

Tratamiento de desechos celulares

Separación de desechos celulares

Etapas a Considerar

Rompimiento

Clarificación

Tamaño de los desechos celulares
(debris)

Viscosidad del extracto

***Esta etapa resulta ser una
de las etapas más difíciles y costosas.***

Operaciones unitarias

- Centrifugación
- Micro o Ultrafiltración
- Extracción en dos fases acuosas (utilizando un sistema de polietilenglicol (PEG) -dextran)
- Adsorción en lechos expandidos (Expanded bed adsorption).

Tipos de desecho

- Ácidos nucleicos
- Proteasa
- Trozos de membrana
- Organelos celulares
- Cuerpos Incluidos

Remoción de Proteasas

La presencia de enzimas proteolíticas puede producir alteraciones en el producto por este motivo se puede reducir este tipo de actividad enzimática.

Alternativas:

- Inhibidor de proteasas: Agregando Fluoruro de fenil-metil-sulfonil (PMSF) en EDTA u otro inhibidor específico
- Trabajar a bajas temperaturas
- Ajustar el pH químicamente.

Remoción de Ácidos Nucleicos

El DNA aumenta la viscosidad del extracto, por otra parte si el producto es de uso terapéutico e inyectable todos los ácidos nucleicos deben ser removidos.

Las alternativas son:

- Precipitar el DNA formando agregados con macromoléculas policationicas, tales como sulfato de protamina.
- Utilizar DNAasa para reducir la viscosidad, pero se debe tener en cuenta que al agregar productos al extracto se dificultan las etapas siguientes de purificación.

Trozos de membrana

Los trozos de membrana se pueden separar utilizando las operaciones de separación sólido-líquido ya mencionadas como son microfiltración, centrifugación o extracción líquido-líquido.

Organelos celulares

Para cada organelo, ya se sea mitocondria, cloroplasto, núcleo, etc. existen procedimientos específicos.

Ver:

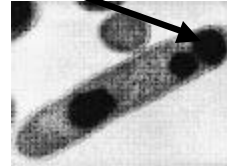
Harris and Angel (1989) " Protein purification methods: a practical approach", IRL Press, pp 97-124

Procesamiento de proteínas agregadas (Inclusion bodies)

Células modificadas genéticamente → proteínas recombinantes → cuerpos incluidos.

¿Cómo son?

Densos
Insolubles
Inactivos

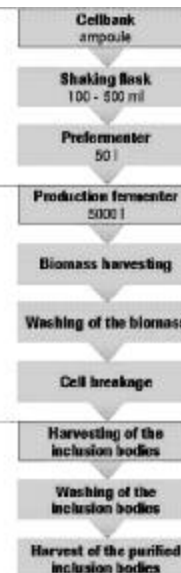
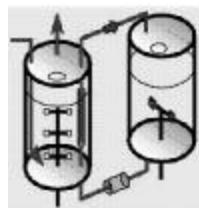


Ventajas

Formación beneficiosa: Agregaciones no son degradadas significativamente por proteasas, ya que los sitios sensible a la actividad de proteasas se encuentran inaccesibles.

- La cantidad de proteína 40 a 50 % del total de polipéptidos que forman estas agregaciones.

Fáciles de separar de otros desechos celulares y componentes solubles de la célula por medio de centrifugación moderada.



Post tratamiento (Renaturación)

Separar los cuerpos incluidos

Solubilizar

Tratamiento con Hidrocloruro de guanidina (GdmCl).

Si las proteínas contienen cisteína se debe agregar un agente reductor como DTT.

Si la proteína contiene enlaces disulfuro el DTT debe ser eliminado por medio de diálisis.

Refolding (Re-enrollar)

Solubilizado de proteínas deben ser diluidas a una concentración muy bajas (5 - 20 mg/L)

Adicionar buffer fosfato con una solución de glutathione reducido y glutathione oxidado.