

Guía de Trabajos Prácticos Bioquímica de Proteínas

Universidad Nacional de Quilmes

Mauricio P. Sica
Noelia Burgardt
Mario R. Ermácora

Año 2013

Índice general

I	Experimentación con proteínas	1
1.	El laboratorio de proteínas	2
1.1.	Higiene y seguridad	2
1.1.1.	Temperatura	3
1.1.2.	Congelado/descongelado	3
1.1.3.	Proteólisis	4
1.1.4.	Contaminaciones	4
1.1.5.	Concentración de sales y pH	4
1.1.6.	Material de los recipientes	4
1.1.7.	Solventes y reactivos	4
1.1.8.	Mezclado	5
1.1.9.	Almacenamiento	5
II	Estructura covalente y química de proteínas	6
2.	Concentración proteica	7
2.1.	Introducción	7
2.2.	Métodos Químicos	7
2.3.	Métodos físicos	9
2.4.	Métodos basados en la absorción de luz UV	10
2.5.	Procedimientos del Trabajo Práctico	11
3.	Tioles y disulfuros	14
3.1.	Introducción	14
3.2.	Reactivos	14
3.3.	Preparación de mercaptoalbúmina	15
3.4.	Determinación de la cantidad de puentes disulfuro en lisozima	17
III	Espectroscopía de proteínas	19
4.	Absorción UV	20
4.1.	Introducción	20
4.2.	Características del espectro UV de proteínas	20
4.3.	Aspectos instrumentales	21
4.4.	Procedimiento	21
4.5.	Reactivos	22

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	II
4.6. Datos de literatura	22
5. Análisis numérico de datos espectrales	23
5.1. Cuarta derivada.	23
5.2. Procedimiento	25

Prefacio

Bioquímica de proteínas es una asignatura que se dicta en el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes. Esta guía de trabajos prácticos intenta facilitar el proceso de aprendizaje a aquellos estudiantes que se asoman a la Biología Estructural con una mente abierta y curiosa. Es un trabajo incompleto y en preparación y contiene muchas cosas que deberían perfeccionarse o incluso corregirse. Lo ponemos a disposición de los alumnos con la esperanza de que sea útil, a pesar de sus defectos, y que además sea juzgado con benevolencia.

Parte I

**Experimentación con
proteínas**

Capítulo 1

El laboratorio de proteínas

1.1. Higiene y seguridad

Las medidas de higiene y seguridad en los laboratorios son de carácter preventivo y están destinadas a la protección frente a los riesgos propios de la actividad, para evitar accidentes y contaminaciones.

Las reglas básicas son prácticas de sentido común realizadas en forma rutinaria. El elemento clave es contar con la información que permita reconocer y combatir los riesgos presentes en el laboratorio. Aquí se resumen las reglas más relevantes teniendo en cuenta que en asignaturas anteriores los alumnos han estudiado y aplicado las mismas.

1. Conocer la ubicación de los elementos de seguridad, tales como matafuegos, salidas de emergencia, lavaojos, etc.
2. Conocer la ubicación del botiquín de primeros auxilios con los elementos indispensables para atender casos de emergencia.
3. No comer, beber, fumar o maquillarse dentro del laboratorio.
4. No ingresar bebidas o alimentos al laboratorio.
5. No apoyar efectos personales en las mesadas o el piso. Sólo se puede tener sobre la mesada el cuaderno de laboratorio, la guía de los prácticos y un lápiz.
6. Utilizar vestimenta apropiada y cabello recogido (guardapolvo preferentemente de algodón y de mangas largas, zapatos cerrados, evitando el uso de accesorios colgantes).
7. No pipetear con la boca.
8. En caso de contacto de un reactivo con la piel u ojos lavar la zona inmediatamente con abundante agua y pedir ayuda.
9. Rotular adecuadamente los recipientes con reactivos.
10. Depositar el material de vidrio roto en el recipiente especial correspondiente.

11. Consultar con el docente antes de descartar reactivos en las piletas.
12. Registrar adecuadamente el procedimiento experimental.
13. Mantener el orden y la limpieza, cada persona es responsable directa de la zona que le ha sido asignada y de todos los lugares comunes.
14. Lavarse las manos cuidadosamente después de cualquier manipulación de laboratorio y antes de retirarse del mismo.
15. Lavar los materiales a utilizar antes y después de usarlos enjuagando con un poco de agua destilada.
16. No regresar residuos de reactivos al frasco original para evitar contaminarlo
- 17.

Trabajando con proteínas

La función de las proteínas está relacionada con la estabilidad de su estructura tridimensional, la cual es muy sensible a las condiciones del medio en el que se encuentra y las condiciones de almacenamiento. En esta sección presentaremos varios factores que afectan la estabilidad de las proteínas.

1.1.1. Temperatura

La temperatura óptima para cada proteína es específica y debe ser determinada adecuadamente. La mayoría de las proteínas de organismos mesófilos tienen una temperatura óptima de funcionamiento entre 20–40 °C. Sin embargo, el almacenamiento de proteínas a temperatura de ambiente generalmente favorece la desnaturalización de las mismas. Esto se debe a que dentro de las células las proteínas están ‘protegidas’ por varios mecanismos como por ejemplo, la interacción con chaperonas. Para evitar entonces la desnaturalización de proteínas purificadas es común mantenerlas en hielo durante su uso. No obstante, las proteínas también sufren desnaturalización a bajas temperaturas, por lo cual repetimos que el rango de temperatura óptima de trabajo debe ser determinado específicamente para cada proteína.

1.1.2. Congelado/descongelado

Los ciclos de congelado/descongelado de proteínas suelen provocar desnaturalización, por lo cual se deben evitar. En el caso de ser necesario congelar para el almacenamiento de una muestra de proteína, se debe alicuotar la misma. Una forma de minimizar los efectos del congelado es enfriar la muestra primero con nitrógeno líquido para acelerar el proceso. Algunas proteínas son más estables almacenadas a -80 °C que a -20 °C, por lo cual es necesario comprobar la pérdida de estabilidad a diferentes temperaturas de congelado. Por último, el proceso de descongelado también es importante, ya que debe realizarse a bajas temperaturas por lo indicado en la sección anterior. Una forma rápida de descongelado es colocar el tubo en agua a temperatura ambiente o menor.

1.1.3. Proteólisis

Si bien la mayoría de las proteasas y peptidasas suelen ser casi inactivas a bajas temperaturas, trabajar a 4 °C no es la única condición necesaria para evitar la degradación de proteínas. Las muestras de proteína purificada puede ser fácilmente contaminada por proteasas provenientes de la piel del investigador, microorganismos, o incluso del aire. El uso de inhibidores de proteasas es sugerido, sobretodo cuando las condiciones experimentales requieren temperaturas mayores a 4 °C durante tiempos largos. Hay que tener en cuenta que algunos inhibidores de proteasas son proteínas o péptidos, los cuales pueden interferir en las mediciones.

1.1.4. Contaminaciones

Aunque no es estrictamente necesario trabajar en condiciones de esterilidad cuando se utilizan muestras de proteínas, en ciertas situaciones esto implica que las mismas se contaminarán con bacterias. Dependiendo del tipo de experimento a realizar, esto puede no ser un problema. Sin embargo, para evitar cualquier tipo de contaminación y siempre que no esté contraindicado por otras razones, se puede agregar un agente antibacteriano, como por ejemplo azida de sodio (NaN_3 0.02–0.05 %). Tener en cuenta cuando se maneja una solución con azida que este compuesto es altamente tóxico.

1.1.5. Concentración de sales y pH

En condiciones fisiológicas se mantiene un balance de la concentración de sales y del pH, por lo que cada proteína presenta actividad en un rango de pH y fuerza iónica determinado. El uso de concentraciones de sales muy baja o muy alta puede ocasionar precipitación de las proteínas, la cual puede ser irreversible. El valor de pH de la solución también puede originar precipitación, aunque lo más común es que simplemente producen desnaturalización. Aunque el buffer PBS es utilizado normalmente, las condiciones óptimas de trabajo y almacenamiento deben ser determinadas para cada proteína.

1.1.6. Material de los recipientes

Los tubos que se utilizan en los laboratorios pueden ser de diferentes materiales, los cuales pueden absorber proteínas en su superficie. Esto puede resultar en la pérdida de proteína, especialmente cuando se trabaja con soluciones de baja concentración. En algunos casos es posible agregar otra proteína a la solución (por ejemplo BSA) para evitar este fenómeno, pero lo preferible es utilizar tubos de un material especial con baja absorción, evitando el vidrio y el poliestireno. Dado que las proteínas se adhieren a los plásticos, la punta de las pipetas se deben cambiar luego de tomar una solución de proteína. Enjuagar la punta de la pipeta es insuficiente para prevenir el arrastre entre de muestra.

1.1.7. Solventes y reactivos

La mayoría de los solventes orgánicos desnaturalizan proteínas, sin afectar la estructura primaria. Los detergentes también producen este efecto en las

proteínas globulares, mientras que son indispensables para la estabilidad y funcionamiento de las proteínas de membrana. Muchas proteínas, especialmente las que tienen cisteínas, requieren agentes reductores para mantener las condiciones de oxidación adecuadas. Los agentes reductores más utilizados son DTT, β -mercaptoetanol y glutatión. Además, cuando estos reactivos se encuentran en alta concentración, permiten romper los puentes disulfuro de las proteínas, permitiendo la caracterización de las mismas. Durante la caracterización de una proteína, además de trabajar en las condiciones óptimas, se puede obtener mucha información a partir de estudios en condiciones desnaturizantes. Para esto se pueden utilizar diferentes tipos de reactivos que rompen las interacciones moleculares débiles, desarmando la estructura cuaternaria, terciaria y secundaria de las proteínas. Entre los compuestos más utilizados se encuentran la urea y el cloruro de guanidinio. Algunas proteínas son sensibles al oxígeno y a la presencia de metales pesados, caso en el cual es necesario trabajar bajo atmósfera de nitrógeno y con el agregado de quelantes.

1.1.8. Mezclado

Nunca se debe agitar vigorosamente una muestra de proteína, ya que la formación de espuma es un proceso de desnaturización. El método preferido de mezclado para soluciones de proteínas es utilizar una micropipeta con una punta de polipropileno, tomando y descargando la solución suavemente. También se puede realizar mezclado por inversión. Los volúmenes grandes (> 50 mL) se pueden mezclar con una barra de agitación, utilizando una velocidad baja.

1.1.9. Almacenamiento

Además del método de congelado ($- 20$ °C, $- 40$ °C, nitrógeno líquido), mencionado anteriormente, existen otros métodos para el almacenamiento de proteínas. En el caso que la proteína no resista el proceso de congelado, es posible almacenar la muestra en forma líquida a baja temperatura, o a $- 20$ °C con el agregado de glicerol. Otro método muy utilizado es la liofilización, proceso por el cual se realiza una sublimación del agua y se obtiene una muestra de proteína en forma de polvo. Si bien este proceso es favorable en muchos aspectos, también puede causar desnaturización de la proteína.

Parte II

Estructura covalente y química de proteínas

Capítulo 2

Concentración proteica

2.1. Introducción

La determinación exacta, precisa y reproducible de la concentración de una proteína en solución, es probablemente uno de los problemas experimentales que más frecuentemente enfrenta el investigador o biotecnólogo, por ejemplo, cuando quiere caracterizar los productos purificados obtenidos por expresión genética. La importancia de esta determinación surge de que casi todas las variables que caracterizan a una proteína deben ser normalizadas por la masa o por la concentración molar. Este es el caso, por ejemplo, de la actividad enzimática específica, la estequiometría de unión de un ligando, la potencia biológica de un polipéptido, el coeficiente de extinción en la absorción electrónica, etc. A pesar de ello, la cuantificación de proteínas frecuentemente se realiza descuidadamente, lo cual invalida muchos ensayos de actividad biológica y lleva a conclusiones incorrectas sobre la calidad de un producto proteico. La raíz de este problema es sin duda la dificultad técnica que implica la determinación exacta de la concentración proteica ¿Cuáles son los problemas que hay que resolver para determinar la concentración de una proteína? A continuación se discuten someramente algunos aspectos. Para un análisis más detallado, el alumno debe remitirse a la bibliografía recomendada.

2.2. Métodos Químicos

El principio fundamental de los métodos químicos para la determinación de la concentración proteica se basa en establecer una relación entre la cantidad de un producto (cromóforo o fluoróforo) formado por la reacción o interacción entre un reactivo y una función química proteica. En el caso ideal, la cantidad de producto es una función lineal de la cantidad de proteína y no hay interferencia de reacciones colaterales. En la práctica, las interferencias siempre están presentes y la relación entre las concentraciones de producto y reactivo raramente es lineal, o lo es en un rango muy estrecho.

¿Qué funciones proteicas se usan? Una elección obvia son las cadenas laterales más reactivas, capaces de generar productos coloreados o fluorescentes. Por ejemplo, aminas primarias (lisinas, grupo NH_2 -terminal), argininas, tirosinas, triptofanos, histidinas, etc. De hecho, se desarrollaron muchos reactivos

para determinar proteínas que se basan en este principio. Por ejemplo, el ácido trinitrobenzeno sulfónico genera un producto amarillo al reaccionar con lisinas y aminos primarios. Otro reactivo es la fluorescamina que forma un compuesto altamente fluorescente al reaccionar con estos mismos grupos. En este caso, el rendimiento cuántico de fluorescencia del producto es tan alto que permite la determinación de trazas de proteína. El inconveniente de estos métodos es el patrón que hay que usar en cada caso. No todas las proteínas tienen el mismo número de grupos reactivos por gramo o por mol. Por lo tanto, a menos que se use como estándar a la misma proteína que se quiere determinar, el resultado no es exacto. Para ser más explícito, si usamos seroalbúmina bovina para hacer una curva de calibración y determinar la concentración de una solución de lisozima estaremos cometiendo un error (que en la mayor parte de los casos es muy serio) simplemente porque estas dos proteínas no tienen la misma composición aminoacídica.

Una solución es utilizar una función proteica que se encuentre distribuida uniformemente en todas las proteínas. La función proteica ideal es el enlace peptídico: en todas las proteínas existe el mismo número de enlaces peptídicos por residuo. A la vez, como el número de residuos por proteína es alto (generalmente superior a cien), el peso molecular promedio por residuo se puede promediar a un valor de ≈ 113 g/mol). Pero este camino tiene una limitación: el enlace peptídico es muy poco reactivo y por lo tanto hay que buscar una manera de aumentar su reactividad. ¿Qué soluciones se encontraron a este problema? El método de referencia para determinar químicamente la concentración proteica es la reacción de ninhidrina¹. No será tema de este trabajo práctico, así que los detalles deberán buscarlos en la literatura. Solamente diremos que la reacción consiste en una hidrólisis exhaustiva de todos los enlaces peptídicos con HCl 6M, a 110 °C en ausencia de oxígeno y luego hacer reaccionar los aminoácidos libres con ninhidrina en una reacción compleja que da un color púrpura intenso. También debe realizarse una curva de calibración con aminoácidos libres en concentración conocida. El rendimiento de color de la mayor parte de los aminoácidos es muy semejante (con la notable excepción del único iminoácido natural encontrado en las proteínas, la prolina). La sensibilidad de esta reacción es extrema, pudiéndose detectar unos pocos nanomoles de aminoácido (unas pocas decenas de picomoles de una proteína de 100-200 residuos). Es una reacción para químicos hábiles y entrenados, requiere absoluta limpieza del material de vidrio y es muy sensible a las contaminaciones con grupos aminos (el humo del cigarrillo de un fumador cercano puede arruinar el experimento, trate de imaginar por qué). Estas dificultades técnicas la hacen impracticable en el laboratorio general. Por eso se buscaron alternativas.

La alternativa más popular a la reacción de ninhidrina es la reacción de Lowry². Tampoco hablaremos mucho aquí acerca de esta reacción. Simplemente diremos que utiliza el poder de formar complejos metálicos que tiene el enlace peptídico y la capacidad que tienen esos complejos de iniciar reacciones redox. La ventaja es que no requiere hidrólisis del enlace peptídico. La desventaja es una sensibilidad mucho menor comparada con la reacción de ninhidrina y la presencia de muchos interferentes que hay que conocer bien. Otro problema es que no es estequiométrica respecto a la cantidad de enlaces peptídicos y que los residuos aromáticos aportan una cuota considerable de absorbancia final, con lo que el problema del patrón a utilizar reaparece. La reacción de Lowry es muy útil para determinaciones aproximadas de concentración total

de proteína en mezclas complejas (por ejemplo, en los pasos tempranos de una purificación). No es en absoluto una alternativa para la determinación exacta de la concentración de proteínas puras a menos que se establezca una relación entre el color del estándar y el color de la proteína en cuestión. Es frecuente encontrar en la literatura frases como esta: “...se determinó la concentración proteica de la proteína X por el método de Lowry usando como proteína patrón seroalbúmina bovina, para lo cual se había establecido previamente que la proteína X tiene un rendimiento de color que es n veces el rendimiento del patrón...”.

El otro método ampliamente utilizado es el de Bradford³. Se basa en la formación de complejos no covalentes fuertemente coloreados que presentan una importante absorbancia en el espectro visible entre distintas cadenas laterales y un colorante. Este método es más sensible que el de Lowry, pero es difícil de realizar correctamente. Los componentes del ensayo son difíciles de estandarizar y de preparar. Además, el colorante interactúa fuertemente con el plástico y el cuarzo, lo que obliga a usar celdas de plástico descartables o placas de fosas múltiples con lectores automáticos tipo ELISA. El método de Bradford tiene una respuesta marcadamente no lineal y debe hacerse una curva de calibración cada vez que se usa. El problema del estándar es agudo con este método y siempre los resultados son relativos. Otro método ampliamente utilizado es el del ácido bicinónico o BCA⁴. Este método tiene un principio semejante al Lowry, con menos interferencias y más sensibilidad. Las mismas precauciones relativas al estándar se aplican en este caso y es necesario hacer una curva de calibración cada vez.

2.3. Métodos físicos

Los métodos gravimétricos no serán tratados aquí. Basta decir que se aplican sólo en casos especiales, por ejemplo, cuando se precisa determinar con precisión muy alta el coeficiente de extinción molar de una proteína. Este método consiste, primero en la determinación directa de la masa de una muestra proteica deshidratada y, luego, en la preparación de soluciones valoradas mediante pesada del componente proteico. Una complicación de este método es el proceso de secado total de la proteína, el cual es técnicamente complejo. Para ello, generalmente se usan deshidratantes químicos, como el pentóxido de fósforo en condiciones de vacío y el proceso se continúa hasta que el peso de la muestra se mantiene constante. Además, este método requiere grandes cantidades de muestra.

Un método físico alternativo muy popular y útil es el método espectroscópico, basado en la absorción electrónica UV⁵. Este método resulta ser muy sensible, versátil, presenta un errores menores al 10% y precisión del 1-2%. Además se puede aplicar en un laboratorio de mediana especialización. Este método se aplica a muestras de composición perfectamente conocida, esto es que se requiere contar con una muestra pura de proteína y conocer el coeficiente de extinción molar (ϵ) de la misma o su composición de aminoácidos. Por otro lado, este método no requiere de muestras estándar. Es, sin lugar a duda, una de las técnicas que un biotecnólogo, bioquímico o biólogo molecular necesita dominar para desempeñarse eficientemente en su trabajo. Además, junto con la determinación de la concentración proteica, esta técnica se puede utilizar para determinar el coeficiente de extinción molar de una proteína con una exactitud

comparable a la de los métodos gravimétricos de referencia.

En el Trabajo Práctico llevaremos a cabo dos determinaciones: (i) determinaremos la concentración aproximada de varias soluciones proteicas con un error aceptable para la mayor parte de las aplicaciones, (ii) determinaremos los coeficientes molares de extinción de esas proteínas y los compararemos con los datos de literatura.

2.4. Métodos basados en la absorción de luz UV

Estimación de la concentración proteica a partir de un espectro de absorción UV. El método propuesto por Gill y von Hippel⁵ se basa en la absorbancia de los residuos aromáticos, especialmente triptfano, tirosina (en mucha menor medida fenilalanina) y de cisteína. Además se sabe que el valor de ε_λ (y consecuentemente, el espectro de absorbancia) de los residuos de triptfano y tirosina varían con la polaridad del entorno molecular. Así, estos residuos presentan un valor de ε en entornos polares (por ejemplo, cuando se encuentran como aminoácidos libres en solución o cuando la proteína donde se encuentran está desnaturalizada) y otro distinto en entornos no polares como el interior de la proteína.

Entonces, y conociendo los coeficientes de extinción ε^{280nm} de cada aminoácido aromático se puede calcular ε_{aa}^{280nm} , el coeficiente de extinción molar de la proteína calculado como la sumatoria de los coeficientes de extinción molar de cada aminoácido libre en solución:

$$\varepsilon_{aa}^{280nm} = \varepsilon_W^{280nm} \times n_W + \varepsilon_Y^{280nm} \times n_Y + \varepsilon_C^{280nm} \times n_C \quad (2.1)$$

donde n_X es el número de residuos de X en la proteína y ε_X^{280nm} es el coeficiente de extinción molar del aminoácido X en solución. Este dato usualmente se obtiene de la bibliografía, aunque es sencillo calcularlo a partir de soluciones preparadas en el laboratorio.

Como se dijo anteriormente, es de esperar que $\varepsilon_{aa}^{280nm} = \varepsilon_U^{280nm}$, el coeficiente de extinción molar de la proteína en condiciones desnaturalizantes. Si utilizamos este valor en la siguiente ecuación, obtendremos una muy buena estimación de la concentración proteica.

$$[P] \approx \frac{Abs_{280nm}}{\varepsilon_{aa}^{280nm}} \quad (2.2)$$

Sin embargo, como se dijo, esta es una aproximación. Para calcular con exactitud la concentración de proteína deberíamos conocer el valor de ε_N^{280nm} , el coeficiente de extinción molar de la proteína en condiciones nativas, cuando se encuentra correctamente plegada y los residuos aromáticos se encuentran mayormente en un entorno no polar. Pero este dato no lo conocemos ya que no se puede predecir cómo afectará el plegado proteico al valor de ε . Para averiguarlo es necesario realizar la siguiente experiencia.

Determinación del coeficiente de extinción molar de una proteína en condiciones nativas. Para calcular el valor de ε_N^{280nm} de una proteína es necesario preparar dos soluciones de proteína de concentración exactamente igual. Una de ellas se prepara en condiciones nativas y la otra en condiciones

fuertemente desnaturalizantes (5M cloruro de guanidinio). A ambas muestras se les mide un espectro de absorbancia del cual se obtiene el valor de Abs_{280nm} . Los valores serán distintos en cada condición, pero las concentraciones serán las mismas. Dada esa igualdad, es sencillo comprobar que

$$\epsilon_N^{280nm} = \frac{Abs_N^{280nm}}{Abs_U^{280nm}} \epsilon_U^{280nm} \quad (2.3)$$

Utilizando el valor de ϵ_N^{280nm} en la siguiente ecuación, se obtiene un valor muy preciso de la concentración proteica.

$$[P] = \frac{Abs_{280nm}}{\epsilon_N^{280nm}} \quad (2.4)$$

2.5. Procedimientos del Trabajo Práctico

Objetivos. Se determinará la concentración y ϵ_N^{280nm} de dos proteínas: lisozima y albúmina sérica bovina. Para calcular el valor de ϵ_U^{280nm} se tendrán en cuenta la siguiente tabla donde figura el tamaño y cantidad de residuos de triptofano, tirosina y cisteína en cada proteína.

Proteína	PM (Da)	Cys	Trp	Tyr
BSA	66296	35	2	19
Lisozima	14314	8	6	3

Además, en la siguiente tabla se presentan los valores de ϵ para cada aminoácido libre a distintas longitudes de onda.

	276 nm	278 nm	279 nm	280 nm	282 nm
N-Acetilriptofanamida	5400	5600	5660	5690	5600
Gly-Tyr-Gly	1450	1400	1345	1280	1200
Cistina	145	127	120	120	100

Además, se utilizarán las siguientes soluciones.

- Buffer fosfato: fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0
- Cloruro de guanidinio (GndHCl): cloruro de guanidinio 8 M en fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0.
- Soluciones de cada proteína (aproximadamente 1 mg/ml) en buffer fosfato.

Diseño experimental. A continuación se describe el protocolo a seguir en el trabajo práctico. Para ello se utilizará un espectrofotómetro Jasco V-550 con la siguiente configuración.

- Barrido: 240–340 nm
- Velocidad de barrido: 40 nm/min
- Ancho de banda: 0.5 nm
- Registrar datos cada 0.1 nm

Determinación de la concentración de proteína. Para obtener una estimación de la concentración de proteína, se procede de la siguiente manera:

1. Agregar 500 μL de buffer fosfato a una celda de cuarzo y colocarla en el espectrofotómetro.
2. Realizar un barrido espectral entre 240 y 340 nm, con velocidad lenta. Guardar el espectro correspondiente al blanco de buffer (B^1).
3. Vaciar la celda, recargarla con 500 μL de la solución de proteína y repetir la medición. Guardar el espectro correspondiente a la proteína en condiciones nativas (P^N).
4. Utilizando una planilla de cálculo Excel, obtener el espectro corregido restando los espectros el espectro blanco al de proteína ($P_c^N = P^N - B^1$).
5. Si en el espectro corregido hay absorbancia a $\lambda > 300nm$ es probable que la muestra presente dispersión de luz (*light scattering*). En este caso, corregir P_c^N como se indica más abajo.
6. Utilizando el valor de Abs_{280nm} (extraído del espectro P_c^N) y ϵ_{aa}^{280nm} (Ec. (2.1)), estimar la concentración proteica de acuerdo con la ecuación (2.2). Es importante que tenga en cuenta que este valor es estimado y que sepa cuáles son sus fuentes de error.

Determinación del Coeficiente de Extinción Molar en estado nativo. Contar con el valor de ϵ_N^{280nm} nos permite estimar la concentración de proteína en condiciones nativas con mucha mejor precisión. Para ello se procede de la siguiente manera.

1. Agregar 400 μL de buffer fosfato y 400 μL de GuHCl 8 M a la celda de cuarzo.
2. Adquirir un espectro como se indicó más arriba y guardar el archivo como B^2 . Descartar el contenido de la celda.
3. Agregar a la celda vacía *exactamente* 400 μL de la solución de proteína y 400 μL de GuHCl 8 M, mezclar por inversión y registrar el espectro P^U .
4. Procesar los espectros haciendo las correcciones por blanco ($P_c^U = P^U - B^2$) y por dispersión de la luz si corresponde.
5. Determinar la concentración exacta de la proteína en condiciones desnaturalizantes, utilizando el valor de Abs_{280nm} extraído del espectro P_c^U , ϵ_{aa}^{280nm} , y la ecuación (2.2). (Comparar con el valor obtenido en la estimación en condiciones nativas ¿Cuál cree usted que es más confiable?)
6. Calcular el coeficiente de extinción molar de la proteína nativa usando los datos de Abs_{280nm} en condiciones nativas adquiridos en la determinación anterior y la ecuación (2.3). Tenga en cuenta que las mediciones no se hicieron a la misma concentración de proteína. Teniendo en cuentas las diferentes diluciones modifique la ecuación (2.3) como corresponda.

Correcciones por dispersión de luz (*light scattering*). El término *light scattering* se refiere a la luz dispersada elásticamente, o sea, la luz dispersada de la misma longitud de onda que la luz incidente. Al determinar la absorción de una solución debe tenerse en cuenta que una parte de la luz incidente se perderá simplemente porque una fracción de fotones incidentes, al interactuar con las moléculas, cambian su dirección sin llegar al detector. Este fenómeno no es absorción, aunque en la práctica incrementa la densidad óptica de las soluciones y distorsiona los espectros. Afortunadamente, si la incidencia de *light scattering* es moderada puede corregirse.

El triptofano es el residuo cuya absorción ocurre a las longitudes de onda más grandes, su máximo principal está centrado a cerca de 280 nm. Esto implica que, para proteínas que no contienen grupos prostéticos o aminoácidos modificados, no se observa absorción a longitudes de onda mayores que 300 nm. En cambio, la intensidad de luz dispersada tiene una dependencia inversa con la longitud de onda elevada a un coeficiente. Para moléculas de tamaño pequeño con respecto al valor λ , este coeficiente es ≈ 4 , mientras que para partículas más grandes toma valores menores. En el trabajo práctico estimaremos el valor de la dispersión de luz a lo largo de todo el espectro utilizando la siguiente ecuación empírica sencilla.

$$DO = k_1 + \frac{k_2}{\lambda^{k_3}} \quad (2.5)$$

De acuerdo con esta ecuación empírica, este fenómeno no produce picos en el espectro, sino una curva siempre creciente hacia las longitudes de onda menores. Por lo tanto, si en el espectro se observa una suave curva que asciende monótonamente desde el extremo de longitudes de onda alta (400–300 nm, dependiendo de cómo se realizó el espectro), estamos en presencia de *light scattering*. En el trabajo práctico aprenderemos a reconocer este síntoma y a corregirlo.

Para corregir el efecto del *light scattering* hay que estimar el valor de DO que toma a lo largo de todo el rango de longitudes de onda. Para ello se ajusta la ecuación (2.5) a los valores experimentales tomados a $\lambda \geq 310$ nm (donde no hay absorción debida a la proteína) y se extrapola la función a todo el rango de λ . Así se obtiene un espectro de dispersión (L^s) que se resta al espectro de proteína corregido. El ajuste se hace por el método de minimización de la suma de los cuadrados de las diferencias (método de Gauss-Newton) entre los datos experimentales y los que toma la ecuación (2.5). Además, esta ecuación puede utilizarse para llevar la línea de base a valores de cero. Esto está contemplado al estimar el valor de k_1 . En el trabajo práctico usaremos la rutina Solver incluida en la planilla de cálculo Excel para realizar esta operación.

Capítulo 3

Tioles y disulfuros

3.1. Introducción

Mediante la realización de los experimentos que se describen a continuación podremos apreciar la relación que existe entre las propiedades químicas de tioles y puentes disulfuro y la conformación proteica. Además evaluaremos la efectividad de agentes químicos y de la temperatura para desnaturalizar una proteína. Recuerde que en el estado desnaturalizado, las propiedades de la proteína coinciden con las de un polímero sin estructura definida que no posee actividad biológica.

Por otra parte, este trabajo brinda entrenamiento en técnicas rápidas de exclusión molecular y en la determinación de concentraciones proteicas por métodos espectroscópicos, las cuales son esenciales y de uso cotidiano en el laboratorio de biología estructural.

3.2. Reactivos

En el presente trabajo práctico utilizaremos los siguientes reactivos.

- BSA: albúmina sérica bovina recristalizada, de origen comercial (SIGMA; conservar liofilizada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- BSA: albúmina sérica bovina en solución acuosa de 2 mg/mL, 1 ml (conservar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Lisozima de huevo de gallina de origen comercial (SIGMA; conservar liofilizada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Lisozima de huevo 10 mg/ml en agua, 1 ml, (conservar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- P100-6: fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0, 100 ml
- P100-8: fosfato de sodio 0.1 M, pH 8.0, 100 ml
- DTT 1 M: solución de ditioneitol 1 M en agua, (conservar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- DTT 10 mM: solución de ditioneitol 10 mM en agua, (se prepara en el momento de usar a partir de DTT 1 M)

- GuHCl: cloruro de guanidinio 5 M, 100 ml
- Sephadex G25: suspensión al 50 % en agua, usar azida como conservador, (conservar a 4 °C)
- Reactivo de Ellman (DTNB, ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico): 3.9 mg/ml en buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 7.

3.3. Preparación de mercaptoalbúmina

La albúmina sérica bovina (BSA) posee 35 cisteínas, de las cuales 34 están involucradas en la formación de 17 puentes disulfuro intramoleculares. Sin embargo, la mayor parte de las preparaciones de BSA contienen bastante menos de un tiol libre por molécula de proteína (aproximadamente 0.6). Esto se debe a que sustancias de bajo peso molecular que contienen grupos $-SH$ se encuentran presentes en el plasma y pueden formar fácilmente puentes disulfuro con la cisteína libre de la BSA en las condiciones de la purificación. Además, una fracción de la cisteína de BSA que no está formando puentes disulfuro está oxidada irreversiblemente formando ácido sulfónico y otros productos de degradación por especies reactivas de oxígeno. Este daño oxidativo ocurre in vivo y también durante la purificación de la proteína.

La mercaptoalbúmina se obtiene a partir de BSA y consiste en una preparación que presenta un alto contenido de tiol libre (cerca de un mol de tiol por mol de proteína). La mercaptoalbúmina se usa en la producción de anticuerpos contra sustancias pequeñas (haptenos). En una sencilla reacción, haptenos modificados pueden unirse de manera reversible a la mercaptoalbúmina por medio de un disulfuro con su tiol libre. Esta técnica de conjugación es muy sencilla y también se la utiliza para la detección fluorescente de diversas sustancias o en la preparación de cualquier otro bioconjugado de interés.

Reducción del tiol libre de la BSA. Se llevará a cabo la reducción de los puentes disulfuro expuestos en BSA de acuerdo con el siguiente protocolo. Los fundamentos de la filtración molecular (FM) se explican en la bibliografía correspondiente.

Preparar en dos tubos Eppendorf de 1.5 ml las mezclas que se indican.

Tubo	1	2
	μl	μl
BSA	450	450
P100-6	50	50
DTT 10 mM	–	55
H ₂ O	55	–

Los tubos se incuban a temperatura ambiente durante una hora. Luego se procede a separar la BSA del DTT aplicando la técnica de filtración molecular.

Filtración Molecular. Se usa una jeringa descartable de 5 ml como soporte para 5 ml de matriz Sephadex G 25. La matriz se equilibra con el buffer de interés (P100-8). Para evitar que la matriz se pierda por el orificio inferior de la jeringa se usa un disco de polietileno poroso de diámetro igual al diámetro

interior de la columna, ajustado en el fondo de la misma. Otro disco de igual tamaño se apoya sobre la superficie superior del gel. Este sistema permite el libre escurrimiento de la fase móvil y a la vez impide que drene completamente. El conjunto se sostiene verticalmente con un pie y agarradera apropiadas.

A continuación se enumeran los pasos a seguir para separar la BSA del DTT aplicando la técnica de filtración molecular. Es esencial respetar el volumen de lecho indicado en el protocolo de preparación, ya que los volúmenes de elución han sido determinados para 5 ml de lecho.

- Se siembran exactamente 0.5 ml de muestra y se deja escurrir
- Se agrega exactamente 1.5 ml de P100-8 y se descarta volumen que eluye
- Se agrega 1.0 ml de P100-8 y se recoge el eluido en un tubo Eppendorf.

Con el fin de evitar que la matriz se resuspenda, los volúmenes deben ser agregados lentamente a la columna, con una pipeta automática de volumen adecuado y vertiendo el líquido en el centro del disco de polietileno.

Determinación del contenido de Tioles libres. La cantidad de tioles libres será determinada en cada una de las fracciones de BSA obtenidas por filtración molecular. Para ello:

1. Llevar a cero el espectrofotómetro con buffer P100-8 y realizar un barrido espectral entre 240 y 340 nm. Almacenar el espectro (blanco).
2. Agregar en la cubeta la solución de BSA purificada. Medir y almacenar espectro (proteína).
3. Pasar el espectrofotómetro al modo *fotométrico* y medir la absorbancia a 425 nm de la solución de proteína.
4. Agregar 5 μ l de DTNB, mezclar por inversión y medir la absorbancia a 425 nm. Esperar (5-15 min) hasta que la lectura sea constante

Cálculos. A partir de los espectros, calcular la concentración de proteína por medio de su Abs_{280nm} . Si fuera necesario, corrección por turbidez (*light scattering*). El coeficiente de extinción molar de BSA es $\epsilon = 44200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La cantidad de tioles libres por molécula se calcula como:

$$n = \frac{Abs_{425nm}^{DTNB} - Abs_{425nm}^{blanco}}{\epsilon_{425nm}^{DTNB}} \frac{1}{C_{BSA}} \quad (3.1)$$

donde n es moles de tiol por mol de proteína, $\epsilon_{425nm}^{DTNB} = 12400 \text{ (mol cm)}^{-1}$ es el coeficiente de extinción molar del DTNB y C_{BSA} es la concentración molar de BSA. A esta longitud de onda y en las condiciones descritas, la absorbancia del reactivo de Ellman es despreciable frente a la absorbancia del producto de reacción y eventualmente puede omitirse el blanco sin proteína.

Autoevaluación. ¿Qué sucedería si la reacción se llevara a cabo a pH 7.5–8.0, con una concentración de DTT de 10mM?

En teoría es posible la formación de dímeros de BSA unidos por puentes disulfuro durante la reacción de Ellman. Indique con ecuaciones cómo podría suceder esto y si se vería afectado el resultado final de la determinación de tioles libres?

3.4. Determinación de la cantidad de puentes disulfuro en lisozima

En esta etapa determinaremos la cantidad de disulfuros de la lisozima por el método de Ellman. Para ello es necesario reducir previamente los puentes disulfuro y luego eliminar el exceso de agente reductor. Se sabe que la lisozima tiene ocho cisteínas y todas forman puentes disulfuro. Además, la lisozima es famosa por la resistencia de sus disulfuros a la acción de agentes reductores. Por lo tanto, en el procedimiento de reducción se debe tener particular cuidado para: a) garantizar el acceso del reductor a los puentes disulfuro, generalmente localizados en el interior de la proteína; b) asegurarse de que el potencial reductor del DTT supere el de los tioles de la proteína y c) asegurarse de que, una vez reducidos, los tioles permanezcan en este estado hasta la titulación de Ellman.

Reducción de los disulfuros de la lisozima. La determinación se llevará a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
	μL	μL	μL	μL	μL	μL	μL
P100-8	50	50	50	50	50	50	50
GuHCl	440	440	440	–	–	–	445
Agua	–	–	10	440	445	440	–
Lisozima	10	10	–	10	10	10	10
DTT 1 M	5	5	5	5	–	5	–
Incubaciones y Purificación							
1 hora, 25 °C	Sí	–	Sí	–	Sí	Sí	Sí
1 hora, 100 °C	–	Sí	–	Sí	–	–	Sí
Filtración Molecular	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	–	–

Filtración Molecular. Al cabo de una hora de incubación, las muestras de proteína que están en contacto con el agente reductor se purifican por filtración molecular utilizando como buffer de elución una solución cloruro de guanidinio 5 M. El procedimiento es similar al descrito para la BSA. Una vez finalizada esta etapa, se mide la concentración de proteína en cada fracción y se determina la cantidad de tioles libres por molécula como se describió más arriba para la BSA.

Determinación de tioles libres. Se determina la concentración de proteína como se hizo con la BSA, utilizando un $\epsilon_{280nm}^{\text{lisozima}} = 38500(\text{Mcm})^{-1}$. Este coeficiente se calcula teóricamente como se indica en la bibliografía correspondiente.

Una vez determinada la concentración proteica, agregar a cada tubo 100 μL de buffer P100-8 por ml de solución (¿por qué?) y medir la concentración de tioles por el método de Ellman como se indicó más arriba. Tenga en cuenta la dilución en el cálculo. La determinación debe ser realizada lo más rápidamente posible para disminuir formación de nuevos puentes disulfuros por oxidación de las cisteínas con el oxígeno molecular.

Cuestionario de autoevaluación. *El poder reductor del DTT está relacionado con la formación de un anillo de seis átomos en el estado oxidado. La formación de estructuras anulares de seis o cinco miembros está es energéticamente favorable y se observa en numerosas reacciones de química orgánica. ¿Por qué un puente disulfuro en una proteína puede ser tan o más estable que el DTT oxidado?*

Parte III

Espectroscopía de proteínas

Capítulo 4

Absorción UV

4.1. Introducción

Antes de la realización del trabajo práctico, se deberían repasar los fundamentos de la espectroscopía de absorción UV, ya que los mismos no serán tratados en esta guía.

Los cromóforos más útiles presentes en las proteínas corresponden a los residuos aromáticos (absorben a 260-290 nm). Otros grupos (por ejemplo el enlace peptídico) absorben intensamente a 200-220 nm pero son menos utilizados porque las mediciones a longitudes de onda tan corta son técnicamente complicadas.

En una primera aproximación, el espectro UV de una solución proteica es la sumatoria de los espectros de los residuos que constituyen la cadena polipeptídica. En la práctica, el entorno fisicoquímico de cada residuo afecta sus propiedades espectroscópicas. Por lo tanto se observan variaciones pequeñas pero significativas en el espectro de la proteína comparado con el espectro calculado a partir de la suma teórica de los constituyentes en un medio acuoso. Esas diferencias son muy útiles porque permiten detectar cambios en el microentorno de los residuos aromáticos debidos a transiciones conformacionales.

4.2. Características del espectro UV de proteínas

Como modelos utilizaremos los espectros de N-Acetyltryptofanamida (NATA), N-Acetyltyrosina (NAYA) y una solución del aminoácido fenilalanina. Nos limitaremos fundamentalmente a la región del espectro donde absorben los residuos de tirosina, triptofano y fenilalanina despreciando las propiedades espectrales de cistina y otros aminoácidos con coeficientes de extinción molar pequeños en esta región.

Estos espectros permitirán simular el espectro UV entre 270 y 320 nm para cualquier proteína de composición aminoacídica conocida en condiciones de máxima exposición de residuos en solución acuosa. Para simular dicho espectro solo se necesita sumar para cada condición los espectros de triptofano, tirosina y fenilalanina en la proporción deseada.

Uno de las primeras tareas de este trabajo práctico será familiarizarse con los máximos y puntos de inflexión atribuibles a los residuos considerados y en

condiciones de máxima exposición.

El espectro real de una proteína será en general muy semejante al calculado aplicando el procedimiento descrito más arriba. Las diferencias observadas serán atribuibles a los efectos conformacionales determinados por la estructura proteica. Estos efectos resultan básicamente del ocultamiento de los residuos aromáticos en el corazón hidrofóbico de la proteína, lo que por supuesto altera los espectros y también a efectos de interacciones específicas, como puentes de hidrógeno, salinos, cercanía orientada de nubes electrónicas, interacciones aromáticas específicas, etc.

El propósito de este trabajo práctico será determinar primero y discutir después los espectros de absorción de una proteína en su estado nativo y en su estado desnaturalizado (considerando que los fragmentos peptídicos resultantes de la digestión total de la proteína con proteinasa K carecen de estructura).

4.3. Aspectos instrumentales

En el trabajo práctico se utilizará un espectrofotómetro Shimadzu UV160. Este es probablemente el equipo más sencillo que puede usarse para un trabajo práctico como el presente. Veamos porqué. a) Se necesita un equipo capaz de realizar un barrido espectral y obtener datos digitales susceptibles de ser manipulados posteriormente por una computadora. b) Los datos deben ser precisos, con poco ruido, reproducibles y además deben ser significativos cuando son obtenidos a intervalos de 0.1 nm.

Si bien muchos equipos comerciales traen hoy incorporados algoritmos y procedimientos para obtener espectros de derivada es necesario analizar en cada caso los parámetros de derivación para obtener los mejores resultados. Generalmente los procesos "default" no son apropiados para todos los casos. En el trabajo práctico se discutirá como estos parámetros son optimizados para el estudio de espectros de proteínas.

4.4. Procedimiento

Luego de preparar las soluciones que se indican en la sección "Reactivos" se procederá a obtener diez espectros para cada muestra de proteína y compuestos modelo. El espectrofotómetro se programará para que recoja los datos automáticamente y los guarde en una serie de archivos ASCII. La nomenclatura de los archivos debe ser cuidadosa para facilitar el tratamiento posterior de los datos.

El espectrofotómetro se inicializará con los parámetros "slow" para la velocidad de barrido y 340-240 para el intervalo de barrido. Automáticamente el equipo coleccionará datos cada 0.1 nm.

Una vez obtenidos los datos se promediarán los espectros en una planilla de cálculo. Uno de ellos se promediará *manualmente* como ejemplo y los siguientes se procesarán con un programa "macro" de Excel escrito a tal efecto. Los detalles acerca de los programas utilizados serán explicados en el transcurso de la práctica.

Los datos correspondientes a distintas series de una misma muestra, se corrigen llevando el valor de absorbancia (correspondiente a la longitud de onda

seleccionada) al valor determinado en la literatura para el correspondiente coeficiente de extinción molar.

A continuación, y usando los espectros de NATA, NAYA y fenilalanina, se simulará el espectro teórico de la proteína en base a su composición en esos aminoácidos.

Finalmente se usará la capacidad gráfica de la planilla de cálculo para representar los espectros obtenidos y se construirán las Figuras que corresponda como informe del trabajo práctico. Con el conjunto de figuras se procederá a discutir los resultados obtenidos.

4.5. Reactivos

- Anhidrasa carbónica nativa: 1 mg/ml, en buffer Tris-sulfato de sodio, pH 7.0.
- Proteinasa K: 10 mg/ml en agua. Se prepara en el momento.
- Anhidrasa carbónica digerida con proteinasa K: 1 mg/ml, en buffer Tris-sulfato de sodio, pH 7.0. Se prepara a partir de anhidrasa carbónica nativa incubada con proteinasa K (1:50, proteasa:sustrato), a temperatura ambiente 24 horas a 20 °C.
- NATA (N-acetyltryptofanamida 0.045 mg /ml (0.185mM) en agua.
- NAYA (N-acetyltyrosinamida 0.159 mg /ml (0.719 mM) en agua.
- Fenilalanina 0.515 mg /ml en agua.

4.6. Datos de literatura

Compuesto	Extinción Molar	nm
N-Acetyltryptofanamida	5390	280
N-acetyltyrosina	1390	275
Fenilalanina	285	257
Anhidrasa carbónica	54800	280

Capítulo 5

Análisis numérico de datos espectrales

5.1. Cuarta derivada.

Como se mencionó anteriormente, el valor de ε_λ varía con las propiedades del entorno de los cromóforos de una proteína. Por lo tanto, es posible analizar los espectros de absorbancia de una proteína para inferir propiedades acerca de entorno en el que se encuentran los residuos aromáticos. Este análisis, por ejemplo, podría indicarnos si una proteína se encuentra plegada en una determinada condición o si ha sufrido algún cambio conformacional. Pero estas diferencias son difíciles de observar comparando los espectros a simple vista. Para hacer más evidentes estas diferencias es común transformar los espectros de manera que los máximos, mínimos y puntos de inflexión se hacen más evidentes. Una de estas transformaciones es obtener la derivada cuarta de la absorbancia con respecto a la longitud de onda, $d^4 Abs/d\lambda^4$.

Figura 5.1: Espectro de absorbancia (línea de puntos) y de cuarta derivada (línea gruesa) de la ribonucleasa.

Por ejemplo, en la Figura 5.1 se muestra el espectro de absorbancia y de

cuarta derivada de la ribonucleasa. Los picos y valles que se observan en el espectro de cuarta derivada también se encuentran en el de absorbancia (también llamado de orden cero). Pero en este último estos no son evidentes, aunque le dan su forma característica. Por ejemplo, en la Figura 5.2 se muestran los espectros de cuarta derivada de la β -lactamasa de *B. licheniformis* en condiciones nativas y desnaturalizantes. Estas diferencias tan obvias son apenas perceptibles en el espectro de absorbancia.

Figura 5.2: Espectro de cuarta derivada de la β -lactamasa de *B. licheniformis* en condiciones nativas (línea gruesa) y desnaturalizantes (línea punteada).

El cálculo de la cuarta derivada del espectro se puede realizar en una planilla de Excel. Para ello se parte del espectro de proteína corregido y suavizado (ver más adelante qué significa esto). Para obtener la cuarta derivada, a partir de este espectro se calcula dos veces la segunda derivada. Para ponerlo en términos matemáticos, supongamos P^0 es un vector (una columna de Excel) que corresponde al espectro de orden cero, formado por los valores de absorbancia a cada longitud de onda (A_λ)

$$P^0 = \{A_{\lambda(1)}, A_{\lambda(2)}, \dots, A_{\lambda(n)}\}$$

donde $i = 1, 2, \dots, n$ es cada una de las casillas (hileras) de la columna de Excel. El nuevo vector $P^2 = \{A_{\lambda(1)}^{ii}, A_{\lambda(2)}^{ii}, \dots, A_{\lambda(n)}^{ii}\}$ correspondiente al espectro de segunda derivada respecto de P^0 se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$A_{\lambda(i)}^{ii} = A_{\lambda(i+20)} - 2A_{\lambda(i)} + A_{\lambda(i-20)}$$

El espectro de cuarta derivada, $P^4 = \{A_{\lambda(1)}^{iv}, A_{\lambda(2)}^{iv}, \dots, A_{\lambda(n)}^{iv}\}$, se calcula aplicando la misma ecuación al espectro P^2 .

Suavizado. A pesar de que utilizamos equipos muy sofisticados, los espectros obtenidos presentan desviaciones azarosas que se denominan *ruido eléctrico*. Este ruido puede ser minimizado obteniendo un promedio entre varios espectros o disminuyendo la velocidad de escaneo. Sin embargo, existe un método conocido como filtro de Savitzky-Golay que permite ajustar todos los datos a una ecuación polinómica, filtrando las desviaciones menos relevantes. Existen varios tipos de filtros de Savitzky-Golay que pueden aplicarse de manera combinada y consecutiva. Si estos filtros se aplican en exceso pueden perderse detalles relevantes de un espectro, por eso su aplicación depende del criterio del usuario. Matemáticamente uno de estos filtros consiste en la siguiente ecuación

$$A\lambda(i) = \sum_{j=-J}^J k_j A_{\lambda(i+k)}$$

donde de la J es la “ventana” del modelo. Para cada valor de $j = -J, -J + 1, \dots, 0, \dots, J - 1, J$, hay una constante k_j tabulada y el valor de j corresponde a la posición de las casillas más arriba o más abajo de la casilla central (i) que se utilizan para calcular el dato $A\lambda(i)$ suavizado.

5.2. Procedimiento

Se procederá al análisis de los datos obtenidos en el trabajo práctico de absorción UV. Se explicarán en la clase, distintas técnicas y procedimientos para el manejo, reducción y utilización de grandes volúmenes de datos generados por los instrumentos modernos de medición. Además, se discutirá el empleo del análisis de los espectros de derivadas para la detección de cambios conformacionales en las proteínas.

Bibliografía

- [1] S. Moore, J Biol Chem 243 (1968) 6281-3.
- [2] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. K. Randall, J Biol Chem 193 (1951) 265-75.
- [3] M. M. Bradford, Anal Biochem 72 (1976) 248-54.
- [4] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk, Anal Biochem 150 (1985) 76-85.
- [5] S. C. Gill, P. H. von Hippel, Anal Biochem 182 (1989) 319-26.