



UACJ

# Fundamentos y Técnicas de Cristalización de Proteínas

Práctica 16: El arte termodinámico de la difracción de rayos X

---

**Profesor:** MC Carlos Montejo Dávila  
**Materia:** Laboratorio de Enzimología



# Objetivos: Del Montaje al Diagnóstico



## Técnica

Implementar la técnica de difusión de vapor (gota colgante) garantizando un microambiente hermético para la cristalización de proteínas.



## Termodinámica

Identificar y manipular las condiciones fisicoquímicas críticas (concentración, pH) que empujan el sistema hacia la nucleación y el crecimiento cristalino.

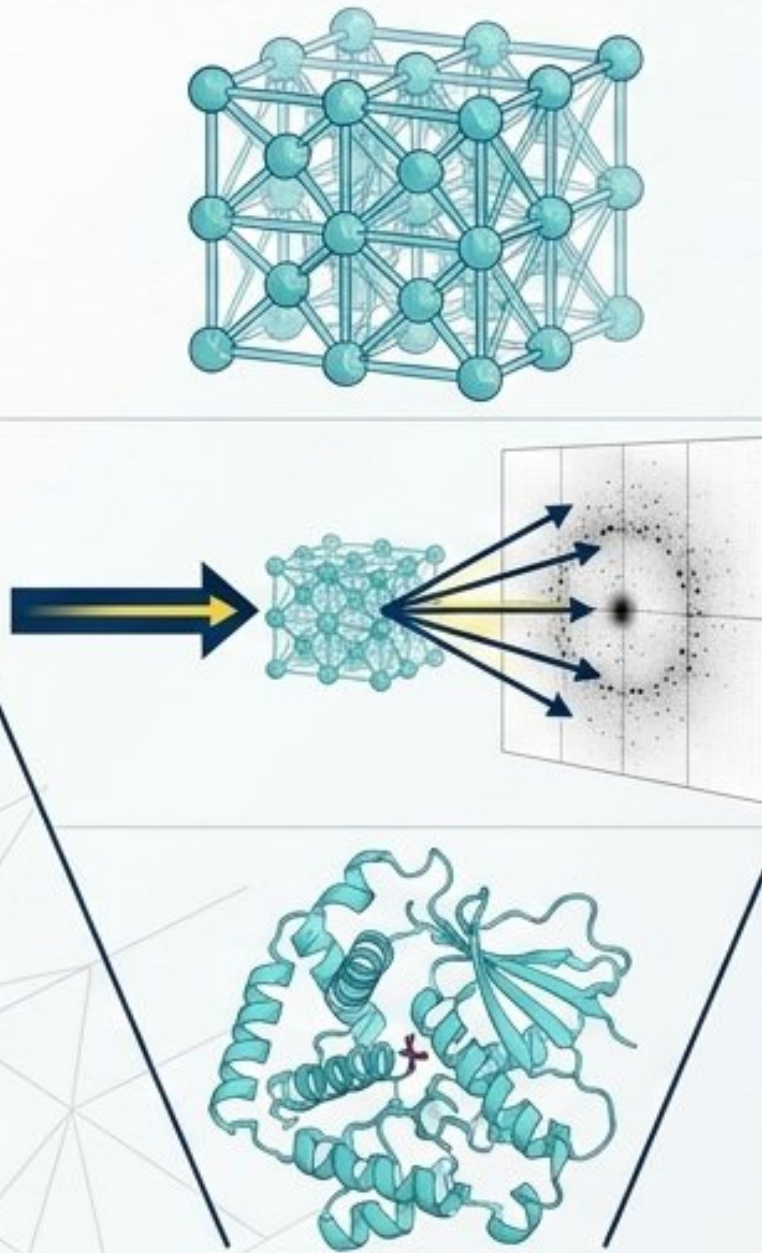


## Diagnóstico Óptico

Diferenciar mediante observación microscópica estereoscópica entre cristales proteicos, cristales salinos y precipitados amorfos.

# El Propósito: Hacer Visible lo Invisible

La **Cristalización** es el proceso de ordenamiento molecular donde una proteína en solución adopta una red tridimensional altamente repetitiva y organizada.



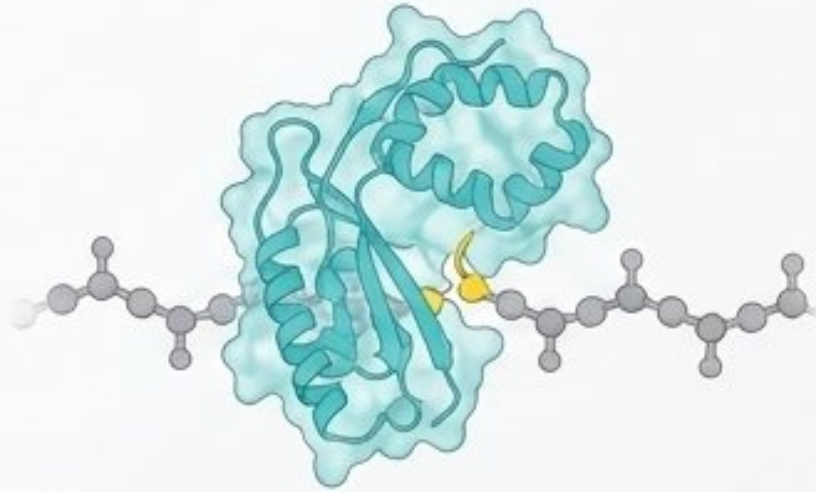
● **Paso 1: Red Cristalina** - Formación del estado sólido ordenado.

● **Paso 2: Difracción** - Bombardeo con rayos X para generar un mapa de densidad electrónica.

● **Paso 3: Resolución Atómica** - Comprensión del mecanismo catalítico de la enzima a nivel estructural.

# El Modelo Experimental: Lisozima

## Biología



**Identidad:** Enzima hidrolasa.

**Función Biológica:** Rompe los enlaces  $\beta(1,4)$  en los peptidoglicanos, destruyendo la pared celular bacteriana.

## Termodinámica



**¿Por qué utilizamos Lisozima?**

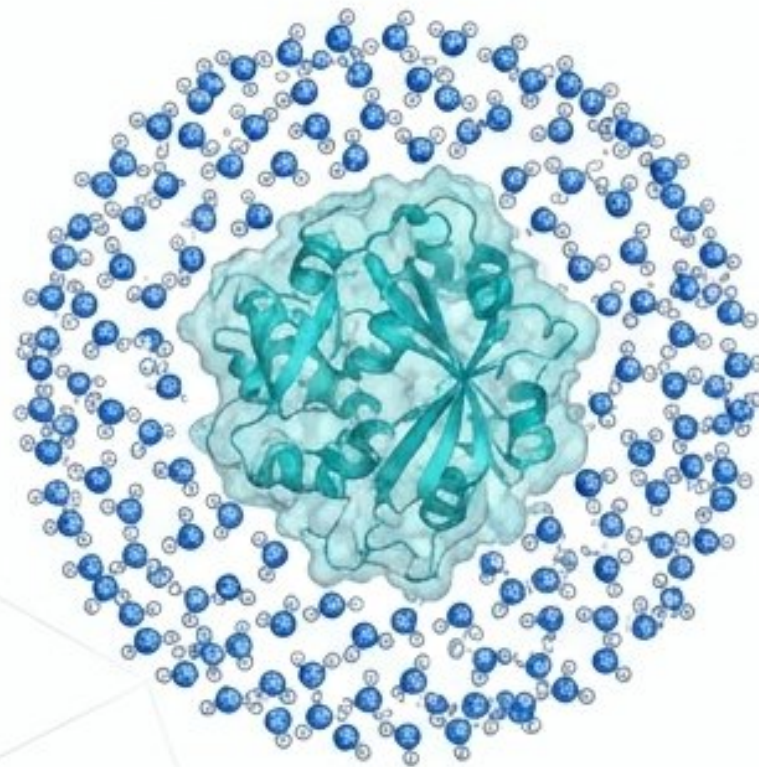
**Estabilidad Extrema:** Posee una altísima estabilidad termodinámica.

**Tolerancia:** Documentada facilidad para soportar estados drásticos de sobresaturación sin sufrir degradación ni desnaturalización.

# Perturbación del Sistema: El Efecto “**Salting-Out**”

Agentes utilizados: Cloruro de Sodio (NaCl 2.5 M) y Acetato de Sodio (AcNa 0.3 M, pH 4.6).

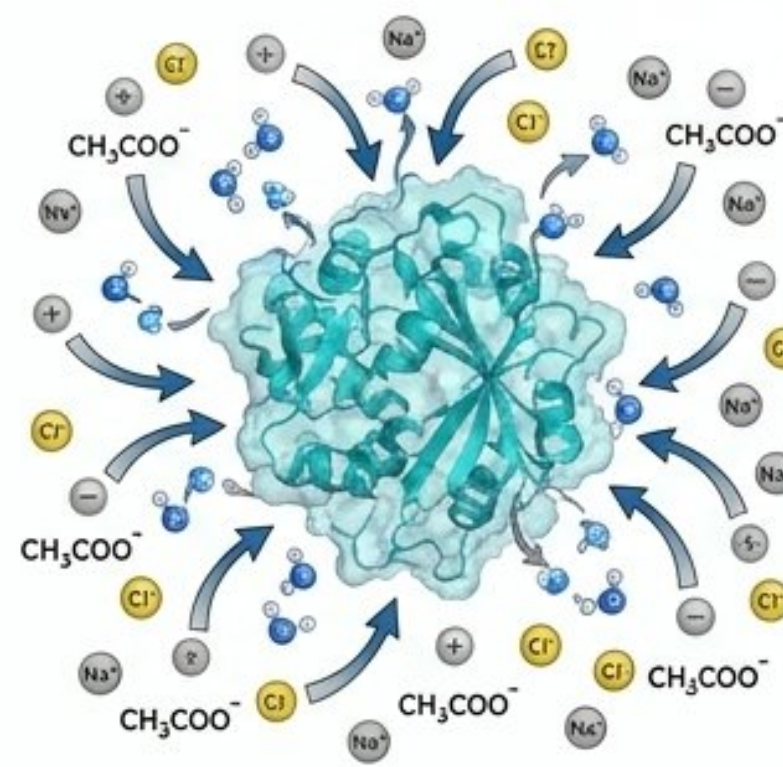
## Alta Solubilidad



## Alta Solubilidad

La proteína está completamente hidratada. El agua impide la interacción inter-molecular.

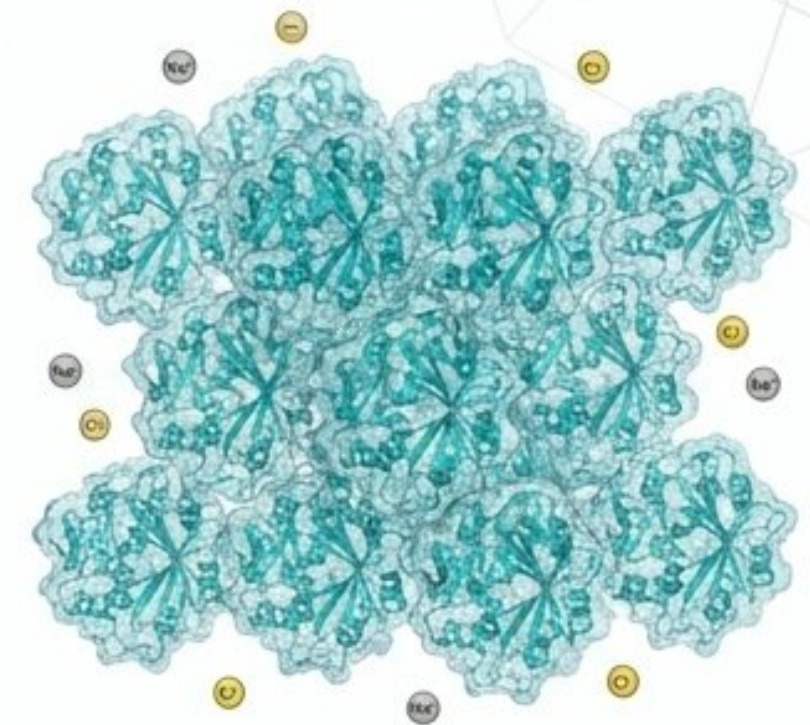
## Competencia Iónica



## Competencia Iónica

Las sales actúan como agentes precipitantes, robando y desplazando las moléculas de agua de la superficie proteica.

## Nucleación



## Nucleación

Al reducirse la solubilidad, las proteínas se ven forzadas a interactuar entre sí, iniciando el ordenamiento cristalino.

# Arquitectura del Ensayo: Difusión de Vapor (Gota Colgante)

**Cubreobjetos:**  
**Sello Hermético:** Grasa de vacío para evitar el escape del sistema.

**Gota Colgante:** 3  $\mu\text{L}$  Proteína  
(Lisozima a 30, 40 o 50 mg/mL)  
+ 3  $\mu\text{L}$  Solución precipitante.  
(Baja concentración inicial de sal).

**Reservorio:** 500  $\mu\text{L}$   
Solución precipitante pura  
(Alta concentración de sal).

**Dinámica:** Evaporación lenta del agua de la gota hacia el reservorio hasta alcanzar el equilibrio.

## Clase 1: Preparación

## Clase 2: Análisis

Montaje de la placa hermética y micro-pipeteo de gotas.  
Incubación inicial a temp. ambiente (30 min).

Observación en estereoscopio  
tras 2 días de incubación.

# Matriz de Diagnóstico del Cristalógrafo

Precipitado Amorfo	Cristal de Sal	Cristal de Proteína
 <p><b>Morfología:</b> Masa desordenada, sin geometría definida.</p> <p><b>Claridad:</b> Opaca, absorbe la luz.</p> <p><b>Diagnóstico:</b> Precipitación demasiado rápida. Condiciones fuera de equilibrio termodinámico.</p>	 <p><b>Morfología:</b> Formas cúbicas perfectas y rígidas.</p> <p><b>Claridad:</b> Extremadamente brillante, alta birrefringencia bajo luz polarizada.</p> <p><b>Diagnóstico:</b> Cristalización inorgánica (falso positivo proteico).</p>	 <p><b>Morfología:</b> Formas complejas (prismas, placas, agujas), caras planas definidas sin burbujas.</p> <p><b>Claridad:</b> Transparente o traslúcido, bordes suaves pero definidos.</p> <p><b>Diagnóstico:</b> Éxito experimental. Nucleación controlada.</p>

# Conclusión: De la Termodinámica a la Estructura

