

AFFIN-KÖLCSÖNHATÁSON ALAPULÓ ELVÁLASZTÁSOK

Dr. Pécs Miklós



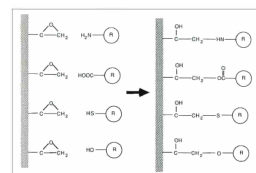
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



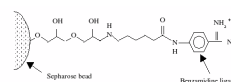
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Affin-elválasztások

Az egyik molekulát valamilyen hordozóhoz kovalensen kötik = ligandum



Célszerű közébeépíteni egy távtartó molekularabot (spacer arm).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Affinkölcsönhatások

A kölcsönhatás (szorpció) a biokémiai aktivitáshoz kötött, szelektivitása a kapcsolódó molekula-felületek komplementer megfelelésén alapul. Molekula/kötési típusok:

Szubsztrátok, analógok	- enzimek
Koenzim, kofaktor, inhibitor	- enzimek
Antigén	- antitest
DNS	- komplementer DNS
Effektor	- receptor
Hormon, gyógyszer, stb.	- karrier fehérje



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

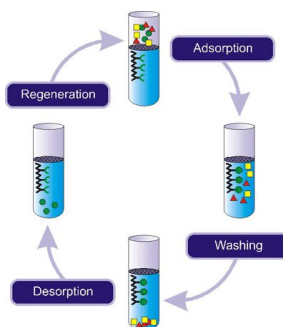
2

Affin-elválasztások

A ligandumon kötődik meg az oldatból a komplementer partner.

Műveletek:

- Affinkromatográfia
- Affinextrakció
- Affin-ultraszűrés
- Affinkicsapás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Affinkölcsönhatások

Gyakran (ki)használt kölcsönhatások:

oligo-hisztidin peptidréz	fémkelátok (Ni, Cu)
Tripszin	p-amino-benzamidin (PABA)
Tripszin	szója tripszin-inhibitor (STI)
(Staphylococcus) protein A	immunoglobulin G (IgG, MAb)
búzacsíra agglutinin (WGA)	kitozán (kítin származék)
avidin (madár fehérje)	biotin
NAD vagy ATP kötő enzimek	triazin színezékek



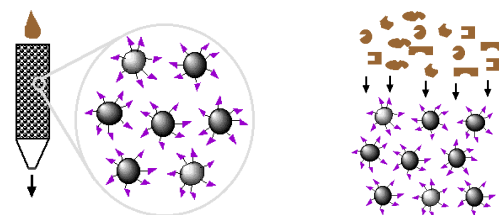
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Affinkromatográfia

A legelső, a klasszikus technika (1972-). A ligandumok egy szilárd oszloptöltet felületéhez kötődnek.

A neve kromatográfia, de inkább adszorpció.



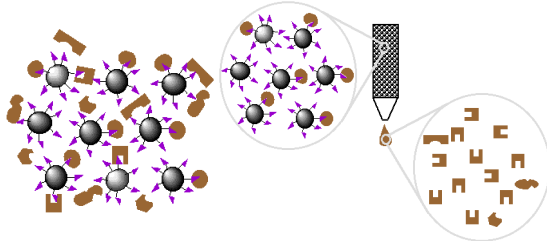
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Affinkromatográfia



A minta komponensei közül egyedül az aktív komponens kötődik meg, a többi az oszlopból kimosható.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

Fejlesztési irányok

A felsorolt nehézségek kiküszöbölésére több irányú fejlesztés folyik:

Töltetek anyaga (egyszerre szilárd és makropórusos)

Batch adszorpció (gyorsabb tömegátadás, nincs terhelés)

Stabilabb (szintetikus) ligandumok

→ pl. fémkelát kromatográfia, triazin színezékek

Elhagyni a szilárd fázist → a ligandumokat vízoldható polimerekre kötni = makroligand → új műveletek:

- » Affin-extrakció
- » Affin-ultraszűrés
- » Affin-kicsapás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

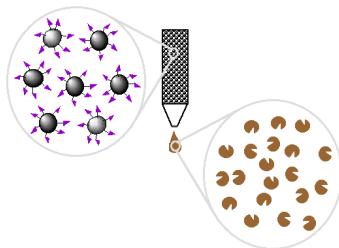
10

Affinkromatográfia

A megkötött célterméket aztán eltérő összetételű eluenssel deszorbeáljuk.

Általánosan használt eluensek:

- Sóoldatok (ionerősség)
- Pufferek (pH)
- Kompetitív molekulák



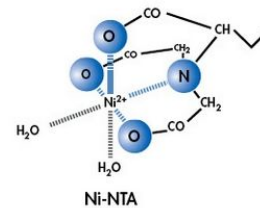
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Fémkelát kromatográfia

Jó komplexképző fémek (Ni, Cu) hajlamosak a fehérjék (His)_n szakaszaival kölcsönhatásba lépni.

A töltet felületén imino-triacetsav csoportok tartják a fémionokat.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

Affinkromatográfia

Előnyei:

Nagy szelektivitás → hatékony tisztítás

Nagy affinitás → nagymértékű koncentráció → jó kihozatal

Gyengéi:

Lassúság → a makromolekulák lassan mozognak

Rövid élettartam → a biomolekulák bomlókonyak

Minden töltet más → minden feladatra mást kell előállítani

Makropórusos töltet kell ↔ mechanikailag nem elég szilárd

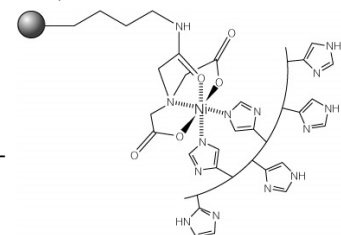


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Fémkelát kromatográfia

Ha a fehérjében nincs oligo(His) szakasz, akkor hozzáépítenek (rec fehérjéknél nem probléma a gént megtoldani egy 8-10 His-t kódoló szakasszal).



→ Nem csak a fehérje kifejeződését tervezik meg, hanem a kinyerését is.

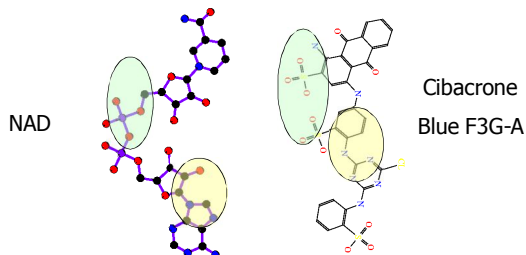


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

Festékkromatográfia

A ligandumok klór-triazin típusú vegyületek (eredetileg textilfestékek), amelyek nukleotid analógok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Az adszorpció erőssége az egyensúlyi állandóval és az egyensúlyi görbével jellemezhető (adszorpciós izoterma)

Hordozó-ligand + reakciópartner \leftrightarrow komplex
 $HL + R \leftrightarrow HL - R$

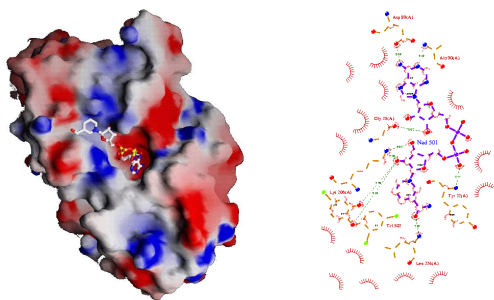
$$K_e = \frac{(HL) \cdot (R)}{(HL - R)}$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

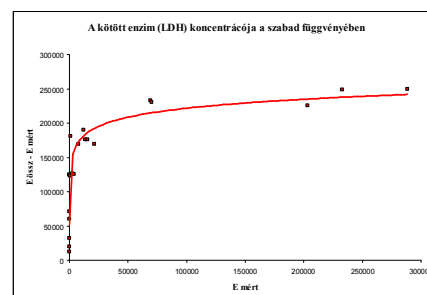
Megkötődik minden enzim, amelynek NAD (vagy ATP) kötőhelye van.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

Az adszorpció erőssége az egyensúlyi állandóval és az egyensúlyi görbével jellemezhető (adszorpciós izoterma)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

Megkötődik minden enzim, amelynek NAD (vagy ATP) kötőhelye van.

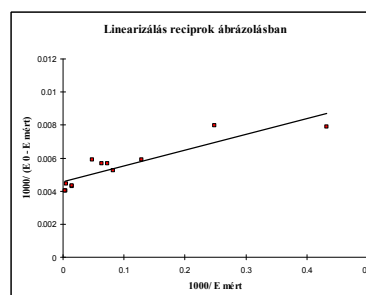
Oxidoreduktázok
 Ligázok, kinázok
 Foszfotranszferázok, foszfodiészterázok
 Nukleinsav szintázok és nukleázok
 N-heterociklus kötő enzimek
 Nem szelektív egy bizonyos enzimre!

A SZELEKTIVITÁS JAVÍTHATÓ:
 a megfelelő festék-ligandum kiválasztásával (Cibacron sorozat, Procion sorozat)
 a kötődés paramétereinek optimalizálásával (pH, ionerősség, koncentrációk, polaritás)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

A kötődés jellemző paraméterei a linearizált görbe egyenletéből meghatározhatók



Csak akkor számíthatunk hatékony elválasztásra, ha

$$K_e < 10^{-4} \text{ (mól/dm}^3\text{)}$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

AZ ELÚCIÓ KIVITELEZHETŐ:

Kompetitív molekulákkal (NAD, adenin, szerkezet-analógok)
A körülmények módosításával (pH, ionerősség, ionok, kationotrop anyagok)

A leggyakoribb: 1 - 2 M KCl
gradiens vagy lépcsős elúció

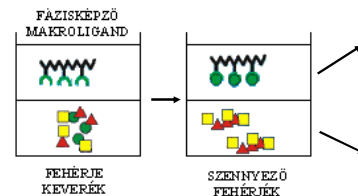


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

Affin-extrakció

A vizes kétfázisú extrakció valamelyik fázisképző polimerjére kapcsolják a ligandumot = maga a fázisképző a makroligand. Dextránon: sok lehetséges kötés, a PEG-en: csak a láncvégi -OH csoportokra lehet kötni.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

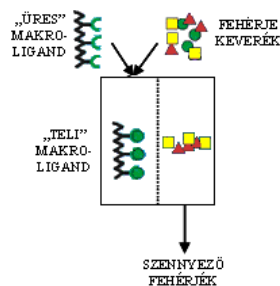
Affin-ultraszűrés

A ligandumokat nagyméretű (~500.000 Da) vízoldható polimerre kötik. A szennyező fehérjék átmennek a membránon, a makroligandhoz kötődők nem.

Analógia:

Diaszűrés

Félfolytonos adszorpció



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

Affin-extrakció

Fázisképzőként sóoldat nem alkalmazható, mert az ionerősség rendszerint megbontja az affin-komplexet. Viszont ha az elválasztott felső fázishoz só adunk – az megbontja a kötést és újra két fázis alakul ki – felszabadul a fehérje.

A ligandumok hatékonyságát a megoszlási hányados megváltozásával jellemzik:

$$\Delta \log K = \log K(\text{ligandummal}) - \log K(\text{ligandum nélkül})$$

Nehézségek:

- A fázisképző polimernek amúgy is nagyon drágák.
- Ezekhez minden feladatnál hozzá kell kötni a megfelelő ligandumot.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

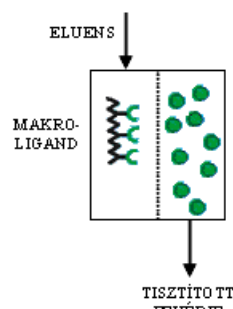
23

Affin-ultraszűrés

Az eluáló oldattal megbontják az affinkomplexet, a termék átmegy a membránon, a makroligand marad a retentátumban (→ diaszűrés)

Nehézségei:

- Ilyen nagy molekulánál fennáll a kicsapódás veszélye
- Minden feladatra meg kell csinálni a makroligandot



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

Affin-kicsapás

Az affin-komplex létrejötte után magától, vagy enyhe behatásra kicsapódik.

1. Homobifunkciós ligandumok (pl. bis-NAD)

Két NAD molekula, 8-14 szénatomos láncsal összekötve. A NAD-kötőhellyel rendelkező enzimeket összeköti.

Ha az enzimnek egy kötőhelye van – dimereket képez

Ha kettő (pl. az enzim maga is dimer) - akkor láncokat

Ha több – térhálós csapadékot képez.

A komplex megbontása: a legegyszerűbben NAD-dal (bár ez elég drága)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

Affin-kicsapás

2. Makroligandok: vízoldható makromolekulára kapcsolt ligandumok. A polimer szerepe kettős:

- hordozza a ligandumokat
- enyhe behatásra kicsapódik.

Kényes feladat:

- az affin-komplex ne disszociáljon
- a szennyezők ne csapódjanak ki
- a termék ne denaturálódjon



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

Affin-kicsapás

Kicsapási lehetőségek:

- pH változtatás: gyenge savak, gyenge bázisok disszociációja visszaszorítható (poliakrilsavak, kitozánok, gyógyszerformulázó polimerek)
- Hőmérséklet: a poli-(N-izopropil-akrilamid) 28-31 °C körül kicsapódik

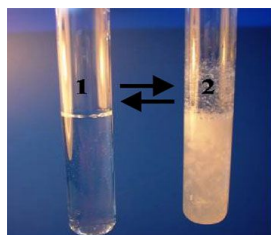


Fig. 1: Reversible thermo-precipitation (2) of an aqueous solution of poly-N-isopropylacrylamide (1).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

Affin-kicsapás

Visszanyerés: sokszor a terméket nem lehet leoldani a csapadékról, előbb vissza kell oldani, aztán disszociáltatni.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27