

# Cromatografía de Exclusión por Tamaño Absoluto

## Anticuerpo IgG4: DLS & Cromatografía

### Introducción

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y la dispersión de luz dinámica (DLS) son dos tecnologías comunes para los laboratorios de proteínas. La SEC es un método de rutina para la purificación, identificación y cuantificación de mezclas de proteínas, y la DLS es otro procedimiento de rutina para el tamaño de pre columna y las mediciones de polidispersión, junto con la cuantificación agregada. El acoplamiento de las tecnologías DLS y SEC fue difícil, debido en gran medida al hecho de que las concentraciones de muestra de proteína eluida tienden a estar muy por debajo del límite de detección para la mayoría de los instrumentos DLS. Como se ve en esta nota, el Zetasizer Nano de alta sensibilidad de Malvern Instruments puede abordar el desafío que presenta esta concentración baja de proteína.

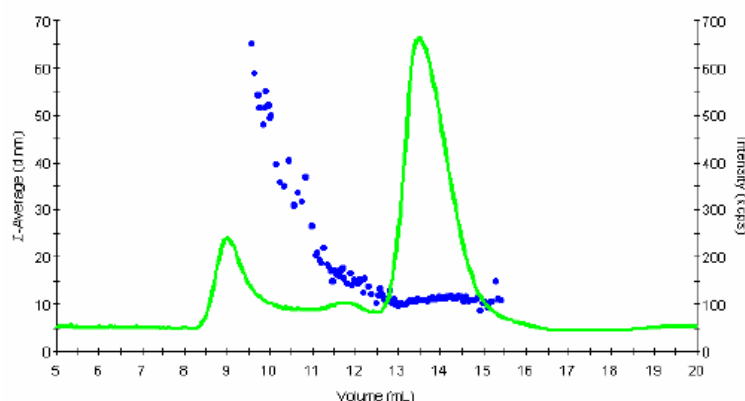
### Experimentación

La dispersión de luz dinámica mide las fluctuaciones de intensidad de DLS para determinar la distribución de tamaño de un conjunto de partículas en una solución. La información de tamaño se extrae del correlograma por ajuste exponencial, donde solamente son necesarias la temperatura y la viscosidad del medio.

La cromatografía de exclusión por tamaño, SEC, separa los materiales sobre la base de su tamaño hidrodinámico y/o su afinidad selectiva. El perfil de elución brinda conocimientos sobre la distribución, y puede interpretarse como una distribución de tamaño. Con la combinación de la alta resolución de la cromatografía y la facilidad en la adquisición de datos que brinda la DLS se puede identificar rápidamente o confirmar la identidad pico. Se utilizó una columna Superdex 200 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) para la separación de un anticuerpo (IgG4) de un peso molecular esperado de 150 kDa. La proteína fue preparada en un búfer de bicarbonato de amonio 0.1 M (pH sin ajustar) a una concentración de 7 mg/mL. Se inyectaron 100µL, es decir la columna recibió una carga de 0.7 mg de proteína.

El sistema corrió a una tasa de flujo de 0.5 mL/min, y la dispersión de luz dinámica fue analizada cada 3 segundos. El software registró todas las funciones de correlación y valores de intensidad.

	Diam. (nm)	% Int.	Width (nm)	MW (kDa)	Width (kDa)	Start (mL)	End (mL)
Peak 1:	11.60	78.6	0.7635	206	0.354	: 13.25	: 14.2
Peak 2:	15.89	7.2	1.163	430	0.947	: 11.51	: 12
Peak 3:	38.54	4.1	2.011	3420	3.41	: 10.11	: 10.39

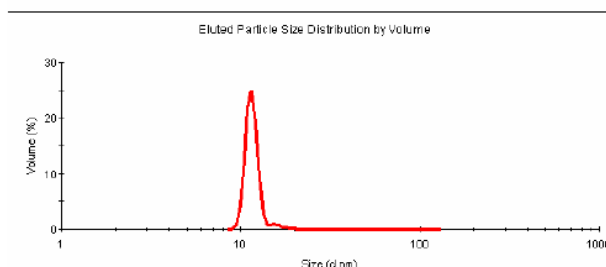


**Figura 1:** diámetro hidrodinámico (promedio z, nm, en azul) e intensidad de dispersión de luz (kilos por segundo, en verde) versus volumen de elución para IgG4, inyectada en la columna Superdex200

## Resultados

La muestra contenía una gama de ensamblajes más grandes que se eludía brevemente después del volumen nulo. El anticuerpo fue separado en dos picos. El monómero principal es razonablemente monodisperso, y llega básicamente a un pico único en el perfil de elución. La Figura 1 muestra el tamaño promedio z (DLS) y la traza de intensidad de la dispersión de luz. El pico de monómero se eluyó entre 13.3 y 14.2 mL con un diámetro de 11.6 nm. Se acerca al tamaño esperado para esta molécula. Una predicción del peso molecular a partir del tamaño medido nos conduce a 200 kDa, tal como se esperaba es un poco más grande que los 150 kDa nominales. Este aumento se debe a la forma de Y de la molécula, esta familia de proteínas no encaja perfectamente con el modelo de familia de proteína globular. Una proteína globular compacta típica de 150kDa tendría un tamaño de 10 nm. Sin embargo, este estimado confirma claramente la presencia del monómero. Los resultados pueden interpretarse en términos de una distribución de volumen. La figura 2 muestra la distribución de tamaño eluido por volumen, con su resumen asociado de los hallazgos. La amplia mayoría (95.8% por masa) está contenida en el pico de elución del monómero.

	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)	MW (kDa)	Width (kDa)
Peak 1:	11.46	95.6	0.8496	200	0.454
Peak 2:	15.89	3.9	1.556	150	1.87
Peak 3:	36.46	0.3	3.821	3000	15.9



**Figure 3:** Eluted size distribution from IgG4. In the analysis of the elution profile, the majority by mass is found to be monomer.

**Figure 2:** distribución de tamaño eluido a partir de IgG4. En el análisis del perfil de elución se demostró que la mayoría por masa era monómero

## Sistema Zetasizer Nano

El sistema Zetasizer Nano de Malvern Instruments es el primer instrumento comercial que incluye el hardware y el software para las mediciones de dispersión de luz electroforética, estática, dinámica y combinada, dándole al investigador una amplia gama de propiedades de muestra, incluyendo el tamaño, el peso molecular, y el potencial zeta. El sistema fue diseñado específicamente para cumplir con los requerimientos de volumen de muestra y concentración baja típicamente asociados con las proteínas y otras aplicaciones biomoleculares, junto con los requerimientos de alta concentración para aplicaciones coloidales. Como consecuencia del diseño óptico patentado, las especificaciones de Zetasizer Nano para un tamaño de muestra y concentración excedió ampliamente a los demás instrumentos de DLS en el mercado, con un rango de tamaño de 0.6 nm a 6 µm, y un rango de concentración de 0.1 ppm a 30% w/v. Estas capacidades de alta sensibilidad también son aplicables a las mediciones de flujo en tiempo real, y facilitan las mediciones de SEC absoluta y otras mediciones HPLC.

Malvern Instruments Ltd

Groewood Road • Malvern • Worcestershire • UK • WR14 1XZ

Tel: +44 (0)1684 892456 • Fax: +44 (0)1684 892789

Malvern Instruments Worldwide

Sales and service centers in over 50 countries for details visit