

[Akceptuje](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal](#) [Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

Chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC) : wykorzystanie chromatografii do rozdzielania i izolowania makrocząteczek białkowych

Chromatografia oddziaływań hydrofobowych (hydrophobic interaction chromatography-HIC) jest metodą szeroko wykorzystywaną do separacji oraz oczyszczania makrocząteczek białkowych. Białka adsorbowane są na złożu dzięki występowaniu oddziaływań pomiędzy hydrofobowymi fragmentami białka z silnie hydrofobowymi grupami ligandów, które są trwale umocowane na powierzchni nośnika pozbawionego ładunku elektrycznego. Różne

czynniki mają wpływ na zachowanie się cząsteczek białkowych w kontakcie z hydrofobowym adsorbentem. Niektóre z nich mają krytyczny wpływ na rozdzielczość i selektywność metody, a także zdolność wiązania cząsteczek przez złoże [6].

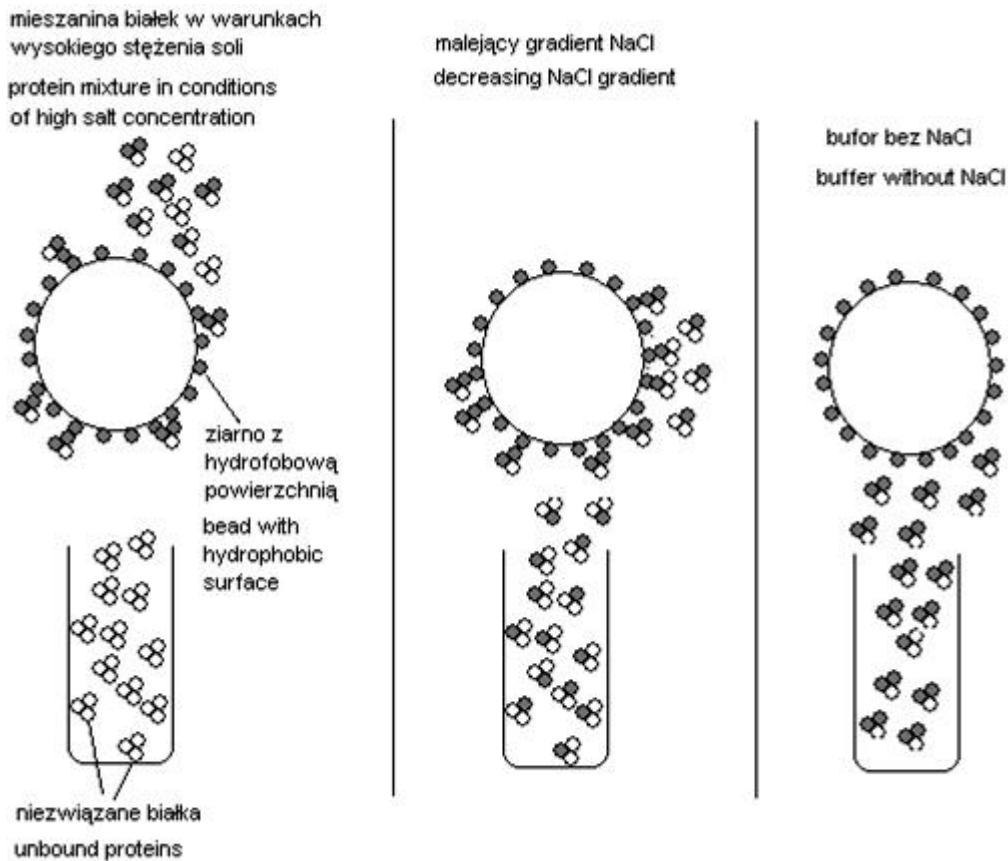
Słowa kluczowe: Chromatografia oddziaływań hydrofobowych, rozdział chromatograficzny, HIC, ligandy, złoże Phenyl Sepharose, α -laktoalbumina, β -laktoglobulina, złoże Phenyl Sepharose 6FF

Przeważająca większość makrocząsteczek posiada skomplikowaną strukturę wewnętrzną. Rozróżnia się w nich zarówno obszary hydrofilowe, które eksponowane są na zewnątrz cząsteczki w polarnym otoczeniu wody, jak i obszary hydrofobowe tj. ukryte w jej wnętrzu i eksponowane na zewnątrz przy zmianie środowiska na niepolarne. Ilość obszarów hydrofobowych i ich umiejscowienie w strukturze cząsteczki stanowią indywidualną cechę makrocząsteczek. Dzięki temu możliwy jest ich rozdział pod względem odmiennych właściwości hydrofobowych [4], [5].

Chromatografii oddziaływań hydrofobowych

Zastosowanie techniki chromatografii oddziaływań hydrofobowych pozwala na rozdzielanie białek na podstawie różnic w sile oddziaływania obszarów hydrofobowych białka z jeszcze bardziej hydrofobowymi grupami ligandów. Grupy ligandów umocowane są na powierzchni nośnika, który pozbawiony jest ładunku elektrycznego [7].

W celu związania białka do nośnika hydrofobowego stosuje się bufony o wysokiej sile jonowej środowiska. Najczęściej stosowany jest 1,5 M roztwór siarczanu amonu, a uwalnianie białek następuje przez ich wymywanie buforem o zmniejszającym się gradiencie soli. Innym, powszechnie znanym sposobem elucji jest zwiększenie pH buforu bądź dodatku komponentów wykazujących silne powinowactwo do ligandu lub zwiększające hydrofilność białek. W tym celu stosuje się np. alkohole i aminy alifatyczne lub detergenty niejonowe [7].



Zdjęcie: Oczyszczanie białek za pomocą IEX, [7]

Zalety IEX:

- w technice gradientowej objętość próbki nanoszona na kolumnę może być wielokrotnie większa od objętości kolumny, a stężenie separowanych substancji może być bardzo niskie;
- IEX pozwala na wielokrotne zażycie wyjściowego materiału;
- pojemność kolumny jest zwykle bardzo duża;
- rozdzielczość metody jest wysoka.

Wady:

- składniki eluowane w solwencie o dużym stężeniu soli muszą być dializowane bądź poddawane etapowi re-chromatografii techniką filtracji żelowej, co ma na celu usunięcie nadmiaru soli [6].

α -laktoalbuminy jest białkiem charakteryzującym się dużą odpornością na wysoką temperaturę. Odmienne od albumin surowicy krwi, α -laktoalbumina zawiera oligosacharyd, który jest przyłączony do łańcucha polipeptydowego przez grupę b-karboksylową reszty kwasu asparaginowego. Ludzka α -laktoalbumina (o masie cząsteczkowej 14 176 Da) zbudowana jest ze 123 aminokwasów. Ponadto, w jej składzie występują 4 mostki disiarczkowe. Dodatkowo, pierwszorzędowa struktura α -laktoalbuminy jest zgodna ze strukturami α -laktoalbumin u innych gatunków ssaków. Białko to pochodzące z mleka krowiego wykazuje duże podobieństwo w budowie do α -laktoalbuminy pochodzenia ludzkiego [8].

Rozdzielanie α -laktoalbuminy i β -laktoglobuliny z zastosowaniem złoża Phenyl Sepharose (L. Lindahl)

W obecności jonów metali wiele białek podlega znacznym zmianom konformacyjnym. Zmiany te mają wpływ na zmianę właściwości hydrofobowych. Zjawisko to jest wykorzystywane do izolowania i oczyszczania białek wiążących się z jonami metali. Proteiny obecne w mleku, a mianowicie α -laktoalbumina i β -laktoglobulina, mają zdolność do wiązania jonów wapnia (Ca^{2+}). Obecność jonów miedzi powoduje, że α -laktoalbumina jest mniej hydrofobowa niż w środowisku ubogim w te jony. Właściwości hydrofobowe β -laktoglobuliny są słabo zależne od obecności jonów miedzi, dzięki temu stosunkowo łatwo można dokonać separacji tych dwóch białek. W tym celu najczęściej wykorzystuje się złożo Phenyl Sepharose [1], [2].

W pierwszym etapie chromatografii przez kolumnę chromatograficzną przepuszcza się mieszaninę badanych białek w obecności EDTA. W takich to warunkach α -laktoalbumina wiąże się ze złożem, podczas gdy β -laktoglobulina przepływa przez kolumnę prawie bez oddziaływań z nią [1], [2].

W drugim etapie chromatografii przeprowadza się elucję zaadsorbowanych białek, korzystając z buforu, który w swym składzie zawiera jony wapnia [1].

Wykonanie:

Należy zmieszać po 500 μl (2 mg/ml) α -laktoalbuminy z 500 μl β -laktoglobuliny (2 mg/ml), po czym do próbki dodać 1 ml buforu Tris-HCl - 0,2 M EDTA (pH=7,5). Próbkę inkubować w temperaturze pokojowej przez 30 minut.

W trakcie inkubacji, pobrać 5 ml złoża Phenyl Sepharose 6FF, przemyć je 3 krotnie 20 ml wody, po czym upakować w plastikowej kolumnie. Przez tak przygotowaną kolumnę przepuścić 50 ml buforu Tris-HCl - EDTA.

Na przygotowaną w ten sposób kolumnę nanieść próbkę mieszaniny białek i rozpocząć zbieranie materiału wypływającego z kolumny, w postaci 2 ml frakcji. Po wsiąknięciu naniesionej próbki w złożo, należy kolejno przepuścić przez kolumnę :

- 15 ml buforu Tris-HCl- EDTA
- 50 ml buforu Tris-HCl- CaCl_2 (ciągle zbierając wypływające z kolumny 2-ml frakcje i oznaczając w nich spektrofotometrycznie zawartość białka).

W powyższych warunkach β -laktoglobulina powinna opuścić kolumnę bez oddziaływania z nią, i znaleźć się we frakcjach o numerach 2 i 3. α -laktoalbumina powinna być wyeluowana w momencie, kiedy EDTA zostanie usunięte z kolumny, a jego miejsce zajmą jony Ca^{2+} (tj. we frakcji nr 8) [1], [2]. Po skończonym rozdziale kolumnę należy przemyć 50 ml wody destylowanej oraz 20% etanolem (15 ml). Tak przygotowaną kolumnę można przechowywać w temperaturze pokojowej- chroniąc przed nadmiernym nasłonecznieniem, zaś przed kolejnym użyciem wystarczy ją przemyć 50 ml wody [1], [2], [6].

Co ważne:

- Wszystkie bufony, które będą stosowane do chromatografii cieczowej oraz nanoszone próbki należy filtrować przed użyciem. Próbki zamiast filtrowania można poddać wirowaniu w warunkach: 5000 x g, 10 min, co ma na celu zabezpieczenie kolumny przed zatkaniami.

- Bufory dobrze jest przygotować na kilka godzin przed użyciem. Z kolei, bezpośrednio przed ich zastosowaniem należy sprawdzić wartość pH (i w razie konieczności ponownie doprowadzić do potrzebnej wartości) [1].

Izolowanie enzymów z mieszaniny z wykorzystaniem złoża Phenyl Sepharose (L. Szepešy).

Obecność dużych stężeń soli w roztworze białek przyczyniają się do pojawienia się licznych zmian konformacyjnych w tych białkach. W krańcowych przypadkach zmiany te mogą spowodować wytrącenie białek z danego roztworu. Zjawisko wysalania białek bardzo często stosowane jest w celu szybkiej i wstępnej separacji białek. Pozostałe w roztworze białka wykazują silne właściwości hydrofobowe, dzięki czemu można je rozdzielać stosując w tym celu technikę chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC) [1], [3].

Po niesieniu na kolumnę próbki (mieszaniny białek) znajdujących się w środowisku o dużym stężeniu soli, dochodzi do oddziaływań hydrofobowych fragmentów tych białek z hydrofobowymi łańcuchami ligandów, które są trwale związane z nośnikiem. Po odmyciu niespecyficznie zaadsorbowanych białek można eluować związane białka w zależności od ich hydrofobowości, stosując w tym celu eluenty o malejącym stężeniu soli [1], [3].

Wykonanie:

W buforze fosforanowym (zawierającym 1,7 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) mieszaninę białek standardowych tj.:

- cytochrom c o stężeniu 2 mg/ml
- mioglobinę o stężeniu 4 mg/ml
- rybonukleazę o stężeniu 10 mg/ml
- chymotrypsynogen A o stężeniu 3 mg/ml [1], [3].

Należy pobrać 5 ml złoża Phenyl Sepharose 6FF, następnie przemyć je za pomocą wody destylowanej (3-krotnie, po 20 ml). Przygotowane w ten sposób złożo upakować w plastikowej kolumnie, zaś kolumnę zrównoważyć 50 ml buforu fosforanowego (zawierającym 1,7 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Korzystając z wyjściowych buforów należy przygotować 15-ml porcje buforu fosforanowego o malejącym stężeniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tj.: 1,3; 1,1; 0,8 oraz 0,3 M [1], [3].

Przygotowaną mieszaninę białek należy odwirować, a otrzymany po wirowaniu supernatant w objętości 1 ml nanieść na kolumnę. Po wnikięciu w kolumnę próbki, należy przepuścić przez nią 15 ml buforu fosforanowego, zawierającego 1,7 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, po czym rozpocząć zbieranie wypływającego z kolumny materiału w postaci 2 ml frakcji [1], [3].

Następnie, wymywać z kolumny związane z nią białka, stosując w tym celu wcześniej przygotowane eluenty w objętości 15 ml każdy. Eluenty stosować w kolejności malejącego stężenia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Po zakończeniu rozdziału chromatograficznego, kolumnę przemyć 50 ml wody oraz 15 ml 20% etanolu. Kolumna może być przechowywana do kolejnego użycia w temperaturze pokojowej.

Zbierane podczas rozdziału frakcje należy oznaczyć spektrofotometrycznie przy $\lambda=280$ nm.

Po analizie należy wykonać wykres zależności gęstości optycznej poszczególnych frakcji od objętości elucji [1], [3].

Podczas rozdziału wymywane są białka w następującej kolejności:

- cytochrom c
- mioglobina
- rybonukleaza
- chymotrypsynogen A (jako ostatni składnik) [1], [3].

Literatura:

[1]. Kłyszajko-Stefanowicz L, 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s. 166-172

[2]. Lindahl L., Vogel H.J., 1984. Metal-ion-dependent hydrophobic-interaction chromatography of

α -lactoalbumins. Anal. Biochem., 140: 394 - 402

[3]. Szepesy L., Horvath C., 1988. Species salt effects in hydrophobic interaction chromatography of proteins. Chromatographia, 28: 13-18.

[4]. Jing Jin, 2010. Lipid foulant interactions during the chromatographic purification of virus-like particles from *Saccharomyces cerevisiae*. <http://discovery.ucl.ac.uk/1302065/1/1302065.pdf>

[5]. http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/pl/GELifeSciences/products/AlternativeProductStructure_17430/17097303

[6]. <http://www.biofizyka.p.lodz.pl/ch6.pdf>

[7]. http://www.pttz.org/zyw/wyd/czas/2005,%203%2844%29/01_Rosinski.pdf

[8]. http://www.pg.gda.pl/chem/Katedry/Inzynieria/images/data/mk/dydaktyka/trm/l/TRM_cw_1.pdf

opracowała: Lidia Koperwas

<http://laboratoria.net/artukul/16344.html>

Informacje dnia: [Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14 Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14 Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14](#)

Partnerzy