



Cromatografias

Aula 7
Nicolas Hoch
QBQ0316 Noturno - 2020

Quais outras características de uma proteína podemos utilizar para purificação em colunas cromatográficas?

Tipos de Cromatografia

CARGA → Troca Iônica (aula passada)

TAMANHO → Gel Filtração

HIDROFOBICIDADE

AFINIDADE → Diversos tipos de colunas

Gel Filtração/Exclusão Molecular

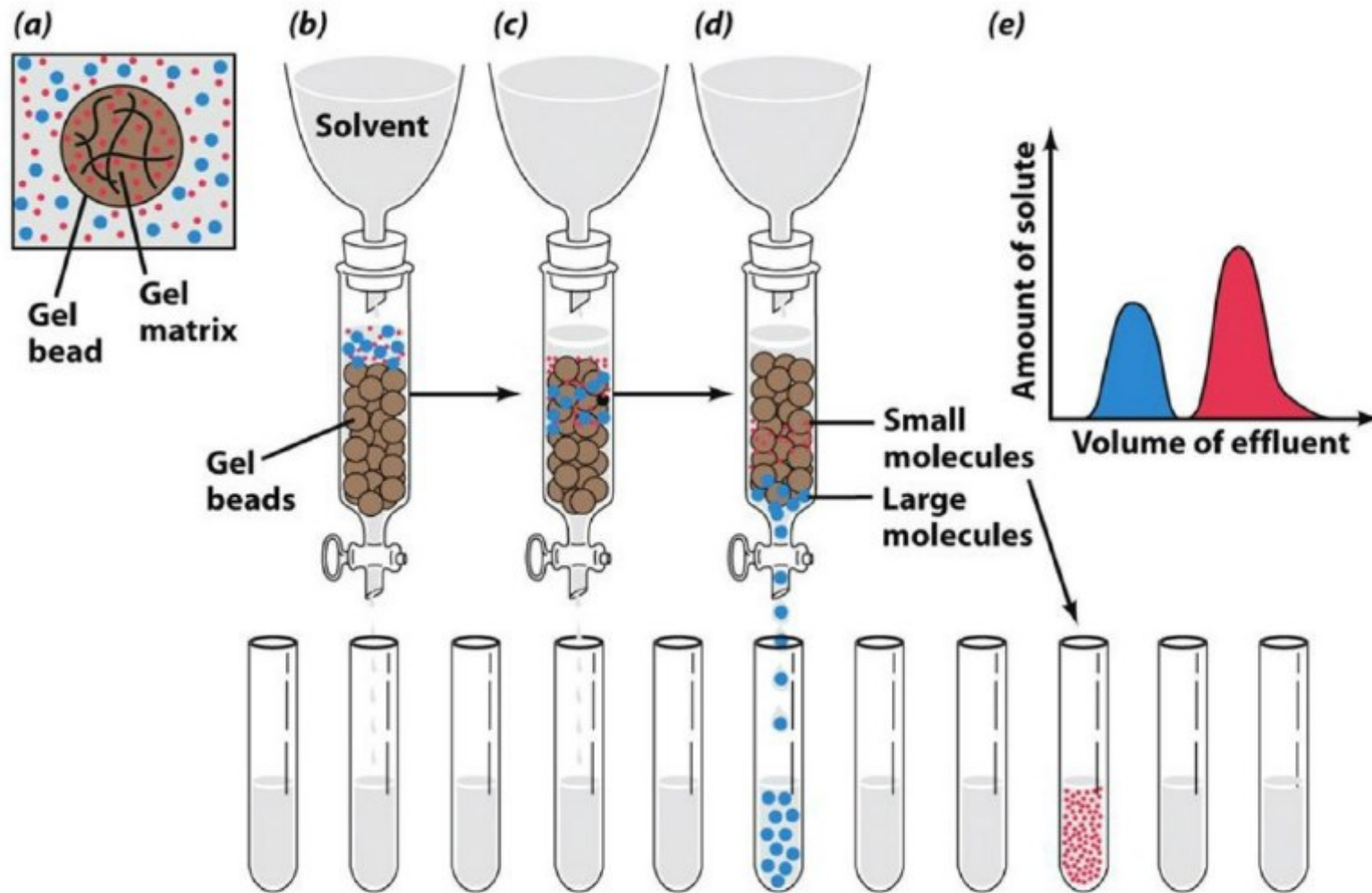
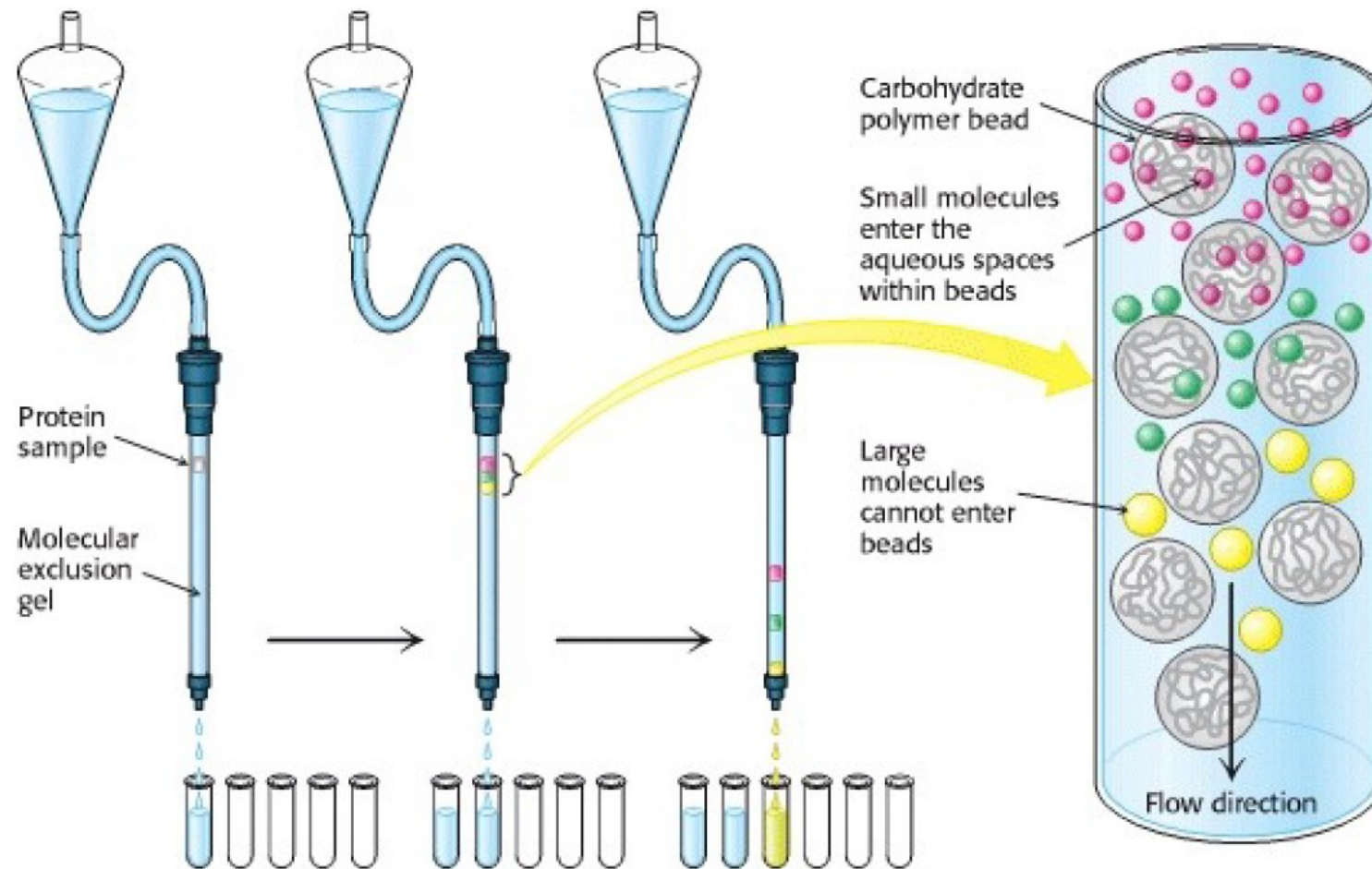
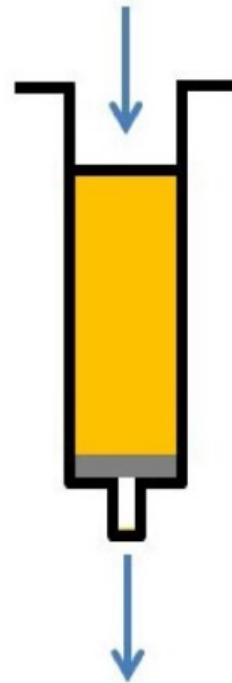


Figure 6-9
© John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

Gel Filtração/Exclusão Molecular



Peso Molecular (aparente)



Volume total (V_t)= 25 ml

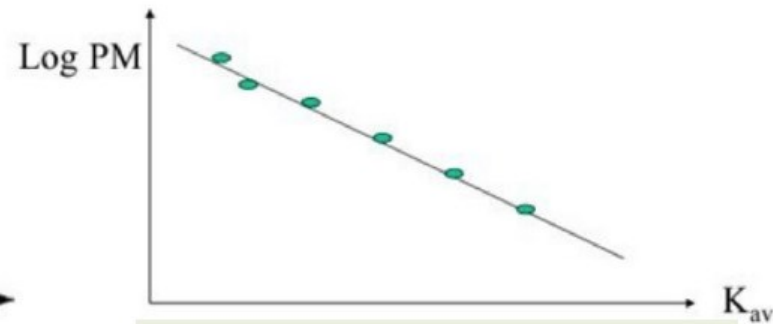
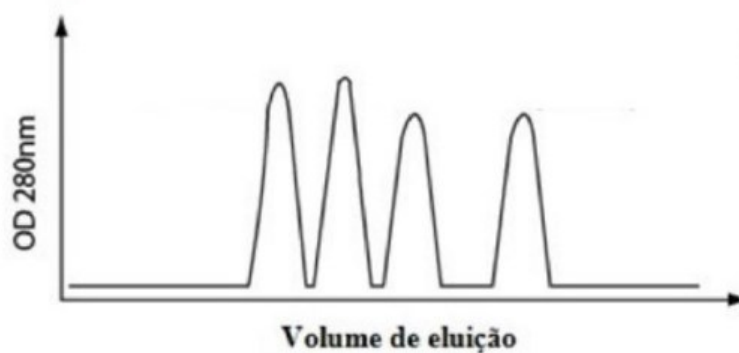
Material	Volume de eluição (ml)
Proteína padrão de 2.000.000 daltons	7,53
Proteína padrão de 66.000 daltons	9,38
Proteína padrão de 45.000 daltons	10,46
Proteína padrão de 12.400 daltons	13,70
Proteína padrão de 6.500 daltons	16,22

V_e = volume de eluição

V_0 = volume de eluição

“razão de eluição”

$$K_{av} = (v_e - v_0)/(v_t - v_0)$$



$$y (\log PM) = a(Kav) + b$$

Peso Molecular (aparente)

- Proteínas em geral estão em estado NATIVO
 - formato da proteína em 3D pode afetar padrão de migração

- Proteínas podem estar em complexos de alto peso molecular
 - depende da concentração de sal do tampão e da estabilidade das interações

Gel Filtração/Exclusão Molecular

Matrix name	Bead type	Approximate fractionation range for peptides and globular proteins (molecular weight)
Sephadex G-50 ¹	dextran	1500 - 30000
Sephadex G-100 ¹	dextran	4000 - 150000
Sephacryl S-200 HR ¹	dextran/acrylamide	5000 - 250000
Ultrogel AcA 54 ²	polyacrylamide/agarose	6000 - 70000
Ultrogel AcA 44 ²	polyacrylamide/agarose	12000 - 130000
Ultrogel AcA 34 ²	polyacrylamide/agarose	20000 - 400000
Bio-Gel P-60 ³	polyacrylamide	3000 - 60000
Bio Gel P-150 ³	polyacrylamide	15000 - 150000
Bio-Gel P-300 ³	polyacrylamide	60000 - 400000

Matrix name

Bead type

Approximate fractionation range
for peptides and globular
proteins (molecular weight)

Sephadex G-50¹

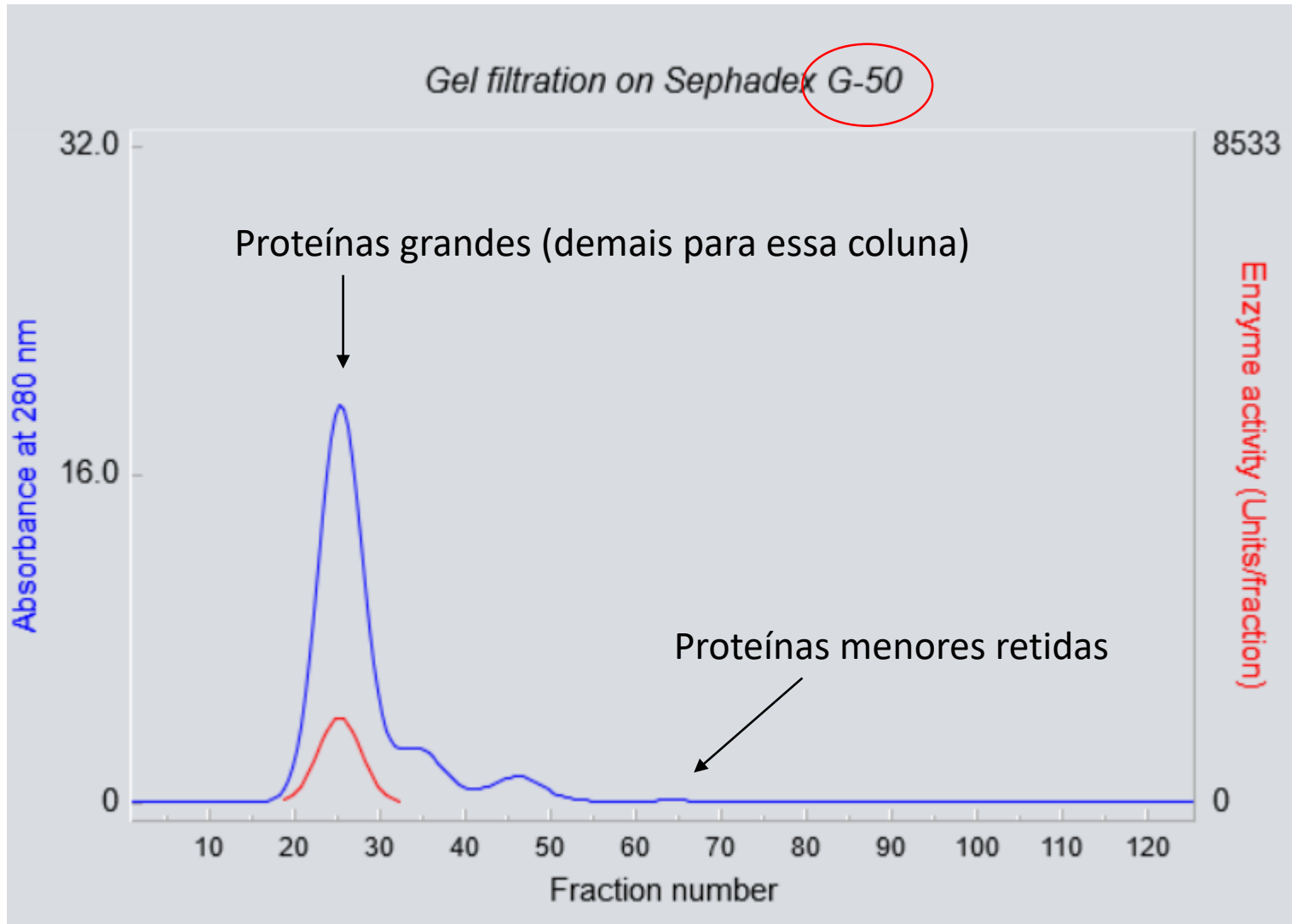
dextran

1500 - 30000

Sephadex G-100¹

dextran

4000 - 150000



Matrix name

Bead type

Approximate fractionation range
for peptides and globular
proteins (molecular weight)

Sephadex G-50¹

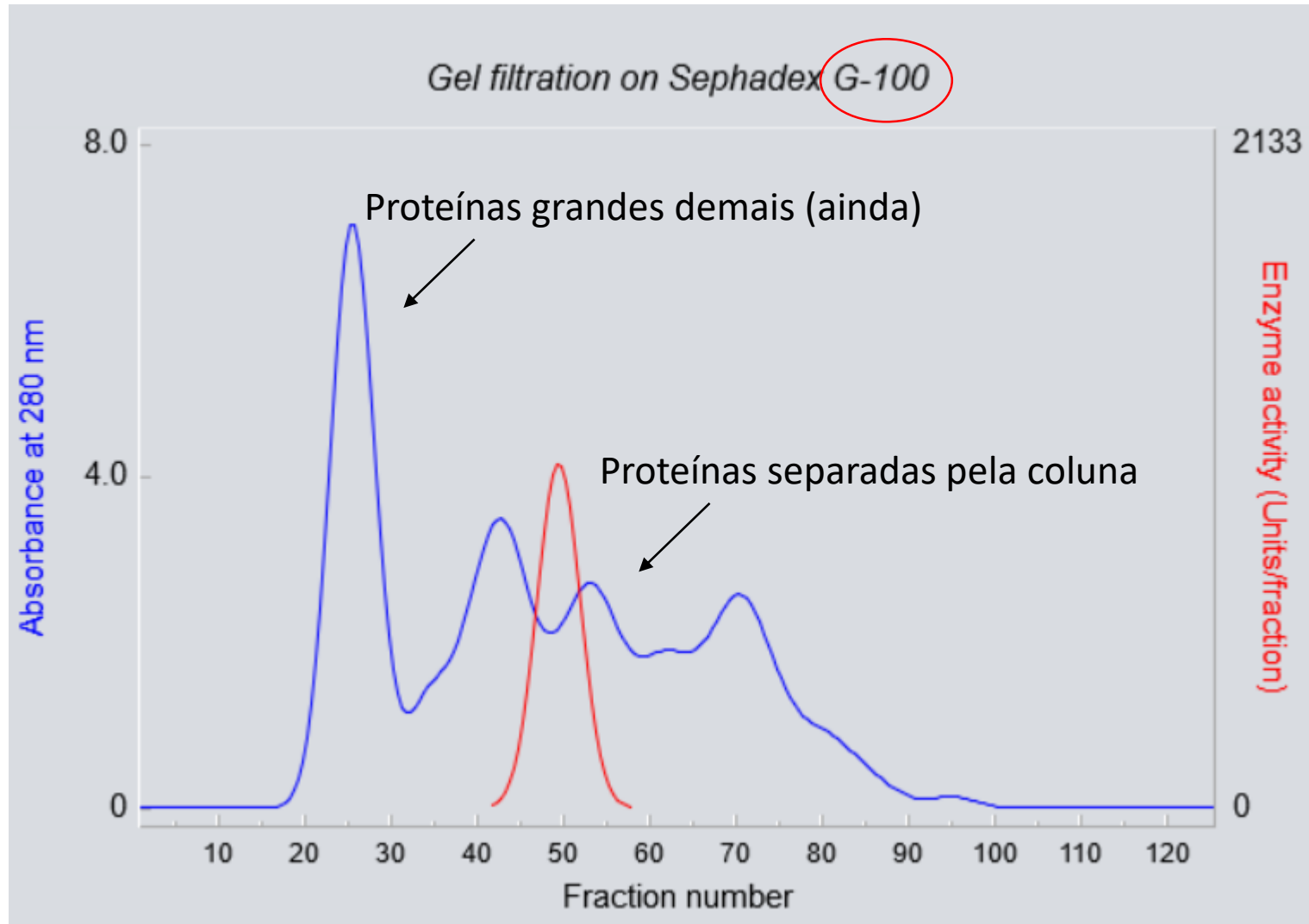
dextran

1500 - 30000

Sephadex G-100¹

dextran

4000 - 150000



Matrix name

Bead type

Approximate fractionation range
for peptides and globular
proteins (molecular weight)

Sephadex G-50¹

dextran

1500 - 30000

Sephadex G-100¹

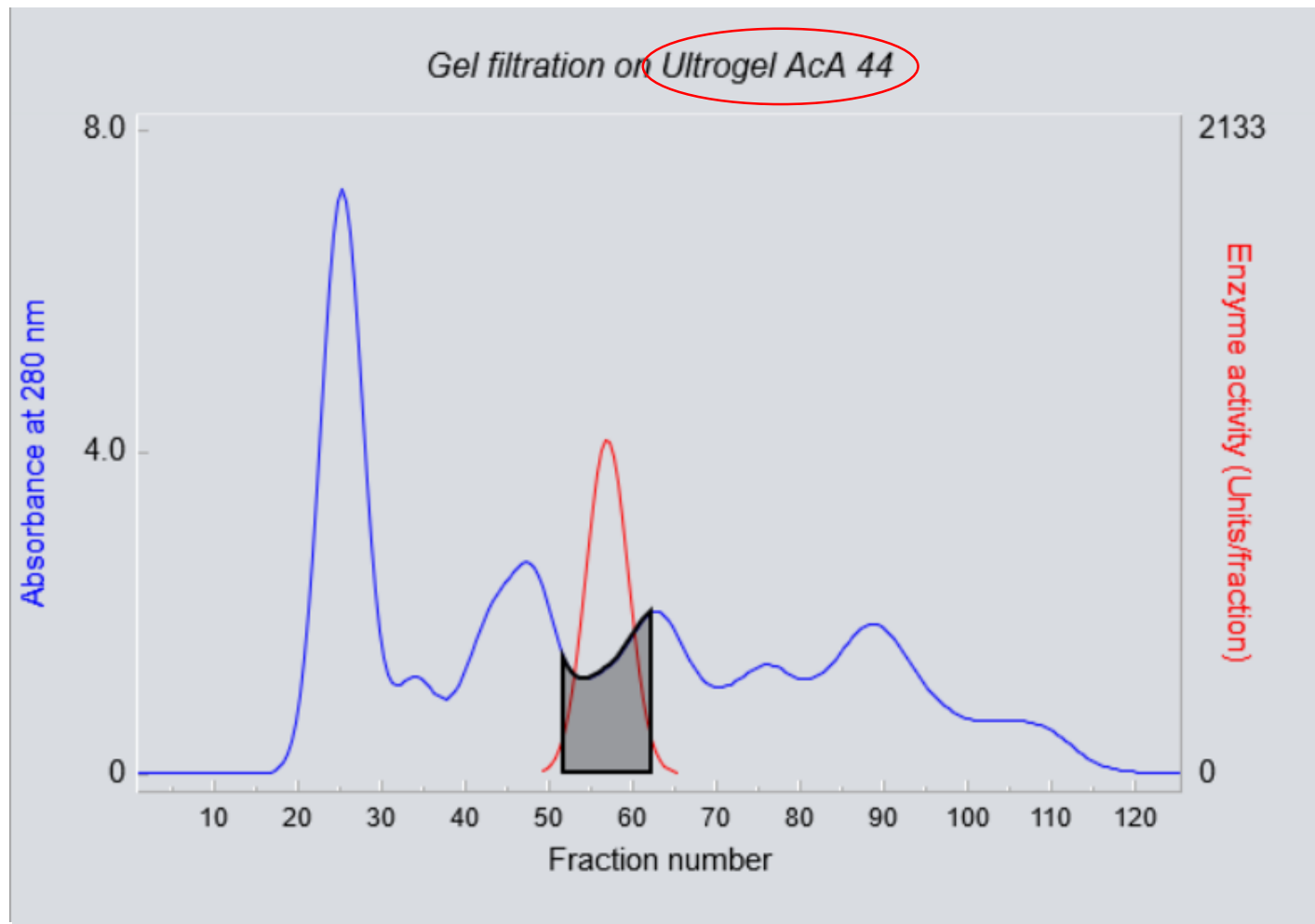
dextran

4000 - 150000

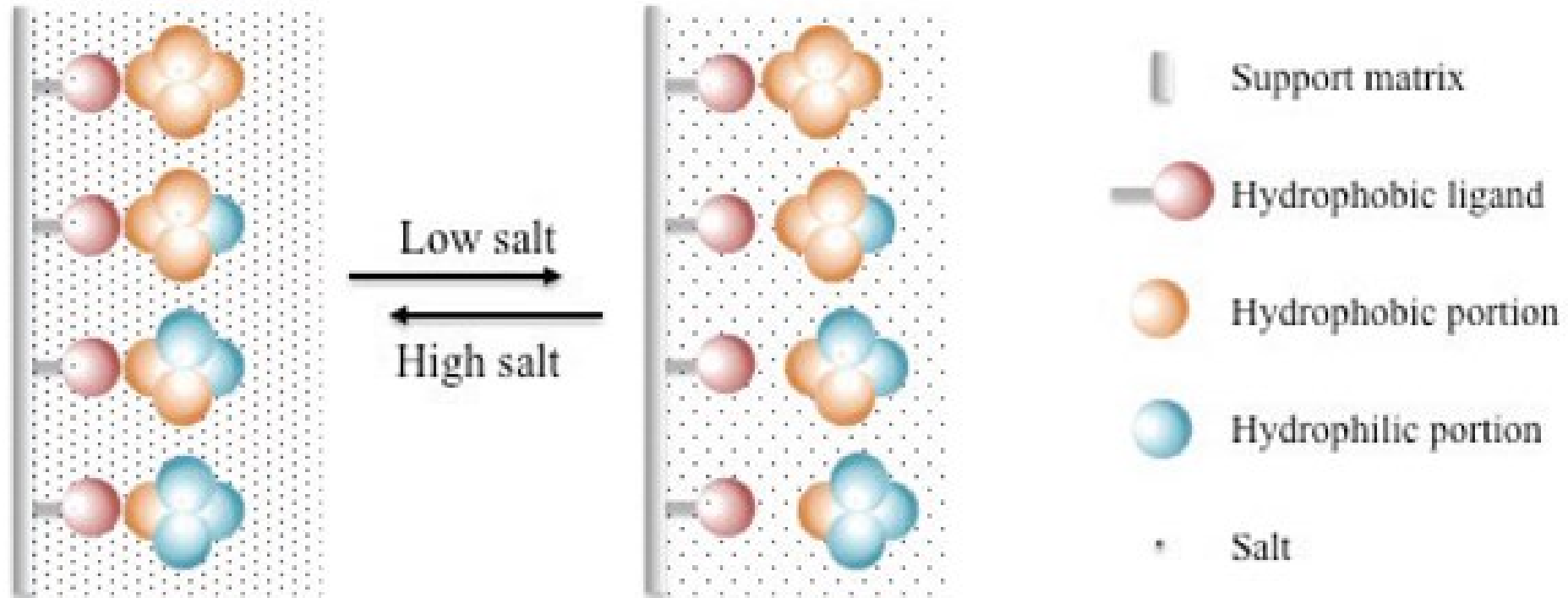
Ultrogel AcA 44²

polyacrylamide/agarose

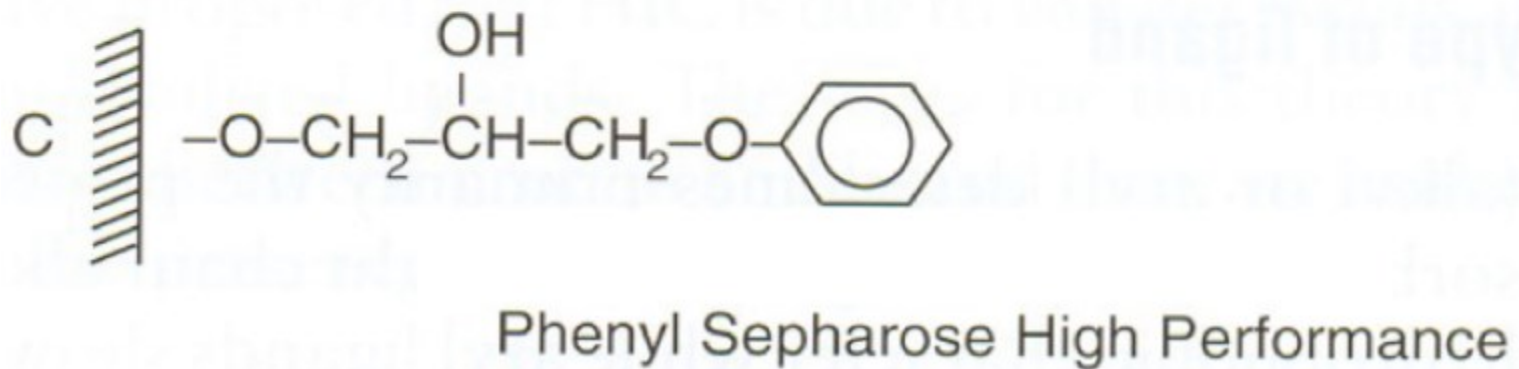
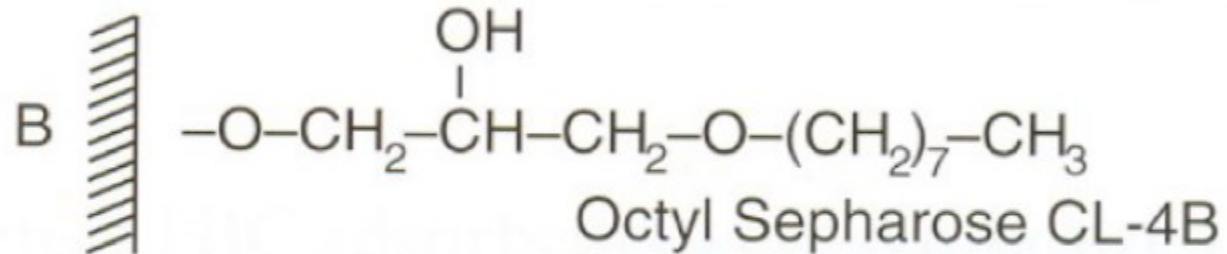
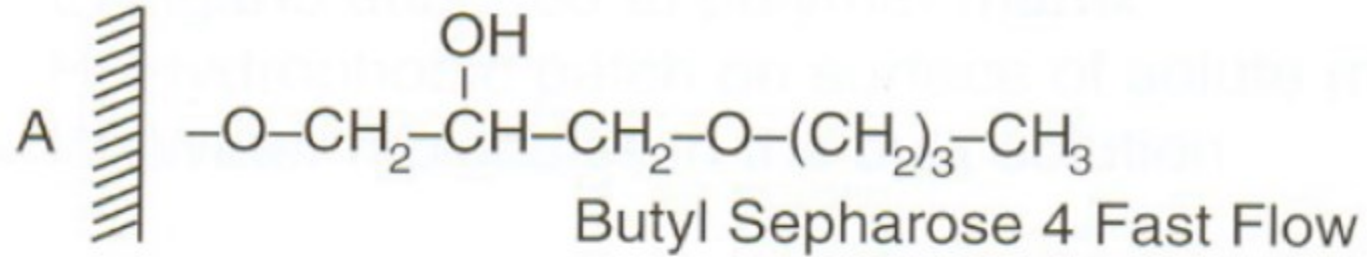
12000 - 130000



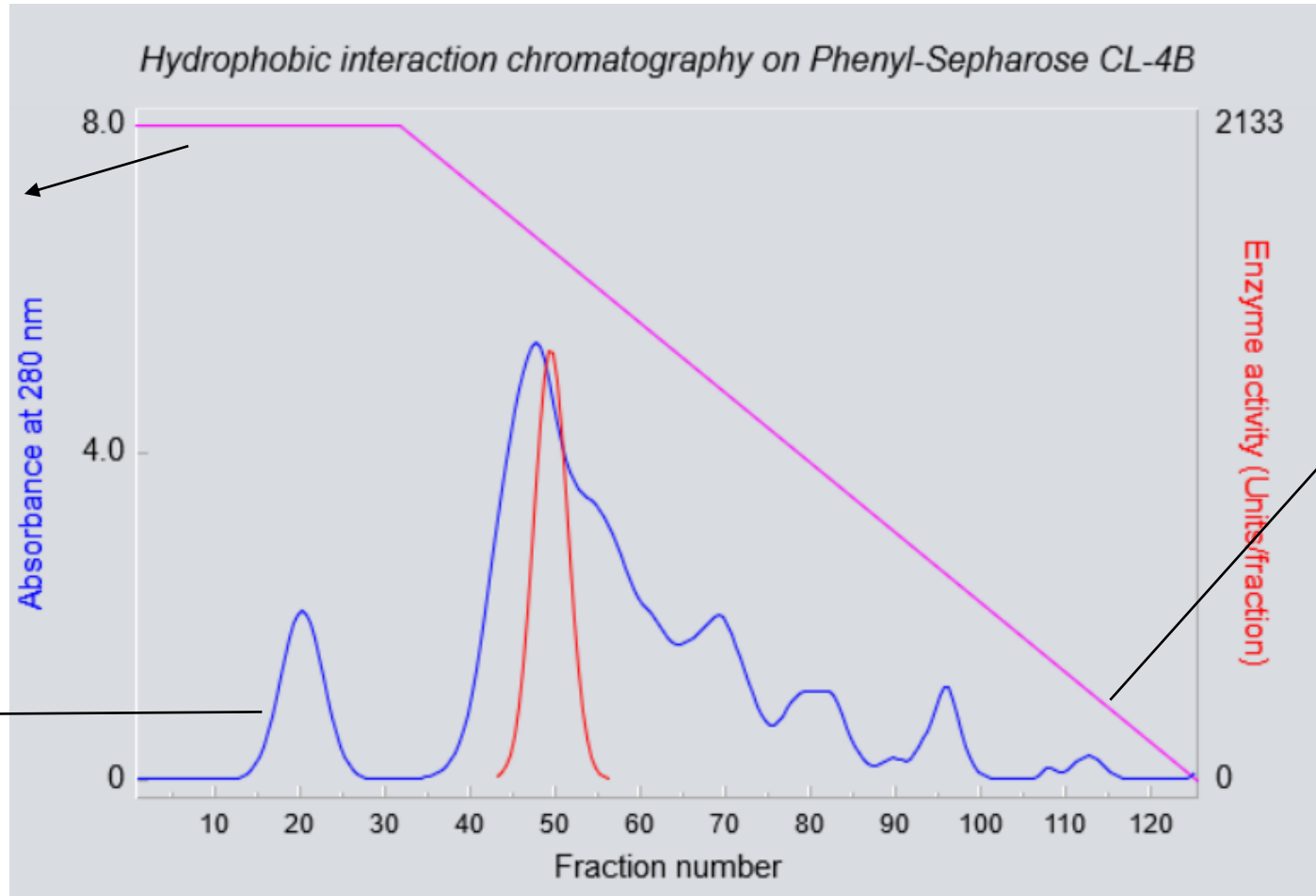
Hidrofobicidade



Hidrofobicidade



Hidrofobicidade



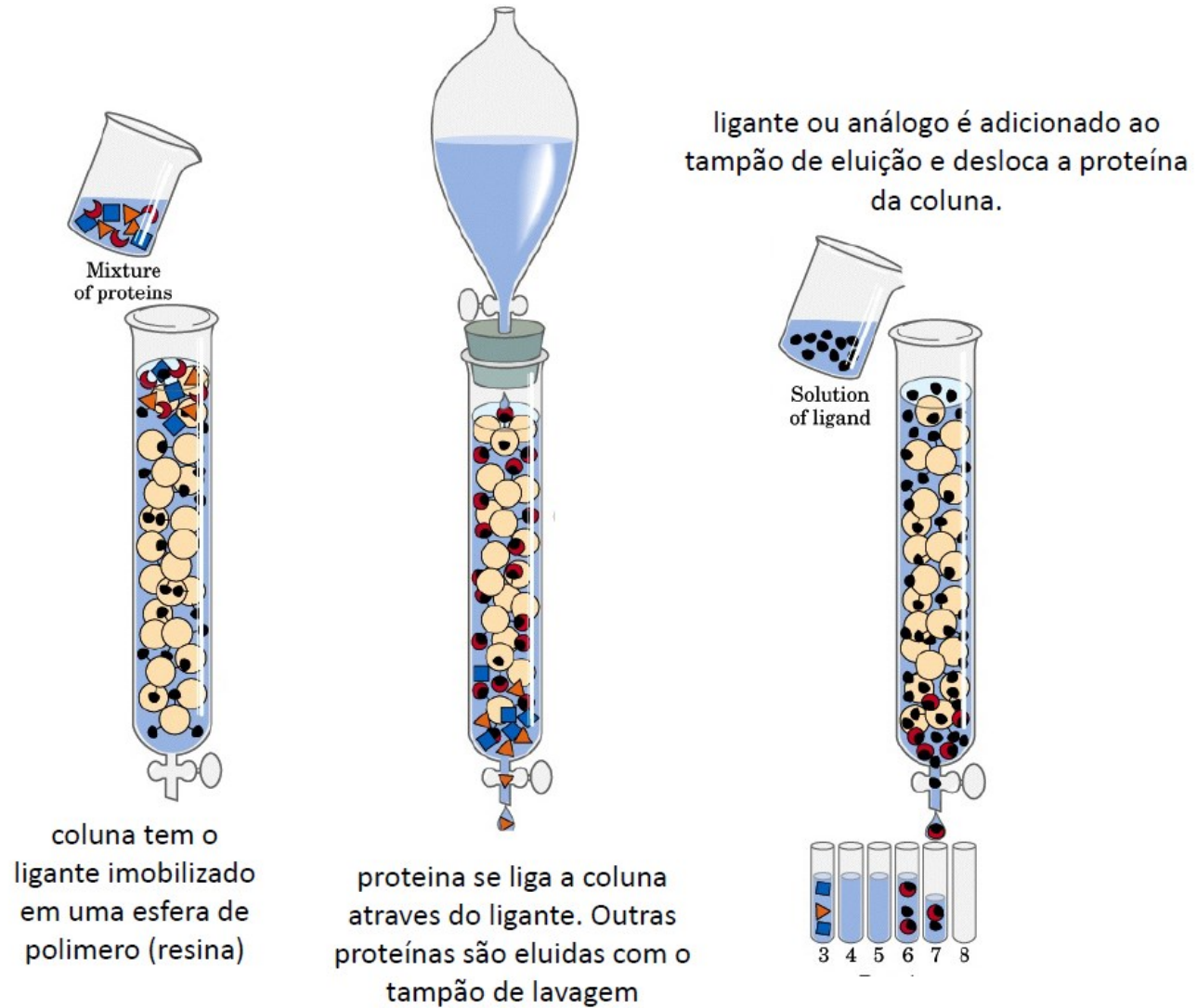
Concentração de sal alta, maioria das proteínas ligadas à resina

Proteínas tão hidrofílicas, que não ligaram na coluna mesmo na presença de sal

Gradiente decrescente de sal, proteínas mais hidrofóbicas eluem por último (têm mais afinidade pela coluna)

- A presença de muito sal no tampão inicial pode levar à precipitação de proteínas na amostra devido ao salting out com sulfato de amônio

Afinidade



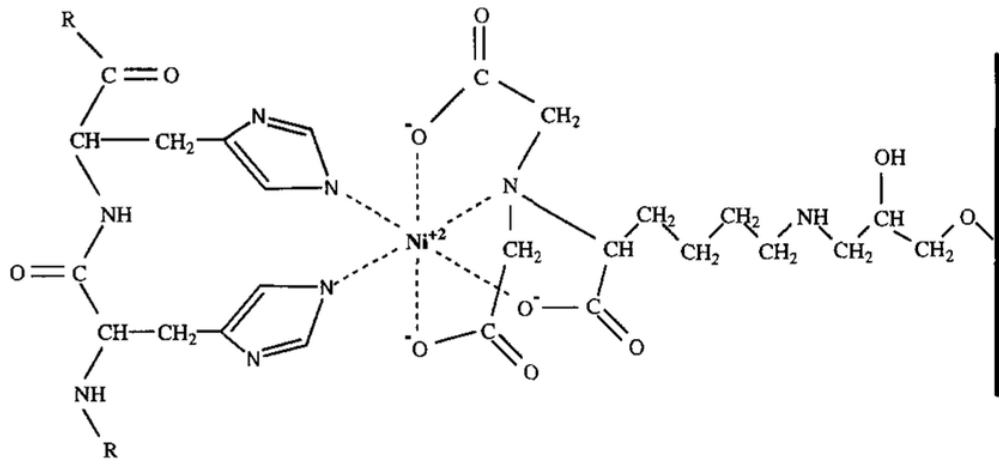
Afinidade

Utilizando engenharia genética, podemos fusionar a proteína de interesse a um peptídeo ou proteína com alta afinidade a um ligante disponível comercialmente! (“tags”)

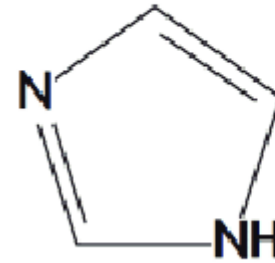
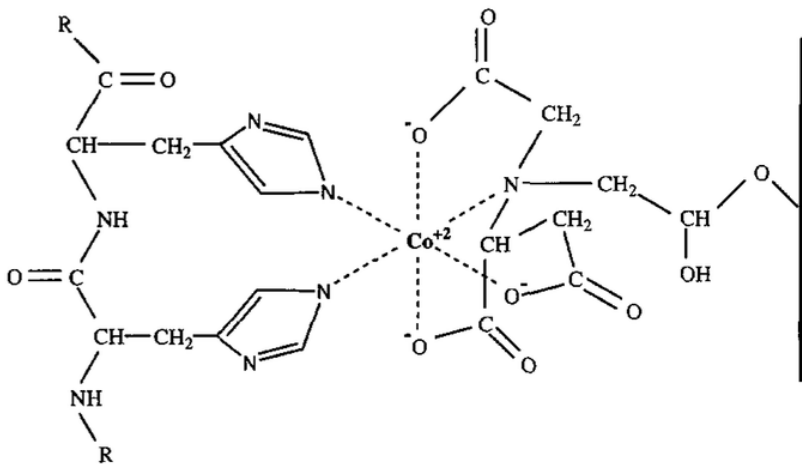
Tag	Tamanho do Tag	Ligante	Eluente
Poli-Histidina	em geral 6-8 aminoácidos (HHHHHH)	Cátions divalentes (em geral Ni^{2+} ou Co^{2+}) imobilizados	Imidazol ou baixo pH
Glutathione S-Transferase (GST)	211 aminoácidos	Glutathione imobilizada	Glutathione
Maltose Binding Protein	396 aminoácidos	Resina de amilose	Maltose
FLAG tag	8 aminoácidos	Anticorpo imobilizado	Baixo pH ou peptídeo FLAG
Streptavidina	159 aminoácidos	Biotina imobilizada	Biotina
Myc tag	11 aminoácidos	Anticorpo imobilizado	Baixo pH

Poli-His

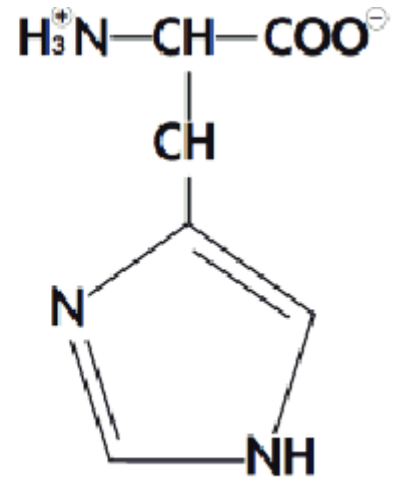
a. Nickel-nitriloacetic acid (Ni^{+2} -NTA)



b. Cobalt-carboxymethylaspartate (Co^{+2} -CMA)



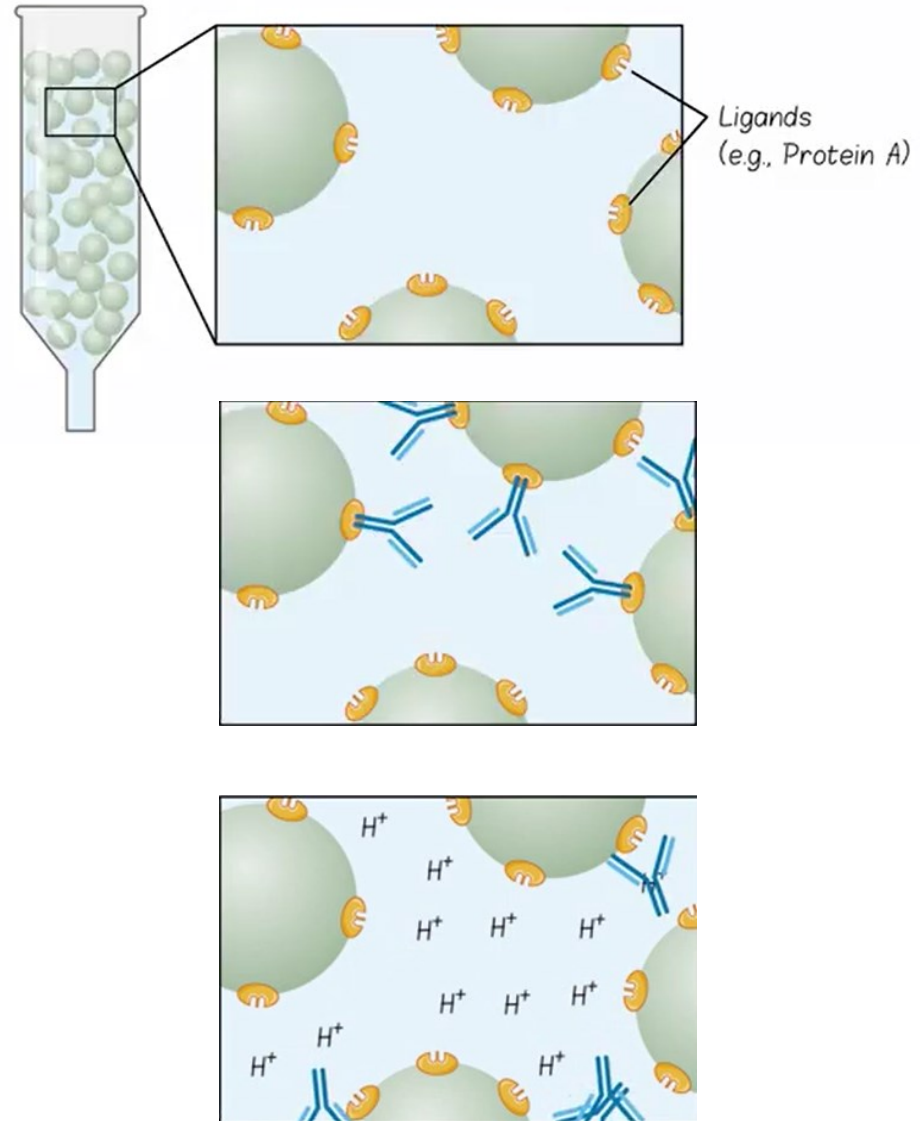
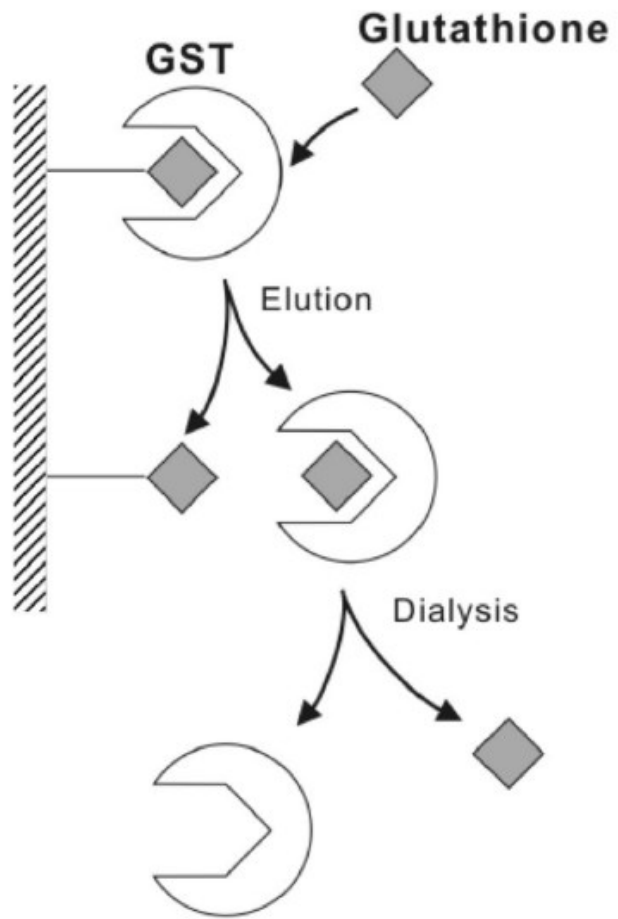
Imidazole



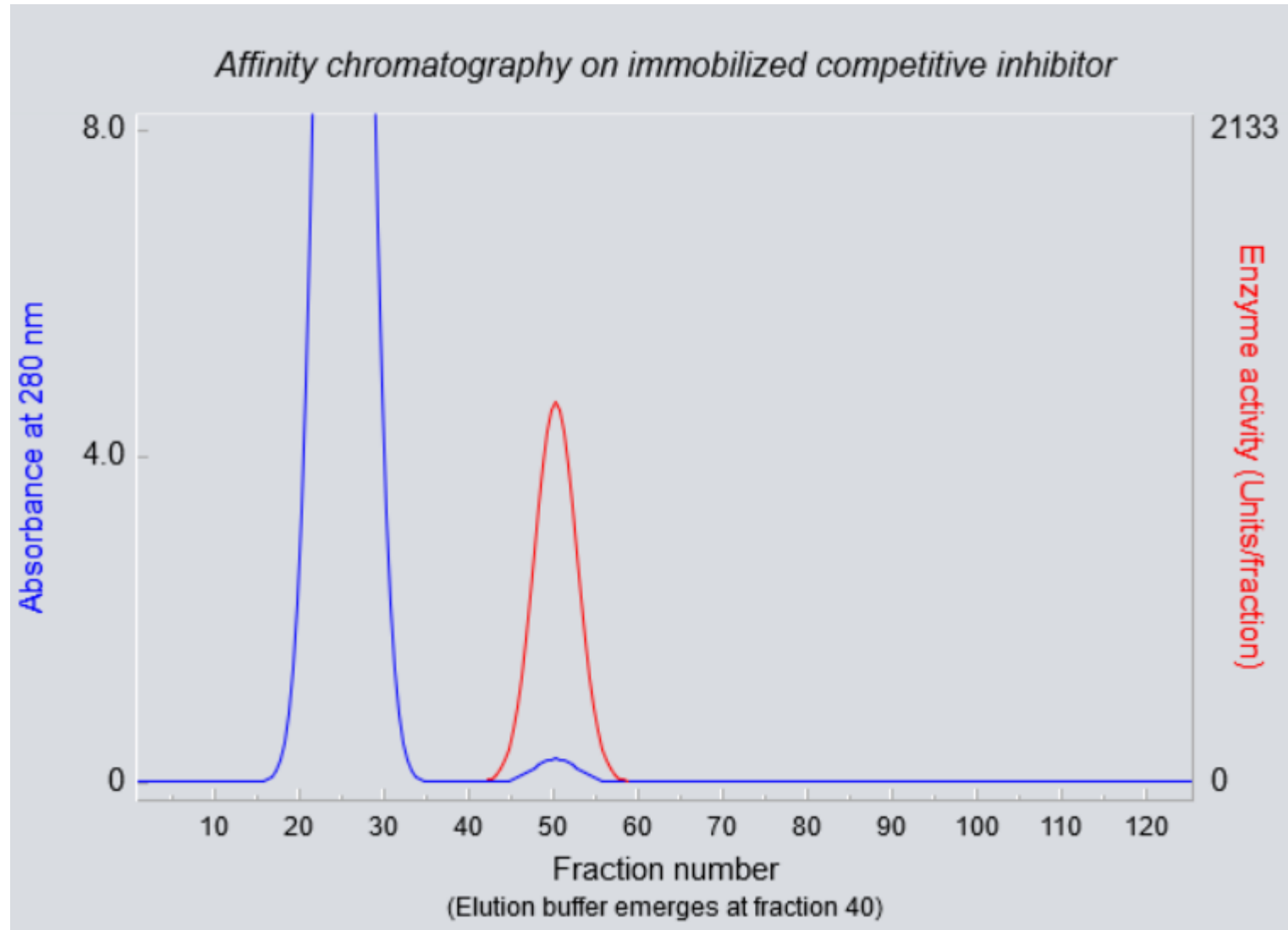
Histidine

GST

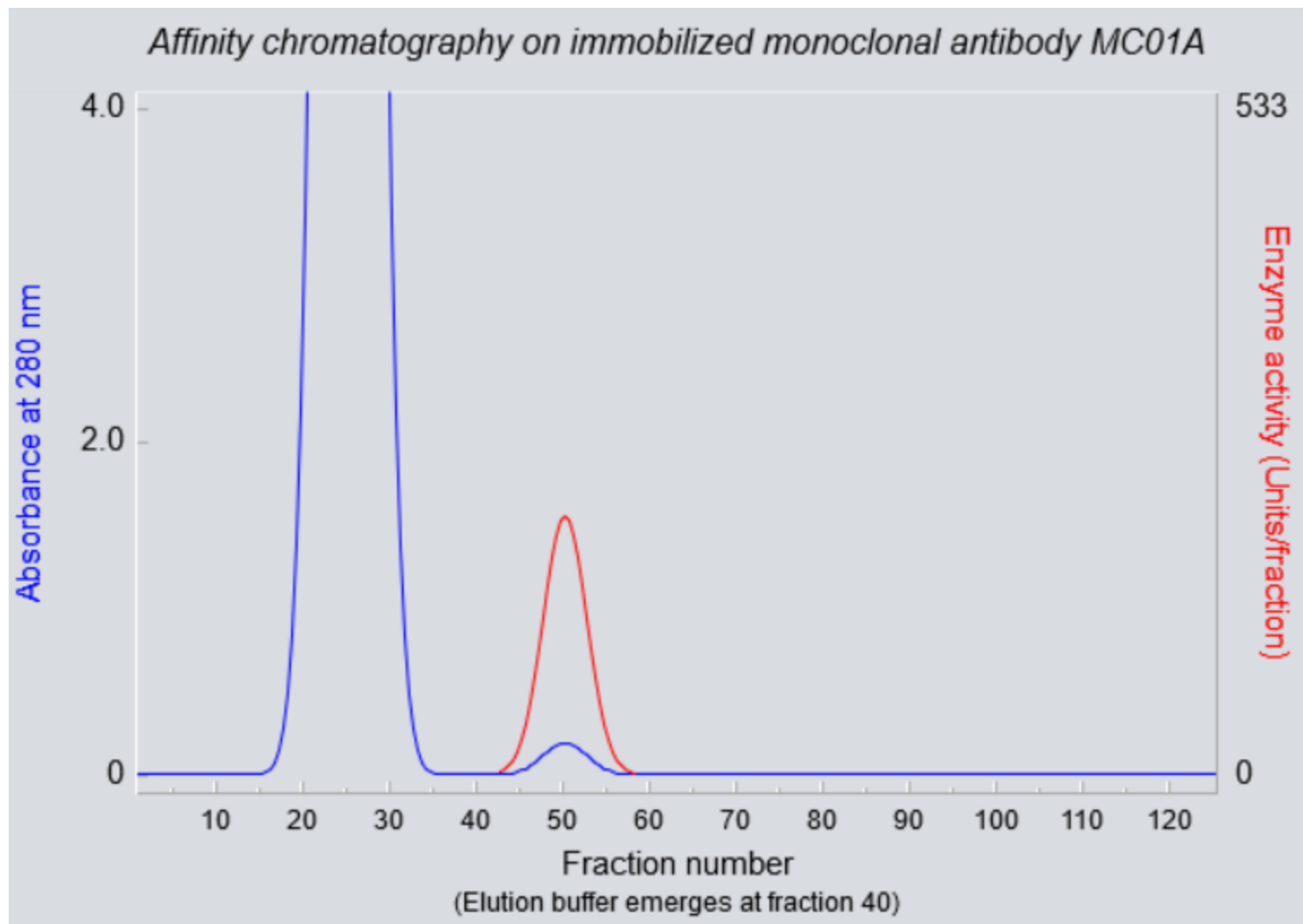
Anticorpos



Proteína 3, mistura complexa, inibidor competitivo, eluir com 5mM inibidor



Proteína 1, mistura complexa, anticorpo MC01A, eluir com glicina pH 2.3



Método de purificação	Propriedade	Capacidade	Custo	Resolução	Comentários
Precipitação com $(\text{NH}_4^+)_2 \text{SO}_4^{-2}$	solubilidade	alta	baixo	baixa	Usada em etapas iniciais ou finais de purificação para concentrar proteínas. Pode desnaturar irreversivelmente a proteína de interesse.
<u>Cromatografias</u>					usado em etapas intermediárias da purificação.
gel filtração/ exclusão molecular	tamanho	média	médio	baixa	informa sobre o tamanho (peso molecular) da proteína de interesse.
troca iónica	carga das cadeias laterais de a.a	média	médio	média	usado em etapas intermediárias da purificação. Variação do pH aumenta ou diminui a interação com a coluna.
hidrofobicidade	conteúdo hidrofóbico		médio	alta	Frequentemente desnatura irreversivelmente a proteína de interesse.
afinidade	interações não-covalentes específicas	baixa	médio/alto	alta	Utilizado em etapas finais da purificação. Depende da existência de um ligante específico. Eluição da coluna pode desnaturar a proteína de interesse.