

VYUŽITÍ HETEROBIFUNKČNÍCH LIGANDŮ V AFINITNÍ CHROMATOGRAFII

ZDENĚK GLATZ

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno
e-mail: glatz@chemi.muni.cz*

Došlo dne 3.VII.2001

Klíčová slova: purifikace bílkovin, afinitní interakce, afinitní chromatografie, heterobifunkční ligand

Obsah

1. Úvod
2. Metody založené na afinitních interakcích
3. Heterobifunkční ligandy
 - 3.1. Strategie použití heterobifunkčních ligandů
 - 3.2. Rozdělení heterobifunkčních ligandů podle použité vazebné interakce
4. Závěr

1. Úvod

Výsadní postavení mezi biomakromolekulami co se týče praktického využití mají bílkoviny, neboť se v organismech podílejí na celé řadě funkcí. Z toho vyplývá jejich široké průmyslové a medicínské uplatnění. Nelze rovněž opomenout použití bílkovinných preparátů jak v základním, tak i aplikovaném výzkumu. V závislosti na jejich konečné aplikaci jsou přitom požadovány bílkovinné preparáty o různém stupni čistoty, což klade rozdílné nároky na jejich purifikaci.

Jako výchozí materiál slouží jak rostlinné, tak živočišné tkáně, především však mikroorganismy. Mnoho bílkovin původně rostlinného či živočišného původu bylo klonováno a po expresi rekombinantní DNA v bakteriálních, kvasničných nebo savčích buňkách jsou získávány právě z těchto zdrojů. Vzhledem k tomu, že tyto technologie značně usnadnily získávání výchozího materiálu, představují nyní náklady na purifikaci dané bílkoviny 50–90 % jejich celkových produkčních nákladů¹. Tato skutečnost je dána tím, že bílkoviny jsou velice často izolovány z hrubých extraktů, ve kterých tvoří purifikovaná bílkovina vedle bílkovin balastních pouze minoritní podíl, a rovněž faktem, že bílkoviny se jen velmi málo liší ve svých fyzikálně-chemických vlastnostech, na nichž jsou založeny klasické purifikační postupy. Ty jsou tedy v mnoha případech nejen zdlouhavé a málo specifické, ale vedou i ke ztrátám izolovaných bílkovin.

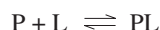
Charakteristickou vlastností, kterou se však bílkoviny navzájem odlišují, je schopnost tvorby biospecifických komplexů s jinými molekulami. Tuto schopnost – schopnost tvorby afinitních interakcí – lze využít při jejich purifikaci, a zefektiv-

nit tak celý proces. Rychlejší a selektivnější separační metody by měly napomoci zvýšení výtěžků, a tím i snížení produkčních nákladů. V tomto směru lze právě očekávat větší rozvoj metod založených na afinitních interakcích² a především jejich uplatnění v počátečních fázích purifikace.

2. Metody založené na afinitních interakcích

Základem všech metod založených na afinitní interakci je tvorba specifického, stabilního a reverzibilního komplexu mezi danou bílkovinou a příslušným ligandem³. Ligandem přitom může být jak látka nízkomolekulární, tak vysokomolekulární, látka anorganického či organického charakteru. Afinitní interakci je přitom nutné brát jako komplexní soubor interakcí, neboť se na ní podílejí elektrostatické, polární i hydrofobní interakce a van der Waalsovy síly. Pro interakci je důležitá také geometrie vazebného místa, tj. prostorové uspořádání interagujících funkčních skupin a jejich sterická dostupnost, a charakter samotného prostředí, ve kterém k interakci dochází, jeho iontová síla, pH, přítomnost iontů atd.

Interakci mezi bílkovinou (P) a ligandem (L) lze popsat jednoduchou rovnicí:



Síla této interakce je vyjádřena afinitní konstantou K_A , respektive její reciprokou hodnotou, konstantou disociační K_D :

Afinitní konstanta (rovnovážná, asociační)

$$K_A = \frac{[PL]}{[P] \cdot [L]} \quad (K_A = 10^4 - 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l})$$

Disociační konstanta

$$K_D = K_A^{-1} \quad (K_D = 10^{-8} - 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1})$$

Hodnota disociační konstanty pro danou dvojici bílkovina–ligand by se měla pohybovat ve výše uvedeném rozsahu. Jestliže je disociační konstanta příliš vysoká, k afinitní interakci nemusí dojít, je-li naopak nízká, extrémní podmínky potřebné k disociaci komplexu na původní složky mohou denaturovat danou bílkovinu. Velikost disociační konstanty rovněž určuje použitelnost příslušné afinitní metody pro daný afinitní pár. Je totiž nutné brát v úvahu, že u metod, u kterých dochází ke vzniku afinitní interakce v roztoku, musí být síla interakce vyšší, než u chromatografických metod, kde interakce vzniká při průchodu separované bílkoviny chromatografickou kolonou. Přehled některých častěji používaných afinitních párů bílkovina–ligand⁴ spolu s hodnotami disociačních konstant je uveden v tabulce I.

Pro usnadnění separace afinitního komplexu z roztoku je ligand imobilizován na nosiči, který může být nerozpustný, rozpustný, případně reverzibilně rozpustný–nerozpustný. Typ nosiče a především způsob separace afinitního komplexu jsou

Tabulka I

Přehled nejčastěji používaných afinitních párů bílkovina–ligand

Bílkovina	Ligand	K_D [mol.l ⁻¹]
Polyklonální protilátka	antigen	10^{-8} – 10^{-6}
Monoklonální protilátka	antigen	10^{-12} – 10^{-8}
Avidin	biotin	10^{-15}
Lektin	sacharid	10^{-6} – 10^{-3}
Vazebný protein	hormon, toxin	10^{-12} – 10^{-9}
Enzym	substrát	10^{-7} – 10^{-3}
Enzym	inhibitor	10^{-14} – 10^{-6}

charakteristické pro konkrétní afinitní metodu. V současné době je známa celá řada metod založených na afinitních interakcích. Mezi základní afinitní metody patří afinitní chromatografie, afinitní membránová filtrace a ultrafiltrace, afinitní dvoufázové separace a afinitní precipitace.

Afinitní chromatografie je založena na interakci mezi bílkovinou a ligandem imobilizovaným na chromatografickém sorbentu^{5,6}. Tento sorbent může být umístěn v chromatografické koloně, na kterou je nanesen vzorek, případně může být přímo přidán do roztoku vzorku. Po vymytí balastních bílkovin je ze sorbentu eluována purifikovaná bílkovina. Díky své vysoké selektivitě umožňuje afinitní chromatografie separovat složité směsi bílkovin s vysokým stupněm přečištění. Nevýhodou však je nízká kapacita a vysoká cena afinitních sorbentů. Při práci s hrubými extrakty navíc dochází k ucpávání chromatografických kolon. Afinitní chromatografie je tak obvykle používána jako jeden z posledních purifikačních kroků, kdy se pracuje již s malými objemy vzorku, a její použití v poloprovozním a provozním měřítku je omezené. Proto existuje snaha o integraci afinitních interakcí s rozličnými separačními metodami, jako jsou filtrace a ultrafiltrace, fázové separace a precipitace.

Afinitní membránová filtrace kombinuje specifitu afinitní interakce a rychlost a objemovou kapacitu membránové filtrace^{7,8}. Ligand je imobilizován na filtrační membráně, přes kterou je filtrován roztok vzorku. Zatímco nezachycené balastní bílkoviny membránou volně procházejí, purifikovaná bílkovina se na ni naváže a po promytí membrány je následně eluována. Použití této metody je limitováno ucpáváním pórů membrány, její nízkou vazebnou kapacitou a vysokou cenou doposud používaných membrán.

Afinitní ultrafiltraci lze užít místo afinitní membránové filtrace⁹. Ligand však není imobilizován na ultrafiltrační membráně, ale na vysokomolekulárním polymeru, respektive částici, které jsou přidány přímo do roztoku vzorku. Pro jeho ultrafiltraci je pak použita membrána s takovou velikostí pórů, aby balastní bílkoviny mohly membránou volně procházet, zatímco vzniklý makromolekulární afinitní komplex je zadržen. Po jejich vymytí je vyvolána disociace komplexu a purifikovaná bílkovina již volně projde ultrafiltrační membránou. Jistým omezením této metody je stále ještě vysoká cena používaných ultrafiltračních membrán.

Afinitní dvoufázové separace využívají dělení látek mezi dvě navzájem nemísitelné fáze^{10,11}, kterými bývají nejčastěji

vodné roztoky polyethylenglykolu a dextranu. Bílkoviny se distribuují mezi tyto dvě fáze podle rozdělovacího koeficientu. Tuto distribuci přitom lze posunout tím, že na jednu z fází se naváže afinitní ligand. Purifikovaná bílkovina se tak distribuuje výhradně do této fáze, přičemž distribuce balastních bílkovin se nemění. Opakovanou výměnou fáze bez ligandu pak postupně dochází k přečišťování purifikované bílkoviny, která je poté z komplexu s ligandem disociována. Nevýhodou této metody je kontaminace vyčištěné bílkoviny stopami polymeru, vysoká cena používaných polymerů a problémy s jejich recyklací.

Afinitní precipitace je metoda, při které dochází ke vzniku afinitního komplexu mezi purifikovanou bílkovinou a bis- nebo polyligandem¹². Tento komplex následně samovolně, respektive změnou fyzikálně-chemických vlastností roztoku precipituje, přičemž balastní bílkoviny zůstávají v roztoku. Po centrifugaci a opakovaném promytí precipitátu je vyvolána disociace afinitního komplexu a purifikovaná bílkovina přechází do roztoku. Problémem u této metody zůstávají nespecifické interakce mezi komplexem a balastními bílkovinami, a tím i snížený stupeň dosahovaného přečištění.

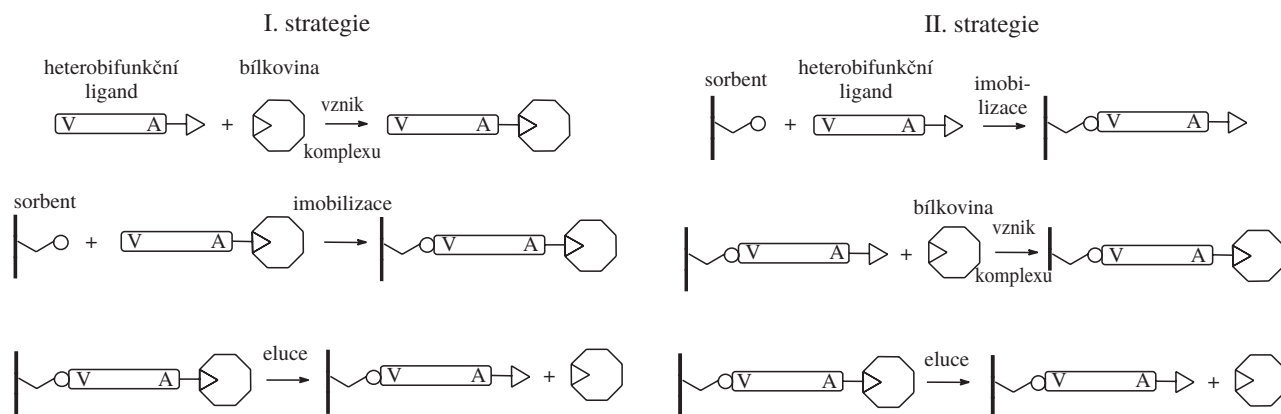
3. Heterobifunkční ligandy

Klasická afinitní chromatografie stále ještě zůstává nejpoužívanější metodou založenou na afinitních interakcích^{3,13–18}. Důležitým krokem v přípravě afinitního sorbentu je imobilizace příslušného ligandu. Kovalentní imobilizace obvykle vede ke statistické orientaci ligandu, což se odráží v jeho nízké dostupnosti pro purifikovanou bílkovinu. Tento problém částečně eliminuje imobilizace reverzibilní, při které je ligand imobilizován prostřednictvím specifických nebo nespecifických interakcí, případně prostřednictvím reverzibilní kovalentní vazby¹⁹. Pomocí tohoto přístupu lze snadno připravit afinitní sorbent požadovaných vlastností, jako jsou typ a koncentrace ligandu. Další nezanedbatelnou výhodou reverzibilní imobilizace je možnost intenzivního promytí či dokonce sterilizace výchozího sorbentu bez imobilizovaného ligandu před jeho opakovaným použitím, což je nezbytné především při produkci farmakologických preparátů.

Jedním z přístupů pro reverzibilní imobilizace ligandů v afinitní chromatografii je využití tzv. heterobifunkčních ligandů²⁰. Tuto metodou zavedl v roce 1989 prof. B. Mattiasson z univerzity v Lundu ve Švédsku. Heterobifunkční ligandy jsou molekuly, které obsahují dvě místa schopná interakce. První z nich – vazebné místo V – slouží k reverzibilní imobilizaci této molekuly na příslušný chromatografický sorbent. Druhé – afinitní místo A – je zodpovědné za biospecifickou interakci s purifikovanou bílkovinou. Ve většině případů jsou heterobifunkční ligandy syntetizovány z odpovídajících složek. Mohou však mezi ně být řazeny i nativní molekuly, jako jsou bílkoviny, fosfolipidy či koenzymy, které obsahují místa pro obě potřebné interakce přímo ve své struktuře.

3.1. Strategie použití heterobifunkčních ligandů

Při práci s heterobifunkčními ligandy lze použít dvě strategie, které se liší ve způsobu vytváření afinitního komplexu (obr. 1).



Obr. 1. Dvě strategie využití heterobifunkčních ligandů v afinitní chromatografii

Tabulka II

Přehled aplikací heterobifunkčních ligandů využívajících nespecifické interakce

Heterobifunkční ligand	Interakce		Lit.
	vazebná	afinitní	
Dinonylfenylethoxylát–trypsin	hydrofobní	trypsin–STI	25
Brij 76–triazinová barviva	hydrofobní	triazinová barviva–RNAse	26
Sérový albumin	hydrofobní	albumin–protilátka	27
Protilátky	hydrofobní	protilátka–antigen	28
Lecitin	hydrofobní	lecitin–fosfolipasa C	29

Tabulka III

Přehled aplikací heterobifunkčních ligandů využívajících specifické interakce

Heterobifunkční ligand	Interakce ^a		Lit.
	vazebná	afinitní	
STI–dextran–CB	trypsin–STI	CB–LDH	20
Dextran–STI	trypsin–STI	dextran–Con A	30
Ovalbumin	protilátka–ovalbumin	ovalbumin–Con A	31
Biotin–ligand	avidin–biotin	ligand–?	32
NAD, NADP, ATP, UTP	borát	koenzymy–enzymy	33–35
α_2 Makroglobulin	Cu^{2+}	α_2 makroglobulin–endopeptidasy	36
Con A	Cu^{2+}	Con A–ovalbumin	37
Iminodiocetová kyselina–PEG–ligand	Cu^{2+}	ligand–?	38
Dextran–ligand	Con A–dextran	ligand–?	39

^a STI – inhibitor trypsinu ze sóji, CB – Cibacron Blue 3G-A, LDH – laktátdehydrogenasa, Con A – konkanavalin A, PEG – polyethylenglykol, ? – různé aplikace

V prvním případě je heterobifunkční ligand přidán přímo do extraktu biologického materiálu. Po inkubaci, při které došlo k vytvoření afinitního komplexu, je roztok nanesen na daný chromatografický sorbent, na který se tento komplex naváže prostřednictvím vazebného místa heterobifunkčního

ligandu. Po vymytí balastních bílkovin je příslušným způsobem eluována specificky navázaná purifikovaná bílkovina. Ze sorbentu je poté eluován i heterobifunkční ligand. Při tomto postupu však může v roztoku docházet k vazbě balastních bílkovin na vazebnou část heterobifunkčního ligandu, proto se

tento postup používá méně často. Jeho výhodou však je, že k vytváření afinitní interakce dochází v roztoku, čímž jsou eliminovány sterické či difuzní limitace.

Ve druhém případě je heterobifunkční ligand nanesen na příslušný chromatografický sorbent a získaný afinitní sorbent je použit způsobem obvyklým v afinitní chromatografii. Tento sorbent lze používat opakovaně bez dalších manipulací. V obou případech však nesmí být k eluci purifikované bílkoviny použita metoda, která by současně ze sorbentu uvolňovala heterobifunkční ligand.

3.2. Rozdělení heterobifunkčních ligandů podle druhu použité vazebné interakce

Pro vazbu heterobifunkčního ligandu na daný sorbent jsou využívány nespécifické i specifické interakce. Každá z uvedených variant má své výhody a nevýhody. Pro nespécifickou vazbu byly využity hydrofobní interakce. Jako vazebná část heterobifunkčního ligandu byly použity kratší hydrofobní řetězce, neiontový detergent, případně přímo hydrofobní část dané molekuly. Pro jejich vazbu byly použity sorbenty jak pro hydrofobní, tak pro chromatografii s obrácenými fázemi – C_{18} . Hlavní výhodou tohoto uspořádání je skutečnost, že uvedené sorbenty jsou dostatečně chemicky i fyzikálně stabilní a pro jejich čištění lze použít i drastičtější metody. Problémem však je rozsah nespécifické vazby balastních bílkovin přímo na tyto sorbenty.

Tato nevýhoda samozřejmě odpadá u metod založených na specifických interakcích. Pro imobilizaci byly použity systémy enzym–inhibitor, avidin–biotin, protilátka–antigen, lektin–sacharid, systémy využívající boronátovou chromatografii^{21,22} a chromatografii na imobilizovaných kovových iontech^{23,24}. V porovnání s hydrofobní interakcí jsou metody založené na specifických interakcích mnohem citlivější na fyzikálně-chemické faktory prostředí, a možnosti čištění vlastního sorbentu jsou tím omezené. Tato skutečnost platí především v případech, kdy se na vazebné interakci podílí bílkovina. Nezanedbatelnou výhodou však je, že se jedná o orientovanou imobilizaci, což se odráží v lepší dostupnosti ligandu pro vyčištěnou bílkovinu.

Některé příklady aplikací heterobifunkčních ligandů spolu s použitou interakcí jsou uvedeny v tabulkách II a III.

4. Závěr

Reverzibilní imobilizace pomocí heterobifunkčních ligandů představuje jednoduchou metodu přípravy sorbentů pro afinitní chromatografii. Tímto způsobem lze velice rychle připravit sorbent požadovaných vlastností, jako jsou typ a koncentrace příslušného ligandu. Po eluci heterobifunkčního ligandu a regeneraci lze sorbent využít pro další aplikace, čímž je eliminována hlavní nevýhoda afinitní chromatografie, tj. potřeba mít pro každou aplikaci nový chromatografický sorbent. Nezanedbatelná je rovněž možnost důkladného promytí základního sorbentu bez nebezpečí zničení příslušného ligandu. Tato skutečnost by měla napomoci většímu rozšíření afinitní chromatografie do poloprovozních a provozních měřítek.

LITERATURA

1. Dwyer J. L.: J. Biotechnol. 1, 3 (1984).
2. Ngo T. T. (ed.): *Molecular Interactions in Bioseparations*. Plenum Press, New York 1992.
3. Turková J.: *Bioaffinity Chromatography*. Elsevier, Amsterdam 1993.
4. Labrou N., Clonis Y. D.: J. Biotechnol. 36, 95 (1994).
5. Campbell D. H., Luescher E. L., Lerman L. S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 35, 575 (1951).
6. Cautrecasas P., Wilchek M., Afinsen C. B.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 61, 636 (1968).
7. Champluvier B., Kula M.-R., v knize: *Separations for Biotechnology* (Pyle D. E., ed.), str. 295. Elsevier, London 1990.
8. Champluvier B., Kula M.-R.: Biotechnol. Bioeng. 40, 34 (1992).
9. Glatz Z.: Chem. Listy 94, 490 (2000).
10. Albertsson P.-A.: *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. Wiley – Interscience, New York 1971.
11. Walter H., Brooks D. E., Fisher D.: *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Theory, Methods, Uses and Applications in Biotechnology*. Academic Press, Orlando 1985.
12. Glatz Z.: Chem. Listy 94, 389 (2000).
13. Lowe C. R.: *An Introduction to Affinity Chromatography*. North Holland Publishing Company, Amsterdam 1979.
14. Scouten W.H.: *Affinity Chromatography*. Wiley, New York 1981.
15. Gribnau T. C. J., Visser J., Nivard R. J. F. (ed.): *Affinity Chromatography and Related Techniques*. Elsevier, Amsterdam 1982.
16. Chaiken I. M., Wilchek M., Parikh I. (ed.): *Affinity Chromatography and Molecular Recognition*. Academic Press, Orlando 1983.
17. Dean P. D. G., Johnson W. S., Middle F. A. (ed.): *Affinity Chromatography – A Practical Approach*. IRL Press, Oxford 1985.
18. Turková J., v knize: *Separation Methods* (Deyl Z., ed.), str. 321. Elsevier, Amsterdam 1984.
19. Glatz Z.: Chem. Listy 94, 314 (2000).
20. Mattiasson B., Olsson U. J.: J. Chromatogr. 370, 21 (1986).
21. Beneš M. J., Štambergová A., Scouten W. H., v knize: *Molecular Interactions in Bioseparations* (Ngo T. T., ed.), str. 313. Plenum Press, New York 1992.
22. Psotová J., Janiczek O.: Chem. Listy 89, 641 (1995).
23. Kleinmann I., Šmidl P., Plicka J.: Chem. Listy 85, 500 (1991).
24. Kučerová Z.: Chem. Listy 85, 526 (1991).
25. Kaul R., Olsson U. J., Mattiasson B.: J. Chromatogr. 438, 339 (1988).
26. Sing Y. L. K., Algiman E., Kroviarski Y., Massot C., Dhermy D., Bertrand O.: J. Chromatogr. 558, 43 (1991).
27. Mattiasson B., Linne E., Kaul R., v knize: *Molecular Interactions in Bioseparations* (Ngo T. T., ed.), str. 395. Plenum Press, New York 1992.
28. Chiong M., Lavadero S., Ramos R., Aguilon J. C., Ferreira A.: Anal. Biochem. 197, 47 (1991).
29. Chan E. C. S., Siboo I. R., Siboo R.: J. Chromatogr. 568, 85 (1991).

30. Olsson U. J., Mattiasson B.: J. Chromatogr. 370, 29 (1986).
31. Turková J., Pekov L., Sajdok J., Káš J., Beneš M. J.: J. Chromatogr. 500, 585 (1990).
32. Bayer E. A., Wilchek M.: J. Mol. Recognition 3, 102 (1990).
33. Maestas R. R., Prieto J. R., Kuehn G. D., Hageman J. H.: J. Chromatogr. 189, 225 (1980).
34. Bouriotis V., Galpin I. J., Dean P. D. G.: J. Chromatogr. 210, 267 (1981).
35. Westmark P. R., Valencia L. S., Smith B. D.: J. Chromatogr. 664, 123 (1994).
36. Wunderwald P., Schrenk W. J., Port H., Kresze G.-B.: J. Appl. Biochem. 5, 31 (1983).
37. Anspach F. B., Altmann-Haase G.: Biotechnol. Appl. Biochem. 20, 323 (1994).
38. Ehteshami G., Porath J., Guzman R.: J. Mol. Recognition 9, 733 (1996).
39. Glatz Z., Psotová J., Janiczek O., Novotný M. V.: Int. J. Biochromatogr. 1, 143 (1994).

Z. Glatz (Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno): **Application of Heterobifunctional Ligands in Affinity Chromatography**

A very important step in the design of affinity sorbents is the choice of an appropriate method for immobilization of the affinity ligand. Covalent immobilization usually leads to statistical orientation of ligands and a part of the ligands is not accessible for binding. An alternative to covalent immobilization is reversible immobilization, which leads to orientation of affinity ligands. The immobilization can be reversed and the column after regeneration can be employed in immobilization of a different ligand and used in another application. A choice for reversible immobilization is the use of heterobifunctional ligands. The ligands are molecules having two binding sites – one for the molecule of the substance to be purified and the other binding to the affinity support. Basic principles of such use of heterobifunctional ligands in affinity chromatography are given together with their applications in protein purification.

Jarmark

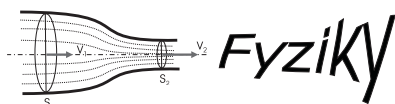
v pavilónu „A“ na výstavišti Flora

aneb poznej kouzlo

24. a 25. května 2002

V Olomouci

Chemie



Fyziky

$\sqrt[3]{(\text{Matematiky})^5}$

- měření tvrdosti přinesené vody (vodní kámen je převít)
- určení obsahu metanolu v tatínkové slivovici
- kontrola kvality slunečních brýlí (vzhledem k UV záření)
- hrátky s plastovými lahvemi
- fyzika a chemie v kuchyni
- stanovení vitamínu C v ovocných nápojích
- počítačový „hyzdič“ dětí, rodičů, babiček a dědečků
- Debrujarijáda, matematické kvízy a hlavolamy
- soutěže („10× odpověď“, „Chemický kufr“), atd.

