



# **Aula 16**

## **Métodos de separação: Cromatografia e eletroforese**

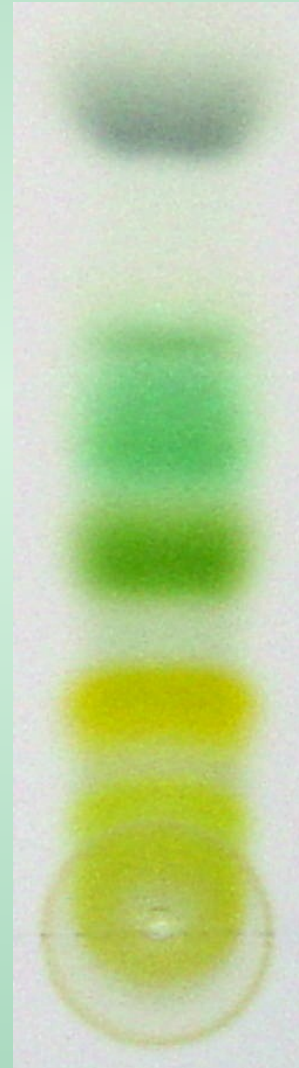
---

**Jiří Borecký  
CCNH  
2014**



# Cromatografia - princípio

- Etimologia: χρῶμα (khroma, “cor”) + γράφω (grafein, “descrever”)
- Metodologia que usa movimento de partículas dissolvidas em *fase móvel* (fluido) que passa pela *fase estacionária* (matriz sólida).
- Partículas tem velocidade afetada pela interação com a fase estacionária (coeficiente de partição fases *móvel*/*estacionária*).
- Interações:
  - Hidrofóbica
  - Afinidade
  - Exclusão
  - Iônica
  - Adsorção
  - Quiralidade



➤ Cromatografia em camada fina de pigmentos de planta que deu nome à técnica



# Cromatografia – princípio

## Métodos de separação

### ➤ Forma da fase estacionária:

- Coluna

- Cromatografia líquida
- Cromatografia gasosa
- Cromatografia supercrítica

<http://www.chromatography-online.org/TLC/contents.html>

- Planar

- Cromatografia de papel
- Cromatografia da camada delgada (TLC – *thin layer chromatography*)

### ➤ Processo de separação:

- Troca iônica
- Troca de elétrons - redox
- Exclusão de tamanho (filtração em gel)
- Afinidade química específica
- Fase reversa
- Cromatofocalização

### ➤ Condições

- Cromatografia 2D (combinação de duas)
- Pressão alta (HPLC, supercrítica)

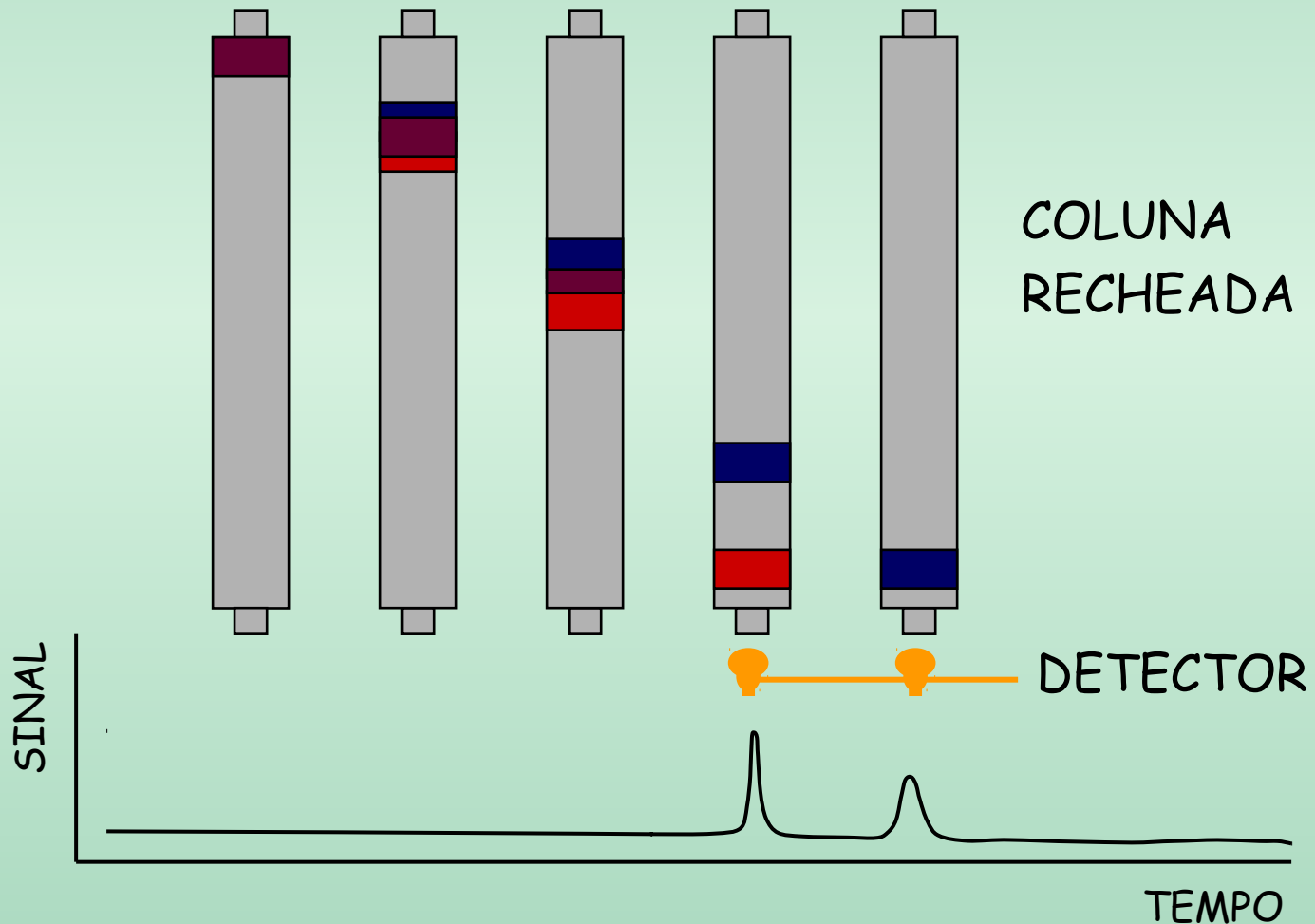


Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

# Cromatografia líquida

Métodos de separação



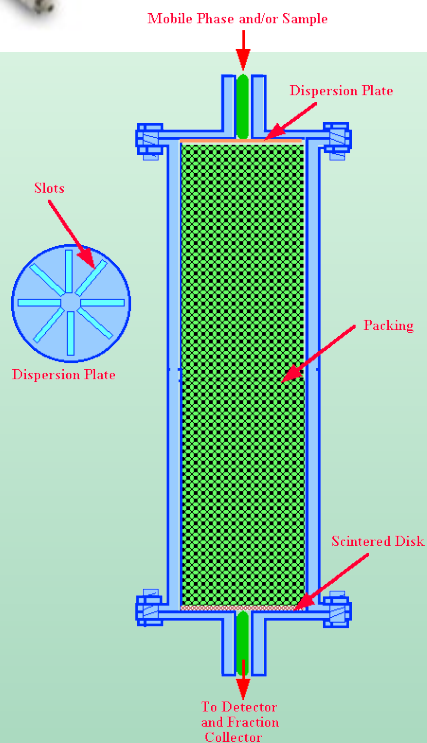
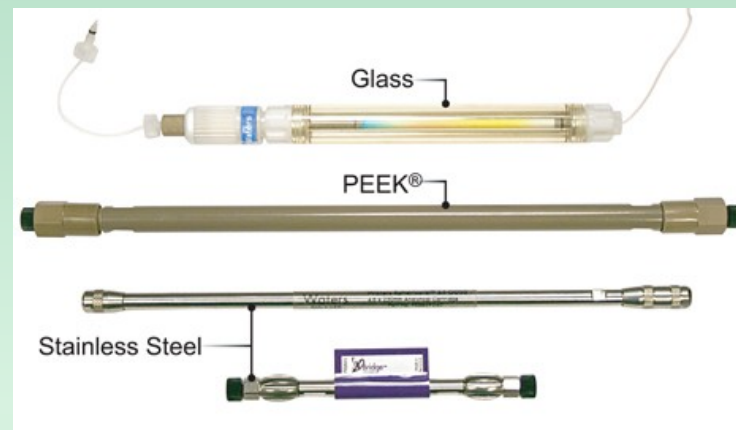


Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

# Cromatografia líquida - colunas

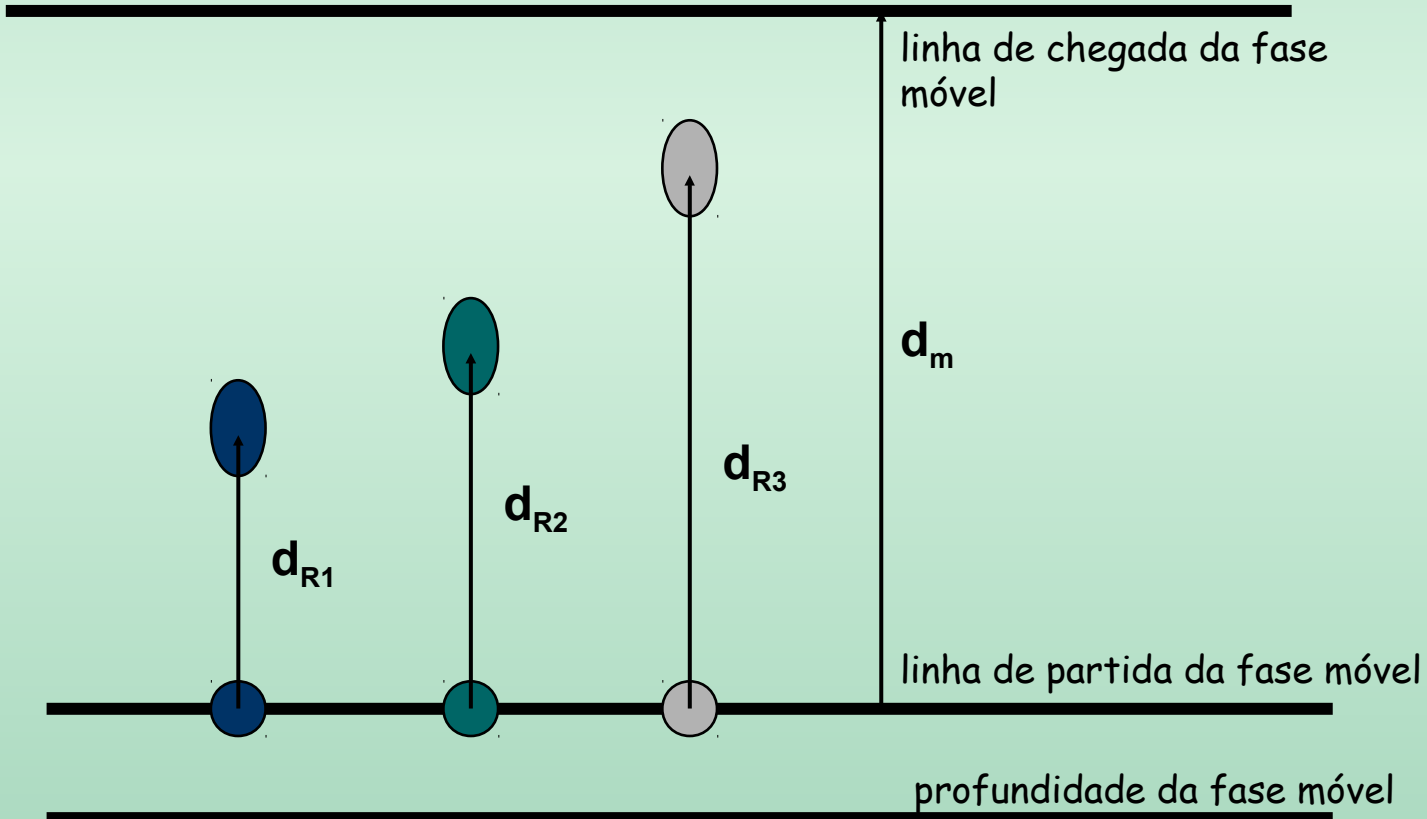
Métodos de separação





# Cromatografia planar

- Compostos são arrastados pelo avanço da fase móvel através da capilaridade e separados pela polaridade deles
- Fase móvel é uma mistura de solventes (ex: acetona, metanol e água)



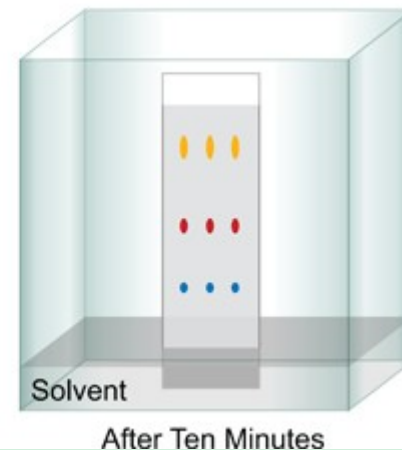
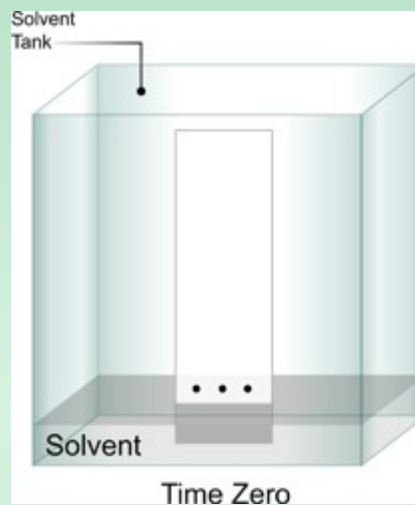
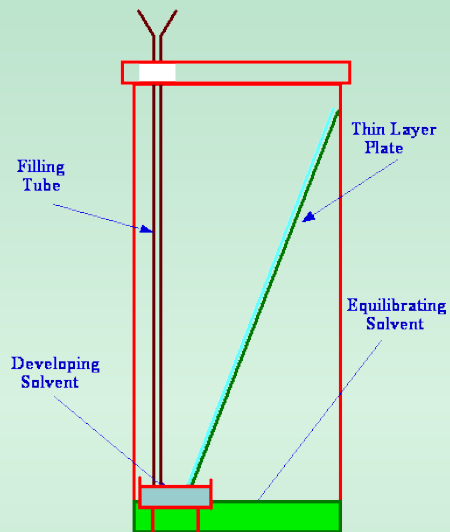


Universidade Federal do ABC

**BC-1308 Biofísica**

# Cromatografia planar - arranjos

**Métodos de separação**







# Cromatografia – Tipos de separação

## **Métodos de separação**

- Adsorção
- Partição
- Troca iônica
- Troca de elétrons - redox
- Exclusão de tamanho (filtração em gel)
- Afinidade química específica
- Fase reversa (fase estacionária menos hidrofílica – fase móvel mais hidrofílica)
- Fase normal (fase estacionária mais hidrofílica – fase móvel menos hidrofílica)
- Cromatofocalização





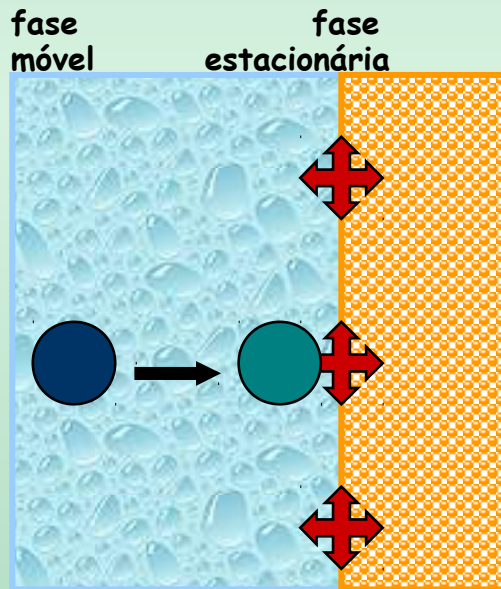
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

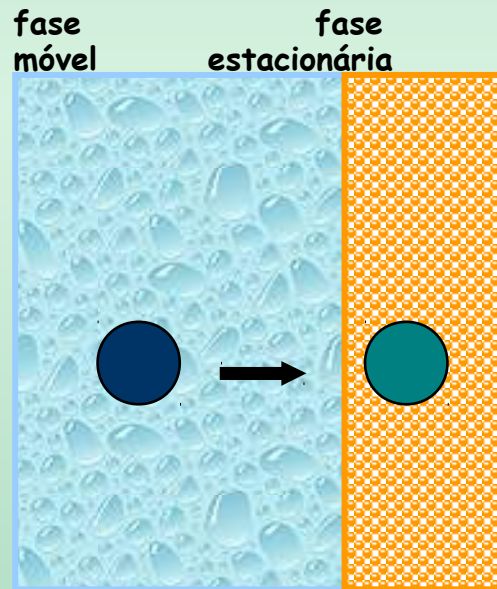
# Cromatografia – mecanismo de separação

Métodos de separação

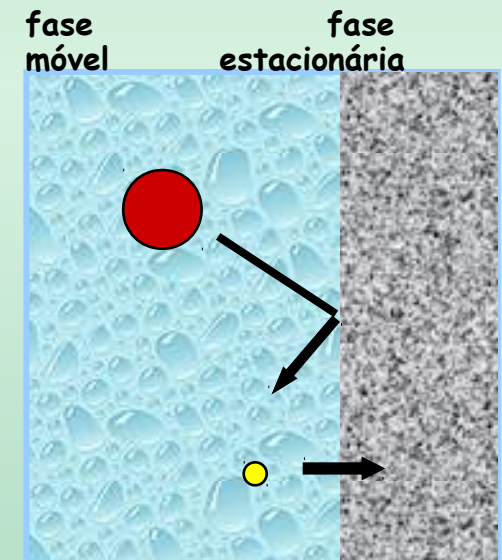
## ADSORÇÃO



## PARTIÇÃO



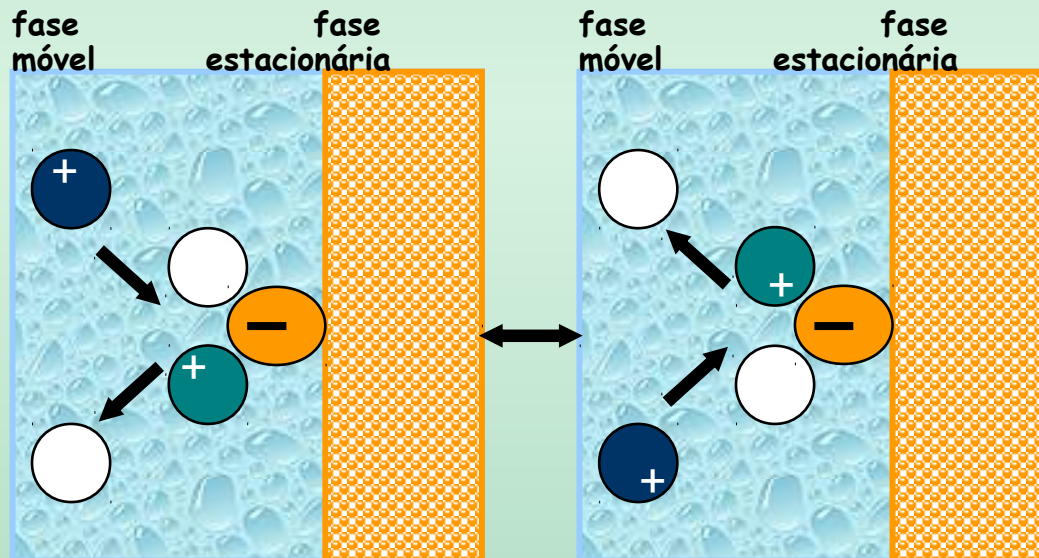
## EXCLUSÃO



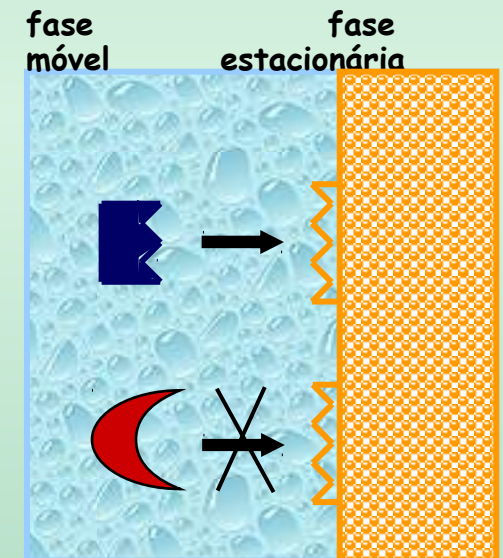


# Cromatografia – mecanismo de separação

## TROCA IÔNICA



## BIOAFINIDADE





# Cromatografia – tempo de retenção e coeficiente de partição

➤ velocidade linear média da amostra  $v = \frac{L}{t_R}$

➤ velocidade linear média do solvente  $u = \frac{L}{t_0}$

$$v = u \frac{C_M V_M}{C_M V_M - C_S V_S} = u \frac{1}{1 - \frac{C_S V_S}{C_M V_M}}$$

➤ Coeficiente de partição

$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad v = u \frac{1}{1 - K \frac{V_S}{V_M}}$$

➤ Coeficiente de separação de soluto A do B

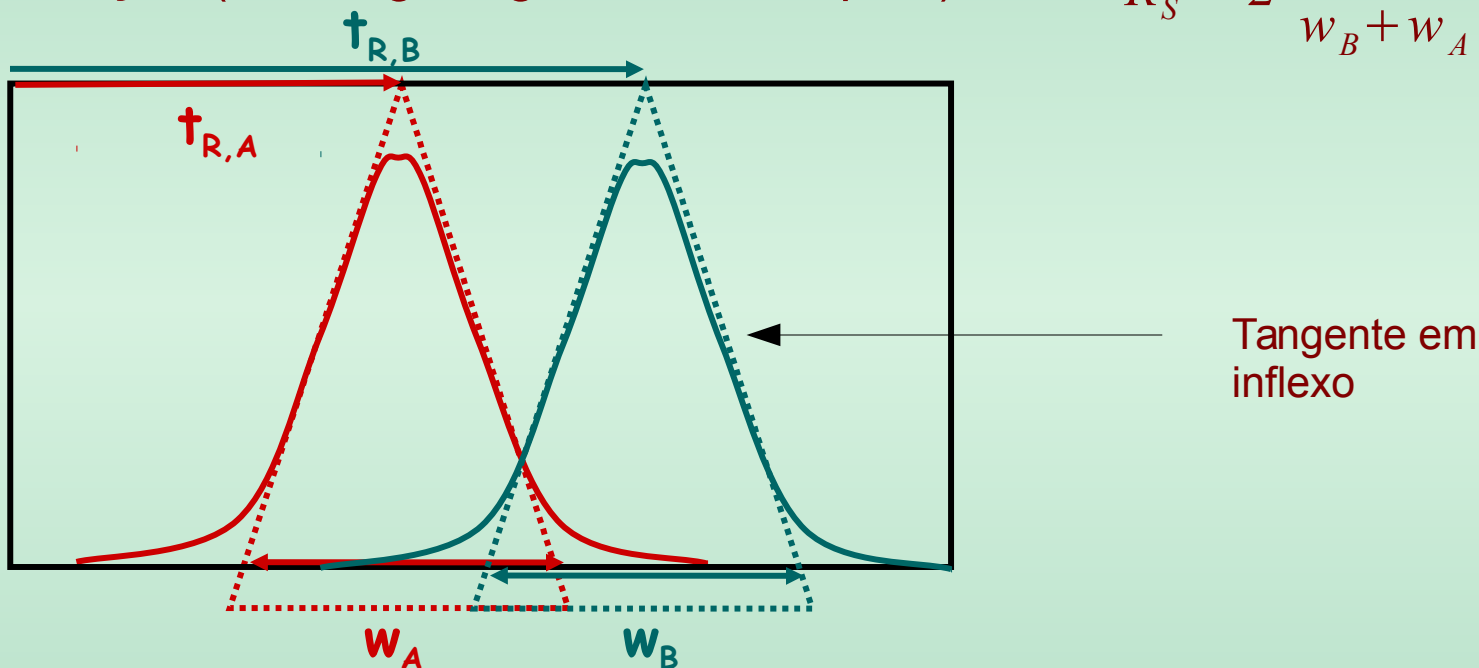
$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{t_{R,B} - t_0}{t_{R,A} - t_0}$$



# Cromatografia – resolução de coluna

➤ Definição ( $w$  – largura gaussiana do pico)

$$R_S = 2 \frac{t_{r,B} - t_{r,A}}{w_B + w_A}$$



➤ Outras formas (solutos com abundância [altura do pico] diferente):




- Comparação com curvas de resolução
- Cálculo baseado na altura do vale entre os 2 picos



# Cromatografia – resolução de coluna

➤ definição

$$R_s = \sqrt{\frac{N}{4}} \quad (1 - \alpha) \quad \frac{k}{1 + k}$$

**eficiência**      **separação**      **retenção**

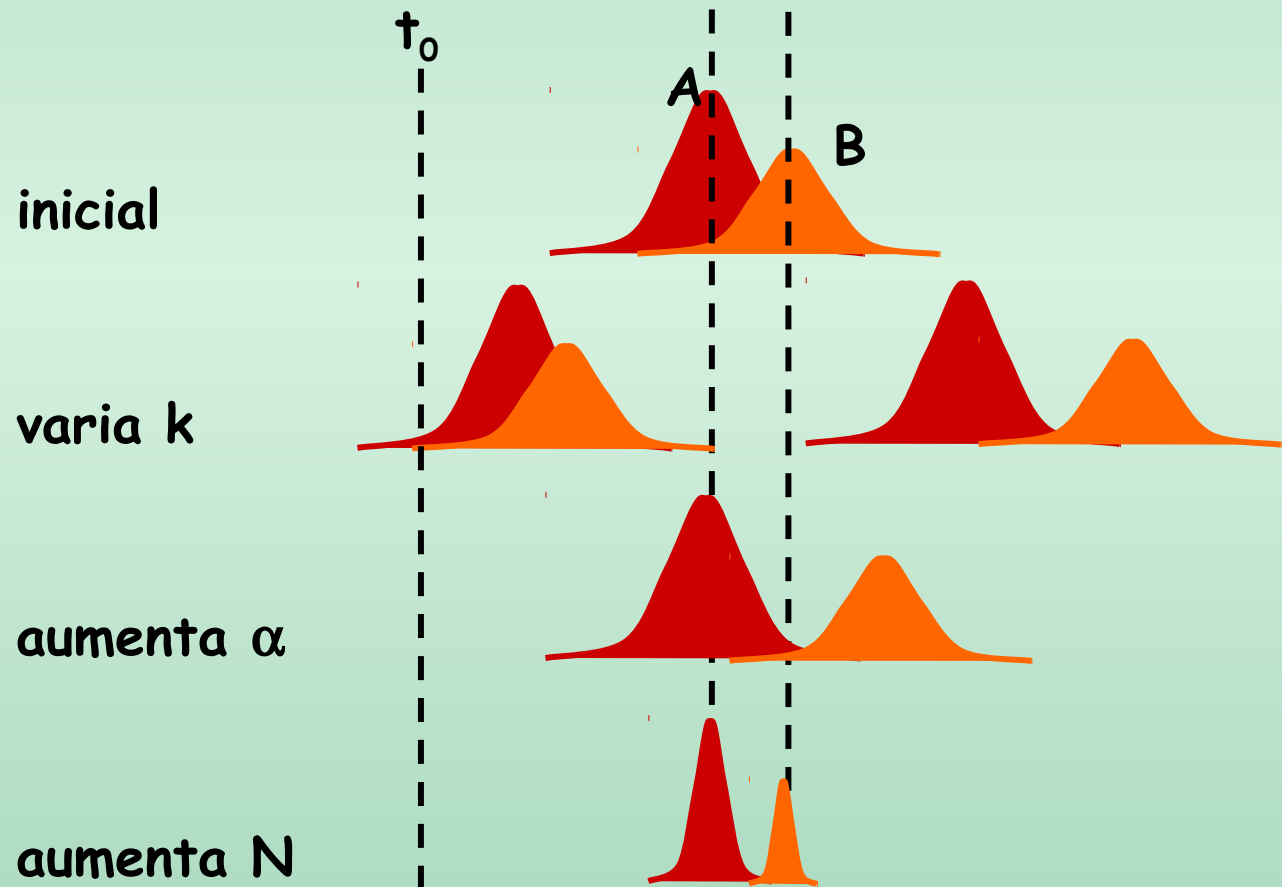
**k** e **α**: são determinados por condições que afetam retenção e equilíbrio de distribuição da amostra entre fase móvel e estacionária – **composição da fase móvel; composição da fase estacionária; temperatura**

**N**: número de pratos teóricos que depende da qualidade da coluna; varia com as condições instrumentais – **vazão da fase móvel; comprimento da coluna; tamanho da partícula**



# Cromatografia – resolução de coluna

➤ Resolução de coluna depende das condições





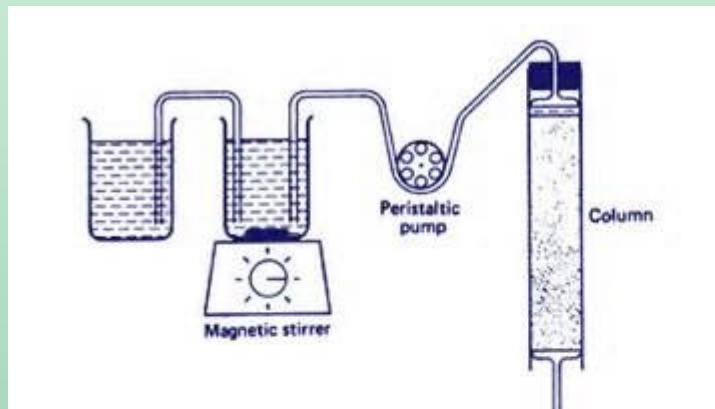


# Cromatofocalização

## Métodos de separação

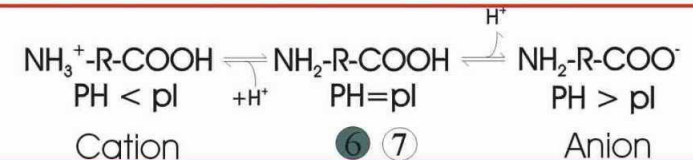
### ➤ Experimento:

- Coluna contém uma resina com uma mistura covalentemente ligada de moléculas tamponantes de pK variadas em faixa de pH (6-9, 4-7 ou 8-11) – *polybuffer exchanger*
- Coluna é equilibrada com tampão de pH inicial
- Aplica-se amostra em tampão de pH inicial
- Elução é feita com gradiente de pH misturando 2 tampões com pH inicial e final (os dois contêm – *polybuffer*)
- compostos/proteínas da amostra são eluídos pelo seu pI (menor ligação com a coluna!)

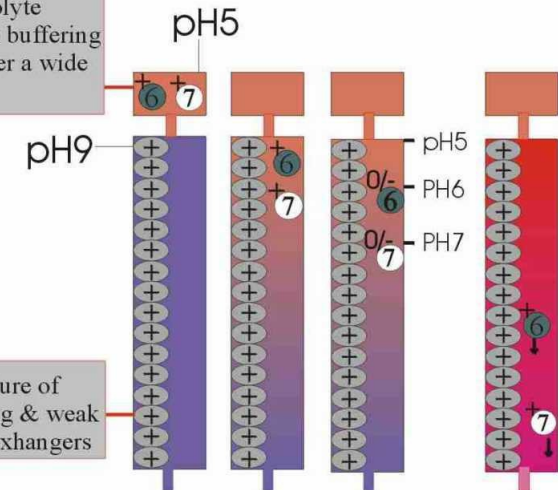


### Chromatofocusing

Separation based on pI.



**Polybuffer**  
 -Polyampholyte  
 -Gives even buffering capacity over a wide pH range

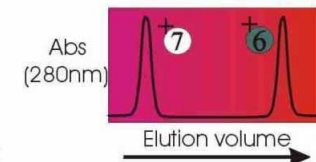


### Advantages

- 1) Highly resolving  
0.02pH Units

### Disadvantages

- 1) Proteins precipitate more easily at pI
- 2) Low salt concentrations used can induce aggregation  
-detergent addition can help







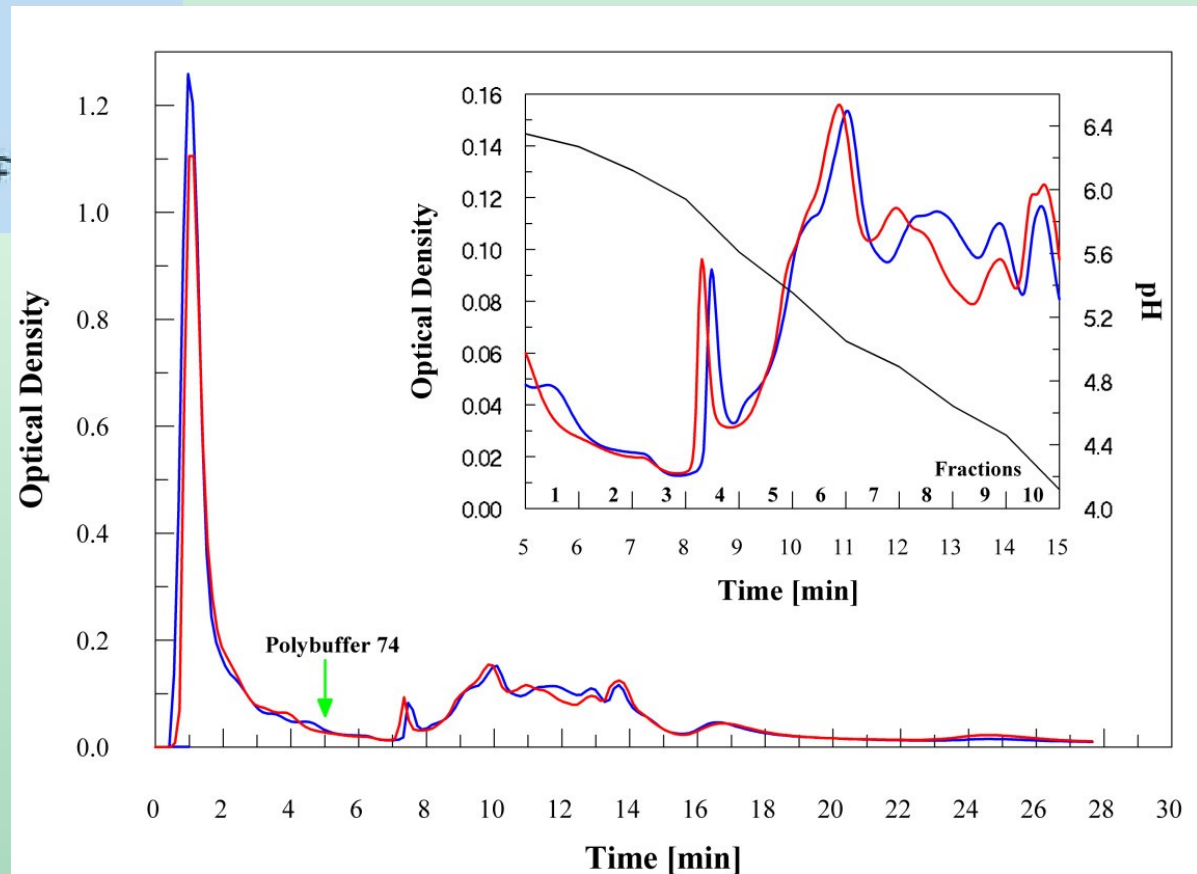
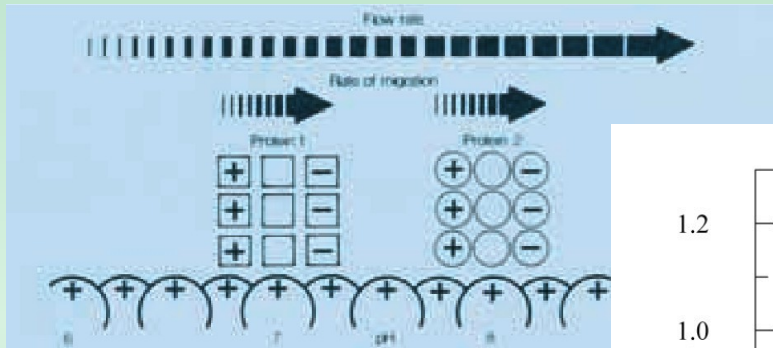
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

# Cromatofocalização

Métodos de separação

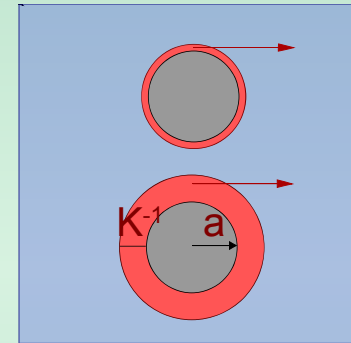
## ➤ Processo de focalização e cromatograma da eluição





# Eletroforese - princípio

- Etimologia: ἤλεκτρον (ēlektron) + φόρησις (foresis) "sendo levado," de φέρω (ferein) "carregar"
- Metodologia que usa movimento de partículas com carga  $q$  no campo elétrico  $E$  que exerce força eletrostática  $F_{el}$ .
- O fluido retarda o movimento com força de fricção  $F_f$  (coeficiente de fricção  $f$ ) e com força de retardação eletroforética (fator  $K$ , reverso a espessura de camada difusa)
- Movimento estável com velocidade  $v$  de partícula esférica no fluido com viscosidade  $\eta$ :



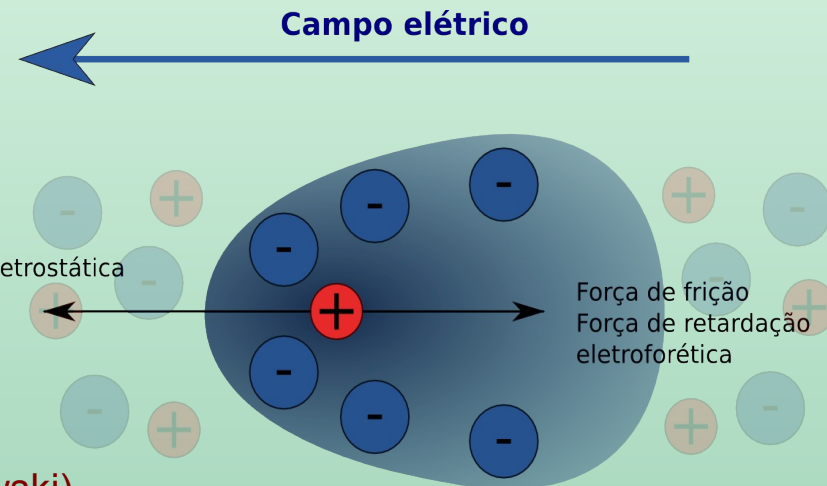
$$F_{el} = qE = F_f = f v$$

$$v = \frac{qE}{F_f} = \frac{zeEK}{6\pi\eta a}$$

- Mobilidade eletroforética  $u$  é dada por:

$$u = \frac{v}{E} = \frac{zeK}{6\pi\eta a} = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta}$$

(Smoluchowski)





# Elektroforese – Tipos

## Métodos de separação

### ➤ Elektroforese de proteínas

- Descontínua em poliacrilamida
  - Desnaturando – com SDS – dodecilsulfato de sódio com carga negativa (SDS-PAGE) - com  $\beta$ -mercaptoetanol (separação de subunidades por redução de pontes S-S)
  - Desnaturando – com CTAB – cetiltrimetilamonium brometo com carga positiva (CTAB-PAGE)
  - Nativa – sem detergente/redutor
- Contínua com gradiente do gel
- Contínua em amida parcialmente digerida (só nativa)
- Focalização isoelétrica (IEF)

### ➤ Elektroforese de DNA/RNA

- Contínua em agarose
- Contínua em poliacrilamida

### ➤ Elektroforese 2D

- Combinação de dois de: SDS-PAGE, CTAB-PAGE, IEF e Blue-native (com/sem ácido caprílico)

### ➤ Dielektroforese, Isotachoforese, etc.



# Uso de *stacking gel* em eletroforese descontínua

## Métodos de separação

### ➤ Aumento de resolução - uso de um sistema de tampões descontínuo

- Focalização inicial:

- *Stacking gel* – contém  $\text{Cl}^-$  → íon com mobilidade maior que as proteínas (*leading ion* – íon líder)
- Tampão de eletroforese – contém Gly “não ionizado” (zwitteríon. pH ~6,8) → íon com mobilidade menor que as proteínas (*trailing ion* – íon terminal)
- Na interfase existe uma diferença entre potenciais eletroquímicos (de  $\text{Cl}^-$  é o maior, de Gly é o menor)
- No gel de densidade baixa (3%), as moléculas de proteínas são obrigadas migrar entre os dois íons → estreitamento/focalização de bandas até espessura de micrômetros

- Separação:

- Gel de separação tem pH mais alto (pH 8,8) → Gly “se ioniza” (ânion) e efeito de focalização é desfeito
- No gel de densidade alta (6-20%), as moléculas de proteínas são obrigadas migrar pelo tamanho (menores – mais rápido)



Fonte: Bio-Rad

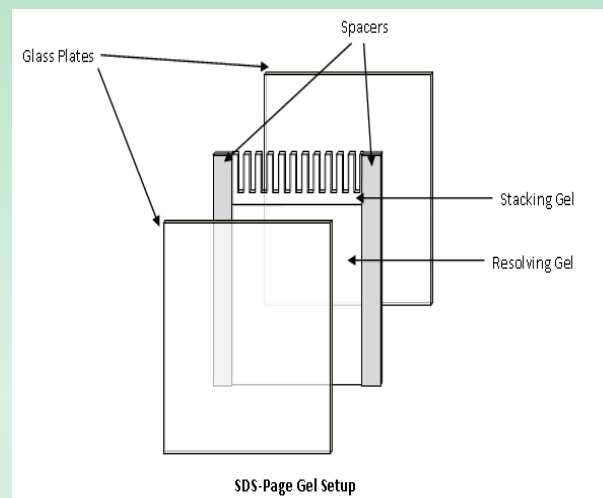


# Preparo do gel de poliacrilamida

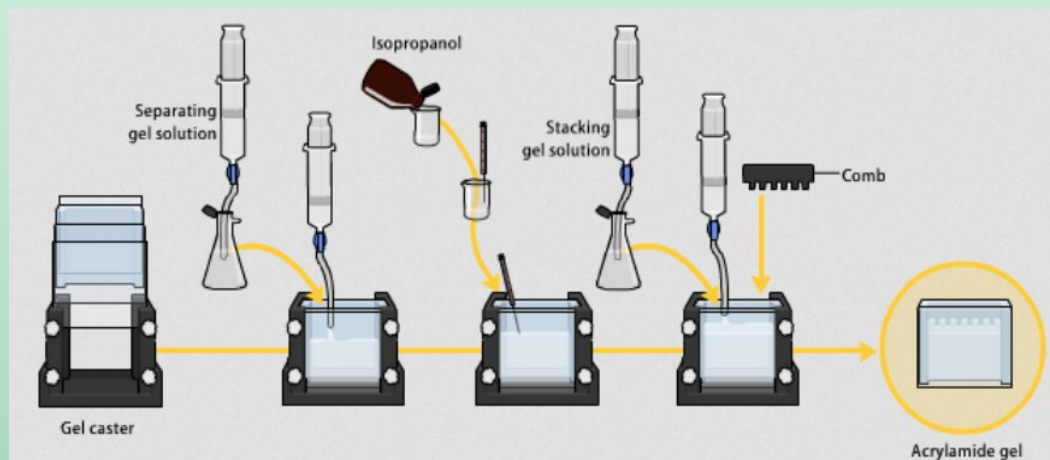
## Métodos de separação

➤ Exemplo de mistura para um gel de resolução padrão 10% - mini-gel para SDS-PAGE.

- 7,5 mL acrilamida 40%
- 3,9 mL bisacrilamida 1%
- 7,5 mL Tris•HCl 1.5 M, pH 8.7
- Completar com água para 30 mL
- 0,3 mL SDS 10%
- 0,003 mL  $\beta$ -mercaptoetanol (reduzidor de pontes S-S)
- 0,03 mL TEMED (catalisador de polimerização)
- 0,3 mL 10% APS (persulfato de amônia; iniciador radical de polimerização)



SDS-Page Gel Setup

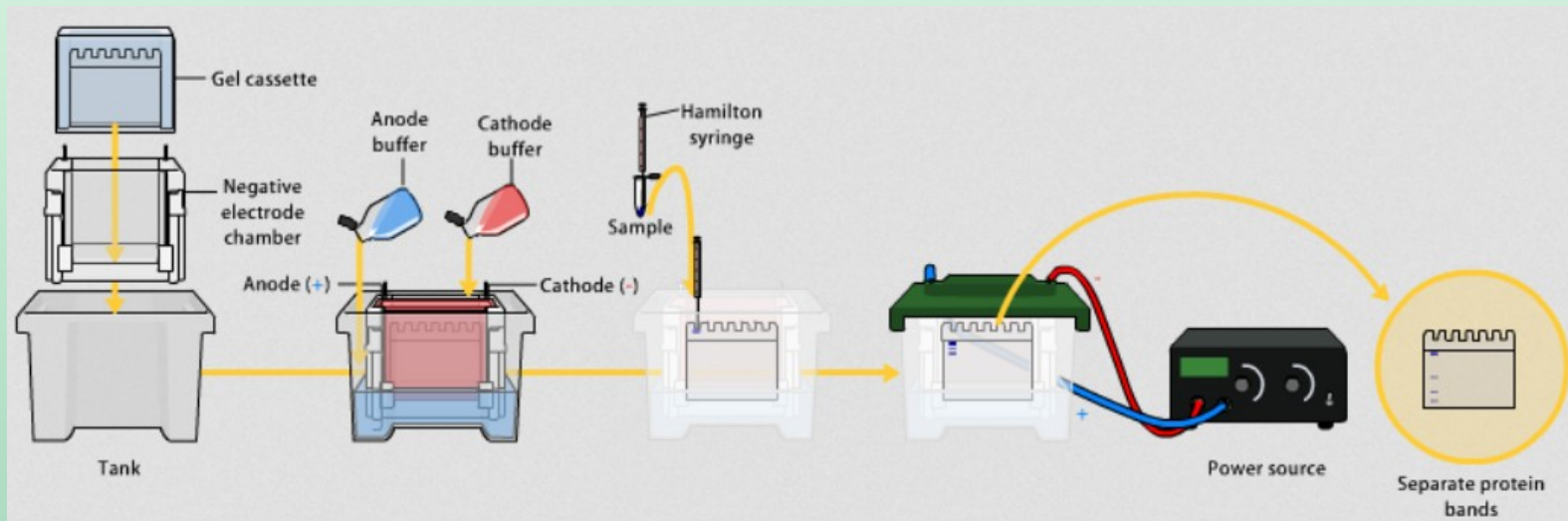






# Loading do gel de poliacrilamida

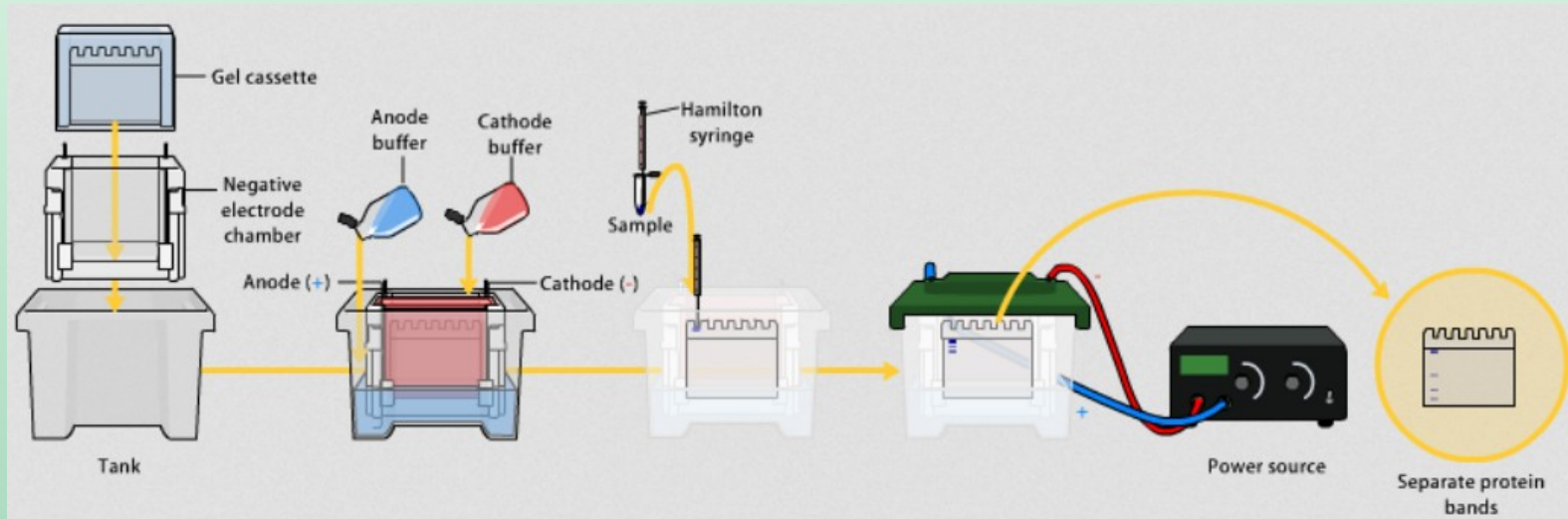
- Gel é inserido no aparelho com eletrodos
  - Tampões de anodo e catodo são adicionados
  - Retirada de pente para formar poços
  - Amostras e padrão de  $M_w$  são adicionados com a seringa Hamilton
- Hamilton





# Corrida do gel de poliacrilamida

- Aparelho da eletroforese é fechado com a tampa de segurança
- Eletrodos são ligados com fonte
- Gel de poliacrilamida é exposto ao campo elétrico → **corrente constante** ( $\sim 0,15 \text{ mA/mm}^2$  –  $\sim 10 \text{ mA/minigel } 11 \text{ cm} \times 0,6 \text{ mm}$ ) - resistência aumenta com tempo → voltagem decresce







Universidade Federal do ABC

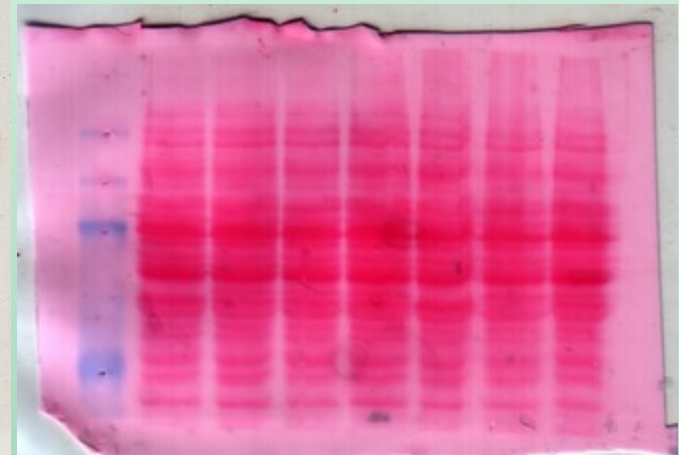
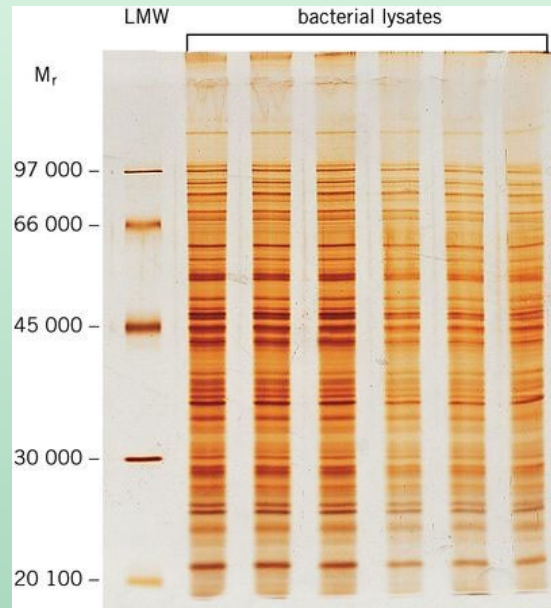
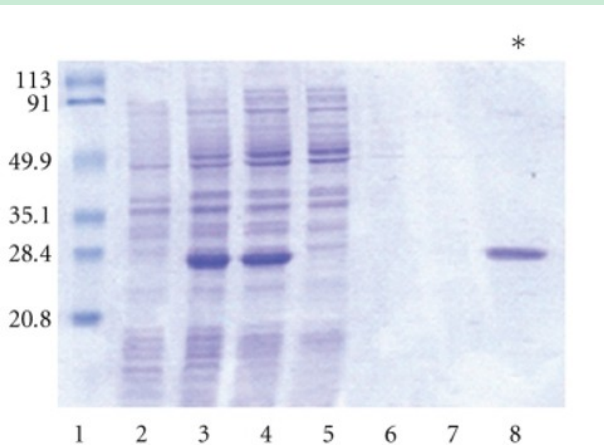
BC-1308 Biofísica

# Detecção das proteínas separadas no gel de poliacrilamida

Métodos de separação

## ➤ Coreantes:

- Azul de Coomassie (definitiva, destrutiva)
- Prata coloidal (definitiva, parcialmente destrutiva, mais sensível)
- Ponceau 2R, 4R, 6R, S, SX (temporária)
- KCl 150 mM a 0°C (coloração temporária não destrutiva)

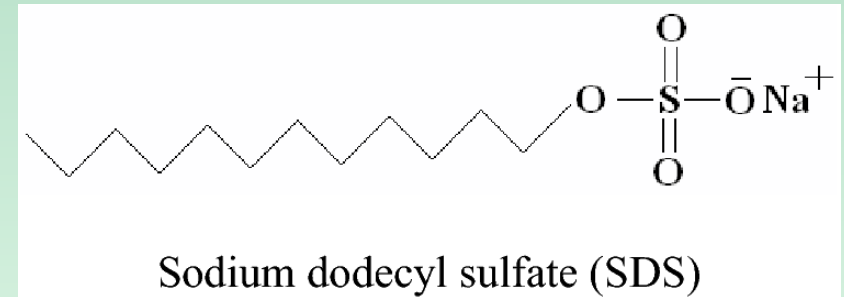




# Efeito de surfactantes

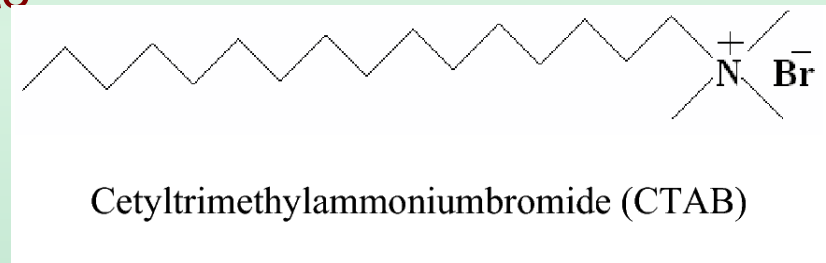
## ➤ SDS – dodecilsulfato de sódio

- Surfactante negativo (CMC alta)
- Separa subunidades
- Lineariza polipeptídeos
- Dá carga uniforme do peptídeo



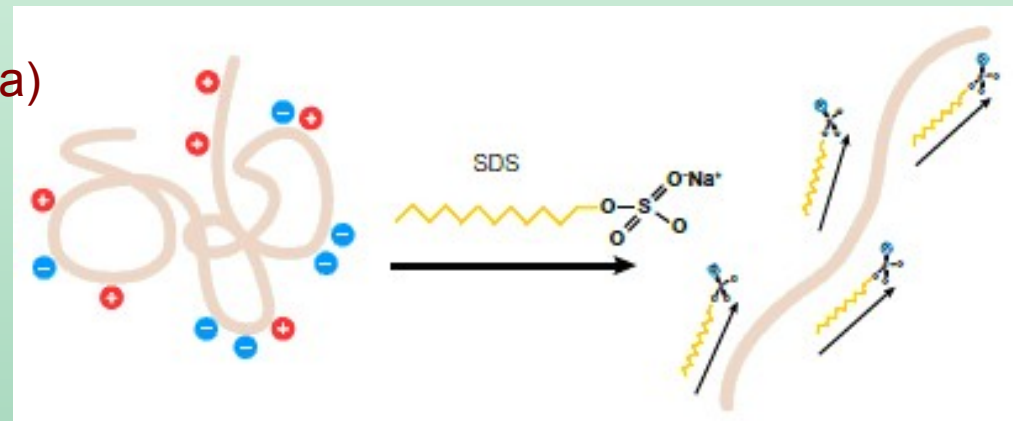
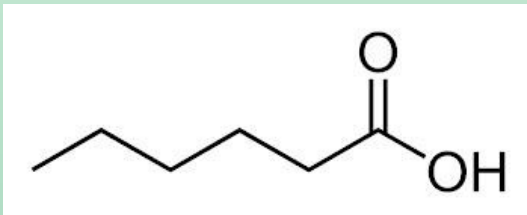
## ➤ CTAB – cetiltrimetilamônio brometo

- Surfactante positivo (CMC alta)
- Separa subunidades
- Lineariza polipeptídeos
- Dá carga uniforme do peptídeo



## ➤ Ácido capróico

- Surfactante negativo (CMC baixa)

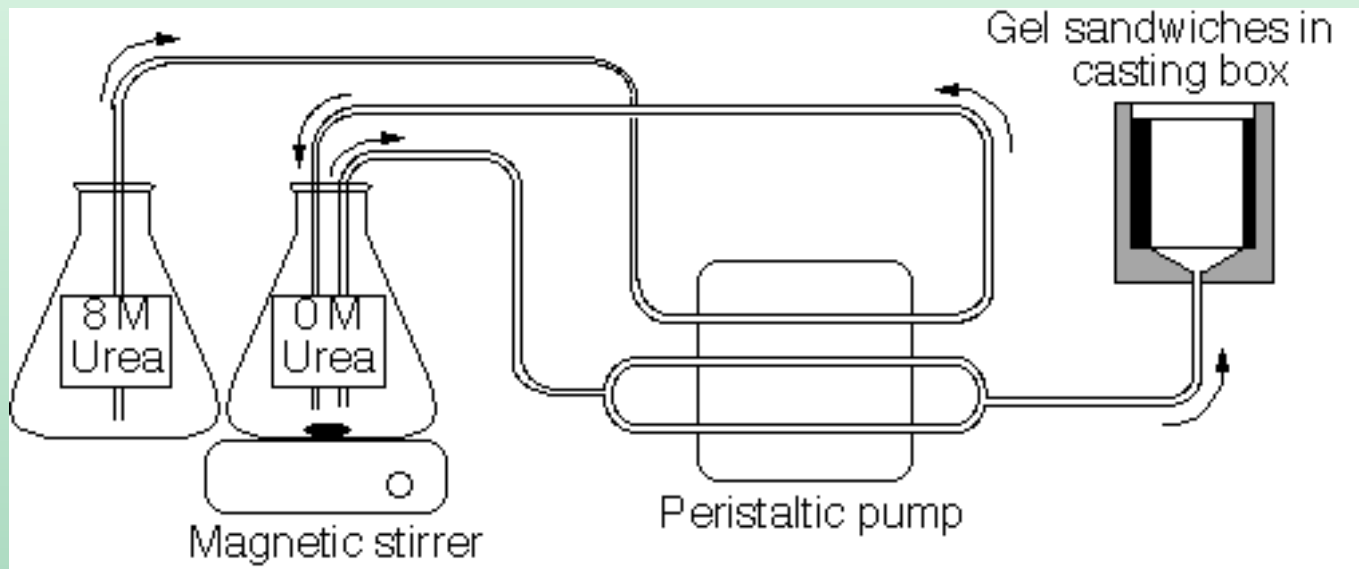




# Eletroforese de proteína

## ➤ Gel com gradiente

- Pode ter mas não precisa o *stacking gel*
- Melhor resolução das bandas
- Ampla faixa de tamanhos de proteínas
- Difícil fazer homogêneo e linear (tempo de preenchimento vs. Tempo de polimerização)





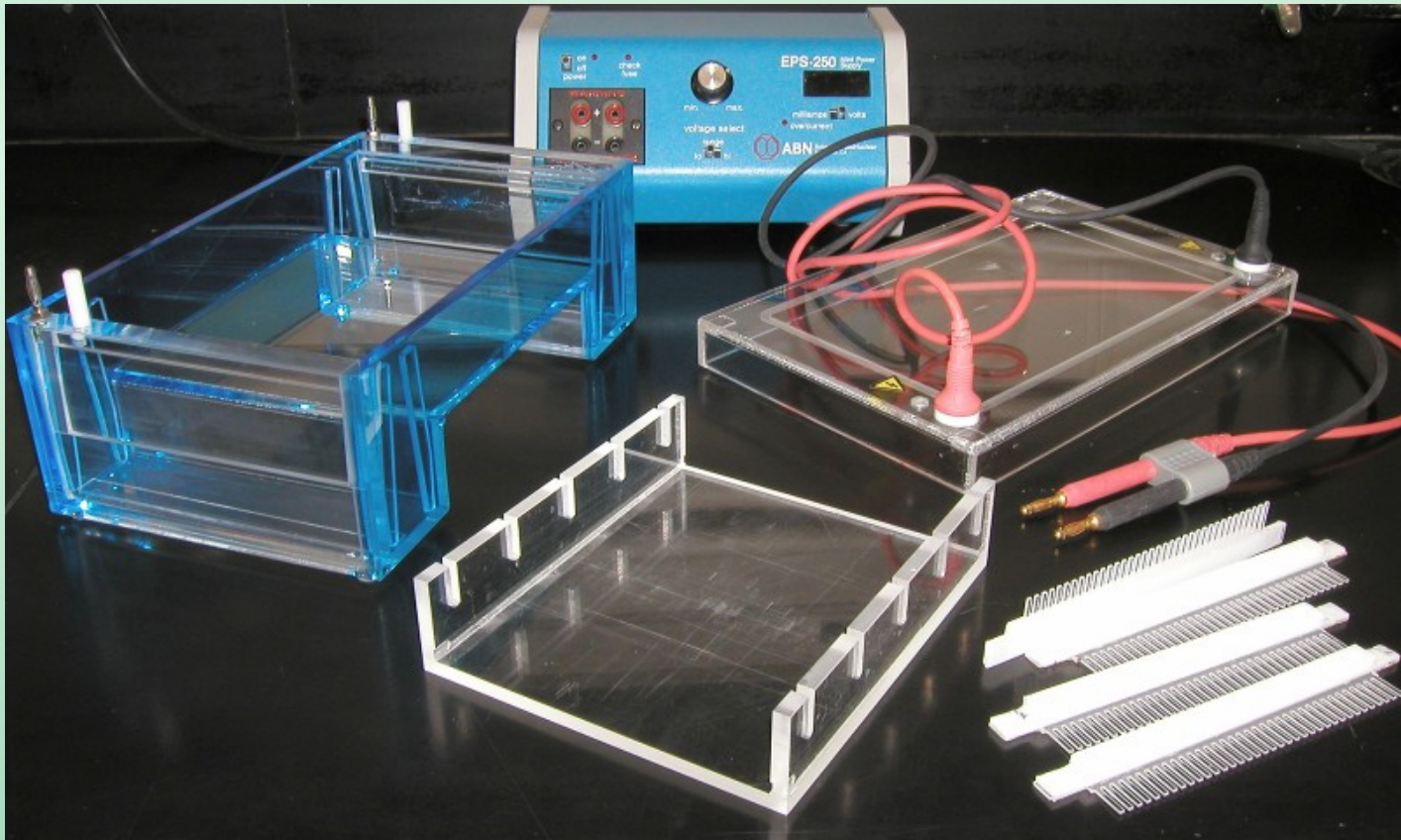
Universidade Federal do ABC

**BC-1308 Biofísica**

# Eletroforese de DNA

**Métodos de separação**

- Eletroforese horizontal
- Gel de agarose (raramente também de poliacrilamida)







Universidade Federal do ABC

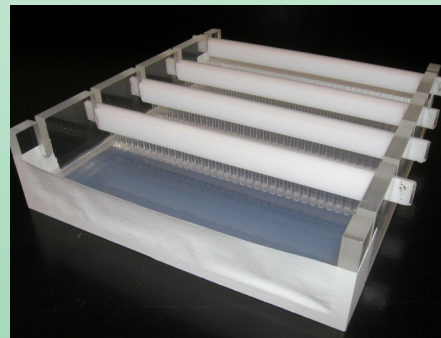
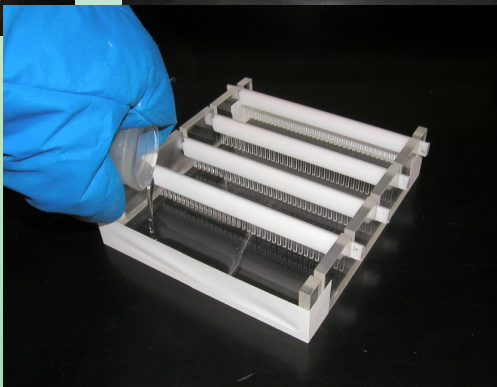
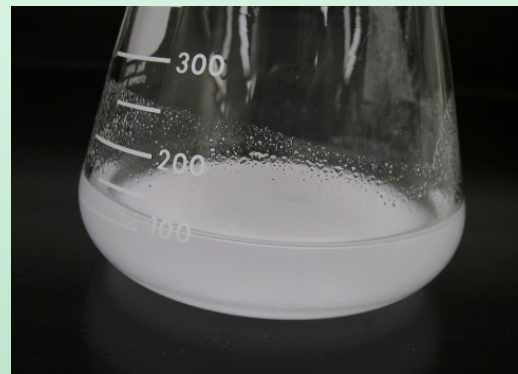
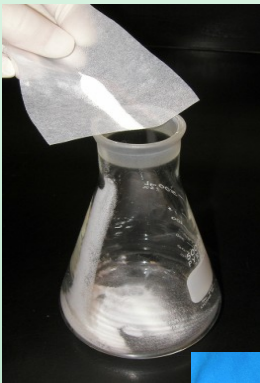
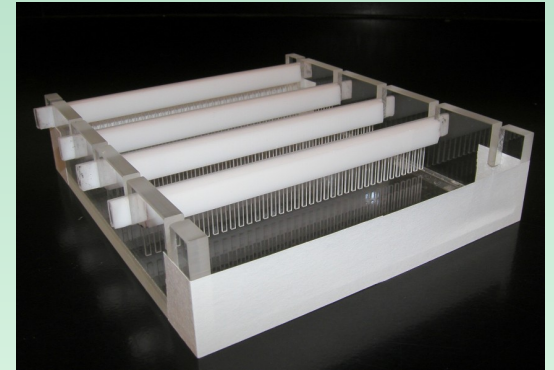
BC-1308 Biofísica

# Eletroforese de DNA

Métodos de separação

## ➤ Preparo de gel de agarose:

- Monte o molde de gel com pentes para poços de amostras
- Misture agarose + tampão (TAE, TBE, ác. Bórico) 1:100 (w/v)
- Aquece em forno de micro-ondas até começar ferver
- Deixe esfriar até ~40-50°C
- Enche o molde e deixa solidificar
- Libere os lados e assenta o gel em cuba com tampão



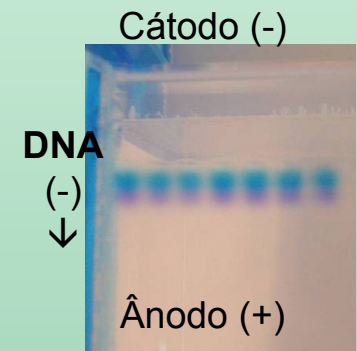
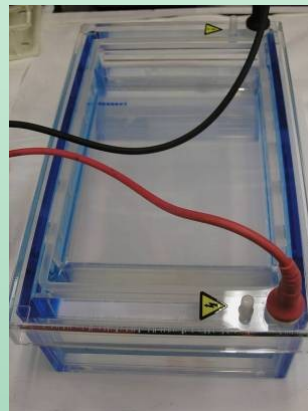
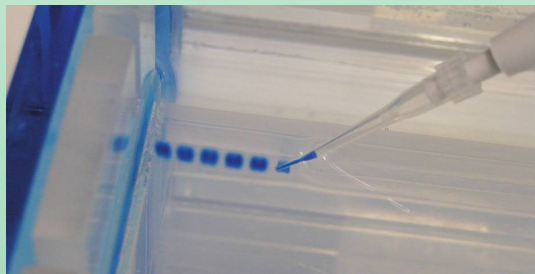


# Eletroforese de DNA

## Métodos de separação

### ➤ Experimento:

- Aplique amostras de DNA misturadas com *loading buffer*
- *Loading buffer*
  - 10 mM Tris-HCl (pH 7.6)
  - 0.03% azul de bromofenol (corante)
  - 0.03% xilene cianol FF (corante)
  - 60% glicerol (densidade para amostra afundar no poço)
  - 60 mM EDTA (remoção de  $\text{Mg}^{2+}$  - inibe nucleases)
- Corrida do gel:
  - DNA → ânion que se move para ânodo (+)
  - Campo elétrico: **voltagem constante** ( $\leq 10$  V/cm entre eletrodos)





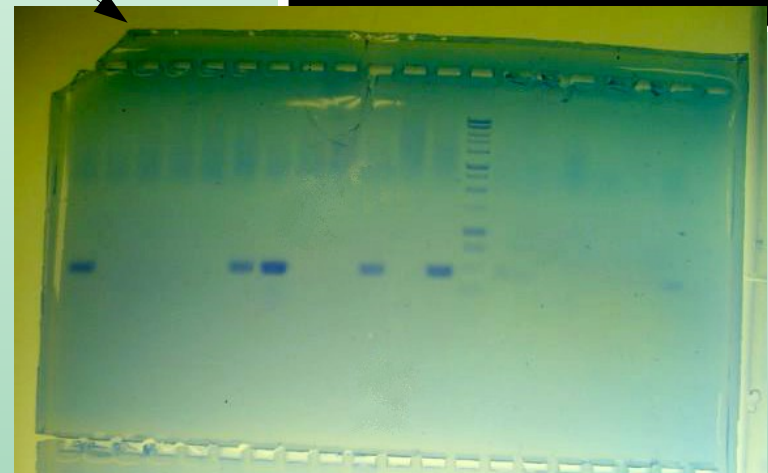
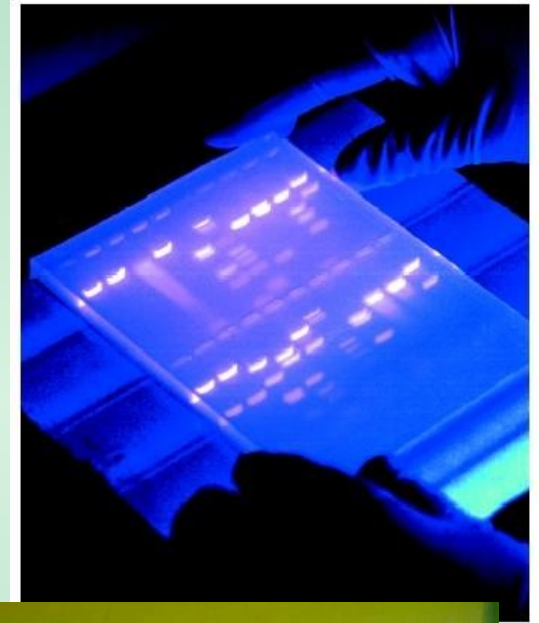
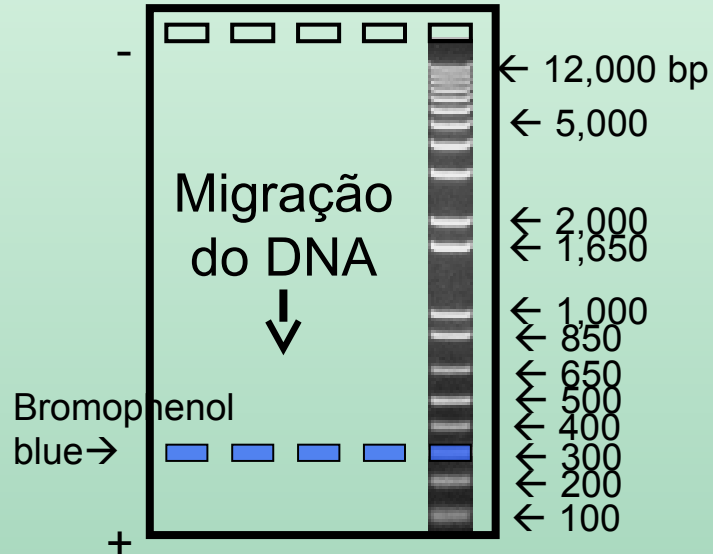
# Eletroforese de DNA

## Métodos de separação

### ➤ Resultado:

- DNA separado por tamanho (pequenos são mais rápidos)
- Coloração do gel
  - Etídeo de brometo
  - Methylene Blue
  - BioRAD - Bio-Safe DNA Stain
  - Ward's - QUIKView DNA Stain
  - Carolina BLU Stain

Padrão molecular: DNA *Ladder*







# Eletróforese de DNA

## Métodos de separação

### ➤ Alternativa ao padrão comercial

#### DNA exercise VII: Characterization of satellite DNA from the Meal Worm Beetle

##### Behavioral Objectives

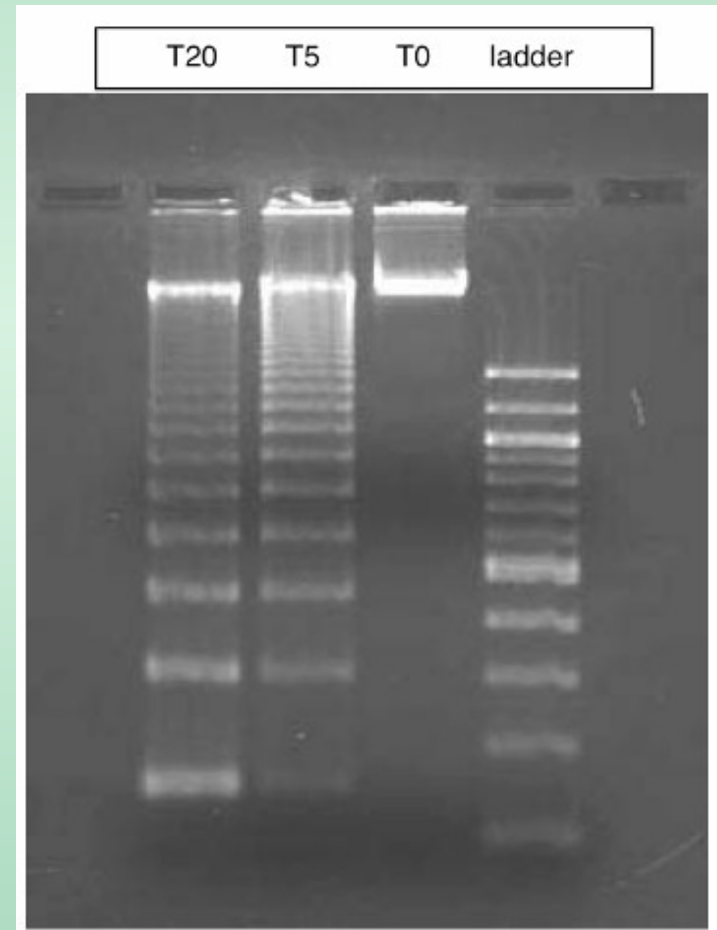
1. To become familiar with the life cycle of the Meal Worm Beetle, *Tenebrio molitor*.
2. To be able to distinguish between the different classes of DNA sequences found within a eukaryote's genome.
3. To gain some familiarity with the methods used for extracting nucleic acids from complex eukaryotes.
4. To appreciate the power of restriction enzymes for studying structural aspects of an organism's genomic DNA.

##### Introduction

So far in this laboratory course, restriction endonucleases have been used to analyze and characterize relatively small DNA molecules (e.g. the genome of phage lambda). However, restriction endonucleases can also be used to investigate certain structural aspects of much larger DNA molecules, such as those that comprise the genomes of higher eukaryotes. The genomes of higher eukaryotes possess three classes of DNA sequences. Those that are present only once per haploid genome are referred to as unique (nonrepetitive) sequences, and can account for between 10-80% of a eukaryote's genome. Sequences that are repeated from 10 to 10,000 times per haploid genome are called moderately repetitive DNA sequences, and can constitute anywhere from 10-50% of a eukaryotic genome. The final class of DNA sequences are those that are referred to as highly repetitive, and are typically repeated in excess of a 100,000 times; these sequences may constitute 10-80% of a eukaryote's genome.

Highly repetitive DNA sequences are located primarily within centromeres and telomeres, and possess repeat units ranging from 5-300 bp that are often arranged one after the other in large tandem arrays. Because these sequences often possess higher levels of AT or GC nucleotides than unique sequence DNA, they tend to band separately from unique sequence DNA during equilibrium density-gradient centrifugation, forming a "satellite" band. Thus, highly repetitive DNA is often referred to as satellite DNA.

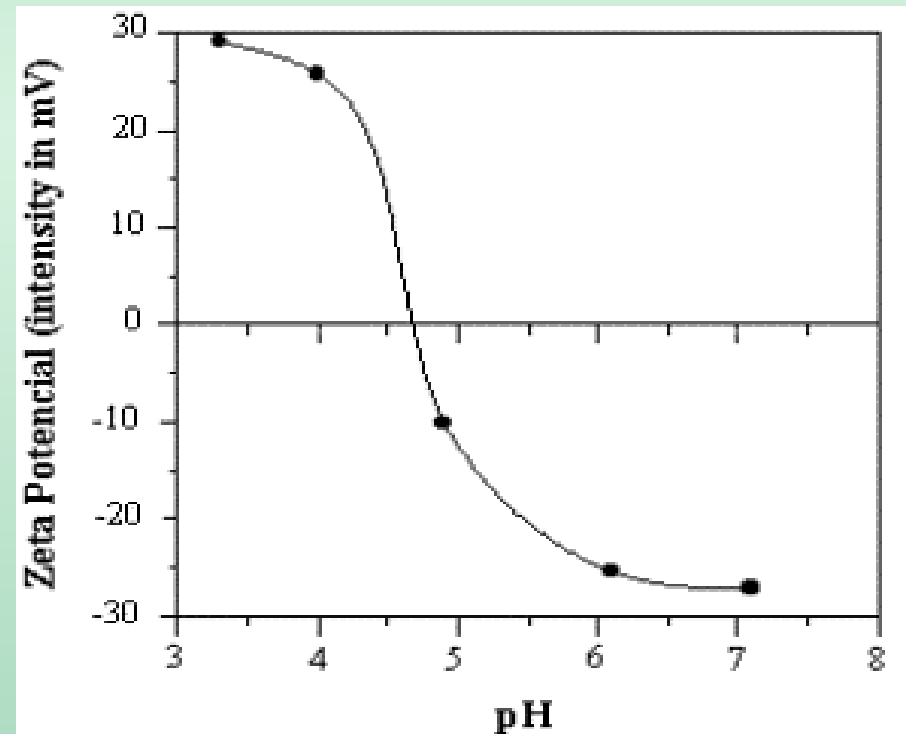
The Yellow Meal Worm Beetle (*Tenebrio molitor*) is an insect that possesses a complex developmental cycle beginning with eggs, laid by the female adult beetle, that hatch within about two weeks to form relatively long-lived larvae. These larvae undergo a number of molting (instar) stages over the course of about 8-9 months producing pupae that transform into adult beetles after about a month. The meal worm beetle often infests grain and grain products such as cereals and although it is not a major food pest, due to its relatively slow life cycle, when encountered its larvae commonly cause alarm due to their relatively large size. Meal Worm larvae are frequently raised for use as fishing bait and for feeding certain types of birds.





# Focalização isoeétrica

- Proteínas contêm aminoácidos ácidos (Glu, Asp) ou básicos (His, Arg, Lys) – ácidos/bases fracos que tem poder tamponante → grau da ionização depende do pH. Assim, a carga total da proteína depende do pH. O pH, onde a carga total da proteína é 0, é denominado como ponto isoeletrico (pI)
- Esta propriedade pode ser utilizada para separar proteínas pelo campo elétrico em um gradiente de pH
- Proteína migra até o pH onde sua carga total é 0 (proteína sem carga não se move em campo elétrico)

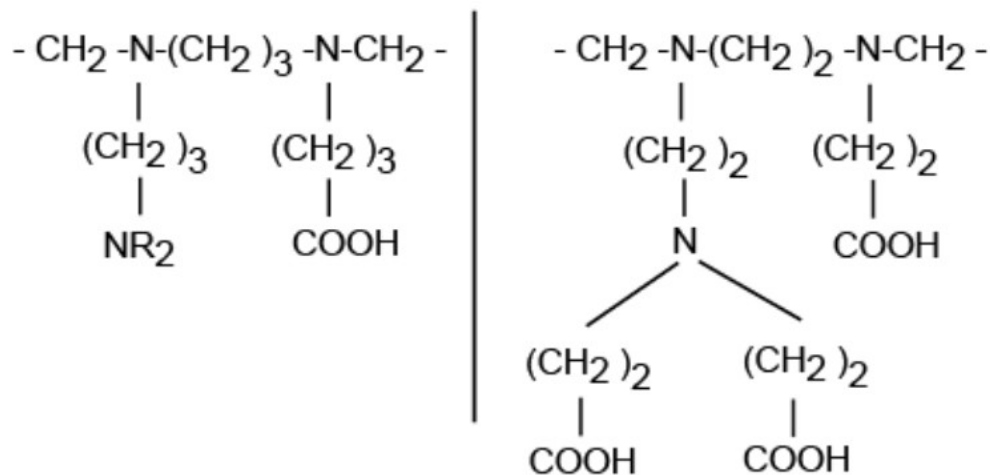
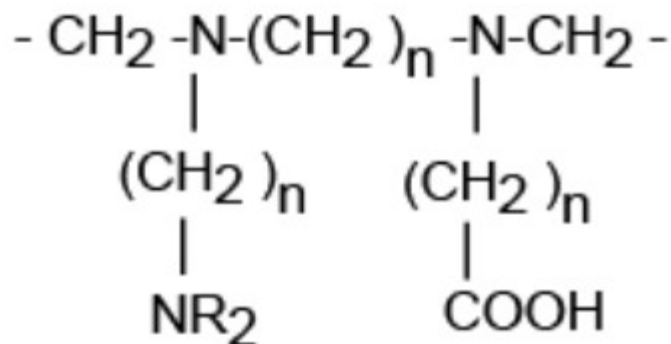


**Figure 4:** Determination of the isoelectric point.

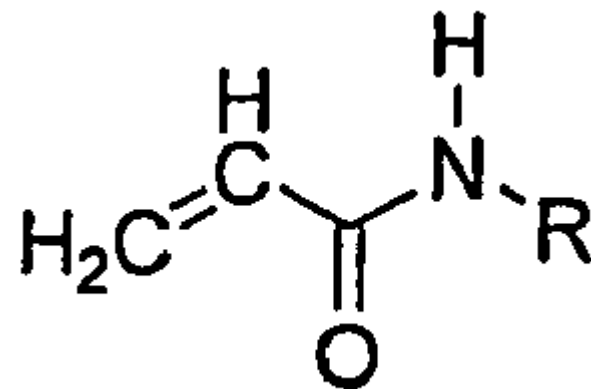


# Focalização isoeétrica

➤ Gradiente de pH pode ser feito com mistura de anfólitos de fórmula geral



➤ Gradiente de pH pode ser feito com mistura de imobilinas (acrilamidas modificados por grupamentos ácidos ou básicos)

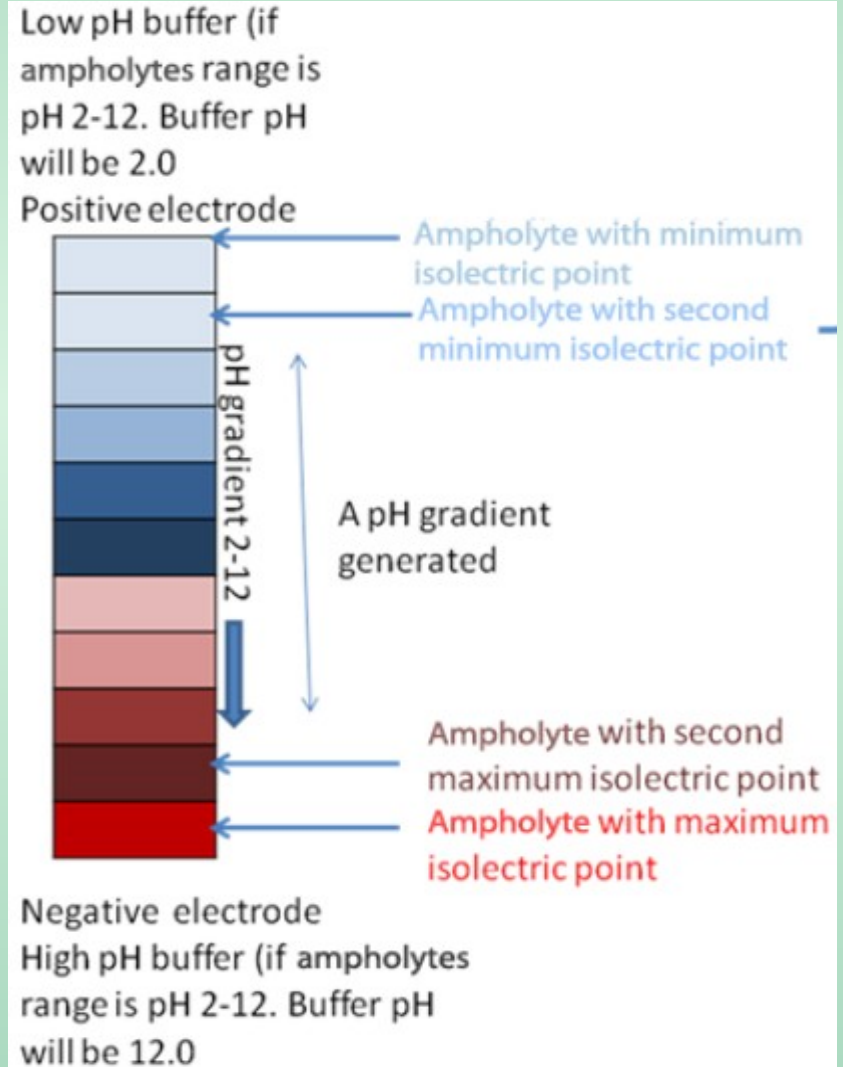




# Focalização isoelétrica

## Métodos de separação

- Gradiente de pH de anfólitos:
- Acrilamida é polimerizado na presença de anfólitos
  - Campo elétrico gera gradiente de pH pelo fato que anfólitos migram até seu  $pI$
  - Gel pode ser guardado na geladeira ou semi-seco no freezer

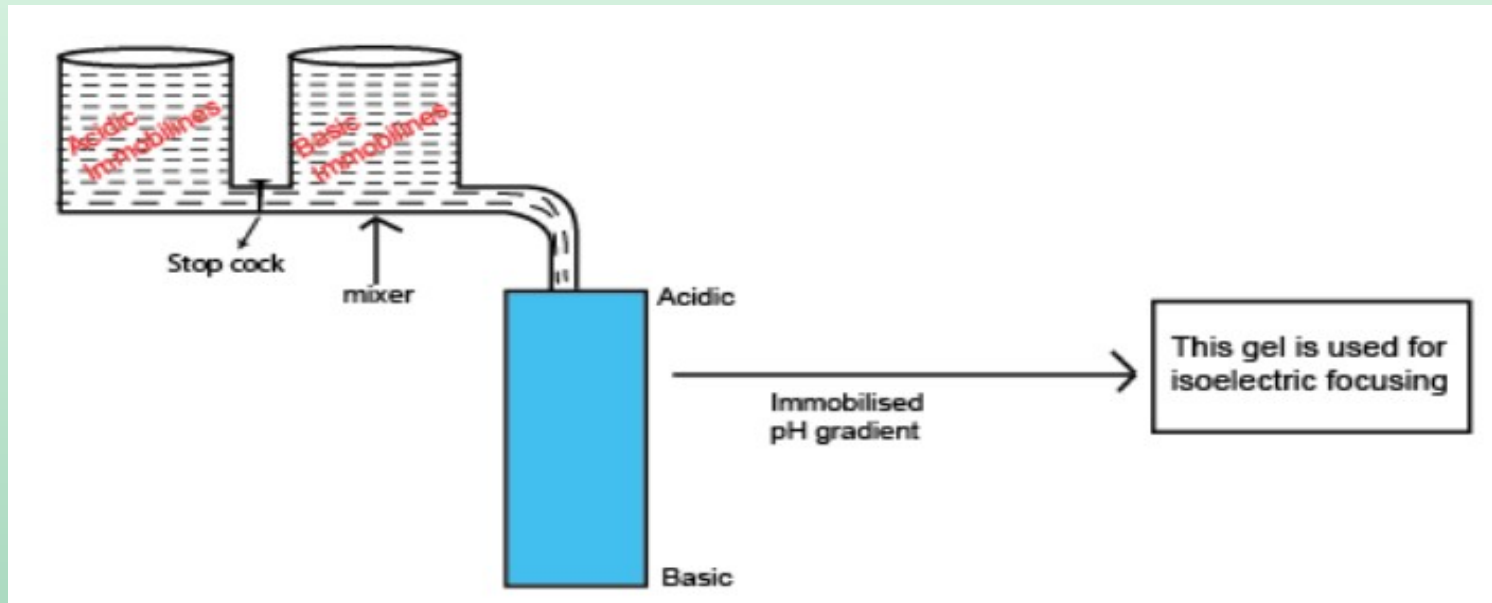




# Focalização isoeétrica

## ➤ Gradiente de pH de imobilinas:

- Gel de poliacrilamida é preparado com gradientes opostos de imobilina ácida e imobilina básica
- Como derivados da acrilamida, as imobilinas polimerizam junto com acrilamida, fixando o gradiente de pH
- Gel pode ser guardado na geladeira ou semi-seco no freezer
- Vantagem: amostra pode conter mais proteínas



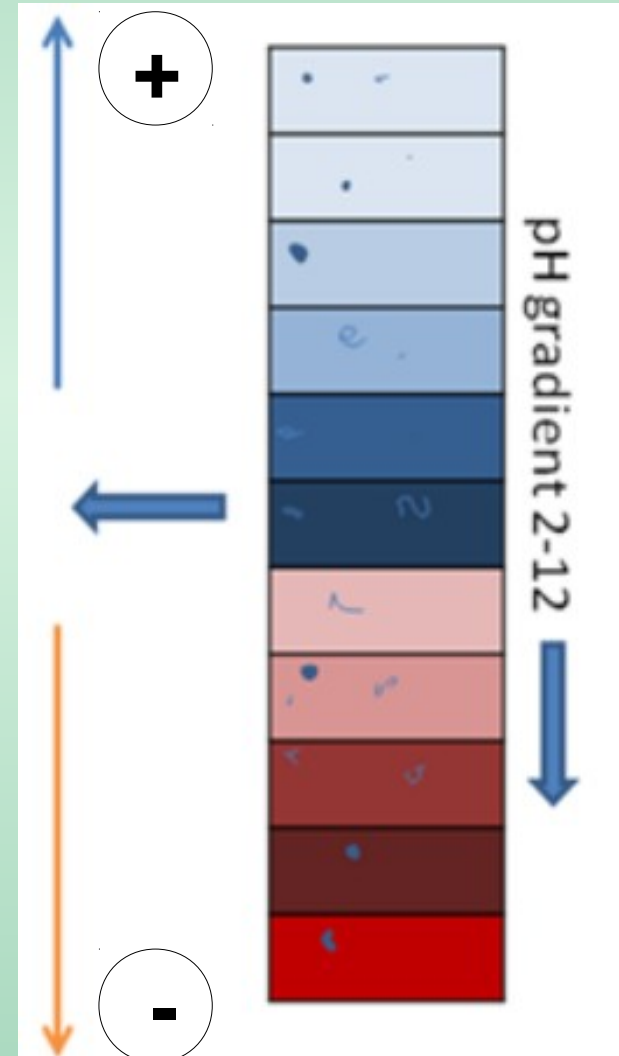


# Focalização isoelétrica

## Métodos de separação

### ➤ Separação de proteínas

- Amostra de proteína aplicada no centro (pH 7)
- Proteínas com **pI alto** terão carga **positiva** e vão migrar para **cátodo** (-) até o pH equivalente de seu pI (sem carga líquida, migração cessa)
- Proteínas com **pI baixo** terão carga **negativa** e vão migrar para **ânodo** (+) até o pH equivalente de seu pI (sem carga líquida, migração cessa)
- Difusão de proteínas é limitada por
  - Gel: obstrução mecânica
  - Campo elétrico: se a proteína sair da zona de  $\text{pH} = \text{pI}$  dela, ganha carga que a direciona de volta para zona de  $\text{pH} = \text{pI}$  dela → **focalização isoelétrica**

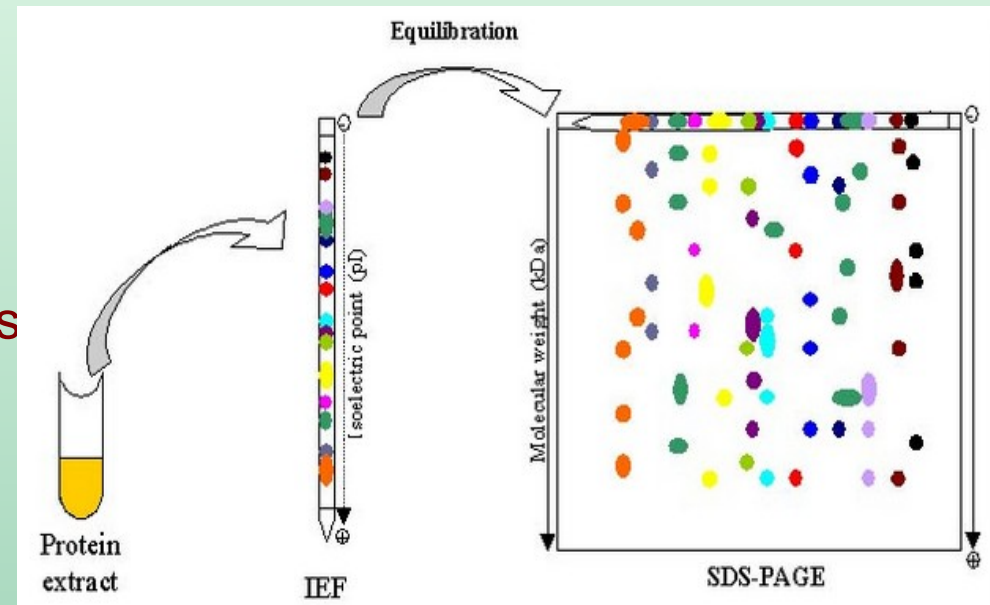






# Eletroforese 2D

- Combinação de dois processos de eletroforese
- Vantagens:
  - Amostra pode ser mistura complexa de proteínas (ex: proteoma de mitocôndria – mitoproteoma)
  - Melhor resolução de proteínas
  - Estudos de complexos/supercomplexos
- Opções mais comuns:
  - Eletroforese nativa (Blue-native com Coomassie Blue)
  - Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE, CTAB-PAGE)
  - Focalização isoeétrica
- Pode ser uma opção duas vezes



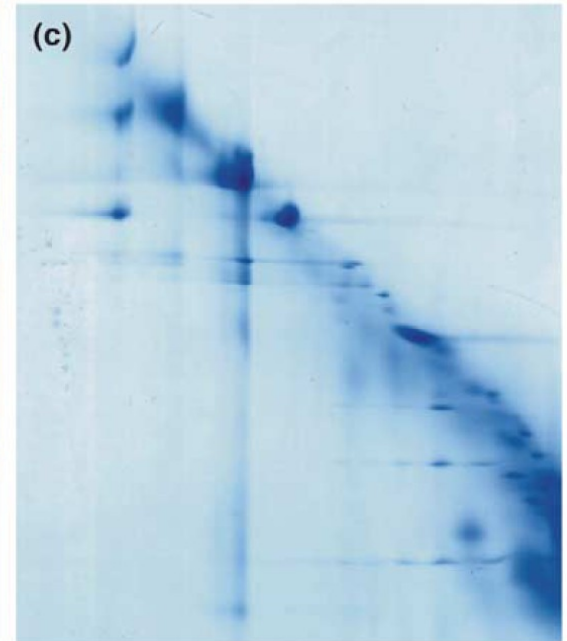
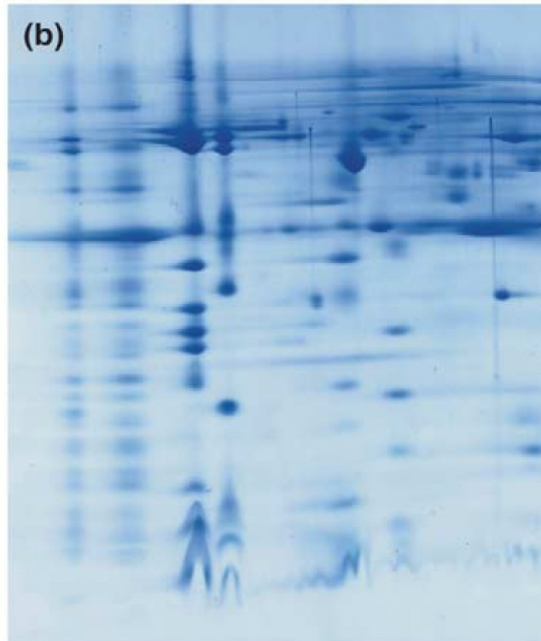
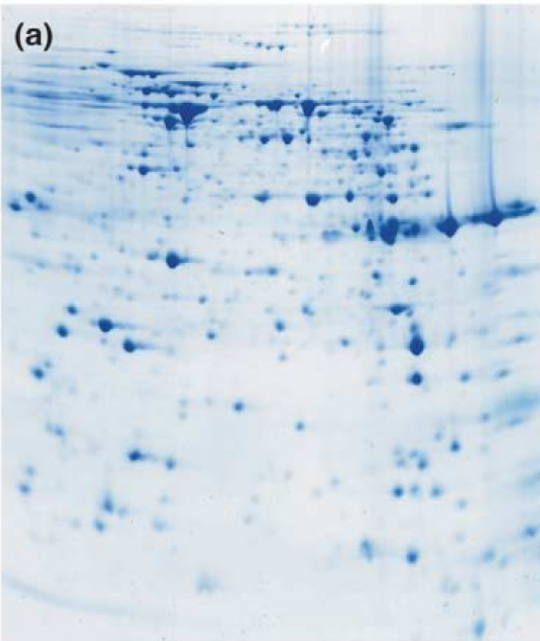




# Eletroforese 2D

## ➤ Exemplos de combinação de dois processos de eletroforese

- (a) 2D IEF/SDS PAGE. IEF (eixo x), SDS-PAGE (eixo y)
- (b) 2D BN/SDS PAGE. BN PAGE (eixo x), SDS PAGE (eixo y)
- (c) 2D BN/BN PAGE. BN PAGE (eixo x), BN PAGE (eixo y)





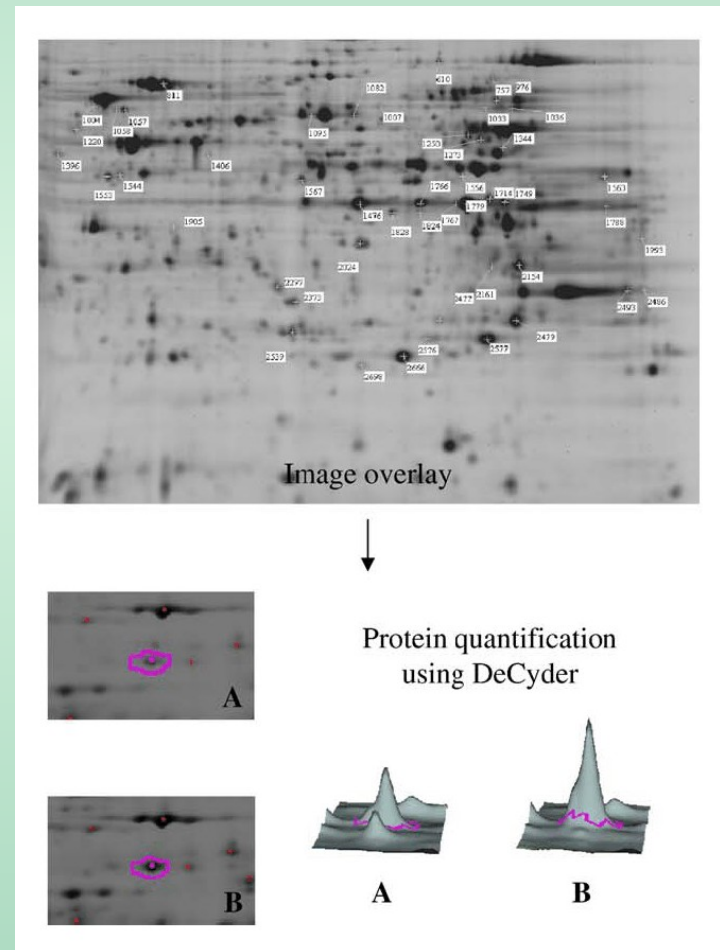
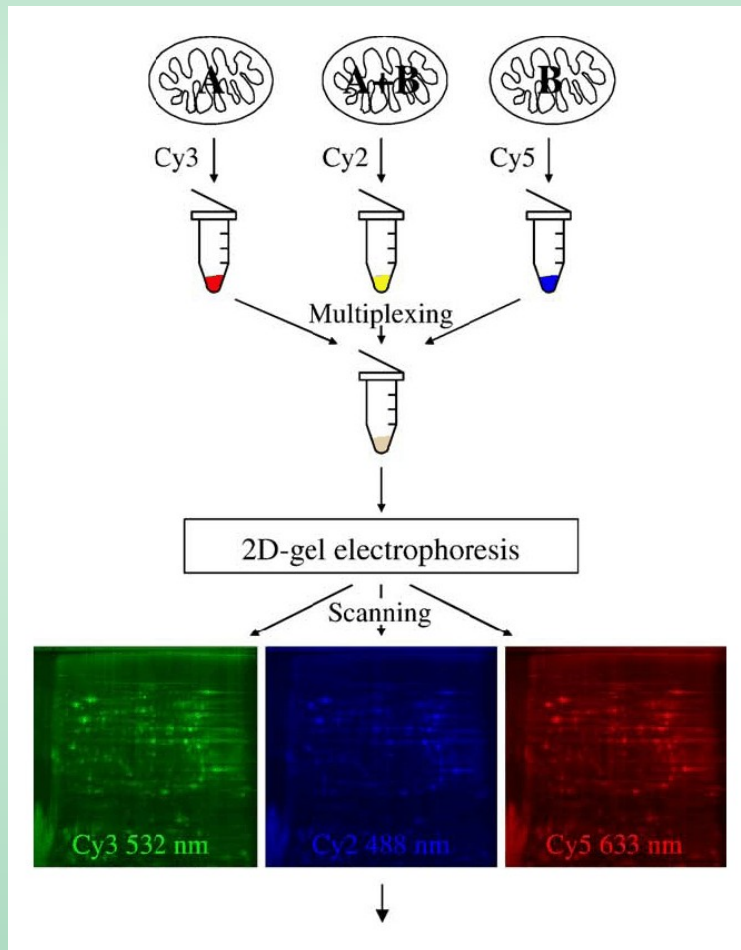
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

# Eletroforese 2D

Métodos de separação

➤ Uso de CyDyes em comparação de duas condições de experimento



*Free Radical Biology & Medicine, vol. 40, 303-315.*



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

# Eletroforese 2D

Métodos de separação

## ➤ Comparação de resultados de mitoproteomas com bancos de dados

**MitoProteome Disease Catalogue**

Number of results to display per page: 10

**Browse**

Browse MitoProteome Disease Catalogue

**Search**

by Keyword / Expression

Search for: myopathy

contained in any of the following fields:

- ☐ MIM Number
- ☒ Disease
- ☐ Gene Name
- ☐ SWISS-PROT Accession
- ☐ GenBank GI
- ☐ Mito ID

Case Sensitive: ☐ Search

NAR-01381-data-E-2003.R1 Figure 1.

**MitoProteome Disease Catalogue Result View**

22 matching record(s) found.

Show Selected

Change Search Parameters Next

Mito ID	Protein Name	Disease	Gene Name	Chromosome
199	Thymidine phosphorylase precursor (EC 2.4.2.4) (TDRPase) (TP) (Platelet-derived endothelial cell growth factor) (PD-ECGF) (Gliostatin) [Homo sapiens (Human)]	Myoneurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome, 603041 (3)		
252	cytochrome oxidase deficient homolog 2	Cardioencephalomyopathy, fatal infantile, due to cytochrome c	SCO2	22
429	carntine palmitoyltransferase II	Myopathy due to CPT II deficiency, 255110 (3); CPT deficiency,	CPT2	1
520	(XM_011580) phosphoglycerate mutase 2 (muscle)	Myopathy due to phosphoglycerate mutase deficiency (3)	PGAM2, PGAMM	7
666	cardiac alpha-myosin heavy chain	Cardiomyopathy, familial hypertrophic, 192600 (3)	MYH6	14
666	cardiac alpha-myosin heavy chain	Cardiomyopathy, familial hypertrophic, 1, 192600 (3); 7Central core	MYH7, CMH1	14
667	actin alpha 2, aortic smooth muscle - human	Cardiomyopathy, dilated, 115200 (3); Cardiomyopathy,	ACTC	10 19
667	actin alpha 2, aortic smooth muscle - human	Myopathy, nemaline, 161800, 256030 (3); Myopathy, actin (3)	ACTA1, ASMA, NEM2, NEM1	10 19
670	desmin	Myopathy, desmin-related, cardioskeletal, 601419 (3);	DES, CMD1I	2
672	myosin binding protein C gene	Cardiomyopathy, familial hypertrophic, 4, 115197 (3)	MYBPC3, CMH4	11

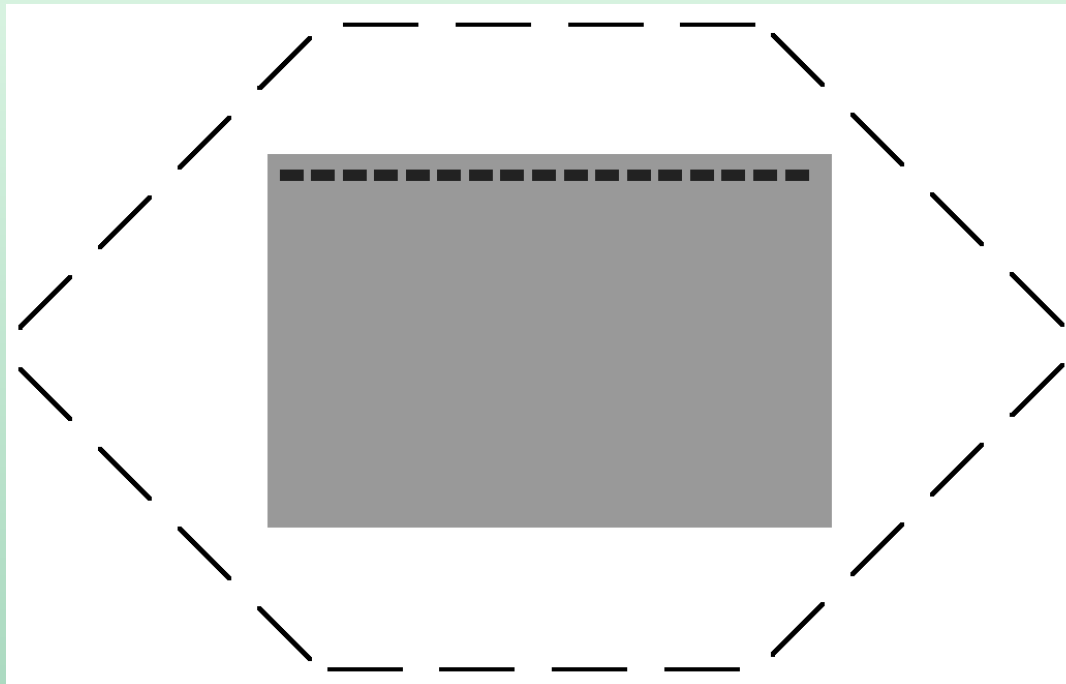
Show Selected

Change Search Parameters Next



# Eletroforese de campo pulsante

- Partículas de DNA  $> 30\text{-}50\text{ kb}$  são tão grandes (em comparação com poros de gel) que a velocidade da migração dele já não depende do tamanho deles – migram junto como uma banda difusa
- Porém, com mudanças periódicas da direção de campo, moléculas maiores vão demorar mais a se realinhar com nova direção do campo do que as moléculas menores → com tempo vão se separar







Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

# Eletroforese de campo pulsante

Métodos de separação

➤ Eletroferograma de DNA de *Staphylococcus aureus*. Padrões (DNA de fago lambda digerido) em kb (!)

