

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Е.Д. Горovenko¹⁾, А.Г. Косыгин²⁾, Л.А. Горovenko³⁾

1) студентка Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (МГУ), г. Москва, Россия, ek.gorov@mail.ru

2) студент Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (МГУ), г. Москва, Россия, andrey.kosygin@gmail.com

3) к.т.н., доцент Армавирского механико-технологического института (филиала) ФГБОУ ВО «Кубанский государственный технологический университет», г. Армавир, Россия, igorovenko@mail.ru

Аннотация: Гель-хроматография – разновидность хроматографии, в ходе которой молекулы веществ разделяются по размеру за счёт их разной способности проникать в поры неподвижной фазы [1]. С помощью этого метода можно разделить высокомолекулярные и низкомолекулярные соединения. В данной статье рассматривается разделение смеси голубого декстрана и соли кобальта (для калибровки хроматографической колонки). Также проводится разделение смеси BSA (бычьего сывороточного альбумина) и соли аммония с последующей проверкой фракций на содержание белка методом Несслера и на содержание соли аммония с амидовым черным.

Ключевые слова: обессоливание белков, разделение ВМС и НМС, метод Несслера, амидовый черный.

USING GEL CHROMATOGRAPHY FOR SEPARATING HIGH- MOLECULAR AND LOW-MOLECULAR COMPOUNDS

Ekaterina D. Gorovenko¹⁾, Andrey G. Kosygin²⁾, Lyubov A. Gorovenko³⁾

1) student of the Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, ek.gorov@mail.ru

2) student of the Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, andrey.kosygin@gmail.com

3) Ph. D., docent of the Kuban State Technological University (the Branch of the Armavir Mechanics and Technology Institute of Federal State Budgetary Institution of Higher Education), Armavir, Russia, igorovenko@mail.ru

Abstract: Gel chromatography is a type of chromatography, during which molecules of substances are separated by size due to their different ability to penetrate into the pores of the stationary phase [1]. This method can be used to

separate high-molecular and low-molecular compounds. This article discusses the separation of a mixture of blue dextran and cobalt salt for calibration of a chromatographic column. Separation of a mixture of BSA (bovine serum albumin) and ammonium salt is also carried out, followed by checking the fractions for protein content by the Nessler method and for the content of ammonium salt with amide black.

Key words: protein desalination, separation of HMC and LMC, Nessler method, amide black.

Введение

Гель-хроматография – процесс, в ходе которого молекулы веществ разделяются по величине и форме за счет их разной способности проникать в поры неподвижной фазы (представляет собой «молекулярное сито»).

«Молекулярные сита» представляют собой сухие порошкообразные гелеобразующие полимеры, нерастворимые в воде, растворах солей, щелочных и слабокислых растворах. Обладают высокой гидрофильностью, за счет чего набухают в воде. Степень набухания (число граммов воды на 1 г сухого препарата) зависит от числа поперечных связей между линейными полимерными цепями.

В качестве неподвижной фазы используются различные гели, в том числе сефадексы разных марок (G-10, G-15, G-100 и т.д.), различающиеся по размеру пор (то есть по разделяющей способности) и размеру гранул (то есть степени дисперсности, от которой зависит скорость фильтрации и качество разделения).

Подвижная фаза (растворитель) находится в гранулах набухшего геля (неподвижная фаза). Наружный объем (V_n , объем вне гранул) доступен для всех молекул, а для самых крупных молекул доступен только он; внутренний объем (V_v , объем внутри гранул) доступен для маленьких молекул, которые проникают сюда через поры, и недоступен для более крупных молекул. Таким образом, при элюции вещества выходят из колонок в порядке уменьшения размера молекул (Рисунок 1).

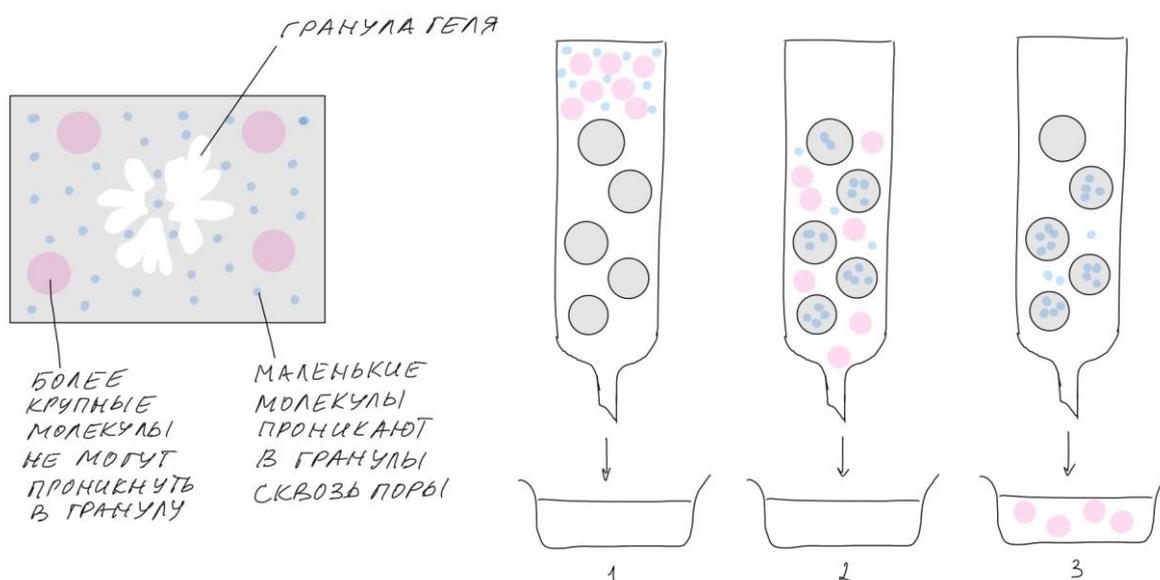


Рисунок 1. Элюция молекул разных размеров в гель-хроматографической колонке [3].

Данный метод применим для:

- 1) Фракционирования белков (G-100, G-200) – не проводили в данной работе;
- 2) Обессоливания белков (G-15, G-25) – проводили в данной работе.

Цель и задачи

Цель: разделить смесь белка и соли.

Задачи:

- 1) Провести калибровку экспериментальной установки.
- 2) Исследовать фракции разделенной смеси на содержание белка и соли (качественное определение).

Материалы и методы [2]

1. Проведение калибровки колонки

- 1) Заранее выдержали гель (сефадекс G-25) в воде 3 часа при комнатной температуре, дав гелю набухнуть. Поместили гель в хроматографическую колонку и залили водой до верха. Для хранения затянули горлышко колонки лентой Parafilm. Схема колонки изображена на Рисунке 2. Фотография установки представлена на Рисунках 3,4.

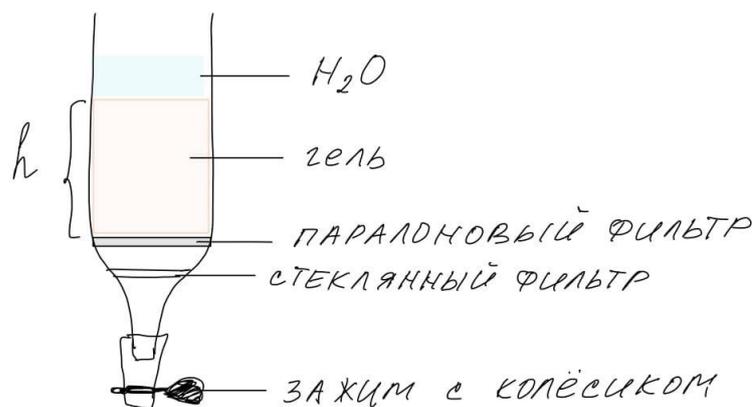


Рисунок 2. Схема колонки



Рисунок 3. Колонка закрыта пленкой Parafilm

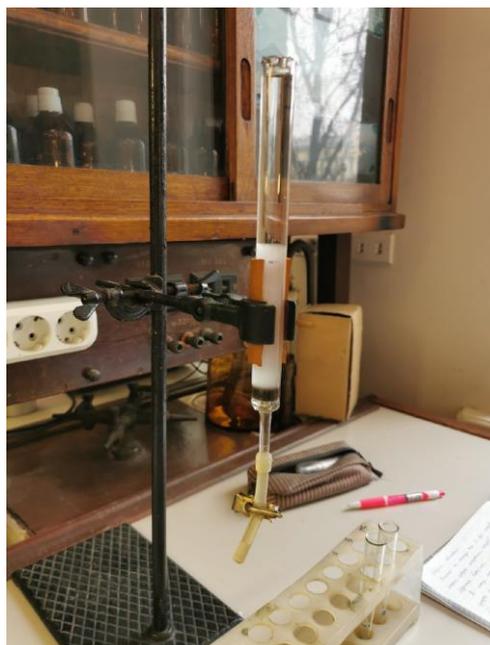


Рисунок 4. Экспериментальная установка

- 2) Перед использованием сняли пленку с колонки, спустили воду в гель (оставили 2-3 мм воды над гелем, чтобы он не сох).
- 3) По всей площади геля автоматической микропипеткой наслоили 200 мкл смеси голубого декстрана (полисахарид, высокомолекулярное соединение голубого цвета) и CoCl_2 (соль, низкомолекулярное соединение розового цвета).
- 4) Дали смеси войти в гель (спустили 2-3 мм жидкости) и аккуратно заполнили колонку водой до верха. По ходу элюции добавляли воду в колонку, чтобы она была заполнена до верха водой.
- 5) Слили элюат в мерные пробирки. В первую пробирку слили прозрачный раствор (это проскок, объем между гранулами и в гранулах). Далее слили в пробирки по 1 мл элюата.
- 6) Получили результаты, представленные в Таблице 1.

Таблица 1. Результат элюции смеси

№ Пробирки	Цвет раствора	Объем пробирки	Общий объем	Чему соответствует объем
1	прозрачный	5,5 мл	5,5 мл	Проскок (вода). $V_{пр}$
2	голубой	1 мл	4 мл	Раствор голубого декстрана. V_H
3		1 мл		
4		1 мл		
5		1 мл		
6	сиреневый	1 мл	1 мл	Смесь растворов голубого декстрана и $CoCl_2$
7	розовый	1 мл	3,6 мл	Раствор $CoCl_2$. V_B
8		1 мл		
9		1 мл		
10		0,6 мл		

7) На основе полученных данных схематично изобраили график элюции смеси (Рисунок 5).

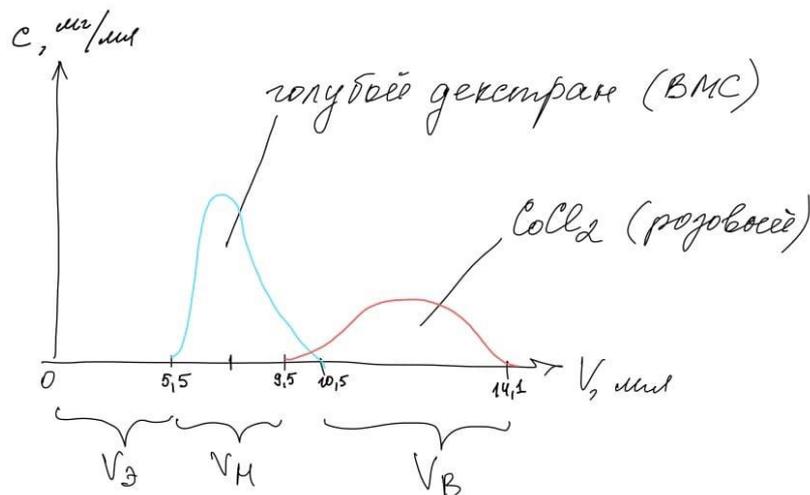


Рисунок 5. Схематичное изображения графика элюции.

8) Результаты калибровки:

$$V_{II} = \pi r^2 h = 20,43 \text{ мл (объем части колонки с гелем)}$$

$$V_{пр} = 5,5 \text{ мл (объем проскока)}$$

$$V_H \approx 4,0 \text{ мл (объем вне гранул)}$$

$$V_B \approx 3,6 \text{ мл (объем внутри гранул)}$$

9) После проведения эксперимента два раза промыли колонку (заполняли до верха водой и спускали жидкость в слив).

2. Обессоливание белка

1) Провели аналогичный первому эксперимент. В качестве разделяемой смеси использовали 200 мкл BSA (бычий сывороточный альбумин) и $(NH_4)_2SO_4$.

- 2) Собрали проскок на 1 мл меньше, чем в эксперименте с калибровкой (объем собранного проскока составил 4,5 мл).
- 3) Далее в мерные пробирки собрали 10 фракций элюата по 1 мл. Скорость элюции, как и в прошлом эксперименте, составила 1 каплю в 2 секунды.
- 4) Полученные фракции исследовали на содержание белка по методу Нesslerа. Затем исследовали фракции на содержание сульфата аммония с амидовым черным.
- 5) Для исследования фракций на содержание белка по методу Нesslerа сделали следующее:
 - На нитроцеллюлозный бумажный фильтр нанесли по 5 мкл фракций №1-6, предварительно разделив карандашом фильтр на 6 частей.
 - Для удобства нанесения фильтр положили на воронку, а воронку поместили в треугольную колбу (Рисунок 6).



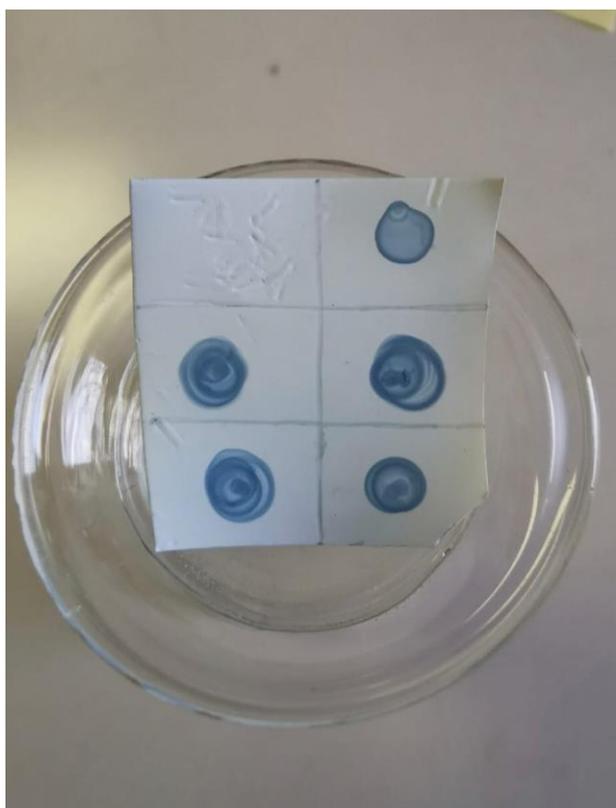
Рисунок 6. Нитроцеллюлозный фильтр на воронке. Закапывание последнего образца.

- После нанесения высушили фильтр под лампой до полного высыхания.
- Затем высушенный фильтр поместили в раствор амидового черного в чашку Петри на 3 минуты и далее промыли 3 раза в трех чашках Петри с 7% раствором уксусной кислоты (Рисунок 7). Промыли до обесцвечивания фона фильтра. Уксусную кислоту отмыли водой в последней чашке Петри.



Рисунок 7. Чашки Петри. Ближняя с раствором амидового черного. Дальняя с водой. Остальные с 7% раствором уксусной кислоты.

- Полученные результаты представлены на Рисунке 8.



~ ФРАКЦИИ

~ 1	~ 2
~ 3	~ 4
~ 5	~ 6

Рисунок 8. Нитроцеллюлозный фильтр с окрашенными фракциями белков. Видна разница в интенсивности пятен.

- б) Для исследования фракций на содержание сульфата аммония в 10 лунок пластмассовой плашки внесли по 20 мкл фракций из пробирок №1-10 и по 50 мкл реактива Несслера (при увеличении концентрации соли увеличивается интенсивность окраски раствора). Результат эксперимента представлен на Рисунке 9.

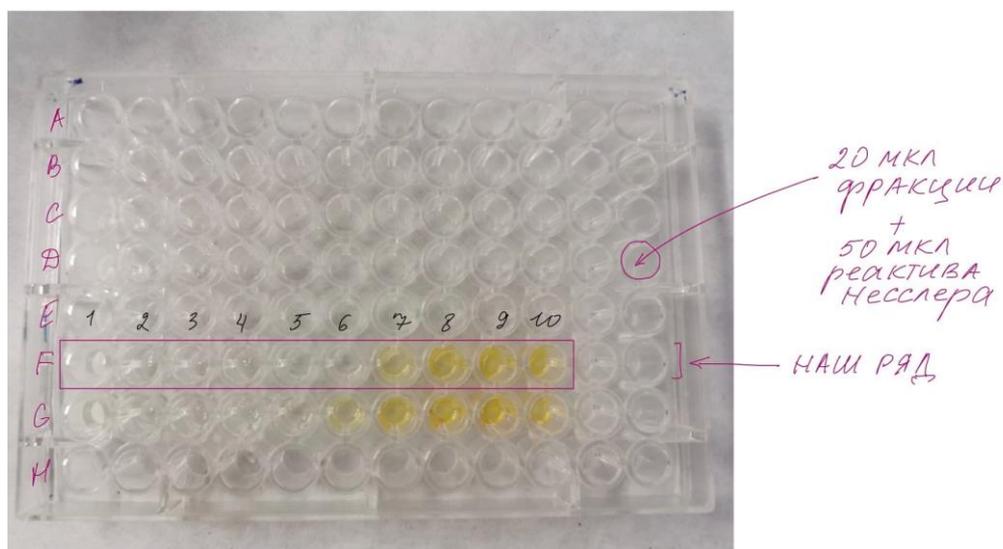


Рисунок 9. Пластмассовая плашка. Наш эксперимент - ряд F. Наблюдается градация интенсивности окраски ячеек.

Результаты и обсуждение

Результаты экспериментов, представленные на Рисунках 8, 9 можно представить в виде таблицы (Таблица 2). Количество знаков «+» обозначает видимую глазом концентрацию вещества. Знак «-» обозначает отсутствие вещества. Пустые ячейки таблицы обозначают отсутствие данных.

Таблица 2. Результаты экспериментов.

№ Фракции	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BSA	-	+	++	+++	++	++				
NH ₄ ⁺	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	++

По результатам в Таблице 2 видно, что во фракциях №№ 2-6 наблюдается белок без соли. Это значит, что с помощью гель-хроматографии получилось разделить белок и соль (провести обессоливание белка).

Заключение

Калибровка колонки позволила рассчитать объемы ($V_{п}$, $V_{пр}$, $V_{н}$, $V_{в}$), которые позволили определить объемы исследуемой смеси для эксперимента с обессоливанием белка.

Для качественного определения белка и соли аммония после обессоливания с помощью гель-хроматографии можно использовать метод

Несслера (для определения белка) и метод определения аммиака с амидо-вым черным (для определения соли аммония).

Список использованных источников:

1. https://ru.wikipedia.org/wiki/Эксклюзионная_хроматография
2. Т.М. Ермохина, М.В. Пахомова, И.А. Крашенинников, Н.С. Ковалева, В.В. Асеев. Практикум по биохимии. Часть I. –М.: Изд-во МГУ. 1991.-187с.
3. https://studme.org/167620/geografiya/gel_pronikayuschaya_hromatografiya_gel_filtratsiya