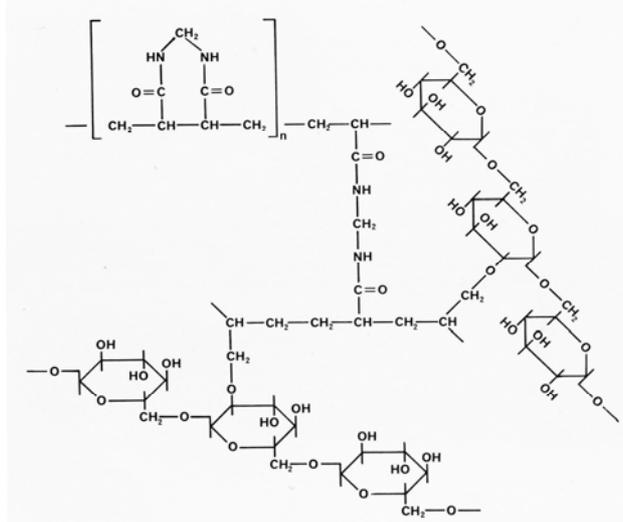


SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

INTRODUCCION

La cromatografía es una técnica que permite la separación de moléculas diferentes presentes en una misma muestra. El método está basado en la circulación de una fase móvil (que arrastra a la mezcla de compuestos a separar), a través de una fase estacionaria. Dependiendo de la afinidad relativa que por ambas fases tengan los distintos compuestos presentes en la mezcla resultará su separación.

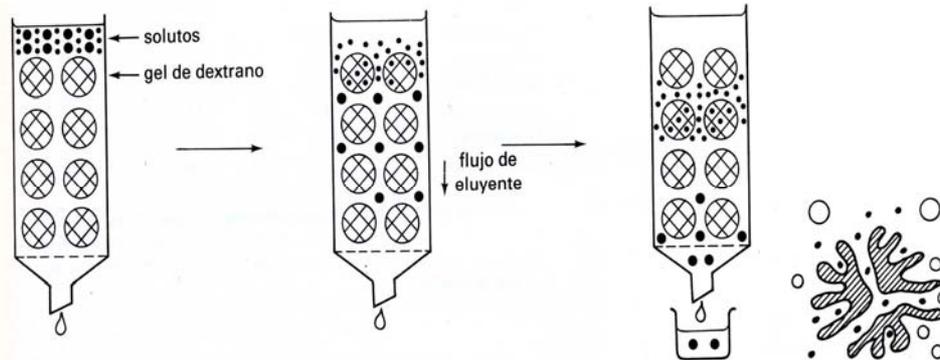
La cromatografía de exclusión molecular (a menudo también llamada filtración en gel o de tamiz molecular) es una de las técnicas más sencillas de las empleadas en la separación de proteínas y ácidos nucleicos. Este tipo de cromatografía se realiza en columnas cilíndricas rellenas con algunos de los geles que se fabrican con este fin y que pueden ser de varios tipos: dextranos con enlaces cruzados (sephadex), agarosa (sepharose, Bio-gel A), poliacrilamida (Bio-gel B), etc. Todos estos geles (fase estacionaria) se hallan constituidos por gránulos (partículas) de un material esponjoso hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado.



Hypothetical partial structure of sephacryl

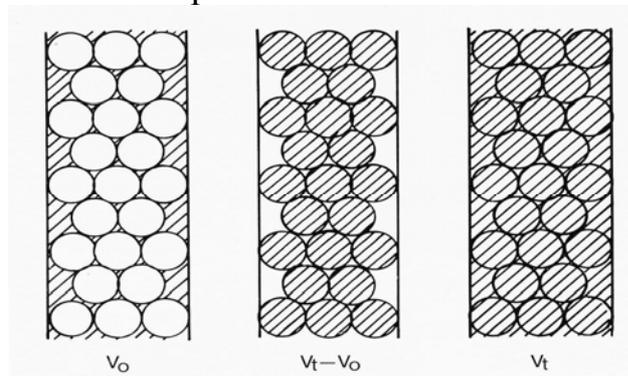
Cuando se hace pasar una mezcla de moléculas de distinto tamaño, a través de una columna de filtración en gel; aquellas moléculas con un tamaño mayor que el diámetro de los poros de las partículas, sólo podrán moverse en su camino, a través de la fase estacionaria, en el espacio que queda entre las partículas; y por lo tanto, no se verán retrasadas en su descenso. En cambio aquellas moléculas capaces de penetrar en las partículas se verán retrasadas por la fase estacionaria; en mayor medida, cuanto menor sea su tamaño. Por lo tanto, las moléculas eluyen en este tipo de cromatografía por orden decreciente de tamaño molecular.

Mecanismo de la cromatografía de exclusión



Las mallas del gel permiten la entrada selectiva de las partículas de menor masa molecular. De ahí que las partículas de mayor peso molecular salgan primero.

Diferentes compartimentos dentro de la columna



Diagrammatic representation of V_t and V_0 . Note that $V_t - V_0$ will include the volume of the actual fibres forming the matrix of each bead.

APLICACIONES

- Cambios de buffers. Después de cromatografías de intercambio iónico, afinidad o de interacción hidrofóbica.
- Desalado. Proteínas, polisacáridos, polipéptidos etc. Pueden ser desalados antes de ser concentrados o liofilizados.
- Eliminación de fenol de las preparaciones de ácidos nucleicos.
- Eliminación de compuestos de bajo peso molecular marcados. I^{125} , FITC de las soluciones de marcaje de proteínas.
- Para reacciones entre macromoléculas y reactivos de bajo peso molecular.
- Eliminación de productos, cofactores, inhibidores, etc. De las enzimas.
- Purificación de macromoléculas.
- Determinación del peso molecular de las proteínas.

OBJETIVO

Realizar la calibración de una columna de gel filtración de sephacryl S-200 y determinación del peso molecular de una proteína problema.

MATERIAL

- 1-Tampón fosfato 25 mM y CIK 100 mM pH 7.
- 2-Columna de cromatografía de 30 cm de altura y 1cm de diámetro
- 3-20 ml de Sephacryl S-200 equilibrados en tampón fosfato
- 4-Patrones de alto y bajo peso molecular. A cada grupo se le suministran 3 marcadores de peso molecular, azul de dextrano y una alícuota de riboflavina 100 mM.
- 5- Muestra problema.

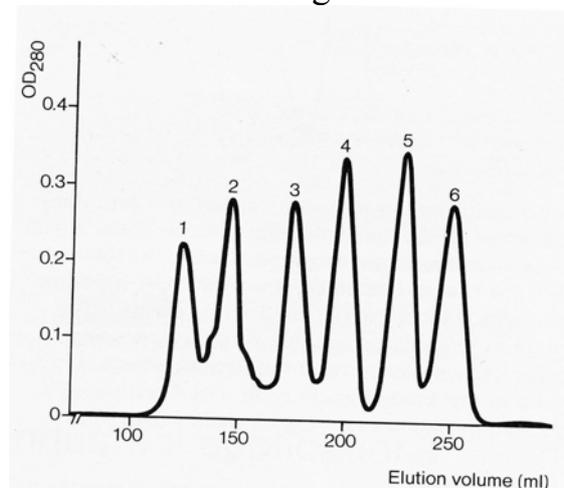
Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit

Protein	Molecular Weight	Stokes' Radius (Å)	Source
ribonuclease A	13 700	16.4	bovine pancreas
chymotrypsinogen A	25 000	20.9	bovine pancreas
ovalbumin	43 000	30.5	hen egg
albumin	67 000	35.5	bovine serum
Blue Dextran 2000			

High Molecular Weight Gel Filtration Kit

Protein	Molecular Weight	Stokes' Radius (Å)	Source
Aldolase*	158 000	48.1	rabbit muscle
catalase	210 000	—	bovine liver
ferritin*	440 000	61.0	horse spleen
thyroglobulin	669 000	85.0	bovine thyroid
Blue Dextran 2000			

Cromatograma



Calibration kits for gel filtration. An example showing their use with Sephadex G-200 superfine. Peaks: 1. catalase; 2. aldolase; 3. bovine serum albumin; 4. ovoalbumin; 5 chymotrypsinogen A; 6 ribonuclease A.

METODO

-Empaquetar el gel dentro de la columna: con la columna cerrada añadir 5 ml de tampón fosfato, a continuación comenzar a añadir los 20 ml de gel debidamente hidratado en el mismo tampón, lentamente y evitando hacer burbujas de aire dentro de la columna. En este momento; colocar un recipiente debajo de la columna para recoger el líquido que va a fluir, abrir la columna para realizar el proceso de empaquetado.

-Lavar bien la columna (aprox. 40 ml).

-Marcar 50 tubos

-Elución de la columna: El proceso descrito a continuación se debe realizar para cada uno de los marcadores de peso molecular y colorantes por separado, más otra vez para la muestra problema.

1- Aplicación de la muestra. Dejar que la columna gotee hasta que se elimine todo el tampón de la parte superior del gel. A continuación aplicar 20 μ l de la muestra.

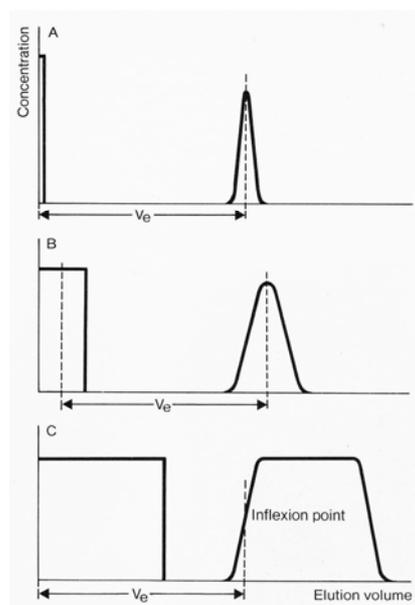
2- Dejar gotear hasta que toda la muestra entre en el gel

3- Colocar el tubo n° 1 debajo de la columna y añadir a la columna una alícuota de 400 μ l de la solución tampón. Recoger en el tubo el eluido hasta que se elimine de la parte superior todo el volumen aplicado.

4- Repetir el paso 3 con cada uno de los tubos numerados

RESULTADOS

1- Determinar el volumen de elución de cada uno de los marcadores de peso molecular, volumen de exclusión y volumen total.

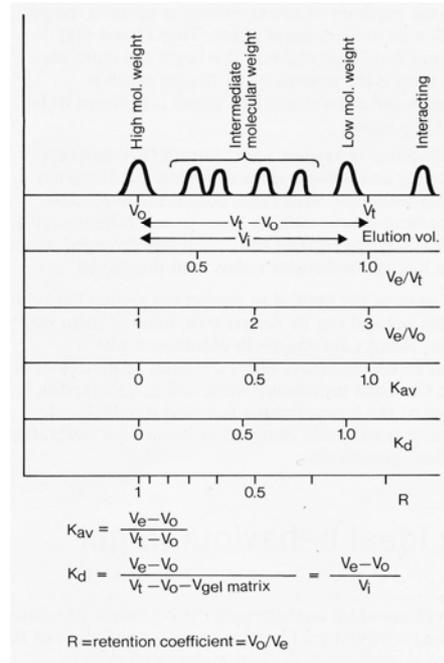


A. Sample size negligible compared with bed volume. B. Sample size not negligible compared with bed volume. C. Sample giving plateau elution curve.

La identificación de las fracciones que contienen los dos colorantes se hace mediante estimación visual; mientras que para saber que fracciones que contienen los marcadores de peso molecular y la muestra problema se añade 1ml del reactivo de Bradford.

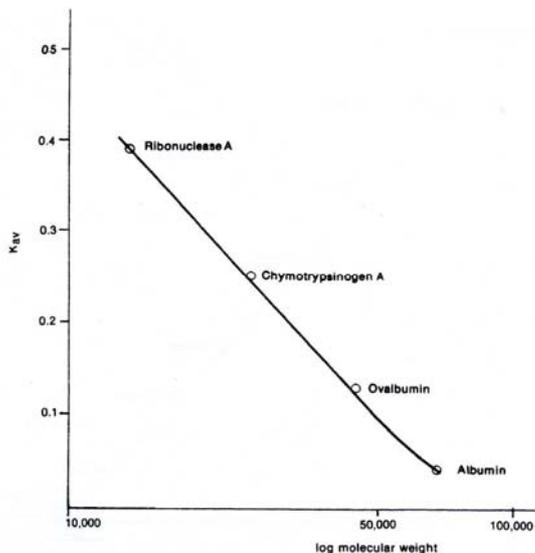
2-Cromatograma: para cada compuesto hacer una gráfica representando en el eje de abscisas el volumen añadido a la columna y en ordenadas la intensidad relativa del color del compuesto (por estimación visual).

3-coeficiente de reparto de cada uno de los marcadores empleados y de la muestra problema.



Relationship between several expressions used for normalizing elution behaviour.

4-realizar la recta de calibración y determinar el peso molecular de la proteína problema.



Calibration curve using the low molecular weight gel filtration calibration kit on sephadex G-75 superfine