

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

## Ionsko-izmenjevalna kromatografija

(Teorija je na straneh 44-49.)

**Namen vaje:** Uporabiti ionsko-izmenjevalno kromatografijo za delno očiščenje katepsina B iz dializiranega vzorca goveje vranice po obarjanju z amonijevim sulfatom in ugotoviti prisotnost katepsina B v frakcijah z encimskim testom.

**Uvod:** Razsoljen vzorec po obarjanju proteinov iz homogenata svinjske vranice s 40%-70% nasičenim amonijevim sulfatom vsebuje še veliko različnih proteinov. Za čiščenje bomo izkoristili različne izoelektrične točke proteinov. Poskus izvajamo pri točno določeni vrednosti pH, kjer imajo proteini ustrezen celokupni naboj glede na njihovo izoelektrično točko. Na nosilec z nabitimi skupinami se vežejo samo nasprotno nabiti proteini, enako nabiti pa se takoj sperejo s kolone. Vzorec smo pred nanosom dializirali proti začetnemu pufru. Uporabili bomo naslednje ionske izmenjevalce: QAE (kvartarni aminoetil), SP (sulfopropil) ali CM (karboksimetil).

Pogoji za izvedbo celotnega poskusa so izbrani tako, da je med proteini, ki so aktivni na sintetični substrat BANA, največ katepsina B. Katepsin B je cisteinska peptidaza, ki ima v aktivnem mestu aminokislino cistein. Cistein je zelo reaktiven in nanj se zlahka vežejo druge skupine, ki blokirajo hidrolizno aktivnost encima. Zato v reakcijo najprej dodamo reducent cistein, ki ponovno aktivira blokirano aktivno mesto. V sintetičnem substratu BANA katepsin B cepi amidno vez med argininskim ostankom in  $\beta$ -naftilamidom. Sprošča se naftilamin. Po določenem času reakcijo prekinemo z dodatkom p-kloromerkuribenzojske kisline, ki je ireverzibilni inhibitor encimov s cisteinom v aktivnem mestu. Nastali naftilamin ni obarvan, zato ga kemično spremenimo z dodatkom diazonijeve soli Fast Garnet – nastane rdeče obarvana azo-spojina.

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

1. Plastično kolono ( $V = 10$  mL) napolni s 4 mL nosilca (na črto nad spodnjo tabelo takoj vpiši, kateri nosilec si dobil).
2. Nosilec spero z 2 x 6 mL startnega pufru (pufer A) (20 mM NaOAc, pH 5.0) brez NaCl. Pufer pod kolono zbiraj v čaši in na koncu zavrzi. (6 mL je volumen od vrha gela do vrha kolone.)
3. Označi epruvete s številkami 0-12. V nadaljevanju zbiraj frakcije po 3 mL, to je do prvega prečnika na stojalu za epruvete.
4. Nanesi 1,5 mL vzorca po obarjanju in dializi proti začetnemu pufru. Takoj začni zbirati vzorec v epruveto 0.
5. Speri z 9 mL začetnega pufru (pufer A) – zbiraj frakcije po 3 mL v epruvete 1-3.
6. Speri z 9 mL začetnega pufru z dodanim NaCl do 25 mM končne koncentracije (pufer B) (frakcije 4-6).
7. Speri z 9 mL začetnega pufru z dodanim NaCl do 150 mM končne koncentracije (pufer C) (frakcije 7-9).
8. Speri z 9 mL začetnega pufru z dodanim NaCl do 600 mM končne koncentracije (pufer D) (frakcije 10-12).
9. Speri s 3 x 6 mL začetnega pufru – s tem ekvilibriš kolono za naslednji poskus. Pufer zbiraj v čaši in na koncu zavrzi.
10. Določi absorbance frakcij pri 280 nm in nariši elucijski diagram. Po posvetu z asistentom izberi frakcije, ki pri vsakem od izbranih elucijskih pogojev vsebujejo največ proteinov (4 vzorci).

### Določanje hidrolizne aktivnosti na substrat BANA:

1. Pripravi si 5 epruvet: za 4 vzorce in za slepi vzorec.
2. V epruvete odpipetiraj po 200  $\mu$ L fosfatnega pufru, pH 6 s cisteinom in dodaj po 100  $\mu$ L posamezne frakcije. Za slepi vzorec namesto frakcije vzemi elucijski pufer s 600 mM NaCl.
3. Pretresi in inkubiraj 5 minut v vodni kopeli pri 37°C.
4. Dodaj po 50  $\mu$ L substrata BANA (v inkubatorju), dobro premešaj in inkubiraj še 10 minut.
5. Ustavi reakcijo z dodatkom 500  $\mu$ L prekinjevalnega reagenta (ta je sestavljen iz p-kloromerkuribenzojske kisline in soli Fast Garnet). Premešaj.
6. Po vsaj 3 minutah inkubiranja pri sobni temperaturi izmeri  $A_{520}$  proti slepemu vzorcu.

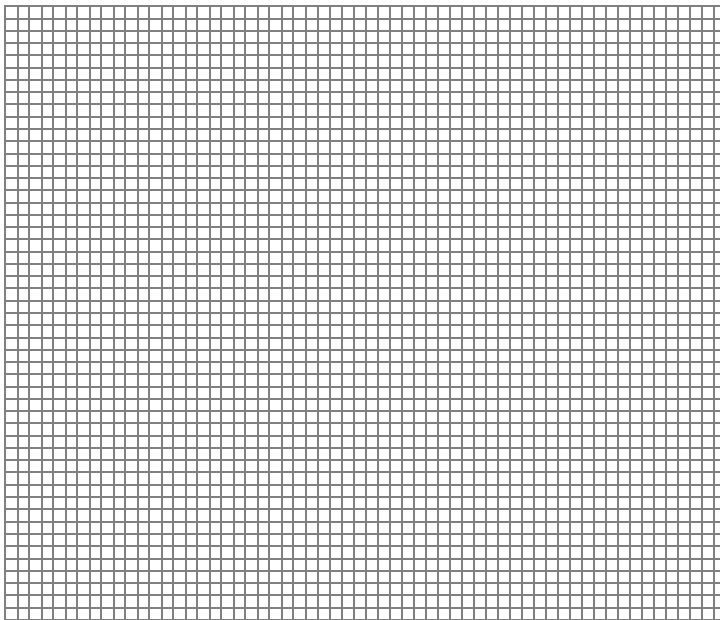
### **Rezultati in odgovori na vprašanja:**

1. V tabelo vpiši izmerjene absorbance in nariši elucijski diagram (os x: št. frakcije, os y1: absorbanca pri 280 nm, y2: aktivnost, izražena posredno kot  $A_{520}$ ). Vriši tudi gradient NaCl – če je potrebno, uvedi še os y3. Na graf vriši tudi vrednosti  $A_{520}$ , ki jih je dobil kolega iz para.

Moja skupina je uporabila ionski izmenjevalec \_\_\_\_\_ .

frakcije 1-3: pufer A: NaOAc  
frakcije 4-6: pufer B: NaOAc + 25 mM NaCl  
frakcije 7-9: pufer C: NaOAc + 150 mM NaCl  
frakcije 10-12: pufer D: NaOAc + 600 mM NaCl

| frakcija | A <sub>280</sub> | A <sub>520</sub> v testu BANA |
|----------|------------------|-------------------------------|
| 0=nanos  |                  |                               |
| 1        |                  |                               |
| 2        |                  |                               |
| 3        |                  |                               |
| 4        |                  |                               |
| 5        |                  |                               |
| 6        |                  |                               |
| 7        |                  |                               |
| 8        |                  |                               |
| 9        |                  |                               |
| 10       |                  |                               |
| 11       |                  |                               |
| 12       |                  |                               |



2. Iz grafa je razvidno, da se katepsin B pri danih pogojih veže na nosilec: DA NE (obkroži pravilno trditev).  
To pomeni, da ima pri pH 5 ..... naboj.
3. Kako bi ločbo proteinov lahko izboljšali?
4. V katerih frakcijah si zaznal/a hidrolizno aktivnost? Kako si lahko razlagamo, da je aktivnost prisotna tako v nevezanih kot v vezanih frakcijah?