

# 1. BLOKEA: PROTEINEN PURIFIKAZIOA

Proteina baten funtzioa zein eta zelan betetzen duen jakiteko bere egitura tridimentsionala ezagutu behar da: loturak, gune aktiboa... ezagutzeko eta proteinaren funtzioa benetan ezagutzeko. Kontaminanteak edo beste proteina motak kendu behar dira bera bakarrik egoteko, horrela gero kristalografia egitean bere egitura egokia lortuko da, adibidez.

Helburutzat erreakzio entzimatikoa bat jarri eta hori katalizatzen duen entzima purifikatu behar da. Gaur egun oso erraza da proteina baten sekuentzia jakitea genomak kodetuta dagoelako baina beharbada ez dakigu bere funtzioa. Gene batek kodetzen duen proteinak zer egiten duen jakin dezakegu edo ezezaguna izan daiteke.

*In vitro* egin daiteke gene bat klonazio-bektore batean jarri edo zelula batean sartuta (*in vivo*) horrela gene horri dagokion proteina sortuko da. Genea amplifikatu (PCR), espresio bektore baten jarri eta adibidez *E.coli*-n sartu daiteke, gure intereseko proteina lortuz, proteina birkonbinatua. Honek bi abantaila ditu: lehenik kantitate handiagoan lortzen dela proteina (berez jatorrizko proteina urria bada honen kantitate handiagoak lortuko ditugu) eta bigarrenaz DNA birkonbinatuaren teknologia erabiliz proteina markatu daiteke eta etiketa honi esker purifikazioa errazagoa izango da.

## Hasi aurretik

- Helburuak jarri: zer egin nahi duen proteinarekin.
- Informazioa bildu: proteinari buruzko informazioa bildu.
- Detekzio saioak prestatu: metodo bat pentsatu proteina detektatzeko, gure saiodian proteina dagoela egiaztatzeko.

**1. Helburuak jarri:** antigorputzak lortzeko, kristalak egiteko, proteinaren parametro zinetikoak kalkulatzeko adibidez. Antigorputzak molekula bereziak detektatzeko espezifikoak dira. Adibidez unxi bati beretzako arrotza den proteina ziztatu eta berak horren kontrako antigorputzak egingo ditu.

Purutasun-maila: helburuaren arabera maila desberdina.

Kantitatea: handia lortzea zailagoa da eta helburuaren arabera desberdina.

Jatorrizko konformazioa/aktibitate biologikoa: kasu batzuetan gure helburuagatik proteina aktiboa beharko dugu eta hau lortzea zailagoa da.

- Farmakoak egiteko bada oso purua eta aktiboa izan beharko da proteina eta hau da kasurik zailena.
- Kristalografia egiteko purutasun altua behar da eta kantitate nahiko altuak batzuetan behar dira proba asko egin behar baitira baldintza desberdinetan kristalifikatuz, kristal hoberena aukeratzeko. Gaur egun badaude robotak eta kantitate txikiagoekin lan egin daiteke ere.
- Antigorputzekin lan egiteko kontaminante gutxi behar da (%5) beraz gure proteinaren proportzio altua dago (%95), eta horrela unxiarentzako gure proteina izango da antigeno bakarra (ez ditu kontaminanteak detektatuko eta sortuko dituen antigorputzak gure proteinaren kontrakoak izango dira).
- Zinetika entzimatikorako purutasuna altua ez da izan behar baina kontaminanteek ez dute interferentziarik sortu behar gure saio entzimatiakoan. Kontaminanteak %5-10 izan daitezke eta proteinak, noski, aktibo egon behar dira.
- Sekuentziazioan %5-10eko kontaminanteak onartu daitezke. Kantitate txikia nahikoa da eta ez du zertan aktiboa izan behar, baina lotura peptidikoak mantentzea da garrantzizkoena.

**2. Informazioa bildu:** gure proteinari buruz dagoen informazioa bildu eta analizatu behar da. Ea purifikatuta dagoen eta horrela bada zein metodorekin purifikatu den ikusi behar da. Gainera, gerta daiteke zure proteinaren familiakoa den beste proteina baten informazioa egotea edota zure proteina aztertuta dagoela baina beste espezie batean.

Proteinaren egonkortasunari buruz informatu: temperatura, pH, gatz kontzentrazioa, kofaktoreen beharra, metal-ioiak, proteasak... Hainbat proba egin daitezke gure proteinaren aktibitatea mantentzen den ala ez jakiteko, hasierako erauzkinarekin, baldin eta gure proteinaren aktibitatea neurtzeko (edo detektatzeko) metodoa daukagun.

Purifikazio-urrats egokiak bilatzeko: proteinaren masa, karga, puntu isoelektrikoa, hidrofobizitatea, afinitatea (ligando konkretu batekin lotzeko gaitasuna duen ala ez) jakitea oso erabilgarria da. Nire proteinarekin inork ez badu lan egin proba desberdinak egingo dira metodo desberdinekin.

**3. Detekzio saioak prestatu:** guk purifikatu dugun proteina non dagoen jakiteko detekzio metodoren bat prestatu behar dugu, zein saioiditan dagoen jakiteko. Detekzio mota kuantitatiboa izan daiteke, hau da, detektatzeaz gain kopuruari buruzko informazioa emango digun metodoa. Oinarri desberdineko detekzio metodoak daude eta proteinaren arabera bat erabiliko da.

3.1. Aktibitatean oinarritutakoak: proteinaren aktibitatea erabiliko da detekzioan.

3.1.1. Saio entzimatikoa: erreakzioak katalizatzen dituzten proteinentzako.

3.1.2. Lotura saioa: ligando bati edo beste zerbaiti lotzen zaien proteinak detektatzeko.

3.2. Antigorputzak: proteinak aktibitatea argia ez duenean edo funtzioa ez dakigunean eta proteinaren aurkako antigorputza dagoenean.

3.2.1. Western plapaketa

3.2.2. ELISA

3.3. SDS-PAGE tindatua: aktibitatea neurtu ezin eta antigorputzik ez. Proteina birkonbinatuen kasuan adibidez.

### 3.1.1.- SAIO ENTZIMATIKOAK

- **Zuzenak:** zuzenean entzimaren erreakzioa neurtzen da, neur daitekeen ezaugarriren bat dagoelako (argi xurgapena esaterako). Entzima batek katalizatutako erreakzio baten jarraipenak substratu edo kosubstratuaren desagertzea edo produktuaren agerpena neurtzea eskatzen du. Espektrofotometria oso erabilia da erreakzio entzimatikoen jarraipena egiteko.
  - o **Etengabea:** entzimek gutxienez substratu bat beharko dute erreakzio kimiko bat katalizatzen. Normalean substratuaren desagertzea edo produktuaren agerpena neurtzen dira, entzimen isla baitira. Laktatodeshidrogenasaren kasuan metodoren bat behar da horren aktibitatea neurtzeko. NADH forma erreduzitua erabiltzen da neurketan, izan ere,  $\text{NAD}^+$  eta NADH-k modu desberdinean xurgatzen dute argia.  $\text{NAD}^+$ -k 260nm-ko argia xurgatzen du eta NADH-k 260nm-z aparte 340an. Beraz espektrofotometro batekin 340nm-tan ikusiko da NADH-ren agerpena, hau produktu bat baita. Laktatodeshidrogenasaren kasuan ez da NADHrik agertuko, eta zenbat eta entzima gehiago egon malda handiagoa izango da.
  - o **Etena:** substratu eta produktua neurtzeko metodoa ez egotea gerta daiteke. Adibidez erredox erreakzio bat neurtzeko, elektroioak molekula batetik bestera doaz. Zuzenean produktu edo erreaktiboren bat neurtu beharrean zenbait erreaktibo gehituko dira nitritoarekin erreakzionatuko dutenak. SFA+NEDA gehituz nitritoarekin erreakzionatu eta kolore arrosa ikusiko da, zenbat eta nitrito gehiago intentsuago. Nitratua eta ferredoxina erreduzitua erreakzionatuko dute nitrato erreduktasa entzimaren laguntzaz eta denbora bat (20min) utziko da erreakzioa gertatu dadin. Ondoren SFA+NEDA gehituko zaio eta larrosa ikusten bada hasierako erreakzioa eman dela esan nahi du, nitratua sortu dela.
- **Akoplatuak:** ezin direnean substratu edo produktuak neurtu, ezta bigarren erreakzio batekin ikusi. Kasu honetan bi erreakzio entzimatikoa akoplatuko dira. Hexokinasaren produktua (G6P) glukosa-6P deshidrogenasaren erreaktiboa da. Bigarren erreakzioan NADPH sortzen da eta hau erabiliko da neurtzeko. Detekzioa konplikatu egiten da lehenengo erreakzioaren substratuez gain, bigarren erreakzioaren entzima eta substratua gehitu behar direlako. Lehenengo erreakzioa ez bada ematen ezin da bigarrena eman, ez baitago substraturik.

Saio entzimatiarren kasuan hiru gauza hartu behar dira kontuan batez ere:

- Espezifitate: adibidez G6Paren agerpena neurtzean hexokinasaren aktibitateaz neurtzeaz aparte, glukokinasarena ere neurtzen da, izan ere, bi entzima hauek glukosaren 6 fosforilazioa katalizatzen dute. Espezifikoa den saioa neurtu behar da, interferentziak egon ez daitezela.
- Denbora, kostua eta abarrak hartu behar dira kontuan ere.
- Zehaztasuna ere kontuan hartu behar da kuantifikatzeko orduan, tresneria eta makineriaren zehaztasuna.

### 3.1.2.- LOTURA SAIOA

Hainbat proteina ligando batzuei lotzen zaie modu nahiko espezifikoa. Adibidez hormonekin lotzen diren hartzaileak. Ligandoak molekula txikiak dira normalean eta ligando-hartzaile lotura oso espezifikoa eratzen da. Beste adibide bat DNArri lotzen zaion proteinak dira, DNA sekuentzia berezi jakinak ezagutu eta lotu egiten baitira. Modu espezifikoa zerbaiti lotzeko gaitasun hori erabiliz proteina bat detektatu daiteke.

- **Hormona-hartzaileak:** ligandoa hormona bat denean eta detektatu nahi dugun proteina horren hartzaile denean egiten da. Ligandoak eta hartzaileak ligando-hartzaile (hormona-proteina) konplexua eratzen dute. Gure proteina dagoen disoluziora ligandoa gehitzen da eta proteina baldin badago lotu egingo dira. Hainbat minutu utziko dira lotu daitezela. Ondoren filtro batetik pasaraziko da disoluzioa huts ponpa baten laguntzaz. Filtroak poro estuak dituelarik ligando txikiak eta solteak pasatzen utziko ditu bakarrik, baina gure proteina ez. Iragazkiak interesaren arabera poro tamaina desberdinak izango ditu, beti ligandoa baino handiagoa baina gure proteina baino txikiagoa. Hormona (ligandoa) markatu egingo da, adibidez, erradiaktiboki. Ligando markatua gehitu denez eta gure proteina baldin badago, hauek biak lotu eta ez dira filtrotik pasatuko, horrela erradiazioa igorri eta kontatuko da (gure proteina detektatuko dugu). Aldiz ez badago proteinarik ligando askea filtratu eta ez dugu ezer detektatuko. Pare bat aldiz filtratzen da ligando soltea joateko. Gainera teknika honi esker kopuruari buruzko informazioa jaso dezakegu: zenbat eta hormona markatu gehiago egon proteina-hartzaile gehiago egongo da eta beraz gure proteina gehiago egongo da.

- **DNA batzen diren proteinak:** DNA sekuentzia jakin bati lotzen zaion proteina detektatzeko metodo elektroforetikoa da. DNAk proteina bat badu itsatsita higikortasun desberdina izango du gehiago pisatzen duelako (geldoagoa izango da). Agarosazkogelean migratzen da DNA, eta dakigunez gel hau sare bat da, non DNA tamaina eta formaren arabera mugitzen den. DNA molekula guztien karga/masa proportzioa (ratioa) bera da, zeren zenbat eta tamaina handiagoa karga handiagoa izango da fosfato talde (-) gehiago egongo direlako. Agarosazko sare honek mugimendua oztopatuko du eta gainera, molekula handiei oztopo handiagoa jartzen die txikiei baino; beraz, DNA txikiak gehiago mugitzen dira handiak baino. Kasu honetan, DNA askeak banda bakarra emango digu eta hau erabiliko da kontrol moduan. Gure proteinaren detekzioarako DNA askea eta proteina nahastura inkubatuko dira lotu daitezela. Proteinak DNArren sekuentzia jakin bat ezagutzen eta horra lotzen bada pisua emango dio DNArri eta DNAk ez du hainbeste migratuko.

- o **1:** kontrola da, free DNA.
- o **2:** banda bakarra lortzen bada kontrolaren parean, gure proteina ez dagoela esan nahi du.
- o **3:** banda gorago baldin badago, ez bada hainbeste migratu, proteina DNArri lotu dela eta beraz proteina dagoela esan nahi du.
- o **4:** 6 proteina desberdin daudenez nahasturan, mugikortasun desberdina duten 6 konplexu sortu dira, DNA bakoitzari proteina bat lotzen zaiolako (desberdina banda bakoitzaren kasuan) edo DNA berdinari hainbat proteina lotu zaizkiolako. Gehienetan konplexuez aparte DNA askea dago ere. Kasu hauetan egin daiteke zutabeen eluitu eta frakzioak aztertu, horrela jatorrizko lagineko proteinak banatzea lortu daiteke, kuantifikazio ideia bat egiteko.



### 3.2.- ANTIGORPUTZAK

Gure proteinaren kontrako antigorputzak erabili daitezke gure proteina detektatzeko. Batzuetan oztopo bat izan daiteke ez baldin badakigu zein den gure proteinaren kontrako antigorputza. Baina antigorputzak ez dira guztiz espezifikoak eta antzekoak diren proteinak detektatzeko balio dute. Erraz detektatzen den eta aktibitatearik ez duen proteina detektatzeko erabiliko da. Gure proteinari antigorputz jakin bat lotuko zaio eta horrela detektatuko da.

\*Antigorputz monoklonalak: epitopo bakar bat ezagutzen du.

\*Antigorputz poliklonalak: linfuzito desberdinez osatuta, epitopo desberdinak ezagutzen dituztenak.

#### 3.2.1.- WESTERN PLAPAKETA

SDS elektroforesian oinarritzen da. SDSak proteinak desnaturalizatu eta karga negatiboa emango dio proteinari, aminoazidoekin lotzen delako. Horrela proteinen karga dentsitatea bera izatea lortzen da: karga/masa erlazioa konstante izatea lortzen da SDSa gehitzean. Proteinak berez dituen kargak arbuigarri bihurtzen dira eta SDS molekulak aminoazido kopuru batekin lotuko da. Horrela mugitzeko joera berdina dute proteinek, baina poliakrilamidazko gelezko sareak oztopo gehiago jarriko dio proteina handiari txikiari baino.

SDS-PAGE egin ondoren proteinak eskuragarri jarri behar dira antigorputzak gehitu eta horiekin lotzeko. Horretarako transferituko dira mintz batera (nitrozelulosazkoa adibidez) teknika desberdinak erabilita eta proteinak bertan geldituko dira eskuragarriago, SDS-PAGEan daudenean gel barruan baitaude. Proteinak transferitu eta mintza blokeatu behar da mintzera antigorputza lotu ez dadin (bakarrik proteinari lotzeko). Azkenik mintza antigorputzak dituen disoluzio batean murgilduko da eta horrela antigorputzak lotuko dira proteinekin.

Antigorputzak detektatzeko erradiaktiboki edo entzimekin markatuko dira.

- **Antigorputz konjokatuak erabiliz:** gure proteinara lotu den antigorputza ez dago markatuta egongo baina bigarren antigorputz bat erabiliko da (konjokatua). Antigorputz konjokatuak ezagutzen duen proteina antigorputza izango da, hau da, bigarren antigorputzak edozein antigorputz ezagutu eta horrekin lotuko da. Garbiketak egingo dira. Konjokatua erradioaktiboki markatuta egon daiteke edo entzima batekin. Bi antigorputz erabiltzearen abantaila: hainbat proteina ezagutu nahi direnean antigorputz desberdinak botako dira disoluziora eta guztiak markatzea zailagoa da; aldiz, konjokatu bera erabiltzen denez guztiekin lotzeko, hau markatuta errazagoa da prozesua.
- **Markatzeko modua entzima kromogenikoa:** entzimak antigorputzei lotuta egon daitezke eta heuk katalizatzen dituzten erreakzioetan produktu kromogenoa sortu daiteke, eta horrela detekzioa posiblea da.
- **Batzuetan antigorputzak ez dira oso espezifikoak** eta bi proteina ezagutu ditzakete eta bi banda agertu daitezke. Kasu honetan hainbat hipotesia daude: proteinaren azpiunitate desberdinak izatea, zatiak izatea, kontaminanteren bat egotea...

#### DOT BLOT

Metodo hau ez da hain zehatza. Proteina detektatu egiten du, hor dagoela dakigu baina ezin dezakegu jakin kontaminanteren baten detekzioa dela edo proteinaren zati bat dagoen. Hau da, ez dakigu kontaminantea edo proteina bakarrik dagoen.

### 3.2.2.- ELISA metodoa

Putzudun plastikozko plakak erabiltzen dira. Putzuak proteinak itsasteko joera duenez, plakaren azalean proteinak itsatsiko dira. Plakara proteinen nahastura bota, denbora batez utzi eta garbiketa egingo da lotu ez diren proteinak kentzeko. Antigorputzak bota, denbora batez utzi eta garbiketa egingo da, eta lotu ez diren antigorputzak kenduko dira horrela. Proteina baldin badago lehenengo antigorputza lotuta egongo da, baina hau ez da detektagarria. Horretarako bigarren antigorputz bat (konjokatua) gehituko da, eta hau bai dago markatuta. Garbiketa egingo da ere kasu honetan. Bigarren antigorputzak entzima bat izango du lotuta eta substratua gehitzean produktuak kolorea emango du. Horrela urdin dauden putzutsuek gure proteina dute. Gainera, intentsitatea kolorimetro batean neurtu daiteke, itsatsitako proteinen kopuruen arabera izango da intentsitatea.

- **Sandwich ELISA:** espezifikoagoa den metodoa, bi antigorputz lotuko baitira gure proteinarekin. Putzuaren azalean antigorputzak pegatuko dira eta gure proteinen nahastura gehituko dugu, horrela antigorputz horiekin proteina batzuk lotuko dira eta besteak garbiketaren ondorioz kenduko dira. Ondoren bigarren antigorputza gehituko da eta proteinari lotuko zaio, horrela 1 eta 2 antigorputzak proteinari lotuta egongo dira. Ez baldin badago proteinarik garbiketara 2. antigorputza joango da. Azkenik 3. antigorputz bat gehituko da, 2. antigorputzari lotuko zaiona. Hirugarren honek entzima bat du eta honi esker detektatuko da. Beraz kolorea ikusten bada entzima horrek substratua produktu egin duela esan nahi du eta ondorioz 3.2. eta 1. antigorputzak daudela eta beraz proteina dagoela esan nahi du. Espezifikoagoa da bi antigorputz espezifiko lotu behar zaiolako proteinari.

### 3.3.- SDS-PAGE

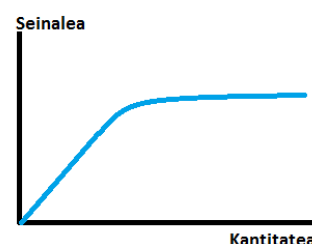
#### -Proteina birkonbinatuen analisisian

Proteina nahastura bat poliakrilamida gelan zehar migrarazi eta gero tindatuko da. Hainbat banda ikusi daitezke eta lodiera desberdinekoak (kantitatea ondorioztatu). Proteina birkonbinatuen kasuan gure proteina zein den jakin dezakegu. Adibidez bi lagin ditugu, biek proteina berdinak dituzte baina batek proteina bat gehiago du, beraz SDS-PAGEan banda bat gehiago ikusiko da.

Espresio bektore bat erabiliz gene bat bektorean txertatzen da, proteina bat kodetzen duena. *E. coli* horrek bere genomaz aparte plasmidoa edukiko du beraz bere geneez aparte gure genea ere transkribatuko du. Hainbat proteina sortuko dira eta gelean migratuko dugu. Bestalde *E. coli* "arrunt" bat jarriko da eta bere proteinak bakarrik lortuko dira, hauek ere gelean migraraziz. Bi lagin hauen bandak konparatuz jakin dezakegu zein den gure geneko proteina.

Kuantifikaziorako ez da oso fidagarria, baina orokorki banda potoloagoa bada gehiago dagoela esan nahi du. Jakin beharra dago banda bat ez dela proteina bat, agian proteina baten azpiunitate bat da.

\*Ez Western blota eta SDS-PAGE-a ez dira guztiz fidagarriak kantitateari begiratu, metodo hauek saturatu egiten baitira eta ondorioz zehaztasuna galtzen dute. Hasieran seinalea eta kantitatearen erlazioak linealitatea gordetzen du, baina kantitatea handituz doanean seinalearen handipena ez da hain handia, espezifikotasuna galtzen du.



#### -SDS-PAGE purifikazioari jarraitzeko

Proteina bat purifikatzeko hainbat pausu (purifikazio) egingo direnez, purifikazio bakoitzaren ostean lagin bat hartuko da eta SDS-PAGE batean migraraziko da. Lehenengo kanalean hasierako homogenatua, proteina nahastura, migraraziko da. Hurrengo kanaletan purifikazioen arabera, lortu diren laginak, geroz eta purifikatuago daudenak. Adibidez, gatz prakzionamendua, ioi trukeko kromatografia, gel iragazpeneko kromatografia eta afinitate kromatografia, bukaeran gure proteina purua lortuz.

Metodo honekin beha dezakegu purifikazio urratsei esker bandak (kontaminanteak) joaten direla. Oso modu bisuarean ikusten da urrats bakoitzak zer egin duen, zenbat purifikatu duen gure proteina. Azkenean gure proteina purua lortuko dugu, emandako urrats guztiei esker lortua.

## Purifikazio taularako

Lagin bakoitzaren bolumena, bolumen horretan intereseko proteina dagoen (eta zenbat) eta proteinaren kontzentrazioa adieraziko dira.

### • ITU-PROTEINA KUANTIFIKATU

- **Aktibitatea:** Gure proteina entzima bada horren aktibitatea neurtuko da, beraz neurtzen eta kuantifikatzen duguna proteina aktiboa da. Gerta daiteke aktibitateak ez neurtzea entzima laginean dagoenean, entzima modu inaktiboan dagoelako. Horregatik lortu behar da proteina aktibo egoten beti entzima denean. Aktibitatea kataletan (mol/s) edo  $\mu\text{mol}/\text{min}$ -etan eman daiteke. Bestela zuk definitutako unitatea erabili dezakezu:  $1\text{u}=1\mu\text{mol}/\text{min}$ .
- **Dentsitograma:** Proteina ez denean entzimabat dentsitograma egiten da. Hau tindatu eta gero bandak ematen duen intentsitatean oinarritzen da, hori neurtzen baita. Ez da metodo zehatz edo fidagarria. Tindatzaileak, erradioaktibitateak edo dena delakoak (detekzio motaren arabera) sortzen duen intentsitatea neurtzen da.

### • PROTEINA TOTALA KUANTIFIKATU. Mg-tan neurtuko da. Lehenengo kontzentrazioa aterako da eta bolumena jakinik masa lor dezakegu. Nire proteina eta kontaminanteak neurtuko dira, guztiak.. Proteinekin erreazionatzen duen errektibo bat gehituz kolorea sortuko da, eta horrek ematen duen absorbantzia lehenik egindako kalibrazio lerro batean ordezkatzuz, laginean dagoen kontzentrazioa jakin daiteke. Gero bolumena jakinik masa jakingo.

- **A280:** aminoazido aromatikoek 280nm-ko argia xurgatzen dute. Kromatografia zutabe ostean erabiltzen da askotan, proteina irteten den ala ez ikusteko. Berezko pigmenturik ez duen proteina baten kasuan ez du beste uhin luzera batean xurgatuko argirik, baina bai 280nm-tan. Horrela zutabetik irteten ari den likidoaren proteina kontzentrazioa kalkulatzeko ari gara.
- **Metodo kolorimetrikoak:**
  - **Biuret:** edozein proteina Biuret-arekin erreazionatzeko joera handia du, gainera guztiek antzera erreazionatzen dute. Sentikortasun baxua du, lagin kontzentratuagoak behar direlako Biuretarekin erreazionatzeko.
  - **Lowry:** sentikorra da, lagin diluituagoak kuantifikatu daitezkeelako. Tirosina eta triptofanoarekin erreazionatzen du Lowryk. Proteina bakoitzak bere sekuentzia aminoazidiko desberdina duenez aldakorra da, proteina batzuekin beste batzuekin baino gehiago erreazionatuko duelako (Tyr, Trp gehiago dutelako).
  - **BCA:** Absorbantzia neurtu daiteke 562nm-tan. Abantailak: Lowry eta Biuret baino sentikorra da; ez da Bradford bezain aldakorra; kolore egonkorra dauka eta detergenteekiko ez da hain sentikorra. Horregatik erabiltzen da mintz proteinekin lanean ari garenean, detergenteak botatzen zaiolako soluble egiteko.
  - **Bradford:** lagin jakin batean dagoen proteina-kontzentrazioaren arabera koloratzaile batek duen argi-xurgapenean oinarritzen da. Metodoaren oinarri kimikoa ondoko behaketan oinarritzen da: Coomassie urdina soluzio azidoaren xurgapenaren maximoa 595nm-tan izango du proteinekin konbinatzen denean. Metodo azkarra eta egonkorra da. Kalibrazio-zuzena eraiki behar da, horretarako ezagunak ditugun BSA soluzioaren kontzentrazio desberdinak prestatuko dira. Sentsibilitate ona du, baina interferentziekin kontu handia izan behar dugu, tanpoiko osagaiek argia xurga dezaketelako. Bestalde, aldakortasuna txarra da, proteina batzuk oso ondo tindatzen baitira eta beste batzuk ez hain ondo. Gainera, suposatzen ari gara gure proteinak eta BSA proteinak berdin erreazionatzen dutela Bradfordarekin. Hau da, suposatzen ari gara gure proteinaren  $\epsilon$  eta BSAren  $\epsilon$  berdinak direla. ( $A=\epsilon \cdot C \cdot L$ ). Ez da oso zehatza. Errorea ez da oso handia izango nahasturekin lan egitean, baina proteina puruarekin gaudenean bai.

## Purifikazio taula

Taula egiteko proteina isolatu eta kuantifikatuko da: gure proteina detektatzeko metadoa erabiliko da gehienetan kuantifikaziorako. Purifikazio urrats bakoitza egin eta osteko laginen datuak erabiliko dira taula egiteko. Taulak ez digu esaten guztiz purifikatuta dagoen proteina ala ez. Purifikazio osoa eman den bakarrik jakin daiteke gure proteinaren aktibitate espezifikoa baldin badakigu.

- Bolumena: ez du zertan handitzen edo txikitzen joan behar, gorabeherak ditu.
- Aktibitatea (U/ml): entzima dela suposatuz, bolumen horretako aktibitatea neurtuko da.
- Aktibitatea (U): bolumena jakina denez, aktibitatea neurtuko da bolumena kontuan hartu gabe. Denboraren poderioz entzimaren aktibitatea galduz joango da, beraz kuantifikazioa azkarra izan behar da.
- Proteina (mg/ml): laginean dagoen proteina kopurua da, bolumena kontuan hartuta.
- Proteina (mg): bolumena jakina denez, mg proteina. Gutxitzen joan behar du, purifikazio bakoitzean kontaminanteak kentzen ari garelako. Handitzen bada pausuren batean, gaizki eginda dago.
- Aktibitate espezifikoa (U/mg): Gure proteinaren aktibitatea zati proteina miligramo totala egingo da. Aktibitatea gure proteinarena bakarrik izango da, baina mg-ak proteina totalena, guztiena. Suposatzen da purifikazio urrats bakoitzean kontaminante gutxiago dagoenez, aktibitate espezifikoa handituz joango dela, mg txikiagoa izaten joango delako. Horretarako proteina aktibo mantendu behar da, inaktibo badago jaitsiera handia ikusiko delako.
- Purifikazioa (aldia): zenbat aldiz aberastu den. Aktibitate espezifikoarekin zerikusia du, eta hasierakoari 1 balio ematen zaio. Ondorengoak hiruko erregela bat erabiliz (1 balioa ematen bazaio hasierakoari, bere balioa atera) lortuko da euren purifikazioa.
- Errendimendua (%): Aktibitatea (U) kontuan hartuz egiten da. Lehenengoarena %100 dela suposatuz, hurrengoarenak aterako dira. Gerta daiteke errendimendua handitzea %150era arte ere, kasu honetan agian proteina aktiboago dagoelako eta horrela badirudielako gehiago dagoela.

## Purutasun irizpideak

SDS-PAGE, 2DE-PAGE, RP-LD, MS metodoekin purifikazioa jarraitu daiteke, baina gehien erabiltzen dena SDS-PAGEa da.

### ***-Zelan demostratu gure proteina guztiz purifikatuta dagoela?***

SDS-PAGE bat eginez, hainbat urrats egin eta gero ikusten da azkeneko laginean banda bakarra dagoela.

### ***-Zelan demostratu banda bakoitzean proteina bakarra dagoela?***

Bi dimentsiotako elektroforesia eginez. Gel honetan proteinak puntu isoelektrikoaren arabera (ezker eskuin) eta masaren arabera (gora behera) banatzen dira.

SDS-PAGE batean proteina desberdinak daudenik ezin da jakin, metodo honetan proteina desnaturalizatuta dagoenez azpiunitatetan banatuta dago eta banda bakoitza azpiunitate bat izan daiteke.

Adibidez, gerta daiteke proteina bat oso purifikatuta egotea eta 19 banda ikustea SDS batean. Kasu honetan proteina honek 19 azpiunitate ditu. SDS-ak proteina desnaturalizatzen duelako gertatzen da, hemoglobina puruaren kasuan 2 banda ikusiko lirateke (bi alfa eta bi beta kate) eta arnas kateko lehenengo konplexuaren kasuan 50 banda.

Elektroforesi natiboa: proteina konplexuak detektatzeko ezin da SDS-PAGEa erabili, proteinak desnaturalizatu egiten direlako. Poliakrilamidazko gelak erabiliko dira eta proteinak euren karga neto natiboa izango dutenez, euren karga eta tamainaren arabera banatuko dira gelean. Aktibitatea gelean bertan neurtu daiteke, edo antigorputza gehitu daiteke proteina detektatzeko.

## **PURIFIKAZIO ESTRATEGIA**

### **Aholkuak**

- Helburua jarri
- Gure proteinari buruzko informazioa bildu
- Saio analitikoak garatu eta detekzio metodoak planteatu
- Ahalik eta pausu gutxien egin, ahalik eta azkarren (egun batzuetan proteina desnaturalizatu ahal da).
- Ahalik eta gauza extra gutxien gehitu (tampoiak...).
- Kontaminanteekin kontuz. Zelula bat apurtzen badugu proteasak askatuko dira eta honek gure proteina apurtu dezake.
- Ezaugarri desberdinetan oinarritzen diren teknikak edo metodoak erabili. Lehenik kargaren arabera egin bada purifikazioa, gero tamainaren arabera, ondoren hidrofobizitateanoinarrituta... Ez errepikatu pausu berdinak.
- Ahalik eta urrats gutxien erabili. 3-4 purifikazio urrats ondo dago, baita 6 edo 2.

### **Purifikazioaren urratsak**

Lau pausutan oinarritzen dira:

- 1) Hasieran purutasuna oso baxua da. Pausu honetan zelulak apurtu, erauzi eta gure proteina duen disoluzioa prestatuko da.
- 2) **Capture:** Proteinaren purifikazioaren hasiera. Lehenik egonkortuko dugu (proteasak kendu...), gero kontzentratzen eta isolatzen.
- 3) **Intermediate:** Purifikazioak. Kontaminanteak kenduz jarraituko da.
- 4) **Polish:** Fintzea (pulir), perfektionatzea. Gure proteinaren antz handia duen proteina-kontaminanteak kentzea purifikazio maila altua lortzeko. Ezin bada hor bukatuko da.

### **Banaketa-urratsen ezaugarriak**

Purifikazio urrats bakoitzak lau ezaugarri izan behar ditu:

- **Bereizmena:** banatzeko ahalmena. Bereizmen altua dagoenean oso antzekoak diren konposatuak ere banatzen dira. Bereizmen txikikoak badira urratsak proteinak oso desberdinak izan behar dira banatuak izateko.
- **Speed:** zenbat denbora behar den urratserako.
- **Kapazitatea:** prozesatu dezakegun laginaren kantitatea.
- **Recovery:** zenbat berreskuratzen den.

Urrats batek lau ezaugarriak batera izatea ezinezkoa da.

- Hasierako teknikak azkarrak eta kapazitate handikoak izan behar dira.
- Gero bereizmena eta kapazitateak garrantzia dute.
- Azkenean gure proteina %90 denean, bereizmenak eta berreskurapenak dute garrantzia.

### **Kromatografien ezaugarriak**

**IEX:**ioi-trukeko kromatografia guztiak ez dira bereizmen handikoak, erretxinaren arabera bereizmena aldatzen delako. Kapazitate altua dute, eta azkarrak dira. Lagina kontzentratua irtengo da. Edozein fasetan erabiltzen da.

**HIC:** elkarrekintza hidrofobikokromatografia. Bereizmen eta kapazitate nahiko onak ditu, abiadura azkarra. Intermediate-n erabiltzen da gehienbat, eta bukaeran oso gutxitan.

**AC:** afinitate kromatografia. Bereizmen, kapazitate altuak eta azkarra da. Edozein fasetan erabili.

**GF:** gel iragazpeneko kromatografia. Bereizpen altua du. Lagina oso kontzentratua sartuko da eta diluitua irtengo da. Hasieran ez da erabiltzen, normalean Polish-en erabiltzen da beti.

**RPC:** alderantzizko kromatografia (releasefactorchromatography). Bereizmen handiena duen



## Urrats kopurua eta errendimendua

Urrats bakoitzak bere errendimendua eta zoritxarrez bere galera du. Urrats bakoitzak %95eko errendimendua balu, zenbat eta urrats gehiago egin galera handiagoa izango litzateke (errendimendu baxuagoa). Errealagoa izanez, %80koa bada pausu bakoitzaren errendimendua, nahikoa dira 3-4 urrats egitea errendimendua %30era jaisteko. Beraz, ahalik eta urrats gutxien erabili behar dira, errendimendu altuena dutenak.

## **ITURRIA, ERAUZKETA eta SOLUBILIZAZIOA**

### Iturria

- Nondik purifikatu gure proteina? Zein ehun, zelula... erabiliko den gure proteina lortzeko zehaztu behar da, hau da, proteinaren iturria.
  - Gure proteina ugariago eta aberastuago agertzen den lekutik hartuko dugu. Nire proteinaren kantitate handia dagoen lekua aukeratu da, proteina hori gehien espresatzen den organoa. Nahiz eta asko ez egon, proteina totalarekiko proportzio altuan dagoen organoa aukeratu behar da, aberatsena dena.
  - Interesa. Zein espezie den araberako interesa. Proteina berez interesgarria bada (agian ezezaguna), espezieen artean errazena aukeratu daiteke. *E.coli*-n badago hobe laborategian kultibatzen delako, gizakien zelulak hartzea zailagoa da. Beste kasu batzuetan espezieak dauka interesa. Medikuntzan adibidez gizakien proteinen ezagutzak landuko dira, eta kasu batzuetan beste espezie baten proteina homologoa hartu daiteke, baina beste zenbaitzuetan ez.
- Gure proteina ugariagoa eta aberastuagoa izateko baldintzak bilatu. Kasu honetan gure proteina gutxiagotan purifikatu beharko dugu, berez aberastua dagoelako apur bat. Adibidez Lacoperioian oinarritzen bagara, *E.coli* bati glukosa ez eta laktosa jartzen badiogu, laktosa hori degradatzeko entzimak sortuko ditu, hala nola, beta-galaktosidasa. Beraz medio horretan beta-galaktosidasa ugari ekoiztuko du. Baldintza zehatz batzuk jartzean datza, zelulak gure proteina era ugarian eta aberatsean sortzeko.
- Proteina birkonbinatuak. Gaur egun proteina bere jatorrizko ehunean urria bada mRNA hartu eta cDNA ekoiztu daiteke, hau espresio-bektore batean sartu eta ostalari batek (*E.coli*-k) proteina hori ekoizteko. Proteina hori markatu daiteke detektatzeko eta isolatzeko.

### Bakterioen konpartimentuak

Nire proteinaren kokapena aprobetxatuko dut hasieran nahiko aberatsa den disoluzioa lortzeko.

- **Jariatu:** *Bacillus subtilis* bakterio Gram positiboak proteina batzuk jariatzen ditu. Nire proteina jariatzen den baten bat baldin bada, zentrifugazioa egingo da eta gainjalkinean dagoena proteina nahastura izango da (pellet-ean zelulak egonik).
- **Periplasmikoa:** periplasmikoa bada gure proteina lizozimaz peptidoglikano geruza zulatu daiteke barrukoa apurtu gabe. Ondoren zentrifugatuko da eta zelulak eta mintza jalkinean geldituko dira, eta gainjalkinean periplasmako proteinen nahastura eta beste substantzia batzuk.
- **Barruko proteina:** gure proteina zelula barruko proteina bat baldin bada pareta apurtuko da eta zentrifugatuko da. Jalkinean bakterioak geldituko dira eta gainjalkinean medioa. Azken hau kenduko dugu eta bakterioen pelleta berresegingo dugu. Ondoren ultrazentrifugazioaz (100.000g) mintzak pelletean geldituko dira, eta proteinak gainjalkinean.

### Eukariotoen konpartimentuak

Eukariotoen konpartimentalizazioa erabili behar da proteinak isolatzeko orduan. Mitokondriako proteina bat behar bada, lehenik mitokondria isolatu beharko da. Zentrifugazio desberdinak erabiliz aberastu ditzakegu. Horrela mitokondria asko isolatzea lortuko dugu eta nire proteina proportzio altuan egongo da zelula osoarekin konparatuz.

Mitokondria barruan konpartibilizazioa dagoenez erabili daiteke, honela mintzak eta solubleak banatuko dira. Erauzketa prozesua ahalik eta modu selektiboenean egin behar da, gure proteinaren nahastura aberats bat lortzeko.

Behin gure proteina lortu kontu handia eduki behar da egonkortasuna galdu dezakeelako, ez baitago bere egora naturalean. Tanpoiak gehitu beharko dira, baina beharrezkoa dena soilik gehituko da. pHa mantentzeko, proteasak kontrolatzeko edo inhibitzeko substantziak, gatzak (beharrezko kantitateetan), erredoxkonposatuak... gehituko dira tanpoian. Tanpoi batzuk oso sinpleak dira, beste batzuk oso konplexuak aldiz. Azken finean, proteina egonkor mantentzeko da.

## **Mintz proteina**

Mintzeko proteina disoluzioan jartzeko horiek solubilizatu behar dira, proteinak disolbatu behar dira. Mintzarekin lotzen diren proteina bakoitza era batean erlazionatuta edo lotuta dago mintz horrekin.

- Proteinak modu sinplean zeharka dezake mintza, behin zeharkatzen du zati bat periplasman, beste bat zitoplasman eta hirugarren bat mintza zeharkatzen dituelarik. Mintza zeharkatzen ari diren aminoazidoak hidrofobikoak dira, eta kanpokoak hidrofiliakoak. Proteina hauek mintzetik askatzeko detergenteak behar dira.
- Hainbat aldiz zeharka dezakete mintza proteina batzuek, zazpi aldiz adibidez. Zeharkatzen ari den zatian aminoazido hidrofobikoak egongo dira. Zailagoa izango da disolbatzea, eta askatzeko detergenteak erabiliko dira.
- Glikolipidoei loturik. Ingurune soluble batean dauden proteinak dira, gluzidoei lotuta daudenak. Glikolipido baten aingura erabiliko dute mintzarekin lotzeko, beraz guztiz disolbagarriak dira. Proteina hauek askatzeko entzimak erabiliko dira, gluzidoaren eta proteinaren arteko lotura mozteko.
- Fosfolipidoei lotuta. Ondo disolbatuko da lipidotik askatzean. Askatzeko entzimak behar dira.
- Beste proteina bati lotuta. Alde urtsuan dagoen proteinak ez du arazorik disolbatzeko, ez baitago lotuta mintzarekin eta hidrofiliak delako. Beraz, bi proteinak banatzeko gatzak erabiliko dira.
- Proteina lipido lotura. Gerta daiteke proteinak ez edukitzea lotura sakonik mintzarekin, txertatuta dagoelako fosfolipidoen buru polarren mailara arte. Hauek banatzeko gatzak erabiliko dira, eta nahiko ondo disolbatuko da proteina.

Beraz mintz proteinak desberdinak direla argi dago, batzuk solubleagoak dira eta hau onuragarria izango da. Loturak apurtzeko 1 eta 2 kasuetan detergenteak beharko dira, 3 eta 4 kasuetan entzimak eta 5 eta 6 kasuetan gatzak. Guztiz txertatuta dauden proteina integralak solubilizatzeko teknika gogorragoak erabili behar dira, detergenteak.

## **Detergente bidezko solubilizazioa**

Proteina integralek aminoazido hidrofobikoak dituzte mintz plasmatikoa zeharkatzeko, eta horregatik solubilizazioa zaila da. Detergenteek izaera anfipatikoa dute: molekularen zati bat polarra (hidrofiloa) da eta bestea hidrofoboa. Detergenteak mintzeko fosfolipidoak ordeztu ditu, horrela erauziko ditugu. Mizelak sortuko dira: azalera polarra urarekin kontaktuan du, eta barru hidrofoboa dauka. Proteinak mizelatan sartuta egongo dira, proteinaren hidrofobizitatearen arabera gehiago edo gutxiago egongo da sartuta. Detergente desberdinak dauzkagu eta CMC (mizelak eratzeko beharrezkoa den kontzentrazioa) arabera desberdinak dira.

Proteina txiki bat lehenago solubilizatuko da, detergente gutxiagorekin inguratuta egongo delako. Maila desberdinetan egiten da solubilizazioa, horrela purifikatzeko pausua izan daiteke.

Gatzak solubilizazioan laguntzen du.

## Solubilizazio selektiboa

Zenbat eta detergente gehiago gehitu proteina gehiago solubilizatuko dira. Adibidez mitokondria bateko proteinen solubilizazioa behatuko da, gatz kontzentrazio desberdinetan. Ikusiko da zenbat eta gatz kontzentrazio altuagoan egin lehenago solubilizatuko direla.

- 600mM NaCl

Detergente apur bat gehituz hidrofilikoenak disolbatuko dira lehenengo, besteak mintzean txertatuta jarraitzen dutelarik. Zentrifugazioa egiten bada, jalkinean mintzeko proteinak egongo dira eta gainjalkinean disolbaturikoak. Zenbat eta detergente gehiago jarri indar gehiago izango du eta proteina gehiago pasatuko dira fase solublerara.

Mitokondrian proteina konplexu desberdinak daude: II, III eta IV konplexuak adibidez.

II konplexua purifikatzeko %1 tritioa botako da, horrela II konplexuaren gehiengoa solubilizatuta egongo da, besteak mintzean egonik. IV konplexua purifikatu nahi bada %2 tritio botako da, zentrifugatu eta gainjalkina botako da, ondoren jalkina berreskuratzeko. Jalkinean IV konplexua geldituko da bakarrik, eta hau askatzeko tritio gehiago bota (%3).

Helburua errez solubilizatzen direnak kentzea da, gurea isolatzeko.

- 200mM NaCl

Gutxiago solubilizatzen da detergente kontzentrazio berdinerako. Ahalik eta modu selektiboenean solubilizatu behar da. Gainera ia beti mantendua behar da detergente maila txiki bat, tanpoietan gehitzen dena.

## Detergenteak

CMC: mizelak eratzeko beharrezkoa den kontzentrazioa.

N: mizelak zenbat detergente molekulaz dauden eratuak.

HLB: zenbat eta altuagoa hidrofiliokoagoa.

## TANPOI ALDAKETA ETA KONTZENTRAZIOA

Ia beti urratsen batean aurretik edo ostean tanpoia erabili behar da, baina honek ez digu kontaminanterik kenduko, proteina nahastura bere baitan jarraituko du. Ez du purifikatzeko balio baina kontzentratzeko edo tanpoiak aldatzeko behar dira.

## Sarrera

- Nahiz eta banaketa-metodoa ez izan, purifikazio prozeduretan askotan erabiltzen dira.
- Askotan tanpoia aldatu behar dugu gatzak diluitzeko, hurrengo banaketa-metodoan gatzak traba egiten duelako. Kromatografietan gatzekin lan egiten da eta batzuetan kendu behar dira gatzak hurrengo pausuetarako. Horregatik diluituko da lagina, gatz kontzentrazioa jaisteko. Badaude metodo batzuk gatz kontzentrazioak murrizteko bolumena handitu gabe.
- Askotan kontzentratu egin behar dugu zenbait banaketa-metodo bolumen txikiko lagina eskatzen dutelako. Kromatografiak (gel iragazpenekoak) lagin txikia eskatzen du, horretarako bolumena kontzentratu behar da.

## Metodoak

Dialisia, ultrairagazpena, gel iragazpena, lurrunketa eta prezipitazioa.

## Dialisia

Honen oinarria mintzean dago. Dialisi mintzak poroak ditu, tamaina jakineko konposatuak pasatzen utziz. Poroak txikiak baldin badira substantzia handiak dialisi poltsan geldituko dira. Proteina pasatzen uzten ez duen mintza erabiliko da, beste molekula txikiak disoluziora pasaraziz. Mintzarekin hodi itxurako egitura sortu, barruan lagina utziz. Bertan proteinak, gatzak, tanpoiaren molekulak... daude, eta helburua kontaminante horiek kentzea izango da. Gatzik gabeko tanpoi bat presatuko da, horrela gure dialisi poltsa tanpoi horretan utziko da iman batekin bueltaka, orekatu arte. Konposatuek kanpoko eta barruko

kontzentrazioak berdintzeko joera izango dute, osmosia burutuko da. Beraz, osmosiz kontzentrazioak berdintzeko, gatz molekularak irtengo dira (poroetatik sartzen dira). Proteinak ez direnez zuloetatik sartzen, ez dira irtengo. Ordu batzuk itxaron eta gero dialisi poltsako eta kanpoko kontzentrazioa berdinduko dira. Horrela gure laginaren gatz kontzentrazioa asko jaitsiko dugu laginaren bolumena handitu gabe.

Bolumenen aldearekin jokatu daiteke ( 10ml 1M NaCl→1L, 0'01M NaCl) edo hainbat pausutan egin daiteke: lehenengo aldiz 100 aldiz diluitu eta bigarrenaz beste 100 aldiz. Eraginkorragoa da pausutan egiten baduzu, baina denbora gehiago behar da. Kasu honetan tanpoia aldatu egiten da.

Kontzentratzeko erabili daiteke: tanpoia ez dugu aldatzen. Hutsarekin bolumena murrizten joango da, eta gure proteina kontzentratuagoa izango da. Tanpoia kentzen joaten da.

### **Ultrairagazpena**

Metodo hau kontzentratzeko erabiltzen da. Mintzak tamaina jakineko poroak izango ditu molekula txikiak irteteko eta gure proteina pasatzen uzten ez duen filtroa izanik. Dialisi zaku bat hutsean jartzen bada molekula txikiak irteten joango dira, eta laginaren bolumena murrizten joango da (proteina gero eta kontzentratuago).

Ontzitxoak beheko aldean mintz produna dauka, filtro bat izango balitz bezala. Ontzitxoan gure laginaren 4ml sartuko ditugu. Helburua lagina filtratzea da, gure proteina filtroan gelditu dadin. Prozesua azkartzeko likido bultzatu behar da indar zentrifugoaren bidez. Ontzitxoa beste ontzi batean sartu eta ultrazentrifugatzailan sartuko da. Honek indar zentrifugoa sortu eta horrela molekula txikiak filtrotik pasatuko dira. Ontzitxoan gelditzen dena gure proteina eta beste zenbait molekula izango dira. Momentu horretan gure proteina oso kontzentratua dago. Saiatu behar gara bolumen guztia berreskuratzen (mikropipetarekin hartu daiteke, baina galerak egon ohi dira). Berreskuratzea eraginkorragoa izateko ontzitxoa beste ependorf batean jarri buelta emanda, bere edukia ependorefean sartzeko. Lagina 4ml izatetik 40µl izatera pasatu da.

Nahi izanez gero, ultrafiltrazioa tanpoiz aldatzeko erabili daiteke. Gure lagina kontzentratu egingo da zentrifugatzen denean, eta ondoren gatzik gabeko tanpoia gehitzean diluitu egingo da. Zentrifugatzean gatzik gabeko kontzentrazioa gure laginean hasierakoaren berdina da. Gero gatzik gabeko tanpoia gehitzean diluitu egingo dugu gatzik gabeko kontzentrazio hori. Beraz lortu dugu tanpoi berri bat (gatz kontzentrazio baxukoa).

Presioa erabiliz egin daiteke ere. Gas batek presioa sortuko du eta soluzioa filtrotik pasatzen joango dira. Molekula txikiak eluitzen joango dira eta botean gure lagina geldituko da.

### **Gel iragazpena**

Tanpoiz aldatzeko erabiltzen den metodoa. Ez du balio kontzentratzeko, diluitu egiten du. Zutabetxoan tanpoi berriaren bolumen handi bat pasarazi behar da, zutabearen tanpoi berria egon dadin. Ondoren gure lagina pasaraziko da. Proteinak (molekula handiak) aurreratuko dira, eta aldiz txikiak (gatzak...) atzetik joango dira, molekula txikiak zutabearen poroetatik pasatzen joango dira gehiago tardatuz.

### **Lurrunketa**

Kontzentratzeko beste metodo bat da. Lagina lurruntzen badut, disolbentea lurrunduz eta gure proteina kontzentratuz joango da. Lagina berotu beharrean (beroa kaltegarria izan daitekeelako gure proteinentzat) huts ponpa batean jarriko da lagina lurrunketa azkartzeko. Ura lurrunduko da baina sodio kloruroa ez. Beraz, proteinaren, gatzik gabeko, detergenteen eta lurruntzeko aukerarik ez duten substantziak kontzentratuko dira. Horregatik kasu batzuetan kaltegarria izan daiteke, gure proteinaz aparte beste

konposatu batzuk kontzentratzen direlako. Lagina saioditik irten ez dadin metodo batzuk daude (bueltak eman..).

## **Prezipitazioa**

Lagina kontzentratzeko edo tanpoiz aldatzeko erabili daiteke. Proteina guztiak prezipitatzeko metodoak daude. Laginari TCA edo alkoholak gehitzen bazaio, proteinak prezipitaraziko ditugu. Horrela gainjalkinean tanpoi zaharra egongo da (hau baztertuko dugu) eta jalkinean proteina. Ondoren proteinak tanpoi berrian jarriko dira eta prezipitatzailerunduaraziko dira. Kontuan hartu behar da substantzia batzuk (TCA-k adibidez) proteinak desnaturalizatzen dituztela.

Amonio sulfatoz prezipitatzeko proteina kontzentratzeko modua izan daiteke, proteinak prezipitatu direlako.

Tanpoiz aldatzeko erabili daiteke, jalkina tanpoi berri batean jarri daitekeelako.

## **HAUSPEATZE SELEKTIBOA**

Disolbatuta dagoen proteina bat prezipitatu daiteke. Temperatura, pH disolbatzaile organikoekin (apolarra), gatzak... erabili daitezke prezipitatzeko. Proteinak desnaturalizatzen dira eta euren artean interakzionatzen dute prezipitatu. Gehien erabiltzen den metodoa indar ionikoa da, normalean gatzak gehitu eta proteinak prezipitatu dira aktibitatea galdu gabe.

### **Prezipitazioa: indar ionikoa**

- Kontzentrazio baxuetan gatzak proteinak disolbatzen laguntzen du (saltingin). Tanpoietan gatz apur bat gehitzen bada solubilizazioan laguntzen du.
- Kontzentrazio altuagoetan solbatzio-ura "lapurtzen" hasten da gatzak, proteinak disoluziotik ateraz (saltingout). Kontzentrazio handitan ura gatzekin joan eta proteina prezipitatu da.
- Zenbat eta aminoazido polar gehiago izan bere azalean, gatz kontzentrazio altuagoa beharko da proteina prezipitatzeko.
- Zenbat eta aa polar gutxiago eduki azalean, gatz gutxiagorekin prezipitatu da.

Proteinak 3D egituran aminoazido hidrofobikoak H<sub>2</sub>O-tik aldentzeko barrurantz orientatzen dituzte. Gehienek azalean aminoazido polarrak dituzte. Aminoazido polar gehiago duena hobeto disolbatu da uretan.

### **Gatz-frakzionamendua**

Aminoazido apolar gehien dituen proteina deserosoen dagoen proteina da, beraz gatz gutxi botaz erraz prezipitatu da. Aldiz aminoazido polar asko dituztenek gatz asko behar dute prezipitatzeko.

Orokorrean gatz kontzentrazio tarte zabala da proteina mota baten prezipitazio puntua: proteina bat prezipitatu hasten denetik proteina mota beraren molekula guztiak prezipitatu arte gatz tarte zabala dago.

Proteinaren nahaste batean bilatuko ditugu gure proteinaren bi prezipitazio mugak. Lehenengo muga baino kontzentrazio txikiagotan errazago prezipitatu diren proteinak (kontaminanteak) kenduko ditugu. Goiko mugara heltzeko gure proteina guztia prezipitatzeko behar den gatz kontzentrazio minimoa topatzen saiatuko gara, gainontzeko proteina guztiak disolbatuta dauden bitartean.

### **Gatz-frakzionamendu saioa**

Gatza poliki-poliki gehituz (pazientziaz) joango gara. Saio hau merkea da eta bolumen handiekin lan egin daiteke. Lehenengo gatz apur bat gehituko da eta jalkina eta gainjalkina gordeko dira. Jalkina gorde eta

disolbaraziko da, eta gainjalkinari gatz gehiago botako zaio eta jalkina gorde eta disolbatuko da berriz. Gainjalkinari gatz gehiago botako da eta jalkina gordeko da, gero disolbatzeko. Beraz, hasierako lagina lau frakziotan banatu dugu, gure proteina baino disolbaezinagoak direnak prezipitarazi ditugu, eta gure proteina baino solubleagoak direnak gainjalkinean mantendu. Detekzio metodo bat erabiliz gure proteina ikusiko dugu eta jakin dezakegu zein frakziotan dagoen. Jalkinak disolbatzeko gatzik gabeko tanpoian jartzen da, horrela berriz disolbatuko dira. Esperimentu hau egin ondoren badakigu gure proteina zein gatz tartetan prezipitatu den, baina orain afinatu behar da tarte hori murrizteko.

Bigarren esperimentu bat egingo da hasierako alikuota batez. Zuzenean gatz kantitate handia gehituko da eta hainbat frakzio egingo dira. Aktibitatea neurtuko da gure proteina non dagoen jakiteko, eta gehien dagoen frakzioan egongo da gure proteina.

### **Zergatik amonio sulfatoa $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ?**

- Oso solublea delako. 4M-etik gorako kontzentrazioan soluble egon daiteke.
- Indar ioiniko handia lortu daitekeelako. Amonio eta sulfato ioiek karga askoko ioiak dira.
- Saltingout-erako (proteinak agregatzeko) egokiak direlako, disolbatutako proteinak prezipitatzeko onak.

Gatz kontzentrazioak saturazio portzentajetan ematen dira. %40 normalean (w/v) da, hau da, 40g 100ml-ko. Baina kasu honetan ez da horrela, hasieran %0 badago eta %70ra eramateko 472g gehituko da 1L lagineko. Hau kalkulatzeko taula batzuk daude.

Prezipitazioa hasieran erabili beharreko teknika da, oso egokia delako.

### **Proteinak hauspeatzeko beste modu batzuk**

- Disolbatzaile organikoak erabiliz: alkoholak, azetona...
  - pH azidoa: TCA. Desnaturalizazioan oinarritzen da.
  - Polimeroak: polietilenglikola (aipatu)
  - Tenperatura: errazena da. Proteina batzuk termoegonkorrak dira (gutxi) eta 80°C-tan prezipitatuko dira. Saiatu behar gara gure proteina baino labilagoak direnak desnaturalizatzen.
- Gure proteina aktibo mantendu nahi bada ez dira desnaturalizatzaileak erabiliko.

## 2. BLOKEA: KROMATOGRAFIK

Nahastura bateko osagaiak banatzeko sistema da. Kromato- aurrizkia darama hasieran hostoen pigmentuak behartzeko erabiltzen zelako eta pigmentu horiek koloredunak zirelako. Bi fase ditu kromatografiak: fase geldikorra eta mugikorra. Gure nahasturako osagaiak gusturago egongo dira fase geldikorrarekin (erretxinarekin erretenitu) edo higikorrarekin (lehenago eluitu). Saillkapen asko daude kromatografiarako.

- **Kromatografia motak ohandzearen arabera:**
  - o **Zutabe kromatografia:** gehienak honelakoak dira. Fase geldikorra disolbagaitza da mugikorrean, eta geldikorra beti bustia egon behar da. Gure lagina nahasturaren gainetik botako da. Fase geldikorrarekin afinitate edo harreman gehiago dutenak erretenituta geldituko dira; aldiz beste batzuk lehenago eluituko dira harreman gutxiago dutelako geldikorrarekin eta mugikorrean ondo disolbatzen direlako.
  - o **Kromatografia laua (TLC, paper-kromatografia):** lagina paper edo mintza batean jarriko da. Fase geldikorra mugikorrarekin kontaktuan jarriko da mutur batetik eta likidoa kapilaritatez igoko d. Paperean gustura daudenak ez dira asko igoko mintzean zehar, baina mugikorrarekin afinitatea dutenak ihes egingo dute gorantz.
  
- **Kromatografia motak fase mugikorraren arabera:**
  - o **Gas kromatografia (GC):** fase mugikorra gasa denean.
    - **Gas-likido kromatografia:** fase mugikorra gasa eta geldikorra likidoa direnean.
    - **Gas-solido kromatografia:** fase mugikorra gasa eta geldikorra solidoa direnean.
  - o **Likido kromatografia (LC):** fase mugikorra likidoa denean.
    - **Likido-likido kromatografia:** biak likidoak direnean.
    - **Likido-solido kromatografia:** mugikorra likido eta geldikorra solidoa denean.
  
- **Kromatografia motak erakarpen indarren arabera:**
  - o **Adsortzioa:** fase geldikorra solidoa da, erretxina (hidroxiapatitoa edo elkarrekintza hidrofobikoa). Elkarrekintza hidrofobikoaren kasuan hori aprobetxatuko da lotzeko.
  - o **Partizioa:** analitoaren disolbagarritasun erlatiboa fase mugikor eta geldikor likidotan (RPC, fase normala, HILIC). Matrize (eusle) bat dago, baina molekulek ez dute elkarrengingoko eusle horrekin, baizik eta hori inguratzen duen geruzarekin. Partizioa egongo da disolbagarritasunaren arabera. Hau da, solidoaren inguruan likido bat dago eta nahasturako molekulak hor disolbatzen badira erretenituak izango dira. Motak RPC (reverse phase c), fase normalekoa eta HILIC dira.
  - o **loi-trukea:** konposatu ionikoentzat egiten da. Fase geldikorra positiboki edo negatiboki kargatuta dago eta gure osagaiak kargaren arabera mugituko dira.
  - o **Gel iragazpena (size exclusion):** tamainaern araberako iragazpena da, eksklusio molekularra egiten da.
  - o **Afinitate kromatografia:** Fase geldikorraren eta osagaiaren arteko lotura espezifikoa ez kobalenteetan oinarrituta dago. Ligandoa fase geldikorrean inmovilizatuko da modu espezifikoa, besteak ez dira lotuko. Proteina birkonbinatuak detektatzeko erabiltzen da askotan, birkonbinatu horiek markatu egiten direlako.

### Bereizmena (resolution)

Kromatografia batek bi osagai banatzeko duen ahalmena da. Kromatograma batean zentratuta, tontorren arteko distantzia eta zabalera da bereizmena, eta zenbat eta distantzia handiagoa eta zabalera txikiagoa bereizmen handiago izango dugu.

Denbora hutsa ( $t_0$ ) edo bolumen hutsa ( $v_0$ ) inolako erretentziorik ez duen substantziak zutabea zeharkatzeko behar duen denbora da. Hau da, fase mugikorrak zutabea zeharkatzeko behar duen

denbora da, fase geldikor eta mugikorraren artean ez dagoelako inolako erretentziorik. Tontorrek eluzio bolumena edo erretentzio denbora adierazten dute. Osagai baten erretentzio denbora erlatiboa kalkulatu behar da, osagai horrek behar duen denbora adierazten duena. Honela kalkulatzen da:  $t_A - t_0$ . Pikoaren zabalera oinarrian kalkulatzen da, baina batzuetan erdian.

$$\text{Bereizmena} = \frac{2 \cdot (t_1 - t_2)}{(W_{b1} - W_{b2})} = \frac{\text{bi osagaien tontorren arteko luzera}}{\text{pikoen zabalera batak bestekoa}}$$

Bi osagai guztiz banatzeko 1'5eko bereizmena izan behar du kromatografiak gutxienez, bestela pikoen buztanak solapatu egiten dira eta horrek nahasketa esan nahi du (banaketa ez da guztiz ona izango). Guk lortu nahi duguna X molekulak irteten bukatzen direnean besteak hastea.

Bereizmenean faktore eragile desberdinak daude: N (efizientzia), k (kapazitate faktorea) eta  $\alpha$  (selektibotasuna). Hauek R-n eragina dute.

- **Efizientzia (N)**

Bereizmenean eragina duen faktorea da, pikoen zabalera adierazten duena. Konposatu baten molekulak ahalik eta bateren irtetea da helburua, piko zabalera estuena izatea. N kalkulatzeko formula bat dago:

$$\text{Efizientzia}(N) = 5'54 \left( \frac{t_r}{W} \right)^2$$

$t_r$  eluzio bolumena, W zabalera erdian eta 5'54 konstantea direlarik.

Orokorra da, hau da, erretxina txikiagoa jartzen baduzu piko guztiak txikituko dira zutabea zeharkatzen duenean, difusioaren ondorioz nahiz eta molekula berdinak egon, pikoen zabalera aldatzen da. Difusioa pikoaren zabalera handitzea da.

- Zutabearen paketamenduak eragina du efizientzian, horregatik homoginoa izan behar da.
- Fluxua: zenbat eta fluxu handiagoa difusioa handiagoa izango da, beraz fluxu txikiagoa hobea.
- Erretxinaren partikularen tamainak eragina du efizientzian. Partikula zenbat eta uniformeagoa eta txikiagoa izan efizientzia hobea izango da (piko estuagoak).

$d_p = 10 \mu\text{m} \rightarrow N = 10.000$

$d_p = 5 \mu\text{m} \rightarrow N = 20.000$  efizienteagoa da, baina ponpa indartsuagoa beharko da.

Tontorren arteko distantzia bera izango da.

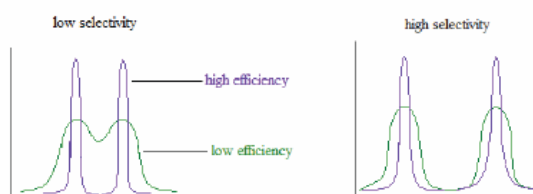
- **Kapazitatea edo erretentzio faktorea (k)**

Erretenitua izateko osagai batek zein ahalmen duen.  $K' = (t'_r / t_0)$  ,  $t'_r = t_r - t_0$ . Hau osagai bakoitzaren ezaugarria da.

- **Selektibotasuna ( $\alpha$ )**

Molekula desberdinen eluzio bolumenak aldentzea da gure helburua, ondo bereizteko osagaiak. Bigarrenaren kapazitate faktorea zati lehenengoaren  $k'$  da. Kromatografian dagoen erretxinak bi osagaiak banatzeko duen ahalmena da, kromatografia egingo da bi osagaien desberdintasunean oinarrituta. Adibidez tamainan desberdintzen badira, ezaugarri hori erabiliko da.

Pikoen arteko distantzia da. Selektibotasun berdinarekin bereizmena desberdina izan daiteke, azken hau efizientzia eta kapazitatearen menpe dagoelako ere.



Selektibotasuna berdina da berde eta urdinaren kasuan, distantzia berdinerak daude pikoen tontorrek. Baina efizientzia desberdina da, berdeak efizientzia baxuagoa



baitu. Beraz, gorriak du bereizmen onena efizientziaren aldetik.

Garrantzitsuagoa da selektibotasuna, tontorren aldentzea, bi osagaiak bereizteko.

## IOI TRUKEKO KROMATOGRAFIA

### 1. IEX: oinarria

Erretxina, fase geldikorra, kargatuta dago positiboki edo negatiboki. Demagun gurea positiboki kargatuta dagoela. Proteina nahastea pH konkretu batean gehituko dugu eta bertako proteinek karga neto desberdinak izango dituztenez pHaren arabera eta talde ionizatzaileen arabera, erretxinara itsatsiko dira negatiboak badira. Kargaren arabera gehiago edo gutxiago pegatuko dira.

Positiboki kargatutako erretxina erabiltzen badugu anionikoa deritzo, anioiak itsasten direlako eta negatiboki kargatutako erretxina badugu kationikoa deritzo, katioiak pegatzen direlako.

### 2. IEX: lotura itzulgarria

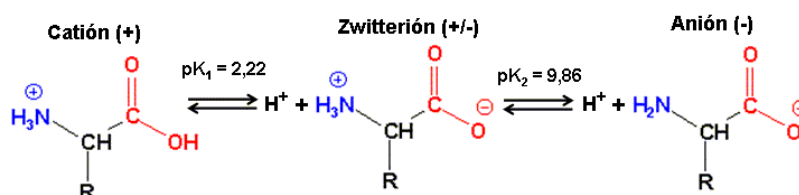
Zenbat eta karga negatiboagoa izan proteina indar handiagoz lotuko da erretxinara, baina lotura horiek itzulgarriak dira. Karga neto negatibo txikia duen molekula ez da guztiz lotuta geldutuko eta gutxinaka eluitzen joango da, indar gutxiarekin lotzen delako erretxinara. Proteina deslotzeko disoluzioaren indar ionikoarekin jokatu dugu. Gatzetik disoziatutako ioiak (kasu honetan negatiboak)erretxinarekin lotuko dira lotuta zegoen proteina desplazatuz. Gatz kontzentrazio txikiak erabiltzean indar ahulekin lotutako proteinak askatuko dira eta kontzentrazioa handitzean indar handiagoz lotutako proteinak askatuko dira. Hau da, gure erretxina positiboa denez nahasteko proteina negatiboak erretxinetik askatuko dira, eta gero horiek erretxinetik askatzeko gatzak erabiliko dira. Gatz horiek afinitate gehiago dute erretxinarekin lotzeko, beraz gure proteinak askatuko dira eta gatzak pegatuta geldituko dira.

### 3. Proteinen karga pHarekiko

Proteinen amino muturra, karboxilo muturra eta erradikalak talde ionizagarriak dira. Bakoitzak protoia emateko joera bat du eta ezaugarri hori pKa-z neurtzen da. pKa=2'2an adibidez karboxilo protonatua %50 eta desprotonatua %50 izango da.

Peptido bakoitzak pHaren arabera karga bat du. pH=1ean orokorrean peptidoa positiboki kargatuta egongo da, bi karga positibo (COOH eta NH<sub>3</sub>). pH3an aminoa protonatuta dago baina karboxiloa COO<sup>-</sup> moduan egongo da, eta beraz pH basikoetan peptidoak negatiboki kargatuta egongo dira orokorrean. Badaude proteina batzuk pH basikotan (lisozima) oraindik positiboki kargatuta daudela, horrela ezaugarri horretaz baliatuz gure proteina isola dezakegu.

Zenbat eta glutamiko gehiago eta aspartiko gehiago izan (aminoazido azidoak, negatiboki) pI (puntu isoelektrikoa) baxuagoa izango da. Lisina eta arginina asko duen proteinek pI altuagoa izango dute eta ondorioz pH basikoetan oraindik positiboki kargatuta egongo dira.



pI > pH proteinak karga neto negatiboa izango du.

pI < pH proteinak karga neto positiboa izango du.

pH bat bilatu behar da non proteinen karga netoaren desberdintasuna handia den banaketa handia izateko, selektibotasuna handia izateko (pikoen tontorrak banatuta egotea).

Itsatsitakoa askatzeko bi aukera: gatzak gehitzea (indar ionikoa gehitzea) eta hau da gehien egiten dena; bestela pHarekin joka daiteke.

- Gatzarekin eluitzen badugu karga netoaren arabera banatuko ditugu.
- Pharen arabera eluitzen baditugu pI-ren arabera banatuko ditugu.

#### **4. IEX esperimentua**

Erretxinean lotutako proteinak banatzeko gai izango gara hau eginez. Zutabetik gure tanpoia pasaraziko dugu orekatzeko. Tanpoiak gatz kontzentrazio txikia (erretxinara lotu ez daitezten ioiak zutabea asetuz) eta pH konkretua (non gure proteinak nahi dugun karga izango duen) izango ditu. Gure laginak gatz kontzentrazio txikia izango du eta pH konkretua (normalean orekatzeko erabilitako tanpoia da). Ateratzen diren proteinak detektatzeko 280nm-ko uhin luzerako absorbantzia aztertuko da. Hasieran zutabera lotu ez diren proteinak agertuko dira (erretxinaren karga berdina dutenak). Ondoren lotuta dauden proteinak askatzeko gatz kontzentrazioa igotzen joango gara. Lotu diren proteinak lotura indarren arabera askatuko dira eta detekzioan pKa desberdinak ikusi ahal izango dira. Horrela, agertzen diren azkenak sendoen lotu direnak izango dira.

#### **5. IEX: itsasten ez direnak**

pHa aukeratu dugu gure proteina lotzen ez den bakarra izateko. Gurea eluitu ondoren lotu ez diren guztiak ahalik eta azkarren eluitzea eragin behar dugu, 2Meko gatz disoluzioa gehituz. Proteina muturren kasuetan (karga handia, pI handia..), kontaminanteak aterako dira batera eta gurea aparte utziko dugu. Zutabea beti garbituko da bustita utziz.

#### **6. Erretxinak: talde kargatuak**

Fase geldikorrek bi osagai ditu, matrizea (bolak) eta karga ematen dion osagaia. Anionikoak positiboki kargatuta egongo dira eta erretxina kationikoak negatiboki.

Strong: pH tarte zabalean mantentzen da kargatuta.

Weak: pH tarte txikian mantentzen da kargatuta.

#### **7. Erretxinak: matrizeak eta bere partikula tamainaren eragina**

Uretan disolbatzen ez diren bolez osatuta. Konposizio desberdinekoak (agarosa...) eta tamaina desberdinekoak izan daitezke. Honek efizientzia eta ondorioz bereizmenean eragina du.

Bolak zenbat eta txikiagoak izan orduan eta efizientzia altuagoa izango da eta bereizmena hobea izango da. Baina garestiagoak dira eta fluxuari oztopo gehiago jartzen diotenez, HPLC ponpa jarri behar da, nahiko garestia dena.

Matrizearen bolen diametroa zenbat eta txikiagoa izan bereizmena orduan eta hobea da. Beraz bolak zenbat eta handiagoak bereizmen txarragoa emango da.

#### **8. IEX erretxinak**

Kromatografia hau purifikazioaren hasieran, bukaeran edo erdian erabili daiteke, gainera behin baino gehiagotan erretxina desberdinak erabiliz eskaintza zabala dagoelako.

## **9. Erretxina aukeratzen**

Gure proteina ondo banatzeko esperimentera diseinatuko dugu, horretarako erretxina aukeratu. Nire proteinaren karga pHeekin zelan aldatzen den jakiterekin aukera dezakegu.

Gure proteina pH 5.5 eta 8 artean egonkorra dela suposatuz (hortik kanpo desnaturalizatu), eta bere puntu isoelektrikoa 5.3 dela. Pltik gora proteina negatiboki kargatuta egongo da eta horitik behera positiboki.

Erretxina negatiboa jartzen badugu proteina pH 4.3an egon behar da eta hor ez dago egonkor. Aldiz erretxina positiboa jartzen badugu proteina pH 6.2an jarri dezakegu eta egonkor egongo da. Hau bakarrik egin daiteke gure proteinari buruzko informazioa dugunean.

Hala ez bada, frogak egingo dira pH desberdinetan kromatografia eginez eta banaketa ona non dagoen ikusiko dugu. Detektatzeko frakzioan aktibitatea ikusiko dugu.

## **10. pHa aukeratzen**

pH egokia aukeratzeko saiodietan pH desberdinetan erretxina jarri eta lagina botako da, nahastuz. Zentrifugatuko da eta pelletean erretxina+lortutakoa egongo da. Gure proteina jalkinean badago aktibitatea neurtu eta ikusiko dugu. Gehien dagoen potea izango da pH egokiena (irudian pH8). Saiodian egiten denean "in batch" deritzo.

Adibidea: gure proteina hoberen pH8an lotu da, eta pH horretan proteina negatiboki kargatuta egongo da seguruenik. Beraz erretxina positiboki egongo da.

## **11. Gradientearen eragina banaketan**

Behin pH eta erretxina aukeratu egon, ikusi behar da bolumen batean zenbat gatz bota behar den despegatzeko. Askotan bada zuzenean irtengo dira guztiak batera eta piko guztiak juntu irtengo dira. Poliki gehitzen badugu bereizmena hobea izango da, pikoak banatu egongo dira.

Gatz gradientearen maldak aukeratu dira, eta bestalde malda jaistean pikoaren zabalera handitzen da. Hau da, gatz gutxinaka (malda txikia) botatzen bada pikoak banatu dira baina zabalagoak izango dira, beraz, kontuz ibili.

## **12. IEX: gradiente eluzioa**

Grafikoaren y ardatzean absorbantzia ( $A_{280}$ ) adieraziko dugu eta x ardatzean eluzio denbora. Grafikoan absorbantziaren azterketaz gain gatz kontzentrazioaren bilakaera ere adierazi daiteke.

Poliki-poliki modu linealean igoko dugu gatz kontzentrazioa, eta gero banatu direnean asko botako da garbitzeko. Besteetan gradiente sofistikuagoak erabiltzen dira, malda desberdinekin. Kromatografia aztertzeko gatz malda igoko da kontaminanteak eluitzen direneko tartean.

## **13. IEX: mailakako eluzioa**

Gradienteak mailaka edo saltoka egin daitezke, eluitzeko.

Mailakatu: Lehenengo 0Mm jarriko da eta gero 100mM, ondoren itxaron, 200mM gero itxaron... Lortu behar dugu asmatzea gure proteina oraindik erretxinan mantentzeko gatz kontzentrazio altuena. Gero nire proteina zutabetik askatzeko behar den gatz kontzentrazio minimoa jakin behar da, bestek askatu gabe.

#### **14. pHaren eragina banaketan**

pH 7'5ean lortzen da banaketarik onena, osagaien karga netoen arteko desberdintasuna handiena delako eta ondorioz pikoak banatuago daudelako. Horrela gure nahasteko molekulak banatuko dira.

pH igotzean proteina negatibotzen ari gara, eta ikusten da zenbat eta pH altuagoa erretentzioa txikiagoa dela, ahulago lotzen dira. Beraz, erretxina negatiboa da, proteinak positiboagoak direnean (pH baxua) hobeto lotzen direlako.

#### **15. Fluxuaren eragina banaketan**

Fluxu altuak edukitzearen abantaila azkar ematen dela da. Zenbat eta azkarragoa izan proteinaren egonkortasunerako hobeto, degradazioa ekiditeko aukera gehiago dagoelako. Alde honetatik ona da azkar lan egitea. Baina bereizmen okerragoa lortzen da, pikoak lodiagoak dira (efizientzia baxuagoa).

Bi grafikoak konparatuz, bigarren kromatografia azkarrago egin da (8minututan), baina bigarren horretan efizientzia okerragoa da pikoak apur bat lodiagoak direlako.

#### **16. Kromatofokapena: pH gradienten bidezko IEX**

pH aldaketaren bidez eluitzen den ioi trukeko kromatografia da, beraz banaketa puntu isoelektrikoaren bidez ematen da eta ez karga netoaren bidez.

Gatzarekin jokatzean pH 12an berdea, gorria eta urdina irtengo dira ordena horretan. Aldiz kromatofokapenean pHarekin jokatzeko, puntu isoelektrikoaren arabera.

Normalean positiboki kargatutako erretxina bat jartzen da eta proteinak pegatzeko pH basikoa erabiltzen da, pH9 an adibidez orekatuko dugu zutabea. Beraz grafikoan ikusten den moduan, hiru proteinak lotuko dira erretxinera indar desberdinekin. Askatzeko, pHa jaisten hasiko gara, pHa modu lineal batean jaisten. pH 8ra heltzean proteina gorriak bere karga negatiboa galdu eta askatu egingo da. Jaisten jarraitzen badugu berdea askatuko da eta azkenik gehiago jaistean proteina urdinak ere karga galdu eta askatu egingo da. Beraz, proteinak euren puntu isoelektrikoaren arabera eluituko dira.

Teorian negatiboki kargatutako erretxinak ere erabili daitezke, baina ez dira asko ezagutzen.

#### **17. Kromatofokapena: erretxinak eta adibidea.**

Erretxina gehienak positiboak dira eta hainbat ezaugarritan desberdindu daitezke. Luzeran, erabili daitekeen pH tartean, fluxu ahalmena (garbitzeko...), zein presio maximotan lan egin dezakeen...

Prezio oso altua dute (1700-2000€), baina guk erabiltzen ditugunak ez (jaja). Zutabe hauek berrerabili egiten dira. Ezaugarririk garrantzitsuena pH tartea da, gure proteinen arabera izan behar dena.

Tanpoi bereziak erabili behar dira pH tarte guztia tanponatuta egon behar direlako. Horretarako ahalmen indargetzaile zabala (egokiena gure kasurako) duen tanpoia erabiliko da, horrela pHarekin aldatu egingo da.

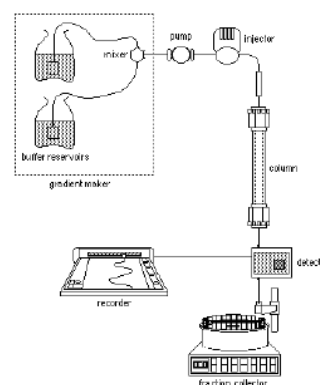
Behin hauek guztiak aukeratu eta gero esperimentua oso erraza da. Hasierako tanpoi batean orekatuko dugu zutabea, lagina sartu eta eluitzeko ez dugu tanpoien nahasketarik egin behar. Helmugako pHa duen tanpoia sartuko dugu zutabea lagina sartu eta gero, horrela gradiente bat eratuko da. Guk ez dugu gradiente bat eratu behar, berez sortzen da. Bereizmen handikoa da kromatografia da, eta nahiko denbora laburrean osagaiak ondo bereizi daitezke (pikoak euren artean eta finak).

Fluxua adierazteko modu desberdinak daude: 1ml/min edo 305cm/h. Zutabearen zein luzera pasatzen duen denbora tarte batean.

## 18. Kromatografi sistemak

Erretxinaz betetako zutabe bat dago, bertako erretxina beti busti egon behar da lehortu ez dadin. Erretxinak paketatzea erraza da, baina txikiagoak badira partikulak zailagoa da (erosi egiten dira). Ponpa batek fluxua sortuko du likidoa beti berdin joateko, beste kasu batzuetan grabitatez egingo da. Ponpa bat aukeratzeko orduan bi ezaugarri hartuko dira kontuan: zein fluxu eta presiopetan egin dezaketen lan. Zutabe batzuk oztopo gisa jokatzeko dute, oso "pretuak" dira fluxuarako eta ponpak indar handiagoa egin behar du (presio altuagoa).

Bi tanpoi egingo dira, bat gatzarekin eta bestea gatzik gabe. **Ponpak** ordenagailuz kontrolatutako balbula bat izango du, zeinek bi tanpoiak kontzentrazio desberdinetan nahastuko dituen momentuan behar den tanpoia (gatz kontzentrazio bereizgarriarekin) sartzeko eta zutabetik pasartzeko. Zutabearen ostean detektorea egongo da (guztiek 280nm-an neurtuko dute eta batzuek gatz kontzentrazioa ere neurtzen dute). Proteinen banaketa egiteko frakzio biltzailea erabiliko da, ondorioz, frakzio bakoitza (numeratuta) saioldi batean egongo da.



- **Injektorea:** gure nahastura sartzeko.
- **Detektorea:** gure nahasturako proteinak banatzen doazen heinean zein proteina dagoen jakiteko, edo behintzat proteinak daudela jakiteko. Proteinek 280nm-ko ehun luzeran argia xurgatzen dute, batzuk gehiago beste batzuek baino. Adibidez, A eta B proteinaren kantitate bera botatzean baliteke pikoaren altuera oso desberdina izan, A proteinak agian 280nm-tan gehiago xurgatzea aminoazido aromatiko gehiago dituelako. Detektoreak desberdinak izan daitezke: sinpletan uhin luzera bakarra aukeratu behar da; konplexuetan hainbat (3) aukeratu daitezke aldi berean. Diodo arraieko detektoreek espektroa egiten dute, espektro osoa jasotzen duzu aldioro.
- **Konduktibimetroa:** detektorearen atzetik, tanpoiaren konduktibitatea neurtzen duena. Zenbat eta gatz gehiago eduki konduktibitate gehiago edukiko du. Horrela jakin dezakegu zutabetik irteten den likidoaren gatz kontzentrazioa zein den. Zutabetik irteten den benetako gatz kontzentrazioa zein den jakingo da horrela.
- **pH-metroa:** Kromatofokapenaren kasuan, zutabe irteeraren ostean pH-metro bat dago etengabe pHa neurtzeko.
- **Frakzio biltzailea:** zutabetik eluitzen dena frakziotan jasoko da, bolumen jakinekoak direnak.
- **Ponpak, hasierako nahasteak...**

Osagai hauek ez dira derrigorrezkoak, baina bai lagungarriak.

## 19. Gradienteak egiteko sistemak

Hiru sistema daude:

- Bi **ponpa** erabiltzea: Modu sofistikatuagoak badaude, bi ponpa erabiliz adibidez. Horrela nahasketa A eta B ponpen fluxuek kontrolatuko dute.
- Ponpa bat eta balbula bat.
- Bi hodi: bi tanpoi egingo dira, bat gatz askorekin eta beste bat gutxirekin. Zutabera konektatuko da eta hasieran gatz gutxi gehitzen joango da. Ondoren bigarren potetik hasiko da irteten gatz eta nahastuko da bestearekin, horrela gutxinaka gradienteak egingo da (nahasteko iman bat dago "eulia").

## 20. Injektorea

Hainbat sarrera eta irteera izan ditzake, eta sarrerak elkartuta egon daitezke. Balbulak duen posizioaren arabera zulo batzuk edo beste batzuk elkartuko dira kanaltxo bat eratuz.

Kasu batzuetan bi zulo loop batekin lotuta egon daitezke, kanal edo hodi batekin. Nire lagina duen xiringarekin loop-a beteko dut, eta gure likidoak loop-ean zegoen substantzia bultzatuko du kanporantz. Gure lagina zutabera sartu nahi denean, balbulak posizioz aldatuko da eta loop-arekin lotzen da ponparekin datorrena. Loop-a mutur batetik ponparekin eta bestetik zutabearekin lotuta geldituko da. Horrela ponpak loopekoa bultzatu eta zutabera bultzatuko du.

## ELKARREKINTZA HIDROFOBIKOKO KROMATOGRAFIA

### 1. HIC: Oinarria

Proteina solubleak saiitzen dira euren aminoazido hidrofobiko gehienak ezkututzen barrualderantz, baina hala ere batzuk kanporantz gelditzen dira. Proteina batzuek azalera hidrofobiko gehiago izango dute beste batzuk baino. Honek urarekin arazoak sortzen ditu, baina itsasteko joera ematen du (elkarrekintza hidrofobikoa, ur molekuletatik aldentzeko eta eurak elkartzeko joera). Gatz kontzentrazio altuetan proteinak euren artean agregatzeko joera dute eta ondorioz prezipititzen dira.

Kromatografiaren kasuan, itsasteko joera hori aprobetxatuko da eta ligando hidrofobiko batekin itsatsaraziko dira. Gatz kontzentrazioa igotzen baldin bada, elkarrekintza hidrofobikoak indartu egiten dira.

Zutabean ligando hidrofobikoa egongo da gure proteina hidrofobikoak lotzeko. Gatz jarri behar da, ez asko bestela prezipititzen dira proteinak.

Hasiera batean gatz kontzentrazio altuan orekatuko ditugu zutabea eta lagina (euren artean prezipitatu gabe). Nahastura zutabetik bota eta ligandora lotu direnak askatzeko gatz kendu beharko da. Lehenengo hidrofobizitate gutxien dutenak askatuko dira eta azkenengo oso hidrofobikoak direnak.

### 2. HIC: gatzaren eragina

Gatzik gabe hidrofobizitatea ez da nahikoa proteinak ligandora lotzeko, baina gatz gehitzean ura "bahituta" gelditu eta proteinak ligandora lotzen dira. Ondoren erretenituta gelditu direnak askatzen saiatuko gara, baina euren artean banatzen saiatuko gara.

### 3. HIC: Kromatografiaren urratsak

- Lehenik gure zutabea eta lagina orekatuko dira, gatz botaz (1M adibidez).
- Behin orekatua lagina sartuko da zutabean. Orekako baldintza horietan proteina guztiak ez dira lotuko ligandora, bakarrik hidrofobikoak direnak lotuko dira.
- Lotu ez direnak eluituko dira.
- Lotu direnak askatuko ditugu, gatz kontzentrazioa jaitsiz.
  - Lehenengo hidrofobizitate gutxi dutenak irtengo dira gatz apur bat kentzean.
  - Gero hidrofobikoagoak direnak irtengo dira gatz gehiago kentzean.
  - Azkenik oso hidrofobikoak irtengo dira gatz asko kentzean.
  -

### 4. HIC: erretxinak

Matrizea eta talde hidrofobikoez eratuta

- Matrizea (bolatxoaren konposizioa) desberdina izango da. Bolak material desberdinezkoak dira, forma desberdina dute eta tamaina desberdina dute ere. Bola txikiagoak erabiltzean efizientzia hobea izango da baina fluxuarekin kontu handia izan behar dugu.
- Hidrofobizitate desberdina duten ligandoak : Talde hidrofobikoak desberdinak izango dira eta matrizeari lotuta agertzen dira: fenilo taldea, butiltoa, isopropiltoa, oktiltoa, eterra... Zenbat eta hidrofobikoagoa izan erakarpen hidrofobiko handiagoa.

Erresoluzioa edo bereizmen hobea lortzeko partikulen tamaina txikiagoa izan behar da, baina honek oztopo egingo dio fluxuari.

### **5. HIC: ligandoen eragina selektibotasunean (banaketan)**

Ligando batetik bestera aldea dago. Lau grafikoetan fluxua, lagina, gatz kontzentrazioa... bera da, aldatzen dena zutabearen ligandoa da. Ikusten denez banaketa desberdina da, ligandoaren dentsitatea aldatzen delako.

A eta B: B kasuan proteina guztiak askapenean aurreratu egiten dira, hau da, gatz gutxiago kenduz askatu egiten dira eta banaketa ez da hain ona.

C eta D: C kasuan hobeto banatzen dira proteinak askapen bera eginez. D-n solapatu egiten dira.

Ligando egokiena aukeratzeko probak egin behar dira, aurreikustea zaila delako. Agian zure ligandoa ez den beste ligando bat egokiagoa da banaketa egiteko. Proba bat egiten baduzu eta ez bada ligandora lotzen ez du esan nahi beste ligando batera ez dela lotuko.

### **6. HIC: emaitza aurreikusteko zailtasuna**

Ez da errez aurreikusten proteina bat nola lotuko zaion ligando bati edo beste bati. Antzeko proteinak ere jokaera nahiko desberdina izan dezakete erretxina beraren aurrean.

### **7. HIC eluzioa: gradiente eta mailakakoa**

Hasieran gatz kontzentrazioa nahiko normala izanik, gutxinaka kentzen joango gara proteinak askatu daitezten. Gero konstante mantendu daiteke proteina guztiak askatzeko eta azkenik berriro hasierako gatz kontzentrazioa jarriko da beste nahastura bat sartzeko prest uzteko.

Saltoka egin daiteke eluzioa: lehenengo apur bat kendu eta mailaka gatz kentzen joango gara. Behin proteina batzuk askatu, gatz apur bat kendu ahalik eta kontaminante gehien zutabearen mantenduz baina gure proteina askatuz.

### **8. HIC: gatzaren eragina selektibotasunean**

Ezkerreko irudian hiru kromatografia daude, lagin, zutabe, pH... berarekin eginak daude. Aldatzen dena oreka tanpoia da. Lehenak 2M du, bigarrenak 1M eta azkenak 0'8M. Oreakatik 0Mera jaisten da kasu guztietan (2M→0, 1M→0, 0'8M→0). Proteina zutabera lotu eta gradientearen bukaeran askatu egiten da. Kontaminanteak hasieran edo gurea baino lehenago askatzen dira.

2M-ekin orekatuz gero lotzen diren proteinak gehiago dira. Gatz kontzentrazio altuegia du.

1M-ekin orekatuz gero gure proteina zutabera pegatu egiten da eta besteak ez hainbeste. Beste proteinak lehenago askatzen dira, eta gurea azkarrago eluitzen da. Azken finean, azkarrago eluitzea lortzen dugu.

0'8M-era jaisten dugunean lotzen ez direnak asko dira, baina gure proteinaren eluzioan difusio-efektua sortu da, ondorioz diluituagoa egongo da. Gatz kontzentrazio baxuegiarekin orekatu dugu.

Normalean amonio sulfatoa erabiltzen da, baina erabiltzen dugun gatzaren arabera kromatograma desberdinak lortu ditzakegu. Gatz desberdina da kasu bakoitzean eta banaketa desberdina lortzen da, gainontzeko parametroak berdinak direlarik.

Gatzak proteinaren solubilitatean eragina du, horregatik kontu handiz ibili behar gara gure proteina ez prezipitatzeko (multzoak eratu).

## GEL IRAGAZPENEN KROMATOGRAFIA (esklusio molekularrekoa)

### **1. GF: oinarria**

Tamainaren arabera (masa molekularren arabera) banatuko dira proteinak. Hemen ez daukagu ligandorik. Erretxina sare baten antzekoa da eta tamaina jakineko poroak izango ditu, guk aukeratutakoak interesen arabera. Honetan ere tanpoia pasarazi beharko da orekatzeko. Proteina handienak ezin izango dira poroetatik sartu eta zuzenean zutabea zeharkatuko dute lehenengoak eluituz. Proteina txikiak aldiz, gehiago atzeratuko dira poro guztietatik sartu ahal izango direlako, horrela azkenengoak eluituko dira. Txikienak bide luzeagoa egingo dutenez azkenak irtengo dira. Ondo funtzionatzeko ez da interakziorik egon behar proteina eta erretxinaren artean. Erabiliko den tanpoiak tarteko gatz kontzentrazioa (50-100mM) izango du. Kromatografia isokratikoa izango da, tanpoiaren izaera ez da aldatuko.

### **2. GF: eluzio-bolumen desberdinak**

Proteinak ez dira itsasten, honek abantaila bat dakar: ez dugu tanpoiz aldatu behar proteinak zutabetik askatzeko. Fase mugikor bakarra behar dugu, ez da behar gradienterik. Horri eluzio isokratikoa deritzo, ez da fase mugikorra aldatuko.

Lagina zutabearen sartuko da eta proteina handienek ere denbora bat behar dute zutabea zeharkatzeko ( $V_0$ , bolumen hutsa), hau da, erretenitzen ez den osagai batek zenbat denbora behar duen zutabea fisikoki zeharkatzeko.  $V_t$  osagairik txikienak zutabea zeharkatzeko behar duen bolumena/denbora. Bukaeran zirrikitu guztietan sartzen diren molekulak irtengo dira, proteina txikiena.

Batzuetan eluzio bolumena normalizatzea komeni da. Horretarako eluzio bolumena zati bolumen totala egiten da, horrela beste neurri desberdineko zutabe bateko emaitzekin konparatu ditzakegu emaitzak.

Normalizatzeke beste modu bat dago, gehiago erabiltzen dena:  $K_{av} = \frac{V_s - V_0}{V_t - V_0}$

Proteina erraldoiak eta proteina handiak aldi berean eluituko dira, ez baitira zirrikituetatik sartzen. Hauek guztiak bolumen hutsaren parte izango dira. Txikienak azkenengoz irtengo dira. Proteina nahasturaren banaketa zutabearen 2/3ean emango da,  $V_0$  1/3 baita. Gure esperimentua honetara mugatu behar dugu, horregatik oso garrantzitsua da erretxina egokia erabiltzea bakaketa ondo egind adin eta gure proteinak  $V_0$  eta  $V_t$ -ren artean (zutabearen 2/3) banatu daitezen.

### **3. GF: helburu desberdineko erabilerak**

Zutabea orekatuko dugu proteina jaso nahi dugun tanpoiarekin. Nahastea gehitu eta proteinak atera arte itxarongo dugu. Poroak baino handiagoak diren proteina guztiak batera eluituko dira, lehenak. Laginak



okupatzen duen tartea zutabea baino askoz txikiagoa izan behar du (%1 gutxi gorabehera), horrela izango ez balitz beherago dauden proteinak, nahiz eta geldoago mugitu, arinago mugitzen direnak eta handiagoak direnak baino lehenago aterako lirateke tamainak nahastuz.

- Purifikatzeko
- Lagin baten gatzak kentzeko erabili daiteke. Poro txikidun erretxina jarriko dugu eta hortik pasaraziko dugu lagina. Proteinak zuzenean batera eluituko dira, gatzak atzeratzen diren bitartean. Horretarako B tanpoi bat jarriko dugu zutabea, gatz gutxirekin. Horrela gure proteinak B tanpoian lortuko ditugu gatz gabe.
- Erabilera analitikoak: informazioa lortzeko. Tamainari buruzko informazioa jaso dezakegu masa jakina duten proteinekin konparatuz.

#### 4. Erretxinak

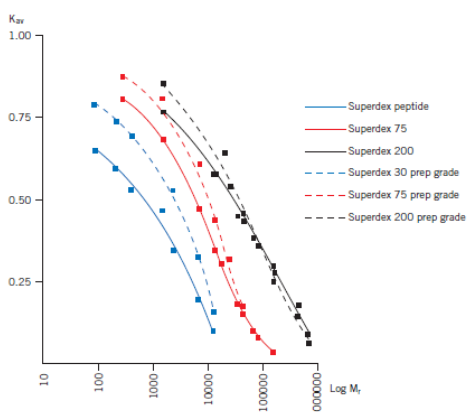
Bolatxoak dituzten erretxinak dira, eta bolatxoek tamaina jakineko zirrikituak dituzte. Bolek hainbat zulo dituzte, baina tamaina jakin batetik hasita txikiagoa. Beraz, frakzionamendu egokia bi mugen artekoa izango da, hau da, proteina txikienak zulo txikienetatik sartzeko gai izango dira eta handienak zulo handienetan ezin izango dira sartu.

Guk gure proteinen tamainaren arabera erretxinak aukeratu ditugu, muga altua eta muga baxuaren artean dagoen proteina purifikatu dugu erretxina horretan. Proteina muga altua baino handiagoa bada eta muga txikia baino txikiagoa bada, erretxina hori ez da izango egokia.

Behin tartea zein den erabakita, partikula txikiagoak edo handiagoak aukeratu dira. Bestalde, bolak tamaina desberdinekoak izan daitezke, txikiagoak izanda efizientzia hobea.

#### 5. Selektibotasuna

Erretxinaren mugen tartearekin erlazioan dago. Erlazio nahiko lineala mantentzen da pisuaren logaritmoaren eta proteinaren eluzio bolumenaren artean ( $K_{av}$ , eluzio bolumena normalizatzeko modua). Pisu edo masa jakin eta ezaguneko proteinak sartuko dira kromatografian, eta euren eluzio bolumena zein den ikusiko dugu kromatogramako pikoak kontuan hartuz. Honekin grafikoa egingo dugu. Proteinak txikiak edo handiak badira zutabetik batera irtengo dira, beraz linalitatea erdiko zonaldean azalduko da. Erretxinen muga tartea linalitatea gordetzen den tartea izango da, eta hau erretxina bakoitzaren ezaugarri bat izango da. (ikus irudia).



Kasu honetan erretxina material berarekin egina dago baina partikulen poroak desberdinak dira. Erretxina bakoitzak pisu molekularren tarte bat dauka eta beraz bakoitzak linalitatea tarte batean gordetzen du.

50.000-ko proteina bat gorria eta beltzaren mugan sartzen da, baina ez du berdin jokatuko.

(Goiko eskumako grafikoa). Lehenengo pikoak 17ml-an irten da eta azkena 50ml-an.  $V_t=5.000Da$ -eko proteinak dira eta  $V_o=250.000Da$ -ekoa, beraz tarte horretako proteinak 33ml-tan banatu dira euren artean. 33ml-tan banatu behar dira, baina tarte estuagoa duen erretxinean banatu da urdinean.

Lerro gorrian bi proteina banatzeko (bi piko ikusteko), proteinen artean desberdintasun handiagoa egon behar da. Lerro urdinean aldiz, proteinen artean desberdintasun txikiagoak antzeman daitezke, baina tartea txikiagoa da. Urdina egokiagoa da, tarte estuagoa duelako eta selektiboagoa delako.

(Beheko eskumako grafiko). Bi grafikoak kromatografia berdina dira, baina erretxina desberdinak erabilia, bakoitzak tarte bat duelako. Gure proteina nahasturaren arabera bata edo bestea egingo dugu.

## 6. GF: laginaren bolumenaren eragina

Laginaren bolumena mugatua da, zutabearen arabera da. Ezkerreko irudiaren kasuan, dena da berdina, aldatzen dena kargatzen dugun laginaren bolumena da. Goiko grafikoan zutabearen bolumenaren %0,1 da, bigarreanean %1 eta hirugarren grafikoan %4,2. 1 eta 2 grafikoaren artean ez dago desberdintasun handirik, baina hirugarren kasuan bereizmena murriztu egiten da. %1era arte bereizmenean ez dago aldaketa handirik, baina hortik hurrera bereizmena asko jaisten da.

## 7. Fluxuaren eragina

Honek eragina du kromatografian. Ikusten den grafikoan substantzia guztiak berdinak dira, aldatzen dena fluxua da. Bigarren kasuan lau aldiz azkarrago bukatzen da kromatografia, fluxua 4 aldiz handiagoa delako. Bigarren kasu honetan banaketa txarragoa da, lehenengo kasuan banaketa nahiko ondo egiten delako.

## AFINITATE KROMATOGRAFIA

Itu molekula eta ligandoaren arteko afinitatean oinarritutako kromatografia da.

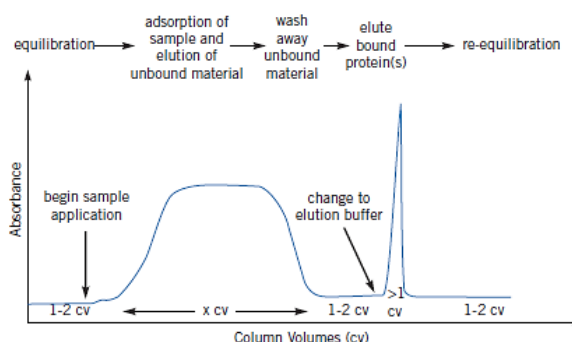
### 1. Oinarria eta ligandoen aukerak

- Selektibotasunak du garrantzia gehien, ez efizientziak. Kromatografiak ahalmena selektibotasunean du. Ligandoarekin oso proteina gutxi lotuko dira, gurea barne, eta gainera lotu direnen artean ez da egongo ia kontaminanterik.
- Ligandoa erretxinean immobilizatuko dugu lotura kobalentez. Ligandoa eta gure proteinaren artean afinitate eta espezifikotasuna egongo da. Gainera itzulgarria izango da lotura hori, baina elkarrekin lotzeko zaletasuna egongo da.
- Ligandoak:
  - Entzima baten substratua, kofaktorea, inhibitzailea: afinitate espezifikoak duen molekula, lotzeko joera duena.
  - Antigeno baten antigorputza edo antigorputz baten antigenoa, lotura oso espezifikoak euren artean.
  - Hartzailen baten hormona.
  - A eta G proteinak Ab purifikatzeko.
  - His asko duten proteinentzako metal ioiak erabiliko dira. Proteina birkonbinatuek his isatsak dituzte purifikatzeko.
  - Proteina batzuk DNA sekuentzia espezifikoak ezagutu eta lotzen dira.
  - mRNA purifikatzeko oligodT: mRNA-k poli-A isatsa dute.

### 2. Afinitate kromatografiako esperimentua

Kasu askotan intereseko ligandoa erretxinean immobilizatuta erosten da, baina zure ligandoa bereziagoa bada zuk immobiliza dezakezu.

Kromatografia honetan lotura gertatzeko moduko bufferra sartuko da zutabera eta gero gure proteina nahastura gehituko da. Ligandora gure itu proteina lotuko da soilik, beste proteinek ihes egin duten bitartean. Lotu den proteina eluitzeko baldintzak aldatuko dira. Behin eluituta, bufferra gehituko zaio zutabeari garbitzeko, erretxina



berrerabili ahal izateko. Beraz, lotzen ez den guztia irten eta gero, baldintzak aldatuko dira lotutakoa eluitzeko.

### 3. Eluzio aukerak

**1.a. aukera:** gure proteina eta ligandoaren arteko lotura apurtzea, euren arteko indarrak ahulduz. H loturak, lotura elektrostatikoak..., hau da, lotura polarrak izango dira euren artekoak, beraz gatzak gehituz loturak apurtuko dira.

**1.b. aukera:** antigorputza ligandoa edo itua denean, askatzeko pHa azidotuko da lotura apurtzeko.

**2.aukera:** ligando-erretxina lotura apurtzea. Ez da gehien erabiltzen den teknika, baina his isatsen kasuan, metala eta erretxinaren arteko lotura apurtuko da, horrela metala+itua askatuko dira.

**3.aukera:** lehiakidea sartzea. Immobilizatutako ligandorekin afinitate handiagoa duen molekula sartuko da, horrela gure itua askatuko da besteak lehia irabazi duelako.

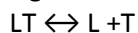
**4.aukera:** ligando aske bat gehituko dugu, immobilizatuarekin lehiatzeko. Itu proteina hobe lotuko da askearekin, eta horrela biak eluituko dira.

pH-arekin jokatzuz → gradientean, mailaka edo bat-batean pHa aldatuz eluitu daitezke lotutako proteinak. Mailaka edo gradientean egiten badugu, proteina desberdinak banatzea lortu dezakegu.

His isatsak → nikeluz kargatutako erretxina erabili da kasu honetan, proteina birkonbinatuak purifikatzeko erabili ohi den metodoa baita. Gure proteinak his isatsa duenez (6-8 histidinaz osatutako isatsa) nikelera lotuko da. Imidazolak nikelari lotzeko gaitasuna du, horrela gradientean imidazola botatzen badugu lotutako itu-proteina askatzea lortuko dugu. Bi urratsetan egingo da: lehena kontaminanteak irteteko baldintzak ezarriko dira eta ondoren gurea askatzeko baldintzak. Honetarako imidazola erabili dugu (3.aukera: lehiakidea sartzea), nikelarekin lotzen delako.

### 4. Zinetika pH edo indar ionikoa aldatzean

Ligandoa eta itu proteinaren arteko afinitatea edo disoziazio konstantearen oreka egongo da.



$K_D = \frac{[L] \cdot [T]}{[LT]}$  hau da disoziazio konstantea.

$K_D$  handia bada, molekulek disoziatzeko joera izango dute.

$K_D$  txikia bada, molekulek elkartzeko joera izango dute, ez disoziatzeko.

Lotu den molekula askatzeko disoziazio konstantea asko handitu behar da, disoziatzeko joera handiago izan dadin. pH-ak edo indar ionikoak  $K_D$  handitzen dute, horrela gure proteina askatuko da baldintzak aldatu ditugulako.

a) kasua: ez dugu  $K_D$  aldatu beraz ez da gurea guztiz eluitzen.

b) kasua:  $K_D$  ez da hain altua, beraz ez da itu-proteina guztia askatu.

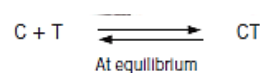
c) kasua:  $K_D$  oso txikia denez, nahiz eta baldintzak asko aldatu ez da askatuko, ligandoarekin afinitate oso afinitate handia duelako.

Modu eraginkorrean gure proteina ligandoari lotzeko  $K_D$  txikia izan behar du. Eluitzeko, aldiz, disoziazio-  
ktea handitu beharko da baldintzak aldatuz.

### 5. Zinetika lehiakidea erabiltzean

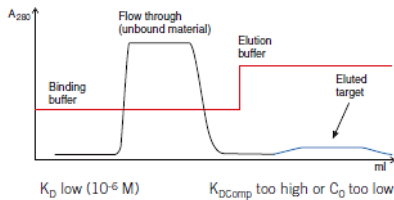
Sisteman lehiakide bat sartzen dugu, gure proteinak ligando immobilizatua askatuko du ligando askearekin lotzeko, horrela biak eluituko dira.

Ligando lehiakide askea kontzentrazio altuan gehituko dugu, eta nahiz eta afinitate txikiagoa eduki ituekin honekin lotuko da.



$$K_{D\text{Comp}} = \frac{[C][T]}{[CT]}$$

Gure proteina ez bada diluitzen bi arrazoigatik izan daiteke: lehiakide gutxi bota dugulako edo disoziazio konstante handia duelako lehiakideak.



## 6. Eluzio motak

Lehiakidearen kontzentrazioa poliki igoz, pH aldatuz, gatzak gehituz... eluitu daiteke. Gradiente lineal bat egiten badugu lotu diren molekuletatik kontaminanteak banatu ditzakegu itu-proteinetatik, baina gehienetan bi pausotan egiten da: lotzen ez direnak zuzenean eluitu eta baldintzak aldatu lotu direnak askatzeko.

## 7. Erretxinak

Agaroszkoa dira eta partikulen tamainak nahiko handiak izaten dira, arruntak eta merkeak gainera. Lotu direnak ez ditugu banatzen. Batzuk ligandoa bolen azalera izango dute, beste batzuetan ligandoak besoa du eta itu-prteoina eskuragarriago izango du horrela. Luzera desberdineko besoak daude.

## 8. Zure ligandoa immobilizatzeke erretxinak

Ligandoak popularrak ez direnean ezin izango dituzu immobilizatuta erosi. Horregatik zuk erretxinari kobalenteke lot diezaiokezu ligando. Hainbat aukera daude lotzeko, aminoazido, peptido, proteina.. edo molekula motaren arabera. Erretxina aktibo desberdinak daude ligandoaren arabera bat aukeratzeko eta bertan zure ligandoa immobilizatzeke. Gainera besoa jarri diezaiokezu eta horren luzera aukera dezakezu. Ligandoa karbohidratoa, nukleotidoa, koentzima, bitamina... izan daiteke ere.

Talde kimiko desberdinekin aktibatuta dauden erretxinak daude, gero guk ligandoa botako diogu lotzeko.

## 9. Immunoglobulinak

Ig-aren alde konstantea A eta G proteinek ezagutzen dute. Ig-ak beste proteinetatik banatzeko egokiak dira A eta G proteinak, eta gainera immunoglobulina mota bakoitzak (IgA, IgG... eta espeziearen arabera) G eta A proteinekin afinitate bat du.

Ligando jakin bat dute immobilizatuta, A eta G proteinak dauden immobilizatuta. Bi ligando hauek immunoglobulinak purifikatzeko erabili daitezke, edozein Ig. Izan ere, A eta G proteinek Ig-en alde konstantea ezagutzen dute.

## 10. Proteina birkonbinatuak: GST-fusio proteinak

GST fusio proteinak guk sortutako proteina birkonbinatuak dira, horretarako gure genearen atzetik glutation transferasaren genea jarriko dugu, eta honez erraztuko du purifikazioa. GST fusiak dituzten proteinak purifikatzeko erretxinak saltzen dituzte. Ligandoa glutation erreduzitua da (GSTren substratua), horrela GSTa glutationarekin lotuko da eta gure proteina berarekin batera purifikatuko da. Gurea askatzeko peptidasa bereziekin moztuko dugu.

## 11. Proteina birkonbinatuak: His etiketak (IMAC)

IMAC (immobilizatutako metal afinitate kromatografia). His etiketak egiten ditugunean gure proteinari 6-8 histidina gehitzen diogu N edo C muturrean, DNAn kodifikatuta (gene moduan). Erretxina kobre, nikel edo zink ioiez kargatuko dugu. Gehienetan nikel ioiaz kargatzen da, eta gero gure proteina nahasketa zutabetik pasazaziko dugu. Proteina gehienak ez dira ioian lotuko. Lotu direnak askatzeko tanpoiz aldatuko dugu. Imidazolak gure proteinarekin lehiatu egingo du nikelarekin lotzeko, horrela gure

proteina askatuko da. Beste batzuetan nikela bera sartzen da, orduan itu-proteina askatuko da nikel soltera lotzeko.

## **12. Beste zenbait ligando**

Hainbat ligando immobilizatuta duten erretxinak erosi ditzakezu, adibidez hauek:

- Heparina immobilizatuta duten erretxinak erosi ditzakezu. Heparinak DNAn batzen diren proteinak eta koagulazio faktoreak lotzen ditu.
- Estreptavidina efizientziaz lotzen da biotiniz eta hainbat konposatu biotiniz etiketatu daitezke.
- Cibacron blue kolorantea: albumina, NAD menpeko DHasak, ATP menpeko kinasak purifikatzeko balio du hauekin elkartzeko joera duelako. Ez dugu bakarrik gurea purifikatuko baina multzo txiki bat purifikatuko dugu.
- AMP: NAD menpeko DHasak eta ATP menpeko kinasak purifikatzeko.
- 2'5 ADP: NADP menpeko DHasak purifikatzeko.
- Lektinak glukoproteinak purifikatzeko.
- Kalmodulina ATPasak, adenilato ziklasak, fosfodiesterasak purifikatzeko.
- Benzamidina, arginina: serin proteasak purifikatzeko.

## **HIDROXIAPATITOKO KROMATOGRAFIA**

### **1. Elkarrekintza konplexuak**

Erretxina hidroxipatitoxkoa da eta erretxinaren azalean fosfato eta kaltzio taldeak agertzen dira. Hidroxipatito eta proteinen artean sortzen diren elkarrekintzak konplexuak dira, elkarrekintza ionikoez aparte beste batzuk sortzen dira. Zutabean OH, Ca eta PO<sub>4</sub> daude kanpora begira. Eratuko diren indarrak erakarpen eta aldarapen indarrak izango dira. Aurreikuspena egitea zaila da eta ez dago oso argi zelan ematen diren elkarrekintzak.

### **2. Erretxina eta adibideak**

HA sortzeko erabiltzen zen metodoak ez zituen sortzen beste kromatografietan bezalako matrizeak (bolak). Ondoren HA zeramikoa sortu zuten, beste metodo batekin, horrela estandar batzuetara heldu ziren: tamaina bereko bolak sortzea lortu zuten eta matrize finkoak eratzen hasi ziren, neurri homogeneokoak eta desegiten ez direnak.

Fase mugikorrari dagokionez kromatograma azalduko dugu. Lotu direnak eluitzeko fosfato tanpoiaren gradientea ingo da, fosfatoaren kontzentrazioa igoz.

## **ALDERANTZIKO FASEKO KROMATOGRAFIA**

### **1. Bereizmen handiko kromatografia**

Elkarrekintza hidrofobikoko k-an ligando hidrofobikoa da eta lotura laguntzeko gatza gehitzen genuen, eta eluitzeko gatz kontzentrazioa jaisten genuen.

Alderantziko faseko kromatografian ligandoak askoz hidrofobikoagoak dira, beraz, gatzik gabe ere lotuko dira proteinak zutabera. Eluitzeko eluyentearen apolartasuna handituko dugu, baina inoiz ez da helduko zutabeak duen apolartasunera.

Eluyentea propanola, azetonitriloa... izango dira eta zoritxarrez eluyente hauek proteinak desnaturalizatuko dituzte. Ondorioz alderantziko faseko kromatografia gehienek proteinak desnaturalizatzen dituzte baldintza gogorretan lan egiten delako, beraz ez da asko erabiliko.

Helburu batzuetan ez da behar proteina aktiboa, beraz kasu hauetan kromatografia hau egin daiteke bereizmen handiko kromatografia delako. Irudian ikusten den bezala, piko estuak ematen ditu, hau da, banatzeko ahalmen handia du osagaiak bereizten dituelako.

Eluitzeko azetonitriloa erabiltzen denez proteinak desnaturalizatuko dira.

Oso bereizmen oneko kromatografia da, baina proteina aktiboak purifikatzeko ez da baliagarria.

## **2. Alderantzizko faseko kromatografia (RPC)**

Gure eluyentea fase geldikorra baino polarragoa izango da hasieran. Ondoren, fase mugikorra apolarragoa jartzen joango gara baina inoiz fase geldikorra bezain apolarra. Hemen beti fase mugikorra geldikorra baino polarragoa izango da eta beste kromatografiatan alderantziz izango da.

## **3. Oinarria**

Gure erretxinak oso hidrofobikoa den ligando bat izango du bere gainazalean. Proteina nahastura zutabetik pasaraziko dugu eta proteinak zenbat eta azalera apolar gehiago eduki indar gehiagorekin lotuko da zutabera. Proteina hidrofobikoenek indar sendoagoak sortuko dituzte eta gatzik gabe ere lotzen dira (beste kromatografietan ez). Guztiz polarrak diren proteinak ez dira lotuko, baina nahikoa da zati apolar bat izatea apur bat itsasteko.

Askatzeko fase mugikorra apolarragoa egingo dugu eta horretarako acetoneitriloa, etanola, propanola... (konposatu organikoa) gehituko dugu. Honek eluyenteari hidrofobizitatea emango dio. Baldintza hauetan gure proteinaren alde hidrofobikoa eta ligandoaren arteko lotura ahulduko da, horrela askatu egingo dira. Lehenengo askatuko dira azalera hidrofobiko txikia duten proteinak (polarrenak) eta geroago apolarrenak direnak (gehiago kostatuko zaie erretxinetik askatzea). Azken finean, azetonitriloak ligando-proteina lotura ahultzen du eta proteina askatzea eragiten du.

## **4. Esperimentua**

Hasiera batean gure erretxina daukagu, azalera oso hidrofobikoarekin, eta oso polarra den tanpoiarekin orekatuko dugu. Gure nahasketa pasaraziko dugu eta baldintza horietan lotzen ez diren osagaiak egongo dira (polarrak) eta horregatik eluituko dira zuzenean. Beste batzuk aldiz, apolarragoak direnak, lotu egingo dira eta hauek askatzeko gradiente lineal bat egingo dugu malda berekoa edo mailaka. Gradiente hau osagai apolar batena izango da, adibidez azetonitriloarena. Gero eta kontzentrazio handiagoan jarriko dugu hau eta proteinak askatuko dira hidrofobizitatearen arabera: lehenengo polarrenak askatuko dira, gero apolarrak eta azkenik oso apolarrak direnak. Zenbat eta hidrofobikoagoa izan beranduago irtengo da zutabetik. Kasu honetan eluitzeko eluyentearen apolartasunarekin jokatu dugu.

Elkarrekintza hidrofobikoan ere zenbat eta apolarragoa izan beranduago irtengo da osagai hori baina kasu honetan gatz kontzentrazioa igoz eluituko dugu.

## **5. Eluzio isokratikoa vs gradientekoa**

Normalean gradiente bat egiten da banaketa on bat lortzeko. Eluyentea (tanpoia) aldatu gabe ere egin daiteke baina tanpoi egokia lortzea oso zaila da. Eluyentea oso polarra baldin bada edo ez bada nahikoa apolarra, hidrofobizitate txikia dutenentzako ona izan daiteke baina apolarrak direnak asko atzeratuko zaizkigu eta piko zabala izango da. Kasu honetan eluyente bakarra erabili da (ez gradientean) eta gainera nahiko polarra da (lehenengo kromatograma lortuko da).

Kromatografia berean apolarragoa den fase mugikorra erabiltzen bada, apolarrek diren substantziak apenas lotzen dira zutabearekin eta oso goiz eluituko dira polarrak eta apolar flojoak. Eluyente hau egokia izan daiteke oso apolarrek diren proteinentzako (horrela bigarren kromatograma lortuko dugu).

Normalean eluyentearen izaera aldatzen joaten da, hau da, gradientean egiten da. Poliki-poliki eluyentea geroz eta apolarragoa jarriko dugu eta horrela proteinak apolartasunaren arabera banatuko dira nahiko ondo: lehenengo polarrenak irtengo dira eta azkenik apolarrenak.

## **6. Erretxinak**

Erretxinaren matrizea (bolak) substantzia desberdinezkoak izan daitezke. Alde batetik poliestirenozko matrizeak daude (taulako 2,3 eta 4. Erretxinak). Poliestirenozko zutabeen zutabeak nahiko apolarrek dira eta berez inolako ligandorik lotu gabe fusionatzeko matrizea da. Hau da, ez dute behar inolako ligandorik boletan, erretxinak berak baduelako hidrofobizitate nahikoa nahasturako proteina apolarrekin lotzeko. Gainera nahiko pH tarte zabalean lan egin daiteke erretxina hauek erabiliz (1-12). Honi esker, pH tarte alkalinoan (altuetan) egin dezakegu eta gainerako erretxinekin ezin da egin. Beraz, pH 12 egin nahi badugu honelako erretxinetara jo behar dugu.

Bestalde, silikazko erretxinak daude, pH 2-8an lan egin dezaketenak eta gehien erabiltzen direnak. Silika berez ez da hidrofobikoa, nahiko polarra da silano taldeak dituelako (Si-OH). Horregatik matrize horri ligando hidrofobikoak lotu behar dizkiogu. Arruntena oktadezil (18 C-zko kateak) taldeak gehitzen zaizkio silikazko erretxinari, horrela talde luze honek emango dio erretxinaren azalerari hidrofobizitatea. Zenbat eta luzeagoa izan kate alifatikoa hidrofobikoagoa izango da erretxina eta ondorioz itsaskorragoa izango da.

Silikazko erretxinak tamaina txikiko bolak dituzte. Erretxina hau HPLC-ren erretxina tipikoa da oso txikia delako (ponparen beharra).

Silikazko erretxina hauek nahiko porosoak izaten dira eta beraz azalera handitzen dute. Poro horren neurria kontuan hartu beharreko faktorea da. Oso tipikoak dira poroen tamaina 100Å-koak edo 300Å-koak izatea eta proteinen kasuan 300Å-koak izatea komeni da (proteinak barrunbera sartu ahal izateko). Zenbat eta dentsitate handiagoa izan erretxina itsaskorragoa izango da.

Garrantzitsuak diren faktoreak: ligandoaren luzera, poroen tamainak, bolen tamainak, dentsitatea.

## **7. Eluzioa: apolartasuna**

Eluitzeko fase mugikorraren polaritatea aldatu behar da: gero eta apolarragoa egiten joan behar da, poliki-poliki uraren ordean apolarrek diren substantziak sartuz. Alkoholek desberdinak edo azetonitriloa sartzen joango gara. Likido organikoa (etanol, metanol, azetonitriloa...) erabiliko da eta bakoitzak bere ezaugarriak izango ditu.

Gehien erabiltzen dena azetonitriloa da. Honek biskositate txikia du eta beste hainbat abantaila ditu, baina proteinak desnaturatu ditzake. Propanolaren arazoetariko bat biskositatea da, dentsitate altua du eta horrek presioa asko igotzen du. Alkoholek ere, kontzentrazioaren arabera, proteinen desnaturazioan eragin dezakete.

Osagai bat erabiliko dugu gradientea egiteko. A tanpoia ia-ia ura izango da eta B tanpoia batez ere azetonitriloa. Honela gradiente bat egingo da eta proteinak eluitzen joango dira eluyenterekin batera joango direlako (euren apolartasunaren arabera).

## **8. Eluzioa: pHa eta ioi-parekatzaileak**

Eluyenteak izaten duen beste osagai bat azidoa izaten da (trifluoroazetikoak, TFA). Adibidez, A tanpoia %0,1TFA uretan eta B %0'1TFA azetonitrilotan. TFA erabiltzen dugunean pHa oso baxua izango da, 2-3. Honek hainbat abantaila ematen ditu horregatik askotan erabiltzen da:

- Silika pH tarte honetan egonkorra da
- pHa azidoa denean (2-3) silikaren silanol taldeak ionizatu gabe egongo dira, OH bezala (pHa altuagoa balitz  $O^-$  egongo litzateke). Karga izatekotan lotura ez litzateke egongo zsoilik hidrofobizitatearen menpe.
- pH horretan proteinek karga izatekotan, karga positiboa izango lukete (silika gelak pH azidotan egingo dira beti). TFA-k proteina inguratuz, enmaskaratuko ditu karga positibo horiek eta proteinari hidrofobizitate handiagoa emango dio.

## **9. Eskala desberdinen helburuak**

Alderantzizko faseko kromatografiaren erabilera desberdinak:

- Analitikoa: analitikan erabiltzen den k. tipikoa da, bereizmen ona baitu. Informazioa lortzea da helburua. Identifikazioa eta kuantifikazioa egin daiteke. Helburua analitikoa denean ez zaigu inporta teknika desnaturalizatzailea den ala ez, ez dugulako proteina aktiboa behar.
- Semi-preparatiboa: informazioa eta kantitate txikiak purifikatzea (<0,5g).
- Preparatiboa: kantitate handiak purifikatzeko (>0,5g).
- Industrial: oso kantitate handiak purifikatzeko (g/kg).

## **10. Analisia: identifikazio eta kuantifikazioa**

Konposatu baten lagin bateko kantitatea zehazteko gehien erabiltzen den kromatografia da. Adibidez, akrilamida detektatu nahi da. Akrilamida estandarren erretentzio denbora kalkulatu dugu akrilamida eredu bat zutabeaz korrituz (patroia). Gero gure nahastura sartuko dugu eta bere erretentzio denbora jakinik eta kromatogramak konparatuz, akrilamidaren pikoak zein den jakin dezakegu. Inguruko pikoetatik ondo bereiztea lortu behar dugu ondo ikusteko. Gero konposatua kuantifikatzeko pikoaren azalera kalkulatu dugu. Adibidean ikusten da akrilamida sample A-n akrilamida gehiago eluitu dela, bere azalera handiago baita (B-rekin konparatuz). Zuzen patroia bat egingo da azalera vs prot kantitatea, honela ondoriozta dezakegu gure proteina pikoaren kantitatea. Adibidez, AMP ziklikoa analizatzeko.

Banaketa on bat behar dugu piko horretan soilik gure intereseko konposatua soilik egotearren. Proteomika egiteko moduetako bat da: lagina hartu, SDS gela egin edo ez, proteina nahastura bat hartu, tripsinaz hidrolizatu eta peptidoen nahasketa bat sortu. Peptidoak banatzeko (masa espektrometro batean sartu baino lehen) alderantzizko faseko kromatografia erabiltzen da. Kromatografia eta masa espektrometriaren eluientea konpatiblea da, beraz, metodo horiek jarraian erabiltzeko aukera ematen digu.

Batzuetan bi kromatografia erabiltzen dira eta orduan ms-ari loturiko RPC izango da.

## **11. Peptidoen purifikazioa eta MS karakterizazioa**

### **12. Proteinen purifikazio preparatiboa**

Proteinak purifikatzeko balio du baina kontuan hartu behar dugu baldintza desnaturalizatzaileetan eiten dela. Proteina purifikatzeko modu bat da baina helburu zein den arabera ezin izango da erabili.



### **13. Gatza kentzen**

Esan bezala, gatza ms-rako txarar da, ionizazioan eragin txarra baitu. Beraz RPC-k gatz hori ere kentze du. Gure laginaren tanpoiak gatza badu, berehala irtengo da eta gero lotutako proteinak pixkanaka askatuko dira (peptidoak jada gatzik gabe daude).

## **HPLC**

Erretxinak partikula txikiak ditu, beraz efizientzia ona lortzen da. Hala ere, partikula txikiak presio handitan lan egitera derrigortzen du beraz, indar handia behar du ponpak lagina bultzatzeko eta presio altu hori ondorioa da. Zenbat eta presio altuagoa egon, partikula txikiagoak izango dira.

### **1. HPLC zutabeak**

Presio handiagoa denez, ponparen indarra handiagoa da eta horrez gain loturak eta konexioak oso onak izan behar dira. Izan ere, presiopean egiten dugunez lan ez dugu tanpoia ateratzea nahi. Neurri eta material desberdinak erabili daitezke zutabeak egiteko. Lagin kantitatearen arabera zutabe desberdinak erabiliko ditugu eta jasan behar duten presioak zeintzuk diren arabera ere zutabe bat edo bestea aukeratuko dugu.

Zutabeen barne diametroa oso txikia da (20 bolatxo sartzen dira), zutabe estuak dira. Diametroa zein den arabera fluxu desberdinak lortuko dira. Horrela, zenbat eta estuagoa izan fluxu txikiagoa lortuko da. Ponpak oso zehatzak izan behar dira fluxua zuzena izateko. Gainera, banaketa ona lortzeko kantitate txikiak erabiliko dira.

Zenbat eta luzeagoa eta estuago izan zutabea, presio handiagoak lortuko dira (oztopo gehiago jarri).

### **2. Presio unitateak**

Pascal-ak nazioarteko unitateak dira.  $Pa=N/m^2$ .

Psi ameristarren unitateak dira.  $1Psi=0,05bar$ .

### **3. Ponpak**

Partikulen tamaina zenbat eta txikiagoa izan bereizmena hobea izango da eta pikoak beraz estuagoak izango dira. Kasu batzuetan, jada oso ondo banatzen denean, denbora murrizteko zutabe laburragoa jarri emaitza berdina lortzen da.

Bolak oso txikiak direnean ( $1,7\mu m$ ) fluxuari oztopo oso handia egiten zaio eta presioa asko handitzen da, beraz ponpa potenteagoak behar dira.

Ponpak gaitasun handiagoa izan behar du bereizmen ona lortzeko, indartsuagoak izan behar dira. Batez ere bi motatako ponpak daude:

- Xiringa-ponpak: xiringa analitoarekin bete eta zutabera bultzatuko da. Enboloak fluxua bultzatuko du motorrak jaisten duelako. Eluientearen bolumen osoa xiringan sartu behar da, beraz xiringaren bolumenak mugatzen du. Kromatografia xiringaren bolumenarekin mugatuta gelditzen da.
- Pistoi-ponpak: bi ganbara ditu, bakoitzak sarrera eta irteera batekin eta guztiak balbulekin. Fluxua eskumara doanean ezkerreko ganbara likidoz beteko da eta eskumakoa hustuko da fluxuarekin jarraituz, eta gero alderantziz. Horrela fluxu jarri bat egingo da.

#### 4. UPLC

Piko oso estuak lortzen dira. HPLC-ren kasuan partikulak oso txikiak dira eta denbora oso gutxian konposatu guztiak banatzea lortu daiteke.

Partikulen tamaina jaitsiko bagenu bereizmena altuagoa izango litzateke, eta gainera hasierako konposatuak lehenago eta hobeto banatuko genituzke. Bereizmenaren hobekuntza pikoak gehiago bereizteko edo kromatografia azkarragoa egiteko erabili dezakegu. Baina tamaina txikitzean presioa igotzen da eta fluxuari oztopo handiagoa egingo zaio. Horregatik UPLC (ultra) erabiliko da, ponpa oso indartsuak erabiltzen dituen kromatografia.

#### **GERUZA MEHEKO KROMATOGRAFIA (TLC)**

Fase geldikorra geruza oso mehea da: oso fina den aluminiozko edo kristalezko euskarri baten gainean silika gelezko geruza mehe bat jarriko da, polarra dena. Eluente apolar bat erabiliko da (fase normalekoa da normalean). Gure laginaren tanta bat jarriko da silikazko gela duen kristal edo aluminiozko euskarrian. Gure laginaren tanta zenbat eta txikiagoa izan hobeto bereiziko da, eta horretarako kapilareak erabiltzen dira tanta oso txikiak gehitzeko. Fase mugikorra silika gelarekin kontaktuan jarriko da, beheko partea ukitzen. Ondoren, kapilaritatez fase mugikorra geldikorraren gainetik igoko da. Konposatu bat zenbat eta polarragoa izan gutxiago mugituko da eta zenbat eta apolarragoa gehiago. Ia osoa bustita dagoenean atera eta marka bat egingo zaio gelari bustita dagoen guneraino. Izan ere, eluentea fase geldikorrarekiko afinitate gutxien duen osagaia izanik fronte bezala erabiliko dugu eta hori mugikortasun erlatiboa kalkulatzeko erabiliko dugu.  $R_f$  kalkulatzeko gure proteinak egin duen distantzia zati fronteak egin duena egingo dugu, topea 1 izanik. Gure bandak ikusteko tindatu eta UV argia erabiliko dugu.

Paper kromatografia baino mekanismo hobea da.

#### **Adibideak**

Landare pigmentuak banatzeko egiten da eta baita tintaren osagaiak banatzeko.

#### **TLC: eluenteen eragina**

Normalena fase geldikorra polarra eta mugikorra apolarra izatea da (fase normaleko kr.). Eluzio isokratikoa edo gradientean eginikoa erabili daiteke. Normalean isokratikoa egingo da eta kasu honetan fase mugikorra ez da aldatzen, eluente bakarra erabiliko dugu. Aldiz, gradientean egiten bada, mugikorra geroz eta polarragoa jarriz joango gara, baina inoiz geldikorra bezain beste (apolarretik polarrerantz).

### 3. BLOKEA: ELEKTROFORESIAK

Eremu elektriko bat erabiliz banatzeko metodo bat da. Osagaiak kargatuta egon behar dira banatzeko. Nahiko bereizmen handia dauka, emaitza onak lortzen dira egiten dugun lanerako (prozesu azkarra eta erraza). Erabilera analitiko eta preparatiborakobereiztu dezakegu elektroforesia, helburuaren arabera. Analitikoan purifikazioa frogatzeko eta jarraipen bat egiteko erabiltzen da, eta gainera gure proteinaren tamaina kalkulatu dezakegu. Preparatiboan aldiz, behin bananduta, gel zatia hartu eta hortik proteina berreskuratu daiteke kantitate txikietan.

Ez da bakarrik proteinak banatzeko teknika, beste molekula batzuk ere banatzen ditu (DNA..). Hor ere DNA zatiak ikusteko, horien tamaina jakiteko eta isolatutako DNA bandak berreskuratzeko izan daiteke, agarosazko gela moztuz. Beraz erabilera analitiko zein preparatiboa du.

Molekulen masa, bolumen, formaren arabera mugituko dira proteinak, baita gelaren matrizearen arabera, eremu elektrikoaren arabera (zenbat voltio aplikatu) ere.

#### 1. Elektroforesia: sailkapena

Hainbat modutan sailkatu daitezke:

- **Ontzien sistema:** kubeta bertikalak edo horizontalak daude. Kubeta bertikaletan gela bertikalki kokatuta dago eta proteinak goitik behera migratuko du, aldiz horizontalean gela horizontalki etzanda dago eta molekulak aurrerantza doaz.
- **Euskarria:** matrize bat dago eta honek mugikortasunari oztipoa jarriko dio. Euskarri famatuena poliakrilamida da proteinen kasuan, baina zelulosa-azetatozkoak daude ere besteak beste. Agarosazko gelak DNA migrazioan erabiltzen den matrize ohikoena da. Gelek bi fase: stacking eta resolving. Pilatzailea eta banatzailea. Pilatzailea kontzentratzeko da, batera irteteko nahiko kontzentratuta. Banatzailea banatzeko.
- **Jatorrizkoa (natiboa) edo desnaturalizatzailea:** elektroforesi natiboan molekulen egitura tridimentsionala mantentzen da, eta aldiz desnaturalizatzailean ez du egitura tridimentsionalik. DNAREN kasuan, desnaturalizatzailean harizpiak banatuta daude eta bakoitza bere aldetik mugituko da.
- **1D/2D:** dimentsio bakarrekoan ezaugarri baten arabera banatuko dira (masaren arabera adibidez) eta bi dimentsiokoan bi ezaugarriren arabera banatuko dira (pI eta masa adibidez).
- **Proteinak/DNA:** batez ere proteinak edo DNA banatzeko erabiltzen da.

#### 2. Proteinak aztertzeke elektroforesi-motak

- 1D
  - Desnaturalizatzailea: SDS-PAGE. Gehien erabiltzen dena.
  - Natiboa: BN-PAGE
  - Fokapen isoelektrikoa (IEF): natiboa zein desnaturalizatzailea izan daiteke, baina normalean baldintza desnaturalizatzaileetan egiten da.
- 2D: konbinazioak
  - IEF+SDS-PAGE (normalean)
  - BN-PAGE + SDS-PAGE (natiboa eta desnaturalizatzailea erabiltzea).

Guztietan edo gehieneatan poliakrilamida erabiltzen da, horregatik dute "PAGE".

#### 3. SDS-PAGE: poliakrilamida

Akrlamida, bisakrilamida, TEMED-a eta amonio persulfatoa nahastean, akrilamida eta bisakrilamida polimerizatu eta gela sortzen da. Honek sare bat osatzen du eta oztipoa jarriko dio molekulen

mugimenduari. Akrilamidaren kontzentrazioarekin jokatzuz, sarea konpaktuagoa edo zabalagoa izango da, horrela oztopo handiagoa edo txikiagoa egingo du. IEF, natiboan eta desnaturalizatzailean erabiltzen da.

#### **4. SDS-PAGE**

Batez ere SDS-aren erabilera da honen bereizgarria. SDS negatiboki kargatutako detergentea da. Isats apolar bat dauka eta bukaeran negatiboki kargatutako sulfatoa du, beraz anfiatikoa da. SDSa proteinari lotu eta proteina destolestu egiten da, bere egitura tridimentsionala galduz. Proteina hori SDS-z guztiz inguratuta gelditzen da. Proteina hainbat azpiunitatez osatuta badago, bakoitza bere aldetik joango da desnaturalizatzen delako eta bakoitza SDSz inguratuta geldituko da. Proteina bat zenbat eta handiagoa izan SDS gehiagoz egongo da inguratuta. Kalkulatuta dago 2 aminoazidoko SDSbat lotzen dela. Beraz, 100aa-ko proteina bat 50SDS-z inguratuta egongo da. Ondorioz, SDSaz tratatutako proteina guztiek karga/masa erlazioa berdina izango dute, salbuespenak salbuespen. Horrela proteina batek aldeztatik aurretik zeukan karga SDS-az tapatuta geldituko da orokorrean.

Horrela proteina guztiek karga dentsitate bera izango dute. Uretan egingo bagenu elektroforesia proteina guztiak batera joango lirateke gutxi gorabehera, karga dentsitate bera dutelako, hau da, guztiek mugitzeko joera berdina daukate. Baina sare moduko gel bat jartzen dugunez (poliakrilamidazko gela), guztiak mugituko dira baina batzuei oztopo handiagoa jarriko zaie. Proteina txikiak poroetatik hobeto sartuko dira eta hauei oztopo txikiagoa jarriko zaie. Aldiz handiei oztopo handiago jartzen zaienez gutxiago korrituko dira.

Forma ere berdintzen dugu, jatorrizko forma kendu baitugu desnaturalizazioaz. Horrela banaketa tamainaren arabera emango da batez ere.

SDS elektroforesian erreduzitzaile bat gehitzen zaio ere, merkaptotetanola edo ditiotreitola bezalako konposatu erreduzitzaileak. Hauek gure proteinen azpiunitateen artean egon daitezkeen disulfuro zubiak apurtzen dituzte, 3D egitura guztiz kentzeko.

SDSa eta merkaptotetanola gure proteinari gehitzean, destolestu eta tamainaren arabera karga lortzen du, horrela tamainaren arabera banatuko da korritzen ari den gelean. Merkaptotetanolak disulfuro zubiak apurtuko ditu. Gure proteinak bi azpiunitate baldin baditu, horiek banatu, SDSak bakoitzari karga eman eta banatuko dira, bi banda ikusiko dira. Banda bat proteina bat dela ez dakigu ziur, agian azpiunitate bat izan daiteke.

#### **5. Masa molekularren determinazioa SDS-PAGEn**

Masa molekular jakina duten proteina zatiekin SDS-PAGEa egingo da (markatzaileak) eta euren mugikortasuna apuntatuko da. Honekin zuzen patroia egingo da  $\log(MM)$  vs mugikortasuna, izan ere, mugikortasuna pisuaren menpean dago.  $R_f$  (mugikortasun erlatibo) erabiliz egin daiteke, frontea erreferentziatuz erabilia eta honen mugikortasuna 1 izanez.

Masa molekularren logaritmoa eta mugikortasunaren arteko linealtasuna masa molekularren tarte batean bakarrik mantentzen da.

#### **6. SDS-PAGE: $R_f$ vs $\log MW$**

Linealtasuna tarte batean mantentzen da bakarrik, eta horretatik kanpo galtzen da. Akrilamida kontzentrazioaren arabera erlazioa desberdina izango da.

%5eko akrilamida sarea zabalagoa da eta oztopo gutxiago jarriko dio molekula migratzaileari, aldiz %10ekoak, konpaktuagoa dagoena, oztopo gehiago egingo die eta gehiago kostatuko zaie proteinei migratzea.

%5 akrilamidagelean 60kDa-eko proteinak eta txikiagoak frontearekin doaz. 60kDa-eko proteinak txikiagiak direnez akrilamida kontzentrazio honentzat, frontearekin doaz eta ez dira euren artean banatzen.

Akrilamida %10ekoa bada oztopoa handiagoa izango da eta 30kDa-eko proteina ez doa frontearekin. 60kDa-eko aerretenitzen da ere gutxi mugitzen delako (zulo konpaktuagoak gelean).

Akrilamida ehuneko bakoitzak linealtasun tarte bat dauka, beraz, bereizi nahi ditugun proteinen arabera akrilamida kontzentrazio desberdinak erabiliko ditugu. Proteina txikiak banatzeko akrilamida kontzentrazio altuagoak eta proteina handientzako akrilamida kontzentrazio baxuagoak.

Kasu batzuetan gradientean egiten da elektroforesia, geroz eta sare estuagoa eginez. Beraz, geroz eta akrilamida gehiago botako da, adibidez %5etik %20ra. Gel hauekin linealtasuna tarte zabalago batean egiten du lan, baina proteinen arteko bereizmena ez da hain ona. Kontzentrazio homogeeneko gel batean hobeto banatzen dira proteinak baina linealtasuna txikiagoa da. Bestalde, gradiente gelak egitea zailagoa da.

Makinan edo euskarrian sartzeko tanpoia: Tris-Gly izaten da. Tris-Trizina erabiltzen bada proteinak gutxiago mugituko dira eta beraz proteina txikiak banatzeko egokia izango da. Beraz, proteina txikiak korritzeko Tris-trizina erabili edo akrilamida kontzentrazio altuagoa.

## **7. Natiboa**

Ez da proteina desnaturalizatuko, beraz proteinaren mugikortasunean tamainak, formak, kargak eta abarrek eragiten dute. Gelean proteina bat asko mugitzen bada ez du txikia denik esan nahi, baliteke proteina ertaina izatea karga handi batekin. Elektroforesi natiboaren helburuetako bat masa molekularren determinazioa da.

Elektroforesi natiboa gradientean akrilamida kontzentrazioa badu, proteinak mugitzen hasiko dira baina denbora pasa ahala saturatu egiten da mugimendua, hau da, ezingo dute aurrera jarraitu eta ataskatuta geldituko dira. Batzuk azkarrago hasiko dira gelditzen eta beste batzuk beranduago. Proteinei denbora nahikoa emango zaie blokeatuta gera daitezten, bere lekura heldu dadin (nahiz eta karga gutxi izan, tamainak usten dion lekura heltzeko). Pisuaren logaritmoa eta mugimendua grafikoa egitean linealtasun majoa sortzen da.

Trukoa: elektroforesi natiboa egitea (SDS barik) eta denbora ematea nahi den lekura heltzeko. Azkarren mugitzen dena negatiboena izango da eta polikien doazenentzako denbora nahikoa utziko dugu euren helmugara heltzeko. Bakoitzak bere abiadura du eta hori kargaren arabera egingo da. pH9an egingo da, horrela proteinak negatiboki kargatuta egongo dira eta korrituko dira.

## **8. BN-PAGE**

Bluenative. Coomassie gehituko zaie proteinei, horrela horiei lotu eta karga negatiboa emango die, desnaturalizatu gabe. Proteina gehienak negatiboki kargatuta egongo dira eta pH7an mugituko dira positiborantz. Gradientean egiten bada linealtasun ona lortuko da.

19.proteinaren kasuan ez da linealitatean sartzen, ez delako Coomassierekin lotzen eta ez da negatiboki kargatzen. Horregatik behar baino gutxiago mugituko da.

21.proteina ere gutxiago mugitu da, Coomassierekin lotu da baina berak aurretik zuen karga positiboa oso handia zenez, gutxiago mugitu da. Honek karga dentsitate gutxiago dauka eta gutxiago mugitu da.

20.proteina nahiko basikoa da, beraz nahiz eta Coomassie gehitu karga dentsitate negatibo gutxiago du eta gutxiago mugituko da.

Natiboaren abantailak: egitura natiboa, lotuta mantenduko da. Masaren informazioa lortu nahi badugu grandientean egingo da eta denbora luzatuko da horretarako, baina pH basikotan egingo da. Aldiz pH neutroan egin nahi bada Coomassie erabiliko da.

## 9. IEF

**pH gradientea** jartzen da, pH tarte bateko gradientea. pH azidotan polo positiboa jarri eta basikoan polo negatiboa. Proteina baten pI-a 5 bada eta guk 5'5 tokian jartzen badugu, proteina negatiboki kargatuta egongo da eta positiborantz migratzen hasiko da, pH5-erantz. Anodorantz (+) mugitzen hasten denean pHazidotzen joaten da eta bera karga negatiboa txikitzen joango da. pH5era heltzean kargarik gabe geldituko da eta bertan geldituko da, kargarik gabe ez baitu joerarik anodo ez katodorantz joateko. Pasatu egiten bada 4ra helduz, positiboki kargatuta egongo da eta berriz katodorantz (-) migratzen hasiko da, beti pH5era helduz. Fokatu egingo da bere pI-kopHan.

pIa 6 duen proteina bat 5'5 tokian jartzen badugu positiboki kargatuta dagoenez katodorantz (-) joango da, pH 6an fokatuz.

Banaketa pI-en arabera emango da eta bakoitza fokatuko da bere pI-koa moduko pHan. Gehienetan banatzeko erabiltzen da baina analitikorako ere erabili daiteke, gure proteinaren pI-a zein den zehazteko. Berdin da non inokulatu nahasketa, ez du eraginik non jartzen dudan, beti migratuko baitute euren pI-etakopHra. Ez da ia difusiorik egongo.

pH gradientea egitekoanfolitoak gehitzen ziren disoluziora eta horrela gradientea sortzen zen. Arazoak zituen errepikakortasun txikia zutelako, gelak euren artean oso desberdinak ziren. Beraz gel desberdinetako emaitzak konparatzeko zailtasunak egoten ziren. Gaur egun ez ditugu guk egiten pH gradienteko gelak, erosi egiten ditugu. Hauek egiteko teknika bereziak erabiltzen dituzte, pH gradientea immobilizatuta izateko. IPG gelak deritze gelei. Gela polimerizatzen direnean anfolitoak immobilizatuta gelditzen dira eta teknikari esker askoz ere errepikakorrangoak dira emaitzak, ia iaidentikoak dira gelak. Askoz ere fidagarriagoak dira emaitzak.

Fokapena egin baino lehen proteina desnaturizatuko dugu, baina ez SDSarekin, bestela honek karga negatiboa emango dio eta ez dira banatuko pI-ren arabera. Ezin dira detergente kargatuak erabili fokapen isoelektrikoa egiteko, guztiz enmaskaritzen direlako proteinen kargak. Beste teknika batzuk erabili daitezke gure proteina destolesteko. Baldintza desnaturatzaileetan egingo da azpiunitateak bereizteko.

IEF egoera natiboan ere egin daiteke, proteina osoa egoteko. Fokapen isoelektrikoa baldintza natiboan egiten bada lortzen dugun pI esperimentala nahiko desberdina izango da proteinaren pI teorikoarekin konparatuz.

## 10. IEF: gradiente immobilizatuak

Proteina batek pIa 4 baino baxuagoa badu getetik ihes egingo du pH gradientea 4-7 bada. Kontuan hartu behar da pH tarte eta gure proteinaren pIa, pH tarte batean proteina batzuk geldituko dira eta beste batzuk ihes egin eta ez dira gelean agertuko.

Gaur egun, eskaintza zabala dago. Luzera desberdineko gelak daude erosteko (7cm-tik 24cm-ra). Zenbat eta luzeagoa izan bereizmen hobea izango da. Bestalde, pH gradientea zenbatetik zenbateraino den kontuan izan behar dugu, pH tarte desberdinak baitaude. Tarte oso zabalak erabiltzen badira proteina gutxiagok egingo dute ihes. Aldiz tarte oso murriztuak baldin badira proteina gutxi geldituko dira tiran eta askok ihes egingo dute. Tarte txikiagoa bada hobe bereiztuko dira proteinak.

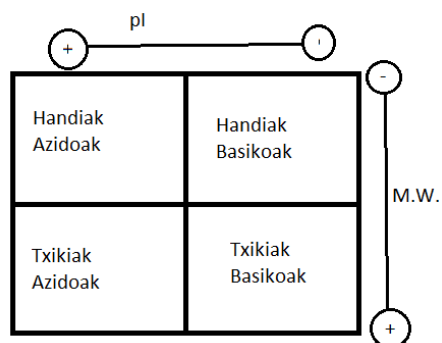
Zenbat eta pH tarte txikiagoa izan eta tira zenbat eta luzeagoa izan, bereizmena hobea izango da.

SDS ezin dugu erabili nahiz eta mintzak solubilizatzeko oso erabilgarriak izan, karga negatiboa ematen diolako proteinari. Fokapen isolektrikorakokompatibleak diren proteinak ez dira hain onak mintz proteinak solubilizatzeko eta horregatik beste hauek erabiltzean arazoak eman daitezke.

### 11. 2Dko elektroforesia: IEF + SDS-PAGE

Dimentsio bakarreko bi elektroforesi konbinatzen dira, normalean IEF eta SDS-PAGE konbinatzen dira. Ez baldin badugu besterik esaten IEF+SDS-PAGE izango da, arruntena baita.

Lehenengo IEF egingo da tira batean, pH gradientean proteinak migraraziko ditugu eta euren pI-en arabera ordenatuko dira, lagina edozein lekutan injektatuz. Hau egiteko ordu batzuk behar dira, gau oso bat. Behin hau egin, gel hau SDSa duen disoluzio baten murgiltzen dugu, merkaptotetanola eta abarrak ere dituen. Proteinak destolestu, azpiunitateak banatu eta desnaturalizatuko da. Ondoren SDS plaka baten gainean jarriko dugu banda ezker-eskuin. Negatiboa banda dagoen lekuan jarri eta positiboa beste puntan. Elektroforesia egingo da bestea baino azkarrago. Azkenik tindatu eta orbanak ikusiko ditugu.



Tiraren luzeraren arabera eta pH tartearen arabera bereizmena desberdina izango da. Metodo honekin orbain asko lortuko dira, milaka.

pH tarte zabaleko 2D gel bat ikustean orbain asko daude, mondrongoak ikusten dira. Horregatik elkarrekin dauden proteinak banatzeko euren pI inguruko pH tarte hartuko da, pH tarte estuagoa duen gel bat erabiliz. Horrela zoom bat egiten da. Laginean dauden proteina guztiak ez daude gelean, bakarrik pH tartekoak daude besteek ihes egin dutelako.

Ahalik eta orbain gehien banatzeko 2D tarte estuagoa duten gel desberdinak egingo dira, bereizmen askoz handiagoa lortzeko.

Proteinak banatzeko bereizmen handia duen metodoa da 2D-ko gela, zure proteinaren pI-az aparte masa molekularra ezagutu dezakezu.

### 12. 2DE: BN-PAGE +SDS-PAGE

Bi elektroforesi desberdin konbinatzen dira. Elektroforesi natiboa eta SDS-zkoa konbinatzen dira kasu honetan. Lehengo dimentsioan proteinak egoera natiboan korritzen dira. Adibidez mitokondriatako konplexuak banatzeko erabiltzen dira, entzima multikonplexuak baitira. Lehenik azpiunitateen arteko loturak apurtu barik banatzen dira, BN-PAGEaren bidez. pH7an egiten da eta tainaren arabera banatzen dira proteina konplexuak. Behin hau egin, konplexuak markatzen dira (I, III, IV..). Gel zatia SDS eta merkaptotetanolarekin tratatuko da proteinak desnaturalizatzeko. Gero elektroforesi arrunt bat egingo da, SDS-PAGEa.

Ilara bakoitzean (goitik behera) konplexu bakoitzaren osagaiak egongo dira. IV.konplexuaren ilaran bere azpiunitate guztiak egongo dira.

2DE-koelektroforesia berezia denez, aipatu behar da BN-PAGE + SDS-PAGE dela.

### 13. Detekzioa: tindaketa eta Ab-ak.

Gelean ez dugu ezer egiten, horregatik behin elektroforesia egin eta gero detekzioa egingo da. Detekzioa proteina guztiak ikustekoa izan daiteke edo gurea espezifikoki ikustea. Proteina guztiak detektatzeko tindatzaileak erabiliko dira, aldiz proteina espezifikoki bat detektatzeko antigorputzak erabiliko dira.

Helburua proteinak guztiak ikustea baldin bada, katalogoa begiratuko dugu eta hainbat tindatzaile egongo dira.

Coomassie:

- Urdinez tindatzen dira bandak. Ohikoena, merkeena eta arruntena da.
- Sentsibilitate nahiko baxua, kantitate txikiak ez dira bereizten.
- Seinale vs kantitate erlazioa tarte handian mantentzen da 7-70 ng-ko tartean.
- Erraza eta azkarra.

Zilar tindaketa:

- Bandak marroiz ikusten dira.
- Sentsibilitate altuagoa.
- Seinale vs kantitate erlazioa tarte murriztuan mantentzen da, horik kanpora saturatzen doa. 1-10ng-ko tartea.
- Urrats gehiago egin behar da, lan gehiago egin behar da. Azkarra da baina ordu bat behar da eta lan asko egin behar da denbora horretan.

Tindatzaile fluoreszentea (Ruby):

- Argi ikuskorrekin ezingo dugu ikusi, horregatik argi ultramorea erabiliko dugu ikusteko.
- Sentsibilitate altua.
- Seinale-vs kantitate erlazioa tarte oso zabalean mantentzen da, hau oso baliagarria izan daiteke. 0'25-1000ng.
- Garestiena.

Gure helburua kuantitatiboa denean kontuan izan behar ditugu parametro hauek.

#### **14. Elektroplapaketa**

Guri interesatzen zaigun proteina bakarrik detekziorako, detekzio espezifikoa egingo da antigorputzak erabiliz. Antigorputzak izango dira gure proteina espezifikoki ezagutuko duten egiturak. Horretarako banatuko diren proteinak eskuragarriago egin behar dira, proteinak gelean harrapatuta daude eta Ab-ak botatzen badira berataraz ez dira markak ikusiko.

Eskuragarri egiteko geletik atera eta beste euskarri batera pasako ditugu proteinak, nitrozelulosazko mintzetara adibidez. Mintzak proteinak itsasteko gaitasuna dauka, eta bertara itsasteko transferentzia egingo da.

Transferentzia egiteko proteinak geletik paperera bultzatuko ditugu korrante elektrikoaz. Sandwich moduko bat egiten dugu kasu guztietan. Tanpoi asko bota daiteke edo beste kasu batzuetan gutxiago (semidry).

Mintza eta gela itsatsita jarriko ditugu eta horiekin sandwich bat eginez filtro papelak tanpoiz bustita. Gero esponjak eta azkenik elektrodoak. Anodoa (+)goian jarriko dugu baldin eta gela mintzaren azpian badago. Proteinak negatiboki kargatuta daudenez, positibora joango dira, eta mintzean geldituko dira.

Tanpoi asko erabiliz kubeta batean egin daiteke. Bestela elektroplapaketa lehorra egin daiteke, tanpoi gutxiago erabiliz. Horrela gelean zegoena paperean daukagu, azalean.

#### **15. Western plapaketa**

Behin paperean proteinak izan, askoz ere eskuragarriago daude Ab-ekin tratatzeko. Erabiltzen ditugun mintz hauek proteinak itsasteko joera dute, beraz transferentzia egin eta gero mintzaren azalera ez dago guztiz beteta. Hau da, gure proteinen bandak daude baina beste azalera hutsik dago. Mintza blokeatu



gabe Ab-ak gehitzen baditugu, antigorputz horiek gure proteinei lotzeaz aparte mintzera zuzenean lortuko dira. Beraz, mintza blokeatu behar da proteina merke batez, esnea edo BSA.

Ab bota eta proteinak espezifikoa aurkitzen baditu lotuko da bestela ez. Ondoren garbituko da lotu ez diren antigorputzak kentzeko. Normalean gure proteinarekin lotu den Ab-a ez dago markatuta, hau 1.Ab da. Bigarren antigorputz konjokatua egongo da markatuta. Bigarren antigorputz konjokatu hau primarioari lotuko zaio, beraz, bigarren Aba gehitzean primarioaren bat baldin badago horra lotuko da.

Antigorputz konjokatua entzimarekin, isotopo erradioaktiboekin edo fluoroforoekin markatzen dira. Entzima baldin bada normalean fosfatasa alkalinoa eta peroxidasa.

Behin 1 eta 2 Ab-ak gehitu eta beharrezko garbiketak egin, substratu kromogenikoa gehituko zaio, kolorea sortuko da produktuarekin. Kasu honetan produktu koloreduna ikusten da, banda bat.

Kimioluminiszentziaren kasuan, erreakzioaren ondorioz kolorea agertu beharrean argia ikusten da. Argia detektatzeko aparatu bereziak daude.

Honi esker detekzio espezifikoa egingo da.

Prozedura guzti honi Western blot-a deritzo.

## **16. Elektroeluzioa**

Gutxiago erabiltzen den metodoa. Gehienetan elektroforesia analitikoa izango da, gure proteina hor dagoela ziurtatzeko, zenbat migratu den ikusteko, ondo purifikatu dugun ikusteko eta abar.

Bestetan, banatutako proteinarekin lanean jarraitzea nahi dugu, helburu preparatiboa dugu. Adibidez, banda moztu eta masa espektrometrian sartuko da edo elektroforesiz banatutako proteinak sekuentziatu nahi ziren; horretarako paperera pasatu eta sekuentziadorean sartu.

Beste batzuetan saioldi batean jasotze nahi dugu gure proteina, gero lan egiteko. Oinarria antzekoa da. Hodi bat dugu, muturrean dialisi mintz bat duena goma batekin lotuta. Honek tamaina jakineko zuloak ditu, gure proteina pasatzen ez ustea egin behar dugu (poro txikiagoa gurearekin konparatuz). Gero hodian gorantz joanez filtroa egongo da gel zatiak pasatzen ez ixteko. Honen gainean gel zatiak pilatuko dira. Elektroforesia egin ondoren eta gure proteina zein den jakin ondoren gel zatia moztu eta zatika sartu dugu hodian. Gel zatia filtroraino helduko da soilik. Katodoa (-) hodi barruko likidoarekin kontaktuan egongo da, aldiz anodoa (+) kanpoko konpartimentuarekin. Proteinak negatiboki kargatuta daudenez positiborantz joango dira, kanporantz dialisi mintzetik pasatu. Horrela hodi barruan bakarrik gure proteinak eta handiagoak geldituko dira. Hori pipetarekin hartu eta gorde.

## **17. Elektroforesi kapilarra**

Kasu honetan ez dago gelik, banaketa disoluzioan egiten da. Kapilar luzea dugu baina mikra gutxiko zabalera duena. Kapilarrean ez dago gelik (DNA sekuentziazioan bai). Kapilar honen azalera silikazkoa da eta silika hau pH 3tik gora negatiboki kargatuta egongo da, beraz kapilarraren barruko hormak negatiboki kargatuta egongo dira. Kapilar hau bi tanpoi disoluzioen artean jarri eta elektrodoekin alde bakoitzean. Fluxua sortzen da, elektroosmotikoa. Azkenean eremu elektrikoa sortzen dugu tanpoi konpartimentuen artean eta gure kapilarra barrukaldean negatiboki kargatuta dago. Likidoa negatiborantz joango da (aurreko kasu gutzietan alderantziz).

Lagina bial batean sartuko dugu. Lagineko osagaiak kargatuta egon zein ez egon, fluxuaren alde joango dira, fluxu elektrosmotikoa dela eta. Gure laginaren osagai guztiak anodotik katodora joango dira, positibotik negatibora. Bidean gure laginaren osagai batzuk positiboki kargatuta egongo dira, eta horregatik azkarrago joango dira katodora korrontearen alde eta lehenago iritsiko dira. Negatiboki kargatutako konposatuak eurak anodora joatea nahiko dute, beraz korrontearen kontra mugitu nahiko dira, ezin izango dira korrontearen kontra joan baina polikiago joango dira korrontearen alde. Horrela

euren tamaina eta kargaren arabera banatuko dira. Batzuk aurreratuko dira zenbat eta karga positiboagoa izan, aldiz negatiboak atzeratu egingo dira.

Banaketa karga eta masaren arabera emango da, denak izango du eragina. Ezaugarri desberdinen arabera banatuko dira.

### **18. Gel-elektroforesi kapilarra**

Kapilarean egindako gel-elektroforesia da. Adibide ezagunean DNAREN sekuentziazio automatikoan erabiltzen den teknika da (Sanger metodoa). Metodo honetan ddNTPak daude soluzioan eta kate amaierara ddNTP bat lotzen bada polimerizazioa bukatzen da. Horrela luzera desberdineko kateak sortuko dira. ddNTPek marka dute eta A,T,C edo G den arabera marka bat izango da eta makinak badaki. Horrela sekuentziatuko da.

Oso tubo estua izango da, barruan gela du. Polo negatiboa goian jarri eta behean positiboa. Irteeran detektorea jarriko dugu, goitik behera pasako dira molekulak tamainaren arabera, lehenengo txikiak eta gero handiak. Horrela sekuentziatuko da. Gel plakak erabili beharrea kapilar batean sartuko dugu.