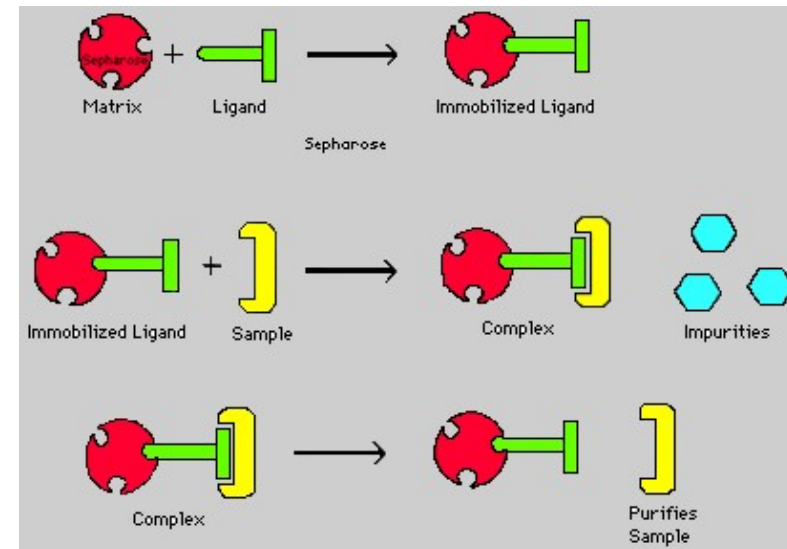
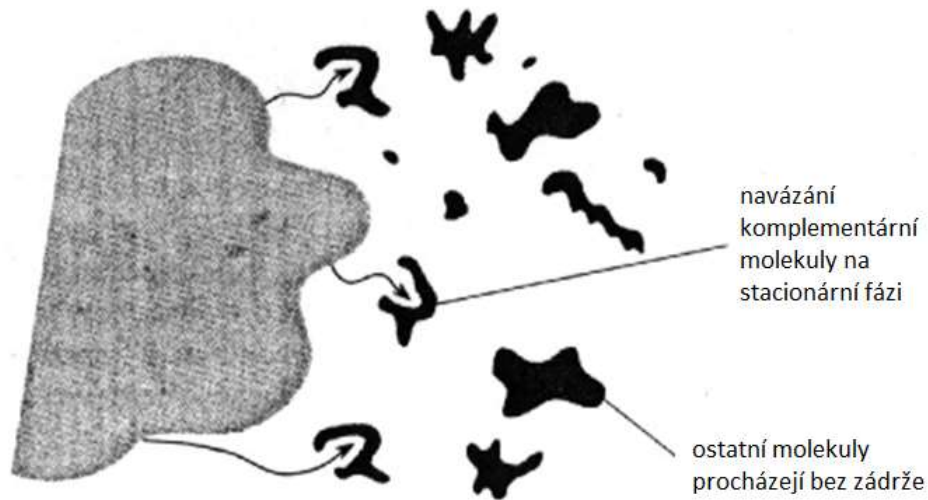


Afinitní Chromatografie (Affinity chromatography, AC)

- 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 afinity 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 celuloze s kovalentně navázaným antigenem

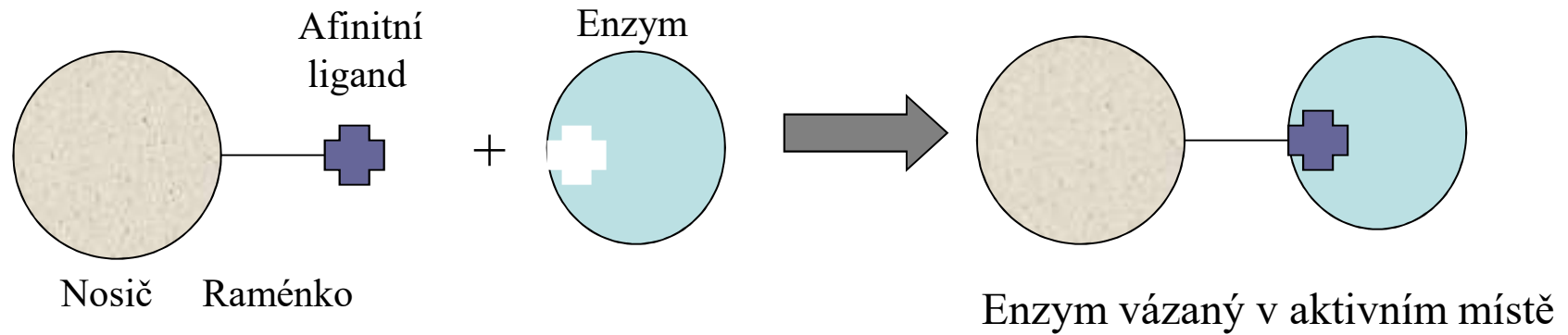
Rozšíření AC: zavedení metod kovalentní vazby afinantu na agarosu (přes N-hydroxysukcinimid, bromkyan CNBr, N,N'-karbodiimid, epoxid, thiol)

Využití AC: izolace

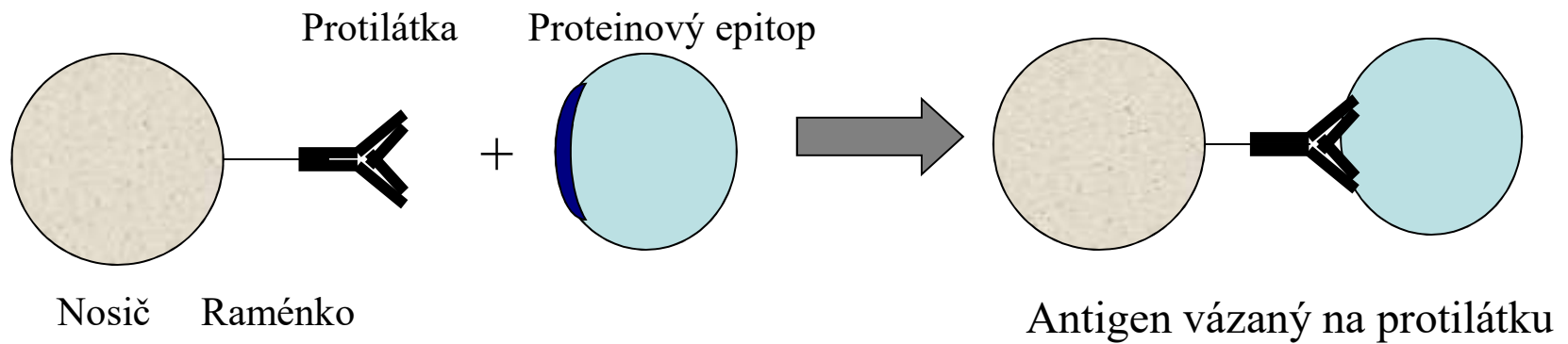
- enzymů pomocí jejich inhibitorů, substrátů nebo koenzymů
- protilátek použitím proteinových antigenů (a naopak)
- lektinů pomocí oligo(poly)sacharidů, glykoproteinů
- DNA pomocí histonů nebo komplementárních nukleových kyselin
- hormonů, toxinů pomocí vazebných proteinů

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, vysoce 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 afinanty vázané na nosič

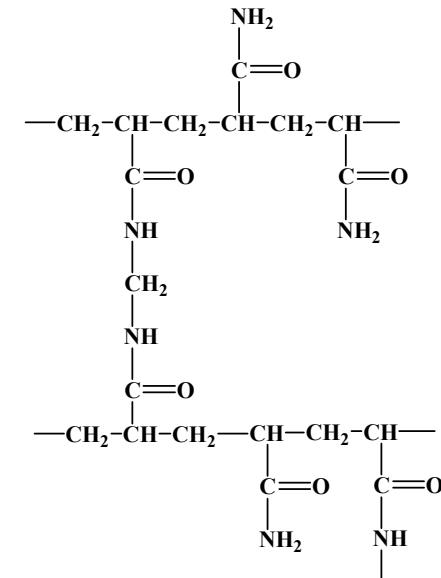
- určeny pro konkrétní bioseparace
- **Con A Sepharose 4B**: agarosa s navázaným konkanavalinem A pro analýzu glykoproteinů

NOSIČE PRO AC

- 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



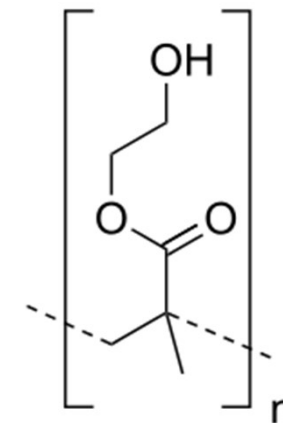
6. Hydroxyalkylmethakrylátové gely

- 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

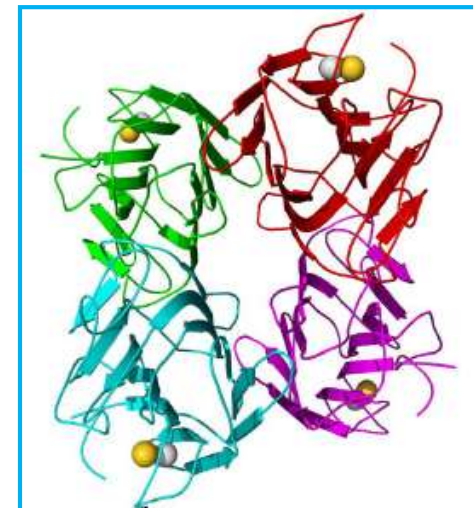
Afinanty pro skupinově specifické separace

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

Afinanty pro monospecifické separace

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

Skupinově specifické afinanty	Specifita
konkanavalin A	glukopyranosyl- a manopyranosylové skupiny
lysin	ribosomální RNA
arginin	serinové proteázy
p-aminobenzamidin	serinové proteázy
heparin	lipoproteiny, steroidní receptory, hormony



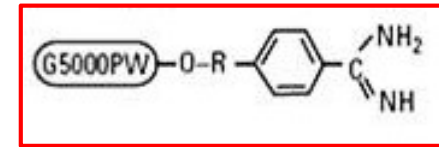
konkanavalin A

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

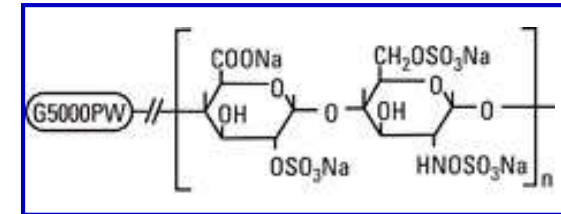


TSKgel Heparin-5PW

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

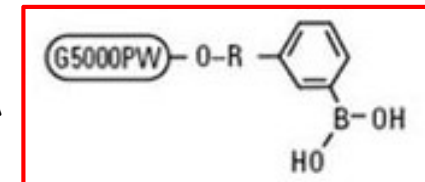


TSKgel Boronate-5PW

Ligand: *m*-aminofenylboronová kyselina

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

Adsorpční kapacita: 40 μ mol sorbitolu na ml gelu

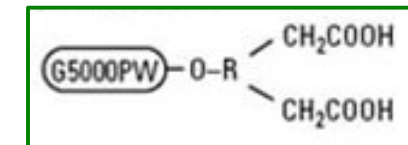


TSKgel Chelate-5PW

Ligand: \sim 20 μ mol iminodioctové kyseliny/mL gelu

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

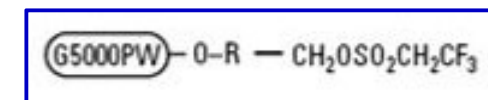
Chelatační kapacita: \sim 20 μ mol Cu^{2+} nebo Zn^{2+} na ml gelu

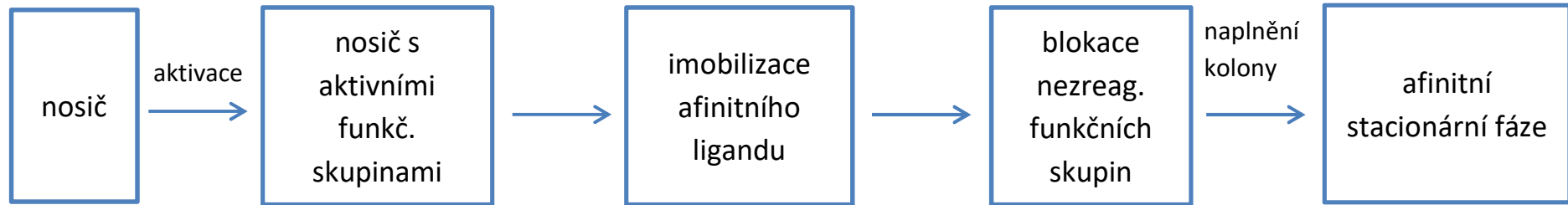


TSKgel Tresyl-5PW

Ligand: 20 μ mol $-\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ /mL gelu

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

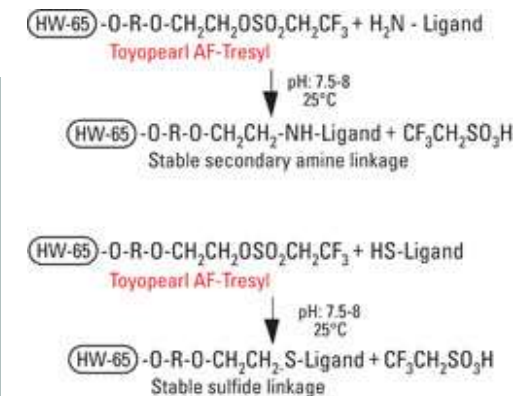
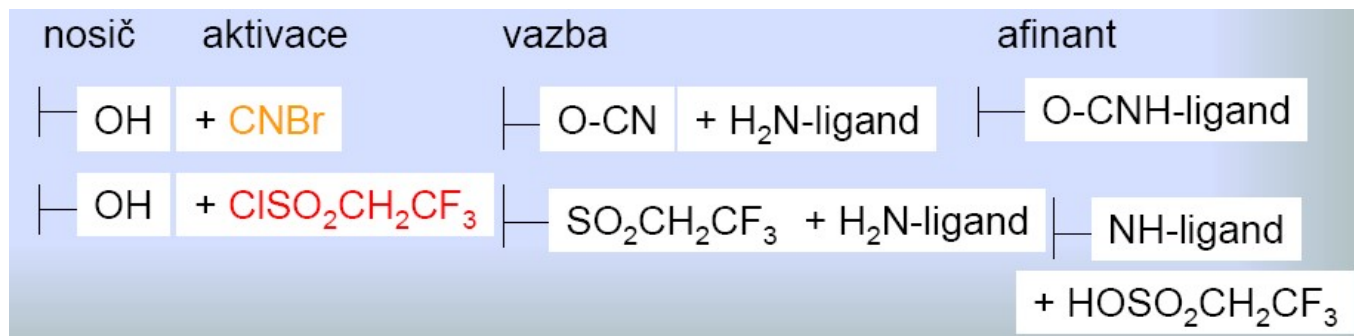




Aktivace nosiče

- 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



R = hydrophilic polymer

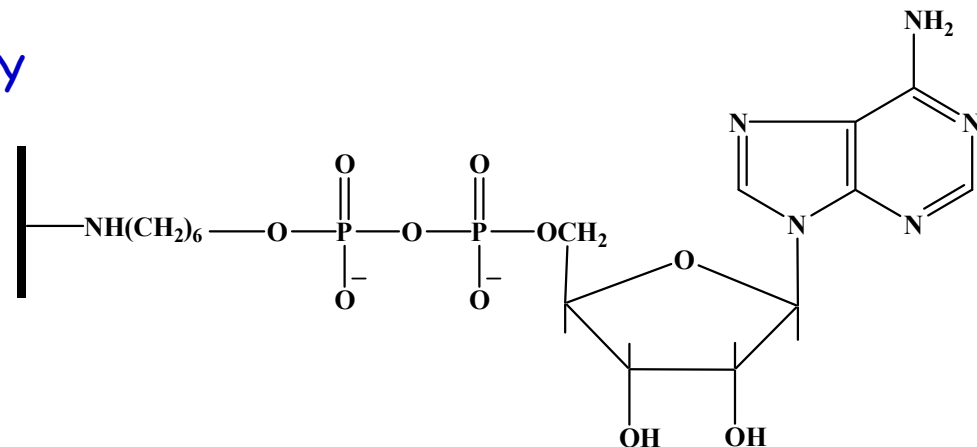
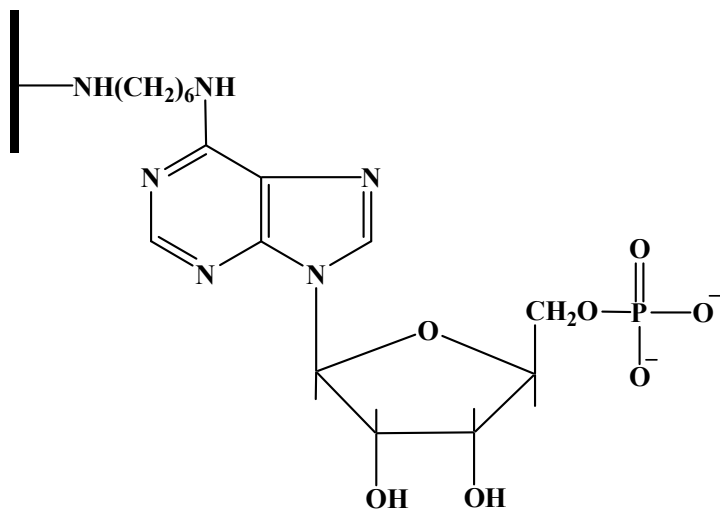
Imobilizace afinantu na nosič

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

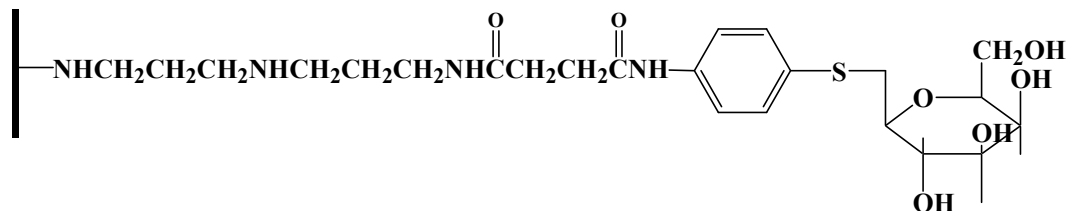
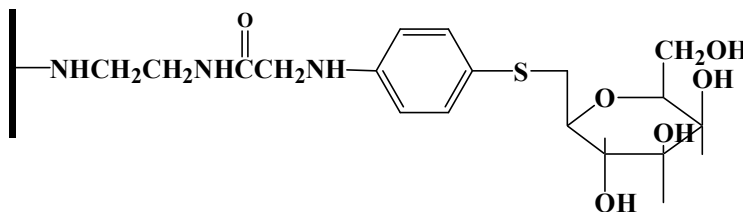
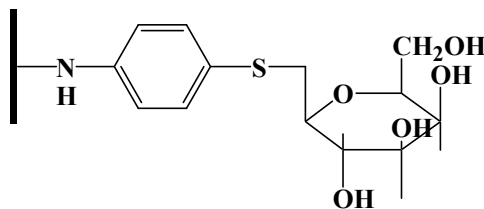
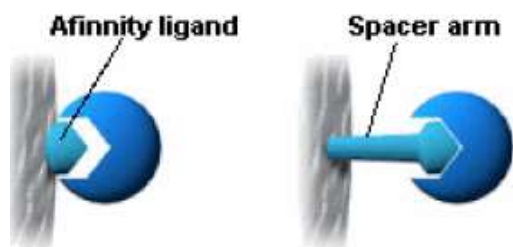
Pro dosažení dostatečné izolace biologicky aktivních látek je důležitá **volba správného místa vazby** afinantu k nosiči a **prostorová přístupnost** afinantu pro makromolekulu.

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.

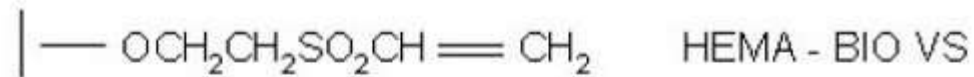
Imobilizace afinantu na nosič

- 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 ($m_{\text{celk.}} - m_{\text{nezreag.}}$)
 - 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

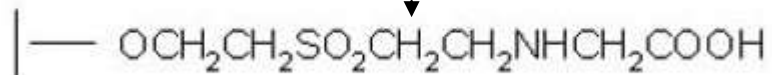
Blokace nezreagovaných funkčních skupin

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

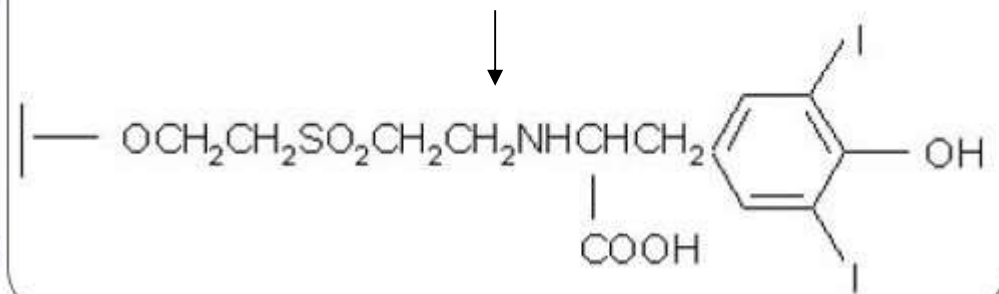
Imobilizace ligandu a blokace zbylých funkčních skupin



HEMA - BIO VS + glycin



HEMA - BIO VS + 3,5 - diiodo-L-tyrosin



3. PODMÍNKY SORPCE A ELUCE

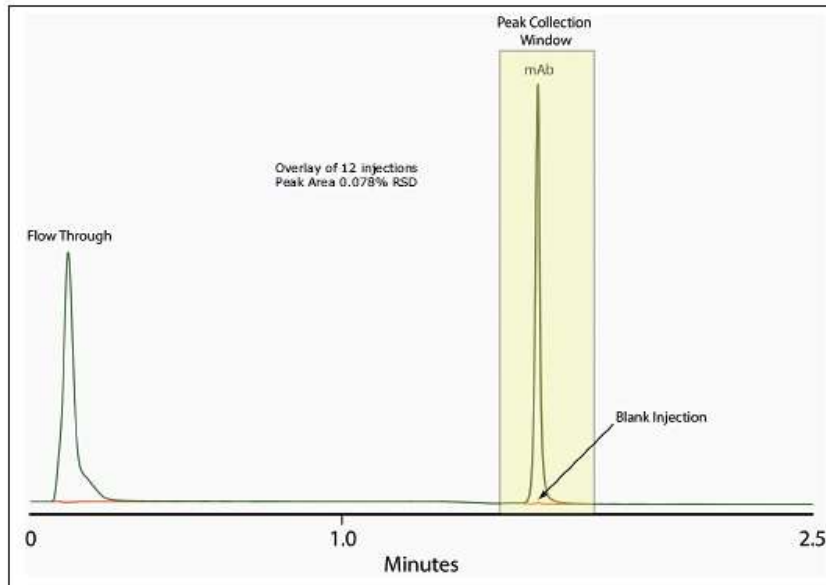
- kondicionace nosiče s afinantem při optimálních podmínkách interakce (iontová síla, pH)
- dávkování vzorku z prostředí o nízké iontové síle
- sorpce izolované látky závisí na intenzitě interakce s afinantem
 - je ovlivněna průtokovou rychlostí a teplotou elučního činidla a dávkovaného vzorku
- eluce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

- 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 kapalinná chromatografie pro kvantifikaci monoklonálních protilátek



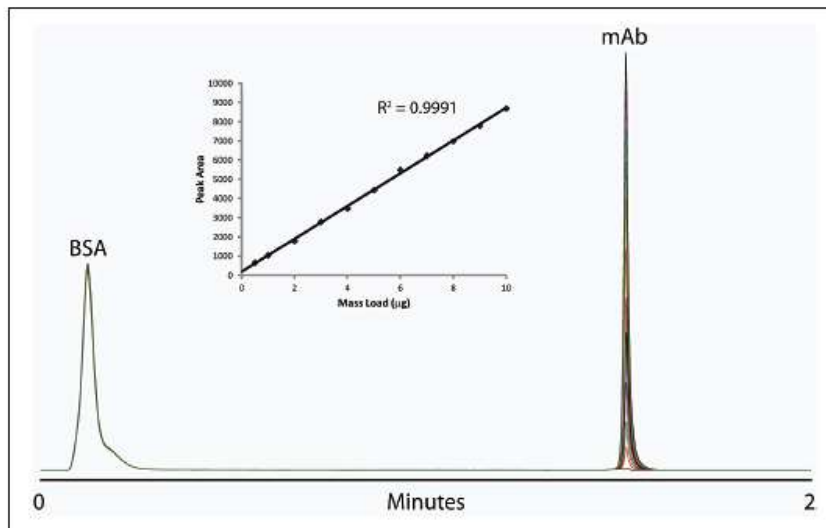
Afinitní chromatografie na koloně s imobilizovaným proteinem A, izolace protilátky ze složité matrice

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

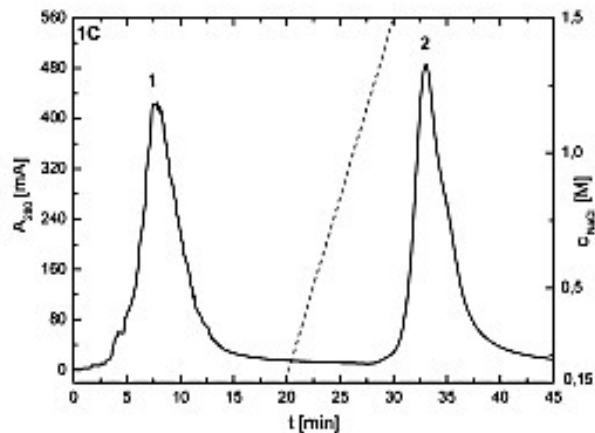
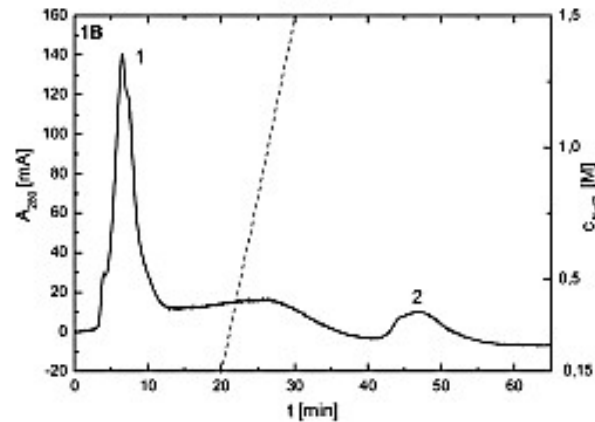
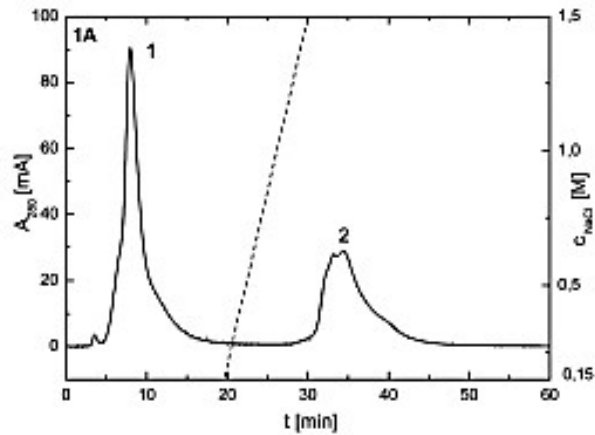


Reverzní chromatografie na krátké koloně, odsolení a zakoncentrování vzorku před MS detekcí

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

MS detekce

Afinitní chromatografie proteinů semenné plazmy



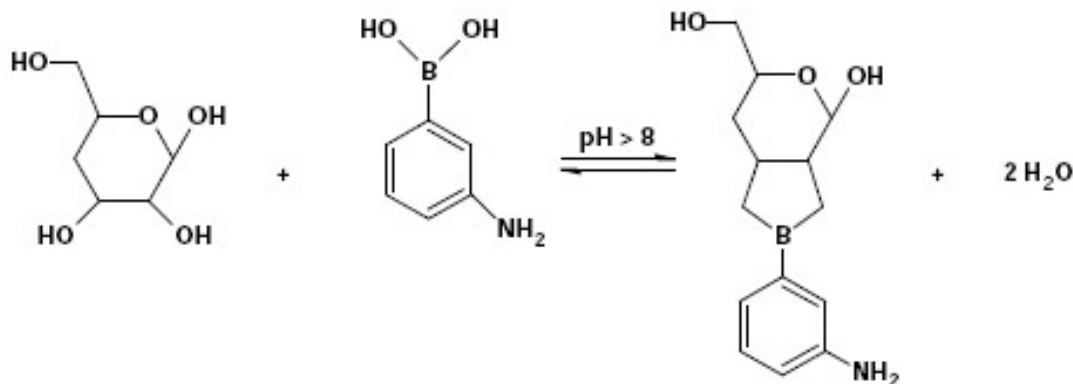
- kolona Toyopearl s heparinem
- proteiny semenné plazmy kančí (A), býčí (B), lidské (C)
- eluce změnou pI (NaCl v $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH 7,5)

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

Analýza vazby ligandu a biopolymeru

Určení disociační konstanty K' komplexu (biopolymer-zakotvený afinant)

- posouzení praktické použitelnosti nosiče se zakotveným afinantem
- vazba na imobilizovaný afinant bývá slabší než na afinant volný
- hodnota K' musí ležet v intervalu 10^{-6} - $5 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³

$$\frac{1}{(V_R - V_0)} = \frac{K'}{(V_0 - V_M) \cdot c_L}$$

- V_M -mrtvý objem kolony
- V_0 -eluční objem nezadržovaného biopolymeru
- V_R -eluční objem studovaného biopolymeru
- c_L -koncentrace vázaného afinantu

Určení disociační konstanty K komplexu (biopolymer-volný afinant)

- vycházíme z předpokladu, že volný i zakotvený afinant se váží na biopolymer kompetitivně (metoda kompetitivní eluce)
- na kolonu s vhodným afinantem nanese biopolymer
- k eluci biopolymeru použijeme určitou koncentraci kompetitivního afinantu c'_L a změříme eluční objem biopolymeru V_R
- provedeme sérii pokusů s různými koncentracemi kompetitivního afinantu c'_L a získáme tak různé eluční objemy V_R

$$\frac{1}{(V_R - V_0)} = \frac{K'}{(V_0 - V_M) \cdot c'_L} + \frac{K' \cdot c_L}{(V_0 - V_M) \cdot c'_L \cdot K}$$

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

