

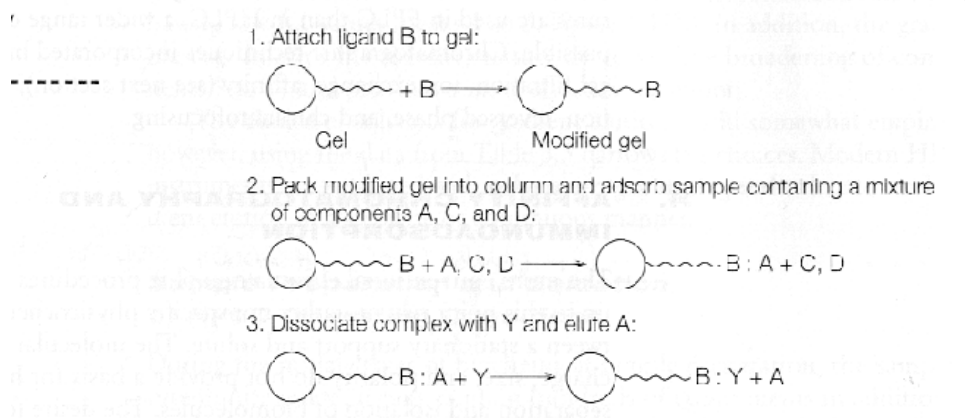
Μέρος 2^ο: Απομόνωση/διαχωρισμός της α-λακταλβουμίνης από τη β-λακτοσφαιρίνη με χρωματογραφία συγγένειας - Στοιχεία θεωρίας

1. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η ανάγκη για μεγαλύτερη εξειδίκευση στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς οδήγησε στην ανάπτυξη της *χρωματογραφίας συγγένειας*. Η τεχνική αυτή παρέχει τον υψηλότερο βαθμό εκλεκτικότητας στην απομόνωση των πρωτεϊνών - τον διαχωρισμό τους βάσει ειδικών βιολογικών αλληλεπιδράσεων. Οι βιολογικές λειτουργίες των μακρομορίων (αντισώματα, πρωτεΐνες-μεταφορείς, ένζυμα, νουκλεϊκά οξέα, πολυσακχαρίτες κ.τ.λ.) είναι αποτέλεσμα αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης με εξειδικευμένα μόρια που είναι γνωστά ως ligands. Αυτό φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση όπου με A συμβολίζεται το μακρομόριο και με B το ligand:



Στην πράξη, η εφαρμογή χρωματογραφίας συγγένειας προϋποθέτει την παρασκευή μιας αδιάλυτης στατικής φάσης στην οποία το κατάλληλο ligand B συνδέεται ομοιοπολικά. Το υλικό αυτό «πακετάρεται» σε μια κολώνα και στη συνέχεια, διοχετεύεται το μείγμα με την ουσία A που θέλουμε να απομονώσουμε. Αφού απομακρυνθούν από την κολώνα οι ουσίες που δεν έχουν προσδεθεί, τα μακρομόρια A λαμβάνονται σε καθαρή μορφή με διάσπαση του συμπλόκου A:B. Στην εικόνα 1 φαίνεται διαγραμματικά η μέθοδος:

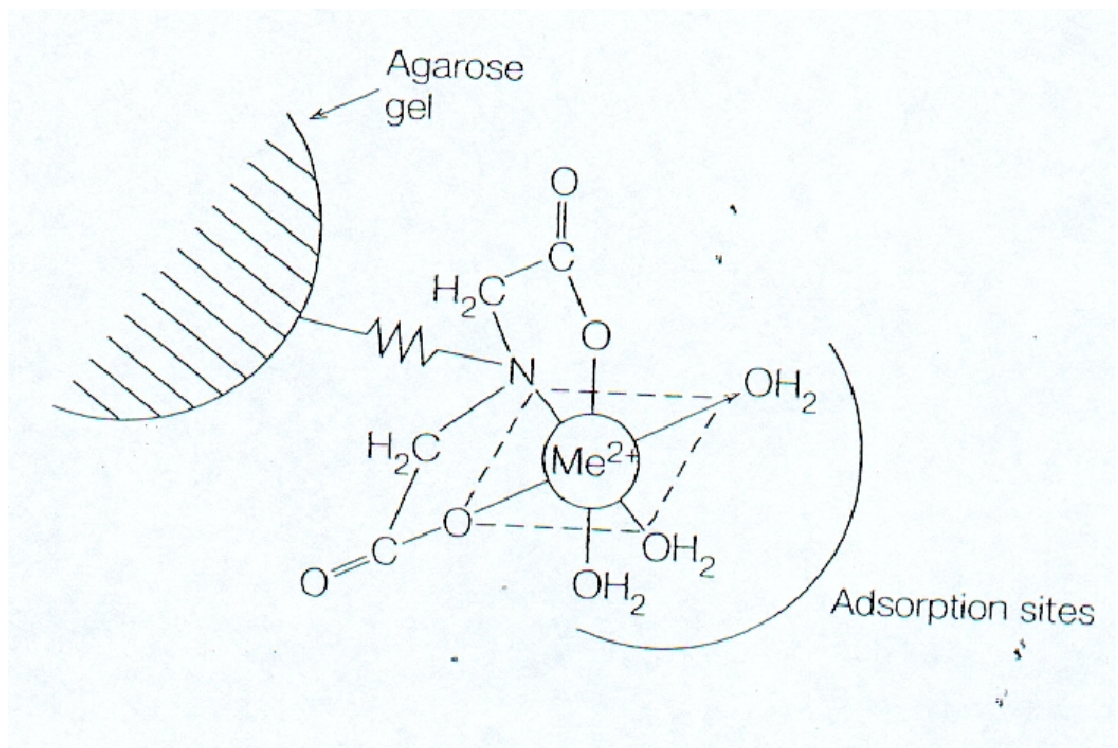


ΕΙΚΟΝΑ 1. Τα στάδια της χρωματογραφίας συγγένειας

Η επιτυχημένη εφαρμογή της μεθόδου απαιτεί προσεκτικό σχεδιασμό των πειραματικών συνθηκών τόσο στο στάδιο της παρασκευής του υλικού πλήρωσης με το ακινητοποιημένο ligand όσο και στην εκτέλεση των σταδίων της χρωματογραφίας.

Χρωματογραφία συγγένειας - IMAC

Μια τροποποιημένη μορφή αυτής της μεθόδου είναι η χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου-ιόντος (IMAC), **την οποία θα χρησιμοποιήσετε για την απομόνωση της πρωτεΐνης στο πείραμά σας**. Στην περίπτωση αυτή το βιοενεργό σύστημα αποτελείται από ιόντα μετάλλων ακινητοποιημένα μέσω χηλικών συμπλόκων πάνω σε μια αδιάλυτη βάση. Το πιο συνηθισμένο υλικό που χρησιμοποιείται ως ligand στην IMAC είναι το ιμινοξικό οξύ (IDA) το οποίο συνδέεται ομοιοπολικά στην αγαρόζη όπως φαίνεται στην εικόνα 2:



ΕΙΚΟΝΑ 2. Δομή του υλικού χρωματογραφίας συγγένειας IDA αγαρόζης-μετάλλου. Me= μεταλλικό ιόν όπως Cu(II), Zn(II), Ni(II), ή Fe(III)

Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει της ικανότητας που έχει καθεμία να δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα μεταλλικά ιόντα. Οι πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων που είναι δότες ηλεκτρονίων και βρίσκονται στην επιφάνεια των πρωτεϊνικών μορίων αλληλεπιδρούν με τα ιόντα των μετάλλων. Τέτοιες ομάδες πλούσιες σε αρνητικά φορτία είναι ο δακτύλιος του ιμιδαζολίου της ιστοιδίνης, ο ινδολικός δακτύλιος της τρυπτοφάνης και η σουλφυδριλική ομάδα της κυστεΐνης. Αυτές οι αμινοξικές πλευρικές αλυσίδες μπορούν να εκτοπίσουν ασθενώς συνδεδεμένους υποκαταστάτες όπως το νερό. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ακινητοποιημένου μεταλλικού ιόντος όπως φαίνεται στην εικόνα 2, μπορεί να διαθέτει μέχρι και τρεις περιοχές προσρόφησης για δέσμευση πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται σε κολώνες συγγένειας μπορούν να αποδεσμευτούν/εκλουστούν με διάφορους τρόπους, όπως:

- Αλλαγή pH ή ιονικής ισχύος: Εάν οι ιονικές αλληλεπιδράσεις είναι καθοριστικός παράγοντας για τον σχηματισμό του συμπλόκου A:B, μια αλλαγή στο pH ή την ιονική ισχύ αποδυναμώνει το σύμπλοκο αλλάζοντας το βαθμό ιονισμού του ligand και του μακρομορίου. Πρακτικά, εφαρμόζεται είτε μια μείωση του pH είτε μια αύξηση της συγκέντρωσης άλατος (αύξηση ιονικής ισχύος).

- Προσθήκη ελεύθερων υποκαταστάτων: Στη μέθοδο αυτή, μια συγκεκριμένη ουσία (όπως ιμιδαζόλιο, αμμωνία, πυροφωσφορικό ή αμινοξέα) προστίθεται στο διάλυμα έκλυσης και συναγωνίζεται με την ουσία A για τη θέση δέσμευσης στο ligand (ή στο ιόν μετάλλου).

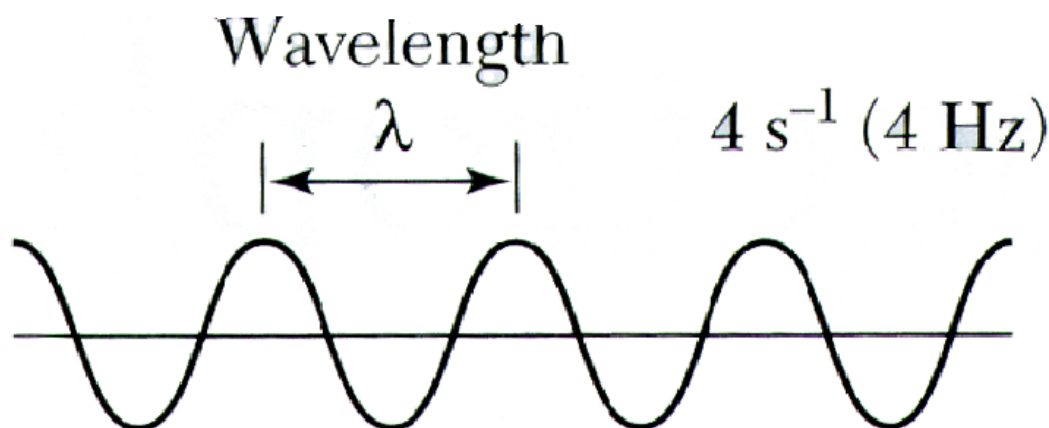
- Έκλυση συγγένειας: Υπάρχει δυνατότητα προσθήκης ουσιών που αλληλεπιδρούν με την ίδια την ουσία A (π.χ. το κατάλληλο υπόστρωμα αν το μακρομόριο A είναι ένζυμο).

II. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

Απορρόφηση φωτός

Είναι γνωστό ότι σε όλα σχεδόν τα πειράματα βιοχημείας γίνεται χρήση φασματοφωτομέτρου για τη μέτρηση της συγκέντρωσης μιας ουσίας σε ένα διάλυμα. Η φασματοφωτομετρία είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με μόρια, άτομα ή ιόντα.

Το φως ή η ηλεκτομαγνητική ακτινοβολία έχει κυματική και σωματιδιακή φύση. Το **μήκος κύματος** λ , του φωτός ορίζεται ως η απόσταση μεταξύ δυο διαδοχικών κορυφών του κύματος. Η **συχνότητα** ν , είναι ο αριθμός των κυμάτων που περνούν από ένα συγκεκριμένο σημείο στη μονάδα του χρόνου (Εικόνα 3).



ΕΙΚΟΝΑ 3. Κυματική φύση του φωτός

Αυτές οι παράμετροι συνδέονται μεταξύ τους με τη σχέση:

$$\lambda = c/\nu$$

όπου c είναι η ταχύτητα του φωτός.

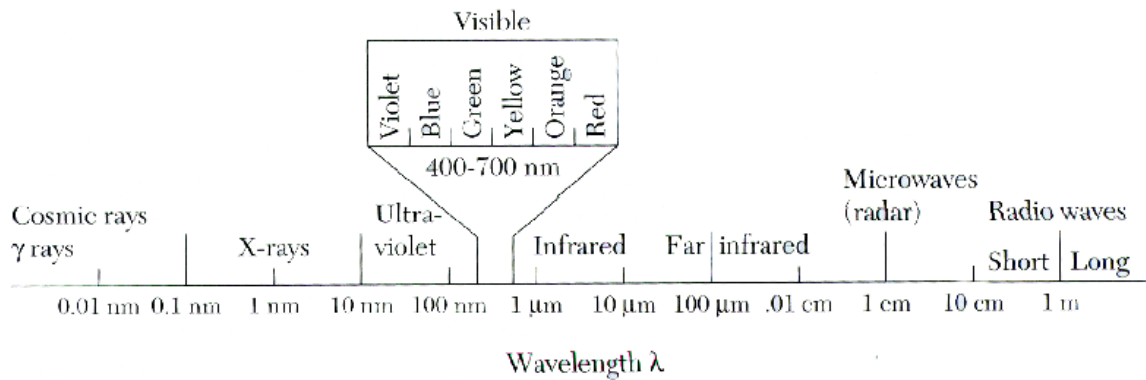
Τα φωτόνια που έχουν διαφορετικά μήκη κύματος έχουν και διαφορετικές ενέργειες. Οι ενέργειες αυτές υπολογίζονται από την εξίσωση:

$$E = hc/\lambda$$

όπου h είναι η σταθερά του Planck.

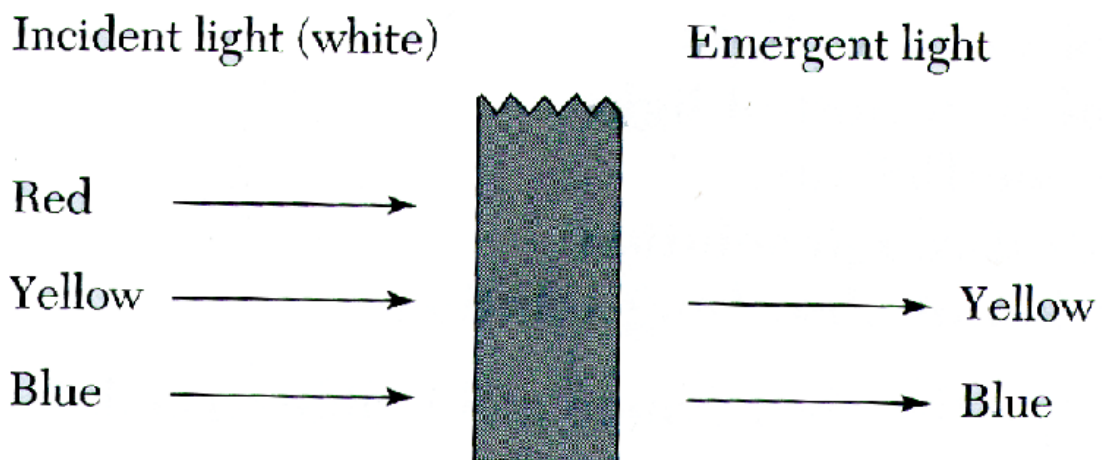
Επομένως, όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος κύματος τόσο μικρότερη είναι η ενέργεια και αντίστροφα.

Στην Εικόνα 4 φαίνεται η σχέση ανάμεσα στο μήκος κύματος του φωτός και στους συνηθισμένους τύπους ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Είναι προφανές ότι οι περιοχές με πολύ μικρό μήκος κύματος αντιστοιχούν σε τύπους ακτινοβολίας πολύ ισχυρούς και συχνά επικίνδυνους για τους ζωντανούς οργανισμούς, όπως ακτίνες X, ακτίνες γ, και υπεριώδης ακτινοβολία.



ΕΙΚΟΝΑ 4. Σχέση μήκους κύματος και ακτινοβολίας

Οι περισσότερες ενώσεις απορροφούν σε ένα (ή περισσότερα) χαρακτηριστικό μήκος κύματος. Η διαδικασία αυτή φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 5. Το συγκεκριμένο διάλυμα φαίνεται πράσινο επειδή το πράσινο (στην πραγματικότητα συνδυασμός μπλε και κίτρινου) εκπέμπεται ενώ το κόκκινο απορροφάται. Ένα διάλυμα πιθανόν να περιέχει πολλές ουσίες που απορροφούν σε διαφορετικά μήκη κύματος, παρόλα αυτά εάν η ουσία που μας ενδιαφέρει απορροφά σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος, μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωσή της.



ΕΙΚΟΝΑ 5. Απορρόφηση φωτός από ένα διάλυμα

Νόμος των Beer-Lambert

Εάν μια ακτίνα μονοχρωματικού φωτός (1 μήκος κύματος) με ένταση I_0 περάσει μέσα από ένα διάλυμα, ένα μέρος του φωτός θα απορροφηθεί και κατά συνέπεια, η ένταση I του φωτός που εκπέμπεται είναι μικρότερη από την I_0 (Εικόνα 6). Ο λόγος των δυο εντάσεων I/I_0 ονομάζεται διαπερατότητα και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες:

1. Εάν η συγκέντρωση, c , του διαλύματος αυξηθεί, η διαπερατότητα ελαττώνεται.
2. Εάν η απόσταση, l , την οποία πρέπει να διασχίσει το φως αυξηθεί, η διαπερατότητα ελαττώνεται.
3. Εάν η διαλυμένη ουσία αλλοιωθεί ή χρησιμοποιηθεί μια διαφορετική ουσία στο διάλυμα τότε η διαπερατότητα θα αλλάξει. Η φύση της διαλυμένης ουσίας καλύπτεται από τον συντελεστή απορρόφησης, ϵ , της συγκεκριμένης ουσίας. Όλες οι παραπάνω υποθέσεις περιλαμβάνονται στην παραπάνω εξίσωση:

$$\log I_0/I = \epsilon lc$$

όπου I_0 = ένταση του φωτός που προσπίπτει στο διάλυμα

I = ένταση του φωτός που εκπέμπεται

ϵ = συντελεστής απορρόφησης

l = απόσταση που διανύει το φως περνώντας μέσα από το διάλυμα

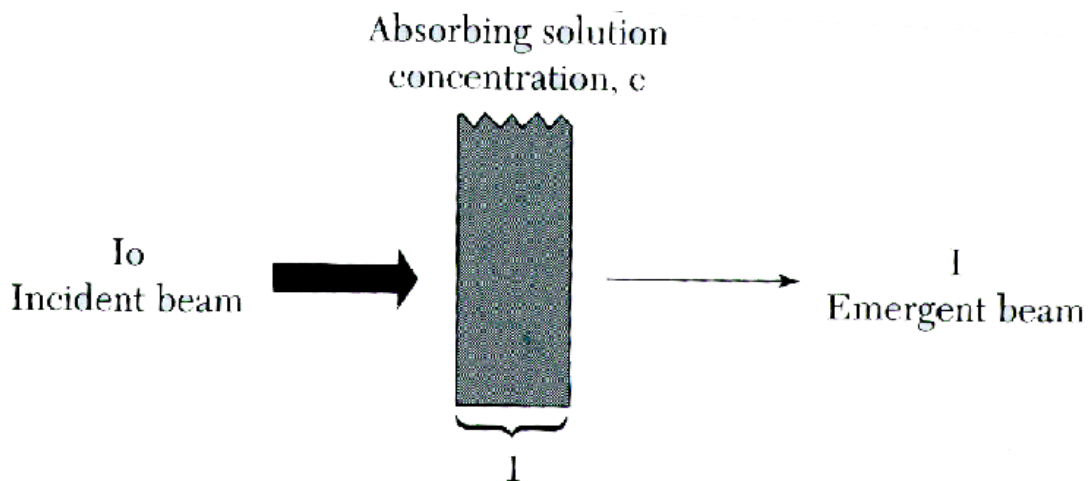
c = συγκέντρωση του διαλύματος

Ο $\log I/I_0$ ονομάζεται απορρόφηση και συμβολίζεται με A .

Η σχέση αυτή:

$$A = \epsilon cl$$

είναι γνωστή ως νόμος των Beer-Lambert (ή νόμος του Beer).



ΕΙΚΟΝΑ 6. Σχέση μεταξύ I , I_0 , l και c για ένα διάλυμα που απορροφά σε μήκος κύματος λ

Παρατηρήσεις

1. Η απορρόφηση, A , δεν έχει μονάδες. Είναι ο αριθμός που εσείς διαβάζετε στο φασματοφωτόμετρο. Συνήθως μαζί με την απορρόφηση σημειώνεται και το μήκος κύματος στο οποίο έγινε η μέτρηση: $A_{540} = 0,3$.
2. Οι πιο συνηθισμένες μονάδες του συντελεστή απορρόφησης, ϵ , αντιστοιχούν σε απόσταση (path length) 1 cm και συγκέντρωση διαλύματος 1 M. Με άλλα λόγια, η σχέση $\epsilon_{600} = 4000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ σημαίνει ότι ένα διάλυμα συγκέντρωσης 1 M έχει απορρόφηση $A = 4000$ στα 600 nm εάν χρησιμοποιηθεί κυψελίδα διαμέτρου 1 cm.
3. Το μήκος που διανύει το φως στο διάλυμα μετριέται συνήθως σε cm και εάν δεν καθορίζεται διαφορετικά είναι 1 cm.
4. Η συγκέντρωση, c , έχει μονάδες αντίστροφες των μονάδων του ϵ .
5. Προσοχή απαιτείται όσον αφορά τη στάθμη του διαλύματος στην κυψελίδα. Εννοείται ότι πρέπει να υπάρχει αρκετό διάλυμα ώστε η δέσμη του φωτός να περνά μέσα απ' αυτό.

Τυφλό δείγμα

Πρόκειται για μείγμα όλων των συστατικών του δείγματος ΕΚΤΟΣ από την ουσία της οποίας θα μετρηθεί η απορρόφηση. Σε πολλές περιπτώσεις κατά τη μέτρηση της απορρόφησης σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος η τιμή που μετριέται δεν προέρχεται μόνο από την ουσία που μας ενδιαφέρει. Αυτό διορθώνεται μετρώντας την απορρόφηση του τυφλού δείγματος και αφαιρώντας την τιμή αυτή

από τις επόμενες μετρήσεις. Για παράδειγμα, έστω ότι θέλουμε να μετρήσουμε σε $\lambda=595$ nm την απορρόφηση ενός πρωτεϊνικού δείγματος αναμεμειγμένο με ένα διάλυμα χρωστικής, το αντιδραστήριο Bradford. Ποιο θα ήταν το πιο κατάλληλο τυφλό δείγμα για τη μέτρηση αυτή;

Στο τυφλό δείγμα περιλαμβάνονται όλες οι ουσίες που συνεισφέρουν στην A_{595} εκτός από την πρωτεΐνη. Επομένως, στην κυψελίδα του τυφλού δείγματος θα υπάρχει μόνο αντιδραστήριο Bradford και ρυθμιστικό διάλυμα (ή νερό). Μηδενίζοντας το φασματοφωτόμετρο στο τυφλό δείγμα, η απορρόφηση που οφείλεται στο αντιδραστήριο Bradford αφαιρείται αυτόματα από τις επόμενες μετρήσεις.

III. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Ο νόμος του Beer μας επιτρέπει να μετράμε τη συγκέντρωση μιας ουσίας σε ένα διάλυμα αφού μετρηθεί η απορρόφησή της σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Είναι προφανές ότι το φασματοφωτόμετρο πρέπει να έχει εξισορροπηθεί ή μηδενιστεί κατάλληλα διαφορετικά οι μετρήσεις είναι λανθασμένες. Όπως θα διαπιστώσετε σε μια από τις ασκήσεις (κινητική τυροσινάσης) μπορούμε επίσης να μετρήσουμε τη μεταβολή της συγκέντρωσης π.χ. ενός προϊόντος αντίδρασης, παρακολουθώντας τη μεταβολή της απορρόφησης. Ο νόμος του Beer μπορεί να εφαρμοστεί μόνο εάν η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης και απορρόφησης είναι γραμμική. Διαφορετικά, πρέπει να κατασκευαστεί καμπύλη αναφοράς.

- Υπολογισμός συγκέντρωσης με μέτρηση στα 280 nm (περιοχή UV)

Η συγκέντρωση ενός πρωτεϊνικού διαλύματος μπορεί να υπολογιστεί εύκολα εάν διαθέτουμε φασματοφωτόμετρο με λάμπα υπεριώδους. Τα αμινοξέα τρυπτοφάνη και τυροσίνη παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 280 nm και μετρώντας την απορρόφηση των δειγμάτων στο συγκεκριμένο μήκος κύματος μπορούμε να μάθουμε εάν υπάρχει ή όχι πρωτεΐνη. Αυτή η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν προσπαθούμε να απομονώσουμε μια πρωτεΐνη χρησιμοποιώντας χρωματογραφικές μεθόδους. Για να βρούμε όμως την ποσότητα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στο δείγμα πρέπει να γνωρίζουμε το ϵ_{280} της πρωτεΐνης. Επιπλέον εάν γνωρίζουμε ήδη ότι η πρωτεΐνη δεν έχει αρκετά αρωματικά αμινοξέα ή ο συντελεστής απορρόφησης είναι χαμηλός τότε η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι η κατάλληλη.

- Υπολογισμός συγκέντρωσης με χρήση χρωστικής και καμπύλης αναφοράς

Πολλές μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται όταν η χρήση της προηγούμενης μεθόδου είναι αδύνατη ή ακατάλληλη. Οι περισσότερες απ' αυτές βασίζονται στην αλληλεπίδραση συγκεκριμένων μορίων (χρωστικών) με πρωτεΐνες. Αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι ο σχηματισμός έγχρωμων συμπλόκων, η απορρόφηση των οποίων μπορεί να μετρηθεί με χρήση φασματοσκοπίας ορατού.

Μια από τις πιο εύχρηστες μεθόδους είναι η μέθοδος Bradford με την οποία θα έχετε την ευκαιρία να εξασκηθείτε στην επόμενη εργαστηριακή άσκηση.

ΠΕΙΡΑΜΑ 1^β: Απομόνωση/διαχωρισμός της α-λακταλβουμίνης από τη β-λακτοσφαιρίνη με χρωματογραφία συγγένειας

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Χρωματογραφία συγγένειας

- IDA-αγαρόζη σε γυάλινη κολώνα χρωματογραφίας 1x10 cm
- Ρυθμιστικό A: 0,020M Tris, 0,5M NaCl, pH 7,0
- Ρυθμιστικό B: 0,020M Tris, 0,5M NaCl, 0,020M imidazole, pH 7,0
- CuSO₄ σε νερό, 0,1M
- Ανιχνευτής UV και κλασματοσυλλέκτης (προαιρετικά)
- Κυψελλίδες χαλαζία
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis
- 0,2M EDTA

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Χρωματογραφία συγγένειας

Για να πακετάρετε το χρωματογραφικό υλικό IDA-αγαρόζη χρησιμοποιήστε μια κολώνα 1x10cm που αποτελείται από ένα σωλήνα και δυο πώματα, που θα στερεώσετε σε κάθετη θέση.

Το υλικό πλήρωσης της κολώνας σας δίνεται ενεργοποιημένο με χαλκό (έχει μπλε χρώμα ενώ αρχικά είναι λευκό) οπότε εσείς παραλείπετε το στάδιο της ενεργοποίησης (βλ. παρακάτω).

Έχοντας την κάτω στρόφιγγα κλειστή προσθέστε περίπου 5ml ρυθμιστικού διαλύματος A. Ανακατεύετε το διάλυμα που περιέχει το υλικό IDA-αγαρόζη και ρίχνετε μια ποσότητα μέσα στην κολώνα υπολογίζοντας να έχετε 2-3ml χρωματογραφικού υλικού σ' αυτήν. Ανοίχτε την στρόφιγγα για να επιτραπεί μια αργή ροή του ρυθμιστικού διαλύματος μέσω της κολώνας. Όταν αρχίσει να καθιζάνει το χρωματογραφικό υλικό (IDA-αγαρόζη) προσθέστε περισσότερο υλικό κλείστε τη στρόφιγγα και γεμίστε την κολώνα με ρυθμιστικό A. Πλύνετε την κολώνα με 10ml ρυθμιστικού διαλύματος φροντίζοντας η ταχύτητα ροής να μην ξεπερνά τα 2ml/min.

<p>Προσοχή! Κατά τη διάρκεια του πακεταρίσματος φροντίστε να μη στεγνώσει η κολώνα.</p>
--

1. Ενεργοποίηση υλικού πλήρωσης με χαλκό

Για να δεσμεύσετε τον χαλκό στο χρωματογραφικό υλικό αφήστε το διάλυμα Α να κατέβει σε επίπεδο μόλις πάνω από το χρωματογραφικό υλικό και προσθέστε 0,5ml από το διάλυμα του χαλκού. Ανοίξτε τη στρόφιγγα για να επιτρέψετε στο χαλκό να εισέλθει στο υλικό. Μόλις γίνει αυτό, προσθέστε προσεκτικά περισσότερο ρυθμιστικό διάλυμα Α, προσέχοντας να μη διαταραχθεί η χρωματογραφική μήτρα. Συνεχίστε να εκλούετε την κολώνα με ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι να απομακρυνθεί ο μη δεσμευμένος Cu(II) (περίπου 25ml). Το χρωματογραφικό υλικό θα έχει αποκτήσει γαλάζιο χρώμα.

2. Εξισορρόπηση κολώνας

Αφήστε να περάσουν τουλάχιστον 25ml (όγκος υλικού πλήρωσης x 10) ρυθμιστικού Α από την κολώνα. Μόλις γίνει αυτό, αφήστε το ρυθμιστικό Α να φτάσει σχεδόν στην επιφάνεια του υλικού.

3. Φόρτωση δείγματος

Προσθέστε προσεκτικά, 0,5-1,0ml δείγματος (τυρόγαλα) σταγόνα-σταγόνα πάνω στην επιφάνεια του χρωματογραφικού υλικού. Ανοίξτε τη στρόφιγγα για να επιτρέψετε στο δείγμα να εισέλθει στην κολώνα (από το σημείο αυτό και μέχρι το τέλος της χρωματογραφίας συλλέγετε κλάσματα και δεν πετάτε τίποτα χωρίς να ενημερώσετε τους υπεύθυνους του εργαστηρίου).

4. Πλύσιμο κολώνας

Γεμίστε την κολώνα με ρυθμιστικό διάλυμα Α και συνεχίστε να συλλέγετε κλάσματα των 2ml. Κάθε κλάσμα θα μεταφέρεται σε κυψελίδα χαλαζία και θα μετράτε την απορρόφηση στα 280nm. Στο στάδιο αυτό, με ποιο διάλυμα θα μηδενίσετε το φασματοφωτόμετρο; Συνεχίστε το πλύσιμο της κολώνας με το διάλυμα Α μέχρι η A_{280} να είναι περίπου 0. Για να γίνει αυτό απαιτούνται 20-25ml ρυθμιστικού διαλύματος Α (όγκος υλικού πλήρωσης x 10).

5. Εκλούση δείγματος

Για την έκλουση της α-λακταλβουμίνης πρέπει να περάσετε ρυθμιστικό διάλυμα Β από την κολώνα. Συνεχίστε να συλλέγετε κλάσματα των 2ml, να μετράτε την απορρόφηση στα 280nm. Στο στάδιο αυτό, με ποιο διάλυμα θα μηδενίσετε το

φασματοφωτόμετρο; Η έκλυση της α-λακταλβουμίνης συνήθως ολοκληρώνεται αφού περάσουν 10ml διαλύματος Β από την κολώνα.

6. Αναγέννηση χρωματογραφικού υλικού

Το χρωματογραφικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά αφού απομακρυνθεί ο Cu(II) με 0,2M EDTA. Χρησιμοποιήστε περίπου 5ml 0,2M EDTA ή όσο χρειάζεται για να απομακρυνθεί τελείως ο χαλκός από το υλικό. Όταν γίνει αυτό, αφήστε να περάσουν από την κολώνα 25ml ρυθμιστικού διαλύματος Α και ενημερώστε τον υπεύθυνο του εργαστηρίου για να συλλέξει το υλικό. Στη συνέχεια, πλύνετε τα μέρη της κολώνας με νερό και απιονισμένο νερό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- R. Boyer, *J.Chem. Educ.* **68**, 430-432 (1991). “ Purification of Milk Whey a-Lactalbumin by Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography”.
- R. Boyer, **Concepts in Biochemistry**, (1999), Brooks/Cole (Pacific Grove, CA),pp. 102-105. Protein purification and analysis.
- K. Ebner, **Acct. Chem. Res.** 3, 41-47 (1970). Biological role of a-Lactalbumin.
- R. Garrett and C. Grisham, **Biochemistry**, 2nd ed. (1999), W.B Saunders (Orlando, FL), pp.153-157. Protein techniques.
- L. Hall and P. Campell, in **Essays in Biochemistry**, Vol.22, R. Marshall and K. Tipton, Editors (1988), Academic Press (London), pp. 1-26. A review on a-Lactalbumin.
- E. Harris and S. Angal, Editors, **Protein Purification Applications: A Practical Approach, Vol. 2** (1990), IRL Press (Oxford). An excellent book for undergraduates.
- C. Mathews, K. van Holde, and K. Ahern, **Biochemistry**, 3rd ed. (2000), Benjamin/Cummings (San Francisco), pp. 148-152. Isolation and purification of proteins.
- J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, and G. Belfrage, **Nature** **258**, 598-599 (1975). ‘Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation’.
- L. Stryer, **Biochemistry**, 4th ed. (1995), W. H. Freeman (New York), pp. 45-52. Isolation, purification, and characterization of proteins.
- D. Voet and J. Voet, **Biochemistry**, 2nd ed. (1995), John Wiley & Sons (New York), pp. 72-104. Study of proteins.
- D. Voet, J. Voet, and C. Pratt, **Fundamentals of biochemistry** (1999), John Wiley & Sons (New York), pp. 96-107. An introduction to protein purification and analysis.