

# **CROMATOGRAFIA DE TAMIZADO MOLECULAR / FILTRACION EN GEL / EXCLUSION MOLECULAR**

## **1.-FUNDAMENTOS DE LA CROMATOGRAFIA DE TAMIZADO MOLECULAR.**

Las biomoléculas presentan una serie de propiedades físicas (tamaño, forma y carga, entre otras), químicas (como la presencia de determinados grupos funcionales) y biológicas (como su capacidad de unirse específicamente a ligandos). Estas propiedades se emplean habitualmente para aislar una molécula del resto de las presentes en un extracto acelular. La cromatografía de tamizado molecular no es destructiva y las muestras separadas pueden ser utilizadas para otro tipo de cromatografía o análisis. La cromatografía de tamizado molecular permite separar moléculas atendiendo a su tamaño y, por consiguiente, a su peso molecular ver esquema en Fig.1. Es aplicable fundamentalmente a moléculas cuya forma hidrodinámica se comporta como una esfera o elipsoide de revolución (proteínas globulares por ejemplo). La fase estacionaria de la cromatografía está constituida por geles insolubles en agua de naturaleza hidrofílica que constituyen granos huecos esféricos, de diámetro controlado y atravesados por numerosos poros de diámetro homogéneo: Las diferentes resinas utilizadas en este tipo de cromatografía se diferencian por sus capacidades de resolución (capacidad de separar moléculas de distinto tamaño) que a su vez dependen tanto del diámetro del grano del gel como del diámetro de los poros que presenta. Cuando se cromatografía una muestra con moléculas de diferente tamaño, si se ha elegido convenientemente la resina de filtración, podrán existir moléculas cuyo tamaño les impida penetrar por los poros del grano y, por tanto, solo podrán desplazarse por el exterior de la resina. Por el contrario, las moléculas cuyo tamaño les permita penetrar por los poros del gel, quedarán retenidas y retrasadas del frente, tanto más cuanto mas pequeña es, ya que es mayor el camino que pueden recorrer. Como consecuencia las moléculas de mayor tamaño saldrán primero de la columna, mientras que las últimas en salir serán las más pequeñas. Las diferentes resinas comerciales, aparte de por sus capacidades de resolución, se diferencian por su naturaleza química. Así, existen resinas de origen natural (de polisacáridos o dextranos), tales como Sephadex, de origen sintético (geles de poliacrilamida), tales como Biogel P, y de tipo mixto (dextranos entrecruzados con poliacrilamida), como el Sephacryl.

En esta práctica utilizaremos Sephacryl S-200 como resina de filtración siendo su capacidad de resolución entre 4 y 200 kDa de masa molecular.

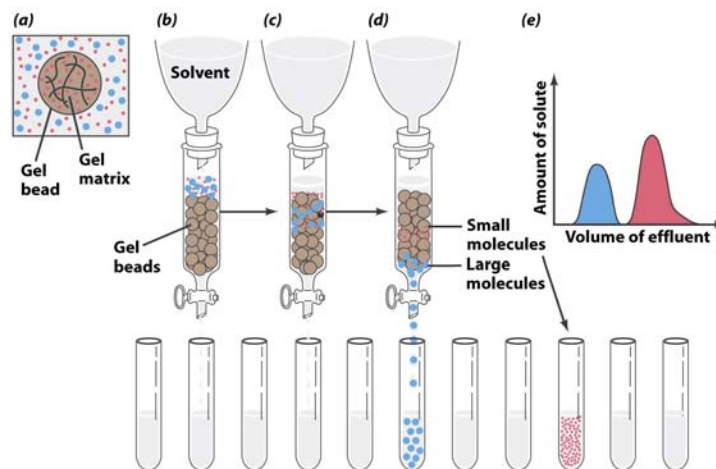


Figure 5-7 Fundamentals of Biochemistry, 2/e  
© 2006 John Wiley & Sons

**Fig.-1 Esquema de la cromatografía en gel filtración de moléculas con diferente tamaño: Masa Molecular.**

## **2.- OBJETIVO DE LA CROMATOGRAFIA EN GEL FILTRACION: MOLECULAS QUE SE VAN UTILIZAN PARA CONSTRUIR LA RECTA PATRON. DETERMINACION DE LA MASA MOLECULAR DE UNA PROTEINA.**

### **- Objetivo de la práctica**

El objetivo de la técnica consiste en calibrar una columna de tamizado molecular, mediante la elución de una serie de proteínas de masa molecular conocida (patrones), obteniendo en primer lugar la absorbancia de las fracciones resueltas frente a los mililitros de buffer de elución de la columna. Esta información nos dará el máximo de absorbancia y el  $V_e$  para cada proteína. Se representa el volumen de elución,  $V_e$ , o el volumen de elución relativo,  $V_e/V_o$ , de cada una de ellas con respecto al logaritmo de su masa molecular respectiva. Se obtendrá una recta Log M versus  $V_e/V_o$ . Utilizando estos datos se calculará la masa de la proteína problema cuya masa molecular es desconocida y tiene un  **$V_e$  de 35,8 ml**. De este modo tendremos una valoración muy próxima a la masa real de la proteína problema purificada por esta técnica y podremos estudiar posteriormente alguna de sus características. Las macromoléculas presentes en la mezcla son el polímero azul dextrano de elevada masa molecular  $210^3$  kDa de carácter no iónico, Alcohol deshidrogenasa (150kDa), Seroalbúmina bovina (66 kDa), Citocromo c (12,4 kDa), Aprotinina (6,5 kDa) y DNP-glicina (DNP-Gly) de 241 Da. Se determinará además, el espectro de absorción del citocromo C purificado con el objetivo de determinar los máximos de absorción.

## **3.- MATERIALES Y METODOS UTILIZADOS EN LA REALIZACION DE LA CROMATOGRAFIA:**

### **3.1. Materiales y Equipamiento necesarios**

- Mezcla de proteínas de masa molecular conocida.
- Columnas de 30x1,5 cm, con llave de cierre, pié de columna y dos pinzas, gel Sephacryl S-200.
- Tampones, HCl, NaCl, Tris.
- Sistema integrado de baja presión con bomba peristáltica, Unidad de detección UV 280nm de flujo continuo, Colector de fracciones, Registro
- Espectrofotómetro, gradillas, agitatuos, tubos, pipetas Pasteur plástico, vasos de precipitados.

### **3.2. Objetivos concretos de la práctica de tamizado molecular.**

- Cromatografía de filtración en gel
- Localización de las macromoléculas y cálculo de masa aproximada de una proteína problema.
- Espectro de absorción. Una vez separadas, se obtendrá el espectro de absorción y se determinarán los máximos de absorción del Citocromo C en la columna de exclusión molecular.

## **4.- PROTOCOLOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS EN EL DESARROLLO DE LA PRACTICA.**

### **4.1. Proteínas patrón para la elaboración de la recta patrón:**

Alcohol deshidrogenasa (150kDa), Seroalbúmina bovina (66 kDa), Citocromo c (12,4 kDa), Aprotinina (6,5 kDa). Además se utilizarán como marcadores, azul dextrano de masa molecular  $210^3$  kDa y DNP-glicina (DNP-Gly) de 241 Da.

## 4.2. Tampones y concentración de proteínas y marcadores.

- Tampón de cromatografía: Se utiliza 10mM Tris-ClH pH=8, en presencia de NaCl 150mM. Se puede disponer de una solución 1 M de Tris-HCl con 15 M de NaCl, a este buffer se le puede adicionar 0,01% p/v de NaN<sub>3</sub>.
- Mezcla de moléculas a separar: Se disuelven en 20 ml y se alicuotan en tubos Eppendorf volúmenes de 0,7 ml. Y se guardan a -20°C.
  - \*5 mg de N-2,4-DNP-Glicina (241Da)
  - \*20 mg de Aprotinina (6,5 kDa)
  - \*20 mg de Citocromo c (12,4kDa)
  - \*20mg de Seroalbúmina bovina (66kDa)
  - \*20mg de Alcohol deshidrogenasa (150 kDa)
  - \*5mg de Azul dextrano (2000 kDa).
- Columna montada de reserva de Sephacryl S-200.
- Tubos, pipetas Pasteur de vidrio y plástico vasos de precipitados, tubos espectrofotómetro.

## 4. 2. Método experimental

### 4.2.1. Cromatografía de filtración en gel

- La columna ha de estar montada y equilibrada antes de comenzar la práctica. Durante el desarrollo de la cromatografía el gel ha de estar cubierto con tampón en todo momento. **Muy importante: Tener cuidado y evitar que no se seque en ningún momento la columna en la parte superior, por lo que debe estar al menos con 3 cm de tampón.**
- Para aplicar la muestra con marcadores y proteínas, cerrar la salida eliminar el tampón sobrante en la parte superior del gel hasta que se aprecie la superficie del gel, dejar fluir el tampón hacia abajo o bien retirarlo, cuidadosamente con una pipeta Pasteur de vidrio y depositar con cuidado sobre el gel **700 µl** de la mezcla de macromoléculas a separar. Dejar que la muestra se absorba en el nivel del gel abriendo de nuevo el tapón de la columna y recogiendo a partir de este momento las sucesivas fracciones de elución. Conectar la bomba, el detector, registrador y el colector de fracciones; añadir suavemente la muestra y vigilar que continuamente le llega tampón desde el reservorio para tampón de cromatografía.
- Dejar pasar aproximadamente el volumen necesario de tampón, hasta que todas las moléculas hayan salido de la columna y anotar este volumen, el color del Citocromo c y de DNP-Gly facilitarán el seguimiento de la separación y elución en la columna.
- El volumen de salida de la columna o volumen de elución (V<sub>e</sub>) se recogerá en fracciones de 1 a 1.5 ml en tubos adecuados y se añadirá posteriormente algún ml de H<sub>2</sub>O si fuera necesario para realizar el espectro de absorción del Citocromo c usando como referencia el tampón de cromatografía, que se mantendrá siempre en un tubo o cubeta y la muestra en otro). El espectro se representa una gráfica con la absorbancia en ordenadas frente a la longitud de onda en abscisas.
- Una vez recogida la DNP-Gly (color amarillo) la columna se debe de limpiar dejando pasar 150 ml ml de tampón y se guardará la columna a 4°C hasta su posterior utilización.

### 4.2.2. Localización de las macromoléculas.

Habitualmente la presencia de proteínas en las fracciones cromatográficas se determina midiendo la absorbancia a 280 nm (ultravioleta) u otra longitud

de onda para proteínas coloreadas, o bien cuantificando su concentración en cada fracción por un método colorimétrico (por ejemplo, Bradford). El gráfico que representa la cantidad de proteína frente al volumen de elución (o número de fracción) se denomina **cromatograma**.

## 5.-OBTENCION Y PRESENTACION DE RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFIA EN GEL FILTRACION

### 5.1. Obtención de Datos, y Presentación: Tablas y Gráficas

Representación Tabla y Figuras del Cromatograma: Representación de absorbancia frente a los mililitros de buffer eluido de la columna.

Teniendo en cuenta el **cromatograma** que representa la absorbancia de las distintas fracciones cromatograficas (ordenadas) frente a su volumen de elución en ml, (abscisas), determinar en el máximo de absorbancia, el  $V_0$  del azul dextrano y el  $V_e$  para cada proteína y calcular la relación  $V_e/V_0$ .

MARCADOR/ PROTEINA	MASA MOLECULAR	Log M	$V_e(\text{ml}),$ $V_e/V_0$	$K_{av}$
Azul Dextrano	$2 \times 10^6$ Da			
Alcohol DH	$150 \times 10^3$ Da			
Seroalbúmina b	$66 \times 10^3$ Da			
Citocromo C	$12,4 \times 10^3$ Da			
Aprotinina	$6,5 \times 10^3$ Da			
DNP-Gly	241 Da			

Se determinarán los valores de  $V_e$ ,  $V_e/V_0$ , y el coeficiente de distribución  $K_{av}$  de cada proteína. A continuación se representarán en tres gráficas de forma semi-logarítmica la masa molecular de cada molécula (en ordenadas) frente a  $V_e$ , frente a  $V_e/V_0$  y frente a  $K_{av}$  (en abscisas), ajustar la recta e interpolar el  **$V_e = 35,8$  ml** de la proteína problema y deducir su masa molecular.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Por último determinar el espectro de absorción del Azul dextrano, Citocromo C y DNP-Gly y comparar los máximos de absorción.

## 6.- CUESTIONES

### 3.1. Explicar cada una de las propuestas planteadas.

- 1 Porque se realizan los espectros de Absorción. ¿Cuál es el máximo de absorción de cada molécula y del citocromo C? ¿A qué grupos funcionales se debe dicha absorción? ¿Otras proteínas conocidas que con este grupo funcional presentarán esta misma característica?
- 2 Explicar: a) Cromatograma obtenido. b) La representación Log M versus  $V_e/V_o$ .
- 3 Porque se calcula  $K_{av}$ , y qué significa?. Porque se representa Log M versus  $K_{av}$ ?, qué aporta esta representación a los objetivos planteados?
- 4 ¿Crees que el método utilizado es el único para separar estas moléculas? ¿Por qué?. Sería conveniente realizar otro tipo de cromatografía adicional para la determinación precisa de la masa molecular de la proteína y su pureza?. En caso afirmativo, que clase de cromatografía propones y que tipo de técnicas aplicarías para determinar la calidad de la purificación.
- 5 Representa un esquema lo mas detallado posible del equipamiento utilizado (cromatógrafo de proteínas de baja presión), explicando la función y utilidad práctica de cada componente del equipo, indica en un esquema las uniones mediante tubos de silicona entre los componentes del sistema y razona porque se han realizado de ese modo. Podría haberse planteado otro tipo de uniones entre los componentes del sistema?