

Affinitás kromatográfia

1. Milyen biokémiai molekulák között fellépő kölcsönhatásokat ismer, amelyek hasznosíthatóak affinitás kromatográfiai technika alkalmazásakor?(min 3)
 - ellenanyag-antitest
 - enzim- szubsztrát
 - receptor-ligand
 - fémion-kelátor
2. Milyen affinitás címkéket ismer?(3 példa)
 - rekombináns fehérjék tisztítására elterjedt:
"címkét" kódoló expressziós vektorok (GST, MBP, His-tag)
3. Mi az az anyag, amit elúciós puffer adalékanyagaként szokás használni, ha His-tag és Ni^{2+} ionok közti kölcsönhatást szeretnénk megszüntetni (azaz amikor az IMAC oszlopról eluáljuk a His taggel jelölt fehérjét)? Miért?(1 szó+ rövid magyarázat)
 - a fémion (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) kelátkötést alakít ki a hisztidinek imidazol gyűrűivel
 - a fehérje imidazol- tartalmú oldattal leszorítható az oszlopról
 - a kötődés feltétele, hogy az imidazol gyűrűk deprotonált állapotban legyenek, így fontos a pH megváltozása
4. Milyen vegyületeket ismer, amelyeket IMAC oszlopok töltetének bevonataként alkalmaznak? (2)
 - NTA(nitrilotriecetsav)
 - IDA (iminodiacetsav)
5. Milyen hullámhosszokon jellemző elnyelési csúcs az EGFP-re és miért? (2 szám + 2magyarázat)

280 és 495 nm-en vannak elnyelési csúcsok, ebből becsülhetjük más fehérjék (aromás gyűrű elnyelése 280) és az EGFP arányát, mert csak az EGFP-nek van elnyelési csúcsa 495-n. (NanoDrop)

A fény elnyeléséért felelős molekulák kromofórok, amik viszonylag könnyen átbillenthetők egy magasabb energiájú állapotba (alacsonyabb hullámhosszú).

Gerjesztés: 488 nm

Elnyelés: 495 nm

Emmisszió: 509 nm

6. Mi az amire különösen figyelni kell az IMAC technikával tisztított fehérje eluátum spektrofotometriás mérésénél? Gondoljunk az 1. gyakorlaton tanultakra a fehérje saját elnyelésének méréséről!
Blankolni kell az eluáló puffer nevezetű oldattal. (Az imidazol elnyelése miatt, hiszen az imidazol is aromás gyűrű)
7. Milyen jellemzői kell, hogy legyenek a natív feltáró puffernek? (3 dolog)
- Oszlopra való felkötés - Kötőpuffer
 - Ekvilibrálni
 - Nem kötő szennyeződések eltávolítása
8. Mit jelent az, hogy az oszlopokat ekvilibráljuk? Miért van erre szükség?
- Egyensúlyba hozzuk a töltetet NATÍV FELTÁRÓ pufferrel (4ml)
 - a sejteket natív feltáró pufferben roncsoljuk szét, úgy hogy a fehérjék natív konformációban maradjanak. A puffer pH-ja 7,4, így a hisztidin oldalláncok kellően deprotonáltak lesznek, míg a benne lévő 300 mM NaCl a megfelelő ionerőt biztosítja az iminodiacetsav kationcserélő hatásának kiküszöbölésére.
9. Mi az a vektor, és mi mit alkalmazunk erre a célra?
- Az expressziós vektorokba egy jól meghatározott, felsokszorozított DNS-szekvenciát ültetünk
 - Vektorok segítségével juttatunk be baktériumokba DNS-t (q34. coli baktériumunk fogja ezt a fehérjét termelni)
 - Génterápiás kísérletekben
 - Transzgénikus élőlények
10. Hogyan kerül rá a His-tag afehérjére?
- A His Taget hozzá fuzionáljuk a fehérjére - rekombináns DNS technológia segítségével.
- komplexálhatók. A rekombináns fehérje elé, vagy mögé 6 (6xHis-tag), vagy 10 (10xHis-tag), tandem elhelyezkedő hisztidint fuzionálunk rekombináns DNS technológia segítségével. A His-tag a hisztidinek oldalláncán keresztül, az imidazol gyűrűk segítségével kötődik fel a kromatográfiás oszlopra. A kötődés feltétele, hogy az imidazol gyűrűk deprotonált állapotban legyenek, így fontos a pH megválasztása. (A hisztidin oldallánc pK értéke 6 körül található, azaz pH=6-on a funkciós csoportok fele protonált.)
11. Hogyan történik a kiindulási minta előkészítése? (azaz milyen lépések vezettek a baktériumkultúrától a kézhez kapott mintáig)
- Sejtek felszuszpendálása** natív feltáró pufferben (ami egyben az oszlopra való felkötéshez használt puffer is, további gyakori elnevezése: binding puffer, kötőpuffer). A **sejteket szonikálással feltárjuk**, majd **sejttörmelékelt elválasztjuk** a

citoplazmától **centrifugálással**. A rekombináns fehérje a felülúszóban oldva található. Az **oszlopon desztillált vízzel átmossuk**, majd a **natív pufferrel ekvilibráljuk**.

1. **Minta felvitele az oszlopra.** Az átfolyó begyűjtése opcionális, ha jól csináljuk, abban már nem lesz fehérje.
2. **Mosás:** további natív feltárót adagolunk az oszlopra, ezzel eltávolítjuk a nem kötődő szennyeződések. Az átfolyó begyűjtése opcionális
3. **Elúció:** eluáló puffert tölrünk az oszlopra. A puffer 250mM imidazolt tartalmaz, ami szintén kötődik az immobilizált Ni^{2+} ionokhoz, ilyen koncentrációban pedig képes a fehérjéket leszorítani az oszlopról. Ezt a frakciót érelemszerűen be kell gyűjteni