



Dicas dos nossos Mestres Zen em Separação de Proteínas

Solvente Orgânico e Exclusão por Tamanho



Chad Eichman, Ph.D.
BioPharm Global Marketing Manager



Solvente Orgânico e Exclusão por Tamanho

De modo a obter separações Exclusão por Tamanho (SEC) “ideais” (ou seja, separações puramente Entrópicas sem interação do Analito com a Fase estacionária), muitas vezes é necessário algum modificador Orgânico, como Isopropanol ou Acetonitrila entre 5% e 15%.

Entretanto, a questão agora é se a Proteína está em seu estado verdadeiramente nativo; uma das maiores contribuições para a agregação são as interações Hidrofóbicas entre nonômeros e Fragmentos.

A maioria dos métodos para Conjugado Anticorpo-Droga (ADC) usam algum componente Orgânico, com IPA a 15% sendo o mais comum. Isso é amplamente aceito como apropriado para a avaliação de Agregados, apesar de depois, os resultados precisarem ser confirmados com uma Ultracentrifugação analítica com velocidade de sedimentação ortogonal (SV-AUC).

Como uma coluna deve ser limpada, quando a mesma é tipicamente utilizada para analisar Amostras de Proteínas?

Caso haja suspeita de fortes interações Iônicas entre as Proteínas e a Fase Estacionária, comece a limpeza com um Desnaturante, como, por exemplo, Hidrocloro de Guanidina 6 M ou DMSO a 10%. Se a Proteína for relativamente Hidrofóbica, comece remover o Tampão com Água a 95-100% e em seguida limpe as Proteínas Hidrofóbicas com um gradiente de 95% de Água e 5% de Acetonitrila até 5% de Água e 95% de Acetonitrila de 3 ~ 5 vezes o volume da coluna. Durante cada etapa, preste atenção para que as pressões de trabalho não excedam os limites recomendados; ajuste o fluxo conforme necessário.

