

# **Métodos cromatográficos**

# Caracterización de las proteínas

- *La caracterización de la estructura y de la función “in vitro” de una proteína requiere tenerla en forma pura*



Lo veo en el proceso de purificar  
una proteína y .....iespere!  
El tampón no es el apropiado...  
Veo más.....  
La proteína pierde actividad biológica....  
Su jefe está muy intranquilo....



Un año después

# PURIFICACION DE PROTEINAS

1. OBTENCION  
DE EXTRACTOS  
LIBRES DE  
CELULAS

SELECCIÓN  
FUENTE PROTEINA

- TEJIDOS CELULARES
- SOBREEXPRESION

SOLUBILIZACION

- LISIS OSMOTICA
- LISIS ENZIMATICA  
(LISOZIMA)
- RUPTURA MECANICA
- DETERGENTES

ESTABILIZACION

- pH
- TEMPERATURA
- FUERZA IONICA
- INHIBIDORES DE PROTEASAS
- CONTAMINACION METALES PESADOS
- OXIDACION RESIDUOS CYS

SEPARACION

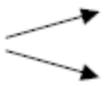
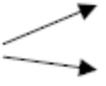
- FILTRACION
- CENTRIFUGACION
- CENTRIFUGACION DIFERENCIAL

DETECCION

- SEGUIMIENTO ACTIVIDAD
- SEGUIMIENTO PROTEINA

## 2. AISLAMIENTO

---

SOLUBILIDAD (PRECIPITACIÓN DIFERENCIAL)	- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -PEG -SOLVENTES
TAMAÑO	-DIÁLISIS -CROMATOGRAFÍA DE FILTRACION MOLECULAR -ULTRACENTRIFUGACION
CARGA	-CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO -ELECTROFORESIS -ELECTROENFOQUE
POLARIDAD	-CROMATOGRAFÍA  HIDROFÓBICA FASE REVERSA
AFINIDAD	-CROMATOGRAFÍA  LIGANDO AFINIDAD ANTICUERPO -INMUNOPRECIPITACIÓN

# **TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS**

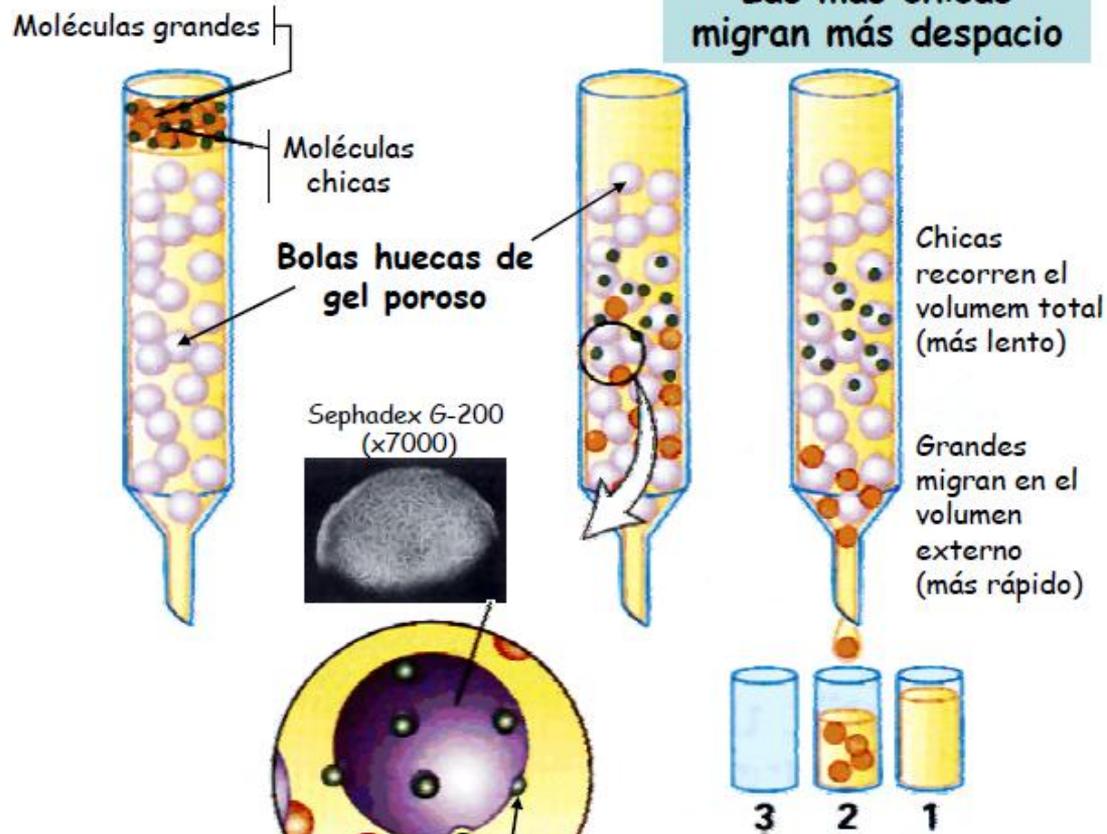
# **CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL**

# FUNDAMENTO TEÓRICO

- La cromatografía de exclusión o filtración en gel es una clase de cromatografía sólido-líquido que permite la separación de moléculas en función de su **TAMAÑO**.
- En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es un gel. El gel está constituido por partículas esféricas que tienen **POROS** de un determinado tamaño.
- Las moléculas de **tamaño pequeño** difunden a través de los poros de las partículas del gel y por ello son retardadas en su paso por la columna.

- Las **moléculas grandes** no entran en los poros de las partículas del gel , de esta forma, las moléculas se separan en función de su tamaño, eluyendo en orden decreciente de peso molecular.

Las más chicas migran más despacio



Las moléculas mayores son **excluidas** del interior del gel

Las moléculas de tamaño inferior al poro acceden al interior del gel

Separación por tamaños

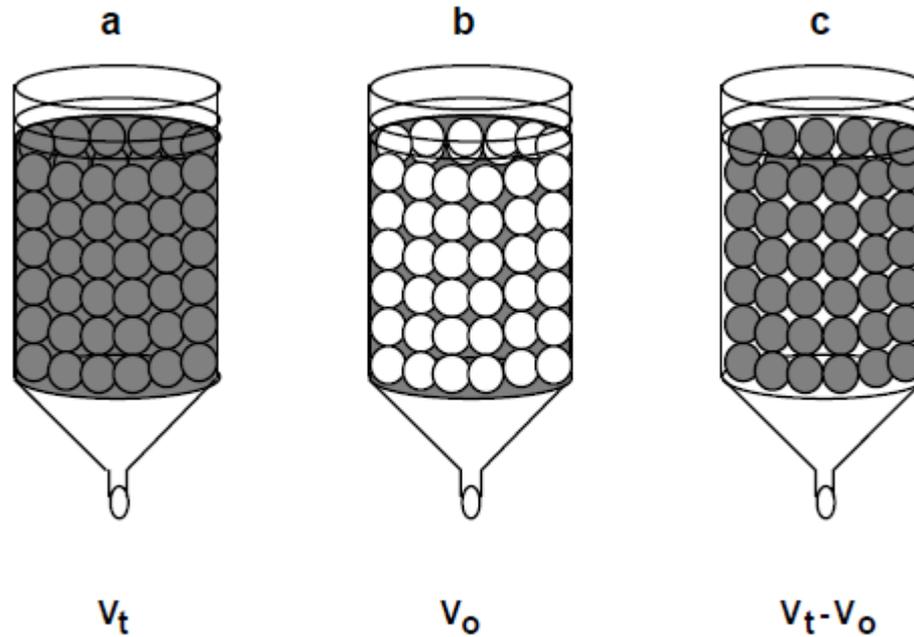
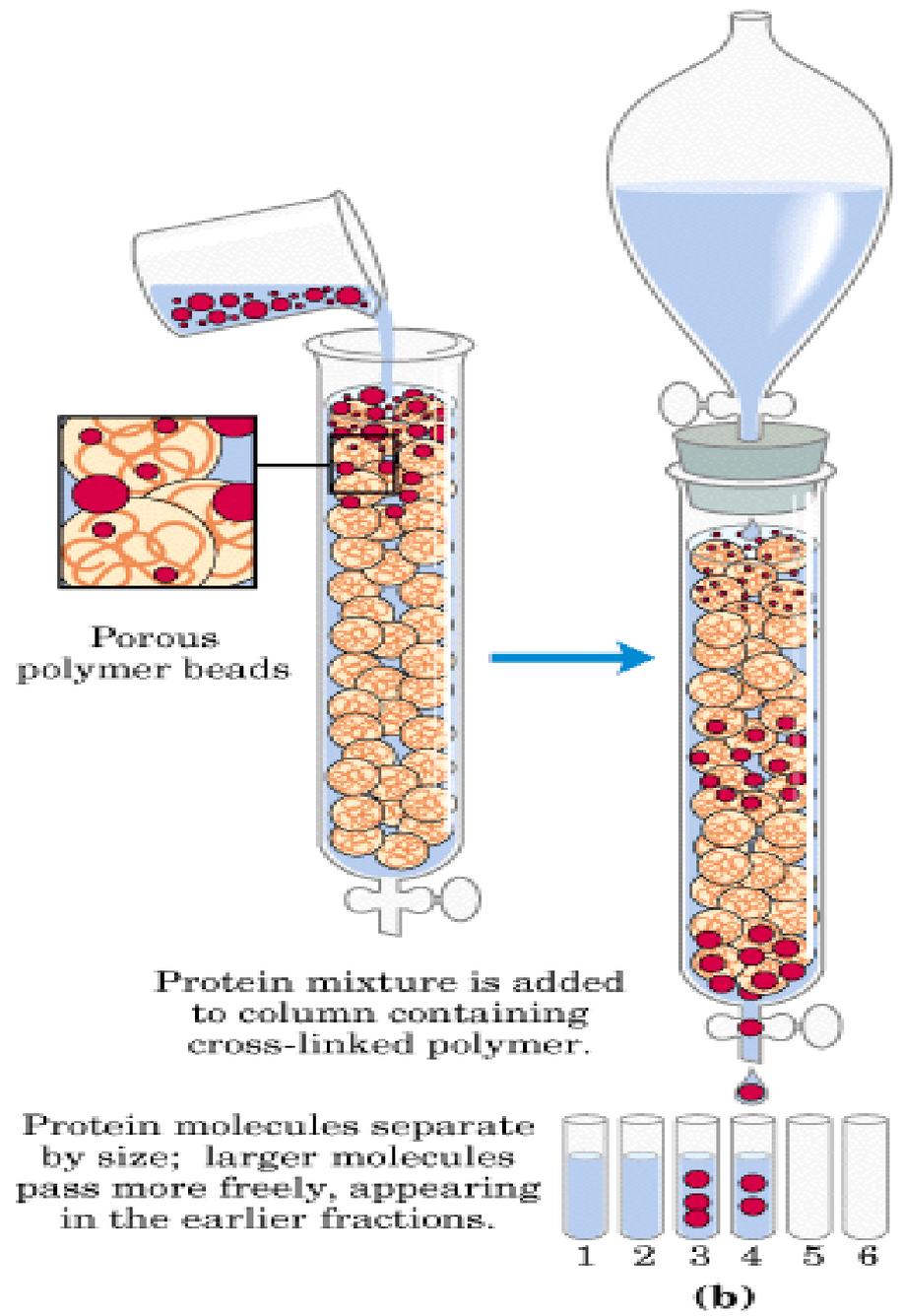
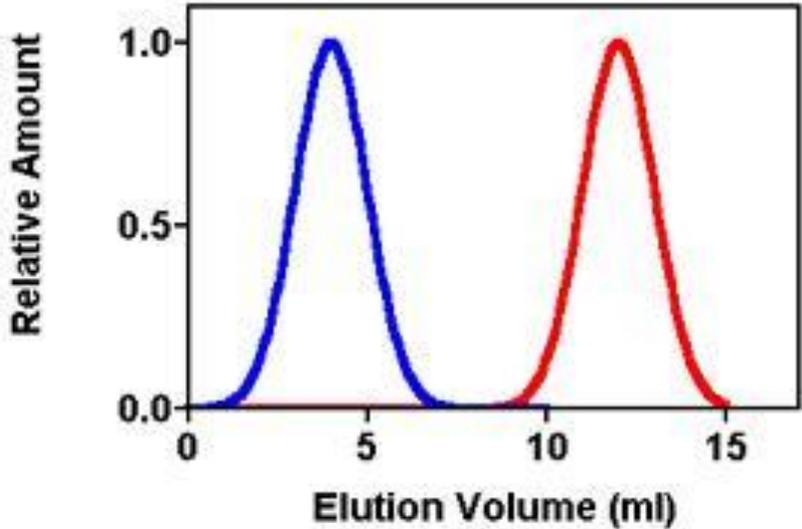


Figura 2. Volúmenes de una columna cromatográfica

- a) El volumen total ( $V_t$ ), que es el volumen que ocupa el cilindro de gel hidratado.
- b) El volumen de vacío ( $V_o$ ), o el volumen existente entre las esferas del gel.
- c) El volumen ocupado por las esferas del gel, que se expresa como la diferencia entre los dos volúmenes anteriores:  $V_t - V_o$ .

# Cromatografía

## Filtración en gel



# MATERIALES PARA LA FILTRACIÓN EN GEL

- Un gel es una **red tridimensional** cuya estructura está entrecruzada al azar. Los geles utilizados como tamiz molecular son **polímeros hidrofílicos e insolubles** cuyas cadenas poliméricas se entrecruzan hasta formar una red tridimensional.
- Los geles normalmente utilizados son de tres tipos: **dextrano, agarosa y poliacrilamida**. El gel de dextrano (polímero ramificado de glucosa, entrecruzado y formado en pequeñas bolitas) se comercializa con el nombre de SEPHADEX. Existen distintos tipos, según el tamaño de poro, proporcionando límites de exclusión comprendidos entre 1 y 200 000 daltons. Estos geles se identifican por una denominación de G-10 hasta G-200, lo que se refiere a la capacidad de retención de agua del gel multiplicada por 10.

Propiedades de algunos geles de Sephadex (gel dextrano)

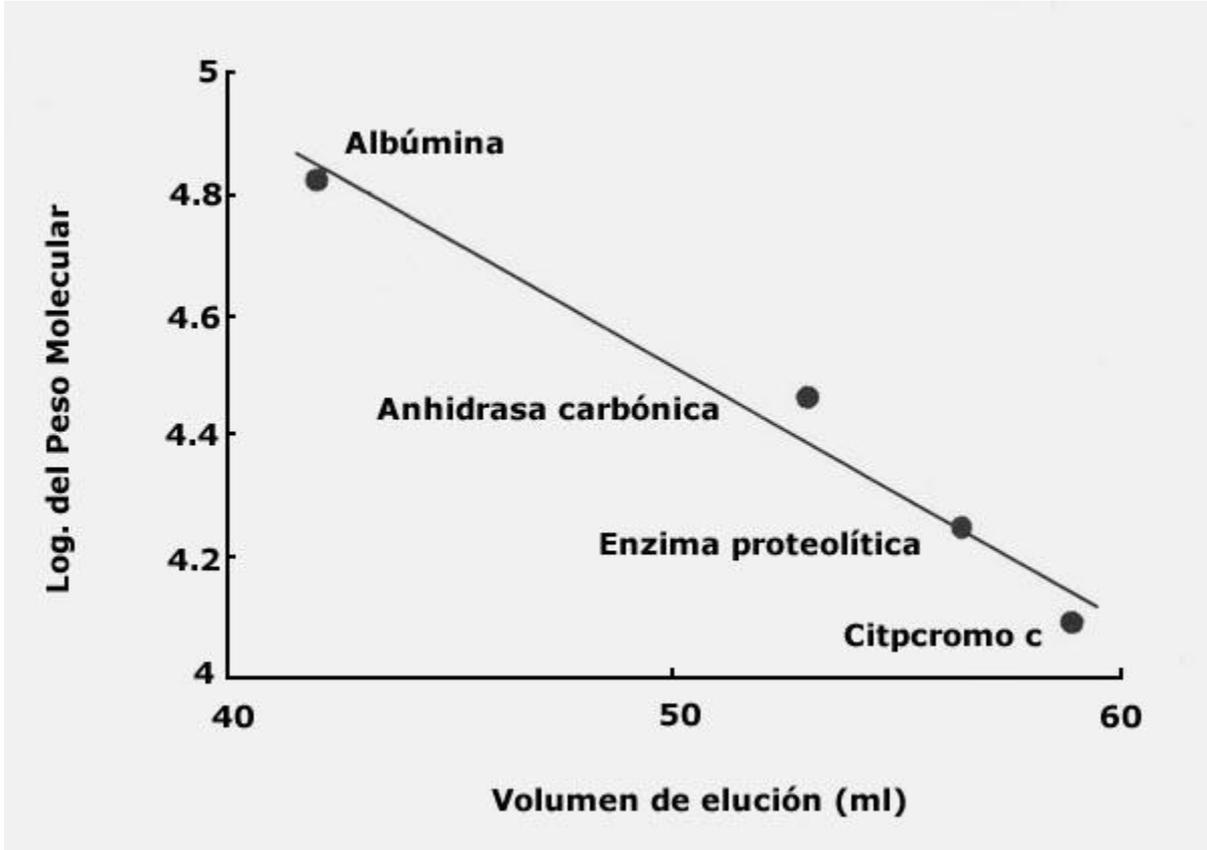
Tipo	Peso molecular, límites de fraccionamiento		agua retenida	vol. de gel hidratado
	polisacáridos	péptidos/proteínas	(g/g gel seco)	(ml/g gel seco)
G10	hasta 700	hasta 700	1.0	2
G15	hasta 1 500	hasta 1 500	1.5	3
G25	100 - 5 000	1 000 - 5 000	2.5	5
G50	500 - 10 000	1 500 - 30 000	5.0	10
G75	1 000 - 50 000	3 000 - 80 000	7.5	12-15
G100	1 000 - 100 000	4 000 - 150 000	10.0	15-20
G150	1 000 - 150 000	5 000 - 400 000	15.0	20-30
G200	1 000 - 200 000	5 000 - 800 000	20.0	30-40

# Aplicaciones de la filtración en gel

- **Separar las sustancias de distintos pesos moleculares**
- **Purificación de proteínas**
- **Determinación de pesos moleculares de proteínas**
- **Eliminar sales, detergentes**
- **Cambiar el amortiguador**

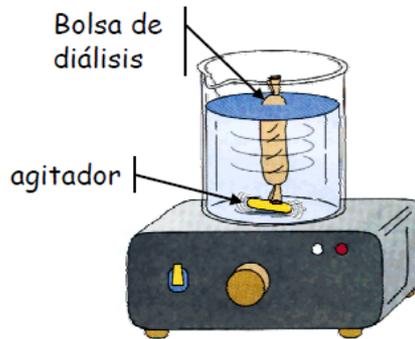
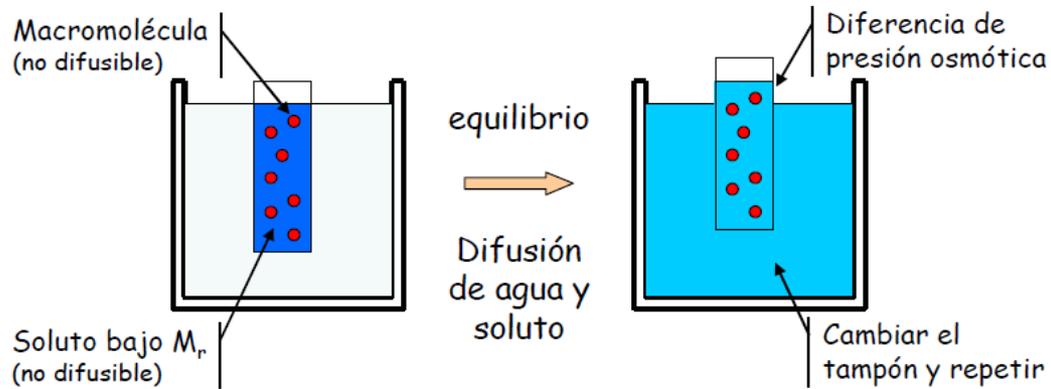
# Determinar el peso molecular

- Para una gran variedad de tipos de geles se ha comprobado que **existe una relación lineal entre el volumen de elución y el logaritmo del peso molecular de las proteínas.**
- Por lo tanto, es suficiente medir el volumen de elución de una proteína desconocida para llevarlo a una recta de calibración (preparada con proteínas puras de peso molecular conocido) y deducir aproximadamente su peso molecular. Esta técnica puede también proporcionar un método para el tratamiento de una proteína con un determinado reactivo.



# Diálisis

Difusión a través de una membrana semipermeable



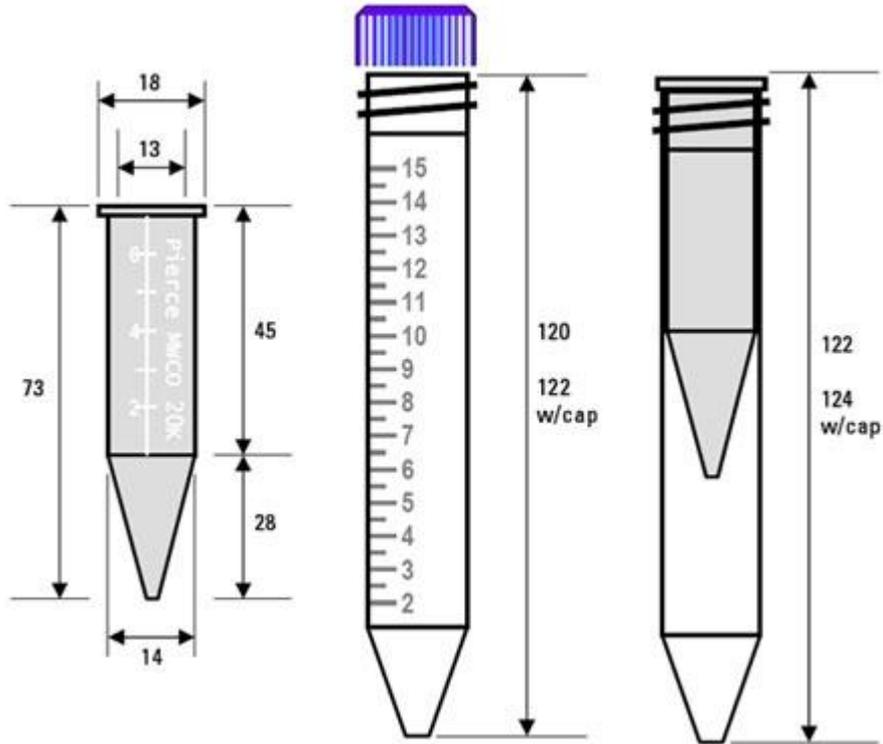
## Diálisis

Membranas de celofán  
Pasivo, difusión en equilibrio  
Poro hasta 6-14 kD

### Aplicaciones:

- Eliminar sales
- Concentrar las macromoléculas

# Ultrafiltración



## CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

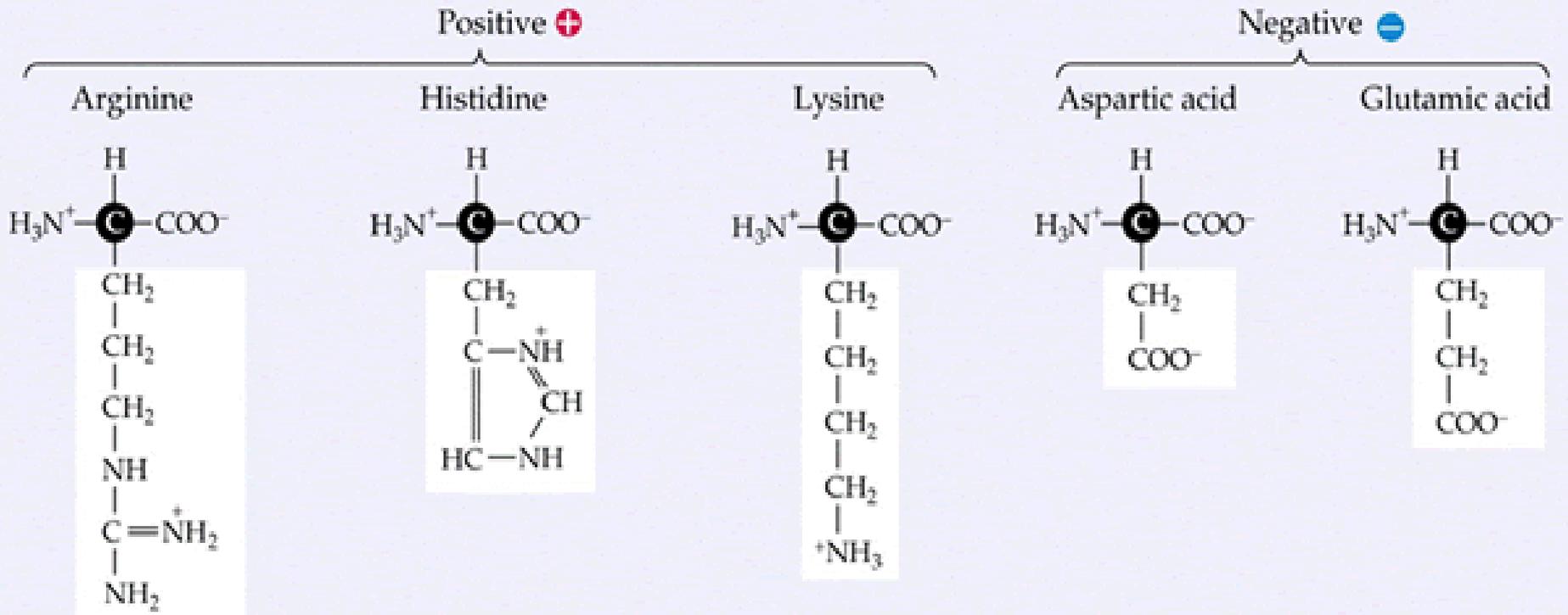
- *Empacar la columna*
- *Equilibrar la columna*
- *Aplicar la muestra*
- *Lavar la columna (no en todos los casos)*
- *Eluir la muestra*
- *Fraccionar el eluato*
- *Detectar y cuantificar la proteína de interés*

# **CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO**

- La cromatografía se emplea en el fraccionamiento de proteínas que se desplazan a lo largo de una matriz sólida porosa.
- Estas técnicas nos permiten purificar a homogeneidad una proteína en un solo paso cromatográfico.

- Se basa en la carga eléctrica de las proteínas.
- Se aplica en una matriz de carga opuesta a la de la proteína que se quiere purificar.
- Se debe tener un pH determinado.
- Las proteínas se eluyen de menor a mayor fuerza de unión.

# Las proteínas son moléculas cargadas

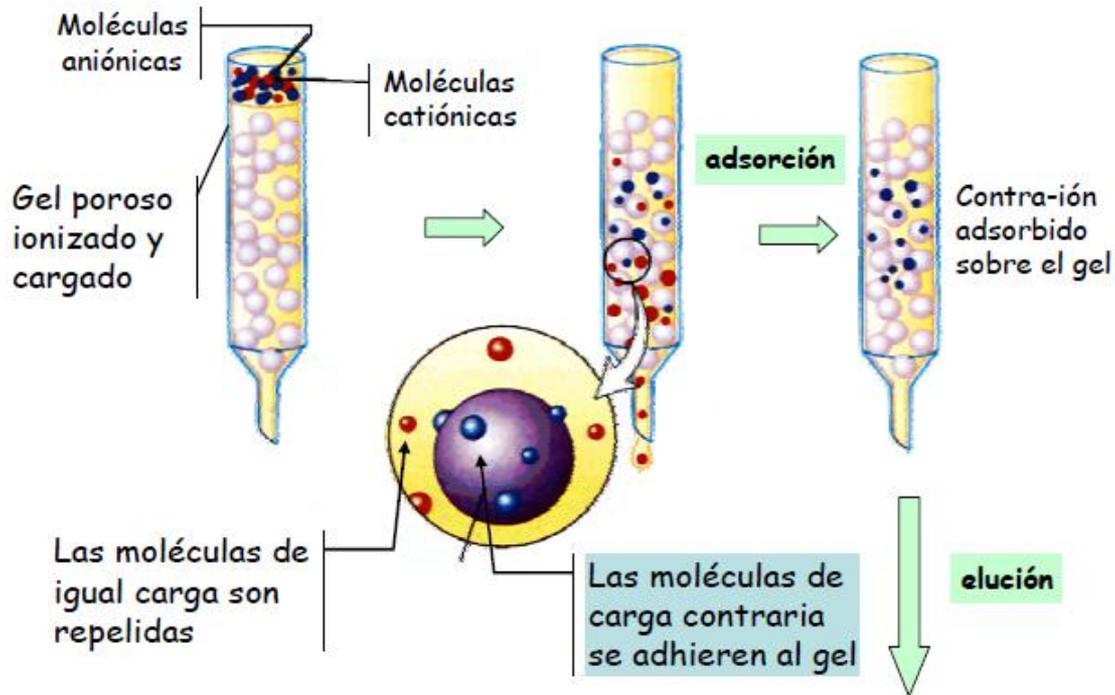


- Suma de las cargas de las cadenas laterales de los aminoácidos
- Dependen de: pH y pKa; ambiente que los rodea

pH solución  $>$  pI = proteína carga(-) por desprotonación.

pH solución  $<$  pI = proteína carga(+) por protonación

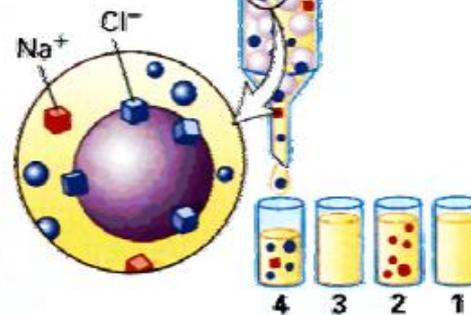
pH solución = pI = proteína carga(0) precipitado insoluble



**Separación en orden creciente de interacción electrostática con la columna**



Elución: gradiente que debilita la interacción

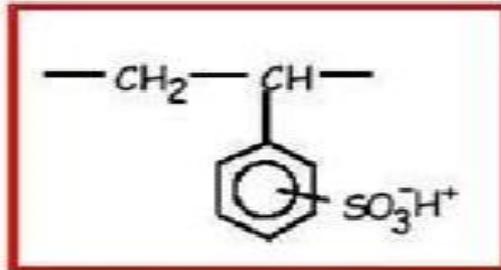


# Factores que afectan la retención

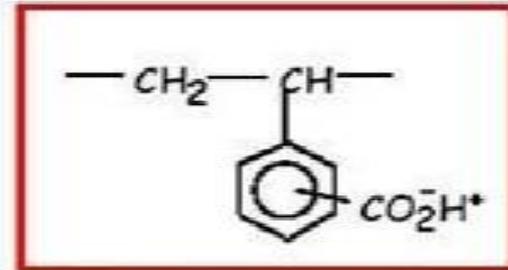
- Fuerza iónica
- pH (funciona muy bien para ácidos y bases débiles)
- Modificadores orgánicos

# Intercambiador catiónico

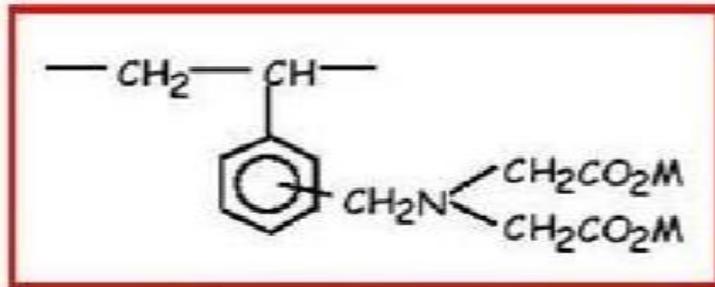
Resinas aniónicas intercambiadoras de cationes



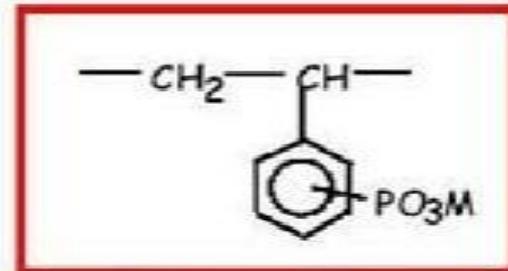
sulfonato



carboxilato



aminodiacetato

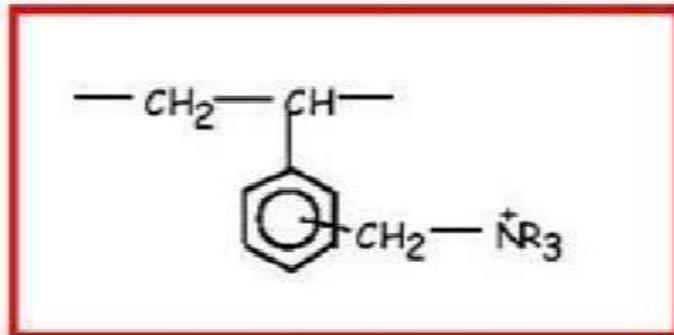


fosfonato

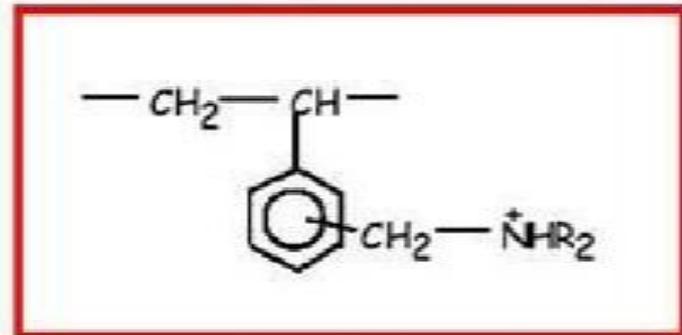
La matriz sólida tiene grupos cargados negativamente  
La fase móvil tiene grupos cargados positivamente

# Intercambiador aniónico

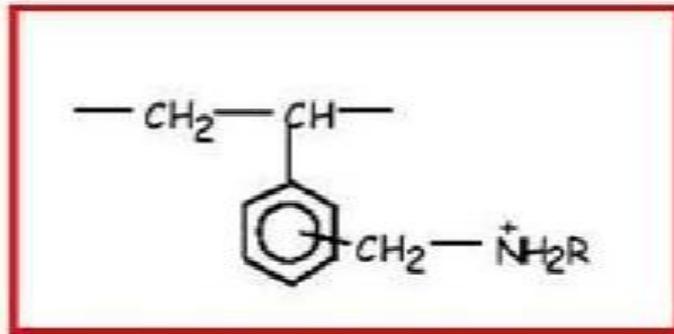
Resinas cationicas intercambiadoras de aniones



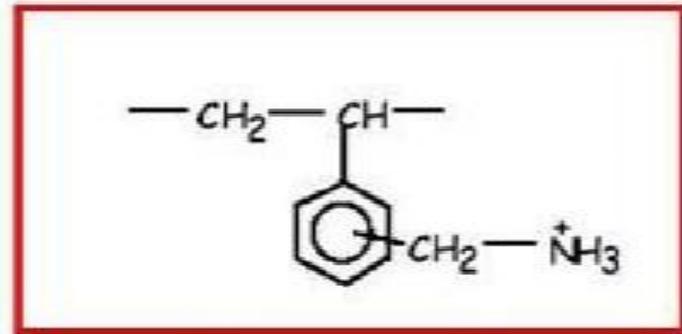
amonio cuaternario



amonio terciario



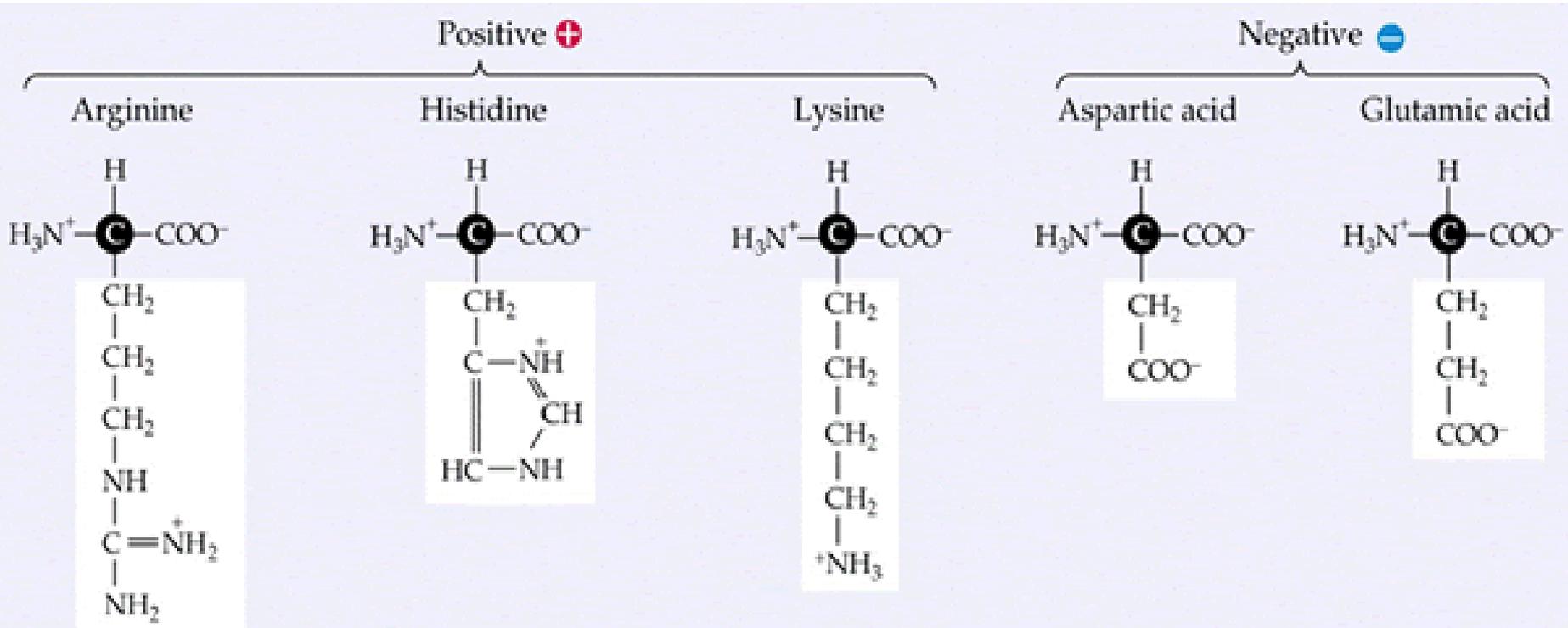
amonio secundario



amonio primario

La matriz sólida tiene grupos cargados positivamente  
La fase móvil tiene grupos cargados negativamente

# Las proteínas son moléculas cargadas



- Suma de las cargas de las cadenas laterales de los aminoácidos
- Dependen de: pH y pKa; ambiente que los rodea

pH solución  $>$  pI = proteína carga(-) por desprotonación.

pH solución  $<$  pI = proteína carga(+) por protonación     $6.5 < 7.75$

pH solución = pI = proteína carga(0) precipitado insoluble

# Intercambiador catiónico

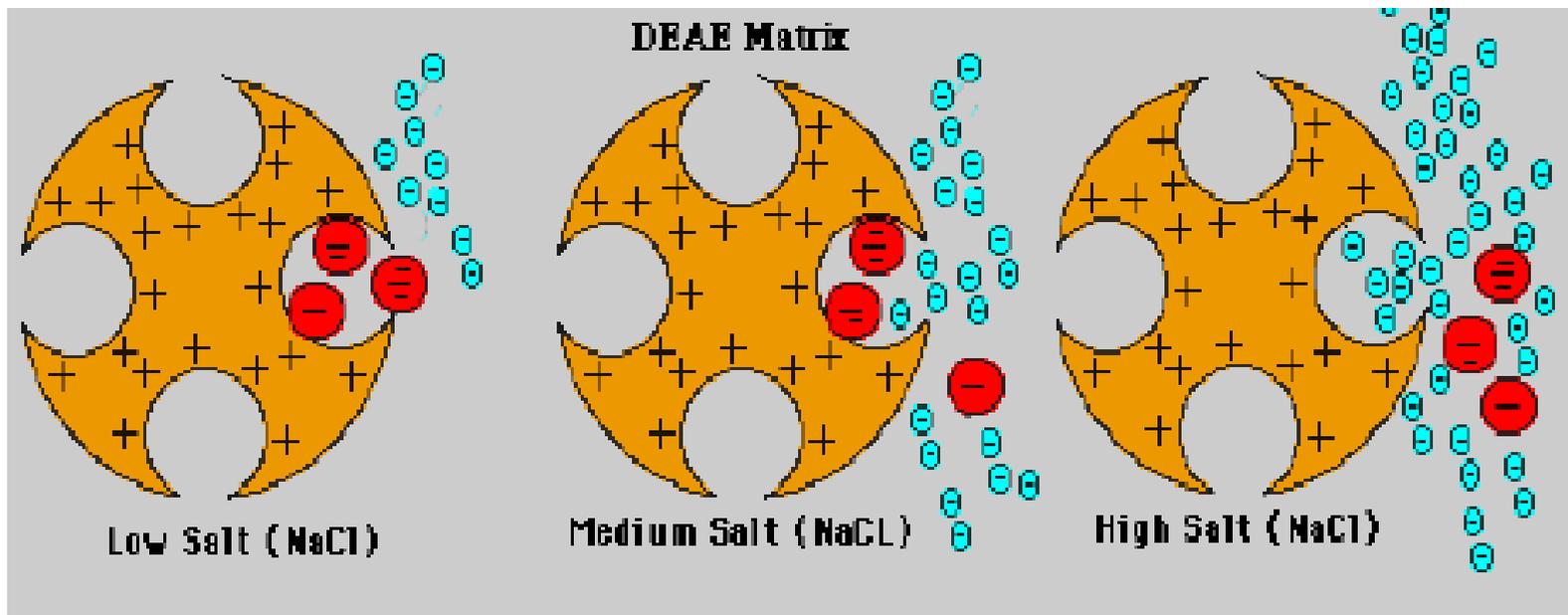
## Macro-prep High S de Biorad

<b>Properties of Macro-Prep High S Support</b>	
Type of support	Strong cation exchange
Functional group	-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Typical dynamic binding capacity*	≥49 IgG/ml
Nominal particle size	50 μm
Nominal pore diameter	1,000 Å
Recommended maximum linear flow rate	3,000 cm/hr
Autoclavability	30 min at 121°C
pH stability	1–10
Regeneration	in 1–2 M NaCl/KCl or 70% ethanol
*Determined with human IgG.	
<b>Chemical Compatability of Macro-Prep High S Support</b>	
1% SDS	Yes
8 M guanidine-HCl	Yes
1 N HCl	Yes
100% ethanol	Yes

sulfonate functional groups and is ideal for purifying basic and neutral proteins and peptides.

# Factores para eluir

- Aumentar concentración de NaCl u otra sal en el buffer eluyente.



### **1.d. Estrategias de elución.**

Para romper las interacciones electrostáticas entre la proteína y la matriz, se eleva la concentración del contra-ion (sal).

Contra iones (sodio o cloruro, bajo PM),

a.- en concentraciones bajas : son desplazados por la proteína,

b.- en concentraciones altas : compiten con la proteína.

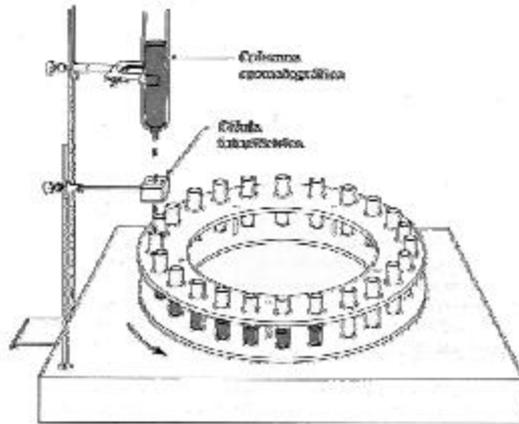
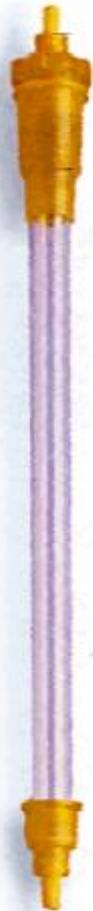
### **1.e. Elución con diferentes contra-iones.**

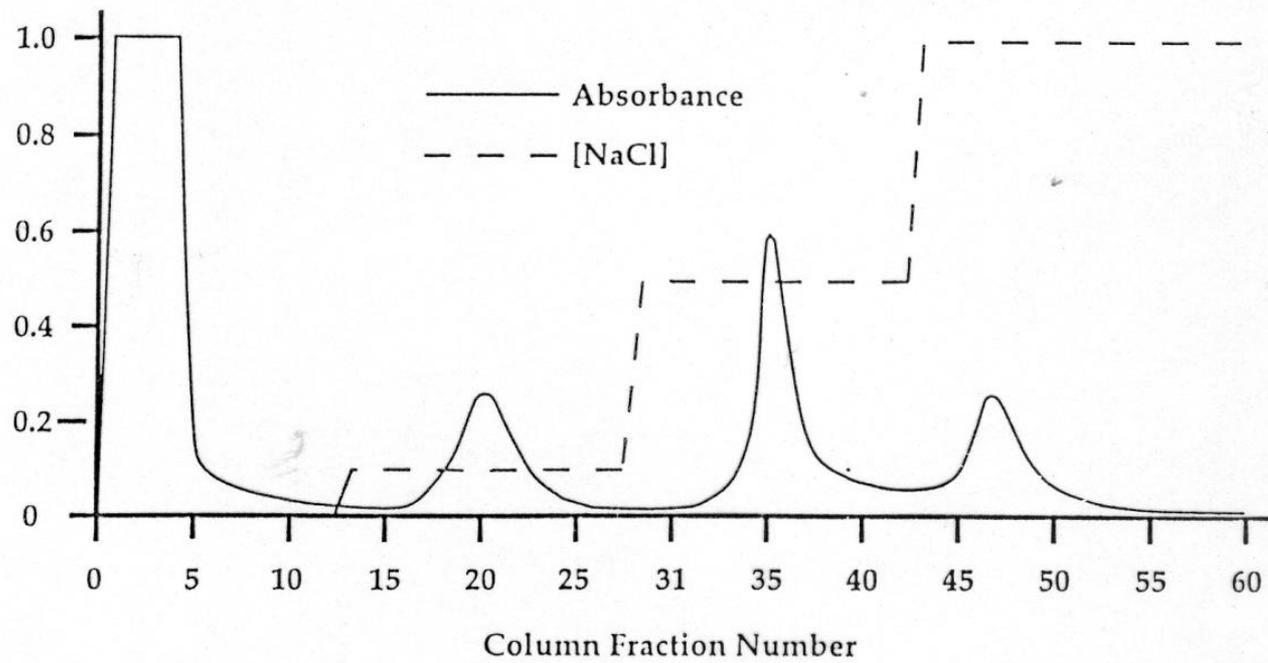
Diferentes contra iones tienen diferente afinidad por la matriz. Si falla la elución de la proteína con un contra ion, se puede utilizar uno que tenga una mayor afinidad por la columna.

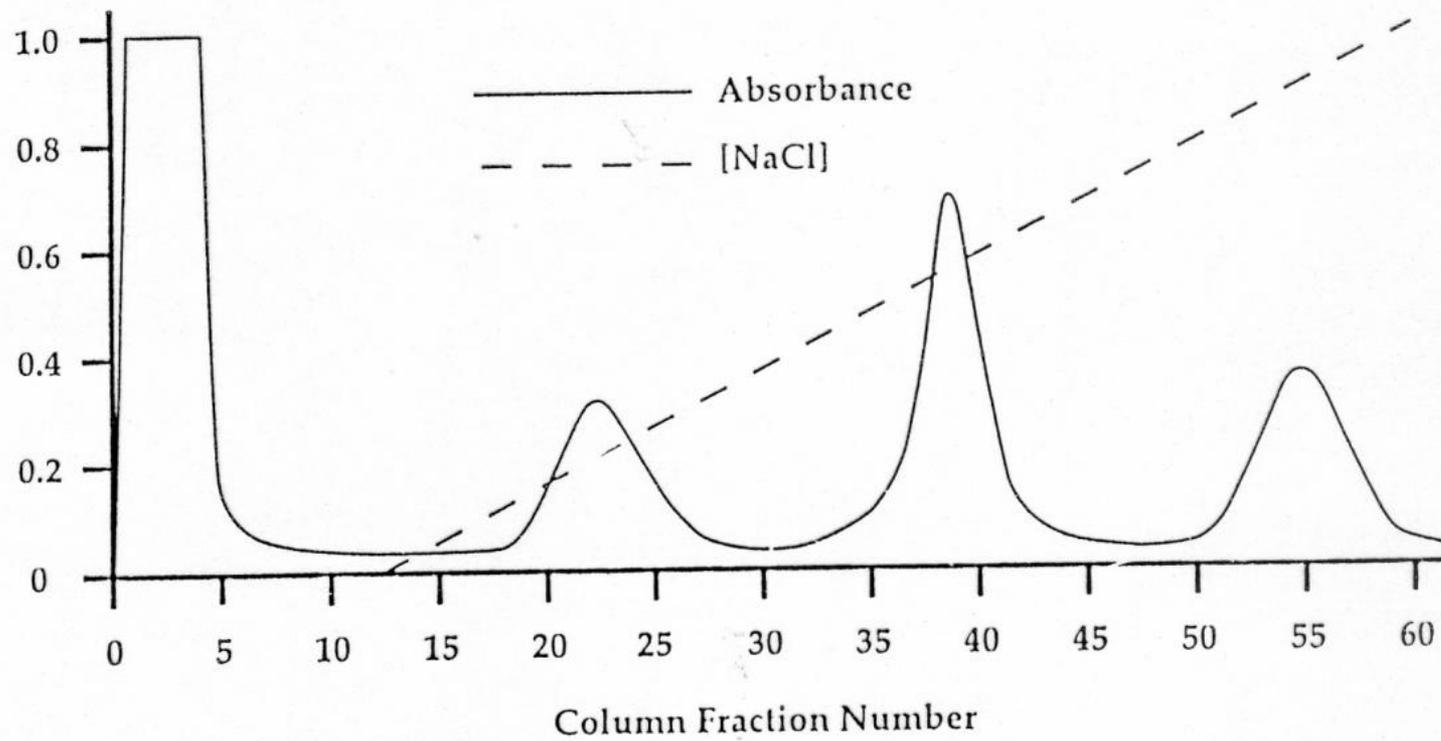
### **1.f. Otras estrategias de elución.**

Al cambiar el pH del buffer, cambia la afinidad de unión de la proteína.

La disminución de la afinidad se debe a una disminución de la carga neta de la proteína.





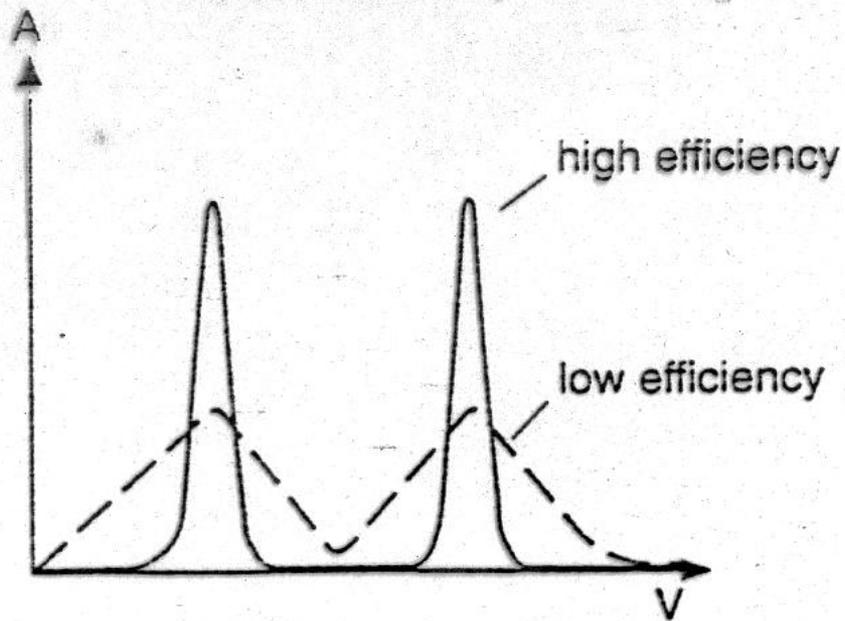


## Counter-ion Activity Series

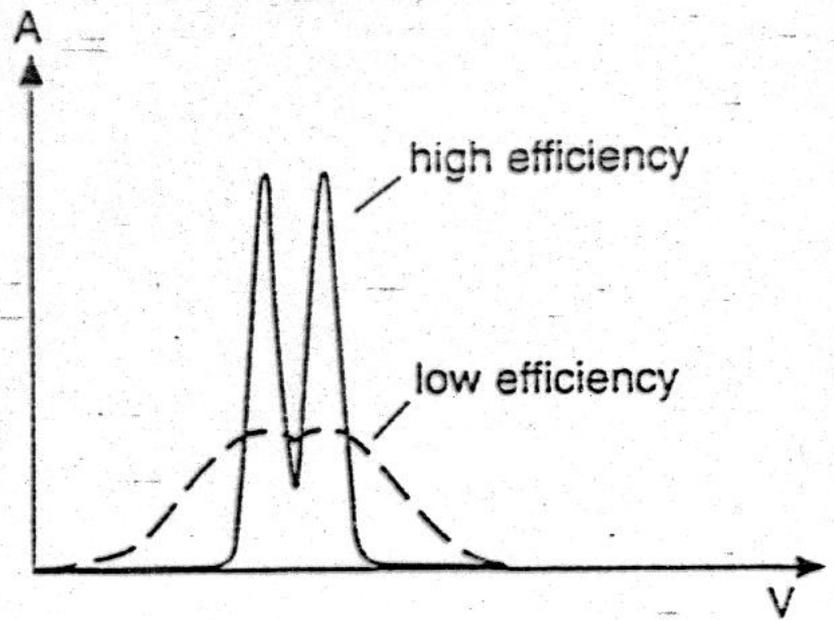
For anion exchange:  $\text{Ag}^+ > (\text{binds more tightly than}) \text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$

For cation exchange:  $\text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{PO}_4^{3-} > \text{CN}^- > \text{HSO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{HCOO}^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{OH}^- > \text{F}^-$

Good selectivity



Bad selectivity



### Commercially Available Ion Exchangers

<u>Supplier</u>	<u>Name</u>	<u>Type</u>	<u>Matrix</u>	<u>Loading Capacity</u> mg/ml	<u>Flow Rate</u> cm/min*	<u>pH</u> <u>Stability</u>
Pharmacia	DEAE Sepharose Fast Flow	Weak anion	X-linked Agarose	3-110	12.5	1-14
"	DEAE Sepharose CL-6B	"	"	2-170	1.7	2-14
"	DEAE Sephacel	"	Beaded Cellulose	10-160	0.17	2-12
"	DEAE Sephadex A-50	"	X-linked Dextran	2-110		2-9
BioSeptra	DEAE Trisacryl M	"	Synth. Polymer	80-90	3	1-11
Bio-Rad	DEAE Bio-Gel A	"	X-linked Agarose	45	>0.3	2-9.5
Pharmacia	CM Sepharose Fast Flow	Weak cation	"	15-50	12.5	2-14
"	CM Sepharose CL-6B	"	"	10-120	2	2-14
BioSeptra	CM Trisacryl M	"	Synth. Polymer	90-100	3	1-11
Bio-Rad	Bio-Rex 70	"	"		0.4-15	5-14
"	CM Bio-Gel A	"	X-linked Agarose	45	>0.3	4.5-10
Pharmacia	CM Sephadex C-50	"	X-linked Dextran	7-140		6-10
"	Q Sepharose Fast Flow	Strong anion	X-linked Agarose	3-120	6.7-11.7	2-12
"	QAE Sephadex A-50	"	X-linked Dextran	1.2-80		2-10
"	SP Sepharose Fast Flow	Strong cation	X-linked Agarose	60	12.5	3-14
"	SP Sephadex C-50	"	X-linked Dextran	8-110		2-10
BioSeptra	SP Trisacryl M	"	Synth. Polymer	100	6	1-11

\* cm/min = ml/min/cm<sup>2</sup> column cross-sectional area

# Usos:

- Se utiliza principalmente para separar una proteína de otros contaminantes siempre que las diferencias entre las cargas sean suficientemente grandes.
- Separa aminoácidos, péptidos, nucleótidos y generalmente compuestos iónicos.
- En laboratorios clínicos se utiliza para separación de hemoglobina, isoenzimas y esteroides.

# **CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD**

# Generalidades

- Una de las técnicas de purificación de proteínas más utilizadas en bioquímica.
- Un ligando específico es capaz de unirse a una proteína (No covalente)
- El ligando se une covalentemente a una matriz cromatográfica porosa e inerte.

# Fundamentos

- Se basa en la afinidad biológica específica de cada proteína hacia un ligando en particular.

Esta puede ser:

Proteína – Ligando

Enzima – Sustrato

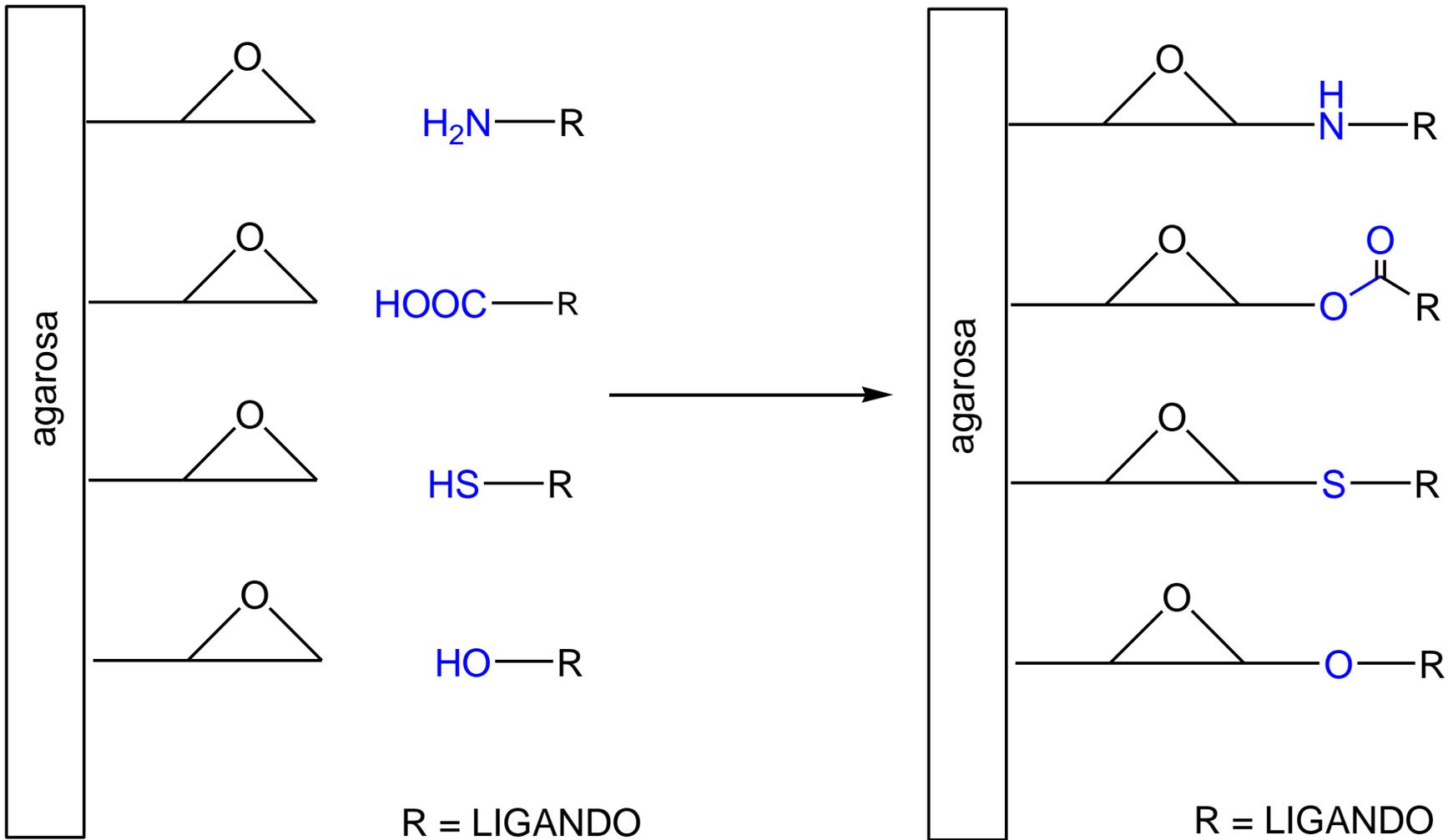
Receptor – Hormona

Anticuerpo - Antígeno

- Los anticuerpos son proteínas con estructura cuaternaria capaces de reconocer y unirse específicamente a alguna molécula llamada antígeno.
- Este antígeno puede ser a su vez una proteína.

# Matriz cromatográfica

- Químicamente inerte.
- Tener alta porosidad.
- Gran número de grupos funcionales capaces de formar enlaces covalentes con los ligandos.
- El más usado: Agarosa, también se usan polímeros de acrilamida y sílices CPG.



# Ligandos

- Unión covalente estable con el gel de agarosa
- Alta capacidad para atrapar a la proteína en cuestión.
- Pueden ser enzimas, anticuerpos, grupos químicos específicos.
- Si el ligando es una enzima evitar condiciones que la activen catalíticamente.

# Ventajas

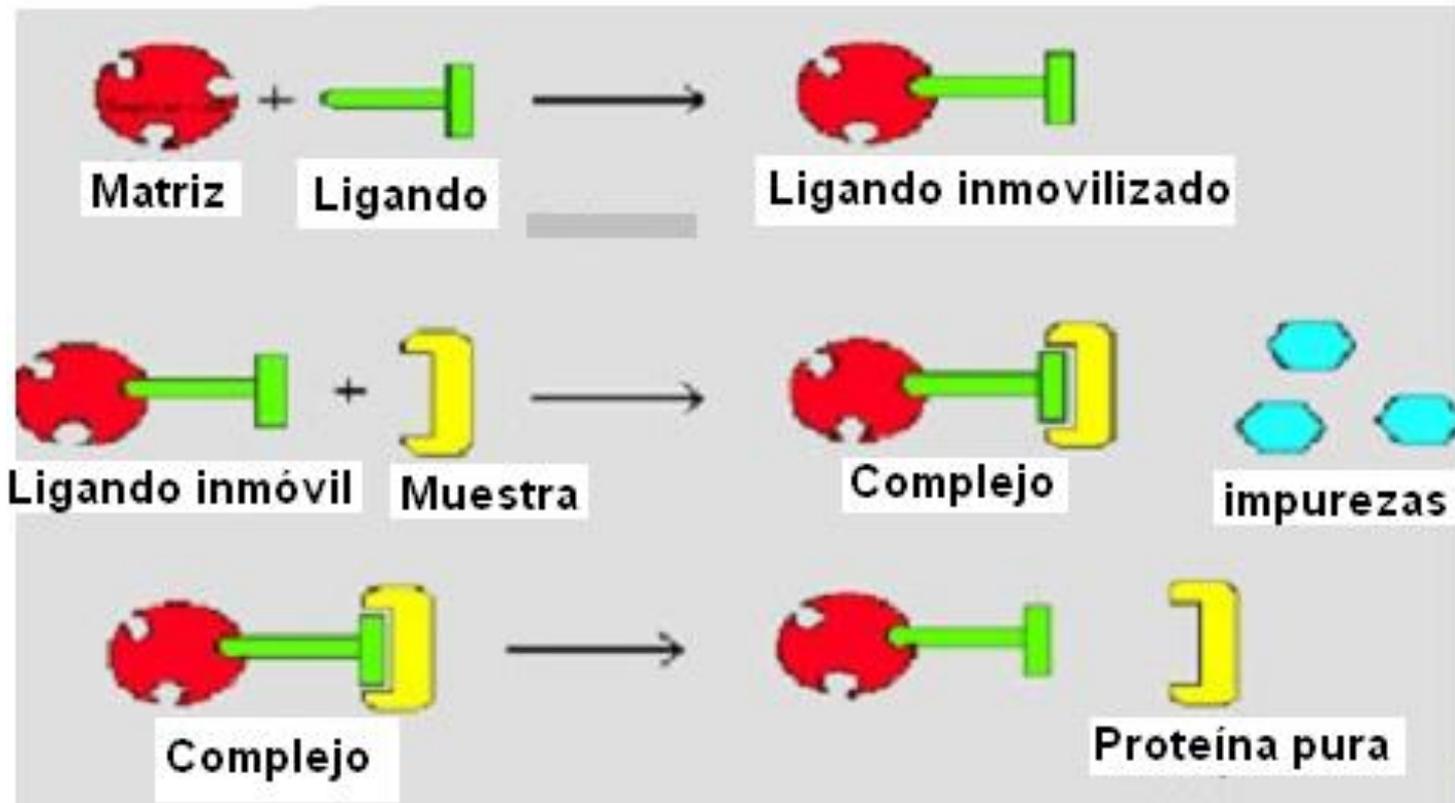
- Capacidad de explotar sus propiedades bioquímicas (únicas).
- Se evitan varios pasos de purificación que con otras técnicas clásicas.
- Normalmente se obtienen altos rendimientos y alta actividad específica.
- Se pueden separar proteínas, enzimas, anticuerpos, membranas, receptores, vitaminas, antígenos incluso células enteras.

# Esquema de purificación

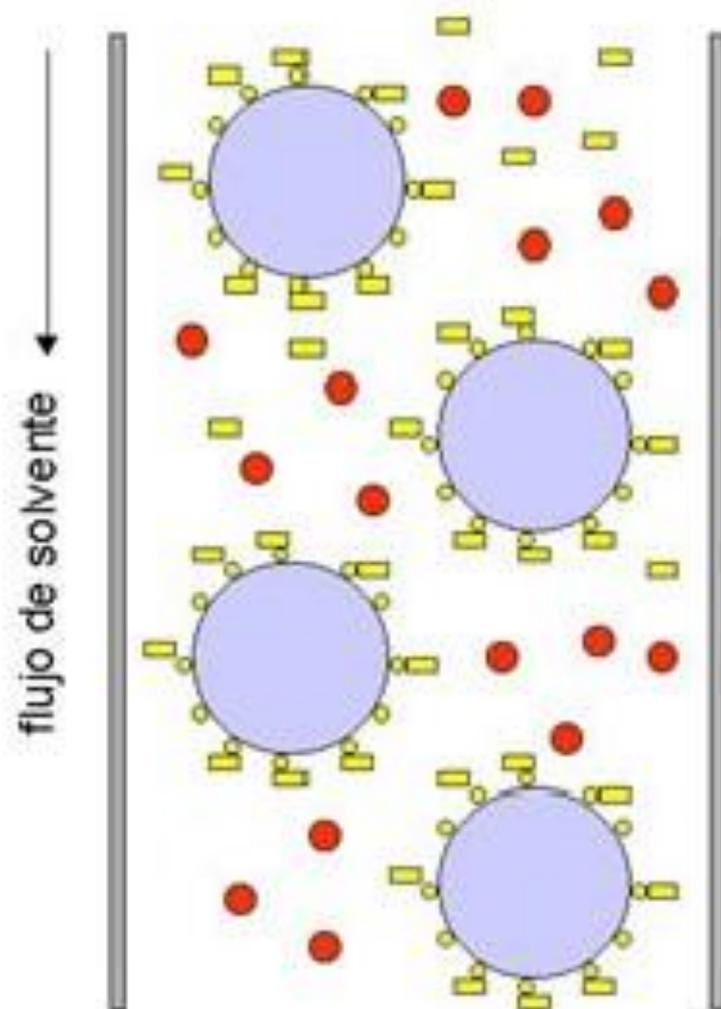
1. El ligando se une covalentemente a una matriz.
2. La mezcla de proteínas se hace pasar por la matriz.
3. Se une sólo la que reconoce al ligando (unión no covalente)
4. Las demás proteínas y el resto se eluye.
5. Se desprende la proteína por adición de sal, pH, temperatura o exceso de ligando libre

# Purificación

## Cromatografía de Afinidad



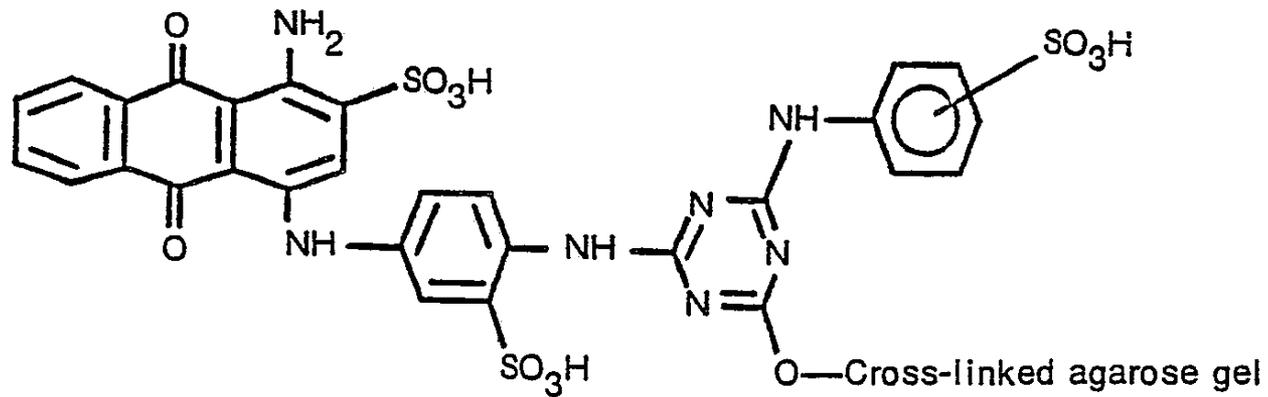
## PRINCIPIO DE LA CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD



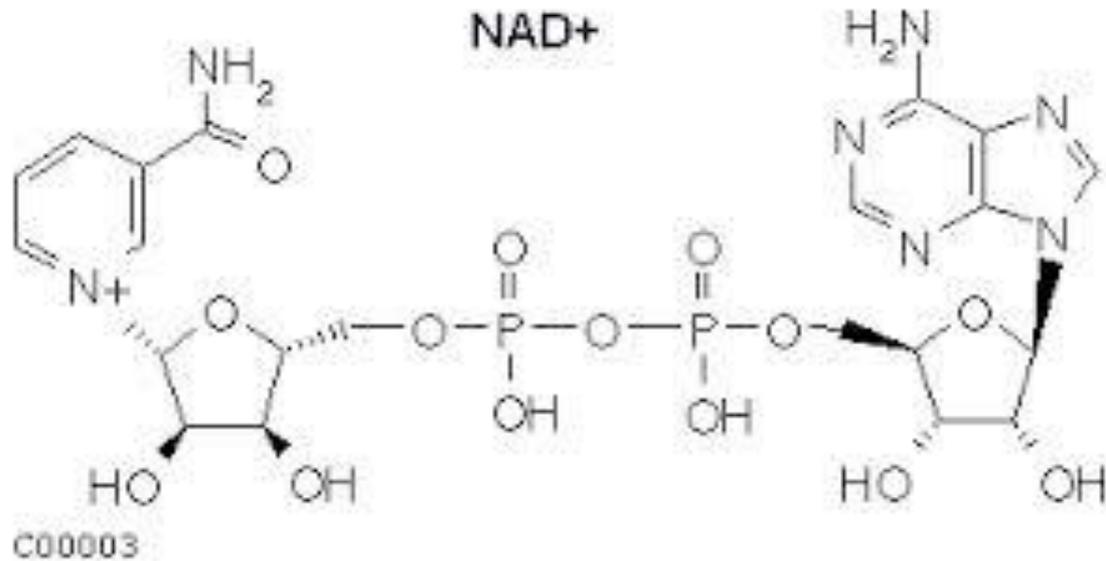
Las bolas de gel están recubiertas de un ligando por el que tiene afinidad alguna de las proteínas a aislar. Al pasar la mezcla compleja a través de la columna ésta proteína es retenida en la superficie de las bolas, eluyéndose las demás.

Para eluir la proteína retenida por afinidad se suele aumentar la fuerza iónica de la solución de solvente o incluir en éste el ligando soluble a alta concentración de forma que compita con el que está unido a las bolas de gel por la unión a la proteína.

## DEAE affi-gel blue gel



Cibacron Blue F3GA and diethylaminoethyl groups to Bio-Gel A.



# Conclusiones

- Técnica muy específica
- Altos rendimientos y eficiencia
- Purificación eficiente con menos pasos posibles
- Ampliamente usada en bioquímica para medicina y farmacia