

# Kapalinová chromatografie proteinů a DNA

**Ctirad Hofr**

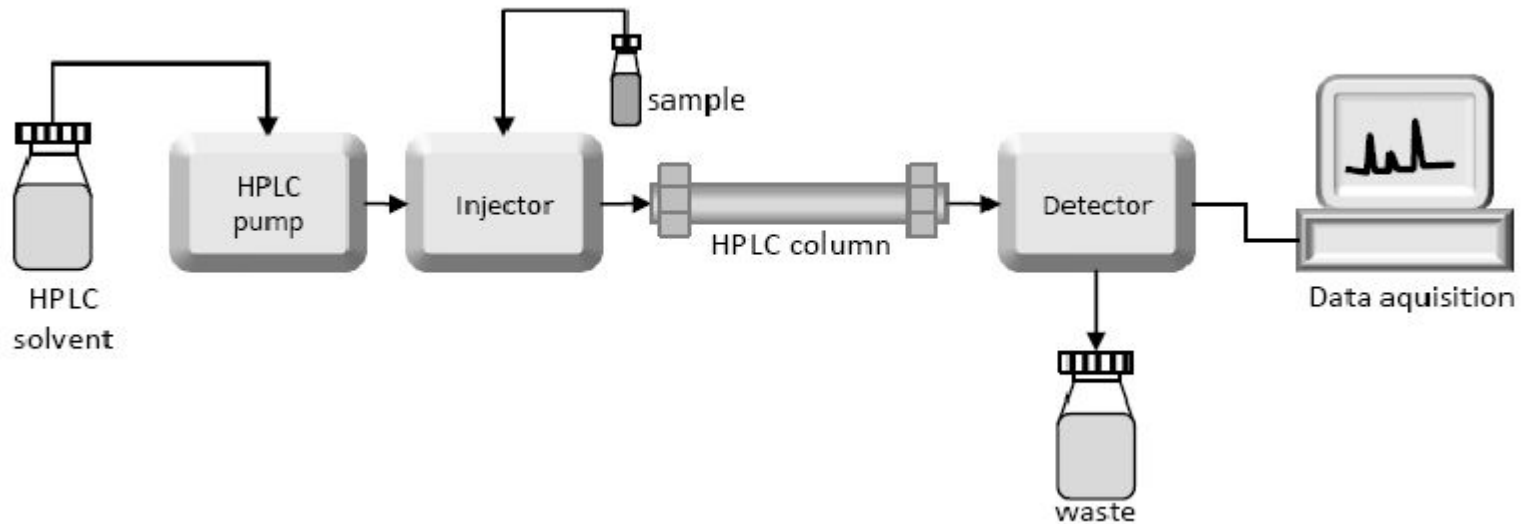
Experimentální metody biofyziky

# Přehled přednášky

---

- Princip chromatografie
- Základní součásti chromatografu
- Druhy chromatografie
- Příklady použití

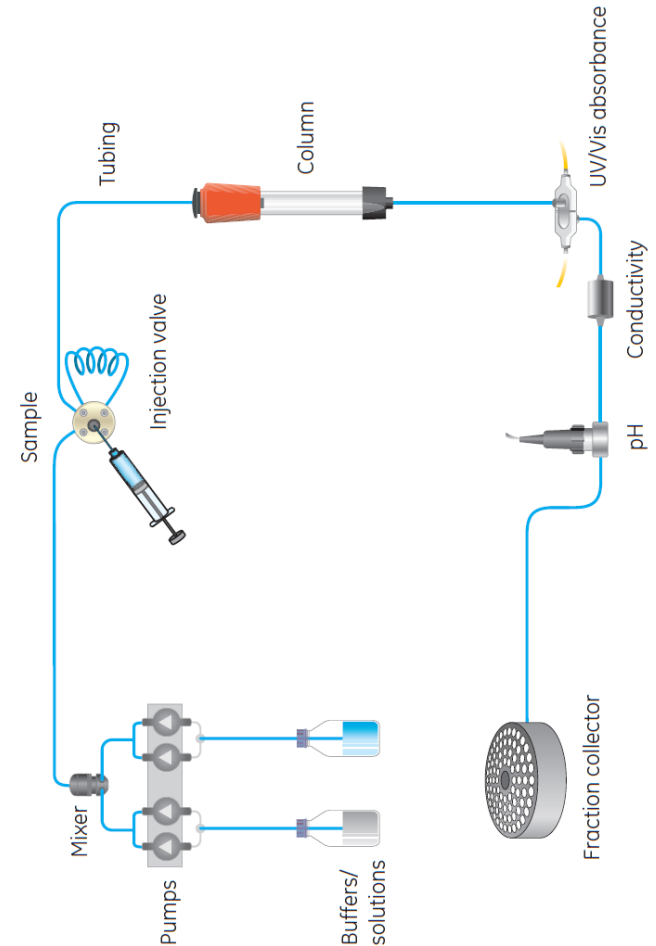
# Princip chromatografie



Molekuly se rozdělují mezi stacionární a mobilní fázi, čímž je dosaženo rozdělení molekul.

# Základní části chromatografu

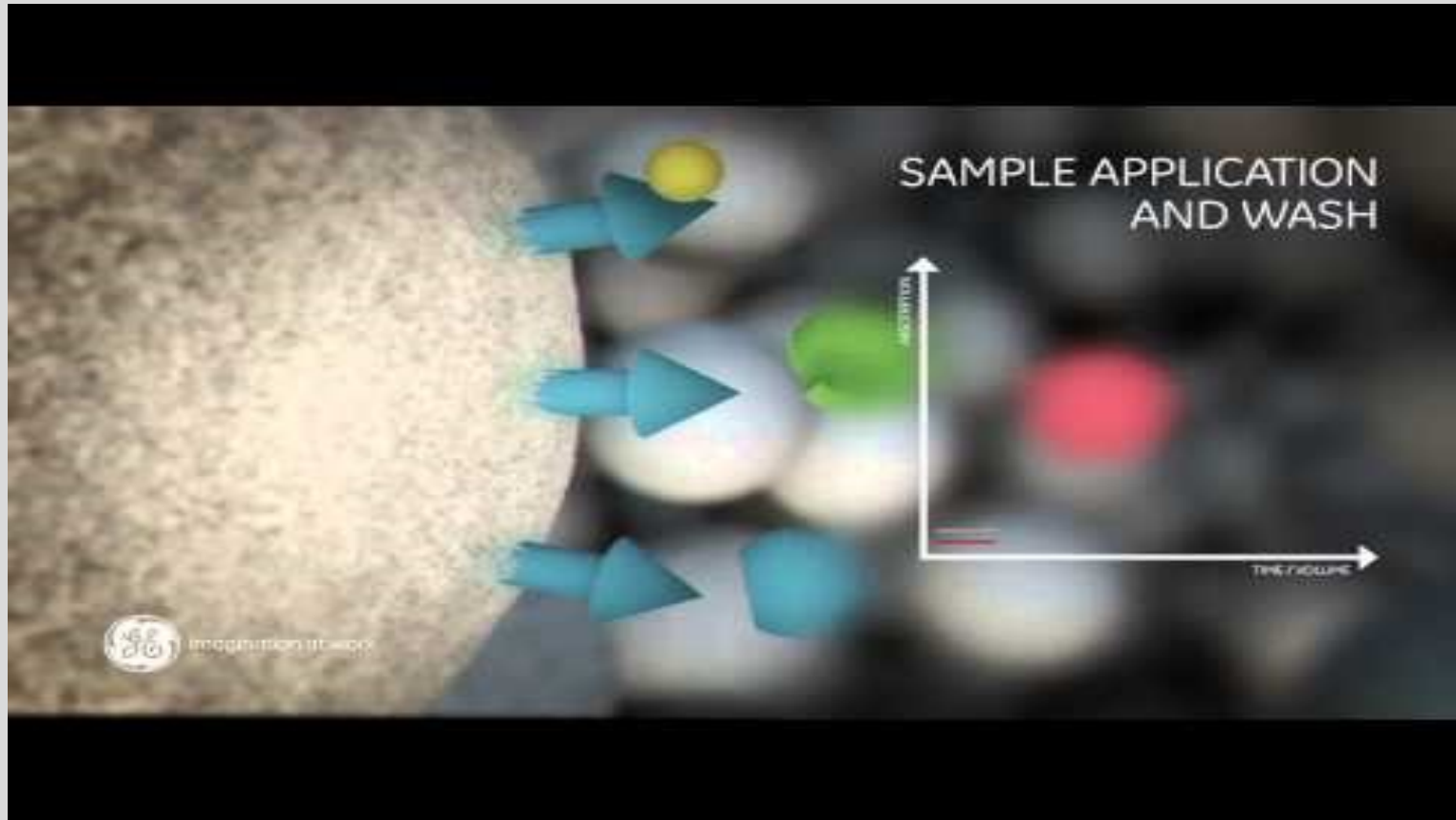
- **Chromatograf** – přístroj sloužící k separaci složek vzorku
- **Mobilní fáze** – neboli eluent, je fáze pohybující se chromatografickým systémem. Tato fáze přivádí vzorek do stacionární fáze, kde dochází k jeho separaci
- **Stacionární fáze** – je fáze ukotvená na místě zpravidla ve formě **kolony**, přes kterou prochází mobilní fáze a také složky vzorku. Zde dochází k separaci v důsledku distribuce vzorku mezi stacionární a mobilní fázi
- **Chromatografická separace** – rozdělení vzorku na jednotlivé složky (analyty) na základě rozdílné distribuce mezi mobilní a stacionární fázi
- **Retenční čas** – čas, který složka potřebuje k průchodu chromatografickým systémem
- **Chromatogram** – záznam z chromatografu znázorňující jednotlivé analyty nejčastěji ve formě tzv. chromatografických píků oddělených navzájem základní linií
- **Preparativní chromatografie** – slouží k izolaci čistých alespoň čistějších složek vzorku, které jsou dále použity (k chemické reakci, další separaci apod.)
- **Autosampler** - automaticky dávkuje vzorky do přístroje
- **Frakční kolektor** – sbírá eluent po průchodu kolonou



# Druhy kapalinové chromatografie

1. Afinitní chromatografie
2. Iontoměničová chromatografie
3. Hydrofobní interakce
4. Gelová chromatografie
5. Reverzní fáze

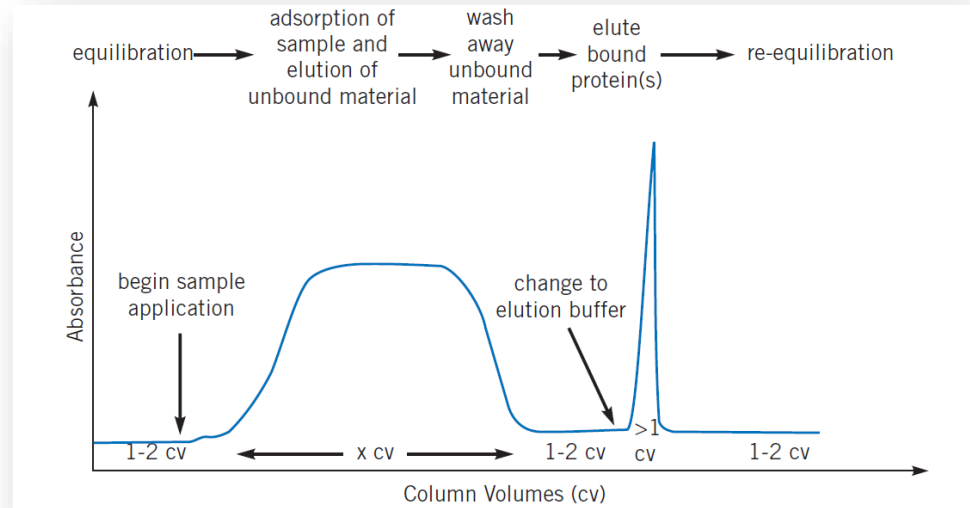
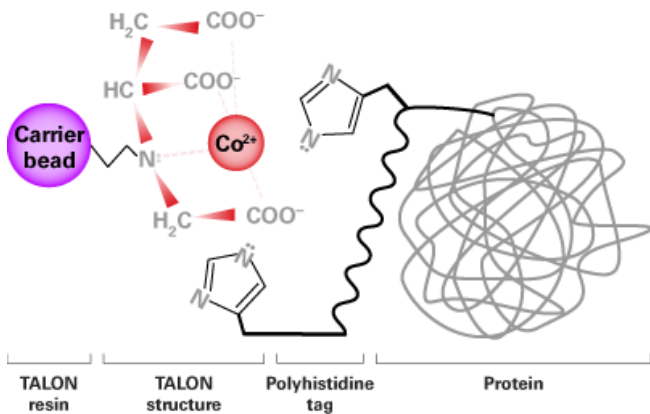
# 1. Afinity chromatografie



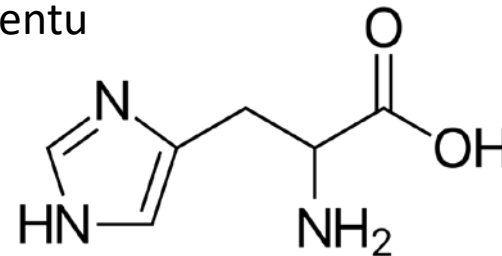
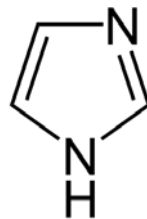
<https://www.youtube.com/watch?v=ezy9MVGcf8c>

# IMAC chromatografie

## Immobilized Metal ion Affinity Chromatography



- Založena na principu kovalentní vazby mezi histidinem a kovy – Co, Ni, Cu
- Používá se pro purifikaci proteinů s rekombinačně vloženým “His-tag”
- Pro eluci navázaného proteinu se používá zpravidla přidání imidazolu jako kompetitoru k His nebo změna pH z 8 na 5
- Vazebná kapacita přibližně 10 mg proteinu/mL sorbentu



# Příklad použití afinitní chromatografie

## A) Affinity chromatography (AC)

**Sample:** 10 ml *E. coli* extract with low-level expression of a histidine-tagged mannanase, Man 26A, from *Cellulomonas fimi* ( $M_r \sim 100\ 000$ )

**Column:** HisTrap HP 1 ml

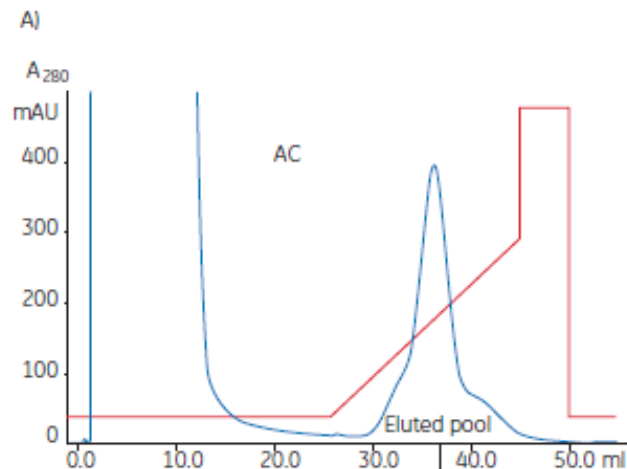
**Binding buffer:** 20 mM sodium phosphate, 30 mM imidazole, 500 mM NaCl, pH 7.4

**Elution buffer:** 20 mM sodium phosphate, 500 mM imidazole, 500 mM NaCl, pH 7.4

**Gradient:** 25 ml linear gradient 30–300 mM imidazole

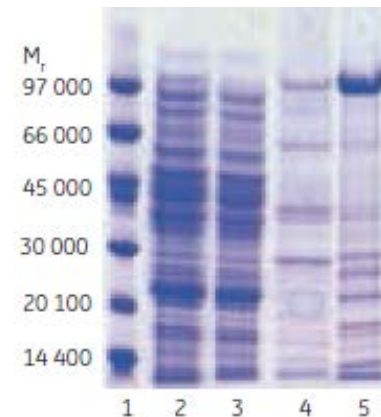
**Flow rate:** 1 ml/min

**System:** ÄKTA



## Lanes

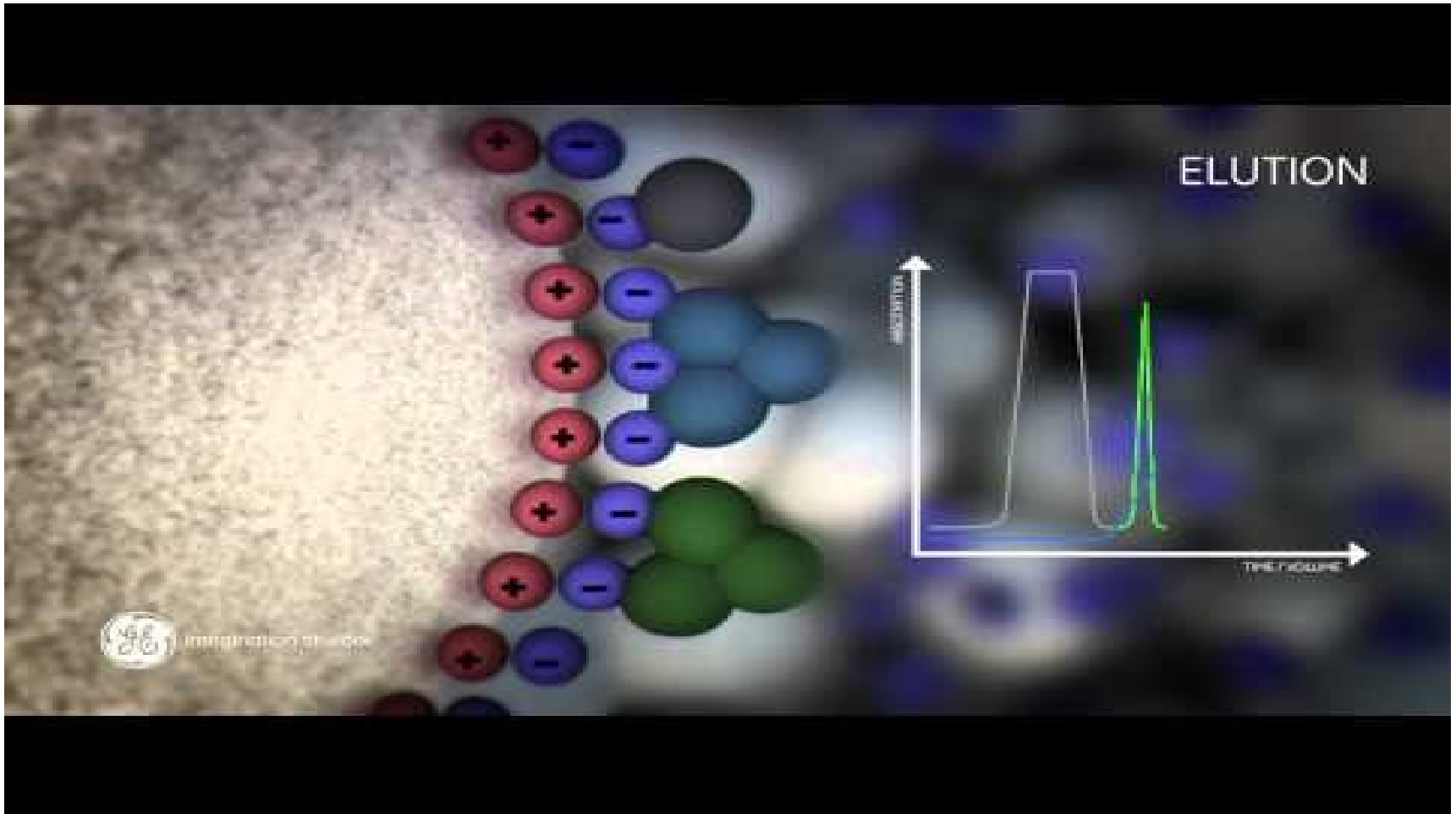
1. LMW markers
2. *E. coli* extract, start material
3. HisTrap HP flowthrough
4. Early elution fraction, HisTrap HP fraction
5. HisTrap HP, eluted pool
6. Superdex 200 10/300 GL, pool



- Rychlá a účinná separace z buněčného extraktu



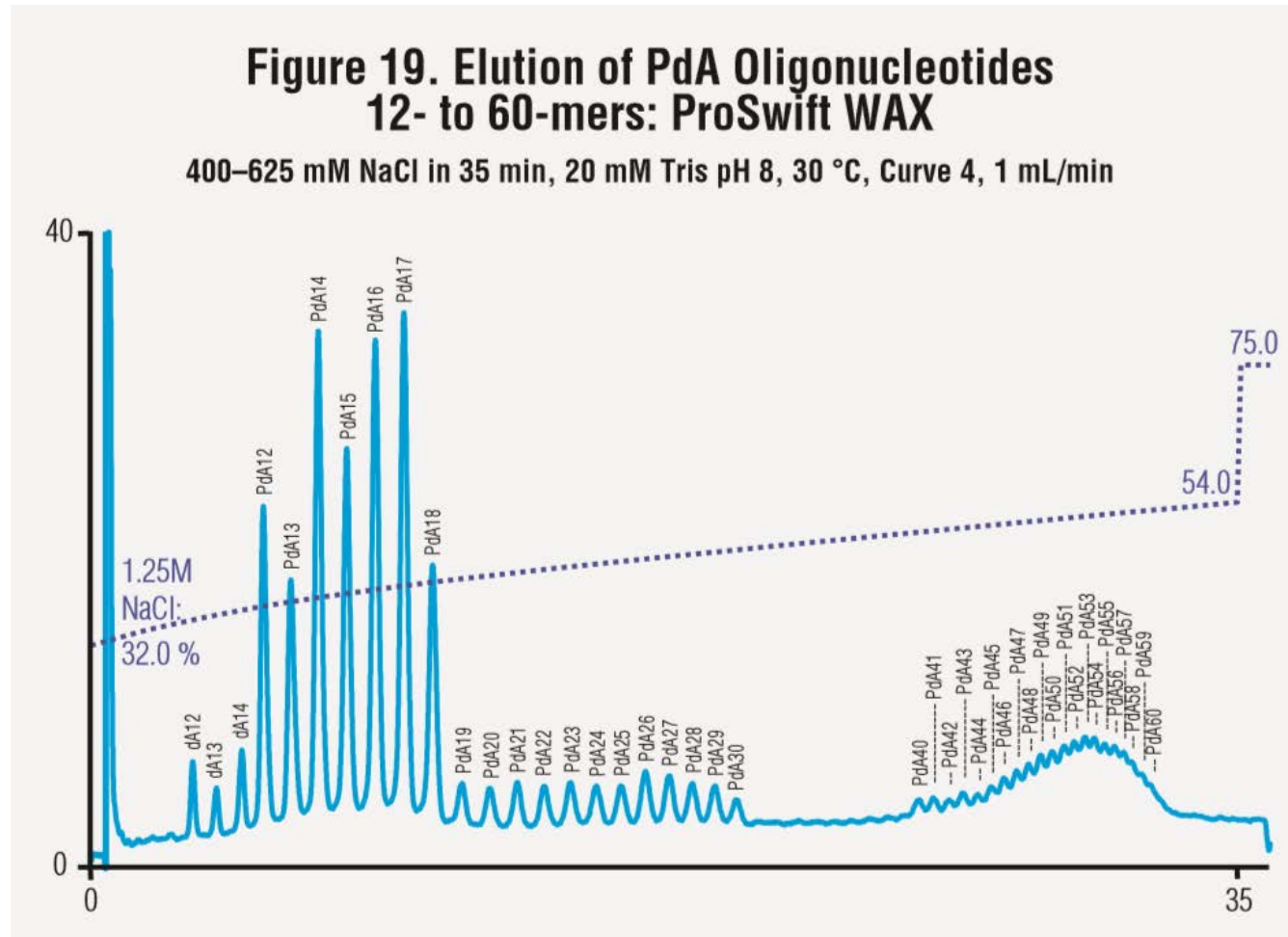
# 2. Iontoměničová chromatografie



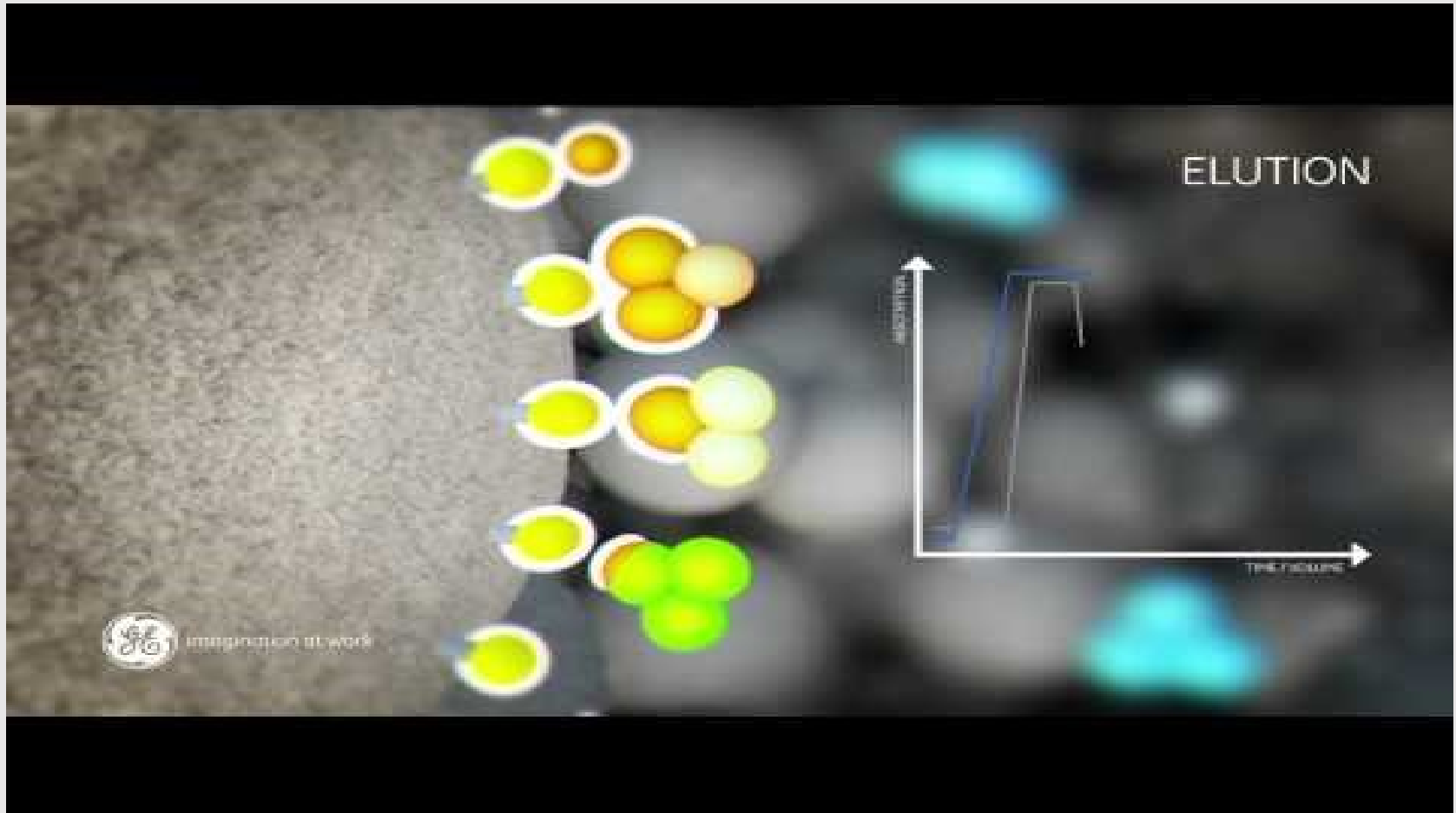
<https://youtu.be/q3fMqgT1do8>

# Příklady použití Ionex chromatografie pro purifikaci DNA

## Separace a purifikace oligonukleotidů



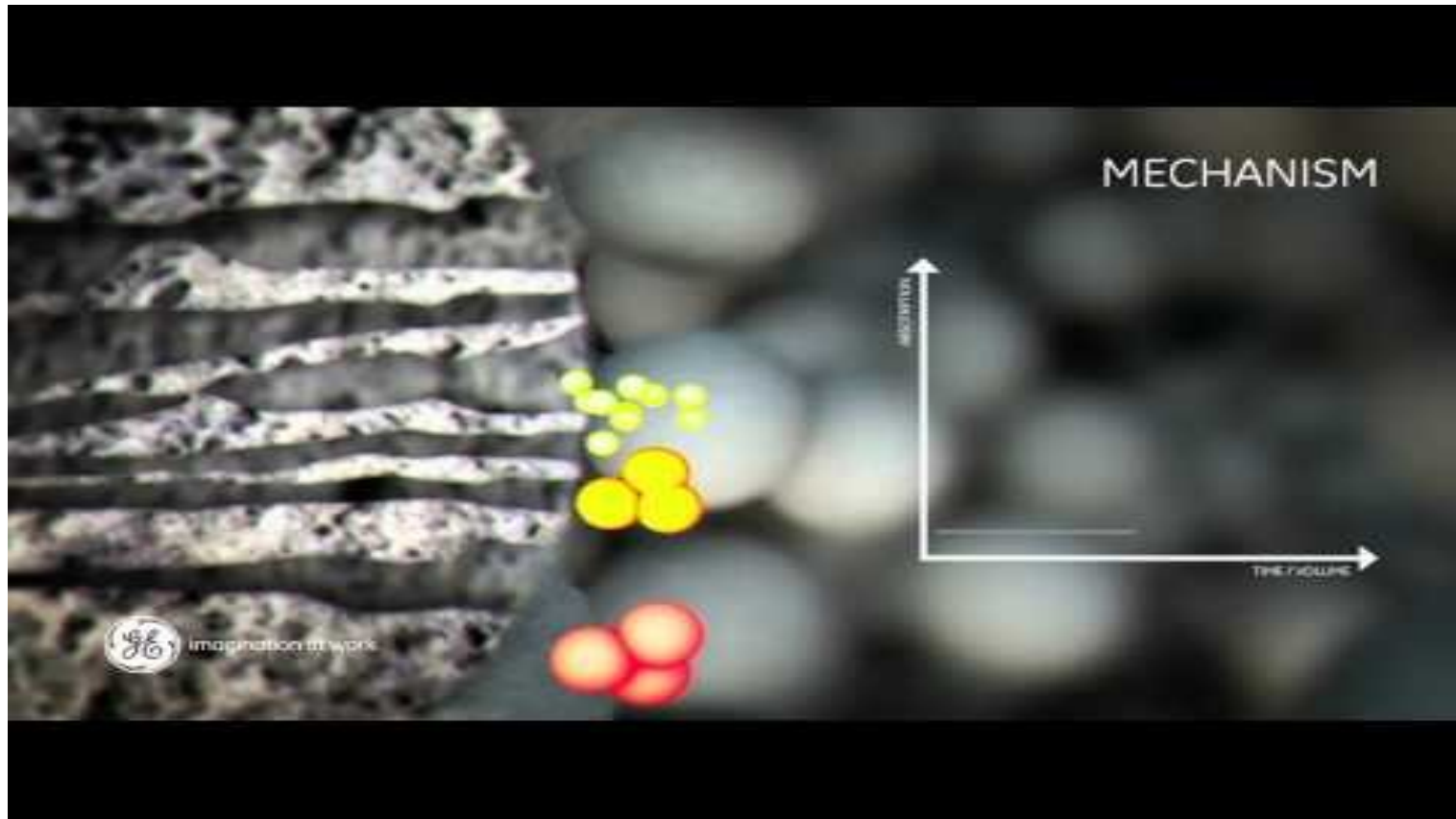
# 3. Hydrofobní interakce



<https://youtu.be/v6SPK6ZovgA>

# 4. Gelová chromatografie

## Size Exclusion Chromatography = SEC

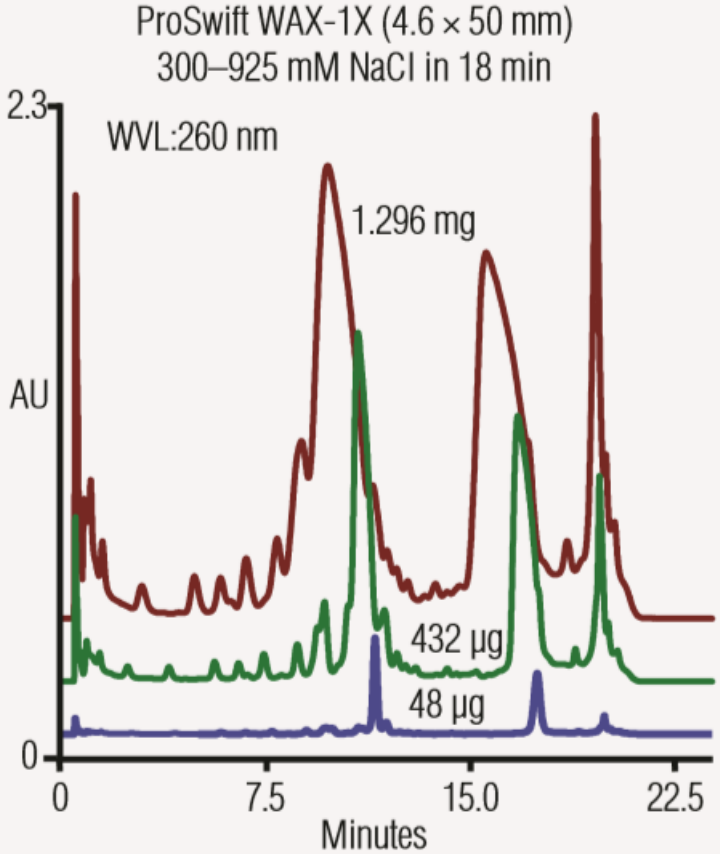
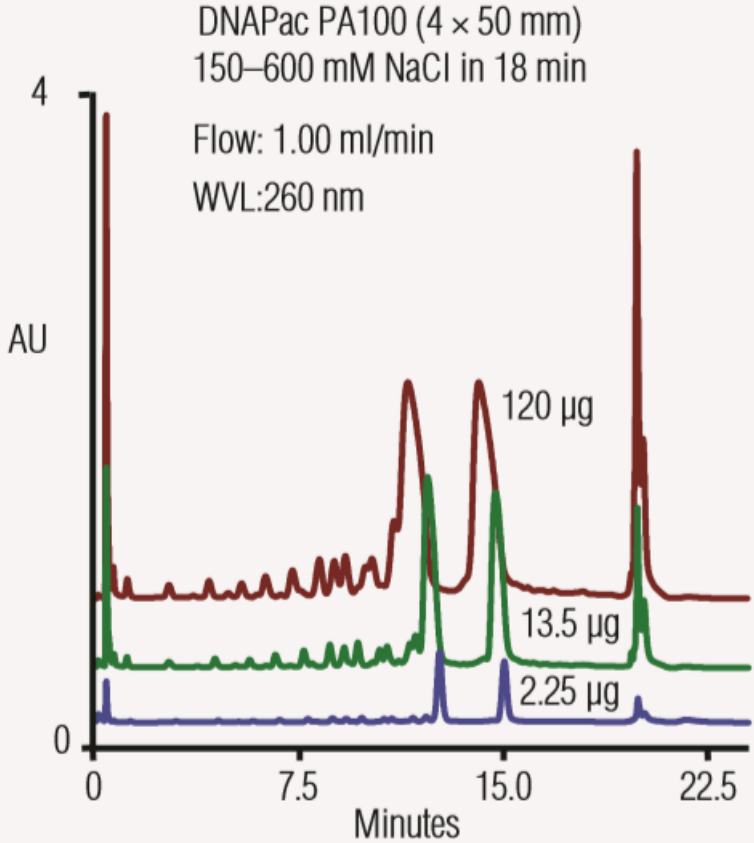


<https://youtu.be/oV5VB5kO3tQ>

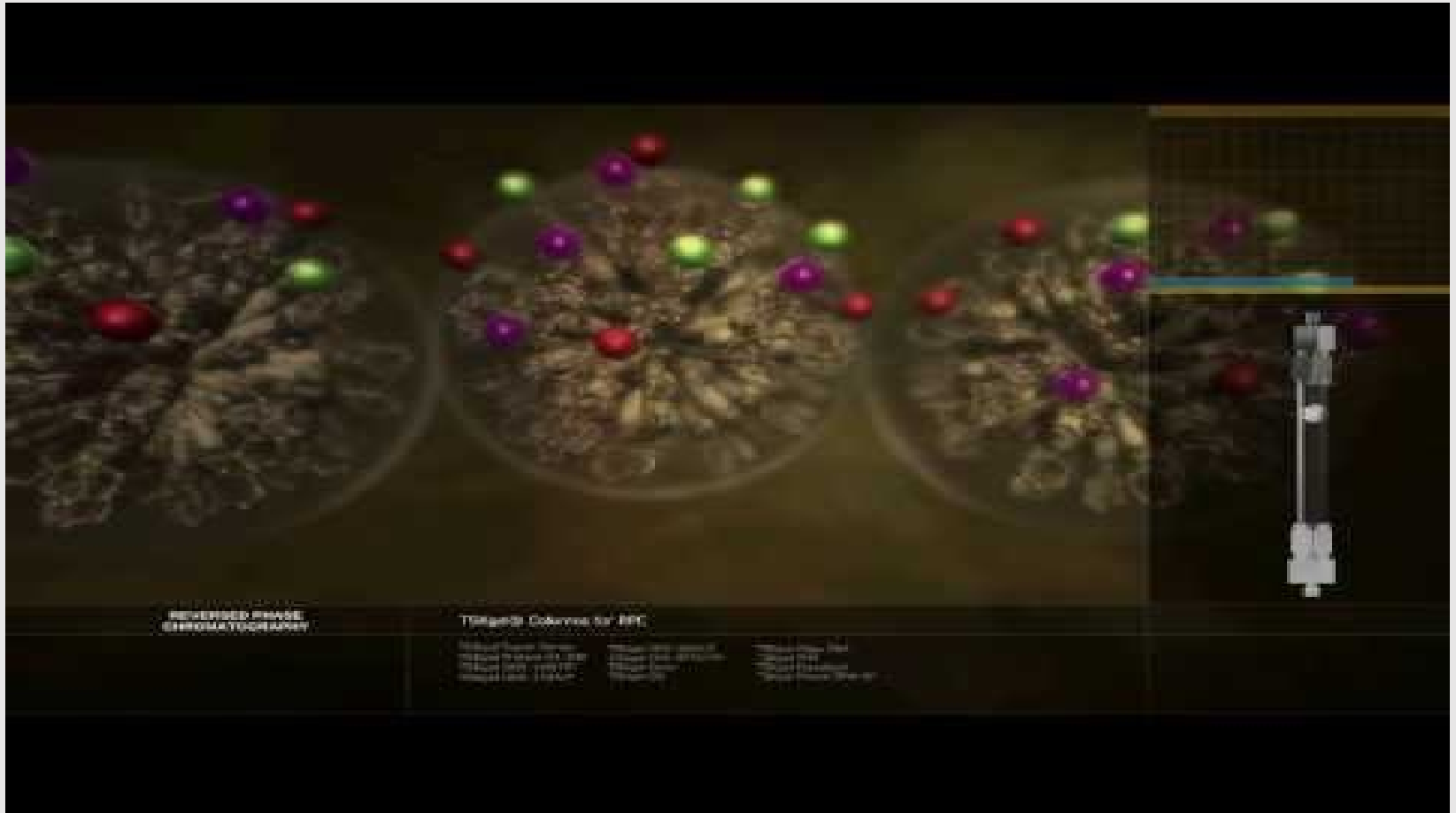
# Retenční čas se s množstvím zkracuje

**Figure 17. Oligonucleotide Dynamic Capacity Comparison:**

**Aldehyde Reductase Primer (25 base) ± Trityl group**

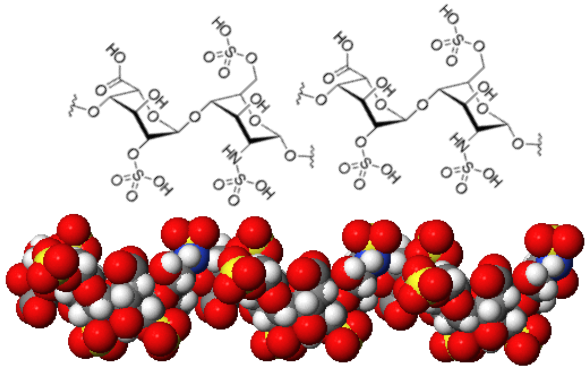


# 5. Reverzní fáze

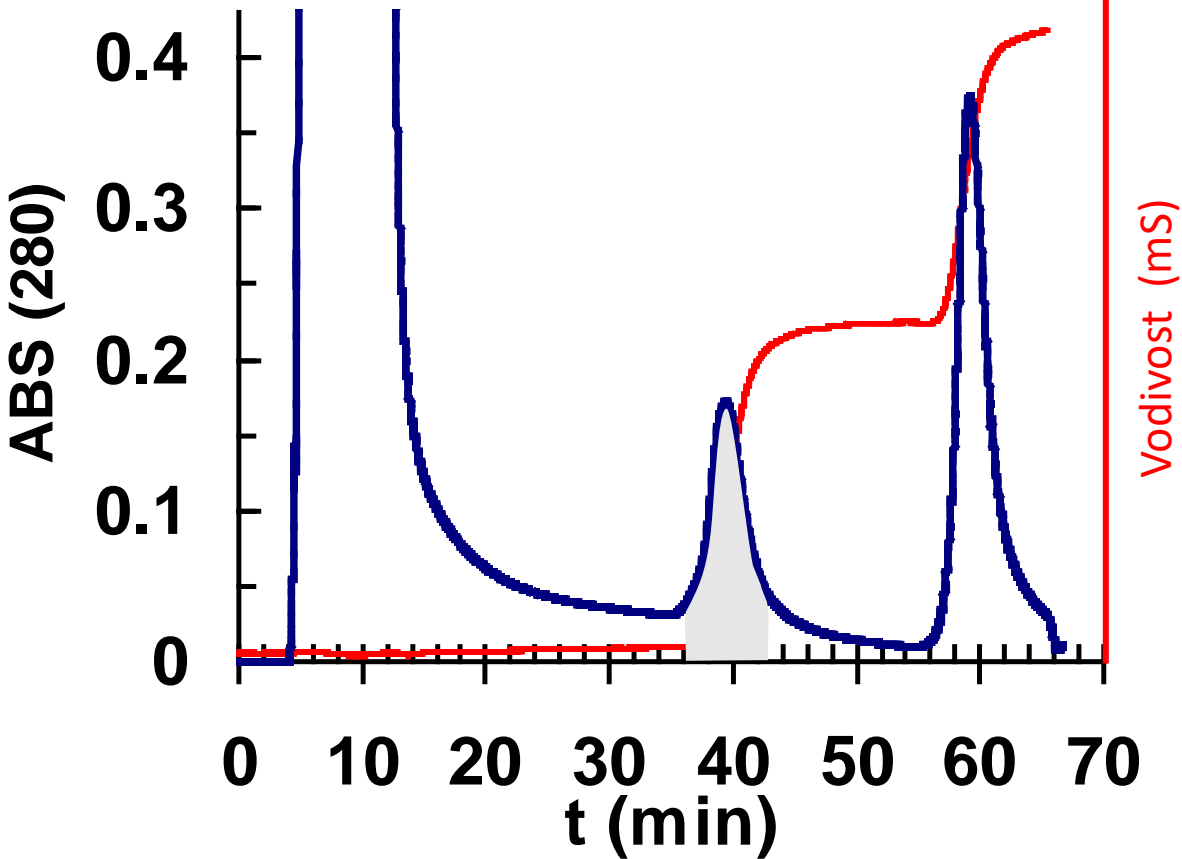
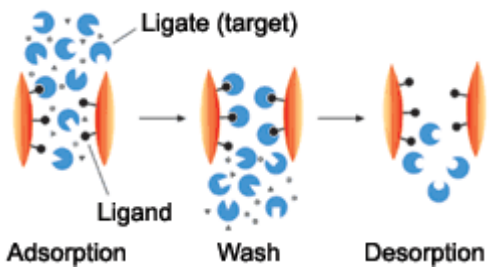


<https://youtu.be/-ajxqELsCFM>

# HEPARIN - afinní chromatografie



Podobá se vlastnostmi DNA => afinita DNA vazebných proteinů



pufr A: 10 mM TRIS-HCl (7.5) 200 mM NaCl  
pufr B: pufr A + 800 mM NaCl; průtok 1ml/min

# Příklady purifikace proteinů

---

1. Lidský protein POT1 (Protection Of Telomeres)
2. Purifikace extraktu obsahující aktivní telomerázu



# Příklad 1 - hPOT1



- DNA vazebný protein, váže jednořetězcovou telomerickou DNA
- Exprese v hmyzích buňkách pomocí bakulovirů
- GST tag pro lepší stabilitu a rozpustnost

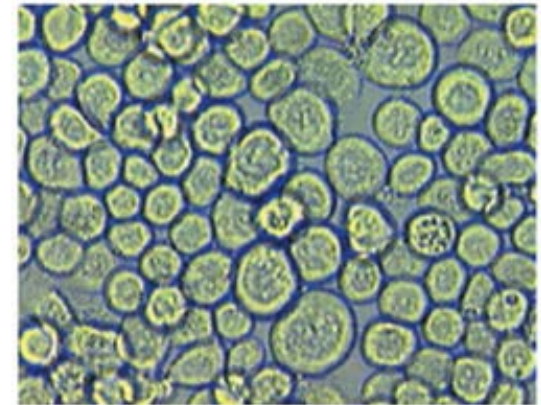


Hmyzí buňky:  
*Spodoptera frugiperda*  
(Blýskavka kukuřičná)



## Purifikace:

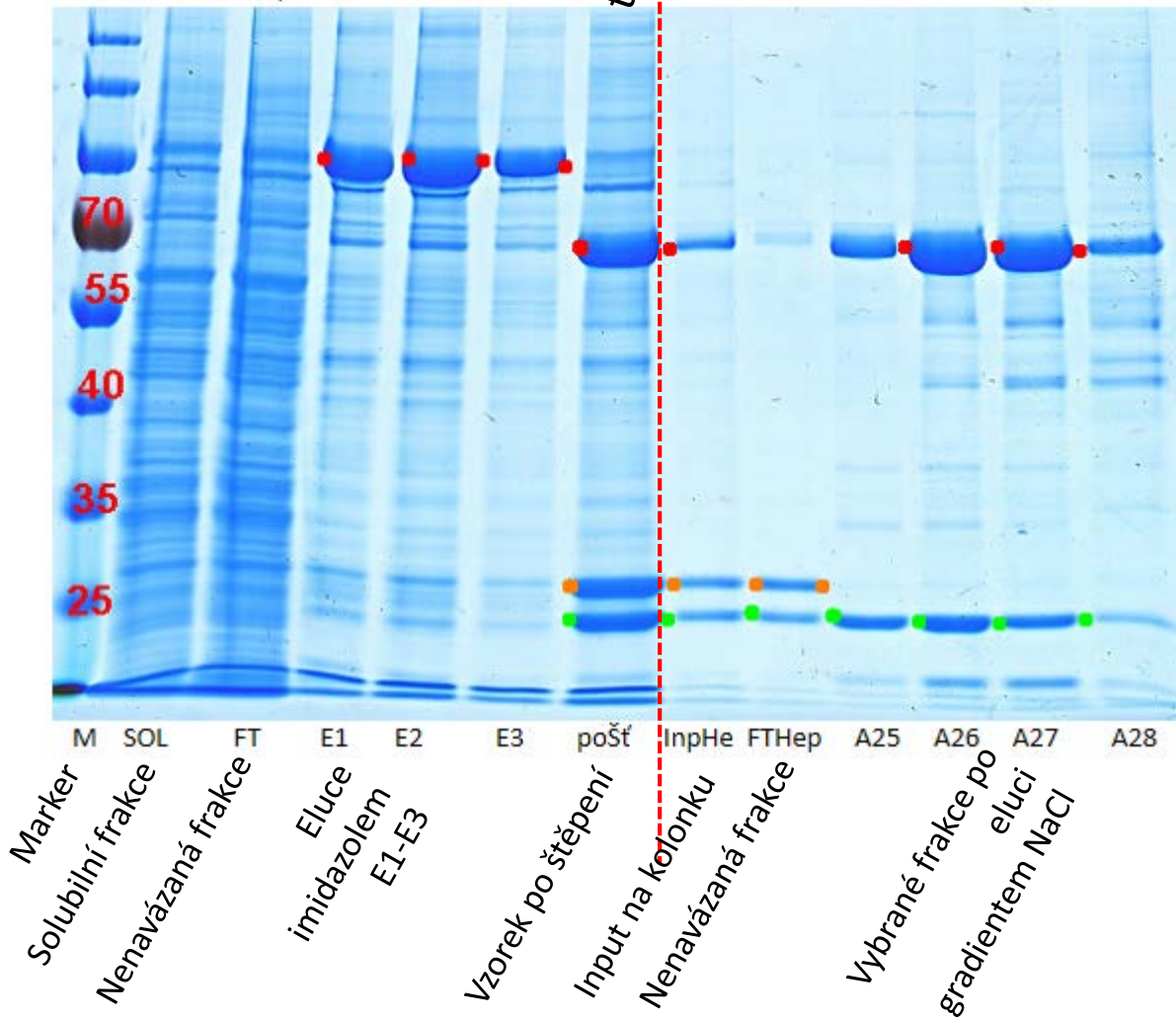
- Rozbití buněk sonikátorem
- Centrifugace -> odstranění nesesolubilních částí
- Afinitní chromatografie (skrze 6xHis tag)
  - Eluce imidazolem
- Odštěpení elučního tagu pomocí HRV3C proteázy
- Iontoměničová chromatografie (Heparinová kolonka mimikuje DNA)
- Gelová permeační chromatografie



# Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie  
6xHis (sorbent Talon)  
eluce imidazolem

Iontoměničová chromatografie  
DNA vazba (sorbent Heparin)  
Eluce gradientem NaCl (0 - 1 M)



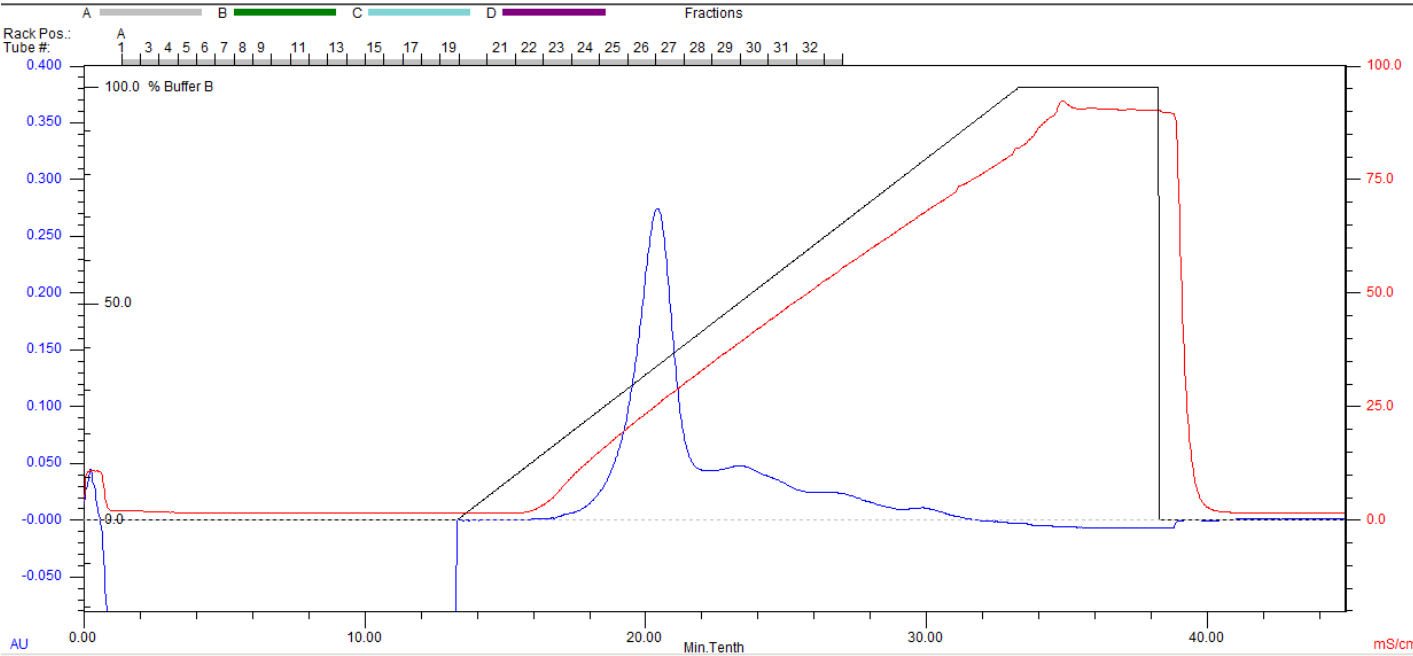
# Iontoměničová chromatografie

DNA vazba (sorbent Heparin)

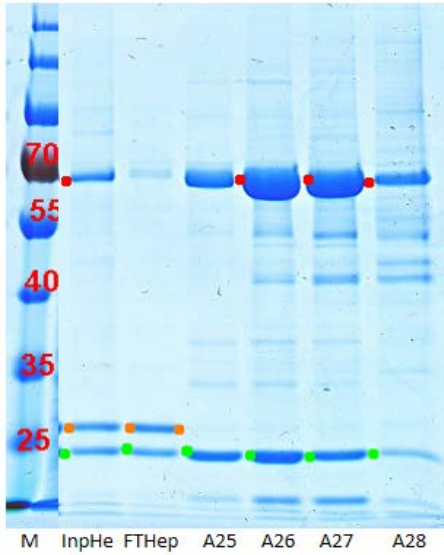
Eluce gradientem NaCl (0 - 1 M) – černá linka na chromatogramu

červená linka reprezentuje naměřenou konduktivitu

modrá linka reprezentuje naměřenou absorbanici  $A_{280}$



Červeně POT1,  
oranžově odštěpené  
tagy,  
zeleně proteáza



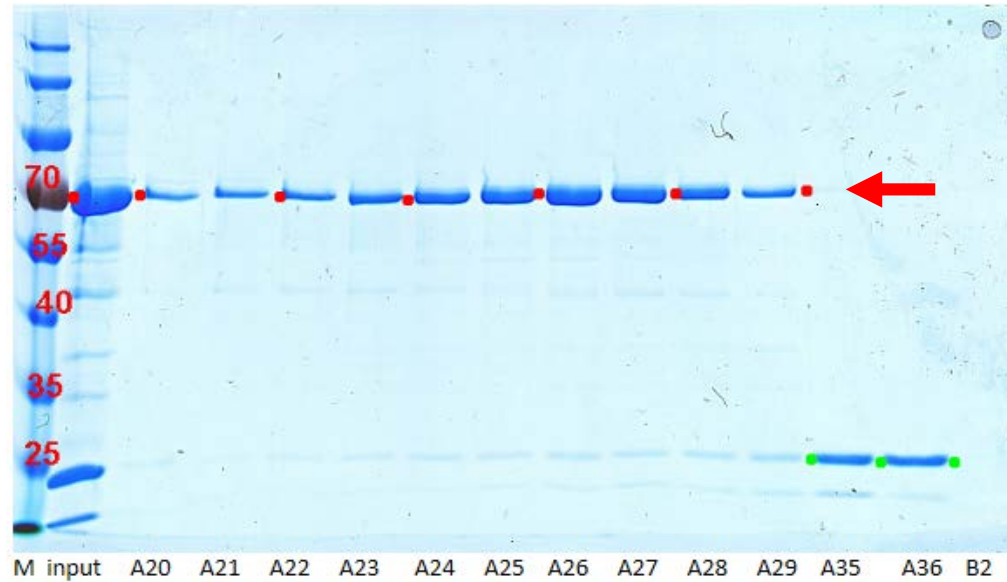
Input na kolonku  
Nenavázaná frakce  
Vybrané frakce po  
eluci  
gradientem NaCl

Na kolonu se zachytí v nízké soli pouze DNA vazebné proteiny, ostatní protečou.

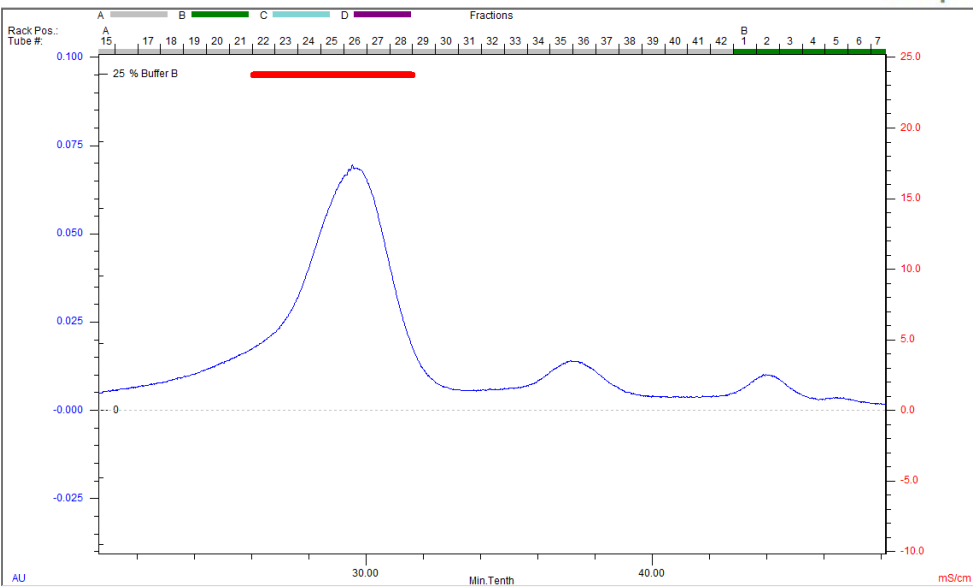
Po eluci drží odštěpený protein zájmu se zbytkem proteázy v nativním komplexu (podle SDS gelu).

# Gelová chromatografie

Superdex 200, 120 mL kolonka  
Pufr: 50mM Napi, 800mM NaCl, pH 7



Odstranění proteázy (24 kDa) a  
zbytku expresních tagů (15 kDa).  
Získávám čistý protein (červená  
šipka).

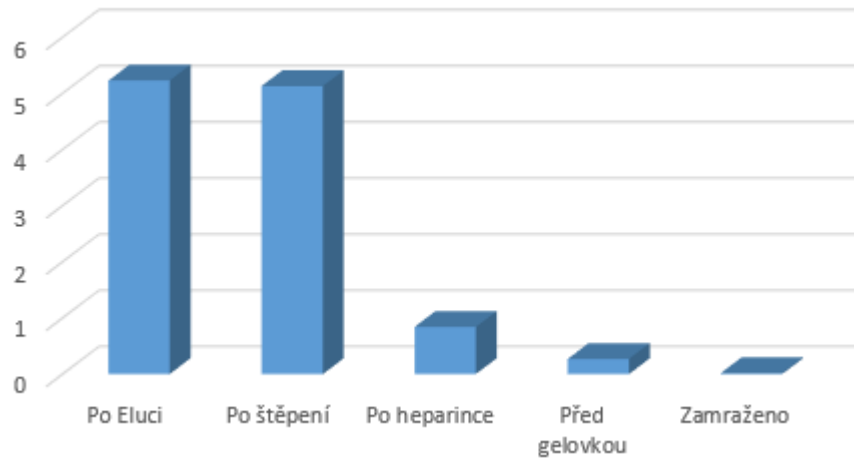


# Kvantitativní zhodnocení purifikace

- Vstup: 7,2 g peletu hmyzích buněk s hPOT1
- Výstup: 0,017 mg čistého proteinu ( $V=35\mu\text{L}$ ,  $c=7,3\mu\text{M}$ )
- Časová náročnost: purifikace 13 hodin kontinuální práce

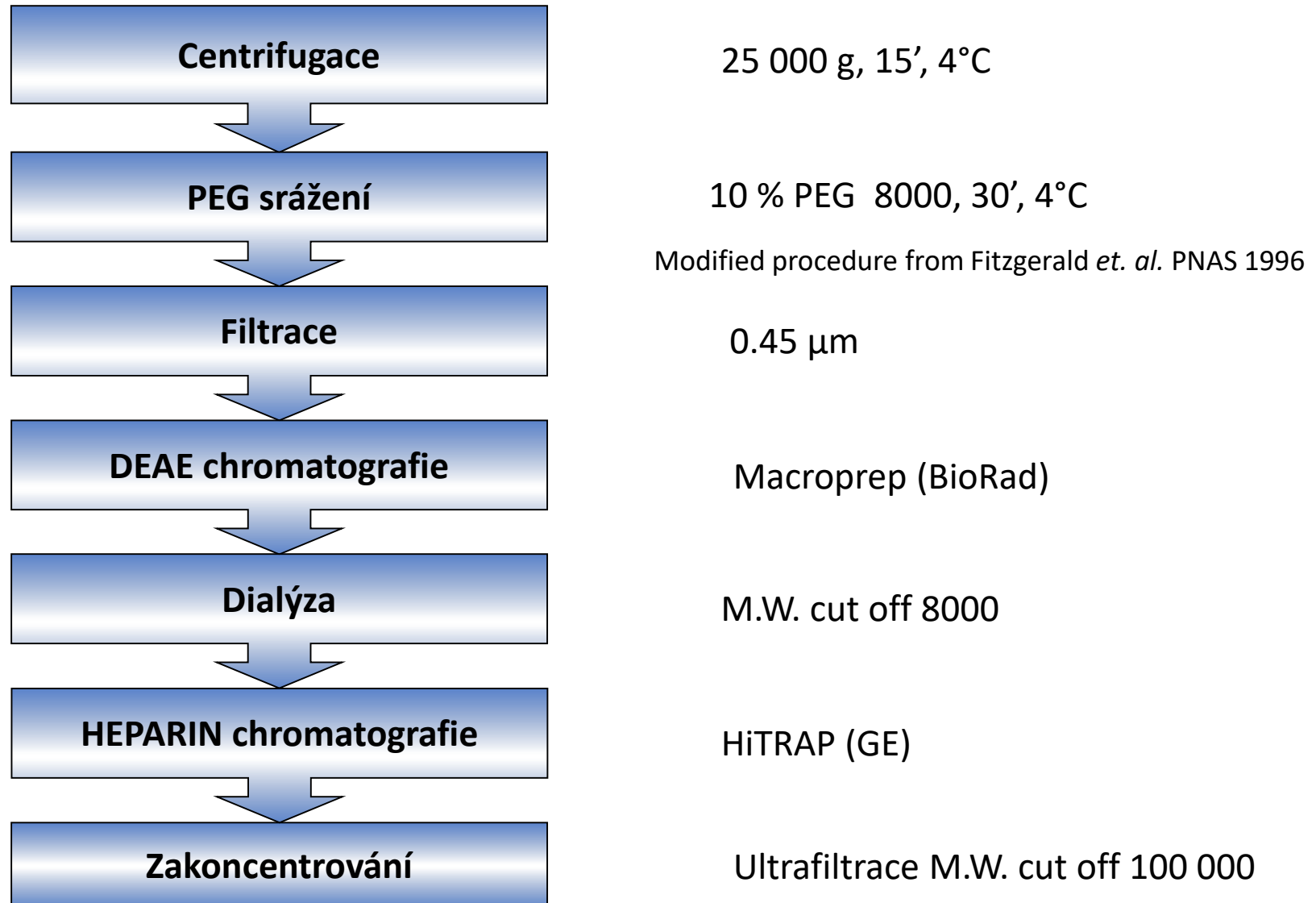
Množství proteinu v jednotlivých krocích

krok	[mg]
Po Eluci	5,23
Po štěpení	5,13
Po heparince	0,84
Před gelovkou	0,27
Zamraženo	0,017



**Mnoho purifikačních kroků = velké ztráty proteinu.**

# Příklad 2. Purifikace telomerázy - postup

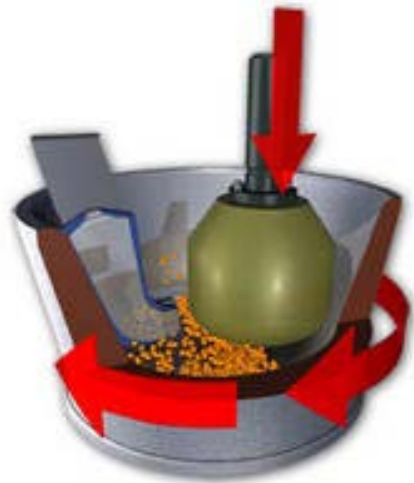


# Příprava dostatečného množství výchozího materiálu

Před dalším krokem je nutné zvýšit počáteční množství purifikovaného materiálu => **homogenizátor rostlinného materiálu**

# Hmoždířový mlýn RM 100 *alias* automatická třecí miska

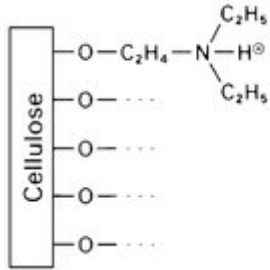
- Zpracování 4 – 100 g materiálu najednou
- Možnost mletí v tekutém dusíku
- Výsledná zrnitost  $\sim 10 \mu\text{m}$





# Aniontoměničová DEAE chromatografie – slabý náboj

DEAE dietylaminoetyl

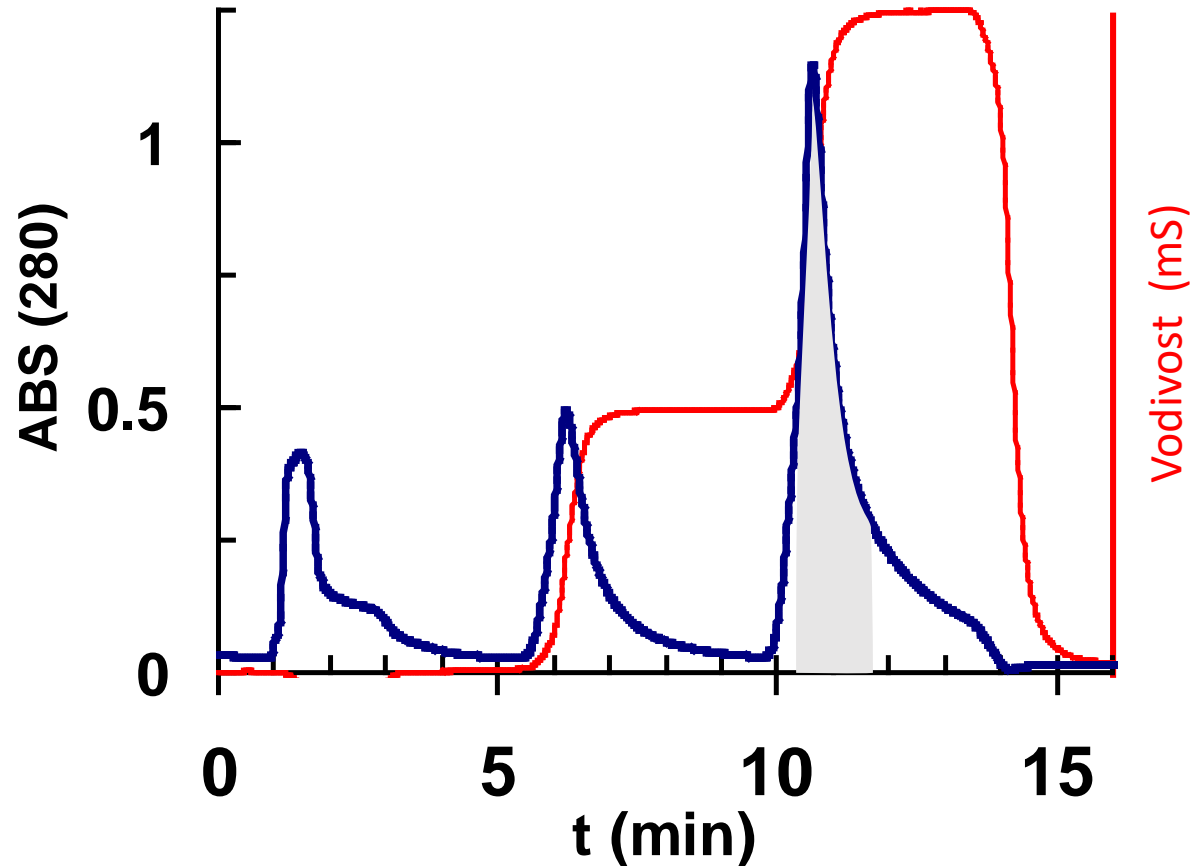


**pufř A:** 10 mM TRIS-HCl (7.5)

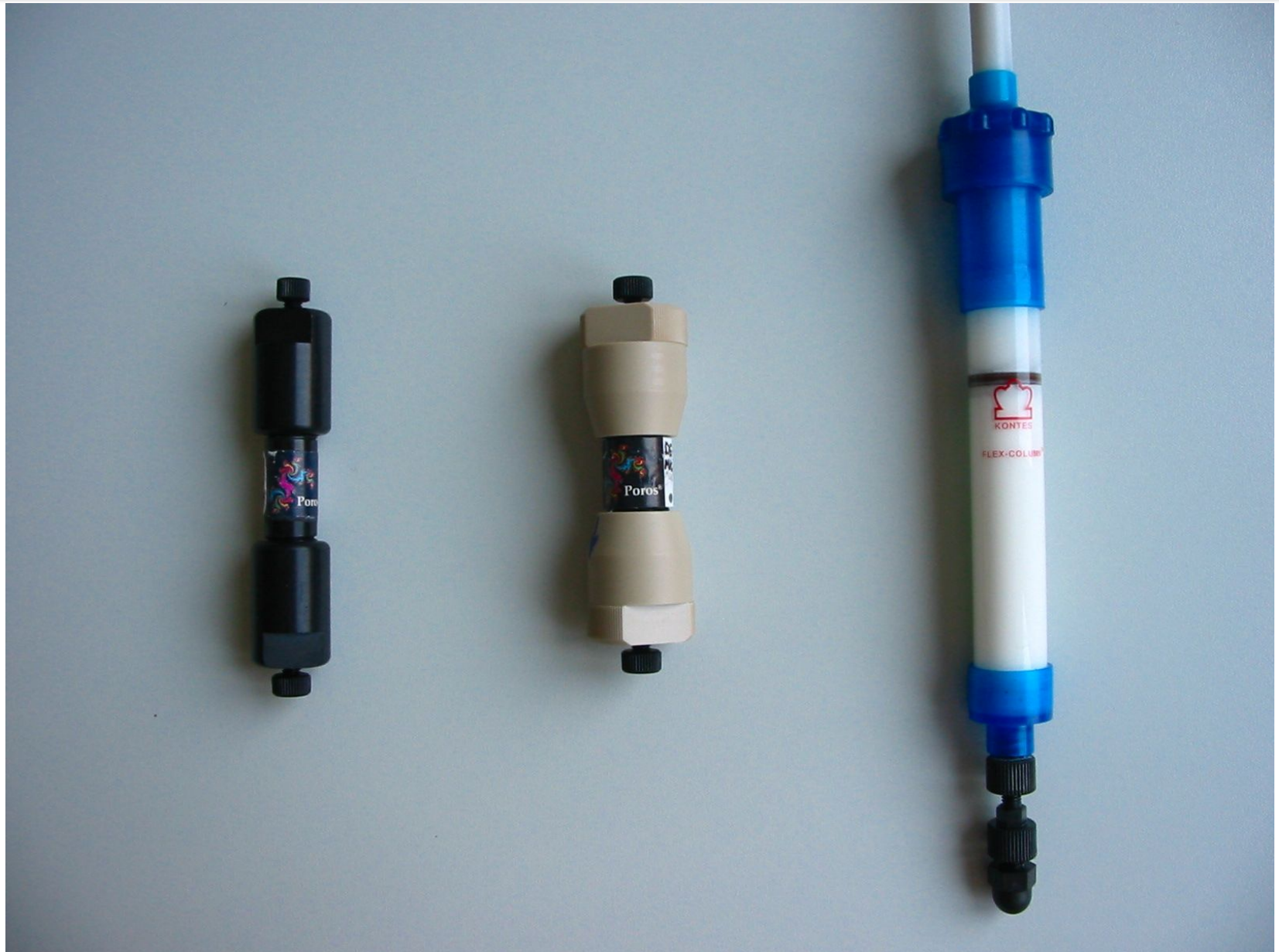
3 mM KCl  
1 mM MgCl  
1 mM EGTA  
50 mM NaCl

**pufř B:** pufř A + 700 mM NaCl

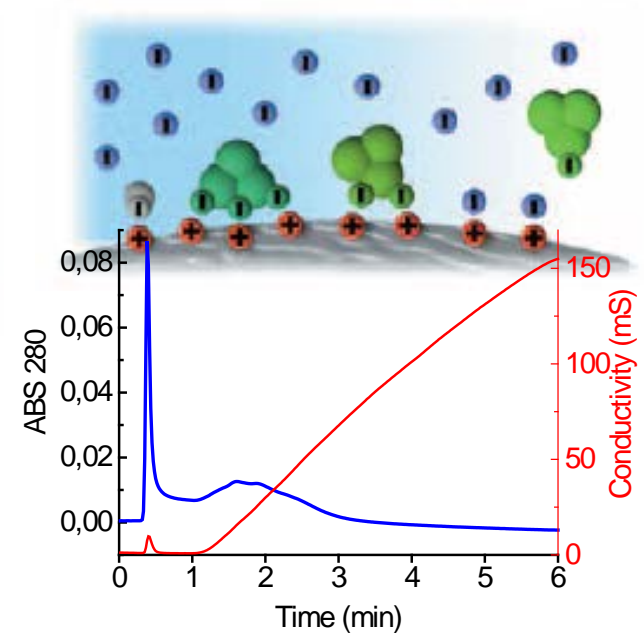
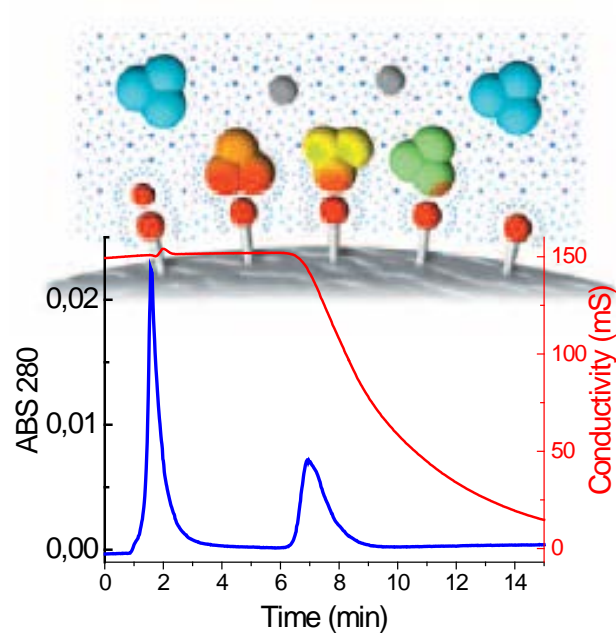
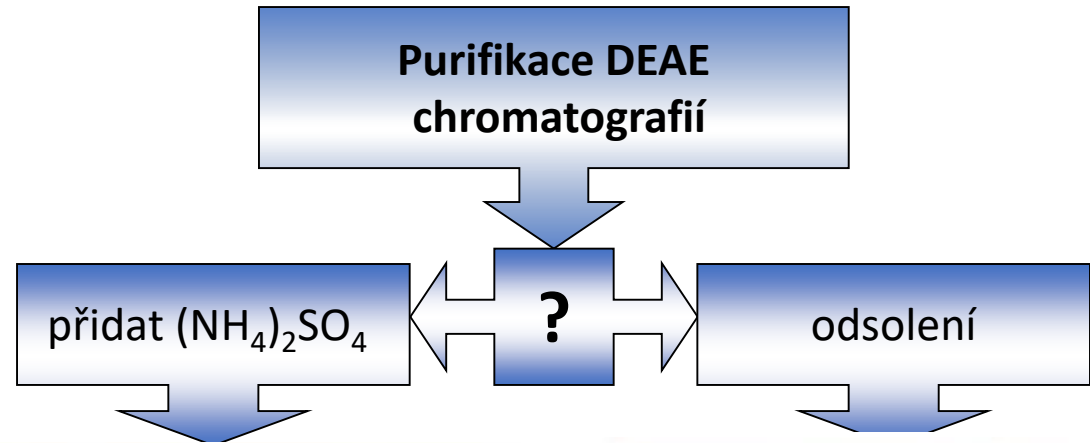
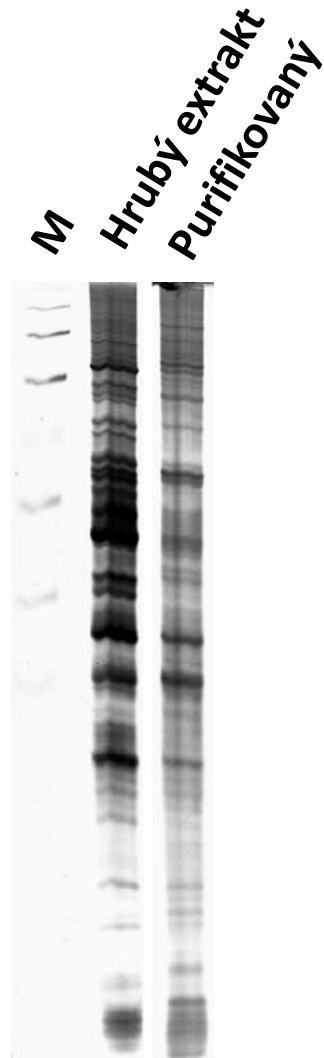
průtok 8 ml/min



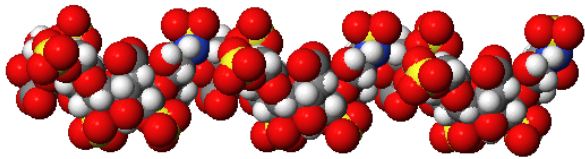
# Přehled velikosti používaných kolon



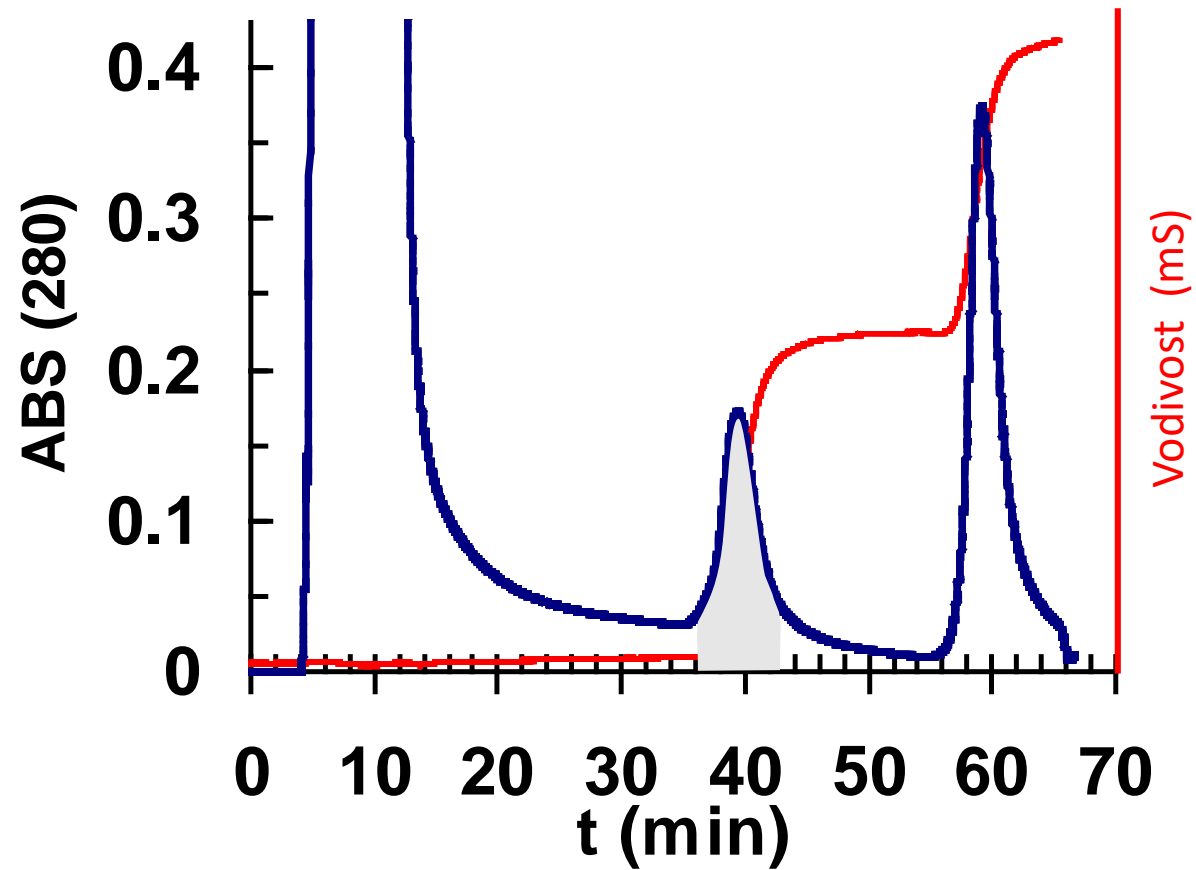
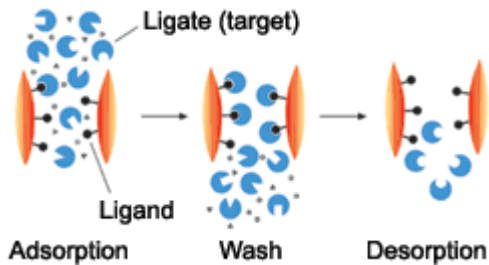
# Profil po DEAE chromatografii



# HEPARIN - afinitní chromatografie



Podobá se vlastnostmi DNA =>  
afinita DNA vazebných proteinů

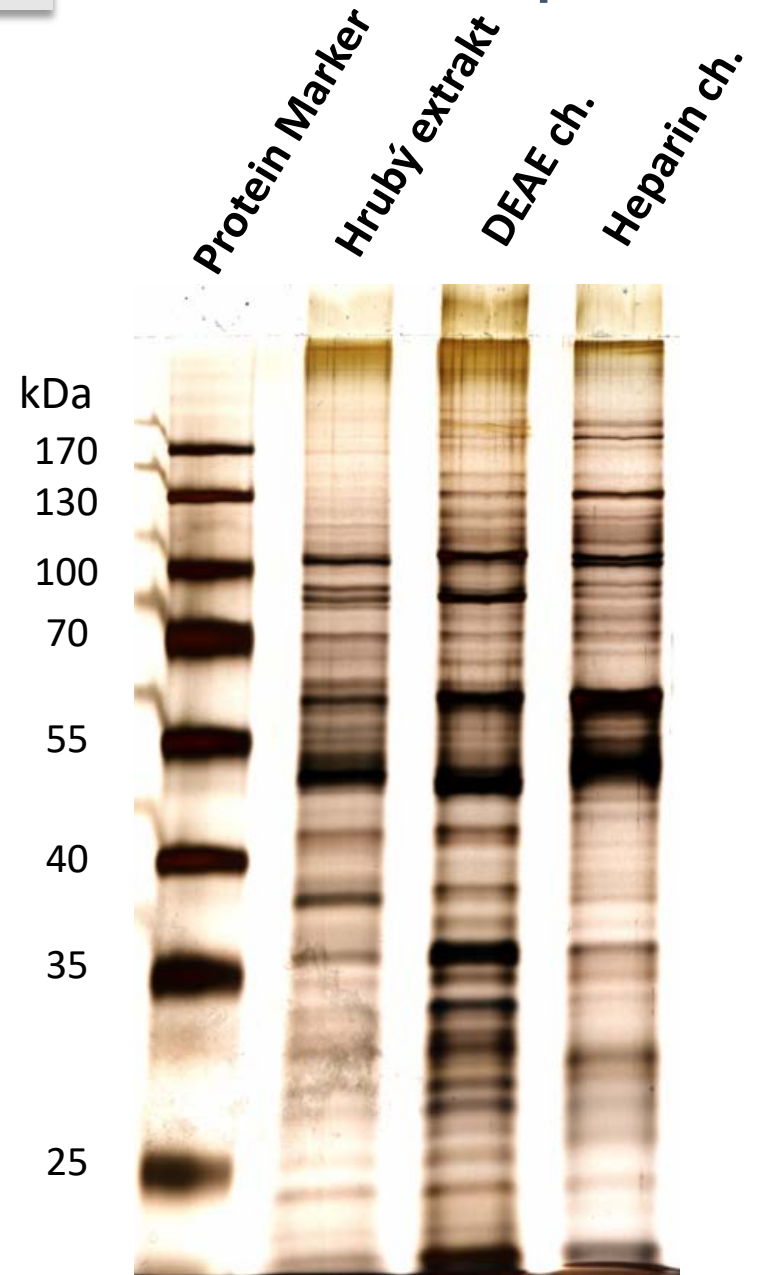
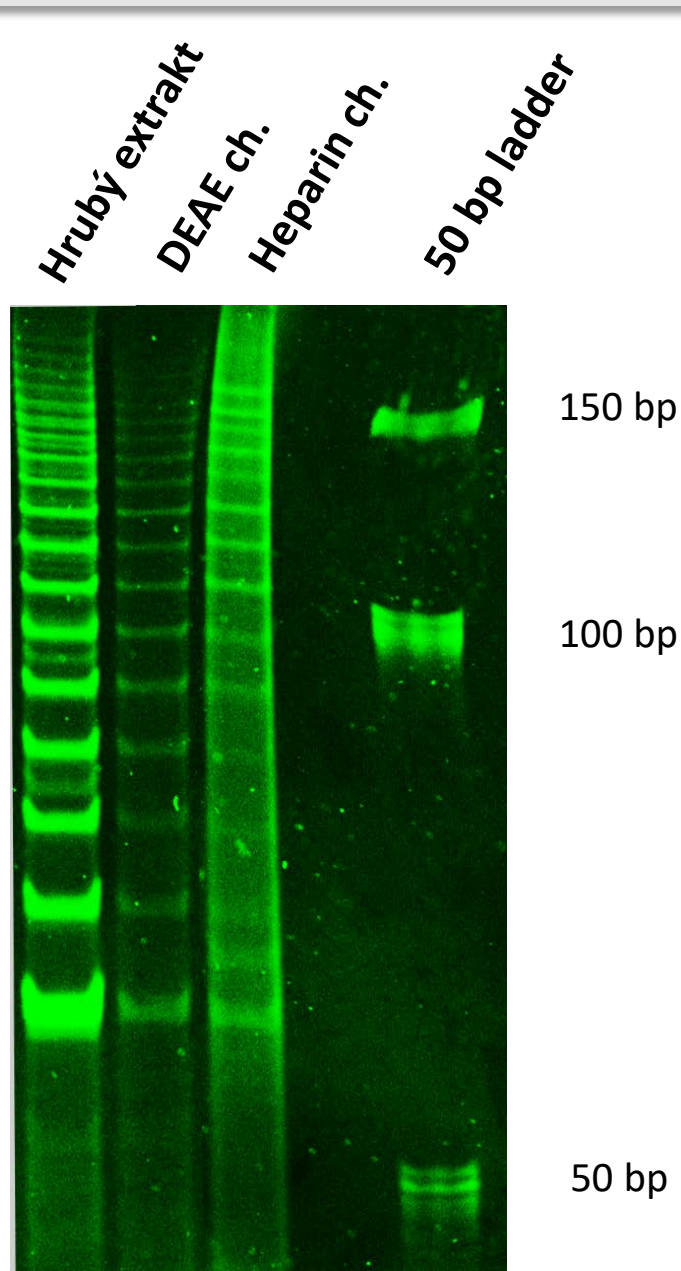


**pufr A:** 10 mM TRIS-HCl (7.5) 200 mM NaCl

**pufr B:** pufr A + 800 mM NaCl; průtok 1ml/min

# Telomerázová aktivita

# SDS PAGE profil





# Přehled množství materiálu

---

Výchozí : mikrokalusová kultura **100 g**

Hrubý extrakt po srážení PEG: **150 mg**

Po 1. purifikačním kroku (DEAE): **10 mg**

Po 2. purifikačním kroku (Heparin): **0.5 mg**

# Literatura

- Protein purification: types
- [Affinity Chromatography - Vol. 1: Antibodies](#)
- [Affinity Chromatography - Vol. 2: Tagged Proteins](#)
- [Affinity Chromatography - Vol. 3: Specific Groups of Biomolecules](#)
- [Hydrophobic Interaction Chromatography](#)
- [Ion Exchange Chromatography](#)
- [Multimodal Chromatography](#)
- [Size Exclusion Chromatography](#)
- Protein purification: strategies
- [ÄKTA Laboratory-Scale Chromatography Systems](#)
- [Cross Flow Filtration Method Handbook](#)
- [Design of Experiments in Protein Production and Purification](#)
- [GST Gene Fusion System](#)
- [High Throughput Process Development \(HTPD\) with PreDictor Plates](#)
- [Purifying Challenging Proteins](#)
- [Strategies for Protein Purification](#)
- Protein analysis
- [2-D Electrophoresis](#)
- [Biacore Assay Handbook](#)
- [Biacore Sensor Surface Handbook](#)
- [Molecular Imaging](#)
- [Western Blotting](#)
- Protein sample preparation
- [Cross Flow Filtration Method Handbook](#)
- [Protein Sample Preparation](#)
- Cells
- [Cell Separation Media \(Density Gradient Centrifugation Media\)](#)
- [Cross Flow Filtration Method Handbook](#)
- [Microcarrier Cell Culture](#)
- [Isolation of Mononuclear Cells](#)
- Nucleic acids
- [Biacore Assay Handbook](#)
- [Biacore Sensor Surface Handbook](#)
- [Cross Flow Filtration Method Handbook](#)
- [GST Gene Fusion System](#)
- [Molecular Imaging](#)
- [Nucleic Acid Sample Preparation for Downstream Analyses](#)
- [Size Exclusion Chromatography](#)