

Pražské analytické centrum inovací

Projekt CZ.04.3.07/4.2.01.1/0002 spolufinancovaný ESF a Státním rozpočtem ČR

Afinitní chromatografie

Tereza Vařilová, Věra Pacáková
PřF UK Praha



Obsah přednášky

1. Úvod
2. Teoretický princip
3. Komerční stacionární fáze
4. Příprava vlastních stacionárních fází
 - 4.1 Nosiče
 - 4.2 Aktivace nosičů
 - 4.3 Vazba ligandu
5. Aplikace
6. Závěr

Analýza biologicky aktivních látek

proteomika

složité systémy → vysoké požadavky
na použité separační metody

separační účinnost
selektivita

Afinitní chromatografie – princip metody

Enzym

Substrát

Enzym

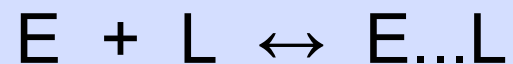
Inhibitor

Protilátka

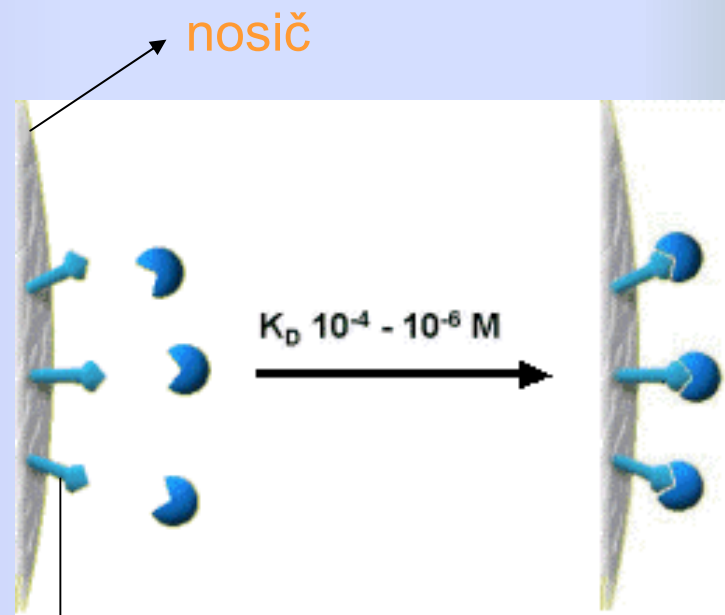
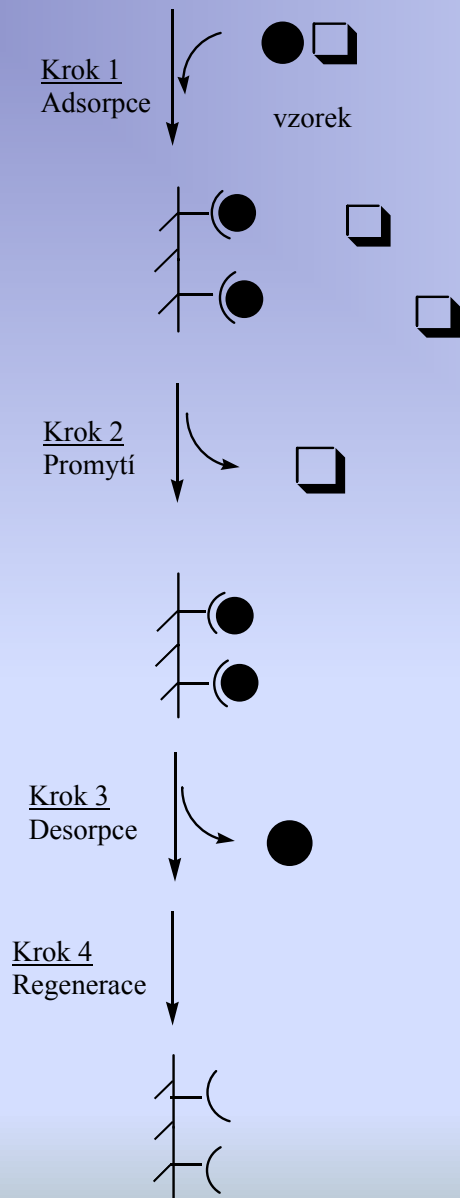
Antigen

Hormon

Receptor



$$K = \frac{[E...L]}{[E] \cdot [L]}$$

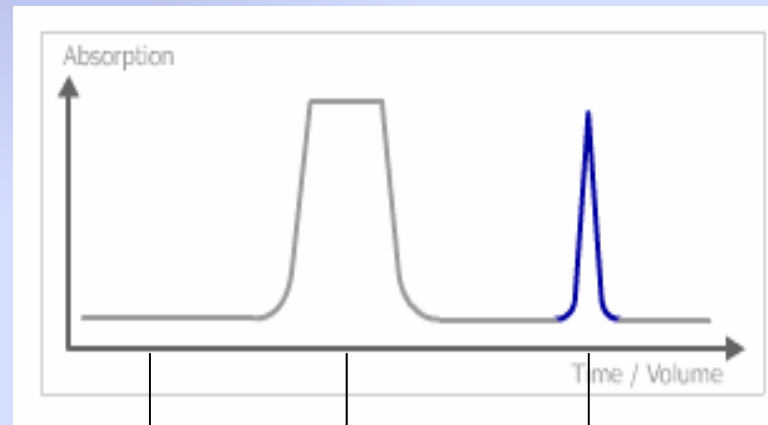


<http://www.amershambiosciences.com>

kovalentně vázaný ligand

3 základní kroky analýzy

- * **rovnováha** – ustálení startovacích podmínek
- * **adsorpce** – nadávkování vzorku a promytí kolony
- * **eluce** – vymytí zachycené molekuly z kolony



<http://www.amershambiosciences.com>

ustálení

promytí
neadsor. látky

desorpce
sorb. látky

Eluce

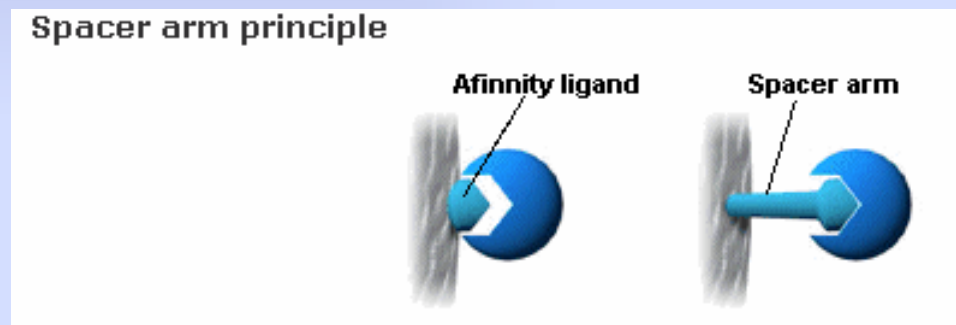
- **Nespecifická**
změna pH nebo iontové síly pl
- **Specifická**
přídavek disociačních činidel
- **Izokraticky**
jednoduché látky s ↓ afinitou k ligandu
- **Gradientovou elucí**
vhodná strmost

Typy afinitních ligandů

- Ligandy pro mono-specifické separace
strukt. a biol. příbuzné s cílovou molekulou
specifický ligand pro každý jedn. případ
pepsin + 3,5-dijodo-L-tyrosin
- Ligandy pro skupinově-specifické separace
širší aplikovatelnost
komerčně dostupnější
glykoproteiny + Konkanavalin A

Skupinově selektivní ligandy	Specifita
Konkanavalin A	Glukopyranosyl- manopyranosylové skupiny
Lysin	Ribosomální RNA
Arginin	Serinové proteasy
Benzamidin	Serinové proteasy
Heparin	Lipoproteiny, hormony, steroidní receptory...

Malé ligandy → nebezpečí stérických interferencí mezi maticí a ligandem nebo nízká přístupnost pro ligand → **oddalovací raménko** (spacer arm)



www.amershambiosciences.com

IMAC

Immobilized Metal Affinity Chromatography

Afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech

- afinita někt. bílkovin k iontům TK, které jsou imobilizovány na pevném nosiči chelátovým komplexem

Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}

- čištění rekombinantních proteinů

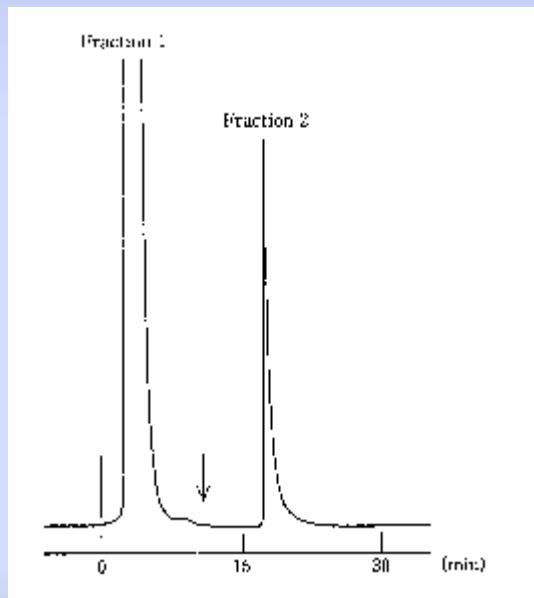
Komerční afinitní stacionární fáze

Tosoh Bioscience

TSKgel ABA-5PW

p-aminobenzamidin...napodobuje inhibitor serinové proteasy

Aplikace: trypsin, urokinasa, krevní koagulační faktory...



0,5 M NaCl + 2 mM CaCl₂ v 50 mM Tris.HCl pH 8,0

Eluce změnou hodnoty pH ↓ pufru na 2,8.

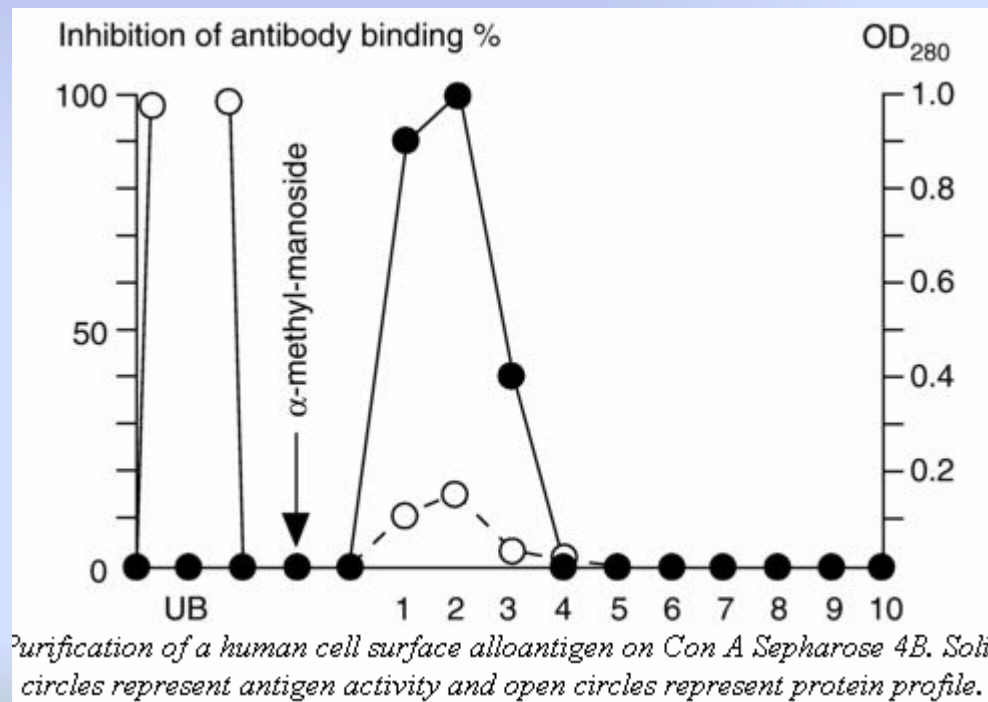
Izolace surového trypsinu

Amersham Bioscience

Con A Sepharose 4B

Concanavalin A...váže sacharidové složky

Aplikace: analýza glykoproteinů

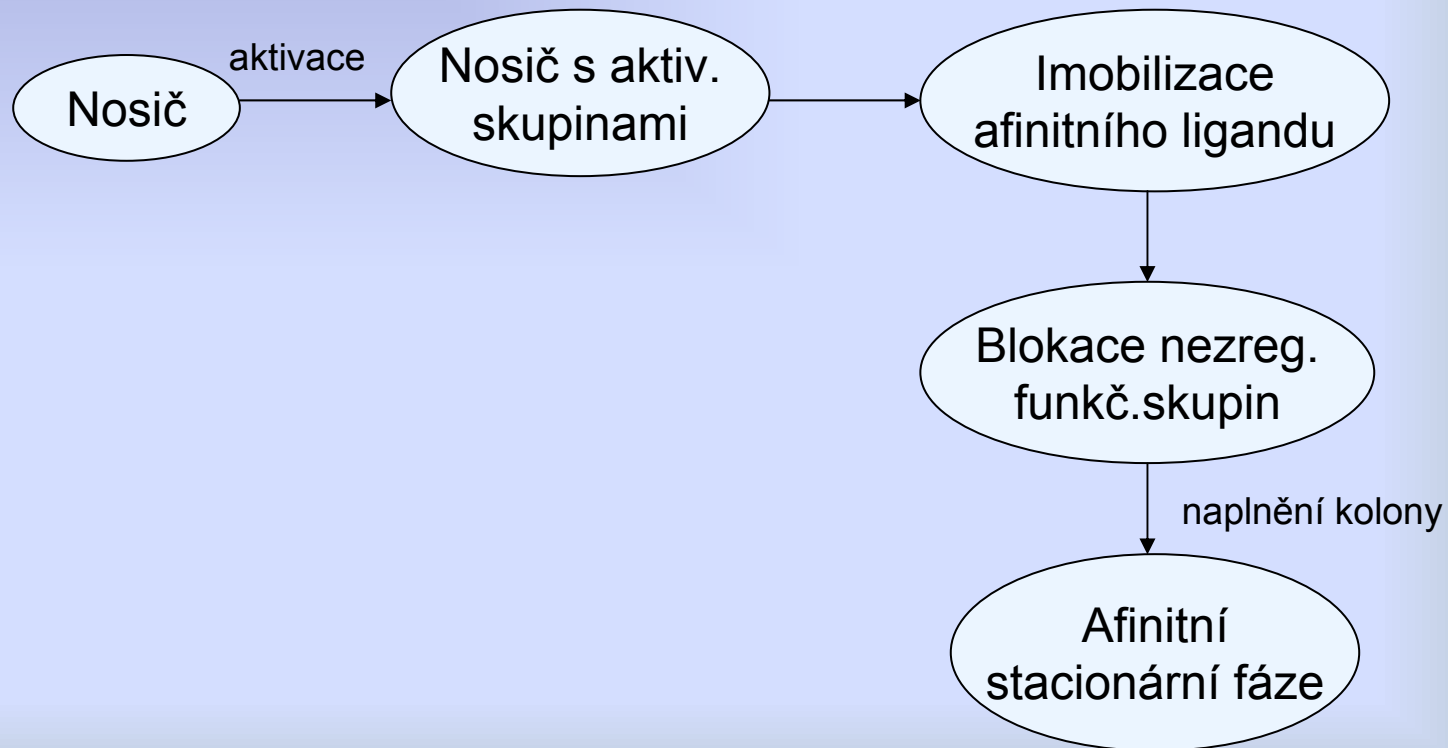


Eluce přidavkem
α-methyl-manosidu.

Přečištění lidského membránového glykoproteinu

Příprava afinitní stacionární fáze

Příprava vlastní stacionární fáze



Nosiče pro afinitní chromatografii

- minimální nespecifické interakce
- chemická stabilita
- mechanická stabilita
- pH stabilita
- teplotní stabilita

Silikagel

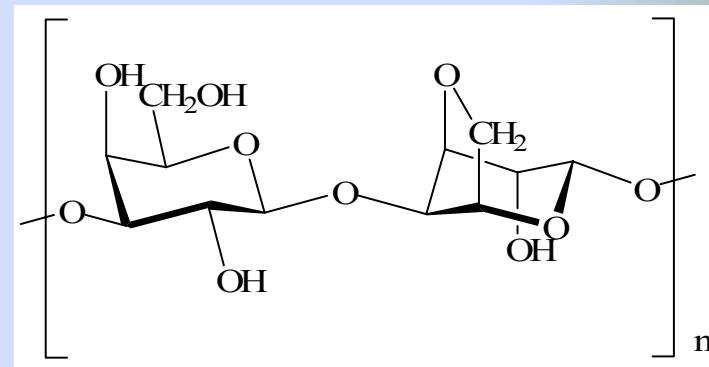
- nutná modifikace povrchu:
volné silanolové Si-OH skupiny → zavedení reaktivní funkční skupiny (epoxy)
- snese \uparrow tlaky
- omezené pH: $2 < \text{pH} < 8$
- nespecifické interakce

Anorganické oxidy Al_2O_3 , TiO_2 a ZrO_2

- mnoho amorfních a krystalických forem
- Al_2O_3 se rozpouští při $\text{pH} > 12$ a $\text{pH} < 3$
- TiO_2 a ZrO_2 snáší i extrémní podmínky pH

Agarosové nosiče a jejich deriváty

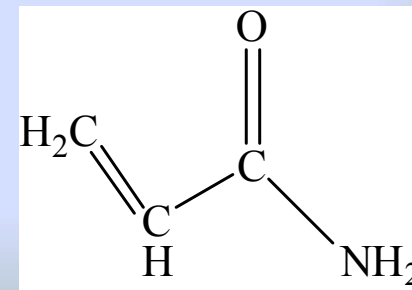
- 2 polysacharidové jednotky, β -(1,4)-O
- **Sepharosa**
- pH 4-9, hydrofilní, ↓ nespecifické interakce
- nestabilní za ↑ tlaků
- mikrobiální atak



Varilova T. *et al.*: Curr. Proteomics 3 (2006) 55.

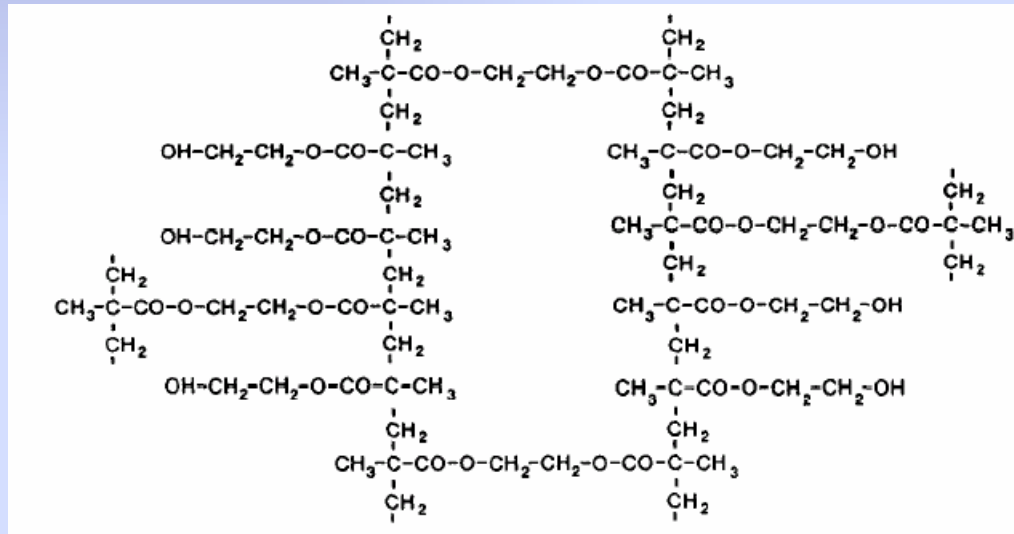
Polyakrylamidové gely

- syntetické kopolymery na bázi akrylamidu
- **Bio-Gely**
- pH 1-10
- chemicky stabilní (sůl, močovina, Gdn.HCl)
- nízký stupeň porozity



Hydroxyalkylmethakrylátové nosiče

- syntetické polymery
- **HEMA** hydroxyethylmethakrylát
- pH 2-12

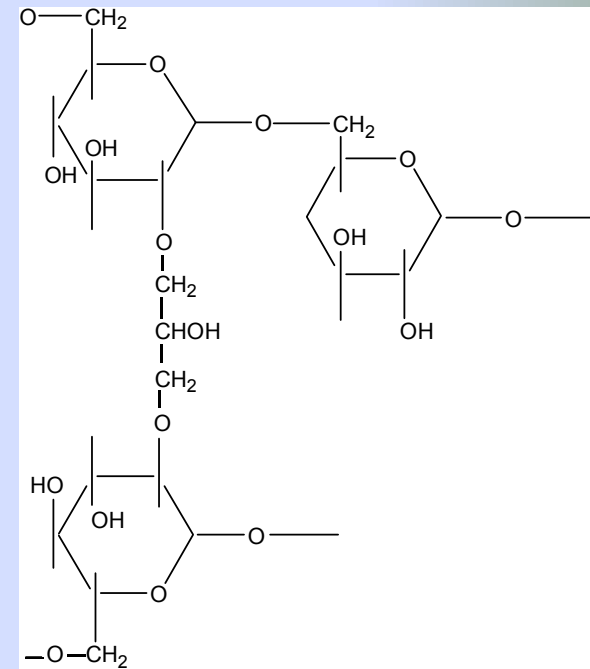


Čoupek J., Vinš I.: J. Chromatogr. A 658 (1994) 391.

- **Toyopearl** pH 2-12, nižší nespec.interakce

Dextranové gely

- glukosové jednotky α -1,6/ větvené 1,2/1,3/1,4
- **Sephadex, Superdex**
- nejsou mechanicky stálé
- glykosidické vazby \rightarrow
 hydrolýza při \downarrow pH
- náchylné k bakteriálnímu útoku



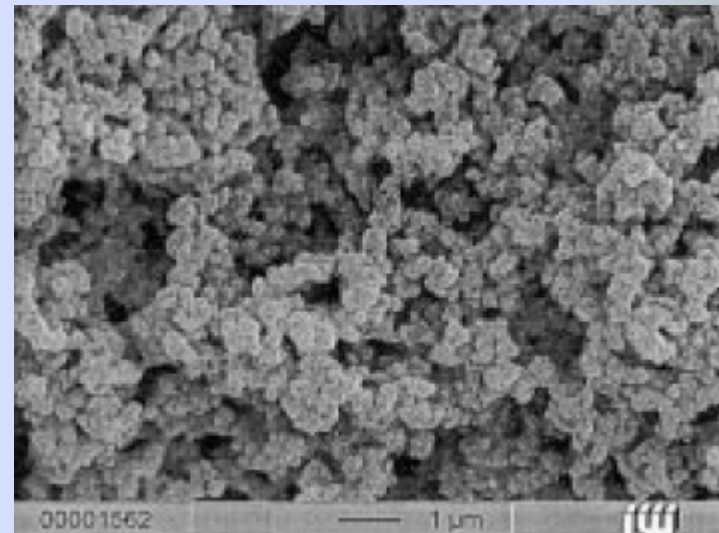
Varilova T. *et al.*: Curr. Proteomics 3 (2006) 55.

Celulosa

- glukosové jednotky β -1,4
- dostupná, levná → využití v průmyslové oblasti
- vláknitá → vazba pro DNA

Monolitické fáze

- kolona je zcela vyplněna polymerem o def. pórovitosti
- ↓ spotřeba vzorku a rozpouštědel
- rychlé separace,
+ pro labilní látky



Monolitický disk (scanning electron microscopy)

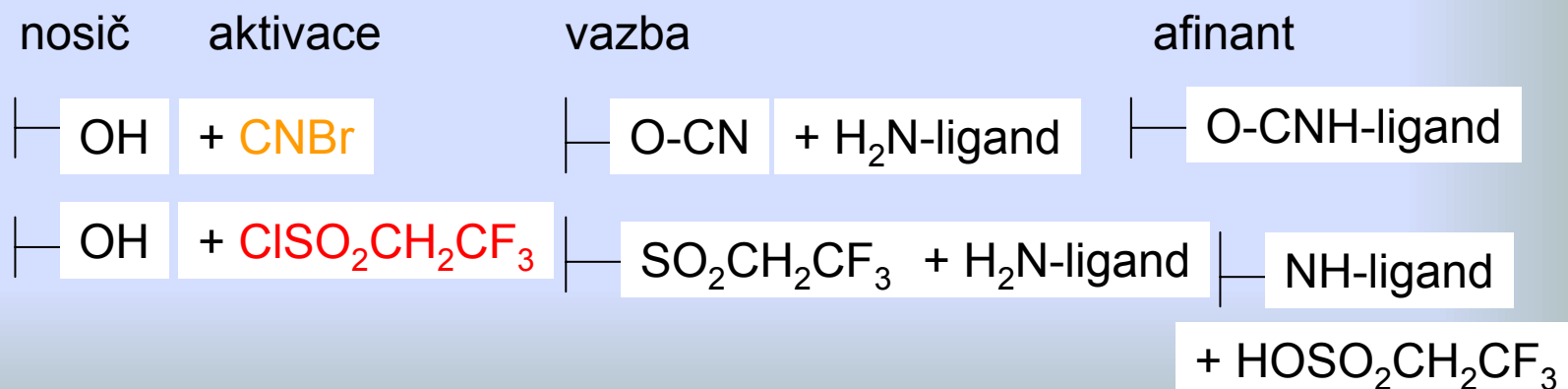
Tennikova T.B.: J. High Resol. Chromatogr. 23 (2000) 27.

Vtištěné polymery (imprinted polymers)

- založené na molekulovém rozpoznávání
- in-situ polymerace v koloně
- v polymeru zůstanou obtisky po vtištěné molekule
- chirální separace

Aktivace nosičů

- Epoxy skupinami (bisoxiranem)
- Bromkyanová metoda (CNBr)
- Divinylsulfonem (DVS)
- Organickými sulfonylchloridy
tosylchlorid ... p-toluensulfonylchlorid
tresylchlorid ... 2,2,2-trifluoroethansulfonylchlorid



Imobilizace afinitního ligandu

Aktivní skupina	Reagující skupiny ligandu	Reakční podmínky
epoxy	- NH ₂ - OH - SH - COOH	pH 5 - 12 doba 4 - 72 hod teplota 4 - 60° C
bromkyan	- NH ₂	pH 7 - 10, doba 1 - 12 hod, teplota 4 - 25° C
divinylsulfon	- NH ₂ - OH - SH	pH 6 - 11, doba 2 - 24 hod teplota 4 - 25° C
tresyl	- NH ₂	pH 7 - 9, doba 2 - 16 hod, teplota 4 - 25° C

Blokace nezreagovaných funkčních skupin

- vazba vhodné látky na zbytkové aktivní skupiny nosiče
glycin, glycerol, ethanolamin
- hydrolýza zbytkových aktivních skupin
v OH^- prostředí

Stanovení množství imobilizovaného ligandu

- diferenční analýza

$$m_{\text{celk}} - m_{\text{nezreag}}$$

- přímá spektroskopie

- kyselá/enzymová analýza

hydrolýza vazby mezi nosičem a ligandem

- elementární analýza

S, I, N, P

- Radioaktivita

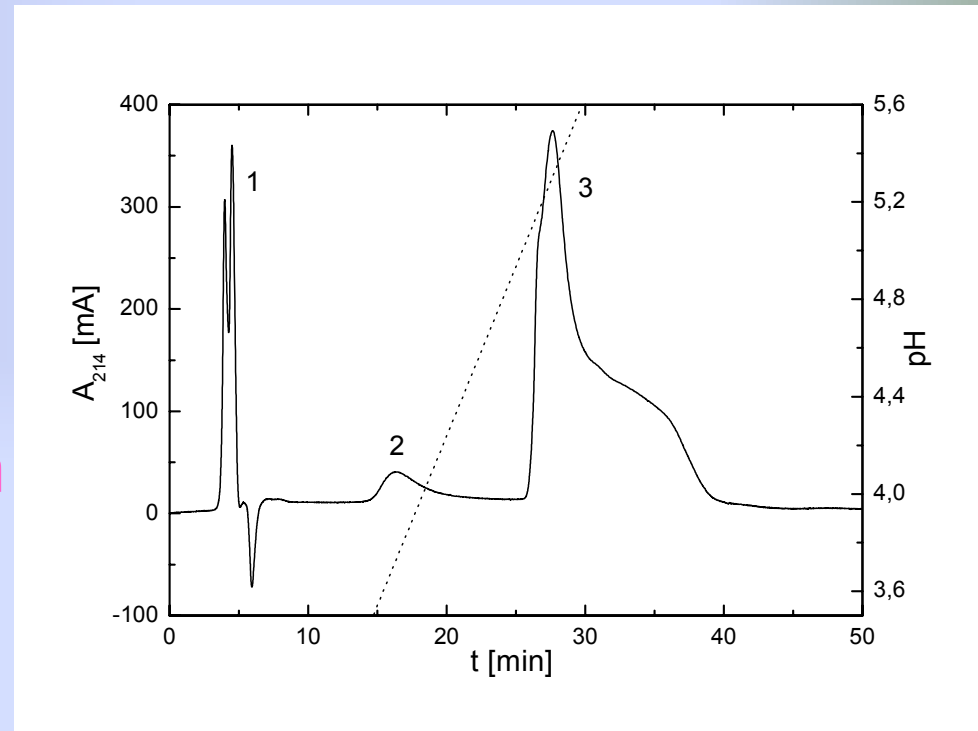
^3H , ^{32}P , ^{57}Co

Příklady použití

- prekoncentrace
- čištění analytů v komplexních směsích
- analýza látek
- oblast ŽP (např. pesticidy a toxiny)
- aplikace v lékařství (enzymy, hormony, viry a jejich genetický fond, rakovinotvorné markery, protilátky, proteiny semenné plazmy, léky/drogy...)
- proteomika
- stanovení vazebných konstant
- kombinace s 2-DE

Pepsin

- **nosiče**
 - HEMA – E
 - HEMA – VS
 - Toyopearl E
- **ligand**
 - 3,5-dijodo-L-tyrosin
- **blokace nezreag.skupin**
 - glycin
- **vzorek**
 - prasečí pepsin A
 - lidský pepsin
- **eluce vzorku**
 - změnou pH mob. f.

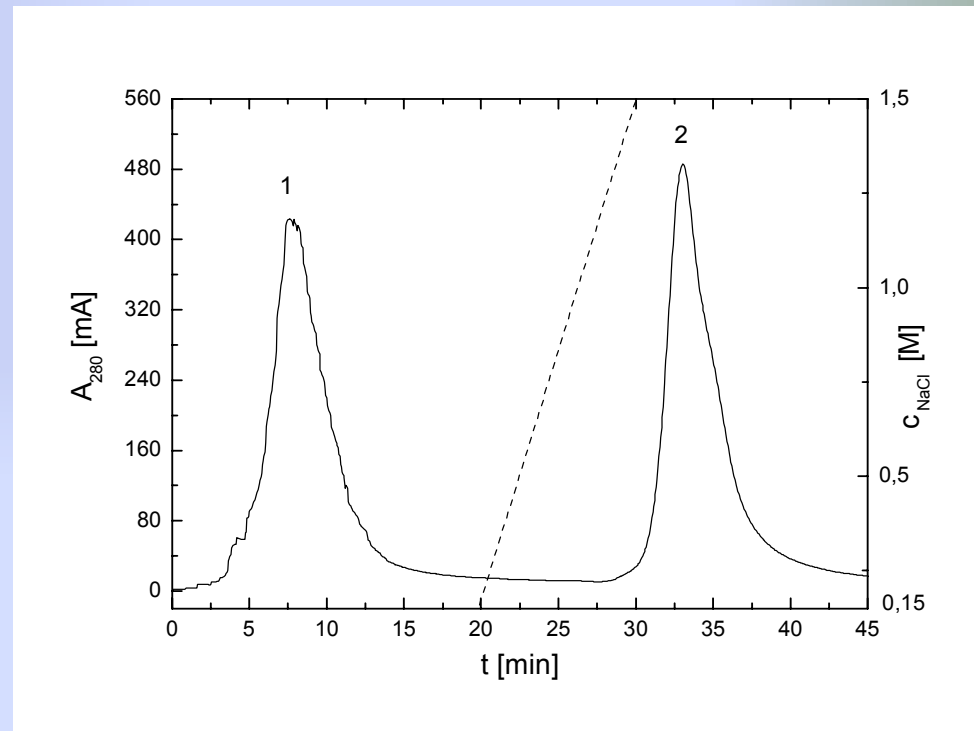


Prasečí pepsin A na koloně HEMA VS-DIT.

Vařilová T. *et al.*: J. Chromatogr. A 1084 (2005) 207.

Proteiny semenné plazmy

- **nosič**
Toyopearl (komerční)
- **ligand**
heparin
- **vzorek**
proteiny semenné plazmy:
kančí, býčí a lidské
- **eluce vzorku**
změnou pl mob. fáze

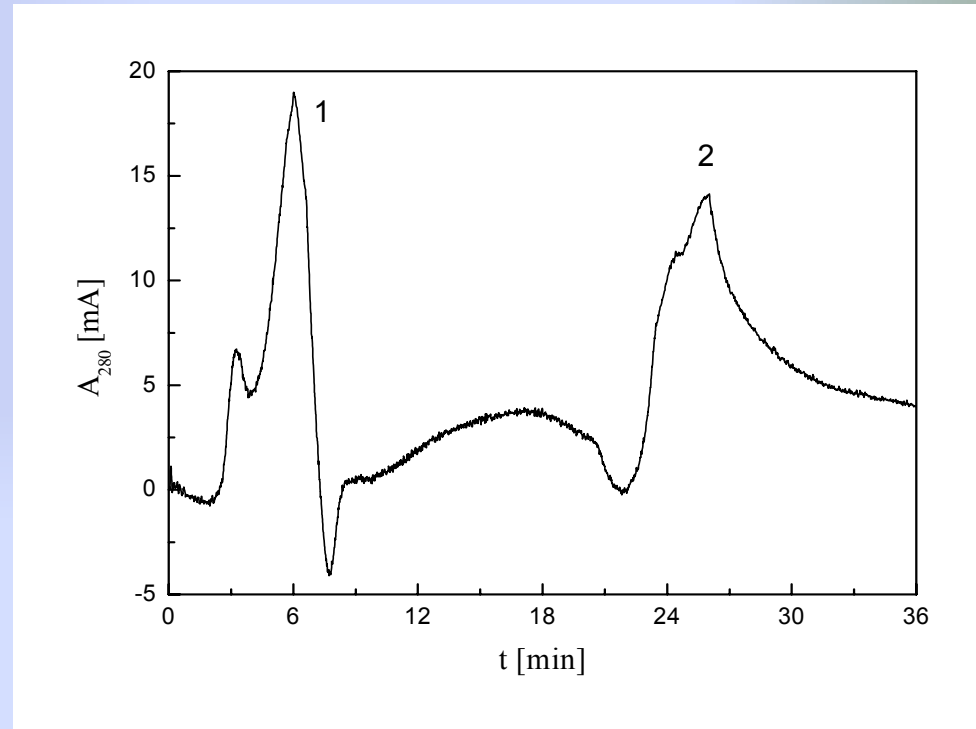


Lidská semenná plazma.

Vařilová T. *et al.*: J. Sep. Sci 29 (2006) 1110.

Glykoproteiny

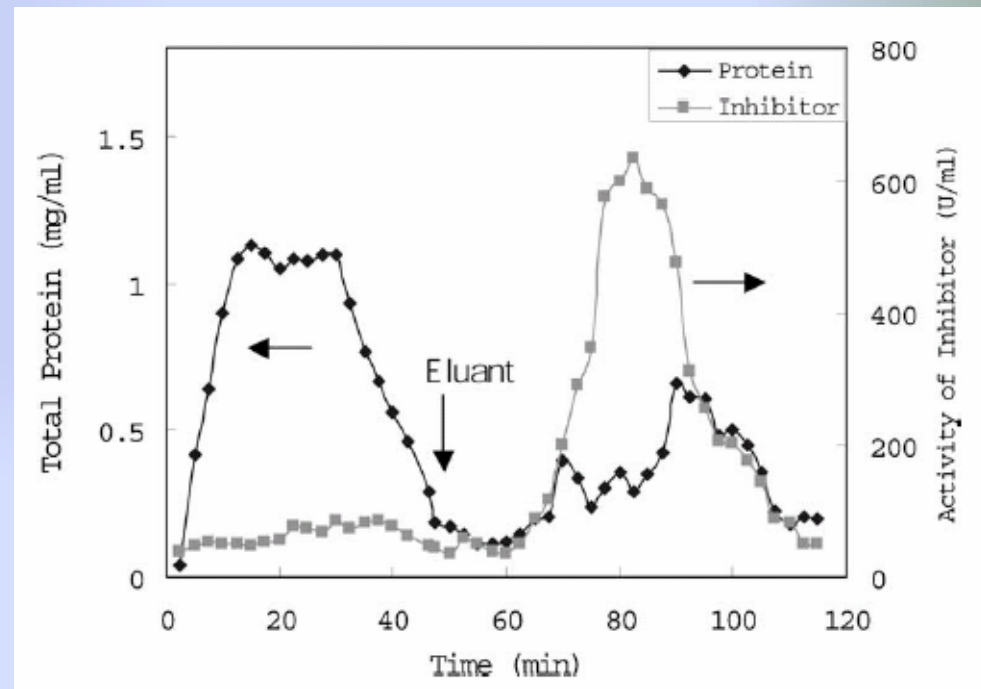
- **nosiče**
 - Toyopearl E
 - Toyopearl T
- **ligand**
 - konkanavalin A
- **blokace nezreag.skupin**
 - glycin
- **vzorek**
 - 4-nitroder. sacharidů
 - glykoproteiny
 - vybrané alergeny
- **eluce vzorku**
 - přídavek
 - manopyranosidu



Pylový alergen *Phleum pratense* na koloně Toyopearl E-Con A.

Papain

- **nosič**
skleněná vlákna
- **ligand**
papain
- **vzorek**
papainové inhibitory z
bramborové šťávy
- **eluce vzorku**
6 M močovinou



Membrána ze skleněných vláken s imobilizovaným papainem.

Guo . W. and Ruckenstein E.: J. Membr. Sci. 215 (2003) 141.

Závěr

Afinitní chromatografie

- separace a izolace látek
- specifické interakce (molekulové rozpoznávání)
- nové stacionární fáze
- miniaturizace techniky (afinitní membrány)

Děkuji
za
pozornost!