

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Волгоградский государственный медицинский  
университет» Минздрава здравоохранения Российской Федерации  
Кафедра фундаментальной медицины и биологии

### Отчетная работа

Учебной практики «Профильная учебная практика по биохимии»

По теме: «Хроматографические методы анализа белков: ион-обменная  
хроматография, гель-фильтрация, аффинная хроматография. Использование  
в биомедицинских исследованиях»

*Хмара Кристина*  
*Тема реферата: ион-обменная*  
*хроматография. Использование*  
*в биомедицинских исследованиях.*  
*20.01.2018*

Выполнили:  
студенты 3 курса 302 группы  
Бервинова Арина Владимировна  
Хмара Кристина Витальевна

Проверил:  
Доцент кафедры ФМиБ, к.м.н. Морковин Евгений Игоревич

Волгоград, 2018г.

## Содержание

Введение.....	3
1.Хроматографические методы.....	4
1.1. Классификация хроматографических методов.....	5
2.Ион-обменная хроматография.....	10
2.1. Практическое применение ион-обменной хроматографии.....	14
3.Аффинная хроматография.....	15
3.1.Требования к носителям.....	19
4. Гель-фильтрация.....	20
5.Использование в биомедицинских исследованиях.....	24
Список литературы.....	26

## **Введение.**

Хроматографическими методами можно определять газообразные, жидкие, и твердые вещества с молекулярной массой от единиц до  $10^6$ . Это могут быть неорганические вещества, например, ионы металлов, изотопы водорода, и органические – белки, синтетические полимеры и т.д. С помощью хроматографии получена обширная информация о строении и свойствах органических соединений многих классов. Хроматографию с успехом применяют в исследовательских и клинических целях в различных областях биохимии и медицины, в фармацевтике, криминалистике, пищевой промышленности, для мониторинга окружающей среды. Универсальность, экспрессность, чувствительность метода обуславливают частое использование хроматографии в аналитических целях.

Возникновение хроматографии как научного метода связано с именем русского ученого-ботаника М.С.Цвета, который впервые применил явление адсорбции для анализа зеленой части хлорофилловых пигментов листьев. В 1903 г. М.С.Цвет опубликовал статью, в которой сформулировал принцип нового метода и наглядно показал возможность отделения зеленой части хлорофилловых пигментов от желтой и оранжевой с помощью углекислого кальция (адсорбента). Однако метод хроматографии не использовался вплоть до 1930 года, когда немецкие биохимики Кун, Ледерер, Винтерштейн повторили опыты Цвета и успешно разделили каротин на отдельные изомеры, предсказанные Цветом. С этого времени хроматография стала развиваться в самых разнообразных направлениях.

Первые публикации, посвященные применению метода Цвета в неорганическом анализе, относятся к 1937 году и принадлежат Швабу и его сотрудникам. В этих работах приведена методика качественного анализа смесей некоторых катионов и анионов на стеклянной колонке с оксидом алюминия. С 1938 г. широкое распространение получил метод тонкослойной хроматографии, разработанный Н.А.Измайловым и М.С.Шрайбер.

Значительные успехи в разделении и анализе неорганических веществ были достигнуты в 50-х годах, когда в практику хроматографии были введены в качестве адсорбентов ионообменные смолы, что способствовало развитию ионообменной хроматографии. В 1941 году английские ученые Мартин и Синдж предложили метод распределительной хроматографии в жидкостно-жидкостном варианте.

В 1948 г. русские ученые Е.Н. Гапон и Т.Б. Гапон предложили осадочную хроматографию, основанную на различной растворимости осадков в подвижной фазе. Первая работа по газовой хроматографии в России была выполнена Н.М. Туркельтаубом в 1949г. В 1952 году Джеймс и Мартин применили газожидкостную хроматографию к анализу жирных кислот. Дальнейшему развитию газовой хроматографии способствовали работы русских ученых А.А. Жуховицкого, М.С. Вигдергауза, А.В. Киселева, Д.А. Вяхирева, А.В. Березкина и других. Более 10 работ (1957–1980), выполненных с применением хроматографических методов, были удостоены Нобелевских премий.

## **1.Хроматографические методы.**

Хроматография – это физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами – *подвижной* и *неподвижной*. Неподвижной фазой обычно служит твердое вещество (сорбент) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу.

Компоненты анализируемой смеси вместе с подвижной фазой перемещаются вдоль стационарной фазы, которую обычно помещают в колонку (стеклянную или металлическую трубку). Если молекулы разных компонентов разделяемой смеси обладают различной адсорбируемостью или растворимостью, то время их пребывания в неподвижной фазе, а

следовательно, и средняя скорость передвижения по колонке различны. Одни компоненты остаются в верхнем слое сорбента, другие, с меньшей адсорбируемостью, оказываются в нижней части колонки, некоторые покидают колонку вместе с подвижной фазой. Так достигается разделение компонентов. Хроматография – динамический метод, связанный с многократным повторением сорбционных и десорбционных процессов, так как разделение происходит в потоке подвижной фазы. Это обеспечивает эффективность хроматографического метода по сравнению с методами сорбции в статических условиях.

С помощью хроматографии возможны: разделение сложных смесей органических и неорганических веществ на отдельные компоненты, очистка веществ от примесей, концентрирование веществ из сильно разбавленных растворов, качественный и количественный анализ исследуемых веществ.

### **1.1. Классификация хроматографических методов.**

В основу классификации многочисленных хроматографических методов положены следующие признаки:

- 1) агрегатное состояние фаз;
- 2) механизм взаимодействия сорбент – сорбат;
- 3) способы проведения хроматографического анализа;
- 4) аппаратное оформление (техника выполнения) процесса хроматографирования;
- 5) цель хроматографирования.

**По агрегатному состоянию фаз** хроматографию разделяют на газовую и жидкостную. Газовая хроматография включает газожидкостную и газотвердофазную, жидкостная – жидкостно-жидкостную и жидкостно-твердофазную. Первое слово в названии метода характеризует агрегатное состояние подвижной фазы, второе – неподвижной.

**По механизму взаимодействия сорбента и сорбата** можно выделить несколько видов хроматографии: *адсорбционная* основана на различии в

адсорбируемости веществ твердым сорбентом; *распределительная* основана на различной растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе (газожидкостная хроматография) или на различной растворимости веществ в подвижной и неподвижной фазах (жидкостная хроматография); *ионообменная хроматография* – на разной способности веществ к ионному обмену; *эксклюзионная хроматография* – на различии в размерах и формах молекул разделяемых веществ; *аффинная хроматография* – на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических процессов (например, антитело и антиген, гормон и рецептор и др.). Существует *осадочная хроматография*, основанная на образовании отличающихся по растворимости осадков разделяемых веществ с сорбентом, *адсорбционно-комплексообразовательная*, основанная на образовании координационных соединений разной устойчивости в фазе или на поверхности сорбента, и др. Следует помнить, что классификация по механизму взаимодействия весьма условна: ее используют в том случае, если известен доминирующий механизм; часто процесс разделения протекает сразу по нескольким механизмам.

**По технике выполнения** выделяют *колоночную* хроматографию, когда разделение проводится в специальных колонках, и *плоскостную* хроматографию, когда разделение проводится на специальной бумаге (*бумажная* хроматография) или в тонком слое сорбента (*тонкослойная* хроматография). В колоночной хроматографии используют насадочные или капиллярные колонки. Насадочную колонку заполняют сорбентом (насадкой), а внутреннюю стенку капиллярной колонки покрывают пленкой жидкости или пылью адсорбента.

В зависимости от **цели проведения** хроматографического процесса различают *аналитическую* хроматографию (качественный и количественный анализ); *препаративную* хроматографию (для получения веществ в чистом виде, для концентрирования и выделения микропримесей); *промышленную* (производственную) хроматографию для автоматического управления

процессом (при этом целевой продукт из колонки поступает в датчик). Хроматографию часто используют для исследовательских целей при изучении растворов, каталитических процессов, кинетики химических процессов и т.п.

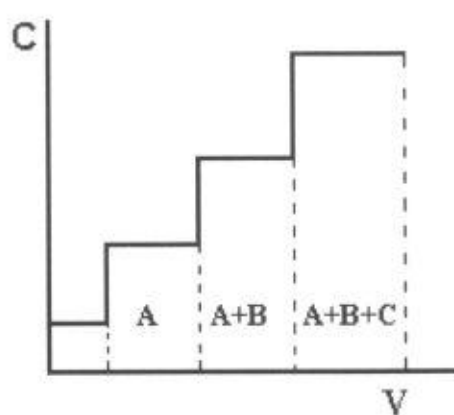
Классификация по способам проведения анализа подразделяет хроматографию на три вида:

- 1) фронтальный,
- 2) проявительный,
- 3) вытеснительный .

**Фронтальный метод** наиболее прост по выполнению. Через хроматографическую колонку с сорбентом непрерывным потоком пропускают раствор или газовую смесь исследуемых веществ, сорбируемость которых увеличивается в ряду  $A < B < C$ . Соответственно этому компоненты располагаются в колонке. Однако они разделяются не полностью. В чистом виде может быть выделен лишь первый, наиболее слабо сорбирующийся компонент, который движется вдоль слоя сорбента впереди остальных. За зоной первого компонента следует в непосредственном контакте зона, содержащая первый и второй компоненты. Третья зона содержит смесь первого, второго и третьего компонентов. В некоторый момент времени сорбент насыщается, и наступает «проскок», т.е. из колонки начинают выходить компоненты в соответствии с их сорбируемостью. Если пропускать жидкость или газ, выходящие из колонки, через детектор концентраций и наносить показания его в течение всего опыта на график, то полученная выходная кривая будет иметь форму ступенчатой кривой (рис.1.1).

Фронтальный метод не нашел широкого применения в анализе, т.к. не дает полного разделения компонентов анализируемой смеси. Однако этот метод весьма эффективен для препаративного выделения чистого вещества из технического образца при условии, что это вещество удерживается в колонке слабее всех других компонентов объекта анализа.

Типичные примеры применения фронтального анализа: очистка и умягчение воды ионообменными материалами; очистка воздуха активированными углями от отравляющих веществ в противогазах и вентиляционных фильтрах химических предприятий; концентрирование ценных веществ из сточных промышленных вод металлургических предприятий; очистка лекарственных препаратов и пищевых продуктов с помощью ионообменников и т.д.



*Рис. 1.1. Выходная кривая фронтального анализа  
A, B, C – разделяемые вещества*

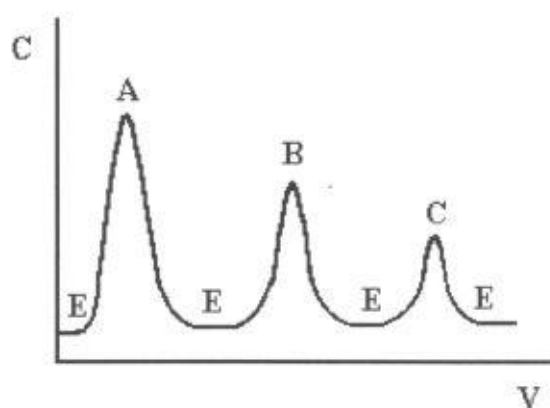
**Проявительный (элюентный) метод** выгодно отличается от фронтального тем, что он позволяет полностью разделить многокомпонентную смесь. Хроматографическую колонку промывают растворителем или газом-носителем (элюентом), обладающим меньшей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. Затем в колонку вводят исследуемую смесь в виде порции раствора или газа, а не непрерывно, и продолжают пропускать элюент. При этом разделяемые вещества перемещаются вдоль колонки с разными скоростями в соответствии с их сорбируемостью. На выходе из колонки детектор фиксирует непрерывно



концентрацию компонентов, а связанный с ним регистрирующий прибор записывает выходную кривую в виде ряда пиков, число которых соответствует числу разделенных компонентов (рис.1.2).

Проявительный метод анализа получил широкое применение как в жидкостной, так и в газовой хроматографии. Это объясняется тем, что при правильном выборе условий разделения компоненты смеси выходят из колонки в чистом виде, и их можно выделить для исследования другими методами анализа. Кроме того, качественный и количественный состав анализируемой смеси можно определить простым измерением объемов удерживания и площадей пиков соответствующих компонентов на полученной хроматограмме.

**Вытеснительный метод** отличается от фронтального и проявительного тем, что после введения пробы исследуемой смеси колонку



*Рис. 1.2. Выходная кривая проявительного анализа*

*A, B, C – разделяемые вещества, E – растворитель (элюент)*

промывают растворителем или газом-носителем, к которым добавляют раствор вещества (вытеснитель), обладающего большей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. По мере продвижения по колонке элюент вытесняет вещество C, которое в свою очередь вытесняет вещество B и т.д. В результате вытесняемая смесь перемещается впереди фронта

вытеснителя и скорость движения вещества равна скорости движения вытеснителя. Разделяемые вещества и на колонке, и в элюате располагаются последовательно друг за другом. Каждый из компонентов выделяется в чистом виде, но не количественно, так как зоны компонентов не разделены промежутками чистого сорбента.

Невозможность получения на выходе из колонки достаточно чистых компонентов разделяемой смеси, а также длительность процесса разделения затрудняют использование этого метода в аналитических целях. Однако для препаративных целей метод не потерял значения, так как возможность применения таких высокоактивных и доступных адсорбентов, как активированные угли, позволяет достигнуть высокой производительности. Достоинством метода является также то, что зоны не размываются в отличие от проявительного анализа.

## **2.Ион-обменная хроматография.**

В основе ионообменной хроматографии лежит обратимый стехиометрический обмен ионов, содержащихся в хроматографируемом растворе, на ионы веществ, называемых ионитами или ионообменниками. Иониты могут быть органические и неорганические, природные и синтетические. По знаку обменивающихся ионов различают катиониты (для обмена катионов) и аниониты (для обмена анионов).

К природным ионитам относятся алюмосиликаты, некоторые сорта каменных углей, мягкие и твердые угли даже без предварительной обработки.

В аналитической практике широко используют синтетические иониты. Ионообменники получают реакциями поликонденсации либо полимеризации, линейные цепи полимеров разветвлены и связаны друг с другом «мостиками», например, молекулами дивинилбензола; в состав ионитов входят различные функциональные (ионогенные) группы, которые и определяют наиболее характерные свойства ионитов. Иониты нерастворимы

в воде, кислотах, щелочах и во многих органических растворителях, но способны набухать в воде за счет гидрофильных ионогенных групп.

Органические катиониты содержат кислотные функциональные группы:  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{PO}_3^-$ ,  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{OH}^-$ . Органические аниониты содержат группы основного характера:  $-\text{NH}_2^+$ ,  $=\text{NH}^+$ ,  $\equiv\text{N}^+$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ . Катиониты представляют собой полиэлектролиты, диссоциирующие с образованием высокомолекулярного аниона (например,  $\text{RSO}_3^-$ ) и подвижного катиона (например,  $\text{H}^+$ -иона), легко обменивающегося на другие катионы. Аниониты диссоциируют на высокомолекулярный катион (например,  $\text{RNH}^+$ ) и подвижный анион (например,  $\text{OH}^-$ ), способный обмениваться на другие анионы (R – высокомолекулярный углеводородный радикал ионообменной смолы).

Реакции ионного обмена можно представить схематично следующим образом:



(катионный обмен)



(анионный обмен)

Реакции ионного обмена обратимы и в первом приближении подчиняются закону действующих масс.

Важной характеристикой ионита является его обменная емкость.

### **Обменная емкость ионитов**

Обменная емкость (ОЕ) – количественная мера способности ионита поглощать противоионы. Численно обменную емкость выражают количеством поглощенных миллимоль эквивалентов ионов на 1г сухой смолы в  $\text{H}^+$ -форме для катионита и  $\text{Cl}^-$ -форме для анионита.

Определение емкости можно отнести и к единице объема набухшего слоя ионита. Обменная емкость, полученная в статических условиях, когда навеску ионита помещают в раствор насыщающего иона определенной концентрации и выдерживают при встряхивании до полного насыщения ионита, называется статической (СОЕ). Величина ее отличается от величины обменной емкости, полученной в динамических условиях при пропускании насыщающего раствора через колонку с ионитом.

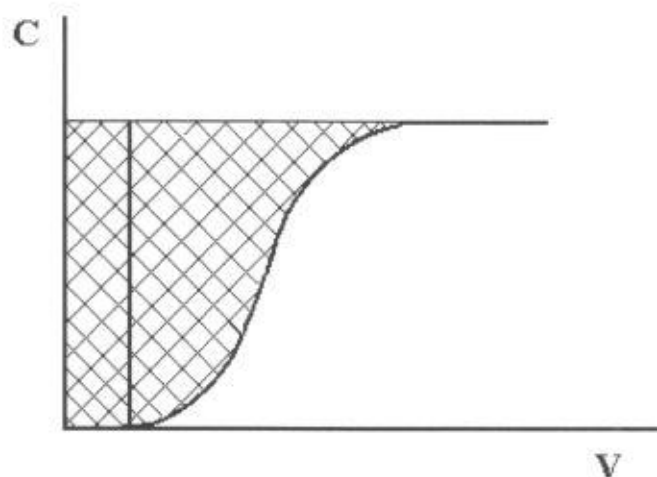


Рис. 1.3. Выходная хроматографическая кривая

Динамическая обменная емкость характеризуется двумя показателями: динамической обменной емкостью до проскока (ДООЕ) и полной динамической емкостью (ПДООЕ). ДООЕ представляет собой емкость ионита, определяемую по появлению данного иона в вытекающем из колонки растворе. ПДООЕ определяется по полному прекращению извлечения данного иона из раствора. Это различие можно пояснить графически на рисунке 1.3.

ДООЕ определяется площадью прямоугольника, основанием которого является объем раствора, вытекающего из колонки до наступления проскока иона, а высотой — исходная концентрация обмениваемого иона. ПДООЕ выражается площадью над выходной хроматографической кривой.

ДОЕ всегда меньше, чем полная динамическая обменная емкость, и зависит от ряда факторов: от типа ионита, состава раствора, размера зерен ионита и скорости протекания раствора.

### ***Классификация ионитов***

От вида функциональных групп, входящих в состав ионита, зависит, насколько сильно выражены кислотные или основные его свойства. В зависимости от этого различают четыре группы ионитов.

**1. Сильнокислотные** катиониты имеют в качестве функциональных групп сульфогруппу  $-\text{SO}_3^-$  и фосфорную группу  $-\text{PO}_3^-$ . Они используются в кислых, нейтральных и щелочных средах. Это сульфокислотные катиониты полистирольного типа марок КУ-2, КУ-23, СДВ, СБС. К фосфорнокислым относятся катиониты марок КФ-2, КФ-11. Катиониты полистирольного типа выпускаются в виде сферических гранул и имеют либо янтарную, либо светло-желтую окраску.

Катиониты фенольного типа, например, КУ-1, окрашены в черный цвет, их частицы имеют неправильную форму. Такие катиониты бифункциональны, т.е. наряду с группой  $-\text{SO}_3^-$  имеют в своем составе группу  $-\text{OH}^-$ . Преимущество полистирольных катионитов – их монофункциональность, высокая обменная емкость, высокая термическая устойчивость.

**2. Слабокислотные** катиониты имеют в качестве функциональных групп карбоксильные группы  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{OH}^-$ . Это катиониты марок КБ-1, КБ-4, КФУ-1. Катиониты с карбоксильными группами окрашены в белый или светло-зеленый цвет. Важным свойством подобных катионитов является их высокое сродство к иону водорода. Даже небольшого количества разбавленной соляной кислоты достаточно для полной регенерации катионита. Слабокислотные катиониты работают в щелочных и нейтральных средах.

**3. Сильноосновные** (высокоосновные) аниониты имеют в качестве функциональных групп четвертичные аммониевые группы. Это аниониты марок АВ-16, АВ-17, АВ-18, АВ-20. Они могут применяться для хроматографирования в кислых, щелочных и нейтральных средах. Сильноосновные аниониты имеют желтую или светло-желтую окраску. Они часто используются для разделения большинства ионов металлов. Ион щелочных, щелочноземельных, редкоземельных элементов, алюминия, никеля, меди и др. не сорбируются анионитами при любой концентрации соляной кислоты. Остальные ионы металлов в пределах концентрации HCl от 0,1 до 12 моль/л сорбируются анионитами в различной степени, т.к. образуют анионные хлоркомплексы, имеющие сильно отличающиеся константы нестойкости.

**4. Слабоосновные** (низкоосновные) аниониты в качестве функциональных групп имеют аминогруппы разной степени замещения:  $\text{NH}_2^+$ ,  $\text{NH}^+$ ,  $\equiv \text{N}^+$ . Это аниониты марок АН-2Ф, АН-1, АН-23 и др. Они работают в кислых и нейтральных средах. Анионит ЭДЭ-10П содержит несколько активных аминогрупп вторичного, третичного и четвертичного аммониевых оснований. Поэтому он обладает и слабоосновными, и в некоторой степени сильноосновными свойствами.

### **2.1. Практическое применение ион-обменной хроматографии.**

Методы ионообменной хроматографии используют преимущественно для разделения ионов. Простейшая методика разделения заключается в поглощении смеси компонентов и последовательном элюировании каждого компонента подходящим растворителем. Иониты используют также в водоподготовке (умягчение воды, опреснение морской воды); в гидрометаллургии и гальванотехнике (селективное извлечение ценных металлов из производственных растворов и сточных вод; в пищевой и гидролизной промышленности (очистка сахаросодержащих растворов,

осветление плодово-ягодных соков и т.д.); в медицине и фармацевтической промышленности (очистка лекарственных препаратов, антибиотиков).

Рассмотренные области применения ионообменных смол не исчерпывают всего многообразия, однако они показывают широкие возможности, которые открывают использование ионитов в аналитической химии и технологии.

### **3.Аффинная хроматография.**

Аффинная хроматография — это разновидность адсорбционной хроматографии. Основной особенностью аффинной хроматографии является наличие комплементарности между иммобилизованным на матрице лигандом и вторым партнером пары взаимодействующих компонентов, который извлекается из смеси с другими, не комплементарными лиганду веществами. Использование высокоизбирательного взаимодействия позволяет за одну стадию достичь очень высокой степени очистки искомого вещества. Аффинное взаимодействие является нековалентным и может быть ослаблено путем изменения рН, ионной силы раствора, введения в раствор веществ, препятствующих образованию комплементарных связей. Важными преимуществами аффинной хроматографии являются: высокая избирательность, эффект концентрирования искомого вещества на аффинной матрице и освобождение от гидролитических ферментов. Аффинная очистка часто позволяет сохранить нативную структуру вещества. Чаще всего лиганд иммобилизуют на матрице ковалентно. Для закрепления лиганда матрица должна быть предварительно активирована, то есть на поверхности частиц носителя должны быть созданы реакционноспособные группы. Наиболее распространенный способ активации — создание на поверхности матрицы электрофильных групп, способных к взаимодействию с нуклеофильными группами лиганда. При этом процесс иммобилизации лиганда сводится к его инкубации с активированной матрицей. Следует отметить, что скорость протекания реакции сильно зависит от рН среды. В иммунохимии применяют

как иммобилизацию антигена на матрице, так и присоединение к матрице антител. Разновидность аффинной хроматографии, в которой в качестве иммобилизованного лиганда используются антитела, носит название иммуноаффинной хроматографии.

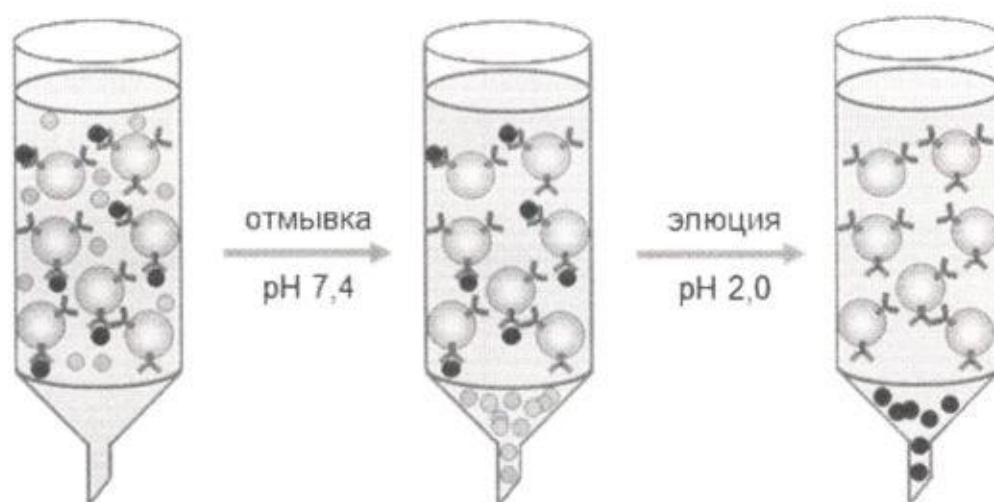
Одним из наиболее распространенных носителей, используемых в биохимии уже на протяжении нескольких десятилетий, является сефароза — специальным образом обработанные сферические гранулы агарозы. Известно несколько способов активации сефарозы, однако чаще других применяют метод активации сефарозы с использованием бромциана (BrCN). Преимуществом данного метода является простота, высокая устойчивость образующихся связей, стабильность сефарозы в довольно широком диапазоне pH (от 2,0 до 12,0). Относительная жесткость и крупные размеры частиц сефарозы позволяют использовать такие носители в колоночной хроматографии при достаточно высоких скоростях подачи растворов на колонку.

Активацию сефарозы осуществляют в процессе инкубации раствора бромциана с водной суспензией сефарозы. Бромциан взаимодействует с гидроксильными группами сефарозы, в результате чего образуется имидокарбонат, содержащий электрофильный атом углерода. Помимо этого в ходе реакции образуется неактивный карбамат, не способный к реакции с нуклеофильными боковыми группами аминокислот. При взаимодействии имидокарбоната с нуклеофильными группами, прежде всего с ε-аминогруппами лизина, происходит образование прочной ковалентной связи белка с активированной матрицей через остаток изомочевины или N-замещенного карбамата. Реакция активации матрицы бромцианом проходит только в щелочной среде с выделением бромистоводородной кислоты, для нейтрализации которой требуется постоянное добавление щелочи к реакционной смеси. Реакция бромциана с гидроксилами матрицы экзотермична, поэтому ее проводят на ледяной бане.



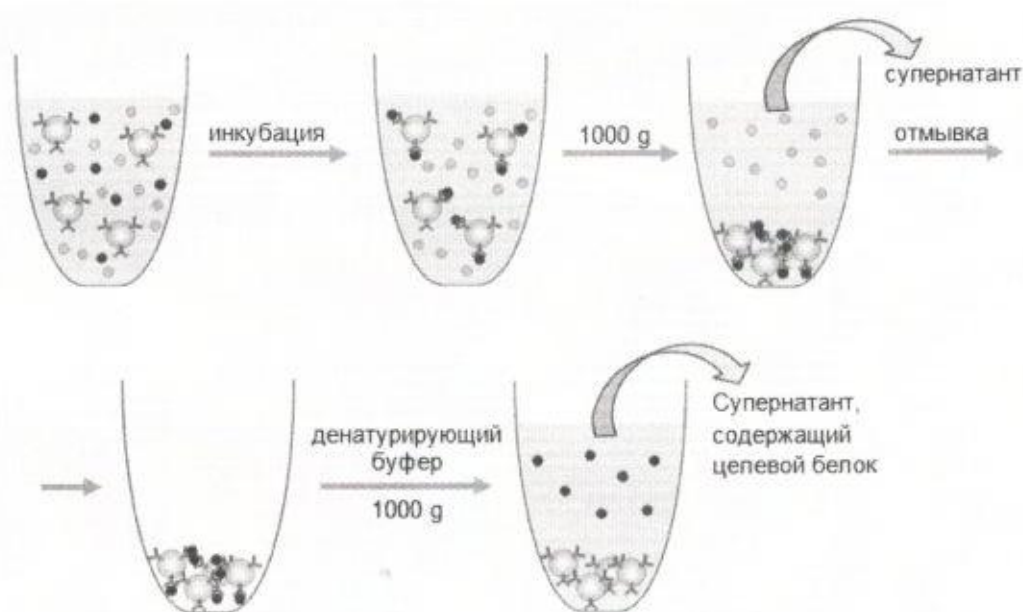
В иммунохимических исследованиях с использованием BrCN-активированной сефарозы готовят два типа носителей — носители с иммобилизованными антигенами и носители с иммобилизованными антителами. Первые имеют ограниченное применение и используются, как правило, для выделения из сыворотки иммунного животного (содержащей антитела различной специфичности) пула антител, специфичных только к белку, иммобилизованному на носителе. Гораздо чаще на практике используют носители с иммобилизованными антителами. Основная область применения таких носителей — экстракция из грубой смеси макромолекул (как правило — белков). Высокая специфичность антител к антигену позволяет за короткий промежуток времени и в одну стадию получить высокоочищенный (с чистотой до 95-99%) препарат белка.

Экстракцию исследуемого белка из смеси осуществляют двумя способами. Первый, используемый, как правило, для получения препаративных количеств белка, основан на применении метода колоночной иммуноаффинной хроматографии. В зависимости от поставленной задачи аффинным носителем заполняют колонки различного диаметра (от нескольких миллиметров до метра) и через эти колонки пропускают белковый раствор, содержащий исследуемый антиген. Большинство макромолекул проходит через частицы носителя не задерживаясь, в то время как между антителами, иммобилизованными на носителе, и антигеном, содержащимся в растворе, образуется иммунный комплекс. После отмывки носителя от не связавшихся белков иммунный комплекс разрушают, пропуская через носитель растворы с низкими (pH 2,0 — pH 4,0) или высокими (pH 11,0 — pH 12,0) значениями pH, либо растворы с высокой ионной силой (2M NaCl), либо растворы, содержащие хаотропные соединения (KSCN). При этом исследуемый белок элюируют с носителя, его собирают и переводят в оптимальный для хранения данного белка буфер.



. Схема хроматографии белков на аффинном носителе.

Второй способ экстракции исследуемого белка из сложной смеси — иммунопреципитация, или экстракция в объеме. Иммунопреципитацию используют при работе с незначительными (нано- и микрограммы) количествами вещества. При этом объем аффинного носителя обычно не превышает сотен микролитров, а объем исследуемого образца — нескольких миллилитров. То есть, иммунопреципитацию используют в тех ситуациях, когда из-за малого количества исследуемого вещества оказывается технически сложным создать адекватную по размерам аффинную колонку.



### *Схема аффинного выделения белков методом иммунопреципитации.*

При проведении иммунопреципитации образец, содержащий исследуемый белок, некоторое время инкубируют (при постоянном перемешивании) с частицами носителя. В процессе инкубации образуется иммунный комплекс, и исследуемый белок переходит из раствора на частицы носителя. После этого носитель осаждают, как правило, центрифугированием, супернатант отбрасывают, а иммунный комплекс, иммобилизованный на частицах носителя, разрушают добавлением тех же растворов, что и в случае с колоночной хроматографией. Также иммунный комплекс может быть разрушен ДСН-содержащим буфером, который используют для приготовления образца белка при проведении ДСН электрофореза. Такой буфер используют в том случае, если в дальнейшем планируют изучать экстрагированный белок с использованием метода электрофореза в денатурирующих условиях, или методом вестерн-блоттинг. Однако при использовании данного метода элюции белка следует учитывать, что повторное использование носителя становится невозможным из-за денатурации иммобилизованных антител. Кроме того, исследуемый образец помимо целевого белка будет содержать легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов.

### **3.1. Требования к носителям.**

- Стерическая доступность.

Образование комплекса БАС с лигандом, который ковалентно связан с матрицей требует достаточного пространства. Поэтому одно из важнейших свойств носителей – высокая пористость. Однако, пористость не играет роли при хроматографии полисом, рибосом, интактных клеток. В этом случае все взаимодействия происходят с поверхностными группами сорбента.

- Конформация присоединенного лиганда.

Высокая реакционная способность специфических субстратов обусловлена наиболее благоприятной конфигурацией групп субстрата. Поэтому способы

привязки лиганда ограничены, т. к. лиганд должен быть привязан той частью молекулы, которая не принимает участия в связывании.

- Концентрация БАС, время уравнивания, скорость потока.

Наносить следует разбавленные растворы БАС, т. к. то связано с диффузией в поры, стерическими затруднениями. Процесс аффинной хроматографии – процесс медленный, т. к. необходимо некоторое время для образования комплекса. Поэтому уменьшение числа теоретических тарелок приводит к увеличению эффективности. Иногда поток элюента останавливают на несколько часов и только потом начинают специфическое элюирование.

- Неспецифические влияния.

Неспецифическая сорбция балластных веществ возможна вследствие ионного обмена или гидрофобных взаимодействий.

#### **4. Гель-фильтрация**

Гель-фильтрация (синоним гель-хроматография) — метод разделения смеси веществ с различными молекулярными массами путем фильтрации через различные так называемые ячеистые гели. Гель-фильтрация широко используется для определения величин молекулярных масс, обессоливания растворов нативных белков, концентрирования растворов полимеров. В медицине Гель-фильтрация применяют для диагностического разделения белков сыворотки крови, например при макроглобулинемии, гемоглобинопатиях, при ранней диагностике беременности, для получения очищенных препаратов ферментов. Гель-фильтрация проводят на хроматографических колонках, заполненных набухшим гранулированным гелем, например гелем сефадексов (коммерческое название полисахаридов декстранов, прошедших специальную химическую обработку, в результате которой между линейными структурами их молекул образуется множество поперечных связей, или «сшивок»), биогелем и т.п., элюируют (вымывают) разделяемые вещества разбавленными солевыми или буферными растворами.

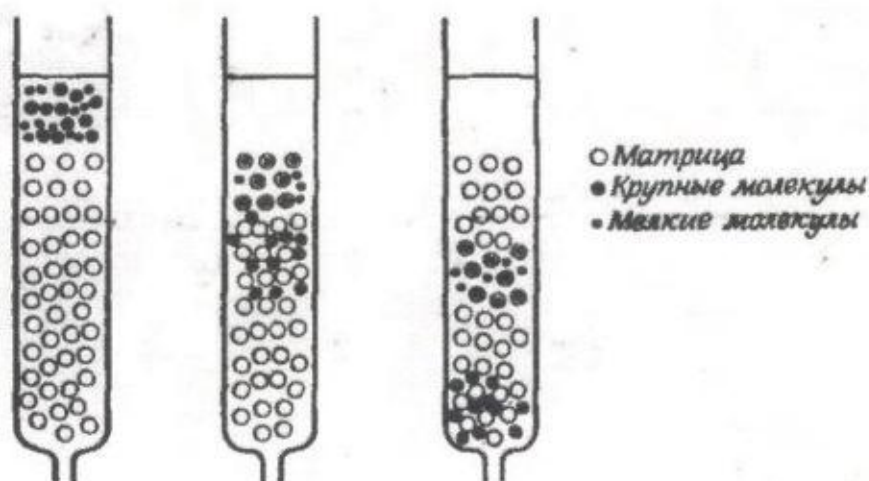
Эффективность Гель-фильтрация определяется размерами пор между гранулами геля и величиной ячеек каждой гранулы: мелкие молекулы вещества (значительно меньше ячейки геля) диффундируют внутрь гранулы и задерживаются при фильтрации через эти своеобразные молекулярные сита, а более крупные молекулы не могут попасть в ячейки и проходят в поры между гранулами. Метод прост в исполнении и проводится в мягких условиях, исключая денатурацию биологически активных белков, что важно при работе, например, с ферментами.

### **Принцип действия.**

Принцип разделения в таких системах несколько иной, чем в предыдущих случаях. Неподвижной фазой являются материалы, обычно гели, со строго контролируемой пористостью, в результате чего одни компоненты смеси в соответствии с размером и формой молекул могут проникать между частицами геля, а другие не могут. Наиболее часто этот вид хроматографии используется для разделения высокомолекулярных соединений. Один из вариантов применения этого метода – определение молекулярных масс разделяемых веществ, часто необходимых для химических исследований.

Разделение молекул по размерам и форме основано на свойствах молекулярного сита, которыми обладают многие пористые материалы. Наиболее часто для этой цели применяют органические полимеры с трехмерной сетчатой структурой, придающей им свойства гелей. Разделение веществ с помощью гелей, основанное в различиях в размере молекул, называется гель-фильтрацией. В последнее время в качестве молекулярного сита стали применять пористые стеклянные гранулы, а сам метод разделения получил название хроматографии фильтрованием через стекло с заданным размером пор. Понятие проникающая хроматография включает в себя все виды разделения молекул, основанные на принципе молекулярного сита. Принцип, лежащий в основе метода проникающей хроматографии, весьма

прост. Хроматографическую колонку заполняют набухшим гелем или пористыми стеклянными шариками и уравнивают с помощью соответствующего растворителя. Крупные молекулы, не проникающие в поры сита, проходят между частицами геля, в то время как небольшие молекулы «застревают» в них и движутся с меньшей скоростью. Три стадии такого разделения:



К материалам для проникающей хроматографии относятся гели, в том числе и декстрины с поперечными сшивками (торговое название сефадекс), агарозные гели (сефароза, биогель А, сагавак), полиакриламидный гель, полиакрилоилморфин (энзокрилгель) и полистиролы (Био-Бидз S). Применяют также пористые стеклянные шарики (гранулы), известные под названием биоглас, и пористый кварц – порастил.

Декстрановые гели получают поперечным сшиванием полисахаридных цепочек декстрана эпихлоргидрином, благодаря чему растворимый в воде декстран становится водонерастворимым, сохраняя при этом свои гидрофильные свойства и способность к быстрому набуханию в водной среде. Варьируя число поперечных сшивок, удалось получить несколько различных типов сефадексов, различающихся степенью пористости частиц, что позволяет применять их для разделения веществ с различными размерами молекул. Поскольку поперечные связи между цепочками

распределены произвольно, размеры пор одного и того же геля варьируют в весьма широких пределах. Это означает что молекулы, размер которых меньше некоторого критического, могут полностью или частично проникать внутрь частиц геля. Каждый тип сефадекса характеризуется так называемой «величиной поглощения воды», т.е. количеством воды, приходящейся на 1 г сухого сефадекса в полностью набухшем геле.

Гели сефадекса нерастворимы и стабильны в воде, солевых растворах и органических растворителях, а также в щелочных и слабокислых растворах. В сильноокислых растворах может произойти гидролиз гликозидных связей матрицы геля. Во влажном состоянии сефадекс можно стерилизовать в автоклаве при температуре 100С в течение 40 мин; свойства геля при этом не меняются.

Агарозные гели, приготовляемые из агара, - это линейные полисахариды, состоящие из чередующихся остатков D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы. Свойства гелей им придают водородные меж- и внутримолекулярные связи. Благодаря своей гидрофильной природе и почти полному отсутствию заряженных групп агарозные гели, подобно декстрановым, лишь в незначительной степени вызывают денатурацию и адсорбцию лабильных биохимических соединений. Агарозные гели, отличающиеся высокой степенью пористости, хорошо дополняют декстрановые. В отличие от последних, которые применяются для фракционирования сферических молекул, таких, как глобулярные белки мол. весом примерно 800 000 или произвольно свернутые полимеры агарозные гели применяются для разделения молекул и частиц с молекулярным весом порядка нескольких миллионов дальтон. В связи с этим они широко используются при изучении вирусов, нуклеиновых кислот и полисахаридов.

## 5.Использование в биомедицинских исследованиях.

Хроматографические методы находят широкое применение в клинической практике. Хроматография на бумаге и ТСХ используют для определения аминокислот, углеводов, нуклеотидов, кетокилот, гормонов и др. в биологических жидкостях (сыворотка крови, моча, слюна, пот) или в экстрактах из тканей в норме и при различных патологических состояниях.

Методом хроматографии на бумаге установлены состав и содержание свободных аминокислот в плазме крови и в моче здоровых людей и при некоторых заболеваниях с нарушением азотистого обмена, например при болезнях печени, почек, болезни Вильсона (гепато-церебральная дистрофия), синдроме Фанкони (цистиноз), недостаточности витаминов, фенилкетонурии и других психических заболеваниях, вызванных токсическим действием отдельных аминокислот или продуктов их неправильного обмена на ЦНС В нормальной моче человека на двухмерной бумажной хроматограмме могут быть обнаружены глютаминовая кислота (или глютамин), аланин, глицин, таурин,  $\beta$ -аминоизомасляная кислота ( $\beta$ -АИМК), гистидин или метилгистидин.  $\beta$ -АИМК впервые открыта при помощи хроматографии на бумаге. Эта аминокислота встречается в больших количествах у отдельных индивидуумов (семейный признак); она найдена примерно у 5—10% населения. Остальные аминокислоты могут быть выявлены на хроматограмме после сгущения мочи. Аминоацидурия хроматографически выявляется при печеночной коме, некрозах печени, злокачественных новообразованиях, нефритах, ожогах, голодании. Обнаружение на хроматограммах в моче детей аргининоянтарной кислоты (АЯК) впервые позволило описать и выяснить патогенез наследственного психического заболевания детей, названного аргининоянтарной ацидурией; причиной заболевания является утрата гена, связанного с синтезом сукцинаргиназы. Высокое содержание АЯК в цереброспинальной жидкости вызывает отравление ЦНС.



ТСХ на окиси алюминия и силикагеле используют для качественного и количественного определения гормонов коры надпочечника (17-кетостероидов) и половых гормонов — андростерона и эстрогенов — в плазме крови и моче; этот метод применяют для ранней диагностики беременности и при гормональных заболеваниях. Сочетание электрофореза и хроматографии на бумаге впервые позволило установить различие в аминокислотном составе нормального гемоглобина человека (гемоглобин А) и гемоглобина больных серповидноклеточной анемией (гемоглобин S), положив начало изучению болезненных процессов, совершающихся на молекулярном уровне (при которых клиническое состояние больного обусловлено присутствием химически измененной белковой молекулы).

Хроматография оказалась незаменимой для изучения патогенеза болезней, протекающих с нарушением различных других сторон обмена веществ, что открыло новые диагностические возможности и указало пути к рациональной терапии некоторых заболеваний. Широкое применение находит хроматография в судебно-медицинской экспертизе.

## Список литературы.

1. Васильев В. П. Аналитическая химия. Ч. 2– М.: Дрофа, 2007. 384 с.
2. Основы аналитической химии. 2 кн. /Под ред. Ю. А. Золотова.– М.: Высшая школа, 2004. –359 с. (кн.1), 503 с. (кн.2)
3. Ю.Я.Харитонов. Аналитическая химия. Аналитика. т. 1, 2.– М.: Высшая школа, 2001.– 615 с., 559 с.
4. Отто М. Современные методы аналитической химии.– М.: Техносфера, 2008.– 543 с.
5. О.М.Петрухина. – М.: Химия, 2001. – 496 с.
6. Аналитическая хроматография / К. И. Сакодынский, В. В. Бражников, С. А. Волков и др.– М.: Химия, 1993.– 463 с.:
7. Айвазов Б.В. Введение в хроматографию. – М.: Высшая школа, 1983. – 250с.
8. Дорохова Е. Н., Прохорова Т.В. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа. – М.: Высшая школа, 1991. – 256с.