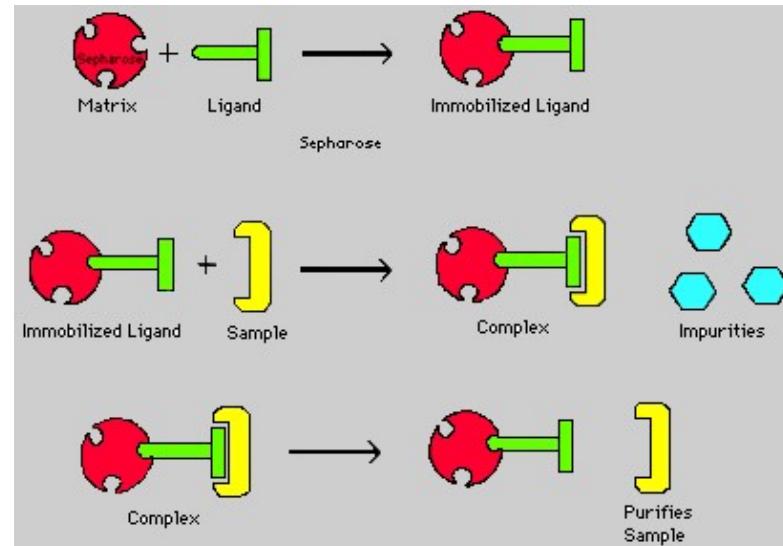


Afinitní Chromatografie (Affinity chromatography, AC)

- biospecifická afinitní, bioafinitní chromatografie (specifický typ LSC)
- metoda izolace biologicky aktivních látek a studia interakcí biopolymerů
- využíváme výjimečné biologické schopnosti některých látek- **afinantů** (afinantních ligandů)- **specificky a reverzibilně** vázat **komplementární** látky (bílkoviny, nukleové kyseliny)

Princip AC

- afinant navážeme **kovaletní vazbou** na vhodný **nerozpustný inertní nosič**
- naplníme kolonu nosičem s navázaným afinantem
- biologicky aktivní látka s afinitou se zachytí, látky bez affinity k použitému afinantu projdou kolonou nezadrženy
- látky se zadržují podle svých **afinit** za daných experimentálních podmínek
- sorbované látky uvolníme vhodným elučním činidlem nebo **rozpuštěním rozpustného afinantu**



První aplikace AC: izolace protilátek na celulose s kovalentně navázaným antigenem

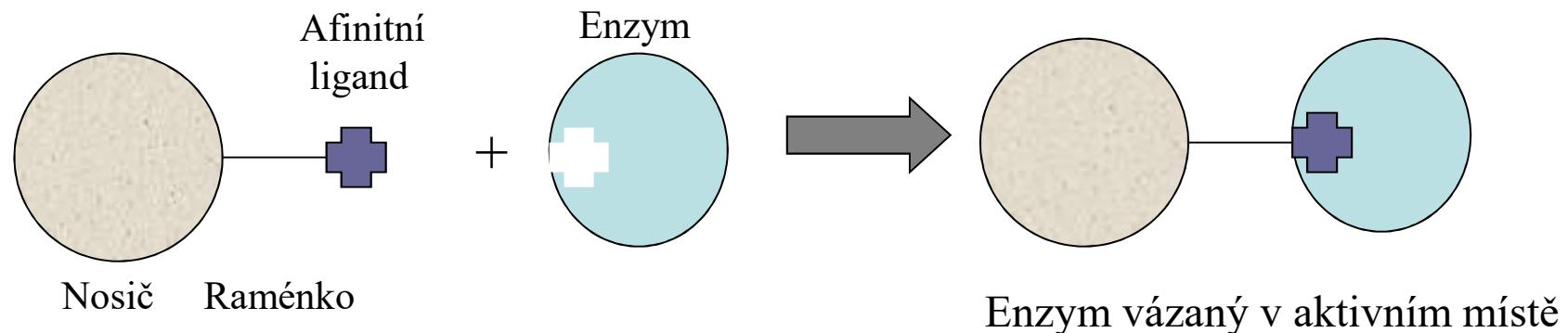
Rozšíření AC: zavedení metod kovalentní vazby afinantu na agarosu
(přes N-hydroxysukcinimid, bromkyan CNBr, N,N'-karbondiimid, epoxid, thiol)

Využití AC: izolace

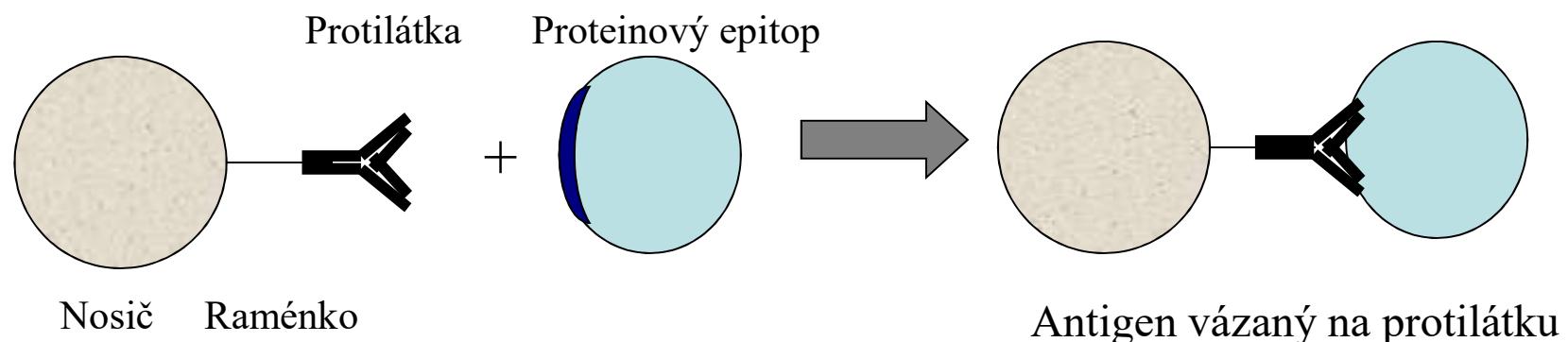
- enzymů pomocí jejich inhibitorů, substrátů nebo koenzymů
- protilátek použitím proteinových antigenů (a naopak)
- lektinů pomocí oligo(poly)sacharidů, glykoproteinů
- DNA pomocí histonů nebo komplementárních nukleových kyselin
- hormonů, toxinů pomocí vazebných proteinů

Afinitní chromatografie

1. Analog substrátu



2. Imunoafinitní chromatografie



VÝVOJ METODY AC

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

1. VOLBA PEVNÉHO NOSIČE

- a) pórovitá struktura umožňující pohyb makromolekul
- b) částice stejnorodé, pravidelného kulového tvaru, pevné, s dobrými průtokovými vlastnostmi, velký povrch
- c) inertní vůči izolovaným látkám (nízká nespecifická sorpce)
- d) přítomnost funkčních skupin, které lze aktivovat pro kovalentní vazbu afinantu
- e) dostatečné množství funkční skupin - dostatečná koncentrace afinantu pro vazbu izolované látky
- f) mechanická a chemická stálost nosiče během vazby ligandu, adsorpce a eluce
- g) odolnost vůči mikrobiálním a enzymatickým účinkům

NOSIČE PRO AC

- hydrofilní, porézní, omezená mechanická odolnost, omezená chemická odolnost, napadány mikroorganismy a enzymy - přírodní organické polymery

1. Agarosové gely

- nejvíce používaný nosič v AC (SEPHAROSA)
- používá se i v SEC a IEC
- hydrofilní gel s dostatečně velkými póry
- nízké nespecifické interakce
- komerčně dostupná aktivovaná Sepharosa (aldehyde, CNBr, epoxy, thiol, N-hydroxysuccinimide; N,N'-carbodiimide activated Sepharose)
- stabilní v rozmezí pH 4 - 9 a teplot 0 - 40 °C
- kompatibilní s organickými rozpouštědly (až 50 %)
- malá mechanická odolnost, mikrobiální atak

2. Celulosové gely

- struktura s velkými póry, vysoko hydrofilní (Perlosa)
- dostupná a levná, vhodná pro průmyslové aplikace
- vláknitou celulosu používáme pro vazbu DNA

3. Dextranové gely

- Sephadex, Superdex
- hydrolýza vazby mezi glukosovými jednotkami při nízkém pH
- malá mechanická odolnost
- náchylné k mikrobiálnímu ataku

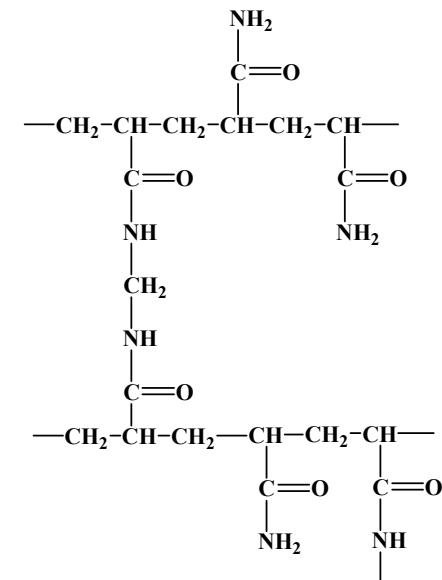
4. Komerční afinenty vázané na nosič

- určeny pro konkrétní bioseparace
- Con A Sepharose 4B: agarosa s navázaným konkanavalinem A pro analýzu glykoproteinů

- hydrofilní, porézní, mechanicky a chemicky odolné, odolné vůči mikroorganismům a enzymatickým účinkům - **syntetické organické polymery**

5. Polyakrylamidové gely

- inertní hydrofilní gely (Bio-Gel)**
- neobsahují nabité funkční skupiny, nedochází k iontové výměně
- nízká porozita (bohužel)
- syntetické materiály**, nejsou napadány mikroorganismy
- stálé v rozmezí pH 1 - 10, mechanicky odolné



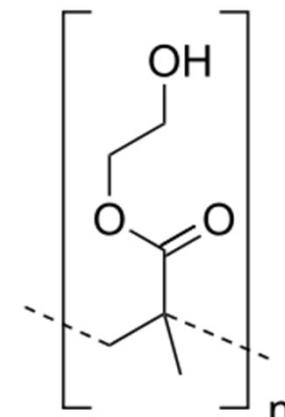
6. Hydroxyalkylmethakrylátové gely

- inertní hydrofilní gely, syntetické**
- stabilní chemicky (pH 2-12) a mechanicky

HEMA (ethylendimethakrylát a hydroxyethylmethakrylát)

SPHERON (ethylenglykolmethakrylátový gel)

TOYOPEARL (nižší nespecifické interakce)



NOSIČE PRO AC

- porézní, mechanicky a chemicky odolné, odolné vůči mikroorganismům a enzymatickým účinkům - **anorganické oxidy**

7. Porézní skla

- afinant kovalentně vázán na povrch skla přes volné -SiOH skupiny
- vhodná pro navázání afinantu velmi špatně rozpustného ve vodě
- lze použít organická rozpouštědla

8. Anorganické oxidy

- Silikagel**
 - porézní SiO_2
 - modifikace povrchu zavedením reaktivní epoxy skupiny
 - mechanická odolnost, pH stabilita 2-8
 - vykazuje nespecifické interakce
- Anorganické oxidy:** TiO_2 a ZrO_2 snesou extrémní podmínky, Al_2O_3 se rozpouští při $\text{pH} < 3$ a > 12

2. VOLBA AFINANTU A JEHO VAZBA

- volba afinantu závisí na druhu a vlastnostech izolované látky (povaha a mechanismus interakce, afinita k ligandu)
- na vhodný afinant se izolovaná látka váže **pevně, specificky a reverzibilně**
- příklady afinantů: heparin pro lipasy či lipoproteiny, nativní protein A (příp. rekomb. protein G) pro IgG, boronát pro cis-dioly (včetně nukleotidů a glykopeptidů), polymyxin (polypeptidové antibiotikum) pro endotoxiny

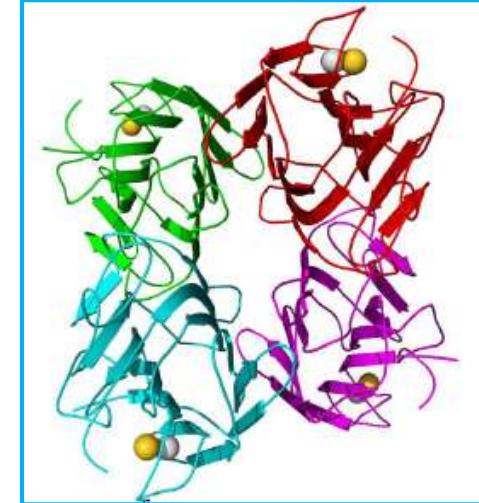
Afinanty pro skupinově specifické izolace

- širší aplikovatelnost, komerční dostupnost
- **konkanavalin A + glykoproteiny**

Afinanty pro monospecifické izolace

- strukturně a biologicky příbuzné s cílovou molekulou, specifický ligand pro každý jednotlivý případ
- **pepsin + 3,5-dijodo-L-tyrosin**

| Skupinově specifické afinenty | Specifita |
|-------------------------------|--|
| konkanavalin A | glukopyranosyl- a manopyranosylové skupiny |
| lysin | ribosomální RNA |
| arginin | serinové proteázy |
| <i>p</i> -aminobenzamidin | serinové proteázy |
| heparin | lipoproteiny, steroidní receptory, hormony |



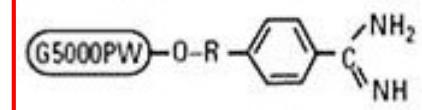
konkanavalin A

TSKgel ABA-5PW

Ligand: *p*-aminobenzamidin (ABA), napodobuje inhibitor serinové proteasy

Aplikace: trypsin, krevní koagulační faktory, urokinasy

Adsorpční kapacita: 3-4 mg trypsinu na ml gelu



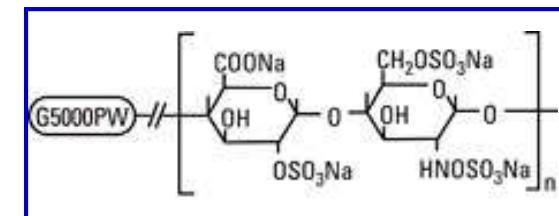
TSKgel Heparin-5PW

Ligand: 4-6 mg heparinu/mL gelu

Aplikace: koagulační faktory, lipoproteiny a lipasy,

RNA polymerasy a jiné enzymy

Adsorpční kapacita: 2-3 mg lidského antithrombinu III na ml gelu

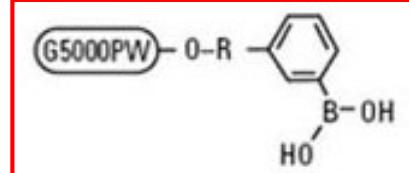


TSKgel Boronate-5PW

Ligand: *m*-aminofenylboronová kyselina

Aplikace: glykoproteiny, nukleasy, nukleotidy, katecholaminy, sacharidy, tRNA

Adsorpční kapacita: 40 µmol sorbitolu na ml gelu

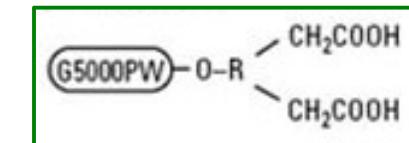


TSKgel Chelate-5PW

Ligand: ~20 µmol iminodioclové kyseliny/mL gelu

Aplikace: proteiny z krevní plazmy, lakoferin, proteinasy (kolagenasa),
granulární proteiny, interferony (proteiny nespecifické imunity)

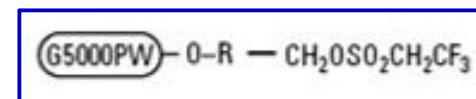
Chelatační kapacita: ~ 20 µmol Cu²⁺ nebo Zn²⁺na ml gelu

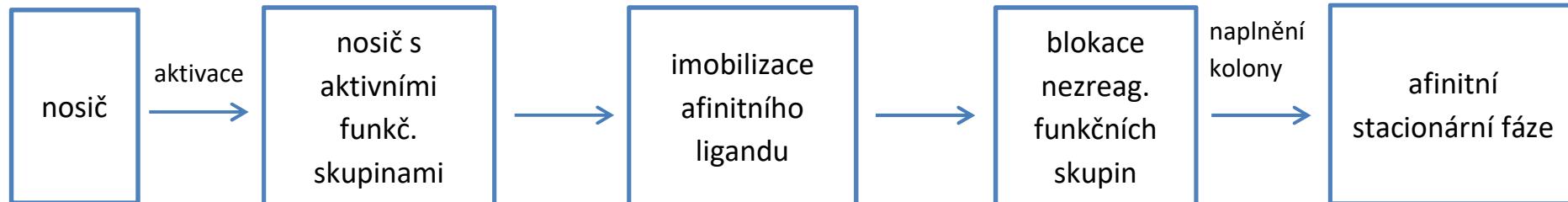


TSKgel Tresyl-5PW

Ligand: 20 µmol -CH₂OSO₂CH₂CF₃/mL gelu

Aplikace: aktivovaný nosič pro imobilizaci ligandů s reaktivní amino, thiol,
fenol nebo imidazolovou skupinou

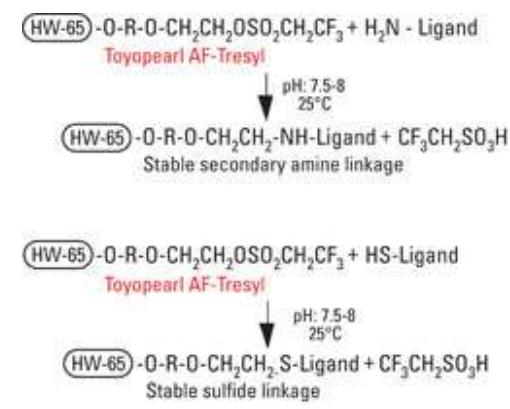
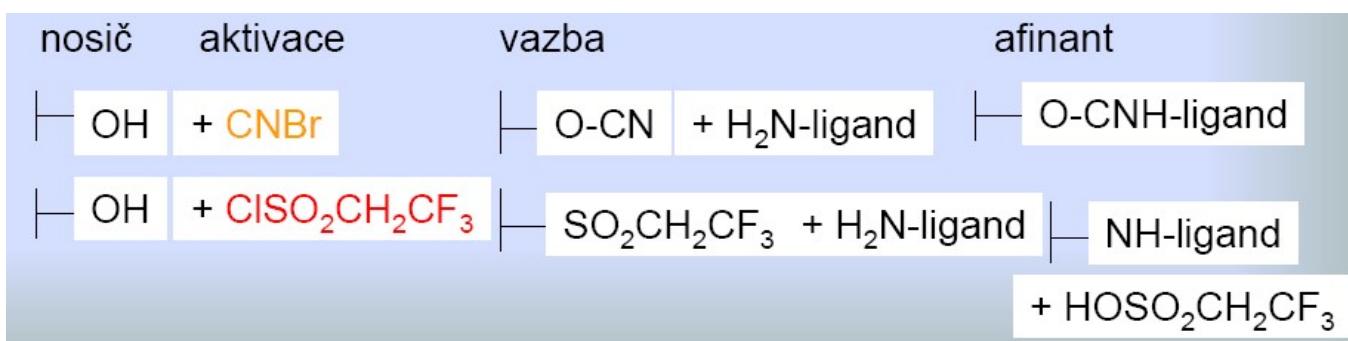




Aktivace nosiče

- epoxy skupinami (bisoxiran)
- bromkyanovou metodou (CNBr)
- divinylsulfonem (DVS)
- organickými sulfonyloxidy
 - tosylchlorid
(*p*-toluensulfonylchlorid)
 - tresylchlorid
(2,2,2-trifluoroethansulfonylchlorid)

| Aktivní skupina | Reagující skupiny afinantu | Reakční podmínky |
|-----------------|------------------------------------|--|
| epoxy | -NH ₂ , -OH, -SH, -COOH | pH 5-12, doba 4-72 hod teplota 4-60 °C |
| brom kyan | -NH ₂ | pH 7-10, doba 1-12 hod teplota 4-25 °C |
| divinyl sulfon | -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 |



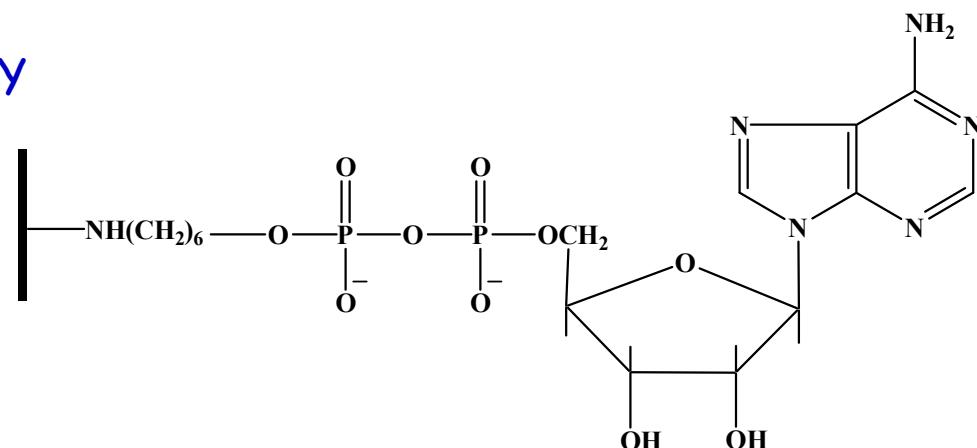
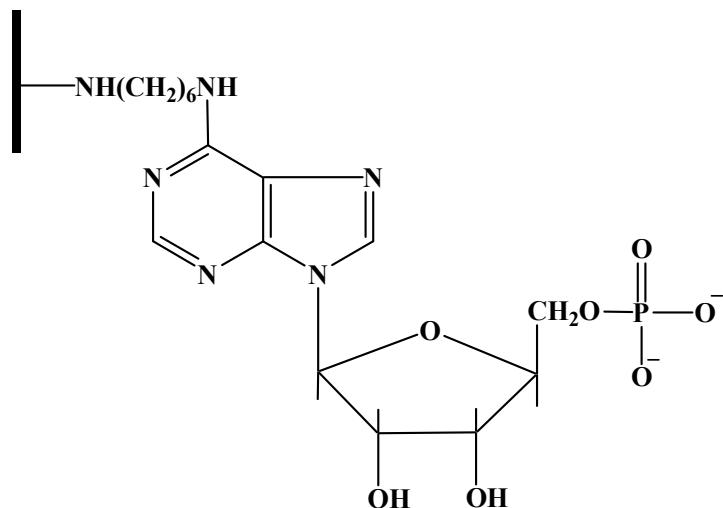
Imobilizace afinantu na nosič

- metoda vazby
- správné vazebné místo
- prostorová přístupnost
- koncentrace ligandu

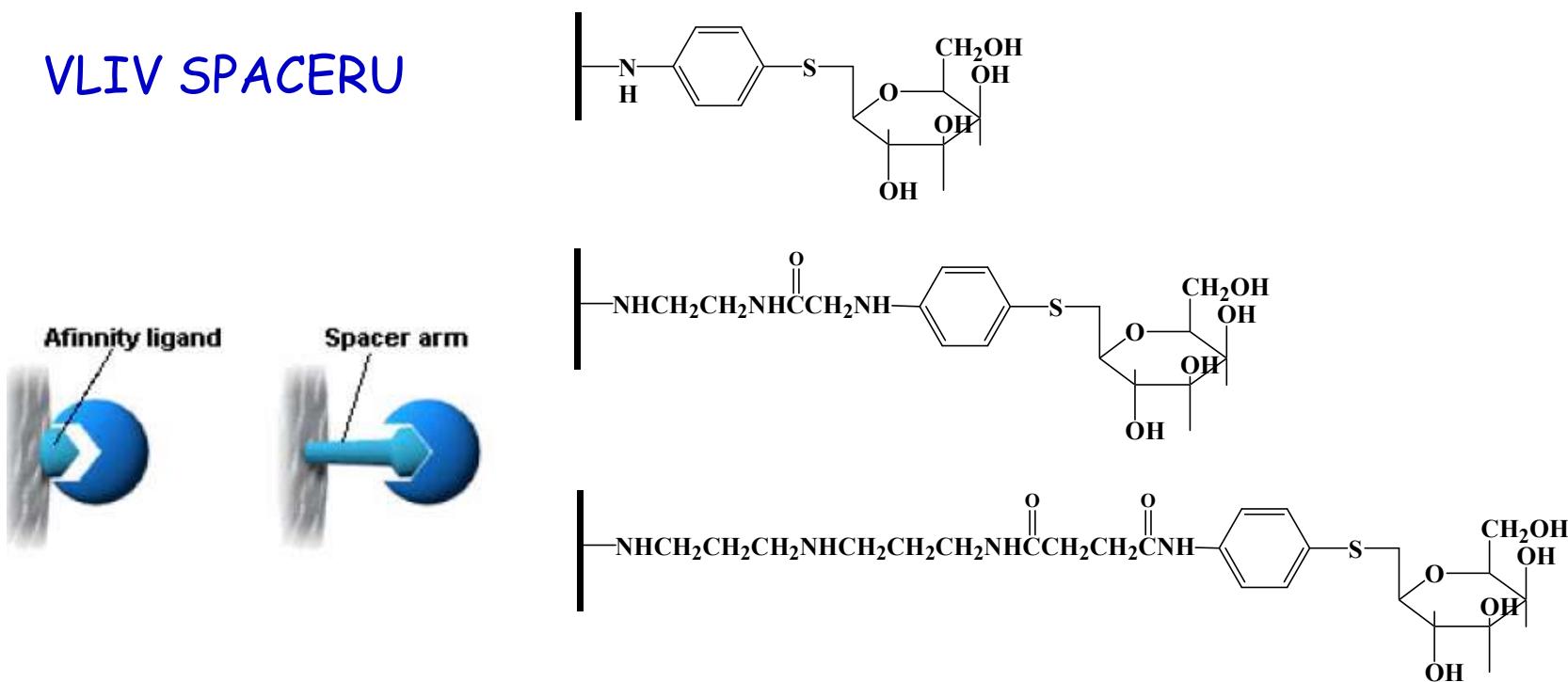
Pro dosažení dostatečné izolace biologicky aktivních látek je důležitá volba správného místa vazby afinantu k nosiči a prostorová přístupnost afinantu pro makromolekulu.

Mezi afinant a povrch nosiče často vkládáme tzv. **spacer** (oddalovací raménko).

VOLBA SPRÁVNÉHO MÍSTA VAZBY



VLIV SPACERU



Aktivita afinantu se vazbou na nosič snižuje. I při optimálním způsobu připojení afinantu k nosiči je interakce s izolovanou látkou slabší než při vazbě analytu na volný afinant.

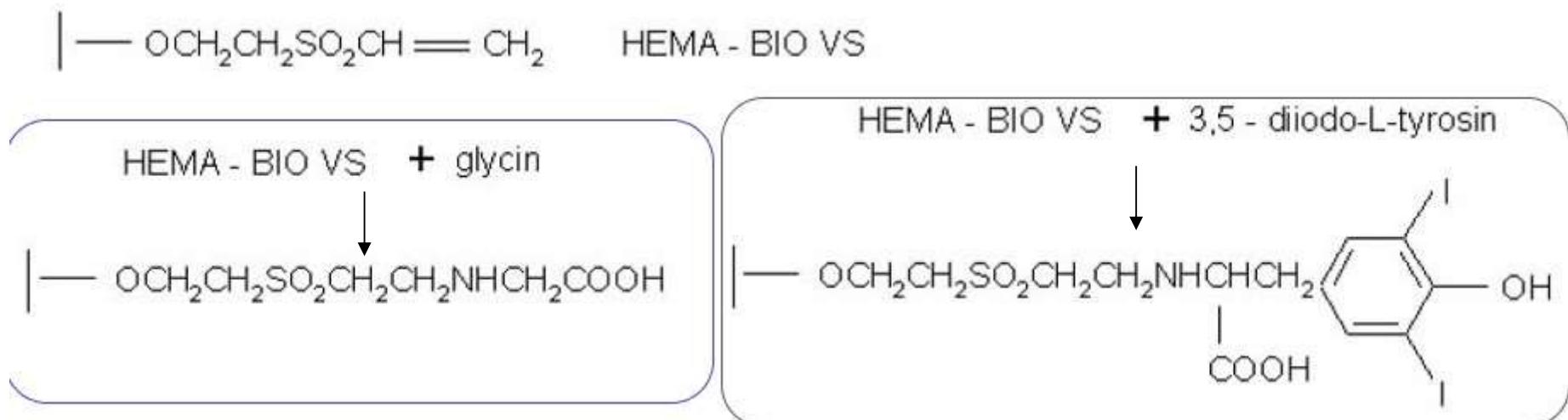
Imobilizace afinantu na nosič

- metoda vazby
 - správné vazebné místo
 - prostorová přístupnost
 - koncentrace afinantu
-
- koncentrace afinantu na nosiči nedostatečná - použití chromatografické kolony s dostatečnou délkou
 - příliš silná afinita izolované látky k afinantu - snížení koncentrace navázaného afinantu, smíchání s čistým nosičem
 - určení množství imobilizovaného ligandu
 - diferenční metoda ($m_{celk.} - m_{nezreag.}$)
 - přímá spektroskopie
 - kyselá/enzymová hydrolýza - hydrolýza vazby mezi afinantem a nosičem
 - elementární analýza - S, I, N, P
 - analýza radioaktivních izotopů - 3H , ^{32}P , ^{57}Co

Blokace nezreagovaných funkčních skupin

- vazba vhodné látky na zbytkové aktivní skupiny nosiče, např. glycín, glycerol, ethanolamin
- hydrolýza zbytkových aktivních skupin v alkalickém prostředí

Imobilizace ligandu a blokace zbylých funkčních skupin



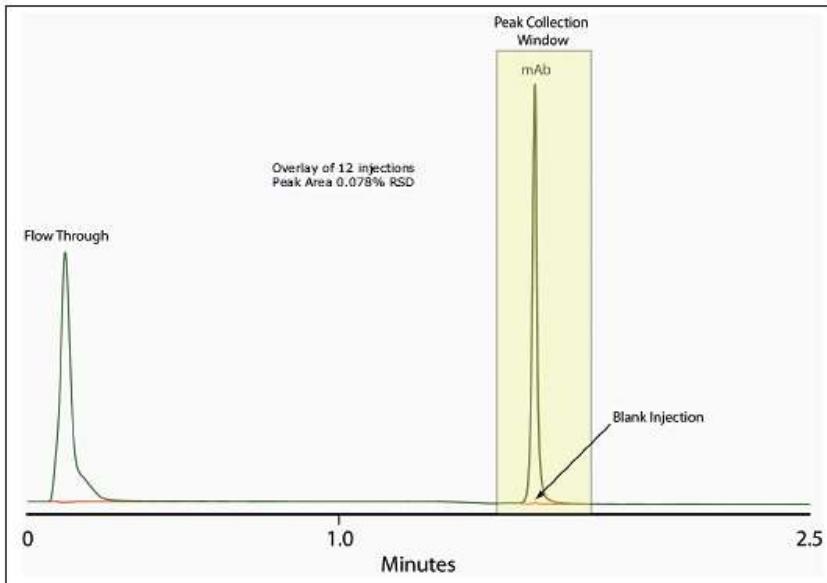
3. PODMÍNKY SORPCE A ELUCE

- kondicionace nosiče s afinantem při optimálních podmírkách interakce (iontová síla, pH)
- dávkování vzorku z prostředí o nízké iontové síle
- sorpce izolované látky závisí na intenzitě interakce s afinantem
 - je ovlivněna průtokovou rychlostí a teplotou elučního činidla a dávkovaného vzorku
- eluce sorbované látky:
 - změnou pH, iontové síly nebo teploty pufrů - nespecifická (neselektivní) eluce
 - přídavkem disociačních činidel (roztok inhibitoru či substrátu u enzymů) - specifická (selektivní) eluce
 - izokratická eluce (stejné složení mobilní fáze)
 - gradientová eluce (změna pH, iontové síly, koncentrace disociačního činidla nebo teploty)

Praktické využití afinitní chromatografie

- izolace/přečištění/prekoncentrace
- proteomika
- genomika
- lékařská analytika: enzymy, hormony, viry a jejich genetický fond, rakovinné markery, protilátky, léky, drogy
- stanovení vazebných konstant komplexu afinat - biopolymer (popis vazby)
- úspěch metody afinitní chromatografie závisí na schopnosti napodobit interakce složek jako kdyby byly v přirozeném prostředí
- podmínky afinitní chromatografie volíme podle izolované biologicky aktivní látky, abychom dosáhli selektivní interakce s afinantem

2D kapalinová chromatografie pro kvantifikaci monoklonálních protilátek



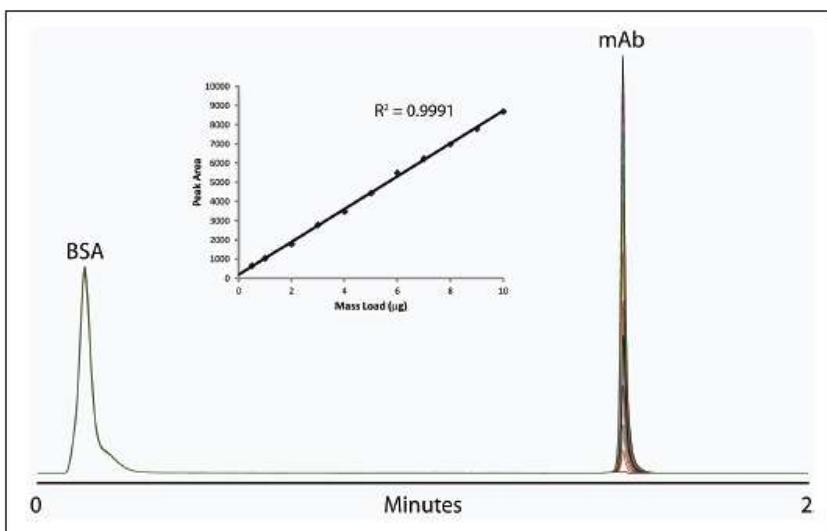
Afinitní chromatografie na koloně s imobilizovaným proteinem A, izolace protilátky ze složité matrice

gradientová eluce MF

A) fosforečnanový pufr, pH 7,0 + 150 mmol dm⁻³ NaCl

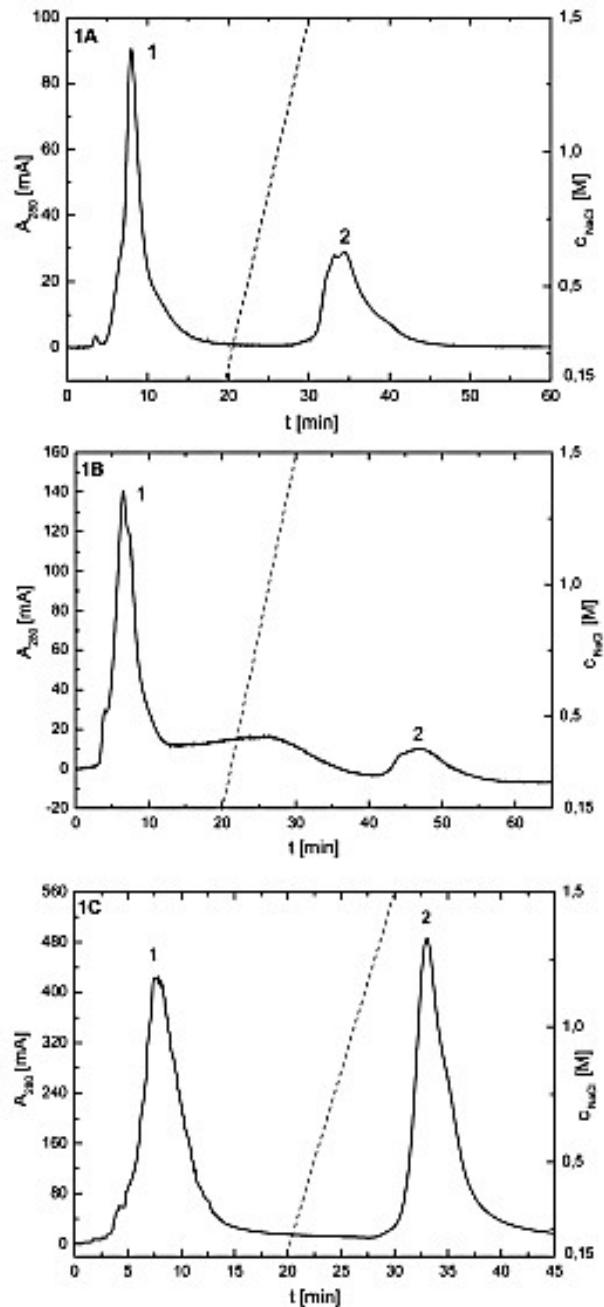
B) HCl, pH 1,9 + 150 mmol dm⁻³ NaCl

UV detekce @280 nm



gradientová eluce, MF: A) 0,1% kyselina mravenčí, B) 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu

MS detekce



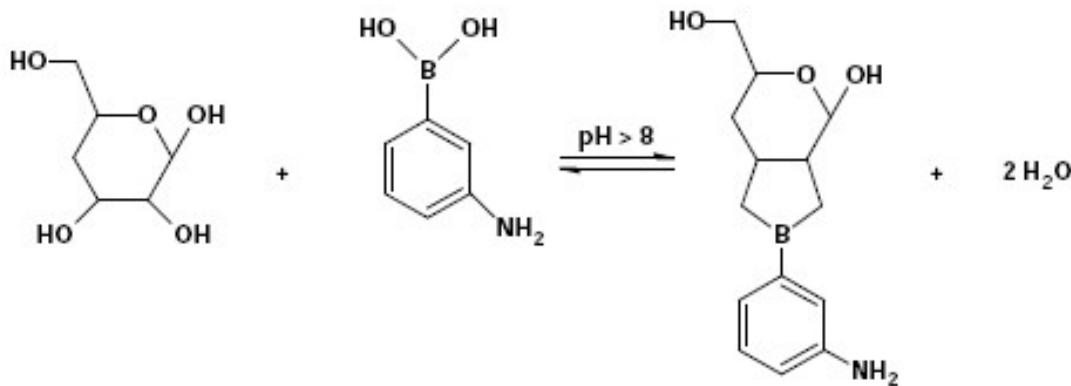
Afinitní chromatografie proteinů semenné plazmy

- kolona Toyopearl s heparinem
- proteiny semenné plazmy kančí (A), býčí (B), lidské (C)
- eluce změnou pI (NaCl v $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH 7,5)

pík 1=proteiny nevážící se na heparin
 pík 2= proteiny vážící se na heparin

Monitorování obsahu glukosy v krvi afinitní boronátovou chromatografií

- koncentrace glykovaného hemoglobinu **HbA1c** je diabetický marker
- získáme souhrnné hodnoty glukosy v předchozích 8-12 týdnech
- glykované hemoglobiny se navazují svými 1,2-cis-diolovými skupinami na boronátovou kolonu, vzniká pětičlenný kruh
- neglykované hemoglobiny se nezadržují, eluují jako první
- glykované hemoglobiny z boronátové vazby eluujeme sorbitolem
- detekce frakcí fotometricky při 413 nm
- komerčně připravené kolony pro POCT (Point of Care, laboratoř u lůžka pacienta)
- automatizovaný analyzátor Premier Hb9210™ - analýza plné krve za 66 sec



Afinitní boronátová chromatografie

- využívá kovalentní vazbu mezi kyselinou aminofenylboronovou a glykoproteiny za vzniku diesterů
- reakce probíhá v alkalickém prostředí, snížením pH či použitím sorbitolu jsou zachycené glykoproteiny z vazby uvolněny

Afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech

IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography)

- využíváme afinitu některých bílkovin k iontům kovů, imobilizovaným na pevném nosiči ve formě chelátu: Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}
- vhodné pro proteiny s atomy N, S, O nebo P
- vazba proteinu na kov přes aminokyseliny His, Cys, Trp, Glu, Asp, Tyr, Lys, Arg
- protein vytěsní slabě vázané ligandy (vodu) z komplexu a nahradí je
- **vysoký stupeň přečištění a zakoncentrování** (až 10 000x) v jednom stupni díky vysoké selektivitě interakce

IMAC- Co^{2+}

- izolace rekombinantrních proteinů značených histidinem (His-tag)
- izolace a stanovení markeru karcinomu prostaty
- chelatující ligand je iminodiocetová kyselina
- koordinační vazba Co^{2+} -biopolymer

