

13. Cromatografía de filtración en gel

José Luis Caballero Repullo, Juan Muñoz Blanco, Enriqueta Moyano Cañete

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba

RESUMEN

La cromatografía de filtración en gel es una técnica que permite separar moléculas en función de su tamaño molecular. La capacidad separadora reside fundamentalmente en el gel cuya matriz consta de un gran número de esferas porosas microscópicas. Cada gel se caracteriza por un rango de fraccionamiento que depende del tamaño de sus poros. El objetivo de esta práctica es separar una mezcla de sustancias de distinto peso molecular por medio de una cromatografía en una columna de Sephacryl S-200 HR y determinar los correspondientes parámetros que caracterizan el comportamiento cromatográfico de cada sustancia.

Palabras clave: exclusión, purificación, separación.

Abreviaturas empleadas. FMN: mononucleótido de flavina; TE: tampón de elución

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

La purificación de una sustancia de interés se hace siguiendo los criterios de separación basados en alguna propiedad física o química que diferencia al compuesto en cuestión de otros que en principio estarían ligados a él.

Entre los diversos criterios de separación cabe citar:

- Aquellos que fraccionan las moléculas basándose en sus tamaños, como la cromatografía de filtración en gel y la ultracentrifugación.
- Los que separan las moléculas atendiendo a las diferencias en la carga eléctrica neta del compuesto, como la cromatografía de intercambio iónico y la electroforesis.
- Los que se basan en la retención específica de sólo uno o varios tipos de moléculas, entre los que cabe destacar la cromatografía de afinidad.
- Procedimientos de separación basados en diferencias de solubilidad.
- Métodos basados en la adsorción diferencial a determinadas matrices.

La cromatografía de filtración en gel, más corrientemente llamada de exclusión molecular, es una técnica de purificación muy extendida y apreciada debido a su sencillez y eficacia en la resolución de mezclas complejas de

macromoléculas. Esta técnica puede utilizarse con buenos resultados con fines analíticos (por ejemplo, para la determinación de pesos moleculares).

1. 2. Principio de la cromatografía de filtración en gel

Con la cromatografía de filtración en gel se separan moléculas en virtud de sus diferencias de tamaño. La capacidad separadora reside en el gel cuya matriz consta de un gran número de esferas porosas microscópicas. Estas esferas están constituidas por largas cadenas de polímeros unidas entre si por enlaces químicos para formar una red tridimensional.

El gel, una vez hidratado, se deposita adecuadamente en una columna hueca de vidrio (Fig. 1) quedando listo para su uso.

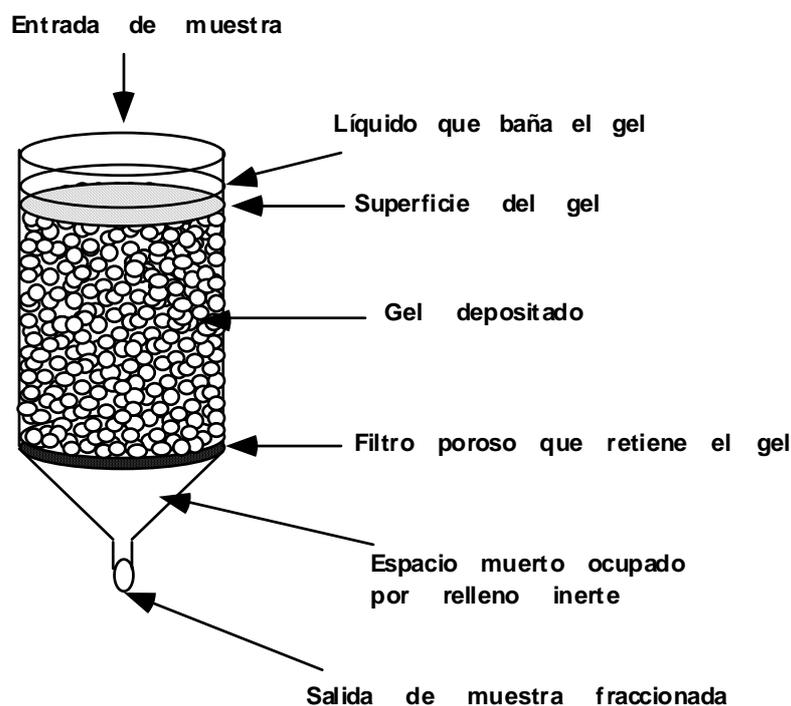


Figura 1. Esquema de una columna de cromatografía de filtración en gel

En el interior de una columna de cromatografía pueden distinguirse varios volúmenes (Fig. 2):

- El volumen total (V_t), que es el volumen que ocupa el cilindro de gel hidratado.
- El volumen de vacío (V_o), o el volumen existente entre las esferas del gel.
- El volumen ocupado por las esferas del gel, que se expresa como la diferencia entre los dos volúmenes anteriores: $V_t - V_o$.

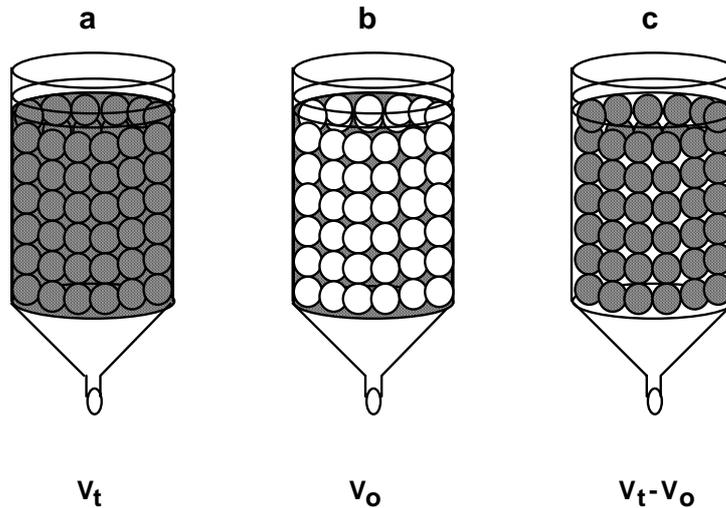


Figura 2. Volúmenes de una columna cromatográfica

Cuando una mezcla de moléculas de diferentes tamaños se hace pasar a través de la columna de gel, se produce la separación en virtud del siguiente principio:

- Las moléculas de muy pequeño tamaño penetran en el interior de las esferas que componen el gel y, por consiguiente, no son extraídas de la columna hasta que no ha pasado a través de ella un volumen de líquido igual a su volumen total (V_t). Sin embargo, aquellas moléculas cuyo tamaño es mayor que el de los poros de las esferas del gel, no pueden penetrar en su interior y atraviesan la columna recorriendo únicamente el volumen vacío (V_o), siendo las primeras en salir de la columna. El resto de las moléculas, de tamaño intermedio, presentan una mayor o menor facilidad para difundir al interior de las esferas en función de su tamaño, siendo extraídas fraccionadamente con volúmenes que están comprendidos entre el V_t y el V_o .

Cuanto mayor es una molécula, menos capacidad tiene para acceder al interior de las esferas del gel y, por tanto, menor es el volumen de líquido que se requiere para extraerla de la columna.

Teniendo en cuenta que para las proteínas globulares el tamaño está, en general, relacionado con el peso molecular, este tipo de cromatografía separa las sustancias en función de dichos pesos moleculares, obteniéndose primero las más pesadas.

1.3. Grados de los Geles

Cada gel se caracteriza por un rango de fraccionamiento que depende del tamaño de sus poros. Éste viene expresado por dos números que representan pesos moleculares, correspondiendo el menor de ellos al peso molecular máximo de una sustancia que difunda perfectamente a través de todos los poros del gel, y el mayor, al peso molecular mínimo que ha de tener una sustancia para que pueda ser excluida de las esferas del gel.

Las sustancias de peso molecular fuera de dicho rango no son fraccionadas sino que se extraen conjuntamente con el volumen vacío (V_o), las de peso molecular mayor que el rango, o con el volumen total (V_t), las más pequeñas que dicho rango.

En el mercado se encuentran geles con rangos de fraccionamiento muy diversos (desde 1.000-5.000, hasta 10.000-4.000.000), lo que posibilita la separación a diferentes escalas de pesos moleculares.

1.4. Factores que influyen en la separación

Además de la diferencia intrínseca de tamaño existente entre las moléculas que van a ser cromatografiadas, hay diferentes factores que influyen en una correcta separación de las mismas:

- Longitud de la columna. La capacidad de separación de sustancias de diferente tamaño aumenta con la longitud de la columna.
- Flujo. La resolución de la separación disminuye al aumentar el flujo del líquido con que son arrastradas las moléculas a lo largo de la columna. Normalmente el flujo oscila entre 2 y 10 cm h^{-1} .
- El volumen de la muestra a cromatografiar. Debe ser pequeño comparado con el volumen total de la columna. Las mejores separaciones se obtienen aplicando volúmenes de muestra iguales o menores al 5% del volumen total.
- Empaquetado del gel en la columna. Las propiedades separadoras del gel se alteran profundamente, e incluso desaparecen, cuando un gel no está empaquetado homogéneamente en la columna o se encuentra excesivamente comprimido.

1.5. Caracterización del comportamiento cromatográfico de un soluto

Los resultados de la cromatografía de filtración en gel se expresan habitualmente en forma de gráficas (cromatogramas) donde se representa la cantidad de solutos en función del volumen de líquido extraído de la columna (Fig. 3).

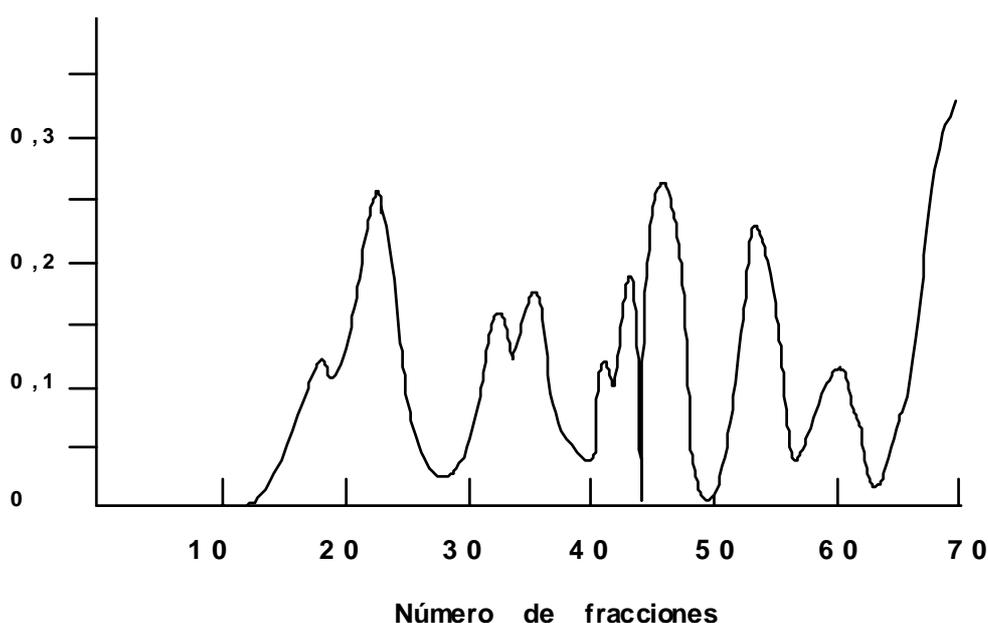


Figura 3. Cromatograma de filtración en gel

Se pueden utilizar varios parámetros para caracterizar el comportamiento cromatográfico de una sustancia:

- Volumen de elución (V_e). Se define como el volumen de líquido necesario para extraer una determinada sustancia. Presenta el inconveniente de depender fuertemente del volumen total de la columna. El volumen de elución (V_e) de una sustancia varía entre V_t y V_o .

- Coeficiente de distribución (K_{av}). Es el parámetro más correcto y también el más ampliamente utilizado. El K_{av} de una sustancia se define como:
$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

El valor de K_{av} oscila entre 0 (cuando $V_e = V_o$) y 1 (cuando $V_e = V_t$), y representa la fracción de volumen del interior de las esferas a la que accede cada sustancia en virtud de su tamaño.

Además, el coeficiente de distribución está relacionado con el logaritmo del peso molecular de un soluto, a partir de su K_{av} , cromatografiando por filtración varios patrones de peso molecular conocido.

1.5. Objetivos

Los objetivos de esta práctica son:

1) Fraccionamiento de una mezcla de sustancias de distinto peso molecular por medio de cromatografía en una columna de Sephacryl S-200 HR.

2) Determinación espectrofotométrica de las sustancias fraccionadas y representación de los resultados en forma de cromatograma (absorbancia frente al número de fracción).

3) Determinación del V_t y V_o de la columna.

4) Determinación del V_e de un compuesto y cálculo de su K_{av} .

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

2.1. Equipamiento

Espectrofotómetro.
Cuvetas de espectrofotómetro.
Columnas.

2.2. Material

Gradillas.
Tubos de ensayo.
Pipetas de 1 y 5 mL.
Pipetas automáticas.

2.3. Reactivos

Agua destilada.

Sephacryl S-200 HR.
Azul de dextrano.
Citocromo c.
FMN.
Ferricianuro.

3. PROTOCOLO A REALIZAR

3.1. Cada grupo recibe una columna ya equilibrada en el tampón de elución (TE), una alícuota de la mezcla de muestras (azul de dextrano, citocromo c, FMN y ferricianuro).

3.2. Se coloca la columna en el soporte de forma que se encuentre en posición vertical (la superficie del gel ha de estar completamente horizontal, para asegurar que la muestra entre por igual). Se quita el tapón inferior de la columna y se deja que caiga el tampón por gravedad hasta que no quede sobre la superficie del gel.

3.3. Inmediatamente se aplica la muestra sobre la columna y se espera a que penetre en el gel. Se añade entonces un cierto volumen de tampón y se comienza a recoger fracciones en orden sucesivo (una fracción cada tres o cuatro gotas).

(La mezcla de sustancias se irá separando por tamaños que será visualizado debido al diferente colorido de cada uno de los componentes: azul para el azul de dextrano, rojo para el citocromo c, amarillo fuerte para el FMN y amarillo pálido para el ferricianuro).

3.4. Una vez recogidas todas las muestras, se mide su absorbancia en el espectrofotómetro, anotando las medidas de cada una de ellas, en las cuatro longitudes de onda a que absorben los diferentes compuestos:

O.D.= 618 nm, para azul dextrano

O.D.= 410 nm, para citocromo c.

O.D.= 450 nm, para FMN.

O.D.= 420 nm, para ferricianuro

3.5. Se representan las medidas obtenidas en un cromatograma y se calcula a partir de los picos de las muestras, el V_t y V_o de la columna y el V_e y K_{av} del citocromo c.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Se realiza un cromatograma como el de la Figura 3, representado el volumen de elución para cada sustancia frente a la absorbancia. El orden de salida es el de pesos moleculares decrecientes: Azul dextrano, FMN, citocromo c y ferricianuro.

4.2. El cálculo de V_t y V_o se efectúa a partir de los volúmenes correspondientes a los máximos de elución del azul dextrano y ferricianuro, respectivamente.

4.3. El cálculo de V_e del citocromo c se determina como en el punto 4.2, a partir del volumen correspondiente a su máximo de absorbancia. El valor de K_{av} se calcula aplicando la fórmula $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$, utilizando los valores de V_o y V_t determinados previamente.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander RR, Griffiths JM (1993) "Basic Biochemical Methods". Wiley-Lyss (Nueva York).
- Devaux G (1984) "Técnicas de Bioquímica Clínica". JIMS (Barcelona).
- Fischer L (1990) "Gel Filtration Chromatography". Elsevier (Amsterdam).
- Plummer DT (1987) "An Introduction to Practical Biochemistry". McGraw-Hill (London).
- Pineda M, Cárdenas J (1988) "Espectroscopia Ultravioleta-visible de Compuestos Biológicos". CAJASUR (Córdoba).
- Valcárcel M, Gómez A (1988) "Técnicas Analíticas de Separación". Reverté (Barcelona).