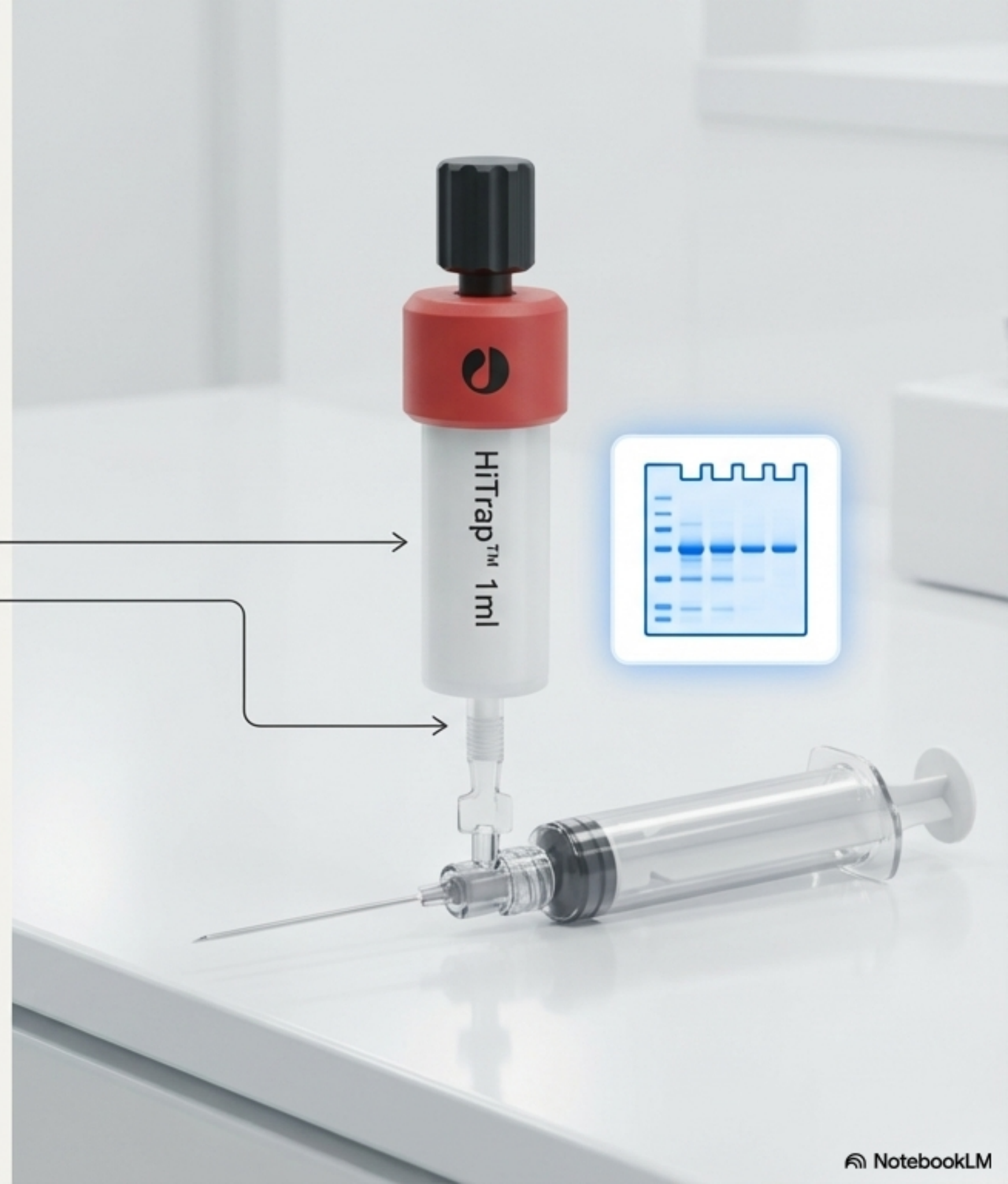


# Purificación IMAC a Prueba de Fallos: De la Columna al Gel

- **Objetivo:** Dominar la purificación de proteínas recombinantes paso a paso.
- **Herramienta:** Columna HisTrap HP (1 ml) + Jeringas manuales de 5 ml.
- **Regla de Oro:** Precisión en el volumen, control en la velocidad.
- **Resultado:** Fracciones puras y listas para validación analítica (SDS-PAGE).

Bienvenidos al laboratorio. Nuestro objetivo hoy no es solo seguir una receta, sino entender la física y la química detrás de cada gota que pasa por nuestras manos. Si sigues esta guía al pie de la letra, tu purificación será perfecta y no cometerás un solo error.



# Inventario Crítico y Equivalencias de Laboratorio

- Matemática de mesada: **1 Columna = 1 ml = 1 CV** (Volumen de Columna).
- Tu herramienta de inyección: **1 Jeringa = 5 ml = 5 CV**.
- Velocidad vital: **1 ml / minuto = Toma 5 minutos** vaciar una jeringa.
- Gestión de fluidos: **Identifica claramente** tu vaso de Desecho vs. Tubos Colectores.

La resina de agarosa necesita tiempo para interactuar. Si empujas rápido, excedes el límite de presión de 5 bar y arruinas el experimento.



# Prevención de Errores: La Conexión Gota a Gota

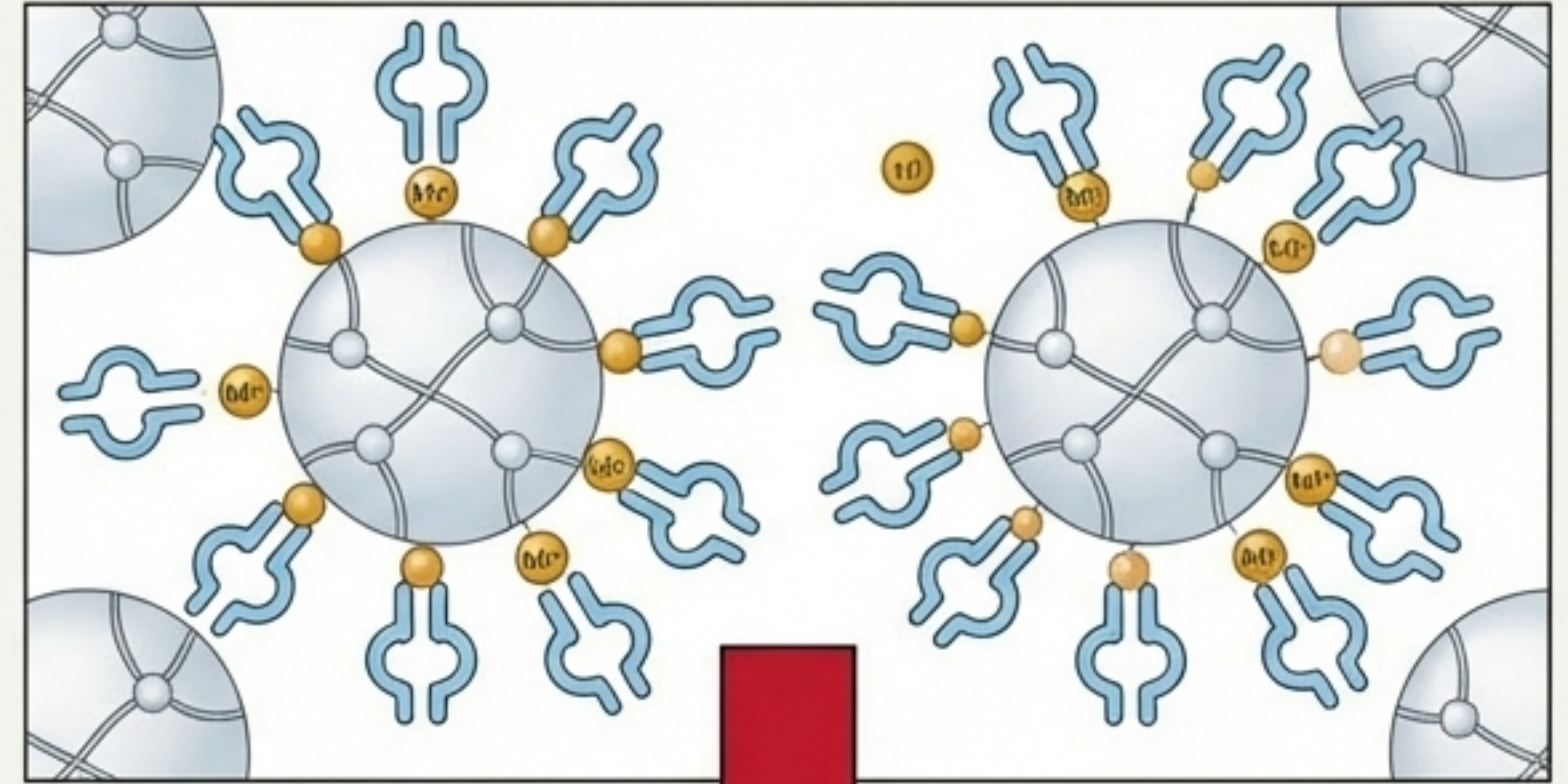
- El aire es el enemigo letal de la matriz de Sepharose.
- Llena la jeringa y expulsa el aire hasta que asome líquido.
- Aplica la técnica Gota a Gota (Drop-to-Drop) al conectar.
- Asegura el conector luer sin sobreapretar.

Aquí ocurren el 90% de los errores de los principiantes. Las burbujas crean canales secos que arruinan la purificación. **Siempre purga el aire.**



# Fase 1: Stripping (Desnudando la Columna)

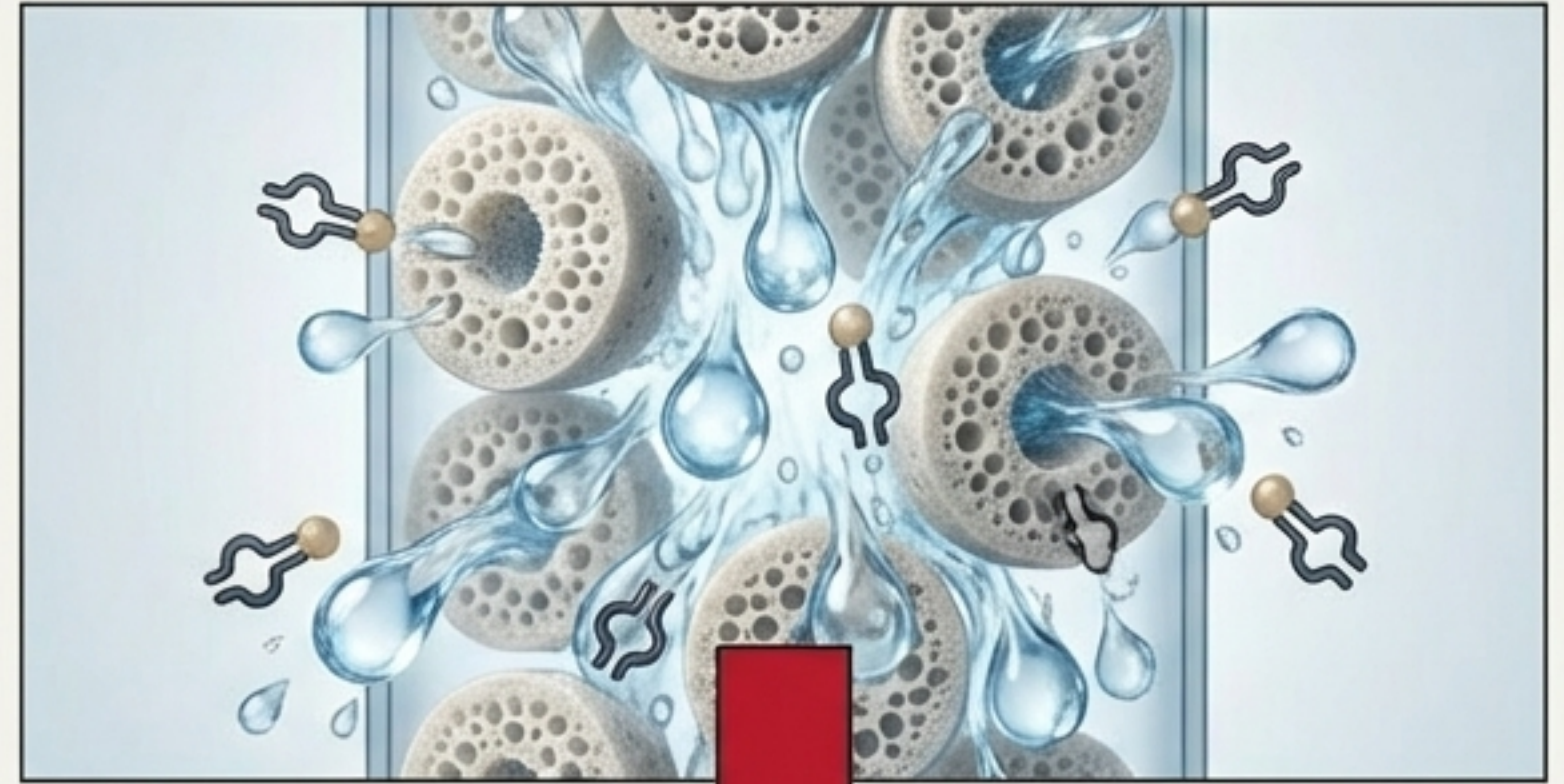
- **Objetivo:** Remover iones de metal y proteínas viejas.
- Inyectar 2 Jeringas (10 CV) de Buffer EDTA (50 mM).
- Destino del líquido: Vaso de Desecho.
- Velocidad: 1 ml/min (10 minutos totales).



# Fase 1: Enjuague Profundo

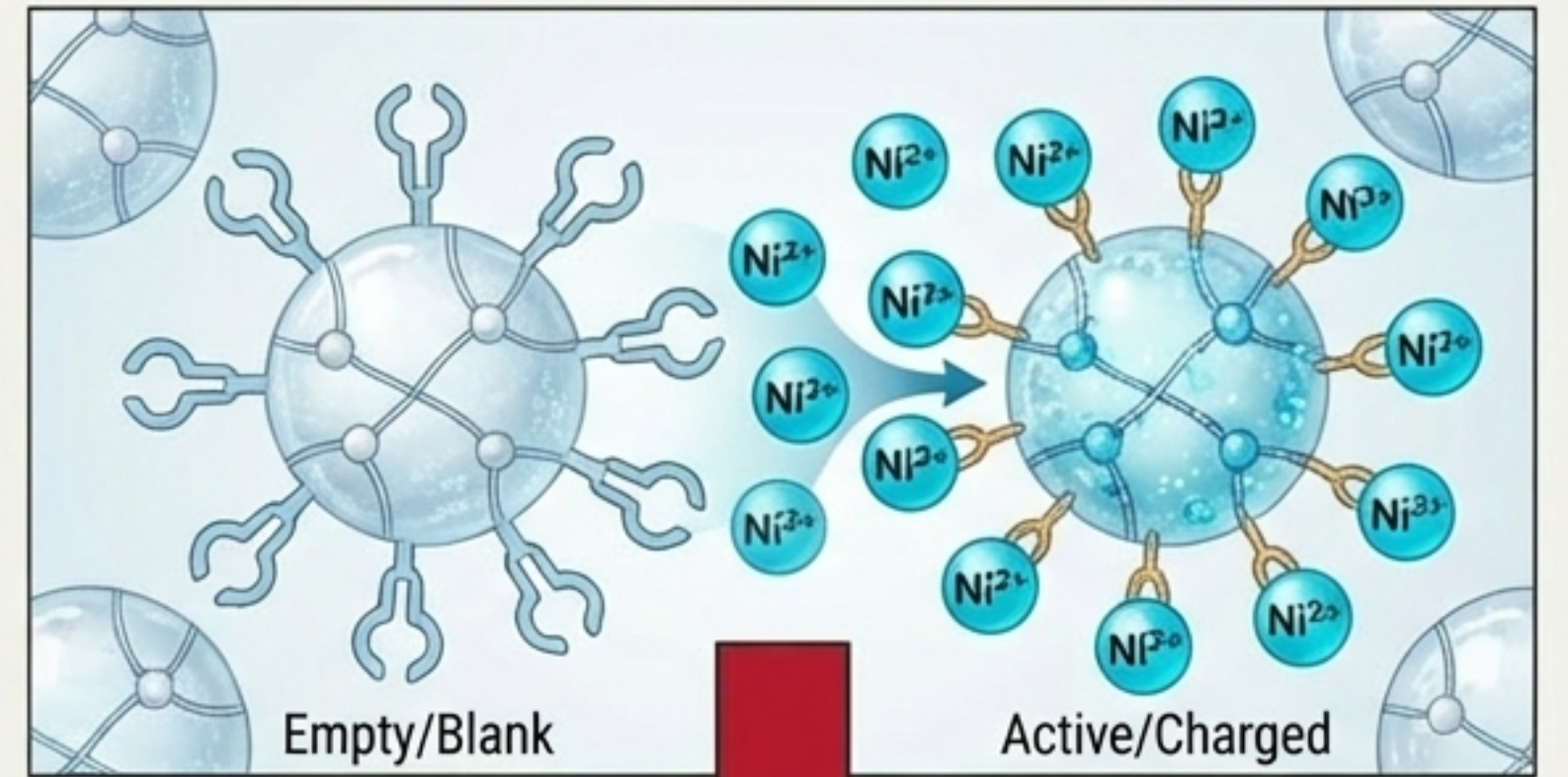
- **Objetivo:** Eliminar todo rastro de EDTA antes de recargar.
- Inyectar 2 Jeringas (10 CV) de Agua Ultrapura.
- Destino del líquido: Vaso de Desecho.
- Si queda EDTA, la recarga de níquel fallará por completo.

No apresures este paso, la pureza de tu trabajo futuro depende de qué tan libre de quelantes quede la resina ahora.



## Fase 2: Recarga de Metal (Armando la Trampa)

- **Objetivo:** Activar la resina para capturar proteínas His-tag.
- Inyectar 0.5 ml de solución  $\text{NiCl}_2$  (0.1 M).
- Lavar con 1 Jeringa (5 CV) de Agua Ultrapura.
- Destino del líquido: Vaso de Desecho.



Flujo de  $\text{NiCl}_2$  y Agua Ultrapura

**Desecho**



# Fase 3: Equilibrio de la Columna

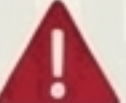
- **Objetivo:** Preparar el entorno químico (pH y sales) para la muestra.
- Inyectar 1 Jeringa (5 CV) de Buffer de Equilibrio.
- Destino del líquido: Vaso de Desecho.
- La columna está lista para recibir tu valiosa muestra.

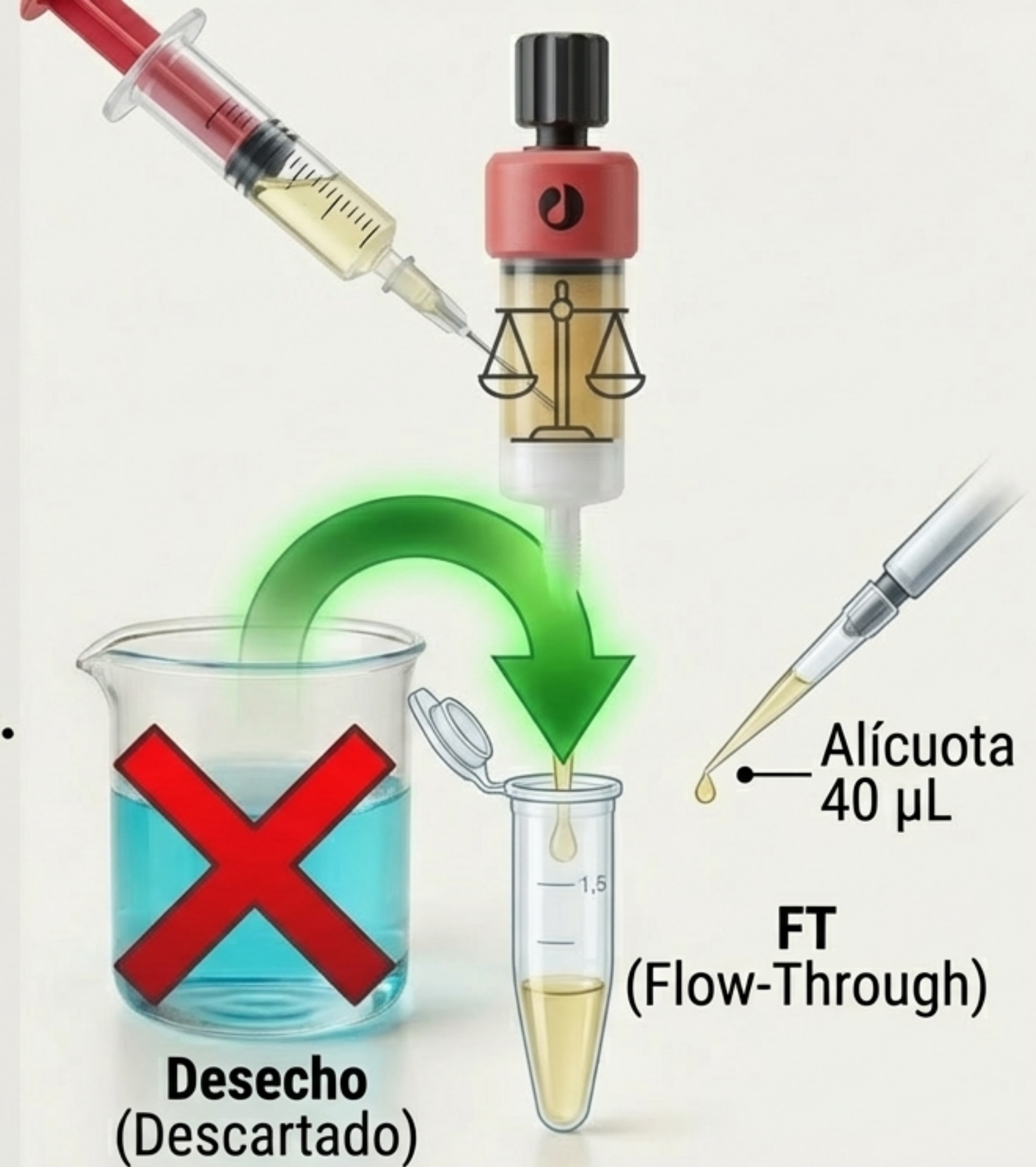


Si inyectamos la muestra en agua, las proteínas precipitarían inmediatamente en la matriz o no se unirían. Debemos igualar el ambiente químico.

# Fase 4: Carga de Muestra (El Momento Crítico)

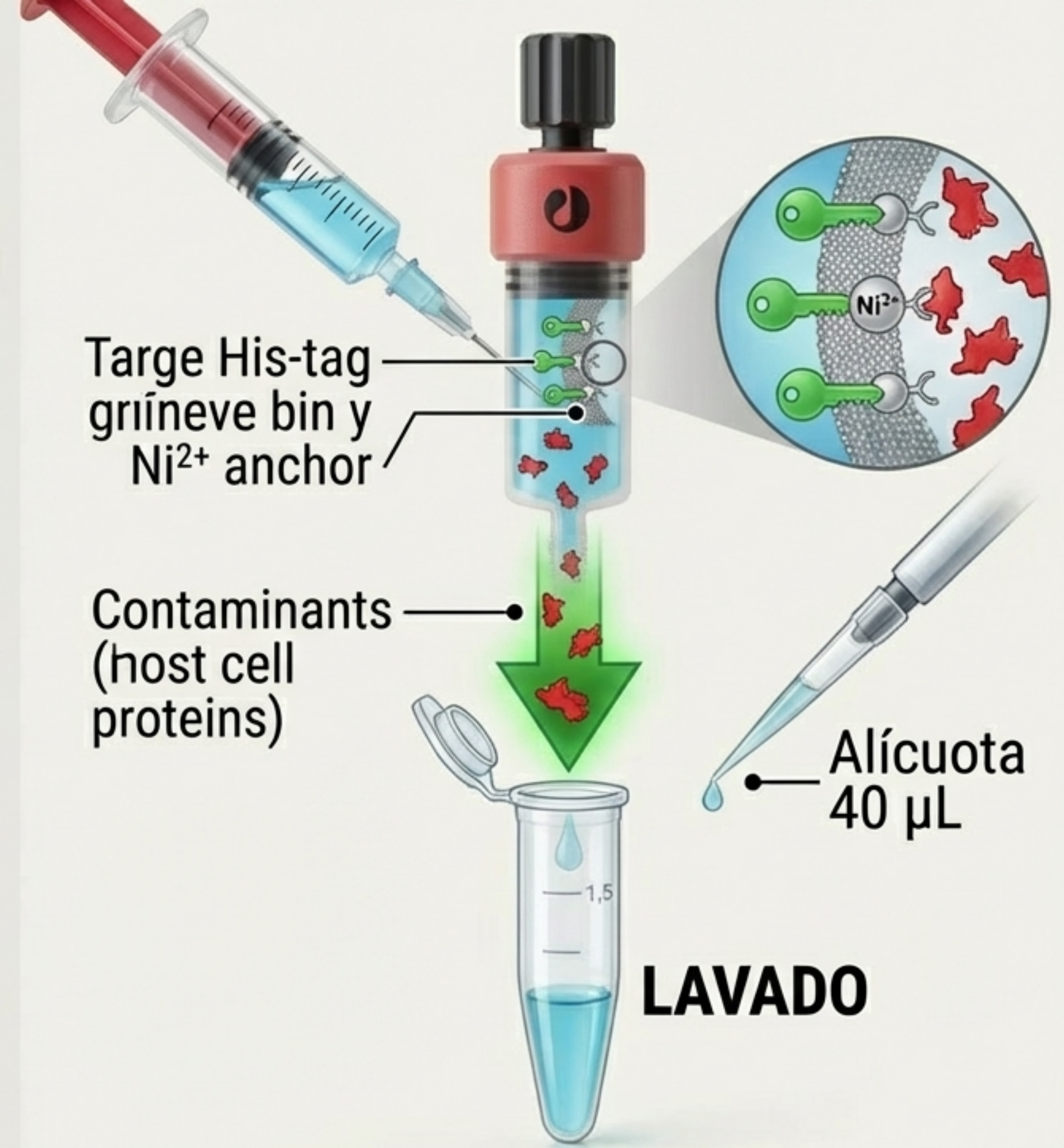
- Inyectar la Muestra Filtrada (proteína lisada).
- **¡ALTO! Cambio de destino: Colectar todo en un Tubo Limpio.**
- Esto se llama Flow-Through (FT).
- **Control de Calidad:** Tomar alícuota de  $40\ \mu\text{L}$  del tubo FT.

 **NUNCA** botes el FT hasta que el gel final confirme que tu proteína sí se unió a la columna. Guárdalo en hielo.



# Fase 5: Lavado (Limpiando Contaminantes)

- **Objetivo:** Arrastrar proteínas inespecíficas débilmente unidas.
- Inyectar 2 a 3 Jeringas (10-15 CV) de Buffer de Lavado.
- Destino: Tubo Limpio Nuevo (Etiquetado: Lavado).
- **Control de Calidad:** Tomar alícuota de 40  $\mu\text{L}$  del tubo de Lavado.



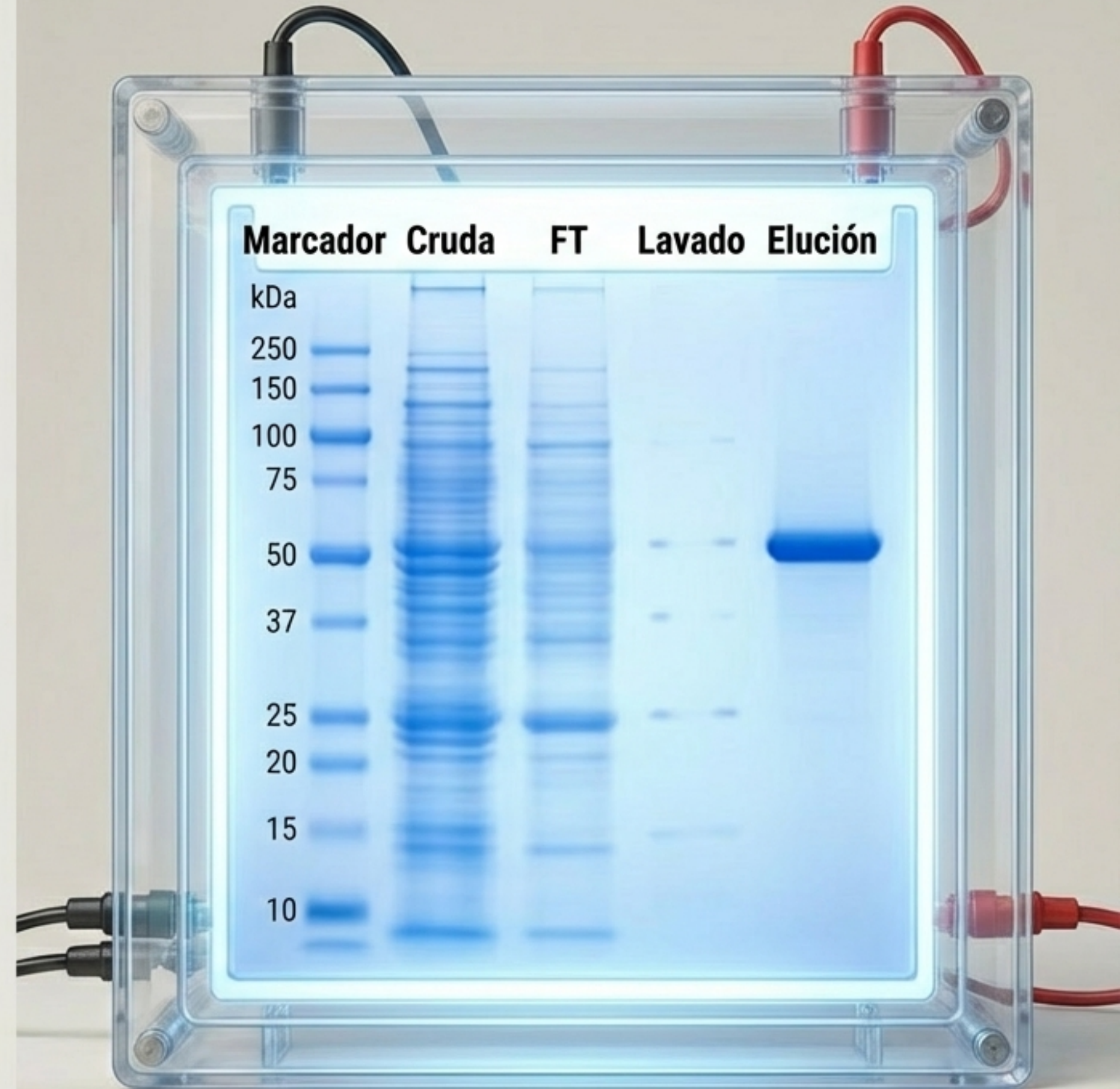
# Fase 6: Elución (Recuperando el Tesoro)

- **Objetivo:** Liberar tu proteína pura de la matriz.
- Inyectar 1 Jeringa (5 CV) de Buffer de Elución.
- Destino: Fraccionar en Tubos Eppendorf Limpios (1 ml c/u).
- **Control de Calidad:** Tomar alícuota de 40  $\mu\text{L}$  de la fracción más concentrada.



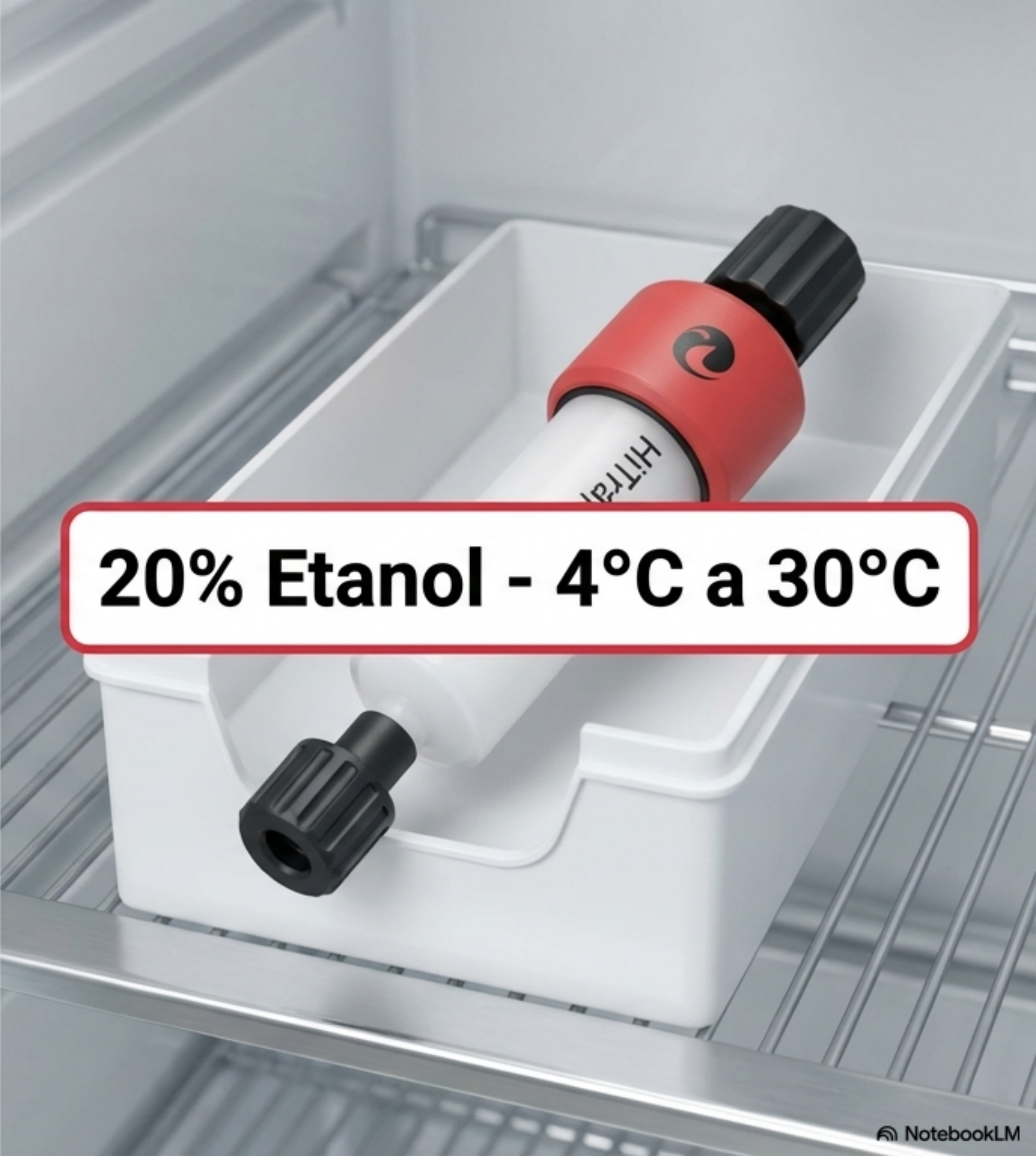
# Gestión de Calidad Obligatoria (SDS-PAGE)

- Revisa tu gradilla en hielo. Debes tener 3 tubos de alícuotas:
  1. **FT (40  $\mu\text{L}$ ):** Verifica qué no se pegó a la resina.
  2. **Lavado (40  $\mu\text{L}$ ):** Verifica qué impurezas se eliminaron.
  3. **Elución (40  $\mu\text{L}$ ):** Verifica la pureza de tu proteína objetivo.
- Sin estas 3 alícuotas, la purificación carece de validez científica.



# Almacenamiento y Cierre de Sesión

- **Lavar:** Inyectar 1 Jeringa (5 CV) de Agua Ultrapura.
- **Almacenar:** Inyectar 1 Jeringa (5 CV) de Etanol al 20%.
- **Sellar:** Colocar los tapones (stop plugs) herméticamente.
- **Limpiar** la mesada y desechar químicos según normas.



**20% Etanol - 4°C a 30°C**