

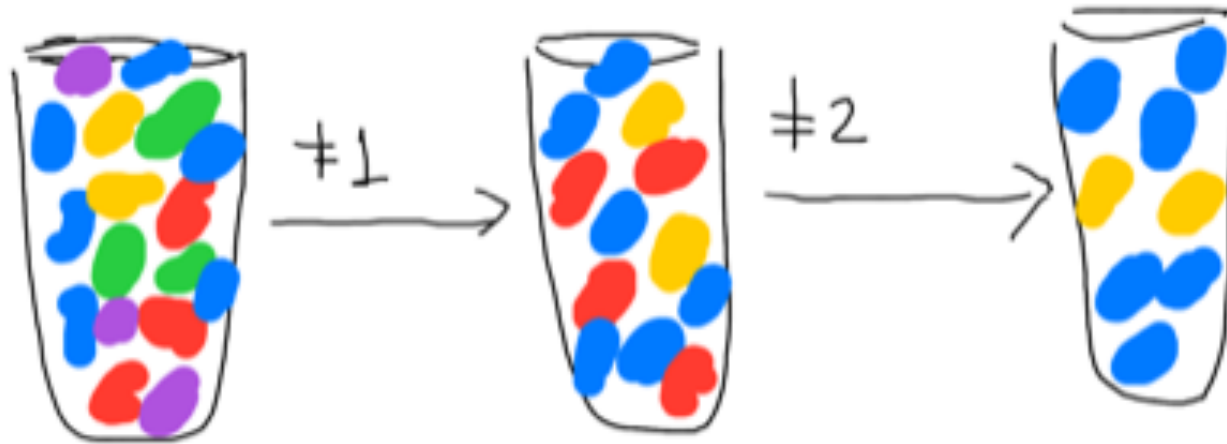
# Cromatografia de troca iônica

Prof. Dr. Roberto Kopke Salinas

Departamento de Bioquímica

IQ – USP

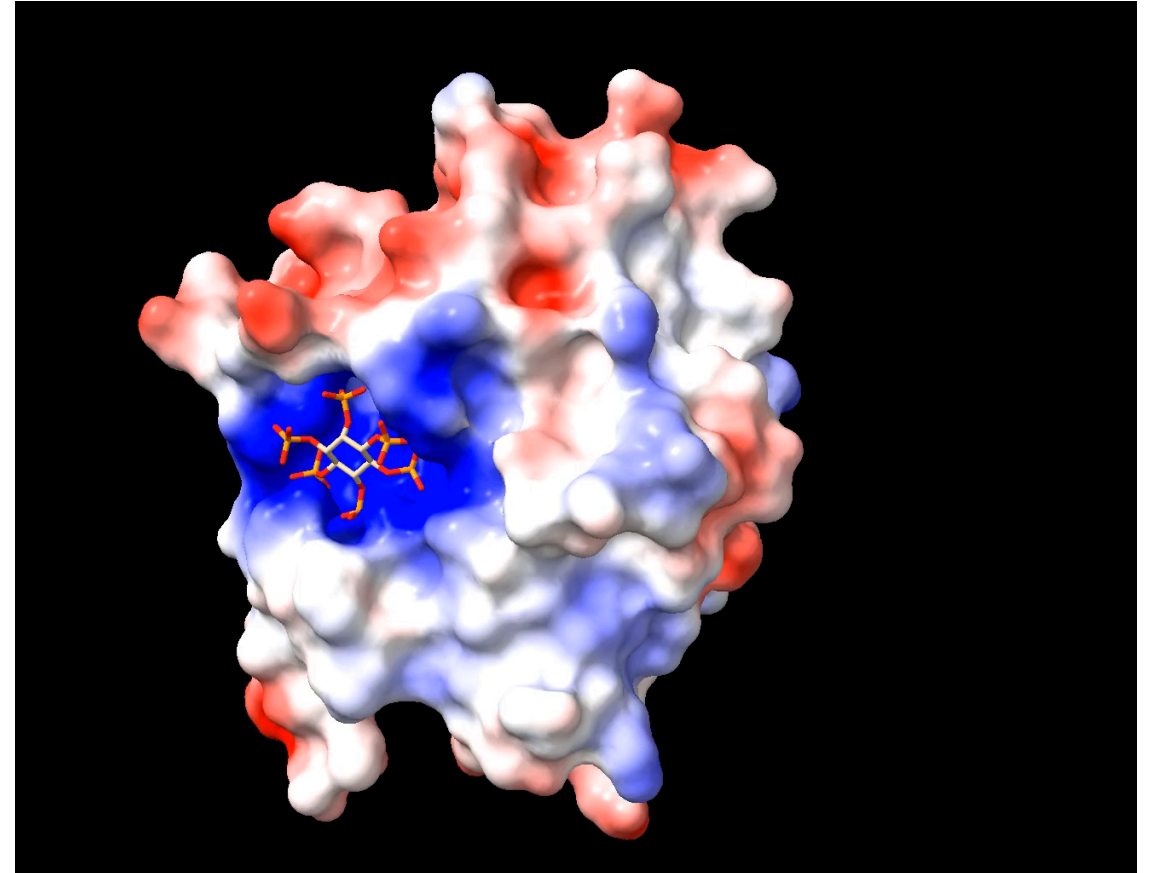
# Como proteínas ser isoladas?



Enriquecimento

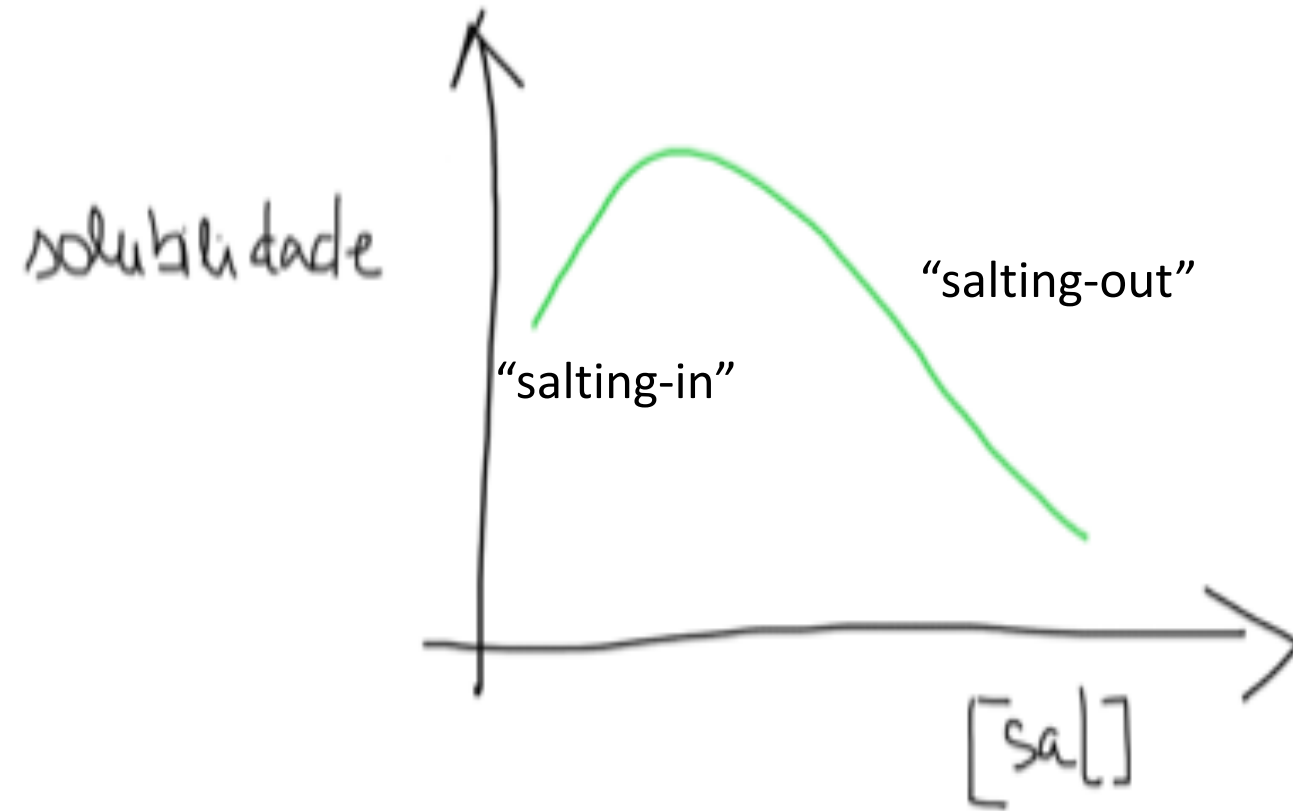
# Os métodos de separação dependem das características físico químicas das proteínas

- Solubilidade em água ou em solvente orgânico (hidrofobicidade)
- Carga líquida em dado pH
- Tamanho (raio hidrodinâmico)
- Afinidade por determinado ligante

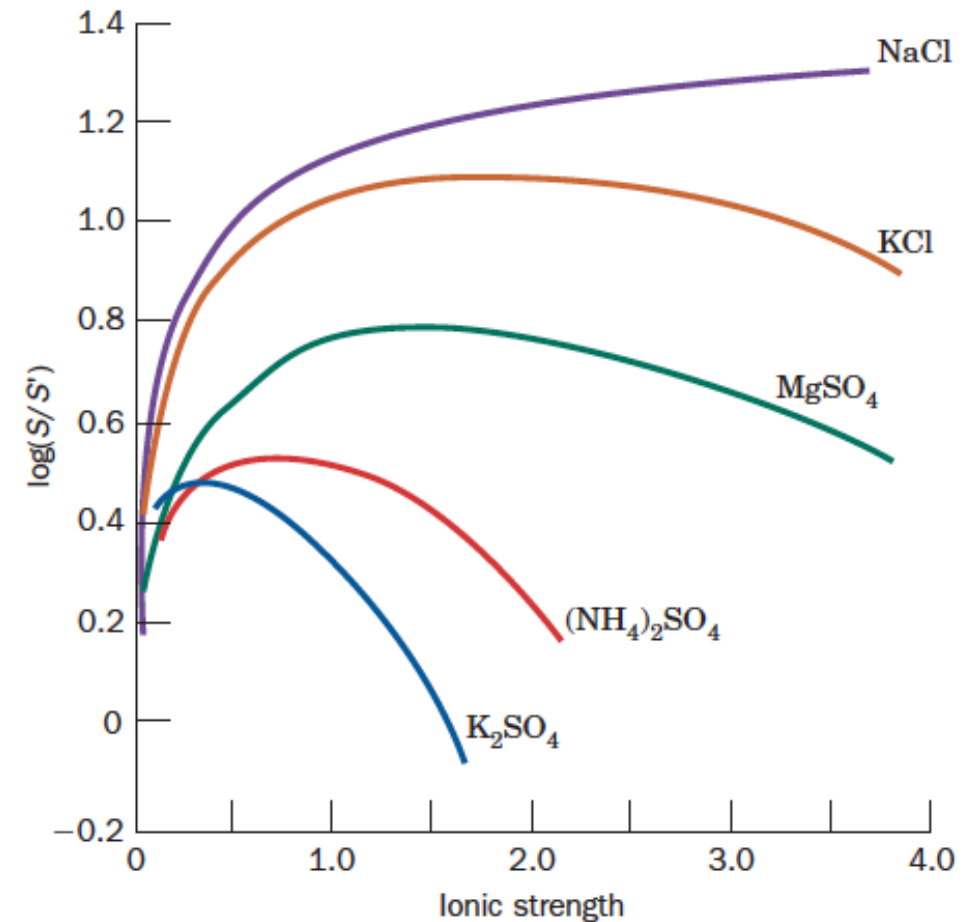


PDB: 3eeb  
ChimeraX

# A força iônica afeta a solubilidade das proteínas em água: *salting in* vs. *salting out*



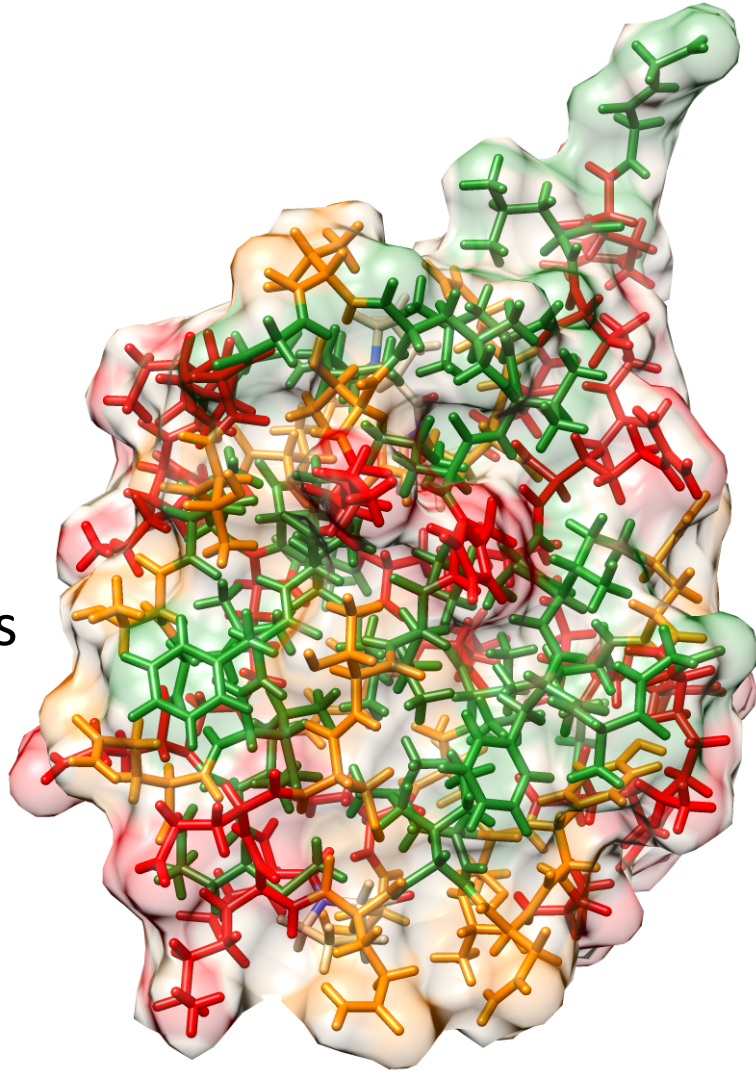
Voe & Voet Biochemistry 4th edition, Wiley, 2011 , pp. 133



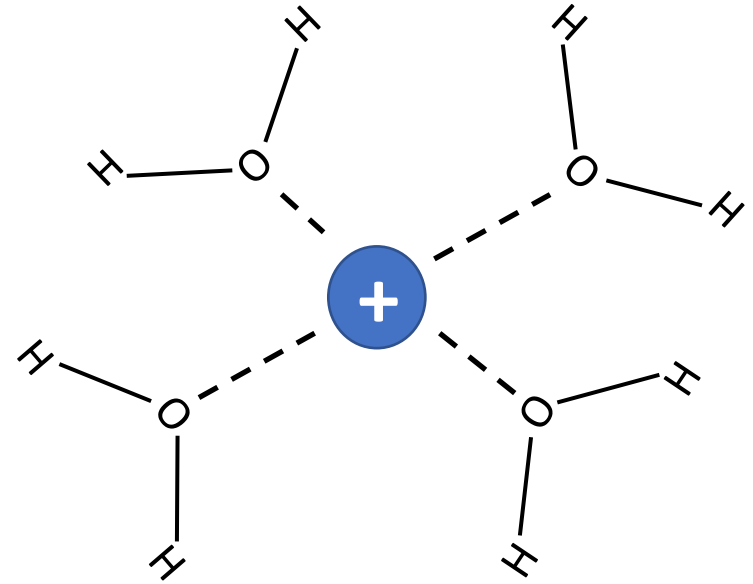
Voe & Voet Biochemistry 4th edition, Wiley, 2011 , pp. 133

# Salting out

- polares
- carregados
- hidrofóbicos

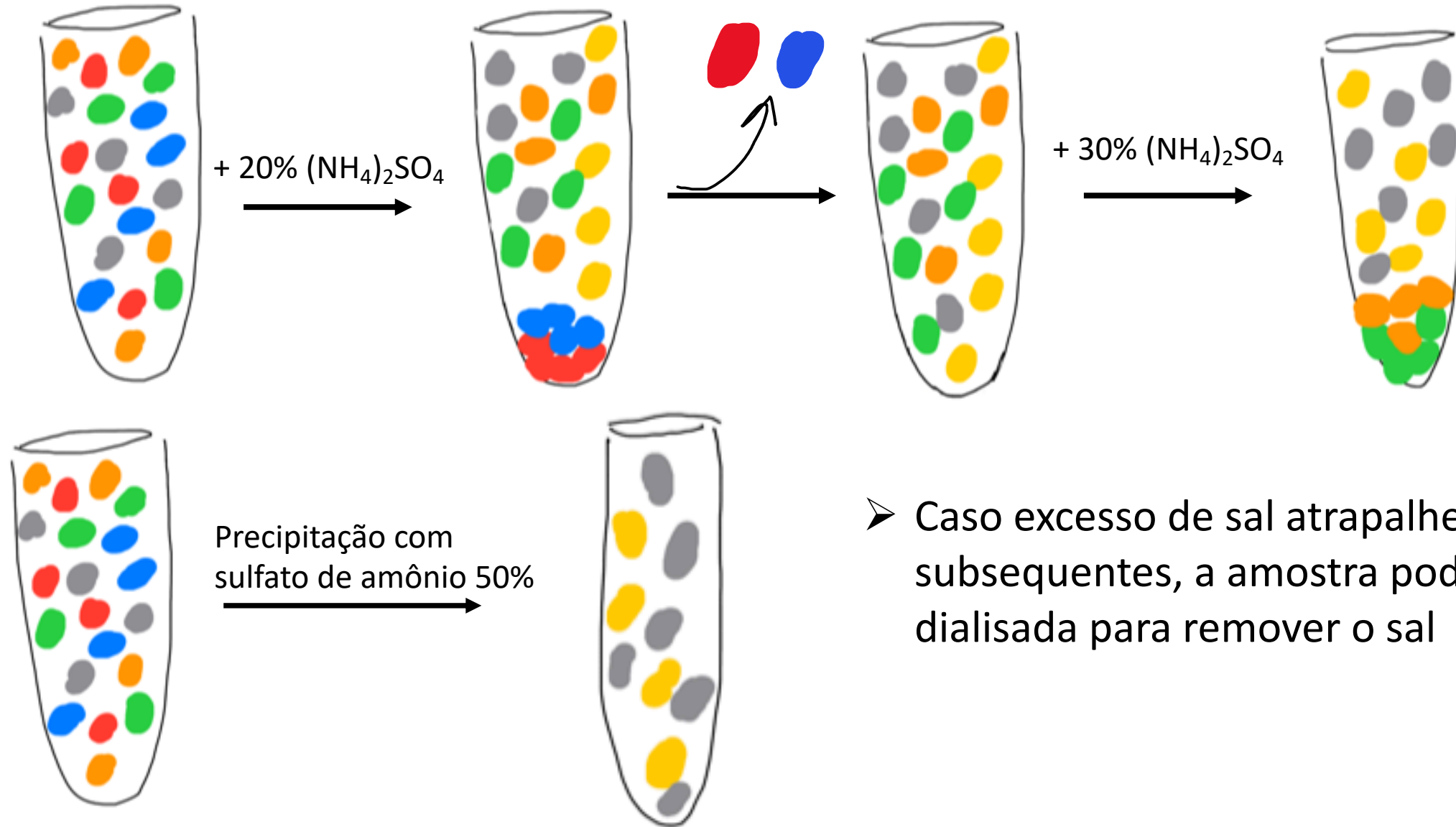


Ubiquitina (1UBQ)



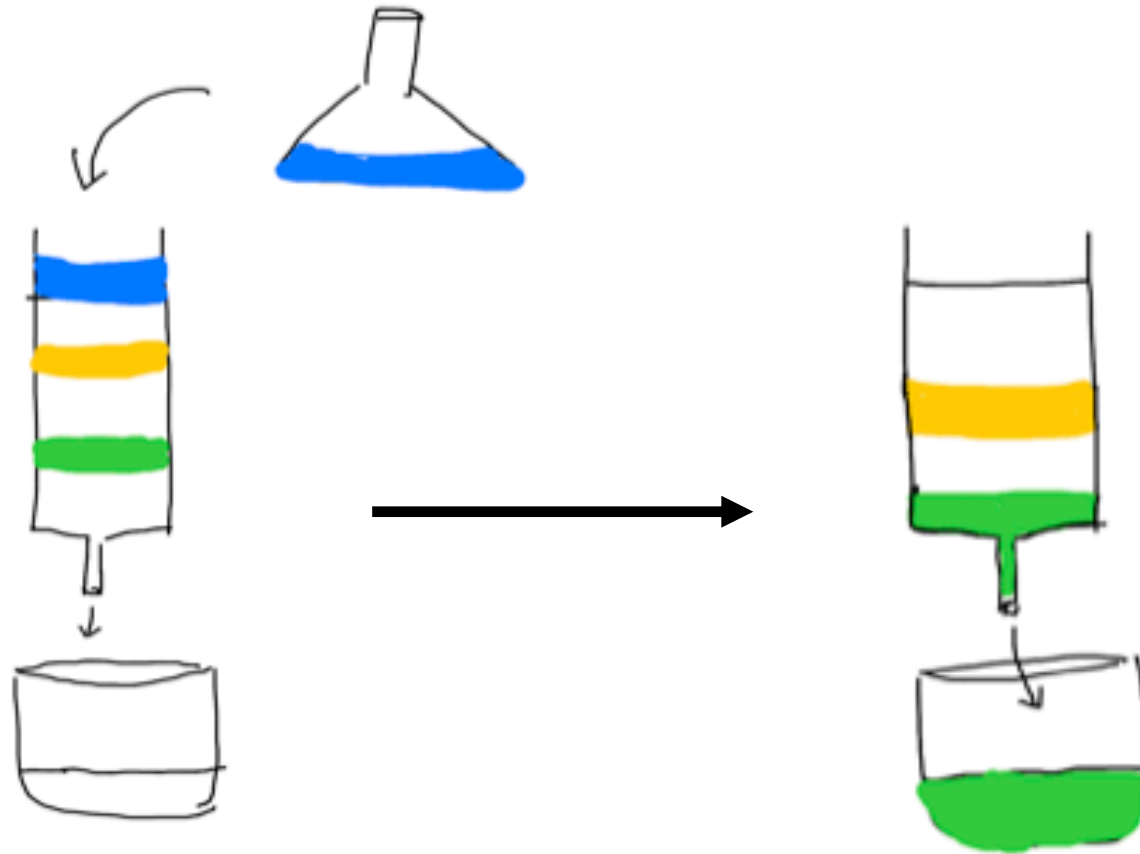
Solubilidade depende da solvatação de grupos expostos ao solvente. Na presença de elevadas concentrações de sal, íons irão competir com a proteína pelas moléculas de água

- Uma mistura complexa de proteínas pode ser fracionada usando uma solução saturada de sulfato de amônio



- Caso excesso de sal atrapalhe as etapas subsequentes, a amostra pode ser dialisada para remover o sal

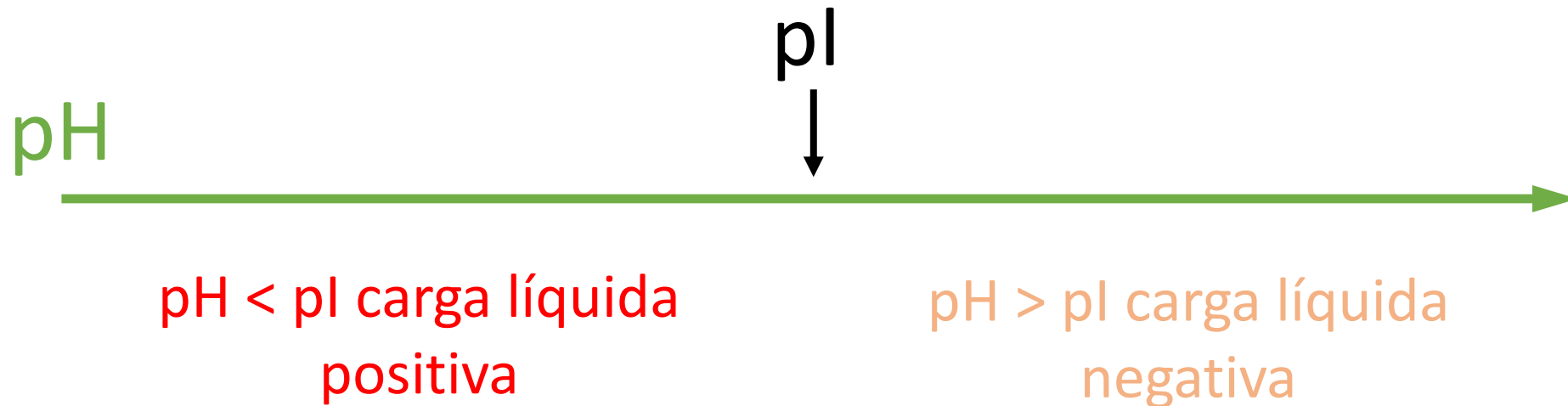
# Cromatografia



- Mistura de moléculas está dissolvida na fase móvel
- Mistura de moléculas é arrastada pela fase móvel
- A interação de cada molécula com a fase sólida determinará a velocidade com a qual cada molécula atravessará a coluna

# Cromatografia de troca iônica

- A separação se dá pela carga líquida da enzima
- A carga líquida da enzima depende, por sua vez, do pH do meio e do pI da enzima
- pI é o pH no qual a carga líquida de uma proteína é zero



- Fase sólida: resina de agarose coberta de grupos carregados
- Fase móvel: solução tampão de pH adequado
- Força da interação depende da carga líquida da enzima, ou seja, do pH do tampão e do pI da enzima



# Cromatografia de troca iônica

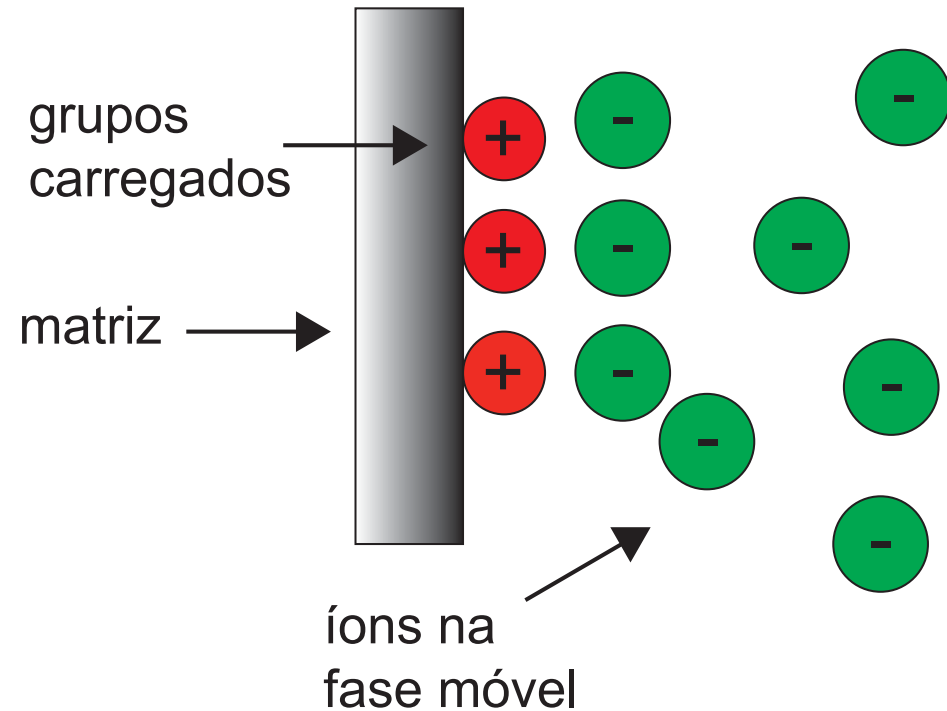
- Matriz: agarose ou poliestireno (inerte, alta porosidade, estabilidade química, estabilidade física)
- Grupos funcionais:

## *Resinas aniônicas:*

- Amônio quaternário (Q):  $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
- Dietilaminoetil (DEAE):  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$

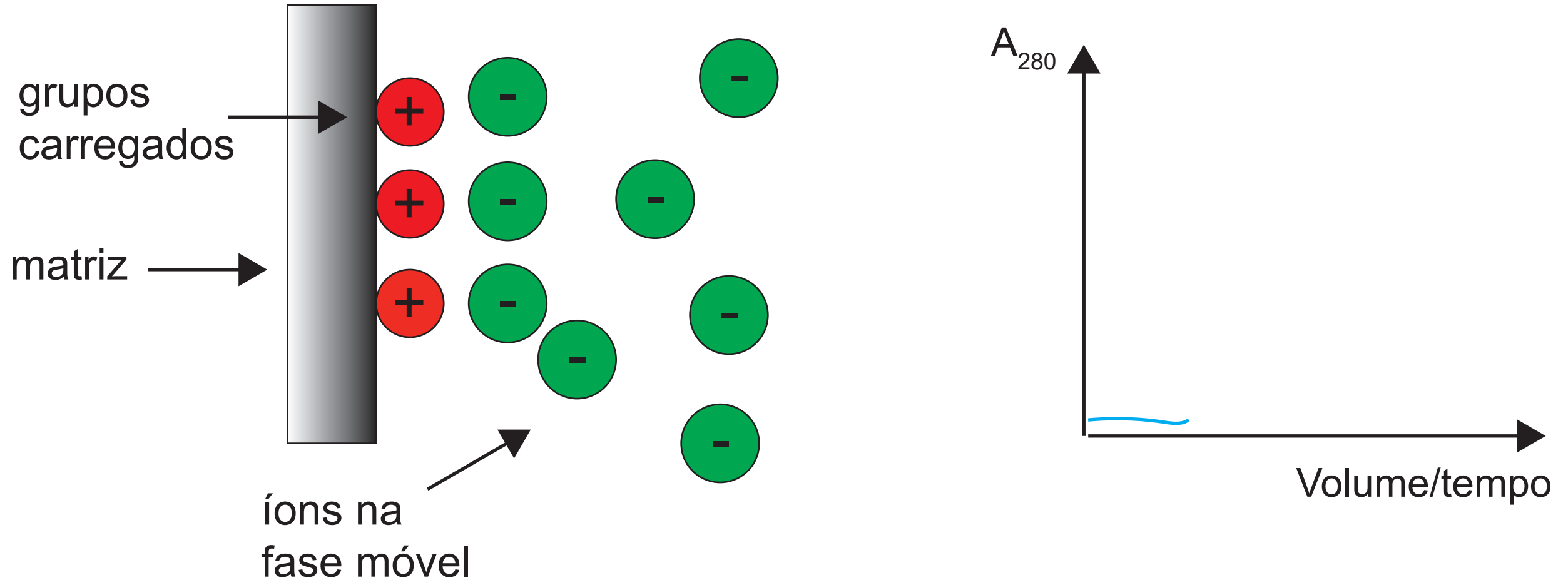
## *Resinas catiônicas:*

- Sulfopropil (SP):  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-SO}_3^-$
- Metilsulfonato (S):  $\text{CH}_2\text{-SO}_3^-$



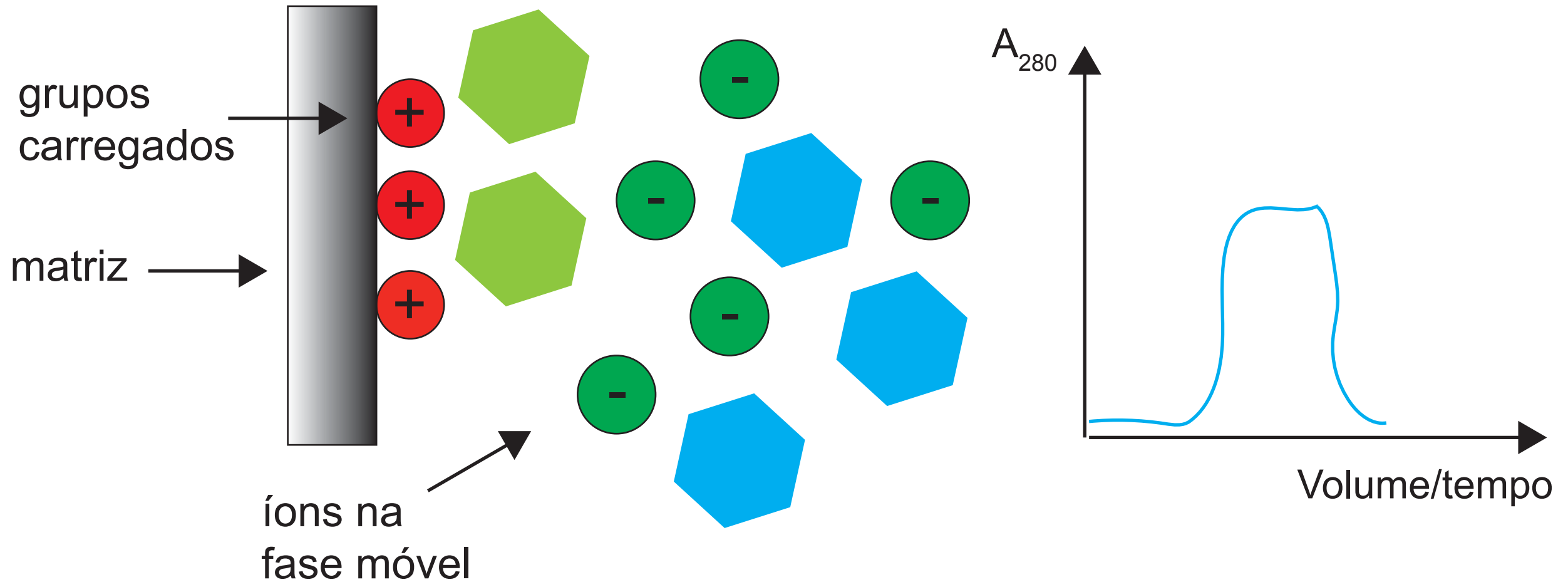
# Cromatografia de troca iônica

*1) Equilíbrio da resina de troca aniônica com o tampão no pH desejado (fase móvel)*



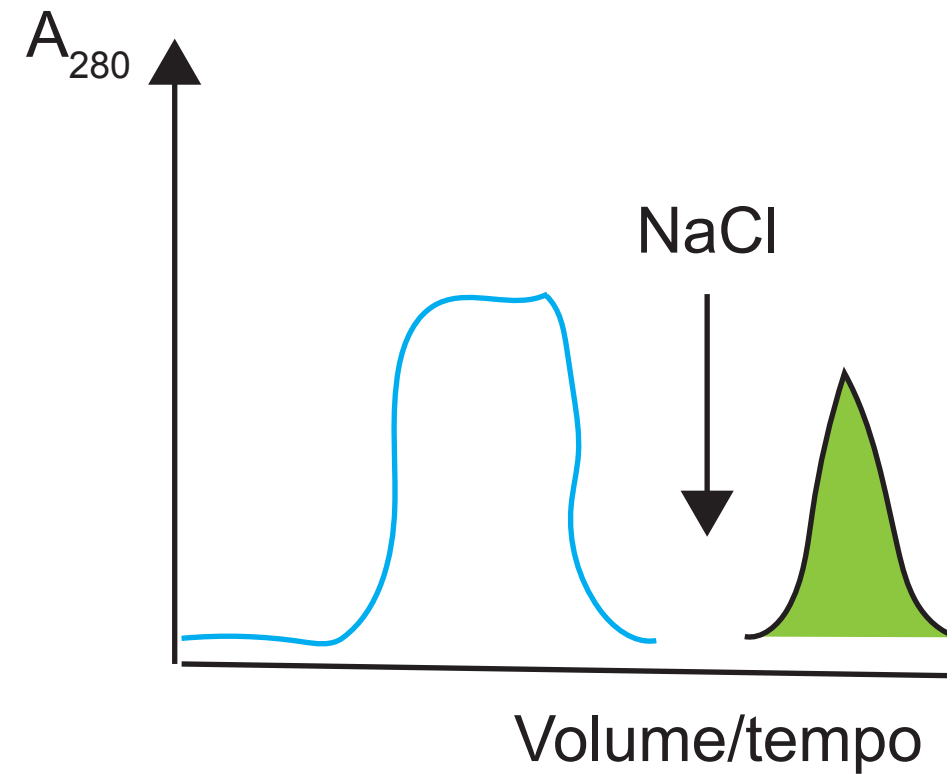
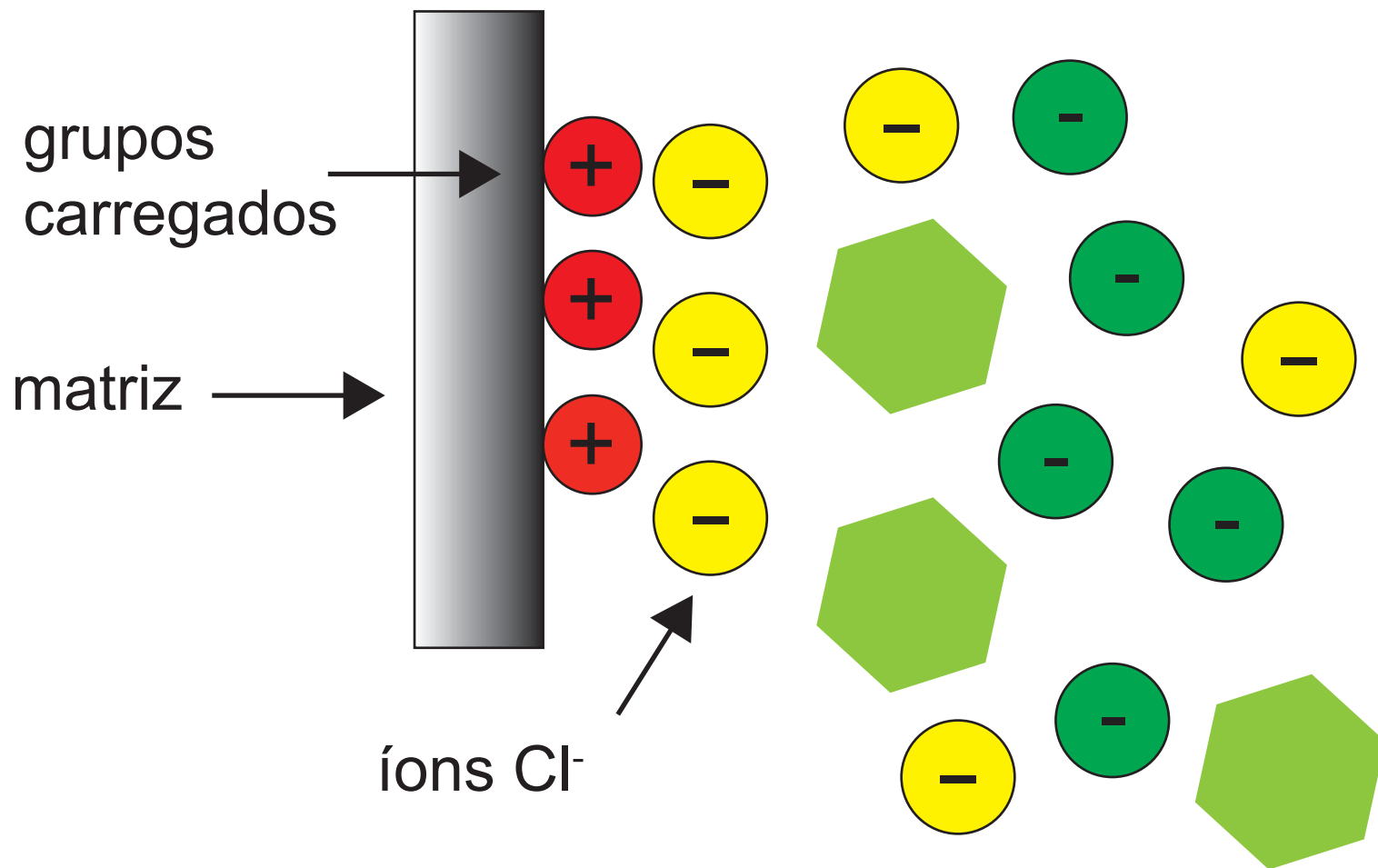
# Cromatografia de troca iônica

*2) A amostra é aplicada, as proteínas que possuem a mesma carga que a resina não interagem, enquanto que as de carga oposta adsorvem na resina*



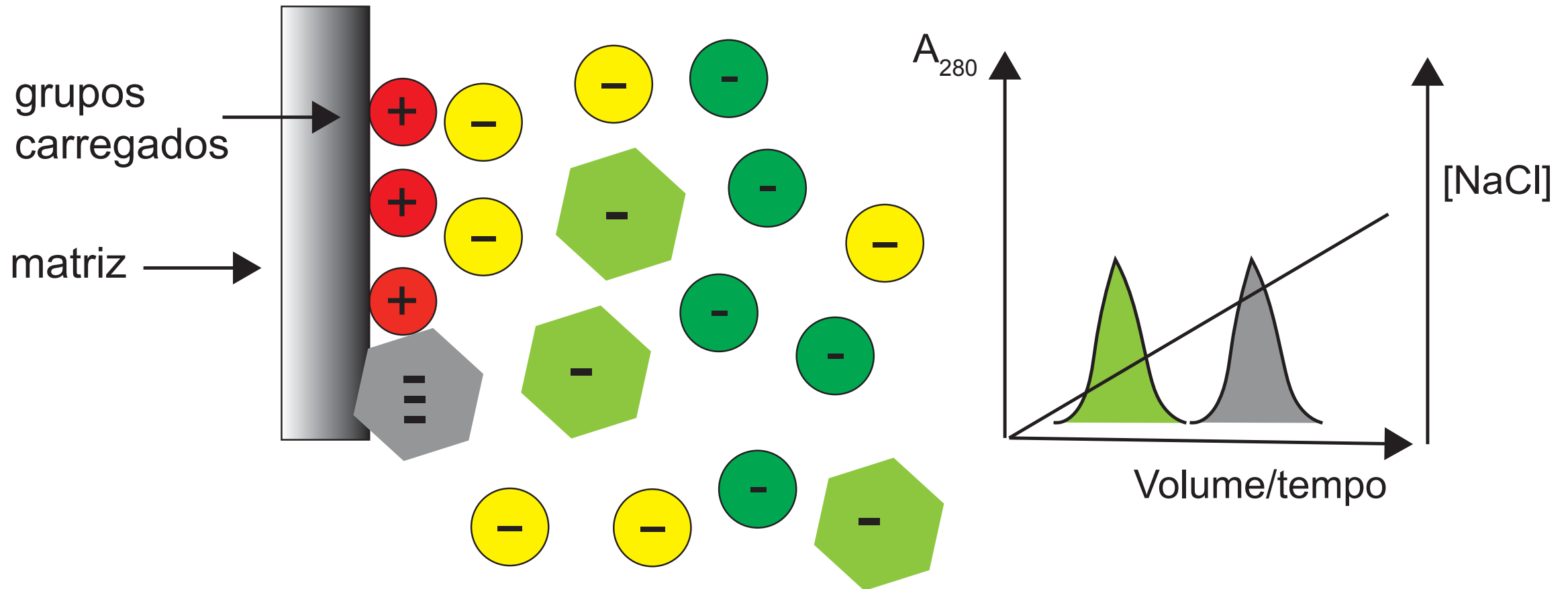
# Cromatografia de troca iônica

*3) A proteína adsorvida é eluída a partir da aplicação de um tampão com alta força iônica, que age como competidor*



# Cromatografia de troca iônica

*4) Proteínas com carga líquida maior irão adsorver mais fortemente à resina, e precisarão de maiores concentrações de NaCl para eluir*



# Cromatografia de troca iônica

- Exemplos de resinas (Cytiva):

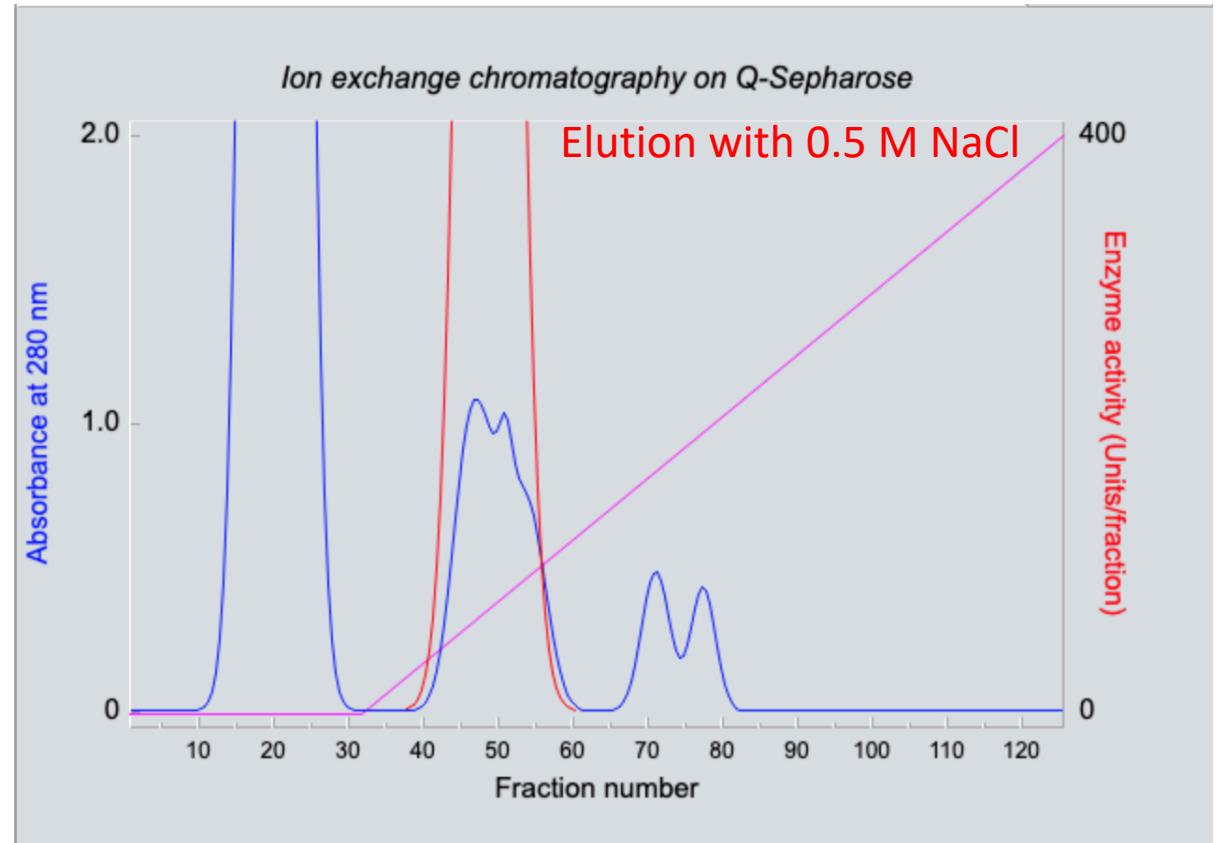
*SP-Sepharose Fast Flow (primeira etapa, lisado)*

*Mono-S (polimento)*

*Q-Sepharose Fast Flow (primeira etapa, lisado)*

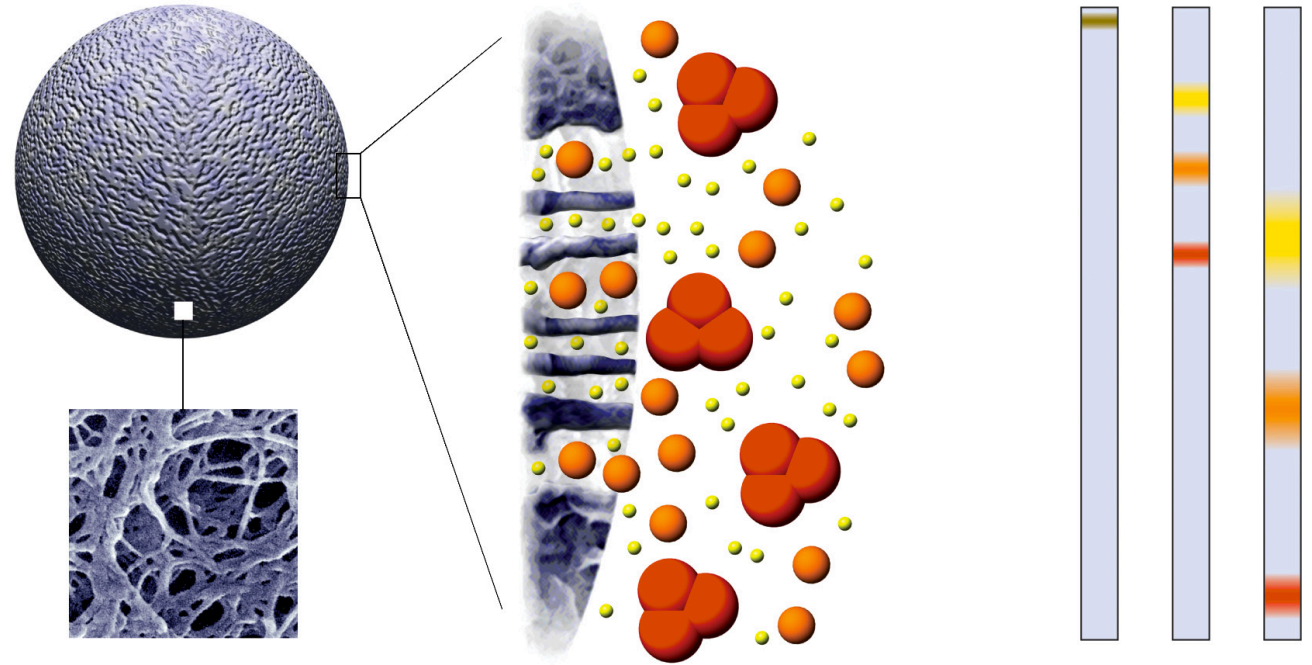
*Mono-Q (polimento)*

*DEAE-Sepharose*



# Cromatografia de exclusão por tamanho (filtração em gel)

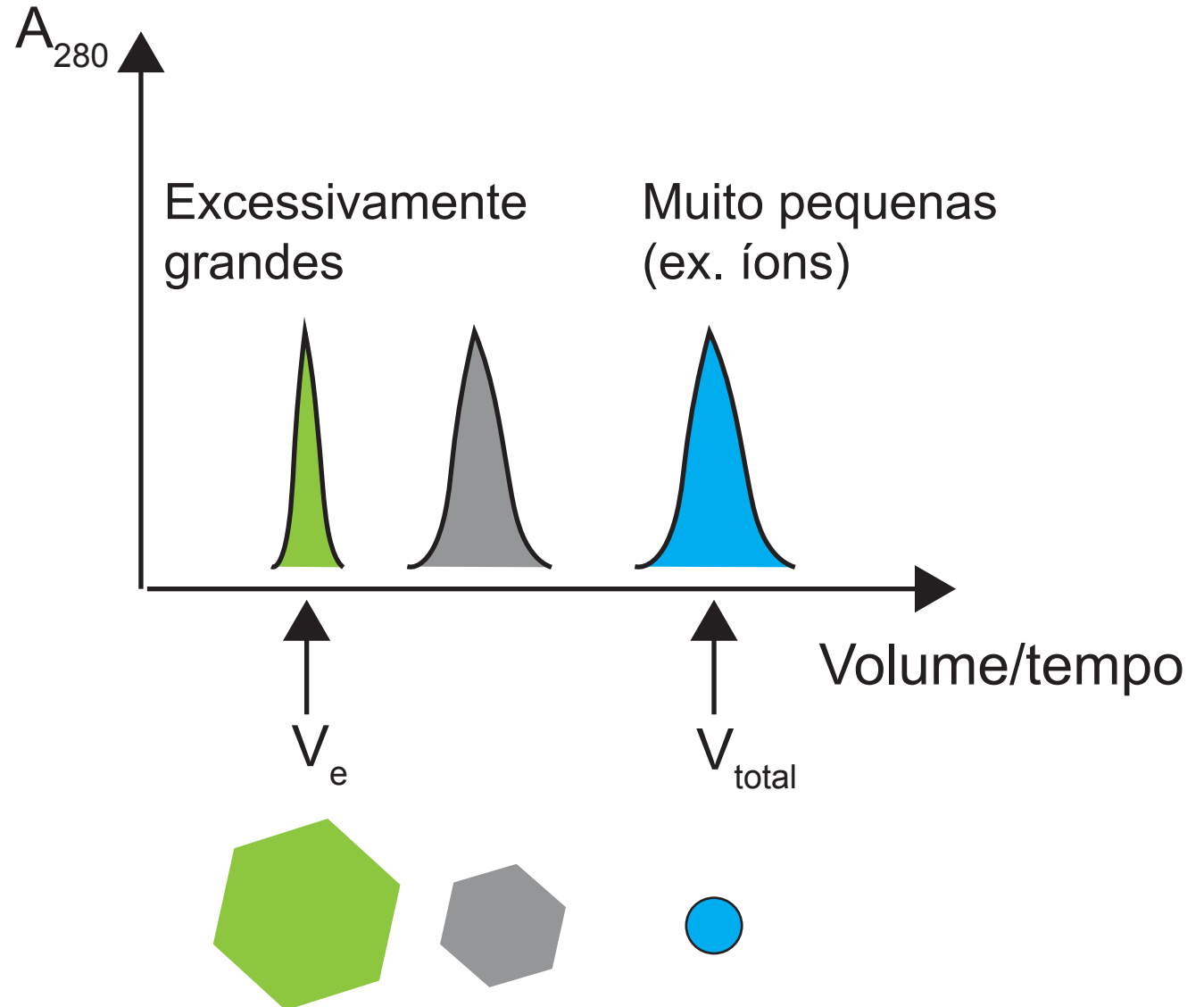
- Separação por tamanho: partículas maiores eluem primeiro, partículas menores eluem depois;
- A matriz é formada por partículas esféricas, que contém poros, dentro dos quais o tampão e as macromoléculas podem difundir
- Partículas muito grandes não conseguem entrar nos poros, e eluem no volume excluído ( $V_e$ )



Cytiva, Handbook

# Cromatografia de exclusão por tamanho

- Proteínas que são muito grandes não entram nos poros do gel, e eluem no volume excluído ( $V_e$ )
- Proteínas ou partículas muito pequenas não são separadas, eluem no volume final





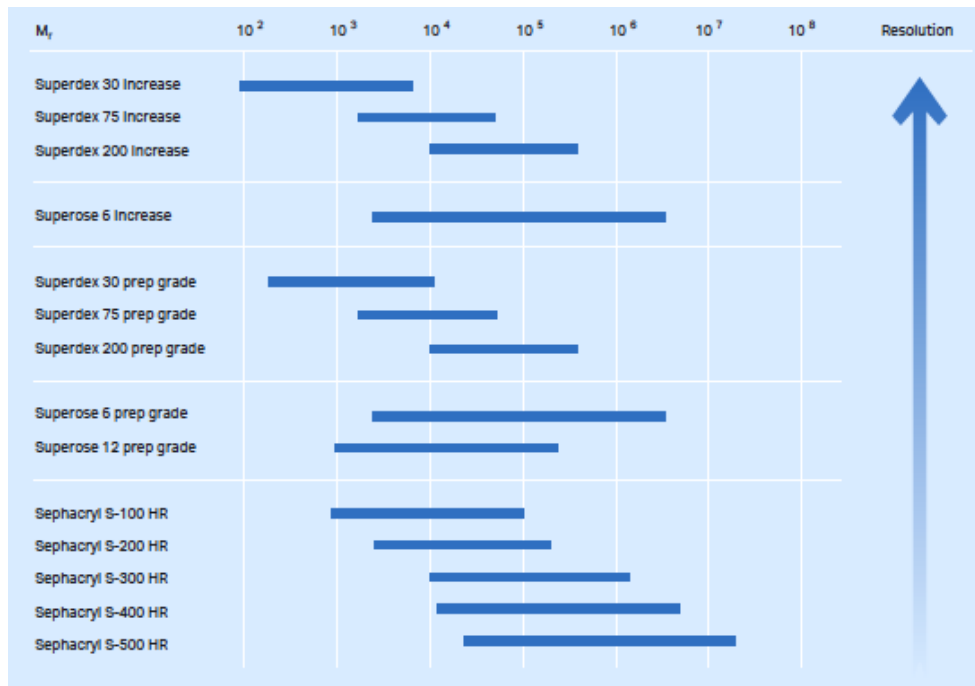
# Cromatografia de exclusão por tamanho

- Exemplos de resinas (Cytiva)

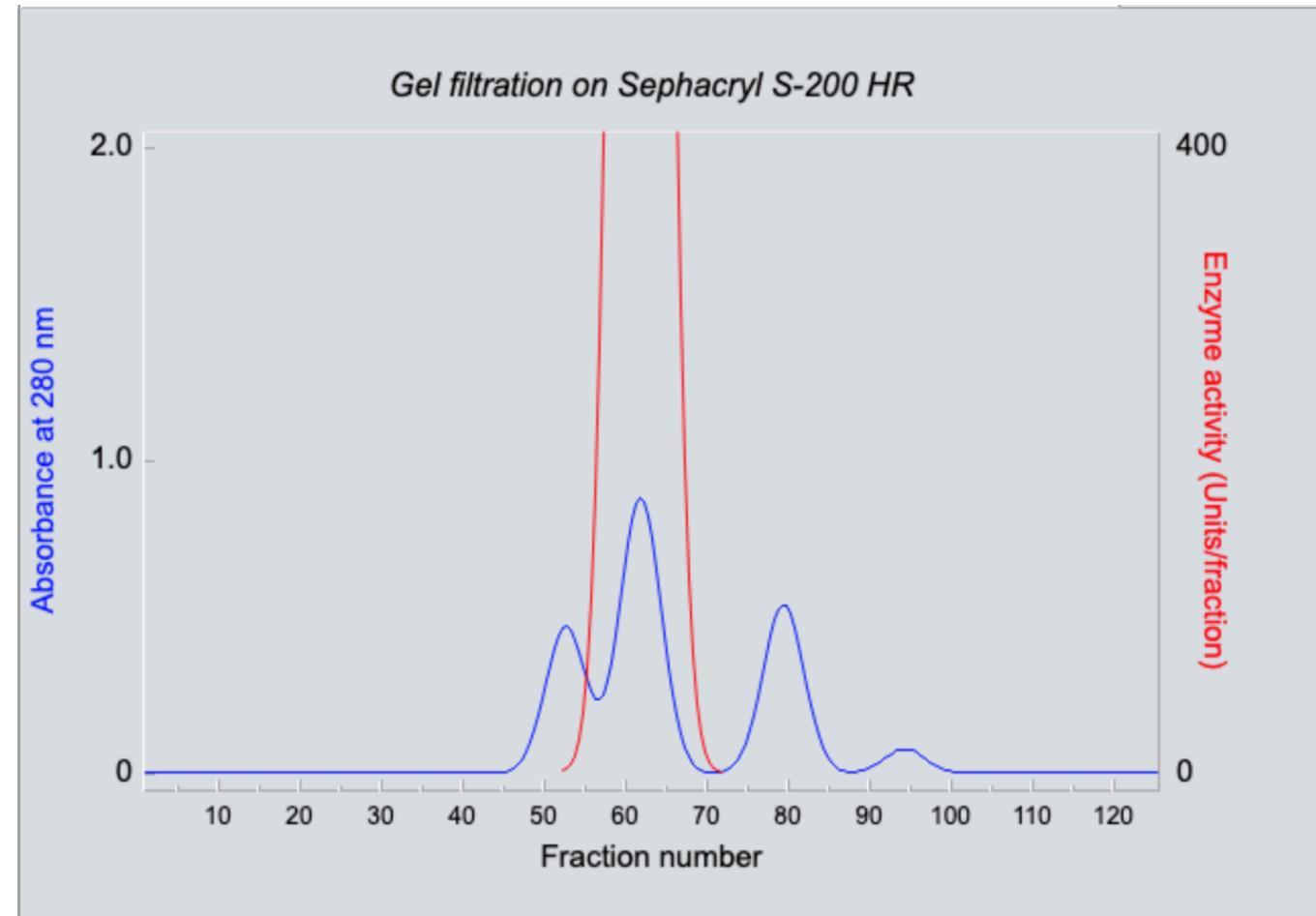
*Superdex 200, Superdex 75*

*Superose 6, Superose 12*

*Sephacryl 200, Sephacryl 300*



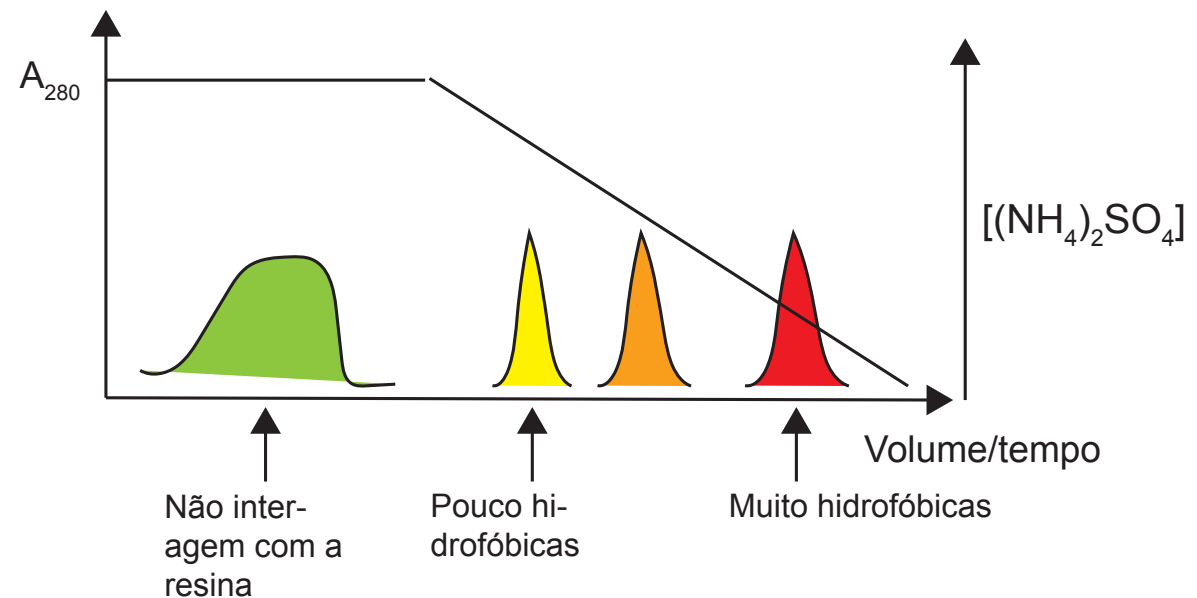
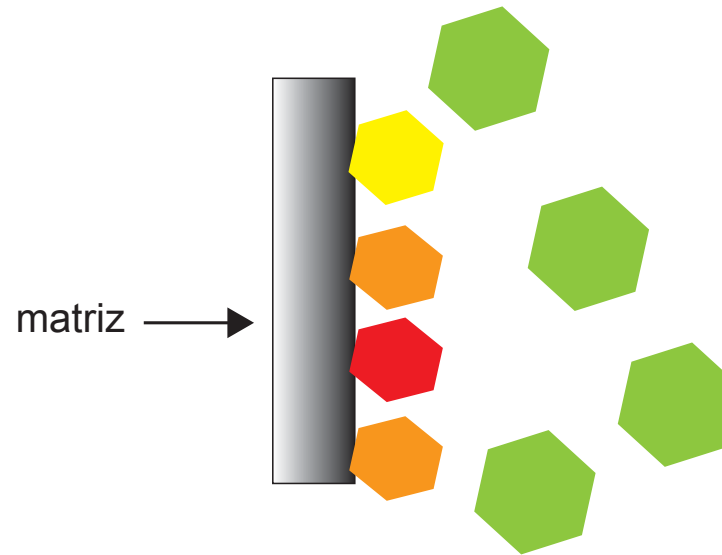
Cytiva Handbook



# Cromatografia de hidrofobicidade

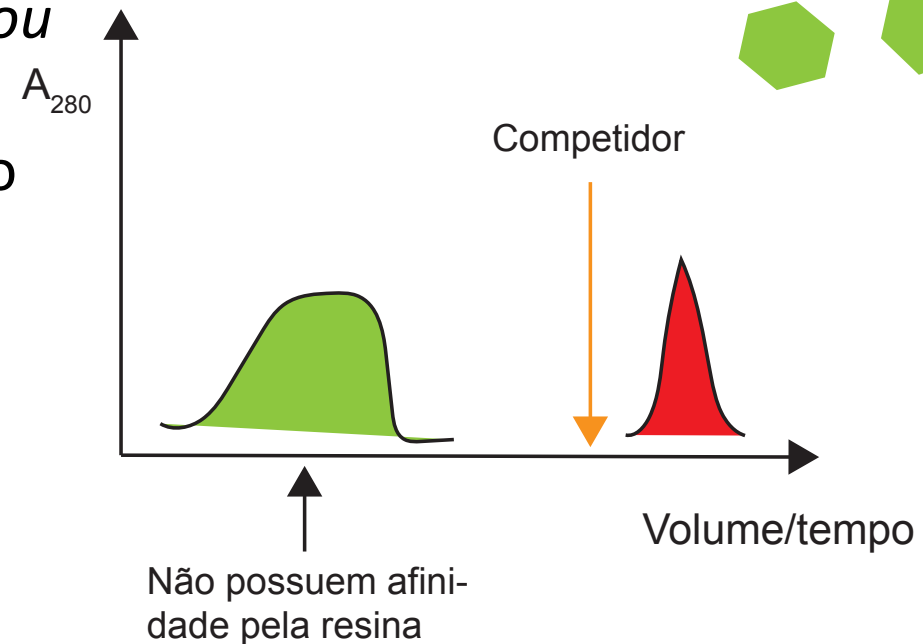
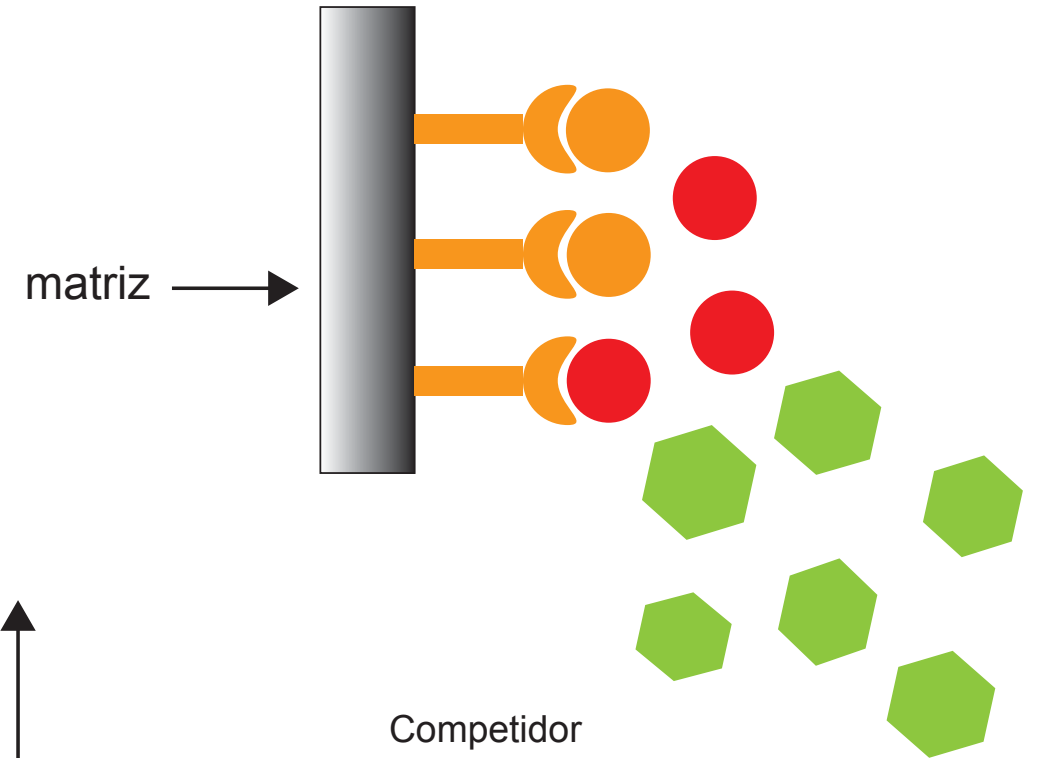
- Interação hidrofóbica com a resina
- Adsorção de moléculas hidrofóbicas é maior em alta força iônica
- As proteínas hidrofóbicas são eluídas em um gradiente decrescente de sal
- Grupos funcionais:

- Fenil
- Butil
- Octil



# Cromatografia de afinidade

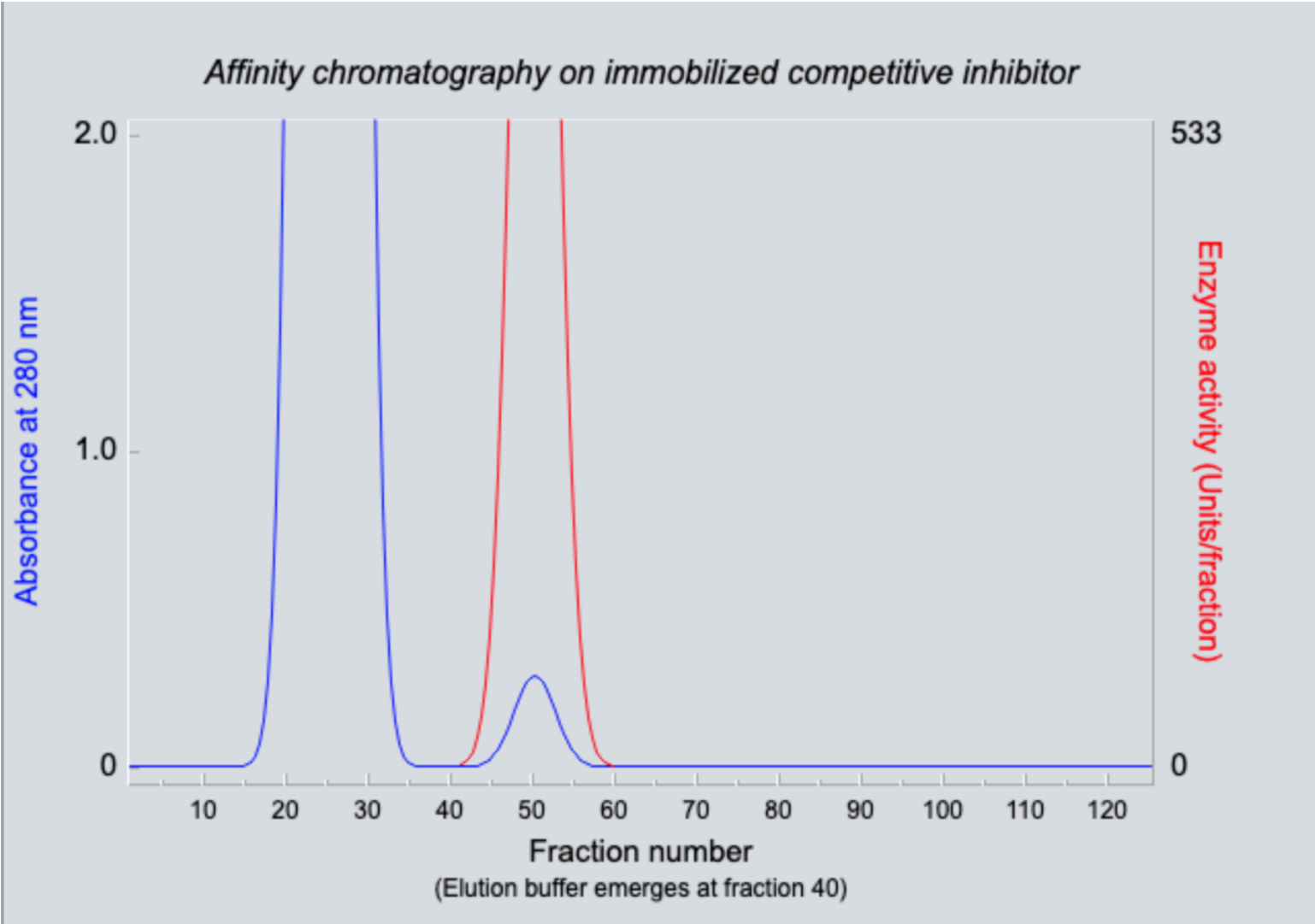
- Proteínas podem ser modificadas para conter diferentes tipos de *tags*
- Extremamente efetivo como primeira etapa de purificação
- *Tags* podem ser colocadas no N-terminal e/ou no C-terminal da proteína de interesse
- Eluição pela adição de um tampão contendo uma substância competidora



# Cromatografia de afinidade

| tag            | Tamanho do tag     | Ligante  | Eluente  |
|----------------|--------------------|--|----------|
| Poli-histidina | 6 - 10 histidinas  | Ni <sup>2+</sup> ou Co <sup>2+</sup><br>imobilizados | Imidazol |
| Myc-tag        | EQKLISEEDL (10 aa) | Anticorpo anti-myc<br>imobilizado                    | Baixo pH |
| Strep-tag      | WRHPQFGG (8 aa)    | Streptavidina<br>imobilizada                         | Biotina  |
| MBP-tag        | 398 aa             | Resina de amilose                                    | Maltose  |

# Cromatografia de afinidade



# Overview

## Cromatografia líquida

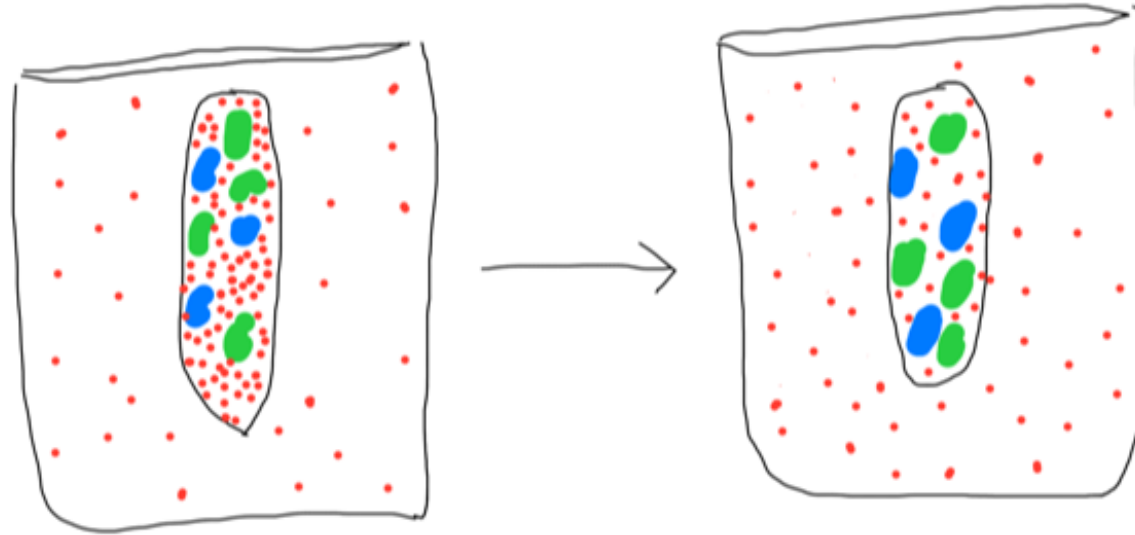
- Cromatografia de troca-iônica: separação de acordo com a carga líquida em um dado pH (primeira etapa)
- Cromatografia de afinidade: separação pela afinidade por um grupo imobilizado na resina (ex. resina de  $\text{Ni}^{2+}$ , resina de streptavidina) (primeira etapa)
- Cromatografia de exclusão por tamanho (polimento)
- Cromatografia de hidrofobicidade: separação pela afinidade por uma resina hidrofóbica (polimento)

- Uma mistura complexa de proteínas pode ser fracionada usando uma solução saturada de sulfato de amônio



- Caso excesso de sal atrapalhe as etapas subsequentes, a amostra pode ser dialisada para remover o sal

# Separação por tamanho: diálise



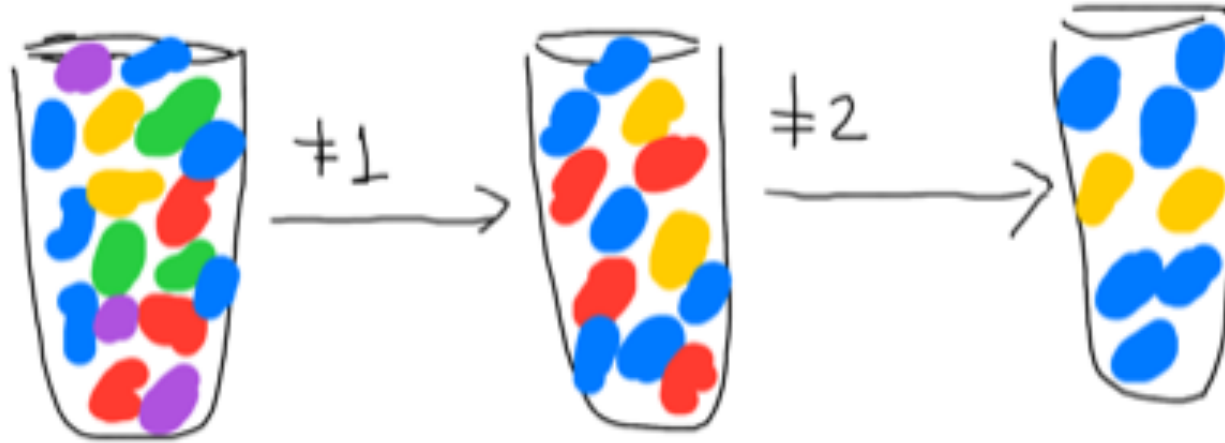
- A amostra deve ser acondicionada em uma membrana com poros que permitam passar moléculas de soluto com tamanho  $< 10$  kDa (outros limites existem)
- Moléculas menores que este limite (p. ex. sais e proteínas menores) atravessam a membrana livremente
- Processo de difusão simples



# Como podemos detectar a enzima de interesse nas várias frações?

- Medir a atividade específica da enzima nas várias frações
- Medir a Abs @ 280 nm para detectar a presença de aminoácidos aromáticos (Trp e Tyr)
- Medir a quantidade total de proteínas com base em ensaio colorimétrico (exemplo: Bradford)

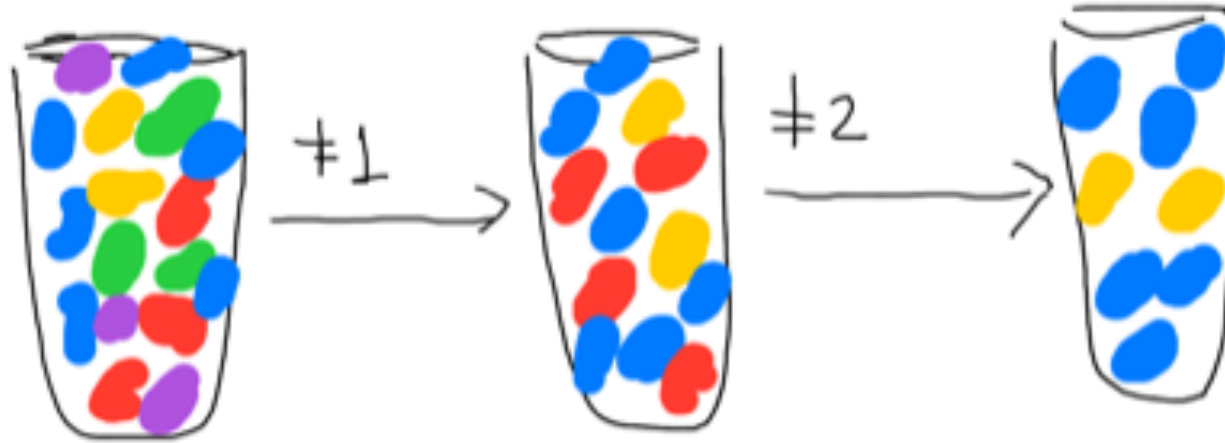
# Cálculos de recuperação e enriquecimento



$$\text{Atividade específica} = \frac{\text{Atividade enzimática } (\Delta n / \Delta t)}{\text{Massa de proteína}} = \frac{\text{mU/ml}}{\text{mg/ml}}$$

U =  $\mu\text{mol}$  de produto formado por minuto

# Cálculos de recuperação e enriquecimento



Ativ. Específica #2 > Ativ. Específica #1 > Ativ. Específica lisado ??

$$\text{Enriquecimento} = \frac{\text{Atividade espec. \#2}}{\text{Atividade espec. Lisado}}$$

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Atividade total (\#2)}}{\text{Atividade total (Lisado)}}$$

# Houve enriquecimento da amostra após a cromatografia de troca iônica?

|                                      | <b>Conc. prot<br/>(mg/ml)</b> | <b>Conc. ativ.<br/>(mU/ml)</b> | <b>Ativ. espec.<br/>(mU/mg)</b> | <b>Enriquecimento</b> | <b>Unidades<br/>(mU)</b> | <b>Recuperação(%)</b> |
|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| Precipitação<br>sulfato de<br>amônio |                               |                                |                                 |                       |                          |                       |
| Troca iônica                         |                               |                                |                                 |                       |                          |                       |

# Resumo

- Métodos de purificação dependem das características físico-químicas das enzimas, e da capacidade de interagir com ligantes
- O enriquecimento deve aumentar em cada etapa
- Quanto maior o número de etapas de purificação, maior o enriquecimento mas menor será a recuperação
- Bibliografia: livros de bioquímica (Lehninger, Voet), e *handbooks* da Cytiva
- Simulador de purificação de proteínas: [http://www.agbooth.com/pp\\_web/](http://www.agbooth.com/pp_web/)