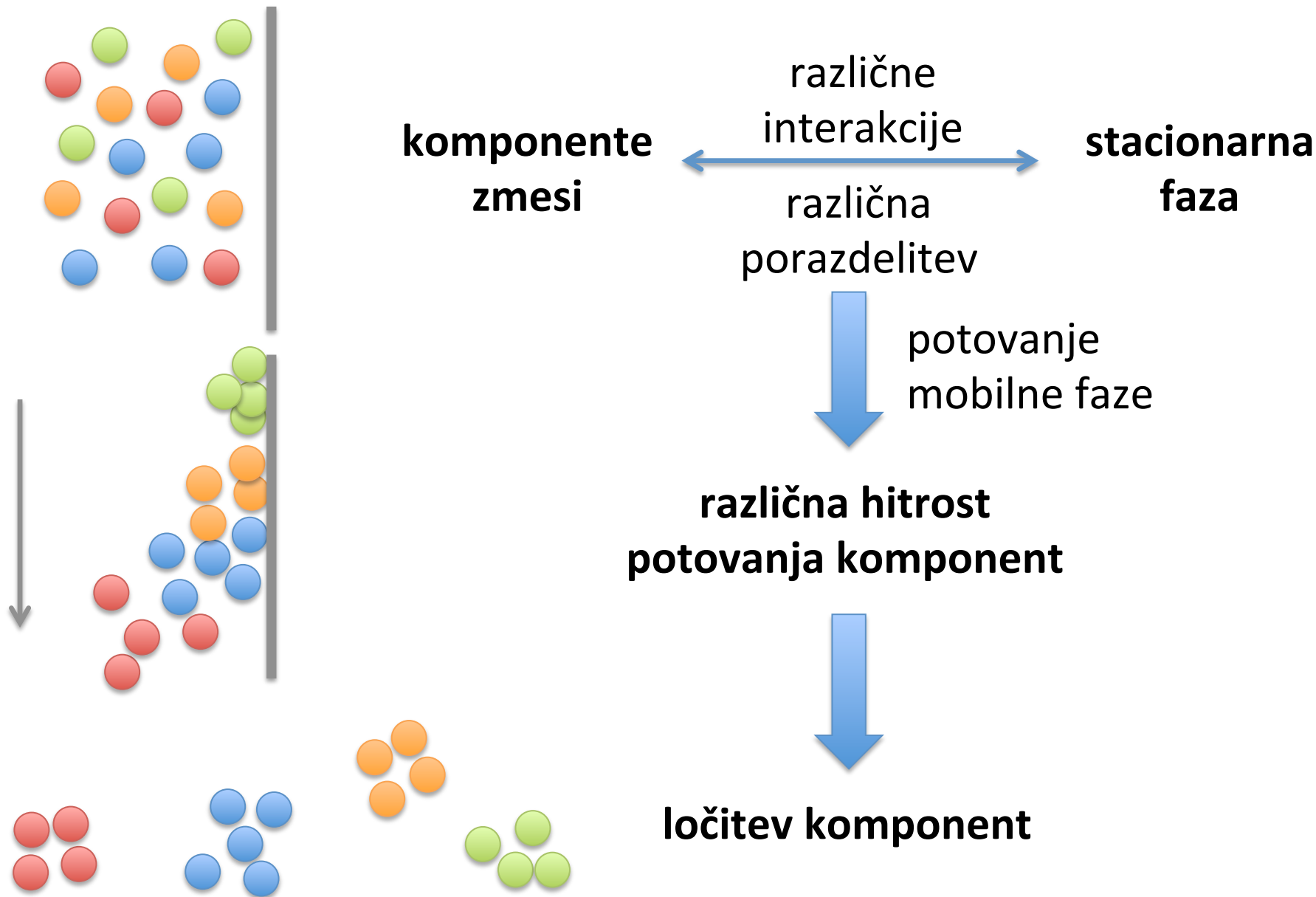


# KROMATOGRAFSKE METODE

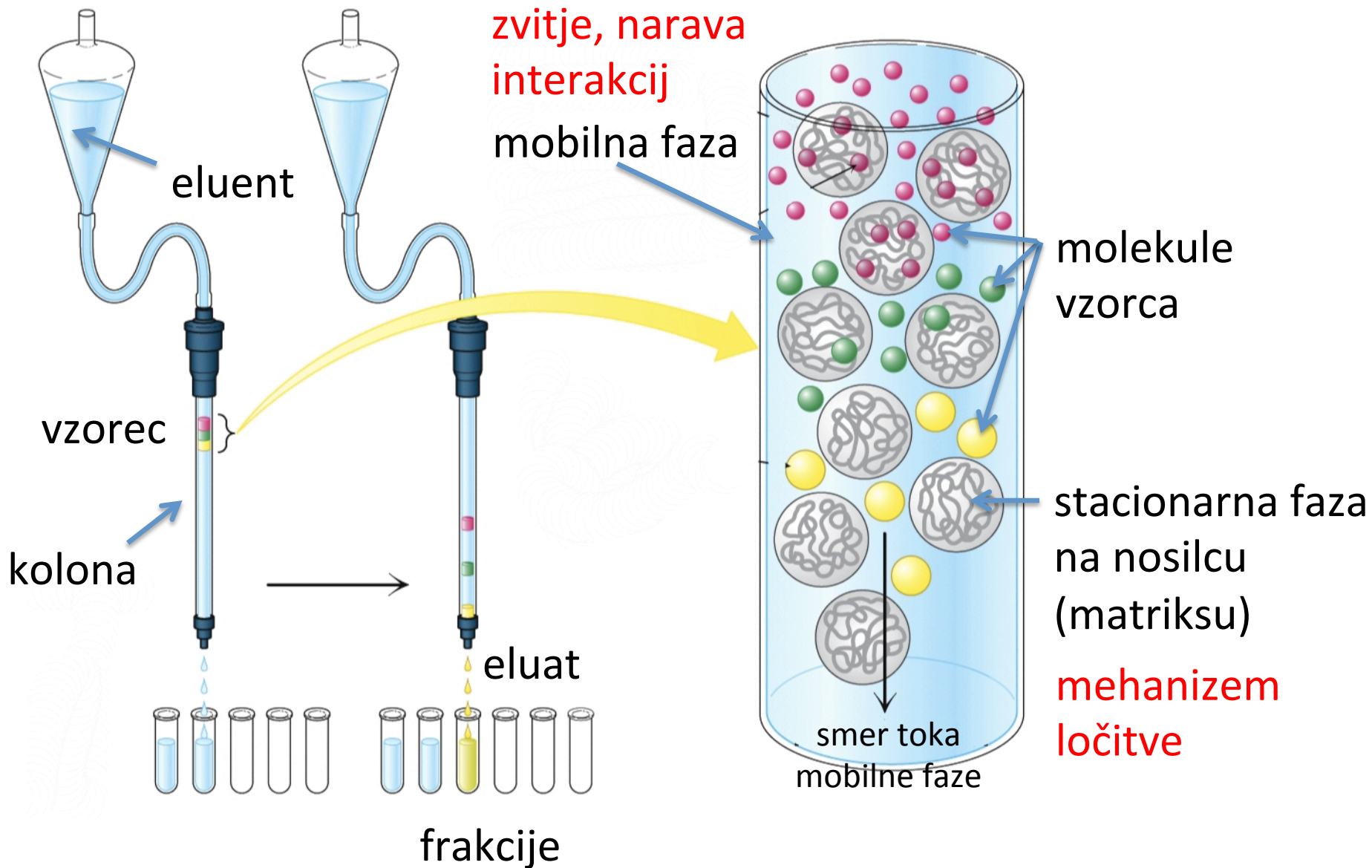
3. vaja – Razsoljevanje proteinov z gelsko izključitveno kromatografijo

**4. vaja – Ionsko-izmenjevalna ter afinitetna kromatografija**

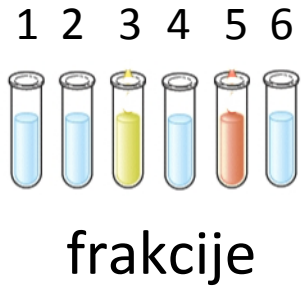
# Osnovni princip kromatografije



# Tekočinska kolonska kromatografija – pojmi (1)



# Tekočinska kolonska kromatografija – pojmi (2)



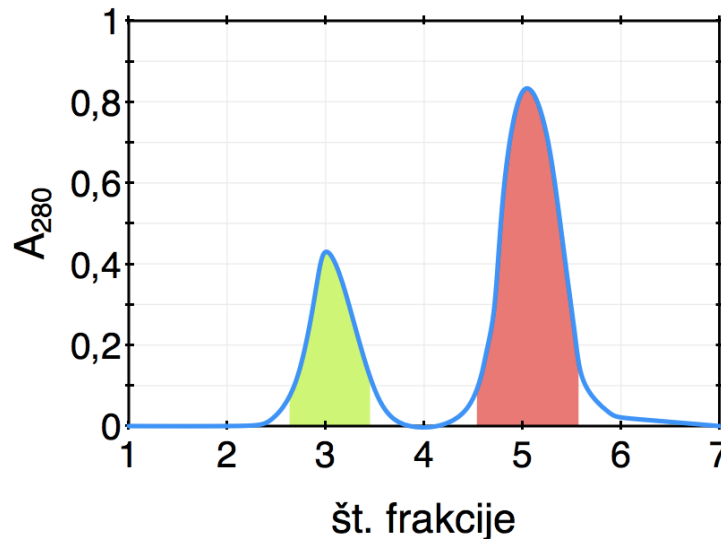
encimski test, elektroforeza, ELISA, ...

$A_{280}$  posameznih frakcij



spektrofotometer

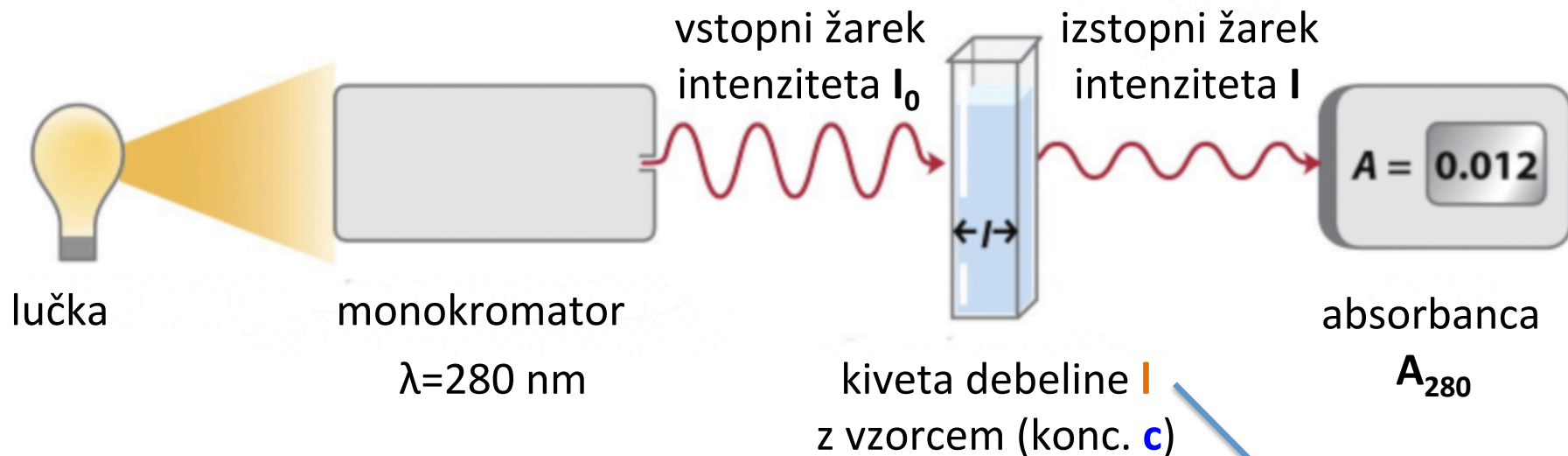
kromatogram



(elucijski volumen  $\propto$  retenzijski čas)



# Absorbanca pri $\lambda=280$ nm ( $A_{280}$ )



$$T = \frac{I}{I_0}$$

transmitanca

$$A = -\log T$$

absorbanca

A	T%
1	10 %
2	1 %
3	0,1 %
4	0,01%

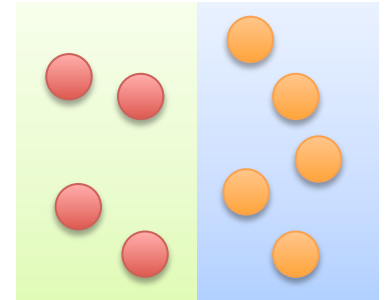
$$A_{280} = \epsilon_{280} \times c \times l$$

molarni  
ekstinkcijski  
koeficient

# Mehanizmi ločitve

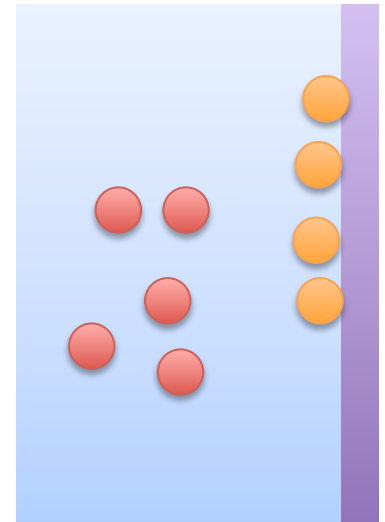
## absorpcija

- porazdelitev vzorca med stacionarno in mobilno fazo zaradi različne topnosti



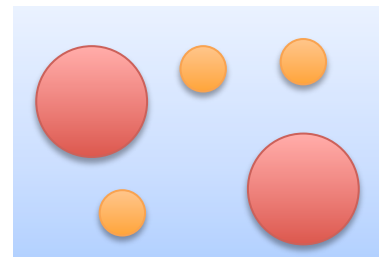
## adsorpcija

- ionske interakcije → ionsko-izmenjevalna kromatografija
- afiniteta → afinitetna kromatografija
- hidrofobne interakcije → hidrofobna kromatografija
- hidroksiapatitna kromatografija
- kovalentna kromatografija



## velikost

- gelska filtracija

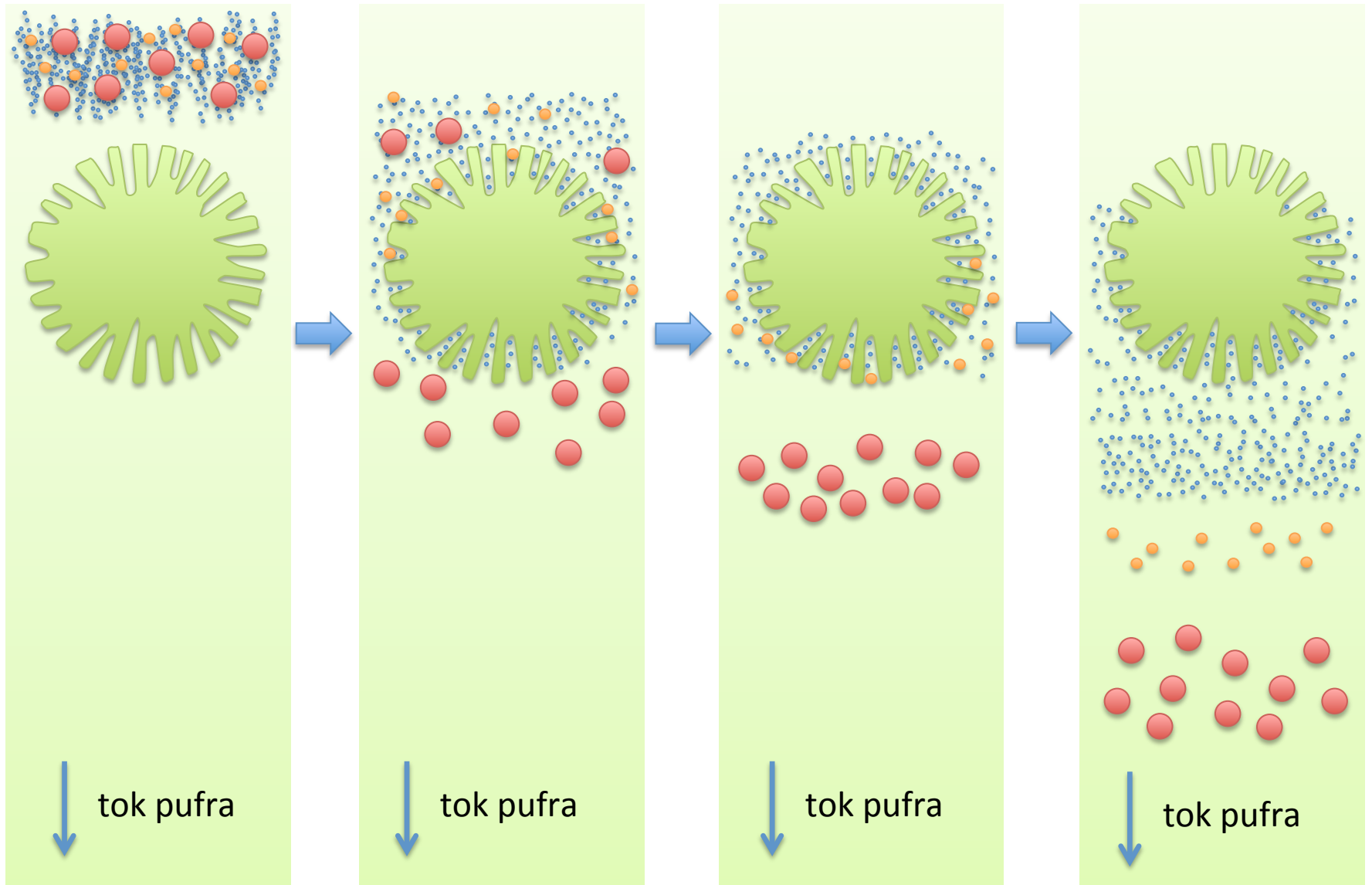


# Gelska filtracija

sol

“majhen” protein

“velik” protein



# GF: Uporaba

- **ločevanje različno velikih makromolekul v preparativne namene**
- določevanje molekulske mase globularnih proteinov
- razsoljevanje vzorcev

## Column Superdex 75 10/300 GL

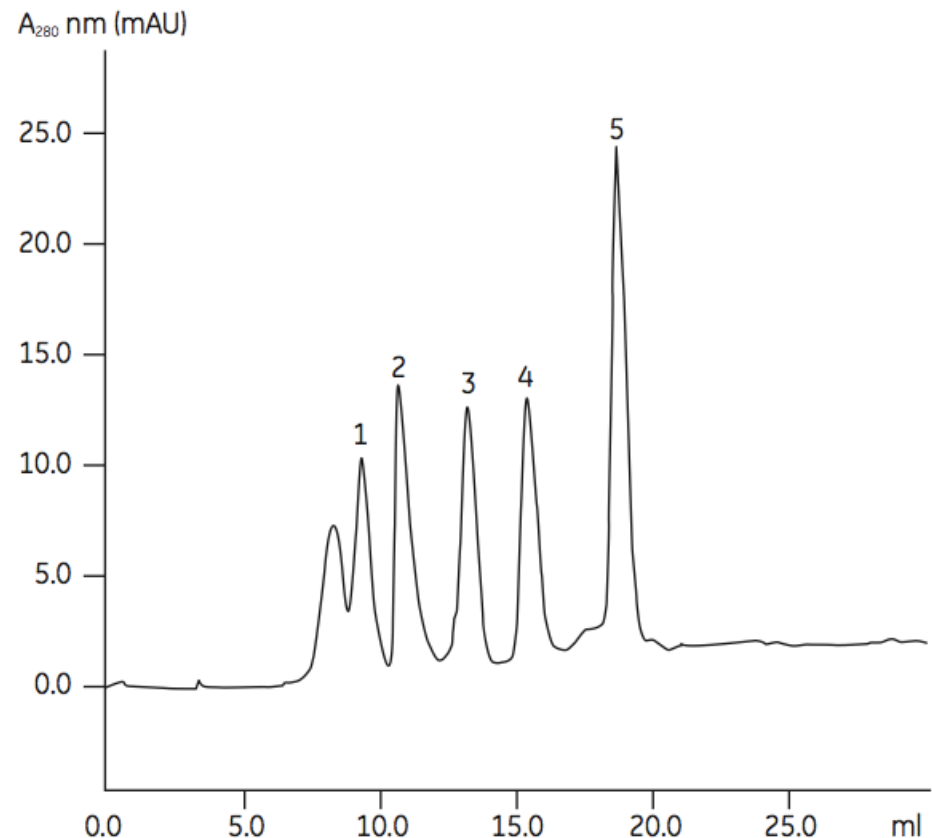
Sample:           1. BSA (M<sub>r</sub> 67 000) 8 mg/ml  
                      2. Ovalbumin (M<sub>r</sub> 43 000) 2.5 mg/ml  
                      3. Ribonuclease A (M<sub>r</sub> 13 700) 5 mg/ml  
                      4. Aprotinin (M<sub>r</sub> 6 512) 2 mg/ml  
                      5. Vitamin B12 (M<sub>r</sub> 1355) 0.1 mg/ml

Sample volume:   500 µl

Eluent:            0.05 M phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.0

Flow rate:        0.4 ml/min, room temperature

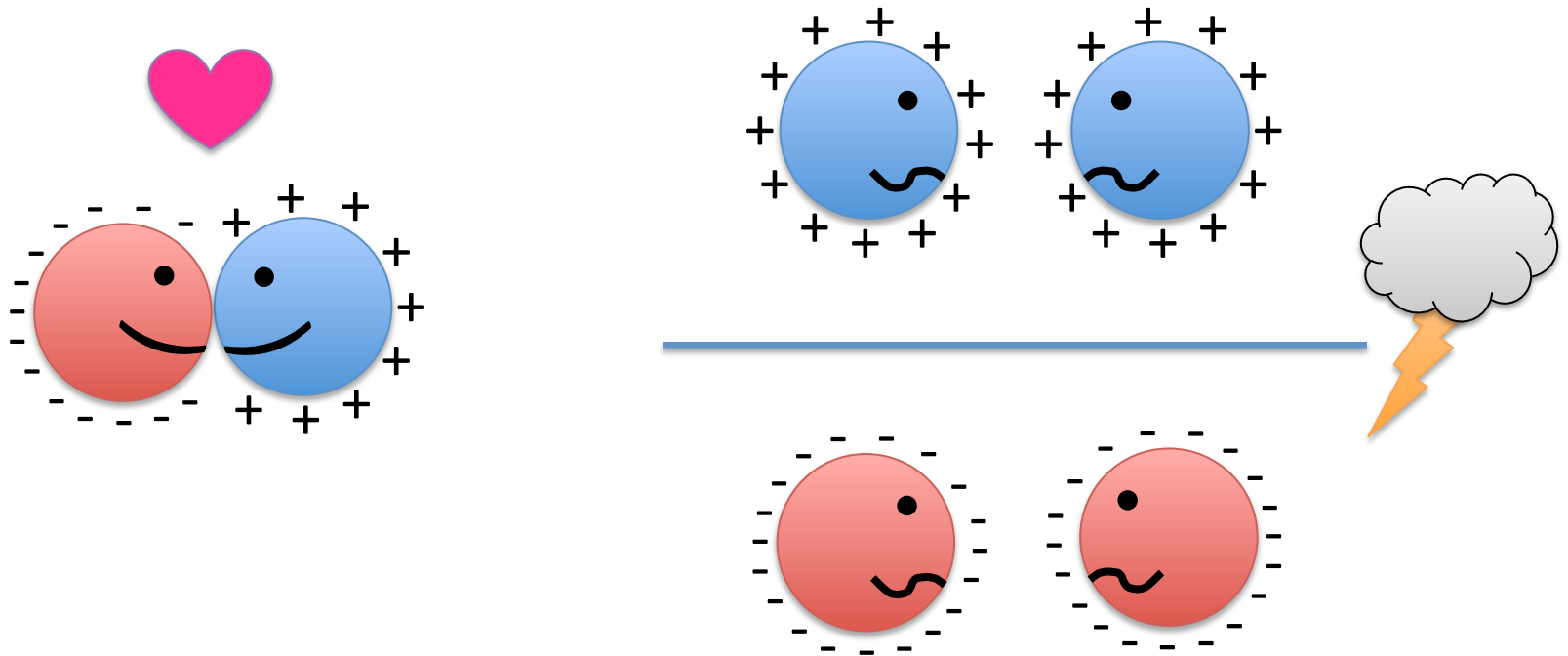
Detection:        280 nm



# Ionsko-izmenjevalna kromatografija (IEX)

angl. **i**on-**ex**change chromatography (IEX)





- temelji na privlačnih elektrostatskih interakcijah med nasprotno nabitimi delci (ioni, poli-ioni)
- **molekule se vežejo na nasprotno nabito stacionarno fazo**

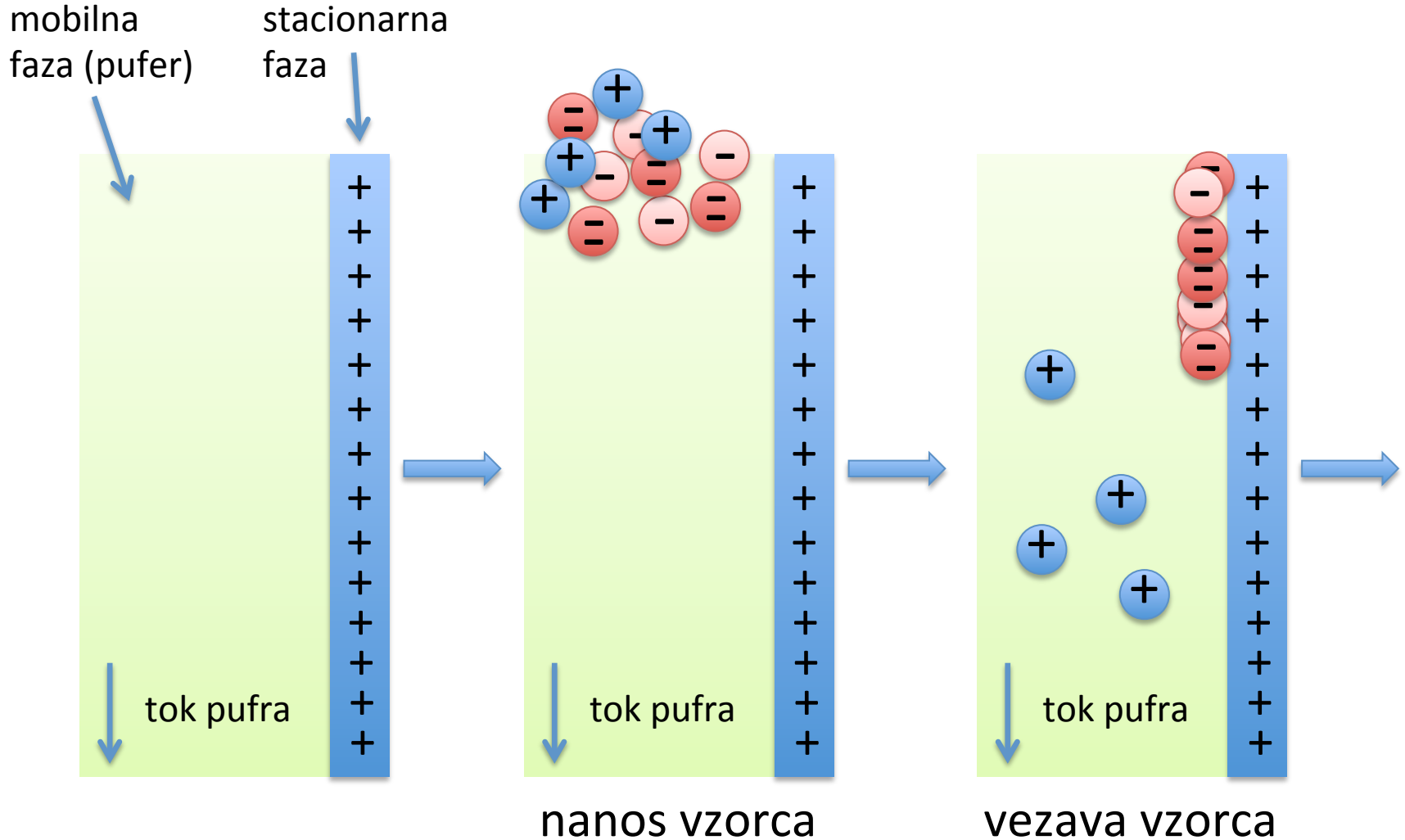


# Ionsko-izmenjevalna kromatografija





1. splošno (ionska izmenjava)
2. stacionarna faza
3. naboj molekul vzorca
4. izbira stacionarne faze in pH mobilne faze (pufra)
5. stopnje ionsko-izmenjevalne kromatografije (povzetek)
6. načini elucije

# IEX: Ionska izmenjava (1)

-  neg. ioni soli
-  močno negativno nabit protein
-  šibko negativno nabit protein
-  pozitivno nabit protein

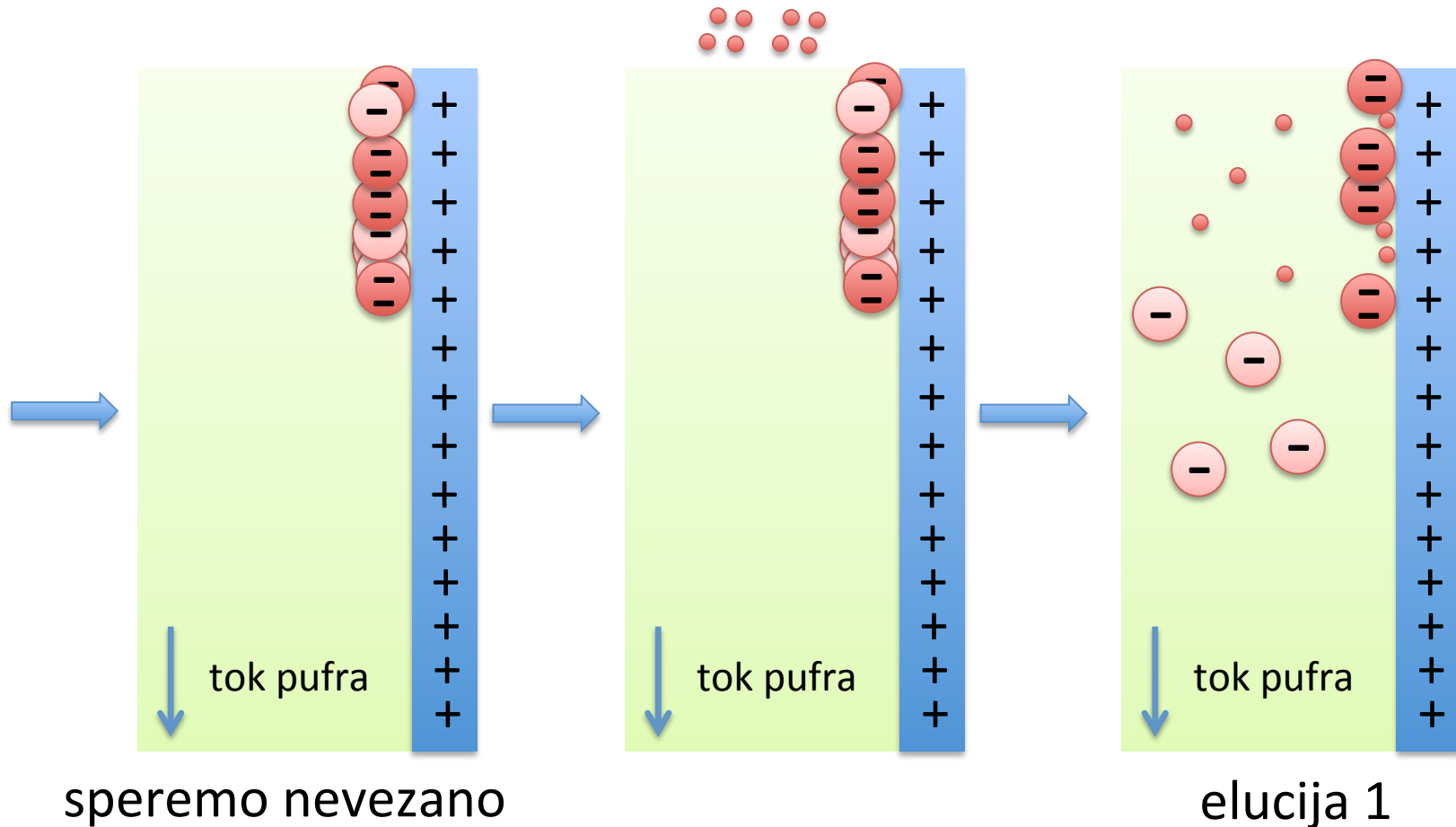


# IEX: Ionska izmenjava (2)

-  neg. ioni soli
-  močno negativno nabit protein
-  šibko negativno nabit protein
-  pozitivno nabit protein


nizka konc. soli

nizka konc. soli



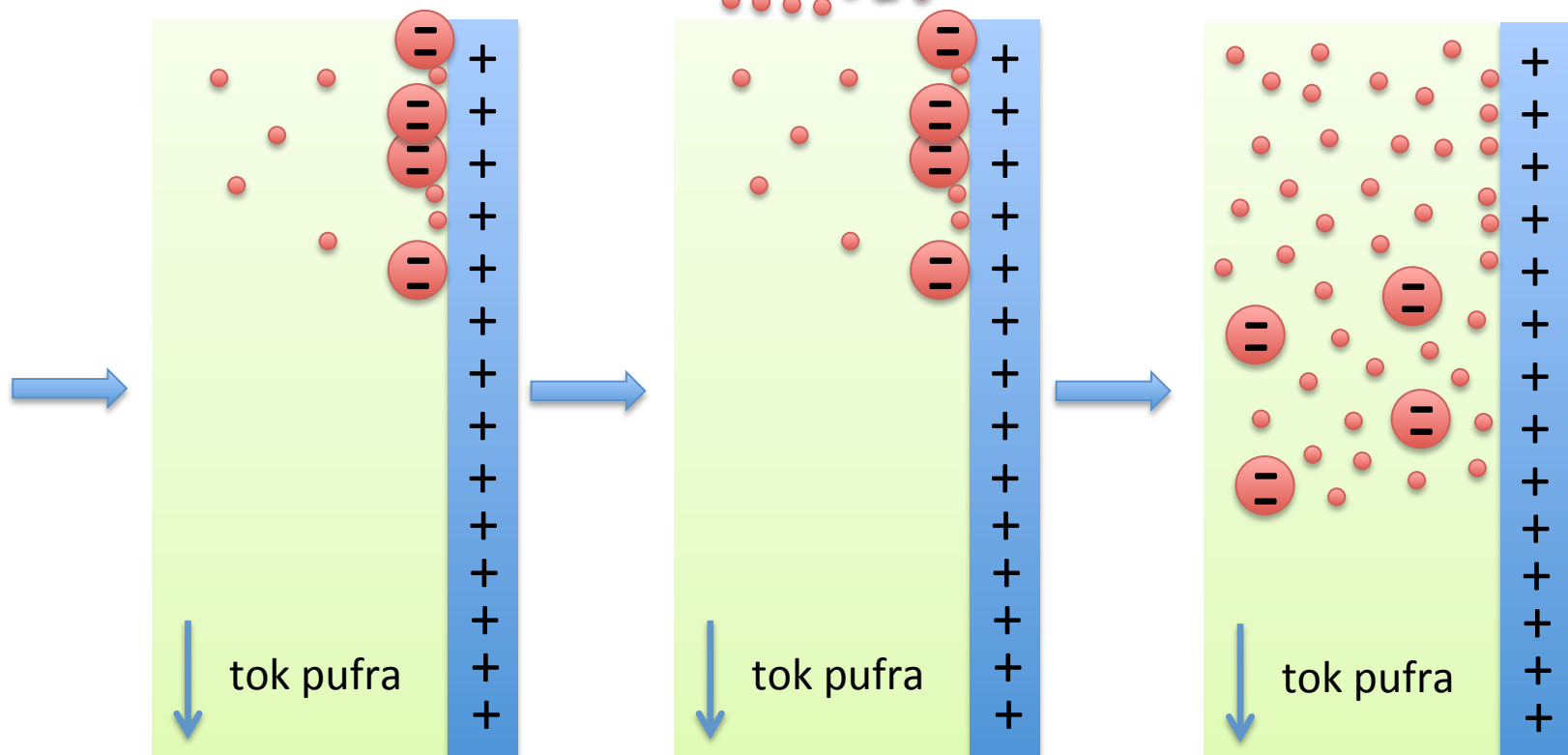


# IEX: Ionska izmenjava (3)

-  neg. ioni soli     močno negativno nabit protein     šibko negativno nabit protein     pozitivno nabit protein

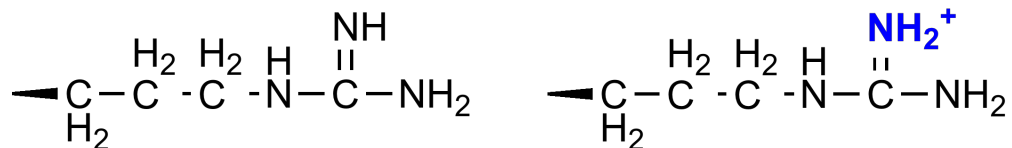
visoka konc. soli

visoka konc. soli

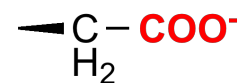
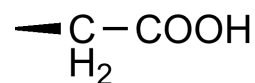


elucija 2

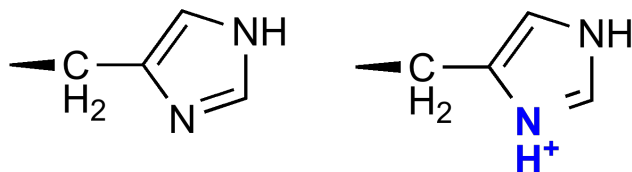
# IEX: Naboj proteinov



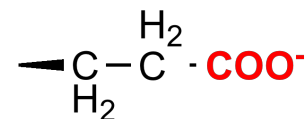
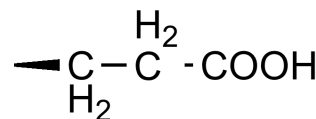
arginin (Arg, R)



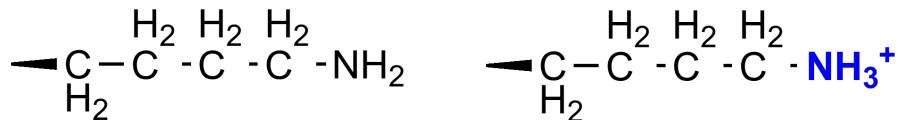
asparaginska kislina (Asp, D)



histidin (His, H)

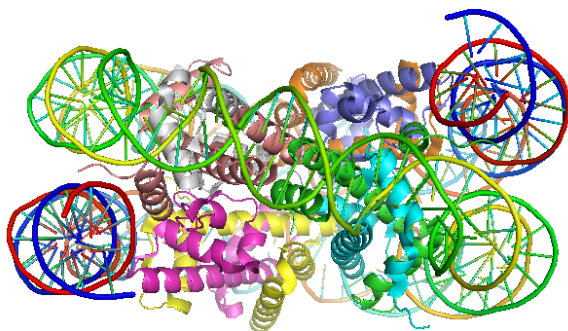
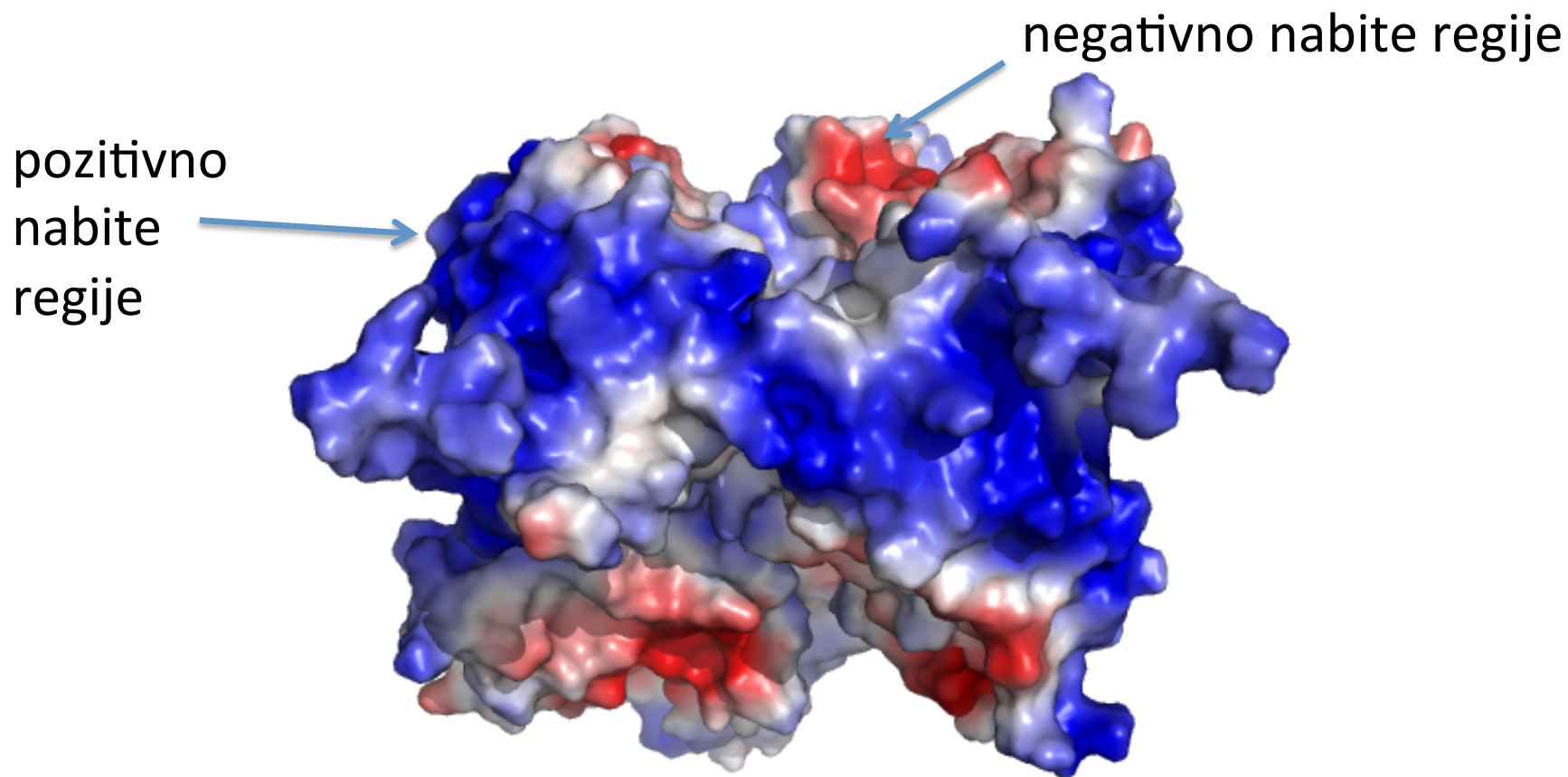


glutaminska kislina (Glu, E)

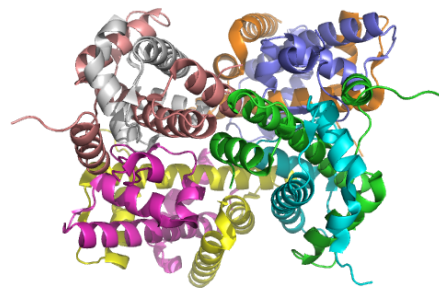


lizin (Lys, K)

# IEX: Naboj proteinov (primer)

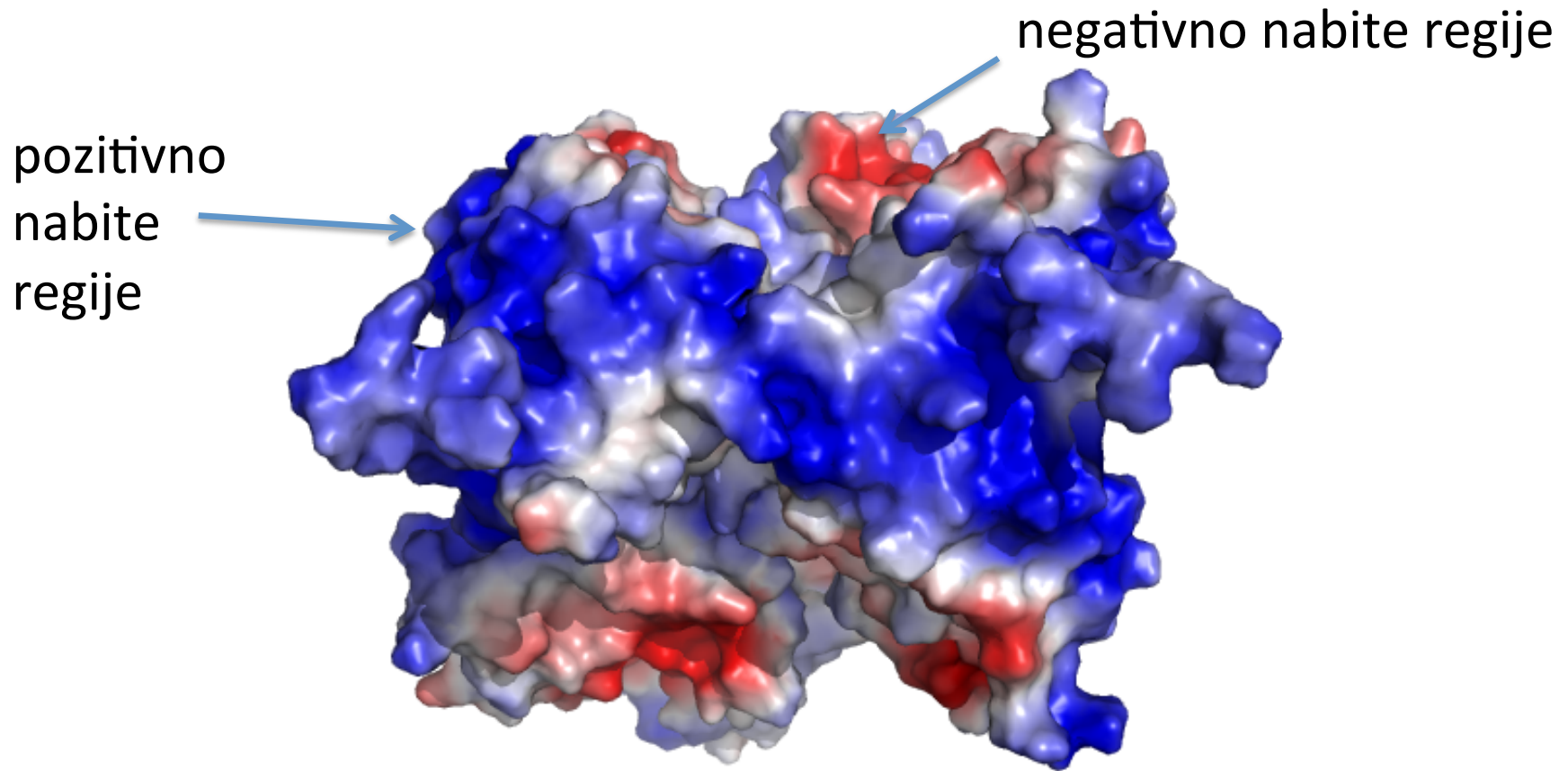


nukleosom (histoni + DNA)



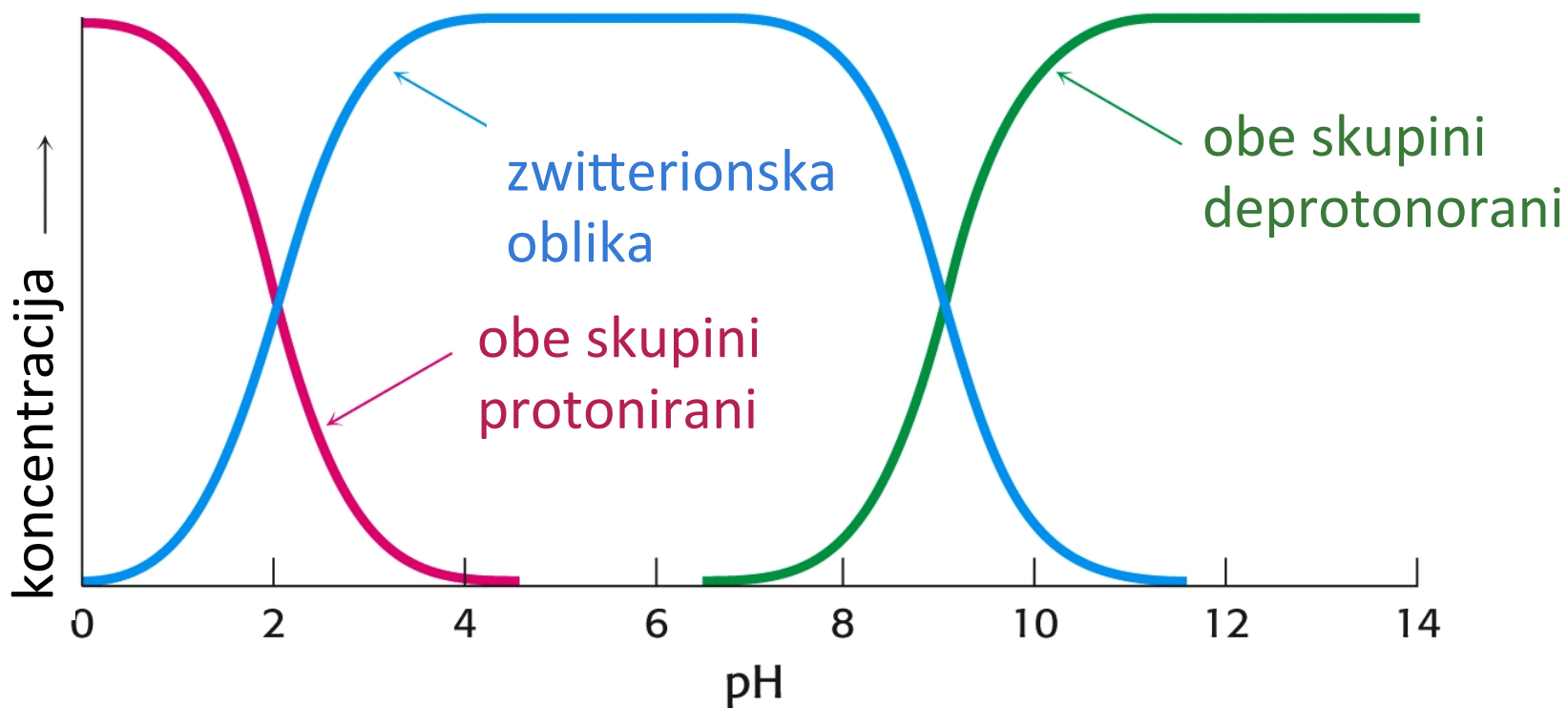
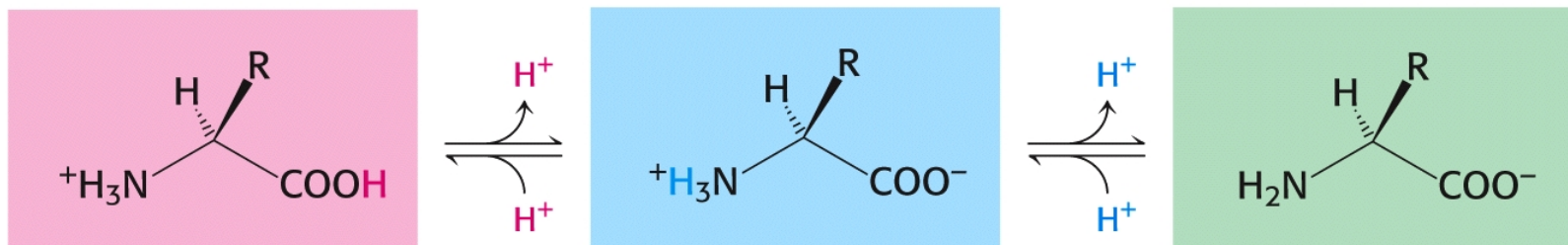
jedro iz histonov

# IEX: Naboj proteinov (primer)



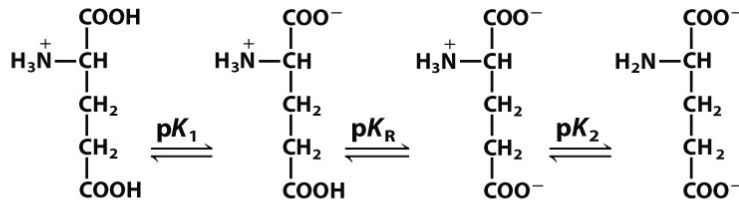
10	20	30	40	50	60
MARTKQTARK	STGGKAPRKQ	LATKAARKSA	PATGGVKKPH	RYRPGTVALR	EIRRYQKSTE
70	80	90	100	110	120
LLIRKLPFQR	LVREIAQDFK	TDLRFQSSAV	MALQEACEAY	LVGLFEDTNL	CAIHAKRVTI
130					
MPKDIQLARR	IRGERA				

# IEX: Naboj proteinov

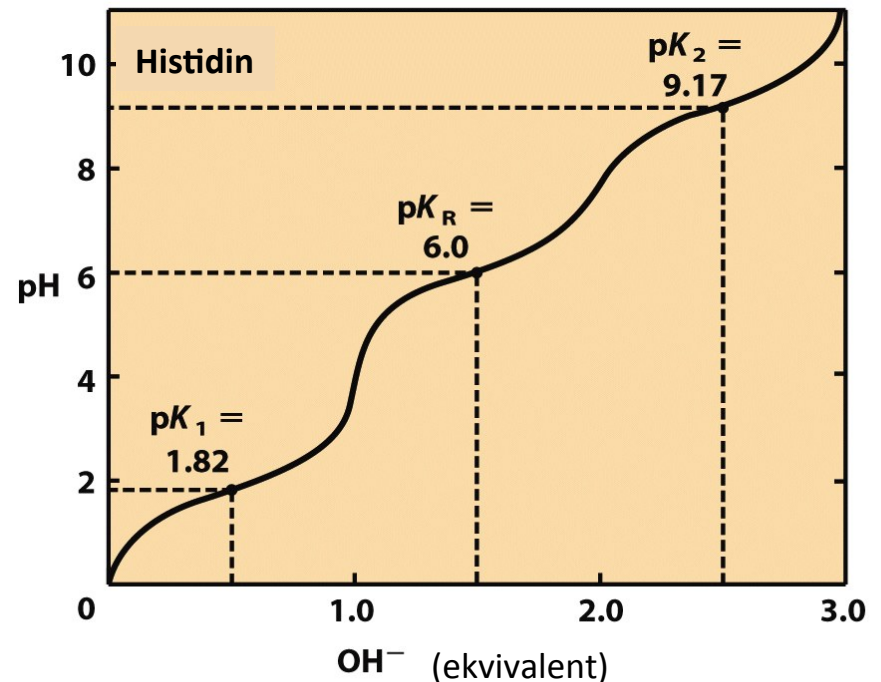
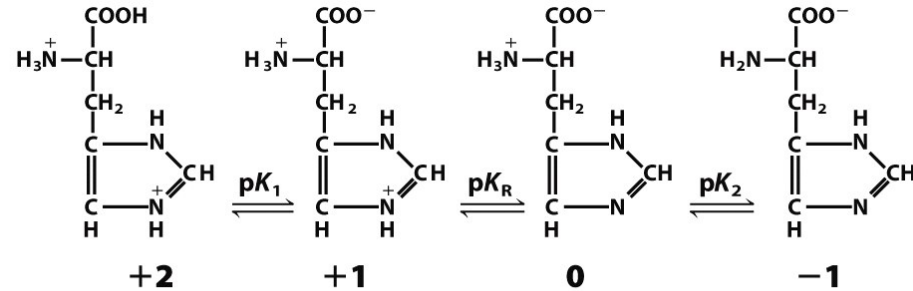
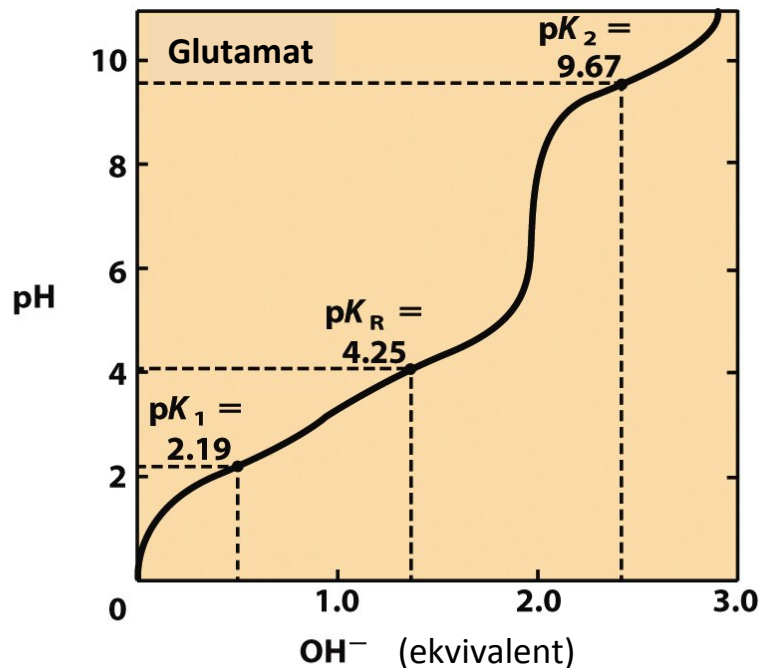


# IEX: Naboj proteinov

$$pK_a = -\log K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}$$



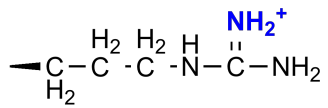
Neto naboj:      +1                      0                      -1                      -2



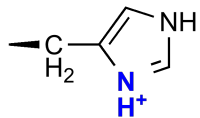
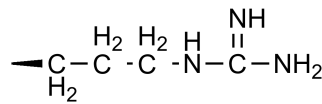
# IEX: Naboj proteinov je odvisen od pH !!!

nizek pH  
(kislo)

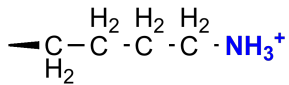
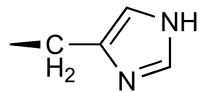
visok pH  
(bazično)



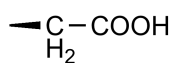
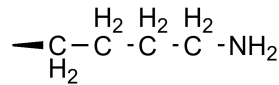
arginin



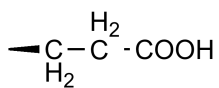
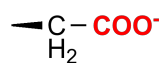
histidin



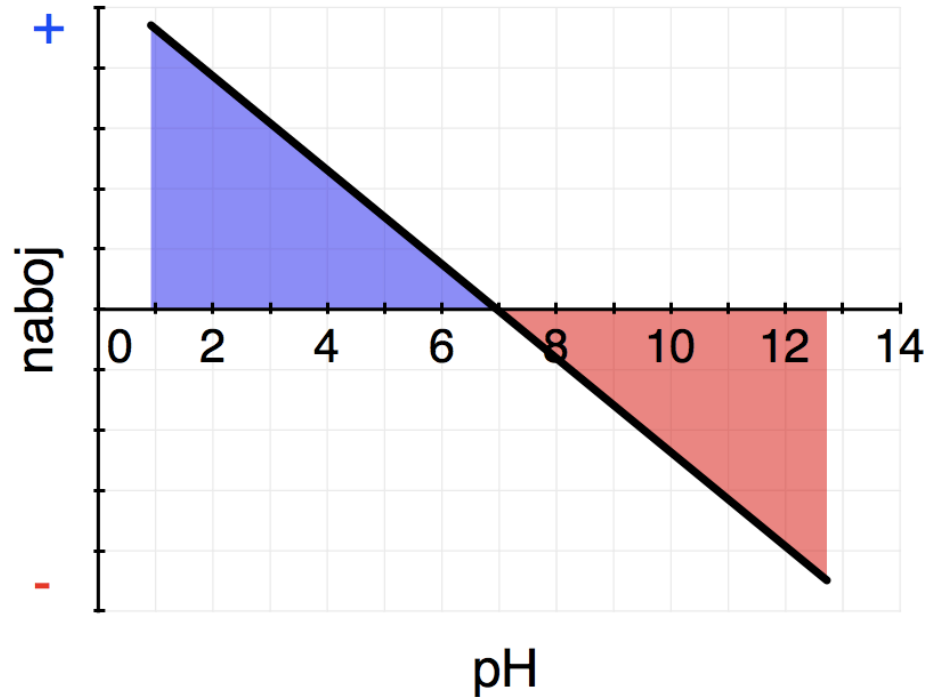
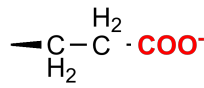
lizin



asparaginska  
kislina



glutaminska  
kislina

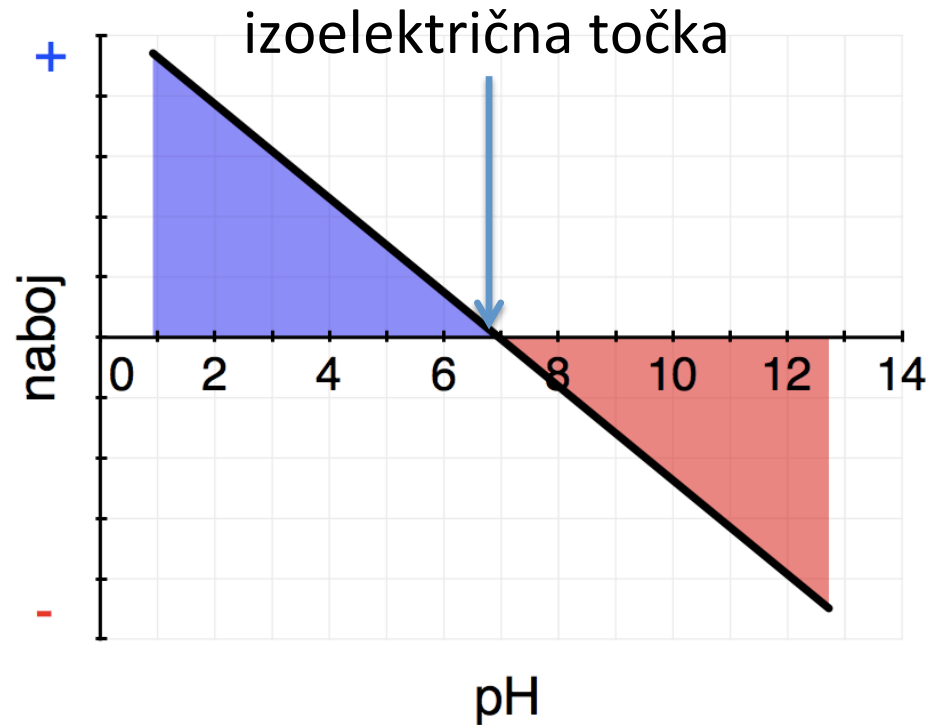


Na splošno velja, da so proteini v kislem nabiti pozitivno, v bazičnem pa negativno.



# IEX: Izoelektrična točka (pI)

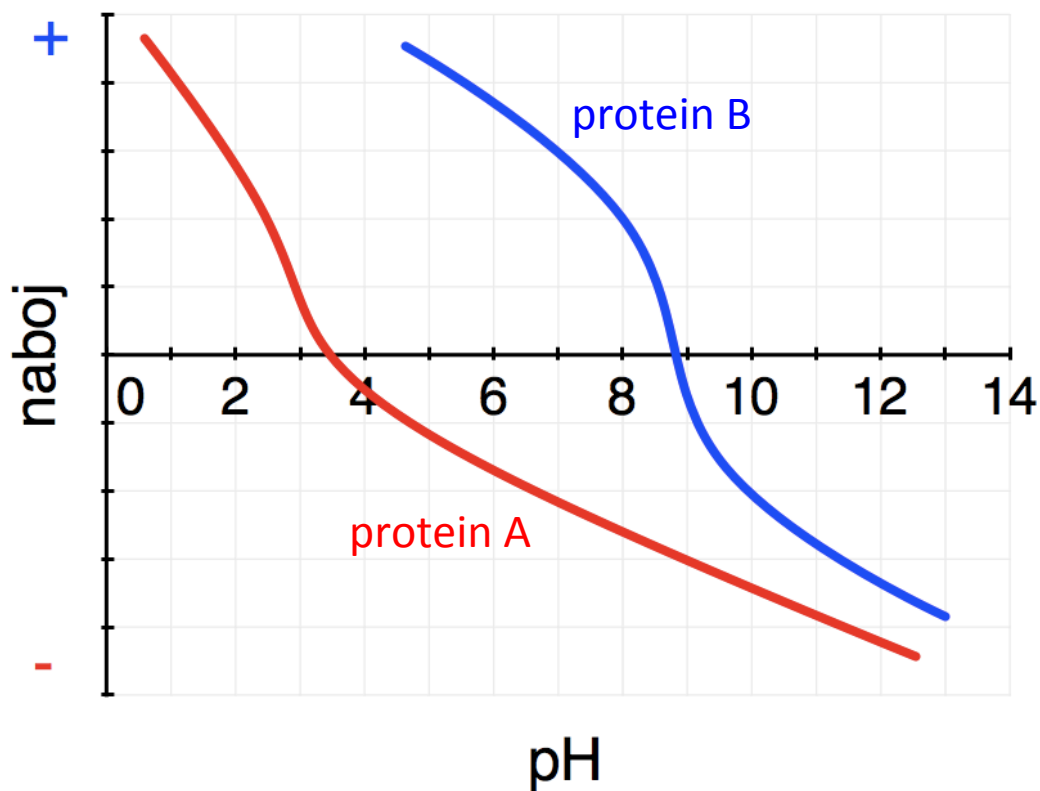
Izoelektrična točka je tista **vrednost pH**, pri kateri je celokupni naboj proteina enak 0.





# IEX: Različni proteini → različna izoelektrična točka

različni proteini → različno ak-zaporedje → različen delež Arg, Lys, His, Asp, Glu → različen naboj pri isti vrednosti pH



titracijske krivulje

pI (protein A) = 3,5  
pI (protein B) = 8,8

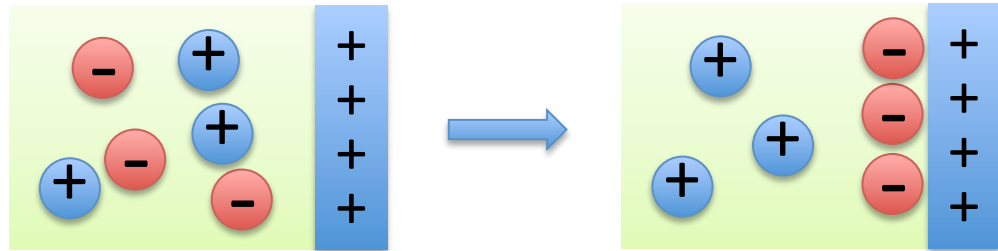
Protein B je bolj bazičen od proteina A. / Protein A je bolj kisel kot protein B.

# IEX: Stacionarna faza

- **nabite skupine**, kovalentno vezane na nosilec (matriks) - kroglice
- narava skupin določa
  - kateri proteini se bodo vezali
  - kako močno se bodo proteini vezali (jakost vezave)

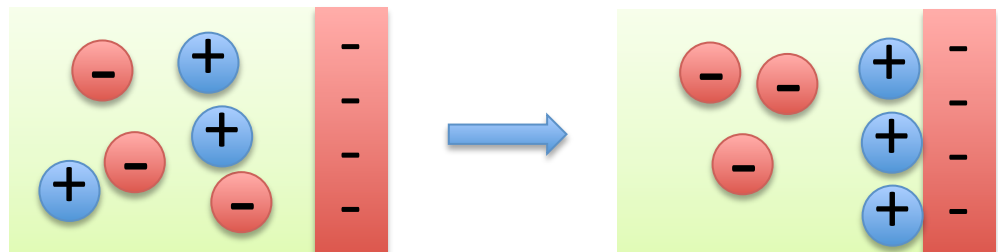
## **ANIONSKI** izmenjevalci:

- so pozitivno nabiti
- vežejo **ANIONE**



## **KATIONSKI** izmenjevalci:

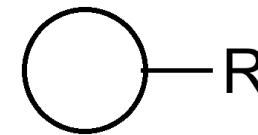
- so negativno nabiti
- vežejo **KATIONE**



# IEX: Anionski in kationski izmenjevalci

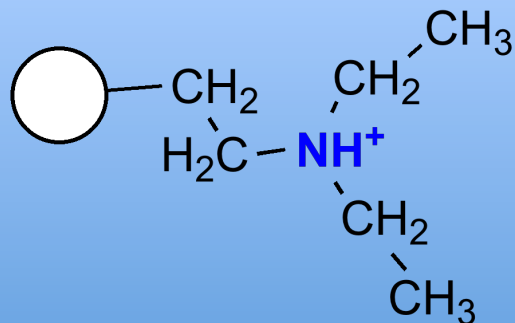
++++  
vežejo **anione**

-----  
vežejo **katione**

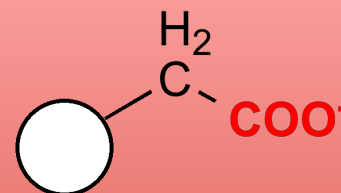


## anionski izmenjevalci

## kationski izmenjevalci

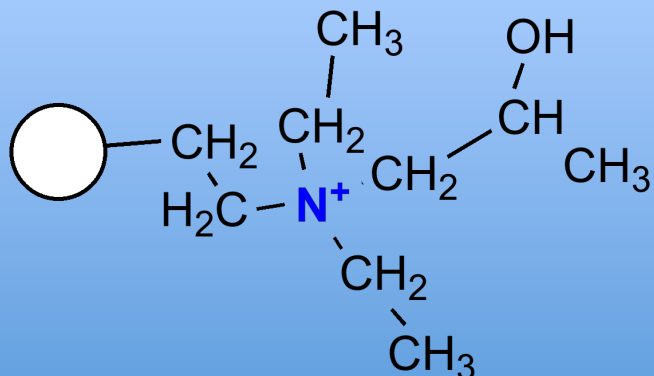


dietilaminoetil (DEAE)

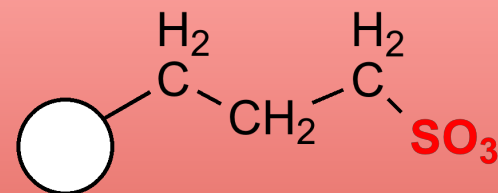


karboksimetil (CM)

šibki  
izm.



kvartarni aminoetil (QAE)



sulfopropil (SP)

močni  
izm.

# IEX: Jakost izmenjevalcev

Razlika med močnimi in šibkimi izmenjevalci je v vrednosti **pKa**

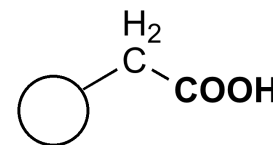
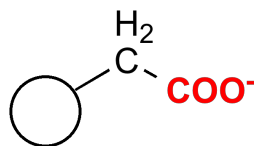
- močni izmenjevalci so nabiti v širokem območju pH
- šibki izmenjevalci so nabiti v ozkem območju pH

$$pK_a = -\log K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}$$

- šibke kisline: velik pKa
- močne kisline: majhen pKa

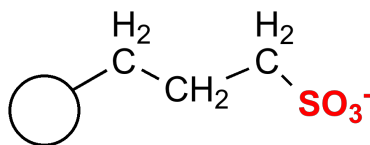
šibek

karboksimetil (CM)  
pK<sub>a</sub> ≈ 4

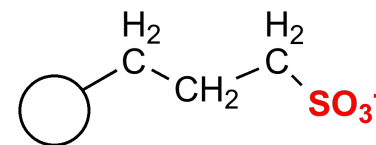


močan

sulfopropil (SP)  
pK<sub>a</sub> ≈ 1



pH = 7



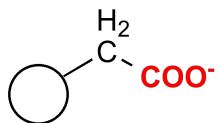
močno kislo (pH < 3)

**Vezava na močne ionske izmenjevalce je na močnejša.**

# IEX: Izbira stacionarne faze in pH pufra

Izrednega pomena za uspešno ločitev proteinov v vzorcu je pravilna izbira stacionarne faze in vrednosti pH pufra (mobilne faze).

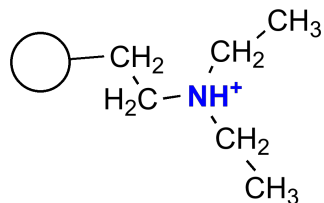
določa, kateri ioni se bodo vezali nanjo



kationski izmenjevalci



vezava kationov



anionski izmenjevalci



vezava anionov

določa ionsko obliko proteinov

nizek pH (kislo)

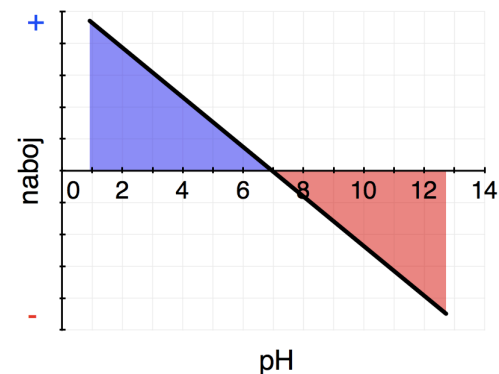


kationska oblika

visok pH (bazično)



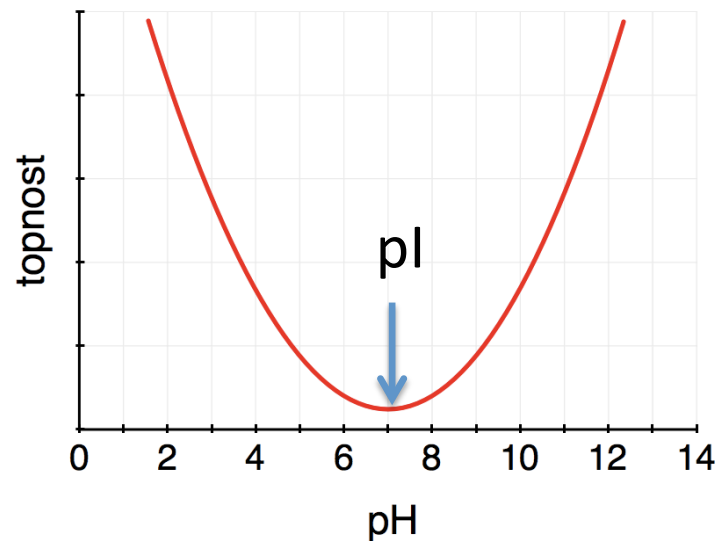
anionska oblika



# IEX: Izbira pH pufra

pH pufra vpliva na:

- **naboj** proteina
- **stabilnost** in **topnost** proteina



pH blizu izoelektrične točke



lahko pride do  
agregacije in obarjanja

ekstremne vrednosti pH  
(močno kislo, močno bazično)

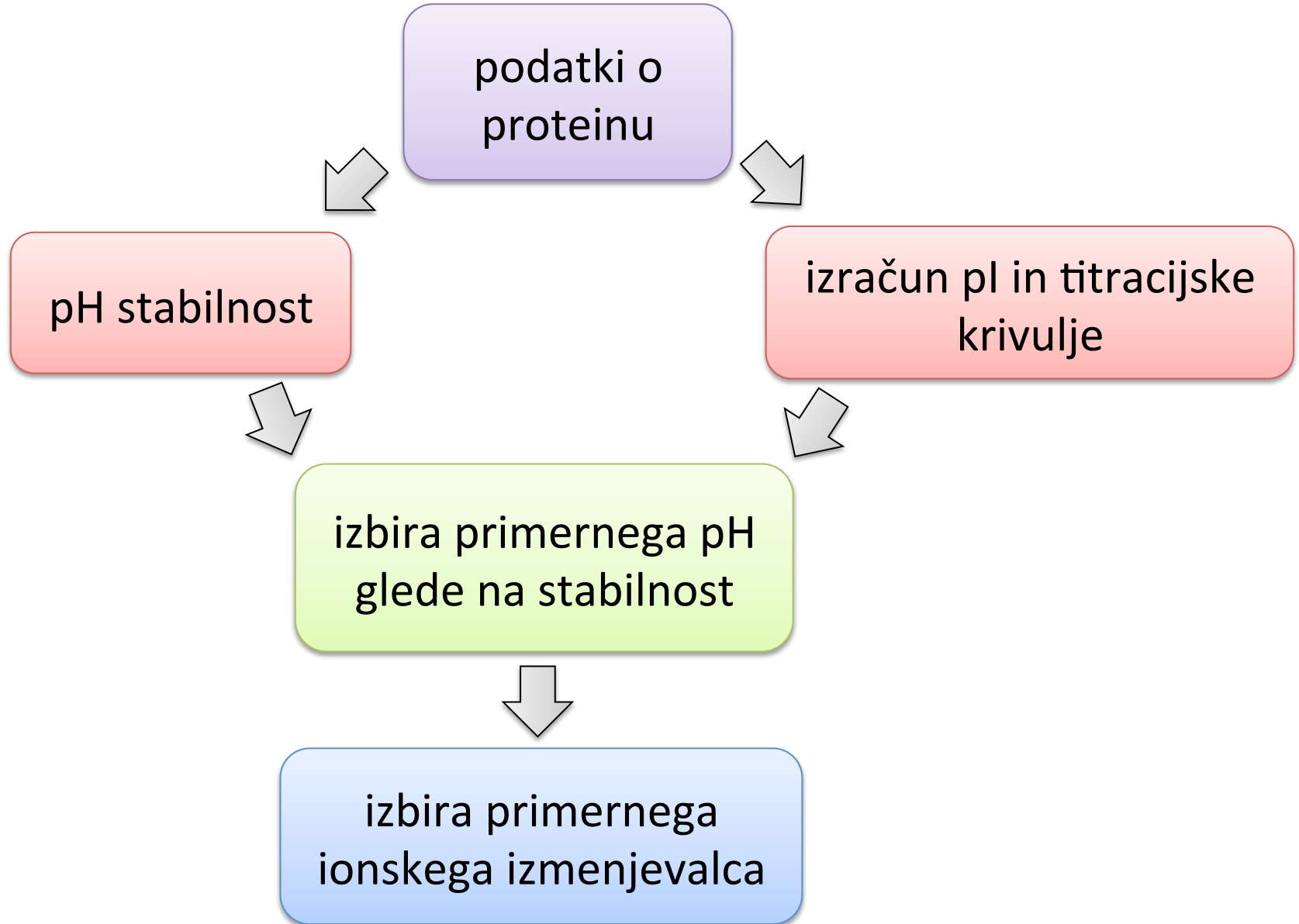


izguba funkcionalnosti



denaturacija  
proteina

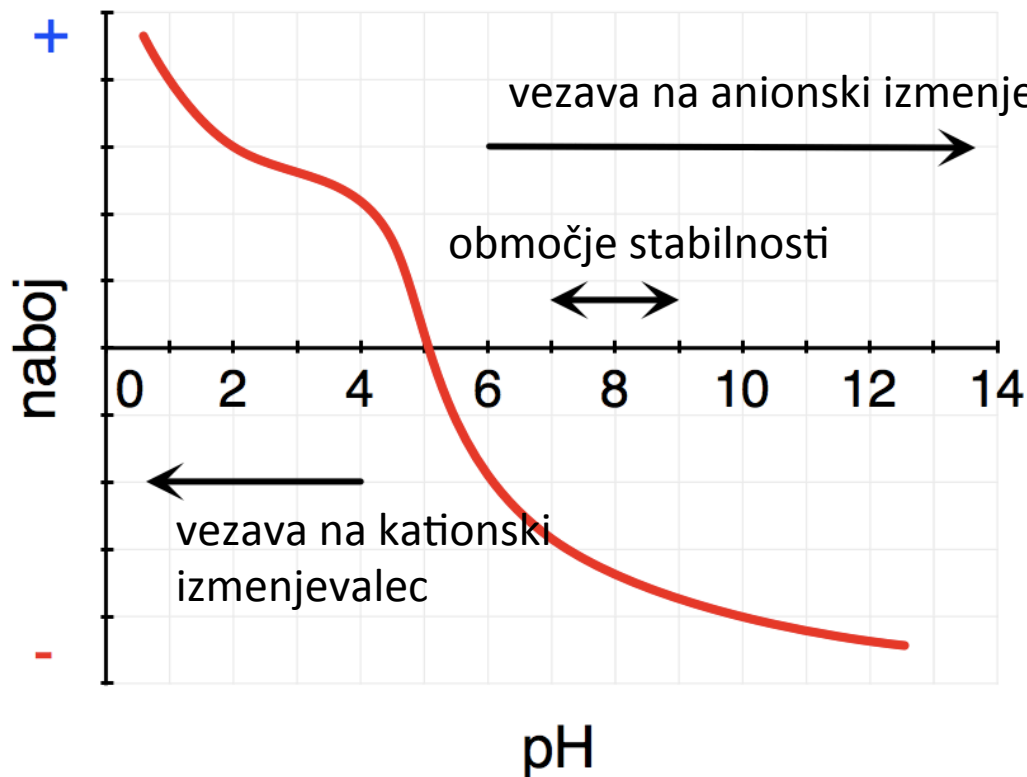
# IEX: Načrtovanje IEX



# IEX: Primer načrtovanja IEX

Situacija: v kompleksni zmesi imamo več proteinov, med drugim protein X, ki ga želimo ločiti od ostalih proteinov z IEX.

- poznamo  $pK_a$ -zaporedje proteina X  $\rightarrow$  izračunamo  $pI$
- poznamo pH območje stabilnosti proteina X



Izbrati moramo:

- pufer s pH med 7 in 9
- anionski izmenjevalec



izberemo ustrezen izmenjevalec



# IEX: Izvedba po stopnjah

Izbran imamo pufer (pH) in ionski izmenjevalec.

ekvilibracija

Kolono speremo s pufrom z izbrano vrednostjo pH ob **NIZKI IONSKI JAKOSTI**.



vezava

Na kolono nanese vzorec, ki je v enakem/podobnem pufru. **DIALIZA!**



spiranje

Z enakim pufrom **speremo nevezane proteine**.

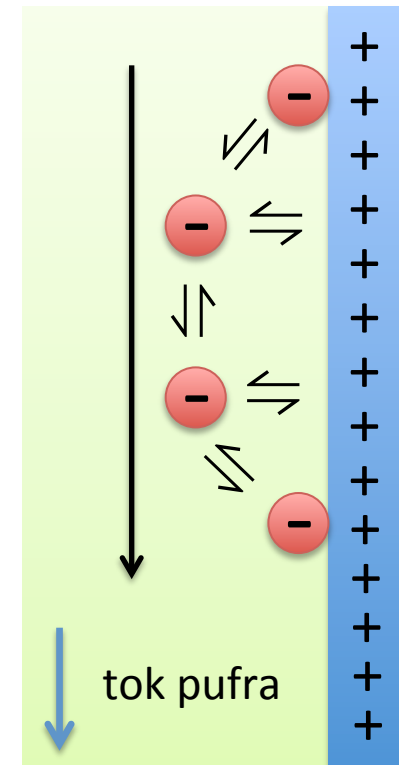


elucija

Vezane proteine eluiramo s **pufrom z višjo ionsko jakostjo** ali s **spremembo pH**.

# IEX: Elucija

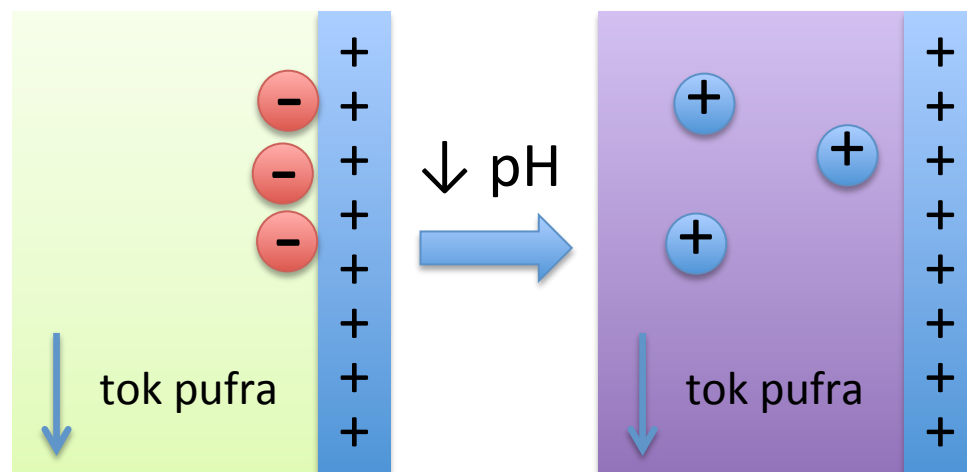
- **izokratska elucija**
  - eluiramo z začetnim pufrom
  - vezava preko ionskih interakcij je ravnotežne narave → vezani proteini počasi potujejo proti iztoku iz kolone
  - slabost: velika količina pufra, počasnost, slaba ločljivost



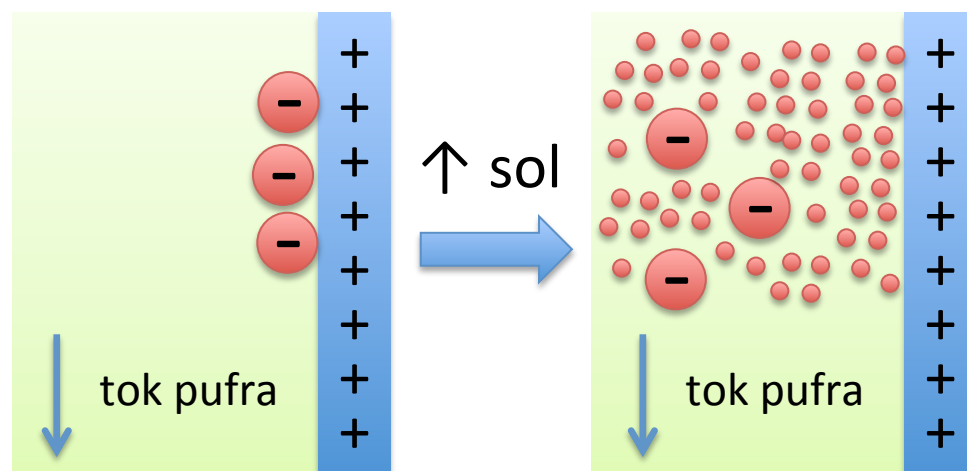
- elucija s spremembo pH ali povišanjem ionske jakosti

# IEX: Elucija s spremembo pH / ionske jakosti

**sprememba pH pufra**  
↓  
sprememba nabojev  
↓  
sprememba moči vezave

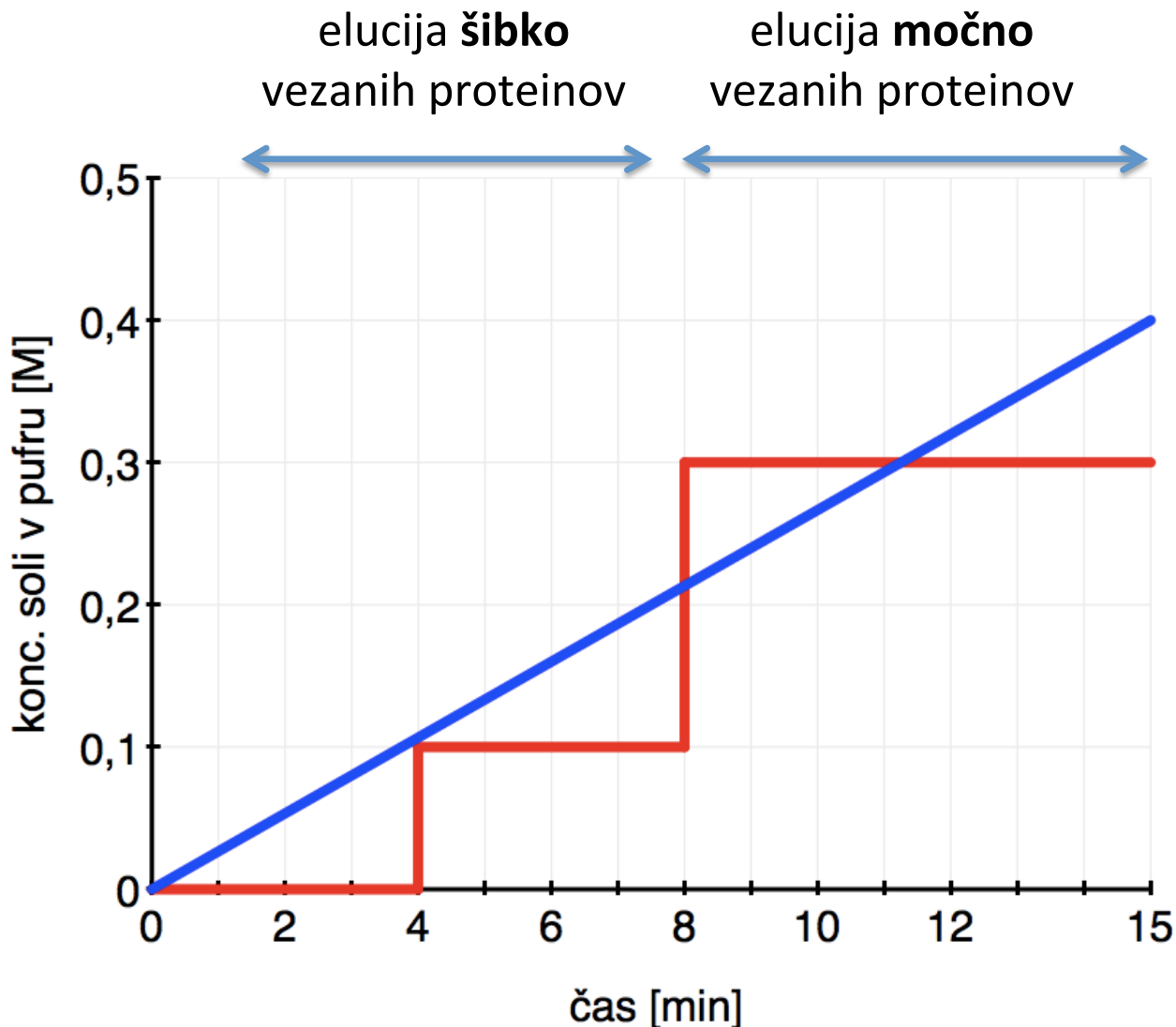


**povišanje ionske jakosti**  
↓  
“tekmovanje” za vezavo na kolono  
↓  
elucija proteina



# IEX: Stopenjska in gradientna elucija

Po **stopnjah** ali **zvezno (gradientno)** spreminjamo ionsko jakost ali pH.

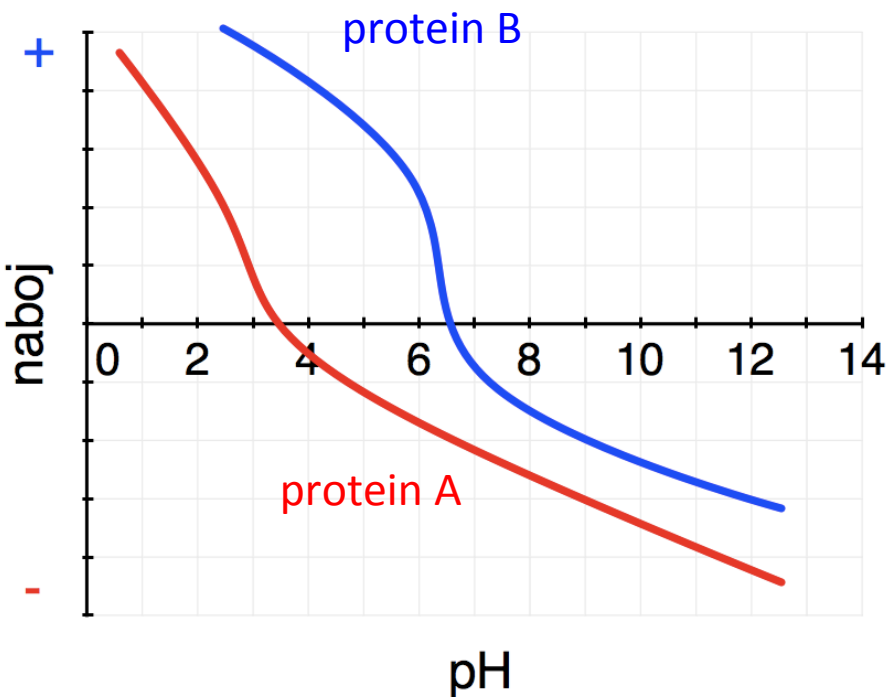


# IEX: Primer gradientne elucije

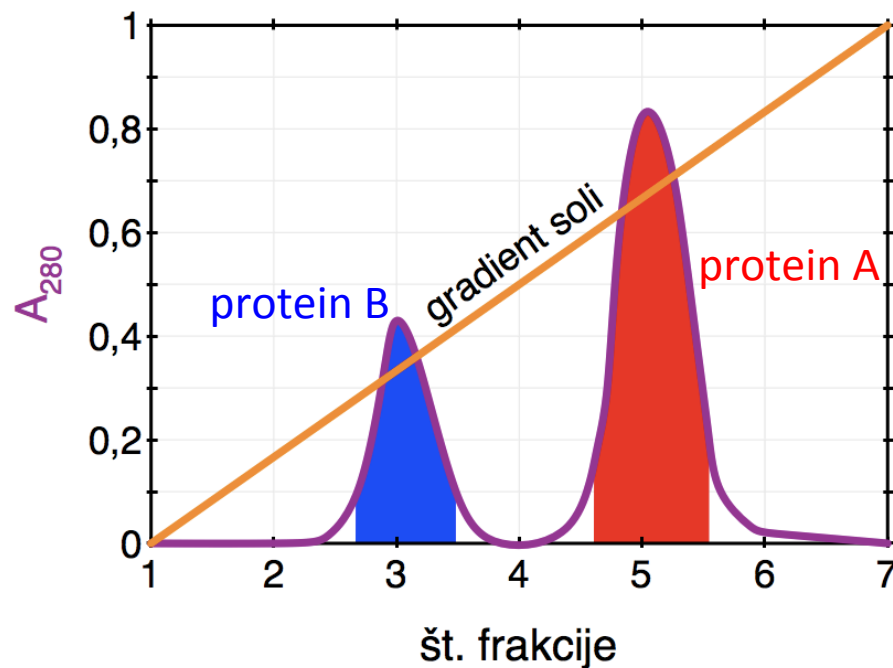
Ionski izmenjevalec: QAE-Sepharose (močan anionski)

Pufer za vezavo: 20 mM Tris, **pH 8,5**

Pufer za elucijo: 20 mM Tris, pH 8,5, **0→0,5 M NaCl**



titracijski krivulji

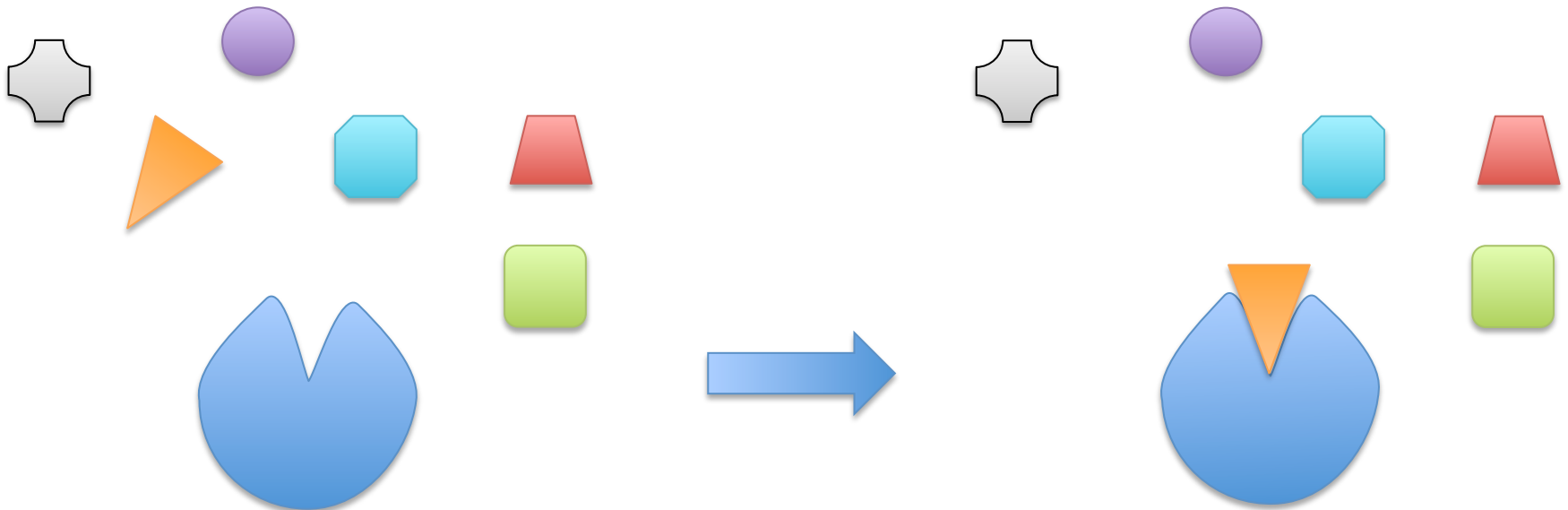


kromatogram

# Afinitetna kromatografija

*angl.* affinity chromatography

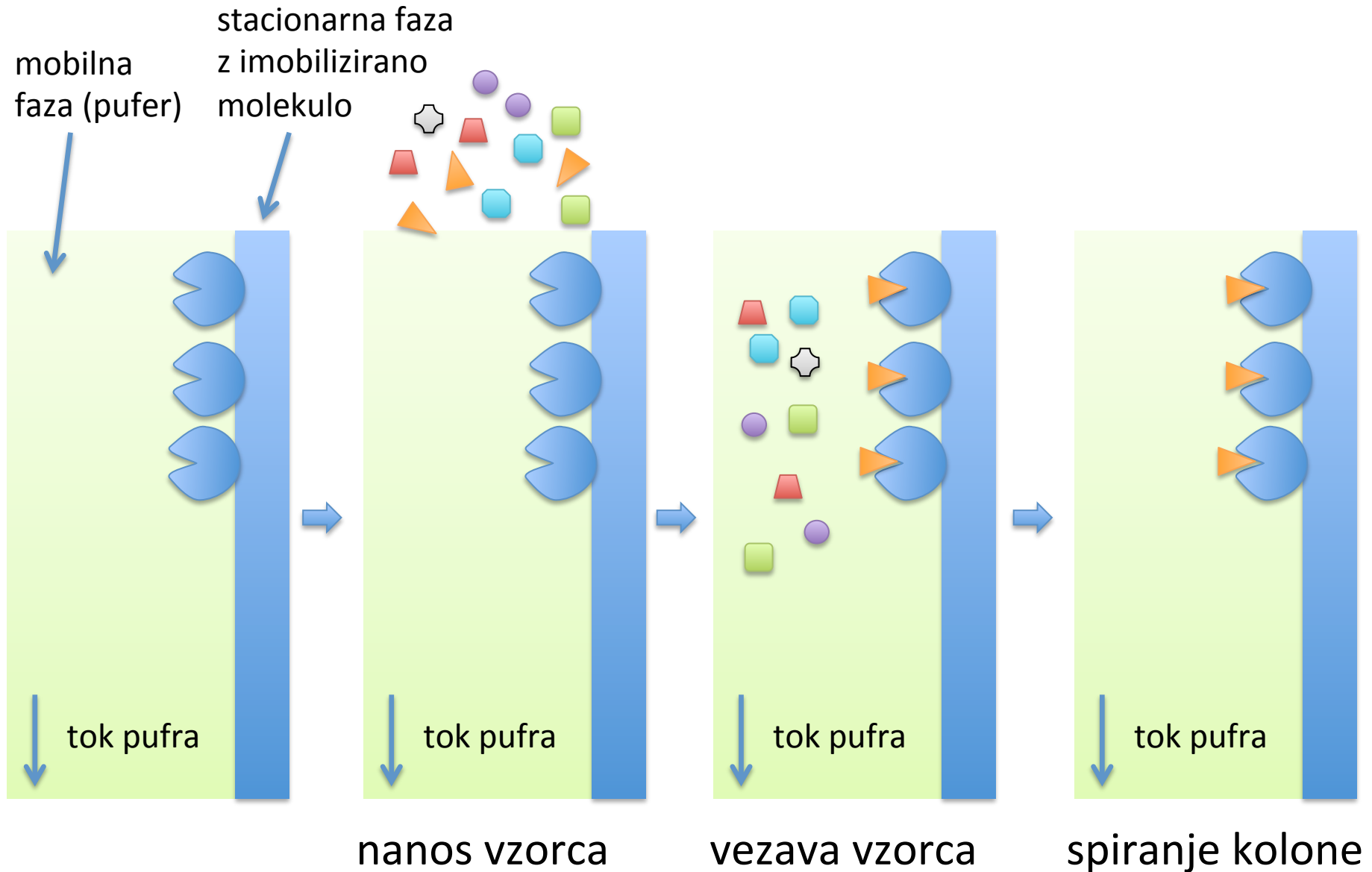
- temelji na **specifičnih interakcijah**
  - biološke interakcije → bioafiniteta
  - nebiološke interakcije → psevdoafiniteta



# Afinitetna kromatografija

1. splošno
2. biološke interakcije
3. ravnotežna vezava, disociacijska konstanta
4. stopnje izvedbe
  - vezava/imobilizacija liganda
  - nanos vzorca, vezava
  - elucija
5. primer psevdofinitetne kromatografije

# Afinitetna kromatografija





# Afinitetna kromatografija: biološke interakcije

Stacionarna faza je ena od molekul, imobilizirana (vezana) na nosilec.

molekula A	molekula B
encim	<ul style="list-style-type: none"><li>• substrat</li><li>• inhibitor</li><li>• kofaktor</li></ul>
receptor	<ul style="list-style-type: none"><li>• vitamin</li><li>• hormon</li></ul>
protitelo	antigen
nukleinska kislina	<ul style="list-style-type: none"><li>• komplementarna nukleinska kislina</li><li>• protein, ki se veže na nukleinsko kislino</li></ul>
protein	drug protein, ki se specifično veže nanj

molekula A + molekula B  $\rightleftharpoons$  kompleks

vzorec + ligand  $\rightleftharpoons$  kompleks

# Disociacijska konstanta

molekula A + molekula B  $\rightleftharpoons$  kompleks

ekvivalenten zapis

kompleks  $\rightleftharpoons$  molekula A + molekula B

$$K_D = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

majhna  $K_D \rightarrow$  močna vezava

Splošno pravilo:  $K_D$  naj bo  $< 10^{-4}$  M.  
(mikromolarno območje oz. nižje)

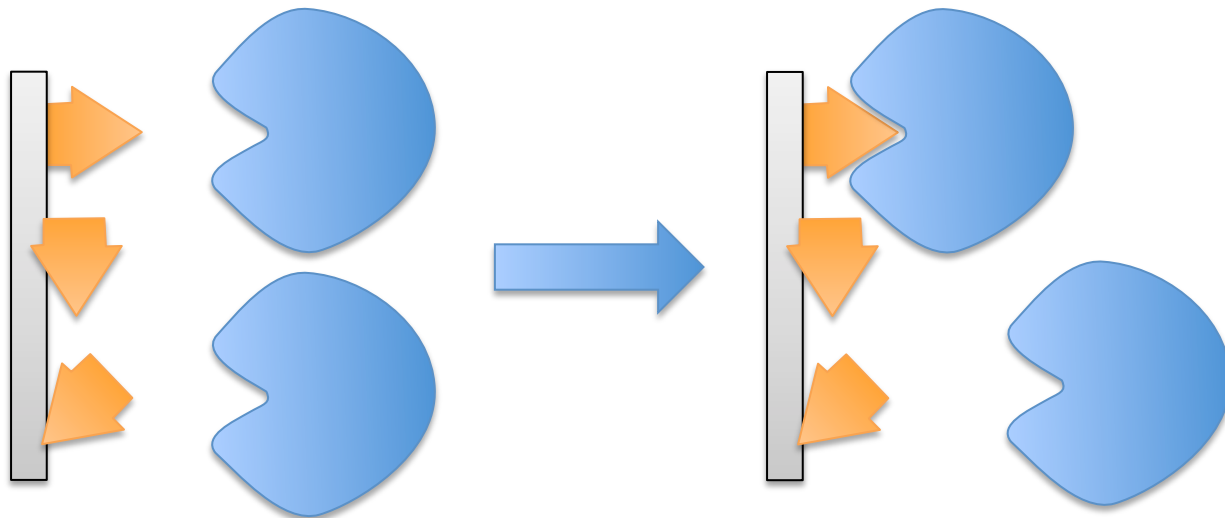
Visoka  $K_D \rightarrow$  šibka vezava  $\rightarrow$  nepopolna vezava  $\rightarrow$  velike izgube.

# Imobilizacija liganda

▶▶ ligand    ◡ makromolekula v vzorcu

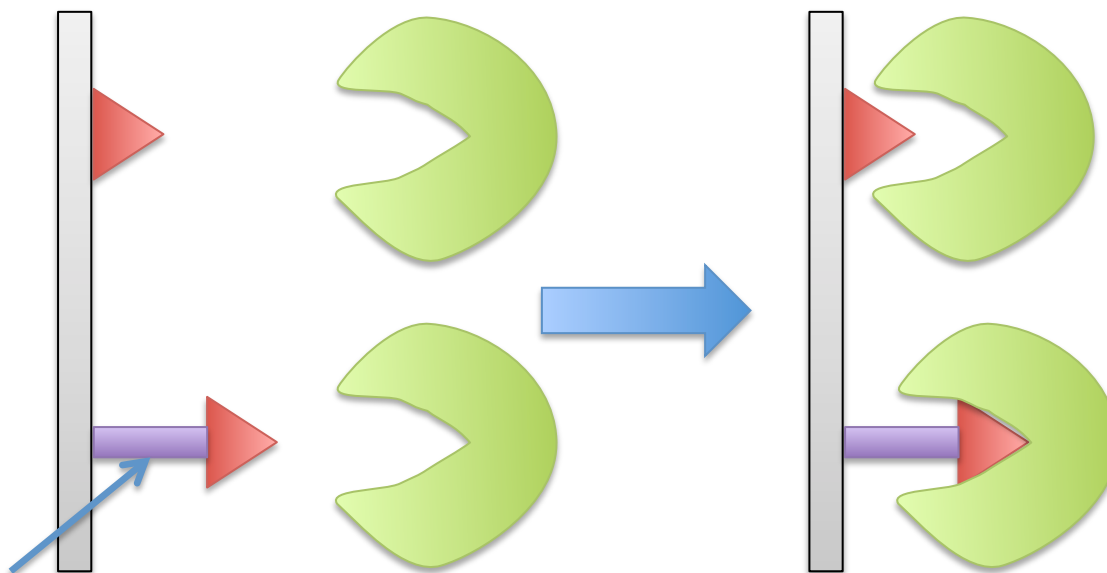
Ligand kovalentno vežemo na posebej pripravljen nosilec (matriks).

primerna  
**orientacija**



zadostna  
**dostopnost**  
(brez steričnih ovir)

vmesnik ("spacer")



# Nanos vzorca

## Volumen vzorca ni bistven!

Afinitetno kromatografijo lahko uporabimo za koncentriranje.

Kolono ekvilibriramo v **pufri za vezavo** (= pufer vzorca).

Željene lastnosti pufra za vezavo:

- omogoča **visoko jakost specifičnih interakcij**
- **oslabi nespecifične interakcije**

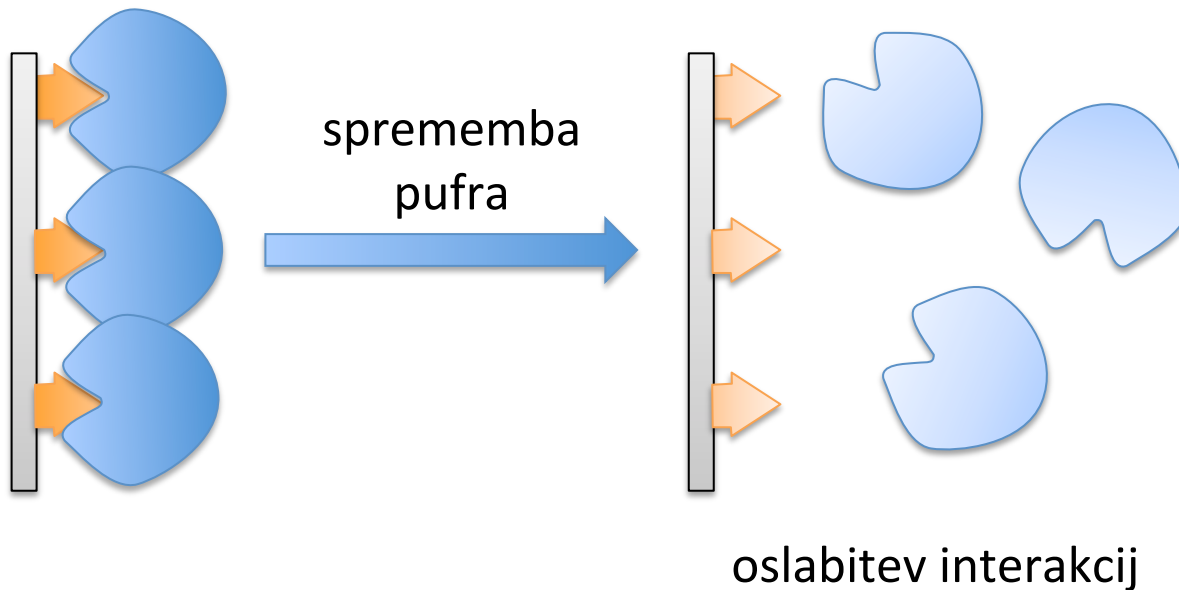
Ustrezna izbira **pH** ter **ionske moči**!

Po nanosu vzorca kolono speremo z začetnim pufrom (= pufer za vezavo), da odstranimo nevezane snovi.

# Elucija

Poznamo dva osnovna načina:

- **elucija s spremembo pogojev**
- elucija s prostim ligandom (afinitetna elucija)



# Elucija

Poznamo dva osnovna načina:

- **elucija s spremembo pogojev**
- elucija s prostim ligandom (afinitetna elucija)

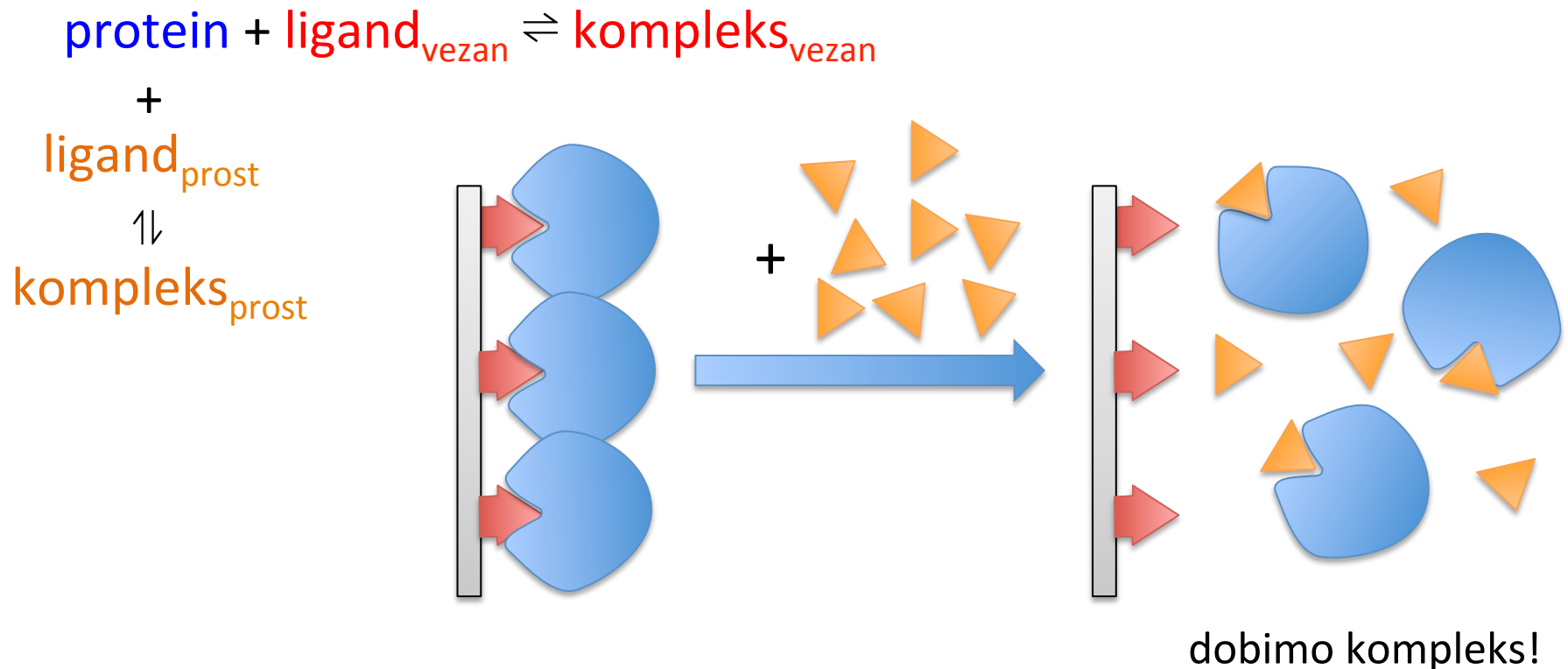
narava interakcij med ligandom in vzorcem	interakcije oslabimo z...
elektrostatske	<ul style="list-style-type: none"><li>• ↑ ionsko jakostjo</li><li>• spremembo pH</li></ul>
hidrofobne	<ul style="list-style-type: none"><li>• ↓ ionsko jakostjo</li><li>• dodatkom topil z nizko dielektrično konstanto</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• šibki denaturanti (rahla sprememba konformacije)</li><li>• sprememba temperature</li></ul>	

# Elucija

Poznamo dva osnovna načina:

- elucija s spremembo pogojev
- **elucija s prostim ligandom (afinitetna elucija)**

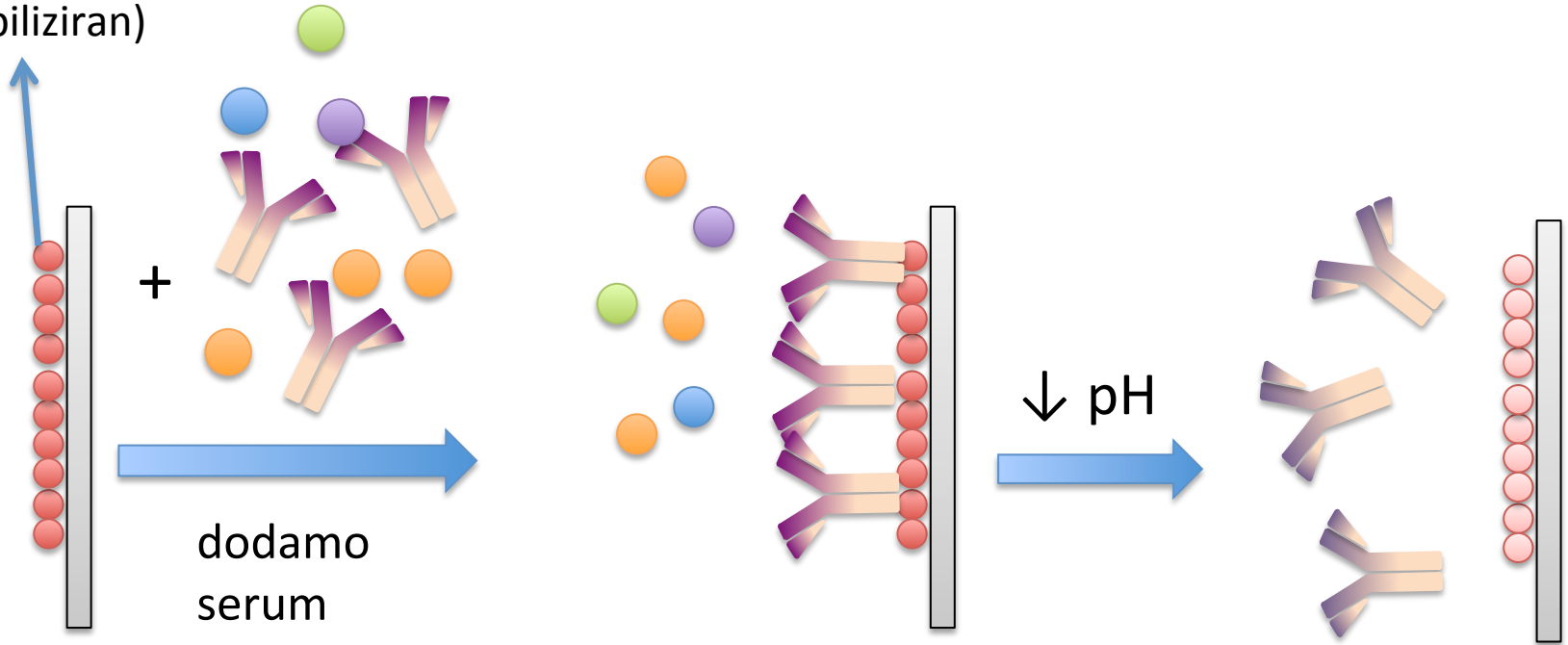
Z visoko konc. nevezanega liganda izpodrinemo immobiliziran ligand.



# Primer: imonoglobulin G (IgG) in protein A

čiščenje (izolacija) protiteles iz seruma

protein A  
(imobiliziran)



protein A-  
Sepharose

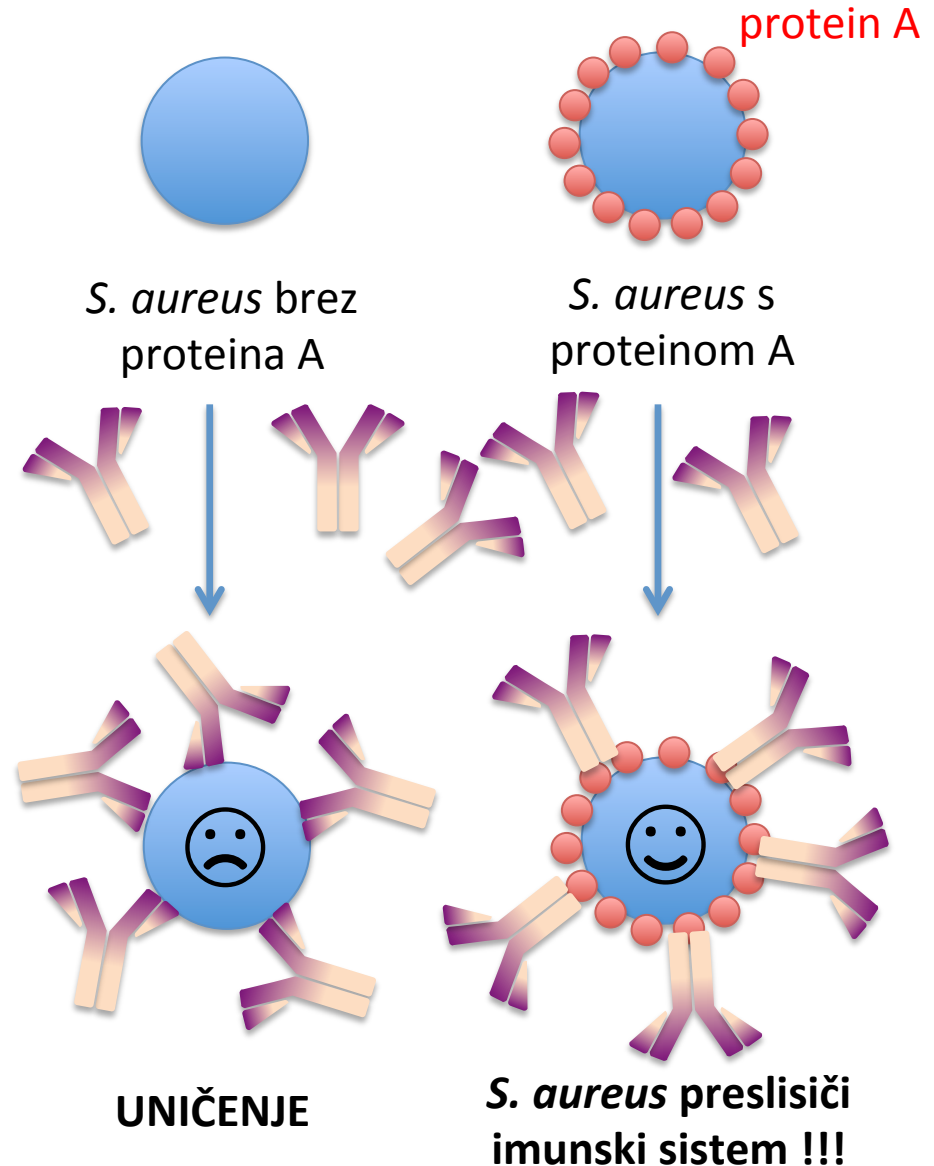
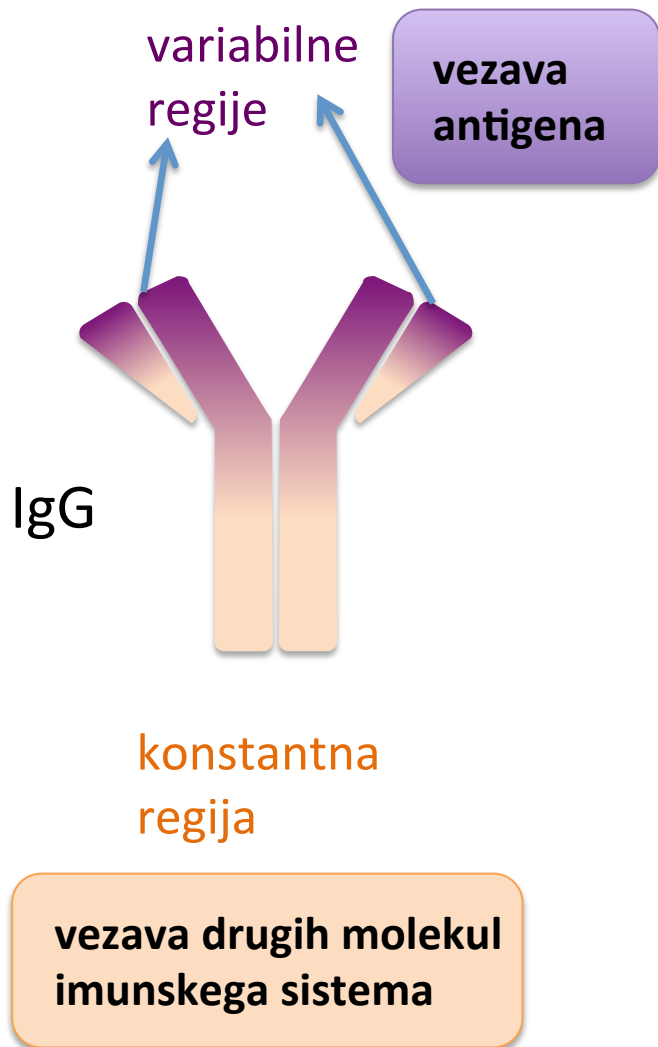
- vezava IgG (fiziološki pH)
- speremo nevezane proteine

elucija s spremembo  
pH (oslabimo  
interakcijo med  
proteinom A in IgG)



# Primer: imonoglobulin G (IgG) in protein A

protein A iz *Staphylococcus aureus*



# Nikelj-afinitetna kromatografija

- *psevdoafinitetna* kromatografija
- IMAC (“**i**mmobilized **m**etal **a**ffinity **c**hromatography”)
- heksahistidinska oznaka (His<sub>6</sub>)

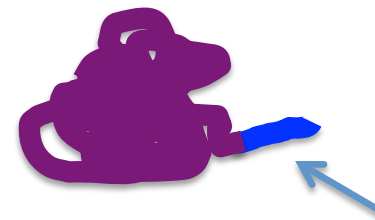
nt ... CTG AGT GAG TGA nespremenjen  
ak ... Leu Ser Glu STOP protein



**genski inženiring**

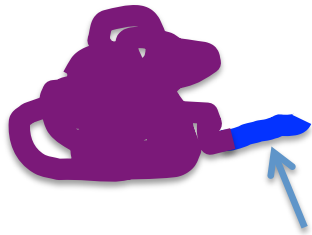
nt ... CTG AGT GAG CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA  
ak ... Leu Ser Glu His His His His His His STOP

spremenjen rekombinanten  
protein



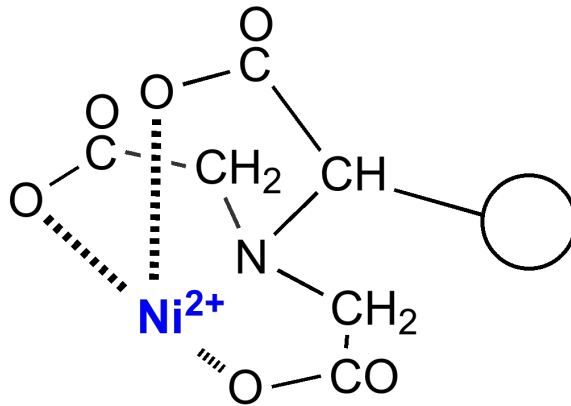
His<sub>6</sub>

# Nikelj-afinitetna kromatografija



His<sub>6</sub>

+



Ni-NTA-Sepharose  
(stacionarna faza)



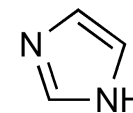
Ni<sup>2+</sup>



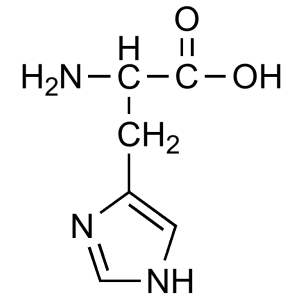
koordinacijski kompleks  
med His<sub>6</sub> in Ni<sup>2+</sup>



elucija z  
imidazolom

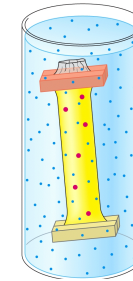


imidazol



His

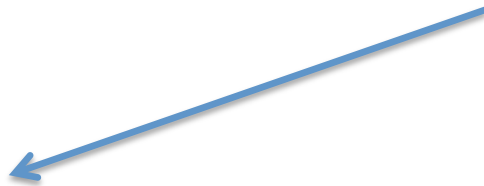
# 4. vaja – Ionsko-izmenjevalna ter afinitetna kromatografija



oborjeni proteini  
(70% amonijev sulfat)



dializa  
(20 mM NaOAc, pH 5)



nakisanje



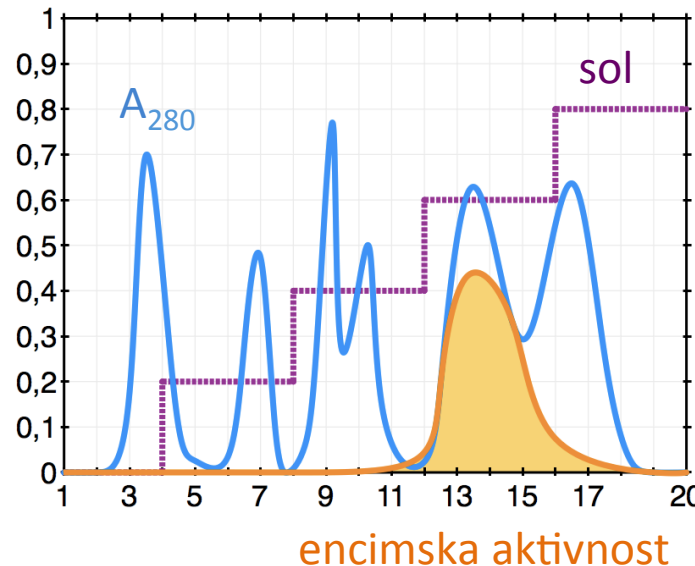
**IEX: QAE,  
SP, CM**



- $A_{280}$
- BANA test



**katepsin B**



**afinitetna  
kromatografija:  
pepstatin-  
Sepharose**



- $A_{280}$
- Ansonov test



**katepsin D**