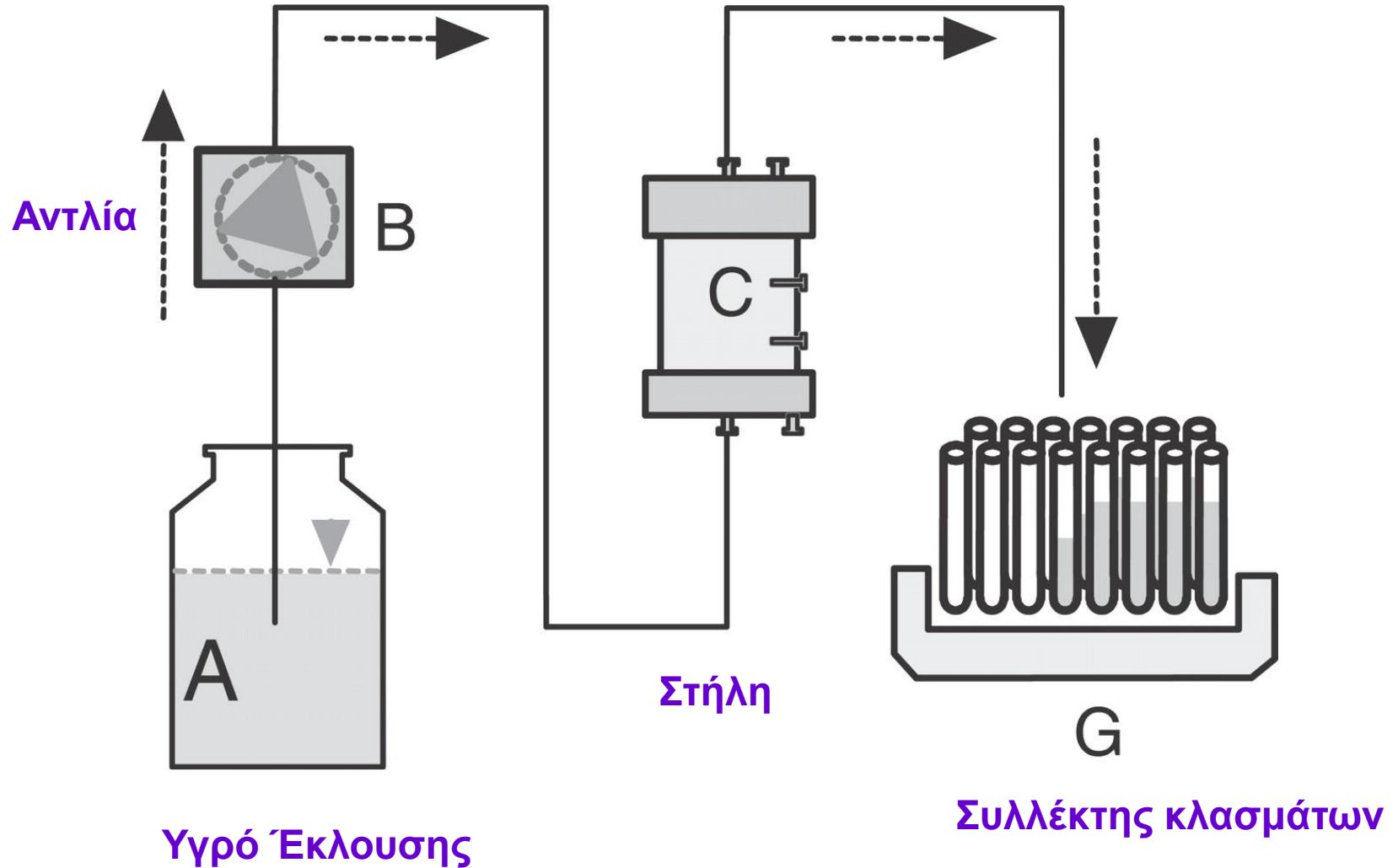


ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ
Τμήμα Βιοχημείας κ Βιοτεχνολογίας



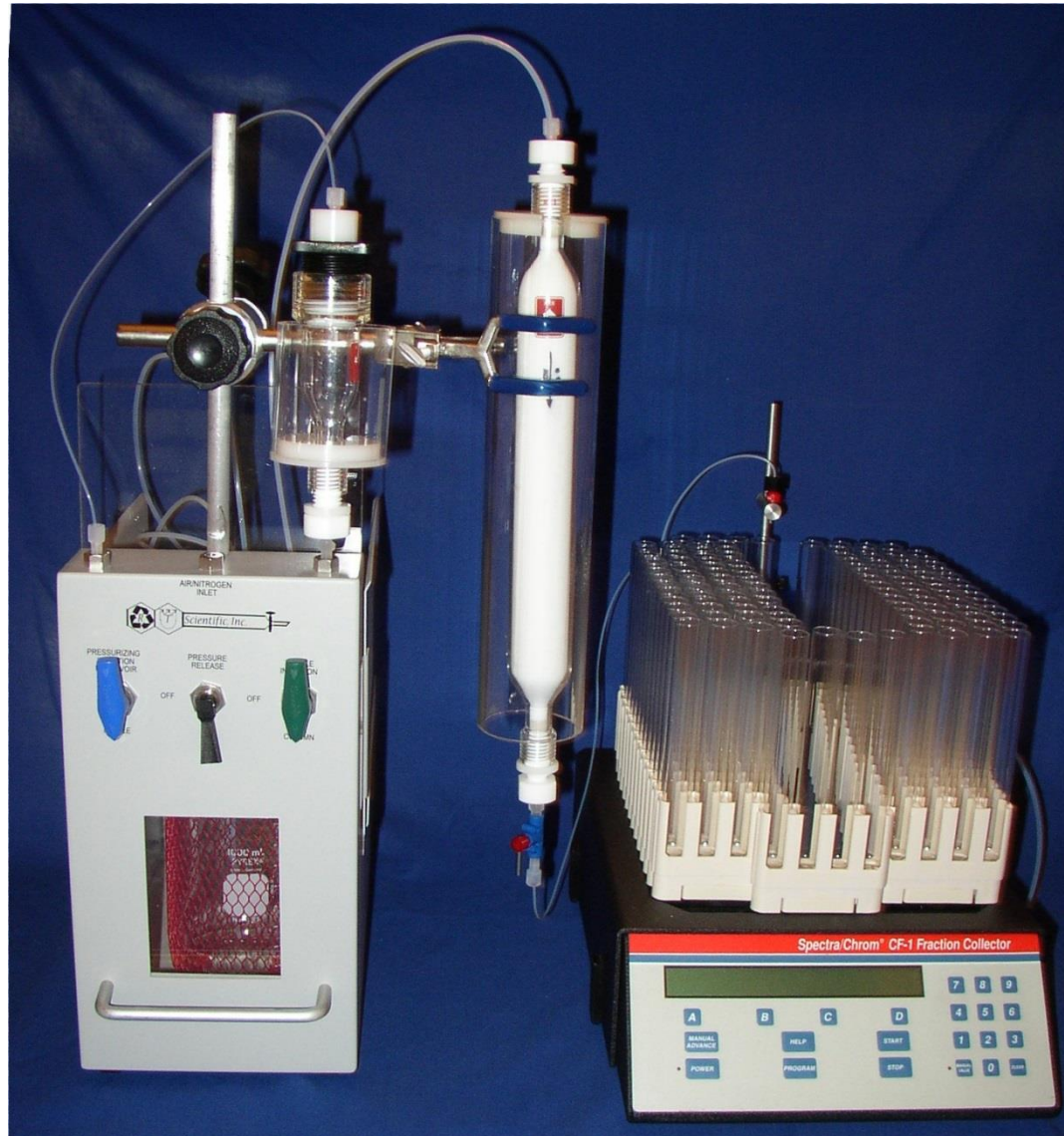
ΣΥΣΤΗΜΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ



ΣΥΣΤΗΜΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

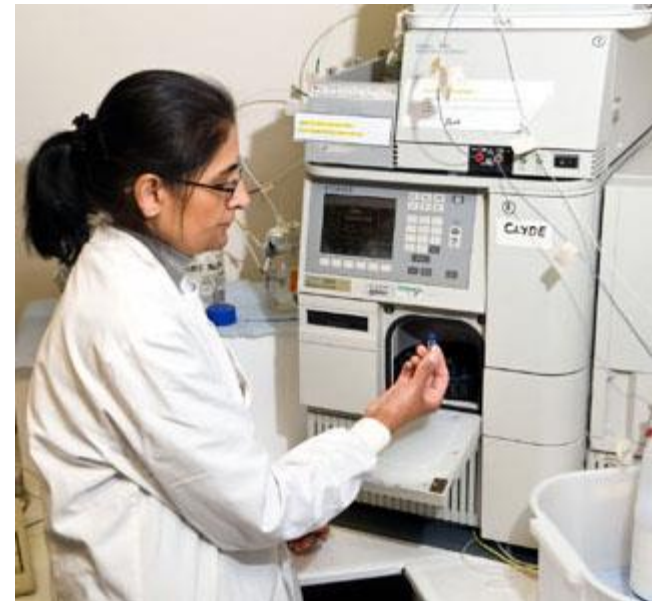


ΣΥΣΤΗΜΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ



Αυτοματοποιημένο σύστημα
Ενσωματωμένο σύστημα μέτρησης
απορρόφησης στα 280 nm

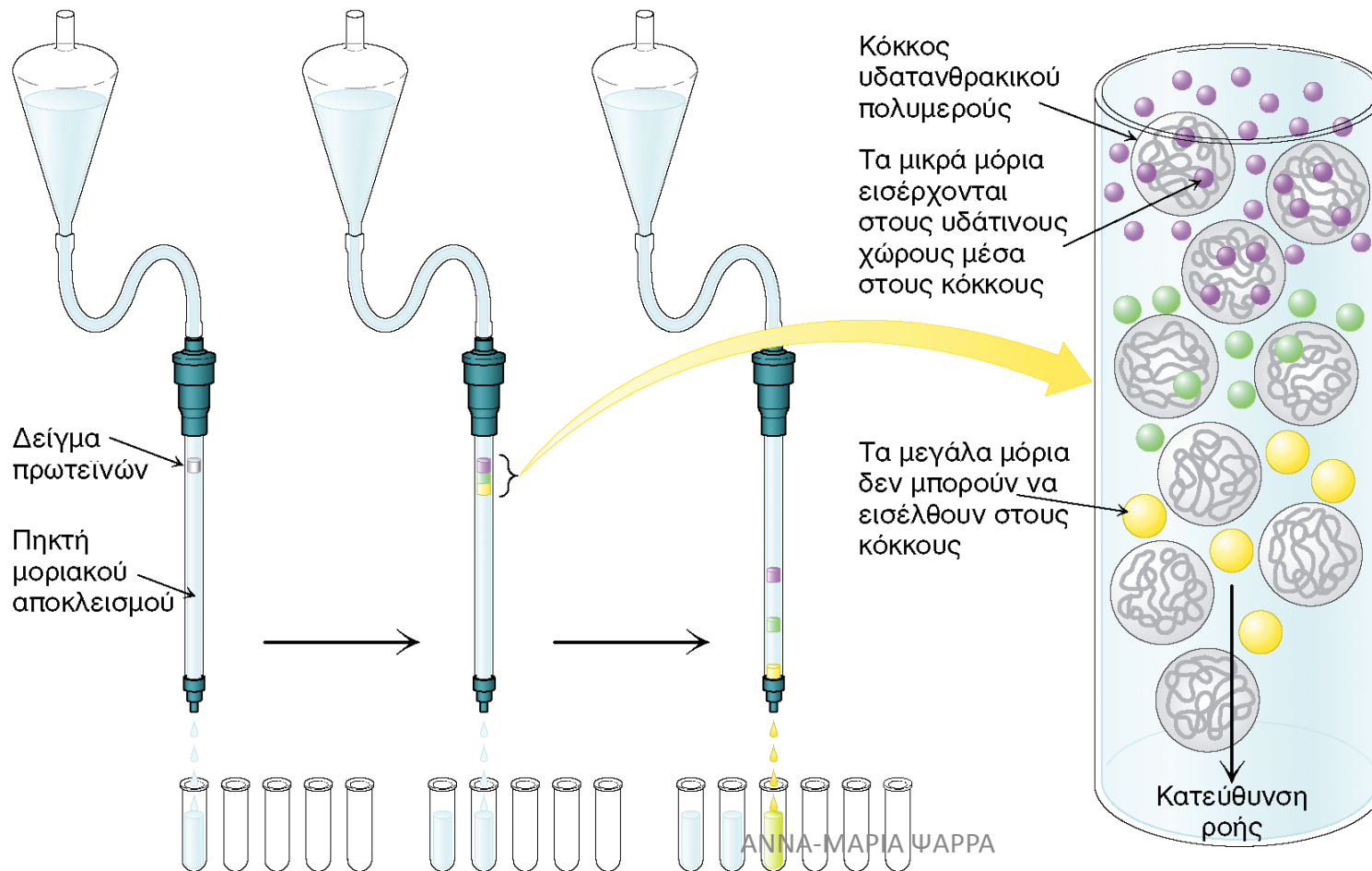
Ενσωματωμένο σύστημα μέτρησης pH



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΗ

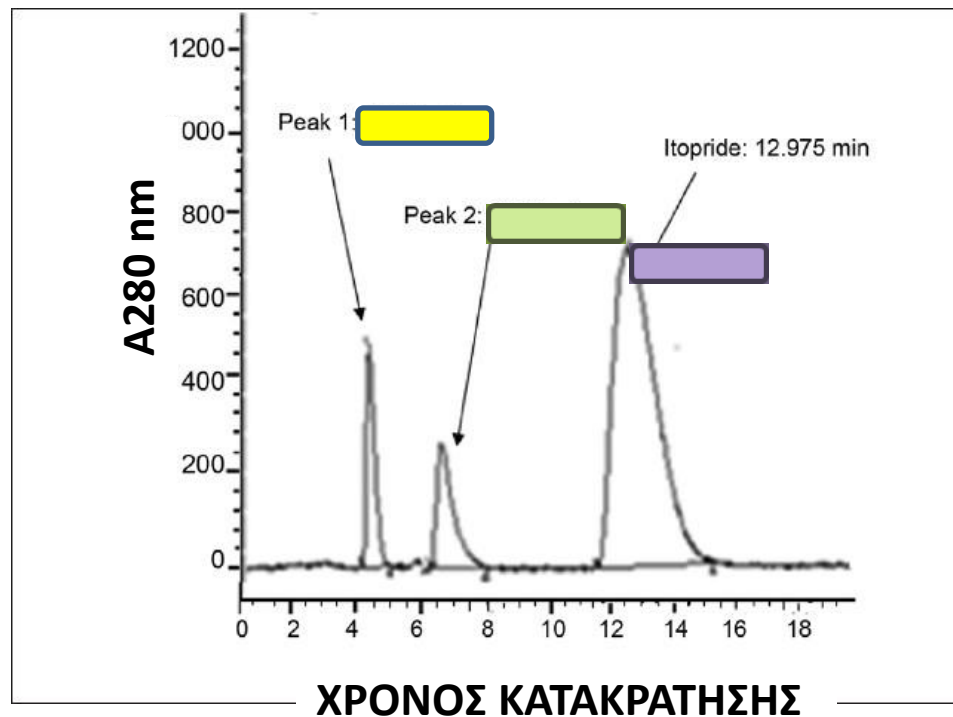
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ

Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός πρωτεϊνών σε κάθε σωλήνα ή/και
Μέτρηση ενζυμικής δραστηκότητας σε κάθε σωλήνα

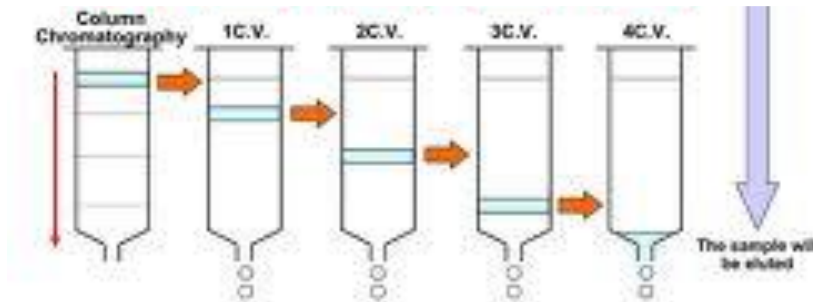
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ

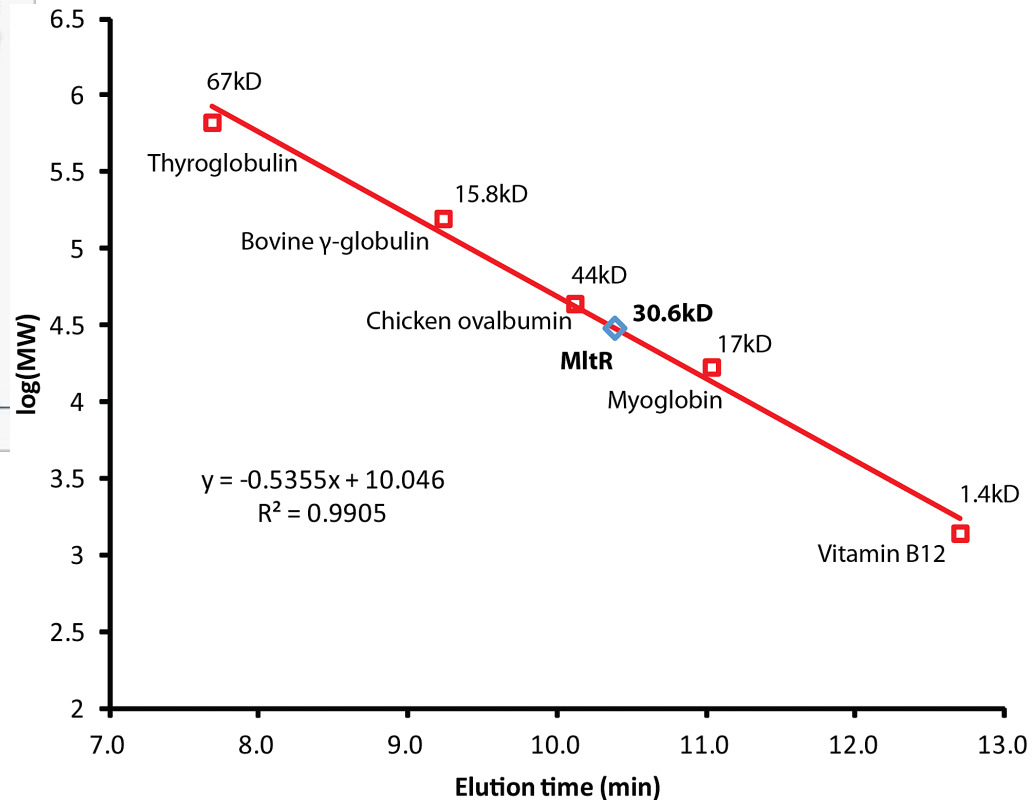
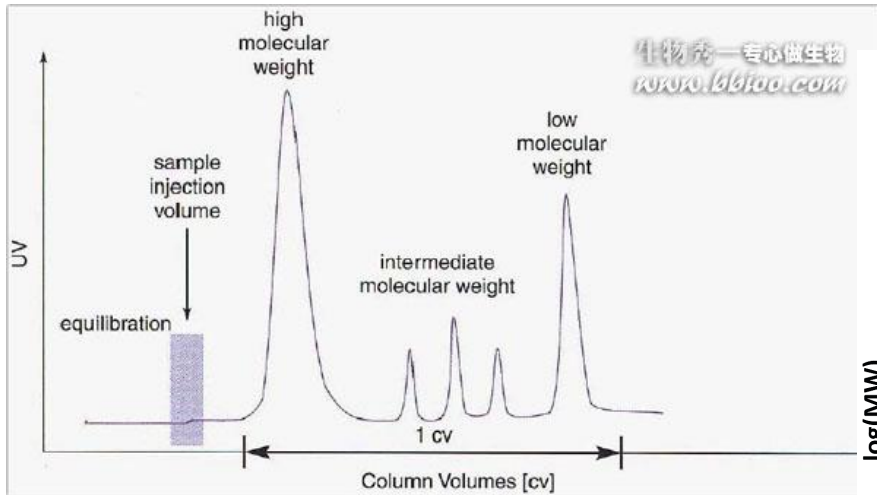
Void volume : Κενός όγκος

Ο όγκος της κινητής φάσης (V_0) σε μία στήλη. Για παράδειγμα αν η στατική φάση καταλαμβάνει το 40% του συνολικού όγκου. Ο κενός όγκος (V_0) πρέπει να είναι το 60% του συνολικού όγκου

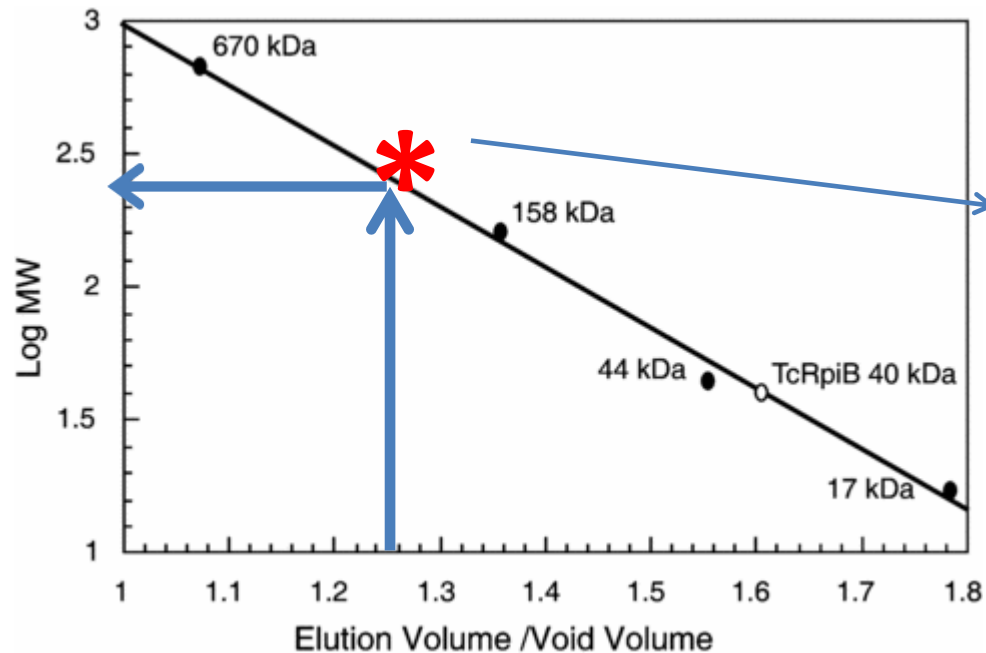


ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ

Δημιουργία **πρότυπης καμπύλης** με καταγραφή του χρόνου ή/και όγκου έκλουσης πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ



Προσδιορισμός
μοριακού βάρους
άγνωστης πρωτεΐνης

Δημιουργία πρότυπης καμπύλης

Μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους χρωματογραφούνται με χρήση χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.

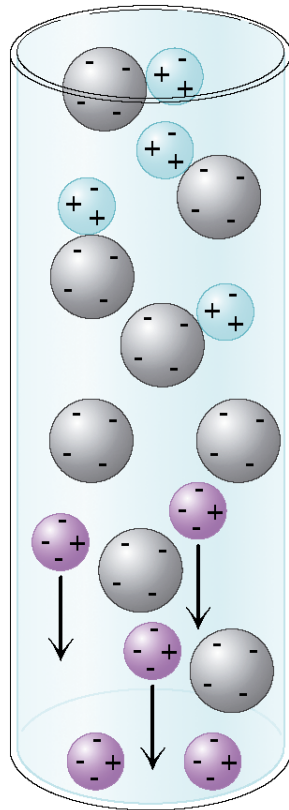
Καταγράφεται ο χρόνος και όγκος έκλουσης

Ο λογάριθμος των μοριακών βαρών είναι ανάλογος του όγκου έκλουσης / τον κενό όγκο.

Προσδιορισμός μοριακού βάρους άγνωστης πρωτεΐνης

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΑΓΗΣ

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΦΟΡΤΙΟ



Μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη δεσμεύεται σε κόκκους με αρνητικό φορτίο

Μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη περνά με απλή ροή

ΕΙΚΟΝΑ 4.4 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.

Με την τεχνική αυτή οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει του καθαρού φορτίου τους.

Θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες προσδένονται σε αρνητικά φορτισμένες ομάδες της στήλης

**Όσο πιο πολλά θετικά φορτία έχουν
Τόσο πιο ισχυρά προσδένονται**

Προσθήκη άλατος σε ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης

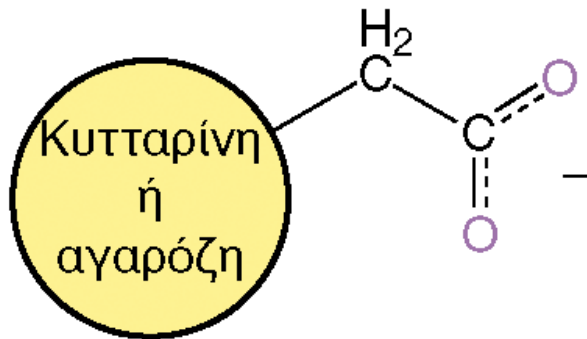


Συναγωνισμός θετικών φορτίων άλατος με τα θετικά φορτία της στήλης

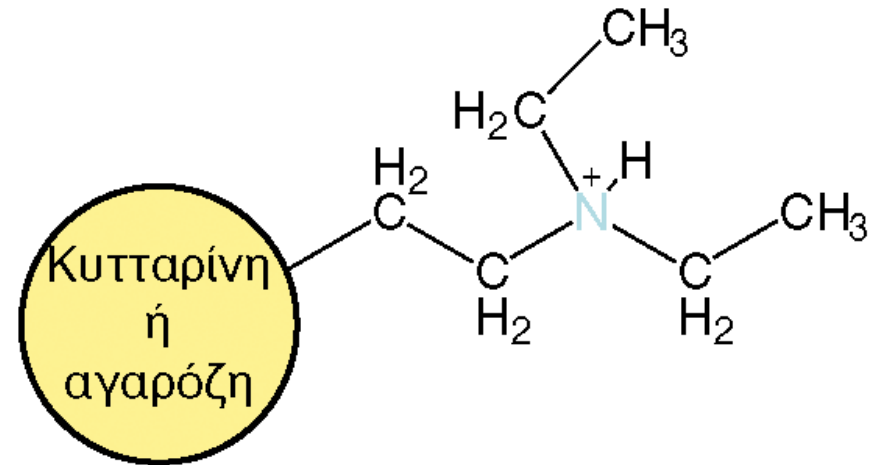


Απομάκρυνση της πρωτεΐνης από τη στήλη και απομόνωσή της

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΑΓΗΣ



**Καρβοξυμεθυλική
(CM) ομάδα
(ιοντισμένη μορφή)**



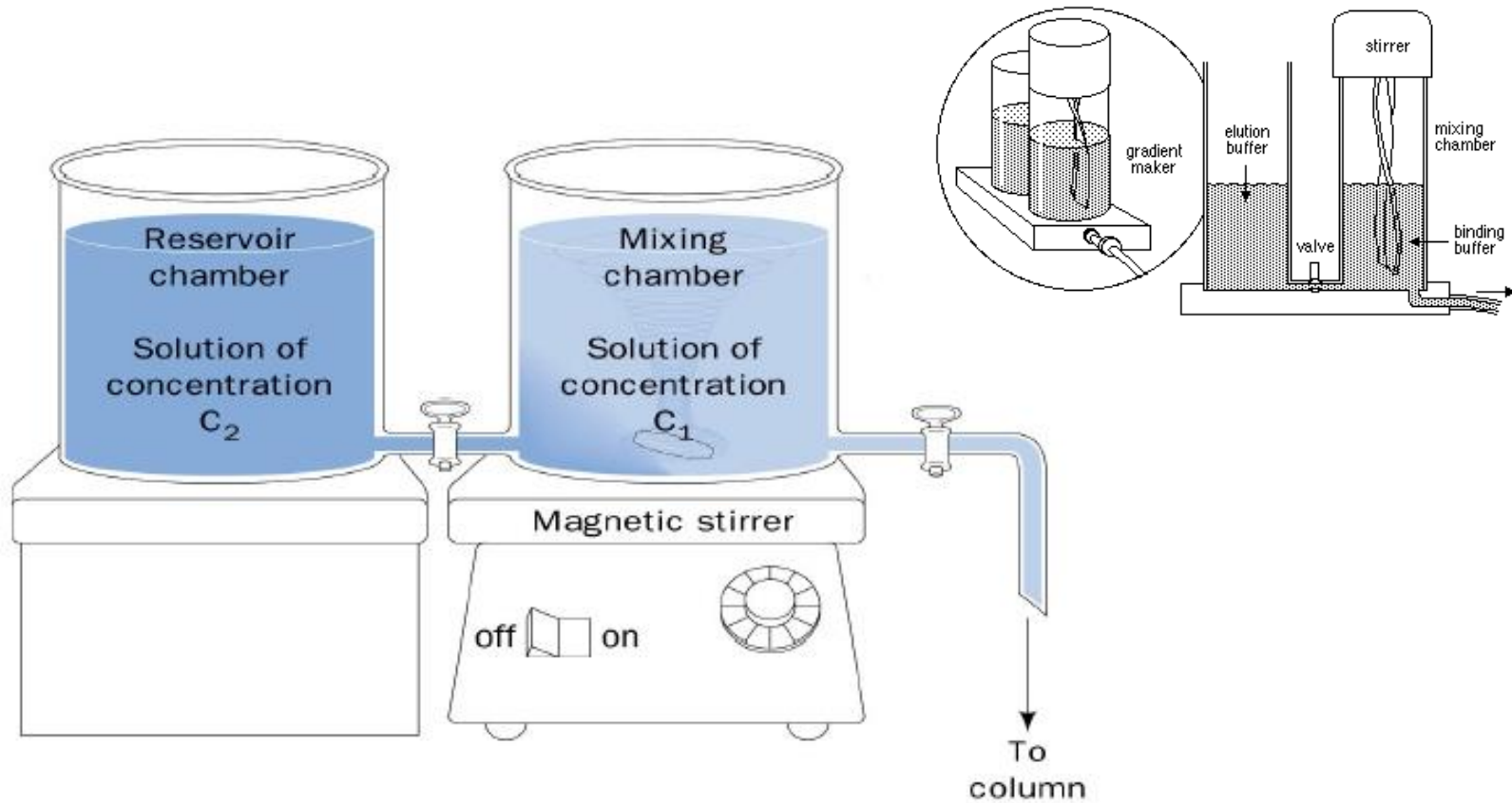
**Διαιθυλο-αμινοαιθυλική
(DEAE) ομάδα
(πρωτονιωμένη μορφή)**

ΚΑΤΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΣΤΗΛΗ

ΑΝΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΣΤΗΛΗ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ

Μηχάνημα δημιουργίας μίγματος γραμμικά αυξανόμενης αλατότητας



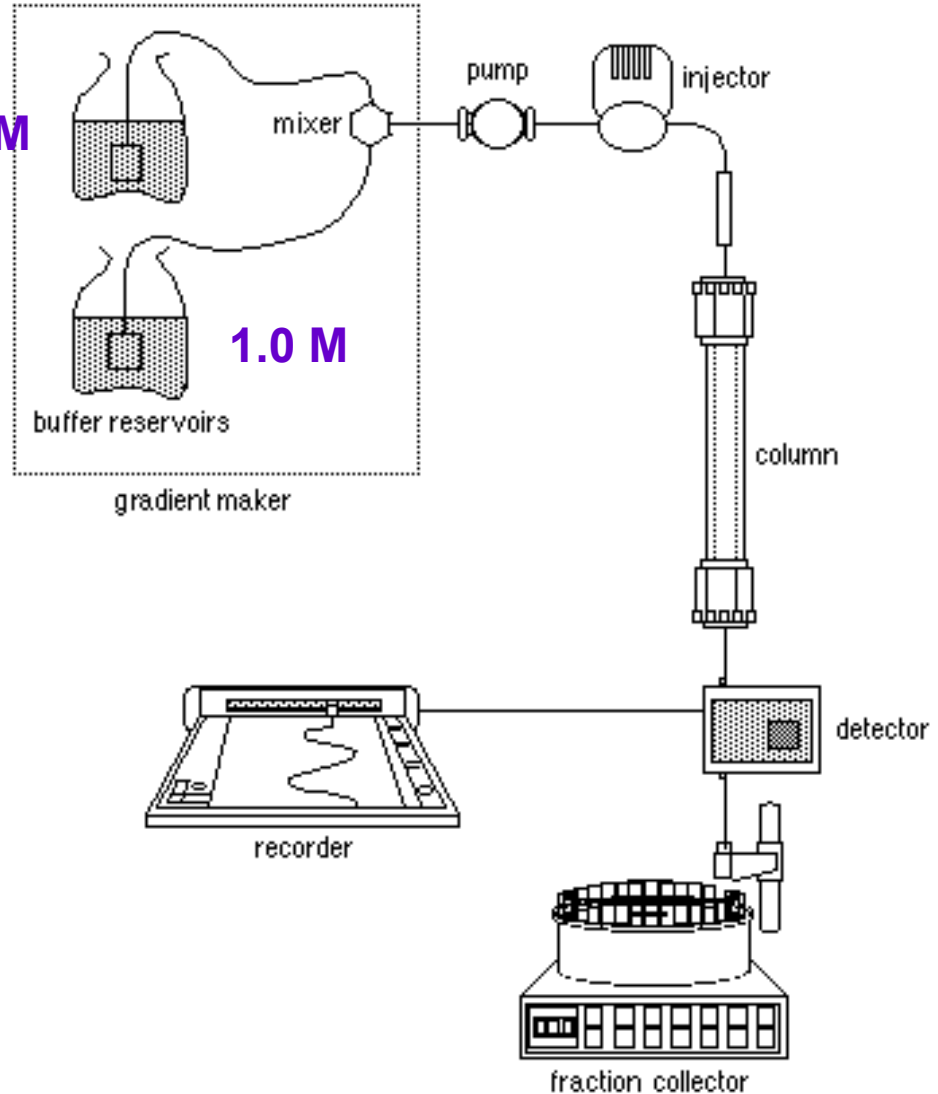
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ

Έκλυση δείγματος με γραμμικά αυξανόμενη αλατότητα

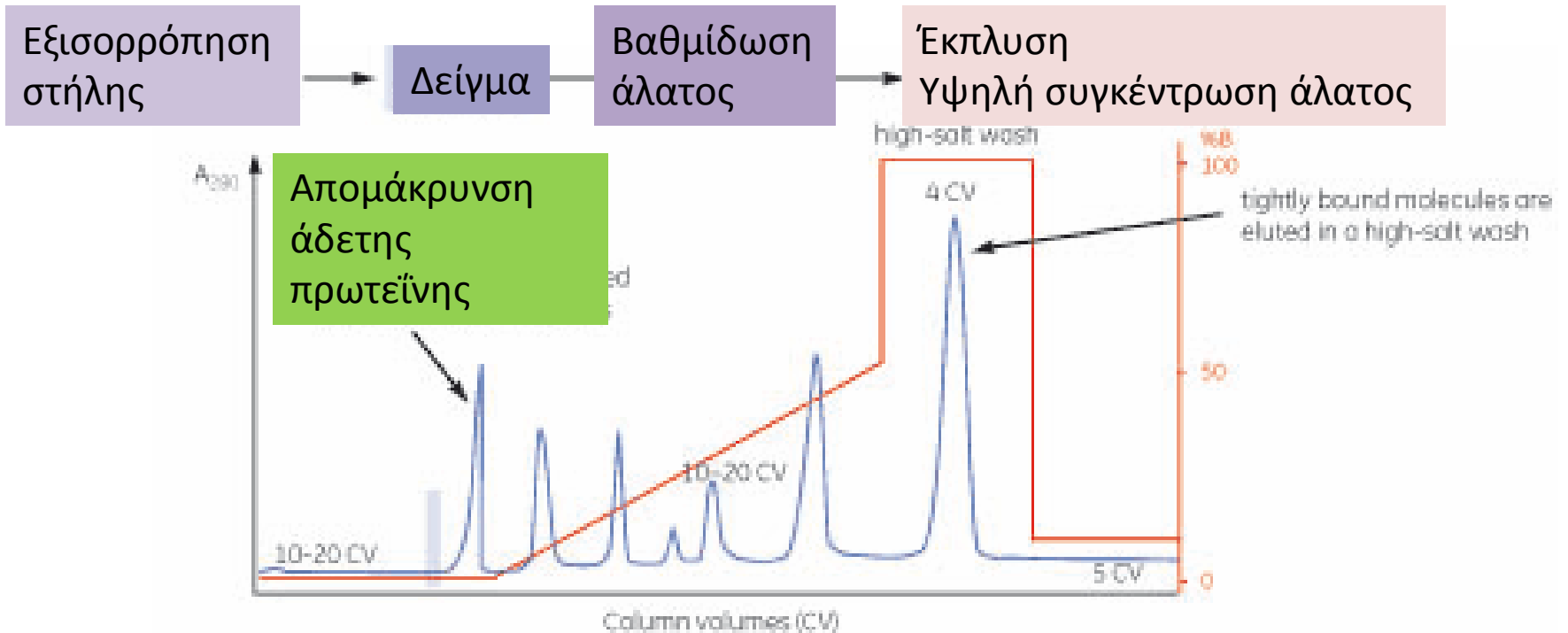
0.0 M



Με χρήση κατάλληλου αναμίκτη



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΓΙΑ ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ

ΑΝΤΙΓΟΝΟ – ΑΝΤΙΣΩΜΑ

ΕΝΖΥΜΟ – ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

ΟΡΜΟΝΗ - ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ

ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ - DNA

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

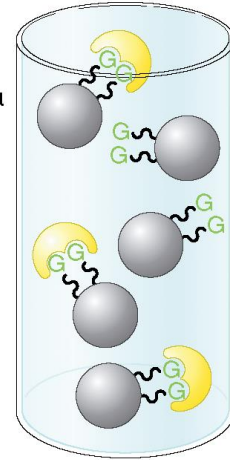
Ομοιοπολική σύνδεση παράγοντα X στη στήλη

Προσθήκη μίγματος πρωτεϊνών στη στήλη

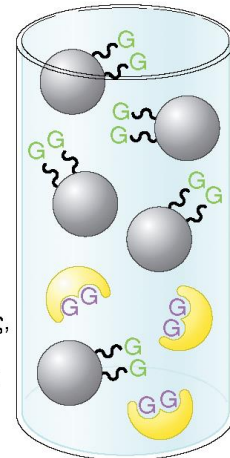
Έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο είναι διαλυμένες οι πρωτεΐνες

Έκλυση της προσδεδεμένης πρωτεΐνης με υψηλή συγκέντρωση διαλυτής μορφής X ή υψηλή συγκέντρωση άλατος

Μια πρωτεΐνη που δεσμεύει γλυκόζη συνδέεται στην ομοιοπολικά συνδεδεμένη γλυκόζη (G) των κόκκων



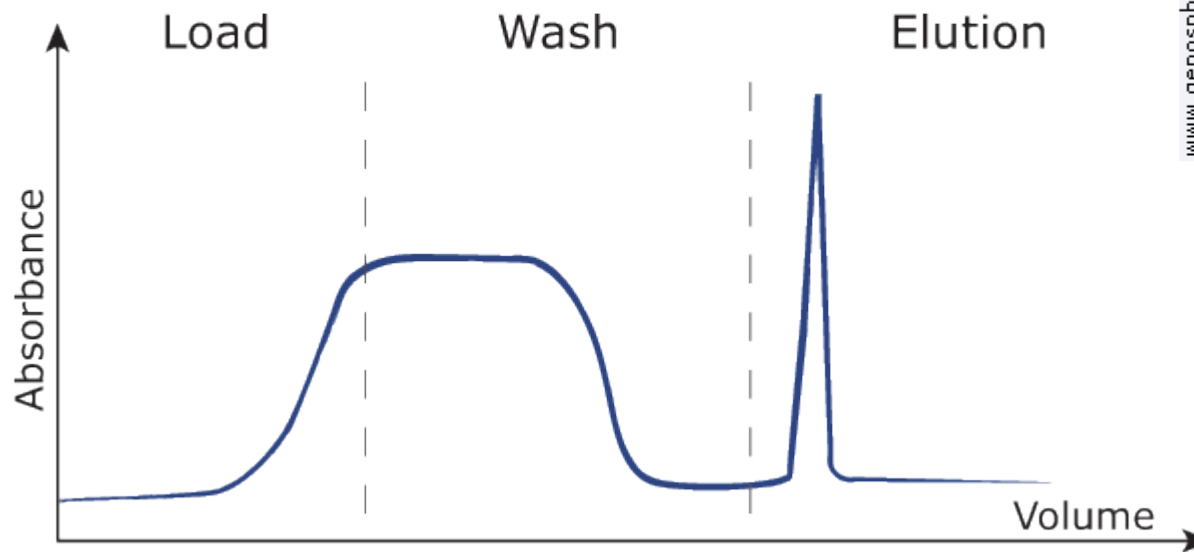
Προσθήκη γλυκόζης (G)



Προσθέτοντας διάλυμα γλυκόζης, η πρωτεΐνη απελευθερώνεται από τη στερεά φάση

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Affinity Chromatography Profile

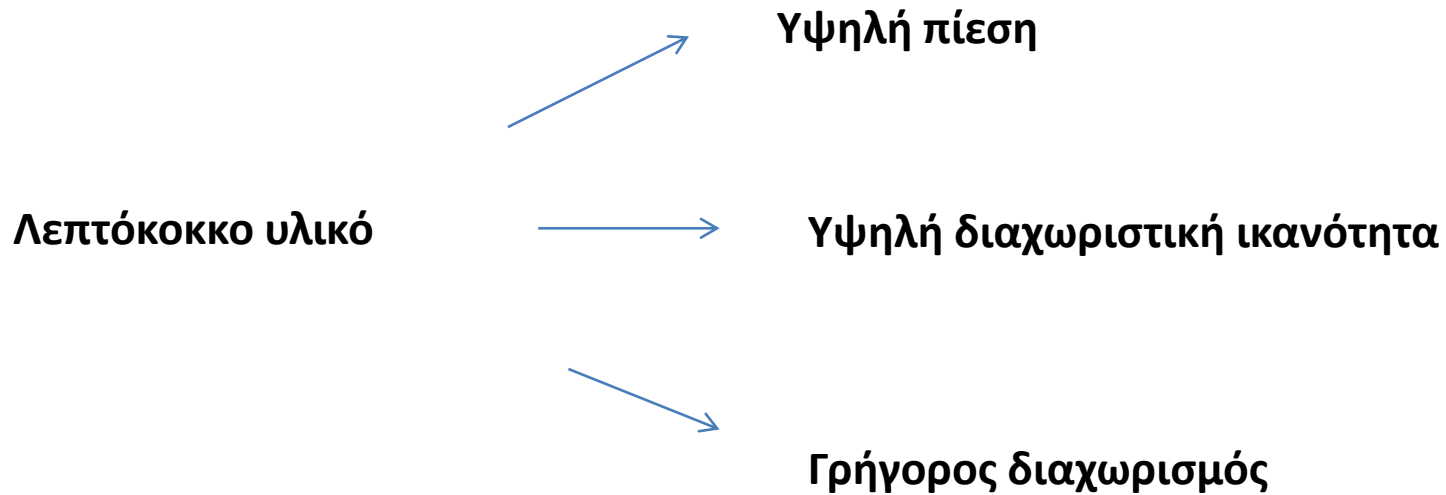


www.genosphere-biotech.com

ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ

High pressure Liquid Chromatography

Χρωματογραφία υψηλής διαχωριστικής ικανότητας
Και υψηλής πίεσης



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΟΥ

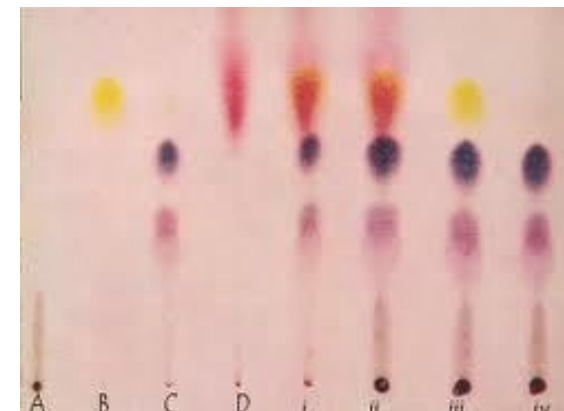
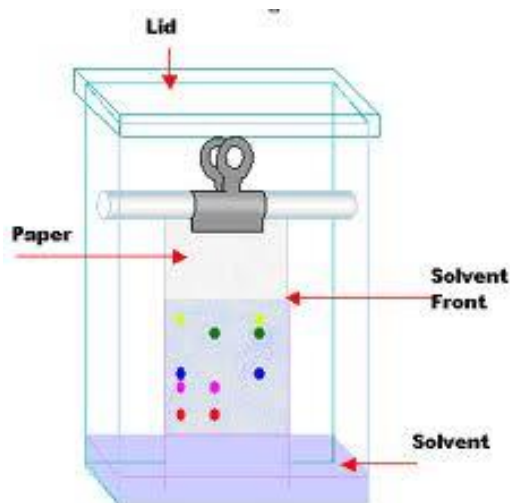
Τοποθέτηση μίας μικρής κηλίδας (σταγόνας) του προς εξέταση δείγματος πάνω σε μία λωρίδα χρωματογραφικού χάρτου κυτταρίνης ή οποία φέρει πολικές ομάδες.

Τοποθέτηση του χάρτου σε ένα δοχείο με μικρή ποσότητα υγρού στη βάση του. Το δοχείο διατηρείται κλειστό κατά την εκτέλεση της χρωματογραφίας.

Καθώς το υγρό ανεβαίνει κατά μήκος του χάρτου συναντά το προς εξέταση δείγμα το οποίο αρχίζει να κινείται μαζί με το υγρό.

Τα μη πολικά συστατικά του δείγματος μετακινούνται πιο γρήγορα.

Τα πολικά μόρια προσδένονται στην κυτταρίνη και δεν μετακινούνται γρήγορα



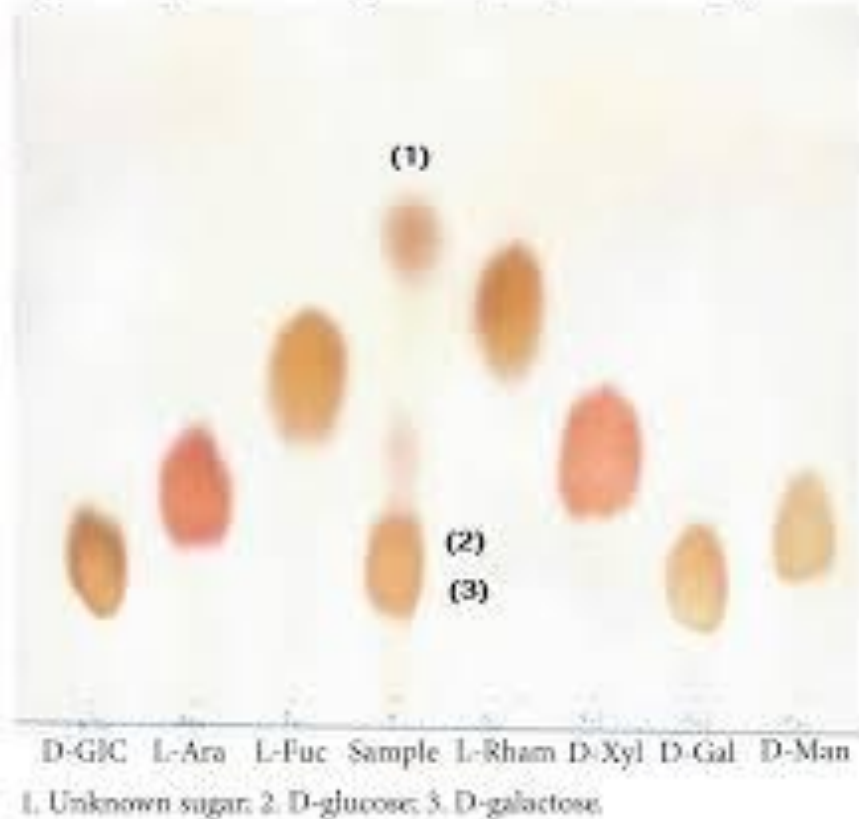
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΟΥ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΧΑΡΤΟΥ

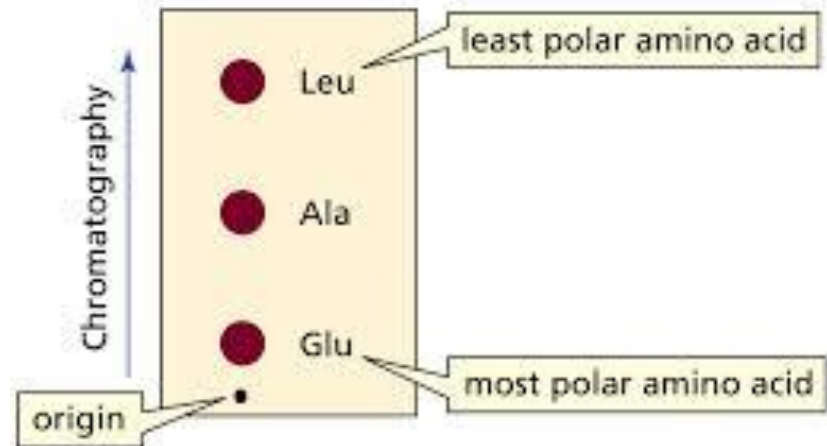


Ποιοτικός χαρακτηρισμός μίγματος υδατανθράκων

Figure S1 : Paper chromatogram of hydrolysate of the polysaccharide.



Διαχωρισμός ταυτοποίηση αμινοξέων



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΟΥ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΧΑΡΤΟΥ

Διαχωρισμός υδατανθράκων



Κινητή φάση: αιθυλ-οξικό: πυριδίνη:νερό (10:4:3)

**Ανίχνευση: 1.νιτρικός άργυρος (1 ml σε 200 ml ακετόνης)
2. 40% NaOH σε μεθανόλη δίνει καφέ κηλίδες**



Διαχωρισμός αμινοξέων

Κινητή φάση: βουτανόλη: οξικό οξύ: νερό (4:1:1)

Ανίχνευση: Ψεκασμός με διάλυμα νινυδρίνης