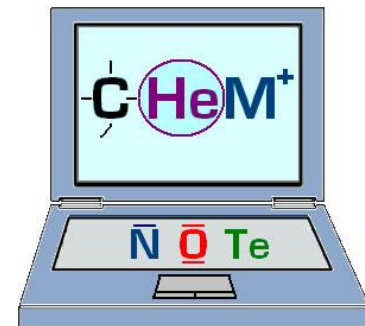




Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti



CHROMATOGRRAFIE

Chromatografie

- ***co je to?*** : široká škála fyzikálních metod pro analýzu nebo separaci komplexních směsí
- ***proč je to super?*** : vysoké rozlišení komponent i velmi složité směsi, typicky velmi mírné podmínky
- ***princip:*** dělení složek směsi mezi dvěma fázemi, tzv. **mobilní a stacionární**
 - směs látek rozpuštěna v mobilní fázi (kapalina, plyn), prochází sloupcem stacionární fáze (pevné částice, tenká vrstva kapaliny na povrchu pevné částice,...), jednotlivé látky ze směsi interagují různým způsobem se stacionární fází – rychlost průniku jednotlivých složek je různá

Rozdělovací koeficient

- během chromatografie dochází opakovaně k přechodu složek do stacionární fáze a zpět do fáze mobilní – při přiblížení rovnováže lze rozdělení složky mezi dvě fáze popsat distribuční konstantou (rozdělovací koeficient)
$$K = [A]_s / [A]_m$$
- **K** vyjadřuje poměr rovnovážných koncentrací této složky v obou fázích
- dnes obrovská škála různých chromatografických metod, i způsoby dělení různé

Chromatografie - rozdělení

- dle separačního mechanismu (charakter interakce dělené látky se stacionární fází)
 - **adsorpční** (různá schopnost látek adsorbovat se na povrch pevné fáze (adsorbentu) jako je např. oxid hlinitý, silikagel; sorpce látek je důsledkem různých polárních sil povrch adsorb - separovaná látka a povrch adsorbentu – mobilní fáze)
 - **rozdělovací** (dělení látek mezi dvě navzájem nemísitelná nebo omezeně mísitelná rozpouštědla, jedna z kapalných fází je zakotvená na pevný nosič (stacionární fáze), druhá kapalina přes ní přetéká (mobilní))
 - **ionexová** (nebo též chromatografie na měničích iontů, založena na iontových interakcích mezi iontoměničem a separovanou látkou, která nese opačný náboj)
 - **afinitní** (vlastně speciální případ adsorpční, založena na specifických reversibilních interakcích, např. enzym-substrát, enzym-kofaktor, antigen-protilátka, hormon-receptor)

Chromatografie - rozdělení

- dle skupenství fází
 - kapalinová (kapalina-kapalina, kapalina - pevná látka)
 - plynová (plyn – pevná látka, plyn – kapalina)
- dle techniky provedení
 - sloupcová (na koloně)
 - v plošném uspořádání (tenká vrstva)

Chromatografie – základní parametry

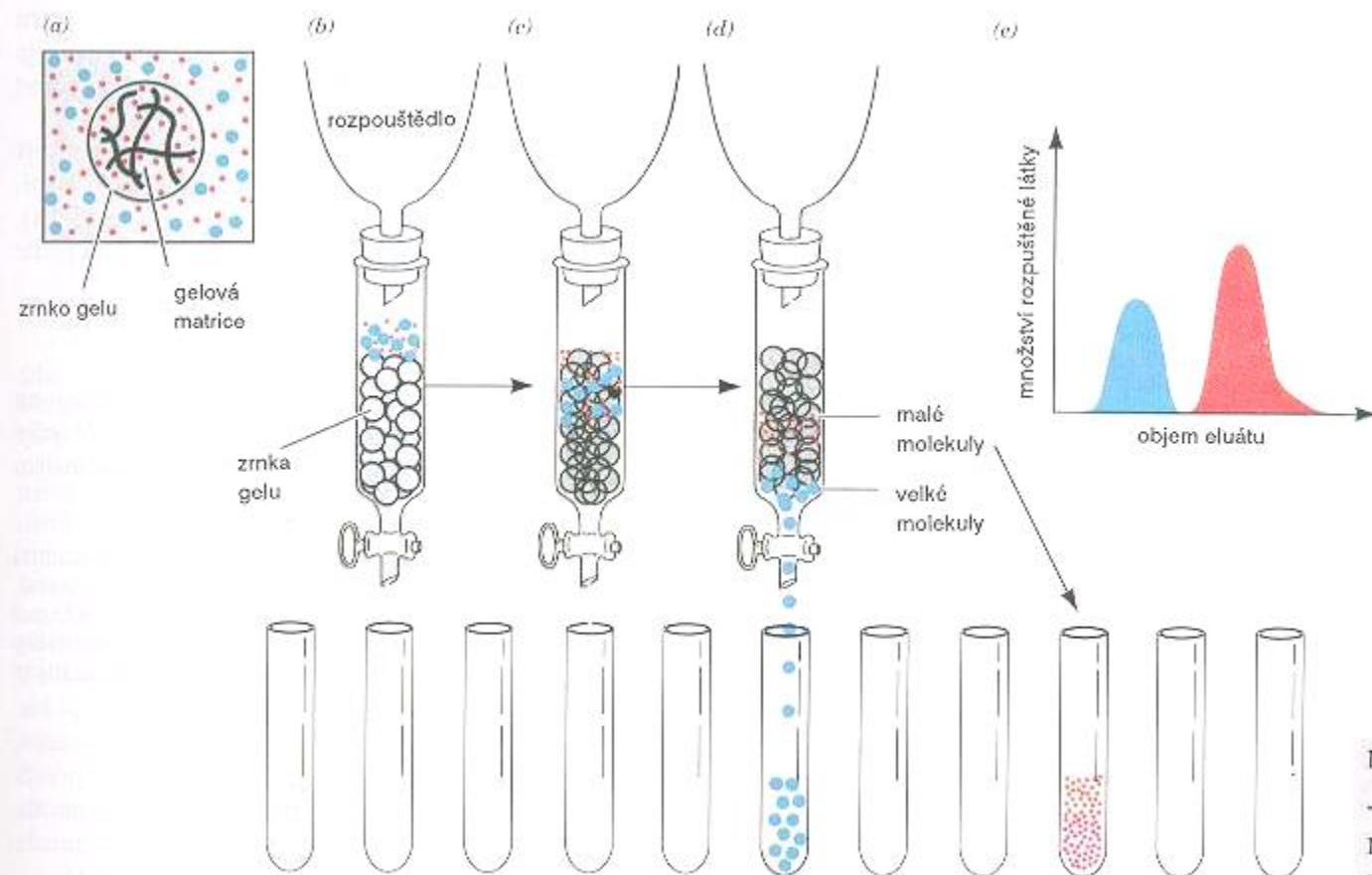
- t_m – **mrvý retenční čas** (čas, ve kterém z kolony vyjde látka, která za daných podmínek nemá ke stacionární fázi žádnou afinitu a je po celou dobu separace rozpuštěná v mobilní fázi)
- t_r – **retenční čas** (čas, ve kterém z kolony vyjde látka separovaná)
 $t_r > t_m$
- V_m – **mrtvý retenční objem** – většinou shodný s objemem mobilní fáze v koloně V_M
- V_r – **retenční (eluční) objem**
- k – **kapacitní faktor** (kapacitní poměr) – míra zpoždění (retence) látek zadržovaných stacionární fází kolony
 - $k = n_S/n_M = (t_r - t_m)/t_m = K (V_S / V_M)$
 - je to poměr doby, kterou průměrná molekula separované látky stráví ve stacionární fázi, k době strávené ve fázi mobilní
 - závisí převážně na povaze stacionární a mobilní fáze a jejich vzájemném poměru
 - na rozdíl od t_r nezávisí na průtokové rychlosti ani na rozměrech kolony

GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

- gelová chromatografie, gelová filtrace, chromatografie na principu molekulového síta
- rozdělení na základě **velikosti a tvaru molekul**
- rozdělovací chromatografie kapalina-kapalina
- stacionární fází je kapalina zakotvená v gelu
- mobilní fází je stejná kapalina, protékající mezi částicemi gelu
- separace složek je dána schopností separovaných molekul procházet póry stacionární fáze, malé molekuly jsou zpomalovány více a jednotlivé složky směsi se uvolňují v pořadí klesající velikosti molekuly

GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

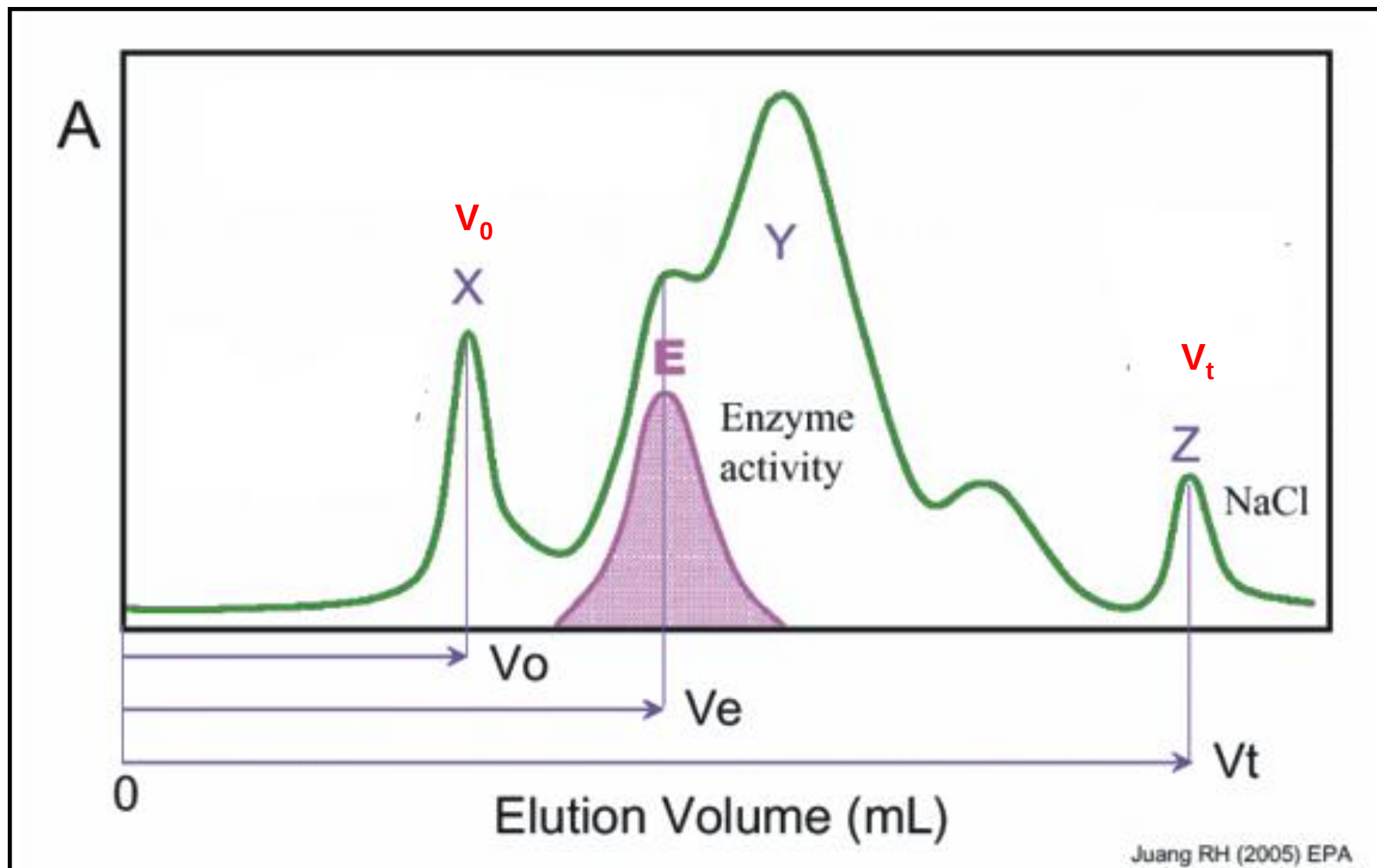
- nejčastěji voda-voda, nízká iontová síla (žádný náboj na koloně)
- hydrofilní gely (prokřížený dextran, agarosa, polyakrylamid)
- frakcionační rozsah gelu – rozmezí molekulových hmotností molekul „dělitelných“ na gelu
- rozlišení lze ovlivnit volbou vhodného typu gelu, velikostí částic, rozměry kolony, objemem vzorku a průtokovou rychlostí
- praktické použití : purifikace proteinů ze směsi, odhad molekulové hmotnosti proteinu, odsolení



Nejužívanější náplně pro gelovou filtraci

Název	Dělicí rozsah, kDa
Sephadex G-10	0,05 – 0,07
Sephadex G-25	1 – 5
Sephadex G-50	1 – 30
Sephadex G-100	4 – 150
Sephadex G-200	5 – 600
Bio-Gel P-2	0,1 – 1,8
Bio-Gel P-6	1 – 6
Bio-Gel P-10	1,5 – 20
Bio-Gel P-30	2,4 – 40
Bio-Gel P-100	5 – 100
Bio-gel P-300	60 – 400
Sepharose 6B	10 – 4 000
Sepharose 4B	60 – 20 000
Sepharose 2B	70 – 40 000

Typický eluční diagram

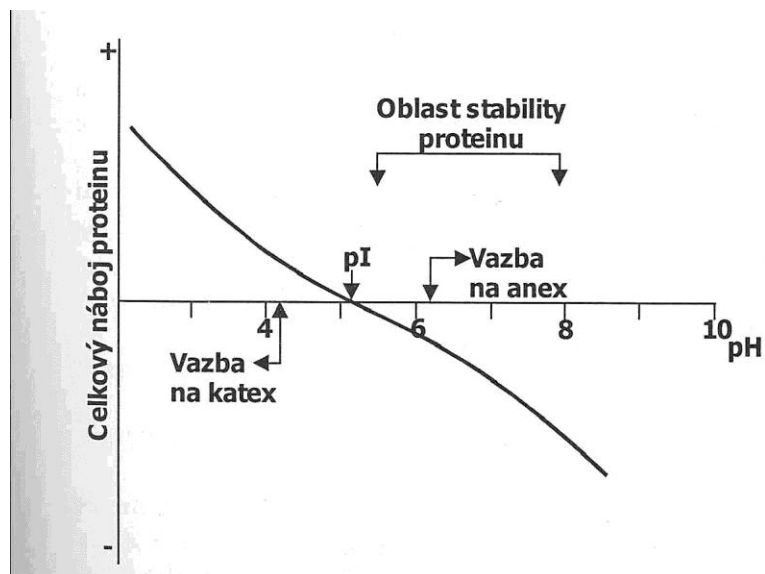


IONEXOVÁ CHROMATOGRAFIE

- separace látek nesoucích náboj
- výměna iontů – ionty elektrostaticky navázané na povrch pevného, nerozpustného, chemicky inertního podkladu se reversibilně vyměňují za ionty z roztoku
$$R^+A^- + B^- \leftrightarrow R^+B^- + A^-$$
- základ separace – **afinita iontů k ionexu** není stejná, závisí na velikosti náboje a poloměru iontu

IONEXOVÁ CHROMATOGRAFIE

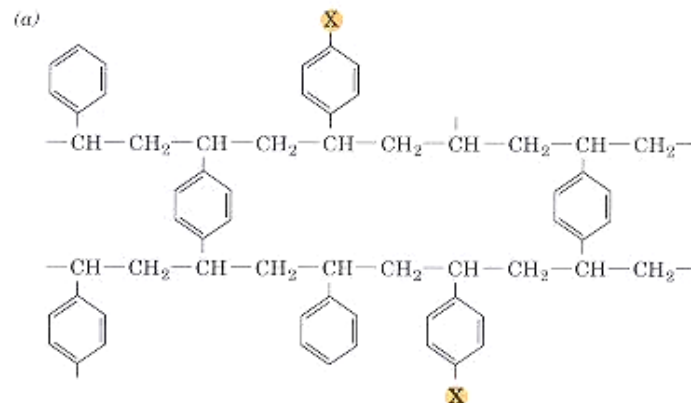
- síla vazby je ovlivněna iontovou silou prostředí a hodnotou pH
- látky nesoucí stejný náboj jako ionex nebudou zachyceny vůbec
- AK – při pH nižším než je pI má látka kladný náboj a váže se na katex, při pH nad pI má látka záporný náboj a váže se na anex
- inertní matrice s kovalentně navázanými kladně nebo záporně nabitými funkčními skupinami, charakter skupiny udává **sílu ionexu**, jejich celkové množství **kapacitu ionexu**
- jednotlivé fáze chromatografie : ekvilibrace ionexu, sorpce separované látky na ionex, desorpce látek změnou podmínek (pH, iontová síla), regenerace ionexu



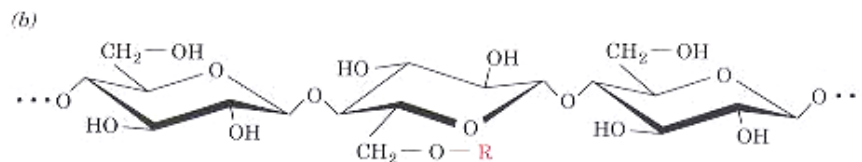
bílkoviny lze separovat na katexech i anexech, neboť jejich nábojové vlastnosti závisí na pH

různé typy ionexů

- polystyrenová pryskyřice zesíťovaná divinylbenzenem
- celulosový nosič



Dowex 50: $X = -SO_3^-$
 Dowex 1: $X = -CH_2N^+(CH_3)_3$



DEAE: $R = -CH_2-CH_2-N^+(CH_2CH_3)_3$
 CM: $R = -CH_2-COO^-$

IONEXOVÁ CHROMATOGRAFIE

matrice – polystyren, celuloza, polyakrylamid, agarose, dextran

	název	Funkční skupina
anexy	Aminoethyl (AE-)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$
	Diethylaminoethyl (DEAE-)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
	Kvarterní aminoethyl (QAE-)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
katexy	Karboxymethyl (CM-)	$-\text{OCH}_2\text{COO}^-$
	Fosfo	$-\text{PO}_4\text{H}_2^-$
	Sulfopropyl (SP-)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$

Chromatofokusace

- Zvláštní typ chromatografie na měničích iontů
- Dělení proteinů (či jiných amfiontů) podle isoelektrického bodu
- Gradient pH se vytváří přímo na koloně (eluční pufr o určitém pH vstupuje do kolony s ionexem, která je ekvilibrována na jiné pH startovacím pufrem)
- Není vhodné pro proteiny, které ve svém pl precipitují

Chromatofokusace

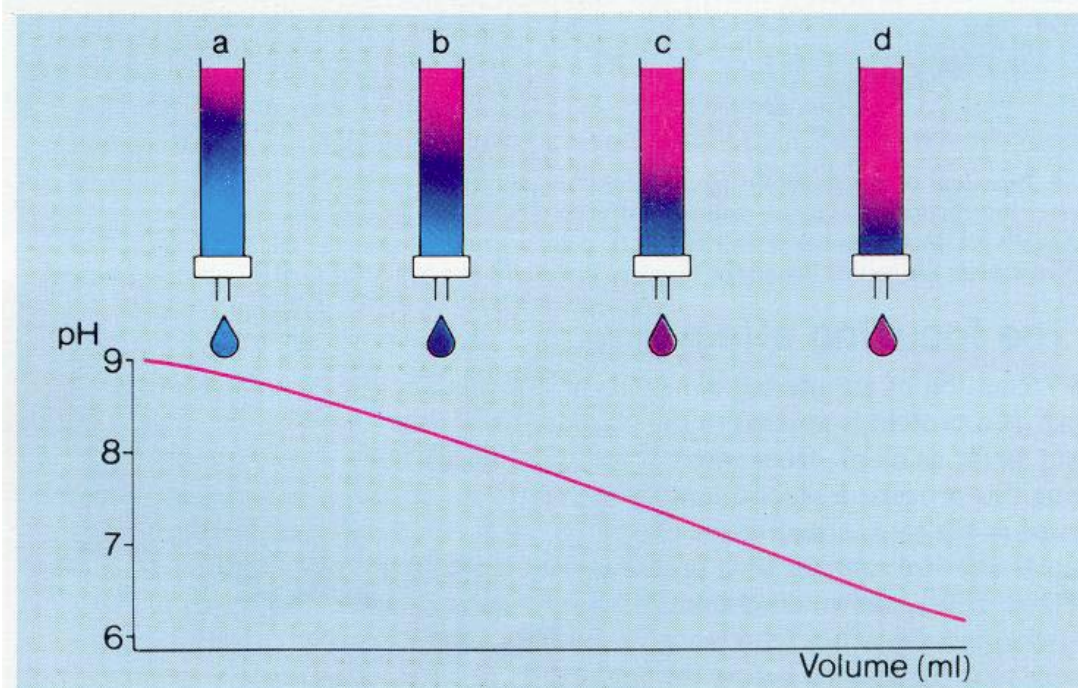
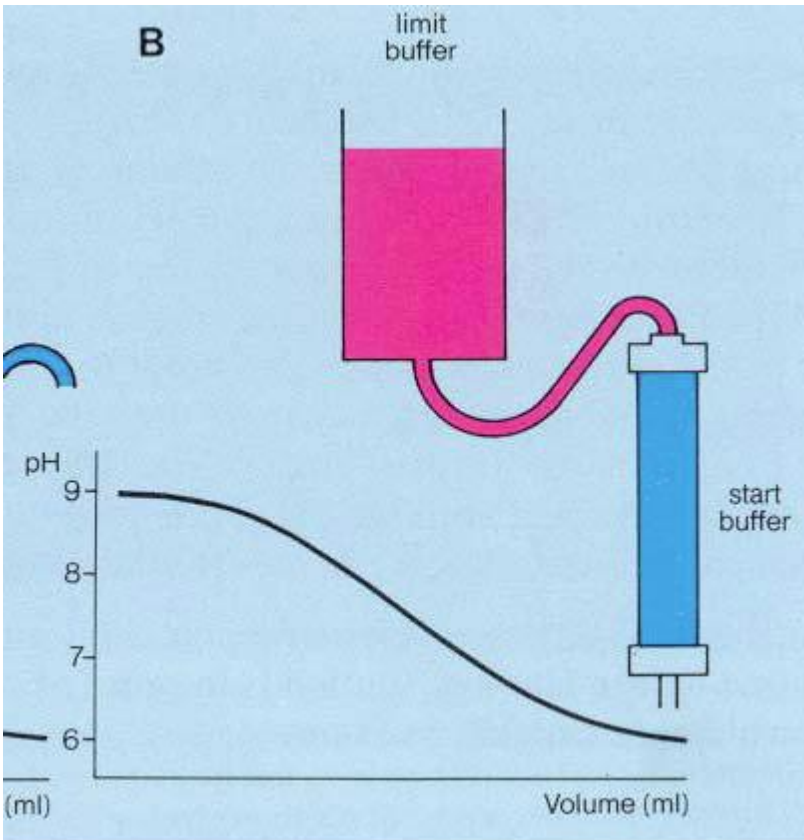
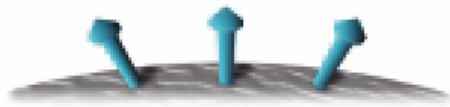


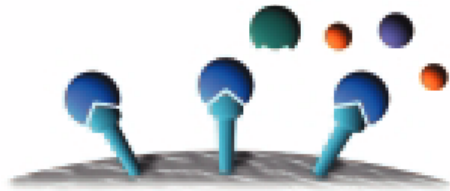
Fig. 3. Formation of a pH gradient (pH 9—6) in a column of PBE 94 eluted with Polybuffer 96. (a) (b) (c) (d) represent different stages in elution.

AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

- vysoký stupeň přečištění v jediném kroku
- ligand navázán na chemicky inertní nerozpustnou matici
- z roztoku ze směsi molekul se zachytí jen odpovídající protein
- eluce navázaného proteinu buď látkou s vyšší afinitou nebo změnou podmínek (pH, iontová síla), které přemění komplex protein-ligand na nestabilní
- spacer – raménko, kvůli sterickému bránění



1. Affinity medium is equilibrated in binding buffer.



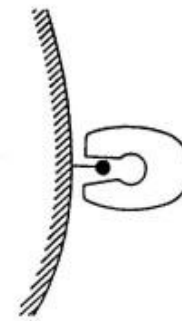
2. Sample is applied under conditions that favour specific binding of the target molecule(s) to a complementary binding substance (the ligand). Target substances bind specifically, but reversibly, to the ligand and unbound material washes through the column.



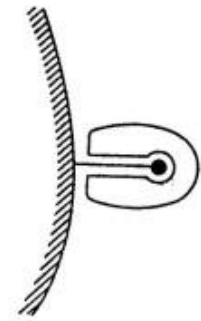
3. Target protein is recovered by changing conditions to favour elution of the bound molecules. Elution is performed specifically, using a competitive ligand, or non-specifically, by changing the pH, ionic strength or polarity. Target protein is collected in a purified, concentrated form.



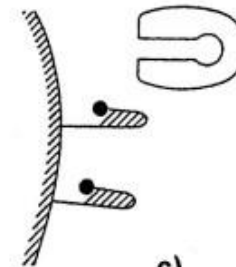
4. Affinity medium is re-equilibrated with binding buffer.



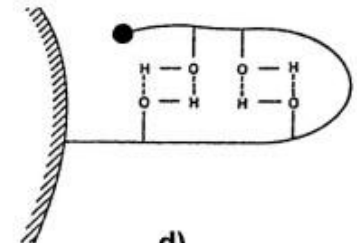
a)



b)



c)



d)

distanční raménko - spacer

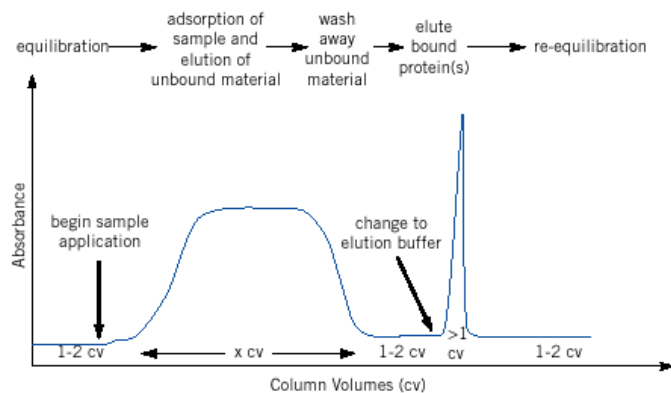


Fig. 2. Typical affinity purification.

AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

Příklady afinitních interakcí

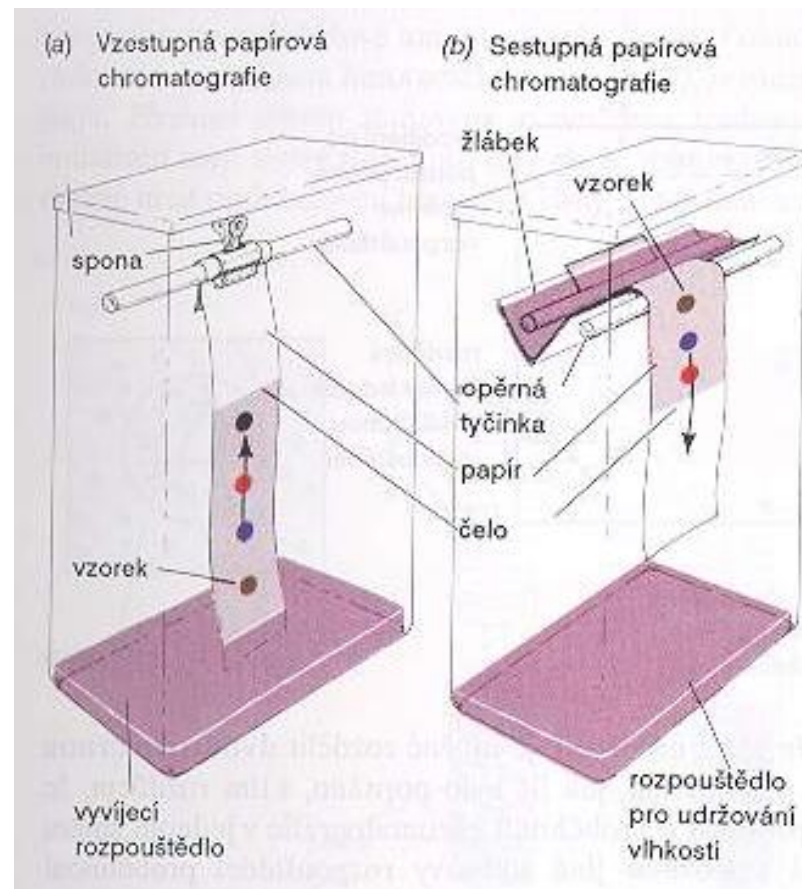
enzym	analog substrátu, inhibitor, kofaktor
protilátka	antigen, virus, buňka
lektin	polysacharid, glykoprotein, buněčný povrch, receptor
nukleová kys.	 komplementární sekvence, histony, DNA/RNA polymerasy, DNA/RNA vázající proteiny
hormon, vitamin	receptor, přenašeče
glutathion	glutathion-S-transferasa nebo GST fúzní proteiny
kovové ionty	Poly (His) fúzní proteiny, nativní proteiny s His, Cys, Trp na povrchu

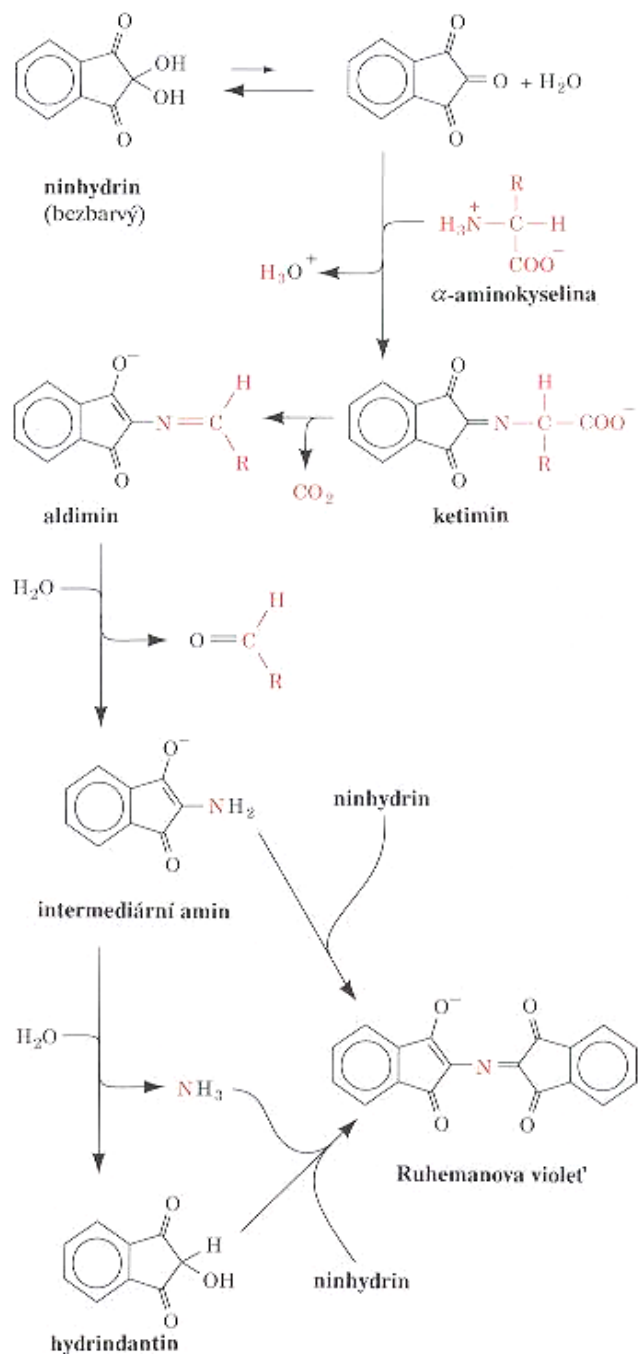
HYDROFOBNÍ CHROMATOGRRAFIE

- hydrofobní interakce hydrofobních částí proteinu s nepolárními skupinami imobilizovanými na vhodném nosiči
- dělení na základě odlišné povrchové hydrofobicity
- purifikace proteinů v nativním stavu
- eluce gradientem zeslabujícím povahu interakcí (např. klesající koncentrace solí)

PAPÍROVÁ CHROMATOGRRAFIE

- extrémně jednoduchá
- dělení malých molekul (AK)
- dělení na základě rozdílné rozpustnosti v mobilní fázi





visualizace aminokyselin např. po papírové chromatografii – reakce s ninhydrinem

- 1.** QuadTec UV/Vis detector **2.** SV5-4 select valve **3.** BioLogic Maximizer mixer **4.** AVR9-8 switching valves **5.** BioLogic Maximizer buffer blending system **6.** pH monitor **7.** F40 workstation **8.** BioFrac fraction collector **9.** AVR 7-3 sample inject valve **10.** UNO Q1 column **11.** BioLogic rack **12.** BioLogic DuoFlow software **13.** USB bitbus communicator **14.** Dell controller

