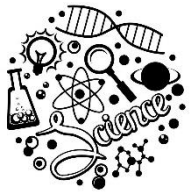
Asal Mahdi Alireza Bita Fatemeh Mahdi Mohammad Sara Fatemeh Amirali	به نام خداوند خورشید و ماه :) TERM 4  KAUMS LABORATORY 1400	نویسنده : سارا صلحی + مهدی زمانی درس : آزمایشگاه بیوشیمی 2 جلسه : 1401/12/21 (3) استاد : دکتر همتی

- **Gel filtration**:

یکی از روش های کروماتوگرافی است که جداسازی مواد در آن براساس اندازه انجام می شود. نام های دیگر این روش عبارت اند از: gel exclusion / molecular sieve. ژل فیلتراسیون یک روش فوق العاده ای است به دو دلیل:

1. جداسازی ذرات درشت(بیش از 100کیلو دالتون) مثل پروتئین ها
2. محیط خشن و تغییرات Ph روی آن تاثیر چندانی ندارد. ؟؟؟؟؟

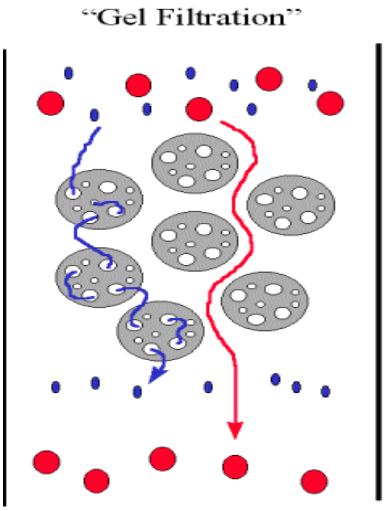
- دو فاز داریم:

1. Mobile phase: نوع آن وابسته به ماده ای است که می خواهیم آن را جداسازی کنیم. مثلا بافر NaCl یک بافر مناسب است. فضای بین بید ها و منفذ موجود در آن را پر می کند.
2. Stationary phase: این فاز ذرات خشکی به نام بید هستند. که آن ها را داخل ستون کروماتوگرافی می ریزیم و سپس آب به آن اضافه می کنیم. خواهیم دید که ذرات متورم شده و تخلخل هایی درون آن ها به وجود می آید. این بید ها از نظر بار الکتریکی خنثی هستند تا تداخل ایجاد نشود.

✂ جداسازی براساس اندازه انجام می شود به طوری که:

ابتدا ذرات درشت سپس ذرات متوسط و در نهایت ذرات کوچک جداسازی و از ستون خارج می شوند.

چرا؟ چون ذرات درشت مسافت کمتری را نسبت به ذرات متوسط و ذرات متوسط نسبت به ذرات کوچک می پیمایند. ذرات درشت از لابلای ذرات بید عبور می کنند و وارد منافذ بید نمی شوند در حالی که ذرات متوسط و ریز وارد منافذ می شوند به طوری که ذرات متوسط وارد منافذ درشت تر و ذرات کوچک وارد منافذ ریز تر میشوند. این ذرات نمی توانند از لابلای بید ها عبور کنند چون در آنجا ذرات درشت حضور دارند، از همین رو این ذرات باید از تمام منافذ موجود در بید ها عبور کنند به خاطر همین مسافت بیشتری را باید طی کنند و به همین دلیل دیر تر خارج می شوند.



- **اندازه ذره با elution رابطه عکس دارد به طوری که هرچه ذره درشت تر باشد میزان مایع شسته شده و خارج شده کمتر است چون سریع تر خارج می شود.**
- **جنس بید:**
  1. **دکستران(عمدتا)**
  2. **اگارز**
  3. **پلی آکریل آمید**

دکستران یک پلی ساکاریدی از مونومر های گلوکز است که براساس پیوند های بین گلوکز ها دارای انواع مختلفی است که یک نوع ان سفادکس می باشد. دکستران برا ی جداسازی پپتید های کوچک(کمتر از 100 کیلو دالتون) کاربرد دارد. پپتید به زنجیره امینواسیدی حامل 10 الی 50 امینواسید را گویند.

- **در دکستران پیوند های عرضی وجود دارد که تعداد این پیوند ها میزان تخلخل بید را مشخص میکند. که هرچه پیوند های عرضی بیشتر باشد میزان تخلخل کمتر است.؟؟؟؟؟**
- **در کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون جداسازی برا ساس اندازه انجام می شود که این موضوع به دلیل وجود منافذ در ساختار بید می باشد که این منافذ در سایز های مختلف می باشد از خیلی کوچک تا بزرگ.**
- **به طورکلی هرچه ذرات ژل درشت تر باشد سرعت حرکت فاز متحرک بیشتر خواهد بود که این موضوع سبب افزایش elution و کاهش resolution می شود. پس سرعت حرکت محلول ما با elution رابطه مستقیم و با resolution رابطه عکس دارد. ما زمانی که تایم برایمان مهم است و دقت و جداسازی جز به جز مهم نیست و تنها می خواهیم ذرات درشت را از ذرات ریز جداسازی کنیم از ذرات بید درشت استفاده می کنیم.**
- **هرچه ذرات بید ریزتر باشند:**
  I. Resolution بیشتر
  II. زمان بیشتر
- **مزیت های روش ژل فیلتراسیون:**
  I. **بهترین روش برای جداسازی ذرات براساس وزن مولکولی**
  II. **تحت تاثیر دما، ph، قدرت یونی، اجزای بافر نیست.**

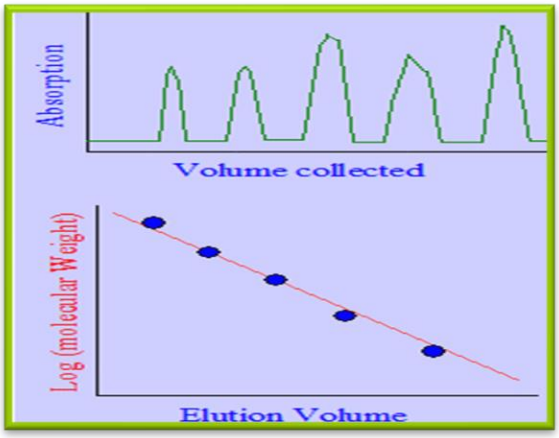
III. انتشار ناحیه ای کمتر نسبت به تکنیک های دیگر

IV. روشی برای جداسازی پروتئین ها است که در ان نیاز به شکستن پیوند ها در پروتئین ها نمی باشد و خطر از دست رفتن پروتئین ها کاهش می یابد.

- **تعیین وزن مولکولی یک ماده به وسیله ژل فیلتراسیون:**

برای انجام این کار نیاز به چندین پروتئین با وزن مولکولی مشخص داریم. محلول حاوی پروتئین های معلوم را در ستون کروماتوگرافی می ریزیم و حجم elution آن ها را ثبت می کنیم. سپس یک نمودار رسم می کنیم که محور عمود آن مربوط به وزن مولکولی و محور افق ان مربوط به حجمelution است. سپس پروتئین مجهول را اضافه می کنیم و حجم الوشن خارج شده را ثبت می کنیم و روی نمودار می بریم و وزن ولکولی ان را محاسبه می کنیم.

همچنین در این روش می توان به غلظت ماده مورد نظر در اسپکتروفتومتر پی برد.



- **نکات مربوط به ژل فیلتراسیون:**

I. ژل باید یک دست یا هموجنوس باشد.

II. در ژل نباید حباب وجود داشته باشد چون در حرکت ذرات تداخل ایجاد می کند.

III. عدم وجود ترک خوردگی در ژل

IV. عدم وجود فضا بین دیواره داخلی ستون و ژل

V. قسمت بالای ژل همیشه باید با بافر مرطوب باشد و نباید اجازه به خشک شدن آن داد چون سبب ایجاد ترک می شود.

- **حجم ها:**

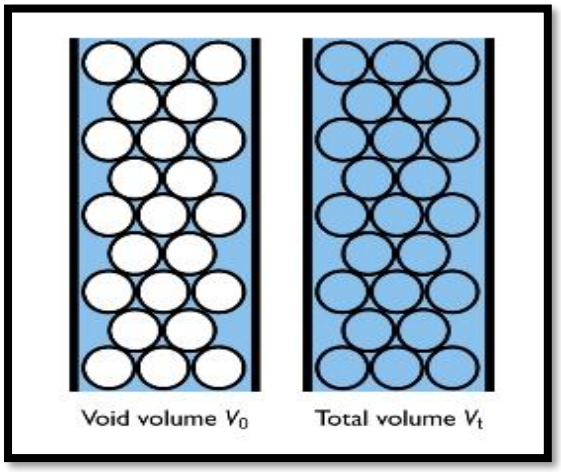
I. **Void volume(v_0)**:

a) **حجم ذرات بید – حجم کل ستون**

b) **حجم *elute* اولین ذره خارج شده**

II. **Total volume(v_t)**: حجم کل ستون

III. **Elution volume(v_e)**: حجم محلول خارج شده که برای هر آنالیت متفاوت است.



- **کاربرد های ژل فیلتراسیون:**

I. **تعیین وزن مولکولی ماده مجهول**

II. **جداسازی ماکرومولکول ها**

III. **تخلیص پروتئین ها ****

- **عوامل موثر در جداسازی ذرات در روش ژل فیلتراسیون:**

I. **اندازه ذرات ژل**

II. **طول ستون: هرچه طول ستون بیشتر باشد جداسازی بیشتر اتفاق می افتد.**

- **برای انجام یک جداسازی خوب با رزولوشن بالا باید طول ستون را افزایش دهیم و ذرات بیدمان را کوچک انتخاب کنیم تا سرعت حرکت آنالیتمان به حداقل برسد.**

پایان.....^_^