

### [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].**

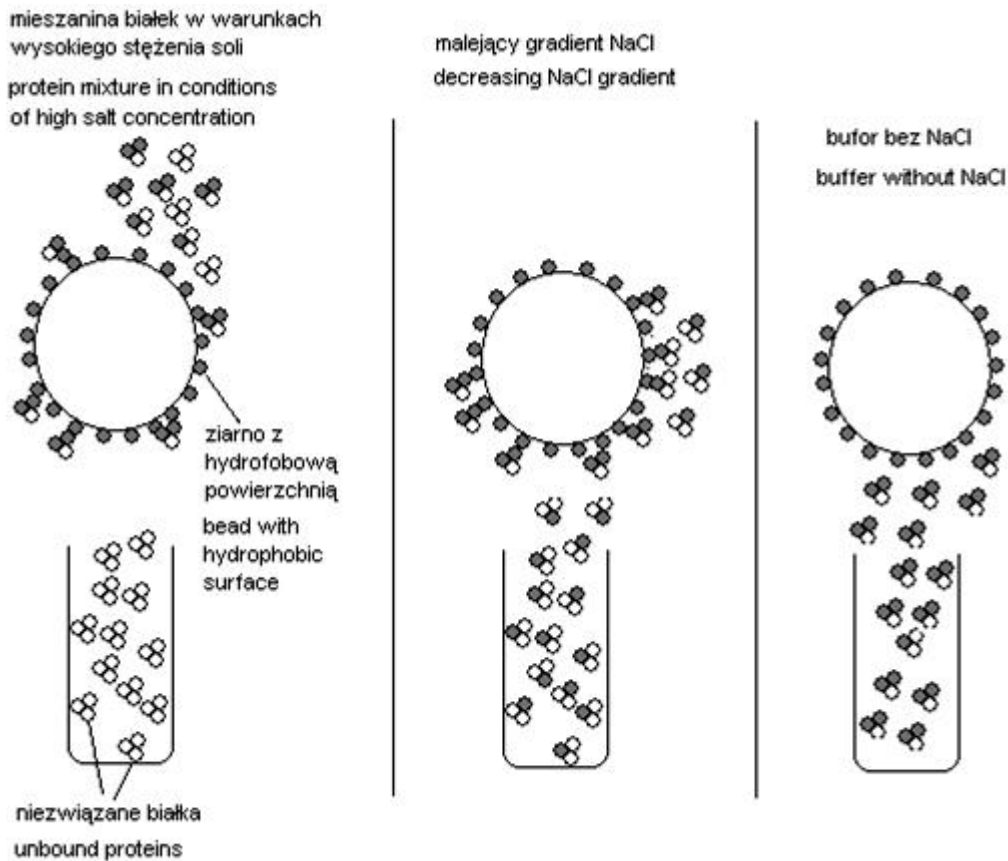
**Słowa kluczowe:** Chromatografia oddziaływań hydrofobowych, rozdział chromatograficzny, HIC, ligandy, złoże Phenyl Sepharose,  $\alpha$ -laktoalbumina,  $\beta$ -laktoglobulina, złoże Phenyl Sepharose 6FF

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 bufor 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 HIC, [7]

### Zalety HIC:

- w technice gradientowej objętość próbki nanoszona na kolumnę może być wielokrotnie większa od objętości kolumny, a stężenie separowanych substancji może być bardzo niskie;
- HIC pozwala na wielokrotne załadowanie 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].

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

### Rozdzielanie $\alpha$ -laktoalbuminy i $\beta$ -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  $\alpha$ -laktoalbumina i  $\beta$ -laktoglobulina, mają zdolność do wiązania jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Obecność jonów miedzi powoduje, że  $\alpha$ -laktoalbumina jest mniej hydrofobowa niż w środowisku ubogim w te jony. Właściwości hydrofobowe  $\beta$ -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  $\alpha$ -laktoalbumina wiąże się ze złożem, podczas gdy  $\beta$ -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  $\mu\text{l}$  (2 mg/ml)  $\alpha$ -laktoalbuminy z 500  $\mu\text{l}$   $\beta$ -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-  $\text{CaCl}_2$  (ciągle zbierając wypływające z kolumny 2-ml frakcje i oznaczając w nich spektrofotometrycznie zawartość białka).

W powyższych warunkach  $\beta$ -laktoglobulina powinna opuścić kolumnę bez oddziaływania z nią, i znaleźć się we frakcjach o numerach 2 i 3.  $\alpha$ -laktoalbumina powinna być wyeluowana w momencie, kiedy EDTA zostanie usunięte z kolumny, a jego miejsce zajmą jony  $\text{Ca}^{2+}$  (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. Szepesy).**

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

$\alpha$ -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](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](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](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:** [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedzin na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#) [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedzin na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#) [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedzin na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#) [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedzin na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#)

## **Partnerzy**