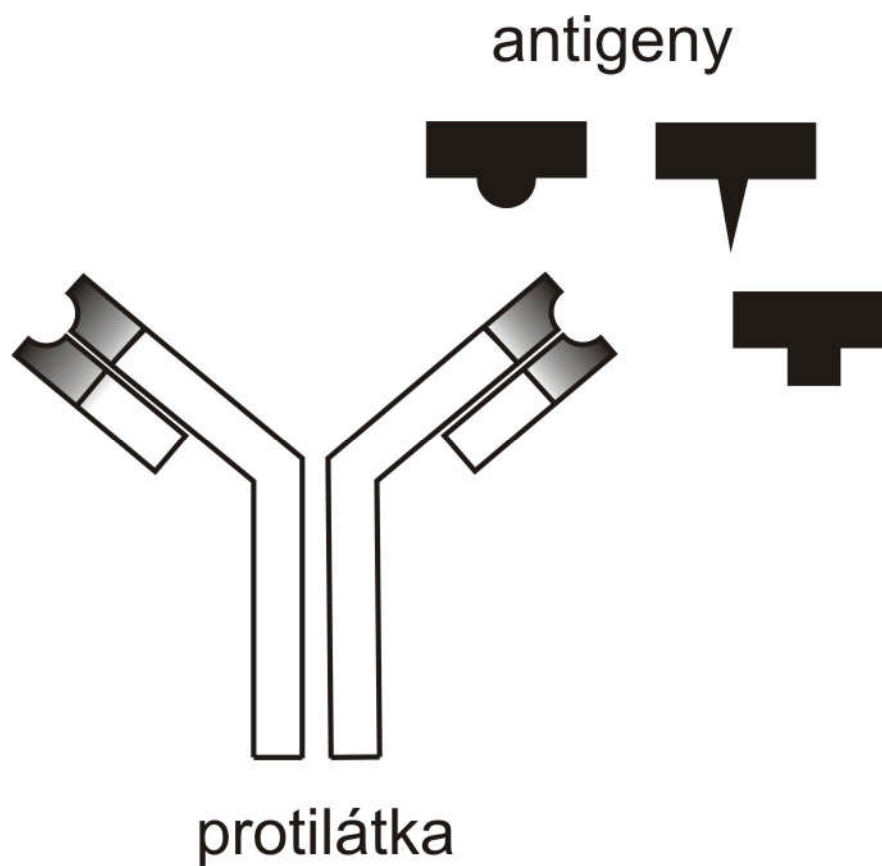
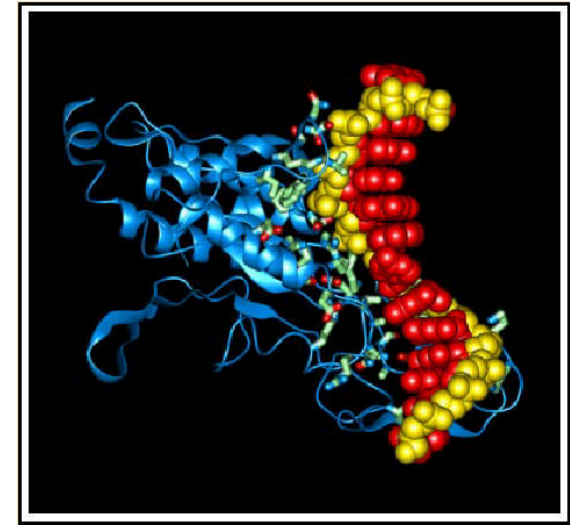
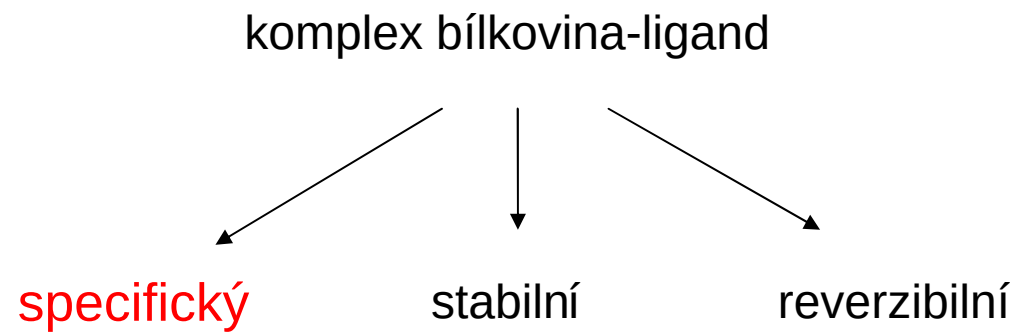


Využití afinitních interakcí při separaci makromolekul





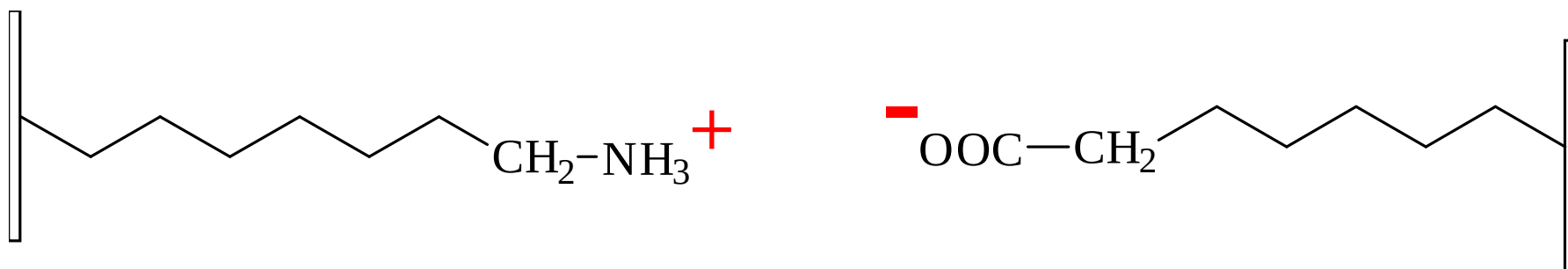
Interakce mezi DNA a endonukleasou

základní typy interakcí
(*iontová, hydrofilní a hydrofobní*)

+

prostorové uspořádání
(*3D struktura aktivního centra*)

Elektrostatické interakce

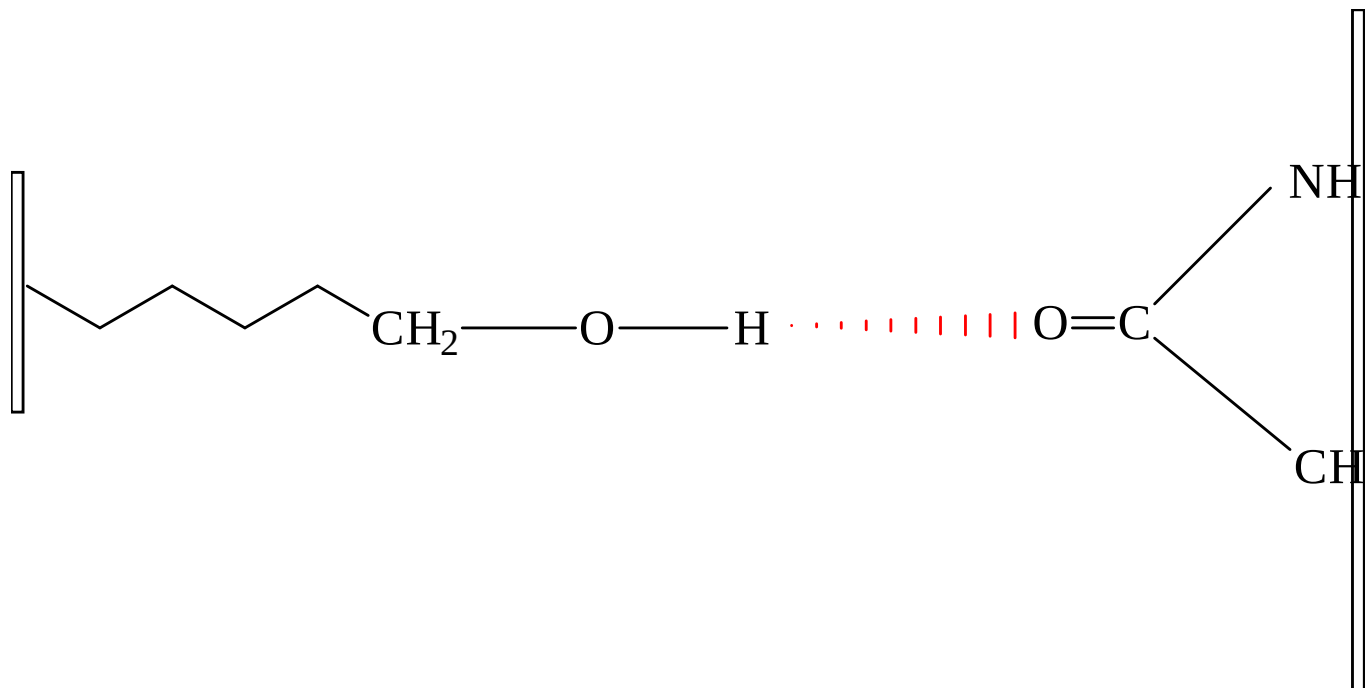


$$F = 1/d^2$$

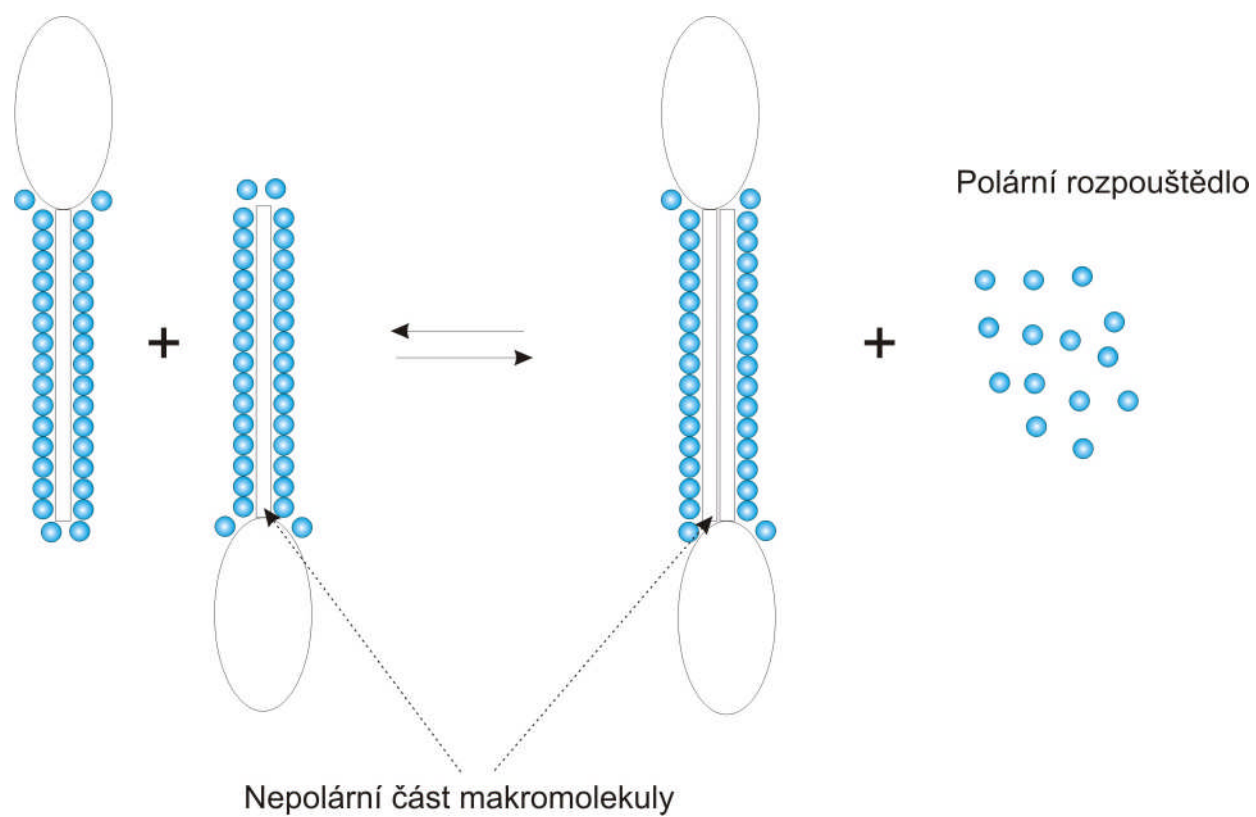
***F** ... přitažlivá síla*

***d** ... vzdálenost*

Polární interakce



Hydrofobní interakce

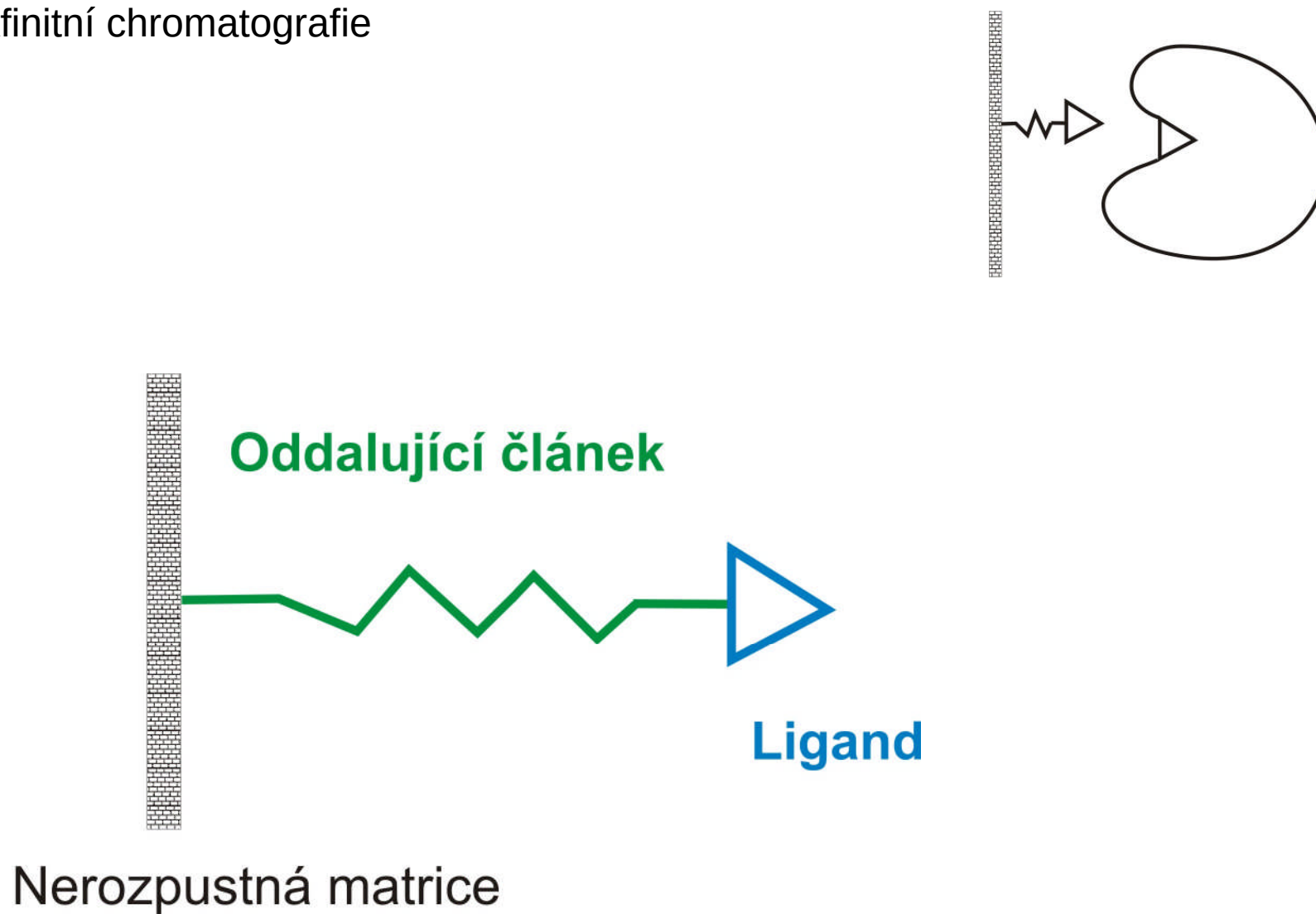


Využití afinitní interakce

- afinitní chromatografie
- afinitní srážení
- afinitní elektroforesa
- afinitní rozdělování

studium aktivního místa enzymu, modifikace, kinetická měření atd.

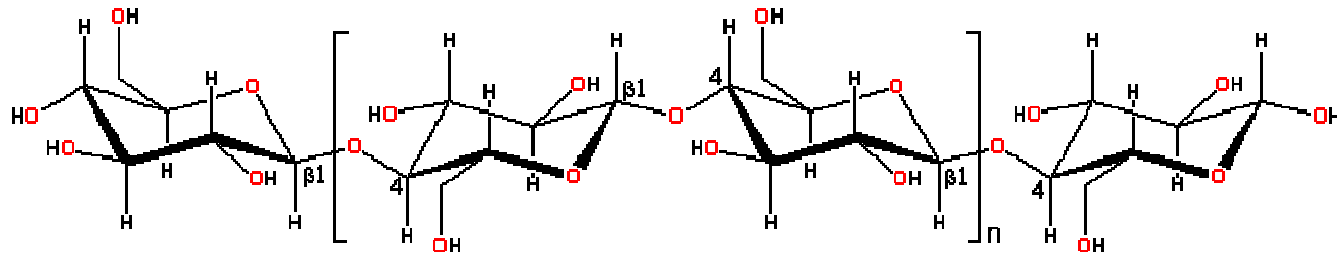
Afinní chromatografie



Ideální nosič (matrice)

- Neměl by interagovat s proteiny (separovanou látkou)
- Velké množství funkčních skupin (připojení ligandu)
- Mechanická a chemická stálost
- Volná, pórovitá struktura
- Částice stejnorodé, kulového tvaru s dobrými průtokovými vlastnostmi

celulosa

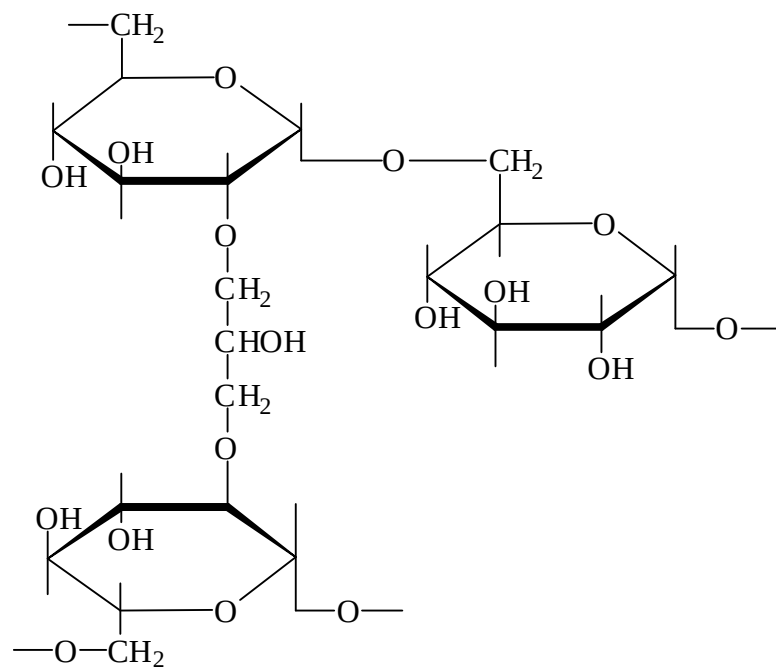


Celulosa je lineární polymer D-glukosových zbytků (až 15000) spojených $\beta(1,4)$ - glykosidovými vazbami.

Vláknitý, nestejnorodý charakter

Mikroheterogenita (uspořádané x neuspořádané oblasti)

dextran



stabilita

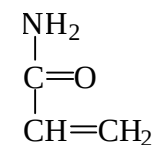
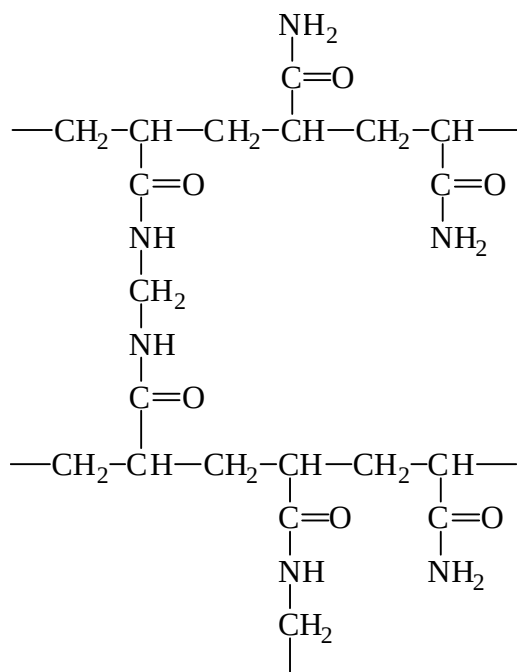
0,2 M NaOH (60 °C)

0,02 M HCl

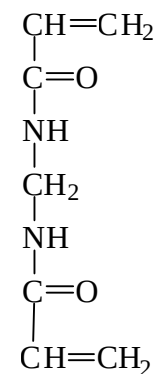
40 min 110 °C

Málo pórovitý

polyakrylamid



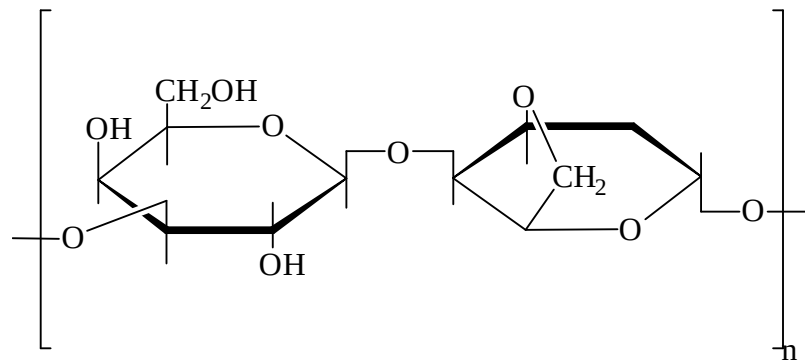
akrylamid



N,N'-methylen-bis(akrylamid)

Změny objemu náplně sloupců změnou iontové síly

agarosa

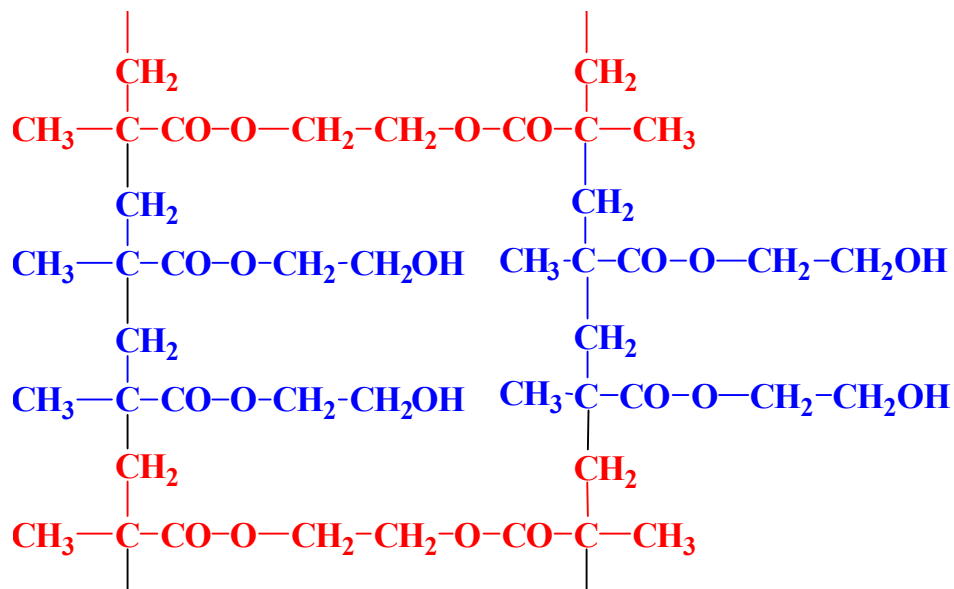


D-galaktosa 3,6-anhydrogalaktosa

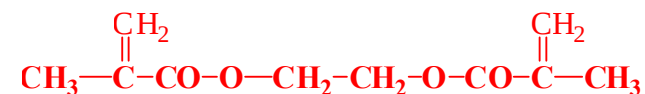
Vyšší teploty (nad 40 °C) a vysoké koncentrace látek
rušících vodíkové můstky (močovina, guanidin)

⇓
gel „taje“

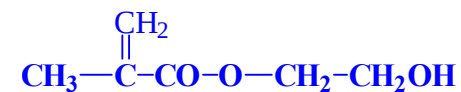
spheron



částečně hydrofobní charakter



etylendimetakrylát



hydroxyetylmetakrylát

Velikost částic	5 – 100 μm
Velikost pórů	25 – 50 nm
Povrch	40 – 200 m ² /g

Nosiče na bázi SiO_2

Silasorb (LACHEMA)
Merckogel Si (Merck)

vodní sklo

↓ $(\text{COOH})_2$

mlýn

↓

síta

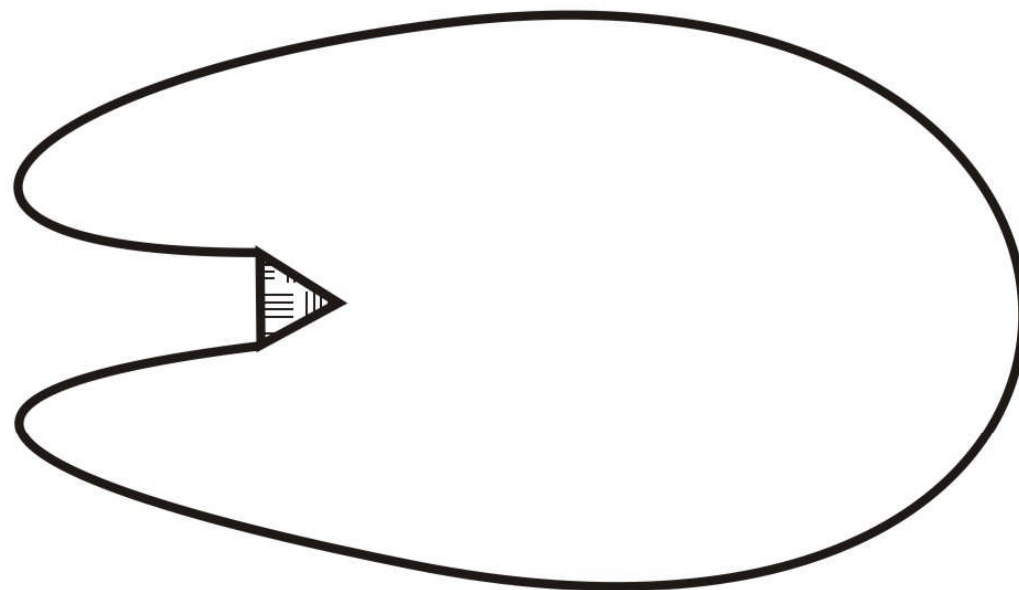
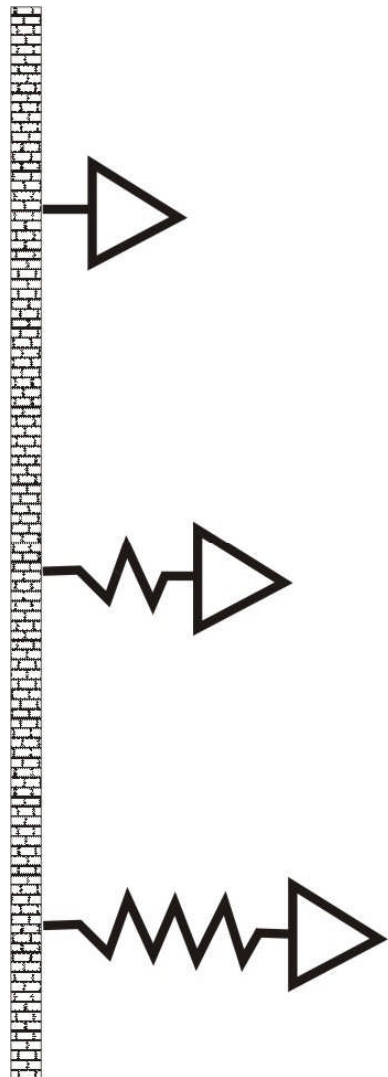
↓

upravení povrchu ($\sim 2\% \text{NH}_4\text{F}$)

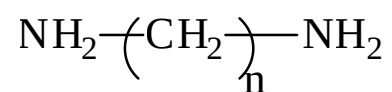
Merckogel (velikost částic 0,4 – 0,063 mm)

velikost póru	m^2/g	exkluzní limit (D)
15 nm	150	50 000
50 nm	50	400 000
100 nm	15	1 000 000

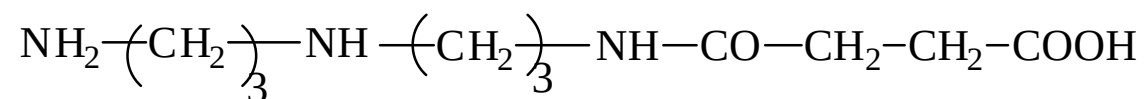
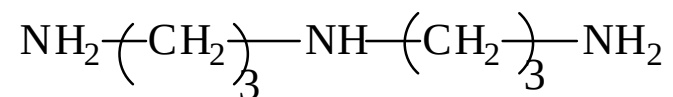
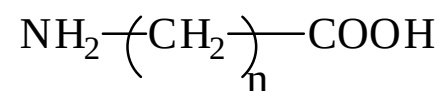
Oddalující článek (ramínko)



příklady



$$n = 4 - 12$$



hydrofilnější články

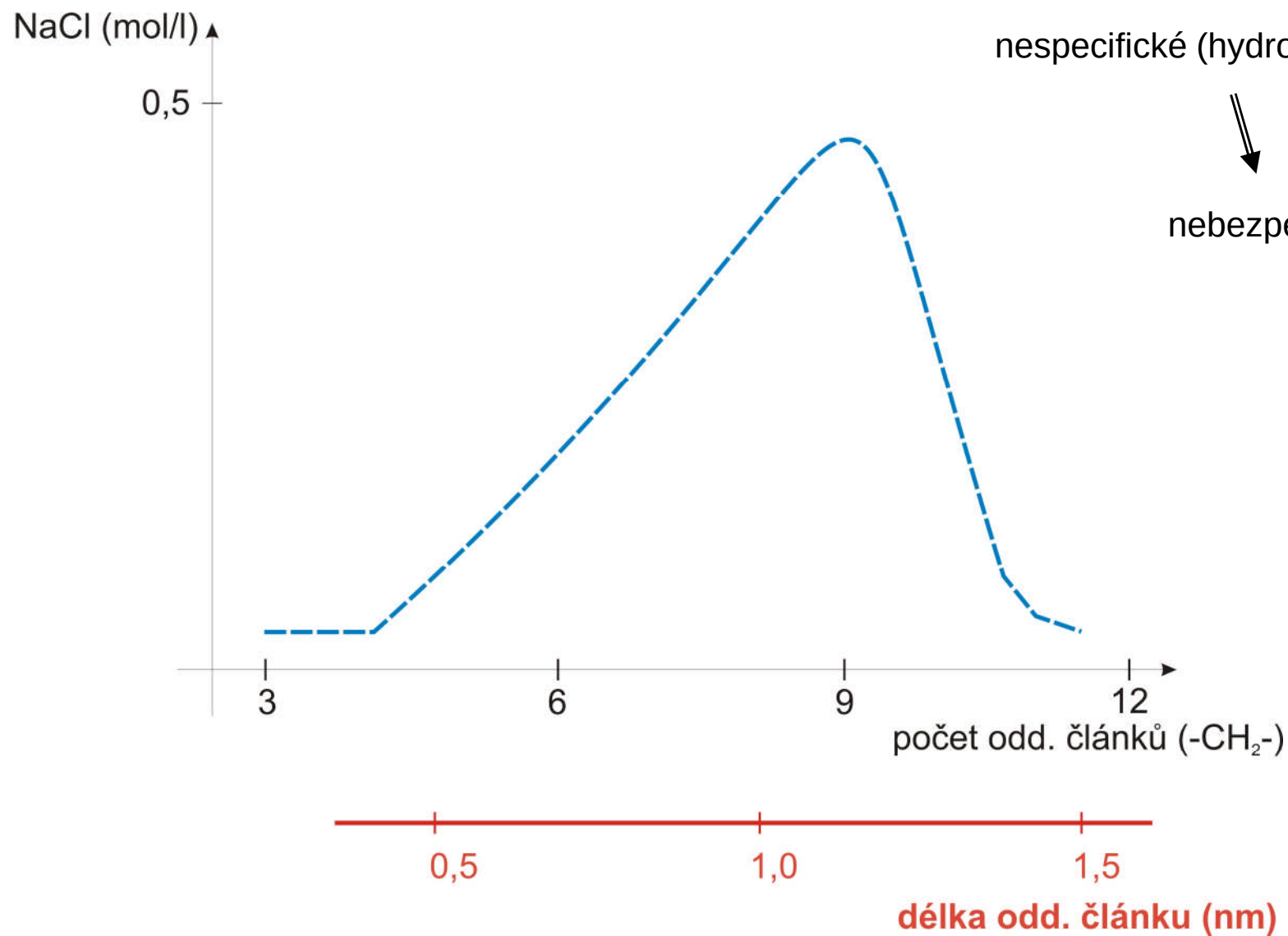
Gly-Gly-Gly

Gly-Gly-Tyr

Gly-Gly-Cys

4 a méně sterické zábrany

8 a více zvlňení „zapletení“ ramínek s ligandy



Ligand

Substrát

analog substrátu
allosterický efektor
kofaktor
inhibitor
analog inhibitoru

Nukleová kyselina

nukleotid
t-RNA

Protilátka

antigen

Protein

inhibitory proteas
enzymy

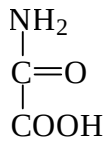
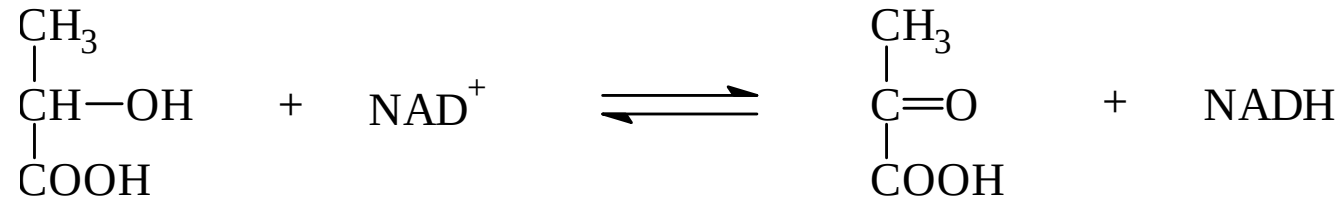
Hydrofobní ligandy

Chromofory

Ligand	Bílkovina	K_D (M)
antigen	polyklonální protilátka	$10^{-8} - 10^{-6}$
antigen	monoklonální protilátka	$10^{-12} - 10^{-8}$
biotin	avidin	10^{-15}
sacharid	lektin	$10^{-6} - 10^{-3}$
hormon, toxin	vazebný protein	$10^{-9} - 10^{-12}$
substrát	enzym	$10^{-7} - 10^{-3}$
inhibitor	enzym	$10^{-14} - 10^{-6}$

$$K_D = 10^{-8} - 10^{-6} \text{ M}$$

1. příklad



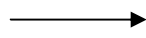
oxamát – akompetitivní inhibitor

až po nasycení NAD^+

AC pomocí ternárních komplexů

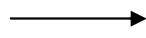
studium mechanismu reakce
(uspořádaný x náhodný)

AMP, NAD^+ , NADH



stabilita ligandů

laktát, pyruvát



imobilizace malých molekul

2. příklad

využití AC při separaci proteas

1. navázání bílkoviny

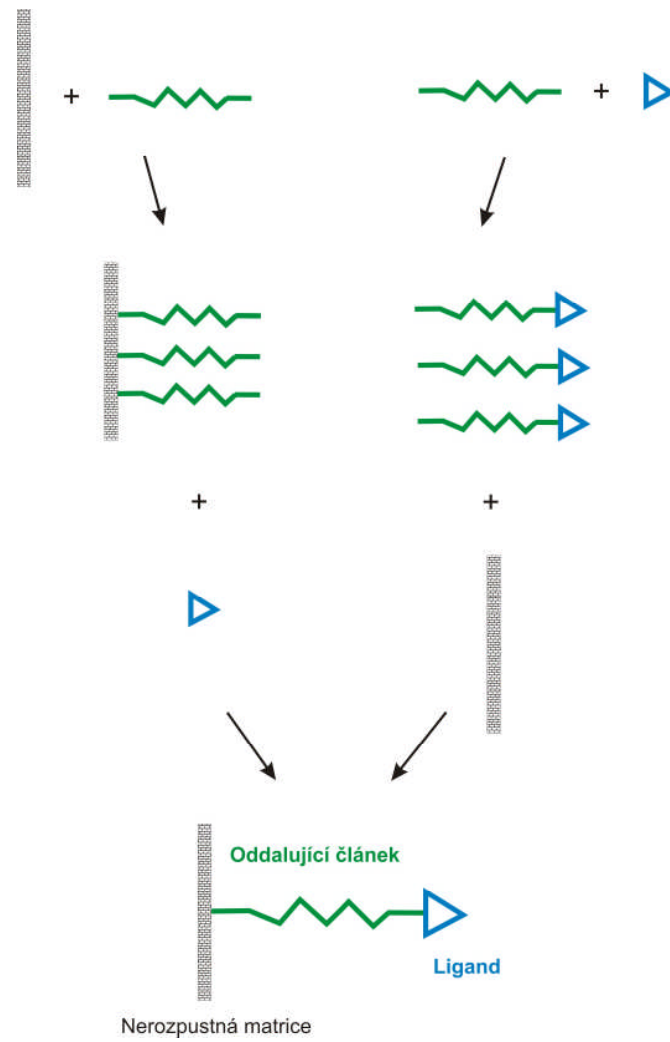
hemoglobin – sepharose
albumin - sepharose

2. využití přirozených inhibitorů

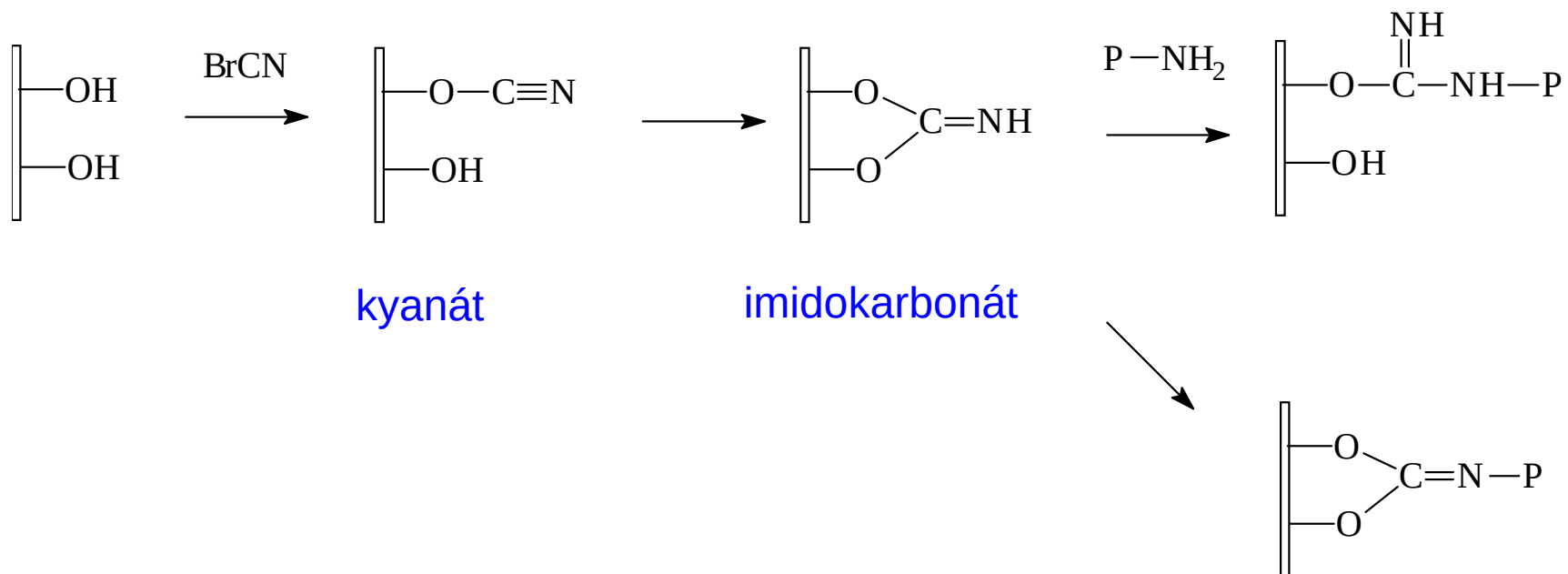
ovomukoid x trypsin
STI x karboxypeptidasy
trypsin
chymotrypsin

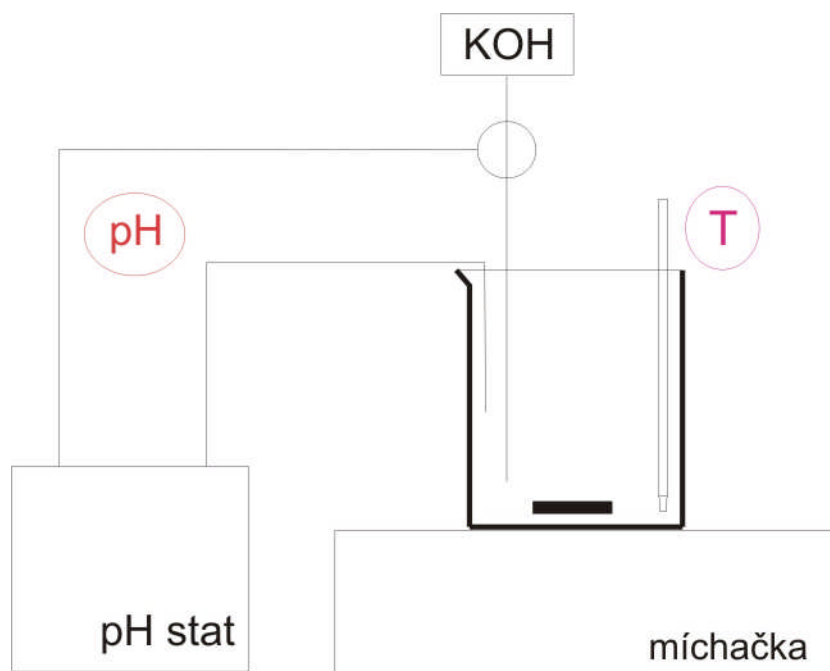
3. cílený výběr proteinů nebo peptidů s aminokyselinovou sekvencí odpovídající specifitě dané proteasy

Chemie afinitní chromatografie



Bromkyanová metoda





aktivace: 20 ml agarosy
20 ml dest. vody
2-5 g BrCN

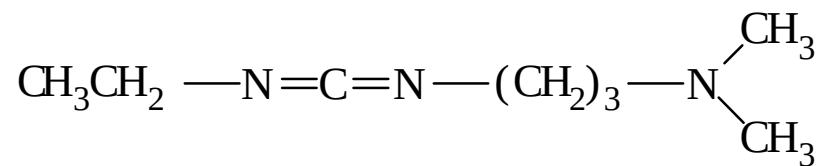
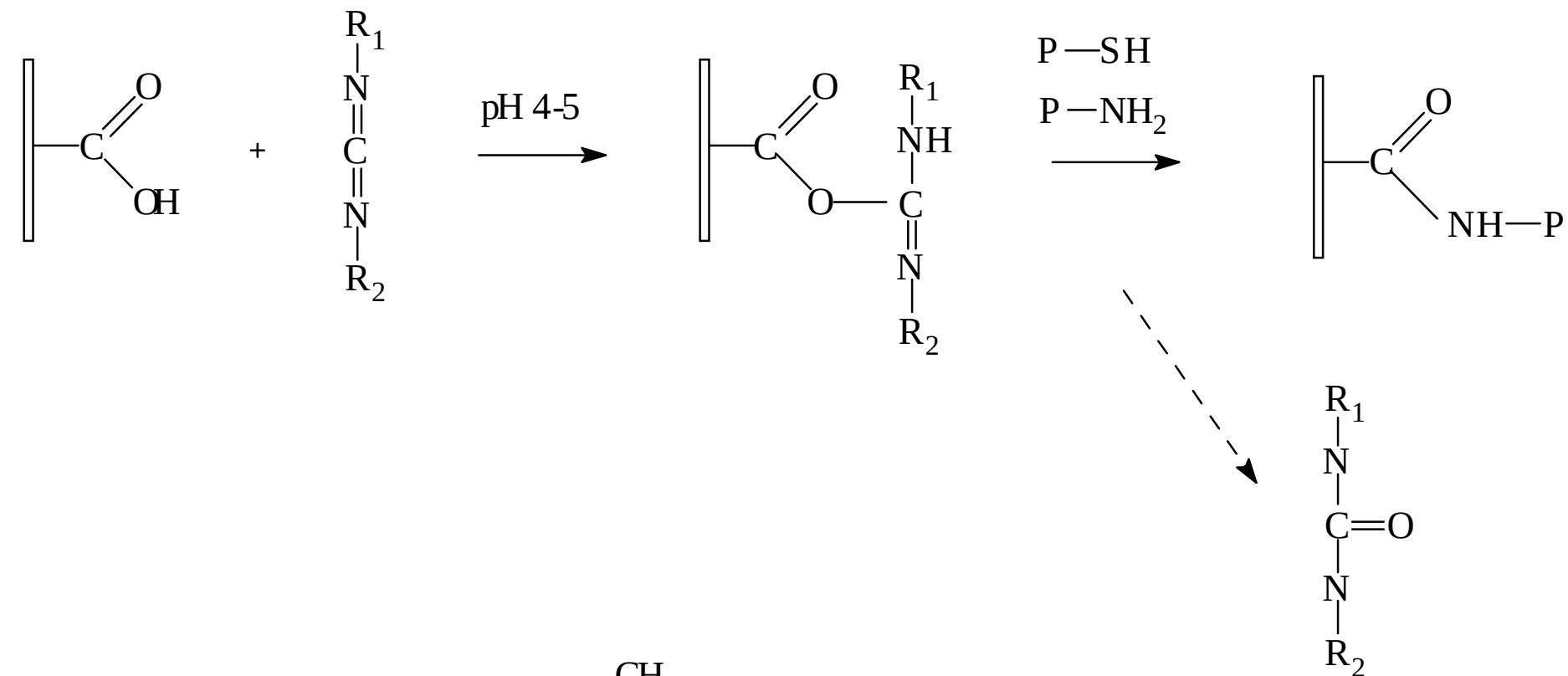
pH 11 (autotitrátor)
T 20 °C
doba aktivace 8 – 12 min

další postup:



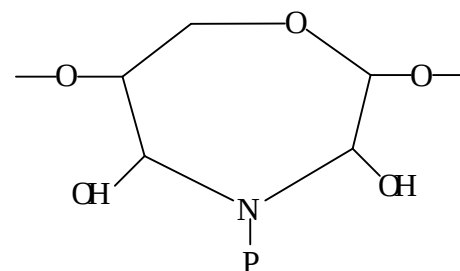
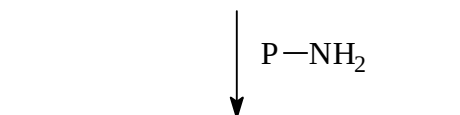
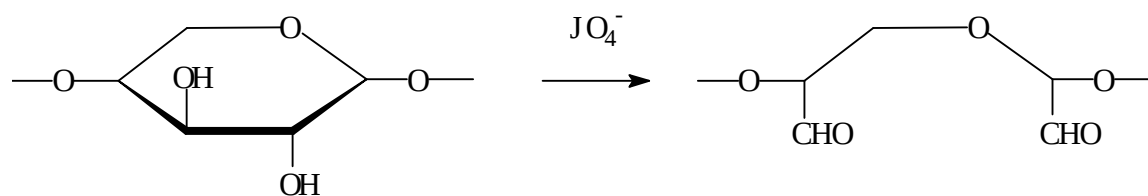
aktivovaný gel se promyje (1 -5 l 0,1 mol/l NaHCO_3)
ekvilibrace na pH následné reakce (0,1 mol/l NaHCO_3)
přidá se ligand
míchání 16 – 20 hod
promytí sorbentu velkým objemem vody a 2 mol/l NaCl

karbodiimidová metoda

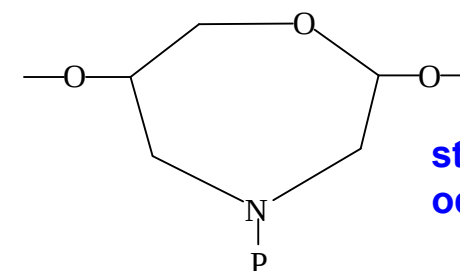


1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl) karbodiimid

aldehydová metoda



„schiffova base“

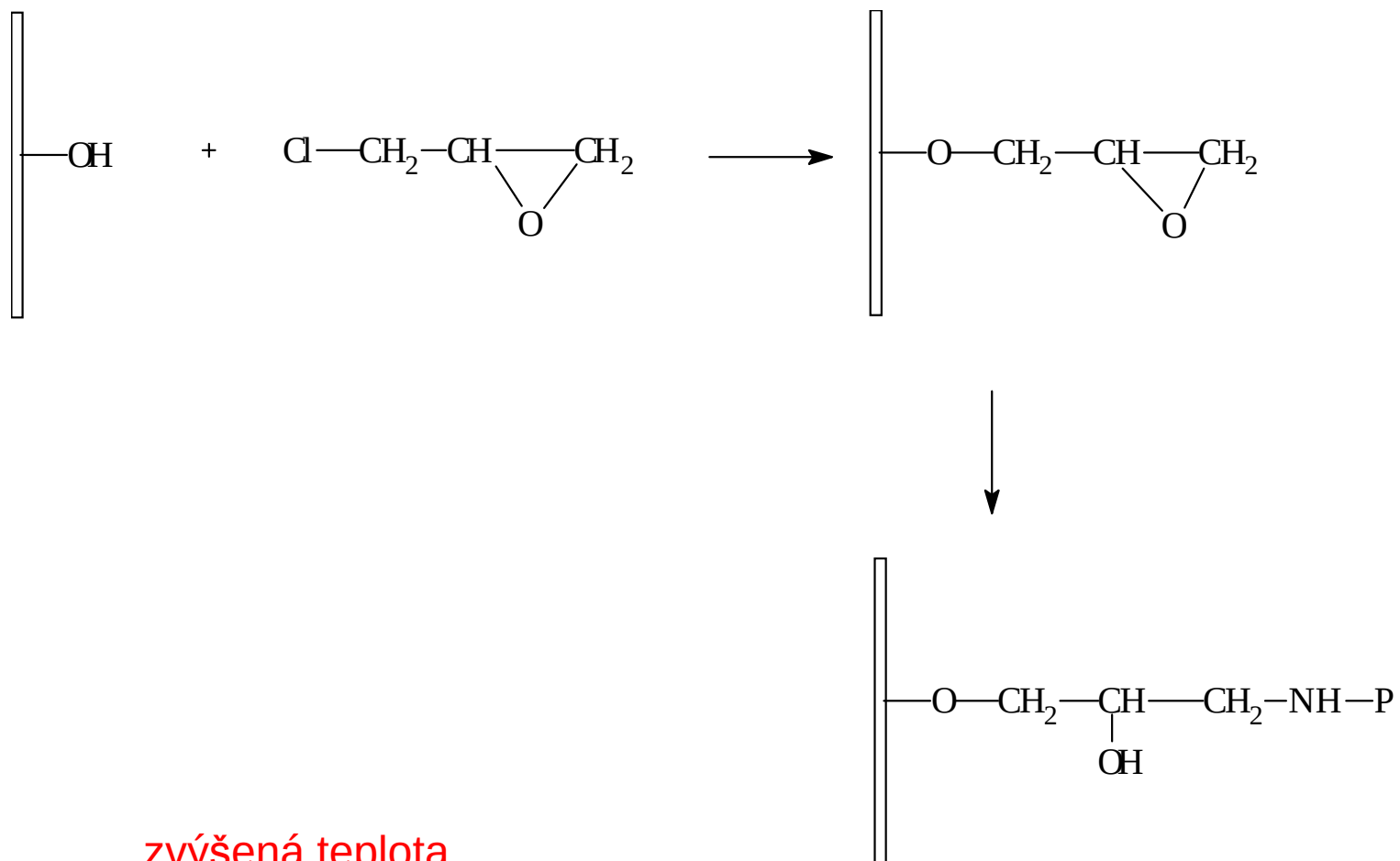


stálejší alkylamid
odstranění možnosti další vazby

podmínky: 0,1 mol/l jodistan, aktivace 24 hod

použití: aktivace nosičů na bázi sacharidů
nebo aktivace glykoproteinů

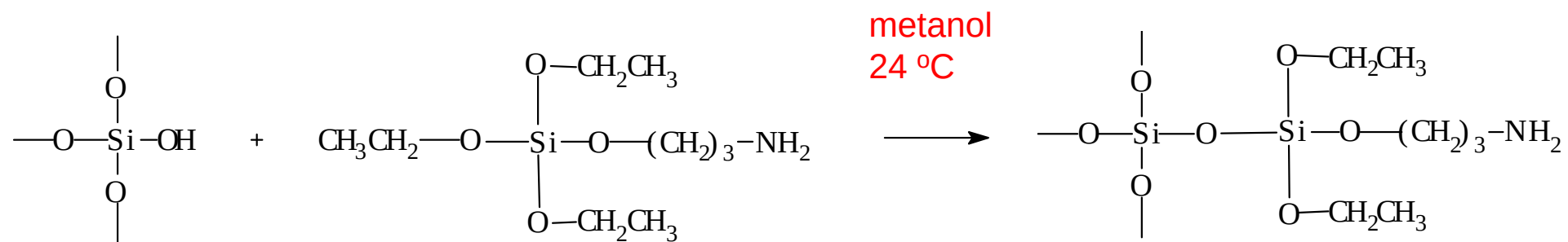
epoxidová metoda



podmínky:

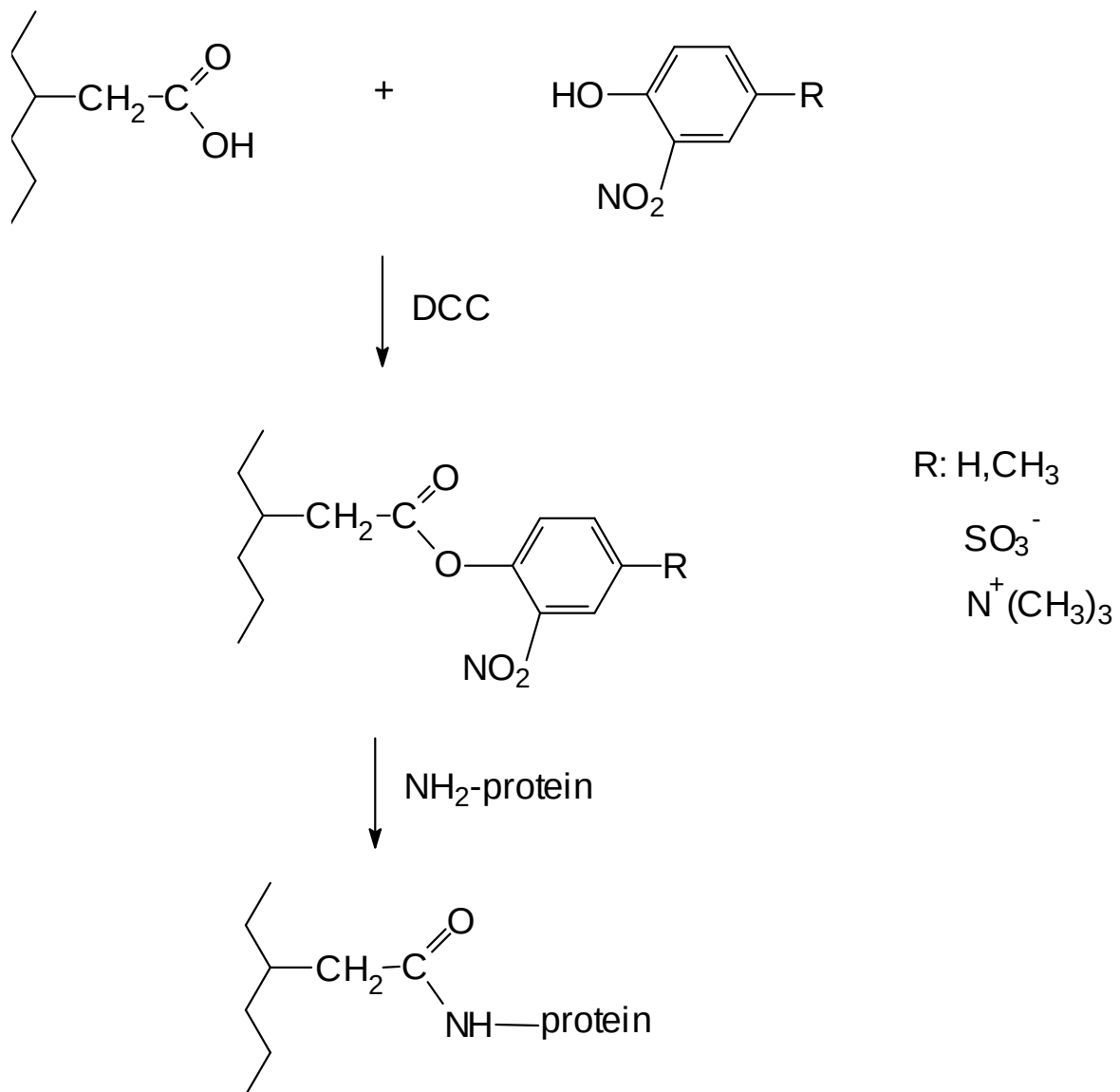
zvýšená teplota
silně alkalické prostředí

silanizace

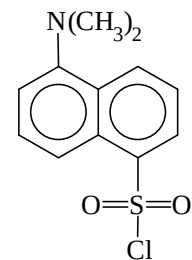
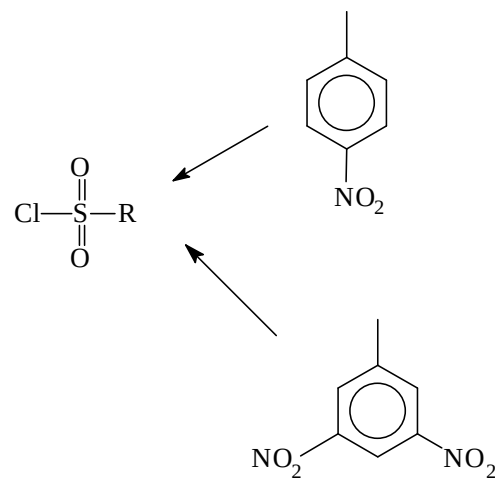


γ -aminopropyl triethoxysilan

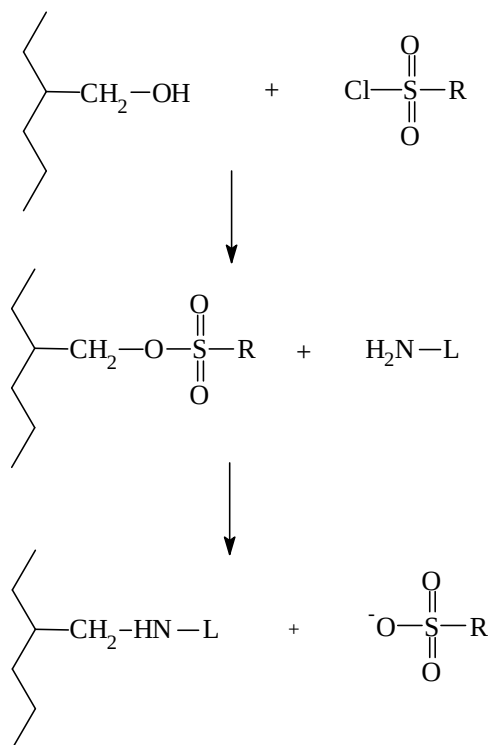
„Orientovaná imobilizace“



„Barevné nosiče“

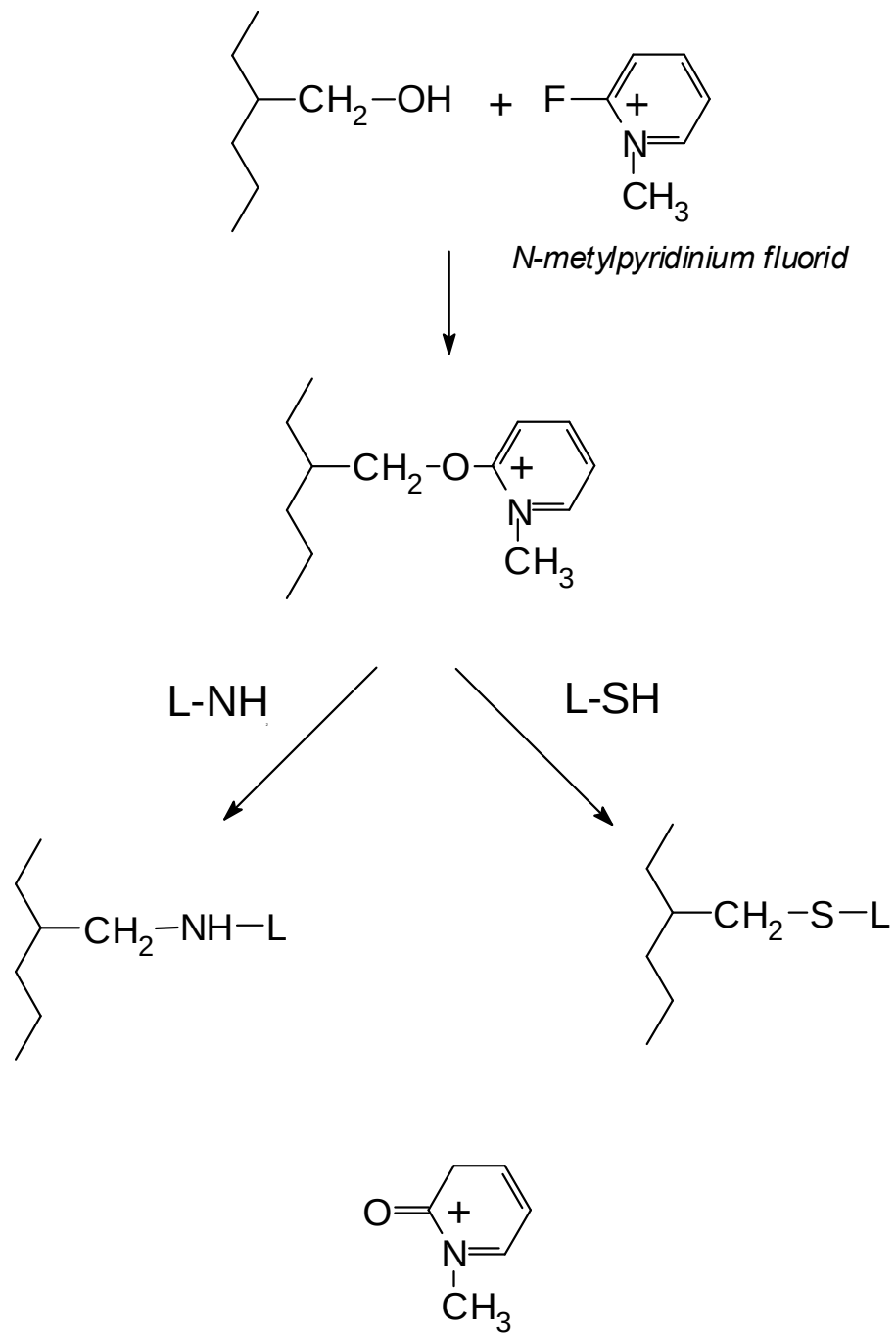


dansyl chlorid



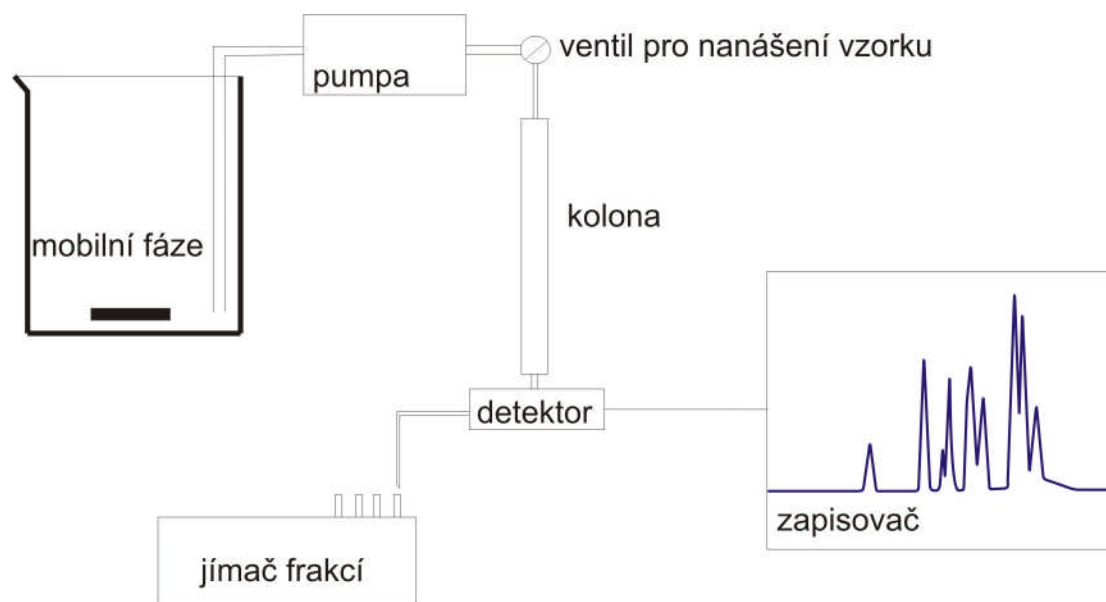
- je vidět účinek imobilizace

„Urychlení imobilizace vazbou proteinu na ionex“



Průběh chromatografické separace

1. příprava sorbentu (viz. výše)
2. naplnění sorbentu do kolony
3. příprava vzorku a ekvibrace kolony
4. eluce a jímání separovaných proteinů

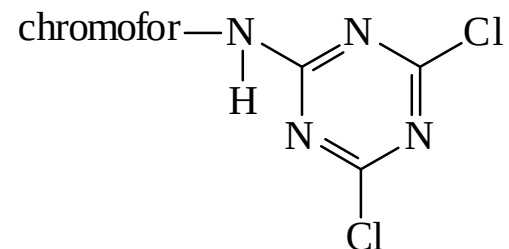




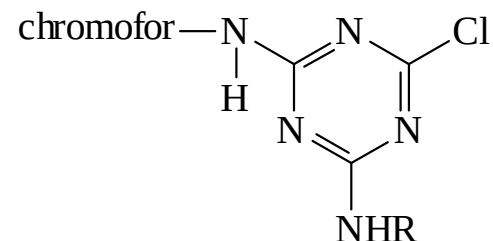
Imobilizovaná reaktivní barviva

z chemického hlediska čtyři druhy:

1. dichlortriaziny (studená barviva)

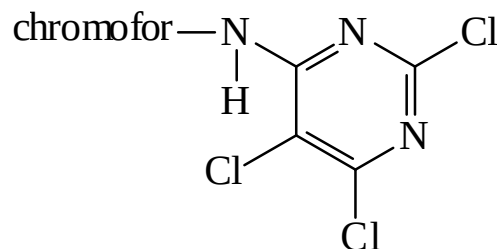


2. monochlortriaziny (horká barviva)



3. sulfoetery chromofor—SO₂CH₂CH₂OSO₃H

4. trichlorpyrimidiny

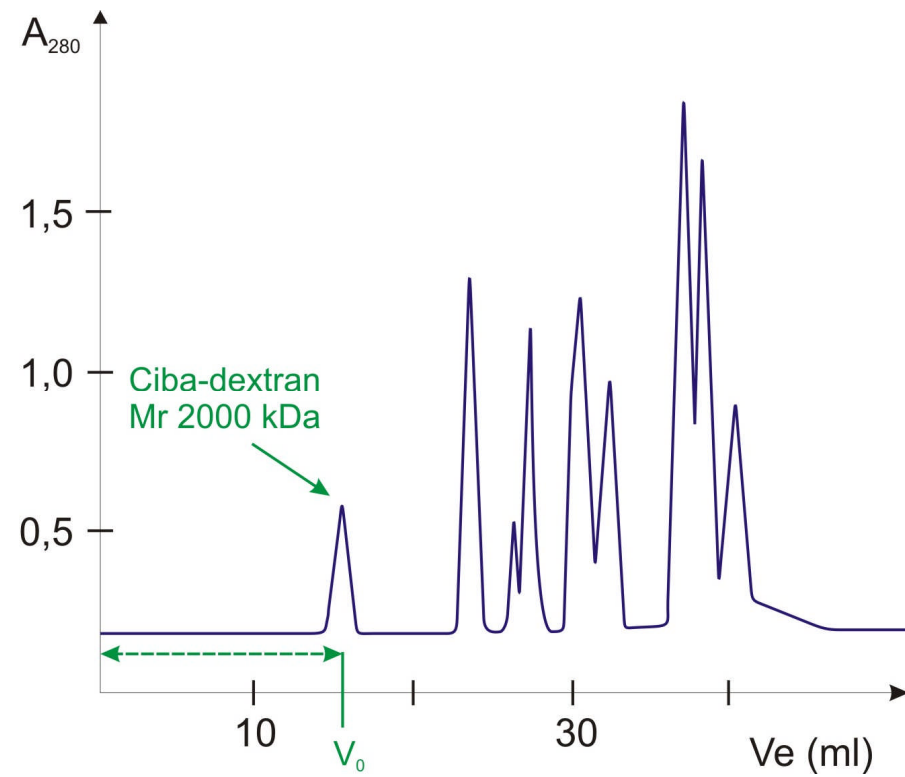


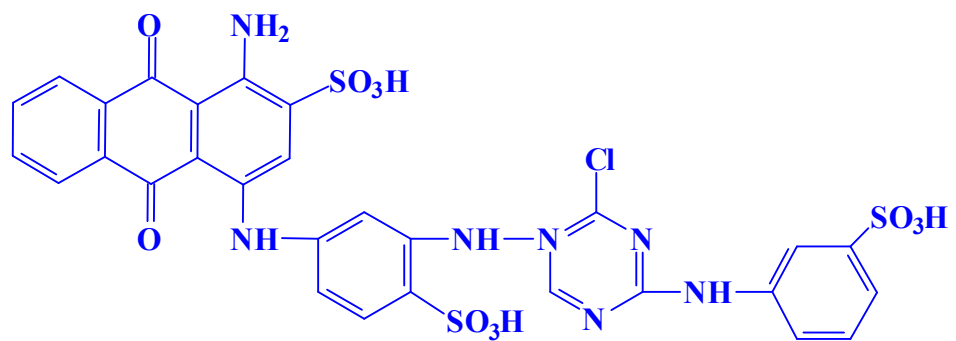
historie:

50-léta barvivo

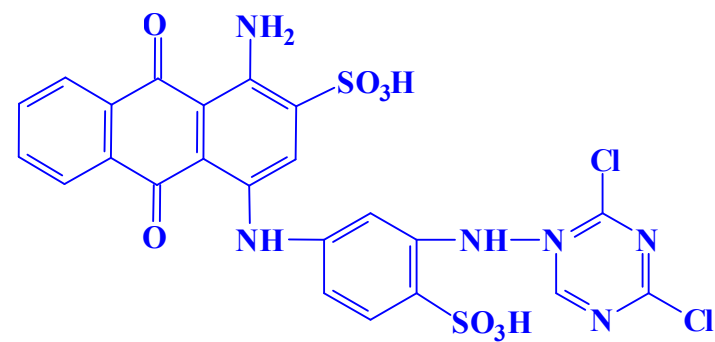
68. značka pro GPC

71. první imobilizované barvivo

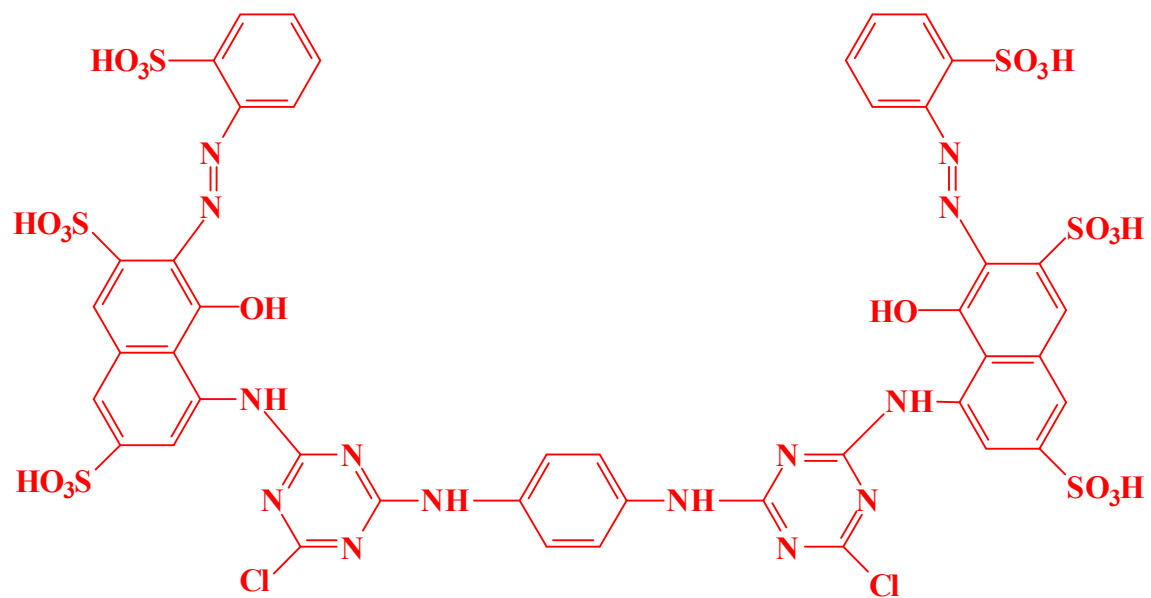




Cibacronová modř

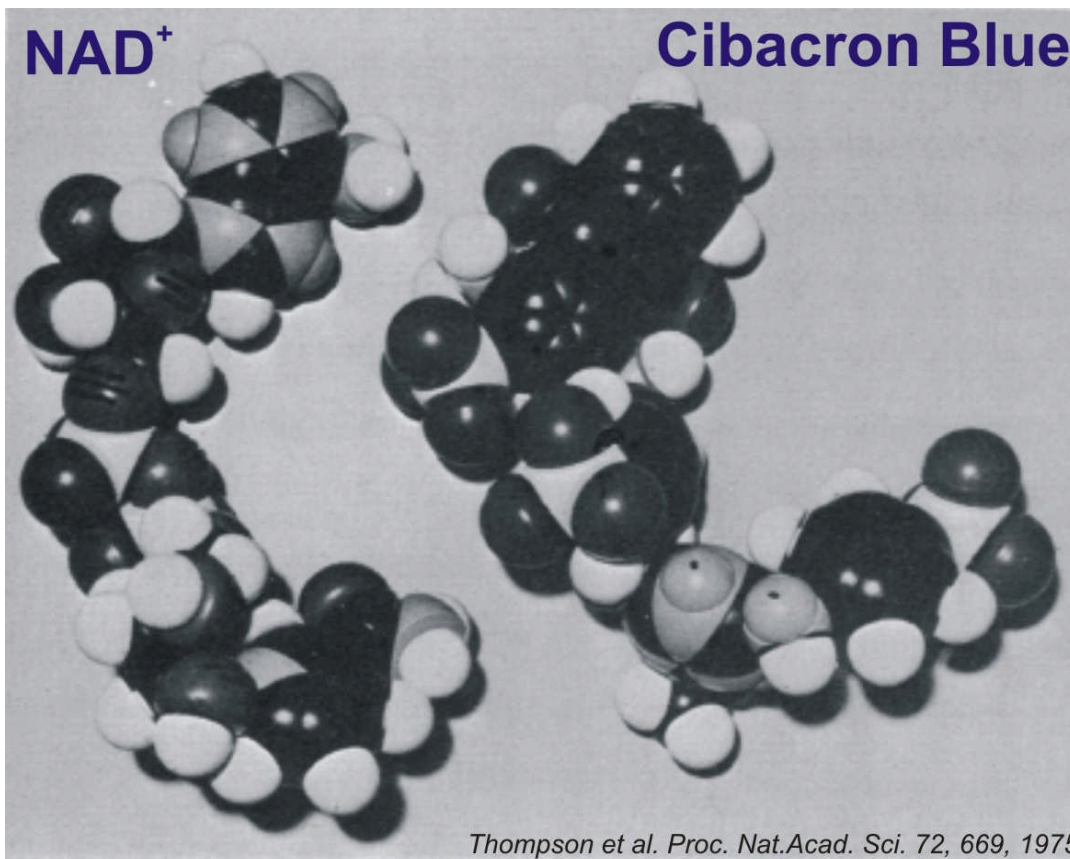


Procionová modř

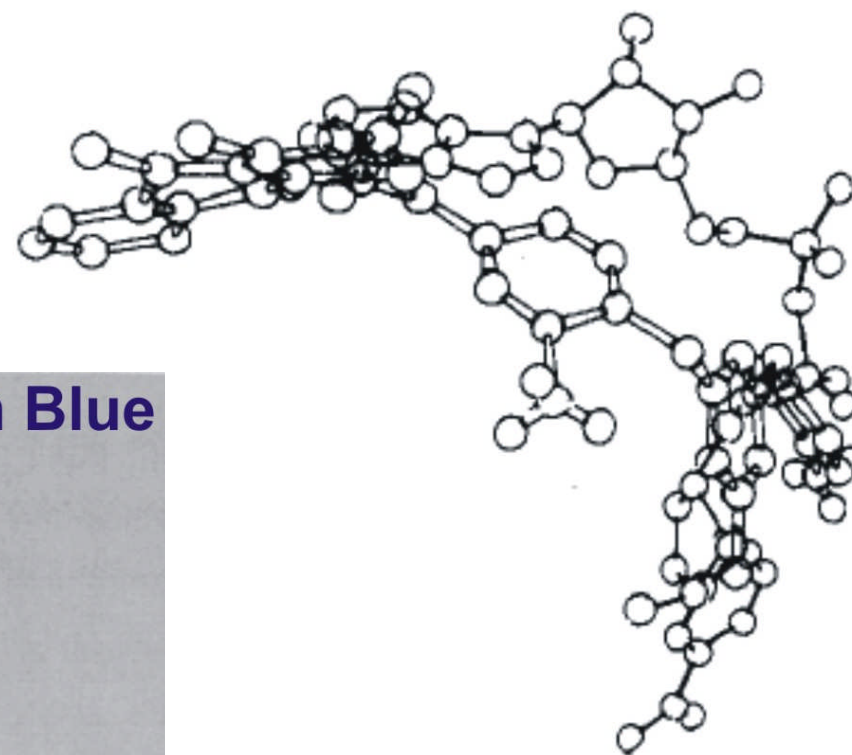


Procionová červená

NAD⁺

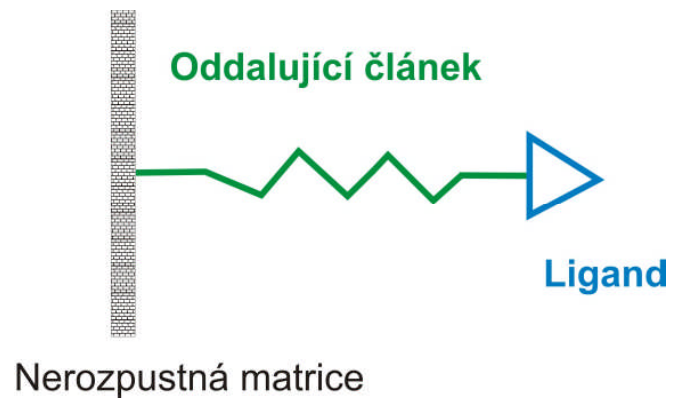
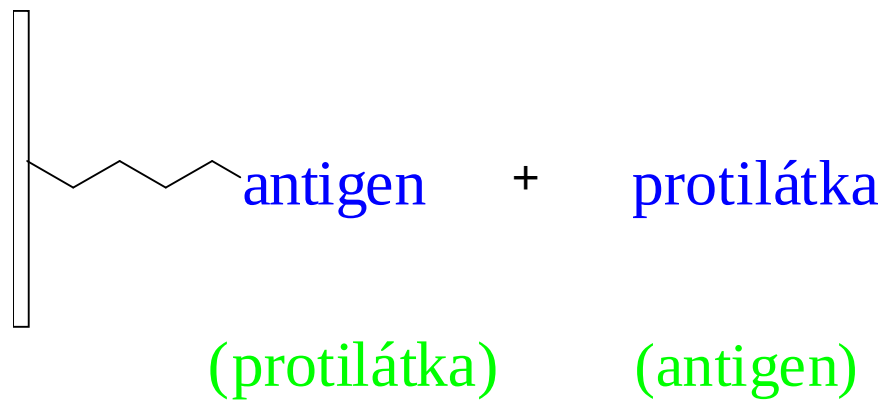


Cibacron Blue



Thompson et al. Proc. Nat.Acad. Sci. 72, 669, 1975

Imunoafinitní chromatografie



problémy:

1. při navázání příliš velkého množství ligandu (protilátky popř. antigenu) mohou vznikat problémy při eluci (nemůže dojít ke konformačním změnám)
2. pozměnění vazebného místa pro antigen (protilátku) při imobilizaci na matrici

Ize řešit vhodnou imobilizační technikou
nebo imobilizací komplexu antigen-protilátka

3. disociace adsorbované látky může být velmi obtížná



eluce často za „drastických“ podmínek

eluce

1. specifická desorpce (nadbytkem haptenu)

2. nespecifická desorpce

typické eluční fáze:

a) změna pH

glycin/HCl pH 2,5

b) snížení hydrofobních interakcí

fosfát/citrát pH 2,8

1 M kys. propionová

50% etylénglykol

c) denaturační činidla

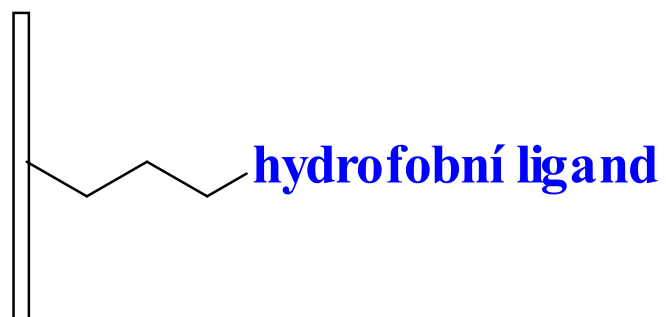
8 M močovina

4,5 M MgCl_2 pH 7,0

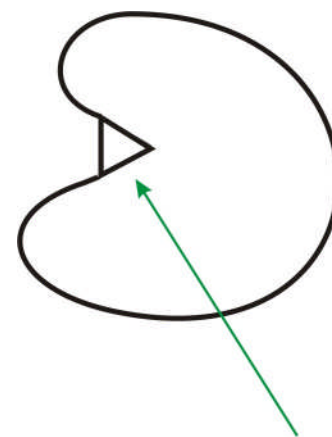
d) chaotropní ionty

SCN^- , I^-

hydrofobní afinitní chromatografie



+



imunoglobuliny
ovalbumin
BSA
 β -laktoglobulin

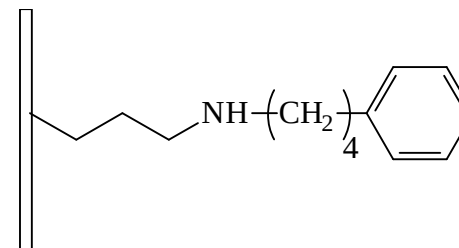
hydrofobní "kapsa"



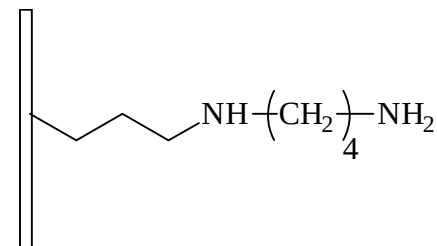
Nerozpustná matrice

hydrofobní x iontové interakce

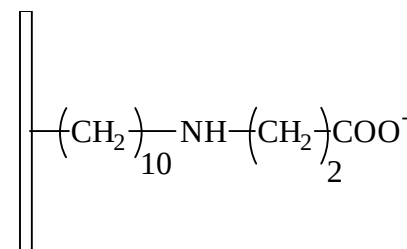
1. nosič: imobilizovaný 4-fenylbutylamin (PBA)
izolovaný protein: α -chymotrypsin
eluce: 50% etylénglykol



2. nosič: imobilizovaný 4-aminobutan
izolovaný protein: glykogenfosforylasa b
eluce: deformující tlumivé roztoky

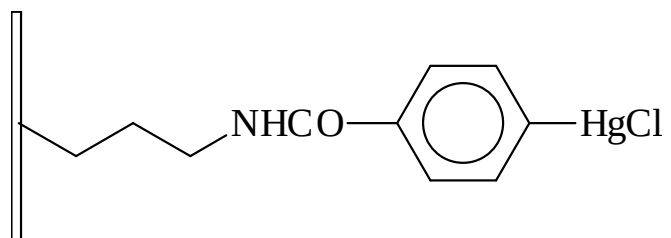


3. nosič: imobilizovaný N-(3-karboxypropionyl) aminodecyl
izolovaný protein: BSA
eluce: 0,5 M NaCl
1,5% SDS
10 % butanol



Kovalentní afinitní chromatografie

1. příklad: imobilizovaný p-chlormerkuribenzoát



+

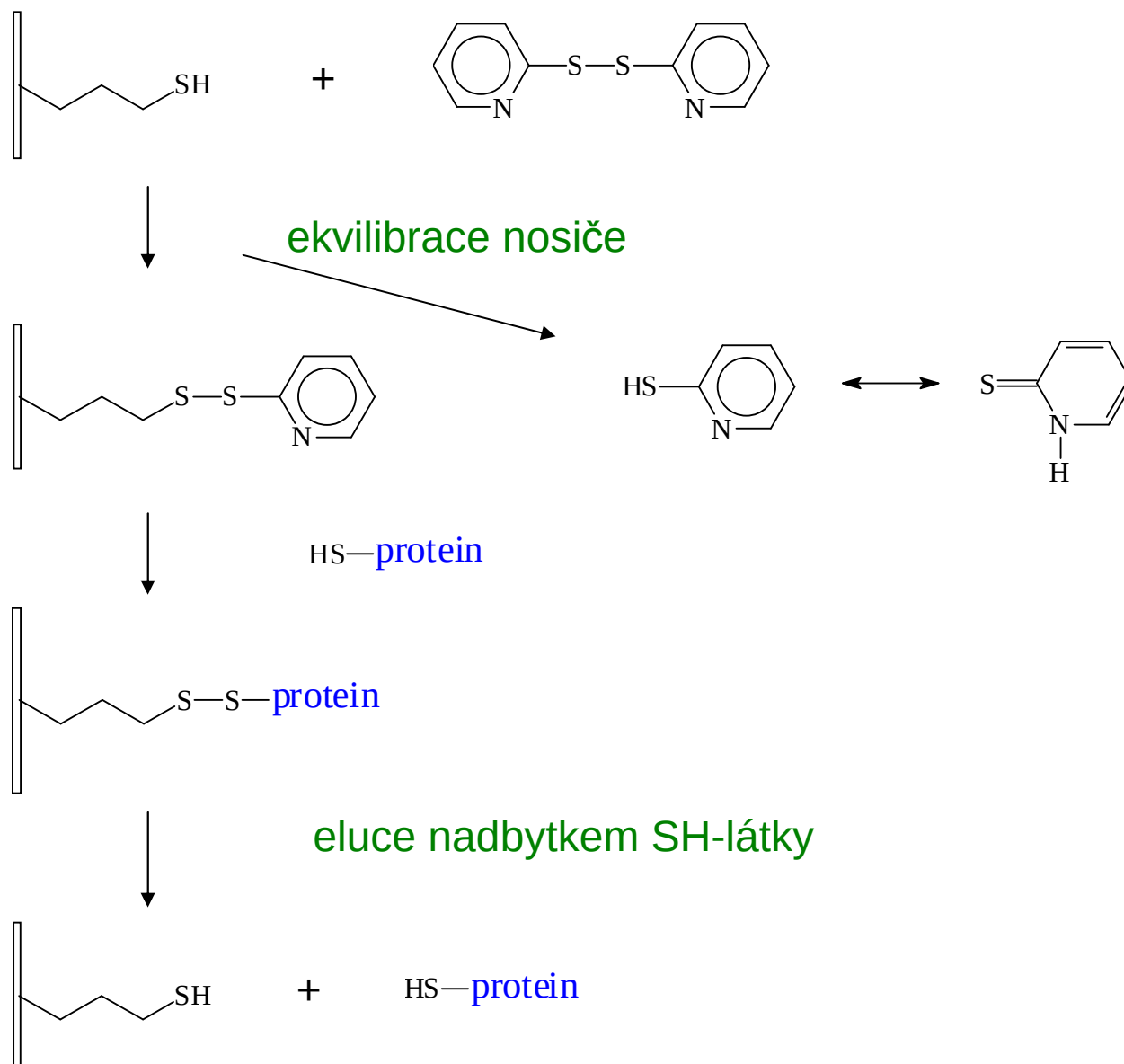
HS—protein



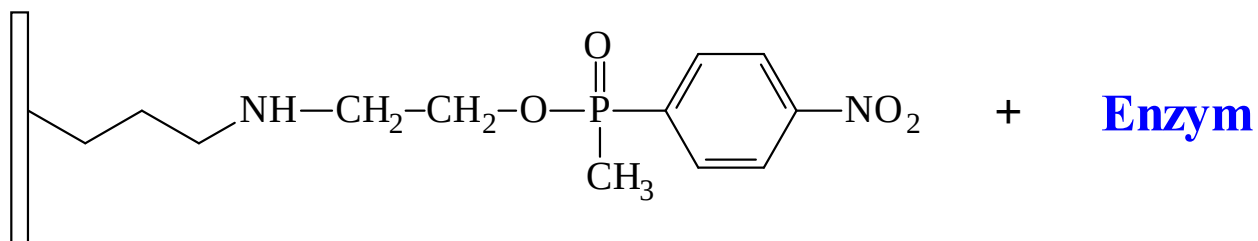
..... Hg—S—

eluze nadbytkem cysteinu nebo HgCl_2

2. příklad: aktivace dipyridyldisulfidem

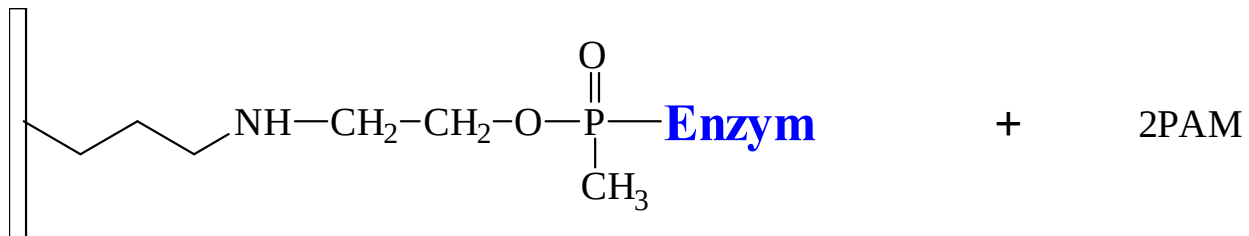


ligand: 2-amino- p-nitrofenylmethylfosfonát



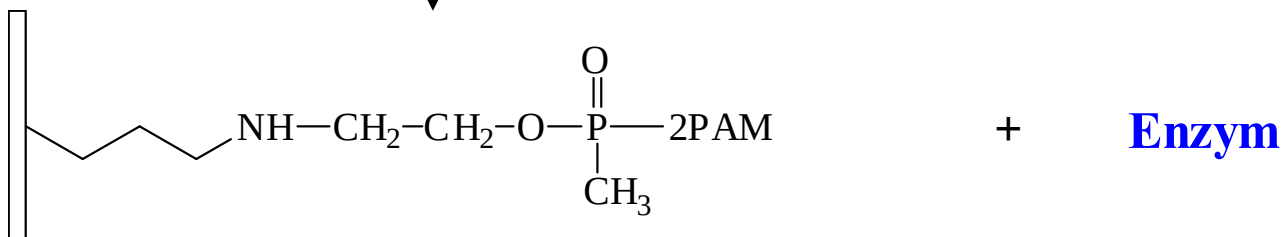
enzym: acetylcholinesterasa

nanášení vzorku



eluze (min. 16 hod)

eluční činidlo: 2-(hydroxyiminomethyl)-1-methylpyridinium jodid



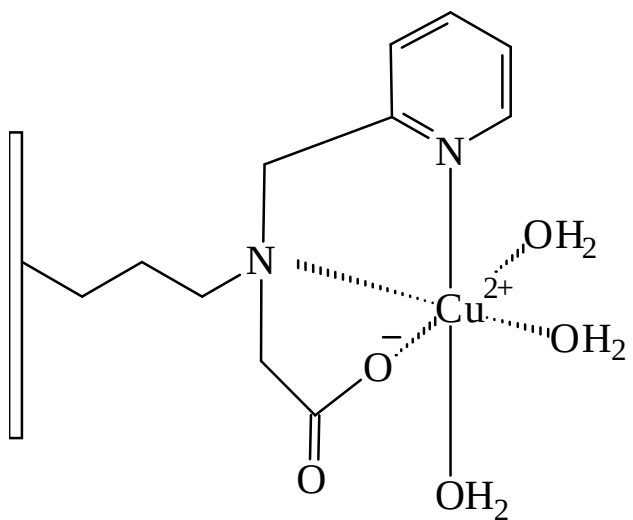
Chelatační afinitní chromatografie



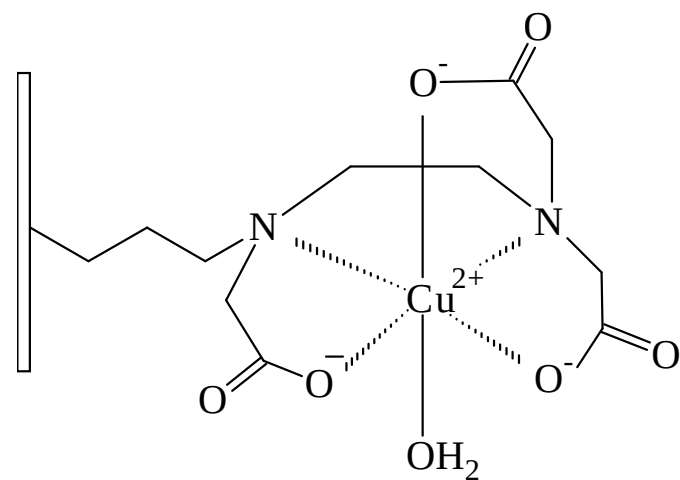
Chelatační sorbent $\rightleftharpoons$ kovový ion $\leftleftharpoons$ separovaná látka

N-(2-pyridylmethyl) glycin
Tris (karboxymethyl) ethylendiamin
Karboxymethyl aspartát
Iminodiacetát

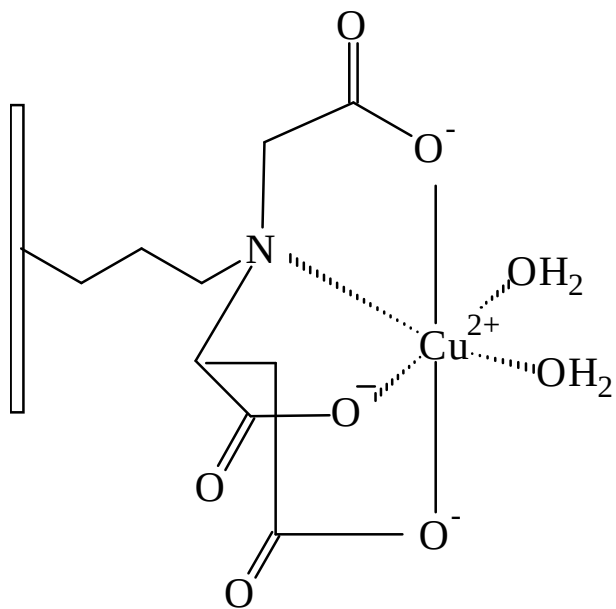
aminokyseliny, peptidy a proteiny
s His, COO⁻ zbytkem



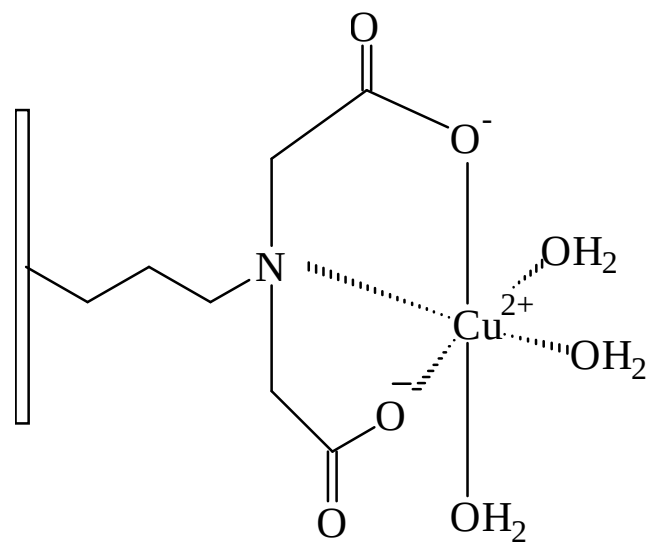
N-(2-pyridylmethyl) glycine



Tris(karboxymethyl) ethylendiamin

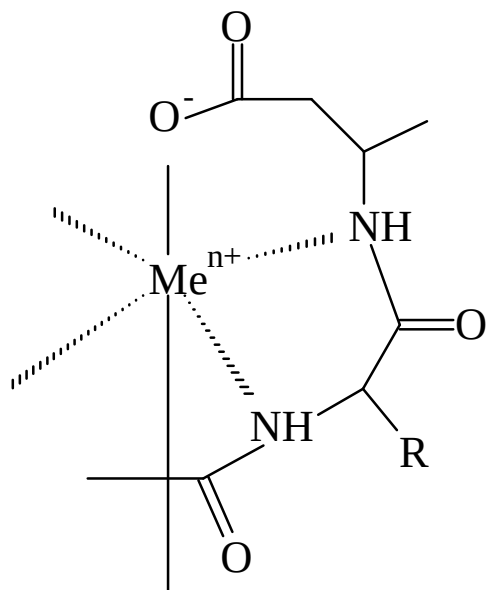


Karboxymethyl aspartát

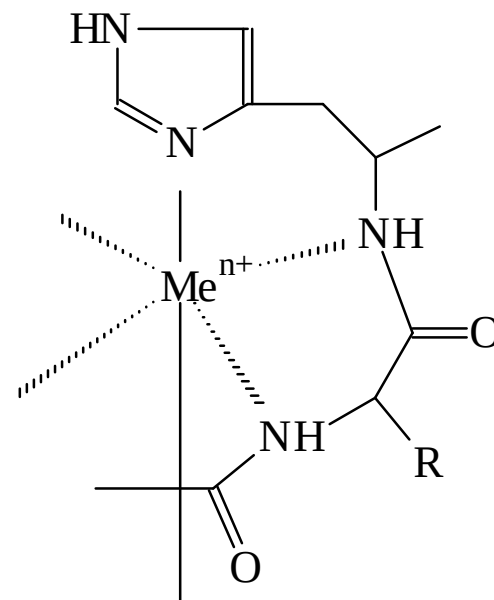


Iminodiacetát

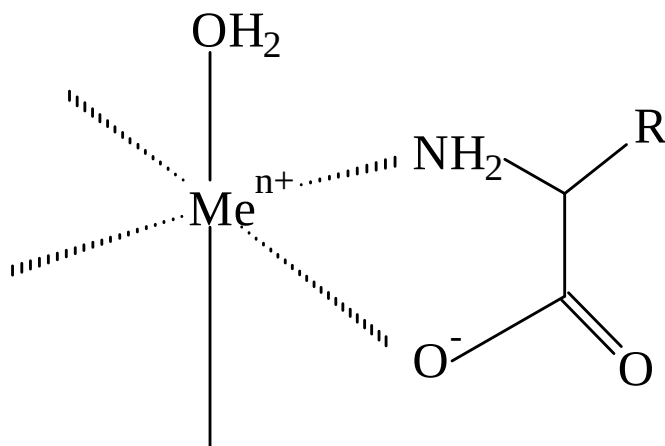
Komplexy s chelatačně vázaným kovovým iontem



komplex peptidu s His zbytkem



komplex peptidu s COO^- zbytkem



komplex aminokyseliny

provedení

1. imobilizace kovového iontu

2. navázání separované látky

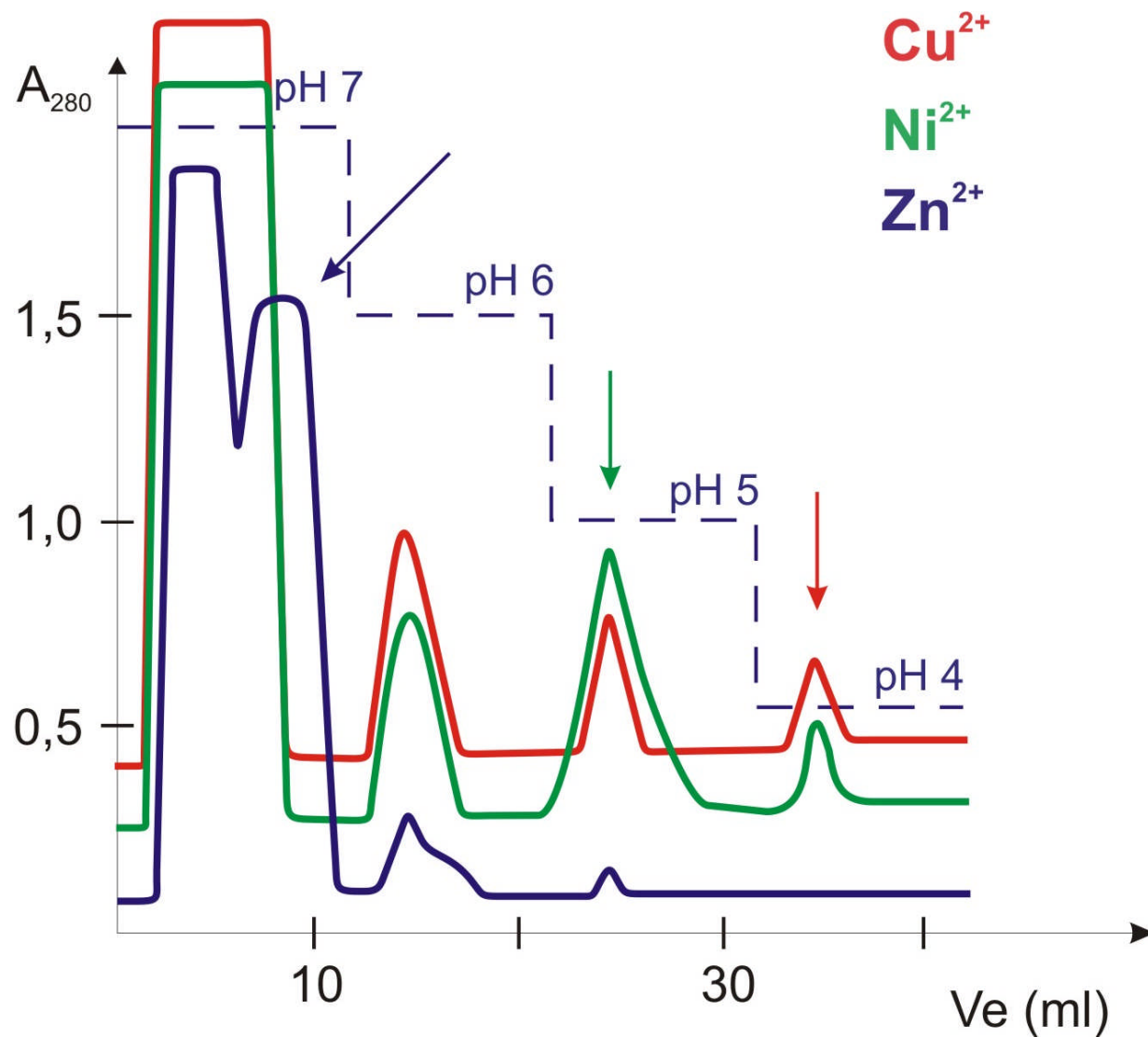
ekvilibrace pufrům se zvýšenou iontovou silou

3. eluce

a) snížení pH

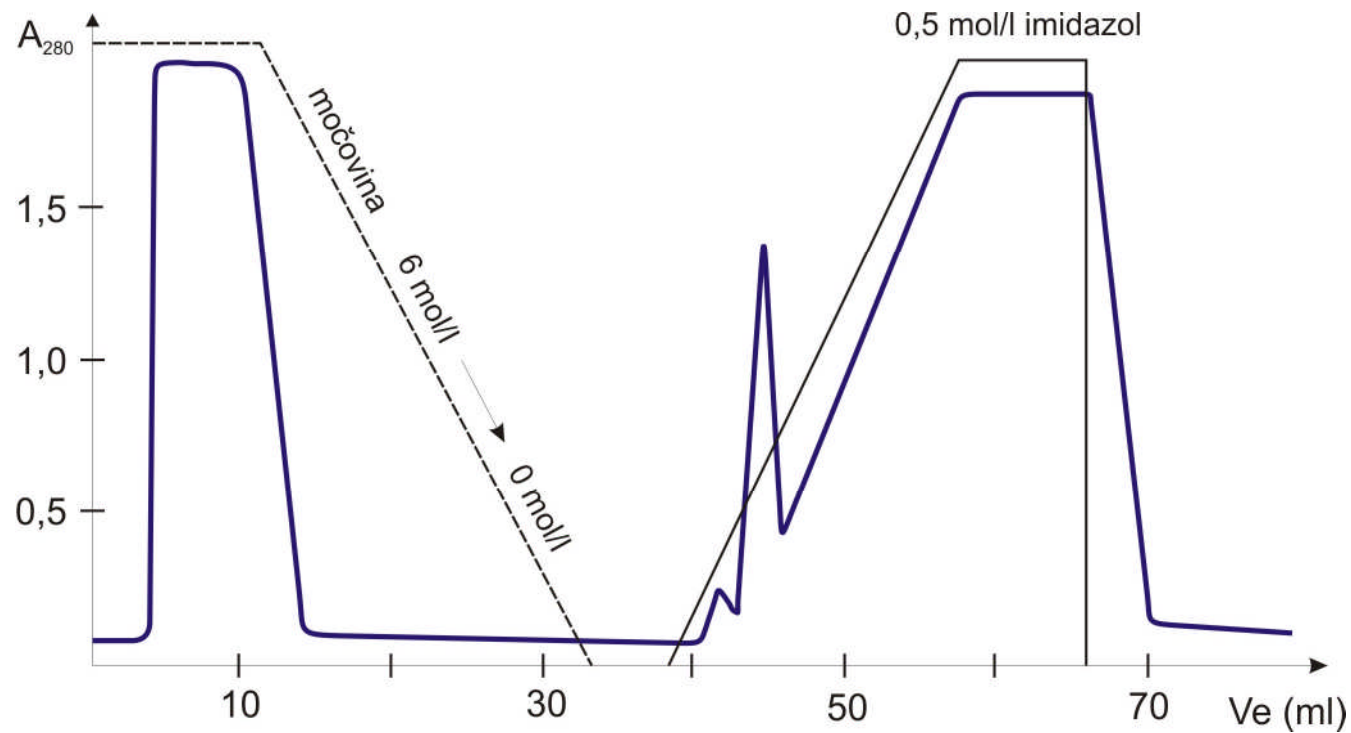
b) kompetitivní ligand (histidin, imidazol)

c) kovový iont



sorbent: iminodiacetát-Sepharosa nasycená příslušným kovovým iontem
 pufrý: 0.2 mol/l NaAc + 0.5 mol/l NaCl pH 7.0, 6.0, 5.0, 4.0
 vzorek: hrachový homogenát
 sledovaný protein: diaminoxidasa (šipka)

- ❖ purifikace rekombinantních proteinů pomocí His tagu
- ❖ refolding



ekvilibrace kolony: 20 mM TRIS, 0,5 M NaCl, 5mM imidazol, 6 M urea, pH 8,0
 promývání: 20 mM TRIS, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, 6 M urea, pH 8,0
 refolding: lin. gradient močoviny z 6 M na 0 M při průtoku 0,1 až 1 ml/min
 purifikace: 20 mM TRIS, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0
 lineární gradient imidazolu do 0,5 M

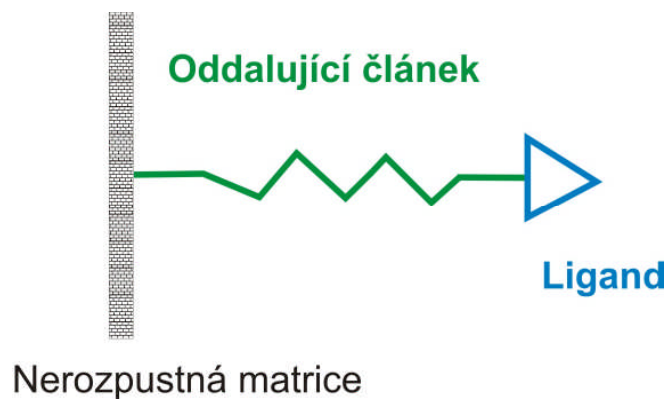
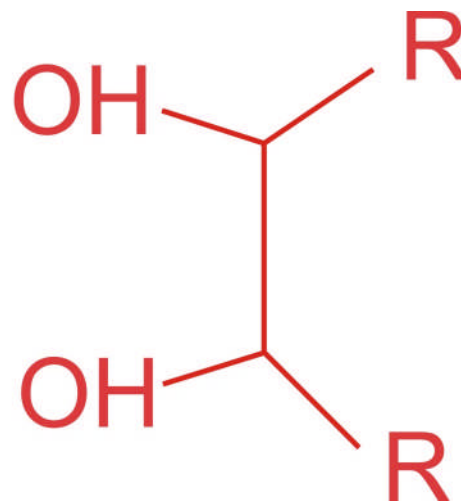
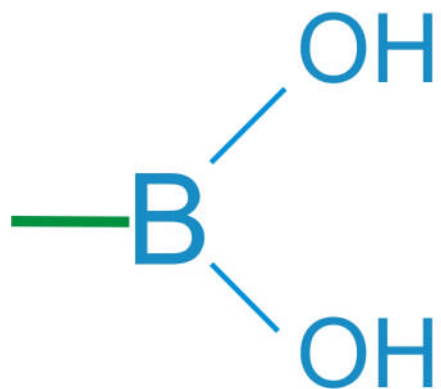
výhody

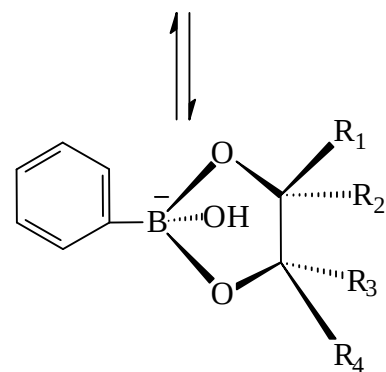
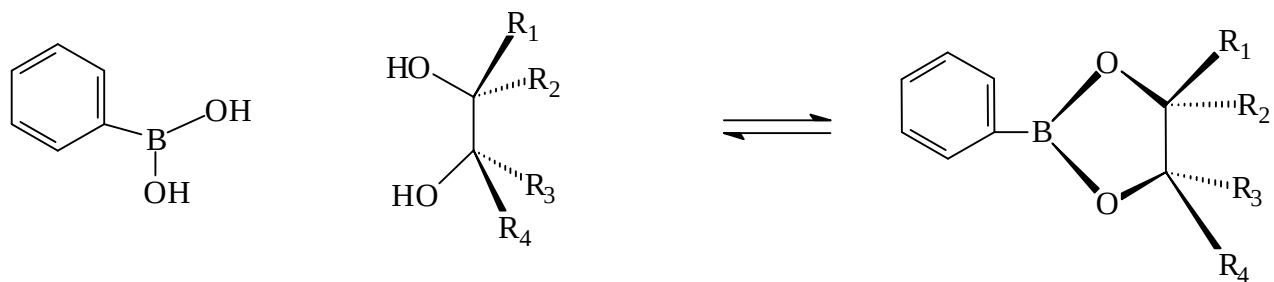
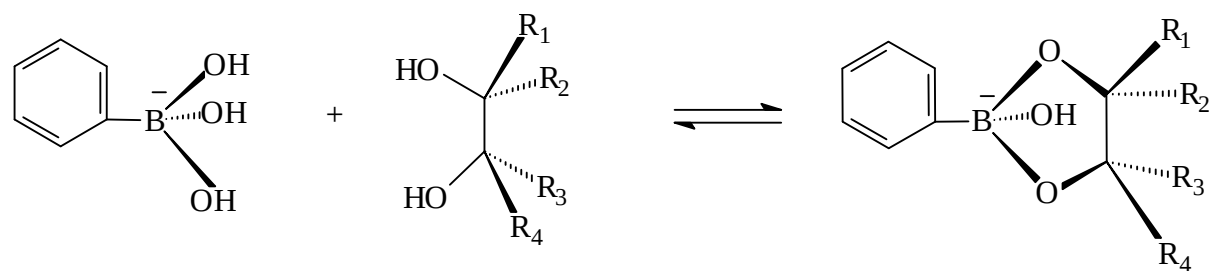
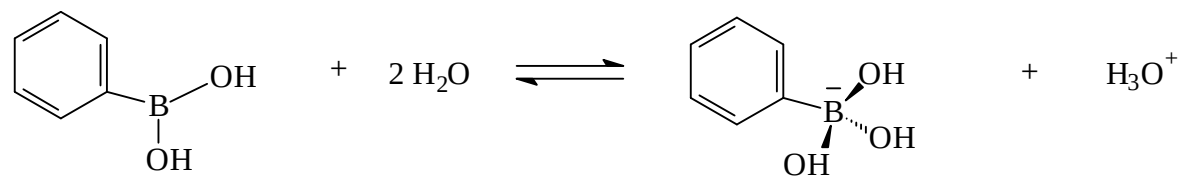
- využití nosiče pro imobilizaci různých kovových iontů
- vysoká odolnost nosiče vůči bakteriální kontaminaci
- vysoká vacebná kapacitapro bílkoviny (0,1 – 10 μ M/ml gelu)
- možnost HP-IMAC a tandemové chromatografie

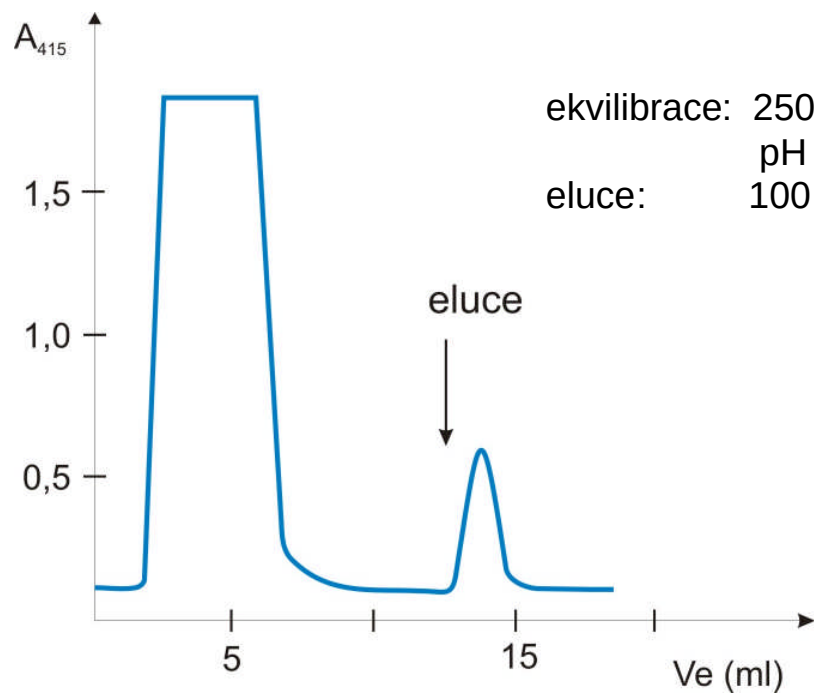
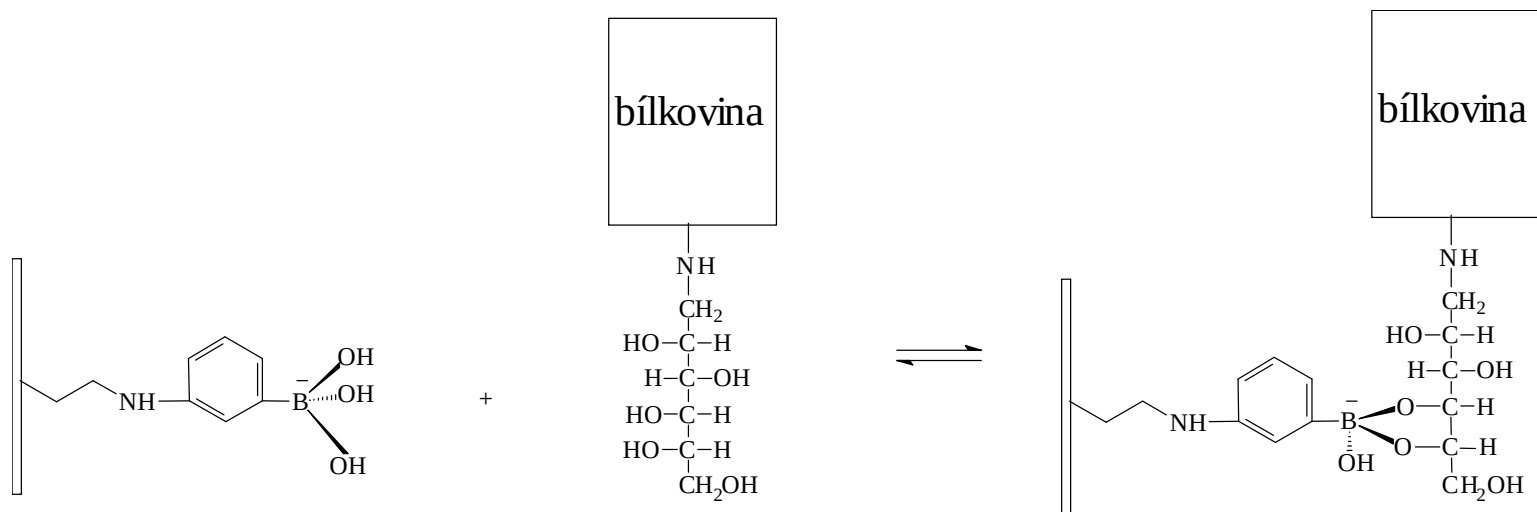
nevýhody

- možnost nespecifických (iontových) interakcí
- možnost uvolňování kovových iontů ze sorbentu

Boronátová afinitní chromatografie





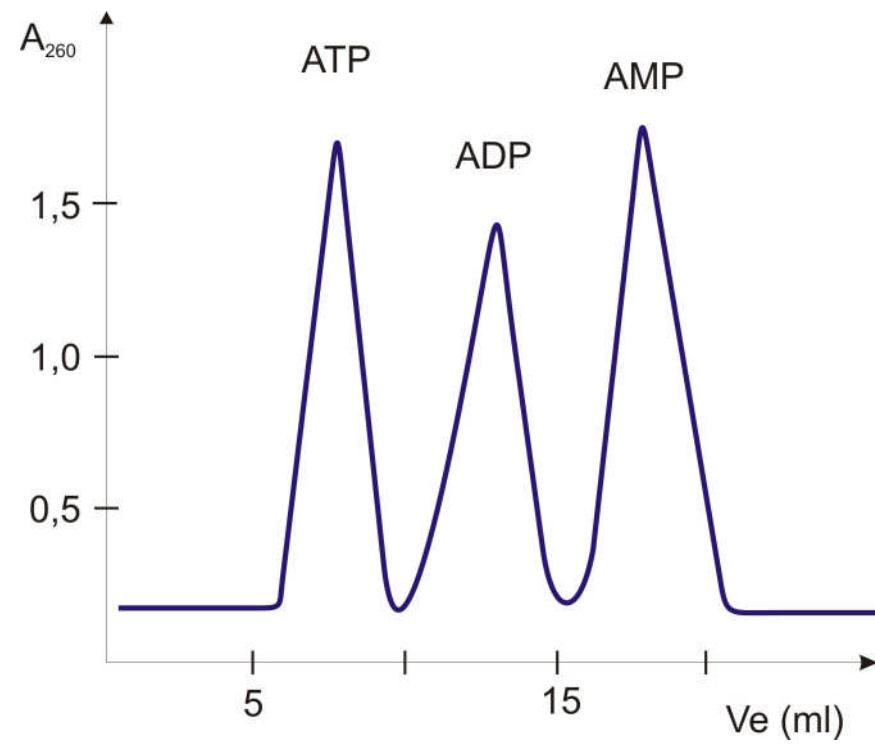


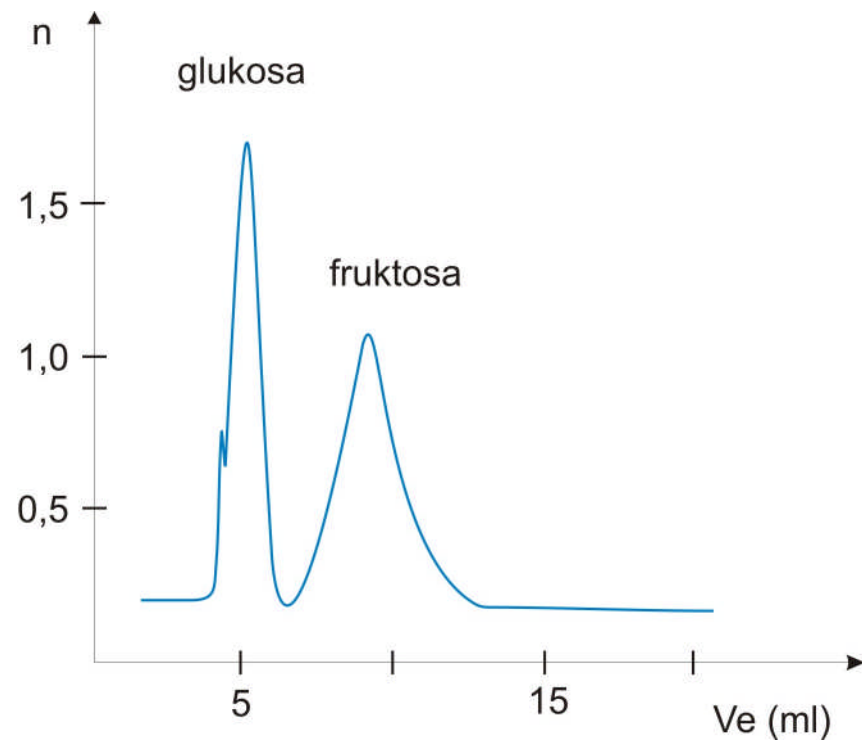
ekvilibrace: 250mmol/l acetát amonný + 50 mmol/l $MgCl_2$

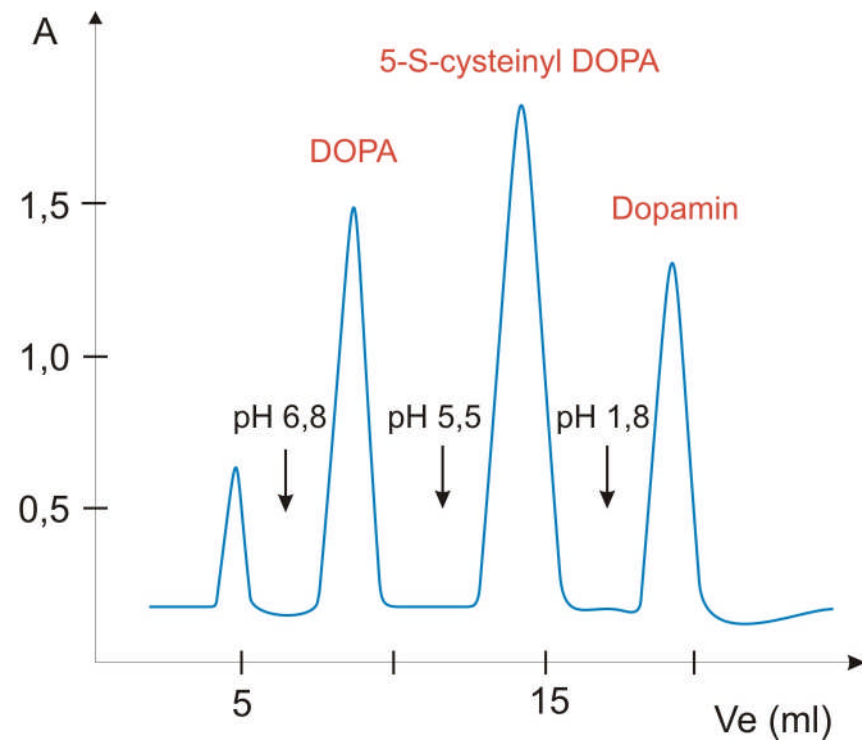
pH 8,0

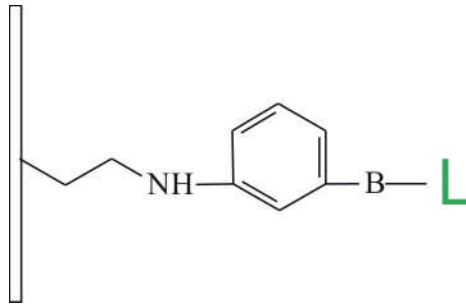
eluca: 100 mmol/l TRIS + 200 mmol/l sorbitol

$$\% \text{ Gly-Hb} = \frac{5 \cdot A_{\text{váz}}}{20,1 \cdot A_{\text{neváz}} + 5 \cdot A_{\text{váz}}} \times 100$$









L (ligand)	
NAD ⁺ , NADP ⁺	dehydrogenase
ATP, AMP	dehydrogenase kinase

K_d distribuční (rozdělovací) konstanta

$$K_d = \frac{[EL]}{[E]}$$

$$K_d = \frac{[EL]}{[E_0] - [EL]}$$

$$K_d = \frac{[L_0]}{[K_L]}$$

eluční objem mrtvý objem

$$V_e = V_0 + K_d \cdot V_0$$

$$\frac{V_e}{V_0} = 1 + \frac{[L_0]}{K_L}$$

enzym

$[E]$

+

ligand

$[L]$



komplex enzym:ligand

$[EL]$

K_L disociační konstanta komplexu enzym:ligand

$$K_L = \frac{[E] \cdot [L]}{[EL]}$$

$$[E] = [E_0] - [EL]$$

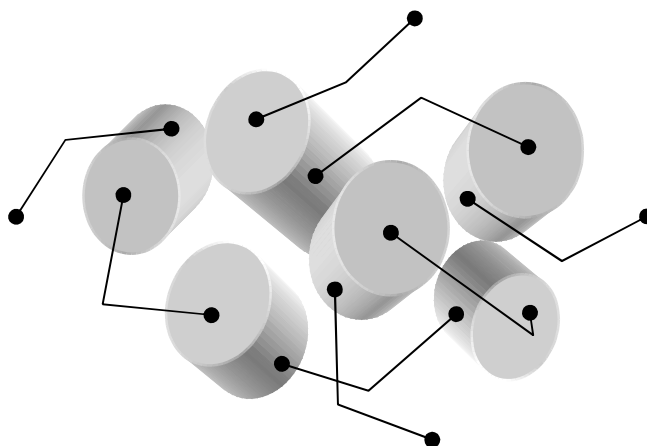
$$[L] = [L_0] - [EL]$$

$$K_L = \frac{[E_0 - EL] [L_0 - EL]}{[EL]}$$

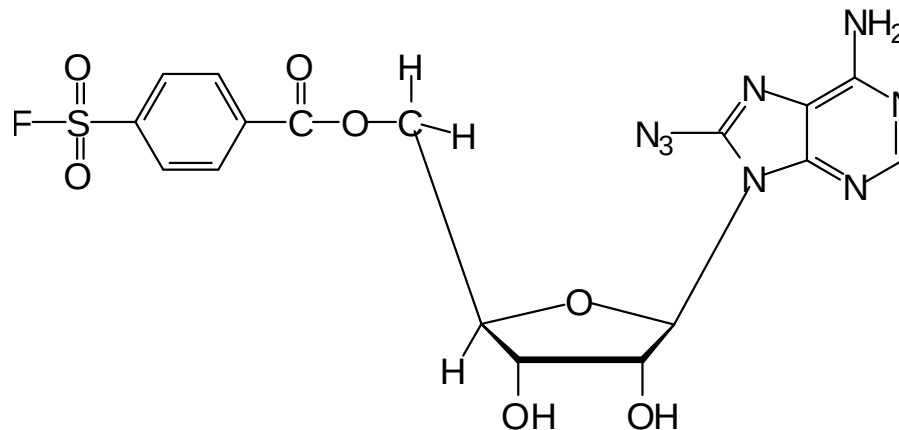
$$\text{pro } [L_0] \gg [E_0]$$

$$K_L = \frac{[E_0 - EL]}{[EL]} [L_0]$$

Afinitní srážení (afinitní precipitace)



1. "semi" afinitní precipitace



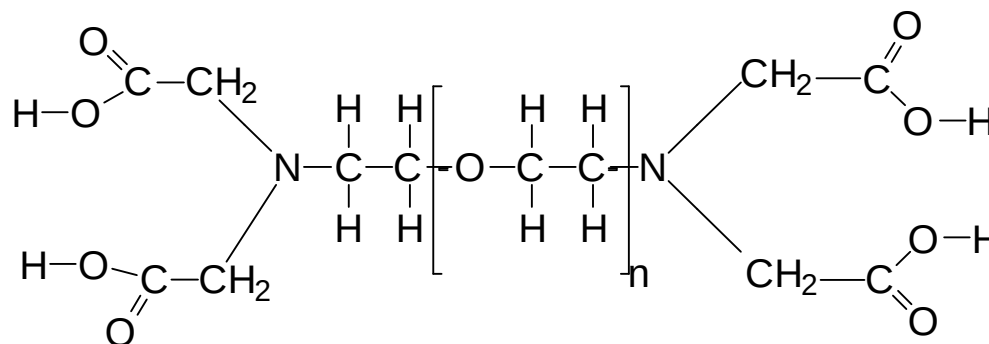
5-p-(fluorosulfonyl) benzoyl-8-azidoadenosin

2. precipitace dehydrogenas a kinas

a/ bis NAD [N2-adipodihydrazido-bis (N6-carbonylmethyl-NAD)]

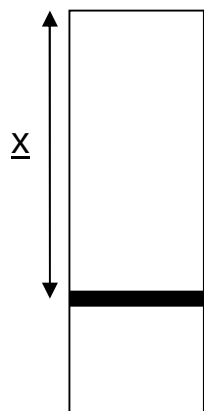
b/ bis Cibacron blue

3. precipitace využívající interakce "kov-protein"

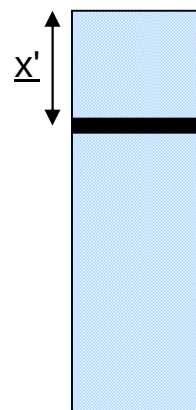


Afinitní elektroforéza

gel bez afinitního ligandu



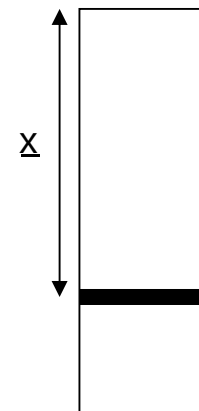
gel s ligandem



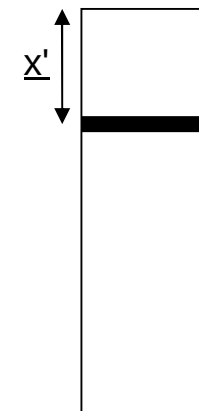
- metoda vhodná pro kvantitativní studium interakce mezi proteinem a imobilizovaným popř. volným ligandem
- získané disociační konstanty komplexu protein - ligand jsou srovnatelné s hodnotami získanými kinetickým měřením

Stanovení disociační konstanty

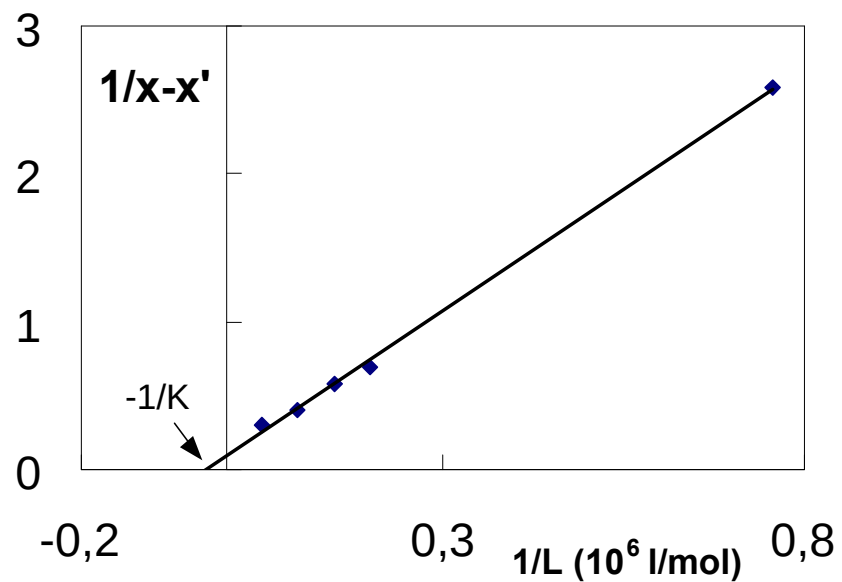
gel bez ligandu



gel s koncentrací ligandu L



x-vzdálenost, kterou protein urazí v gelu bez ligandu
x'-vzdálenost, kterou protein urazí za stejnou dobu v gelu o koncentraci ligandu L
K-disociační konstanta komplexu
 protein volný ligand



Fázové separace

rozdělení směsi proteinů mezi dvě fáze

(nejčastěji dextran 500000 x PEG 8000)

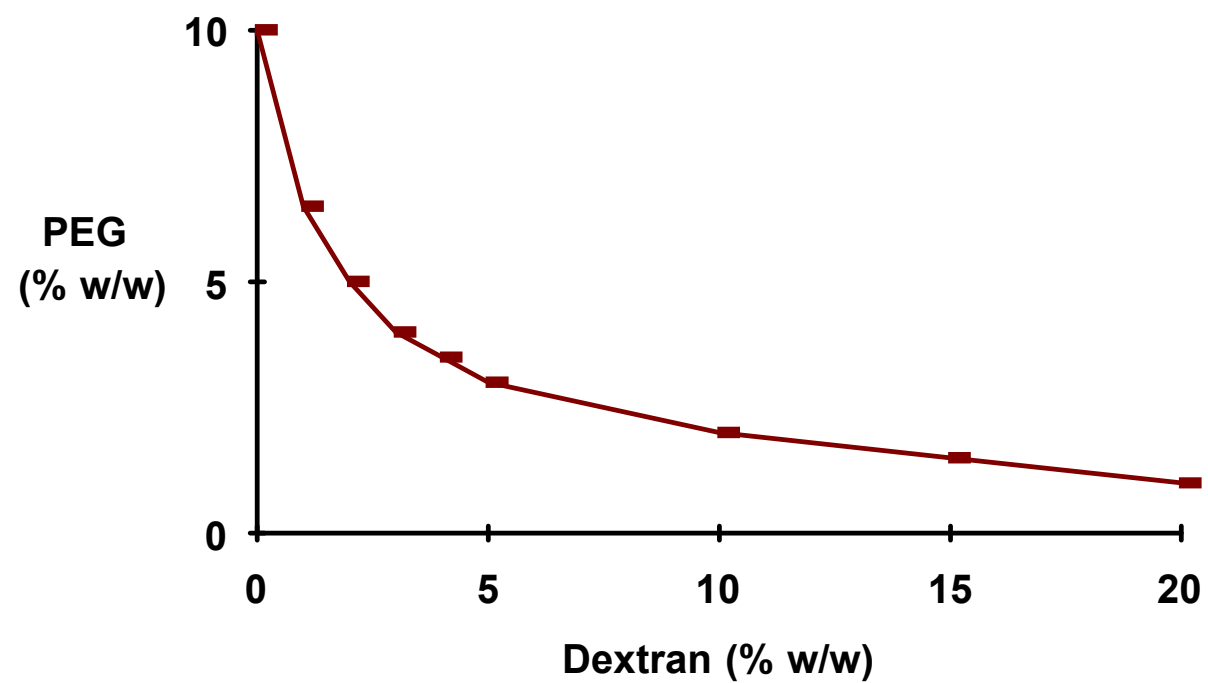
využití: 1. dělení podle ligandu $\Longrightarrow$ afinitní rozdělování

2. dělení celých buněk

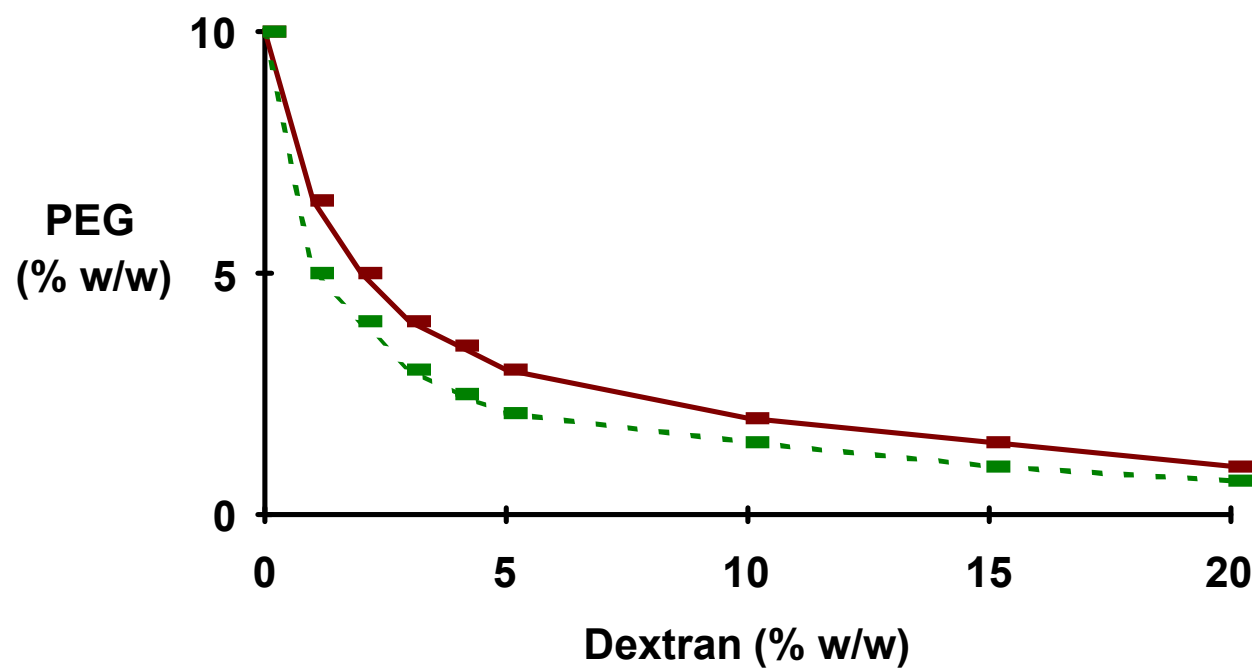
Postup:

1. příprava zásobních roztoků
(20% dextran, 40% PEG, 0,1 M fosfátový pufr, fáze s ligandem)
2. namíchání fází (nejčastěji 2g)
3. přidání vzorku
4. promíchání na třepačce (cca. 5 min)
5. centrifugace (urychlení rozdělení fází) 2000g 2 min
6. odebrání frakcí a proměření aktivity

Fázový diagram PEG8000/Dx500



Fázový diagram PEG8000/Dx500
Vliv teploty



Fázový diagram PEG8000/Dx500
Vliv iontové síly

