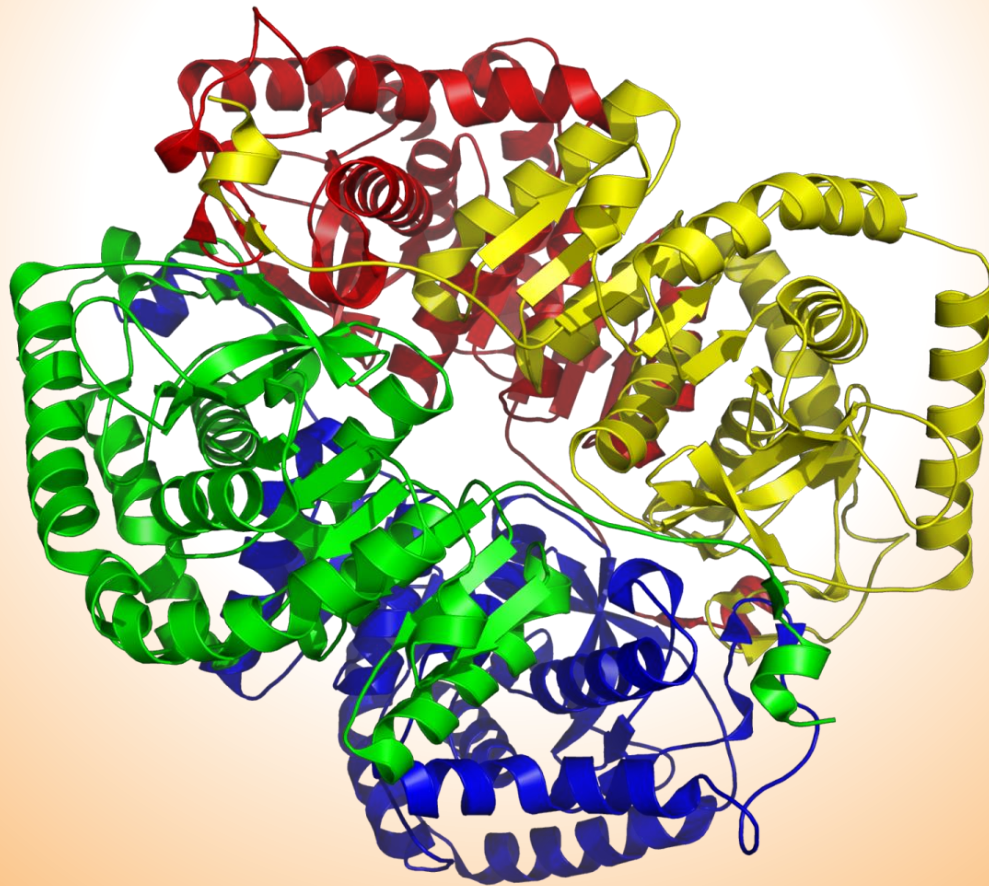


Purificación de proteínas

Cromatografías



Purificación de la enzima lactato deshidrogenasa de músculo esquelético de pollo

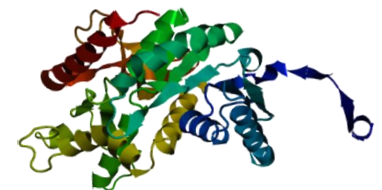
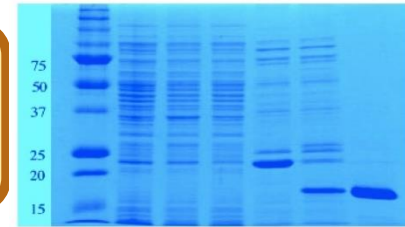
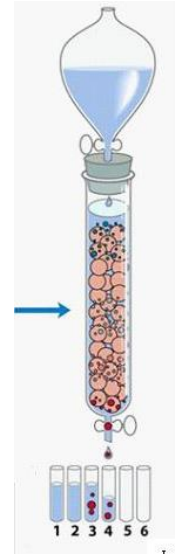
ESQUEMA GENERAL

Sesión 1. Extracción y precipitación con sulfato de amonio.

Sesión 2. Purificación por cromatografía

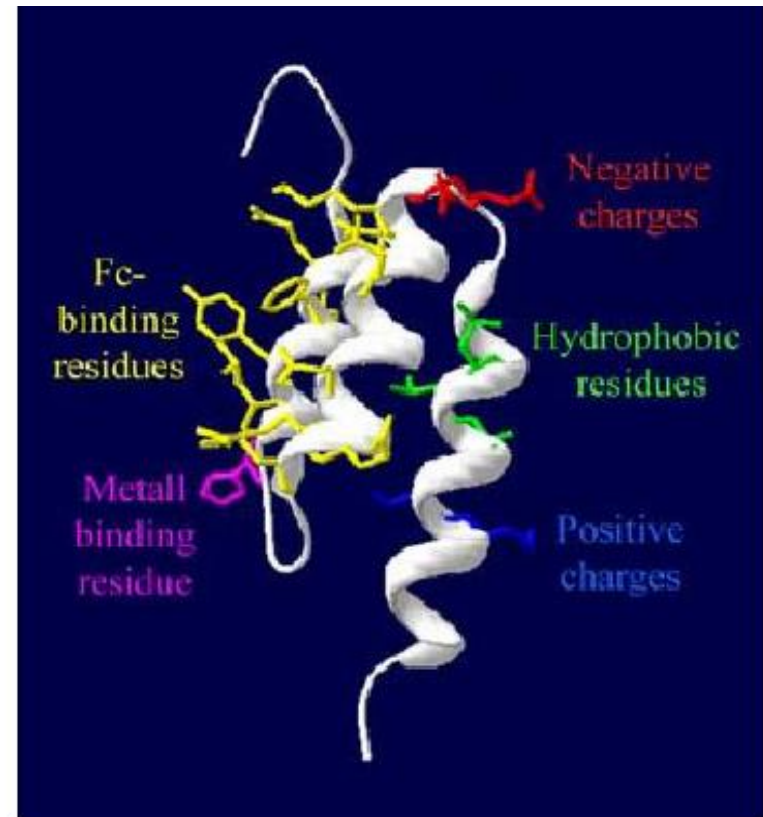
Sesión 3. Monitoreo del proceso de purificación (SDS-PAGE)

Sesión 4 y 5. Actividad enzimática.



Las propiedades de las proteínas son útiles para su purificación por cromatografía

- ❖ Tamaño (masa molecular)
- ❖ Carga
- ❖ Hidrofobicidad
- ❖ Unión específica a ligandos



Cromatografía

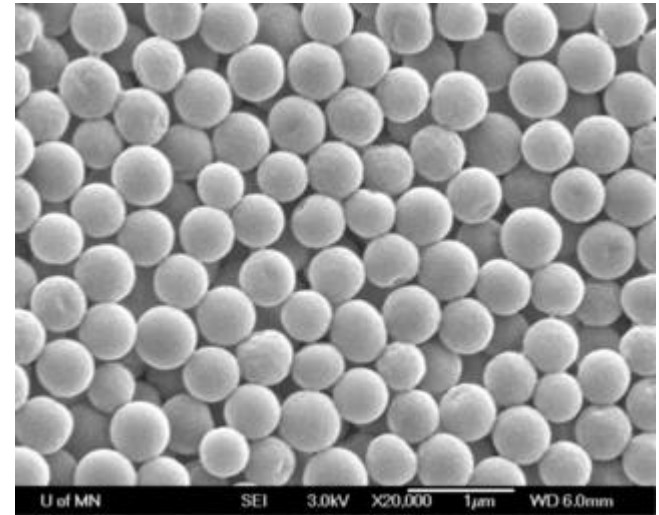
Método de separación que se basa en el reparto de especies entre una fase estacionaria y una fase móvil.

Conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificarlos.

- Cromatografía de exclusión molecular (o filtración en gel)
- Cromatografía de intercambio iónico
- Cromatografía de interacción hidrofóbica
- Cromatografía de afinidad



Matriz o resina



Matriz químicamente inerte

Alta porosidad

Soportes que pueden ser de material variado como:

Diferentes tipos de polímeros que varían en el grado de entrecruzamiento y por lo tanto en la selectividad por moléculas de diferente tamaño.

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)

Matriz. Sustancia con la que se empaqueta la columna. También se denomina fase estacionaria o lecho de la columna.

Fase Móvil (Eluyente). Solución tamponada (buffer) que se emplea para transportar solutos a través de una fase estacionaria.

Volumen de la columna. Volumen total de la sustancia con la que se empaqueta una columna cromatográfica.

Volumen muerto de la columna. Cantidad de solvente que tiene que atravesar la columna para asegurar que se ha reemplazado completamente.

Volumen de elución de un soluto: Cantidad de solvente necesaria para eluir el soluto de la columna.

Volúmenes de una columna cromatográfica

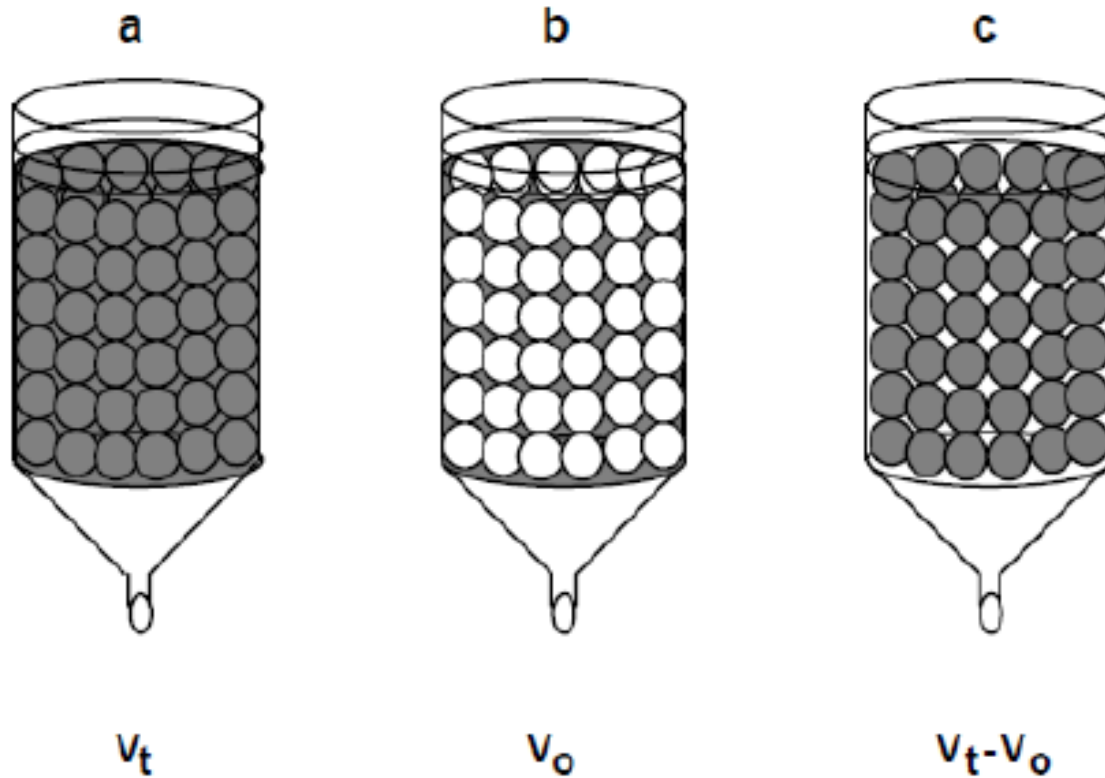
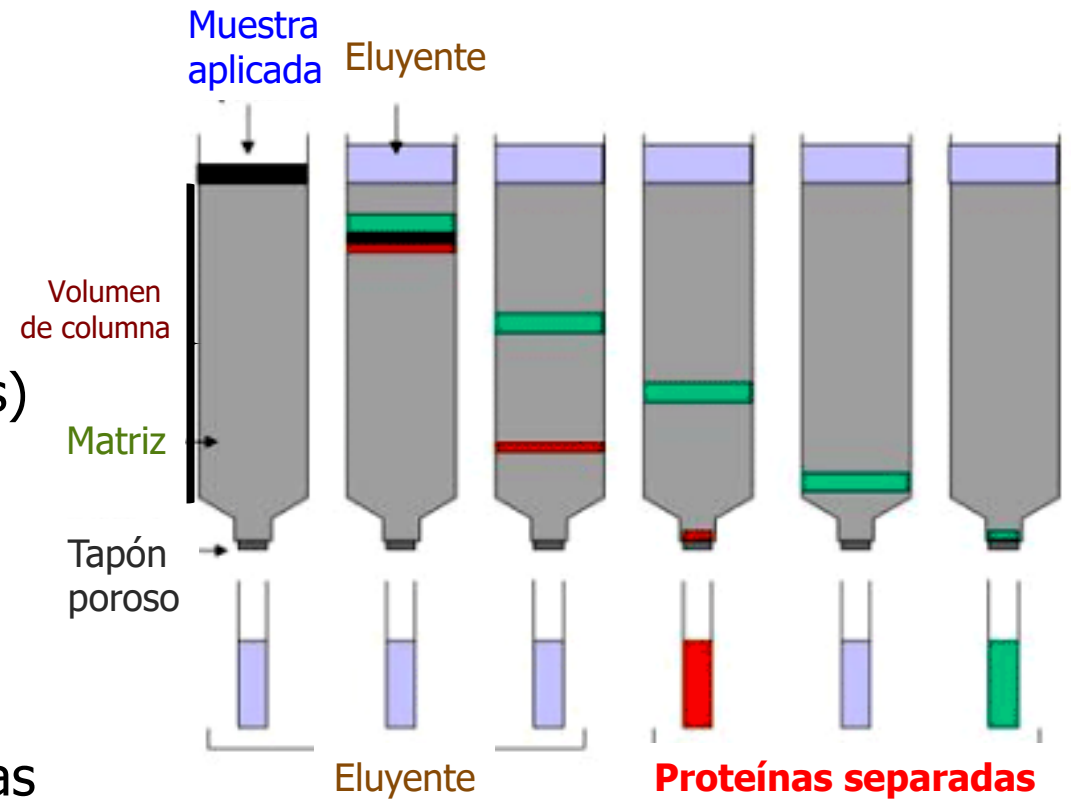


Figura 2. Volúmenes de una columna cromatográfica

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

Pasos para purificar proteínas por cromatografía

- Empacar la columna
- Equilibrar la columna
- Aplicar la muestra
- Lavado (no en todos los casos)
- Eluir la muestra
- Colectar el eluato
- Detectar y cuantificar proteínas



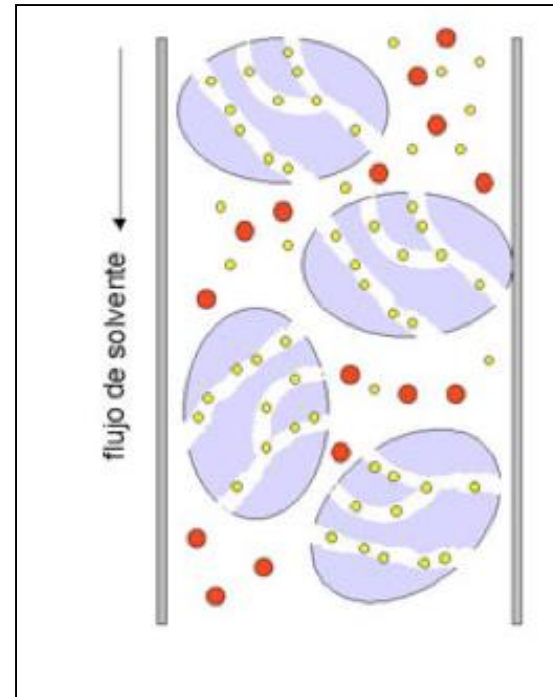
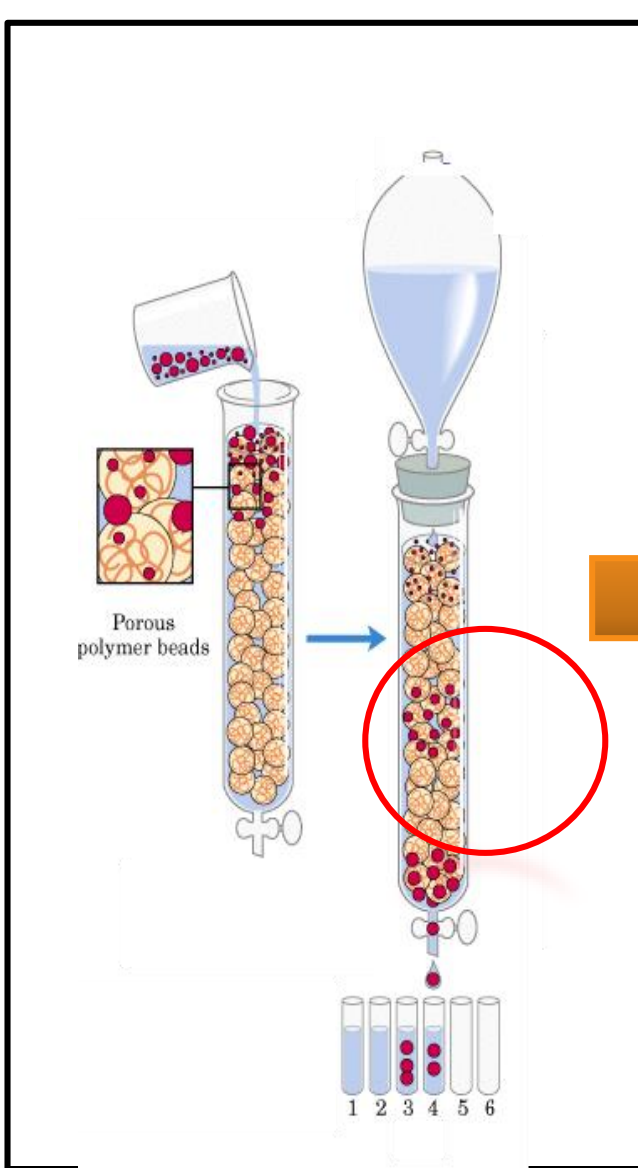
Cromatografía de partición: La separación depende de las diferencias en la movilidad de las moléculas en el líquido (fase móvil) al atravesar la matriz.

Cromatografía de adsorción: Las moléculas se unen a la matriz y son eluidas al cambiar la composición del medio de elución.

Cromatografía de exclusión molecular (Filtración en gel)

Permite la separación de moléculas en función de su tamaño.

Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel.



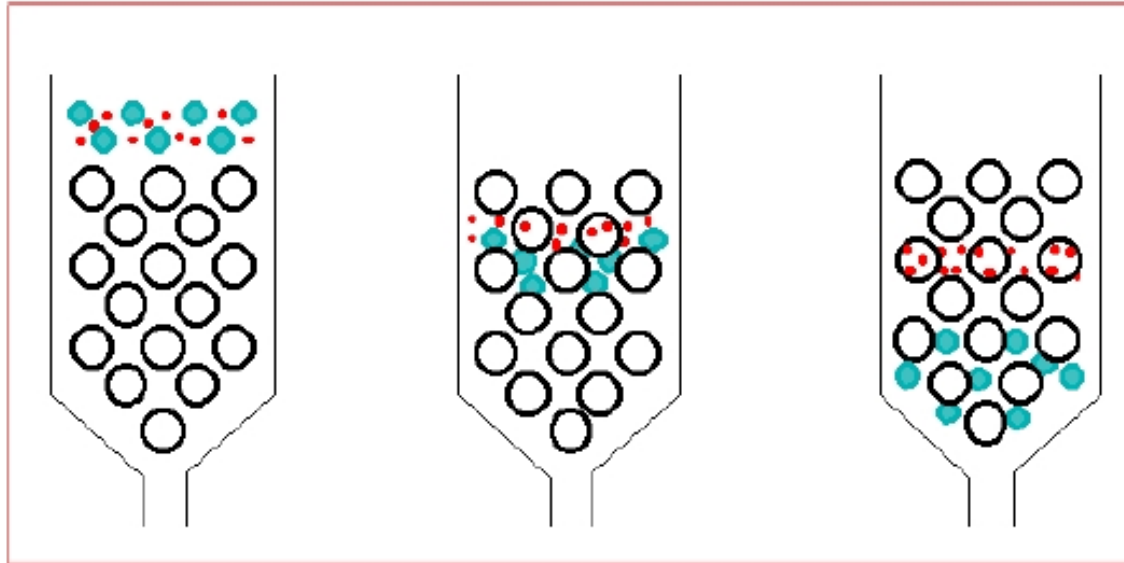
PRINCIPIO:

El material de la columna es poroso.

Las moléculas de menor tamaño difunden a través de los poros de las partículas del gel y son retardadas en su paso por la columna.

Las moléculas grandes no entran en los poros de la matriz, por lo tanto eluyen primero.

Cromatografía de exclusión molecular



TIPOS DE MATRIZ

GRANULOS DE UN MATERIAL POROSO
E HIDRATADO

- Dextranos con enlaces cruzados
- Agarosa
- Poliacrilamida

El material debe ser:

- Un polímero inerte
- No cargado
- Con tamaño de poro uniforme

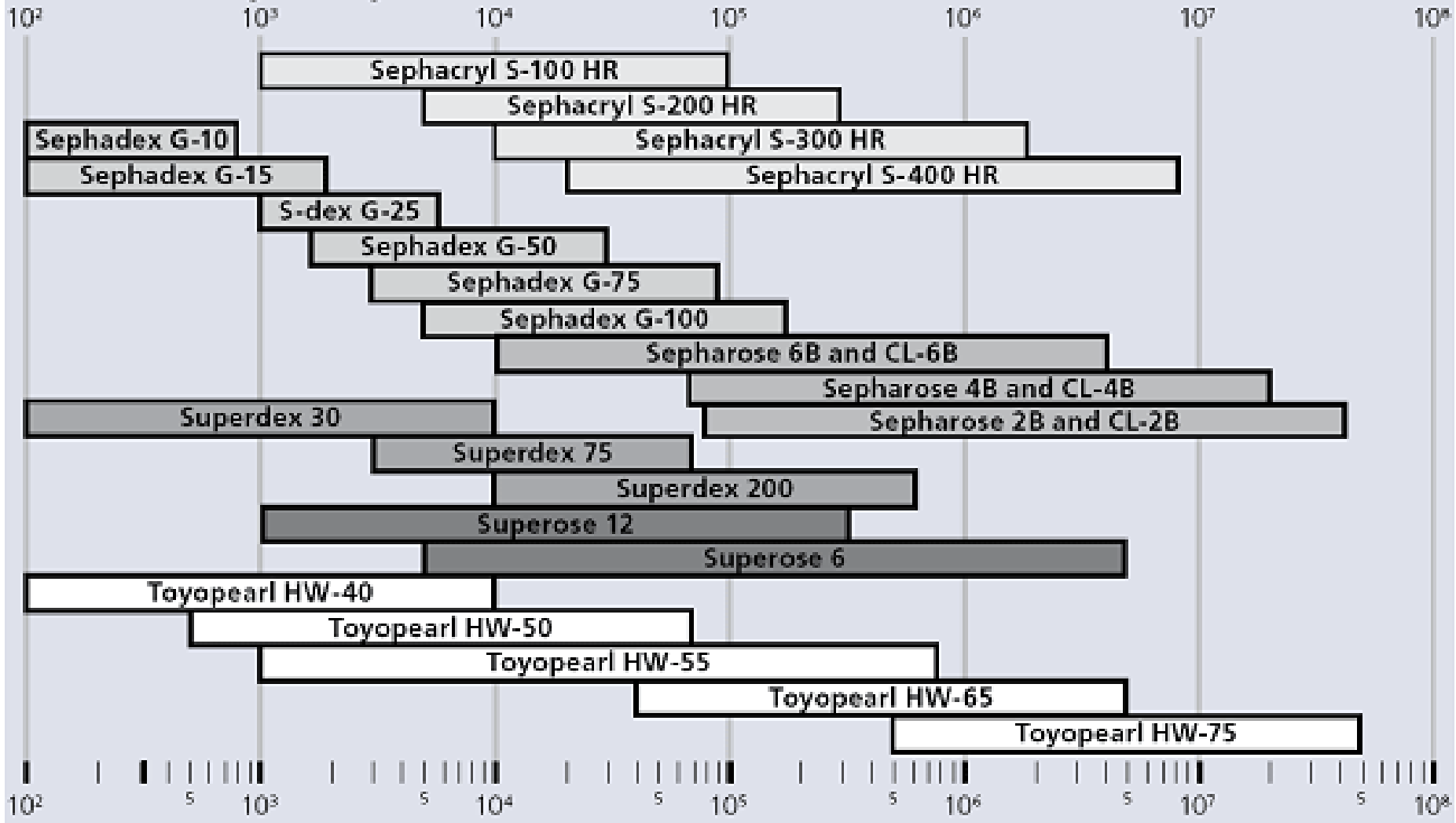
Propiedades de algunos geles de Sephadex (gel dextrano)

	Peso molecular, límites de fraccionamiento		agua retenida	vol. de gel hidratado
Tipo	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

Tabla 26.4 ■ Medios de filtración por gel

Nombre^a	Intervalo de fraccionamiento (PM) de proteínas globulares	Nombre^a	Intervalo de fraccionamiento (PM) de proteínas globulares
Sephadex G-10	hasta 700	Bio-Gel P-2	100–1 800
Sephadex G-15	hasta 1 500	Bio-Gel P-4	800–4 000
Sephadex G-25	1 000–5 000	Bio-Gel P-6	1 000–6 000
Sephadex G-50	1 500–30 000	Bio-Gel P-10	1 500–20 000
Sephadex G-75	3 000–80 000	Bio-Gel P-30	2 500–40 000
Sephadex G-100	4 000–150 000	Bio-Gel P-60	3 000–60 000
Sephadex G-150	5 000–300 000	Bio-Gel P-100	5 000–100 000
Sephadex G-200	5 000–600 000	Bio-Gel P-150	15 000–150 000
		Bio-Gel P-200	30 000–200 000
		Bio-Gel P-300	60 000–400 000
Sephacryl S-200	5 000–250 000		
Sephacryl S-300	10 000–1 500 000	Bio-Gel A-0,5 m	<10 000–500 000
		Bio-Gel A-1,5 m	<10 000–1 500 000
		Bio-Gel A-5 m	10 000–5 000 000
Sepharose 2B	70 000–40 000 000	Bio-Gel A-15 m	40 000–15 000 000
Sepharose 4B	60 000–20 000 000	Bio-Gel A-50 m	100 000–50 000 000
Sepharose 6B	10 000–4 000 000	Bio-Gel A-150	1 000 000–150 000 000

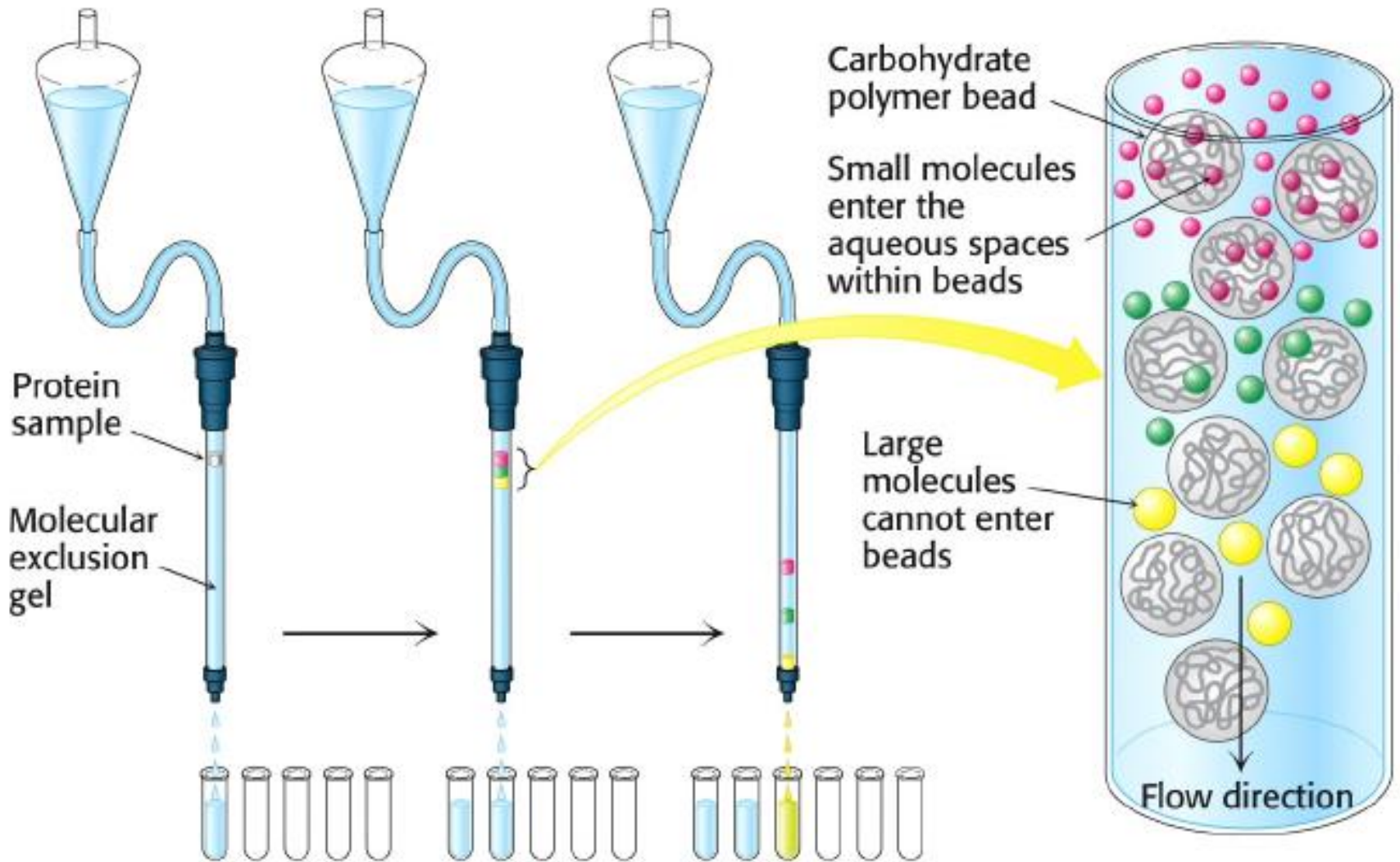
Molecular Weight Ranges for Gel Filtration Media



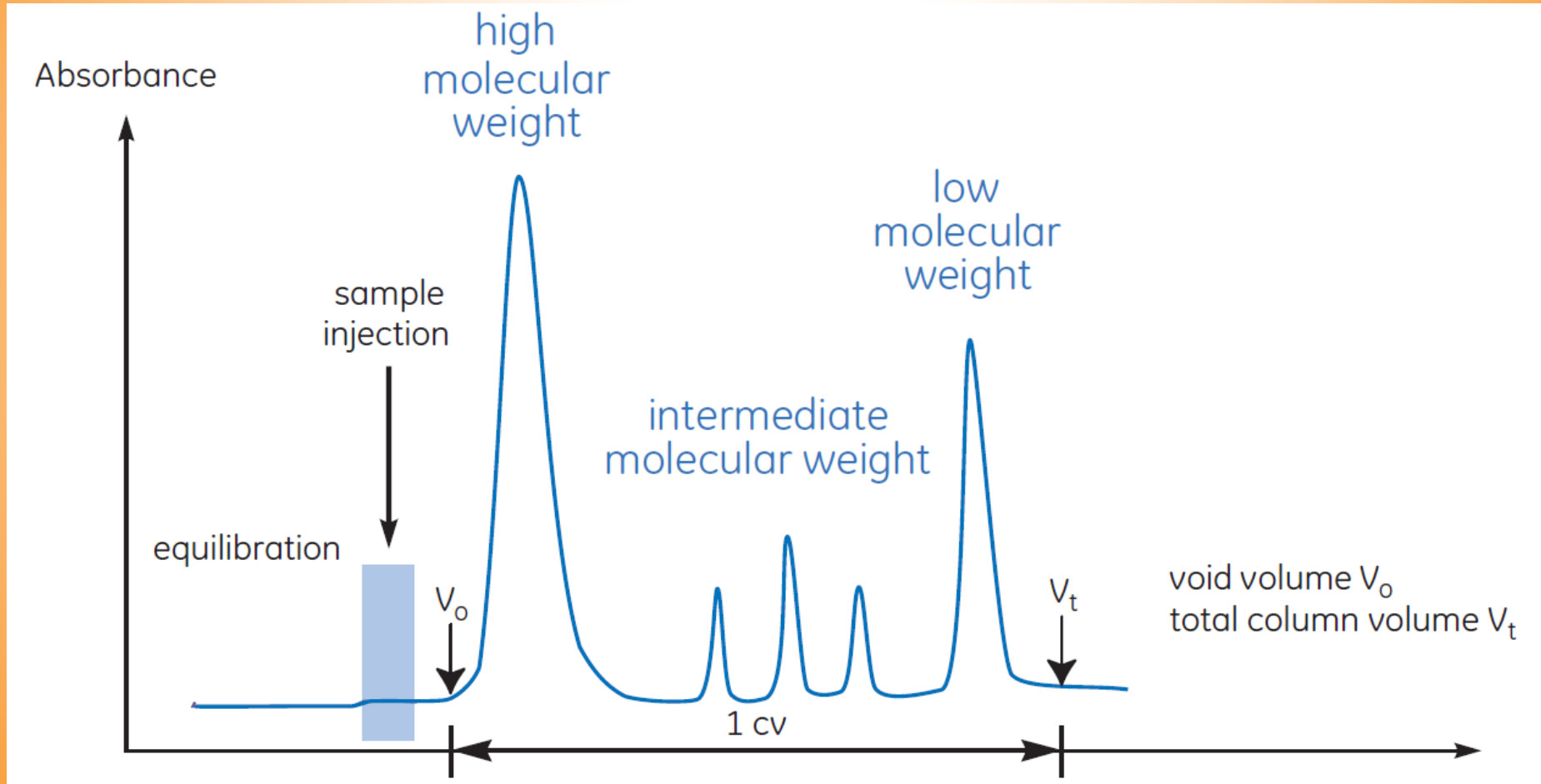
Media Selection

Type	Dia μm	Cut off Da	Application
G-10	40-120	≤ 700	Desalting Peptides
G-25	40-120	$\leq 1,500$	Desalting Proteins & Nucleic Acids
G-50	50-150	100-5,000	Removal of Free labels from labeled macromolecules
G-100	40-150	1,000-10,000	Molecular weight determination

Cromatografía de exclusión molecular



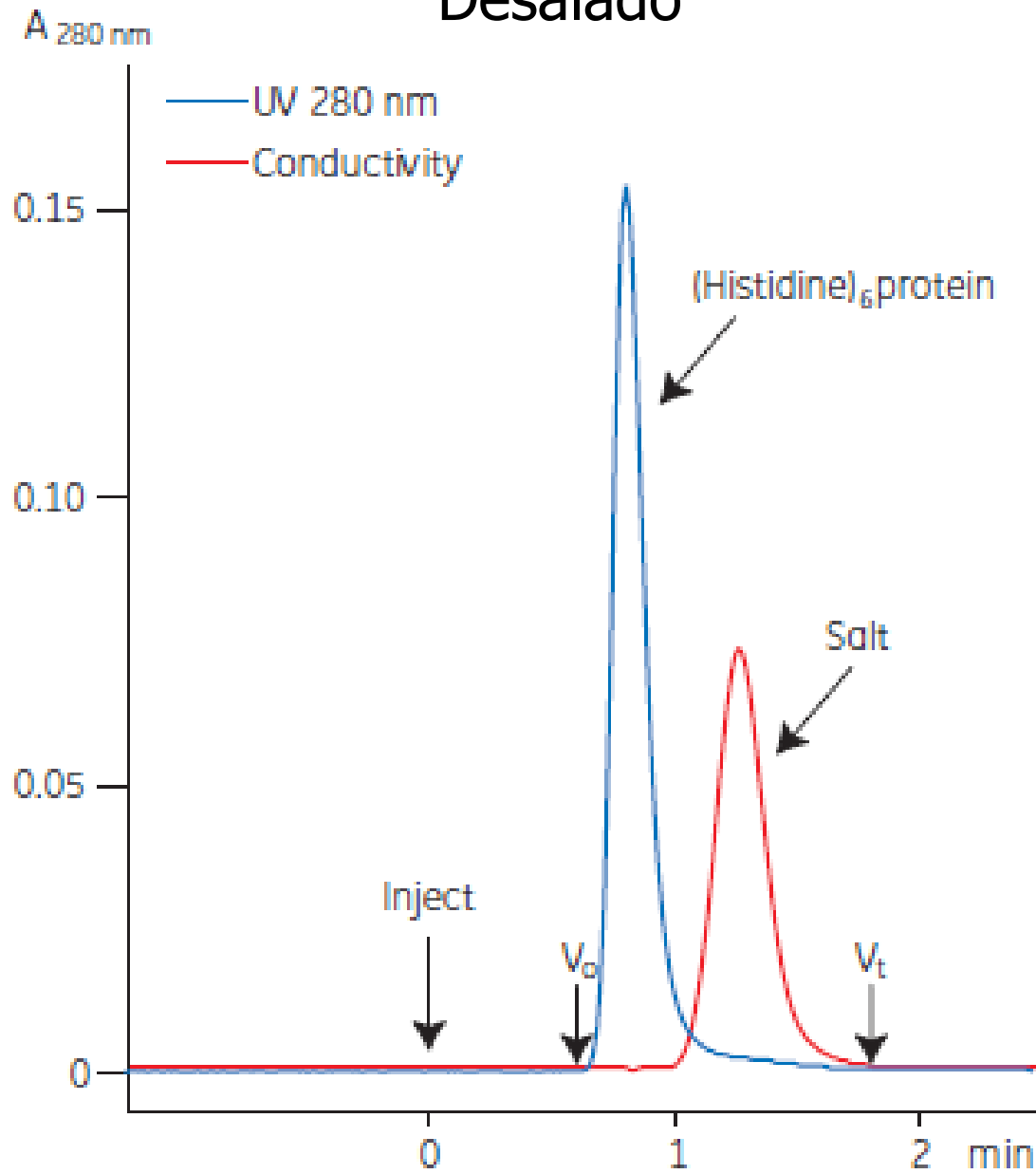
Cromatograma del monitoreo de la purificación por cromatografía de exclusión molecular.



Aplicaciones de la cromatografía de exclusión molecular

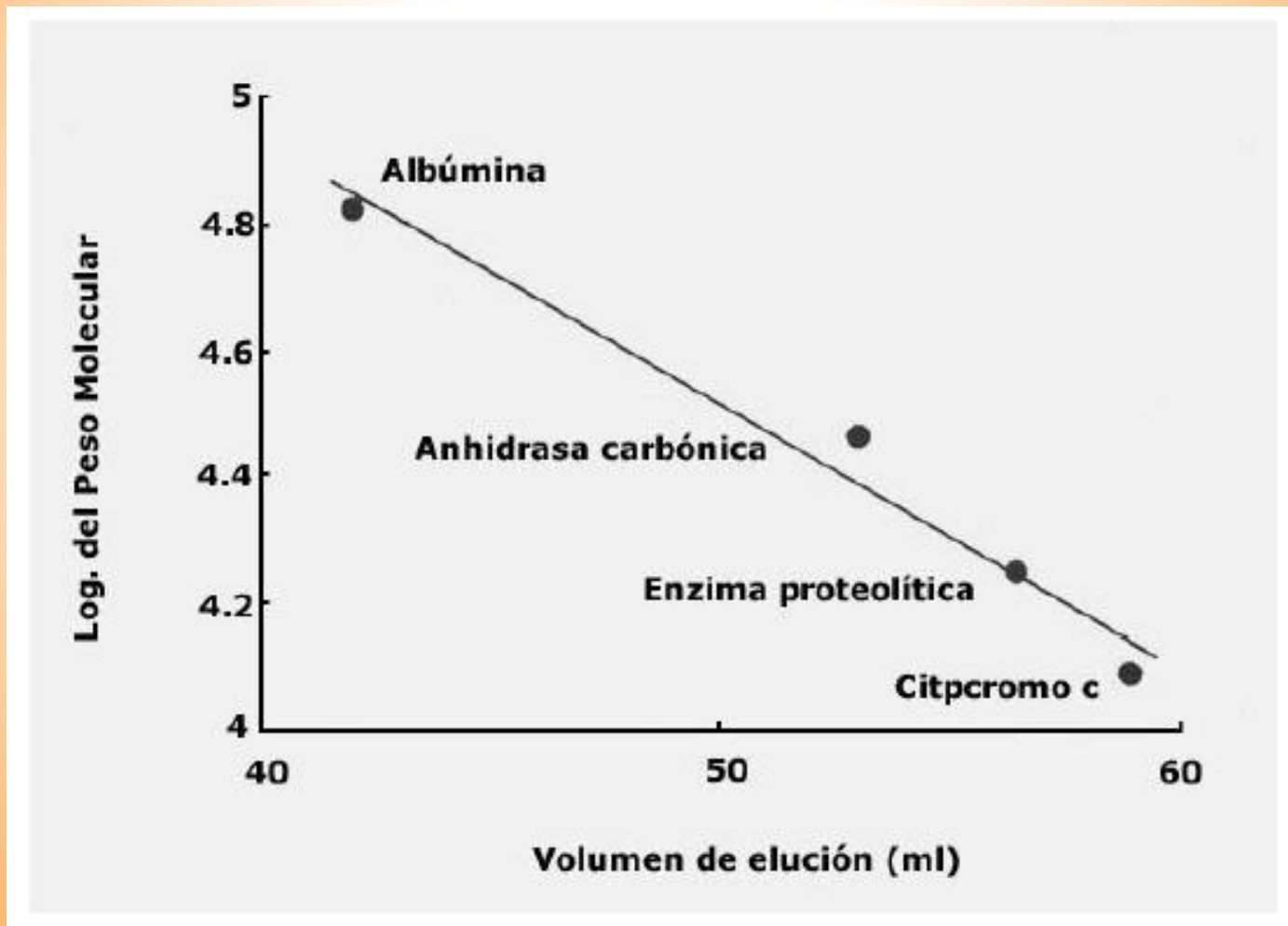
- ❖ Desalado
- ❖ Cambio de condiciones del amortiguador
- ❖ Separación de biomoléculas de distintos tamaños.
- ❖ Purificación de proteínas.
- ❖ Determinación de la masa molecular de las proteínas.
El volumen de elución es proporcional al logaritmo de la masa molecular.

Desalado



Aplicación: Determinación de la masa molecular.

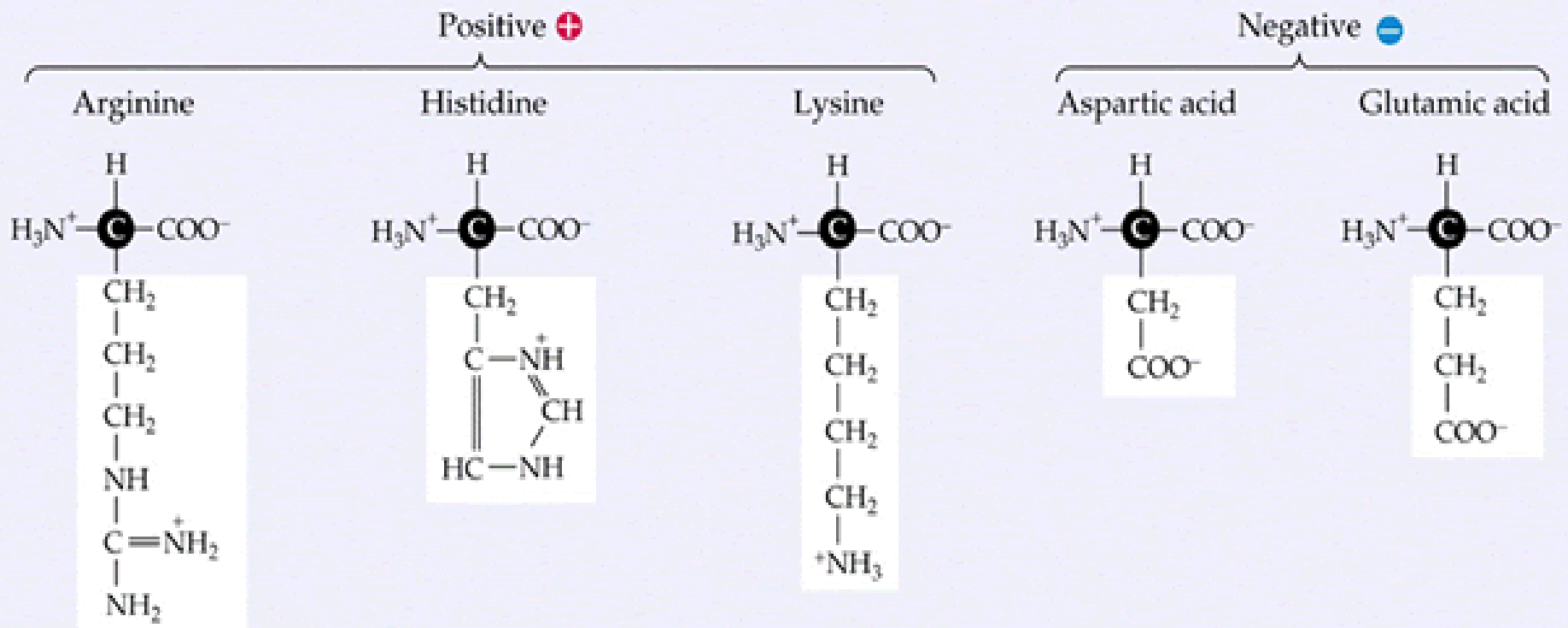
Existe una relación lineal entre el volumen de elución y el logaritmo de la masa molecular de las proteínas.



Cromatografía de intercambio iónico

- ❖ Separación de moléculas con base en su carga neta
- ❖ La muestra se aplica en una matriz de carga opuesta a la carga neta de la proteína que se quiere purificar
- ❖ Se debe tener un pH determinado en el buffer de elución
- ❖ El orden de elución de las proteínas depende de la “fuerza” de unión con la matriz.

Las proteínas son moléculas que tienen carga

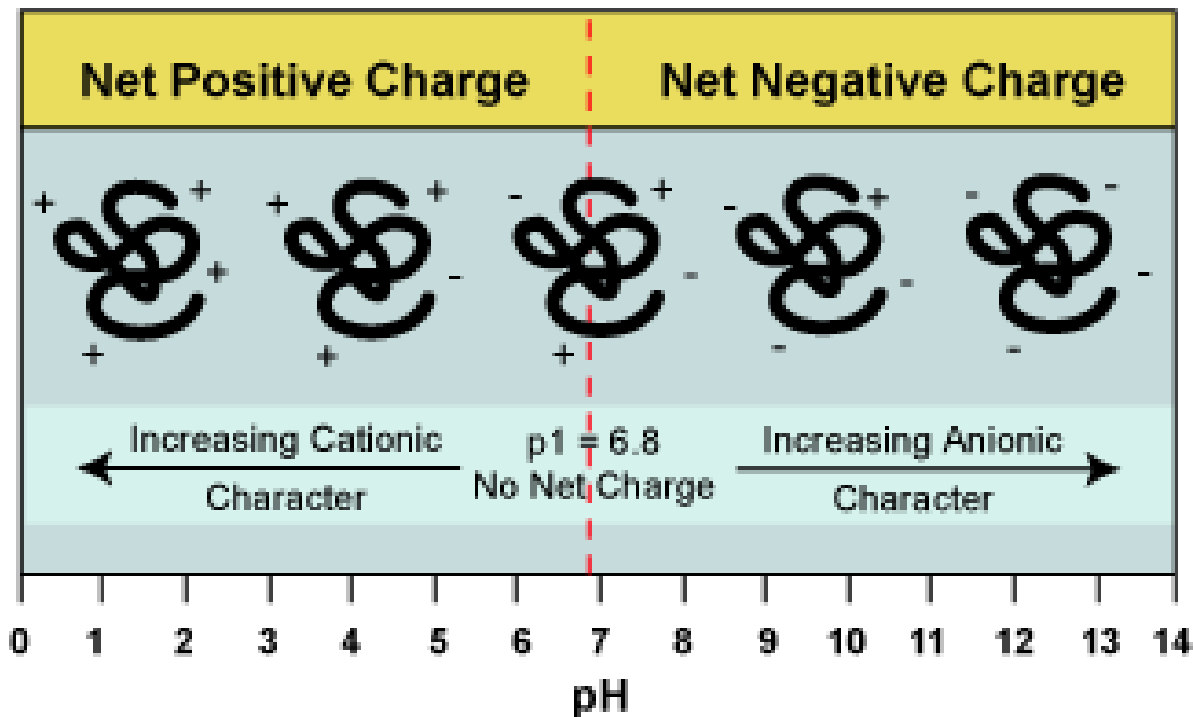


Carga neta

- Suma de las cargas de las cadenas laterales de los aminoácidos
- Depende del pH del medio

Punto isoeléctrico (pI)

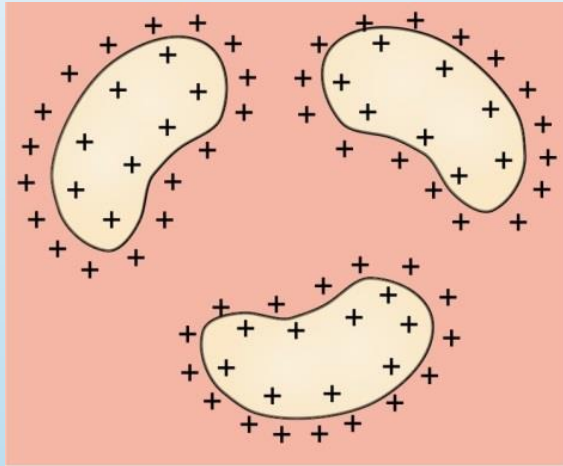
Es el pH al cual se iguala el número de cargas positivas y de cargas negativas en la proteína, por lo que la carga neta es = 0.



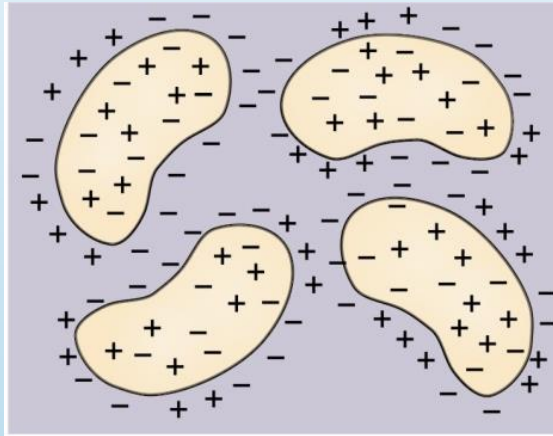
pH solución > pI = proteína carga(-) por desprotonación.

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

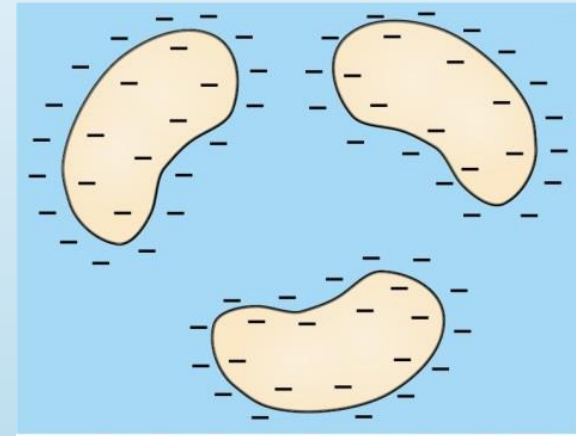
pH solución = pI = proteína carga(0) precipitado insoluble



c) At pH values below the isoelectric point the protein is positively charged



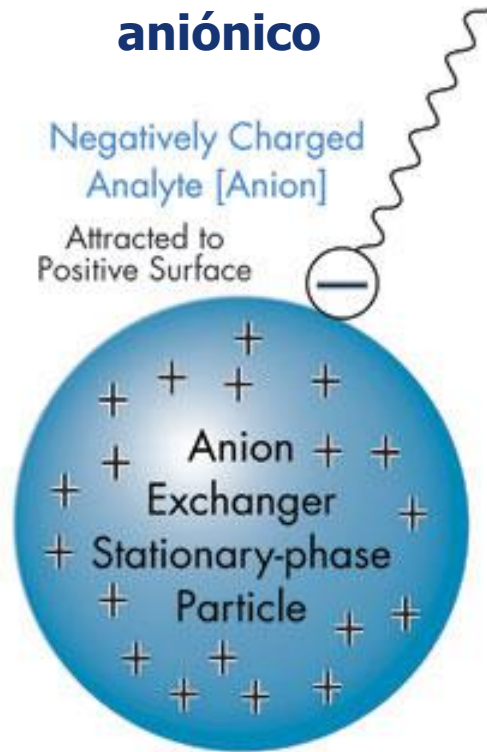
b) $\text{pH} = \text{pI}$, the number of negative and positive charges is equal



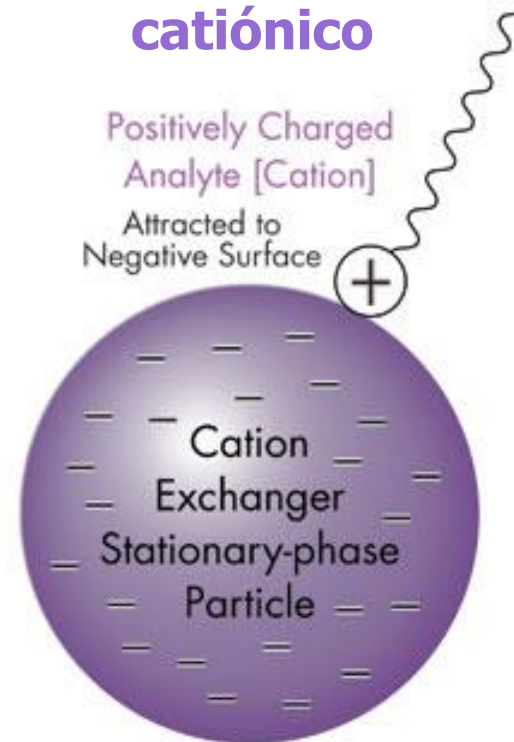
a) At pH values above the isoelectric point the protein is negatively charged

Matrices en la cromatografía de intercambio iónico

Intercambiador aniónico

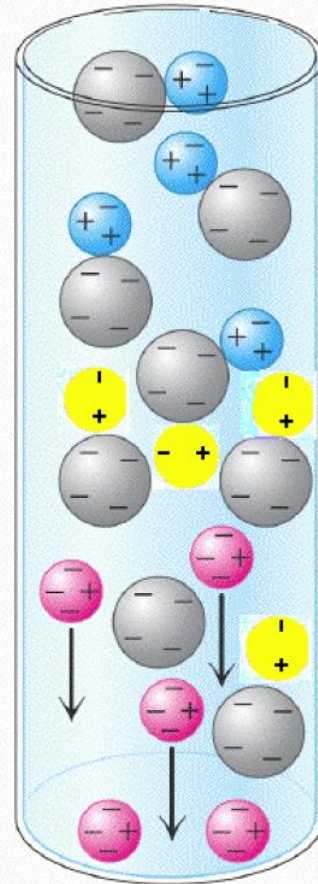
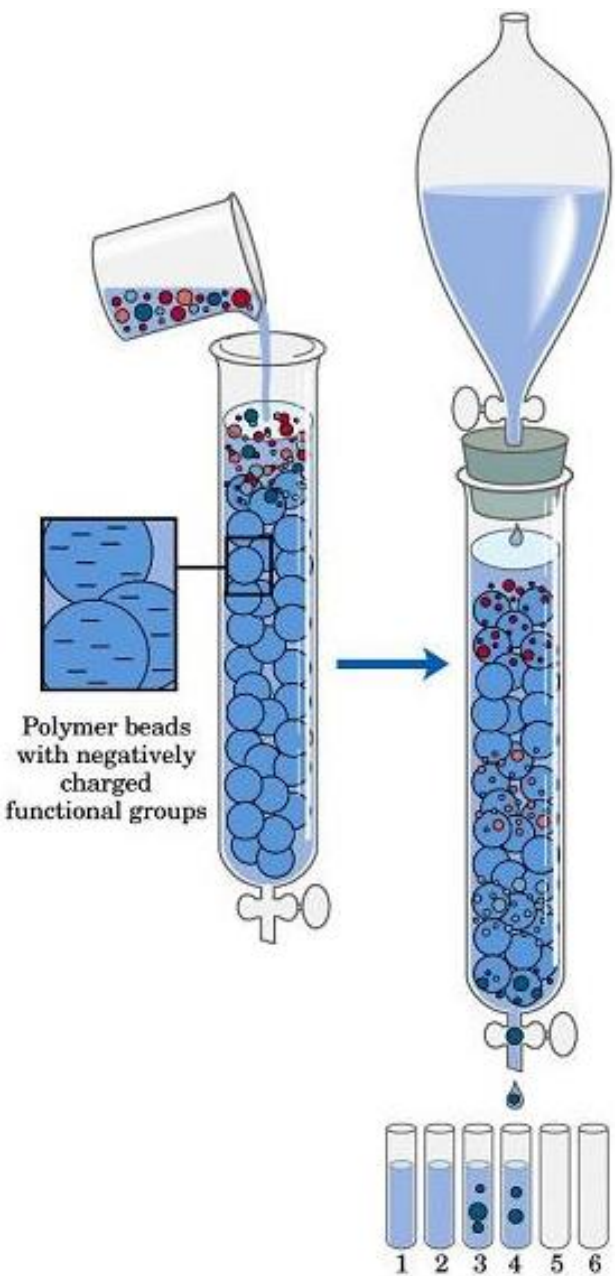


Intercambiador catiónico



La separación se logra por una interacción electrostática entre los residuos cargados de la matriz y los residuos de la proteína con carga contraria. Esta interacción se puede romper por cambios en fuerza iónica o de pH.

Las proteínas se unen al intercambiador a través de **interacciones electrostáticas reversibles**.



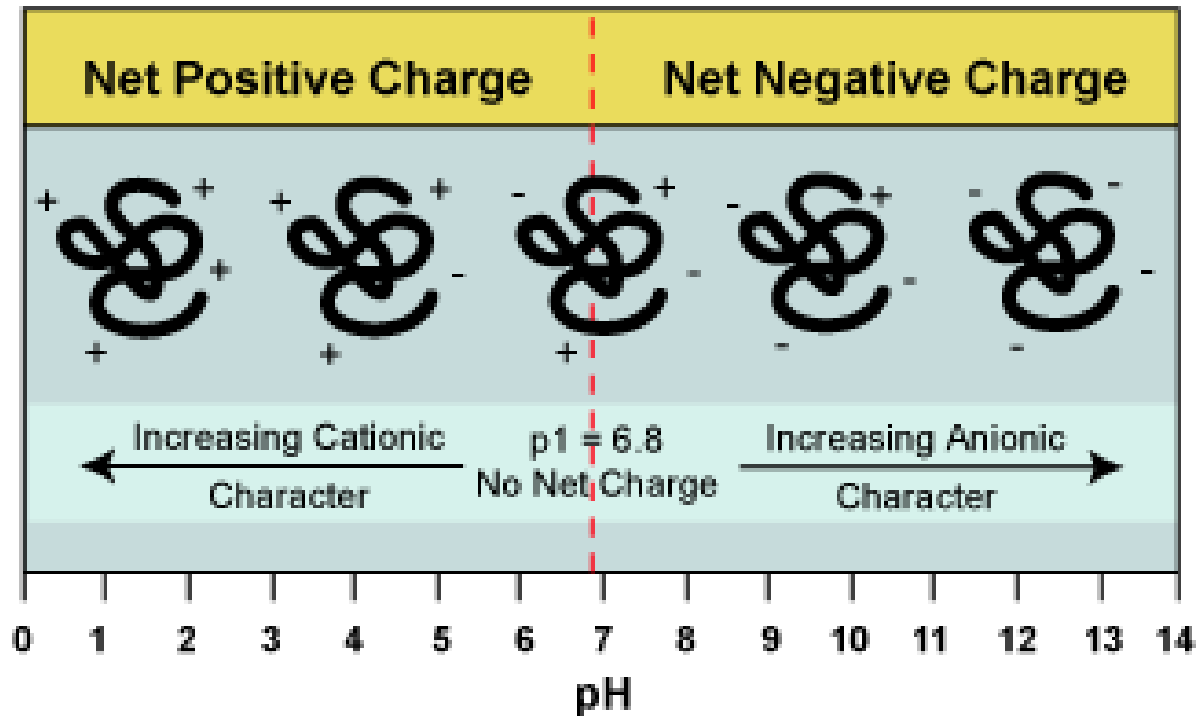
Intercambio catiónico

Fase estacionaria cargada negativamente

Intercambio aniónico

Fase estacionaria cargada positivamente

Interacción electrostática entre los grupos funcionales de la matriz y la proteína



Proteína (+)

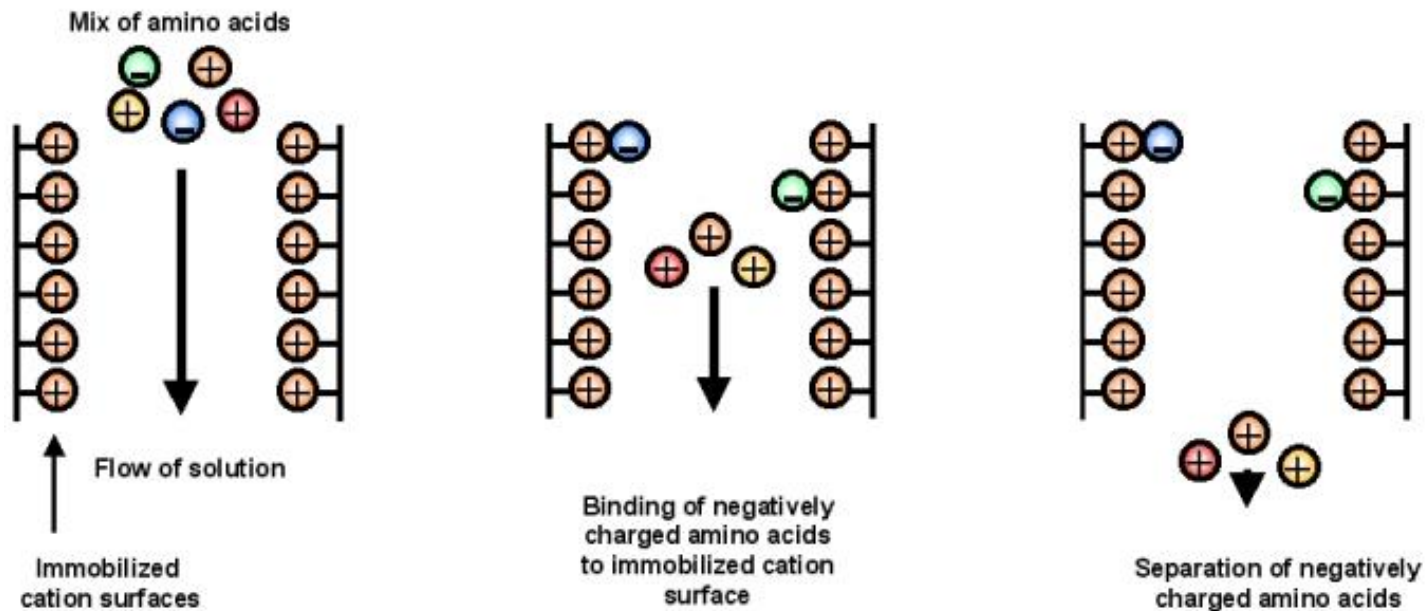
Intercambiador
catiónico (-)

Proteína (-)

Intercambiador
aniónico (+)

La distribución de la carga neta en la superficie de la proteína determina la interacción con los grupos cargados en la superficie del material de empaque.

Ion-exchange chromatography (anion exchange)



La carga de las proteínas depende del pH del medio en el que se encuentran.

Factores que afectan a la retención de las proteínas en la matriz

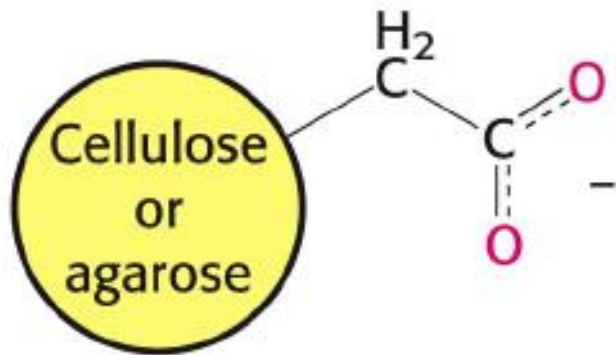
1. Fuerza iónica

2. pH

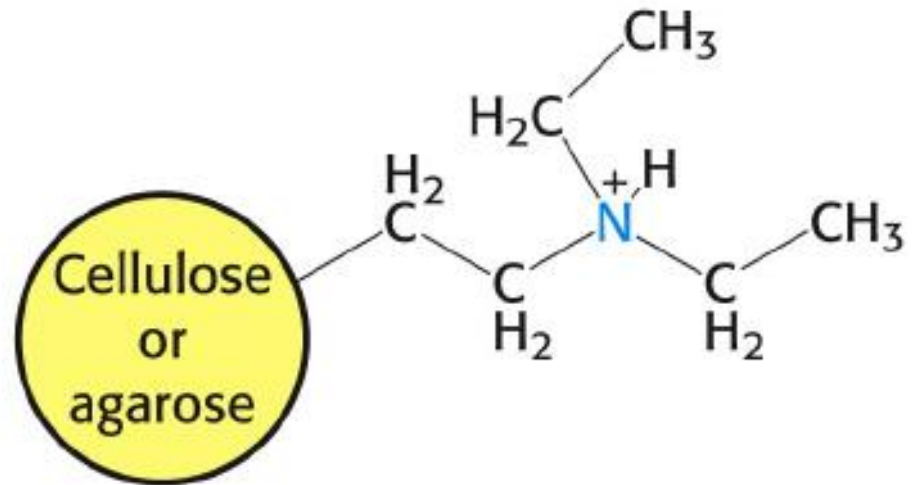
Materiales de las columnas de intercambio iónico

Intercambiador aniónico

Intercambiador catiónico



Carboxymethyl (CM) group
(ionized form)



Diethylaminoethyl (DEAE) group
(protonated form)

Estructuras de grupos químicos que le dan carga a las matrices intercambiadoras de iones

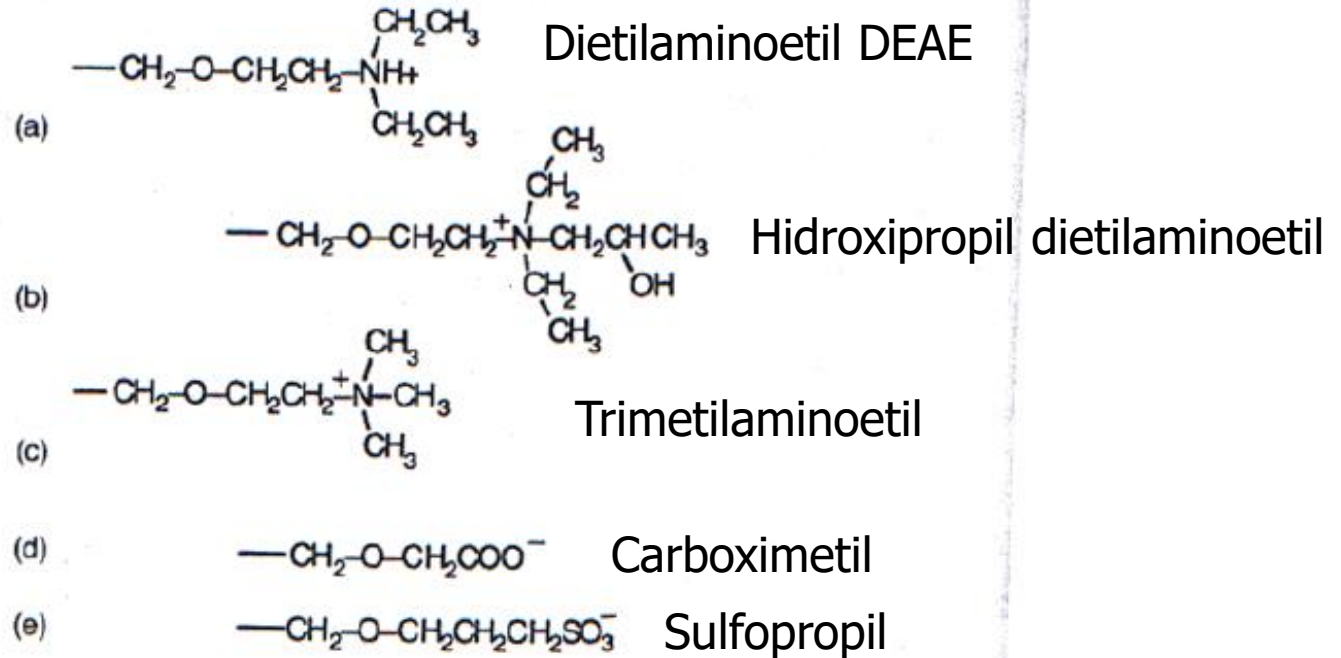


Figure 5.18. Structures of the commonly used charged substituents on anion exchangers. (a) diethyl aminoethyl-, DEAE-; (b) hydroxypropyl diethyl aminoethyl-, (quaternary) Q-; (c) trimethyl aminoethyl-, TMAE- or Q-; (d) carboxymethyl-, CM-; (e) sulfopropyl-, SP- or S-.

Grupos de intercambiador aniónico

Aminas cuaternarias (Q)
Dietilaminoetil (DEAE)

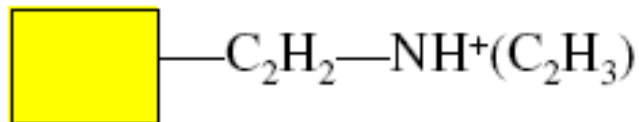
Grupos de intercambiador catiónico

Sulfopropil (S- o SP)
Carboximetil (CM)

Para **eluir** a la proteína se utilizan soluciones que modifican el **pH** o la **concentración de sales**.

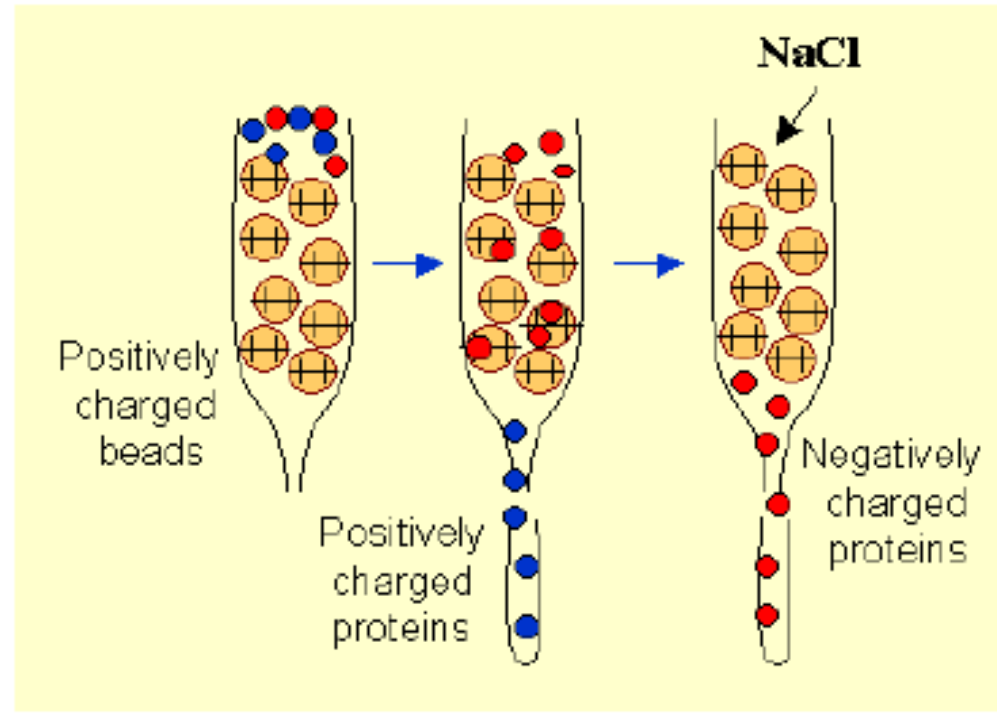
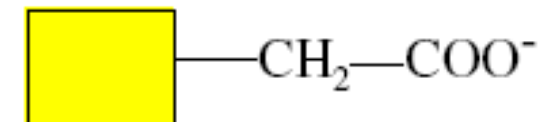
Intercambiador aniónico:

Celulosa--DEAE



Intercambiador catiónico:

Celulosa—CM

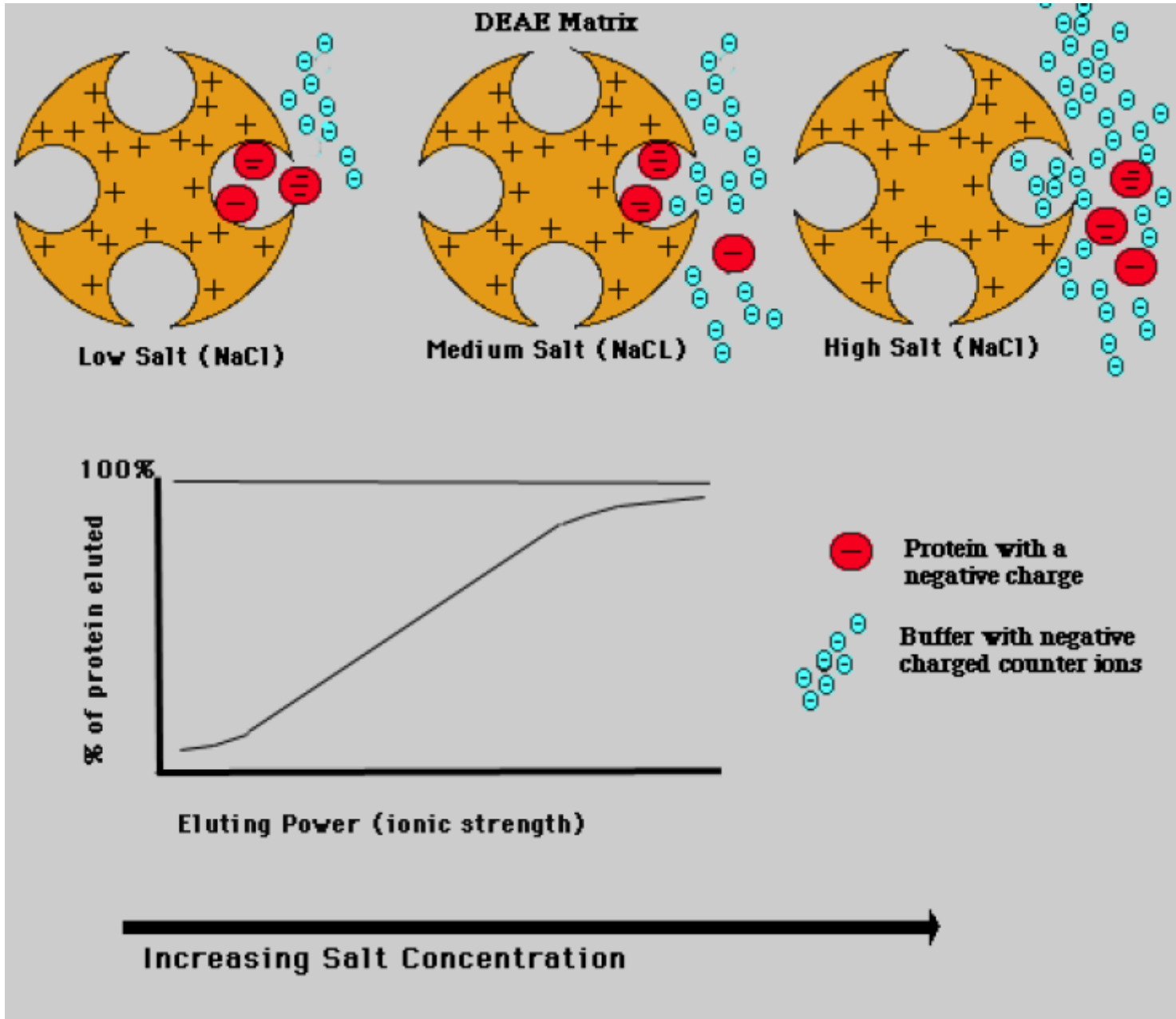


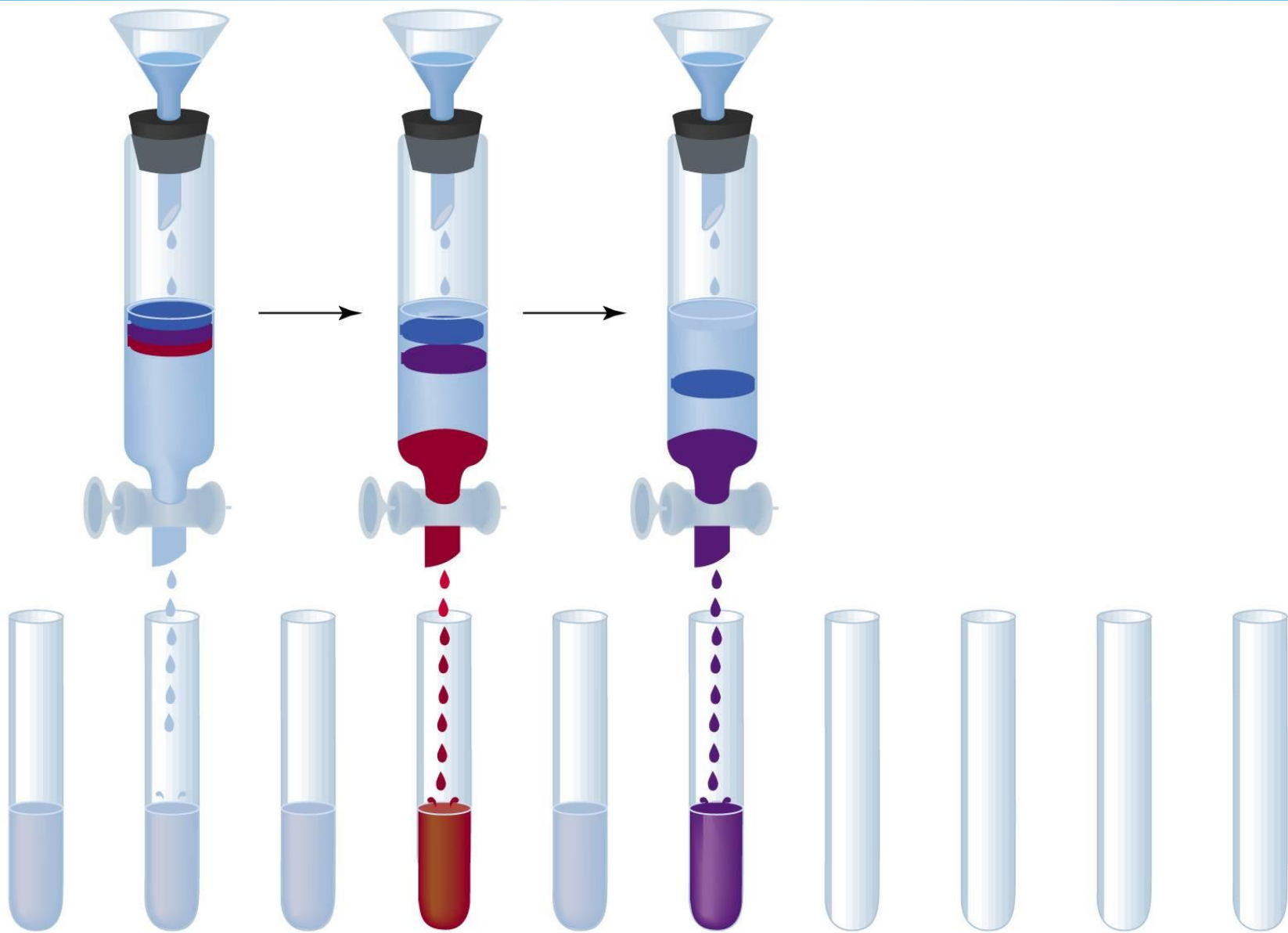
Tipos de elución

Elución isocrática: Composición constante del eluyente

Elución en gradiente: La composición del medio eluyente se modifica.

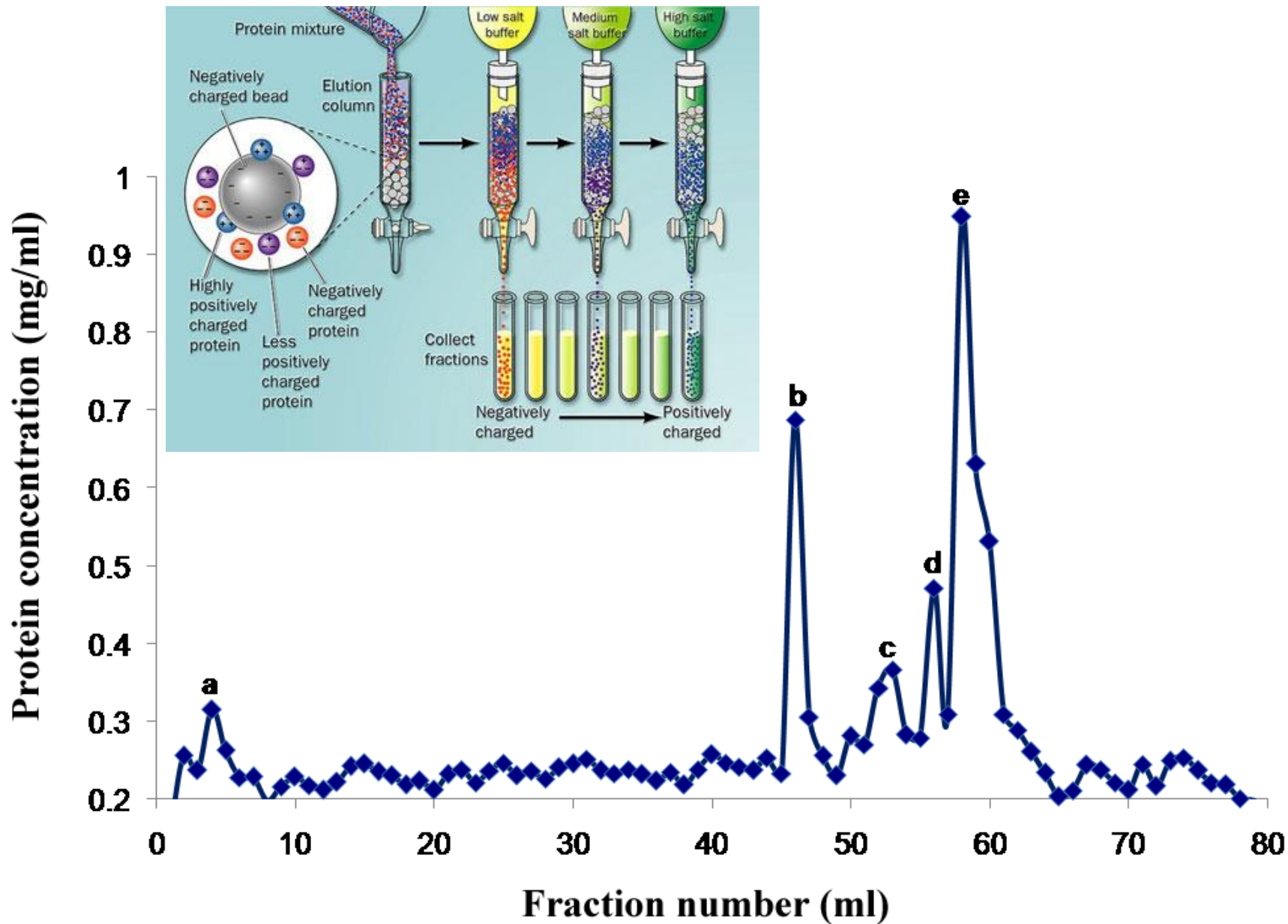
GRADIENTE DE CONCENTRACIÓN



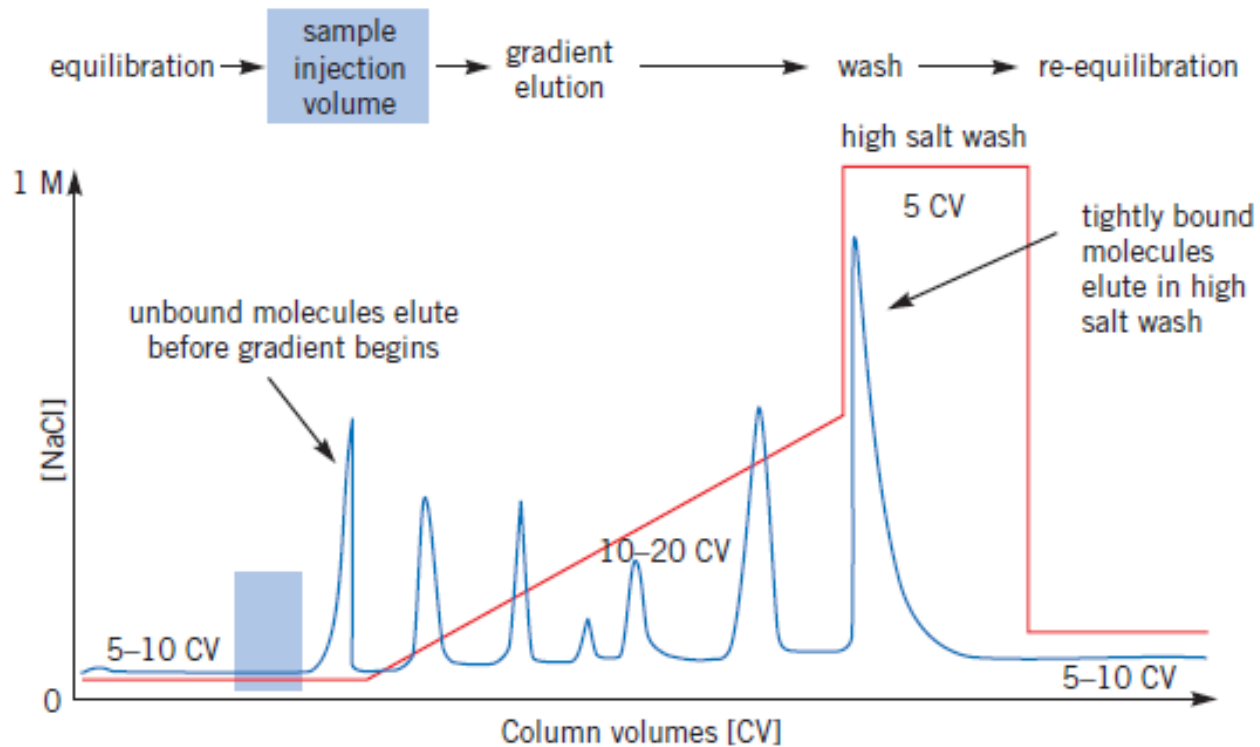


Fractions sequentially collected

Monitoreo de la purificación

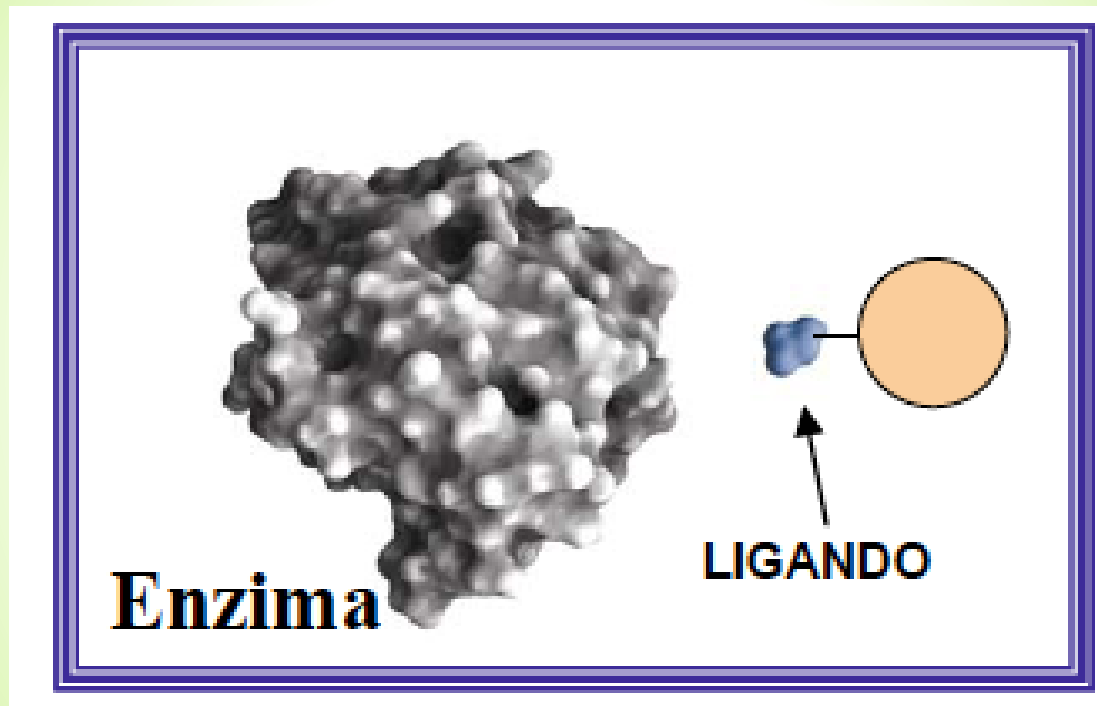


Monitoreo de la purificación



Cromatografía de Afinidad

Método basado en la interacción específica y reversible entre la proteína y un ligando específico unido a la matriz cromatográfica.



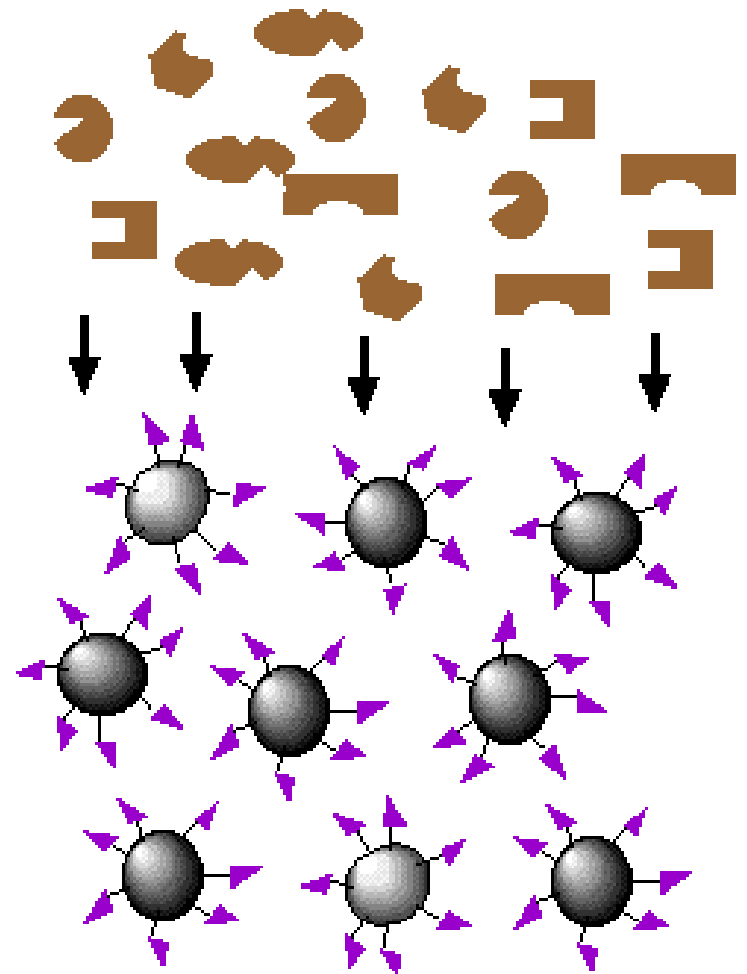
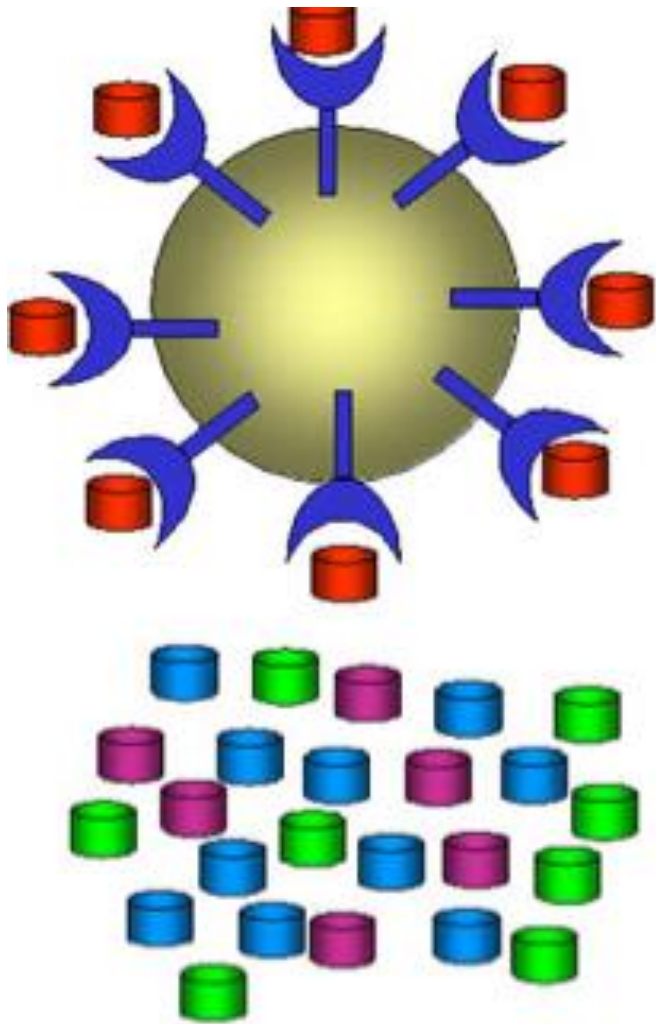
Ligandos: anticuerpo, ión metálico, sustrato (análogo), cofactor, coenzima, inhibidor.

Cromatografía de Afinidad

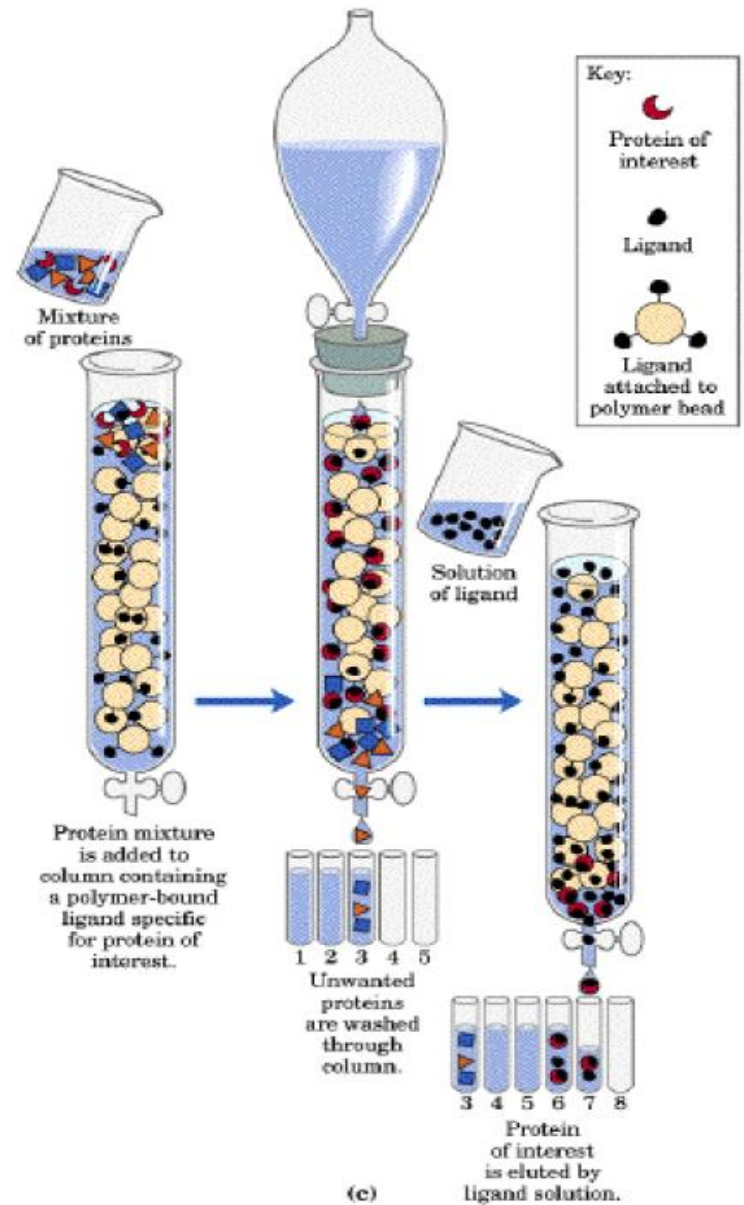
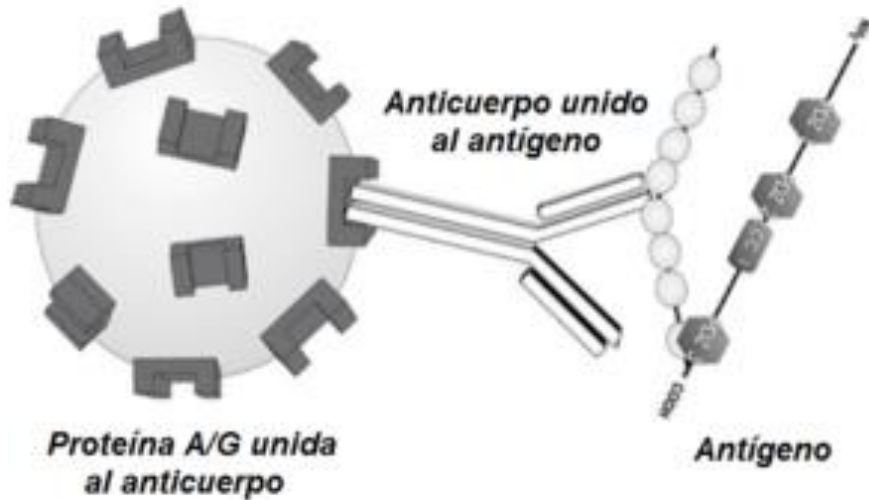
Se basa en la afinidad específica de una proteína por un ligando en particular:

- Enzima- sustrato (análogo)
- Enzima-cofactor o coenzima
- Enzima-inhibidor
- Hormona-receptor
- Anticuerpo-antígeno

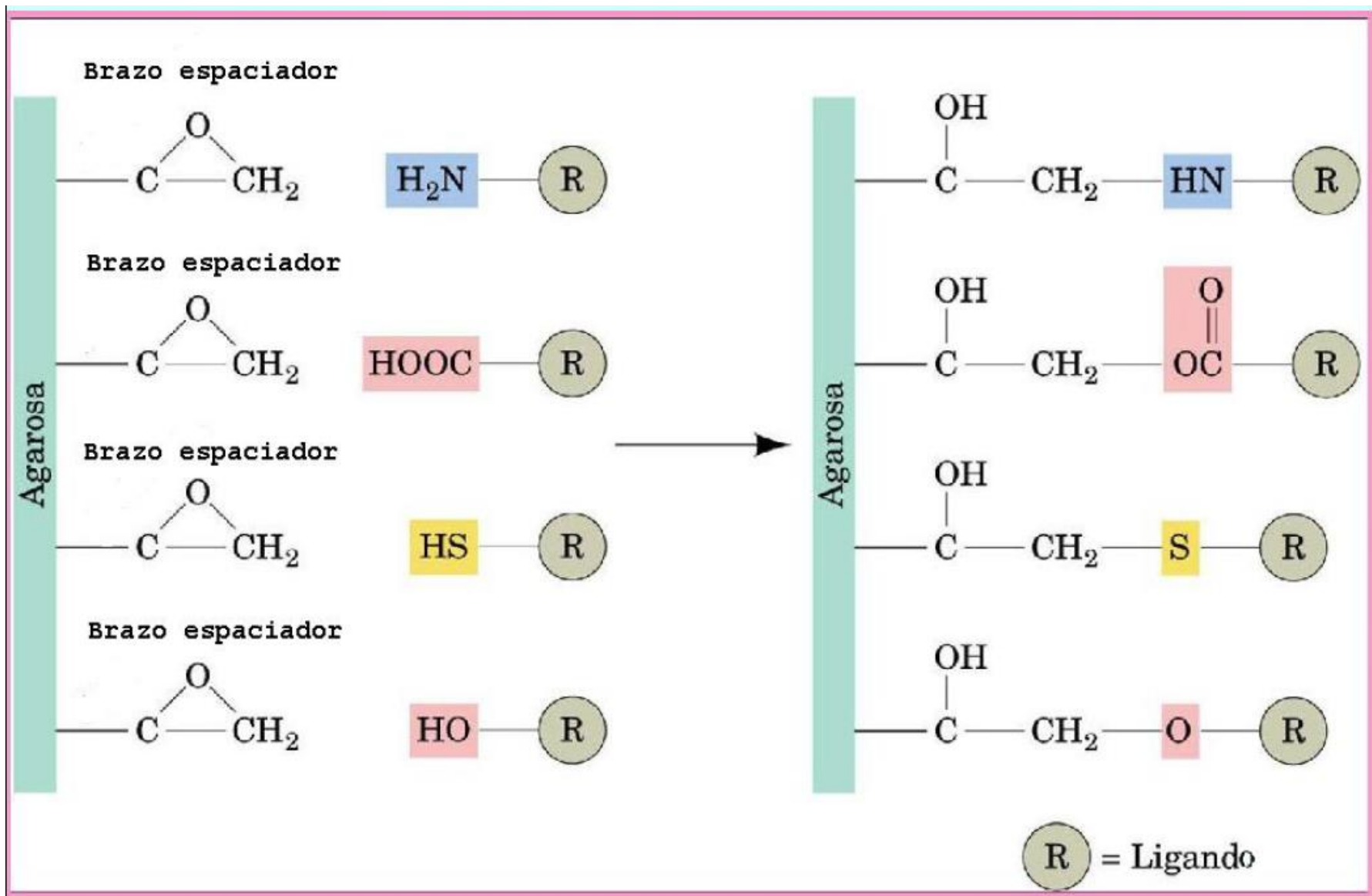
Reconocimiento molecular



Cromatografía de afinidad



Utiliza la alta especificidad entre las moléculas biológicas para separar componentes específicos de mezclas complejas.



Los ligandos presentan:

- Unión covalente estable con la matriz
- Alta capacidad para unir a la proteína de interés

¿Cómo eluir la proteína de interés?

Ejemplo: Proteínas con poli-His

Proteínas recombinantes que contienen una secuencia marcadora de Histidinas

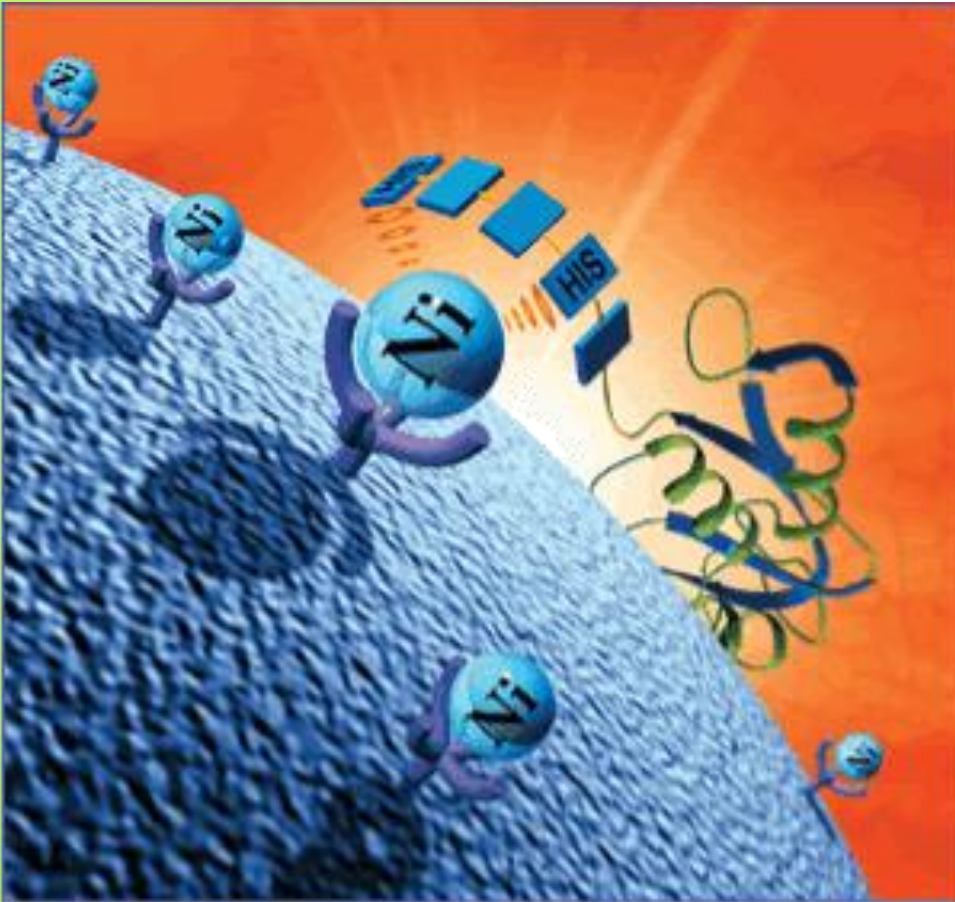


Figure 1. Model of IMAC purification of histidine-tagged proteins on HIS-Select HC Nickel Affinity Gel.

Elución con Imidazol, EDTA.

Cromatografía de afinidad

VENTAJAS:

Especificidad

Pureza del producto final

Se evitan otros pasos de purificación

Altos rendimientos

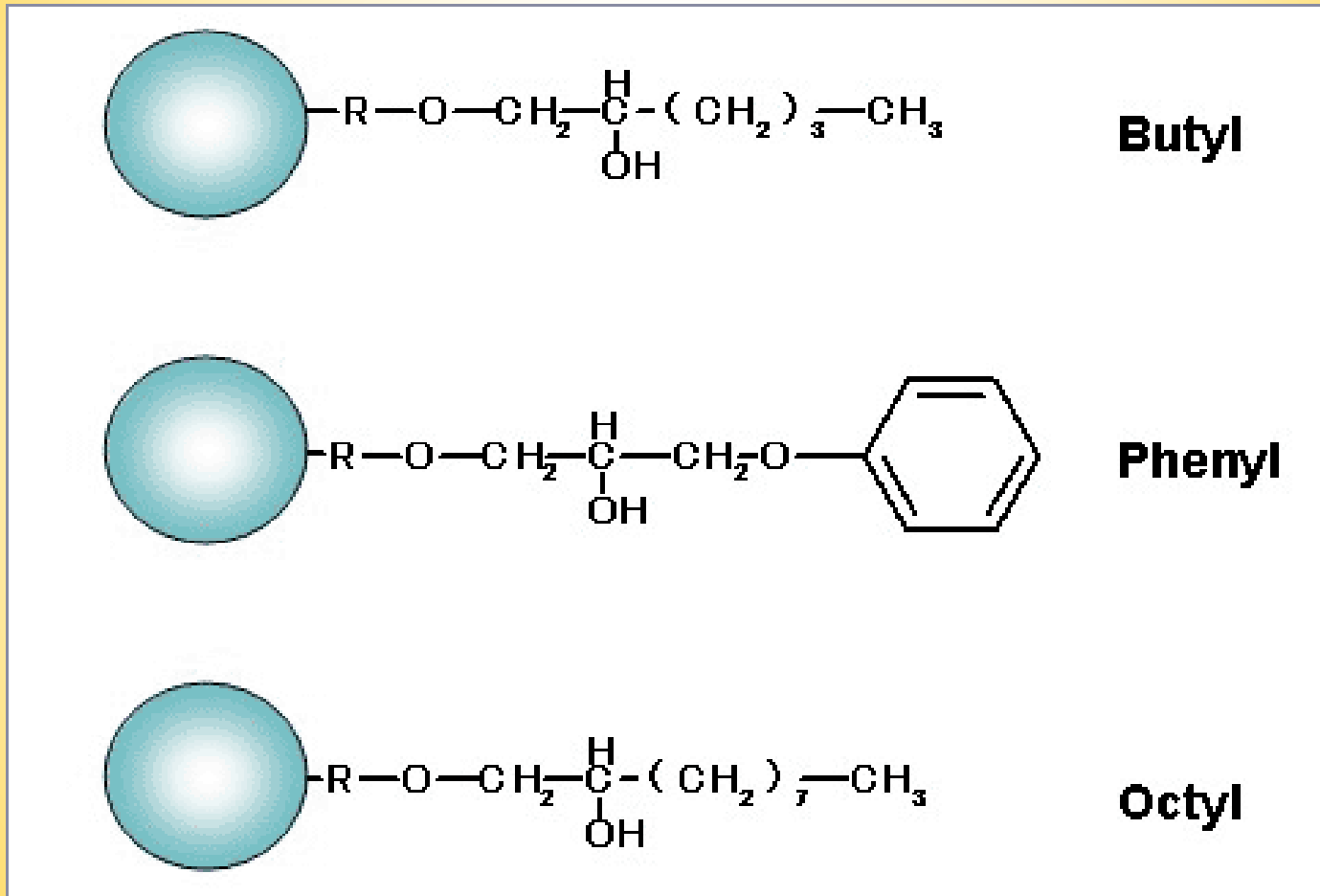
DESVENTAJAS:

Condiciones de elución drásticas

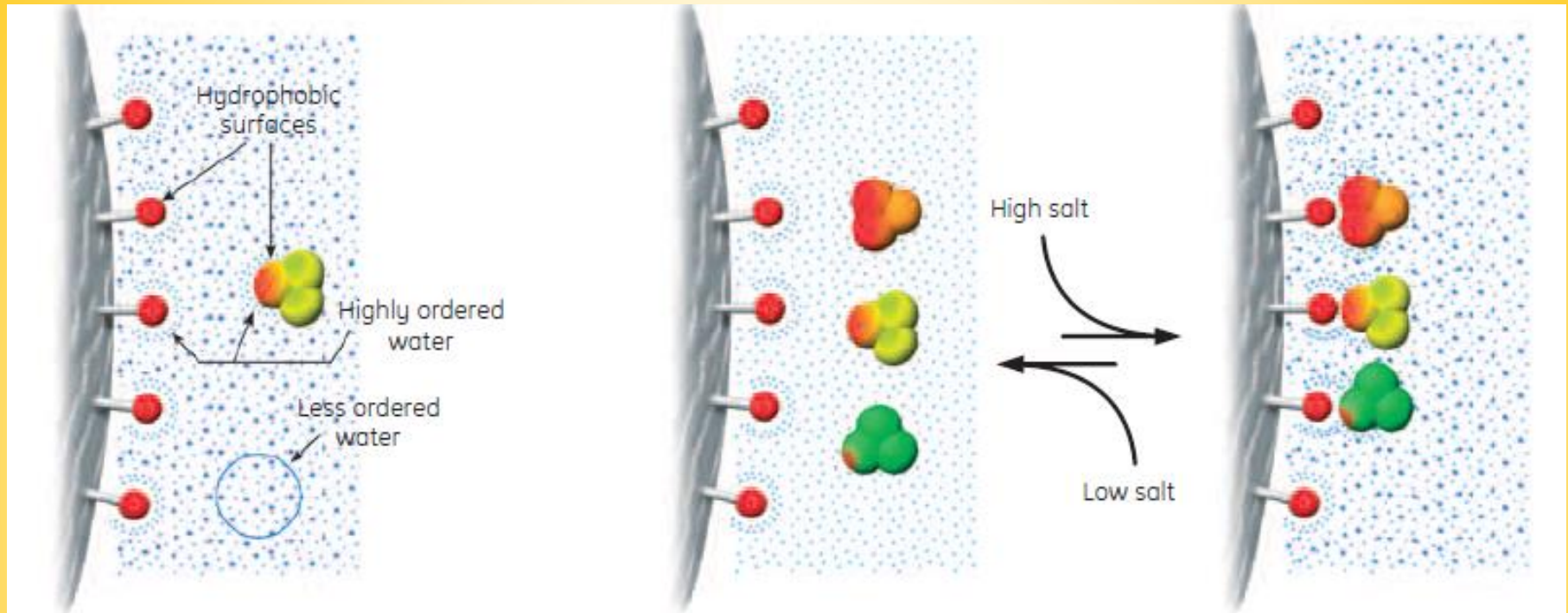
Ligando específico no disponible o inadecuado

Precio

Cromatografía de interacción hidrofóbica



Cromatografía de interacción hidrofóbica



La **interacción hidrofóbica** es dependiente de la fuerza iónica del amortiguador utilizado como eluyente.

La unión es mayor a altas concentraciones de sales.

Para eluir a la proteína se utilizan concentraciones decrecientes de sales.

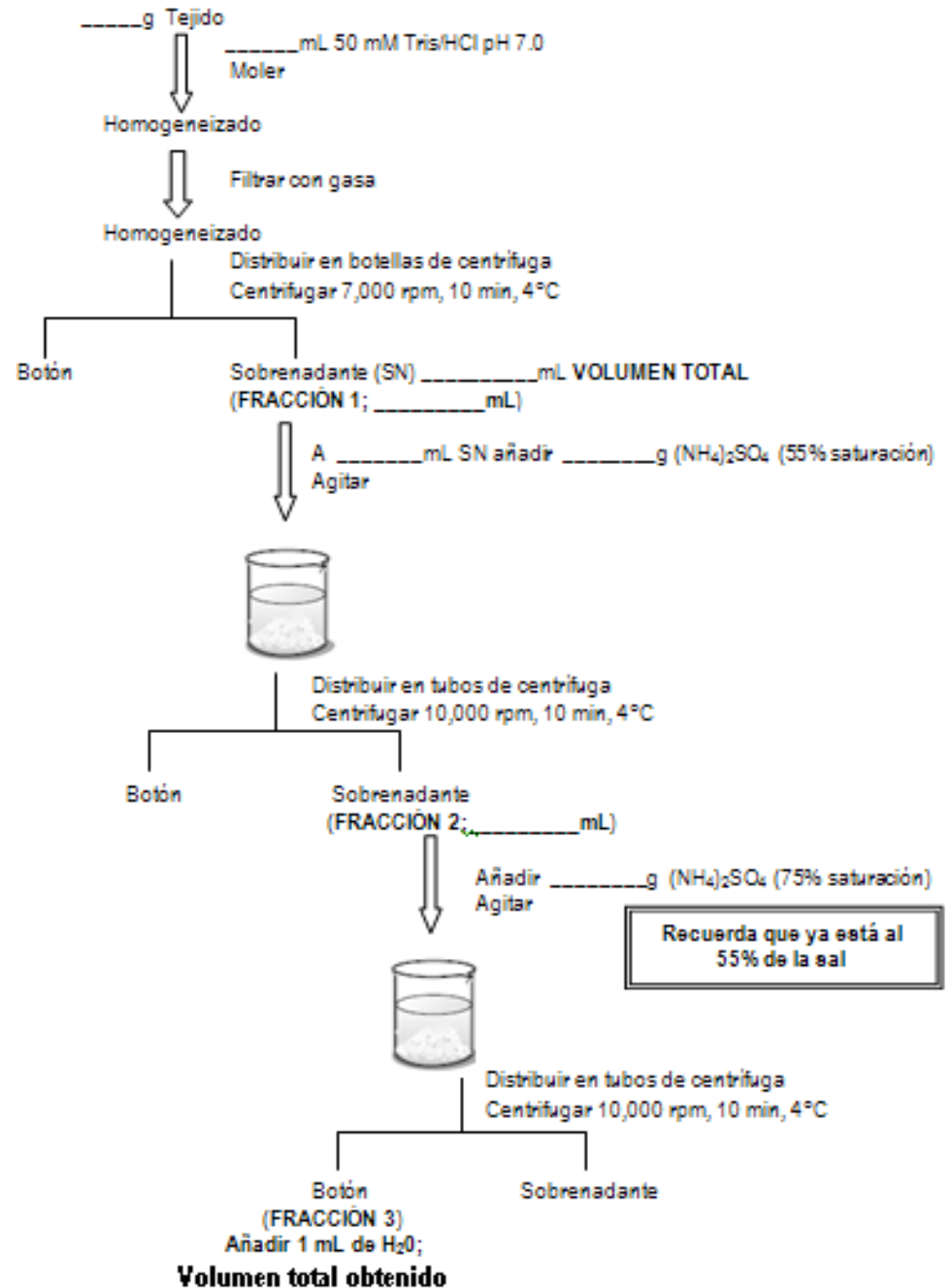
El experimento

Objetivos:

- Continuar con la purificación de la LDH.
- Llevar a cabo el desalado de la muestra por cromatografía de exclusión molecular.
- Emplear las técnicas de cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de afinidad.

¿Cómo vamos a purificar a la


LDH de *Gallus gallus*?



Alignment

Aminoácidos cargados

Negative
 Positive

 Learn how to print this alignment in color

1	-MSLKDHLIHNVHKEEHAHANKISVVGVGAVGMACAISILMKDLADELTLVDVVEDKLLK	59	P00340	LDHA_CHICK
1	MATLKEKLIIPVA-AGSTVPSNKITVVGVGQVGMACAISILGKGLCDELALVDVLEDKLLK	59	P00337	LDHB_CHICK
	:*::** * : ***:***** ***** * * .***:*****:*****			
60	GEMLDLQHGSLFLKTPKIISGKDYSVTAHSLKLVIVTAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFK	119	P00340	LDHA_CHICK
60	GEMLDLQHGSLFLQTHKIVADKDYAVTANSKIVVVTAGVRQQEGESRLNLVQRNVNVEKFK	119	P00337	LDHB_CHICK
	:**:* **:: ***:***.***:***.*****:***			
120	IIPNVVYSPDCKLLIVSNPVDILTYVAWKISGFPKHRVIGSGCNLDSARFRHLMGERLG	179	P00340	LDHA_CHICK
120	IIPQIVYSPNCTILVSNPVDILTYVTWKLKSLGPKHRVIGSGCNLDTARFRYLMAERLG	179	P00337	LDHB_CHICK
	:**:*.:::*****:***:***:*****:***:***:***.***			
180	IHPLSCHGWIVGEGHGDSSVPVWSGVNVAGVSLKALHPDMGTDADKEHWKEVHKQVVD SAY	239	P00340	LDHA_CHICK
180	IHPTSCHGWILGEGHGDSSVAVWSGVNVAGVSLQELNPPAMGTDKDSENWKEVHKQVVE SAY	239	P00337	LDHB_CHICK
	*** *****:***** *****: * * *** * * .*****:***			
240	EVIKLLKGYTSWAIGLSVADLAETIMKNLRRVHPISTAVKGMHGIKDDVFLSVPCVLGSSG	299	P00340	LDHA_CHICK
240	EVIKLLKGYTNWAIGLSVAELCETMLKNLYRVHVSSTLVKGTYGIENDVFLSLPCVLSASG	299	P00337	LDHB_CHICK
	:**.*****:*.***:*** ** :** *** :***:*****:***.:**			
300	ITDVKMILKPDDEEKIKKSAITLWGIQKELQF-	332	P00340	LDHA_CHICK
300	LTSVINQKLDDEVAQLKKSAITLWSIQKDLKDL	333	P00337	LDHB_CHICK
	:*.***: ** ** :*****.***:***			

You may add additional sequences to this alignment (in FASTA format)

No todas las cargas se encuentran expuestas

Consideraciones para la purificación de la LDH

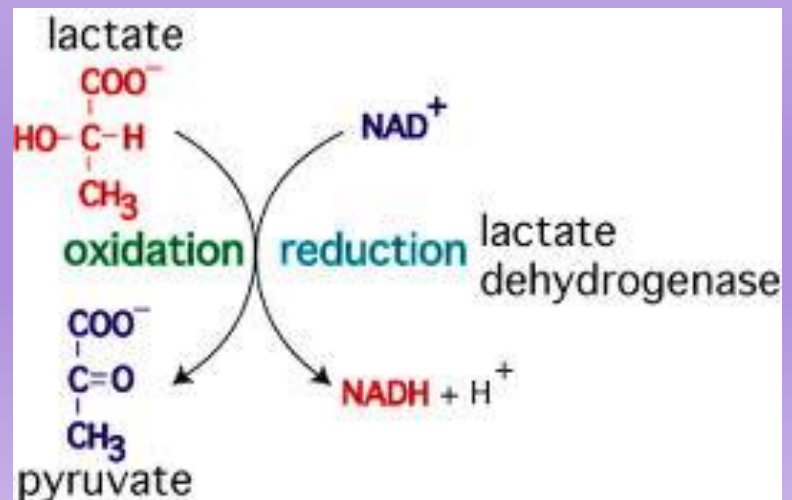
¿Cuál es el peso molecular?

¿Cuál es su pI?

¿Cuál será la carga neta de la proteína a un pH de 6.5?

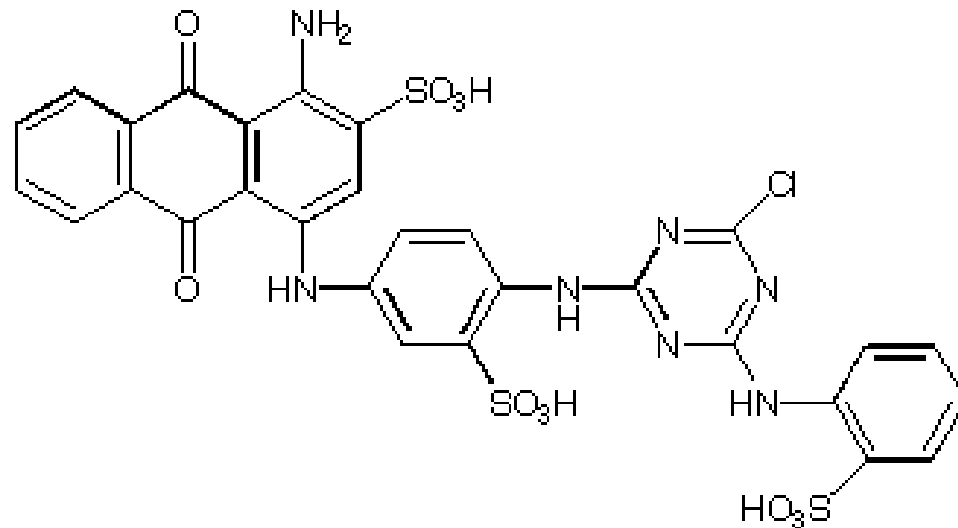
¿Qué tipo de intercambiador necesitamos?

¿Posibles ligandos?



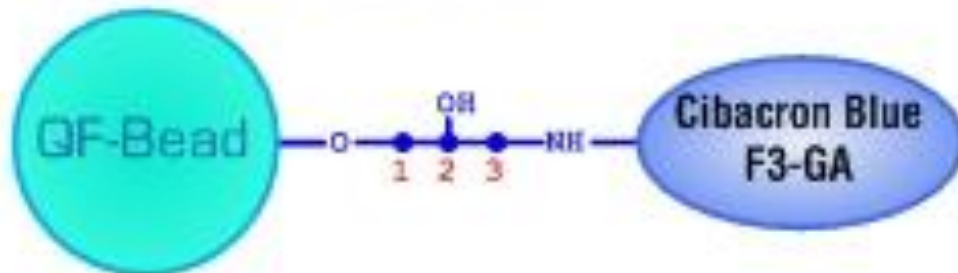
Purificación de la LDH por cromatografía de afinidad

Cibacron Blue (Blue-Sepharose, Affigel-Blue)



Cibacron Blue 3G-A

QF Cibacron Blue



Ejercicio

De acuerdo a la siguiente mezcla de proteínas, cual es el orden de elución en:

- a) Una cromatografía de exclusión molecular
- b) Una cromatografía de intercambio catiónico, si la mezcla de proteínas se encuentra a un pH de 6.5.

Proteína	Peso molecular (kDa)	pI
Mioglobina	17	7
Ureasa	483	5
Tripsina	34	8
Catalasa	222	3.4