



2004

# Классификация ХГ методов разделения.

## I. По принципу разделения.

### Вид ХГ

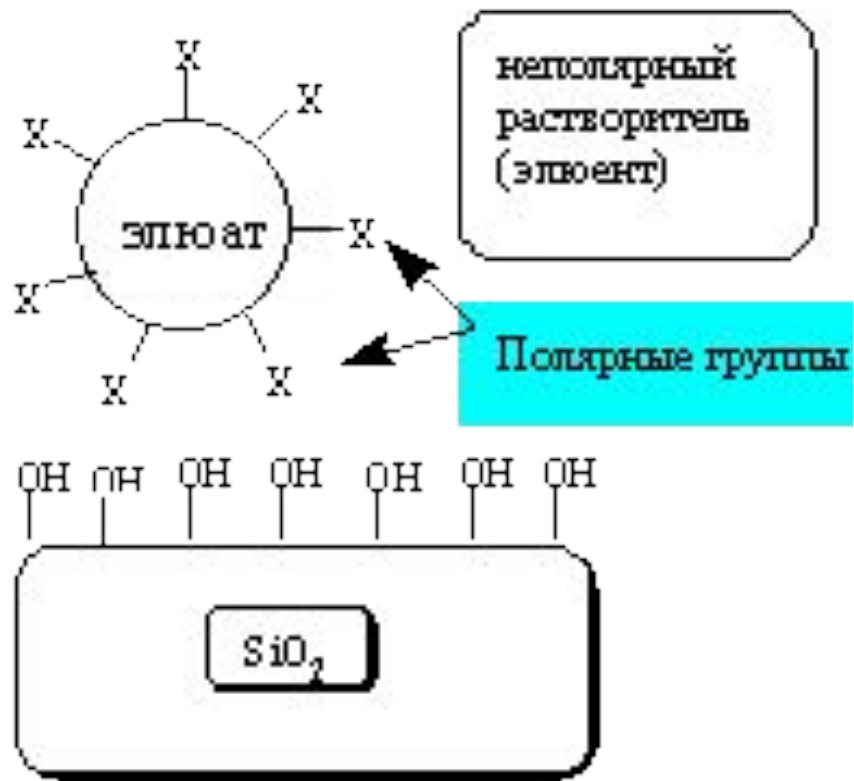
1. Адсорбционная
2. Распределительная

### Принцип разделения

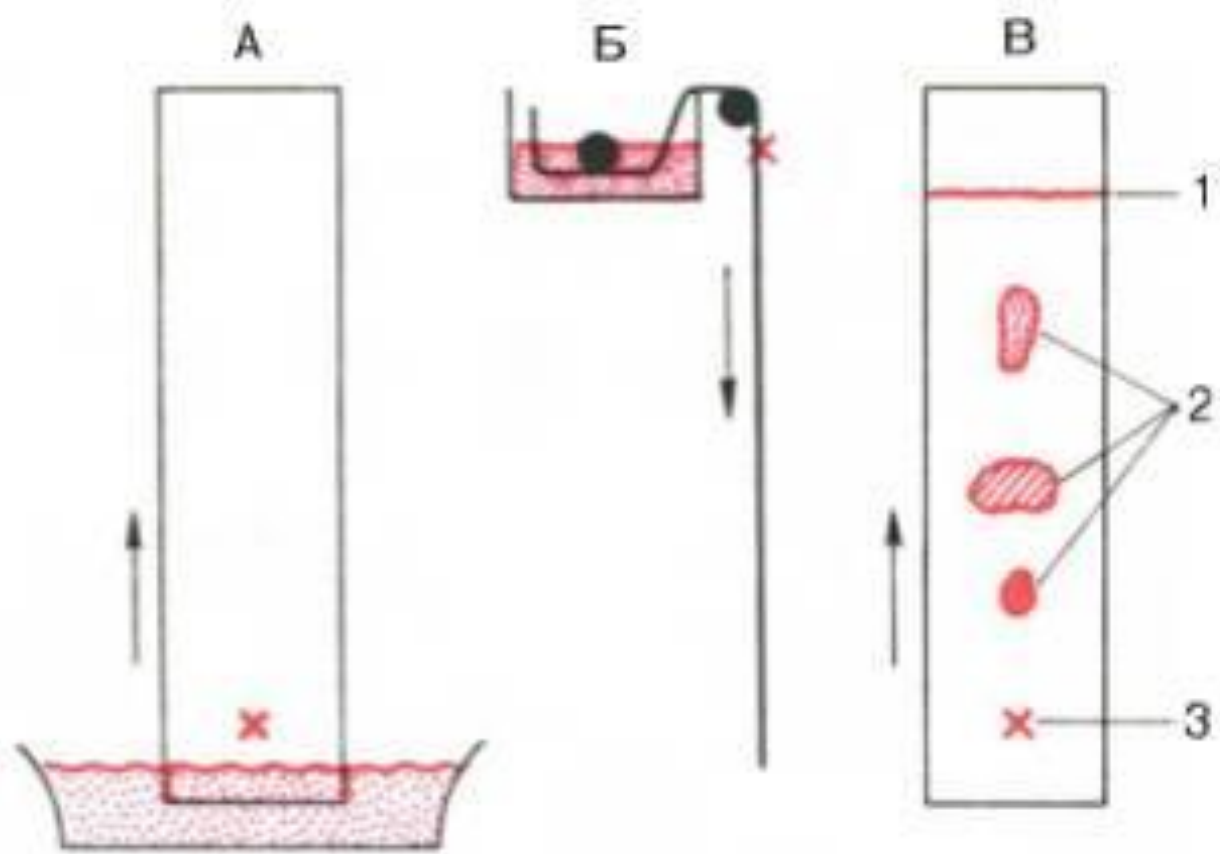
Физическая сорбция веществ.  
Разделение веществ между двумя жидкими несмешивающимися фазами.

$$K_p = \frac{C_n}{C_n}$$

# Адсорбционная хроматография







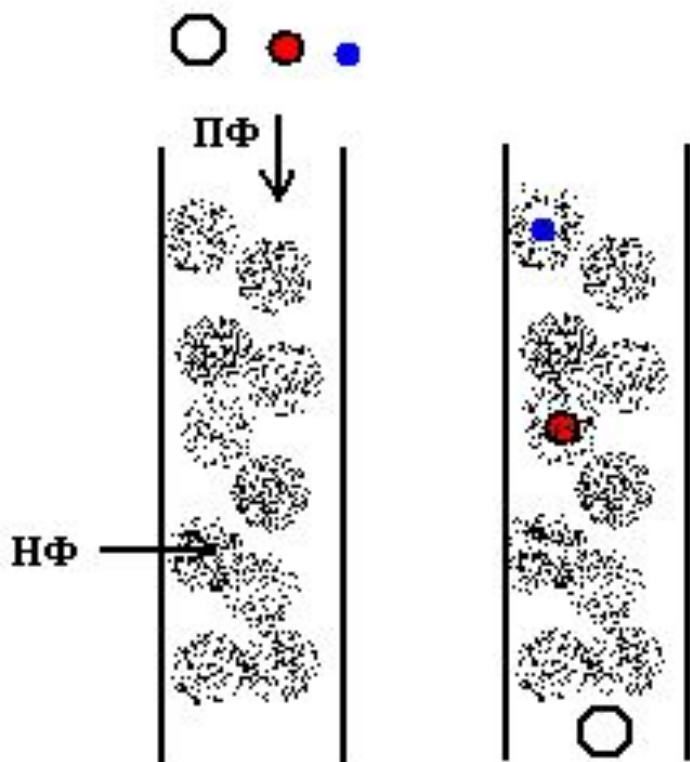
## Распределительная хроматография:

(по относительной полярности)

- **Нормально-фазовая** – неподвижная фаза более полярна, чем подвижная (хлороформ: метанол)

- **Обращенно-фазовая** – неподвижная фаза менее полярна, чем подвижная (метанол: вода)

### 3. Гель-проникающая (эксклюзионная, молекулярно-ситовая)



Неодинаковая доступность внутреннего растворителя в пористой структуре для молекул разделяемых веществ.

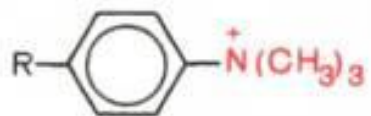
#### 4. Ионообменная

Ионные взаимодействия  
между растворенными  
веществами и носителем.

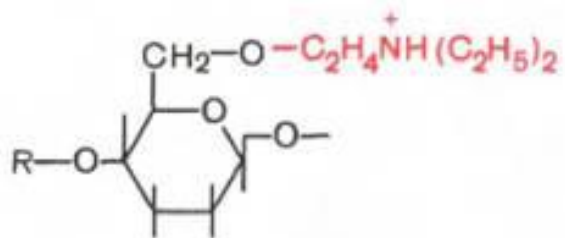
#### 5. Аффинная (affinity, по сродству)

Избирательное  
взаимодействие со  
специфическими  
лигандами,  
закрепленными на  
носителе.

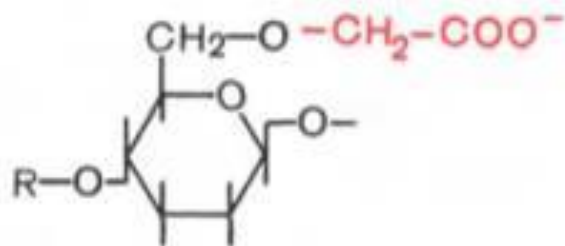
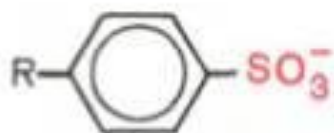


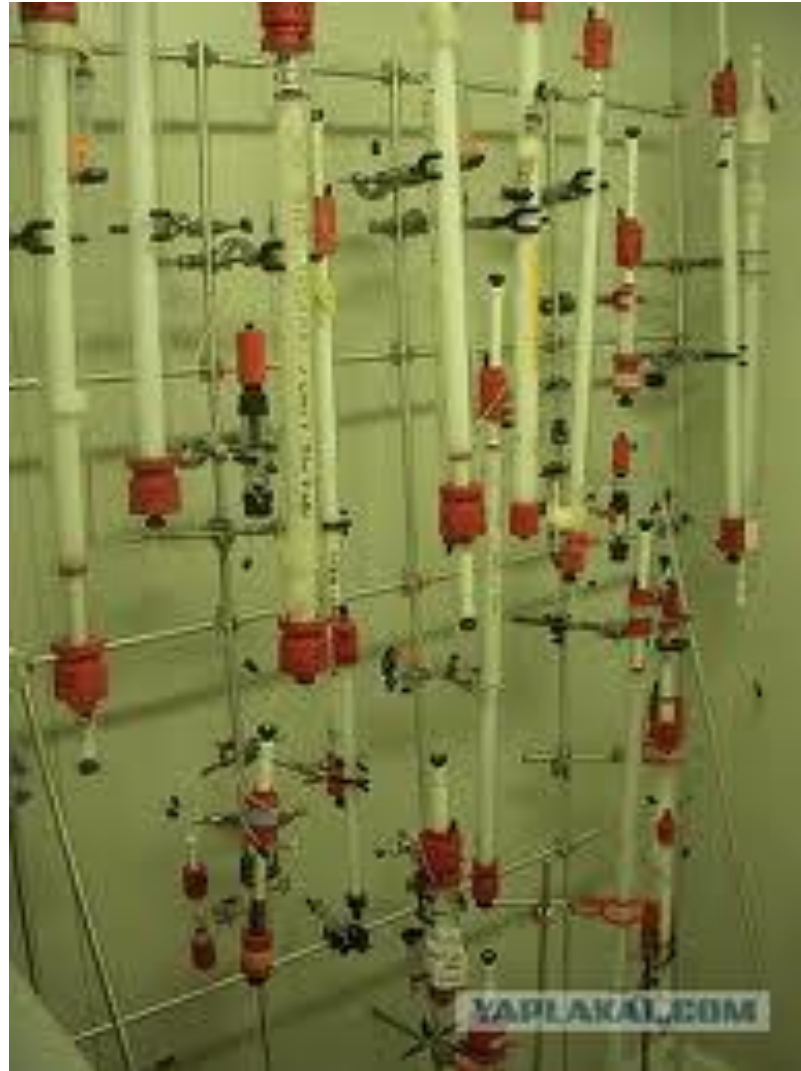


Триметиламинополистирол



Диэтиламиноэтилцеллюлоза  
(ДЭАЭ-целлюлоза)





6. ВЭЖХ = HPLC

(high performance liquid chromatography)

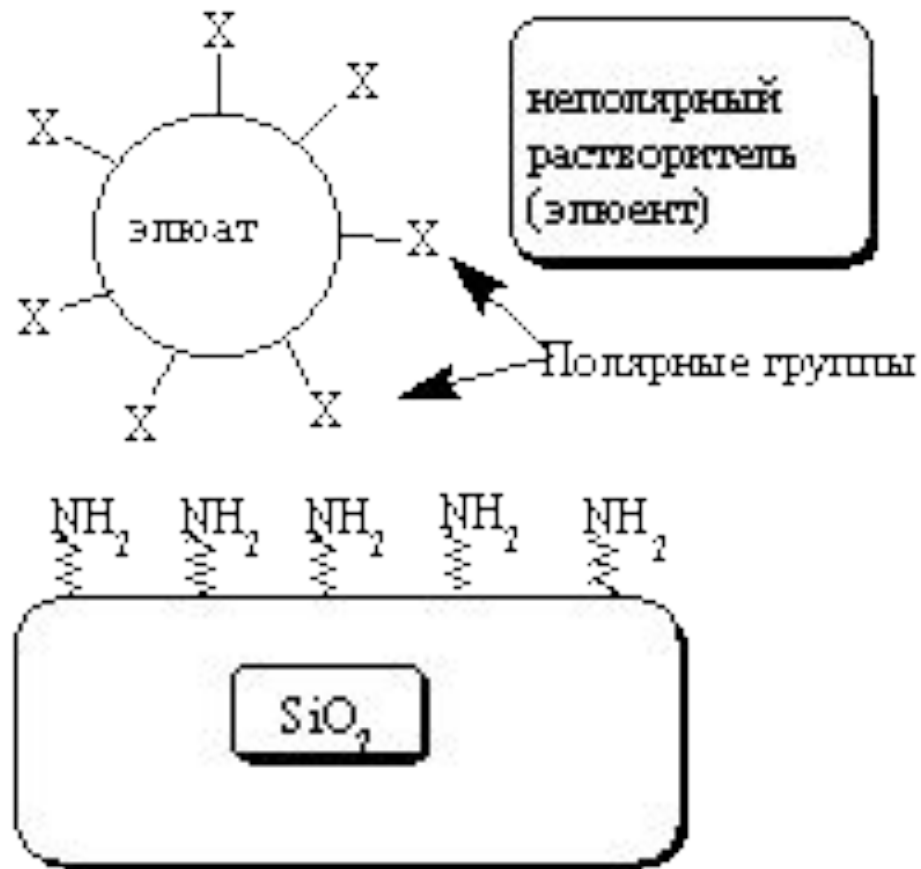
Другие виды ХГ.

# Колонки для ВЭЖХ

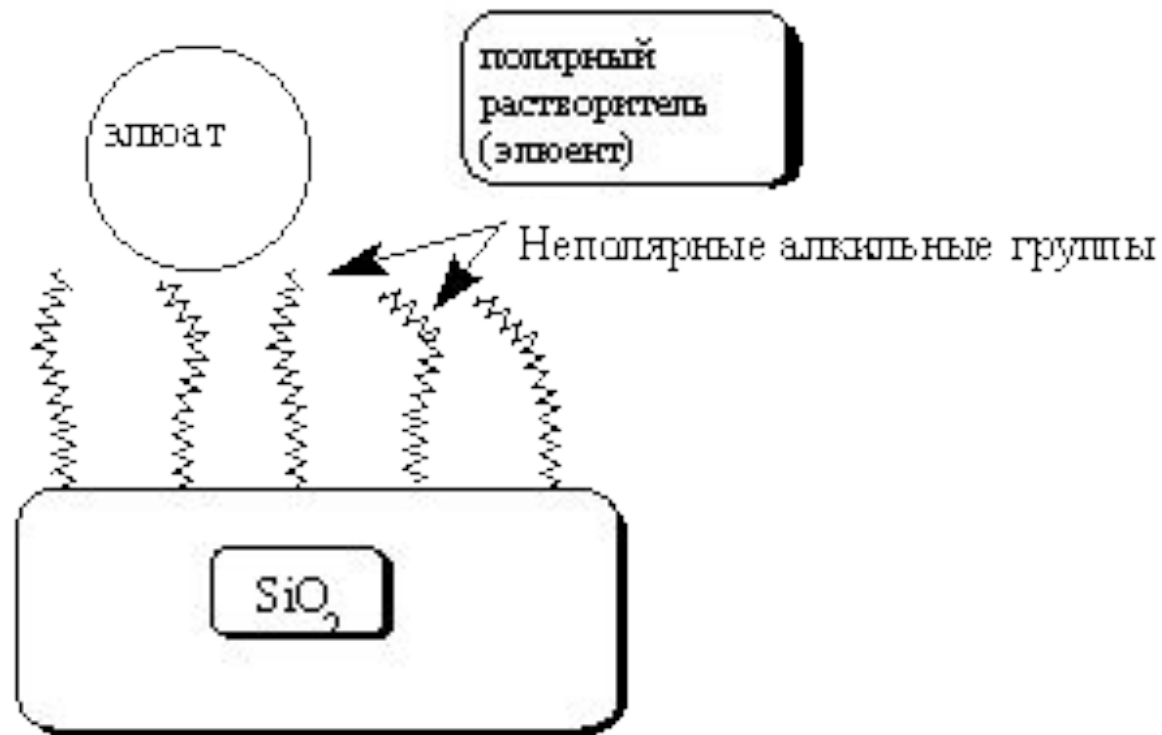




# Нормально-фазовая хроматография



# Обращенно-фазовая хроматография



# Хроматограф ВЭЖХ





Колонка: RSpak D18-613, 6x150 мм

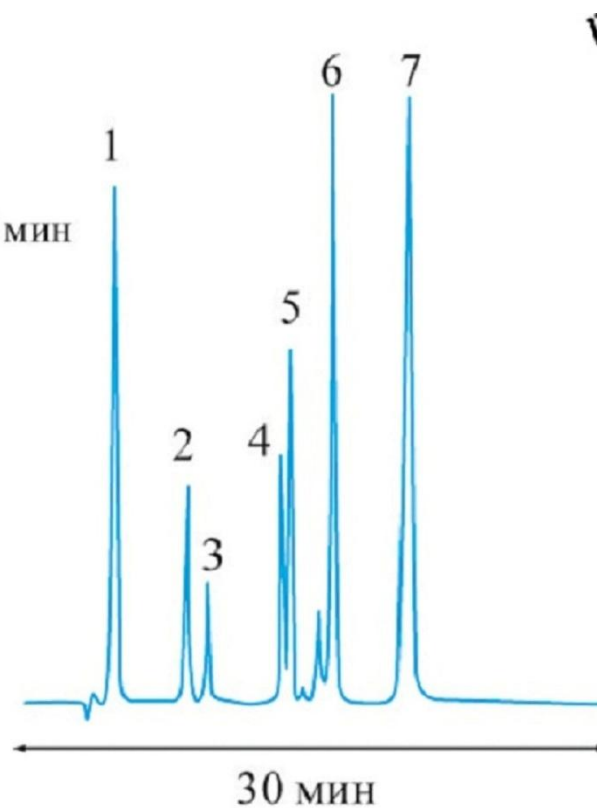
Состав элюента: А: 0,05% TFA: CH<sub>3</sub>CN (80:20)  
В: 0,05% TFA: CH<sub>3</sub>CN (30:70)  
линейный градиент от А до В за 30 мин

Скорость потока: 1мл/мин

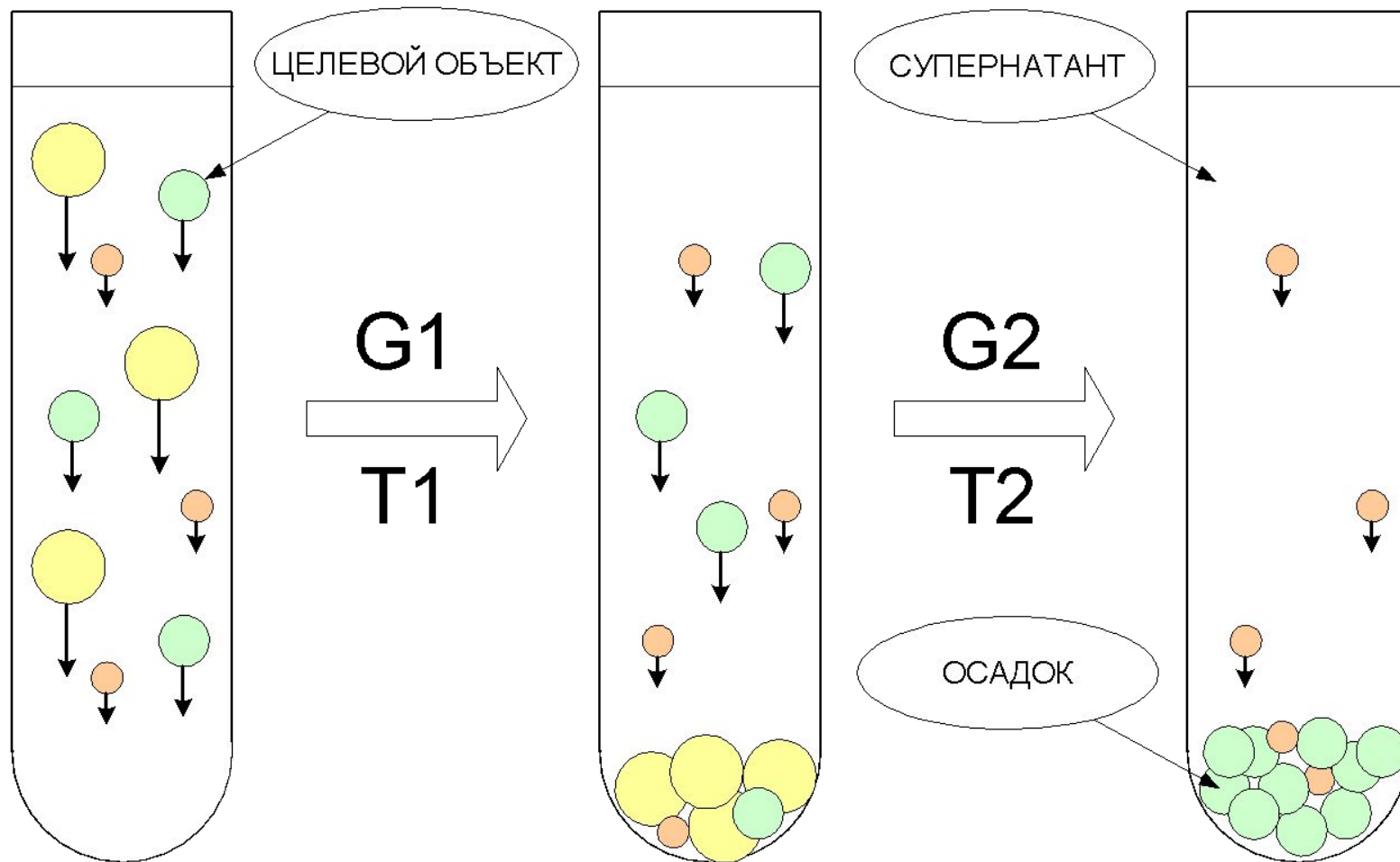
Длина волны: 220 нм

Состав образца:

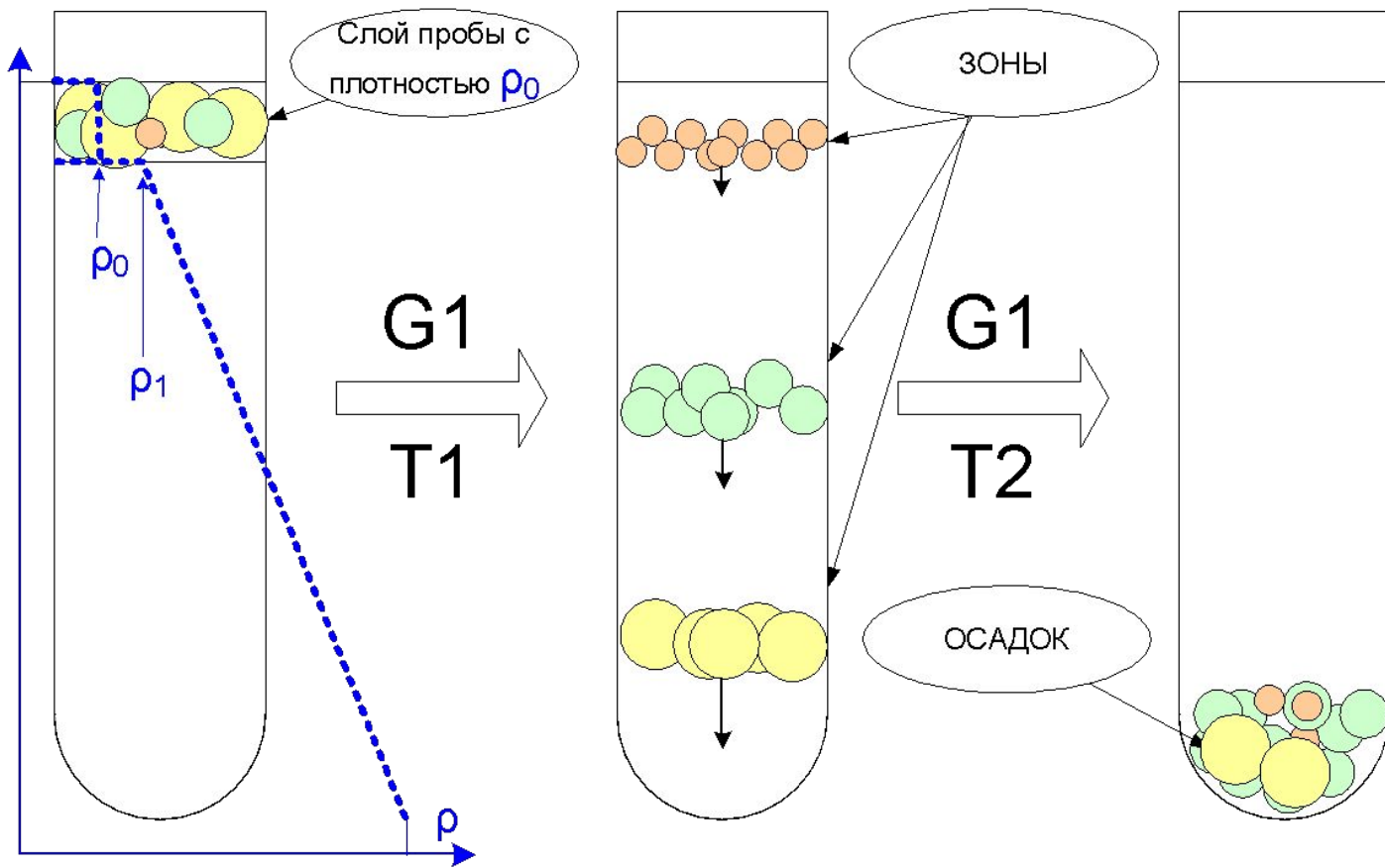
1. Брадикинин
2. Нейротензин
3. Субстанция Р
4. Инсулин
5. Инсулиновая цепочка В
6. Лизозим
7. Миоглобин



# Дифференциальное центрифугирование



# Зонально-скоростное центрифугирование



В пробирке заранее создается градиент плотности  $\rho$  (например раствором сахарозы)

Плотность увеличивается ко дну пробирки .  $\rho_0 < \rho_1$

# Бакет ротор



$$G = \pi^2 \times N^2 \times R / 900$$

**G** – *ЦЕНТРОБЕЖНОЕ  
УСКОРЕНИЕ*

**N** – *ЧИСЛО ОБОРОТОВ*

**R** – *РАДИУС РОТОРА*



## Ультрацентрифугирование

$$s = \frac{V}{W^2 \cdot r}$$

**s** - константа седиментации;

**V** - скорость перемещения границы *растворитель-белок* (см/с);

**W** - угловая скорость ротора (рад/с);

**r** - радиус ротора (см).

**S** - единица измерения величины константы седиментации (Сведберг).



## Очистка белков

(Разделение белков из гетерогенной белковой смеси)

- I. Разделение на основе растворимости белков
  
- II. Разделение на основе формы, размера молекулы и Mr.
  - 1) Диализ
  - 2) Гель-фильтрация
  - 3) Ультрацентрифугирование
  - 4) SDS - ПААГ электрофорез



## Очистка белков

(Разделение белков из гетерогенной белковой смеси)

### III. Разделение на основе молекулярного заряда

- 1) Ион-обменная ХГ
- 2) Высоко-эффективная жидкостная ХГ (ВЭЖХ)  
(HPLC - High Performance Liquid Chromatography)
- 3) Электрофорез
  - а) гель-ЭФ
  - б) Изоэлектрическое фокусирование
  - в) Капиллярный ЭФ

### IV. Разделение с помощью специфического связывания

- 1) Аффинная хроматография
- 2) Осаждение антителами





## Очистка белка от низкомолекулярных примесей

Диализ

Кристаллизация

Обессоливание (*с помощью гель-фильтрации*)

Ультрафильтрация



## Оценка степени очистки белка

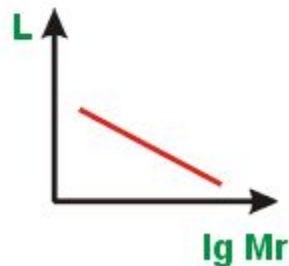
Способы определения молекулярной массы белка

1. Метод седиментационного анализа
2. Гель-фильтрация



$$K = \frac{V_e - V_0}{V_s}$$

3. Электрофорез в ПААГ с SDS



$L(\text{см})$  - длина пробега от линии старта

# **SDS–Polyacrylamide Gel Electrophoresis**



2004