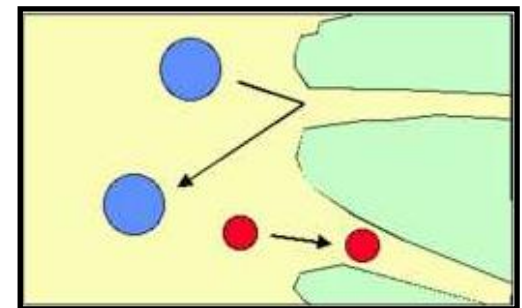
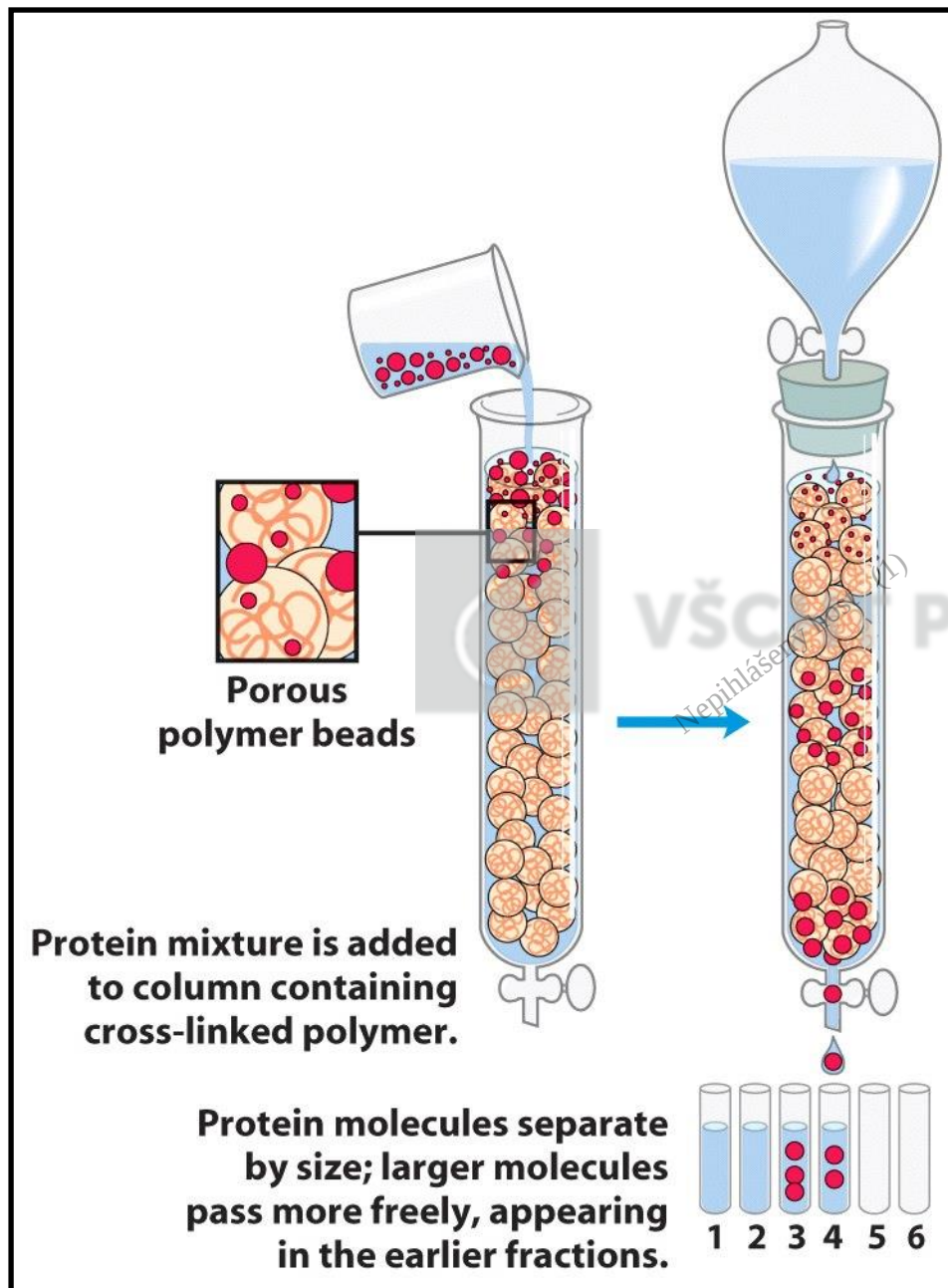


Gelová permeační chromatografie

- separace molekul na základě molekulové hmotnosti, velikosti a tvaru molekuly
- stacionární fáze – gel (obvykle prokřížený cukr)
- velké molekuly se eluují dříve, malé molekuly se eluují později
- možnost stanovení molekulových hmotností
- odstraňování nízkomolekulárních sloučenin (odsolování)



GE Healthcare
Life Sciences



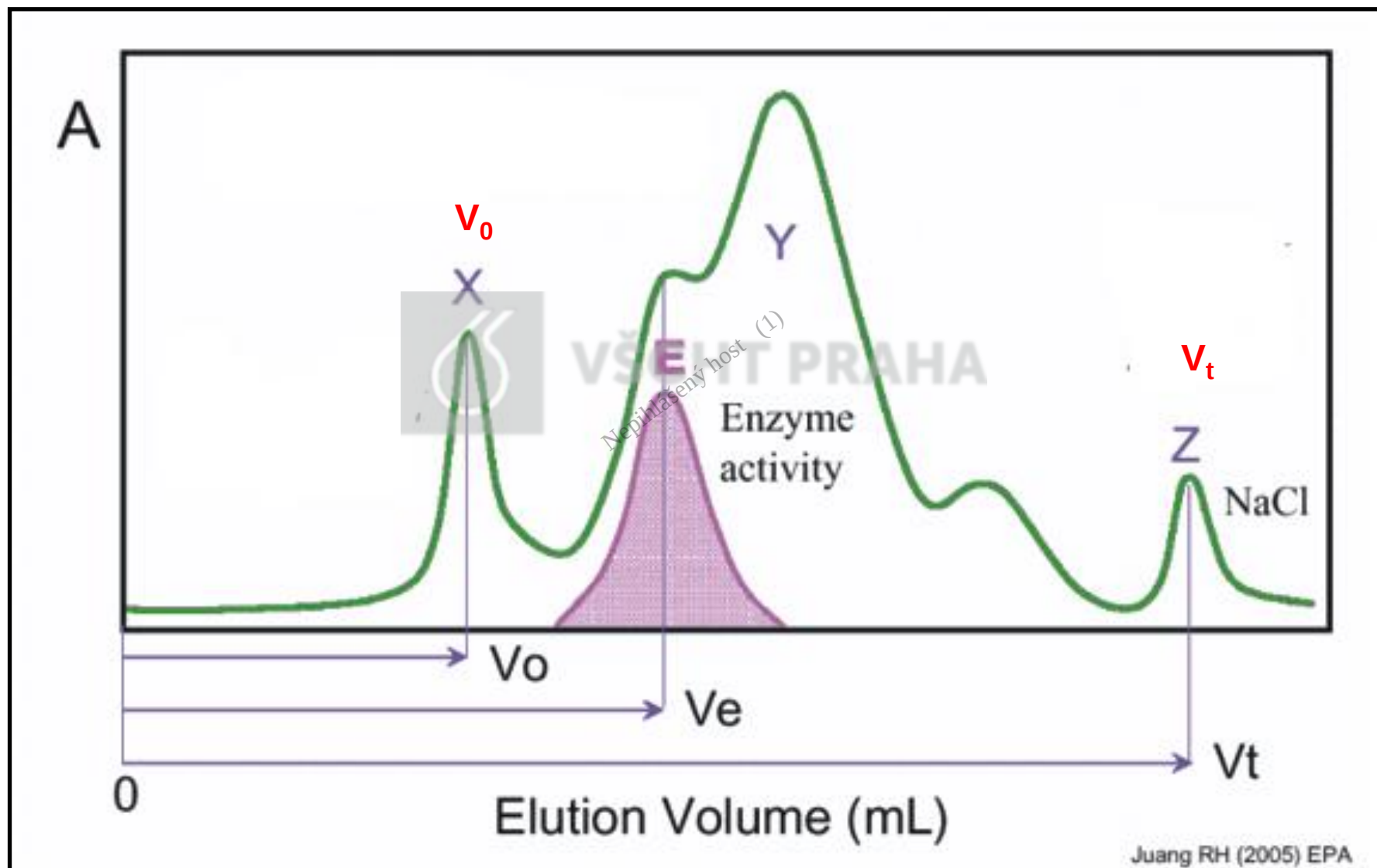
VŠCHT PRAHA

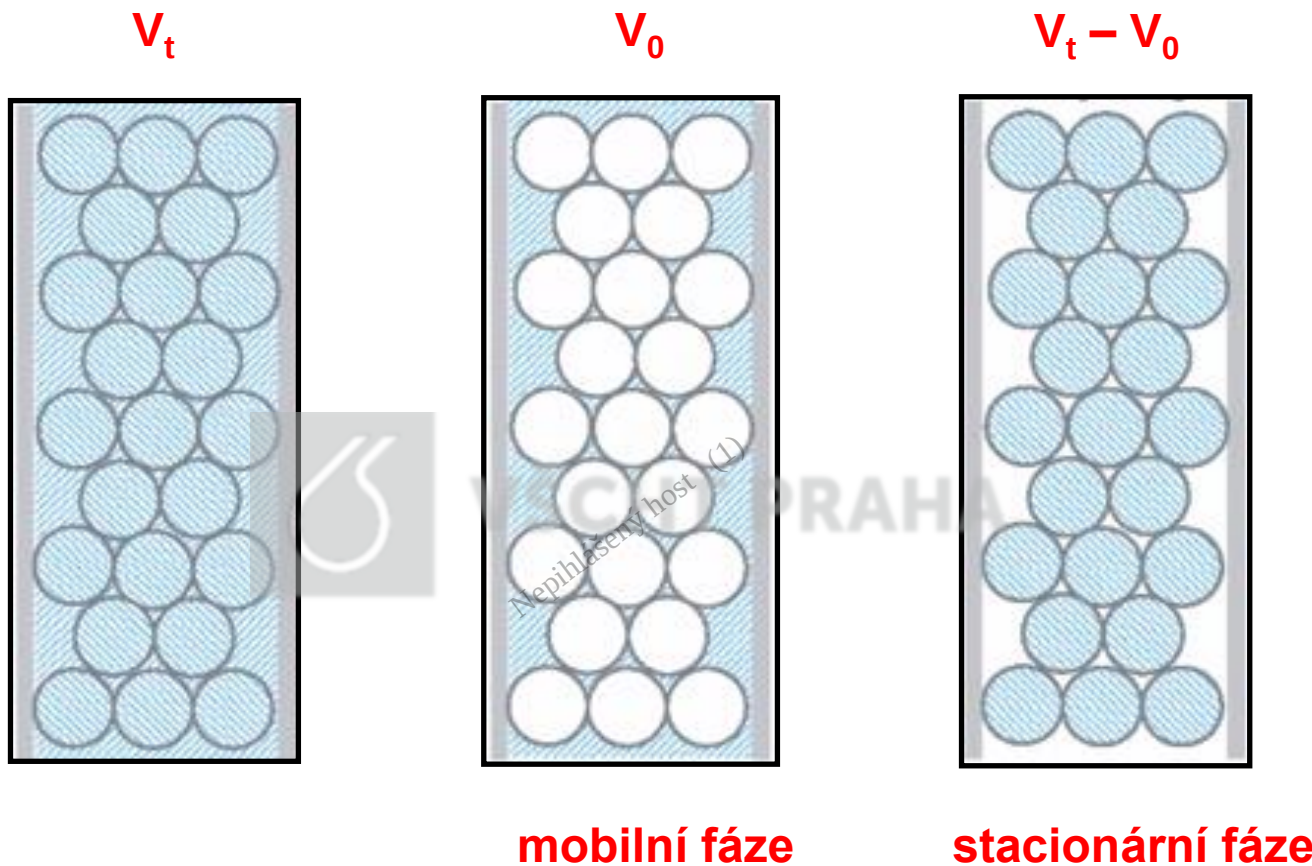
Nepřihlášený host (1)



imagination at work

Typický eluční diagram





$$K = \frac{V_e - V_0}{V_s} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0 - V_{gelu}}$$

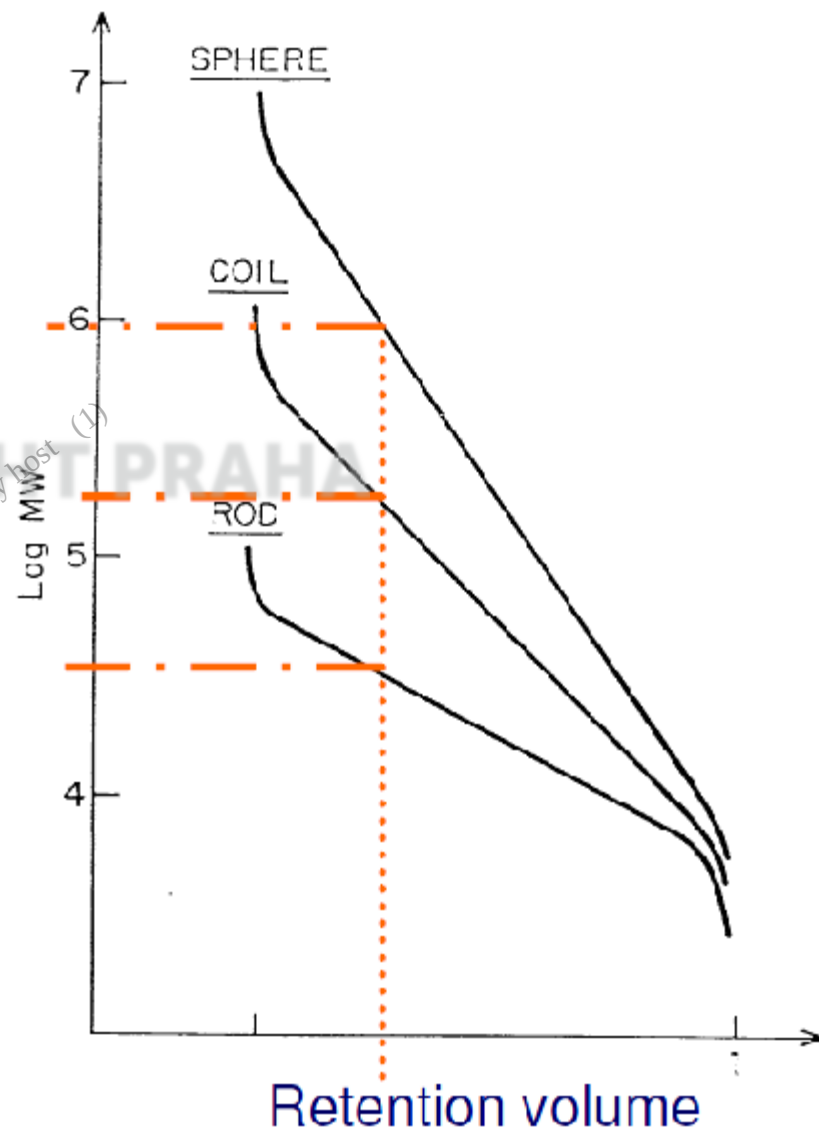
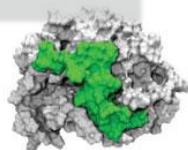
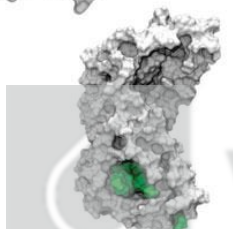
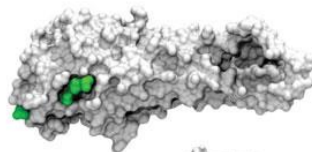
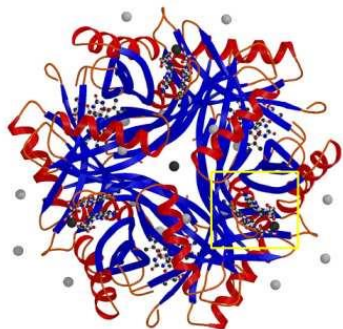
K_d – distribuční koeficeint

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

K_{av} rozdělovací koeficient

$$R = \frac{V_0}{V_e}$$

Vliv tvaru molekuly

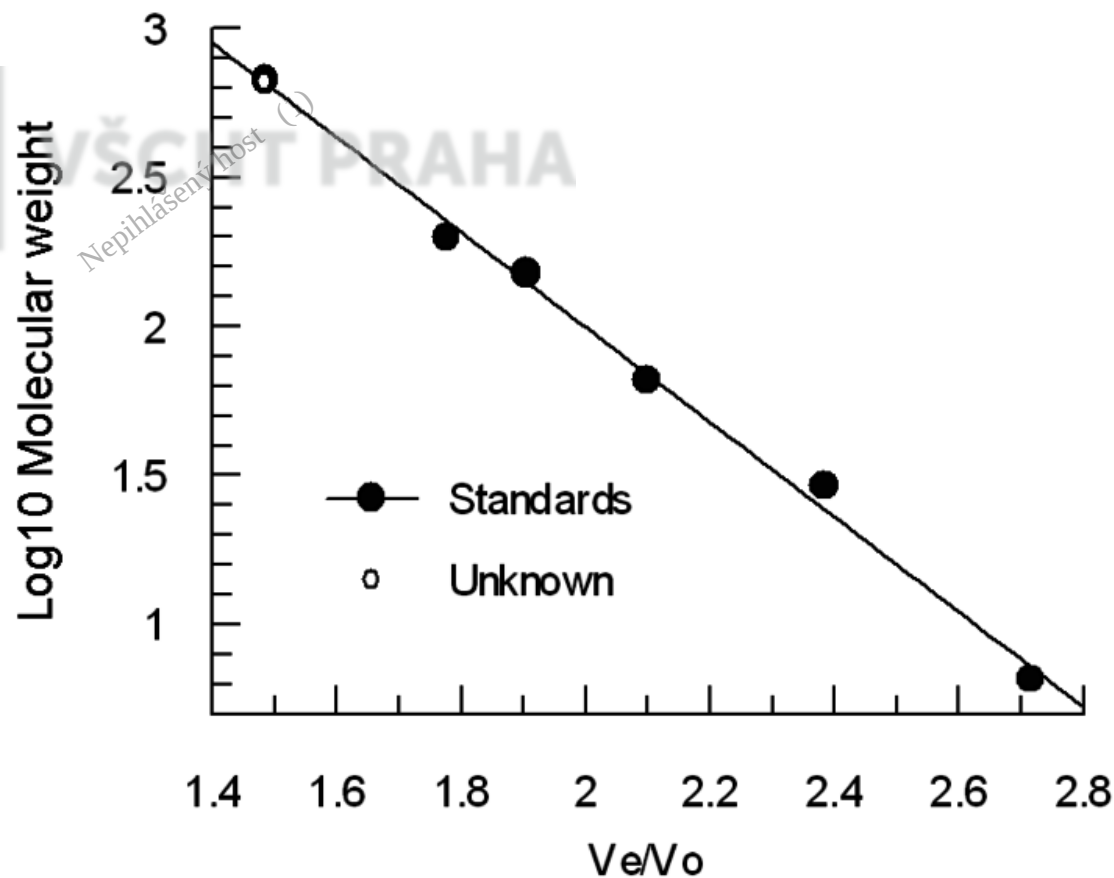
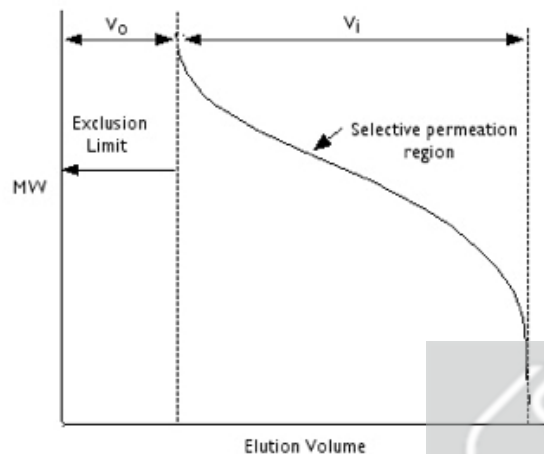


Kalibrace

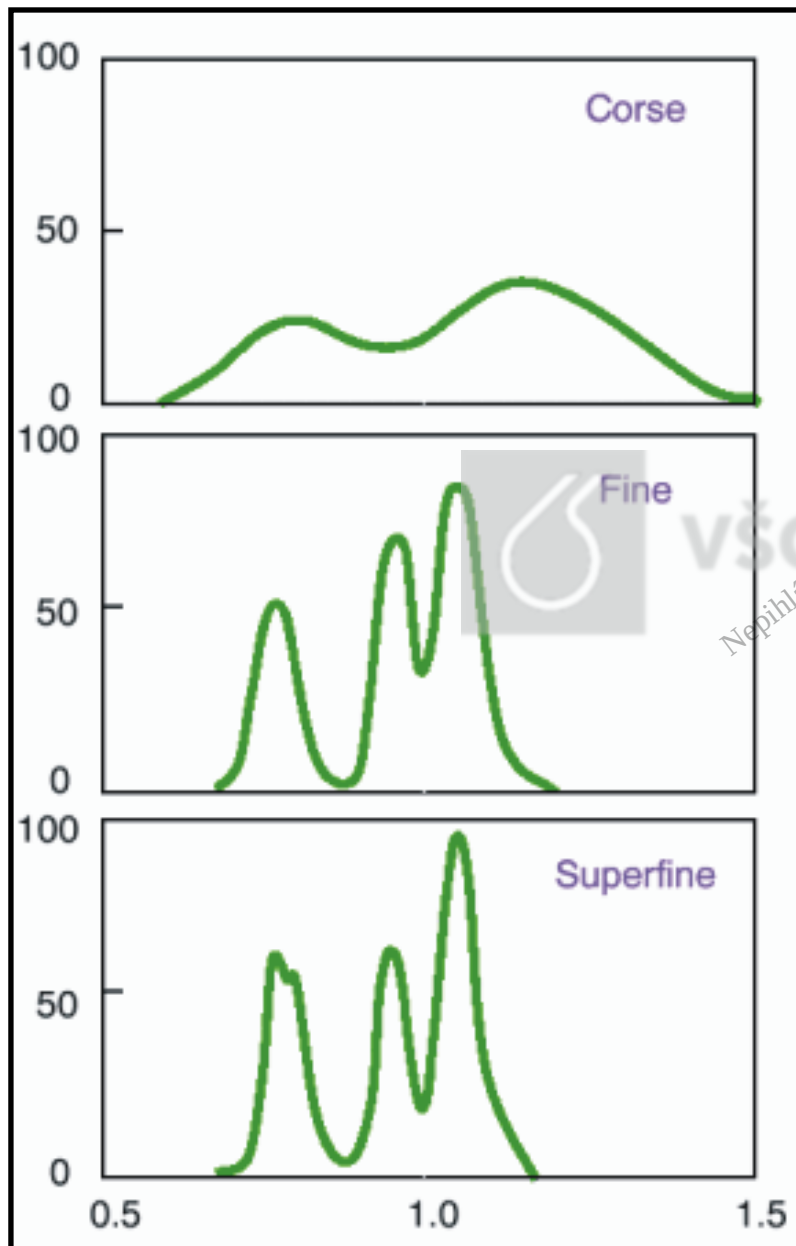
- eluční čas (eluční objem) standardů je vynesen v závislosti na molekulové hmotnosti
- kolona by měla být pravidelně kalibrována
- stálý průtok
- kolona separuje podle velikosti ne molekulové hmotnosti, proto je získaná molekulová hmotnost jen relativní

Standard	Molecular weight (kDa)
Cytochrome C	12.4
Carbonic Anhydrase	29
Bovine Serum Albumine	67
Alcohol Dehydrogenase	150
Beta-Amylase	200
Thyroglobulin	670

Kalibrační křivka



Vztah mezi velikostí částic a rozlišením



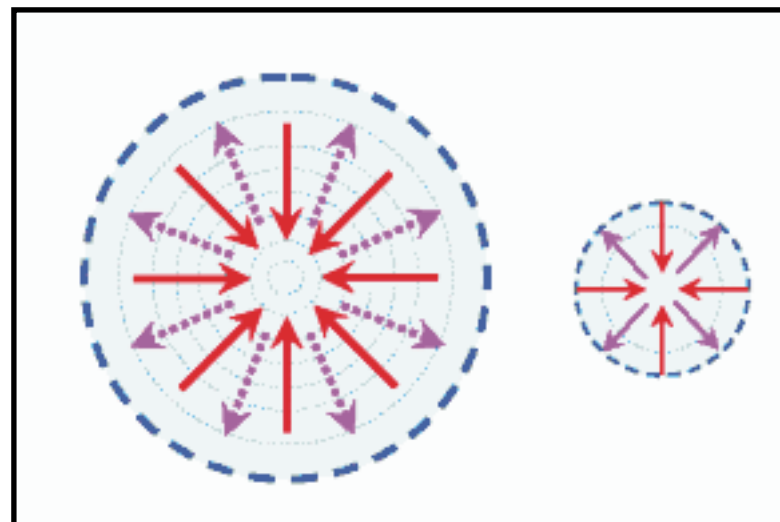
VELIKOST ČÁSTIC [μm]

Coarse 100–300

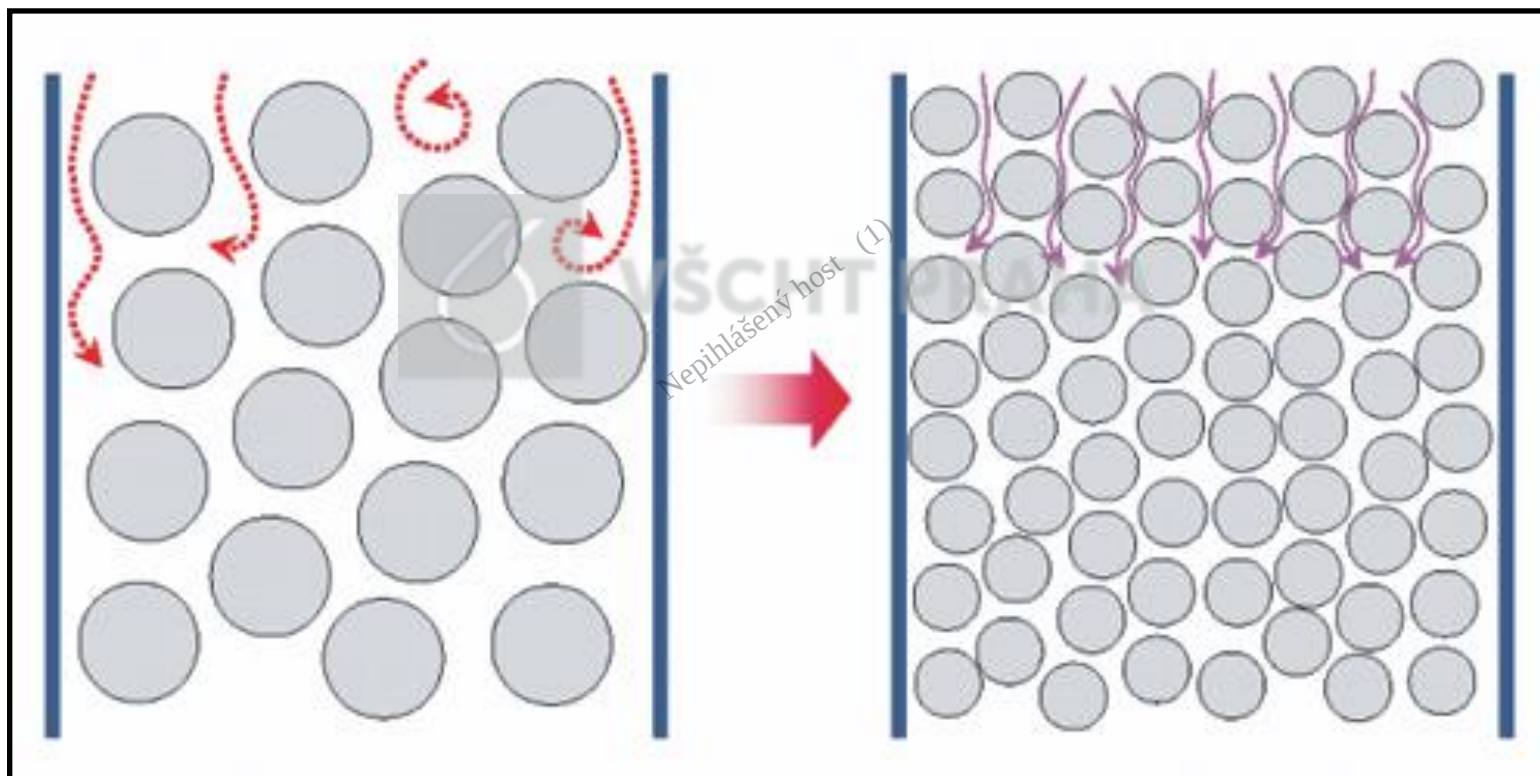
Medium 50–150

Fine 20–80

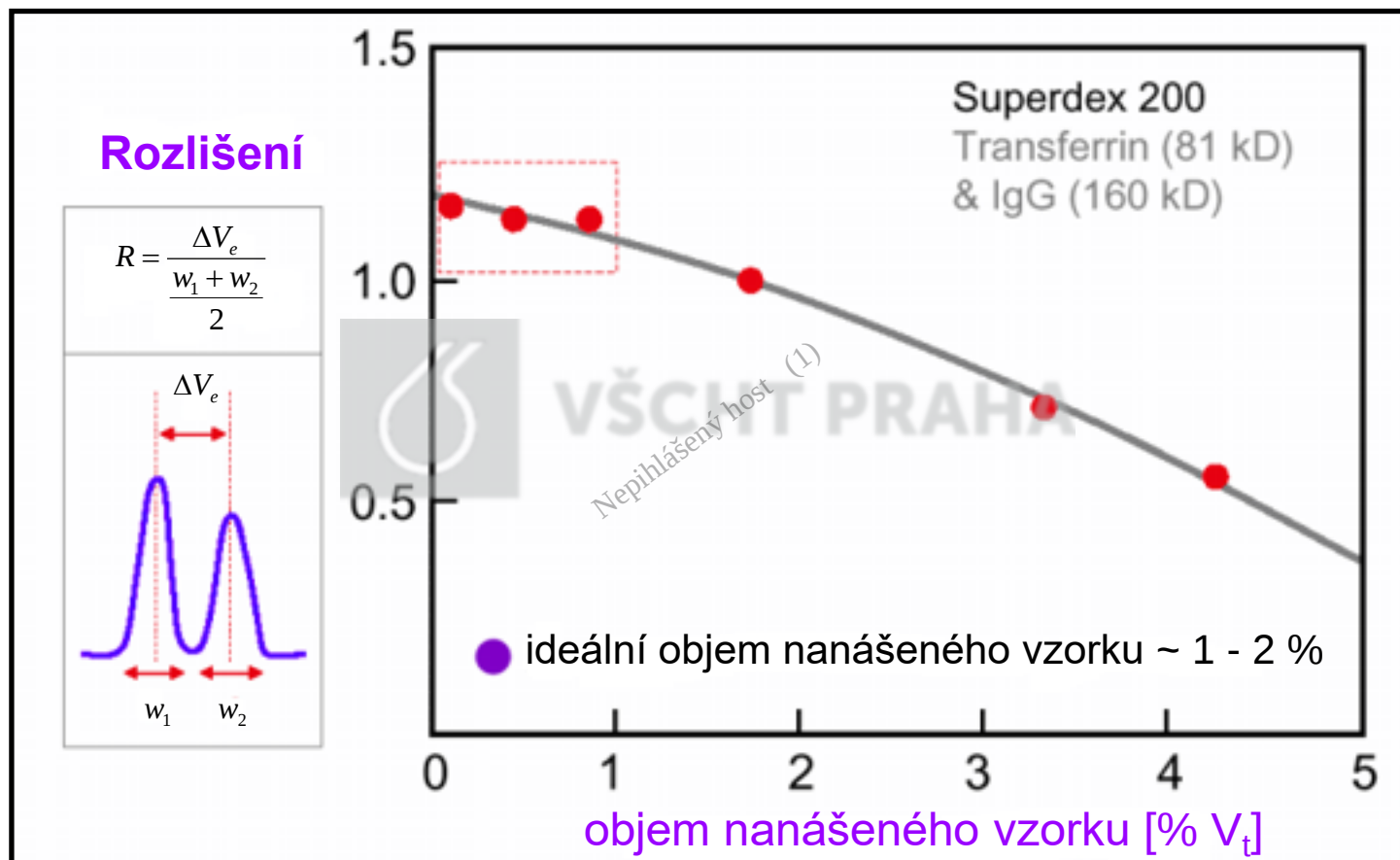
Superfine 10–40



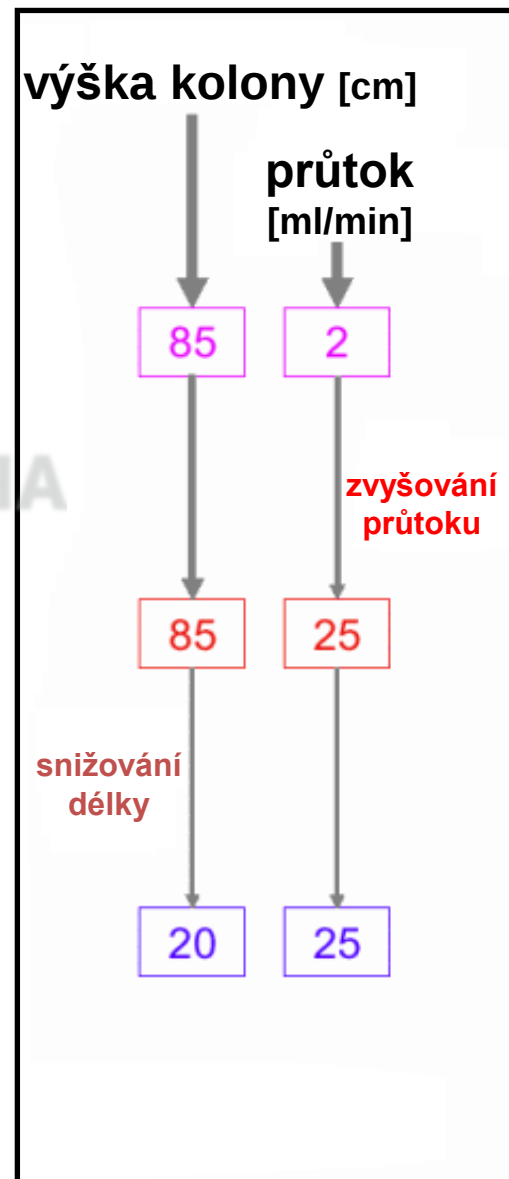
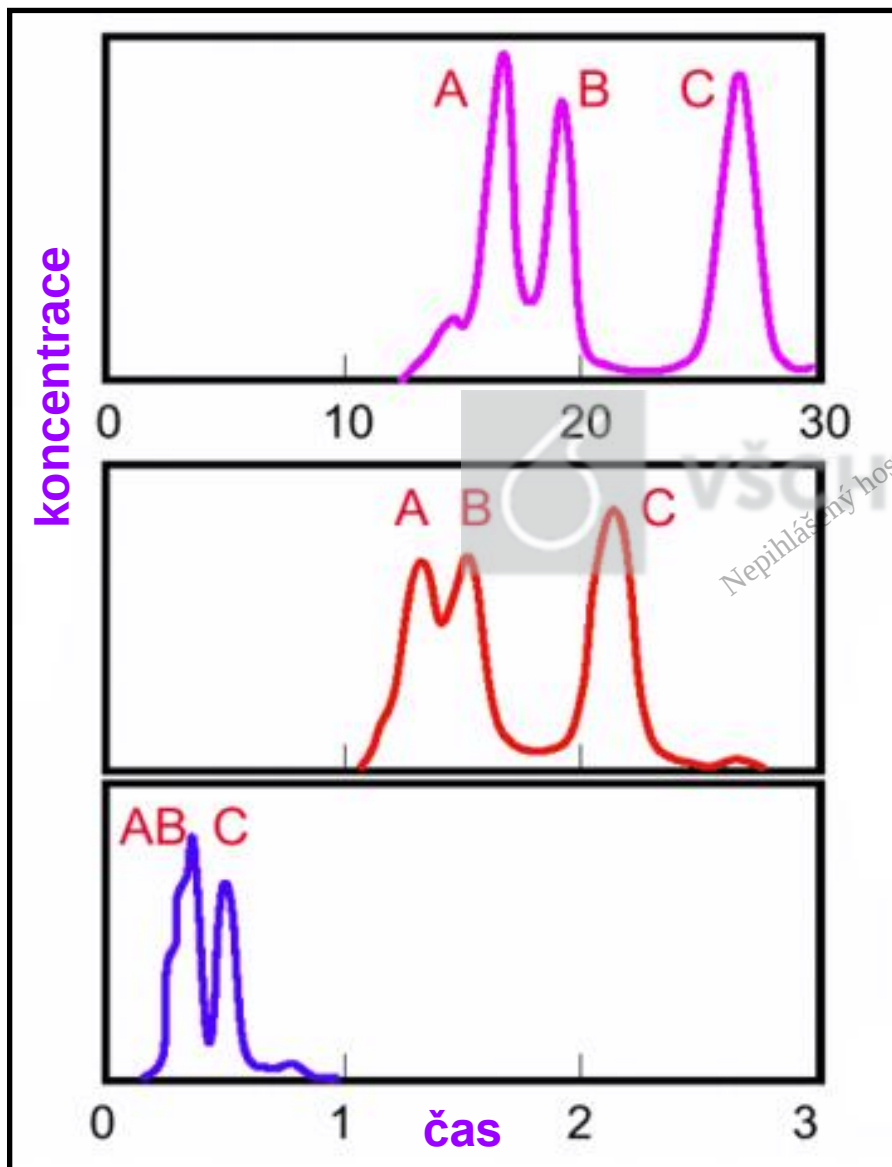
Vztah mezi velikostí částic a průtokem



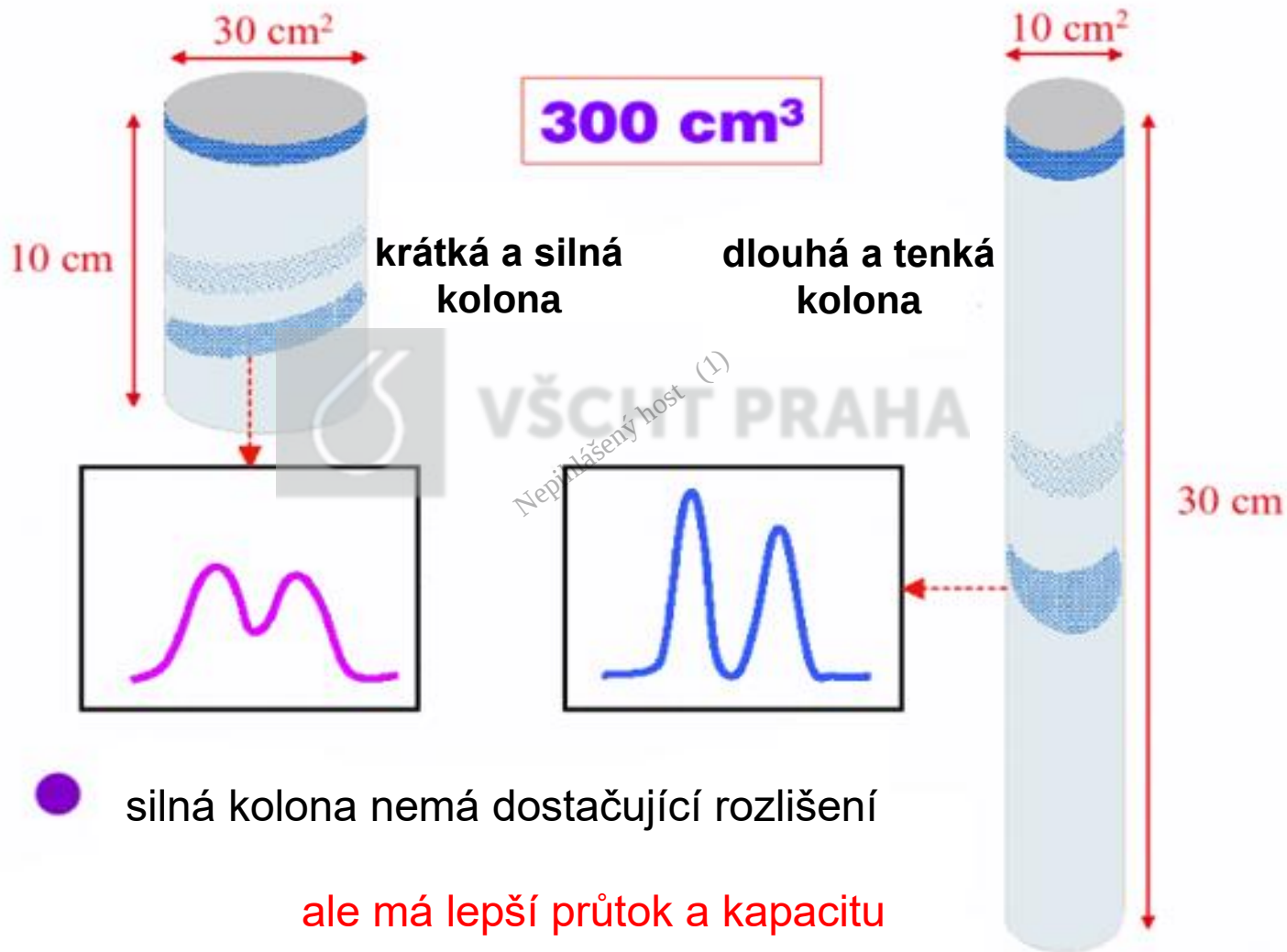
Vztah mezi rozlišením a objemem vzorku



Vztah mezi rozlišením, průtokem a délkou kolony



Tvar kolony



Stacionární fáze



GE Healthcare

Sephadex	glukosa (dextrosa)
Sepharose	agarosa
Sephacryl	glukosa + akryamid
Sephacel	cellulosa

FPLC

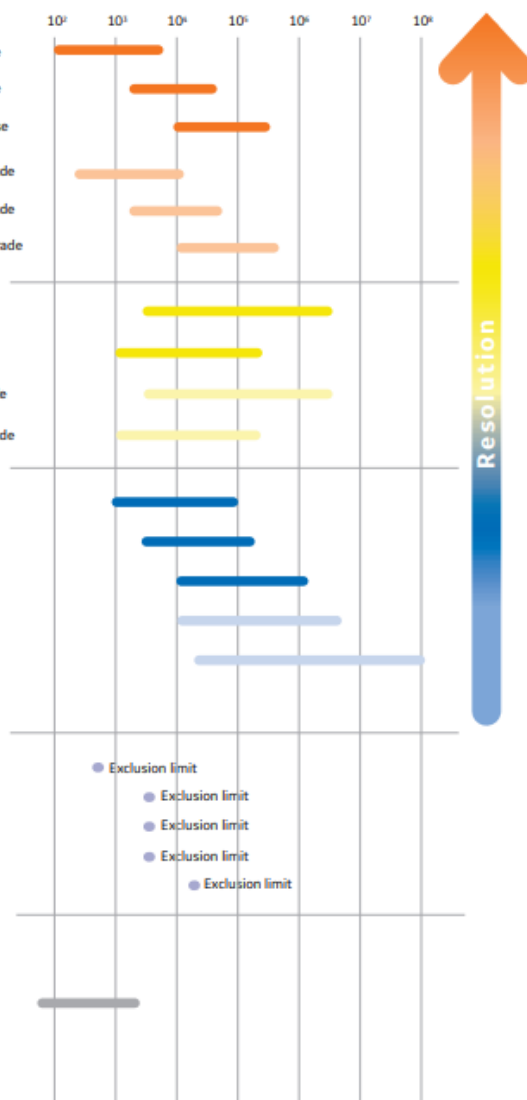
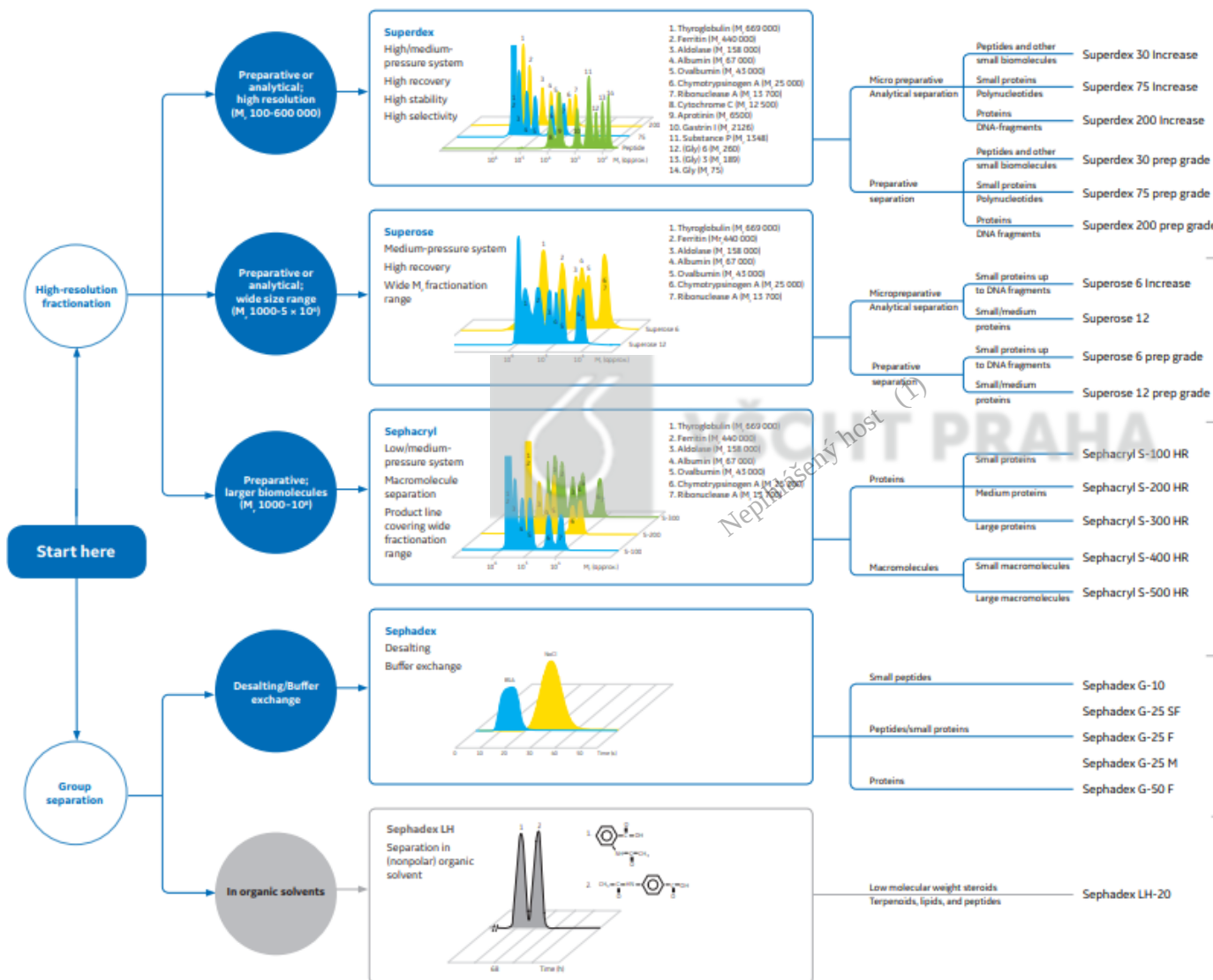
Superose

Superdex

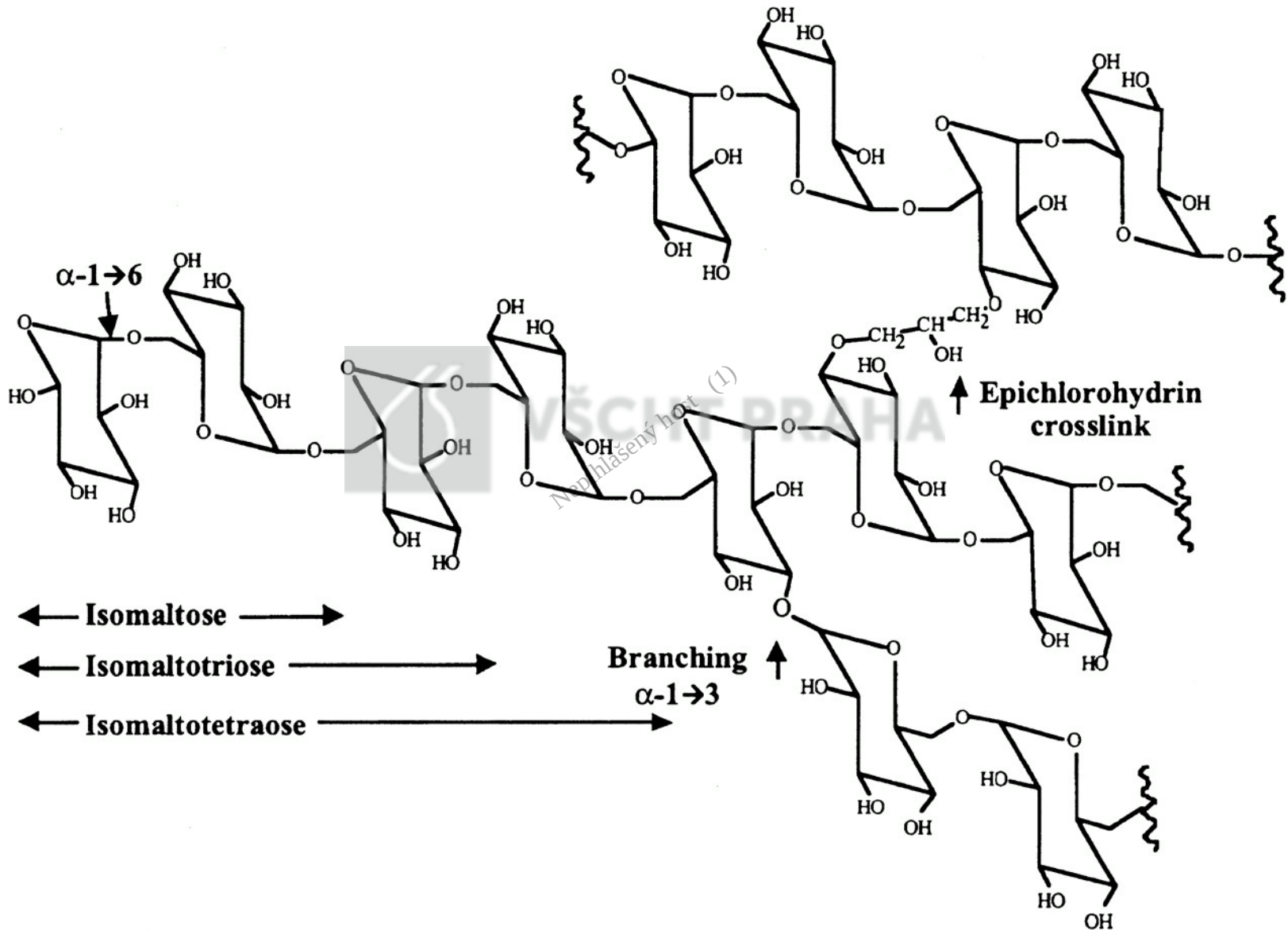
BIO-RAD

BioGel P	akrylamid
BioGel A	agarosa

Selection guide SEC resins



Dextrany - Sphadexy

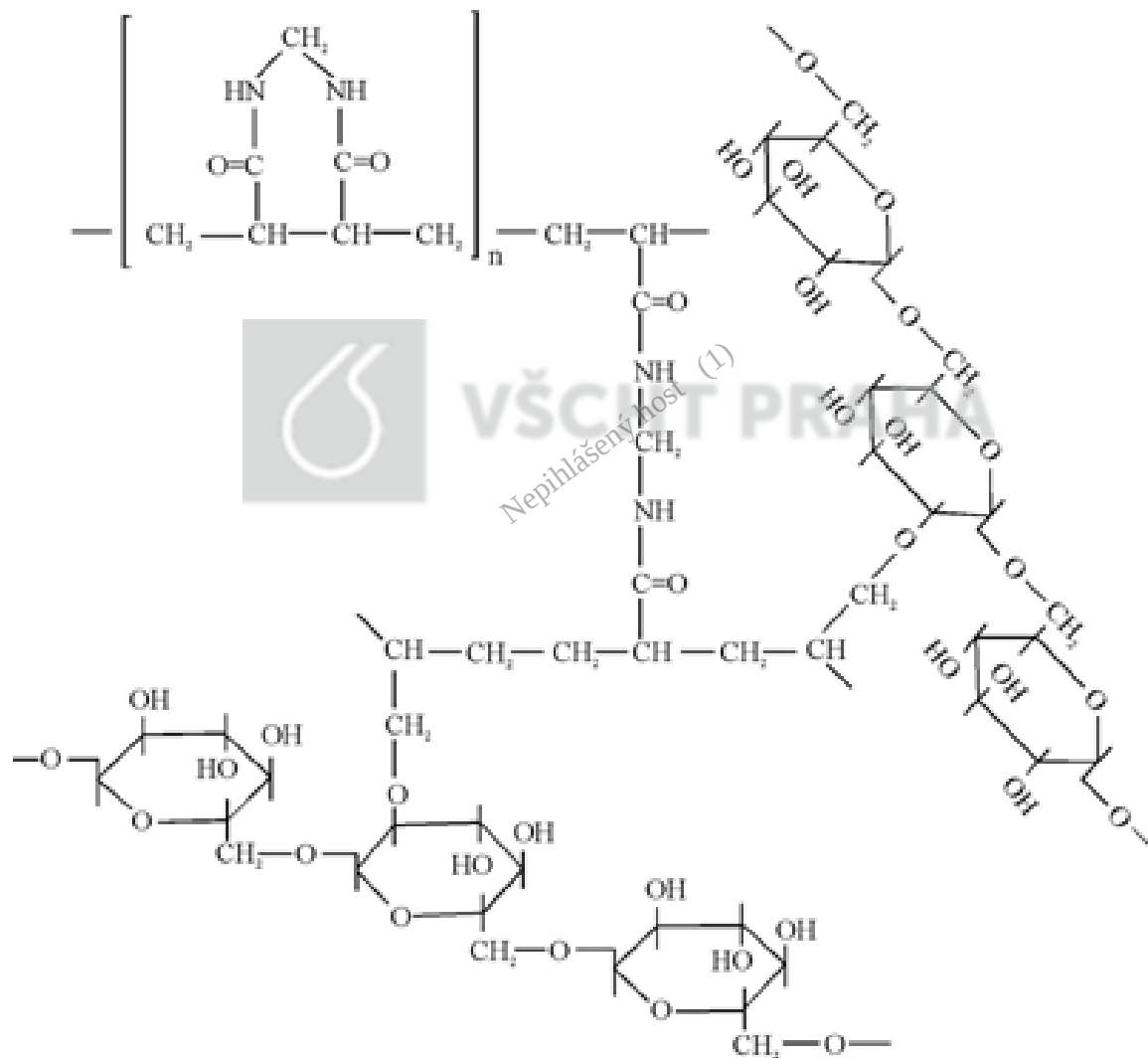


Vlastnosti Sephadexu

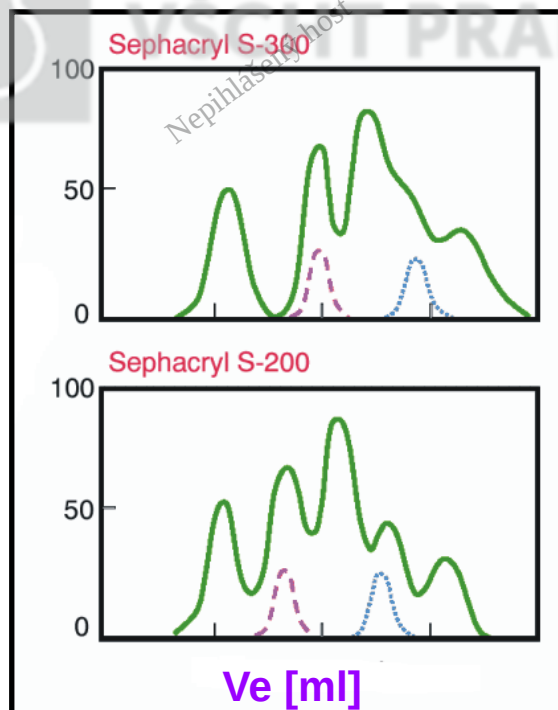
Gel type	Dry bead size μm	Fractionation range Globular proteins	Fractionation range Dextrans	Swelling factor ml/g
Sephadex G-10	40 – 120	– 700	– 700	2 – 3
Sephadex G-15	40 – 120	– 1 500	– 1 500	2.5 – 3.5
Sephadex G-25 Coarse	100 – 300	1 000 – 5 000	100 – 5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Medium	50 – 150	1 000 – 5 000	100 – 5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Fine	20 – 80	1 000 – 5 000	100 – 5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Superfine	10 – 40	1 000 – 5 000	100 – 5 000	4 – 6
Sephadex G-50 Coarse	100 – 300	1 500 – 30 000	500 – 10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Medium	50 – 150	1 500 – 30 000	500 – 10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Fine	20 – 80	1 500 – 30 000	500 – 10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Superfine	10 – 40	1 500 – 30 000	500 – 10 000	9 – 11
Sephadex G-75	40 – 120	3 000 – 80 000	1 000 – 50 000	12 – 15
Sephadex G-75 Superfine	10 – 40	3 000 – 70 000	1 000 – 50 000	12 – 15
Sephadex G-100	40 – 120	4 000 – 150 000	1 000 – 100 000	15 – 20
Sephadex G-100 Superfine	10 – 40	4 000 – 100 000	1 000 – 100 000	15 – 20
Sephadex G-150	40 – 120	5 000 – 300 000	1 000 – 150 000	20 – 30
Sephadex G-150 Superfine	10 – 40	5 000 – 150 000	1 000 – 150 000	18 – 22
Sephadex G-200	40 – 120	5 000 – 600 000	1 000 – 200 000	30 – 40
Sephadex G-200 Superfine	10 – 40	5 000 – 250 000	1 000 – 150 000	20 – 25

Dextran-N, N'-methylen-bisakrylamid

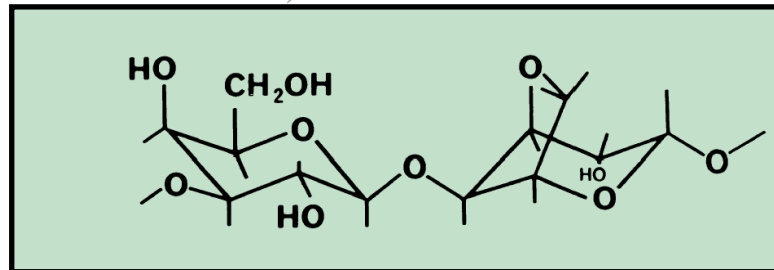
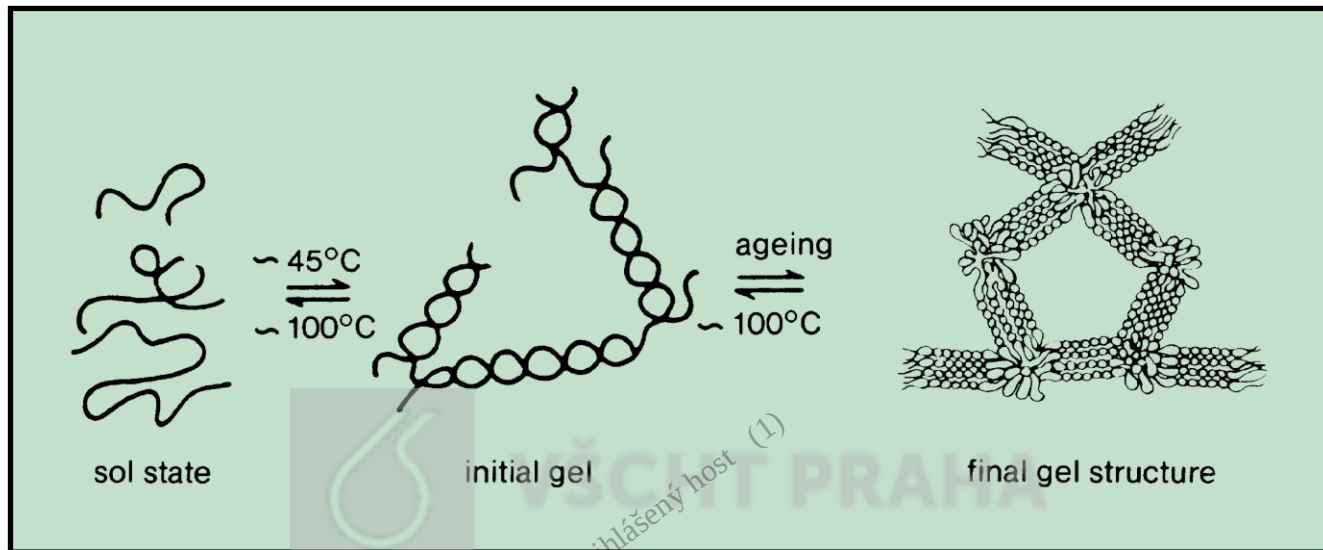
Sephacryl HR



Gel type	Bead size μm	Fractionation range Globular proteins	Fractionation range Dextrans	Exclusion limit DNA
Sephacryl S-100 HR	25 – 75	1 000 – 100 000	ND	ND
Sephacryl S-200 HR	25 – 75	5 000 – 250 000	1 000 – 80 000	118
Sephacryl S-300 HR	25 – 75	10 000 – 1 500 000	2 000 – 400 000	118
Sephacryl S-400 HR	25 – 75	20 000 – 8 000 000	10 000 – 2 000 000	271
Sephacryl S-500 HR	25 – 75	ND	40 000 – 20 000 000	1078



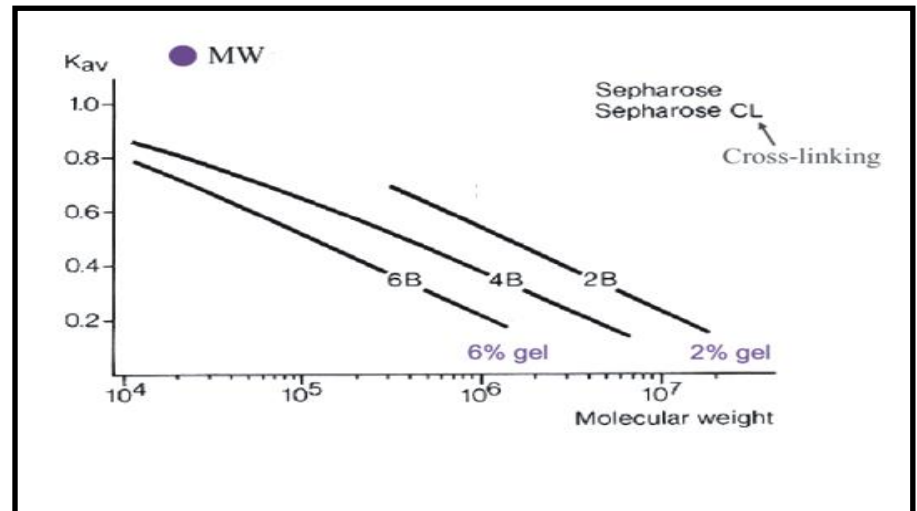
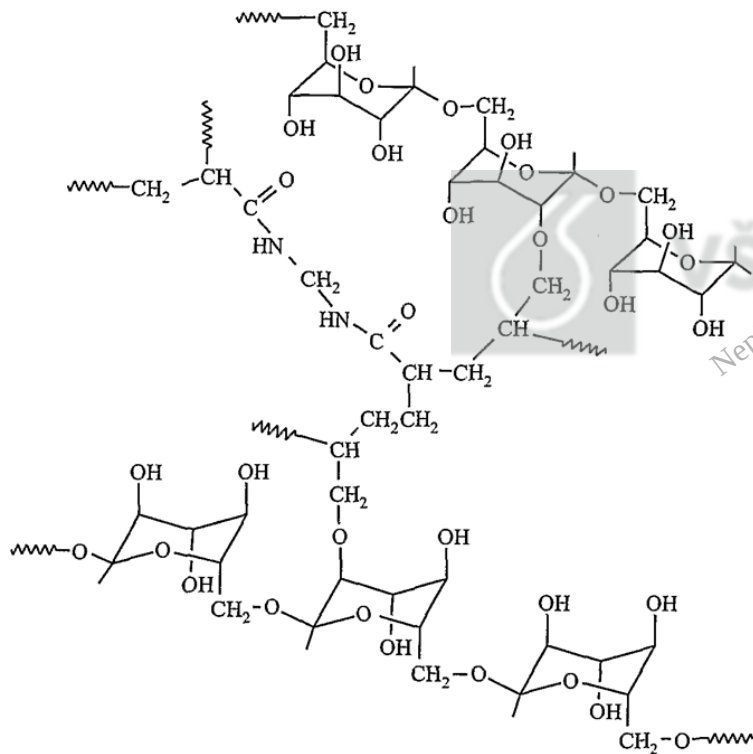
Agarosa - **Sepharose**



Gel type	Approx. % agarose	Bead size μm	Fractionation range Globular proteins.	Fractionation range Dextrans
Sepharose 6B	6	45 – 165	10 000 – 4 000 000	10 000 – 1 000 000
Sepharose 4B	4	45 – 165	60 000 – 20 000 000	30 000 – 5 000 000
Sepharose 2B	2	60 – 200	70 000 – 40 000 000	100 000 – 20 000 000

Sepharose CL

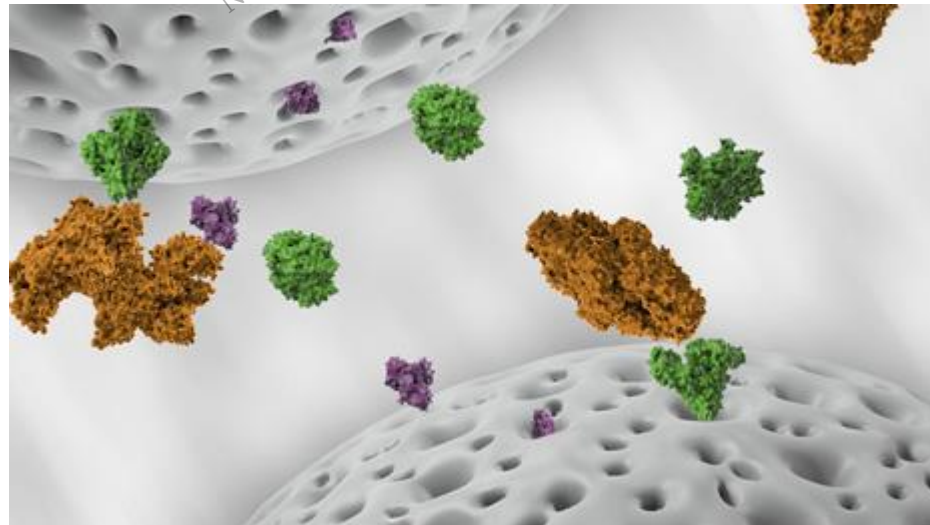
- lepší teplotní a chemická stabilita
- extrémě malé množství ionizovatelných skupin



Superose

prokřížená poresní agarosa

Gel type	Bead size μm	Fractionation range Globular proteins	Fractionation range Dextrans
Superose 12 prep grade	20 – 40	1 000 – 300 000	ND
Superose 12	8 – 12	1 000 – 300 000	ND
Superose 6 prep grade	20 – 40	5 000 – 5 000 000	ND
Superose 6	11 – 15	5 000 – 5 000 000	ND



Bio-Gel P

Bio-Gel P gely – poretí polyakrylamidové částice vzniklé kopolymerací akrylamidu a N,N'-methylene-bis-akrylamidu.

- extremě hydrofilní
- nenabité

Gel	Particle Size Range, Hydrated Beads (μM)	Typical Hydrated Bed Volume, ml/g of Dry Gel	Typical Flow Rates (cm/hr)*	Typical Fractionation Range/Nominal Exclusion Limit (Daltons)**, †
Bio-Gel P-2 Gel, Fine	45-90	3	5.0-10	100-1,800
Bio-Gel P-2 Gel, Extra Fine	< 45		<10	100-1,800
Bio-Gel P-4 Gel, Medium	90-180	4	15-20	800-4,000
Bio-Gel P-4 Gel, Fine	45-90		10.0-15	800-4,000
Bio-Gel P-4 Gel, Extra Fine	< 45		<10	800-4,000
Bio-Gel P-6 Gel, Medium	90-180	6.5	15-20	1,000-6,000
Bio-Gel P-6 Gel, Fine	45-90		10.0-15	1,000-6,000
Bio-Gel P-6 Gel, Extra Fine	< 45		<10	1,000-6,000
Bio-Gel P-6DG Gel	90-180	6.5	15-20	1,000-6,000
Bio-Gel P-10 Gel, Medium	90-180	7.5	15-20	1,500-20,000
Bio-Gel P-10 Gel, Fine	45-90		10.0-15	1,500-20,000
Bio-Gel P-30 Gel, Medium	90-180	9	7.0-13	2,500-40,000
Bio-Gel P-30 Gel, Fine	45-90		6.0-11	2,500-40,000
Bio-Gel P-60 Gel, Medium	90-180	11	4.0-6	3,000-60,000
Bio-Gel P-60 Gel, Fine	45-90		3.0-5	3,000-60,000
Bio-Gel P-100 Gel, Medium	90-180	12	4.0-6	5,000-100,000
Bio-Gel P-100 Gel, Fine	45-90		3.0-5	5,000-100,000

Product Description	Comments
Bio-Gel P-2 Gel, Fine, 100 g Bio-Gel P-2 Gel, Fine, 500 g Bio-Gel P-2 Gel, Extra Fine, 100 g	Rapid carbohydrate and small peptide separations and desalting. Fractionation range of 100-1,800.
Bio-Gel P-4 Gel, Medium, 100 g Bio-Gel P-4 Gel, Fine, 100 g Bio-Gel P-4 Gel, Extra Fine, 100 g	Rapid carbohydrate and small peptide separations and desalting. Fractionation range of 800-4,000.
Bio-Gel P-6 Gel, Medium, 100 g Bio-Gel P-6 Gel, Fine, 100 g Bio-Gel P-6 Gel, Extra Fine, 100 g	Purification of proteins and polypeptides. Fractionation range of 1,000-6,000.
Bio-Gel P-6DG Gel, 100 g Bio-Gel P-6DG Gel, 1 kg	Gel most highly suited for protein desalting or buffer exchange. Fractionation range of 1,000-6,000. Also available in prepacked columns and cartridges.
Bio-Gel P-10 Gel, Medium, 100 g Bio-Gel P-10 Gel, Fine, 100 g	Purification of proteins and polypeptides. Fractionation range of 1,500-20,000.
Bio-Gel P-30 Gel, Medium, 100 g Bio-Gel P-30 Gel, Fine, 100 g	Purification of proteins and polypeptides. Fractionation range of 2,500-40,000.
Bio-Gel P-60 Gel, Medium, 100 g Bio-Gel P-60 Gel, Fine, 100 g	Purification of proteins and polypeptides. Fractionation range of 3,000-60,000.
Bio-Gel P-100 Gel, Medium, 100 g Bio-Gel P-100 Gel, Fine, 100 g	Purification of proteins and polypeptides. Fractionation range of 5,000-100,000.

Bio-Gel A

Bio-Gel A gely – agarosa

- minimalní nespecifické interakce
- výborné průtokové vlastnosti

Product	Grade	Hydrated Bead Size (μm)	Typical Flow Rates* (cm/hr)	Fractionation Range/Exclusion Limit (daltons)
Bio-Gel A-0.5m gel				
151-0130	Coarse	150-300	20-25	<10,000-500,000
151-0140	Medium	75-150	15-20	<10,000-500,000
151-0150	Fine	38-75	7-13	<10,000-500,000
Bio-Gel A-1.5m gel				
151-0430	Coarse	150-300	20-25	<10,000-1,500,000
151-0440	Medium	75-150	15-20	<10,000-1,500,000
151-0450	Fine	38-75	7-13	<10,000-1,500,000
Bio-Gel A-5m gel				
151-0730	Coarse	150-300	20-25	10,000-5,000,000
151-0740	Medium	75-150	15-20	10,000-5,000,000
151-0750	Fine	38-75	7-13	10,000-5,000,000
Bio-Gel A-15m gel				
151-1030	Coarse	150-300	20-25	40,000-15,000,000
151-1040	Medium	75-150	15-20	40,000-15,000,000
151-1050	Fine	38-75	7-13	40,000-15,000,000
Bio-Gel A-50m gel				
151-1330	Coarse	15-300	20-25	100,000-50,000,000
151-1340	Fine	75-150	5-15	100,000-50,000,000

* Flow rate determined by using a 1.5 x 20 cm column and a head to bed ratio of 1:1.

Použití gelové permeační chromatografie

vysoké rozlišení

skupinová separace

separace molekul na základě velikosti (tvaru)

odsolení

vhodná jako závěrečný krok purifikace

výměna pufru

separace polymerů od monomerů

odstranění vysokomolekulárních a nízkomolekulárních látek

separace denaturovaných forem proteinů od nativních

Před purifikací:

- zkontrolujte viskozitu vzorku
- zfiltrujte nebo odstředte vzorek

Pro zvýšení rozlišení:

1. optimální frakcionační rozsah
2. co nejmenší objem vzorku
3. co nejmenší částice gelu (x průtok)
4. dvě kolony do série
5. snížit průtok



Nespecifická adsorbce

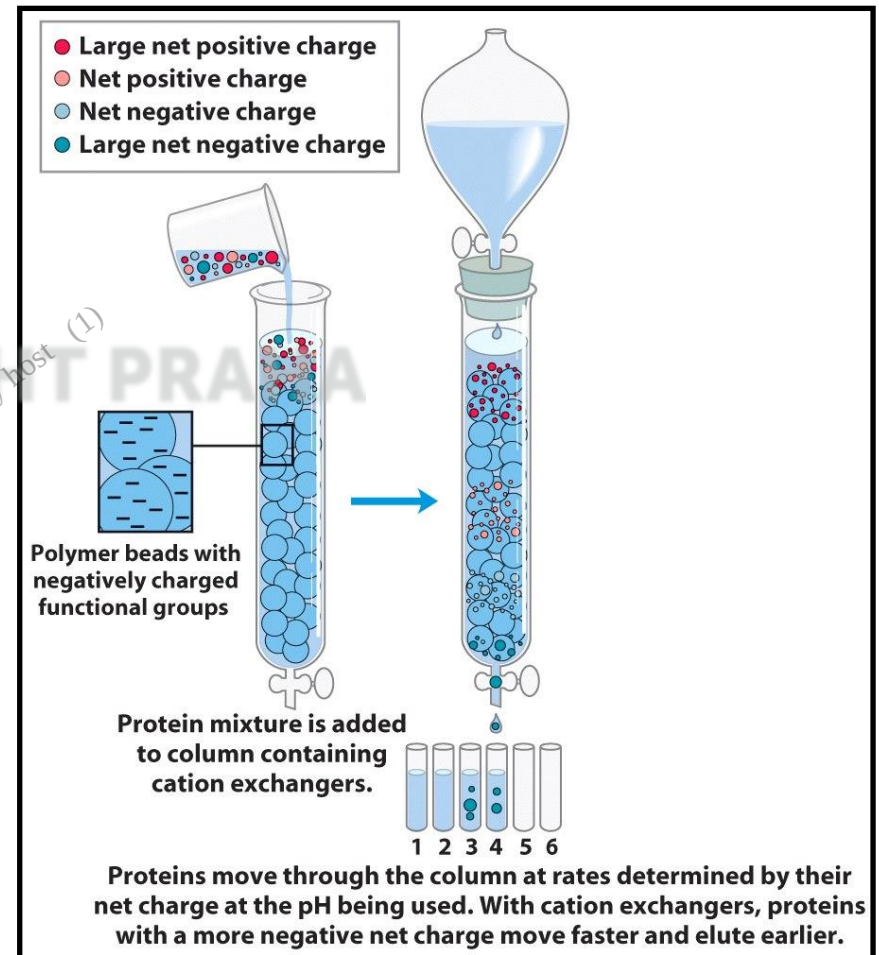
vzácně na agarosu a dextran

pokud $K_{av} > 1$ iontové nebo hydrofobní interakce

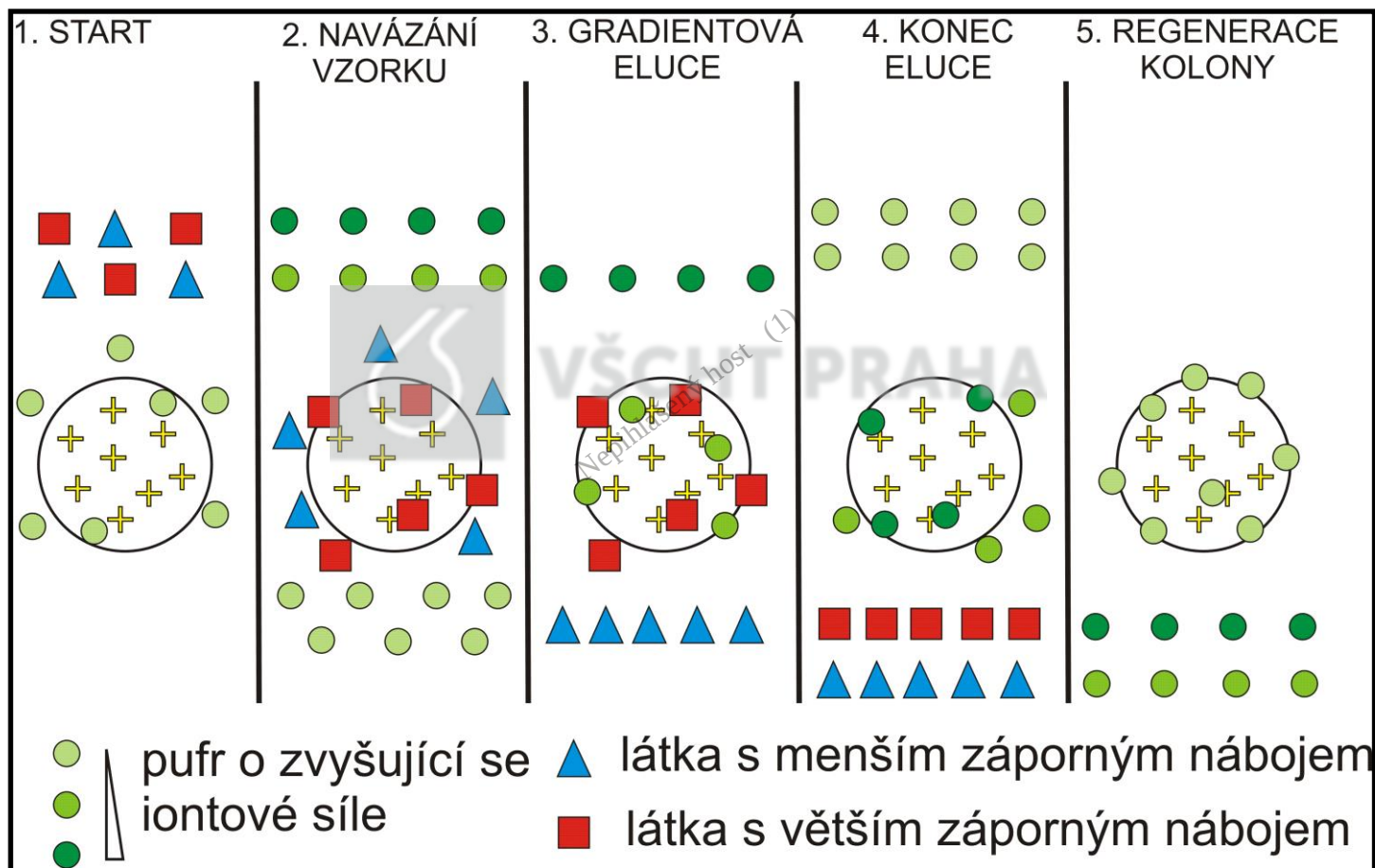
- pufr $> 0.05M$ NaCl
- Hydrofobní interakce - 25% acetonitrile, EtOH nebo isopropopanol, 10% etyleneglycol

Ionexová chromatografie

- Určena pro separaci látek nesoucích kladný nebo záporný náboj
- Afinita iontů k ionexu závisí na velikosti náboje
- V případě proteinů hraje zásadní roli pH !



Princip ionexové chromatografie



Větší náboj



Větší iont

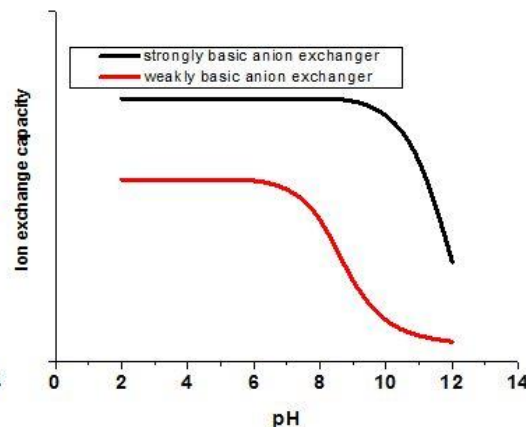
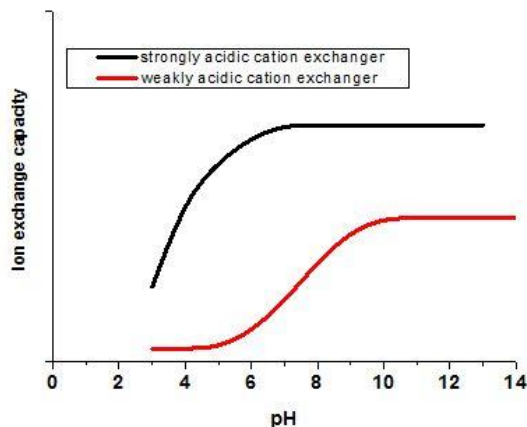


Větší koncentrace



Ionexy

Anion exchangers	Functional group
Diethylaminoethyl (DEAE)	$-O-CH_2-CH_2-N^+H(CH_2CH_3)_2$
Quaternary aminoethyl (QAE)	$-O-CH_2-CH_2-N^+(C_2H_5)_2-CH_2-CHOH-CH_3$
Quaternary ammonium (Q)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2-N^+(CH_3)_3$
Cation exchangers	Functional group
Carboxymethyl (CM)	$-O-CH_2-COO^-$
Sulphopropyl (SP)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2SO_3^-$
Methyl sulphonate (S)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2SO_3^-$



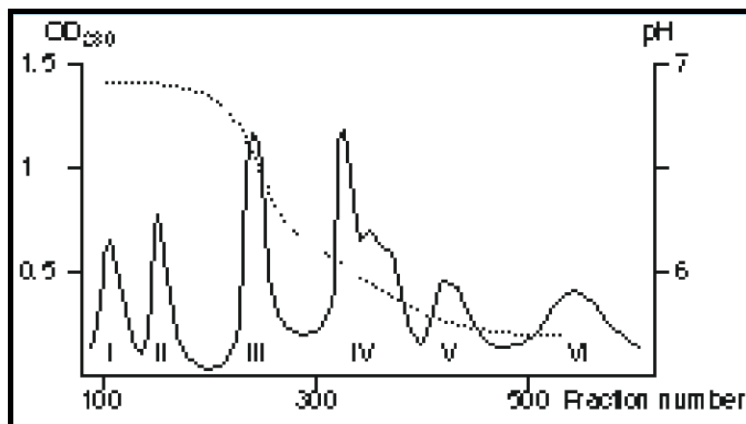
Eluční gradient

Ion exchanger	Direction of pH gradient	Direction of ionic strength gradient
Anion exchanger	decreasing	increasing
Cation exchanger	increasing	increasing



Nepřihlášený host (1)
VŠCHT PRAHA

pH gradient



Nosiče

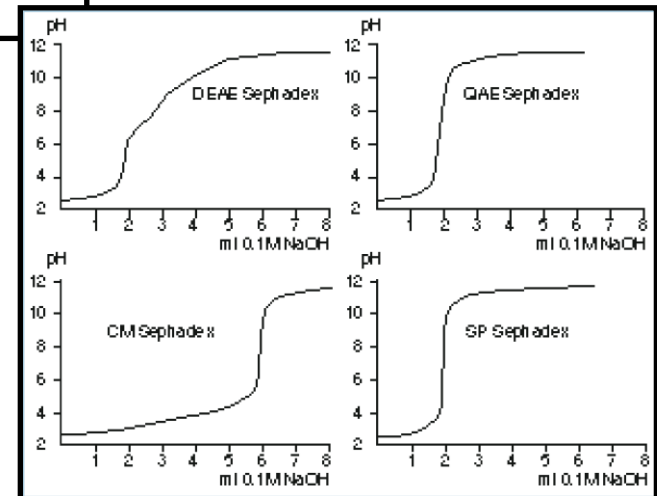
- polystyren – Amberlit, Dowex
- celuloza – X-Sephacel
- dextran – X-Sephadex
- prokřížená agarosa – X-Sepharosa
- syntetické polymery – MonoBeads, MiniBeads (Q, S)

X-Sephadex

velikost částic – 40-160 μm

prokřížený dextran – Sephadex G25 nebo G 50

Types		Description	Functional groups	Counter ion
DEAE Sephadex	A-25 A-50	Weakly basic anion exchanger	Diethylaminoethyl	Chloride
QAE Sephadex	A-25 A-50	Strongly basic anion exchanger	Diethyl-(2-hydroxypropyl)aminoethyl	Chloride
CM Sephadex	C-25 C-50	Weakly acidic cation exchanger	Carboxymethyl	Sodium
SP Sephadex	C-25 C-50	Strongly acidic cation exchanger	Sulphopropyl	Sodium



X-Sepharosa

Sepharose High Performance (34 μm), Sepharose Fast Flow (90 μm), Sepharose Big Beads (100 – 300 μm),
Sepharose CL-6B (90 μm , lepší chemická a fyzikální stabilita)

Vzorek: 0,8 mg cytochrom C (pI 10,3)
0,8 mg lysozym (pI >11)
3 mg ribonukleasa A (pI 9,3)

Startovací pufr: 20mM fosfátový pufr pH 6,8

Eluční pufr: 20mM fosfátový pufr pH 6,8+0,5 M NaCl

Průtok: 1 ml/min

Kolona: 1ml

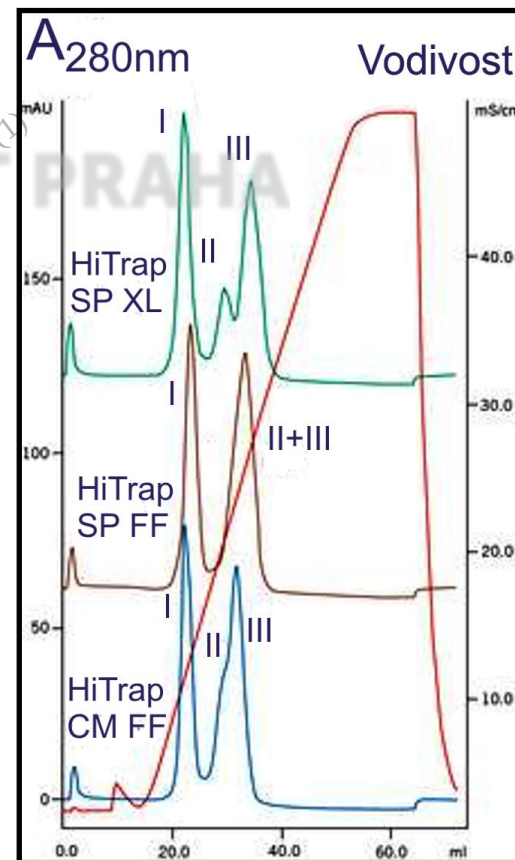
Průběh separace:

ekvilibrace – 20 ml startovacího pufru

aplikace vzorku – 2 ml

promytí - 5 ml startovacího pufru

eluce – 40 ml, lineární gradient, 0-100 % elučního pufru



Vzorek: 0,8 mg α -laktoglobulin (pI 5,8)
0,4 mg conalbumin (pI 6,3)
1,2 mg trypsin inhibitor (pI 4,5)

Startovací pufr: 20mM Tris/HCl pH 7,4

Eluční pufr: 20mM Tris/HCl pH 7,4 + 0,5 M NaCl

Průtok: 1 ml/min (150cm/h)

Kolona: 1ml

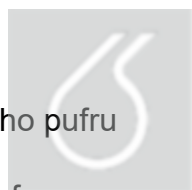
Průběh separace:

ekvilibrace – 20 ml startovacího pufru

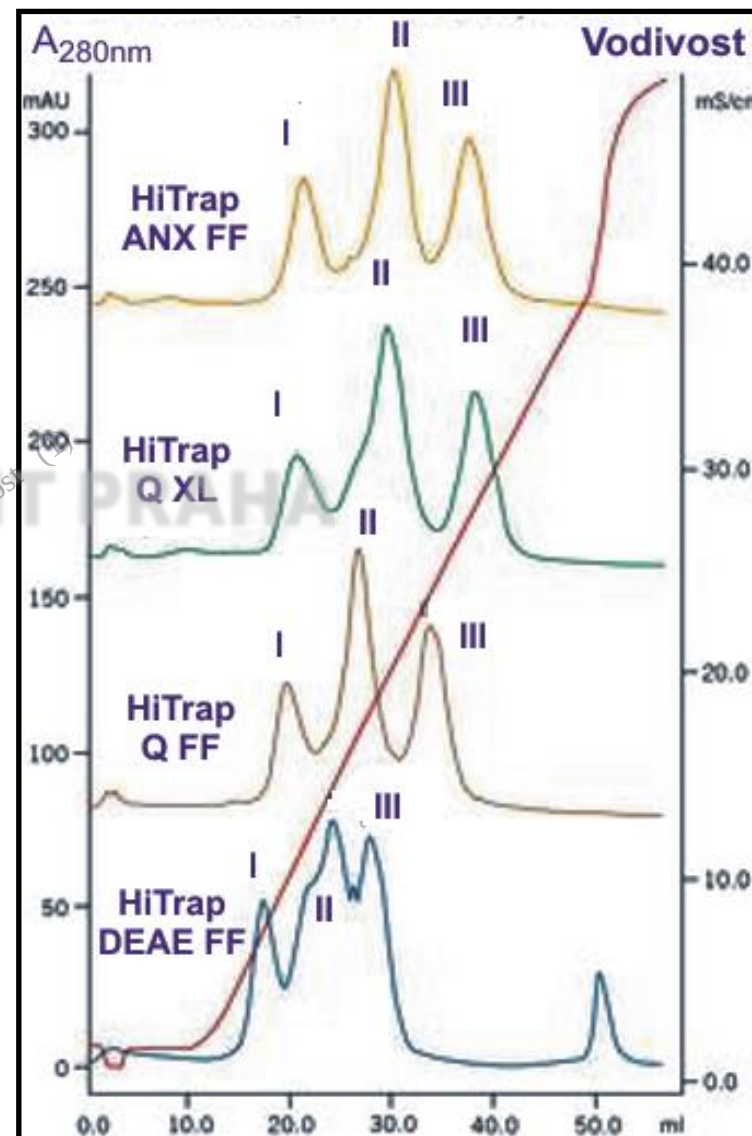
aplikace vzorku – 2 ml

promytí - 5 ml startovacího pufru

eluce – 40 ml, lineární gradient, 0-80 % elučního pufru



VŠCHT PRAHA
Nepřehlášený host



Vzorek: 0,5 mg **Leonardo** (pl 4,8)
0,6 mg **Raphael** (pl 6,3)
1,0 mg **Donatello** (pl 4,5)
1,2 mg **Michelangelo** (pl 6,3)
0,6 mg **Trhač** (pl 8,0)
rozpuštěno v 50 mM Tris pH 7,0

Stacionární fáze:

Startovací pufr:

Eluční pufr:

Průtok: 1 ml/min

Průběh separace:



VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

Údaje od výrobce

Anion exchangers	Q Sepharose Fast Flow	Q Sepharose XL	DEAE Sepharose Fast Flow	ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)
Bead structure	6% highly cross-linked agarose	6% highly cross-linked agarose with bound dextran	6% highly cross-linked agarose	4% highly cross-linked agarose
Bead size	45 - 165 μm	45 - 165 μm	45 - 165 μm	45 - 165 μm
Type of gel	Strong anion	Strong anion	Weak anion	Weak anion
Charged group	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	$-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{H}$	$-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{H}$
Total ionic capacity	0.18 - 0.25 mmol Cl^-/ml gel	0.18 - 0.26 mmol Cl^-/ml gel	0.11 - 0.16 mmol Cl^-/ml gel	0.13 - 0.17 mmol Cl^-/ml gel
Dynamic binding capacity ¹	120 mg HSA/ml gel	>130 mg BSA/ml gel	110 mg HSA/ml gel	43 mg BSA/ml gel
pH stability ²				
Short term	1 - 14	2 - 14	1 - 14	2 - 14
Working	2 - 12	2 - 12	2 - 9	3 - 13
Long term	2 - 12	2 - 12	2 - 13	3 - 13
Storage temperature	+4 ° to +30 °C	+4 ° to +30 °C	+4 ° to +30 °C	+4 ° to +30 °C
Storage buffer	20% ethanol	20% ethanol	20% ethanol	20% ethanol
Chemical stability	All commonly used buffers, 1 M NaOH, 8 M urea, 6 M guanidine hydrochloride, 70% ethanol			
Avoid	Oxidizing agents, anionic detergents and buffers			

MonoBeads, MiniBeads (Q, S)

vysoké rozlišení

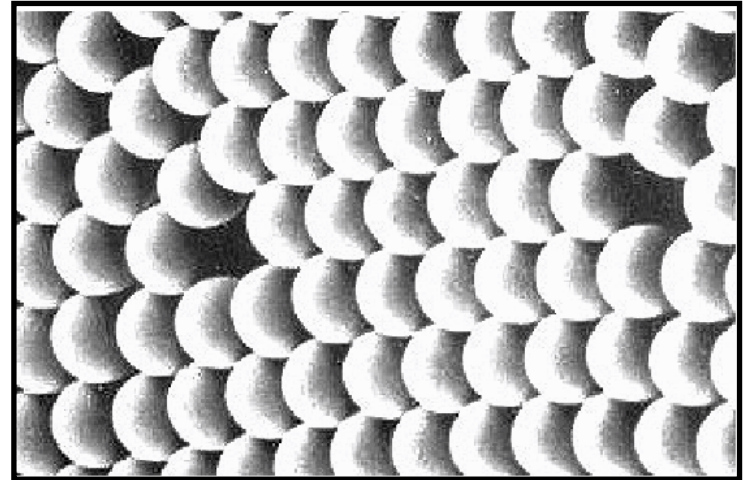
MiniBeads – mikropurifikace, analýza

vyšší pracovní tlak – FPLC/HPLC

MonoBeads -FPLC

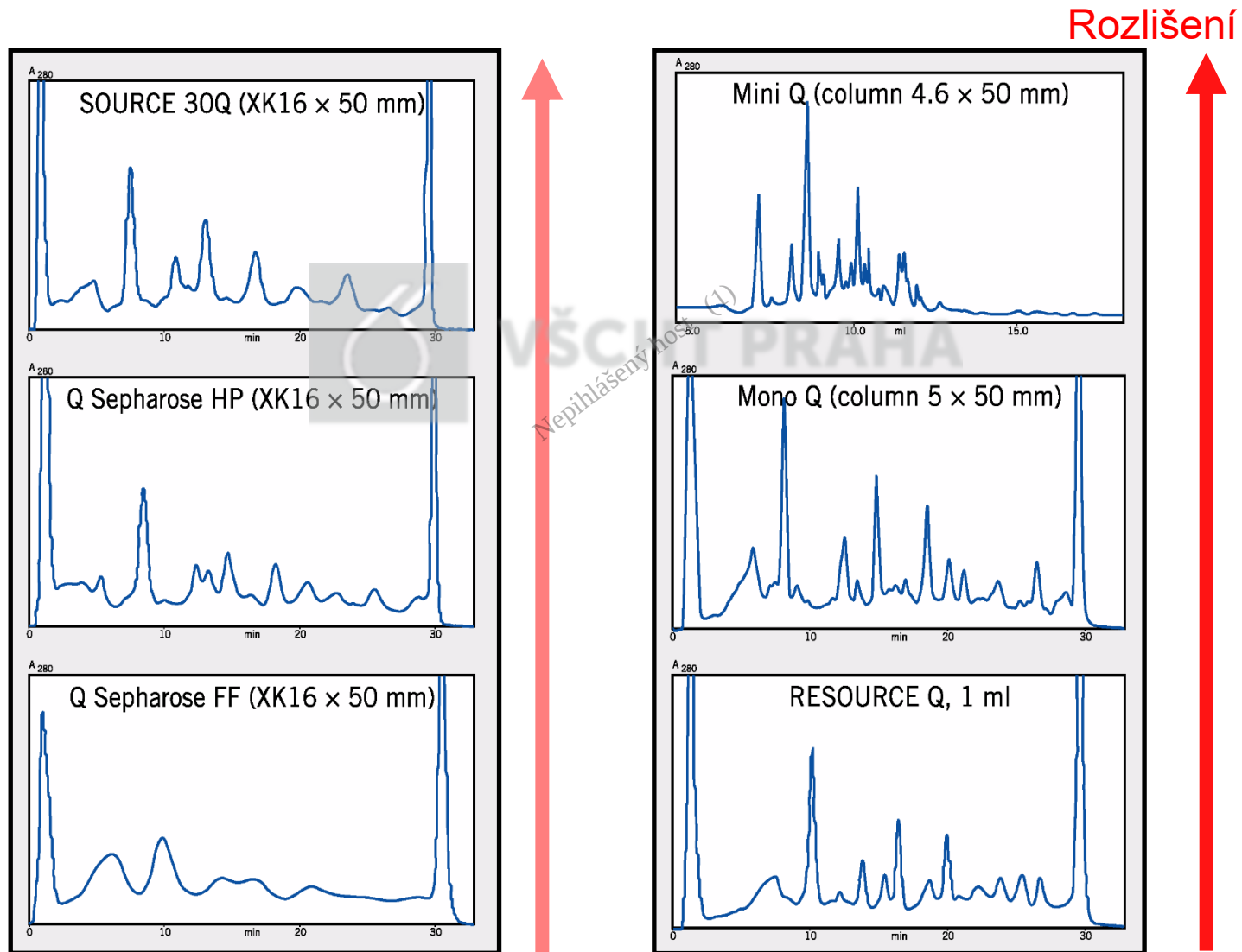


VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

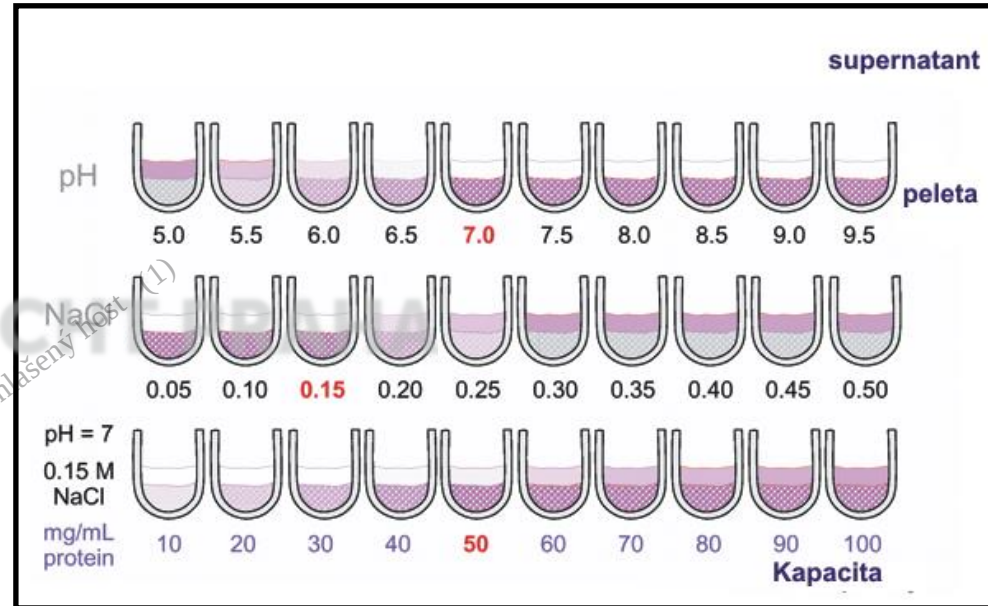
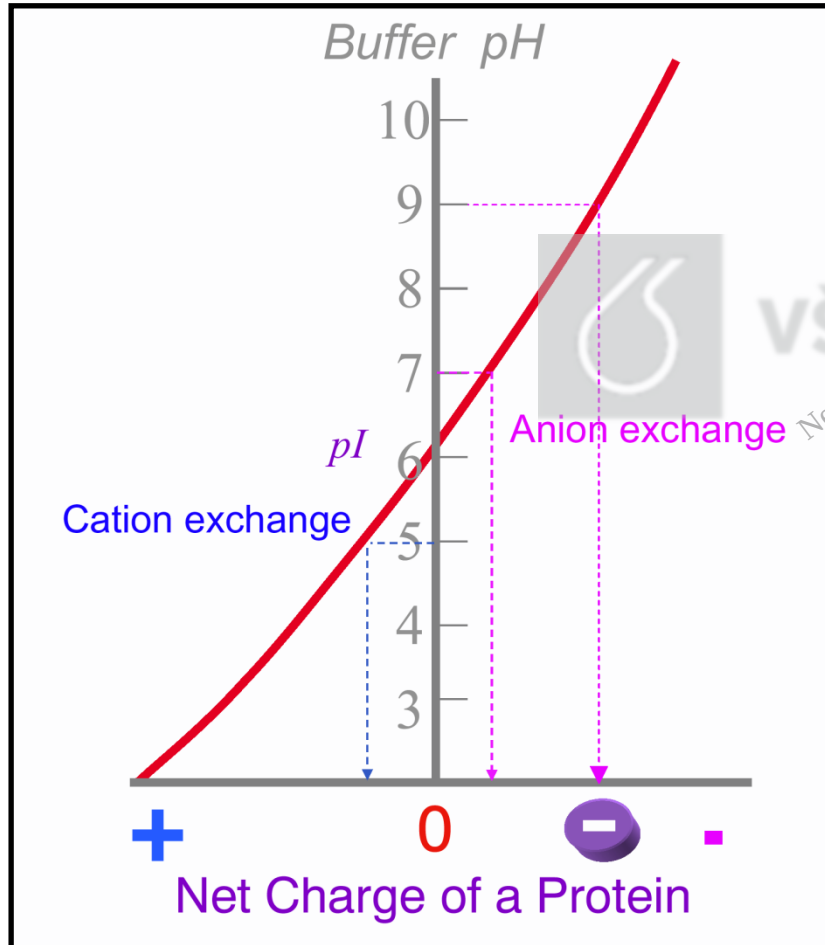


Vzorek: pankreatin

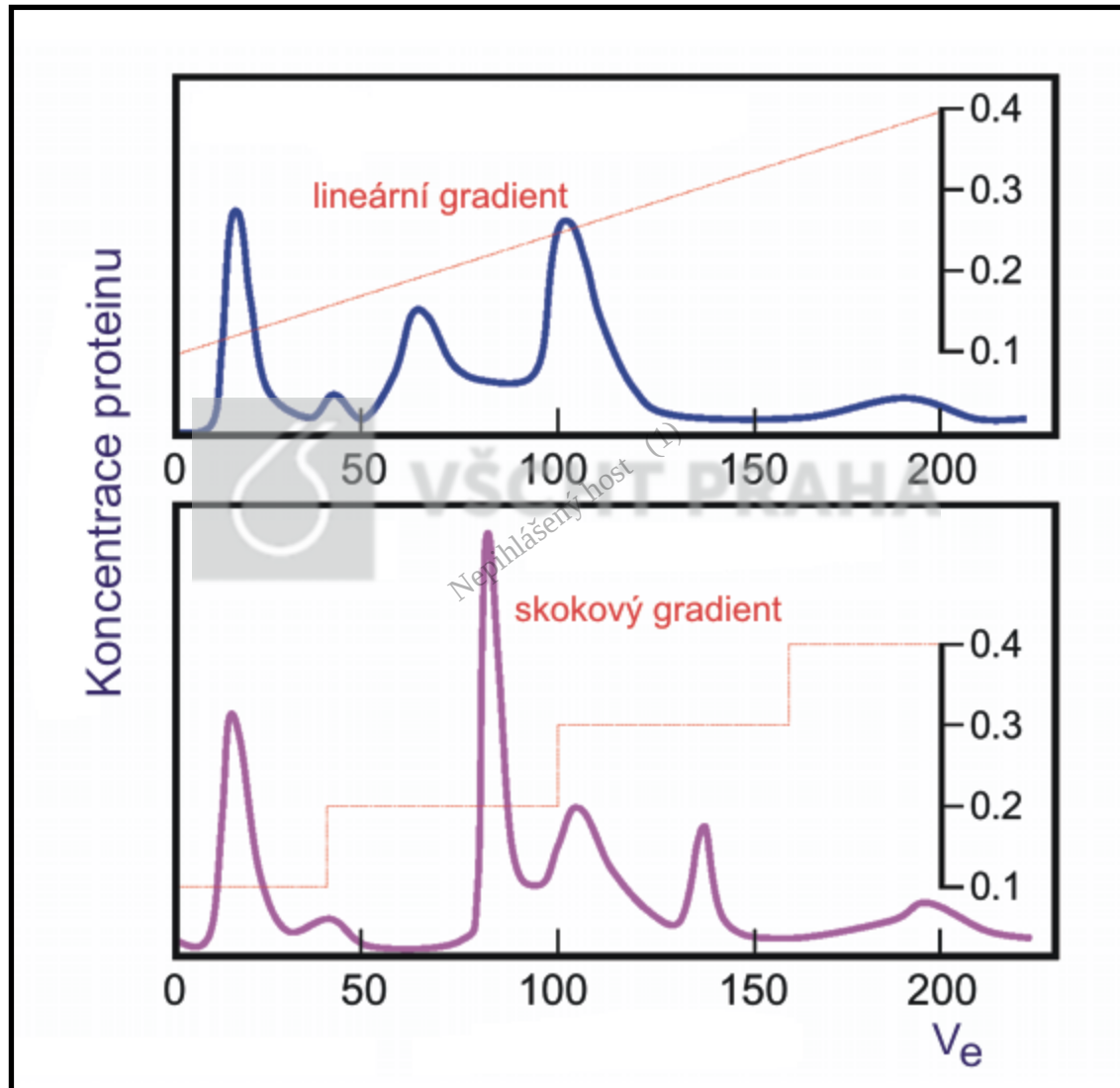
Eluce: gradient iontové síly



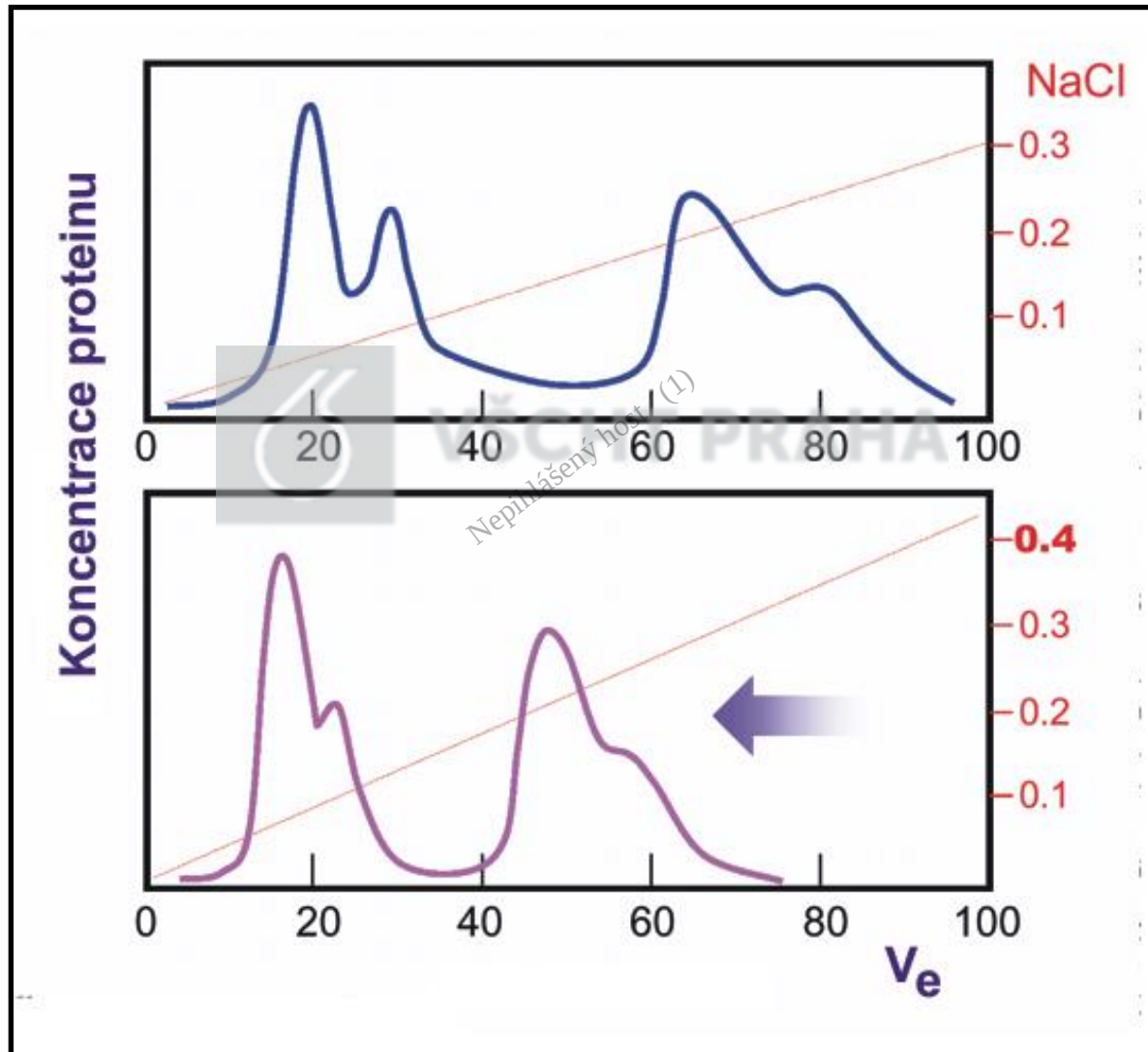
Výběr vhodného pH pro ionexovou chromatografii



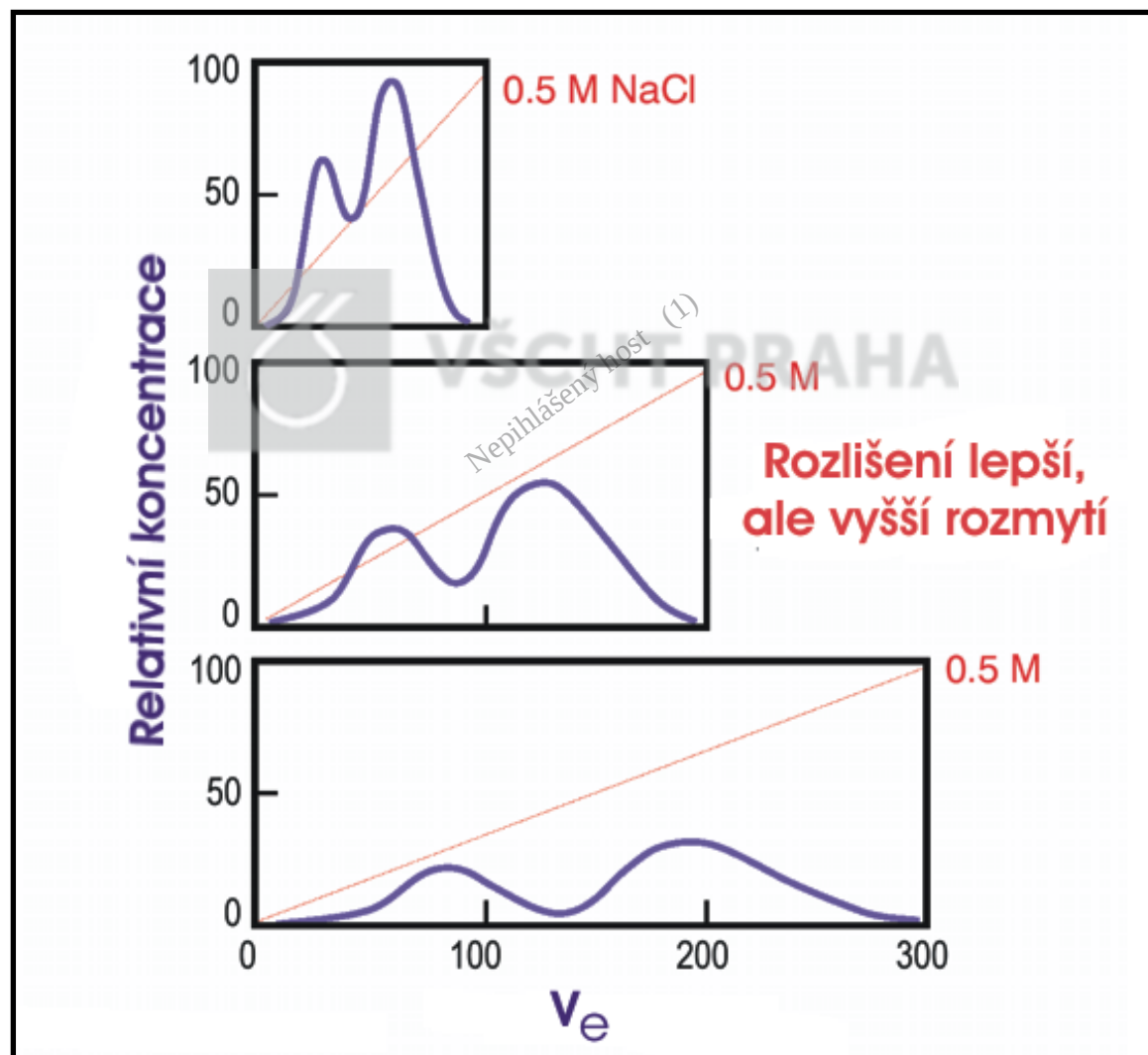
gradient iontové síly – lineární x skokový



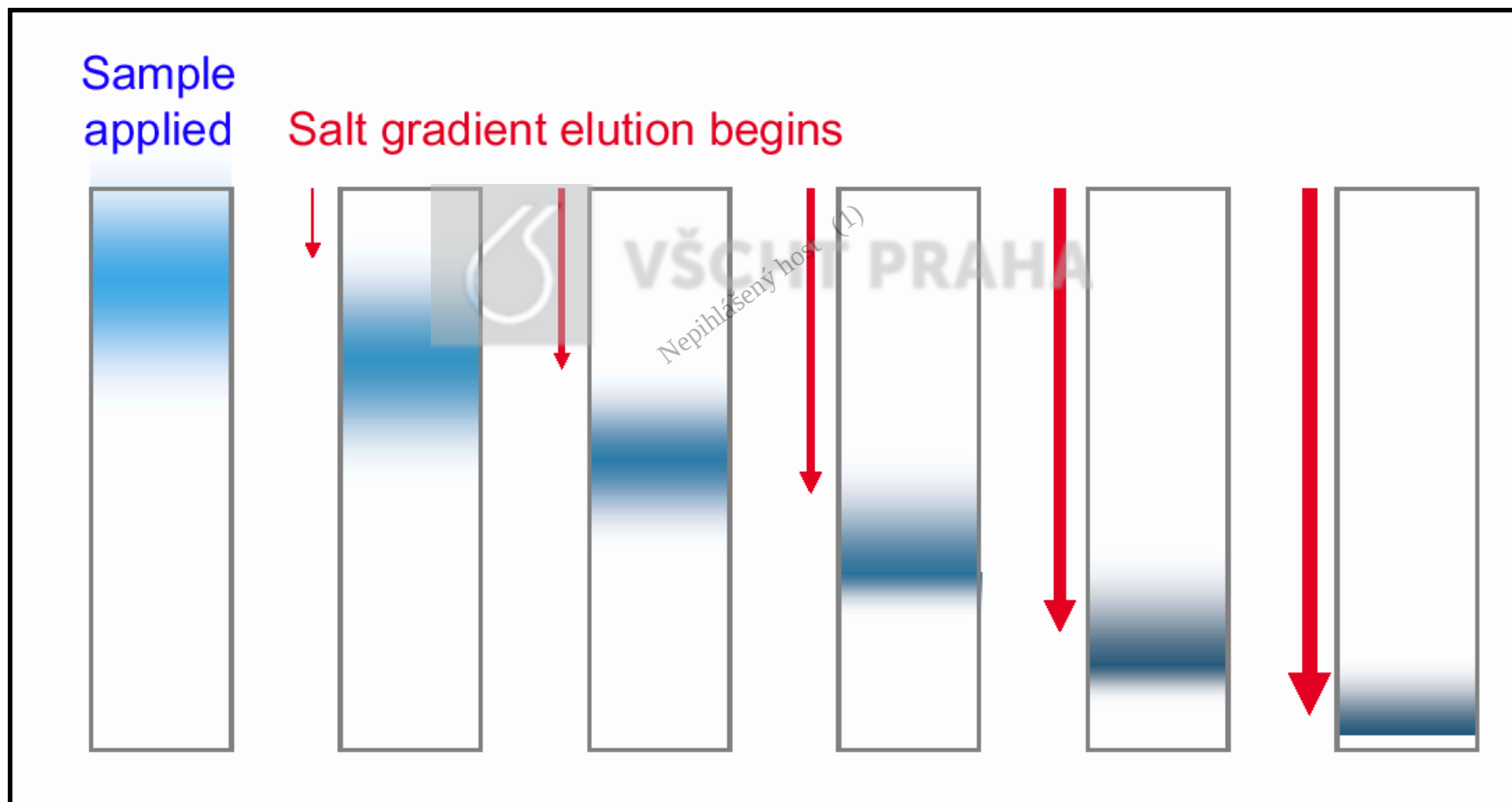
Vliv strmosti gradientu

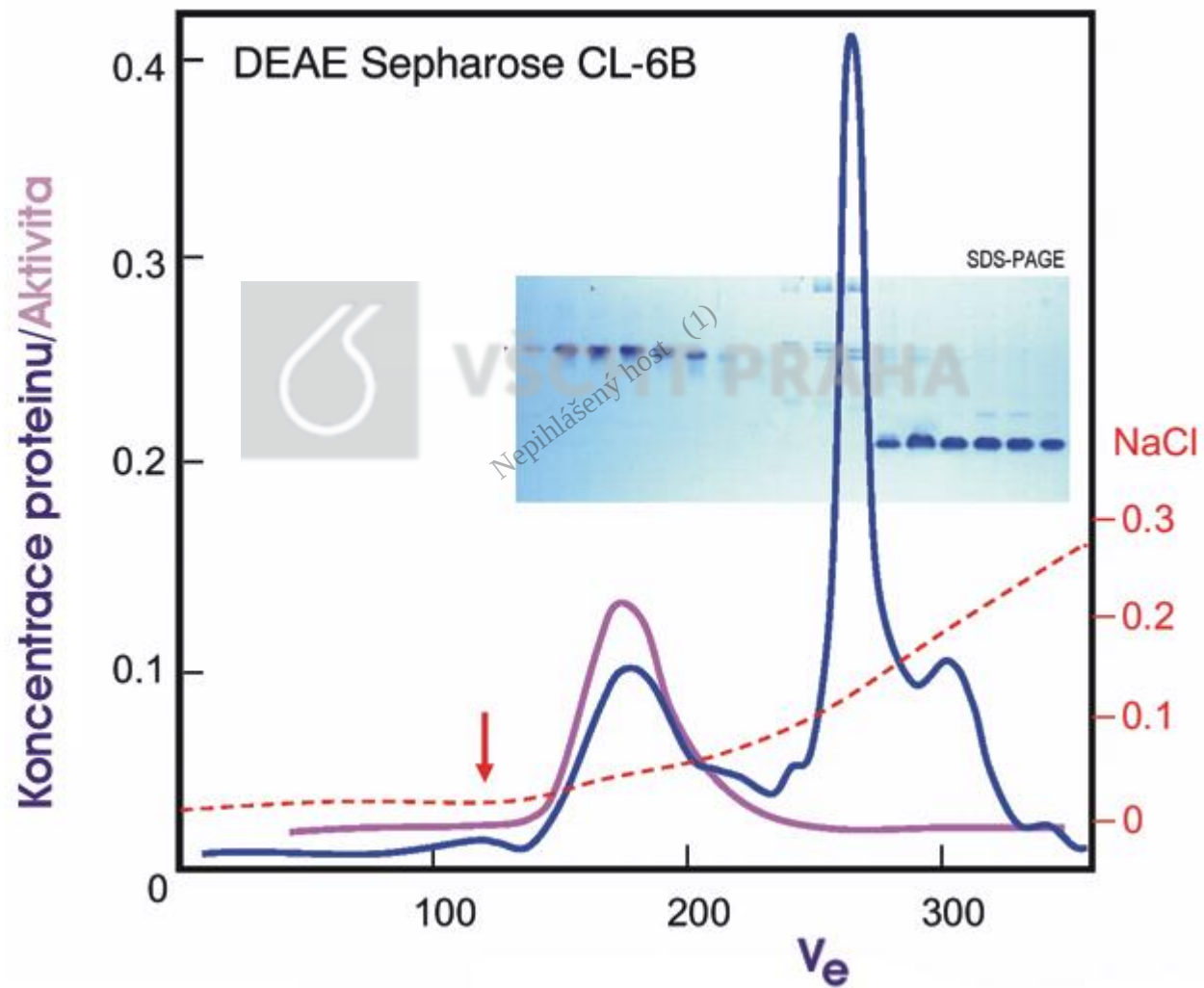


Vliv elučního objemu



Koncentrační efekt



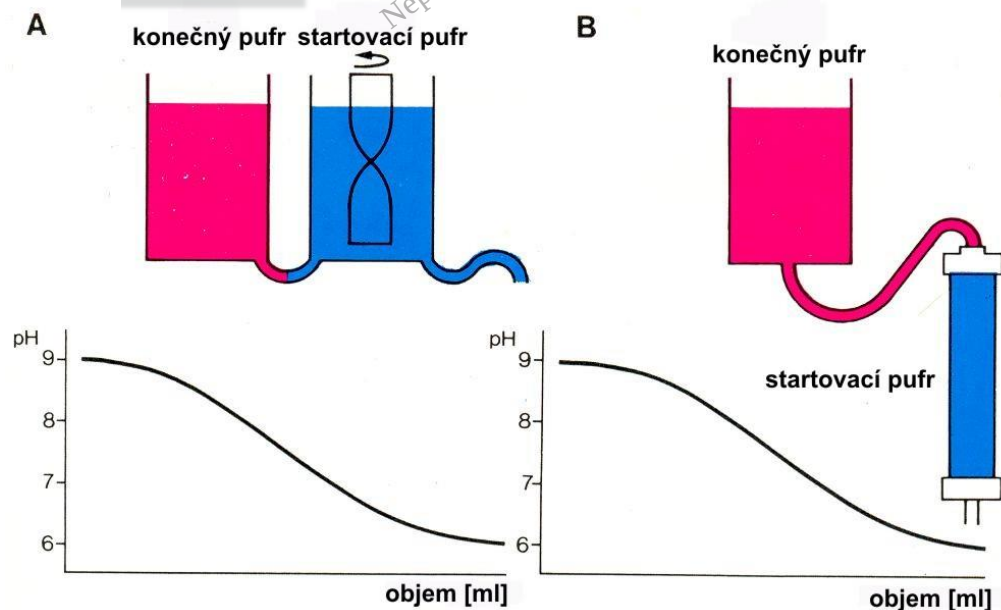


Experiment		
	vysoké rozlišení (gradientová eluce)	skupinová separace (kroková eluce)
stacionární fáze	silné ionexy velikost částic 10 - 30 μm – pro purifikaci 3 - 5 μm – pro analytiku	silné ionexy velikost částic 30 μm nebo větší – vyšší průtok
kolona	dékla 1 - 10 cm	nezáleží, krátká, silná lepší pro vyšší průtok
mobilní fáze	pH pufru aspoň o 0,5 než pl Koncentrace pufru 20 - 50 mM	pH pufru aspoň o 0,5 než pl
objem vzorku	na objemu nezáleží	na objemu nezáleží
množství vzorku	5 - 10 % celkové kapacity kolony (dobré rozlišení)	40 % celkové kapacity kolony



Chromatofokusace

- separace proteinů na základě jejich pI
- vysoké rozlišení
- není potřeba připravovat pH gradient
- zaostřovací efekt
- jednoduchost

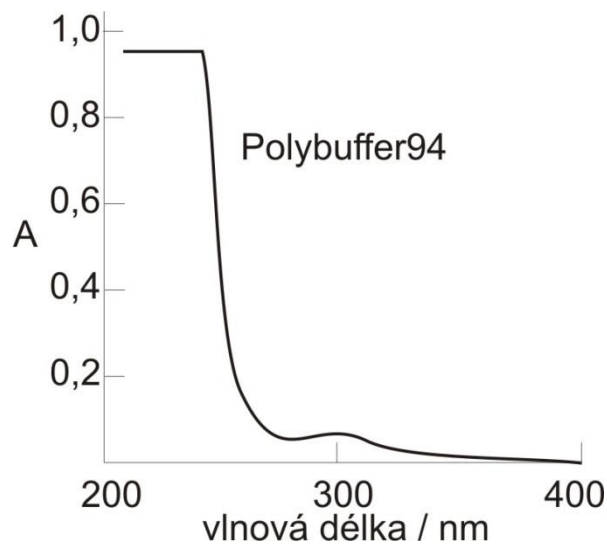
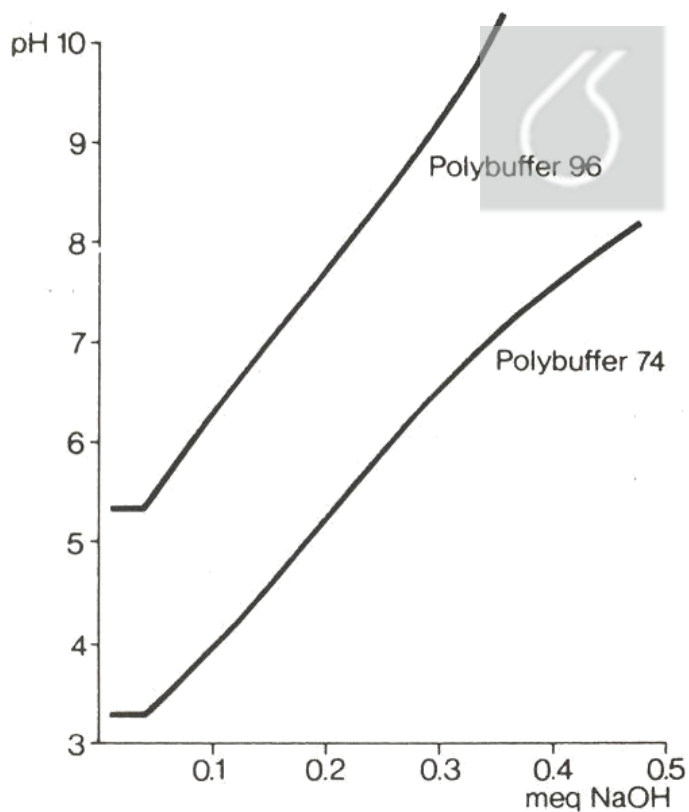


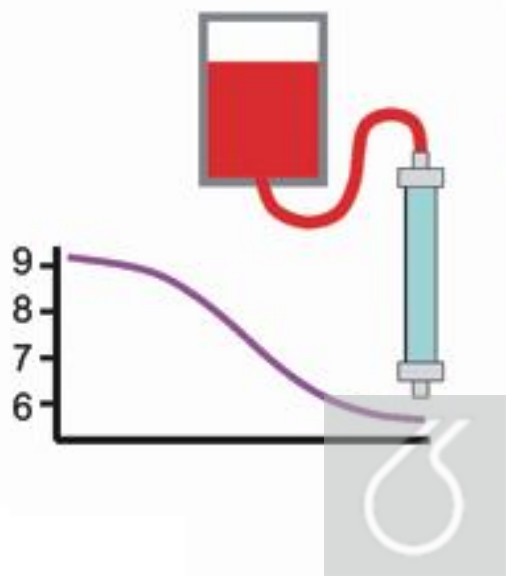
Polypufry - amfolyty

Stacionární fáze

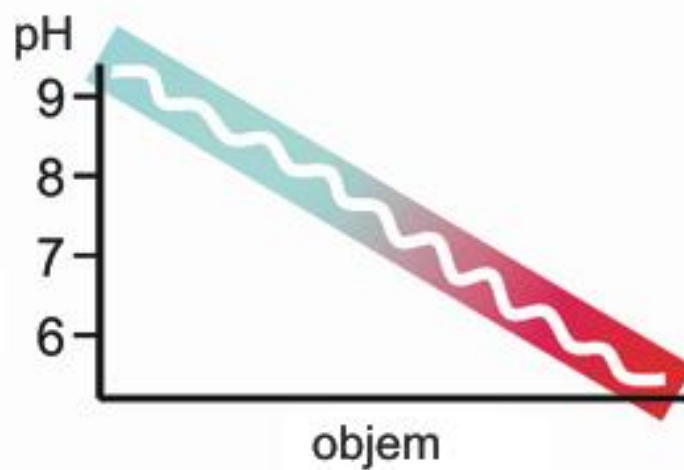
Polybuffer 96 - pH 9-6
Polybuffer 74 - pH 7-4 → PBE94

Pharmalyte - pH 8-10,5 → PBE118

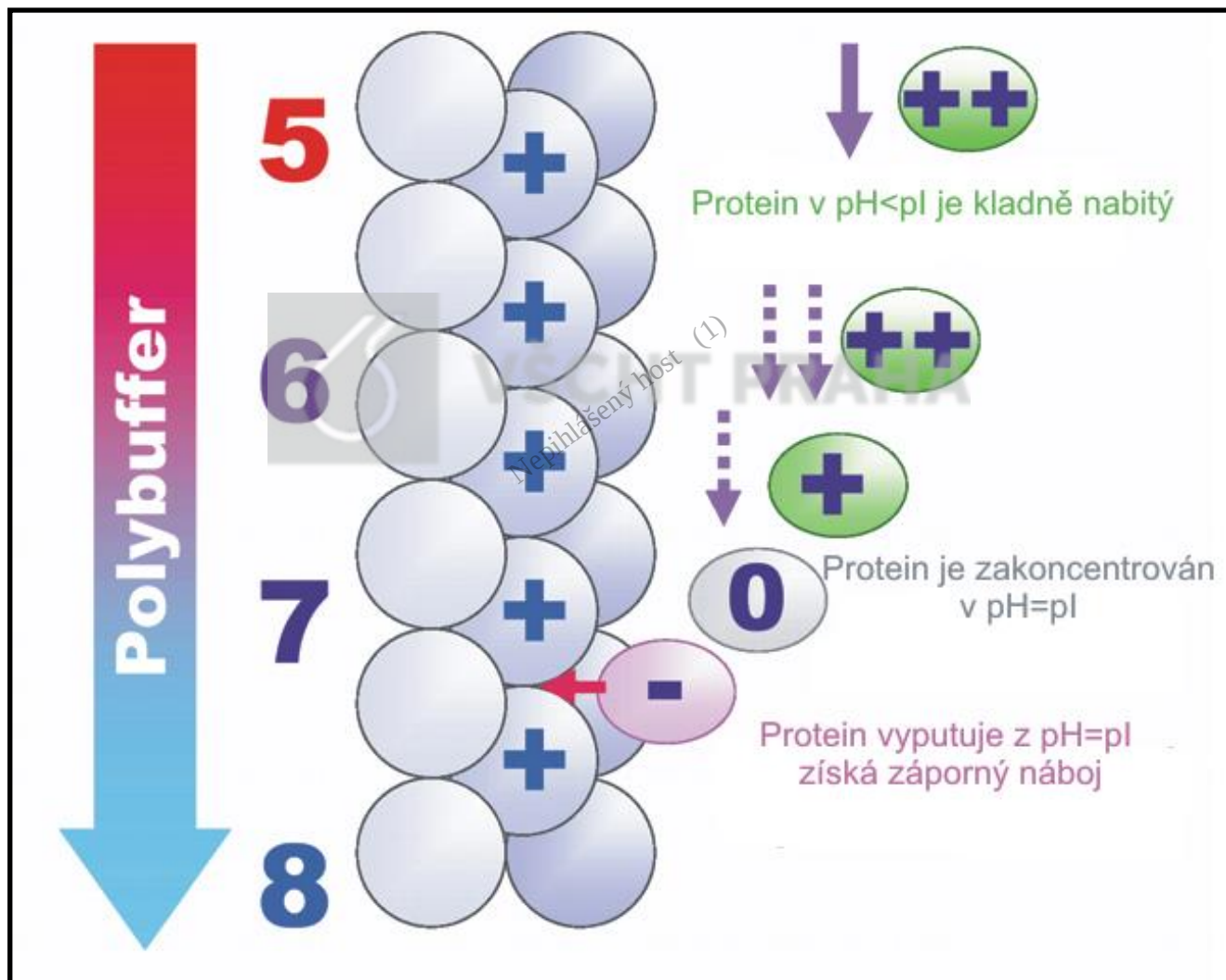




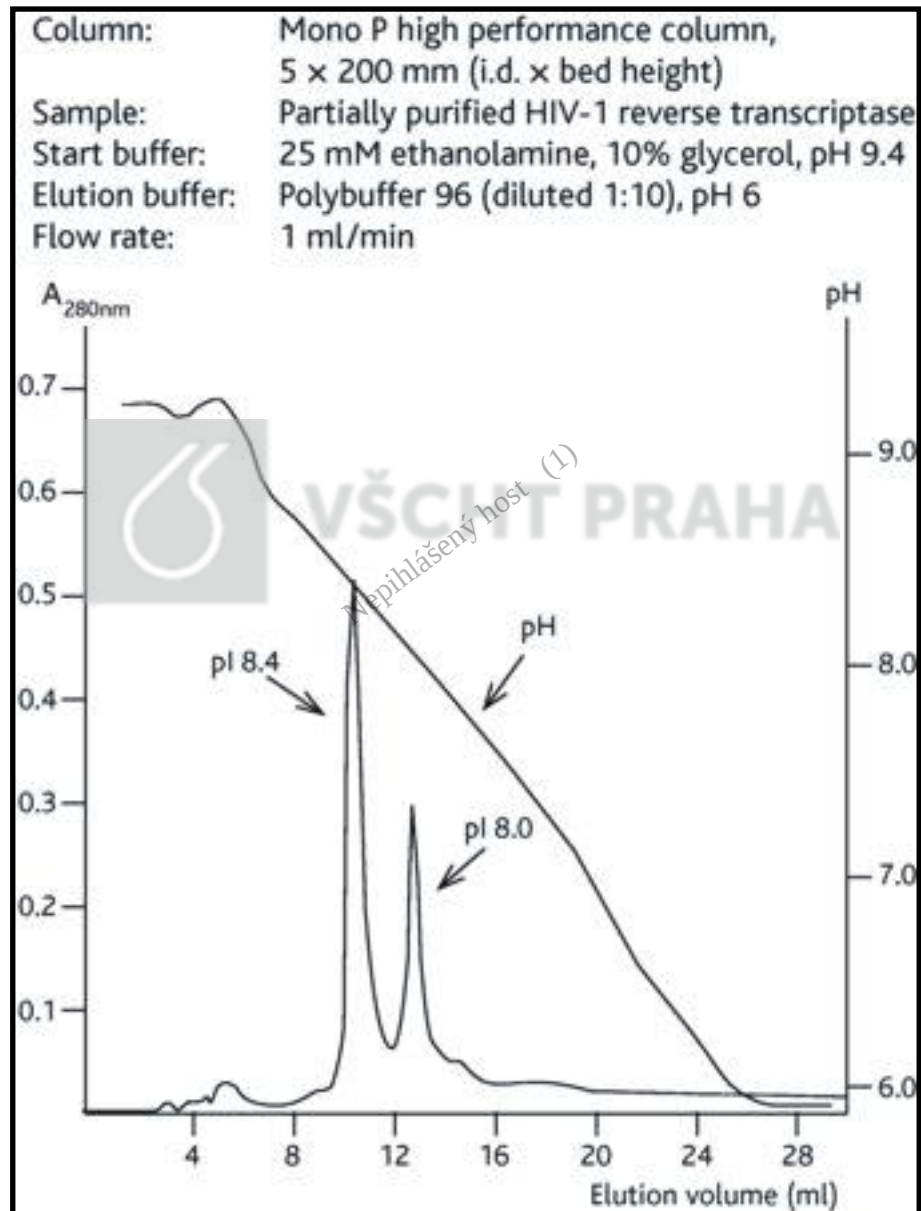
- Polybuffer (pulypufr) obsahuje ampholyty - směs látek majících různé pK_a



Princip fokusace



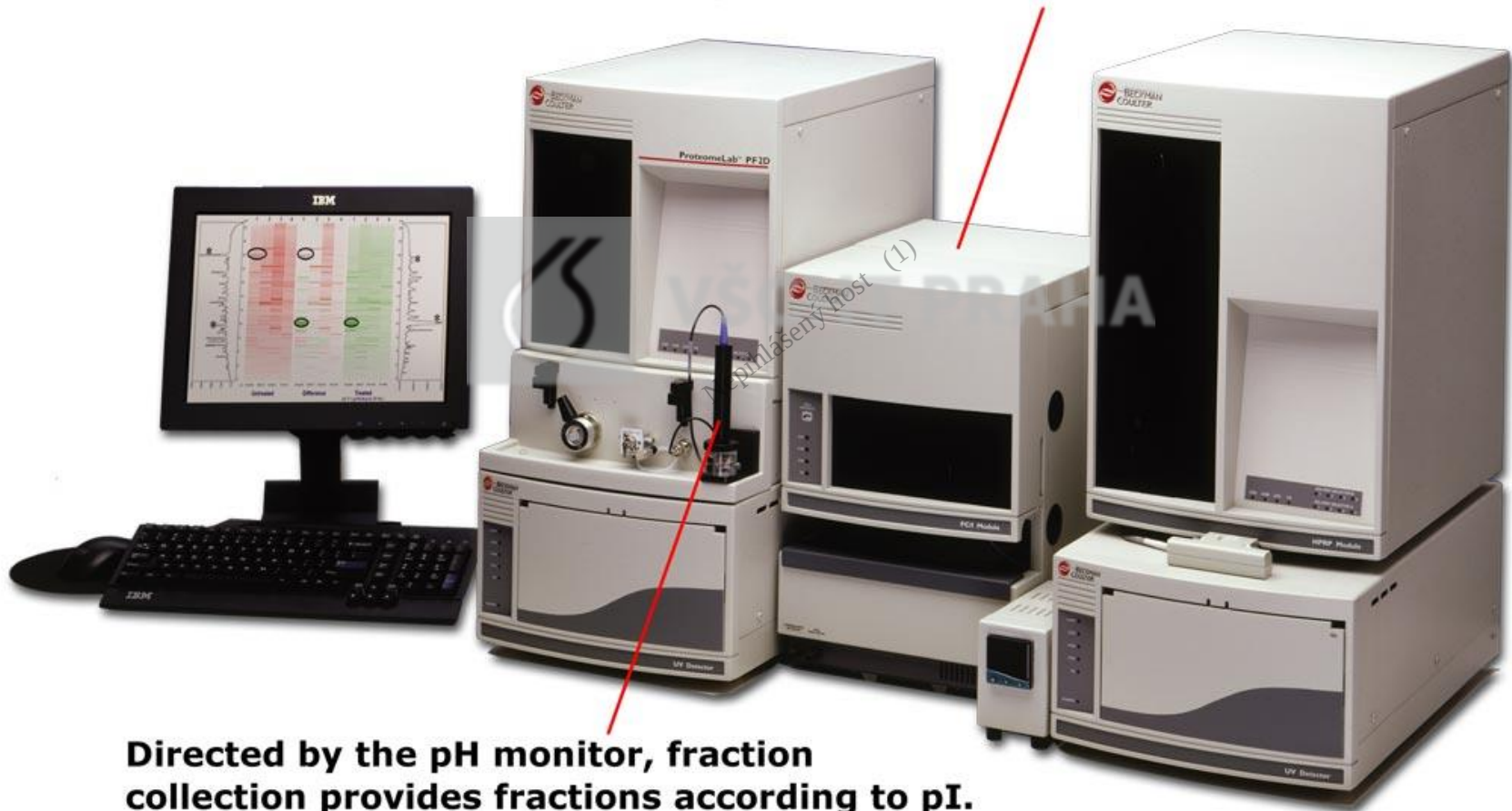
MonoP Beads – směs kvartérních a terciálních aminů



Dvoudimenzionální chromatografie

Beckman Coulter – PF 2D

Fractions from the first dimension are automatically injected into the second, eliminating the need for manual transfer.

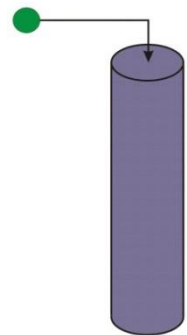


Directed by the pH monitor, fraction collection provides fractions according to pI.

Dvoudimenzionální chromatografie



1. ROZMĚR
CHROMATOFOKUSACE

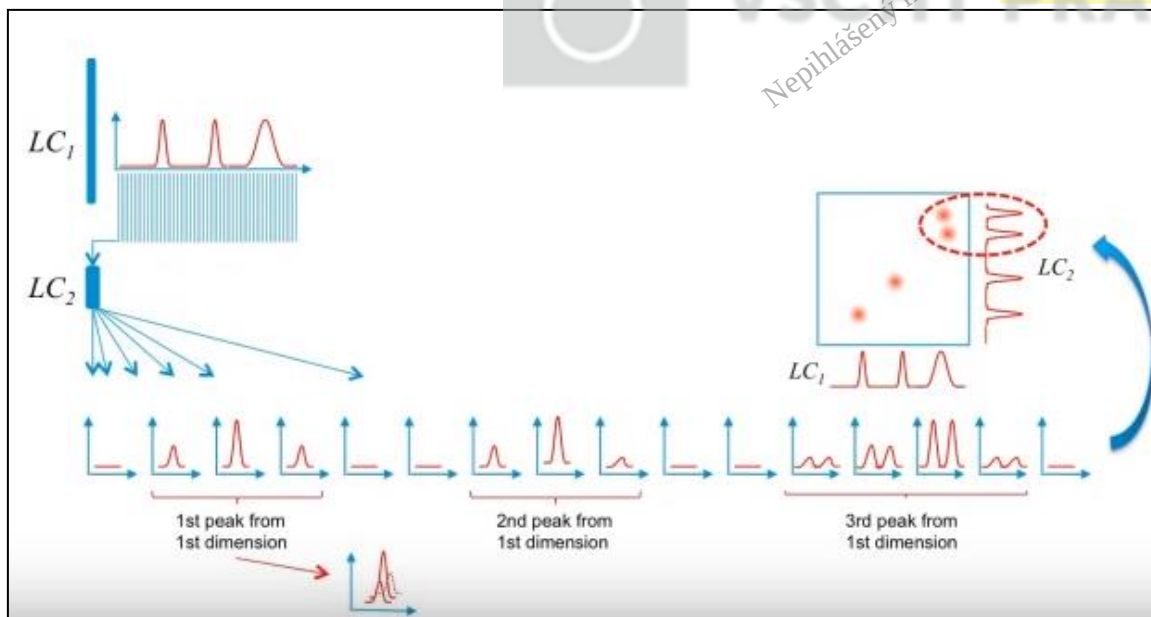


detekce
pH + UV

2. ROZMĚR
CHROMATOCHRAFIE
NA REVERSNÍ FÁZI

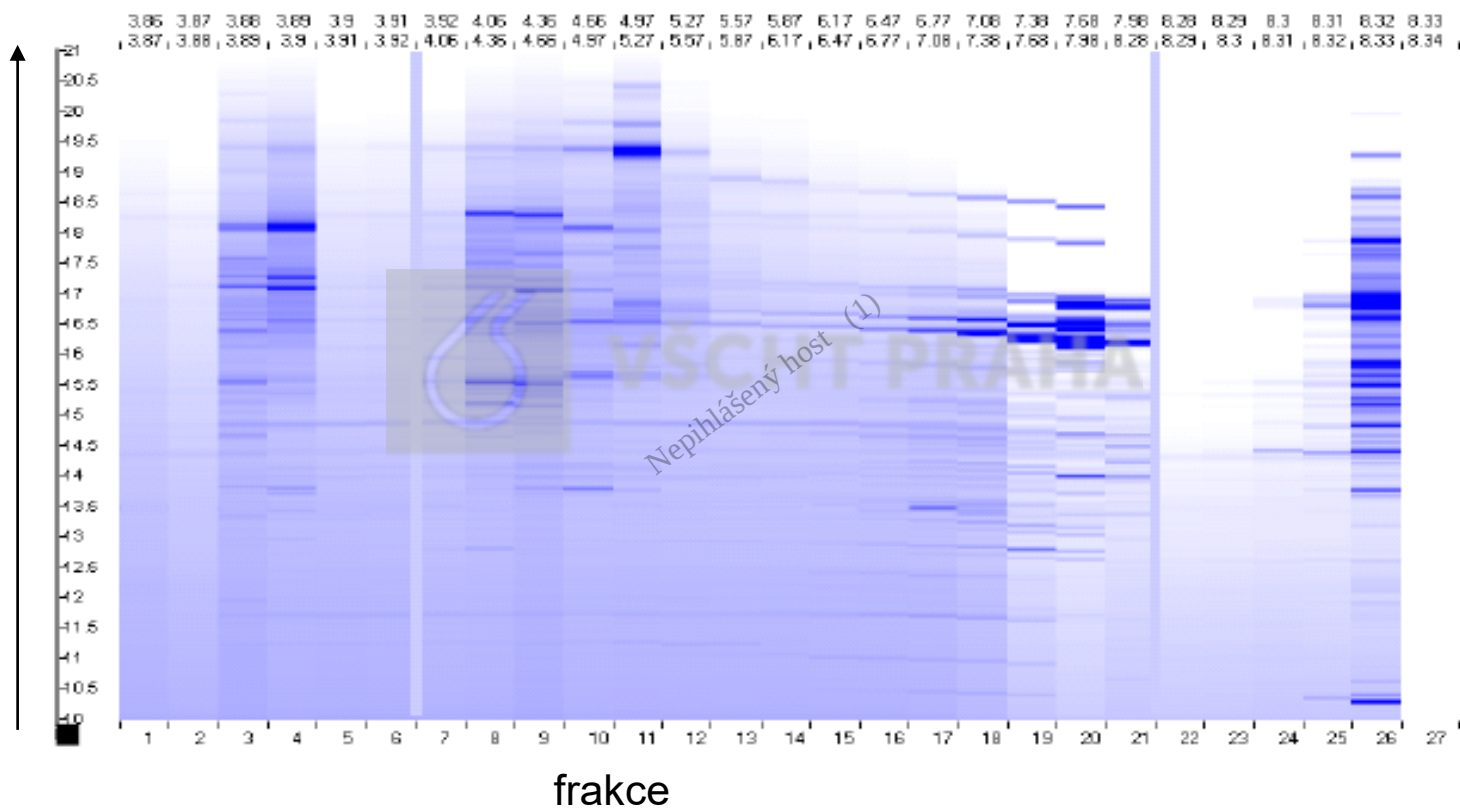


detekce
pH + UV

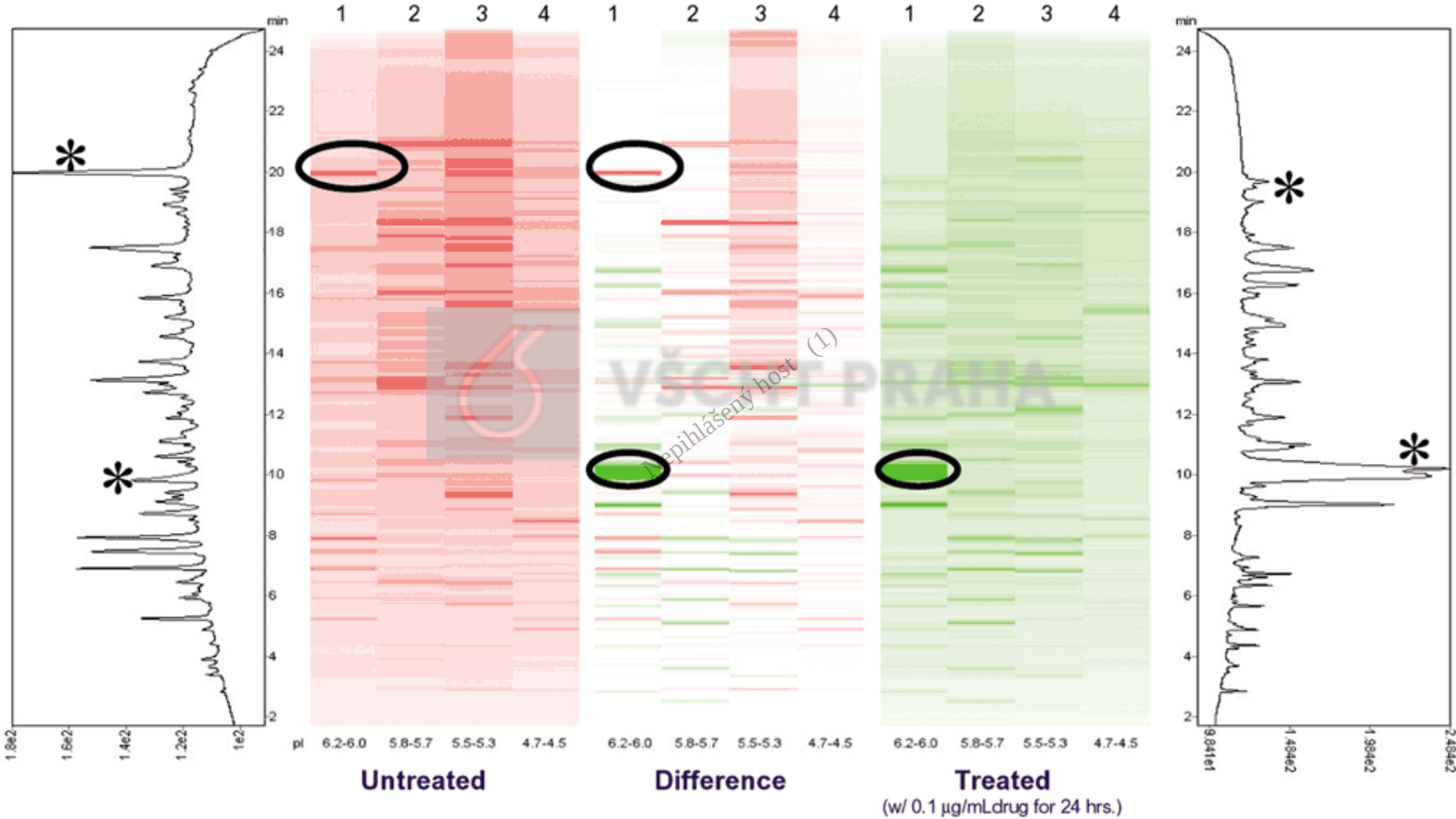


pH

hydrofobicita



Partial pI/UV map of colon cancer cell line before and after treatment



Hydrofobní chromatografie



VŠCHT PRAHA

Nepřihlášený host (1)

Hydrofobicita proteinu insulin

malwmrllpl lallalwgpdpaaafvnqhl cgshlvealy lvcgergffy tpktrreaed
lqvgqvelgg gpgagslqpl alegslqkrg iveqcctsic slyqlenycn

MALWMRLLPLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSI CSLYQLENYCN

- Green: hydrophobic uncharged residues, like F I L M V W A and P
- Red: acidic residues, like D E and C-terminal -COOH
- Blue: basic residues, like R K H and N-terminal -NH₂
- Black: other residues, like G S T C N Q and P
- ?: Unrecognized codes are replaced of '?'.

Acidic

Choosing suitable solvent:

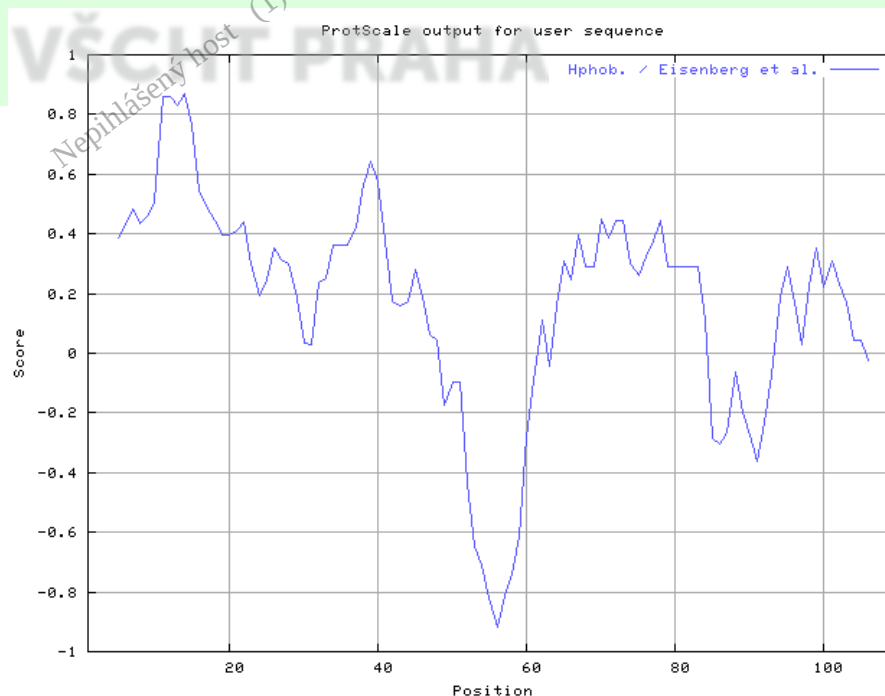
For acidic peptide, initially try to dissolve the peptide in water; if the peptide does not dissolve, add NH₄OH(<50ul) and dilute to 1ml with deionized water.

Hydrophobic: 46.36%

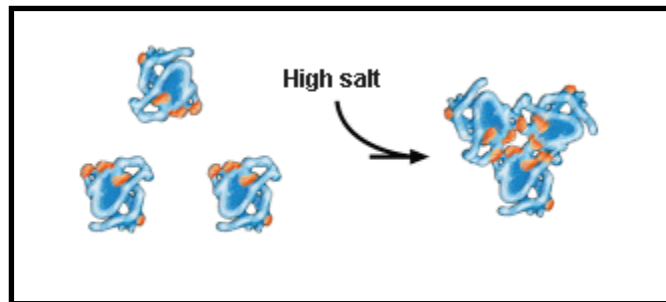
Acidic: 9.09%

Basic: 8.18%

Neutral: 36.36%

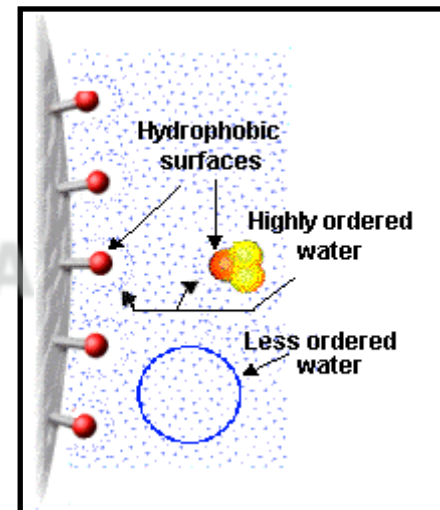


vliv soli na protein



Stacionární fáze

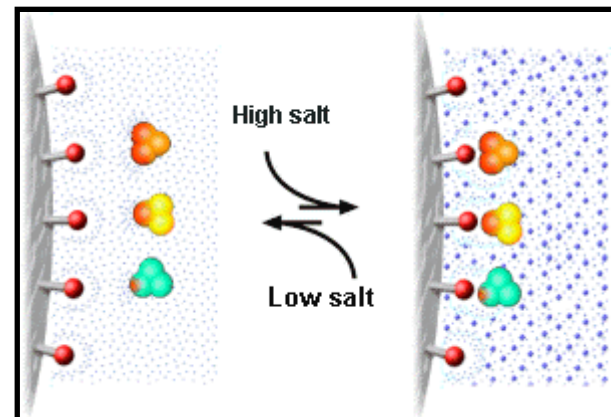
vazba hydrofobních oblastí na povrchu proteinu
v H_2O slabé interakce $\Rightarrow$ přidavek soli
méně hydrofobní než RPC



Mobilní fáze

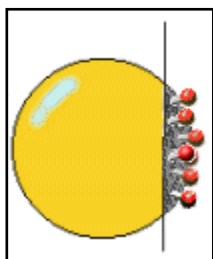
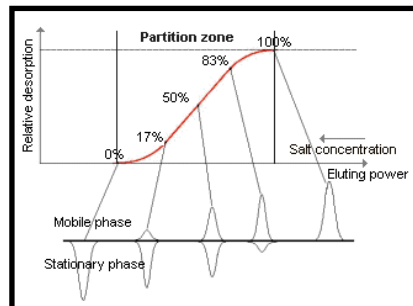
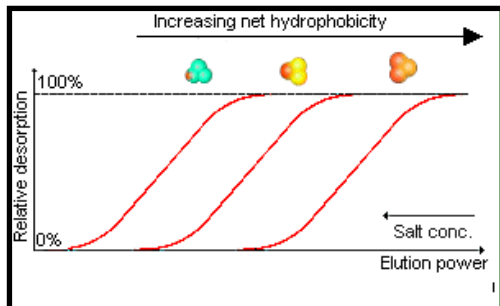
H_2O /sůl (~ 1 M) nejčastěji $(NH_4)_2SO_4$

← Increasing precipitation ("salting-out") effect
Anions: PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , $CH_3 \cdot COO^-$, Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^-
Cations: NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}
Increasing chaotropic ("salting-in") effect →

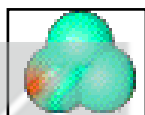


Eluce

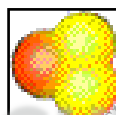
klesajícím gradientem soli (1 M – 0 M)



stacionární fáze



nejméně hydrofobní látka



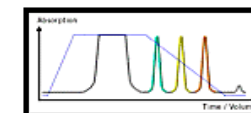
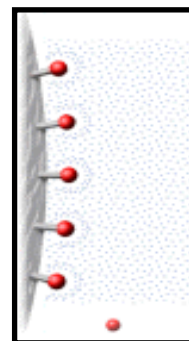
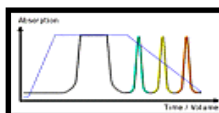
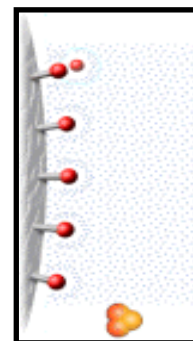
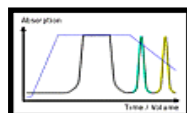
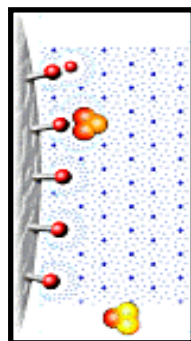
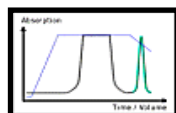
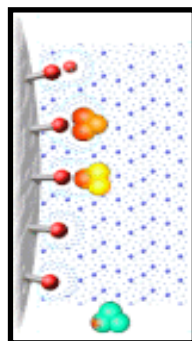
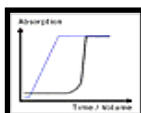
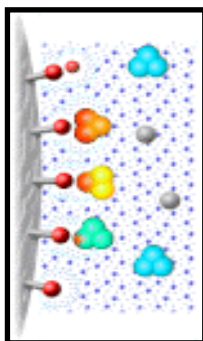
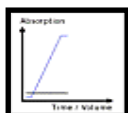
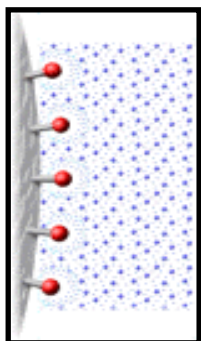
středně hydrofobní látka



velmi hydrofobní látka



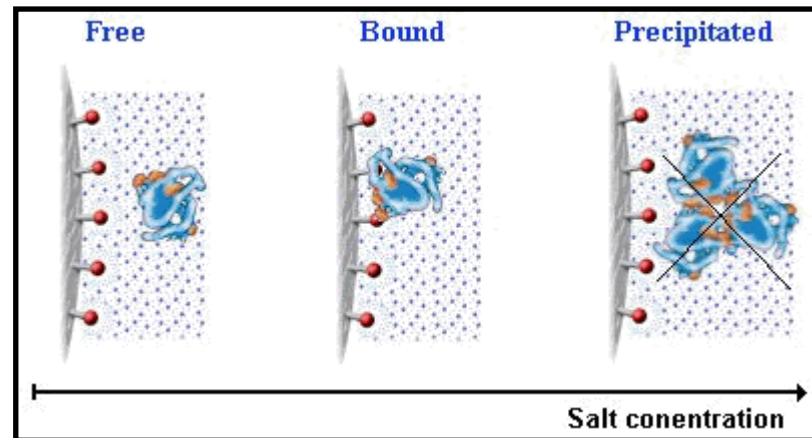
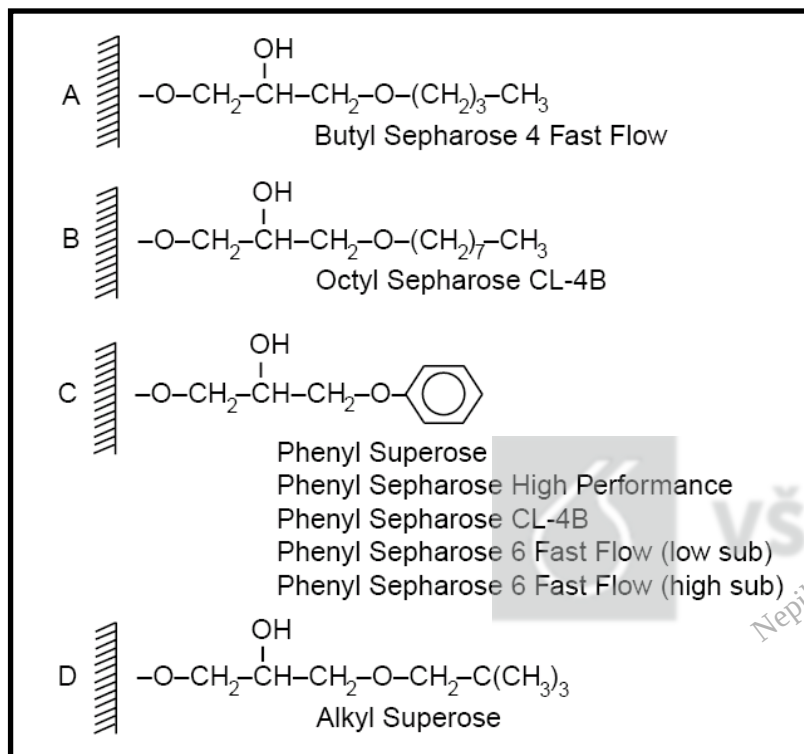
velmi hydrofobní kontaminace



Přehled typů stacionární fáze

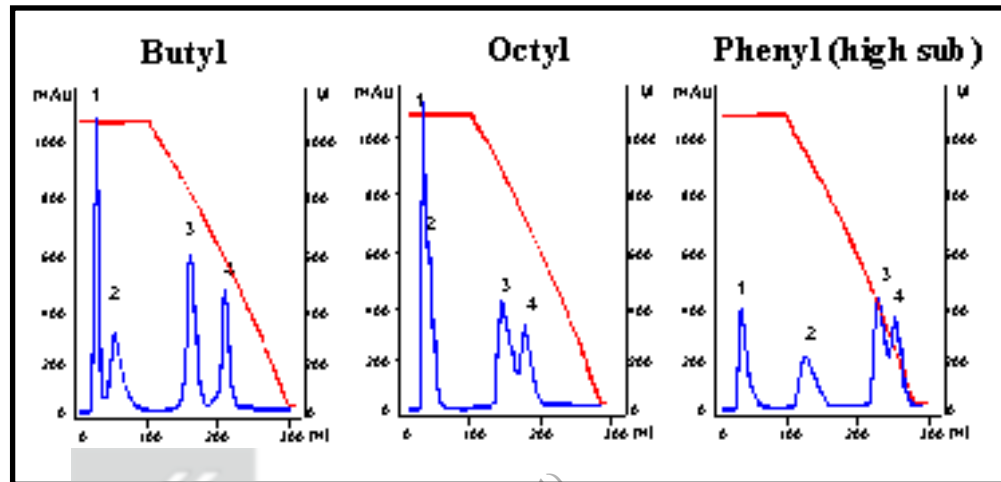
- Phenyl, Butyl nebo Octyl Sepharose Fast Flow (FF), FPLC kolony Phenyl Superose fy **GE Healthcare** na polysacharidové (agarosové) bázi
- Macro-Prep t-Butyl HIC Support fy **Bio-Rad** na methakrylátové bázi
- Spheron 100 (300, 1000) fy **Lachema** založené na bázi kopolymeru hydroxyethylmethakrylátu a ethylendimethakrylátu
- Separon HEMA-S 1000, Separon HEMA-Bio 1000 Phenyl fy **TESSEK** jsou vyráběny na bázi hydroxyethylmethakrylátu

výběr ligandu

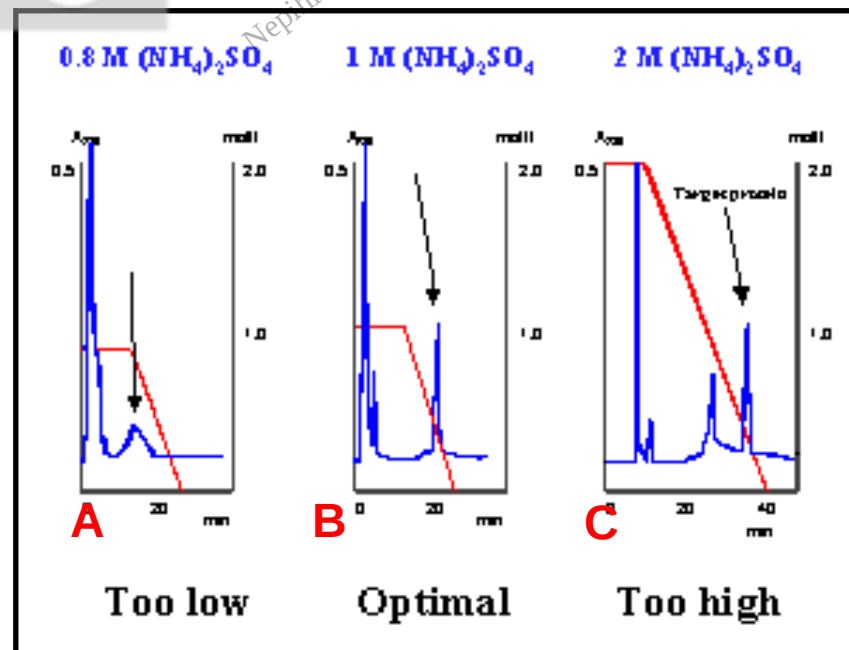


Ether < Isopropyl < Butyl < Octyl < Phenyl

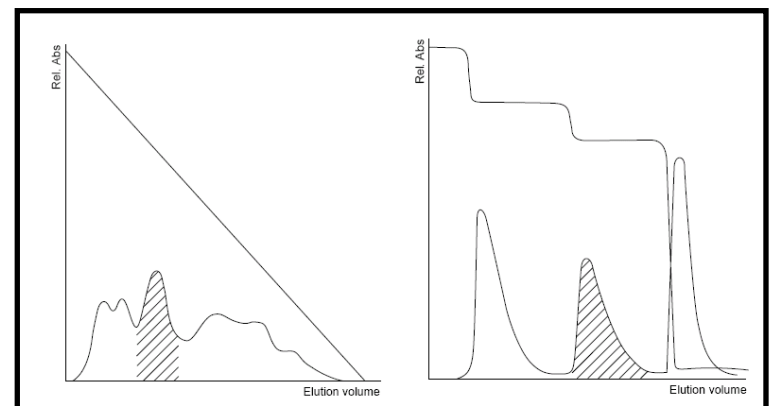
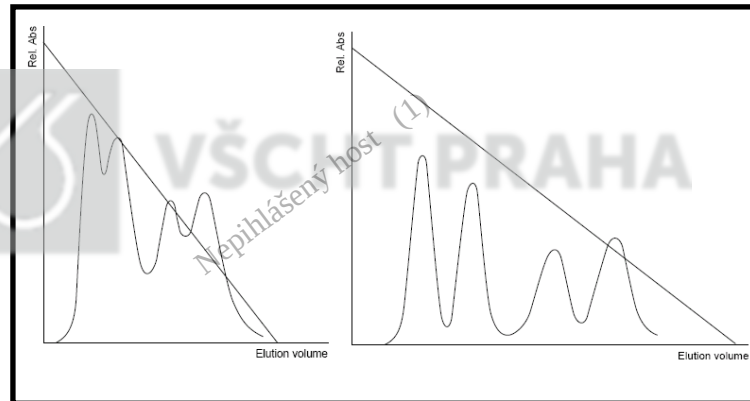
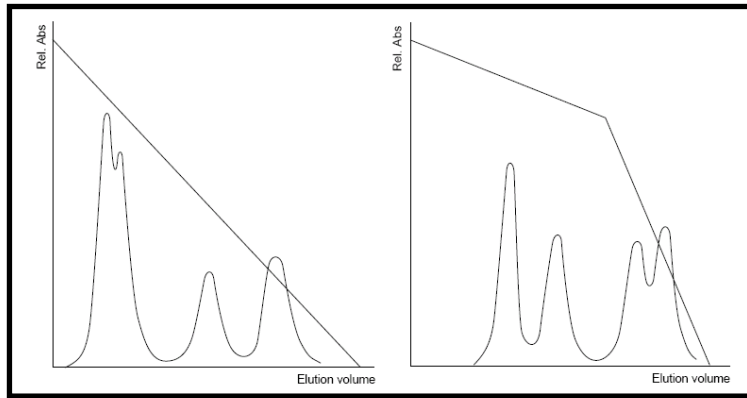
efekt ligandu na purifikaci



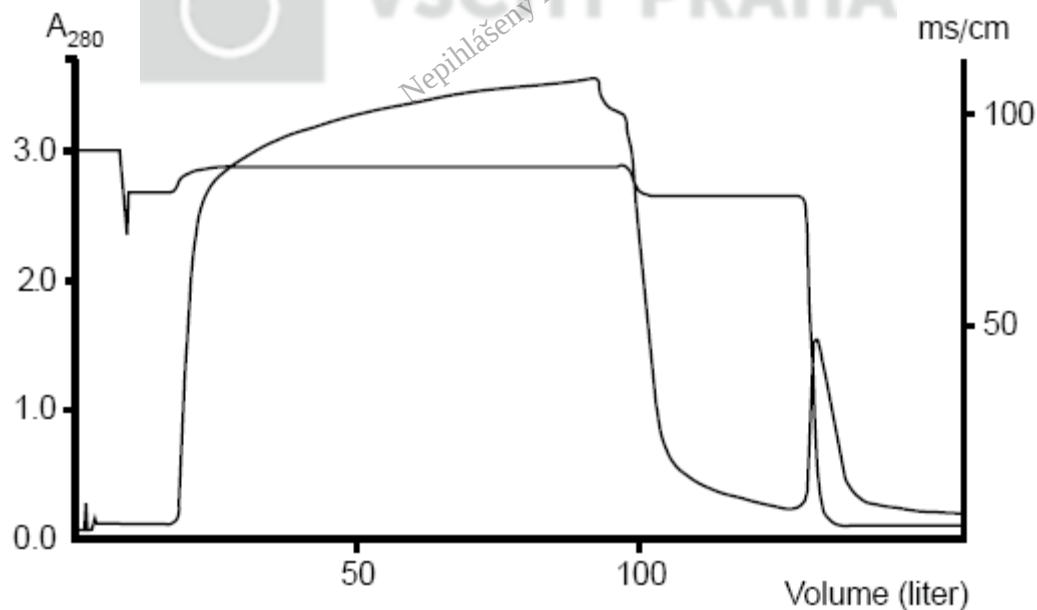
efekt mobilní fáze



typy gradientů



Column: BPG 300/500
Gel: Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub), 10 cm bed height
Sample: Yeast supernatant. Ammonium sulphate added to 0.5 M
Sample volume: 80 l
Sample load: 0.36 mg h-EGF/ml media
Flow rate: 300 cm/h; 212 l/h (loading)
 60 cm/h; 42 l/h (elution)
Buffer A: 20 mM sodium phosphate pH 7.0 + 0.5 M ammonium sulphate
Buffer B: 20 mM sodium phosphate pH 7.0
Purification time: 1.5 h



Experiment		
	vysoké rozlišení (gradientová eluce)	skupinová separace (kroková eluce)
stacionární fáze	velikost částic 10-30 μm	velikost částic 30 μm nebo větší – vyšší průtok
kolona	délka 1 - 10 cm (krátká kolona nevhodná pro pozvolný gradient)	nezáleží, krátká, silná lepší pro vyšší průtok
mobilní fáze	20 – 50 mM pufrů v rozmezí pH 4-8 (pH má malý vliv na selektivitu) gradient soli (nejčastěji $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	20 – 50 mM pufrů v rozmezí pH 4-8 (pH má malý vliv na selektivitu) gradient soli (nejčastěji $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
objem vzorku	na objemu nezáleží	na objemu nezáleží
množství vzorku	5-10 % celkové vazebné kapacity (bez ztráty rozlišení)	~ 40 % celkové vazebné kapacity

použití hydrofobní chromatografie	
vysoké rozlišení (gradientová eluce)	skupinová separace (kroková eluce)
separace proteinů na základě jejich hydrofobicity	koncentrace naředěného vzorku
vhodná jako první nebo střední purifikační krok	vhodná jako purifikační krok po precipitaci síranem amonným



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Jako první krok purifikace alkoholdehydrogenasy z *Pseudomonas* sp. jste zvolili srážení síranem amonným (Mr 132,14 g/mol). Při 50 % nasycení se ještě nesrážela, ale při 55 % nasycení se již srážela. Máte k dispozici 20 ml extraktu s alkoholdehydrogenasou. Jak byste postupovali, když jako další krok purifikace chcete zvolit hydrofobní chromatografii na koloně Butyl-Sepharose?

[illegible]