

## Хроматографски методи

Принципът на хроматографските методи е разделяне и концентриране на веществата на граничната повърхност между две фази – подвижна и неподвижна, благодарение на различната адсорбционна способност на веществата.

Класификация на базата на физикохимичния процес, чрез който става разделянето:

- адсорбционна
- разпределителна
- йонообменна
- молекулно-ситова
- афинитетна

Според начина на елуиране биват – фронтален, изместителен и разпределителен анализ.

Според разположението на фазите хроматографиите могат да бъдат колонни, тънкослойни, хартиени и др.

В зависимост от мащаба на хроматографския процес се различават аналитична, препаративна и промишлена хроматография.

### I. Молекулно-ситова хроматография

Разделянето се основава на дифузия в порьозни гелове. Тук стационарната фаза трябва да е химически инертна. Степента на задържане на молекулите от гела зависи от размера на разтворените молекули, отнесен към размера на порите. Малките молекули ще проникват и в най-малките пори и ще се отделят от другите, а най-големите молекули ще “пътуват” по-бързо през стационарната фаза и ще се елуират първи от колоната. Така гел-филтрацията е особено подходяща за разделяне на високомолекулни

органични съединения, каквито са белтъците, от по-малки молекули.

Използвани гелове: декстранови / Sephadex G10, G15, G25 и т.н. в зависимост от размера на порите./, агарозни гелове /Sepharose/ и съполимерни гелове на ПЗХ и друго органично вещество / Sephacryl/.

### II. Йонообменна хроматография

Йонообменната хроматография е тип течна хроматография, при която белтъците се разделят на база разлика в зарядите. Използват се модифицирани гранули, чиято повърхност е покрита с аминокиселини или карбоксилни групи и така носи положителен или отрицателен заряд при неутрално рН. Когато разтвор с протеини преминава през колона с положително заредени гранули, само протеините с отрицателен нетен заряд ще се свържат с гранулите. Положителните и неутралните протеини преминават невъзпрепятствани през колоната. След това киселите белтъци селективно се елуират като през колоната се пропуска елуент с нарастващ солеви градиент. При ниски солеви концентрации белтъците и гранулите са свързани чрез противоположните си заряди. При по-високи солеви концентрации, отрицателните йони на солта се свързват с положително заредените гранули, измествайки негативно заредените белтъци. При градиент с нарастваща солева концентрация, най-слабо заредените протеини се елуират първи, а тези с най-голям заряд – последни.

Аналогично, негативно заредената колона се използва за задържане на фракцията от позитивно заредени белтъци.

**Колоната се пълни с йонообменници – катионити и анионити, които са специални полимери със заредени групи.**

**Процесът, който се извършва при йонообменната хроматография е електростатична адсорбция. Силно адсорбиращия се компонент на базата на електростатични сили се задържа, а слабоадсорбиращият се компонент изтича с елуента.**

## При йонообменната хроматография се използват буфери с различна йонна сила.

III. Афинитетна хроматография – това е една селективна филтрационна техника за макромолекули, използваща високоспецифични, обратими биохимични реакции. При изолирането на белтъци техниката се основава на възможността на белтъците да се свързват специфично с други молекули. В колоните ковалентно са свързани лиганди, които специфично свързват интересувания ни протеин. Лгандите могат да бъдат ензимни субстрати или други малки молекули, които специфично се свързват с белтъци. Често използвана техника е антитяло-афинитетната хроматография. Прикаченият лиганд е антитяло срещу желанния белтък. Колоната ще задържа само белтъците, които са се свързали с лиганда, останалите белтъци ще преминават през нея независимо от масата и заряда си. Свързаните с лиганда протеини се елуират с излишък от лиганда или с промяна на солевата концентрация или рН. Очевидно възможността на тази техника да разделя специфични белтъци зависи от избора на подходящи лиганди.

Принцип на действие:

1. матрица + лиганд = афинитетен носител
2. прибавяне на смес от вещества  $S_1$ ,  $S_2$  и  $S_3$
3. афинитетен носител, свързан с  $S_2$
4.  $S_1$  и  $S_3$  напускат
5. елуиране и изолиране на  $S_2$  и възстановяване на афинитетния носител

При избора на матрица е необходимо тя да отговаря на следните условия: неразтворимост, хидрофилност, механична стабилност, подходяща форма и размер на гранулите, химична инертност по време на хроматографията, наличие на химични групи, които могат да се модифицират за свързване с лиганда.

Лгандите могат да бъдат с индивидуална или групова специфичност. С цел по-доброто захващане на лиганда за матрицата се удължава рамото му. При много къси и много дълги рамена колоната е неефективна.

IV. Адсорбционна хроматография /хроматография течност – твърдо вещество/

Разделянето се основава на взаимодействие между разтвора и активни места, фиксирани на твърдия адсорбент, използван като стационарна фаза. Адсорбентът може да запълва колона, да бъде нанесен на плака, или да инпрегнира порьозна хартия.

Чиста адсорбция се наблюдава, ако свързването се наблюдава само по повърхността на адсорбента. Ако освен взаимодействие по повърхността на адсорбента имаме и навлизане в порите му, тогава адсорбцията е с молекулно-ситов характер.

Ако свързването между сорбента и веществата е обратимо, то броят на свързаните молекули ще е правопропорционален на концентрацията на разтвореното вещество. Разделянето става благодарение на това, че веществата имат различни изотерми и дори при еднакви концентрации, те ще насищат по различен начин сорбента. Придвижването на веществата по дължината на колоната е обратно пропорционално на силата на свързване със сорбента.

Видове сорбенти : двуалуминиев триоксид, силикагел /за АК, витамини, хормони, стерини/, активен въглен / за АК, МЗХ, ОЗХ/, калциев фосфат /за белтъци и пептиди с никса мол. маса/.

V. Разпределителна хроматография - Разделянето се осъществява между две несмесващи се течности, едната от които е подвижна, а другата неподвижна фаза. Неподвижната фаза е върху носител или матрица. Задължително условие е носителят на неподвижната фаза да не адсорбира разтворените вещества. Примерни носители – силикагел, декстран, целулоза, скорбяла.

**Ако разтворимостта на разделяната вещество е различна в двете течности, то ще преминава от едната в другата течност до установяване на равновесие, което съответства на разпределителния коефициент.**

**Идентификацията на компонентите се извършва с външни и вътрешни свидетели.**

### VI. Тънкослойна хроматография

Извършва се на хоризонтални плаки – стъклени или от алуминиево фолио. Върху плаките се излива гел /2-3 мм. / – двуалуминиев триоксид, целулоза, полиакрил, полиетилен и д. Пробата се нанася на пътеки или капки, като се оставят две пътеки за стандарти. Сравняваме стандартите с нашата проба. Това, обаче, е възможно, когато имаме оцветени продукти. В противен случай се преминава към изгаряне и белязане с флуоресцентен маркер.

Тънкослойната хроматография е приложима за разделяне на белтъци, АК и особено фосфолипиди.

Предимства : висока разделителна способност, висока скорост на разделяне, богат набор от сорбенти, лесно извличане на петната, много по-голяма гранична повърхност в сравнение с колонната хроматография, ниска вероятност за грешки и относително ниска цена.

Тънкослойна гел-проникваща хроматография – използва се за определяне на молекулна маса. По-големите компоненти ще “избързат”, докато нискомолекулните компоненти ще проникнат в гела и ще се забавят. Колкото е по-голяма молекулната маса, толкова по-голямо ще е изминатото разстояние. Плаките след това се подлагат на електрофореза и така се установява дали петната са еднокомпонентни или съдържат няколко компонента.

### VII. Хроматография на базата на хидрофобни взаимодействия /обратнофазова хроматография/

Използва се хидрофобна стационарна фаза и полярна подвижна фаза, обикновено вода, заедно със смесващ се с нея разтворител. При този тип хроматография нейонни, йонни и йонизиращи се съединения могат често да се разделят, понякога едновременно, използвайки единична колона и подвижна фаза. Колоните със свързана фаза са относително устойчиви. Редът на елуиране е лесно предвидим, тъй като времената за задържане нарастват успоредно с хидрофобния характер на веществата. Така може да се разделя смес от хидрофилни и хидрофобни белтъци. Чрез обратнофазова

хроматография се изолират серумни белтъци, гликопротеини и др. Може да се проведе и пептидно картиране като смес от белтъци и протеази се пусне през колоната и в нея получените пептиди се разделят в зависимост от тяхната хидрофобност. Последните излезли са най-хидрофобни.

VIII. Газова хроматография – вид разпределителна хроматография. Отличителните и черти са, че подвижната фаза е газ и че движението на ивиците на компонентите по посока на хроматографското проявяване включва принудителна дифузия на веществата в техните газови фази. Този вид хроматографски метод е изключително чувствителен. Неподвижната фаза е течност, подвижната инертен газ носител, който внася пробата в колоната. Разделянето се основава на различна адсорбция на отделните компоненти в течната фаза. Най-силно адсорбиращите се компоненти са най-горе в колоната, а най-слабо адсорбиращите се – най-долу.

Газовата хроматография може да се използва за определяне на броя АК в даден белтък, както и за процентното съотношение на видовете АК.

### **Електрофоретични методи**

Електрофоретичните методи са свързани с движение на макромолекули или колоидни частици във флуидна среда /газ или течност/. Биополимерите, движещи се в течна среда образуват дисперсна система. Приложеното електрично поле води до придвижване на дисперсната фаза спрямо дисперсната среда.

При електроосмозата се наблюдава движение на дисперсната среда под действие на приложеното електрично поле.

Механизмът на електрофорезата се обяснява с наличието на повърхностен заряд върху твърдата повърхност, компенсирани с обемен, дифузно-размит заряд в течността.

Разтворените молекули в електричното поле се придвижват в зависимост от тяхното съотношение - заряд/маса. Например, ако две молекули са с еднаква маса и форма, тази с по-големия нетен заряд ще се движи по-бързо към електрода. Сепарирането на малки молекули като АК и нуклеотиди е едно от многото приложения на електрофорезата.

### I. SDS-PAA гелна електрофореза

Много протеини и нуклеинови киселини имат различна големина и форма, но почти еднакви отношения заряд/маса. Електрофорезата на такива макромолекули в разтвор води до малко или почти никакво разделяне. Независимо от това успешно разделяне може да се постигне чрез електрофореза в различни гелове, а не в разтвор. Електрофоретично разделяне на белтъци най-често се прилага в ПАА гелове. Размерите на порите на гела варират в зависимост от концентрацията на акриламида и омрежващия агент.

Когато смес от протеини се нанесе в гела и се приложи електрично поле, малките по размер протеини мигрират по-бързо в гела. Скоростта на придвижване се влияе от големината на порите и от силата на приложеното електрично поле.

Протеините са подложени на действието на йонния детергент SDS /натриев додецил сулфат/ преди и по време на гелната електрофореза. SDS елиминира различията във формата като денатурира белтъците. Така дължината на ППВ и съответно масата на белтъците единствена определя миграцията им при SDS-PAA електрофореза. С тази техника могат да бъдат разделени ППВ, които се различават по молекулна маса с по-малко от 10%. Нещо повече, молекулната маса на неизвестен белтък може да бъде определена, като се сравни изминатото от него разстояние в гела с това на протеин с известна молекулна маса /маркер/.

### I. 2-D гелна електрофореза

Електрофореза на всички клетъчни протеини чрез SDS гел може да раздели протеини със сравнително големи разлики в молекулната маса, но не може да раздели молекули с приблизително еднакви мол. маси /напр. 41 kDa протеин от 42 kDa – нов белтък/. За разделяне на протеини със сходни маси трябва да се използва друга физична характеристика. Най-често това е електричният заряд, който се определя от киселинни или основни остатъци в белтъка. Два различни протеина с приблизително еднакви молекулни маси имат различни нетни заряди, поради различната АК-последователност и съответно различния брой кисели и основни остатъци.

При 2-D електрофорезата белтъците се разделят на две стъпки – първо по заряд и след това по маса. В първата стъпка клетъчният екстракт се денатурира напълно с високи концентрации урея. След това се нанася върху ПАА, наситен с амфолити. При прилагане на електрично поле амфолитите се разделят и формират непрекъснат градиент, базиран на нетния им заряд. Най-силните полианиони от амфолитите се събират в единия край, а най-силните катиони в противоположния край. Така амфолитите формират рН градиент. Заредените протеини ще се придвижват през градиента, докато не достигнат изоелектричната си точка  $pI$ , или рН-то, при което нетният заряд на белтъка е равен на 0. Тази техника се нарича изоелектрично фокусиране /ИЕФ/ и чрез нея се разделят белтъци, които се различават по нетния си електричен товар.

Белтъците, разделени на гел чрез ИЕФ, могат да бъдат разделени във второ направление, базирано на молекулните им маси. Така гелът от ИЕФ се поставя хоризонтално на втори ПАА гел, наситен с SDS. След прилагане на електрично поле белтъците мигрират в SDS-гела и се разделят според молекулната им маса.

По този начин чрез 2-D електрофореза могат отлично да се разделят клетъчни белтъци.

III. Пулсова електрофореза – чрез пулсова електрофореза могат да се разделят големи биополимери с малка разлика в молекулната маса. Методът е широко приложим за големи фрагменти ДНК.

При пулсовата електрофореза полето известно време действа в една посока, а след това в обратната. Периодът на алтернация е времето, за което става смяна на полето. Известен недостатък на метода е, че полето може да се изкриви и да не може да се “прочете” резултатът от електрофорезата.

IV. Капилярна електрофореза – провежда се в кварцова капилярна тръбичка, която е отрицателно заредена. Тя се пълни с буферна система. На стените и се образува ДЕС /двойно електричен слой/, което означава, че на стената се адсорбират противойони. Наблюдава се движение на дисперсната среда /електроосмоза/.



При внасяне на смес от белтъци, ако пробата е положително заредена, тя се движи от собствената си електрофоретична подвижност и потока. Ако пробата е отрицателно заредена, движението е разликата от собствената ѝ електрофоретична подвижност и тази на потока. При неутрална проба, тя няма електрофоретична подвижност и се движи само от потока.

Пробата може да бъде нанесена хидродинамично / с помпа/, гравитационно или изотахофоретично.

Селективност на метода може да се постигне с промяна в рН, като капиллярата се напълни с ПАА, вместо буфер, или с детергент вместо буфер.

Разновидности на капилярната електрофореза:

1. CZE – Capillary Zone Electrophoresis
  2. MECC – Micelar Electrocinematic Capillary Chromatography – използва се детергент, който се въвежда в сферичен мицел. Хидрофобните компоненти проникват в мицела и така се изолират от хидрофилните.
  3. CGE – Capillary Gell Electrophoresis – гелът значително намалява размиването. Използва се за определяне на молекулно тегло. Има голямо триене и се налага охлаждане.
  4. CIEF – капиллярно изоелектрично фокусиране
1. CИTP – капилярна изотахофореза /тахо – движение, скорост/

Хидродинамични методи

Първата стъпка при типична схема за пречистване на белтъци е центрофугирането. Принципът, който стои зад центрофугирането е, че две частици с различна маса или плътност ще се утаят на различни нива от дъното на епруветката. Протеините варират значително в своята маса, но не и в плътността си. Средната плътност на белтъците е  $1,37 \text{ г/см}^3$ . Освен ако протеинът не е липопротеин или гликопротеин, неговата плътност

не варира с повече от 15% от горната стойност. Центрофугата ускорява седиментацията при сили на центрофугиране 600 000 g /силата на гравитацията/ .

Центрофугирането се използва по две основни причини :

1. Като препаративна техника за разделяне на един тип материя от друг.
2. Като аналитична техника за измерване на физични характеристики, като молекулна маса, плътност, форма и др.

I. Диференциално центрофугиране – използва се при разделяне на разтворими протеини от неразтворим клетъчен материал. Силата и продължителността на центрофугирането се настройват, така че неразтворимите компоненти да паднат като утайка. Разтворимите белтъци остават в супернатанта.

Диференциалното центрофугиране разделя смес от частици, които се различават по маса или плътност. Най-плътните частици се събират на дъното на епруветката като утайка. Най-малко плътните частици остават в течната супернатанта.

II. Центрофугиране в плътностен градиент. В зависимост от разликата в масата на протеините те могат да се разделят при центрофугиране в плътностен градиент от захароза. Когато смес от белтъци се наслоят на върха на плътностен градиент от захароза и се приложи центрофугиране, те мигрират към дъното със скорост, която се влияе от факторите, определящи седиментационната константа. Те се разделят на зони в зависимост от масата им. Центрофугирането в плътностен градиент се нарича зонално центрофугиране.

Центрофугирането в плътностен градиент разделя частици или молекули, които се различават по маса, но могат да имат близка форма и плътност /напр. РНК молекули/.

### Методи за експериментално определяне на седиментационна константа

При *скоростно ултрацентрифугиране*, когато  $\omega$  – ъгловите скорости са достатъчно високи и биополимерите са достатъчно тежки е възможно при насляване на дисперсна система върху чиста дисперсна среда, разделящата граница да се движи с измерима скорост. Като се измерва скоростта на движение на границата, става възможно да се определи молекулната маса при положение, че е известен дифузионния коефициент на биополимерите.

При ъглова скорост  $\omega$ , обем на частиците  $V$ , с плътност  $\rho$  върху частиците действа центробежна сила в посока към оста на въртене :

$$/1/ \quad f_1 = V\rho\omega^2 x$$

$x$  – разстоянието от оста на въртене до разглежданата

В обратна посока действа Архимедовата сила:

$$/2/ \quad f_2 = - V\rho_0\omega^2 x$$

Сумарната действаща сила върху частицата е:

$$/3/ \quad f_1 + f_2 = - V(\rho - \rho_0)\omega^2 x$$

С нарастване на тази сила върху частицата и съответно с увеличаване на скоростта на частицата нараства и обратно насочената сила на триене:

/4/

$f$ - коефициентът на триене на частицата, свързан с дифузионния коефициент на частицата  $D$  със съотношението на Айнщайн:

/5/

След кратко време, при което нараства силата на триенето, се стига до равновесие и частицата започва да се движи с постоянна скорост, т.е. нейното ускорение е 0. Оттук следва, че и сумарната действаща сила върху частиците е 0., т.е.

$$f_1 + f_2 = f_3 \text{ или } /6/$$

За един мол вещество:

/7/

$f_M$  – коефициента на триене за един мол частици.

- специфичен обем /обемът на единица маса/

/8/

Но  $N_A V_p = M$  /молекулната маса/  $\rightarrow$

/9/

/10/

газова константа -  $R=k.N_A$

Това е първият закон на Сведберг. Величината  $S$  е седиментационна константа или коефициент на седиментация. Тя представлява скоростта на частицата за единица центробежно ускорение. Измерва се в сведберги  $1S = 10^{-13} \text{ s}$

Линеализираме уравнение /10/ :

$d \ln x =$

$y = \ln x$  ,  $a = \text{tg } \alpha =$  ,  $b=0$  / $y = ax+b$ /

Така графично се определя  $S = \text{tg } \alpha$  /

При *равновесното ултрацентрифугиране* центробежният пренос на веществото е сравним с дифузионния пренос в обратна посока. След достатъчно дълго време се установява равновесие – равенство на двата потока. При достигане на равновесието в кюветата концентрацията на изследваното вещество се разпределя по определен начин, който е еднозначно свързан с молекулната му маса. Тук действа Вторият закон на Сведберг :

, където  $C$  е концентрация на съответното вещество.

Вторият закон на Сведберг дава независима възможност за определяне на молекулната маса. Методът позволява да се изследва и полидисперсността на изследваното вещество. Най големият недостатък на този метод е изчакването, докато настъпи равновесие.

Фактори, от които зависи скоростта на седиментация :

1. Концентрацията на молекулите с неизвестна молекулна маса
2. Оборотите на въртене на центрофугата
3. Зарядът на молекулата – най-добре е молекулата да е неутрална.
4. Видът на разтворителя и температурата
5. Формата на молекулата

Western Blotting – един от най-мощните методи за детектиране на определен белтък в смес от белтъци. Комбинира се гелната електрофореза, специфичността на антителата и чувствителността на ензимния анализ. Техниката включва 3 стъпки :

1. Смес от протеини се разделя електрофоретично в SDS – гел. След което се прехвърля върху мембрана. Незаетите места в мембраната се блокират.
2. Мембрана се залива с разтвор на антияло, специфично за търсения протеин. Само ивиците, съдържащи въпросния белтък се свързват с антиялото. След изтичане времето на инкубация мембраната се промива за отстраняване на несвързаното антияло.
3. Мембраната се инкубира с второ антияло, което е специфично спрямо първото. Второто антияло е ковалентно свързано с алкална фосфатаза, която катализира цветна реакция. Прибавя се субстрат и наличието на търсения от нас белтък се следи по липсата или наличието на цветен продукт.

Второто антитяло може да бъде и флуоресцентно белязано.