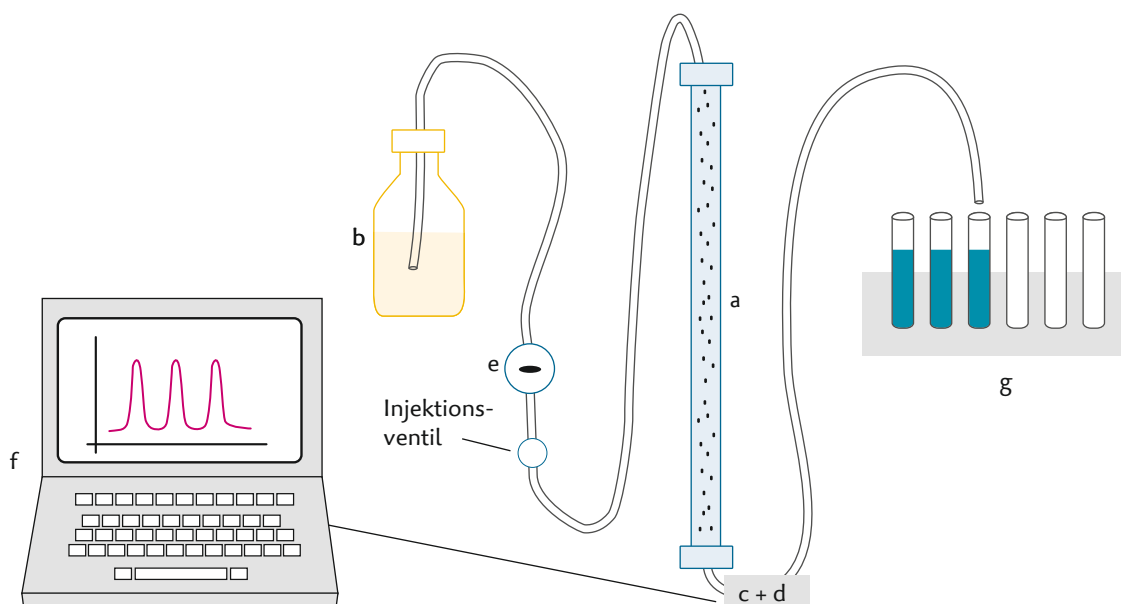




Kromatografi

Princippet i søjlekromatografi er forklaret i Bioteknologi 2, side 56-57.

Overordnet benyttes metoden til at adskille proteiner på baggrund af forskelle i størrelse, ladning, polaritet og affinitet, dvs. bindingsevne til søjlematerialet. Man kan tilsvarende skille proteiner fra urenheder i prøven.



Figur 1. Princippet i søjlekromatografi.

Figur 1 viser princippet i metoden. Bogstaverne svarer til de tilsvarende bogstaver i Bioteknologi 2, tema 4, figur 10, side 57:

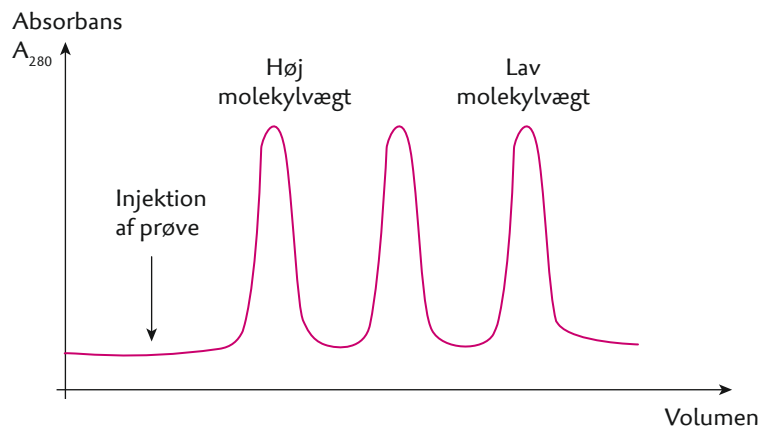
1. En buffer (b) pumpes gennem søjlen (a).
2. Opløsningen med de proteiner man ønsker at adskille, tilsættes gennem en injektionsventil inden bufferen når søjlen.
3. Buffer med proteiner kører gennem søjlen som forsinkes eller binder proteinerne forskelligt, alt efter hvilket søjlemateriale der anvendes.
4. Efter gennemløbet passerer væsken, eluatet, forbi en detektor (c og d), som måler på proteinerne efterhånden som de passerer.
5. Data fra detektorerne opsamles på en tilsluttet computer (f).
6. Eluatet opsamles i fraktioner i prøveglas (g). Er der proteaser til stede, nedkøles fraktionerne under processen.

Er der tale om søjlemateriale som binder bestemte proteiner, udvaskes disse til sidst med en passende skyllevæske.

Detektoren er typisk et uv-spektrofotometer. De aromatiske aminosyrer, tryptophan, tyrosin og phenylalanin absorberer ultraviolet lys ved en bølgelængde på 280 nm.

Detektoren kan tilsvarende være et pH-meter eller en ledningsevne måler. En ledningsevne måler måler ledningsevnen i en opløsning. Jo flere polære og ladede partikler opløsningen indeholder, jo lettere vil den have ved at lede elektrisk strøm.

Resultatet er et kromatogram som viser hvornår forskellige fraktioner af protein har absorberet uv-lys, se figur 2. Man kan herudfra identificere bestemte fraktioner med protein.



Figur 2. Kromatogram.

Man kan også måle fx enzymaktivitet i de aftappede fraktioner. På den måde kan man identificere de fraktioner hvor enzymaktiviteten er størst, og hvor der derfor er mest af det pågældende enzym.

En søjle med en lille diameter, som påvist i Bioteknologi 2, Tema 4, figur 10, side 57 er til analytisk brug. Når søjlen er indstillet, kan man imidlertid lave tilsvarende søjler med en stor diameter for at få en større kapacitet til oprensning af det ønskede protein.

Opgave

- Find de tre nævnte aminosyrer, tryptophan, tyrosin og phenylalanin, i Bioteknologi 2, side 52. Hvad vil det sige at de er aromatiske? Sammenlign med side 13.
- Forklar princippet i et spektrofotometer ud fra Bioteknologi 2, side 20.
- Hvad er forskellen på uv-lys og synligt lys?
- Hvordan kan forskellige proteiner give forskellige udslag på et pH-meter? Sammenlign med Bioteknologi 2, side 52-53. Find eksempler på radikaler som kan påvirke pH.
- Hvordan kan forskellige proteiner give forskellige udslag på en ledningsevne måler? Sammenlign med Bioteknologi 2, side 52-53. Find eksempler på radikaler som kan påvirke ledningsevnen.

Gelmaterialer

Der findes en lang række søjlematerialer som har forskellige egenskaber. Søjlematerialet består grundlæggende af en matrix, et porøst fast stof, som helst ikke skal påvirke proteinets struktur. De mest brugte søjlematerialer er polysaccharider som dextran, agarose eller cellulose eller syntetiske polymerer som fx polyacrylamid (PAA) og polystyren.

Man kan binde forskellige molekyler, ligander, til gelmaterialet ved elektronparbindinger, hvorved gelen kan binde proteiner forskelligt. Figur 3 viser forskellige geltyper og deres ligander.

Type	Princip	Ligand	Gelmateriale
Gelfiltrering	Proteinerne adskilles udelukkende ved deres størrelse. De største proteiner vandrer hurtigst gennem gelen fordi de vandrer gennem de største porer imellem søjlematerialet. De mindre proteiner vandrer gennem de mindre porer i selve gelmaterialet. Derfor får de en længere vej gennem gelen	Ingen	Dextran, agarose, PAA
Ionbytning	Ladede funktionelle grupper på gelmaterialet binder ladede radikaler på proteinerne forskelligt	Ladede funktionelle grupper, ofte syre- eller base-grupper. Deres ladning indstilles med bufferen	Dextran, agarose, cellulose
Hydrofob interaktion	Hydrofobe funktionelle grupper på gelmaterialet binder hydrofobe grupper på proteinet	Hydrofobe grupper, ofte carbonhydrider eller phenolforbindelser	Agarose, polystyren
Omvendt fase-kromatografi	Proteinet gøres mere hydrofobt med pH eller opløsningsmidler. Herefter er princippet som ved hydrofob interaktion, men det bundne protein vaskes ud til sidst med et ikke-polært opløsningsmiddel	Hydrofobe grupper, ofte carbonhydrider	Silica, polystyren
Affinitets-kromatografi	Proteiner bindes specifikt til andre proteiner som er bundet til gelen	Molekyler som kan bindes specifikt til det protein man er ude efter, fx antistoffer eller enzyminhibitorer. Liganden kan være forsynet med en spacer, en molekyllarm, som bringer den i bedre kontakt med proteinerne	Agarose

Figur 3. Eksempler på gelmaterialer.

Links og kilder

Kielberg, V. og Rasmussen, L.: Proteiner – oprensning og karakterisering, 3. udgave, Gads Forlag, 2005.

Beskrivelser og vejledninger til det mest brugte kromatografiske udstyr kan findes i en række af firmaet GE Healthcare's online-håndbøger på http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/service_and_support~documents_and_downloads~handbooks.

I håndbogen Gel Filtration er de forskellige søjlematerialer præsenteret, se fx oversigtsfiguren side 5: [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/226C564DBB7D5229C1257628001CD36F/\\$file/18102218AJ.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/226C564DBB7D5229C1257628001CD36F/$file/18102218AJ.pdf).