

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS:

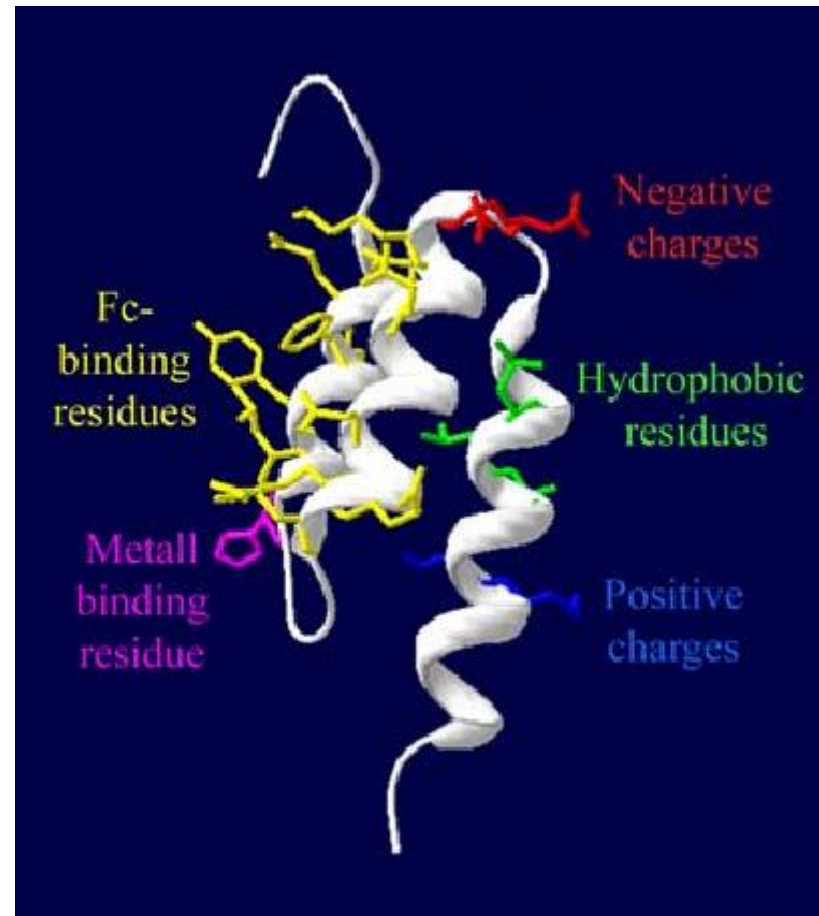
1. Exclusión molecular

2. Intercambio iónico

3. Afinidad

Propiedades de una proteína que son útiles para su purificación por cromatografía

- Peso molecular
- Carga iónica
- Hidrofobicidad
- Unión específica a ligantes



Pasos para purificar a una proteína por 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

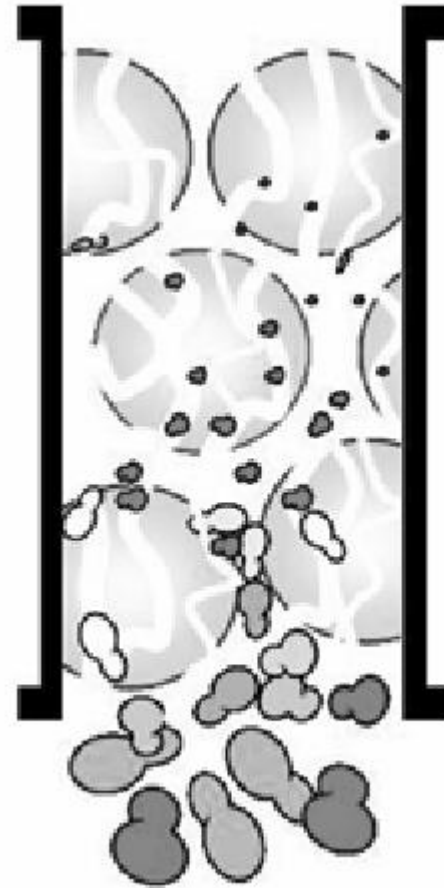
EXCLUSIÓN MOLECULAR O FILTRACIÓN EN GEL

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.

CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL

- 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, eluyen primero.



Soportes que pueden ser de material variado como:

Inorgánicos

- Sílica Porosa
- Vidrio de Poro controlado
- Hidroxiapatita

Polímeros sintéticos

- Poliacrilamida (Biogel P)
- Polimetacrilato (Spheron)
- Poliestireno

Polisacáridos

Celulosa (Cellulafine, Sephacel)

Dextrano (Sephadex)

Agarosa (Sepharosa, Superosa, Ultragel A y BioGel)

Compuestos Polímero orgánico – polisacárido

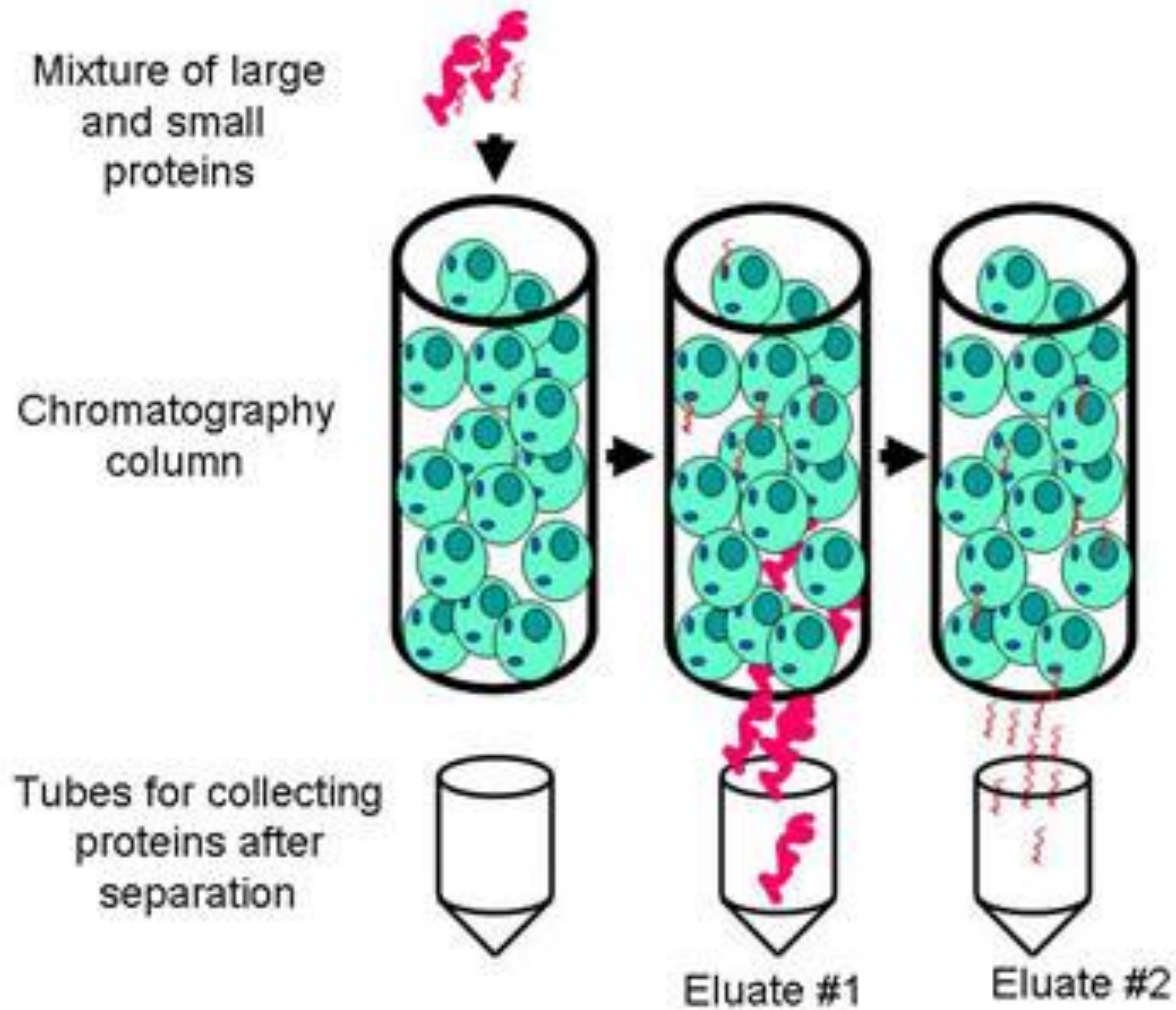
- Poli N,N' .- bisacrialmida- dentrano (Sephacryl)
- Agarosa – dextrano (Superdex)
- Agarosa – poliacrilamida (Ultradex A A)

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

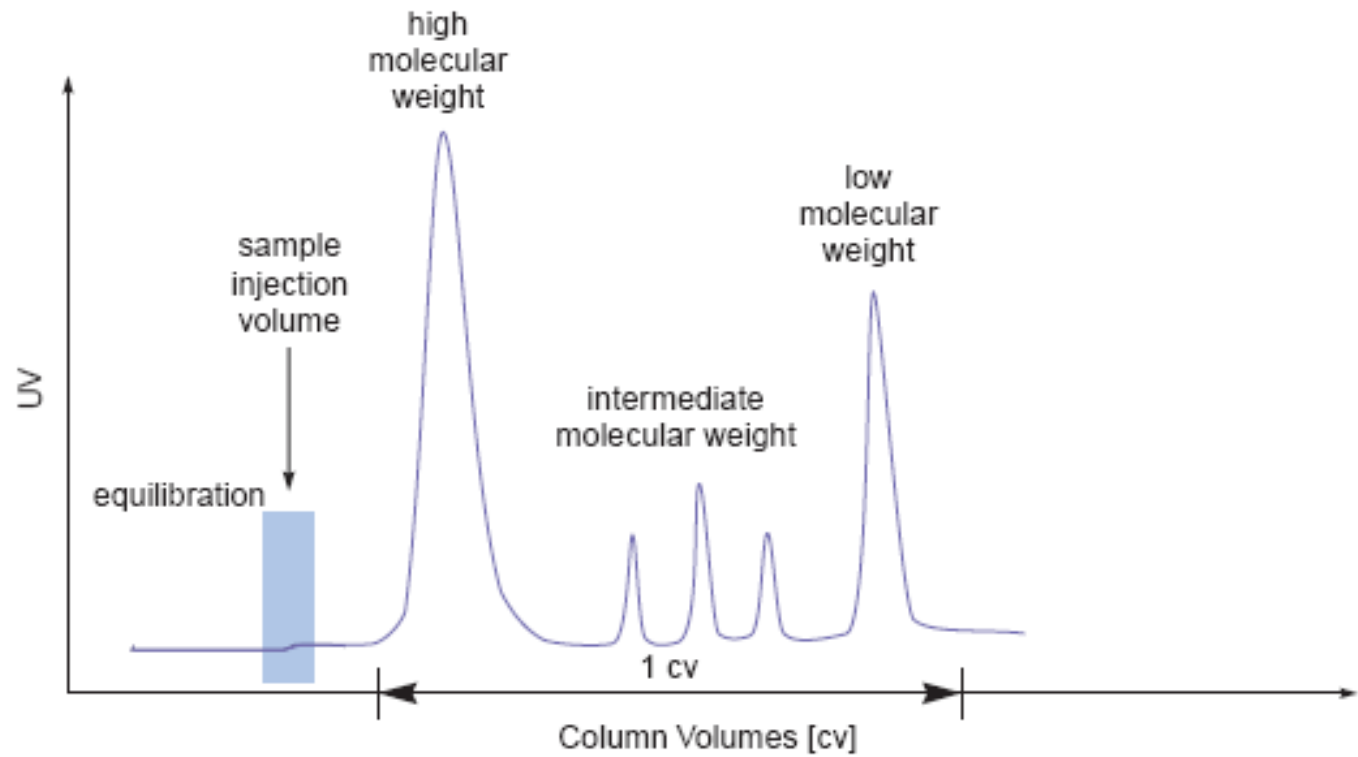
DESALADO

Cromatografía Filtración en gel



Cromatograma de monitoreo de la eficiencia de la purificación

Abs 280 nm



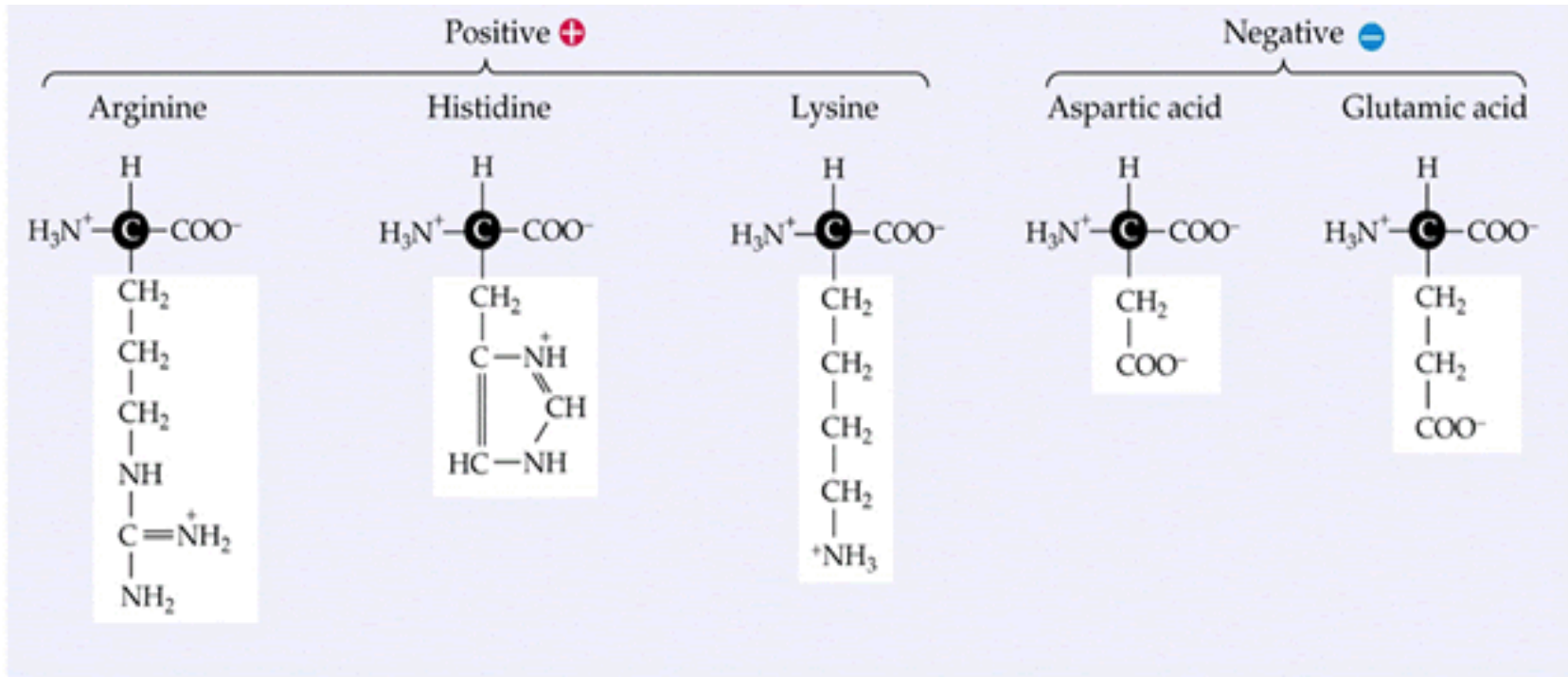
Aplicaciones de la filtración en gel

- separación de sustancias de distintos pesos moleculares
- determinación de pesos moleculares de proteínas
- Desalar proteínas

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

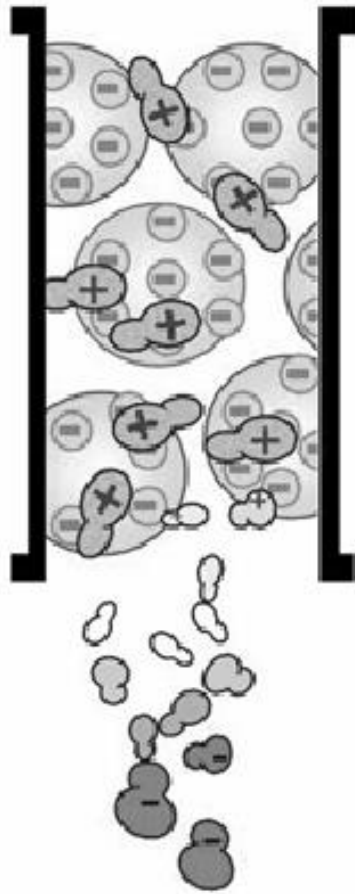
- Separación que se basa en la carga eléctrica de las proteínas.
- Se aplica en una matriz de carga opuesta a la de la proteína que se quiere purificar.
- Se debe tener un pH determinado.
- Las proteínas se eluyen de menor a mayor fuerza de unión.

Las proteínas son moléculas cargadas



- Suma de las cargas de las cadenas laterales de los aminoácidos
- Dependen de: pH y pK_a; 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

Principio de la cromatografía



- Las proteínas quedarán retenidas sólo si tienen carga opuesta a la matriz.
- Si se tienen proteínas retenidas, su tiempo de retención será mayor a mayor carga.

Factores que afectan la retención

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

Intercambio Aniónico (moléculas a separar cargadas negativamente)

Resinas **Catiónicas**

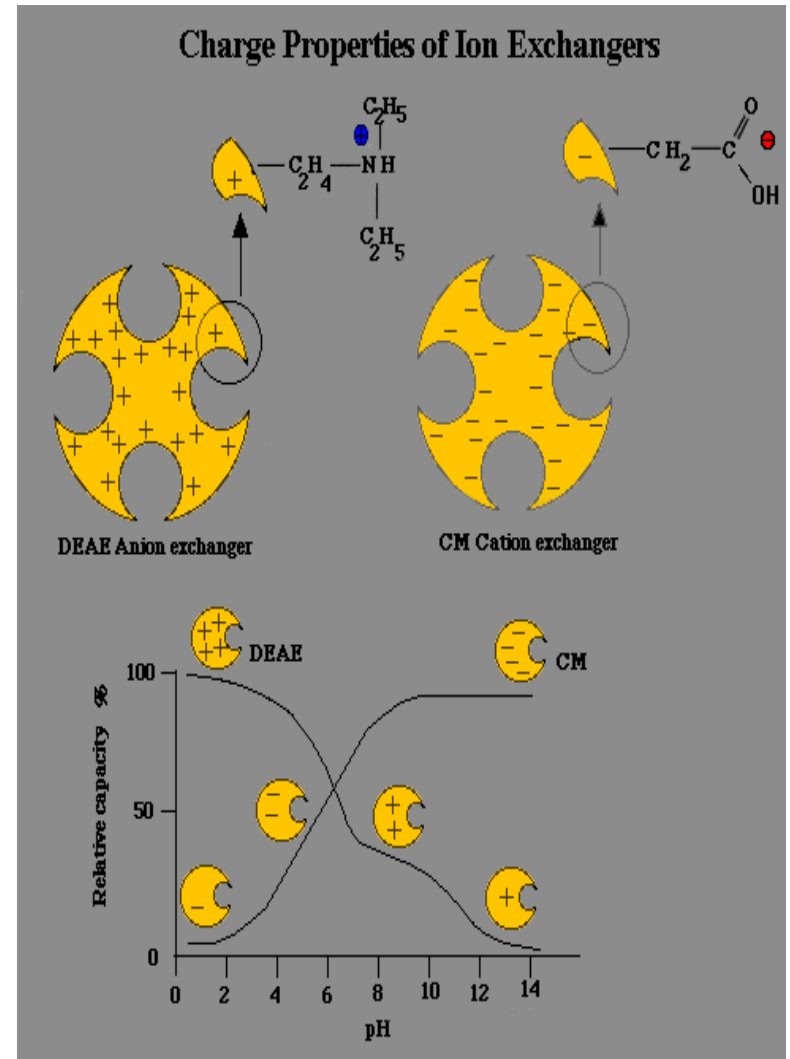
Dietil **amino** etilcelulosa o **DEAE**
(débil)

Amina Cuaternarias- $\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)$
Q (fuertes)

Intercambio Catiónico (moléculas a separar cargadas positivamente)

Resinas **Aniónicas**
Carboximetil $\text{-O-CH}_2\text{COO}^{(-)}$
(CM) débil

Sulfometil $\text{-CH}_2\text{-SO}_3^{(-)}$
S (fuerte)



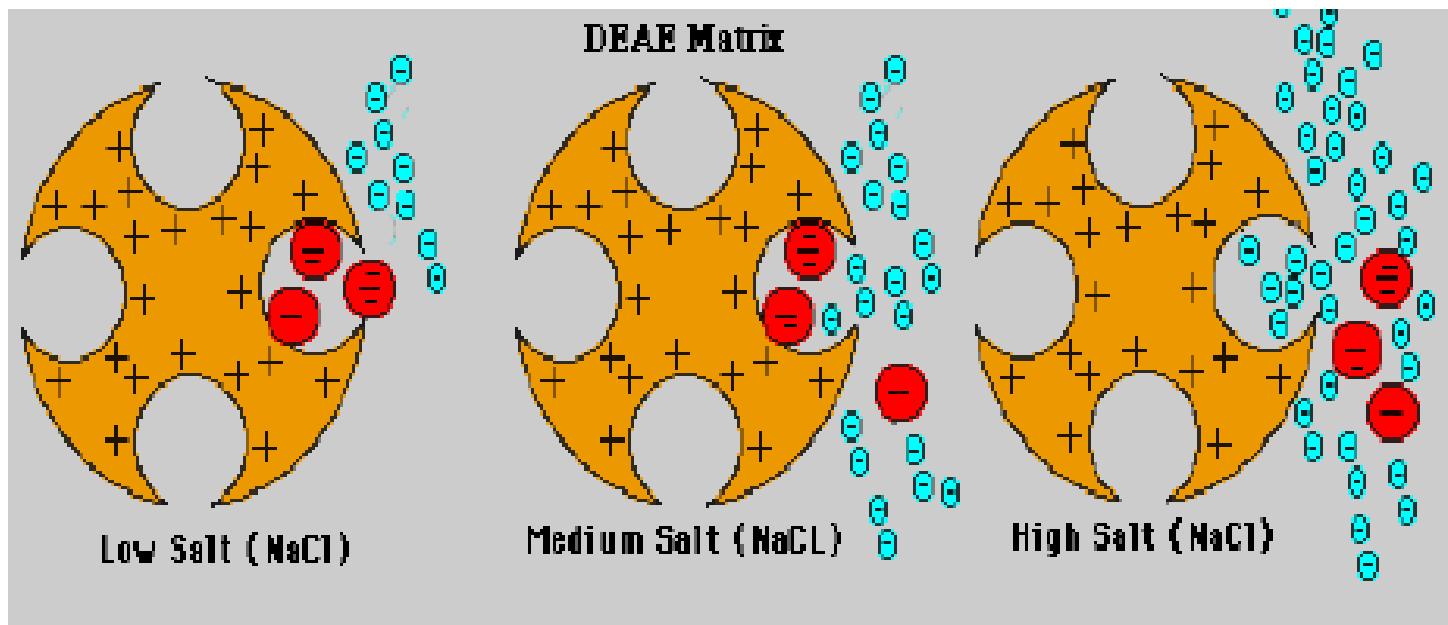
Commercially Available Ion Exchangers

<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 ÷ cm² column cross-sectional area

Factores para eluir

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



- Cambio de pH

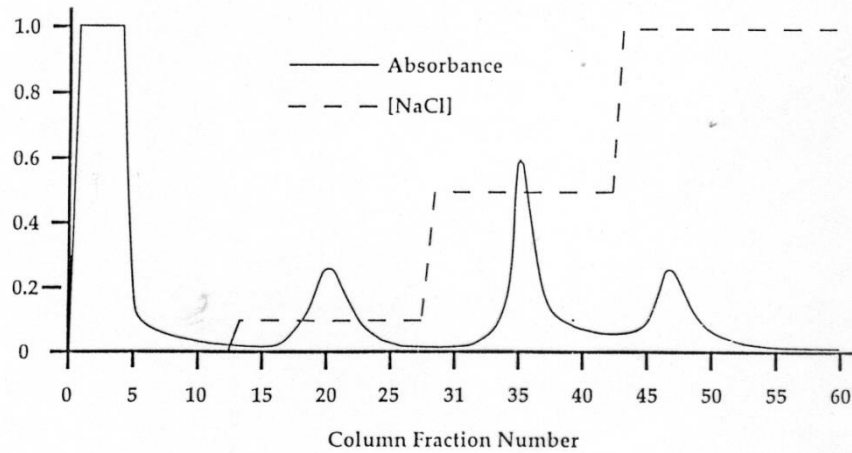
Iones comúnmente usados

Counter-ion Activity Series

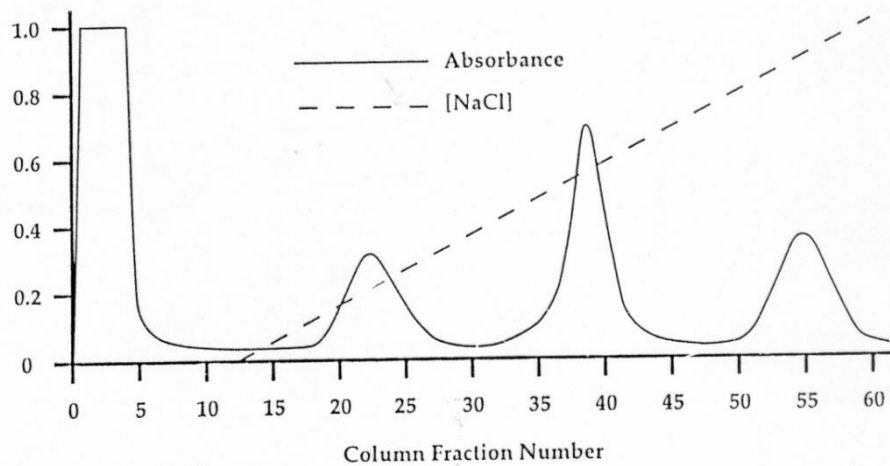
For anion exchange: $\text{Ag}^+ > (\text{binds more tightly than}) \text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$

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

Gradiente de NaCl



En pasos



Lineal

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

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

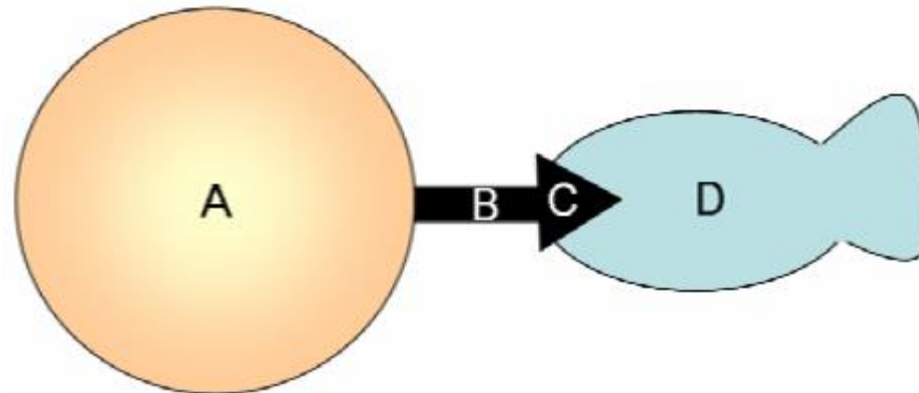
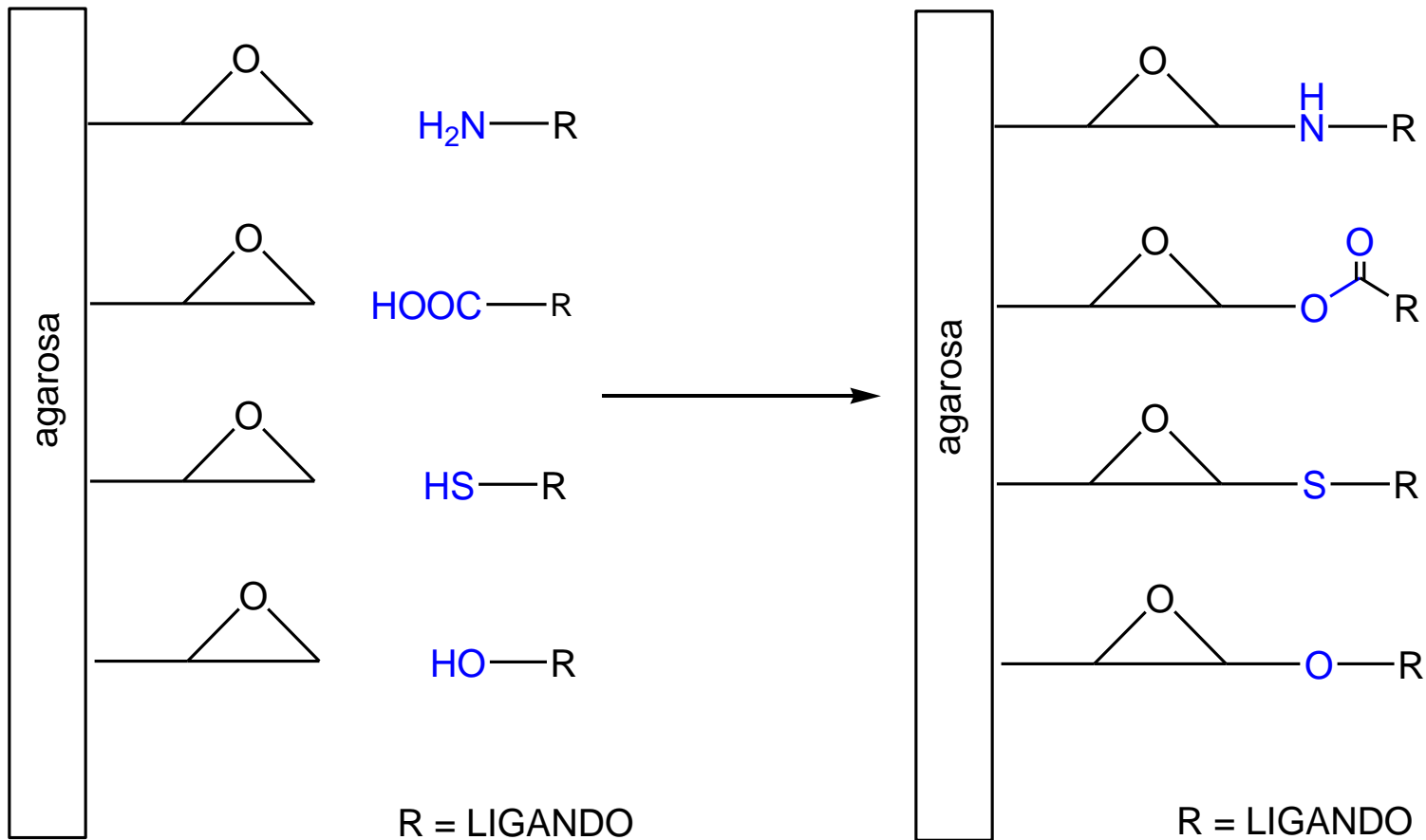


Figure 6. An affinity matrix binding to its target protein
A. The bead. B. The Spacer arm. C. The ligand. D. The target protein.

Soportes o matrices

- 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

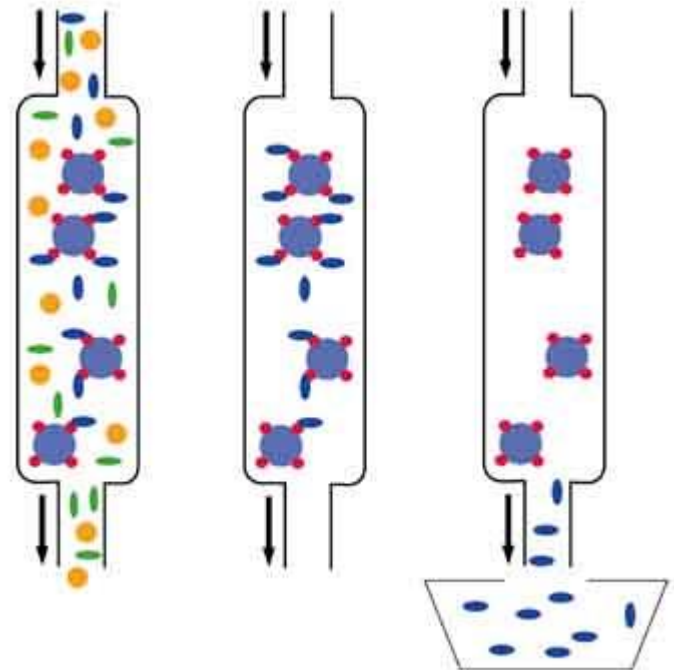
- Capacidad de explotar sus propiedades bioquímicas (únicas).
- Se evitan varios pasos de purificación que con otras técnicas clásicas.
- Normalmente se obtienen altos rendimientos y alta actividad específica.
- Se pueden separar proteínas, enzimas, anticuerpos, membranas, receptores, vitaminas, antígenos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

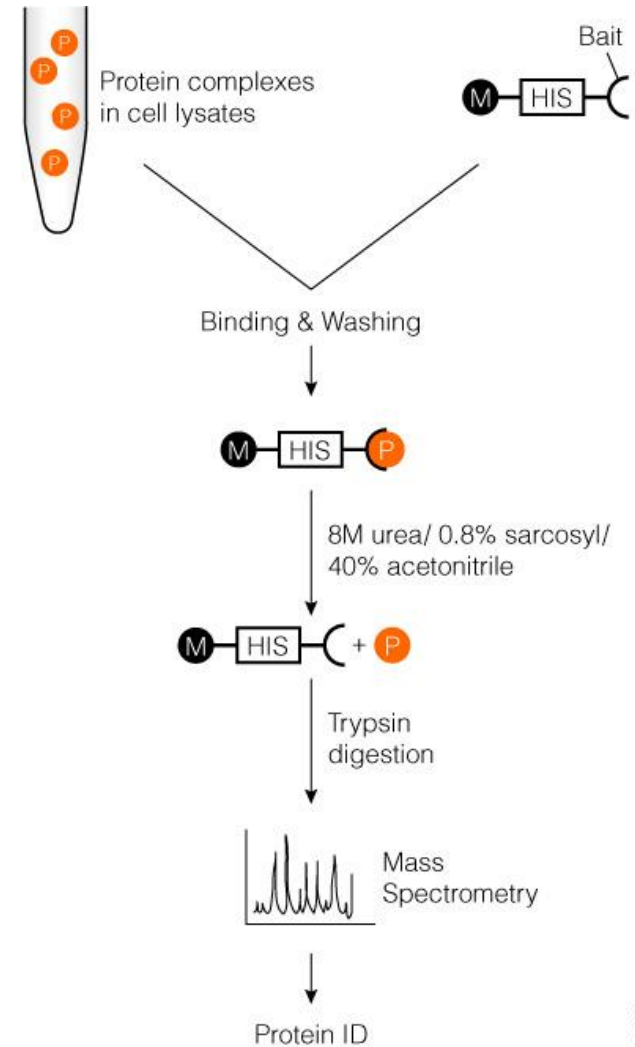
Procedimiento de purificación

- Para eluir a la proteína se puede usar a su ligando natural



Procedimiento de purificación

- Para proteínas recombinantes que contienen una secuencia marcadora (extensión de His)
- Se usa una columna con un soporte unido a metal
- Se desplaza la proteína por la adición de imidazol, solventes, EDTA.....



Conclusiones

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

TAREA: entrega 26 de febrero

Se presenta la siguiente mezcla de proteínas

Proteína	Peso Molecular (Da)	Punto Isoeléctrico
Tripsina	34.000	8.0
Pepsina	35.500	2.75-3.0
Gelatinas	100.000	4.8-4.85
Insulina	40.900	5.30-5.35

Con la información que cuenta:

- 1. Prediga (dibujando) los perfiles de elución bajo las siguientes operaciones cromatográficas:**
 - Intercambio Aniónico a pH 6.0
 - Intercambio Cationico a pH 6.0
 - Filtración por geles

2. Plantea 2 procesos óptimos para purificar insulina de la mezcla antes señalada

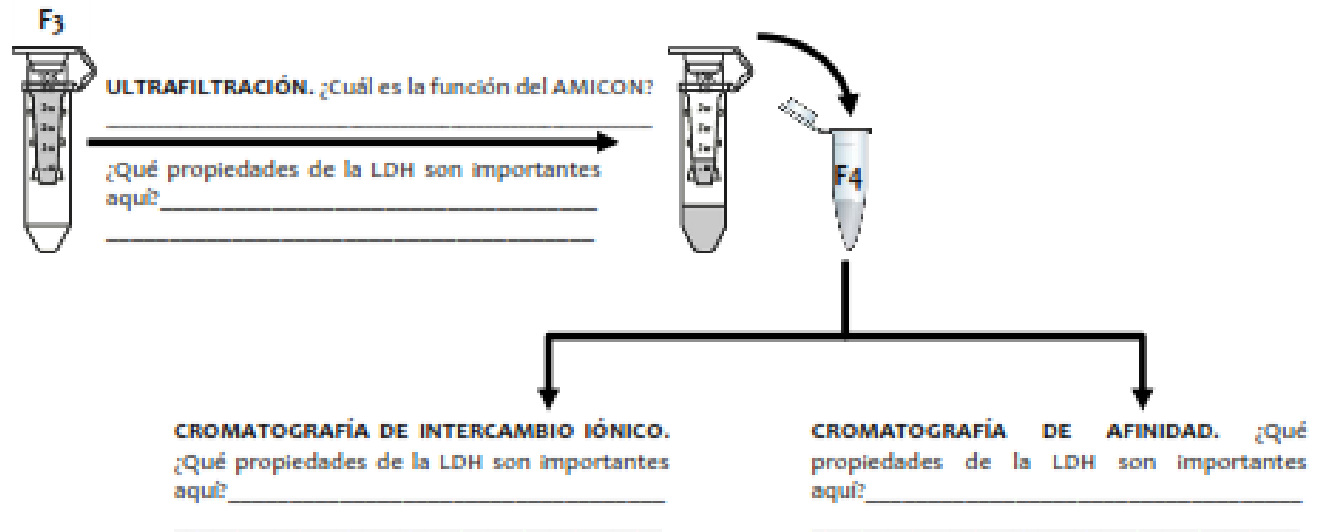
(Indique tipo de columna y el pH de trabajo en el caso de ser necesario).

Indique en cada paso que contaminante(s) se estaría eliminando. Considere:

- i) el siguiente ranking de eficiencias
Afinidad > Intercambio Iónico, HIC > Filtración por gel
- ii) Adicionalmente considerando que cuenta con las siguientes matrices
 - Q-sefarosa
 - SP-sefarosa
 - Fenil-sefarosa
 - Sephadex G-100
 - Proteína M (Específica para Insulina)

Purificación de la LDH de músculo esquelético de Gallus gallus

- Parte II: Desalado y cromatografías

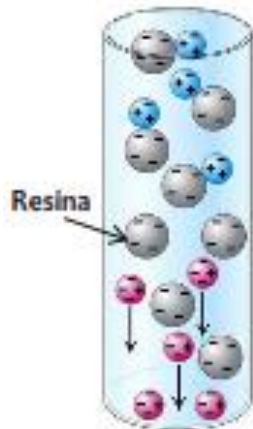


Buffer	Función
C: 20 mM Tris/HCl pH=6.5	
D: 20 mM Tris/HCl pH=6.5 y 1 M de NaCl	

Buffer	Función
A: 20 mM Tris/HCl pH=8.6	
B: 20 mM Tris/HCl pH=6.5 y 1 mM de NADH	

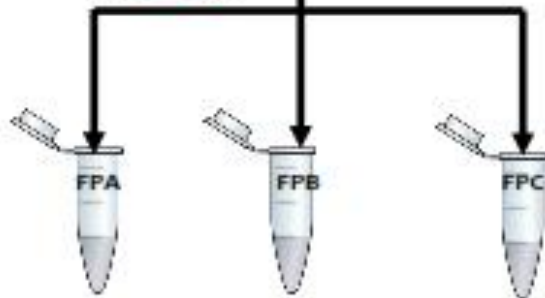
Consideraciones para las cromatografías

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.
 ¿Cuál es el pI de la LDH? _____

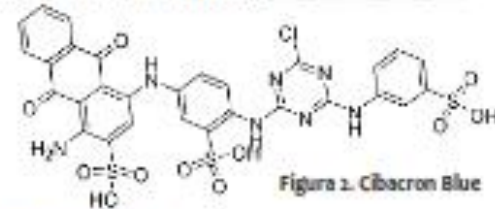


LAVADO. ¿Cuál es la función del lavado? _____

ELUCIÓN. ¿Cuál es la función del NaCl? _____



CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.
 ¿Qué cofactor utiliza la LDH? _____



LAVADO. ¿Cuál es la función del lavado? _____

ELUCIÓN. ¿Cuál es la función del NADH? _____

