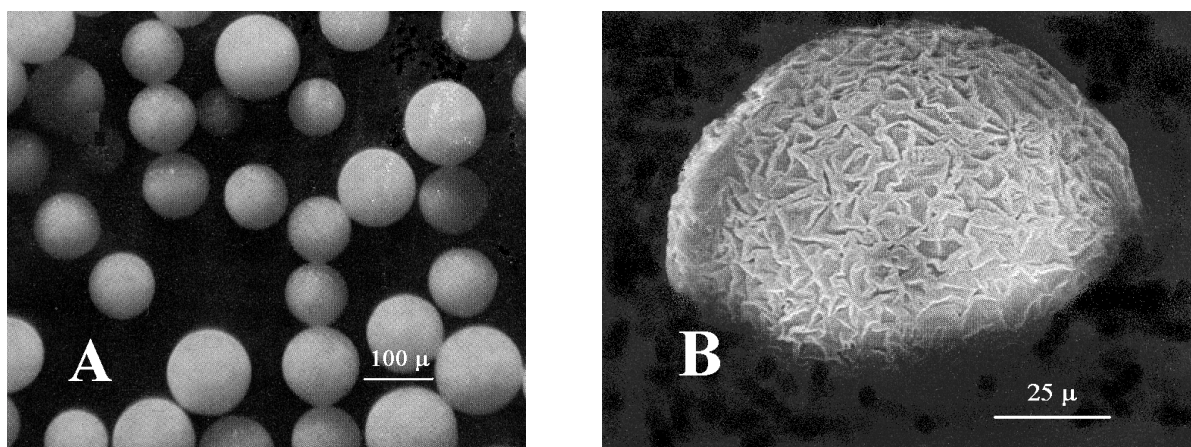


## 4. Filtracja żelowa (*gel filtration chromatography* – GFC)

Pierwsze próby separacji biomolekuł, ze względu na ich rozmiary, podejmowano już w latach czterdziestych obecnego wieku, ale dopiero w 1955 r opublikowano pierwsze doniesienia na ten temat (1). Pierwszym złożem zastosowanym z powodzeniem w filtracji żelowej był uwodniony krochmal kukurydziany. Niestety, mała odporność na ściskanie przez ciśnienie hydrostatyczne ograniczała zastosowanie tego materiału. Dopiero wprowadzenie – w końcu lat pięćdziesiątych – usieciowanego dekstranu pozwoliło rozwinąć technikę filtracji żelowej na większą skalę. Pojawił się wtedy produkt o nazwie **Sephadex**, do dziś bardzo popularny i powszechnie stosowany w klasycznej chromatografii niskociśnieniowej. Od tego czasu datuje się dynamiczny rozwój zarówno złożów przeznaczonych do filtracji żelowej, jak i ich zastosowań (patrz tabela 4.1.).

### 4.1. Podstawy teoretyczne filtracji żelowej

Separacja makrocząsteczek przy zastosowaniu techniki filtracji żelowej polega na wykorzystaniu porowatej struktury ziaren żelu oraz zjawiska dyfuzji, któremu podlegają zarówno molekuly solwentu, jak i separowane makromolekuly. Załóżmy, że dysponujemy żelem, którego ziarna mają kształt kulisty, z jednoczesną głęboką porowatością (rys 4.1.), przy czym ściśle kontrolowane podczas produkcji żelu były zarówno rozmiary ziarna, jak i wielkość oraz jednorodność porów.



Rys. 4.1.

**Sephadex G-200** widziany pod skaningowym mikroskopem elektronowym. Uwagę zwraca kulisty kształt ziaren (A) oraz porowatość powierzchni ziarna (B).

Po uwodnieniu takiego żelu, we wszystkich porach ziaren oraz wokół nich znajdują się cząsteczki wody. W takiej postaci żel można łatwo upakować w kolumnie chromatograficznej o odpowiednio dobranych rozmiarach. Zwykle przed rozpoczęciem rozdzielania chromatograficznego dokonuje się równoważenia kolumny (złoża) solwentem odpowiednio dobranym dla separowanego materiału wyjściowego. W trakcie równoważenia kolumny dochodzi do wymiany wody na solwent - najszybciej w otoczeniu ziaren żelu, a dopiero później - dzięki zjawisku dyfuzji, w całej objętości porowatego ziarna złoża. Właśnie proces dyfuzyjnej wymiany solwentów w porowatościach żelu decyduje o tym, że zrównoważenie kolumny wymaga przepuszczenia przez nią solwentu w ilości równej kilku jej objętościom. Gdy kolumna jest już zrównoważona, czyli gdy cała objętość kolumny jest równomiernie wypełniona wybranym solwentem, można na nią nanieść materiał przeznaczony do separacji. Krytycznym parametrem w technice filtracji żelowej jest objętość naniesionej na kolumnę próbki. Objętość ta nie powinna przekraczać 3-5% objętości kolumny. W przeciwnym razie wynik separacji może być zupełnie niezadowalający. Po naniesieniu na kolumnę materiału przeznaczonego do separacji dochodzi do jego wnikięcia w złożo. Małe makrocząsteczki, o rozmiarach mniejszych od rozmiarów porów, mogą dyfundować w porowatości złoża. Makrocząsteczki o rozmiarach porównywalnych z rozmiarami porów i większe, przepływają przez kolumnę wraz z solwentem, nie wnikając w porowatości żelu. Im mniejsze są makromolekuły tym głębiej mogą penetrować porowatości złoża. Obszar zajmowany przez strefę naniesionej próbki przemieszcza się wzdłuż kolumny wraz z solwentem, ale prędkość przepływu makromolekuł jest mniejsza bądź równa prędkości przepływania solwentu. Te makromolekuły, które są zbyt duże aby wnikać w porowatą strukturę złoża, przemieszczają się równie prędko jak solwent. Pozostałe makromolekuły poruszają się tym wolniej, im są mniejsze. W związku z tym, pierwsze kolumnę opuszczają te makrocząsteczki, które były zbyt duże aby wnikać w porowatości ziaren, a później będą wymywane coraz mniejsze makromolekuły, w porządku podyktowanym ich rozmiarami.

Ten uproszczony opis procesu separacji makromolekuł wymaga jeszcze pewnych uzupełnień. Otóż w rzeczywistości naniesiona próbka, w zależności od stężenia rozdzielanych makromolekuł i składu solwentu, może być mniej lub bardziej lepka. Zbyt wysoka lepkość próbki może być przyczyną znacznego pogorszenia rozdzielczości metody, a nawet może uniemożliwić separację molekuł, zatykając i niszcząc złożo. Warto w tym miejscu zauważyć, że takie czynniki jak: wartość pH, wartość siły jonowej, stężenie jonów metali i skład buforów, nie mają większego znaczenia dla warunków separacji tak długo, jak długo nie wpływają one na rozmiary i stabilność rozdzielanych molekuł oraz ziaren żelu.

Na dobrą jakość rozdziału wpływa również rozmiar kolumny. Im kolumna jest dłuższa, tym rozdzielczość metody jest lepsza, ale niestety odbywa się to kosztem czasu potrzebnego na dokonanie separacji. Konieczny jest w tym przypadku kompromis pomiędzy oczekiwaniami w stosunku do rozdzielczości metody i czasu trwania separacji. Tym bardziej, że ze wzrostem długości kolumny czas separacji wzrasta liniowo, a rozdzielczość tylko jak pierwiastek kwadratowy z tej długości.

W praktyce laboratoryjnej stosuje się kolumny chromatograficzne o różnych rozmiarach. Warunki rozdziału zależą natomiast od szybkości, z jaką eluent przepływa przez kolumnę. Jeżeli prędkość wypływu eluentu wyrażamy w ml/min (tak najczęściej postępujemy) to przy tej samej prędkości wypływu z dwóch kolumn o różnych przekrojach poprzecznych prędkość przepływu eluentu przez złożę wypełniające kolumnę będzie różna. Trudno wtedy porównać warunki separacji molekuł oraz rozdzielczość złoż. Aby ujednoczyć opis faktycznych warunków separacji makromolekuł, przyjęto posługiwać się pojęciem liniowej prędkości przepływu, która nie zależy od rozmiarów kolumny i jest wyrażana w cm/godz. Zależność między objętościową prędkością przepływu i jej liniowym odpowiednikiem dana jest równaniem:

$$\text{Prędkość liniowa (cm/godz.)} = \frac{\text{Prędkość objętościowa (ml/min.)} \times 60}{\text{Przekrój poprzeczny kolumny (cm}^2\text{)}}$$

We wszystkich rozważaniach teoretycznych przyjmuje się upraszczające założenie, że wszystkie separowane makromolekuły – pomimo różnych rozmiarów – mają taki sam regularny, symetryczno-obrotowy kształt. W rzeczywistości istnieje duża różnorodność form przestrzennych makromolekuł i wyznaczona na podstawie filtracji żelowej wartość masy cząsteczkowej może być obarczona znacznym błędem. Wynika to z różnic w strukturze przestrzennej makromolekuł użytych do standaryzacji kolumny oraz obecnych w rozdzielanym materiale. Zawsze należy pamiętać, że standaryzacja kolumny jest poprawna tylko dla ściśle określonego składu solwentu, w którym dokonano standaryzacji. Zastosowanie innego solwentu może być przyczyną zarówno zmian w strukturze przestrzennej makromolekuł, jak i wpływać na niespecyficzne oddziaływania separowanych makromolekuł ze złożem. Ten ostatni czynnik, pomimo wysiłków producentów złoż, zawsze musi być brany pod uwagę, gdyż niespecyficzne oddziaływanie biomolekuł z żelami występuje zawsze i jest najważniejszą przyczyną niemożliwości zamiennego stosowania różnych żeli. Zamiana jednego rodzaju żelu na inny zawsze wymaga ponownej standaryzacji kolumny.

### **Zalety i wady techniki filtracji żelowej**

Zalety:

- technika łatwa do zastosowania oraz interpretacji wyników
- można separować wszystkie rodzaje biomolekuł
- próbka może być naniesiona na kolumnę i eluowana z niej w tym samym solwencie
- proces separacji bardzo słabo zależy od składu solwentu

Wady:

- objętość nanoszonej próbki jest ograniczona i zawsze musi pozostawać w odpowiedniej proporcji do objętości kolumny
- rozdzielczość metody jest znacznie gorsza w porównaniu z metodami adsorbcyjnymi, szczególnie gdy stosowane są techniki elucji gradientowej.

## 4.2. Złóża stosowane w filtracji żelowej

Blisko czterdziestoletni okres stosowania techniki filtracji żelowej zaowocował wprowadzeniem nowych złóż o mocno zróżnicowanych właściwościach, pozwalających z powodzeniem stosować tę technikę zarówno w skali analitycznej, jak i preparatywnej oraz przemysłowej. W tabeli 4.1 zestawione są wybrane dane dotyczące aktualnie dostępnych złóż, najczęściej stosowanych w technice filtracji żelowej w zakresie niskich ciśnień.

Złóża przedstawione w tabeli 4.1. różnią się nie tylko rodzajem materiału użytego do ich przygotowania, ale również rozmiarami ziaren żelu oraz porowatością, co rzutuje tak na zakres mas cząsteczkowych białek, które można rozdzielać na tych złożach, jak i na opory przepływu solwentów przez kolumnę wypełnioną wybranym żelem. Ogólnie ujmując, im większe są rozmiary ziarna żelu, tym mniejsze są opory przepływu, ale tym gorsza jest zwykle selektywność rozdziału. Z drugiej strony, im mniejsze są rozmiary porów w ziarnie żelu, tym mniejsze molekuly białkowe mogą być skutecznie rozdzielane przy jego zastosowaniu.

Większość złóż dostępna jest w kilku rodzajach w ramach tej samej grupy (scharakteryzowanej zakresem rozdzielanych mas cząsteczkowych). Są to typy: coarse, medium, fine i superfine. Jak łatwo zauważyć, złoża typu coarse zbudowane są z żeli o dużych wymiarach ziaren, co umożliwia użycie tego złoża przy stosunkowo dużych przepływach objętościowych solwentu. Natomiast złoża typu fine czy superfine składają się z żeli o znacznie mniejszych rozmiarach ziaren, przy zachowaniu tych samych rozmiarów porów. Użycie złoża o mniejszych rozmiarach ziaren ogranicza znacznie prędkość przepływu solwentu, jeżeli przepływ wymuszany jest takim samym ciśnieniem jak w przypadku złoża o większych ziarnach. W zamian za ograniczenie prędkości przepływu i wydłużenie czasu trwania rozdziału można jednak uzyskać znacznie lepszą selektywność separacji. Poszczególne złoża charakteryzują się również zróżnicowaną wytrzymałością mechaniczną oraz odpornością na stosowane solwenty.

Ogólna charakterystyka odporności chemicznej podana jest w tabeli 4.1, ale wskazanym jest, aby przed użyciem złoża dokładnie sprawdzić jego odporność na chemikalia, korzystając z dostarczonej przez producenta informacji o produkcie.

**Tabela 4.1.**

Wybrane złoże przeznaczone do filtracji żelowej techniką klasycznej chromatografii niskociśnieniowej. Dane zaczerpnięto z aktualnego katalogu firmy Amersham Pharmacia Biotech (2000 r.) oraz z materiałów promocyjnych: Gel filtration. Principles and Methods (2)

Nazwa handlowa żelu	Materiał	Rozmiar ziarna ( $\mu\text{m}$ )	Zakres mas cząsteczkowych ( $\times 10^3$ )	Zakres pH (odporność chemiczna)
Sephadex G-10 G-15 G-25 Coarse G-25 Medium G-25 Fine G-25 Superfine	Usieciowany dextran z dodatkiem epichlorohydryny	55-160 60-181 172-516 86-258 34-138 17- 69	- 0,7 - 1,5 1 - 5 1 - 5 1 - 5 1 - 5	2 – 13 (może być stosowany w wodnych roztworach soli oraz w niskich stężeniach alkoholi - do 20%, wysoka odporność termiczna)
G-50 Coarse G-50 Medium G-50 Fine G-50 Superfine G-75 G-75 Superfine G-100 G-100 Superfine G-150 G-150 Superfine G-200 G-200 Superfine	Usieciowany dextran z dodatkiem epichlorohydryny	200-600 100-300 40-160 20- 80 90-280 20- 90 100-300 30-100 120-350 30-115 130-390 30-130	1,5 - 30 1,5 - 30 1,5 - 30 1,5 - 30 3 - 80 3 - 70 4 - 150 4 - 100 5 - 300 5 - 150 5 - 600 5 - 250	2 – 10 (może być stosowany w wodnych roztworach soli oraz w niskich stężeniach alkoholi - do 20%, wysoka odporność termiczna)
Sephadex LH-20 Sephadex LH-60			małe biomolekuły	(może być stosowany w obecności rozpuszczalników organicznych)
Sepharose 2B 4B 6B	Agarozą	60-200 45-165 45-165	70 - 40 000 60 - 20 000 10 - 4 000	4-9 (wodne roztwory alkoholi i soli z wyjątkiem soli chaotropowych)
Sepharose CL-2B CL-4B CL-6B	Agarozą sieciowaną	60-200 45-165 45-165	70 - 40 000 60 - 20 000 10 - 4 000	3-13 (odporność na obecność soli chaotropowych oraz szeregu rozpuszczalników organicznych)
Sephacryl S-100 HR S-200 HR S-300 HR S-400 HR S-500 HR S-1000 SF	Dextran-bisakrylamid	25-75 25-75 25-75 25-75 25-75 25-75	1 - 100 5 - 250 10 - 1 500 20 - 8 000 40 - 20 000 500 - >100 000	3-11 (wysoka odporność chemiczna i termiczna z wyjątkiem silnych utleniaczy)

Gotowe kolumny wypełnione złożami niskociśnieniowymi		
	Wypełnienie	Zastosowanie
HiTrap Desalting	Sephadex G-25 Superfine	Wymiana buforów i odsalanie próbek, separacja makromolekuł od niskocząsteczkowych znaczników, fragmentów degradacji lub składników użytych do syntezy. Przepływ solwentów wymuszany grawitacyjnie, przy pomocy strzykawki lub systemu chromatograficznego
Fast Desalting	Sephadex G-25 Superfine	
PD-10 Columns	Sephadex G-25 Medium	
NAP Columns	Sephadex G-25 DNA grade	
NICK Spin Columns	Sephadex G-50 DNA grade	Wymiana buforów i odsalanie próbek, separacja makromolekuł od niskocząsteczkowych znaczników, fragmentów degradacji lub składników użytych do syntezy. Szybki przepływ solwentów wymuszany przy pomocy znacznych sił odśrodkowych uzyskiwanych dzięki wirówkom.
MicroSpin G-25	Sephadex G-25 DNA grade	
MicroSpin G-50 Columns	Sephadex G-50 DNA grade	
MicroSpin S-400HR	Sephacryl S-400 HR	
MicroSpin S-300HR	Sephacryl S-300 HR	
MicroSpin S-200HR Columns	Sephacryl S-200 HR	
cDNA Spun Columns	Sephacryl S-300 HR	
AutoSeq G-50	Sephadex G-50 DNA grade	
ProbeQuant G-50 Micro Columns	Sephadex G-50 DNA grade	
Miniprep Spun Columns	Sephacryl S-400 HR	
SizeSep-400 Spun Columns	Sephacryl S-400 HR	

W tabeli 4.1. znajdują się również złoża przystosowane do pracy w obecności rozpuszczalników organicznych (**Sephadex LH-20** i **Sephadex LH-60**). Złoża te są używane zwykle do frakcjonowania małych makromolekuł (lipidów, witamin czy hormonów wymagających obecności rozpuszczalników niepolarnych dla pozostania w formie rozpuszczonej).

Złoża stosowane w niskociśnieniowej filtracji żelowej można spotkać również w postaci gotowych do użycia małych kolumnienek, które mogą być stosowane zarówno do odsalania próbek jak i wymiany buforowej. Gotowe kolumny są tak przygotowane, aby umożliwić natychmiastową pracę bez potrzeby stosowania dodatkowego i skomplikowanego sprzętu. W większości przypadków dla wymuszenia przepływu solwentu wystarcza pole grawitacyjne. Aby przyspieszyć proces separacji można również stosować strzykawkę lub system

chromatograficzny wyposażony w pompę. W pewnych jednak przypadkach niezbędne jest zastosowanie mikrowirówki w celu wymuszenia szybkiego przepływu solwentu przez kolumnę.

Większość prezentowanych powyżej złożeń może być stosowana w warunkach niskociśnieniowych tak w skali preparatywnej, jak i w skali produkcyjnej. Złoża te nie nadają się jednak do prac analitycznych i mikropreparatywnych. Dla tych celów przygotowano inne złoża, o znacznie mniejszych rozmiarach ziaren i większej odporności mechanicznej. Mogą one pracować przy znacznie wyższych ciśnieniach wymuszających przepływ solwentów (tabela 4.2). Do wymuszenia przepływu przez złoża niskociśnieniowe wystarcza różnica ciśnień hydrostatycznych, wynikająca z różnicy poziomów cieczy na końcach kolumny znajdującej się w polu grawitacyjnym, lub ciśnień wymuszonych przez pompę perystaltyczną. W przypadku złożeń analitycznych, wysokociśnieniowych, potrzeba pomp pracujących w systemach HPLC lub FPLC.

**Tabela 4.2.**

Wybrane złoża i gotowe kolumny chromatograficzne przeznaczone do prac przy wysokim ciśnieniu i charakteryzujące się wysoką zdolnością rozdzielczą. Dane zaczerpnięto z aktualnego katalogu firmy Amersham Pharmacia Biotech (2000 r.)

Nazwa handlowa	Materiał	Rozmiar ziarna ( $\mu\text{m}$ )	Zakres mas cząsteczkowych ( $\times 10^3$ )	Zakres pH
Złoża przeznaczone do samodzielnego przygotowania kolumn				
Superdex 30 Prep grade	Agaroza /dextran Sieciowane	34	< 10	1 – 14
Superdex 75 Prep grade	Agaroza/dextran Sieciowane	34	3 - 70	1 – 14
Superdex 200 Prep grade	Agaroza/dextran Sieciowane	34	10 - 600	1 – 14
Superose 12 Prep grade	Agaroza gęsto sieciowana	20-40	1 - 300	1 – 14
Superose 6 Prep grade	Agaroza gęsto sieciowana	20-40	5 - 5000	1 – 14
cd. tabeli 4.2.				
Nazwa handlowa	Materiał	Rozmiar ziarna ( $\mu\text{m}$ )	Zakres mas cząsteczkowych ( $\times 10^3$ )	Zakres pH
Gotowe kolumny chromatograficzne (FPLC i HPLC)				
Superdex peptide	Agaroza/dextran Sieciowane	13	0,1 - 7	1 – 14
Superdex 75 HR	Agaroza/dextran	13	3 – 70	1 – 14

Superdex 200 HR	Sieciowane Agaroz/dextransieciowane	13	10 – 600	1 – 14
Superose 12	Agaroz gęsto sieciowana	10	1 – 300	1 – 14
Superose 6	Agaroz gęsto sieciowana	13	5 – 5000	1 – 14

Warto zauważyć, że złoża do filtracji żelowej, z wyłączeniem typu Sephacryl, zbudowane są na bazie agarozy i dextranu, przez co są biologicznie bezpieczne (biokompatybilne). Produkty innych firm bardzo często bazują na polimerach akrylamidu - bardzo silnej neurotoksyny, która w ekstremalnych warunkach (wysokie lub niskie pH, wysokie ciśnienia) może być uwalniana z kolumny.

### 4.3. Przykłady zastosowań techniki filtracji żelowej

#### Przykład 4.1.

#### Kalibracja kolumny wypełnionej złożem Sephadex G-200 Superfine (3)

##### Wprowadzenie:

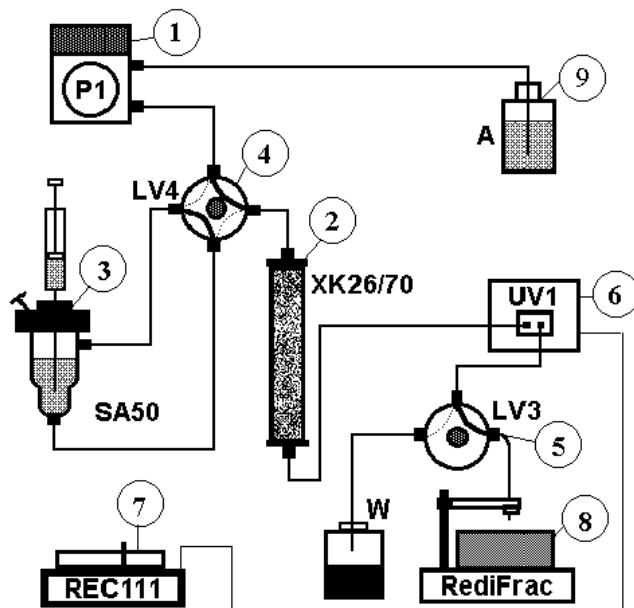
Podstawową metodą identyfikacji makromolekuł rozdzielanych techniką filtracji żelowej jest określenie czasu retencji lub objętości elucji dla danej molekuly i przyporządkowanie im określonej masy cząsteczkowej. Zależność czasów retencji (objętości elucji) od mas cząsteczkowych makromolekuł należy dla danej kolumny wyznaczyć doświadczalnie. Czynność tę przyjęto nazywać kalibracją kolumny. Raz przeprowadzona kalibracja kolumny zachowuje swą ważność tylko dla warunków separacji identycznych z tymi, które panowały w trakcie kalibracji. Jeżeli zmianie ulegnie złożo w kolumnie, rodzaj solwentu, temperatura kolumny lub prędkość przepływu eluentu, to kolumnę należy kalibrować od nowa. W większości jednak przypadków niewielka zmiana składu solwentu czy temperatury kolumny nie wpływa zauważalnie na czas retencji wybranej makromolekuly. Aby jednak mieć pewność prawidłowej interpretacji chromatogramu, uzyskanego w wyniku przeprowadzonego rozdzielania, należy posługiwać się aktualną kalibracją kolumny. Sam proces kalibracji kolumny nie nastęrcza zwykle problemów i polega na dokonaniu separacji mieszaniny makromolekuł o dobrze zdefiniowanych właściwościach – głównie masie cząsteczkowej – i przyporządkowaniu odpowiednich pików i ich czasów retencji (objętości elucji) odpowiednim makromolekułom wchodzącym w skład mieszaniny kalibracyjnej. Jako mieszaniny



kalibracyjnej najwygodniej jest użyć gotowych zestawów kalibracyjnych, oferowanych przez firmy dostarczające złoże i kolumny. Zwykle można zaopatrzyć się w zestawy zawierające 4-5 różnych makromolekuł o tak dobranych masach cząsteczkowych, aby łatwo było je rozdzielić. Dla jeszcze większej wygody, zestawy te podzielono na wysokocząsteczkowe (**high molecular weight - HMW**) i niskocząsteczkowe (**low molecular weight - LMW**), tak aby łatwo było dobrać standardy do mas cząsteczkowych separowanych molekuł.

Rys. 4.2.

Schemat manualnego niskociśnieniowego systemu chromatografii cieczowej umożliwiającego pracę w warunkach izokratycznych. Solwent z naczynia A tłoczony jest przez pompę perystaltyczną P1 na kolumnę XK26/70. Po drodze solwent przepływa przez zawór LV4, umożliwiający skierowanie go albo bezpośrednio na kolumnę albo przez aplikator próbek SA50. W sytuacji jak na rysunku, solwent tłoczony jest bezpośrednio na kolumnę, a do aplikatora próbek podawany jest materiał przeznaczony do separacji. Po przekręceniu zaworu o kąt 90°, połączone zostaną inne kanały co wymusi przepływ solwentu przez aplikator próbek i naniesienie rozdzielanego materiału na kolumnę. Wyjście kolumny połączone jest z detektorem UV1, gdzie w sposób ciągły monitorowana jest gęstość optyczna wypływającego z kolumny eluentu. Wyjście z detektora połączone jest kapilarną rurką z zaworem LV3, który pozwala na wybór dalszej drogi eluentu – albo do kolektora frakcji (RediFrac) albo do odpadów ciekłych (W). Elektryczny sygnał z detektora UV1 jest podawany na rejestrator (Rec-111) i zapisywany na taśmie przesuwającego się papieru, dając w rezultacie chromatogram.



#### Material:

1. Mieszanka wysokocząsteczkowych (HMW) i niskocząsteczkowych (LMW) standardów białkowych dla filtracji żelowej firmy Amersham Pharmacia Biotech (APB) o składzie: tyreoglobulina (669 k – HMW), ferrytyna (440 k – HMW), katalaza (232 k – HMW), aldolaza (158 k – HMW), albumina wołowa (67 k – LMW), ovalbumina (43 k – MW), chymotrypsynogen A (25 k – LMW), rybonukleaza A (13,7 k – LMW).
2. Żel **Sephadex G-200 Superfine**.

#### Aparatura:

1. Pompa perystaltyczna **P1**.
2. Kolumna **XK 26/70** lub **C 26/70** ( $\phi = 26$  mm,  $l = 70$  cm).
3. Aplikator próbek **SA-50**.
4. Zawór **LV4**.
5. Zawór **LV3**.
6. Detektor **UV1** z filtrem 280 nm.
7. Rejestrator **Rec-111**.

8. Kolektor frakcji **RediFrac**.

**Uwaga!** Alternatywnie zamiast detektora **UV1** i rejestratora **Rec-111** można zastosować spektrofotometr **Ultrospec 2000** z celką przepływową 75 µl i modulem programu komputerowego **Swift TimeDrive**, co pozwala gromadzić dane w pamięci komputera.

9. Pompka wodna.

10. Kolba umożliwiająca odpowietrzenie płynu pod próżnią.

#### **Odczynniki:**

1. 50 mM bufor fosforanowy zawierający 100 mM NaCl, pH 6,8.

2. 2% wodny roztwór azydku sodu.

#### **Przygotowanie kolumny chromatograficznej:**

##### **a) przygotowanie złoża.**

- Odważyć 20 g suchego żelu **Sephadex G-200 SF** i wsypać (powoli) do zlewki zawierającej 500 ml buforu fosforanowego, cały czas delikatnie mieszając szklaną bagietką powstającą zawiesinę żelu.
- Pozostawić w temperaturze pokojowej na okres trzech godzin, a następnie przy pomocy pompki wodnej delikatnie zebrać supernatant z drobnymi fragmentami żelu, które nie opadły na dno.
- Ponownie zalać żel buforem fosforanowym do początkowej objętości. Czynności te powtórzyć po kolejnych trzech godzinach i po 10-12 godzinach. Dla osiągnięcia odpowiedniego uwodnienia żelu potrzeba w tych warunkach około trzech dni (72 godz.). Dopiero po upływie tego czasu żel nadaje się do wypełnienia kolumny, ale po uprzednim odpowietrzeniu pod próżnią.
- Czas potrzebny na odpowiednie uwodnienie złoża można znacznie skrócić inkubując zawiesinę żelu w łaźni wodnej w temperaturze wrzenia wody. Gotowość do pracy żelu można wtedy osiągnąć po około 5 godzinach. Dodatkową korzyścią takiego traktowania żelu jest to, że nie trzeba go odpowietrzać przed wypełnieniem kolumny.

##### **b) Wypełnienie kolumny.**

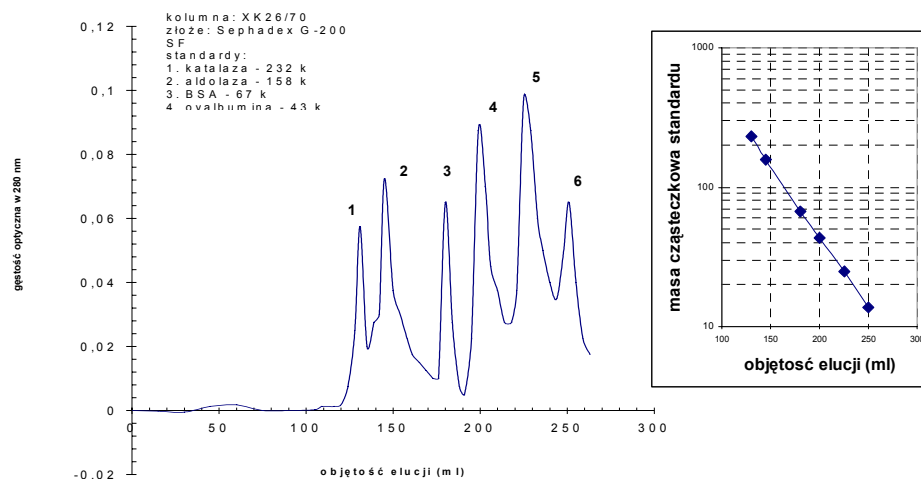
- Kolumnę umocować pionowo i od dołu napełnić ją, przy pomocy pompy perystaltycznej albo strzykawki buforem fosforanowym (do wysokości około 3 cm). Zamknąć wylot kolumny, uniemożliwiając wypływ buforu. Czynność ta ma na celu usunięcie powietrza z dolnego wężyka oraz sit zamykających kolumnę od dołu.
- Na górnym końcu kolumny warto zamocować naczynie do wypełniania kolumny, pozwalające wprowadzić złoże do kolumny w sposób jednostajny, nawet wtedy, gdy chcemy kolumnę wypełnić w całości i pracować bez adaptorów.
- Odpowietrzoną zawiesinę złoża (75% złoża w buforze) nalewać powoli, ale w sposób ciągły, do kolumny. Podczas tej czynności może być pomocnym zastosowanie cienkiego szklanego pręta o długości większej niż długość kolumny. Pręt ten pozwala usunąć przypadkowe pęcherze powietrza w układającym się żelu.
- Po napełnieniu kolumny należy ją zamknąć od góry (adaptozem lub przez naczynie do wypełniania kolumny) uważając aby nie wprowadzić do środka powietrza. Wężyki oraz adaptor powinny być wcześniej napełnione buforem.
- Otworzyć wylot kolumny i przy pomocy pompy perystaltycznej wymusić nominalny przepływ solwentu (przepływ przewidziany dla pracy kolumny). Pozwolić na sedymentację żelu (około 3 godz.) i dostosować adaptor do wysokości złoża lub usunąć naczynie do wypełniania kolumny. Kolumnę zamknąć od góry nakrętką z wężykiem dopływowym. Tak przygotowaną kolumnę zastosować do separacji standardów.

### **Przebieg doświadczenia:**

- Oba zestawy standardów białkowych do filtracji żelowej zawierają po 50 mg każdego ze składowych białek. Przygotować, na bazie buforu fosforanowego, 10 ml mieszaniny standardów białkowych o stężeniu każdego ze składników 0,1 mg/ml. Pomiąć tyreoglobulinę i ferrytynę, których masy cząsteczkowe wykraczają poza zakres mas separowanych przez złożę **Sephadex G-200 SF**.
- Zmontować manualny system chromatograficzny według schematu przedstawionego na rysunku 4.2.
- Wypełnić buforem fosforanowym aplikator próbek **SA-50** (przy otwartym zaworze odpowietrzającym) i po jego zamknięciu wymusić przepływ buforu przez kolumnę z prędkością objętościową równą 0,15 ml/min, co odpowiada prędkości liniowej około 1,7 cm/godz.
- Ustawić przełącznik zakresu absorbancji detektora na 1,0, a rodzaj pracy na **AU** i włączyć zasilanie detektora (pełną stabilność pracy lampa osiąga dopiero po jednej godzinie). Czulość rejestratora ustawić na zakres 10 mV. Po upływie godziny ustawić linię bazową rejestratora na poziomie zera.
- Zawór **LV3** ustawić w pozycji omijającej kolektor frakcji i kierującej wypływ z kolumny do naczynia na odpady ciekłe.
- Wypełnić koszyk kolektora frakcji próbkami o objętości 4 ml (70 sztuk), ustawić rodzaj pracy w trybie czasu i wybrać czas frakcjonowania równy 25 minut (objętość frakcji równa 3,75 ml).
- Pozwolić systemowi pracować przez jedną godzinę obserwując zachowanie linii bazowej na rejestratorze. Jeżeli linia bazowa jest stabilna można przystąpić do naniesienia próbki na kolumnę.
- Zawór **LV4** ustawić w pozycji omijającej aplikator próbek i przy pomocy strzykawki (10 ml), przebijając igłą gumową membranę, nanieść próbkę na dno aplikatora. W tym momencie system jest gotowy do rozpoczęcia separacji.
- Przekręcając zawór **LV4** spowodować naniesienie próbki na kolumnę.
- Przekręcając zawór **LV3** i wciskając przycisk "start" w kolektorze frakcji rozpocząć zbieranie frakcji. Pełen czas trwania rozdziału nie powinien być krótszy niż 30 godzin. Przy dobrze sprawdzonym systemie rozdzielanie może być prowadzone w sposób ciągły bez konieczności stałego nadzoru operatora. Należy jednak pamiętać o zaopatrzeniu systemu w odpowiednią ilość buforu fosforanowego (około 500 ml).

**Oczekiwane wyniki:** Po upływie około 30 godzin separacja białek wchodzących w skład standardów powinna być ukończona. Rejestrator powinien wykreślić układ sześciu pików. Pierwszy pik powinien pojawić się po wypłynięciu z kolumny około 130 ml solwentu (14 godz.). W pikie tym zawiera się katalaza. Kolejne białka powinny być eluowane w następującej kolejności: aldolaza (16 godz., 145 ml), albumina wołowa (20 godz., 180 ml), ovalbumina (22 godz., 200 ml), chymotrypsynogen A (25 godz., 225 ml) oraz rybonukleaza A (28 godz., 250 ml). Na podstawie uzyskanych wyników można przygotować krzywą

kalibracyjną, odkładając na osi pionowej masy cząsteczkowe standardów a na osi poziomej objętość elucji lub czas retencji. W skali logarytmiczno-liniowej krzywa kalibracyjna powinna mieć postać linii prostej. Tak wykalibrowaną kolumnę można zastosować do separacji materiału o nieznanym składzie białek, uzyskując informację o ilości i wielkości rozdzielanych molekuł.



**Rys. 4.3.**

Kalibracja kolumny **XK26/70** wypełnionej złożem **Sephadex G-200 SF**. Krzywa kalibracyjna sporządzona w skali log-lin przedstawia linię prostą.

### Regeneracja i przechowywanie złoża:

Po zakończeniu pracy, jeżeli przerwa w użytkowaniu kolumny będzie dłuższa niż jeden tydzień, kolumnę należy zabezpieczyć przed porastaniem bakterii. Należy wtedy przepuścić przez kolumnę 300 ml buforu fosforanowego z dodatkiem 0,01% azydku sodowego. Po wykonaniu tej operacji należy wyloty kolumny szczelnie zamknąć, aby ją zabezpieczyć przed wysychaniem. Dobrze zabezpieczoną kolumnę można przechowywać przez szereg miesięcy w temperaturze pokojowej. Jeżeli jednak nie bierze się pod uwagę ponownego użycia kolumny w dającym się przewidzieć czasie, wygodniej jest wypakować złożo, dodać do niego wodnego roztworu azydku sodu, do końcowego stężenia 0,01%, i przechowywać je w lodówce. Przed ponownym wypełnieniem kolumny złożo należy kilkakrotnie przepłukać w solwencie przewidywanym do użycia.

### Uwagi:

1. W przypadku kalibracji kolumny można zaniedbać pracę kolektora frakcji.

2. W przypadku separacji interesującego nas materiału zbieranie frakcji można rozpocząć od 10-tej godziny rozdziału.
3. Objętość nanoszonej próbki nie może przekroczyć 5% objętości kolumny.
4. Stężenie białka w nanoszonej próbce nie powinno przekraczać 30 mg/ml. Przy wyższych stężeniach lepkość próbki może znacznie pogorszyć warunki separacji a w skrajnych przypadkach kolumna może ulec zatkaniu.
5. Zastosowanie spektrofotometru **Ultrospec 2000** z oprogramowaniem, zamiast detektora **UV1** i rejestratora **Rec-111**, znacznie upraszcza procedurę rejestracji wyników oraz ich interpretacji. Co więcej, można wtedy rejestrować gęstość optyczną wypływającego z kolumny materiału jednocześnie w wielu długościach fali.
6. Separację makromolekuł na kolumnie wypełnionej złożem do filtracji żelowej można przeprowadzić bez użycia pompy, wykorzystując w tym celu grawitacyjny przepływ solwentu przez kolumnę. W takiej sytuacji prędkość przepływu można regulować wysokością słupa cieczy – solwentu. Można również zrezygnować z ciągłej detekcji gęstości optycznej cieczy wypływającej z kolumny na rzecz pomiaru tej wielkości w poszczególnych frakcjach. Ten sposób postępowania umożliwia prowadzenie separacji z zastosowaniem filtracji żelowej w laboratoriach nie posiadających odpowiedniego wyposażenia chromatograficznego. Jedynym elementem koniecznym do pracy w technice filtracji żelowej jest kolumna wypełniona złożem. Pozostałe elementy systemu można w dość dowolny sposób wymieniać i zastępować innymi.

## **Przykład 4.2.**

### **Fracjonowanie hydrolizatu łańcucha $\gamma$ fibrynogenu (4)**

#### **Wprowadzenie:**

Zarówno enzymatyczne jak i nieenzymatyczne trawienie białka prowadzi do powstania licznych fragmentów peptydowych, charakteryzujących się dużym zróżnicowaniem zarówno mas cząsteczkowych jak i aktywności biologicznej. Procedura izolowania wybranego fragmentu trawionej makromolekuły zawiera zwykle dwa etapy chromatografii cieczowej. W pierwszym etapie dokonuje się wstępnego frakcjonowania hydrolizatu białka i wybiera się frakcje zawierające fragmenty o oczekiwanej masie cząsteczkowej. Dopiero tak przygotowany materiał staje się przedmiotem kolejnego etapu, którym jest zwykle jedna z bardziej zaawansowanych technik: technika odwróconej fazy – wykorzystująca różnice w hydrofobowości molekuł, chromatografia jonowymienna – wykorzystująca różnice właściwości elektrycznych molekuł, lub chromatografia powinowactwa.

#### **Material:**

1. Łańcuch  $\gamma$  fibrynogenu ludzkiego lub wieprzowego.
2. Niskocząsteczkowy standard białkowy do filtracji żelowej (**APB**).
3. **Sephadex G-50 Fine**.

#### **Aparatura:**

1. Jak wyspecyfikowano w przykładzie 4.1., z wyjątkiem kolumny, którą zamieniono na **XK16/70** lub **C16/70** ( $\phi = 16$  mm,  $l = 70$  cm).
2. Liofilizator.

#### **Odczynniki:**

1. 70% kwas mrówkowy
2. 10% kwas octowy.
3. 0,01% azydek sodu w H<sub>2</sub>O.
4. Bromocyjan w substancji (SIGMA)

#### **Przygotowanie kolumny chromatograficznej:**

- Odważyć 30 g złoża **Sephadex G-50 Fine** i powoli wsypać je do zlewki zawierającej 300 ml wody, delikatnie mieszając powstającą zawiesinę szklaną bagietką.
- Pozwolić na swobodną sedymentację żelu i pompką wodną zebrać supernatant zawierający drobne ziarna złoża.
- Uzupełnić ponownie zawiesinę wodą do objętości 300 ml i pozwolić złożu na pęcznienie w ciągu 3 godzin (lub 1 godz. w 95°C).
- Ponownie zebrać supernatant i zawiesić złożo w 10% kwasie octowym.
- Tak przygotowane złożo upakować w kolumnie **XK16/70** lub **C16/70**, postępując zgodnie ze wskazówkami zawartymi w opisie przykładu 4.1.

#### **Przebieg doświadczenia:**

##### **a) Standaryzacja kolumny.**

- Przeprowadzić standaryzację kolumny wypełnionej złożem **Sephadex G-50 Fine**, przy ustalonym przepływie objętościowym 1 ml/min, korzystając ze wskazówek zawartych w opisie przykładu 4.1. Do standaryzacji użyć tylko: rybonukleazę A (13,7 k), chymotrypsynogen A (25 k) oraz ovalbuminę (43 k).

##### **b) Trawienie łańcucha $\gamma$ fibrynogenu.**

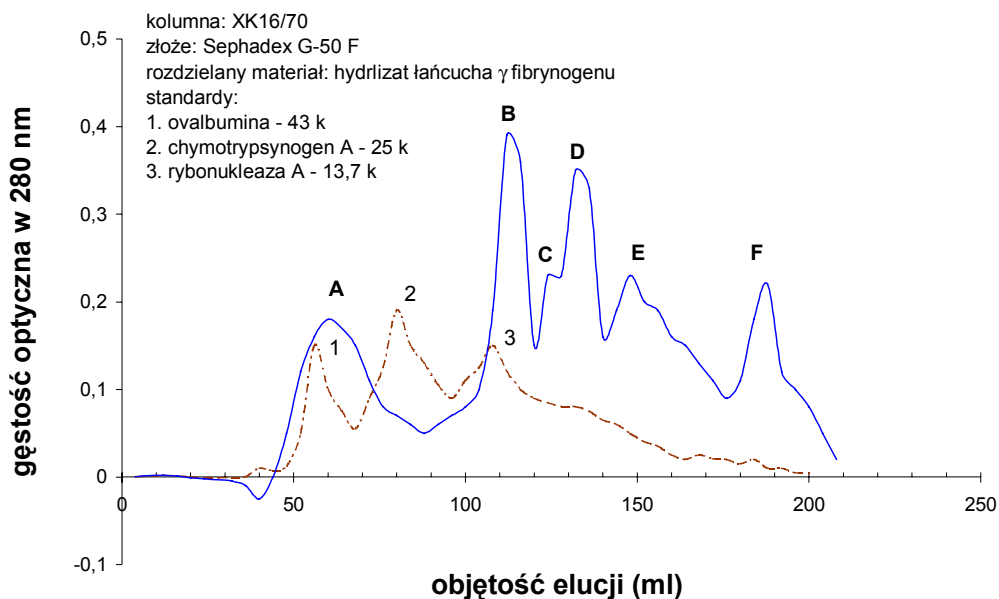
- Preparat łańcucha  $\gamma$  fibrynogenu (30 mg) rozpuścić w 3 ml 70% kwasu mrówkowego. Rozpuszczanie prowadzić w temperaturze pokojowej w ciągu 24 godz., z delikatnym mieszaniem.
- Do roztworu dodać 100 mg bromocyjanu i kontynuować inkubację w tych samych warunkach przez kolejną dobę.
- Preparat rozcieńczyć czterokrotnie wodą destylowaną i poddać liofilizacji.
- Zliofilizowane peptydy rozpuścić w 3 ml 10% kwasu octowego

##### **c) Frakcjonowanie hydrolizatu fibrynogenu.**

- Korzystając z aplikatora próbek (**SA-50**) nanieść na kolumnę 3 ml hydrolizatu łańcucha  $\gamma$  fibrynogenu.
- Prowadzić rozdział chromatograficzny zgodnie z uwagami zawartymi w opisie do przykładu 4.1., przepuszczając przez kolumnę 10% kwas octowy, cały czas zbierając 4-mililitrowe frakcje.
- Na podstawie uzyskanego chromatogramu i krzywej kalibracyjnej kolumny zidentyfikować masy cząsteczkowe poszczególnych pików.
- Frakcje zawierające fragmenty degradacji fibrynogenu opisać, zamrozić i zachować do dalszych badań metodami opisanymi w następnych rozdziałach (przykład 7.1).

#### **Oczekiwane wyniki:**

W wyniku procesu filtracji żelowej produktów nieenzymatycznej degradacji łańcucha  $\gamma$  fibrynogenu oczekujemy pojawienia się sześciu pików na chromatogramie. Pierwszy z pików (A) zawiera niestrawiony łańcuch  $\gamma$  fibrynogenu i fragmenty degradacji łańcucha o masach powyżej 30 k. Tak duże molekuly nie podlegają rozdzielaniu na zastosowanym żelu i wymywają się z kolumny wraz z czołem eluentu. Kolejne piki zawierają fragmenty peptydowe o masach cząsteczkowych z przedziału 1,5 – 30 k, w tym pik (B) zawiera fragment  $\gamma_{1-78}$ , który na skutek znacznej zawartości komponentów cukrowych posiada masę około 12 k.



Rys. 4.4.

Fracjonowanie fragmentów łańcucha  $\gamma$  fibrynogenu powstałych w wyniku hydrolizy bromocyjanem. Krzywą przerywaną zaznaczono separację standardów. Pierwszy pik (A) zawiera niestrawione cząsteczki łańcucha  $\gamma$  fibrynogenu oraz fragmenty degradacji o masie powyżej 30 k. Pik następny (B) zawiera głównie fragment  $\gamma_{1-78}$ . W ostatnich frakcjach znajdują się niskocząsteczkowe fragmenty degradacji o masach rzędu 1-3 k.

#### Regeneracja i przechowywanie złożeń:

Należy zastosować się do uwag zawartych w przykładzie 4.1.

#### Uwagi:

Zastosowanie mają odpowiednio uwagi 5 i 6 z przykładu 4.1.

#### Przykład 4.3.

#### Rozdzielanie $^{125}\text{I}$ -znakowanych IgG od swobodnego izotopu jodu $^{125}\text{I}$ (5)

#### Wprowadzenie:

Znakowane radioaktywnie lub fluorescencyjnie cząsteczki białka lub kwasów nukleinowych stosowane są często jako sondy molekularne. Dla przykładu, zastosowanie w

te-chnice Western-immunoblotingu pierwszego przeciwciała znakowanego radioizotopowo lub fluorescencyjnie pozwala uwolnić metodę od konieczności stosowania drugiego przeciwciała, wprowadzającego liczne niespecyficzne efekty. Zwykle w procesie znakowania makrocząsteczek znacznik radioizotopowy lub fluorescencyjny podawany jest w dużym nadmiarze. Z tego też powodu pojawia się potrzeba rozdzielenia znakowanych makromolekuł od swobodnego znacznika. Najlepsze efekty uzyskuje się stosując filtrację żelową, o ile rozmiary znakowanych molekuł i znaczników różnią się wystarczająco. W przeciwnym razie niezbędne jest stosowanie innych metod, takich jak chromatografia jonowymienna (IEC) lub chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC).

#### **Material:**

1. Preparat immunoglobulin G (IgG) oczyszczonych metodą chromatografii powinowactwa z zastosowaniem białka A.
2. Kulki IODO-BEADS (Pierce).
3. Kolumna **PD-10** wypełniona złożem **Sephadex G-25 Medium**.
4. Izotop jodu  $^{125}\text{I}$

**Uwaga!** Wszystkie czynności związane ze znakowaniem białka i jego dalszym zastosowaniem muszą być wykonywane w pracowni izotopowej źródeł otwartych, posiadającej aktualne zezwolenie Centralnego Laboratorium Ochrony Radiologicznej (CLOR) na zakup i wyko-rzystywanie izotopu  $^{125}\text{I}$ .

#### **Aparatura:**

1. Wyciąg chemiczny.
2. Licznik promieniowania gamma.

#### **Odczynniki:**

1. 0,5 M bufor fosforanowy, pH 7,2.
2. Bufor TBS – 10 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7,4.
3. 1% roztwór albuminy wołowej w buforze TBS.
4. 100 mM wodny roztwór jodku potasu.

#### **Przygotowanie kolumny chromatograficznej:**

- a) Kolumna PD-10 jest fabrycznie upakowana złożem **Sephadex G-25**, co pozwala ominąć całą procedurę przygotowania złoża i pakowania kolumny.
  - Przed zastosowaniem do rozdziału znakowanego białka od swobodnego izotopu należy kolumnę wysycić albuminą wołową i w tym celu trzeba przepuścić przez kolumnę 30 ml 1% roztworu albuminy. Dla wymuszenia przepływu przez kolumnę wystarczy różnica ciśnień spowodowana grawitacją (przepływ grawitacyjny).
  - Przygotowaną kolumnę zabezpieczyć przed wyciekami buforu i pozostawić do wykorzystania po znakowaniu białka.
- b) Można jednak zastosować własną kolumnę jednorazowego użytku, wykorzystując w tym celu 10 ml strzykawkę lub 10 ml plastikową pipetę.
  - Należy wówczas odważyć 3 g żelu **Sephadex G-25 Medium**, wsypać powoli do 20 ml wody lub buforu TBS i po około 30 minutach zebrać supernatant, a pozostałą zawiesinę żelu zalać ponownie buforem TBS.
  - Pozostawić na około 3 godziny (1 godz. w temp  $95^{\circ}\text{C}$ ) a następnie wypełnić uwodnionym żelem pustą kolumnę (10 ml).



- Kolumnę należy zabezpieczyć od dołu przed wyciekami żelu, umieszczając w ujściu kolumny kawałek siatki nylonowej (najlepiej kawałek nylonowej pończochy).
- Po napełnieniu kolumny pozwolić na sedymentację żelu a następnie przepuścić przez nią 30 ml 1% roztworu albuminy wołowej.
- Kolumnę zabezpieczyć przed wyciekami buforu i pozostawić do wykorzystania.

#### **Przebieg doświadczenia:**

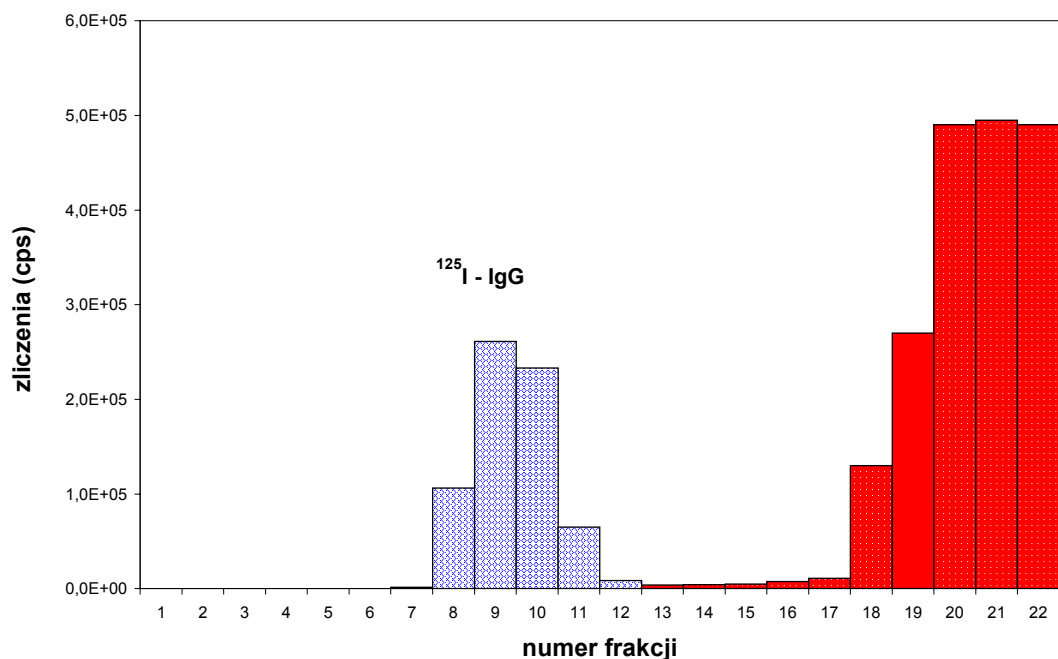
- Pobrać z roztworu IgG, przeznaczonych do znakowania, objętość zawierającą 5-10 µg białka (zwykle 5-20 µl) i dodać do 100 µl buforu fosforanowego (pH 7,2) znajdującego się w 1,5 ml probówce.
- Do mieszaniny dodać 20 MBq izotopu  $^{125}\text{I}$  po czym delikatnie całość wymieszać, przez kilkakrotne nabranie mieszaniny do końcówki pipety i powolne wypuszczenie jej do próbki.
- Dodać dwie kulki IODO-BEADS.
- Całość inkubować w temperaturze pokojowej w ciągu 5 minut, a następnie dodać nadmiarowo roztworu KI do końcowego stężenia około 5-10 mM.
- Bezpośrednio przed naniesieniem próbki na kolumnę doprowadzić do kontrolowanego wycieku buforu, tak aby powierzchnia złoża była wolna od buforu.
- Delikatnie nanieść na powierzchnię złoża mieszaninę inkubacyjną i pozwolić jej wnikać w żel.
- Nanosić na powierzchnię żelu 300 µl porcje buforu TBS i zbierać 300 µl frakcje.
- Zbieranie frakcji zakończyć po przepuszczeniu przez kolumnę 15 ml buforu TBS.
- Zebrane frakcje poddać analizie na zawartość radioaktywności przy pomocy licznika promieniowania gamma.

#### **Uwaga!**

Przez cały czas trwania doświadczenia zwracać baczność uwagę na niebezpieczeństwo groźnego w skutkach skażenia izotopem  $^{125}\text{I}$ . Wszystkie czynności wykonywać w podwójnych gumowych rękawiczkach i w fartuchu ochronnym, wszystko zgodnie z regulaminem pracowni izotopowej źródeł otwartych.

#### **Oczekiwane wyniki:**

Dla prawidłowego udokumentowania procesu separacji należy wykonać wykres zmian radioaktywności w zebranych frakcjach w funkcji objętości elucji. Na podstawie wykonanego histogramu łatwo można zidentyfikować frakcje zawierające interesujące nas radioznakowane białko. Z powodu różnej prędkości migracji w żelu cząsteczek białka i znacznika, należy spodziewać się, że w analizowanych frakcjach będzie można wyodrębnić dwa piki radioaktywności. Pierwszy z nich, zawierający  $^{125}\text{I}$ -IgG, powinien pojawić się we frakcjach 8-11. W dalszych frakcjach znajduje się swobodny izotop jodu, który powinien być wmywany z kolumny w postaci masywnego piku, poczynając od frakcji 18.



**Rys. 4.5.**

Przykład separacji znakowanego izotopowo białka od swobodnego izotopu.  $^{125}\text{I}$ -IgG wmywane są z kolumny we frakcjach 8-11 (jaśniejsze słupki histogramu). Swobodny izotop  $^{125}\text{I}$  wmywany jest dopiero w dalszych frakcjach (ciemniejsze słupki). Rzeczywista różnica w radioaktywności frakcji zawierających  $^{125}\text{I}$ -IgG i swobodny izotop  $^{125}\text{I}$  jest znacznie większa niż przedstawiona różnica zliczeń. Powodem tego jest czas martwy licznika, powodujący gubienie zliczeń, tym większe im wyższa jest aktywność.

### **Regeneracja i przechowywanie złożeń:**

Ze względu na zagrożenie jakie stwarza skażenie promieniotwórcze, kolumny stosowane do wyżej opisanych celów traktuje się jako wysoce niebezpieczne i przechowuje się je wraz z innymi odpadami promieniotwórczymi, wg zasad przewidzianych regulaminem pracowni izotopowej.

### **Uwagi:**

1. Kolumny i złożeń podobne jak w opisanym doświadczeniu stosuje się do szybkiej wymiany buforów, odsalania oraz separacji ekstrahowanego materiału od miceli powstałych z detergentów.
2. W większości przypadków dla osiągnięcia założonego celu wystarcza grawitacyjny przepływ eluentu przez kolumnę. Można jednak znacznie przyspieszyć proces filtracji żelowej stosując kolumny pracujące w systemach chromatografii ciekłej wyposażonych w pompy.

## Przykład 4.4.

### Izolowanie płytek krwi z osocza metodą filtracji żelowej (6, 7)

#### Wprowadzenie:

Izolowanie komórek jest wstępnym, ale niezbędnym etapem podczas prowadzenia różnego rodzaju badań nad strukturą tych komórek, przemianami biochemicznymi zachodzącymi w ich obrębie oraz - co obecnie jest najciekawsze – nad mechanizmami przekazywania sygnałów przez błonę komórkową i we wnętrzu komórki. Metoda izolowania komórek musi spełniać odpowiednie kryteria, wśród których najważniejszymi wydają się być prostota metody oraz możliwość uzyskania komórek w stanie natywnym. Wypracowano wiele różnorodnych metod, odpowiednich dla różnych rodzajów komórek. Płytki krwi - elementy morfotyczne biorące udział w procesie krzepnięcia krwi, są niewielkimi fragmentami rozpadu macierzystych komórek szpiku kostnego – megakariocytów. Płytki krwi są niezwykle wrażliwe na wszelkie zmiany warunków w środowisku, w którym się znajdują. Odpowiedzią na te zmiany jest szybka i masywna aktywacja płytek krwi, połączona ze zmianą ich kształtu, reakcją uwalniania różnych substancji z zasobów wewnątrzpłytkowych ziarnistości i w końcu ich agregacja. Za najdelikatniejszą metodę izolowania płytek krwi uważa się filtrację żelową na kolumnie wypełnionej złożem **Sepharose 2B**. Aby ograniczyć do minimum możliwość kontaktu płytek krwi z powierzchnią żelu, opłuszcza się go wstępnie albuminą wołową. Ze względu na relatywnie duże rozmiary, płytki krwi nie mogą wnikać w porowatości ziaren złoża i dlatego przepływają przez kolumnę bardzo szybko. Natomiast białka osoczowe penetrują porowatości żelu i ich wypływ z kolumny jest znacznie spowolniony. W ostatnim czasie zauważono, że szczególnie dobre rezultaty daje separacja płytek krwi na złożu **Sepharose 2B** z kowalencyjnie związaną albuminą wołową (**BSA-Sepharose 2B**). Złoże takie jest bardzo gęsto i równomiernie pokryte albuminą, która uniemożliwia nawet przypadkowy kontakt płytek krwi z powierzchnią żelu (7).

#### Material:

1. Krew ludzka (ewentualnie wieprzowa lub wołowa) pobrana na 3,8% cytrynian sodowy (9:1).
2. **Sepharose 2B** lub **BSA-Sepharose 2B**.

#### Aparatura:

1. Wirówka z rotorem horyzontalnym, mogąca wirować preparaty o objętości 10-50 ml z przyspieszeniem 3000 x g.
2. Spektrofotometr UV-VIS **Ultrospec 2000**.

### Odczynniki:

1. Bufor Tyroda – 0,02 M bufor fosforanowy zawierający: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM glukozy, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4.

### Przygotowanie kolumny chromatograficznej:

- Najodpowiedniejszą do zrealizowania zamierzonego w tym doświadczeniu celu jest pusta kolumna **PD-10**, ale można również zastosować 10 ml strzykawkę (bez tłoka) z centralnym ujściem, bądź inną pustą kolumnę o pojemności 10 ml.
- W ujściu zastosowanej kolumny umieścić kawałek siatki nylonowej (najlepiej kawałek nylonowej pończochy) lub krążek bibuły. W przypadku kolumny PD-10 zrezygnować z zamykających kolumnę sit, gdyż mogą one być przyczyną aktywacji płytek krwi.

#### a) metoda I

- Pobrać 10 ml złoża **Sepharose 2B**, odmyć konserwant przez trzykrotne przemycie 20 ml destylowanej wody i zawiesić złoże w 10 ml buforu Tyroda z dodatkiem 1% BSA.
- Inkubować 10-15 minut w temperaturze pokojowej często i delikatnie mieszając.
- Tak przygotowanym złożem wypełnić kolumnę, po czym przepuścić przez nią 20 ml buforu Tyroda.
- Zamknąć wylot kolumny i pozostawić w temperaturze pokojowej do rychłego użycia. Tak przygotowana kolumna powinna być użyta w ciągu kilku godzin.

#### b) metoda II

- Pobrać 10 ml złoża **BSA-Sepharose 2B** (przygotowanego jak w przykładzie 8.1.).
- Odmyć konserwant przez trzykrotne przemycie złoża buforem Tyroda
- Wypełnić przygotowanym złożem wybraną kolumnę.
- Po sedymentacji złoża przepuścić przez nie 20 ml buforu Tyroda.
- Zamknąć wylot kolumny i pozostawić w temperaturze pokojowej do spodziewanego użycia. Tak przygotowana kolumna powinna być użyta w ciągu kilku godzin.

### Przebieg doświadczenia:

#### Przygotowanie osocza bogatopłytkowego.

- Krew cytrynianową poddać wirowaniu w temperaturze pokojowej (10 min, 200xg).
- Plastikową pipetą zebrać żółty supernatant wyraźnie oddzielony od osadzonych erytrocytów. Należy uważać aby nie pobrać komórek leukocytarnych zalegających cienką warstwą granicę między erytrocytami a osoczem bogatopłytkowym.

#### Izolowanie płytek krwi.

- Z uprzednio przygotowanej kolumny, zawierającej złoże **Sepharose 2B** opłaszczone BSA lub złoże **BSA-Sepharose 2B**, usunąć nadmiar buforu, ale nie dopuścić do wyschnięcia złoża.
- Na powierzchnię złoża delikatnie nawarstwić 1 ml osocza bogatopłytkowego.
- Otworzyć wylot kolumny i pozwolić na wniknięcie osocza w złoże.
- Delikatnie nanosić na powierzchnię złoża 200 µl porcje buforu Tyroda i zbierać 200 µl frakcje.
- W uzyskanych frakcjach oznaczyć ekstynkcję światła w 800 nm. Zmierzona ekstynkacja jest w prostej relacji (8) z liczbą płytek krwi w zawieszynie.

#### Oznaczanie zawartości białek osoczowych

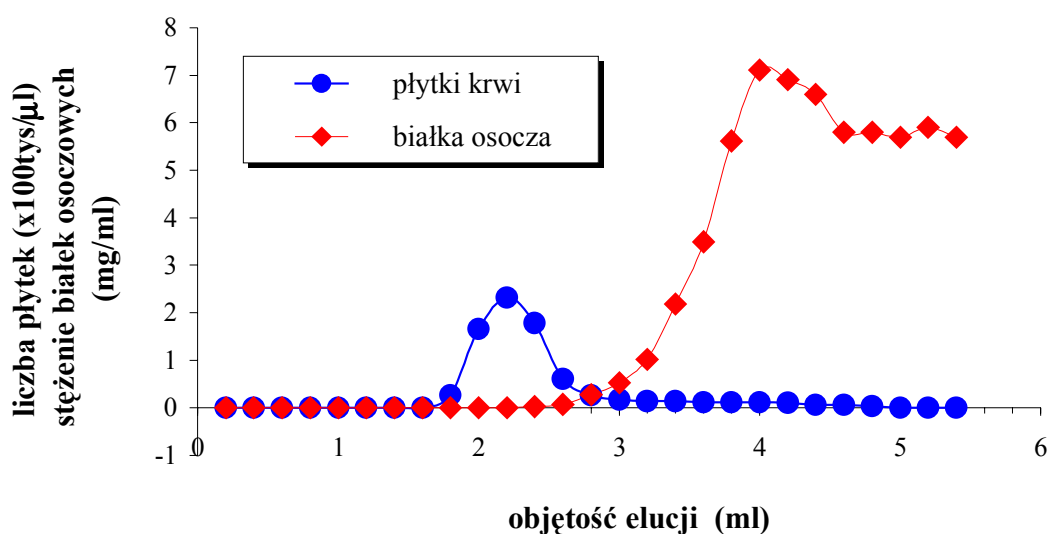
(dotyczy tylko kolumny wypełnionej złożem BSA-Sepharose 2B).

- Zwirować uzyskane frakcje (3000xg, 5 min), supernatanty rozcieńczyć pięciokrotnie wodą i oznaczyć gęstość optyczną uzyskanych próbek w świetle o długościach fali 260 nm, 280 nm i 320 nm.
- Korzystając z równania Warburga wyznaczyć stężenie białka w analizowanych frakcjach

$$c(\text{mg/ml}) = 1.55x(E_{280} - E_{320}) - 0.76x(E_{260} - E_{320}),$$

gdzie E oznacza ekstynkcję światła o odpowiedniej długości fali

- Zaznaczyć frakcje zawierające płytki krwi, wolne od białek osoczowych i frakcje zawierające białka osoczowe.



Rys. 4.6.

Przykład separacji płytek krwi z osocza bogatopłytkowego z zastosowaniem metody filtracji żelowej. Do separacji zastosowano złożo BSA-**Sepharose 2B** wypełniające 10 ml kolumnę **PD-10**. Przepływ eluentu realizowany był siłami grawitacji.

**Oczekiwane wyniki:**

Obserwując kolumnę w trakcie doświadczenia łatwo można zauważyć przemieszczanie się strefy koloru żółtego w dół kolumny. W trakcie tego przemieszczania się szerokość strefy znacznie wzrasta, co wskazuje na zachodzące frakcjonowanie białek osocza. W wypływającym z kolumny materiale można zaobserwować moment, gdy pojawiają się płytki krwi. Krople stają się wtedy mętne, a przy maksymalnej kondensacji płytek, nawet mleczne. Pojawienie się i obecność płytek krwi przypada na objętość elucji daleko wcześniejszą niż pojawienie się białek osoczowych.

W przypadku zastosowania złoża **Sepharose 2B** opłaszczonego albuminą uzyskuje się we frakcjach zawierających płytki krwi znaczne stężenie białka. Białkiem tym jest wypływająca ciągle z kolumny wolna albumina. Gdy do doświadczenia zastosuje się kolumnę

wypełnioną złożem BSA-Sephrose 2B, frakcje zawierające płytki krwi wolne są nie tylko od białek osoczowych, ale również od BSA.

### **Regeneracja i przechowywanie złoża:**

Ze względu na możliwość niespecyficznego zaadsorbowania na złożu i ściankach kolumny śladowych ilości białek i elementów osoczowych, które mogą być czynnikami aktywującymi płytki krwi w kolejnej preparatyce, nie zaleca się ponownego stosowania, ani kolumny, ani wypełniającego ją złoża.

### **Uwagi:**

1. W warunkach prac preparatywnych można proporcjonalnie powiększyć objętość kolumny i objętość nanoszonego osocza bogatopłytkowego. Jednak stosowanie dużych objętości osocza bogatopłytkowego jest trudne do realizacji ze względu na znaczny koszt stosowanego złoża. Metoda ta jest bardzo przydatna w przypadku izolowania niewielkich ilości płytek krwi o bardzo dobrze zachowanych funkcjach fizjologicznych (7).
2. Oznaczenie zawartości białka w zebranych frakcjach zawierających płytki krwi prowadzi do utraty tych płytek krwi. Oznaczenie to zaleca się wykonać tylko wtedy, gdy chcemy scharakteryzować metodę ze względu na możliwości separacji płytek krwi od białek. **Podczas rutynowego izolowania płytek krwi nie oznaczamy zawartości białek osoczowych w zebranych frakcjach.**
3. W trakcie rutynowego preparowania płytek krwi zbiera się tylko materiał wypływający z kolumny, który zawiera płytki krwi o odpowiedniej koncentracji. Wprawny operator jest w stanie ocenić zawartość płytek krwi w kropli biorąc pod uwagę jej zmętnienie.
4. Płytki krwi izolowane na złożu BSA-Sephrose 2B swymi cechami fizjologicznymi nie odbiegają od płytek krwi zawartych w osoczu bogatopłytkowym lub w pełnej krwi (7).

### **Przykład 4.5.**

**Końcowe oczyszczanie receptora FcγRII wyizolowanego z błon płytek krwi ludzkiej metodą chromatografii powinowactwa (9)**

### **Wprowadzenie.**

Receptor FcγRII należy do rodziny powierzchniowych receptorów komórkowych zdolnych wiązać kompleksy IgG poprzez ich fragment Fc. Receptor ten można stosunkowo łatwo wyekstrahować z błon płytek krwi stosując 2M roztwór bromku potasu (10). Wykorzystując fakt istnienia specyficznego oddziaływania tego receptora z fragmentem Fc cząsteczki IgG, można z kolei łatwo otrzymać względnie czysty preparat zawierający ten receptor. Analiza

elektroforetyczna uzyskanego tą drogą preparatu pokazuje jednak, że zawiera on znaczną ilość niskocząsteczkowych zanieczyszczeń. Usunięcie tych zanieczyszczeń możliwe jest na drodze filtracji żelowej z wykorzystaniem kolumny pracującej w systemie HPLC.

**Material:**

1. Wstępnie oczyszczony metodą chromatografii powinowactwa receptor Fc $\gamma$ RII.

**Aparatura:**

1. Zestaw HPLC **ÄKTA - Basic** z kolektorem frakcji **Frac 901**.
2. Kolumna **Superose 12 HR 10/30** ( $\phi = 10$  mm,  $l = 30$  cm).
3. Zestaw do filtracji buforów i próbek (AMICON).

**Odczynniki:**

1. 10 mM bufor Hepes zawierający 0,01% CHAPS, pH 7,4.
2. 20% wodny roztwór etanolu.

**Przygotowanie kolumny chromatograficznej:**

- Bufor Hepes przefiltrować przez filtr o porowatości 0,45  $\mu$ m.
- Kolumnę **Superose 12 HR 10/30**, podłączoną do systemu HPLC, zrównoważyć 10 mM buforem Hepes przy objętościowej prędkości przepływu 1 ml/min. Stabilną linię bazową uzyskuje się po przepłynięciu około 35 ml buforu.

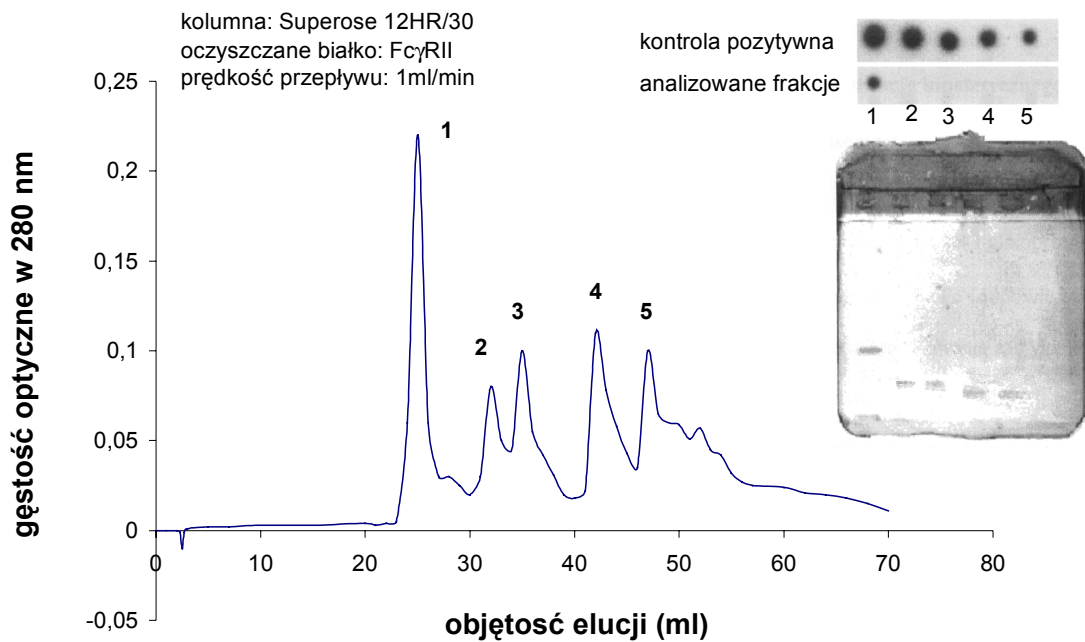
**Przebieg doświadczenia:**

- Próbkę zawierającą receptor Fc $\gamma$ RII przefiltrować przez filtr o porowatości 0,45  $\mu$ m a następnie nanieść 500  $\mu$ l próbki do pętli zaworu iniekcyjnego.
- Ustalić objętościową prędkość przepływu na 1 ml/min, maksymalne ciśnienie na 3 MPa.
- Detekcję prowadzić w 280 nm.
- Kolektor frakcji zaprogramować na zbieranie pików z poziomem odcięcia 0,02.
- Po uzyskaniu stabilnej linii bazowej nastrzyknąć próbkę na kolumnę i prowadzić rozdział aż do przepuszczenia przez kolumnę 75 ml buforu.

**Oczekiwane wyniki:**

Zgodnie z wstępną charakterystyką preparatu, uzyskaną w analizie elektroforetycznej (**PhastSystem**, 12,5% żel homogeniczny, rozdział w obecności SDS), należy spodziewać się występowania znacznej ilości niskocząsteczkowych zanieczyszczeń. Interesujące nas białko, (Fc $\gamma$ RII) powinno więc zostać wymyte w pierwszym z pików (bo nie stwierdzono obecności wysokocząsteczkowych zanieczyszczeń w preparacie). Pozostałe piki zawierają prawdopodobnie niskocząsteczkowe fragmenty degradacji białek niespecyficznie zaadsorbowanych na kolumnie chromatografii powinowactwa ze związanymi fragmentami Fc. Ostateczne potwierdzenie obecności receptora Fc $\gamma$ RII we frakcjach może zostać dokonane metodami: immunoenzymatyczną, radioimmunologiczną, Western-immunoblottingu lub dot-immunoblottingu, z zastosowaniem przeciwciała monoklonalnego IV.3, wysoce specyficznie

rozpoznającego receptor Fc $\gamma$ RII.



Rys. 4.7.

Końcowy etap oczyszczania receptora Fc $\gamma$ RII metodą filtracji żelowej. Zebrane piki analizowane były elektroforetycznie w 12,5 % żelu poliakrylamidowym z wykorzystaniem automatycznego systemu elektroforezy **PhastSystem**. Ponadto frakcje analizowane były metodą dot-immunoblottingu z wykorzystaniem radioznakowanego przeciwciała monoklonalnego IV.3, specyficznego rozpoznającego receptor Fc $\gamma$ RII.

### Regeneracja i przechowywanie złoża:

Kolumnę przemyć wodą destylowaną (80 ml) a następnie 20% wodnym roztworem etanolu (80 ml). Przechowywać w temperaturze 4-25°C. W razie zaobserwowania wzrostu ciśnienia na kolumnie lub pogorszenia selektywności rozdzielania, kolumnę należy zregenerować przez przemycie 5 ml 0,1 M zasady sodowej, następnie 5 ml 50% kwasu octowego i 30 ml wody. Zrównoważyć kolumnę wybranym solwentem albo przygotować do przechowywania w 20% etanolu. Jeżeli prosta regeneracja złoża nie przynosi spodziewanych skutków należy zastosować się do procedury proponowanej przez wytwórcę.

### Uwagi:

1. Zawsze filtrować solwenty (eluenty) stosowane w systemie HPLC stosując filtry o porowatości 0,45 – 0,6  $\mu$ m.
2. Próbkę do separacji w systemie HPLC bezwarunkowo muszą być filtrowane



- (0,45-0,6  $\mu\text{m}$ ) lub wirowane (10 000 x g, 5 minut).
3. Jeżeli system HPLC nie jest wyposażony w automatyczne odpowietrzanie solwentów lub w ogranicznik przepływu (*flow restrictor*), to solwenty należy odpowietrzyć przed podaniem na pompy HPLC. Można tego dokonać pod próżnią lub przy pomocy ultradźwięków. System ÄKTA wyposażony jest w ogranicznik przepływu, co nie pozwala na rozprężanie się powietrza zawartego w solwentach w całej objętości systemu.
  4. Nigdy nie należy odwracać kierunku przepływu eluentu przez kolumnę w trakcie jej regeneracji lub przygotowywania do przechowywania.
  5. Podobnie nie należy odwracać kierunku przepływu gdy kolumna pracuje w wysokim lub w niskim pH (pH poniżej 5 i powyżej 10) bądź przy wysokim stężeniu rozpuszczalników organicznych (powyżej 10%).
  6. Zawsze należy przestrzegać warunku pracy kolumny pod ciśnieniem niższym od maksymalnego podanego przez producenta.
  7. Nigdy nie należy nanosić na kolumnę próbki o stężeniu białka powyżej 30 mg/ml. Podanie na kolumnę próbki o zbyt wysokim stężeniu białka grozi zatkaniem kolumny i w efekcie tego zniszczeniem jej.

#### 4.4. LITERATURA

1. Lindqvist B., Storgårds T. *Nature (London)*, **175**, 511, 1955.
2. Gel filtration. Principles and methods. Amersham Pharmacia Biotech, 8 edition, kat. No. 18-1022-18.
3. Detarmann H., Michel W. *J. Chromatogr.*, **25**, 303, 1966.
4. Cierniewski CS., Budzyński AZ. *Eur. J. Biochem*, **218**, 321, 1993.
5. Walkowiak B., Naik UP., Lange M., Kornecki E. *Thromb. Res.* **68**,323, 1992.
6. Tangen O. Berman BJ., Merfey P. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **25**, 268, 1971.
7. Walkowiak B., Kralisz U., Michalec L., Majewska E., Koziolkiewicz W., Cierniewski CS. *Platelets*, **9**, 427, 1998.
8. Walkowiak B., Kęsy A., Michalec L. *Thromb. Res.*, **87**, 95, 1997.
9. Walkowiak B., Koziolkiewicz W. *Annal. Acad. Med. Lodz.* **37**, 5, 1996.
10. Cheng C.M., Hawiger J. *J. Biol. Chem.*, **254**, 2167, 1979.