



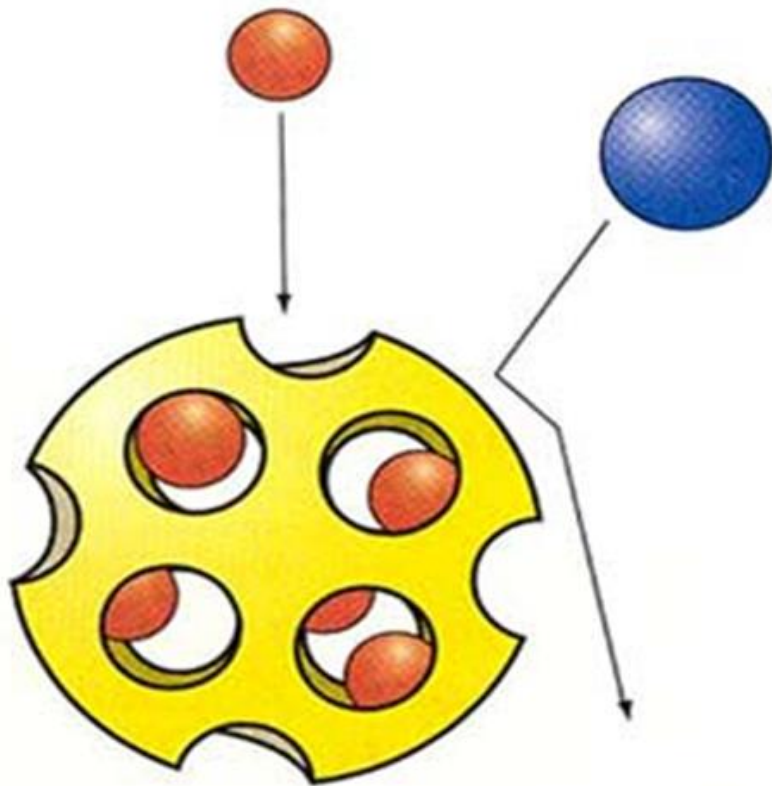
# ГЕЛ ХРОМАТОГРАФИЈА

# Поим за гел хроматографија

- **Синоними:**
  - Гел филтрирање
  - Хроматографија на молекулски сита
  - Гел-ексклузивна хроматографија
  - Гел-пермеабилна хроматографија
- **Разделување на молекулите според нивната големина и облик**
  - Молекули со маса од 100 до милиони далтони
  - Пречистување на: протеини, нуклеински киселини, ензими, полисахариди...

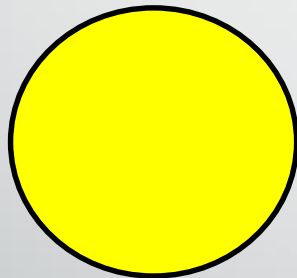
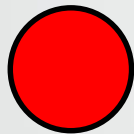
# Принципи на гел хроматографија

- Стационарната фаза е составена од инертни порозни честички со дефинирана големина.
- Внатрешноста на честичките е слична на сунѓер.
- Помалите молекули поминуваат повеќе време во порите за разлика од поголемите, поради што подоцна елуираат (потребно е поголемо количество на мобилна фаза).



Порозната честичка е претставена со жолто. Големите волуминозни молекули (сино) не може да навлезат во порите, па престојуваат во релативно мал волумен надвор од порите. Поради тоа, брзо се движат низ колоната. Помалите молекули (црвени) се соодветни на големината на порите и навлегуваат во нив, па имаат на располагање поголем волумен.

големина

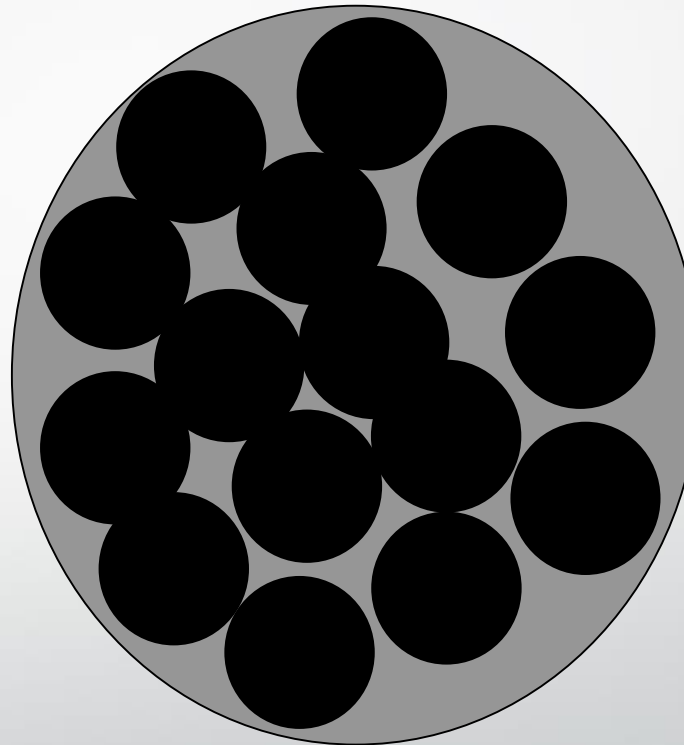


Молекулска маса  
(dalton)

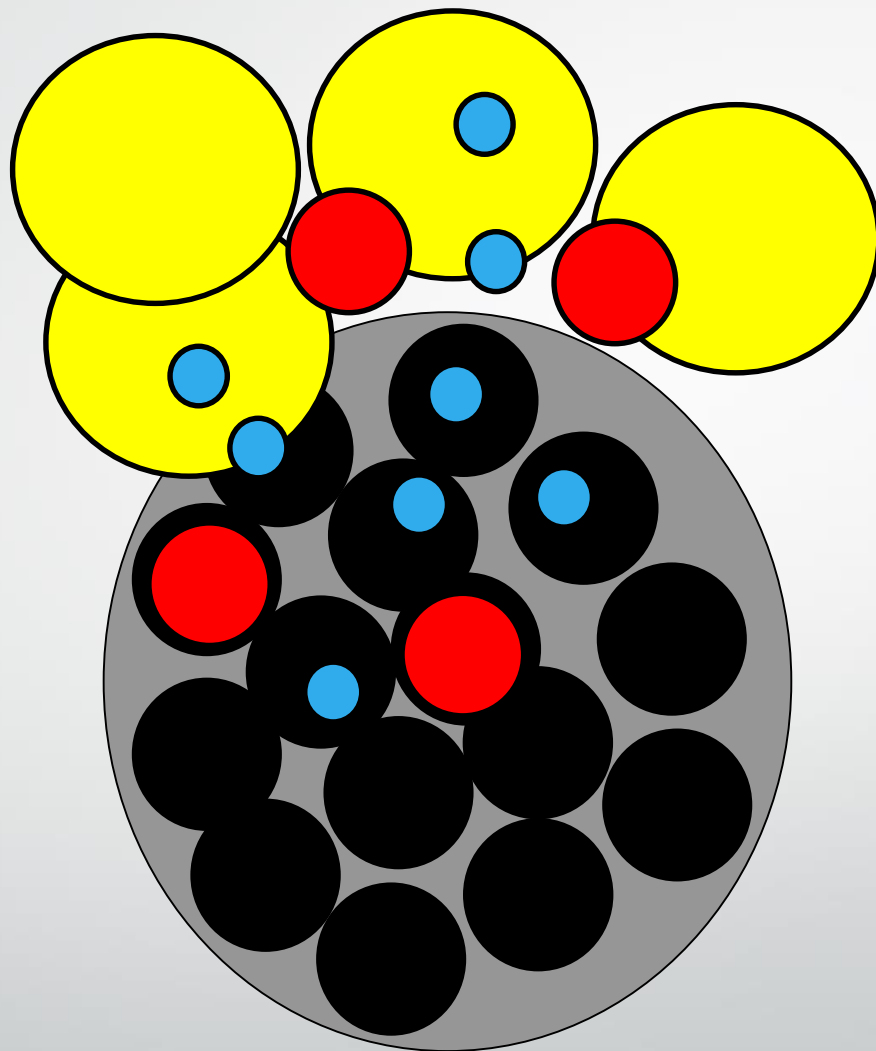
10,000

30,000

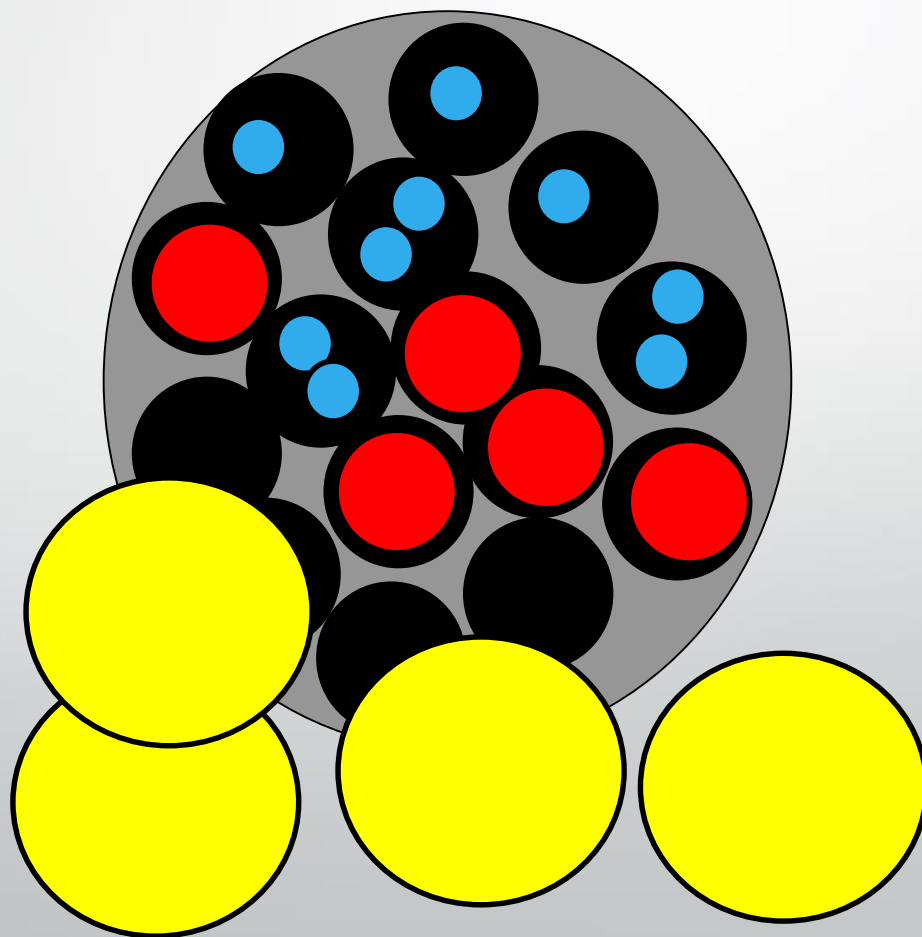
100,000



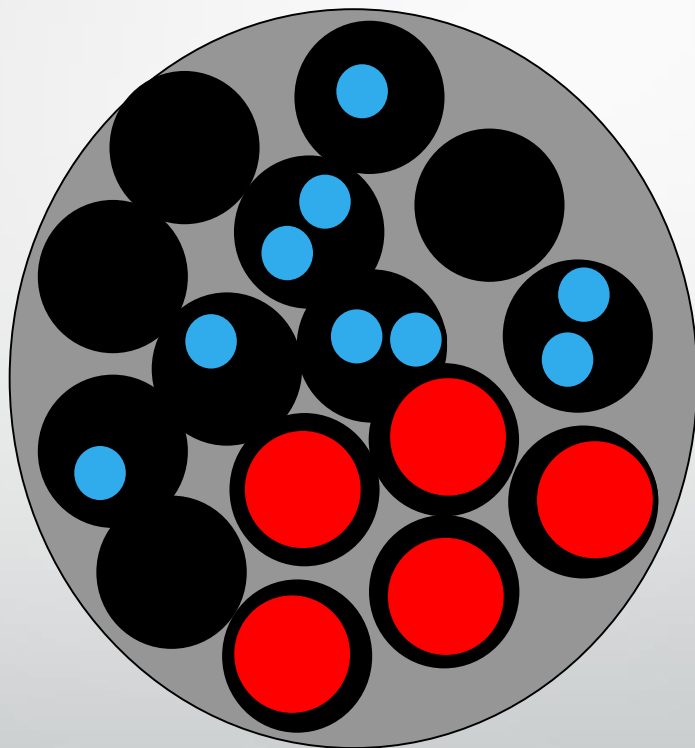
поток



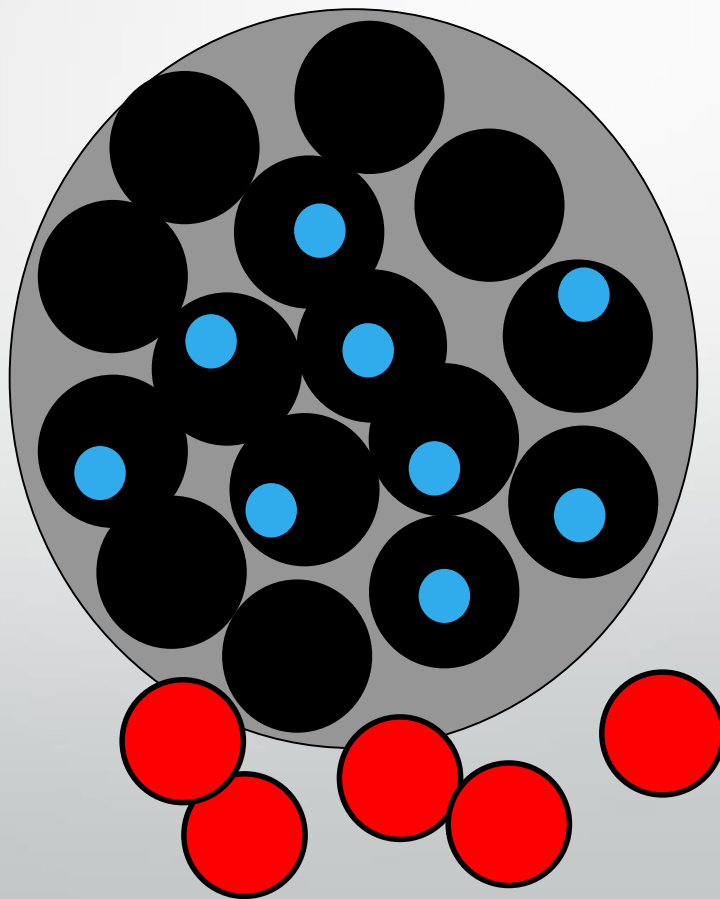
проток



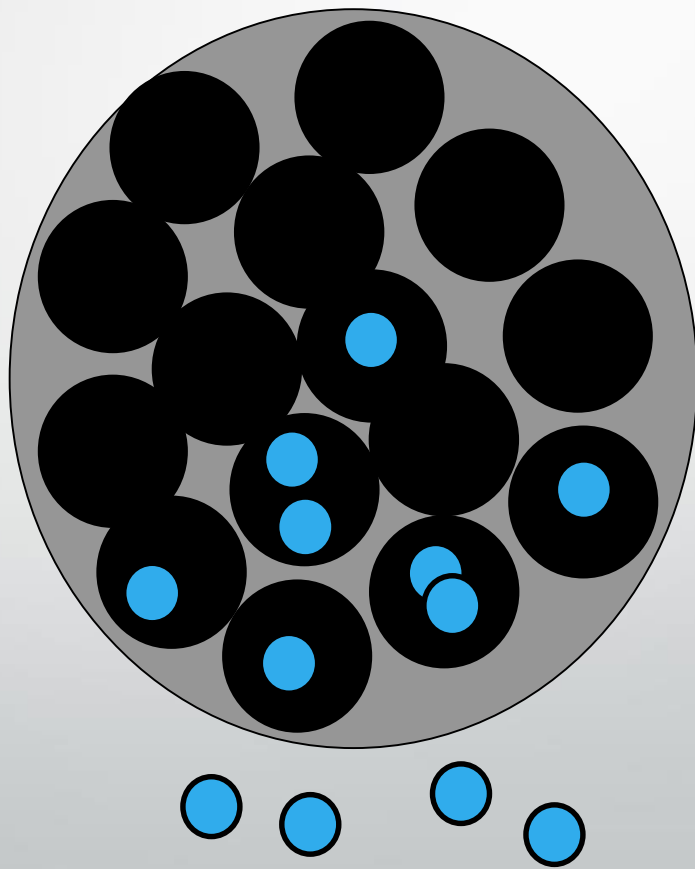
поток



поток



проток



# Стационарна фаза - гел

## 1. Облик и големина на честичките гел

- Сферен облик
  - Мрежна големина (mesh), пречник  $\mu\text{m}$

|                                     | Мрежна големина<br>(mesh) | пречник $\mu\text{m}$ |
|-------------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Одличен проток,<br>слаба резолуција | 50-100                    | 100-300               |
| Добар проток,<br>добра резолуција   | 100-200                   | 50-100                |
| Слаб проток, добра<br>резолуција    | 400                       | 10-40                 |

## 2. Интервал на фракционирање

- Линеарно разделување на протеините во граници на овој интервал, изразен со далтони
- Пр. Sephadex G-50, интервал на фракционирање 1500-30000 далтони

## 3. Граница на ексклузија

- Ја означува молекулската маса на најмалата молекула која не може да дифундира во внатрешниот волумен на матриксот.
- Пр. Граница на ексклузија за Sephadex G-50 изнесува 30000 далтони.

#### 4. Сврзана вода

- Волумен (или маса) на вода потребна за набабрување на 1 g сув дехидратиран гел
- Пр. За Sephadex G-50, вредноста за сврзана вода изнесува  $5,0 \pm 0,3$  g.

#### 5. Волумен на гел

- Производителот го дава податокот за конечниот волумен на стационарната фаза.
- Пр. Конечниот волумен што го завзема по набабрувањето 1 g сув гел Sephadex G-50 во 5 g вода изнесува 9-11 mL.

## 6. Мртов волумен

- Вкупниот волумен на пуфер кој ги опкружува честичките гел во колоната.
- Начин на определување:
  - Колоната се полни со боја син декстран со голема молекулска маса (2000000 далтони).
  - Се определува потребниот волумен за елуирање и целосно отстранување на супстанцата од гелот.

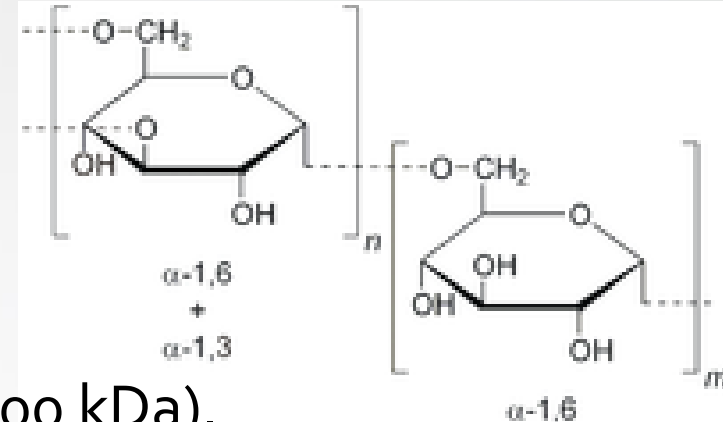
## 7. Волумен на елуирање

- Потребен волумен на пуфер за целосно елуирање на анализираната супстанца

# Хемиски својства на геловите

- Геловите кои имаат улога на молекулски сита претставуваат **вмрежени полимери**.
- Тие се:
  - инертни (не стапуваат во реакција со анализираните супстанции)
  - немаат полнеж
- Најчесто се користат три видови гел:
  - Декстран
  - Агароза
  - Полиакриламид

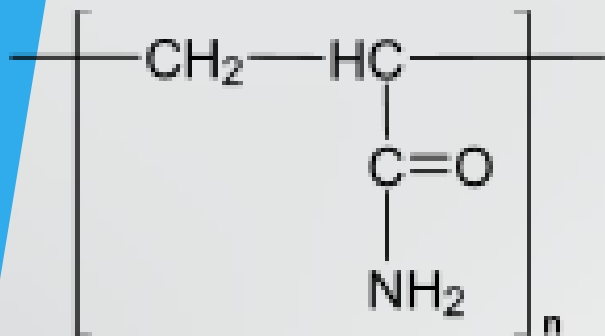
# Декстран



- Декстранот е разгранет хомополисахарид изграден од голем број на D-глюкопиранозни остатоци (3 to 2000 kDa).
- Долгата низа од  $\alpha$ -1,6 гликозидно сврзани глюкозни молекули, најчесто има  $\alpha$ -1,3 разгранувања.
- Декстранот се синтетизира од сахароза под дејство на некои видови млечно-киселински бактерии, од кои најпознати се *Leuconostoc mesenteroides* and *Streptococcus mutans*.
- Се употребува во медицината како анти тромботик, за намалување на вискозноста на крвта, како плазма експандер при анемија.
- Декстранот за прв пат бил откриен од Луј Пастер, како микробен продукт во виното.
- Забните наслаги се богати со декстриани.
- Тривијалното име потекнува од производителеот **Sephadex**.

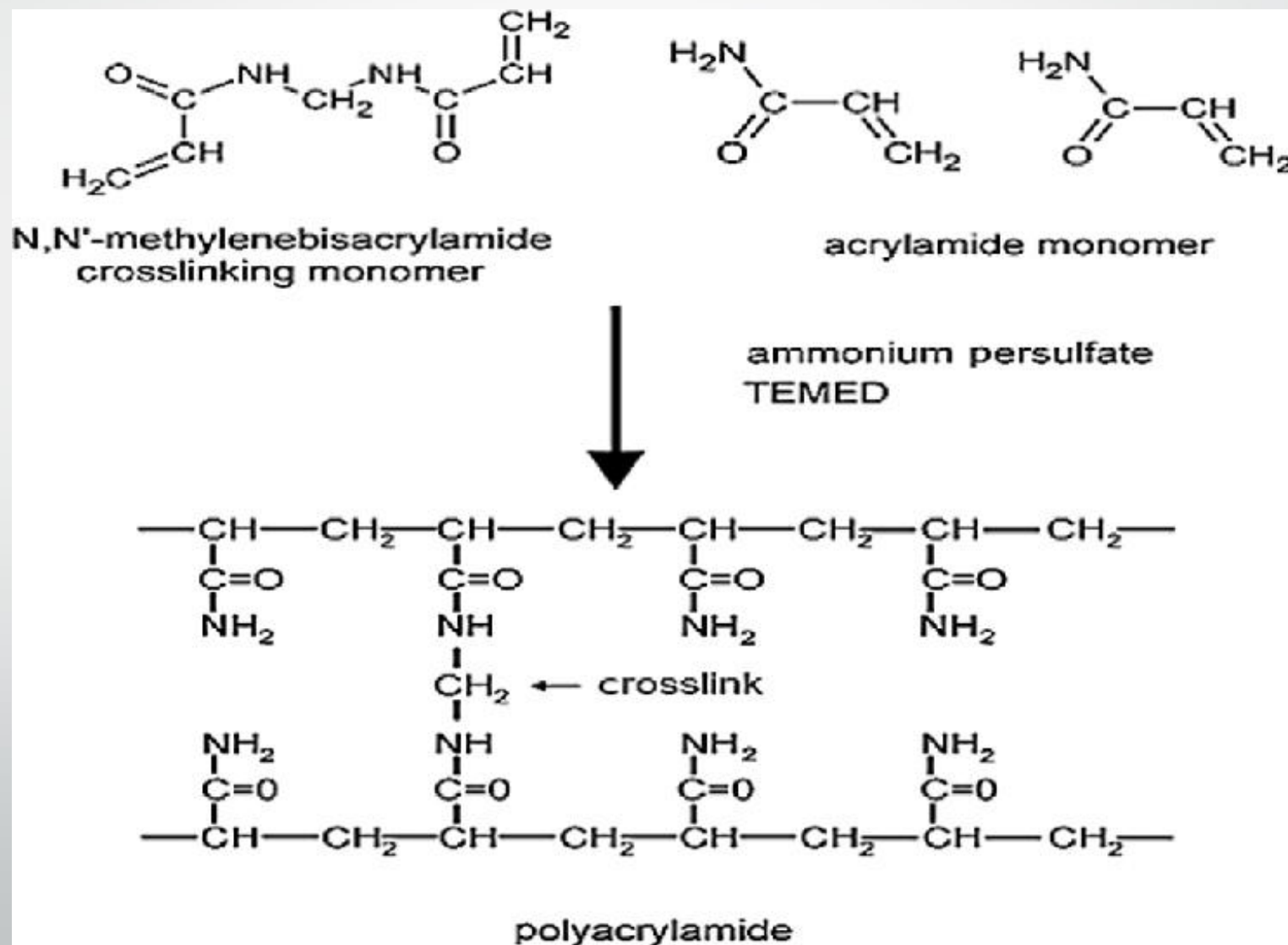
# Декстран

- Честичките гел имаат различна **големина**: големи, средни, фини и суперфини.
- **Граница на ексклузија** до 600 000 D; главно се користат за сепарација на мали пептидни молекули и глобуларни протеини со мала до средна молекулска маса.
- **Означување на геловите**: Sephadex G-број
  - Бројот се однесува на волуменот на сврзаната вода потребна за набабрување на гелот, помножена со 10.
- Пр. Sephadex G-50, сврзана вода за набабрување на 1 g гел е 5 mL, што помножено со 10 ја дава вредноста карактеристична за гелот.
- Се приготвуваат со различен **степен на вмрежување**, со што се контролира димензијата на порите.

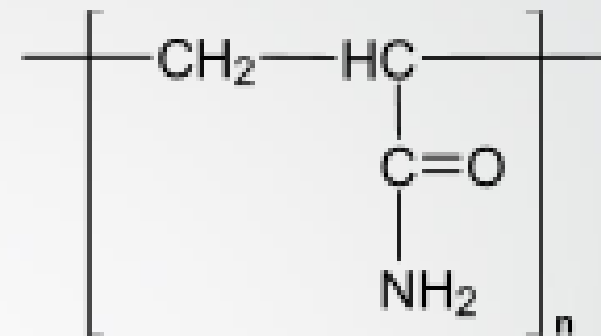


- Полиакриламид геловите се добиваат со кополимеризација на акриламид и агенсот за вмрежување N,N-метилен бис акриламид.

# Полиакриламид

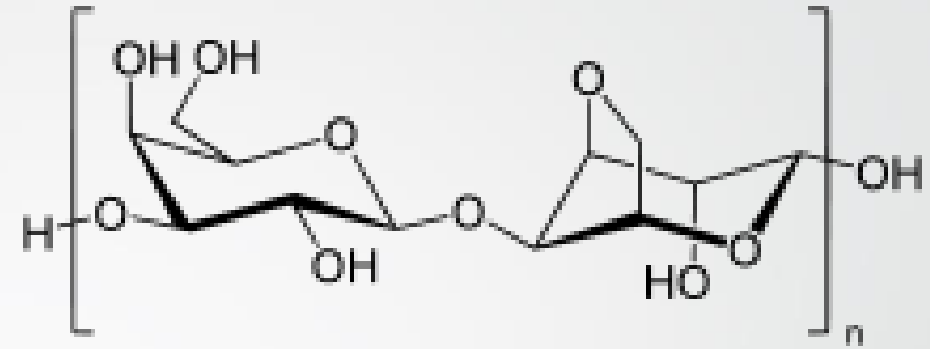


# Полиакриламид



- Димензиите на порите се определени од степенот на вмрежување.
- Доаѓаат во 10 различни големини.
- Производител е **Bio-Rad Laboratories (Bio-Gel P)**.
- **Граница на ексклузија** од 1800 до 400 000 далтони; сепарирањето е слично како кај декстраните.

# Агароза



- Агарозата е неутрален полисахарид на агарот, од кој се добива со пречистување и отстранување на другата негова компонента - агаропектин.
- Претставува линеарен полимер од агаробиоза, дисахарид на D-галактоза и 3,6-анхидро-1-галактоза.
- Структурата на гелот е **стабилизирана со водородни врски**, а не со ковалентно вмрежување.

# Агароза

- Димензиите на порите кај агарозните гелови се многу поголеми од оние на Sephadex и Bio-gel P.
- Затоа имаат **висока граница на ексклузија** до 150 000 000 далтони.
- Наоѓаат примена за разделување на големи глобуларни протеини или долги линеарни молекули, како DNA.
- Производители се **Bio-Rad Laboratories (Bio-Gel A)** и **Pharmacia (Sephacrose и Superose)**.

# Комбинирани гелови

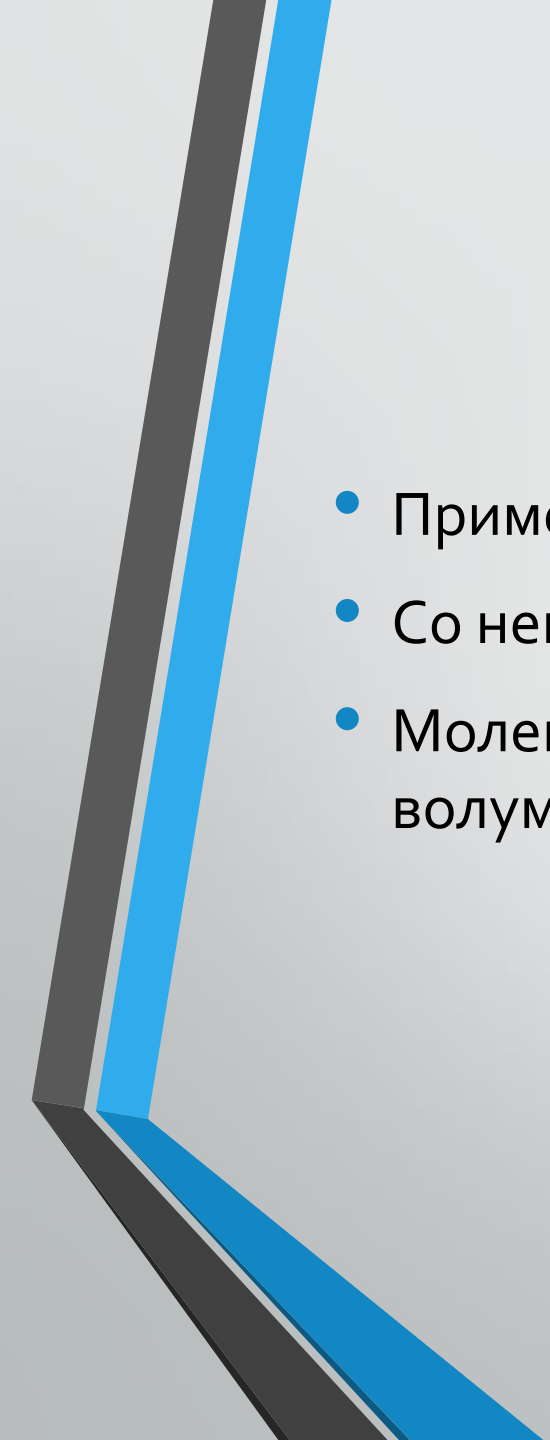
- При кополимеризација на декстран и агенсот за вмрежување N,N-метилен бис акриламид, се добива комбиниран гел **полиакриламид-декстран**.
- Се зголемува границата на ексклузија.
- Производител **Pharmacia ( Sephacryl)**.
- Комбиниран **полиакриламид-агароза** гел **Ultragel**.
- Агарозата е заробена во вмрежениот дел на полиакриламидот:
  - Агарозата дава цврстина на гелот;
  - Полиакриламидот овозможува висока резолуција.

| Name <sup>a</sup> | Type           | Fractionation Range (kD) |
|-------------------|----------------|--------------------------|
| Sephadex G-10     | Dextran        | 0.05–0.7                 |
| Sephadex G-25     | Dextran        | 1–5                      |
| Sephadex G-50     | Dextran        | 1–30                     |
| Sephadex G-100    | Dextran        | 4–150                    |
| Sephadex G-200    | Dextran        | 5–600                    |
| Bio-Gel P-2       | Polyacrylamide | 0.1–1.8                  |
| Bio-Gel P-6       | Polyacrylamide | 1–6                      |
| Bio-Gel P-10      | Polyacrylamide | 1.5–20                   |
| Bio-Gel P-30      | Polyacrylamide | 2.4–40                   |
| Bio-Gel P-100     | Polyacrylamide | 5–100                    |
| Bio-Gel P-300     | Polyacrylamide | 60–400                   |
| Sepharose 6B      | Agarose        | 10–4,000                 |
| Sepharose 4B      | Agarose        | 60–20,000                |
| Sepharose 2B      | Agarose        | 70–40,000                |
| Bio-Gel A-5       | Agarose        | 10–5000                  |
| Bio-Gel A-50      | Agarose        | 100–50,000               |
| Bio-Gel A-150     | Agarose        | 1000–150,000             |

<sup>a</sup>Sephadex and Sepharose gels are products of Amersham Pharmacia Biotech; Bio-Gel gels are manufactured by BioRad Laboratories.

# Избор на гел

- Во зависност од видот на гел хроматографијата:
- **Групно сепарирање:** разделување на биолошкиот примерок на два дела (со мала и со висока молекулска маса)
  - Препорачани: Sephadex G-25, Bio Gel-P6 и Sephacryl S-100HR, 100-200 mesh, 50-150  $\mu\text{m}$
- **Фракционирање:** разделување на супстанции со слична молекулска маса од повеќекомпонентна смеса
  - Прилагодување со границата на ексклузија, добра резолуција (се постигнува со фини гелови), но и добар проток. Метод на проба и погрешка.

- 
- Пример: **Гел Sephadex G-75**,
  - Со него се разделуваат молекули со молекулска маса од 3000 до 70 000.
  - Молекулите со поголема молекулска маса елуираат со мртвиот волумен.

# Приготвување на гел и чување

- Дехидрирани гелови (**декстран и акриламидни**):
  - *Набабрување во вода*
  - 3-4 часа на собна температура до 72 часа за високовмрежени гелови.
  - Скратување на време, со набабрување во врела вода.
- Хидратирани (**агарозни и комбинирани**)
  - *Отстранување на суперфини честички од супнатантниот слој. (2-3 пати)*
  - **Дегазирање**: отстранување на растворените гасови од суспензијата на гел (1-2 часа, со водна вакуум пумпа)
  - **Чување**: додавање на антимикиробен агенс, натриум азид (0,02%)

# Операции на гел колоната

## 1. Избор на колона (пакување)

- *Фракциона гел хроматографија:*
  - Не подолги од 100 cm.
  - Однос на должина и ширина 25-100.
- *Групно сепарирање:*
  - Не пократки од 50 cm.
  - Однос на должина и ширина 5-10.

## 2. Полнење на колона

- *Фракциона гел хроматографија:*
  - Волумен на примерокот 1-5% од вкупниот волумен на колоната.
- *Групно сепарирање:*
  - Волумен на примерокот 10-25% од вкупниот волумен на колоната.

Вкупен волумен на колона: волумен на вода во еквивалентна стаклена колона

### 3. Елуирање

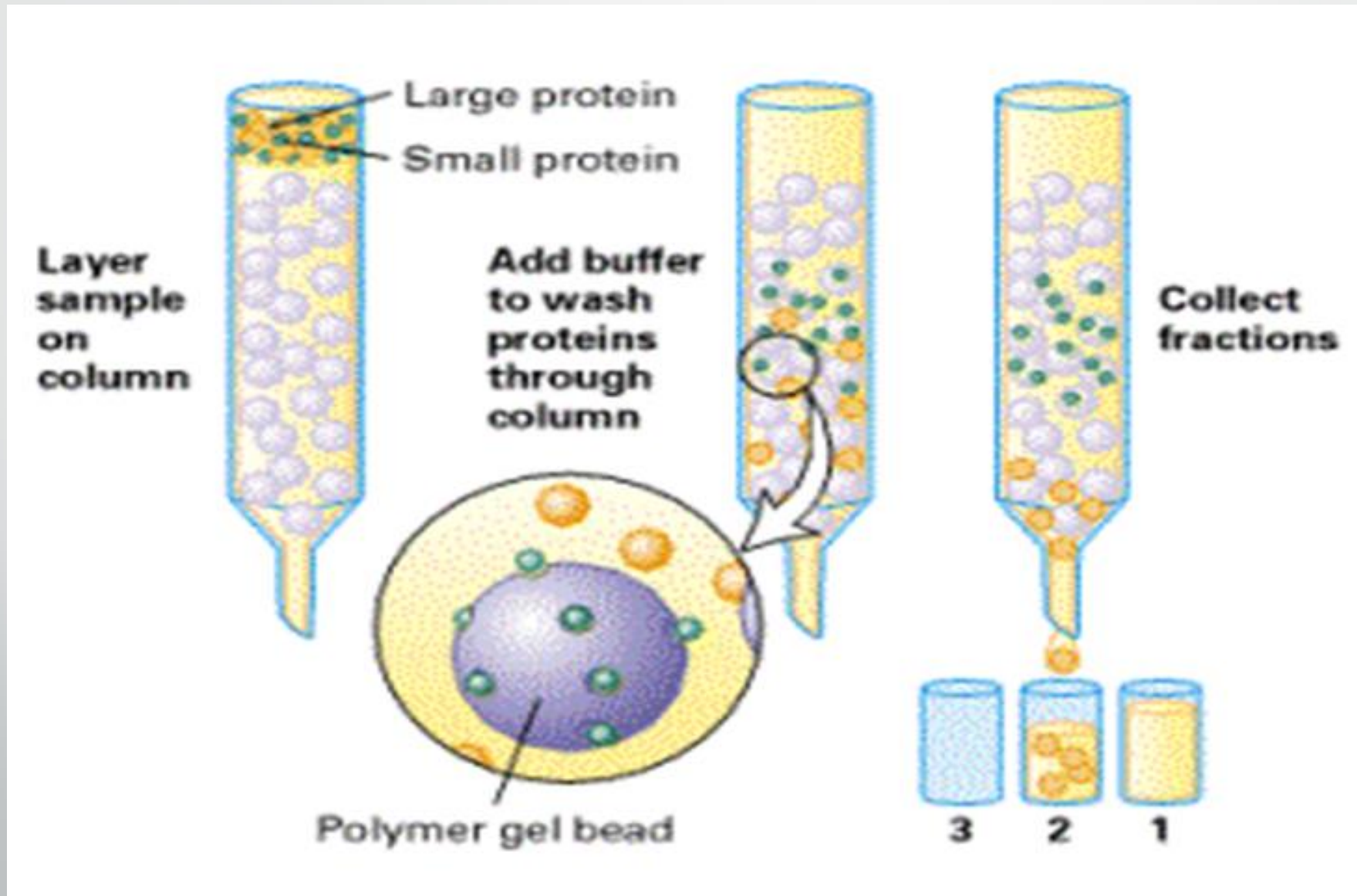
- ***Избор на пуфер***

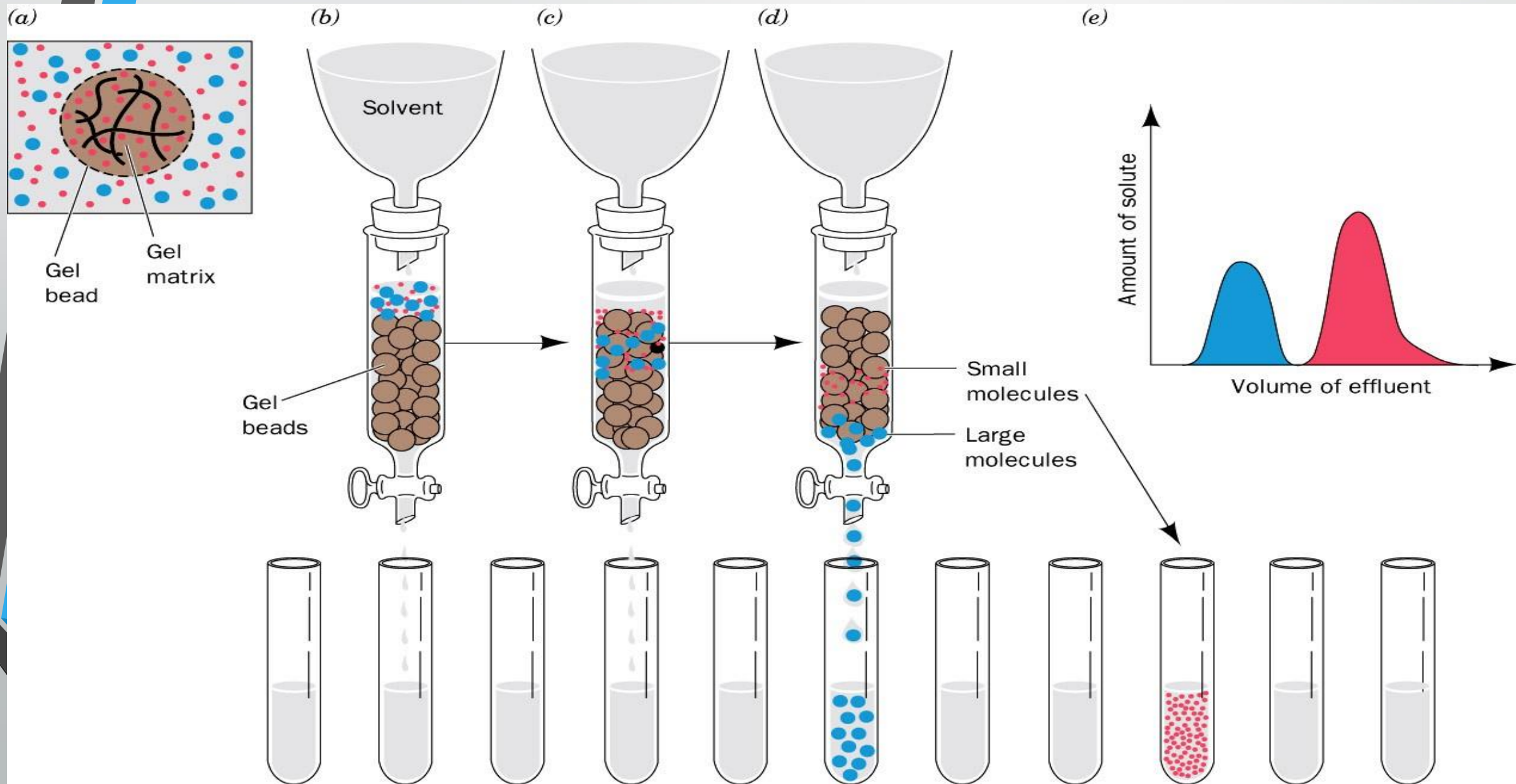
- Декстран и полиакриламид: pH од 1-10.
- Агароза: pH од 4-10
- Интервал на pH вредности во кои макромолекулата е стабилна

- ***Проток на колоната:***

- Брзина помала од слободно капење (гравитациски сили или пумпа под притисок)
- Висок проток: слаба резолуција
- Среден проток:
  - Гелови со мала големина на пори: 8-12 mL/cm<sup>2</sup> и 15-20 mL/h.
  - Гелови со голема димензија на пори: 2-5 mL/cm<sup>2</sup> и 5-10 mL/h.

# Хроматографија на гел колоната





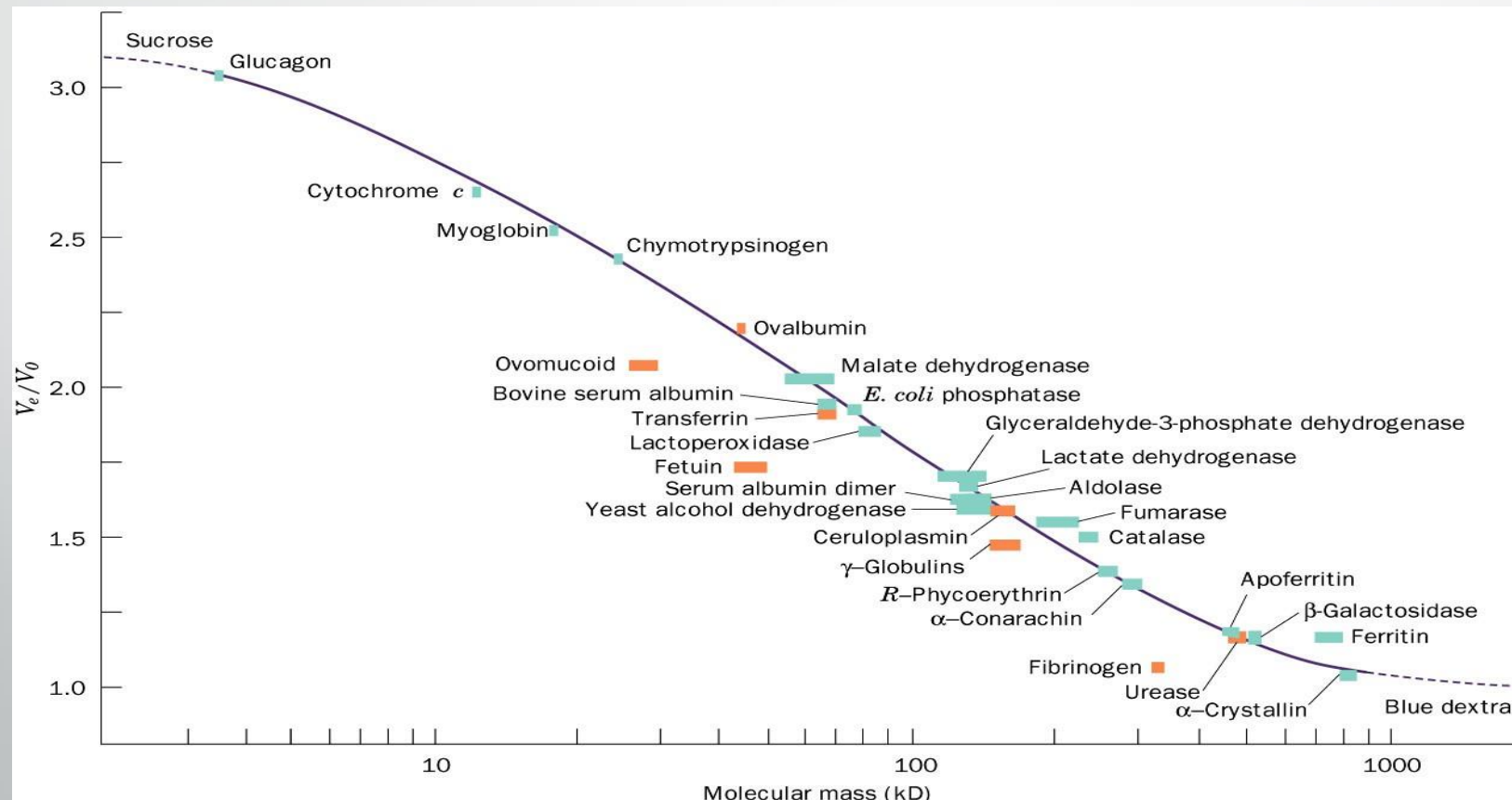
# Предности на гел колоната

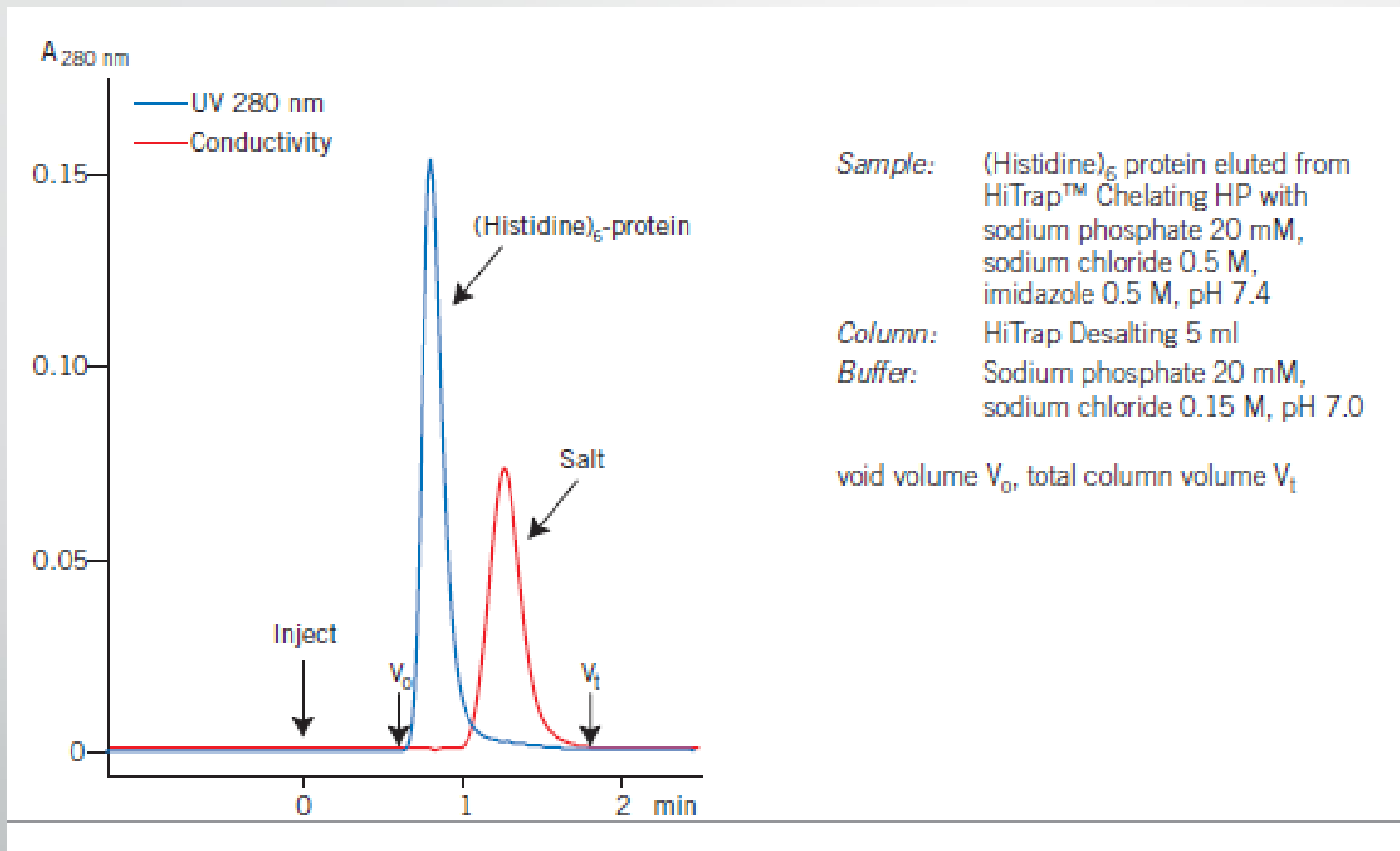
Најдобра метода за разделување на молекули со различни молекулски маси:

- 1.** Не зависи од температурата, рН, јонската сила и составот на пуферот. Хроматографирањето се одвива во широк спектар на услови.
- 2.** Постои незначителна адсорпција
- 3.** Зонското препокривање е помало одошто во другите техники. Потребниот волумен за елуирање зависи од молекулската маса.

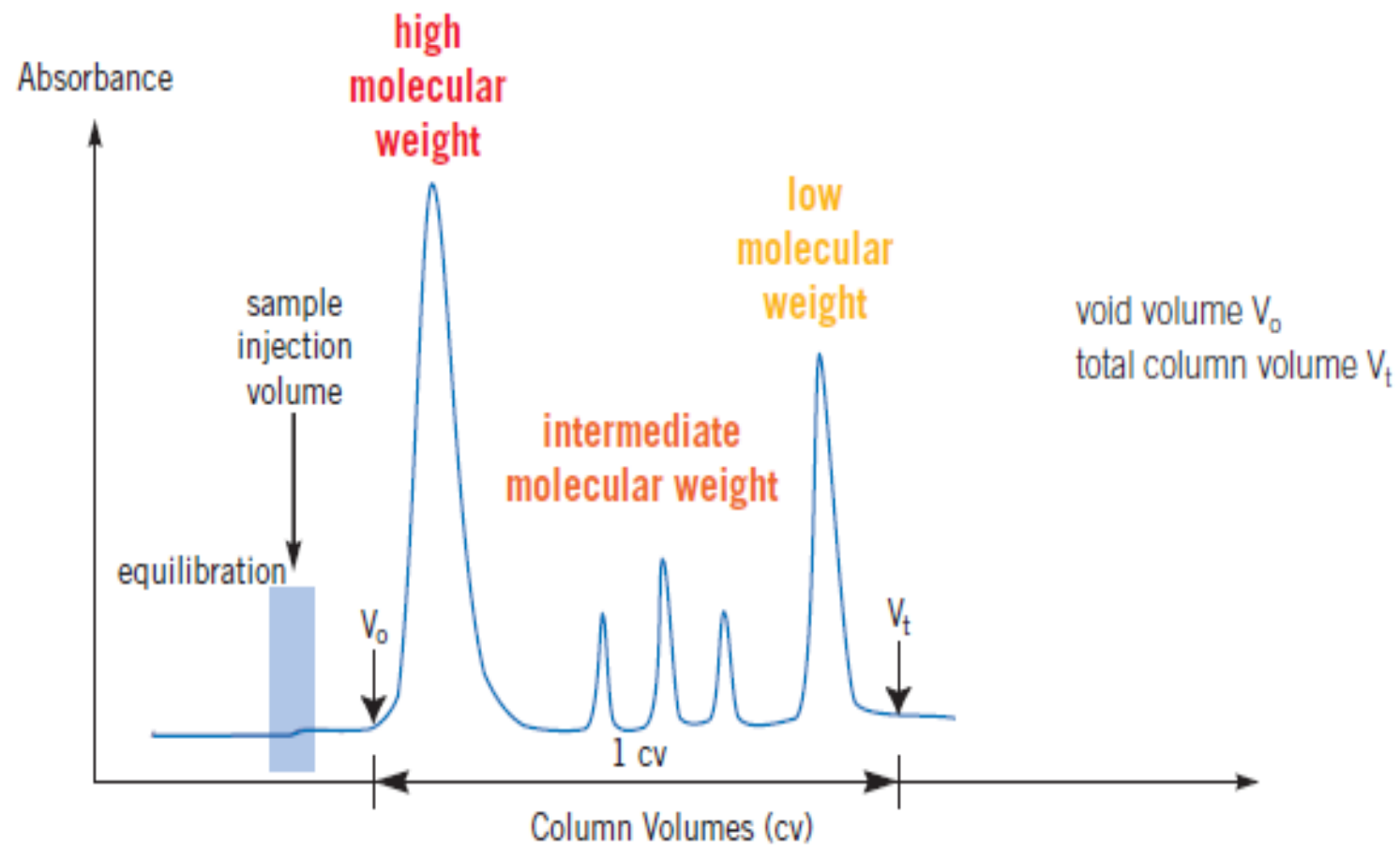
# Примена на гел хроматографија

1. Пречистување на биомолекули: ензими и други протеини
2. Проценка на молекулската маса





Хроматограм на групно сепарирање



Теоретски хроматограм на фракционо сепарирање

# Проценка на молекулската маса

- Калибрирање на колоната со познат стандард
- Цртање на крива на зависност на волуменот потрошен за елуирање во однос на  $\lg$  од молекулската маса

