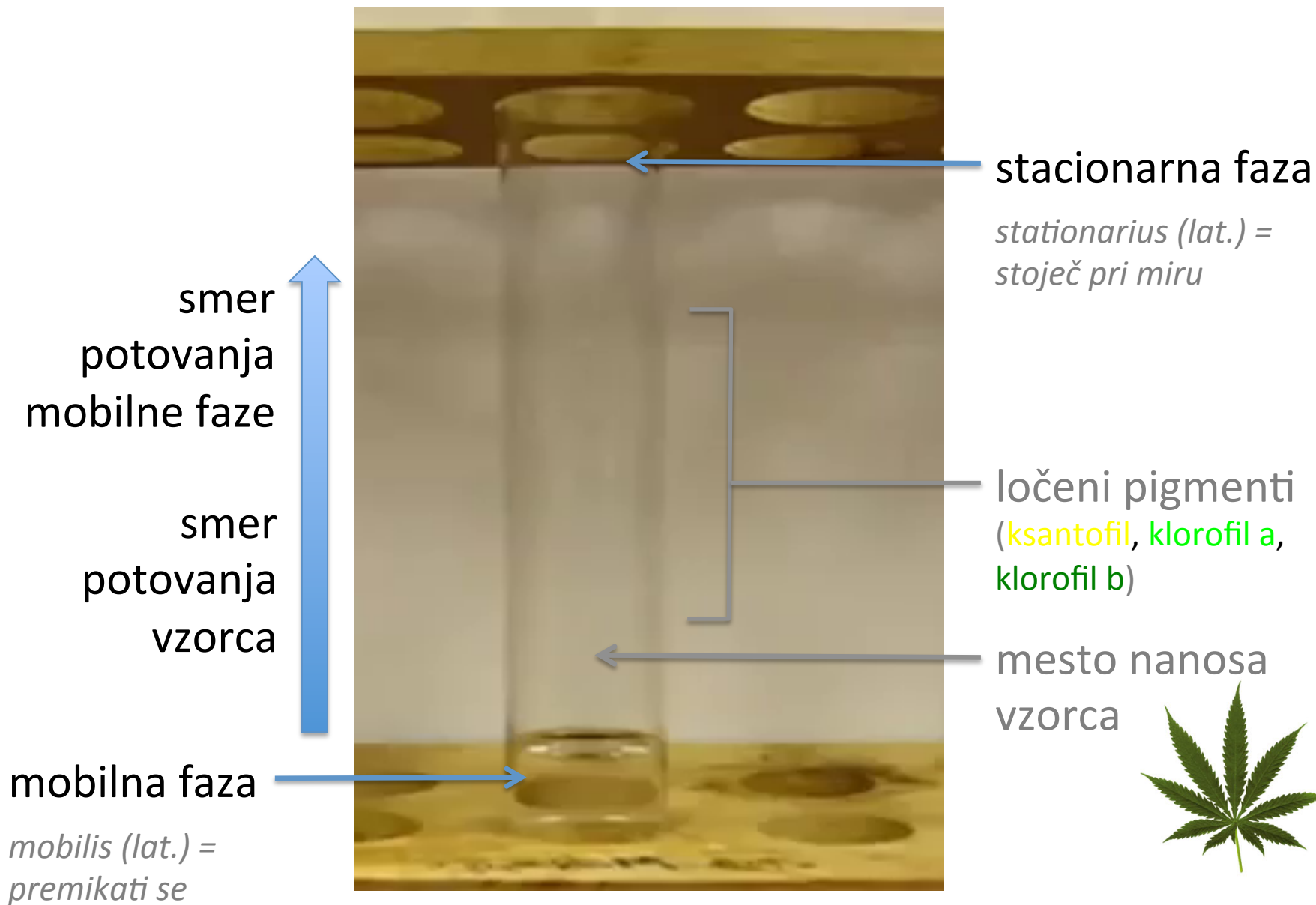


KROMATOGRAFSKE METODE

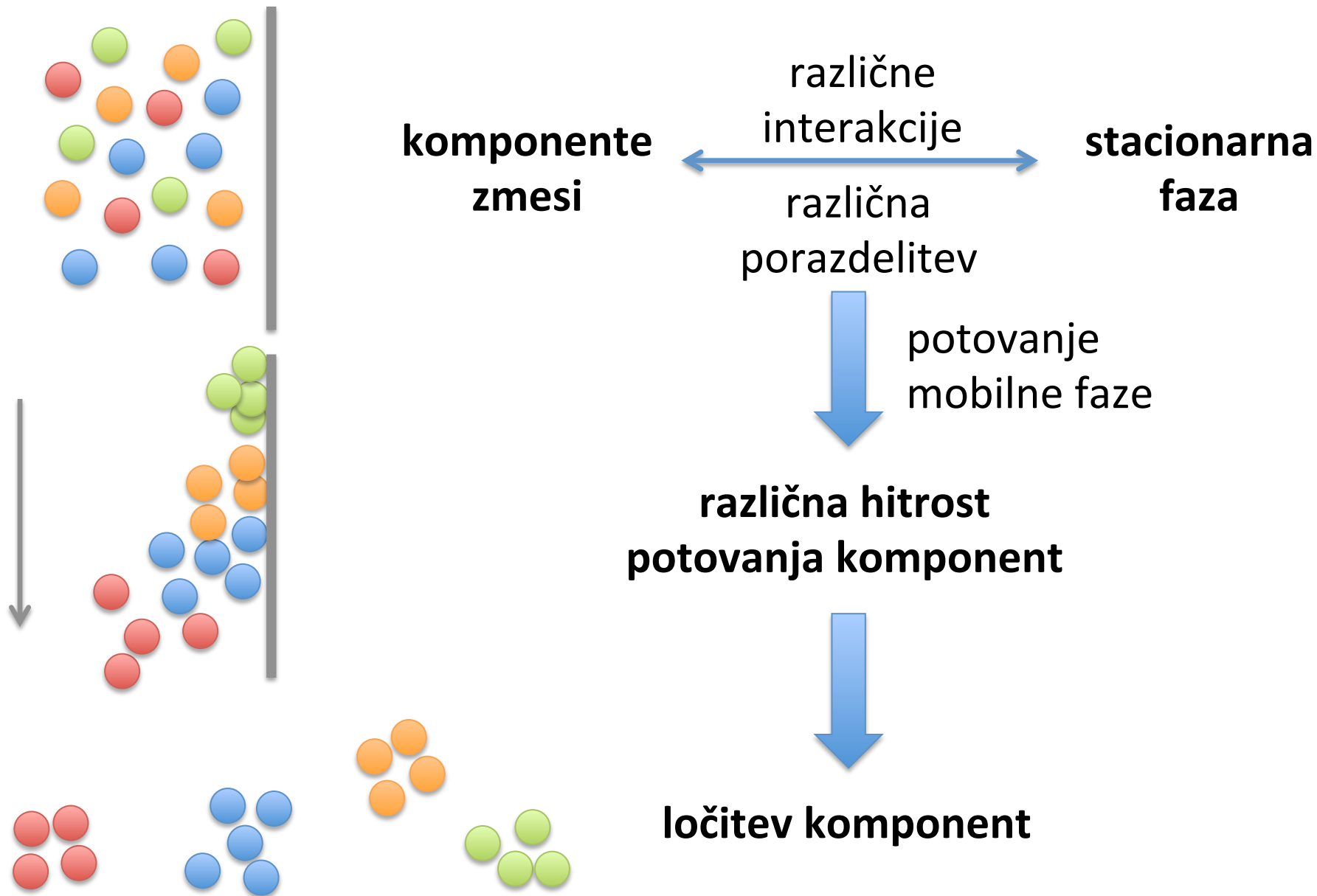
3. vaja – Razsoljevanje proteinov z gelsko izključitveno kromatografijo

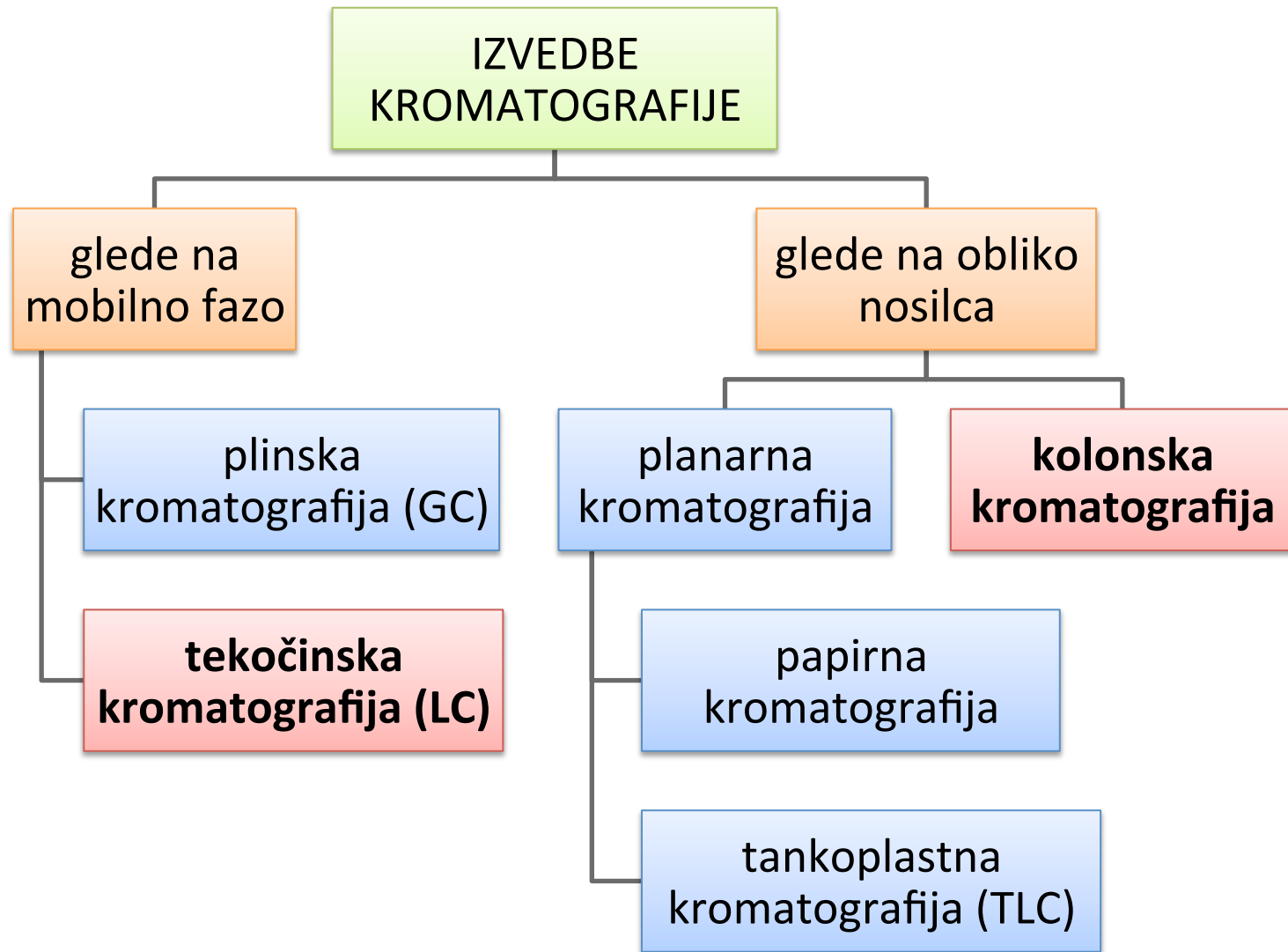
4. vaja – Ionsko-izmenjevalna ter afinitetna kromatografija

Klasični primer kromatografije: ločitev fotosintetskih pigmentov



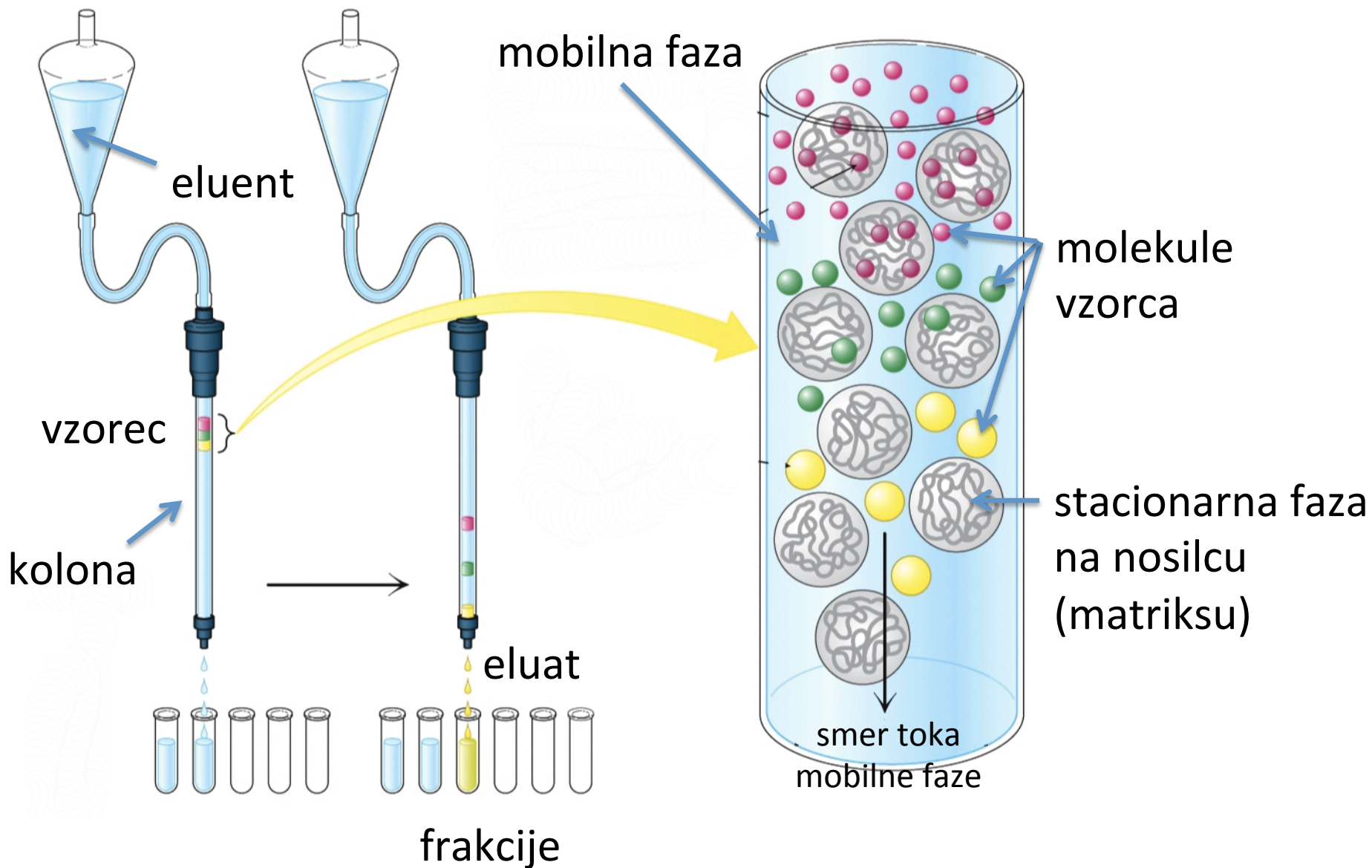
Osnovni princip kromatografije



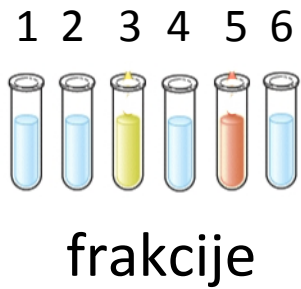


Za funkcionalne biološke makromolekule je primerna le **tekočinska kolonska kromatografija**.

Tekočinska kolonska kromatografija – pojmi (1)



Tekočinska kolonska kromatografija – pojmi (2)



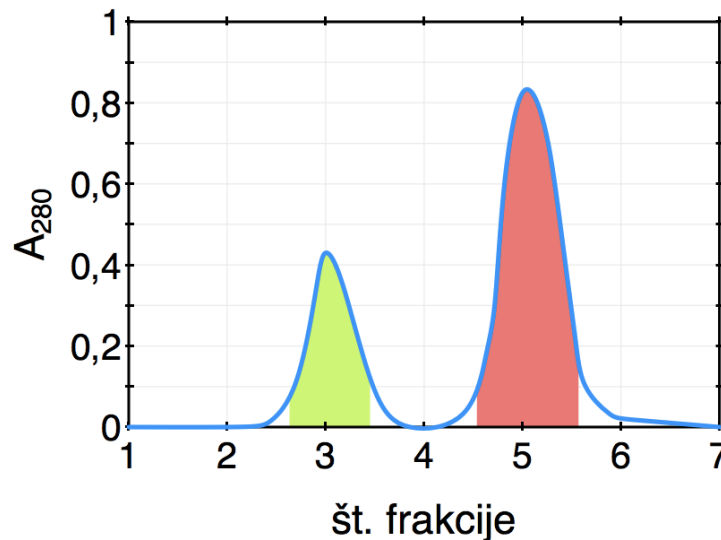
encimski test, elektroforeza, ELISA, ...

A_{280} posameznih frakcij



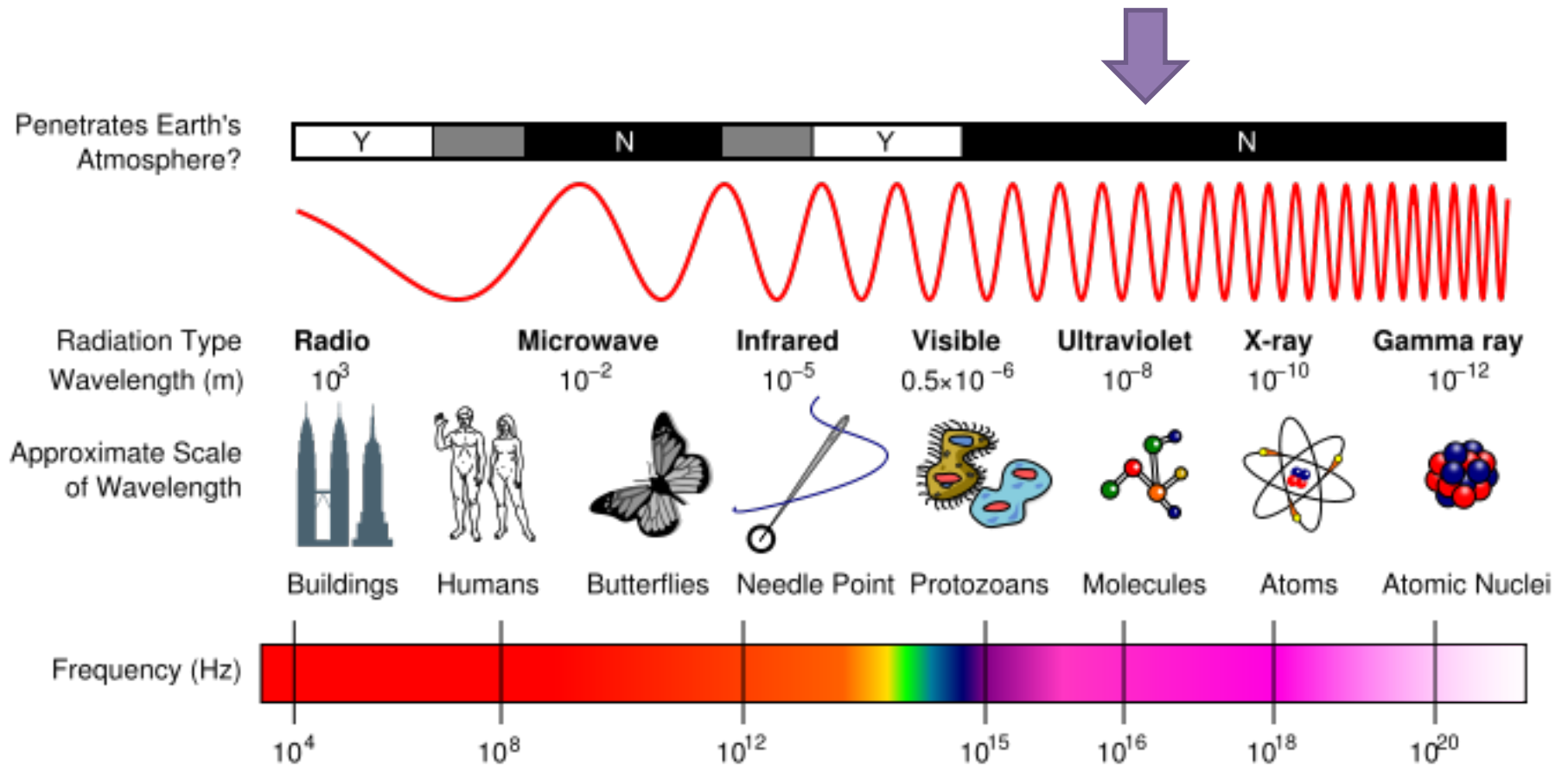
spektrofotometer

kromatogram

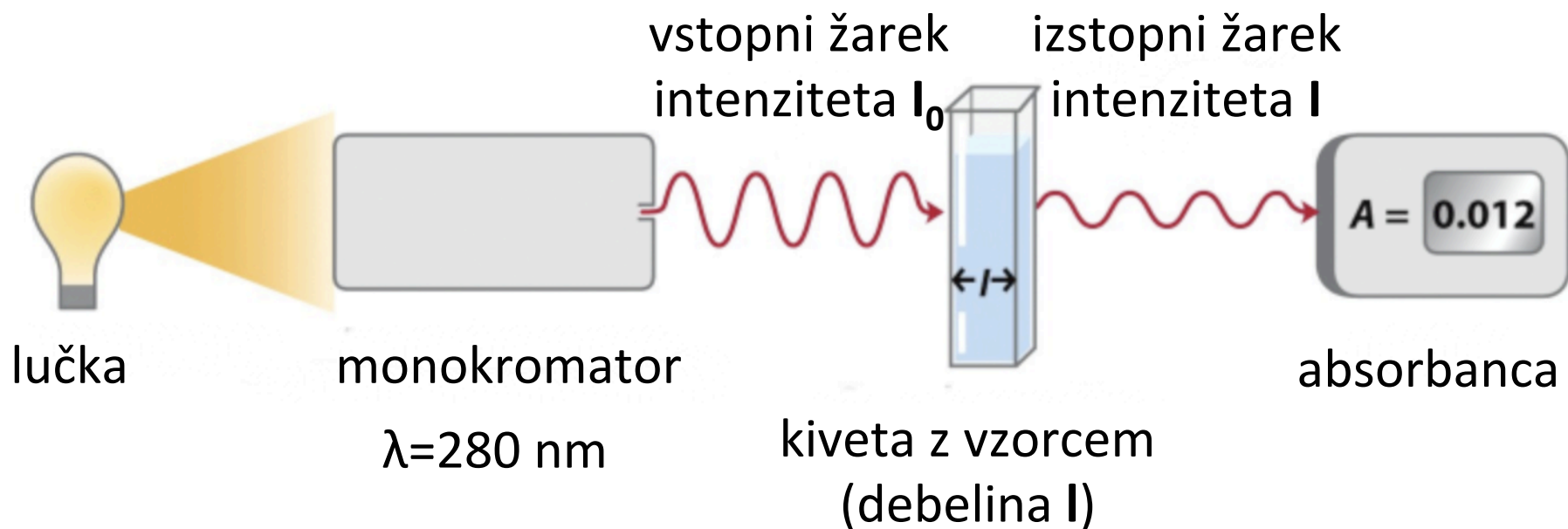


(elucijski volumen \propto retenzijski čas)

Valovna dolžina 280 nm ($\lambda = 280 \text{ nm}$)



Absorbanca pri $\lambda=280$ nm (A_{280})



$$T = \frac{I}{I_0}$$

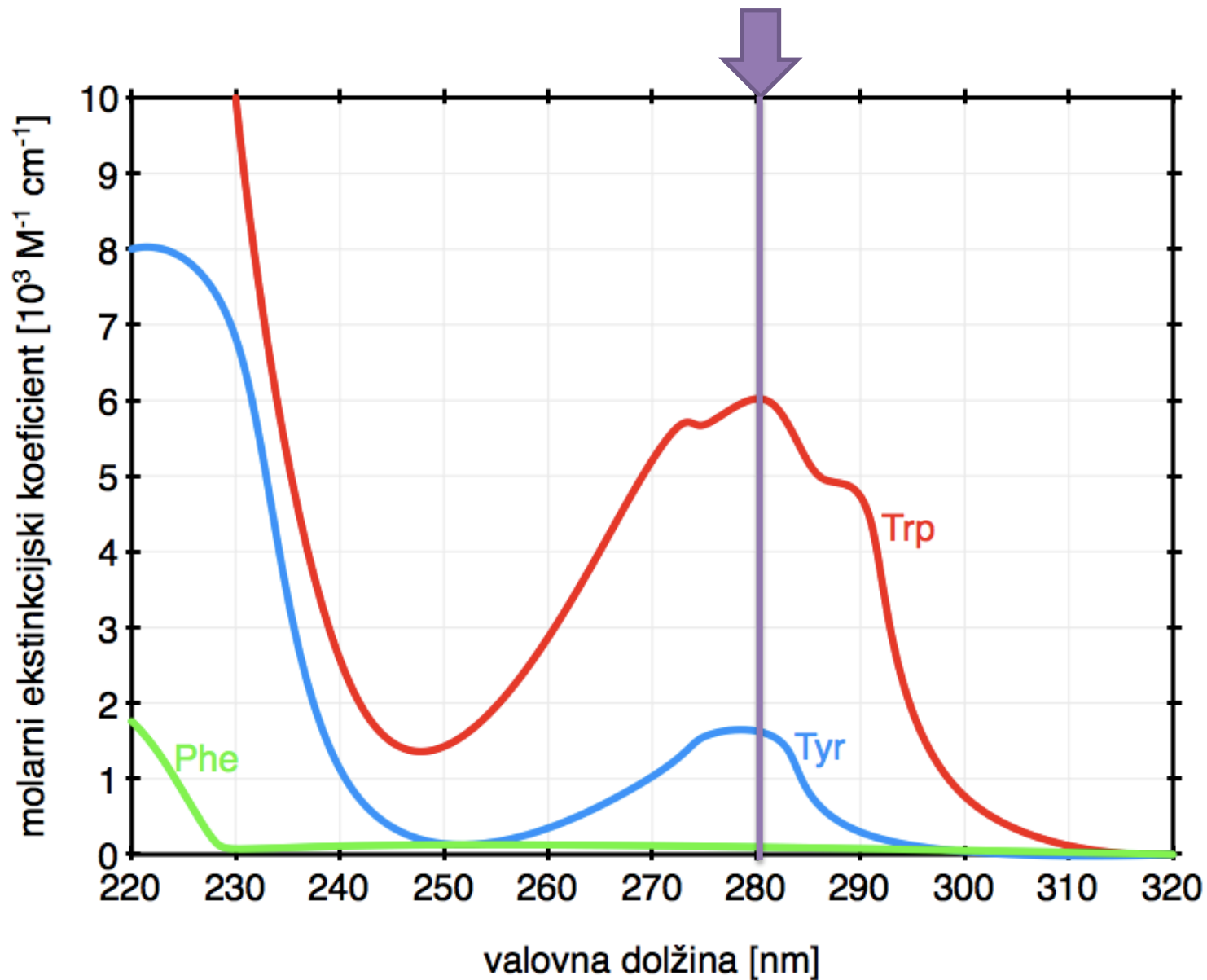
transmitanca

$$A = -\log T$$

absorbanca

A	T%
1	10 %
2	1 %
3	0,1 %
4	0,01%

Zakaj merimo ravno pri 280 nm?



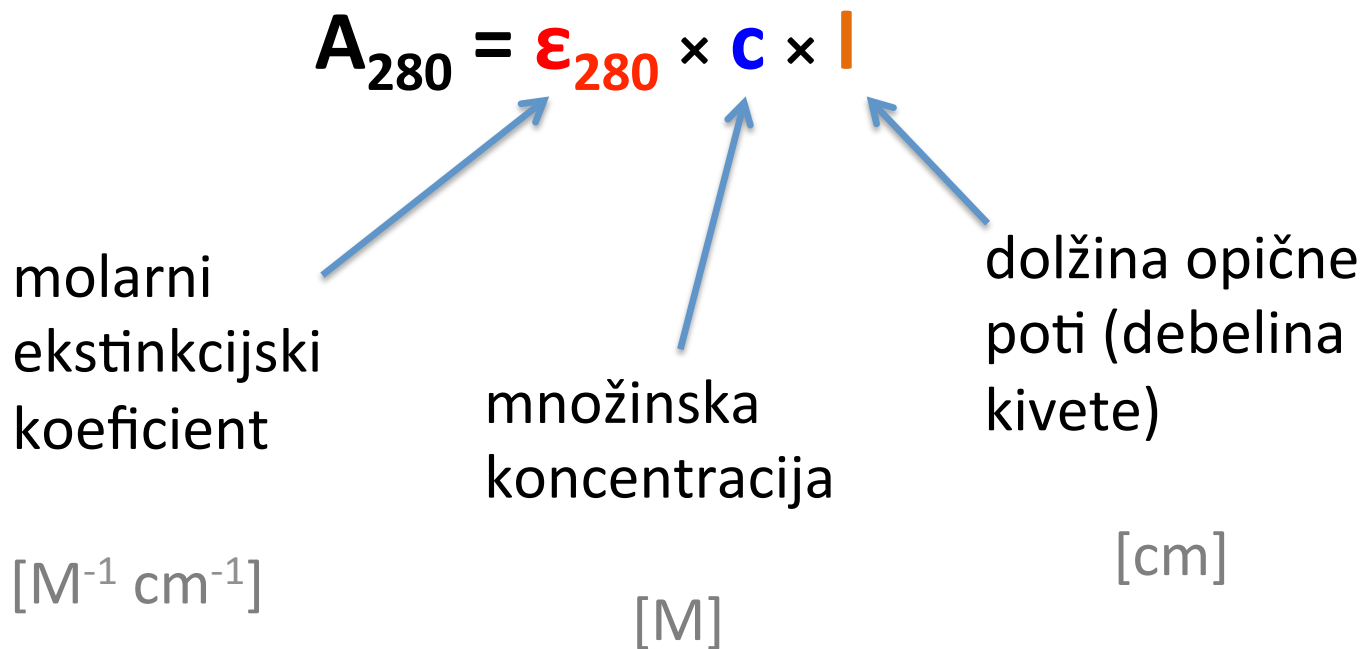
Absorbanca pri $\lambda=280$ nm

$$A_{280} = \epsilon_{280} \times c \times l$$

molarni ekstinkcijski koeficient
[M⁻¹ cm⁻¹]

množinska koncentracija
[M]

dolžina optične poti (debelina kivete)
[cm]



$$A_{280}(\text{zmes}) = A_{280}(\text{protein 1}) + A_{280}(\text{protein 2}) + \dots$$

Mobilna in stacionarna faza, nosilec (matriks)

Mobilna faza:

- vzdrževanje molekul vzorca v željenem stanju (zvitje, aktivnost, ...) → pufer
- primerni pogoji za ločitev (narava interakcij med molekulami vzorca in stacionarno fazo)

Stacionarna faza:

- ključen vpliv na mehanizem ločitve (primerna mobilna faza!)

Nosilec:

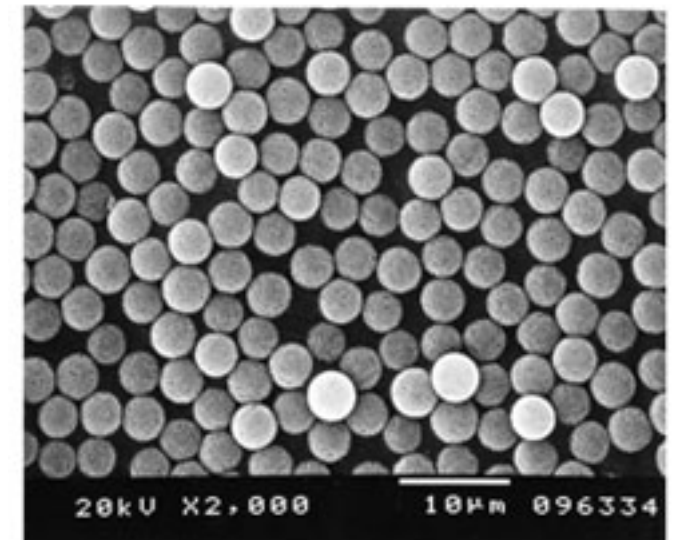
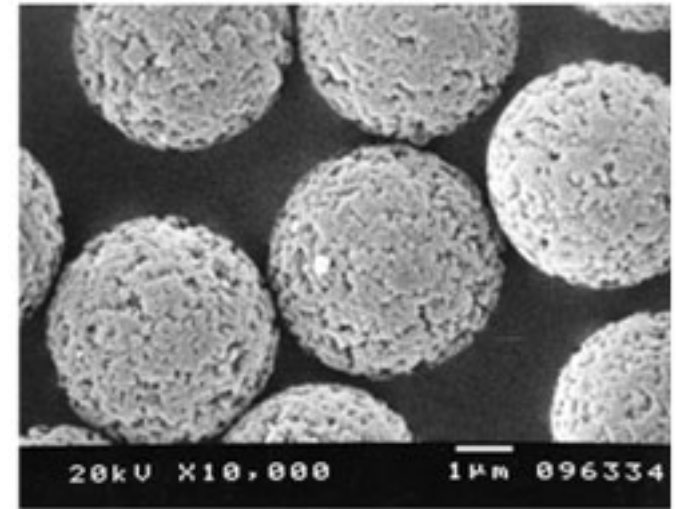
- “pritrnitev” stacionarne faze
- inerten in netopen, odporen na visok tlak, obstojen
- ponavadi v obliki kroglic

Nosilec (matriks)

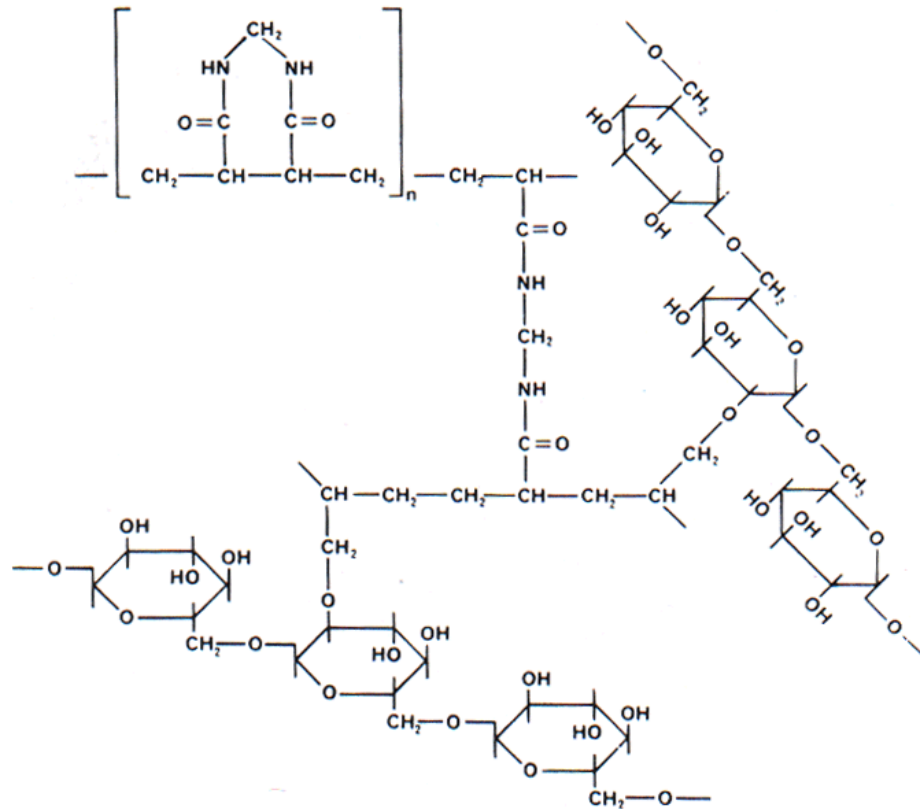
- agaroz
- celuloza
- dekstran
- poliakrilamid
- polistiren
- silikagel

Primeri komercialnih imen:

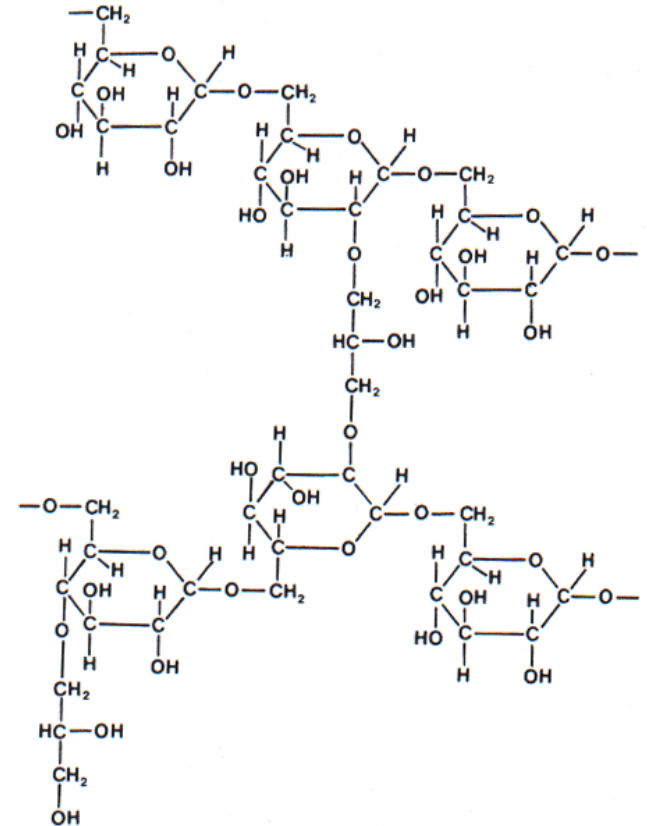
- Sephadex (**se**paration **Ph**armacia **dex**tran)
- Sephacryl (**se**paration **Ph**armacia dextran-polya**cryl**amide)
- sepharose (**se**paration **Ph**armacia aga**rose**)



Nosilec (matriks)



Sephacryl

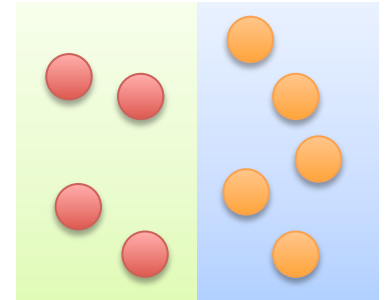


Sephadex

Mehanizmi ločitve

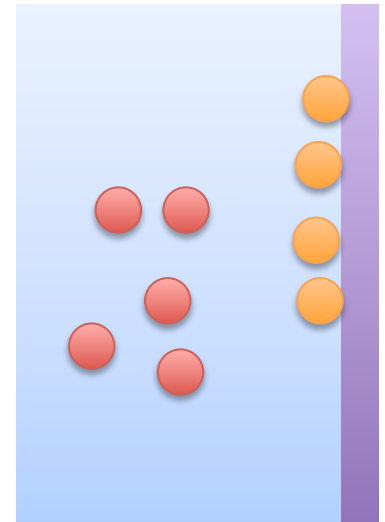
absorpcija

- porazdelitev vzorca med stacionarno in mobilno fazo zaradi različne topnosti



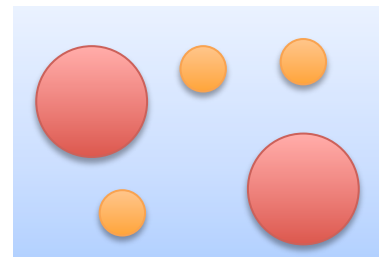
adsorpcija

- ionske interakcije → ionsko-izmenjevalna kromatografija
- afiniteta → afinitetna kromatografija
- hidrofobne interakcije → hidrofobna kromatografija
- hidroksiapatitna kromatografija
- kovalentna kromatografija



velikost

- gelska filtracija



Gelska filtracija (GF)

Poimenovanje:

gelska filtracija

angl.: gel filtration)

gelska izključitvena kromatografija

angl.: gel exclusion chromatography,

angl.: size exclusion chromatography (SEC)

gelska permeacija

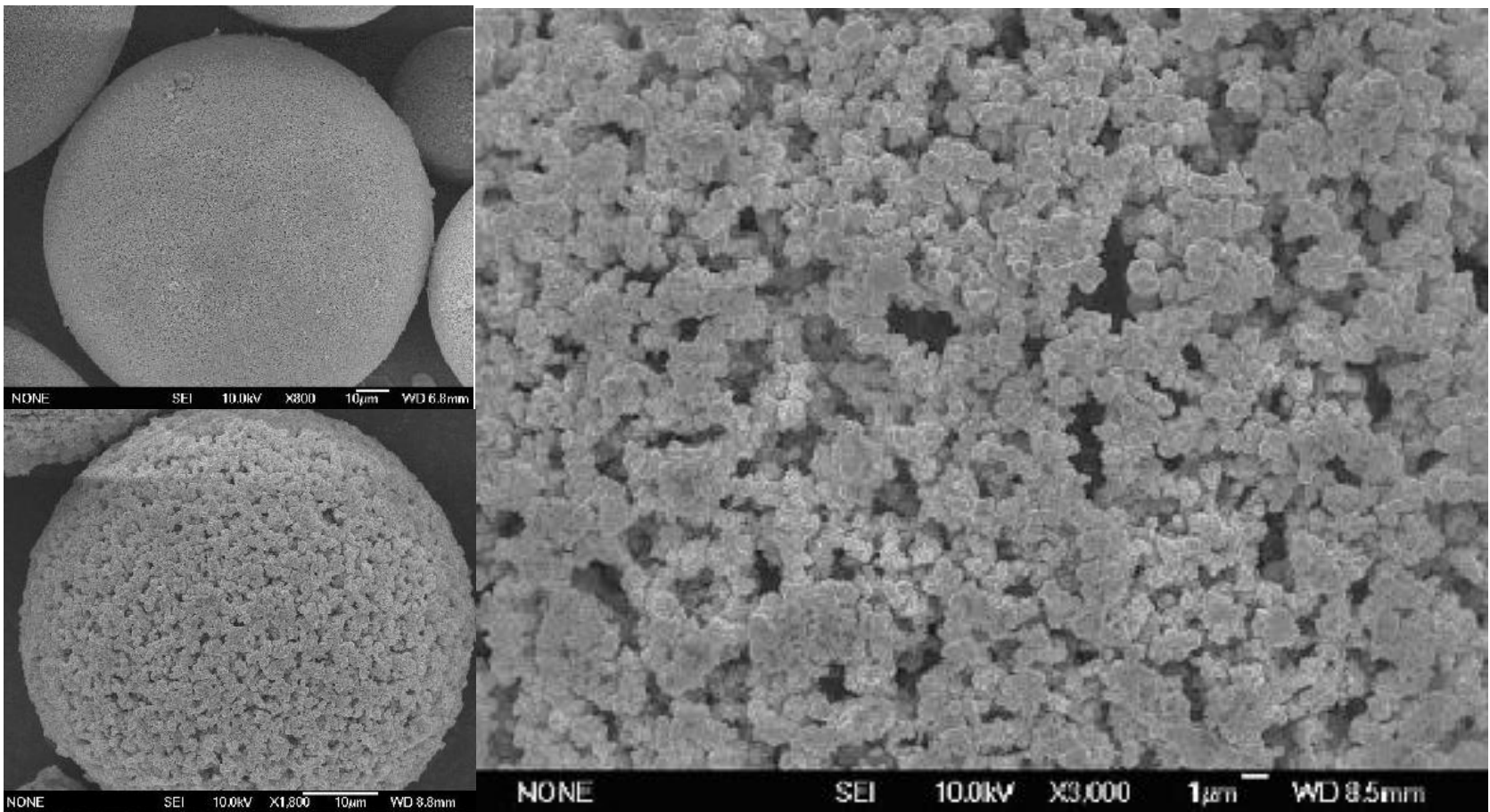
angl.: gel permeation

molekulsko sejanje

angl.: molecular sieving

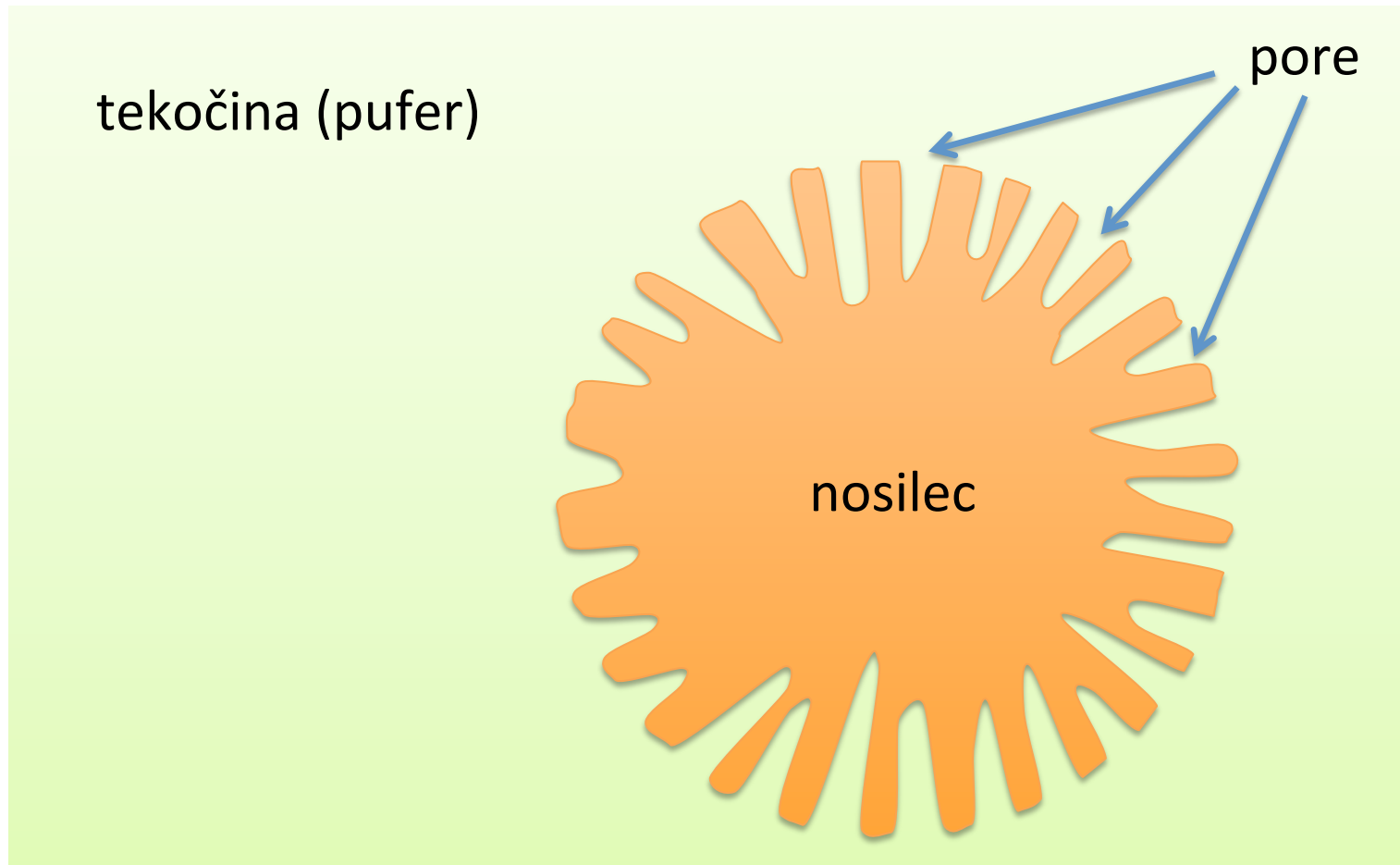
GF: Nosilec

- Nosilec so porozne kroglice.
- Pore kroglic so napolnjene s tekočino.
- **Ločitev je odvisna od velikosti por nosilca.**

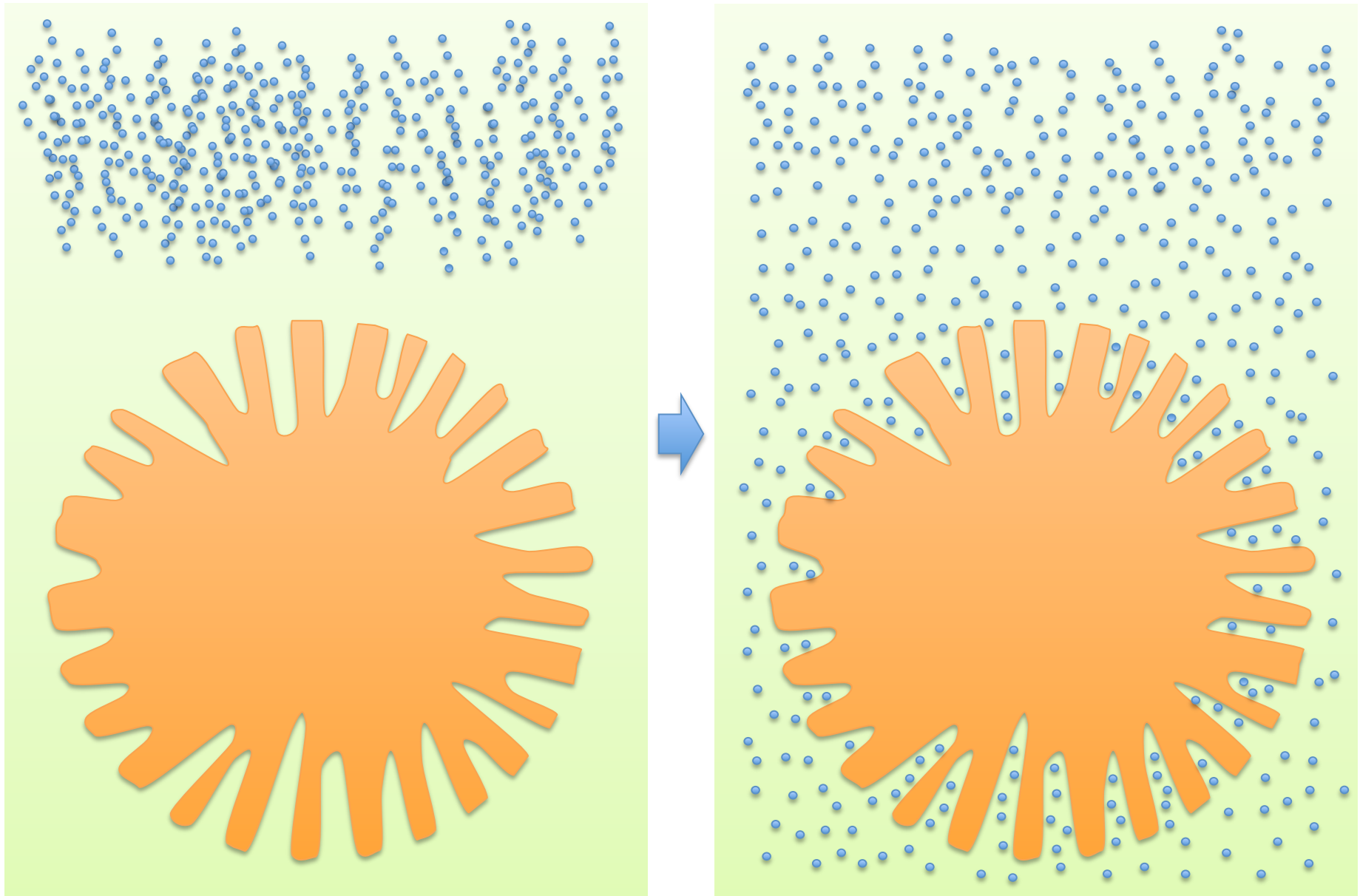


GF: Mobilna in stacionarna faza

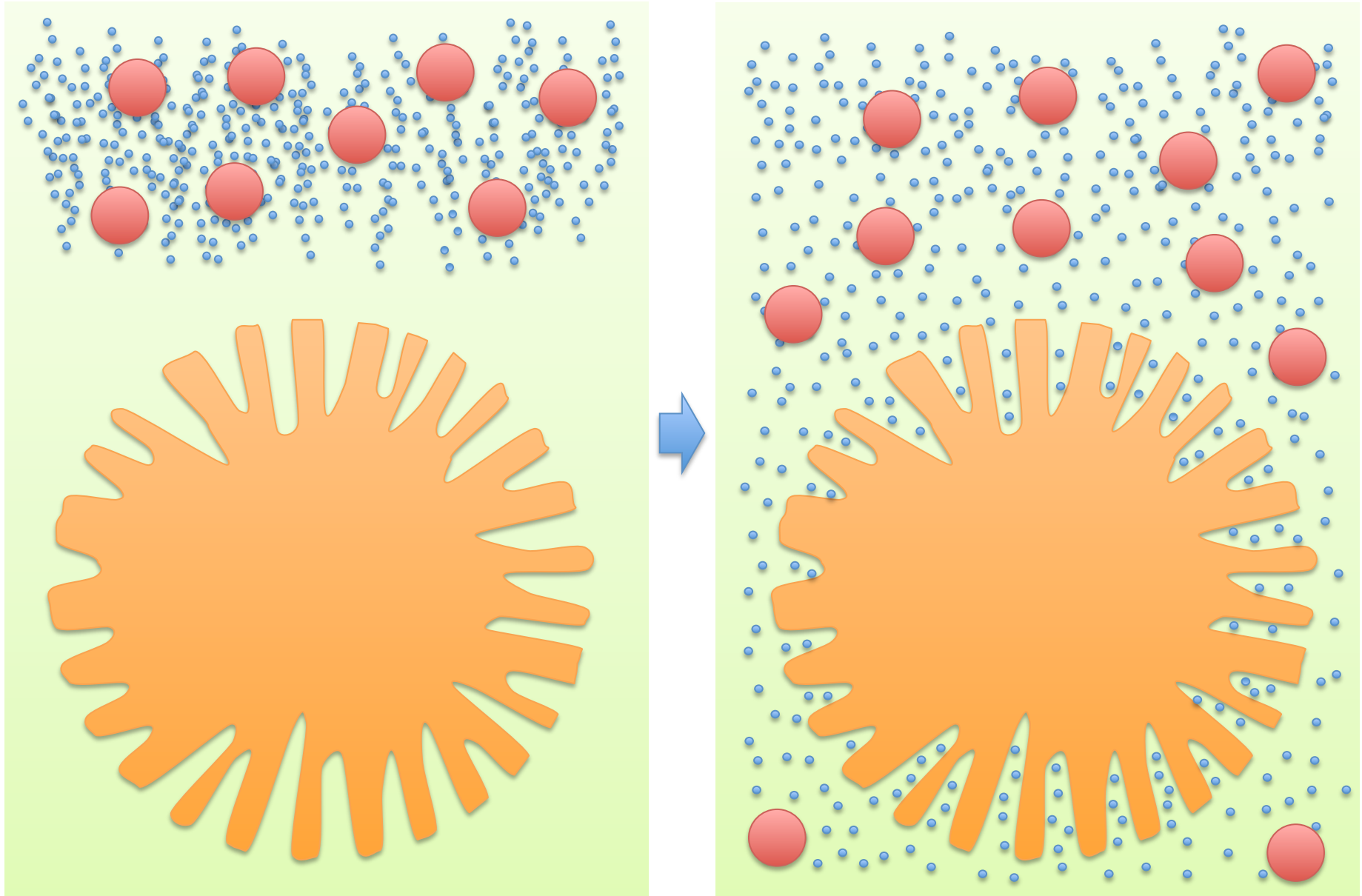
Tekočina, ujeta v pore kroglic gela, je hkrati mobilna in stacionarna faza.



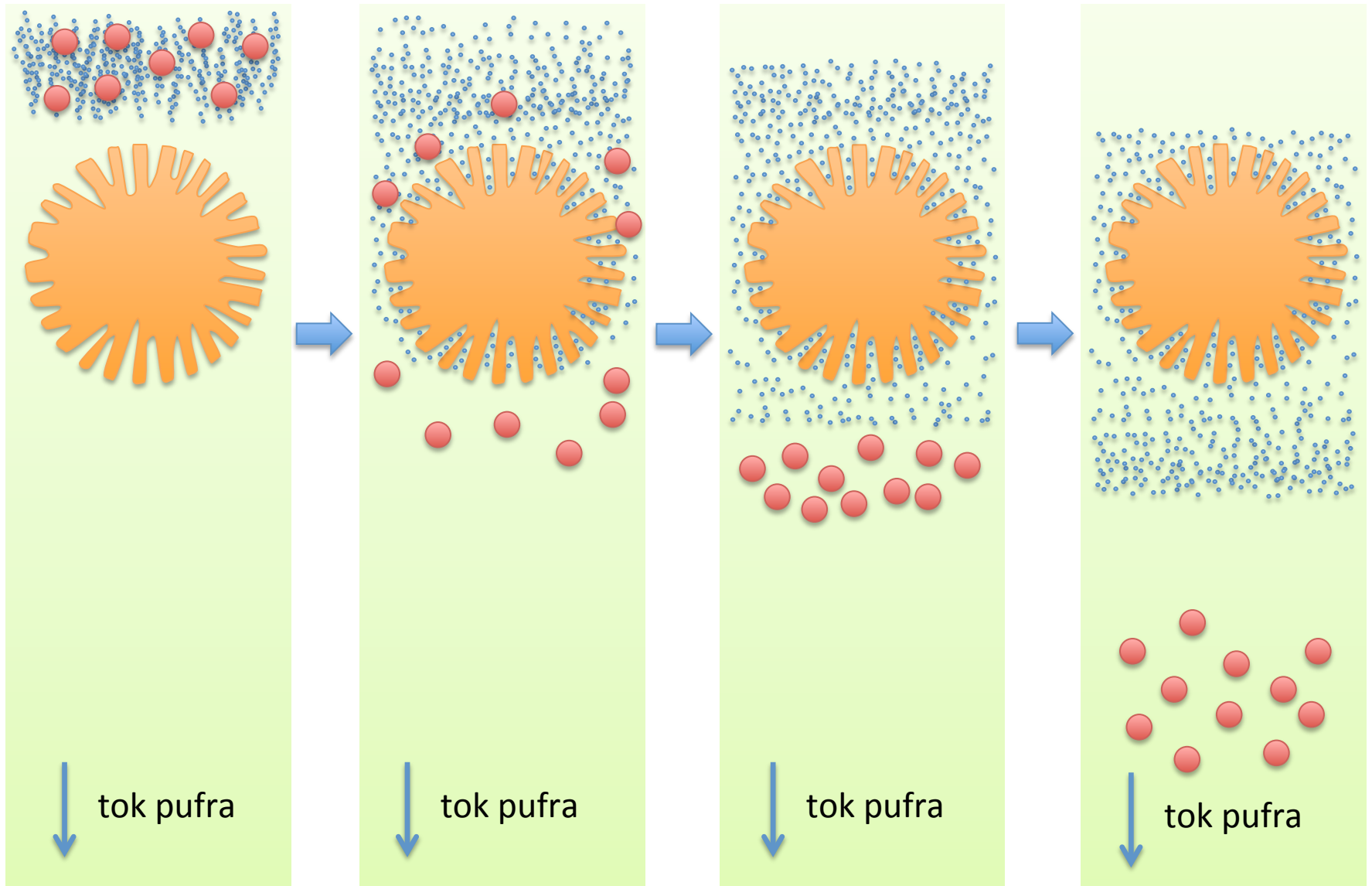
GF: Nizko-molekularen topljenec



GF: Nizko- in visoko-molekularen topljenec



GF: Nizko- in visoko-molekularen topljenec



GF: Zamreženost gela

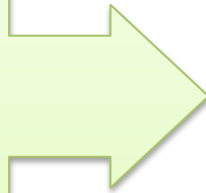
Razpon mas, ki jih lahko z določenim nosilcem ločimo, je odvisen od stopnje zamreženosti gela.

večja zamreženost gela  **manjše pore na površini kroglic**

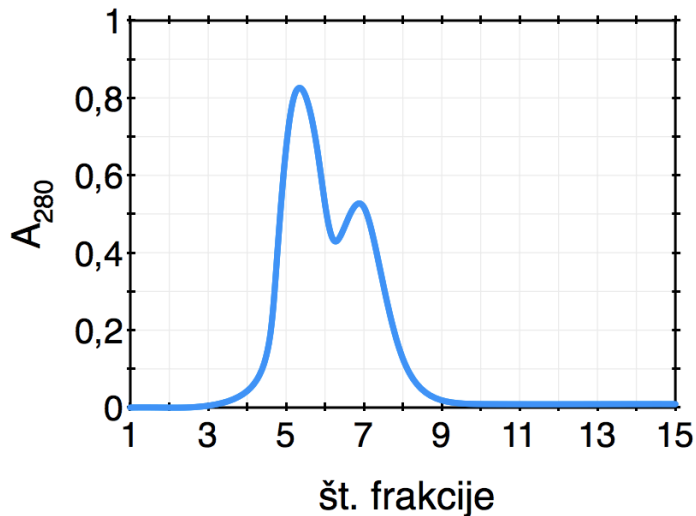
Ime	Območje ločevanja [Da]	Nabrekanje [ml/g suhega gela]	Volumen gela [ml/g suhega gela]
Sephadex G-10	0 - 700	1,0	2 - 3
Sephadex G-15	0 – 1.500	1,5	2,5 - 3,5
Sephadex G-25	1.000 – 5.000	2,5	4 - 6
Sephadex G-50	1.500 – 30.000	5,0	9 - 11
Sephadex G-75	3.000 – 80.000	7,5	12 - 15
Sephadex G-100	4.000 – 150.000	10	15 - 20
Sephadex G-150	5.000 – 300.000	15	20 - 30
Sephadex G-200	5.000 – 600.000	20	30 - 40

GF: Ločljivost

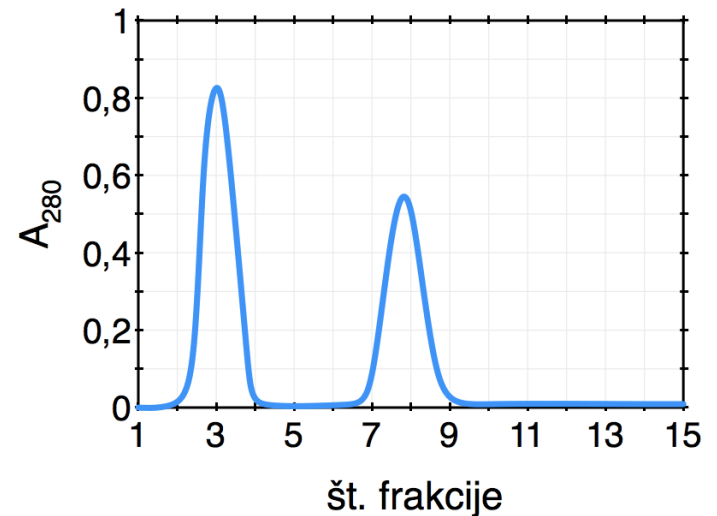
- dolga in ozka kolona
- konstanten pretok
- majhen volumen vzorca
- nizka viskoznost vzorca
- pravilna izbira nosilca
- pravilna izbira pufra



**boljša ločljivost
(resolucija)**

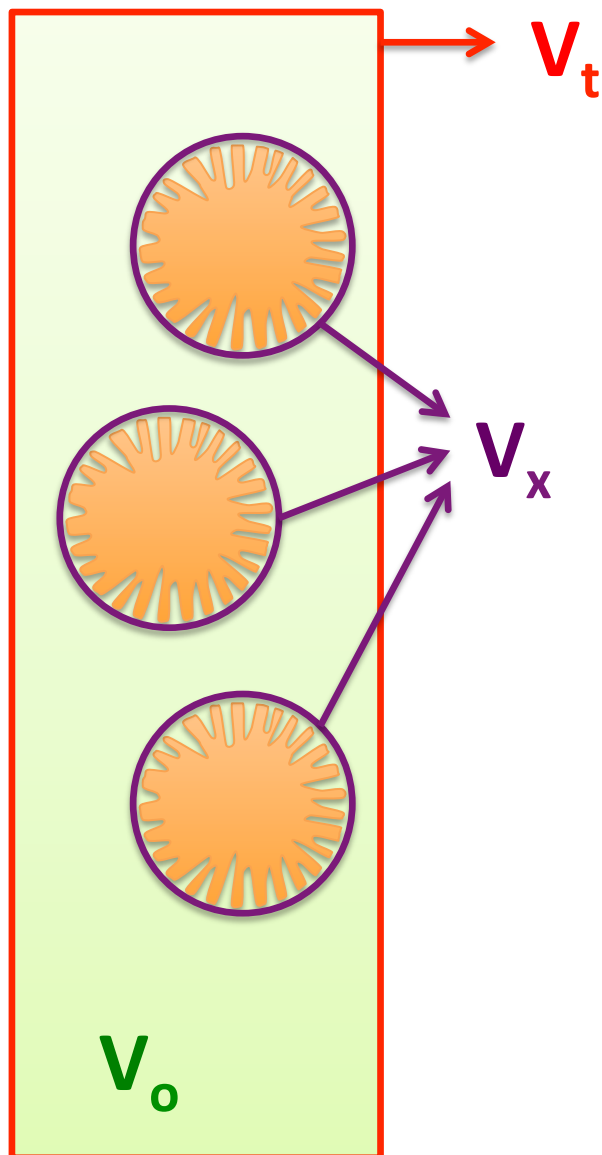


slaba ločljivost



dobra ločljivost

GF: Kvantitativen opis



$$V_t = V_x + V_o$$

V_t = celoten volumen kolone

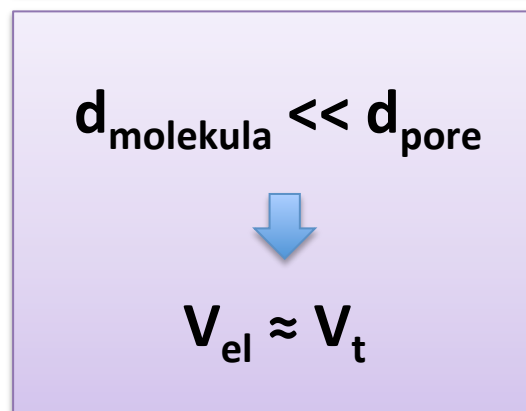
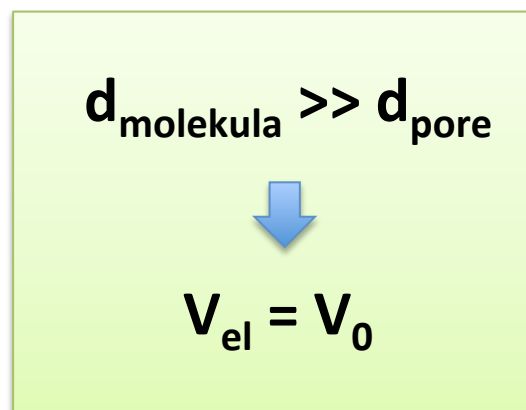
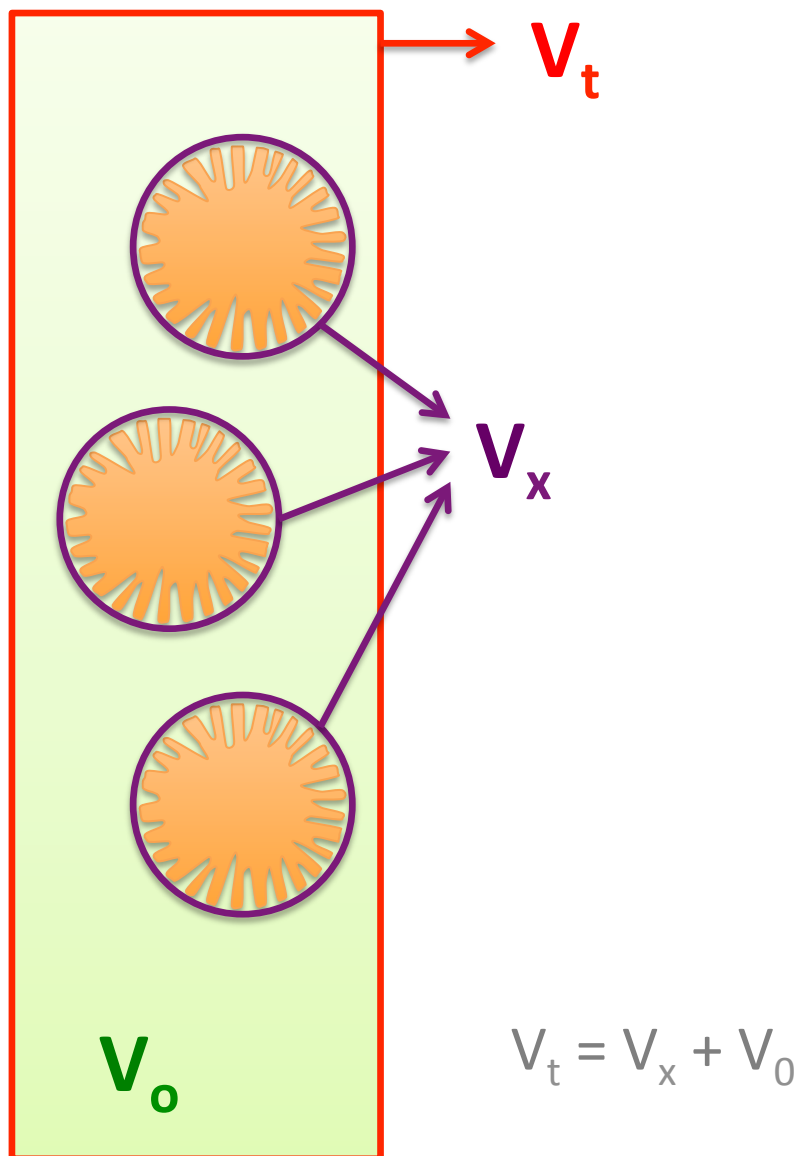
V_x = skupen volumen kroglic

V_o = prosti volumen (*angl.* void volume)

$$V_{el} \lesssim V_t$$

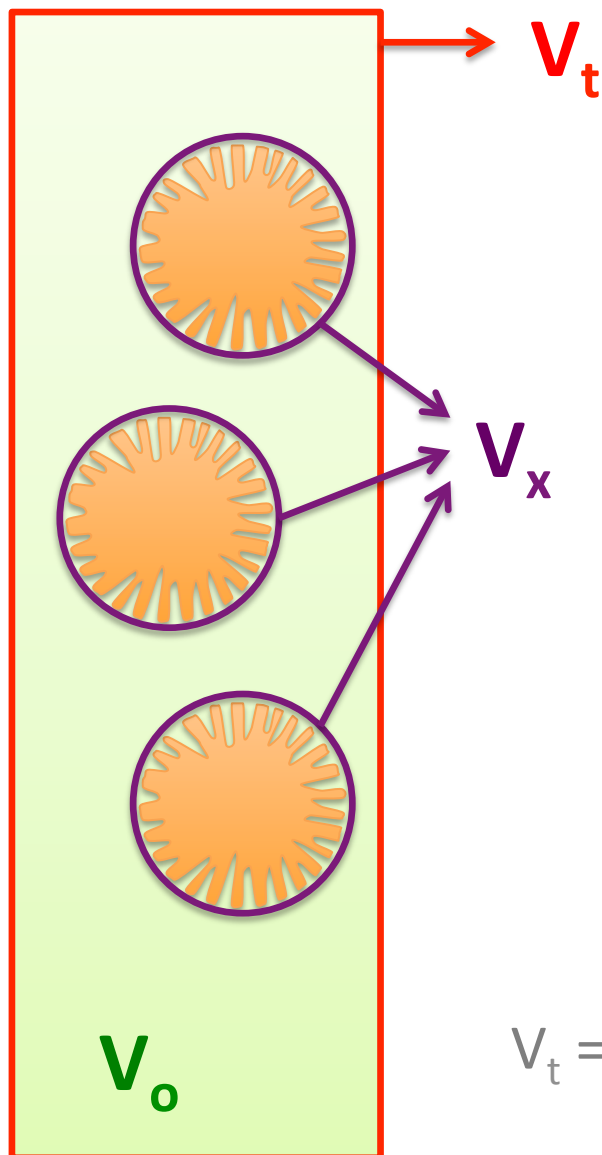
V_{el} = elucijski volumen

GF: Kvantitativen opis



V_t = celoten volumen kolone
 V_x = skupen volumen kroglic
 V_0 = prosti volumen (*angl.* void volume)
 V_{el} = elucijski volumen

GF: Kvantitativen opis



$$K_{av} = \frac{V_{el} - V_0}{V_t - V_0}$$

K_{av} = porazdelitveni koeficient

K_{av} je:

- neodvisen od dimenzij kolone in
- odvisen od proteina in nosilca.

$$V_t = V_x + V_0$$

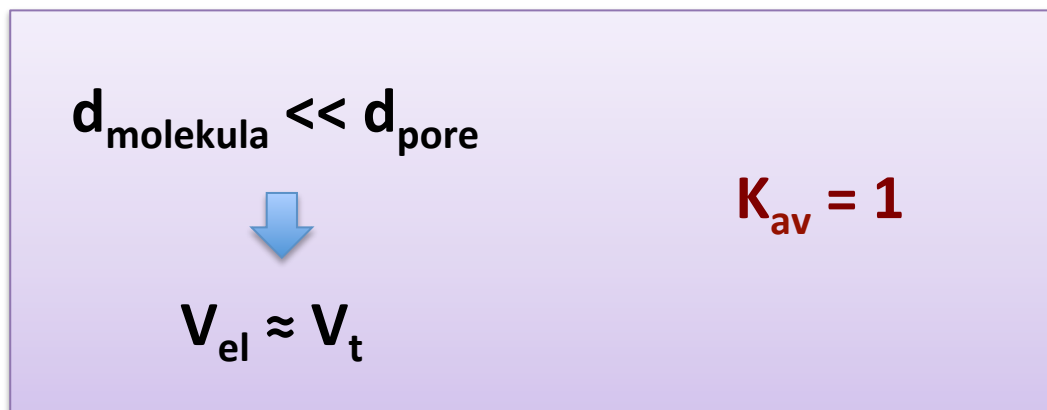
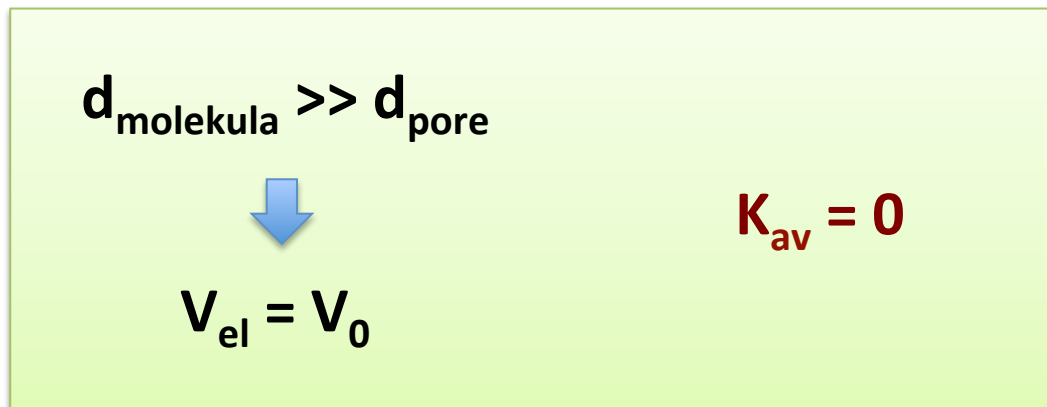
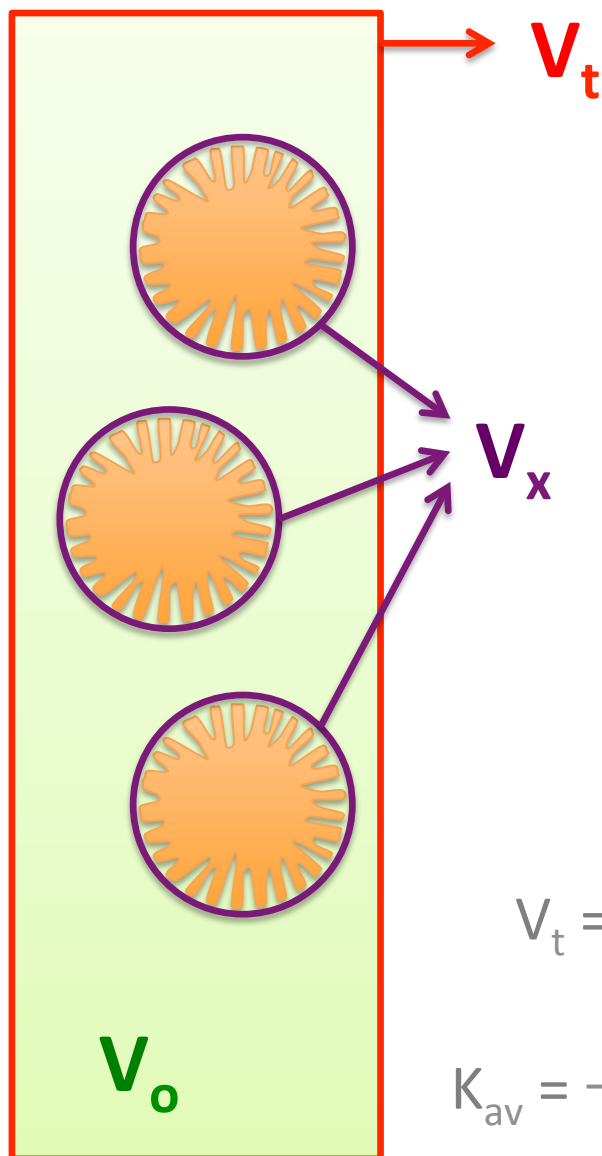
V_t = celoten volumen kolone

V_x = skupen volumen kroglic

V_0 = prosti volumen (*angl.* void volume)

V_{el} = elucijski volumen

GF: Kvantitativen opis



$$V_t = V_x + V_0$$

$$K_{\text{av}} = \frac{V_{\text{el}} - V_0}{V_t - V_0}$$

V_t = celoten volumen kolone

V_x = skupen volumen kroglic

V_0 = prosti volumen (*angl.* void volume)

V_{el} = elucijski volumen

K_{av} = porazdelitveni koeficient

GF: Praktični vidiki

$$V_{\text{vzorec}} \leq 0,05 \times V_t$$

Volumen vzorca naj ne preseže 5% celotnega volumna kolone, sicer bo ločljivost slabša.

$$V_{\text{eluat}} > V_{\text{vzorec}}$$

Pri gelski filtraciji zmeraj pride do razredčitve vzorca!

Ne želimo hidrofobnih in ionskih interakcij med vzorcem in nosilcem ($> V_{el}$) !!



- hidrofilni nosilci
- **pufri z višjo ionsko jakostjo**
(→ oslabitev elektrostatskih interakcij)

GF: Uporaba

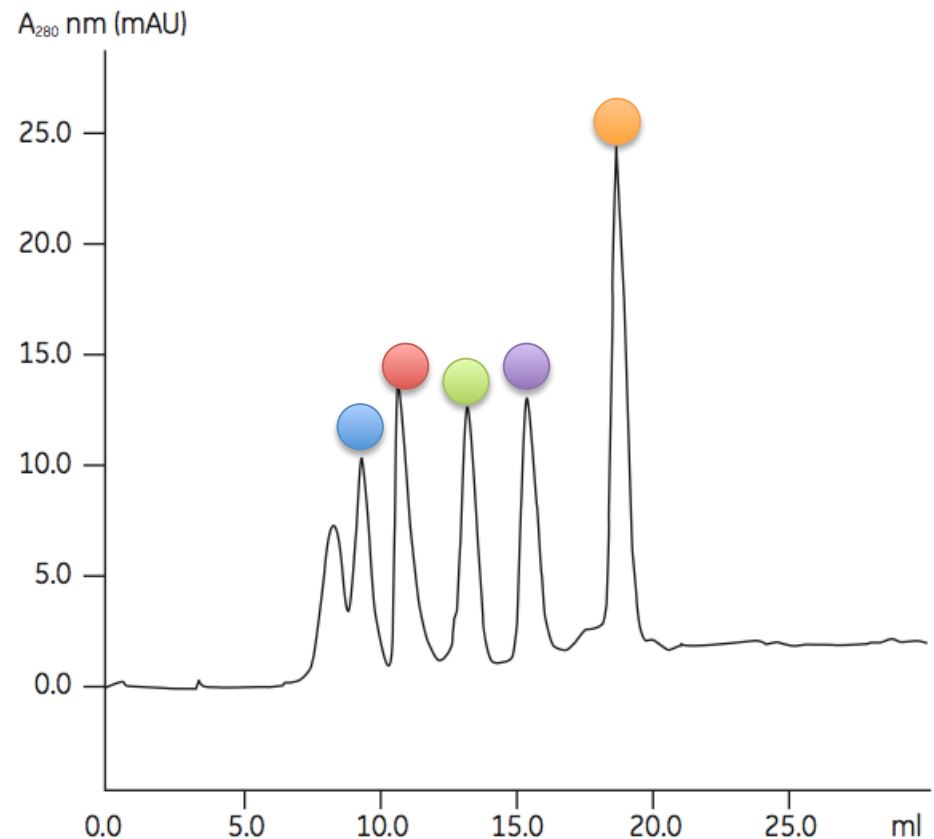
- **ločevanje različno velikih makromolekul v preparativne namene**
- določevanje molekulske mase globularnih proteinov
- razsoljevanje vzorcev

Column Superdex 75 10/300 GL

Sample:

1. BSA (M_r 67 000) 8 mg/ml
2. Ovalbumin (M_r 43 000) 2.5 mg/ml
3. Ribonuclease A (M_r 13 700) 5 mg/ml
4. Aprotinin (M_r 6 512) 2 mg/ml
5. Vitamin B12 (M_r 1355) 0.1 mg/ml

Sample volume: 500 μ l
Eluent: 0.05 M phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.0
Flow rate: 0.4 ml/min, room temperature
Detection: 280 nm



GF: Uporaba

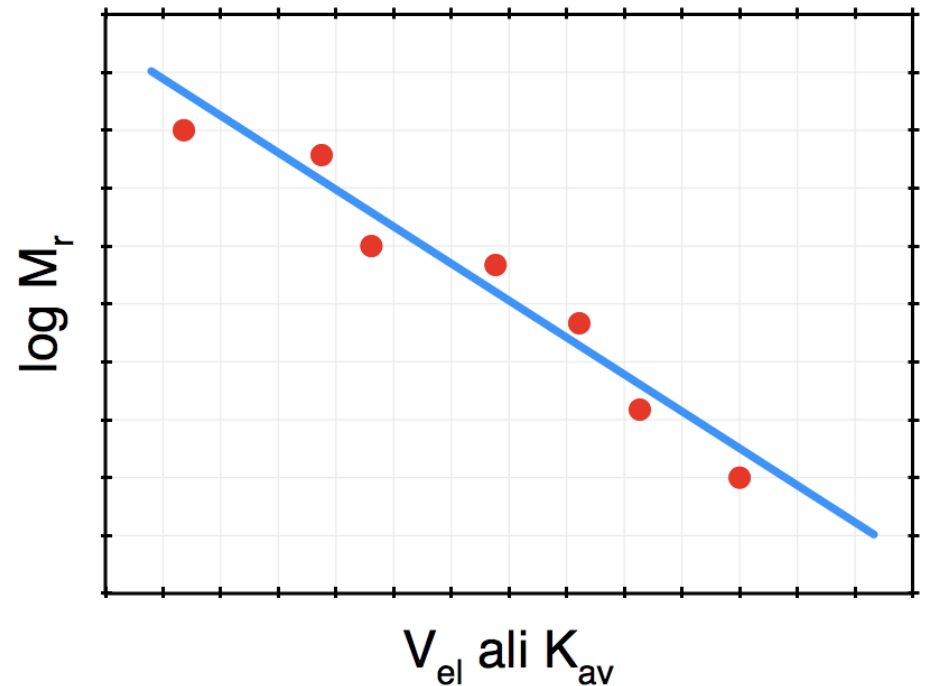
- ločevanje različno velikih makromolekul v preparativne namene
- **določevanje molekulske mase globularnih proteinov**
- razsoljevanje vzorcev

$$M_r \propto R_S$$

R_S = Stokesov radij

$$\log R_S \propto V_{el}$$

Umeritvena premica!



● globularni proteini z znano M_r

GF: Uporaba

- ločevanje različno velikih makromolekul v preparativne namene
- določevanje molekulske mase globularnih proteinov
- **razsoljevanje vzorcev, menjava pufra**

“ M_r ” (sol) \ll M_r (protein)

Gel z majhnimi porami:

- ioni soli vstopajo v pore \rightarrow počasno potovanje \rightarrow velik V_{el}
- proteinske molekule ne morejo vstopiti v pore \rightarrow majhen V_{el}

$V_{el}(\text{protein}) < V_{el}(\text{sol})$  posebej lahko zberemo frakcije, ki vsebujejo samo protein

Uporabimo seveda mobilno fazo, ki vsebuje malo soli (razsoljevanje) ali pa drug pufer (zamenjava pufra).

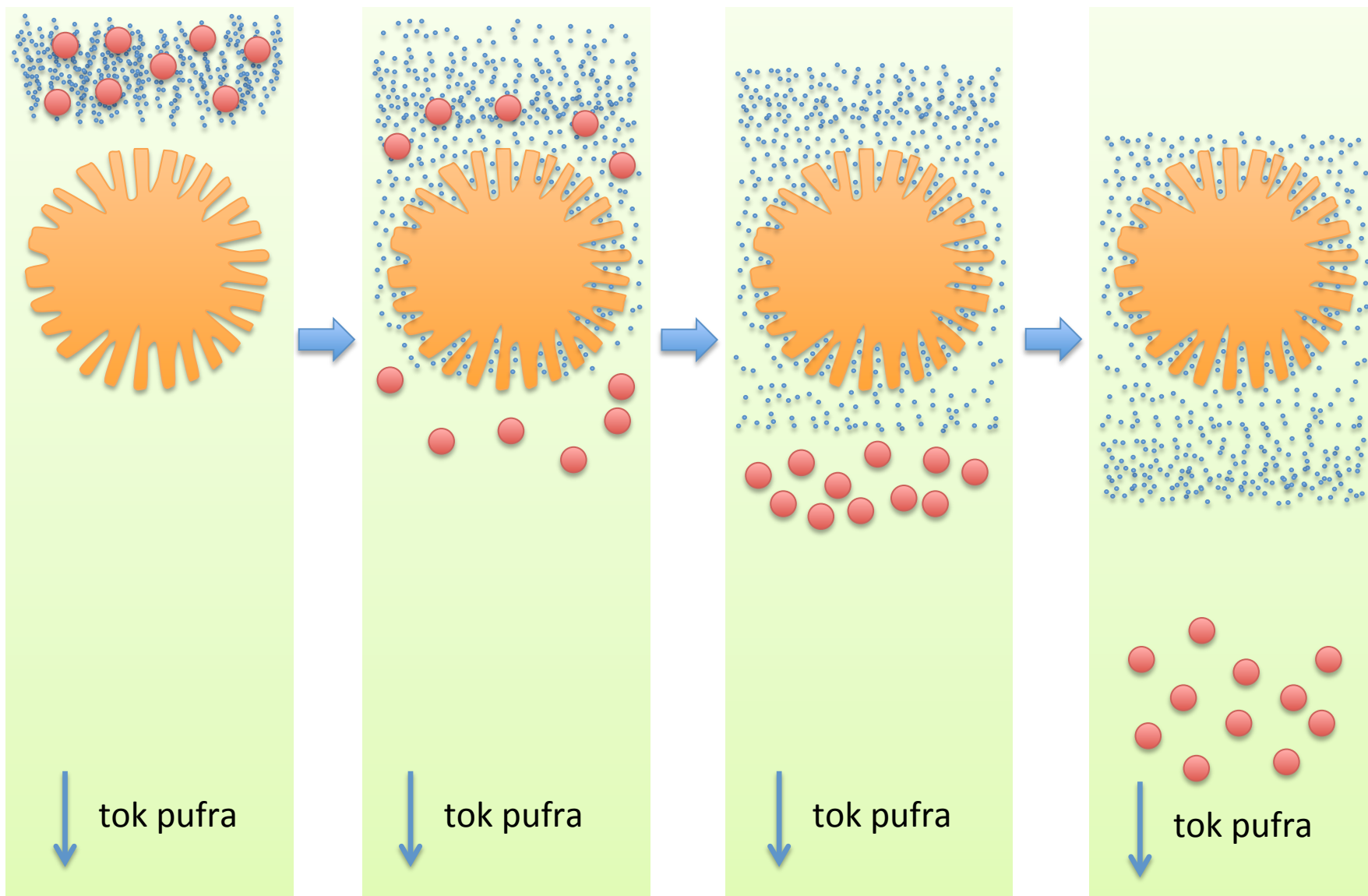
GF: Razsoljevanje



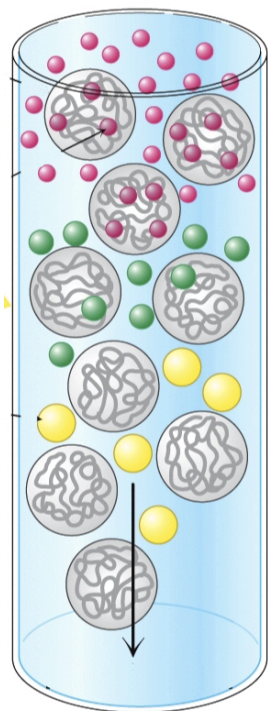
sol



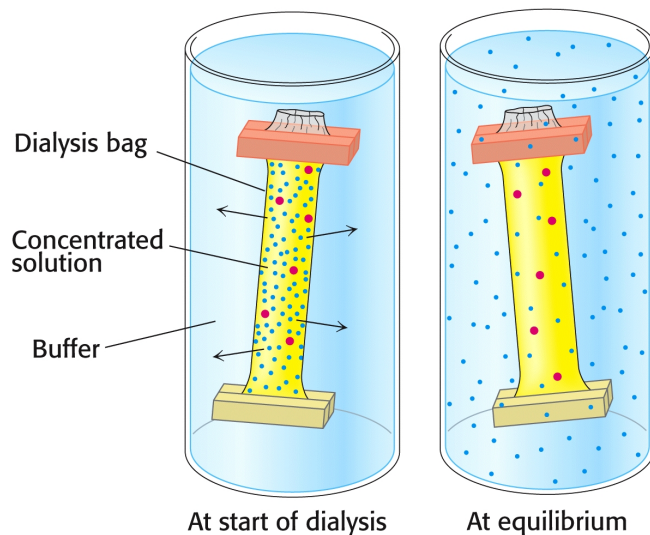
protein



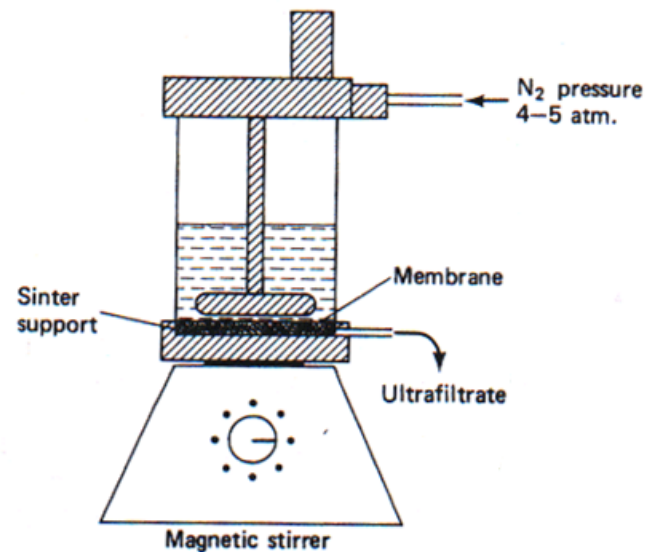
Razsoljevanje / menjava pufra (povzetek)



gelska filtracija



dializa

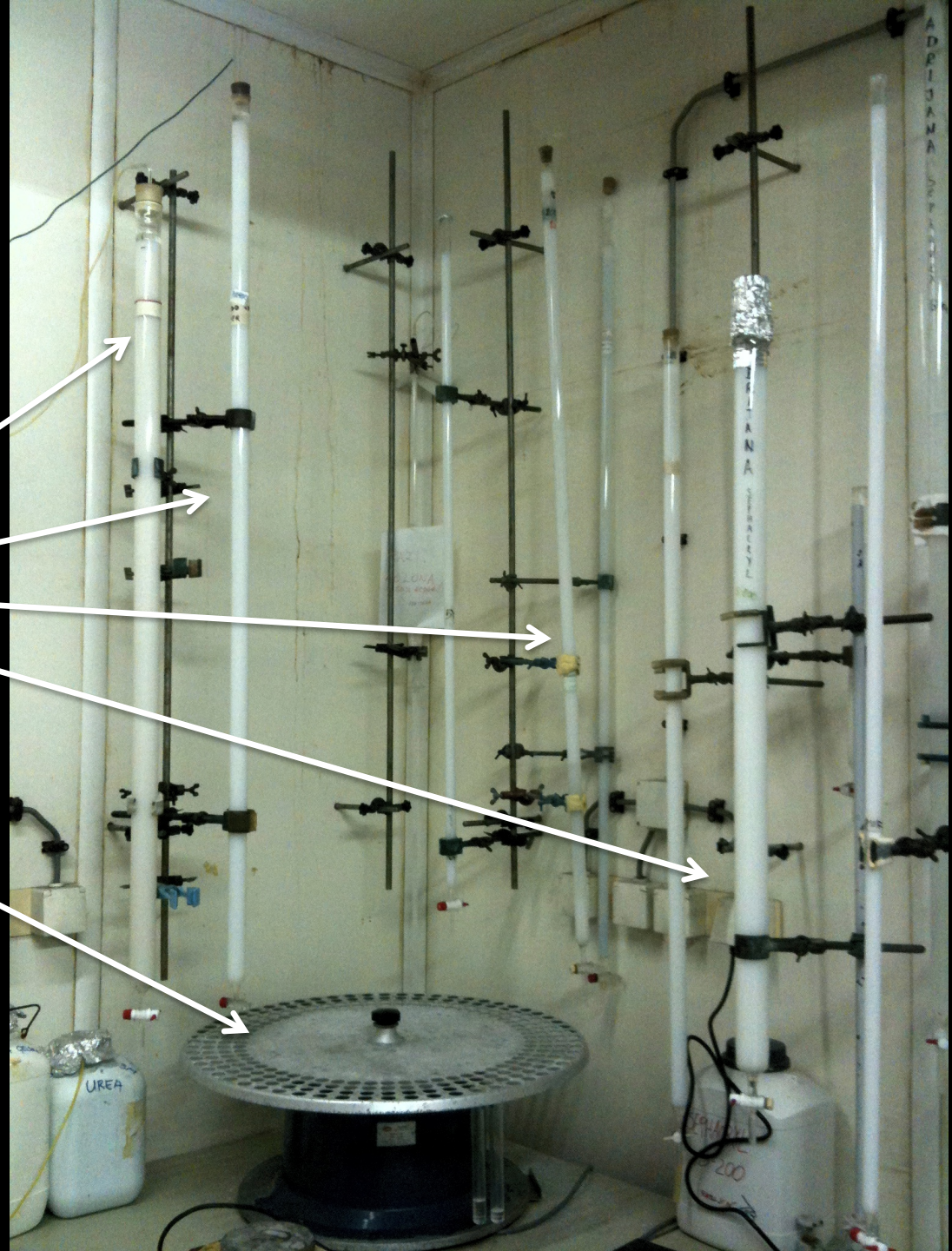


ultrafiltracija
(koncentriranje & razredčenje)

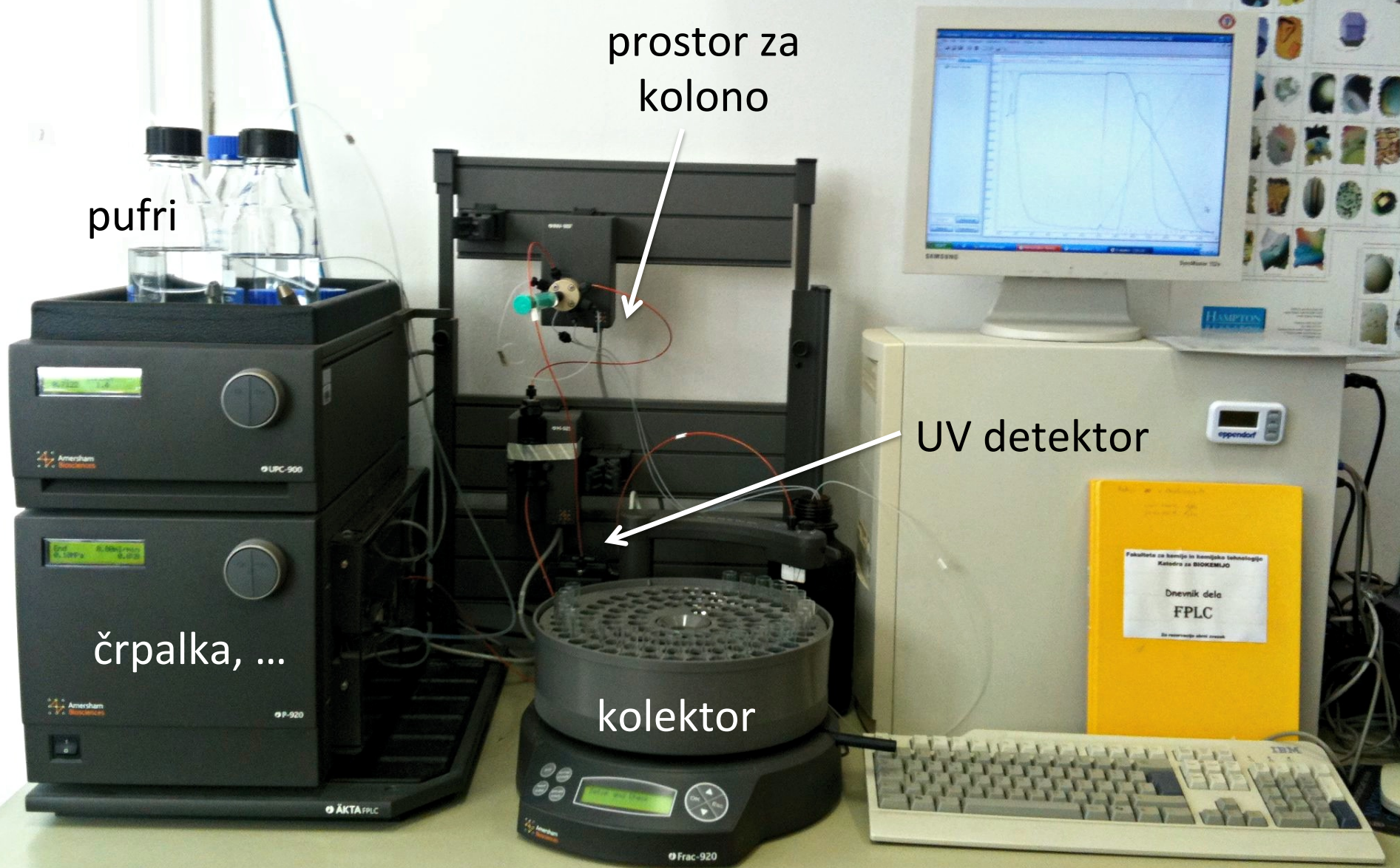
GF v praksi - včasih

kolone za
gelsko
filtracijo

kolektor z epruветami



GF v praksi - danes

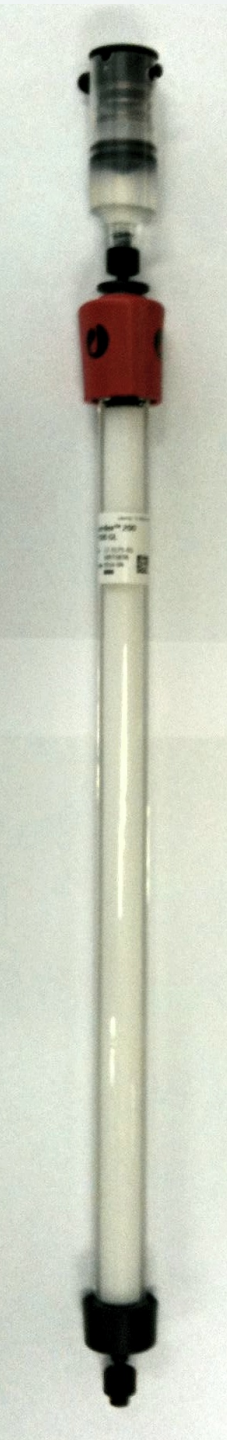






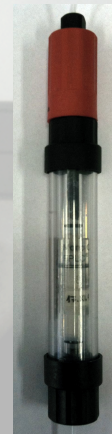
gelska filtracija

Superdex G200



**ionsko-
izmenjevalna
kromatografija**

MonoQ



**afinitetna
kromatografija**

HiTRAP IMAC

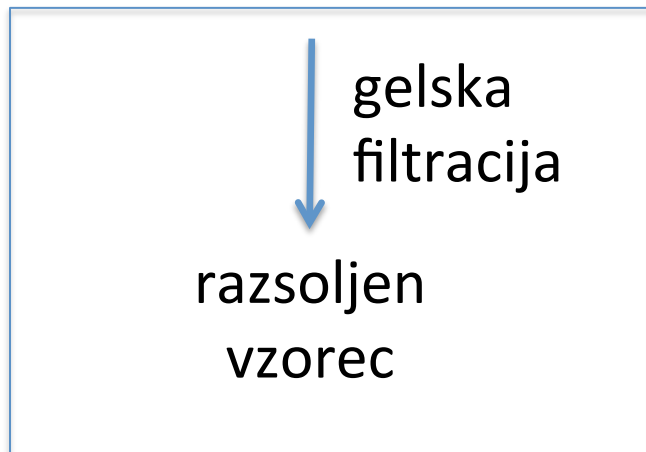


3. vaja - Razsoljevanje proteinov z gelsko izključitveno kromatografijo

oborjeni proteini
(40% amonijev sulfat)

↓ + 0,1 M NaCl

raztopina
proteinov in soli



- merjenje A_{280} → kromatogram
- detekcija NH_4^+ ionov (Nesslerjev reagent)

