

PURIFIKÁCIA PROTEÍNOV POMOCO CHROMATOGRAFICKÝCH TECHNÍK FPLC

ZDENKO LEVARSKI



UNIVERZITA
KOMENSKÉHO
V BRATISLAVE

Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

Zdenko Levarski

Purifikácia proteínov pomocou chromatografických techník FPLC

Učebné texty

2025

Univerzita Komenského v Bratislave

Recenzent:

Prof. RNDr. Ján Turňa, CSc.

Katedra molekulárnej biológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave

©Mgr. Zdenko Levarski, PhD., 2025

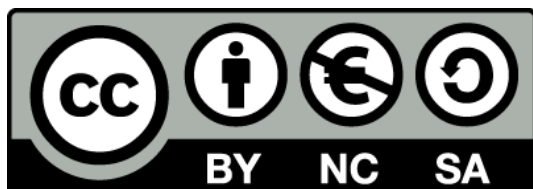
zdenko.levarski@uniba.sk

Katedra molekulárnej biológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave

[Researchgate.com](https://www.researchgate.com)

[ORCID](#)

[SCOPUS](#)



Publikácia je šírená pod licenciou Creative Commons CC BYNC-SA 4.0 (vyžaduje sa: povinnosť uvádzať pôvodného autora diela, len nekomerčné použitie, povinnosť odvodené dielo zdieľať pod rovnakou licenciou ako pôvodné dielo).

Viac informácií o licencií a použití diela: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>

ISBN 978-80-8240-083-3 (PDF)

EAN 9788082400833

Názov: Purifikácia proteínov pomocou chromatografických techník FPLC

Vydavateľ: Centrum vedecko-technických informácií SR, Lamačská cesta 8/A, 840 05 Bratislava

Prvé vydanie

Jún 2025

Obsah

1.	Predhovor a poďakovanie.....	3
2.	Zoznam použitých skratiek.....	4
3.	Úvod.....	5
4.	Produkcia proteínov a príprava vzoriek.....	6
4.1.	Príprava vzorky.....	8
4.2.	Tri fázy Purifikačný stratégie.....	9
4.3.	Určenie rozmedzia stability cieľového proteínu.....	10
4.4.	Príprava na chromatografiu.....	11
5.	FPLC.....	13
5.1.	Charakteristika systému FPLC.....	13
6.	Afinitná chromatografia.....	15
6.1.	Proteíny nesúce afinitné značky.....	15
5.1.1	Protokol.....	20
5.1.2	Riešenie problémov pri IMAC.....	24
5.1.3	GST.....	24
6.2.	Purifikácia protilátok – imunoafinitná chromatografia.....	25
5.1.4	Protokol.....	27
6.3.	Špecifické skupiny biomolekúl.....	28
7.	Iónovo-výmenná chromatografia.....	32
7.1.	Zložky IEX chromatografického média.....	36
7.2.	Protokol.....	37
8.	Gélová filtrácia.....	39
8.1.	Teória.....	41
8.2.	Krivky selektivity a výber chromatografického média.....	44
9.	Chromatografia na základe hydrofóbnej interakcie.....	46
9.1.	Kroky HIC separácie.....	48
10.	Chromatografia na reverznej fáze.....	51
10.1.	Kroky RPC.....	52
11.	Chromatografia s využitím hydroxyapatitu.....	54
12.	Purifikácia náročných proteínov.....	57
12.1.	Membránové proteíny.....	57
12.2.	Multiproteínové komplexy.....	60
12.3.	Inklúzne telieska.....	65
13.	Záver.....	67
14.	Zoznam použitej literatúry.....	68

1. Predhovor a poďakovanie

Motiváciou napísať text zameraný na chromatografickú purifikáciu proteínov bol nedostatok podobne zameranej publikácie, vhodnej pre študentov magisterského stupňa v odboroch molekulárna biológia a biotechnológie. Cieľom je sumarizovať dôležité parametre a technické detaily v zrozumiteľnej forme vhodnej aj ako teoretický podklad pre pokročilé laboratórne cvičenia. Text, aj keď ďaleko od dokonalosti a finálnej formy, predstavuje sumár osobnej skúsenosti s technikami purifikácie rekombinantných proteínov na FPLC prevažne z bakteriálnych expresných systémov a z toho dôvodu je aj jeho zameranie hlavne na spracovanie materiálu získaného týmto spôsobom. K jeho vzniku v najväčšej miere prispela možnosť využívať dostupné prístrojové vybavenia na Katedre molekulárnej biológie už od skorých študentských čias a najmä po nástupe na doktorandské štúdium, voľnosť v experimentovaní v jeho najčistejšej forme bez obmedzení a prísneho riadenia zo strany školiteľov – Doc. Stanislava Stuchlíka a Prof. Jána Turňu, zabezpečenia materiálu a zaujímavých projektov za čo im patrí moje úprimná vďaka. Nechať čerstvého absolventa hrať sa s drahým prístrojom je určite jedným zo spôsobov ako motivovať k experimentálnej práci. Zároveň cítim zodpovednosť v pokračovaní ich školy techník rekombinantných DNA, rozšíreniu a odovzdaníu poznatkov ďalším generáciám študentov a širšiemu etablovaniu moderných biotechnológií v súčasnej spoločnosti. Tento text má byť prvým krokom v tejto ceste.

Autor

2. Zoznam použitých skratiek

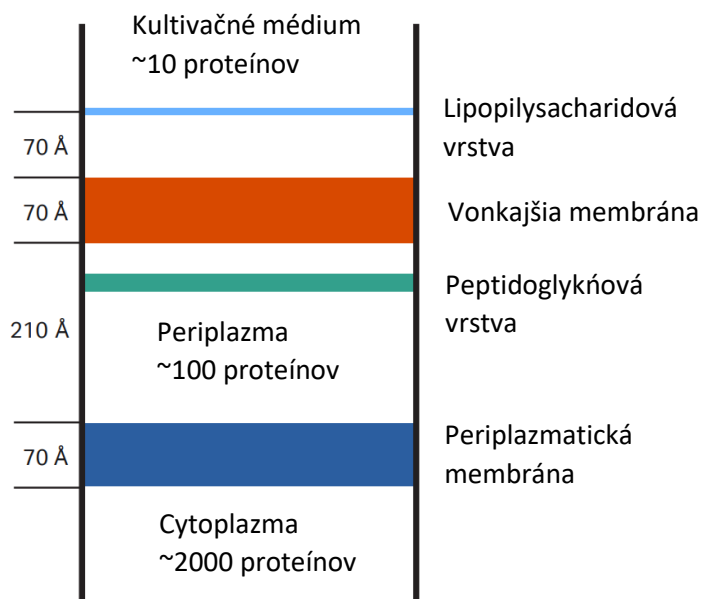
AC	afinitná chromatografia
ANEX	aniónovo-výmenná chromatografia
CATEX	kationovo-výmenná chromatografia
CBP	proteín viažuci kalmodulín
CMC	kritická micelárna koncentrácia
CV	objem kolóny
EDTA	Kyselina etyléndiamínotetraoctová
EGTA	Kyselina etylénglykolbis(2-aminoetyléter)tetraoctová
FPLC	Rýchla proteínová kvapalinová chromatografia
G-CSF	Faktor stimulujúci kolónie granulocytov
GST	glutatión-S-transferáza
HA	hydroxyapatit
HEPES	4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazínétánsulfónová kyselina
HIC	chromatografia na základe hydrofóbnej interakcie
IEX	iónovo-výmenná chromatografia
IMAC	afinitná chromatografia využívajúca imobilizované kovy
MBP	proteín viažuci maltózu
MOPS	kyselina 3-(N-morfolíno)propánsulfónová
PIPES	piperazín-N,N'-bis(2-etánsulfónová kyselina)
RNAi	RNA interferencia
RPC	chromatografia na reverznej fáze
SDS-PAGE	denaturačná elektroforéza proteínov v polyakrylamidovom géle za prítomnosti dodecylsírany sodného
SEC	gélová filtrácia
SNS	systém povrchovej neutralizácie
TEV	vírus leptaných škvŕn tabaku

3. Úvod

Proteíny ako základné funkčné a štrukturálne jednotky každej bunky (a nebunkových organizmov) odjakživa predstavovali cieľ výskumu v biologických vedách. Vývoj techník rekombinatnej DNA umožnil podrobné štúdium charakteristík proteínov, ktoré bolo veľmi obtiažne alebo až nemožné získať z prirodzených zdrojov primárne z dôvodu ich nízkej abundancie. Táto snaha viedla aj k rozvoju pridružených techník ako je aj kvapalinová chromatografia, ktorá našla svoje pevné uplatnenie pri purifikácii proteínov ako z prirodzených zdrojov tak aj tých heterológneho pôvodu. Automatizácia jednotlivých krokov purifikačného a chromatografického procesu ďalej posunula možnosti a dostupnosť proteínov na štúdium alebo aplikáciu v rôznych odvetviach a umožnila získať materiál v dostatočnej čistote a množstve s výraznou redukciou v potrebnom čase. Sofistikácia metód a paralelizácia technologických prístupov umožnila dnešnú aplikáciu proteínov v omických analýzach, základ stále však zostáva v princípoch kvapalinovej chromatografie. Tú pri proteínoch najčastejšie rozdeľujeme do skupín metód využívajúcich konkrétnu medzimolekulovú interakciu na selektívne oddelenie cieľového proteínu z komplexnej zmesi. Pri afinitných metódach využívame špecifickú vlastnosť a interakciu molekúl (napr. avidín-biotín, histidín – kov, protilátka – antigén a množstvo iných), iónovo-výmenné metódy sa spoliehajú na iónové interakcie povrchu proteínu a chromatografického média, molekulárne sitá využívajú póry na separáciu na základe hydrodynamického tvaru proteínov alebo multimodálne prístupy ako hydroxyapatit, obsahujúce rôzne funkčné skupiny a umožňujúce viacúrovňovú separáciu proteínov na jednej kolóne. Cieľom každej z uvedených a mnohých ďalších chromatografických metód je pomocou definovaných krokov v kontrolovanom prostredí zaistiť účinnú separáciu proteínov vo vzorke s dôrazom na izoláciu konkrétneho cieľového proteínu. Rýchla proteínová kvapalinová chromatografia (FPLC), ako sa nazýva často využívaný spôsob aplikácie kvapalinovej chromatografie na purifikáciu proteínov má za cieľ ponúknuť možnosť automatizácie jednotlivých krokov a sprístupniť variabilitu nastavení s cieľom optimalizácie purifikačného procesu vhodného na aplikáciu biologických vzoriek. Cieľom tohto textu je priblížiť základné koncepty najčastejšie využívaných metód chromatografickej purifikácie proteínov pomocou automatizovaných FPLC systémov.

4. Produkcia proteínov a príprava vzoriek

Biologický systém nadprodukcie proteínov sa typicky skladá z vektora, obsahujúceho vhodný promótor, gén cieľového proteínu a regulačné sekvencie a hostiteľského organizmu, schopného produkovať rekombinantný proteín na základe informácie z vektora. Ten môže v hostiteľskom organizme zostať vo forme voľnej DNA (plazmid v prokaryotických organizmoch) alebo sa integrovať do genómu hostiteľa (najčastejšie pri eukaryotoch). Množstvo vektorov je dostupných vo forme komerčných produktov (napr. pET vektory pre kmene *E. coli* nesúce DE3 lyzogén) ale súčasne *in silico* nástroje v kombinácii s dostupnou syntézou DNA umožňujú efektívny dizajn a konštrukciu vektorov na mieru konkrétnej aplikácie. Pri výbere alebo dizajne vektora sa zohľadňuje hostiteľ, v ktorom bude vektor použitý (*E. coli*, kvasinky, cicavčie bunky), možnosti fúzie cieľového génu s afinitnou alebo solubilizačnou značkou (His-tag, GST-tag, SUMO-tag, tioredoxín), typ expsie (cytoplazmatická, periplazmatická, membránové ukotvenie – display, sekrécia do média) a spôsob selekcie pozitívnych klonov (auxotrofia, rezistencia na antibiotiká, neutrálna selekcia). Všetky uvedené faktory predstavujú esenciálnu kvalitu v ďalšom spracovaní biomasy s cieľom izolácie konkrétnych proteínov a ich výber predstavuje základ produkčného bioprocessu, jeho škálovateľnosť a následne aj potenciálnu ekonomiku výrobného procesu.



Obr. 1 Počet proteínov identifikovaný v kompartmentoch buniek *E. coli*

Tab. 1 Porovnanie základných vlastností expresných systémov rôzneho pôvodu

Processing	Bacteria	Yeast	Insect cells	Mammalian cells
Inclusion bodies	+/-	(+)/-	-	-
Secretion	+/-	+ ¹	+	+
Glycosylation	-	+ ²	+	+
Proteolytic cleavage	+/-	+/-	-	-
Other post translational modifications	-	+ ³	+	+

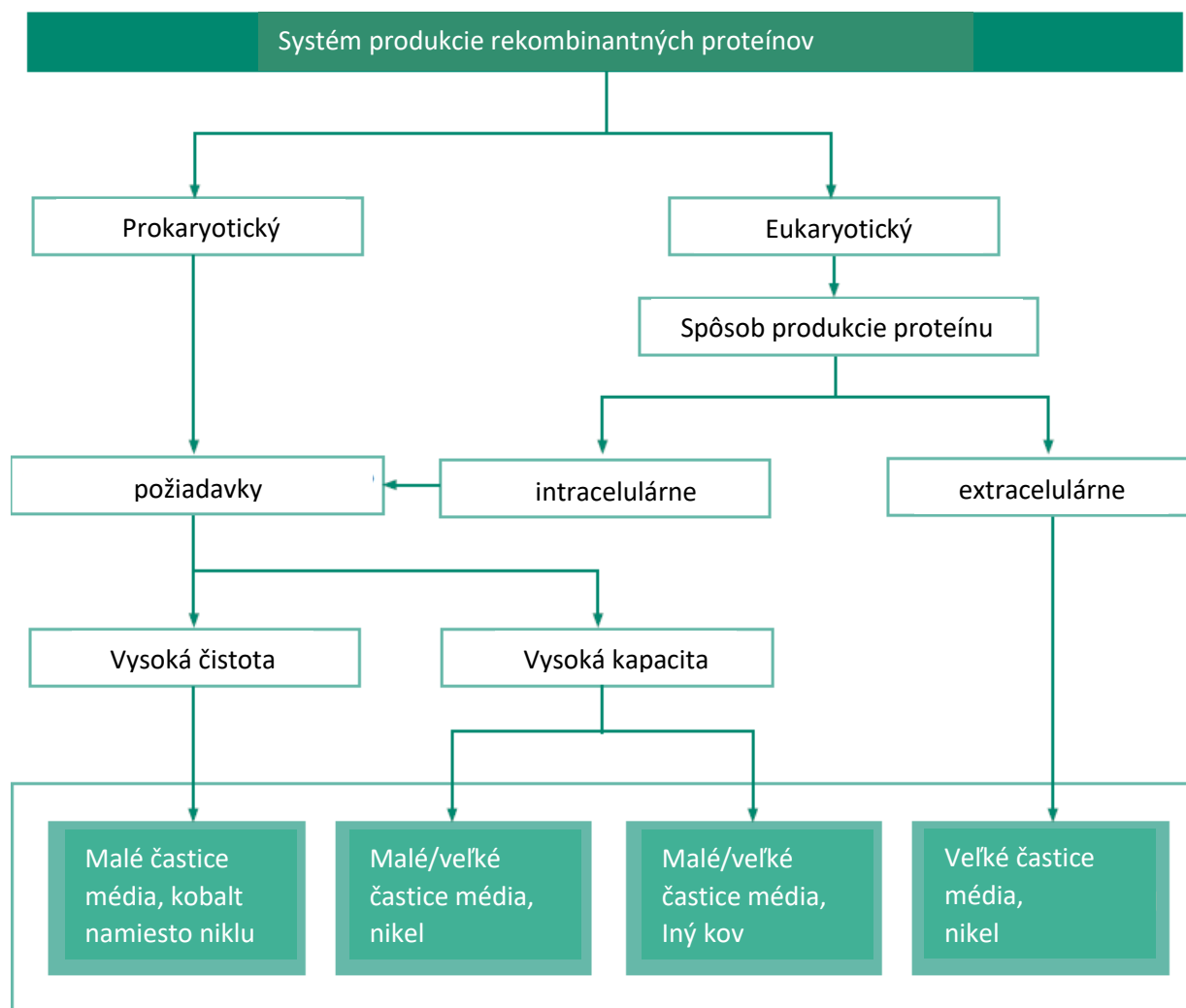
+ Yes

- No

¹ Constructs are often prepared to allow secretion of the protein. This eliminates the need for cell lysis, which requires more powerful methods for yeast than for *E. coli*.

² Yeast give more extensive glycosylation than insect cells and mammalian cells; this is a drawback of heterologous expression in yeast.

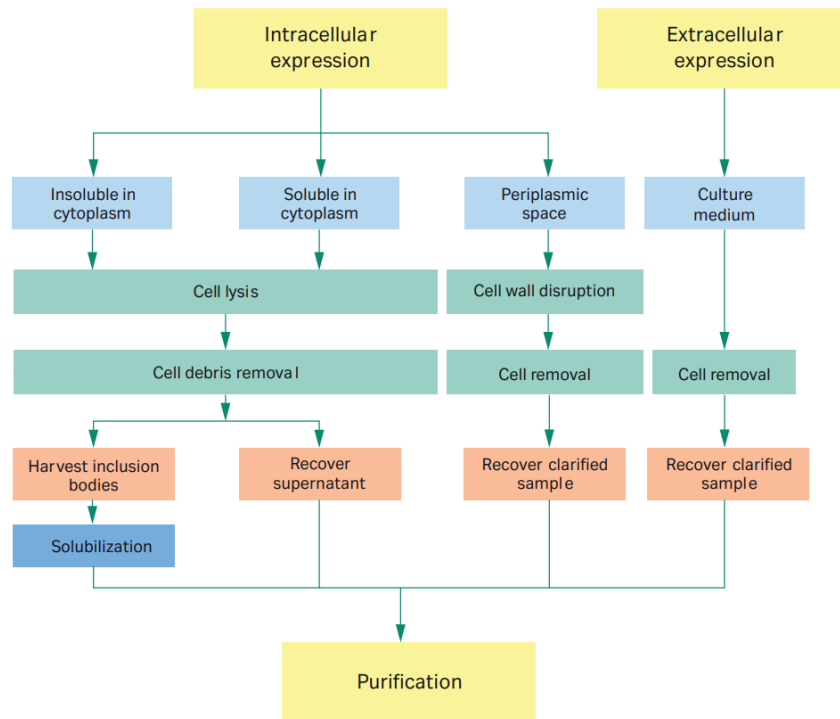
³ Yeast lack some functions of post-translational modifications that exist in higher eukaryotes.



Obr. 2 Schéma výberu IMAC chromatografického média na základe zdroja proteínu

4.1. Príprava vzorky

Po úspešnej optimalizácii kultivačného a produkčného procesu nastáva potreba nájsť vhodné riešenie pre celý tzv. „downstream“ proces, tj. spracovanie biomasy, homogenizáciu buniek a voľbu chromatografických krokov vedúcich k odstráneniu kontaminantov a získaniu cieľového proteínu v čo najvyššej čistote.



Obr. 3 Prehľadná schéma krokov prípravy vzoriek pred purifikáciou

Prvým krokom pri dizajne purifikačných postupov je zodpovedanie na otázky: Na čo bude použitý výsledný produkt? Z akého materiálu sa bude cieľový proteín izolovať? Akú čistotu je potrebné dosiahnuť? V akom množstve sa nachádza cieľový proteín vo vzorke?

Okrem kombinácie chromatografických techník, väčšina purifikačných postupov si vyžaduje viacero krokov nevyhnutných na úpravu vzorky pri prechodoch medzi jednotlivými technikami. Tie medzikroky predstavujú najčastejšie výmenu tlmivého roztoku pomocou dialýzy alebo ultrafiltrácie.

Použitie purifikovaných proteínov

Na základe informácie o použití konkrétneho proteínu sa navrhuje postup jeho purifikácie. Na terapeuticky a hlavne intravenózne používané proteíny sa kladú tie najvyššie nároky z hľadiska čistoty, obsahu neproteínových kontaminantov (napr. imunogénne polysacharidy z bakteriálnych membrán - endotoxíny) a ekvivalencii výslednej štruktúry so štruktúrou natívneho proteínu. Naopak, enzýmy

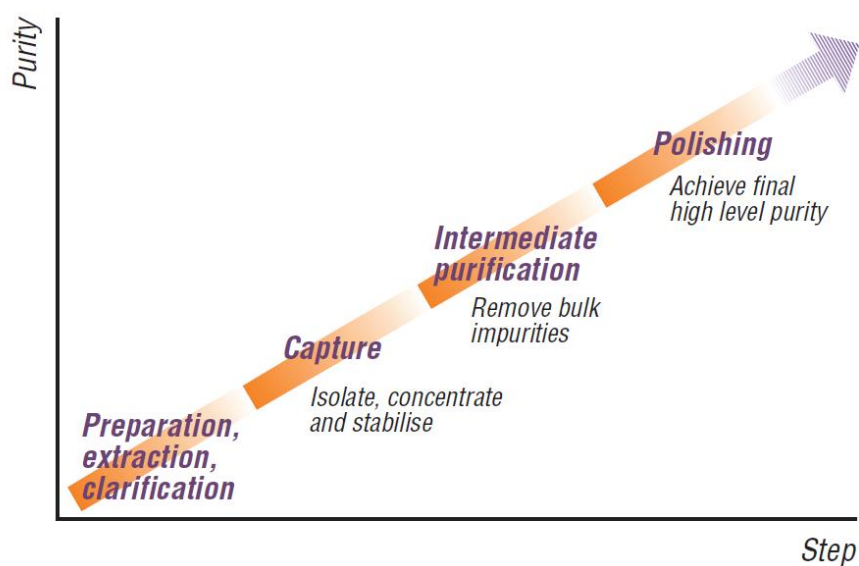
používané na biotransformácie aromatických látok sa často používajú len v komplexnej zmesi – bunkovom lyzáte, čo výrazne znižuje výrobné a prevádzkové náklady.

Tab. 2 Príklady úrovni prečistenia proteínu

Extrémne vysoká >99%	Terapeutické použitie, <i>in vivo</i> štúdie
Vysoká 95-99%	Proteínová kryštalografia, fyzikálno-chemická charakterizácia
Dostatočná <95%	Charakterizácia enzymatickej aktivity, antigény na produkciu protilátok, N-terminálne sekvenovanie

4.2. Tri fázy purifikačnej stratégie

Purifikačný proces je možné rozdeliť do troch fáz – zachytenie, prečistenie a leštenie. V prvej fáze ide primárne o zachytenie, zakoncentrovanie a stabilizáciu cieľového proteínu. V druhej fáze sa odstraňuje väčšina nečistôt ako sú napr. iné proteíny, nukleové kyseliny alebo endotoxíny. V poslednej, tzv fáze leštenia, dochádza k odstráneniu zvyškov nečistôt v stopových koncentráciách alebo príbuzných látok čím sa docieli vysoká čistota purifikovaného proteínu.



Obr. 4 Fázy purifikácie proteínov

Tab. 3 Vhodnosť jednotlivých chromatografických techník vo vzťahu k fáze purifikácie proteínov

Typical characteristics			Purification phase			Conditions	
Method	Resolution	Capacity	Capture	Intermediate	Polishing	Sample start conditions	Sample end conditions
AC	+++ or ++	+++ or ++	+++	++	+	Various binding conditions	Specific elution conditions
IMAC	+++	++	+++	++	+	Low concentration of imidazole, pH > 7.0	High concentration of imidazole, 500 mM NaCl, pH > 7.0
SEC	++	+	+		+++	Most conditions acceptable, limited sample volume	Buffer exchange possible, diluted sample
IEX	+++	+++	+++	+++	+++	Low ionic strength. pH depends on protein and IEX type	High ionic strength or pH changed
HIC	+++	++	++	+++	+++	High ionic strength, addition of salt required	Low ionic strength
RPC	+++	++		+	++	Ion-pair reagents and organic modifiers might be required	Organic solvents (risk for loss of biological activity)
MMC	+++	++	++	+++	+++	Various binding conditions	High ionic strength and/or pH change

4.3. Určenie rozmedzia stability cieľového proteínu

Aby sa predišlo inaktivácii, denaturácii alebo štrukturálnemu poškodeniu cieľového proteínu, nevyhnutné je určiť rozmedzie podmienok, v ktorých sa zachová jeho prirodzená aktivita a stabilita. Z dostupných databáz a známej aminokyselinovej sekvencie získame informácie o veľkosti, izoelektrickom bode (pI) alebo hydrofobicite. Na základe týchto údajov vieme určiť základné rozmedzie pH tlmivých roztokov a potrebnej iónovej sile aby sa zabezpečila solubilita počas purifikačných krokov. Zhrnutie v Tab 4.

Tab. 4 Často používané extrakčné metódy

Extraction process	Typical conditions	Comment
Gentle		
Cell lysis (osmotic shock)	2 volumes water to 1 volume packed prewashed cells	Lower product yield but reduced protease release
Enzymatic digestion	Lysozyme 0.2 mg/mL, 37°C, 15 min.	Lab scale only, often combined with mechanical disruption
Moderate		
Grinding with abrasive, e.g., glass beads	Add glass beads to prewashed cells, vortex, centrifuge, repeat up to five times, pooling supernatants	Physical method. Chemical conditions are less important for cell lysis but may be important for subsequent removal of cell debris and purification steps.
Freeze/thaw	Freeze cells, thaw, resuspend pellet by pipetting or gentle vortexing in room-temperature lysis buffer. Incubate, centrifuge, retain supernatant.	Several cycles
Vigorous		
Ultrasonication or bead milling	Follow equipment instructions	Small scale; release of nucleic acids may cause viscosity problems (may add DNase to decrease viscosity); inclusion bodies must be resolubilized.
Manton-Gaulin homogenizer	Follow equipment instructions	Large scale
French press	Follow equipment instructions	Lab scale
Fractional precipitation	See Appendix 5	Precipitates must be resolubilized

4.4. Príprava na chromatografiu

Vzorky, ktoré by mali byť použité v chromatografických zariadeniach, by mali v ideálnom prípade byť číre a bez prítomnosti zrazenín (špeciálne typy kolón a chromatografických nosičov umožňujú použiť aj tzv. „crude“ – neprečistených vzoriek). Odstránenie nesolubilnej časti preparátu je základný krok predchádzajúci chromatografii, ktorý zaisťuje hladký priebeh purifikačného procesu, zabraňuje upchatiu kolóny a predlžuje životnosť chromatografického média. Odstránenie precipitátu zo vzorky sa najčastejšie dosahuje centrifugáciou alebo filtráciou.

V niektorých prípadoch si postup vyžaduje aj prídanie stabilizačných látok alebo inhibítorov proteáz na udržanie cieľového proteínu v optimálnom stave, kvalite a množstve.

Tab. 5 Vlastnosti proteínov a ich vplyv na purifikačnú stratégiu

Sample and target protein properties	Influence on purification strategy
Temperature stability	Need to work rapidly at lowered temperature
pH stability	Selection of buffers for extraction and purification Selection of conditions for ion exchange, affinity or reversed phase chromatography
Organic solvents stability	Selection of conditions for reversed phase chromatography
Detergent requirement	Consider effects on chromatographic steps and the need for detergent removal. Consider choice of detergent.
Salt (ionic strength)	Selection of conditions for precipitation techniques, ion exchange and hydrophobic interaction chromatography
Co-factors for stability or activity	Selection of additives, pH, salts, buffers
Protease sensitivity	Need for fast removal of proteases or addition of inhibitors
Sensitivity to metal ions	Need to add EDTA or EGTA to buffers
Redox sensitivity	Need to add reducing agents
Molecular weight	Selection of gel filtration media
Charge properties	Selection of ion exchange conditions
Biospecific affinity	Selection of ligand for affinity medium
Post translational modifications	Selection of group-specific affinity medium
Hydrophobicity	Selection of medium for hydrophobic interaction chromatography

Pred konkrétnym chromatografickým krokom je najčastejšie potrebné vzorku dostať do vhodného prostredia z hľadiska udržania stability proteínu a zachovania efektivity separácia na základe charakteristiky použitého chromatografického média. Tento krok sa často označuje ako „odsolenie“ alebo „výmena tlmivého roztoku“ a môže sa vykonať pomocou dialýzy, diafiltrácie, odsolovacej kolóny alebo zahustenia a následného nariedenia vzorky cieľovým roztokom.

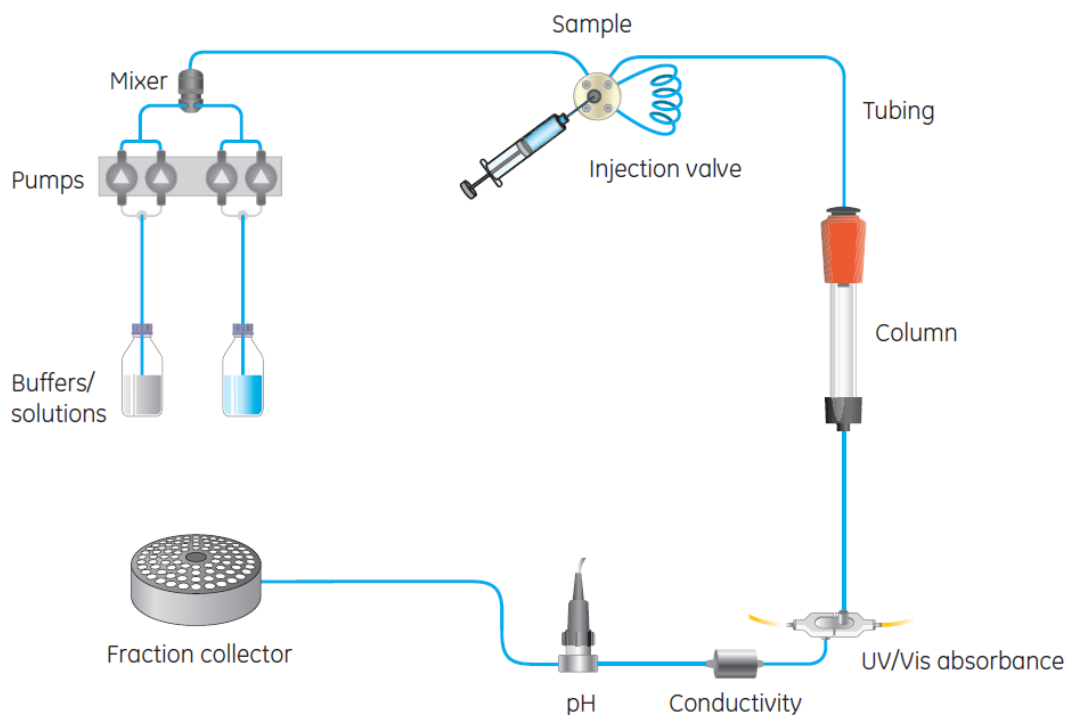
Typickým krokom pred samotnou chromatografiou je aj vizuálna analýza – confirmácia prítomnosti cieľového proteínu a orientačná kvantifikácia pomocou elektroforézy, najčastejšie SDS-PAGE alebo v prípade nižšej koncentrácie cieľového proteínu aj Western blot. Relatívna kvantifikácia je potom možná pomocou denzitometrickej analýzy gélov a prepočtu na základe merania celkového obsahu proteínov vo vzorke pomocou Bradfordovej alebo Lowryho metódy stanovenia proteínov, príp. pomocou merania absorbancie pri vlnovej dĺžke 280 nm.

5. FPLC

Automatizácia proteínovej purifikácie značne uľahčila ako bežné laboratórne postupy tak aj veľkoobjemové priemyselné aplikácie. Začiatkom 80-tych rokov, priekopnícka švédka firma Pharmacia ako prvá použila skratku FPLC (z ang. fast protein liquid chromatography) pri propagácii automatizovaných systémov zameraných na analýzu a izoláciu proteínov. S rozširujúcou sa ponukou matric sa aj aplikácia FPLC rozšírila na iné typy molekúl, ako napr. lipidy alebo sacharidy. V nasledovnom texte sa zameriame predovšetkým na proteínovú chromatografiu a systémy rady ÄKTA (v súčasnosti predávaných pod značkou Cytiva).

5.1. Charakteristika systému FPLC

Základná konfigurácia systému zahŕňa nasledovné komponenty: dve, najčastejšie piestové, pumpy s vysokou presnosťou, riadiacu jednotku, chromatografickú kolónu, detektory a sondy (UV, pH, konduktivita) a frakčný zberač.



Obr. 5 FPLC schéma so základnými komponentami

Dve pumpy umožňujú zmiešavanie dvoch (a v kombinácii s vhodným ventíлом aj viacerých) roztokov ako aj tvorbu lineárneho gradientu, ktorý je jedným z najdôležitejších krokov počas optimalizácie purifikačného procesu. Dôležitým faktorom je aj výber zmiešavača, objem ktorého určuje zvolená rýchlosť prietoku v systéme. Jeho hlavnou úlohou je zabezpečiť premiešanie roztokov počas formovania gradientu a zabrániť výkyvom v sledovaných parametroch. Okrem systémových púmp, pokročilejšie FPLC systémy majú aj tretiu, vzorkovú pumpu, ktorá umožňuje naniesenie veľkého objemu vzorky priamo na kolónu, tj. bez použitia vzorkových slučiek, ktoré je potrebné manuálne naplniť vzorkou a ktoré sú limitované vopred definovaným objemom. Sondy umožňujú monitorovanie množstva proteínov (absorbancia v UV oblasti),

pH prostredia a jeho konduktivitu, dva dôležité parametre roztokov používaných na purifikáciu proteínov. Posledným článkom FPLC usporiadania je zberač frakcií, čo je zariadenie, ktoré separuje jednotlivé frakcie purifikovanej vzorky podľa vopred definovaných parametrov. Môže ísť o jednoduché externé zariadenie separujúce frakcie na základe definovaného objemu alebo pokročilé zariadenie s možnosťou chladenia a rozšírených nastavení separačných parametrov (intenzita absorpcie, veľkosť a šírka píku, sklon krivky píku a iné).

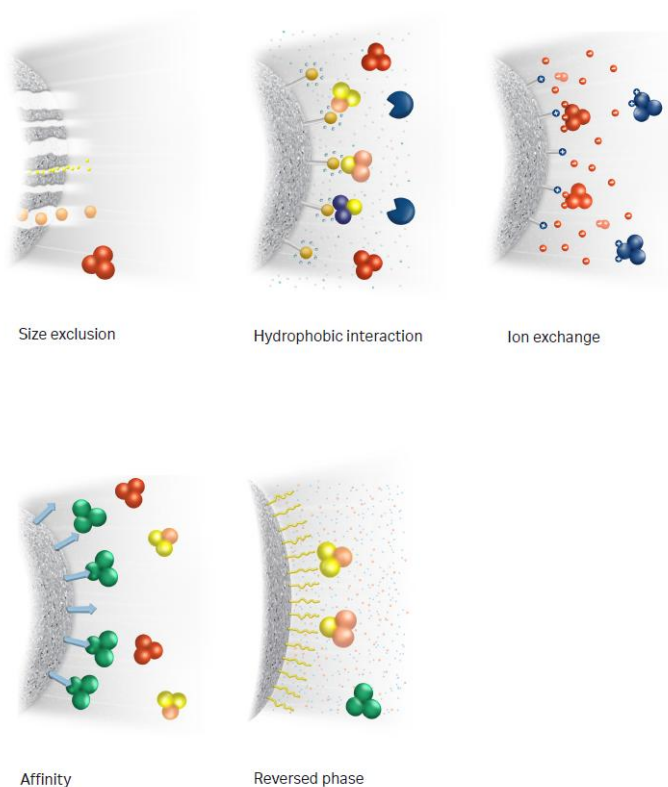


Fig 1.1. Separation principles in chromatographic purification.

Obr. 6 Princíp separácie v jednotlivých chromatografických technikách

Tab. 6 Typická vlastnosť využitá v konkrétnej metóde

Property	Technique
Biorecognition (ligand specificity)	Affinity chromatography (AC)
Charge	Ion exchange chromatography (IEX)
Size	Size exclusion chromatography (SEC), also called gel filtration (GF)
Hydrophobicity	Hydrophobic interaction chromatography (HIC) Reversed phase chromatography (RPC)

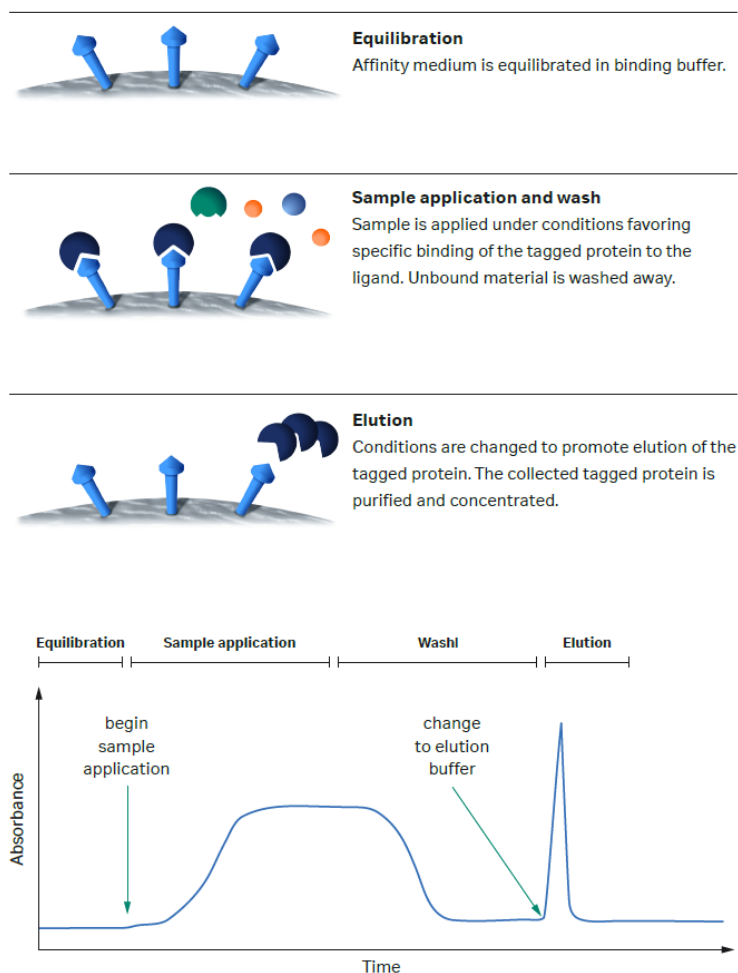
6. Afinitná chromatografia

Pri afinitnej chromatografii môžeme na základe využitej charakteristiky biomolekuly rozdeliť do troch skupín:

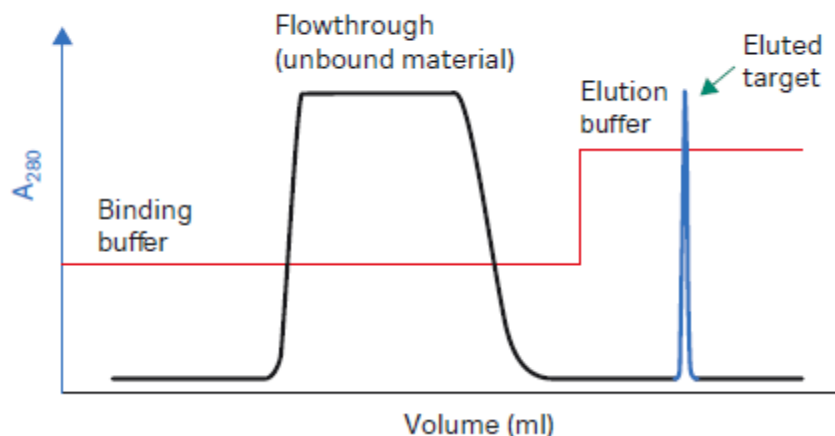
1. Proteíny nesúce afinitné značky („tagy“) umožňujúce afinitnú interakciu
2. Protilátky
3. Špecifické skupiny biomolekúl

6.1. Proteíny nesúce afinitné značky

Pri rekombinantných proteínoch sa afinitnej značke venujeme už pri dizajne ich expresného systému – výbere vhodného vektora, umožňujúceho klonovanie priamo do N- alebo C- koncovej fúzie s konkrétnou značkou. Najznámejšou a najčastejšie používanou značkou je bezpochýb histidínová kotva - „His-tag“, sekvencia 6 až 12 po sebe idúcich histidínových zvyškov vykazujúcich silnú afinitu k dvojmocným iónom kovov (najčastejšie Ni^{2+} alebo Co^{2+}). Tieto kovy sú chelátované vhodným ligandom (iminodiacetát alebo nitrilotriacetát) na povrchu chromatografického média (napr. sefaróza).



Obr. 7 Všeobecný postup purifikácie rekombinantných proteínov obsahujúcich his-tag



Obr. 8 Typický chromatogram metódy IMAC

Okrem histidínovej kotvy je dostupných a popísaných množstvo afinitných značiek umožňujúcich efektívnu purifikáciu rekombinantných proteínov s využitím špeciálnych chromatografických médií. Také sú napríklad glutation-S-transferáza (GST) alebo maltózu viažuci proteín (MBP).

Tab. 7 Výhody a nevýhody purifikácie proteínov obsahujúcich a neobsahujúcich afinitnú značku

Advantages	Disadvantages
Tagged proteins Simple purification is possible using AC. Generic two-step purification protocols can often be set up for lab-scale protein production platforms. Detection of the tag instead of the target protein moiety allows for a generic detection method in, e.g., protein production platforms for structural biology Solubility and stability can be improved Targeting information can be incorporated into a tag A marker for expression is provided Some tags allow strong binding to chromatography media in the presence of denaturants, making on-column refolding possible	Tag may interfere with protein structure and affect folding and biological activity If tag needs to be removed, cleavage may not always be achieved at 100%, and sometimes amino acids may be left¹
Untagged proteins Tag removal is not necessary	Purification and detection not as simple Problems with solubility and stability may be difficult to overcome, reducing potential yield

¹ The effectiveness of proteases used for cleavage may be decreased by substances, for example, detergents, in the protein preparation or by inappropriate conditions.

Tab. 8 Charakteristiky bežne využívaných afinitných značiek

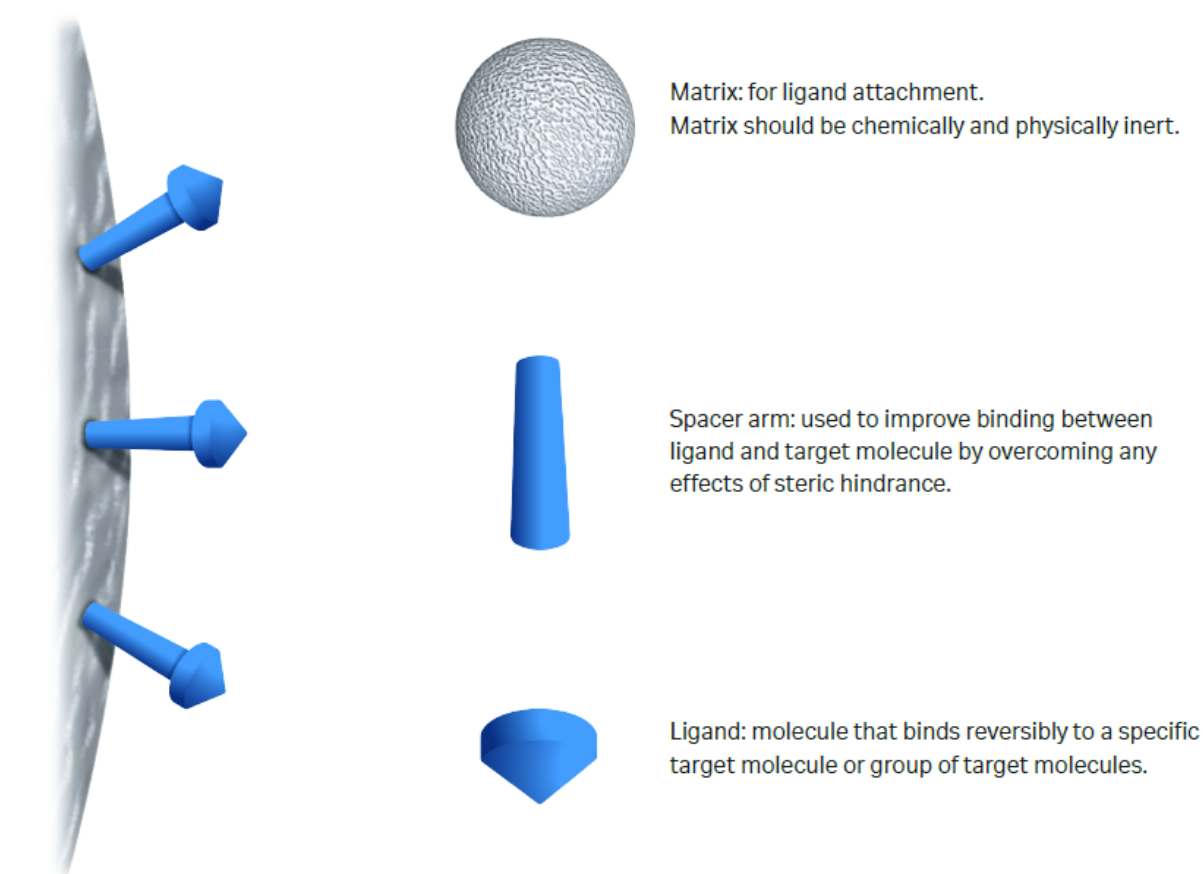
Tag-specific characteristics	Histidine tag	GST tag	MBP tag
Compatible expression systems	Can be used in any expression system	Can be used in any expression system	Can be used in any expression system
Metabolic burden to host	Low metabolic burden to expression host	High metabolic burden to expression host	High metabolic burden to expression host
Yield after purification	Purification procedure gives high yields	Purification procedure gives high yields	Purification procedure gives high yields
Purity in a single step	Allows relatively high purity in a single purification step. Optimization of washing and elution conditions is recommended when extra high purity is needed in a single step.	Allows extremely high purity in a single purification step	Allows extremely high purity in a single purification step
Effect on solubility of expressed protein	Does not enhance solubility.	May increase the solubility of the expressed protein	May increase the solubility of the expressed protein
Purification products for different scales	Selection of purification products available for any scale	Selection of purification products available for any scale	Selection of purification products available for any scale
Affinity tag removal	Small tag may not need to be removed (e.g., tag is weakly immunogenic so target protein can be used directly as an antigen for immunization). Site-specific proteases ¹ enable cleavage of tag if required. Tobacco Etch Virus (TEV) protease is often used to cleave off histidine tags. Note: Enterokinase sites that enable tag cleavage without leaving behind extra amino acids are preferable.	Site-specific protease (PreScission™ Protease) ¹ enables highly specific cleavage at 4°C. This protease is also easily removed because it is itself GST-tagged (see Chapter 5).	Protease cleavage site can be engineered into the tagged protein
Tag detection	Histidine tag is easily detected using anti-histidine based immunoassay	GST tag is easily detected using a GST activity assay or anti-GST-based immunoassay	Antibodies for detection available
Ease of purification	Simple purification. Note: Imidazole may cause precipitation in rare cases. Buffer exchange to remove imidazole may be necessary (see Chapter 11).	Simple purification. Very mild elution conditions minimize risk of damage to structure and function of the target protein. Buffer exchange may be desirable to remove reduced glutathione used for elution (see Chapter 11).	Simple purification. Very mild elution conditions minimize risk of damage to structure and function of the target protein. Buffer exchange may be desirable to remove maltose used for elution (see Chapter 11).
Elution conditions	Mild elution conditions	Very mild elution conditions	Very mild elution conditions
Suitability for dual tagging	Can be used for dual tagging to increase purity and to secure full-length polypeptides if the tags are placed at the N- and C-terminals Dual tagging in combination with Strep-tag II minimizes effects on the target protein due to the small size of both tags	Can be used for dual tagging to increase purity and to secure full-length polypeptides if the tags are placed at the N- and C-terminals	Can be used for dual tagging to increase purity and to secure full-length polypeptides if the tags are placed at the N- and C-terminals
Suitability for purification under denaturing conditions	Purification can be performed under denaturing conditions if required. Allows on-column refolding.	Cannot be used under denaturing conditions	Cannot be used under denaturing conditions
Effect on protease action	No effect on protease action	A protein tag may hinder protease action on the target protein	A protein tag may hinder protease action on the target protein
Effect on folding	Minimal effect on folding	Believed to promote folding of recombinant proteins	Believed to promote folding of recombinant proteins
Effect on structure and function of fusion partner	Small tag is less likely to interfere with structure and function of fusion partner	Tagged proteins form dimers via the GST tag. A protein tag may interfere with structure and function of the target protein.	A protein tag may interfere with structure and function of the target protein
Effect on crystallization	Less risk of effects on crystallization than for large tags. May allow crystallization via coordination to Ni ²⁺ ions	May interfere with crystallization due to increased flexibility of the tagged protein. Removal of tag after purification may be needed. Crystals have been obtained in a few cases by using extra-short spacers between the tag and target protein.	May interfere with crystallization due to increased flexibility of the tagged protein. Removal of tag after purification may be needed. Crystals have been obtained in a few cases by using extra-short spacers between the tag and target protein.
Suitability for purification of protein complexes	The tag will have a minimal effect on protein complex synthesis and will allow preparative purification of stable complexes provided that additional purification steps can be added for final purity	Suitable for protein complex purification requiring extremely mild wash and elution conditions	Suitable for protein complex purification requiring extremely mild wash and elution conditions
Suitability for purification of proteins containing metal ions	Generally, not recommended for purification of proteins that contain metal ions	Can be used for metal-containing proteins	Can be used for metal-containing proteins

¹ The effectiveness of proteases used for cleavage may be decreased by substances, for example, detergents, in the protein preparation or by inappropriate conditions.

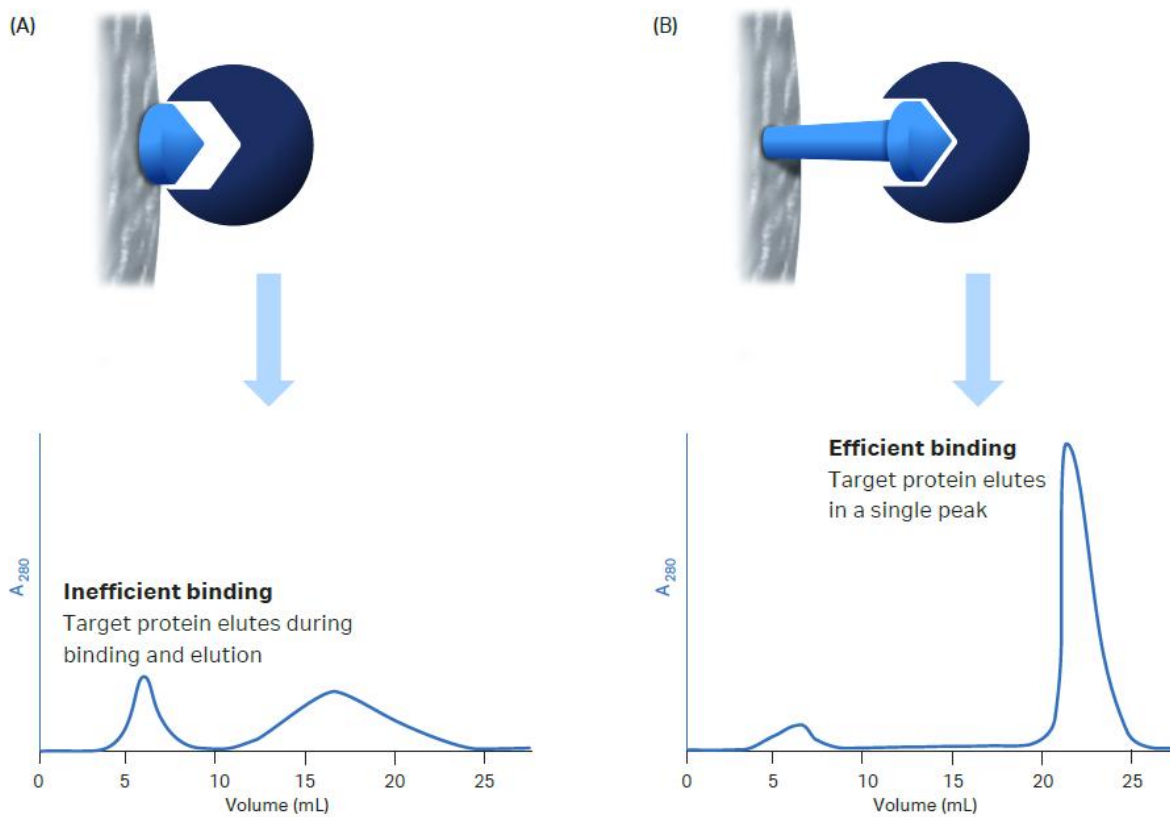
Na purifikácie rekombinantných proteínov nesúcich His-tag možno využiť viaceré chromatografické médiá, ktorých parametre volíme na základe koncentrácie cieľového proteínu, prítomnosti kontaminujúcich proteínov alebo iných biomolekúl, priestorovej dostupnosti His-tagu (pokiaľ

na chromatografiu používame natívne podmienky), potrebu použitia denaturačných činidiel a iné parametre ovplyvňujúce celkový výkon chromatografického behu. Pre purifikáciu proteínov priamo zo supernatantu homogenizovaných buniek sú vhodné médiá s väčšími časticami (napr. 90 a viac μm), pre menej dostupné a slabšie zastúpené proteíny zase médiá s menšími časticami (napr. 34 μm). Umožní sa tým optimálne využitie dostupnej funkčnej plochy média a dosiahne lepší efekt separácie.

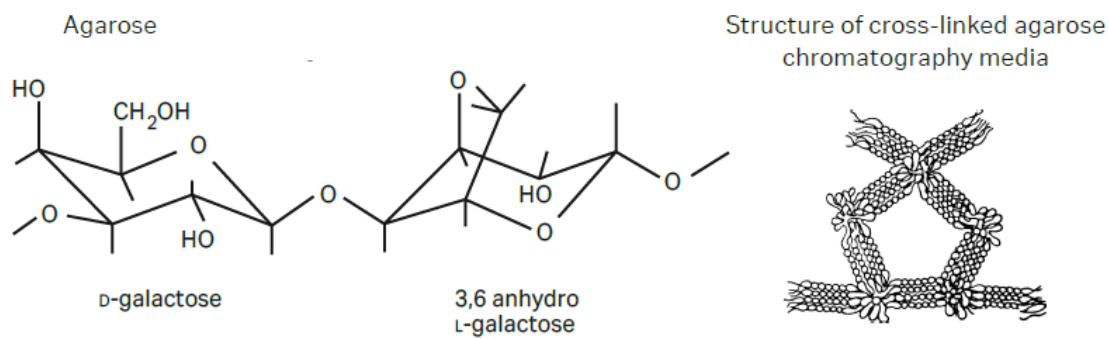
Ak si protokol vyžaduje použitie denaturačných činidiel alebo detergentov (cieľový proteín je nerozpustný alebo málo rozpustný), nevyhnutné je zvážiť ako kompatibilitu média s denaturačnou látkou (bežne používané médiá sú odolné voči napr. až 10 M močovine alebo 6M Guanidín-HCl) alebo absorbciu konkrétneho činidla v meranej oblasti (napr. detergent Triton X-100, bežne používaný na rozpustenie slabo rozpustných alebo membránových proteínov vykazuje silný absorpčný signál pri 280 nm, čo je typická vlnová dĺžka používaná na detekciu proteínov). Imidazol, používaný ako elučné činidlo pri IMAC, tiež vykazuje miernu absorpciu pri 280 nm a ovplyvňuje tak odhad koncentrácie proteínov vo vzorke len na základe absorpcie pri 280 nm.



Obr. 9 Tri zložky afinitného chromatografického média



Obr. 10 Vplyv dĺžky dištančného ramena obsahujúceho ligand na efektivitu väzby cieľových proteínov



Obr. 11 Štruktúra matrice ako základu chromatografického media (sefaróza)

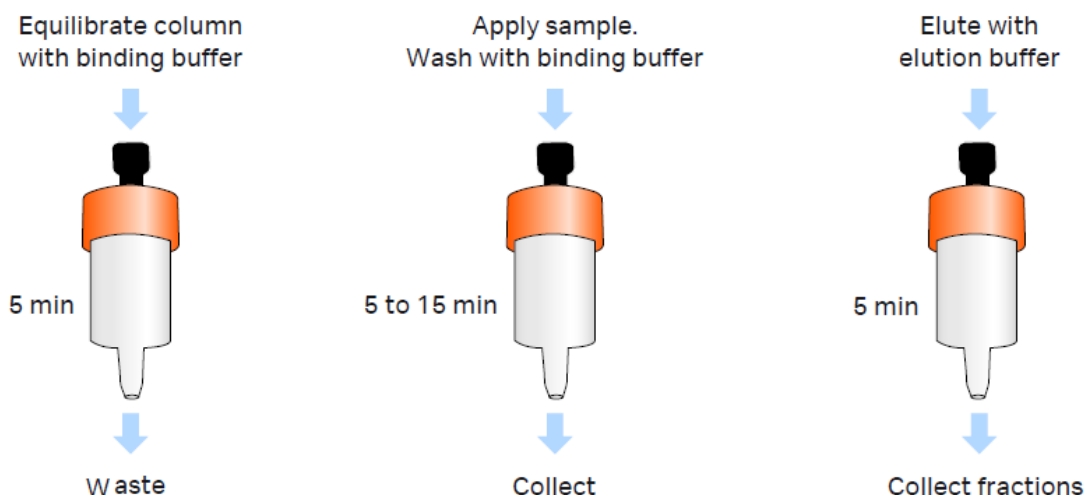
5.1.1 Protokol

Typický protokol, využívajúci FPLC na automatizáciu krokov IMAC chromatografie zahŕňa kroky prípravy kolóny a systému, krok chromatografickej separácie a nakoniec krok čistenia.

Príprava – ekvilibracia – kolóny predstavuje odstránenie skladovacieho roztoku (najčastejšie 20% etanol) a nasýtenie média roztokom, v ktorom sa nachádza cieľový proteín s cieľom zabezpečenia optimálnych podmienok na stabilitu a interakciu proteínu s chromatografickou maticou. Kolóna sa premyje 2-5 objemami kolóny (CV z anglického “column volume”) deionizovanej vody a následne 2 až 10 CV ekvilibračného roztoku. Na presnejšie určenie bodu, v ktorom sa kolóna dostane do vhodných podmienok sa môže využiť monitorovanie niektorých parametrov – napr. fluktuácia UV signálu (absorbancie pri 280nm) nižšia ako 1 miliabsorbčná jednotka (mAU) znamená dostatočnú stabilitu a signalizuje vhodnosť naniesenia proteínového preparátu na kolónu. Pri citlivejších aplikáciách je možné ako podmienku definovať viaceré parametre – okrem stabilného UV signálu, aj stabilné pH a konštantnú vodivosť, na zabezpečenie optimálnych podmienok. Variabilita dĺžky ekvilibračného kroku na základe monitorovania vybraných parametrov umožňuje (i) zabezpečiť optimálne podmienky pre purifikáciu cieľového proteínu, (ii) znížiť objem použitého roztoku a (iii) zachytiť prípadnú chybu v príprave roztoku skôr ako dôjde k jeho interakcii so vzorkou. Zloženie typického ekvilibračného roztoku pri IMAC je 20 mM fosfátový tlmivý roztok, 500 mM NaCl. V prípade purifikácie proteínov v denaturačných podmienkach sa do uvedeného roztoku pridá aj vhodná koncentrácia denaturačného činidla, napr. 6 M guanidín HCl, 8-10 M močovina alebo vhodná koncentrácia detergentu.

Prvým krokom samotnej separácie cieľového proteínu od kontaminantov je naniesenie bunkového lyzátu na ekvilibrovanú kolónu, kedy nastáva afinitná interakcia medzi cieľovým proteínom a funkčnou skupinou na chromatografickej matici. V tomto kroku sa najčastejšie odstráni aj väčšina kontaminujúcich molekúl, ktorým chýba potrebná kvalita na zabezpečenie afinitnej interakcie – afinitná značka alebo iný interakčný partner fúzovaný s cieľovým proteínom. Ako pri všetkých biologických interakciách, ani v tomto prípade nemožno očakávať absolútne cieľovú väzbu bez nešpecifických interakcií. Komplexné molekuly ako sú proteíny sú charakterizované širokou škálou parametrov závislých na primárnej aminokyselinovej sekvencii a následne formovanej štruktúre (povrchový náboj, hydrofobicita, konformácia) a s tým súvisí aj dostupnosť afinitnej značky pri cieľových proteínoch (afinitná väzba vznikne ľahšie ak je afinitná značka dostupná na povrchu štruktúry alebo je voľná a neusporiadaná v priestore) ale zároveň dochádza k nešpecifickým interakciám medzi kontaminantami a chromatografickým nosičom (polymér, polysacharid) cez iónové interakcie alebo aj slabšie afinitné väzby, pokiaľ sa v sekvencii kontaminantov nachádza štruktúra podobná afinitnej značke (napr. viacero histidínových zvyškov v relatívnej blízkosti ako dôsledok sekundárnej alebo terciárnej štruktúry kontaminujúceho proteínu). Tento jav je možné eliminovať pridaním nízkej koncentrácie elučného činidla do bunkového lyzátu, ktoré kompetitívne zníži podiel nešpecifických afinitných väzieb. Dôležitá je tiež prítomnosť NaCl na zabezpečenie dostatočnej iónovej sily roztoku a elimináciu iónových interakcií medzi proteínmi a chromatografickou maticou. Zloženie vzorkového roztoku je v podstate rovnaké ako ekvilibračný roztok, s tým že obsahuje okrem proteínovej časti aj napr. 20 až 40 (niekedy aj viac) mM imidazol v prípade IMAC (20 mM fosfátový tlmivý roztok, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol). Frakcia, ktorá prejde kolónou v tejto fáze a obsahuje proteíny nezachytené na kolóne sa nazýva prietoková – „flow-through“ frakcia. Analýza jej obsahu je dôležitá z hľadiska optimalizácie parametrov purifikácie ako sú: objem naneseného lyzátu (pokiaľ sa v neskorších štádiách detekovateľné stopy cieľového proteínu znamená to presiahnutie kapacity kolóny), tolerovaná koncentrácia elučného činidla, potrebná iónová sila, vhodnosť tlmivého činidla alebo potenciálna

agregácia proteínov. Za optimálnych podmienok sa v tejto frakcii nachádza väčšina kontaminantov a je bez cieľového proteínu. Dĺžka samotného kroku je značne variabilná a závislá na objeme lyzátu, v ktorom sa cieľový proteín nachádza.

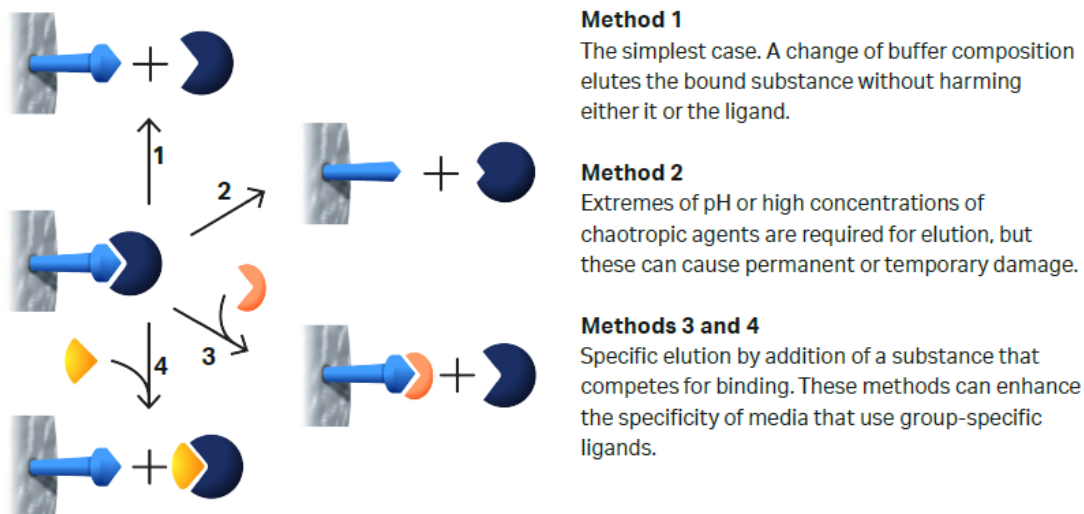


Obr. 12 Základné kroky metódy IMAC

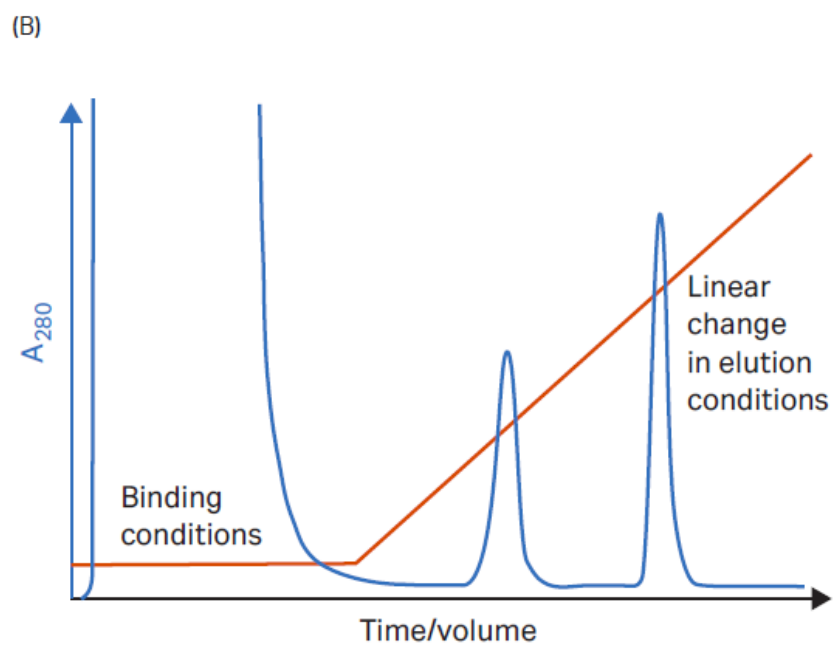
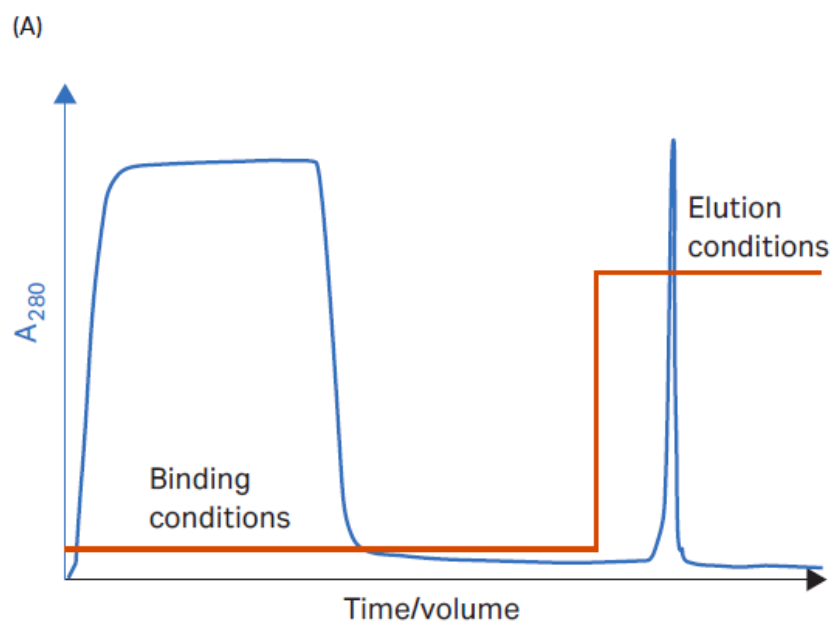
Po nanosení preparátu na kolónu a zachytení frakcie proteínov na chromatografickú maticu nasleduje krok premytia – „wash“, ktorým sa vyplavia zbytky nenaviazaných proteínov a pokiaľ to sila väzby cieľového proteínu umožňuje aj afinitne alebo nešpecificky viazané necieľové proteíny pomocou zvýšenej koncentrácie elučného činidla, napr. 60 mM imidazol pri IMAC. Dĺžka tohto kroku je silno závislá od množstva kontaminantov a jeho optimálna dĺžka sa často dosahuje automatickým sledovaním absorbancie a prerušením po jej poklesnutí pod určitú úroveň, napr. stabilný signál pod 5-20 mAu po dobu 1 min. Kvôli absorbancii imidazolu pri 280 nm je potrebné túto hodnotu zvážiť vzhľadom na jeho koncentráciu. Typický premývací roztok má zloženie ekvilibračného so zvýšenou koncentráciou imidazolu oproti tej, ktorá bola v lyzáte obsahujúcom cieľový proteín. Objem potrebný na efektívne premytie cieľového proteínu je v rozmedzí 2 až 20 CV. Táto frakcia je za optimálnych podmienok charakteristická nízkou koncentráciou proteínov, prípadne malým „píkom“ na chromatograme pri jej nástupe, ktorý tvoria afinitne slabo naviazané proteíny. Typické zloženie roztoku je 20 mM fosfátový tlmivý roztok, 500 mM NaCl, 40 mM imidazol.

Finálnym krokom separačnej fázy chromatografie je elúcia alebo uvoľnenie cieľového proteínu z chromatografického média. Tento efekt sa najčastejšie dosahuje dostatočnou koncentráciou činidla s vyššou afinitou ku konkrétnej funkčnej skupine, v prípade IMAC ktorý sa svojou aromatickou štruktúrou podobá histidínu a má vyššiu afinitu k imobilizovanému kovu na matici. Týmto sa dosiahne efekt vytlačenia a uvoľnenia cieľového proteínu, ktorý sa v rámci tekutej fázy dostane z kolóny a vytvorí tak elučnú frakciu, obsahujúcu v ideálnom prípade vysoký nadbytok cieľového proteínu v porovnaní s kontaminujúcimi proteínmi. Dosiahnutie takého výsledku si väčšinou vyžaduje optimalizačné behy a určenie ideálnej koncentrácie imidazolu na elúciu cieľového proteínu. Častá stratégia je použitie stúpajúceho lineárneho gradientu koncentrácie imidazolu, pričom dochádza k postupnému uvoľňovaniu zvyškov kontaminujúcich proteínov a po dosiahnutí optimálnej koncentrácie imidazolu aj výrazného píku, predstavujúceho frakciu obsahujúcu cieľový proteín. V niektorých prípadoch je možné efektívnosť separácie

zvýšiť pomocou skokového gradientu alebo kombináciou skokového a lineárneho s jasným rozhraním v oblasti koncentrácie pri ktorej dochádza k elúcii cieľového proteínu. Automatizácia elučného kroku je preto najkomplexnejším a najcitlivejším štádiom purifikačného procesu. Na zabezpečenie čo najvyššej čistoty sa využívajú viaceré detekčné a frakcionačné stratégie s cieľom izolácie konkrétneho píku a zabráneniu kontaminácie vzoriek s jeho najvyššou koncentráciou. Oddelenie píku alebo viacerých píkov je možné dosiahnuť jednoduchou frakcionáciou na základe objemu, presnejší výsledok však ponúkne zaradenie detekcie stúpania absorbancie pri 280 nm (sklonu vznikajúceho píku – slope), ktoré možno označiť za začiatok píku a následný pokles absorbancie, ktorý znamená jeho ukončenie a zastavenie odberu konkrétnej frakcie. Pomocou definovaných sklonov kriviek chromatogramu sa dosiahne ešte presnejšie rozlíšenie vo frakcionácii a zabezpečí eliminácia prekrývajúcich sa oblastí píkov. Absorbancia zložiek používaných roztokov (imidazol, detergenty) aj v tomto prípade môže znamenať skreslenie výsledku a potrebu optimalizácie zloženia roztokov aby sa tento jav minimalizoval alebo kompenzoval.



Obr. 13 Spôsoby elúcie cieľových molekúl pri afinitnej chromatografii



Obr. 14 Typický priebeh krokovej (A) a gradientovej (B) elúcie

5.1.2 Riešenie problémov pri IMAC

Situation	Cause	Remedy
Poor binding of the protein	Sample has not been filtered properly Sample has altered during storage Sample has wrong pH or buffer conditions are incorrect Solutions have wrong pH The column is not equilibrated sufficiently in the buffer Column is overloaded with sample Microbial growth has occurred in the column	Clean the column, filter the sample, and repeat Prepare fresh samples Use a desalting column to transfer sample into the correct buffer (see <i>Buffer exchange and desalting</i> in Appendix 1) Calibrate pH meter, prepare new solutions Repeat or prolong the equilibration step Decrease the sample load Store in 20% ethanol when possible
Low yield	Protein is still attached to ligand Protein has been degraded by proteases Adsorption to filter during sample preparation Sample precipitates Hydrophobic proteins. Protein is still attached to ligand.	If using competitive elution, increase the concentration of the competitor in the elution buffer Add protease inhibitors to the sample and buffers to prevent proteolytic digestion. Run sample through a medium such as Benzamide Sepharose 4 Fast Flow (high sub) to remove serine proteases. Use another type of filter Can be caused by removal of salts or unsuitable buffer conditions Use chaotropic agents, polarity reducing agents, or detergents
Low recovery of activity, but normal recovery of protein	Protein is unstable or inactive in the elution buffer Enzyme separated from cofactor or similar	Determine the pH and salt stability of the protein Collect fractions into neutralization buffer such as 1 M Tris-HCl, pH 9.0 (60 to 200 µL per fraction) if elution is performed at low pH Test by pooling aliquots from the fractions and repeating the assay
More activity is recovered than was applied to the column	Different assay conditions have been used before and after the chromatographic step	Use the same assay conditions for all the assays in the purification scheme
Reduced or poor flow through the column and/or too high back pressure	Presence of lipoproteins or protein aggregates Protein precipitation in the column caused by removal of stabilizing agents during fractionation Clogged column filter Clogged end-piece, adapter, or tubing Precipitated proteins Bed is too compressed Microbial growth	Remove lipoproteins and aggregates during sample preparation (see Appendix 1) Modify the eluent to maintain stability Replace the filter or use a new column. Always filter samples and buffer before use. Remove and clean or use a new column Clean the column using recommended methods or use a new column Repack the column, if possible, or use a new column Store in 20% ethanol when possible
Back pressure increases during a run or during successive runs	Turbid sample Precipitation of protein in the column filter and/or at the top of the bed	Improve sample preparation (see Appendix 1). Improve sample solubility by the addition of ethylene glycol, detergents, or organic solvents. Clean using recommended methods. Exchange or clean filter or use a new column. Include any additives that were used for initial sample solubilization in the solutions used for chromatography
Bubbles in the bed	Column packed or stored at cool temperature and then warmed up Buffers not properly degassed	Remove small bubbles by passing degassed buffer upwards through the column. Take special care if buffers are used after storage in a fridge or cold-room. Do not allow column to warm up in direct sunlight or by placement in close proximity to heating system. Repack column if possible (see Appendix 3). Degas buffers thoroughly
Cracks in the bed	Large air leak in column	Check all connections for leaks. Repack the column if possible (see Appendix 3).

Obr. 15 Príčiny a možné riešenia niektorých problémov pri IMAC

5.1.3 GST

Systém génovej fúzie glutatión-S-transferázy (GST) je všestranný systém na expresiu, purifikáciu a detekciu proteínov značených GST produkovaných v *E. coli*. Systém pozostáva z troch hlavných komponentov: plazmidových vektorov pGEX, produktov na purifikáciu GST a produktov na detekciu GST. Systém dopĺňa séria proteáz špecifických pre štiepenie GST-značky. Vektory pGEX sú navrhnuté pre indukovateľnú, vysokoúrovňovú intracelulárnu expresiu génov alebo fragmentov génov ako fúzie s GST zo *Schistosoma japonicum*. Expresia v *E. coli* vedie k značeným proteínom s GST časťou na aminokonci a sledovaným proteínom na karboxylovom konci. GST sa prirodzene vyskytuje ako proteín s molekulovou hmotnosťou 26 kDa, ktorý sa môže exprimovať v *E. coli* s plnou enzymatickou aktivitou. Značené proteíny, ktoré majú kompletnú aminokyselinovú sekvenciu GST, tiež vykazujú enzymatickú aktivitu GST a môžu podliehať dimerizácii podobnej tej, ktorá sa pozoruje v prírode. Kryštálová štruktúra rekombinantného GST *S. japonicum* z vektorov pGEX bola stanovená a zhoduje sa s kryštálovou štruktúrou natívneho proteínu. Purifikácia proteínov označených GST je založená na afinite GST k glutatiónovému ligandu viazanému na matricu. Väzba proteínu označeného GST na ligand je reverzibilná a proteín sa môže eluovať za miernych, nedenaturačných podmienok pridaním redukovaného glutatiónu do elučného pufru. Táto technika teda poskytuje mierny proces purifikácie, ktorý neovplyvňuje natívnu štruktúru a funkciu proteínu. V prípade potreby je možné štiepenie proteínu z GST dosiahnuť pomocou špecifickej proteázy, ktorej rozpoznávacía sekvencia sa nachádza bezprostredne pred viacnásobným klonovacím miestom (MCS) na plazmidoch pGEX. Označené proteíny je možné detegovať kolorimetrickými alebo

imunologickými metódami. Proteíny označené GST sa dajú relatívne ľahko purifikovať z bakteriálnych lyzátov afinitnou chromatografiou s použitím glutatiónu imobilizovaného na matrici, ako je napr. sefaróza. Po aplikácii na afinitné médium sa proteíny viažu na ligand a nečistoty sa odstránia premytím ekvilibračným roztokom. Označené proteíny sa potom eluujú z média za miernych, nedenaturačných podmienok s použitím redukovaného glutatiónu, aby sa zachovala štruktúra aj funkcia proteínu. Ak je žiaduce oddelenie cieľového proteínu od GST značky, označený proteín sa môže štiepiť vhodnou špecifickou proteázou, zatiaľ čo označený proteín sa viaže na médiu (štiepenie na kolóne). Alternatívne sa označený proteín môže štiepiť po eluovaní z média. Štiepenie viazaného označeného proteínu eliminuje ďalší krok oddelenia eluovaného proteínu od GST značky, pretože GST časť zostáva viazaná na médium, zatiaľ čo fúzaný proteín sa eluuje pomocou premývacieho roztoku. Jedným z najdôležitejších parametrov ovplyvňujúcich väzbu proteínov značených GST na médium je prietok. Keďže väzbová kinetika medzi glutatiónom a GST je relatívne pomalá, je dôležité udržiavať nízky prietok počas aplikácie vzorky, aby sa dosiahla maximálna väzbová kapacita. Premývanie a eluovanie sa môžu vykonávať pri mierne vyšších prietokoch.

6.2. Purifikácia protilátok – imunoafinitná chromatografia

Všetky imunoglobulíny, nezávisle od ich špecifickosti, majú spoločnú štruktúru so štyrmi polypeptidovými reťazcami: dva identické ťažké (H) reťazce, z ktorých každý nesie kovalentne viazané oligosacharidové skupiny; a dva identické, neglykozylované ľahké (L) reťazce. Disulfidová väzba spája ťažký a ľahký reťazec. Ťažké reťazce sú tiež navzájom spojené disulfidovými väzbami. Tieto disulfidové väzby sa nachádzajú vo flexibilnej oblasti ťažkého reťazca známej ako pánt, čo je oblasť s približne 12 aminokyselinami, ktorá je vystavená enzymatickému alebo chemickému štiepeniu. Každá globulárna oblasť vytvorená skladaním polypeptidových reťazcov v dôsledku disulfidovej väzby sa nazýva doména. Všetky štyri polypeptidové reťazce obsahujú konštantné (C) a variabilné (V) oblasti, ktoré sa nachádzajú na karboxylovom a aminokonci. Ťažké a ľahké reťazce majú jednu V oblasť. Ťažké reťazce obsahujú tri C oblasti, zatiaľ čo ľahké reťazce majú jednu C oblasť. V oblasti ťažkých aj ľahkých reťazcov sa spájajú a tvoria dve identické väzbové miesta pre antigén (časti protilátky, ktoré viažu antigén). Efektorové funkcie protilátok, ako je placentárny transport alebo antigén-dependentná bunková toxicita, sú sprostredkované štrukturálnymi determinantmi v oblasti Fc imunoglobulínu. Pre výskumné, diagnostické a terapeutické aplikácie je potenciálne využitie fúzných proteínov protilátok rozsiahle. Kombinácia fúzneho partnera s celou protilátkou alebo jej časťou môže umožniť protilátke alebo fragmentu prístup do špecifických oblastí hostiteľa (napr. prekročenie hematoencefalickej bariéry), prenos enzýmu na špecifické miesto (napr. na terapiu alebo na vytvorenie lieku na mieste) alebo prenos toxínu na špecifický cieľ na terapiu.

Fúzne proteíny protilátok sa delia do dvoch skupín:

1. Fúzie Fab a F(ab')₂, v ktorých je zachované jedno alebo dvojité väzbové miesto pre antigén a fúzny partner buď nahradí, alebo je spojený s doménou Fc.
2. Fúzie Fc, známe aj ako imunoadhézie, v ktorých je miesto rozpoznávania antigénu nahradené fúznym partnerom, ale oblasť Fc zostáva zachovaná. V závislosti od typu zapojeného imunoglobulínu si fúzia Fc zachová efektorové funkcie a môže fúznemu proteínu poskytnúť dlhší polčas rozpadu.

Protilátky a fragmenty protilátok sa vyrábajú z natívnych a rekombinantných zdrojov. Výber zdrojového materiálu môže ovplyvniť výber techník prípravy a purifikácie vzoriek v dôsledku rozdielov v špecifických kontaminantoch a požadovanom množstve cieľovej molekuly. V mnohých prípadoch však vysoká selektivita afinitného purifikačného média pre špecifickú molekulu minimalizuje kontamináciu a vytvára vzorku s vysokou čistotou v jednom kroku.

Tab. 9 Zdroj a hlavné kontaminanty natívnych a rekombinantných protilátok

	Molecular types	Quantity	Significant contaminants
Source: native			
Human serum	Polyclonal IgG, IgM, IgA, IgD, IgE	IgG 8 to 16 mg/mL, IgM 0.5 to 2 mg/mL, IgA 1 to 4 mg/mL, IgE 10 to 400 ng/mL, IgD up to 0.4 mg/mL	Albumin, transferrin, α_2 -macroglobulin, and other serum proteins
Hybridoma: cell culture supernatant	Monoclonal	Up to 1 mg/mL	Phenol red, albumin, transferrin, bovine IgG, α_2 -macroglobulin, other serum proteins, viruses
Hybridoma: cell culture supernatant, serum-free	Monoclonal	1 to 4 mg/mL	Albumin, transferrin (often added as supplements)
Ascites	Monoclonal	1 to 15 mg/mL	Lipids, albumin, transferrin, lipoproteins, endogenous IgG, other host proteins
Egg yolk	IgY	3 to 4 mg/mL	Lipids, lipoproteins, vitellin
Source: recombinant			
Extracellular protein expressed into supernatant	Monoclonal antibodies, tagged antibodies, antibody fusion proteins, Fab, or Fab ₂ fragments	Depends upon expression system	Proteins from the host, e.g., <i>E. coli</i> , Chinese Hamster ovary (CHO) cells, general low level of contamination
Intracellular protein expression		Depends upon expression system	Proteins from the host, e.g., <i>E. coli</i> , phage

Zdroj a nasmerovanie rekombinantnej molekuly určia postup extrakcie. Bakteriálny alebo cicavčí pôvod, extracelulárne alebo intracelulárne expresné systémy poskytujúce rozpustný produkt alebo inklúzne telieska budú mať všetky špeciálne požiadavky. Zložky tlmivých roztokov by sa mali vybrať tak, aby sa zabezpečili priaznivé extrakčné podmienky. Ak dôjde k imunošpecifickej interakcii, afinitná chromatografia je často prvým a niekedy jediným potrebným krokom. Na dosiahnutie uspokojivej homogenity vzorky však môže byť potrebný ďalší krok dočisťovania, často gélová filtrácia. Afinitná purifikácia ponúka vysokú selektivitu a zvyčajne vysokú kapacitu pre cieľové protilátky. Cieľová molekula sa koncentruje do menšieho objemu a v jednom kroku je možné dosiahnuť úroveň čistoty často nad 95 %.

Vysoká afinita proteínu G a proteínu A k oblasti Fc polyklonálnych a monoklonálnych protilátok typu IgG tvorí základ pre purifikáciu IgG, fragmentov IgG obsahujúcich oblasť Fc a podtried IgG. Proteín G a proteín A sú bakteriálne proteíny zo streptokokov skupiny G a *Staphylococcus aureus*. Po naviazaní na sefarózu vytvárajú proteín G a proteín A mimoriadne užitočné a ľahko použiteľné chromatografické médiá na rutinnú purifikáciu protilátok. Medzi príklady patrí purifikácia monoklonálnych protilátok typu IgG, purifikácia polyklonálneho IgG a jeho podtried, adsorpcia a purifikácia imunitných komplexov zahŕňajúcich IgG a fúzne proteíny. Podtriedy IgG je možné izolovať zo supernatantov bunkových kultúr, séra a ascitu. Jednokroková purifikácia vzoriek z natívnych zdrojov alebo média doplneného teľacím sérom na základe špecificity oblasti Fc bude ko-purifikovať hostiteľský IgG a dokonca môže viazať stopové množstvá sérových proteínov. Aby sa predišlo stopovým množstvám kontaminujúceho IgG, je potrebné počítať s ďalšími krokmi ako je imunošpecifická afinita s použitím protilátok proti hostiteľskému IgG spojených napríklad s NHS-aktivovanou sefarózou, iónomeničová chromatografia (IEX) alebo chromatografia na základe hydrofóbnej interakcie (HIC).

Proteín L bol prvýkrát izolovaný z povrchu bakteriálneho druhu *Peptostreptococcus magnus* a zistilo sa, že viaže imunoglobulíny prostredníctvom interakcie s ľahkým reťazcom imunoglobulínu, z čoho bol odvodený aj názov. Keďže žiadna časť ťažkého reťazca nie je zapojená do väzbovej interakcie, proteín L viaže širšiu škálu tried protilátok ako proteín A alebo G. Proteín L sa viaže na zástupcov všetkých tried protilátok vrátane IgG, IgM, IgA, IgE a IgD. Rekombinantný proteín L má štyri väzbové domény a viaže sa

na variabilnú oblasť ľahkého reťazca kappa imunoglobulínov a fragmentov imunoglobulínov. Proteín L sa viaže na tri zo štyroch podtypov ľahkého reťazca kappa u ľudí (1, 3 a 4) a na kappa 1 u myší.

Proteín G je dobrou voľbou na všeobecné zachytávanie protilátok v laboratórnom meradle, pretože viaže širšie spektrum IgG z eukaryotických druhov a viaže viac tried IgG ako proteín A. Proteín G má zvyčajne väčšiu afinitu k IgG ako proteín A a vykazuje minimálnu väzbu na albumín, čo vedie k čistejším prípravkom a vyšším výťažkom. Väzbová sila proteínu G k IgG závisí od zdrojového druhu a podriedy imunoglobulínu. Dynamická väzbová kapacita závisí od väzbovej sily a tiež od niekoľkých ďalších faktorov, ako je prietok počas aplikácie vzorky. Mnohé protilátky interagujú aj prostredníctvom oblasti Fab s miestom s nízkou afinitou na proteíne G. Zdá sa, že proteín G sa neviaže na ľudské myelómové IgM, IgA alebo IgE. Ukázalo sa však, že ľudské IgA a IgM sa slabo viažu na proteín A. Je potrebné zvážiť únik ligandov z afinitného média, najmä ak sa používajú drsné elučné podmienky. Viacbodové pripojenie proteínu G k chromatografickému médiu Sepharose vedie k veľmi nízkemu úniku ligandu proteínu G v širokom rozsahu elučných podmienok. Odstránenie kontaminantu ligandu je možné dosiahnuť pridaním leštiaceho kroku pomocou SEC alebo IEX. Chromatografické médiá Protein G Sepharose viažu IgG v širokom rozsahu pH so silnou afinitou pri fyziologickom pH a iónovej sile. Optimálne väzbové podmienky pre IgG z konkrétneho druhu nájdete v najnovšej literatúre. Treba sa vyhnúť nadmernému premývaniu, ak je interakcia medzi protilátkou a ligandom slabá, pretože to môže znížiť výťažok. Na elúciu IgG je potrebné znížiť pH na hodnotu medzi 2,5 a 3,0 v závislosti od protilátky. Ak sa biologická aktivita protilátky alebo fragmentu protilátky stratí v dôsledku nízkeho pH potrebného na elúciu vhodným médiom je Proteín A sefaróza; použité elučné podmienky sú vo všeobecnosti miernejšie.

Proteín A pochádza z kmeňa *Staphylococcus aureus* a obsahuje päť oblastí, ktoré sa viažu na Fc oblasť IgG. Ako afinitný ligand je proteín A spojený so sefarózou tak, že tieto oblasti sa môžu voľne viazať. Jedna molekula spriahnutého proteínu A sa môže viazať na najmenej dve molekuly IgG. K dispozícii sú ligandy natívneho proteínu A (nProtein A) aj rekombinantného proteínu A (rProtein A). Tieto molekuly majú podobnú špecifitu pre Fc oblasť IgG, ale rekombinantný proteín A bol upravený tak, aby obsahoval C-terminálny cysteín, ktorý umožňuje jednobodové spojenie, keď je proteín spojený so sefarózou, čo zaisťuje vyššiu väzbovú kapacitu. Okrem dobre známej afinity k Fc oblasti IgG má proteín A aj afinitu k určitým variantom Fab oblasti, a preto sa chromatografické médiá s proteínom A môžu v niektorých prípadoch použiť na purifikáciu fragmentov Fab a F(ab')₂. Chromatografické médiá s proteínom A na sefaróze majú tiež podstatne vyššiu väzbovú kapacitu ako chromatografické médiá s proteínom G, a preto sú preferovanou voľbou na zachytenie monoklonálnych protilátok v priemyselných procesoch.

Ak nie je k dispozícii AC médium, ligand (ako napríklad čistý antigén alebo protilátka) sa môže kovalentne naviazať na vhodnú maticu, čím sa vytvorí imunošpecifické afinitné médium na purifikáciu. Hoci tento proces vyžaduje starostlivý vývoj a optimalizáciu, často sa oplatí, napríklad keď je potrebné pravidelne pripravovať špecifický proteín. Imunošpecifická purifikácia je obzvlášť užitočná, ak sa cieľové molekuly slabo alebo vôbec neviažu na proteín A alebo proteín G, a možno ju použiť aj na odstránenie kľúčových kontaminantov.

5.1.4 Protokol

1. Pripravte odberové skúmavky pridaním 60 až 200 µl 1 M Tris-HCl s pH 9,0 na mililiter odoberanej frakcie. Na zachovanie aktivity acidolabilného IgG odporúčame pridať 60 až 200 µl 1 M Tris-HCl s pH 9,0 do odberových skúmaviek, čím zabezpečíte, že konečné pH vzorky bude približne neutrálne.

2. Naplňte striekačku alebo hadičku pumpy destilovanou vodou. Odstráňte zátku a pripojte kolónu k striekačke (použite dodaný konektor), laboratórnemu čerpadlu alebo chromatografickému systému „kvapka po kvapke“, aby ste zabránili vniknutiu vzduchu do systému.
3. Premyte etanol 3 až 5 CV destilovanej vody v kolóne.
4. Ekvilibrujte kolónu s najmenej 5 CV ekvilibračného roztoku. Odporúčané prietoky sú 1 ml/min (1 ml kolóna) a 5 ml/min (5 ml kolóna).
5. Predspracovanú vzorku naneste pomocou injekčnej striekačky pripojenej k Luer konektoru alebo pumpovaním na kolónu. Pre dosiahnutie optimálnych výsledkov použite prietok 0,2 až 1 ml/min (1 ml kolóna) a 0,5 až 5 ml/min (5 ml kolóna) počas aplikácie vzorky.
6. Premývajte ekvilibračným roztokom (vo všeobecnosti aspoň 5 až 10 objemov kolóny), kým absorbancia nedosiahne stabilnú základnú hodnotu alebo kým v efluente nezostane žiadny materiál. Pri premývaní udržiavajte prietok 1 až 2 ml/min (1 ml kolóna) a 5 až 10 ml/min (5 ml kolóna). IgG z väčšiny druhov a poddried sa viaže na proteín G pri pH blízkom fyziologickému a iónovej sile. Optimálne väzbové podmienky pre IgG z konkrétneho druhu nájdete v najnovšej literatúre. Vyhnite sa nadmernému premývaniu, ak je interakcia medzi protilátkou a ligandom slabá, pretože by to mohlo znížiť výťažok.
7. Eluujte elučným roztokom s použitím jednokrokového alebo lineárneho gradientu. Pre skokovú elúciu zvyčajne postačuje 5 CV. Pre lineárnu gradientovú elúciu zvyčajne postačuje 10 až 20 CV. Udržiavajte prietok 1 až 2 ml/min (1 ml kolóna) a 5 až 10 ml/min (5 ml kolóna) pre elúciu. Chromatografické médiá s proteínom G Sepharose viažu IgG v širokom rozsahu pH so silnou afinitou pri neutrálnom pH. Na eluovanie IgG je potrebné znížiť pH na hodnotu medzi 2,5 a 3,0 v závislosti od protilátky. Ak sa biologická aktivita protilátky alebo fragmentu protilátky stratí v dôsledku nízkeho pH potrebného na elúciu, vyskúšajte proteín A Sepharose; použité elučné podmienky sú vo všeobecnosti miernejšie.
8. Po eluovaní regenerujte kolónu premytím 3 až 5 objemami ekvilibračného roztoku. Kolóna je teraz pripravená na novú purifikáciu tej istej protilátky.

6.3. Špecifické skupiny biomolekúl

Biotín a biotinylované látky sa viažu na streptavidín, molekulu izolovanú zo *Streptomyces avidinii*. Väzba streptavidínu na biotín je jednou z najsilnejších známych nekovalentných biologických interakcií. Preto sú na účinnú elúciu biotinylovaných biomolekúl vo všeobecnosti potrebné denaturačné podmienky. Alternatívne sa na zachytenie interagujúcich cieľových látok, ako sú proteíny, môžu použiť biotinylované biomolekuly viazané na streptavidínové chromatografické médium. Nečistoty sa odstránia premytím a obohatený cieľový proteín sa eluuje za relatívne miernych elučných podmienok. Alternatívou k značeniu biomolekuly, napríklad protilátky, biotínom je použitie 2-iminobiotínu, ktorý sa viaže na streptavidín pri pH nad 9,5 a môže byť eluovaný pri pH 4,0. Obohatenie konkrétneho proteínu je často žiaduce na zosilnenie jeho signálu v nasledujúcich krokoch analýzy.

Ďalším príkladom molekuly využíanej na afinitnú purifikáciu je kalmodulín. Je to vysoko konzervovaný regulačný proteín, ktorý sa nachádza vo všetkých eukaryotických bunkách. Tento proteín sa podieľa na mnohých bunkových procesoch, ako je metabolizmus glykogénu, kontrola cytoskeletu, neurotransmisia, aktivita fosfátov a kontrola pomerov NAD⁺/NADP⁺. Kalmodulín obsahujúca sefaróza 4B

poskytuje vhodnú metódu na izoláciu mnohých proteínov viažucich kalmodulín, ktoré sa podieľajú na týchto dráhach. Kalmodulín viaže proteíny hlavne prostredníctvom interakcií s hydrofóbnymi miestami na svojom povrchu. Tieto miesta sú exponované po konformačnej zmene vyvolanej pôsobením Ca^{2+} na samostatné väzbové miesta Ca^{2+} . Sila väzby enzýmov sa môže zvýšiť, ak je prítomný substrát enzýmu a enzým-substrát-kalmodulín- Ca^{2+} tak vytvárajú obzvlášť stabilné komplexy.

Koagulačné faktory krvi tvoria mimoriadne dôležitú skupinu proteínov pre výskum, medicínske a klinické aplikácie. Rôzne koagulačné faktory zapojené do porúch krvácania sa selektívne čistia pomocou VIISelect, VIIISelect a IXSelect chromatografického média. Hemofília typu A je spôsobená nedostatkom alebo poruchou faktora VIII (FVIII), zatiaľ čo hemofília typu B je známa ako nedostatok faktora IX (FIX). Faktor VII (FVII) sa používa u pacientov s hemofiliou s nedostatkom FVIII alebo FIX, u ktorých sa vyvinuli inhibitory proti náhradným koagulačným faktorom. Okrem toho sa koagulačné faktory získané z plazmy alebo exprimované ako rekombinantné proteíny v rôznych typoch buniek môžu čistiť pomocou chromatografických médií Heparin sefaróza alebo Capto Heparin.

Proteíny viažuce DNA tvoria mimoriadne rozmanitú triedu proteínov, ktoré zdieľajú jednu vlastnosť, a to ich schopnosť viazať sa na DNA. Funkčne možno skupinu rozdeliť na tie, ktoré sú zodpovedné za replikáciu a orientáciu DNA, ako sú históny, nukleozómy a replikázy, a tie, ktoré sa podieľajú na transkripcii, ako sú RNA/DNA polymerázy, transkripčné aktivátory a represory a reštrikčné enzýmy. Môžu byť produkované ako značené proteíny, aby sa umožnila špecifickejšia purifikácia, ale ich schopnosť viazať DNA tiež umožňuje skupinovo špecifickú afinitnú purifikáciu s použitím heparínu ako ligandu. Heparín je vysoko sulfónovaný glykozaminoglykán so schopnosťou viazať sa na veľmi širokú škálu biomolekúl vrátane:

- DNA viažucich proteínov, ako sú iniciačné faktory, elongačné faktory, reštrikčné endonukleázy, DNA ligáza, DNA a RNA polymerázy
- Inhibitory serínových proteáz, ako je antitrombín III, proteázové nexíny
- Enzýmy, ako sú proteázy mastocytov, lipoproteínová lipáza, koagulačné enzýmy, superoxiddismutáza
- Rastové faktory, ako je rastový faktor fibroblastov, rastový faktor Schwannových buniek, rastový faktor endotelových buniek
- Extracelulárne matricové proteíny, ako je fibronektín, vitronektín, laminín, trombospondín, kolagény
- Hormonálne receptory, ako sú estrogénové a androgénne receptory
- Lipoproteíny

Heparín má dva spôsoby interakcie s proteínmi a v oboch prípadoch môže byť interakcia oslabená zvýšením iónovej sily.

1. Pri interakcii s DNA viažucimi proteínmi heparín napodobňuje polyaniónovú štruktúru nukleovej kyseliny.

2. Pri interakcii s koagulačnými faktormi, ako je antitrombín III, heparín pôsobí ako afinitný ligand.

Glykoproteíny a polysacharidy reagujú reverzibilne, prostredníctvom špecifických cukorných zvyškov, so skupinou proteínov známych ako lektíny. Ako ligandy pre purifikačné médiá sa lektíny používajú na izoláciu a separáciu glykoproteínov, glykolipidov, polysacharidov, subcelulárnych častíc a buniek a na čistenie zložiek bunkových membrán rozpustených v detergentoch. Látky viazané na lektín sa rozdeľujú pomocou gradientu iónovej sily alebo kompetitívnej väzbovej látky. Na výber optimálneho lektínu na purifikáciu môže byť potrebné vykonať skríning rôznych chromatografických médií. Ligandy, konkanavalín A (Con A) a šošovicový lektín, poskytujú spektrum parametrov na separáciu glykoproteínov. Con A je tetramérny metaloproteín izolovaný z *Canavalia ensiformis* (fazuľa obyčajná). Con A viaže molekuly obsahujúce α -D-mannopyranosyl, α -D-glukopyranosyl a stericky príbuzné zvyšky. Väzbový cukor vyžaduje prítomnosť hydroxylových skupín C-3, C-4 a C-5 pre reakciu s Con A. Con A sa môže použiť na aplikácie ako:

- Separácia a purifikácia glykoproteínov, polysacharidov a glykolipidov
- Detekcia zmien v zložení látok obsahujúcich sacharidy, napríklad počas vývoja
- Izolácia glykoproteínov na povrchu buniek z membrán rozpustených v detergentoch
- Separácia membránových vezikul na frakcie „zvnútra von“ a „pravá strana von“

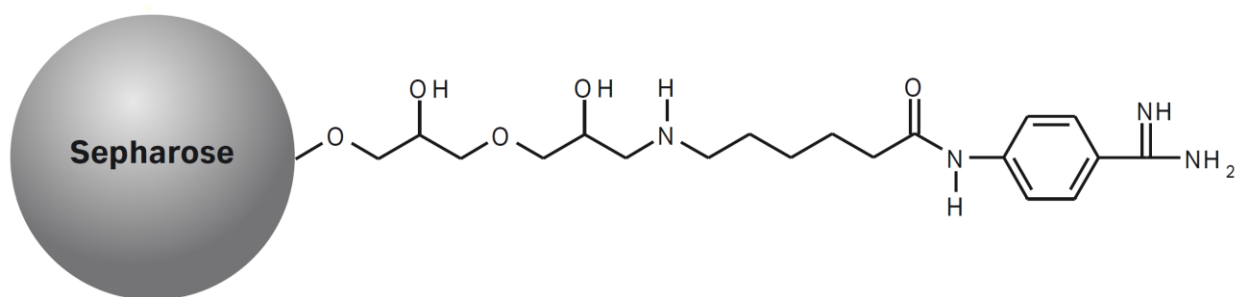
Šošovicový lektín viaže zvyšky α -D-glukózy a α -D-manózy a je afinitným ligandom používaným na čistenie glykoproteínov vrátane membránových glykoproteínov rozpustených v detergentoch, antigénov na povrchu buniek a vírusových glykoproteínov. Šošovicový lektín je hemaglutinín z bežnej šošovice, *Lens culinaris*. V porovnaní s Con A menej ostro rozlišuje medzi glukozylóvymi a manozylóvymi zvyškami a menej silno viaže jednoduché cukry. Svoju väzbovú schopnosť si zachováva aj v prítomnosti 1 % deoxycholátu sodného. Z týchto dôvodov je šošovicový lektín Sepharose 4B užitočný na čistenie membránových proteínov solubilizovaných v detergentoch, pričom poskytuje vysoké kapacity a extrémne vysoké výťažnosti.

Faktor stimulujúci kolónie granulocytov (G-CSF) je hormón, ktorý stimuluje produkciu bielych krviniek v kostnej dreni. GCSFSelect je špeciálne navrhnutý na purifikáciu rekombinantného G-CSF a je založený na vysoko rigidnej agarózovej základnej matici, ktorá umožňuje vysoké prietoky. Pre vysoko selektívny krok čistenia je afinitný ligand založený na jednoreťazcovom protilátkovom fragmente namierenom proti G-CSF. Na uľahčenie väzby cieľovej molekuly je ligand pripojený k základnej matici prostredníctvom hydrofilného spacerového ramena. Ligand sa produkuje v kvasinkovom expresnom systéme. Rigidná agarózová základná matica GCSFSelect umožňuje spracovanie veľkých objemov vzoriek.

NAD⁺-dependentné dehydrogenázy a ATP-dependentné kinázy patria do skupiny proteínov, ktoré interagujú s Cibacron Blue F3G-A, syntetickým polycyklickým farbivom, ktoré vykazuje určité štrukturálne podobnosti s kofaktorom NAD⁺. Pri použití ako afinitný ligand sa Cibacron Blue F3G-A silne a špecificky viaže na širokú škálu proteínov. Niektoré proteíny sa viažu špecificky kvôli ich požiadavke na nukleotidové kofaktory, zatiaľ čo iné, ako napríklad albumín, lipoproteíny, faktory zrážanlivosti krvi a interferón, sa viažu menej špecifickým spôsobom elektrostatickými a/alebo hydrofóbnymi interakciami s aromatickým aniónovým ligandom. Chromatograficé médiá tohto typu sa označujú názvom „blue sepharose“.

Postupy extrakcie vzoriek často uvoľňujú proteázy do roztoku, čo si vyžaduje prídanie inhibítorov proteáz, aby sa zabránilo nežiaducej proteolýze. Alternatívou k pridaniu inhibítorov je použitie skupinovo špecifického AC média na odstránenie proteáz zo vzorky. Rovnaký postup sa môže použiť buď na špecifické

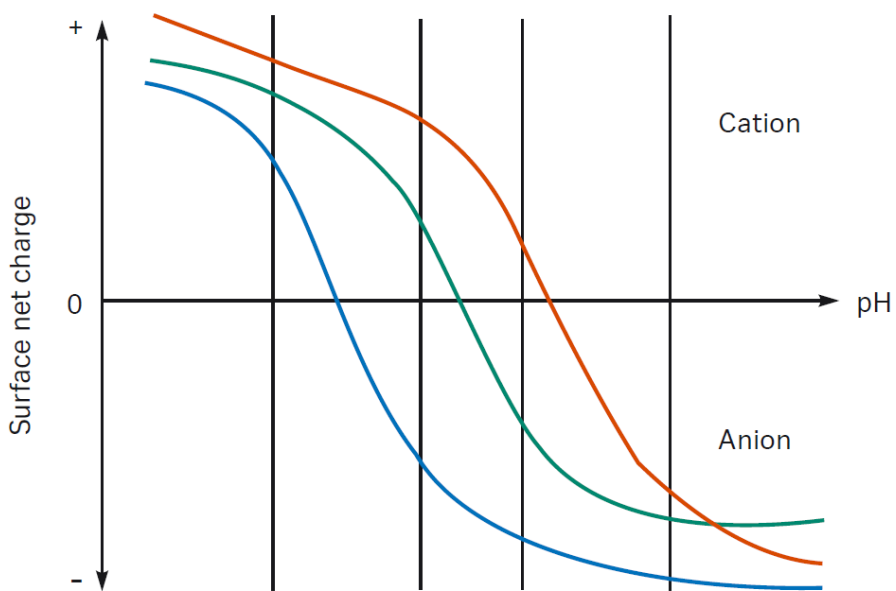
odstránenie týchto proteáz, alebo na ich purifikáciu. Syntetický inhibítor para-aminobenzamidín sa používa ako afinitný ligand pre trypsín, trypsínu podobné serínové proteázy a zymogény. Benzamidín Sepharose 4 Fast Flow sa často používa na odstránenie molekúl zo supernatantu bunkovej kultúry, bakteriálneho lyzátu alebo séra. Počas produkcie rekombinantných proteínov sa často používajú značky, ako napríklad GST, na uľahčenie purifikácie a detekcie. V rekombinantnom proteíne sú zahrnuté rozpoznávacie miesta špecifické pre enzýmy, aby sa v prípade potreby umožnilo odstránenie značky enzymatickým štiepením. Trombín sa bežne používa na enzymatické štiepenie a často sa musí z rekombinantného produktu odstrániť.



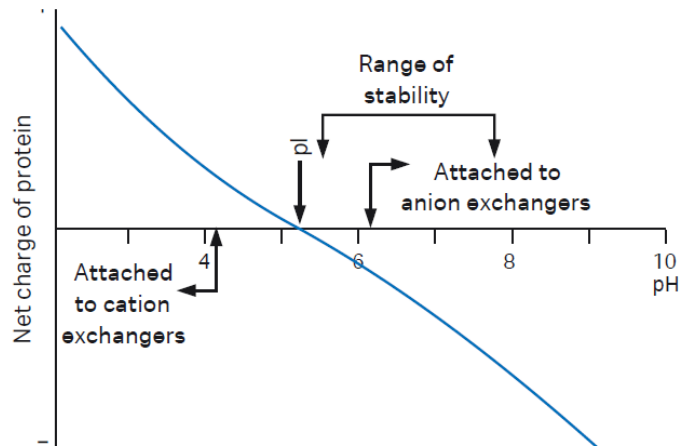
Obr. 16 Schematická štruktúra chromatografického média s benzamidínom

7. Iónovo-výmenná chromatografia

Iónovo-výmenná chromatografia (IEX – z anglického „ion exchange chromatography“) je technika separácie biomolekúl známa od 60-tych rokov 20. storočia umožňuje efektívnu separáciu peptidov, proteínov, DNA alebo iných nabitých molekúl s vysokou rozlišovacou schopnosťou na úrovni minimálneho rozdielu v nábojoch. V kombinácii s vysokou väzobnou kapacitou chromatografického média je IEX možné použiť ako pri prvých krokoch hrubej separácie tak aj na finálne dočistenie preparátov proteínov. Používajú sa dva základné operačné režimy na základe náboja matrice a separovaných molekúl – aniónovo-výmenná chromatografia (ANEX) a kationovo-výmenná chromatografia (CATEX), pričom o výbere rozhoduje pI separovaného proteínu a pH použitého tlmivého roztoku. Pokiaľ je pH tlmivého roztoku vyššie ako pI cieľového proteínu nastane väzba medzi proteínom a pozitívne nabitým ANEX médiom, pokiaľ je pH tlmivého roztoku nižšie ako pI cieľového proteínu možné je použiť len negatívne nabité CATEX médium. Pri stave $\text{pH}=\text{pI}$ má cieľový proteín nulový náboj a stráca možnosť interakcie. Každý proteín má vlastnú titračnú krivku ako výsledok výsledného náboja aminokyselín vo vzťahu k pH prostredia. Práve táto unikátna vlastnosť umožňuje, pri správnej optimalizácii, navrhnuť podmienky na efektívne izolovanie cieľového proteínu pomocou IEX chromatografie.



Obr. 17 Teoretické titračné krivky pri zmenách pH a následných zmenách povrchového náboja

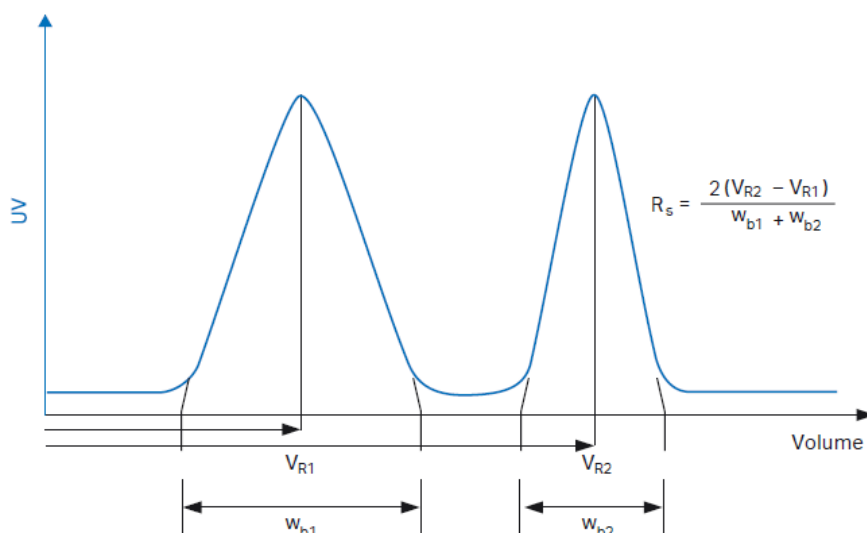


Obr. 18 Faktory pri výbere vhodného IEX média

IEX chromatografické médium je tvorené sférickými časticami, ktoré na povrchu obsahujú pozitívne alebo negatívne nabité iónové skupiny. Porozita média umožňuje zvýšenie dostupnej plochy a tým aj kapacity väzby.

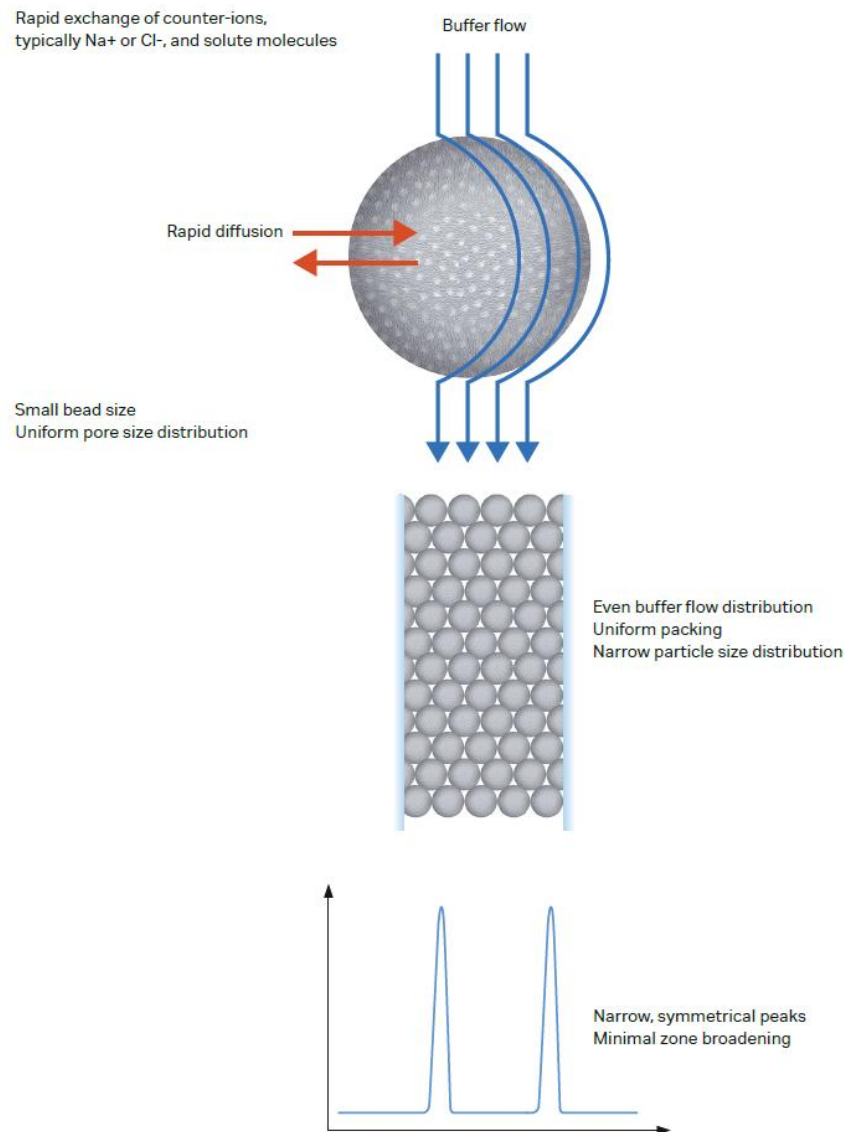
Rozlíšenie separácie, dosiahnuteľné pomocou IEX metódy, predstavuje kombináciu počtu detekovateľných pík na chromatograme (selektivita média), šírka a symetria pík (efektivita) a väzobná kapacita. Všetky tieto faktory sú výsledkom vlastností samotnej matrice, podmienok purifikácie, spôsobu naplnenia kolóny a zvolených prietokov mobilnej fázy.

Rozlíšenie (R_s) je definované ako vzdialenosť medzi maximom pík v porovnaní s priemernou šírkou báz dvoch pík a určuje sa na základe chromatogramu. Získaný údaj umožňuje určiť úroveň relatívnej separácie medzi zvolenými píkmi a môže signalizovať potrebu ďalších optimalizačných krokov.

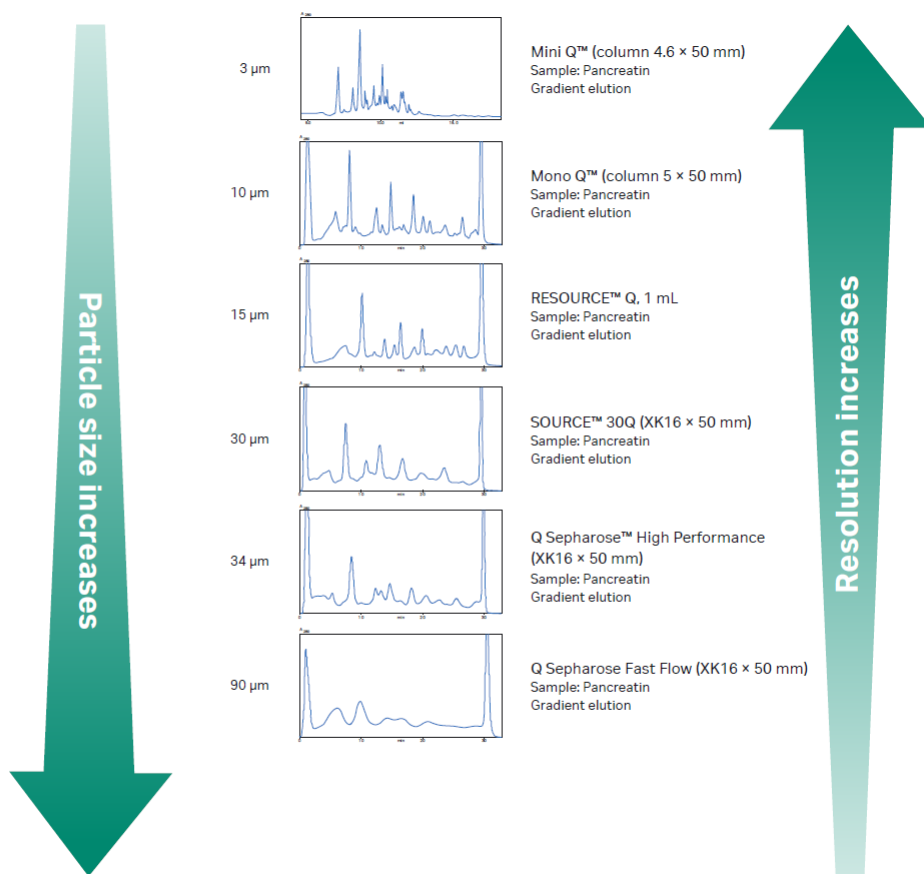


Obr. 19 Výpočet rozlišovacej schopnosti IEX kolóny

Efektivita kolóny sa vzťahuje na tzv. „rozširovanie zóny“ na kolóne tj. nariedenie vzorky a vyjadruje sa počtom teoretických platní (podrobnejšie v časti Gélová filtrácia). Jedným z najväčších faktorov vplývajúcich na rozširovanie zóny je pozdĺžna difúzia separovanej zmesi (proteínov, peptidov, oligonukleotidov) a jej minimalizácia je možná znížením dostupných difúzných oblastí pomocou správneho naplnenia kolóny. Nerovnomerná distribúcia chromatografického média, príliš voľno alebo tesne uložené častice alebo prítomnosť vzduchových bublín majú za následok tvorbu kanálikov a možností difúzie vzorky. Vo všeobecnosti platí, že menšie častice v správne naplnenej kolóne zvýšia efektivitu separácie.

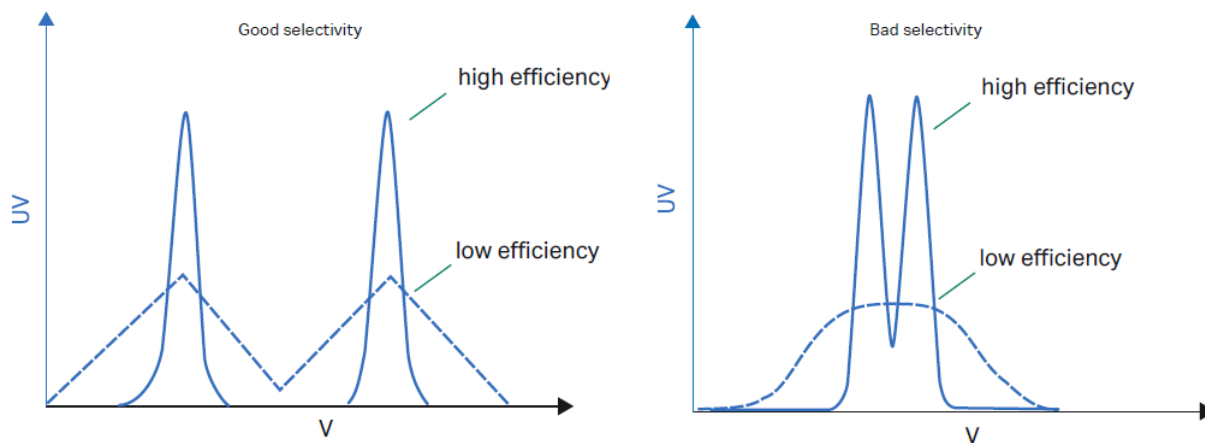


Obr. 20 Faktory ovplyvňujúce efektivitu separácia pri IEX



Obr. 21 Príklady vplyvu veľkosti častíc IEZ média na selektivitu a rozlišovaciu schopnosť IEX média

Selektivita kolóny je z hľadiska rozlíšenia dôležitejším faktorom v porovnaní s efektivitou a závislá je nie len od povahy a počtu funkčných skupín na povrchu chromatografického média ale aj na pH prostredia, iónovej sile a podmienok elúcie. Optimálna selektivita sa dosahuje presnou voľbou pH s cieľom maximalizácie rozdielov v celkových nábojoch separovaných molekúl.



Obr. 22 Vplyv selektivity a efektivity na rozlišovaciu schopnosť IEX

7.1. Zložky IEX chromatografického média

IEX médium môže byť tvorené ako poróznou tak aj neporóznou maticou vyznačujúcou sa chemickou stabilitou, odolnosťou voči pôsobeniu bežne používaných zložiek tlmivých roztokov a rezistenciou voči čistiacim postupom medzi chromatografickými separáciami. Na matici sú substituované funkčné skupiny určujúce náboj média. Vysoká porozita umožňuje zvýšenie dostupnej plochy na interakciu so separovanými molekulami, zatiaľ čo neporózna matica umožňuje vysoký rozlišovací schopnosť.

Tab. 10 Príklady chromatografických matric a priemerná veľkosť častíc

	Form	Mean particle size (µm)
MiniBeads™	Polystyrene/divinyl benzene	3
MonoBeads™	Polystyrene/divinyl benzene	10
SOURCE 15	Polystyrene/divinyl benzene	15
SOURCE 30	Polystyrene/divinyl benzene	30
Sepharose High Performance	Agarose 6%	34
Sepharose Fast Flow	Agarose 6%	90
Sepharose 4 Fast Flow	Agarose 4%	90
Sepharose XL	Agarose 6%, dextran chains coupled to agarose	90
Sepharose Big Beads	Agarose 6%	200
Capto™ ImpRes	High-flow agarose	40
Capto ImpAct	High-flow agarose	50
Capto	High-flow agarose	90

Funkčné skupiny, určujúce náboj média, môžu byť pri IEX slabé alebo silné. Nejedná sa pritom o silu väzby ale stupeň ionizácie konkrétnej skupiny v závislosti od hodnoty pH.

Tab. 11 Príklady funkčných skupín na IEX médiách

Anion exchangers		Functional group
Quaternary ammonium (Q)	strong	$-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Diethylaminoethyl (DEAE)*	weak	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$
Diethylaminopropyl (ANX)*	weak	$-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$
Cation exchangers		Functional group
Sulfopropyl (SP)	strong	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$
Methyl sulfonate (S)	strong	$-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$
Carboxymethyl (CM)	weak	$-\text{CH}_2-\text{COO}^-$

* The active end of the charged group is the same for DEAE and ANX. The difference between them is in the length of the carbon chain of the charged group. DEAE has a diethylaminoethyl group bound to the agarose. ANX has a diethylaminopropyl group attached which prevents the formation of quaternary groups, giving a different selectivity compared to DEAE.

7.2. Protokol

Typický FPLC protokol IEX chromatografie možno rozdeliť na fázu prípravy – ekvilibračie kolóny, fázu naniesenia vzorky a fázu elúcie a zachytenie cieľového proteínu.

Ekvibrácia kolóny je jednoduché premytie 2 až 4 CV tlmivého roztoku vhodného pH (napr. trisHCl pH 8 alebo fosfátový tlmivý roztok pH 7,6) zvoleného na základe vopred známych parametrov proteínu, najmä jeho pI. Pri použití niektorých IEX médií, a hlavne prvom použití prednaplnenej kolóny, odporúča sa ekvilibračiu vykonať trojkrokovu – 1-2 CV ekvilibračný roztok, 1-2 CV elučný roztok a nakoniec 2-4 CV ekvilibračný roztok z dôvodu bazálneho nasýtenia média NaCl a eliminácie skoku v konduktivitě pri prechode z ekvilibračného na elučný roztok v poslednom kroku.

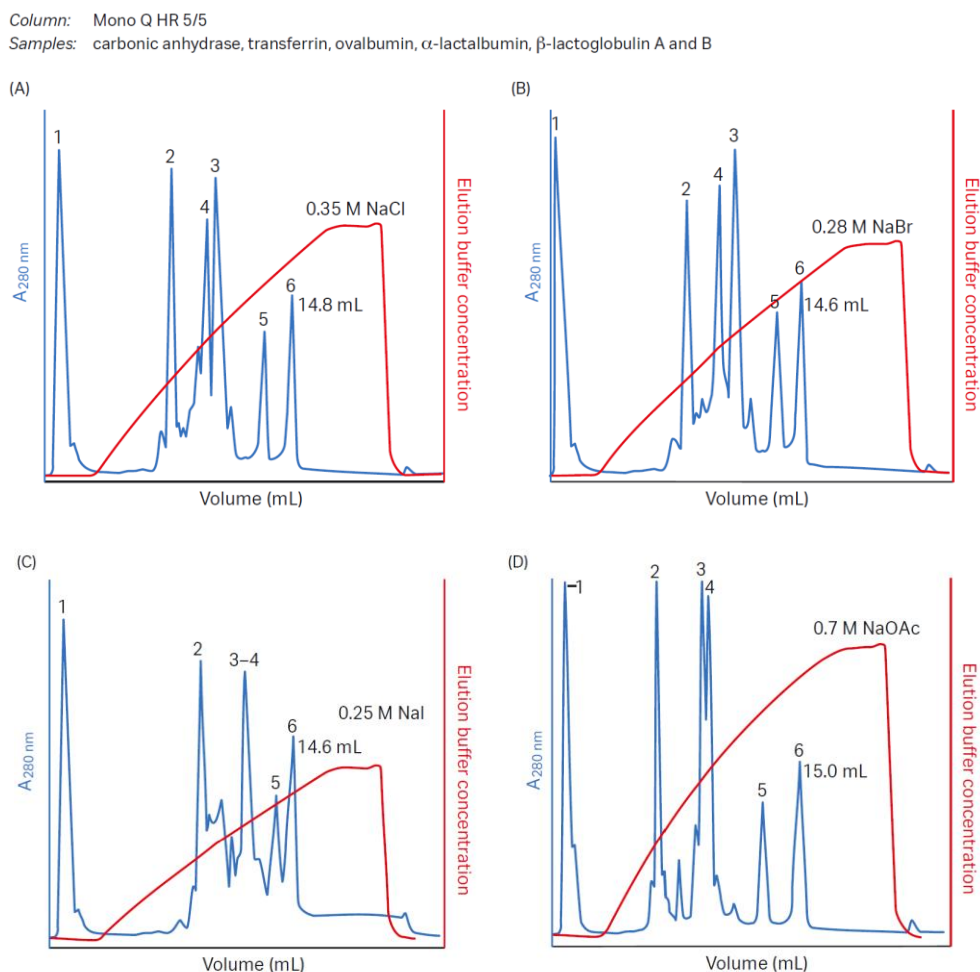
Nanesenie vzorky na ekvilibrovanú kolónu predstavuje krok, ktorý produkuje frakciu oveľa chudobnejšiu na zastúpenie proteínov v porovnaní s IMAC najmä z dôvodu zachytenia väčšiny proteínov v zmesi na IEX médiu pri nízkej iónovej sile ekvilibračného roztoku. K vyššej koncentrácii proteínov v tejto frakcii dochádza len v prípade prekročenia väzobnej kapacity média alebo v prípade neinteragujúcich proteínov za daných podmienok.

Premytie kolóny po nanosení vzorky je krátky, často vynechávaný krok, ktorý odstráni len nepatrné množstvo naviazaných proteínov. Objem obvykle 1 CV.

Krok elúcie predstavuje najviac variabilnú fázu IEX a je najnáročnejší na optimalizáciu. Princípom uvoľňovania proteínov naviazaných na IEX médiu je zvýšenie iónovej sily na úroveň uvoľňovania proteínov alebo skupín proteínov. Prakticky to znamená lineárny, skokový alebo kombinovaný gradient koncentrácie NaCl zabezpečujúci postupné uvoľňovanie frakcií. Lineárny gradient, v objeme viac ako 20 CV predstavuje najčastejšie prevedenie elučného kroku a dosiahnutie postupného uvoľňovania naviazaných proteínov. Píky majú tendenciu byť skôr menej ostré a dochádza k čiastočnému nariedeniu konkrétnych frakcií, v prípade nižšieho rozlíšenia alebo príliš krátkeho gradientu aj čiastočnému prekryvu pík. Po identifikácii frakcie, obsahujúcej cieľový proteín a jej priradeniu ku konkrétnemu píku je možné zvýšiť špecifitu

a optimalizovať elúciu smerom k izolácii cieľového proteínu pomocou krokového alebo kombinácie krokového a lineárneho gradientu NaCl (najčastejšie v rozmedzí 0 až 300 alebo 500 mM). V tomto prípade sa všetky proteíny, s väzbou slabšou ako má cieľový proteín odstránia v jednom kroku pomocou koncentrácie NaCl o 5 až 10 % nižšej ako je potrebná na elúciu cieľového proteínu. Nasleduje krok koncentrácie NaCl, pri ktorej dochádza k uvoľneniu cieľového proteínu a zachytenie tejto frakcie (pri väčších objemoch kolóny sa používa 0,5 až 1 CV, pri nižších 1 až 5 CV). Posledným krokom je premytie kolóny 1 M NaCl na odstránenie takmer všetkých naviazaných proteínov, keďže pri takej iónovej sile je interakcia hocikakého proteínu s IEX médium takmer nemožná. Možností kombinácie lineárneho gradientu a krokového zvýšenia koncentrácie NaCl je množstvo a každá je navrhnutá s ohľadom na individuálne vlastnosti cieľového proteínu.

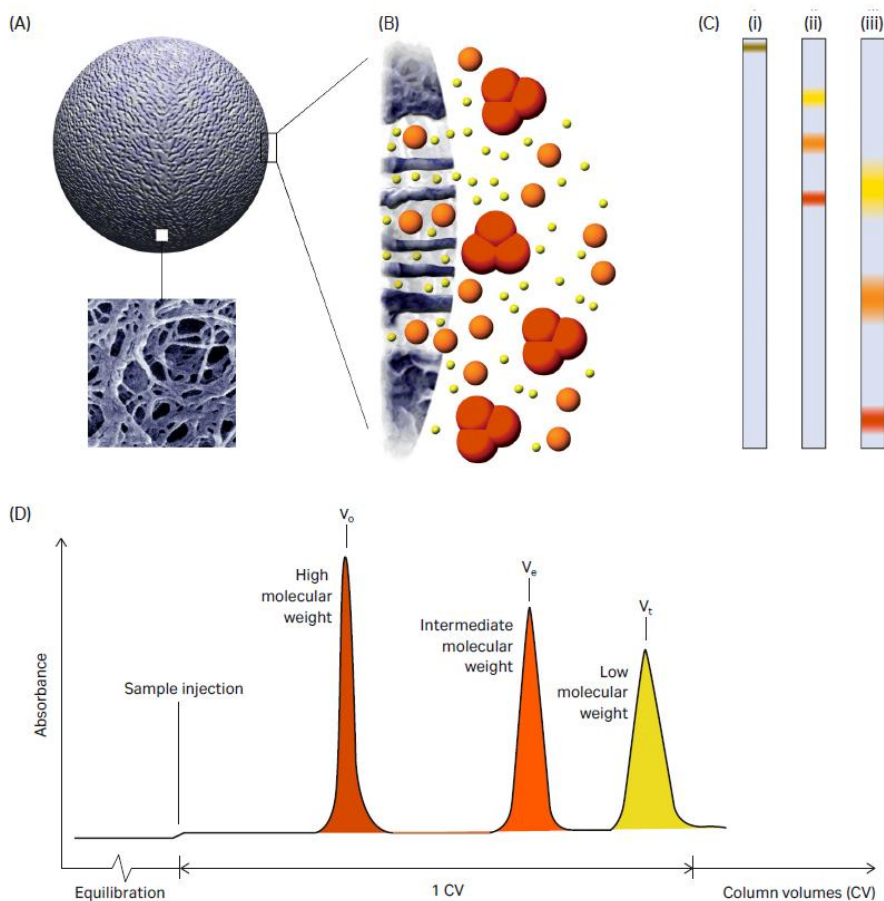
Vplyv na separáciu a selektivitu IEX majú aj faktory ako teplota alebo soľ v elučnom roztoku, ktoré môžu dramaticky zmeniť získaný profil chromatogramu a sú nezanedbateľnou časťou pri optimalizácii IEX purifikácie proteínov.



Obr. 23 Vplyv koncentrácie iónov na selektivitu a rozlíšenie IEX (A) NaCl (B) NaBr (C) NaI a (D) NaOAc

8. Gélová filtrácia

Od uvedenia na trh chromatografického média Sephadex v roku 1959, technika gélovej filtrácie (SEC - z anglického „size exclusion chromatography“) hrala kľúčovú úlohu v purifikácii proteínov, polysacharidov, nukleových kyselín a iných biomolekúl. Na rozdiel od techník ako IEX alebo IMAC sa molekuly neviažu na chromatografické médium, čo znamená, že zloženie tlmivého roztoku priamo neovplyvňuje rozlíšenie (stupeň separácie medzi píkmi). V dôsledku toho je významnou výhodou SEC to, že podmienky sa môžu meniť tak, aby vyhovovali typu vzorky alebo požiadavkám na ďalšie chromatografické kroky, analýzu alebo skladovanie. Ide o všestranú techniku, vhodnú pre biomolekuly citlivé na zmeny pH, koncentráciu kovových iónov alebo kofaktorov alebo drsné podmienky prostredia. Separácie sa môžu uskutočňovať v prítomnosti esenciálnych iónov, kofaktorov, detergentov, močoviny alebo guanidínu HCl pri vysokej alebo nízkej iónovej sile. Okrem toho sa SEC môže vykonávať v širokom rozsahu teplôt pokrývajúcich požiadavky väčšiny experimentov. SEC sa najčastejšie vykonáva v rozsahu 4 °C až 30 °C, ale mnohé SEC kolóny umožňujú separáciu pri ešte vyšších teplotách. Na uskutočnenie separácie sa chromatografické médium naplní do kolóny, aby sa vytvorili vhodné podmienky z hľadiska vzdialenosti častíc, ich usporiadania a dostupnosti pórov.



Obr. 24 Proces SEC. (A) Schematický obrázok častice so zväčšením z elektrónového mikroskopu. (B) Schematický náčrt molekúl vzorky difundujúcich do pórov častice. (C) Grafický popis separácie: (i) vzorka sa naniesie na kolónu; (ii) najmenšia molekula (žltá) je oneskorenejšia ako najväčšia molekula (tmavooranžová); (iii) najväčšia molekula sa eluuje z kolóny ako prvá. Rozšírenie pásu spôsobuje významné riedenie proteínových zón počas chromatografie. (D) Schematický chromatogram.

Chromatografické SEC médiá pozostávajú z poréznej matrice chemicky a fyzikálne stabilných sférických častíc s vlastnosťami, ktoré minimalizujú adsorpciu biomolekúl. Kvapalina vo vnútri pórov alebo stacionárna fáza je v rovnováhe s kvapalinou (tlmivý roztok alebo mobilná fáza) mimo častíc. Zložky vzorky sa eluujú izokraticky, to znamená, že zloženie tlmivého roztoku zostáva počas separácie konštantné. Počas separácie nie je potrebné používať rôzne tlmivé roztoky. Na konci separácie je však často zahrnutý premývací krok s použitím tlmivého roztoku, aby sa odstránili molekuly, ktoré mohli zostať na kolóne, a aby sa kolóna pripravila na nový cyklus. SEC krok je možné zaradiť priamo po inom type chromatografie (IMAC, IEX, HIC) bez zásadného vplyvu na účinnosť separácie.

SEC je možné rozdeliť do troch hlavných aplikačných prístupov:

1. Preparatívna gélová filtrácia
2. Analytická gélová filtrácia
3. Odsolenie a výmena tlmivého roztoku

Preparatívna SEC je separácia biomolekúl s frakcionáciou na základe veľkosti s vysokým rozlíšením. Preparatívna SEC sa uskutočňuje na izoláciu jednej alebo viacerých zložiek vzorky. Oddelené zložky možno priamo preniesť do vhodného tlmivého roztoku na testovanie alebo skladovanie. Malé objemy vzoriek 0,5 % až 4 % celkového objemu kolóny sa aplikujú pri nízkych prietokoch s použitím dlhých kolón, často 60 cm alebo dlhších. Veľkosť častíc chromatografického média je bežne $> 12 \mu\text{m}$, čo poskytuje nízky protitlak v kolóne. Rozlíšenie preparatívnej SEC sa mení od vysokého po miernejšie v závislosti od veľkosti častíc média. Na dosiahnutie optimálnych výsledkov sa používajú vzorky s malým počtom zložiek, ako sú tie, ktoré sú čiastočne purifikované inými chromatografickými technikami. Vďaka tomu je preparatívna SEC vhodná pre konečný krok leštenia v schéme chromatografickej purifikácie.

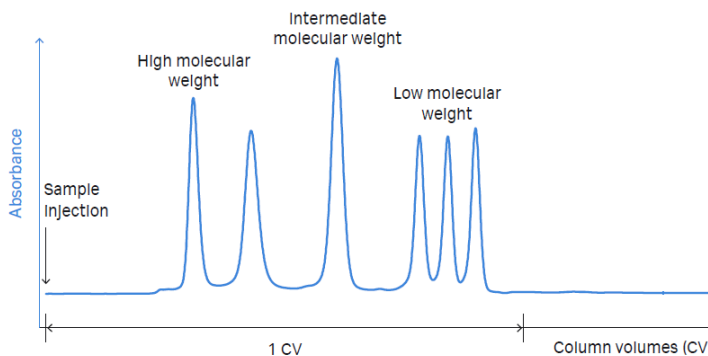


Fig 1.3. Typical high-resolution SEC separation.

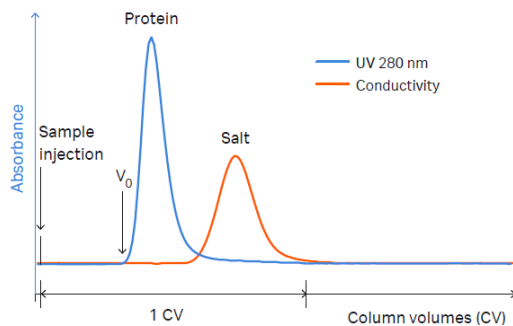


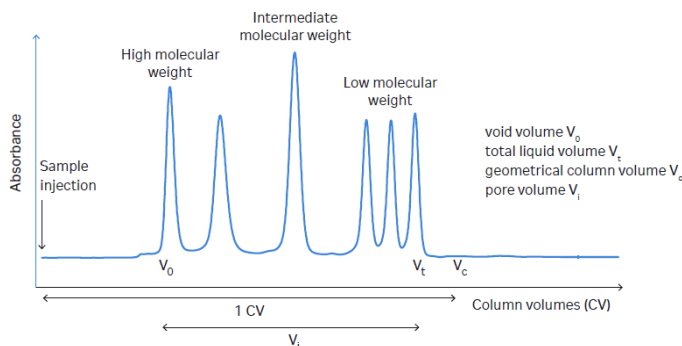
Fig 1.4. Typical group separation.

Analytická SEC je separácia na základe veľkosti s vysokým rozlíšením bez frakcionácie. Často je analýza spojená s vysoko selektívnymi detektormi, ako sú hmotnostné spektrometre a fotodiódové polia (DAD), ako aj viacuhlové detektory rozptylu svetla (MALS) alebo fluorescenčné detektory. Analytická SEC sa vykonáva na kontrolu kvality vzorky alebo na štúdium vlastností biomolekuly. Malé objemy vzoriek, často 0,3 % až 0,5 % objemu kolóny, sa aplikujú pri nízkych prietokových rýchlostiach s použitím dlhých kolón, typicky 30 cm. Veľkosť častíc je bežne 4 až 12 μm , čo poskytuje vysoké rozlíšenie. Prednaplnené kolóny SEC sú vynikajúcou voľbou na zabezpečenie spoľahlivých výsledkov. Analytický SEC možno použiť aj na rýchlu kontrolu čistoty a skríning. Na tento účel použite kratšie stĺpiky s priemerom 15 cm, ktoré poskytujú adekvátne rozlíšenie za krátkych chromatografických behov a nízkej spotreby tlmivého roztoku. Faktom ale zostáva, že krátke kolóny vo všeobecnosti majú nižšie rozlíšenie v porovnaní s dlhšími kolónami s rovnakým médiom.

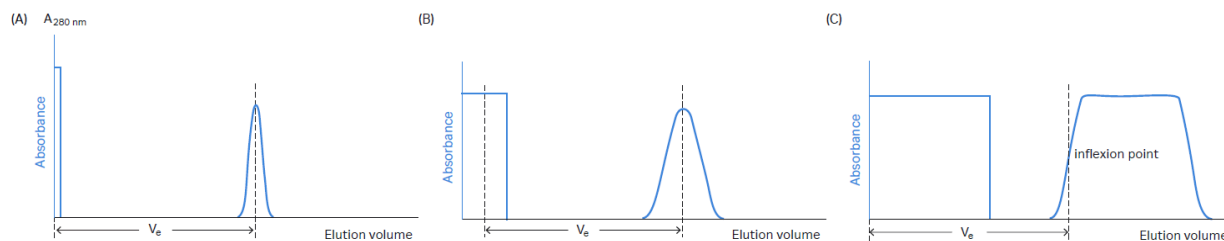
Odsoľovanie a výmena tlmivých roztokov je oddelenie skupín, pri ktorom sa oddeľujú malé molekuly, ako je soľ alebo voľné značky, od skupiny väčších molekúl, ako sú proteíny. Vzorky môžu byť pripravené na uskladnenie alebo na iné chromatografické techniky a testy. Veľké objemy vzoriek – až 30 % celkového objemu kolóny – je možné aplikovať pri vysokých prietokoch pomocou širokých krátkych kolón. Veľkosť častíc je relatívne veľká, poskytuje nízky protitlak kolóny a vysoké prietokové rýchlosti. Veľké molekuly nemajú žiadny alebo obmedzený prístup k pórom média, a preto sa eluujú v prázdnom objeme V_0 alebo tesne za ním. Malé molekuly, ako sú soli, majú plný prístup k pórom a pohybujú sa po stĺpci pomalšie. Tieto molekuly sa zvyčajne eluujú tesne predtým, ako kolónou prejde 1 CV tlmivého roztoku.

8.1. Teória

Výsledky zo SEC sa zvyčajne vyjadrujú ako chromatogram (elučný profil), ktorý ukazuje kolísanie koncentrácie zložiek vzorky, keď sa eluujú z kolóny v poradí ich molekulovej veľkosti. Molekuly, ktoré sú väčšie ako najväčšie póry v matrici, nemôžu vstúpiť do matrice. Tieto molekuly sa eluujú spolu v prázdnom objeme, V_0 , keď prechádzajú priamo cez kolónu. Pre dobre naplnenú kolónu je prázdny objem ekvivalentný približne 30 % celkového objemu kolóny. Molekuly s čiastočným prístupom k pórom matrice sú oddelené a eluované z kolóny v poradí klesajúcej veľkosti. Malé molekuly, ako sú soli, majú plný prístup k pórom a nie sú oddelené, keď sa pohybujú po kolóne. Tieto molekuly sa zvyčajne eluujú pri celkovom objeme kvapaliny (V_t), tesne predtým, ako kolónou prejde 1 CV (alebo V_c) tlmivého roztoku. Z chromatogramu je zrejмый elučný objem (V_e), často označovaný ako retenčný objem (V_R). Ako je znázornené na obrázku 1.6, existujú tri rôzne spôsoby merania V_e v závislosti od objemu vzorky aplikovanej na kolónu.



Obr. 25 Teoretický SEC chromatogram



Obr. 26 Meranie elučného objemu, V_e . (A) Veľkosť vzorky je zanedbateľná v porovnaní s objemom náplňového lôžka. (B) Veľkosť vzorky nie je zanedbateľná v porovnaní s objemom náplňového lôžka. (C) Vzorka s elučnou krivkou s platô.

V_e sa mení s celkovým objemom naplneného média (V_c) a spôsobom, akým bola kolóna naplnená. V dôsledku toho je elúcia vzorky najlepšie charakterizovaná distribučným (alebo rozdeľovacím) koeficientom (K_d). K_d je nezávislá od rozmerov kolóny a teda umožňuje porovnanie a predikciu medzi kolónami s rôznymi veľkosťami, ak sa použije rovnaké médium.

K_d opisuje, ako je molekula distribuovaná medzi dve fázy:

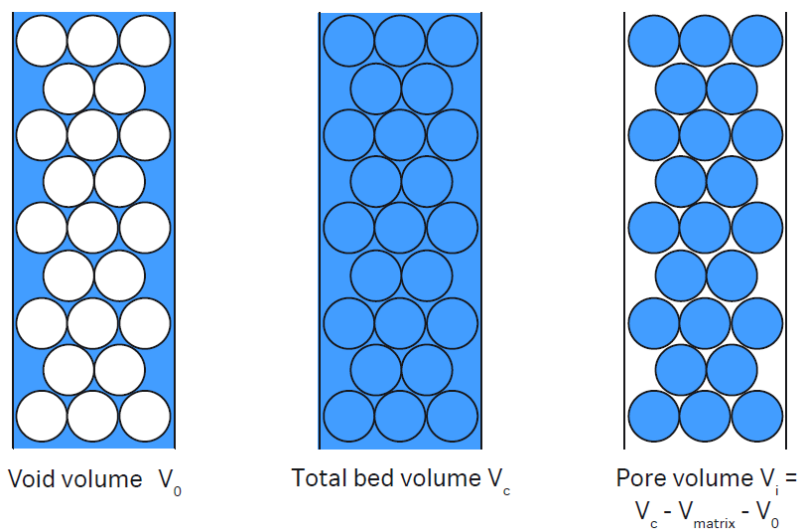
$$K_d = \frac{\text{Concentration of solute in stationary phase}}{\text{Concentration of solute in mobile phase}}$$

Mobilná fáza SEC živice zodpovedá roztoku medzi časticami, to znamená prázdneho objemu V_0 . Stacionárna fáza zodpovedá objemu pórov, to znamená objemu roztoku vo vnútri častíc, V_i . Molekuly s prístupom k celému objemu pórov sa eluujú pri V_t . Tieto molekuly sa voľne distribuuju medzi mobilnú a stacionárnu fázu. Inými slovami, K_d predstavuje časť stacionárnej fázy živice, ktorá je k dispozícii na difúziu danej molekuly:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_{\text{matrix}} - V_0} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

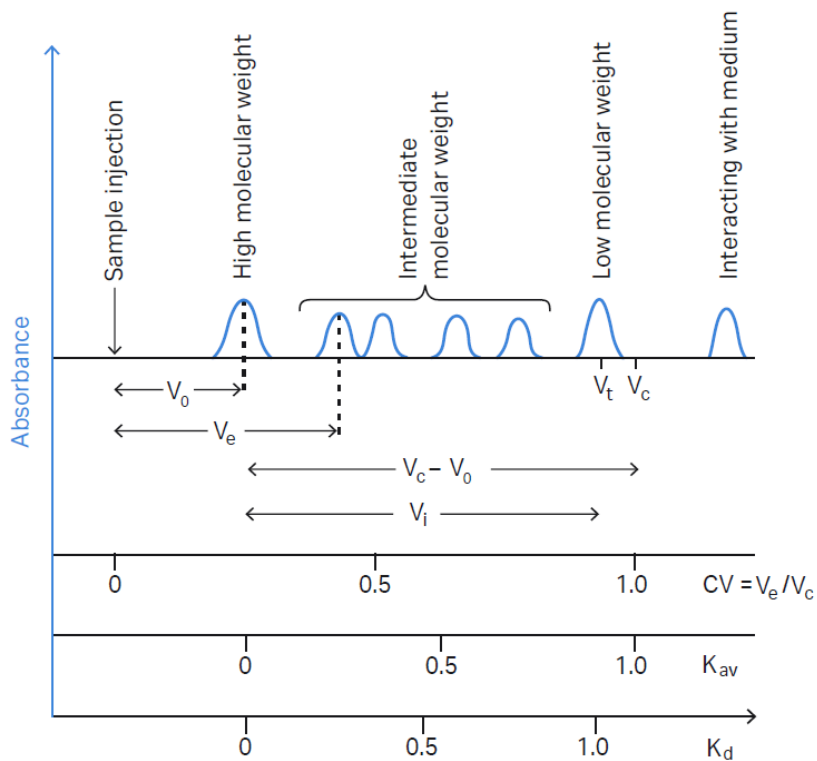
Veľké molekuly prechádzajúce priamo cez živicu bez toho, aby vstúpili do častíc, budú mať K_d rovné 0, zatiaľ čo malé molekuly s plným prístupom k pórom častice budú mať K_d rovné 1. V praxi je často ťažké určiť V_i . Namiesto toho sa často používa priemerná distribučná konštanta K_{av} . Tu je V_t nahradené ľahšie určeným geometrickým objemom naplneného média, V_c :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$



Obr. 27 Schematické znázornenie V_0 , V_c a V_i . Zjednodušený výraz $V_c - V_0$ bude zahŕňať objem pevnej látky, ktorá tvorí maticu, V_{matrix}

Kedže zjednodušený výraz pre stacionárnu fázu ($V_c - V_0$) zahŕňa objem pevnej matrice, ktorý je nedostupný pre všetky molekuly rozpustenej látky, K_{av} nie je skutočný distribučný koeficient. Avšak pre danú živicu existuje konštantný pomer medzi K_{av} a K_d , ktorý je nezávislý od povahy molekuly alebo jej koncentrácie. K_{av} sa dá ľahko určiť a podobne ako K_d definuje správanie vzorky nezávisle od rozmerov kolóny a balenia. K_{av} je viac ovplyvnená zmenami parametrov systému, ako je prietok a mŕtvy objem, ako K_d . Presné určenie výšky lôžka je rozhodujúce pre stanovenie V_c . Iné metódy normalizácie údajov poskytujú hodnoty, ktoré sa líšia v závislosti od toho, ako dobre je stĺpec zabalený.



$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$

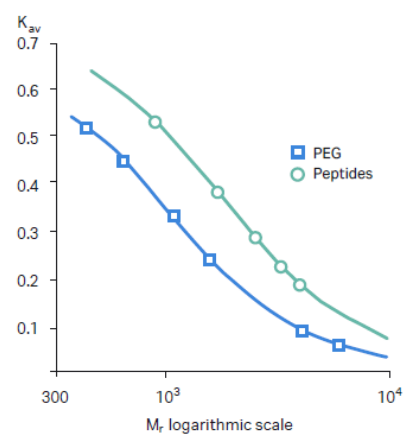
$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_{matrix} - V_0} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Obr. 28 Vzťahy popisujúce elúciu

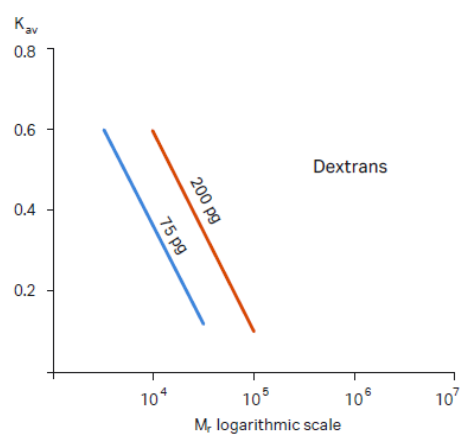
8.2. Krivky selektivity a výber chromatografického média

Distribučné koeficienty K_d a K_{av} súvisia s veľkosťou molekuly. Molekuly podobného tvaru a hustoty demonštrujú sigmoidálny vzťah medzi ich hodnotami K_d (alebo K_{av}) a logaritmi ich relatívnych molekulových hmotností (M_r). Kalibračné krivky zostrojené týmto spôsobom sa nazývajú krivky selektivity. Vzťah medzi $\log M_r$ a K_d (alebo K_{av}) je prakticky lineárny v značnom rozsahu. Praktický pracovný rozsah K_d je približne 0,1 až 0,9. Selektivita SEC chromatografického média je inherentnou vlastnosťou matrice. Závisí výlučne od distribúcie veľkosti pórov a je vizualizovaná krivkou selektivity. Sklon krivky selektivity súvisí s tvarom analyzovaných molekúl, to znamená, že krivka selektivity bude pre lineárne molekuly strmšia ako pre globulárne molekuly podobnej veľkosti.

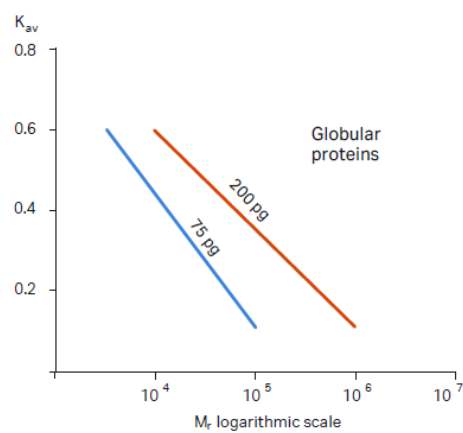
Superdex 30 prep grade



Superdex 75 prep grade and Superdex 200 prep grade



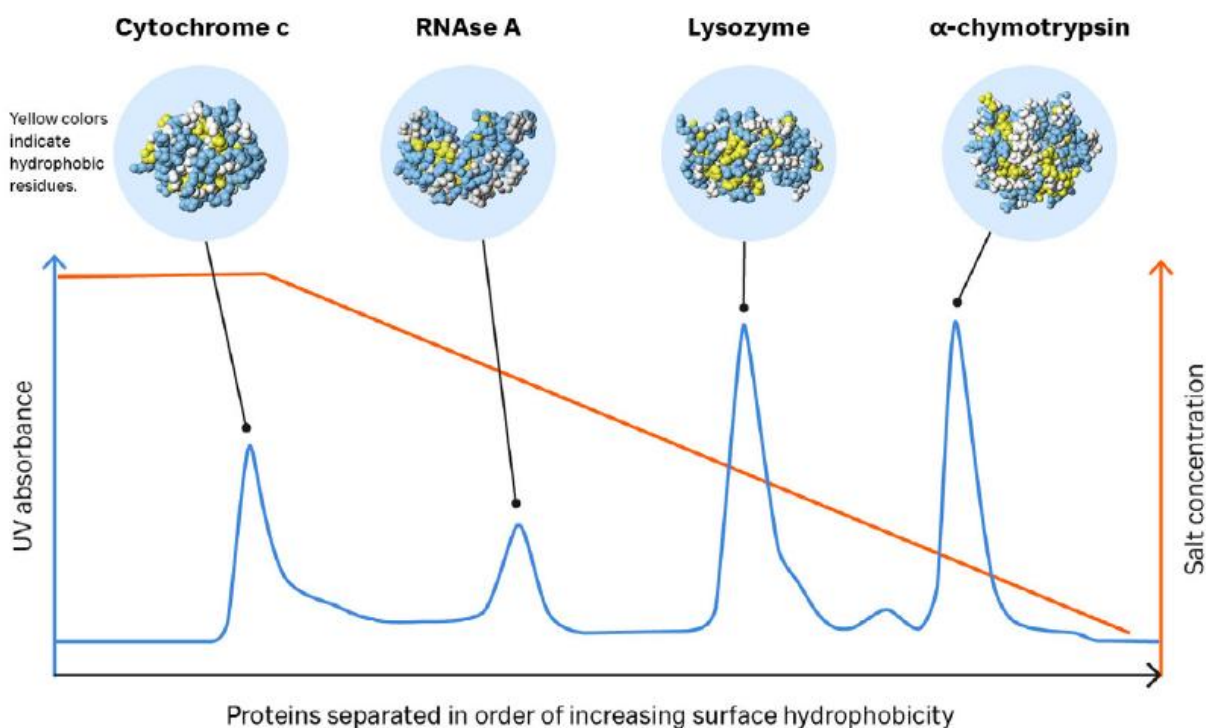
Superdex 75 prep grade and Superdex 200 prep grade



Obr. 29 Krivky selektivity v závislosti od použitého SEC média

9. Chromatografia na základe hydrofóbnej interakcie

Chromatografia na základe hydrofóbnej interakcie (HIC – z anglického „hydrophobic interaction chromatography“) využíva na rozdelenie zmesi molekúl ich reverzibilnú interakciu s hydrofóbnym povrchom HIC chromatografického média. Týmto spôsobom je možné proteíny separovať na základe stupňa ich povrchovej hydrofobicity, pričom prítomnosť solí v tlmivých roztokoch môže výrazne ovplyvniť interakciu proteínov s chromatografickým médiom. Platí, že vysoká iónová sila zvyšuje silu interakcie a naopak, nízka iónová sila túto interakciu oslabuje. Ide o opačný jav, aký pozorujeme pri iónovo-výmennej chromatografii a na základe neho je aj založený chromatografický postup separácie a selektívnej elúcie proteínov z komplexnej zmesi.



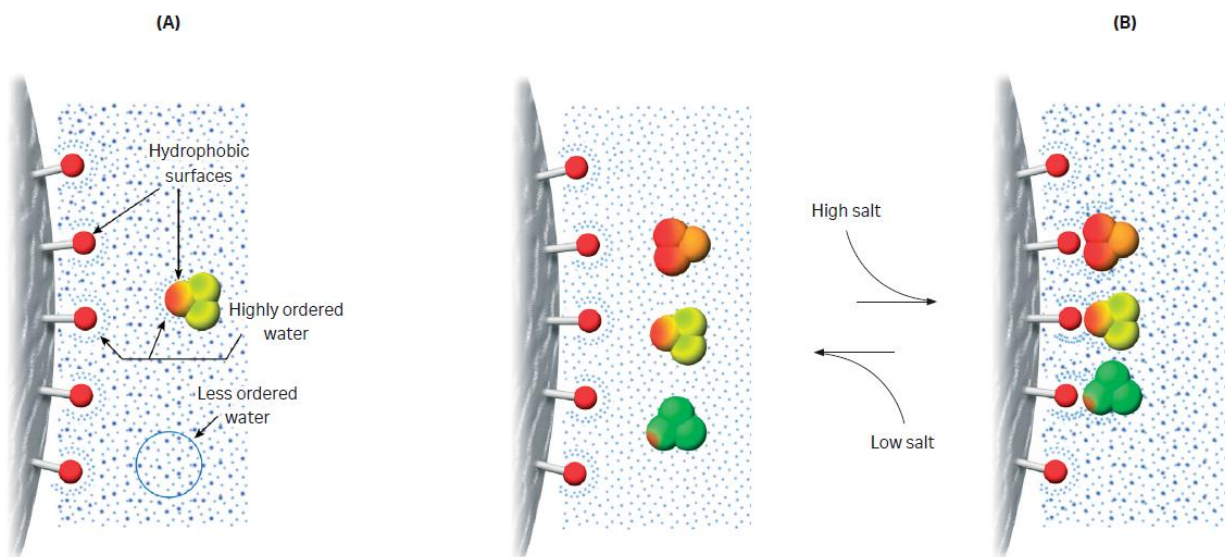
Obr. 30 Separácia proteínov na základe zvyšujúcej sa povrchovej hydrofobicity (žltá – hydrofilné zvyšky, modrá – hydrofóbne zvyšky)

Voda je dobrým rozpúšťadlom pre polárne látky, ale zlým rozpúšťadlom pre nepochopiteľné látky. V akejkoľvek kvapalnej vode sa väčšina molekúl vody nachádza v zhlukoch kvôli vodíkovým väzbám medzi nimi. Počas rozpadu vodných zhlukov je krátky, ale konečným efektom je silná súdržnosť medzi molekulami vody. To sa prejavuje napríklad vysokým bodom varu. Na rozhraní vzduch-voda sa molekuly vody usporiadajú do silnej škrupiny s vysoko usporiadanou štruktúrou. Tu už nie je možnosť vytvárať vodíkové väzby v rovnováhe – namiesto toho dominuje kvapalná strana rozhrania. To vedie k usporiadanej štruktúre, ktorá sa prejavuje ako silné povrchové napätie. Čokoľvek, čo ovplyvňuje stabilitu vodnej škrupiny, ovplyvňuje aj povrchové napätie. Keď sa hydrofóbná látka, ako je proteín alebo hydrofóbny ligand, ponorí do vody, stane sa niečo analogické s javom povrchového napätia. Molekuly vody nemôžu „zmáččať“ povrch hydrofóbnej látky a namiesto toho tvoria okolo látky vysoko usporiadaný obal kvôli svojej neschopnosti vytvárať vodíkové väzby vo všetkých smeroch. Minimalizácia rozsahu tohto obalu znižuje počet usporiadaných molekúl vody – to znamená termodynamicky priaznivejšiu situáciu, v ktorej sa

entropia zvyšuje. Na dosiahnutie entropie sa hydrofóbne látky musia zlúčiť a minimalizovať celkovú plochu obalu. To znamená, že hydrofóbna interakcia závisí skôr od správania molekúl vody než od priamej príťažlivosti medzi hydrofóbnymi molekulami.

Trojozmerná štruktúra proteínu je výsledkom intramolekulárnych interakcií, ako aj interakcií s okolitým rozpúšťadlom. Pre ľahko rozpustné proteíny je týmto rozpúšťadlom voda, ktorá typicky presúva hydrofóbne bočné reťazce do vnútra proteínu. Konečná štruktúra je výsledkom termodynamického kompromisu, ktorý najlepšie vyhovuje okolitému roztoku. Hoci vnútro globulárnych proteínov obsahuje väčšinu hydrofóbných aminokyselinových zvyškov, niektoré sú odkryté, a to vedie k hydrofóbnym škvŕnám na povrchu proteínu. Pretože proteíny nesú na svojom povrchu hydrofilné aj hydrofóbne oblasti, môžu sa pri vysokých koncentráciách určitých solí precipitovať v dôsledku vynútenej hydrofóbnej interakcie. Zmeny iónovej sily, prítomnosť organických rozpúšťadiel, teplota a pH (najmä v izoelektrickom bode, pI , keď nie je žiadny čistý povrchový náboj) môžu ovplyvniť štruktúru a rozpustnosť proteínu a následne aj interakciu s inými hydrofóbnymi povrchmi, ako sú tie v chromatografických médiách používaných na HIC.

Hydrofóbne ligandy na HIC médiách môžu interagovať s hydrofóbnymi povrchmi proteínov. V čistej vode je akýkoľvek hydrofóbny účinok príliš slabý na to, aby spôsobil interakciu medzi ligandom a proteínmi alebo medzi samotnými proteínmi. Niektoré soli však zosilňujú hydrofóbne interakcie a pridanie takýchto solí spôsobuje väzbu (adsorpciu) na HIC živice. Pri selektívnej elúcii (desorpcii) postupne sa znižuje koncentrácia soli a zložky vzorky sa následne eluujú v poradí podľa úrovne hydrofóbnosti. Výsledok HIC separácie je založený na vzájomnom pôsobení medzi prevalenciou a distribúciou povrchovo exponovaných hydrofóbných aminokyselinových zvyškov, hydrofóbnosťou chromatografického média, povahou a zložením vzorky a typom a koncentráciou soli použitej v tlmivých roztokoch.



Obr. 31 (A) Vysoko usporiadané vodné vrstvy obklopujú hydrofóbne povrchy ligandov a proteínov. Hydrofóbne látky sú nútené spájať sa, aby minimalizovali celkovú plochu takýchto vrstiev (maximalizovali entropiu). Sali zvyšujú hydrofóbnu interakciu. (B) Rovnováha hydrofóbnej interakcie je riadená prevažne koncentráciou soli.

9.1. Kroky HIC separácie

HIC médiá sa skladajú z ligandov, ktoré obsahujú alkylové alebo arylové skupiny viazané na inertnú maticu sférických častíc. Matrica je pórovitá, aby poskytovala vysoký vnútorný povrch, zatiaľ čo ligand hrá významnú úlohu v konečnej hydrofóbnosti živice. Naplnenie živice do kolóny vytvára nabitú lôžku. Vyrovnanie lôžka tlmivým roztokom vyplní póry matrice a priestor medzi časticami. Stredne vysoké koncentrácie solí podporujú interakciu medzi proteínom a médiom, typicky 1 až 2 M síran amónny alebo 3 M NaCl. Typ soli a koncentráciu potrebnú v štartovacom tlmivom roztoku sa volí tak, aby sa zabezpečilo, že sa požadované proteíny viažu na médium a že iné menej hydrofóbne proteíny a nečistoty prechádzajú priamo cez kolónu. Väzbové podmienky sú kľúčovým faktorom pri akejkoľvek HIC separácii. V tejto fáze môžu významne ovplyvniť konečnú selektivitu, rozlíšenie a väzbovú kapacitu cieľového proteínu (proteínov). Vzorky by mali byť v rovnakých soľných podmienkach ako štartovací tlmivý roztok, ale výmena roztokov je zriedkakedy potrebná, pretože ióny a pH vzorkového tlmivého roztoku hrajú menej dôležitú úlohu v porovnaní so soľami. V prípade potreby je možné pH priamo upraviť. Keďže mnohé proteíny sa môžu precipitovať pri zvýšených koncentráciách soli, potrebné je pred samotnou purifikáciou skontrolovať „okno stability“ cieľového proteínu (proteínov) pri rôznych koncentráciách soli. Precipitácia cieľového proteínu môže znemožniť separáciu alebo v najlepšom prípade výrazne znížiť výťažok. Najjednoduchším prístupom k určeniu „okna stability“ môže byť pozorovanie vzoriek v skúmavke pri rôznych koncentráciách soli a monitorovanie aktivity proteínu, ktorý zostal v supernatante. Keď je nanášanie vzorky dokončené a kolóna je premytá tak, aby sa všetky neviazané proteíny odmyli (t. j. UV signál sa vrátil na základnú hodnotu), podmienky sa zmenia, aby sa začala elúcia. Na elúciu proteínov sa využíva zníženie koncentrácie soli v elučnom tlmivom roztoku. S poklesom hladiny soli sa z kolóny začnú uvoľňovať proteíny s najnižšou hydrofóbnosťou. Na riadenie zmien koncentrácie soli a diferencovanú elúciu proteínov v purifikovanej, koncentrovanej forme sa štandardne používajú gradienty a platí, že proteíny s najvyšším stupňom hydrofóbnosti budú najsilnejšie zadržané a budú eluované ako posledné.

Premytie kolóny s tlmivým roztokom bez solí odstráni na konci elúcie najpevnejšie viazané proteíny. Ak bol správne zvolený HIC médium a posúdená hydrofobicita proteínov vo vzorke, v tomto kroku budú eluované všetky proteíny. Kolónu je následne možné znovu ekvilibrovať štartovacím tlmivým roztokom pred aplikáciou ďalších vzoriek v ďalšom cykle. Hydrofóbná interakcia je občas taká silná, že odstránenie všetkého viazaného materiálu si vyžaduje „drsnejšie“ podmienky, napríklad 0,5 až 1,0 M NaOH, 70 % etanol alebo 30 % izopropanol. Pred opätovným umiestnením kolóny do štartovacieho tlmivého roztoku s vysokým obsahom soli je nutné tieto látky odmyť vodou. Alternatívou je voľba podmienok, ktoré maximalizujú väzbu hydrofóbnych kontaminantov a umožnia cieľovému proteínu (proteínom) prejsť kolónou.

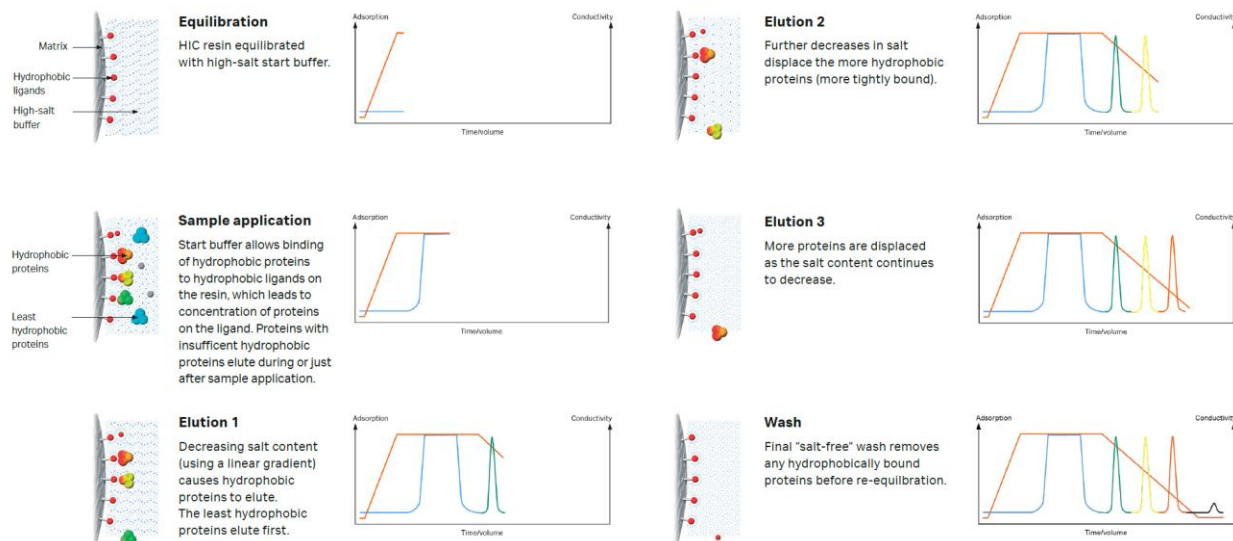
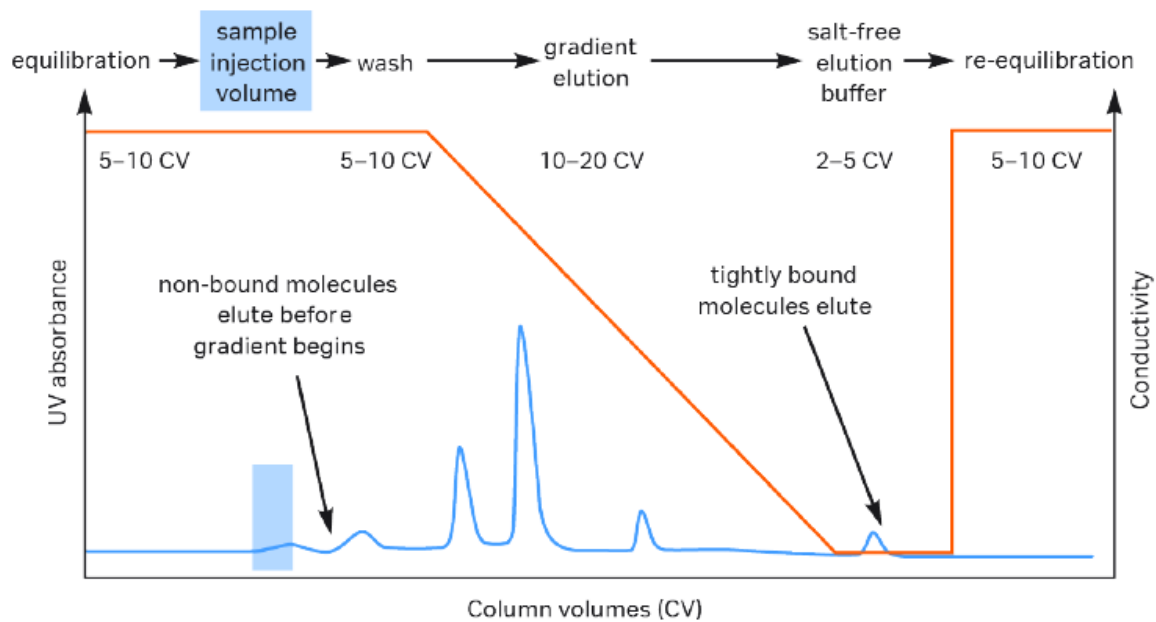
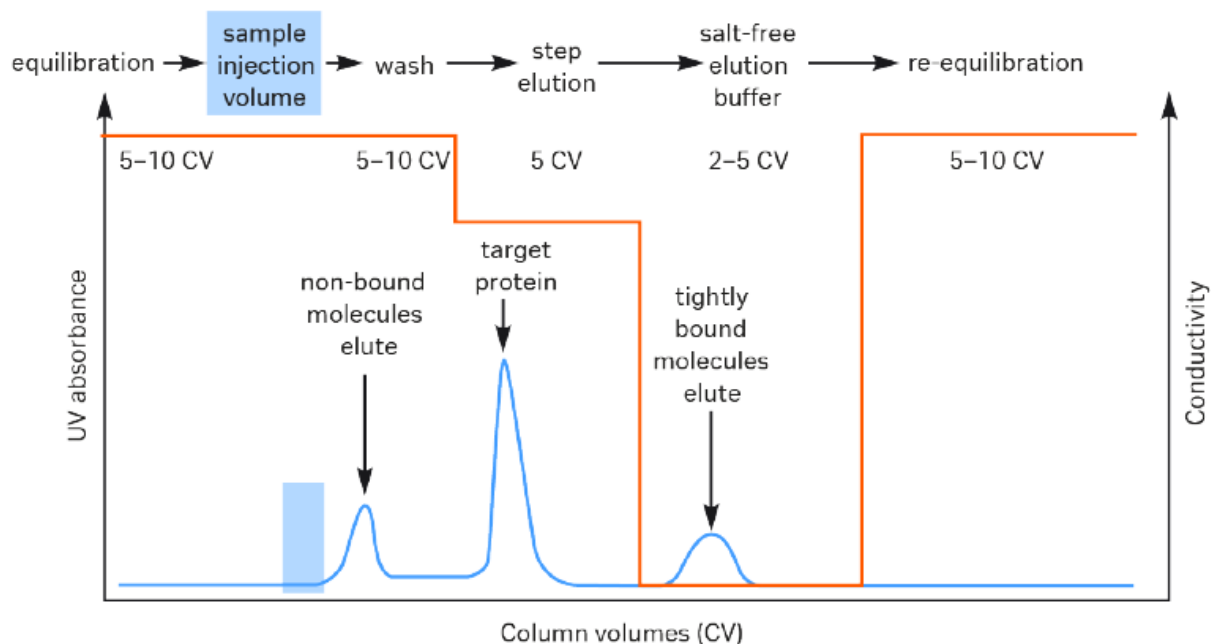


Fig 1.4. Steps in a HIC separation

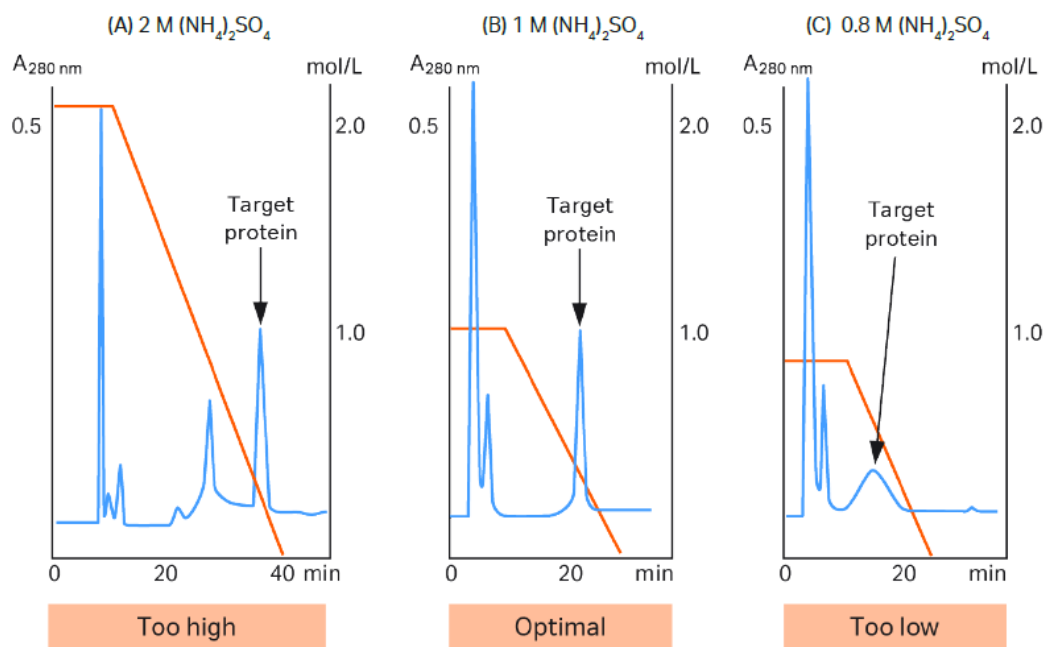
Obr. 32 Kroky separácie proteínov pomocou HIC



Obr. 33 Typický chromatogram HIC (gradientová elúcia)



Obr. 34 Typický chromatogram HIC (kroková elúcia)



Obr. 35 Vplyv koncentrácie soli na selektivitu a rozlíšenie HIC

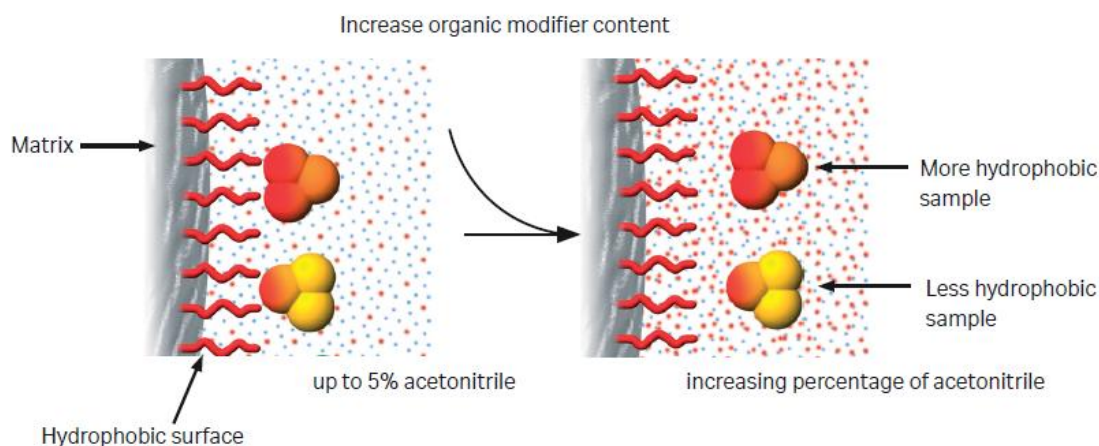
10. Chromatografia na reverznej fáze

Chromatografia na reverznej fáze (RPC - z anglického „reversed phase chromatography“) sa stáva čoraz dôležitejšou pre separáciu a analýzu proteínov, peptidov a nukleových kyselín s vysokým rozlíšením. Táto technika je dobrou voľbou pre aplikácie, ako je mapovanie peptidov alebo kontrola čistoty, a často sa používa na konečné dočistenie oligonukleotidov a peptidov. RPC separuje molekuly, podobne ako HIC, podľa rozdielov v ich hydrofóbnosti. Teoreticky sú HIC a RPC úzko súvisiace techniky, pretože obe sú založené na interakciách medzi hydrofóbnymi oblasťami na povrchu biomolekúl a hydrofóbnymi povrchmi chromatografického média. V praxi sa však tieto techniky veľmi líšia. Povrch RPC média je zvyčajne hydrofóbnejší ako povrch HIC média. To vedie k silnejším interakciám, ktoré sa pre úspešnú elúciu musia zvrátiť pomocou nepolárnych organických rozpúšťadiel, ako je acetonitril alebo metanol. HIC živice ponúkajú alternatívny spôsob využitia hydrofóbných vlastností biomolekúl prácou v polárnejšom a menej denaturujúcom prostredí, čiže RPC ponúka veľkú flexibilitu v separačných podmienkach. Pomocou tejto techniky možno dosiahnuť separáciu s extrémne vysokým rozlíšením, čím sa rozlíšia zložky, ktoré majú len malé rozdiely v hydrofóbnosti. Separácie sa môžu vykonávať pomocou izokratickej elúcie; najčastejšie sa však na minimalizáciu času behu používa gradientová elúcia.

Terminológia, ktorá sa občas spája s RPC, odráža históriu vývoja tejto techniky. Termín „reverzná fáza“ pochádza z chromatografie s „normálnou fázou“ – technika s „normálnou fázou“ využíva hydrofilnú stacionárnu fázu spolu s hydrofóbnymi mobilnými fázami (s použitím organických rozpúšťadiel, ako je hexán alebo metylénchlorid). V RPC je stacionárna fáza hydrofóbná, preto sa v mobilnej fáze používa voda alebo organické rozpúšťadlo, t. j. stacionárna fáza je hydrofóbnejšia ako mobilná fáza. RPC médiá sa môžu označovať ako adsorbenty, zatiaľ čo tlmivé roztoky sa môžu označovať ako mobilné fázy.

RPC sa tiež používa na odsoľovanie a koncentrovanie hydrofóbných zložiek vzorky. Ióny soli prechádzajú kolónou RPC, zatiaľ čo sa hydrofóbne zložky viažu a efektívne koncentrujú na kolóne, kým sa neodstránia jednoduchým krokom eluovania. RPC sa preto používa na prípravu vzoriek, ako aj na separácie vyžadujúce vysokú selektivitu. Schopnosť odsoľovať a používať organické rozpúšťadlá robí z RPC ideálnu techniku v spojení s hmotnostnou spektrometriou (MS). RPC sa často kombinuje s inými chromatografickými technikami na dosiahnutie identifikácie a charakterizácie neznámych proteínov a peptidov. Multidimenzionálna kvapalinová chromatografia (MDLC) s následnou MS je rýchlym a presným riešením pre identifikáciu a charakterizáciu proteínov v proteomike a RPC je jednou z kľúčových techník používaných v tomto procese.

V prítomnosti nepolárnych rozpúšťadiel je pravdepodobnejšie, že komplexné enzýmy a viaczložkové proteíny stratia aktivitu ako peptidy, oligonukleotidy alebo vysoko stabilizované, zosieťované proteíny. Interakcia proteínov alebo polypeptidov s hydrofóbnym povrchom v prítomnosti organických rozpúšťadiel vo všeobecnosti vedie k určitej strate terciárnej štruktúry, čo často vedie k odlišnému konformačnému stavu, ktorý môže interagovať odlišne s RPC médiom. Denaturáciu a následnú stratu aktivity však možno minimalizovať návratom biomolekuly do podmienok, ktoré uprednostňujú natívnu štruktúru, ako dokazuje široké používanie RPC na rozsiahle purifikáciu rekombinantných a syntetických proteínov a peptidov, ako je inzulín a rastový hormón. Pokiaľ nedôjde k precipitácii, denaturácia nie je problémom pri používaní RPC na purifikáciu proteínu alebo peptidu na stanovenie primárnej štruktúry.



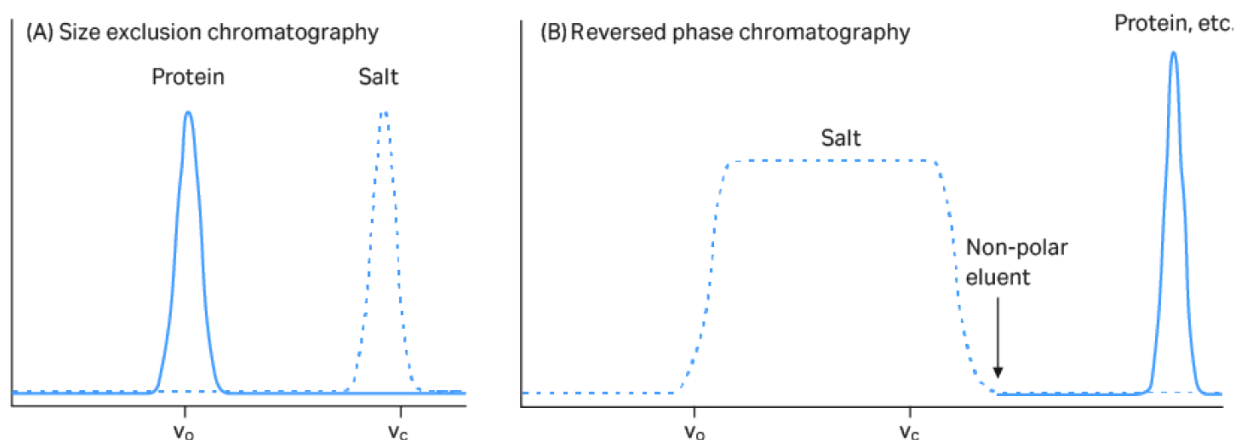
Obr. 36 Proteíny a peptidy sa viažu na RPC médium vo vodnom roztoku a postupne eluujú so zvyšujúcou sa hydrofobicitou prostredia

Separácia biomolekúl pomocou RPC závisí od reverzibilnej hydrofóbnej interakcie medzi molekulami vzorky v tlmivom roztoku a mádia. Počiatočné podmienky sú primárne v prostredí vody, čo podporuje vysoký stupeň organizovanej vodnej štruktúry obklopujúcej molekulu vzorky. Často je prítomné malé percento organického modifikátora (3 % až 5 %) acetonitrilu, aby sa dosiahol „zmáčaný“ povrch. Keď sa vzorka viaže na médium, hydrofóbna oblasť vystavená tlmivému roztoku je minimalizovaná. Separácia sa spolieha na molekuly vzorky, ktoré existujú v rovnováhe medzi tlmivým roztokom a povrchom média. Distribúcia vzorky závisí od vlastností média, hydrofóbnosti vzorky a zloženia tlmivého roztoku (mobilnej fázy). Spočiatku podmienky uprednostňujú extrémny rovnovážny stav, v ktorom je viazaných v podstate 100 % vzorky. Keďže proteíny a peptidy nesú zmes prístupných hydrofilných a hydrofóbných aminokyselín a sú pomerne veľké, interakcia s médiom má charakter viacbodového pripojenia. Aby sa dosiahla elúcia, množstvo organického rozpúšťadla sa zvyšuje, aby sa podmienky stali hydrofóbnejšími. Väzba a elúcia prebiehajú kontinuálne, keď sa vzorka pohybuje kolónou. Proces pohybu kolónou je pomalší pre vzorky, ktoré sú hydrofóbnejšie. V dôsledku toho sa vzorky eluujú v poradí podľa rastúcej hydrofóbnosti.

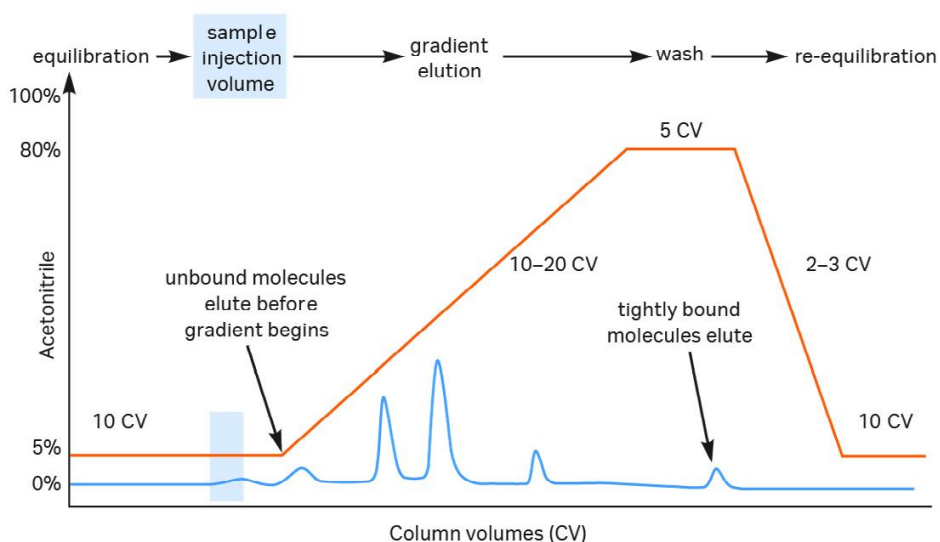
10.1. Kroky RPC

Existujú dva hlavné typy RPC chromatografického média, jedna založená na hydrofilnej matrici silikónových guľôčok pokrytých viazanou hydrofóbnou fázou uhlíkových reťazcov, typicky n-alkylových alebo aromatických uhľovodíkov, a druhá založená na nahej, hydrofóbnnej polymérnej matrici. Vysoko pórovité matrice poskytujú veľký vnútorný povrch pre vysokú väzbovú kapacitu. Matrice s jednotnou veľkosťou častíc sa môžu použiť pri vyšších prietokoch. Rovnako ako pri iných chromatografických technikách, RPC médium je potrebné naplniť kolónu, aby sa vytvorilo náplňové lôžko. Lôžko sa potom vyrovná tlmivým roztokom, aby sa vyplnili póry matrice a priestor medzi časticami. Výkon dosiahnuteľný na RPC, najmä rozlíšenie, je silne ovplyvnený účinnosťou náplne kolóny. Preto sa dôrazne odporúča použitie vopred naplnených kolón. Typická biologická vzorka obsahuje komplexnú zmes molekúl s príslušne rozmanitým rozsahom hydrofóbnosti. Väčšina biomolekúl je dostatočne hydrofóbná, aby sa silne

viazala na RPC živice vo vodných podmienkach, v prítomnosti nízkej koncentrácie organického modifikátora a aby sa eluovala vo veľmi úzkom okne koncentrácie organického modifikátora. Gradientová elúcia je preto najpraktickejšou metódou na separáciu komplexných biologických vzoriek pomocou RPC. Vzorky sa počas procesu väzby koncentrujú. Vzorka sa aplikuje za podmienok, ktoré podporujú väzbu, zvyčajne s použitím vodného roztoku obsahujúceho iónové párovacie činidlo, ako je kyselina trifluóroctová (TFA), na zvýšenie hydrofóbnej interakcie a nízkej koncentrácie organického modifikátora, ako je 5 % acetonitril. Po aplikácii a keď všetky neviazané molekuly pretiekli kolónou sa podmienky zmenia tak, aby sa viazaná vzorka eluovala. Elúcia začína zvýšením koncentrácie organických modifikátorov, ako je acetonitril. Molekuly s najnižšou hydrofóbnosťou sa eluujú ako prvé. Riadením nárastu organických modifikátorov sa molekuly eluujú diferencovane. Molekuly s najvyšším stupňom hydrofóbnosti sa najsilnejšie zachytia a eluujú ako posledné. Krok premytia na konci eluácie odstráni väčšinu pevne viazaných molekúl. Kolóna sa potom pred ďalším cyklom znovu ekvilibruje.



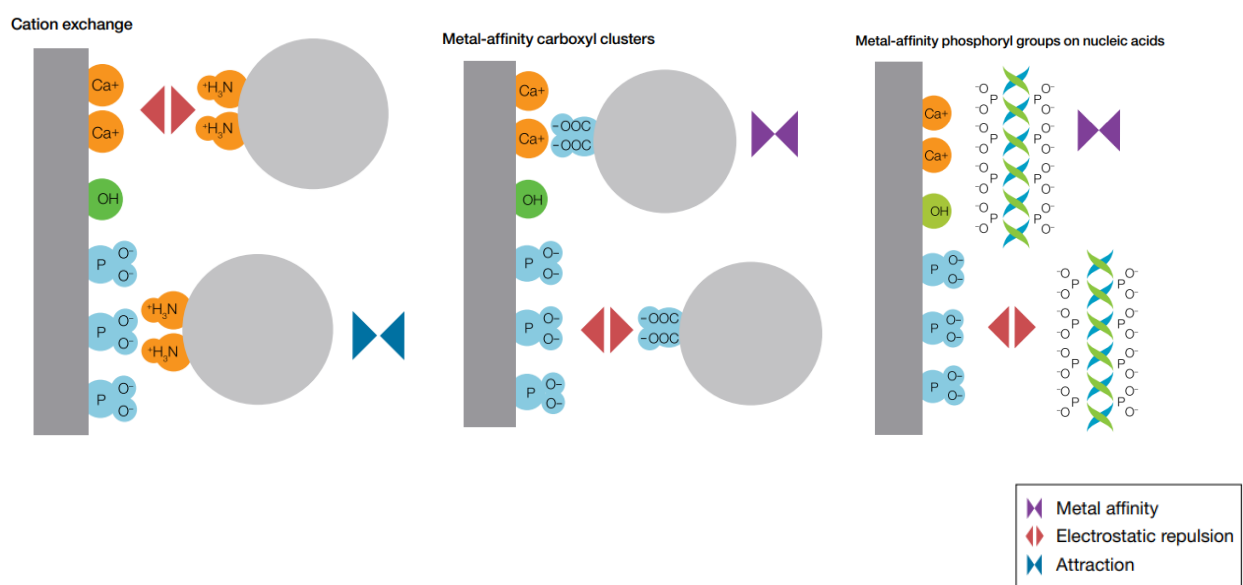
Obr. 37 Porovnanie mobility soli a proteínov v SEC (A) a RPC (B)



Obr. 38 Typická separácia proteínov na RPC s použitím lineárneho gradientu

11. Chromatografia s využitím hydroxyapatitu

Hydroxyapatit (HA), $\text{Ca}(\text{PO}_2)_3(\text{OH})$, je forma fosforečnanu vápenatého používaná pri chromatografickej separácii biomolekúl. Sady piatich vápenatých dvojíc (C-miest) a párov fosfátových tripletov obsahujúcich $-\text{OH}$ (P-miest) sú usporiadané v opakujúcom sa geometrickom vzore. Hydroxyapatit má jedinečné separačné vlastnosti, selektivitu a rozlíšenie. Často separuje proteíny, ktoré sa elektroforetickými a inými chromatografickými technikami javia ako homogénne. Chromatografické médium tvorí sférická, makroporézna forma hydroxyapatitu formovaná pri vysokých teplotách, aby sa modifikovala z nanokryštalickej na keramickú formu. Keramický materiál si zachováva jedinečné separačné vlastnosti kryštalického hydroxyapatitu. Na rozdiel od väčšiny iných chromatografických adsorbentov je HA ligandom aj nosnou matricou. Separačné protokoly pôvodne vyvinuté na kryštalickom hydroxyapatite sa často dajú preniesť priamo na keramický materiál len s malými úpravami.

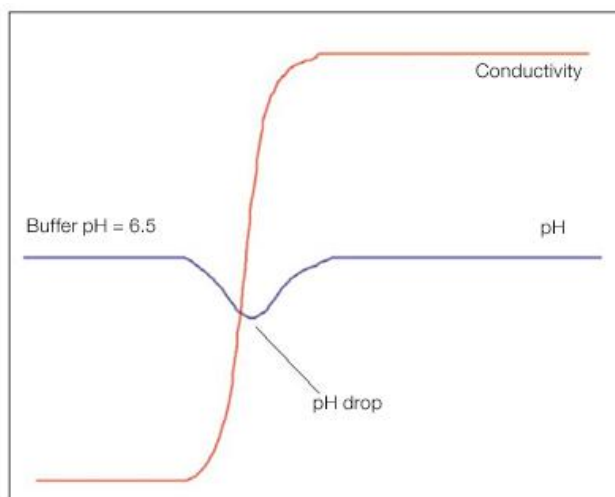


Obr. 39 Funkčné skupiny a interakcie na HA

Hydroxyapatit obsahuje dva typy väzbových miest - kladne nabité vápnikové a záporne nabité fosfátové skupiny. Tieto miesta sú pravidelne rozmiestnené v celej kryštálovej štruktúre matrice. Separované molekuly dominantne interagujú prostredníctvom katiónovej výmeny cez fosfátové skupiny a/alebo afinitou ku kovu prostredníctvom atómov vápnika. Ku katiónovej výmene dochádza, keď kladne nabité aminoskupiny proteínov iónovo interagujú so záporne nabitými fosfátmi. Aminoskupiny sú podobne odpudzované vápenatými miestami. Väzba závisí od kombinovaných účinkov týchto interakcií. Tieto interakcie iónovej výmeny možno narušiť pridaním neutrálnych solí, ako je chlorid sodný, alebo tlmivých látok, ako je fosfát, do mobilnej fázy. Interakcie katiónovej výmeny tiež oslabujú so zvyšujúcim sa pH. Preto sa pridanie soli alebo fosfátu alebo zvýšenie pH môže použiť na oslabenie interakcie. Štúdie s modelovými proteínmi preukázali, že aniónová výmena, ktorú by sa dalo očakávať od interakcií záporne nabitých povrchových zvyškov s vápnikom, neprispieva významne k separačnému efektu. Afinita k vápniku nastáva prostredníctvom interakcií s karboxylovými klastrami a/alebo fosforylovými skupinami na proteínoch alebo iných molekulách (napríklad nukleových kyselinách). Tieto skupiny sú súčasne

odpuďzované záporným nábojom fosfátových skupín HA. Afinitná interakcia je 15 až 60-krát silnejšia ako samotné iónové interakcie a podobne ako klasické interakcie s afinitou ku kovu nie je ovplyvnená zvyšujúcou sa iónovou silou pomocou typických elučných iónov (napríklad chloridu). Molekuly viazané prostredníctvom afinity k vápniku sa môžu adsorbovať silnejšie so zvyšujúcou sa iónovou silou v dôsledku iónového tienenia odpudzovania náboja z fosfátových miest HA. Afinitné interakcie s kovom môžu byť disociované fosfátom v mobilnej fáze.

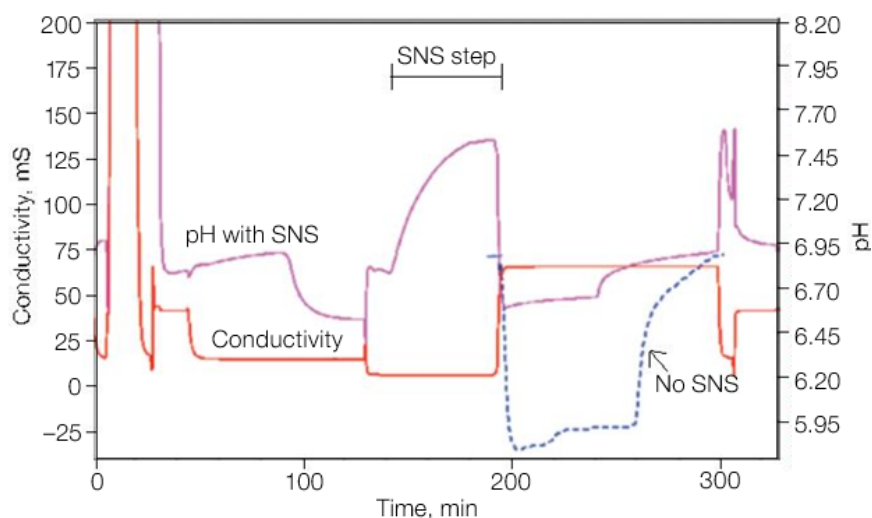
Optimalizácia chromatografickej metódy využívajúcej HA si vyžaduje analýzu a integráciu viacerých premenných vrátane interakcie matrice a elučných charakteristík. Vzorky, ktoré sa nanášajú na kolónu by mali byť bez činidiel, ako je citrát alebo EDTA, ktoré by mohli degradovať keramický hydroxyapatit prostredníctvom chelácie. HA chemicky kompatibilný s množstvom bežne používaných tlmivých roztokov pri pH 6,5 – 14 v prítomnosti vápnika a fosfátu. Počas behu môže akákoľvek zmena (najmä krok) v podmienkach tlmivého roztoku (zvýšenie alebo zníženie soli, tlmivých látok alebo iných zložiek) viesť k prechodnej zmene pH mobilnej fázy. Tento jav možno pripísať interakcii iónov mobilnej fázy s fosfátovými povrchovými skupinami HA. Rozsah tohto posunu pH závisí od stupňa, v akom sa množstvo zložiek zvyšuje alebo znižuje.



Obr. 40 Pokles v hodnote pH zaznamenaný pri skokovom zvýšení koncentrácie katiónov v roztoku

Hoci sa rozsah poklesu pH významne nezníži, celkový čas vystavenia nízkemu pH sa dramaticky skráti. Ukázalo sa, že to významne zvyšuje počet cyklov možného použitia HA média. Zjavné je to napr. keď je ko-pufor prítomný iba počas prvého objemu kolóny (CV) eluácie, keď sa uvoľní väčšina protónov. Množstvo potrebného ko-pufra sa bude líšiť v závislosti od rôznych okolností. V ideálnom prípade, ak by sa všetky protóny na povrchu HA mohli nahradiť neutrálnym katiónom bezprostredne pred elúciou bez ovplyvnenia výkonu kolóny, zvýšenie koncentrácie katiónov počas elúcie by nemalo žiadny vplyv na pH. Možná úprava metódy zahŕňa zaradenie kroku s mierne alkalickým tlmivým roztokom bezprostredne pred elúciou tzv. neutralizáciu povrchu (SNS – z anglického „surface neutralization system“). Typický protokol zahŕňa 6 – 8 CV 25 mM Tris, 25 mM NaCl, 5 mM fosfátu, pH 7,75. Tris udržiava celkový roztok mierne zásaditý, čím vytvára rezervoár hydroxylových skupín, ktoré rýchlo tvoria vodu s uvoľnenými protónmi, a

preukázateľne dramaticky zlepšuje životnosť HA média. Rôzne ďalšie pufovacie látky (arginín, lyzín, histidín, PIPES, HEPES, MOPS) sa ukázali byť účinné v kolónach s HA médiom. Štúdie monoklonálnych protilátok ukázali, že použitie SNS v porovnaní s tradičnými metódami produkuje eluant s rovnakou kvalitou výstupov (výťažok, elučný bod píku v gradiente, hladina agregátu, DNA, proteín hostiteľskej bunky). Okrem toho použitie SNS po dobu > 40 cyklov nemení väzbovú kapacitu HA pre individuálne testované protilátky. V niektorých prípadoch sa počas kroku SNS môžu kyslé proteíny eluovať. V tomto prípade by sa mal eluant stále kontrolovať, pretože atribúty kvality môžu odôvodňovať použitie neutralizácie povrchu priamo ako elučného pufru. Pridanie vápnika tiež zvyšuje životnosť kolóny HA. Množstvo pridaného vápnika sa určuje meraním vápnika v odpadovej vode z konkrétneho kroku (ekvilibrácia, zaťaženie, elucia). Toto sa môže vykonať v jednom simulovanom (bez proteínov) behu v malom meradle alebo niekoľkokrát, aby sa získalo štatisticky platné číslo. Samotný test trvá približne 10 minút na vzorku a je priamo odvodený zo štandardnej kolorimetrickej titračnej metódy analýzy tvrdosti vody.



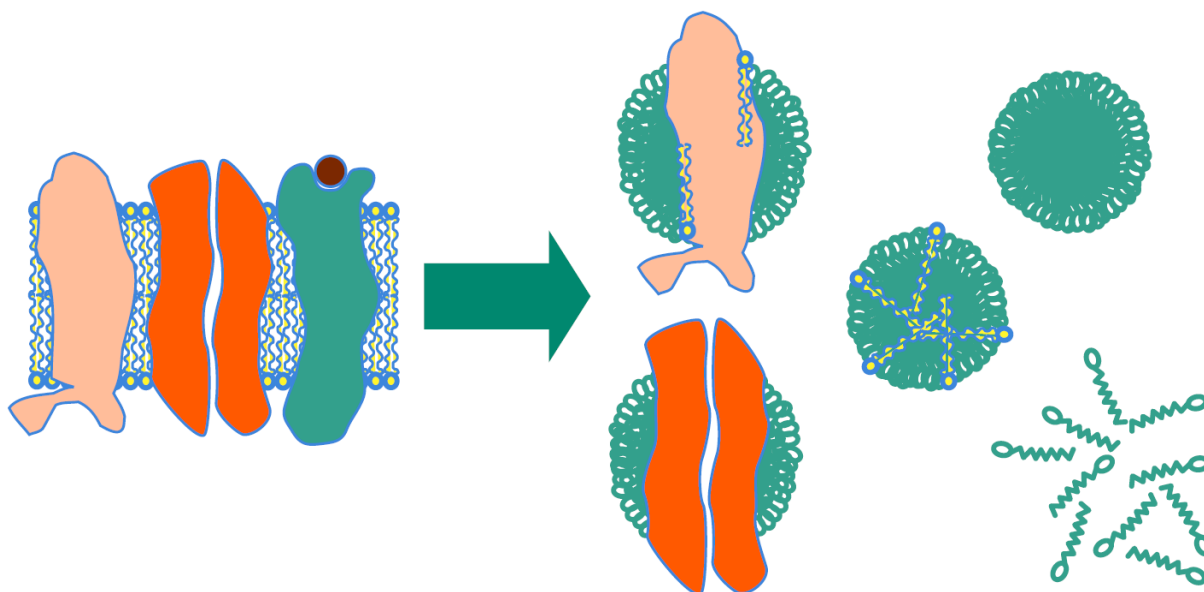
Obr. 41 Vplyv SNS na pH počas skokovej elúcie pomocou 1M NaCl; červená - konduktivita, fialová - pH s SNS, modrá - pH bez SNS

12. Purifikácia náročných proteínov

V praxi, a najmä tej biologickej, je máločo jednoznačné – pri proteínoch žiaden nie je v 100% rozpustnom a funkčnom stave, neviaže sa na chromatografické médium za presne definovaných (a očakávaných) parametrov alebo „zabudne“ na svoju primárnu aktivitu hneď po separácii od kontaminantov. Časť proteínov, označovaná aj ako náročné na purifikáciu, predstavuje skupinu, pri ktorej je nutné použiť kombinácie chromatografických techník len na ich parciálnu purifikáciu alebo extrémne podmienky prostredia, v ktorom purifikácia prebieha. Medzi také napríklad membránové proteíny, proteínové komplexy alebo proteíny agregujúce sa do inklúzných teliesok v hostiteľských bunkách.

12.1. Membránové proteíny

Membránové proteíny hrajú kľúčovú úlohu v základných biologických procesoch, ako je transport molekúl, signalizácia, využitie energie a udržiavanie bunkových a tkanivových štruktúr. Približne 30 % génov kóduje membránové proteíny a tieto proteíny tvoria nezanedbateľný podiel cieľov súčasných liečiv. Integrálne membránové proteíny existujú v lipidovom prostredí bunkových membrán, ale dostupné techniky na ich purifikáciu, manipuláciu a analýzu boli optimalizované pre vo vode rozpustné proteíny, čo je prvou prekážkou v ich efektívnej purifikácii. Ďalšie dve prekážky predstavujú nízka abundancia v prirodzených zdrojoch a komplikovaná produkcia v rekombinantnej forme. Aby bolo možné manipulovať s membránovými proteínmi a študovať ich, musia byť dispergované vo vodnom roztoku. To sa zvyčajne dosiahne pridaním detergentu, ktorý solubilizuje biomembránu a vytvorí rozpustný komplex s lipidmi a membránovými proteínmi.



Obr. 42 Stabilizácia membránových proteínov pomocou detergentov (zelené) z prirodzenej lipidovej dvojvrstvy (modrožlté)

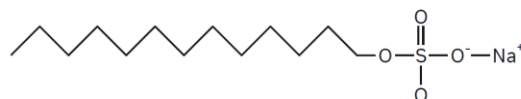
Tab. 12 Systémy nadprodukcie používané na produkciu membránových proteínov a ich výhody a nevýhody

Expression system	Advantages	Disadvantages
<i>E. coli</i>	The most widely used overexpression system for (prokaryotic) membrane protein production.	Often not suitable for overexpression of eukaryotic membrane proteins No glycosylation and limited post-translational modifications
Yeast	Can perform some post-translational modifications Several different yeast systems have been used for membrane protein production (5)	Does not produce high cell densities (<i>S. cerevisiae</i>) Hyperglycosylation can occur (<i>S. cerevisiae</i>) Different lipids (compared with mammalian cells)
Insect cells	Less complex growth conditions compared with mammalian cells Relatively high expression levels Glycosylation	More costly and complex than <i>E. coli</i> or yeast; different lipids (compared with mammalian cells)
Mammalian cells	CHO, BHK and other cell lines are often used for functional studies of receptors Authentic (mammalian) protein is produced	High cost and complex work
<i>Rhodobacter</i> spp.	High expression levels through coordinated synthesis of foreign membrane proteins with synthesis of new internal membranes (3)	Different lipids (compared with mammalian cells)
Cell free	Allows expression of toxic proteins and proteins that are easily degraded <i>in vivo</i> Allows incorporation of labeled and non-natural amino acids.	High cost Membrane protein insertion in membrane or detergent micelle has not been fully developed

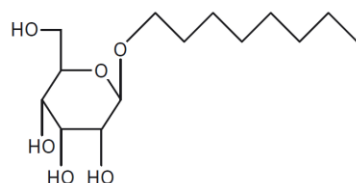
Solubilizácia je jednou z najdôležitejších fáz prípravy membránových proteínov. Počas fázy solubilizácie sa membránové proteíny extrahujú z ich prirodzeného prostredia, lipidovej membrány, do vodného prostredia pomocou detergentov. Detergenty pôsobia tak, že rozkladajú lipidovú dvojvrstvu a zároveň začleňujú lipidy a proteíny do micel detergentu. Hydrofóbne povrchové oblasti membránových proteínov a lipidové „chvosty“ sú ukryté v hydrofóbnom vnútrajšku micelárnych štruktúr detergentu, zatiaľ čo hydrofilné časti proteínov sú v kontakte s vodným prostredím. Účinná solubilizácia disociuje väčšinu interakcií lipid-proteín a proteín-proteín, čím umožňuje separáciu proteínov. Cieľový proteín je možné purifikovať v prítomnosti detergentu použitím v podstate ktorejkoľvek z existujúcich techník purifikácie proteínov dostupných pre rozpustné proteíny. Úspešný protokol solubilizácie extrahuje membránový proteín s vysokým výťažkom a vedie k stabilným komplexom proteín-detergent (alebo komplexom proteín-lipid-detergent), kde si proteín zachováva svoju aktívnu konformáciu. Niektoré membránové proteíny vyžadujú interakciu s natívnymi lipidmi z lipidovej dvojvrstvy alebo s pridanými exogénnymi lipidmi, aby si zachovali svoju aktívnu konformáciu. V takýchto prípadoch je nevyhnutné, aby solubilizačný protokol umožňoval tvorbu stabilného komplexu proteín-lipid-detergent a aby neodstraňoval požadované natívne lipidy spojené s cieľovým proteínom. Príliš drsné postupy solubilizácie a purifikácie môžu viesť k odstráneniu takýchto esenciálnych lipidov, a tým k inaktivácii proteínu.

Detergenty sú amfipatické látky s polárnou (hydrofilnou) hlavnou skupinou a nepolárnym (hydrofóbnym) chvostom. Polárna časť môže byť neiónová, aniónová, katiónová alebo zwitteriónová a detergenty sa často klasifikujú podľa toho (t. j. detergent s aniónovou polárnou časťou sa označuje ako aniónový detergent). Nad určitou koncentráciou vo vodnom prostredí sa molekuly detergentu asociujú a tvoria multimolekulárne komplexy, micely, s hydrofóbnym vnútrom a hydrofilnými povrchmi. Táto koncentrácia sa označuje ako kritická micelárna koncentrácia (CMC). CMC je pre rôzne detergenty odlišná a mení sa aj v závislosti od pH, teploty a iónovej sily. Vo všeobecnosti by všetky tlmivé roztoky a roztoky používané na prípravu membránových proteínov (na solubilizáciu, purifikáciu, skladovanie atď.) mali mať koncentráciu detergentu vyššiu ako CMC.

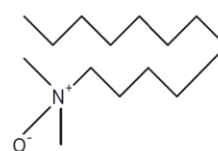
Ionic: Sodium dodecyl sulfate



Non-ionic: Octyl glucoside



Zwitterionic: LDAO (Lauryl dimethylamine oxide)



Obr. 43 Chemická štruktúra vybraných detergentov

Na stanovenie najlepších podmienok pre každý membránový proteín je potrebné vyskúšať niekoľko rôznych detergentov a podmienok. Výťažok solubilizácie sa monitoruje stanovením cieľového membránového proteínu v solubilizovanej frakcii pričom sa nesolubilizovaný materiál odstráni (ultra)centrifugáciou. Je tiež možné aplikovať neprečistený (crude) solubilizát priamo na špeciálne navrhnuté chromatografické kolóny, ktoré dokážu zvládnuť zvyšky bunkového materiálu bez upchatia, hlavne z dôvodu veľkosti častíc chromatografického média. Detekciu proteínu je možné vykonať Western blotom po SDS-PAGE ale pri proteínoch s nízkou expresiou môže byť pred samotnou detekciou cieľového proteínu potrebný krok chromatografického obohatenia. Okrem stanovenia výťažku a homogenity je často potrebné monitorovať aktivitu proteínu, ktorá je najlepším ukazovateľom intaktnej štruktúry (a funkcie) proteínu. Pri niektorých membránových proteínoch je možné na proteín solubilizovaný v detergente priamo použiť funkčné testy, v iných prípadoch je potrebné opätovné vloženie membránového proteínu do umelej lipidovej dvojvrstvy (rekonštitúcia membránového proteínu).

Tab. 13 Výhody a nevýhody jednotlivých tried detergentov

Detergent class	Advantages	Disadvantages
Nonionic (e.g., dodecyl maltoside)	Generally mild and non-denaturing Widely used	May give low solubilization yields
Ionic (anionic or cationic) (e.g., SDS, LTAB)	Can be extremely efficient in solubilization	Often denaturing Interfere with ion exchange separations
Zwitterionic (e.g., FOS-Choline 12)	Often used in membrane protein crystallization. Combines the advantages of ionic and non-ionic detergents	More denaturing than nonionic detergents

Tab. 14 Vybrané detergenty často používané na purifikáciu membránových proteínov

Detergent	Class ¹	FW	CMC ² (mM)
Brij™ 35	N	1200	0.07
C12E8	N	539	0.11
CHAPS (3[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonic acid)	Z	615	8
Cymal 7 (Cyclohexyl- <i>n</i> -heptyl-β-D-maltoside)	N	522	0.19
Decyl maltoside	N	483	1.8
Digitonin	N	1229	< 0.5
DDM (dodecyl maltoside)	N	511	0.17
FOS-Choline 12	Z	352	0.12
Hecameg (6-O-(<i>N</i> -Heptylcarbamoyl) methyl-α-D-glucopyranoside)	N	335	19.5
LDAO (lauryldimethylamine oxide)	Z	229	1
Nonidet P40	N	615	0.25
Nonyl glucoside	N	306	6.5
Octyl glucoside	N	292	18
Tween™ 20	N	1228	0.06
Triton X-100	N	647	0.23

¹ N = nonionic; Z = zwitterionic

² At 20°C to 25°C and ~ 50 mM Na⁺

Po solubilizácii sa membránové proteíny obvykle purifikujú ako komplexy proteín-lipid-detergent. Rozpustnosť komplexov vo vodnom prostredí umožňuje použitie v podstate rovnakých chromatografických techník, aké sa používajú pre proteíny rozpustné vo vode. Hlavný rozdiel spočíva v tom, že čistenie membránových proteínov sa vykonáva s detergentom prítomným vo všetkých roztokoch, čo je nevyhnutné, z dôvodu že komplexy proteín-detergent sú dynamické a v neprítomnosti voľného detergentu by okamžite stratili molekuly detergentu a následne precipitovali. Koncentrácie detergentov by mali byť nad CMC, ale môžu sa udržiavať približne 10-krát nižšie ako tie, ktoré sa použili počas solubilizácie (typicky v rozsahu 0,1 %). Vysoké koncentrácie detergentov môžu znížiť stabilitu proteínu. Koncentrácie detergentov však musia byť počas solubilizácie vysoké, ak je koncentrácia membránových zložiek vysoká. Po dokončení solubilizácie je možné koncentrácie detergentov znížiť pomocou dialýzy alebo ultrafiltrácie. Stabilitu membránových proteínov možno často zvýšiť použitím 5 % glycerolu vo všetkých tlmivých roztokoch počas celého purifikačného procesu.

12.2. Multiproteínové komplexy

Mnohé proteín-proteínové interakcie vedú k tvorbe stabilných komplexov, ktoré je možné izolovať a charakterizovať v natívnej štruktúre. Napríklad stabilné binárne komplexy, ako sú jednoduché komplexy antigén-protilátka a komplexy proteáza-inhibitor proteázy, je možné relatívne ľahko odizolovať od zmesi ale proteínové komplexy s viac ako 10 a dokonca aj viac ako 100 rôznymi podjednotkami predstavujú experimentálne výzvy, ktoré sa násobia s veľkosťou a počtom rôznych podjednotiek.

Kľúčové výzvy súvisiace s výskumom multiproteínových komplexov zahŕňajú napr. stabilitu - podjednotky môžu byť voľne asociované s konkrétnym komplexom a môžu sa stratiť, keď sa na izoláciu komplexu použijú štandardné biochemické metódy. Ďalej sú to falošne pozitívne výsledky, keď sa irelevantné zložky môžu spolu s komplexom kopurifikovať a javiť ako integrálne zložky. Artefakty sa môžu vyskytnúť aj po narušení subcelulárnej kompartmentalizácie alebo keď sú jednotlivé zložky komplexu nadmerne exprimované. Dynamika komplexu predstavuje ďalšiu z výziev keďže niektoré zložky komplexu môžu byť len prechodne asociované s konkrétnym komplexom. Samotná veľkosť komplexu keďže multiproteínové komplexy môžu byť veľmi veľké (rádovo stovky alebo tisícky kDa), a preto je extrémne komplikované purifikovať ich štandardnými technikami. Napríklad nemusia byť schopné prejsť štandardnými filtrami na odstránenie častíc alebo vstúpiť do pórov chromatografického média. Produkcia a nadmerná expresia multiproteínových komplexov pozostávajúcich z veľkého počtu rôznych podjednotiek nie je uskutočniteľná použitím prokaryotických hostiteľov ako je *E. coli* a pri použití prirodzených zdrojov je na biochemické štúdie komplexov s nízkym zastúpením potrebné veľké množstvá východiskového materiálu. V neposlednom rade sú obmedzením aj štandardné analytické techniky, napr. hmotnostná spektrometria môže byť obmedzená veľmi vysokými pomermi hmotnostných nábojov (m/z) a veľkými iónmi, ktoré sa odchyľujú od ideálnych trajektórií.

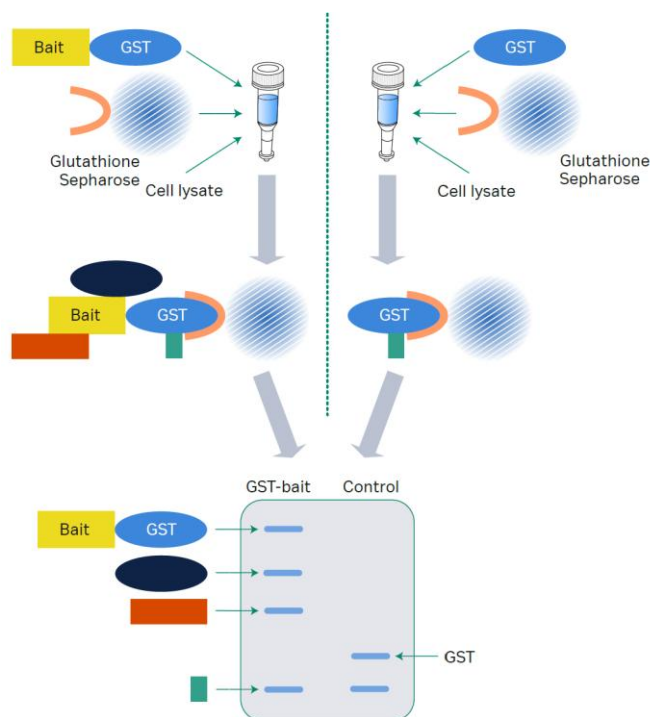
Pri purifikácii multiproteínových komplexov najčastejšie používame tzv. „pull-down“ eseje, ktoré zahŕňajú izoláciu proteínového komplexu jeho adsorpciou na častice chromatografického média. Imobilizované ligandy na časticiach sa špecificky viažu na zložku komplexu, buď prostredníctvom afinitnej značky (napr. GST, histidín, MBP atď.), alebo protilátky. Pull-down eseje sa často používajú na izoláciu nízkych množstiev komplexov rádovo v μg , najmä na účely identifikácie jednotlivých podjednotiek. Zložky zachyteného komplexu sa často nakoniec analyzujú hmotnostnou spektrometriou na identifikáciu podjednotiek a predstavujú tak dôležité nástroje na mapovanie sietí proteín-proteínových interakcií.

Tab. 15 Typy pull-down metód používaných na purifikáciu multiproteínových komplexov

Method	Advantages	Disadvantages
Affinity pull-down	Generic Ability to purify low-abundant protein complexes	The presence of a protein tag may influence results Competition with the endogenous complex
Tandem affinity purification (TAP)	Generic Ability to purify low-abundant protein complexes Mild conditions used throughout	The presence of a protein tag may influence results Competition with the endogenous complex
Co-immunoprecipitation	Does not require cloning and heterologous expression Rapid if antibody is available	Not generic — requires access to specific antibodies

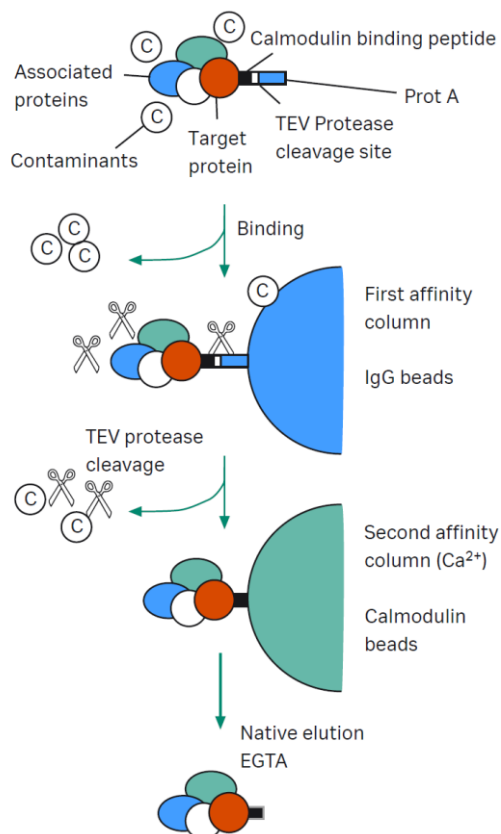
Afinitné pull-down testy sú vhodné na izoláciu a následnú identifikáciu proteínových komplexov. GST pull-down testy zahŕňajú afinitnú purifikáciu jedného alebo viacerých neznámych proteínov z biologickej vzorky pomocou GST-značeného „návnadového“ proteínu. GST-značený návnadový proteín sa viaže na svojich partnerov a výsledný komplex sa zachytáva na guľôčkach s imobilizovaným glutatiónom. Kľúčovým faktorom na identifikáciu falošne pozitívnych výsledkov, ktoré sa viažu na GST v neprítomnosti

návnadového proteínu, je použitie vhodnej kontroly. Kontrolou môže byť buď lyzát z buniek, ktoré exprimujú GST (nie návnadový fúzny proteín).



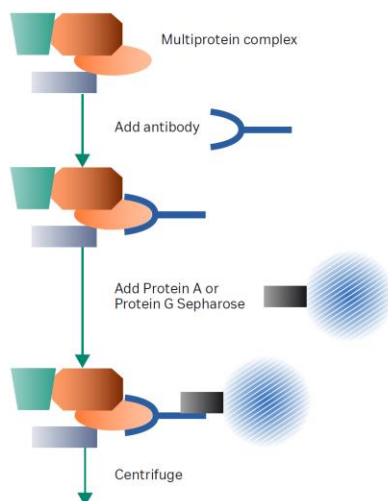
Obr. 44 Schéma priebehu afinitnej pull-down eseje s využitím návnadového proteínu označeného GST

Metóda tandémovej afinitnej pull-down eseje využíva dva po sebe nasledujúce kroky afinitnej chromatografie na izoláciu proteínových komplexov. Dôvodom použitia dvoch afinitných krokov je zvýšenie špecificity purifikačného postupu a zníženie počtu falošne pozitívnych výsledkov. Okrem toho sú podmienky používané v tejto metóde mierne, aby sa zachovala integrita komplexu a maximalizoval výťažok. Návnadový proteín (známa alebo podozrivá zložka komplexu) je označený proteínom A aj peptidom viažucim kalmodulín (CBP) so štiepnym miestom TEV proteázy medzi týmito dvoma značkami. Dvojito označený návnadový proteín je nutné exprimovať na takmer natívnych úrovniach, pretože nadmerná expresia môže spustiť nefyziologické interakcie. Komplex sa najprv adsorbuje na IgG sefarózu prostredníctvom proteínu A a eluuje sa štiepením pomocou TEV. Komplex sa potom adsorbuje na kalmodulín sefarózu (prostredníctvom značky CBP) a eluuje sa pomocou EGTA. Zložky komplexu sa separujú pomocou SDS-PAGE a analyzujú sa hmotnostnou spektrometriou. U vyšších organizmov môže byť potrebné potlačiť zodpovedajúci endogénny gén pre cieľový proteín pomocou technológie RNAi.



Obr. 45 Schéma priebehu tandémovej afinitnej pull-down eseje

Imunoprecipitácia je relatívne stará zavedená technika, ktorá využíva protilátky na izoláciu antigénov zo zmesí a biologických vzoriek. Názov je historický a pochádza z analytických metód založených na precipitačnej reakcii získanej zmiešaním protilátky a antigénu v správnom pomere. V tomto prípade ide skôr o pull-down test ako precipitačnú reakciu. Koimunoprecipitácia využíva protilátky namierené proti jednej (známej alebo predpokladanej) zložke komplexu. Protilátka sa viaže na svoj antigén, ktorý je súčasťou multiproteínového komplexu a vytvorený komplex protilátka-proteín sa potom zachytí pridaním chromatografického média obsahujúceho proteín A alebo proteín G sefarózu do zmesi. Alternatívne môže byť vhodná protilátka imobilizovaná na aktivovanej matrici a následne použitá na vychytenie vhodných komplexov. Podobne môže byť protilátka zosieťovaná s médiom proteínu A alebo proteínu G a použitá na koimunoprecipitáciu zložiek proteínových komplexov.



Obr. 46 Schéma priebehu koimunoprecipitácie

Multiproteínové komplexy z prirodzených zdrojov (nerekombinantné, bez afinitných značiek) je možné purifikovať na štrukturálne a funkčné štúdie pomocou klasických biochemických metód. Prirodzený zdroj cieľového komplexu sa používa ako východiskový materiál na purifikáciu a na izoláciu komplexu sa používa kombinácia chromatografie a iných techník. Purifikačná schéma sa najlepšie navrhuje kombináciou techník v postupnosti, napríklad kombináciou afinitnej chromatografie (separácia podľa biošpecificity) s iónovou výmenou (separácia podľa vlastností náboja) a gélovou filtráciou (separácia podľa veľkosti). Optimálna kombinácia techník minimalizuje požiadavky na úpravu vzorky medzi krokmi purifikácie ako je výmena tlmivého roztoku alebo striedanie vysokých a nízkych iónových síl. Je dôležité udržiavať počet krokov na minime, aby sa maximalizovali výťažky purifikácie ale pri náročných purifikáciách, ako sú tie pre multiproteínové komplexy, môže byť potrebné použiť väčší počet purifikačných krokov na dosiahnutie požadovanej čistoty. Napríklad ľudský proteazóm (20S) (obsahujúci 14 podjednotiek, $M_r \sim 700$ kDa) a prekursorové komplexy boli izolované z ľudskej bunkovej línie pomocou kombinácie aniónovo-výmennej chromatografie, centrifugácie v sacharózovom gradiente, afinitnej chromatografie, chromatografie na základe hydrofóbnej interakcie a gélovej filtrácie.

Tab. 16 Klady a zápory jednotlivých chromatografických metód pri purifikácii multiproteínových komplexov

Technique	Separation principle	Pros (+) and cons (-) for multiprotein complex purification
Gel filtration	Size and shape	+ Mild separation conditions; separation can be achieved over a broad pH and ionic strength range + Additives can be used
Affinity chromatography	Biospecific affinity	+ Excellent specificity - Affinity ligands (for the chromatography beads) cannot be found for all proteins - Elution may require conditions (pH, ionic strength) that may disrupt intracomplex interactions
Ion exchange chromatography	Charge	+ High resolution can often be achieved - A salt gradient is often used for elution. This may disrupt intracomplex interactions.
Hydrophobic interaction chromatography	Hydrophobicity	+ A useful complement to the other techniques - High salt concentrations (e.g., 1–2 M ammonium sulfate) are often used during sample application. This may disrupt intracomplex interactions.

12.3. Inklúzne telieska

Rekombinantný proteín, ktorý sa akumuluje intracelulárne v *E. coli*, sa často ukladá vo forme inklúzných teliesok. Ide o jav ktorý vzniká najmä z dôvodu redukovúceho prostredia v cytoplazme buniek a neumožňujúceho správnu tvorbu disulfidových mostíkov, okrem iného. Inklúzne telieska sú nerozpustné agregáty nesprávne poskladaného proteínu, ktoré nemajú biologickú aktivitu a ktoré možno pozorovať fázovou mikroskopiou ako tmavé intracelulárne častice. Sú to ale dynamické štruktúry, pri ktorých za natívnych podmienok prebieha konštantná výmena proteínov medzi solubilnou a nesolubilnou formou, nabaľovanie hostiteľských proteínov a akumulácia materiálu. Inklúzne telieska majú veľkosť od 0,2 do 0,6 μm . Denaturovaný rekombinantný proteín je hlavnou zložkou inklúzných teliesok a počiatočná izolácia inklúzných teliesok centrifugáciou je preto účinným krokom purifikácie proteínu. Natívny rekombinantný proteín sa získava z inklúzných teliesok procesom známym ako tzv. „refolding“ čiže znovuskladanie do natívnej štruktúry. Zatiaľ čo refolding môže byť pre menšie proteíny a pre proteíny, ktoré neobsahujú disulfidové mostíky, jednoduchý, v mnohých prípadoch ide o proces náročný na optimalizáciu. Optimálne podmienky pre refolding závisia od proteínu a nemožno ich predpovedať. V literatúre je však k dispozícii veľa údajov o refoldingu, ktoré boli zhromaždené v databázach (napr. databáza REFOLD). Pri nadmernej tvorbe inklúzných teliesok existujú dve možnosti, ktoré treba zvážiť: buď urobiť krok späť a optimalizovať kultivačné podmienky s cieľom zvýšenia podielu solubilnej frakcie cieľového proteínu, alebo akceptovať tvorbu inklúzných teliesok a vyvinúť stratégie na solubilizáciu a opätovné zloženie proteínu.

Je známe, že znížená rýchlosť rastu zvyčajne vedie k zvýšenému podielu rozpustnej frakcie rekombinantných proteínov, a tým znižuje tendenciu k tvorbe inklúzných teliesok. Na optimalizáciu podmienok kultivácie sa preto oplatí zvážiť niekoľko jednoduchých úprav kultivačných podmienok zameraných na zníženie rýchlosti rastu a/alebo rýchlosti expresie. Nevýhodou je, že celkový výťažok rekombinantného proteínu sa v dôsledku toho pravdepodobne zníži. Zníženej rýchlosti rastu sa dá dosiahnuť znížením teploty rastu na 20 °C až 30 °C, pri použití špeciálnych kmeňov aj na 12 °C. V prípade proteínov, ktoré sú exprimované pod kontrolou indukovateľného promotora, sa dá rýchlosť expresie znížiť aj zmenou indukčných podmienok ako je zníženie množstva induktora alebo kratšia indukcia expresie. Ak sa tieto úpravy ukážu ako nedostatočné, možno zvážiť komplexnejšie zmeny. Patrí sem použitie fúzy značiek, ako je GST a MBP či thioredoxín, o ktorých je známe, že zvyšujú rozpustnosť proteínu s ktorým sú vo fúzii. Medzi ďalšie možnosti patrí koexpresia so chaperónmi (napr. GroEL/ES) alebo inými komponentmi skladacieho mechanizmu a pokiaľ žiadna z metód alebo úprav nedokáže poskytnúť želané výsledky tak aj použitie alternatívneho hostiteľského organizmu.

Po homogenizácii buniek sa inklúzne telieska izolujú centrifugáciou. Ide o vysoko účinný purifikačný krok, pretože cieľový proteín je často hlavnou zložkou inklúzných teliesok ale zhluky DNA, membránové vezikuly a fragmenty bunkovej steny majú rovnakú veľkosť ako inklúzne telieska a počas centrifugácie sa môžu s inklúznymi telieskami sedimentovať. Metóda použitá na rozrušenie buniek určuje veľkosť vytvorených bunkových zvyškov. Často sa používa vysokotlaková alebo ultrazvuková homogenizácia. Na lepšiu fragmentáciu bunkových zvyškov, aby sa počas centrifugácie ľahšie oddelili od inklúzných teliesok, sa odporúča vysokotlaková homogenizácia (napr. „French press“). Po rozrušení buniek prídanie DNázy zníži množstvo kontaminujúcej DNA a prídanie detergentu (napr. 1% Triton X-100) zníži množstvo membránového materiálu spojeného s inklúznymi telieskami. Činidlá, ktoré sa najčastejšie používajú na solubilizáciu inklúzných teliesok sú napr. močovina (v koncentrácii 8 až 10M) a guanidín-HCl (6M). Tieto potom musia byť aj súčasťou tlmivých roztokov používaných na chromatografickú purifikáciu aby sa predišlo agregácii proteínov na kolóne a jej následnému upchatiu.

Po purifikácii za denaturačných podmienok musia byť proteíny správne refoldované, aby znovu získali svoju natívnu štruktúru a funkciu. Najčastejšie sa to dosahuje odstránením denaturačných činidiel, aby sa umožnilo zloženie proteínu a vytvorenie správnych intramolekulárnych asociácií. Refolding je najdôležitejším krokom v pracovnom postupe purifikácie proteínov z inklúzných teliesok. V praxi však neexistuje univerzálny protokol na dosiahnutie efektívneho refoldingu a preto je tento krok nutné optimalizovať pre každý produkovaný proteín. Parametre, najviac ovplyvňujúce refolding sú koncentrácia proteínu, teplota, reakčný čas, činidlá použité na ovplyvnenie tvorby disulfidových mostíkov a prísady do tlmivých roztokov. Predpokladá sa, že prísady do pufrov pôsobia buď potlačením agregácie (močovina alebo guanidín-HCl), alebo podpora skladania proteínu (arginín, glycerol, soli).

Tab. 17 Najčastejšie aditíva tlmivých roztokov pri purifikácii proteínov z inklúzných teliesok a obvyklá koncentrácia

Additive	Concentration
Urea	2 M
Guanidinium hydrochloride	1 M
Arginine	0.5 M
Glycerol	0.4 M
Sucrose	0.4 M
Lauryl maltoside	0.3 mM
Polyethylene glycol 3550	0.05% (w/v)
Tris	0.5 M
Triton X-100	10 mM
n-hexanol	5 mM
Salts	0.5 mM

Je vysoko nepravdepodobné, že k okamžitej tvorbe správnych intramolekulárnych disulfidových väzieb dôjde náhodne, ak sú prítomné viac ako dva cysteínové zvyšky. Počet možných kombinácií dramaticky rastie so zvyšujúcim sa počtom disulfidových väzieb (15 možných kombinácií pre 3 disulfidové väzby, 105 pre 4, 945 pre 5 atď.). Ak sú disulfidové väzby potrebné pre správne skladanie, počas solubilizácie sa zvyčajne do tlmivého roztoku pridáva redukčné činidlo (napr. 1 až 10 mM DTT). Redukčné činidlo sa nahradí disulfidovými výmennými činidlami pre opätovné skladanie (napr. oxidovaný + redukovaný glutatión alebo cysteamín + cystamín), ktoré sa pridávajú na zabezpečenie vhodného redoxného potenciálu. Činidlá tvoria zmiešané disulfidové medziprodukty s cysteínovými zvyškami. Táto reakcia je reverzibilná a proteínové disulfidové väzby sa tvoria alebo rozpadajú, kým nedôjde k najpriaznivejšej tvorbe proteínových disulfidových väzieb. Tento proces je známy ako oxidačné skladanie. Výťažky procesu oxidačného skladania silne závisia od koncentrácie redoxných činidiel a od pH.

13. Záver

Zámerom predloženého textu je priblížiť základné koncepty a najčastejšie využívané chromatografické metódy na purifikáciu proteínov, či už rekombinantných alebo zo svojich prirodzených zdrojov. Poznatkov v tomto smere je obrovské množstvo a získanie celkového prehľadu si vyžaduje štúdium množstva zdrojov ďaleko nad rámec prezentovaný v tomto texte, ale najmä nemať strach pri skúšaní nových metód, hľadaní riešení, kombinovaní krokov a hlavne experimentovaní s podmienkami v ktorých prebieha separácia biomolekúl. Poznať základné charakteristiky FPLC systému, kolón, chromatografických médií a princípov separácie predstavuje základ, ale len samotný priebeh separácie ukáže kde sa zatúlala bublinka, pri ktorom roztoku nie je upravené pH, ktorá vzorka sa aj napriek overeným podmienkam na kolóne zráža, aký je rozdiel použiť slabý alebo silný ionomenič pri purifikácii proteínu obsahujúceho hém a množstvo iných situácií, ktoré je potrebné vyriešiť počas optimalizácie purifikačného procesu.

14. Zoznam použitej literatúry

- Arora S, Saxena V, Ayyar BV. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. *Methods*. 2017 Mar 1;116:84-94. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.12.010. Epub 2016 Dec 22. PMID: 28012937.
- Bupp CR, Wirth MJ. Making Sharper Peaks for Reverse-Phase Liquid Chromatography of Proteins. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2020 Jun 12;13(1):363-380. doi: 10.1146/annurev-anchem-061318-115009. Epub 2020 Feb 28. PMID: 32109149.
- Cassedy A, O'Kennedy R. Antibody Purification Using Affinity Chromatography. *Methods Mol Biol*. 2022;2466:3-22. doi: 10.1007/978-1-0716-2176-9_1. PMID: 35585307.
- Cawley J. Hydroxyapatite Chromatography (HAC). *Methods Mol Biol*. 2023;2699:179-192. doi: 10.1007/978-1-0716-3362-5_10. PMID: 37646999.
- Cummings LJ, Snyder MA, Brisack K. Protein chromatography on hydroxyapatite columns. *Methods Enzymol*. 2009;463:387-404. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63024-X. PMID: 19892184.
- Cummings LJ. Hydroxyapatite chromatography: purification strategies for recombinant proteins. *Methods Enzymol*. 2014;541:67-83. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00006-9. PMID: 24674063.
- Cummins PM, Rochfort KD, O'Connor BF. Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application. *Methods Mol Biol*. 2017;1485:209-223. doi: 10.1007/978-1-4939-6412-3_11. PMID: 27730555.
- Duong-Ly KC, Gabelli SB. Gel filtration chromatography (size exclusion chromatography) of proteins. *Methods Enzymol*. 2014;541:105-14. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00009-4. PMID: 24674066.
- Eriksson KO, Belew M. Hydrophobic interaction chromatography. *Methods Biochem Anal*. 2011;54:165-81. doi: 10.1002/9780470939932.ch6. PMID: 21954777.
- Esposito D, Chatterjee DK. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr Opin Biotechnol*. 2006 Aug;17(4):353-8. doi: 10.1016/j.copbio.2006.06.003. Epub 2006 Jun 15. PMID: 16781139.
- Fekete S, Beck A, Veuthey JL, Guilleme D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *J Pharm Biomed Anal*. 2014 Dec;101:161-73. doi: 10.1016/j.jpba.2014.04.011. Epub 2014 Apr 19. PMID: 24816223.
- Hage DS, Matsuda R. Affinity chromatography: a historical perspective. *Methods Mol Biol*. 2015;1286:1-19. doi: 10.1007/978-1-4939-2447-9_1. PMID: 25749941.
- Josic D, Kovac S. Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography of proteins. *Curr Protoc Protein Sci*. 2010 Aug;Chapter 8:8.7.1-8.7.22. doi: 10.1002/0471140864.ps0807s61. PMID: 20814934.
- Jungbauer A, Hahn R. Ion-exchange chromatography. *Methods Enzymol*. 2009;463:349-71. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63022-6. PMID: 19892182.
- Madadlou A, O'Sullivan S, Sheehan D. Fast protein liquid chromatography. *Methods Mol Biol*. 2011;681:439-47. doi: 10.1007/978-1-60761-913-0_25. PMID: 20978981.

Madadlou A, O'Sullivan S, Sheehan D. Fast Protein Liquid Chromatography. *Methods Mol Biol.* 2017;1485:365-373. doi: 10.1007/978-1-4939-6412-3_19. PMID: 27730563.

McCue JT. Theory and use of hydrophobic interaction chromatography in protein purification applications. *Methods Enzymol.* 2009;463:405-14. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63025-1. PMID: 19892185.

Middelberg AP. Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.* 2002 Oct;20(10):437-43. doi: 10.1016/S0167-7799(02)02047-4. PMID: 12220907.

Ó'Fágáin C, Cummins PM, O'Connor BF. Gel-Filtration Chromatography. *Methods Mol Biol.* 2017;1485:15-25. doi: 10.1007/978-1-4939-6412-3_2. PMID: 27730546; PMCID: PMC7121854.

Rodriguez EL, Poddar S, Iftekhhar S, Suh K, Woolfork AG, Ovbude S, Pekarek A, Walters M, Lott S, Hage DS. Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2020 Nov 10;1157:122332. doi: 10.1016/j.jchromb.2020.122332. Epub 2020 Aug 14. PMID: 32871378; PMCID: PMC7584770.

Rogl H, Kosemund K, Kühlbrandt W, Collinson I. Refolding of Escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Lett.* 1998 Jul 31;432(1-2):21-6. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00825-4. PMID: 9710243.

Zhao M, Vandersluis M, Stout J, Haupts U, Sanders M, Jacquemart R. Affinity chromatography for vaccines manufacturing: Finally ready for prime time? *Vaccine.* 2019 Aug 23;37(36):5491-5503. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.02.090. Epub 2018 Apr 5. PMID: 29627235.