

Rozdział 3

Chromatografia powinowactwa i techniki pośrednie

3.1. Typy oddziaływań zaangażowanych w chromatografii powinowactwa

Białka wypełniają swoją funkcję biologiczną wykorzystując zdolności oddziaływania z innymi biomolekułami (ligandami), za pośrednictwem tzw. miejsc wiążących, formowanych w strukturze białka. Ligandami mogą być zarówno małe cząsteczki - takie jak substraty w oddziaływaniach z enzymami, jak również makrocząsteczki – np. hormony polipeptydowe. Oddziaływanie miejsca wiążącego z ligandem określone jest przez wielkość i kształt cząsteczki ligandu jak również przez liczbę i dystrybucję miejsc komplementarnych. Komplementarność ta może angażować kombinację oddziaływań, wynikających z udziału regionów cząsteczek obdarzonych ładunkiem, regionów hydrofobowych czy też wynikać może z innych oddziaływań krótkiego zasięgu – jak np. wiązania wodorowe. Ta zdolność wiązania ligandów przez białka, która jest stereoselektywna i często charakteryzuje się wysokim powinowactwem, może być wykorzystywana w oczyszczaniu białek w technice nazywanej chromatografią powinowactwa.

W technice tej wyróżnia się następujące etapy:

- wybór odpowiedniego ligandu,
- immobilizacja ligandu na inertnej matrycy,
- oddziaływanie interesującego nas białka zawartego w mieszaninie ekstrakcyjnej z przygotowanym złożem,
- usunięcie białek niespecyficycznie oddziaływujących ze złożem,
- elucja interesującego nas białka w czystej formie.

Chromatografia powinowactwa jest wyjątkową techniką ze względu na swoją selektywność, pozwala mianowicie na pozyskanie z ekstraktu białek pojedynczego składnika o wysokiej czystości i w dużym stężeniu. W praktyce jednak ten jednoetapowy proces chromatograficzny jest wykorzystywany w szczególnych przypadkach, gdyż wymaga szeregu etapów przygotowawczych (pozyskanie ligandu, przygotowanie odpowiedniego złoża) i często jest techniką dość kosztowną.

3.2. Własności źródeł stosowanych w chromatografii powinowactwa

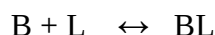
Konstrukcja złoza do chromatografii powinowactwa dla celów oczyszczania wybranego białka składa się z następujących etapów:

- selekcji odpowiedniego ligandu,
- wyboru odpowiedniej matrycy i grupy dystansowej,
- wbudowania ligandu do wybranej matrycy.

3.2.1. Kryteria doboru ligandu

Wyboru odpowiedniego ligandu dokonuje się w oparciu o własności białka, którego izolacją jesteśmy zainteresowani. Najczęściej staramy się wybrać ligand, z którym białko tworzy kompleks naturalny, o odpowiedniej mocy, o ile jego pozyskiwanie jest łatwe i niezbyt kosztowne.

Moc powstającego kompleksu białko-ligand:



określona jest wielkością stałej dysocjacji (K_d):

$$K_d = [B][L] / [BL]; \quad \text{gdzie} \quad \begin{array}{ll} [B] & - \text{stężenie białka} \\ [L] & - \text{stężenie ligandu} \\ [BL] & - \text{stężenie kompleksu} \end{array}$$

$$\downarrow$$

$$[L] / K_d = [BL] / [B]$$

Z powyższego równania wynika, że w momencie pełnej adsorpcji ($[BL] : [B] = 99 : 1$) wartość K_d musi być o około dwa rzędy niższa niż stężenie unieruchomionego ligandu. Generalnie przyjmuje się, że chromatografia powinowactwa dobrze sprawdza się w przypadku kompleksów dla których stała dysocjacji mieści się w granicy $10^{-4} - 10^{-8}$ M. Należy jednak pamiętać, że szacowane wartości K_d są wartościami przybliżonymi, ponieważ dotyczą kompleksu z udziałem ligandu natywnego, natomiast procedura jego unieruchamiania często prowadzi do modyfikacji oddziaływań zaangażowanych w procesie tworzenia kompleksu, co powoduje z kolei zmiany w wartości odpowiadającej mu stałej dysocjacji.

W budowie takiego selektywnego adsorbentu musimy wziąć pod uwagę również rozmiary unieruchamianego ligandu. Powinien on być wystarczająco duży by mógł zawierać odpowiednie reszty, które zdolne byłyby do oddziaływań z białkiem, zapewniając odpowiednią stereoselektywność i powinowactwo. Zastosowanie ligandu o zbyt małej wielkości może prowadzić do wzrostu udziału oddziaływań niespecyficznych, jakie mogą się

pojawić w wyniku oddziaływania oczyszczanego białka z resztami obecnymi w matrycy (np. -OH), na której prowadzimy unieruchamianie.

Ligand powinien również zawierać grupy funkcyjne, które można łatwo wykorzystać w procedurze unieruchamiania na matrycy, z zachowaniem nienaruszonego powinowactwa do białka.

Najczęściej jednak na etapie preparatyki posiadamy tylko ogólne informacje dotyczące własności pozyskiwanego białka, a z drugiej strony otrzymanie odpowiedniego ligandu biologicznego może być kosztowne lub wręcz trudne. W takich przypadkach możemy wykorzystać odpowiednie analogi chemiczne lub strukturalne ligandu, powszechnie dostępne lub tzw. ligandy o specyficzności grupowej. Przykłady takich ligandów i ich wykorzystania podaje tabela 5-1. Ligandy o specyficzności grupowej pozwalają na oczyszczanie spokrewnionych białek lub grup białek, bez konieczności inwestycji czasu i pracy w przygotowanie specyficznego adsorbentu. Ich szerokie zastosowania czynią je na tyle popularne, że szereg firm dostarcza gotowe do użycia złoża o specyficzności grupowej (Pharmacia, Sigma, BioRad).

Odrębnym problemem w chromatografii powinowactwa jest odwracalność kompleksu powstającego w układzie białko-ligand. Kompleks taki powinien być trwały w warunkach sorpcji na kolumnie z wybranym adsorbentem, a jednocześnie ulegać łatwej dysocjacji w warunkach elucji, która powinna prowadzić do pozyskania białka z zachowaniem jego własności biologicznych i integralności strukturalnej. Nie powinna zatem wymagać etapu denaturacji białka. Oczywistym jest także, że sam ligand w powyższych warunkach (denaturacja, proteoliza), jak również w warunkach jego unieruchamiania, czy też późniejszego przechowywania (rozpuszczalniki organiczne), także powinien być trwały.

Tabela 3-1: Przykłady ligandów stosowanych w izolacji białek techniką chromatografii powinowactwa.

ligand	stosowany w oczyszczaniu:
białko A / białko G	immunoglobuliny z różnych gatunków
przeciwciała monoklonalne	antygeny
antygeny	specyficzne przeciwciała mono- lub poliklonalne
steroidy	białka wiążące steroidy, receptory steroidowe
kwasy tłuszczowe	białka wiążące kwasy tłuszczowe, albuminy
nukleotydy	białka wiążące kwasy nukleinowe, enzymy zależne od nukleotydów
inhibitory proteinaz	proteinazy
modyfikowane proteinazy	inhibitory proteinazy
lizyna/arginina	plazmina, aktywatory plazminogenu
polimyksyna B	bakteryjna endotoksyna C, usuwanie endotoksyn z białek
fenyloboronian	glikowane białka, glikoproteiny
lektyny	glikoproteiny
cukry	lektyny, glikozydazy
kwask fosforowy	fosfatazy
biotyna	białka wiążące biotyłę, awidyna, streptawidyna
awidyna	enzymy sprzężone z biotyną
heparyna	czynniki krzepnięcia, lipazy, proteazy tkanki łącznej, polimerazy DNA
żelatyna	fibronektyna
kalmodulina	enzymy wiążące kalmodulinę
barwniki triazynowe	dehydrogenazy, kinazy, polimerazy, interferony, enzymy restrykcyjne

3.2.2. Wybór nośnika i grupy dystansowej

Odpowiednia matryca, na której dokonane zostanie kowalencyjne unieruchomienie wybranego ligandu, powinna spełniać poniższe kryteria:

- powinna być stabilna chemicznie w warunkach stosowanych w procesie aktywacji i unieruchamiania ligandu, jak również w procesach sorpcji i elucji białek (skrajne pH, rozpuszczalniki organiczne, temperatura),
- powinna zawierać szereg reszt, które będą łatwo ulegać aktywacji, w celu unieruchomienia ligandu i zapewnią możliwość wysokiego stopnia podstawienia, co jednocześnie nie powinno mieć wpływu na własności tak zmodyfikowanej matrycy,
- powinna wykazywać minimalny poziom adsorpcji niespecyficznej,

- powinna posiadać jednorodność strukturalną by zapewnić równomierną dystrybucję ligandu,
- powinna posiadać wysoki stopień porowatości, tak aby zapewnić maksymalny dostęp dużych cząsteczek białka do unieruchomionych w jej wnętrzu ligandów,
- powinna wykazywać wysoką stabilność mechaniczną, co umożliwi stosowanie nawet dużych przepływów.

Do najczęściej wykorzystywanych w chromatografii powinowactwa złożeń należą żele dekstranowe, agarozowe, poliakrylamidowe lub mieszane (patrz pozycja 7 w cytowanym piśmiennictwie).

W przypadku stosowania w chromatografii powinowactwa niskocząsteczkowych ligandów, procedurę jego unieruchamiania poprzedza etap wprowadzenia tzw. grup dystansowych, które zapewnią odpowiedni dostęp ligandu unieruchomionego w żelu dla izolowanego tą techniką białka. Długość takiej grupy dystansowej może być różna i dla celów konkretnej izolacji powinna zostać dobrana na drodze eksperymentalnej. Najczęściej jednak stosuje się grupy dystansowe zawierające od 4 do 8 grup metylenowych. Należy jednak pamiętać, że zbyt długie reszty dystansowe mogą brać udział w niespecyficznym oddziaływaniu z oczyszczanym białkiem, zwykle na zasadzie oddziaływań hydrofobowych.

3.2.3. Chemia aktywacji nośnika i unieruchamiania ligandu

Bromocyjan

Bromocyjan (CNBr) reaguje z resztami hydroksylowymi obecnymi w agarozie i innych polisacharydowych matrycach (rys. 3-1A), dając reaktywne podłoże, które może podlegać dalszej reakcji z grupami dystansowymi czy bezpośrednio z ligandami, zawierającymi reszty amin pierwszorzędowych (rys.3-1B).

Rysunek 3-1A: Produkty reakcji CNBr z agarozą (i-cykliczne-, ii-niecykliczne imidowęglany, iii-karbaminian, v-ester węglanowy, vi-ester cyjanianowy).

Rysunek 3-1B: Reakcja estru cyjanowego z resztami aminowymi – powstawanie pochodnej izomocznika.

Nieuprotonowane aminy z dużą wydajnością przyłączają się do aktywowanej bromocyjanem agarozy, dlatego pH, w którym następuje przyłączenie ligandu, powinno być wyższe niż jego pK_a , ale niższe niż 10 (pH ok. 7-8 dla amin aromatycznych i pH 10 dla alifatycznych).

Buforami zalecanymi do tego celu są bufor: boranowy lub węglanowy. Wydajność przyłączania spada w pH poniżej 9,5-10, co objawia się obniżeniem stabilności aktywowanego kompleksu. Również z uwagi na niestabilność aktywowanej CNBr agarozy w temperaturze pokojowej, reakcje sprzęgania należy prowadzić w temperaturze 4°C.

Pochodne izomocznika są podatne na atak nukleofilowy (bufory zawierające reszty aminowe, białka), a w ekstremalnych wartościach pH ulegają powolnej hydrolizie, co powoduje uwalnianie ligandu do buforu.

N-podstawiony izomocznik wykazuje w pH obojętnym dodatni ładunek ($pK_a \sim 9,5$) co oznacza, że powstały adsorbent posiada własności wymiennicza jonowego. Z drugiej strony szereg unieruchamianych ligandów obdarzonych jest ładunkiem ujemnym, zatem pochodne izomocznika mogą neutralizować jego wpływ.

Bromocyjan jest substancją bardzo toksyczną (po zakwaszeniu uwalniany jest HCN), zaleca się zatem stosowanie złóż już poddanych aktywacji, dostępnych handlowo. Jednak nawet przy tym zastrzeżeniu, aktywacja z użyciem bromocjanu jest jedną z najczęściej stosowanych sposobów w preparowaniu złóż do chromatografii powinowactwa.

Bis-epoksydy

Epoksydy (trójczłonowe pierścienie oksyranu) reagują chętnie zarówno z grupami hydroksylowymi jak i aminowymi, jakie mogą występować w matrycy. Reakcja przebiega w zasadowym pH (8,5-11), prowadząc do powstania pochodnych posiadających długi hydrofilowy łańcuch reaktywnego oksyranu (rys.3-2). Łańcuch ten stanowi zatem „automatycznie” wprowadzaną 11-węglową grupę dystansową. Może on dalej reagować z resztami aminokwasowymi białek, których reaktywność względem oksyranu maleje w szeregu: $SH > NH_2 > OH$.

Rysunek 3-2: Aktywacja złoza przy udziale bis-epoksydów.

Powstały adsorbent wykazuje znacznie mniejszą zawartość reszt hydrofilowych czy jonowych w porównaniu z aktywacją bromocyjanem. Wydajność unieruchamiania ligandów rośnie tu z temperaturą (do 40°C). Adsorbenty powstałe z udziałem epoksydów charakteryzują się wysoką stabilnością.

Karbonylodiimidazol

Złóża polisacharydowe mogą podlegać aktywacji w reakcji ze związkami karbonylującymi, takimi jak N,N'- karbonylodiimidazol (CDI), przebiegającej w warunkach bezwodnych.

Powstałe imidazolowe pochodne reagują w zasadowym pH z pierwszorzędowymi resztami aminowymi ligandów, tworząc stabilny adsorbent (rys.3-3).

Rysunek 3-3: Aktywacja agarozy z udziałem N,N'-karbonylodiimidazolu i przyłączanie ligandu poprzez reszty aminowe.

CDI jest substancją nietoksyczną, jest efektywnym czynnikiem aktywującym i nie wprowadza własności jonowymiennych w powstające złoże. Handlowo dostępna CDI-aktywowana agarozą jest stabilna w rozpuszczalnikach organicznych. Dla celów unieruchamiania ligandu należy usunąć rozpuszczalnik (aceton) przez szybkie odmycie schłodzoną wodą i prowadzić reakcję sprzęgania w 0,1M buforze boranowym pH 8,5-10 w temperaturze pokojowej.

Chłoki sulfonylu

Organiczne chlorki sulfonylu reagują z resztami hydroksylowymi matrycy dając pochodne, które łatwo oddziałują z nukleofilowymi grupami aminowymi lub tiolowymi ligandów (rys.3-4).

Rysunek 3-4: Aktywacja złożeń i reakcja przyłączania ligandu z udziałem tosyłu.

Aktywacja przy użyciu chlorku p-toluenosulfonylu (tosylu) lub trifluoroetanosulfonylu (tresylu) przebiega w środowisku rozpuszczalników organicznych, a uzyskane złoże wykazuje dużą stabilność przez długi okres czasu (w 1mM HCl lub w stanie suchym). Reaktywność estrów sulfonylowych zależy od rodzaju użytej pochodnej: w przypadku tresylu – aktywacja przebiega w neutralnym pH już w 4°C, w przypadku tosyłu – w pH 9,0-10,5 w 40°C. Zaletą złożeń aktywowanych chlorkiem tosyłu jest możliwość śledzenia stopnia podstawienia złożeń w oparciu o własności spektralne tosyłu.

Nadjodan sodu

Wicynalne diole złożeń polisacharydowych mogą być utlenianie przy udziale nadjodanu sodu (NaJO_4) do aldehydów. Nadjodan sodu bardzo dobrze rozpuszcza się w wodzie i łatwo jest usuwany ze złożeń po aktywacji. Reaktywne reszty aldehydowe reagują z pierwszorzędowymi aminami w pH 4-6, tworząc zasady Schiff'a, które mogą być stabilizowane przez redukcję borowodorkiem sodu lub cyjanoborowodorkiem sodu (rys.-5). Ten typ aktywacji złożeń polecany jest szczególnie w przypadku wrażliwości ligandu na zasadowe pH.

Rysunek 3-5: Kowalencyjne sprzęganie ligandu do zaktywowanej nadjodanem agarozy.

Sulfonian fluorometylopirydyny

Łatwej aktywacji reszt hydroksylowych polisacharydów można dokonać przy użyciu 2-fluoro-1-metylopirydyno-4-toluenosulfonianu (FMP) w rozpuszczalnikach organicznych. Reakcja ta przebiega w czasie 10 min, w temperaturze pokojowej, w obecności trzeciorzędowych amin - np. trietyloaminy. Zaktywowane reszty mogą bezpośrednio reagować z grupami aminowymi lub tiolowymi ligandu (pH 8-9). Zarówno aktywacja jak i przyłączanie ligandu może być śledzona spektrofotometrycznie z uwagi na własności absorpcyjne reszty, która ulega odszczępieniu – 2-fluoro-1-metylopirydyny ($\lambda = 297 \text{ nm}$). FMP jest nietoksyczny, tani i pozwala na uzyskanie stabilnych, nie zawierających reszt jonowych złożów z wysokim stopniem podstawienia, co czyni tę procedurę dość popularną.

Glutaraldehyd

Aktywacja reszt aminowych lub amidowych, jakie występują w złożach poliakrylamidowych lub w zawierających grupy dystansowe złożach agarozowych, przebiega przy udziale 25% wodnego roztworu aldehydu glutarowego w 0,5 M buforze fosforanowym, pH 7,0 w temperaturze 20-40°C przez około dobę. Zaktywowany żel, po dokładnym odmyciu nadmiaru aldehydu, reaguje z resztami aminowymi ligandu, w tym samym buforze lecz w temperaturze 4°C. Metoda ta jest polecana ze względów ekonomicznych oraz z uwagi na jej prostotę, szczególnie dla ligandów wrażliwych na zasadowe pH.

3.2.4. Blokada reaktywnych reszt

Handlowo dostępne aktywowane złoża, zawierają grupy reaktywne w stężeniu mieszczącym się w zakresie 5-25 $\mu\text{moli/ml}$. Natomiast stężenie przyłączonego ligandu na ogół nie przekracza 10 $\mu\text{moli/ml}$. Zatem po procedurze przygotowania stosownego złoża pozostaje w nim szereg reaktywnych reszt, które nie wzięły udziału w przyłączeniu ligandu i mogą wchodzić w niespecyficzne oddziaływanie z izolowanymi przy ich zastosowaniu białkami. By temu zapobiec, należy zablokować te grupy, poddając je reakcji z niskocząsteczkowymi związkami, których obecność nie ma znaczenia w dalszych procesach oczyszczania białek z udziałem tych adsorbentów. Powszechnie jako czynnik blokujący, stosuje się 1 M roztwór etanoloaminy, pH 8,0, w obecności której inkubuje się otrzymane złożo. Reakcja przebiega w

temperaturze pokojowej przez ok. godzinę. Po odmyciu i zabezpieczeniu złoza może być ono przechowywane dłuższy czas w temperaturze 4°C.

3.3. Standaryzacja warunków procesu oczyszczania z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa

3.3.1. Określenie pojemności złoza

Ilość materiału jaka może zostać oczyszczona przy zastosowaniu przygotowanego złoza do chromatografii powinowactwa nazywana jest pojemnością wiązania i określana jest w sposób przybliżony. Pierwsza możliwość zakłada określenie ilości ligandu, jaka została unieruchomiona i przy założeniu pełnej dostępności każdej cząsteczki ligandu dla białka oraz odpowiedniej stechiometrii wiązania, pozwala na określenie maksymalnej pojemności złoza. W rzeczywistości jednak nie wszystkie ligandy, które zostały unieruchomione są dostępne dla składników próbki, głównie za przyczyną oddziaływań niespecyficznych lub przeszkód sterycznych.

Często do określenia pojemności złoza stosuje się również poniższy diagram (rys.3-6). Wyznacza się go, mierząc parametry nakładanej próbki, w której zlokalizowana jest określona ilość interesującego nas białka (P_0). Dla minimalnej ilości złoza (1ml) dokonujemy rozdziału białek śledząc w jego trakcie A_{280} (absorpcja wszystkich białek) oraz poziom aktywności jaką wykazuje nasze białko (np. test enzymatyczny). Z poniższych wykresów wyznaczamy objętość elucji dla 50% wartości każdej z mierzonych wielkości (V_0 – dla absorbancji białek i V_e – dla aktywności właściwej izolowanego białka) i na ich podstawie szacujemy pojemność wiązania naszego złoza (P), wynoszącą: $P = P_0 (V_e - V_0)$. Jest to tzw. pojemność oczekiwana.

Rysunek 3-6: Oznaczanie pojemności adsorbentu w chromatografii powinowactwa. Linia ciągła – oznacza ilości białka całkowitego w eluacie; linia przerywana – ilość białka, którego izolację chcemy prowadzić.

3.3.2. Dobór parametrów kolumny i przepływu fazy ruchomej

Ilość złoza jaką należy przygotować w celu preparatyki, zależy od jego pojemności i ilości materiału jaki chcemy na nie nałożyć. Pojemność złoza określamy sami po jego preparatyce

lub wskazana jest przez jego producenta. Ze względów praktycznych stosujemy 2-3 krotny nadmiar objętość złożeń w stosunku do wartości wyliczonej.

Handlowo dostępne złożeń występują w formie suchej – wtedy złożeń należy poddać pęcznieniu (15 – 60 minut), a złożeń w formie spęczniałej należy przemywać wodą lub buforem wykorzystywanym w procesie sorpcji w stosunku 1:200 (żel : bufor). Ma to na celu usunięcie wszelkich substancji pozostałych po syntezie lub wymaganych dla celów przechowywania. Złożeń możemy uformować w kolumnę – gdy oddziaływania między ligandem i białkiem są słabe, lub możemy korzystać z tzw. procedury „batch” – w przypadku oddziaływań mocnych ($K_d < 10^{-6}$). Selektywność zależy będzie od wyboru ligandu i warunków rozdzielania, a rozdzielczość od własności adsorbentu, w mniejszym natomiast stopniu od rozmiaru kolumny. Dlatego w chromatografii powinowactwa stosuje się krótkie i grube kolumny, o wzajemnym stosunku długości i przekroju nawet 1:1.

Prędkość przepływu fazy ruchomej zależy będzie od etapu rozdzielania chromatograficznego i kinetyki asocjacji białka z ligandem. Jeżeli K_d powstającego kompleksu jest niższa niż 10^{-6} , co wskazuje na wysokie powinowactwo, przepływy mogą być większe; przy wyższych stałych dysocjacji kompleks powinien być traktowany z większą ostrożnością. Szybkość przepływu przy nakładaniu próbki na kolumnę powinna wynosić ok. 10 cm/godz. (jest to przepływ liniowy; by obliczyć rzeczywisty przepływ, należy tę wartość przemnożyć przez pole przekroju kolumny). W czasie przemywania kolumny po nałożeniu próbki przepływ możemy zwiększyć, gdyż w tym etapie chodzi o usunięcie substancji oddziałujących ze złożem niespecyficznie (20-50 cm/godz). Natomiast przepływ na etapie elucji zależy od siły jonowej buforu lub jego powinowactwa do ligandu lub białka (20-50 cm/godz), nie może jednak prowadzić do uszkodzenia białka, ligandu czy złożeń.

3.3.3. Wybór warunków sorpcji

Środowisko, w którym zachodzi wiązanie białka do unieruchomionego ligandu powinno zapewniać optymalne warunki dla tego oddziaływania, mającego charakter oddziaływań niekowalencyjnych, z udziałem wiązań wodorowych, oddziaływań jonowych czy hydrofobowych. Bufor stosowany na tym etapie chromatografii z jednej strony winien zapewnić najlepsze warunki dla wiązania specyficznego między ligandem a izolowanym białkiem, z drugiej natomiast strony powinien minimalizować oddziaływania niespecyficzne, jakie mogą zachodzić w obecności składników nakładanej próbki. Najczęściej stosowanym tu buforem jest bufor fosforanowy lub bufor Tris/HCl, w stężeniu 0,1-0,2 M, z ewentualnym dodatkiem soli (do 0,5 M) jeśli oddziaływanie ma charakter hydrofobowy. Istotna jest także

obecność dwuwartościowych jonów metali, jeżeli mogą one wpływać na odpowiednią orientację centrum wiążącego. Wszelka standaryzacja rozdziału w chromatografii powinowactwa odbywa się metodami kolejnych przybliżeń warunków optymalnych.

3.3.4. Optymalizacja warunków elucji

Elucja zaadsorbowanych białek jest możliwa na skutek zmiany otoczenia powstałego w procesie sorpcji kompleksu, co powinno prowadzić do jego destabilizacji. Gdy o naturze tworzonego kompleksu mamy zbyt mało informacji, wybieramy warunki elucji określane mianem *elucji niespecyficznej*. W elucji tego typu wykorzystuje się:

- gradient stężenia soli, niszczący oddziaływania jonowe,
- zmianę (zwykle obniżenie) pH buforu, prowadzącą do zmianę stopnia jonizacji naładowanych reszt zlokalizowanych w obrębie płaszczyzny kontaktu białka z ligandem, co uniemożliwia np. dalsze tworzenie mostków solnych w centrum wiążącym,
- zmianę temperatury w stosunku do optymalnej dla wiązania,
- wprowadzenie czynników chaotropowych, niszczących wodną powłokę adsorpcyjną białek: KSCN (3M), KI (2M), $MgCl_2$ (4M),
- w przypadku silniejszych oddziaływań można również zastosować czynniki denaturujące czy też detergenty. Zawsze jednak należy pamiętać by warunki te, nie prowadziły do uszkodzenia integralności strukturalnej oraz aktywności biologicznej izolowanego białka, podobnie jak nie powinny powodować destrukcji złoża (uszkodzenia struktury ligandu, odszczepiania go z matrycy, czy niszczenia struktury samej matrycy).

W przypadku lepszej orientacji we własnościach tworzonego kompleksu ligand-izolowane białko, w procesie elucji możemy wpływać na konkretne oddziaływania zaangażowane w tworzenie kompleksu. Metodę tę określa się terminem *elucji specyficznej*; może ona być realizowana w dwóch układach. W pierwszym z nich, bufor elucyjny powinien zawierać substancję konkurującą z białkiem w oddziaływaniu z unieruchomionym ligandem (np. α -metyloglukozyd w elucji glikoproteiny ze złoża zawierającego unieruchomioną Con A). Drugim podejściem w elucji powinowactwa jest zastosowanie w buforze elucyjnym ligandu (kontrligandu), konkurującego z ligandem unieruchomionym o centrum wiążące izolowanego białka - najlepiej więc, by tworzył z nim kompleks o większym powinowactwie (np. elucja białka wiążącego witaminę B₁ roztworem tej witaminy, ze złoża zawierającego

unieruchomiony jej analog strukturalny, tworzący kompleks o wyższej stałej dysocjacji niż w przypadku ligandu natywnego).

3.3.5. Regeneracja i przechowywanie złożeń do chromatografii powinowactwa

W przypadku złożeń dostępnych handlowo producent zwykle podaje szczegółową instrukcję regeneracji złoża. Na ogół polega ona na przemywaniu złoża buforami zawierającymi wysokie stężenie soli (1M NaCl, 2 M KCl) lub sekwencją buforów o odmiennym pH (np. 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5 z 0,5 M NaCl, oraz 0, 1M octanem sodu, pH 4,5 z 0,5 M NaCl.). Zwykle stosuje się przemycie buforem o objętości odpowiadającej ok. 10-krotnej objętości złoża. Również na tym ostatecznym etapie obróbki złoża należy mieć na uwadze jego stabilność w zastosowanych warunkach.

Zregenerowane adsorbenty przechowuje się w buforze wyjściowym w obecności bakteriostryków (0,05% azydek sodu) lub etanolu (20%) - który zaleca się w przypadku złożeń, mogących ulegać uszkodzeniu w obecności bakteriostryków (ligandy reaktywne względem grup -SH, tiopropyl-Sepharose). Temperatura przechowywania złoża nie może być niższa niż 4°C, gdyż zamrażanie może prowadzić do jego uszkodzenia.

3.4. Immunoabsorbenty w chromatografii powinowactwa

Chromatografia powinowactwa z wykorzystującą unikalne własności układu antygen – przeciwciało jest najbardziej selektywną, wysoce specyficzną i spektakularną w wynikach oczyszczania (1000-10 000-krotne oczyszczenie) techniką chromatograficzną. Jest jednak również metodą drogą, zwłaszcza jeśli wykorzystuje przeciwciała monoklonalne.

Sukces w zastosowaniu chromatografii powinowactwa na immunoabsorbentach określają cztery procesy: pozyskiwanie odpowiedniego przeciwciała, wyjściowy stan antygeny, jego powinowactwo do przeciwciała i warunki, w których to powinowactwo może zostać zniesione. Pozyskiwanie odpowiednich przeciwciał zarówno mono- jak i poliklonalnych jest często wyjściowym krokiem w pracach nad badanym antygenem. Wykorzystywane są one bowiem w technikach oznaczania aktywności czy w immunoblottingu, zatem często są dostępne już na etapie planowania strategii oczyszczania. Ich zastosowanie nawet do dość zanieczyszczonego ekstraktu jest również możliwe ponieważ przeciwciała wykazują dość dużą odporność na proteolizę i są degradowane tylko przez wybrane klasy enzymów.

3.4.1. Unieruchamianie przeciwciał na agarozie

Istnieje szereg metod unieruchamiania przeciwciał w obojętnych nośnikach.

Najpopularniejsze są dwie z nich :

- bezpośrednia, polegająca na unieruchomieniu przeciwciała na aktywowanej CNBr agarozie,
- pośrednia, z udziałem proteiny .

W metodzie bezpośredniej należy pamiętać o ograniczeniach jakie tu występują w momencie użycia aktywowanej CNBr agarozy. Złoża te będą należeć do raczej delikatnych, zatem wykluczają zastosowanie nadmiernych przepływów oraz kolumn o zbyt dużych rozmiarach. Posiadają limit wielkości cząsteczek penetrujących złoża (20×10^6), zatem nie mogą być wykorzystywane do unieruchamiania zbyt dużych immunoglobulin (np. IgM). Powstające kowalencyjne wiązanie między ligandem i matrycą jest dość labilne, zatem w skrajnych warunkach elucji może dochodzić do powolnej degeneracji złoża i uwalniania unieruchomionego ligandu (przeciwciała). Ograniczenia te jednak nie wpływają na powszechność stosowania tej metody.

Przygotowanie przeciwciała do procedury unieruchamiania na aktywowanej CNBr agarozie:

- roztwór przeciwciała należy poddać dializie względem buforu, w którym zachodzić będzie wiązanie (0,1 M NaHCO₃, pH 8,3 zawierający 0,5 M NaCl lub 0,1 M bufor boranowy, pH 8,0)
- proponowana ilość przeciwciała do immobilizacji : 1-10 mg/ml żelu dla monoklonalnych i 10-20 mg/ml żelu dla poliklonalnych, nadmiar przeciwciał może prowadzić do sterycznych utrudnień w oddziaływaniu z antygenem.

Przygotowanie aktywowanej CNBr Sepharose:

- należy przygotować odpowiednią ilość aktywowanej CNBr Sepharose (0,3 g – 1 ml żelu) bezpośrednio przed użyciem (złoża to adsorbują wilgoć z atmosfery i ulegają destrukcji),
- złoża poddajemy pęcznieniu w 10 objętościach 1 mM HCl, mieszając łagodnie (nie należy używać mieszadła magnetycznego, z uwagi na możliwość zniszczenia struktury złoża) przez ok. 15 min, a następnie przemywamy je łagodnie na sączku ze spiekem szklanym pozostałą porcją HCl (200 ml/g suchego złoża),
- przemywamy złoża 10 objętościami buforu (4°C), w którym zachodzić będzie wiązanie (złoża nie mogą ulec zasuszeniu).

Reakcja sprzęgania ligandu

- mieszamy 1 objętość przemytego złoza z 5 objętościami roztworu przeciwciała w buforze do sprzęgania w temp. 4 °C (w wyższych temperaturach aktywowane CNBr reszty reagują szybciej z grupami aminowymi białka, co może powodować wielopunktowe przyłączanie przeciwciał i zmniejszać wydajność złoza),
- inkubujemy mieszaninę reakcyjną przez 16-20 godzin w temperaturze 4°C, przy ciągłym mieszaniu złoza (np. przez wytrząsanie).

Blokowanie reszt nie biorących udziału w reakcji sprzęgania

Zaktywowane reszty, które nie wzięły udziału w reakcji przyłączania ligandu, muszą zostać zablokowane przez wprowadzenie nadmiaru substancji zawierających reszty amin pierwszorzędowych. Należy przy tym mieć na uwadze by nie były to substancje mogące wprowadzić dodatkowe grupy (np. jonowe), których obecność mogłaby powodować oddziaływania niespecyficzne, prowadzące do adsorbowania na złożu dodatkowych zanieczyszczeń. Najczęściej stosuje się w tym celu 1 M roztwór etanoloaminy, doprowadzony do pH 8,0 przy pomocy stężonego HCl (reakcja silnie egzotermiczna).

Procedura jest następująca:

- odsączamy mieszaninę reakcyjną na sączku ze spiekem szklanym i przemywamy dodatkowo 5 objętościami świeżego buforu, używanego do reakcji sprzęgania,
- złoże z unieruchomionym przeciwciałem inkubujemy w roztworze etanoloaminy w temperaturze pokojowej przez 1-2 godzin, przy ciągłym mieszaniu,
- prowadzimy przemywanie żelu trzema cyklami buforów, na przemian o wysokim i niskim

pH (0,1 M bufor octanowy, pH 4,0 z 0,5 M NaCl i 0,1 M bufor węglanowy, pH 8,3 również zawierający 0,5 M NaCl), inkubując złoże w każdym z nich przez 5-10 min i przemywając na spieku szklanym 10 objętościami każdego z buforów. Ten sposób przemywania ma na celu usunięcie cząsteczek przeciwciał, które zostały przyłączone niekowalencyjnie,

- zawieszamy złoże w buforze używanym do nakładania próbki antygeny, równoważymy je odpowiednią objętością tego buforu i przechowujemy do chwili użycia w obecności 0,1% azydku sodu.

W metodzie pośredniej unieruchamiania przeciwciał wykorzystuje się złoża sprzęgnięte z białkiem A lub białkiem G, stosowane także do oczyszczania przeciwciał (pozycja 7 literatury). Schemat procesu unieruchamiania ilustruje rys. 3-7.

Rysunek 3-7: Przykładowa konstrukcja immunoabsorbentu z udziałem białka A.

Białko A zawiera cztery miejsca wiązania, które oddziałują z fragmentem Fc immunoglobulin, pozostawiając fragmenty Fab w pełni dostępny dla antygeny. W przypadku, gdy oddziaływanie białko A - immunoglobulina nie jest wystarczająco mocne, można je stabilizować przez wprowadzenie dodatkowego wiązania kowalencyjnego techniką sieciowania chemicznego (ang. *cross-linking*), z zastosowaniem pimelimidoestru dimetylowego (DMP).

Przygotowanie immunoabsorbentu metodą pośrednią

- mieszamy roztwór przeciwciała z żelem zawierającym unieruchomione białko A (patrz instrukcja producenta) i mieszaninę inkubujemy przez 1 godz. w temperaturze pokojowej, ciągle mieszając (ok. 2 mg przeciwciała / 1 ml spęczniałego żelu),
- złożę przemywamy dwukrotnie 0,2 M buforem boranowym, pH 9,0 (10 ml buforu / ml żelu) sącząc na spieku szklanym lub delikatnie wirując,
- zawieszamy złożę w 10 objętościach buforu boranowego i dodajemy DMP, w końcowym stężeniu 20 mM (57 mg/1ml żelu +10 ml buforu), reakcja ta musi być prowadzona w pH powyżej 8,3; mieszamy całość jeszcze przez 30-45 minut w temperaturze pokojowej,
- aby zatrzymać reakcję, sączymy powyższą mieszaninę i przemywamy 0,2 M roztworem etanoloaminy, pH 8,0, a następnie inkubujemy dodatkowo złożę w tym roztworze przez dalsze 2 godz. w temperaturze pokojowej, przy ciągłym mieszaniu,
- ostatecznie przemywamy złożę i przechowujemy w buforze PBS, z dodatkiem azydku sodu (w temperaturze 4°C złożę stabilne przez co najmniej rok).

Aby oszacować wydajność unieruchamiania przeciwciała na złożu możemy pobrać 10 µl otrzymanego adsorbentu, zagotować w 1 % roztworze SDS i wykonać dla uzyskanej próbki elektroforezę SDS-PAGE w warunkach redukujących. Jeżeli proces unieruchamiania z dodatkowym sieciowaniem przebiegł prawidłowo, nie powinniśmy zaobserwować prążków odpowiadających łańcuchom ciężkim (55 kDa). Jeśli takowe występują, należy przemyć złożę 100 mM roztworem glicyny, pH 3,0, w celu eliminacji cząsteczek przeciwciała, związanych z białkiem A w sposób niekowalencyjny.

3.4.2. Warunki rozdziału stosowane w chromatografii z wykorzystaniem immunoadsorbentów

Wiązanie przeciwciał do antygeny zachodzi w neutralnym pH, w niskiej sile jonowej, (np. w buforze fosforanowym, pH 7,2). W procesie sorpcji należy zwrócić uwagę na zapewnienie maksymalnego wykorzystania możliwości wiązania przez immunoadsorbent; dotyczy to zwłaszcza szybkości przepływu, która powinna być w tym przypadku wystarczająco wolna, by zapewnić pełne wysycenie dostępnych miejsc wiążących.

Teoretycznie, każda cząsteczka monoklonalnego IgG może wiązać dwie cząsteczki antygeny, jednak wydajność immobilizacji znacząco redukuje tę możliwość. Wpływa na to zarówno chemia wiązania, porowatość złoza, struktura przeciwciała czy wielkość antygeny. Zakłada się wręcz, że wydajność wiązania otrzymanego adsorbentu w stosunku do antygeny mieści się w zakresie 1% - 50% (najczęściej 10%).

Z uwagi na charakter oddziaływań jakie uczestniczą w wiązaniu antygeny do immunoglobulin (słabe oddziaływania typu wiązań wodorowych, oddziaływań van der Waals'a czy kulombowskich mostków solnych), w procesie elucji stosuje się stałą taktykę rozpoczynającą się od wprowadzenia drastycznych warunków pH, soli chaotropowych, czynników zmieniających powierzchnię kontaktu obu molekuł, czy wreszcie rozpuszczalników organicznych. Najczęściej stosowanymi warunkami w celu desorpcji antygeny jest wprowadzenie buforów o niskim pH (0,1 M glicyna/HCl, pH 2,5; cytrynian sodu, pH 2,5), rzadziej o wysokim pH (50 mM etylenodiamina, pH 11,5; 0,15 M NH_4OH , pH 10,5). Tak drastyczne warunki pH mogą oczywiście destabilizować złoze lub niszczyć strukturę i własności antygeny, jednak elucja tego typu jest bardzo szybka (wymagana ilość buforu elucyjnego na ogół nie przekracza dwóch objętości złoza). Można zatem zapobiec tym destrukcjom np. zbierając eluowany antygen do roztworu buforu neutralizującego, lub szybko równoważąc złoze po elucji odpowiednim buforem.

Pośród czynników chaotropowych, (naruszających trzeciorzędową strukturę białek), stosowanych w elucji antygenów, należy wyróżnić: MgCl_2 (3-5 M), NaI (2,5M), NaSCN (1-5 M), mocznik (2-8 M), chlorowodorek guanidyny (2-5 M).

Tak niekorzystne warunki, jakich wymaga elucja, wynikają z bardzo wysokiej trwałości kompleksów jakie tworzą antygen i immunoglobulina ($K_d \sim 10^{-8} - 10^{-12}$). Aby obniżyć to powinowactwo, stosuje się różne zabiegi np. w pozyskiwaniu przeciwciał dla tego samego antygeny lecz izolowanego z innego gatunku – w przypadku przeciwciał poliklonalnych, Natomiast problem ten rozwiązywany jest skutecznie przez techniki produkcji przeciwciał

monoklonalnych, dobranych tak, aby wykazywały obniżone powinowactwo do interesującego nas antygeny.

3.5. Chromatografia powinowactwa z zastosowaniem złożeń lektynowych - przykład złoża o specyficzności grupowej

Lektyny stanowią rodzinę białek wiążących reszty węglowodanów, a ich obecność wykryto początkowo w roślinach, a następnie w komórkach zwierzęcych i bakteryjnych, gdzie uległy adaptacji do spełniania różnych funkcji. Oprócz popularnych lektyn izolowanych z nasion głównie roślin motylkowych, zidentyfikowano szereg lektyn, stanowiących białka zdolne do aglutynacji ludzkich erytrocytów i stąd często spotykana nazwa lektyn – aglutyniny. Inne inicjują proliferację i/lub morfologiczną transformację limfocytów. Niezależnie od źródła występowania, lektyny wykazują duże podobieństwo strukturalne. Zbudowane są z jednej lub kilku podjednostek, tworząc najczęściej tetramer. Gdy podjednostki są identyczne, lektyna posiada szereg miejsc wiążących, które rozpoznają pojedynczy, konkretny sacharyd, aczkolwiek zdarza się, że w przypadku struktury zawierającej zróżnicowane podjednostki, ta specyficzność może dotyczyć dwóch różnych cukrowców. Podstawową charakterystykę dotyczącą struktury i specyficzności lektyn podaje tabela 3-2.

Tabela 3-2: Charakterystyka biochemiczna i specyficzność wybranych lektyn.

nazwa lektyny	MW (kDa)	liczba podjednostek	specyficzność względem reszty cukrowej	wymagany jon metalu
konkanawalina A (Con A)* <i>Canavalia ensiformis</i>	55 110	2 4	α -D-Man> α -D-Glc> α -D-GlcNAc	Ca ²⁺ , Mn ²⁺
lektyna z nasion soczewicy (LCA)	49	2	α -D-Man> α -D-Glc> α -D-GlcNAc	
lektyna z nasion soji (SBA)	110-120	4	α -D-GalNAc> β -D-GalNAc> α -D-Gal	Ca ²⁺ , Mn ²⁺
aglutynina z nasion pszenicy (WGA)	36	2	(β -D-GlcNAc) ₃ >(β-D-GlcNAc) ₂	Ca ²⁺ , Mn ²⁺ Zn ²⁺
lektyna z nasion grochu (PLS)	49	4	α -D-Man	
fitohemaglutynina z nasion fasoli (PHA)	128	4	D-GalNAc	Ca ²⁺ , Mn ²⁺

* ConA występuje jako dimer (55 kDa) poniżej pH 5,6; jako tetramer (110 kDa) w pH pomiędzy 5,6-7,0; powyżej pH 7,0 występuje w formie jeszcze większych agregatów.

3.5.1. Wybór i przygotowanie adsorbentu

Powinowactwo lektyn do specyficznych reszt węglowodanów stało się podstawą ich wykorzystania w izolacji glikoprotein. Jako przykład może posłużyć oczyszczanie receptorów z wykorzystaniem złoża zawierającego unieruchomioną aglutyninę z zarodków pszenicy (WGA) czy izolacja cytokin i innych czynników wzrostu, z wykorzystaniem konkanawaliny A lub lektyny z nasion soczewicy (LCA).

Przygotowanie stosownego złoża nie stanowi obecnie problemu, gdyż zarówno czyste lektyny jak również sprzęgnięte ze stosownym podłożem, są handlowo dostępne (Sigma, Pharmacia, Pierce). A jego wybór zależy od natury i reszt cukrowych występujących w interesującej nas glikoproteinie. Warto dodać, że ten typ chromatografii nadaje się zarówno do glikoprotein występujących naturalnie jak również produkowanych technikami rekombinantowymi.

W wyborze złoża należy wziąć pod uwagę rodzaj wiązań kowalencyjnych, występujących pomiędzy białkiem a wbudowanymi resztami cukrowymi. Są to na ogół połączenia N-glikozydowe, występujące pomiędzy N-acetyloglukozoaminą i asparaginą. W tym przypadku sprawdza się większość lektyn (Con A, LCA, WGA, RCA). Natomiast dla wiązań O-

glikozydowych, które powstają głównie pomiędzy N-acetylogalaktozaminą a L-seryną czy L-treoniną (np. w mucynach) najlepiej sprawdza się lektyna PNA.

3.5.2. Uwagi dotyczące unieruchamiania lektyn

Lektyny mogą oddziaływać z resztami cukrowymi tylko w obecności odpowiednich jonów dwuwartościowych (tabela 5-2). Ich obecność warunkuje transformację trzeciorzędowej struktury lektyny, umożliwiającej tworzenie centrum wiążącego dla odpowiedniego sacharydu. Sposób unieruchamiania lektyny na złożu może w znacznej mierze ograniczać tę możliwość, dlatego dla zabezpieczenia tych centrów wiązania już na etapie unieruchamiania wprowadzamy jony dwuwartościowe. Również dodatek specyficznych cukrów może umożliwić dodatkową protekcję struktury lektyny.

3.5.3. Przygotowanie próbki w chromatografii lektynowej

Ze względu na podział glikoprotein na:

- rozpuszczalne – ulegające sekrecji przez komórki i występujące w płynach biologicznych czy medium komórkowym (np. hormony), oraz
- błonowe – np. białka transportowe czy receptory występujące na powierzchni komórki,

procedury ich przygotowania i obróbki na złożu lektynowym będą nieco odmienne.

Oddziaływanie glikoprotein ze złożem lektynowym zależy od pH, dlatego w przypadku glikoprotein rozpuszczalnych najlepiej ich ekstrakt przygotować w buforze fosforanowym lub Tris/HCl w zakresie pH fizjologicznego (6,8 – 7,5). Obecność wysokich stężeń soli nie stanowi tu ograniczenia, ponieważ oddziaływanie nie angażuje sił jonowych, a dodatkowo jej obecność znosi oddziaływania niespecyficzne. Próbka wyjściowa powinna zawierać także dwuwartościowe jony metali, których obecność jest niezbędna dla wiązania ze złożem lektynowym. Wystarczające jest 1 mM stężenie chlorków odpowiednich metali.

W cytoplaźmie lub medium hodowlanym często znajdują się cukry, które przed nałożeniem próbki na złoże muszą być z niej usunięte, gdyż brałyby udział w kompetycji o miejsce wiążące w lektynach. W tym celu ekstrakt glikoprotein należy poddać wstępnej obróbce stosując np. wysalanie siarczanem amonu lub frakcjonowanie PEG, dializę, sączenie molekularne, zateżanie przez chromatografię jonowymienną itp.

Do ekstraktu glikoprotein można dodać także bakteriostryki (0,05% azydek sodu) o ile dalej nie będzie stosowane oznaczenie aktywności biologicznej (możliwość zakłócania reakcji), wówczas lepiej użyć antybiotyków (gentamycyna 100 µg/ml).

W przypadku glikoprotein błonowych obowiązują również powyższe reguły, ale dochodzą również dodatkowe wymogi, wynikające ze sposobów solubilizacji tych białek. W niszczeniu oddziaływań hydrofobowych pomiędzy białkami a lipidami często wykorzystywane są silne denaturanty – mocznik czy chlorowodorek guanidyny, związki chaotropowe lub rozpuszczalniki organiczne. Mogą one jednak prowadzić do denaturacji białek lub uniemożliwiać detekcję specyficzną ich aktywności. Dlatego bardziej popularne są detergenty. Wybrane przykłady ich zastosowań prezentuje tabela 3-3A, a granice ich stosowalności – tabela 3-3B.

Tabela 3-3A: Wybrane przykłady detergentów stosowanych w solubilizacji glikoprotein przed nałożeniem ich na złoża lektynowe.

detergent	stężenie	oczyszczane białko	rodzaj zastosowanej lektyny
<i>jonowy:</i> Triton X-100	1%	receptor NGF	WGA
	0,5%	glikoforyna A	WGA
Nonident P-40	2,5%	receptor PGDF	WGA
<i>anionowy:</i> deoksycholan sodu	1%	antygen HLA	LCA
	6,6%	glikoproteiny wirusów	LCA
<i>kationowy</i> bromek dodecyltri- metyloamoniowy	1,4%	rodopsyna	ConA

Tabela 3-3B: Wpływ rodzaju i stężenia wybranych detergentów na zdolność wiązania cukrów przez wybrane złoża lektynowe.

stężenie detergentu (%)	% zachowanej zdolności wiązania sacharydu		
	Con A	WGA	SBA
Nonident P-40			
0,1	88	95	100
1,0	78	90	100
2,5	80	92	100
Triton X-100			
0,1	85	90	100

1,0	76	76	100
2,5	74	79	99
deoksycholesterol			
0.1	60	85	53
1,0	46	39	34
2,5	20	10	10
SDS			
0,05	70	89	22
0,1	26	13	11

O ile zastosowanie detergentów dla celów solubilizacji konkretnej glikoproteiny i wyboru odpowiedniego złoża lektynowego wymaga indywidualnych testów, to jednak można podać tu kilka wskazówek natury ogólnej:

- chromatografia z zastosowaniem Con A nie zależy od obecności detergentów,
- detergenty niejonowe (Triton X-100, Nonidet P-40) mają mniej niszczący wpływ na lektyny niż inne detergenty,
- SDS redukuje oddziaływanie z lektynami, prawdopodobnie powodując rozwijanie ich struktury,
- wszelkie detergenty należy używać w stężeniu poniżej 1% (w/v lub v/v) dla optymalnej solubilizacji i wydajności wiązania z lektynami.

Niszczenie komórek przy zastosowaniu detergentów prowadzi do uwalniania proteinaz lizosomalnych, które mogą degradować lub modyfikować glikoproteiny błonowe, należy zatem pamiętać o konieczności stosowania inhibitorów proteinaz.

3.5.4. Warunki rozdzielania

Skład eluentu stosowanego w wymyciu zaadsorbowanych glikoprotein zależy przede wszystkim od rodzaju wykorzystanej lektyny. Zazwyczaj bufor elucyjny (np. 20 mM fosforan sodu, pH 7,2; z 1 M NaCl) zawiera cukier lub jego analog, do którego lektyna przejawia wysokie powinowactwo. Przykładowo, stosując Con A bufor elucyjny powinien zawierać α -D-metylomannozyd w stężeniu 0-0.5 M, w przypadku aglutyniny sojowej - α -D-N-acetylogalaktozaminę w podobnym stężeniu (tabela 5-2).

Z uwagi na udział oddziaływań hydrofobowych w adsorpcji glikoprotein na złożach lektynowych, często do bufor elucyjnego, obok odpowiedniego sacharydu, wprowadza się glikol etylenowy, w stężeniu 0-50 %.

W elucji glikoprotein można wykorzystywać również zmiany pH buforu elucyjnego (pH 3.0 – 10.0), o ile zachowują one stabilność w wybranym zakresie pH.

Wzrost wydajności elucji można również osiągnąć prowadząc ją przez odpowiednio długi czas (np. przez noc, w skończonej objętości).

3.5.5. Regeneracja i przechowywanie złożeń

Po wykorzystaniu złoża z unieruchomioną lektyną należy przemyć je 0.1 M buforem octanowym pH 6.0, zawierającym jony odpowiedniego metalu dwuwartościowego, w stężeniu 100 μ M oraz czynnik bakteriostatyczny. Przechowywanie złożów lektynowych w tych warunkach, w temperaturze 4°C, powinno zapewnić jego stabilność przez około 1 rok. Należy natomiast unikać obecności denaturantów i proteinaz oraz czynników chelatujących, a pH roztworów buforowych winno mieścić się w zakresie 3-9.

3.6. Chromatografia pseudo-powinowactwa wykorzystująca barwniki jako ligandy

Technika chromatograficzna wykorzystująca złoża barwnikowe czerpie swój początek z zupełnie niezależnych eksperymentów firmy Pharmacia, zmierzających do syntezy barwnego związku, który w sprzęgnięciu z wysokocząsteczkowym dekstranem stanowi marker tzw. „pustej objętości” złożów, stosowanych w sączeniu molekularnym (błękit dekstranowy).

Testując objętość elucji kinazy pirogronianowej z drożdży stwierdzono, że jest ona różna, w zależności od tego, czy w nakładanej mieszance jest obecny czy też nie powyższy marker, co wskazywało na tworzenie swoistego kompleksu między tym białkiem a barwnikiem. Po unieruchomieniu błękitu dekstranowego na agarozie stwierdzono, że takie nowe złożo sprawdza się nie tylko w opisanym wyżej przykładzie, ale także dla szeregu enzymów, a szczególnie dehydrogenaz oraz innych enzymów wiążących nukleotydy purynowe. Bliższe badania strukturalne wykazały, że budowa tego barwnika nawiązuje do struktury NAD w odniesieniu do planarnego ułożenia pierścieni i lokalizacji reszt niosących ładunek ujemny. Barwnik ten z powodzeniem wiązał się m.in. do dehydrogenazy alkoholowej dokładnie w miejsce NAD i generalnie można go traktować jako szczególny analog AMP, IMP, ATP, NAD, NADP i GTP. Stąd też pochodzi nazwa tego typu chromatografii wykorzystującej złoża barwnikowe - chromatografia pseudo-powinowactwa.

Stosowane barwniki należą do grupy barwników triazynowych; do najpopularniejszych należą wspomniany wyżej Cibacron Blue F3GA i Porcion Red HE-3B (rys. 3-8)

Z czasem szereg firm zaczęło proponować coraz to nowsze złoża z unieruchomionymi barwnikami (rys. 3-8), co pozwoliło na zwiększenie selektywności tej techniki. Złoża te znane

są pod szeregiem nazw w zależności od producenta, a ich dokładna struktura często chroniona jest prawem patentowym. I tak, enzymy zależne od NADP silniej wiążą się do złóż zawierający barwnik Procion Red HE-3B (pochodna barwnika Red 8, rys. 3-8), natomiast zależne od NAD - do Cibacron Blue F3GA (Blue 2, rys. 3-8). Mimo, że istnieje szereg spektakularnych zastosowań złóż barwnikowych, wykazujących szczególną selektywność względem określonych białek np. albuminy i lipoprotein osoczowych czy interferonu, to powinny one stanowić raczej jeden z możliwych kroków chromatograficznych na wstępnych etapach oczyszczania białek. Ich wykorzystanie jest obecnie dość powszechne z uwagi na wysoką pojemność, łatwą dostępność i niską cenę tych złóż.

Rysunek 3-8: Struktury wybranych barwników unieruchamianych na złożach agarozowych: A/ Yellow 3; B) Red 8; C/ Blue 2

3.6.1. Przygotowanie złóż barwnikowych

Tak jak w każdym przypadku chromatografii powinowactwa i tu matryca, na której osadzony zostaje barwnik powinna spełniać określone wymogi, o których wspomniano wyżej.

Najpopularniejsza agarozą w tym przypadku daje złożo o niskim podstawieniu, a wynika to z procedury wiązania barwników, wymagającej temperatury powyżej 40°C, w której agarozą ulega stapianiu. Z kolei złoża dekstranowe, umożliwiające swobodny przepływ nawet dużych cząsteczek (Sephadex G-150, G-200) wprowadzają ograniczenie przepływu. Najlepsza okazała się agarozą poddana odpowiedniemu sieciowaniu (Sepharose CL-4B, CL-6B, Sephacryl S-300, Ultrogel, Bio-Gel A), wytrzymująca temperatury nawet do 100°C.

Przyłączanie barwników do agarozy zachodzi w warunkach wysokiego pH (Na_2CO_3 lub NaOH) w obecności soli (2% NaCl), w temperaturze 30-90°C. Stopień podstawienia musi być dobrany w każdej procedurze indywidualnie.

Przy obecnym rozwoju chromatografii barwnikowej, coraz częściej korzysta się ze stosunkowo tanich, gotowych złóż z unieruchomionymi barwnikami, sprzedawanymi w zestawach, umożliwiającymi szybkie przetestowanie kilku ich wersji.

3.6.2. Warunki stosowania złóż barwnikowych

Oddziaływaniami warunkującymi adsorpcję białek na unieruchomionych barwnikach są oddziaływania jonowe i/ lub hydrofobowe. W zależności od tego, które z nich dominują należy dobierać odpowiednie warunki sorpcji i elucji. I tak, gdy udział oddziaływań

hydrofobowych jest większy, wzrost siły jonowej będzie je wzmacniał, przeciwnie - oddziaływania jonowe ulegną osłabieniu. W roztworach o niskich wartościach pH adsorbenty barwnikowe dodatkowo stają się efektywnymi wymiennicami kationów (udział reszt sulfonowych). Proces sorpcji powinien przebiegać w obecności niskiej siły jonowej, co można osiągnąć np. rozcieńczając nakładany ekstrakt białek. Optymalnie zaleca się na starcie 0,05 M bufor Tris/HCl o odpowiednim pH i próbki złoże o objętości nie większej niż 0,5-2,0 ml, co jest istotne, zwłaszcza, że dla badanego układu złoże barwnikowe zwykle dobierane jest metodą prób i błędów. Ilość nakładanego białka nie powinna przekraczać 20 mg/ml żelu. Dla celów elucji najlepiej wystartować ze zmianą siły jonowej eluentu (np. wprowadzając 1 M NaCl), natomiast dla jej optymalizacji często stosuje się tzw. elucję powinowactwa, w której wykorzystywane są np. w przypadku enzymów ich substraty, koenzymy, inhibitory lub efektory, w stężeniu 10-krotnie wyższym niż odpowiednia stała dysocjacji, a gdy ta nie jest znana, proponowane jest stężenie 10 mM.. I tak stosuje się np. dla kinaz – ATP, dla dehydrogenaz NAD^+ lub NADH, dla enzymów wiążących AMP – AMP. Niestety jest to jednak mało ekonomiczny wariant.

Po wyselekcjonowaniu odpowiedniego złoże pozostaje tylko dobrać odpowiednią skalę rozdzału, biorąc pod uwagę ilość nakładanego materiału i pojemność złoże. W przypadku oddziaływań słabych stosuje się wersję kolumnową (rozmiar kolumny – wysokość: przekrój = 2:5, przepływ 1-5 ml/min), natomiast dla mocniejszych oddziaływań można stosować procedurę „batch”.

Chromatografia barwnikowa może być wykorzystywana w wersji pozytywnej – do oczyszczania konkretnego białka, ale także w wersji negatywnej - do oddzielania zanieczyszczeń, które będą zatrzymywane na kolumnie. Można również, testując szereg żeli barwnikowych, dobrać taki zestaw złożeń, w którym jeden krok stanowić będzie adsorpcję zanieczyszczeń a drugi krok pozytywną adsorpcję oczyszczanego białka.

3.6.3. Regeneracja i przechowywanie złożeń barwnikowych

O ile odmycie złoże 1 M NaCl prowadzi do elucji większości zaadsorbowanych białek, z czasem jednak, zwłaszcza przy stosowaniu wyjściowych ekstraktów białek, złoże ulega zanieczyszczeniu. W takich przypadkach stosuje się przemycanie bądź mocną zasadą (0,5 M NaOH) lub silnym denaturantem (8 M mocznik lub 1% roztwór SDS) albo odpowiednią sekwencją tych roztworów. Po odmyciu wodą, adsorbenty należy przechowywać w roztworze soli, w obecności bakteriostatyków. Przed ponownym użyciem złoże trzeba dokładnie odmyć, ponieważ w trakcie przechowywania może dochodzić do uwalniania barwnika, które jednak

zachodzi nie na skutek odwracalności wiązania barwnika do podłoża lecz w wyniku hydrolizy połączeń glikozydowych występujących w matrycy.

3.7. Techniki chromatograficzne spokrewnione z chromatografią powinowactwa

3.7.1. Chromatografia chelatująca

Podstawę wykorzystania metali przejściowych w technice chromatografii powinowactwa stanowi fakt, że mogą one brać udział w wiązaniach koordynacyjnych z elektrodonorowymi resztami łańcuchów bocznych aminokwasów takich jak histydyna, cysteina czy tryptofan, występującymi na powierzchni białek. Unieruchamianie metali na odpowiednich złożach przebiega z udziałem grup chelatujących, z tym zastrzeżeniem, że wybrany metal musi wykazywać większe powinowactwo do matrycy niż do białka, w oczyszczaniu którego ma wziąć udział. Do najczęściej stosowanych w tej technice grup chelatujących należy kwas iminodioctowy (IDA), który jest mocowany do złoża –np. Sepharose 6B, poprzez długą, hydrofilową grupę dystansową, co pozwala na lepszą dostępność unieruchomionego metalu dla centrów wiążących na powierzchni białka. Inną popularną grupą chelatującą jest tris(karboksymetylo)etylenodiamina (TED), która nadaje powstałemu złożu odmienne właściwości w porównaniu z IDA. Złoże zawierające TED wykazuje większe powinowactwo w stosunku do jonu metalu i słabsze – w stosunku do białka w porównaniu z analogicznym złożem IDA. Złoża z TED tworzą kompleksy (pojedyncze wiązanie koordynacyjne), natomiast złoża z IDA tworzą chelaty (koordynacja wielopunktowa).

Do najczęściej stosowanych metali przejściowych w tym typie chromatografii należy cynk i miedź, chociaż znane też są zastosowania niklu, kobaltu i wapnia. Metodyka unieruchamiania tych metali w złożu jest stosunkowo prosta, polega na przepuszczeniu odpowiedniego roztworu soli metalu, który zamierzamy zastosować (ZnCl_2 lub CuSO_4) przez złoże nie obdarzone żadnym ładunkiem a jedynie posiadające właściwości chelatujące (wynikające z obecności TED lub IDA). Wyboru metalu dokonujemy metodą prób i błędów, pamiętając jedynie, że miedź tworzy silniejsze kompleksy z białkami niż cynk, ale oznacza to jednocześnie trudniejsze wymycie, zatem dla każdego układu musimy dokonać stosownego

dopasowania. Czynnikiem decydującym o wiązaniu białka jest pH w jakim ten proces przebiega. Zakres optymalny to pH 6-8, w bardziej zasadowym pH wiązanie może zachodzić przy udziale zdeprotonowanych reszt aminowych. Istotnym czynnikiem jest również skład buforu; należy unikać buforów mogących brać udział w tworzeniu chelatów, zatem nie mogą one zawierać EDTA czy cytrynianów. Zaleca się bufor: octanowy, fosforanowy lub Tris/HCl, chociaż ten ostatni może prowadzić do redukcji wiązania i należy go stosować tylko w oddziaływaniach o odpowiedniej mocy pomiędzy białkiem a metalem.

Obecność mocznika, detergentów, czy soli powinno mieć znikomy wpływ na to oddziaływanie, chociaż niektórzy badacze wręcz sugerują dodatek soli (0,5 - 1 M) w celu zniesienia oddziaływań jonowych, które w tej sytuacji wprowadzają niebezpieczeństwo oddziaływań niespecyficznych.

Z uwagi na zależność wiązania od pH, jego gradient może stanowić dobry sposób na wymycie zaadsorbowanego białka (w pH 6-8, reszty biorące udział w wiązaniu są zdeprotonowane, obniżenie pH prowadzi do ich protonacji i utraty ich własności chelatujących, co powoduje powolne wymywanie białka). Inny sposób elucji to wprowadzenie ligandów kompetycyjnych (elucja powinowactwa) takich jak: imidazol, histamina, glicyna lub chlorek amonu, najlepiej z elucją w wersji gradientowej.

Zastosowanie czynników chelatujących (EDTA, EGTA), oznacza usunięcie ze złoża całego kompleksu białko-jon metalu. Jest to metoda szybka, ale powoduje uwolnienie wszystkich zaadsorbowanych białek, bez względu na ich stopień powinowactwa względem złoża (brak rozdzielczości). W pewnych przypadkach ten sposób elucji może jednak być korzystny.

Chromatografię tego rodzaju po raz pierwszy zastosowano w oczyszczaniu białek osocza, w określeniu topografii interferonu izolowanego z różnych gatunków czy wreszcie rozdzielenia różnych subklas interferonu ludzkiego (tabela 5-4). Istnieją także doniesienia o zastosowaniu jonów Fe^{3+} w przygotowaniu chelatującego adsorbentu o specyficzności grupowej w stosunku do fosfoprotein i fosforanowych pochodnych aminokwasów. Przykładowo, dla ovoalbuminy wyróżniono w ten sposób trzy subklasy, zróżnicowane pod względem stopnia fosforylacji.

Tabela 3-4: Przykłady białek, w których oczyszczaniu zastosowano chromatografię chelatującą.

oczyszczone białko	zastosowany metal
aktywator plazminogenu	Zn^{+2}

kolegenaza	Zn^{+2}
laktoferyna	Cu^{+2}
białka niehistonowe	Cu^{+2}
α_2 -makroglobulina	Zn^{+2}
fibrinogen ludzki	Zn^{+2}
difosfataza nukleozydowa	$\text{Zn}^{+2}, \text{Cu}^{+2}$

3.7.2. Chromatografia kowalencyjna

Wiązanie większości ligandów w chromatografii powinowactwa przebiega z udziałem głównie grup aminowych i karboksylowych. Trzeci rodzaj reszt jakie biorą udział w tych oddziaływaniach to grupy –SH. Matryce zawierające unieruchomione reszty sulfhydrylowe znalazły zastosowanie w odniesieniu do związków posiadających w swej strukturze wolne reszty tiolowe, co w szczególności dotyczy enzymów. Złoża tego typu oddziałują również ze związkami zawierającymi ugrupowania atomów: C=O, C=C, N=N, jak również z metalami ciężkimi (Hg), oraz z chlorkami alkilowymi i aryłowymi.

Najczęściej stosowane są złoża zawierające reszty tiopropylu lub glutationu; te ostatnie, stosowane do izolacji dużych białek, wykazują jednak o wiele niższą pojemność.

Adsorpcję można prowadzić zarówno z zastosowaniem kolumny jak i procedurą batch.

Proces przygotowania złoża oraz roztworu białka powinien przebiegać w łagodnych warunkach (pH obojętne lub lekko kwaśne). W pH ~ 8 większość białek zawierających tiol reaguje dość szybko, natomiast w pH kwaśnym (4,0) rośnie selektywność wiązania białek, ponieważ wiązać będą się tylko te, które posiadają grupy –SH z unikalnie niskim pK_a .

Dotyczy to szeregu proteinaz cysteinowych, takich jak papaina, w której pK_a grupy sulfhydrylowej centrum aktywnego jest niskie, z uwagi na występowanie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych.

Elucja zaadsorbowanych białek odbywa się z udziałem niskocząsteczkowych tioli takich jak ditiotritol lub 2-merkaptioetanol w obojętnym pH buforu elucyjnego. Niektórzy autorzy zalecają stosowanie rosnącego gradientu stężenia tego samego związku tiolowego lub sekwencji tioli o rosnącej zdolności redukcyjnej: 5-25 mM L-cysteina; 50 mM zredukowany glutation; 20-50 mM 2-merkaptioetanol; 20-50 mM ditiotritol. Po elucji czynniki redukujące muszą być odmyte ze złoża i zastąpione resztą 2-pirydylową (rys. 5-8). W tym celu należy zmieszać 1 objętość etanolowego roztworu dwusiarczku 2-2'-dipirydyłu (30-40 mg/ml) z czterema objętościami żelu w 0,1 M buforze boranowym pH 8,0, zawierającym 1 mM EDTA.

Mieszaninę ogrzewamy pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 80 °C przez 3 godziny. Złoże przemywamy etanolem i równoważymy wyjściowym buforem (w przechowywaniu stosujemy 0,02% azydek sodu).

Przykład zastosowania takiego adsorbentu prezentuje rys. 3-9. W procesie wiązania tioli, ze złoża uwalniany jest 2-tioketon pirydyny, posiadający własności absorpcyjne ($\lambda = 343\text{nm}$), co pozwala na śledzenie procesu sorpcji.

Rysunek 3-9: Procesy sorpcji (a), elucji (b) i regeneracji (c) w przykładowej procedurze kowalencyjnej wykorzystującej wymianę tiol – disiarczek.

3.8. Inne przykłady wykorzystania technik chromatografii powinowactwa bazujących na dostępnych handlowo złożach

Chromatografia powinowactwa może być również użyteczną techniką w izolacji określonych komórek, wymaga jednak uwzględnienia specyficznych warunków niezbędnych do zachowania ich stabilności. Komórki selekcjonowane mogą być na złożach zawierających unieruchomione białko lub inny „ligand”, który na powierzchni komórki rozpoznawany będzie przez inne specyficzne białko lub receptor. Z uwagi na wielkość komórek, główny problem stanowić będzie dobór właściwej matrycy, która pozwoli na swobodną ich migrację przez złoże. Zakładając średnią wielkość komórek 50-70 μm , wielkość ziaren powinna mieścić się w granicach 250-350 μm . Oprócz standardowych własności złoże to nie może być „toksyczne” w stosunku do komórek i musi zachować stabilność w warunkach sterylizacji lub autoklawowania.

Błona komórkowa zawiera szereg składników, które mogą zostać wykorzystane w procesie unieruchamiania, np. glikoproteiny błonowe mogą być dla tych celów szczególnie użyteczne przy zastosowaniu złożów lektynowych. Elucja zaadsorbowanych białek musi przebiegać z udziałem specyficznych eluentów, gdyż ze względu na efekty osmotyczne gradient soli w tym przypadku nie może być użyty. Podobnie należy zwracać uwagę na pH i temperaturę eluentu. Adsorbenty zawierające unieruchomiony w żelu agarazowym długi łańcuch kwasu poliurydylowego (poli(U)-Sepharose 4B) specyficznie i w sposób odwracalny wiążą kwasy nukleinowe pochodzenia roślinnego oraz mRNA, ponieważ prawie wszystkie cząsteczki mRNA mają w swej strukturze sekwencję kwasu poliadenylowego, komplementarną do sekwencji poli(U). Elucję zaadsorbowanych kwasów prowadzi się przy udziale czynnika

niszczącego powstałe w warunkach sorpcji wiązania wodorowe – formamidu. Podobną rolę spełnia złożo poliadenylowe (poli(A)-Sephadex).

Innym przykładem złoża, które stosowane jest w izolacji glikoprotein jest agaroz z unieruchomionym fenyloboronianem (PBA). Istotą jego wykorzystania jest zdolność do tworzenia kompleksów kowalencyjnych z cis-diolami (rys. 3-10).

Rysunek 3-10: Przebieg reakcji fenyloboronianu z ugrupowaniem 1,2-cis diolowym, występującym w resztach cukrowych glikoprotein i pierścieniu rybozy w nukleotydach.

Wiązanie zachodzi w 50 mM buforze Tris/HCl, pH 8,0, zawierającym 20 mM MgCl₂. Elucja wymaga sorbitolu (gradient 0-50 mM) w tym samym buforze.

Dalsze szczegółowe informacje na temat możliwości stosowania licznych, handlowo dostępnych złożów do chromatografii powinowactwa, znajdzie czytelnik w innych opracowaniach cytowanych niżej oraz w szerokiej ofercie firm dostarczających tego typu adsorbenty (Pharmacia, Pirce, Sigma, Amicon, BioRad).

3.9. Literatura

1. Deutscher M.P.: Guide to protein purification. W: Methods in Enzymology, ((Abelson J.N. Simon M.I.), tom 182, Academic Press, INC, San Diego, New York, Boston, London, Sidney, Tokyo, Toronto, 1993
2. Harris E.L.V. i Angal S.: Protein purification methods. A practical approach, IRL Press, Oxford, 1995
3. Rosenberg I.M.: Protein analysis and purification, Birkhäuser, Boston, 1996
4. Scopes R.K.: Protein purification. Principles and practice, Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin, 1984
5. Kłyszewko-Stefanowicz L.: Ćwiczenia w biochemii, PWN, Warszawa, 1999
6. Kozik A.: Zastosowania immobilizowanych białek w biotechnologii i biochemii analitycznej. Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 1999

7. Kozik A., Rapala-Kozik M. i Guevara-Lora I. Analiza instrumentalna w biochemii. Wybrane problemy i metody instrumentalnej biochemii analitycznej. Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2001
8. Walkowiak B.: Techniki chromatografii cieczowej. Przykłady zastosowań. Amersham Pharmacia Biotech, MORPOL, Lublin, 2000