

# **CROMATOGRAFÍA.**

## **A.- INTERCAMBIO IONICO:**

**A.1. ANIONICA**

**A.2. CATIONICA**

## **B.- FILTRACIÓN EN GEL**

## **C.- AFINIDAD**

## **A. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.**

### **Usos**

- 1.- Purificar Proteínas
- 2.- Concentrar Proteínas

### **Ventajas**

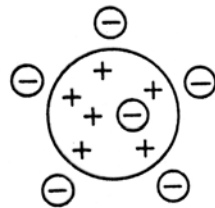
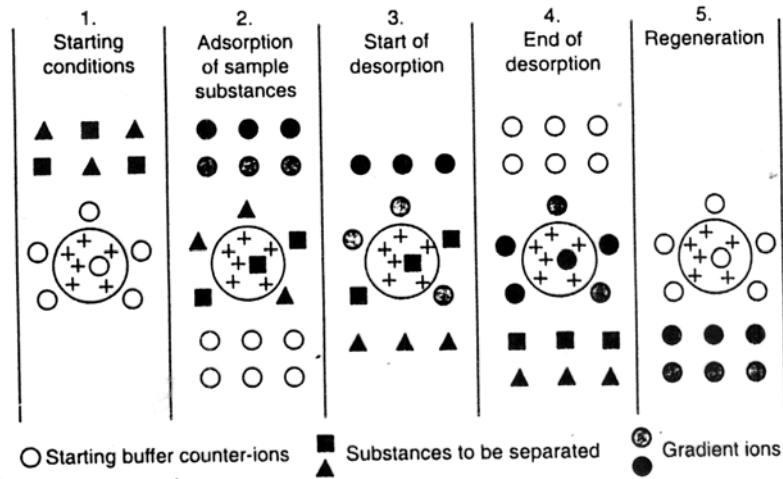
- a.- Alta resolución
- b.- Fácil de usar
- c.- Resultados altamente reproducibles
- d.- Bajo costo.

## **CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO**

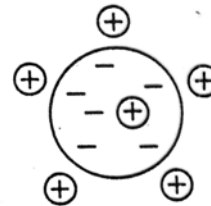
La separación por cromatografía de intercambio iónico depende de la adsorción reversible de una molécula de soluto cargada a un grupo de intercambiadores iónicos inmovilizados de carga opuesta.

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



ANION exchanger with  
exchangeable counter-ions



CATION exchanger with  
exchangeable counter-ions

## 1. Principios.

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

### 1.a. 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)

### 1.b. Unión de la proteína a la matriz.

La matriz y la proteína deben tener cargas opuestas.

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

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

### 1.c. 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 separan usando diferentes concentraciones de sal o variando el pH.

La resolución ( $R_s$ ) de una cromatografía de intercambio iónico es una medida de la separación relativa entre dos picos y se puede usar para determinar si es necesaria una optimización del procedimiento cromatográfico.

### **$R_s \propto \text{Selectividad} \times \text{Eficiencia} \times \text{Capacidad}$**

**Selectividad.** Define la habilidad del sistema para separar los picos, es decir, la distancia entre dos picos

**Eficiencia.** Se relaciona con el ancho de los picos de elución.

**Capacidad.** Es una medida de la retención de un componente y no se debe confundir con la capacidad de carga.

### Capacity factor

The capacity or retention factor  $k$  is a measure of the retention of a component and should not be confused with loading capacity (mg sample/ml) or ionic capacity (mmol/ml).

The capacity factor is calculated for each individual peak. For example  $k$  for peak 1 in Figure 5 is derived from the equation:

$$\text{capacity factor } k = \frac{V_{R1} - V_t}{V_t}$$

In the equation for  $R_s$ ,  $k$  is the average of  $k_1$  and  $k_2$ .

$$R_s = \underbrace{1/4 \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha}}_{\text{selectivity}} \underbrace{(\sqrt{N})}_{\text{efficiency}} \underbrace{\frac{k}{(1 + k)}}_{\text{capacity}}$$



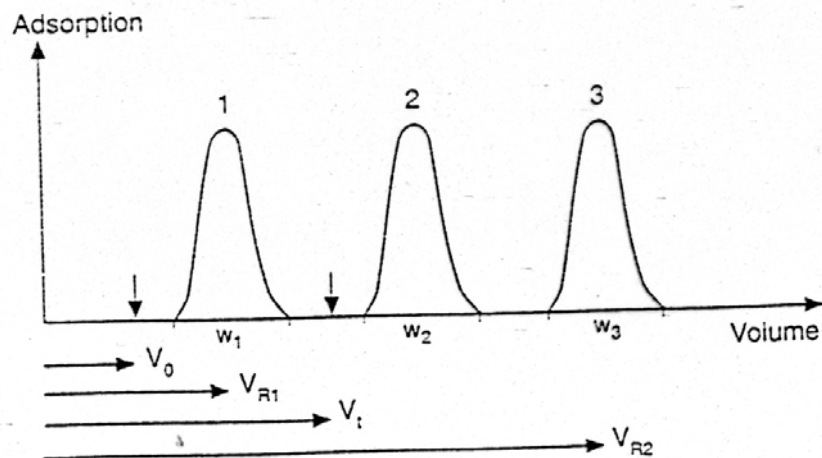


Fig. 5. Hypothetical chromatogram.  $V_0$  = void volume,  $V_{R1}$  = elution volume for peak 1,  $V_{R2}$  = elution volume for peak 2,  $V_t$  = total volume,  $w_{b1}$  = peak width for peak 1,  $w_{b2}$  = peak width for peak 2.

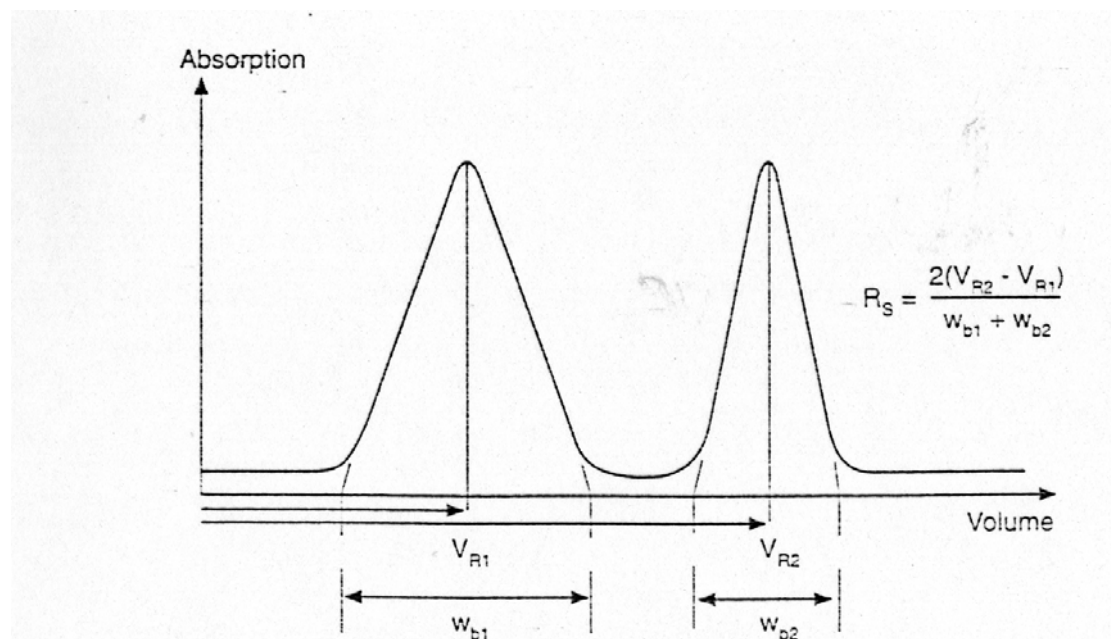
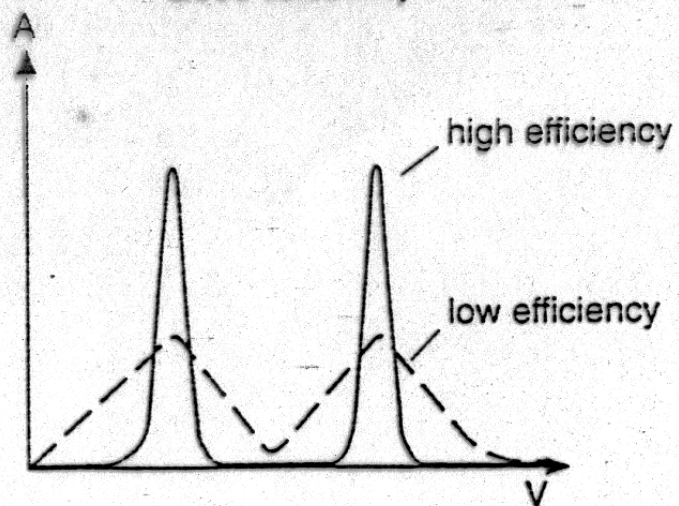
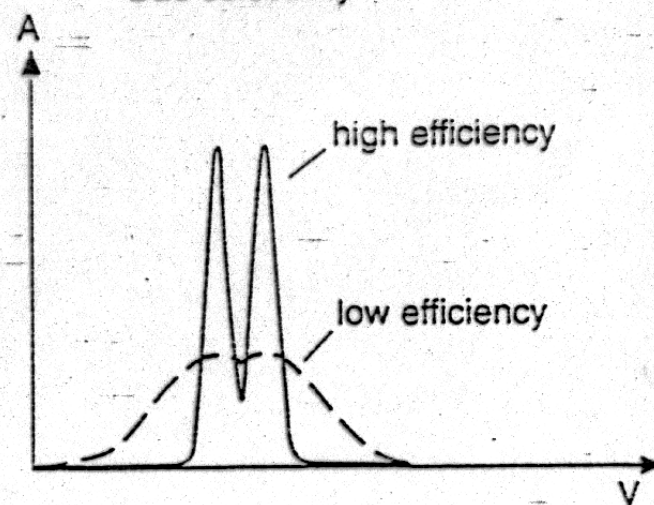


Fig. 3. Determination of the resolution ( $R_s$ ) between two peaks.

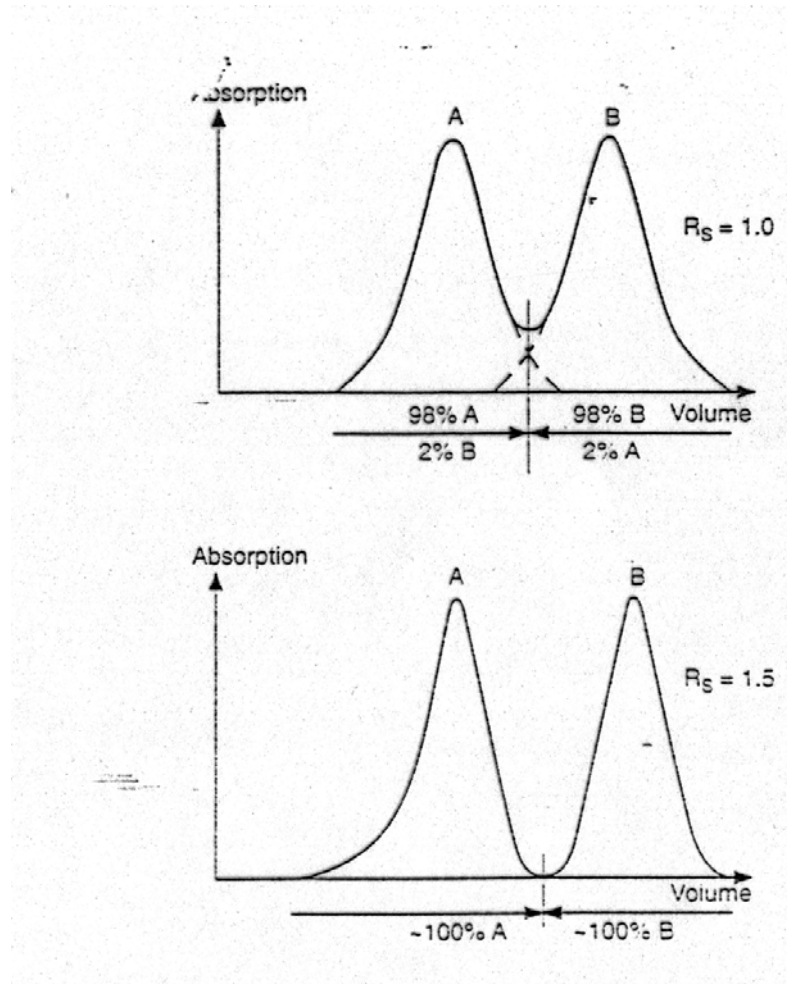
Good selectivity



Bad selectivity



## Separación con diferente resolución



### **1.d. 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 bajas concentraciones: son desplazados por la proteína,

b.- a altas concentraciones: compiten con la proteína.

### **1.e. Elución con diferentes contra-iones.**

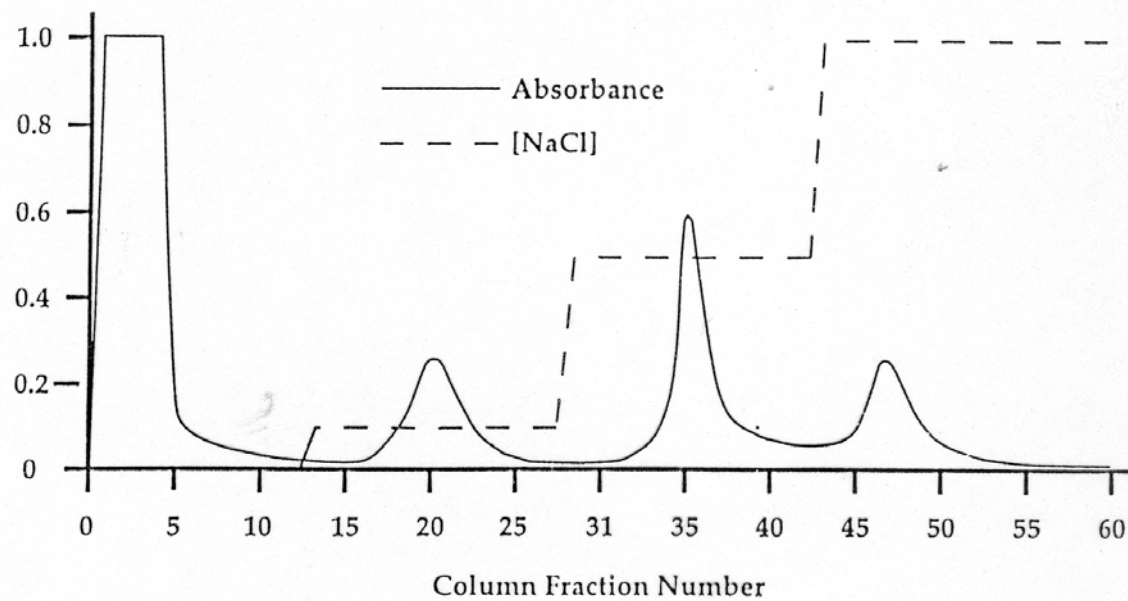
Diferentes contra iones tienen diferente afinidad por la matriz. Si falla la elución de la proteína con un contra ion, se puede utilizar uno que tenga una mayor afinidad por la columna.

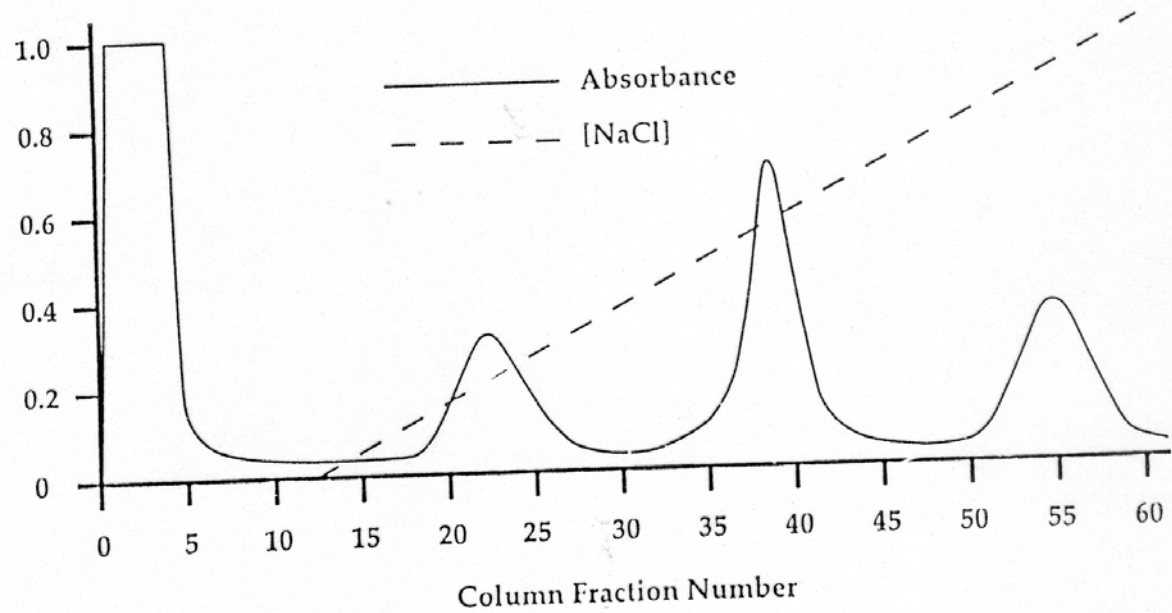
### **1.f. Otras estrategias de elución.**

Al cambiar el pH del buffer, se disminuye la afinidad de unión.

La disminución de la afinidad se debe a una disminución de la carga neta de la proteína.

**Chromatofocusing**, es una forma especial de cromatografía de intercambio iónico, en donde las proteínas se separan en base a la diferencia en los pI.





## **2. Selección de la matriz de intercambio iónico**

Proteína con carga negativa: matriz de intercambio anionica.

Proteína con carga positiva: matriz de intercambio cationica.

### **2.a. Tipo de intercambiador.**

#### **Matrices de intercambio ionico:**

**Fuertes:** permanecen ionizadas en todo el rango útil de pH.

**Débiles:** disminuyen su ionización en función del pH.

Si las condiciones de la cromatografía requieren pH extremos, se debe utilizar un intercambiador ionico fuerte.



## **2.b. Velocidad de flujo.**

La resolución de la columna depende del flujo de la columna.

## **2.c. Capacidad de la matriz.**

La capacidad de carga determina la cantidad de proteína que une. Para una resolución alta, se debe usar solo una pequeña fracción de la capacidad (10-20%).

## **2.d. Estabilidad de la matriz a diferentes pH.**

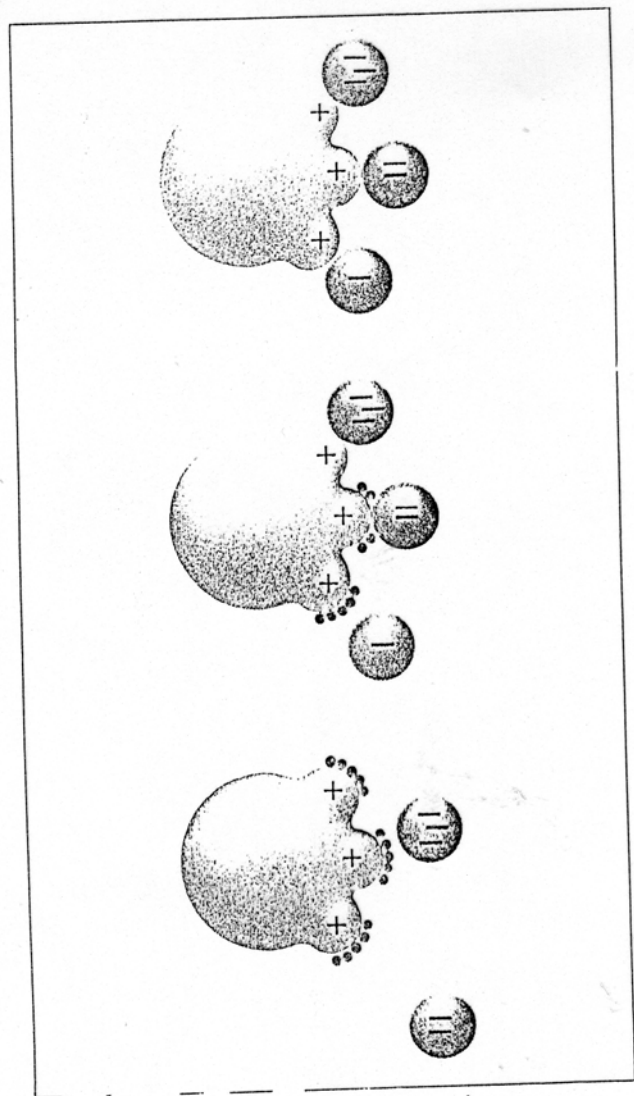
Es importante cuando se usan condiciones de pH extremas.

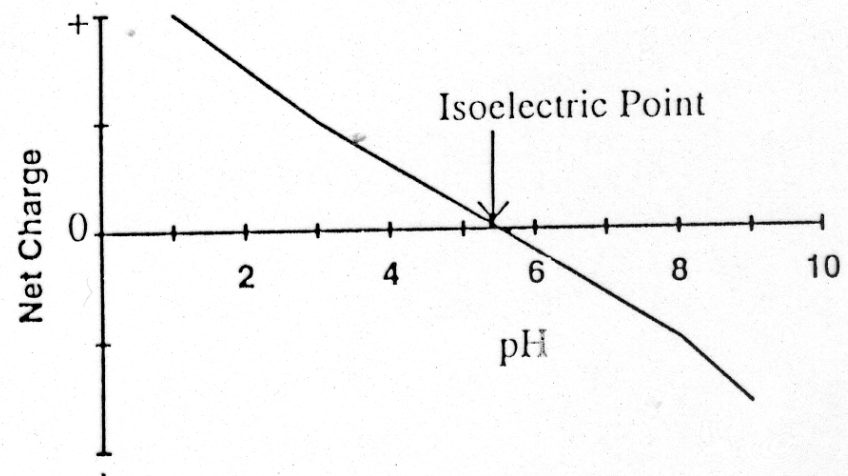
A pH extremos, las matrices débiles pueden estar parcialmente ionizadas, por lo tanto se debe usar una matriz fuerte.

## **3. Elución de la Muestra**

La proteína unida a la matriz puede ser eluida:

- a) aumentando la fuerza iónica en concentraciones discretas,
- b) aumentando la concentración en forma gradual, en una gradiente lineal.





### Counter-ion Activity Series

For anion exchange:  $\text{Ag}^+ > (\text{binds more tightly than}) \text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$

For cation exchange:  $\text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{PO}_4^{3-} > \text{CN}^- > \text{HSO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{HCOO}^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{OH}^- > \text{F}^-$

### Commercially Available Ion Exchangers

<u>Supplier</u>	<u>Name</u>	<u>Type</u>	<u>Matrix</u>	<u>Loading Capacity</u> mg/ml	<u>Flow Rate</u> cm/min*	<u>pH</u> <u>Stability</u>
Pharmacia	DEAE Sepharose Fast Flow	Weak anion	X-linked Agarose	3-110	12.5	1-14
"	DEAE Sepharose CL-6B	"	"	2-170	1.7	2-14
"	DEAE Sephacel	"	Beaded Cellulose	10-160	0.17	2-12
"	DEAE Sephadex A-50	"	X-linked Dextran	2-110		2-9
BioSeptra	DEAE Trisacryl M	"	Synth. Polymer	80-90	3	1-11
Bio-Rad	DEAE Bio-Gel A	"	X-linked Agarose	45	>0.3	2-9.5
Pharmacia	CM Sepharose Fast Flow	Weak cation	"	15-50	12.5	2-14
"	CM Sepharose CL-6B	"	"	10-120	2	2-14
BioSeptra	CM Trisacryl M	"	Synth. Polymer	90-100	3	1-11
Bio-Rad	Bio-Rex 70	"	"		0.4-15	5-14
"	CM Bio-Gel A	"	X-linked Agarose	45	>0.3	4.5-10
Pharmacia	CM Sephadex C-50	"	X-linked Dextran	7-140		6-10
"	Q Sepharose Fast Flow	Strong anion	X-linked Agarose	3-120	6.7-11.7	2-12
"	QAE Sephadex A-50	"	X-linked Dextran	1.2-80		2-10
"	SP Sepharose Fast Flow	Strong cation	X-linked Agarose	60	12.5	3-14
"	SP Sephadex C-50	"	X-linked Dextran	8-110		2-10
BioSeptra	SP Trisacryl M	"	Synth. Polymer	100	6	1-11

\* cm/min = ml/min • cm<sup>2</sup> column cross-sectional area

## **4. Algunos problemas.**

### **4.a. 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.

### **4.b. 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. Se ha perdido un cofactor.
4. Una proteasa está presente en la preparación.

#### **4.c. Baja resolución.**

1. El flujo de la columna es muy rápido.
2. La columna es muy corta para permitir una adecuada separación.
3. Se ha cargado mucha proteína en la columna.
4. La pendiente de la gradiente es muy inclinada.

#### **4.d. Pérdida de actividad.**

1. Pérdida de un cofactor.
2. La proteína no es estable en las condiciones de elución.

#### **4.e. Aumento de la actividad.**

1. Se ha removido un inhibidor.

## **A.2. Concentración de una Solución de Proteínas.**

Se lava con un pequeño volumen de una solución de fuerza iónica alta.

Se obtiene, de manera rápida y simple, una solución concentrada de proteína.

El rendimiento (60-80%) es similar al esperado en una precipitación con sulfato de amonio.



## **B. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL.**

### **1. Principios.**

No requiere la unión de la proteína, lo cual reduce significativamente la posibilidad de perder la proteína por una unión irreversible o bien por inactivación de la misma.

Separa las proteínas de acuerdo a su **tamaño**.

## **2. Usos.**

### **2.a. Purificación de proteínas.**

Se puede utilizar como una etapa de purificación de proteínas.

Este tipo de cromatografía es complementario a la de intercambio iónico.

Se basan en principios diferentes (carga y tamaño).

### **2.b Determinación del peso molecular**

Se puede tener una estimación del peso molecular de una proteína.

La estimación del PM supone que las proteínas son globulares. (Estándar de PM son proteínas globulares).

El PM de una proteína fibrilar puede ser mayor si no entra en los poros o menos si accede a ellos.

Una forma de evitar el problema de la geometría es tratar la muestra con un agente denaturante (guanidina o urea).

## **2. Usos.**

### **2.c Remoción de impurezas de bajo PM.**

Remoción de isotopos de bajo PM.

### **2.d Separación de monómeros, dímeros u otros oligómeros.**

### **2.e Cambio de buffer de una proteína.**

Es un método suave y rápido para transferir una proteína de un buffer a otro.

También se usa para desalar una muestra, es decir pasarla de un buffer de alta fuerza iónica a uno de baja fuerza iónica.

### **2.f Estudios de unión proteína-ligando.**

### **3. Procedimiento.**

#### **3.1 Elección de la matriz.**

En la elección de la matriz se debe tener en cuenta:

##### **a. Tamaño de la proteína.**

Este es el criterio mas importante. El tamaño de la proteína debe estar en el medio del rango óptimo de fraccionamiento de la matriz.

Matrices con un rango de separación estrecho permiten una mejor resolución. Si no se conoce el PM de la proteína, se debe usar una matriz de rango amplio.

##### **b. Velocidad de Flujo.**

Matrices de flujo rápido permiten realizar el proceso de separación de manera rápida. Matrices de flujo lento permiten una mejor resolución.

#### **3.2 Determinar el tampón (buffer) a usar.**

El buffer debe:

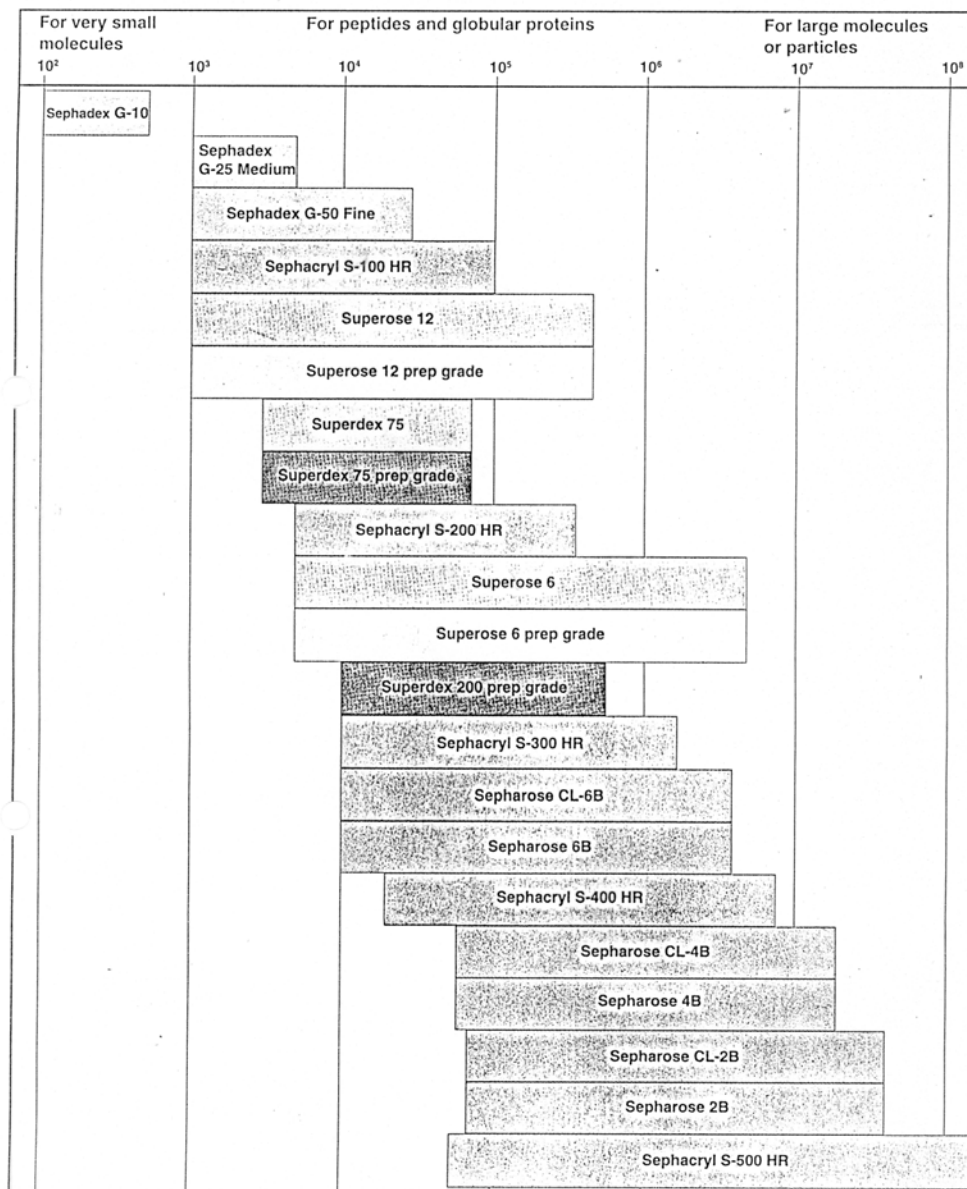
a.- preservar la actividad de la proteína.

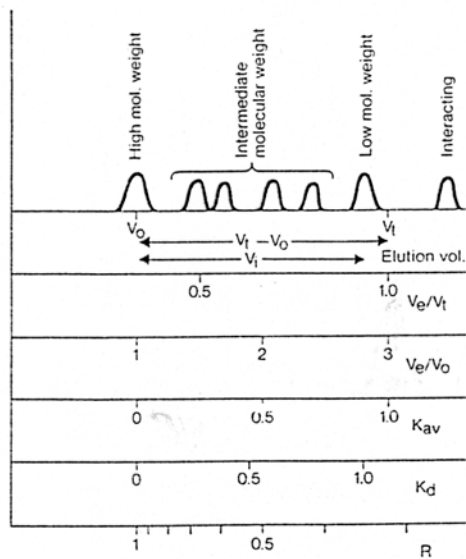
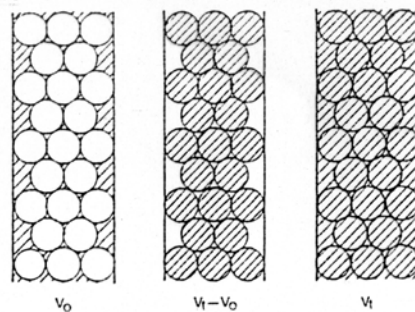
b.- Impedir interacciones inespecíficas proteína-proteína y proteína-matriz.

Esto se logra usando un buffer con baja concentración de sal (20 - 100 mM).

Interacciones hidrofóbicas con la matriz, no se debe usar fuerza iónica alta.

# Fractionation range (globular proteins)





$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0 - V_{gel\ matrix}} = \frac{V_e - V_0}{V_t}$$

$R$  = retention coefficient =  $V_0/V_e$

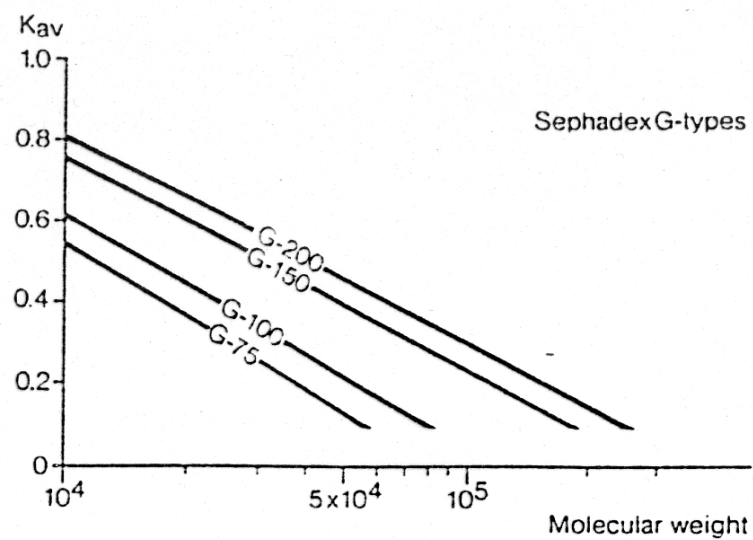


Fig. 24. Selectivity curves of Sephadex G-types, globular proteins.

Table 5. Properties of Sephadex.

Gel type	Dry bead size μm	Fractionation	Fractionation range		Swelling factor ml/g
		range Globular proteins	Dextrans		
Sephadex G-10	40 – 120	– 700	–	700	2 – 3
Sephadex G-15	40 – 120	– 1 500	–	1 500	2.5 – 3.5
Sephadex G-25 Coarse	100 – 300	1 000 – 5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Medium	50 – 150	1 000 – 5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Fine	20 – 80	1 000 – 5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Superfine	10 – 40	1 000 – 5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-50 Coarse	100 – 300	1 500 – 30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Medium	50 – 150	1 500 – 30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Fine	20 – 80	1 500 – 30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Superfine	10 – 40	1 500 – 30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-75	40 – 120	3 000 – 80 000	1 000 –	50 000	12 – 15
Sephadex G-75 Superfine	10 – 40	3 000 – 70 000	1 000 –	50 000	12 – 15
Sephadex G-100	40 – 120	4 000 – 150 000	1 000 –	100 000	15 – 20
Sephadex G-100 Superfine	10 – 40	4 000 – 100 000	1 000 –	100 000	15 – 20
Sephadex G-150	40 – 120	5 000 – 300 000	1 000 –	150 000	20 – 30
Sephadex G-150 Superfine	10 – 40	5 000 – 150 000	1 000 –	150 000	18 – 22
Sephadex G-200	40 – 120	5 000 – 600 000	1 000 –	200 000	30 – 40
Sephadex G-200 Superfine	10 – 40	5 000 – 250 000	1 000 –	150 000	20 – 25



## **4. Algunos problemas.**

### **4.a. Perfil de elución inusual.**

Interacción entre la proteína y la matriz. Se debe aumentar la fuerza iónica.  
Si la interacción es de carácter hidrofóbico, se debe disminuir la fuerza iónica.

### **4.b. Baja resolución.**

La columna puede ser muy corta.

El flujo muy rápido.

También puede haber un error en la elección de la matriz

### **4.c. Baja recuperación.**

La proteína puede haber sido adsorbida a la matriz.

Condiciones de elución muy extremas (disociación de subunidades, pérdida de cofactores, etc.)

Proteolisis.

### **4.d. Pérdida de la actividad.**

Pérdida de un cofactor o una parte de la proteína.

La proteína no es estable en las condiciones experimentales usadas.

## **C. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.**

### **1. Principios.**

Se basa en la afinidad entre una proteína y un ligando unido a una matriz. El ligando puede ser específico: inhibidor, anticuerpo o un ácido nucleico, o inespecíficos: lectinas, colorantes o grupos hidrofóbicos.

La columna de afinidad se prepara uniendo el ligando a la matriz sólida.

1. Unión de un grupo reactivo a la matriz
2. Formación de un enlace covalente entre este grupo y el ligando.

Las proteínas unidas se eluyen:

- a. con concentraciones saturantes de un sustrato que compita con el ligando o
- b. en condiciones en que se reduzca la afinidad de la interacción proteína -ligando.

La elución mediada por el sustrato es mas específica y permite una mejor separación.

## **CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD**

Es una técnica de separación única, puesto que solo ella es capaz de Purificar biomoléculas en base a su función biológica o a su Estructura química.

En este tipo de cromatografía la molécula que va a ser purificada es Adsorbida específica y reversiblemente por un ligando inmovilizado En un soporte insoluble (matriz).

Se logre una purificación de varios miles de veces y un alto porcentaje de recuperación.

Se pueden lograr espectaculares separaciones en un solo paso de Purificación: ahorro de tiempo.

Este tipo de cromatografía concentra la muestra, por lo cual pueden Ser procesadas grandes volúmenes de muestra.

**Enzima**

Análogo de Sustrato

Inhibidor

Cofactor

**Anticuerpo**

Antígeno

**Acido nucleico**

Secuencia de Bases Complementaria

Polimerasa

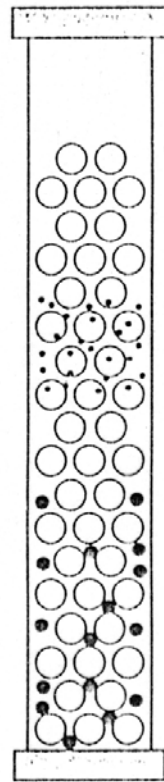
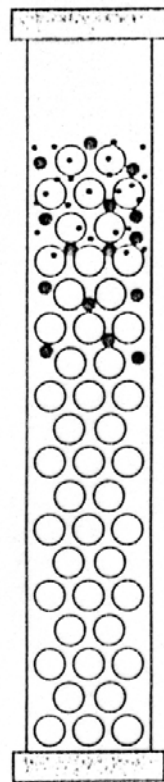
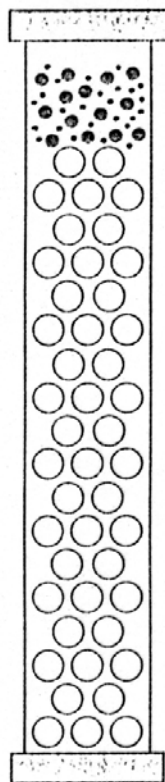
**Hormona, Vitamina**

Receptor

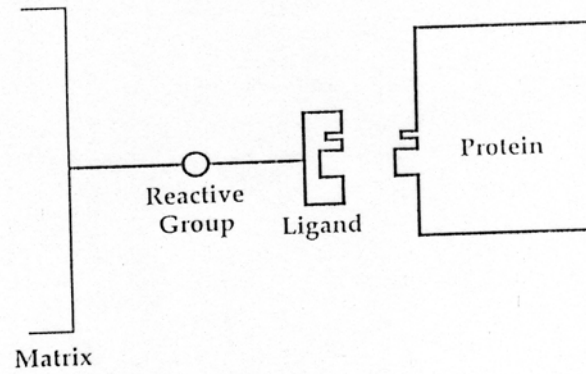
Proteína de Unión

Esta cromatografía puede ser usada para:

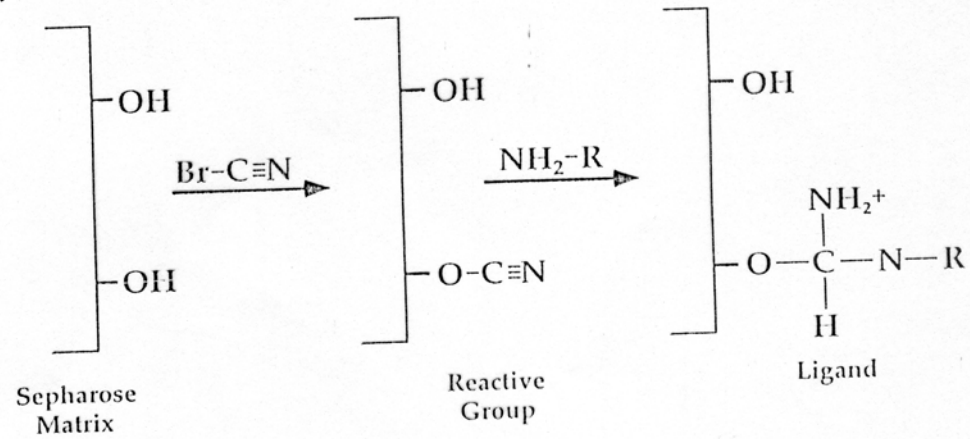
- Purificar sustancias de mezclas biológicas complejas.
- Separar proteínas nativas de su forma denaturada.
- Remover pequeñas cantidades de material biológico de grandes cantidades de sustancias contaminantes.



A.

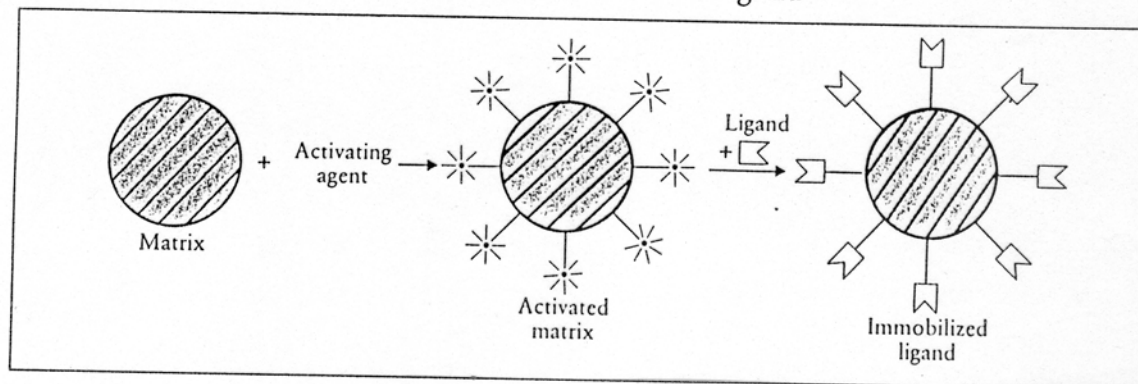


B.

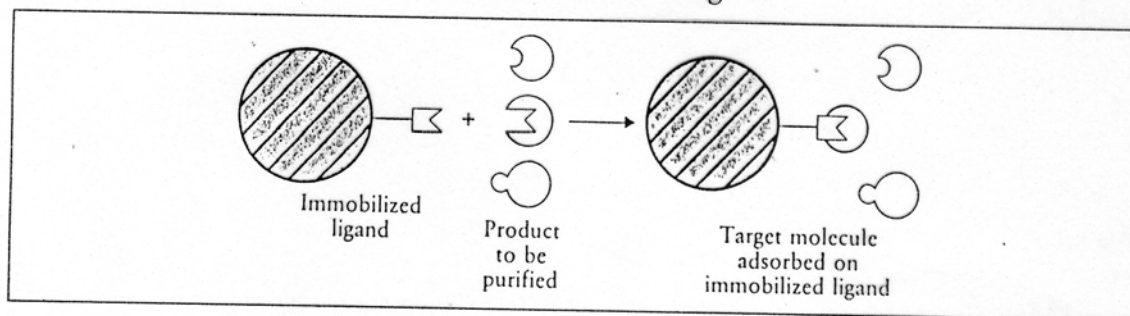


# Separation principle

## Immobilization of the ligand

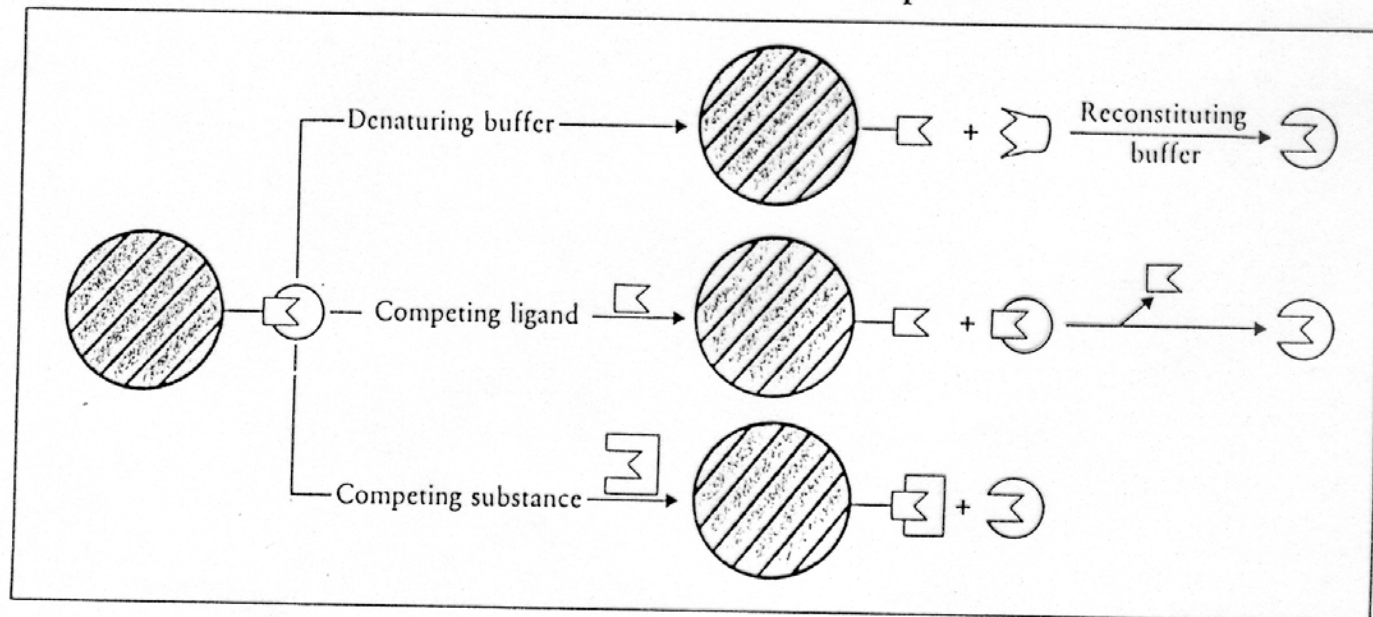


## Adsorption of the molecule to be purified on the immobilized ligand





### Elution of the molecule to be purified



## **2. INMUNOPURIFICACION.**

El ligando es un anticuerpo. Permite una purificación de 1.000 a 10.000 veces en un solo paso.

Los anticuerpos monoclonales son mas útiles que los policlonales: representan una población mas homogénea de anticuerpos con un solo sitio de unión en la proteína.

Anticuerpos policlonales, preparados usando un antígeno puro, han demostrado ser muy útiles en la purificación de proteínas.

Se debe tener un anticuerpo con una afinidad adecuada, para que permanezca unida a la columna durante el lavado y no requiera condiciones muy extremas para ser eluída.

### 3. LECTINAS.

Las **lectinas** son proteínas que unen carbohidratos reversiblemente.

Son muy útiles como ligandos de afinidad para glicoproteínas, o para remover contaminantes del tipo glicoproteínas.

Aunque este tipo de ligando no es muy específico, es muy útil en la purificación de proteínas.

El tipo de lectina a usar se elige de acuerdo a su especificidad y fuerza de unión.

#### **4. CROMATOGRAFÍA USANDO PIGMENTOS (dye) COMO LIGANDO.**

Esta **no** es realmente una cromatografía de afinidad: el pigmento no es el ligando natural de la proteína.

Este tipo de columnas son baratas, estables y de alta capacidad de unión.

La selección del tipo de columna es por prueba y error.

Cibacron blue (pigmento muy utilizado) tiene una estructura muy similar al NAD (nicotinamida adenin dinucleotido), es muy útil para purificar proteínas que son dependientes de nucleotidos.

La interacción proteína-pigmento puede ser: hidrofóbico, electrostático, o por enlaces del hidrógeno.

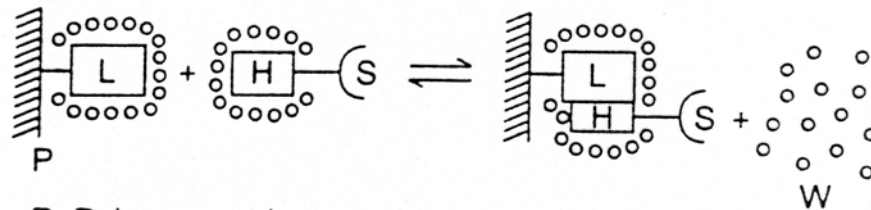
## 5. CROMATOGRAFIA DE INTERACCION HIDROFOBICA.

Depende de la afinidad de un grupo hidrofóbico de la matriz y una zona hidrofóbica de la proteína.

Proteínas de membrana tienen importantes segmentos hidrofóbicos. Proteínas solubles tienen solo alguna zona hidrofóbica, un sitio de unión para un ligando hidrofóbico, o un sitio activo con esas características.

Aunque este tipo de cromatografía **no** es muy específica, es útil puesto que sus principios son muy diferentes a las otras técnicas cromatográficas.

Las interacciones hidrofóbicas aumentan al aumentar la concentración de sal de la solución. La aplicación de la muestra se realiza en una solución de concentración de sal alta y la elución a una concentración baja.



P=Polymer matrix

S=Solute molecule

L=Ligand attached to polymer matrix

H=Hydrophobic patch on surface of solute molecule

W=Water molecules in the bulk solution

Close to the surface of the hydrophobic ligand and solute (L and H), the water molecules are more highly ordered than in the bulk water and appear to "shield off" the hydrophobic ligand and solute molecules. Added salt interacts strongly with the water molecules leaving less water available for the "shielding off" effect, which is the driving force for L and H to interact with each other.