



Práctica 4. Cromatografía

• 1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Cromatografía de exclusión molecular

Los métodos cromatográficos se emplean para separar los componentes de una mezcla. La separación puede tener una finalidad analítica, es decir, averiguar cuáles son los componentes de una mezcla, o una finalidad preparativa, para obtener separadamente alguno de los componentes de la mezcla en mayor cantidad para su mejor estudio o utilización posterior.

Dentro de las macromoléculas biológicas, las proteínas son las que poseen una mayor diversidad de tamaño y estructura. Su estudio viene realizándose desde hace varias décadas utilizando una gran variedad de técnicas y aproximaciones metodológicas. En la mayoría de los casos se requiere de un paso previo de aislamiento o purificación.

Existen varias técnicas cromatográficas para la purificación de proteínas, pero en todas ellas hay una **fase móvil** que consiste en un fluido que arrastra a las proteínas a través de una **fase estacionaria** de consistencia sólida. Las proteínas interactúan con la fase estacionaria de distinta forma por lo que la atraviesan a distintas velocidades consiguiéndose su separación.

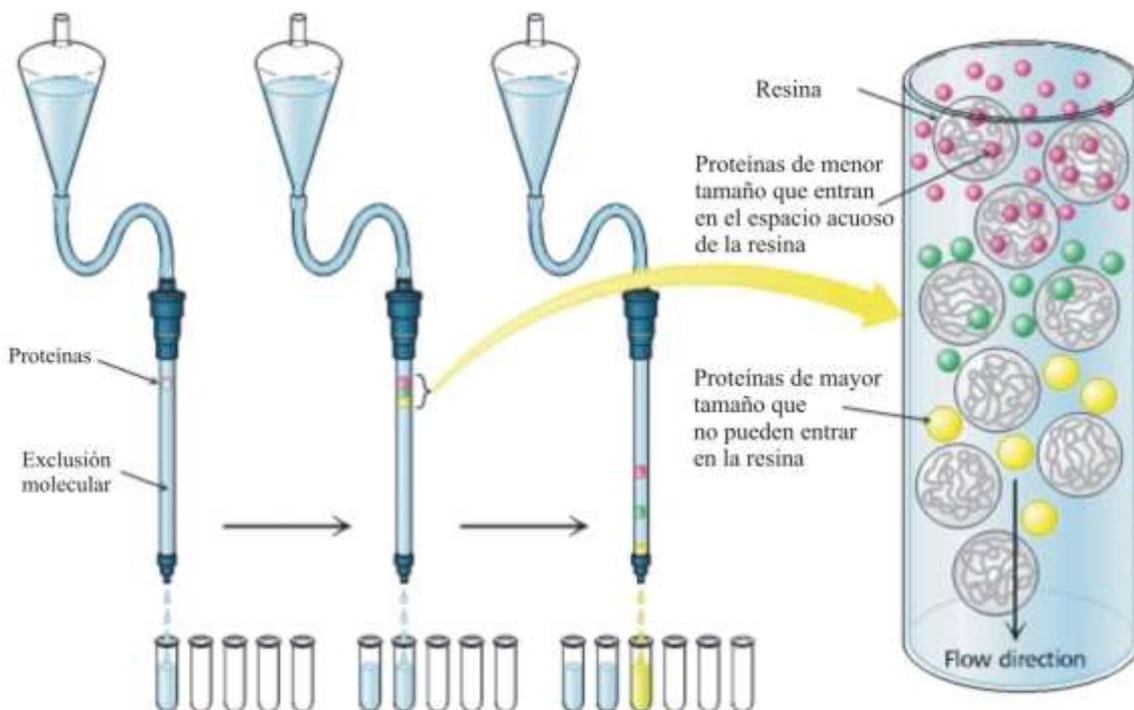
Una de las técnicas cromatográficas más utilizadas es la **exclusión molecular**. Esta técnica permite la separación de moléculas atendiendo a su tamaño molecular. La separación de los componentes se consigue al hacer pasar la mezcla a través de una resina en una columna de vidrio. Una vez que la muestra ha penetrado en la resina por completo, se arrastra mediante un eluyente, normalmente el mismo tampón o solución en el que está equilibrada la resina en la columna. Los diferentes componentes de la mezcla descienden a lo largo de la columna a diferentes velocidades, separándose unos de otros. El líquido que sale o eluye de la columna se recoge en pequeñas fracciones en diferentes tubos por lo que puede llevarse a cabo una separación total o parcial de los componentes.

La explicación de que los componentes de la mezcla desciendan por la columna a diferentes velocidades está, por un lado en el diferente tamaño de dichos componentes y por otro en la estructura de la resina. Las resinas utilizadas son polímeros insolubles en agua con diferente grado de porosidad, estos polímeros forman partículas esféricas microscópicas que constituyen un verdadero entramado molecular. El grado de porosidad es tal que algunas moléculas más pequeñas pueden penetrar en la resina pero otras de mayor tamaño no pueden hacerlo por lo que descienden libremente entre los intersticios de la resina, sin embargo las moléculas que por su menor tamaño pueden penetrar a través de los poros de la resina son retardadas pues se entretienen durante algo más de tiempo en el laberinto o

entramado poroso que supone el interior de la resina, este retraso será mayor cuanto más pequeña sea la molécula.

Para cada tipo de resina existen dos valores límite a tener en cuenta según el grado de porosidad, un valor máximo que hace referencia al peso molecular a partir del cual las moléculas son excluidas de la resina y un valor mínimo por debajo del cual todas las moléculas son incluidas completamente en la resina. Existen diferentes tipos de resinas para la cromatografía de filtración, uno de los más utilizados es el denominado Sephadex del que existen varios tipos atendiendo principalmente al rango de fraccionamiento, es decir los límites de pesos moleculares entre los que la resina es capaz de discriminar, así por ejemplo el Sephadex G-50 posee un rango de fraccionamiento para proteínas globulares entre 1500-30000 Da. Esto quiere decir que esta resina podría resolver una mezcla de dos proteínas de 8000 y 20000 Da pero no nos serviría para separar dos proteínas de 35000 y 50000 Da. Para cada caso según el tamaño de las proteínas de la mezcla elegiremos una resina u otra.

Esquema representativo de la cromatografía de exclusión molecular



Los resultados de una cromatografía de exclusión molecular se expresan en forma de un **diagrama de elución** donde se representa la aparición del soluto en forma de concentración, absorbancia, etc., en función del volumen de eluyente que pasa por la columna. El **volumen de elución** (V_e) para una sustancia corresponde con el volumen de eluyente que ha pasado por la columna desde la aplicación de la muestra hasta la aparición del máximo de concentración de dicha sustancia.

En una cromatografía es importante considerar dos parámetros:

1.- En primer lugar el **volumen de exclusión** o volumen muerto (V_0) es decir el volumen que queda en el exterior de la resina, o en otras palabras el volumen de eluyente de las

moléculas que son excluidas por la resina. Para su determinación se suele emplear una sustancia coloreada de alto peso molecular como el Azul dextrano (PM=2.000.000). Bastará medir el volumen eluido por la columna desde la aplicación hasta la aparición del color azul del dextrano característico.

2.- El otro parámetro importante es el **volumen de la fase estacionaria** (V_i) es decir el volumen de eluyente en el interior de la resina al cual pueden acceder las moléculas más pequeñas, para calcularlo podemos recurrir al mismo sistema que antes utilizando en este caso una sustancia coloreada de muy bajo peso molecular pudiendo ser una sal como el dicromato potásico, la vitamina B12, etc.

Para normalizar los resultados de la cromatografía, en lugar de expresar el volumen de elución de un componente se puede expresar el **coeficiente de distribución** (K_d) que representaría la fracción de la fase estacionaria accesible a la difusión del soluto.

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

En algunos casos no es posible determinar con precisión V_i , en este caso se puede aproximar su valor conociendo el volumen del lecho (V_t), cuya determinación podemos hacer bien matemáticamente o bien midiendo el volumen equivalente de agua con una probeta, en este caso $V_t - V_o$ nos daría el volumen que ocuparía la resina tanto de la fase estacionaria de su interior como el volumen de las fibras que constituyen su matriz.

En este caso el coeficiente normalizado que emplearíamos sería K_{av} :

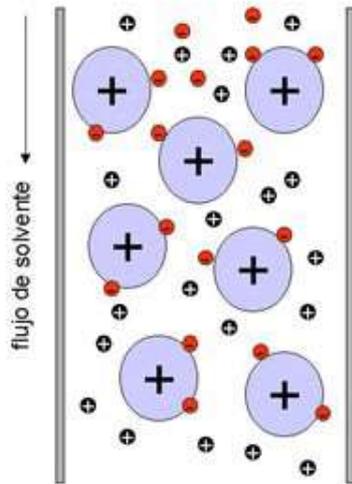
$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Tanto K_d como K_{av} definen la conducta cromatográfica del soluto independientemente de la longitud del lecho o grado de empaquetamiento. Existen otras formas de normalizar los resultados por ejemplo: V_e/V_t o V_e/V_o

1.2.- Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se fundamenta en las propiedades ácido-base de las proteínas. **Una proteína, a pH menor de su pI (punto isoelectrico), tendrá carga positiva y a pH mayor de su pI presentará carga negativa.** Por lo que, en el primer caso, se unirá a una resina con carga negativa (Carboximetil-celulosa, CM-celulosa) y en el segundo a una resina con carga positiva (Dietilaminoetil-celulosa, DEAE-celulosa).

PRINCIPIO DE LA CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO



Las partículas cargadas negativamente se unen a la matriz sólida cargada positivamente, y son retenidas.

Las partículas cargadas positivamente son rechazadas por la matriz sólida cargada positivamente y son eluidas.

La elución de las partículas cargadas negativamente se consigue cambiando el pH del solvente hasta igualarlo a su punto isoeléctrico o hasta invertir su carga neta.

Una vez unida la proteína a las resinas, estas se pueden eluir de dos formas distintas:

1. **variando el pH** del medio hasta alcanzar el pI .
2. **mediante un gradiente iónico** añadiendo el contraión correspondiente (Na^+ en el caso de intercambio catiónico o Cl^- para el intercambio aniónico).

Dado que el pI de la Hemoglobina es aproximadamente 6.1, a pH de 8 la proteína estará con carga negativa neta y a pH 4 tendrá carga positiva. En la práctica comprobaremos su comportamiento en un intercambiador aniónico a pH 4 y pH 8.

• 2.- OBJETIVOS

Conocer e interpretar los principios de separación de cromatografías de exclusión molecular y de intercambio iónico.

En esta práctica el **primer día** se empaquetarán los soportes que se van a utilizar para la cromatografía de exclusión molecular y la de intercambio iónico previamente hinchadas en el tampón adecuado y se regulará el flujo en ambos casos a 1,5 ml/min. El **segundo día**, se procederá a la aplicación y elución de las muestras. Además, se realizará la detección de las muestras cromatografiadas y se obtendrá el perfil de elución.

• 3.- MATERIALES

1. Columna de exclusión molecular Sephadex G-75 (rango de separación 3000 -100000 Da).
2. Columna DEAE-celulosa.
3. Solución de azul dextrano (PM: 2000000 Da, 5 mg/ml)
4. Solución de hemoglobina (5 mg/ml).
5. Solución de dicromato de potasio (PM: 294.2 Da, 10 mg/ml).
6. Tampón A: Tris-HCl 50 mM pH 8.

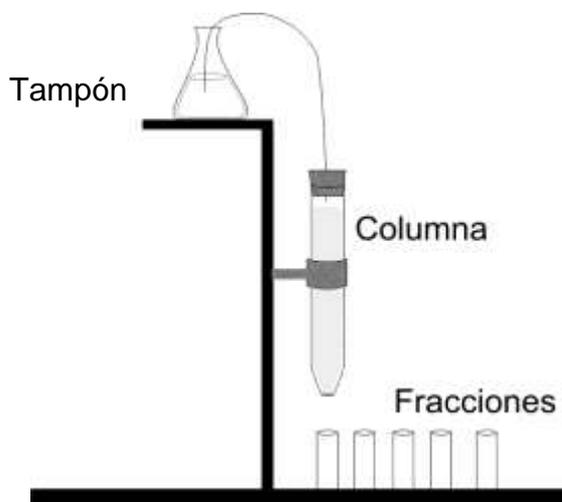
7. Tampón B: Tris-HCl 50 mM pH 8 + 0.5 M NaCl.
8. Tampón C: Acetato de Na 50 mM pH 4.
9. Tampón D: Acetato de Na 50 mM pH 4 + 0.5 M NaCl.
10. Pipeta Pasteur, micropipetas, tubos eppendorf, gradilla, cronómetro, rotulador permanente, cubeta y espectrofotómetro.

• 4.- PROTOCOLO A REALIZAR

4.1.- Trabajo durante el primer día: preparación de las columnas.

4.1.1.- Preparación de la columna de exclusión molecular:

- A) Preparar 200 ml del **tampón A** a partir de una disolución madre de Tris-ClH 0,5 M pH 8
- B) Empaquetar la resina hasta una altura de 30-35 cm. Pasar 2 volúmenes de tampón para equilibrar y regular el flujo de la misma hasta alcanzar 1,5 ml/min aproximadamente.



4.1.2.- Preparación de la columna de intercambio iónico:

- A) Preparar 40 ml del **tampón A** a partir de una disolución madre de Tris-ClH 0,5 M pH 8 y 25 ml del **tampón B** a partir de las siguientes disoluciones madre: Tris-ClH 0,5 M pH 8 y NaCl 2 M, en el caso de trabajar a pH 8. Preparar 40 ml del **tampón C** a partir de una disolución madre de acetato de Na 0,5 M, pH 4 y 20 ml de **tampón D** a partir de las siguientes disoluciones madre: acetato de Na 0,5 M, pH 4 y ClNa 2 M, en el caso de trabajar a pH 4.
- B) Empaquetar la columna de DEAE-celulosa hasta una altura de 5 cm, pasar 2 volúmenes (15 ml) de tampón para equilibrar y regular el flujo de la misma hasta alcanzar 1,5 ml/min aproximadamente. Usar **tampón A** ó **C** según indique el profesor.

4.2.- Trabajo durante el segundo día.

4.2.1.- Trabajo a realizar empleando la columna de exclusión molecular:

1. Numerar 30 eppendorf de 1.5 ml.
 2. Extraer de la columna el líquido que sobrepasa la superficie de la resina con ayuda de una pipeta Pasteur, con cuidado de no perturbar el lecho cromatográfico.
 3. Aplicar 0,2 ml de la mezcla problema constituido por: Azul dextrano, dicromato potásico y proteína(s) problema(s).
 4. **Colocar bajo la salida de la columna el primer eppendorf y abrir el paso de líquido con la llave. Cuando la muestra coloreada haya penetrado en la resina, añadir a la columna con ayuda de una pipeta Pasteur tampón A. Para realizar este paso es recomendable añadir el tampón sobre las paredes de la columna, no añadir el tampón directamente sobre la resina.**
 5. Una vez que haya una altura de 4 cm de tampón sobre la resina, volver a conectar la columna al frasco de Erlenmeyer.
 6. Recoger fracciones de 1.5 ml de forma sucesiva y ordenada en eppendorf previamente numerados. Observar en los tubos la presencia de sustancias coloreadas. Anotar el volumen en que eluyen el azul dextrano (V_0) y el dicromato de potasio (V_i).
 7. Medir la absorbancia a 412 nm.
 8. **Realizar un perfil cromatográfico**, es decir, representar en una gráfica la Abs. frente al volumen.
9. **Guardad 20 μ l del tubo de mayor absorbancia a 4°C.**

4.2.2.- Trabajo a realizar empleando la columna de intercambio iónico:

1. Numerar eppendorf de 1,5 ml (del 1 en adelante)
2. Depositar 0.2 ml de la solución de hemoglobina en la columna de DEAE-celulosa equilibrada con los tampones A o C.
3. **Colocar bajo la salida de la columna el primer eppendorf y abrir el paso de líquido con la llave. Cuando la muestra coloreada haya penetrado en la resina, añadir a la columna con ayuda de una pipeta Pasteur tampón A o C de acuerdo al pH en el que esté equilibrada la columna. Para realizar este paso es recomendable añadir el tampón sobre las paredes de la columna, no añadir el tampón directamente sobre la resina.**
4. Mantener una altura de 4 cm de tampón por encima de la resina.
5. Pasar aproximadamente dos volúmenes (16 ml) de tampón. Este paso se denomina lavado. Luego cerrar la llave.
6. Eluir el/los compuestos retenidos en las matrices con tampón B ó D según el pH de la columna. Para ello, abrir la llave y dejar pasar el tampón de lavado hasta que no se observe líquido por encima de la resina, luego agregar el tampón B o D con ayuda de una pipeta Pasteur.
7. Recoger fracciones de 1.5 ml de forma sucesiva y ordenada en tubos previamente numerados. Observar en los tubos la presencia de sustancias coloreadas y medir la absorbancia a 412 nm.

8. **Realizar el perfil de elución.** Indicar el lavado y la elución.
9. **Guardad 20 μ l del tubo de mayor absorbancia a 4°C.**

5.- EVALUACIÓN

5.1.- Se pedirá a cada alumno que realice un informe en el que se recojan los resultados obtenidos en los apartados 4.1. y 4.2. de este protocolo. Dicho informe debe incluir la gráfica con el perfil cromatográfico que se pide que el alumno realice en los **epígrafes 4.2.1.8. y 4.2.2.8.**

5.2.- Igualmente, se pide a cada alumno que en el informe incluya la respuesta a las preguntas que se muestran a continuación:

... en relación con la cromatografía de exclusión molecular:

1. ¿Cuántas sustancias coloreadas aparecen en la columna durante el desarrollo de la cromatografía?.
2. ¿Cuál es el V_t de la cromatografía?
3. ¿Qué son y cuál es el valor de los V_o y V_i ?
4. ¿Por qué se realiza el cálculo del K_{av} en lugar de emplear directamente el volumen de elución?
5. En una exclusión molecular Sephadex G-50 (rango de separación 1500-30000). ¿Podría haberse tomado como referencia la ovoalbúmina (45 Kd) para confeccionar la curva de calibración de la columna? Justifique la respuesta.
6. ¿Cuál es el valor de K_d y K_{av} para la hemoglobina?
7. ¿Cuál es el orden de elución de las siguientes proteínas en una columna de Sephadex G-50: Catalasa (222 kDa), quimotripsina (21.6 kDa), concanavalina B (42.5 kDa), lipasa (6.7 kDa) y mioglobina (PM 17 kDa)?

... en relación con la cromatografía de intercambio iónico:

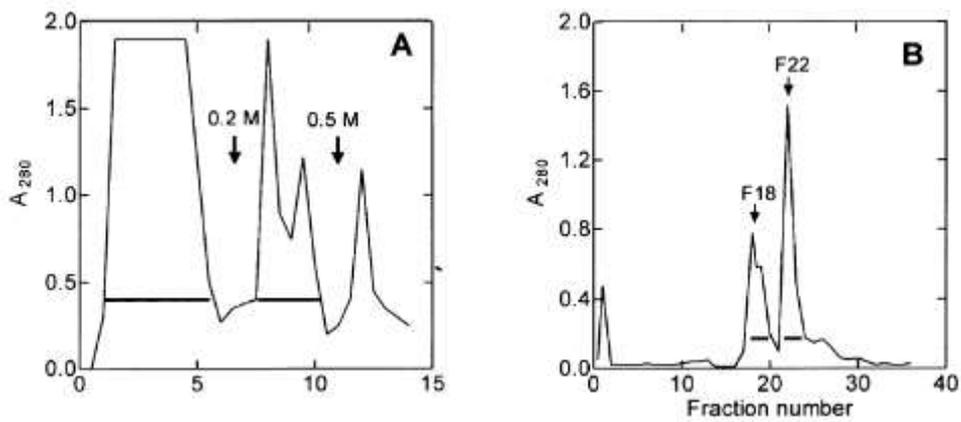
1. ¿Qué sucede cuando se agrega el tampón B o D en la columna?
2. Realizar una tabla indicando como "retenida" o "no retenida" la fracción de hemoglobina en función del pH, para el lavado y elución de cada columna.
3. ¿De qué modo puede mejorar la elución de las proteínas retenidas en la matriz? Fundamente la respuesta.
4. ¿En qué orden eluirán las siguiente proteínas de una columna de intercambio iónico de CM-celulosa al aumentar el gradiente de sal a pH 7: hemoglobina (pI 6.8), lisozima (pI 11), pepsina (pI 1) y ribonucleasa A (pI 9.6)?

5. Purificación de proteínas antifúngicas de flores de girasol.

A, Cromatografía de intercambio catiónico de la fracción proteica resistente al calor. Las flechas indican la elución con 0.2 and 0.5 M NaCl.

B, La fracción eluída con 0.2 M de NaCl de A se pasó por una cromatografía de filtración en gel Superosa 12 FPLC. Las barras indican las fracciones con actividad antifúngica.

- En **A**, Cual es la carga de la fracción eluída?
- Que fracción tiene más carga, la fracción eluída con 0.2 M o con 0.5 M NaCl?
- En **B**, Como podría determinar la pureza de F18? Justifique su respuesta.
- Que fracción tiene mayor peso molecular F18 o F22?



6.- ENTREGA DEL TRABAJO

Cada alumno debe generar:

Un fichero Word con los resultados que respondan a lo solicitado en el epígrafe 5.- EVALUACIÓN.

Para nombrar de forma sistemática, se debe seguir el siguiente ejemplo: soy el alumno **Emilio Moreno Serrano**, generaré el siguiente fichero:

4_MorenoSerrano_Emilio.doc Este fichero se entregará (COMO UN ÚNICO ENVIO) a través del sistema de TAREAS al que el alumno tiene **acceso personalizado** en la **página web de la asignatura**.

NO SE ACEPTARÁN ENVIOS POR EMAIL NI FUERA DE PLAZO.