



Opgaver om oprensning og analyse af aminosyrer og proteiner

Baseret på side 47-64

1. Isoelektrisk punkt (pI) for pepsinproteiner

Pepsin er navnet på et fordøjelsesenzym der udskilles fra kirtler i mavesækken. I mavesækken udskilles også saltsyre (HCl), og denne blanding af enzymer og syre kaldes mavesaft. Mavesaftens pH ligger omkring 1,5, og pepsin har typisk en pI-værdi omkring 1.

- Hvilken nettoladning har pepsin i mavesaften?
- Hvilke aminosyrer i proteinet må bidrage til denne nettoladning?

2. Isoelektrisk punkt (pI) for histoner

Histoner er proteiner der findes i kernen af eukaryote celler, hvor de er tæt bundet til DNA. Histoner har en pI-værdi omkring 10,8.

- Hvilken nettoladning har histoner i cellen hvor pH ligger omkring 7?
- Hvilke aminosyrer må findes i relativt store mængder i histoner?
- På hvilken måde bidrager disse aminosyrers sidekæder til histonernes stærke binding til DNA?

3. Kromatografi

Vælg det rigtige ord eller den rigtige sætning i følgende tekststykke om kromatografi.

Kromatografi er en metode der anvendes til at *adskille* – *blande* – *måle* indholdet af stoffer i prøver, ved at de på grundlag af deres kemiske egenskaber kan fordeles mellem to *blandbare* – *ikke-blandbare* faser som flyttes i forhold til hinanden. *Som regel er der en fast stationær fase og en flydende mobil fase* – *Som regel er der to flydende mobile faser* – *Som regel er der to faste stationære faser*.

4. Ionbytningskromatografi

En forsker ønsker at adskille to proteiner A og B ved ionbytningskromatografi. Protein A har en netto ladning på -3, mens protein B har en netto ladning på +1 ved pufferopløsningens pH.

- Hvilket af proteinerne ville eluere først ved brug af en kationbyttersøjle?
- Hvilket af proteinerne ville eluere først ved brug af en anionbyttersøjle?
- Giv forslag til hvilke aminosyrer der kan medvirke til at give protein A en negativ nettoladning.
- Giv forslag til hvilke aminosyrer der kan medvirke til at give protein B en positiv nettoladning.

**5. Ionbyttingskromatografi**

En blanding af aminosyrer kan adskilles ved hjælp af ionbytterkromatografi. Bestem for hvert af de nedenstående par af aminosyrer, hvilken der vil elueres først fra en kationbyttersøjle i en pufferopløsning med pH 7.

- a) aspartat og lysin
- b) arginin og methionin
- c) glutamat og valin
- d) serin og alanin

6. Oprensning af enzym

En forsker opdager et nyt enzym og får følgende resultater ved forskellige oprensningstrin:

Fremgangsmåde	Total protein (mg)	Aktivitet (units)
1. Råekstrakt	20.000	4.000.000
2. Fældning med salt	5.000	3.000.000
3. Ionbytterkromatografi	200	800.000
4. Affinitetskromatografi	50	750.000
5. Gelfiltrering	45	675.000

- a) Beregn enzymets specifikke aktivitet i enheden unit/mg for hvert oprensningstrin.
- b) Hvilket oprensningstrin er tilsyneladende mest effektivt, det vil sige giver den største relative stigning i specifik aktivitet?
- c) Hvilke analyser kunne efterfølgende udføres for at tjekke om enzymet er helt oprenset efter gelfiltrering?

7. Antallet af polypeptidkæder i et protein

Størrelsen af et protein er blevet bestemt til en molekylmasse på 400 kDa ved oprensning ved hjælp af gelfiltrering. Proteinet blev derefter analyseret ved hjælp af SDS-PAGE for at undersøge antallet af polypeptidkæder i proteinet. Analysen gav 3 bånd med molekylmasser på hhv. 180, 160 og 60 kDa.

- a) Argumenter for antallet af polypeptidkæder i proteinet og deres størrelse.