Metode pročišćavanja proteina

Matijević, Tena

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:416013

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Preddiplomski studij kemije

Tena Matijević

Metode pročišćavanja proteina

Završni rad

Mentorica : doc.dr.sc. Katarina Mišković Špoljarić

Osijek, 2017.

Sažetak

U stanici postoji na tisuće vrsta proteina, a svaki od njih ima svoju funkciju. Upravo zato, da bismo istražili njihova svojstva i funkcije, potrebno ih je najprije izolirati iz stanice, a nakon toga pročistiti. Dok velike proteine nije teško izolirati i pročistiti iz stanice, za izolaciju i pročišćavanje malih proteina potreban je veliki broj koraka i različitih tehnika. U ovom radu opisat ćemo upravo tehnike izolacije i pročišćavanja proteina iz različitih stanica i tkiva.

Ključne riječi: proteini, stanice, izolacija, pročišćavanje

Abstract

There are thousands of types of proteins in the cell, and each of them has a different function. That is why, in order to investigate their properties and functions, it is necessary to first isolate them from the cells and then purify them. While large proteins are not difficult to isolate and purify from the cell, isolating and purifying small proteins requires a large number of steps and techniques. In this paper we will describe the techniques of isolation and purification of proteins from different cells and tissues.

Key words: proteins, cell, isolation, purification

Popis kratica korištenih u završnom radu:

pI	-	Izoelektrična točka proteina
PVP	-	Polivinilpirolidon
HIC	-	Kromatografija hidrofobnih interakcija, *(engl. Hydrophobic Interaction Chromatography)*
IAC	-	Imunoafinitetna kromatografija, *(engl. Immunoaffinity Chromatography)*
TLC	-	Tankoslojna kromatografija, *(engl. Thin-layer Chromatography)*
LPLC	-	Niskotlačna tekućinska kromatografija, *(engl. Low Pressure Liquid Chromatography)*
HPLC	-	Visokotlačna tekućinska kromatografija, *(engl. High Pressure Liquid Chromatography)*
FPLC	-	Tekućinska kromatografija brzih proteina, *(engl. Fast Protein Liquid Chromatography)*
RPLC	-	Tekućinska kromatografija reverzne faze, *(engl. Reversed Phase Liquid Chromatography)*
CM-celuloza	-	Karboksimetil-celuloza
DEAE-celuloza	-	Dietilaminoetil-celuloza
PAGE	-	Poliakrilamidna gel-elektroforeza, *(engl. Polyacrylamide Gel Electrophoresis)*
SDS-PAGE	-	Natrij-dodecil-sulfat poliakrilamidna gel-elektroforeza, *(engl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
IEF	-	Izoelektrično fokusiranje

Sadržaj:

1. UVOD 1
2. IZOLACIJA PROTEINA IZ STANICA I TKIVA 2
2.1. Izolacija proteina iz životinjskih stanica i tkiva 4
2.2. Izolacija u vodi topljivih proteina iz jednostaničnih organizama 5
2.3. Izolacija biljnih proteina topljivih u vodi 5
2.4. Izolacija proteina topljivih u mastima 6
2.5. Izolacija agregiranih proteina 6
3. PROČIŠĆAVANJE PROTEINA 7
4. TIPOVI MOLEKULARNIH INTERAKCIJA I VARIJABLE KOJE NA NJIH UTJEČU 10
4.1. Vodikove veze 10
4.2. Hidrofobne interakcije 10
4.3. Disulfidne veze 10
4.4. Ionske interakcije 11
4.5. Varijable koje utječu na molekularne sile 12
5. SVOJSTVA PROTEINA NA OSNOVU KOJIH SE MOGU PROČISTITI 13
5.1. Veličina 13
5.2. Oblik 13
5.3. Naboj 14
5.4. Izoelektrična točka 14
5.5. Raspodjela naboja 14
5.6. Hidrofobnost 14
5.7. Topljivost 15
5.8. Gustoća 15
5.9. Vezanje liganda 15
5.10. Metalna veza 16
5.11. Reverzibilno udruživanje 16
5.12. Posttranslacijske modifikacije 16
5.13. Specifične sekvence ili strukture 17
6. RAZDVAJANJE PROTEINA 18
6.1. Razdvajanje na osnovu topljivosti 18
6.2. Razdvajanje na osnovu veličine i gustoće 18
7. KROMATOGRAFSKE METODE RAZDVAJANJA 21

7.1. KROMATOGRAFIJA NA KOLONI (STUPCU) 21
7.2. KROMATOGRAFIJA MOLEKULARNOG ISKLJUČIVANJA (GEL-FILTRACIJSKA KROMATOGRAFIJA) 23
7.3. IONSKO-IZMJENJIVAČKA KROMATOGAFIJA 25
7.4. AFINITETNA KROMATOGRAFIJA 27
7.5. KROMATOGRAFIJA HIDROFOBNIH INTERAKCIJA 29
8. ANALIZA PROČIŠĆENOG PROTEINA 30
9. ZAKLJUČAK 31
10. LITERATURA: 32

1. UVOD

Proteini su složeni polimeri lančane ili globularne strukture, najsvestranije molekule u živim organizmima, i kao takve obavljaju bitne funkcije u svim biološkim procesima. To su zapravo makromolekule, velike, složene i za život neophodne molekule. Osnovne gradivne jedinice svih proteina su aminokiseline, njih 20 različitih. Svih 20 aminokiselina razlikuju se prema obliku, naboju, sposobnosti stvaranja vodikovih veza, hidrofobnosti te kemijskoj reaktivnosti. Svaki od proteina ima jedinstven i točno određen slijed aminokiselina koje određuju geni. Zbog tog redoslijeda aminokiselina u polimernom lancu, proteini se spontano sklapaju u trodimenzionalne strukture o kojoj ovisi i njihova funkcija. Neke od najvažnijih funkcija koje obavljaju proteini su kataliza, odnosno ubrzavanje kemijskih reakcija koje obavljaju proteini enzimi, te prijenos. Primjer transportnog proteina je hemoglobin koji prenosi kisik iz pluća do tkiva. Kako bismo razumjeli funkciju koju obavlja protein kojeg istražujemo, potrebno je odrediti slijed aminokiselina u njegovom polipeptidnom lancu. To je moguće odrediti samo čistim proteinima, stoga je prvi korak u istraživanju proteina zapravo njihovo pročišćavanje. Proteini se mogu pročistiti na osnovu svojih različitih fizikalnih i kemijskih svojstava, a neki najvažniji od njih su veličina, oblik te naboj proteina. Svrha ovog rada je objasniti na koji se način proteini mogu pročistiti iz smjese proteina te koje su to najučinkovitije kromatografske metode koje se koriste za ovaj postupak.

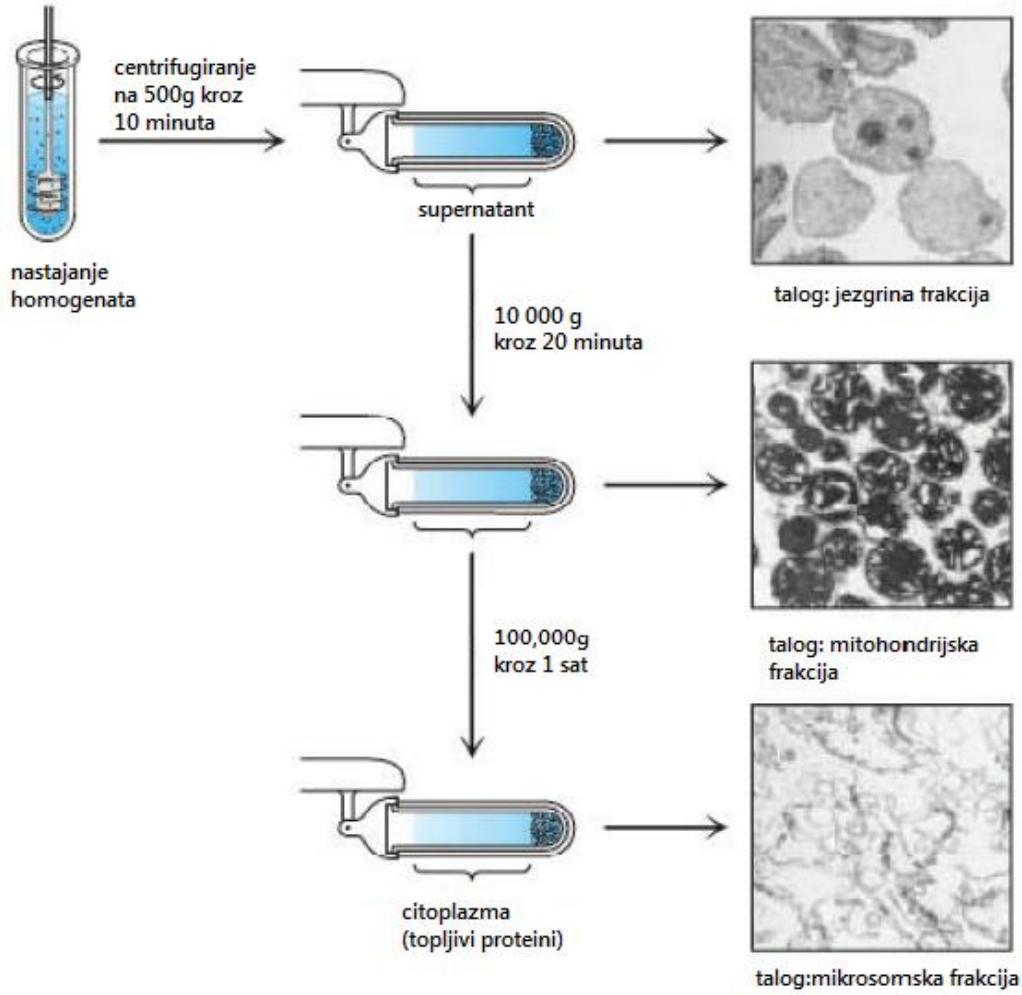
2. IZOLACIJA PROTEINA IZ STANICA I TKIVA

Nakon što smo odredili u kojoj se staničnoj komponenti nalazi naš željeni protein, da bismo mogli proučavati njegovu strukturu, potrebno ga je izolirati iz stanice. Općenito, procesi izolacije većine proteina provode se u hladnim uvjetima, uglavnom od 0-4°C, kako bi proteini ostali zaštićeni i zadržali svoju aktivnost. Za hlađenje uzorka koriste se ledene kupelji ili neki drugi od oblika sustava za hlađenje. Proces izolacije varira s obzirom na vrstu uzorka, te fizikalna i kemijska svojstva proteina. Većina životinjskih stanica i tkiva je krhko te se lako razara, pa se za njihovo razaranje mogu koristiti nježnije metode. Bakterije, gljive i većina biljnih stanica imaju čvrste stanične ovojnice, pa su za njihovo razaranje potrebni nešto snažniji postupci. Također, jedan od bitnih čimbenika za proces izolacije proteina iz stanice je izolacijski pufer[1] ili otapalo. Pufer s prikladnom koncentracijom, ionskom jakosti i pH[2], koristi se za izolaciju proteina topljivih u vodi. U nekim slučajevima, u izolacijski se pufer dodaju blagi deterdženti ili druge odgovarajuće tvari sa svojstvom disocijacije. Kako bi se spriječilo uništavanje izoliranih proteina proteazama[3], potrebno je koristiti inhibitore proteaza. Ekstrakt proteina dobiven iz određenih staničnih komponenti sadrži manje nečistoća nego protein izoliran iz cijele stanice, pa se prije same izolacije ciljnog proteina može obaviti razdvajane staničnih komponenti. Razaranje stanice treba se prilagoditi tako da potrebne stanične komponente u kojima se nalazi željeni protein ostanu netaknute. Razdvajanje pojedinih komponenti stanice obavlja se centrifugiranjem pod odgovarajućim uvjetima, razlikovnim centrifugiranjem, te centrifugiranjem gradijentom gustoće.[1]

[1] **Puferi** su otopine slabih kiselina i njihovih soli ili slabih baza i njihovih soli i ne mijenjaju bitno svoj pH dodatkom izvjesne količine kiselina ili baza

[2] **pH** je broj koji služi kao mjera kiselosti ili bazičnosti neke otopine

[3] **Proteaze** (proteinaze/peptidaze) su enzimi koji kataliziraju hidrolizu peptide veze koja povezuje aminokiseline u proteinima

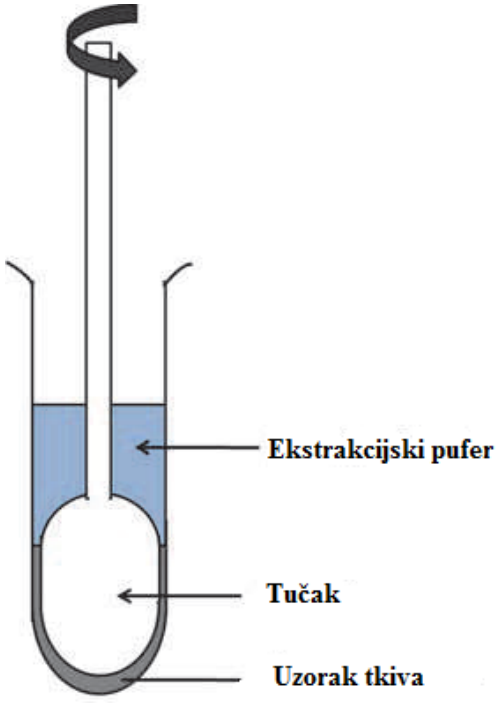


Slika 1. Razlikovno centrifugiranje. Stanice se razore u homogenizatoru, a nastali se homogenat nadalje centrifugira uz povećanje centrifugalne sile. Gušći materijali će stvoriti talog pri manjim centrifugalnim silama, dok rjeđim treba puno veća centrifugalna sila kako bi se istaložili. Nastale se frakcije koriste kao izvor materijala za daljnje korake pročišćavanja. **[2]**

2.1. Izolacija proteina iz životinjskih stanica i tkiva

Proteini koji su komponente krhkih jednostaničnih tkiva, kao što su životinjske stanice krvi, mogu se izolirati korištenjem hipotonične otopine pufera. Ako uzorak sadrži različite vrste stanica, njihovo razdvajanje olakšat će izolaciju ciljnog proteina. Metoda temeljena na osmozi koristi se za izolaciju životinjskih stanica uzgojenih u kulturi stanice. Sonifikacija, proces zamrzavanje/odmrzavanje te blaga mehanička agitacija mogu se koristiti kako bi se dodatno narušila struktura stanice te olakšala disocijacija staničnih komponenti.[1]

Za višestanična, mekana tkiva, koristi se ručni, odnosno električni homogenizator *(Slika 2.)*. Za uzorke malog volumena koristi se mala štipaljka koja sadrži cijev za mikrocentrifugu. Za izolaciju proteina iz čvrstih tkiva i stanica, primjerice životinjskih mišića, potrebna je oprema s jačom snagom razaranja kao što je miješalica s oštricama. Jedna od metoda razaranja životinjskih stanica je razaranje dekompresijom dušika. Dušik se otapa u stanicama u posudi pod visokim tlakom. Kada se tlak iznenada pusti iz posude, otopljeni dušik se oslobodi u obliku mjehurića, a upravo ti veliki mjehurići uzrokuju puknuće stanice.[1]



Slika 2. Ručni homogenizator. [1]

2.2. Izolacija u vodi topljivih proteina iz jednostaničnih organizama

Ova skupina organizama uključuje bakterije, kvasac, gljivice i neke alge. Njihove stanične ovojnice su jače nego ovojnice životinjskih stanica, pa su potrebne snažnije metode za njihovo razaranje. Jedna od jednostavnijih metoda je protresanje suspenzije stanica ili spora s malim staklenim kuglicama. Suspendiranje stanica može se obaviti samo uz odgovarajući pufer, ili uz dodavanje nekog enzima i/ili blagog deterdženta. Neki od enzima koji se koriste su lizozim, celuloza i kitinaza. Najčešće se koriste neionski i zwitterionski[4] deterdženti, osobito Triton X-100 i CHAPS[5], jer su blagi i imaju vrlo mali utjecaj na denaturaciju[6] proteina. Kako bi se narušila struktura stanica organizama s vrlo jakom staničnom ovojnicom, potrebni su visokotlačni uređaji za tiskanje, kao što su procesori za mikrofluidizaciju. U takvim sustavima suspenzija stanica nalazi se pod tlakom (do 30.000 psi) uz pomoću hidraulične pumpe. Razarajuća sila se stvara kada ta stlačena suspenzija prolazi kroz vrlo uski izlaz u atmosferski tlak.[1]

2.3. Izolacija biljnih proteina topljivih u vodi

Za razaranje biljnih stanica koriste se tarionik i tučak, uz pristutnost određenog pufera. Sastav pufera ovisi o proteinima koje se želi analizirati, a vrlo je važna i pH vrijednost pufera. Pri izolaciji biljnih proteina dodaje se i polivinilpirolidon (PVP) koji ima ulogu stabilizatora tj. veže na sebe fenole i alkaloide kojima su bogata neka biljna tkiva. Ukoliko je tkivo preteško za razaranje, brzo zamrzavanje s tekućim dušikom učinit će biljku krhkom. Također, za izolaciju nekih biljnih stanica koristi se i metoda dekompresije s dušikom.[1]

[4] Molekule koje u otopini neutralne pH vrijednosti postoje uglavnom kao dipolarni ioni (**zwitter ioni**), odnosno posjeduju i pozitivan i negativan naboj
[5] **CHAPS**, Dimethyl[3-(propyl]. azaniumyl}propane-1-sulfonate], zwitterionski deterdžent
[6] **Dentaturacija** je proces u kojem je proteinu narušena struktura, odnosno lišen je svoje biološke aktivnosti

2.4. Izolacija proteina topljivih u mastima

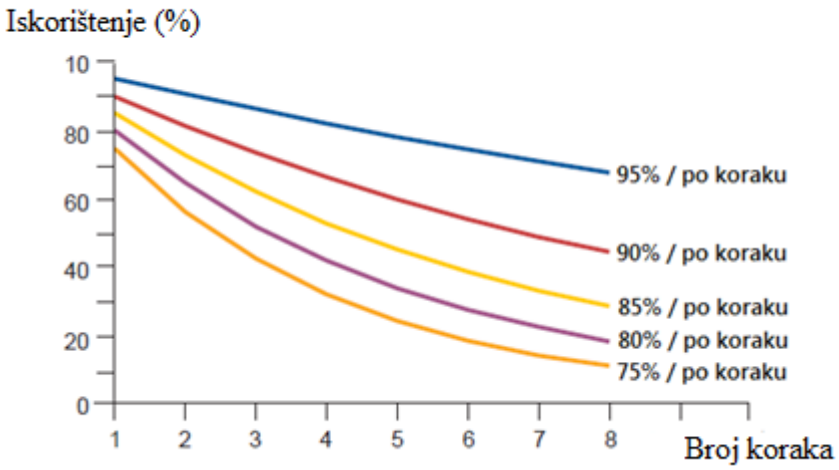
Većina proteina koji su topljivi u mastima su membranski proteini. Takvi se proteini izoliraju iz uzoraka korištenjem organskih otapala, kao što su smjesa kloroforma i metanola. Alternativni način za otapanje proteina iz stanica ili tkiva je vodena otopina Triton X-100 i CHAPS. Mogu se koristiti i neki snažniji deterdženti, ali oni mogu uzrokovati trajnu denaturaciju proteina.[1]

2.5. Izolacija agregiranih proteina

Rekombinantni proteini u bakterijskoj stanici domaćina često čine netopljive agregate koji su poznati kao inkluzijska tijela. Takvi oblici proteina su teško topljivi. Za izolaciju tih proteina, često se koriste snažni denaturati kao što su gvanidin-HCl (6 mol/dm^3) ili otopina uree (6-8 mol/dm^3).[1]

3. PROČIŠĆAVANJE PROTEINA

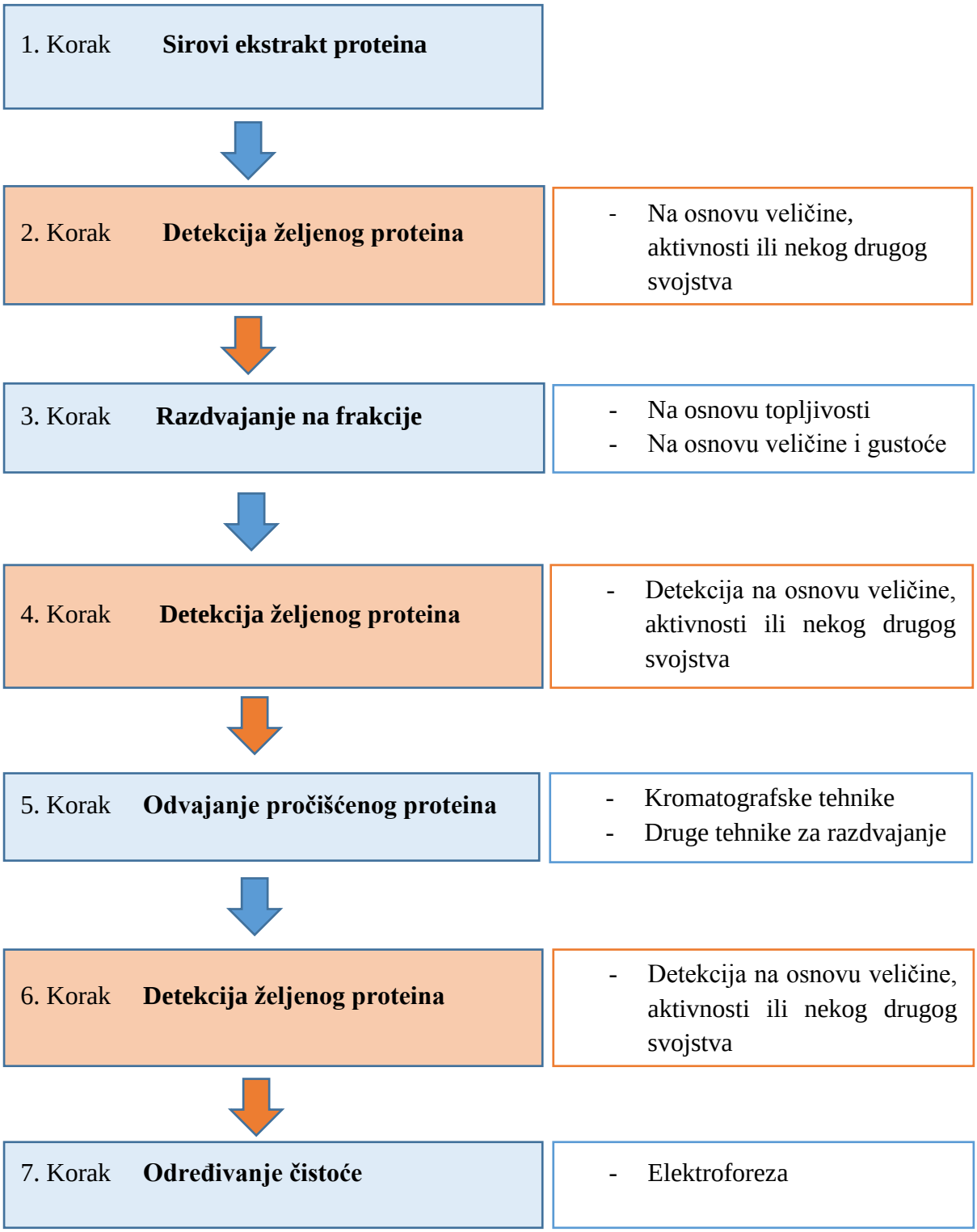
Protein koji smo izolirali iz stanice potrebno je pročistiti. Prije samog početka postupka potrebno je napisati osnovni scenarij za pročišćavanje željenog proteina te odgovoriti na neka opća pitanja poput: Što je namjena proizvoda? Kakav polazni materijal nam je dostupan i kako s njim treba postupati? Kolika je čistoća krajnjeg produkta u odnosu na izvorni materijal? Što se treba dijelom ukloniti? Što se treba ukloniti u potpunosti? Koja su ekonomska ograničenja i koji su izvori i oprema dostupni? Većina tehnika za pročišćavanje zahtjeva više od jednog koraka kako bi se postigla željena razina čistoće proizvoda. To uključuje i svaki korak potreban za prijenos uzorka iz jedne tehnike u uvijete pogodne za provođenje sljedeće tehnike pročišćavanja. Svaki korak u procesu će izazvati gubitak dijela proizvoda. Na *Slici 3.* prikazano je iskorištenje po koracima u postupku pročišćavanja u 8 koraka. Iskustvo pokazuje da, čak i za najzahtjevnija pročišćavanja, visoki stupanj čistoće i iskorištenje mogu se učinkovito postići u manje od 4 dobro odabrana i optimizirana stupnja pročišćavanja. Stoga tehnike treba organizirati u logičan slijed kako bi se izbjegla potreba za više koraka zbog manjih gubitaka krajnjeg proizvoda.[3]



Slika 3. Iskorištenje kod procesa pročišćavanja u 8 koraka. [3]

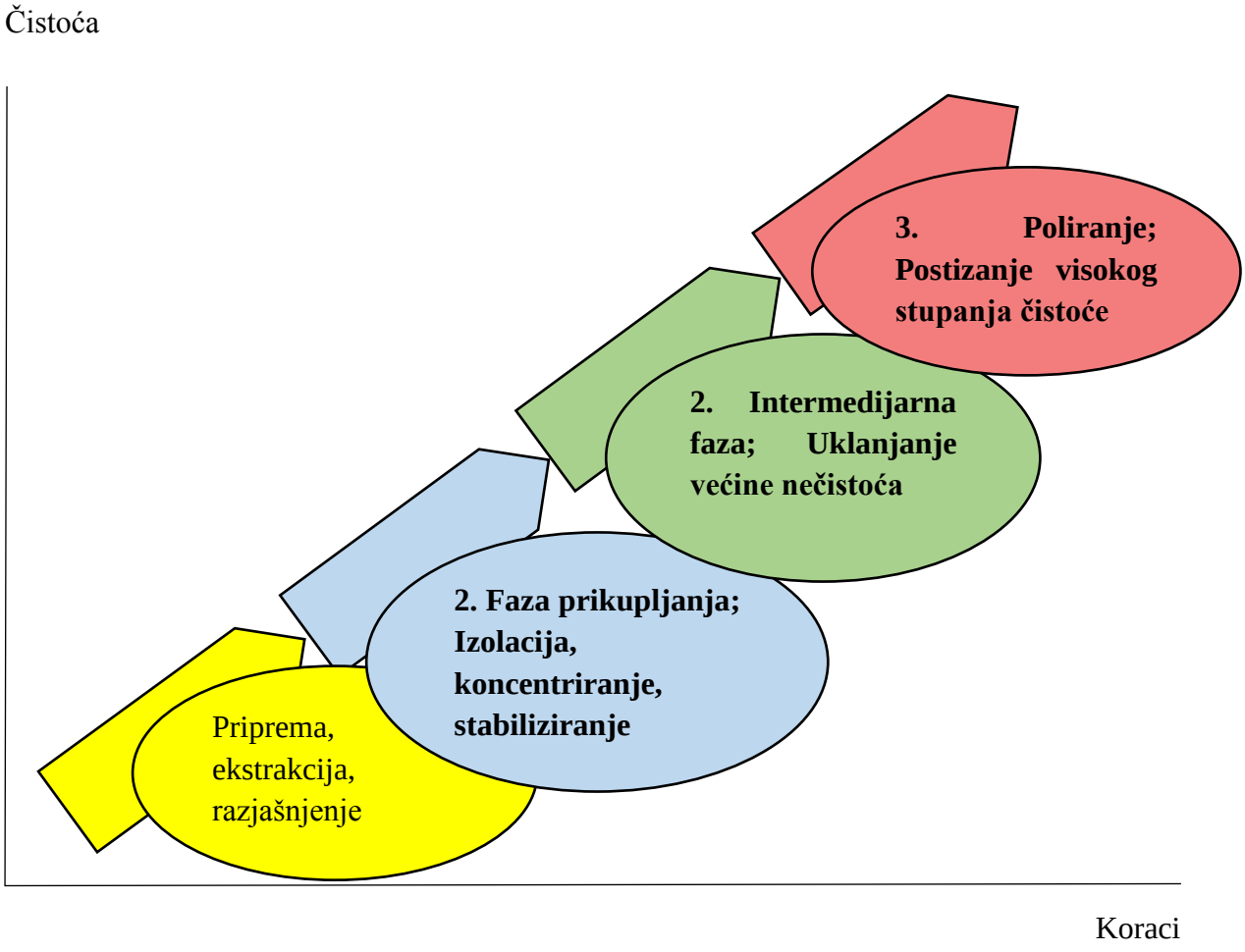
SMJERNICE ZA PROČIŠĆAVANJE PROTEINA

Navedene smjernice za pročišćavanje proteina mogu se primijeniti na bilo koji postupak pročišćavanja.



Slika 4. Smjernice za pročišćavanje proteina. [1]

U nekim slučajevima nije potrebno provoditi sve gore navedene korake i tehnike pročišćavanja. Broj koraka i tehnika ovisi od proteina do proteina. Primjerice, mioglobin se lako može promatrati zbog svoje crvene boje ili detektirati pomoću UV-Vis spektroskopije, bez potrebe za bilo kakvim drugim postupkom. Također, jednako učinkovit je i proces pročišćavanja u 3 faze, u kojem svaki od koraka ima svoj cilj.[1]



Slika 5. Proces pročišćavanja u 3 faze. [3]

U fazi prikupljanja glavni su ciljevi izolacija, koncentriranje i stabilizacija ciljnog proteina.

U intermedijarnoj fazi pročišćavanja cilj je ukloniti većinu nečistoća kao što su neki drugi proteini, nukleinske kiseline, endotoksini i virusi.

U fazi poliranja cilj je postići visoki stupanj čistoće uklanjanjem nečistoća u tragovima i sličnih stvari.[3]

4. TIPOVI MOLEKULARNIH INTERAKCIJA I VARIJABLE KOJE NA NJIH UTJEČU

S obzirom na strukturu proteina i na njihovu stabilnost te interakcije između jedne vrste proteina, različitih vrsta proteina, DNA ili materijala koji se upotrebljavaju za pročišćavanje proteina, moramo razumjeti sile između molekula i kako njihova jakost varira s promjenom uvjeta kao što su temperatura, pH i ionska jakost otopine. Najvažnije sile između atoma i molekula s obzirom na protein su vodikove veze, hidrofobne interakcije, disulfidne veze te ionske interakcije.[4]

4.1. Vodikove veze

Vodikove veze nastaju dijeljenjem protona između proton donora (NH i OH skupine) i proton akceptora (OC i N). S obzirom na geometriju, vodikove veze su linearne i udaljenost između proton donora i proton akceptora je 2,6 i 3,1 Å[7]. Vodikove veze su jake pri nižim temperaturama, a s povišenjem temperature slabe.[4]

4.2. Hidrofobne interakcije

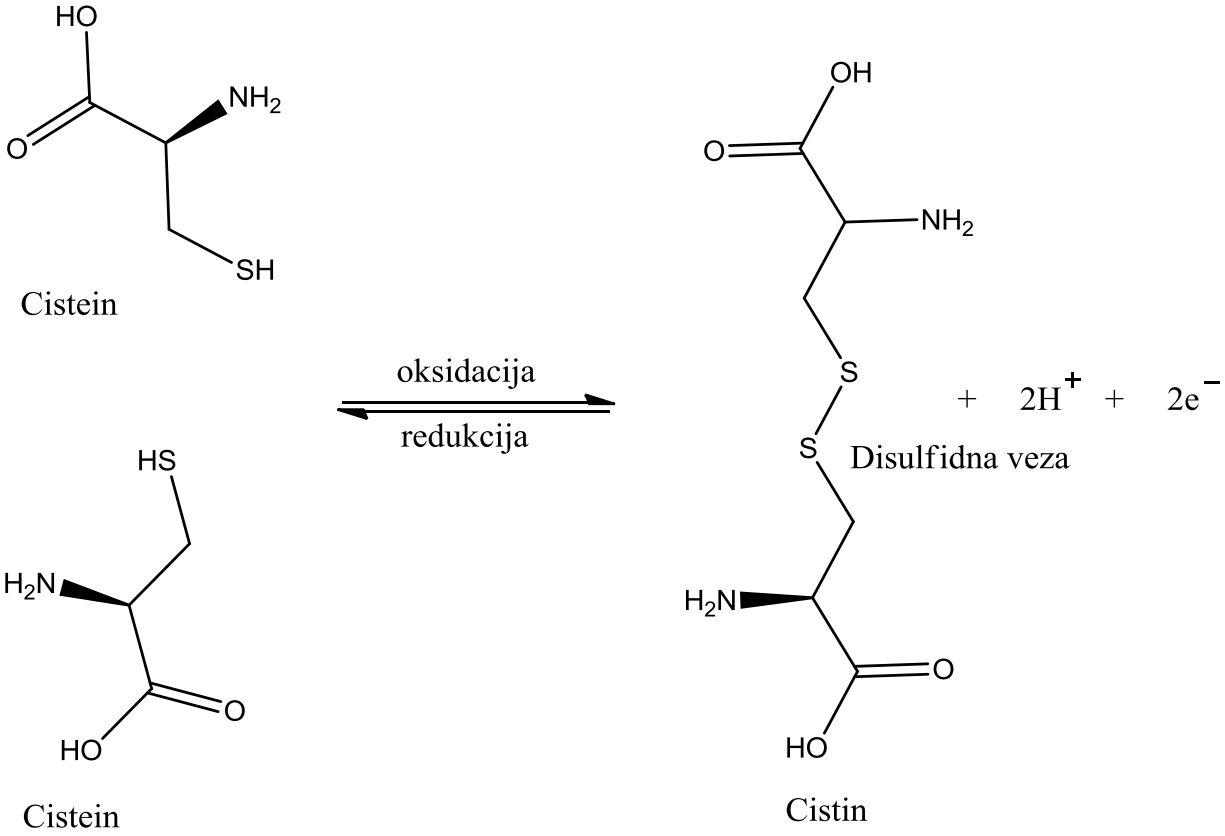
Nepolarni ostatci aminokiselina (izoleucin, leucin, valin, fenilalanin i triptofan) ne mogu tvoriti vodikove veze s vodom. Kako bi se izbjegla voda (s obzirom da su hidrofobni), oni se međusobno vežu takozvanim hidrofobnim interakcijama i obično se nalaze u unutrašnjosti proteina. Hidrofobne interakcije su jake pri visokim temperaturama i pri visokoj koncentraciji soli.[4]

4.3. Disulfidne veze

Linearni polipeptidni lanci nekih proteina također se mogu međusobno povezati. Najčešće veze kojima se povezuju jesu disulfidne veze koje nastaju oksidacijom para cisteinskih ostataka. Jedinica koja nastane spajanjem dvaju cisteinskih ostataka naziva se

[7] Å (Angstrem ili Ångstrom) je mjerna jedinica za duljinu, iznosi 10^{-10} metara

cistinom. Izvanstanični proteini uglavnom imaju nekoliko disulfidnih veza, dok ih unutarstanični proteini nemaju.[2]



Slika 6. Nastanak disulfidne veze između dvaju cisteinskih ostataka. (ChemDraw)

4.4. Ionske interakcije

Ionske interakcije javljaju se između nabijenih molekula, odnosno iona. Suprotni naboji se međusobno privlače, dok se isti naboji međusobno odbijaju. Sila elektrostatskih interakcija dana je Coulombovim zakonom,

$$E = Z_A Z_B e^2 / D r_{AB},$$

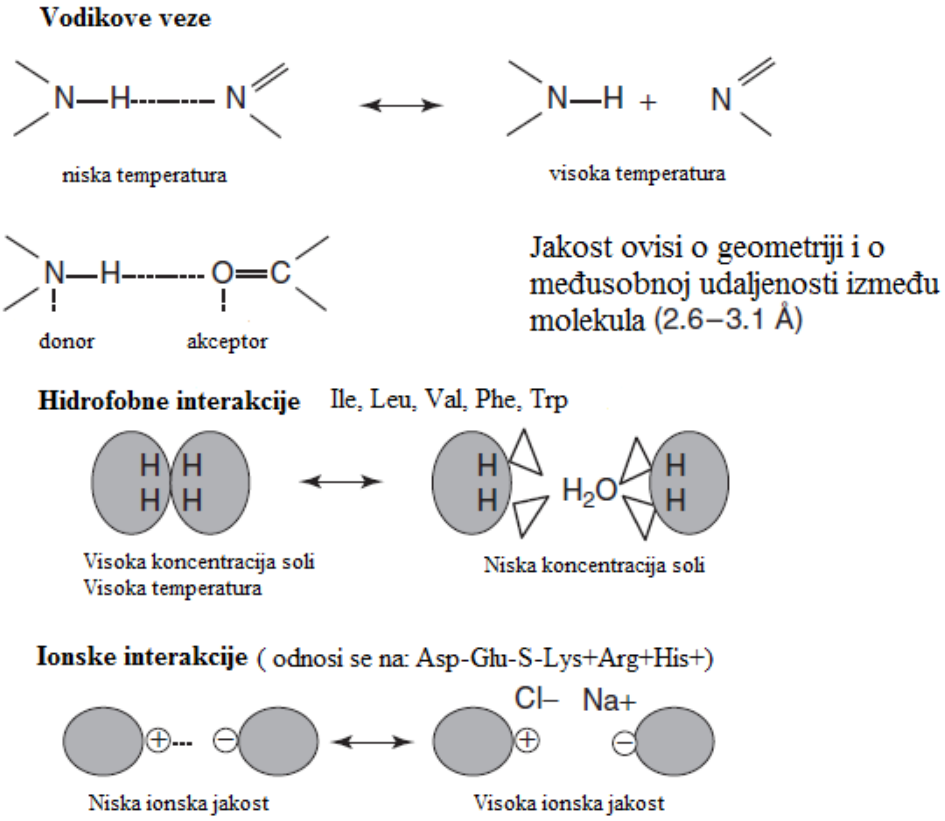
r_{AB} - udaljenost između naboja A i B,

Z_A i Z_B -nabojni brojevi,

e -elementarni naboj,

D -dielektrična konstanta otapala.

Jakost ionskih interakcija je obrnuto proporcionalna udaljenosti između naboja i dielektričnoj konstanti otapala. Ionske interakcije slabe kako se povećava ionska jakost otapala. pH otopine utječe na ionske interakcije budući da on određuje broj nabijenih aminokiselinskih ostataka.[4]



Slika 7. Vodikove veze, hidrofobne interakcije i ionske interakcije. [4]

4.5. Varijable koje utječu na molekularne sile

Na relativnu jakost gore navedenih sila mogu utjecati različiti uvjeti. To su primjerice temperatura, ionska jakost, dielektrična konstanta i pH, čije vrijednosti mogu varirati. U nekim slučajevima i tlak može biti jedna od varijabli.[4]

5. SVOJSTVA PROTEINA NA OSNOVU KOJIH SE MOGU PROČISTITI

Jedan protein može se pročistiti iz smjese tisuća proteina jer se kemijska i fizikalna svojstva razlikuju od proteina do proteina. Ta svojstva su posljedica različitog broja i sekvenci aminokiselina. Aminokiselinski ostatci vezani za okosnicu polipeptidnog lanca mogu biti pozitivno ili negativno nabijeni, neutralni i polarni ili neutralni i hidrofobni. Osim toga, polipeptidni se lanac smata u jasno definirane sekundarne strukture (α- uzvojnicu, β-listove i različite okrete i omče), dok tercijarna struktura ima jedinstvenu veličinu, oblik i raspodjelu aminokiselinskih ostataka na površini proteina. Zbog razlike u svojstvima između našeg proteina od interesa i drugih proteina u smjesi, može se dizajnirati racionalna serija koraka za frakcioniranje. Ta svojstva su veličina, oblik, naboj, izoelektrična točka, raspodjela naboja, hidrofobnost, topljivost, gustoća, vezanje liganda, metalna veza, reverzibilno udruživanje, posttranslacijske izmjene i specifične sekvence ili strukture.[4]

5.1. Veličina

Veličina proteina može varirati, od peptida od nekoliko aminokiselina do vrlo velikih proteina koji sadrže više od 10 000 aminokiselina. Proteini koji su dio kompleksa od više podjedinica mogu biti i puno veći. Proteini se često razdvajaju na osnovu veličine (odnosno polumjera) u postupku gel-filtracijske kromatografije.[4]

5.2. Oblik

Proteini mogu biti različitog oblika, od sfernog do sasvim asimetričnog. Oblik proteina utječe na njegovo kretanje kroz otopinu tijekom centrifugiranja, kroz pore na membranama, u kuglicama tijekom gel-filtracije ili kroz gelove u elektroforezi.

Promotrimo dva monomerna proteina od kojih je jedan sfernog oblika, a drugi štapićastog oblika. Tijekom centrifugiranja, sferni protein ima manji Stokesov radijus, a samim time i manje trenje tijekom sedimentacije kroz otopinu pa će se brže i taložiti. S druge strane, tijekom gel-filtracijske kromatografije, sferni protein s manjim Stokesovim radijusom će lakše ući u pore kuglica gela te će kasnije eluirati iz kolone nego štapićasti protein.[4]

5.3. Naboj

Neto-naboj proteina određen je sumom naboja pozitivno i negativno nabijenih aminokiselinskih ostataka. Ako se protein sastoji od asparaginskih i glutaminskih aminokiselinskih ostataka, pri pH=7 njegov ukupni naboj je negativan, pa se naziva kiseli protein. Ako se sastoji od lizinskih i argininskih aminokiselinskih ostataka, smatra se da je protein bazičan. Ravnoteža između nabijenih i nenabijenih skupina, a samim time i naboj proteina određuje se na osnovu pH otopine. Na osnovu neto-naboja proteini se mogu razdvojiti ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom.[4]

5.4. Izoelektrična točka

Izoelektrična točka je vrijednost pH pri kojoj je ukupan naboj proteina jednak 0 i određuje se na osnovu titracijske krivulje proteina. pI vrijednosti proteina su uglavnom u rasponu od 4 do 10.[4]

5.5. Raspodjela naboja

Nabijeni ostatci aminokiselina mogu se raspodijeliti ravnomjerno po površini proteina ili mogu biti grupirani tako da je jedan dio vrlo pozitivan, dok je drugi dio vrlo negativan. Tako neuobičajena raspodjela naboja također se može koristiti za razlikovanje proteina. Kao primjer imamo protein σ^{32} izoliran iz E.coli. Pri pH=7, protein ima negativan naboj od -46 i pozitivan naboj od +40, što znači da je ukupan neto-naboj -6. To znači da je protein u mogućnosti da se veže na obje kolone, i anionsku i kationsku, jer mu nabijeni ostatci nisu pravilno raspoređeni po površini. To svojstvo se može koristiti za pročišćavanje ovog proteina jer se većina proteina ne veže za obje vrste kolona u ionsko-izmjenjivačkoj kromatografiji.[4]

5.6. Hidrofobnost

Većina aminokiselinskih ostataka nalazi se u unutrašnjosti proteina, međutim neki se nalaze i na površini. Broj i prostorna raspodjela aminokiselinskih ostataka prisutnih na površini

proteina određuju njegovu sposobnost vezanja za hidrofobne materijale u kolonama (na primjer u kromatografiji hidrofobnih interakcija ili HIC) pa se stoga mogu iskoristiti za frakcioniranje. Općenito, proteinska smjesa se nanese na HIC kolonu pri visokoj koncentraciji soli (primjerice 1 mol/dm^3 amonijevovg sulfat) gdje su hidrofobne interakcije najjače, te se zatim eluiraju (ispiru) otopinom smanjene koncentracije soli.[4]

5.7. Topljivost

Proteini se značajno razlikuju prema topljivosti, od gotovo netopljivih (<10 µg/mL) do vrlo topljivih (>300 mg/mL) proteina. Ključne varijable koje utječu na topljivost proteina su pH, ionska jakost, priroda iona, temperatura i polarnost otapala. Proteini su gotovo netopljivi u svojoj izoelektričnoj točki. Obično se razdvajaju dodavanjem sve veće i veće koncentracije soli amonijevog sulfata. Općenito, topljivost danog proteina će se smanjivati oko 10 puta ako se zasićenost amonijevim sulfatom poveća za 6%. (760 g amonijevog sulfata doda se u 1 L vode kako bi se dobila 100% zasićena otopina, sto je otprilike 4,1 M otopina pri 20°C). Budući da je amonijev sulfat blaga sol i stabilizira protein, relativno je jeftina, čista i vrlo topljiva, to je najčešće upotrebljavani materijal koji se koristi za frakcioniranje proteina na osnovu topljivosti.[4]

5.8. Gustoća

Gustoća većine proteina je 1,3 i 1,4 g/cm^3 i općenito nije korisno svojstvo za razdvajanje proteina. Međutim proteini koji sadrže velike količine fosfata (na primjer fosfitin, gustoće 1,8 g/cm^3) ili skupina lipida (na primjer lipoproteini, gustoće 1,03 g/cm^3) se uglavnom razlikuju po gustoći u usporedbi s prosječnim proteinima pa se mogu odvojiti od skupine proteina primjenom postupaka razdvajanja baziranih na gustoći, primjerice centrifugiranjem gradijentom gustoće.[4]

5.9. Vezanje liganda

Mnogi enzimi (proteinske molekule) prilično čvrsto vežu supstrate, efektorske molekule, kofaktore ili sekvence DNA. Taj afinitet vezanja može se upotrijebiti za vezanje enzima na

kolonu na koju su imobilizirani odgovarajući ligandi i sekvence DNA. Kao primjer možemo uzeti transkripcijski faktor AP-1 koji se pročišćava vezanjem za određenu sekvencu DNA vezanoj za kolonu.[4]

5.10. Metalna veza

Mnogi enzimi vežu određene kelirane metalne ione (npr. Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, CO^{2+} i Ni^{2+}) vrlo čvrsto, obično interakcijama sa cisteinskim ili histidinskim aminokiselinskim ostatkom. To vezanje može se iskoristiti za vezanje enzima na kolonu na koju je učvršćen odgovarajući kelatni ion.[4]

5.11. Reverzibilno udruživanje

Pod određenim uvjetima otopine, neki enzimi agregiraju u obliku dimera, tetramera i slično. Na primjer, sposobnost RNA polimeraze iz E. coli da bude dimer (pod uvjetom 0,05 mol/dm^3 NaCl) i monomer (pod uvjetom 0,3 mol/dm^3 NaCl) može se iskoristit ako se frakcioniranje na temelju veličine provodi uzastopno pod tim dvjema različitim uvjetima.[4]

5.12. Posttranslacijske modifikacije

Nakon sinteze proteina, neki od njih se mogu modificirati dodatkom ugljikohidrata, acilnih skupina, fosfatnih skupina ili raznih drugih ostataka. U nekim slučajevima ove modifikacije mogu poslužiti za razdvajanje proteina. Na primjer, proteini koji sadrže ugljikohidrate na svojoj površini često mogu biti vezani za stupce koji sadrže biljne lektine, molekule koje imaju sposobnost čvrstog vezanja na određene skupine ugljikohidrata na glikoproteinima. Fosfoproteini će se u nekim slučajevima vezati za kelirani Fe^{2+} ion u stupcu.[4]

5.13. Specifične sekvence ili strukture

Precizno geometrijski postavljeni aminokiselinski ostatci na površini proteina mogu se upotrijebiti kao osnova za postupak razdvajanja proteina. Na primjer, može se dobiti specifično antitijelo koje prepoznaje samo određeni položaj na proteinu. Imunoafinitetna kolona može se pripraviti vezanjem monospecifičnog antitijela (koje se veže samo na protein od interesa) na smolu. Imunoafinitetna kromatografija (IAC) može rezultirati visoko selektivnim razdvajanjem i vrlo je učinkovit korak pročišćavanja. Protein od interesa može biti imobiliziran i korišten za specifično vezanje drugih proteina iz složenog kompleksa proteina. Taj proces se naziva afinitetna kromatografija.[4]

6. RAZDVAJANJE PROTEINA

6.1. Razdvajanje na osnovu topljivosti

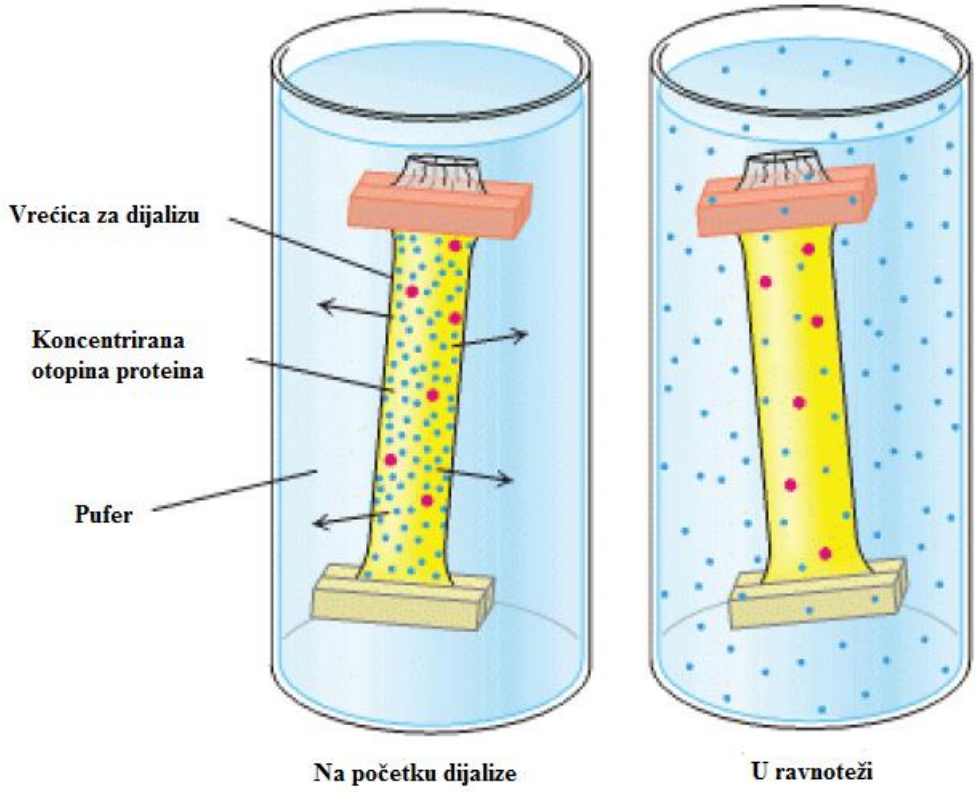
Topljivost hidrofilnih proteina ovisi o njihovom naboju i vodikovim vezama s molekulama vode. U izoelektričnoj točki proteina, njegov neto naboj je 0, pa ga je lako agregirati i nakon toga istaložiti, a sama metoda se naziva izoelektrično taloženje. Ukoliko ne znamo pI, (izoelektričnu točku proteina), visoka koncentracija neke soli može istaložiti protein tako što će uništiti vodikovu vezu između samog proteina i molekule vode. Takva metoda razdvajanja naziva se isoljavanje. Zbog svoje ionske jakosti, najčešće upotrebljavana sol je amonijev sulfat. Iz sirovog ekstrakta, proteini se mogu razdijeliti i u nekoliko frakcija, postupnim dodavanjem soli. Protein koji se istaloži može se ponovno otopiti i upotrijebiti za daljnje analize, a za neke proteine potrebna je kombinacija obiju metoda kako bi se istaložili.[1]

6.2. Razdvajanje na osnovu veličine i gustoće

Najčešće tehnike razdvajanja koje se temelje na ovim svojstvima su centrifugiranje, dijaliza i filtracija. Centrifugiranje pri velikim brzinama (od 10 000-20 000g) se najčešće koristi kako bi se uklonio stanični debris i velike organele iz sirovog ekstrakta proteina, koji će se nakon centrifugiranja istaložiti, a naš željeni protein topiv u vodi će ostati u supernatantu. Supernatant se onda dalje koristi u drugim koracima pročišćavanja. Kako bismo saznali točno mjesto gdje se nalazi naš protein u stanici, razaranje same stanice treba se odvijati polagano kako bi stanične komponente i organele ostale netaknute. Tako dobivene stanične organele i strukture se zatim dalje frakcioniraju postupkom razlikovnog centrifugiranja. Postupkom razlikovnog centrifugiranja, stanice se odvajaju u frakcije na osnovu njihove veličine i to postupnim povećavanjem centrifugalne sile. Centrifugiranje gradijentom gustoće se koristi za razdvajanje agregiranih proteina na osnovu njihove gustoće. Za gradijent gustoće mogu se upotrijebiti različiti materijali, poput recimo saharoze. Jednako tako, gradijent gustoće može se i sam formirati tijekom samog procesa razdvajanja. Ovakvom metodom, uzorak je sloj koji se nalazi pri vrhu cijevi i otprilike je odgovarajuće koncentracije cezijeva klorida, koji pri jakoj centrifugalnoj sili migrira na dno cijevi. Gradijent gustoće se tako sam formira

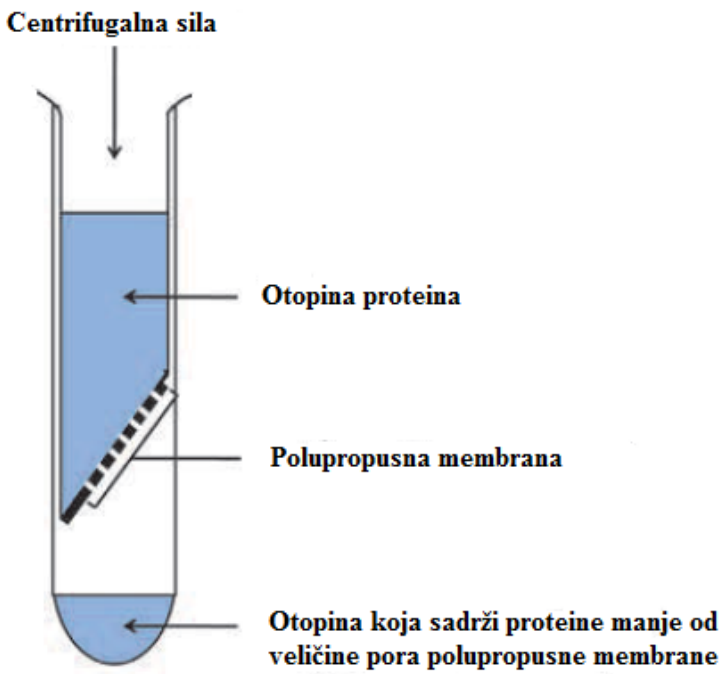
koncentracijskim gradijentom cezijeva klorida. Jednako kao i s cezijevim kloridom, gradijent gustoće se spontano stvara i centrifugiranjem uz pomoć Percolla (čestice silicija obložene polimerom).[1]

Jednako učinkovita i široko primjenjivana metoda razdvajanja je dijaliza *(Slika 8)*. Dijaliza je sama po sebi jednostavna metoda, međutim za nju treba vremena, jer razdvajanje ovisi o difuziji. Uzorak se postavi u vrećicu za dijalizu, koja sadrži polupropusnu membranu, na primjer celuloznu membranu s porama. Molekule koje imaju puno veće dimenzije od promjera pora celulozne membrane ostaju s unutarnje strane vrećice za dijalizu, dok manje molekule i ioni prolaze kroz membranu i nakupljaju se u puferu izvan vrećice. Uzmimo za primjer komercijalno dostupnu cijev za dijalizu, u kojoj samo molekule koje su manje od 10kDa odlaze iz uzorka u okolni medij. S obzirom na to, ova se tehnika često koristi za uklanjanje soli iz otopine proteina, a upotrebljava se i za koncentriranje otopine proteina. Molekule vode se uklanjaju iz unutrašnjosti vrećice za dijalizu korištenjem hidrofilnog polimera kao što je polietilen glikol.[1]



Slika 8. Proces dijalize. Proteinske molekule, označene crvenom bojom, ostaju unutar vrećice za dijalizu, dok manje molekule, označene plavom bojom, difundiraju u okolni medij.**[2]**

Proces molekularne filtracije *(Slika 9.)*, odnosno ultrafiltracije, sličan je kao i proces dijalize. Za frakcioniranje proteina koristi se membrana sa specifičnom veličinom pora, a pri velikom tlaku ili centrifugalnoj sili, samo će molekule manje od pora proći kroz membranu. Postoje različite veličine pora na membranama, one najveće mogu razdvojiti molekule čija je masa gotovo 100kDa. Tako se proteini iz sirovog uzorka mogu razdvojiti u različitim rasponima molekularnih masa uz pomoć membrana s različitim veličinama pora.[1]



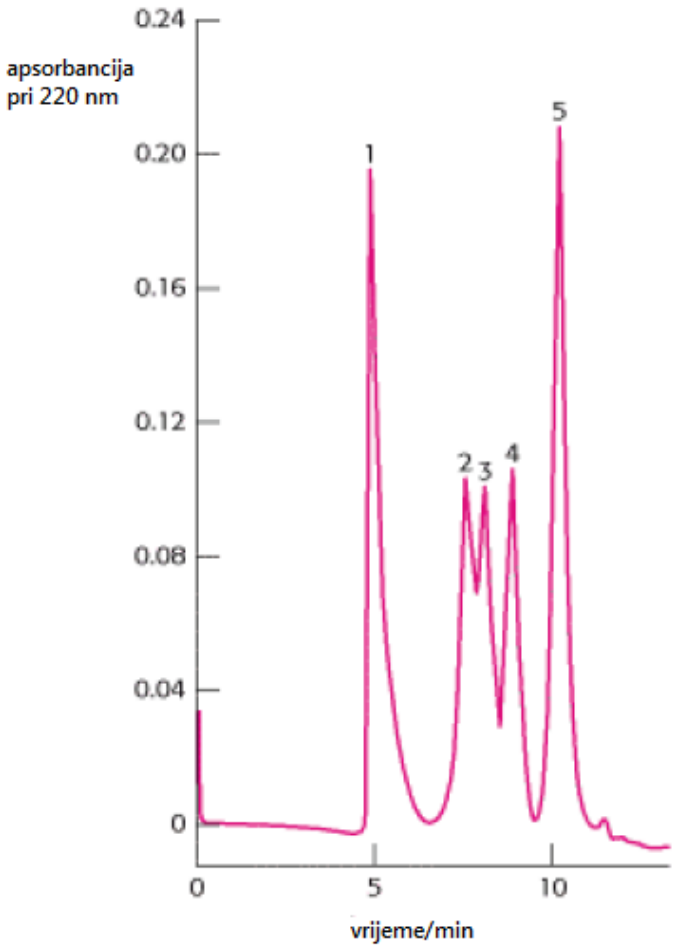
Slika 9. Molekularna filtracija. [1]

7. KROMATOGRAFSKE METODE RAZDVAJANJA

Najkorisnija metoda za detekciju i pročišćavanje proteina je kromatografija. Zapravo osnovni princip kromatografije je raspodjela molekula između dvije različite faze, mobilne i stacionarne faze. Kromatografske tehnike također možemo rasporediti s obzirom na fizikalna svojstva mobilne faze, prirodu stacionarne ili mobilne faze te mehanizam odjeljivanja kromatografskog sustava. Zato se svaka metoda popularno zove po nekoj od svojih specifičnosti. Recimo, kromatografija na papiru se tako naziva zbog materijala koji se koristi kao stacionarna faza (papir), tankoslojna kromatografija (TLC) i kromatografija na koloni (stupcu) se tako nazivaju zbog oblika svoje stacionarne faze, i slično. Stacionarna faza plinsko-tekućinske kromatografije je tekućina, dok je mobilna faza plin. Zbog svog mehanizma na osnovu kojeg se molekule razdvajaju, kromatografiju možemo razvrstati kao adsorpcijsku kromatografiju, kromatografiju razdjeljivanja, kromatografiju molekularnog isključivanja, ionsko-izmjenjivačku kromatografiju i afinitetnu kromatografiju. Za pročišćavanje proteina najviše se koristi kromatografija na koloni (stupcu).[1]

7.1. KROMATOGRAFIJA NA KOLONI (STUPCU)

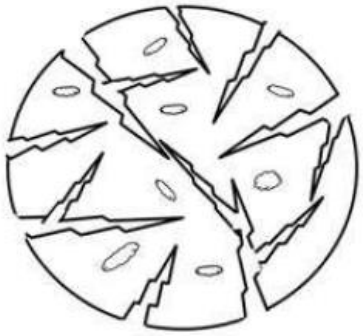
Kromatografija na koloni odnosno stupcu provodi se pod niskim tlakom. Sama mobilna faza protječe kroz stacionarnu fazu zbog gravitacije ili potaknuta niskotlačnim pumpama. Zbog toga se još naziva niskotlačna tekućinska kromatografija (LPLC). Visokotlačna tekućinska kromatografija, odnosno (HPLC) je naprednija nego kromatografija na koloni zbog toga što se koriste visokotlačne pumpe kao stacionarna faza koje poboljšavaju razdvajanje te smanjuju vremenski okvir rada. Za pročišćavanje i detekciju bioloških molekula ova je kromatografska metoda vrlo popularna i učinkovita. Neke druge kromatografske tehnike koje se također koriste su tekućinska kromatografija brzih proteina (FPLC), kapilarna kromatografija, tekuća kromatografija reverzne faze i ostale. FPLC kromatografija je slična HPLC, samo što je tlak kod FPLC nešto manji. Navedene metode se često koriste za razdvajanje proteina upravo na osnovi njihove veličine, naboja ili afiniteta vezanja. Odijeljeni proteini eluiraju iz kolone i mogu se vidjeti kao pikovi apsorpcijskom spektrometrijom odnosno spektrofluorometrijom.[1]



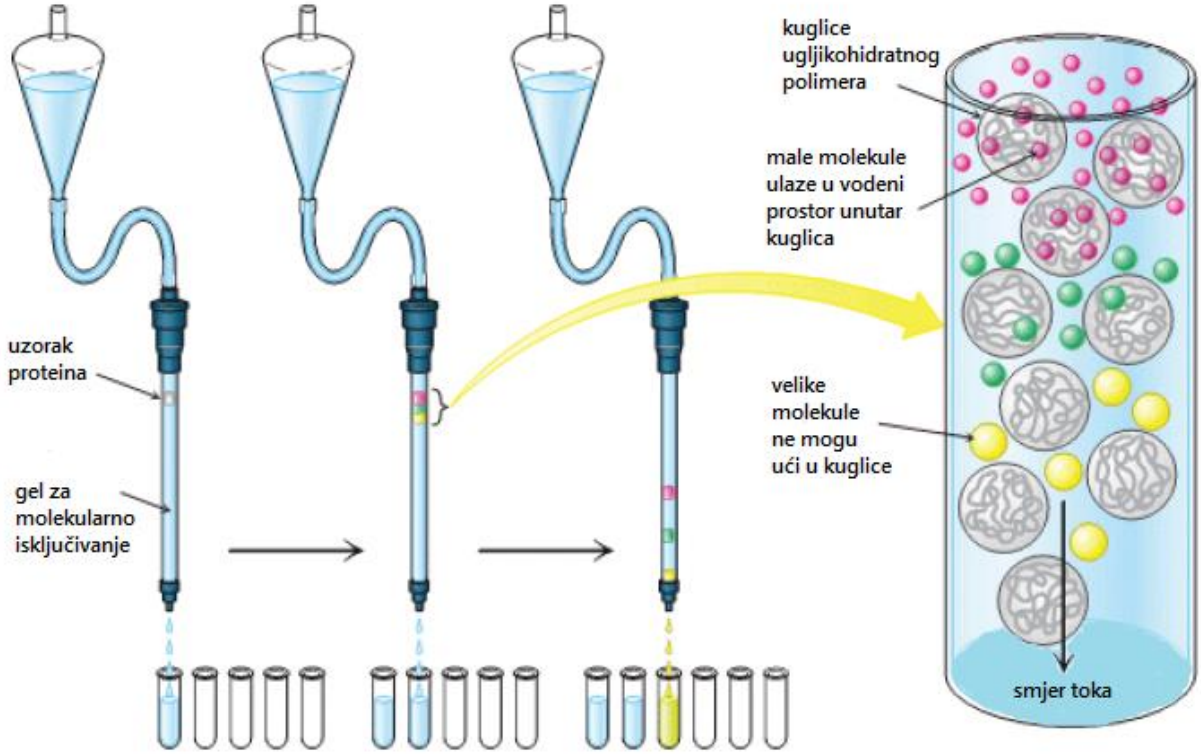
Slika 10. Visokotlačna tekućinska kromatografija, HPLC, zbog svoje velike moći razdjeljivanja jasno određuje pojedine proteine. 1. Tiroglobulin (669 kDa), 2. Katalaza (232 kDa), 3. Serumski albumin goveda (67 kDa), 4. Ovalbumin (43 kDa) i 5. Ribonukleaza (13,4 kDa).**[2]**

7.2. KROMATOGRAFIJA MOLEKULARNOG ISKLJUČIVANJA (GEL-FILTRACIJSKA KROMATOGRAFIJA)

Jedan od naziva ove kromatografske metode je gel-filtracijska kromatografija, a bazira se također na veličini molekula. Ova kromatografska metoda je najbolji izbor za analizu proteina s obzirom na to da nakon pročišćavanja izvorna struktura i funkcija proteina ostaju očuvane, a da bi se dobili odgovarajući uvjeti za protein može se koristiti široki spektar pufera. Stacionarna faza ove kromatografske tehnike je najčešće sadrži porozne hidrofilne kuglice izgrađene od agaroze, dekstrana, poliakrilamida ili nekih njihovih derivata *(Slika 11*). Za HPLC i FPLC se za stacionarnu fazu koriste kuglice načinjene od čvršćih materijala kao što su umreženi dekstran i polistiren, a mogu se koristiti i za odvajanje nekih hidrofobnih tvari u prisustvu organskih otapala. Metoda se temelji na difuziji molekula u porozne šupljine kuglica. Veće molekule neće moći ući u kuglice, dok će one manje to moći. S obzirom na to da pore u kuglicama nisu jednake veličine, proteini će se razdvojiti na osnovu njihove molekulske mase. Veće molekule će proći brže kroz kolonu nego manje molekule, zbog toga što im je na raspolaganju puno manji volumen *(Slika12.)*.[1]



Slika 11. Pore hidrofilnog gela. [1]

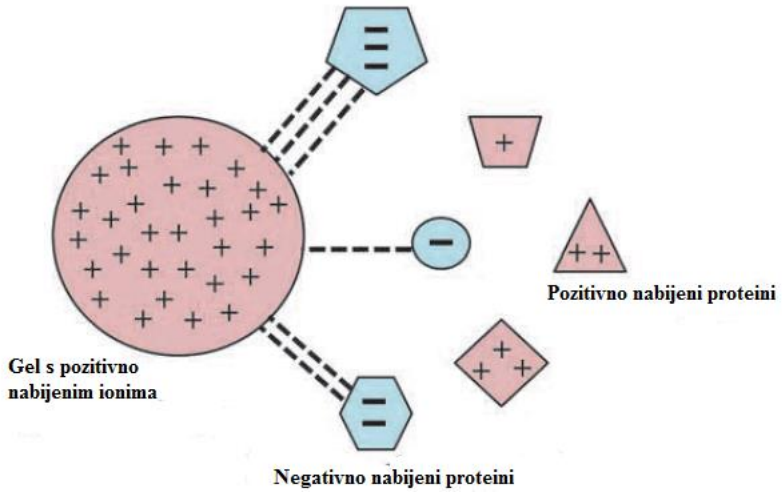


Slika 12. Kromatografija isključivanjem ili gel-filtracijska kromatografija. Smjesa proteina se nanosi u malom volumenu na stupac koji je napunjen poroznim kuglicama. S obzirom na to da veliki proteini ne mogu ući u unutrašnjost poroznih kuglica, izlaze iz stupca prije malih proteina.**[2]**

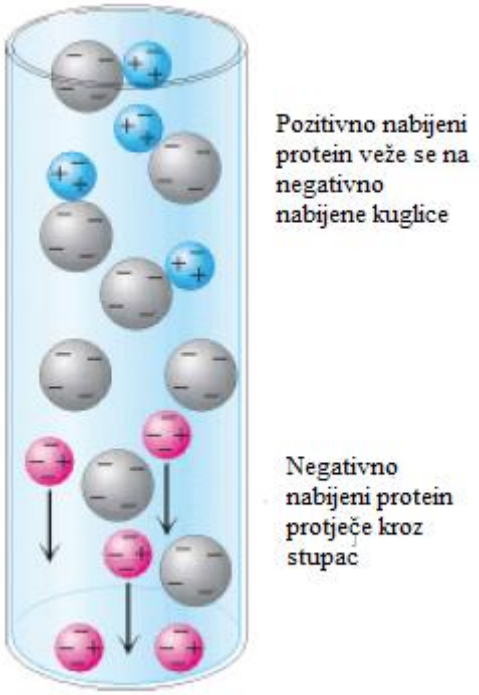
Ova se metoda također može koristiti i za procjenjivanje molekularne mase samih proteina. Skup odgovarajućih proteina poznate molekulske mase odvoje se na isti način kao i smjesa proteina kojima treba odrediti masu. Broj frakcija, odnosno eluacijski volumeni se zatim prikažu grafički sa logaritmom molekulskih masa standardnih proteina, a krivulja koju dobijemo crtanjem se koristi za procjenu molekulskih masa pročišćenih proteina. Kako bismo dobili što bolji rezultat također treba obratiti pozornost i na odabir samih poroznih kuglica.[1]

7.3. IONSKO-IZMJENJIVAČKA KROMATOGAFIJA

Za razliku od kromatografije molekularnog isključivanja, ova kromatografska metoda temelji se na odvajanju proteina na osnovu njihovog neto naboja. Razlikujemo dva tipa: anionsko-izmjenjivačka kromatografija te kationsko-izmjenjivačka kromatografija. Materijal koji se nalazi u koloni naziva se ionski izmjenjivač, koji također može biti anionski ili kationski. Anionski izmjenjivači sadrže pozitivno nabijene skupine, dok kationski imaju negativne skupine. Kationsko-izmjenjivačka kromatografija sastoji se od kationskog izmjenjivača i koristi se za odvajanje pozitivno nabijenih proteina *(Slika 13.)*. Anionska se prema tome koristi za odvajanje negativno nabijenih proteina *(Slika 14.)*. Razlikujemo puno vrsta ionskih izmjenjivača. Za LPLC se upotrebljavaju celuloza, agaroza, dekstran te polistiren, a polistiren, polieteri te silika su dovoljno jaki pa se koriste za HPLC. Matriks se kemijski modificira tako da sadrži ionske skupine koje su slabo kisele, jako kisele, slabo bazične ili jako bazične. Matriks sa slabo kiselom skupinom (kationski izmjenjivač) ili slabo bazičnom skupinom (anionski izmjenjivač) pogodan je za razdvajanje i pročišćavanje većine proteina. Izbor samog izmjenjivača ovisi o rasponu pH u kojem je protein stabilan te pI vrijednosti izmjenjivača. Proteini s malom gustoćom s neto-pozitivnim nabojem pojavit će se prvi u eluatu, a potom oni s većom gustoćom naboja.[1]



Slika 13. Shematski prikaz kationsko-izmjenjivačke kromatografije. Proteini se odjeljuju na osnovu svog neto-naboja. **[1]**



Slika 14. Anionsko-izmjenjivačka kromatografija. Proteini se odjeljuju na osnovu svog neto-naboja.**[2]**

Pozitivno nabijeni proteini (tzv. kationski proteini) mogu se odijeliti kromatografijom na negativno nabijenim kolonama karboksimetilceluloze, CM-celuloza, dok se negativno nabijeni proteini (tzv. anionski proteini) odjeljuju na stupcima pozitivno nabijene dietilaminoetilceluloze, DEAE-celuloza, *(Slika 15.)*. Čimbenici koji utječu na to hoće li odvajanje biti uspješno su upravo pH i ionska jakost eluacijskog pufera.[1]



Slika 15. CM i DEAE celuloza. [2]

7.4. AFINITETNA KROMATOGRAFIJA

Afinitetna kromatografija je također učinkovita metoda odjeljivanja, međutim materijal koji se koristi kao stacionarna faza je skup. Razdvajanje molekula temelji se na vezanju makromolekula s makromolekulama ili makromolekula s ligandima male molekulske mase, a vezivanje je specifično za određenu molekulu ili grupu molekula. Na primjer, monoklonalna antitijela vežu se samo za njihov antigen, dok se avidin može vezati na bilo koji protein sa biotionom. Biljni protein konkanavalin A može se pročistiti propuštanjem sirovog proteinskog ekstrakta kroz stupac kuglica na koje su kovalentno vezani ostatci glukoze. Konkanavalin A se veže za stupac jer ima veliki afinitet prema glukozi, dok ga drugi proteini nemaju. Tako vezani protein može se otpustiti sa stupca dodavanjem koncentrirane otopine glukoze. Glukoza iz otopine zamjenjuje glukozne ostatke vezane za stupac u veznom mjestu konkanavalina A.[2]

Afinitetna kromatografija je korisna metoda za izolaciju transkripcijskih faktora, proteina koji reguliraju ekspresiju gena vežući se za specifične sekvence DNA. Smjesa proteina se polako propušta kroz stupac koji sadržava vezane određene sekvence DNA. Proteini koji imaju jak afinitet za upravo te sekvence DNA vezat će se i ostati na stupcu. U tom slučaju transkripcijski se faktori otpuštaju ispiranjem s otopinom koja sadržava veliku koncentraciju soli. Afinitetna se kromatografija može upotrebljavati za izolaciju proteina koji prepoznaju molekulu X na sljedeće načine:

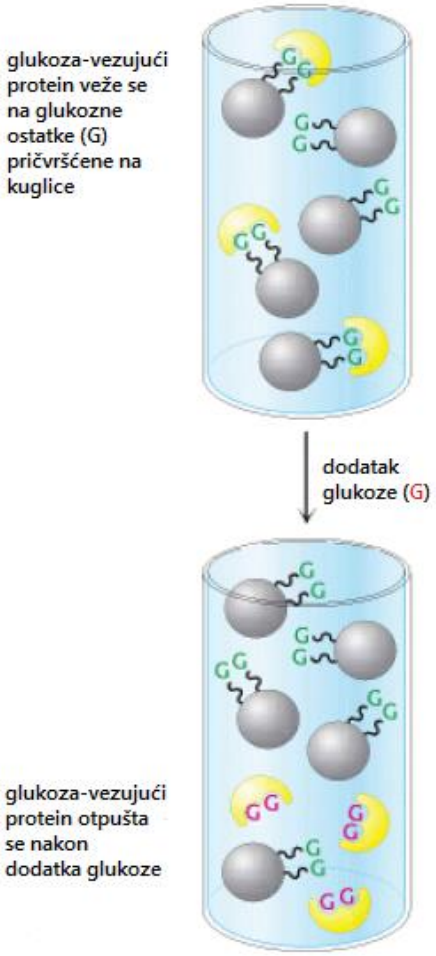
1. X ili njezin derivat kovalentno se veže za stupac;

2. dodaje se smjesa proteina na taj stupac, koja se potom ispire puferom da bi se odstranili nevezani proteini;

3. vezani se protein eluira (ispire) velikom koncentracijom topljivog oblika X ili promjenom uvjeta koji smanjuju afinitet vezanja.

Afinitetna kromatografija je najučinkovitija kada je interakcija između proteina i molekule koja se upotrebljava kao mamac visoko specifična. Također, proces afinitetne kromatografije može se i obrnuti kako bi se izolirali proteini koje eksprimiraju klonirani geni. U ovom se slučaju modificira gen koji kodira protein, tako da kodira i dodatne aminokiseline. Kada se one eksprimiraju zajedno s proučavanim proteinom, služe kao afinitetni privjesak koji se lako može

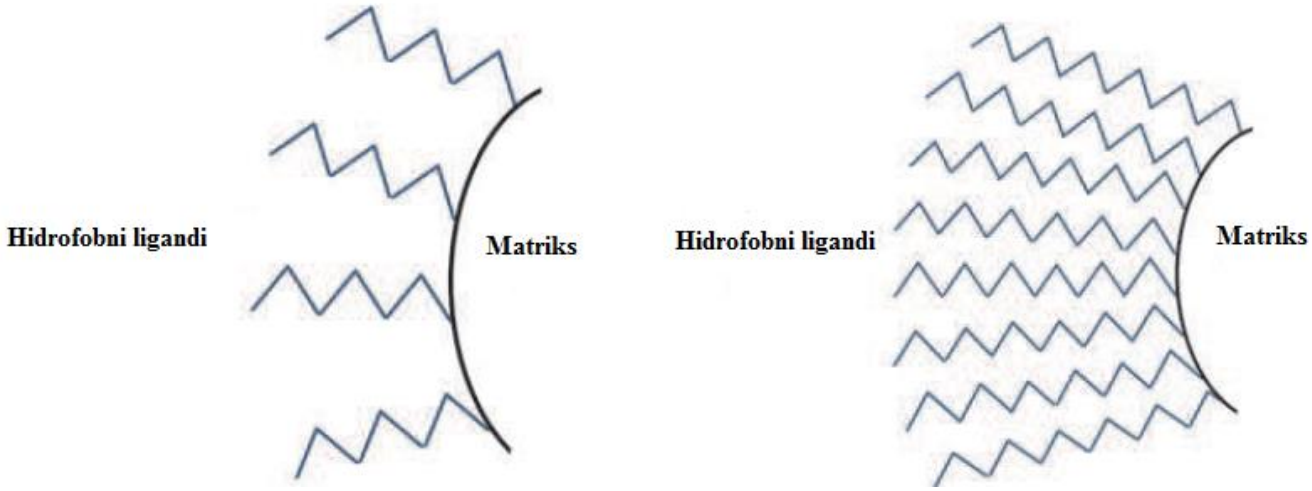
uloviti. Na primjer niz histidinskih ostataka (nazivaju se His-privjeskom) može se dodati na amino-kraj ili karboksilni kraj eksprimiranog proteina. Proteini s privjeskom tada se propuštaju kroz stupac kuglica na koje je kovalentno vezan, odnosno imobiliziran nikal(II) ion ili neki drugi ion metala. His-privjesak čvrsto se veže na imobilizirane ione metala te veže željezni protein, dok drugi proteini protječu kroz stupac. Protein se potom eluira sa stupca dodatkom imidazola ili drugih kemikalija koje se vežu za ione metala i izmještaju protein. [2]



Slika 16. Afinitetna kromatografija. Prikaz afinitetne kromatografije konkavalina A, prikazanog žuto, na čvrstoj podlozi koja sadržava kovalentno vezane ostatke gukoze, označeno G. **[2]**

7.5. KROMATOGRAFIJA HIDROFOBNIH INTERAKCIJA

Ova kromatografska metoda razdvaja proteine na osnovu njihove hidrofobnosti, jednako kao i tekućinska kromatografija reverzne faze (RPLC). Stacionarna faza kod obiju metoda su hidrofobni ligandi vezani na matriks. Hidrofobnost te broj vezanih liganda u kromatografiji hidrofobnih interakcija (HIC) je manja nego onih u RPLC, pa se tako HIC smatra slabijom nego RPLC. Tekućinska kromatografija reverzne faze se koristi za odvajanje peptida i molekula manjih molekulskih masa koji su stabilni u vodeno-organskim otapalima. Kromatografija hidrofobnih interakcija je pogodna za pročišćavanje proteina jer koristi manje ekstremne uvijete za eluiranje adsorbiranih proteina. Hidrofobni ligandi koji se koriste u HIC su uglavnom alkilne (etil-oktil), fenilne ili poliamidne skupine, dok je matriks umrežena agaroza ili silika. Općenito, za postupak kromatografije hidrofobnih interakcija uzorak se nanosi na kolonu koja je uravnotežena sa mobilnom fazom relativno visoke koncentracije soli. Adsorbrani se proteini zatim eluiraju iz kolone otapalom smanjene koncentracije soli. HIC se koristi za odvajanje proteina nakon isoljavanja ili kromatografije izmjenjivanjem, s obzirom na to da su se proteini već otapali u otopini s visokom koncentracijom soli.[1]



Slika 15. Shematski prikaz stacionarnih faza kromatografije hidrofobnih interakcija (a) i tekućinske kromatografije reverzne faze (b). [1]

Koji kromatografski postupak upotrijebiti za pročišćavanje određenog proteina? Ionsko-izmjenjivačka kromatografija je obično prva od kromatografskih tehnika koju treba napraviti kako bi se uklonili neželjeni proteini, budući da je matriks relativno jeftin i ima veliki kapacitet vezanja. Kromatografija molekularnog isključivanja se obično koristi nakon ionsko-izmjenjivačke kromatografije. Međutim, redoslijed ne mora uvijek biti takav. Pročišćavanje proteina iz sirovog ekstrakta u jednom koraku može biti učinkovito primjenom afinitetne kromatografije. Gel-filtracijska kromatografija i ionsko-izmjenjivačka kromatografija ponekad se koriste zajedno sa afinitetnom kromatografijom.[1]

8. ANALIZA PROČIŠĆENOG PROTEINA

Nakon svakog koraka pročišćavanja potrebno je odrediti specifičnu aktivnost proteina, odnosno napraviti analizu elektroforezom. Općenito, elektroforeza je najčešće korištena metoda za određivanje čistoće proteina, a katkad je potrebna i za sam postupak pročišćavanja. Bazira se na migraciji nabijenih proteina u električnom polju. Najčešće korišteni tipovi elektroforeze su poliakrilamidna gel-elektroforeza (PAGE), natrij-dodecil-sulfat-poliakrilamidna gel-elektroforeza (SDS-PAGE), te izoelektrično fokusiranje (IEF). SDS-elektroforeza se često koristi za procjenu čistoće i molekularne mase proteina, zbog toga što je reproducibilna i relativno jeftina. Natrijev dodecil sulfat se u sustavu veže za većinu proteina koji su približno proporcionalne molekulske mase. Tako svaki protein ima sličan omjer naboja i masa i migrira proporcionalno svojoj masi. Parametri koji se najčešće mjere nakon procesa pročišćavanja jesu količina proteina koja je ostala nakon procesa, ukupna enzimska aktivnost, specifična aktivnost proteina, iskorištenje, te razina pročišćenosti koja se dobije dijeljenjem specifične aktivnosti izračunate nakon pročišćavanja sa specifičnom aktivnosti početnog ekstrakta.[1]

9. ZAKLJUČAK

Da bismo nekom proteinu odredili slijed aminokiselina, odnosno njegovu strukturu i funkciju, potrebno ga je izolirati iz stanice te pročistiti. Proces pročišćavanja proteina može varirati od jednostavnih postupaka u jednom koraku do velikog broja različitih postupaka u nekoliko koraka. Često je potrebno više od jednog koraka pročišćavanja kako bi se postigao željeni stupanj čistoće. Ključ za uspješno i učinkovito pročišćavanje proteina je odabrati najprikladnije tehnike i optimizirati njihovu izvedbu tako da odgovaraju zahtjevima te kombiniranje samih tehnika na logičan način kako bi se povećao prinos i smanjio broj potrebnih koraka. Većina shema za pročišćavanje uključuje neki oblik kromatografije. Kao rezultat toga, kromatografija je postala bitan alat u svakom laboratoriju u kojem je potrebno pročišćavanje proteina. Različite kromatografske tehnike sa različitom selektivnošću mogu se kombinirati i koristiti za pročišćavanje bilo koje biomolekule, ne samo proteina. Razvoj tehnike rekombinantne DNA unaprijedilo je proizvodnju proteina u velikim količinama. Rekombinantni proteini često su proizvedeni u oblicima koji olakšavaju njihovo kasnije kromatografsko pročišćavanje. Iako se za pročišćavanje može uzeti u obzir veliki broj parametara, s nekoliko jednostavnih smjernica proces se može lako i jednostavno izvesti, uz samo osnovno poznavanje detalja o kromatografskim tehnikama.

10. LITERATURA:

[1] Nison Sattayasai (2012). Protein Purification, Chemical Biology, Prof. Deniz Ekinci (Ed.), ISBN:978-953-51-0049-2

[2] Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (5th ed.), pp. 79-91, ISBN 0-7167- 4684-0, W.H. Freeman and Company, New York

[3] Protein purification, Hanbook, Amersham

[4] Burgess, R.R. (1987) Protein Purification, in *Protein Engineering* (eds D. Oxender and C.F. Fox), A.R. Liss, New York

[5] Program ChemDraw Ultra

[6] www.kemija.unios.hr/wp-content/uploads/nastavni-materijali/ak1/P9_puferi (10.09.2017.)

[7] https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/protein-purification-and-analysis/ (10.09.2017.)