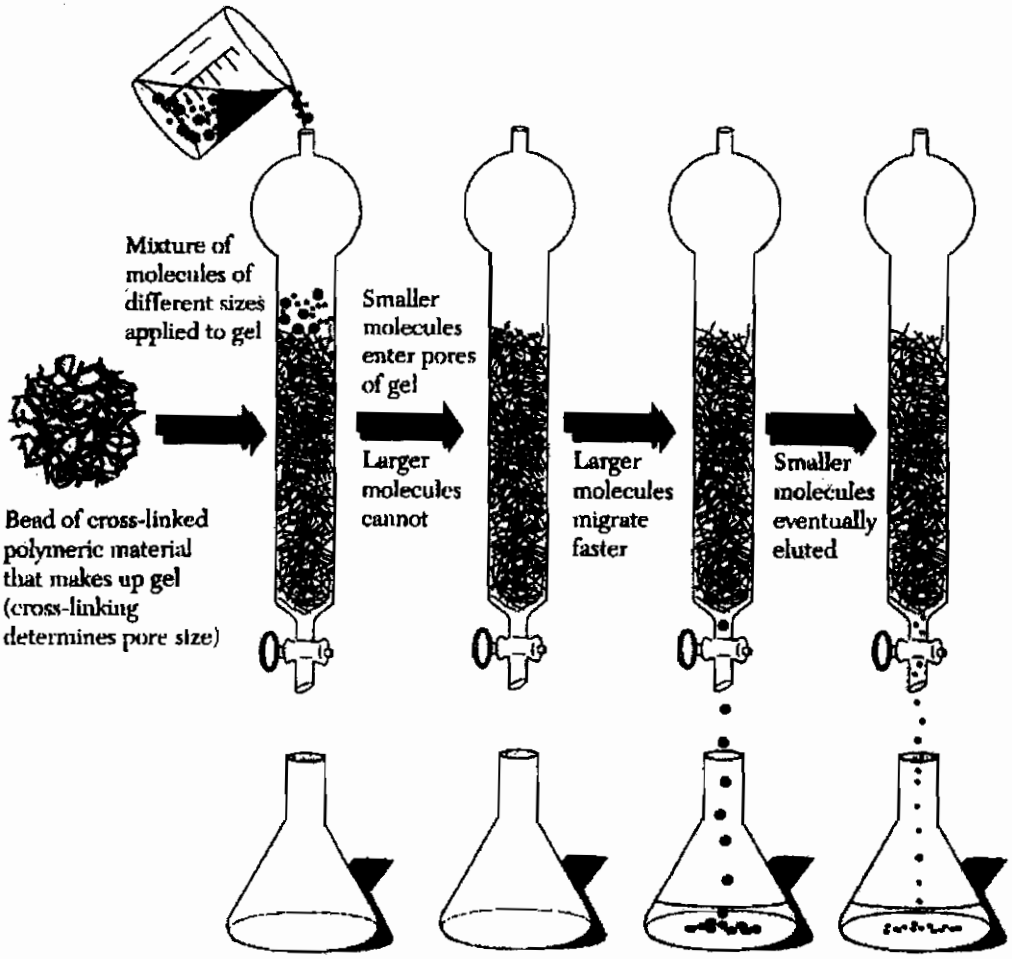
5 โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน

- บทนำ
- ประโยชน์ของโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน
- ประเภทของเจล
- ขั้นตอนการทำโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน
- วิธีหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน

บทนำ

โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน (gel filtration chromatography) หรือเรียกในชื่ออื่นได้อีกหลายชื่อ คือโครมาโทรกราฟีแบบเจลเพอมิเอชัน (gel permeation chromatography) โครมาโทกราฟีแบบโมเลกุลาร์ซีฟ (molecular sieve chromatography) และโครมาโทกราฟีแบบเจลเอ็กซ์คลูชัน (gel exclusion chromatography) เป็นต้น โครมาโทกราฟีชนิดนี้เป็นระบบคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล ส่วนคงที่ของระบบ (stationary phase) คือน้ำที่ถูกอุ้มอยู่ในเนื้อเจล ซึ่งเจลนี้จะบรรจุลงในคอลัมน์ ในขณะที่ส่วนเคลื่อนที่ของระบบ (mobile phase) คือน้ำหรือบัฟเฟอร์ที่ไหลผ่านคอลัมน์ เจลที่ใช้เป็นสารพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำแต่ดูดซับน้ำได้ดี เจลมีรูปร่างทรงกลม โครงสร้างของเจลมีการเชื่อมโยงกันเป็นร่างแห เกิดเป็นเม็ดเจลที่มีรูพรุน (porous gel bead) เมื่อผ่านสารที่มีรูปร่างเหมือนกันลงสู่คอลัมน์ที่บรรจุเจลไว้ โมเลกุลของสารจะแยกตัวอยู่ในส่วนทั้งสองของระบบโดยอาศัยความแตกต่างของขนาด ดังรูปที่ 5.1 สารที่มีขนาดใหญ่กว่า



รูปที่ 5.1 การทำโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน

รูพรุนของเจลไม่สามารถผ่านเข้าไปในรูพรุนของเจลได้ จึงละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ที่อยู่ระหว่างเจล และเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็ว ส่วนสารที่มีขนาดเล็กกว่ารูพรุนของเจลสามารถผ่านเข้าสู่รูพรุนของเจลได้ ทำให้มีระยะทางในการเคลื่อนที่มากกว่า จึงออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่า ถ้าเลือกชนิดของเจลให้เหมาะสมกับขนาดของสารที่ต้องการแยก สามารถแยกสารที่มีขนาดต่างๆ กันออกจากกันได้ เนื่องจากความกว้างของรูพรุนของเจลแต่ละชนิดนั้นมีความหลากหลาย สารที่มีขนาดเล็กที่สุดจะมีโอกาสผ่านรูพรุนได้ดีที่สุด ในขณะที่สารที่มีขนาดใหญ่กว่าอาจเข้าสู่รูพรุนของเจลบางตำแหน่งไม่ได้ และสารที่มีขนาดใหญ่มากไม่สามารถเข้าสู่รูพรุนใดๆ ของเจลได้ ดังนั้นสารจึงเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์เรียงลำดับตามขนาดโมเลกุล

สารชีวโมเลกุลที่แยกโดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน ได้แก่ โปรตีน เอนไซม์ ฮอร์โมน แอนติบอดี้ กรดนิวคลีอิก และพอลิแซคคาไรด์ เป็นต้น สามารถแยกสารเพื่อวิเคราะห์โดยตรง หรือเป็นการเตรียมสารเพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนอื่นต่อไป ข้อดีของการแยกโดยวิธีนี้คือ เจลมีคุณสมบัติเฉื่อยและไม่มีประจุ จึงไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการแยกหรือวิเคราะห์ เหมาะกับการแยกสารที่เสียสภาพได้ง่าย ให้ผลการแยกที่ดีและเหมือนกันเมื่อทำการทดลองซ้ำ (reproducibility) มีการสูญเสียสารน้อย ใช้เวลาในการแยกต่ำ อุปกรณ์ราคาค่อนข้างถูก และเจลสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง

ประโยชน์ของโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน

1. การเตรียมสารชีวโมเลกุลให้บริสุทธิ์ขึ้น (purification) โดยใช้เจลที่เหมาะสมในการแยกสารที่มีขนาดแตกต่างกัน เช่น การแยกโอลิโกนิวคลีโอไทด์ออกจากดีเอ็นเอ หรือการแยกกรดอะมิโนออกจากโปรตีน เป็นต้น

2. การหาน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight determination) เช่น การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล

3. การทำให้สารเข้มข้นขึ้น (concentration) เช่น การทำให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมีความเข้มข้นมากขึ้น วิธีทำคือ นำเจลที่มีรูพรุนขนาดเล็ก เช่น Sephadex G-25 (เกรดหยาบ) ใส่ลงในสารละลาย แช่ไว้ประมาณ 10 นาที น้ำและสารที่มีขนาดเล็กจะถูกดูดซับไว้ในเนื้อเจล ในขณะที่สารที่มีขนาดใหญ่จะละลายอยู่ในสารละลาย สามารถแยกสารที่ต้องการโดยการนำไปเซนตริฟิวจ์เพื่อแยกเอาเจลออก

4. การกำจัดเกลือ (desalting) หรือสารปนเปื้อนที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น การกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ออกจากโปรตีน ภายหลังการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และต้องการแยกเกลือที่ปะปนมากับตะกอนโปรตีนออก ทำได้โดยละลายตะกอนโปรตีนในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ใส่สารละลายนี้ลงสู่คอลัมน์ที่บรรจุเจลที่มีรูพรุนขนาดเล็กกว่าโมเลกุลของโปรตีน เช่น Sephadex G-25 (เกรดกลาง), Bio-Gel P-6 หรือ Sephacryl S-100 HR เป็นต้น เมื่อชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ จึงเก็บสารละลายโปรตีนที่ไหลออกจากคอลัมน์ก่อนที่สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตจะไหลออกมา

ประเภทของเจล

เจลที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการทำโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชันมีหลายประเภท ทั้งนี้เพื่อให้เหมาะสมกับลักษณะโมเลกุลของสารที่ต้องการแยก โดยมีขนาดของรูพรุน ความถี่ของรูพรุน รวมทั้งความแข็งแรงของเจลแตกต่างกันไป สารที่ใช้ผลิตเจลได้แก่ สารพอลิเมอร์ประเภทต่างๆ ได้แก่ เด็กซ์แทรน (dextran) พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) หรืออะกาโรส (agarose) เป็นต้น ชื่อที่ใช้เรียกเจลแต่ละประเภทมักเรียกตามชื่อทางการค้าของบริษัทผู้ผลิต ประเภทของเจลมีดังนี้

1. เด็กซ์แทรน

เด็กซ์แทรนเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ของกลูโคส (D-glucose) กลูโคสแต่ละหน่วยต่อกันด้วยพันธะ α (1→6) และบางหน่วยเชื่อมโยง (cross–linking) กันด้วยพันธะ α (1→3) ที่ glycerol group จากการใส่สาร epichlorohydrin อัตราการเชื่อมโยงทำให้เจลมีขนาดของรูพรุน

แตกต่างกันไป ถ้าอัตราการเชื่อมโยงสูงเจลจะมีรูพรุนขนาดเล็ก ดังนั้นเจลแต่ละชนิดจึงแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงต่างๆ กัน ชื่อทางการค้าของเด็กซ์แทรนคือ Sephadex โดยแบ่ง Sephadex ตาม G-type เป็น 8 ชนิด คือ G-10, G-15, G-25, G-50, G-75, G-100, G-150 และ G-200 ดังตารางที่ 5.1 เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่าง Sephadex G-10 กับ Sephadex G-200 นั้น Sephadex G-10 มีอัตราการเชื่อมโยงเป็นร่างแหสูง ทำให้เจลมีรูพรุนขนาดเล็ก มีความแข็งแรงมาก ให้อัตราการไหล (flow rate) ของสารละลายออกจากคอลัมน์สูง ในขณะที่ Sephadex G-200 มีอัตราการเชื่อมโยงเป็นร่างแหต่ำ ทำให้เจลมีรูพรุนขนาดใหญ่ มีความแข็งแรงน้อย ให้อัตราการไหลของสารละลายออกจากคอลัมน์ต่ำ การเลือกใช้ Sephadex G ชนิดใดขึ้นอยู่กับขนาดของสารที่ต้องการแยก ดังตารางที่ 5.1 ซึ่งแสดงช่วงของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เจลสามารถแยกได้ (fractionation range for proteins) ถ้าในสารละลายประกอบด้วยโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 120,000 ผสมกันอยู่ เมื่อใช้ Sephadex G-150 จะให้ผลการแยกที่ดี ถ้าใช้ Sephadex G-100 จะทำให้สารออกมาพร้อมหรือใกล้เคียงกัน และออกมาใกล้เคียงกับสารที่ใช้หา void volume (V_0) เช่น บลูเด็กซ์แทรน ในขณะที่ใช้ Sephadex G-200 ให้อัตราการไหลของสารละลายออกจากคอลัมน์ช้า ทำให้เสียเวลาในการแยกมาก

Sephadex มีการผลิตให้มีคุณภาพแตกต่างกัน โดยมีความแตกต่างกันที่ขนาดหรือเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจล สามารถแบ่งออกเป็นเกรดได้ 4 ระดับ จากเม็ดเจลขนาดใหญ่มาเล็กดังนี้ เกรดหยาบ (coarse), เกรดกลาง (medium), เกรดละเอียด (fine) และเกรดละเอียดมาก (superfine) ดังตารางที่ 5.2 ทั้งนี้การเลือกใช้เกรดใดนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงานที่ทำ เม็ดเจลขนาดเล็กจะให้ผลการแยกที่ดีกว่าเม็ดเจลขนาดใหญ่ เนื่องจากมีพื้นที่ผิวเจลต่อปริมาตรมากกว่า เกรดหยาบและเกรดกลางเหมาะสำหรับงานเตรียมสารให้บริสุทธิ์ขึ้น ให้อัตราการไหลที่เร็ว เกรดละเอียดใช้เตรียมสารซึ่งใช้กับคอลัมน์ค่อนข้างใหญ่ เกรดละเอียดมากเหมาะสำหรับงานวิเคราะห์ เช่น การหาน้ำหนักโมเลกุล เนื่องจากให้ผลการแยกที่ดีที่สุด แต่จะเสียเวลามากเนื่องจากอัตราการไหลช้า

ตารางที่ 5.1 ชนิดและคุณสมบัติของเจลที่ใช้ในการทำโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน

Name	Fractionation Range for Proteins (Daltons)	Water Regain (ml/g dry gel)	Bed Volume (ml/g dry gel)
Dextran (Sephadex)			
Sephadex G–10	0–700	1.0 ± 0.1	2–3
Sephadex G–15	0–1,500	1.5 ± 0.2	2.5–3.5
Sephadex G–25	1,000–5,000	2.5 ± 0.2	4–6
Sephadex G–50	1,500–30,000	5.0 ± 0.3	9–11
Sephadex G–75	3,000–80,000	7.5 ± 0.5	12–15
Sephadex G–100	4,000–150,000	10 ± 1.0	15–20
Sephadex G–150	5,000–300,000	15 ± 1.5	20–30
Sephadex G–200	5,000–600,000	20 ± 2.0	30–40
Polyacrylamide (Bio–Gels)			
Bio–Gels P–2	100–1,800	1.5	3.0
Bio–Gels P–4	800–4,000	2.4	4.8
Bio–Gels P–6	1,000–6,000	3.7	7.4
Bio–Gels P–10	1,500–20,000	4.5	9.0
Bio–Gels P–30	2,500–40,000	5.7	11.4
Bio–Gels P–60	3,000–60,000	7.2	14.4
Bio–Gels P–100	5,000–100,000	7.5	15.0
Bio–Gels P–150	15,000–150,000	9.2	18.4
Bio–Gels P–200	30,000–200,000	14.7	29.4
Bio–Gels P–300	60,000–400,000	18.0	36.0

ตารางที่ 5.1 (ต่อ) ชนิดและคุณสมบัติของเจลที่ใช้ในการทำโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน

Name	Fractionation Range for Proteins (Daltons)	Water Regain (ml/g dry gel)	Bed Volume (ml/g dry gel)
Agarose			
Sepharose 6B	10,000–4,000,000	–	–
Sepharose 4B	60,000–20,000,000	–	–
Sepharose 2B	70,000–40,000,000	–	–
Superose 12 HR	1,000–300,000	–	–
Superose 6 HR	5,000–5,000,000	–	–
Bio–Gel A–0.5	10,000–500,000	–	–
Bio–Gel A–1.5	10,000–1,500,000	–	–
Bio–Gel A–5	10,000–5,000,000	–	–
Bio–Gel A–15	40,000–15,000,000	–	–
Bio–Gel A–50	100,000–50,000,000	–	–
Bio–Gel A–150	1,000,000-150,000,000	–	–
Dextran-polyacrylamide (Sephacryl)			
Sephacryl S–100 HR	–	–	–
Sephacryl S–200 HR	5,000–250,000	–	–
Sephacryl S–300 HR	10,000–1,500,000	–	–
Sephacryl S–400 HR	20,000–8,000,000	–	–
Agarose–polyacrylamide (Ultragel)			
Ultragel AcA 54	6,000–70,000	–	–
Ultragel AcA 44	12,000–130,000	–	–
Ultragel AcA 34	20,000–400,000	–	–

ตารางที่ 5.2 การแบ่งเกรดของ Sephadex

Sephadex	Grade	Dry Bead Diameter (μm)	Fractionation Range for Proteins (Dalton)
G-10		40 – 120	0 – 700
G-15		40 – 120	0 – 1,500
G-25	Coarse	100 – 300	1,000 – 5,000
	Medium	50 – 150	
	Fine	20 – 80	
	Superfine	10 – 40	
G-50	Coarse	100 – 300	1,500 – 30,000
	Medium	50 – 150	
	Fine	20 – 80	
	Superfine	10 – 40	
G-75		40 – 120	3,000 – 80,000
	Superfine	10 – 40	3,000 – 70,000
G-100		40 – 120	4,000 – 150,000
	Superfine	10 – 40	4,000 – 100,000
G-150		40 – 120	5,000 – 300,000
	Superfine	10 – 40	5,000 – 150,000
G-200		40 – 120	5,000 – 600,000
	Superfine	10 – 40	5,000 – 250,000

Sephadex ที่จำหน่ายจะอยู่ในรูปผงที่แห้ง เมื่อใช้ต้องนำมาทำให้เป็นเจลที่พองน้ำหรือบัฟเฟอร์ ซึ่งน้ำหรือบัฟเฟอร์จะเข้าไปอยู่ในรูพรุนของเจล เจลที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ใช้เวลาในการแช่เจลให้อุ้มน้ำหรือบัฟเฟอร์จนเต็มที่ มากกว่าเจลที่มีรูพรุนขนาดเล็ก Sephadex ไม่ค่อยทนความร้อน ถ้าให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 °C เจลจะไหม้ เนื่องจากเจลเป็นสารประกอบประเภทพอลิแซคคาไรด์ Sephadex ไม่สามารถแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 600,000

2. พอลิอะคริลาไมด์

พอลิอะคริลาไมด์ที่เตรียมสำหรับโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชันมีชื่อทางการค้าว่า Bio–Gel P มีขนาดรูพรุนกว้างกว่า Sephadex สามารถแยกโปรตีนที่มีขนาด 3,000–400,000

3. อะกาโรส

อะกาโรสซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาล D–galactose และ 3,6–anhydro–L–galactose ชื่อทางการค้าของอะกาโรสเจลคือ Sepharose, Superose และ Bio-gel A ซึ่งมีขนาดของรูพรุนใหญ่กว่า Sephadex ใช้ในการแยกโปรตีนที่มีขนาดใหญ่หรือดีเอ็นเอ ชนิดของ Sepharose แสดงดังตารางที่ 5.1 นอกจากนี้ยังมีการผลิต Sepharose CL ซึ่งเป็น cross-linked Sepharose เตรียมได้จากปฏิกิริยากับ 2,3–dibromopropanol ในสภาวะด่างแก่ Sepharose CL เป็นเจลที่มีความแข็งแรงและความคงตัวสูง ทนความร้อนและสารเคมีได้ดี

4. เด็กซ์แทรนผสมพอลิอะคริลาไมด์

สารประกอบพอลิเมอร์ที่ผสมกันระหว่างเด็กซ์แทรนและพอลิอะคริลาไมด์ มีชื่อทางการค้าคือ Sephacryl เตรียมจากการทำให้เกิดร่างแห (cross–linked) ของ allyl dextran กับ N,N′–methylene bisacrylamide เจลมีขนาดรูพรุนตามต้องการ มีประสิทธิภาพในการแยกสูง มีความแข็งแรงและเสถียร ใช้แยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 8,000,000

5. อะกาโรสผสมพอลิอะคริลาไมด์

สารประกอบพอลิเมอร์ผสมของอะกาโรสและพอลิอะคริลาไมด์ ซึ่งผลิตขึ้นเพื่อให้เหมาะสมกับการแยกโปรตีน มีความแข็งแรงสูง เนื่องจากอะกาโรสช่วยเพิ่มความแข็งแรงและความเสถียรให้กับเจล ชื่อทางการค้าคือ Ultragel

ขั้นตอนการทำโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน

1. ทำให้เจลอิ่มตัวด้วยน้ำหรือบัฟเฟอร์ สารพอลิเมอร์ประเภทเด็กซ์แทรนหรือพอลิอะคริลาไมด์ที่อยู่ในรูปผงที่แห้ง ก่อนนำมาใช้ต้องทำให้อิ่มตัวด้วยน้ำหรือบัฟเฟอร์ โดยนำเจลมาแช่ไว้ในน้ำหรือบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิห้องระยะเวลาหนึ่งตามชนิดของเจล Sephadex G-25 ใช้เวลาแช่เจลประมาณ 3–4 ชั่วโมง สำหรับ Sephadex G-200 และ Bio-Gel P-300 ใช้เวลาแช่เจลประมาณ 72 ชั่วโมง อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะช่วยลดเวลาในการแช่เจลลง เช่น นำเจลไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C ส่วนเจลประเภทอะกาโรส หรือพอลิอะคริลาไมด์ผสมอะกาโรส เป็นเจลที่อยู่ในรูปที่อุ้มน้ำอยู่แล้วจึงสามารถนำมาใช้ได้ทันที

2. ขจัดเศษเจลและอากาศ เศษเจลคือเม็ดเจลที่แตกเป็นชิ้นเล็กๆ เศษเจลนี้จะทำให้อัตราการไหลของน้ำหรือบัฟเฟอร์ที่ชะคอลัมน์ช้าลง วิธีขจัดเศษเจลทิ้งคือนำเจลใส่กระบอกตวงเติมน้ำหรือบัฟเฟอร์สองเท่าของปริมาตรเจล ผสมให้เข้ากัน เมื่อเจลตกลงสู่ด้านล่างประมาณ 90-95% ให้เทส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง ส่วนอากาศสามารถขจัดออกโดยนำเจลไปเข้าเครื่องดูดอากาศ เช่น ใช้ water suction เวลาประมาณ 1 - 2 ชั่วโมง

3. ใส่เจลลงในคอลัมน์แก้วหรือพลาสติก ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของคอลัมน์ที่เหมาะสมในการแยกสาร ปรับอัตราการไหลของบัฟเฟอร์ให้เหมาะสมและคงที่

4. ชะล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ด้วยอัตราการไหลของบัฟเฟอร์ที่คงที่ และไม่ชะคอลัมน์เร็วเกินไปเพราะจะทำให้สารปะปนกันออกมา

5. ใส่สารที่ต้องการแยกหรือวิเคราะห์ลงสู่ด้านบนของคอลัมน์ ชะสารด้วยบัฟเฟอร์เก็บบัฟเฟอร์ที่ไหลออกจากคอลัมน์ (fraction) นำไปวิเคราะห์เพื่อหาสารที่ต้องการ

6. เก็บเจลโดยใส่สารป้องกันการเจริญเติบโตของจุลชีพ (antimicrobial agents) เช่น โซเดียมเอไซด์ (sodium azide) เข้มข้น 0.02%

หมายเหตุ สารละลายที่ใช้เป็นตัวชะสารออกจากคอลัมน์ ถ้าสารที่ทำการแยกไม่มีประจุสามารถใช้น้ำเป็นตัวชะได้ แต่ถ้าเป็นสารที่มีหมู่ที่มีประจุต้องใช้บัฟเฟอร์เป็นตัวชะเพื่อควบคุม pH และ μ ของสารนั้น

วิธีหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน

ปริมาตรที่เกี่ยวข้องในการทำโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน มีประโยชน์ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ปริมาตรแบบต่างๆ มีดังนี้

- ปริมาตรรวม (total volume; V_t) คือปริมาตรรวมของคอลัมน์ที่บรรจุเจล หาได้จากสูตร $\pi r^2 h$ เมื่อ r คือรัศมีของคอลัมน์ และ h คือความสูงของเจลที่บรรจุในคอลัมน์ หรือวัดปริมาตรรวมจากปริมาตรของน้ำที่ใส่ในคอลัมน์เท่ากับระดับความสูงของเจล

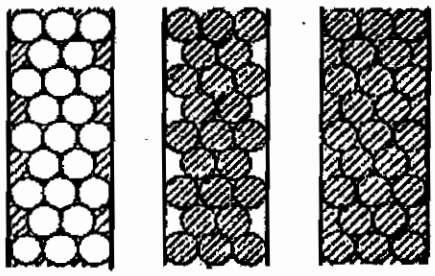
- ปริมาตรของตัวชะ (elution volume; V_e) คือปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะสารออกจากคอลัมน์ โดยทั่วไปวัดจากปริมาตรเมื่อเริ่มเก็บสารละลายจนถึงจุดที่สารนั้นออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นสูงที่สุด

- ปริมาตรระหว่างเจล (void volume หรือ outside volume; V_o) คือปริมาตรระหว่างเม็ดเจลในคอลัมน์ หาจากค่า elution volume ของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งไม่สามารถผ่านเข้าสู่รูพรุนของเจลได้ นิยมใช้บลูเด็กซ์แทรน ซึ่งเป็นสารประเภทพอลิแซคคาไรด์ที่มีสีน้ำเงิน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 2,000,000

- ปริมาตรรวมของเม็ดเจล (gel volume; V_g) คือปริมาตรของเนื้อเจลที่บรรจุในคอลัมน์

- ปริมาตรภายในเจล (inner volume; V_i) คือปริมาตรของน้ำที่อยู่ภายในเจลทั้งหมด หรือปริมาตรของน้ำที่ทำให้เจลแห้งอุ้มน้ำ

ความสัมพันธ์ของปริมาตรคือ $V_t = V_o + V_g + V_i$ แสดงดังรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 แสดงปริมาตรในการทำโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน

ค่า V_e มีความสัมพันธ์กับขนาดของสาร ซึ่ง V_e หาจากกราฟแสดง elution profile ดังรูปที่ 5.3 ส่วนค่า V_t นั้นขึ้นอยู่กับการบรรจุเจลในคอลัมน์ เพื่อเปรียบเทียบค่า V_e ของสารชนิดเดียวกันจากคอลัมน์ต่างๆ ซึ่งมีค่า V_t ต่างกัน จึงเปรียบเทียบจากการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสาร (distribution coefficient; K_d) ซึ่งเทียบได้กับสัมประสิทธิ์การแบ่งละลาย (partition coefficient; α) K_d คือสัดส่วนของสารที่ละลายอยู่ในน้ำที่อยู่ภายในเนื้อเจล ซึ่งเป็นส่วนคงที่ของระบบ ซึ่งหาได้จากสมการ

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

V_e หาได้จากปริมาตรที่ชะสารที่ต้องการออกจากคอลัมน์

V_o หาได้จากปริมาตรที่ใช้ชะสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่าขนาดรูพรุนของเจล เช่น บลูเด็กซ์แทรน

V_i หาได้จากสมการ

$$V_i = V_t - V_o - V_g$$

หรือ $$V_i = A + W_r$$

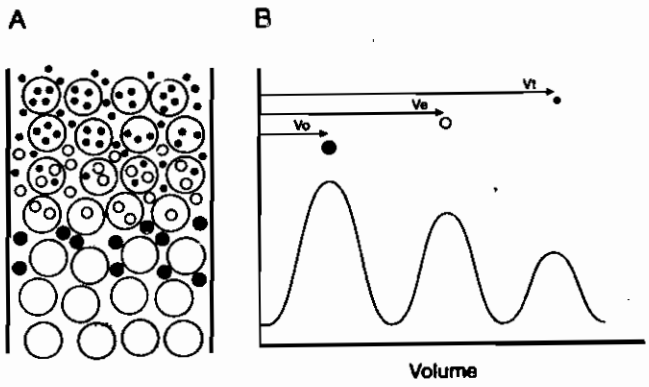
A คือน้ำหนักของเจลแห้งที่ใช้บรรจุคอลัมน์

W_r คือปริมาตรของน้ำที่เจลแห้ง 1 กรัม สามารถอุ้มไว้ได้เต็มที่ (water regain) ซึ่งบริษัทผู้ผลิตอาจบอกค่า W_r มา

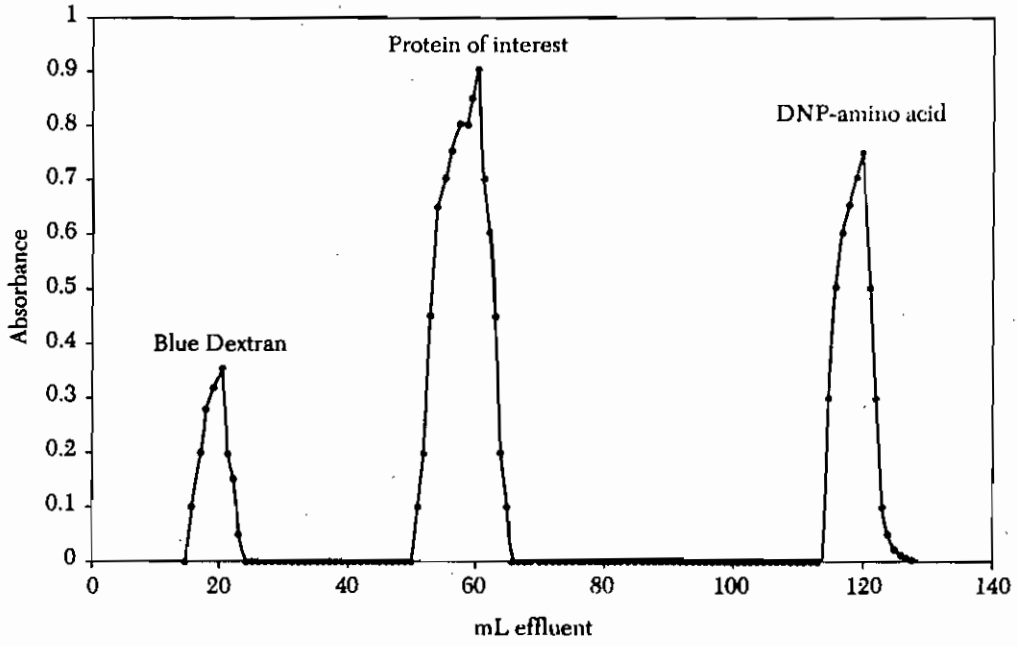
เมื่อนำ W_r ไปคูณกับ A สามารถหาค่า V_i ได้ หรือเทียบหาค่า V_i จากการทดลอง

$$V_i = V_{salt} - V_o$$

เมื่อ V_{salt} คือปริมาตรที่ใช้ชะสารที่มีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่ารูพรุนของเจล เช่น ใช้สารละลายเกลือโปแตสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) หรือ DNP amino – acid ดังรูปที่ 5.4



รูปที่ 5.3 การทำโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน (A) แสดงการเคลื่อนที่ของสารออกจากคอลัมน์เรียงลำดับจากขนาดใหญ่มายังขนาดเล็ก (B) แสดง elution profile ในการแยกสาร



รูปที่ 5.4 แสดง elution profile ของการแยกบลูเด็กซ์แทรน โปรตีนที่สนใจ และ DNP amino - acid

ดังนั้น $$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_{salt} - V_o}$$

เมื่อคิดค่าการแบ่งละลายโดยรวมปริมาตรของเนื้อเจลด้วย สามารถหาเป็นค่า K_{av} คือ

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

ค่า K_{av} ซึ่งไม่ใช่ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งกระจายที่แท้จริง เนื่องจากรวมเนื้อเจลซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการกระจายตัวของสาร แต่อัตราส่วนของ K_{av} / K_d ของเจลชนิดหนึ่งๆ มีค่าคงที่ โดยที่ K_d และ K_{av} ไม่ขึ้นกับธรรมชาติหรือความเข้มข้นของสาร และไม่ขึ้นกับขนาดของคอลัมน์ รวมทั้งวิธีการบรรจุเจลในคอลัมน์ ซึ่งจากสมการข้างต้นสามารถทำการทดลองเพื่อหาค่า K_{av} ได้ง่ายกว่า K_d

การหาน้ำหนักโมเลกุลของชีวโมเลกุล โดยเฉพาะโปรตีนหรือเอนไซม์ สามารถหาได้จากค่าต่างๆ ดังนี้

1. หาน้ำหนักโมเลกุลของสารจากค่า V_e

โดยการเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานโดยใช้คอลัมน์เดียวกัน การเปรียบเทียบใช้กราฟมาตรฐานระหว่างค่า log MW กับ ค่า V_e

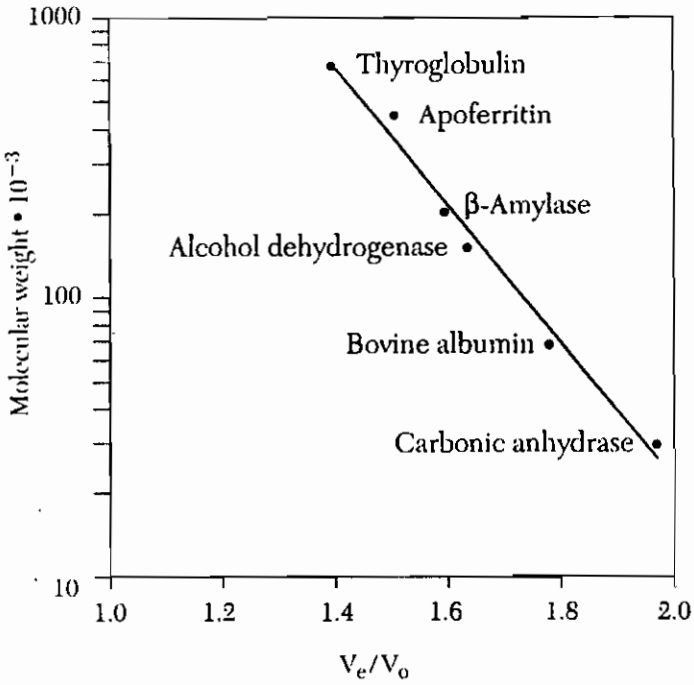
การเปรียบเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างจากค่า V_e ต้องทำการทดลองจากคอลัมน์เดียวกัน คือมีขนาดคอลัมน์เท่ากันทั้งเส้นผ่านศูนย์กลางและความสูงของเจล และมีวิธีการบรรจุเจลที่เหมือนกัน เจลที่ใช้ต้องเป็นชนิดเดียวกัน ในกรณีที่ต้องการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารโดยไม่ต้องการหา V_e ของสารมาตรฐาน อาจเปรียบเทียบจากค่า relative elution volume, ค่า K_d หรือค่า K_{av} ของเจลชนิดเดียวกันซึ่งหาไว้แล้วจากการทดลอง หรือได้มาจากหนังสืออ้างอิง

2. หาน้ำหนักโมเลกุลของสารจากค่า relative elution volume

เมื่อทำการชะคอลัมน์ภายหลังจากใส่สารที่ต้องการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและสารโมเลกุลขนาดใหญ่กว่าของเจล เช่น บลูเด็กซ์แทรน โมเลกุลของสารมีการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ตามลำดับของน้ำหนักโมเลกุล เมื่อหาค่า V_e และ V_o และนำค่าดังกล่าวมาหาอัตราส่วนของ V_e/V_o ซึ่งคือค่า relative elution volume โดยค่า V_e/V_o นี้ไม่ขึ้นอยู่กับขนาดของคอลัมน์ สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างได้ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่พล็อตระหว่าง log MW ของสารมาตรฐานกับค่า V_e/V_o ดังรูปที่ 5.5 เมื่อใช้เจลชนิดเดียวกัน และใช้สารมาตรฐานซึ่งมีรูปร่างเหมือนกันกับสารตัวอย่าง

3. หาน้ำหนักโมเลกุลของสารจากค่า K_d หรือ K_{av}

ถ้าต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลของชีวโมเลกุล สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลจากค่า K_d เนื่องจากค่า K_d ไม่ขึ้นกับขนาดของคอลัมน์และวิธีการบรรจุเจลในคอลัมน์ K_d เป็นการบอกลักษณะการกระจายของสารในคอลัมน์ กราฟระหว่างค่าลอกการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล (logarithm of molecular weight; log MW) กับค่า K_d มีลักษณะเป็นเส้นตรง สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างได้ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่พล็อต ระหว่าง log MW ของสารมาตรฐานกับค่า K_d หรือหาจากค่า K_{av} ได้ในทำนองเดียวกัน ทั้งนี้ต้องเปรียบเทียบโดยใช้เจลชนิดเดียวกัน และใช้สารมาตรฐานซึ่งมีรูปร่างเหมือนกันกับสารตัวอย่าง



รูปที่ 5.5 กราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนและค่า V_e/V_o

การทดลองที่ 5.1

การแยกสารโดยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน

การทดลองนี้เป็นการแยกสารผสมออกจากกันโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน ด้วยเจลชนิด Sephadex G–25 และทำการหาค่า relative elution volume ของสาร

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

คอลัมน์แก้วขนาด 1.5 x 25 เซนติเมตร

แท่งแก้วยาว

สายยาง

สำลี

กระดาษกรอง

หลอดดิวเวตต์

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

สารเคมี

Sephadex G – 25

20 mg/ml blue dextran

1 mg/ml bromophenol blue ใน 1% เมทานอล

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมคอลัมน์ Sephadex G-25

1.1 ชั่ง Sephadex G-25 หนัก 4 กรัม และตวงน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ เท Sephadex G-25 ใส่ลงในน้ำกลั่น คนเบาๆ แช่ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้เจลพองตัว

1.2 เทส่วนที่เป็นน้ำกลั่นและเศษเจลที่ลอยอยู่ออก นำเจลใส่กระบอกตวง เติมน้ำกลั่นสองเท่าของปริมาตรเจลแล้วผสมให้เข้ากัน เมื่อเจลตกลงสู่ด้านล่างประมาณ 90-95% ให้เทส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง

1.3 ยึดคอลัมน์ให้อยู่ในแนวดิ่งบนฐาน (stand) ในลักษณะตั้งตรง สวมสายยางที่ปลายด้านล่างของคอลัมน์

1.4 ใส่น้ำกลั่นลงไปจนเกือบเต็มคอลัมน์ ไล่ฟองอากาศที่อยู่บริเวณสายยางออกให้หมด ใส่สำลีแผ่นบางๆ ลงคอลัมน์ และใช้แท่งแก้วดันลงไปจนสุดปลายคอลัมน์ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ที่สำลี

1.5 เปิดที่หนีบและปล่อยให้น้ำกลั่นไหลออกจนเหลือประมาณ 1/4 ของคอลัมน์ หนีบสายยางไว้ตามเดิม

1.6 คนเจลที่เตรียมไว้ด้วยแท่งแก้วเบาๆ ให้เจลกระจายทั่วกัน รินเจลลงสู่คอลัมน์ช้าๆ เมื่อบรรจุเจลลงสู่คอลัมน์ได้ความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร เปิดสายยางให้น้ำกลั่นไหลออกด้วยอัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเติมเจลที่เหลือลงในคอลัมน์อย่างต่อเนื่องจนระดับความสูงของเจลเท่ากับ 10 เซนติเมตร โดยก่อนเติมเจลแต่ละครั้งให้คนส่วนบนของเจลเพื่อป้องกันไม่ให้เจลแยกชั้น และระวังอย่าให้ผิวหน้าของเจลแห้ง รวมทั้งพยายามรักษาอัตราการไหลของน้ำกลั่นให้คงที่ เมื่อบรรจุเจลเรียบร้อยแล้วให้ปิดผิวหน้าเจลด้วยกระดาษกรอง

1.7 ชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นอีกประมาณ 10 มิลลิลิตร เมื่อพร้อมที่จะใส่สารจึงปล่อยน้ำกลั่นให้ไหลออกจากคอลัมน์ จนระดับของบัฟเฟอร์อยู่เหนือผิวหน้าเจลเพียงเล็กน้อย ปิดปลายสายยางไว้ คอลัมน์ที่เตรียมได้นี้พร้อมที่จะใส่สารละลายผสมที่ต้องการแยก

2. การใส่สารละลายผสมลงในคอลัมน์และการเก็บสารจากคอลัมน์

2.1 ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายผสมระหว่างบลูเด็กซ์แทรนและโบรโมฟีนอลบลู ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปล่อยสารลงในคอลัมน์ช้าๆ โดยพยายามอย่าให้กระเทือนผิวหน้าเจล

2.2 เปิดปลายสายยางให้สารไหลลงสู่เนื้อเจลช้าๆ จนหมด เติมน้ำกลั่นทีละน้อย เมื่อสังเกตว่าไม่มีสารอยู่เหนือเจลแล้ว จึงเติมน้ำกลั่นปริมาณมากได้

2.3 เก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร (เริ่มเก็บตั้งแต่ขั้นตอนการบรรจุสารลงสู่คอลัมน์)

3. การวิเคราะห์ผล

3.1 นำสารละลายที่เก็บได้แต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บันทึกผลลงในตาราง จากค่าดังกล่าวนำมาเขียนกราฟ elution profile โดยให้แกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสง และแกนนอนเป็นปริมาตรที่ชะสาร

3.2 หาค่า relative elution volume ของโบรโมฟีนอลบลู

4. การเก็บเจล

4.1 หลังจากเก็บสารละลายที่ได้จากคอลัมน์เรียบร้อยแล้ว ให้ชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นอีกประมาณ 20 มิลลิลิตร เพื่อล้างเจลให้สะอาด

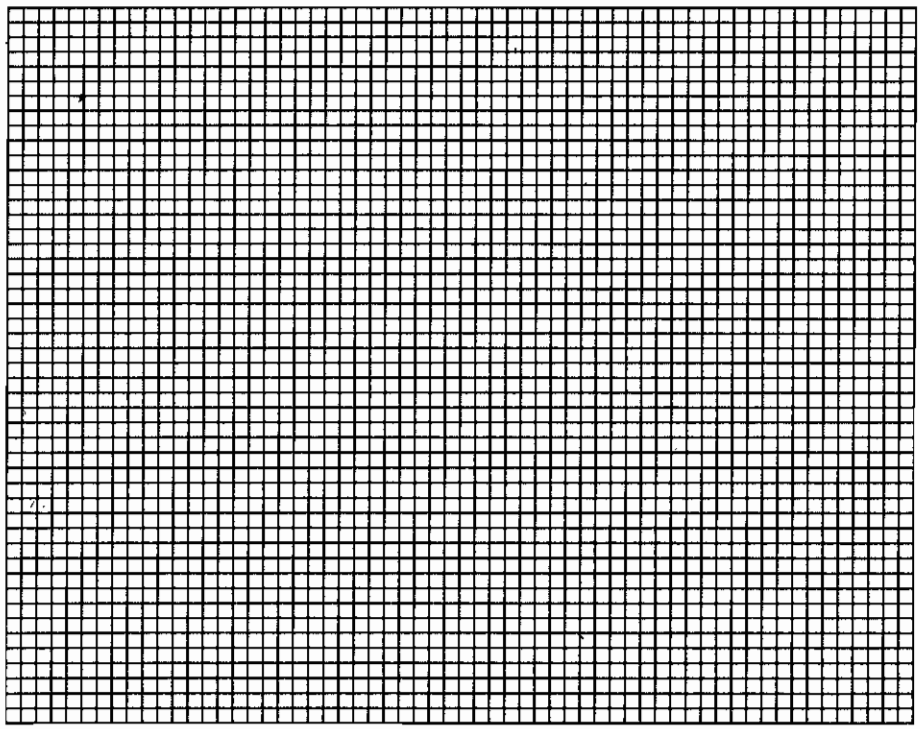
4.2 นำกระดาษกรองออก เทเจลออกจากคอลัมน์ใส่ลงในบีกเกอร์ ถ้าคอลัมน์แห้งให้เติมน้ำกลั่น และใช้แท่งแก้วคนเบาๆ เทเจลให้หมดโดยระวังอย่าให้สำลีปนมากับเจล

4.3 เก็บเจลใส่ภาชนะเดิมที่มีฝาปิด โดยใส่น้ำกลั่นให้ท่วมเหนือเจล

ตารางบันทึกผลการทดลอง

หลอดที่	A_{600}
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	

กราฟแสดง elution profile



คำถาม

1. ถ้าต้องการแยกสารผสมโดยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน โดยที่สารผสมนั้นมีน้ำหนักโมเลกุลที่มีความแตกต่างกันน้อยกว่าความแตกต่างระหว่างบลูเด็กซ์แทรนและโบรโมฟีนอลบลู จงออกแบบการทดลองเพื่อให้ได้ผลการแยกที่ดี

   .....

   .....

2. นักศึกษาสามารถใช้ Sephadex G-75 เพื่อแยกเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (MW 150,000) ออกจากเอนไซม์ β–amylase (MW 200,000) ได้หรือไม่

   .....

   .....

   .....