

# Cromatografía en Lecho Fijo

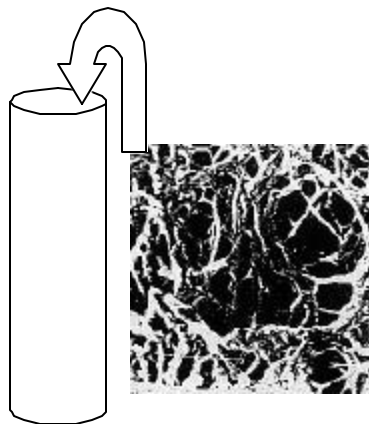
## Purificación de Proteínas

### Soportes

Las columnas cromatográficas se encuentran conformadas por un soporte (empaque) que es que contiene al material adsorbente. Todo ello contenido dentro de un recipiente de forma cilíndrica

Dichos soportes deben satisfacer las siguientes características :

- Modificados químicamente
- Poseer alto poder hidratante
- Esferas de diámetro 10 – 100  $\mu$
- Altamente porosos



Los materiales de los cuales pueden ser estos soportes son:

Inorgánicos

- Sílica Porosa
- Vidrio de Poro controlado
- Hidroxiapatita

Polímeros sintéticos

- Poliacrilamida (Biogel P)
- Polimetacrilato (Spheron)
- Poliestireno

Polisacáridos

- Celulosa (Cellulafine, Sephacel)
- Dextrano (Sephadex)
- Agarosa (Sephacel, Superose, Ultragel A y BioGel)

Compuestos Polímero orgánico – polisacárido

- Poli N,N' .- bisacrilamida- dextrano (Sephacryl)
- Agarosa – dextrano (Superdex)
- Agarosa – poliacrilamida (Ultradex A A)

Los geles pueden ser :

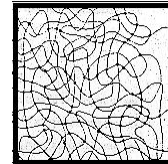
Características

Esquema

Microporosos

Entrecruzamiento Puntual  
Baja resistencia

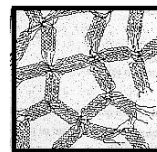
Filtración por geles



Macroporosos

Poros grandes

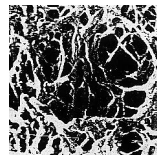
Intercambio iónico  
Afinidad



Compuestos

Geles microporosos en poros  
de geles macroporosos

HPLC



**Las características de cada soporte son entregadas por los proveedores, siendo los principales:**

- Amersham pharmacia biotech  
<http://www.apbiotech.com>
  - Biorad :  
<http://discover.bio-rad.com>
- Whatman

**Tipos de Operaciones Cromatográficas utilizadas**  
**en Purificación de Proteínas**

Tipo de Cromatografía	Propiedad Fisicoquímica o Bioquímica	Características
<b>NO ADSORCION</b>		
Filtración por Geles (GF) o Exclusión por Tamaño	Peso Molecular	Resolución: Moderada Capacidad: Baja Velocidad: Baja
<b>ADSORCION</b>		
Afinidad (AC)	Afinidad Biológica	Resolución: Excelente Capacidad: Alta Velocidad: Alta
Intercambio Iónico (IEC) (Aniónico Catiónico)	Carga a diferentes pH	Resolución: Alta Capacidad: Alta Velocidad: Alta
Cromatofocusing	Punto Isoeléctrico	Resolución: Muy Alta Capacidad: Muy Alta Velocidad: Alta
Interacción Hidrofóbica (HIC)	Hidrofobicidad Superficial	Resolución: Alta Capacidad: Alta Velocidad: Alta
Fase Reversa (RPC)	Interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas	Resolución: Excelente Capacidad: Intermedia Velocidad : Alta

### CROMATOGRAFIA DE PERMEABILIZACION POR TAMAÑO

FILTRACIÓN POR GELES (GF)

EXCLUSION POR TAMAÑO (SEC)

## CROMATOGRAFIA DE FILTRACIÓN POR GELES

Es la única **Cromatografía de No-adsorción**, no hay interacción entre la proteína y la matriz.

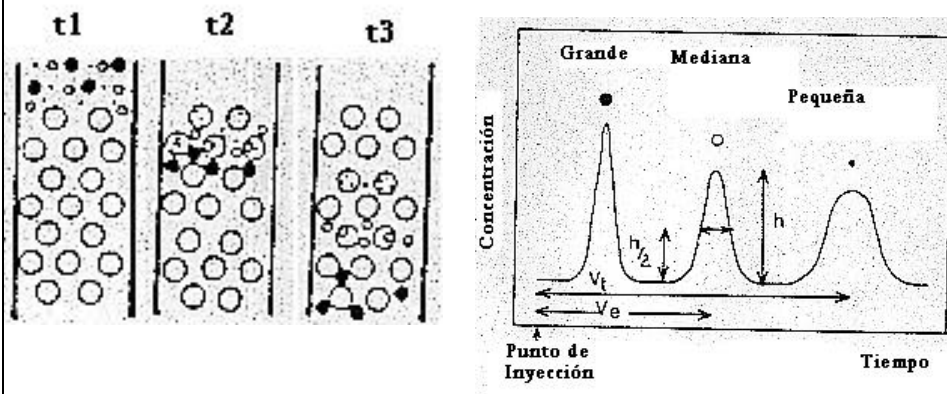
La proteína entra y sale.

No se puede manejar el proceso para evitar la elución.

### **Características**

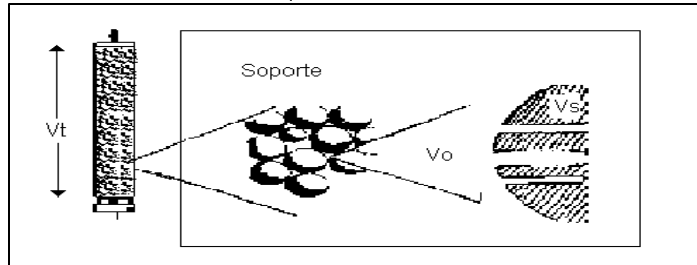
- Se utiliza en las últimas etapas de los procesos de purificación de proteína.
- Se utilizan geles porosos que actúan como mallas moleculares que permiten separar las moléculas en función de su tamaño.
- Se utilizan geles microporosos de dextrano o poliacrilamida

## **Proceso**



La matriz es un material poroso, con tamaño de poro definido, las partículas más grandes no ingresan en todos los poros, luego tienen un camino más corto que recorrer y eluyen primero, así sucesivamente las más pequeñas tienen un camino mucho mayor.

### Características de la elución



$V_t$  representa el volumen total del lecho,  $V_o$  el volumen de huecos en el lecho y  $V_s$  el volumen de solvente dentro de las partículas y  $V_g$  el volumen de las partículas de gel.

Se define el coeficiente de partición,  $K_{av}$ :

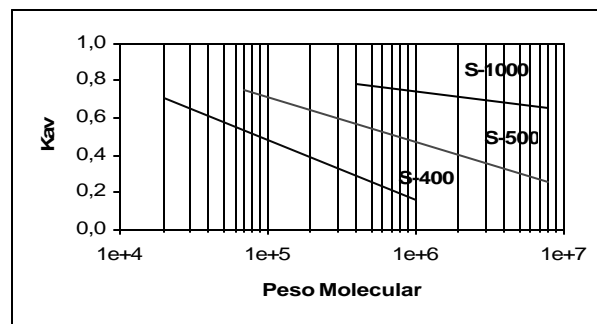
$$k_{av} = \frac{V_E - V_o}{V_t - V_o}$$

donde :  $V_E$  volumen al cual eluye la proteína.

$$V_t = V_o + V_s + V_g$$

Existe una relación lineal entre el logaritmo del tamaño de la proteína (mw) y este coeficiente,  $K_{av}$ :

$$K_{av} = A - B \log mw$$



Relación entre los pesos moleculares y los coeficientes  $K_{av}$  para diferentes matrices analíticas de Filtración por Geles

### **Aplicaciones**

La cromatografía de filtración por geles se puede aplicar en:

- Caracterización de proteínas, por su peso molecular (mw, [Da])
- Determinación si las proteínas están en forma de dímero u otra más compleja. Se comparan los valores de peso molecular obtenidos por filtración por geles y por electroforesis.

### **Purificación de proteínas**

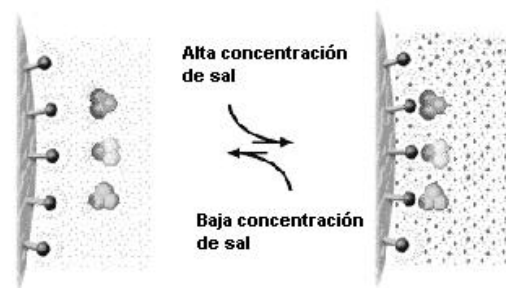
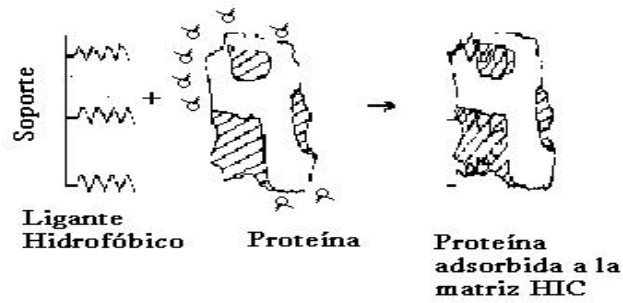
- Generalmente se utiliza en las últimas etapas, cuando se tiene poco volumen de muestra a tratar, dado que:
  - La capacidad de esta técnica es baja, sólo un 5-10% del volumen de la columna se puede inyectar como muestra.
  - La velocidad de flujo es baja, dado que la matriz no resiste mucha presión por sus grandes poros.

## **CROMATOGRAFIA DE INTERACCION HIDROFOBICA (HIC) Y FASE REVERSA (RP)**

## Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

### Teoría

Se basa en la interacción entre los grupos hidrofóbicos de las proteínas que componen la mezcla y los grupos hidrofóbicos del absorbente (por razones termodinámicas).



Al igual que en la precipitación por disminución de la solubilidad, la interacción hidrofóbica se favorece en presencia de altas concentraciones de sal (que desplazan el agua que solvata las zonas hidrofóbicas)



### Características de las proteínas

Hay más de 40 escalas para caracterizar las hidrofobicidad de los aa, pero en Terminos generales los amino ácidos hidrofóbicos de las proteínas son:

Alanina  
Metionina  
Tryptofano  
Fenilalanina

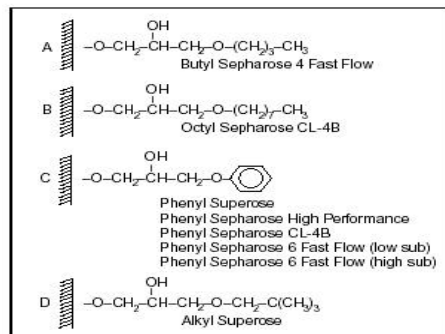
### Características de las Matrices

Los grupos hidrofóbicos del adsorbente son:

Fenil > Octil > Butil

Mientras más larga es la cadena mayor es la hidrofobicidad.

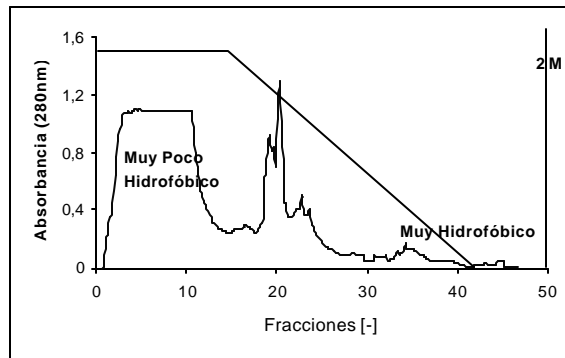
Sobre matrices de agarosa.



Se trabaja en presencia de altas concentraciones de sal, cercana a las de precipitación de proteínas (2M), generalmente Sulfato de Amonio o Cloruro de Sodio.

### Operación

Las proteínas con alta hidrofobicidad permanecerán adsorbidas por mucho más tiempo que aquellas que son débilmente hidrofóbicas.



### Formas de Elución

- **Disminución de la concentración de sal (Gradiente lineal, escalonado o isocrático).**

Sal: **Sulfato de Amonio**, Sulfato de Sodio, Cloruro de Sodio

- Incremento del pH : Cambio de carga , aumento en la repulsión con la matriz.
- Reducción de la temperatura, se ve desfavorecido el efecto de agregación.
- Adición de agentes:
  - Detergentes no iónicos
  - I sopropanol
  - Acetonitrilo

### **Comparación con otras técnicas**

#### **Ventajas**

- Se puede aplicar directamente luego de una precipitación con sulfato de amonio
- No se requiere de cambio de buffer
- La presencia de sal estabiliza a las proteínas

#### **Desventajas**

- Las proteínas pueden interactuar entre sí.
- Pueden producirse cambios conformacionales en las proteínas.
- Puede entregar menor resolución que Intercambio Iónico, pero mayor que filtración por geles.

### **Cromatografía de Fase Reversa (RPC)**

#### **Principio**

Es el principio análogo a HIC. Los adsorbentes son similares, cadenas alifáticas de entre 8 a 18 carbonos, sobre matrices de sílica. Inicialmente sólo se utilizó en equipos de HPLC.

En esta técnica la matriz hidrofóbica y el solvente inicialmente es polar (agua), esto resulta opuesto a lo que es Fase Normal, donde la matriz es hidrofílica (polar) y el solvente es orgánico (hidrofóbico).

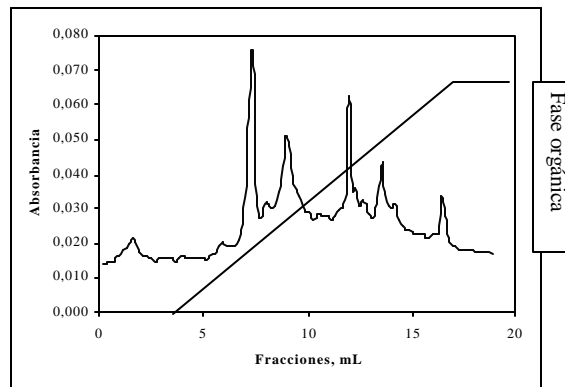
#### **Usos**

- ☞ Generalmente se utiliza para proteínas pequeñas (<30.000 Da)
- Peptidos obtenidos por digestión de proteínas

## Condiciones de Operación

### Fase orgánica

La elución se lleva a cabo por debilitamiento de las fuerzas de interacción debido a la adición de agentes orgánicos como Metanol, Acetonitrilo



## Comparación

### Desventajas

- Se produce una denaturación, la proteína no eluye en su estado nativo.
- La recuperación depende de la reversibilidad de dicha denaturación