

5. Chromatografia jonowymienna (*ion exchange chromatography* – IEC)

Wykorzystanie właściwości elektrycznych makromolekuł jako podstawy ich separacji zapoczątkowane zostało w końcu lat czterdziestych obecnego stulecia. Obecnie techniki jonowymiennej chromatografii cieczerwowej są najczęściej używanymi metodami chromatografii cieczerwowej w praktyce laboratoryjnej. Służą głównie do preparatywnego izolowania białek, peptydów i innych makromolekuł. W odniesieniu do izolowania białek, techniki jonowymiennej chromatografii cieczerwowej zajmują czołowe miejsce w częstości zastosowań, wyprzedzając techniki chromatografii powinowactwa oraz filtracji żelowej (1). Pomimo tak licznych zastosowań techniki IEC nie ma pełnej jasności co do mechanizmów prowadzących do separacji makromolekuł białkowych w tej metodzie, a niektóre rezultaty wydają się być wręcz trudne do wyjaśnienia. Powodem trudności interpretacyjnych jest wysoki stopień komplikacji zjawisk zachodzących we wzajemnym oddziaływaniu białek i wymiennicza jonowego. Poniżej omówione zostaną podstawowe parametry mogące decydować o jakości tego oddziaływania.

5.1. Podstawy teoretyczne chromatografii jonowymiennej

Separacja makromolekuł w chromatografii jonowymiennej polega na odwracalnej adsorpcji obdarzonych ładunkiem elektrycznym makromolekuł na złożu jonowymiennym (jonowymienniczu). Jonowymienniczem jest złożo chromatograficzne z unieruchomionymi na powierzchni polarnymi molekułami posiadającymi ładunek elektryczny określonego znaku. W zależności od tego jakie jony wiąże wymienniczo jonowy mówi się o anionowymienniczu – wiążącym aniony, lub o kationowymienniczu – wiążącym kationy. W obrębie obu grup wymienniczy spotkać można różne grupy funkcyjne odpowiedzialne za ekspozycję odpowiedniego ładunku elektrycznego. W zależności od wartości pK , charakteryzującej grupę funkcyjną, wymienniczo zaliczany jest do jonowymienniczy silnych bądź słabych. Podział ten nie ma związku z siłą wiązania makromolekuł przez wymienniczo, a mówi jedynie o tym, czy możliwości eksponowania ładunku przy zmianie pH środowiska są względnie trwałe – jonowymienniczo silny, czy też mogą ulec znacznym zmianom – jonowymienniczo słaby. Im bliższa skrajnym wartościom pH jest wartość pK tym silniejszy jest jonowymienniczo. Poniżej podane są najczęściej spotykane grupy funkcyjne, ich symbole, wartości pK oraz wzory chemiczne.

Tabela 5.1.

Zestawienie najczęściej spotykanych grup funkcyjnych jonowymieniaczy. Zestawienie danych na podstawie prac (1) oraz (2).

Nazwa jonowymieniacza	Skrót	Wartość pK	Wzór chemiczny
Anionowymieniacze (anionity)			
Dietyloaminoetyl	DEAE	9,5	$-\text{OCH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
Trimetyloaminoetyl	TMAE	-	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Dimetyloaminoetyl	DMAE	10	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_3)_2$
Trietyloamina	TEAE	9,5	$-\text{OCH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$
Czwartorzędowy aminoetyl	QAE	*	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
Czwartorzędowa amina	Q	*	$-\text{OCH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Kationowymieniacze (kationity)			
Metakrylan		6,5	$\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$
Karboxymetyl	CM	4	$-\text{OCH}_2\text{COOH}$
Ortofosforan	P	3 i 6	$-\text{OPO}_3\text{H}_2$
Sulfoxyetyl	SE	2	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$
Sulfopropyl	SP	2,5	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$
Metylosulfonian	S	2	$-\text{OCH}_2\text{SO}_3\text{H}$

/* Dla amin czwartorzędowych nie podano wartości pK ponieważ niezależnie od wartości pH otoczenia grupy te zawsze zachowują swój ładunek elektryczny.

Podstawą chromatografii jonowymiennej jest współzawodnictwo jonów i polarnych makromolekuł o możliwość bliskozasięgowego oddziaływania (wiązania się) z obdarzonymi przeciwnym ładunkiem elektrycznym grupami funkcyjnymi jonowymieniacza. Jeżeli stężenie konkurujących jonów jest stosunkowo niewielkie dochodzi do sorpcji tych makromolekuł na wymieniaczu. Po usunięciu niespecyficznie zaadsorbowanych cząsteczek można dokonać selektywnej desorpcji związanych makromolekuł poprzez wprowadzanie coraz większej ilości silnie konkurujących jonów. Selektywną elucję można również wykonać przez zmianę wartości pH, co skutkuje zmianami ładunku elektrycznego makromolekuł białkowych i w rezultacie ich desorpcję. Zmianie wartości pH może towarzyszyć zmiana gęstości ładunku elektrycznego słabego jonowymieniacza, co również ułatwia proces elucji związanych makromolekuł. Nie odbywa się to jednak tak selektywnie jak w przypadku jonowymieniacza silnego, gdzie o desorpcji decydują tylko właściwości zaadsorbowanej makromolekuły.

Oddziaływanie elektrostatyczne, zachodzące między dwoma ładunkami elektrycznymi, opisane jest prawem Coulomba. Prawo to stanowi, że siła z jaką ładunki elektryczne

oddziałują wzajemnie jest wprost proporcjonalna do iloczynu wartości ładunków, a odwrotnie proporcjonalna do kwadratu odległości między nimi. Współczynnikiem proporcjonalności jest odwrotność stałej dielektrycznej, której wartość zależy od właściwości środowiska przenoszącego oddziaływanie. Tak więc na siłę oddziaływania makromolekuły z wymienniczym jonowym wpływ mają ładunki elektryczne jakimi obdarzone są zarówno jonowymieniacz, jak i oddziałująca z nim makromolekuła. Z drugiej strony, siła wzajemnego oddziaływania modulowana jest odległością między ładunkami oraz właściwościami dielektrycznymi środowiska przenoszącego oddziaływanie. Stała dielektryczna dla środowiska wodnego jest prawie czterokrotnie wyższa od typowej wartości stałej dielektrycznej rozpuszczalników organicznych. Wynika stąd, że w środowisku wodnym oddziaływanie elektryczne między ładunkami jest znacznie (prawie czterokrotnie) słabsze niż w środowisku rozpuszczalników organicznych.

Wartość pH środowiska wymiennicza jonowego odgrywa równie ważną rolę jak jego właściwości dielektryczne, szczególnie w odniesieniu do makromolekuł o dwufunkcyjnym charakterze (aminokwasy, peptydy, białka) oraz słabych wymienniczy. W silnie kwaśnym środowisku dysocjacja grupy COOH jest zahamowana i aminokwasy tworzą kationy $H_3N^+-CHR-COOH$ (gdzie R oznacza resztę aminokwasową, determinującą dany aminokwas). W środowisku silnie zasadowym aminokwasy tworzą aniony $H_2N-CHR-COO^-$. Każdy aminokwas charakteryzuje odrębna wartość punktu izoelektrycznego (pI), to jest wartość pH w której dany aminokwas występuje jako jon obojnaczy. Oddalając się wartością pH środowiska od wartości pI cząsteczki uzyskuje się efekt stopniowego wzrostu ilości molekuł obdarzonych ładunkiem, aż do pełnej ich jonizacji w skrajnych wartościach pH. Liniowy polimer zbudowany z różnych aminokwasów - nazywany peptydem - charakteryzuje wypadkową wartość pI, zależna od składu aminokwasowego. Z kolei struktura białkowa, zbudowana z jednej lub więcej podjednostek peptydowych, posiada punkt izoelektryczny będący wypadkową właściwości tych fragmentów polipeptydowych, które wyeksponowane są na powierzchni molekuly białkowej. Zmiana wartości pH może dodatkowo indukować takie zmiany konformacyjne cząsteczki białka, przy których na jej powierzchni mogą pojawiać się inne aminokwasy, a część aminokwasów dotąd eksponowanych powierzchniowo może zostać ukryta we wnętrzu.

Dla procesu chromatografii jonowymiennej ważne jest, że na powierzchni molekuly istnieją nie zrównoważone ładunki elektryczne mogące oddziaływać z grupami funkcyjnymi jonowymieniacza. Można powiedzieć, że amfoteryczna molekula białkowa, gdy znajdzie się w środowisku o pH wyższym od wartości jej pI, obdarzona będzie wypadkowym ładunkiem

ujemnym. W pH poniżej pI wypadkowy ładunek takiej molekuly będzie dodatni. Kierując się kryterium stabilności interesującej nas cząsteczki należy wybrać wymienniczkę anionową dla cząsteczki stabilnej w $\text{pH} > \text{pI}$. W przeciwnym wypadku należy rozważyć wybór kationitu. Ze względów praktycznych przyjęto stosować solwent o wartości pH o jedną jednostkę powyżej lub poniżej wartości pI charakteryzującej interesującą nas molekulę.

Uważa się, że mechanizmy leżące u podstaw oddziaływania trwałych jonów (nukleotydy, kwasy nukleinowe, małe jony organiczne i nieorganiczne) są znacznie mniej skomplikowane, przez co łatwiejsze do przewidzenia są skutki takich oddziaływań.

W tym miejscu należy zwrócić uwagę na mechanizmy związane z oddziaływaniem dużych jonów białkowych z wymienniczką jonową. Na skutek efektu Donnana dochodzi do przesunięcia protonów w obszarze jonowymieniacza, co skutkuje zmianą rzeczywistej wartości pH w bliskim otoczeniu wymienniacza w stosunku do wartości pH solwentu. Zmiana ta może sięgać wartości jednej jednostki pH. Informacja ta jest o tyle istotna, o ile zmiana pH o tę wartość może prowadzić do denaturacji molekuly białkowej lub do indukcji dodatkowego ładunku elektrycznego powodującego silniejsze bądź słabsze wiązanie molekuly.

Dla potrzeb cieczerwowej chromatografii adsorpcyjnej wprowadzono pojęcie regionu kontaktu w molekule białkowej oraz związanego z tym regionem parametru Z. Regionem kontaktu nazwano ten obszar makromolekuly, który decyduje o jej zachowaniu się w procesie chromatografii. W odróżnieniu od innych technik adsorpcyjnych - szczególnie chromatografii powinowactwa, gdzie region kontaktu ograniczony jest zwykle od niewielkiego obszaru zajmowanego przez kilka charakterystycznych aminokwasów - w technice IEC na powierzchni cząsteczki białkowej można zdefiniować wiele różnych regionów kontaktu ze złożem. Regiony te mogą się zmieniać (powstawać lub zanikać) wraz ze zmianami warunków w jakich znajduje się molekula. W ten sposób można wyjaśnić zdolność adsorpcji większości molekuly białkowych na wymienniczkę jonową w warunkach $\text{pH} = \text{pI}$, czyli wtedy, gdy sumaryczny ładunek molekuly równy jest zeru. Co więcej, niektóre cząsteczki białka mogą wiązać się z jonowymieniaczką nawet wtedy, gdy cząsteczka wykazuje niewielki sumaryczny ładunek o znaku zgodnym z ładunkiem wymienniacza. Parametrem Z nazwano liczbę regionów kontaktu przypadających na jedną molekulę. W przypadku techniki IEC odpowiada to liczbie regionów - obdarzonych ładunkiem elektrycznym - zdolnych oddziaływać z grupami funkcyjnymi wymienniacza. Dla cząsteczek białkowych parametr Z nie przekracza wartości 5. Zaobserwowano, że w przypadku mocno zateżonych preparatów nanoszonych na kolumnę wypełnioną wymienniczką jonową, uzyskuje się wielokrotne piki zawierające ten sam rodzaj makromolekuly. Jeżeli rozcieńczoną zawartość tych pików poddać ponownej

chromatografii w tych samych warunkach, to uzyskuje się zwykle pojedynczy pik. Obserwację tę można wyjaśnić biorąc pod uwagę różnorodność regionów kontaktu badanej cząsteczki białkowej. W przypadku wysokiej koncentracji danej makromolekuły nie ma właściwych warunków dla jednakowego oddziaływania wszystkich cząsteczek tego samego rodzaju z grupami funkcyjnymi wymiennicza poprzez wszystkie regiony kontaktu. Takie same molekuły konkurują wtedy między sobą o miejsca wiążące i oddziałują z wymienniczem różną liczbą regionów kontaktu. To z kolei jest przyczyną różnic w sile wiązania molekuł tego samego rodzaju i ich różnej elucji z kolumny. W sytuacji znacznego rozcieńczenia próbki, wszystkie molekuły tego samego rodzaju mają szansę oddziaływania z wymienniczem w ten sam sposób. Pozwala to na wiązanie cząsteczek z taką samą siłą i ich elucję w pojedynczym pik.

Należy również zwrócić uwagę na fakt, że technika **IEC**, jak wszystkie techniki adsorpcyjne, pozwala na zateżenie separowanych makromolekuł, o ile praca kolumny przebiega w warunkach pozwalających na adsorpcję i późniejszą selektywną elucję zaadsorbowanego materiału.

Zalety i wady chromatografii jonowymiennej

Zalety:

- wysoka rozdzielczość metody oraz znaczna jej selektywność
- możliwość stosowania próbek o objętościach znacznie przekraczających objętość kolumny i o bardzo niskiej koncentracji separowanych makromolekuł
- możliwość zateżania rozdzielanych makromolekuł przy pracy w technice gradientowej
- duża pojemność kolumny

Wady:

- konieczność stosowania próbek w roztworze o niskiej sile jonowej i dokładnie określonej wartości pH
- rozdzielone molekuły wymywane są zwykle w eluencie o wysokiej zawartości soli, którą trzeba później usunąć innymi technikami.

5.2. Złoza stosowane w chromatografii jonowymiennej

Długi okres stosowania techniki chromatografii jonowymiennej doprowadził do zna-

cznego wzbogacenia wyboru źródeł o mocno zróżnicowanych właściwościach, pozwalających z powodzeniem stosować tę technikę do celów preparatywnych. W tabeli 5.2 zestawione są wybrane dane dotyczące aktualnie dostępnych źródeł najczęściej stosowanych w technice IEC w zakresie niskich ciśnień.

Tabela 5.2.

Wybrane źródła przeznaczone do chromatografii jonowymiennej techniką klasycznej chromatografii niskociśnieniowej. Dane zaczerpnięto z aktualnego katalogu firmy Amersham Pharmacia Biotech (2000 r.), oraz z pozycji piśmiennictwa (1) i (2).

Nazwa handlowa	Grupa funkcyjna	Rodzaj żelu i rozmiar ziarna (μm)	Górny limit rozdzielanych mas cząsteczkowych ($\times 10^3$)	Gęstość grup funkcyjnych ($\mu\text{mol/ml}$)	Pojemność kolumny (mg białka/ml)	Zakres pH/zakres pH krótkotrwały
Złoża przeznaczone do samodzielnego wypełniania kolumny						
DEAE Sephacel	DEAE, słaby anionit	Celuloza (40-160)	1000	170	160 – BSA	2-12 / 2-12
DEAE Sephadex A-25	DEAE, słaby anionit	Dekstran (20-150)	5	500	50 – Hb	4-9 / 2-10
DEAE Sephadex A-50	DEAE, słaby anionit	(20-80)	30	175	250 – Hb	4-9 / 2-10
QAE Sephadex A-25	QAE, silny anionit	(20-150)	5	500	50 – Hb	4-9 / 2-10
QAE Sephadex A-50	QAE, silny anionit	(20-80)	30	100	200 – Hb	4-9 / 2-10
CM Sephadex C-25	CM, słaby kationit	(20-150)	5	560	50 – Hb	4-9 / 2-10
CM Sephadex C-50	CM, słaby kationit	(20-80)	30	170	350 – Hb	4-9 / 2-10
SP Sephadex G-25	SP, silny kationit	(20-150)	5	300	30 – Hb	4-9 / 2-10
SP Sephadex G-50	SP, silny kationit	(20-80)	30	90	270 – Hb	4-9 / 2-10
DEAE Sepharose FF	DEAE, słaby anionit	6% agarozą (45-165)	4000	150	110 – HSA	3-12 / 1-14
Q Sepharose FF	Q, silny anionit	(45-165)	4000	200	120 – HSA	2-12 / 1-14
CM Sepharose FF	CM, słaby kationit	(45-165)	4000	110	50 – RNAza	4-13 / 3-14
SP Sepharose FF	SP, silny kationit	(45-165)	4000	220	70 – RNAza	4-13 / 3-14
Q Sepharose HP	Q, silny anionit	4% agarozą (34)	4000	180	70 – HSA	2-12 / 2-14
SP Sepharose HP	SP, silny kationit	(34)	4000	180	55 – RNAza	4-13 / 3-14
SOURCE 15Q	Q, silny anionit	polimer synt. 15	10000	*	45 – BSA	2-12 / 1-14
SOURCE 30Q	Q, silny anionit	30	10000	*	45 – BSA	2-12 / 1-14
SOURCE 15S	S, silny kationit	15	10000	*	80 – Lysozym	2-12 / 1-14
SOURCE 30S	S, silny kationit	30	10000	*	80 – Lysozym	2-12 / 1-14
cd. tabeli 5.2.						
Nazwa handlowa	Grupa funkcyjna	Rodzaj żelu i rozmiar ziarna (μm)	Górny limit rozdzielanych mas cząsteczkowych ($\times 10^3$)	Gęstość grup funkcyjnych ($\mu\text{mol/ml}$)	Pojemność kolumny (mg białka/ml)	Zakres pH/zakres pH krótkotrwały
Gotowe kolumny chromatograficzne						
		6% agarozą				

HiLoad Q Sepharose FF	Q, silny anionit	(45-165)	4000	200	120 – HSA	2-12 / 1-14
HiLoad SP Sepharose FF	SP, silny kationit	(45-165)	4000	220	70 – RNAza	4-13 / 3-14
HiLoad Q Sepharose HP	Q, silny anionit	4% agarozą (34)	4000	180	70 – HSA	2-12 / 2-14
HiLoad SP Sepharose HP	SP, silny kationit	(34)	4000	180	55 – RNAza	4-13 / 3-14
HiTrap Q	Q, silny anionit	4% agarozą (34)	4000	180	70 – HSA	2-12 / 2-14
HiTrap SP	SP, silny kationit	(34)	4000	180	55 – RNAza	4-13 / 3-14
RESOURCE Q	Q, silny anionit	polimer synt. 15	10000	*	45 – BSA	2-12 / 1-14
RESOURCE S	S, silny kationit	15	10000	*	80 – Lysozym	2-12 / 1-14

/* - w dostępnych publikacjach brak danych o gęstości grup funkcyjnych złożeń typu SOURCE.

Technika IEC może być z równym powodzeniem stosowana do prac analitycznych, gdzie wymagane są znacznie lepsze parametry rozdzielczości złożeń, co musi iść w parze z mniejszymi rozmiarami ziarna i większymi ciśnieniami wymuszającym przepływ solwentów. Zestawienie wybranych kolumn chromatograficznych przeznaczonych dla technik wysokociśnieniowej chromatografii HPLC i FPLC przedstawione jest w tabeli 5.3.

Tabela 5.3.

Wybrane gotowe kolumny IEC przeznaczone do prac przy wysokim ciśnieniu i charakteryzujące się wysoką zdolnością rozdzielczą. Dane zaczerpnięto z katalogu firmy Amersham Pharmacia Biotech (2000 r.).

Nazwa handlowa	Grupa funkcyjna	Rodzaj żelu i rozmiar ziarna (µm)	Górny limit mas cząsteczkowych (x10 ³)	Pojemność złożeń (mg białka/ml)	Zakres pH / Zakres pH krótkotrwały	Maksymalne ciśnienie (MPa)
Gotowe kolumny chromatograficzne (FPLC i HPLC)						
Mono Q Mono S	Q, silny anionit S, silny kationit	Hydrofilny polimer 10	1000	65 – HSA 75 – IgG	3-11 / 2-14 3-11 / 2-14	5 5
		10	1000			
Mini Q Mini S	Q, silny anionit S, silny kationit	Hydrofilny polimer 3	1000	2 2	3-11 / 2-14 3-11 / 2-14	18 18
		3	1000			
SOURCE 15Q SOURCE 15S	Q, silny anionit S, silny kationit	Polimer syntetyczny 15	1000	45 – BSA 80 – Lysozym	2-12 / 1-14 2-12 / 1-14	4 4
		15	1000			

Wśród kolumn chromatograficznych przeznaczonych do chromatografii jonowymiennej można znaleźć kolumny z klasycznym ziarnem żelu (Mono Q i S, SOURCE Q i S) o określonych rozmiarach ziarna i określonych jego porowatościach. Można jednak znaleźć inne rozwiązania. Kolumny typu Mini Q i S wypełnione są złożem o małych rozmiarach ziarna i braku porowatości. Złoża takie charakteryzują się bardzo małą pojemnością na wiązanie białka ale w zamian oferują

niespotykaną w innych złożach rozdzielczość chromatograficzną, co idealnie spełnia zapotrzebowania technik analitycznych.

5.3. Przykłady zastosowań techniki chromatografii jonowymiennej

Przykład 5.1.

Izolowanie receptora fibrynogenu (kompleksu glikoprotein GPIIb/IIIa) z płytek krwi (3).

Wprowadzenie.

Receptor fibrynogenu, znajdujący się w płytce krwi i na jej powierzchni, jest heterodimerem glikoprotein IIb i IIIa. Występuje w postaci skompleksowanej tylko w obecności jonów dwuwartościowych (wapń, magnez) i w takiej postaci bierze udział w procesach agregacji i adhezji płytek krwi. W nomenklaturze receptorów integrynowych określany jest jako receptor $\alpha_{IIb}\beta_{III}$. W pojedynczej płytce krwi znajduje się od 50 do 100 tys. kopii tego receptora. Ekstrakcję receptora można prowadzić poprzez lizę detergentem błon płytek krwi a następnie można go stosunkowo wydajnie izolować metodą chromatografii jonowymiennej.

Material:

1. krew ludzka lub wieprzowa pobrana na 3,8% cytrynian sodu (v/v 9/1)
2. DEAE Sephacel

Aparatura:

1. Pompa **P-50**.
2. Kolumna **XK 16/20** lub **C 16/20** ($\phi = 16$ mm, $l = 20$ cm).
3. Aplikator próbek **SA-50**.
4. Zawór **LV4**.
5. Zawór **LV3** dwie sztuki.
6. Detektor **UV1** z filtrem 280 nm.
7. Rejestrator **Rec-112**.
8. Kolektor frakcji **RediFrac**.

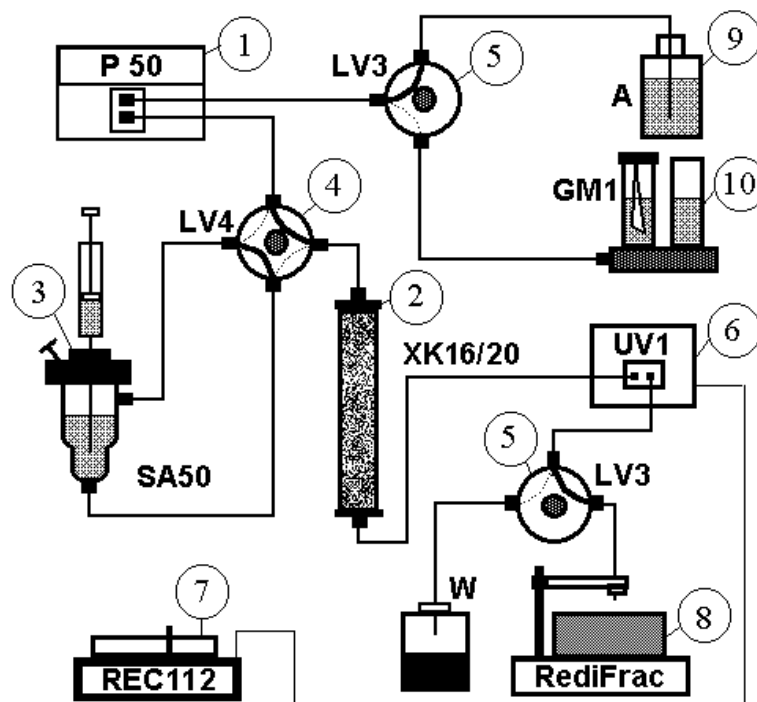
Uwaga! Alternatywnie zamiast detektora **UV1** i rejestratora **Rec-112** można zastosować spektrofotometr **Ultrospec 2000** z celką przepływową 75 μ l i modulem programu komputerowego **Swift TimeDrive**, co pozwala gromadzić dane w pamięci komputera.

9. Zbiornik buforowy.
10. Naczynie do formowania gradientu buforowego **GM1**.
11. Pompka wodna.
12. Kolba umożliwiająca odpowietrzenie płynu pod próżnią.
13. Wirówka laboratoryjna (50 ml do 15 000 x g).

Rys. 5.1.

Schemat manualnego systemu chromatografii niskociśnieniowej umożliwiającego pracę w technice gradientowej dzięki zastosowaniu naczynia do przygotowania gradientu **GM1** oraz dodatkowego zaworu **LV3**.

W celu zapewnienia szybszych przepływów solwentów w systemie zastosowano pompę **P-50** w miejsce pompy **P-1**. Pozostałe objaśnienia jak w opisie do rysunku 4.1.



Odczynniki:

1. Bufor Tyroda – 20 mM bufor fosforanowy zawierający: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM glukozy, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,4.
2. Bufor A – 10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, pH 7,4.
3. 20% roztwór glicerolu w buforze A
4. Bufor B – 20 mM Tris, 250 mM NaCl, 0,1% Chaps, 1 mM CaCl₂, 1 mM PMSF, pH 7,4.
5. Bufor C – 20 mM Tris, 4% Chaps, 1 mM CaCl₂, 1 mM PMSF, pH 7,4.
6. Bufor D – 50 mM Tris, 0,5% Chaps, 0,1 mM CaCl₂, 1 mM PMSF, pH 7,0.
7. Bufor E - 50 mM Tris, 0,5% Chaps, 0,1 mM CaCl₂, 1 mM PMSF, 1 M NaCl, pH 7,0.
8. 20% etanol.

Przygotowanie kolumny chromatograficznej:

a) przygotowanie złoża.

- Pobrać 15 ml złoża zawiesić je w 30 ml buforu D.
- Poczekać na pełną sedymentację złoża (około 30 min.).
- Przy pomocy pompki wodnej zebrać supernatant i ponownie zawiesić złoże w 30 ml buforu D. Czynności te powtórzyć dwukrotnie
- Odpowietrzyć zawiesinę żelu pod próżnią.

b) wypełnienie kolumny.

- Kolumnę umocować pionowo. Od dołu napełnić ją, przy pomocy pompy albo strzykawki, do wysokości około 3 cm buforem D następnie zamknąć wylot kolumny, uniemożliwiając wypływ buforu. Czynność ta ma na celu usunięcie powietrza z dolnego wężyka oraz sit zamykających kolumnę od dołu.
- Na górnym końcu kolumny wskazane jest zamocować naczynie do wypełniania kolumny (**RK16/26**), pozwalające wprowadzić złoże do kolumny w sposób

jednostajny nawet wtedy, gdy chcemy kolumnę wypełnić w całości i pracować bez adaptorów.

- Odpowietrzoną zawiesinę złoża (75% złoża w buforze) nalać powoli, ale w sposób ciągły do kolumny. Podczas tej czynności pomocne może być zastosowanie cienkiej szklanej bagietki o długości większej niż długość kolumny. Bagietka ta pozwala usunąć przypadkowe pęcherze powietrza w układającym się żelu.
- Po napełnieniu kolumny należy ją zamknąć od góry (adaptorem lub przez naczynie do wypełniania kolumny) uważając aby nie wprowadzić do środka powietrza. Wężyki oraz adaptor powinny być wcześniej wypełnione buforem.
- Otworzyć wylot kolumny i przy pomocy pompy wymusić nominalny przepływ buforu D z naczynia A (1 ml w czasie 3 minut, 10 cm/godz.).
- Pozwolić złożu na sedymentację (około 3 godz.) i dostosować adaptor do wysokości złoża.
- Zamknąć wylot kolumny i pozostawić ją w temperaturze pokojowej do czasu przygotowania materiału do chromatografii.

Przebieg doświadczenia:

a) Otrzymywanie płytek krwi.

- Płytki krwi należy wyizolować z pełnej krwi stosując bufor Tyroda oraz postępowanie opisane w szczegółach w przykładzie 4.4.

b) Przygotowanie ekstraktu białek płytkowych.

- Przygotować 15 ml próbki do wirowania, wypełnić je liniowym gradientem glicerolu (0-40%, 8 ml) przygotowanym dzięki naczyniu do formowania gradientu **GM1**.
- Zawiesinę płytek krwi (3×10^8 /ml) zmieszać w stosunku 1:1 z buforem A i delikatnie nawarstwić 2 ml porcje na powierzchnię gradientu glicerolu.
- Wirować 30 minut w temperaturze 4°C przy 2000 x g.
- Usunąć supernatant, a osad zawiesić w 1 ml porcjach w buforze B i inkubować w ciągu jednej godziny w łaźni lodowej (0°C) delikatnie mieszając.
- Próbkę (1 ml) wirować w czasie 1 godziny w temperaturze 0°C stosując przyspieszenie 1000 x g.
- Otrzymany osad z każdej próbki zawiesić w 0.5 ml buforu C (zawierającego 4% detergentu Chaps) i ponownie inkubować w ciągu jednej godziny w łaźni lodowej.
- Inkubację zakończyć wirowaniem próbek w czasie 30 minut w temperaturze 0°C stosując 15000 x g.
- Otrzymany supernatant rozcieńczyć trzykrotnie buforem D i w takiej postaci stosować jako materiał wyjściowy w chromatografii jonowymiennej.

c) Chromatografia IEC.

- W detektorze **UV1** zainstalować filtr 280 nm, rodzaj pracy ustawić na absorbancję, a zakres na 1.0. Czulość rejestratora ustawić na 10 mV. Pełną stabilność pracy lampy UV osiąga dopiero po około godzinie pracy.
- Przez przygotowaną wcześniej kolumnę przepuścić bufor D (z naczynia A przy odpowiedniej pozycji zaworu buforowego **LV3**) przy ustalonym przepływie 10 cm/godz., do osiągnięcia stabilnej linii bazowej rysowanej przez rejestrator **REC-112** (ostatni etap przygotowania kolumny).
- Do naczyń **GM1** nalać po 25 ml buforów D i E (bufor D do naczynia zawierającego mieszało).
- Zawór **LV4** ustawić w pozycji omijającej naczynie **SA-50**.
- Przy pomocy strzykawki nanieść do naczynia **SA-50** 10 mililitrów przygotowanego materiału.

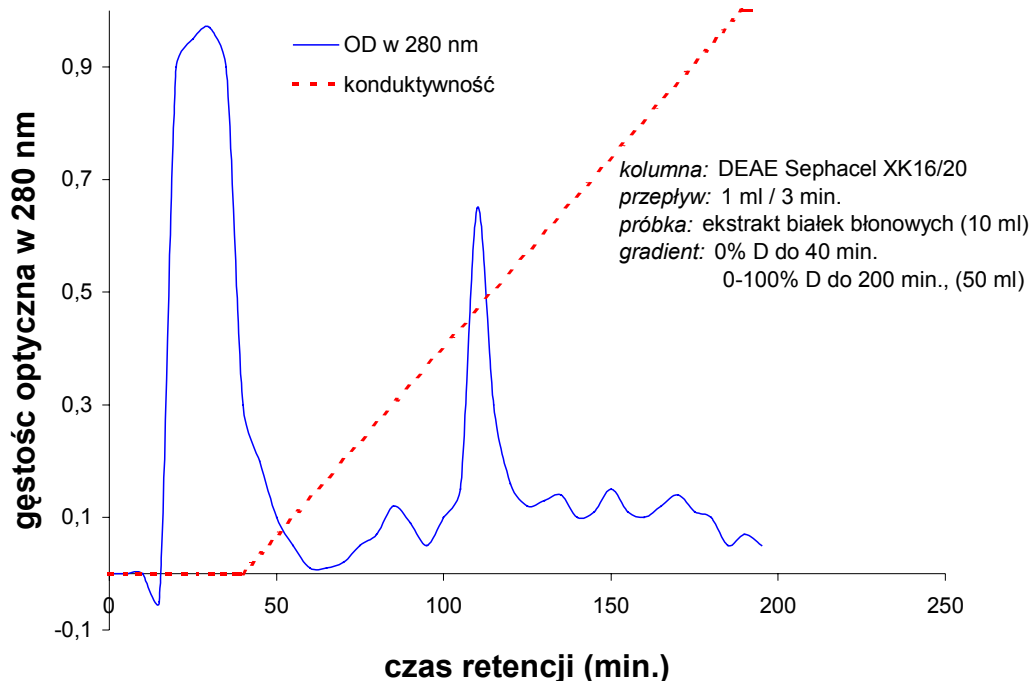
- Zawór **LV3** kolektora frakcji ustawić w pozycji omijającej kolektor.
- Do koszyczka kolektora włożyć 60 probówek mieszczących po 4 ml. Wybrać rodzaj pracy „time” i czas zbierania kropli 10 min.
- Zawór **LV4** przestawić w pozycję przepływu solwentu przez naczynie **SA-50** i kolumnę, co jest równoznaczne z naniesieniem próbki na kolumnę.
- Obserwować chromatogram rysowany przez rejestrator. Po wypłynięciu z kolumny niezwiązanego z nią materiału (po około 30-40 minutach) włączyć mieszanie w naczyniu **GM1** i przełączyć buforowy zawór **LV3** w ten sposób, aby pompa **P-50** zaczęła tłoczyć płyn z naczynia **GM1** zamiast z naczynia A.
- Włączyć „start” kolektora frakcji i przekręcić zawór **LV3** kolektora frakcji w pozycję kierującą przepływ do kolektora. Zbierać 2 ml frakcje.

Oczekiwane wyniki:

Tylko białka posiadające wypadkowy ładunek ujemny (bądź posiadające ładunek ujemny w którymś z regionów kontaktu) mogą wiązać się z anionitem. Pozostałe białka - w warunkach eksperymentu przeważająca większość białek płytkowych - przepłyną przez kolumnę bez wiązania się z grupami funkcyjnymi. Z tego też powodu w czasie do 40 minut od momentu naniesienia materiału na kolumnę należy oczekiwać znacznego wypływu z kolumny tych białek, które w pH 7,0 mają ładunek dodatni bądź pozbawione są ładunku. Białka związane z anionitem można usunąć zwiększając stężenie jonów konkurujących o miejsca wiążące. Jonami tymi mogą być jony chlorkowe, podawane w narastającej ilości wraz ze wzrostem udziału buforu E w składzie eluentu. W trakcie elucji pojawiają się różne piki, ale największy pik powinien być wymyty z kolumny przy 45-50% buforu E (0,45 – 0,5 M NaCl). Pik ten zawiera głównie kompleks glikoprotein GPIIb/IIIa, o czym można się przekonać analizując zebrane frakcje elektroforetycznie lub poddając je rechromatografii przez filtrację żelową. W przypadku analizy elektroforetycznej należy oczekiwać w tym pikcie dominujących białek o masach około 90 i 110 k. Podczas filtracji żelowej kompleks GPIIb/IIIa powinien migrować jako dimer o masie około 200 k.

Regeneracja i przechowywanie złoża:

Po zakończeniu separacji przepuścić przez kolumnę około 45 ml buforu E, a następnie 60 ml buforu D, co czyni kolumnę gotową do ponownego użycia. W razie potrzeby dłuższego przechowania kolumny należy wymienić w niej bufor na wodę (60 ml wody) i przepuścić przez nią około 45 ml 20% etanolu, zamknąć ją szczelnie i przechowywać w temperaturze pokojowej, chroniąc od światła. Jeżeli jednak złoże nie będzie użytkowane w dającej się przewidzieć perspektywie czasu, dobrze jest je wypakować z kolumny i przechowywać w lodówce, zakonserwowane 20% etanolem.



Rys. 5.2.

Przykładowy chromatogram otrzymany w trakcie izolowania kompleksu GPIIb/IIIa z ekstraktu białek płytkowych z zastosowaniem techniki IEC na złożu **DEAE-Sephacel**. Linia przerywaną zaznaczono teoretyczny kształt wymiany buforowej na kolumnie w trakcie formowania gradientu. Receptor fibrynogenu eluowany był w pikie o czasie retencji około 120 min.

Uwagi:

1. Objętość nanoszonej próbki w technice gradientowej, w odróżnieniu od izokratycznej, może być bardzo duża, wielokrotnie większa od objętości kolumny. Krytycznym parametrem jest w tym przypadku nie objętość próbki nanoszonej na kolumnę, ale ilość naniesionego białka. Ilość ta nie powinna przekraczać pojemności kolumny, która dla 15 ml złożu **DEAE Sephacel** wynosi około 2,4 g białka.
2. Stężenie białka w nanoszonej próbce nie powinno przekraczać kilku mg/ml. Przy wyższych stężeniach selektywność rozdzielania może być znacznie gorsza. Dlatego bezpieczniej jest rozcieńczyć materiał wyjściowy przed naniesieniem go na kolumnę.
3. Zastosowanie spektrofotometru **Ultrospec 2000** z oprogramowaniem, zamiast detektora **UV1** i rejestratora **REC-112**, znacznie upraszcza procedurę rejestracji wyników oraz ich interpretacji. Co więcej, można wtedy rejestrować gęstość optyczną wypływającego z kolumny materiału jednocześnie w wielu długościach fali światła.
4. Separację makromolekuł na kolumnie wypełnionej złożem **DEAE Sephacel** można przeprowadzić bez użycia pompy, wykorzystując w tym celu grawitacyjny przepływ solwentu przez kolumnę. W takiej sytuacji prędkość przepływu można regulować wysokością słupa cieczy – solwentu. Można również zrezygnować z ciągłej detekcji gęstości optycznej cieczy wypływającej z kolumny na rzecz pomiaru wartości OD w poszczególnych frakcjach. Zamiast przyrządu do formowania ciągłego gradientu można podawać na kolumnę porcje buforów o

skokowo zmieniającym się składzie. Ten sposób postępowania umożliwia prowadzenie separacji z zastosowaniem złożów jonowymiennych w laboratoriach nie posiadających odpowiedniego wyposażenia. Jedynym elementem koniecznym do pracy w technice jonowymiennej jest kolumna wypełniona złożem. Pozostałe elementy systemu można w dość dowolny sposób wymieniać i zastępować innymi. Taki sposób postępowania jest często prezentowany w rozdziale poświęconym chromatografii powinowactwa.

Przykład 5.2.

Izolowanie monoklonalnych immunoglobulin G z mysiego płynu wysiękowego (2).

Wprowadzenie:

Jedną z powszechnie stosowanych metod otrzymywania mysich przeciwciał monoklonalnych jest wszczepienie myszkom komórek *hybrydoma*, co prowadzi do powstania guza i produkcji płynu wysiękowego bogatego w cząsteczki IgG. Alternatywną metodą jest hodowla komórek *hybrydoma* w warunkach *in vitro*. W takiej hodowli monoklonalne IgG uwalniane są przez wybraną linię komórkową do medium hodowlanego. Zarówno płyn wysiękowy, jak i supernatant z hodowli komórkowej, są bogatymi źródłami potrzebnych przeciwciał monoklonalnych i mogą posłużyć do ich izolowania. Jedną z uznanych metod oczyszczania przeciwciał, z obu materiałów wyjściowych, jest technika chromatografii jonowymiennej.

Material:

1. Mysi płyn wysiękowy (ascites)
2. **Q Sepharose HP**

Aparatura:

Jak wyspecyfikowano w przykładzie 5.1.

Odczynniki:

1. Bufor A – 50 mM Tris buforowany kwasem octowym, pH 8,0.
2. Bufor B – 0,5 M NaCl w buforze A.
3. Bufor C – 1,0 M NaCl w buforze A

Przygotowanie kolumny chromatograficznej:

- Dokładnie odpowietrzyć bufor pod próżnią.
- Pobrać 15 ml złoża **Q Sepharose HP** i zawiesić je w 30 ml buforu A. Dokładnie zamieszać zawiesinę i pozwolić jej swobodnie osiąść.
- Usunąć supernatant, ponownie zawiesić żel w 30 ml buforu A.
- Wypełnić kolumnę tak jak to opisano w przykładzie 5.1., z tą różnicą, że jako nominalny przepływ przyjąć 2 ml/min (60 cm/godz.), a czas sedymentacji skrócić do 30 minut.

Przebieg doświadczenia:

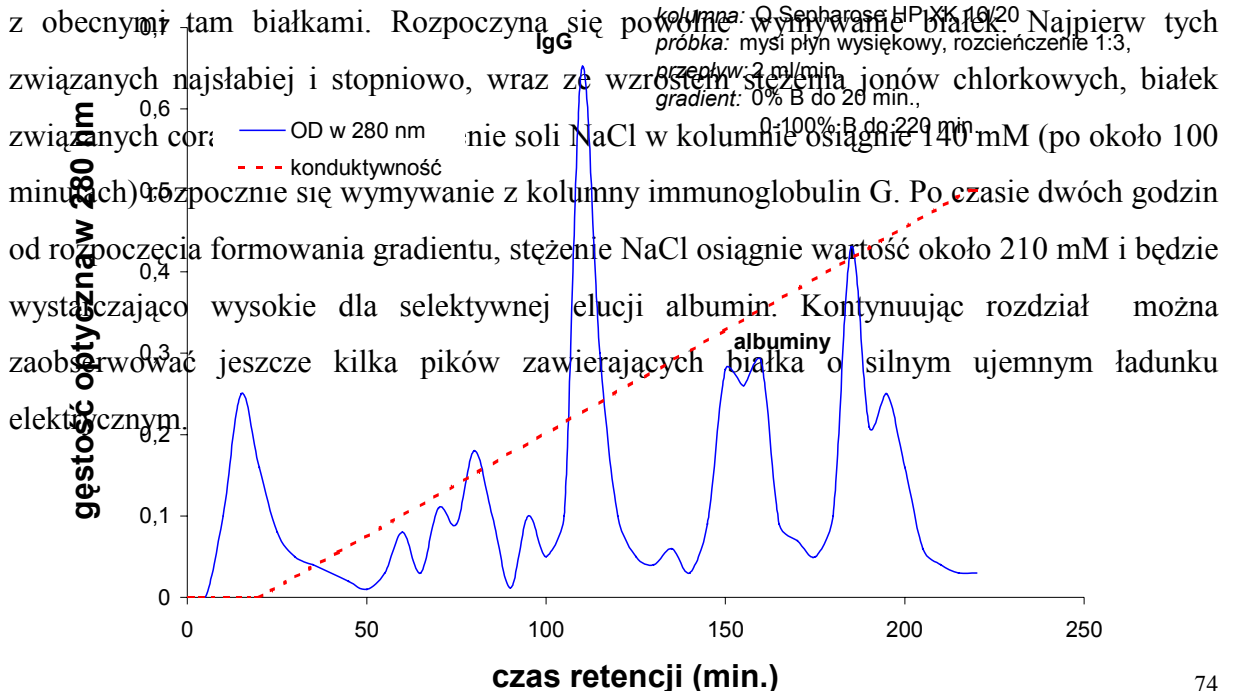
- Płyn wysiękowy (5 ml) rozcieńczyć trzykrotnie buforem A i odwirować (10 min, 2000 x g, RT) a następnie zebrać supernatant i pobrać go do 20 ml strzykawki.
- W detektorze **UV1** zainstalować filtr 280 nm. Włączyć detektor do sieci i wybrać rodzaj pracy AU, a zakres na 1,0. Czulość rejestratora ustawić na 10 mV.
- Zawór **LV4** (rys. 5.1.) ustawić w pozycji omijającej naczynie aplikacyjne **SA-50**.
- Zawór buforowy **LV3** ustawić w pozycji pozwalającej na przepływ buforu A z naczynia A.
- Zawór **LV3** kolektora frakcji ustawić w pozycji omijającej kolektor.
- Przy pomocy pompy **P-50** wymusić przepływ buforu A przez kolumnę, z prędkością objętościową 2 ml/min.
- W trakcie oczekiwania na ustalenie się linii bazowej nanieść przygotowany wcześniej materiał wyjściowy do naczynia **SA-50**.
- W koszyczku kolektora frakcji umieścić 150 probówek o pojemności 4 ml każda.
- Kolektor frakcji zaprogramować na zbieranie 2-minutowych frakcji.
- Do naczynia formującego gradient (**GM1**) nalać po 200 ml buforów A i B (bufor A do pojemnika z mieszałem).
- Po ustaleniu się linii bazowej przekręcić zawór **LV4** w pozycję pozwalającą na przepływ solwentu przez naczynie **SA-50** i przez kolumnę (obrót o kąt 90°).
- Przepuszczać przez kolumnę bufor A w czasie 20 min.
- Uruchomić naczynie formujące gradient i przy pomocy zaworów **LV3** połączyć pompę **P-50** z naczyniem **GM1** oraz kolektor frakcji z wyjściem detektora **UV1**.
- Uruchomić kolektor frakcji.
- Kontynuować rozdział aż do wyczerpania się buforów w naczyniu formującym gradient (około 200 min), po czym zakończyć rozdział.

Oczekiwane wyniki:

W czasie pierwszych 20 minut trwa nanoszenie separowanego materiału na kolumnę oraz wmywanie z kolumny białek, które nie związały się z wymiennicem jonowym. Po uruchomieniu formowania gradientu warunki na kolumnie zaczynają się stopniowo zmieniać.

Wzrasta stężenie jonów chlorkowych, konkurujących o miejsca wiążące na anionicie z obecnymi tam białkami. Rozpoczyna się powolne wmywanie białek. Najpierw tych związanych najslabiej i stopniowo, wraz ze wzrostem stężenia jonów chlorkowych, białek związanych coraz silniej.

W czasie formowania gradientu, stężenie NaCl osiągnie wartość około 140 mM (po około 100 minutach) i rozpocznie się wmywanie z kolumny immunoglobulin G. Po czasie dwóch godzin od rozpoczęcia formowania gradientu, stężenie NaCl osiągnie wartość około 210 mM i będzie wystarczająco wysokie dla selektywnej elucji albumin. Kontynuując rozdział można zaobserwować jeszcze kilka pików zawierających białka o silnym ujemnym ładunku elektrycznym.



Rys. 5.3.

Przykład izolowania przeciwciała monoklonalnego z mysiego płynu wysiękowego. Linia przerywaną zaznaczono oczekiwaną wymianę buforową dokonywaną w kolumnie w wyniku formowania gradientu.

Regeneracja i przechowywanie złożeń:

Przepuścić przez kolumnę 45 ml buforu C a następnie 150 ml buforu A. Kolumna jest wtedy gotowa do ponownego użycia. W razie dłuższego przechowania kolumny należy po regeneracji przemyć ją 150 ml wody, a następnie zrównoważyć 20% etanolem i trzymać w temperaturze pokojowej chroniąc od nadmiernego oświetlenia. Jeżeli złożenie ma być przechowywane przez dłuższy czas, wygodniej jest wypakować je z kolumny i przechowywać w lodówce - zakonserwowane 20% etanolem i zabezpieczone przed wysychaniem.

Uwagi:

1. W trakcie rutynowego izolowania białek nie ma potrzeby zbierania wszystkich frakcji wypływających z kolumny. Wystarczy w pierwszym rozdziale oznaczyć dokładnie objętość elucji interesującego nas białka, a następnie zbierać tylko frakcje, które zawierają to białko.
2. Zastosowanie mają tutaj wszystkie uwagi zawarte w przykładzie 5.1.
3. Poprawioną selektywność rozdziału można uzyskać stosując elucję związanych białek w gradiencie pH. Należy jednak zachować w takim wypadku szczególną ostrożność. Wiele białek wykazuje minimalną rozpuszczalność w pH bliskim wartości pI. Zbliżenie się wartości pH do wartości pI zawsze grozi wytrącaniem białka z roztworu i uszkodzeniem kolumny. Rozpuszczalność separowanych białek w pH elucji należy zawsze sprawdzić eksperymentalnie podczas planowania warunków rozdziału.
4. Elucja białek w warunkach gradientu pH pozwala czasami odzyskać silnie związane z wymienniczymi molekułami. Stosowanie takiego postępowania zaleca się wtedy, gdy w wymytych frakcjach nie można zidentyfikować interesującego nas białka, pomimo pewności, że w naniesionej próbce białko to było obecne.

Przykład 5.3.

Separacja peptydów powstałych w wyniku hydrolizy łańcucha α -1 kolagenu bromocyanem (2).

Wprowadzenie:

Do badania poszczególnych regionów białek potrzeba często fragmentów ich

degradacji uzyskanych dzięki enzymatycznemu bądź nieenzymatycznemu trawieniu tych białek. Aby uzyskać homogenne peptydy, konieczne do dalszych badań, niezbędnym jest ich wyizolowanie z mieszaniny wszystkich peptydów. Najczęściej stosowaną w tej sytuacji metodą jest technika odwróconej fazy (RPC). Technika chromatografii jonowymiennej stanowi jednak dobre uzupełnienie techniki RPC ze względu na różne właściwości makromolekuł decydujące o separacji w obu technikach.

Material:

1. Mieszanina peptydów powstałych w wyniku nieenzymatycznego trawienia łańcucha α -1 kolagenu typu 1 bromocyjanem.
2. **SP Sepharose HP**

Aparatura:

Jak wyspecyfikowano w przykładzie 5.1.

Odczynniki:

1. Bufor A – 20 mM HCOOH zawierający 2 M mocznika, pH 3,8.
2. Bufor B – bufor A zawierający dodatkowo 1 M NaCl.

Przygotowanie kolumny chromatograficznej:

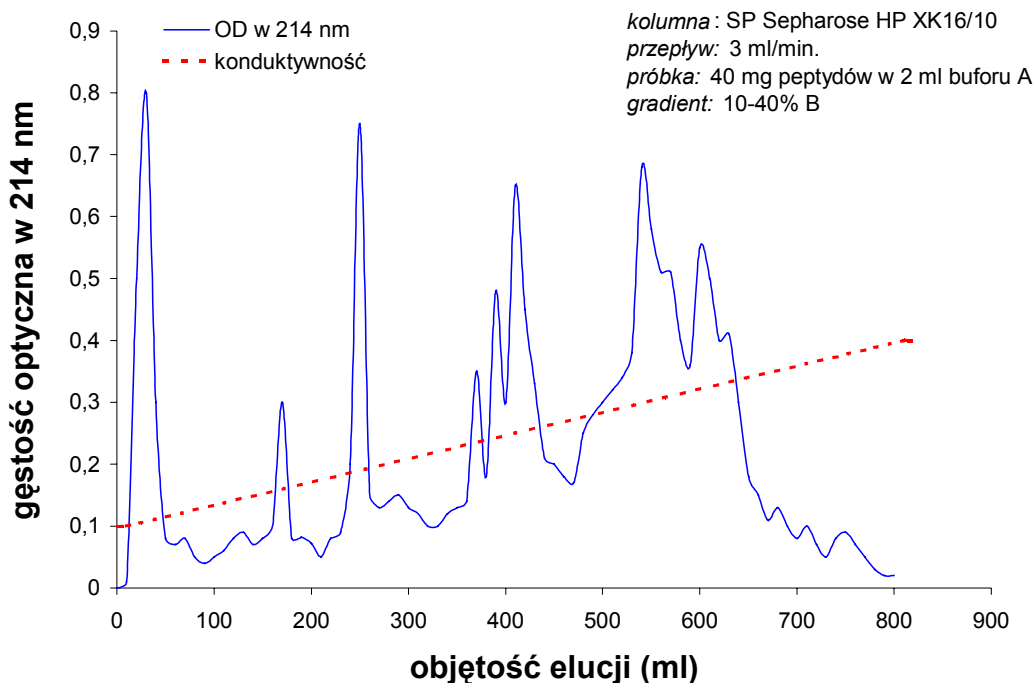
- Wszystkie czynności związane z przygotowaniem kolumny jak w przykładzie 5.2. z wcześniejszym odniesieniem się do przykładu 5.1.

Przebieg doświadczenia:

- Przygotować kolumnę i manualny zestaw chromatograficzny jak w przykładzie 5.2.
- Do naczynia aplikującego próbki **SA-50** nanieść około 40 mg mieszaniny peptydów rozpuszczonych w 2 ml buforu A.
- Dalsze czynności wykonywać dokładnie tak, jak w przykładzie 5.2.

Oczekiwane wyniki:

W przedziale czasu między naniesieniem próbki na kolumnę i uruchomieniem formowania



gradientu z kolumny wypływają tylko te peptydy, które obdarzone są ujemnym ładunkiem elektrycznym. Pozostałe peptydy pozostają na kolumnie silniej lub słabiej związane z kationitem. Wraz z narastaniem stężenia jonów sodowych, konkurujących ze związanymi peptydami o miejsce na wymieniaku, warunki wiązania ulegają zmianie i najslabiej związane peptydy wymywane są z kolumny. Proces ten zachodzi analogicznie jak w przypadku anionitu z przykładu 5.2. Różnica dotyczy tylko rodzaju jonów konkurujących o miejsca wiążące na wymieniaku jonowym. Poszczególne grupy peptydów wymywane są z kolumny przez cały czas trwania rozdziału i stanowią bardzo dobry materiał wyjściowy do dalszej rechromatografii w technice RPC.

Rys. 5.4.

Separacja peptydów pochodzących z nieenzymatycznego trawienia kolagenu bromocyjanem. Linia przerywana zaznacza oczekiwaną wymianę buforową w kolumnie zachodzącą podczas formowania gradientu.

Regeneracja i przechowywanie złoża:

Przepuścić przez kolumnę 45 ml buforu B i dalej postępować jak w przykładzie 5.2.

Uwagi:

Zastosowanie mają wszystkie uwagi z przykładów 5.1 i 5.2.

Przykład 5.4.

Fracjonowanie białek osocza z zastosowaniem kolumny HiTrapQ (4).

Wprowadzenie.

Osocze krwi ludzkiej jest mieszaniną wielu różnych białek, wykazujących odmienne właściwości funkcjonalne i biochemiczne. Pomimo bardzo szybkiego i owocnego postępu w produkcji białek rekombinowanych, osocze ciągle pozostaje niezastąpionym źródłem wielu czynników stosowanych w terapii. Chromatografia jonowymienna jest zwykle stosowana jako pierwszy krok w technologii frakcjonowania i izolowania białek osoczowych. Celem poniższego przykładu jest wstępne rozdzielenie białek osoczowych z zastosowaniem kolumny **HiTrap Q**.

Material:

1. Ubogopłytkowe osocze ludzkie lub wieprzowe.
2. Kolumna **HiTrap Q**

Aparatura:

1. System chromatografii niskociśnieniowej **GradiFrac**.
2. Spektrofotometr **Ultrospec 2000** z programem **Swift TimeDrive**.

3. Kuweta przepływowa 70 µl.
4. Wirówka laboratoryjna (4x15 ml, 3000xg)

Odczynniki:

1. Bufor A – 10 mM Tris, pH 7,4
2. Bufor B – 10 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7,4
3. 20% etanol.

Przygotowanie systemu:

- W systemie **GradiFrac** w miejsce detektora **UV1** i rejestratora **Rec-112** zainstalować spektrofotometr **Ultrospec 2000** wyposażony w kuwetę przepływową i podłączony do komputera z zainstalowanym programem **Swift TimeDrive**.
- Końcówki wężyków oznaczone literami A i B zanurzyć odpowiednio w buforach A i B.
- Jeżeli w systemie zamontowana była jakaś kolumna to należy ją usunąć, a w jej miejsce podłączyć zwykły wężyk. Wypełnić buforami wężyki przy przepływie pompy 5 ml/min i gradiencie 50% B. Kontynuować przemywanie w czasie 2 min.
- Pozwolić na przepływ buforu A (0% B) w czasie następnych 2 min.
- Podłączyć kolumnę **HiTrap Q** zwracając uwagę, aby wężyk dołączany do wejścia kolumny był wypełniony solwentem.
- Zrównoważyć kolumnę przepuszczając przez nią bufor A (1 ml/min., 4 min).
- Przygotować program chromatograficzny wg poniższego schematu:

METHOD BASE:	VOLUME (ml)		
FRACTIONATION BY:	VOLUME (ml)		
VOLUME	0.0 ml;	CONC %B	0.0;
		FLOW	1 ml/min;
		FRACTION	0.0 ml
VOLUME	7.0 ml;	CONC %B	0.0;
		FLOW	1 ml/min;
		FRACTION	0.0 ml
VOLUME	25.0 ml;	CONC %B	50.0;
		FLOW	1 ml/min;
		FRACTION	2.0 ml
VOLUME	28.0 ml;	CONC %B	100.0;
		FLOW	1 ml/min;
		FRACTION	2.0 ml
VOLUME	30.0 ml;	CONC %B	100.0;
		FLOW	1 ml/min;
		FRACTION	2.0 ml
VOLUME	31.0 ml;	CONC %B	0.0;
		FLOW	1 ml/min;
		FRACTION	2.0 ml
VOLUME	50.0 ml;	CONC %B	0.0;
		FLOW	1 ml/min;
		FRACTION	2.0 ml
		END	
- Uruchomić program **Swift TimeDrive**, wybrać długości fali dla rejestracji gęstości optycznej: 204 nm i 280 nm.
- Wypełnić koszyczek kolektora frakcji próbkami o objętości 4 ml.

Przebieg doświadczenia:

a) przygotowanie próbki do separacji.

- Krew cytrynianową poddać wirowaniu w temperaturze pokojowej (20 min, 3000xg).
- Pipetą zebrać żółty supernatant wyraźnie oddzielony od osadzonych elementów morfotycznych.
- Dodać 0,5 ml otrzymanego osocza ubogopłytkowego do 9,5 ml **buforu A**, delikatnie zamieszać i pozostawić w temperaturze pokojowej do dalszego wykorzystania. Jeżeli próbka nie będzie użyta w całości w tym samym dniu, można ją zamrozić. Próbkę po rozmrożeniu należy odwirować (10 min, 3000xg) przed użyciem.

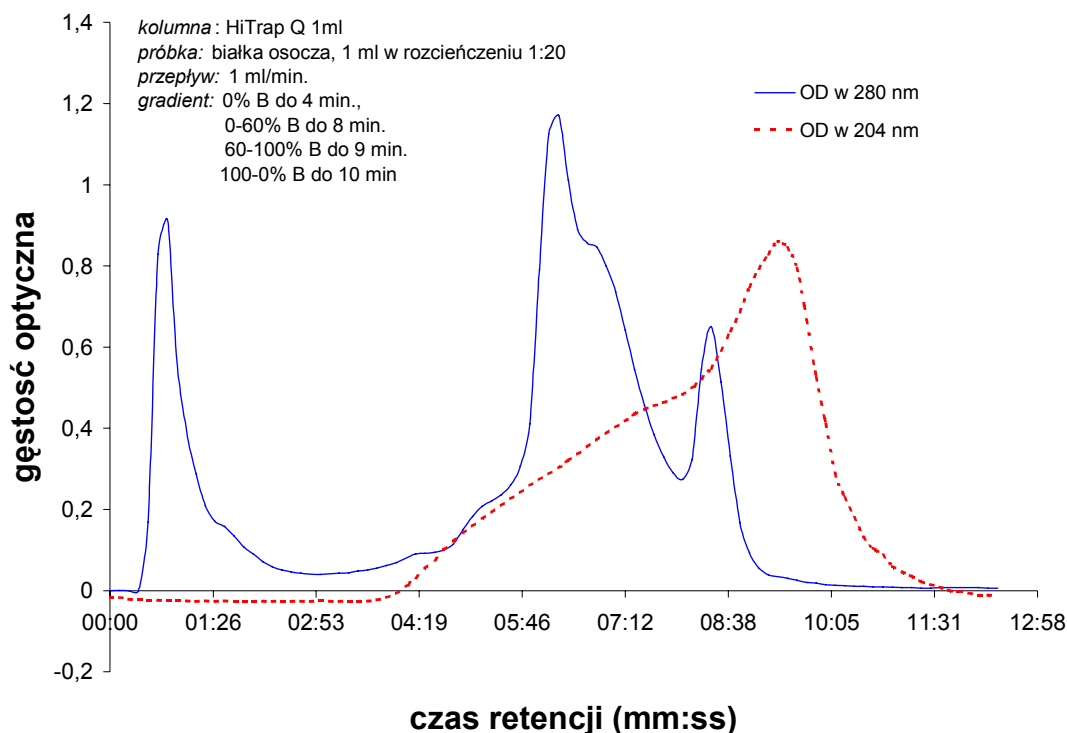
b) frakcjonowanie białek.

- Bezpośrednio przed rozpoczęciem frakcjonowania białek osocza uruchomić program chromatograficzny bez nanoszenia na kolumnę próbki. W tym celu wykonać wszystkie czynności jak poniżej, z wyłączeniem naniesienia próbki do petli.

- Nanieść próbkę (1 ml) do pętli zaworu **IV-7**, pełniącego rolę zaworu iniekcyjnego w systemie **GradiFrac**.
- Uruchomić system GradiFrac z jednoczesnym uruchomieniem zbierania danych ze spektrofotometru **Ultrospec 2000** przez program komputerowy **Swift TimeDrive**.
- Pozwolić systemowi na samodzielną pracę. Po upływie około 15 minut cykl frakcjonowania białek można rozpocząć ponownie.

Oczekiwane wyniki:

Uruchomienie programu chromatograficznego bez naniesienia na kolumnę badanej próbki dostarcza bardzo istotnych informacji o stanie kolumny (obserwacja w 280 nm) oraz kinetyce wymiany buforu w kolumnie (obserwacja w 204 nm). Narastające stężenie jonów Cl^- umożliwia elucję cząsteczek białkowych związanych z anionitem, a nie usuniętych z kolumny podczas wcześniejszych prac. Ominięcie tego etapu może przyczynić się do zanieczyszczenia uzyskanych frakcji białkami, które wcale nie występują w badanej próbce, ale związały się z wymienniczem podczas innych prac. Obserwacja dokonana w świetle o długości fali 204 nm bardzo dokładnie pokazuje kinetykę wymiany buforu w kolumnie podczas realizacji programu chromatograficznego. Warto zauważyć, że ten sposób postępowania prezentuje rzeczywistą wymianę buforu, w przeciwieństwie do często stosowanych wykresów reprezentujących zmianę składu buforów dokonywaną przed kolumną przez układ pomp i zaworów. Pierwszy z pików - pojawiający się zaraz po rozpoczęciu rozdzału - zawiera te białka, które nie wiążą się z anionitem w pH 7,4. W miarę narastania w eluencji stężenia jonów Cl^- wymywane są białka, które oddziaływały z wymienniczem. Na początku kolumnę opuszczają białka najslabiej związane przez wymiennicaz. Z czasem usuwane są z kolumny białka coraz silniej oddziałujące z wymienniczem. Poddając zebrane frakcje ponownej chromatografii jonowymiennej, w warunkach wolniejszych zmian stężenia jonów Cl^- , można uzyskać znacznie lepszą selektywność rozdzału.



Rys. 5.5.

Przykład frakcjonowania białek osocza krwi ludzkiej z wykorzystaniem kolumny **HiTrap Q**. Linia przerywaną zaznaczono obserwowaną wymianę buforu w kolumnie. Obserwacja ta prowadzona była w 204 nm bez naniesienia próbki na kolumnę.

Regeneracja i przechowywanie kolumny:

Zaprogramowany cykl pracy pozostawia kolumnę gotową do ponownego użycia w tych samych warunkach. Przy zmianie składu buforów należy powtórzyć całą procedurę przygotowania systemu do pracy. Jeżeli kolumna nie będzie użytkowana przez kilka dni, lub dłużej, należy przepuścić przez nią 5 ml wody, a następnie 5 ml 20% etanolu. Tak zakonserwowaną kolumnę można zdemontować z systemu, zabezpieczyć przed wysychaniem i przechowywać w temperaturze pokojowej, chroniąc od nadmiernego nasłonecznienia.

Uwagi:

1. Zastosowanie mają wszystkie uwagi dotyczące ćwiczeń 5.1 i 5.2.
2. Kolumny HiTrap przewidziane zostały do szybkiego testowania warunków chromatografii interesujących nas próbek. Możliwe jest wymuszenie przepływu solwentów przez te kolumny przy pomocy zwykłych strzykawek.
3. Kolumny HiTrap można podłączać również do wszystkich systemów chromatografii ciekowej, pod warunkiem, że nie zostanie przekroczone ciśnienie 0,3 MPa.

Przykład 5.5.

Separacja fragmentów restrykcyjnych DNA z zastosowaniem kolumny Mono Q (5,6).

Wprowadzenie.

Chromatografia jonowymienna może być z powodzeniem stosowana do separacji oligonukleotydów. Przykładem takiego zastosowania może być separacja fragmentów restrykcyjnych uzyskanych dzięki trawieniu cząsteczki DNA enzymem restrykcyjnym HaeIII (5). Zdolność rozdzielcza i selektywność rozdziałów w technice jonowymiennej pozwala nawet na separację poszczególnych nukleotydów (6). W poniższym przykładzie zastosowana będzie technika jonowymienna do izolowania mieszaniny nukleotydów.

Material:

1. Mieszanina nukleotydów zawierająca: CMP, UMP, AMP, GMP, CDP, UDP, ADP, GDP, CTP, UTP, ATP, GTP.
2. Kolumna **Mono Q HR 5/5**.

Aparatura:

1. Zestaw chromatograficzny **ÄKTA_{FPLC}** obsługiwany przez program **UNICORN**

Odczynniki:

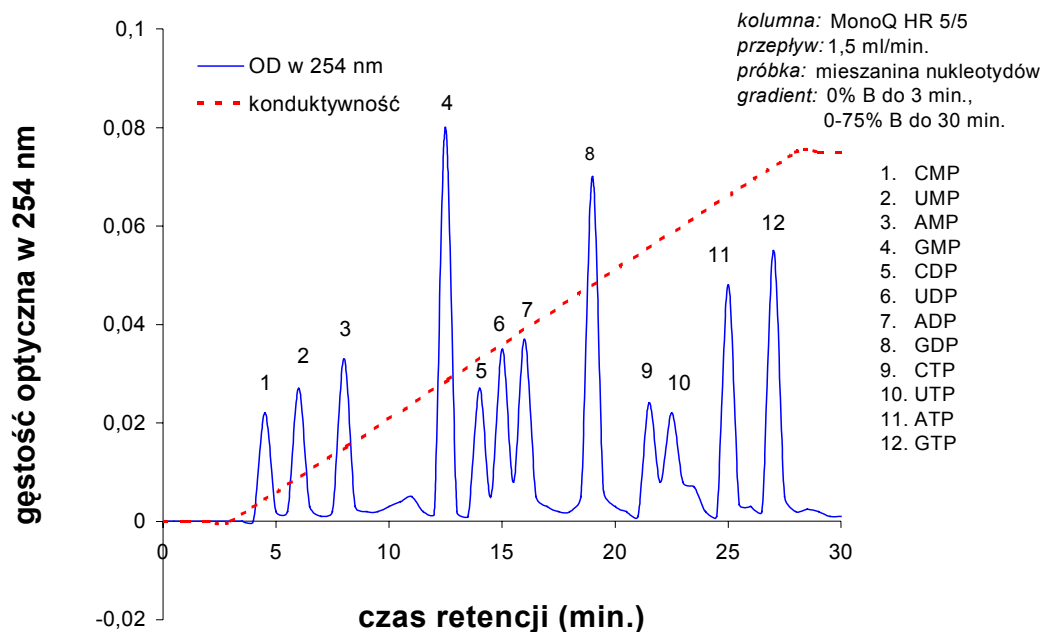
1. Bufor A – 10 mM K₂HPO₄, pH 8,0.
2. Bufor B – 50 mM K₂HPO₄, 0,25 M NaCl, pH 8,0.
3. 20% etanol.

Przygotowanie kolumny chromatograficznej:

- Bufory przefiltrować przez filtr o porowatości 0,45-0,6 µm.
- O ile system nie jest wyposażony w ogranicznik przepływu (flow restrictor) należy odpowietrzyć bufory.
- Kolumnę zamontować w systemie **ÄKTA_{FPLC}**, dokręcając wszystkie nakrętki palcami (bez użycia kluczy). Klucze używać tylko do odkręcania nakrętek.
- Proces montowania kolumny zaczynać zawsze od wypełnienia solwentem wężyka montowanego do wlotu kolumny. Ma to zabezpieczyć kolumnę przed dostaniem się powietrza do jej wnętrza.
- Przepuścić przez kolumnę 5 ml buforu A, przy przepływie 1,5 ml/min.

Przebieg doświadczenia:

- W programie UNICORN, obsługującym system **ÄKTA_{FPLC}**, przygotować proces tworzenia gradientu przy zadanym przepływie 1,5 ml/min.
- Przez pierwsze cztery minuty przez kolumnę ma płynąć tylko bufor A.
- Następnie narastać ma liniowo udział buforu B do 75% w czasie 26 minut.
- Wybrać detekcję w 254 nm.
- Nanieść do pętli zaworu iniekcyjnego 50 µl mieszaniny nukleotydów (20 µg/ml). Próbkę wprowadzić do pętli przy pomocy strzykawki wyposażonej w filtr (0,45 µm).
- Z poziomu komputera uruchomić procedurę rozdziału chromatograficznego.



Rys. 5.6.

Separacja wybranych nukleotydów z mieszaniny. Linia przerywaną zaznaczona jest zmiana składu eluentu rejestrowana przy pomocy detektora konduktywności

Oczekiwane wyniki:

Należy się spodziewać, że poszczególne nukleotydy będą wiązały się z anionitem z różną siłą. Siła ta będzie uzależniona od rodzaju zasady, ale w głównej mierze będzie zależeć od liczby grup fosforanowych w nukleotydzie. Najslabiej z wymiennikiem zwiążą się monofosforany a najsilniej trójfosforany. W ramach mono-, dwu- i trójfosforanów najslabiej zwiążą się cytozynofosforany a najsilniej guanozynofosforany. W takiej też kolejności wmywane będą nukleotydy z kolumny. Należy więc spodziewać się następującej kolejności elucji: 1) CMP, 2) UMP, 3) AMP, 4) GMP, 5) CDP, 6) UDP, 7) ADP, 8) GDP, 9) CTP, 10) UTP, 11) ATP, 12) GTP.

Regeneracja i przechowywanie kolumny:

Kolumnę po ukończonym rozdiale należy przemyć 5 ml buforu B a następnie 5 ml buforu A. Tak potraktowana kolumna gotowa jest do ponownego rozdiale w tych samych warunkach. Jeżeli kolumnę zamierzamy zastosować w innej kompozycji buforowej, to należy zrównoważyć ją przed rozpoczęciem rozdiale nowym buforem startowym A (5-10 ml), aż do ustabilizowania się nowej linii bazowej. Przed odłączeniem kolumny od systemu należy ją zregenerować a następnie przemyć wodą destylowaną (5 ml) i 20% wodnym roztworem etanolu (5 ml). Przechowywać w temperaturze pokojowej, dbając aby kolumna była szczelnie

zamknięta i nie była narażona na zbyt silną ekspozycję do światła.

Uwagi:

1. Posiadanie zautomatyzowanego systemu chromatografii wysokociśnieniowej (**FPLC** lub **HPLC**), zarządzanego z poziomu komputera, bardzo ułatwia pracę, ale nie jest koniecznością. Równie dobre rezultaty można uzyskać stosując manualny system **FPLC** lub **HPLC**.
2. Zawsze należy pamiętać o filtrowaniu i odgazowaniu buforów oraz filtrowaniu bądź wirowaniu separowanej próbki. Wirowanie lub filtrowanie ma za zadanie pozabawienie próbki drobnych cząstek materii, niewidocznych gołym okiem, które mogą zatkać i zniszczyć kolumnę.
3. Dla właściwej ochrony kolumny zaleca się stosowanie odpowiednich dla danej kolumny prefiltrów.
4. W razie utraty przez kolumnę wymaganej selektywności lub pojemności należy ją zregenerować zgodnie z dostarczoną wraz z kolumną instrukcją postępowania.

Przykład 5.6.

Oczyszczanie rekombinowanego białka A z zawiesiny fermentacyjnej *E. coli* z zastosowaniem techniki ekspansji złoża i kolumny STREAMLINE (7).

Wprowadzenie.

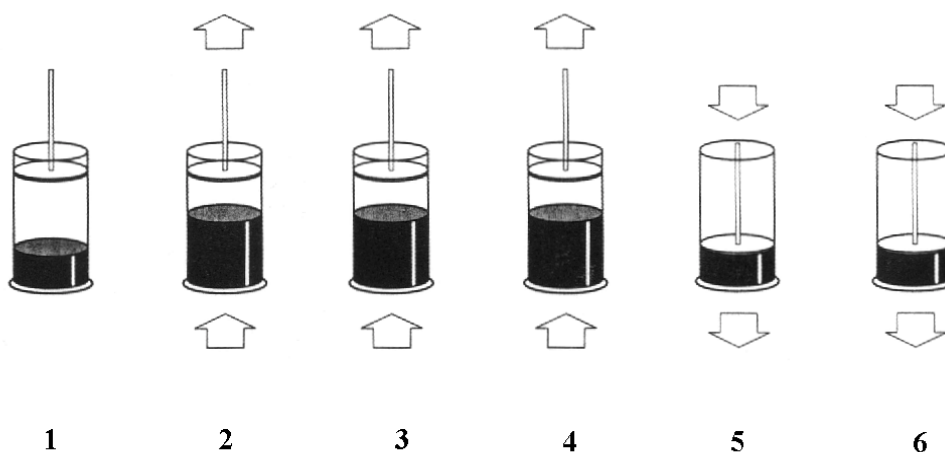
Technika ekspansji złoża jest stosunkowo nową modyfikacją metod chromatografii adsorpcyjnej. Technika ta pozwala na wyizolowanie - w jednym kroku chromatograficznym - wybranego białka z materiału wyjściowego charakteryzującego się bardzo niekorzystnymi parametrami reologicznymi. Materiałem takim może być zawiesina komórek lub ich fragmentów, albo inny płyn zawierający makro-zanieczyszczenia znacznych rozmiarów. Standardowe metody chromatografii adsorpcyjnej wymagają specjalnego, czasem bardzo pracochłonnego, przygotowania próbek przed ich naniesieniem na kolumnę. W przeciwnym wypadku kolumna może ulec zniszczeniu. Technika ekspansji złoża pozwala ominąć etap wstępnego przygotowania próbki i przepuścić ją przez swobodnie zawieszony w solwencie złoże, bez niebezpieczeństwa zatkania kolumny.

Kolumny oraz złoża typu **STREAMLINE** zaprojektowane zostały specjalnie w celu umożliwienia pracy w warunkach ekspansji adsorbentu i utrzymywania go w stanie fluidalnym. Rysunek 5.7 przedstawia schematycznie zasadę pracy kolumny **STREAMLINE**.

1. Sytuacja wyjściowa, gdy przez kolumnę nie przepływa solwent, a adsorbent osadzony jest na dnie. Tłok adaptora ustawiony jest w górnym położeniu.
2. Przez kolumnę przepływa solwent w kierunku od dołu do góry. Wynikiem tego jest

ekspansja złoza i jego równowazenie przeplywajacym solwentem. Rozmiary i cięzar ziaren adsorbentu oraz liniowy przeplyw solwentu muszà byc tak dobrane, aby złoze osiàgnęło stan fluidalny.

3. Gdy adsorbent zostal już odpowiednio przygotowany, przez kolumnę przepuszczany jest material podlegajacy separacji. Utrzymywany jest ten sam kierunek przeplywu jak w poprzednim punkcie. Molekuly wykazujace powinowactwo do zastosowanego adsorbentu wiàzà siê z nim. Pozostałe czàsteczki, wraz z makro-zanieczyszczeniami (komórki lub ich fragmenty) przeplywajà przez rozluźnione złoze bez specjalnych oporów i opuszczajà kolumnę górnym wylotem.
4. Kontynuowana jest ekspansja złoza i jego fluidalny stan, ale przez kolumnę przepuszcza siê ponownie solwent. Celem tego etapu jest usunięcie niespecyficzenie zaadsorbowanych makroczàsteczek oraz pozostałych w objętości fluidalnego złoza makro-zanieczyszczeń.
5. Po odmyciu złoza zatrzymywany jest przeplyw solwentu i pozwala siê na sedymentacjê złoza. Na osadzone złoze opuszcza siê tlok adaptora, zmniejszajàc znacznie objętość czynnà kolumny. Przez tak przygotowane złoze przepuszczany jest eluent usuwajàcy z kolumny zwiàzane specyficzenie makroczàsteczki.
6. Po dokonaniu zamierzonej separacji adsorbent poddawany jest regeneracji i przygotowany jest do ponownego użycia bådź do przechowywania.



Rys. 5.7.

Schematyczne przedstawienie zasady adsorpcyjnej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem techniki ekspansji adsorbentu. Zarówno złoze jak i kolumna noszà nazwê **STREAMLINE** i mogà byc wykorzystywane do prac na skalę tak preparatywnà, jak i przemysłowà. Sekwencja procesów ekspansji, adsorpcji oraz elucji jest następujaca:

1. adsorbent osadzony na dnie kolumny,

2. ekspansja złoża i równoważenie kolumny solwentem,
3. ekspansja złoża i nanoszenie separowanego materiału,
4. ekspansja złoża i przemywanie solwentem,
5. sedymentacja złoża i elucja zaadsorbowanego materiału,
6. regeneracja osadzonego materiału.

Celem niniejszego przykładu jest przedstawienie procesu oczyszczania rekombinowanego białka A (r-prot. A) z zawiesiny fermentacyjnej transfekowanych komórek bakteryjnych *E. coli*, w technice ekspansji adsorbentu jonowymiennego.

Material:

1. Zawiesina hodowlana transfekowanych komórek *E. coli*, produkujących rekombinowane białko A.
2. Adsorbent jonowymienny **STREAMLINE Q XL**.

Aparatura:

1. System **GradiFrac**.
2. Kolumna **STREAMLINE 25**.

Odczynniki:

1. Bufor A – 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,4.
2. Bufor B – 10 mM Tris-HCl, 1,0 M NaCl, pH 7,4.
3. Bufor C – 0,5 M NaOH, 1 m NaCl.
2. 20% etanol.

Przygotowanie kolumny chromatograficznej:

- Końcówki wężyków kolumny **STREAMLINE 25** połączyć z odpowiednimi zaworami systemu GradiFrac, zgodnie ze schematem załączonym do kolumny.
- Odmierzyć 75 ml złoża **STREAMLINE Q XL** i umieścić je w kolumnie.
- Ustawić tłok adaptora w górnym położeniu i rozpocząć ekspansję oraz równoważenie złoża buforem A, wymuszając przy pomocy pompy **P-50** przepływ solwentu o wartości 400 cm/godz. (około 33 ml/min.), w kierunku od dołu do góry.
- Przepuścić przez kolumnę 2 litry buforu A, utrzymując kierunek i prędkość przepływu jak wyżej.

Przygotowanie materiału do separacji:

- Do 2 litrów zawiesiny fermentacyjnej dodać 3,2 litra buforu A.
- Ustawić pojemnik z zawiesiną na mieszadle magnetycznym i umieścić w nim stalowy pręt. Uruchomić mieszanie.
- Zanurzyć w mieszaninie wężyk łączący pojemnik z zaworem i dalej z pompą.

Przebieg doświadczenia:

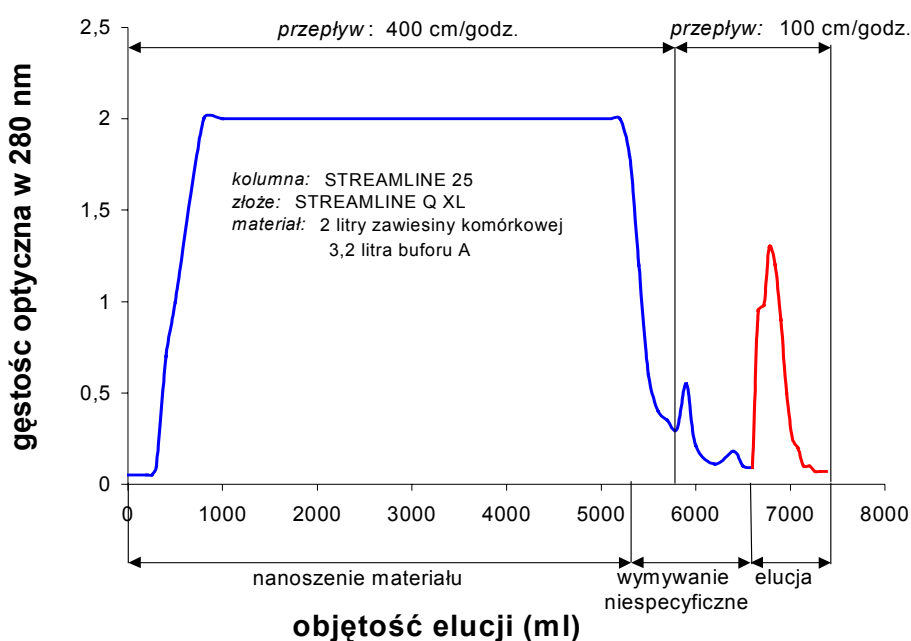
- Po zrównoważeniu złoża rozpocząć nanoszenie na kolumnę separowanego, utrzymując kierunek przepływu od dołu ku górze, oraz prędkość przepływu 400 cm/godz.
- Utrzymywać mieszanie materiału podawanego na kolumnę przez cały czas trwania tego etapu pracy.
- Po zakończeniu nanoszenia separowanego materiału rozpocząć przemywanie

kolumny buforem A, utrzymując dotychczasowy kierunek i prędkość przepływu. Przemycanie kontynuować do momentu, aż gęstość optyczna (280 nm) wypływającego z kolumny materiału spadnie do poziomu 0,05 AU.

- Zatrzymać przepływ buforu A i pozwolić złożu na sedimentację.
- Przesunąć tłok adaptora z górnego położenia tak, aby kontaktował się z osadzonym złożem.
- Uruchomić przepływ buforu B, w kierunku od góry do dołu z prędkością 100 cm/godz. (około 8,25 ml/min) i zbierać wypływający z kolumny materiał.
- Elucję zakończyć, gdy gęstość optyczna (280 nm) wypływającego materiału spadnie poniżej 0,1 AU.

Oczekiwane wyniki:

W wyniku ekspansji adsorbentu możliwe jest przepuszczenie przez kolumnę surowego materiału, nie poddanego procesowi klaryfikacji. W trakcie przepływu materiału przez kolumnę rekombinowane białko A oraz inne molekuly, posiadające ujemny ładunek elektryczny, powinny wiązać się z wymiennikiem jonowym. Pozostałe białka oraz całe komórki bakteryjne powinny swobodnie przepływać przez złożo pozostające w stanie ekspansji i opuścić kolumnę. Po przemyciu kolumny i usunięciu niespecyficznego zaadsorbowanego materiału możliwa jest elucja oczyszczanego białka. Czystość i homogenność preparatu można sprawdzić metodą elektroforetyczną lub korzystając z innych technik chromatografii cieczowej.



Rys. 5.8.

Przykład oczyszczania białka z zawiesiny komórkowej z zastosowaniem kolumny i złoża STREAMLINE.

Regeneracja i przechowywanie kolumny:

Przepuścić przez kolumnę 250 ml buforu C a następnie 500 ml buforu A. Tak zregenerowana kolumna gotowa jest do ponownego użycia. Jeżeli kolumna nie będzie używana przez więcej niż dwa dni, należy przepuścić przez nią 500 ml wody a następnie 250 ml 20% etanolu. W przypadku konieczności wymiany złoża, wymiennicz jonowy **STREAMLINE Q XL** należy odmyć wodą a następnie zakonserwować 20 % etanolem i przechowywać w temperaturze pokojowej bez nadmiernej ekspozycji do światła słonecznego.

4.4. Literatura

- 1 Karlson E., Ryden L., Brewer J. Ion-Exchange Chromatography. in: Protein Purification Principles, High Resolution Methods and Applications, 2nd edition, eds: Janson J-C., Ryden L., J. Wiley & Sons. Inc., New York 1988.
- 2 Ion Exchange Chromatography. Principles and Methods. Pharmacia Biotech AB. Kat. Nr 18-1114-21.
- 3 Rivas GA., Calvete JJ., Gonzales-Rodriguez P. Protein Expression and Purification, **2**, 248, 1991.
- 4 Walkowiak B. Use of the ULTROSPEC 2000 as a full range Multi-Wavelength detector for liquid chromatography. Application Note 53, Pharmacia Biotech (Biochrom), 11, 1998.
- 5 Muller W. *Eur. J. Biochem*, **155**, 203, 1986.
- 6 Meek JL. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **83**, 4162, 1986.
- 7 Expanded Bed Adsorption. Principles and Methods. Pharmacia Biotech. Kat. Nr 18-1124.