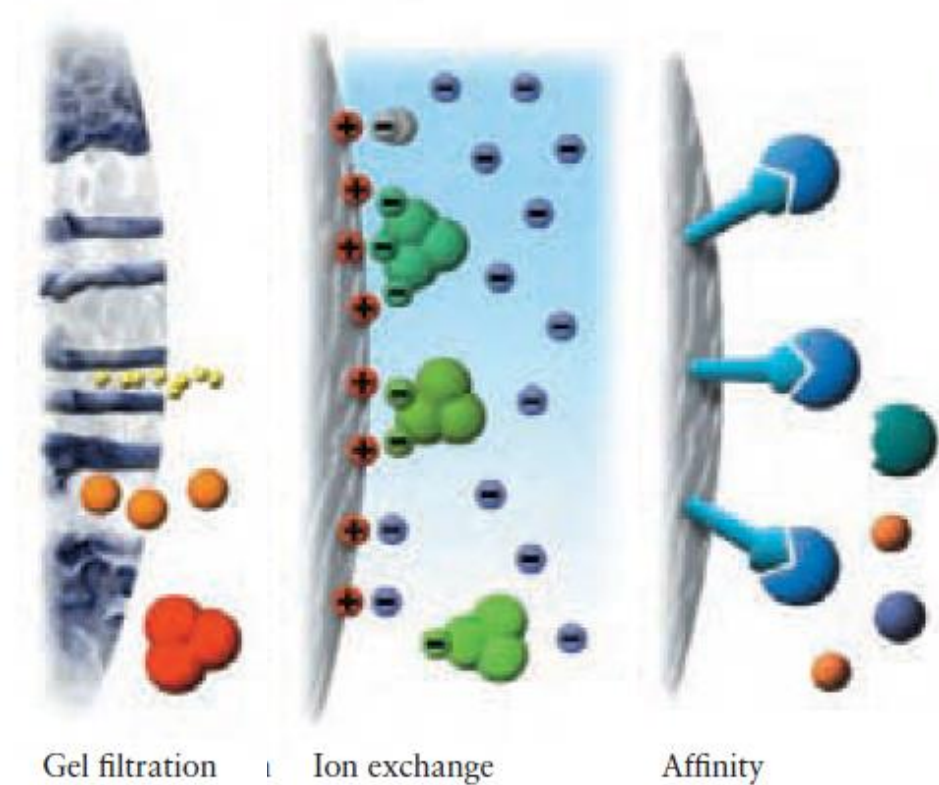


# Métodos cromatográficos.

QA Alejandro Hernández Loyola

# Cromatografía

Técnica de separación por las propiedades fisicoquímicas de las biomoléculas. Dependiendo del tipo de cromatografía va a variar el grado de purificación que se puede alcanzar.

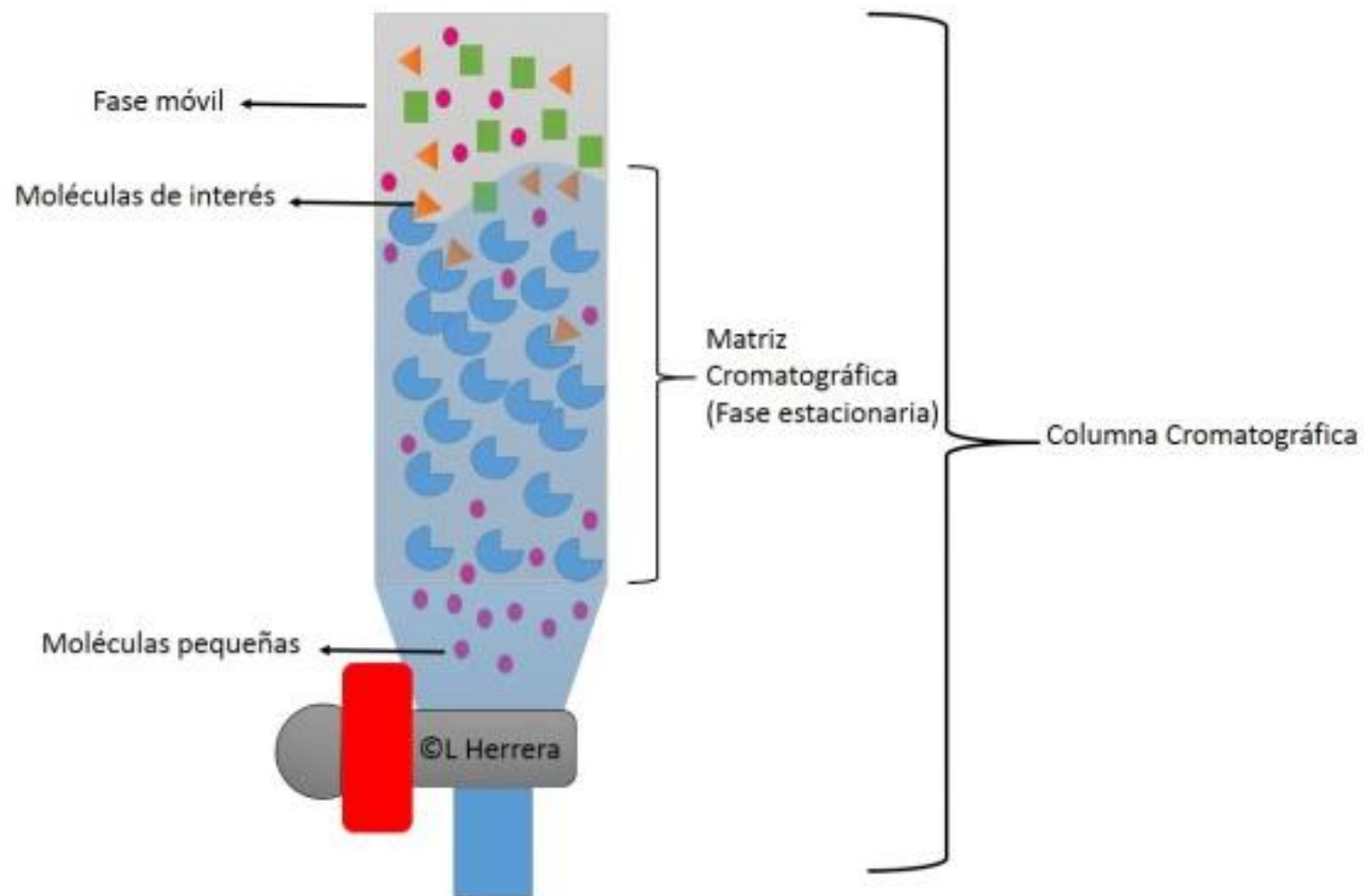


# Utilidad de la cromatografía.

En la purificación de proteínas, la cromatografía nos permitirá eliminar muchos contaminantes propios de la muestra. Para llevar a cabo la separación se aprovechan las propiedades fisicoquímicas de las proteínas:

Propiedad	Tipo de cromatografía
Tamaño	Exclusión molecular o filtración en gel
Carga	Intercambio iónico
Bioreconocimiento (unión específica a ligandos)	Afinidad

# Partes de la columna de cromatografía.



# Procedimiento básico de una cromatografía

## 1. Equilibrio de la columna.

Se hace pasar el buffer necesario para la adsorción de la proteína a la resina.

## 2. Aplicación de la muestra.

Se aplica la muestra en la columna, promoviendo la unión de la proteína con la resina.

## 3. Lavados.

Se hace pasar un gran volumen de buffer para eliminar las proteínas que no se unieron a la columna, así como las posibles uniones no específicas.

## 4. Elución.

Se rompen las interacciones entre la proteína y la matriz, puede llevarse a cabo **elevando la concentración de sal**, **cambiando el pH del buffer** o añadiendo una **molécula que compita por la unión** con la matriz.

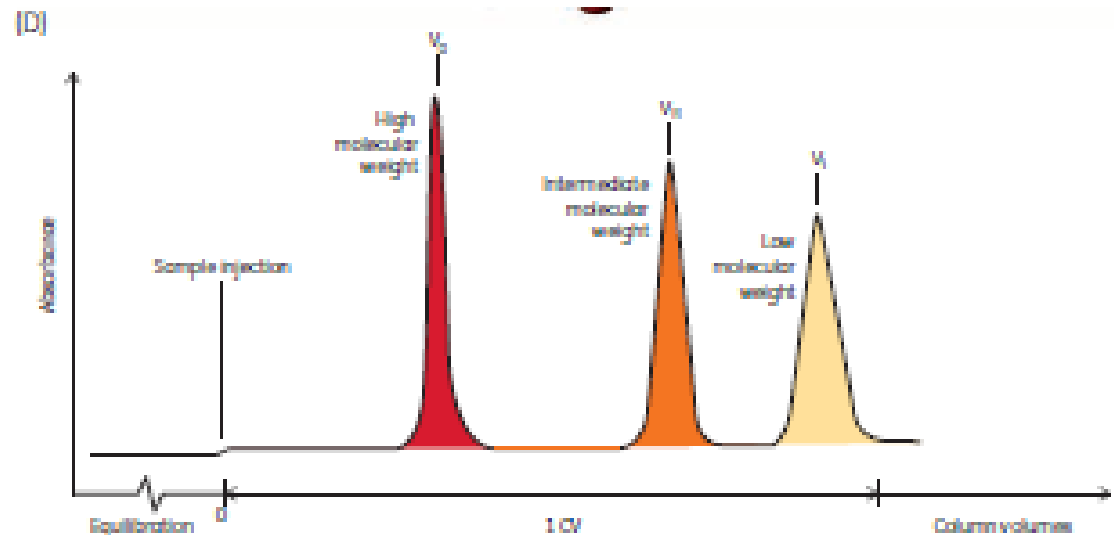
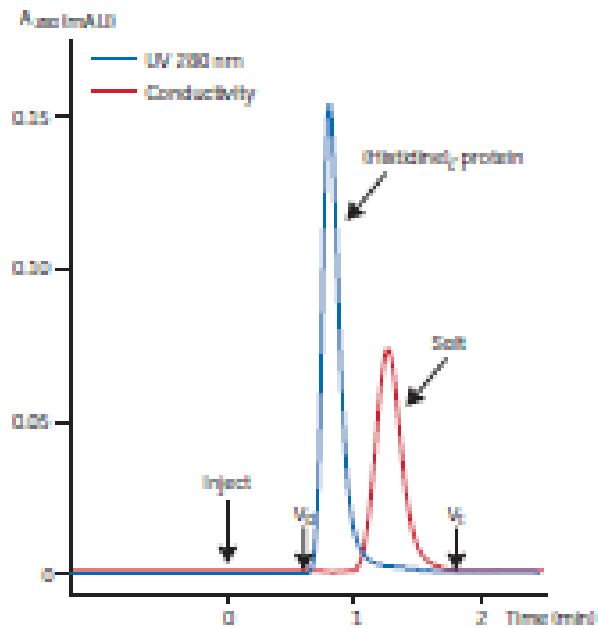
## 5. Regeneración.

Se eliminan los contaminantes restantes y se reestablece el equilibrio de la matriz para que se encuentre a su máximo potencial de unión.

# Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

**Fundamento:** Este tipo de cromatografía se basa en la separación de proteínas por su tamaño. Se tiene una fase estacionaria que posee un tamaño de poro determinado.

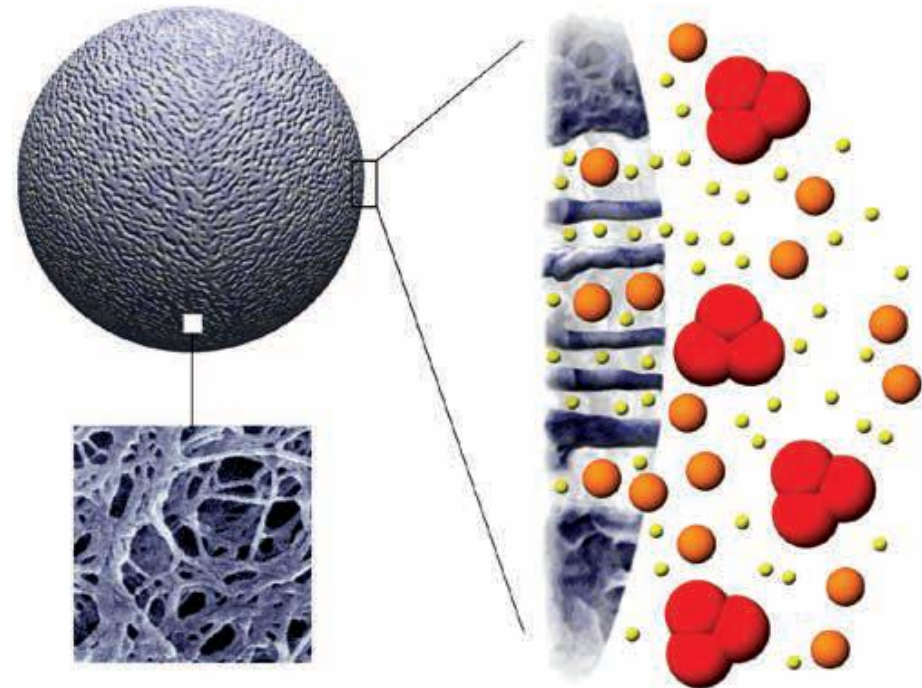
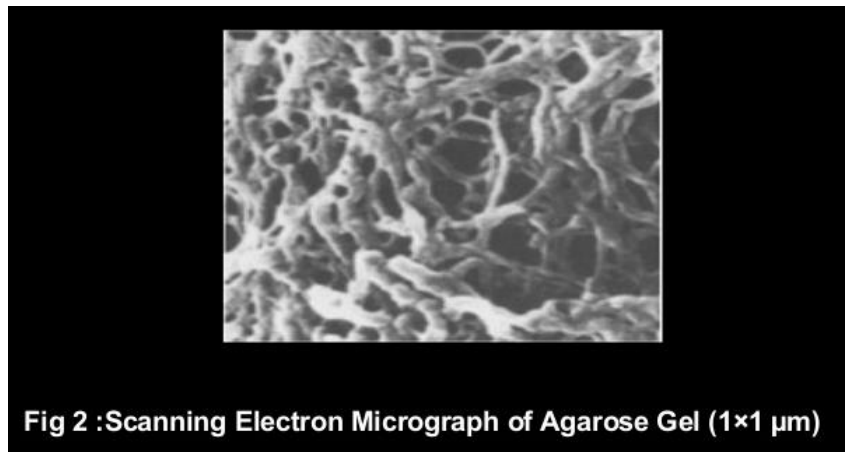
Eluyen primero las moléculas con **mayor tamaño**, ya que no pueden entremeterse en la matriz porosa.



# Polímeros que conforman la fase estacionaria en SEC

Normalmente éste tipo de cromatografía utiliza una fase estacionaria conformada por un gel insoluble que forma una red tridimensional que funcionará como tamiz molecular.

Los geles utilizados normalmente son dextrano, agarosa y poliacrilamida.

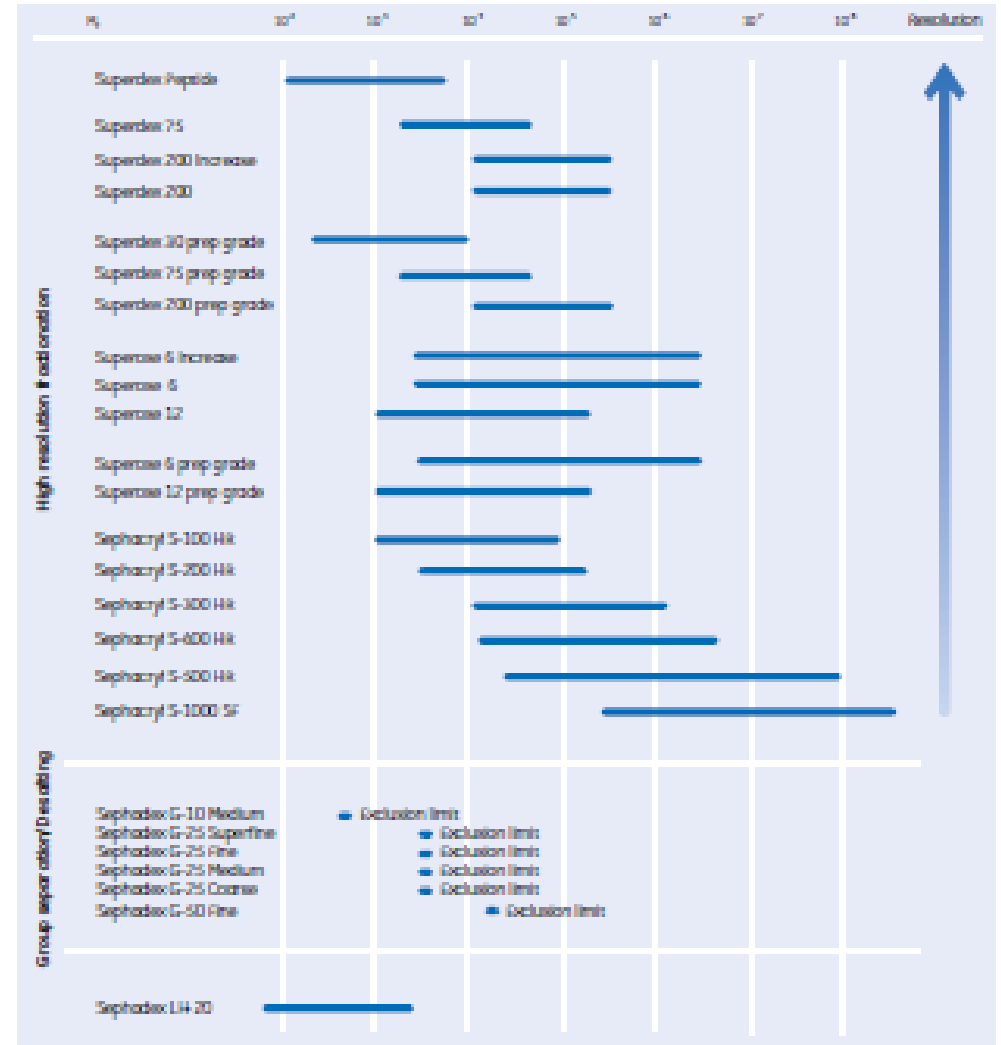
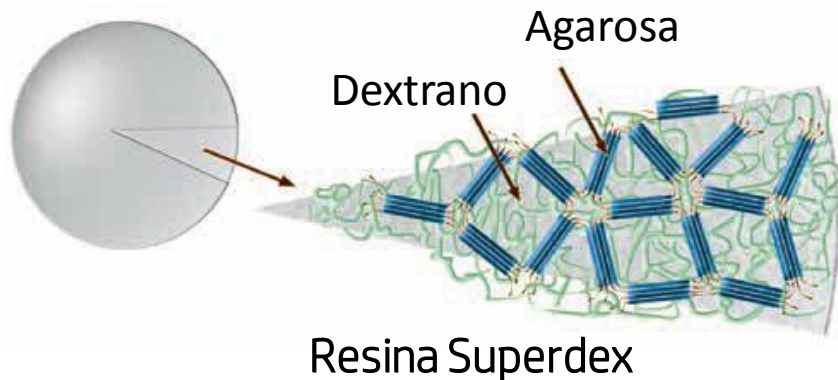


# Resinas comerciales

Hay algunas resinas comerciales para SEC, que utilizan uno o más polímeros para mejorar la separación de proteínas, unos ejemplos son:

Sephadex: Dextrano.

Superdex: Dextrano unido covalentemente a agarosa.





# Cromatografía de intercambio iónico

**Fundamento:** La separación de las proteínas es dada por la carga eléctrica de la proteína. De igual manera, un cambio en ella promueve la separación de la fase estacionaria.

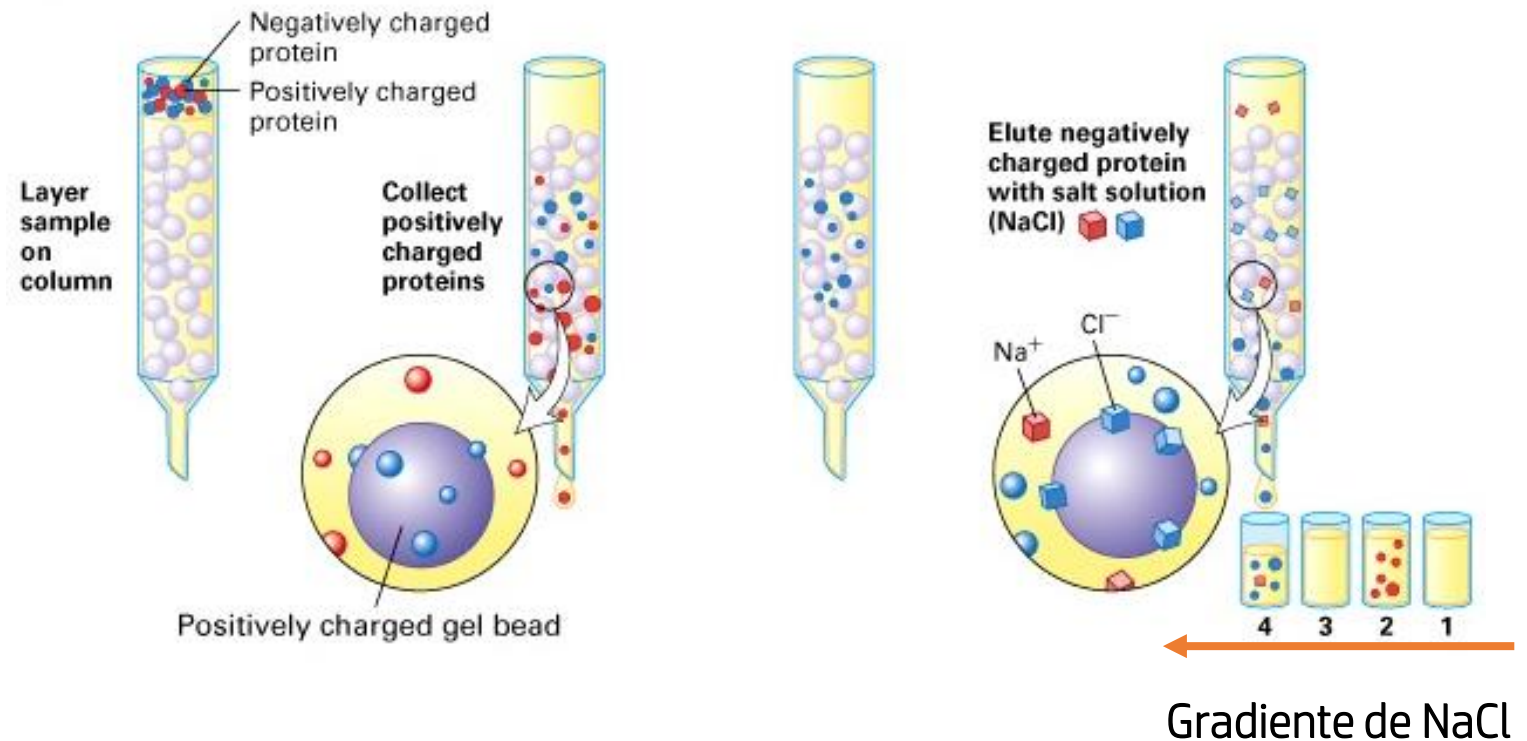
**Punto isoeléctrico:** pH en el que la carga total de la proteína es cero.

Intercambiadores catiónicos:

Cargados **negativamente**, como CM celulosa (contiene grupos  $\text{COO}^-$ )

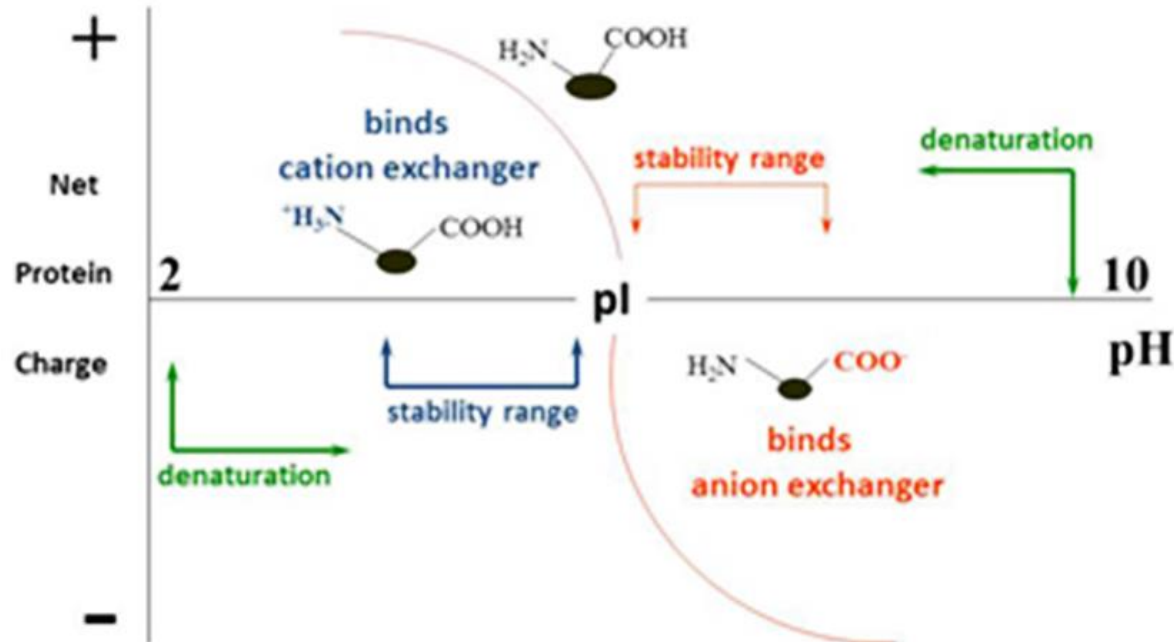
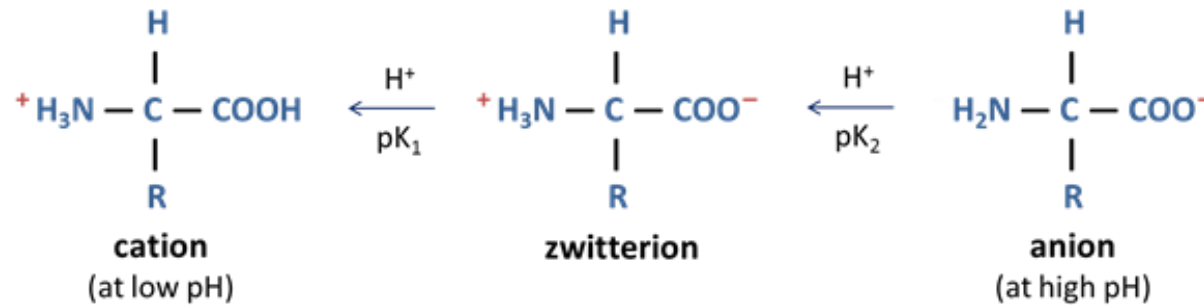
Intercambiadores aniónicos:

Cargados **positivamente**, como DEAE celulosa (contiene grupos  $\text{NH}^+$ )



# Carga total de la proteína

La carga de la proteína se va a poder manipular debido a la capacidad de los aminoácidos de funcionar como **zwitterion**.



Resin Type	Cation Exchanger	Anion Exchanger
Net charge of molecule of interest	+	-
Charge of resin	-	+
Running conditions	0.5–1.5 pH units below the pI of the molecule of interest	0.5–1.5 pH units above the pI of the molecule of interest

# Macro-prep High S (Bio-rad)

Resina de intercambio catiónico, que contiene grupos funcionales **sulfonato** fijados a una matriz de metilacrilato.

Ideal para purificar proteínas básicas y neutras.

## Properties of Macro-Prep High S Support

Type of support	Strong cation exchanger
Functional group	$-\text{SO}_3^-$
Typical dynamic binding capacity*	$\geq 49 \text{ IgG/ml}$
Nominal particle size	50 $\mu\text{m}$
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

# Cromatografía de afinidad

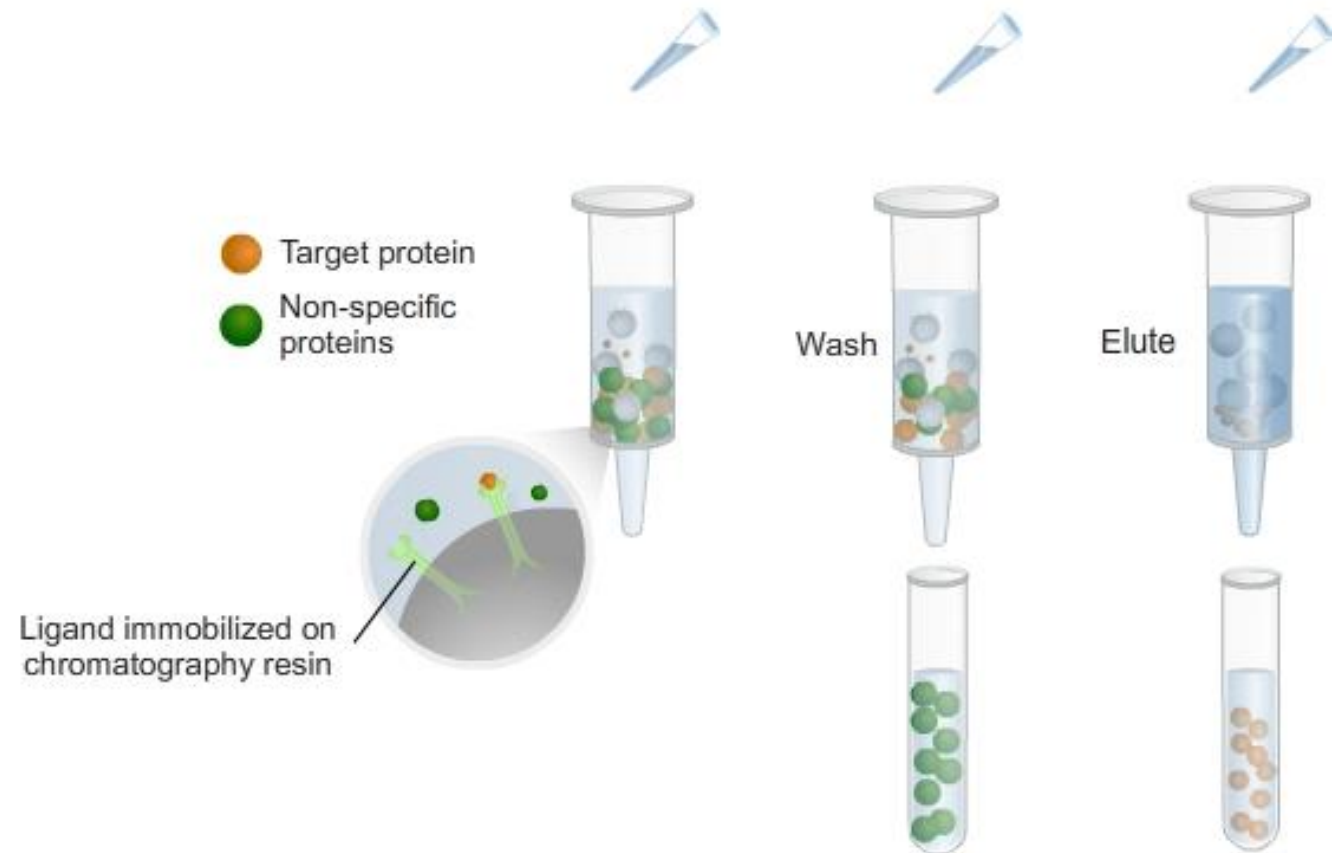
Es el método más poderoso para el enriquecimiento de la proteína de interés en una mezcla compleja, se basa en la afinidad que presenta la proteína por una molécula, éstas interacciones pueden ser:

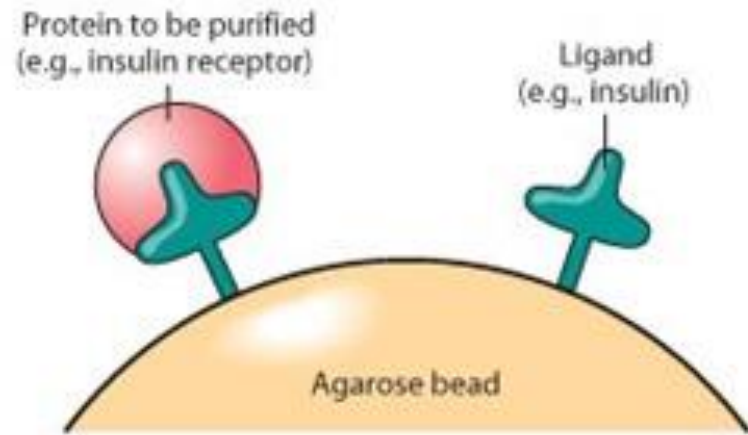
Proteína – Ligando

Enzima – Análogo de Sustrato,  
Inhibidor o Cofactor

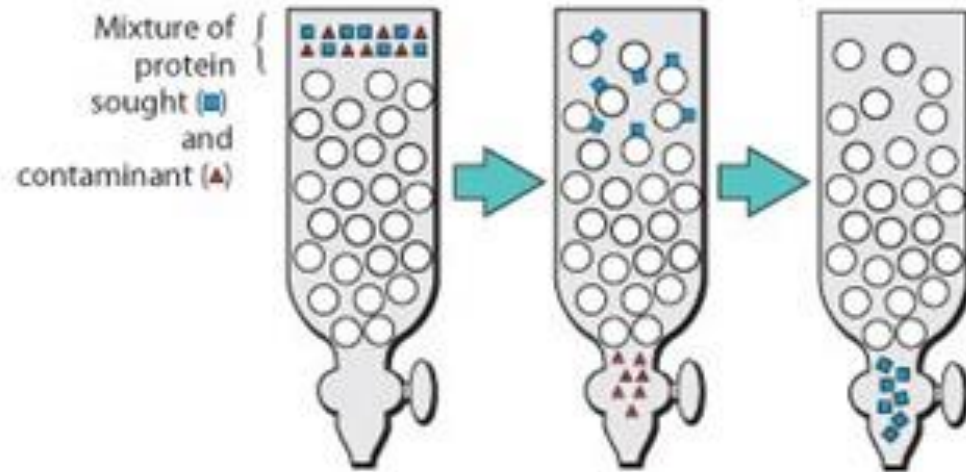
Receptor – Hormona

Anticuerpo – Antígeno

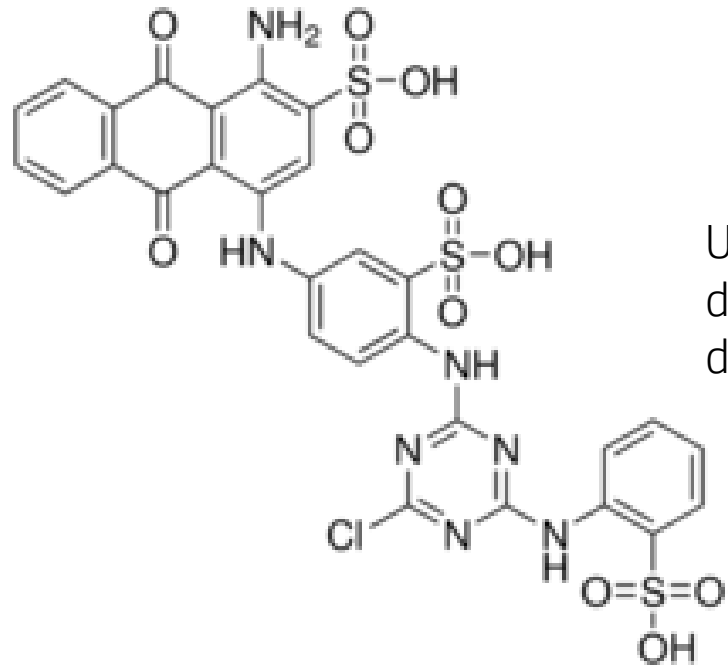




Para aumentar la eficiencia de unión entre proteína y ligando, se añaden unos **brazos espaciadores** entre el ligando y la matriz.

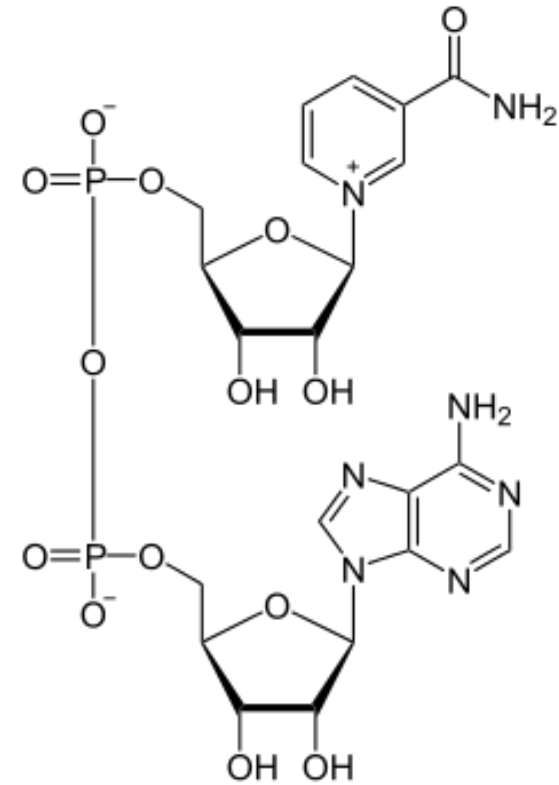


# DEAE-Affi-gel Blue



Cibacron Blue 3G-A

Unión análoga por el a  
dominio de unión a  
dinucleótidos de la LDH



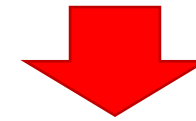
NAD<sup>+</sup>



Se hace pasar la mezcla de proteínas por la columna.

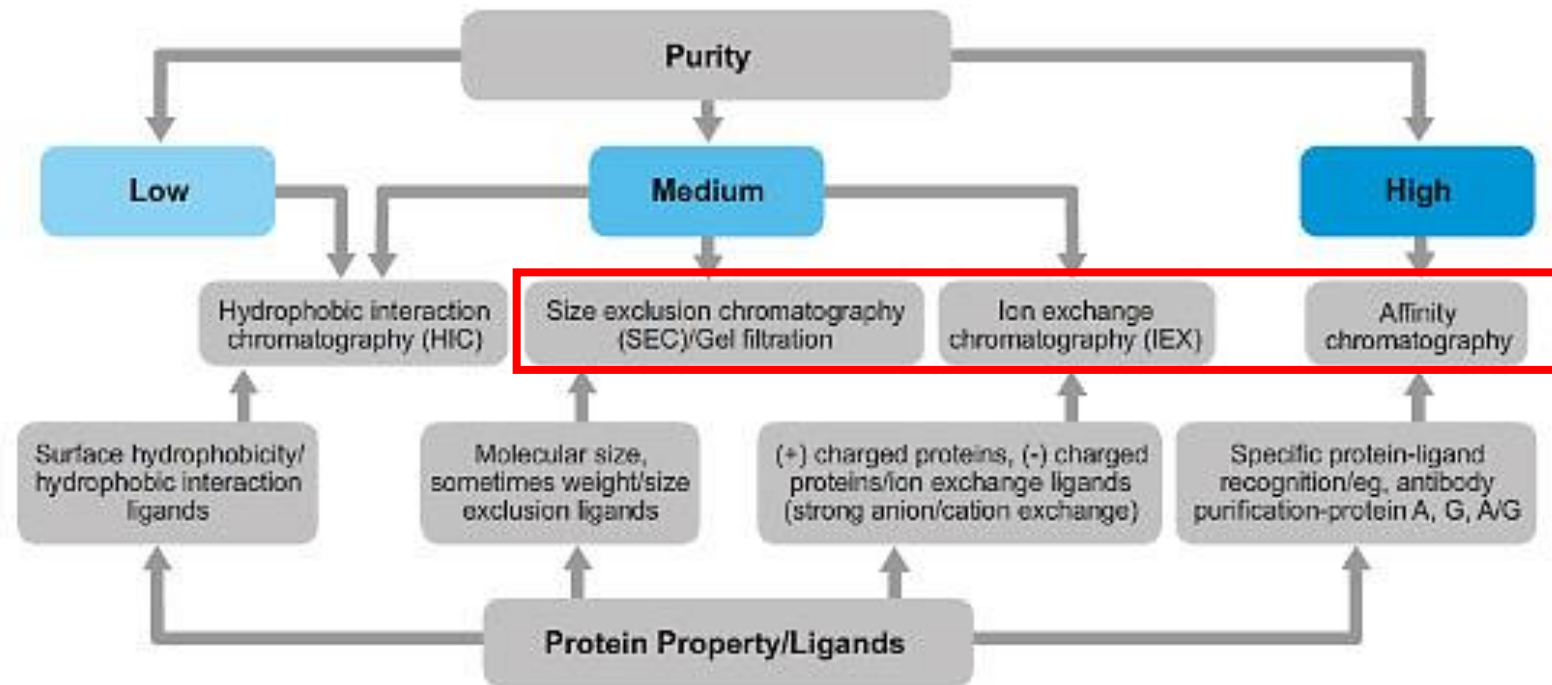


Unión de la proteína de interés  
+  
Unión de proteínas no específicas



Lavados para eliminar a las proteínas contaminantes.

# Comparación entre las diferentes cromatografías.



HIC, SEC, IEX

- Isolation of novel proteins
- Affinity chromatography not available
- Purity protein dependent

Ion exchange and affinity chromatography are the most commonly used chromatographic strategies for partial or 1-step purification.



# Ventajas de utilizar la cromatografía como técnica de separación.

Capacidad de usar las propiedades fisicoquímicas de las biomoléculas.

Se evitan varios pasos de purificación, en algunos casos incluso puede realizarse la cromatografía como una purificación en un solo paso.

Se obtienen altos rendimientos y una buena actividad enzimática.

Se pueden separar proteínas, enzimas, anticuerpos y receptores de manera sencilla.