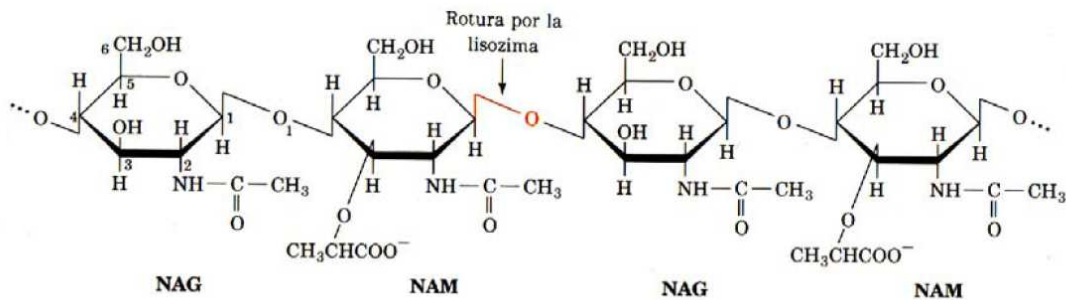


PURIFICACION DE UNA ENZIMA: LA LISOZIMA DE HUEVO

OBJETIVO: Purificar la enzima **lizozima** a partir de la clara del huevo mediante cromatografía de intercambio catiónico utilizando **carboximetilcelulosa**. Determinar la **actividad de la lizozima** en las diferentes fracciones de purificación.

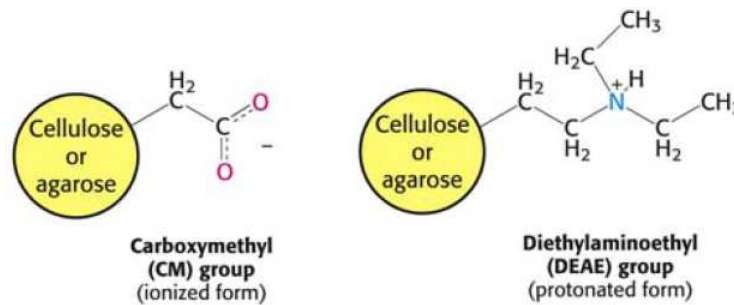


INTRODUCCIÓN

El nombre de lizozima o muramidasa (EC 3.2.1.17) incluye a un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos $\beta(1 \rightarrow 4)$ de los polisacáridos de la pared celular bacteriana. Son proteínas globulares constituidas por una sola cadena polipeptídica (129 aminoácidos para la lizozima de *Gallus gallus*) y de peso molecular comprendido en el rango de 14 a 30 KDa. Estas proteínas contienen **cuatro puentes cruzados disulfuro** que contribuyen a su elevada estabilidad. La lizozima fue la primera proteína secuenciada, la primera enzima de la que se dispuso de un modelo tridimensional (usando cristalografía de rayos x) y la primera para la que se propuso un mecanismo de acción detallado.

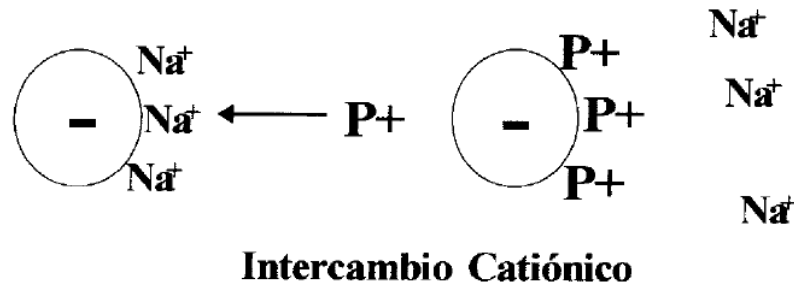
CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

La cromatografía de intercambio iónico se fundamenta en las propiedades ácido-base de las proteínas. **Una proteína, a pH menor de su pI (punto isoeléctrico), tendrá carga positiva y a pH mayor de su pI presentará carga negativa.** Por lo que, en el primer caso, se unirá a una resina con carga negativa (Carboximetil-celulosa, CM-celulosa) y en el segundo a una resina con carga positiva (Dietilaminoetil-celulosa, DEAE-celulosa).



Una vez unida la proteína a las resinas, estas se pueden **eluir** de dos formas distintas:

- 1) **variando el pH** del medio hasta alcanzar el pI
- 2) **mediante un gradiente iónico** añadiendo el contraión correspondiente (Na^+ en el caso de intercambio catiónico o Cl^- para el intercambio aniónico)



Dado que el **pI de la lisozima es de 11**, dos unidades de pH superior al del resto de las proteínas de la clara del huevo, a un pH de 9,5 - 10 la lisozima es **prácticamente la única proteína con carga positiva neta**. Ello permite separar esta enzima del resto de proteínas mediante la utilización de resinas **intercambiadoras de cationes**.

La **CM-celulosa** es, debido a la presencia de restos carboxilo ionizados a pH neutro y básico, una resina intercambiadora de cationes. A pH 10, la lisozima es prácticamente la única proteína que puede unirse a la CM-celulosa. Posteriormente, puede disociarse de la resina mediante lavados con un tampón de alta fuerza iónica.

MATERIALES

- **Huevos** de gallina para la obtención de la enzima.
- **Tampón A:** glicina/NaOH 100 mM, pH 10
- **Tampón B:** glicina/NaOH 100 mM, pH 10, conteniendo **0.6 M NaCl**
- **Carboximetil-Celulosa**

Activación de la CM: previamente a su utilización, la resina se lava con HCl 0.5 M (5 minutos), 2 veces con H₂O (hasta pH neutro), NaOH 0.5 M (5 minutos) y finalmente dos veces con H₂O (hasta pH neutro). Por último se hace una suspensión 1/1 (vol/vol) en tampón glicina/NaOH 100 mM pH 10

- **Tampón fosfato sódico** 100 mM, pH 6,2
- **Suspensión de la bacteria *Micrococcus Lvsodeikticus*** 20 mg en 100 ml del tampón fosfato.

METODOS

A. PURIFICACION DE LA LISOZIMA

1. **Recoger** la clara procedente de un huevo. **Diluir**la 1/5 (vol/vol) con **tampón A**. Tomar 10 ml de la muestra anterior en un tubo cónico con tapón de 15 ml.
2. Antes de comenzar la purificación de la lisozima separar **una alícuota de 1 ml** para medir la actividad de la enzima en la fracción de partida.
3. A los 9 ml restantes (**Fracción O, Fo**), añadir **5 ml de CM-celulosa** previamente activada y agitar suavemente **durante 15 min**, para que la lisozima se adsorba a la resina.
4. Al finalizar la incubación, centrifugar la muestra a **1500 xg** durante **5 min**. Guardar el sobrenadante (**Fracción 1, F₁**).
5. Añadir a la resina (precipitado) **10 ml de tampón A**. Agitar suavemente y centrifugar de nuevo. Recoger el sobrenadante (**Fracción 2, F₂**).
6. Repetir el lavado anterior y desechar el sobrenadante.
7. **Elución.** Resuspender la CM-celulosa con **3 ml de tampón B** e incubar, agitando suavemente, **durante 10 minutos**. Centrifugar y recoger el eluido (**Fracción 3, F₃, lisozima purificada**).

Medir, exactamente, en tubo cónico graduado el volumen total de cada fracción

B. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La medida de la actividad lisozima se realiza utilizando **una suspensión de células de *Micrococcus Lysodeikticus*** en concentración suficientemente elevada para atenuar, por dispersión, la transmisión de luz monocromática a través de la cubeta de un espectrofotómetro. Al incubar esta suspensión con lisozima, los fragmentos de pared celular se hidrolizan, originando otros más pequeños, lo que reduce la dispersión de la luz, que se manifiesta en una reducción en la absorbancia a una longitud de onda fija de **450 nm**. La actividad enzimática es proporcional a la disminución de la absorbancia a 450 nm. **Por definición**, en condiciones estándar (25°C, pH 6,2 y 0,1 M fosfato), se considera que **1 unidad de actividad enzimática de lisozima (U) produce una disminución en la absorbancia de 0,001 en 1 minuto**.

METODO DE MEDIDA:

- En una cubeta de espectrofotómetro, añadir **3 ml de suspensión de células**. Meterla en el espectrofotómetro y anotar la densidad óptica (D.O.). **Esta medida constituye el tiempo cero y hay que hacerlo para cada medida.**
- Añadir **25 µl** de la fracción correspondiente a ensayar, tomar el tiempo por el reloj, **agitar** e introducir la cubeta en el espectrofotómetro y anotar la absorbancia observada al primer minuto y al segundo minuto. Calcular la variación de absorbancia al primer minuto ($\Delta A_1/\text{min}$) y al segundo ($\Delta A_2/\text{min}$). Hacer la media de las dos medidas.

Anotar los resultados en la tabla siguiente:

	Volumen (ml)	A ₄₅₀ a t ₀	A ₄₅₀ a t ₁	A ₄₅₀ a t ₂	$\Delta A_1/\text{min}$	$\Delta A_2/\text{min}$	$\Delta A_{av}/\text{min}$	Actividad (U)
F ₀								
F ₁								
F ₂								
F ₃								

CALCULOS:

- Actividad** de cada fracción
- % Retención de la resina:**

$$[(\text{Actividad } F_0 - \text{Actividad } F_1) / \text{Actividad } F_0] \times 100$$
- % de Recuperación:**

$$(\text{Actividad } F_3 / \text{Actividad } F_0) \times 100$$

GUARDAR TODAS LAS FRACCIONES PARA USARLAS EN LA PRÓXIMA PRÁCTICA (SDS-PAGE)