

Trabajo Práctico 11: Cromatografía en columna: filtración molecular

OBJETIVO:

- Demostrar la aplicación de una columna de cromatografía como método de separación.
- Separar los componentes de una mezcla mediante una columna de tamiz molecular.
- Verificar la separación de los compuestos.

FUNDAMENTO

Las proteínas, debido a su alto peso molecular, no pueden ser separadas por cromatografía de partición, ya que no son arrastradas por el solvente. En tales casos se utiliza la *cromatografía en columna*, en la que una solución de una mezcla de proteínas se pasa por una columna formada por un material sólido y poroso (denominado *matriz*), con el cual las proteínas interaccionan de diferentes maneras y pueden ser separadas según sean o no retardadas en su pasaje (Fig. I). Las matrices de las columnas están diseñadas de manera de interactuar con la carga de las proteínas (*cromatografía de intercambio iónico*) o con los aminoácidos expuestos en su superficie (*cromatografía de interacción hidrofóbica*), o pueden llevar unida alguna molécula que, a su vez, interacciona específicamente con la proteína que se quiere retener (*cromatografía de afinidad*).

La *cromatografía de exclusión molecular* es diferente de las anteriores, pues conduce al fraccionamiento de las proteínas según su tamaño. Para ello, la matriz está formada por pequeñas esferas porosas que permiten la entrada de proteínas de un cierto tamaño, que son retardadas, mientras las moléculas mayores pasan o *eluyen* más rápido (Fig. II).

La salida de las proteínas de una columna cromatográfica se detecta normalmente por absorción de la luz a una longitud de onda de 280 nm. Debido a la composición de sus aminoácidos, las proteínas absorben esta luz y, utilizando un *espectrofotómetro*, se puede detectar la elución de las proteínas en la cromatografía. Los datos se registran en lo que se denomina *diagrama de elución* e indican la posición de las proteínas que se han separado. Después pueden realizarse estudios de actividad biológica, enzimática, etc. de las proteínas fraccionadas.

La cromatografía de filtración en gel, permeación en gel, columna de filtración molecular o cromatografía de exclusión es una técnica ampliamente utilizada para separación de moléculas de acuerdo al tamaño molecular.

Las sustancias de la muestra se mueven a distintas velocidades en la columna y son eluidas como bandas separadas. La columna tiene un gel de polímero entrecruzado con poros de

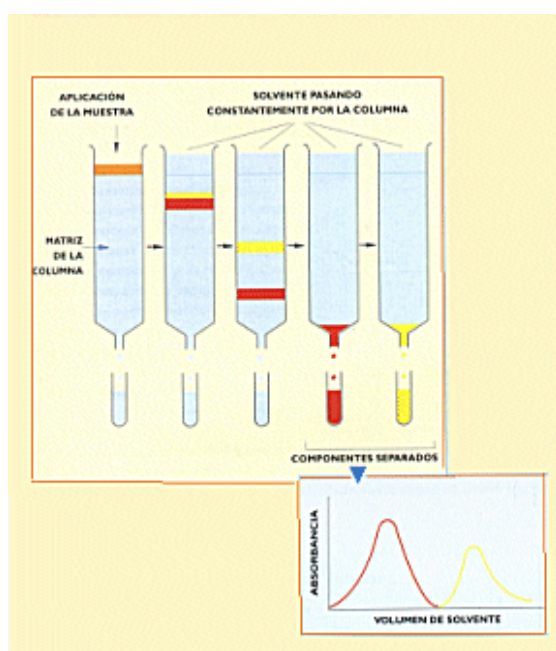
tamaño seleccionado. Las moléculas mayores son eluidas más fácilmente que las menores por ser demasiado grandes para penetrar en los poros del gel así pueden recorrer un camino más directo a través de la columna.

Las moléculas menores pueden penetrar en los poros y de esa manera se equilibran rápidamente entre la fase móvil, compuesta de líquido intersticial y la fase estacionaria constituida por el agua del interior del gel. Como hay dos veces mayor cantidad de agua en el espacio intersticial, las moléculas pequeñas gastan un tercio de tiempo en el agua intersticial y 2/3 dentro de las partículas del gel, siendo eluidas después.

Las moléculas de tamaño intermedio pueden penetrar solamente en la parte del agua del gel y así ser separadas las moléculas mayores y menores.

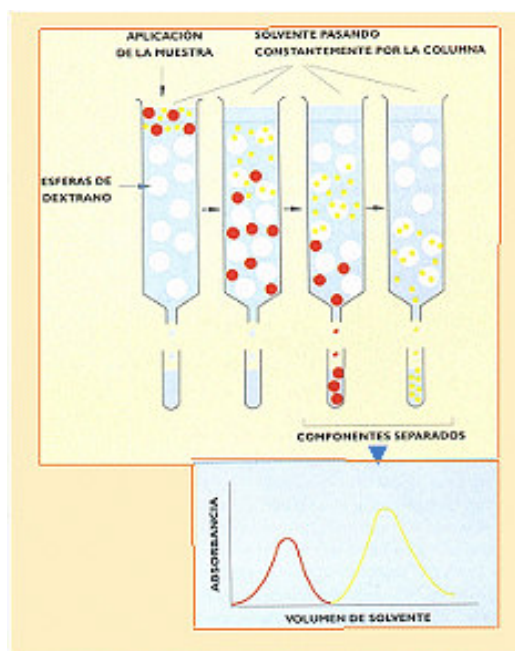
Cuando la columna es calibrada con moléculas de masa molecular conocida, puede utilizarse para conocer la masa molecular de una sustancia en análisis.

Figura I



Separación de proteínas por cromatografía en columna. La muestra se aplica en la superficie de una columna de vidrio o plástico llena con una matriz permeable inmersa en el solvente elegido. Luego, el solvente se hace pasar lentamente por la columna y es recogido en tubos separados. La elución de las proteínas se registra por su capacidad de absorber luz en una longitud de onda de 280NM. Abajo: Diagrama de elución de proteínas fraccionadas.

Figura II



Separación de proteínas según su tamaño molecular. La mezcla de proteínas en solución se pasa por una columna compuesta por esferas de un polímero sólido (en general dextrano), que permite la entrada de pequeñas moléculas; las de mayor tamaño no penetran en la matriz y eluyen con mayor rapidez. Abajo: Diagrama de elución de las proteínas fraccionadas.

PARTE EXPERIMENTAL

Muestra a sembrar: mezclar 200 ul de Blue-Dextrán (1 mg/ml) y 200 ul de Hemoglobina bovina (1 mg/ml)

Volumen a sembrar: 0,4 ml

Fase estacionaria: Sephadex G-100 (rango de fraccionamiento de 4.000 a 100.000 Daltons)

Altura del gel en la columna: 12 cm

Fase móvil: agua destilada

Recolección del eluato: fracciones de 1 ml por tubo desde el instante en que se siembra la muestra en el gel.

El análisis de las fracciones obtenidas se realiza en forma visual, ya que ambas sustancias son coloreadas, y por lectura de su absorbancia a 280 nm para el caso de la proteína.

Confeccionar el diagrama de elución de la hemoglobina.

Masa molecular de Blue-Dextrán: mayor a 500.000 Daltons

Masa molecular de Hemoglobina: aproximadamente 60.000 Daltons