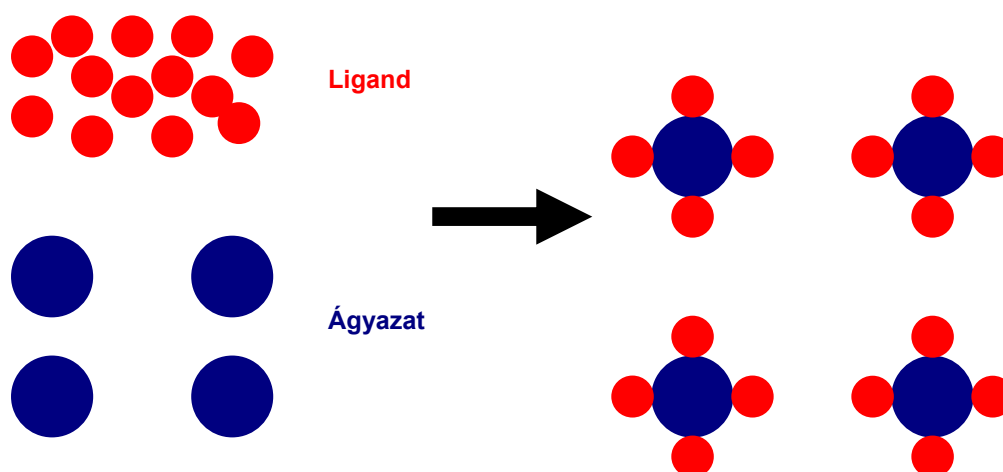


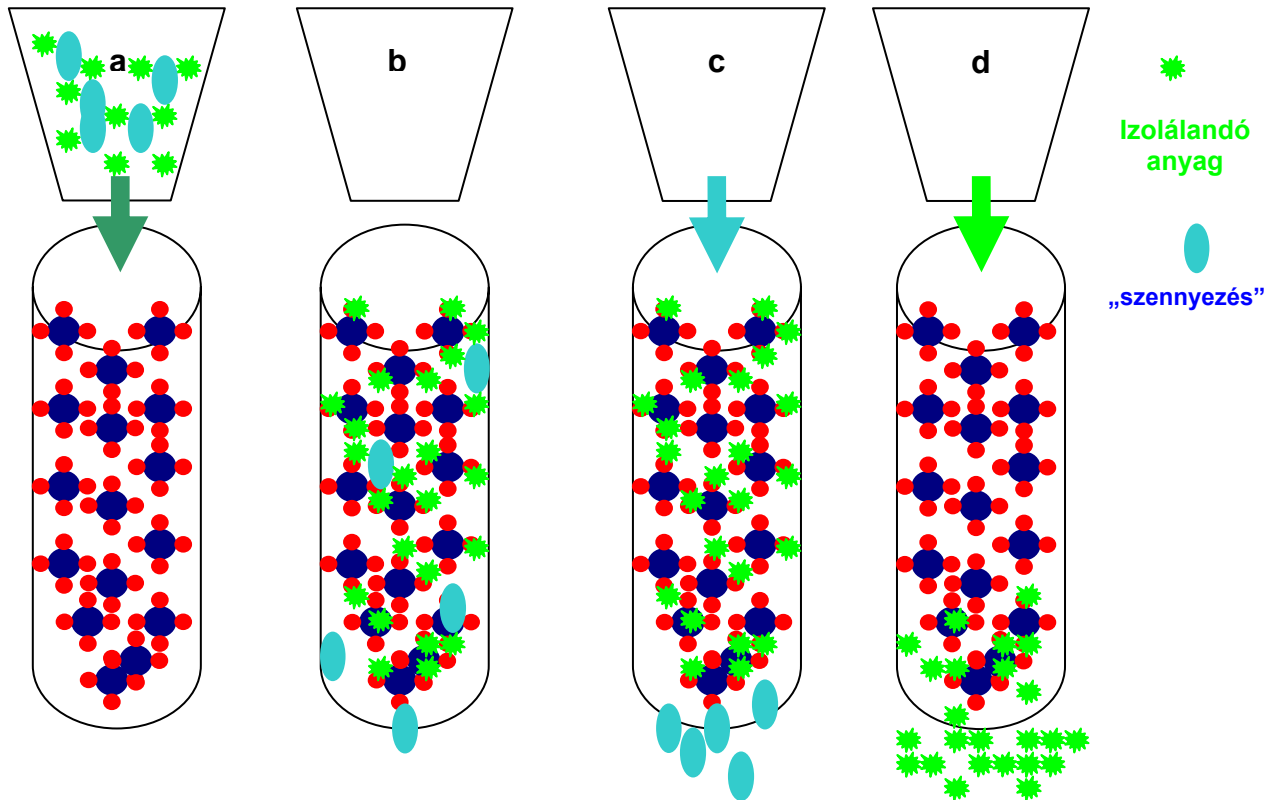
TRIPSZIN TISZTÍTÁSA AFFINITÁS KROMATOGRÁFIA SEGÍTSÉGÉVEL

Az egyes biomolekulák izolálása kulcsfontosságú a biológiai szerepük tisztázásához. Az affinitás kromatográfia egyszerűsége, reprodukálhatósága miatt az utóbbi évtizedben széles körben alkalmazott módszerre vált.

Az affinitás kromatográfia különleges helyet foglal el az elválasztás technikában, ugyanis a biomolekulák tisztítása kémiai szerkezetükön alapul. Elvét az 1. és a 2. ábra foglalja össze.



1. ábra. Ligand immobilizációja



2. ábra Az affinitás kromatográfia elve

a. az izolálható anyagot + „szennyezést” tartalmazó minta felvitele az affinitáskromatográfias ágyazatra. **b.** az izolálható anyag specifikusan, a „szennyezés” aspecifikusan kötődik az ágyazathoz. **c.** az aspecifikusan kötött anyag eltávolítása „mosással” **d.** a specifikusan kötött anyag elúciója

A megfelelő szeparációhoz szükséges (i) a biospecifikus ligand (L), melyet kovalensen a kromatográfias ágyazathoz kötnék, (ii) az izolálható anyag (I), (iii) a deszorbens anyag, mely az aspecifikusan kötött anyag lemosása után ("szennyezés" eltávolítása) szelektív módon deszorbeálja az izolálható anyagot.

Az affinitás kromatográfias eljárások során leggyakrabban alkalmazott biológiai rendszereket az 1. táblázat sorolja fel.

IZOLÁLHATÓ ANYAG	LIGAND
enzimek	szubsztrát analógok, inhibitor, kofaktor
antitest	antigén, sejt, vírusok
nukleinsav	komplementer szekvenciák, hiszton
hormon	receptor, karrier fehérje
vitamin	receptor, karrier fehérje

1. táblázat: Az affinitás kromatográfia során leggyakrabban használt biológiai rendszerek.

Ágyazatként leggyakrabban Sepharose gyantákat alkalmaznak. Az ágyazathoz kovalensen kötött ligandnak két alapvető tulajdonsággal kell rendelkeznie: (i) a ligandum specifikusan és reverzibilisen kösse meg a tisztítandó molekulát (ii) a ligandnak rendelkeznie kell olyan kémiai csoportokkal, melyek segítségével az ágyazathoz köthető anélkül, hogy a tisztítandó anyag iránti affinitását elveszítené. A ligandnak a tisztítandó anyag iránti affinitása ideális 10^{-4} - 10^{-8} M esetében.



Amennyiben a K_d nagyobb, mint 10^{-4} M, nem végezhető el hatékony affinitás kromatográfia, 10^{-8} M-nál kisebb K_d esetén túl szoros a ligand és a tisztítandó anyag közötti kölcsönhatás. Az izolált I komponenst az IL komplex megbontásával - deszorpció - útján nyerjük. A deszorpció folyamat az I molekula konformáció változtatásának (hőmérséklet, pH, ionerőváltozás) révén, illetve ligand-analóg (kompetitor) vegyületet hozzáadásával indítható el.

A gyakorlat során tripszin (I) affinitás kromatográfias tisztítását végezzük, szójatripszin-inhibitor-Sepharose 4B (L+ágyazat) ágyazaton. A deszorpció a jelzett tisztítás során pH-változtatás következménye.

A szójababból izolált tripszin inhibitor (Kunitz Soybean Inhibitor, SBTIA₂) kb. 22 000 D molekulatömegű fehérje, tripszin-gátló hatása sztöchiometrikus. A tripszin-SBTIA₂ komplex képződés sebessége jelentősen nő a pH növekedés (4,5-8,0) hatására, pH 8 érték közelében platót mutat. A komplex disszociációs sebessége nagyon gyors pH 2,0-nél, és a disszociáció gyorsan lecsökken pH emelés hatására.

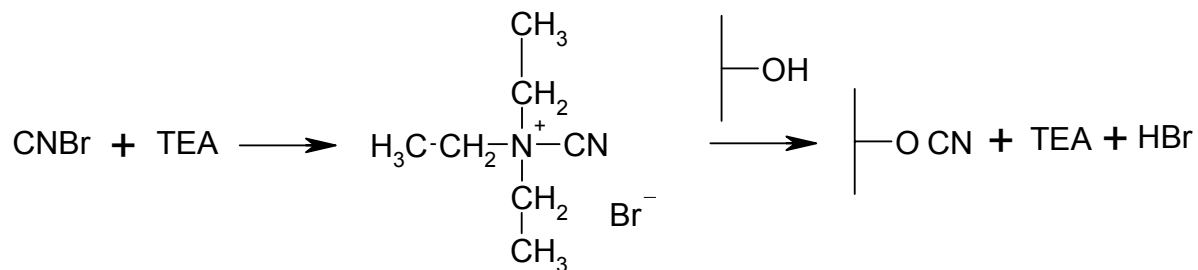
Szükséges oldatok, anyagok

1. szójatripszin-inhibitor-Sepharose 4B géllal töltött oszlop
2. 0,1 M TRIS-HCl puffer, pH 8,5
3. 0,1 M Na-formiát puffer, pH 4,5
4. 0,1 M Na-formiát puffer, pH 2,6
5. 1 mM BAPNA oldat (BAPNA = N- α -benzoil-DL-arginin-p-nitroanilid) 0,1 M TRIS-HCl 1 % dimetilszulfoxid pH 8,5 pufferben feloldva. (A BAPNA-t előbb dimetilszulfoxidban oldjuk fel 100 mM koncentrációban, majd a fenti pufferrel hígítjuk tovább a jelzett koncentrációra.)
6. nyers tripszin oldat: 1 mg/ml tripszin 10 mg/ml BSA (marha szérum albumin) oldat
7. szűkített 1 cm-es küvetták
8. spektrofotométer
9. stopperóra

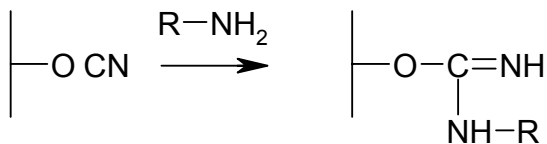
Az affinitásgél készítése

Az oszlopokba betöltött szójatripszin-inhibitor-Sepharose 4B affinitásgél a következő reakciósor szerint (ligand immobilizációja a Sepharose 4B ágyazathoz) két munkafázisban - (i) gél aktivációja brómciánnal TEA (triethylamin) katalízis segítségével, (ii) ligand kötése az aktivált gyantához - készült.

1. Ágyazat aktivációja:



2. A ligand immobilizációja:



R = szója tripszin-inhibitor

A gyakorlaton alkalmazott oszlopokban már a fenti reakcióknak megfelelően előkészített oszlopok vannak bekészítve.

Az affinitás kromatográfia kivitelezése

- 1.) Az oszlop egyensúlyba hozása: az 1 ml ágytérfogatú géloszlopot 6 ml 0,1 M TRIS-HCl pH 8,5 pufferrel mossuk át. Az elfolyó oldatot főzőpohárba gyűjtjük.
- 2.) Mintavétel: Hagyjuk az kiegyenlítő puffert úgy lecsöpögni, hogy a gélagyazat felső felszíne felett már ne legyen folyadék, de a gélagyban még igen. Ekkor 200 µl nyers tripszin oldatot csepegtessünk a gélagyazat felszínére és kezdjük meg a frakciószedést. A továbbiakban 1 ml-es frakciókat szedünk.
- 3.) Aspecifikusan kötött fehérjék elválasztását a következő pufferekkel végezzük: 3 ml 0,1 M TRIS-HCl pH 8,5; 3 ml 0,1 M Na-formiát puffer pH 4,5.
- 4.) Elúció (deszorpció): 3 ml 0,1 M Na-formiát pufferrel pH 2,6. A frakciók gyűjtését befejezzük.
- 5.) Oszlopregenerálás: 10 ml 0,1 M TRIS-HCl pH 8,5.

A tripszinaktivitás és a fehérjetartalom detektálása

A frakciók fehérjetartalmának detektálása: Az egyes frakciókban a fehérjék jelenlétére a 280 nm-en desztillált vízzel szemben mért fényelnyelés értékekből következtetünk. A kapott extinkciós értékeket milliméterpapíron a frakciószám függvényében ábrázoljuk.

A frakciók tripszinaktivitásának meghatározása BAPNA oldattal: A frakciókban a tripszin aktivitás jelenlétét a tripszin BAPNA-ra gyakorolt amidolitikus hatása segítségével detektáljuk. A szintetikus szubsztrát hasítása során p-nitroanilin szabadul fel, mely a szubsztráttól eltérő fényabszorpciós maximummal rendelkezik 405 nm-en.

Mérési módszer: A fotométert 405 nm-en 1 ml BAPNA oldattal szemben nullázzuk. A reakciót 100 µl tripszin hozzáadásával indítjuk és 5 perc múlva, leolvassuk az optikai denzitást.

A kapott eredmények értékelése:

Frakciószám	puffer pH	E _{280nm}	Tripszinaktivitás
1.	8,5		
2.	8,5		
3.	8,5		
4.	4,5		
5.	4,5		
6.	4,5		
7.	2,6		
8.	2,6		
9.	2,6		