

Bioquímica Geral

Sumário

Isolamento de proteínas

Fraccionamento por ultra-centrifugação diferencial

Extracção de proteínas membranares

Factores a controlar na estabilização das proteínas isoladas

Métodos de detecção da proteína em estudo

Métodos para purificação de proteínas

Solubilidade; diálise

Técnicas de cromatografia em coluna: cromatografia de filtração em gel, cromatografia de permuta iónica, cromatografia de afinidade, HPLC.

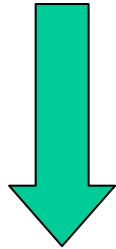
Separação e visualização de proteínas:

electroforese em gel (SDS-PAGE), focagem isoeléctrica, electroforese bidimensional (2D).

Avaliação quantitativa do progresso da purificação

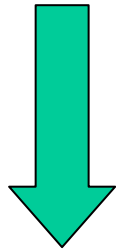
Genoma

(Ex. genoma humano: 3 bilhões pares bases, cerca de 40.000 genes)



Proteoma

Corresponde às proteínas que estão a ser sintetizadas pelo organismo/orgão/célula num dado instante. É mais **vasto** do que o genoma (RNA splicing, modificações pós-tradução, regulação síntese proteica, interações proteína-proteína) e é **dinâmico** (célula, estágio desenvolvimento, condições exteriores).



Informação funcional

Para estudar as proteínas primeiro temos que as isolar e purificar

A estratégia é: 'dividir para conquistar' !

1. crescimento do organismo ou isolamento do órgão

2. purificação da proteína com interesse

As proteínas podem ser separadas umas das outras com base na **solubilidade**, **tamanho**, **carga** e **afinidade** de ligação

3. determinação da sequência de aminoácidos

Degradação de **Edman** automática e cortes por proteases específicas

4. determinação da estrutura 3D da proteína

Cristalografia de **raios X** e **RMN**

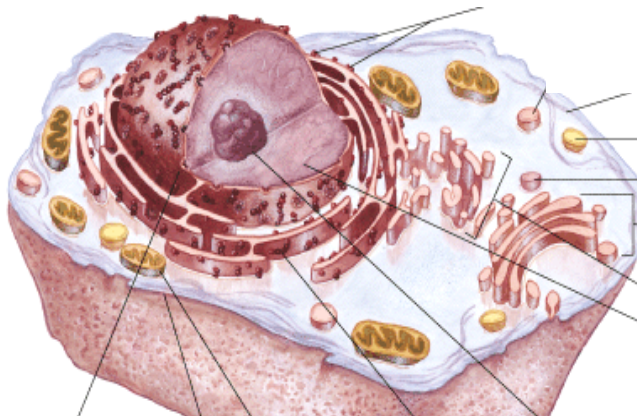
5. estudos funcionais

As proteínas têm que ser libertadas das células

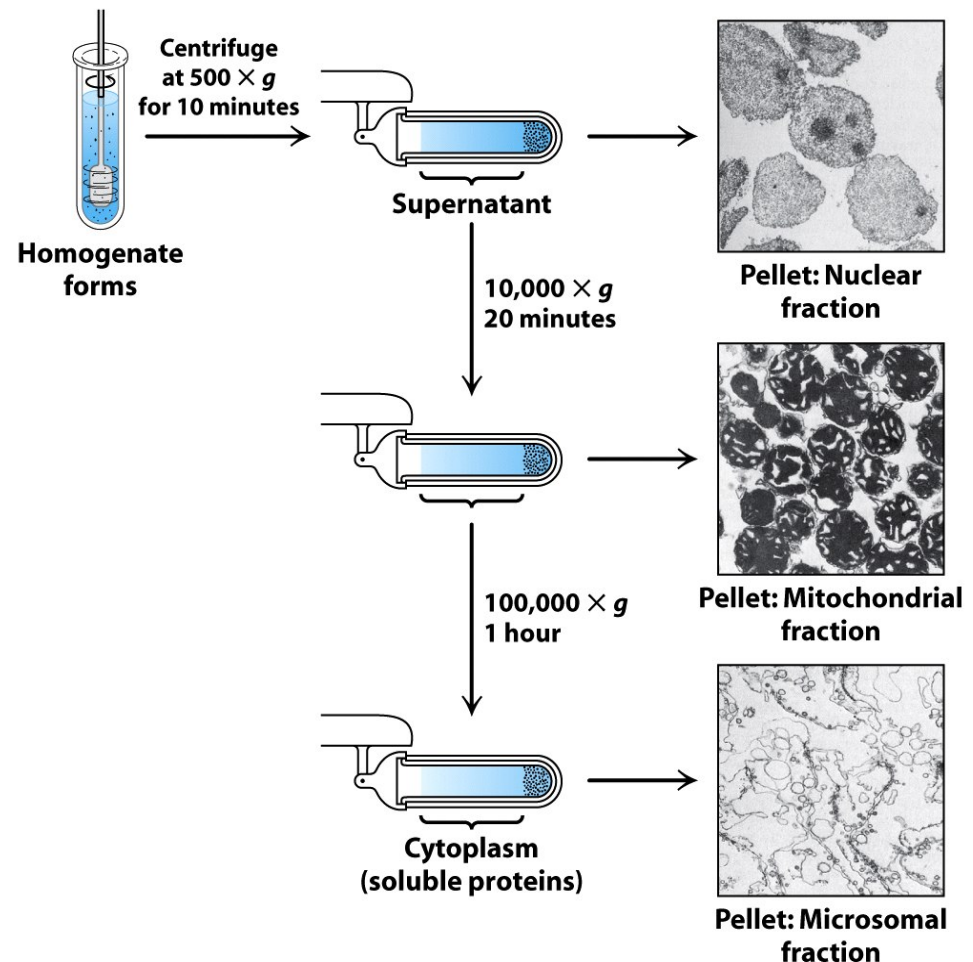
O primeiro passo no isolamento de uma proteína é a sua solubilização/extracção (libertação do organismo / órgão / tecido / célula)

O método a usar depende do tipo de célula, da localização celular e da natureza da proteína em estudo.

- **Proteína do citosol** → lise das células
- **Proteína membrana** ou de componentes celulares (mitocôndrias) → separação dos componentes celulares (fraccionamento) do restante material biológico por centrifugação; adição de detergentes



Ultra-centrifugação diferencial



Estabilização da proteína em estudo

Uma vez isolada do seu ambiente natural, as proteínas são expostas a agentes que podem causar a sua desnaturação ou inativação irreversíveis.



Em todos os passos do processo de purificação há vários parâmetros que têm que ser controlados:

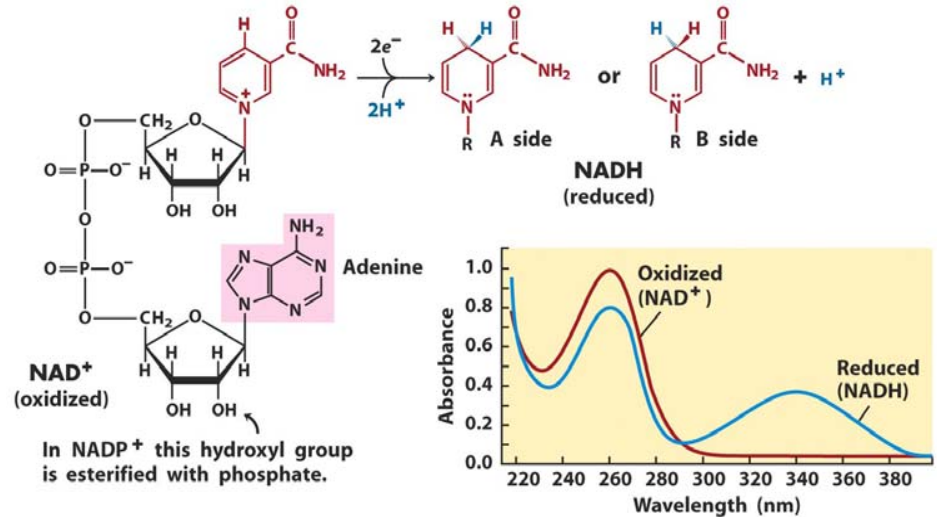
1. **pH**; a integridade estrutural das proteínas é sensível ao pH devido aos grupos ácido-base das proteínas → usar soluções tamponizadas.
2. **Temperatura**; purificação a 4 °C; armazenamento a –80 °C ou em azoto líquido.
⇒ A termoestabilidade de algumas proteínas poderá ser usada para separar as proteínas que são sensíveis à temperatura e que precipitam por aquecimento da mistura.
3. **Inibição das proteases celulares**; nas primeiras etapas da purificação da proteína de interesse é, muitas vezes, necessário inibir as proteases e as enzimas degradativas que são libertadas no processo de lise celular.

Métodos de detecção da proteína em estudo

1. Ensaaios enzimáticos

– monitorização do desaparecimento do substrato ou aparecimento do produto por técnicas espectroscópicas (UV/visível, fluorescência) ou espectrometria de massa.

⇒ Quando o produto (ou substrato) não é directamente detectável, recorre-se a reacções acopladas

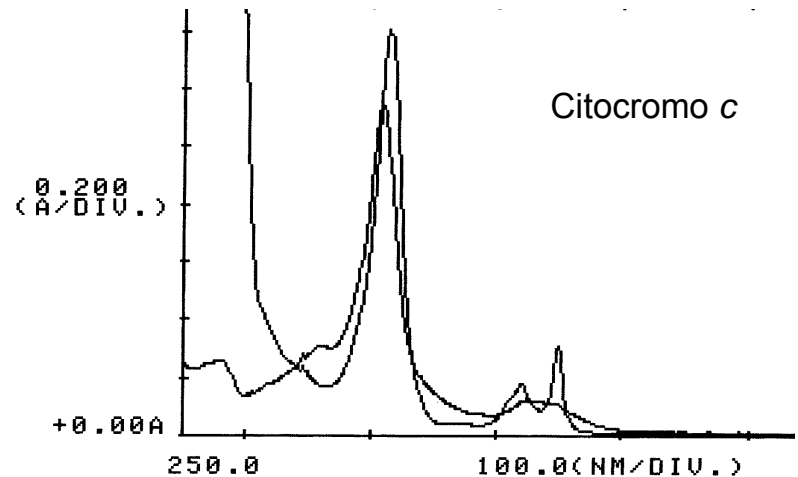


2. Métodos não-enzimáticos

- efeitos biológicos detectáveis
- **características espectrais**

3. Métodos imunológicos

- utilização de anticorpos



Purificação de proteínas: métodos

As proteínas podem ser purificadas com base na sua solubilidade, carga, tamanho/forma, especificidade de ligação ou polaridade.

1. Solubilidade

- adição de uma solução salina por forma a que a proteína em estudo ou os contaminantes precipitem

2. Carga

- Cromatografia de permuta iónica
- Electroforese
- Focagem isoeléctrica

3. Tamanho (peso molecular)

- Cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel
- Electroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)
- Diálise
- Ultrafiltração

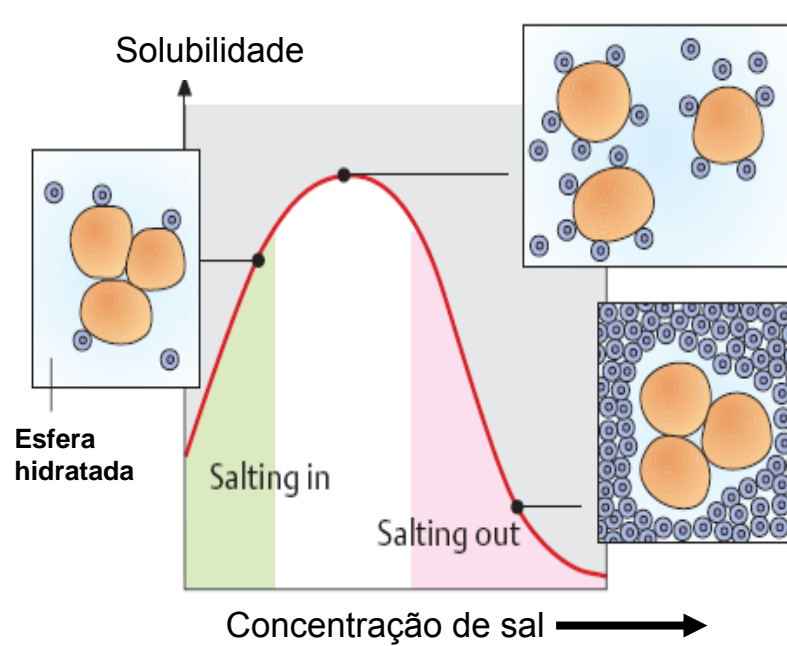
4. Especificidade

- Cromatografia de afinidade

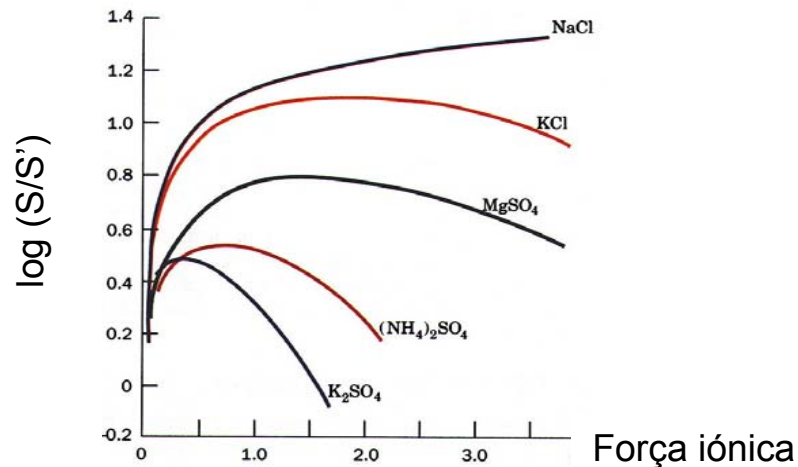
5. Polaridade

- Cromatografia de fase reversa
- Cromatografia de adsorção
- Cromatografia em papel

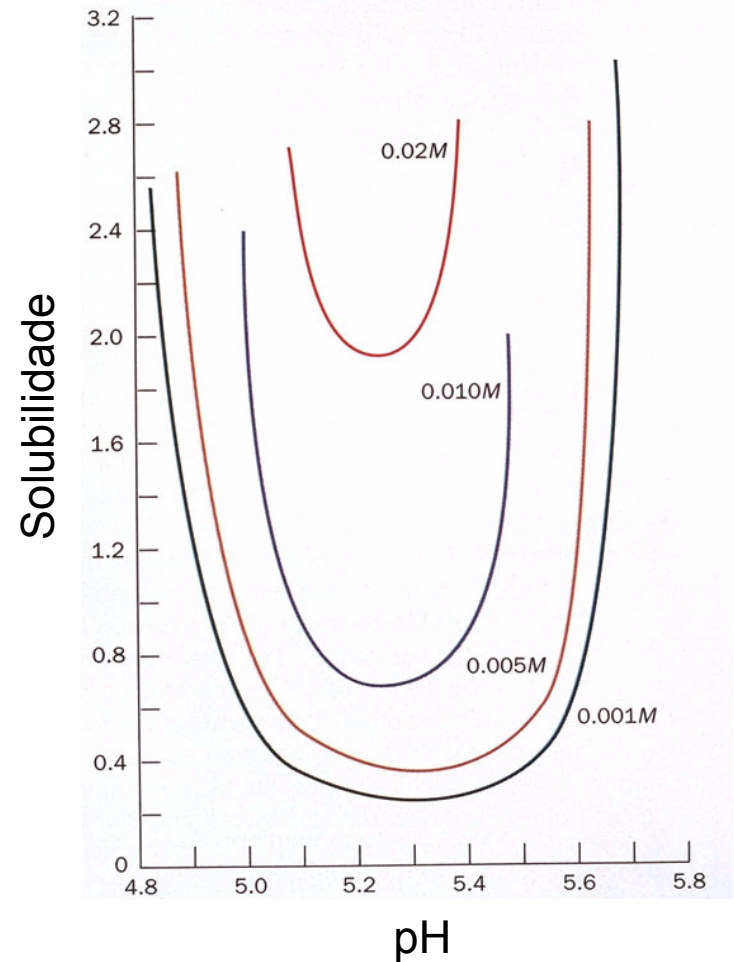
Solubilidade das proteínas



Salting in / Salting out



Solubilidade da β -lactoglobulina em função do pH.



A solubilidade é mínima ao pH do ponto isoelectrico.

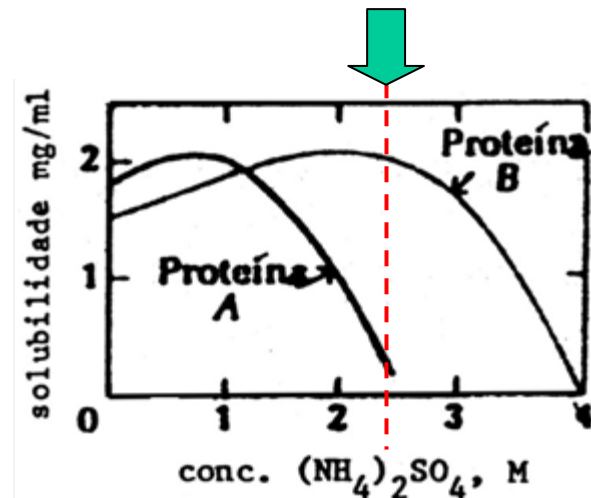
A solubilidade das proteínas depende de:

- concentração de sais (i.e. força iónica $I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$)
- natureza do sal
- polaridade do solvente (água, acetona, DMSO...)
- pH
- temperatura

Verifica-se que pequenas variações na força iónica causam grandes alterações na solubilidade. Este facto pode ser usado para precipitar proteínas diferencialmente, pois a concentração de sal a que precipitam varia de proteína para proteína.

‘ salting out ’

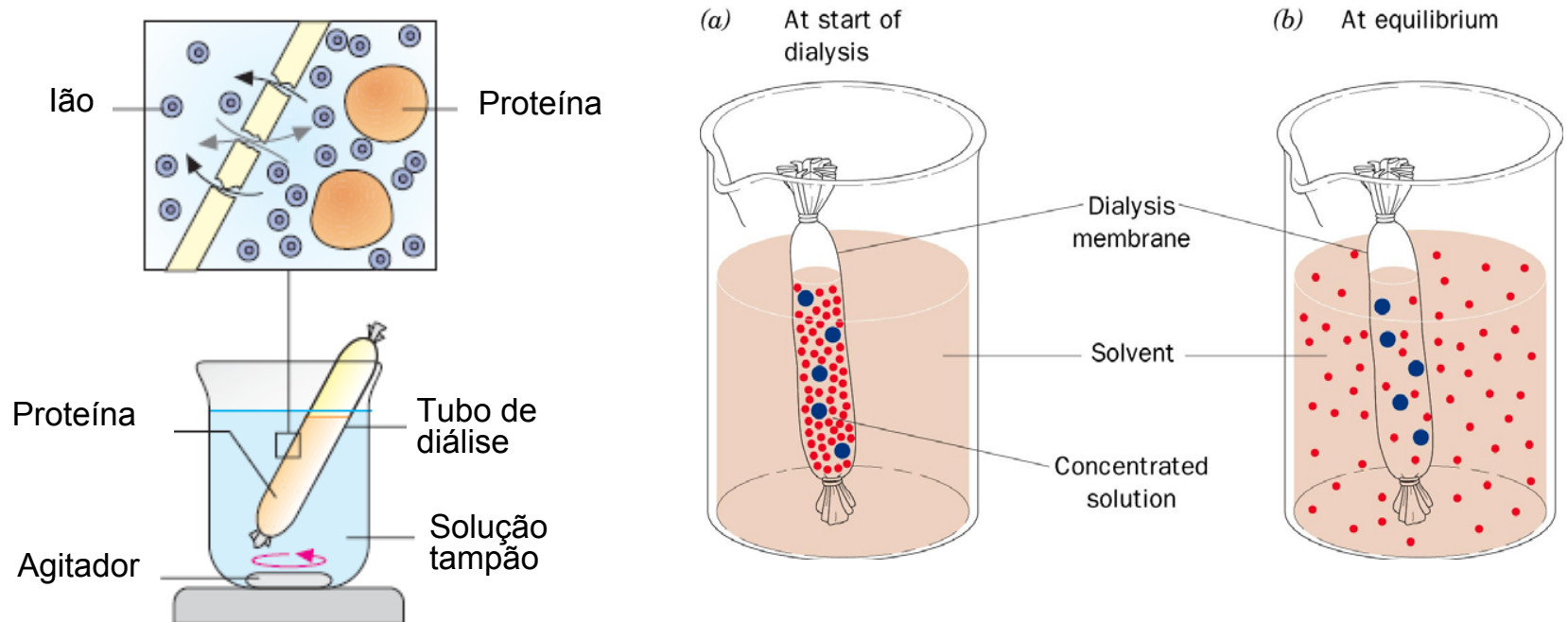
Precipitação em sulfato de amónio. A concentração de sal para a qual a proteína A precipita é diferente da de B.



Diálise

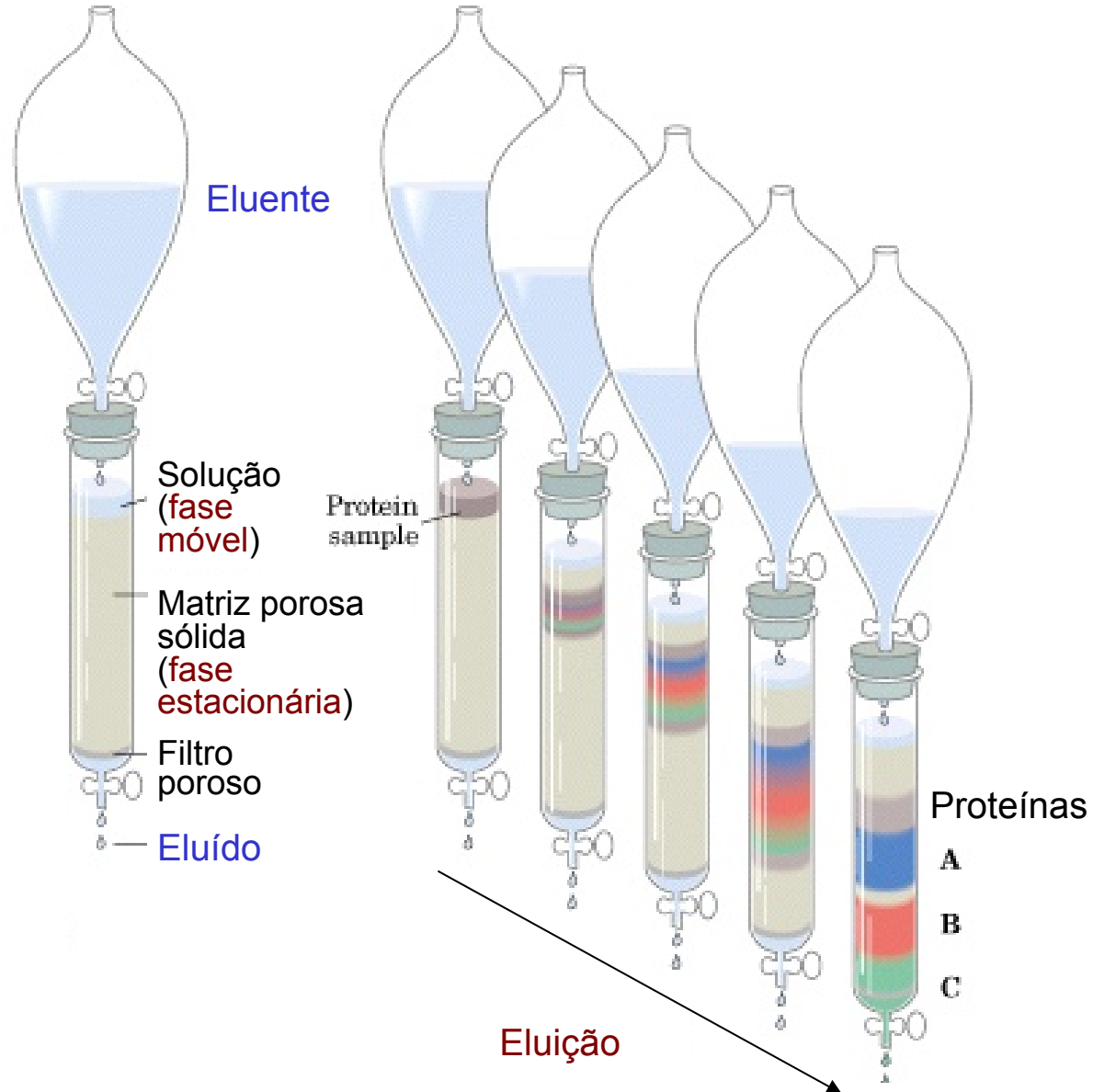
Técnica separativa que se baseia na diferença de tamanho e no equilíbrio osmótico. Os íões do sal (ou outras moléculas pequenas) atravessam livremente a membrana de diálise e saem para o exterior do saco de diálise. A água entra para manter o equilíbrio osmótico.

Separação de moléculas pequenas / troca de tampões (após precipitação com sal ou cromatografia de permuta iónica)



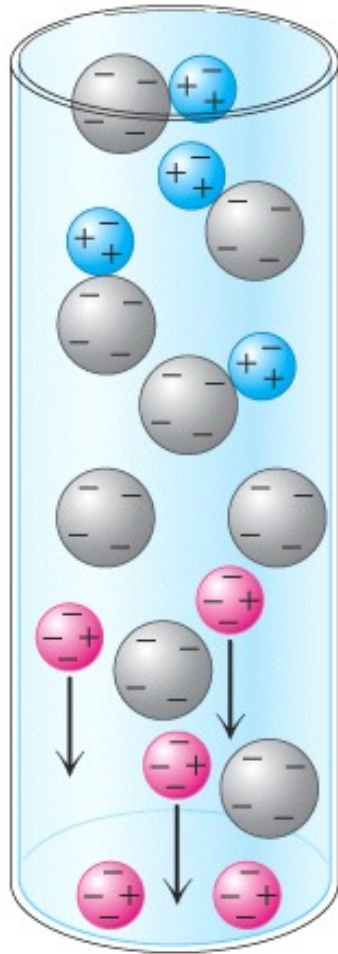
As proteínas podem ser separadas de moléculas mais pequenas por diálise, utilizando uma membrana semi-permeável. Esta técnica é muito útil para remover sais, mas não permite distinguir proteínas. A seguir a uma precipitação é sempre necessário remover o excesso de sal.

Técnicas de cromatografia em coluna



Cromatografia de permuta iónica

Separa proteínas com base na carga formal



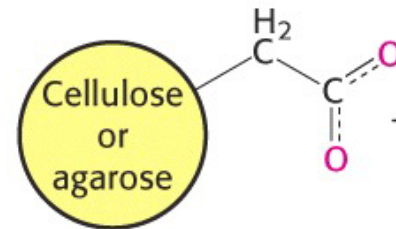
Proteínas com carga positiva ligam-se às cargas negativas da coluna e ficam retidas

Proteínas com carga negativa, não se agarram e são eluídas

resina catiónica

CM-celulose

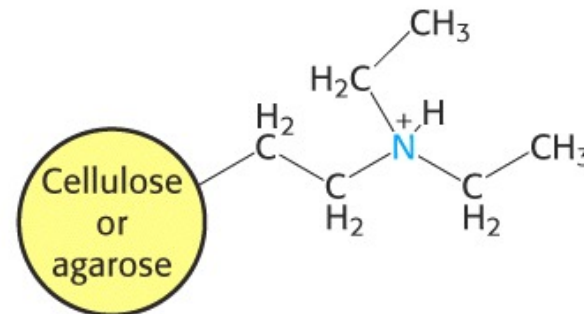
Resina catiónica (agarra catiões)



CM carboximetil-celulose
(forma ionizada)

DEAE-celulose

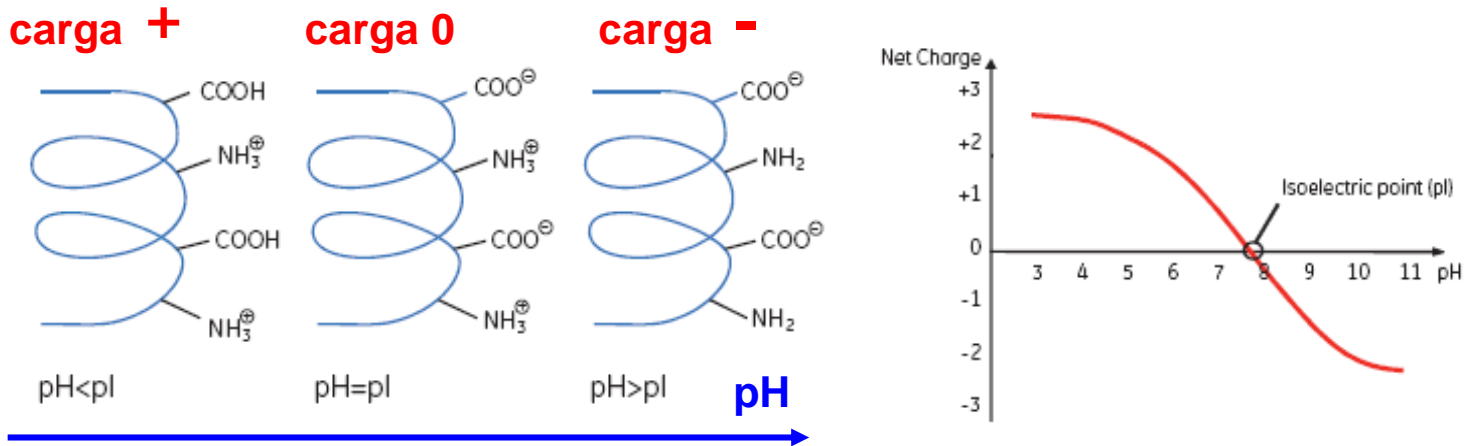
Resina aniónica (agarra aniões)



DEAE dietilaminoetil-celulose
(forma protonada)

Cromatografia de permuta iónica: resina vs pl

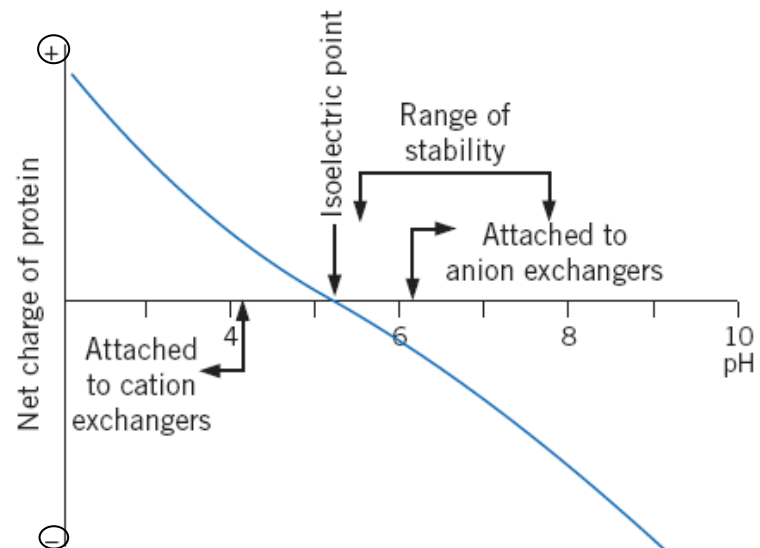
Variação da carga global das proteínas em função do pH



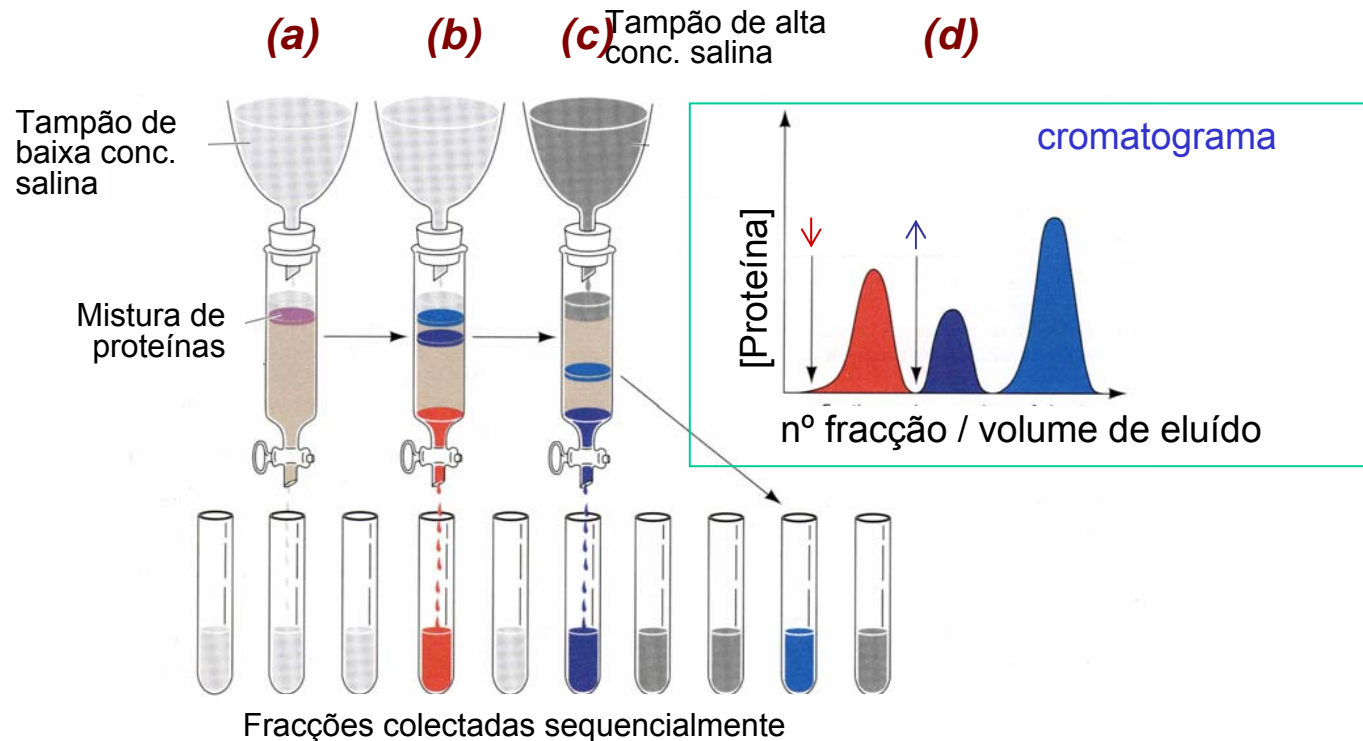
Ex: proteína com $pI < 7.0$ e estável numa gama de pH entre 5 e 8



Escolher $pH > pI$ e usar uma resina aniónica
(pH versus estabilidade)

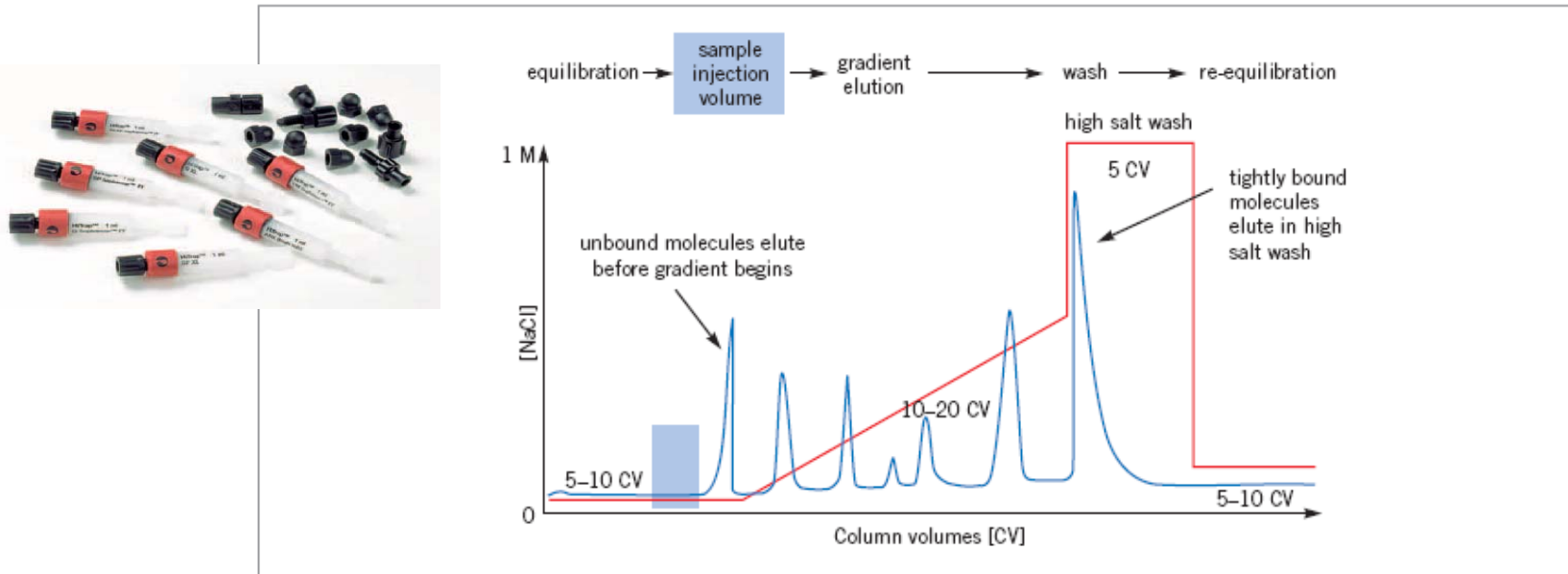


Cromatografia de permuta iónica na prática



- (a)** Aplicação da mistura de proteína (pH inicial)
- (b)** Durante a fase de eluição as proteínas separam-se de acordo com a carga formal (ligam mais as que têm um pI mais afastado do pH do tampão de eluição).
- (c)** As restantes proteínas são eluídas com o aumento da força iónica/variação do pH do tampão de eluição.
- (d)** Cromatograma

Cromatografia de permuta iónica na prática



- 1- Equilibrar a resina num tampão de baixa força iónica ao pH adequado (estabilidade da proteína)
- 2- Injectar a amostra
- 3- Eluir com gradiente de força iónica (linear ou descontínuo)
- 4- Lavar a coluna com tampão de força iónica muito elevada
- 5- Re-equilibrar novamente.

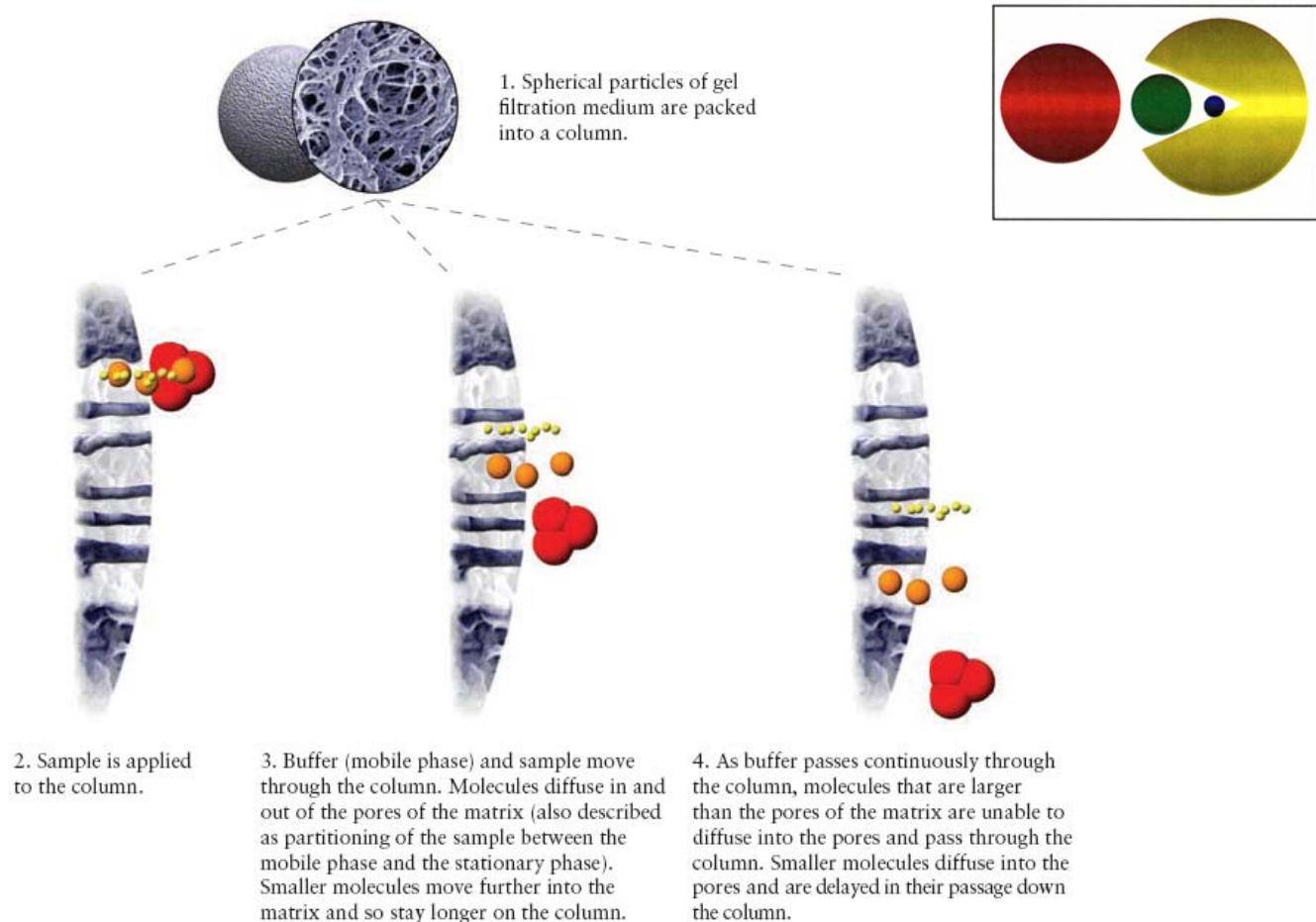
Moléculas não ligadas (com a mesma carga da resina) são eluídas antes de começar o gradiente de força iónica.
Moléculas ligadas muito fortemente só são eluídas durante a lavagem final.

Na cromatografia de permuta iónica a amostra injectada fica retida no topo da coluna, sendo concentrada antes de se iniciar a fase de eluição.
A detecção à saída da coluna normalmente é feita por leitura de Abs 280 nm

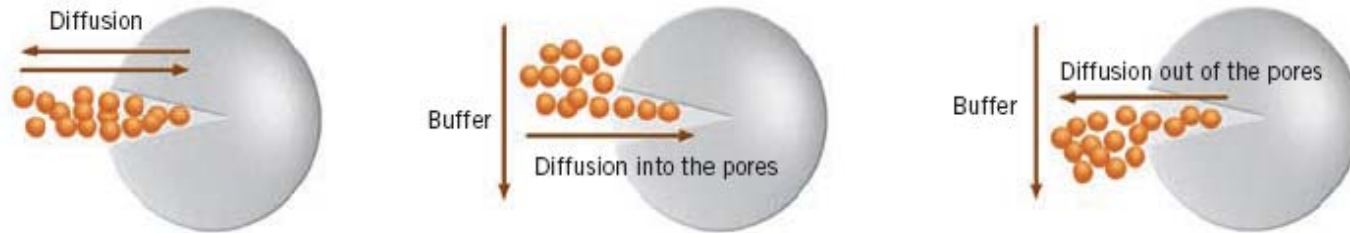
Cromatografia de filtração em gel

A separação é função do tamanho e da forma das moléculas; separa por exclusão de moléculas do volume do poro da matriz.

A fase estacionária consiste em polímeros insolúveis muito hidratados (agarose, dextrano, poliacrilamidas)



O processo de filtração em gel / exclusão molecular

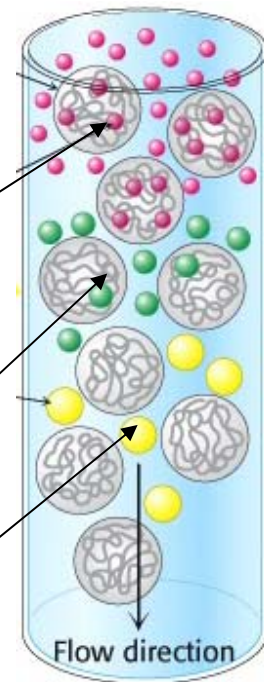


- 1- A amostra é aplicada no topo da coluna.
- 2- O tampão (fase móvel) arrasta a amostra ao longo da coluna.
- 3- As moléculas difundem para dentro e para fora dos poros da matriz (fase estacionária).

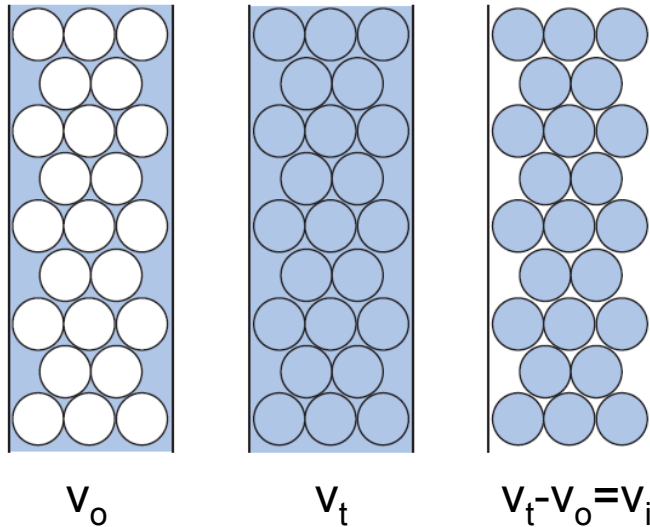
As moléculas mais pequenas penetram mais fundo nos poros e são atrasadas. Moléculas com MM inferior ao limite de exclusão do gel têm um volume de eluição $v_e = v_o + v_i$ porque todo o volume da coluna lhes é acessível.

Moléculas com MM dentro dos limites de exclusão do gel têm volumes de eluição proporcionais ao logaritmo da MM.

As moléculas maiores não conseguem penetrar nos poros e são eluídas primeiro. Moléculas com MM superior ao limite de exclusão do gel têm um volume de eluição $v_e = v_o$, porque apenas lhes é acessível o volume exterior às partículas do gel.



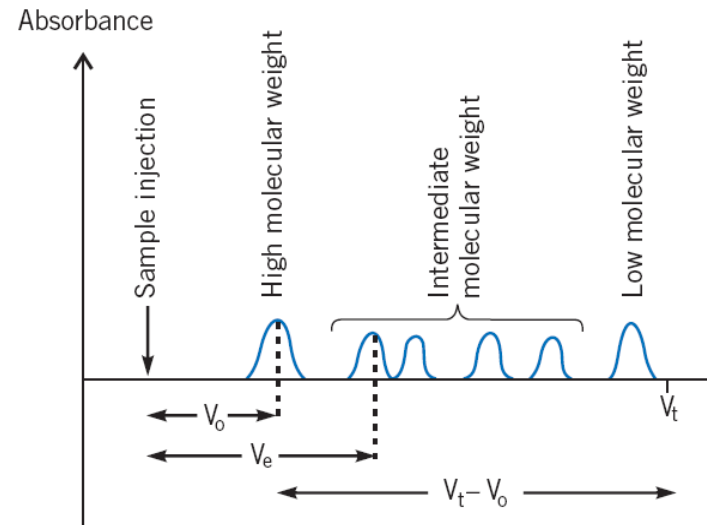
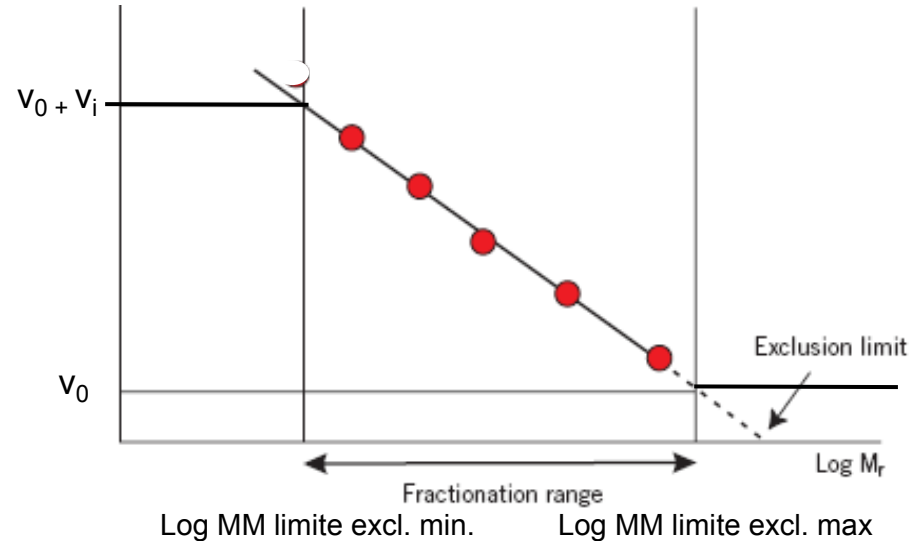
Os termos cromatográficos na filtração em gel



V_o volume exterior às partículas do gel
 V_t volume total da coluna (fase móvel).
 V_i volume da fase móvel no interior das partículas do gel.

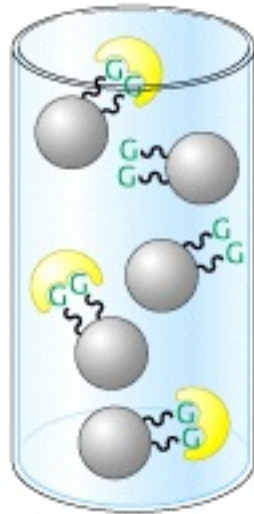
As moléculas maiores são eluídas primeiro, seguindo-se a eluição das moléculas mais pequenas, por ordem decrescente do seu tamanho.

A separação total ocorre enquanto um volume de tampão equivalente ao volume da coluna (V_t) percorre o gel.



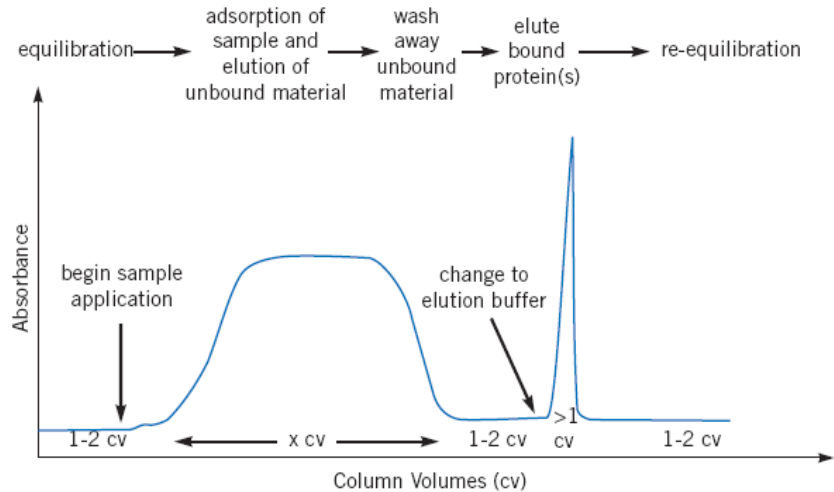
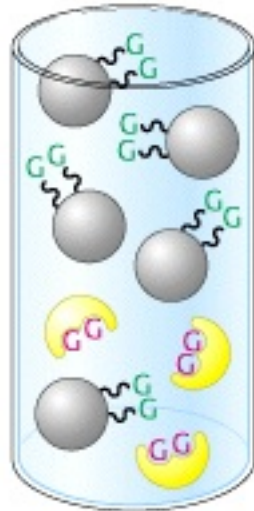
Cromatografia de afinidade

A proteína que tem afinidade para a glucose (G), liga-se aos resíduos de glucose agarrados às partículas de polímero



Addition of glucose (G)

A proteína é eluída por adição de um tampão contendo glucose (G)



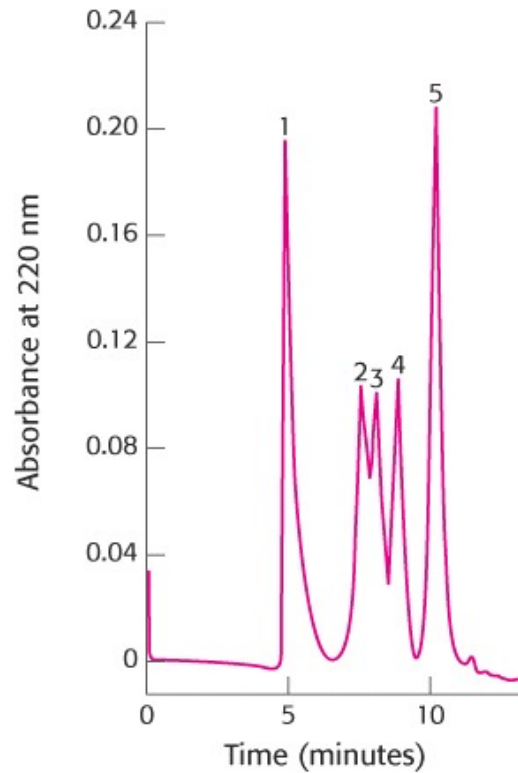
Na cromatografia de afinidade a fase estacionária é constituída por uma matriz que contém uma substância que se liga especificamente à proteína alvo. Essa ligação é muito específica e reversível.

A amostra é aplicada em condições que favorecem a ligação da proteína alvo ao ligando da matriz. Os outros contaminantes são eluídos com o tampão.

A eluição da proteína da coluna de afinidade é feita especificamente por adição de um ligando competitivo, ou não-especificamente, por variação do pH, força iónica ou polaridade. A proteína alvo é recolhida numa forma concentrada e muito pura.

Cromatografia HPLC

High Pressure Liquid Chromatography



Esta técnica é utilizada com qualquer dos tipos de cromatografia descritos

Aumenta a resolução e rapidez da técnica cromatográfica.

Os materiais da coluna são finamente divididos originando um maior número de locais de interacção. Necessita de pressão!

Separação e visualização de proteínas:

Ao contrário das técnicas cromatográficas que são simultaneamente técnicas analíticas e preparativas

a Electroforese

é fundamentalmente uma técnica analítica

Electroforese

Baseia-se na migração de moléculas carregadas (iões) num campo eléctrico aplicado

Enquanto as técnicas cromatográficas têm aplicações quer analíticas quer preparativas, a electroforese é essencialmente uma técnica analítica

Para proteínas são, geralmente, usados géis de poliacrilamida ou agarose com tamanhos de poros específicos.

A electroforese envolve os seguintes efeitos:

- 1. Mobilidade electroforética** \Rightarrow a mobilidade depende da razão carga/massa
- 2. Efeitos de exclusão molecular** (poros / malha do gel) \Rightarrow as moléculas mais pequenas migram mais do que as maiores (moléculas com igual densidade de carga)

O pH do gel é aproximadamente igual a 9.0 para que todas as moléculas de proteína estejam carregadas negativamente e se movam para o ânodo (polo positivo).

A visualização das bandas faz-se por tratamento com um corante (coloração para proteína, hemos, actividade enzimática, etc...). Os limites de detecção dependem do corante: é possível detectar 0.1 μg de proteína com azul de Coomassie e 0.02 μg com prata.

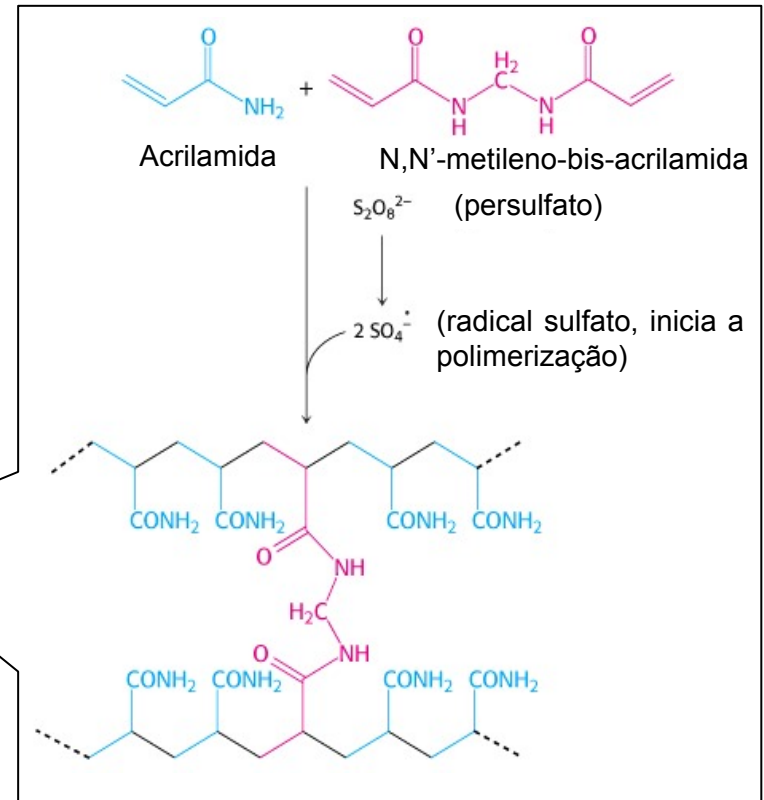
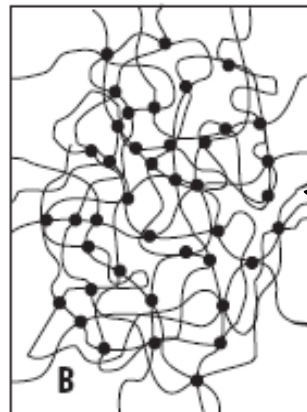
Electroforese

Condições não-desnaturantes (PAGE) / desnaturantes (SDS-PAGE)

PAGE \equiv **P**oly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis

Os géis de poliácridamida formam-se por polimerização do monómero de acrilamida e *cross-linking* do polímero resultante com N,N'-metileno-bis-acrilamida.

A polimerização da acrilamida é iniciada por persulfato de amónio, sendo utilizado TEMED (N,N,N',N'- tetrametilenodiamina) como catalisador para a geração de radicais livres



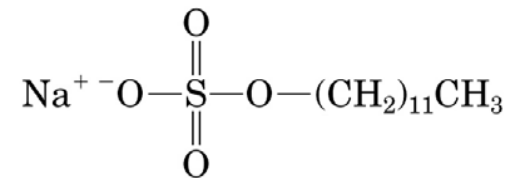
SDS-PAGE

Realizado em condições desnaturantes, i.e., na presença de SDS (**Sodium Dodecyl Sulfate** / dodecil sulfato de sódio)

O SDS é um **agente desnaturante** que destrói as ligações não-covalentes da proteína; liga-se não-especificamente à proteína na razão ≈ 1 SDS / 2 a.a



- Carga formal negativa
- Formas semelhantes (bastonete)
- Razão carga/massa semelhante \Rightarrow **separação é função do peso molecular**



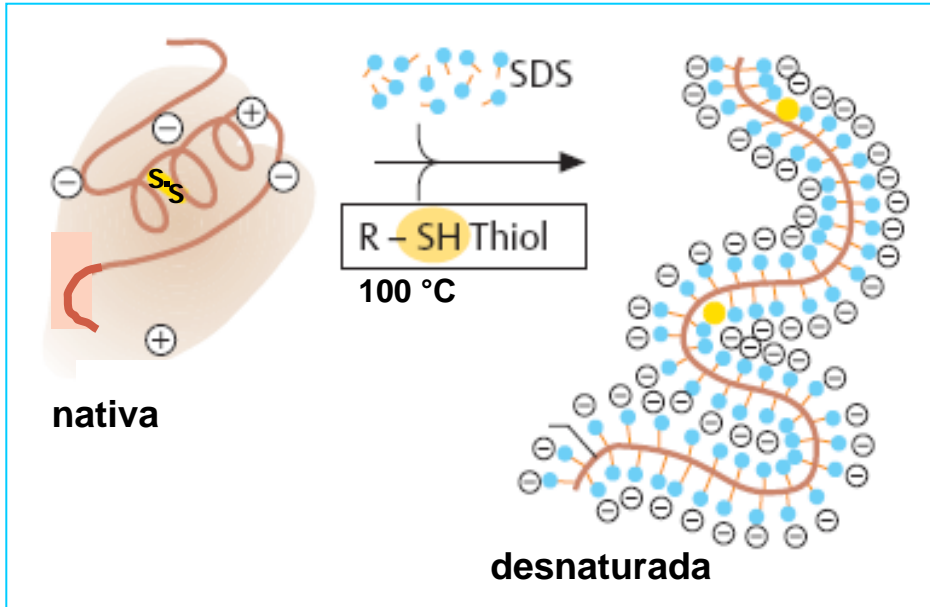
Aplicações:

- Método de separação
- Avaliação da pureza (conhecimento prévio da composição em subunidades)
- Método de determinação da massa molecular aparente / composição em subunidades (estrutura quaternária)

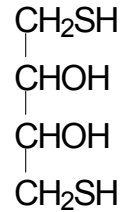
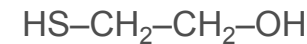
Separation size range (kD)	% acrylamide in resolving gel
36–205	5%
24–205	7.5%
14–205	10%
14–66*	12.5%
14–45*	15%

SDS-PAGE na prática

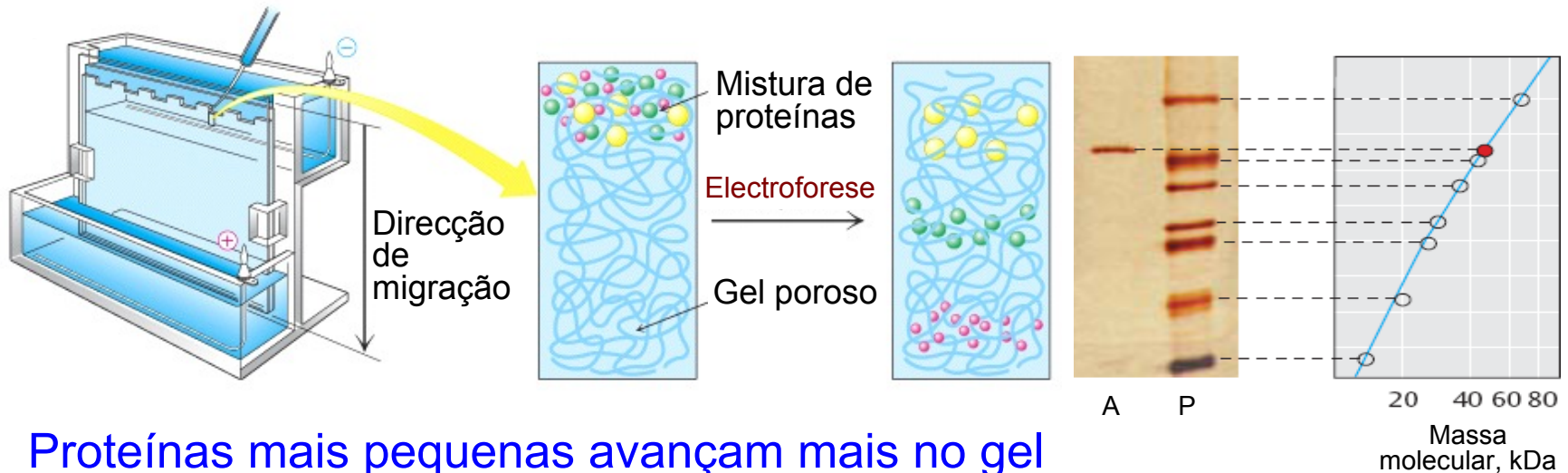
Tratamento da amostra



⇒ Tiol \equiv β -mercaptoetanol / Ditioneitol (DTT)

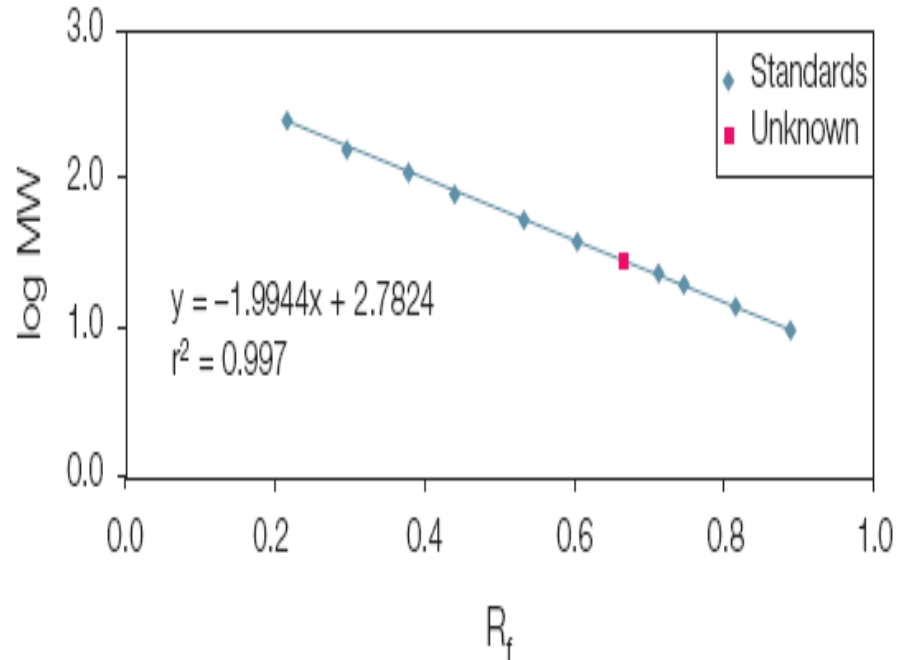
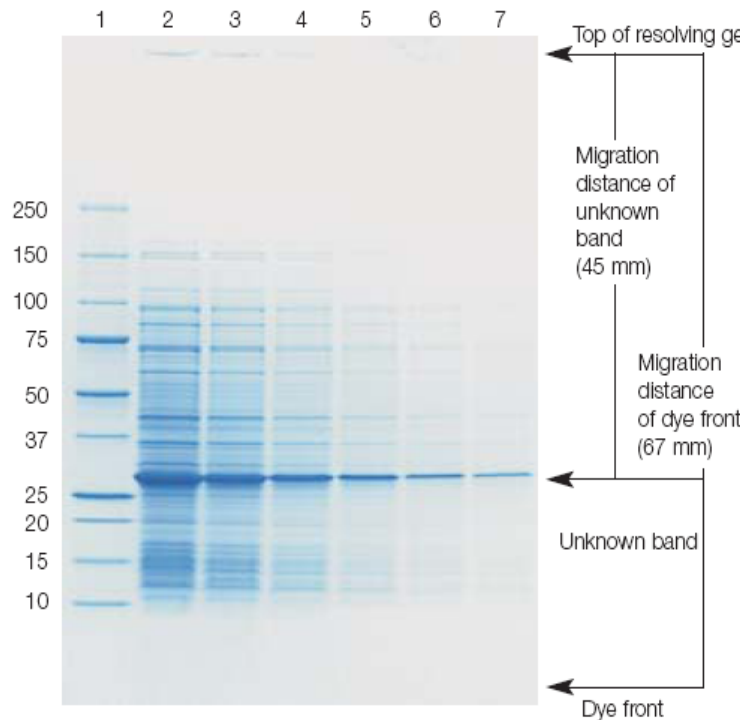


Na presença de SDS a carga da proteína é dominada pela carga do detergente. Todas as proteínas apresentam uma razão carga/massa semelhante e a separação faz-se de acordo com a massa: proteínas maiores são atrasadas pelo efeito de exclusão molecular da matriz de poliacrilamida.



Proteínas mais pequenas avançam mais no gel

SDS-PAGE: determinação da massa molecular



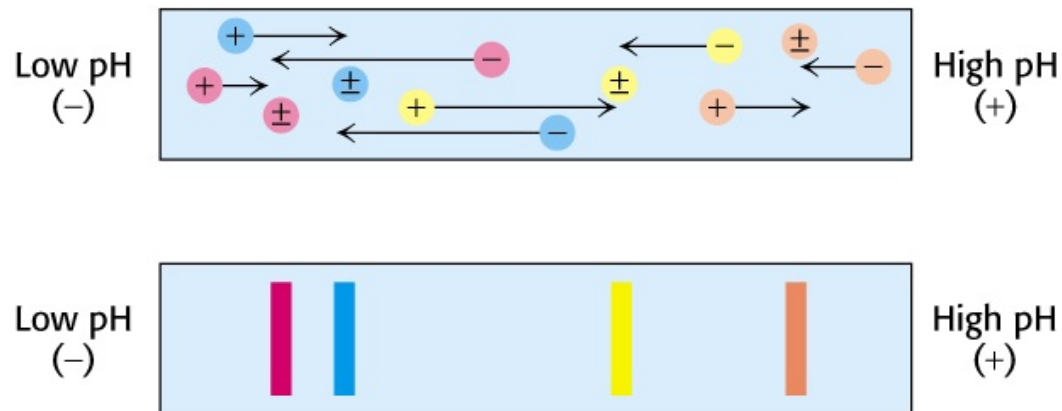
R_f = distância percorrida pela banda da proteína a dividir pela distância percorrida pela frente do solvente

A mobilidade relativa (R_f) é inversamente proporcional ao log MM

Para proteínas multiméricas, determina-se a massa molecular aparente de cada subunidade; a massa molecular total é calculada por cromatografia de filtração em gel ou espectrometria de massa.

Focagem isoelétrica

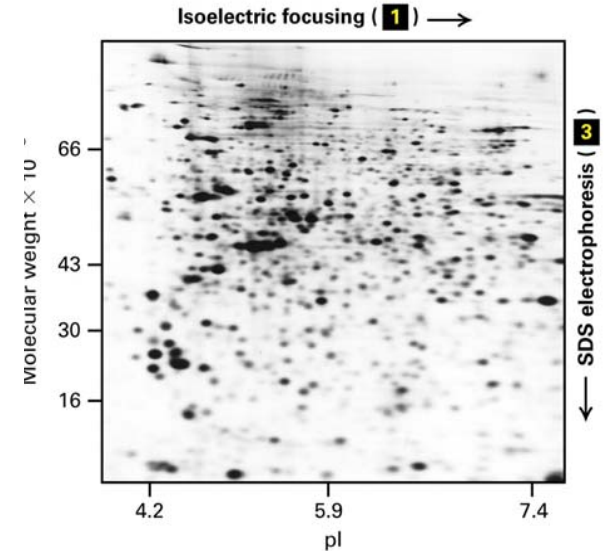
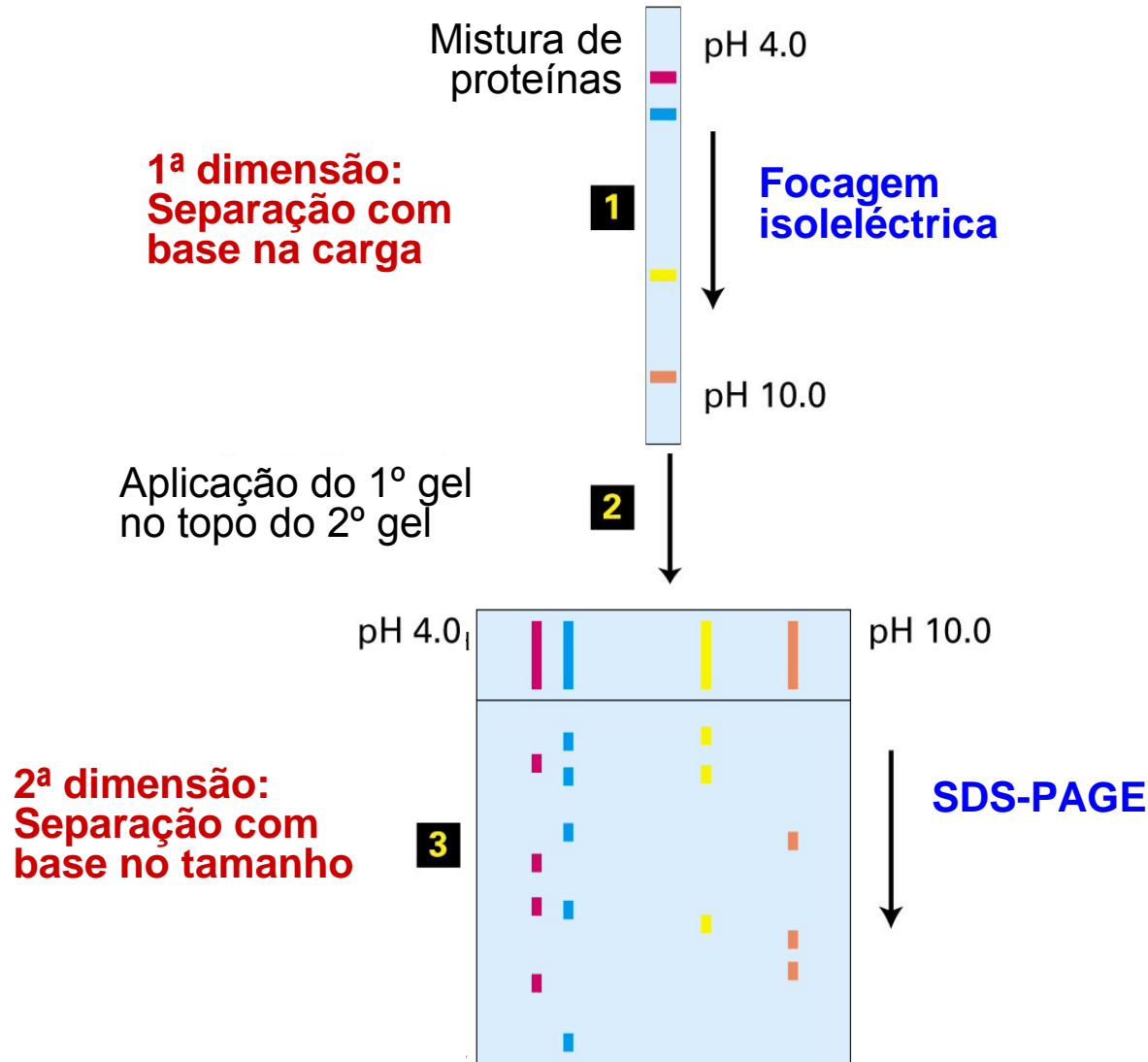
Técnica separativa que permite determinar pontos isoelétricos. Separação com base na carga.



Suporte: gel de anfolinas com gradiente de pH.

As proteínas movem-se até encontrarem uma região do gel em que o pH é igual ao seu ponto isoelétrico (pI).

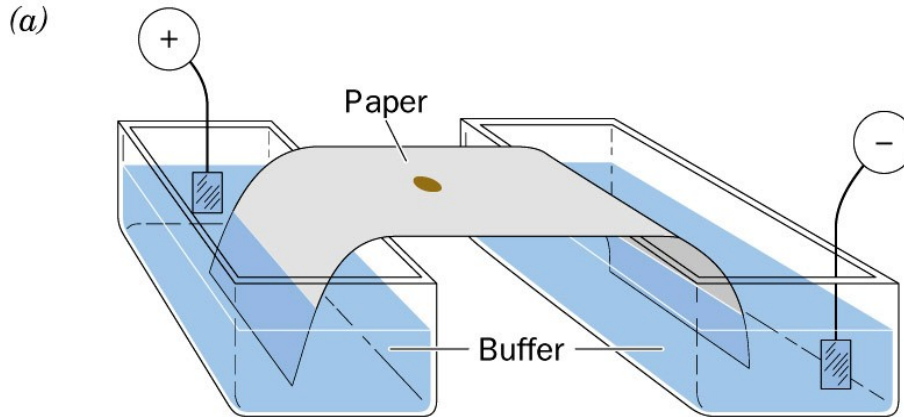
Electroforese bidimensional



A técnica de electroforese 2D é muito utilizada em proteómica: estudo das proteínas que são expressas em determinadas condições numa célula, órgão ou organismo. Ex. Conseguem separar-se mais de 1000 proteínas em *E. coli*.

Electroforese em papel

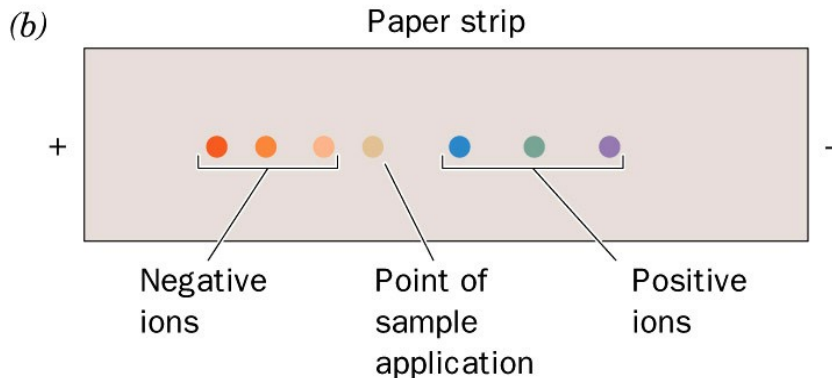
Usada para separar aminoácidos ou péptidos



A amostra é colocada no centro da tira de papel. Este é embebido com o tampão que funciona como electrólito permitindo a passagem da corrente. Os eléctrodos são ligados a uma fonte de tensão.

Os aminoácidos ou péptidos são separados de acordo com as cargas respectivas ao pH do tampão.

Os iões negativos (aniões) deslocam-se em direcção ao ânodo (pólo positivo) e os iões positivos (catiões) deslocam-se em direcção ao cátodo (pólo negativo).



A distância percorrida em relação à origem é proporcional à carga (mas também é afectada pela massa).

Avaliação do progresso da purificação

- **Actividade específica** (aumenta)
- Actividade: Teste específico da proteína que está a ser purificada
- Quantidade total de proteína

- **Visualização das proteínas**
- Electroforese SDS-PAGE



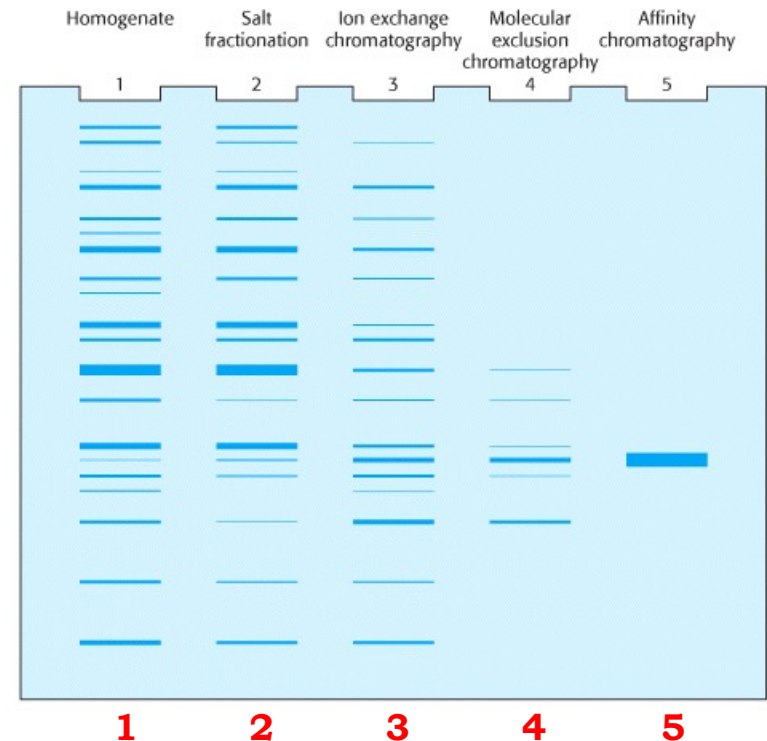
Quantificação de um protocolo de purificação de uma proteína hipotética

passo	proteína total (mg)	actividade total (unid.)	actividade específica (unid.mg ⁻¹)	rendimento (%)	nível de purificação
1 Homogeneização	15000	150000	10	100	1
2 Precipitação fraccionada	4600	138000	30	92	3
3 C. permuta iónica	1278	115500	90	77	9
4 C. filtração em gel	68.8	75000	1100	50	110
5 C. de afinidade	1.75	52500	30000	35	3000

$$\text{actividade específica} = \frac{\text{actividade total}}{\text{proteína total}}$$

$$\text{rendimento} = \frac{\text{activ. total no passo i}}{\text{activ. do extracto bruto}}$$

$$\text{nível de purificação} = \frac{\text{activ. específica no passo i}}{\text{activ. específica do extracto bruto}}$$



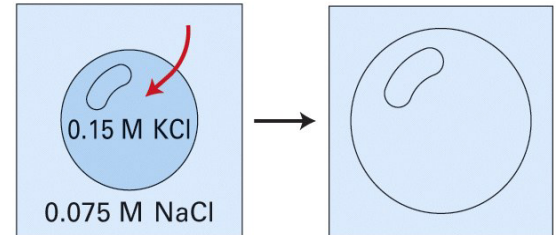
Informação suplementar

Técnicas de desintegração celular

Técnicas suaves

- 1. Lise osmótica** da membrana; diluição das células numa solução hipotónica → difusão da H_2O para o compartimento de maior concentração (interior das células), causando a inchação das células e subsequente rebentamento
ex: isolamento de eritrócitos do sangue
- 2. Lise enzimática**; hidrólise da parede celular (células bacterianas, de plantas ou de fungos) pela lisozima; a membrana é normalmente desintegrada por choque osmótico
- 3. Solubilização química / autólise** da membrana celular por adição de solventes orgânicos (acetona, acetato de etilo, tolueno) ou detergentes → solubilização química (total ou parcial) da membrana; as enzimas líticas libertadas completam o processo
- 4. Homogeneização manual**; as células são forçadas a passar por um orifício muito estreito, partindo a membrana celular
ex: fraccionamento celular de fígado
- 5. Desintegração por ciclos rápidos de congelação / descongelação**; as células são sujeitas a ciclos de congelação rápida em N_2 líquido e descongelamento
ex: lise de células bacterianas; cultura de células de tecidos

(b) Hypotonic medium



Técnicas de desintegração celular

Técnicas moderadas

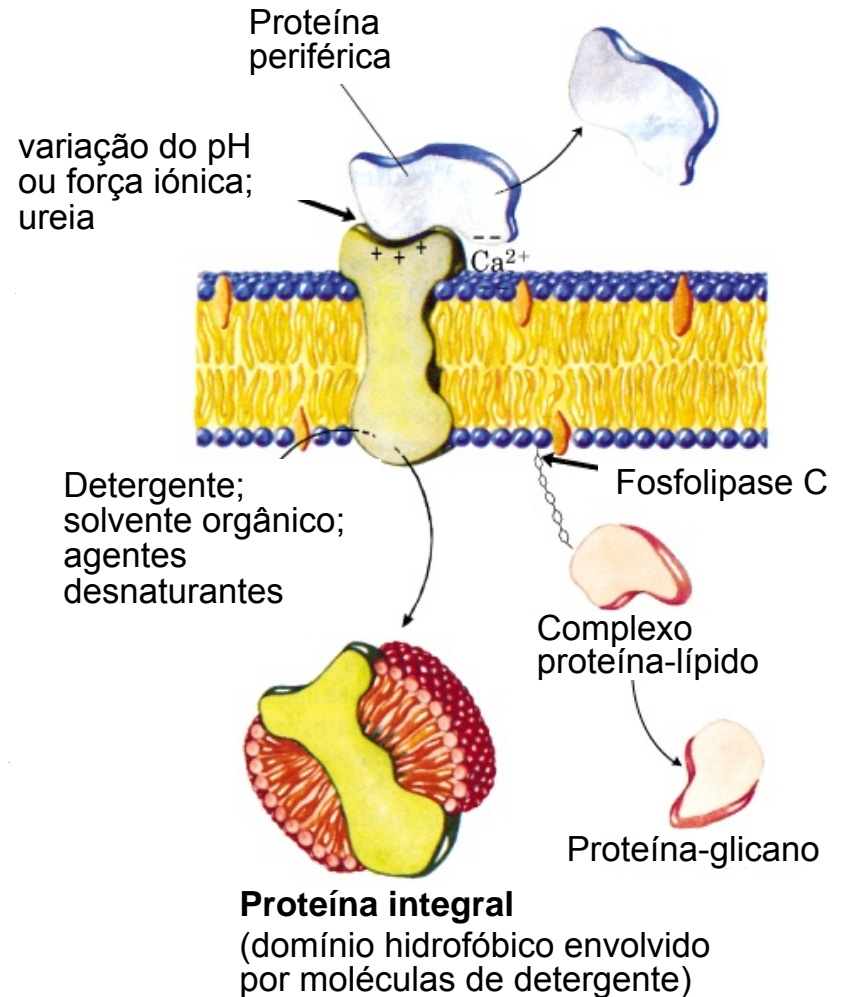
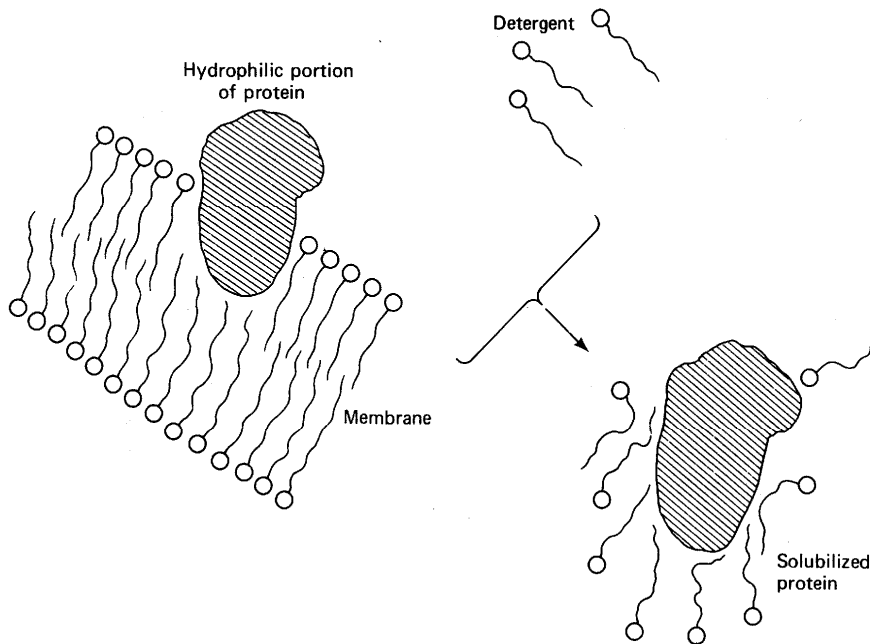
1. **Homegeneizador de lâminas**; a acção de cortar quebra os tecidos e as células
ex: tecidos musculares, tecidos animais e vegetais
2. **Picar o tecido**; as células são partidas por forças de tensão
ex: tecidos musculares

Técnicas vigorosas

3. **Sonicação**; ondas sonoras de alta frequência causam rupturas por forças de tensão / resistência à tracção. Atenção ao sobreaquecimento!
ex: suspensões celulares
4. **“French press”**; as células são forçadas a passar por um orifício sob pressão elevada; as forças de tensão quebram as células
ex: células bacterianas, células vegetais
5. **Moinho de esferas**; vibração rápida com esferas de vidro
ex: suspensões celulares

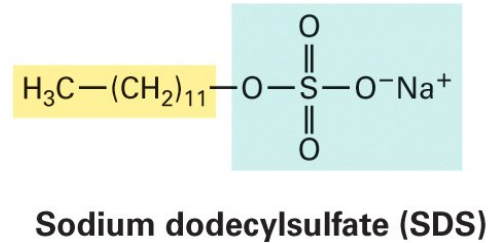
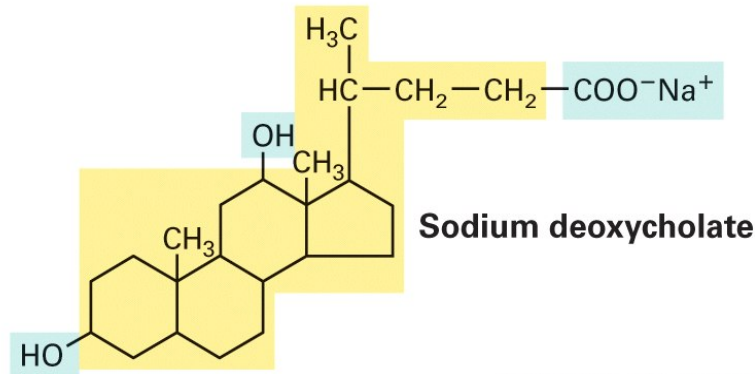
Extracção de proteínas membranares

Adição de detergentes (moléculas anfipáticas) para solubilizar as proteínas membranares (1-3% peso/volume)

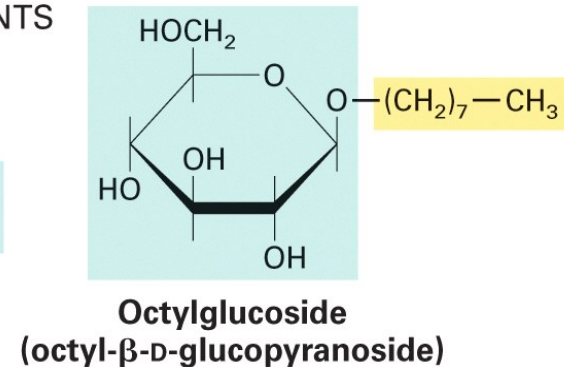
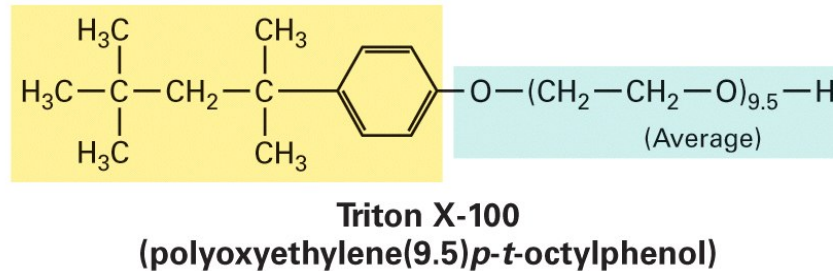


Extracção de proteínas membranares

IONIC DETERGENTS



NONIONIC DETERGENTS



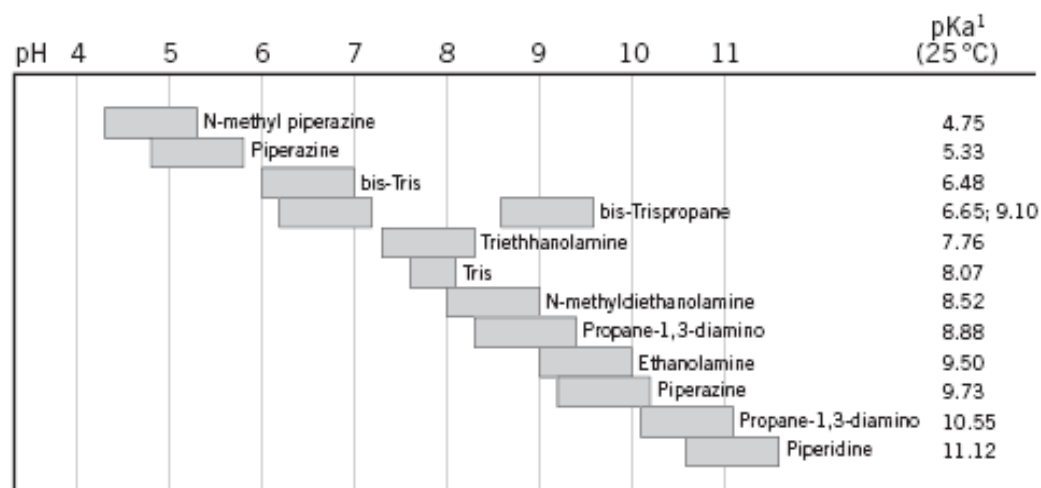
As resinas de permuta iônica de alta resolução

Anion exchangers		Functional group
Quaternary ammonium (Q)	strong	$-O-CH_2N^+(CH_3)_3$
Diethylaminoethyl (DEAE)*	weak	$-O-CH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
Diethylaminopropyl (ANX)*	weak	$-O-CH_2CHOHCH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
Cation exchangers		Functional group
Sulfopropyl (SP)	strong	$-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CH_2CH_2SO_3^-$
Methyl sulfonate (S)	strong	$-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CHOHCH_2SO_3^-$
Carboxymethyl (CM)	weak	$-O-CH_2COO^-$



HPLC
(High Pressure Liquid Chromatography)

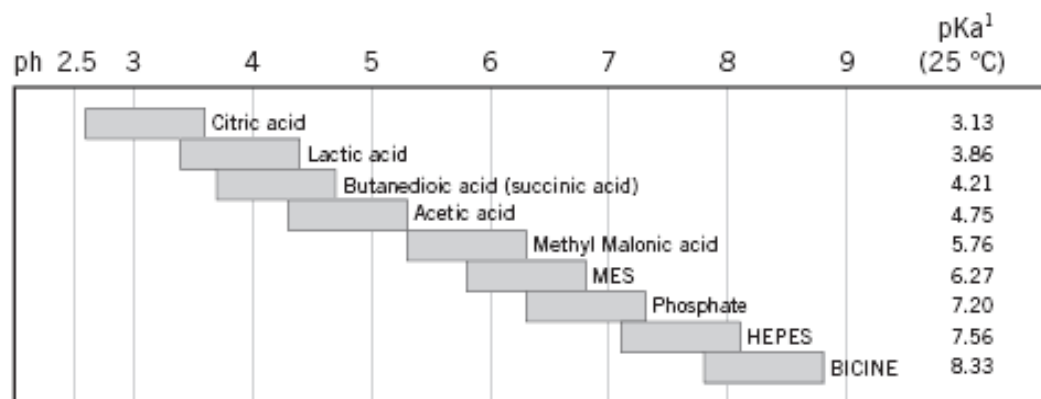
Tampões para separação numa coluna aniónica



pH interval	Substance	Conc. (mM)	Counter-ion	pKa (25 °C) ¹	d(pKa)/dT (°C)
4.3–5.3	N-Methylpiperazine	20	Cl ⁻	4.75	-0.015
4.8–5.8	Piperazine	20	Cl ⁻ or HCOO ⁻	5.33	-0.015
5.5–6.5	L-Histidine	20	Cl ⁻	6.04	
6.0–7.0	bis-Tris	20	Cl ⁻	6.48	-0.017
6.2–7.2; 8.6–9.6	bis-Tris propane	20	Cl ⁻	6.65; 9.10	
7.3–8.3	Triethanolamine	20	Cl ⁻ or CH ₃ COO ⁻	7.76	-0.020
7.6–8.6	Tris	20	Cl ⁻	8.07	-0.028
8.0–9.0	N-Methyldiethanolamine	20	SO ₄ ²⁻	8.52	-0.028
8.0–9.0	N-Methyldiethanolamine	50	Cl ⁻ or CH ₃ COO ⁻	8.52	-0.028
8.4–9.4	Diethanolamine	20 at pH 8.4	Cl ⁻	8.88	-0.025
		50 at pH 8.8			
8.4–9.4	Propane 1,3-Diamino	20	Cl ⁻	8.88	-0.031
9.0–10.0	Ethanolamine	20	Cl ⁻	9.50	-0.029
9.2–10.2	Piperazine	20	Cl ⁻	9.73	-0.026
10.0–11.0	Propane 1,3-Diamino	20	Cl ⁻	10.55	-0.026
10.6–11.6	Piperidine	20	Cl ⁻	11.12	-0.031

¹ Ref: *Handbook of chemistry and physics*, 83rd edition, CRC, 2002–2003.

Tampões para separação numa coluna catiónica



pH interval	Substance	Conc. (mM)	Counter-ion	pKa (25 °C) ¹	d(pKa)/dT (°C)
1.4–2.4	Maleic acid	20	Na ⁺	1.92	
2.6–3.6	Methyl malonic acid	20	Na ⁺ or Li ⁺	3.07	
2.6–3.6	Citric acid	20	Na ⁺	3.13	-0.0024
3.3–4.3	Lactic acid	50	Na ⁺	3.86	
3.3–4.3	Formic acid	50	Na ⁺ or Li ⁺	3.75	+0.0002
3.7–4.7; 5.1–6.1	Succinic acid	50	Na ⁺	4.21; 5.64	-0.0018
4.3–5.3	Acetic acid	50	Na ⁺ or Li ⁺	4.75	+0.0002
5.2–6.2	Methyl malonic acid	50	Na ⁺ or Li ⁺	5.76	
5.6–6.6	MES	50	Na ⁺ or Li ⁺	6.27	-0.0110
6.7–7.7	Phosphate	50	Na ⁺	7.20	-0.0028
7.0–8.0	HEPES	50	Na ⁺ or Li ⁺	7.56	-0.0140
7.8–8.8	BICINE	50	Na ⁺	8.33	-0.0180

¹ Ref: *Handbook of chemistry and physics*, 83rd edition, CRC, 2002–2003.

Valores de pI de algunas proteínas

Protein	Isoelectric pH
Pepsin	<1.0
Ovalbumin (hen)	4.6
Serum albumin (human)	4.9
Tropomyosin	5.1
Insulin (bovine)	5.4
Fibrinogen (human)	5.8
γ -Globulin (human)	6.6
Collagen	6.6
Myoglobin (horse)	7.0
Hemoglobin (human)	7.1
Ribonuclease A (bovine)	7.8
Cytochrome c (horse)	10.6
Histone (bovine)	10.8
Lysozyme (hen)	11.0
Salmine (salmon)	12.1

Cromatografia de filtração em gel: os géis

– Alguns géis de filtração comerciais:

Nome	Tipo	Gama de separação (kDa)
Sephadex G-10	Dextran	0.05 – 0.7
Sephadex G-25	Dextran	1 – 5
Sephadex G-50	Dextran	1 – 30
Sephadex G-100	Dextran	4 – 150
Sephadex G-200	Dextran	5 – 600
Bio-Gel P-2	Poliacrilamida	0.1 – 1.8
Bio-Gel P-62	Poliacrilamida	1 – 6
Bio-Gel P-10	Poliacrilamida	1.5 – 20
Bio-Gel P-30	Poliacrilamida	2.4 – 40
Bio-Gel P-100	Poliacrilamida	5 – 100
Bio-Gel P-300	Poliacrilamida	60 – 400
Sepharose 6B	Agarose	10 – 4,000
Sepharose 4B	Agarose	60 – 20,000

Product	Fractionation range, M_r (globular proteins)
Superdex Peptide PC 3.2/30	$1 \times 10^2 - 7 \times 10^3$
Superdex Peptide HR 10/30	$1 \times 10^2 - 7 \times 10^3$
HiLoad 16/60 Superdex 30 pg*	$< 1 \times 10^4$
HiLoad 26/60 Superdex 30 pg*	$< 1 \times 10^4$
Superdex 30 pg*	$< 1 \times 10^4$
Superdex 75 PC 3.2/30	$3 \times 10^3 - 7 \times 10^4$
Superdex 75 HR 10/30	$3 \times 10^3 - 7 \times 10^4$
HiLoad 16/60 Superdex 75 pg*	$3 \times 10^3 - 7 \times 10^4$
HiLoad 26/60 Superdex 75 pg*	$3 \times 10^3 - 7 \times 10^4$
Superdex 75 pg*	$3 \times 10^3 - 7 \times 10^4$
Superdex 200 PC 3.2/30	$1 \times 10^4 - 6 \times 10^5$
Superdex 200 HR 10/30	$1 \times 10^4 - 6 \times 10^5$
HiLoad 16/60 Superdex 200 pg*	$1 \times 10^4 - 6 \times 10^5$
HiLoad 26/60 Superdex 200 pg*	$1 \times 10^4 - 6 \times 10^5$
Superdex 200 pg*	$1 \times 10^4 - 6 \times 10^5$

Cromatografia de filtração em gel: os géis (cont.)

- Mais géis de filtração comerciais para acoplamento a HPLC:

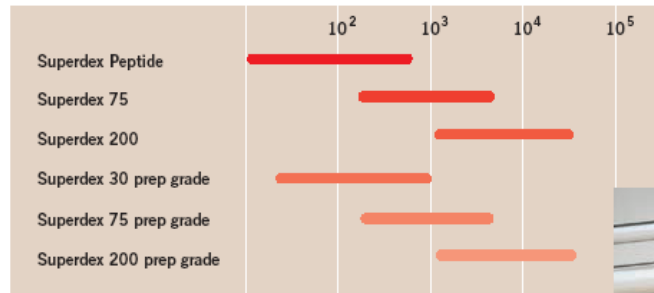


Fig. 17. Fractionation ranges for Superdex.



- Gel *Superdex* com as cadeias de dextrano covalentemente ligadas a uma matriz de agarose:

