

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

10 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es que los estudiantes aprendan los principios de la cromatografía de intercambio iónico mediante la separación de dos moléculas cargadas en dos etapas, utilizando un gradiente de sales.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	Conservación
A. Matriz de intercambio iónico, CM-celulosa	Temperatura ambiente
B. Tampón concentrado de acetato de potasio (KOAc), pH 6,0	Temperatura ambiente
C. Colorante azul/verde	Temperatura ambiente
D. Colorante rojo	Temperatura ambiente
Columnas de cromatografía	
Pipetas de plástico	
Tubos cónicos de 15 ml	
Microtubos de centrífuga	

Todos los componentes de esta práctica pueden almacenarse a 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

- Tubos de ensayo (8-10 ml).
- Soporte con abrazaderas para columnas.
- Vasos de precipitación o matraces Vidrio (100 o 200 ml).
- Probeta Graduado (100, 250, 500 ml).
- Agua destilada.
- Pipetas de 5 ml y pera de succión.
- Espectrofotómetro y cubetas (opcional).

3. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los compuestos biológicos están cargados positivamente o negativamente cuando se expone a un pH en el intervalo 2-10. Cuando se altera el pH, la carga neta de una biomolécula puede cambiar de neutra a una carga neta positiva o negativa. La cromatografía de intercambio iónico utiliza un soporte o matriz sólido (adsorbente), que puede tener carga positiva (cationes) o carga negativa (aniones). La separación de los compuestos se basa en un equilibrio de las moléculas adsorbidas a la matriz con el disolvente de elución. Este equilibrio puede ser desplazado gradualmente por el cambio de la fuerza iónica o pH del tampón de elución, lo que debilita las fuerzas electrostáticas y eluye las moléculas. Esto permite la separación de moléculas con pequeñas diferencias.

La matriz sólida generalmente es una resina sintética (poliestireno reticulado) o un derivado de celulosa unido covalentemente al grupo funcional deseado para crear un intercambiador de iones débil o fuerte. Por ejemplo (Tabla 1), el grupo funcional del intercambiador catiónico débil es un ácido carboxílico, un intercambiador fuerte es un sulfonato. Del mismo modo, los intercambiadores de aniones son derivados de cualquiera de aminas secundarias o terciarias.

Tabla 1

Intercambiador catiónico		Intercambiador aniónico	
-CH ₂ COO	R-SO ₃	-CH ₂ NHR ₂	-CH ₂ NR ₃

La carboximetilcelulosa o CM-celulosa es un intercambiador de cationes que tiene los grupos -CH₂OH de la celulosa modificados como -CH₂OCH₂COOH. El intercambiador correspondiente está sustituido con -CH₂OCH₂CH₂N (CH₂CH₃)₂ (DEAE-celulosa). La capacidad la matriz se determina por el número de meq/ml de un material estándar que pueda ser adsorbido. En el caso de la celulosa, hay un límite para el número de sustituciones que se pueden haber por unidad de celulosa. Si el número de sustituciones es demasiado alto, la matriz se convertirá en un material muy soluble en agua. Las celulosas son los soportes preferidos para las proteínas biológicamente activas debido a que no desnaturalizan las proteínas tan fácilmente como las resinas sintéticas.

La adsorción y la separación se basan en las diferencias entre la interacción electrostática de las moléculas y la matriz iónica. En la figura 1 se muestra el principio del intercambio comentado.

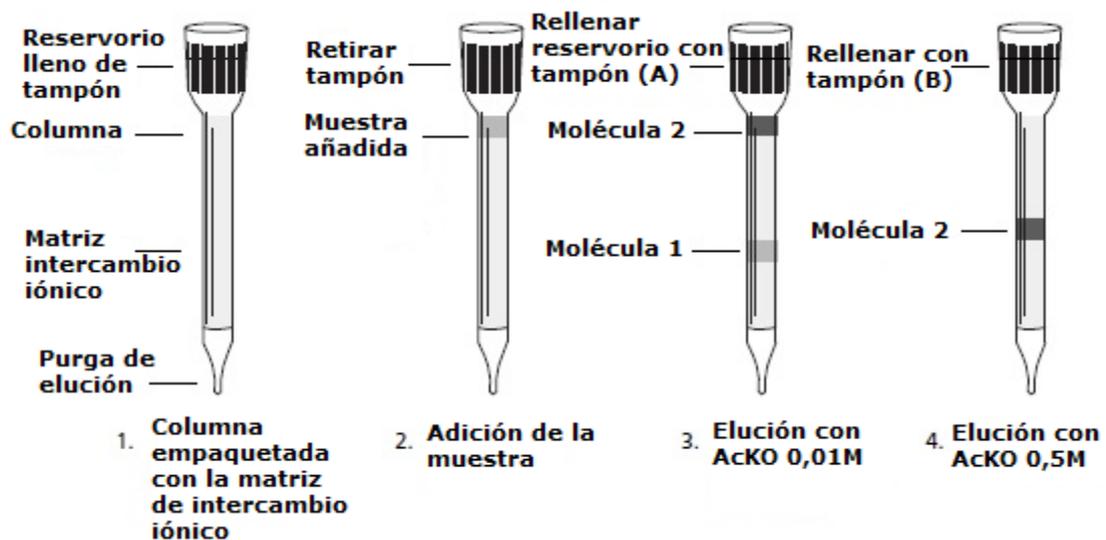


Figura 1: Principios del funcionamiento del intercambio iónico.

La molécula 2 debe tener una mayor capacidad de unión (mayor afinidad) con la matriz que la molécula 1. Al cambiar la fuerza iónica o el pH, el punto de elución para la molécula 1 se obtiene antes que el de la molécula 2.

La cromatografía de intercambio iónico se puede utilizar para separar dos moléculas pequeñas, como aminoácidos, o grandes, como las proteínas, ARN y ADN. Las moléculas pueden ser separadas por la diferencia de sus cargas (positiva o negativa), o por la cantidad de las mismas.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es que los estudiantes aprendan los principios de la cromatografía de intercambio iónico mediante la separación de dos moléculas cargadas en dos etapas, utilizando un gradiente de sales.

4.1 Precauciones

En esta práctica no se utilizan materiales de origen humano.

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

Evitar errores comunes

1. Diluir los tampones correctamente (punto **4.2. A. Preparación de tampones**).
2. Evitar perder matriz cuando se decanta el agua de la mezcla (punto **4.2. B. Preparación de la matriz de intercambio iónico**).
3. Al empaquetar las columnas, evitar las burbujas y bolsas de aire que puedan interrumpir el flujo de la muestra en el interior de la columna (punto **5. A. Empaquetamiento de la columna**).

4.2 Requisitos de tiempo (aproximado) de los procedimientos de la práctica

Los materiales pre-práctica se pueden preparar el día anterior a la práctica. La preparación debe durar alrededor de una o dos horas.

Una vez preparados estos materiales se deben tapar los tampones y la matriz del intercambio iónico con papel de aluminio o envoltura de plástico.

4.3 Preparaciones previas

A. Preparación de tampones.

1. Marcar como "KOAc 0,5 M" (acetato de potasio) 10 pequeños vasos o matraces.
2. Diluir tampón concentrado de acetato de potasio pH 6,0 (Componente B) mediante la adición de 25 ml de tampón (Componente B) a 100 ml de agua destilada. Este será el tampón KOAc 0,5M.
3. Alícuotar 10 ml del tampón KOAc 0,5M en cada uno de los vasos o matraces marcados "KOAc 0,5 M".
4. Marcar como "KOAc 0,01 M" 10 pequeños vasos o matraces.
5. Añadir 15 ml de tampón KOAc 0,5M del punto 2 a 735 ml de agua destilada. Este será el tampón KOAc 0,01M.
6. Alícuotar 30 ml de KOAc 0,01M a cada uno de los 10 vasos o matraces marcados "KOAc 0,01M".

B. Preparación de la matriz de intercambio iónico.

1. Añadir el contenido completo del componente A, la matriz de intercambio iónico CM-celulosa a un vaso de precipitación de tamaño medio (250 ml).
2. Para hidratar la matriz de intercambio iónico añadir 150 ml de KOAc 0,01M al vaso de precipitación que contiene la matriz de intercambio iónico. Remover la mezcla de forma ocasional durante 5 minutos. Utilizar una cuchara o una espátula para romper los grumos duros de celulosa. Dejar que la matriz de intercambio iónico se asiente durante 10 minutos.
3. Después que la mayor parte de la matriz de intercambio iónico se haya asentado, decantar con cuidado y eliminar el líquido (debe ser muy cuidadoso para evitar perder la matriz de intercambio iónico que se haya asentado en el fondo del vaso).
4. Añadir 150 ml de tampón KOAc 0,01M nuevo a la matriz de intercambio iónico previamente hidratada. Agitar brevemente para mezclar bien la suspensión y dejar que la matriz de intercambio iónico se asiente durante 10 minutos. Decantar como en el paso 3.
5. Después de la segunda sedimentación y decantación, añadir 50 ml de tampón KOAc 0,01M a la matriz de intercambio iónico y remover la suspensión para mezclarla bien.
6. Mezclar la matriz de intercambio iónico y alícuotar aproximadamente 6 ml de la suspensión con la matriz de intercambio iónico en los tubos cónicos de 15 ml proporcionados con el kit. Tapar los tubos y distribuir un tubo por grupo.

C. Preparación de la muestra mezcla y del patrón estándar.

1. Marcar 10 tubos de microcentrífuga como "muestra".
2. Añadir 2 ml de colorante azul/verde (C) a la botella de colorante rojo (D). Tapar y mezclar bien. Alícuotar 0,5 ml en los tubos marcados como "muestra".
3. Marcar 10 tubos de ensayo como "estándar".
4. Alícuotar 6 ml de colorante azul/verde (C) en tubos de ensayo marcados como "estándar".

4.4 Material que debe recibir cada grupo

- 1 columna unida a un soporte.
- 1 vaso de precipitación con KOAc 0,01M (30 ml).
- 1 vaso de precipitación con KOAc 0,5M (10 ml).
- 1 tubo "muestra" de 0,5 ml.
- 1 tubo de ensayo de solución "estándar" (6 ml).
- 1 tubo con la matriz de intercambio iónico (suspensión) (6 ml).
- 3 pipetas de transferencia.
- 1 vaso pequeño vacío.
- Pipeta de 5 ml y una bomba de succión.
- 6 tubos de microcentrífuga.
- Tubos de ensayo (8-10 ml de capacidad) y un "rack" para la cuantificación de la muestra (opcional).

5. PRÁCTICA

Lea todas las instrucciones antes de comenzar la práctica.

NOTA: Es muy importante usar el tampón KOAc correcto que se indica a lo largo del procedimiento experimental. Asegúrese de leer la etiqueta de la botella que contiene el tampón KOAc y no mezclarlos.

A. Empaquetamiento de la columna.

1. Montar verticalmente una columna en un soporte de anillo como se muestra en la figura 2, asegurándose que queda recta. Mantenga ambas tapas de la columna, superior e inferior, colocadas.

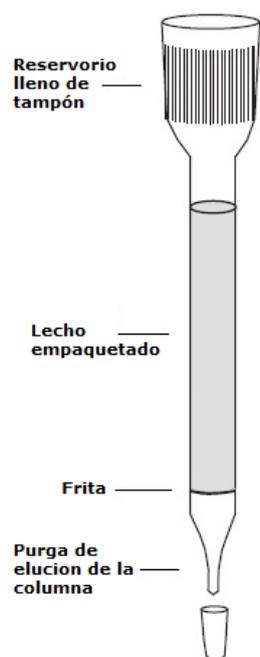


Figura 2: Esquema de una columna empaquetada

2. Medir 1 ml de agua en un tubo de ensayo vacío. Esto servirá de referencia más adelante.
3. Realizar un lavado de la columna con tampón con 0,01 M KOAc.
4. Retire el tapón de la purga de elución para eliminar el tampón. Vuelva a colocar el tapón.
5. Mezclar la suspensión hasta obtener una mezcla homogénea, pipetear todo el contenido de la suspensión y verter en la columna dejando que fluya hacia abajo de las paredes interiores del depósito. Si la suspensión se queda atascado en el depósito, utilizar una pipeta para volver a suspender la suspensión y continuar empaquetando la columna. Si el flujo de la suspensión es detenido por una bolsa de aire, dejar de verter y golpear suavemente la columna hasta que se elimina el aire y la suspensión vuelva a fluir hacia abajo; continuar vertiendo el resto de la suspensión.
6. Verter tampón KOAc 0,01M adicional en el depósito. Colocar un vaso vacío debajo de la columna y quitar el tapón de la purga de elución. Eluir el tampón y permitir que la suspensión se asiente para obtener el lecho empaquetado de la columna.
7. Añadir KOAc 0,01M adicional para mantener el nivel del tampón por encima de la superficie superior del lecho empaquetado. No dejar que la columna se seque.
8. Después que el lecho empaquetado de la columna se haya asentado, colocar el tapón de la purga. Eliminar con cuidado el tampón restante que quede por encima de la superficie del lecho empaquetado con una pipeta a través del reservorio de la columna. Tratar de minimizar la alteración del lecho empaquetado mientras se quita el tampón.

B. Separación de la muestra.

1. Utilizar una pipeta para añadir la "muestra" en la parte superior del lecho empaquetado.
2. Retirar el tapón de la purga para permitir que la muestra entre en el lecho empaquetado lentamente. Después de que haya entrado por completo la muestra, dejar la parte superior del lecho empaquetado expuesta al aire.
3. Con una pipeta, con cuidado y lentamente (2-3 gotas a la vez), añadir tampón KOAc 0,01M al reservorio de la columna. Dejar que el tampón fluya por el interior de la columna después de que la muestra haya entrado completamente en el gel.
4. Recoger las fracciones que contienen el colorante rojo:
 - Marcar 2 tubos con la letra "R".
 - Mantener cada uno de los tubos de ensayo vacíos debajo de la columna y recoger aproximadamente 1 ml en fracciones (utilizar el tubo marcado del punto 1 del apartado A como referencia).
5. Verificar el nivel de tampón en el depósito, añadiendo más KOAc 0,01M si es necesario.
6. Después que el colorante rojo se ha eluido completamente de la columna, colocar el vaso de precipitados debajo de la columna y eluir el KOAc 0,01M restante hasta vaciar el reservorio de la columna.
7. Con una pipeta, con cuidado y lentamente (unas pocas gotas cada vez), añadir tampón KOAc 0,5M hasta llenar el depósito.

8. Recoger las fracciones que contienen el colorante azul/verde:
 - Marcar 6 tubos con la letra "G".
 - Mantener cada uno de los tubos de ensayo vacíos debajo de la columna y recoger aproximadamente 1 ml en fracciones (utilizar el tubo marcado del punto 1 del apartado A como referencia).
9. Verificar el nivel de tampón en el depósito, añadiendo más KOAc 0,5M si es necesario.
10. Después que el colorante azul/verde haya eluido completamente de la columna, colocar el tapón en la purga de elución.
11. Medir el volumen de tampón requerido para eluir cada colorante. Compare sus resultados con otros grupos.

C. Cuantificación de la muestra (opcional).

1. Preparar la curva estándar.
 - a. La muestra stock tiene una concentración de 1 mg/ml. Preparar diluciones seriadas siguiendo las indicaciones de la Tabla 2.

Tabla 2

Concentración muestra	Solución	Agua destilada
1 mg/ml	stock	-
0,5 mg/ml	3 ml de 1 mg/ml	+ 3 ml A.d.
0,25 mg/ml	3 ml de 0,5 mg/ml	+ 3 ml A.d.
0,125 mg/ml	3 ml de 0,25 mg/ml	+ 3 ml A.d.
0,0625 mg/ml	3 ml de 0,125 mg/ml	+ 3 ml A.d.

- b. Realizar el blanco en el espectrofotómetro a 550 nm con agua destilada.
- c. Registrar la absorbancia A_{550} y realizar una gráfica donde el eje Y refleje el valor de absorbancia y el eje X la concentración de colorante azul/verde.

NOTA: Si el espectrofotómetro no puede leer las muestras de 1 ml, puede hacer diluciones de las fracciones para leer la A_{550} . No se olvide de incluir el factor de dilución en los cálculos.

2. Muestras

- a. Transferir las fracciones del colorante verde de la cromatografía a cubetas.
- b. Leer y registrar la absorbancia A_{550} de cada fracción.
- c. Juntar las fracciones del colorante verde en un vaso de precipitación o tubo de ensayo grande. Mezclar y medir el volumen total con una pipeta o una probeta graduada.
- d. Transferir una muestra de la mezcla de fracciones a una cubeta. Leer y registrar A_{550} .
- e. A partir de la curva estándar, determinar la concentración del colorante azul/verde en la mezcla de fracciones.
- f. Para determinar el rendimiento, la concentración en mg/ml se multiplica por el volumen total (en ml).
- g. La muestra cargada en la columna contiene 0,4 mg (0,4 ml de 1 mg/ml) de colorante azul/verde. Calcular el porcentaje de recuperación de la columna.

NOTA: Una curva estándar se debe hacer para cada espectrofotómetro utilizado. No utilice la curva estándar de la figura 3, es sólo para fines ilustrativos.

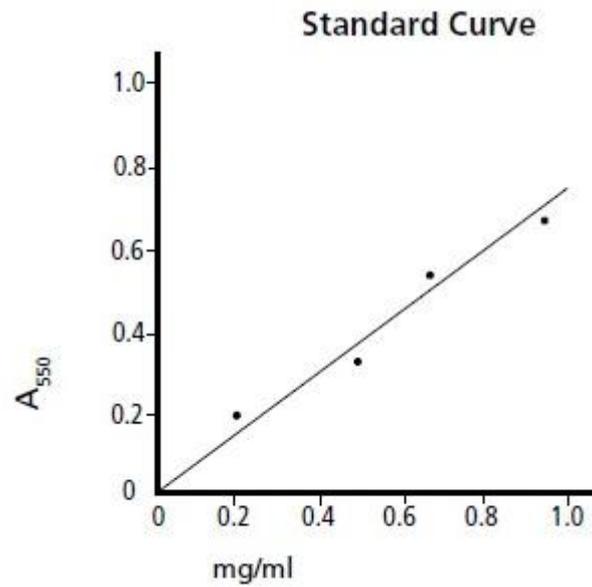


Figura 3: Ejemplo de curva estándar.

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

6.1 Resultados

El colorante rojo se eluye primero, después de adicionar el tampón KOAc 0,01M. El colorante azul/verde se eluye después de añadir el tampón KOAc 0,5 M. En la figura 4 se puede apreciar la separación de los 2 colorantes durante la cromatografía.



Figura 4: Separación de los colorantes en la columna.

6.2 Preguntas

Responde a las siguientes preguntas en la libreta de prácticas:

- 1. ¿Cuál es la base para la separación de diferentes compuestos por intercambio iónico?**
- 2. ¿Cómo se pueden separar las moléculas con la misma carga presentes en cantidades diferentes en una solución por cromatografía?**
- 3. ¿Por qué las celulosas son utilizados de forma habitual como soportes para separar las grandes proteínas biológicamente activas?**
- 4. ¿Qué crees que pasaría si el tampón KOAc 0,5M se utilizara primero para eluir la muestra? ¿Por qué?**
- 5. ¿Por qué es importante preparar una curva estándar para cada espectrofotómetro?**