

PRINCIPIOS DE CROMATOGRAFIA DE FILTRACIÓN EN GEL

10 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es introducir a los estudiantes en los principios de la cromatografía de filtración en gel como un método para separar moléculas en función de su tamaño y forma. En esta práctica los alumnos deberán separar dos moléculas presentes en una solución muestra.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	Conservación
A. Solución muestra	nevera
B. Matriz seca	nevera
C. Tampón de elución concentrado	nevera
Pipetas de transferencia de plástico	
Tubos de microcentrífuga	
Columnas de cromatografía	

Almacenar todos los componentes por debajo de temperatura ambiente.

Nota: Se suministran reactivos y solución muestra suficientes para realizar 10 separaciones.

Nota: Todos los componentes de este kit están destinados a la investigación educativa. No pueden ser utilizados con fines de diagnóstico o médicos, ni pueden ser administrados o consumidos por seres humanos o animales.

2.1 Material requerido y no suministrado

- Agua destilada
- 10 vasos de precipitación o matraces (50 ml o 100 ml)
- 1 vaso pequeño o matraz (10 o 25 ml) o 1 tubo de ensayo (10 ml)
- 1 soporte universal con pinza para cada columna
- Pipetas (5 o 10 ml) y pera de succión para pipeta (opcional)

3. INTRODUCCIÓN

La **cromatografía de filtración en gel** (a veces conocido como **cromatografía de tamiz molecular**) es un método que separa las moléculas en función de su tamaño y forma. La separación de los componentes de una solución muestra, con algunas excepciones, se correlaciona con sus pesos moleculares. En estos casos, la filtración en gel se puede utilizar como un método analítico para determinar el peso molecular de una molécula no caracterizada. La filtración en gel es también una importante técnica de preparación, ya que es a menudo una etapa cromatográfica en la purificación de proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos.

Los componentes básicos de esta práctica son la **matriz**, la **columna de cromatografía** y el **tampón de elución**. La **matriz** es el material presente en el interior de la columna, es el medio de separación. Es la **fase estacionaria** de la cromatografía.

La **columna** es un tubo con una **frita** y una **purga de elución** en la parte inferior. La **frita** es una membrana o un disco poroso que soporta y retiene la matriz en la columna, pero permite que el agua y los solutos disueltos pasen. El **tampón de elución** es la **fase móvil** de la cromatografía y pasa a través de la matriz y de la columna. La columna, con la matriz y la solución muestra aplicada, es "desarrollada" por el tampón de elución. Esto significa que las moléculas de la solución muestra son transportados por el flujo del tampón en la matriz donde se separan gradualmente. Las moléculas, separadas en fracciones, salen de la columna y se recogen por separado para su análisis.

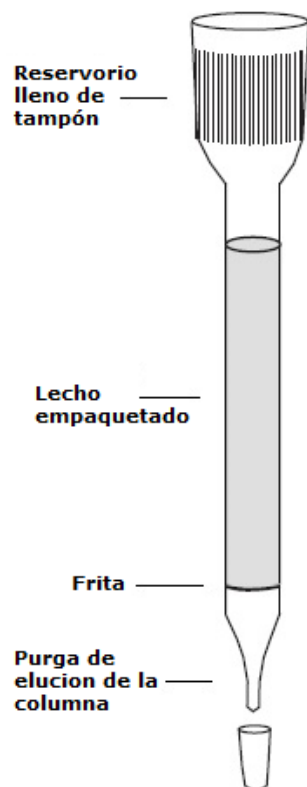


Figura 1: Esquema de una columna empaquetada

El relleno con la matriz de la columna de cromatografía se conoce como "**paquete**". La matriz empaquetada se llama la "**lecho**" y el volumen que ocupa se denomina el "**volumen de lecho**". Es muy importante no permitir que el lecho funcione en seco. De lo contrario, se desarrollan grietas y fisuras, y la matriz tiene que ser eliminada y empaquetada de nuevo.

La matriz de la filtración en gel se compone de esferas microscópicas (**perlas**) que contienen poros y canales internos. Cuanto mayor sea la molécula, más difícil es para ella pasar a través de los poros en el interior de las perlas. Las moléculas más grandes tienden a fluir alrededor y entre las perlas. El volumen total de tampón entre las perlas es el "**volumen vacío**". Las moléculas más pequeñas tienden a pasar más tiempo en el lecho. En consecuencia, las moléculas de peso molecular superior, más grandes, se eluyen (salen) de la columna antes que moléculas más pequeñas. Las moléculas más grandes toman el camino más directo y rápido, lo que implica menos tiempo en el interior de la columna (**Figura 2**). Esto es algo parecido a encontrar la manera de cruzar un laberinto complicado simplemente caminando por el exterior del laberinto y evitar la situación por completo.

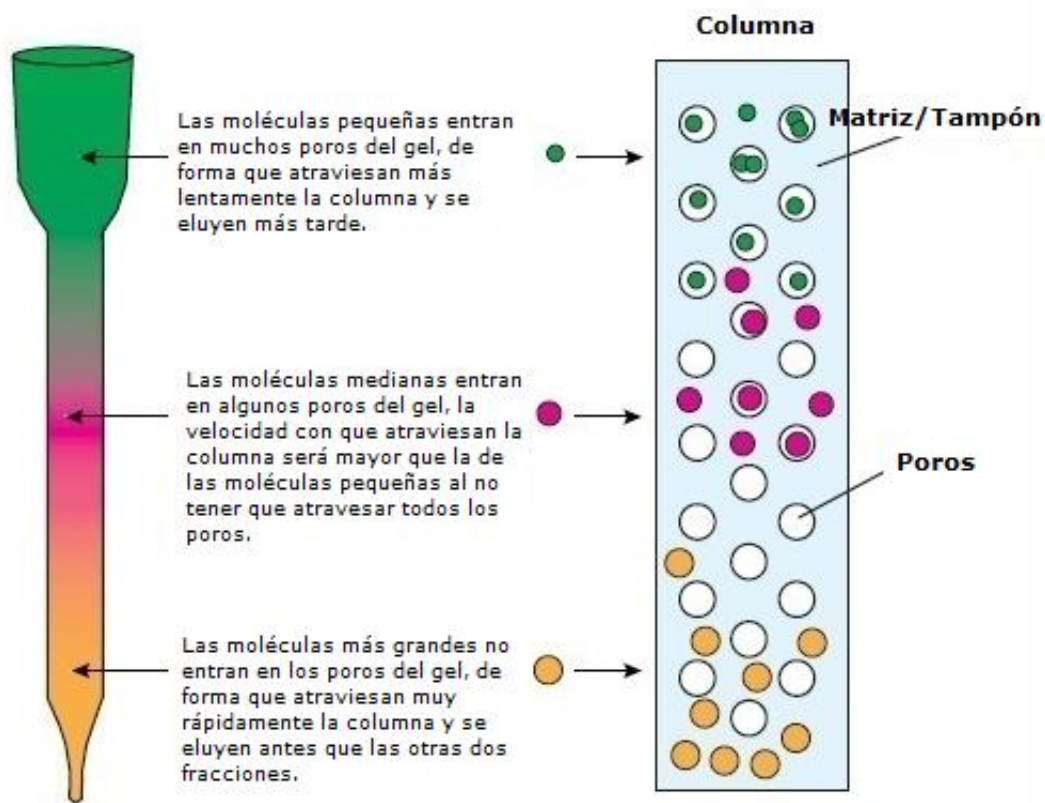


Figura 2: ¿Cómo se mueven las moléculas de diferentes tamaños a través de la matriz?

Las moléculas pueden tener el mismo peso molecular pero con formas totalmente diferentes. Las moléculas con una forma más compacta, como una esfera, pueden pasar por el interior de las perlas más fácilmente que las que tienen una forma alargada, como una varilla. Por lo tanto, una molécula en forma de varilla se eluye antes que una esférica del mismo peso molecular.

Hay muchos tipos diferentes de matrices de gel de filtración. El espectro de pesos moleculares que la matriz es capaz de separar se llama el **intervalo de fraccionamiento**. Por ejemplo, considere una matriz que tiene un intervalo de fraccionamiento (en peso molecular) de 1.000 a 100.000 daltons. Las moléculas con un peso molecular medio de 1.000 o menos no se pueden separar el uno del otro, ya que todos ellos pasan por el interior de las perlas y con igual eficiencia. Estas moléculas tienen el máximo volumen de tampón para la elución, lo que es igual a un volumen de lecho.

El **volumen del lecho** es igual al volumen de la matriz más el volumen vacío. Las moléculas en el intervalo de 1.000 a 100.000 daltons entrarán en las perlas con diferentes eficiencias y quedarán parcial o completamente separadas unas de otras. Moléculas superiores a 100.000 daltons, no entrarán en las perlas y se eluyen en el volumen vacío. Tenga en cuenta que en este ejemplo, cualquier número de moléculas diferentes que tengan pesos moleculares de 100.000 daltons o mayor se eluyen todas al mismo tiempo, ya que no son tamizadas por la matriz. Las fracciones de moléculas separadas parcial o completamente que se eluyen de la columna se denominan **picos**. Un pico consiste en un aumento y disminución en la concentración de moléculas (**Figura 2**).

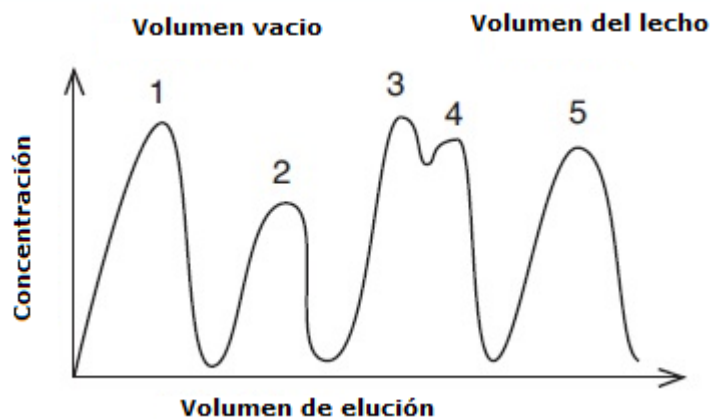


Figura 2: Los diferentes picos de las moléculas eluidas

Este experimento incluye las columnas, en las que se empaqueta la matriz, adecuadas para la separación de nuestra solución muestra. La solución muestra en esta práctica contiene una mezcla de moléculas de color naranja y azul. El tinte de color naranja tiene un peso molecular de 452 daltons. El azul es un polímero de glucosa con un peso molecular medio de 2.000.000 daltons, y tiene una forma de varilla. El intervalo de fraccionamiento de la matriz es de 4.000 a 150.000 daltons. El tinte de color naranja más pequeño entra en los poros de las perlas y fluye lentamente a través de ellos, mientras que el polímero de glucosa azul muy grande no puede entrar en los poros de la perla y fluye alrededor de ellas, moviéndose mucho más rápido.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es introducir a los estudiantes en los principios de la cromatografía de filtración en gel como un método para separar moléculas en función de su tamaño y forma. En esta práctica los alumnos deberán separar dos moléculas presentes en una solución muestra.

4.1 Precauciones

Las buenas prácticas de laboratorio nos obligan a utilizar los guantes y las gafas de seguridad durante la realización de esta práctica.

4.2 Preparaciones previas

Preparación de las columnas

1. Montar verticalmente cada columna en un soporte de anillo, asegurándose que quedan rectas. Mantenga ambas tapas de la columna, superior e inferior, colocadas.

Preparación del tampón de elución

1. Diluir el tampón de elución concentrado añadiendo 540 ml de agua destilada:
 - a. Coger el tampón de elución concentrado (contenido completo del componente C).
 - b. Añadir 540 ml de agua destilada.
 - c. Mezclar bien.

2. Dispensar aproximadamente 50 ml del tampón de elución diluida en un vaso para cada grupo. Conservar el tampón de elución diluido que sobre para una aplicación adicional en caso de derrames.

3. Pipetear 0,2 ml de la mezcla de la muestra (componente A) en un microtubo. Etiquetar este tubo como "X".

NOTA: Hay suficiente muestra para dividirla en diez tubos, conteniendo cada uno 0,2 ml.

Cada grupo debe tener:

- 8 tubos de microcentrífuga.
- 2 pipetas de transferencia de plástico.
- 1 vaso de precipitados vacío.

Preparación de matriz seca

1. Añadir la matriz seca (Componente B) a un matraz o vaso de precipitado. Añadir 52ml de tampón de elución diluido.

2. Cubrir el recipiente con la matriz y el tampón de elución. Agitar para mezclar la matriz y conseguir una suspensión homogénea.

3. Dejar reposar la suspensión durante al menos 2 horas a temperatura ambiente para permitir que la matriz se hinche antes del empaquetamiento de la columna (también se puede hacer el día antes de la práctica).

4. Después que la matriz se ha hinchado, remover o agitar para obtener una suspensión homogénea y dispensar rápidamente 5 ml en un vaso pequeño, matraz o tubo para cada grupo.

5. PRÁCTICA

Cromatografía: Empaquetado de la columna

1. Remover o agitar suavemente la matriz hasta tener una mezcla homogénea.
2. Con una pipeta de 5 o 10 ml, pipetear con cuidado toda la suspensión mezclada en el interior de la columna dejando que caiga por las paredes interiores del depósito o verter la suspensión en el interior de la columna muy lentamente.

Si el flujo de la matriz es detenido por una bolsa de aire, dejar de verter y dar suaves toques a la columna hasta eliminar el aire y la suspensión fluya hacia abajo. Continuar vertiendo el resto de la suspensión.
3. Con una pipeta de transferencia, añadir tampón de elución para llenar el depósito de la columna.
4. Coloque un vaso vacío bajo en la columna.
5. Quitar el tapón de la purga de elución de la columna.
6. Deje que el tampón pase a través de la columna durante aproximadamente 10 minutos. La matriz se empaquetará comprimiéndose hacia abajo en el interior de la columna.
7. Coloque el tapón a la purga de elución de la columna.
8. La matriz estará empaquetada cuando acabe de comprimirse.

Punto de parada OPCIONAL

Si el tiempo es limitado, se puede detener el experimento en este punto de forma temporal. Las columnas deben quedar bien cerradas para que no se sequen.

Si se desea detener el experimento aquí, asegúrese que el nivel de tampón está por encima del lecho y que el depósito de la columna queda cubierto con un plástico o parafilm.

Cromatografía: La recogida de fracciones

1. Etiqueta 8 tubos de ensayo con los números del 1 al 8. Poner una identificación o el número de grupo de prácticas en todos los tubos.
2. Retirar cuidadosamente todo el tampón de elución que hay sobre la parte superior del lecho con una pipeta de transferencia. La parte superior del lecho debe quedar expuesta al aire.
Introducir una pipeta por la parte superior de la columna, a través del depósito. Debe tratar de minimizar la alteración del lecho mientras se retira el tampón.
3. Cargar el contenido de la "muestra" tubo X en la parte superior del lecho con una pipeta de transferencia. Dejar que la muestra gotee por las paredes interiores de la columna.
4. Colocar un vaso debajo de la columna.
5. Quitar el tapón de la purga de elución. La muestra entrará lentamente en el lecho empaquetado. Cuando la muestra entre por completo en el lecho empaquetado (la

parte superior del lecho empaquetado quedara de nuevo expuesto al aire), colocar de nuevo el tapón de la purga.

6. Añadir con cuidado unas gotas de tampón de elución sobre el lecho empaquetado con una pipeta de transferencia. Abrir el tapón de la purga y permitir que el tampón entre en la columna.

7. Continuar la adición de tampón, varias gotas a la vez, haciendo una pausa para permitir que el tampón pueda entrar en el lecho empaquetado.

8. Cuando el colorante azul llegue cerca de la parte inferior de la columna, comenzar a recoger fracciones de 0,5 ml. Mantener el tubo # 1 directamente debajo de la columna (los tubos están graduados para ayudarle a medir 0,5 ml).

9. A medida que los colorantes se separan gradualmente en el interior de la columna, añadir periódicamente tampón nuevo al depósito para mantenerlo lleno.

10. Continuar la recogida de fracciones de 0,5 ml en cada uno de los tubos 2-8.

11. Después de que todos los tubos de columna de efluente (fracciones de la columna) se han recogido, vuelva a colocar el tapón en la purga de elución de la columna.

12. Identificar el tubo con la mayor cantidad de azul de dextrano eluido de la columna.

13. Identificar el tubo que tiene la mayor cantidad de tinte de color naranja eluido de la columna.

6. PREGUNTAS

Responde a las siguientes preguntas en la libreta de prácticas:

1. Comparar la cromatografía de filtración en gel con otras técnicas de separación.

2. Dibujar y nombrar las diferentes partes de una columna. Indicar la cantidad de tampón que se coloca por encima/debajo del lecho. Definir: frita, matriz y eluyente.

3. ¿Cuál es la función de un tampón de elución?

4. ¿Qué molécula saldrá primero en la elución de una columna: una esférica o una lineal? ¿Por qué?

5. ¿Cuál es la fase estacionaria de la cromatografía? ¿Y la fase móvil?