

PROTOCOLO DE UTILIZACIÓN DE SEC-MALS

ÍNDICE

1. OBJETO

2. ALCANCE

3. REFERENCIAS

4. GENERAL

- Descripción del equipo.
- Fundamento de la técnica.

5. MANEJO DEL EQUIPO

- Día previo a la realización del experimento.
- Día del experimento.

6. ANEXOS

- ANEXO I: CONSIDERACIONES A TENER EN CUENTA PARA LA PREPARACIÓN DEL BUFFER.
- ANEXO II: CONSIDERACIONES A TENER EN CUENTA PARA LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.
- ANEXO III: ALINEACIÓN DE PICOS, CORRECCIÓN DE ENSANCHAMIENTO DE BANDA Y PROCEDIMIENTOS DE NORMALIZACIÓN.
- ANEXO IV: EXPORTAR DATOS.

OBJETO

Este procedimiento tiene por objeto la descripción de las operaciones necesarias para la utilización de **SEC-MALS** para ensayos de determinación de tamaño y masa molecular de biomoléculas.

ALCANCE

El procedimiento descrito se aplica para la realización de ensayos de determinación de tamaño y masa molecular de biomoléculas, así como las operaciones necesarias para su correcto mantenimiento.

REFERENCIAS

- Some, D., Amartely, H., Tsadok, A., Lebendiker, M. Characterization of Proteins by Size-Exclusion Chromatography Coupled to Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS). *J. Vis. Exp.* (148), e59615, doi:10.3791/59615 (2019).
- ASTRA V User's Guide version 5.3.4 (M1000 Rev. H).
- Hardware Manual for the DAWN® HELEOS™ Light Scattering Instrument.

GENERAL

❖ Descripción del equipo:

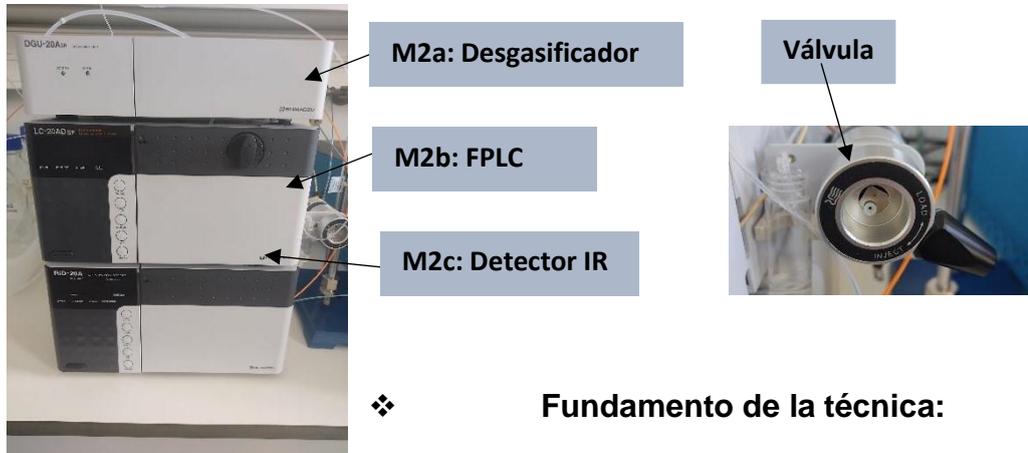
El equipo está integrado por un sistema de cromatografía de exclusión molecular, al que van acoplados un detector de índice de refracción y un equipo de dispersión de luz estática multiángulo.

Con el fin de facilitar la identificación de cada uno de los módulos que componen todo el sistema, se nombrarán de la siguiente manera:

- M1: El módulo 1 se compone del MALS, y de la pantalla de lectura de IR y del láser. Trabaja a temperatura ambiente. Es importante dejarlo desenchufado cuando no se utilice.



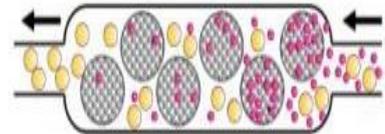
- M2: El módulo 2 se compone del desgasificador, FPLC y el detector de índice de refracción, M2a, M2b y M2c respectivamente. Posee dos cubetas, una de medida y otra de referencia. Cuenta además con una válvula con dos posiciones “load” / “inject” donde se carga la muestra.



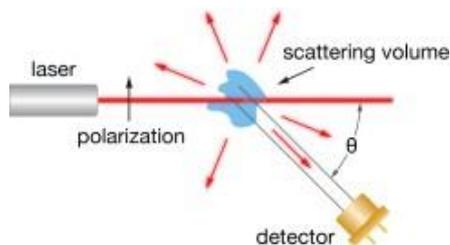
❖ **Fundamento de la técnica:**

Esta técnica, combina la cromatografía de exclusión por tamaño con la dispersión de la luz multiángulo, lo que permite separar e identificar especies presentes en una muestra en función de su tamaño, y calcular su masa molecular.

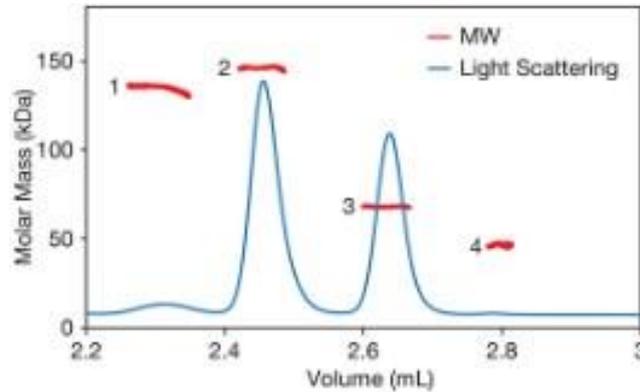
La columna SEC separa las moléculas por volumen hidrodinámico, y tras salir del sistema FPLC, las moléculas pasan a través del detector MALS donde un láser incidirá sobre ellas.



Cuando la luz interacciona con un medio, como un disolvente, en el que hay presente un soluto, se produce una dispersión fuera del eje del haz luminoso, que dependerá de la concentración y masa molar de la molécula.



La señal MALS y la señal de índice de refracción se analizan para cuantificar las propiedades físicas del analito.



MANEJO DEL EQUIPO

❖ Día previo a la realización del experimento:

- Encendido del equipo:
Encender M2b y M2c mediante el botón “power”.

El día previo a la realización del experimento deseado, se debe llevar a cabo el lavado con agua y el equilibrado del equipo. Para ello, se procede de la siguiente manera:

1. Liberar la rueda de M2b (evita el paso de agua por la válvula).
2. Seleccionar un flujo de **1 mL/min***. Para ello, presionar “func”, introducir el valor y pulsar “enter”.
3. Seleccionar **600 psi*** de presión máxima. Para ello, presionar “func” dos veces, introducir el valor, y pulsar “enter”.
4. Presionar botón “purge” a flujo y presión máxima.
5. Fijar la rueda de M2b, cambiar el flujo a 0.5mL/min, y presionar el botón “pump” (se bombeará agua por todo el sistema, pasando por el loop o no, dependiendo de si la válvula se encuentra en la posición “inject” o “load”). Se puede observar que la salida del agua será a través del tubo naranja del waste. Dejar 1 - 2 minutos con este flujo, hasta que el IR sea estable y “Temp Cont” deje de parpadear.
6. Una vez la lectura de IR es estable, presionar en M2c “purge” para limpiar la cubeta de referencia. Cuando se estabiliza (baja a 0), presionar de nuevo “purge” para que deje de pasar por ahí.
7. De nuevo, cuando se estabilice, presionar “balance” (coloca el haz en el centro, aumentando la precisión de la medida).

***(ojo, estos parámetros, dependen de la columna que se esté utilizando).**

Para la eliminación de burbujas del equipo, realizar el proceso de lavado con etanol puro, filtrado a 0,1µm.

En el equipo lavado con agua:

- Conectar la columna, y comenzar a pasar un flujo de 0,1 mL/min, con una presión máxima de 200 psi en el caso de la *superdex*, o 600 psi para la columna de sílice.
- Repetir el punto 6 del lavado.
- Dejar pasar un flujo de 0,05 - 0,1 mL/min toda la noche.

❖ **Día del experimento:**

- Equilibrar la columna a un flujo de 0,5 mL/min. Para ello, ir aumentando el flujo lentamente, en intervalos de 0,1 mL/min, esperando aproximadamente un minuto entre cada subida.
- Cuando la columna esté equilibrada, repetir el punto 6 de lavado.
- Encender el láser. Para ello, en M1 se presiona TAB para ir desplazándose por los parámetros, hasta llegar al láser, y pulsar "enter". **(Importante, dejar el láser apagado durante la noche).**
- Dejar pasando el flujo a 0,5 mL/min hasta observar que el ruido solo tiene fluctuaciones en la tercera cifra decimal. (Esto puede verse en la línea roja del display del láser).
- Encender el ordenador.
- Abrir el programa ASTRA5.3.4.
- *Cargar experimento desde la plantilla H20LSRI0.5mimI50* (No cambiar nada). Para la columna de sílice, el nombre del archivo es el mismo, pero tiene añadido **new column**.

En la plantilla se encuentran 3 apartados principales, con diferentes subapartados:

1. Configuration:

Debe modificarse únicamente el nombre de la muestra, el volumen y la concentración. Lo demás no debe modificarse.

2. Procedure:

- a. Con la válvula colocada en la posición "inject", sacar la jeringa, tomar la muestra y pincharla de nuevo.
- b. Cambiar la válvula a la posición "load", e inyectar la muestra al loop.
- c. En la pantalla del ordenador, pulsar "start", tiene forma de triángulo ►Aparecerá "Wait for autoinject signal".
- d. Cambiar la válvula a la posición "inject". Aparecerá una cuenta atrás de 5 minutos, y se inyectará automáticamente la muestra del *loop* a la columna.

3. Results:

- a. **Basic collection:** Cromatogramas crudos, tanto del láser como de índice de refracción.
 - Picos en IR: puede observarse el decalaje del buffer, será el último pico que aparece. Es proporcional a la masa.
 - Picos en láser: Proporcional al peso molecular y a la masa.
- b. **Despiking:** Seleccionar “heavy-apply” para disminuir el ruido. Seleccionar “apply” y dar a “ok”.
- c. **Baselines:** Comenzar seleccionando uno de los láseres (L11) y seleccionar “autobaseline”. Después comprobar uno por uno, e ir ajustando si es necesario. (Se debe ajustar cuando la línea base aparece inclinada, y hay que ponerla sólo bajo los picos de interés, pero todos los picos deben estar dentro para que calcule bien el valor de la masa). Seleccionar “apply” y dar a “ok”.
- d. **Peaks:** Suprimir los picos del run anterior, y seleccionar los picos de interés.
- e. **Mass and radius from LS:** Muestra el peso molecular estimado de cada pico. En teoría, al desplazarse por el pico, no debería cambiar el tamaño, pero en los últimos experimentos hay fluctuaciones significativas.

En la pestaña de arriba del todo, “**easy graph**” se pueden representar el peso molecular de cada pico. Para ello, seleccionar “**molar mass**” en el display.

Finalmente, para guardar el experimento, debe *seleccionarse* “**save as experiment**”.

ANEXO I: CONSIDERACIONES A TENER EN CUENTA PARA LA PREPARACIÓN DEL *BUFFER*.

Los tampones que vayan a ser utilizados deben ser preparados con reactivos de grado AR, en agua de alta calidad (Millipore) y ser filtrados a través de filtros de 0,1 μm .

Partículas pequeñas presentes en el eluyente, o desprendidas de la columna, provocarán cambios en la señal de dispersión de la luz. Así mismo, es recomendable que el tampón de las muestras y el de ejecución coincidan, a fin de minimizar el pico de artefacto en la señal del índice de refracción que se ve en el volumen del lecho de la columna.

Puesto que el sistema incluye un desgasificador, no es necesario hacerlo previamente.

Respecto a la composición, el sistema es compatible con la mayoría de ellos. Sin embargo, en el caso de tampones de bajo pH y alto contenido en sal, que vayan a ser utilizados durante tiempos prolongados, será necesario evaluarlo individualmente, puesto que estará en contacto con piezas de acero inoxidable.

ANEXO II: CONSIDERACIONES A TENER EN CUENTA PARA LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Cuando se trabaja con proteínas pequeñas (<10 kDa), puede ser necesaria una elevada concentración, para poder observar la señal.

Concentraciones de 2,5 – 3 mg/ml generalmente darán buenos resultados tanto en la determinación del peso molecular, como del radio hidrodinámico. También es posible utilizar concentraciones más bajas (1 mg/ml) en el caso de las medidas de peso molecular.

Es importante mencionar que, aunque los detectores son capaces de manejar partículas bastante grandes, **la columna no debe usarse como filtro**: los precipitados y el material insoluble deben eliminarse mediante centrifugación* o prefiltración.

***Centrifugar a 10.000 rpm durante 20 minutos.**

ANEXO III: ALINEACIÓN DE PICOS, CORRECCIÓN DE ENSANCHAMIENTO DE BANDA Y PROCEDIMIENTOS DE NORMALIZACIÓN.

- ALINEACIÓN DE PICOS:

En el apartado “*procedures*”, seleccionar “*alignment*”. Seleccionar la región central de los picos, y seleccionar “*align signals*” y a continuación “*OK*”.

- CORRECCIÓN DE ENSANCHAMIENTO DE BANDA:

En el apartado “*procedures*”, seleccionar “*band broadening*”. Seleccionar el 50% central del pico del monómero. Asegurarse de que el detector de índice de refracción está especificado como instrumento de referencia y a continuación seleccionar “*perform fit*” y “*apply*” para hacer coincidir la señal del láser con la del índice de refracción.

Hacer zoom a los picos de señal del láser y del índice de refracción para verificar que se superponen muy estrechamente dentro el 50-70% central, y seleccionar “*OK*”. Si el solapamiento no es perfecto, puede ser necesario realizar el ajuste y aplicarlo una o dos veces más hasta que el solapamiento sea bueno.

- PROCEDIMIENTOS DE NORMALIZACIÓN:

En el apartado “*procedures*”, seleccionar “*Normalization*”, seleccionar el pico 1, introducir 3,0 como valor de Rg, seleccionar “*Normalize*” y después “*OK*”.

ANEXO IV: EXPORTAR DATOS.

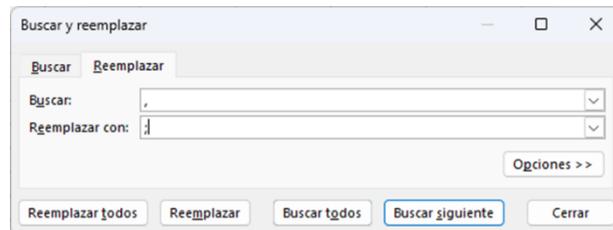
Para exportar los datos con formato Excel, se procede de la siguiente manera:

Una vez abierto el archivo del experimento que se desea exportar, haciendo click derecho sobre el nombre, aparecerá la opción de exportar.

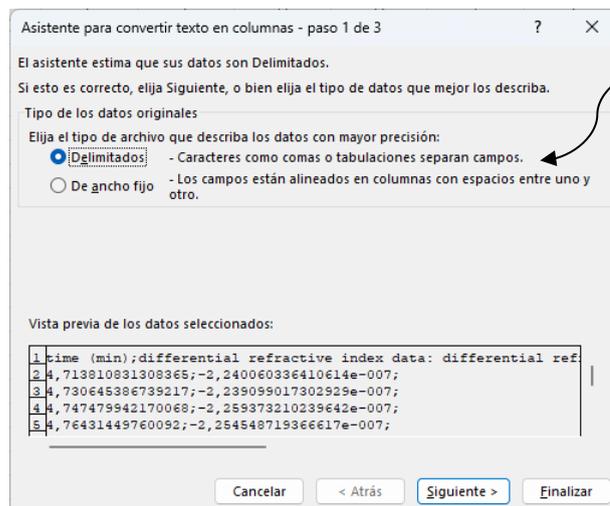
- Se debe seleccionar el formato .csv

Aparecerán los datos en una misma columna y separados por comas. Para resolver este problema:

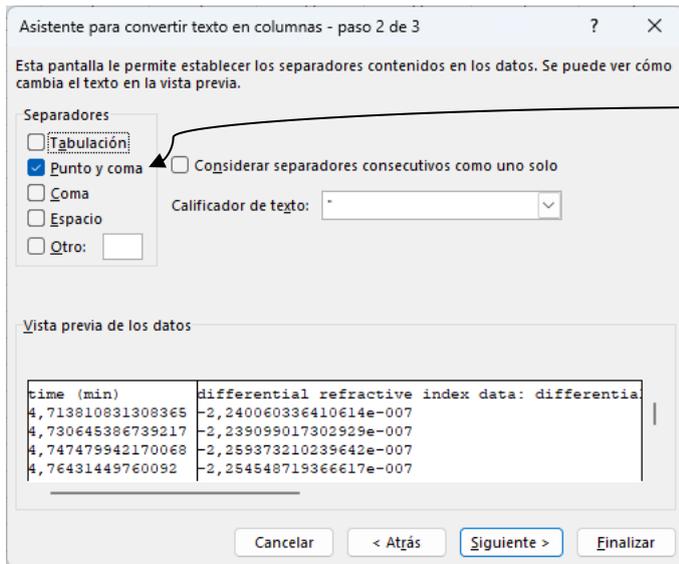
- Ctrl+B (Aparecerá una ventana con la opción de buscar/reemplazar)



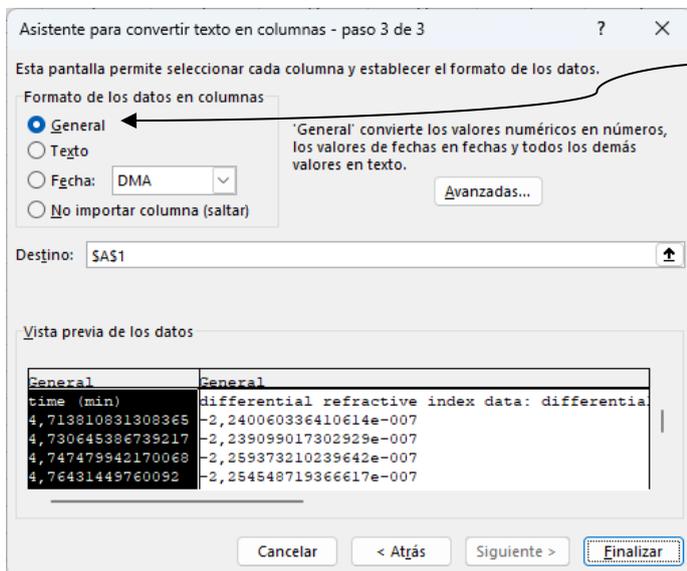
- Seleccionar reemplazar
 - Reemplazar las comas por punto y coma.
 - Reemplazar los puntos por comas.
- Seleccionar la columna y en la pestaña datos, seleccionar "Texto en columnas". Aparecerá de nuevo una ventana con las distintas opciones.



Seleccionar Delimitados



Seleccionar como separadores "Punto y coma"



Seleccionar formato "General"

Aparecerán ambas columnas por separado y los valores decimales separados por comas. Finalmente asegurarse de seguir guardándolo en formato csv.