

Priimek in ime:..... smer študija:..... skupina:.....

## Afinitetna kromatografija

(Teorija je v skriptih na straneh 50-52)

**Namen vaje:** Z afinitetno kromatografijo izolirati katepsin D iz dializiranega vzorca goveje vranice po obarjanju z amonijevim sulfatom in preveriti prisotnost encima v vezanih frakcijah z encimskim testom.

**Uvod:** Po obarjanju z amonijevim acetatom smo shranili frakcijo, ki med mnogimi drugimi proteini vsebuje tudi aspartatno peptidazo katepsin D (v aktivnem mestu ima aspartat). Oborjeni material je bil dializiran čez noč proti 20 mM NaOAc pufru pH 5, tik pred današnjo vajo pa nakisan na pH 3.5. Kljub temu, da vzorec vsebuje veliko proteinov, lahko iz mešanice izoliramo aspartatne peptidaze v enem samem koraku s pomočjo reverzibilne vezave na specifični ligand – inhibitor pepstatin. Pepstatin je oligopeptid mikrobnega izvora (*Streptomyces*), ki je za potrebe kromatografije imobiliziran na sefarozo ali agarozo. V kislem, kjer je pH optimum aspartatnih peptidaz, se na pepstatin veže katepsin D. Nosilec z vezano peptidazo speremo, da se znebimo drugih molekul iz vzorca, nato pa katepsin D eluiramo s spremembo pH – kompleks peptidaza-inhibitor razpade.

Aktivnost peptidaz lahko določimo na sintetične ali naravne substrate. Za določanje aktivnosti aspartatnih peptidaz obstaja le malo sintetičnih substratov, zato kot substrat pogosto uporabljamo hemoglobin (Ansonov test). V encimskem testu določimo količino (oligo)peptidov v raztopini hemoglobina, ki smo ga inkubirali z vzorcem (aspartatno peptidazo). (Oligo)peptide od nerazgrajenega hemoglobina ločimo z obarjanjem s trikloroacetno kislino – ta obori velike proteinske molekule, peptidov pa ne. Oborjene proteine iz raztopine ločimo s filtriranjem, količino peptidov pa določimo s pomočjo Folinovega reagenta. Več ko je bilo v vzorcu katepsina D, več peptidov je nastalo po inkubaciji hemoglobina s tem vzorcem in večja bo izmerjena absorbanca pri 750 nm. Za vsak vzorec – frakcijo pripravimo slepi vzorec, ker frakcije lahko vsebujejo različne količine peptidov, ki nam s Folinovim reagentom dajo določeno vrednost. Poleg tega raztopina hemoglobina že sama vsebuje določen delež peptidov, zato moramo to vrednost odšteti od vrednosti dobljene po razgradnji hemoglobina s peptidazo.

**Potek dela:** Afinitetno kromatografijo delaš v paru, encimski test pa vsak študent zase.

1. Na vnaprej pripravljen nosilec (~3 mL pepstatin-sefaroze ali agaroze) nanesi 1,5 mL dializiranega, nakisanega in centrifugiranega vzorca, ki vsebuje katepsin D. Nevezani material zberi v epruveti in ponovno nanesi na isti nosilec.
2. Pod kolono podstavi epruvete in nevezani material po 2. nanosu shrani za analizo (epruveta 0/nanos).
3. Nevezane proteine speri s kolone s pufrom za spiranje (0.1 M NaOAc, pH 5, 1 M NaCl). Zberi 4 frakcije po 3 ml.
4. Eluiraj katepsin D z rahlo alkalnim pufrom (50 mM Tris/HCl, pH 8.6, 1 M NaCl). Zberi 4 frakcije po 1.5 ml.
5. Določi  $A_{280}$  vsem frakcijam in nariši elucijski diagram.
6. Vsak študent iz para vzame 4 oz. 5 frakcij (skupaj ste dobili 9 frakcij), katerim določi proteolizno aktivnost na substrat hemoglobin (Ansonov test).

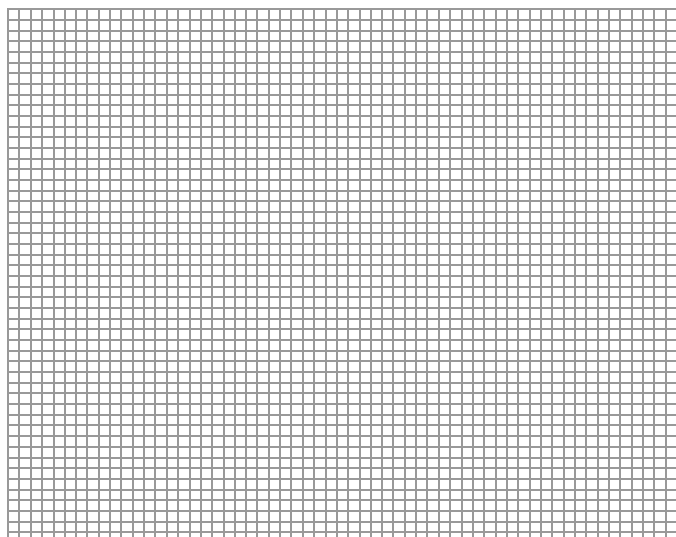
### Ansonov test:

1. Pripravi si 8 oz. 10 epruvet, 4 oz. 5 za slepe vzorce in 4 oz. 5 za vzorce iz afinitetne kromatografije.
2. Označi epruvete z zaporedno številko frakcije, ki jo boš testiral in ravno toliko epruvet za slepi vzorec (oznaka S-X, kjer je X št. frakcije, ki ji slepi vzorec pripada).
3. V vsak par epruvet odpipetiraj po 200  $\mu$ L ustrezne frakcije. Natančno pipetiranje je ključno za uspeh tega testa!
4. V epruvete s slepimi vzorci odpipetiraj po 2 mL 0.3 M trikloroacetne kisline (TCA). Dobro premešaj.  
*S tem denaturiraš vse proteine v vzorcu, vključno s katepsinom D – zato ta ne bo mogel razgrajevati substrata hemoglobina.*
5. V vse epruvete dodaj po 1 mL 2% raztopine hemoglobina (pH 3.5).
6. Inkubiraj pri 37°C 25 minut. Občasno premešaj. Med inkubiranjem zgubaj 8 filtrov in pripravi ter označi epruvete za filtriranje.
7. Reakcijo v vzorcih prekini z dodatkom 2 mL 0.3 M TCA.  
*Ne dodajaj TCA v slepe vzorce – tja si ga dodal že na začetku.*
8. Reakcijske mešanice prefiltriraj v označene epruvete. Oborine zavrzi.
9. V nov komplet označenih epruvet prenesi po 1 mL filtrata in dodaj 2 mL 0.5 M NaOH. Dobro premešaj.
10. V pare vzorec/slepi vzorec enega za drugim dodaj po 0.6 mL Folinovega reagenta in takoj začni meriti čas.
11. Po natančno 5 minutah izmeri  $A_{750}$  vzorcev proti slepim vzorcem.

### Rezultati in odgovori na vprašanja:

1. Nariši elucijski diagram (os x: št. frakcije, os y1: absorbanca pri 280 nm, y2: aktivnost, izražena posredno kot  $A_{750}$ ). Označi, katere frakcije vsebujejo katepsin D. Nariši tudi točke pri  $A_{520}$ , ki jih je izmeril kolega.

frakcija	$A_{280}$	$A_{750}$
0/nanos		
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		



2. Katepsin D je prisoten v frakcijah .....
3. Ocenjujem, da je količina izoliranega katepsina D .....  $\mu\text{g}$  (raztopina 1 mg/mL ima  $A_{280}=1.2$ ).  
Račun:
4. Pričakujem, da je katepsin D po afinitetni kromatografiji bolj / manj (obkroži) čist kot po ionsko-izmenjevalni kromatografiji.
5. Katere druge ligande bi lahko uporabil/a za izolacijo katepsina D z afinitetno kromatografijo? Napiši imena molekul, če veš.
6. Ali bi Ansonov test lahko izvedli s samo enim slepim vzorcem za vse 4 testirane frakcije? Zakaj?
7. Ali je potrebno vzorec pred afinitetno kromatografijo vedno dializirati?