



Instituto Nacional de
Medicina Genómica
MÉXICO

Métodos de Separación y Purificación de Proteínas

Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda
Inmegen

Introducción

El análisis de péptidos y proteínas es esencial para estudios biomoleculares y farmacéuticos.

Una de las herramientas más poderosas utilizadas para este propósito es la cromatografía de líquidos de alta resolución.

“High performance liquid chromatography”

¿Qué es la cromatografía?

Cromatografía

griego chromos = color

Es el término usado para una familia de técnicas de laboratorio para la separación de mezclas

Esta involucra el pasar una mezcla de compuestos a través de una fase estacionaria, la cual permite sean separadas de acuerdo a sus propiedades.

La Cromatografía es un método de separación físico para separar.



Cromatografía

En toda cromatografía existe un contacto entre dos fases:

Fase estacionaria: fija

1. Alúmina

2. Sílice

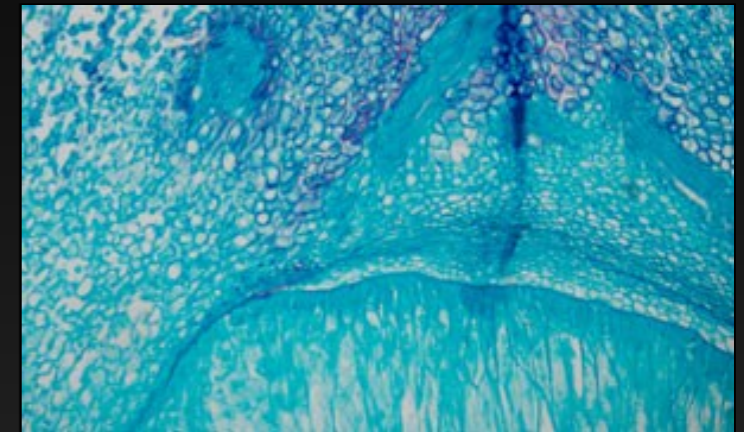
3. Resinas de intercambio iónico: son matrices sólidas que contienen sitios activos (también llamados grupos ionogénicos) con carga electrostática (positiva o negativa).

Fase móvil: fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido o mezcla de varios líquidos.

Acuoso: Solución amortiguadora

Orgánicos: ACN, MeOH, Isopropanol, etc.

Tipos: Isocrática, gradiente.



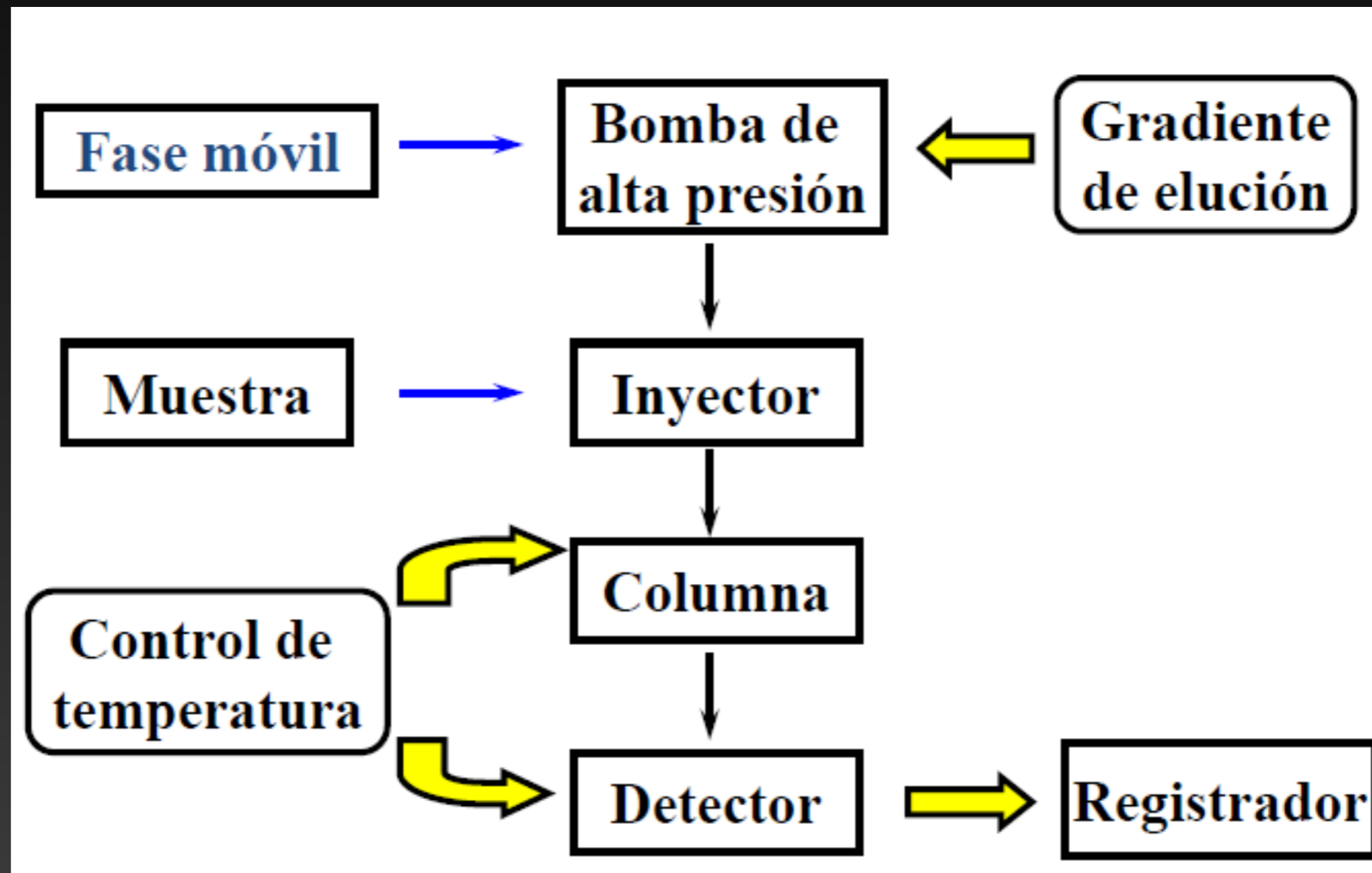
Cromatografía

Principio:

La muestra queda retenida sobre el soporte sólido por afinidad electrostática. Dependiendo de la relación carga/tamaño unos constituyentes de la mezcla serán retenidos con mayor fuerza sobre el soporte sólido que otros, lo que provocará su separación.

Las sustancias que permanecen más tiempo libres en la fase móvil, avanzan más rápidamente con el flujo de la misma y las que quedan más unidas a la fase estacionaria o retenidas avanzan menos y por tanto tardarán más en salir o fluir.

HPLC - Componentes

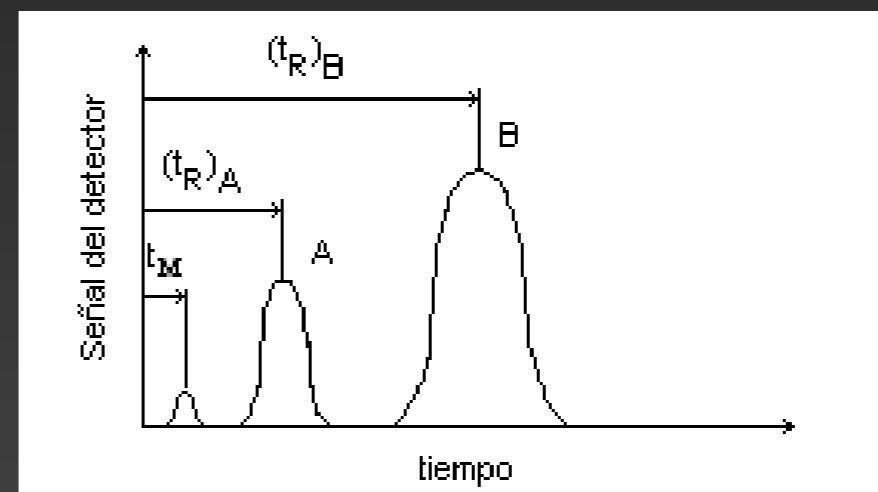


Equipos



Cromatograma

Es la representación gráfica de la señal en función del tiempo una vez que la muestra es inyectada a un sistema cromatográfico. Para obtener este cromatograma a la salida de la columna se coloca un sistema de detección y registro, que permite responder a una propiedad de la solución que contiene el analito o del propio analito en función del tiempo.



Definiciones

Tiempo de Retención

El tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra para que el pico del analito alcance el detector se denomina tiempo de retención y se le da el símbolo t_R .

Tiempo Muerto

Es el tiempo t_M para que la especie no retenida alcance el detector.

Definiciones

Constante de Distribución

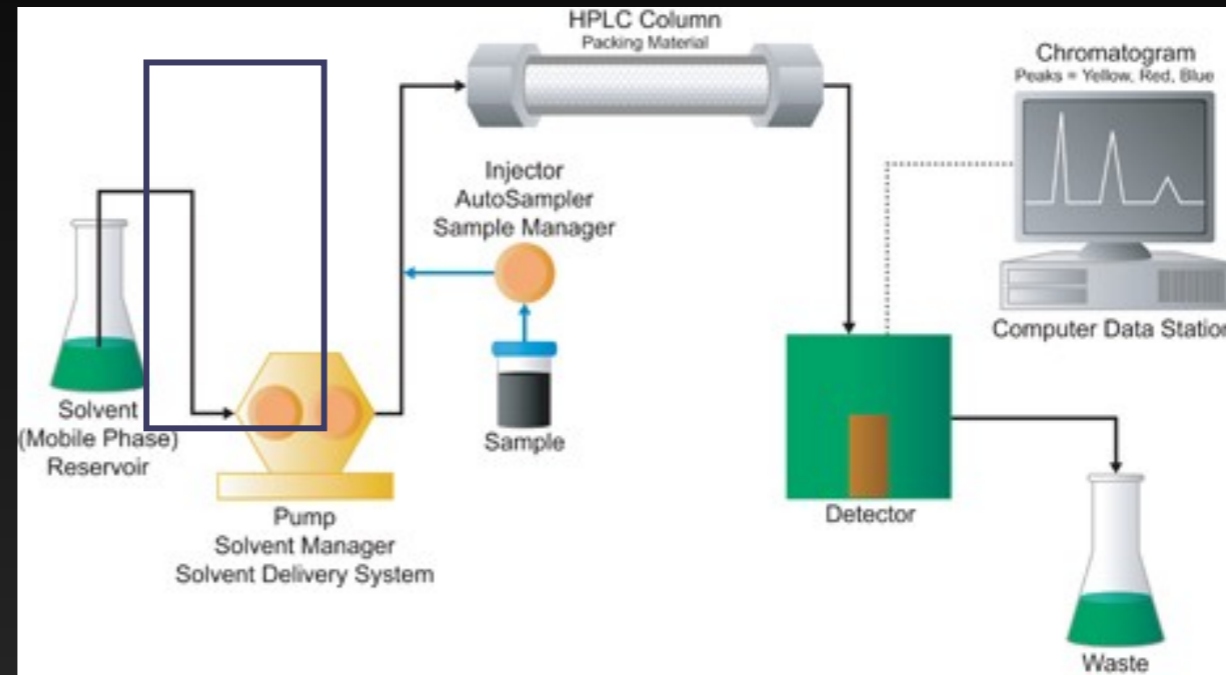
Los equilibrios de distribución implicados en cromatografía que suponen la transferencia de un analito entre las fases estacionaria y móvil.

Factor de Capacidad

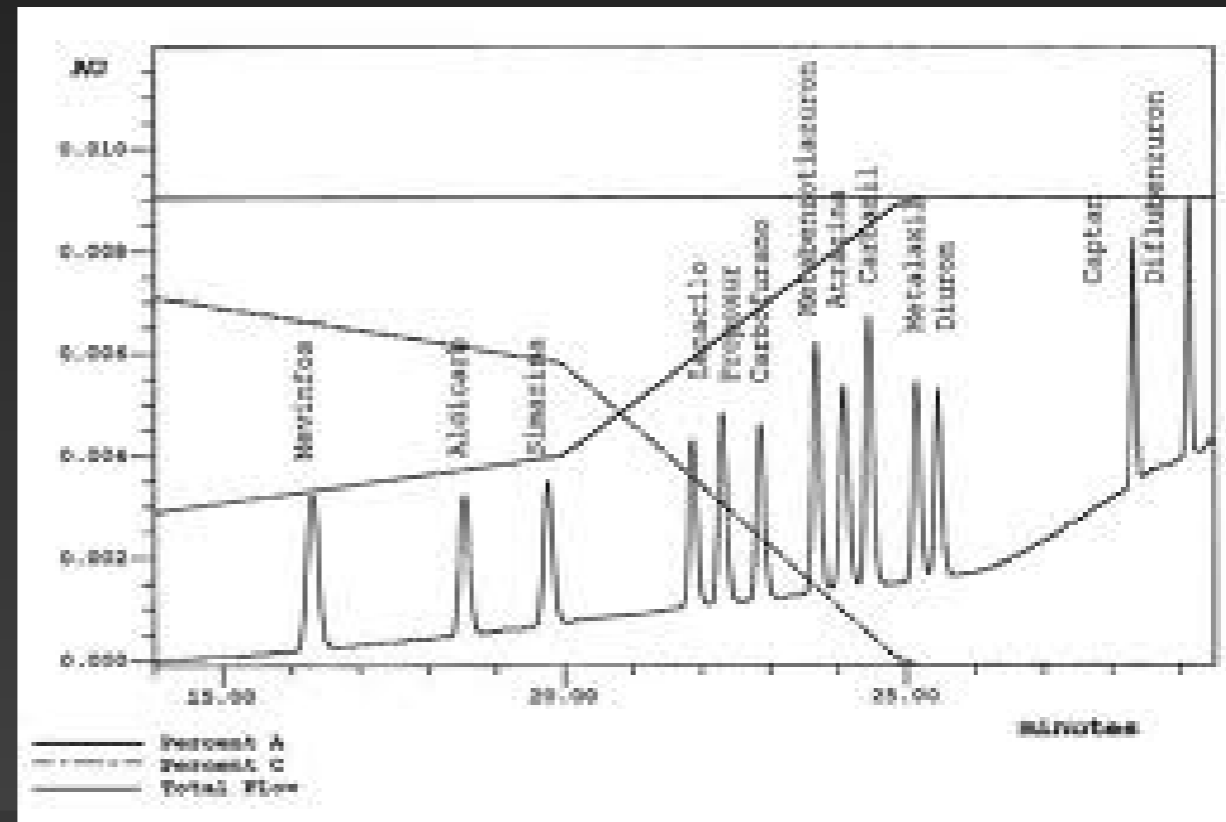
Es un parámetro (k') que se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas y se interpreta considerando que mientras mayor sea el valor de este factor menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna.

Tipos de fase móvil

Isocrática



Gradiente



Separación de proteínas y péptidos

Para poder separar y purificar proteínas y péptidos es necesario estudiar el carácter de las sustancias y seleccionar un modo de separación.

Para poder escoger el modo de separación se debe de considerar cual de los siguientes casos describe mejor a tu analito.

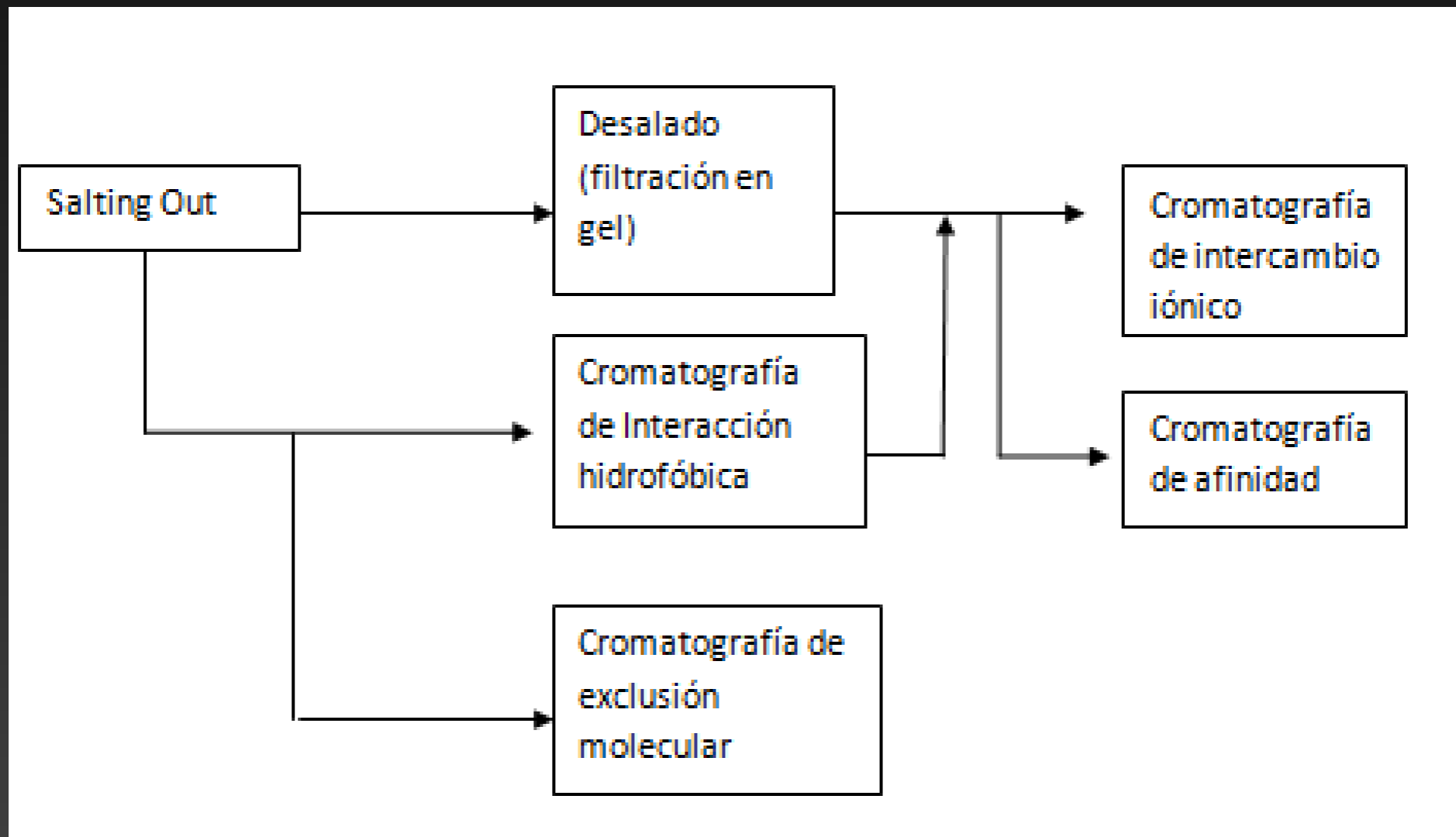


Analitos

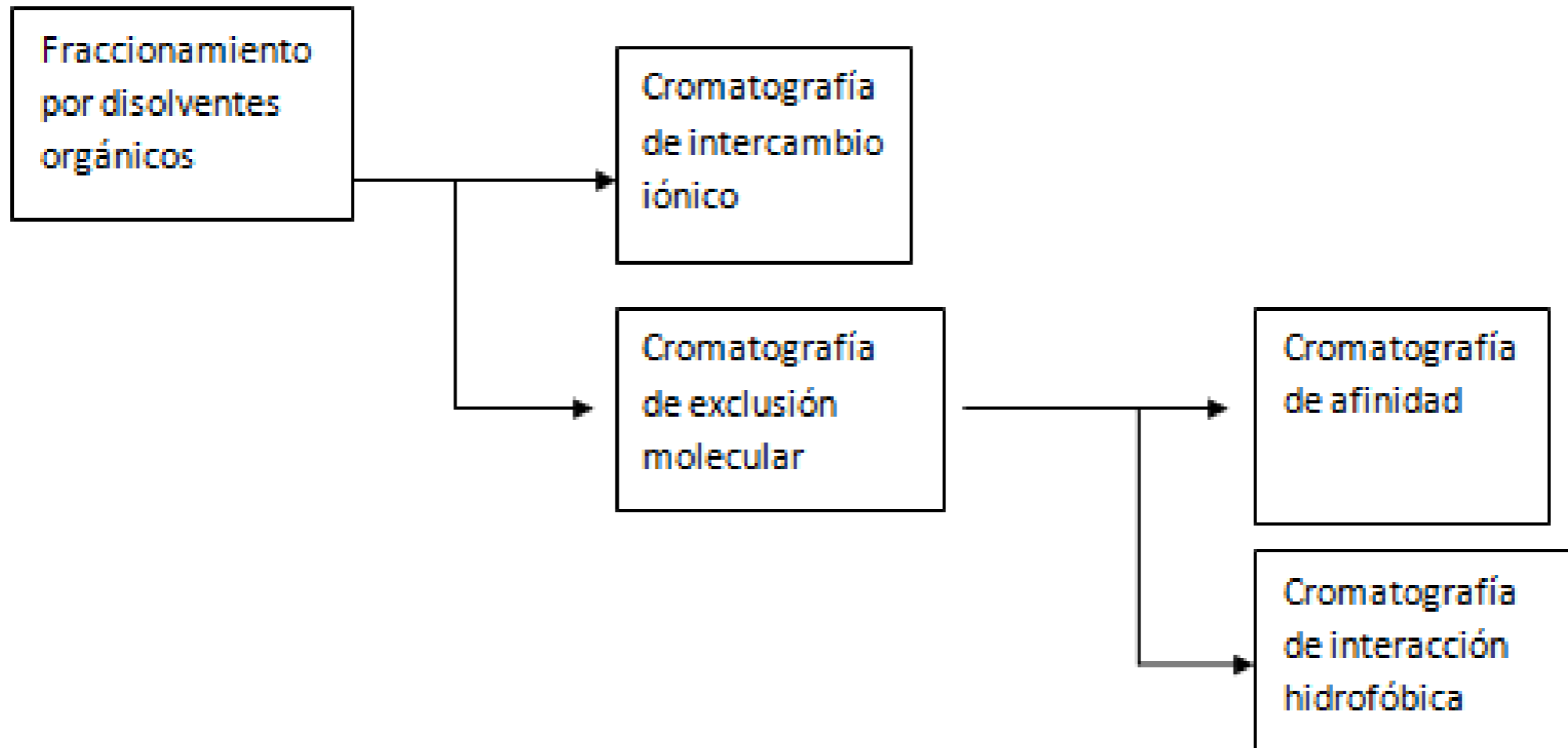
- El caso en el que la diferencia en pesos moleculares es grande:
cromatografía de exclusión molecular
- El caso en el que existan diferencias en el punto isoeléctrico
cromatografía de intercambio iónico
- El caso en que existen diferencias en la hidrofobicidad:
cromatografía fase reversa
- El caso en que exista una afinidad a un tipo de resina:
cromatografía de afinidad
- En todos los casos hay que considerar factores como el pH,
termoestabilidad y concentración.

Cromatografía

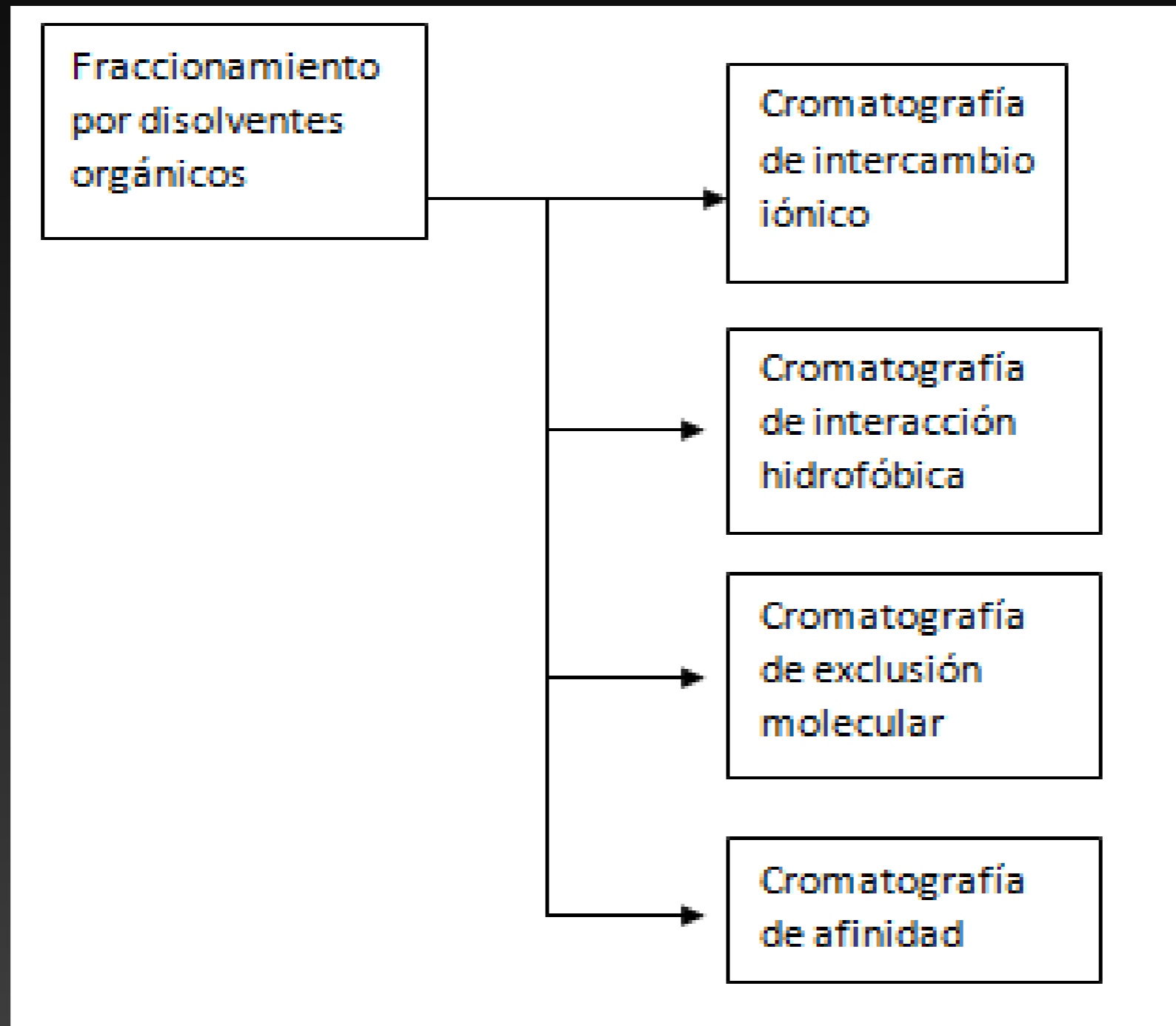
Usualmente es necesario de combinar los métodos de separación. Por ejemplo:



Cromatografía



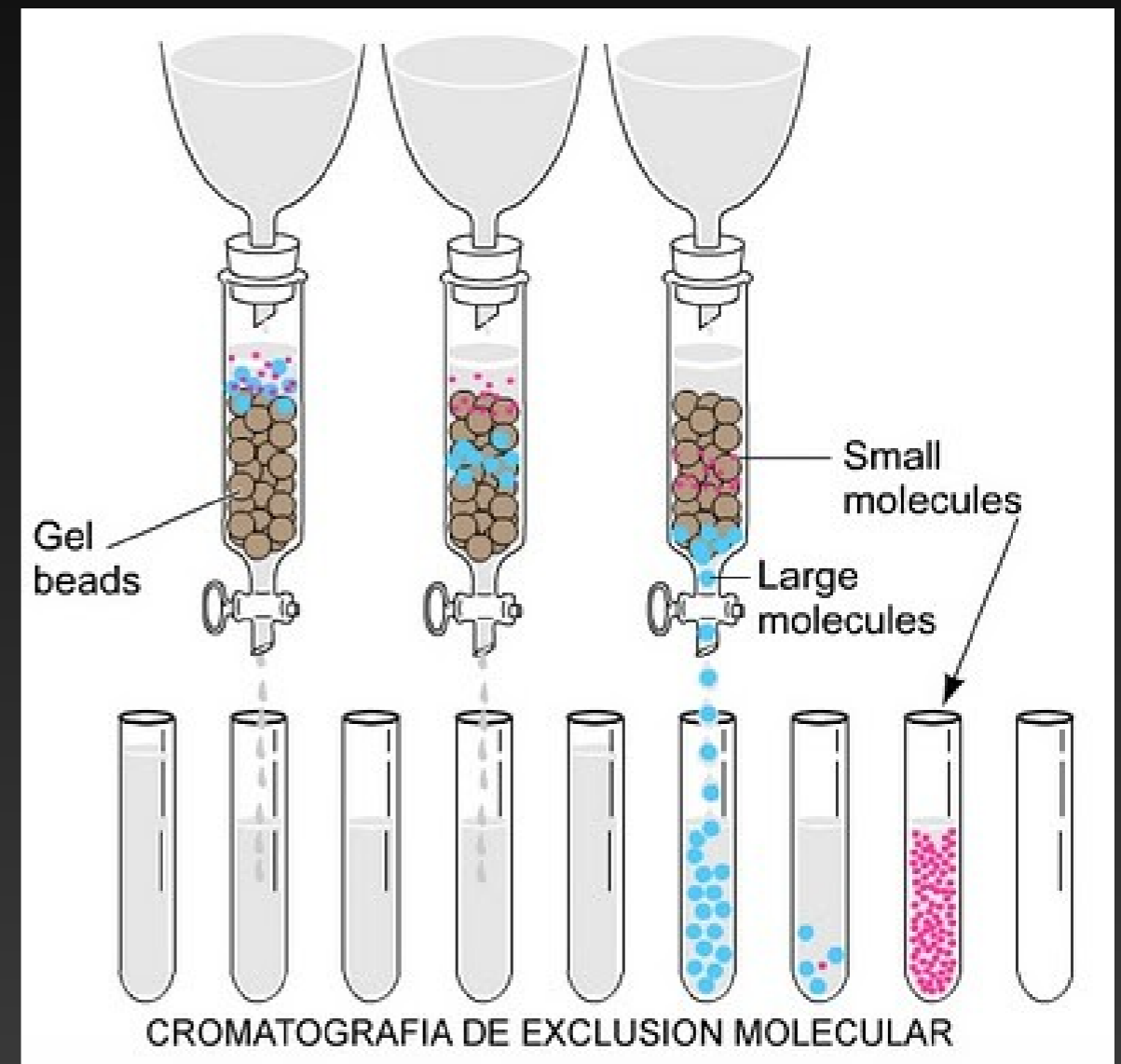
Cromatografía



Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión, también llamada de filtración en gel o cromatografía de permeación en gel, se basa en la diferencia de penetración de las moléculas en los poros de la fase estacionaria debido a que la separación obtenida depende del tamaño de la molécula.

El tiempo de elución es proporcional al peso molecular de los mismos, por lo que no es muy usada con los compuestos de alto peso molecular y menor gasto en la columna.



Cromatografía de exclusión molecular

- La fase fija está formada por partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros por los que pueden penetrar las moléculas de pequeño tamaño.
- Las moléculas de tamaño grande se excluyen totalmente y son eluidas en primer lugar, mientras que las de pequeño tamaño tienen acceso a todo el volumen poroso y son las últimas que se eluyen; de esto se deduce que el volumen disponible para las moléculas pequeñas es mayor que para las grandes.
- Por lo tanto las moléculas se eluyen por su tamaño decreciente.

Cromatografía de exclusión

En resumen los factores que determinan la separación de las moléculas son:

- El tamaño del poro
- El tamaño de la partícula
- Flujo de elución

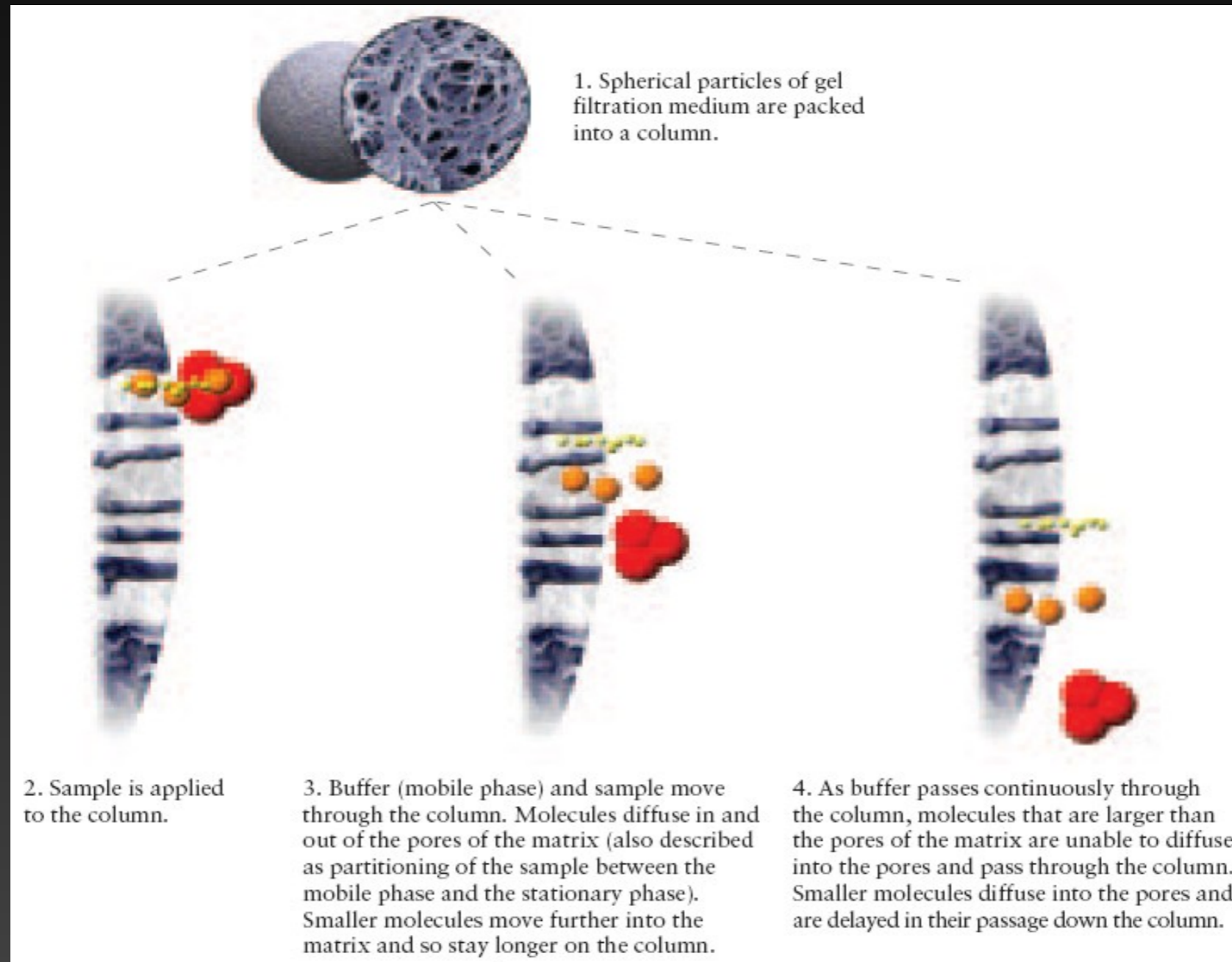
Características de las partículas: (fase estacionaria)

- Estables: mecánica y químicamente
- Bajo contenido en grupos iónicos
- Uniformidad de poro y tamaño

Los compuestos pueden ser derivados de dextranos (Sephadex), derivados de agarosa (Sepharosa), derivados de acrilamidas (Biogel P) y esferas de vidrio.

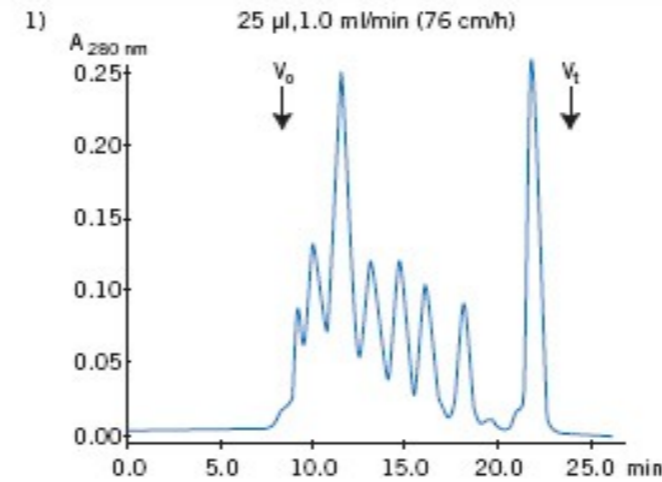
Hay diferentes tamaños de partícula para un gel: a menor tamaño mayor resolución.

Cromatografía de exclusión molecular



Cromatografía de exclusión molecular

Diferencias en volumen de inyección



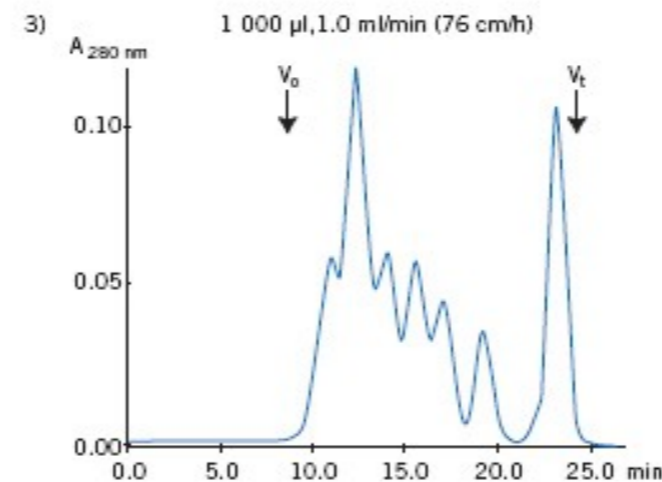
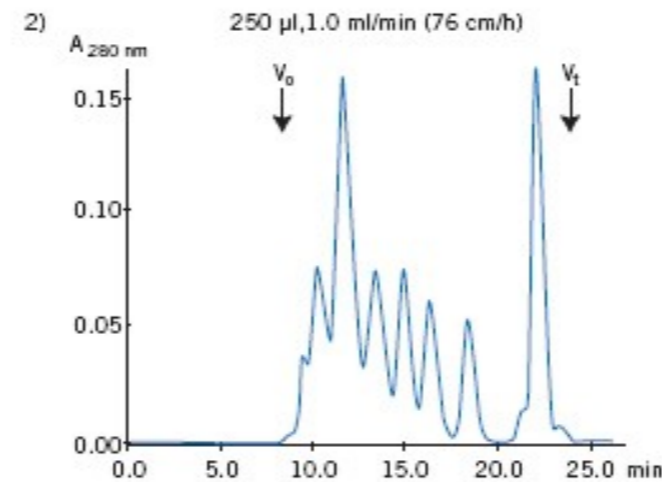
Column: Superdex™ 200 HR 10/30 (V_t : 24 ml)

Sample:	M_r	Conc. (mg/ml)
Thyroglobulin	669 000	3
Ferritin	440 000	0.7
IgG	150 000	3
Transferrin	81 000	3
Ovalbumin	43 000	3
Myoglobin	17 600	2
Vitamin B12	1 355	0.5

Sample concentration: 15.2 mg/ml

Sample volumes:
1) 25 μ l ($0.1\% \times V_t$)
2) 250 μ l ($1\% \times V_t$)
3) 1000 μ l ($4.2\% \times V_t$)

Buffer: 0.05 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.0
Flow: 1.0 ml/min (76.4 cm/h)



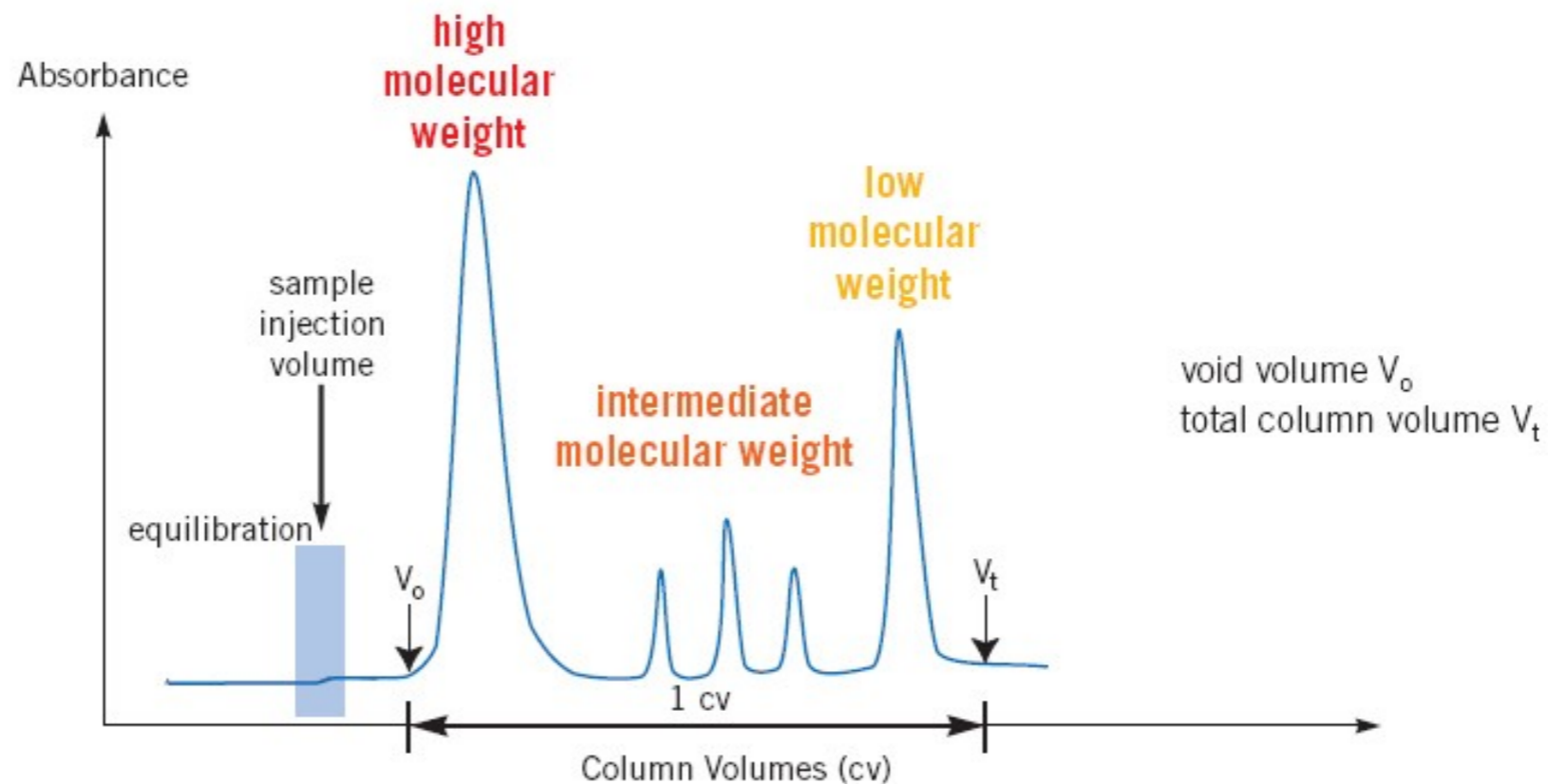
Influencia del volumen de la muestra en la resolución de los picos

El volumen recomendado de muestra es de 0,5-4% del total del volumen de la columna.

Se puede adicionar de muestra hasta un 30% del volumen total de la columna.

Cromatografía de exclusión molecular

Todas las moléculas a separar entran en los poros de las esferas. Si la columna está bien empacada, aproximadamente el 30% del volumen total de la columna es volumen muerto (V_0).



Theoretical chromatogram of a high resolution fractionation (UV absorbance).

Cromatografía de exclusión molecular

Se utiliza como el primer screening de separación para proteínas desconocidas ya que:

- El eluyente se puede seleccionar fácilmente
- Se puede separar por tamaño de partícula
- Se usa como método de purificación

Cromatografía de Intercambio Iónico

- Es un proceso que permite la separación de iones y moléculas polares basado en las propiedades de carga de las moléculas.
- Puede ser usada en casi cualquier tipo de molécula cargada, incluyendo grandes proteínas, pequeños nucleótidos y aminoácidos.
- La solución que debe inyectarse es usualmente llamada "muestra" y los componentes separados individualmente son llamados *analitos*.
- Es usada a menudo en purificación de proteínas, análisis de agua o control de calidad.

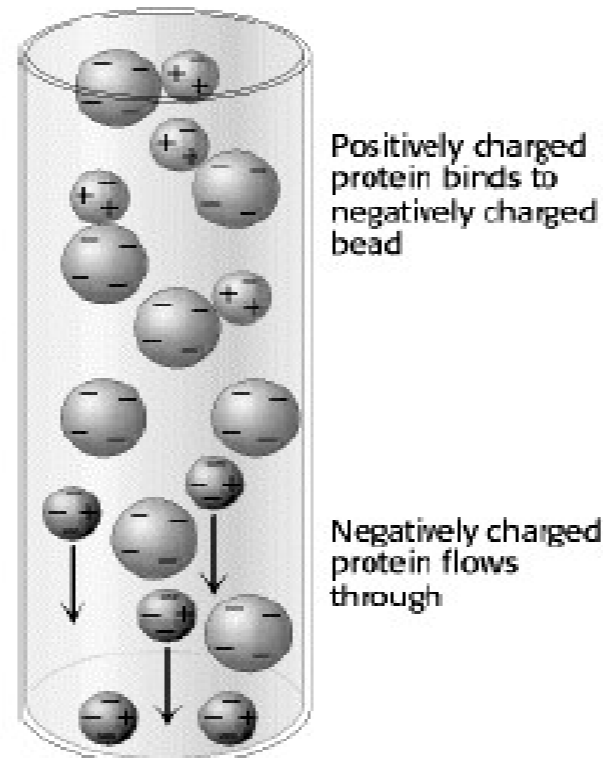
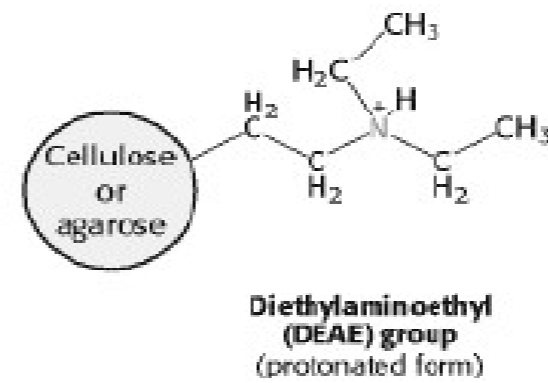
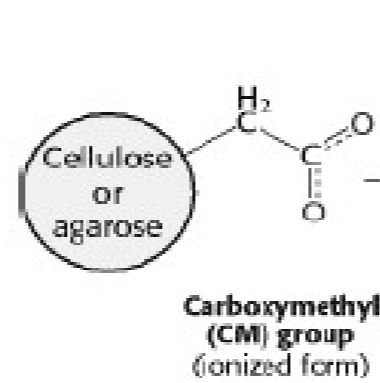
Cromatografía de intercambio iónico

- La cromatografía de intercambio iónico conserva los analitos basándose en las interacciones de Coulomb.

Ventajas

- a.- Alta resolución
 - b.- Fácil de usar
 - c.- Resultados altamente reproducibles
 - d.- Bajo costo
- La fase estacionaria muestra en la superficie grupos funcionales iónicos que interactúan con iones de carga opuesta del analito.

Cromatografía de intercambio iónico



Cromatografía de intercambio iónico

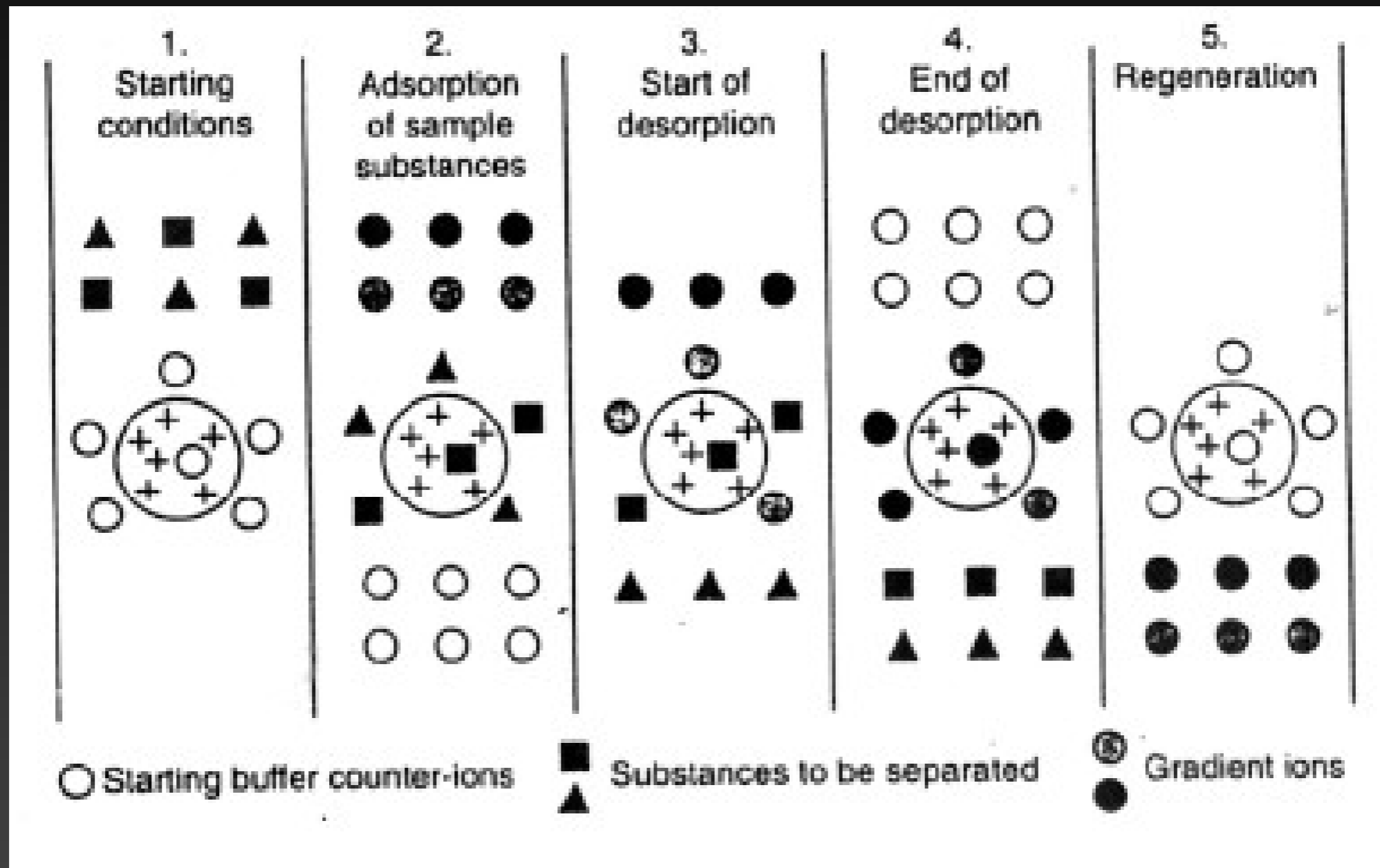
La separación por cromatografía de intercambio iónico depende de la adsorción reversible de una molécula de soluto cargada a un grupo de intercambiadores iónicos inmovilizados de carga opuesta.

La mayoría de los experimentos de intercambio se realizan en cinco etapas:

1. Equilibrio de la matriz (pH, fuerza iónica)
2. Adsorción de la muestra
3. Comienzo de la remoción
4. Fin de la remoción
5. Regeneración de la matriz

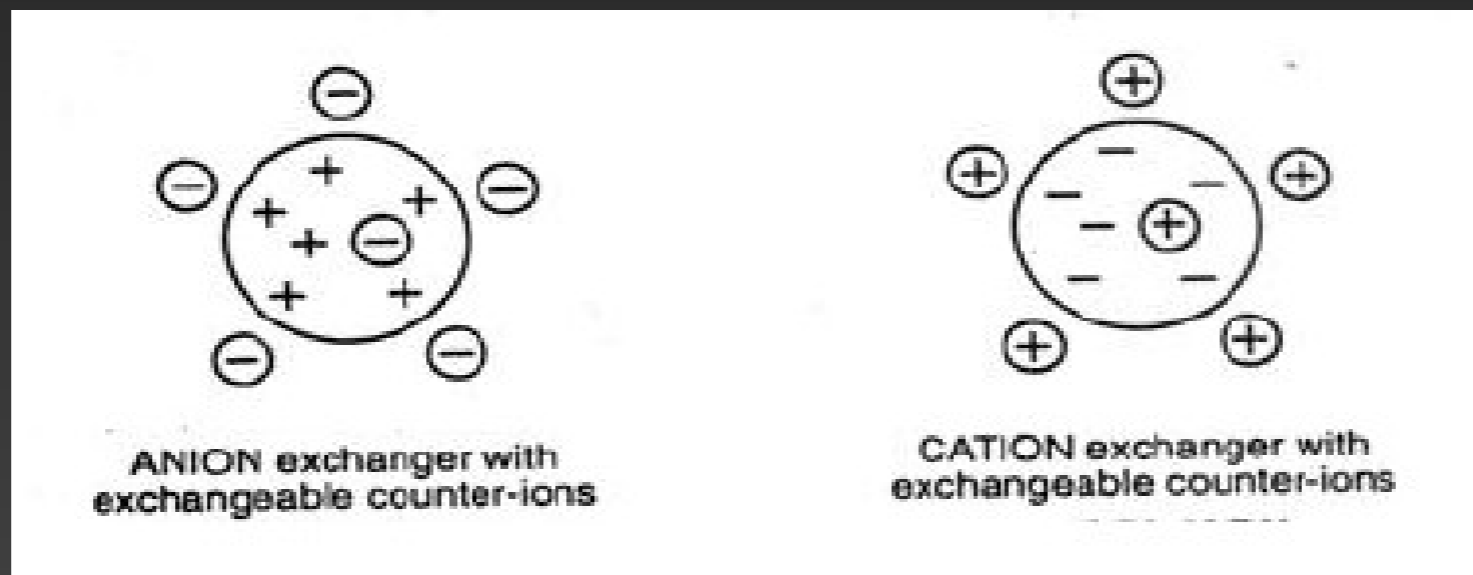
Cromatografía de intercambio iónico

Etapas:



Cromatografía de intercambio iónico

- La cromatografía de **intercambio catiónico** retiene cationes cargados positivamente debido a que la fase estacionaria muestra un grupo funcional cargado negativamente, como un ácido fosfórico.
- La cromatografía de **intercambio de aniones** retiene aniones usando grupos funcionales cargados positivamente, como un catión de amonio cuaternario.



Cromatografía de intercambio iónico

Principios.

La proteína desplaza a un ion de bajo peso molecular que se encuentra unido a una matriz de intercambio iónico y se une a ella. Es necesario que la proteína tenga una carga neta.

Punto isoeléctrico de la proteína.

- Se debe usar un pH que difiera en una unidad del pI de la proteína.
- La proteína debe tener una carga neta suficiente para unirse a la matriz, pero no tanta para que se requieran condiciones muy extremas para ser eluída (alta fuerza iónica o cambios significativos de pH).

Cromatografía de intercambio iónico

Unión de la proteína a la matriz. La matriz y la proteína deben tener cargas opuestas.

1. Matriz con carga positiva, DEAE (dietilamino etilo): intercambio aniónica.

2. Matriz con carga negativa, CM (carboximetil): intercambio catiónica.

Purificación de una proteína.

Unión diferencial de las proteínas a la matriz, (cargas netas diferentes).

Las proteínas se unen a la matriz con distintas afinidades, se separa usando diferentes concentraciones de sal o variando el pH.

Cromatografía de intercambio iónico

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.

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.

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.

Cromatografía de intercambio iónico

La proteína no se absorbe a la matriz.

1. La fuerza iónica inicial puede ser muy alta.
2. El pH de la columna puede no ser el adecuado.
3. La columna puede no estar equilibrada adecuadamente.

Rendimiento bajo.

El rendimiento normal es de 60 - 80 %. Un rendimiento mas bajo pueden ser porque:

1. La proteína permanece unida a la columna; se requiere una fuerza iónica mayor.
2. El pH de la columna no es el adecuado. Si el pH es muy diferente al pI, la proteína se puede unir muy fuertemente a la columna.
3. Una proteasa está presente en la preparación.

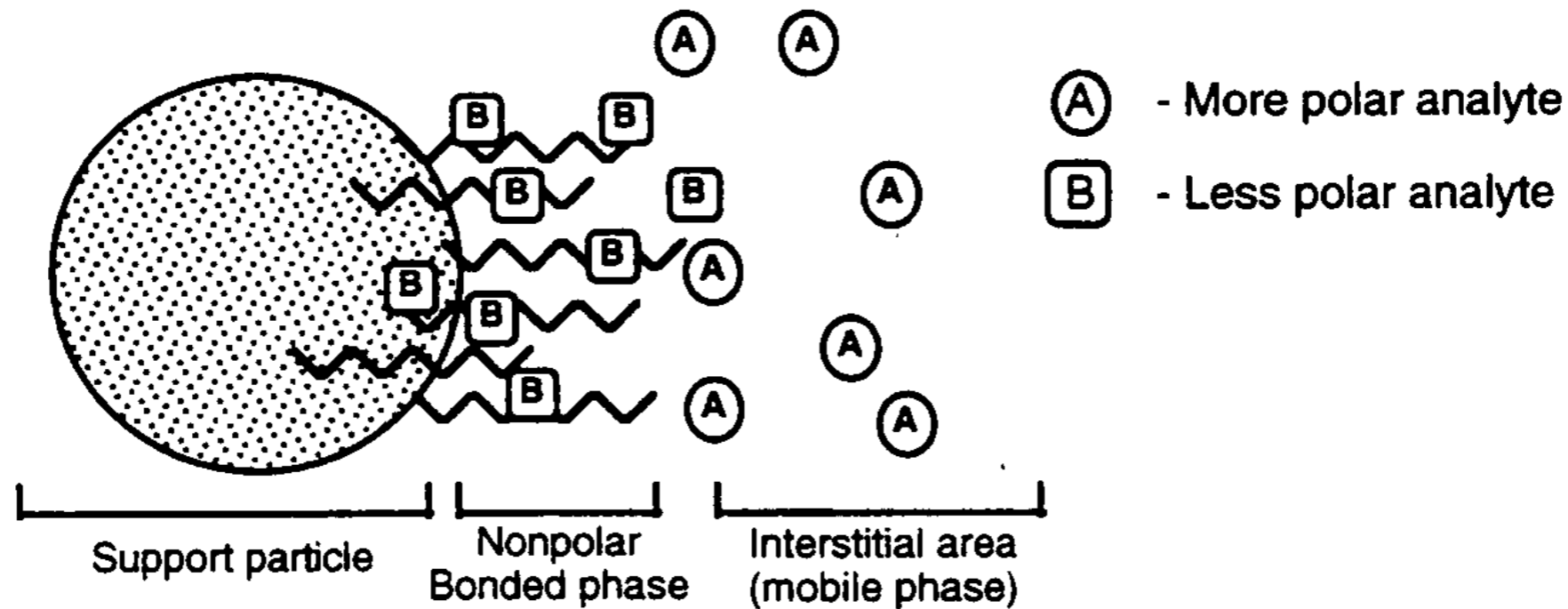
Cromatografía fase reversa

- La cromatografía en fase reversa (RPC) permite separar moléculas en base a su polaridad.
- El principio de la cromatografía en fase reversa es semejante al de la cromatografía en **capa fina**.
- Sin embargo, aquí la fase estacionaria es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos.
- Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar. Por lo tanto, para este tipo de cromatografías se emplean mezclas de solventes polares, tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos.

Cromatografía fase reversa

- En virtud de lo anterior, este tipo de cromatografía ha sido también llamada como cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).
- En general, este último término se ha empleado para referirse a las aplicaciones en las que se emplean sustituyentes y matrices compatibles con fluidos biológicos.
- Por tanto, el término HIC es común cuando se habla de purificación de proteínas y carbohidratos, en tanto que RPC es más empleado para referirse a la separación de moléculas en sistemas que son inadecuados para la separación de macromoléculas biológicas.

Cromatografía fase reversa



- **Less polar (more hydrophobic) analytes are more attracted to the hydrophobic bonded phase...**
- **...more hydrophobic spends more time associated with the bonded phase...**
- **...and are eluted last. Methanol is active solvent.**

Cromatografía fase reversa

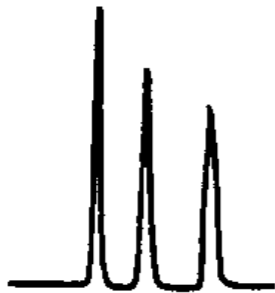
- Las moléculas se retienen en la columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada.
- Aunque, las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también a menudo muy numerosas y para eluir las moléculas es casi siempre necesario disminuir la polaridad del disolvente; para ello se puede substituir el agua de la fase móvil con un solvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente.

Cromatografía fase reversa



75 % MeOH / 25 % H₂O

FAST



60 % MeOH / 40 % H₂O

SLOW



50 % MeOH / 50 % H₂O

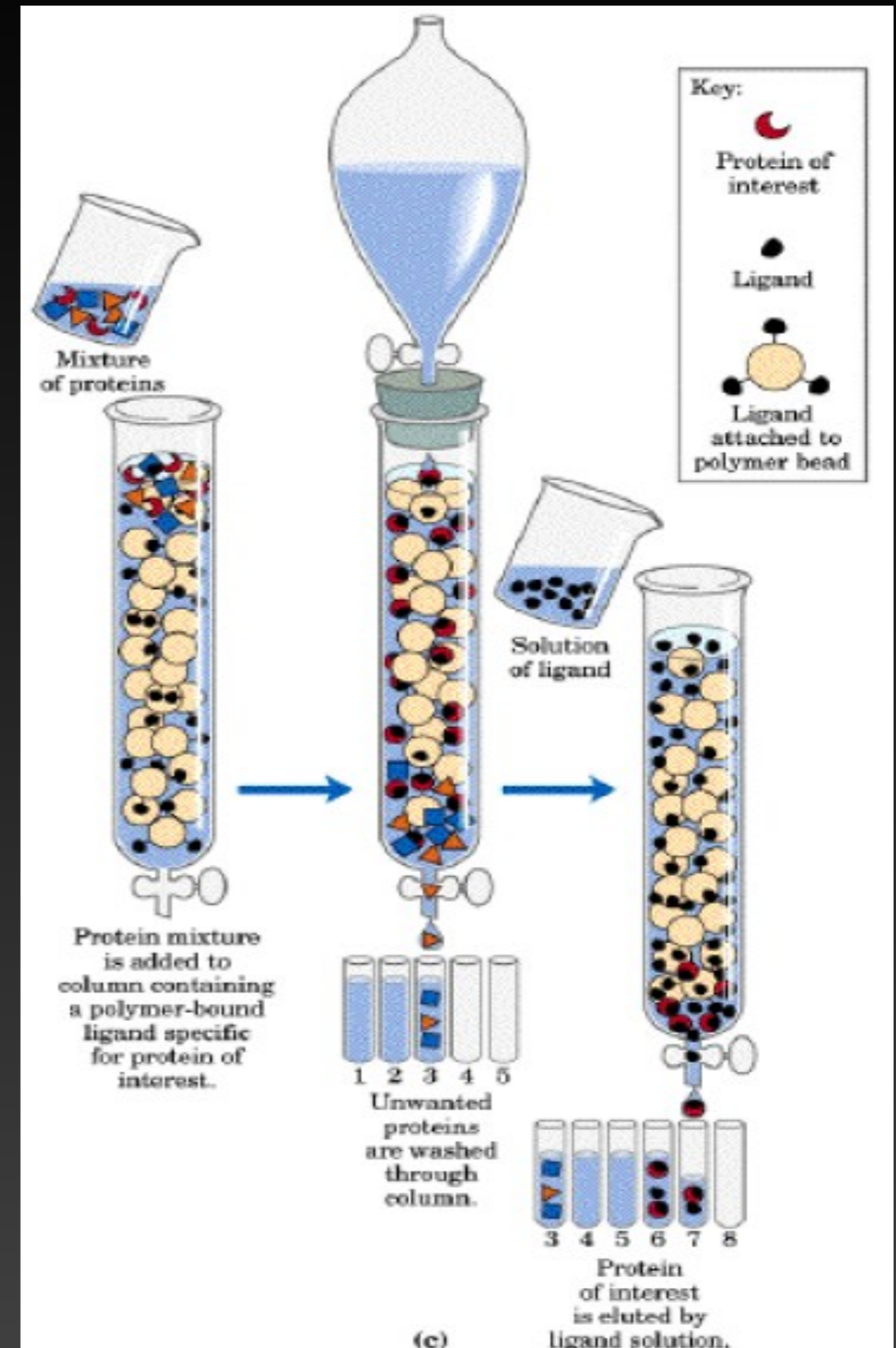
SLOWEST

Cromatografía de afinidad

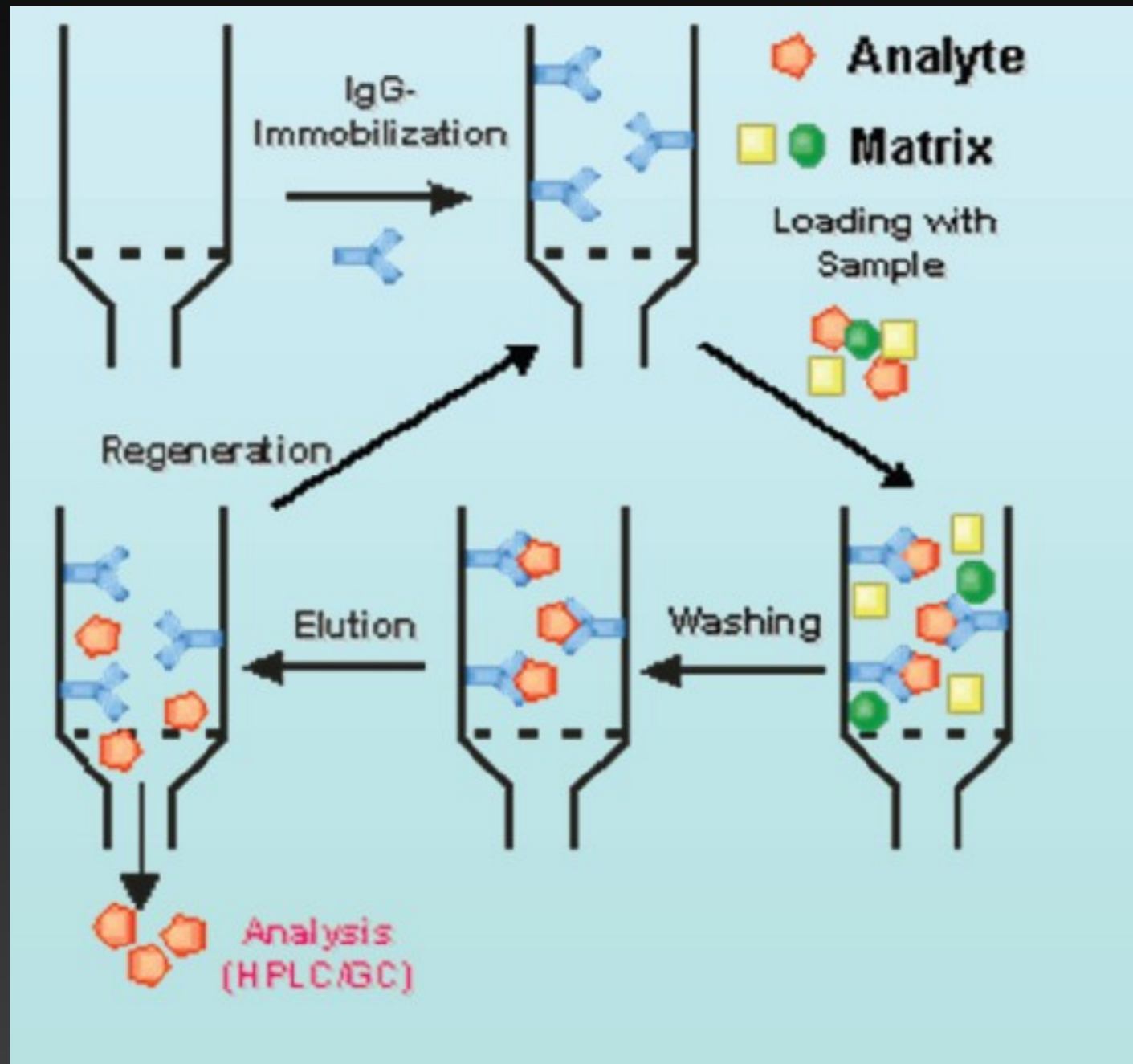
Es una cromatografía que utiliza la alta especificidad de las reacciones biológicas del tipo antígeno-anticuerpo, hormona-receptor.

- Para ello un ligando de afinidad se une al soporte de la FE. Cuando la muestra atraviese la columna solo se retendrá la sustancia capaz de reaccionar con dicho ligando.
- Una vez concluida la separación hay que provocar la salida de la sustancia que dio la reacción específica.

Cromatografía de afinidad



Cromatografía de afinidad

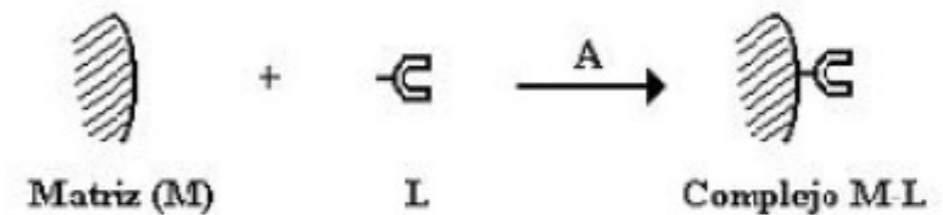


Cromatografía de afinidad

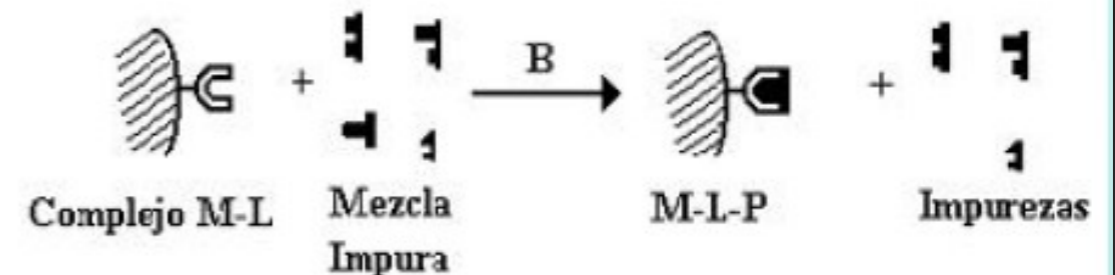
Etapas fundamentales:

1. Inmovilización del ligando
2. Adsorción de la muestra
3. Desorción

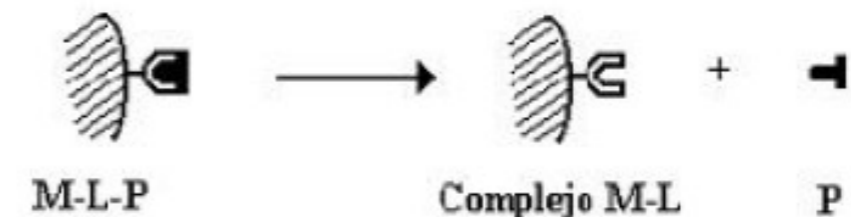
1- Inmovilización del ligando (L).



2- Adsorción de la sustancia a purificar (P).



3- Desorción de la sustancia fijada.



A: Enlace covalente

B: Enlace reversible y específico

Tipos de inmovilización

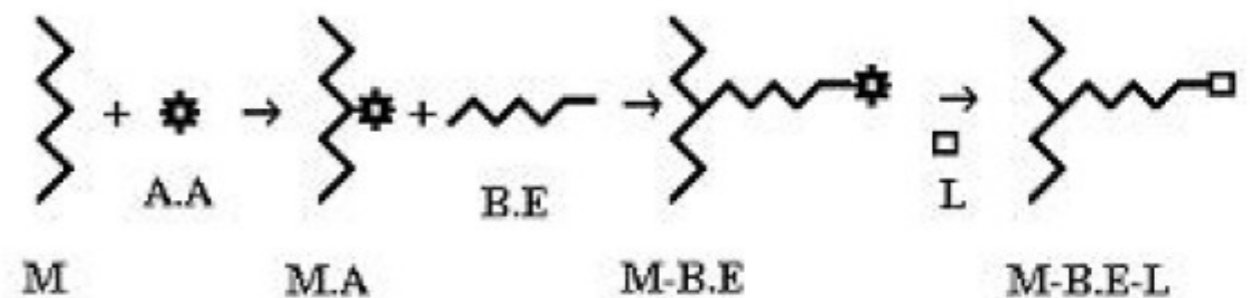
PRINCIPALES METODOS DE INMOVILIZACION

INMOVILIZACIÓN DIRECTA: Unión del ligando al soporte activado



M= Matriz A.A= Agente activante M.A= Matriz activada
L= Ligando M-L= Matriz-Ligando

INMOVILIZACION INDIRECTA: Unión del ligando a un brazo espaciador previamente fijado a un soporte activado.



B.E = Brazo espaciador M-B.E = Matriz-Brazo espaciador
M-B.E-L = Matriz-Brazo espaciador-Ligando

Métodos de activación e inmovilización	Toxicidad del reactivo	Tiempo de activ. (horas)	pH de inmov.	Tipo de enlace L-M	Estabilidad del complejo	Interacciones no específicas	Grupos químicos que reaccionan en M activada
<u>Glutaraldehido</u>	Moderada	5-18	6.5-8.5	<u>Alquilamina</u>	Excelente	-	Aminas primarias
Bromuro de cianógeno	Alta	0.2-0.4	8-10	Derivado de Carbonato N-sustituido	Inestable a pH < 8 y > 10	<u>Catiónicas</u>	Aminas primarias
Hidracina	Alta	1-3	7-9	Amida	Excelente	-	Aminas primarias
<u>Bisepoxiranos</u>	Moderada	5-18	8.5-12	<u>Alquilamina</u> <u>Eter, Tioeter</u>	Excelente	-	Aminas primarias <u>Hidroxilos</u> <u>Tioles</u>
<u>Divinilsulfona</u>	Alta	0.5-2	8-10	-	Inestable a pH alcalino	-	Aminas primarias Hidroxilos
<u>Epiclorhidrina</u>	Moderada	2-24	8.5-12	<u>Alquilamina</u> <u>Eter, Tioeter</u>	Excelente	-	Aminas primarias <u>Hidroxilos</u> <u>Tioles</u>
<u>Benzoquinona</u>	Moderada	1-2	7.5-9	Eter aromático	Buena	Tipo p-p (aromáticas)	Aminas primarias
<u>Peryodato</u>	No tóxico	14-20	7.5-8.5	<u>Carbinolamina</u> o base de Schiff	Débil	-	Aminas primarias
				<u>Alquilamina</u>	Buena		
Cloruro de tosilo	Moderada	0.8-0.8	7.5-10.5	<u>Alquilmercaptan</u> o <u>Alquilamina</u>	Buena	-	Aminas primarias <u>Tioles</u>
<u>Diazonio</u>	Moderada	0.5-1	6-8	<u>Azo</u>	Moderada	Tipo p-p (aromáticas)	Fenoles Aminas aromáticas

Tabla 1. Características fundamentales de los diferentes métodos de activación e inmovilización



www.inmegen.gob.mx

Síguenos en



Facebook

<http://on.fb.me/qaNj1Z>



Broadcast Yourself

<http://bit.ly/pc12Zo>



Twitter

[#/INMEGEN](https://twitter.com/#!/INMEGEN)



<http://bit.ly/rbUsIB>