

Affinity chromatography, AC

## AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

biospecifická afinitní, bioafinitní

- speciální metoda izolace biologicky aktivních látek

- využívá výjimečné biologické schopnosti některých látek- **afinantů**, ligandů či afinantních ligandů- specificky a reverzibilně vázat jiné látky

Afinant se **kovalentní vazbou** naváže na vhodný **nerozpustný inertní nosič**.

**Princip dělení analytů při AC:** kolona se naplní nosičem s navázaným afinantem. Biologicky aktivní látka se zachytí, látky bez afinity k použitému afinantu projdou kolonou nezadrženy.

Látky jsou zadržovány v **poměru** svých **afinit** za daných experimentálních podmínek.

Specificky sorbovaná látka může být vymyta **vhodným elučním činidlem**, tj roztokem o odlišném pH či iontové síle, nebo **rozpuštěním rozpustného afinantu**.

**První aplikace AC:** izolace protilátek pomocí celulózy s kovalentně navázaným antigenem

K rozšíření AC přispělo objevení univerzální metody kovalentní vazby afinantu na agarózu.

### **Použití AC:**

- izolace enzymů pomocí jejich inhibitorů, substrátů, kofaktorů nebo efektorů
- protilátek použitím antigenů
- NK, bílkovin, hormonů a jejich receptorů pomocí vhodných afinantů

Úspěch metody AC závisí na schopnosti napodobit interakce složek jako kdyby byly ve vodném roztoku.

Podmínky AC se liší podle druhu izolované biologicky aktivní látky.

### Obecné požadavky metody AC:

1. povaha pevného nosiče
2. výběr afinantu a jeho vazba na nosič
3. podmínky adsorpce a eluce izolovaných látek

### **1. VOLBA PEVNÉHO NOSIČE**

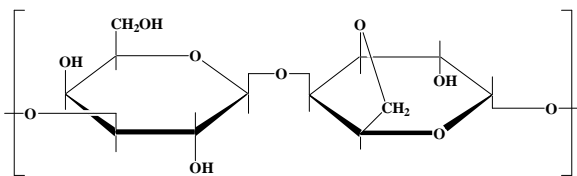
Nosič musí splňovat následující podmínky:

- a) volná, pórovitá struktura umožňující pohyb makromolekul
- b) částice stejnorodé, pravidelného kulového tvaru, pevné, s dobrými průtokovými vlastnostmi
- c) inertní vůči izolovaným látkám, aby nedocházelo k jejich nespecifické sorpci
- d) přítomnost funkčních skupin, které lze aktivovat pro kovalentní vazbu afinantu nebo modifikovat
- e) dostatečné množství funkčních skupin v matici, aby po navázání ligandu byla dostatečně vysoká koncentrace aktivních míst pro vazbu izolované látky
- f) mechanická a chemická stálost nosiče během vazby ligandu, adsorpce a eluce

### PEVNÉ NOSIČE PRO AC

#### **1. Agaróзовые deriváty**

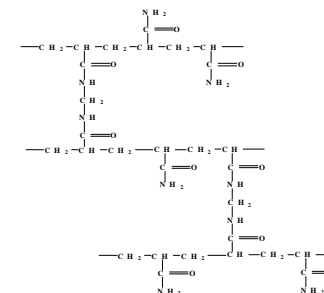
Agaróza: neutrální lineární polykondenzát D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy



- nejvíce používaný nosič v AC (Sepharosa, Bio-Gel A)
- používá se i v GPC a modifikovaná v IEC
- hydrofilní gel se strukturou podobnou pryskyřičným ionexům, ale s mnohem většími póry
- stabilní v rozmezí pH 4 - 9 a teplot 0 - 40 °C
- kompatibilní s organickými rozpouštědly (až 50 %)
- skladování při 4 °C s přidávkou antibakteriálního činidla

### **2. Polyakrylamidové a hydroxyalkylmethakrylátové gely**

- inertní hydrofilní gely
- neobsahují nabitě funkční skupiny, nedochází k iontové výměně
- běžně se používají v GPC
- syntetické materiály, nejsou napadány mikroorganismy
- stálé v rozmezí pH 1 – 10 (PAM)



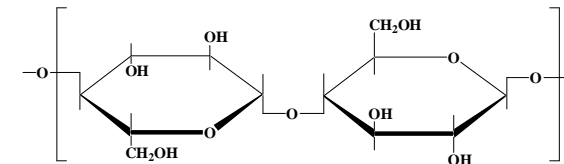
Polyakrylamid

- volné amidové skupiny slouží pro vazbu afinantu k nosiči

HEMA gely mají obdobné chemické vlastnosti jako agaróзовые gely, jsou chemicky a mechanicky stabilní. - ve formě kuliček o velikosti 100 - 200 µm

### **3. Celulóзовые deriváty**

Celulóza: lineární polymer, D-glukóзовé jednotky spojené vazbou β - 1,4, popř. 1,6



- nejstarší nosič pro afinanty, většina metod vazby byla vypracována právě pro celulózu
- typická fyzikální struktura s velkými póry, vysoce hydrofilní
- komerční celulózový nosič s již navázanými aktivními funkčními skupinami

### **4. Skla**

Afinant je kovalentně navázán na povrch skla díky volným silanolovým skupinám. Využívá se pro navázání **afinantu** velmi **špatně rozpustného ve vodě**.

### **5. Komerční afinanty vázané na nosič**

- určeny pro konkrétní bioseparace

## 2. VOLBA AFINANTU A JEHO VAZBA

Volba afinantu závisí na druhu a vlastnostech izolované látky.

Na vhodný afinant se izolovaná látka váže **pevně, specificky a reverzibilně**.

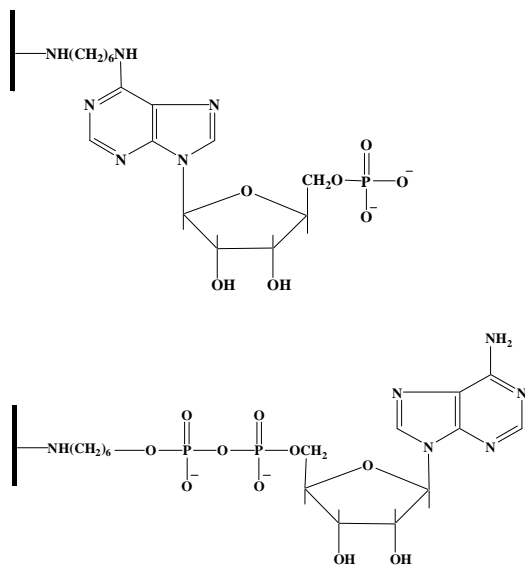
Příklad afinantů: hormony, antibiotika, NK substráty, inhibitory, koenzymy, kofaktory,

### Výběr afinantu ovlivňuje:

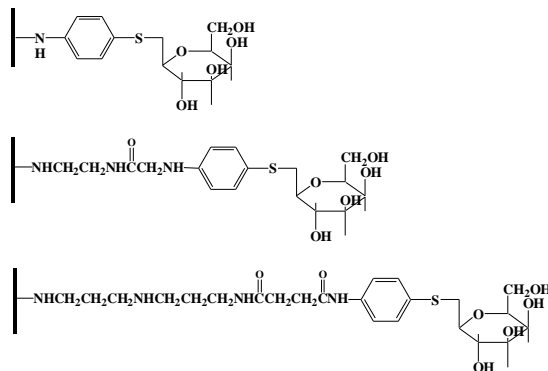
- povaha a mechanismus interakce ligandu s makromolekulou
- afinita ligandu k makromolekule
- způsob připojení afinantu k nosiči
- koncentrace ligandu

Pro dosažení dostatečné izolace biologicky aktivních látek je důležitá **volba správného místa vazby** afinantu k nosiči a **prostorová přístupnost afinantu** pro makromolekulu.

Mezi afinant a povrch nosiče se často vkládá tzv. **spacer**.



Obrázek 1: Význam způsobu připojení ligandu k matici.



Obrázek 2: Vliv spaceru na imobilizaci afinantu.

Výběr afinantu ovlivňuje koncentrace ligandu.

Pokud je **koncentrace** afinantu na nosiči **nedostatečná**, používají se chromatografické kolony s dostatečnou délkou.

V případě příliš **silné afinity izolované látky** je nutné snížit koncentraci navázaného afinantu. Nosič s afinantem se naředí čistým nosičem.

## 3. PODMÍNKY SORPCE A ELUCE

**Sorpce** izolované látky závisí na její **povaze a interakci** s imobilizovaným afinantem.

Kondicionace nosiče s afinantem by měla probíhat při optimálních podmínkách interakce (iontová síla, pH).

Sorpce je ovlivněna průtokovou rychlostí elučního činidla a dávkovaného vzorku a teplotou.

**Eluce** sorbované látky lze dosáhnout změnou pH, iontové síly nebo teploty pufrů, u enzymů roztokem inhibitoru či substrátu.

Způsob eluce závisí na druhu sorbované látky, nosiče a afinantu, druhu a intenzitě interakce a experimentálních podmínkách izolace.

Způsoby eluce: 1. frontální  
2. vytěšňovací  
3. eluční

### 1. Frontální analýza

Vzorek se nanáší na kolonu tak dlouho, až se jím stacionární fáze nasytí.

### 2. Vytěšňovací analýza

Vzorek je nanesen na kolonu, mobilní fáze se nesorbuje na koloně. Na kolonu je též nanesen přebytek vytěšňovacího činidla. Vytěšňovací činidlo před sebou tlačí zónu vzorku.

### 3. Eluční analýza

Vzorek nadávkovaný na kolonu se vymývá čistou mobilní fází.

- *izokratická* eluce
- *gradientová* eluce