

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 **nerozpuštěný inertní nosič**.

Princip dělení analytů při AC: kolona se naplní nosičem s navázaným afinantem. Biologicky aktivní látka se zachytí, látka 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

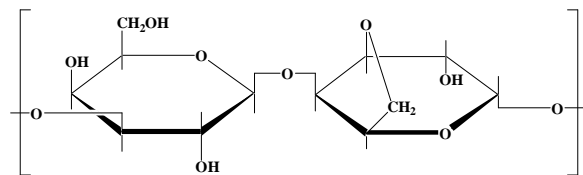
Nosič musí splňovat následující podmínky:

- 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

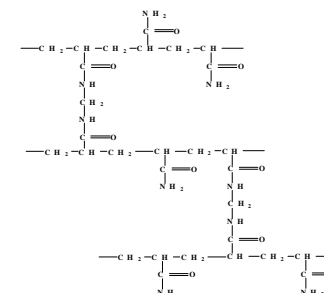
Agaróza: neutrální lineární polykondenzát D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy



- nejvíce používaný nosič v AC (Sepharsa, 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 přídavkem 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
- stále v rozmezí pH 1 – 10 (PAM)



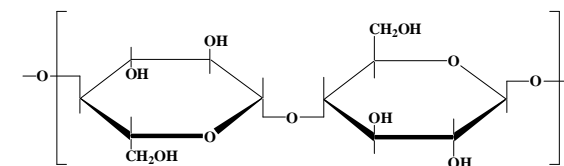
Polyakrylamid

- 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 celulóзовý nosič s již navázanými aktivními funkčními skupinami

4. Skla

Afinant je kovalentně navázan 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**.

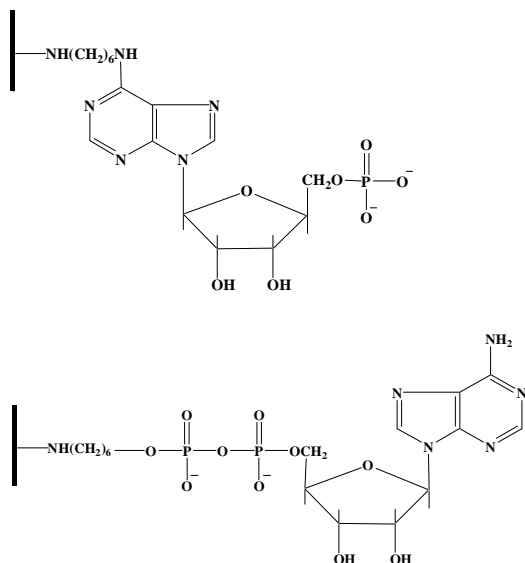
Příklad afinantů: hormony, antibiotika, NK substráty, inhibitory, koenzymy, kofaktory,

Výběr afinantu ovlivňuje:

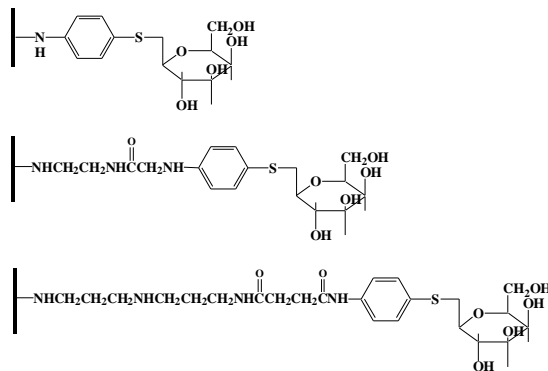
- povaha a mechanismus interakce ligandu s makromolekulou
- afinita ligandu k makromolekule
- způsob připojení afinantu k nosiči
- koncentrace ligandu

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