

## **OPRENSNING AF TRANSFERRIN VED IONBYTTERKROMATOGRAFI**

### **FORMÅL.**

Formålet med denne del af øvelsen var at oprense serumproteinet transferrin. Til bestemmelse af transferrinkoncentrationen benyttes forskellige biokemiske metoder.

### **PRÆSENTATION OG DISKUSSION AF RESULTATER.**

#### ***1. Hvorfor skal der anvendes dialyseret serum ?***

Vi fik udleveret dialyseret serum til anvendelse i forsøget. Det er nødvendigt at arbejde med dialyseret serum da transferrinkoncentrationen bla. bestemmes ved ionbytterkromatografi. Dialyse betyder, at de frie ioner i serum er filtreret fra, således at matrix - som jo også er ladet (positiv-amoniumion) - i kolonnen kun binder proteiner og ikke frie ioner.

#### ***2. Giv en beskrivelse af hvad dialyse er.***

Dialyse betyder som sagt en frafiltrering af frie ioner fra serum. Dette gøres praktisk ved en hullet slange indeholdende prøven (serum) neddyppes i et kar med vand. En koncentrationsgradient for proteiner og ioner medfører en fiktiv diffusionskraft rettet ud af vandkarret. Da proteiner ikke kan diffundere gennem hullerne i slangen (pga. størrelsen) får man frafiltreret ionerne. Det osmotiske tryk fører til, at vand suges ind i slangen. Det er vigtigt at skifte vandet for at opretholde den fiktive diffusionskraft.

#### ***3. Hvor genfindes sandsynligvis igG og albumintoppen i kromatogrammet ?***

Med en saltgradient skylles kromatografikolonnen, hvorved plasmaproteinerne vaskes ud efter deres affinitet. På absorptionskurven ses, at IgG'erne skylles ud først og albuminen sidst. Dette skal ses i relation til proteinernes respektive isoelektriske  $pK_a$ -værdier. IgG skylles ud først, da de har et isoelektrisk punkt nærmest bufferen, dvs. at IgG har færre negative ladninger end albumin og  $\alpha$ - og  $\beta$ -globulinerne og derved har en mindre affinitet for anionbytermembranen. Matrixen har sædvanligvis kloridioner bundet til sig som modion. Proteinerne vil binde sig med større affinitet til matrix end kloridioner, da de med deres større molekylvægt har mange ladede grupper pr. molekyle. Elueringen foregår derfor ved at øge kloridionkoncentration, hvorved det bundne protein dissocieres fra DEAE-grupperne i matrix.

Proteiner blev elueret natten over i 80 fraktioner og et absorptionsspektrum er resultatet.

Fraktionerne 15-19 (transferrintop) og fortyndet serum analyseres ved spektrofotometri.

#### 4. Transferrinkoncentrationer i dialyseret serum beregnes.

Fraktion	14	15	16	17	18	serum
Absorbans	0,146	0,294	0,294	0,256	0,210	0,376
(g/100 mL)	$1,04 \times 10^{-2}$	$2,04 \times 10^{-2}$	$2,04 \times 10^{-2}$	$1,82 \times 10^{-2}$	$1,49 \times 10^{-2}$	4,747 (x101)
(mg/mL)	0,104	0,209	0,209	0,182	0,149	47,47

Koncentrationerne er beregnet ud fra formlen:  $C = A / E$ .

$$E = A_{1 \text{ cm, serum}} = 8 ; A_{1 \text{ cm, transferrin}} = 14,1$$

$$\text{Total [protein] i topfraktion} = 0,294/8 \times 10 = 0,368 \text{ mg/mL}$$

Den samlede proteinkoncentration i serum er lavere end tabelværdien, pga. dialysen som nedsætter koncentrationen ca. 20 %. Koncentrationer i fraktioner er ca. en faktor 10 mindre end værdier fra tabel 1.

Ved raketimmunoelktroforese bestemmes  $c_{\text{transferrin}}$  og  $c_{\text{serum}}$  kvantitativt ud fra en standard kurve (se bilag 2). Denne kurve er fremkommet af raketimmunoelktroforeseværdierne (se bilag 1). På bilag 2 ses at kurven skærer i (0,0).

[protein] i serum beregnes til 1,19 mg/mL. Tabelværdi (gennemsnit) 2,6 mg/mL.

Dialyseret serum har ca. 20 % lavere proteinkoncentration = 2,08 mg/mL – der er ved metoden altså tab af transferrin.

#### 5. Udbytte og oprensingsgrad beregnes for transferrin.

$$\text{Udbytte: } \frac{[T]_{\text{fraktion}} (\text{mg / mL}) \times \text{Vol}_{\text{fraktion}} (\text{mL})}{[T]_{\text{serum}} (\text{mg / mL}) \times \text{Vol}_{\text{serum}} (\text{mL})} \times 100$$

$$\text{Udbytte: } \frac{(0,022 + 0,0975 + 0,0938 + 0,036 + 0,049) \text{ mg / mL} \times 4 \text{ mL}}{(2,6 \text{ mg / mL} - 20 \%)} = 0,574 \times 100 = 57,4 \%$$

$$\text{Oprens. grad} = \frac{[T]_{\text{topfraktion}}/[protein]_{\text{topfraktion}}}{[T]_{\text{serum}}/[protein]_{\text{serum}}} = \frac{0,209/0,368 \text{ mg/mL}}{1,19/47,47 \text{ mg/mL}} = 22,7$$

$$\text{Teoretisk max. Oprensningsgrad} = \frac{1}{0,19 \text{ mg/mL}/47,47 \text{ mg/mL}} = 39,9$$

$$\text{Reel oprensingsgrad} = (22,7 / 39,9) \times 100 = \underline{56,9 \%}$$

**6. Hvor stor er den transferrinmængde, som er sat på nitrocellulosemembranen ?**

*Diskuter i relation hertil den anvendte detekteringsmetode.*

[T] i den fraktion indeholdende mindst transferrin = 0,022 mg/mL.

På nitrocellulosemembranen tilsattes 3 µL fraktionsopløsning.

Mængden af transferrin afpippeteres på membranen:

$$3 \times 10^{-3} \text{ mL} \times 0,022 \text{ mg/mL} = 6,6 \times 10^{-2} \text{ mg.}$$

Den laveste transferrin koncentration detekteres tydeligt på membranen. Metoden er endda så følsom, at der detekteres transferrin i fraktion 8, der har en væsentlig lavere transferrin koncentration.

Øvelse: Biokemi II

Studenter: Shahid Q. Manan & Gobind S. Kalsi

Hold: Forår 1998, 503; hold D

Vejleder: Britta Gavnholt