

GELOVÁ FILTRAČNÍ CHROMATOGRRAFIE – PRINCIP FUNKCE

Kat. číslo 1093147



Pokusnou sadu skladujte při pokojové teplotě.

CÍL POKUSU:

Cílem tohoto pokusu je představit principy gelové filtrační chromatografie, jakožto metody, kterou se separují molekuly podle jejich velikosti a tvaru. Při tomto pokusu se separuje směs dvou druhů molekul.

CONATEX – DIDACTIC UČEBNÍ POMŮCKY s.r.o. – Velvarská 31 – 160 00 Praha 6
Tel.: 224 310 671 – Tel./Fax: 224 310 676
Email: conatex@conatex.cz – [http: www.conatex.cz](http://www.conatex.cz)

Obsah

Strana Obsah pokusné sady	3
Požadavky na provádění pokusu	3
Základní informace	4
Postup provádění pokusu	6
Studijní otázky	8
Průvodce pro instruktora	
Předlaboratorní příprava	9

Sada obsahuje dostatek chemických činidel a vzorku pro provedení deseti separací.

Obsah pokusné sady

Všechny níže uvedené komponenty skladujte při pokojové teplotě

Komponenta	Kontrola obsahu (✓)
A Směs vzorku	<input type="checkbox"/>
B Suchá matrice	<input type="checkbox"/>
C Koncentrovaný elučňi pufr	<input type="checkbox"/>
• Plastové transferové pipety	<input type="checkbox"/>
• Mikrozkušavky do mikrocentrifugy	<input type="checkbox"/>
• Chromatografické kolony	<input type="checkbox"/>

Požadavky

- Deset 50ml, nebo 100ml kádinek, nebo baněk
- 1 malá kádinka, nebo baňka (10, nebo 25 ml), nebo 10 ml zkumavka
- 1 kruhový stojan se svorkou pro každou kolonu
- Destilovaná, nebo deionizovaná voda
(destilovaná voda, kterou je možné koupit v supermarketu, má dostatečnou kvalitu)
- 5ml, nebo 10 ml pipety a pipetovací nástavce (volitelné)

Všechny komponenty pokusné sady jsou určeny pouze pro účely vzdělávacího výzkumu. Nejsou určeny k použití pro diagnostické nebo farmaceutické účely, ani nejsou určeny pro podávání a konzumaci lidmi nebo zvířaty.

Základní informace

Gelová filtrační chromatografie (někdy také nazývaná filtrací na molekulových sítích) je metoda používaná pro separaci molekul podle jejich velikosti a tvaru. Až na výjimky souvisí separace složek ve směsi vzorku s molekulovou hmotností těchto složek. V těchto případech lze použít gelovou filtraci jako analytickou metodu pro stanovení molekulové hmotnosti neznámé molekuly. Gelová filtrace dále představuje důležitou přípravnou techniku, protože se často používá jako chromatografický krok při čištění proteinů, polysacharidů a nukleových kyselin.

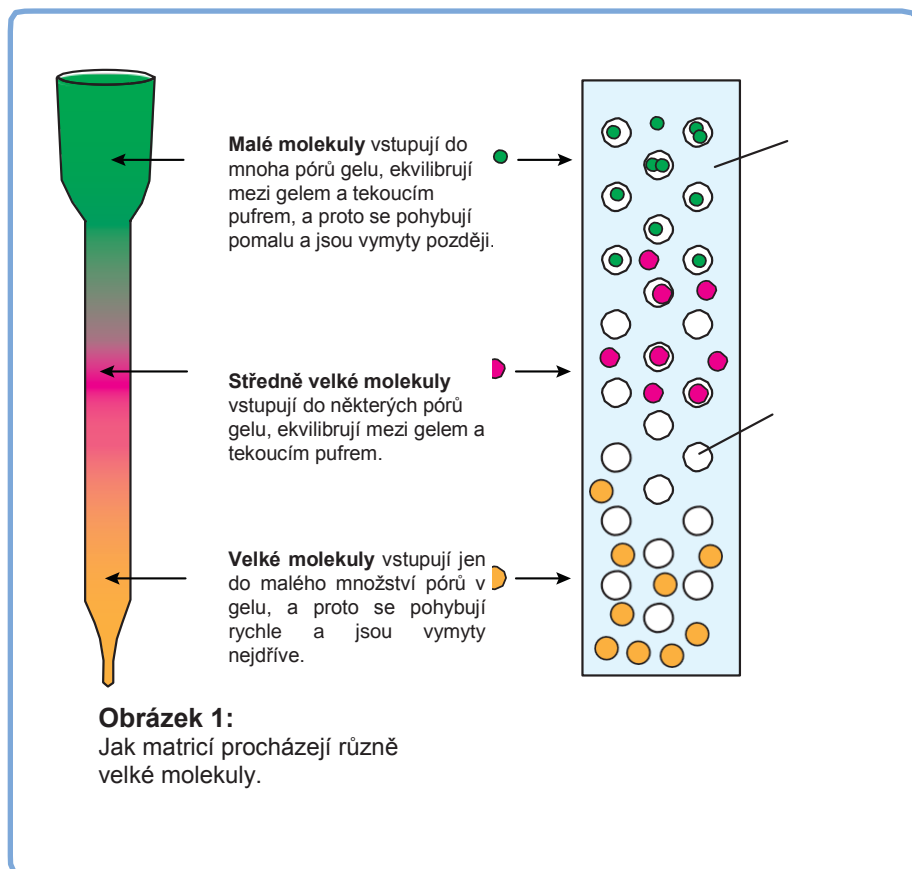
Mezi základní komponenty pokusné gelové filtrační sady patří matrice, chromatografická kolona a eluční pufr. Matrice je materiál naplněný do kolony, který představuje separační médium. Jedná se o stacionární fázi chromatografie.

Kolona je v podstatě trubka s fritou a elučním hrdlem ve spodní části. Frita je membránový nebo porézní disk, který drží matrici v koloně, ale umožňuje průchod vody a rozpuštěných látek. Eluční pufr představuje mobilní fázi chromatografie, která protéká matricí a ven z kolony. Kolona s matricí a aplikovaným vzorkem se "vyvíjí" v elučním pufru. To znamená, že molekuly ve vzorku jsou unášeny proudem pufru do matrice, kde se postupně separují. Separované frakce molekul poté vytékají ven z kolony do sběrače a provede se jejich analýza.

Založení matrice do chromatografické kolony se říká "náplň". Naplněná matrice se nazývá "lůžko" a objem, který zabírá, se nazývá "objem lůžka". Je velmi důležité nenechat lůžko vysušit. Pokud by se tak stalo, vytvořily by se praskliny a trhliny a matrici by bylo nutné vyjmout a znovu naplnit.

Filtrační gelová matrice se skládá s mikroskopických kuliček, které obsahují póry a vnitřní kanálky. Čím větší molekula, tím obtížnější je pro ni projít póry a proniknout do kuliček. Větší molekuly mají tendenci pronikat okolo a mezi kuličkami. Celkový objem pufru mezi kuličkami se nazývá "mezerový objem". Menší molekuly se déle zdržují v labyrintu kanálků a pórů lůžka. Na druhou stranu, větší molekuly s větší molekulovou hmotností se z kolony vymyjí dříve, než menší molekuly.

Větší molekuly jdou rychlejší a přímější cestou, takže se v kuličkách zdrží méně času (obrázek 1).



Základní informace

Je to podobný rozdíl, jako byste hledali cestu ven ze složitého labyrintu, nebo jednoduše labyrint obešli a zcela se hledání cesty vyhnuli.

Molekuly mohou mít stejnou molekulovou hmotnost, ale zcela odlišný tvar. Molekuly kompaktnějšího tvaru, například kulové, budou kuličkami procházet snadněji než molekuly podlouhlých tvarů, které vypadají jako tyčky. Proto se tyčovitě molekuly vymyjí dříve než kulovité molekuly stejné molekulové hmotnosti.

Existuje mnoho různých typů filtračních gelových matic. Spektrum molekulových hmotností, které je matrice schopna separovat, se nazývá frakční rozsah. Vezměme si jako příklad matrici, která má frakční rozsah (molekulových hmotností) 1.000 až 100.000 Daltonů. Molekuly s průměrnou molekulovou hmotností 1.000 nebo méně Daltonů se od sebe navzájem neseparují, protože všechny zcela projdou kuličkami a to se stejnou efektivitou. Tyto molekuly využijí maximální objem pufru pro eluci, který se rovná jednomu objemu lůžka.

Objem lůžka je součet objemu kuliček a mezerového objemu. Molekuly s molekulovou velikostí v rozsahu od 1.000 do 100.000 Daltonů projdou kuličkami různou rychlostí a dojde k jejich částečné, nebo kompletní separaci. Molekuly větší než 100.000 Daltonů kuličkami neprojdou a vymyjí se v rámci mezerového objemu. Pamatujte, že v tomto příkladu se jakékoli množství různých molekul s molekulovou hmotností 100.000 a více Daltonů vymyje najednou, protože molekuly neprojdou sítí matrice. Částečně, nebo zcela separované zóny molekul, které se vymývají z kolony, se nazývají píky. Pík se skládá ze stoupajícího a klesajícího koncentračního gradientu molekul (obrázek 2).

Tento pokus pracuje s kolonami, které budou naplněny vhodnou matricí pro separování daného vzorku směsi. Vzorek určený pro tento pokus obsahuje směs oranžových a modrých molekul. Oranžové barvivo má molekulovou hmotnost 452. Modré molekuly zastupují polymer glukózy s průměrnou molekulovou hmotností 2.000.000 Daltonů. Tyto molekuly mají tyčovitý tvar. Frakční rozsah matrice je 4.000 až 150.000 Daltonů. Malé oranžové barvivo pronikne do pórů kuliček a bude jimi pomalu procházet, zatímco velké molekuly polymeru glukózy póry kuliček projít nemohou a musí je obtéct, a tak se pohybují mnohem rychleji.



CÍL POKUSU:

Cílem tohoto pokusu je představit principy gelové filtrační chromatografie, jakožto metody, kterou se separují molekuly podle jejich velikosti a tvaru. Při tomto pokusu se separuje směs dvou druhů molekul.

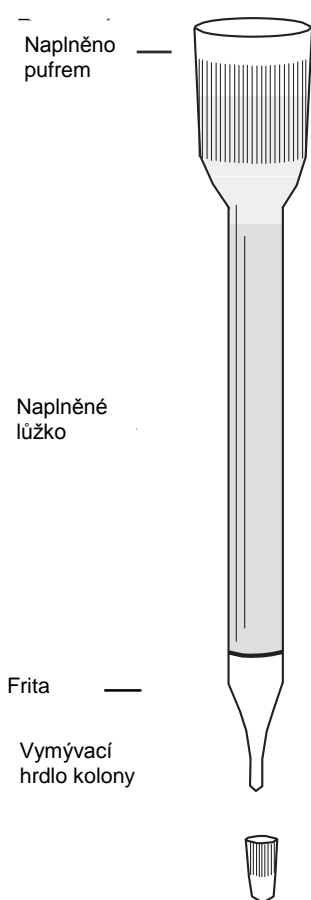


LABORATORNÍ BEZPEČNOST

Dobrou laboratorní praxí je používání ochranných rukavic a brýlí.

Postup provádění pokusu

Postup provádění pokusu pro studenty



CHROMATOGRAFIE: PLNĚNÍ KOLONY

1. Vířením, nebo jemným mícháním dobře promíchejte matici.
2. Pomocí 5ml, nebo 10 ml pipety opatrně zaveďte zamíchanou směs do kolony a nechte ji stéct po vnitřních stěnách zásobníku, nebo směs nalijte do kolony.

Pokud se tok matrice zastaví o vzduchovou kapsu, přerušte liti směsi a klepněte kolonou, aby se vzduch uvolnil a směs stékala dolů. Poté pokračujte v liti zbytku směsi.

3. Pomocí transferové pipety přidejte do zásobníku eluční puřr.
4. Pod kolonu umístěte prázdnou kádinku.
5. Vyjměte zátku z hrdla kolony.
6. Nechte puřr protékat kolonou asi 10 minut. Matrice zaplní kolonu.
7. Umístěte zátku do hrdla kolony.
8. Matrice je naplněná, když se komprese zastaví. Objem naplněného lůžka bude přibližně 3 ml.

MOŽNOST PŘERUŠENÍ POKUSU

Pokud máte na pokus omezený čas, je možné jej zde pozastavit. **Kolonu je nutné bezpečně zavřít, aby nevyschla.** Pokud v tuto chvíli pokus pozastavíte, ujistěte se, že nad lůžkem je puřr a že zásobník je překryt plastovým obalem, nebo filmem.

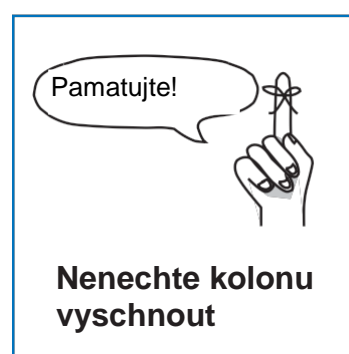


Postup pokusu pro studenty

CHROMATOGRRAFIE: ODBĚR FRAKCIÍ

1. Označte 8 zkumavek štítky s čísly 1 až 8. Na zkumavky napište vaše iniciály, nebo číslo laboratorní skupiny.
2. Opatrně odstraňte všechen pufr z prostoru nad lůžkem pomocí transferové pipety. Horní povrch lůžka musí být na vzduchu.

Zavádějte pipetu do zásobníku. Při odstraňování pufru se pokuste minimalizovat zasahování do lůžka.
3. Pomocí transferové pipety zaveďte obsah zkumavky označené štítkem "Vzorek" (X) na povrch lůžka. Nechte vzorek stékat po vnitřních stěnách kolony.
4. Pod kolonu umístěte kádinku.
5. Vyjměte zátku z hrdla kolony. Vzorek začne pomalu prostupovat do lůžka. Až vzorek **kompletně** prostoupí do lůžka (povrch lůžka bude opět na vzduchu), vraťte zátku do hrdla.
6. **Opatrně** pomocí transferové pipety přidejte několik kapek pufru na lůžko. Vyjměte zátku a nechte pufr prostoupit do kolony.
7. Pokračujte v přidávání pufru vždy po několika kapkách. Dělejte pauzy a nechte pufr prostoupit do lůžka.
8. Až se modré barvivo dostane do blízkosti dna kolony, začněte odebírat 0,5ml frakce. Zkumavku č. 1 podržte přímo pod kolonou. (Zkumavky mají stupnici, abyste mohli snadno odměřit 0,5 ml).
9. Jak se barvivo postupně separuje v koloně, občas přidejte čerstvý pufr do zásobníku a udržujte ho plný.
10. Pokračujte v odběru 0,5ml frakcí do každé ze zkumavek s čísly 2 až 8.
11. Po naplnění všech zkumavek odtokem z kolony (kolonové frakce), vraťte zátku do hrdla.
12. Označte zkumavku s největším množstvím modrého dextranu, který se vymyl z kolony.
13. Označte zkumavku s největším množstvím oranžového barviva, které se vymyl z kolony.



Postup provádění

Studijní otázky

Odpovězte na následující studijní otázky ve vašem laboratorním zápisníku, nebo na samostatném pracovním listu.

1. Porovnejte gelovou filtrační chromatografii s jinými separačními technikami.
2. Nakreslete a popište části kolony. Do popisu vepište množství pufru přidaného pod a nad lůžko. Definujte fritu, matici a eluční činidlo.
3. K čemu se používá eluční pufr?
4. Které molekuly by se z kolony vymyly dříve: kulové, nebo lineární? Proč?
5. Co je stacionární fáze chromatografie? A co je mobilní fáze?

Postup provádění

Návod pro instruktory

Předlaboratorní příprava

A. PŘÍPRAVA DESETI KOLON

- Každou kolonu upevněte vertikálně do kruhového stojanu a ujistěte se, že je nainstalována rovně. Horní i spodní zátku nechte v koloně.

B. PŘÍPRAVA ELUČNÍHO PUFRU

1. Koncentrovaný eluční pufr zředte smícháním následujících složek:
 - koncentrovaný eluční pufr (celý obsah komponenty C)
 - 540 ml destilované vody
 - Dobře promíchejte
2. Odlijte do kádinek přibližně 50 ml zředěného elučního pufru pro každou separaci.
Zbylý pufr si nechte při ruce pro případ rozlití, abyste mohli použít další vzorek.
3. Pomocí pipety přeneste 0,2 ml vzorku (komponenta A) do mikrozkušavky. Tuto zkumavku označte značkou "X". (V sadě je dostatek vzorku pro rozdělení do deseti zkumavek po 0,2 ml).

Připravte následující pomůcky:

- 8 mikrozkušavek do mikrocentrifugy
- 2 plastové transferové pipety
- prázdnou kádinku

C. PŘÍPRAVA SUCHÉ MATRICE

1. Vložte suchou matici (komponenta B) do baňky, nebo kádinky. Přidejte 52 ml zředěného elučního pufru.
2. Zavřete kádinku, nebo baňku a protřepáváním míchejte matici.
3. Před litím nechte matici bobtnat po dobu nejméně 2 hodin při pokojové teplotě (to je také možné provést den před laboratorním pokusem).
4. Po nabobtnání matrice ji promíchejte a protřepejte, abyste získali homogenní suspenzi a poté rychle odlijte 5 ml do malé kádinky, baňky, nebo zkumavky pro každou pracovní skupinu.