

# KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE PROTEINŮ A DNA

**Experimentální metody biofyziky**

F9070

**Ctirad Hofr**

**LifeB** – Laboratoř interakce a funkce esenciálních **Biomolekul**

FGP – Funkční genomika a proteomika

NCBR – Národní centrum výzkumu biomolekul

Přírodovědecká fakulta | Masarykova univerzita

**MUNI** **SCI** **Národní centrum  
pro výzkum  
biomolekul**

# Přehled přednášky

Princip chromatografie

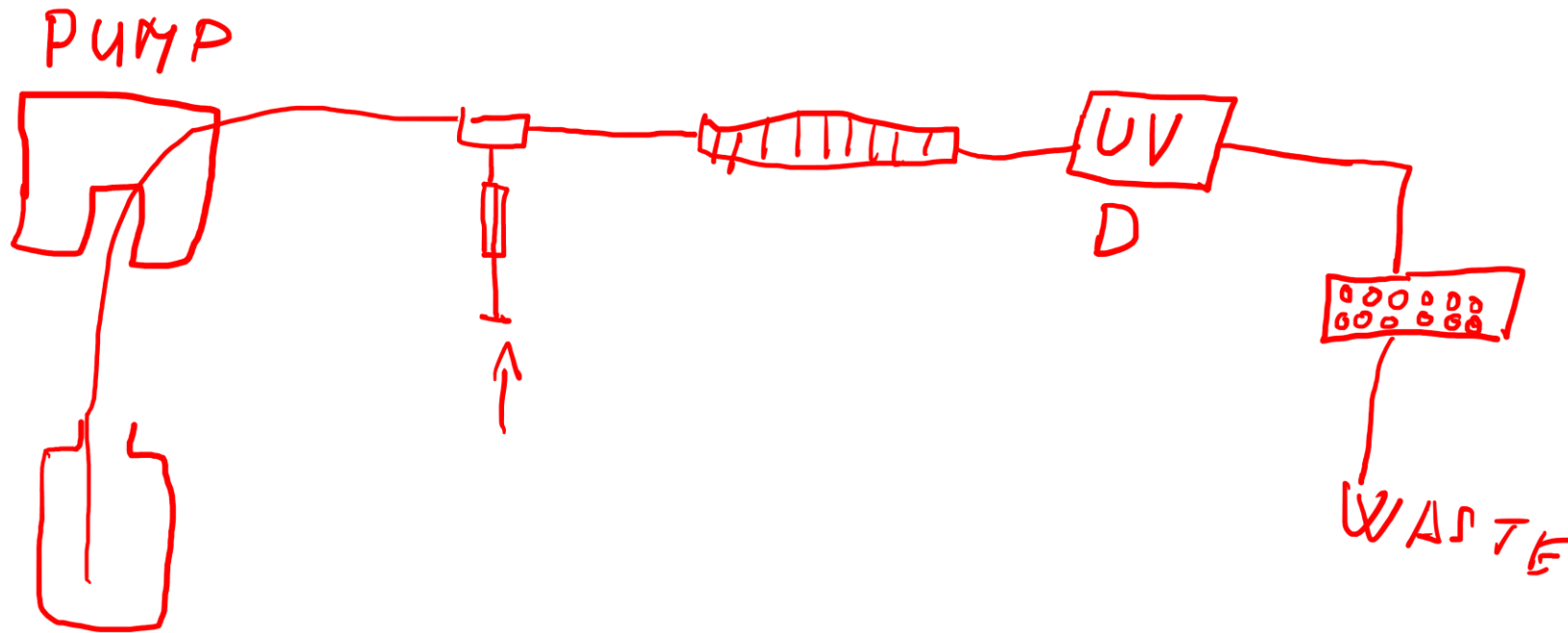
Základní součásti chromatografu

Druhy kapalinové chromatografie

Příklady použití

# Princip chromatografie

Molekuly se rozdělují – přecházejí mezi stacionární a mobilní fází, 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

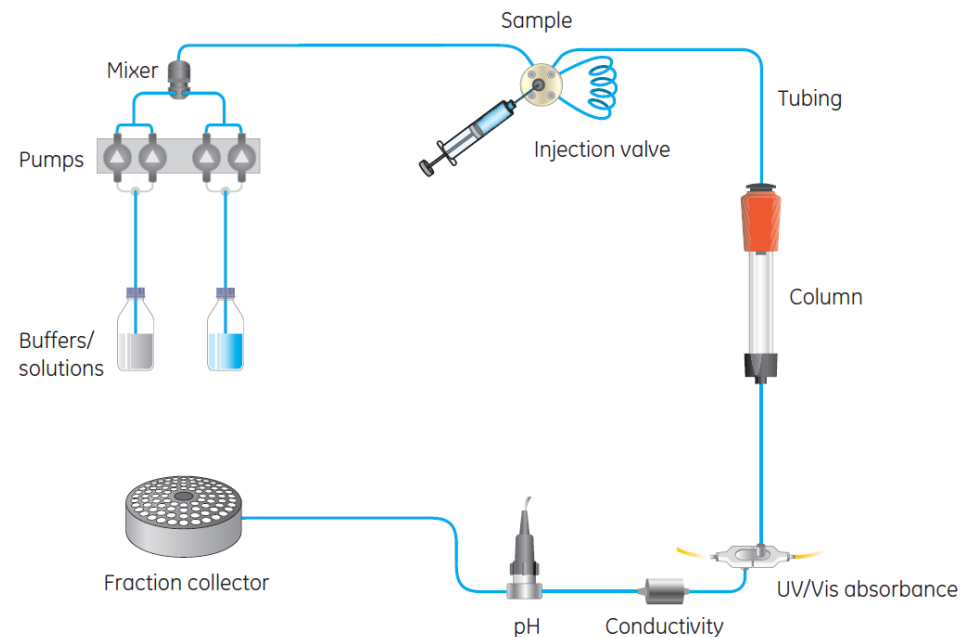
**Retenční čas** – čas, který složka potřebuje k průchodu chromatografickým systémem

**Chromatogram** – záznam z chromatografu znázorňující jednotlivé analyty nejčastěji ve formě tzv. chromatografických píků oddělených navzájem základní linií

**Preparativní chromatografie** – slouží k izolaci čistých nebo alespoň čistějších složek vzorku, které jsou dále použity k chemické reakci, další separaci apod.

**Autosampler** - automaticky dávkuje vzorky do přístroje

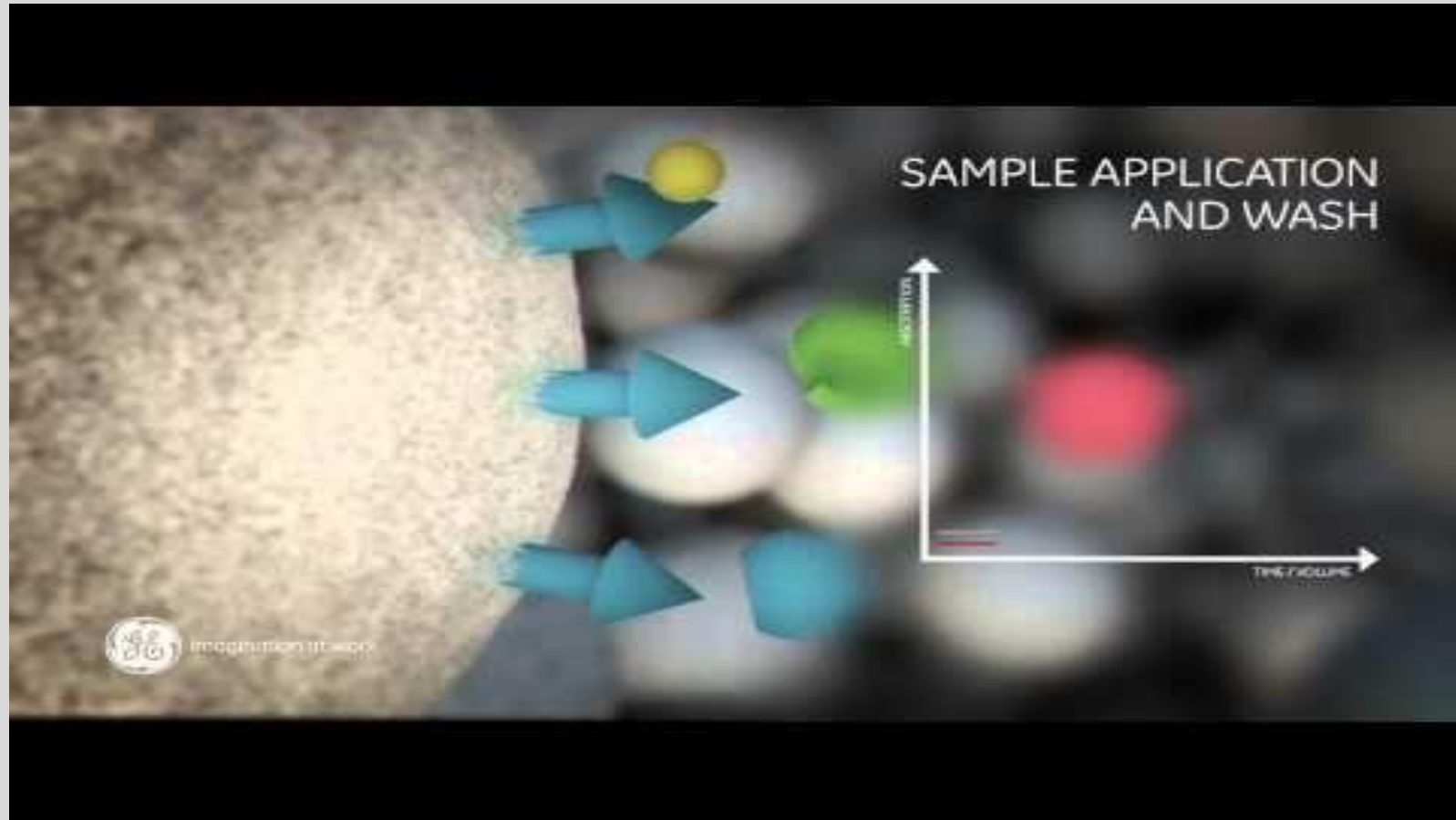
**Frakční kolektor** – sbírá eluent po průchodu kolonou



# Druhy kapalinové chromatografie

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

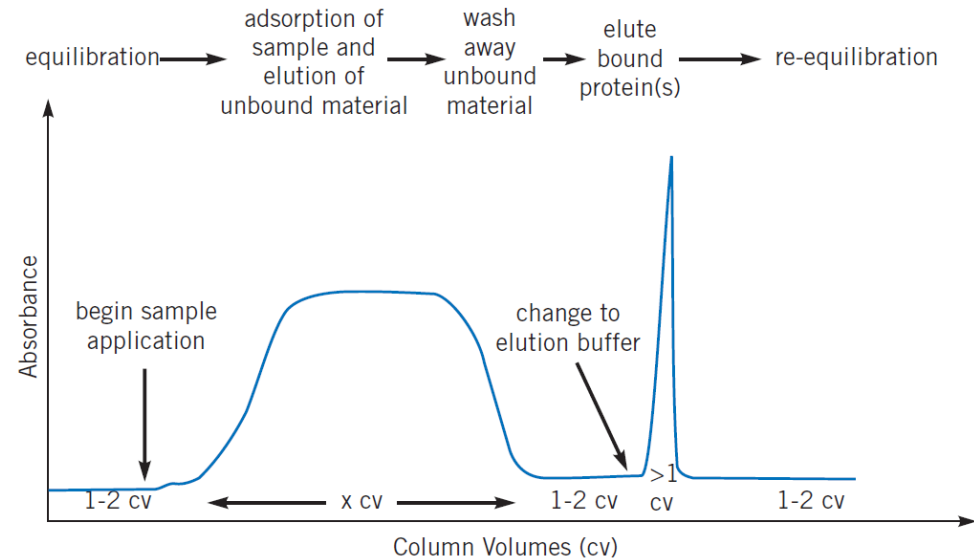
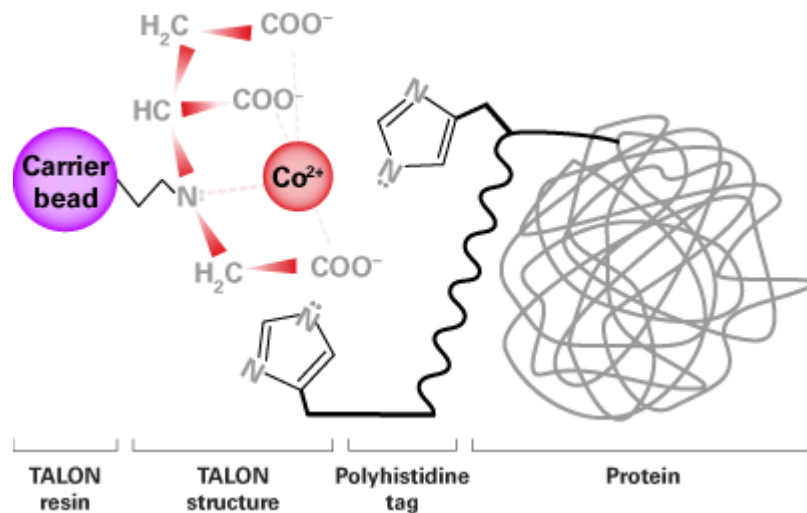
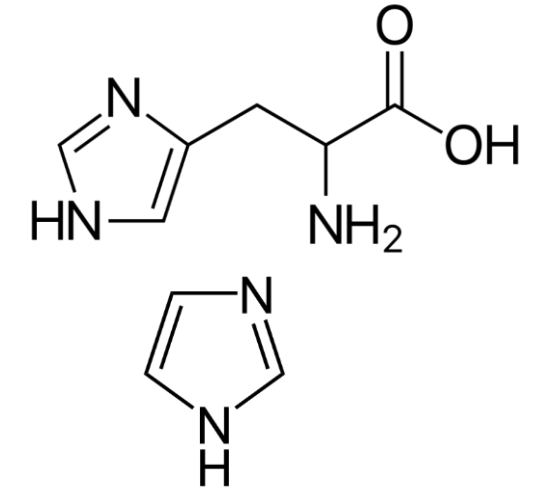
# 1. Afinitní chromatografie



<https://youtu.be/ezj9MVGCF8c?si=gV4m-lvda8gqDEef>

# IMAC – Immobilized Metal ion Affinity Chromatography

- Založena na koordinační vazbě 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

Rychlá a účinná izolace proteinu z buněčného extraktu.

Obvykle první krok při purifikaci proteinu.

## 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

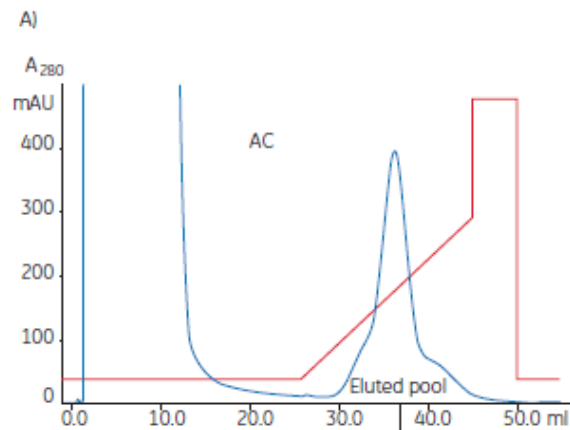
**Binding buffer:** 20 mM sodium phosphate, 30 mM imidazole, 500 mM NaCl, pH 7.4

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

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

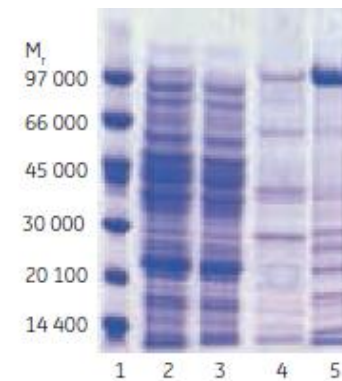
**Flow rate:** 1 ml/min

**System:** ÄKTA



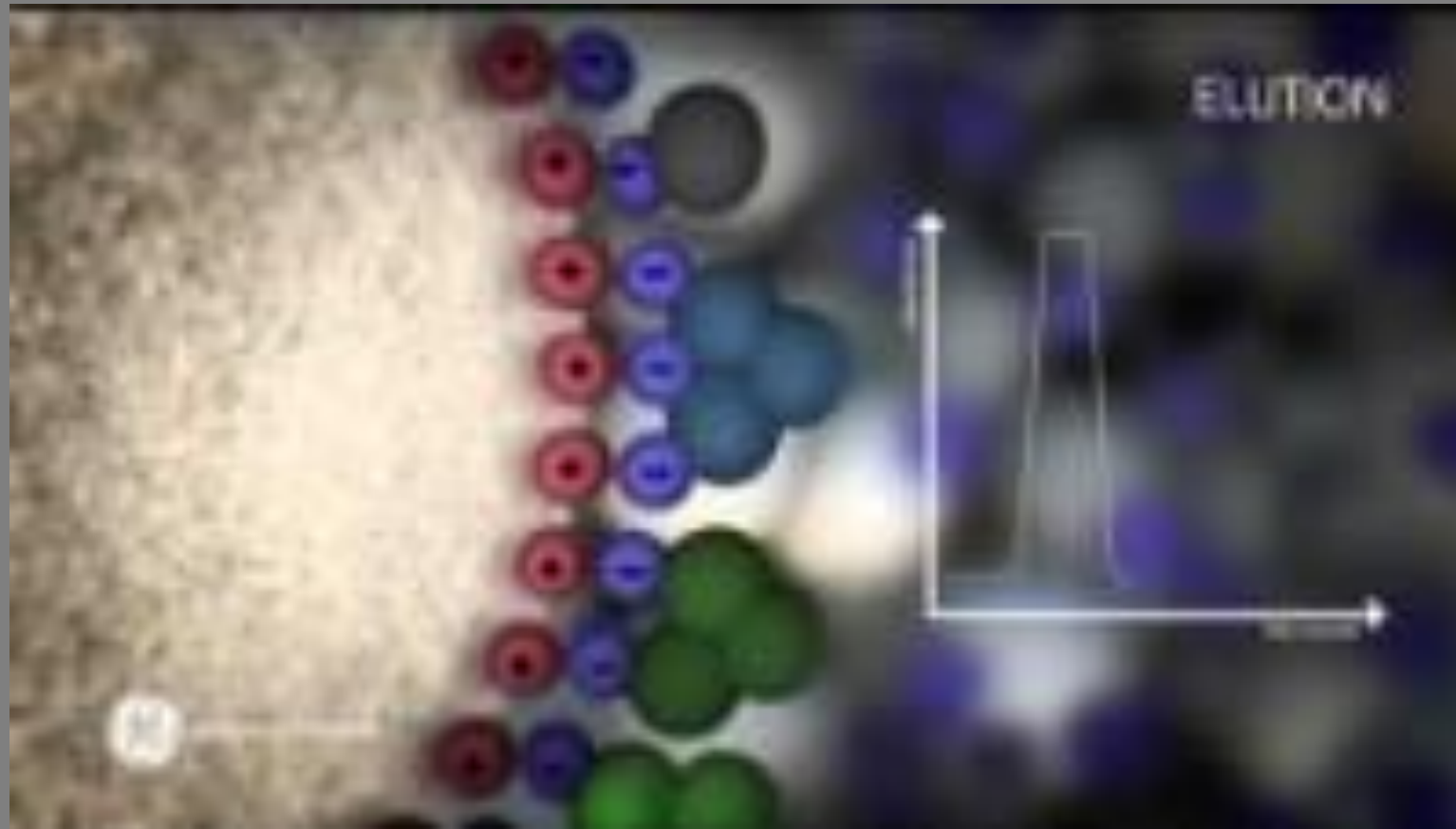
## Lanes

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





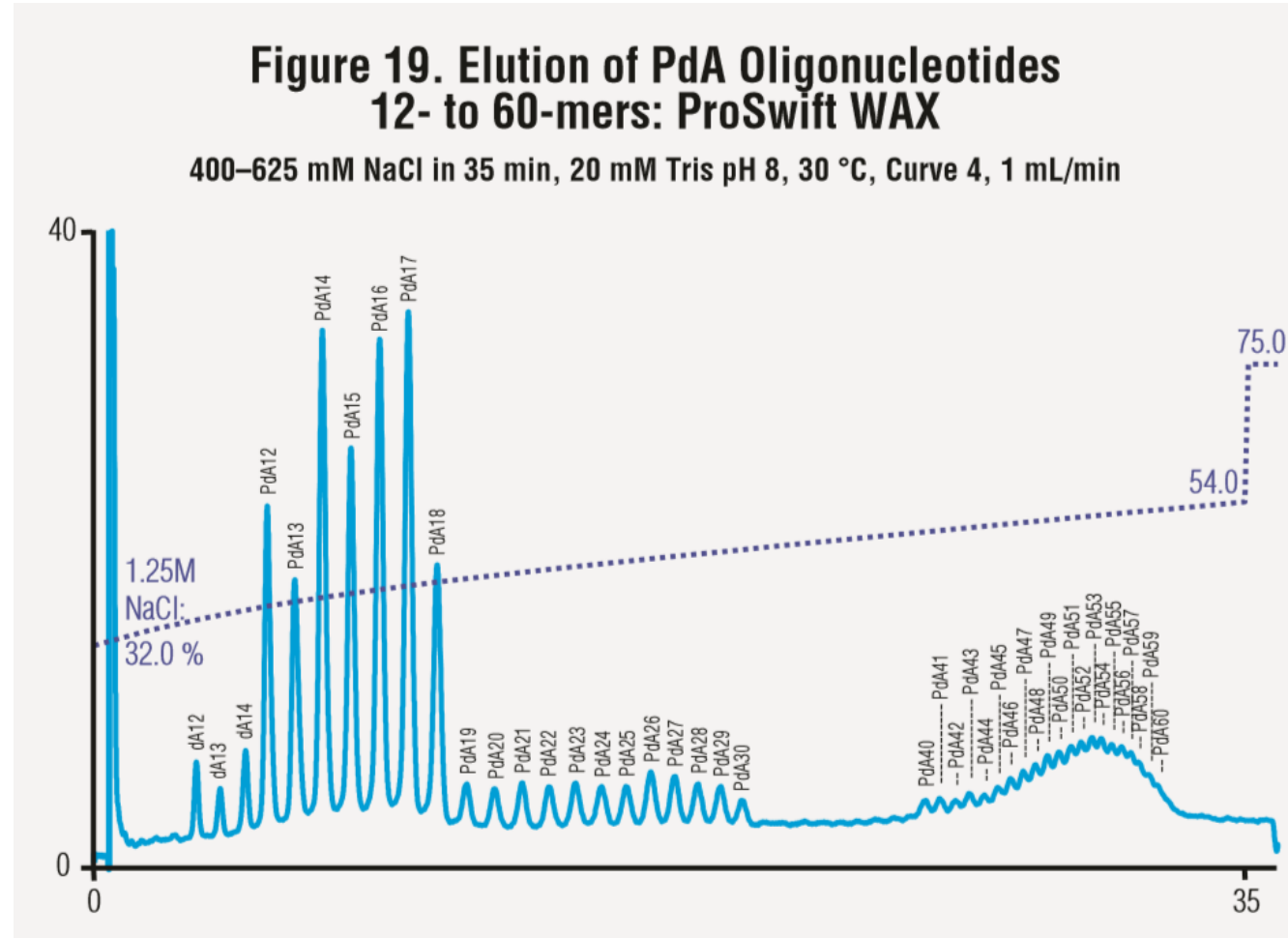
## 2. Iontoměničová chromatografie



<https://youtu.be/tqianb7AvnU?si=pasEFtIA7jVgmPDd&t=26>

# Použití Ionex chromatografie pro purifikaci DNA

Separace a purifikace oligonukleotidů



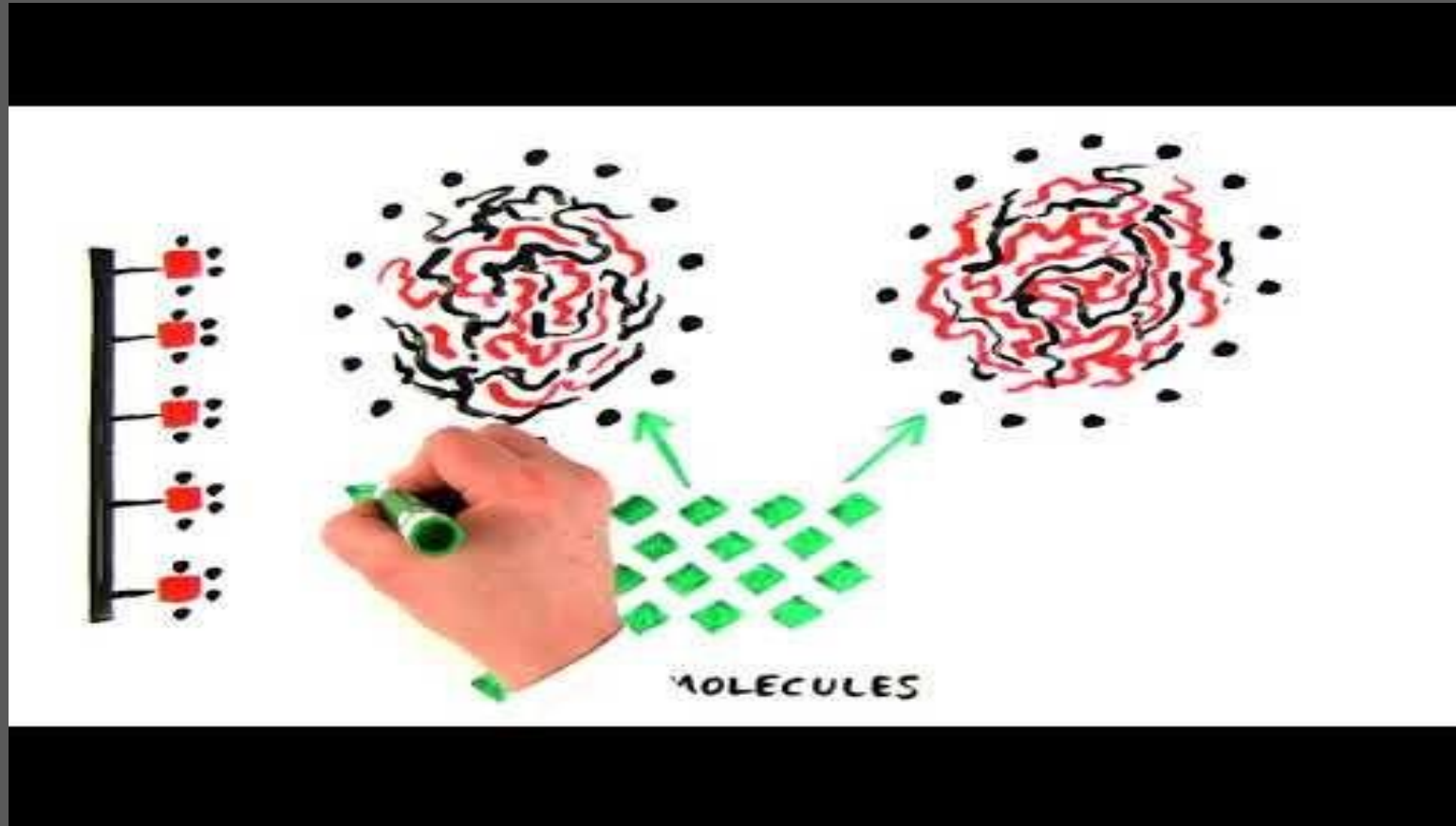
# 3. Hydrofobní interakce

**The principle of  
Hydrophobic  
Interaction  
Chromatography**



<https://www.youtube.com/watch?v=d8P04atG9Fs>

# 3. Hydrofobní interakce



<https://youtu.be/aqO-p8terxY?si=i7SPwy7U7jMN0MEW>

# 4. Gelová – Size Exclusion Chromatography SEC

The principle of  
Gel Filtration  
Chromatography

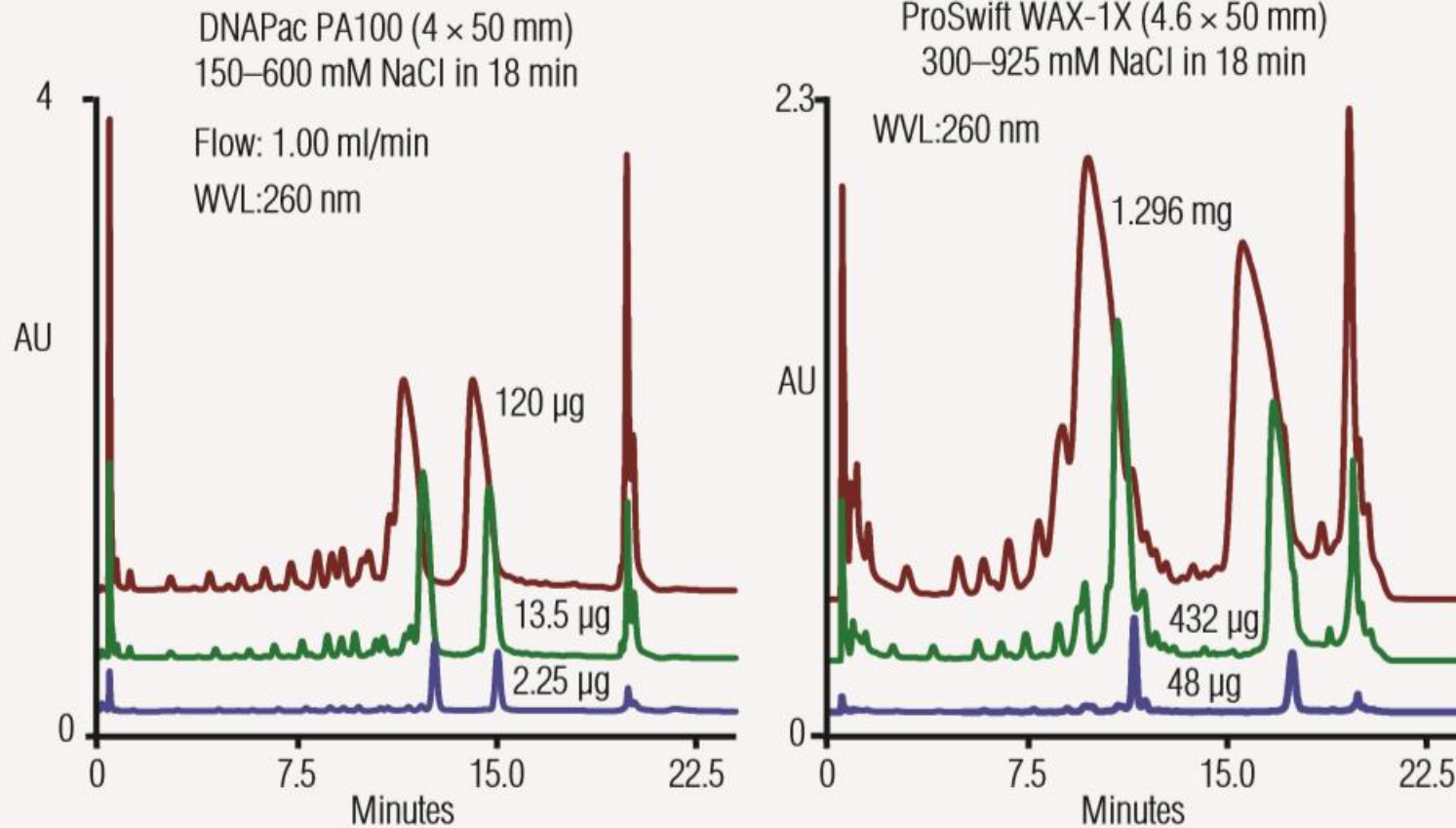


<https://youtu.be/aWtThd13l4I?si=LoBZ-kuVF3PzQzWB>

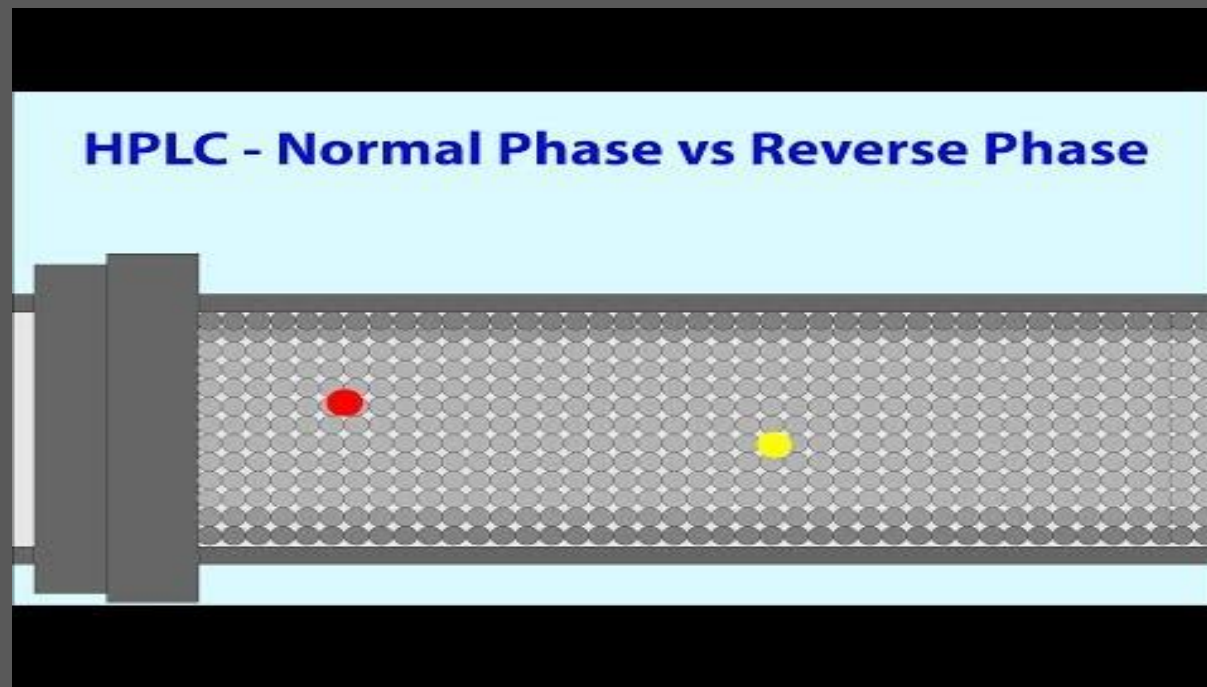
# Retenční čas se s množstvím vzorku zkracuje

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

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



# 5. Normální a reverzní fáze



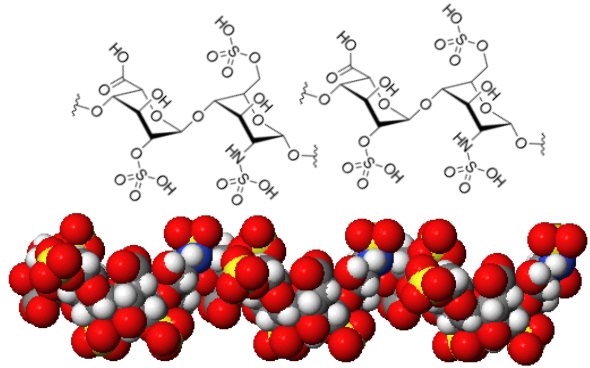
[https://youtu.be/MLoitPJQH3g?si=NuyBE81nkZq6\\_LAK](https://youtu.be/MLoitPJQH3g?si=NuyBE81nkZq6_LAK)

# 5. Reverzní fáze

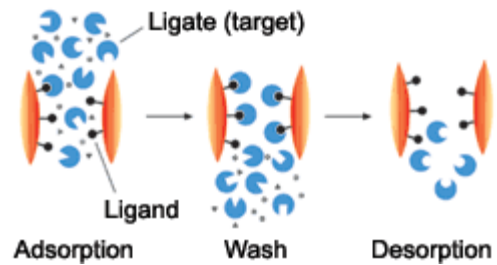




# HEPARIN - afinitní a iontoměničová chromatografie v jednom



Heparin se podobá vlastnostmi DNA => afinita DNA vazebných proteinů



# Příklady purifikace proteinů

1. Purifikace lidského telomerového proteinu hPOT1 laskavě poskytnul Pavel Veverka
2. Purifikace rostlinné telomerázy

# 1. Purifikace lidského proteinu hPOT1



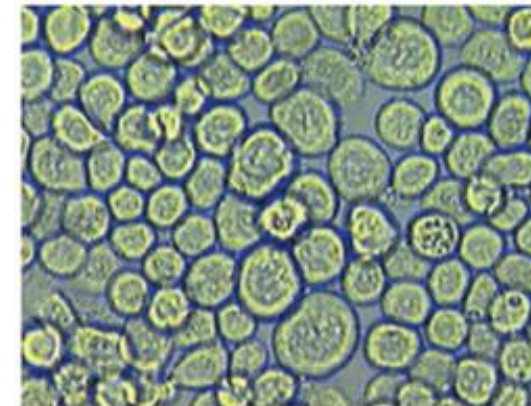
- DNA vazebný protein, váže jednořetězcovou telomerickou DNA
- Exprese v hmyzích buňkách pomocí bakulovirů
- GST tag pro lepší stabilitu a rozpustnost

## Purifikace:

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

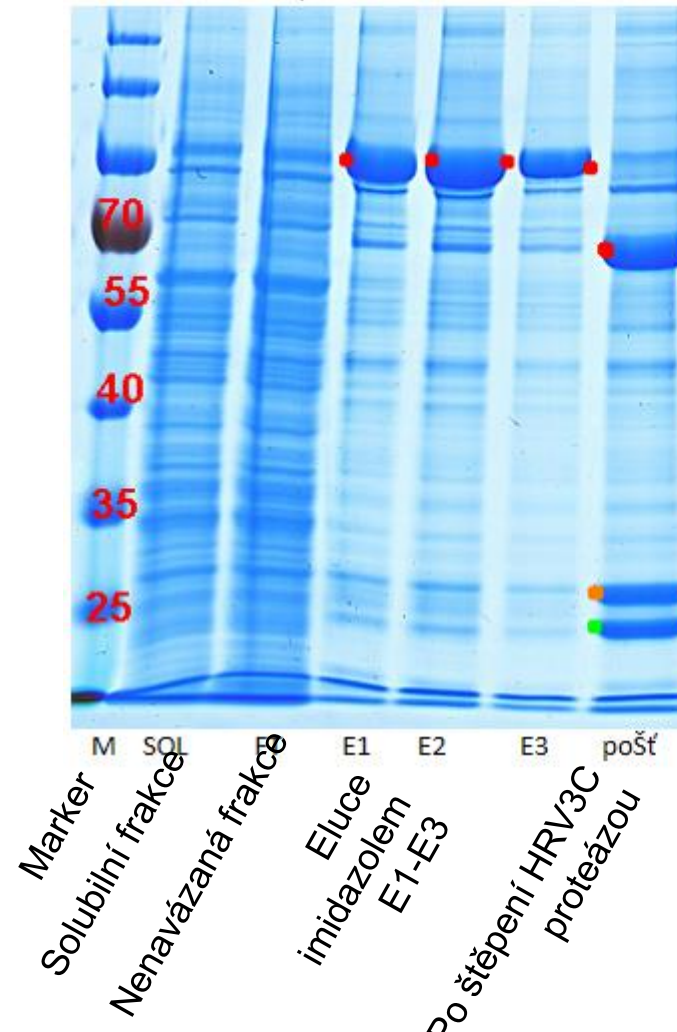


Hmyzí buňky:  
*Spodoptera frugiperda*  
(Blýskavka kukuřičná)



# Afinitní chromatografie POT1

Afinitní chromatografie  
6xHis (sorbent Talon)  
eluce imidazolem 300 mM

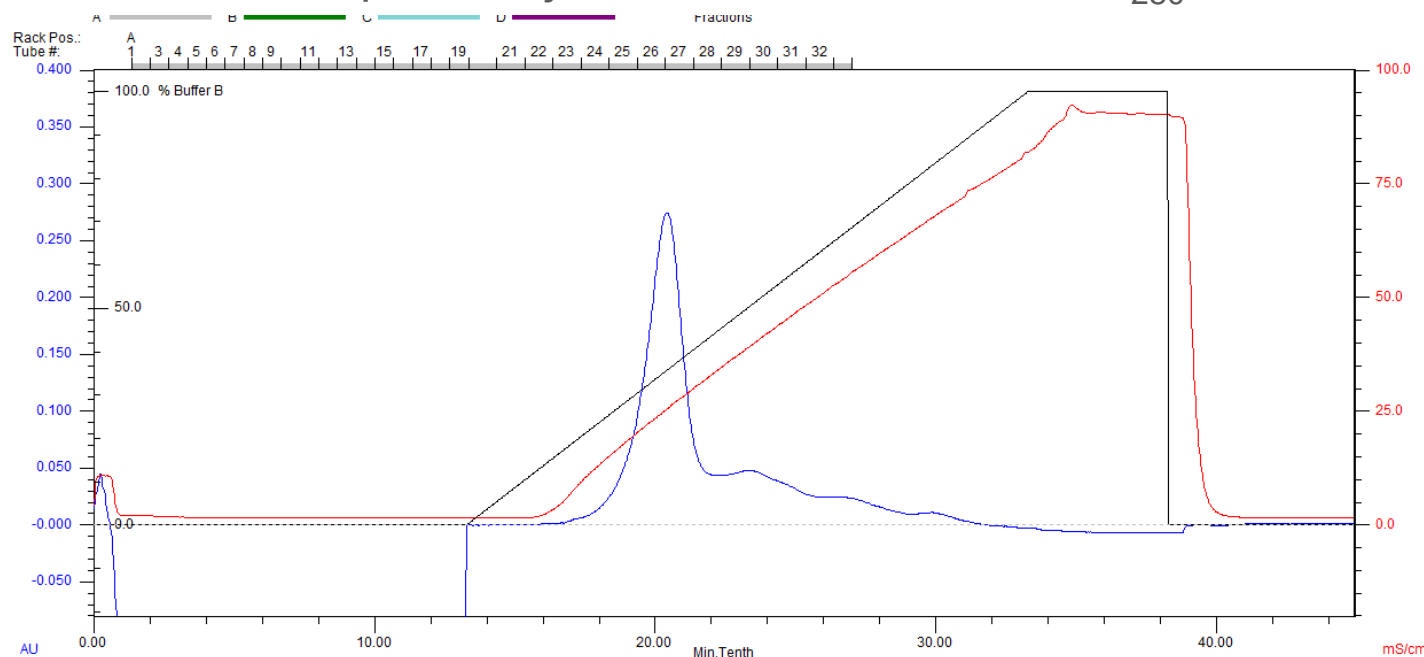


# Heparinová chromatografie hPOT1

DNA vazba (sorbent Heparin)

Eluce gradientem NaCl (0 - 1 M) – černá linka na chromatogramu červená linka reprezentuje naměřenou konduktivitu

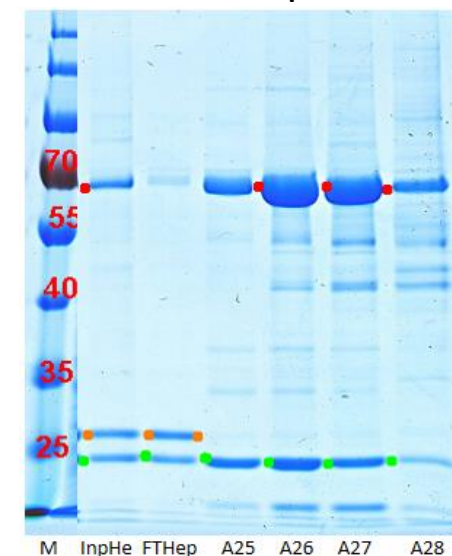
modrá linka reprezentuje naměřenou absorbanici  $A_{280}$



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).

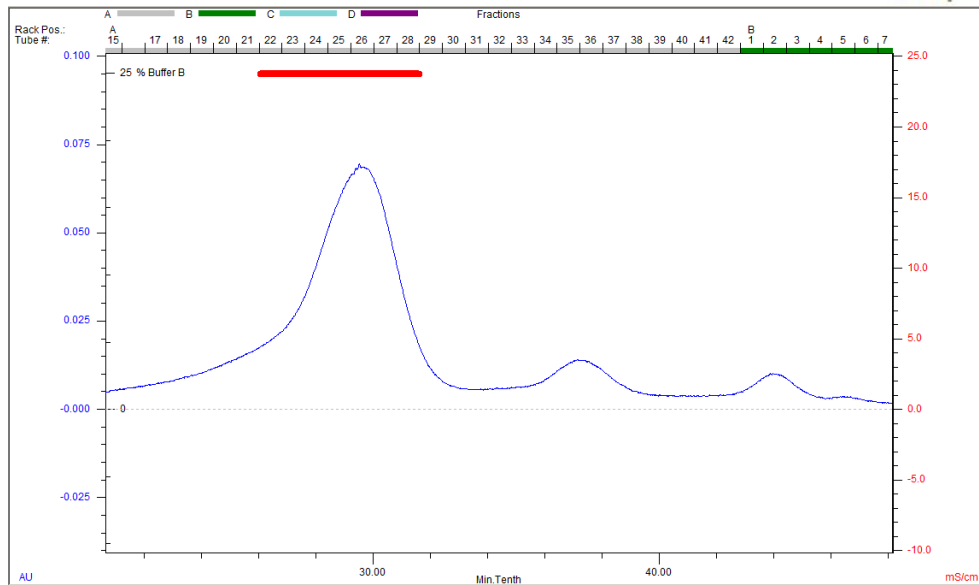
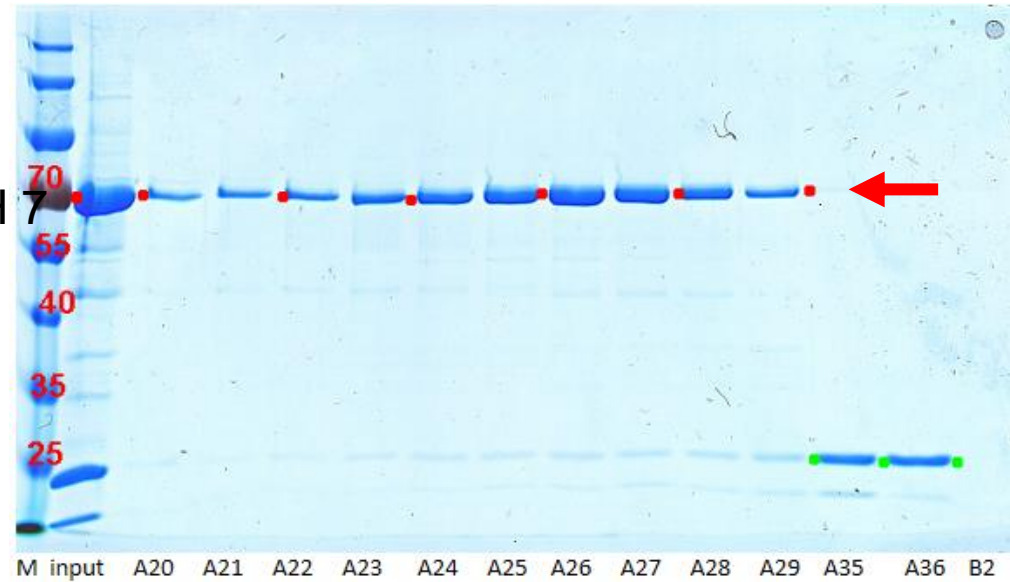
Červeně POT1,  
oranžově odštěpené  
tagy,  
zeleně proteáza



Input na kolonku  
Nenavázaná frakce  
Vybrané frakce po  
eluci  
gradientem NaCl

# hPOT1 Gelová permeační 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).

# hPOT1 shrnutí purifikace

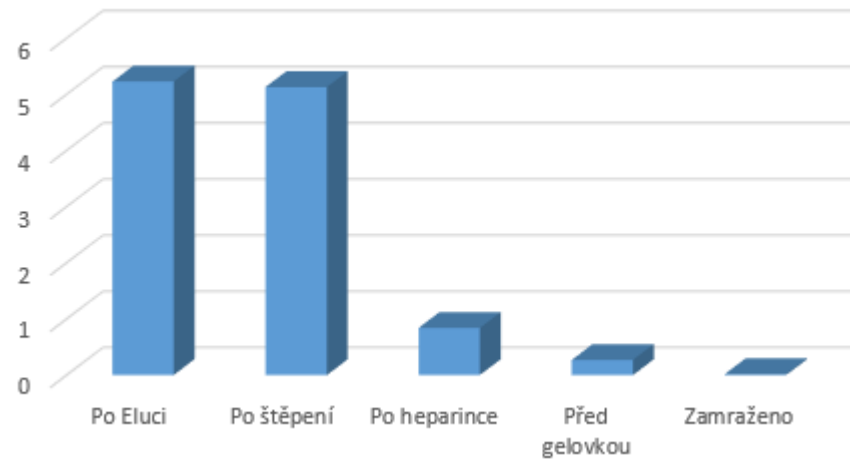
Vstup: 7,2 g peletu hmyzích buněk s hPOT1

Výstup: 0,017 mg čistého proteinu ( $V=35\mu\text{L}$ ,  $c=7,3\mu\text{M}$ )

Časová náročnost: purifikace 13 hodin kontinuální práce

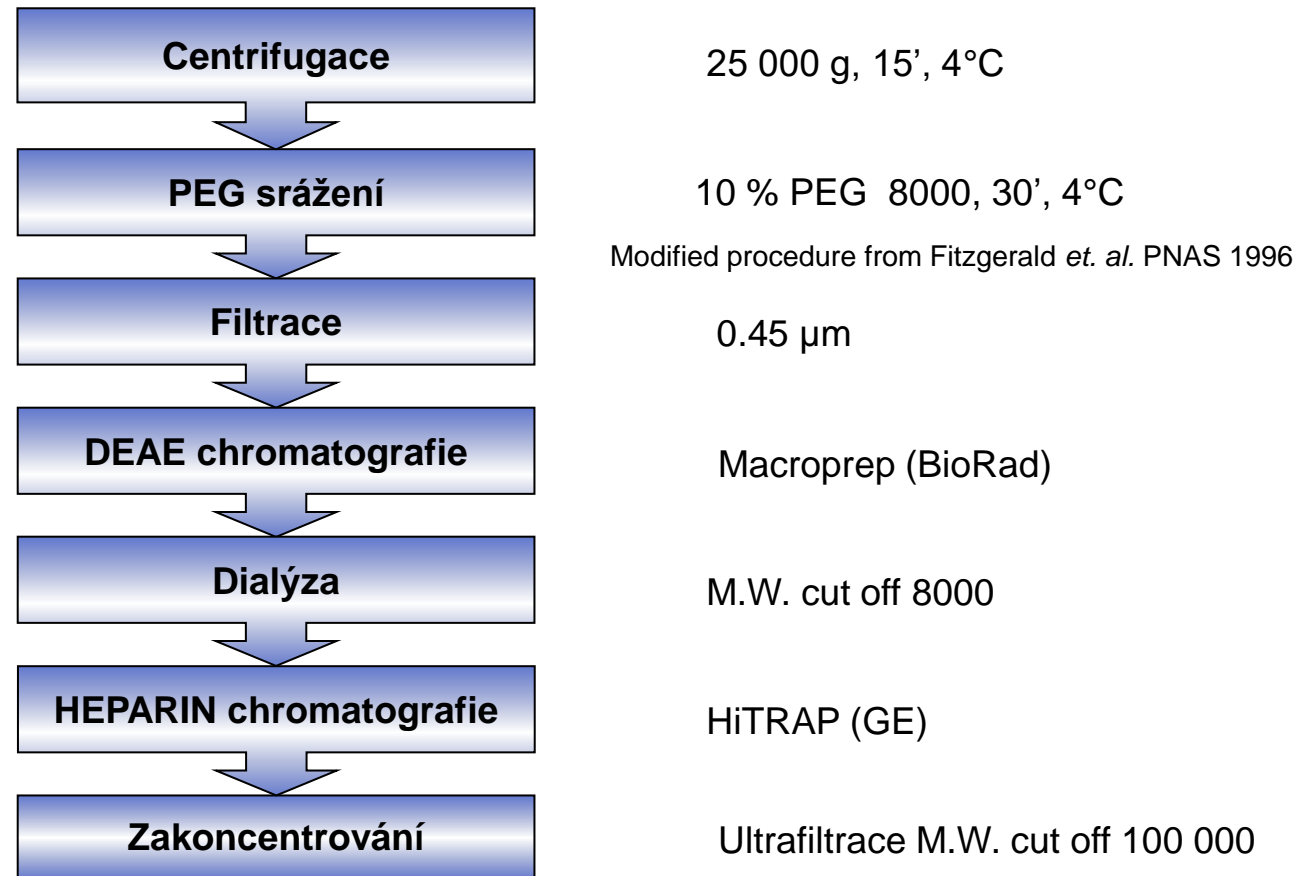
Množství proteinu v jednotlivých krocích

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



**Čím více purifikačních kroků, tím větší ztráty proteinu.**

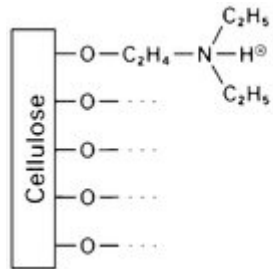
# 2. Purifikace rostlinné telomerázy





# Slabá aniontoměničová chromatografie

DEAE dietylaminoetyl



**pufir A:** 10 mM TRIS-HCl (7.5)

3 mM KCl

1 mM MgCl

1 mM EGTA

50 mM NaCl

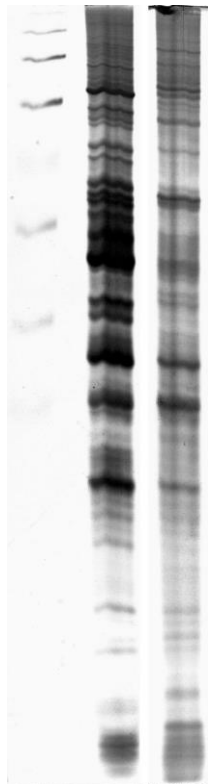
**pufir B:** pufir A + 700 mM NaCl

průtok 8 ml/min



# Profil po přečištění a další krok

M  
Hrubý extrakt  
Purifikovaný



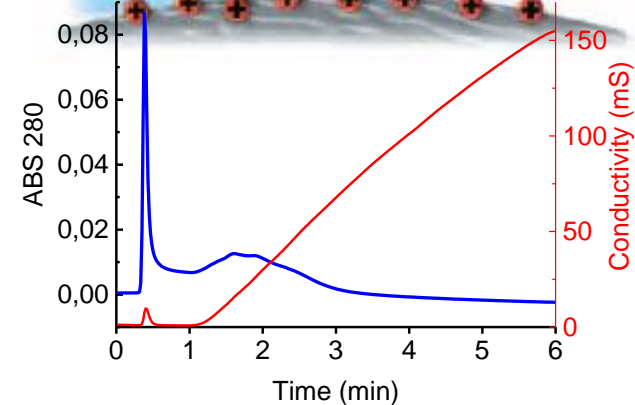
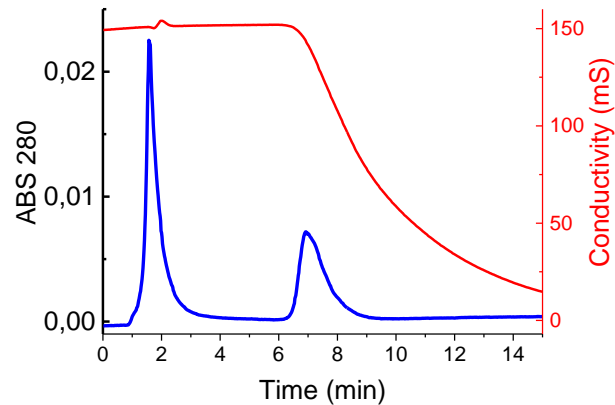
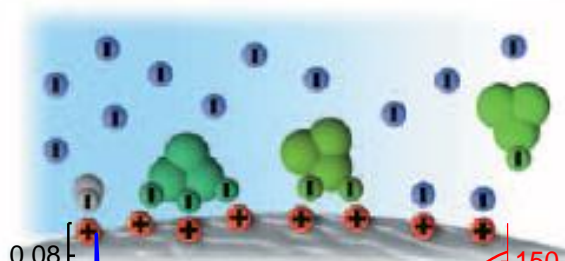
Purifikace DEAE chromatografií

přidat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

?

odsolení

Hydrofobní



# Nedostatečné množství výchozího materiálu

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

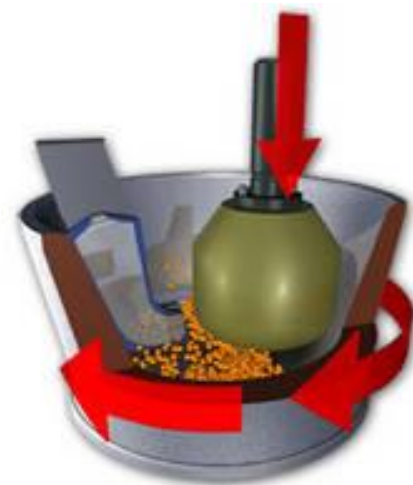
**V chromatografii na množství výchozího vzorku velmi záleží!**

# Hmoždířový mlýn *aneb* automatická třecí miska

Zpracování 4 – 100 g materiálu najednou

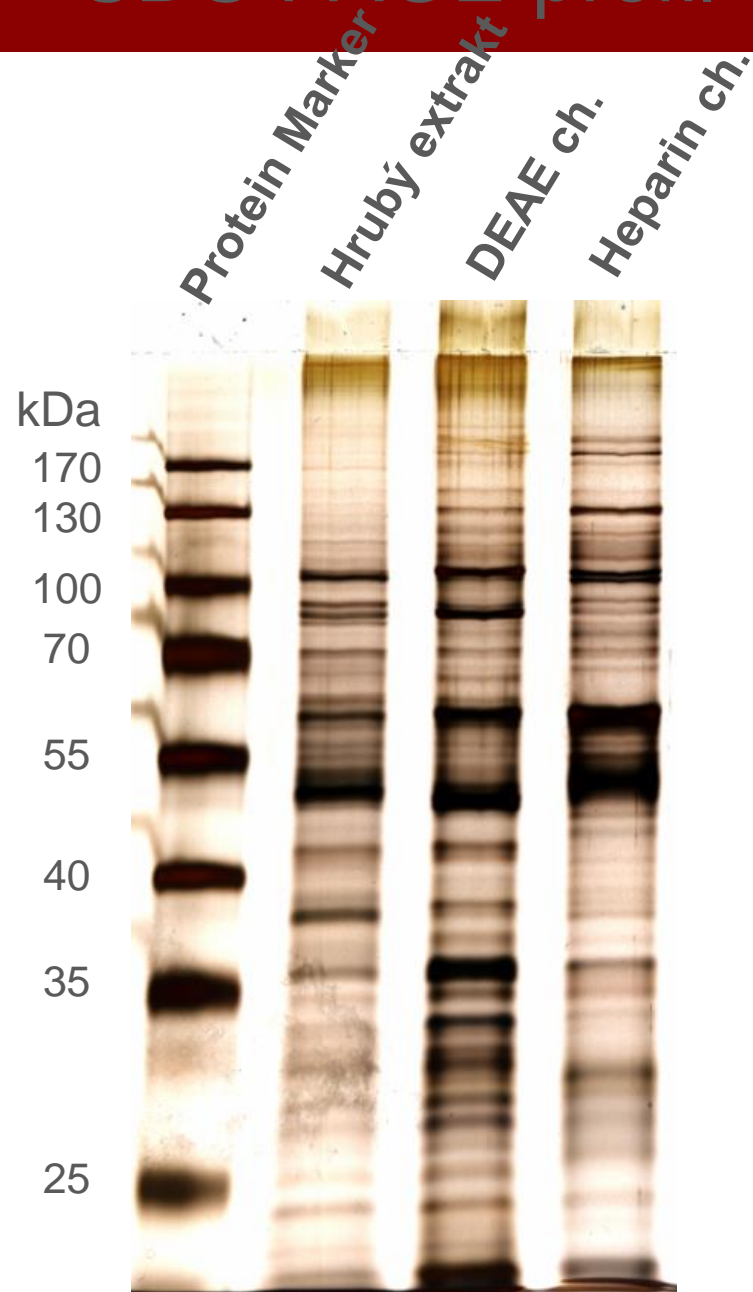
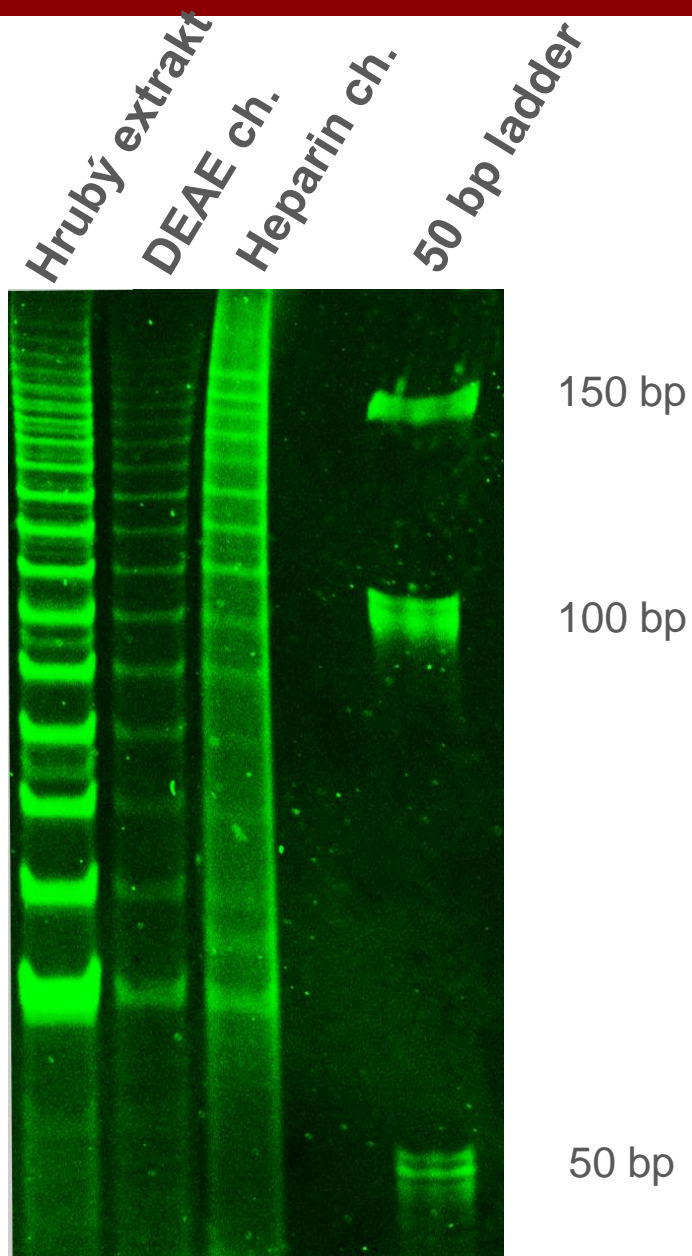
Možnost mletí v tekutém dusíku

Výsledná zrnitost ~ 10  $\mu\text{m}$



# Telomerázová aktivita

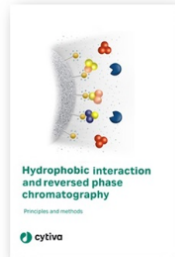
# SDS PAGE profil



# Množství materiálu před a po purifikaci

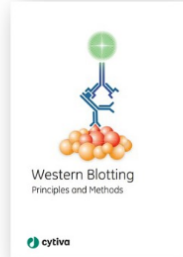
Výchozí : mikrokalusová kultura	<b>100 000 mg</b>
Hrubý extrakt po srážení PEG:	<b>150 mg</b>
Po 1. purifikačním kroku (DEAE):	<b>10 mg</b>
Po 2. purifikačním kroku (Heparin):	<b>0.5 mg</b>

# Užitečné odkazy



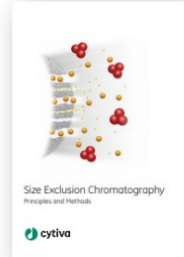
Revised in 2022:  
HIC Chromatography Principles & Methods

[Download PDF](#)



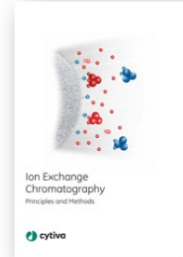
Revised in 2022:  
Western Blotting Principles & Methods

[Download PDF](#)



Size Exclusion Chromatography (SEC) Principles & Methods

[Download PDF](#)



Ion Exchange Chromatography (IEX) Principles & Methods

[Download PDF](#)

## 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

---

[ÅKTA 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](#)

[Molecular Imaging](#)

[Western Blotting Handbook](#)

## Principles & Methodology Handbooks

Find practical tips and in-depth information about common methodologies used in the lab.

<https://www.cytivalifesciences.com/en/us/support/handbooks>