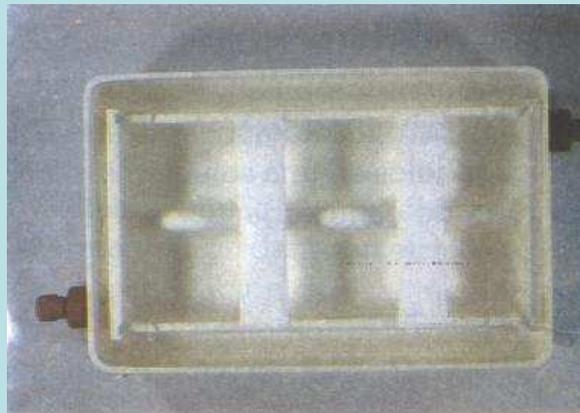
- **Solución tampón:** Buffer Veronal-Veronal sódico (pH 8,6): Veronal sódico (10,30 g), Veronal (1,34 g), Agua destilada (h/1 L)
- **Colorante:** Amidoschwartz 10 B (0,5 mg), Metanol (35 mL), Agua destilada (45 mL), Acido acético glacial (10 mL)
- **Decolorante:** Acido acético al 5% en agua
- **Solución trasparentezadora:** Metanol (87 mL), Acido acético (12 mL), Glicerina (1 mL)

ELECTROFORESIS: TINCIONES

COLORANTE	ESPECIFICIDAD SENSIBILIDAD	COMENTARIOS
Amido Black o Negro Amido 10B o Amido Schwartz	Tinción general Sensibilidad: 1 µg/banda	Mejora con fijación previa . Diferente grado de unión según la proteína.
Coomassie Blue R-250	Tinción general Sensibilidad: 0,2-0,5 µg/banda	Diferente grado de unión según la proteína. Tinción estable. Apropiado para densitometría.
Xylene Cyanine Brilliant G o Coomassie Blue G-250	Tinción general Aumenta la sensibilidad x3 en TCA después de la tinción	Apropiado para densitometría.
Verde Lisamine	Tinción general	
Rojo Ponceau 2S	Tinción general. Sensibilidad: alrededor de 0,5 µg/banda	Tinción más uniforme con todas las proteínas séricas.
Tinciones con plata y combinaciones con otros colorantes	Sensibilidad: 100 veces > tinciones generales	Laborioso. Varios protocolos. Polisacáridos y DNA. No reaccionan todas las proteínas.

Cubeta y puente

- Las tiras sobre el puente y en la cubeta
- Con tampón
- Con la tapa para crear una atmósfera saturada
- Con los cables para conectar a la fuente



puente soporte de 11 cm x 8,5 cm

Fuente de alimentación

- 0-400 voltios
- 0-50 mA
- Temporalizador
- Inversor de corriente
- Varias tomas
- Cable rojo y negro

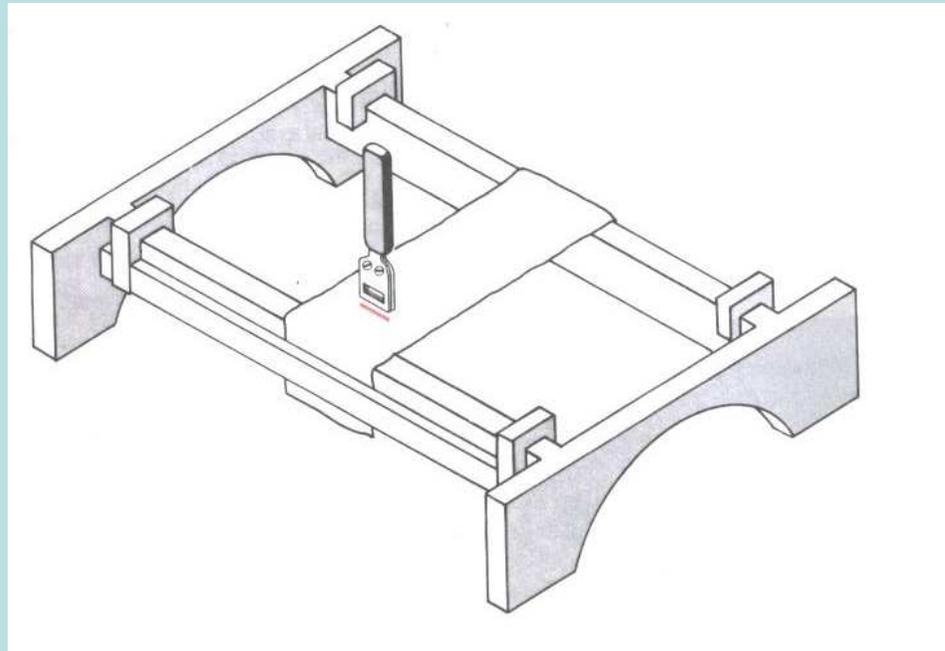
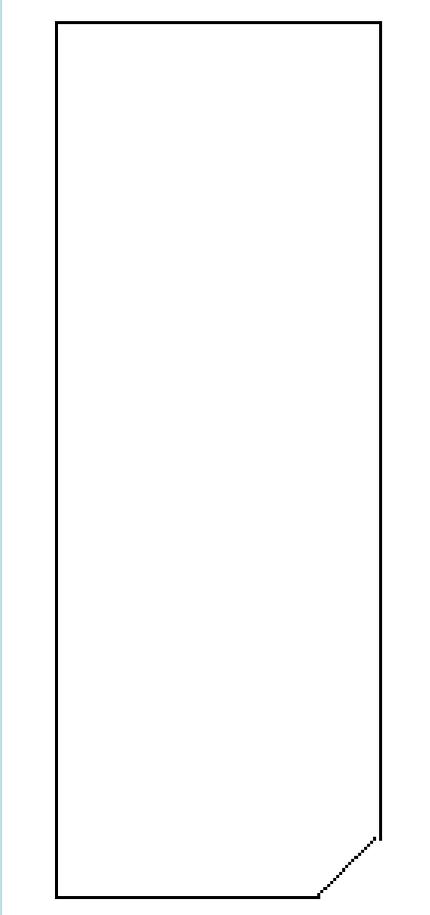


Aplicador

- Macro
- Semi-micro
- Micro



Colocación de la tira y de la muestra



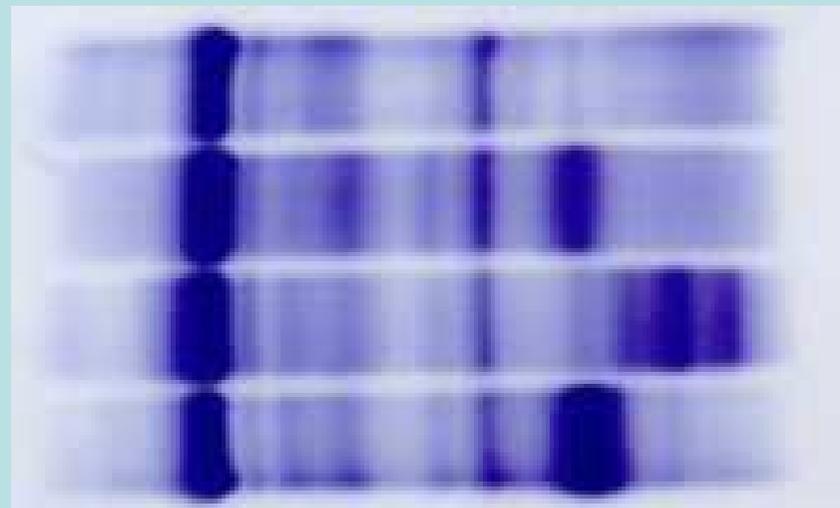
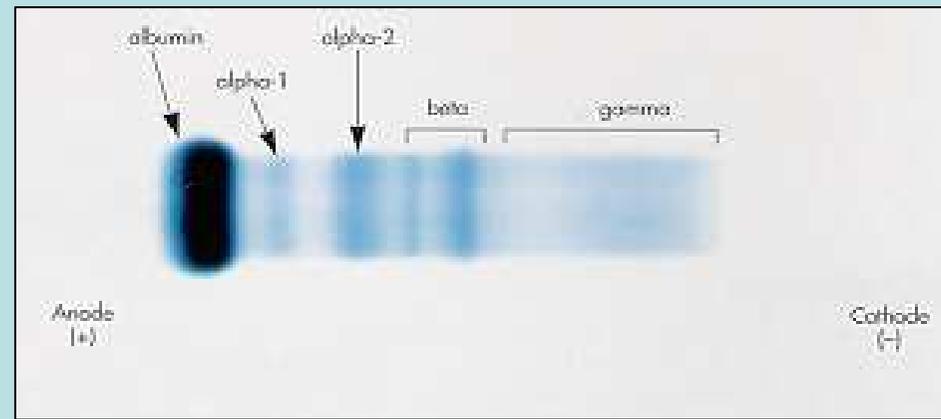
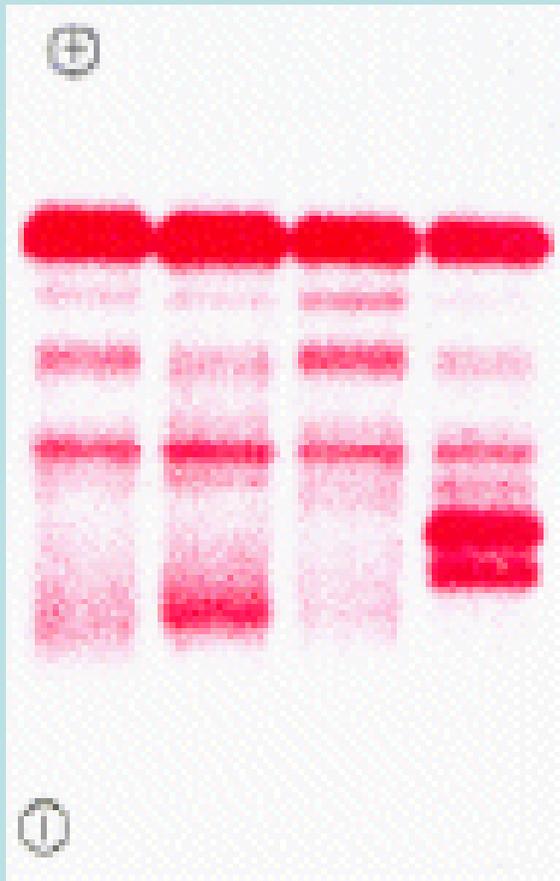
Hacer pasar una corriente de 200 V fijos y 2,5 mA/tira de acetato de celulosa. Tiempo de corrida óptimo de 55'

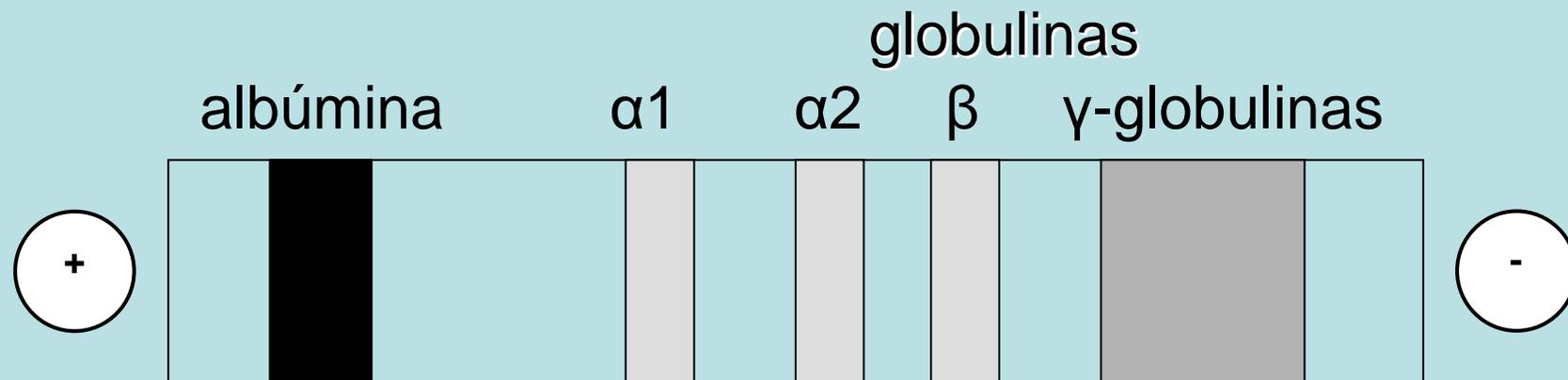
Migración



- Protocolo de la técnica para la migración
- Colorear
- Decolorar
- Transparentizar

Resultado final

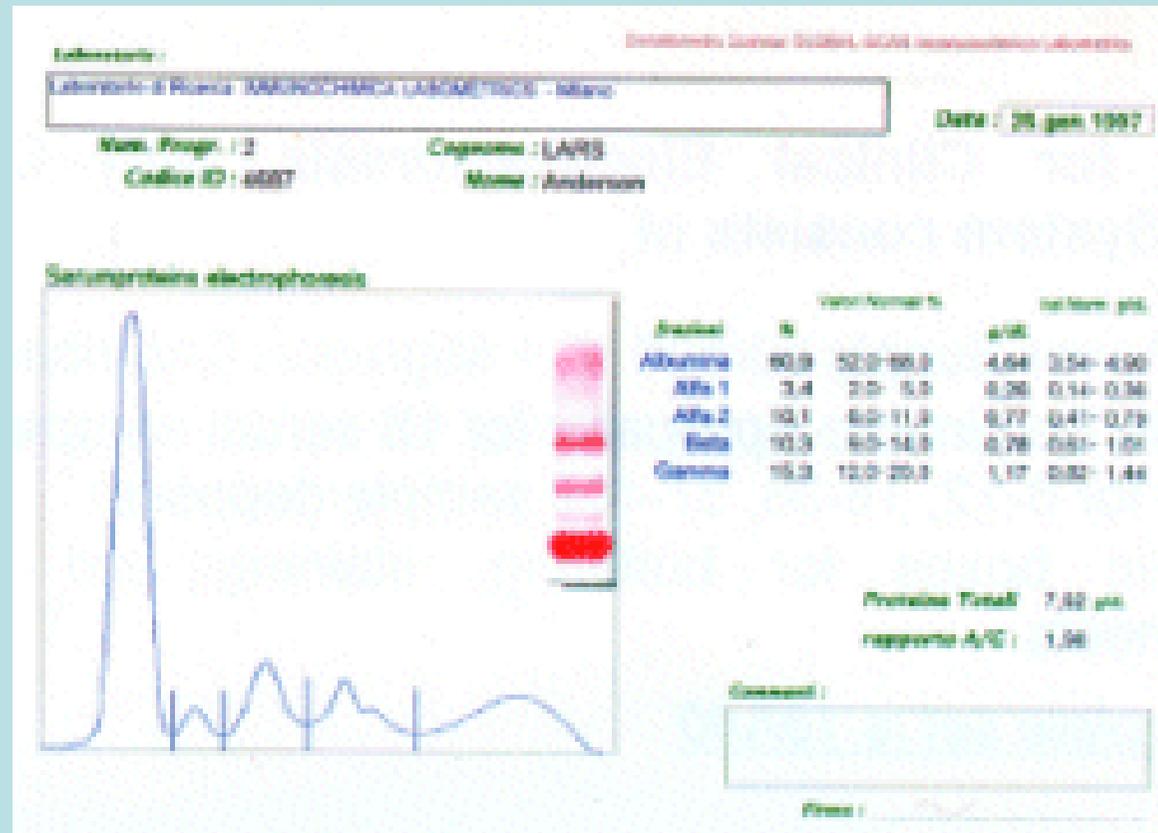




Proteínas del Suero

Clase	Proteína	Concentración normal sérica (g/L)
	prealbúmina	0,25
	albúmina	40
α -1-globulinas	α -1-antitripsina	2,9
	α -1-glicoproteína ácida	1,0
α -2-globulinas	haptoglobinas	2,0
	α -2-macroglobulina	2,6
	ceruloplasmina	0,35
β -globulinas	transferrina	3,0
	lipoproteína de baja densidad	1,0
γ -globulinas	IgG	14,0
	IgA	3,5
	IgM	1,5
	IgD	0,03
	IgE	trazas

Fotodensímetro





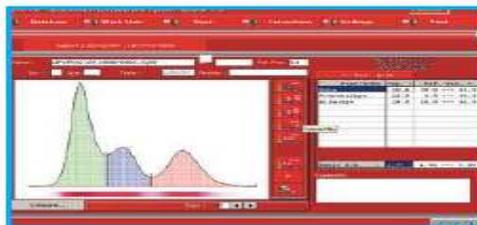
Bioquímica

Electroforesis Automática Sistema EXPRIME®

2009
MONLAB



Sistema automatizado de electroforesis en acetato de celulosa para proteinogramas, hemoglobinas o lipoproteínas. Pensado para laboratorios con una carga media/alta de proteinogramas, con ciclos de trabajo para 72 muestras en aproximadamente 2 horas.



MÉTODO

Electroforesis en acetato de celulosa. El sistema aplica la muestra, realiza la foforesis, tiñe, decolora y lee automáticamente las electroforesis sin intervención del usuario.

MUESTRAS

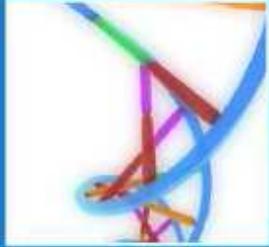
Suero, orinas concentradas, hemoglobina, lipoproteínas

CAPACIDAD DE PROCESADO

8 muestras en técnica semimicro por tira. 72 muestras por ciclo..

VELOCIDAD MEDIA

72 muestras/ 2 horas



Bioquímica

Electroforesis Automática Sistema GIANT HS®



2008



Sistema ultra compacto, automatizado, de sobremesa de tan sólo 34 Kg y de unas medidas de 56x54x45 cm que lo hacen el perfecto equipo de sobremesa para aquellos laboratorios que necesitan automatizar el proceso de la electroforesis en un pequeño espacio.

Ideal para laboratorios de hasta máx 24 muestras diarias.



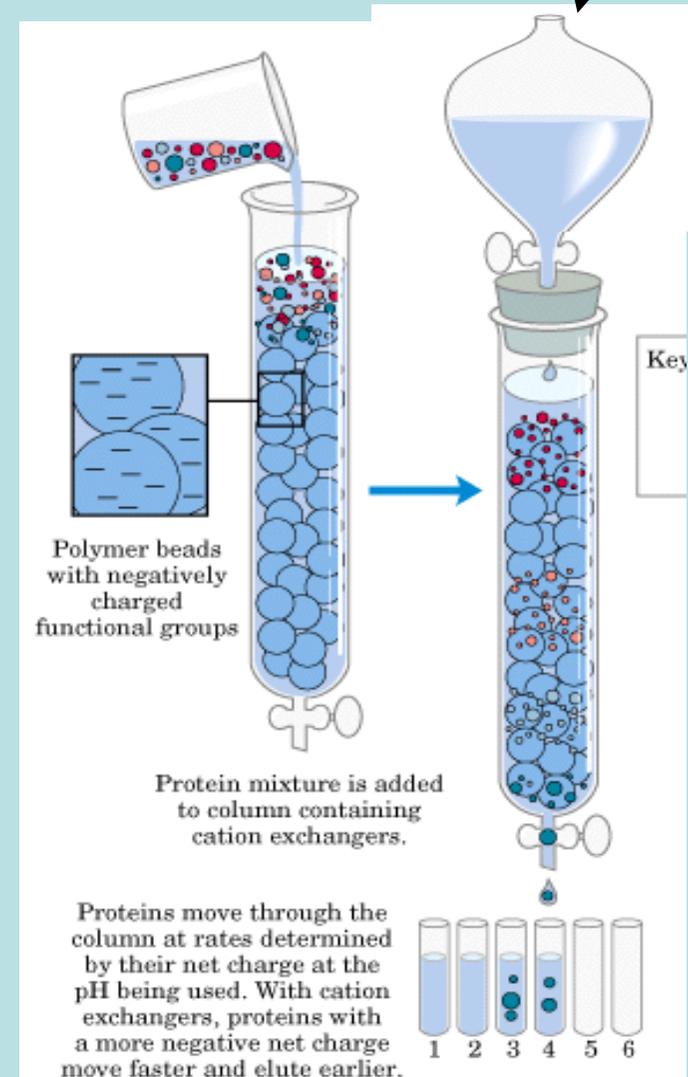
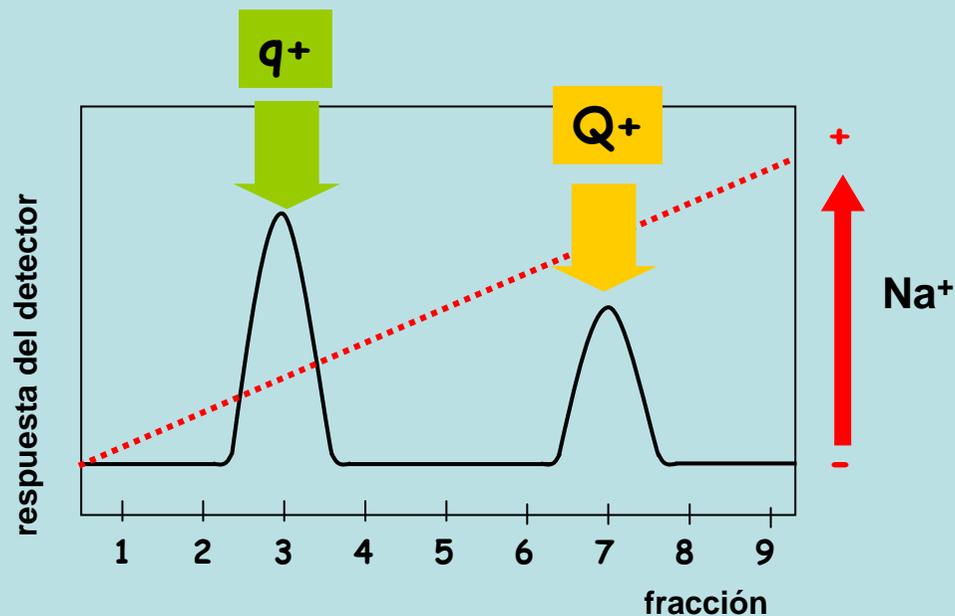
• Cromatografía de intercambio iónico

Moléculas MENOR CARGA (+) → RÁPIDAS
Son desplazadas más fácilmente por la fase móvil.

- Gradiente de pH
- Gradiente salino

Moléculas MAYOR CARGA (+) → LENTAS
Son retenidas por los grupos cargados iónicamente de la f. estacionaria.

PERFIL DE ELUCIÓN



Purificación de IgG por Cromatografía en DEAE-celulosa

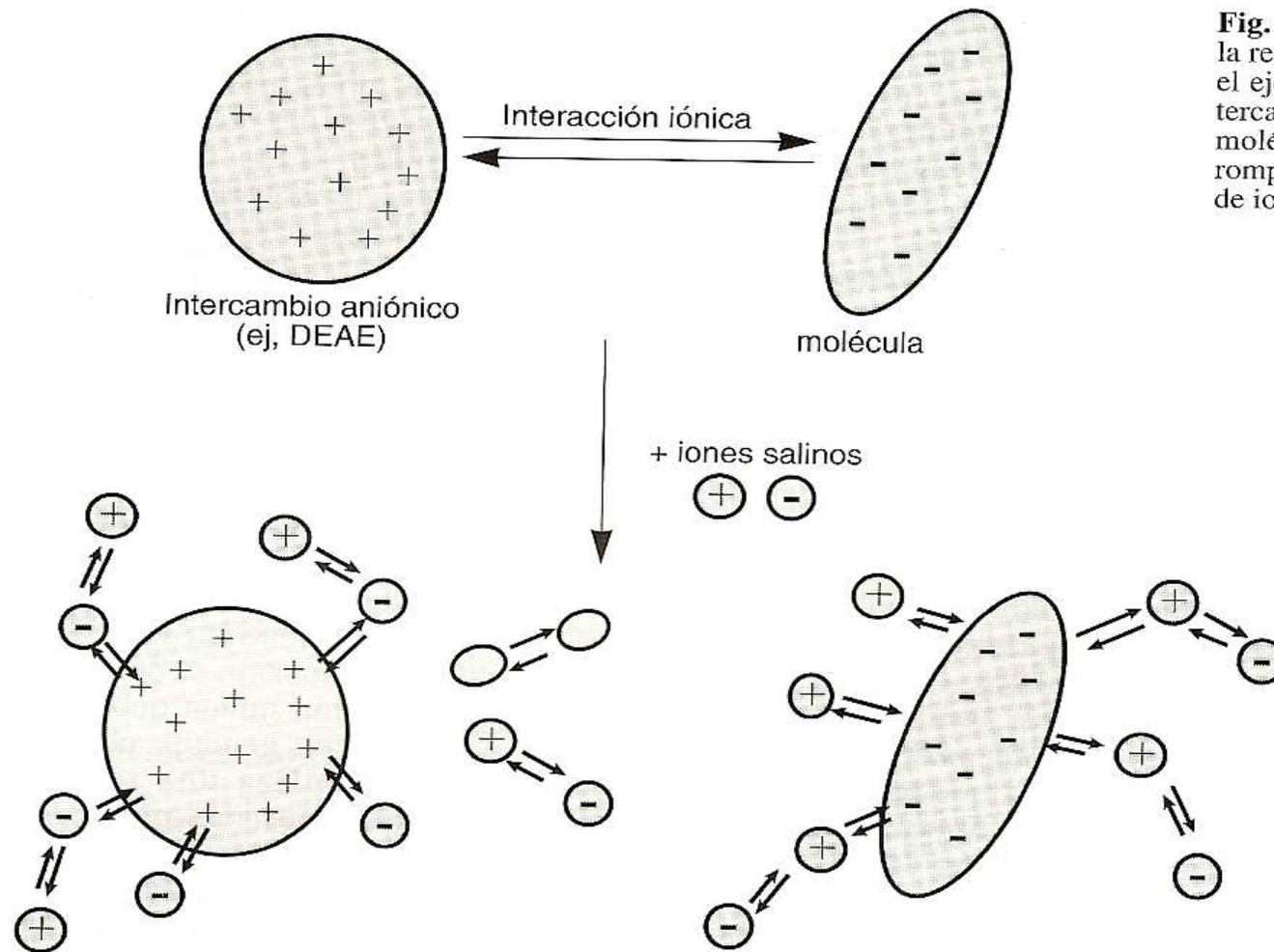


Fig. 41-6. Interacción entre la resina intercambiadora (en el ejemplo, una resina de intercambio aniónico) y la biomolécula. La interacción se rompe mediante el agregado de iones salinos.

Métodos basados en especificidad de ligandos

- La proteína A es un polipéptido de 42.000 Da constituyente habitual de la pared celular de *S. aureus*.
- Se ha estudiado con gran detalle la interacción entre la proteína A y los anticuerpos.
- La afinidad de la proteína A depende de las regiones Fc del anticuerpo, dependientes de la subclase (IgG1, IgG2 y IgG4).
- La proteína A tiene alta afinidad por los anticuerpos humanos y de otros animales.
- La proteína A se ha empleado en métodos cromatográficos unida a resinas pudiéndose purificar anticuerpos IgG.

Producción y purificación de sueros antiofídicos

En la producción industrial de los antivenenos se llevan a cabo las siguientes etapas:

- Primera etapa: *Obtención de veneno*



- **Segunda etapa: Producción del antisuero**



- **Tercera etapa: Fraccionamiento del plasma equino**



Sangría



Plasma



Precipitación salina



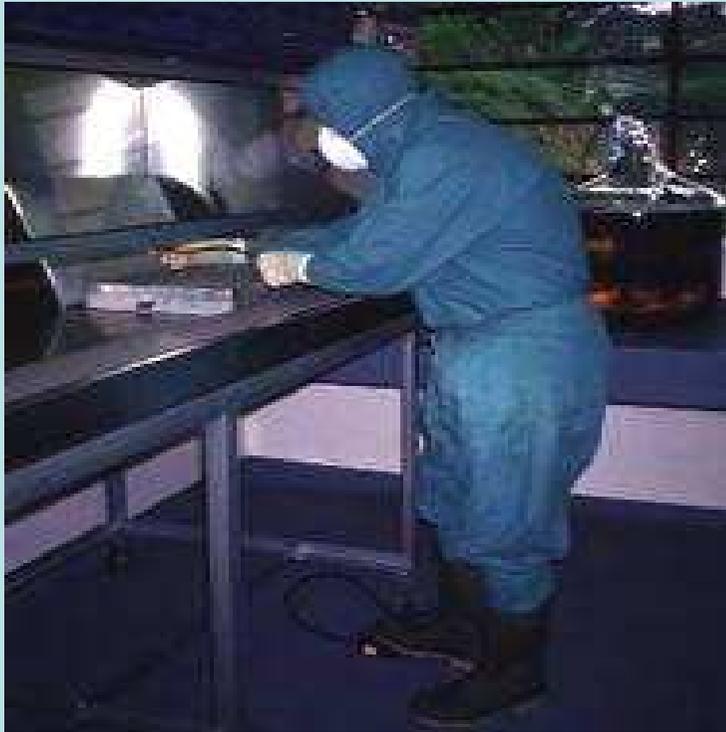
Filtración



Diálisis



Filtración estéril



Envasado del producto final



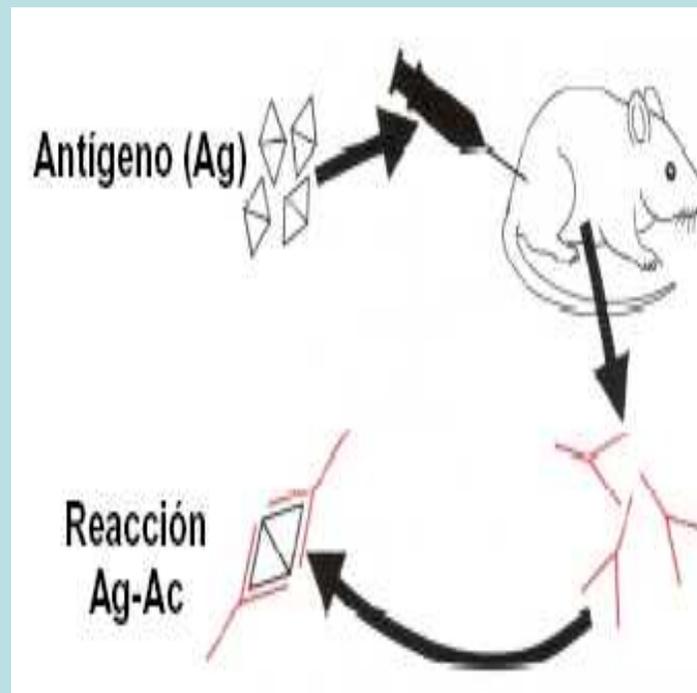
Control de Calidad

Etiquetado y empaquetado



Obtención de antisueros (anticuerpos policlonales)

- Uso diagnóstico
- En terapia antisueros antitetánicos



**Que vamos
hacer en el
práctico???**

Primera etapa ...

Precipitación de inmunoglobulinas

5 mL de suero + 5 mL de sulfato de amonio → vortex

↓
Medir pH y ajustar a 7,8 → heladera 10'

↓
Centrifugar 4000 rpm durante 25'

↓
Eliminar el sobrenadante y agregar igual cantidad de sulfato de amonio (1:2) → límpido

↓
Precipitado + 5 mL de PBS o agua destilada

Segunda etapa ... Desionización

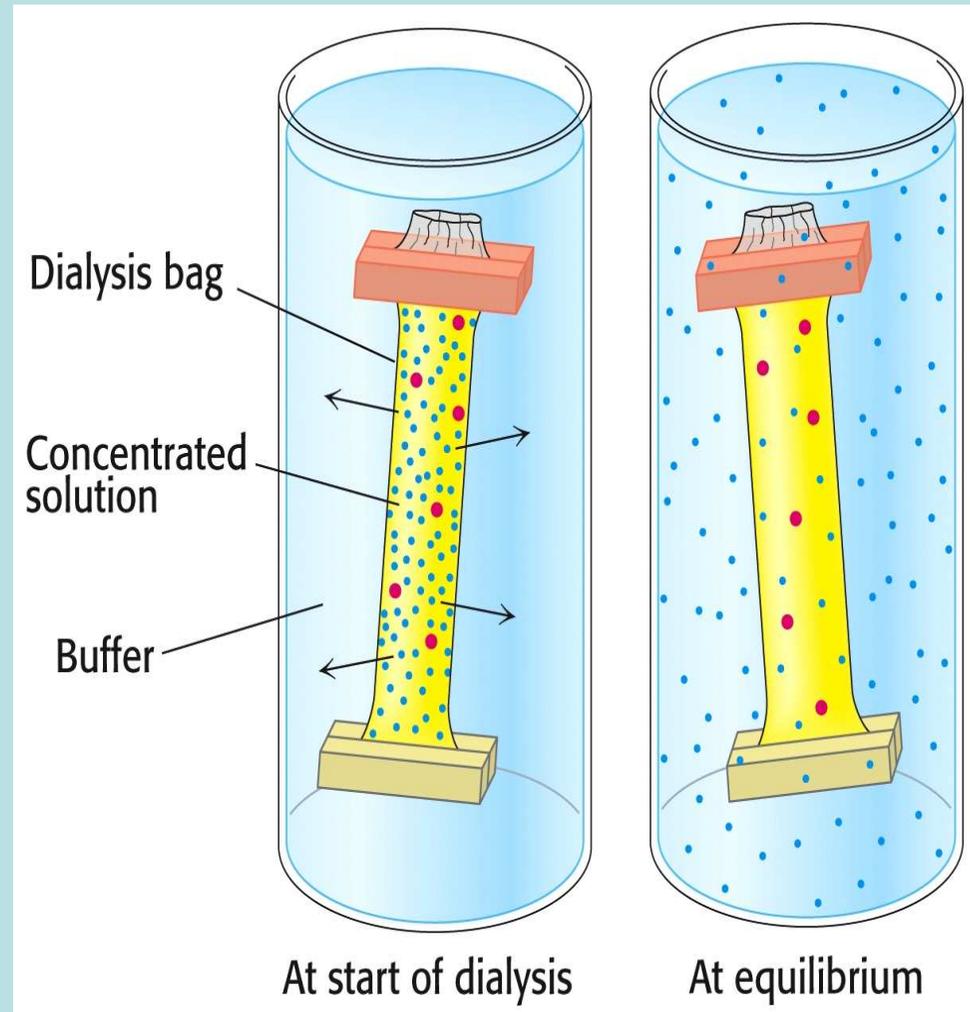
SF



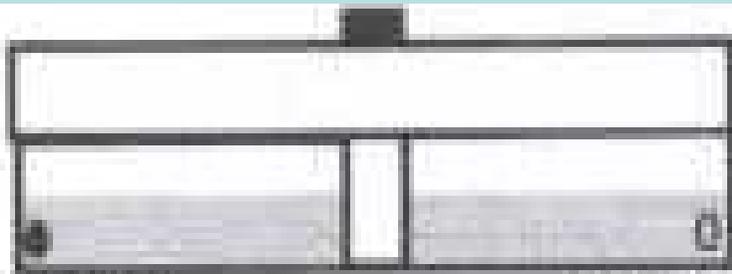
Cambiar cada 2 hs.



Reposar toda la
noche

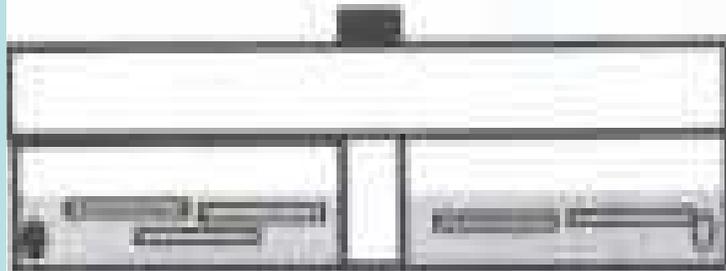
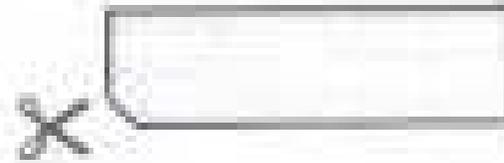


Tercera etapa ...
Control por electroforesis

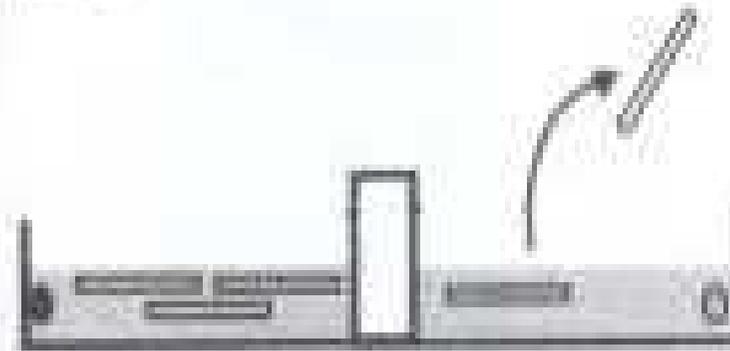


CATODO (-)

ANODO (+)



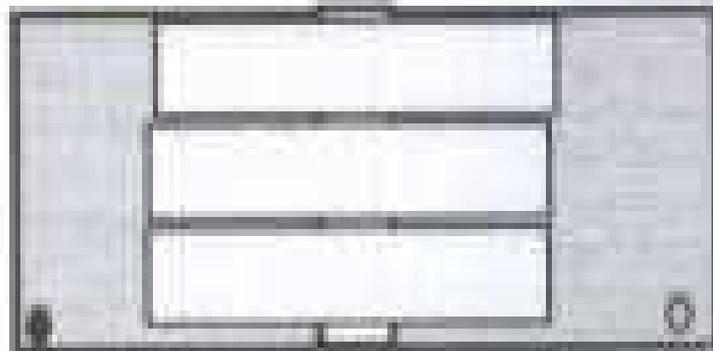
Sumergir de 5 a 15 minutos



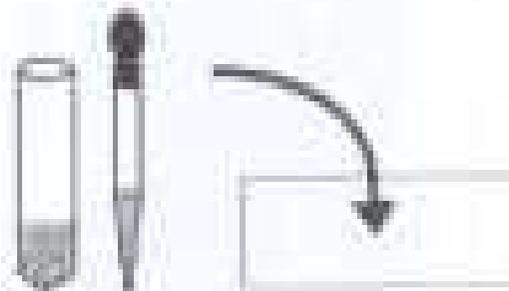
Extraer



Secar ligeramente

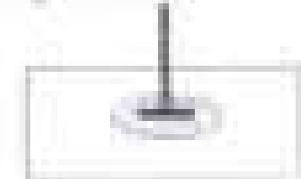


Estabilización de las tiras 2-5 minutos

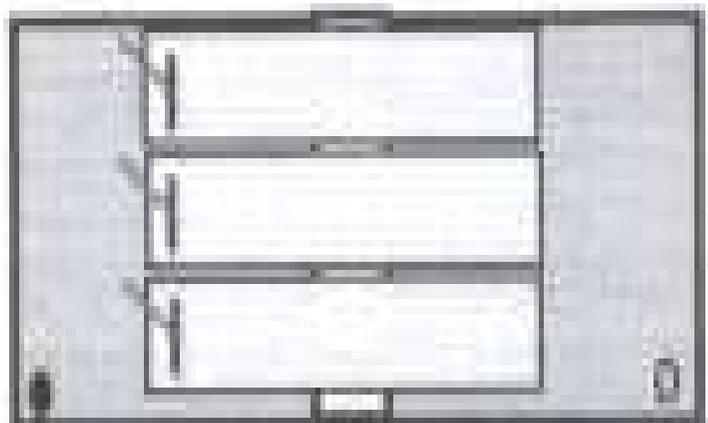


3-4 gotas de suero

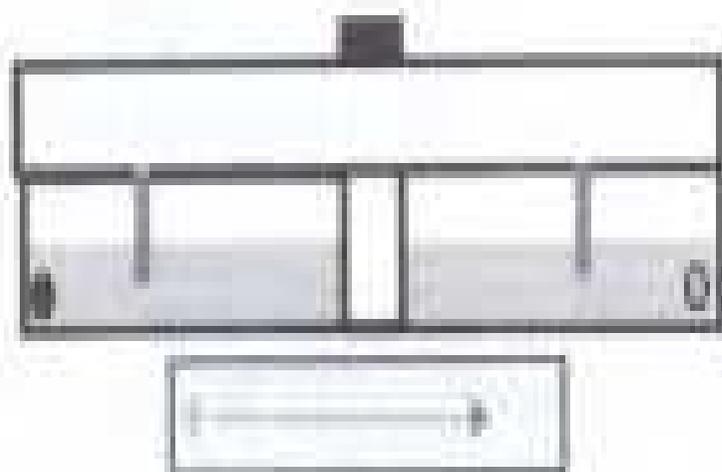
Aplicador



Tomar la muestra



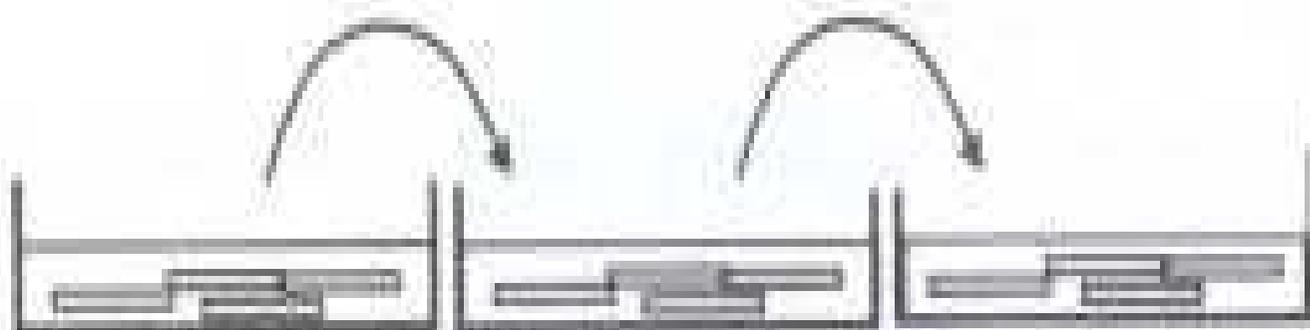
Depositar la muestra a 1 cm del borde (-) y tapar la cubeta



35 minutos a 200 v



Tañir con negro amido durante 10 minutos



Decolorar hasta obtener fondo blanco

**Luego se procede a transparentizar con una
mezcla de metanol + ácido acético
1:10 o 1+9**

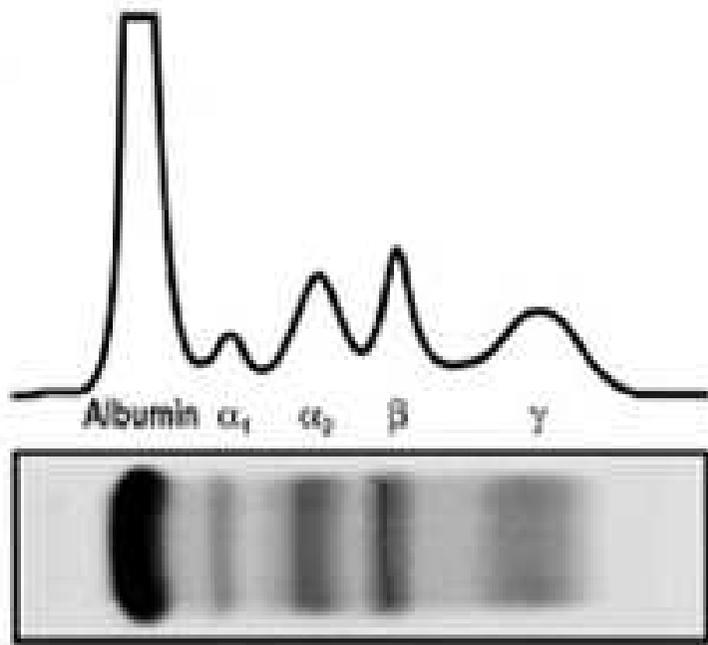
Tinción:

- Azul de Coomassie
- Negro amido
- Rojo Ponceau

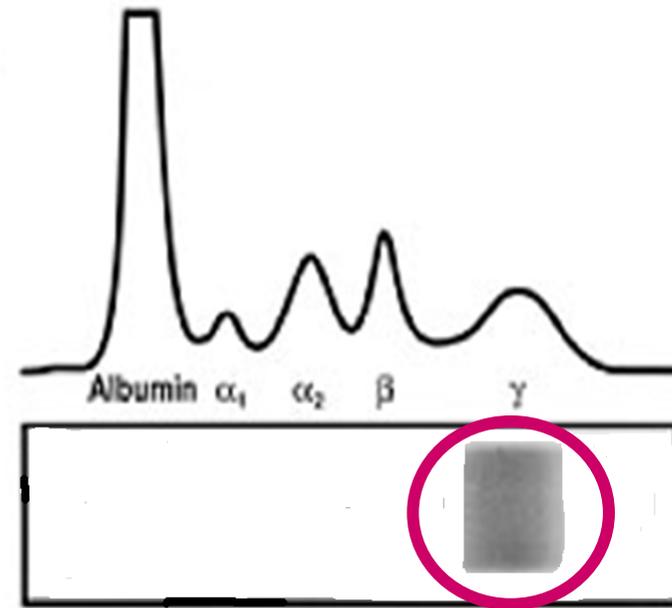
Es aplicable a:

- suero
- orina
- LCR

A



A



Alb α_1 α_2 β γ



γ

