

CARRERA DE ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL FCEyN-INTI

Materia de Especialización CEBI_E1b
Técnicas de análisis en biotecnología
Macromoléculas

Docente a cargo: **SANTAGAPITA, Patricio**

CEBI_E1b: *Cromatografía*

Temario clase de hoy

1. Conceptos básicos y tipos de columnas
2. Tipos de cromatografías
 - a. *Size exclusion chromatography* (también llamada *Molecular Sieve* o *Gel filtration*).
 - b. *Ion exchange chromatography* (catiónica y aniónica)
 - c. *Affinity chromatography*
 - c1. *Hydrophobic interaction chromatography (HIC)*

Cromatografía – Tipos

Property	Technique
Biorecognition (ligand specificity)	Affinity chromatography
Charge	Ion exchange chromatography
Size	Gel filtration (sometimes called size exclusion)
Hydrophobicity	Hydrophobic interaction chromatography Reversed phase chromatography

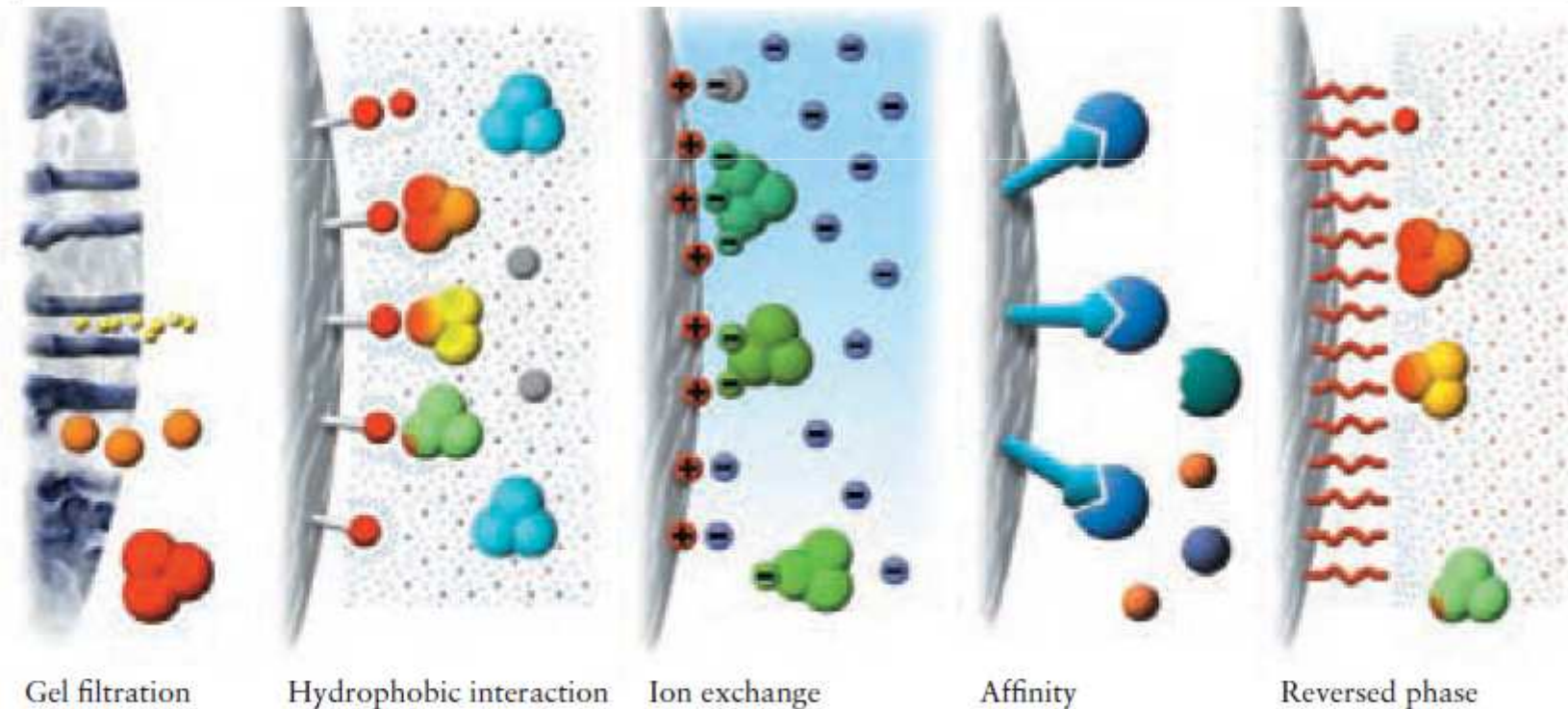
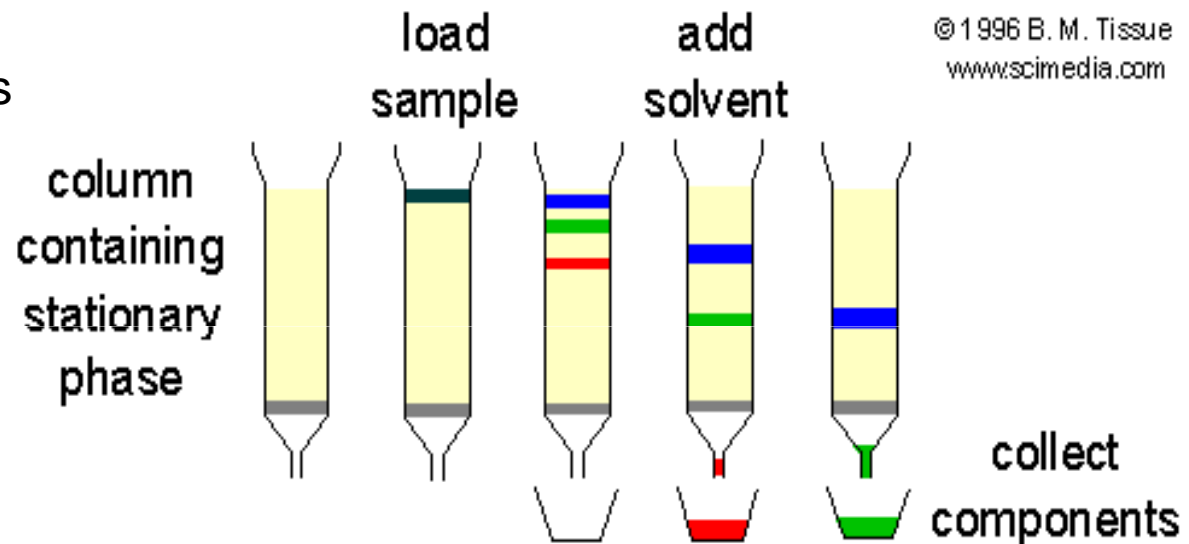


Fig. 1. Separation principles in chromatographic purification.

Cromatografía

Generalidades

Se pasa por la columna una mezcla de proteínas



Por alguna razón (diferencias de radio hidrodinámico -tamaño + forma), diferentes afinidades de unión de la columna de la matriz o por interacciones electrostáticas), algunas macromoléculas se mantienen más tiempo en la columna (y en ese caso eluyen posteriormente) y otras se retienen menos (en ese caso eluyen antes).

Cromatografía

Generalidades/ terminología

Columna de fase sólida ("matriz", "resina", por lo general algún tipo de polímero, a menudo un polisacárido) colocado en un tubo de vidrio

- **adsorbente**: material sólido o de la matriz, una "fase estacionaria" a la que algunas moléculas se unen
- **elución**: el proceso de lavado de aquello que quedó absorbido (con un *buffer* de elución)

Cromatografía

Cromatografía de exclusión molecular

Animación de la técnica (*GE Healthcare*)

http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc29091645_20140915112231.swf



BIORAD ©

Otra opción:

<http://www.wiley.com/college/fob/quiz/quiz05/5-6.html>

Cromatografía

Principios de SEC

- **Las cápsulas o filtros moleculares se basan en el tamaño y forma**
- **La separación de las moléculas se llama fraccionamiento y se basa en el radio hidrodinámico de la molécula**
- **El tamaño de poro de las cápsulas determina el límite de exclusión y por lo tanto lo que pasa **POR** las cápsulas o **ALREDEDOR** de estas**

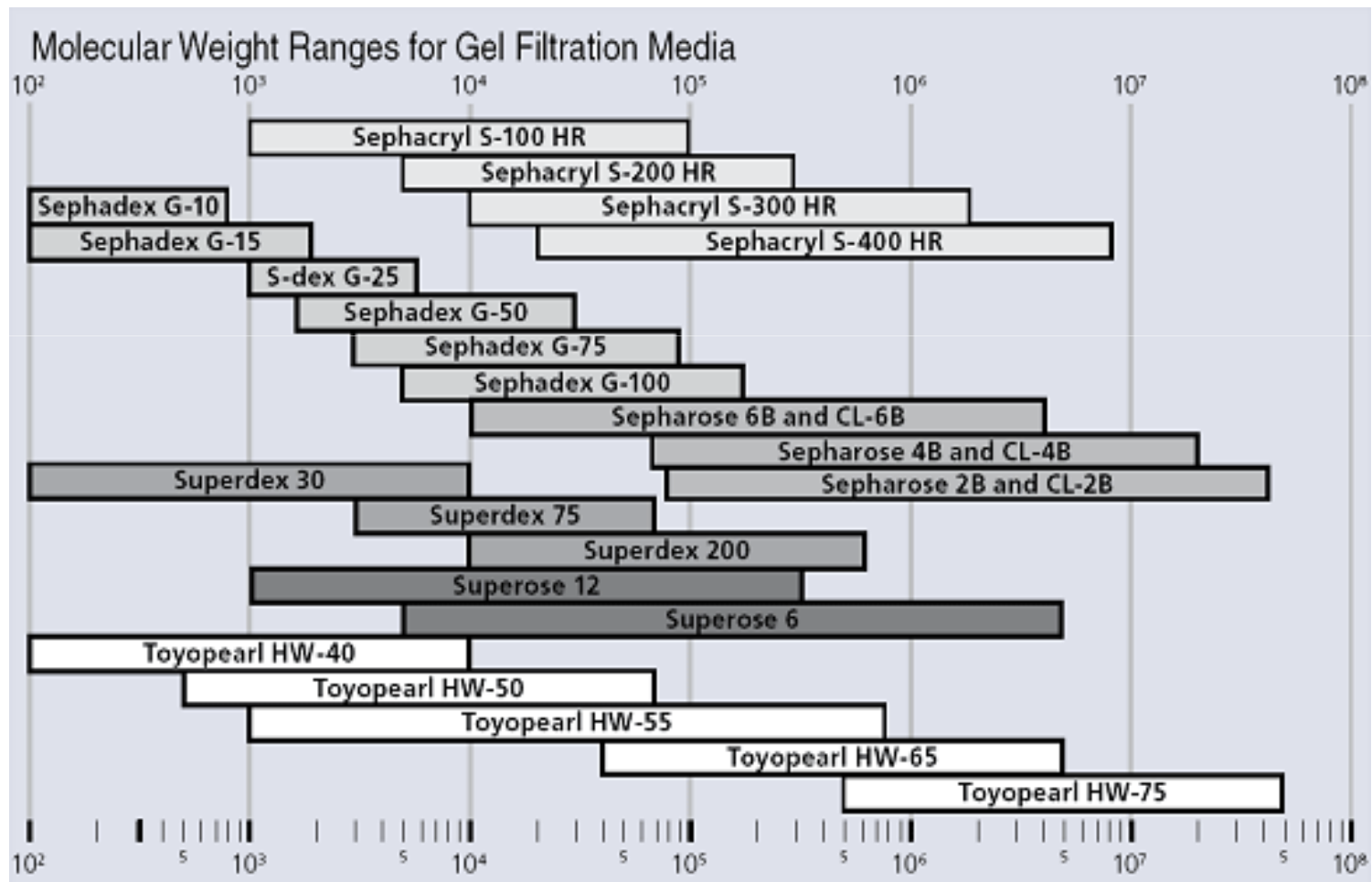
SEC

Hay **varios tipos** de *beads* (cápsulas) disponibles (hidratadas, de polisacáridos porosos (dextrano, agarosa) o de poliacrilamida) que cubren rangos muy amplios

El volumen de *buffer* requerido será función del **radio hidrodinámico** de las moléculas. Si son de forma similar, la separación será básicamente por tamaño

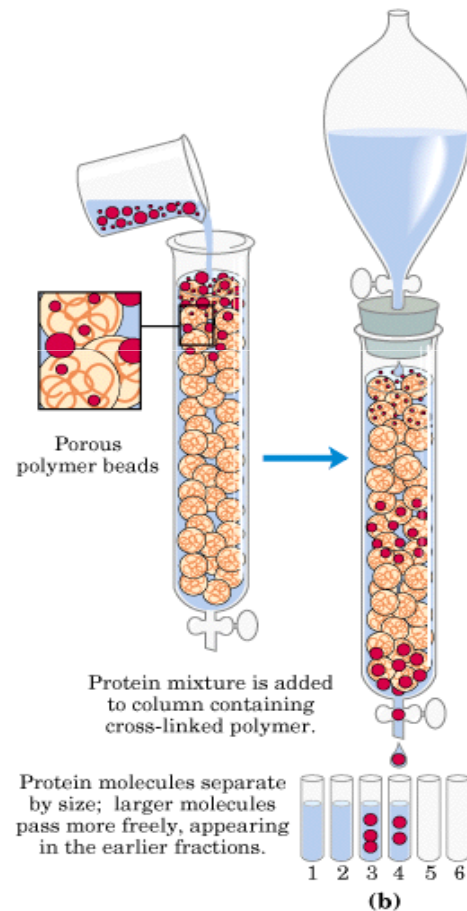
Cromatografía

SEC



Cromatografía

SEC



- Las cápsulas de las columna poseen poros pequeños. Hay tamaños de poros variables
- Las moléculas **más grandes que el poro** viajarán **rápidamente** por la columna, ya que no entran entre los poros
- Las moléculas **más pequeñas que el poro** pasarán por estos y **tardarán mucho más tiempo** en eluir de la columna

GRAN DIFERENCIA CON
ELECTROFORESIS

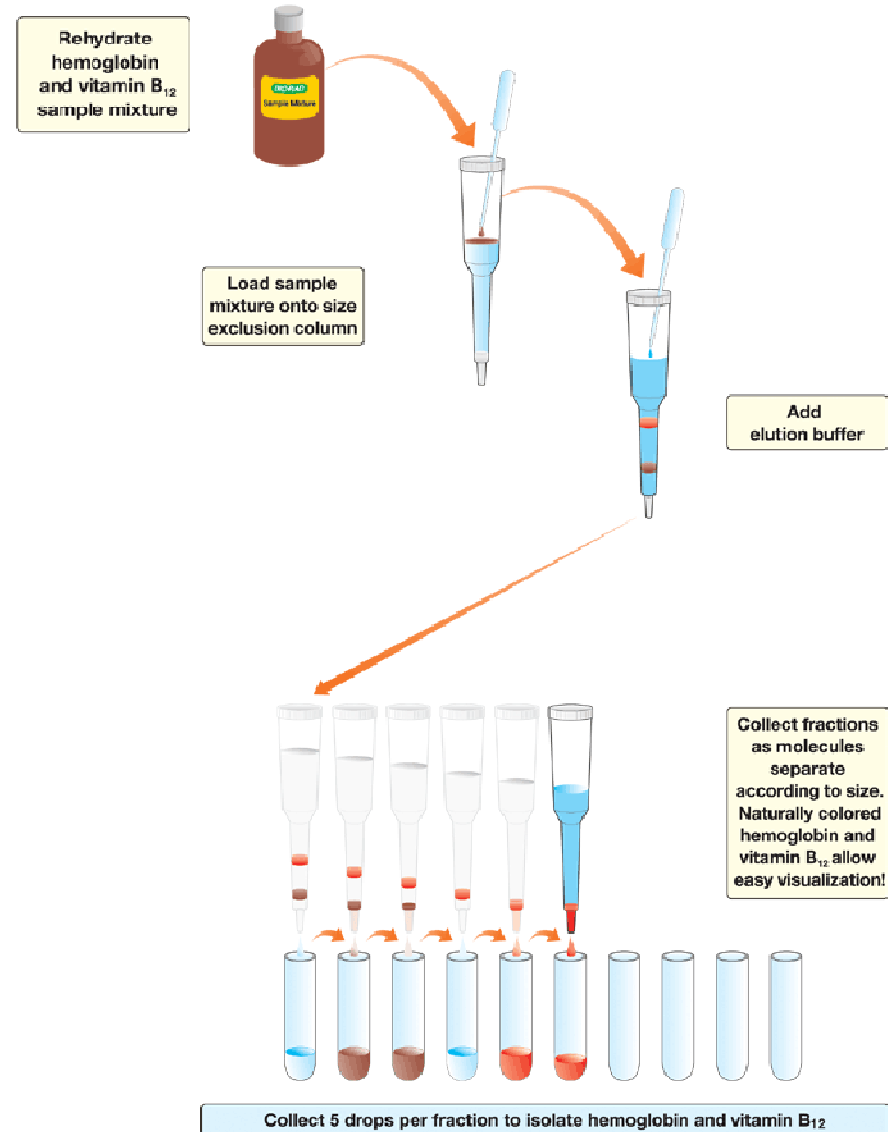
SEC

Procedimiento

Existen kits comerciales fáciles de utilizar



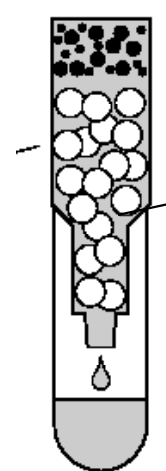
BIORAD ©



Cromatografía

Principios de SEC

Asociar quién eluye primero o después con la “distancia” que recorrió cada molécula de una mezcla.



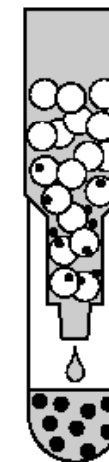
Fraction 1

A mixture of large and small proteins is applied to a column of porous beads.

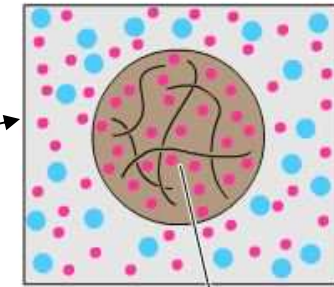


Fraction 2

As the buffer flows down the column, the small protein molecules penetrate into the beads and are slowed.



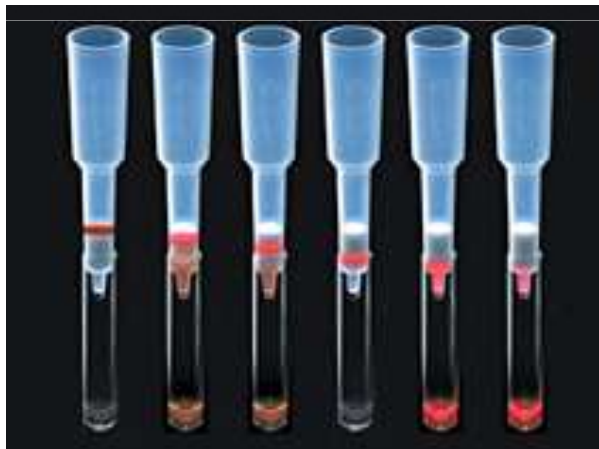
Fraction 3



Cromatografía

SEC

**Ejemplo: mezcla
de: hemoglobina
y vitamina B12**

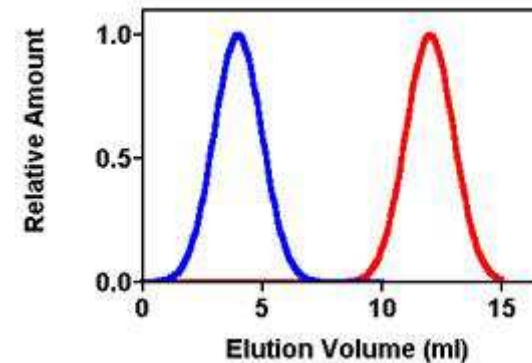


- **La hemoglobina posee color rojo-marrón y su PM es de 65 KDa**
- **La vitamina B12 es rosa y su PM es de 1,35 KDa**
- **Si el límite de exclusión de las cápsulas es de 60 KDa, quién eluye primero?**

La hemoglobina eluye primero, mientras que luego la vitamina B12

SEC

Detección (caso del ejemplo)



Calibración de la columna

- construcción de curva de calibración a partir de la determinación del volumen de elución en proteínas de PM conocido
- uso de estándar interno

SEC

Det. PM polímero modificado (basado en alginato de sodio).

Cal. Patrones de pululanos en el rango de 5.800 a 1.600.000

V_{iny} : 200 μ L

Fase móvil:

Buffer pH7

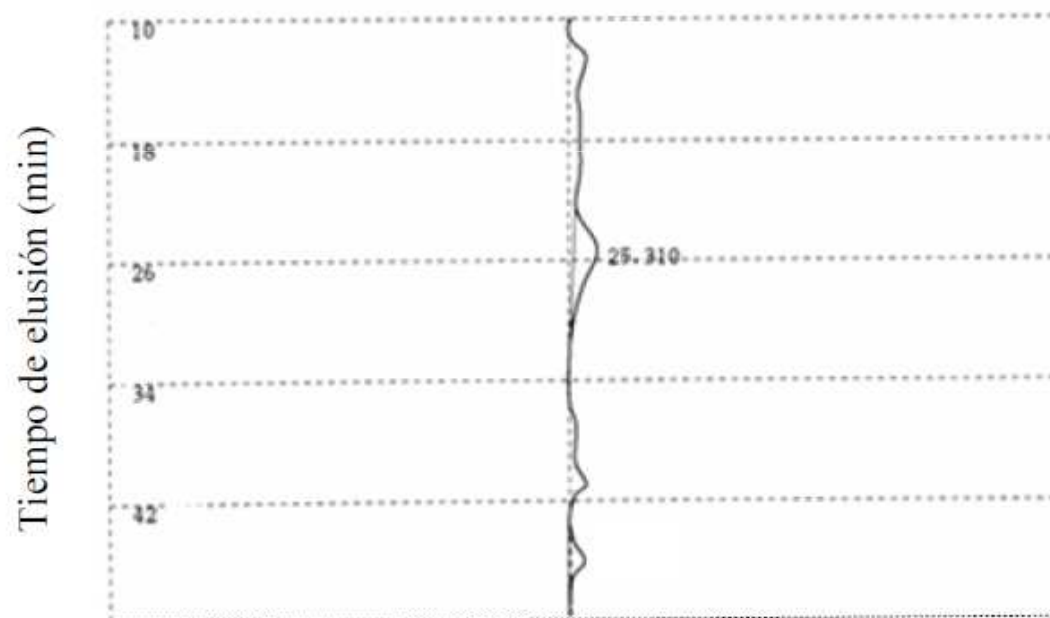


Figura 4.14. Cromatograma de elusión obtenido por cromatografía en geles de permación (GPC) del biopolímero ACD y patrones para su determinación del peso molecular y polidispersidad.

Cromatografía

Cromatografía de afinidad

Animación de la técnica (*GE Healthcare*)

http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314750913712/litdocGE_Affinity_20140706224433.swf

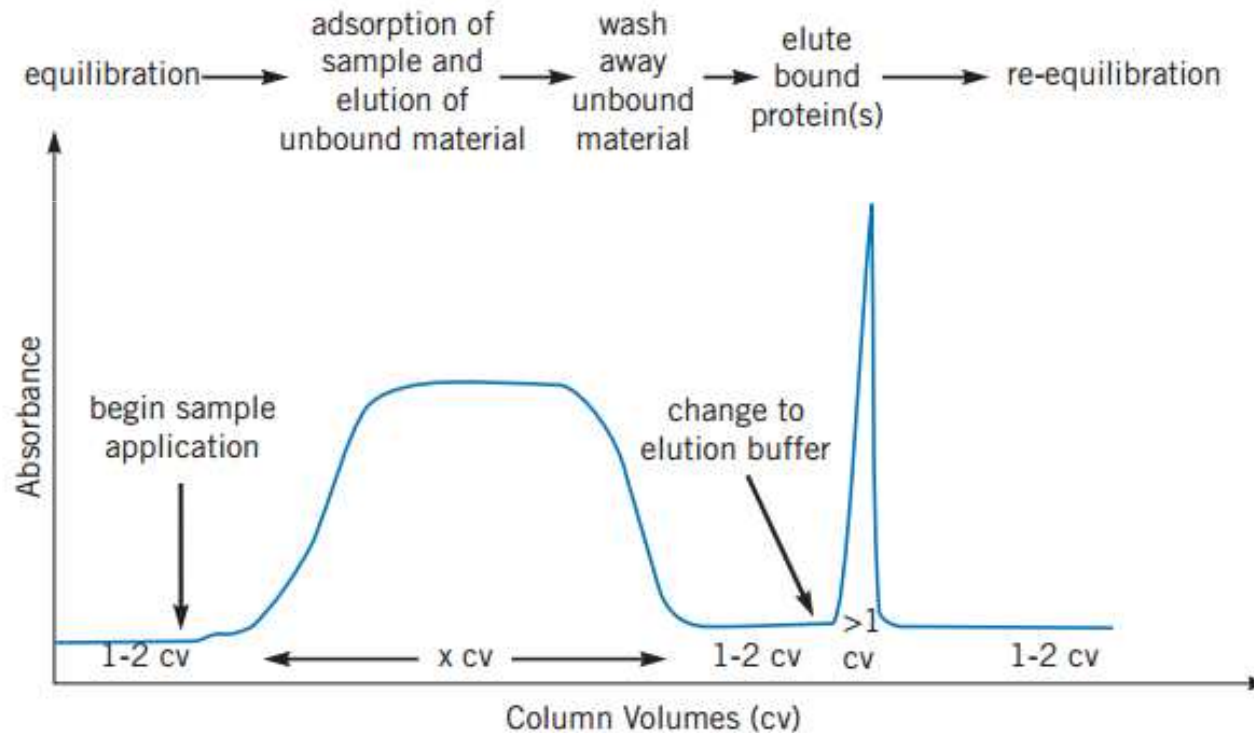
Uso de ligandos específicos unidos covalentemente a la columna

Fundamento de la separación: adsorción reversible de los ligandos a la matriz



Cromatografía

Cromatografía de afinidad Etapas (descripto en video)



Ejemplos de columnas afinidad comerciales

Applications for Affinity Media

Affinity Class	Potential Application
Activated / Functionalized	Functional spacer; support matrix; eliminates handling of toxic reagents
Amino Acid	Serum proteins; proteins; peptides; enzymes; rRNA; dsDNA
Avidin Biotin	Purification of biotin/avidin & derivatives; biotinylated substances. Biotin derivatives dissociate under nondenaturing conditions.
Carbohydrate Binding	Soluble glycoproteins ; other carbohydrate-containing substances
Carbohydrate	Glycoproteins; lectins; other carbohydrate metabolite proteins. Proper selection can ensure one-step purification.
Dye Ligand	Nonspecific interaction. Mimic biological substrates (substrates, cofactors, effectors); proteins. Optimize purification protocol with different dyes
Glutathione	Purification of glutathione enzymes and GST tagged recombinant proteins
Heparin	General affinity ligand, useful for plasma coagulation proteins, nucleic acid enzymes, lipases, etc.
Hydrophobic Interactions	Couple ligands containing free carboxyl groups; proteins
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography. Uses interactions between protein and chelated metal to separate.
Immunoaffinity	Quantitative determination of antigens, high specificity
Nucleotide / Coenzyme	Dehydrogenases; kinases; transaminases. Reliable adsorbents.
Nucleic Acid	mRNA; DNA; rRNA; other nucleic acids and oligonucleotides
Protein A / Protein G	Purification of immunoglobulins
Speciality	Purification of specific classes or types of proteins, coenzymes, or physiological partners

SIGMA
ALDRICH ©

Cromatografía



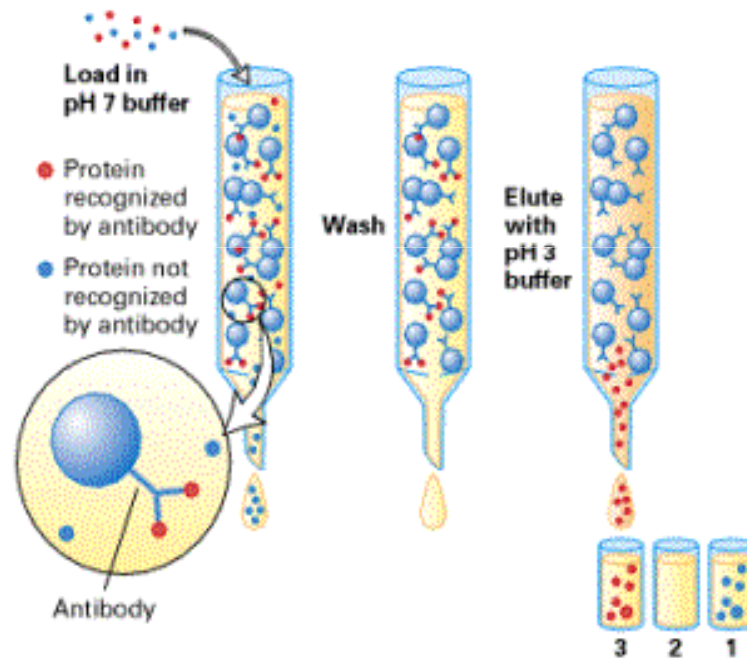
Cromatografía de afinidad

Algunas propiedades físicas de las resinas utilizadas

Physical properties of affinity chromatography resins.			
Support	4% crosslinked beaded agarose	6% crosslinked beaded agarose	UltraLink Biosupport (acrylamide-azlactone polymer)
Bead size	45-165µm	45-165µm	50-80µm
Exclusion limit	20,000 kDa	4,000 kDa	2,000 kDa
Durability	crushes under high pressure	crushes under high pressure	sturdy (>100 psi, 6.9 bar)
Methods	gravity-flow or low-speed centrifugation	gravity-flow or low-speed centrifugation	FPLC Systems, HPLC, gravity flow
Coupling Capacity	medium	medium	high
pH range	3-11	3-11	1-13
Form	preswollen	preswollen	dry or preswollen

Cromatografía

Cromatografía de Afinidad



Ej.: inmunoafinidad

- Usa *tags* de afinidad
 - permiten que las moléculas se unan a la columna
 - pueden ser específicos hacia la proteína de interés
- Aquellas proteínas que no se unen pasan rápidamente por la columna
- Se usa un *buffer* para luego eluir las proteínas que si se unieron

Cromatografía de afinidad

Buffer de elución: dependiendo de la columna, se usan o una diferencia en pH (se baja el mismo) o se utiliza un *buffer* con el ligando libre específico de la columna (depende de disponibilidad/costo) que compite por la unión en la columna con la molécula de interés

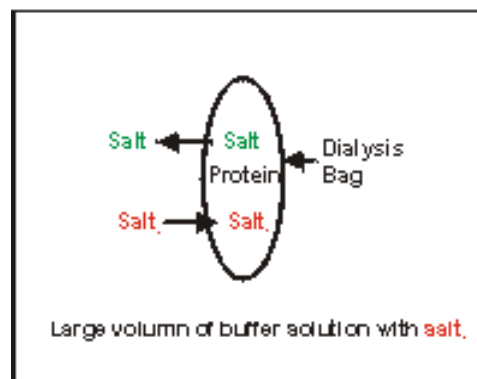
Cromatografía de afinidad

Algunos ejemplos
de *buffer* de elución

Common elution buffers systems for protein affinity purification.	
Condition	Buffer
pH	100 mM glycine•HCl, pH 2.5-3.0 100 mM citric acid, pH 3.0 50-100 mM triethylamine or triethanolamine, pH 11.5 150 mM ammonium hydroxide, pH 10.5
Ionic strength and/or chaotropic effects	3.5-4.0 M magnesium chloride, pH 7.0 in 10 mM Tris 5 M lithium chloride in 10 mM phosphate buffer, pH 7.2 2.5 M sodium iodide, pH 7.5 0.2-3.0 sodium thiocyanate
Denaturing	2-6 M guanidine•HCl 2-8 M urea 1% deoxycholate 1 % SDS
Organic	10% dioxane 50% ethylene glycol, pH 8-11.5 (also chaotropic)
Competitor	>0.1 M counter ligand or analog

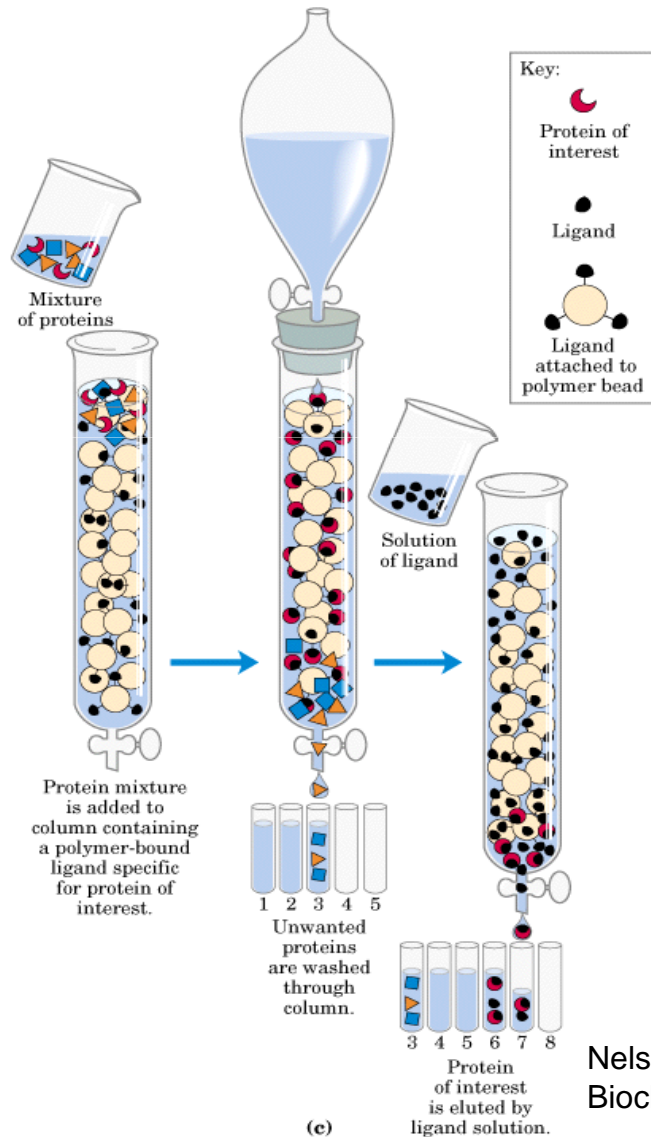
Cromatografía de afinidad

Si luego se debe separar las macromoléculas de ligandos pequeños o realizar un cambio de buffer (si requiero pasar de una columna a otra, por ej.): **DIALISIS**
(uso de membranas semi-permeables a diferentes PM)



Cromatografía

Cromatografía de afinidad



Nelson & Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed.

Patricio Santagapita_CEBI_E1b

Cromatografía de afinidad

muy usadas:

- **cromatografía de inmunofinidad**: se usan anticuerpos inmovilizados en la columna
- ***polyHis tags***= la columna posee iones Ni^{2+} (o Cu^{2+} , Co^{2+} o Zn^{2+}) que unen al grupo imidazol de las histidinas puestas ad hoc en la producción *in vivo* de proteínas recombinantes en el C-terminal. Se utiliza luego un *buffer* con imidazol para eluir.
- **cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)**.

Cromatografía

Cromatografía de afinidad

Elusión usando buffer con imidazol – *His tag proteins*

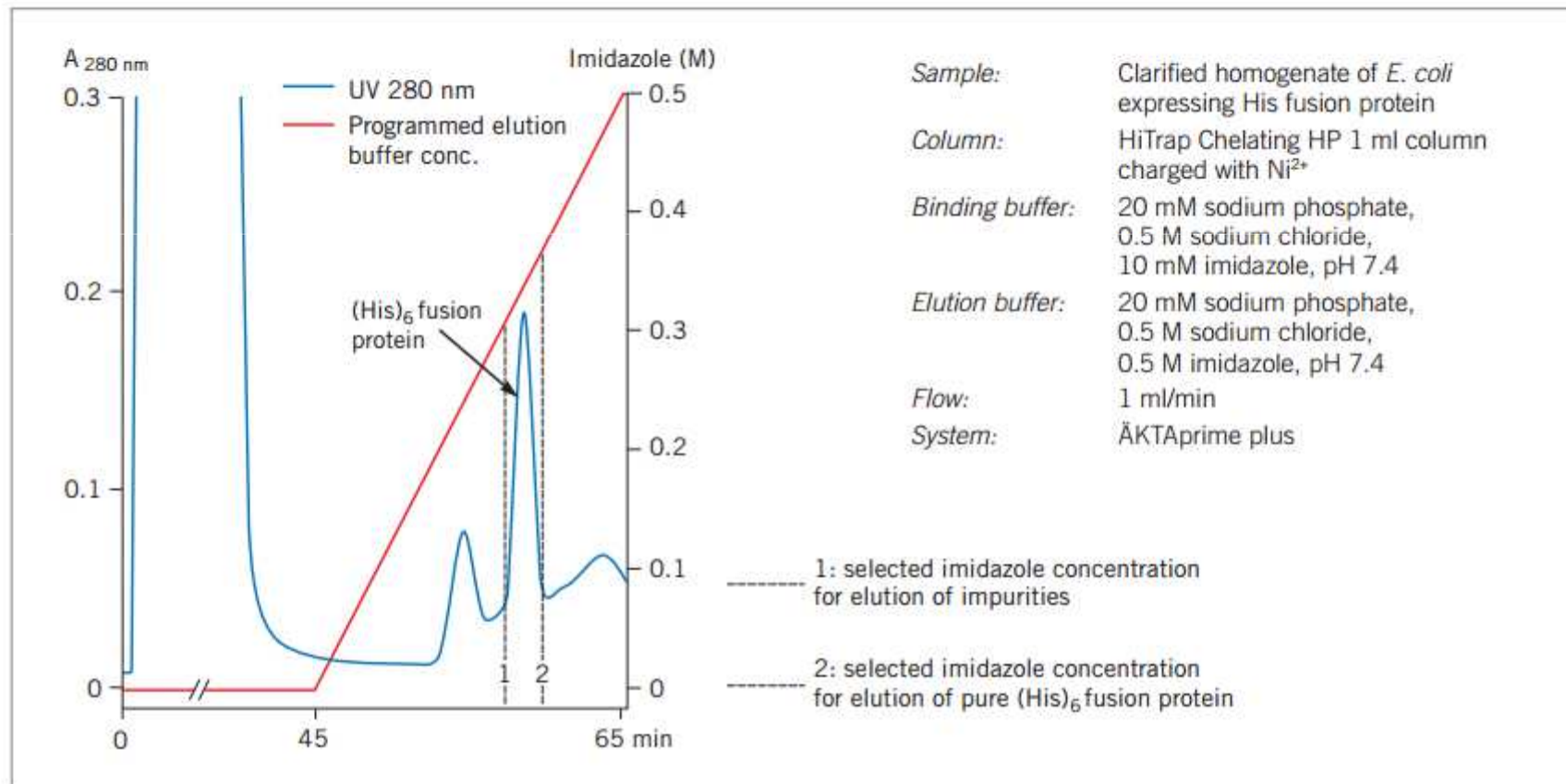


Fig. 7. Gradient elution of a (His)₆ fusion protein.

Cromatografía

Cromatografía de afinidad

Elección de pH óptimo para elusión – IgG (usando un gradiente)

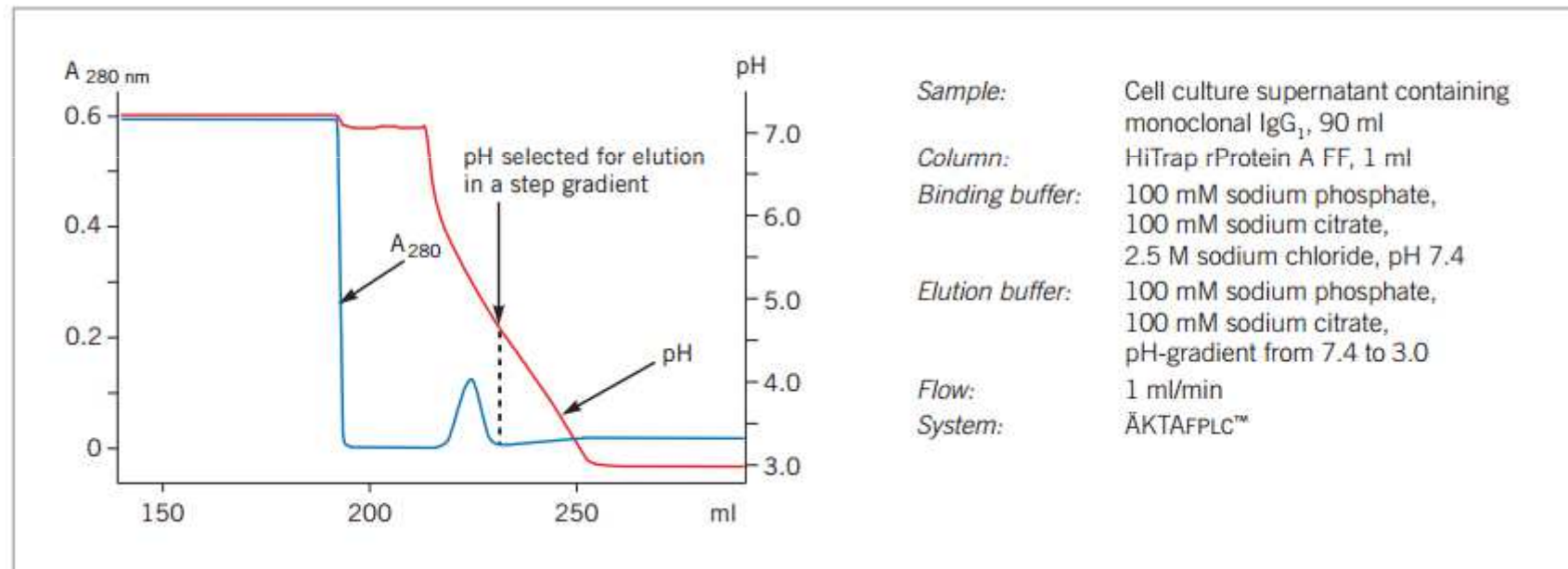
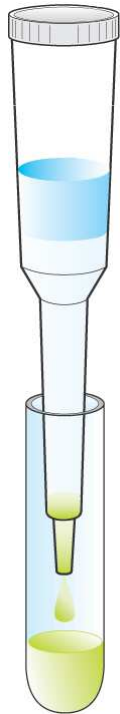


Fig. 8. Scouting for optimal elution pH of a monoclonal IgG₁ from HiTrap rProtein A FF, using a pH gradient.

Cromatografía

Cromatografía de interacción hidrofóbica *HIC*



BIORAD ©

- **Las cápsulas de la columna son hidrofóbicas**
- **La columna se trata con un *buffer* de elevada concentración salina**
- **Aquellas proteínas que son hidrofóbicas se unen a las cápsulas**
- **Un *buffer* de bajo contenido de sal eluye las proteínas menos hidrofóbicas**
- **Un *buffer* sin sales eluye las proteínas de interés**

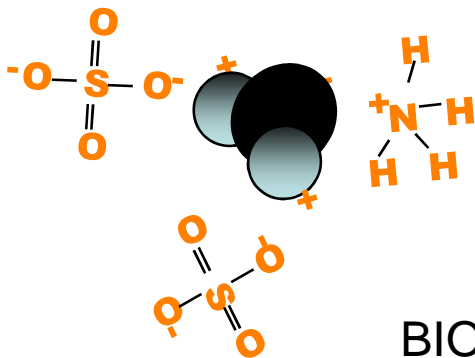
Patricio Santagapita_CEBI_E1b

Cromatografía

Paso 1: *HIC*

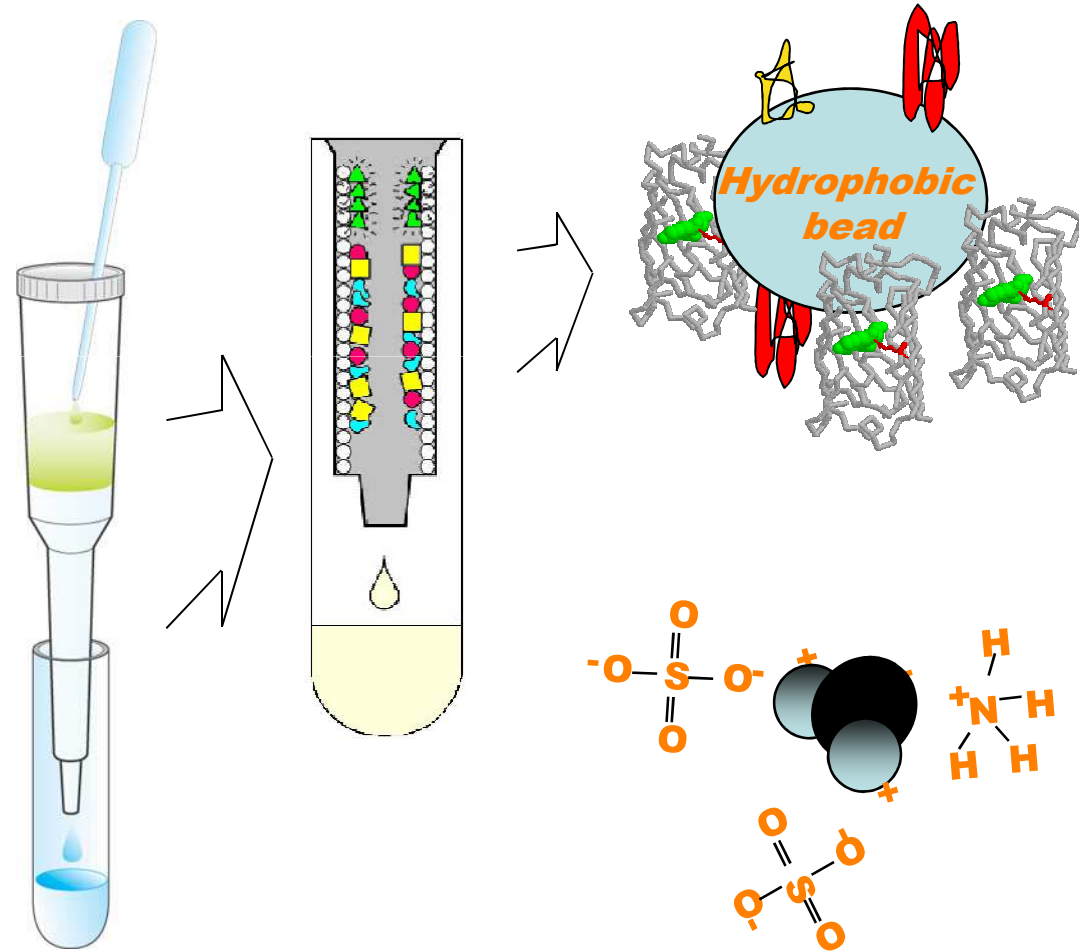
La muestra se adiciona a la matriz junto con un buffer de **alto contenido de sal**

- Las proteínas hidrofóbicas interactúan con la columna
- Los iones de la sal interactúan con proteínas menos hidrofóbicas y con agua



BIORAD ©

ej. proteína recombinante con GFP



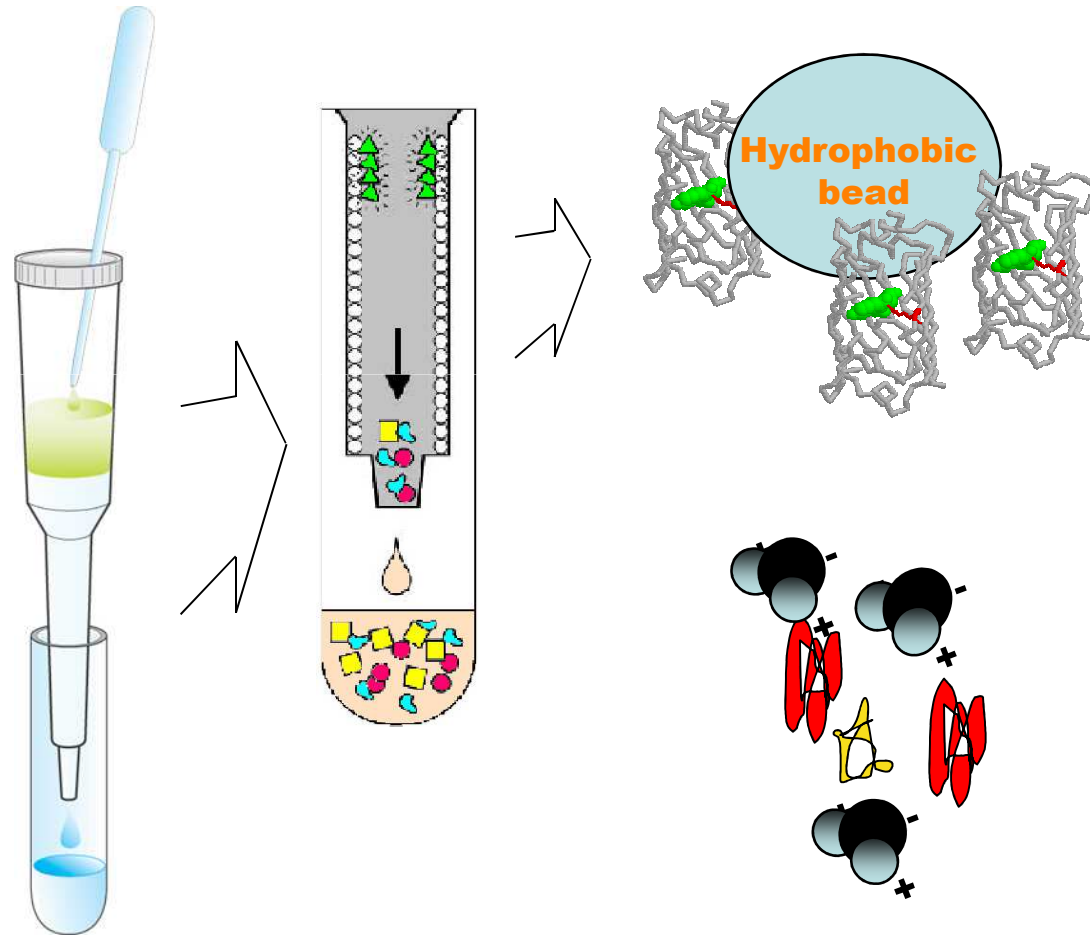
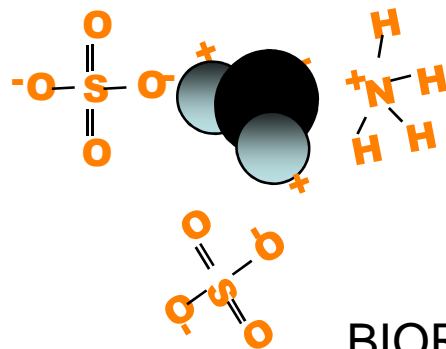
1-2 M sulfato de amonio; 3 M cloruro de sodio

Cromatografía

Paso 2: HIC

Lavar las proteínas menos hidrofóbicas de la columna con buffer con **bajo contenido de sal**

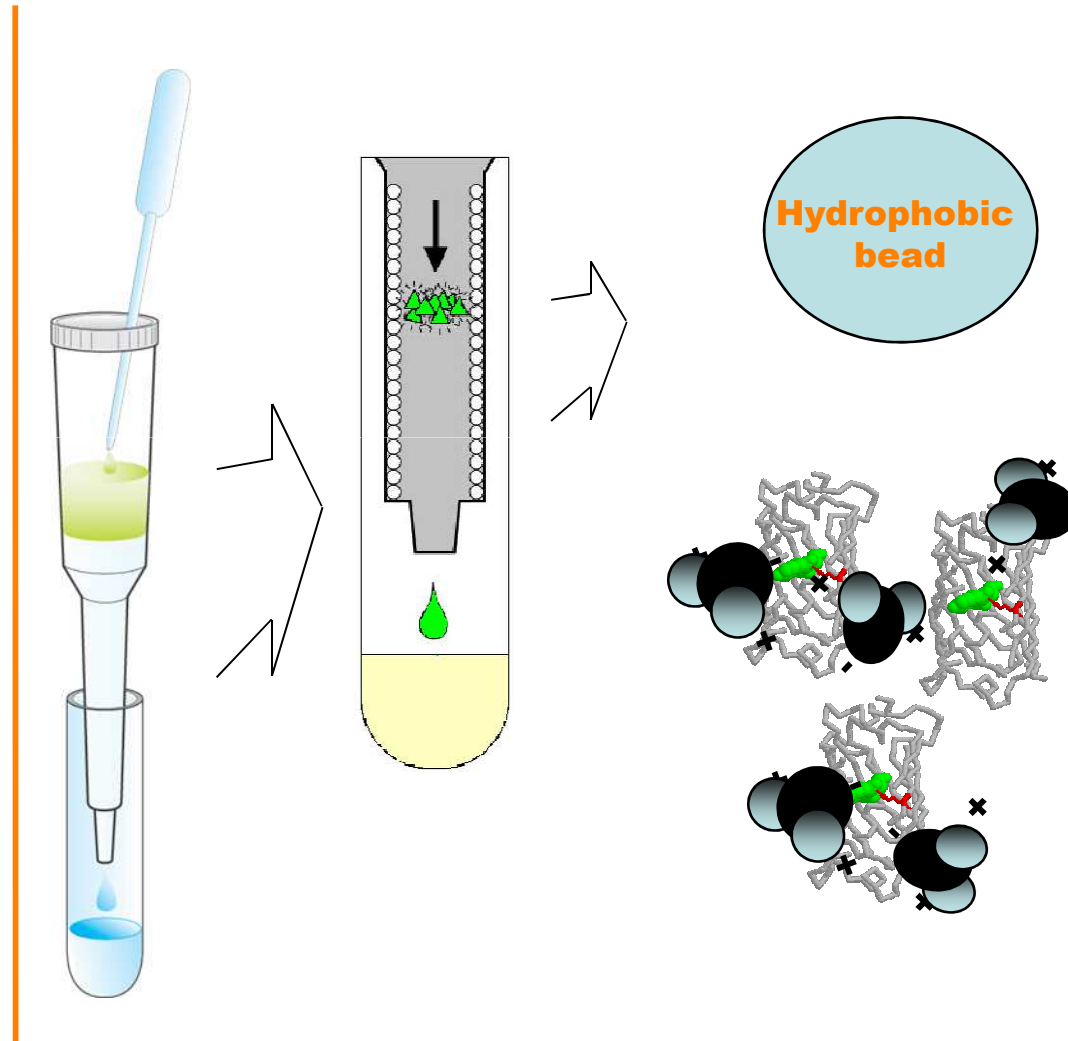
- Así se eluirán las proteínas menos hidrofóbicas
- mi proteína de interés quedará unida a la columna



Cromatografía

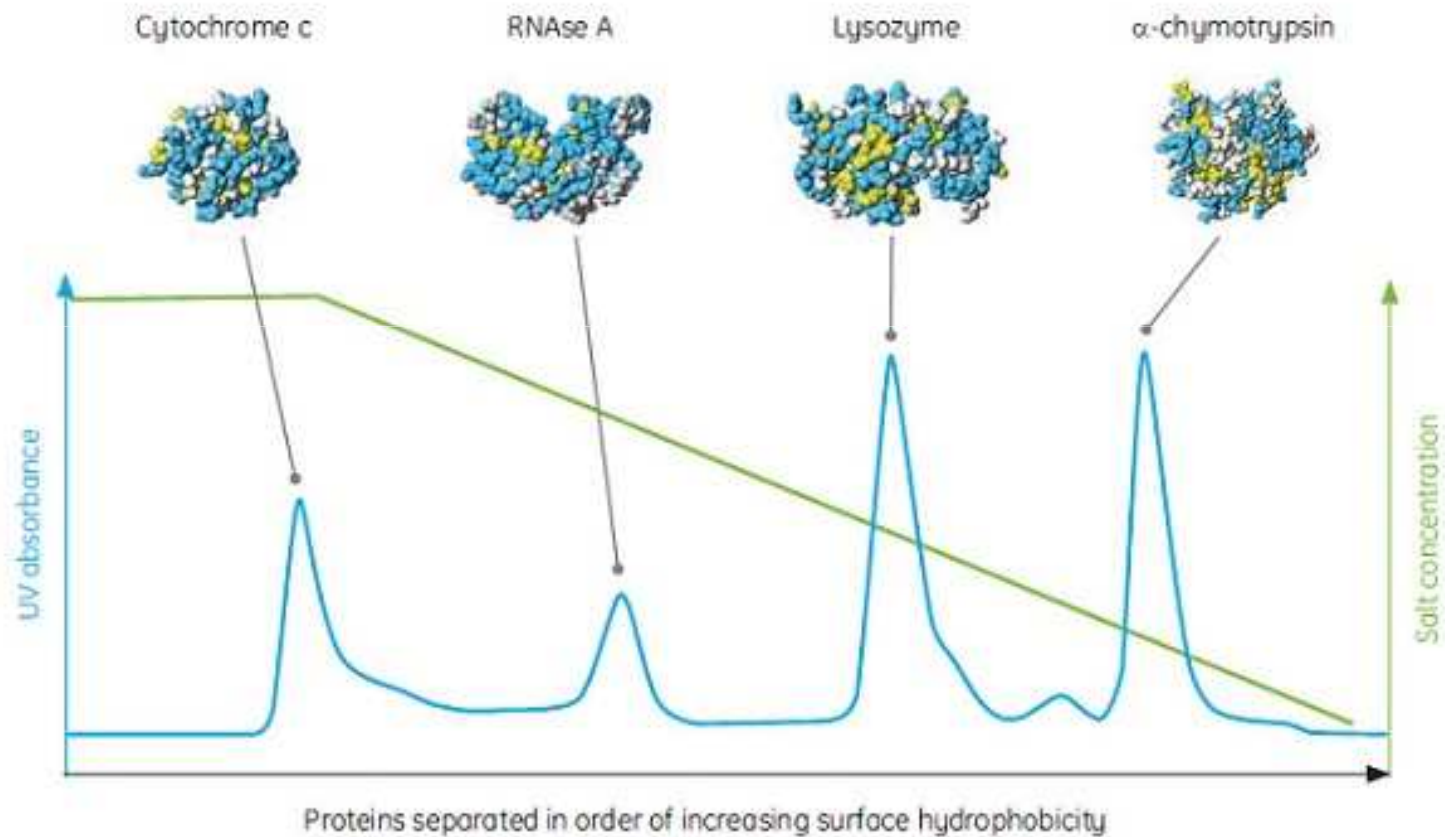
Paso 3: HIC

La proteína de interés se eluye de la columna con un *buffer* sin sales



Cromatografía

HIC



Cromatografía

Cromatografía de afinidad

- *polyHis tags*

Purificación de una proteína con tag de histidinas a partir de un extracto sin purificar.

Otro muy usado es GST tag (*glutathione S-transferase*), y muchas veces se utilizan en combinación.

La enzima unirá a su substrato.

GST: 211 aa (26 kDa).

Brochure: http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc28935364_20140706223607.pdf

Cromatografía

Cromatografía de afinidad

Ejemplos de *kits*:

http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-ar/products/AlternativeProductStructure_17312



Affinity Coupling

Activated chromatography media (resin) enable you to covalently immobilize a ligand to a suitable affinity medium without the need for chemical synthesis or special equipment



Group Specific Affinity

Group-specific chromatography media utilize ligands that bind specific classes of biomolecules



Immobilized Lectin

Lectin affinity chromatography is a widely used for the purification of glycoproteins



Immobilized Nucleotide and Nucleic acid Affinity

Immobilized nucleotides purify a wide diversity of proteins such as kinases and motor proteins



GST-Tagged Protein Purification

GST-tagged proteins are conveniently purified with Glutathione Sepharose chromatography media



Histidine-Tagged Protein Purification

Polyhistidines are a widely used affinity tag on recombinant proteins



MBP-Tagged Protein Purification

Maltose binding protein (MBP)-tags are well-suited for the purification of inclusion bodies



Metal Chelate Affinity

Metal chelate affinity purifies most proteins with exposed histidine, cysteine, and tryptophan residues

Cromatografía de afinidad + permeación

[Ver animación](#)

http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc3Dkit.swf_20120420125305.swf

Cromatografía

Cromatografía de intercambio iónico

Animación de la técnica (*GE Healthcare*)

http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdocGE_IonExchange_20130407221710.swf

Ej. de resina aniónica (+)

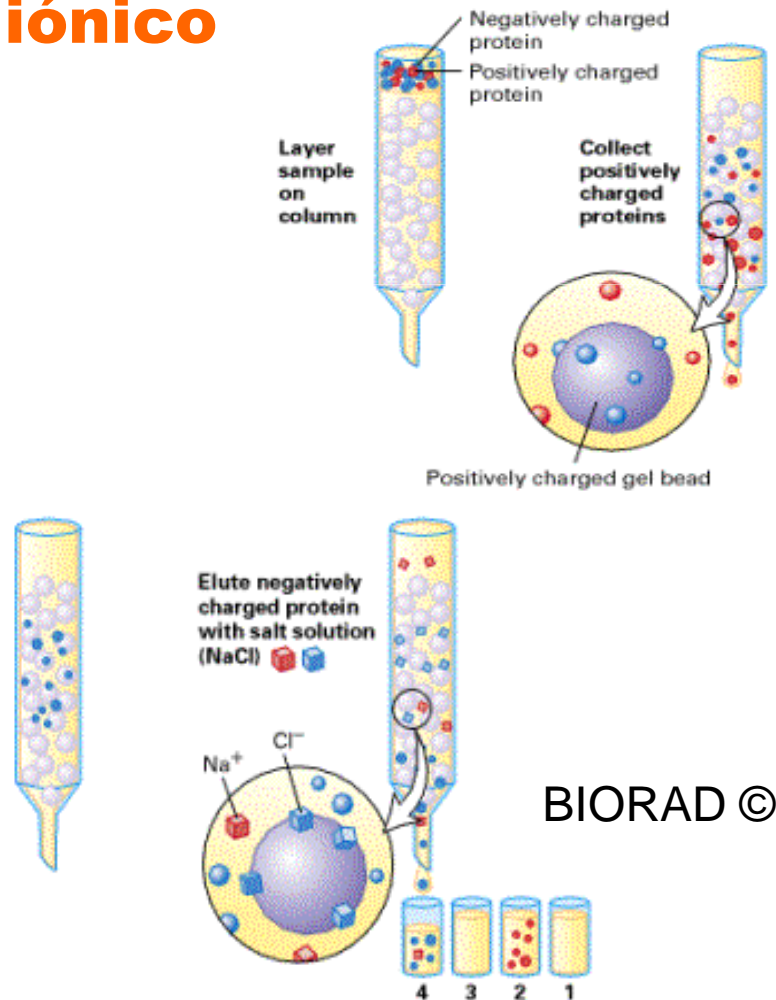
<http://www.wiley.com/college/fob/quiz/quiz05/5-5.html>

Ej. general – independiente de la resina-

Fundamento de la unión: **interacciones electrostáticas**

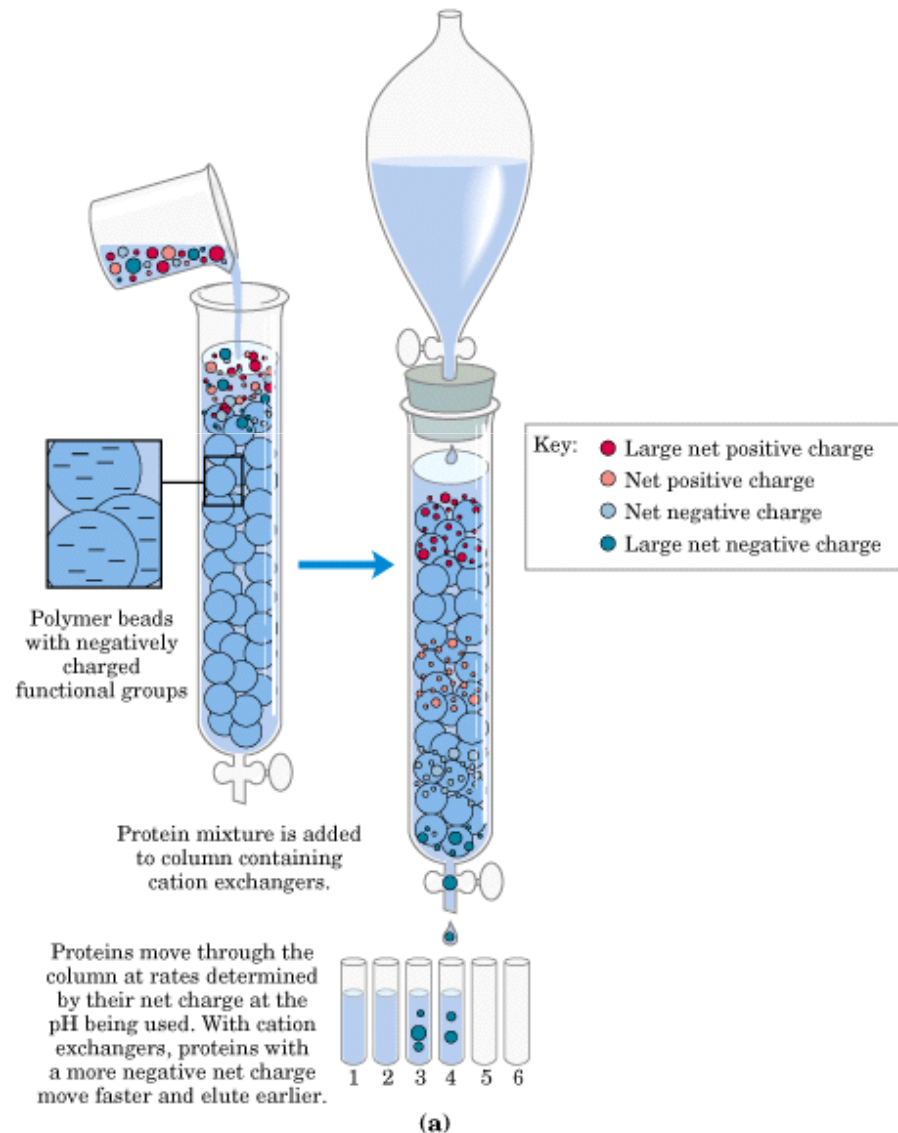
Cromatografía

Cromatografía de intercambio iónico



- **Las cápsulas de la columna están cargadas:**
 - positivamente (+) - aniónica (ej. grupos DEAE -dietilaminoetil-)
 - negativamente (-) - catiónica (ej. grupos carboximetilos (CM))
- **Las moléculas a ser purificadas deben poseer una carga opuesta a las de las cápsulas de la columna**
- **Aquellas moléculas que no se unen a las cápsulas, pasan por la columna rápidamente**

Cromatografía



Cromatografía de intercambio iónico

Columna catiónica (carga -)

Todo lo cargado en forma (-) eluirá primero

Luego eluirá desde lo de menor carga neta (+) hasta lo de mayor carga neta (+)

Cromatografía de intercambio iónico

Las columnas presentan grupos cargados. Si los grupos ionizables son ácidos o bases débiles → dependerán del pH del *buffer*!

La fuerza de unión dependerá:

- carga neta de la proteína (pI)
- concentración de sales en el *buffer* (competencia con las proteínas por los sitios de unión de la columna)

Cromatografía de intercambio iónico

Entonces,

Mientras mayor sea la diferencia (pH *buffer* y pI) →

> **carga neta** de la proteína al pH del *buffer*

→ **más fuertemente** se unirá a una carga opuesta en la matriz y

→ mayor es la concentración de sal en el **buffer para eluir**

Eligiendo **adecuadamente** el *buffer* de elución (generalmente se realiza un gradiente que incrementa la concentración o pH), se pueden separar proteínas específicas de la columna en forma diferencial

Cromatografía



Ejemplo purificación para una enzima

table 5–5

A Purification Table for a Hypothetical Enzyme*

Procedure or step	Fraction volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

*All data represent the status of the sample *after* the designated procedure has been carried out. Activity and specific activity are defined on page 137.

Problemas en pdf adjunto

Cromatografía



Problema 1. Cromatografía de intercambio iónico

Se poseen 5 proteínas diferentes con sus respectivos pI s como se indica en la escala señalada abajo. Suponiendo que la columna utilizada fue equilibrada a pH 6,5 y se eluye a ese mismo pH,

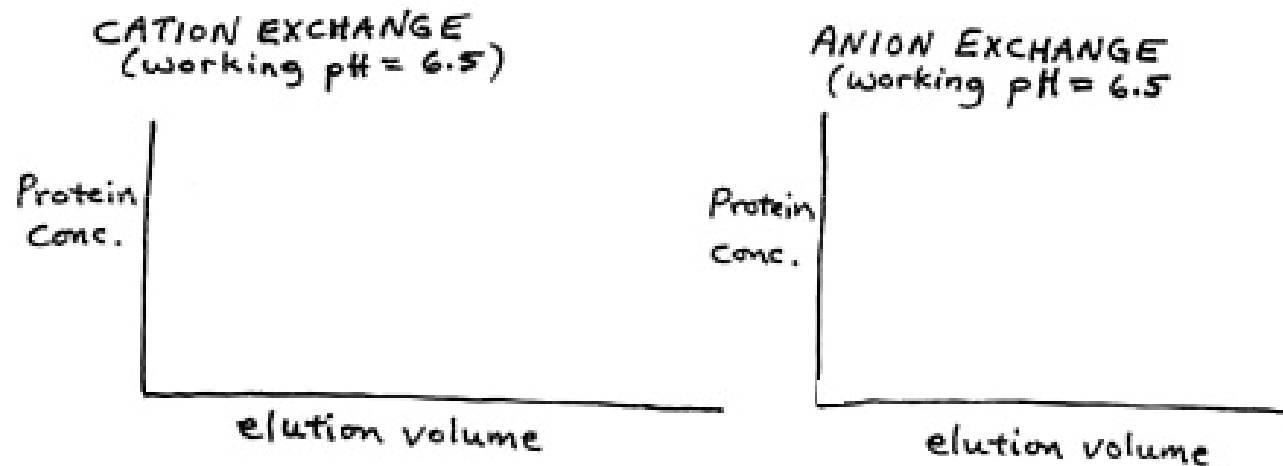
Escala de pH (*buffer* de trabajo a pH = 6,5):

0 ----- $pI_{\#5}$ ----- $pI_{\#4}$ ----- 6.5 ----- $pI_{\#1}$ ----- $pI_{\#2}$ ----- $pI_{\#3}$ ----- 14

- Cuál será la carga neta de las proteínas a pH 6,5?
- Si la columna en cuestión es catiónica y se utiliza un buffer de elución de concentraciones de sales crecientes, dar el orden de elución.
- Si la columna en cuestión es aniónica y se utiliza un buffer de elución de concentraciones de sales crecientes, dar el orden de elución.
- Completar las figuras con la cantidad de picos que se observarán en cada caso para cada caso colocando a que proteína/s corresponde cada pico.

Cromatografía

- d) Completar las figuras con la cantidad de picos que se observarán en cada caso para cada caso colocando a que proteína/s corresponde cada pico.



Problema 2. Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Una mezcla de proteínas globulares se estudia por SEC. Los pesos moleculares de las proteínas fueron determinados por PAGE y corresponden a 25, 50 y 70 kDa.

Indique el orden de salida y cómo se determinaría el peso molecular de las mismas por SEC.

Aclare que supuestos realiza para poder realizar la corrida cromatográfica.