

Mod de lucru:

I. Solubilizarea corpurilor de incluziune:

Se urmează etapele 1-8 din protocolul anterior. Supernatantul din ultima etapă se aruncă, iar depozitul se spală cu în HEPES 40 mM, NaCl 500 mM, Triton X 10% de trei ori. Depozitul obținut după ultima spălare se resuspendă în soluție tampon de denaturare HEPES 40 mM, NaCl 500 mM, guanidin-HCl 6 M. Denaturarea proteinei duce la solubilizarea corpurilor de incluziune. Este indicat ca procesul să se realizeze lent, sub agitare continuă timp de cel puțin patru până la 24 ore. După solubilizare, se centrifughează la 14.000rpm, 30 min. Supernatantul obținut conține proteina recombinată solubilizată.

II. Pregătirea coloanei cromatografice și III. Separarea cromatografică propriu-zisă se realizează identic ca și în metodologia descrisă pentru IMAC în condiții native, cu observația că soluția tampon HEPES 40 mM, NaCl 500 mM pH 7,4 este înlocuită cu soluția tampon HEPES 40 mM, NaCl 500 mM, guanidină-HCl 6M în absolut toți reactivii.

VIII. 5 Determinarea maselor moleculare native utilizând cromatografia de filtrare prin gel (GF)

Datorită condițiilor denaturante folosite în SDS-PAGE, metoda de determinare a masei moleculare relative descrisă în subcapitolul *Fotografierea gelurilor și analiza imaginilor. Stabilirea masei moleculare relative*, pagina 264, permite precizarea dimensiunilor unei catene de aminoacizi. Deoarece, de cele mai multe ori o catenă de aminoacizi este în mod direct asociată cu o proteină, masa moleculară relativă a devenit un parametru obligatoriu pentru caracterizarea unei asemenea molecule.

Masa moleculară relativă nu surprinde însă moleculele proteice în forma lor nativă, fiziologic normală. Mai mult decât atât, unele proteine au o structură multimeră, fiind alcătuite din două sau mai multe catene identice (proteine homomere) sau diferite (proteine heteromere) de