



Memoria del XLVIII Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

## Purificación de proteínas.

### Protein purification.

Ramírez-Carreto, Santos<sup>1</sup>; Miranda-Zaragoza, Beatriz<sup>1,2</sup> y Rodríguez-Almazán, Claudia\*<sup>1,2</sup>.

1. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM.
2. Departamento de Micro y Nanotecnologías, Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM

\*Correspondencia. Instituto de Biotecnología, UNAM Av. Universidad # 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.  
CP. 62210 Tel. +52 (55) 56 22 86 02, [claudiar@comunidad.unam.mx](mailto:claudiar@comunidad.unam.mx)

#### Resumen

El desarrollo e innovación de técnicas que permitan un estudio cada vez más detallado de las proteínas, diverge en dos direcciones, hacia el conocimiento básico para conocer su papel en diferentes procesos celulares, y en otro sentido sus aplicaciones en las áreas de la biomedicina, biotecnología y nanotecnología. Las técnicas de purificación de proteínas juegan un papel fundamental en estas investigaciones, tomando como base el conocimiento de las propiedades de estas biomoléculas para determinar el protocolo de purificación. Un protocolo para purificar una proteína se inicia seleccionando la muestra biológica, el método y la condición para lisar las células con la finalidad de exponer a las proteínas, inevitablemente obteniendo una mezcla de estas junto con todos los componentes de la célula, biomoléculas, metabolitos y fragmentos de estructuras celulares. A partir de este momento, es imperante mantener a la proteína de interés en condiciones óptimas que le permitan preservar su función y estructura. La gama de métodos para la purificación de proteínas la podemos enlistar con base a estas propiedades; los métodos más comunes están basados en: purificación por peso molecular (cromatografía de filtración en gel), por carga (cromatografía de intercambio iónico), por hidrofobicidad (precipitación por sales o solventes, cromatografía de interacción hidrofóbica o fase reversa), por afinidad a un ligando (cromatografía de afinidad). La validación de cada técnica en un protocolo de purificación se basa en el uso de algunas

#### Abstract

The development and innovation of techniques that allow an increasingly detailed study of proteins diverge in two directions, towards the basic knowledge to know their role in different cellular processes. In another sense, its application in the areas of biomedicine, bio- and nanotechnology. Protein purification techniques play a fundamental role in these areas, the basis being the prior knowledge of these biomolecules to determine the purification protocol. A protocol to purify a protein starts from choosing the biological sample, the method and its condition to lyse the cells to expose the proteins, and inevitably together with all the components of the cell, biomolecules, metabolites and fragments of cellular structures. From this moment on, it is imperative to keep the protein of interest in optimal conditions to preserve its function and structure. The methods for protein purification can be listed based on protein properties: by molecular weight (gel filtration chromatography), by charge (ion-exchange chromatography) by hydrophobicity (precipitation by salts or solvents, hydrophobic interaction chromatography or reverse-phase) by affinity to a ligand (chromatography affinity). Polyacrylamide gel electrophoresis and protein quantification methods go in each purification step to analyze the protein purity and yield. Finally, the conditions to preserve the pure protein must be defined, again, considering its biochemical properties. The success of a protein purification consists of prior knowledge of the

de las variantes de la electroforesis en gel de poliacrilamida y cuantificación de proteínas. El éxito de una purificación de proteínas consiste en la paciencia, orden, y conocimiento previo de la proteína de interés, del fundamento de cada técnica, análisis detallado de cada paso, y sobre todo persistencia.

*Palabras claves:* proteínas, cromatografía, electroforesis, extracto.

protein of interest, the foundation of technique, detailed analysis of each step, principally, persistence and patience.

*Keywords:* proteins, chromatography, electrophoresis, extract.

## Introducción

El auge de la aplicación de moléculas polipeptídicas (péptidos y proteínas) en diferentes áreas de la ciencia, ha marcado el rumbo de la innovación de técnicas para la purificación de estas biomoléculas. El conjunto de técnicas para purificar moléculas polipeptídicas se ha convertido en un campo de estudio amplio. Contar con una proteína pura permite, de manera directa y específica, la caracterización de su función, estructura, estabilidad, la interacción con otras biomoléculas, con la finalidad de comprender los procesos moleculares y celulares. Asimismo, se explora la posibilidad de su aplicación en la biotecnología, biomedicina, nanobiotecnología, entre otras áreas.

Las biomoléculas polipeptídicas, péptidos y proteínas, son cadenas formadas por aminoácidos, los cuales contienen dos grupos funcionales. En uno de los extremos se localiza un grupo amino ( $^+\text{NH}_2$ ) y en el otro extremo un grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), además de una cadena lateral que determina la característica físico- química de cada uno de los aminoácidos existentes en la naturaleza. La unión entre los aminoácidos es mediante un enlace covalente llamado enlace peptídico, en el que interacciona el grupo amino de un aminoácido con el grupo carboxilo de otro aminoácido [1, 2].

La cadena formada por aminoácidos requiere plegarse, es decir adquirir su conformación nativa, con la finalidad de generar una estructura y función determinada [2]. Las propiedades particulares de cada polipéptido son determinantes en el manejo de las diversas técnicas para su caracterización bioquímica.

Las técnicas para purificar una proteína se determinan a partir de una o varias de estas propiedades, como son la carga, el peso molecular, la hidrofobicidad, la especificidad por algún ligando, principalmente [3]. Por lo que es fundamental conocer a profundidad, todas o la mayor parte de estas propiedades para precisar los pasos a seguir en un

protocolo para purificación, así como las condiciones específicas en cada uno de ellos.

En este trabajo se describirán, de manera general, las etapas a considerar para establecer un protocolo de purificación de proteínas. La manera como se presentan las técnicas es con base a la secuencia que se sigue para una purificación convencional, llegando a un punto en que cada protocolo puede divergir dependiendo de las características bioquímicas de la biomolécula de interés, así como el objetivo de cada investigación.

## Conocimiento de las características bioquímicas de las moléculas polipeptídicas

Las proteínas son biomoléculas abundantes en los sistemas vivos, realizan una gran variedad de funciones esenciales, por lo que se les considera como protagonistas en gran número de procesos bioquímicos para el mantenimiento y función de cada organismo. La purificación de proteínas permite su estudio de manera individual, lo que ha permitido conocer su función biológica, además de que brinda la oportunidad de su enfoque en aplicaciones tecnológicas.

El primer paso en el estudio de una proteína se basa en la investigación exhaustiva de las propiedades bioquímica y físico- químicas, secuencia de aminoácidos, carga, peso molecular, hidrofobicidad, función, incluso qué moléculas y parámetros físico- químicos pueden modificar estas propiedades y el mecanismo por el cual llevan a cabo esta alteración de la molécula.

La función de la proteína de interés es determinante durante el proceso de purificación. Considerando que la muestra se dividirá en fracciones a lo largo de todo el proceso de purificación, la identificación de la proteína de interés será mediante su función, o alguna característica que se pueda monitorear de manera sencilla, rápida, reproducible y económica. El ensayo que se determine para llevar a

cabo esto, deberá estandarizarse antes de iniciar con la obtención del extracto.

Partiendo de esta información se inicia con el planteamiento de las técnicas para purificar a la proteína, e incluso determinar las condiciones en que se trabajará cada técnica. Sin duda, esta información es fundamental como primer paso en la purificación de proteínas, una decisión errónea por la falta de información de la proteína de interés puede ser fatídico, debido a la posibilidad de perder la muestra biológica, tiempo y recursos materiales.

### Preparación de un extracto

La purificación de una proteína parte de las características del sistema biológico donde se sintetice (produzca), sea una célula eucariota o procarionta, así como la localización de la proteína dentro de la célula, citoplasma, membrana celular, organelo, periplasma (espacio existente entre la pared y membrana plasmática de las bacterias Gram negativas) [4, 5].

La preparación de un extracto se inicia al determinar el amortiguador o solución química con sales específicas y pH definido, los cuales se establecen a partir de las propiedades bioquímicas, función de la proteína de interés, y la meta de la investigación. El siguiente paso es definir el método para lisar (romper) a las células que contienen a la proteína de interés. De manera general se consideran dos métodos para este paso, métodos mecánicos y químicos [6, 7].

Entre los métodos mecánicos se enlistan la homogenización, sonicación, ciclos de congelado-descongelado y uso de presiones altas [7, 8]. En los métodos químicos siempre se usará un compuesto químico para producir la lisis mediante un choque osmótico, detergentes, disolventes orgánicos, entre otros.

El rompimiento de las membranas celulares permite la interacción de la proteína de interés con proteínas de la misma célula que tienen la capacidad de romper los enlaces peptídicos (enzimas proteasas). Por lo que es fundamental añadir en el amortiguador inhibidores de proteasas, para mantener la integridad de las proteínas [6, 8].

Lo que se obtiene en este paso es una solución con una mezcla de especies químicas (biomoléculas, metabolitos, etc.), fragmentos de membranas celulares, y en algunos casos de pared celular, como es el caso de las plantas. El siguiente paso es clarificar el extracto, es decir, si nuestra proteína es soluble en

el amortiguador, los restos celulares se separan mediante la centrifugación. La centrifugación consiste en someter la muestra a una fuerza centrípeta a una velocidad determinada, con lo que se logrará que las partículas más pesadas se concentren al fondo del contenedor de la mezcla. Finalmente, la muestra se decanta para separar la parte soluble (donde se encuentra la proteína de interés) de los fragmentos celulares (Figura 1). La Tabla 1 describe el fundamento de algunos métodos para la preparación de un extracto, así como el tipo de célula en el que se pueden aplicar y algunos aspectos que deben considerarse [4, 6–8].

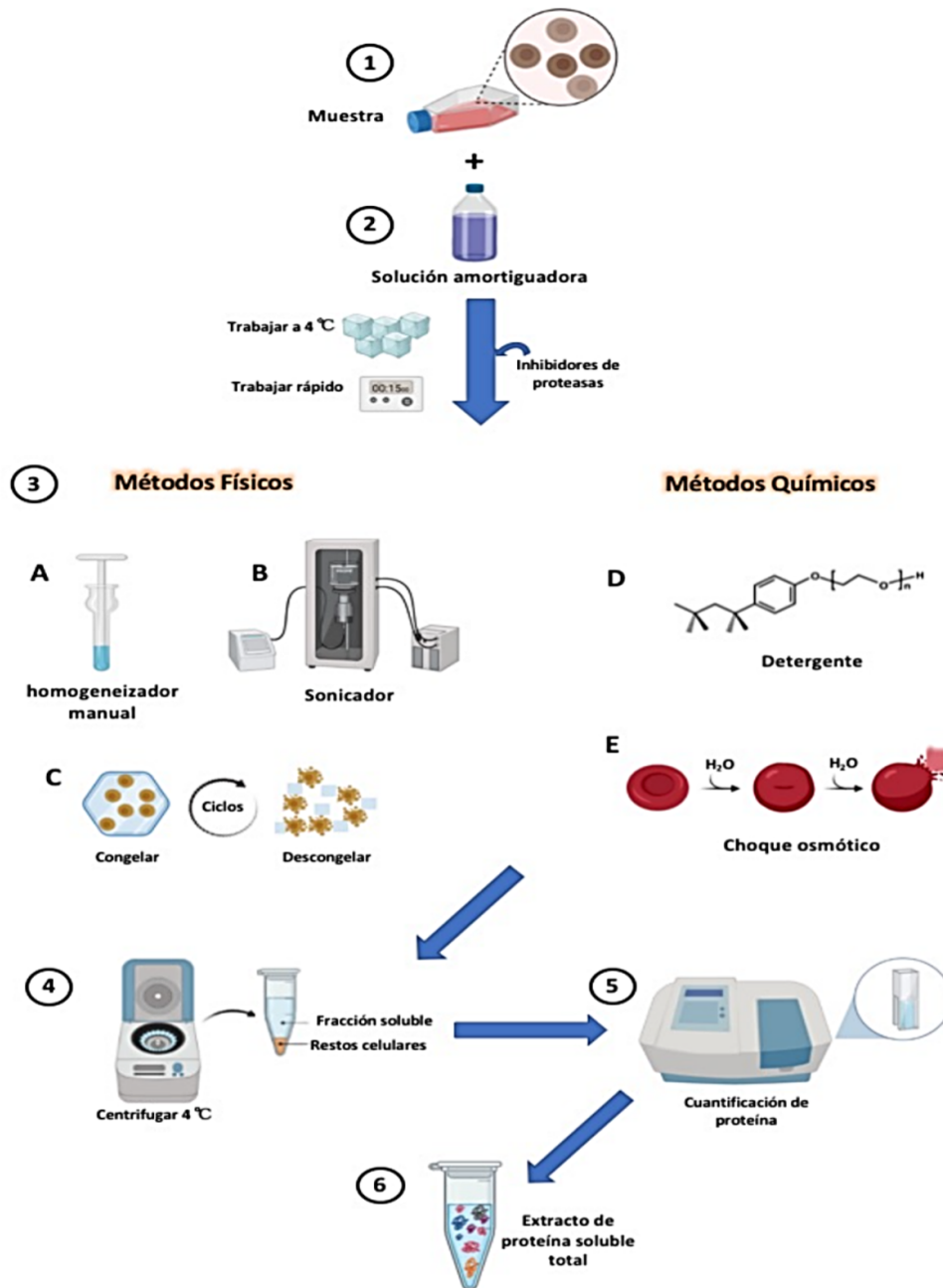
Durante el proceso de purificación de una proteína se deben considerar dos aspectos importantes:

1. Estandarizar un protocolo que abarque el menor tiempo posible, por lo que se deben considerar el menor número de pasos que permitan obtener la mayor cantidad de proteína pura, y sobre todo que mantenga su función y estabilidad.
2. La muestra debe mantenerse siempre a cuatro grados Celsius. Esto es con la finalidad de reducir la actividad de las proteasas y procesos químicos que desencadenen la ruptura del enlace peptídico, el cual puede ser resultado no sólo de la acción de las proteasas.

### Cuantificación de proteínas

Una manera de evaluar el protocolo de purificación es conociendo la cantidad de proteína total de la muestra, desde que se clarifica el extracto hasta que se obtiene pura (rendimiento expresado en porcentaje). Los métodos para cuantificar a la proteína se clasifican en colorimétricos y no colorimétricos. Ambos métodos se fundamentan en la ley de Beer y Lambert, la cual se basa en la transmitancia y absorbancia de la incidencia de un haz de luz a través de una muestra [9].

Los métodos no colorimétricos se basan en la detección de la proteína al incidir un haz de luz ultravioleta con una longitud de onda de 210 o 280 nm. Esto se consigue mediante un equipo que se llama espectrofotómetro, observamos la detección mediante una gráfica (espectro). Con la longitud de onda de 210 nm se detecta el enlace peptídico, mientras que a una longitud de onda de 280 nm se detecta el aminoácido triptófano presente en la mayor parte de las proteínas descritas hasta ahora. Este método se recomienda para proteínas puras, ya que se considera el coeficiente de extinción molar (es un parámetro específico para cada proteína) para obtener la cantidad de proteína [10–13].



**Figura 1. Obtención de un extracto proteico.** El primer paso (1) consiste en elegir la muestra biológica de partida, esta puede ser células en suspensión (cultivo) o tejido total. Después (2) se requiere seleccionar la solución amortiguadora adecuada para realizar la ruptura del tejido y la extracción de la proteína total en su forma soluble sin afectar las características estructurales y funcionales de la proteína de interés. En este paso se recomienda trabajar a 4°C, de forma rápida y en presencia de inhibidores de proteasas para proteger a las proteínas de la degradación. Determinar el método que se empleará para lisar la membrana celular (3). Estos métodos pueden ser físicos como (A) la homogenización manual o mecanizada, (B) la sonicación o ciclos de congelación y descongelación (C), o bien ser químicos como el uso de detergentes como el Tritón X-100 (D) o la lisis por choque osmótico, por ejemplo, los eritrocitos al diluir su medio con agua y hacer más hipotónica la solución en la que se encuentran hasta generar que se hinchen y revienten (E). Se puede emplear más de un paso de extracción y la combinación de métodos químicos y físicos. El aclaramiento (4) consiste en separar fragmentos celulares de las proteínas solubles mediante centrifugación. Finalmente se cuantifica la cantidad de proteína en el extracto usando un espectrofotómetro (5). El extracto es la muestra (6) de la que se parte para aplicar una o varias técnicas de purificación de proteínas. Figura realizada en BioRender.com

Tabla 1. Métodos físicos y químicos para la obtención del extracto proteico.

Método	Fundamento	Tipo de muestra	Comentarios
<b>Métodos Físicos</b>			
<b>Sonicación</b>	En la sonicación se aplica energía sonora (ultrasonido) mediante una sonda vibratoria sumergida en el líquido donde se encuentra la suspensión celular. Este tipo de energía mecánica agita las partículas en el líquido generando la ruptura de las membranas celulares y la liberación del contenido celular al medio.	Células eucariontes y procariontes en suspensión	Es ideal para obtener proteínas citoplasmáticas. Es importante mantener la muestra en hielo para evitar que el calor generado durante el procedimiento desnaturalice las proteínas de interés.
<b>Homogenización</b>	La homogenización puede ser realizada empleando distintos instrumentos como una licuadora o un politrón que emplean navajas, perlas de vidrio y un agitador, prensa francesa, homogeneizador de vidrio tipo Potter-Elvehjem. En todos los casos se busca triturar el tejido y/o someterlo a presiones altas con la finalidad de romper las células mecánicamente.	Tejidos de plantas, hongos o animales	El proceso es muy sensible y se debe tener cuidado para evitar dañar los componentes sub-celulares que se está tratando de aislar.
<b>Ciclos de congelado y descongelado</b>	Involucra el congelamiento de las células en un baño de hielo seco/etanol o en un congelador siguiendo el descongelamiento del material a temperatura ambiente o a 37°C. La formación de los cristales de hielo generan la ruptura de la membrana celular haciéndola más permeable y potenciando la liberación de su contenido.	Extractos celulares acuosos	Se requieren de múltiple ciclos para que la lisis se lleve a cabo de manera eficiente.
<b>Métodos Químicos</b>			
<b>Choque osmótico</b>	En este método las células son expuestas a una solución hipotónica lo que genera que las células se hinchen y se rompan. Se puede aplicar una agitación mecánica suave para favorecer la lisis.	Eritrocitos	Es uno de los métodos más suaves para generar la lisis celular junto con los ciclos de congelado y descongelado.
<b>Detergentes</b>	Los detergentes rompen la barrera lipídica de las membranas solubilizando las proteínas e interrumpiendo la interacción lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína. Los detergentes, al igual que los lípidos, se asocian entre ellos y se unen a superficies hidrofóbicas. Se componen de una cabeza polar hidrofílica y una cola no polar hidrofóbica.	Células animales y bacterianas en suspensión	Los detergentes no iónicos y bipolares, como los de la serie Tritón-X, son más suaves y menos desnaturalizantes, por lo cual, son comúnmente empleados para estos fines.
<b>Enzimáticos</b>	Algunas células poseen, a parte de la membrana plasmática, una pared celular rígida que confiere a las células forma, protección y rigidez. Estas paredes pueden ser digeridas con enzimas específicas.	Levaduras, plantas y bacterias en suspensión	Para plantas pueden ser utilizada la celulasa, para hongos quitinasas y en bacterias lisozima.

## Referencias [3,6 y 7]

Los métodos colorimétricos se basan en el uso de un colorante, el cual interacciona químicamente y de manera específica e irreversible con algunos aminoácidos presentes en las proteínas. La intensidad del color determina la cantidad de proteína, es decir, si la mezcla de la muestra tiene un color claro denota una cantidad pequeña de proteínas, mientras que un color intenso refiere la presencia de una alta concentración de proteína en la muestra.

Los métodos colorimétricos más comunes son los ensayos de Bradford, Lowry y ácido bicinonínico (BCA) [10–12]. Cada método se convierte en un análisis cuantitativo al medir la intensidad de color mediante la absorbancia de luz visible a una longitud de onda determinada. Siempre en este tipo de técnicas

se debe construir una gráfica conocida como “Curva de calibración”, en la que se grafican concentraciones determinadas de albúmina sérica de bovino (BSA) y su respectiva absorbancia. A partir de un volumen definido de la muestra problema se extrapolarán sus valores de absorbancia para determinar su concentración de proteína, otra alternativa es mediante la ecuación de la gráfica (recta). Los métodos colorimétricos se ensayan con un volumen determinado de la muestra, de tal manera que no se expone el extracto al colorante. Los métodos colorimétricos se recomiendan para muestras con una proteína pura y con muestras de varias proteínas.

Al elegir el método para cuantificar la cantidad de proteína, se debe considerar la sensibilidad, reproducibilidad y costo del método. La

compatibilidad de cada método con la muestra depende de las condiciones (amortiguador, pH y pureza) en las que se encuentra la proteína de interés, composición de aminoácidos y otros componentes de la muestra que puedan interferir con cada método.

### Electroforesis en gel

Para tener una idea de la complejidad del extracto, es decir, conocer aproximadamente la cantidad de proteínas que están presentes en la muestra, así como el tipo de proteínas con base en su peso molecular y carga, las proteínas que conforman el extracto se pueden analizar mediante la técnica de electroforesis en gel. Esta técnica se basa en el movimiento de las proteínas en respuesta a un campo eléctrico a través de una matriz porosa (tamiz) o gel de poliacrilamida, dando como resultado la separación de las proteínas [14, 15]. La electroforesis en gel de poliacrilamida es una técnica de separación ampliamente empleada debido a que es fácil de realizar, es sencilla, con alto poder de resolución, y bajo costo.

Existen variantes de esta técnica, elegir una de ellas dependerá de la característica bioquímica de la proteína con la que se basará su análisis. Esto es, si se analiza la muestra por el peso molecular de las proteínas o por carga, o ambas. El análisis de las proteínas con base en su peso molecular se realiza mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

En la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, las proteínas se ponen en contacto con un detergente catiónico que despliega estas cadenas y les confiere carga negativa a todas las proteínas de la muestra, por lo que las proteínas migrarán hacia la misma dirección, hacia el polo positivo. El gel funciona como un tamiz, con poros microscópicos de tamaño definido, a través de los cuales las proteínas de mayor tamaño permanecerán en la parte superior del gel, mientras que las de menor tamaño migrarán en la parte inferior de la matriz, y las de tamaño intermedio se distribuirán en la mayor parte del gel. De esta manera, la separación de las proteínas dependerá de su tamaño.

En el caso de la electroforesis en condiciones nativas, es decir, en ausencia de agentes químicos que alteren la función y plegamiento de la proteína, se mantendrá su conformación y función. La migración de las moléculas a través de la matriz se rige por la carga natural de la proteína.

El isoelectroenfoco es otra técnica de electroforesis en gel en la cual las proteínas se distribuyen en un gel de poliacrilamida conteniendo

un gradiente de pH, cada proteína migra hacia la región con carga eléctrica opuesta [15].

La detección de proteínas en la matriz de poliacrilamida se logra mediante colorantes que se unen de manera específica a las proteínas, entre los que se encuentran son el azul de Coomassie G250, la plata y reactivos fluorescentes como Deep Purple™ y SYPRO Ruby. Las proteínas se observan en el gel como líneas (bandas) de diferente intensidad, determinada por la cantidad de proteína total en cada banda, teniendo en cuenta que cuando la proteína aún no está pura, en cada banda podemos encontrar desde una hasta decenas de diferentes proteínas [10, 14, 15].

Cuando se combina el análisis de la muestra considerando tanto el peso molecular como la carga, se aplica la electroforesis en dos dimensiones (2D), la cual consiste en la separación de las proteínas de una muestra mediante su peso molecular, y posteriormente esas proteínas inmersas en el gel se incorporan en una matriz de poliacrilamida con gradiente de pH, entonces la misma muestra se analiza considerando dos propiedades de las proteínas, peso molecular y carga [15, 16].

La electroforesis en gel se puede acoplar a otra técnica conocida como Western blot, en la cual un gel de poliacrilamida que contiene proteínas se pone en contacto con una membrana (difluoruro de polivinilideno o nitrocelulosa). Las proteínas del gel se transfieren del gel a la membrana a través de un campo eléctrico. A diferencia de los geles de poliacrilamida, para visualizar la presencia de proteínas en la membrana, no se usan colorantes, sino anticuerpos [17, 18].

Mediante electroforesis de gel, en específico en condiciones desnaturalizantes, se monitorea cada paso durante el proceso de purificación de proteínas, en el paso final de purificación, si la proteína está pura, sólo se detectará una banda única. La cual se recomienda analizar esa misma muestra mediante una electroforesis en gel que se base ahora en la carga de la proteína (isoelectroenfoco o gel nativo), para tener la certeza de la pureza de la proteína.

### Estandarización del protocolo de purificación

A partir de este paso, durante la estandarización del protocolo de purificación de proteínas, se elegirá una técnica a partir de una de las características bioquímicas de la molécula de interés.

### *Fraccionamiento del extracto por precipitación*

La solubilidad de una proteína depende de los residuos de aminoácidos ionizados, regiones polares e hidrofóbicas que están en contacto con el solvente (agua), generando una capa de moléculas de agua (capa de solvatación). Cuando la interacción de la proteína con la capa de solvatación se interrumpe por un aumento en la entropía del sistema, entonces la proteína se precipita, esto se logra con solventes, sales o cambios en el pH. Altas concentraciones de sales se usan de manera común para precipitar proteínas, los iones compiten con las proteínas por las moléculas de agua en la capa de solvatación, hasta que la proteína pierde la interacción con la capa de solvatación. A este fenómeno se le llama en inglés “*saltig out*”, cuando la proteína es soluble en presencia de bajas concentraciones de sales, se denota “*salting in*” [3, 19].

La precipitación de proteínas con alta concentración de sal (Serie de Hofmeister) es una alternativa recurrente en la purificación de proteínas cuando se trata de extractos muy complejos (gran número de proteínas), o cuando se manejan volúmenes grandes de la muestra, incluso se convierte en una alternativa para clarificar extractos. Una gran ventaja de precipitar proteínas con altas concentraciones de sales, en comparación con solventes o cambios del pH, se mantiene la estructura y función de las proteínas.

Las proteínas precipitadas se recuperan por centrifugación (precipitado y sobrenadante), se solubilizan y dializan con un amortiguador determinado. Las proteínas que no se precipitaron (sobrenadante) se recuperan adicionando una concentración mayor de sal. Para conseguir una separación adecuada y reproducible la incorporación del agente precipitante debe ser gradualmente. La temperatura, pH y la carga de las proteínas son factores determinantes en la precipitación. En el caso de la precipitación con sales, existen tablas o servidores en internet que permiten determinar la cantidad de sales que se requieren para precipitar proteínas [20, 21]. La validación de este método es por geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes, así como la identificación de la proteína de interés (por función, peso molecular, inmunodetección, etc.)

### *Cromatografía*

Es una técnica que se basa en la separación de moléculas a través de su distribución entre dos fases, estacionaria y móvil. Las propiedades de cada molécula determinarán su tiempo de permanencia (se retenga) en la fase estacionaria (tiempo de retención). La fase estacionaria (polímero) es empaquetada dentro

de un cilindro, y en la parte superior se coloca la muestra. Las moléculas se desplazan a través de la fase estacionaria mediante el bombeo de la fase móvil (amortiguador) con un flujo a velocidad controlada. Para detectar las proteínas que salen de la columna, la fase móvil pasará por un detector UV (280 nm), generando una señal hacia un software, que finalmente se representará como una gráfica (cromatograma), donde los picos o montañas representan la presencia de proteínas, y los valles la ausencia de éstas.

En una muestra con un gran número de proteínas, su cromatograma se representará con varios picos; si el pico de la proteína de interés se mezcla con otros picos, entonces se deben considerar las diferentes alternativas que tiene cada técnica para mejorar la resolución (cuando dos picos están bien definidos, dos montañas y un valle) (Figura 2). Al final de cada proceso de cromatografía, la fase estacionaria debe tener un proceso de mantenimiento (limpieza, regeneración si es necesaria, almacenamiento).

#### Por peso molecular

Las técnicas de separación por peso molecular se comenzaron a utilizar en la década de los sesenta del siglo XX, al tratar de separar compuestos de una planta. Investigadores de esa época descubrieron que el dextrán, como fase estacionaria, tenía propiedades para separar moléculas por tamaño (peso molecular), dando lugar a la cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel [22].

El principio de la cromatografía de exclusión molecular consiste en que una mezcla de moléculas de diferentes tamaños se hace pasar a través de la fase estacionaria, produciendo una separación con base al tamaño de las moléculas, las de menor tamaño penetran en el interior de las esferas (polímero o gel) que componen la fase estacionaria, deben pasar por toda la columna para salir o eluir de la fase estacionaria, recorriendo el volumen total de la columna ( $V_t$ ). Mientras que las moléculas de mayor tamaño al de los poros del polímero, sólo rodean a éste recorriendo únicamente el volumen vacío ( $V_o$ ), siendo las primeras en salir de la columna. Las moléculas de tamaño intermedio difunden con mayor o menor facilidad en el interior del polímero en función de su tamaño (volumen de elución,  $V_e$ ), y salen de la columna fraccionadamente en volúmenes comprendidos entre el  $V_t$  y el  $V_o$  (3, 25, 26) (Figura 2B).

Los factores que influyen en la resolución mediante cromatografía de exclusión molecular son:

- a) *Longitud de la columna.* A mayor longitud de la columna mejor separación.
- b) *Flujo.* La resolución de la separación disminuye al aumentar el flujo de la fase móvil.
- c) *Volumen de la muestra a separar.* Las mejores separaciones se obtienen con un volumen de muestra entre 2 % y 5 % del volumen total de la columna.
- d) *Empaquetamiento de la columna.* La resina debe empaquetarse de manera homogénea a lo largo de toda la columna para obtener picos bien definidos. Esta característica va de la mano con la composición del polímero de la columna.
- e) *Viscosidad de la muestra.* Debe ser muy similar a la viscosidad de la fase móvil.
- f) *Selección de la resina.* La eficiencia de la resina depende del tamaño de su partícula, una mejor resolución se obtiene con partículas pequeñas, sin embargo, esto incrementa la presión de trabajo al usar un sistema automatizado.
- g) *Interacciones inespecíficas de la muestra con la columna.* Las proteínas pueden interactuar con la muestra mediante interacciones iónicas o hidrofóbicas, lo que puede alterar la elución de las proteínas. Esto se evita aumentando la fuerza iónica de la fase móvil mediante pH o alguna sal.

La distribución de la muestra en la fase estacionaria (o partición) está relacionada con la accesibilidad de los poros de la resina y el tamaño de las proteínas. Estos dos parámetros se relacionan con el coeficiente de distribución (Kd), que se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$Kd = (V_e - V_0)/V_i = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$$

donde  $V_e$  es el volumen de elución de la muestra (volumen de la fase móvil que pasa a través de la columna, desde que se inyecta la muestra hasta el punto máximo del pico),  $V_0$  refiere al volumen muerto (volumen de la fase móvil que pasa a través de la columna desde que se inyecta la muestra, hasta que comienza a salir el primer pico),  $V_t$  es el volumen total (volumen de toda la columna),  $V_i$  volumen interno del poro (el correspondiente al volumen total que ocupa el interior de las esferas de la resina) [3, 4, 25, 26].

Para elegir una resina se debe enfocar en su capacidad de resolución con base a la curva de

calibración de la columna. En la cual se representa una relación lineal del Kd (de diversas moléculas de tamaño conocido) con el logaritmo del peso molecular (Mr) de proteínas de tamaño conocido.

La cromatografía de exclusión molecular tiene varias aplicaciones: separación de grupos de moléculas por tamaño, cambio de amortiguador, eliminación de moléculas pequeñas de la muestra (como sales o marcas radioactivas), determinación del peso molecular de una proteína.

#### Por carga

La cromatografía de intercambio iónico es la técnica que separa a las proteínas en función de su carga (Figura 2C). La carga de la cada proteína varía por su composición de aminoácidos cargados, distribución y densidad de carga de la molécula, y el ambiente químico en el que se encuentran. Los grupos ionizables de los residuos de aminoácidos modifican su carga de manera gradual como el pH del ambiente cambia, si esto lo observamos en una curva de titulación, la proteína alcanzará un pH en el cual su carga neta es igual a cero, a lo que se le conoce como punto isoeléctrico (pI), lo que significa que la proteína no interactúa con las cargas del medio y por lo tanto se precipita. Si el pH del medio en el que se encuentra la proteína está por arriba de su pI, la proteína adquiere carga negativa; de manera contraria, si el pH del medio es menor a su pI, la proteína adquiere carga positiva [1, 2].

La fase estacionaria en la cromatografía de intercambio iónico puede ser aniónica o catiónica, y se unirán moléculas de carga opuesta. La manera de separar y eluir a las proteínas de la fase estacionaria se basa en modificar la fuerza iónica de la fase móvil, por cambios graduales de pH o concentraciones de un intercambiador iónico (por lo general es una sal).

Los pasos para seguir una cromatografía de intercambio iónico son:

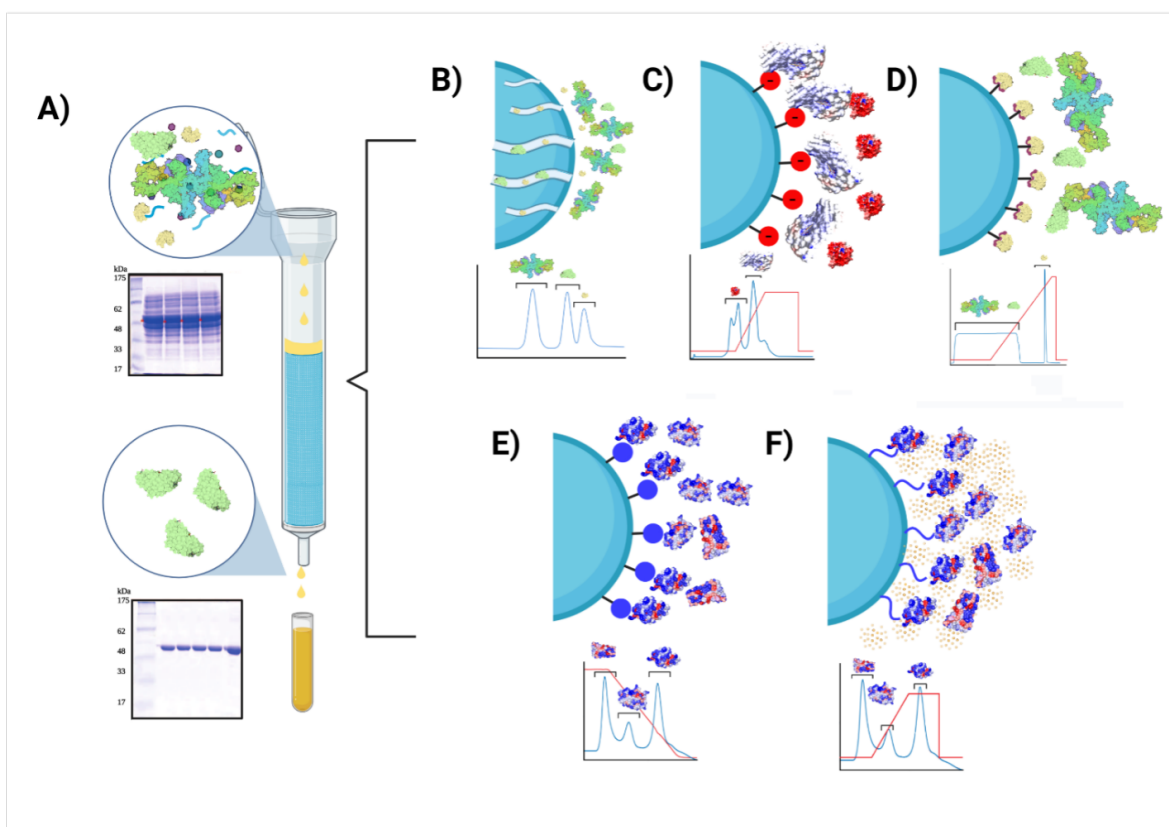
- Equilibrar la columna con un amortiguador determinado, considerando el efecto del pH del amortiguador en las cargas de la fase estacionaria y las proteínas de la fase móvil.
- Aplicación de la muestra y lavado, en este paso las moléculas que no se unen a la columna (es decir, que tienen la misma carga que la columna) saldrán de la columna pasando algunos volúmenes de la fase móvil.



- Elución, las proteínas que se unieron a la columna de manera diferencial se desplazarán mediante un gradiente de fuerza iónica, al aumentar la fuerza iónica, para eluir completamente cualquier proteína unida y también para regenerar las cargas [3, 4, 27].

En esta técnica las proteínas son adsorbidas en polímeros de poliestireno usando divinil benceno

como entrecruzador, al cual se une un grupo funcional como dietilaminoetil (DEAE), carboximetil (CM), sulfopropil (SP), amonio cuaternario (Q), entre otros. La longitud del grupo funcional se relaciona directamente con la resolución de la técnica, a mayor longitud del grupo funcional mejor es la resolución [27].



**Figura 2. Purificación de proteínas por cromatografía.** A) Esquema general de cromatografía. En la parte superior e inferior se muestra la composición de la muestra inicial y final, respectivamente, corroborada mediante una electroforesis de un gel desnaturante de poliacrilamida. En color amarillo se encuentra la muestra (fase móvil) y en azul la fase estacionaria. B) Cromatografía de exclusión molecular. C) Cromatografía de intercambio iónico. D) Cromatografía de afinidad. E) Cromatografía de interacción hidrofóbica. F) Cromatografía de fase reversa. En la parte inferior de las distintas técnicas cromatográficas se encuentra un cromatograma, en el eje de las abscisas se grafica el tiempo, volumen o número de fracción obtenida. En rojo se muestra el gradiente de elución empleado. Figura realizada en BioRender.com

### Por afinidad

La capacidad de las proteínas de interactuar de manera reversible, estable y específica con otras moléculas que funcionan como ligando (anticuerpos, proteínas, carbohidratos, metales, entre otras), determina el fundamento de la cromatografía por afinidad (Figura 2D). En esta técnica una proteína del extracto se une a un ligando inmovilizado en la columna. Al pasar algunos volúmenes de la fase móvil (lavado), las moléculas que no se unieron a la columna se disociarán y recuperará al modificar el

amortiguador (cambiando fuerza iónica, polaridad o pH, con una molécula que compita con el ligando de la columna) [3, 23, 28].

Para obtener aumentar la resolución en la cromatografía por afinidad es importante considerar que la composición de la columna consista de un polímero (dextrán, celulosa, poliacrilamida, silica, o mezcla de ellas) de gran área para favorecer la interacción con el ligando, que sea hidrofílica o neutra, para evitar la interacción no específica entre las proteínas y la fase estacionaria, con grupos

funcionales que favorezcan la unión química del ligando, que sea físicamente estable [3, 23].

En cuanto al ligando, este debe ser compatible con los reactivos que se apliquen para su unión con la fase estacionaria, al menos con un grupo funcional (amino, carboxilo, aldehído, tiol, hidroxilo). Lo recomendable es usar ligandos largos para aumentar la resolución de

la cromatografía. Las condiciones para el proceso de cromatografía no deben alterar la inmovilización del ligando ni sus propiedades de interacción con la proteína. Es fundamental almacenar la resina para cromatografía de afinidad a 4°C, con la finalidad de mantener estable la inmovilización del ligando [3, 4, 23].

**Tabla 2. Generalidades y consideraciones de las técnicas cromatográficas.**

Componentes	Propiedades	Exclusión molecular	Afinidad	Intercambio iónico	Interacción hidrofóbica	Fase reversa
Fase móvil	Característica fisicoquímica	Peso molecular de las proteínas	Interacción específica con un ligando	Carga superficial	Hidrofobicidad	Hidrofobicidad
	Interacción con matriz	Interacción inespecífica controlada adicionando sales	Reversibles, electrostáticas	Electrostática	Hidrofóbica	Hidrofóbica
	Consideraciones	Solución clarificada, filtrada, desgasificada, 4 °C en las condiciones de pH y fuerza iónica de acuerdo con la proteína de interés. Uso de inhibidores de proteasas durante la ruptura celular.				
Fase estacionaria	Matriz	Dextranos, agarosa, sephadex, sephacryl	Dextranos, agarosa, celulosa, sílica, poliacrilamida	Sílica, metacrilato, agarosa	Agarosa, poliestireno, sílica	Apolar: silanol, éter, octadecil
	Ligando/Grupo	No es necesario	Estable y compatible con la proteína	Sulfopropil, metil sulfonato, dietilaminoetil, dietilaminopropil	Butilo, octilo, fenilo, éter	N-alquilo o hidrocarburos aromáticos,
	Consideraciones	Mantener la resina siempre hidratada y con un empacamiento homogéneo. Almacén en etanol 20 %, 4 ° C				
Proceso	Condiciones iniciales de la muestra	Volumen de la muestra limitado (< 10 % del volumen total)	Unión específica. Volumen de la muestra no limitante	Baja fuerza iónica, no hay volumen limitante de muestra	Alta fuerza iónica, volumen de muestra no limitante	Fase móvil es polar
	Condiciones finales de la muestra	Muestra diluida	Elución específica, muestra concentrada	Muestra al final, alta fuerza iónica, o cambio de pH, muestra concentrada	Baja fuerza iónica, muestra concentrada	Muestra con alta concentración de solventes no polares u orgánicos, concentrada y baja fuerza iónica
	Elución	Flujo depende de la fase móvil y del movimiento browniano	Ligando competitivo, pH, fuerza iónica, polaridad	Desprendimiento en relación a fuerza iónica de menor a mayor, concentración de sal, flujo, temperatura , pH,	Disminución de salinidad	Solventes no polares, orgánicos, acetonitrilo o metanol
	Resolución	Tamaño y uniformidad de partículas, altura y empaque de la columna, velocidad de flujo y concentración de muestra	Alta resolución, capacidad desde 5 y hasta 250 mg por mL de resina, en general procesos de un solo paso	Alta resolución, capacidad y velocidad, en general en procesos de más de un paso	Buena resolución, capacidad y velocidad, en general en procesos de más de un paso	Alta resolución
	Consideraciones	Flujo de acuerdo con las especificaciones de la resina, en general 1 mL min <sup>-1</sup> .				
Desventajas	Dilución de la muestra	No existen ligandos para todas las proteínas	No se trata de resinas particularmente específicas. Se debe considerar la diálisis para remover el exceso de sales	No se trata de resinas particularmente específicas. Se requieren parches hidrofóbicos superficiales capaces de interactuar con la resina.	Riesgo de desnaturalización de la muestra. Utilizada principalmente para péptidos	

Referencias [3,4,23,24]

### Por hidrofobicidad

En la superficie de las proteínas se pueden detectar regiones que repelen moléculas de agua (regiones hidrofóbicas). Esta propiedad de las proteínas se aprovecha en las cromatografías de interacción hidrofóbica y en fase reversa (Figura 2E y 2F). En la cromatografía de interacción hidrofóbica, las proteínas se unen a la fase estacionaria en un ambiente que favorezca el efecto “*salting out*”, es decir, donde

las proteínas no están en contacto con el solvente (ver precipitación de proteínas). Mientras que en la fase reversa el ambiente hidrofóbico lo favorece la fase móvil, es decir, el solvente.

La resolución de dichas cromatografías se rige, primeramente, por la composición de grupos funcionales unidos al polímero de la columna [29, 30]. La cromatografía de interacción hidrofóbica utiliza grupos tales como: fenilo, octilo y butilo; para las

columnas de fase reversa el soporte es a base de sílica que varía en el número de carbonos (de 8 a 18). En ambas técnicas, entre mayor es el tamaño del grupo funcional, mejor es la retención de las proteínas y por tanto la resolución de la cromatografía. Las proteínas se adsorben a la fase estacionaria en un ambiente hidrofóbico, con alta concentración de sal (hasta 2 M).

Una ventaja de la interacción hidrofóbica es mantener a las proteínas en su conformación y nativas, en la fase reversa las proteínas se desnaturalizan. Sin embargo, la resolución de la fase reversa es mayor, en particular para péptidos, los cuales no presentan regiones hidrofóbicas de tamaño considerable para unirse a una columna de interacción hidrofóbica. La elución de las proteínas o péptidos, en ambas técnicas, es la reducción del ambiente hidrofóbico de manera gradual [3, 4, 31].

Los pasos de ambas cromatografías consisten en: equilibrar la columna, adicionar la muestra, lavar con el amortiguador con el que se equilibró la columna, eluir las proteínas reduciendo de manera gradual el ambiente hidrofóbico y regenerar la columna.

## Conclusión

En las últimas tres décadas, el impacto de la generación del conocimiento científico ha sido de

manera exponencial y siempre en concordancia con el desarrollo de nuevas tecnologías y métodos. La diversidad de técnicas para la purificación de proteínas ha generado un efecto excepcional en la ciencia. El estudio de proteínas como moléculas aisladas, libres de un ambiente celular, contribuye en el entendimiento de procesos celulares, metabolismo e incluso la biología de múltiples enfermedades, en el diseño de nuevas moléculas con aplicación en la biomedicina y diversas industrias.

La amplia gama de materiales para la purificación de proteínas, como lo son las matrices usadas en la cromatografía, permite solucionar de manera rápida y eficiente problemas para purificar proteínas. Para lograr esto, es fundamental considerar en todo momento, las propiedades bioquímicas de la proteína de interés y los fundamentos teóricos de cada técnica, para poder realizar los ajustes necesarios de acuerdo a los objetivos de cada investigación; sin olvidar que durante el proceso de purificación de una proteína, debemos contar con un método adecuado para identificarla, mantener en lo posible su estabilidad y función, estandarizar un protocolo eficiente de purificación, en el cual se incluya el menor número de pasos para reducir el tiempo. Finalmente, hay que recordar que el éxito para obtener una proteína pura se obtendrá con persistencia, constancia y paciencia.

## Referencias

- Buxbaum, E. (2015) Amino Acids. in *Fundamentals of Protein Structure and Function* (Buxbaum, E. ed), pp. 3–13, Springer International Publishing, Cham, 10.1007/978-3-319-19920-7\_1
- Buxbaum, E. (2015) Protein Structure. in *Fundamentals of Protein Structure and Function* (Buxbaum, E. ed), pp. 15–64, Springer International Publishing, Cham, 10.1007/978-3-319-19920-7\_2
- Janson, J.-C. (ed.) (2011) *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications*, Third edition, *Methods of biochemical analysis*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey
- Cutler, P. (ed.) (2004) *Protein Purification Protocols*, 2nd Ed., *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 10.1385/159259655X
- Protein production and purification (2008) *Nat Methods*. 5, 135–146
- Grabski, A. C. (2009) Advances in preparation of biological extracts for protein purification. *Methods Enzymol.* 463, 285–303
- Kwon, Y.-C., and Jewett, M. C. (2015) High-throughput preparation methods of crude extract for robust cell-free protein synthesis. *Sci Rep.* 5, 8663
- Hopkins, T. R. (1991) Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins. *Bioprocess Technol.* 12, 57–83
- Swinehart, D. F. The Beer-Lambert Law
- Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications, 3rd Edition | Wiley Wiley.com. [online] <https://www.wiley.com/en-ae/Protein+Purification%3A+Principles%2C+High+Resolution+Methods%2C+and+Applications%2C+3rd+Edition-p-9780471746614> (Accessed April 29, 2021)
- Campion, E. M., Loughran, S. T., and Walls, D. (2017) Protein Quantitation and Analysis of Purity. *Methods Mol Biol.* 1485, 225–255
- Noble, J. E., and Bailey, M. J. A. (2009) Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 463, 73–95
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411–2423
- Gupta, M. N. (2019) Electrophoresis | Gel Electrophoresis: Polyacrylamide Gels ☆. in *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)* (Worsfold, P., Poole, C., Townshend, A., and Miró, M. eds), pp. 447–456, Academic Press, Oxford, 10.1016/B978-0-12-409547-2.14434-8
- Kurien, B. T., and Scofield, R. H. (eds.) (2012) *Protein Electrophoresis: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, 10.1007/978-1-61779-821-4
- Vandahl, B. B., Christiansen, G., and Birkelund, S. (2009) Preparation of Bacterial Samples for 2-D PAGE. in *The Protein Protocols Handbook* (Walker, J. M. ed), pp. 121–130, Springer Protocols Handbooks, Humana Press, Totowa, NJ, 10.1007/978-1-59745-198-7\_14
- Mahmood, T., and Yang, P.-C. (2012) Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci.* 4, 429–434

18. Kurien, B. T., and Scofield, R. H. (eds.) (2015) *Western Blotting: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 10.1007/978-1-4939-2694-7
19. Duong-Ly, K. C., and Gabelli, S. B. (2014) Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. in *Methods in Enzymology*, pp. 85–94, Elsevier, 541, 85–94
20. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate (2016) *Current Protocols in Protein Science*. 84, A.3F.1-A.3F.9
21. Matulis, D. (2016) Selective Precipitation of Proteins. *Current Protocols in Protein Science*. 83, 4.5.1-4.5.37
22. Egas, D. A., and Wirth, M. J. (2008) Fundamentals of Protein Separations: 50 Years of Nanotechnology, and Growing. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 1, 833–855
23. Urh, M., Simpson, D., and Zhao, K. (2009) Affinity chromatography: general methods. *Methods Enzymol.* 463, 417–438
24. Eriksson, K. O. (2018) Chapter 19 - Hydrophobic Interaction Chromatography. in *Biopharmaceutical Processing* (Jagschies, G., Lindskog, E., Łacki, K., and Galliher, P. eds), pp. 401–408, Elsevier, 10.1016/B978-0-08-100623-8.00019-0
25. Doyle, S. A. (ed.) (2009) High Throughput Protein Expression and Purification: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, NJ, 10.1007/978-1-59745-196-3
26. Rosenberg, I. M. (2005) Protein analysis and purification: benchtop techniques, Second edition, Birkhäuser Verlag, Boston
27. Duong-Ly, K. C., and Gabelli, S. B. (2014) Using ion exchange chromatography to purify a recombinantly expressed protein. *Methods Enzymol.* 541, 95–103
28. Urh, M., Simpson, D., and Zhao, K. (2009) Chapter 26 Affinity Chromatography: General Methods. in *Methods in Enzymology* (Burgess, R. R., and Deutscher, M. P. eds), pp. 417–438, Guide to Protein Purification, 2nd Edition, Academic Press, 463, 417–438
29. McCue, J. T. (2009) Theory and use of hydrophobic interaction chromatography in protein purification applications. *Methods Enzymol.* 463, 405–414
30. Jennissen, H. P. (2016) Hydrophobic Interaction Chromatography. in *eLS*, pp. 1–12, American Cancer Society, 10.1002/9780470015902.a0002678.pub4
31. McCue, J. T. (2014) Use and application of hydrophobic interaction chromatography for protein purification. *Methods Enzymol.* 541, 51–65.



**DRA. CLAUDIA RODRÍGUEZ  
ALMAZÁN**

**ID ORCID: 0000-0002-8586-2317**

Bióloga de la Facultad de Ciencias, UNAM; obtuvo su Maestría en Ciencias por el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, al realizar investigación relacionada con toxinas formadoras de poro de anémona. Obtuvo su Doctorado en Ciencias Biomédicas, en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM; en el área de físico-química y termodinámica del plegamiento y estabilidad de enzimas. Realizó una estancia posdoctoral en el Instituto de Biotecnología, UNAM, mecanismos de acción de toxinas formadoras de poro de bacterias.

Desde el año 2010 es Investigadora Asociado del Instituto de Biotecnología, UNAM. Actualmente en comisión en el Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM. Ha sido mentora de alumnos de licenciatura, maestría y doctorado. Tiene múltiples publicaciones en revistas indizadas. Ha participado de

forma constante como docente en cursos de posgrado y en divulgación de la ciencia.

Tiene a su cargo de dos líneas de investigación:

1) Toxinología de anémonas. Las anémonas tienen la capacidad de producir veneno mediante estructuras celulares llamadas nematocistos. Debido a la complejidad que se tiene para la obtención del veneno de anémona, las ciencias ómicas han abierto grandes perspectivas para este campo. Esta línea de investigación es conducida en dos vertientes, el estudio ómico del veneno de la anémona *Anthopleura dowii* y la identificación de toxinas formadoras de poro (TFP) por métodos de bioquímica clásica. Las TFPs forman monómeros en solución que se pueden unir a la membrana plasmática, cambiando su conformación a un estado oligomérico al interactuar con lípidos como la esfingomielina y colesterol, presentando una selectividad con el primero. Dos aplicaciones principales le han sido otorgadas a las toxinas formadoras de poro de anémona: el diseño de inmunotoxinas como posibles herramientas en la terapia de cáncer, y el diseño de biosensores basados en nanoporos.

2) Ingeniería de enzimas de bacterias extremófilas. El cuidado del ambiente dio pauta para implementar estrategias que deben ser consideradas en los procesos químicos y que tuvieran el menor impacto posible en el ambiente, a lo que se le nombró química verde. Uno de los objetivos de la química verde es el uso de catalizadores, que pueden ser sensibles a condiciones extremas de temperatura y pH, entornos en los cuales gran parte de los procesos industriales se desarrollan. En este sentido, las lacasas

han surgido como enzimas de gran interés en la industria, debido a que no solamente son una excelente alternativa en la química verde al llevar a cabo reacciones acopladas, también engloban aplicaciones en un gran número de procesos industriales, como industria del papel, control de la

contaminación ambiental, industria alimentaria, biosensores, industria textil y farmacéutica. En esta línea estudiamos a las lacasas bacterianas y mediante Ingeniería de proteínas mejoramos sus características catalíticas para su aplicación en el diseño de biosensores.

---