



2004

Классификация ХГ методов разделения.

I. По принципу разделения.

Вид ХГ

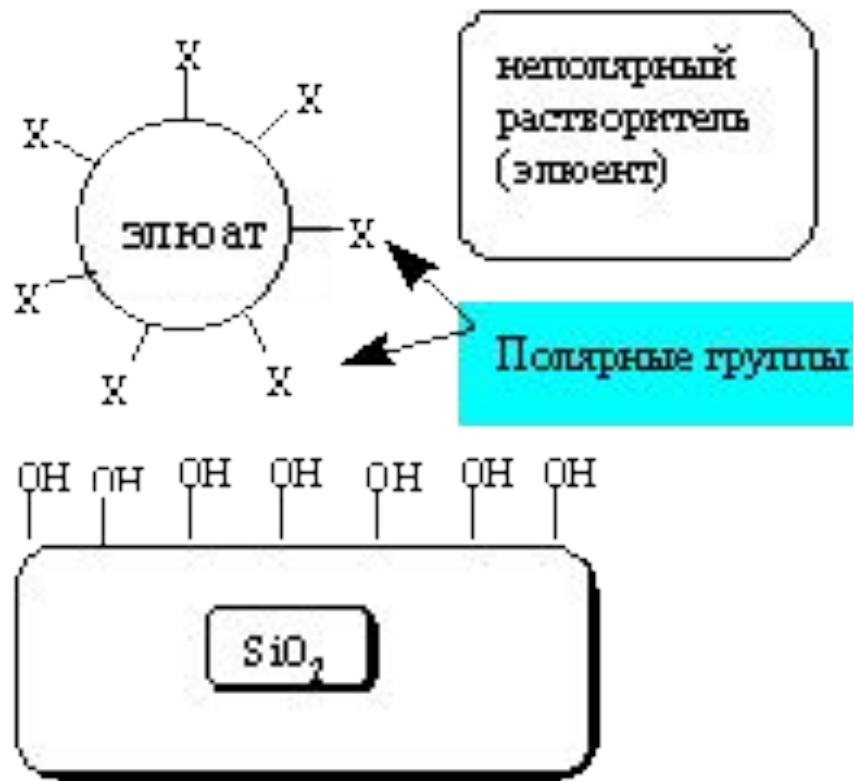
1. Адсорбционная
2. Распределительная

Принцип разделения

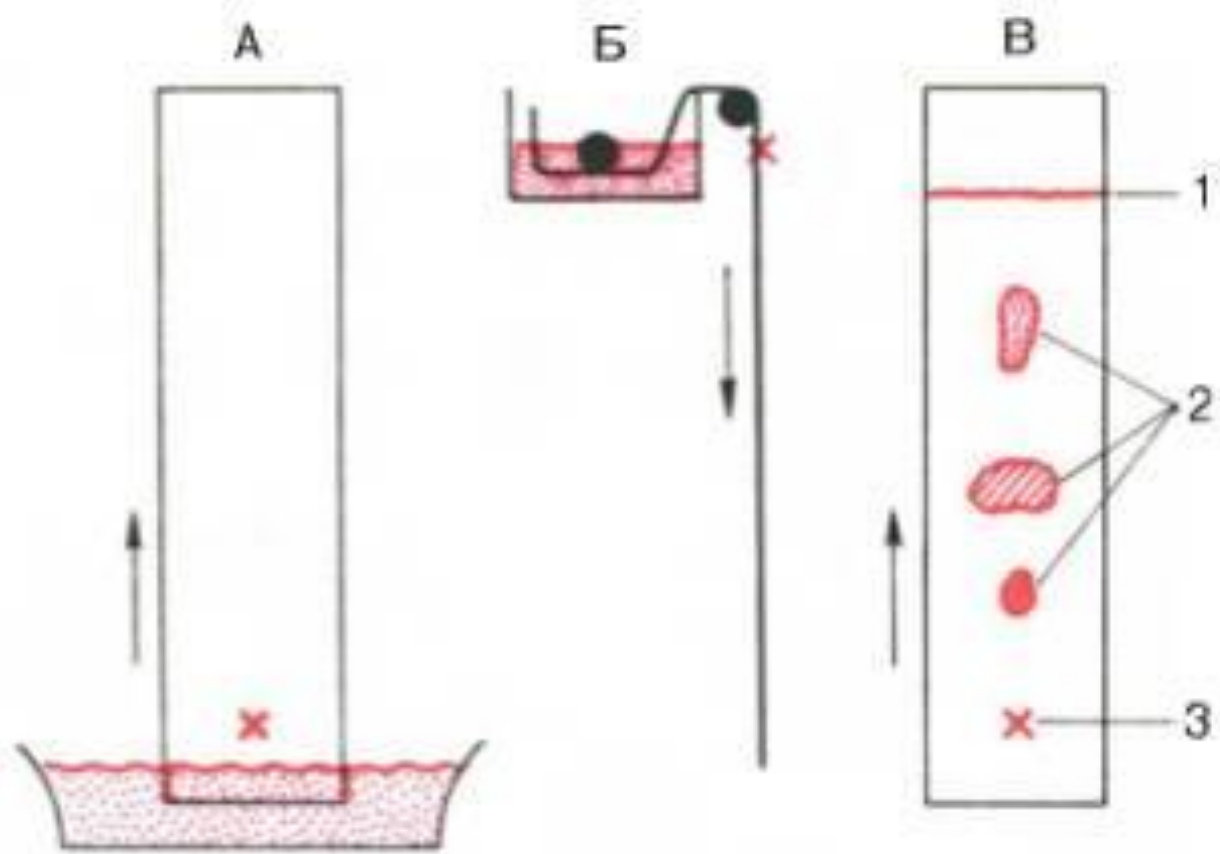
Физическая сорбция веществ.
Разделение веществ между двумя жидкими несмешивающимися фазами.

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

Адсорбционная хроматография







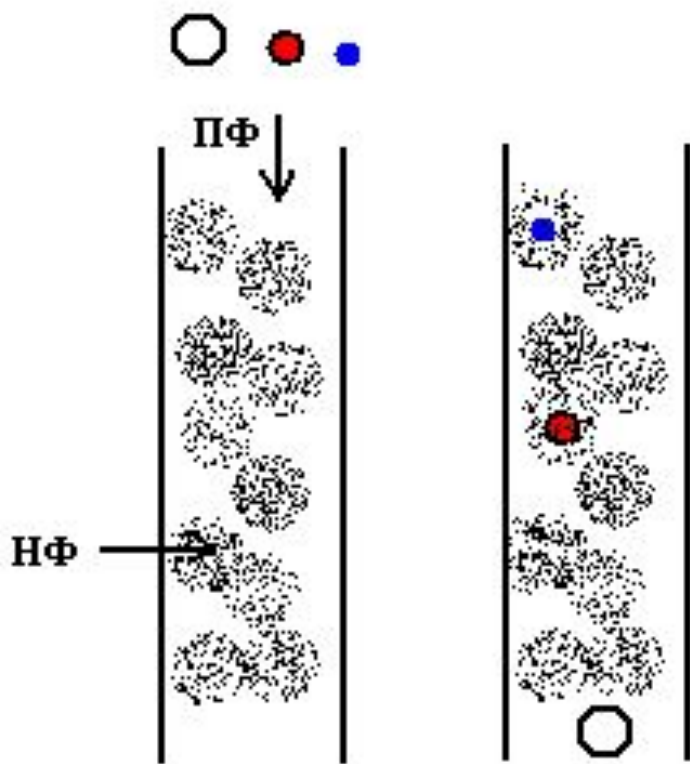
Распределительная хроматография:

(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)



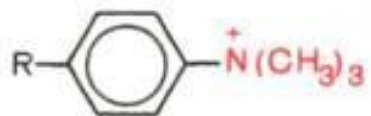
Неодинаковая доступность внутреннего растворителя в пористой структуре для молекул разделяемых веществ.

4. Ионообменная

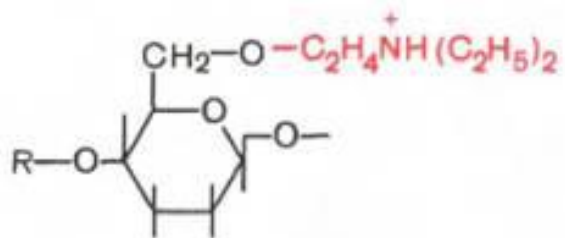
Ионные взаимодействия
между растворенными
веществами и носителем.

5. Аффинная (affinity, по сродству)

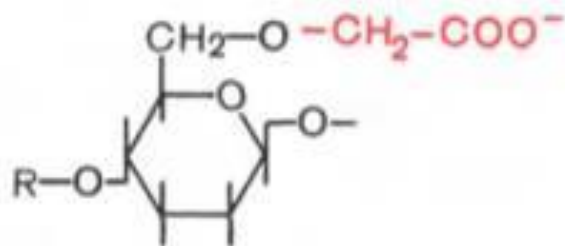
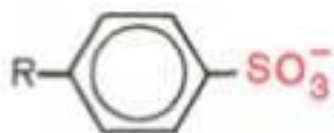
Избирательное
взаимодействие со
специфическими
лигандами,
закрепленными на
носителе.

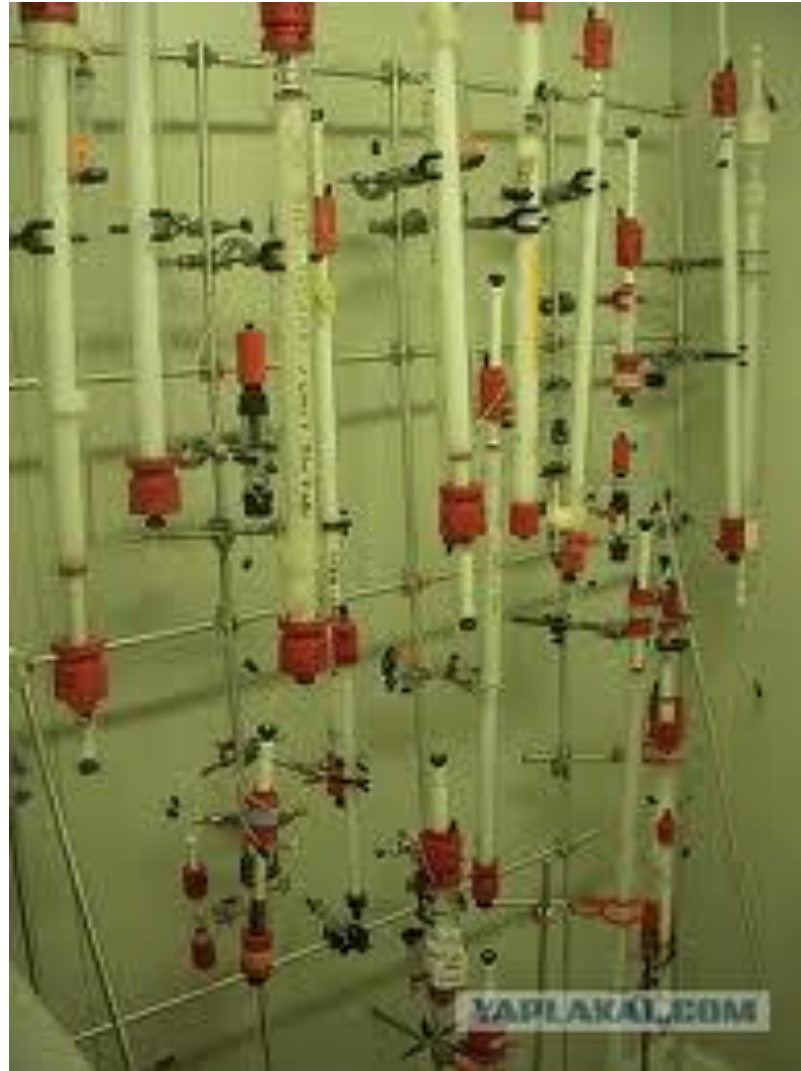


Триметиламинополистирол



Диэтиламиноэтилцеллюлоза
(ДЭАЭ-целлюлоза)





6. ВЭЖХ = HPLC

(high performance liquid chromatography)

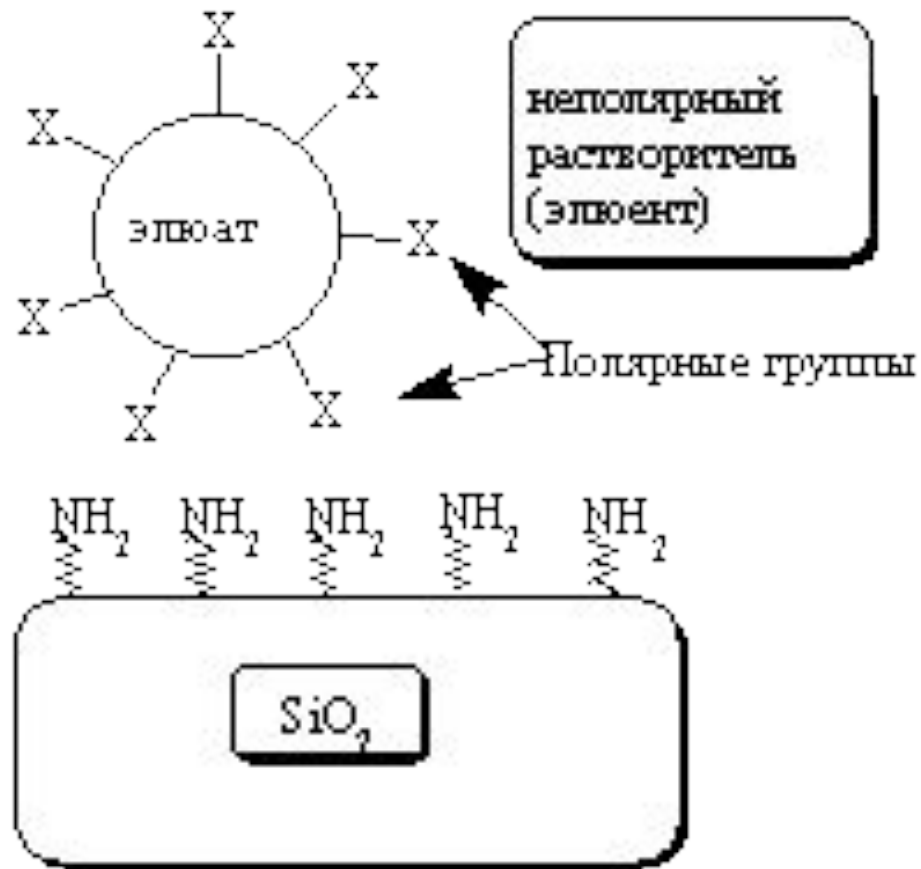
Другие виды ХГ.

Колонки для ВЭЖХ

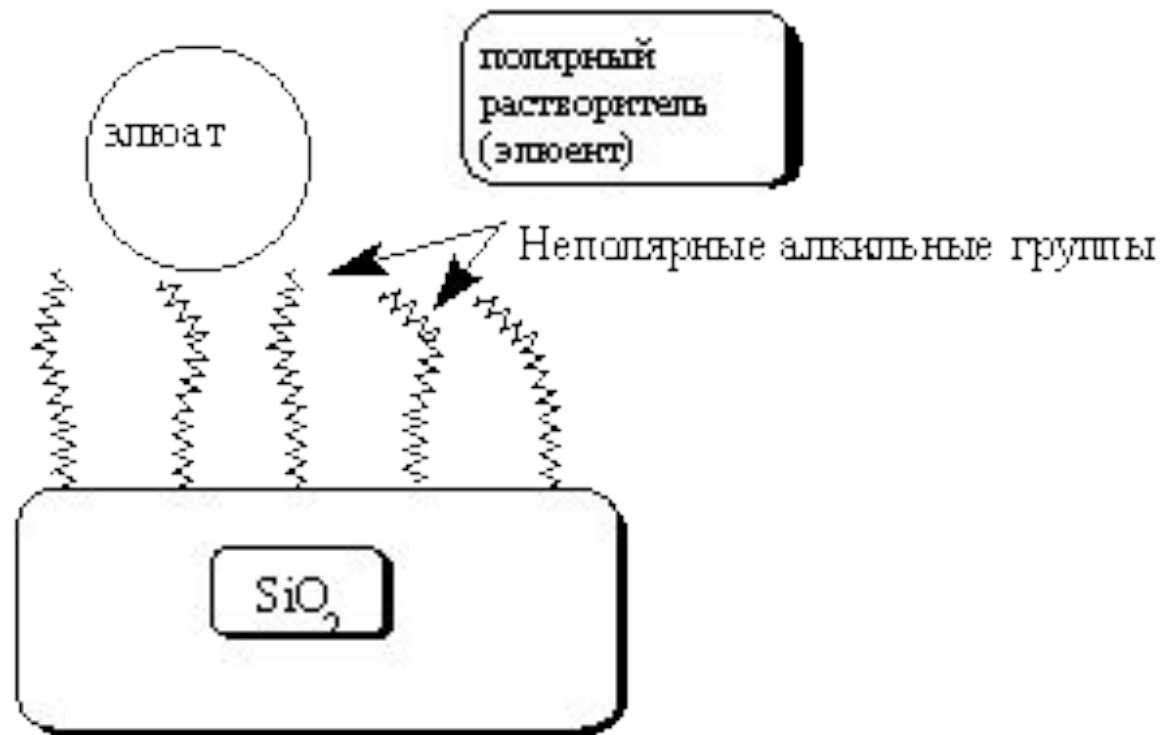




Нормально-фазовая хроматография



Обращенно-фазовая хроматография



Хроматограф ВЭЖХ



Колонка: RSpak D18-613, 6x150 мм

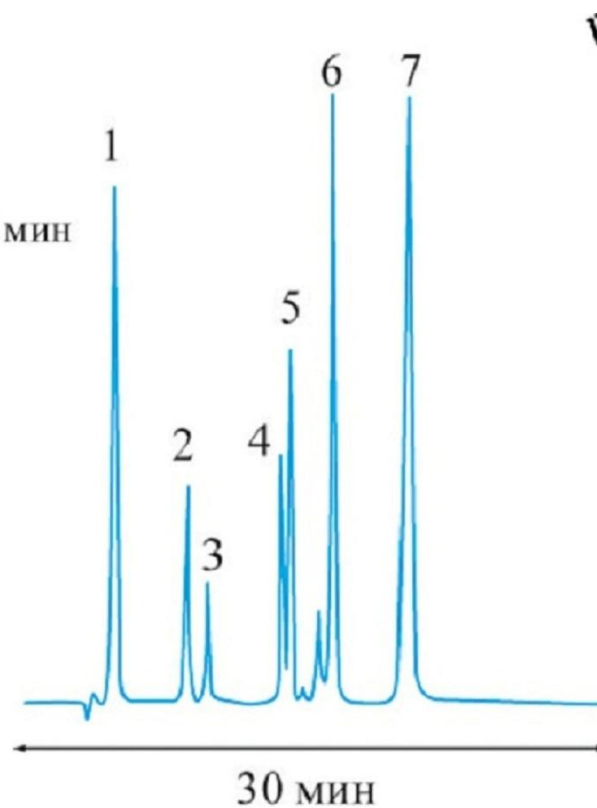
Состав элюента: А: 0,05% TFA: CH₃CN (80:20)
В: 0,05% TFA: CH₃CN (30:70)
линейный градиент от А до В за 30 мин

Скорость потока: 1мл/мин

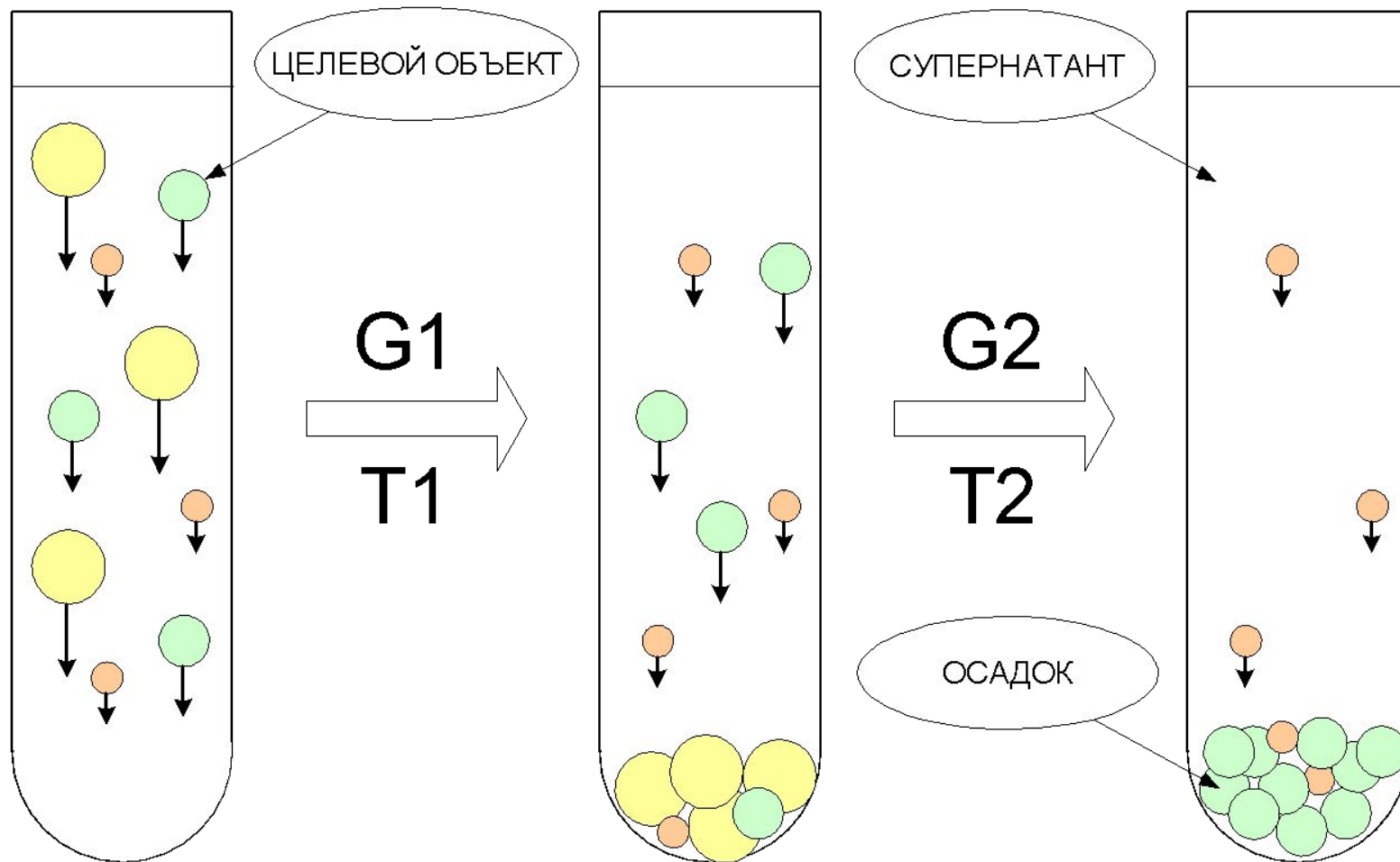
Длина волны: 220 нм

Состав образца:

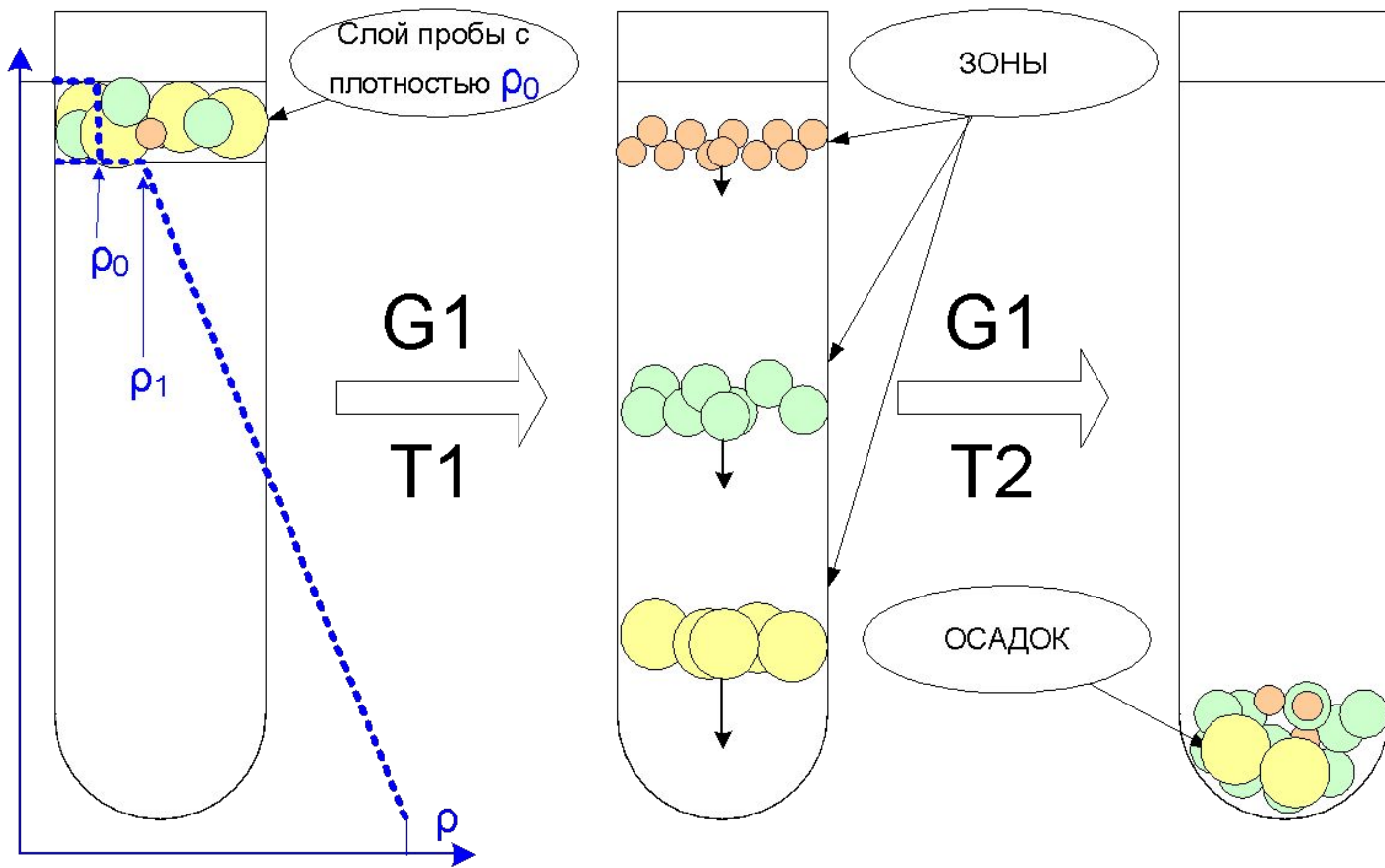
1. Брадикинин
2. Нейротензин
3. Субстанция Р
4. Инсулин
5. Инсулиновая цепочка В
6. Лизозим
7. Миоглобин



Дифференциальное центрифугирование



Зонально-скоростное центрифугирование



В пробирке заранее создается градиент плотности ρ (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*)

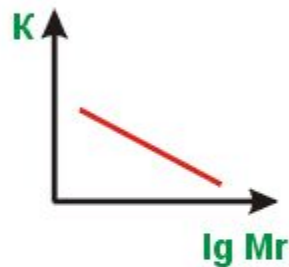
Ультрафильтрация



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