

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Disciplina RCB-110

**Cromatografia por exclusão molecular ou filtração em gel**

**Objetivos:**

- Conhecer suportes usados em cromatografia líquida.
- Usar resina de filtração em gel e conhecer fundamentos deste tipo de cromatografia.
- Ganhar familiaridade com métodos de detecção de biomoléculas em cromatografia.

**Material:**

Colunas cromatográficas empacotadas com:

- a) resina Sephadex G-75
- b) resina preparada em classe a partir de poliacrilamida 10%.

Substâncias para amostras:

- a) IgG-HRP (5 mg/mL)
- b) Crotamina (10mg/mL)
- c) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. (0.7M)

Reagentes para revelar as amostras utilizadas: Solução de CH<sub>3</sub>COOH a 7%. Papel de celulose. Solução salina 0.154M. Reagentes para detecção de peroxidase.

**Procedimentos experimentais:**

A) Separação cromatográfica por exclusão molecular.

1 – Aplicar amostra contendo mistura de IgG-HRP, crotamina e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20uL+200uL+200uL) em cada coluna equilibrada com salina. Correr a cromatografia com fluxo determinado por gravidade, adicionando-se porções de 0.8 mL de salina, separadamente, às colunas e coletando-se os respectivos volumes efluentes em frações individuais.

2 – Identificar cada composto nas frações cromatográficas obtidas, anotando os volumes efluentes correspondentes à eluição de cada um deles.

Reação peroxidase:

20 mg de O-PD (O-phenylenediamine).

40 mL de Tris 0,02M pH 7,2.

50 uL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%

Adicionar 50 uL de cada fração + 200 uL de reagente.

Reação com BaCl<sub>2</sub>

50 uL de cada fração

200 uL de 0.5M BaCl<sub>2</sub>

Revelar em tira de celulose

- Aplicar 2 uL de cada amostra em tira de celulose
- Corar a tira com amido-negro 0.3% em ácido acético 7%
- Descolorir em ácido acético 7%

**Discussão em classe:**

- a) Definições e aplicações de cromatografia.
- b) Fundamentos da cromatografia por exclusão molecular ou filtração em gel. Matrizes.
- c) Fundamento dos métodos analíticos propostos para revelação da cromatografia.
- d) Os resultados obtidos foram de acordo com a teoria de filtração em gel?