

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.

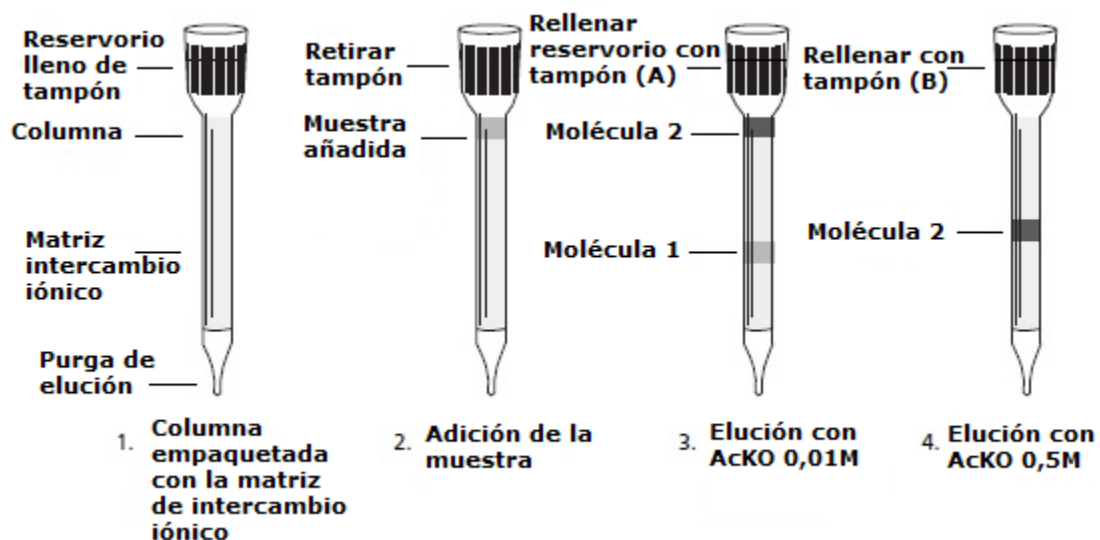


Figura 1: Principios del funcionamiento del intercambio iónico.

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

4.1 OBJETIVO DEL EXPERIMENTO:

El objetivo de este experimento es que los estudiantes aprendan los principios de la cromatografía de intercambio iónico separando dos moléculas cargadas usando un gradiente de sal en dos pasos.

4.2 SEGURIDAD:

No se utilizan materiales humanos en este experimento. Se deben usar guantes y gafas de seguridad como buena práctica de laboratorio.

5. PRÁCTICA

Lea las instrucciones completas antes de comenzar la práctica.

A. EMPAQUETAMIENTO DE LA COLUMNA

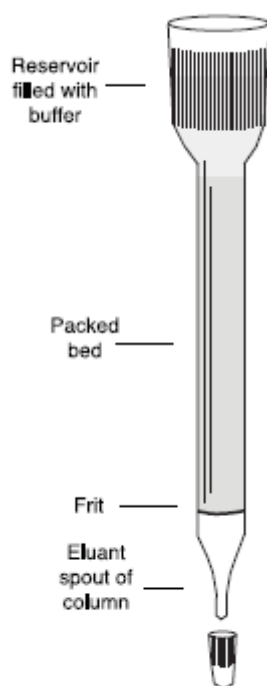


FIGURE 1:
Packing the column.

1. Montar verticalmente una columna como se muestra en la Figura 1. Deslizar la tapa sobre la punta en la parte inferior de la columna.
 2. Medir 1 ml de agua en un tubo de ensayo vacío. Esto se utilizará más adelante como una guía de referencia.
 3. Enjuagar la columna con tampón llenándola con 0,01 M KOAc.
 4. Retirar la tapa para liberar el tampón. Volver a colocar la tapa.
 5. Mezclar completamente y pipetear todo el contenido de la suspensión a la columna, permitiendo que fluya por las paredes internas del depósito. Si la suspensión se atasca en el depósito, utilizar una pipeta para volver a suspender la suspensión y continuar con el relleno de la columna.
- Si el flujo de suspensión se detiene por una bolsa de aire, deje de verter y golpear firmemente la columna hasta que se elimine el aire y la suspensión fluya hacia abajo; continuar vertiendo el resto de la suspensión.
6. Verter tampón KOAc 0,01 M adicional en el depósito. Colocar un vaso de precipitados vacío debajo de la columna y retirar la tapa para permitir que la suspensión se asiente.

7. Agregar 0,01 M KOAc adicional para mantener el nivel de la solución amortiguadora (tampón) por encima del lecho superior de la suspensión. No deje que la columna se seque.

8. Después de que la suspensión se haya asentado, volver a colocar la tapa. Retirar con cuidado cualquier tampón restante de encima de la parte superior de la cama insertando una pipeta de transferencia a través del depósito. Tratar de minimizar la perturbación de la cama/suspensión mientras se retira el tampón.

NOTA: Es muy importante utilizar el tampón de KoAc correcto como se indica a lo largo del procedimiento experimental. Asegurarse que es el tampón correcto por la etiqueta que identifica la botella que contiene el tampón KoAc y no mezclarlos.

B. SEPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Usar una pipeta de transferencia para agregar la "muestra" en la parte superior de la cama.

2. Retirar la tapa para permitir que la muestra entre lentamente en el lecho. Después de que haya entrado por completo, la parte superior de la cama debe exponerse al aire.

3. Con una pipeta de transferencia, con cuidado y lentamente (2-3 gotas a la vez) agregar tampón KOAc 0,01 M al depósito. Dejar que el tampón fluya por el interior de la columna después de que la muestra haya entrado por completo en el gel.

4. Recoger fracciones que contengan colorante rojo:

- Etiquete 2 tubos "R".
- Sostener cada uno de los tubos de ensayo vacíos debajo de la columna y recoger fracciones de aproximadamente 1 ml (utilizar el tubo del paso A-2 como referencia).

5. Supervisar el nivel de tampón en el depósito, rellenarlo con 0,01 M KOAc si es necesario.

6. Después de que el rojo haya eluido completamente de la columna, colocar el vaso de precipitados debajo de la columna y dejar que el KOAc 0,01 M restante se vacíe del depósito.

7. Con una pipeta de transferencia, con cuidado y lentamente (unas pocas gotas a la vez) agregar tampón KOAc 0,5 M para llenar el depósito.

8. Recoger fracciones que contengan colorante azul/verde:

- Etiquetar 6 tubos "G".
- Sostener cada uno de los tubos de ensayo vacíos debajo de la columna y recoger fracciones de aproximadamente 1 ml (utilizar el tubo del paso A-2 como referencia).

9. Supervisar el nivel de tampón en el depósito, rellenarlo con 0,5 M KOAc si es necesario.

10. Después de que la mayor parte del verde se haya eluido por completo de la columna, volver a colocar la tapa.

11. Medir el volumen de tampón necesario para eluir cada colorante. Comparar los resultados de todos los grupos.

C. CUANTIFICACIÓN DE LA MUESTRA (OPCIONAL)

1. Preparar la curva estándar.

a. El stock es de 1 mg/ml. Preparar diluciones en serie de la siguiente manera:

1 mg/ml	=	stock		
0.5 mg/ml	=	3 ml of 1 mg/ml	+	3 ml distilled water
0.25 mg/ml	=	3 ml of 0.5 mg/ml	+	3 ml distilled water
0.125 mg/ml	=	3 ml of 0.25 mg/ml	+	3 ml distilled water
0.0625 mg/ml	=	3 ml of 0.125 mg/ml	+	3 ml distilled water

b. Realizar el blanco en el espectrofotómetro a 550 nm con agua destilada.

C. Registrar los valores de absorvancia A_{550} y realizar una grafica con la absorbancia en el eje Y y la concentración de colorante azul/verde en el eje X.

NOTA: Si su espectrofotómetro no puede leer muestras de 1 ml, puede considerar hacer diluciones de las fracciones para leer el valor de A_{550} . No olvidar incluir el factor de dilución en el cálculo.

2. Muestras.

a. Transferir las fracciones de colorante verde de la cromatografía realizada a las cubetas.

b. Leer y registrar los valores de A_{550} para cada fracción.

c. Reunir las fracciones de colorante verde en un vaso de precipitados o en un tubo de ensayo grande. Mezclar y medir el volumen total con una pipeta o probeta graduada.

d. Transferir una porción de fracciones mixtas a una cubeta. Leer y registrar el valor de A_{550} .

e. A partir de la curva estándar, determinar la concentración de colorante azul/verde en las fracciones mixtas.

f. Para determinar el rendimiento, multiplicar la concentración en mg/ml por el volumen total (en ml).

g. La muestra cargada en la columna contenía 0,4 mg (0,4 ml de 1 mg/ml) de colorante azul/verde. Calcular el porcentaje de recuperación de la columna.

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

Responder las siguientes preguntas de estudio en la libreta de laboratorio o en una hoja de trabajo separada.

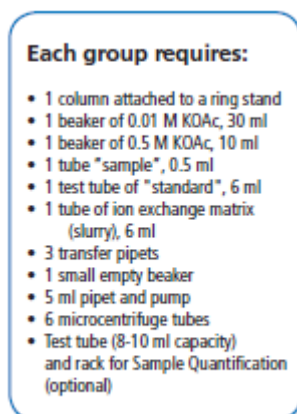
1. ¿Cuál es la base para la separación de diferentes compuestos por intercambio iónico?
2. ¿Cómo se pueden separar por cromatografía moléculas con la misma carga en cantidades variables?
3. ¿Por qué se utilizan a menudo las celulosas como soporte para separar proteínas grandes biológicamente activas?
4. ¿Qué sucedería si se usara primero acetato de K^+ 0,5 M para eluir la muestra? ¿Por qué?
5. ¿Por qué es importante preparar una curva estándar para cada espectrofotómetro?

7. GUÍA DEL PROFESOR

7.1 Requisitos de tiempo aproximado

Los materiales previos a la práctica se pueden preparar el día anterior a la práctica. La preparación debe tomar alrededor de una o dos horas. Tapar los tampones y el intercambiador con papel de aluminio o envoltura de plástico.

7.2 Preparaciones previas al laboratorio



A. PREPARACIÓN DE TAMPONES

1. Etiquetar 10 vasos de precipitados o matraces pequeños como "0,5 M KOAc (acetato de potasio)".

2. Diluir el tampón de acetato de potasio concentrado, pH 6,0 (componente B) añadiendo 25 ml de tampón a 100 ml de agua destilada. Este es ahora un tampón KOAc 0,5 M.
3. Distribuir en alícuotas 10 ml de acetato de K⁺ 0,5 M en cada uno de los vasos de precipitados o matraces etiquetados como "KOAc 0,5 M".
4. Etiquetar 10 vasos de precipitados pequeños o matraces "0,01 M KOAc".
5. Agregar 15 ml de tampón KOAc 0,5 M del paso 2 a 735 ml de agua destilada. Esto es ahora 0,01 M KOAc.
6. Distribuir en alícuotas 30 ml de 0,01 M KOAc en cada uno de los 10 vasos de precipitados o matraces etiquetados como "0,01 M KOAc".

B PREPARACIÓN DE LA MATRIZ DE INTERCAMBIO IÓNICO (SLURRY)

1. Agregar todo el contenido del componente A al intercambiador (matriz) de iones de CM-celulosa en un vaso de precipitados de tamaño mediano (tamaño de 250 ml).
2. Agregar 150 ml de KOAc 0,01 M al vaso de precipitados que contiene el intercambiador de iones. Remover de vez en cuando durante 5 min. Usar 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 de que la mayor parte de la matriz se haya asentado, decantar con cuidado y desechar el líquido más los finos (tener mucho cuidado para evitar tirar la matriz que se ha asentado en el fondo).
4. Añadir 150 ml de KOAc 0,01 M fresco a la matriz de iones previamente hidratado. Revolver brevemente para mezclar y dejar que la matriz se asiente durante 10 minutos. Decantar como en el paso 3.
5. Después de la segunda sedimentación y decantación, agregar 50 ml de KOAc 0,01 M la matriz y agitar para mezclar bien.
6. Realizar alícuotas de aproximadamente 6 ml de la matriz resuspendida en los tubos cónicos de 15 ml provistos con el kit, se debe mezclar la matriz entre el vertido de cada tubo. Tapar los tubos y distribuir un tubo por grupo.

C PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE LA MUESTRA Y EL ESTÁNDAR

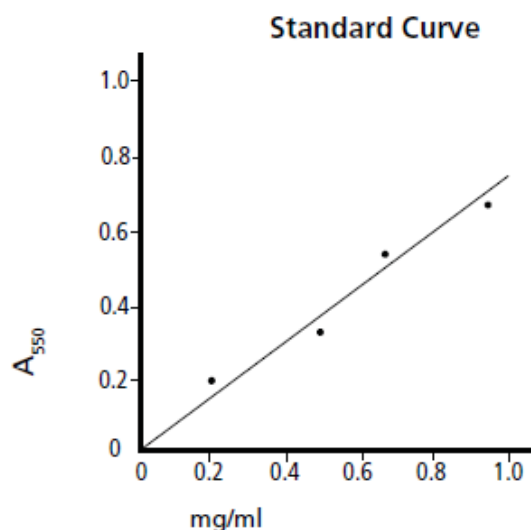
1. Etiquetar 10 tubos de microcentrífuga como "muestra".
2. Agregar 2 ml del tinte azul/verde (C) a la botella de tinte rojo (D). Tapar y mezclar bien. Alícuotar 0,5 ml en los tubos etiquetados como "muestra".
3. Etiquetar 10 tubos de ensayo como "estándar".
4. Alícuotar de 6 ml del tinte azul/verde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

7.3 Evitar errores comunes

1. Diluir los tampones adecuadamente.
2. Evitar desechar la leche (matriz sedimentada) al decantar el agua de la mezcla.
3. Al empaquetar las columnas, evitar las burbujas y las bolsas de aire que interrumpirán el flujo de la muestra.

7.4 Resultados previstos

El tinte rojo se eluirá primero después de la adición de 0,01 M KOAc. El tinte azul/verde seguirá después de agregar 0,5 M de KOAc.



NOTA: Se debe realizar una curva estándar para cada espectrofotómetro utilizado. No utilizar la curva estándar representada en la gráfica anterior, es solo para fines ilustrativos.