

Komplex Biolabor II. jegyzőkönyv

Csornai Borbála
ZZMDFE

2020.02.27.
ITK 324 biomikrofluidika labor

Affinitás kromatográfia

Bevezetés

Az második laborgyakorlat gyakorlat célja a kromatográfia elméletének és gyakorlatának megismerése, illetve a NanoDrop műszer használatának gyakorlása.

Felhasznált anyagok, eszközök

- szonikált és centrifugált baktérium felülúszó
- etil-alkohol
- desztillált víz
- natív feltáró puffer
- eluáló puffer
- Thermo Scientific NanoDrop
- kék színnel jelölt pipetta (100-1000 μl mérettartomány)
- sárga színnel jelölt pipetta (10-100 μl mérettartomány)
- etanolban tisztított IMAC oszlop (5-ös számú)
- kémcső, amiben a frakciók gyűjthetők
- eppendorf cső
- piros pipetta (0,5-10 μl mérettartomány)

A gyakorlat menete

1. Az IMAC oszlopokban található etanolt hagytuk lecsepegni a kémcsőbe. Ezzel fertőtlenítettük a mintánkat.
2. Ezt követően az oszlopot átmostuk 4 ml desztillált vízzel. Ez azért volt fontos, mert a fennmaradó etanol roncsolhatja a mintánkat.
3. 4 ml natív feltáró puffer átcsöpögtetésével egyensúlyoztuk a töltetet. Erre azért van szükség, mert a pufferben lévő imidazolnak kellően deprotonálnak kell lennie a fehérje megkötéséhez.
4. Ezután felvittünk 250 μl E.coli sejt felülúszót (E.coli citoplazma) az oszlopra, és ezt is hagytuk átcsöpögni.
5. Az oszlopot átmostuk 2,5 ml natív feltáró pufferrel, így eltávolítottuk a nem kötődő fehérjéket.
6. 1,5 ml eluáló puffert töltöttünk az oszlopokra. A puffer imidazolt tartalmaz, ami képes megkötni a Ni^{2+} ionokat és képes leszorítani a fehérjéket az oszlopról.

7. Az ezek után lecsöpögő, zöldes színű folyadékot külön eppendorf csőbe gyűjtöttük, majd NanoDrop műszerrel 280 nm-en és 495 nm-en fotometráltuk.
8. Az oszlopot ismét átmostuk 4 ml desztillált vízzel.
9. Végül 1 ml, 20%-os etanolba tettük az oszlopot, hogy a fertőzés veszélyét lecsökkentsük. Megvártuk, míg néhány csepp lecsöpög, majd lezártuk az oszlopot.

A kémcsőbe gyűjtött folyadékot időközönként ürítettük. A kémcső tartalmát UV fényben vizsgáltuk.

Megfigyeltük, hogy a lecsöpögtetett oldat enyhén zöldes fénnel világított. Ezt az okozhatta, hogy a citoplazmában található protázok miatt fehérje is került a lecsöpögtetett oldatba.

A minta előkészítése

A gyakorlat során EGFP fehérjét választottuk el, a rajta lévő His-tag segítségével. Az EGFP-t E.coli baktériumban állítottuk elő. A sejtek feltárása után, már csak az E.coli citoplazmájával dolgozunk tovább. A sejteket szonikálással roncsoltuk, majd a törmelékek eltávolítása érdekében centrifugáltuk.

Elméleti háttér - Affinitás kromatográfia

A kromatográfia egy olyan laboratóriumi módszer, melynek segítségével el tudjuk választani egy adott keverék különböző tulajdonságú összetevőit. Affinitás kromatográfia esetén az elválasztás biokémiai kölcsönhatások alapján történik. (Pl enzim-szubstrát, receptor-ligand vagy antigén-antitest közötti interakciók.) Legelterjedtebb felhasználási területe a rekombináns fehérjék tisztítása.

Az IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) az affinitás kromatográfia egyik felhasználási területe, melyet His-Taggel ellátott fehérjék tisztítására alkalmaznak. A His-tag, a rekombináns fehérje elé vagy mögé helyezett hisztidin oldalláncán kersztül, az imidazol gyűrűk segítségével kötődik fel a kromatográfiás oszlopra. A kötődés feltétele, hogy az imidazol gyűrűk deprotonált állapotban legyenek, így fontos a pH megválasztása.

Mérés NanoDrop műszerrel

A gyakorlat során a külön eppendorf csőbe gyűjtött, tisztított fehérjénk abszorbanciáját NanoDrop műszerrel mértük. A műszer tisztítása után, 2 μ l eluáló pufferrel blankoltunk, letisztítottuk a mérési felületet, majd lemértük tisztított fehérjénk (szintén 2 μ l) abszorbanciáját.

A kapott eredményeket két különböző elnyelési hullámon vizsgáltuk:

- 280 nm-en az összfehérje elnyelését mértük
- 495 nm-en, hiszen ez az EGFP fehérjére jellemző elnyelés

Eredmények

A nem tisztított fehérje abszorbanciáját a gyakorlatvezetőink már korábban lemérték, erre hivatkozom az 1 táblázatban.

	Abs280	Abs495
Nem tisztított fehérje	1,6451	0,2044
Tisztított fehérje	0,0697	0,0859

1. táblázat. A tisztított és a nem tisztított fehérjének abszorbanciája NanoDrop műszerrel mérve, 280 és 495 nm-en

Az eredmények kiértékelése

Az eredmények kiértékeléséhez az alábbi képletet használtam:

$$\frac{Abs_{495}}{Abs_{280}} \quad (1)$$

Ez alapján, a nem tisztított fehérjénk esetén a kapott érték:

$$\frac{Abs_{495}}{Abs_{280}} = \frac{0,2044}{1,6451} = 0,1242 \quad (2)$$

A tisztított fehérjénk esetén:

$$\frac{Abs_{495}}{Abs_{280}} = \frac{0,0859}{0,0697} = 1,2324 \quad (3)$$

Az eredmények alapján jól látható, hogy az abszorbancia a tisztítás után az összfehérje elegyet, valamint az EGFP elnyelését tekintve is csökkent. Míg a (2)-es számolásnál az eredeti, szűretlen elegyben jóval több fehérje volt, a tisztítás után az elegyünk hígabb lett, ezáltal csökkentek az abszorbancia értékei. A (3)-as számú egyenlet jól demonstrálja, hogy bár az EGFP mennyisége is csökkent a tisztítás során, aránya mégis nőtt az összfehérje oldatban.