

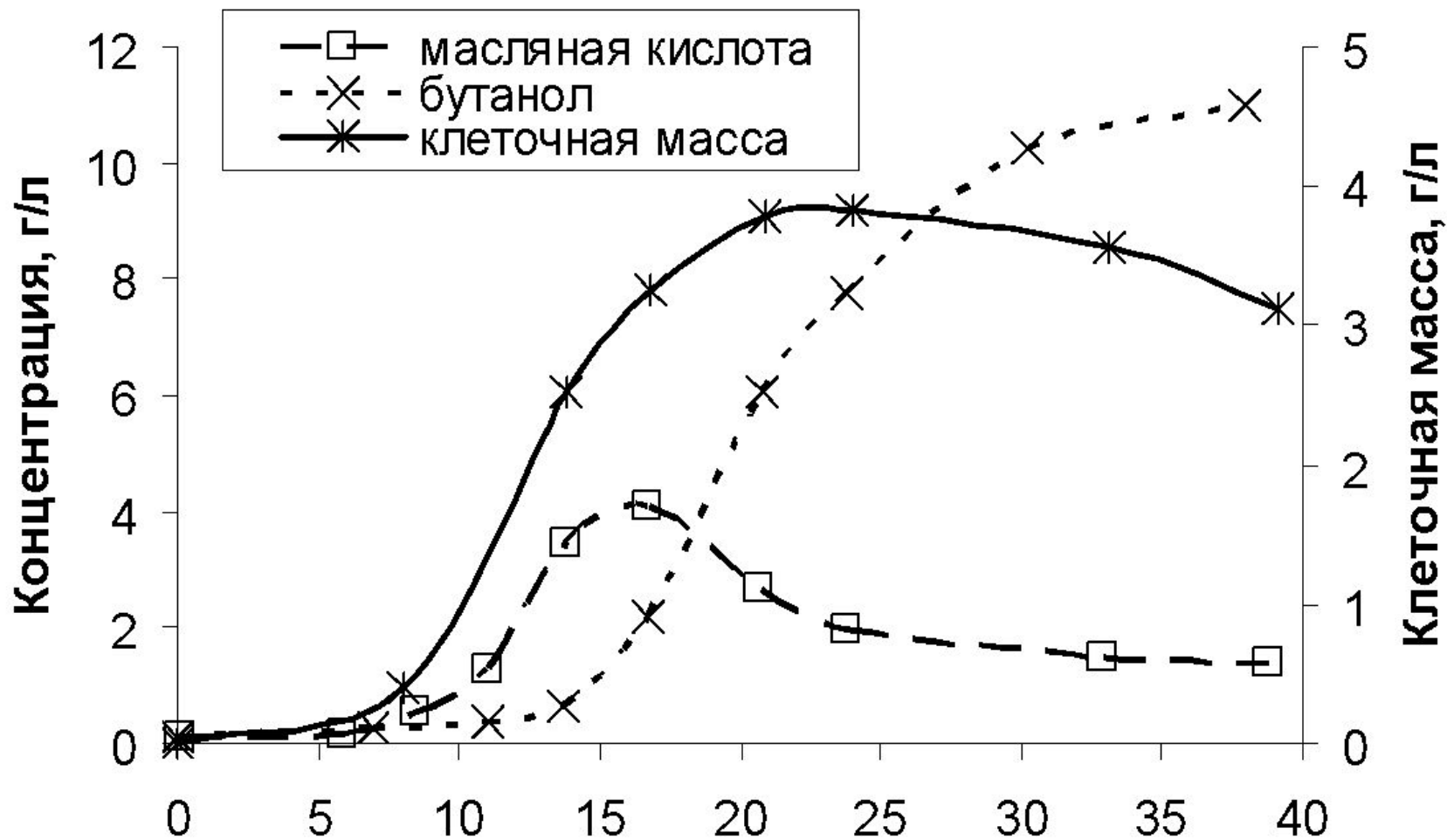


**Демидюк  
Илья  
Валерьевич**

**(499) 196-1853  
duk@img.ras.ru**

# Методы выделения и анализа биологически активных веществ

# ***Методы разрушение клеток (гомогенизация)***



Образование различных веществ в ходе периодического роста *Clostridium acetobutylicum* при pH 5; приведены экспериментально найденные концентрации клеточной массы, масляной кислоты, бутанола.

# Способы разрушения клеток

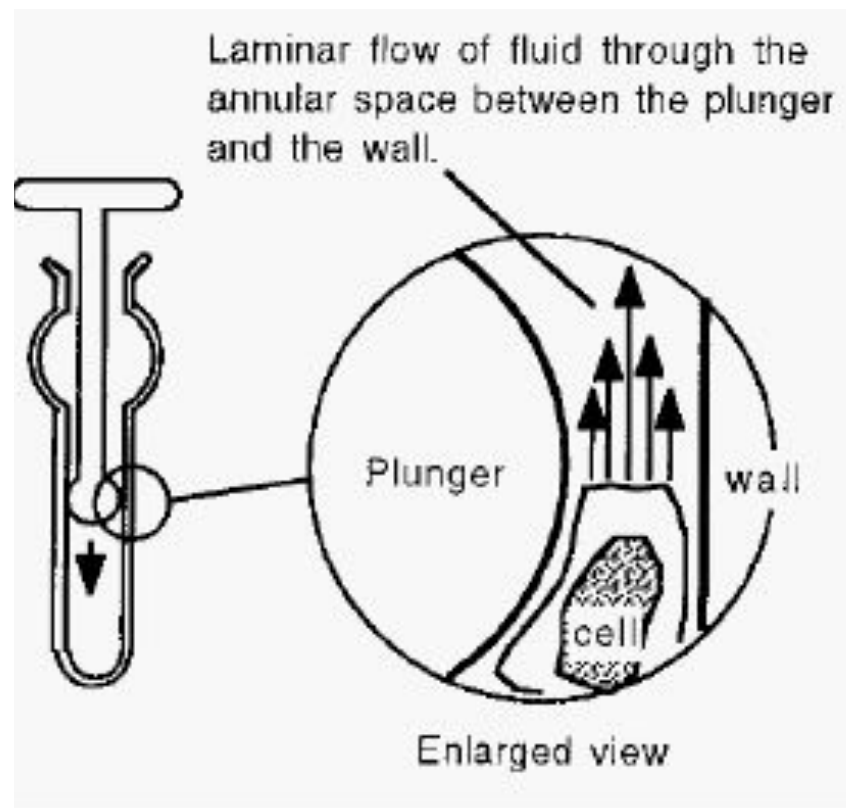
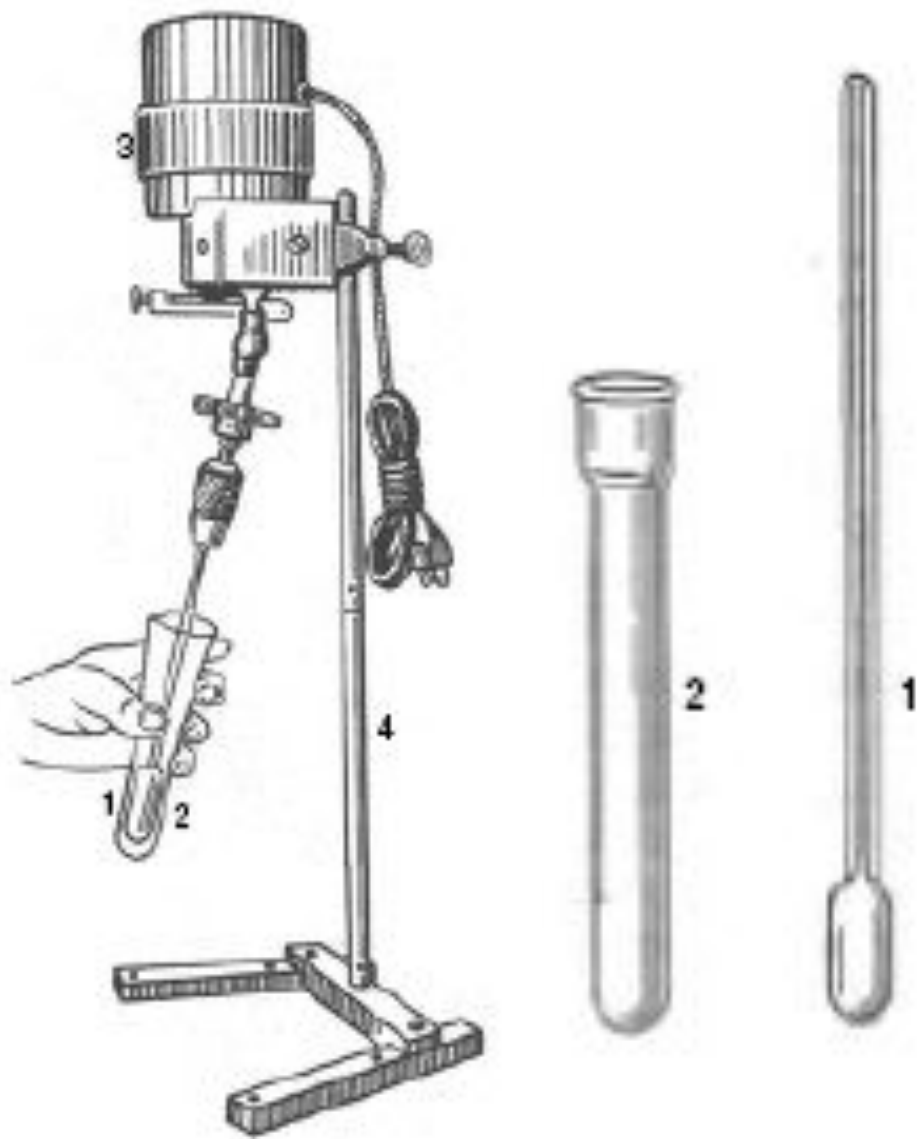
Способ	Пример	Принцип
<i>Мягкое воздействие</i>		
Лизис клеток	Эритроциты	Осмотическое разрушение клеточной мембраны
Разрушение под действием ферментов	Обработка бактерий лизоцимом	Разрушение клеточной стенки приводит к осмотическому разрыву клеточной мембраны
Химическая солюбилизация и автолиз	Экстракция дрожжей толуолом	Клеточная стенка (мембрана) частично растворяется под действием химических веществ, освободившиеся при этом литические ферменты завершают процесс

Способ	Пример	Принцип
<i><b>Мягкое воздействие</b></i>		
Гомогенизация вручную	Ткань печени	Клетки продавливают через узкий зазор, что приводит к разрушению клеточной мембраны
Размельчение (растирание)	Мышечная ткань и др.	Клетки разрушаются в процессе размельчения ткани под действием силы сдвига
<i><b>Воздействие средней силы</b></i>		
Лопастной гомогенизатор	Мышечная ткань, большинство животных тканей, растительные ткани	Происходит механическое разрушение крупных клеток и отделение друг от друга мелких

Способ	Пример	Принцип
<i>Воздействие средней силы</i>		
Растирание с абразивом (например, с песком или окисью алюминия)	Растительные ткани, бактерии	Разрушение клеточных стенок происходит благодаря наличию на частицах абразива микрошероховатостей
<i>Сильное воздействие</i>		
Пресс Френча	Бактерии, растительные клетки	Клетки продавливаются через маленькое отверстие под очень большим давлением; они разрушаются под действием силы сдвига

Способ	Пример	Принцип
<i>Сильное воздействие</i>		
Ультразвук	Суспензии клеток	Ультразвуковые волны создают высокий локальный градиент давления; в результате клетки разрушаются под действием напряжения сдвига и кавитации
Шаровая мельница	Суспензии клеток	Разрушение клеточной стенки происходит под действием быстрой вибрации стеклянных шариков
Гомогенизатор Мэнтон-Гаулина	Суспензии клеток	Действует так же, как и пресс Френча, но позволяет обрабатывать большие количества материала

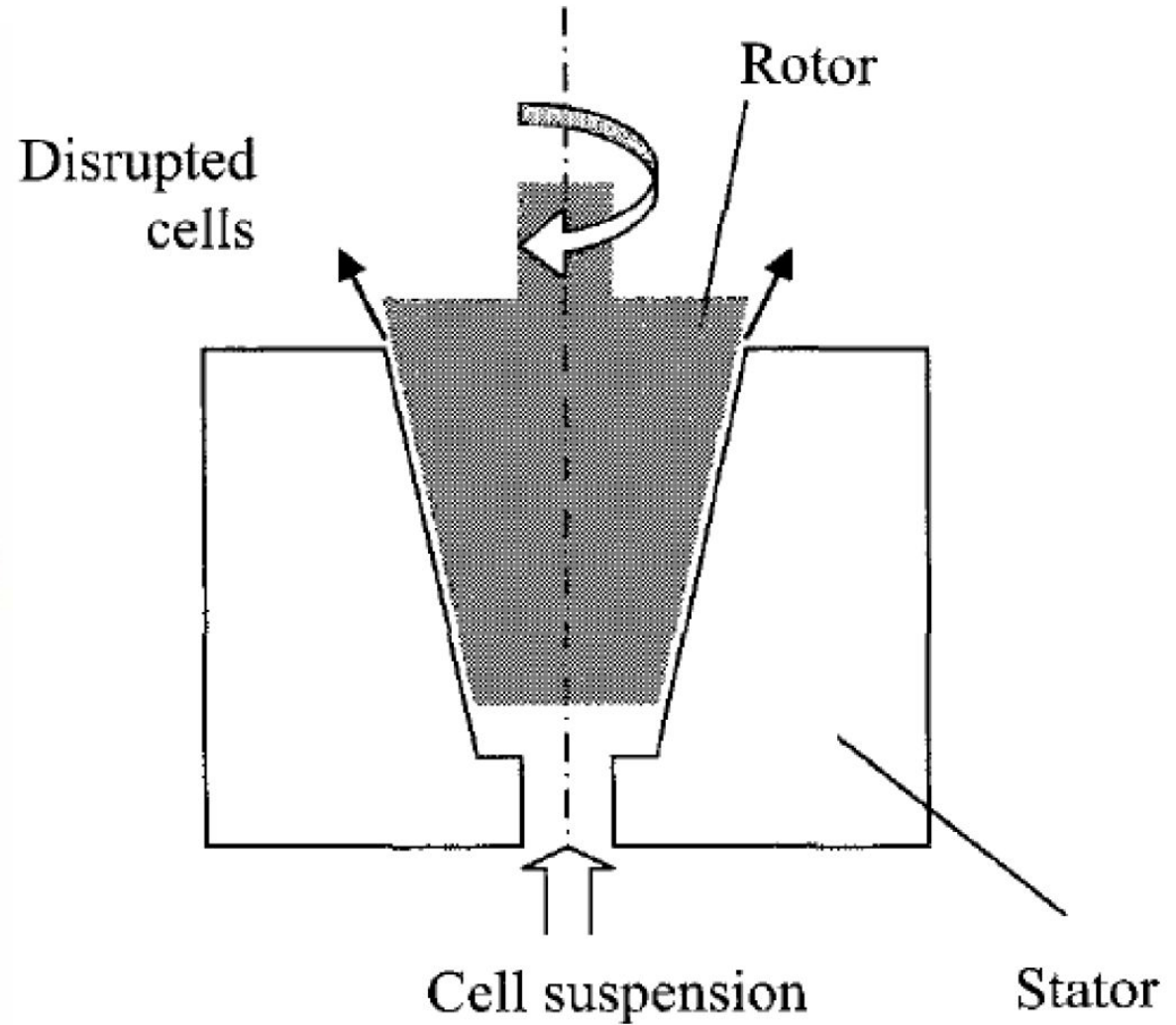


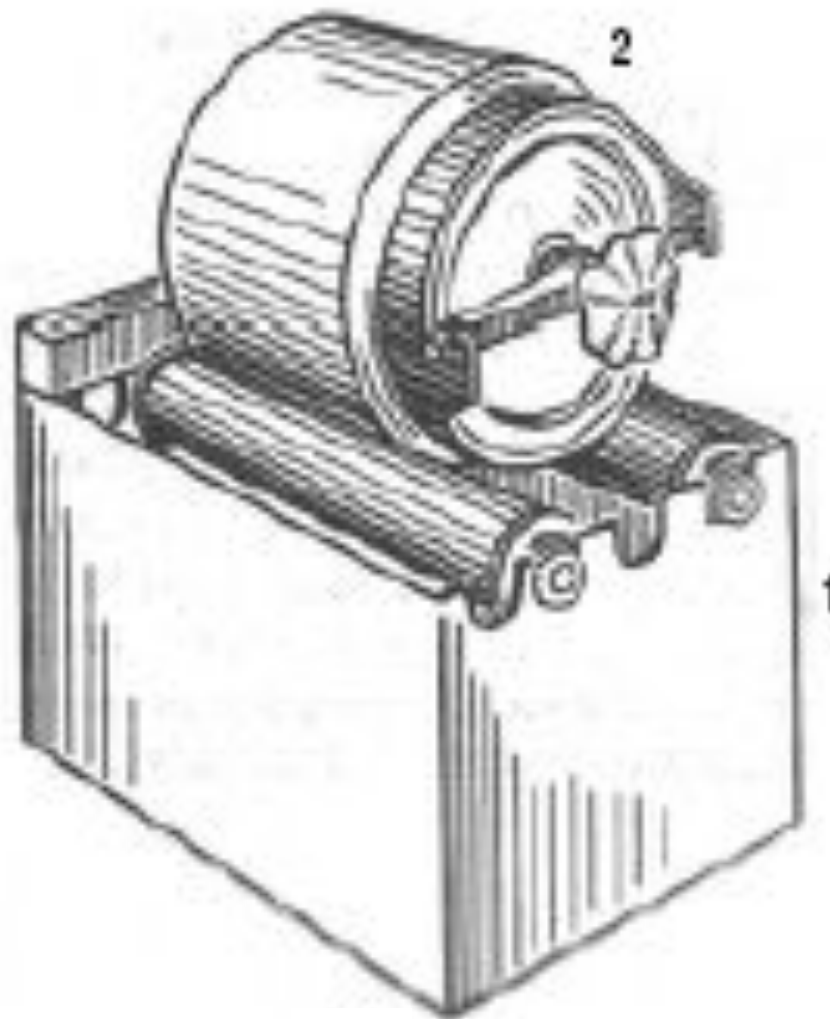
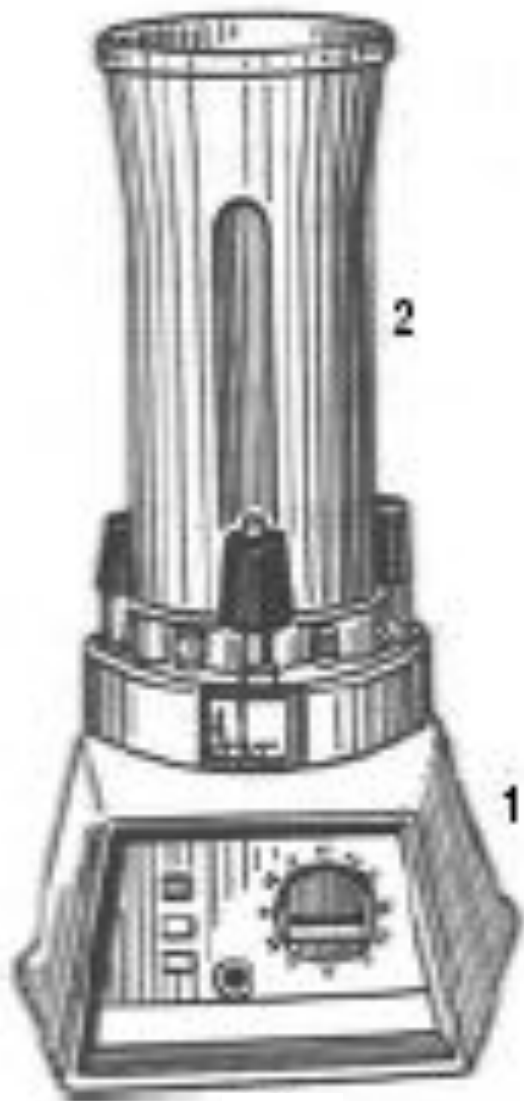


Гомогенизатор Даунса (Dounce)

Пестиковый ручной гомогенизатор  
1 – пестик; 2 – корпус; 3 – мотор; 4 – штатив

# ROTOR-STATOR MILL





Механический лопастной гомогенизатор и шаровая мельница  
1 – корпус с электродвигателем и пусковым устройством;  
2 – камера для измельчения материала

# Механический лопастной гомогенизатор



- 1 – корпус с электродвигателем и пусковым устройством;  
2 – камера для измельчения материала

## Manual Disperser

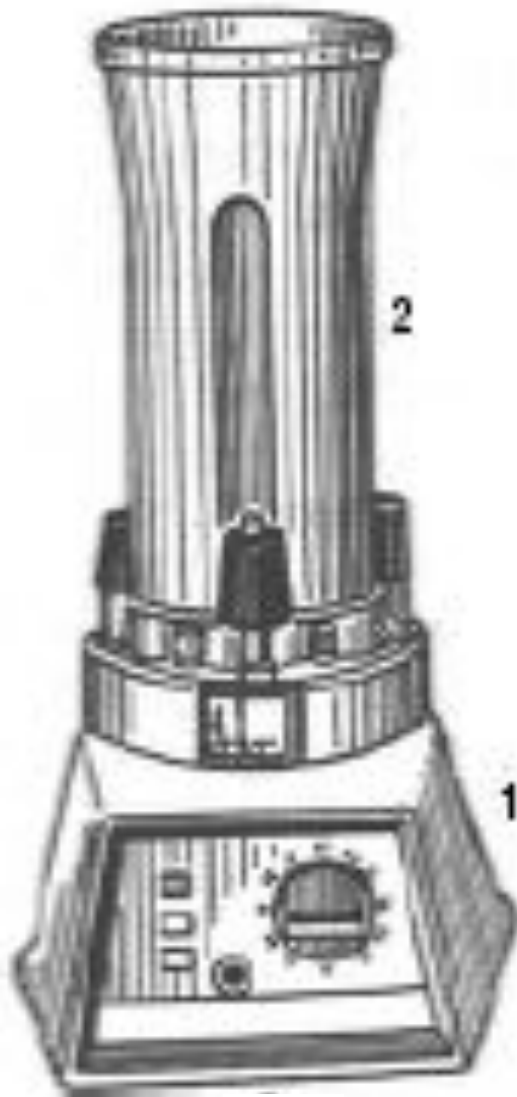
Application volumes  
0.05 - 250 ml



## Applications

- General homogenization applications (dispersion and emulsification)
- **Homogenising of tumour tissue sample, for research of diverse tissue diseases**
- Fast dissolving of pills, sugar-coated tablets for quality control purposes
- Sample preparation for subsequent extraction of pharmaceutical agents
- **Cell disruption, RNA / DNA isolation from tissue**
- **Dispersion of small quantities from plants, animals or human tissue**
- Solving of solid materials

# Механический лопастной гомогенизатор



1 – корпус с электродвигателем и пусковым устройством;  
2 – камера для измельчения материала

## Manual Disperser

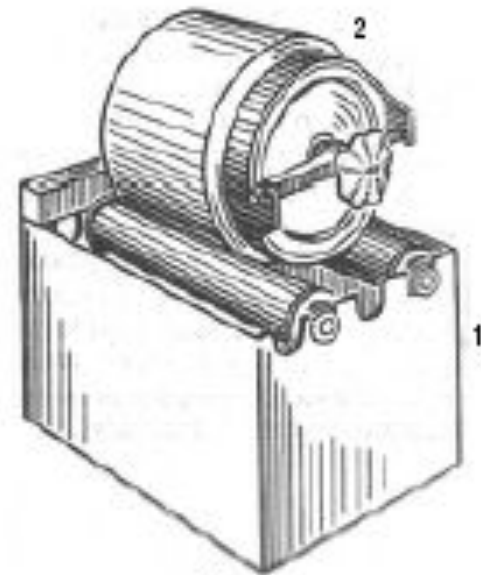
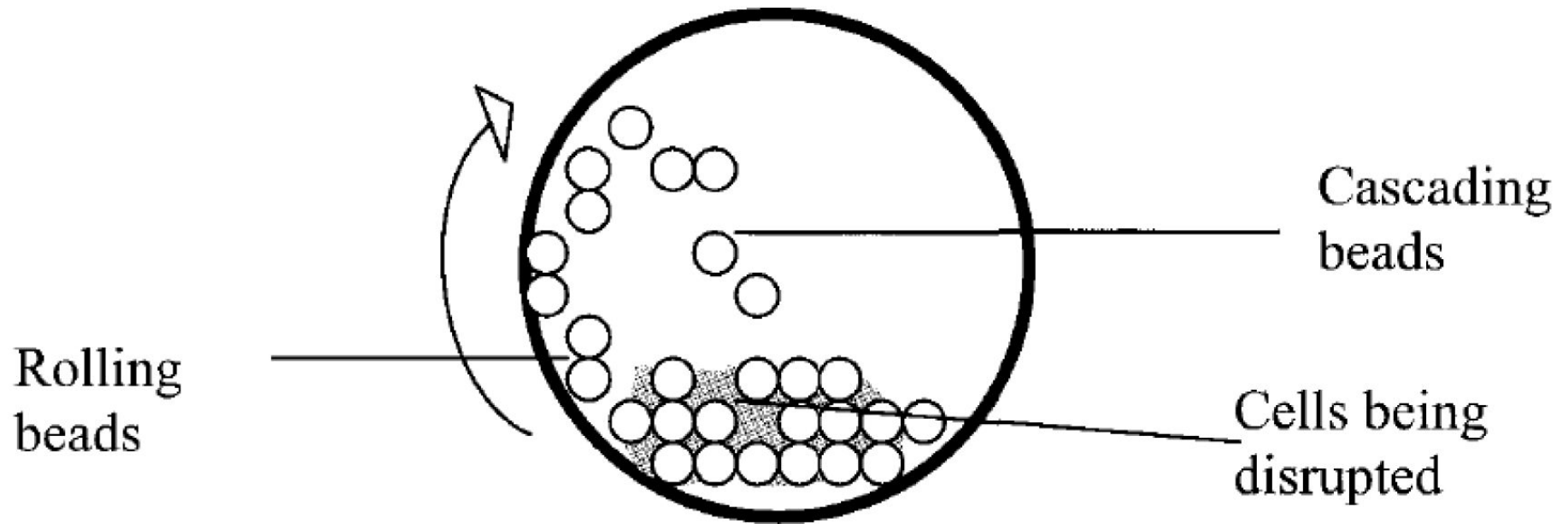
Application  
volumes  
0.05 - 250 ml



## Applications

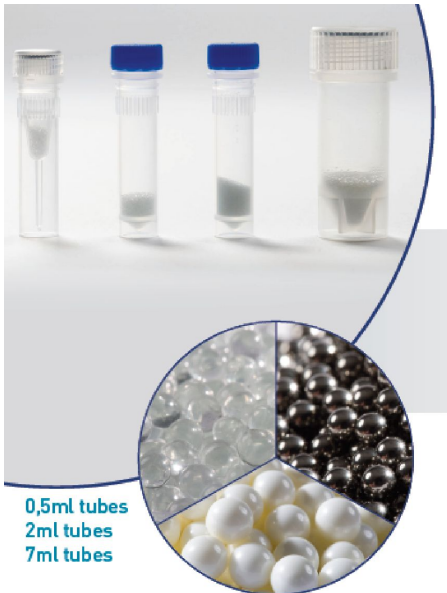
- General homogenization applications (dispersion and emulsification)
- Homogenising of tumour tissue sample, for research of diverse tissue diseases
- Fast dissolving of pills, sugar-coated tablets for quality control purposes
- Sample preparation for subsequent extraction of pharmaceutical agents
- Cell disruption, RNA / DNA isolation from tissue
- Dispersion of small quantities from plants, animals or human tissue
- Solving of solid materials

# ШАРОВАЯ МЕЛЬНИЦА

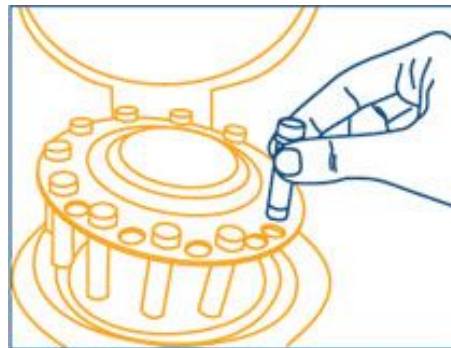


# 3D гомогенизаторы

Технология основана на растирающем действии лизирующих частиц при 3D-движениях вибрационного ротора. Высокоэффективный принцип позволяет гомогенизировать и лизировать образец любой сложности в считанные секунды.



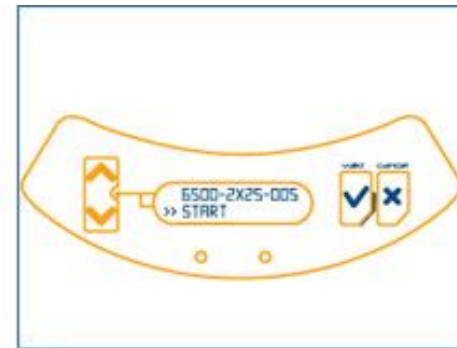
0,5ml tubes  
2ml tubes  
7ml tubes



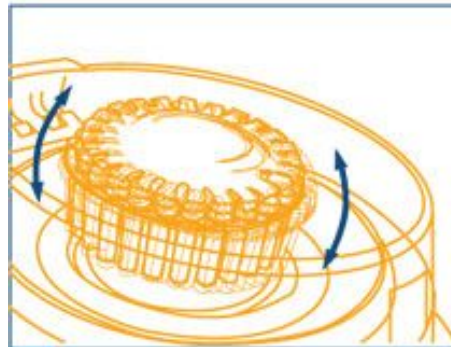
1 Загрузка образцов



2 Блокировка пробирок:  
быстро и надежно



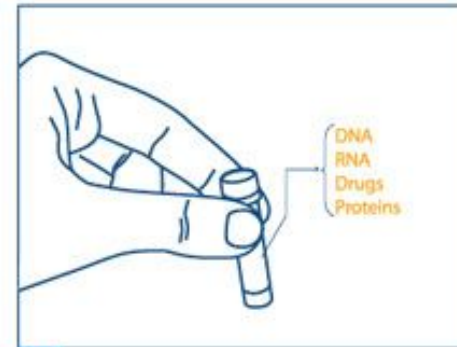
3 Установка скорости/ времени/  
количества циклов



4 3D-движения обеспечивают  
эффективную гомогенизацию.



5 Растирающие движения лизиру-  
ющих частиц в каждой пробирке  
обеспечивают высвобождение



6 Образец готов к дальнейшему  
анализу менее чем за 30  
секунд!



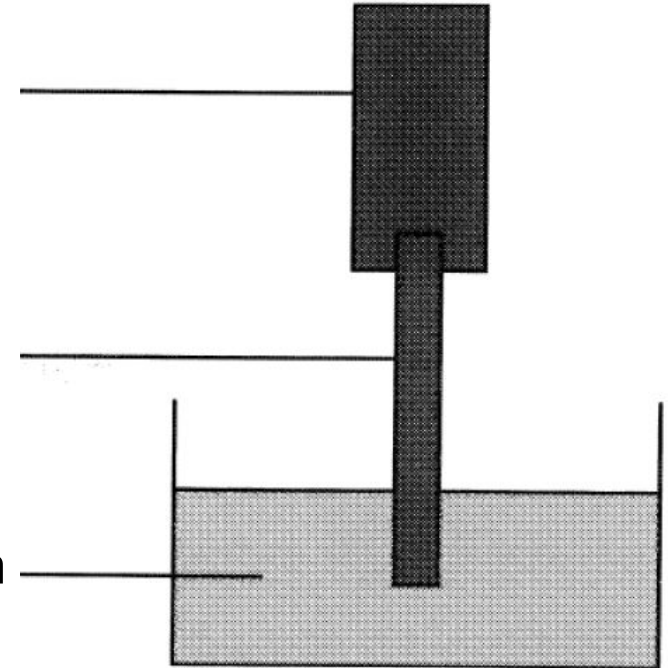


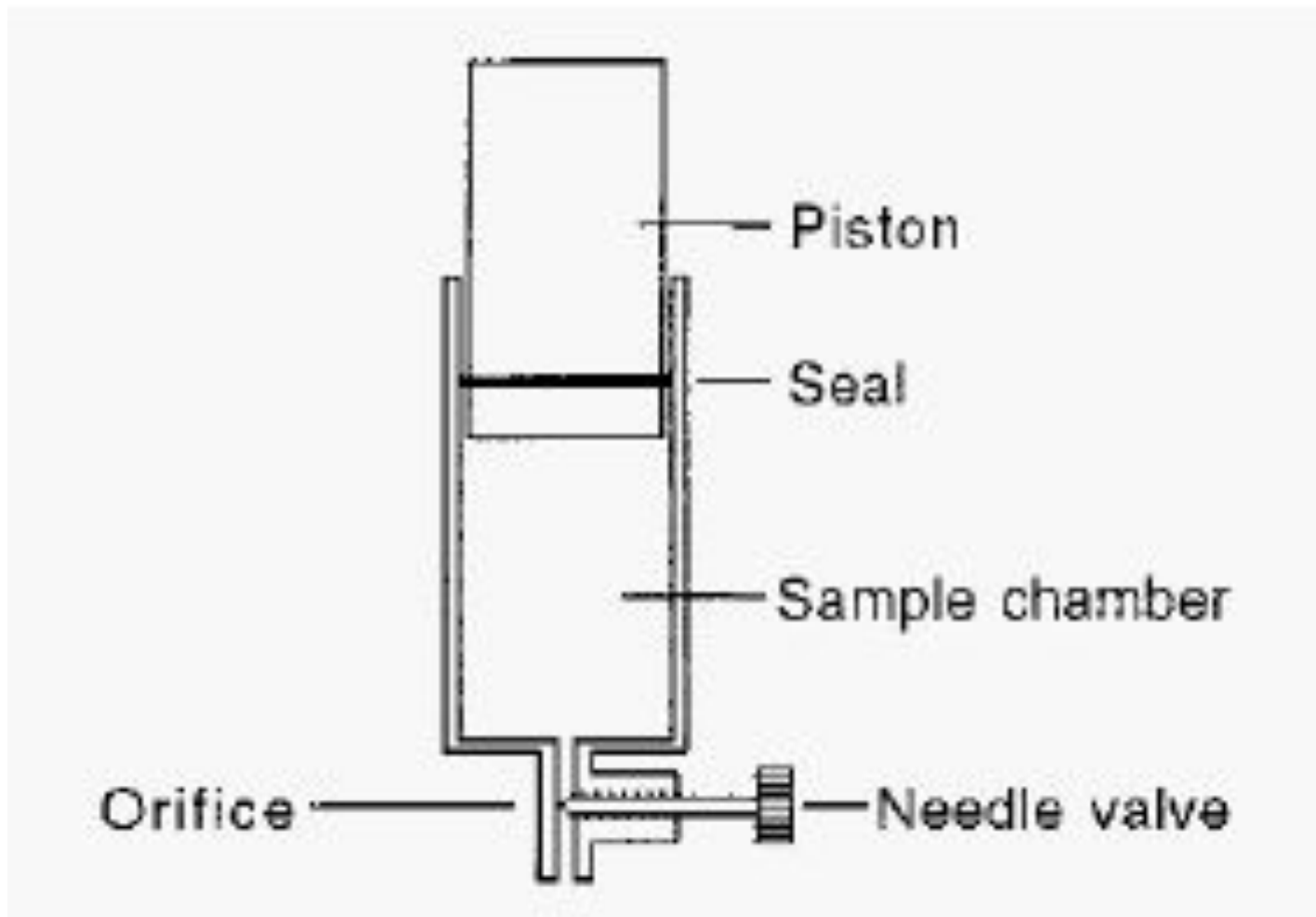
# Ультразвуковой дезинтегратор

Ultrasound generator

Ultrasound tip

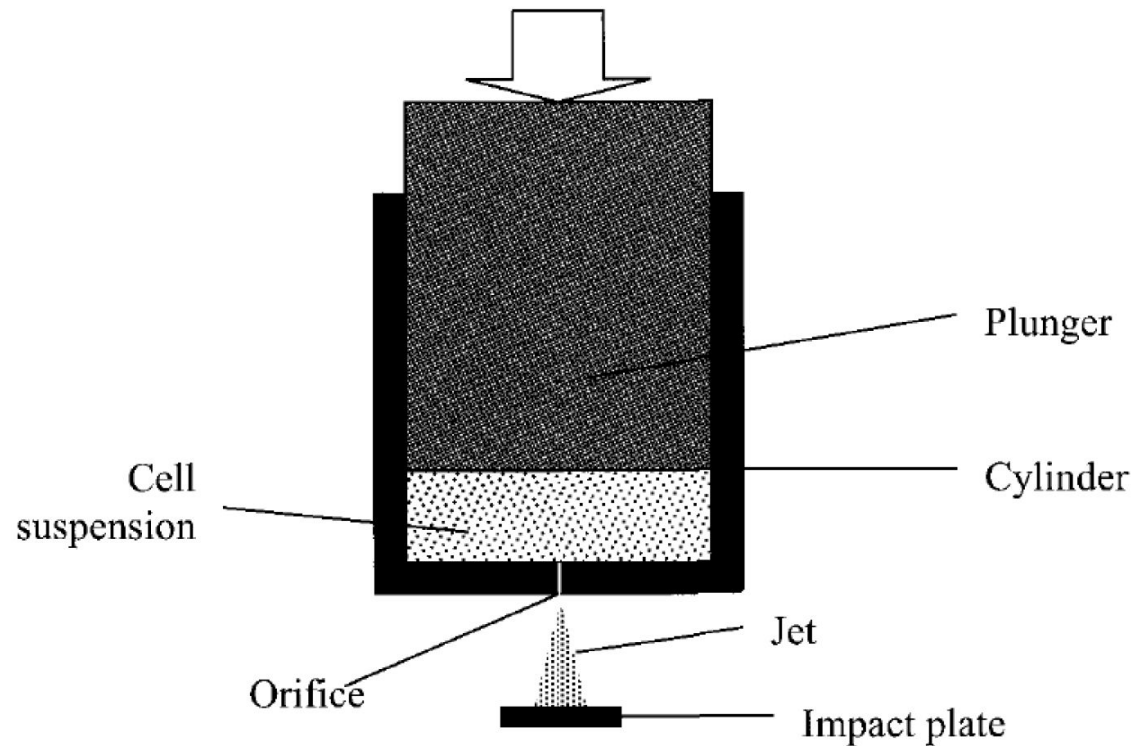
Cell suspension





Ячейка пресса Френча

# Пресс Френча



## Ячейка пресса Френча

# *Некоторые примеры*

## 1. Ткани животных

Ткань разрезают на кусочки, удаляют, насколько это возможно, соединительную ткань и жир. Разрезанную ткань помещают в лопастной гомогенизатор, добавляют 2-3 объема холодного экстрагирующего буфера в расчете на 1 г ткани. Смесь гомогенизируют в течение 30 с; гомогенизацию повторяют, если остались куски неразрушенной ткани. При доведении рН до нужного значения перемешивают гомогенат 10-15 мин, а затем переносят его в центрифужные пробирки и центрифугируют при 5000-10000g 60 мин. Экстракт сливают через фильтр, марлю или стеклянную вату для удаления частиц жира.

## 2. Эритроциты

Экстракт можно легко получить из осажденных центрифугированием эритроцитов после промывания их изотоническим раствором NaCl (0,9%, 0,15 M). Клетки разрушают осмотическим шоком в воде (2 объема на воды на 1 объем отцентрифугированных клеток).

### 3. Мягкие растительные ткани

К растительной ткани добавляют только 0,5-1 объем холодного буфера, содержащего 20-30 мМ меркаптоэтанола. и гомогенизируют в лопастном гомогенизаторе в течение 30 с. Вместо этого можно пропустить материал через бытовую соковыжималку или натереть на терке. Гомогенат следует отцентрифугировать как можно скорее, чтобы уменьшить его потемнение в результате окисления. Жидкость осторожно сливают с поверхности осадка.

### 4. Дрожжи

1. Полностью разрушить клетки можно с помощью гомогенизатора Мэнтон-Гаулина, используя около двух объемов буфера на 1 г сырой массы.
2. Автолиз толуолом. Применяют различные методы с использованием толуола. В основе этих методов лежит обработка дрожжей толуолом, обычно при температуре 35-40°C. Через 20-30 мин дрожжи "разжижаются" вследствие экстракции компонентов клеточной стенки. После этого к дрожжам добавляют буфер и перемешивают их в течение нескольких часов или оставляют на ночь на холоде. Так как метод автолитический и структуры клеточной стенки разрушаются под действием ферментов, во время обработки может произойти деградация некоторых клеточных белков.

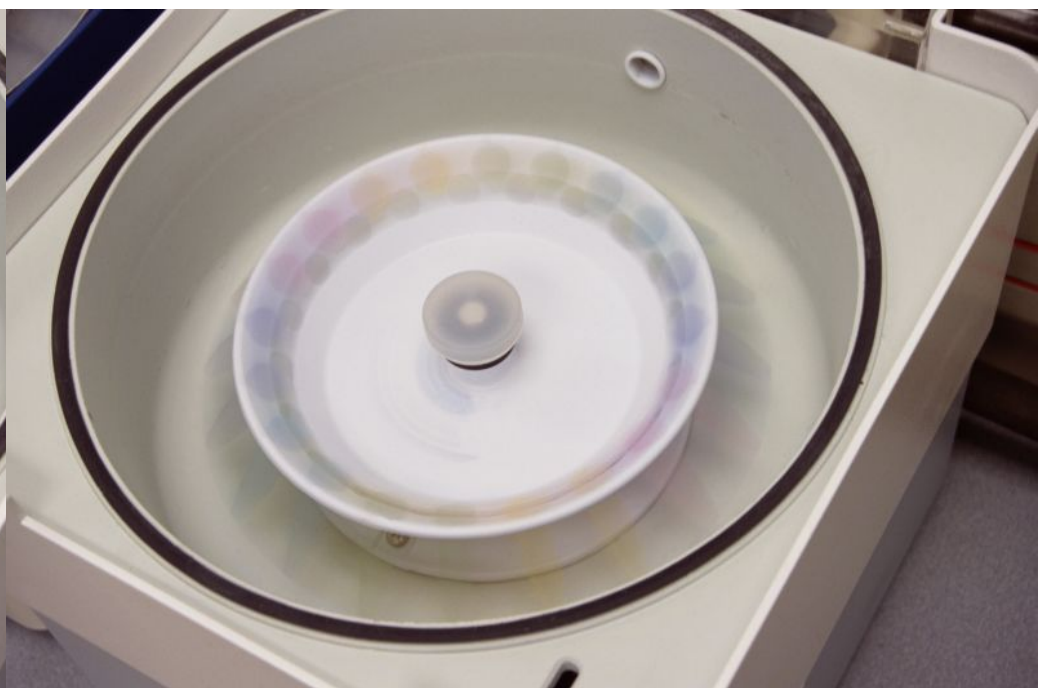
## 5. Бактерии

Бактериальные клетки можно разрушить ультразвуком, с помощью шаровой мельницы или прессы Френча, хотя не все эти способы удобны для приготовления больших объемов экстракта. В случае небольших объемов клетки можно растирать с окисью алюминия. Грамположительные бактерии обычно чувствительны к лизоциму. (*Bacillus*). Грамотрицательные бактерии, если их предварительно не обрабатывать, менее чувствительны к лизоциму (*E. coli*).

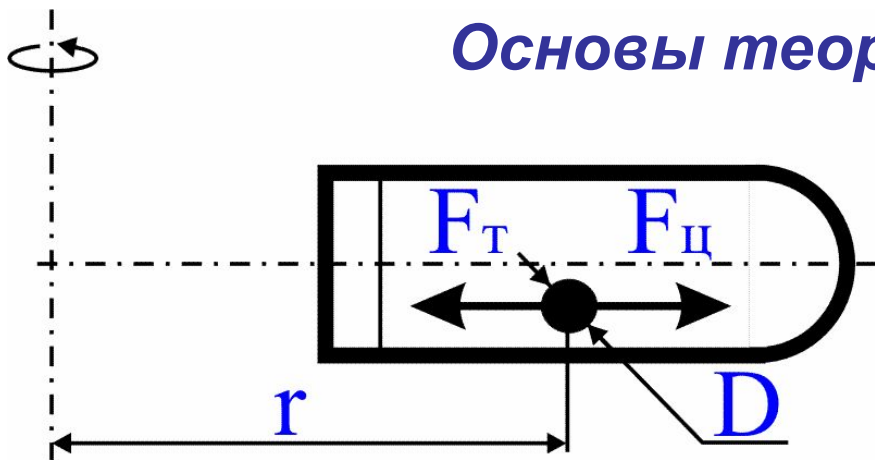
### *Извлечение мембранных белков*

При извлечении белков связанных с мембранами эффективным является применение детергентов. Часто для этой цели используется мягкий неионный детергент Тритон X-100. Детергенты способны растворить клеточную мембрану и солюбилизировать белок сохранив при этом его целостность.

# Центрифугирование



## Основы теории седиментации



Частица (в том числе и макромолекула) в пробирке вращающегося ротора испытывает действие радиально направленной центробежной силы  $F_{ц}$ .

$$F_{ц} = M\omega^2 r, \text{ где } \omega \text{ — угловая скорость вращения, рад/с;}$$

$r$  — радиус вращения, см.

$$a_{ц} = r\omega^2 \text{ — центробежное ускорение.}$$

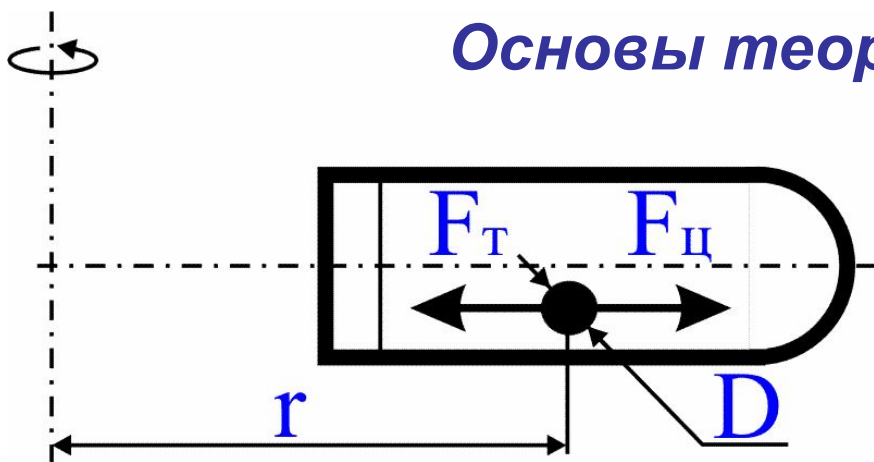
$$M = V(\rho - \rho_c), \text{ где } \rho \text{ и } \rho_c \text{ — плотность соответственно частицы и среды, г/см; } V \text{ — объем частицы, см}^3.$$

Для сферической частицы диаметром  $D$ :  $V = \frac{1}{6}\pi D^3$ , тогда

$$F_{ц} = \frac{1}{6}\pi D^3 (\rho - \rho_c)\omega^2 r$$



# Основы теории седиментации



Частица движется вдоль радиуса со скоростью  $v$  (см/с), при этом сила трения действует в обратном направлении:

$$F_m = fv, \text{ где } f \text{ — коэффициент трения.}$$

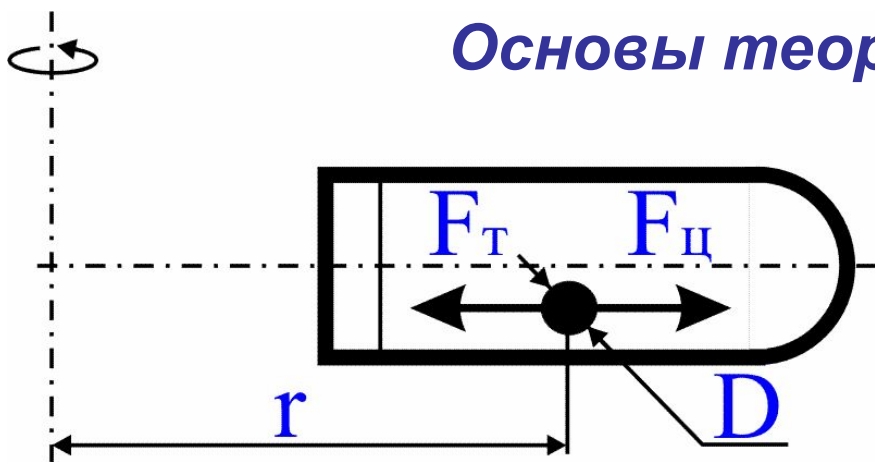
Согласно закону

Стокса

$$f = 3\pi\eta_c D, \text{ где } \eta_c \text{ — вязкость среды в сантипуазах.}$$

Таким образом:  $F_m = 3\pi\eta_c Dv$

## Основы теории седиментации



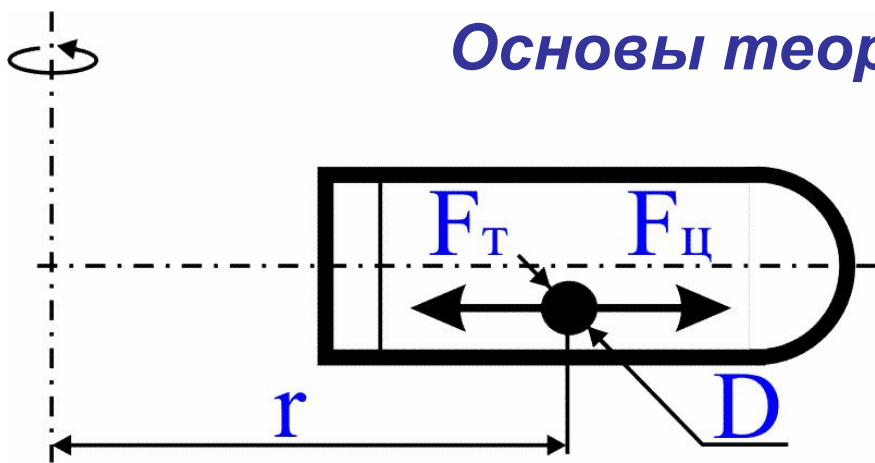
Скорость частицы под действием центробежной силы будет нарастать до тех пор, пока сила трения не уравновесит центробежную силу (после этого скорость станет постоянной):

$$F_{ц} = F_{т} \quad \text{или} \quad \frac{1}{6} \pi D^3 (\rho - \rho_c) \omega^2 r = 3\pi \eta_c D v$$

Отсюда:

$$v = \frac{1}{18} \frac{D^2 (\rho - \rho_c) \omega^2 r}{\eta_c}$$

## Основы теории седиментации



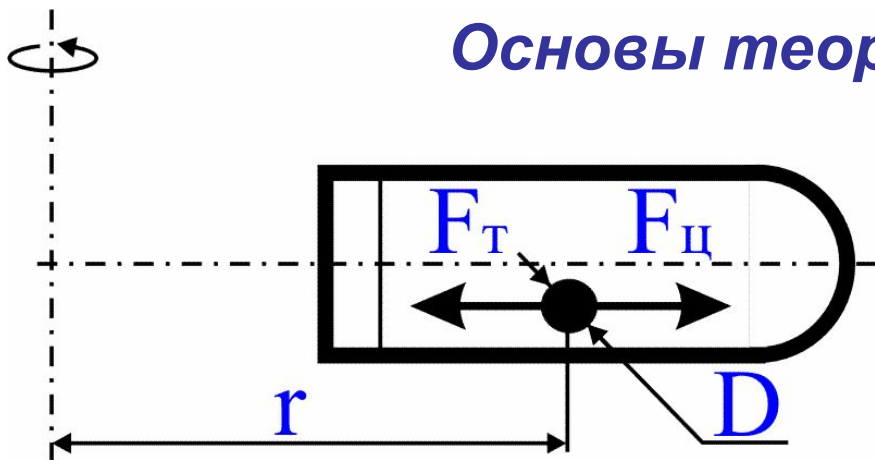
От угловой скорости вращения  $\omega$  легко перейти к угловой скорости  $n$  в об/мин или  $N$  тыс. об/мин:

$$\omega = 2\pi n / 60 = 2\pi N \cdot 1000 / 60, \text{ тогда}$$

$$\omega^2 = 1,097 \cdot 10^4 N^2 \text{ и}$$

$$v = k \frac{D^2 (\rho - \rho_c) N^2 r}{\eta_c}, \text{ где } k = \frac{1,097 \cdot 10^4}{18}$$

## Основы теории седиментации



$$v = k \frac{D^2 (\rho - \rho_c) N^2 r}{\eta_c}$$

*Выводы из рассмотренной зависимости:*

- При одинаковых плотностях частицы большего размера оседают быстрее чем мелкие ( $D$ ).
- Скорость оседания пропорциональна плотности частицы, особенно сильно это проявляется когда плотность частицы и среды близки.
- Скорость оседания пропорциональна квадрату числа оборотов ротора.
- Скорость оседания обратно пропорциональна вязкости среды.
- Скорость оседания пропорциональна расстоянию от оси вращения. Это расстояние увеличивается по мере оседания и следовательно возрастает скорость. Если это почему-либо нежелательно следует создать градиент плотности среды так, что бы она увеличивалась по мере удаления от оси.

## ***Коэффициент седиментации***

$$s = v / \omega^2 r = k' \frac{D^2 (\rho - \rho_c)}{\eta_c}$$

## *Плавучая плотность частиц*

Плотность частицы обусловлена не только ее химическим составом и пространственной структурой, но и количеством прочно связанной с ней воды. Эта вода движется вместе с частицей, значительно уменьшая ее эффективную плотность. Количество связанной с частицами воды уменьшается в присутствии высокой концентрации ионов и гидрофильных молекул. Они связывают воду, тем самым препятствуя гидратации частиц. С другой стороны, некоторые ионы или молекулы могут прочно связываться с частицами, увеличивая, как правило, их эффективную плотность.

Таким образом, **эффективная плотность частиц, определяющая скорость их оседания, сильно зависит от химической природы и концентрации веществ, растворенных в среде, в которой ведется центрифугирование.** Поэтому для данных частиц в данной среде вводят понятие «плавучей плотности». Ее можно определить экспериментально, измерив плотность среды, в которой движение частиц прекращается, как только разность  $\rho - \rho_c$  становится равной нулю.

Плавучая плотность частиц определенной химической природы может изменяться очень сильно. Например, **плавучая плотность ДНК в воде составляет примерно  $1,1 \text{ г/см}^3$ , а в концентрированном растворе CsCl - около  $1,7 \text{ г/см}^3$ .** Плавучая плотность как и степень гидратации зависит от температуры (также как плотность и вязкость).

# Центробежное ускорение и относительное центробежное ускорение

Условия центрифугирования описывают двумя параметрами один из которых время, а второй угловая скорость в об/мин или относительное центробежное ускорение. Относительное центробежное ускорение это отношение центробежного ускорения к ускорению силы тяжести Земли:

$$a_{ц}^{отн} = \frac{a_{ц}}{g} \quad a_{ц} = r\omega^2$$

Шкалы центрифуг калиброваны в тех или других единицах, иногда. и в тех и в других, часто есть таблицы соответствия. Условия центрифугирования так и описывают 5000 об/мин, 30 мин или 7500g, 15 мин.

Правильнее приводить значение относительного центробежного ускорения, однако оно зависит от радиуса вращения и принято рассчитывать его для  $r_{\max}$ . Хотя при попытке воспроизведения условий центрифугирования приведенных таким образом на другом роторе будут получены несколько отличные параметры. Если же приводятся обороты в минуту, то отличия на разных роторах будут больше, хотя обычно и не очень значительны.

# *Центрифуги*

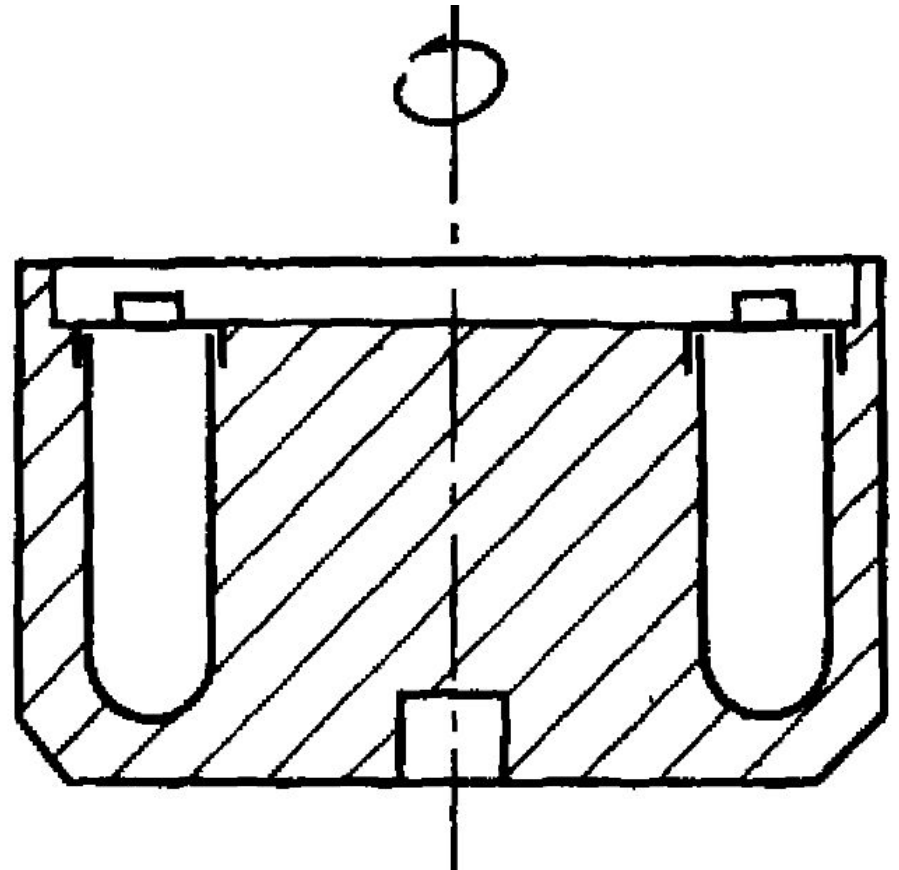
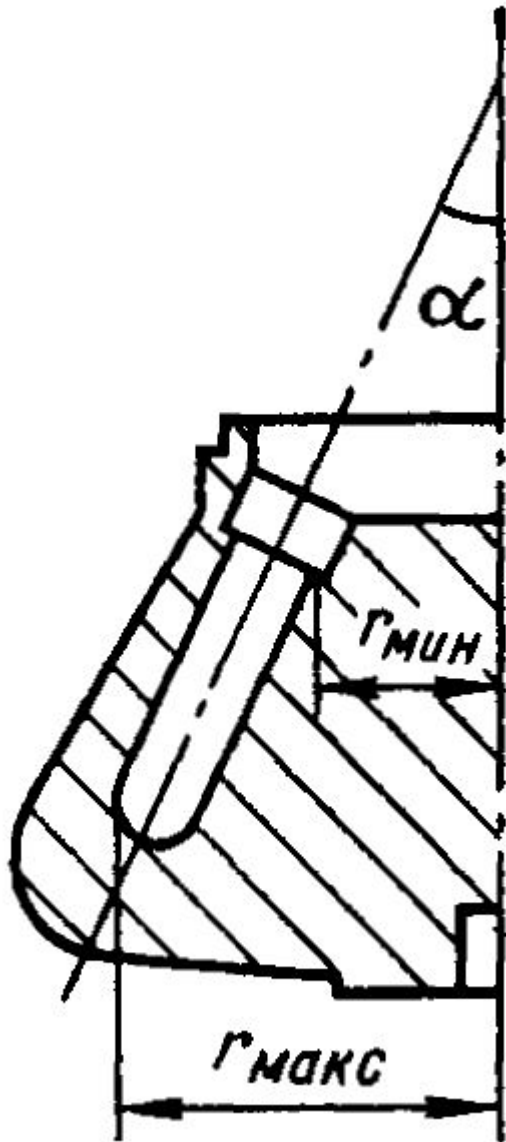
Ультрацентрифуги –  
скорости вращения 50-80 тыс. об/мин

Высокоскоростные центрифуги –  
скорости вращения 20-50 тыс. об/мин

Обычные центрифуги –  
скорости вращения менее 20 тыс. об/мин



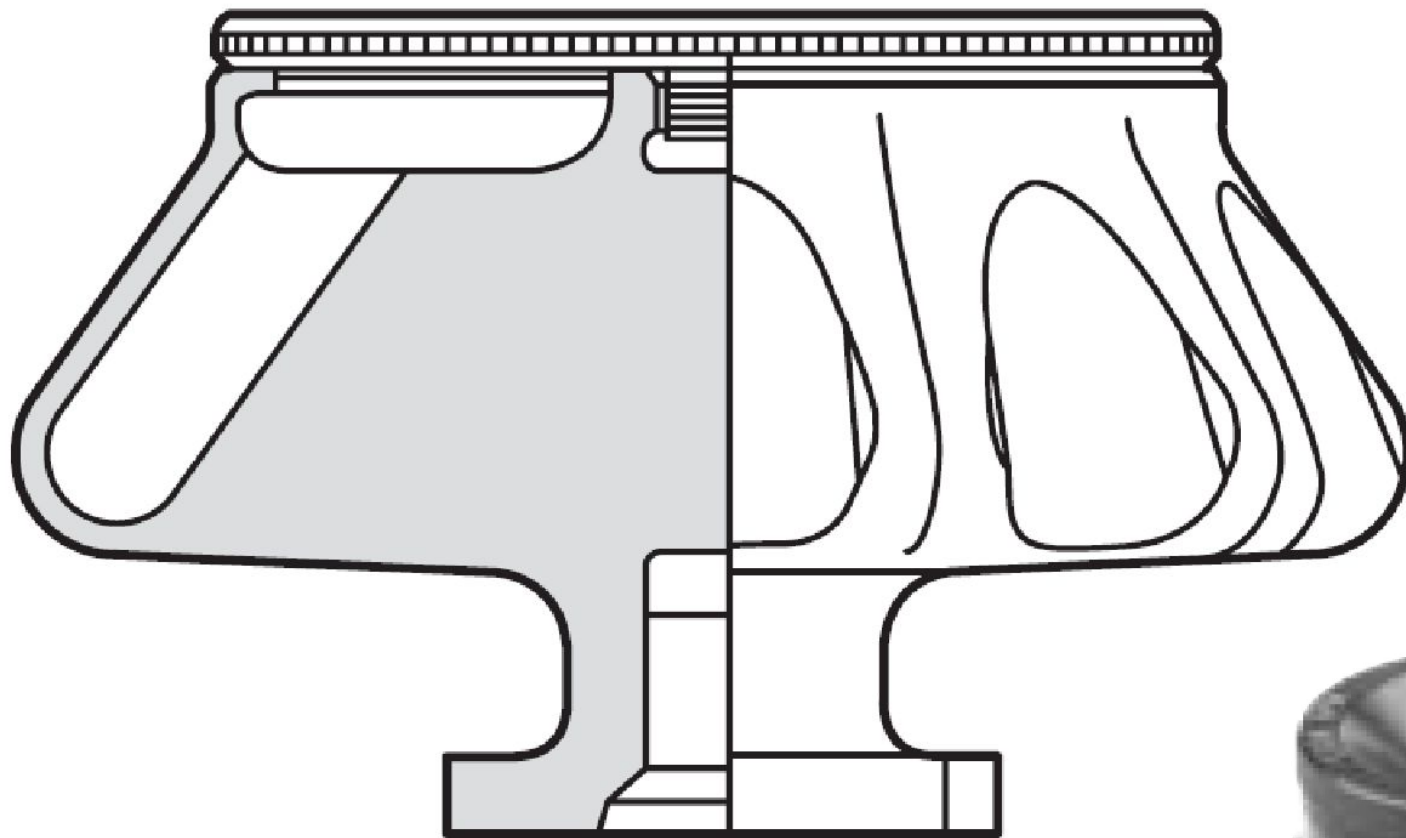
# Типы роторов



Ротор с вертикальным расположением пробирок

Схема углового ротора

# *Типы роторов*

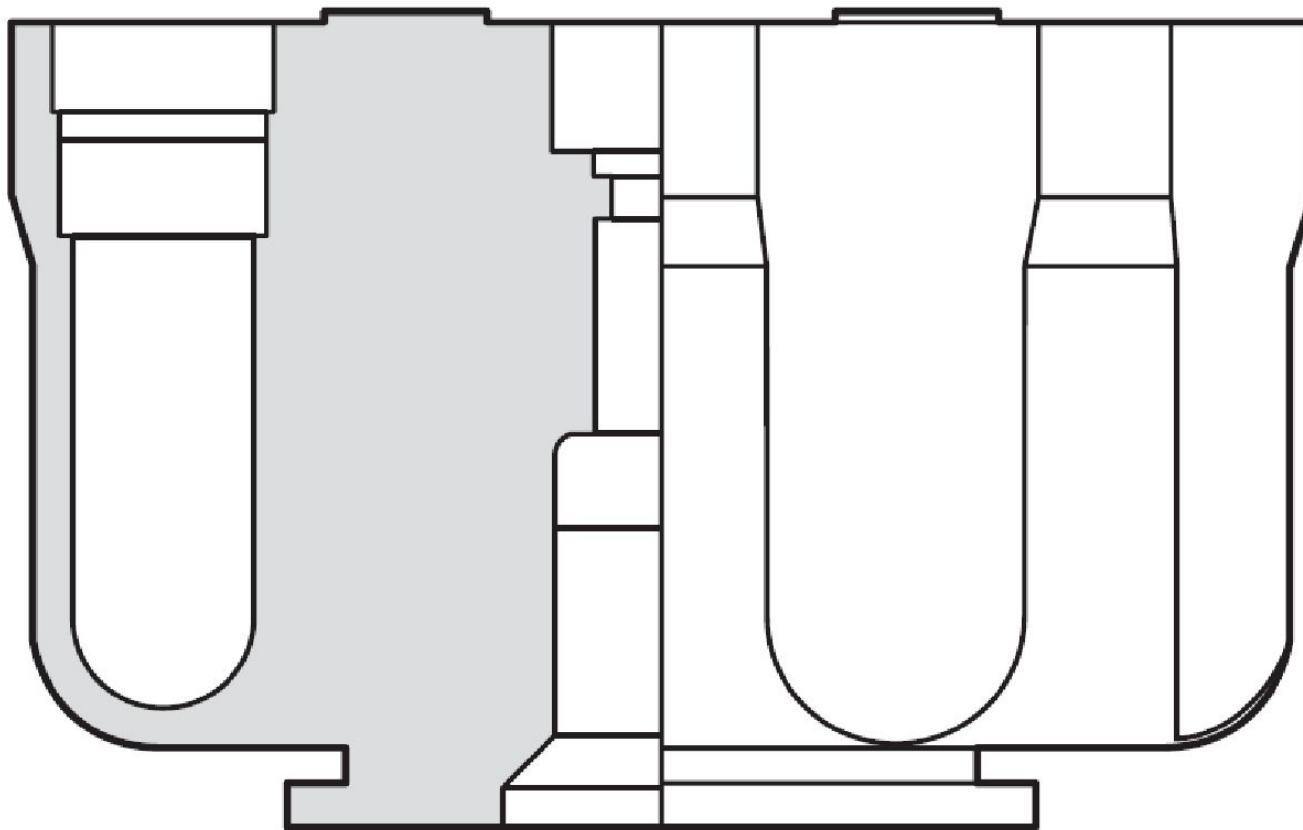


**Угловой ротор**



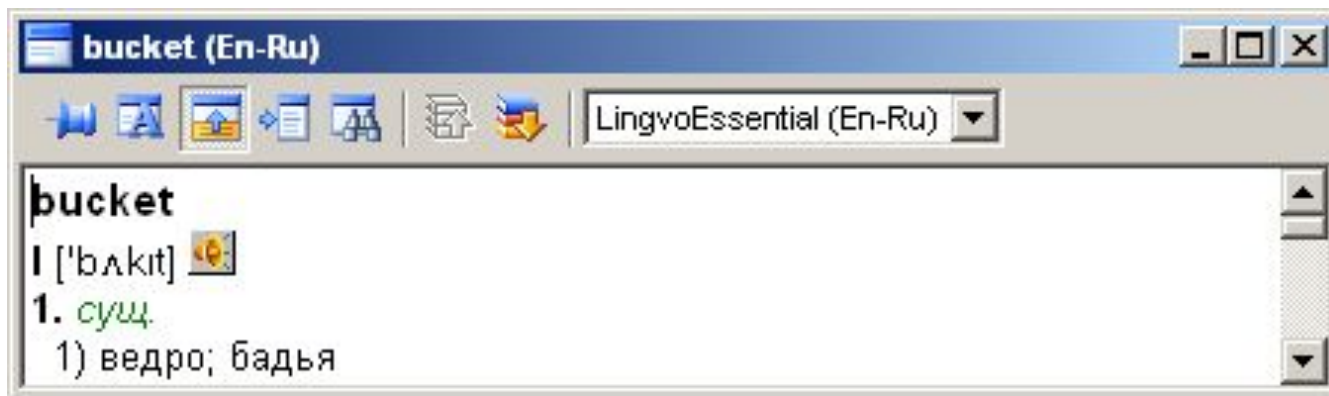
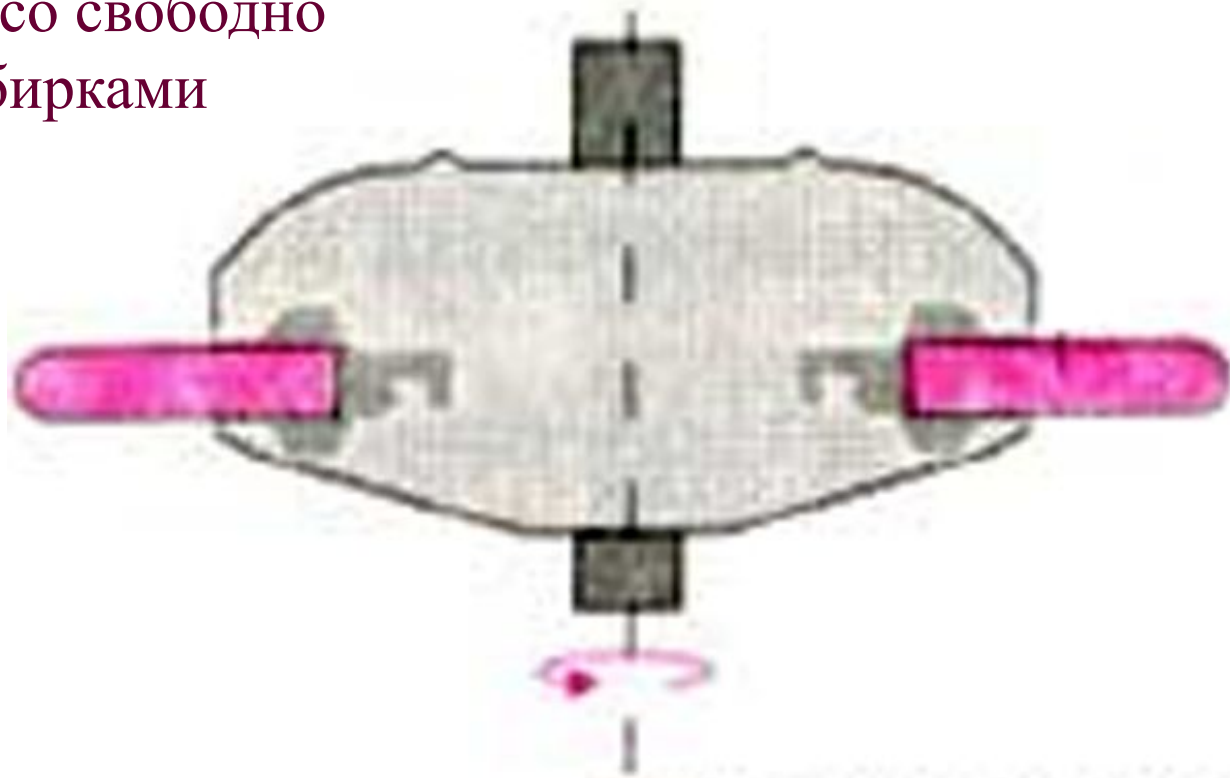
# *Типы роторов*

**Ротор с вертикальным  
расположением пробирок**



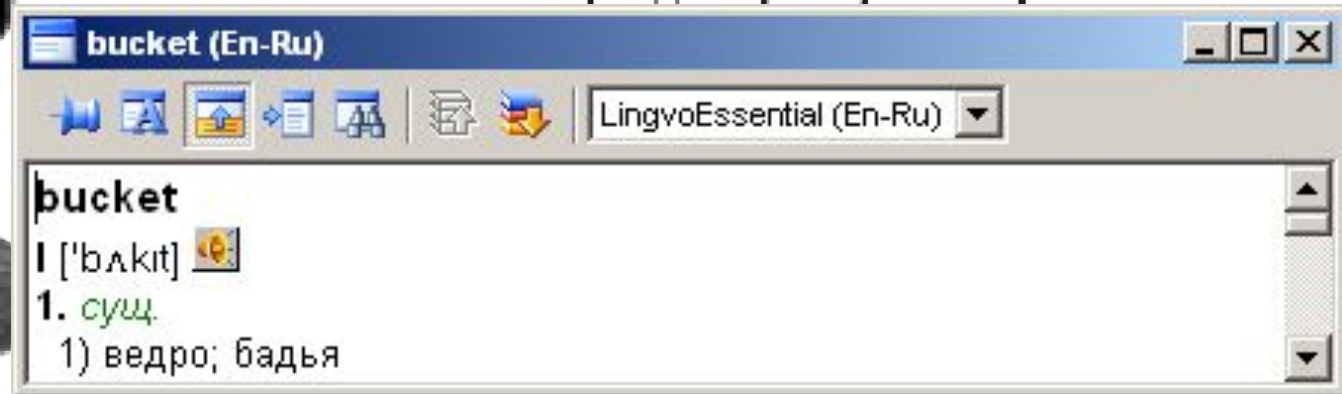
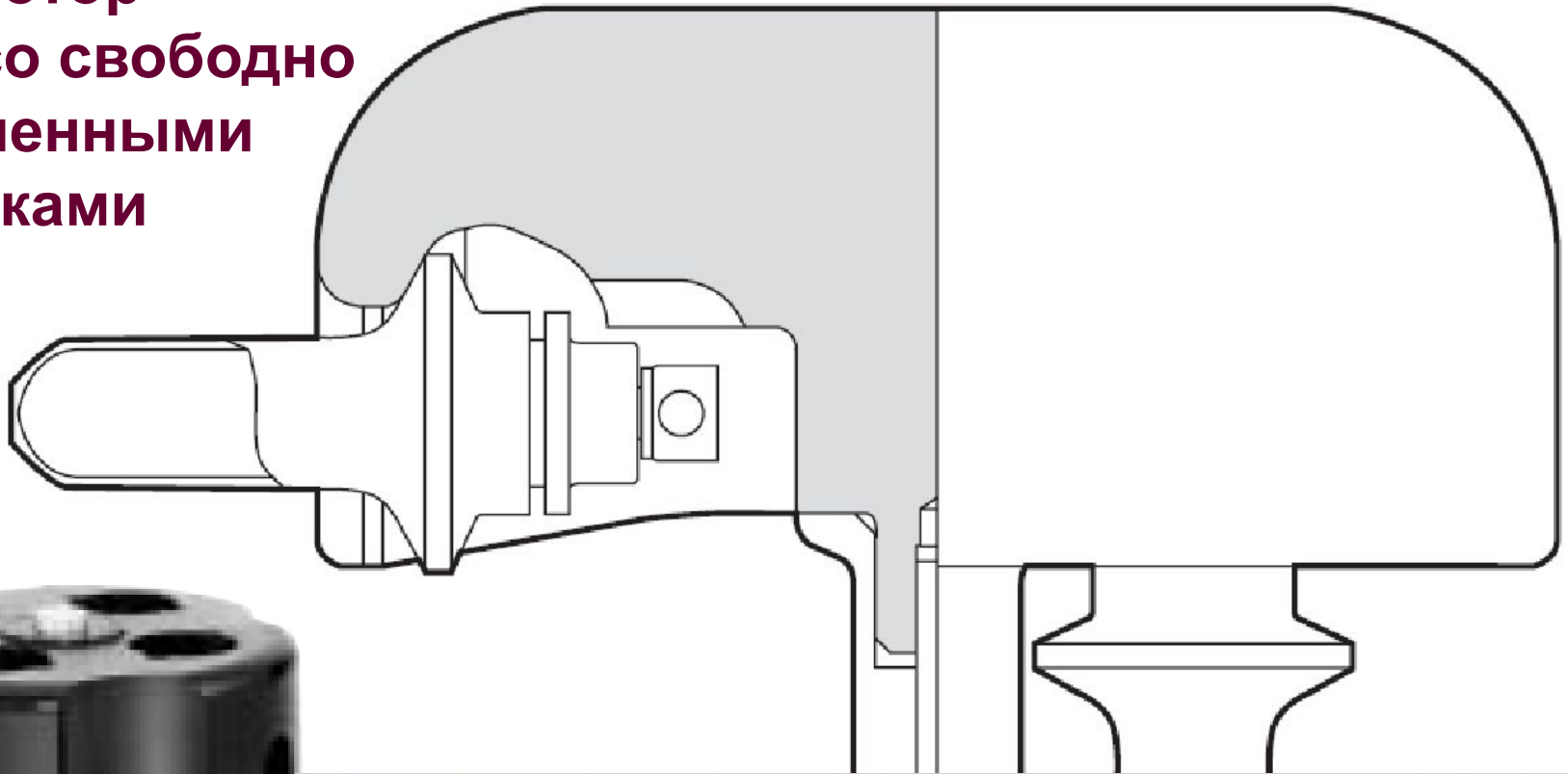
# Типы роторов

Бакет ротор – ротор со свободно  
подвешенными пробирками



# Типы роторов

**Бакет ротор –  
ротор со свободно  
подвешенными  
пробирками**



# Типы роторов

## Зональный ротор с переходным устройством

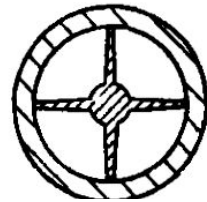
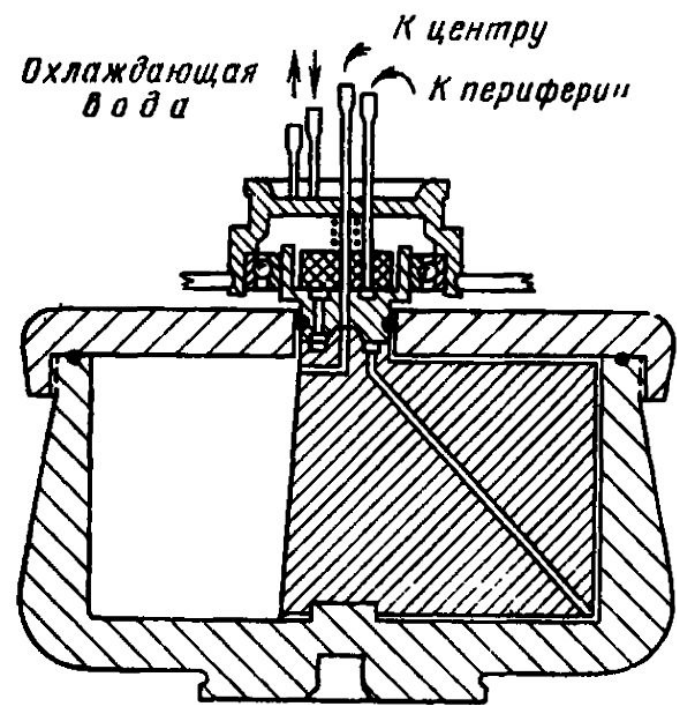
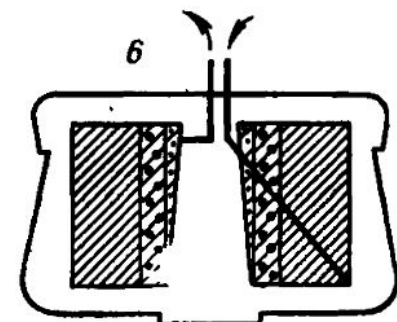
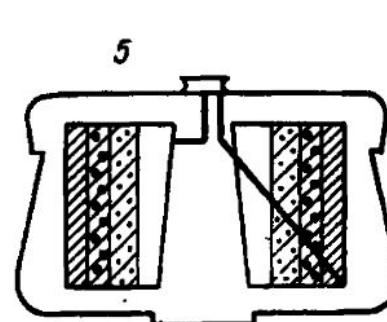
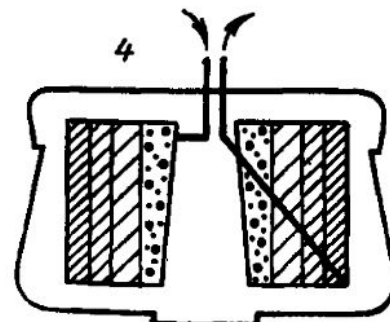
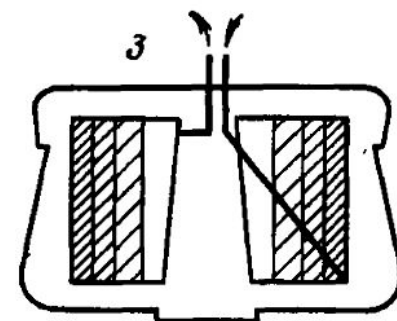
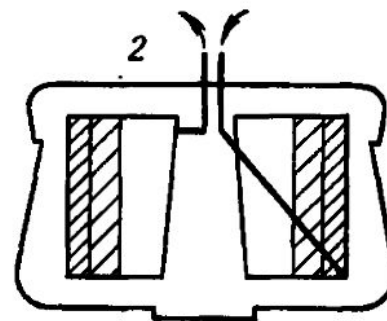
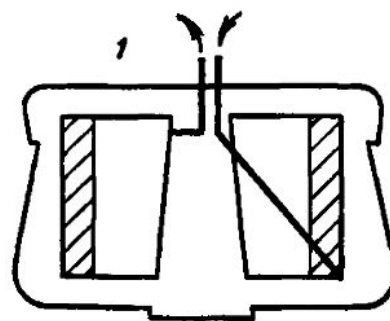
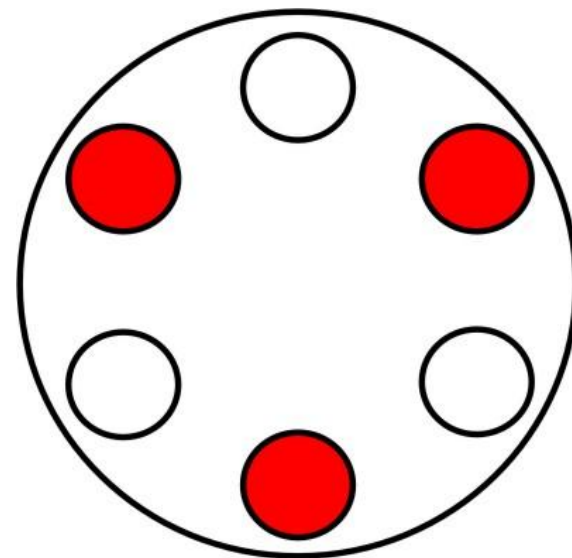
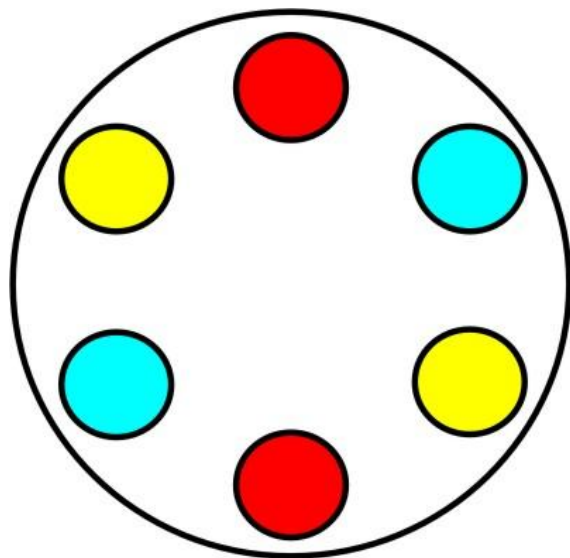
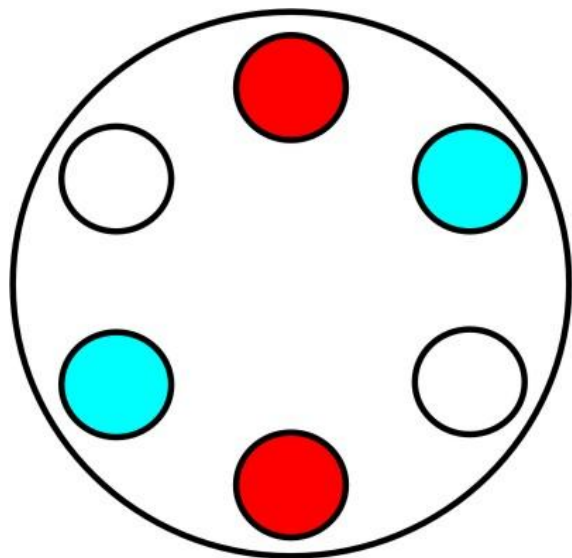
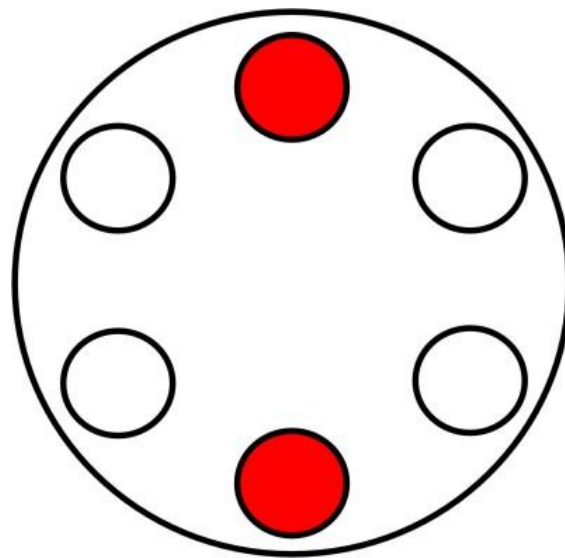
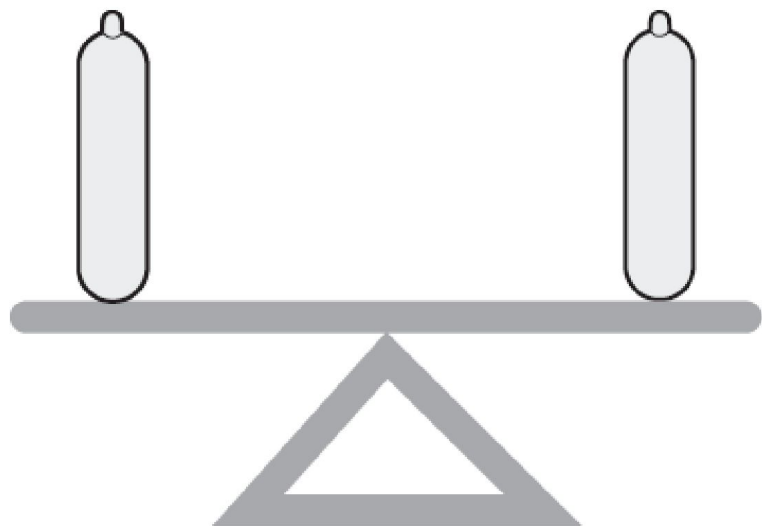


Схема работы  
проточного  
зонального ротора  
1-3 – формирование  
градиента плотности  
4 – введение образца  
5 – разделение  
6 - отбор фракций  
после разделения



# *Размещение пробирок в роторах*



**Ротор должен быть уравновешен**

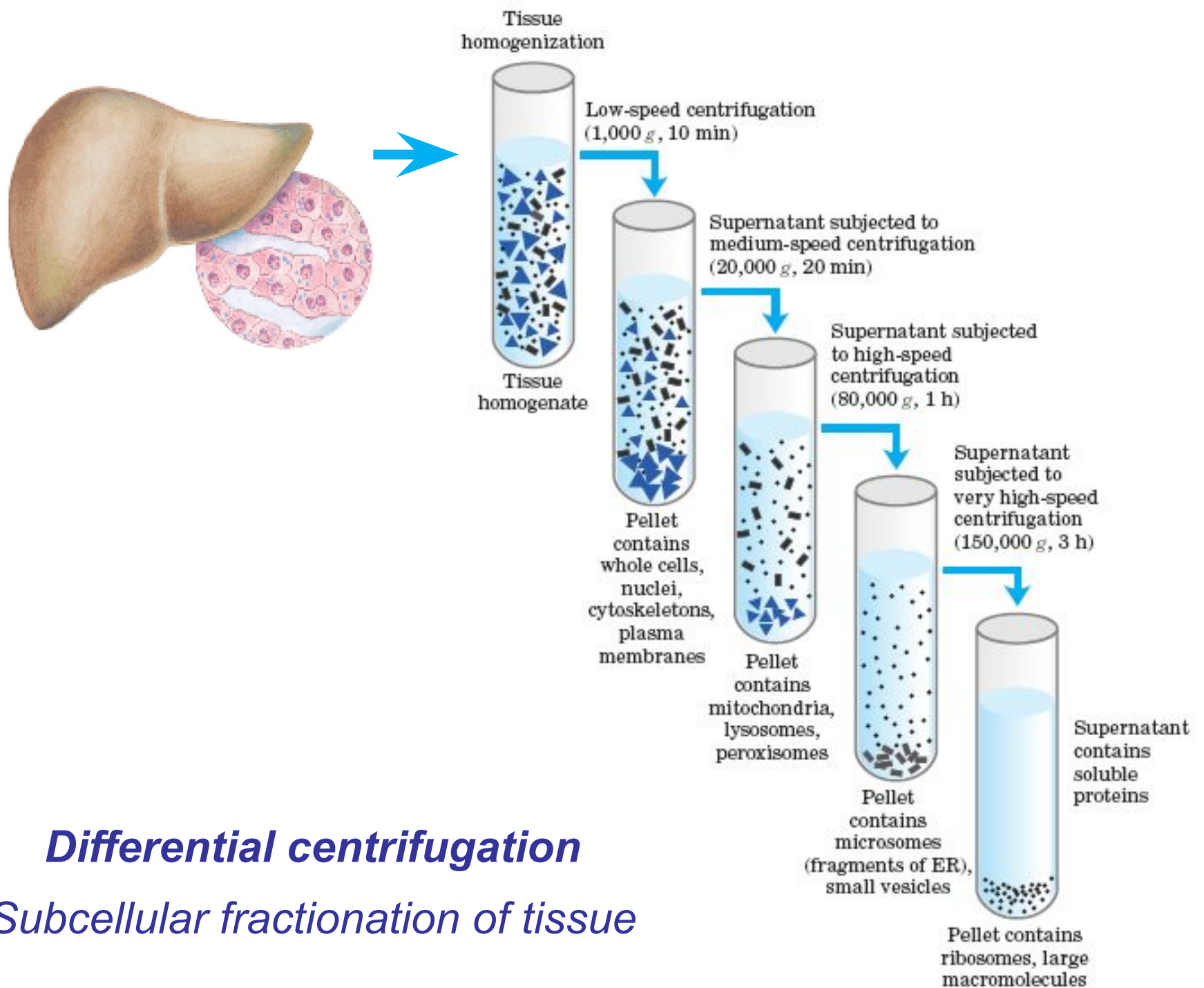
# ***Методы центрифугирования***



**Раздельное осаждение частиц.  
Дифференциальное центрифугирование**

$$\rho \gg \rho_c \quad v = k \frac{D^2 (\rho - \rho_c) N^2 r}{\eta_c}$$

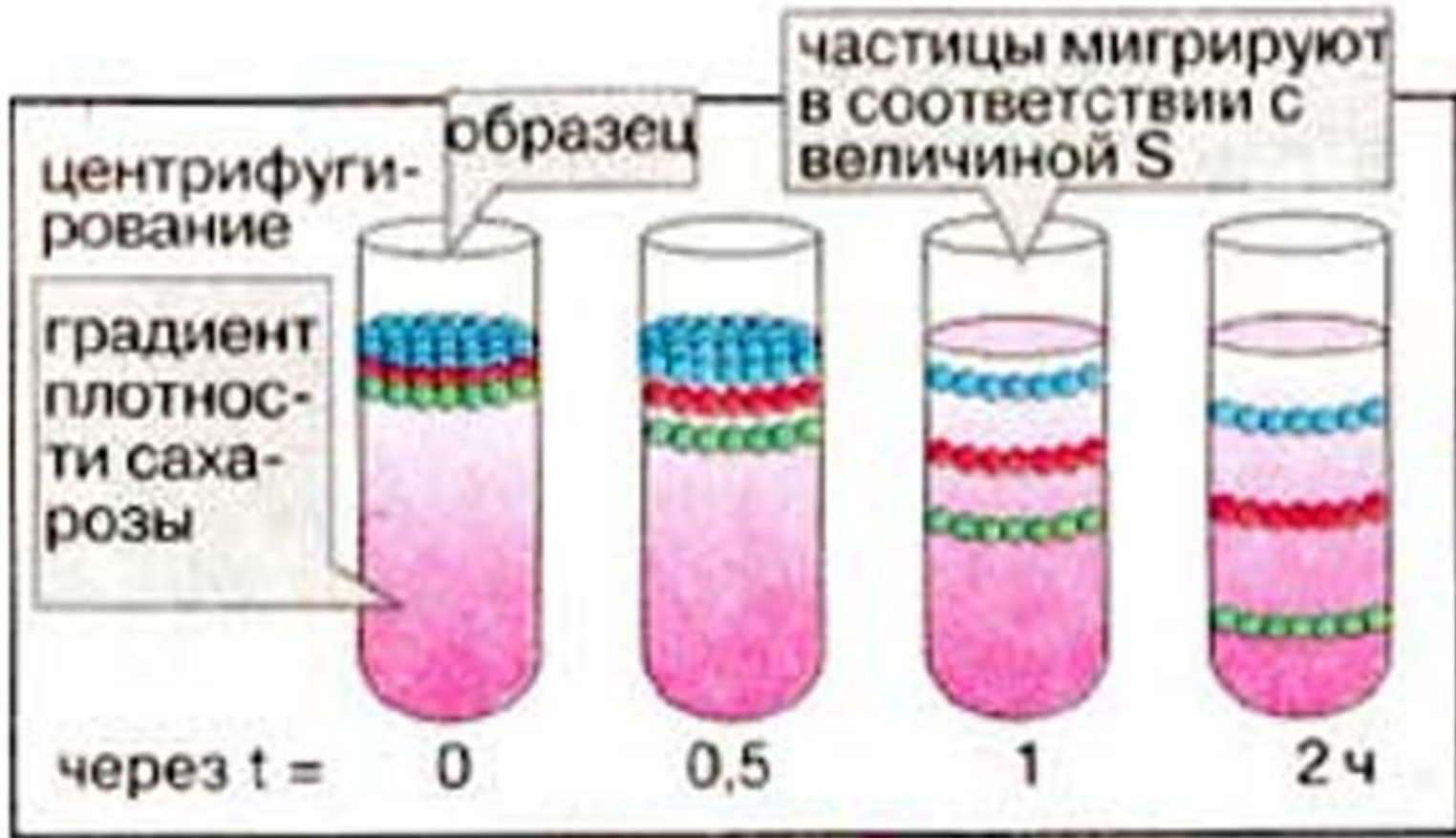
Скорость оседания частиц определяется их размером. Крупные оседают быстрее, мелкие – медленнее. Можно подобрать условия (время и скорость вращения ротора) так, что более крупные частицы осядут, а мелкие почти целиком останутся в супернатанте.



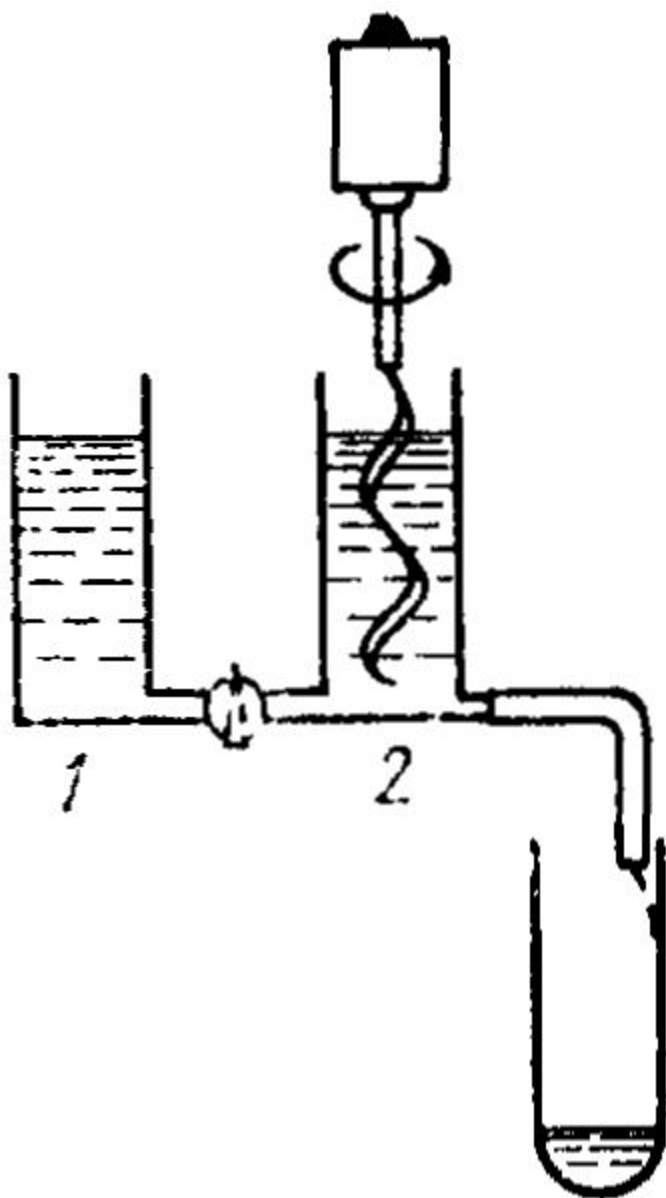
## Зонально-скоростное центрифугирование

$$\rho \gg \rho_c$$

Зональное - частицы разного размера оседают более или менее ограниченными слоями - зонами. Скоростное - частицы разделяются по скорости оседания.



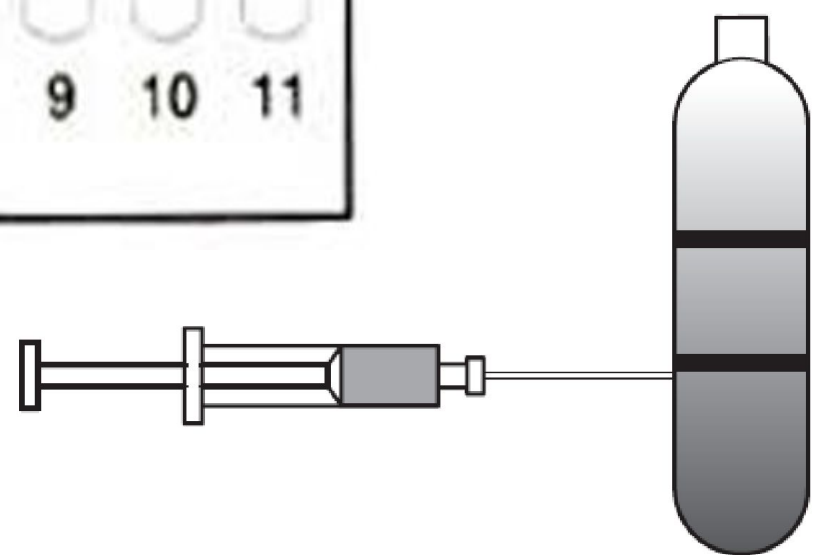
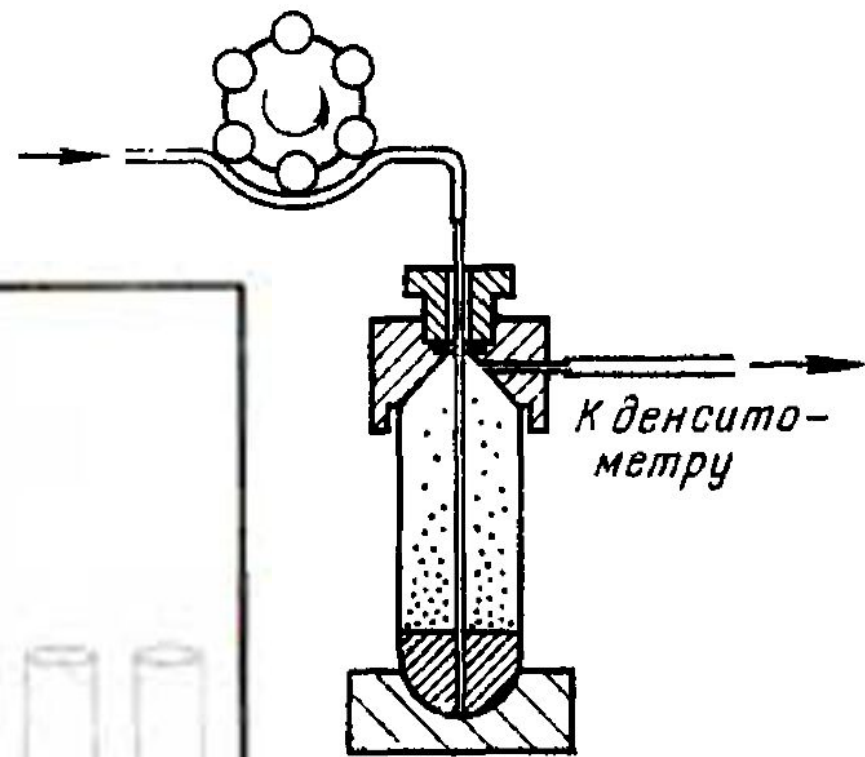
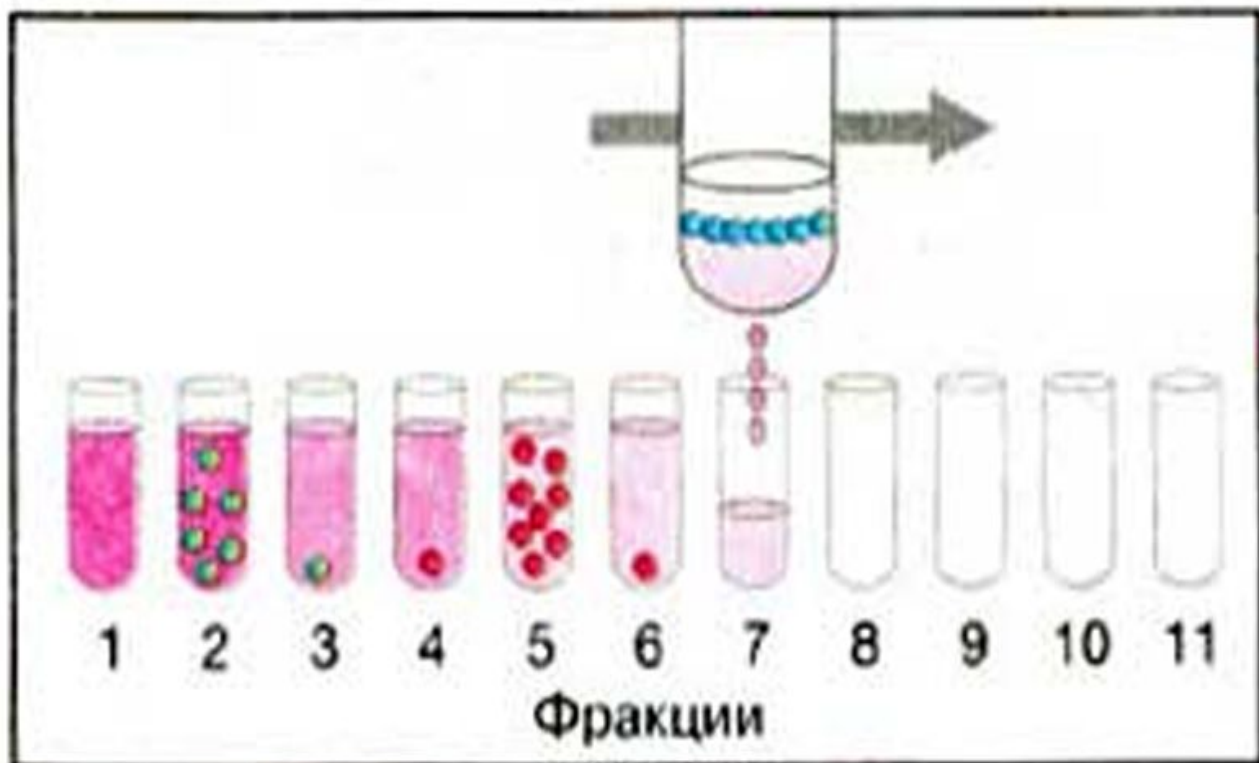
Эффективный способ подавления конвекции создания градиента плотности среды с увеличением вдоль радиуса вращения от центра к периферии.



Устройство для создания  
линейного градиента  
плотности раствора.

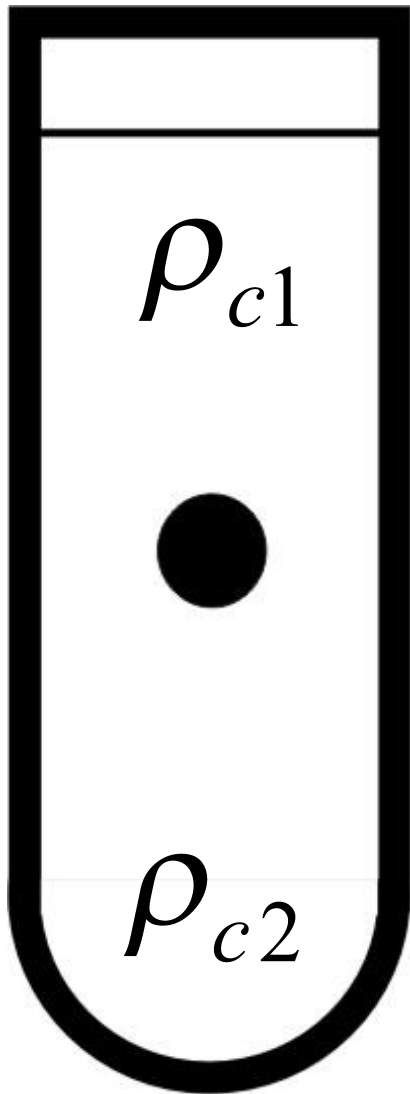
1 – резервуар  
2 – смеситель

# Фракционирование зон



# Равновесное (изопикническое) центрифугирование

$$\rho_{c2} > \rho > \rho_{c1}$$



# Равновесное (изопикническое) центрифугирование

## Особенности разделения:

1. Процесс центрифугирования должен быть длительным, так как при подходе к положению равной плотности (изопикническому положению) частицы будут двигаться замедленно.
2. Вязкость среды вследствие этого является нежелательным фактором.
3. Размеры частиц и, следовательно, их масса не скажутся на окончательном распределении. Положение на градиенте определяется только их плотностью, хотя начальная скорость миграции из области иной плотности градиента будет больше у тяжелых частиц.

# Равновесное (изопикническое) центрифугирование

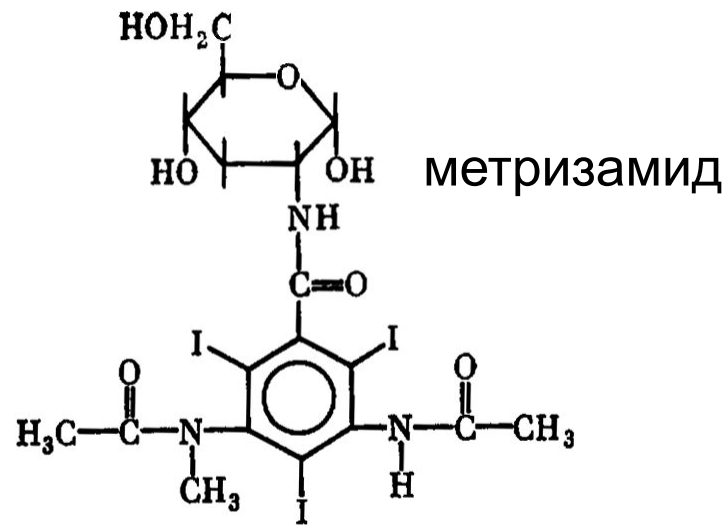
## Особенности разделения:

4. Частицы будут двигаться к положению равновесия как из области более низкой плотности градиента, чем их плавучая плотность, так и из области более высокой плотности. Таким образом, наряду с седиментацией, может происходить и флотация. Это означает, что нет необходимости наносить тонкий начальный слой препарата и можно даже смешать его со всем объемом градиента.
5. Из п.4 следует, что при равновесном центрифугировании допускается более высокая емкость загрузки препаратом, чем при зонально-скоростном.

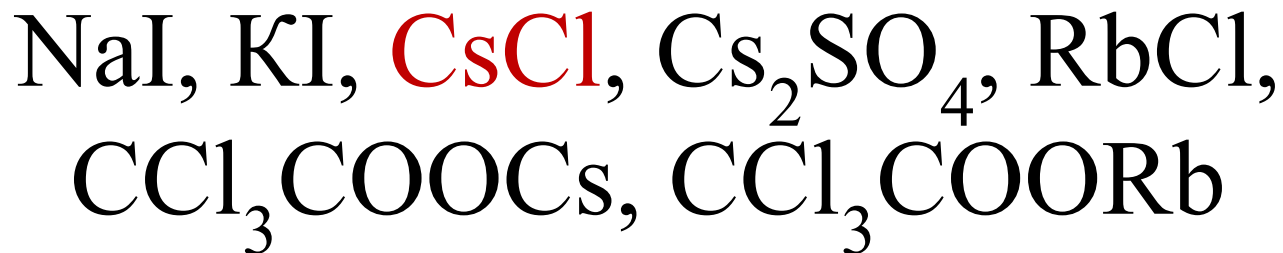


# Вещества, используемые для формирования градиента плотности при изопикническом центрифугировании

## 1. Элементоорганические соединения содержащие тяжелые атомы

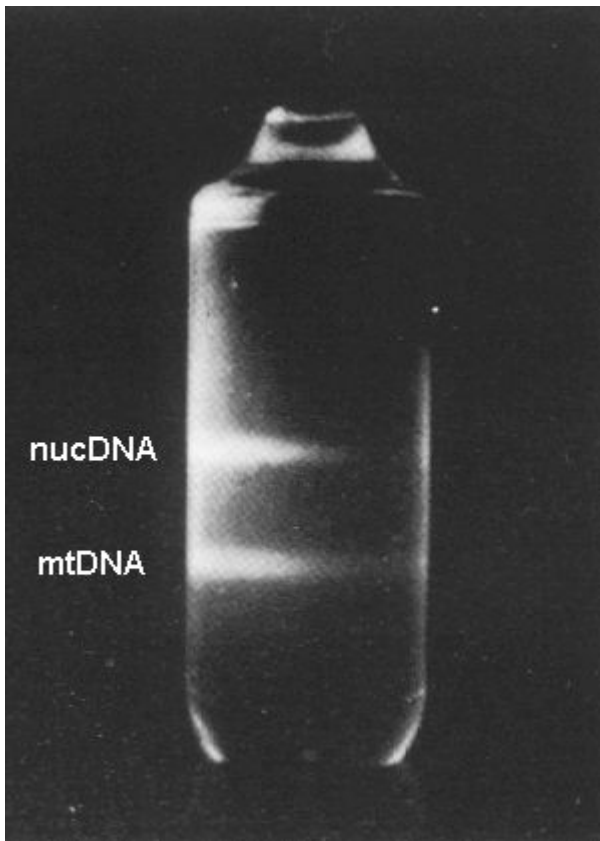


## 2. Соли металлов с «большими ионами»



При достаточно больших скоростях вращения ротора молекулы этих веществ оседают под действием центробежной силы, создавая градиент плотности, нарастающий от мениска ко дну пробирки.

All text material © 2015 by [Steven M. Carr](#)

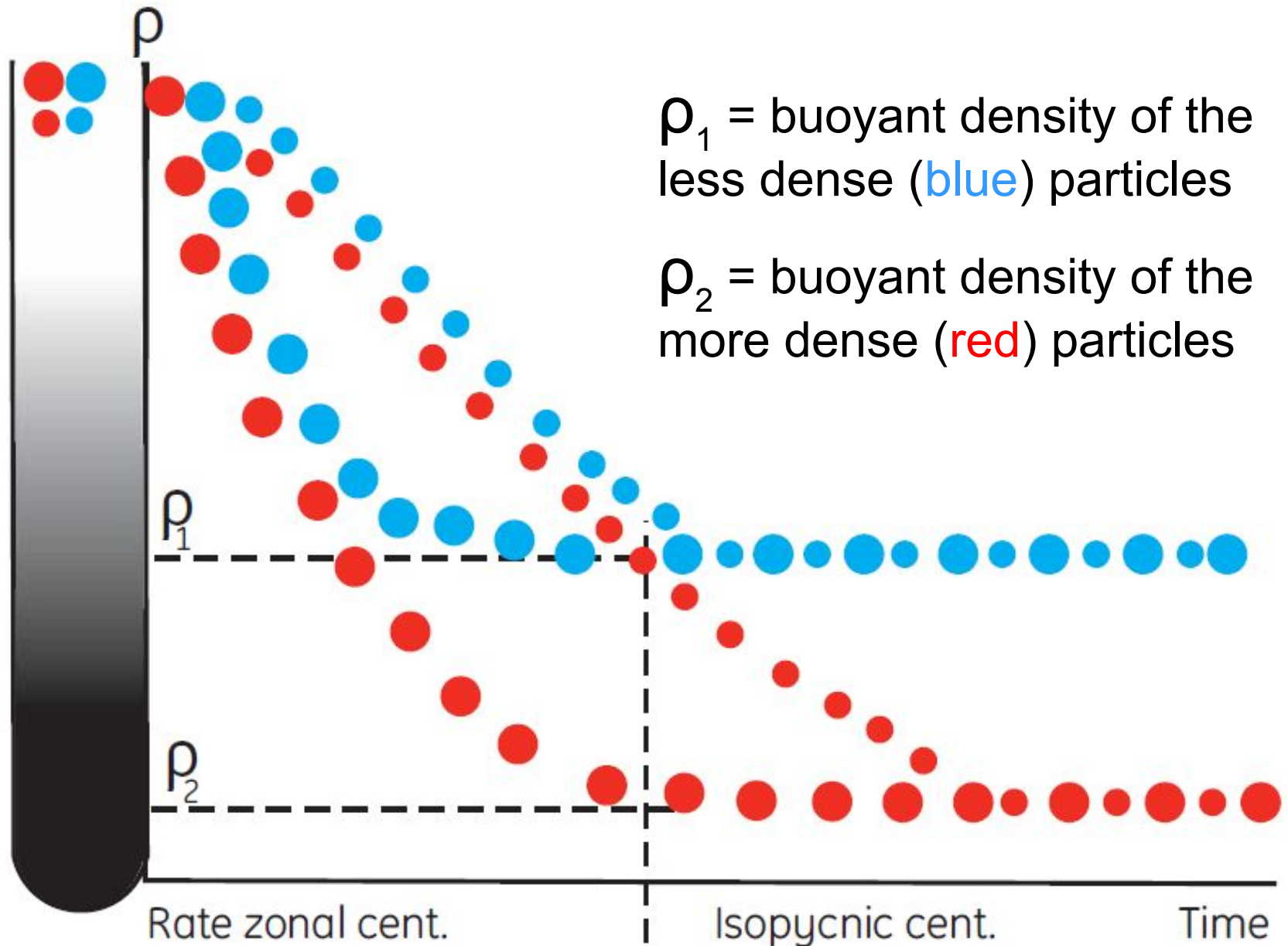


**Preparative density-gradient ultracentrifugation of DNA**  
(SM Carr & OM Griffiths. 1987. *Biochem Genet* 25:385-390)

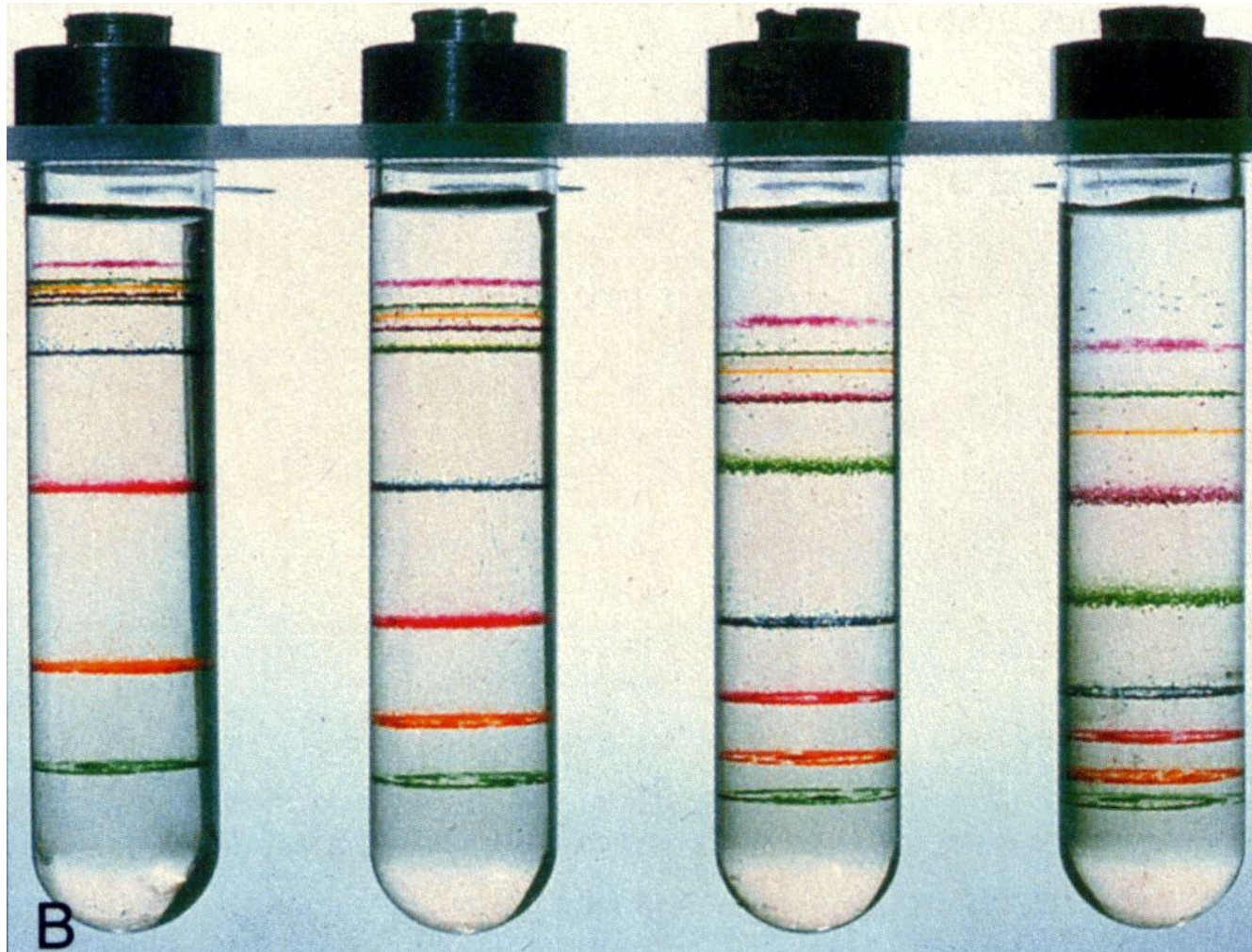
Under high centrifugal force, a solution of **cesium chloride (CsCl)** molecules will dissociate. The heavy **Cs<sup>+</sup>** atoms will be forced away from the center towards the outer end of the tube, but will at the same time *diffuse* back towards the top of the tube, thus forming a shallow density gradient. **DNA** molecules placed in this gradient will migrate to the point where they have the same density as the gradient (the **neutral buoyancy** or **isopycnic point**). The gradient is sufficient to separate types of **DNA** with slight differences in density due to differing [**G+C**] content, or physical form (*e.g.*, linear *versus* circular molecules).

In the experiment above, after centrifugation for 10 hrs at **100,000 rpm** (450,000 x **g**), two distinct bands, corresponding to sheared **linear nuclear DNA** above and **circular mitochondrial DNA** below, are visible under ultraviolet light. The **DNA** has been mixed with the intercalating dye **ethidium bromide**, which enhances the density difference between the two forms and causes the **DNA** to fluoresce. The separate bands are collected by poking a hole in the bottom of the tube. The intact **mtDNA** is available for further biological analysis.

# Diagrammatic representation of rate zonal and isopycnic centrifugation.



## Density Marker Beds в градиентах Percoll'a (Pharmacia)



15 мин

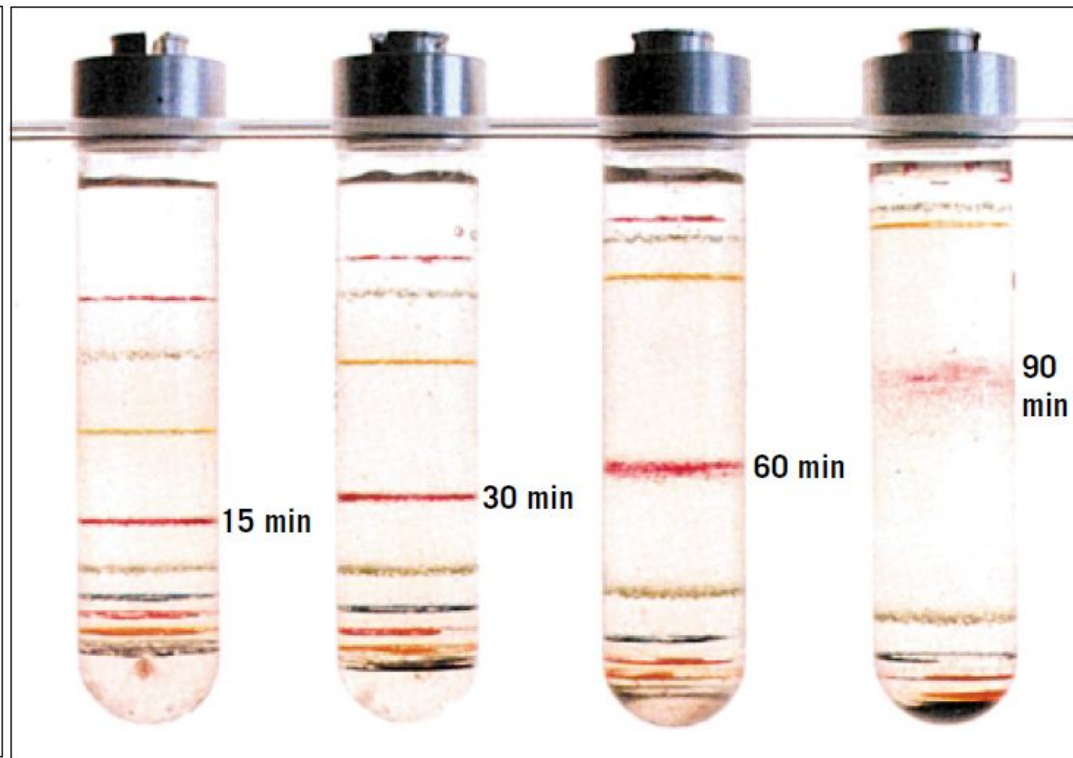
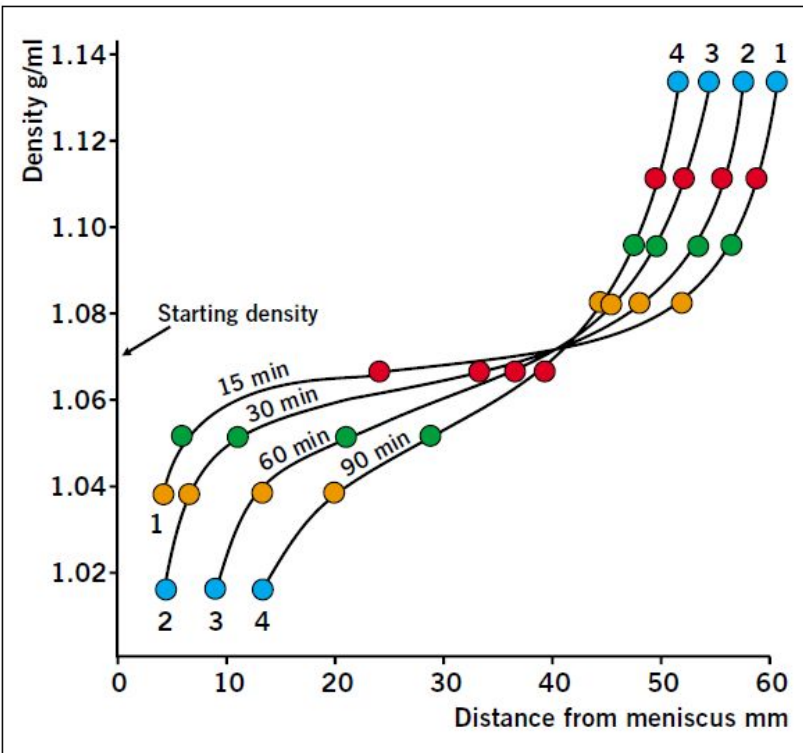
30 мин

60 мин

90 мин

Стартовая плотность 1,07 г/мл в 0,15 М NaCl. Центрифугирование при 20000 g

Percoll представляет собой частицы силикагеля 15-30 нм диаметром «одетые» недифузирующим поливинилпирролидоном и предназначен для разделения клеток, клеточных органелл и вирусов. Percoll способен формировать градиент плотности в диапазоне 1-1,3 г/мл.



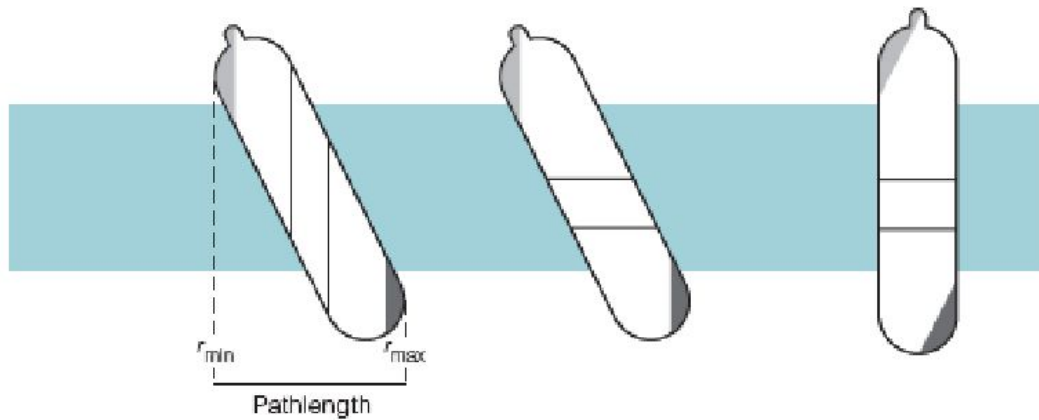
Isometric gradient formation by Percoll in an anglehead rotor, 8 x 14 ml (MSE Superspeed centrifuge) starting density 1.07 g/ml in 0.15 M NaCl. Running conditions: 20,000 x g for 15, 30, 60 and 90 minutes. Gradient density was monitored by means of colored Density Marker Beads. (Work from Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

At Speed

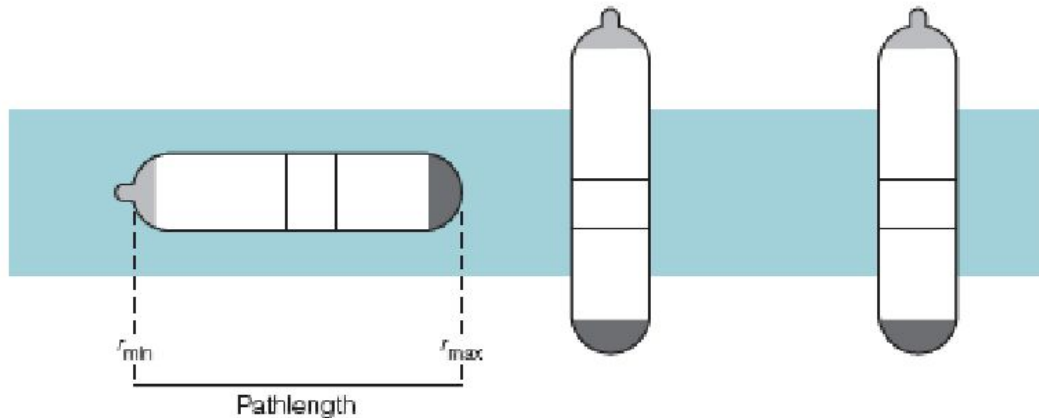
At Rest in Rotor

At Rest Outside Rotor

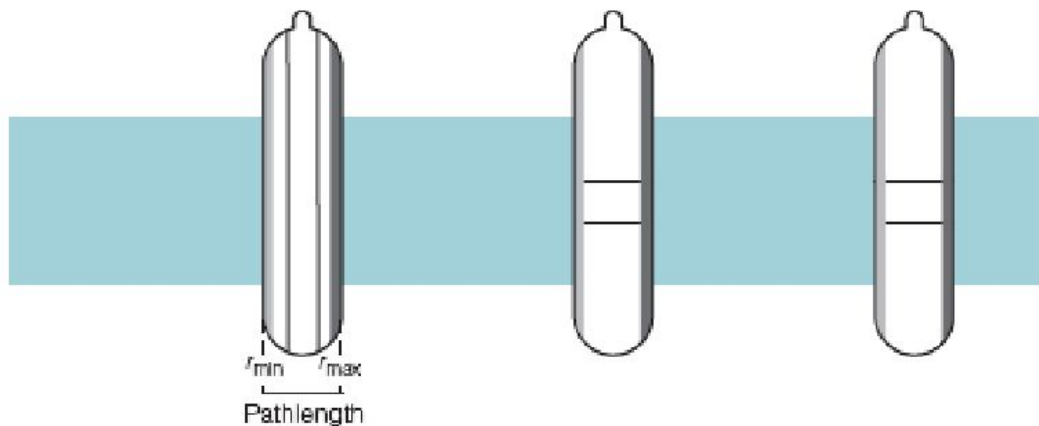
Fixed Angle Rotors



Swinging Bucket Rotors

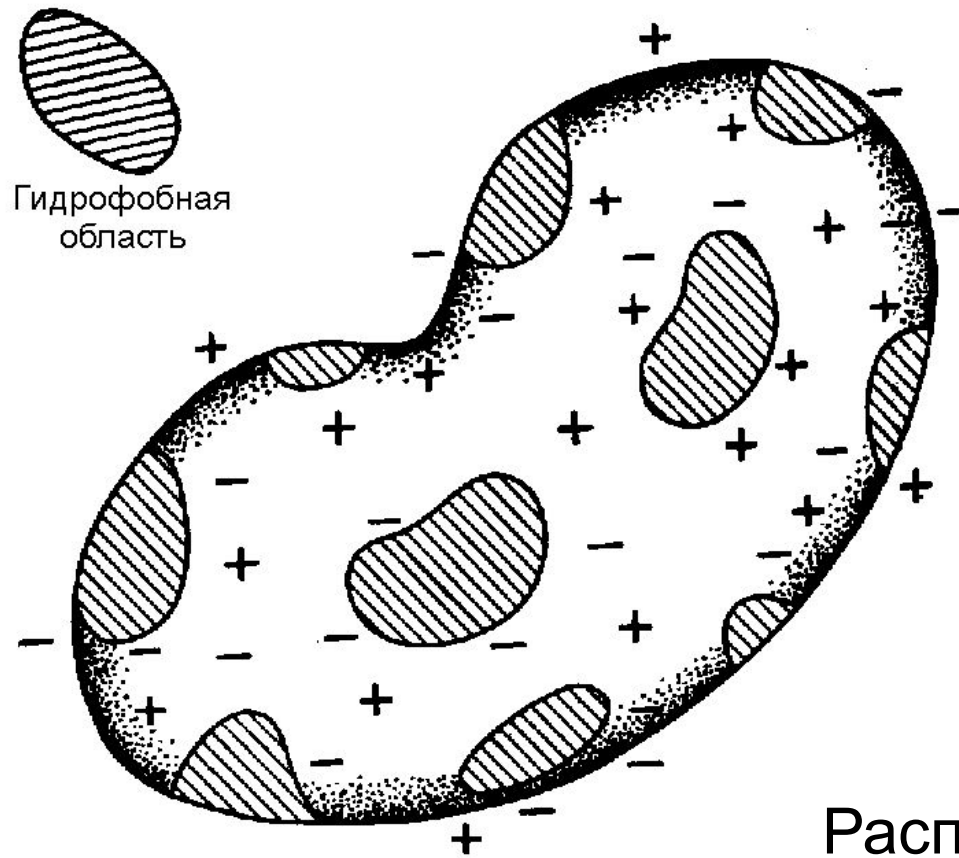


Vertical Tube Rotors



Использование угловых и вертикальных роторов не мешает созданию градиента плотности и даже предпочтительно, т.к. уменьшает время проведения эксперимента за счет уменьшения длины градиента.

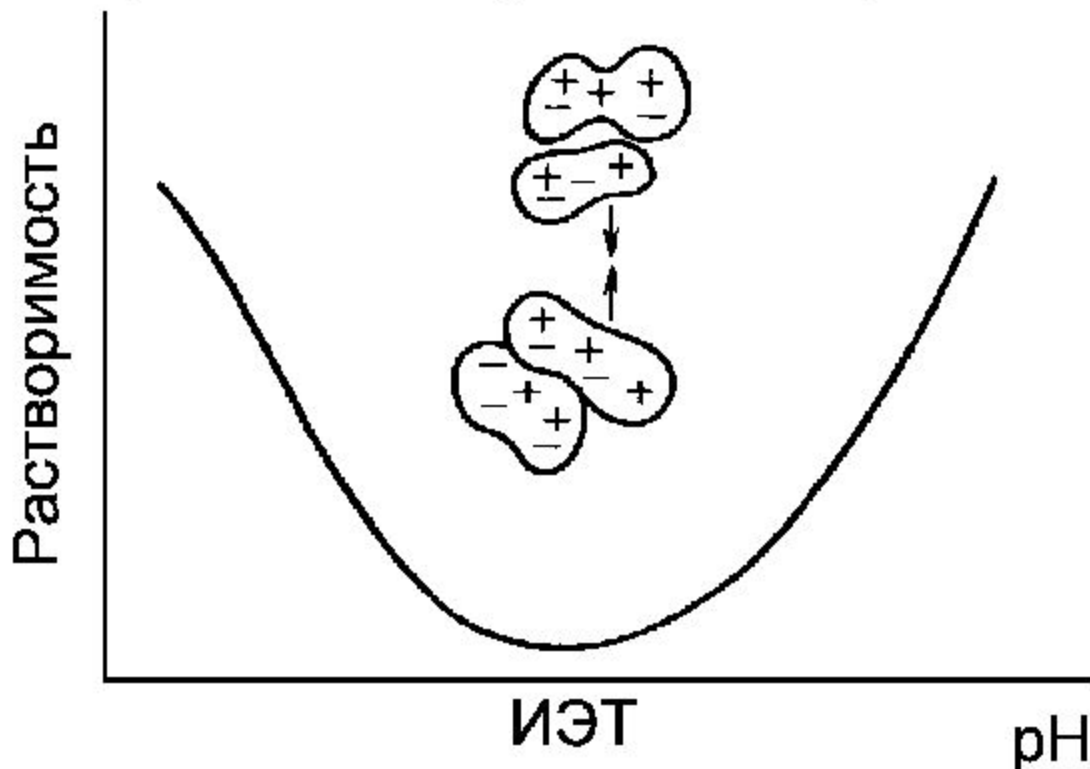
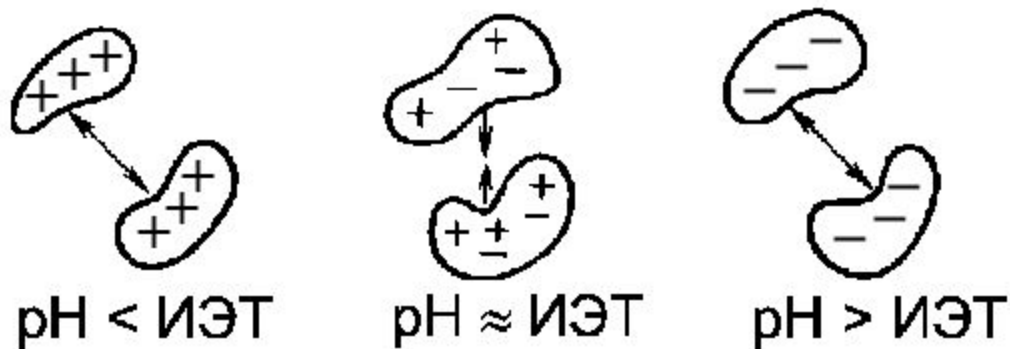
# Разделение осаждением



Распределение зарядов и гидрофобных областей на поверхности молекулы типичного белка

## Изоэлектрическое осаждение

Изоэлектрическая точка – значение рН, при котором молекула полиэлектrolита неподвижна в электрическом поле.

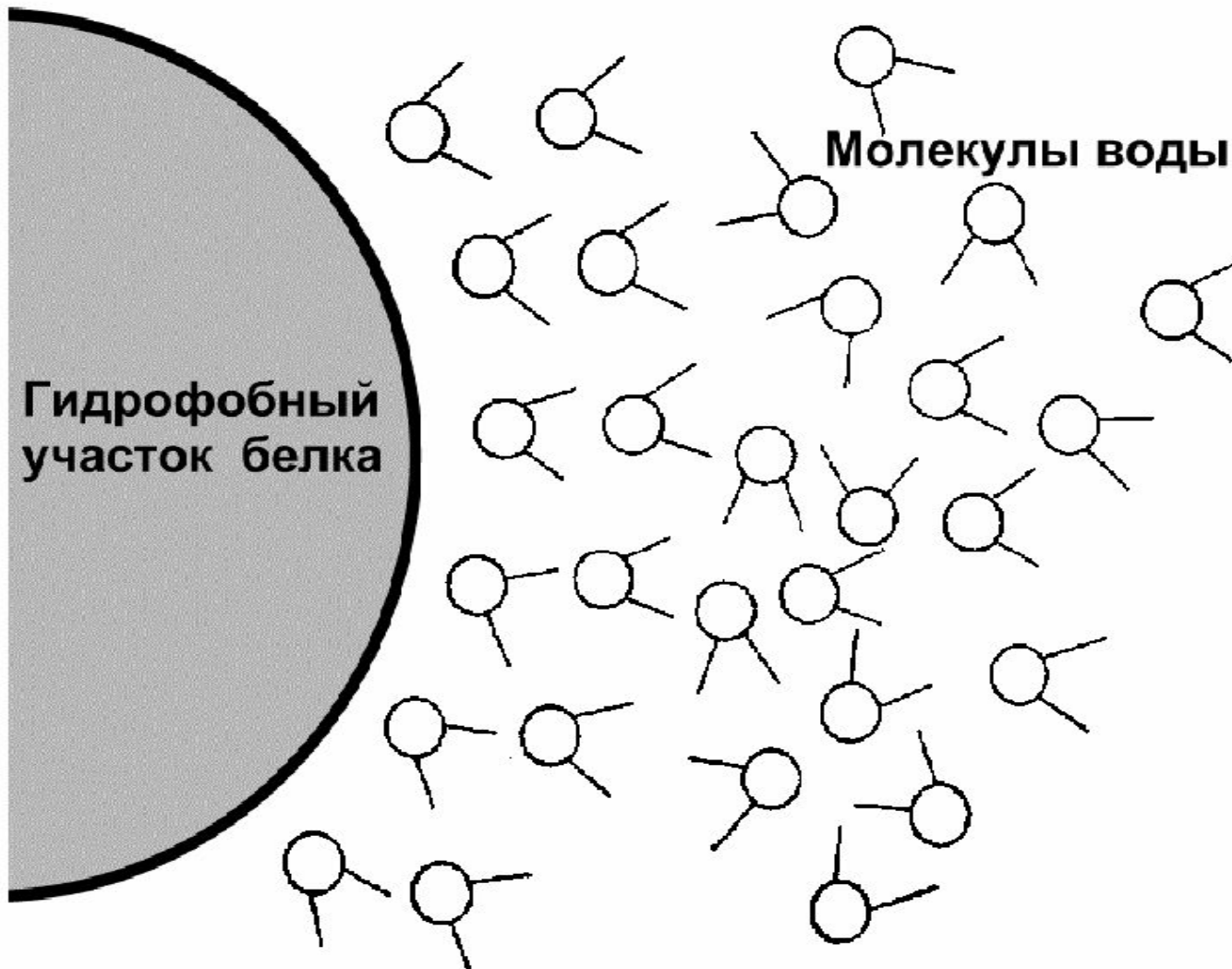


Растворимость белка при значениях рН, близких к изоэлектрической точке



## Высаливание

Высаливание - осаждение при высокой концентрации соли



Упорядоченное расположение молекул вокруг гидрофобных участков на поверхности белка

## Высаливание

Для высаливания белков наиболее эффективны те соли, анионы которых имеют большой заряд, например, сульфат, фосфат, цитрат. Катионы в этом отношении сравнительно менее важны.

 Increasing precipitation ("salting-out") effect

Anions:  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{SCN}^-$

Cations:  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$

Increasing chaotropic ("salting-in") effect 

Ряд Гофмейстера – влияние ионов на растворимость белков



Сульфат аммония – наиболее широко используемый осадитель.

## *Осаждение органическими растворителями*

Осаждение белков и нуклеиновых кислот смешивающимися с водой органическими растворителями, такими как ацетон, этанол или изопропанол.

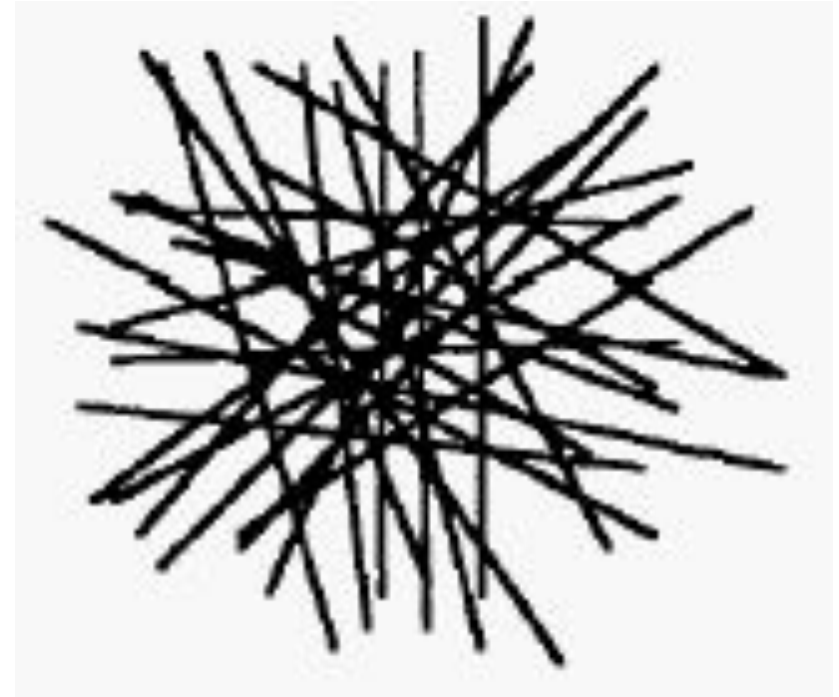
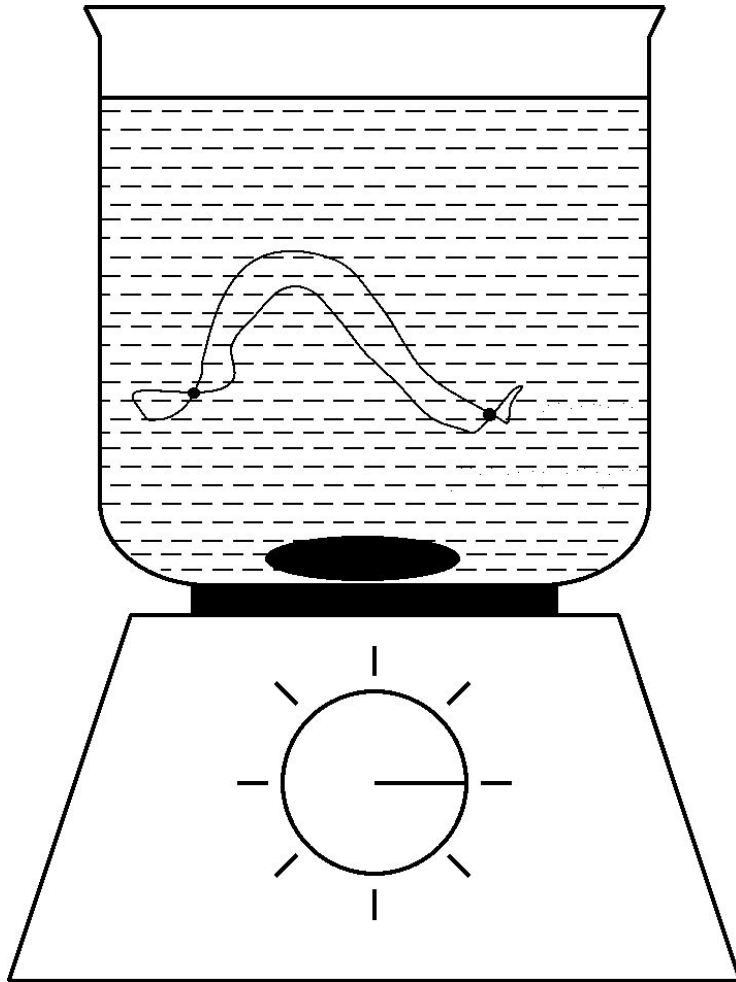
### **Acetone precipitation of proteins**

- Cool the required volume of acetone to  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Place protein sample in acetone-compatible tube.
- Add four times the sample volume of cold ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) acetone to the tube.
- Vortex tube and incubate for 60 minutes at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Centrifuge 10 minutes at  $13,000\text{-}15,000 \times g$ .
- Decant and properly dispose of the supernatant, being careful to not dislodge the protein pellet.
- Allow the acetone to evaporate from the uncapped tube at room temperature for 30 minutes. Do not over-dry pellet, or it may not dissolve properly.
- Add buffer appropriate for the downstream process and vortex thoroughly to dissolve protein pellet.

***Мембранные методы разделения  
Диализ и ультрафильтрация***

## Диализ

Диализ - отделение низкомолекулярных соединений от высокомолекулярных за счет действия осмотических сил

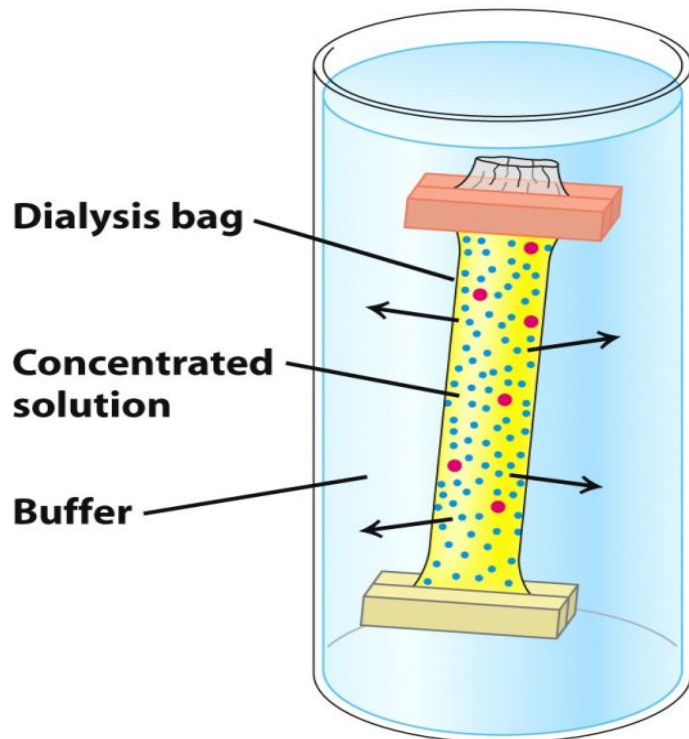


Распределение целлюлозных волокон в диализной мембране

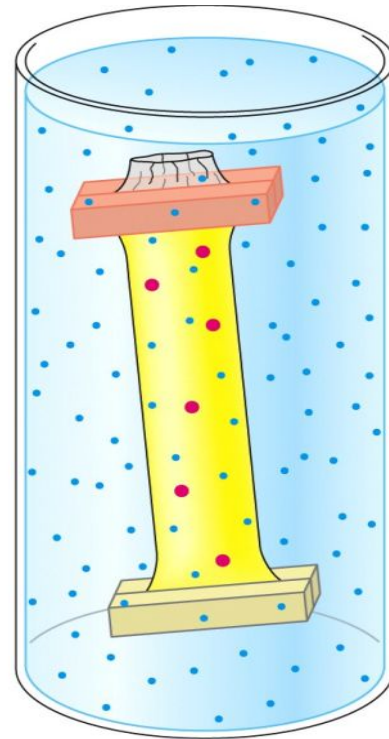
Основные области применения диализа  
обессоливание и замена буфера

# Диализ

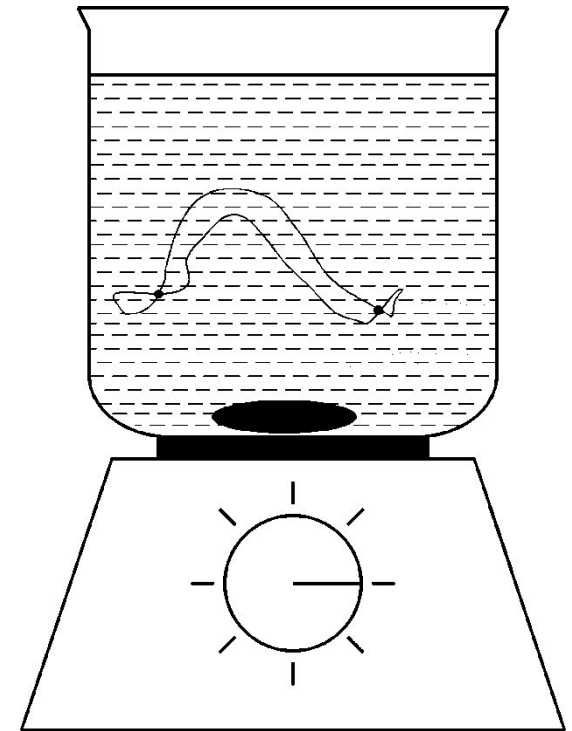
Диализ – отделение низкомолекулярных соединений от высокомолекулярных за счет действия осмотических сил



При начале диализа



При достижении равновесия

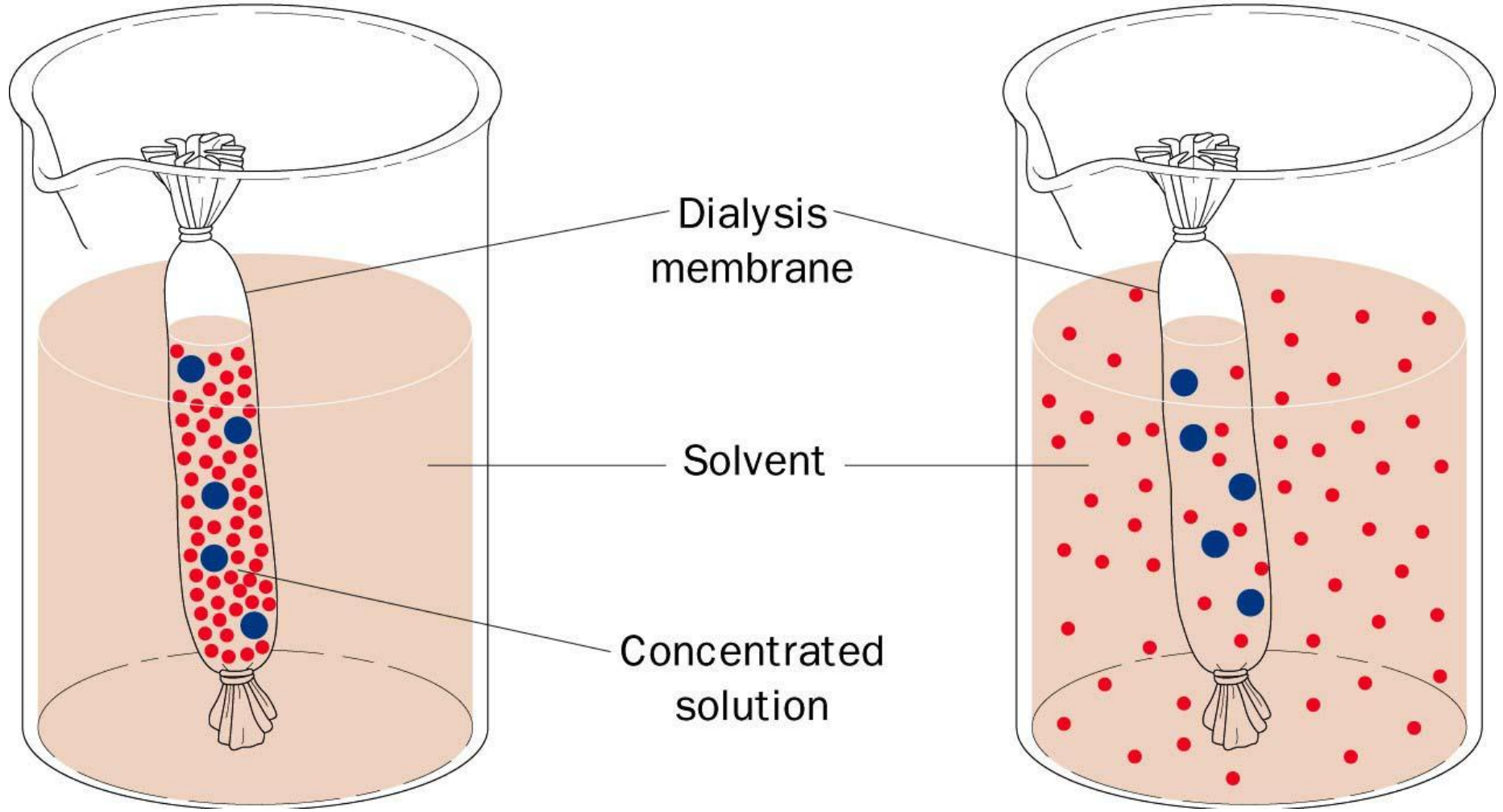


Для уменьшения времени достижения равновесия используют перемешивание

Основные области применения диализа обессоливание и замена буфера

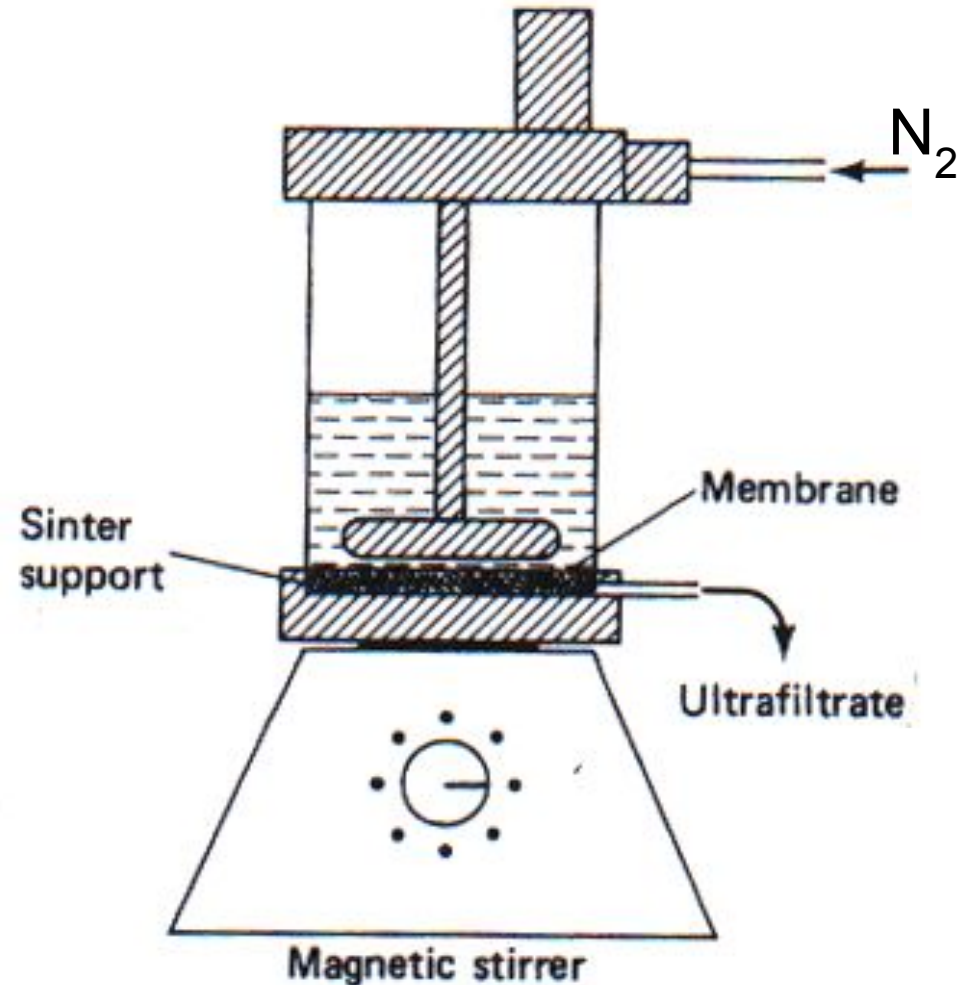
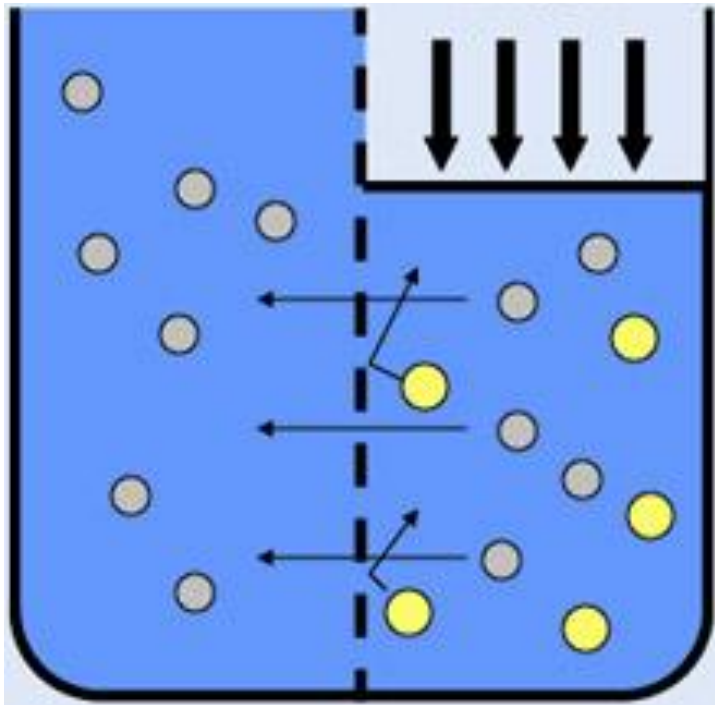
(a) At start of dialysis

(b) At equilibrium



# Ультрафильтрация

Ультрафильтрация - метод разделения мелких частиц (молекул) в растворах или коллоидных системах с помощью полупроницаемых мембран под давлением.

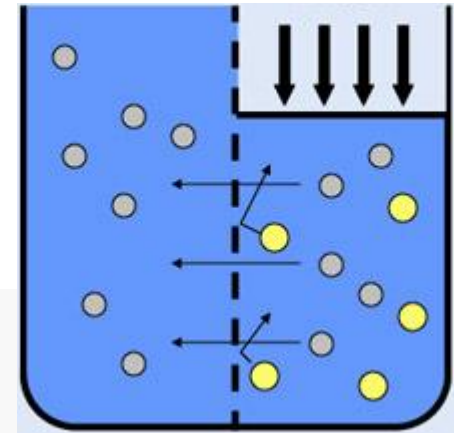


Перемешиваемая ультрафильтрационная ячейка



# Ультрафилтрация

Ультрафилтрация - метод разделения мелких частиц (молекул) в растворах или коллоидных системах с помощью полупроницаемых мембран под давлением.



Nitrogen  
50 p.s.i.

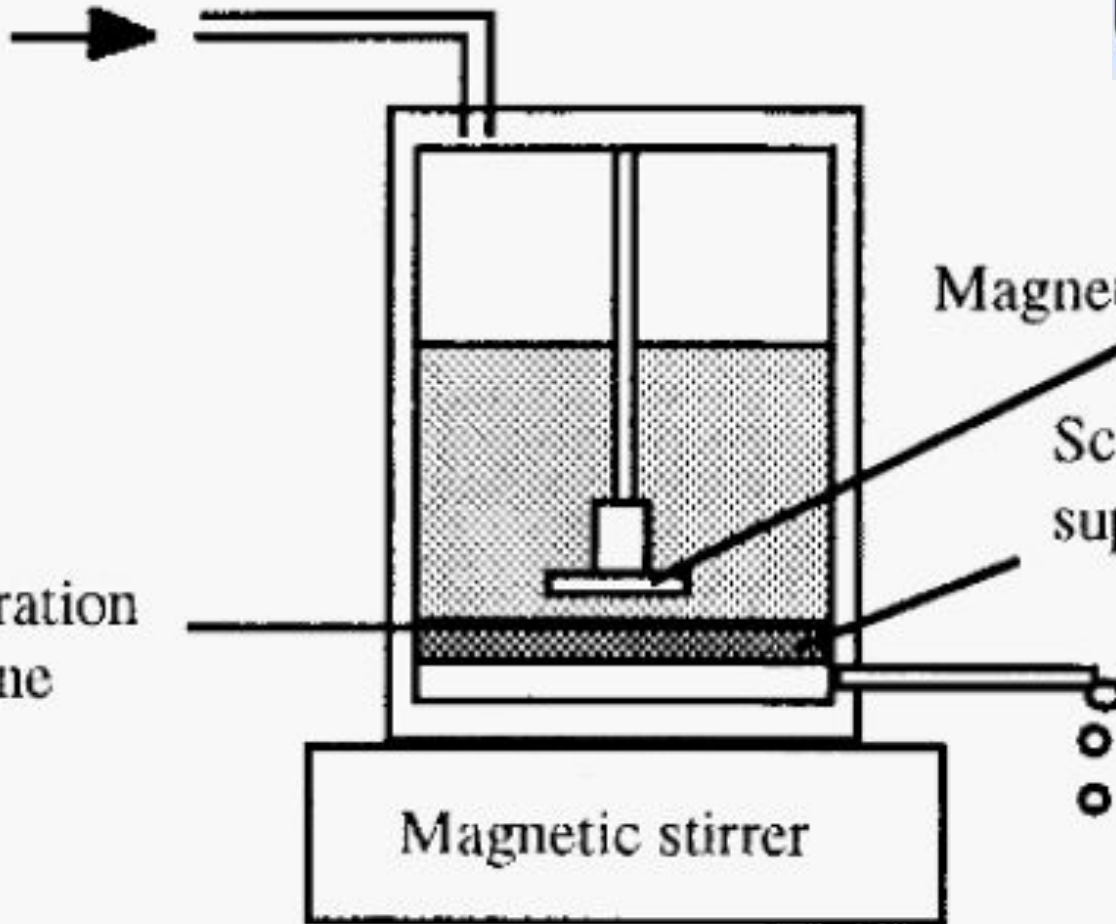
Ultrafiltration  
membrane

Magnetic stirrer bar

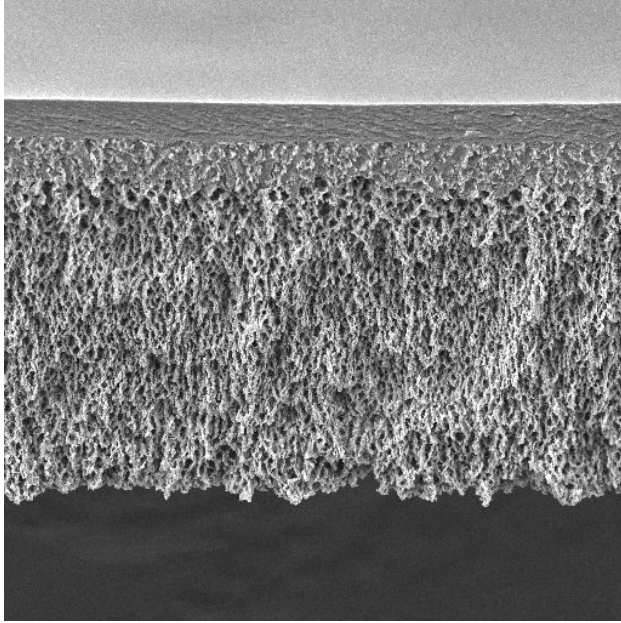
Scintered plastic  
support layer

Effluent  
(ultrafiltrate)

Magnetic stirrer



# Ультрафилтрационные мембраны



Millipore (Amicon)  
GE Healthcare  
(Amersham)



Ультрафилтрация может быть использована для фракционирования молекул по размеру, а также, подобно диализу, для обессоливания растворов высокомолекулярных соединений и замены буфера. Однако наиболее распространенное приложение ультрафилтрации – концентрирование растворов высокомолекулярных соединений без увеличения содержания низкомолекулярных веществ.

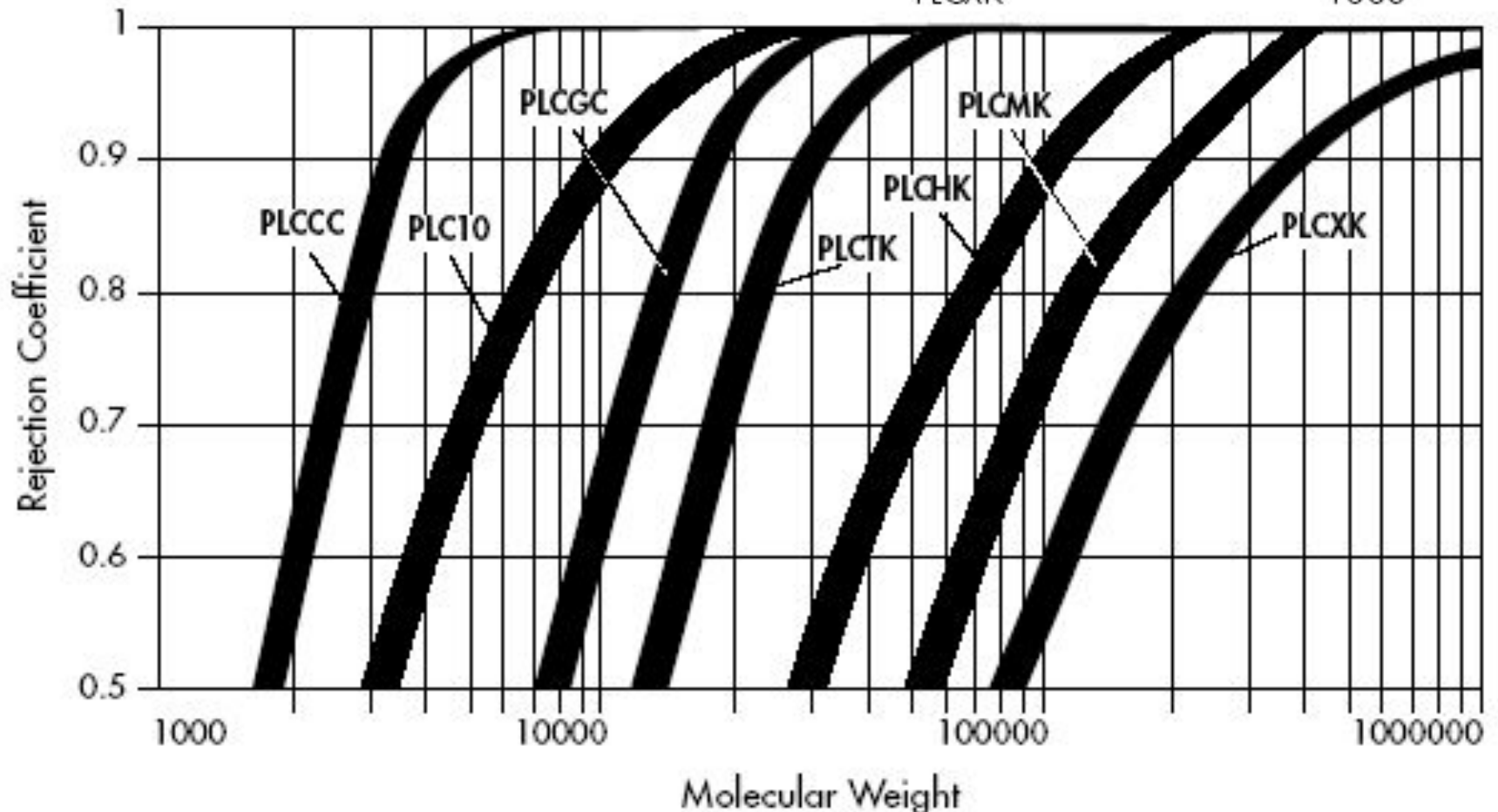
Номинальный предел молекулярной массы (nominal molecular weight limit - NMWL) - максимальная молекулярная масса белка или полисахарида, молекулы которого проходят через мембрану.

# Ультрафилтрационные мембраны

## NMWL

Ultracel PLC Membrane	NMWL* (kDa)
PLCCC	5
PLC10	10**
PLCGC	10
PLCTK	30
PLCHK	100
PLCMK	300
PLCCK	1000

Ultracel Membrane Dextran Rejection



## Оборудование для ультрафильтрации

Перемешиваемая ячейка  
(Stirred cell)

Стандартные рабочие  
объемы 3-500 мл



## Ультрафильтрационные патроны для центрифуг



Рабочие объемы как правило  
не превышают 15 мл

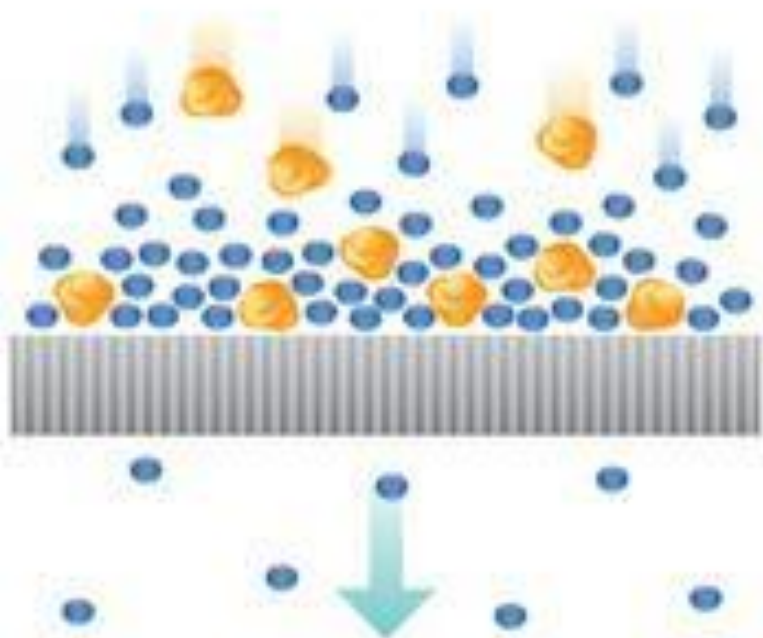
## Ультрафильтрационные патроны для центрифуг



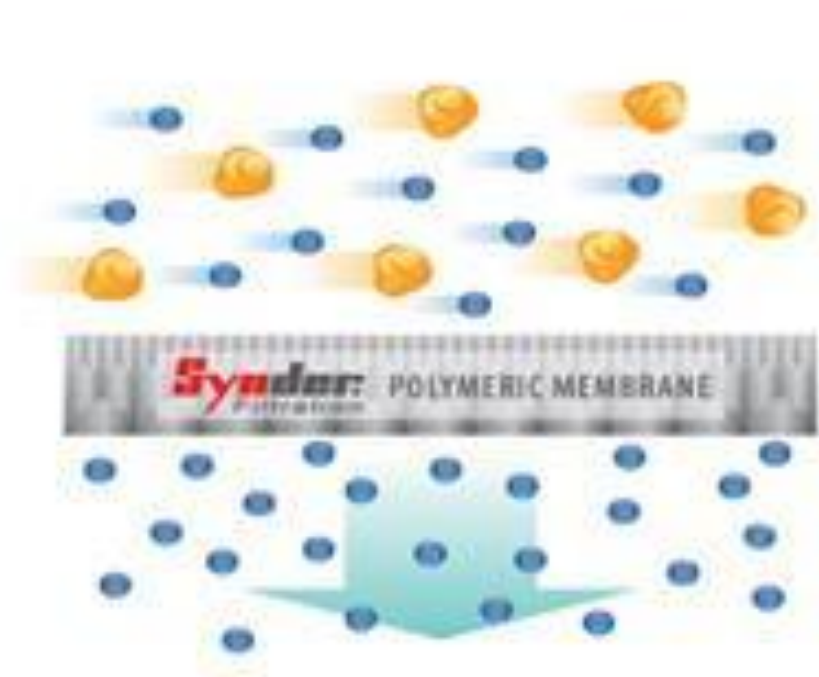
Рабочие объемы как правило  
не превышают 15 мл

# Тангенциальная (cross flow) ультрафильтрация

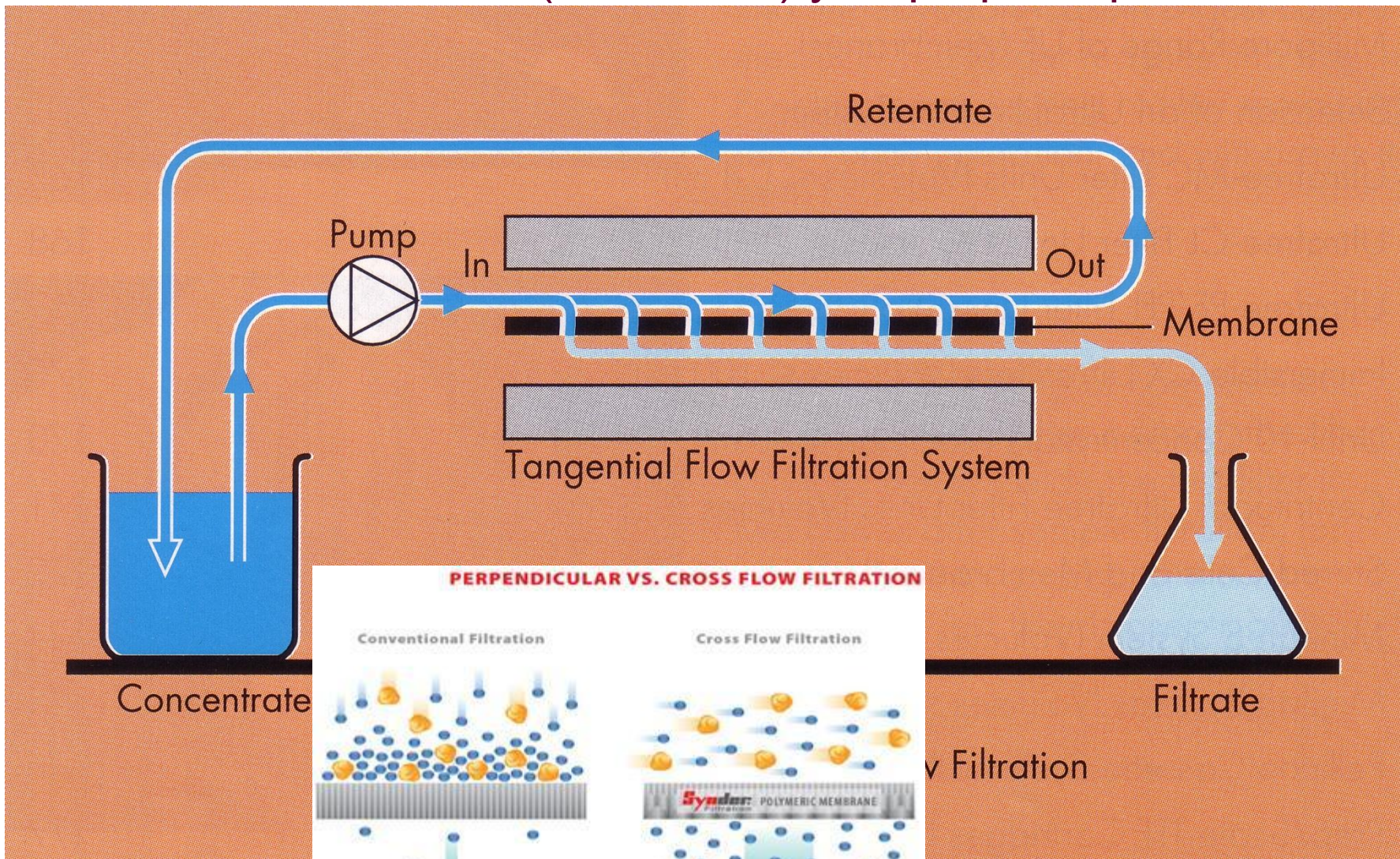
Conventional Filtration



Cross Flow Filtration



# Тангенциальная (cross flow) ультрафильтрация



Могут испо или полые волокна.  
Объем обрабатываемого раствора практически не ограничен.

Лабораторные системы начального уровня позволяют сконцентрировать 2 литра раствора белка до 50 мл за 1 час.



# Тангенциальная ультрафильтрация – полые волокна

