

Физико-химические свойства белков. Электрофоретические и хроматографические методы

Анна Дидио

Кафедра биохимии

2016

Хроматография

История открытия

- Хроматография - метод разделения и анализа смесей веществ, а также изучения физико-химических свойств веществ. Основан на распределении веществ между двумя фазами — неподвижной (твердая фаза или жидкость, связанная на инертном носителе) и подвижной (газовая или жидкая фаза, *элюент*).
- Название метода связано с первыми экспериментами по хроматографии, в ходе которых разработчик метода Михаил Цвет разделял ярко окрашенные растительные пигменты.

Хроматография

История открытия



Михаил Семёнович Цвет

- **1872 Асти (Италия) – 1919 Воронеж (Россия)**
- 1893 — бакалавр физических и естественных наук (Женевский университет)
- 1896 — возвращение в Россию
- 1901 — защита магистерской диссертации в Казанском университете
- 1910 — защита диссертации в Варшавском университете «Хромофиллы в растительном и животном мире»

Хроматография

История открытия

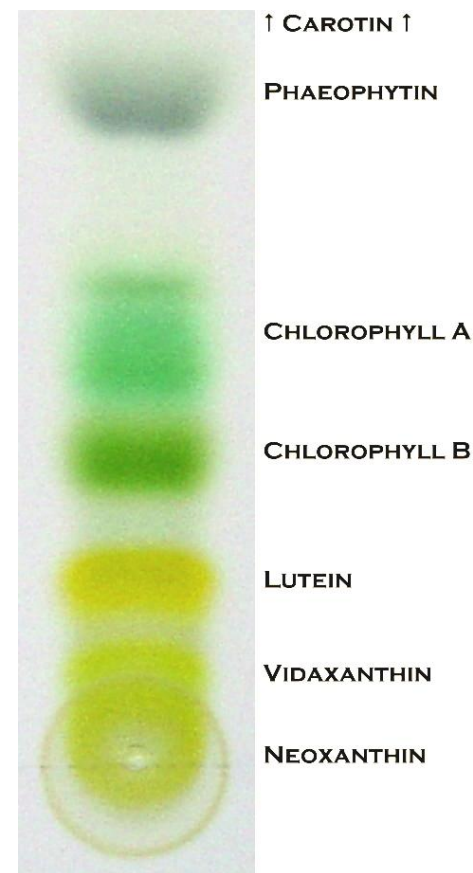


- Работал в Санкт-Петербурге, Варшавском университете, Москве, Нижнем Новгороде, Воронеже
- 1918 — январь — выдвижение на Нобелевскую премию (отказ)
- 1919 — умер от голода (по другим сведениям, от болезни), похоронен в Воронеже на территории монастыря.

Хроматография

История открытия

- Первая хроматография проведена в 1900 году.
- М.Цвет использовал колонку, заполненную карбонатом кальция, для разделения пигментов растительного происхождения. Первое сообщение о разработке метода хроматографии было сделано Цветом в 1901 году на *XI Съезде естествоиспытателей и врачей* в С.-Петербурге.
- В 1910—1930 годы метод был забыт и не развивался.
- В 1941 году А. Дж. П. Мартин и Р. Л. М. Синг разработали новую разновидность хроматографии, в основу которой легло различие в коэффициентах распределения разделяемых веществ между двумя несмешивающимися жидкостями. Метод получил название «*распределительная хроматография*». Нобелевская премия 1952 года.



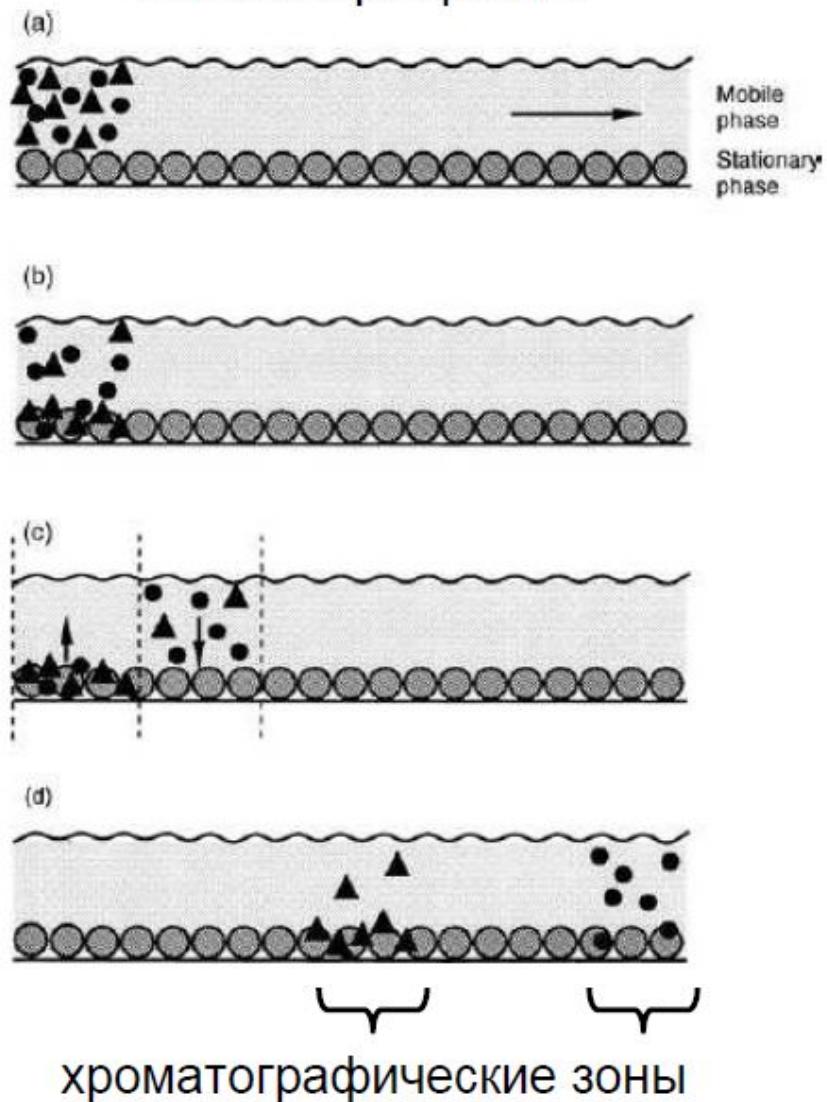
Хроматография

Общие понятия

- **Хроматография** — метод разделения смесей веществ или частиц, основанный на различиях в скоростях их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз.
- **Подвижная фаза** (элюент): газ, жидкость или (реже) сверхкритический флюид.
- **Неподвижная фаза** — твердая фаза или жидкость, связанная на инертном носителе, в адсорбционной хроматографии — сорбент.
- **Колонка** — содержит хроматографический сорбент, в ней происходит разделения смеси на индивидуальные компоненты.
- **Хроматограмма** – регистрируемый на детекторе результат зависимости концентрации компонентов на выходе из колонки от времени.

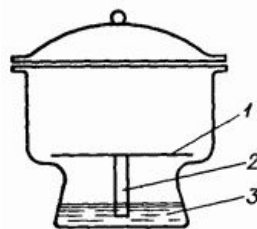
Хроматографический процесс – многочисленные циклы сорбции–десорбции

Схема процесса:

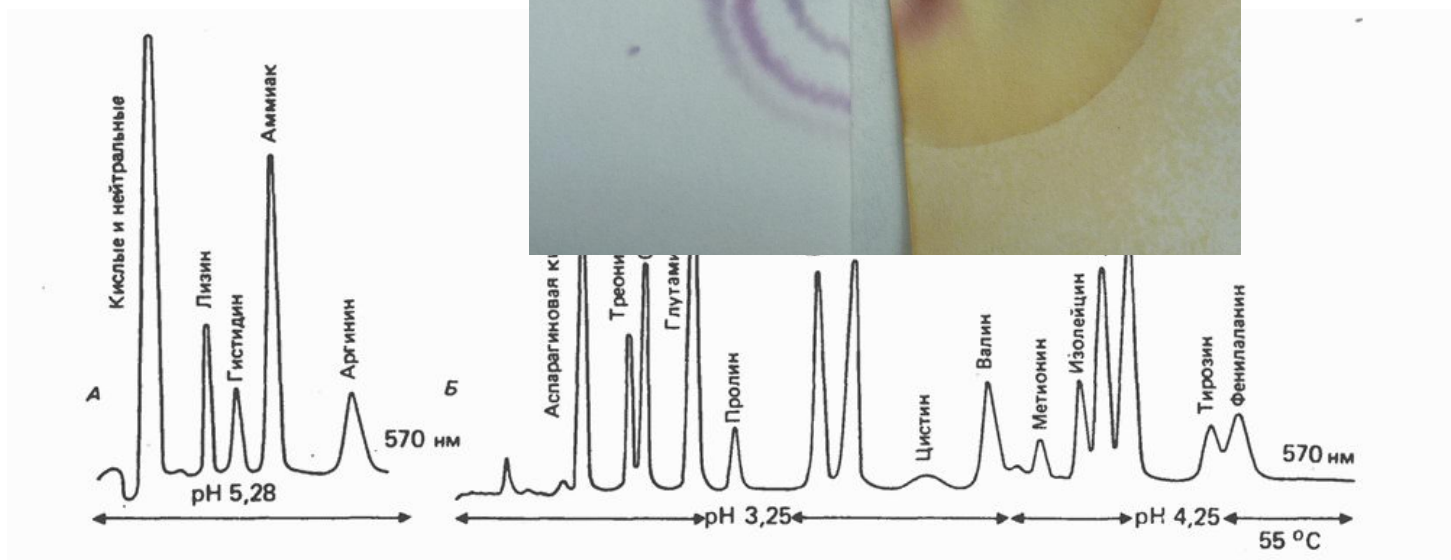
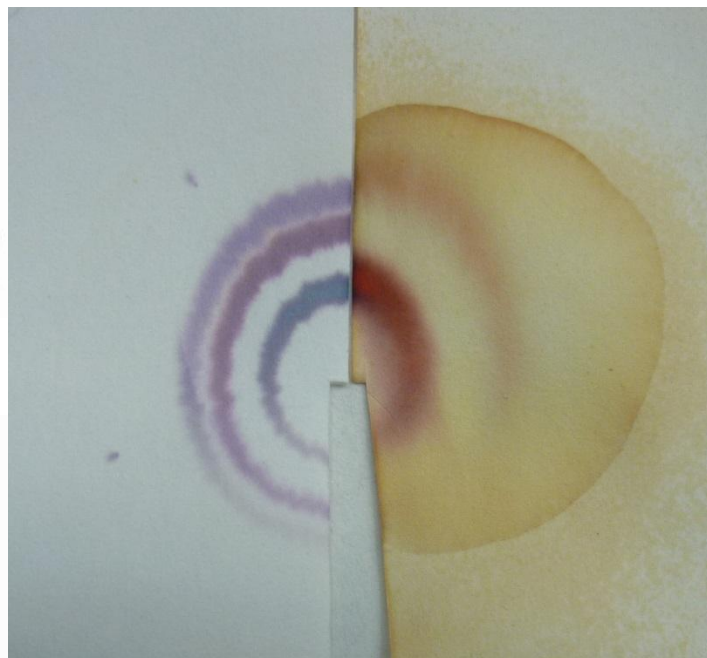


Хроматография для анализа АМИНОКИСЛОТ

- Бумажная
- Газовая
- Ионообменная



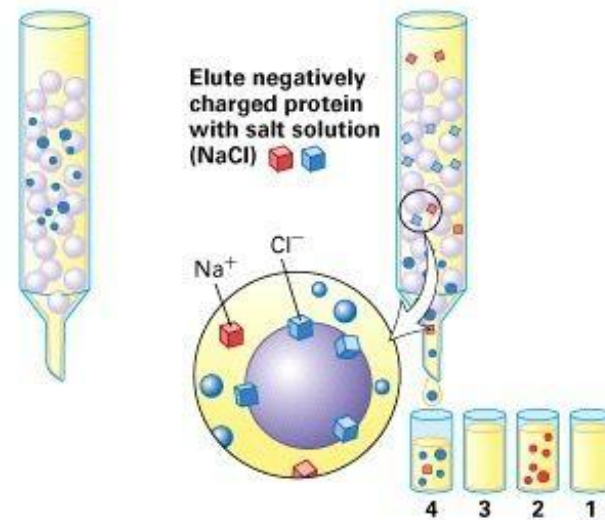
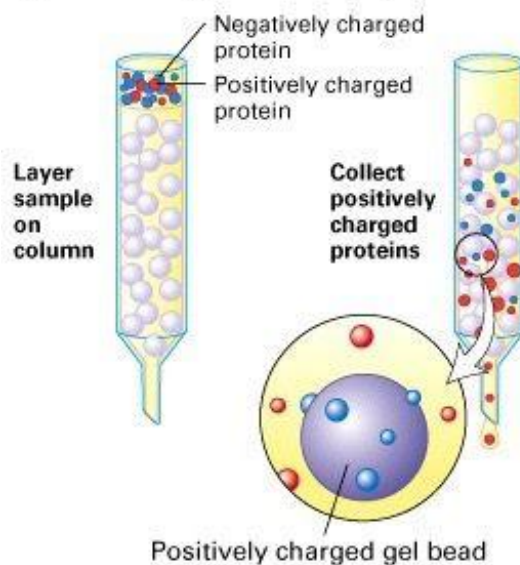
Смесь из трёх аминокислот
покраска: нингидрин и по методу Паули



Хроматография для анализа белков

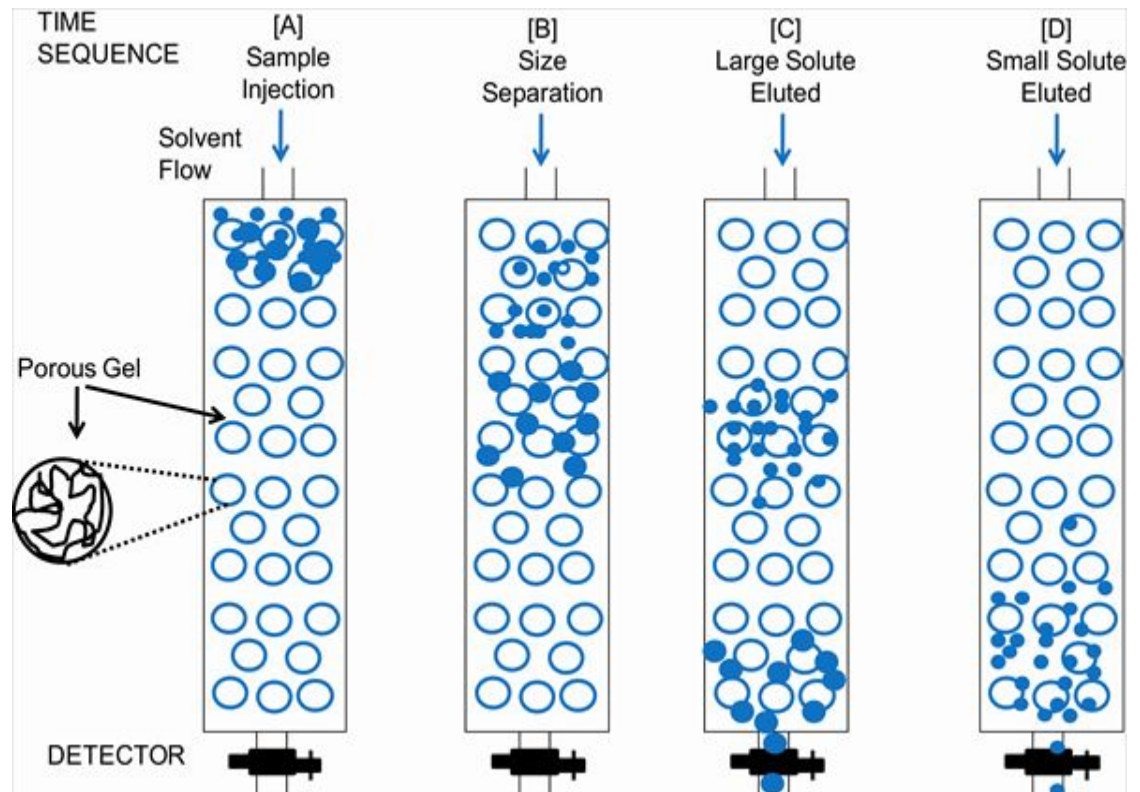
- **Ионообменная**
- **Эксклюзионная**
- **Афинная**

(b) Ion-exchange chromatography



Хроматография для анализа белков

- Ионообменная
- **Эксклюзионная**
- Афинная



Состав пробы на 1 мл 0.9% NaCl:

Голубой декстран – 1 мг

Цитохром С – 1,5 мг

K₂CrO₄ – 2 мг

Сахароза – 200 мг (для уплотнения анализируемой пробы)

Параметры колонки и сбора фракций:

$h = 32$ см (высота столбика геля)

$r = 0.5$ см (радиус колонки)

$m_g = 2$ г (вес сухого геля)

$V_g = 0.61$ (парционный удельный объем полимера, образующего гель, в данном случае сефадекса)

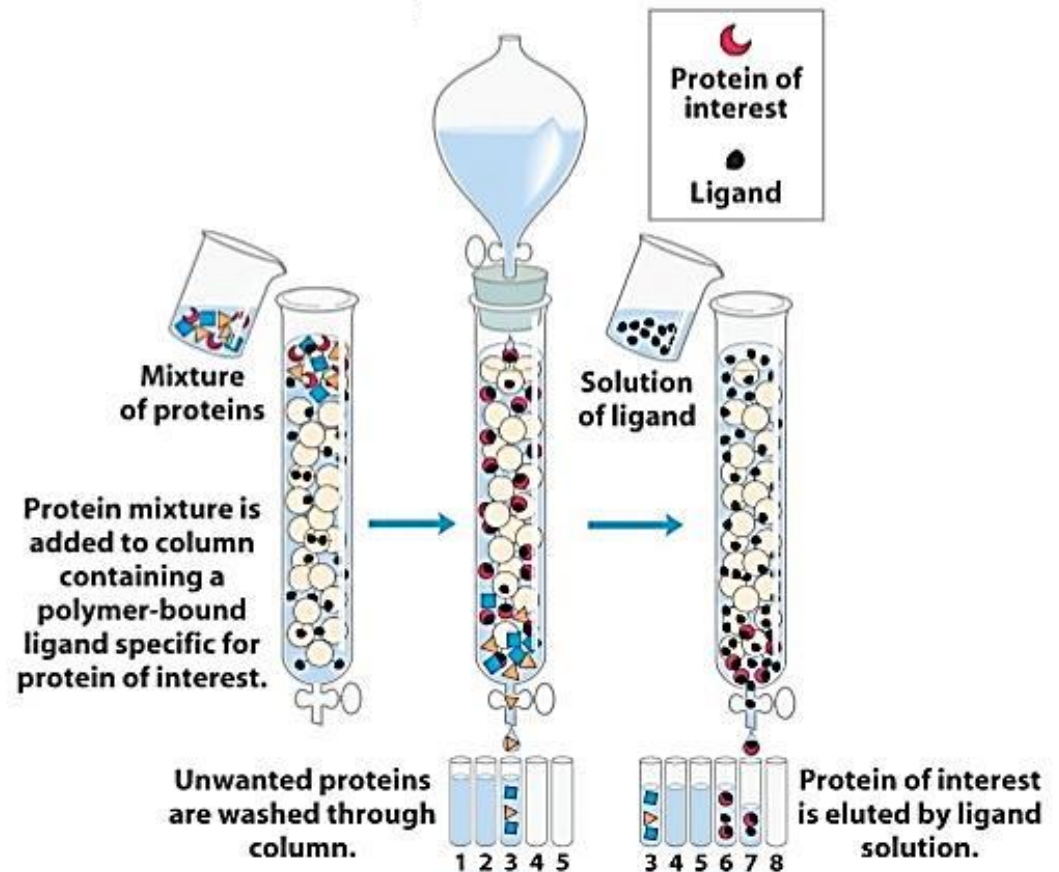
$V = 20.4$ мл/ч (скорость элюции)

$V_{fr} = 3.4$ мл (объем фракции)

- V_t = общий объём колонки
- V_o = объём подвижной фазы снаружи от частиц сефадекса
- V_e = объём, необходимый для элюции компонента
- Коэффициент разделения, $K_d = (V_e - V_o)/V_t$
- $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$
- K_{av} зависит от гидродинамического радиуса молекулы, который пропорционален молекулярному весу и форме молекулы.

Хроматография для анализа белков

- Ионообменная
- Эксклюзионная
- **Афинная**



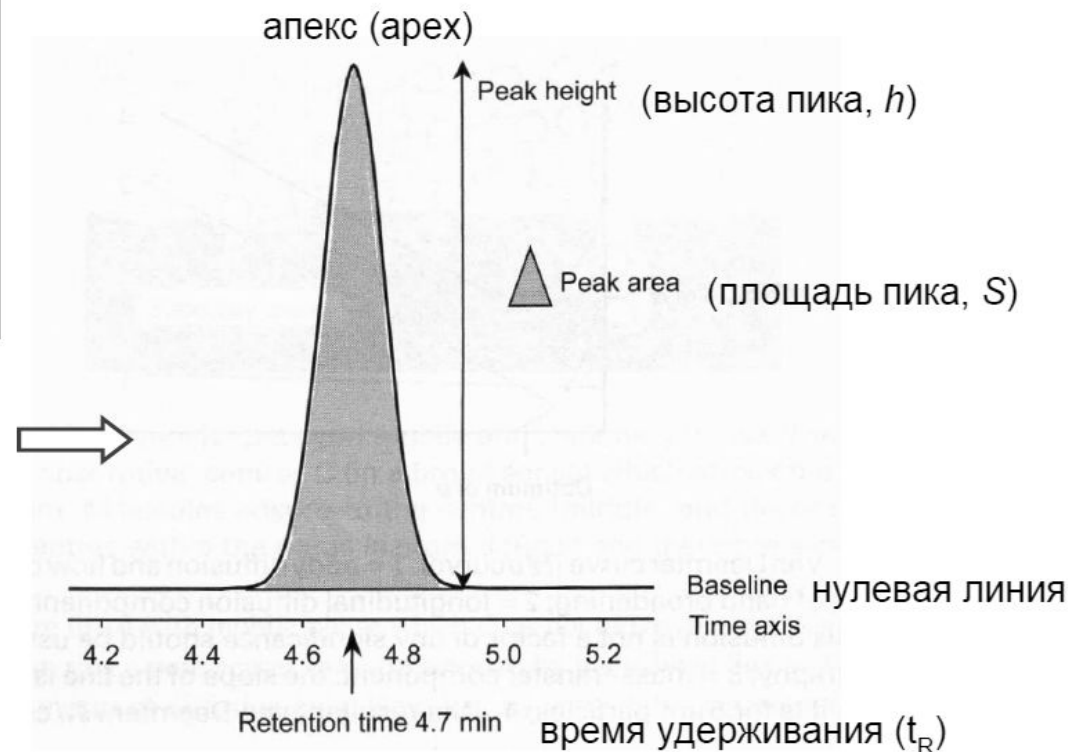
Параметры хроматограммы

Хроматограмма (chromatogram) – графическое отображение хроматографического процесса (формирования хроматографических зон), зависимость интенсивности ответа детектора от времени

Индивидуальные сигналы – **хроматографические пики** (соответствуют хроматографическим зонам)

Качественный параметр - t_R

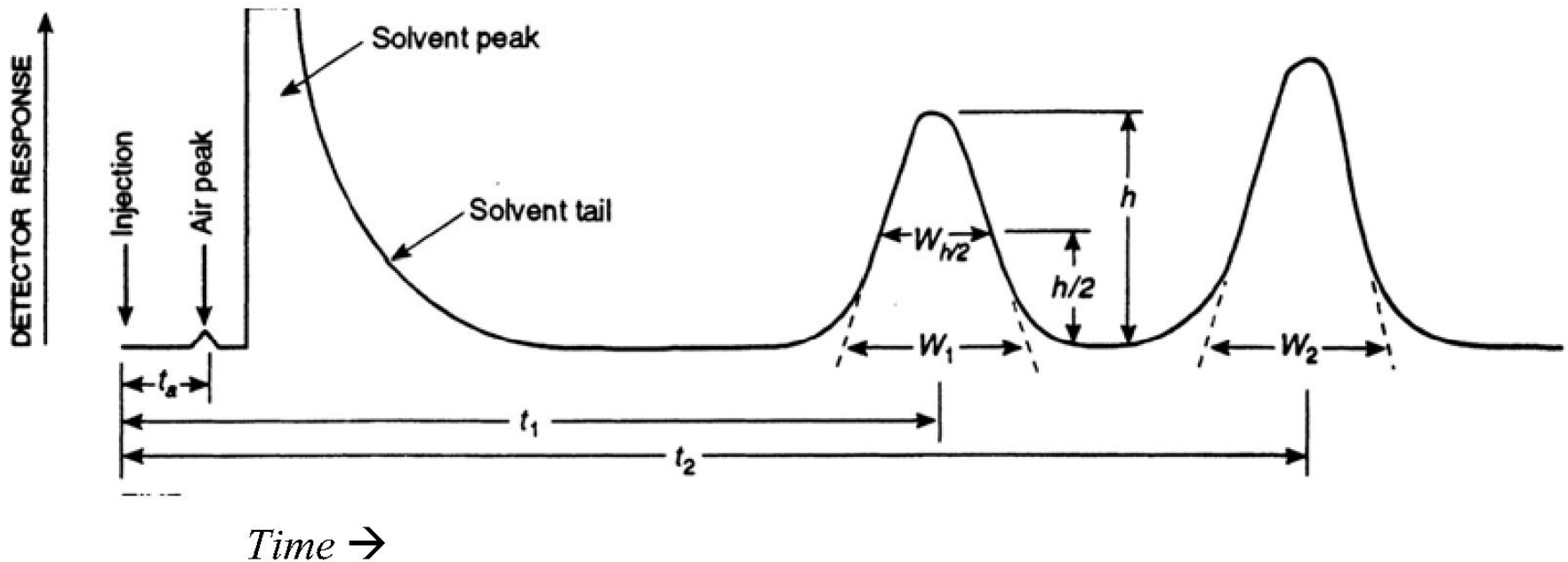
Количественные параметры – S и h



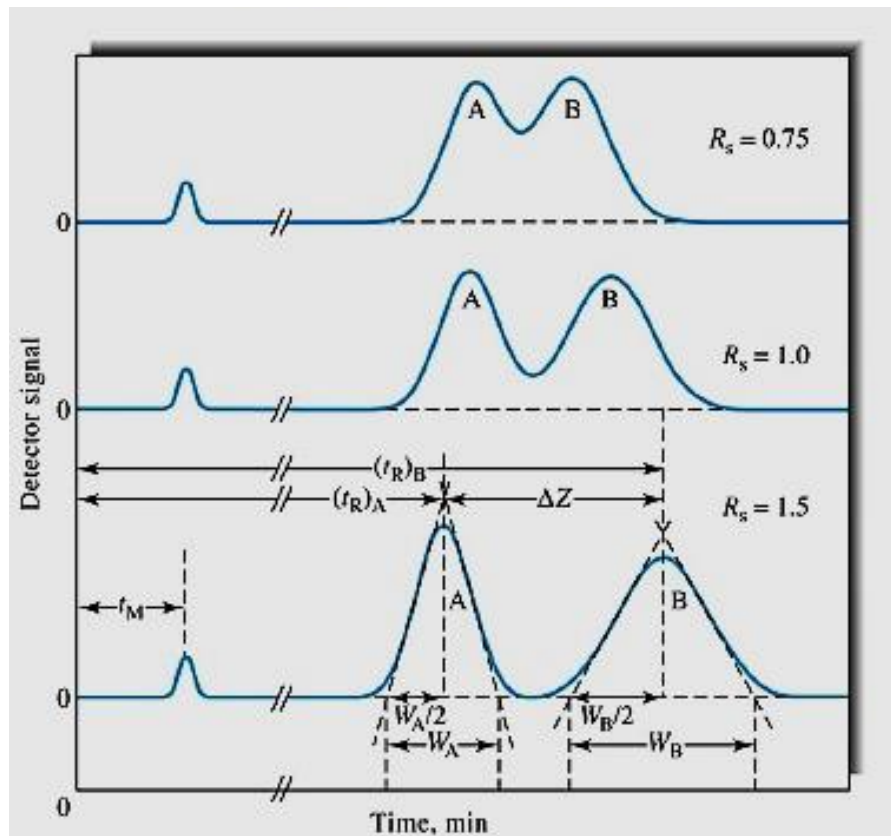
Хроматография: детекция и работа с хроматограммой

Способы детекции:

- Спектрофотометрические
- Визуальная оценка
- Масс-спектрометрия

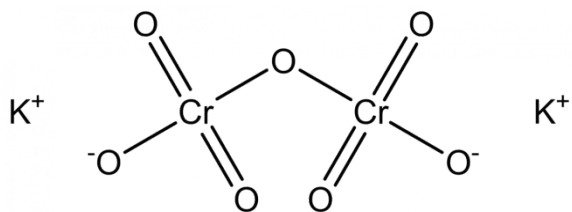
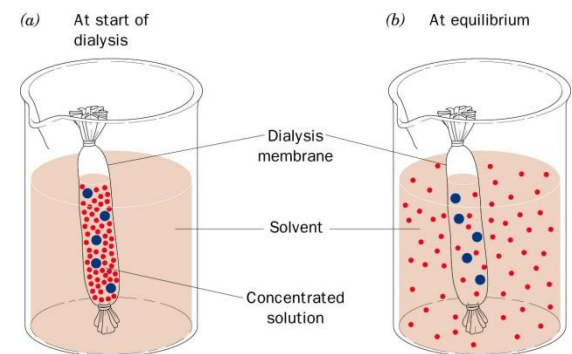
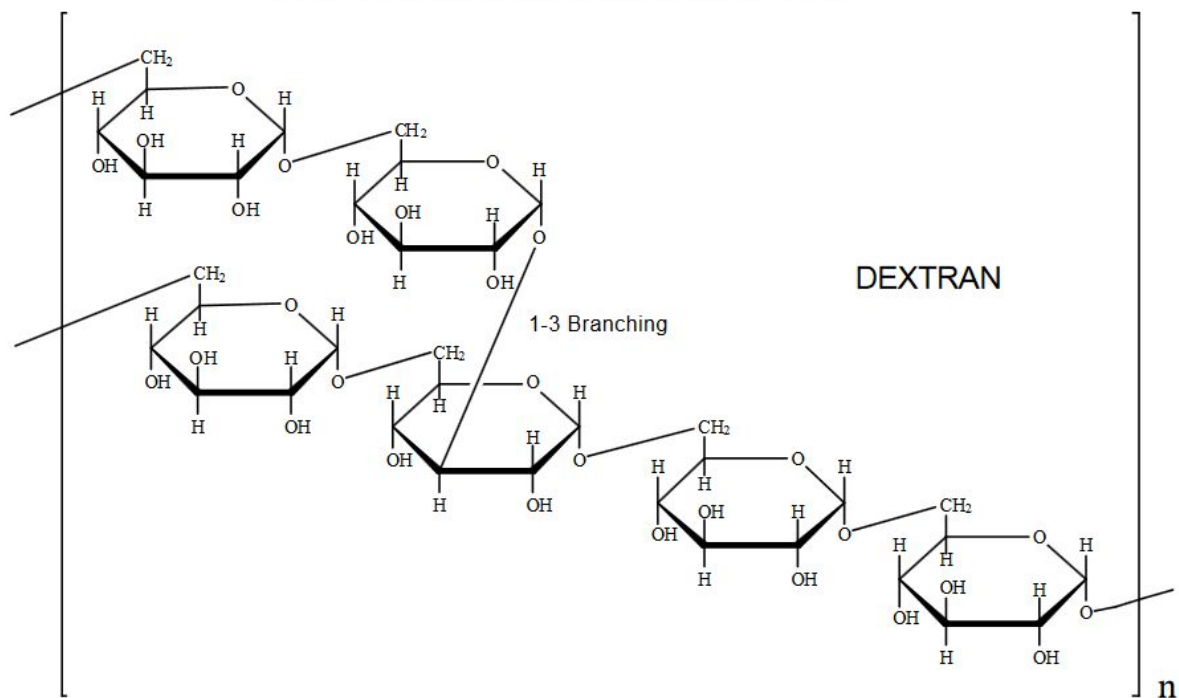


Разрешение хроматограммы



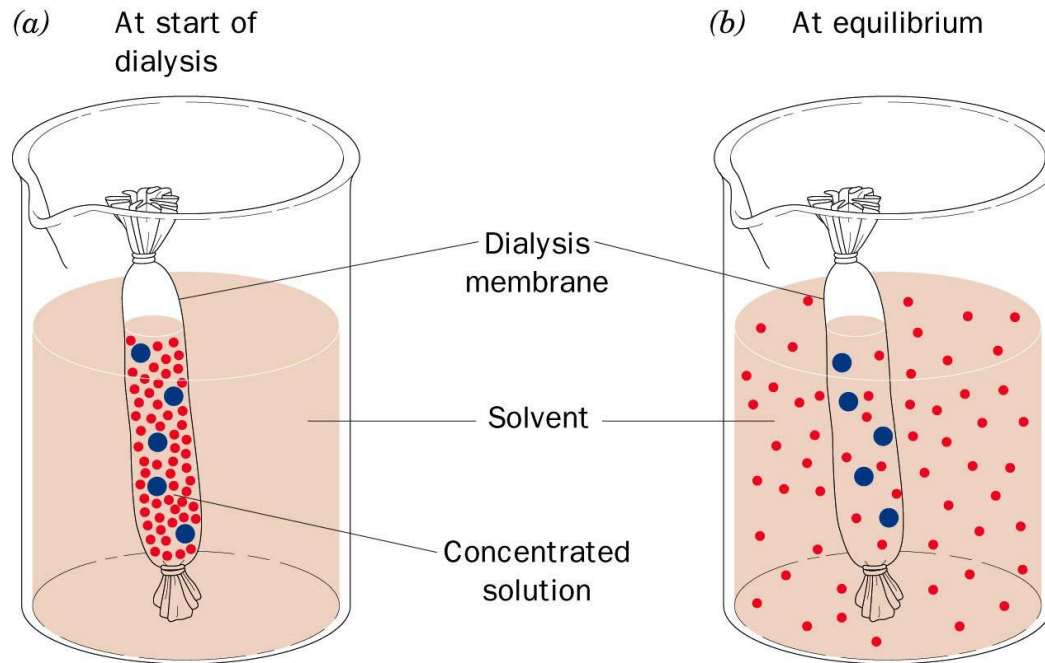
$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{(W_{b2} + W_{b1})/2}$$

Диализ как метод очистки от низкомолекулярных примесей

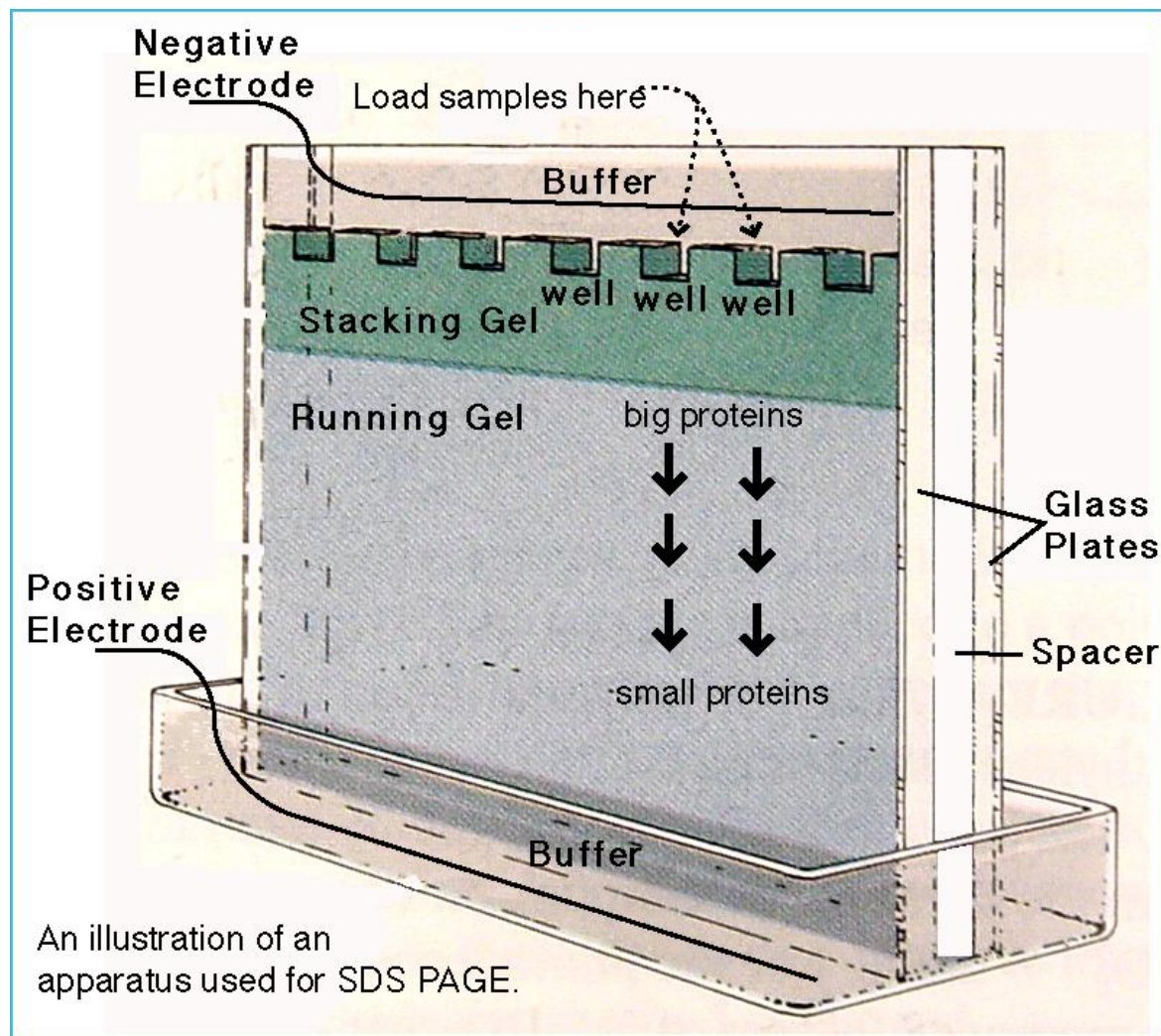


Диализ как метод очистки от низкомолекулярных примесей

- Диализ - очистка коллоидных растворов и субстанций высокомолекулярных веществ от растворённых в них низкомолекулярных соединений при помощи полупроницаемой мембраны.
- При диализе молекулы растворенного низкомолекулярного вещества проходят через мембрану, а неспособные проходить через мембрану частицы остаются за ней.
- Процесс диализа основан на процессах осмоса и диффузии

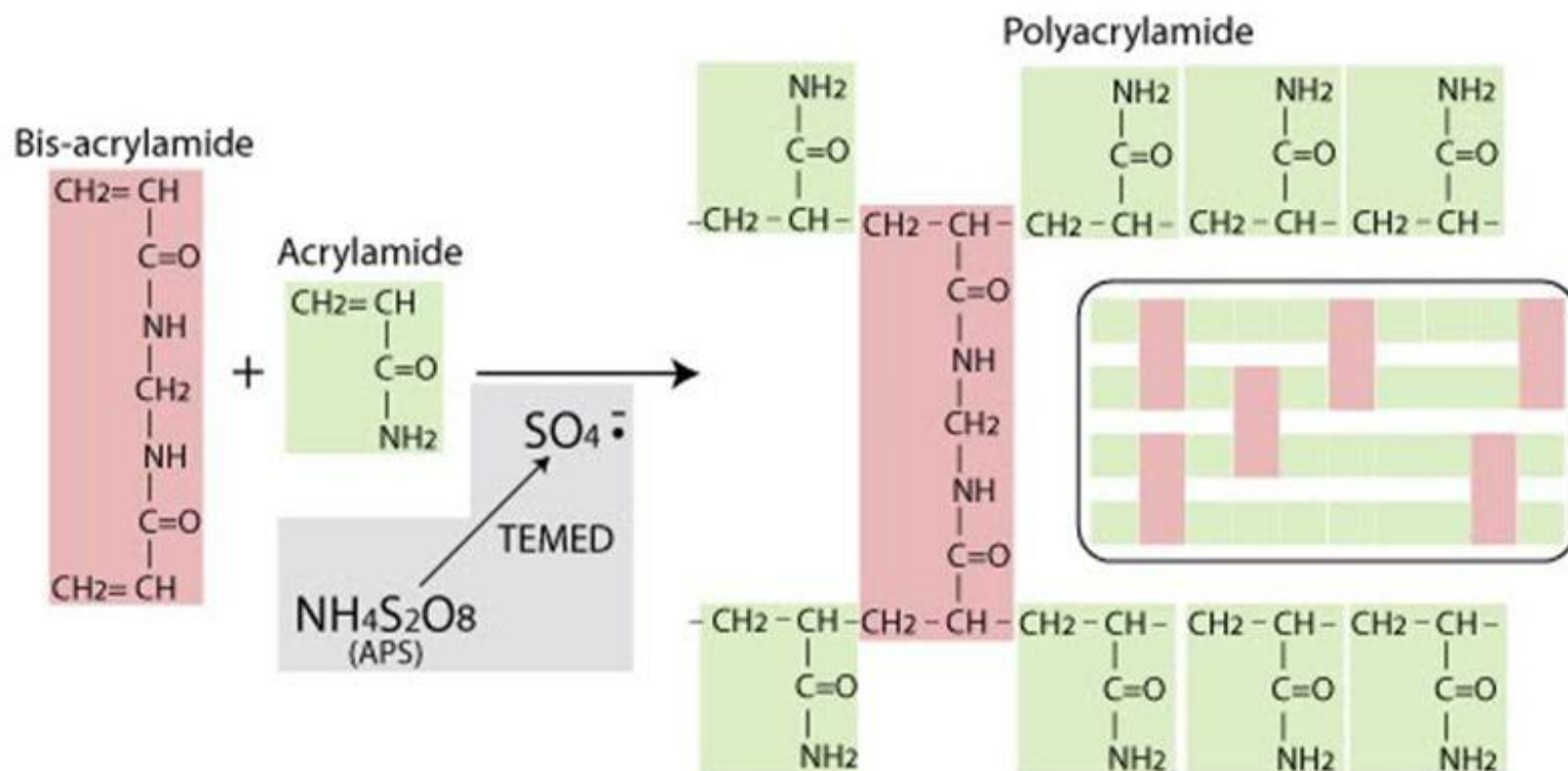


Диск-электрофорез ПААГ в присутствии с ДДС-Na.



Общие принципы электрофореза

Полимеризация геля



Общие принципы электрофореза

