

AFFIN-KÖLCSÖNHATÁSON ALAPULÓ ELVÁLASZTÁSOK

Dr. Pécs Miklós



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

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 (kitin származék)
avidin (madár fehérje)	biotin
NAD vagy ATP kötő enzimek	triazin színezékek

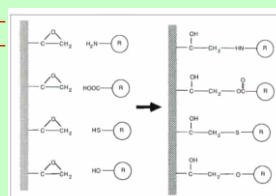


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

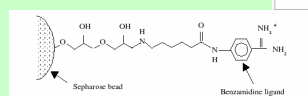
3

Affin-elválasztások

Az egyik molekulát valamilyen hordozóhoz kovalensen kötik (= ligandum).



Célszerű közébeépíteni egy távtartó molekula-darabot (spacer arm).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

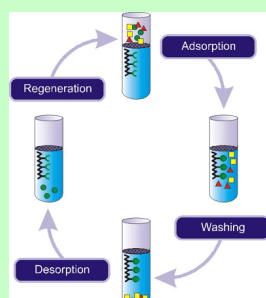
4

Affin-elválasztások

A ligandumon kötődik meg az oldatból a komplementer partner.

Műveletek:

- Affinkromatográfia
- Affinextrakció
- Affin-ultraszűrés
- Affinkicsapás



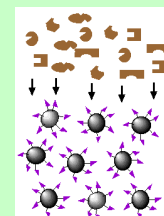
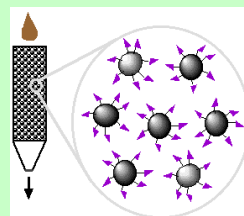
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Affinkromatográfia

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

A neve kromatográfia, de inkább adszorpció.



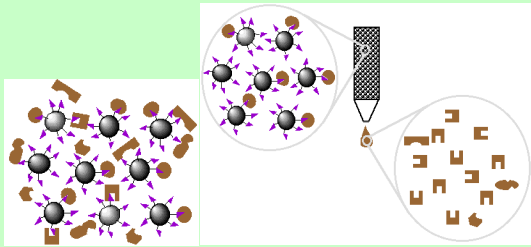
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Affinkromatográfia



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

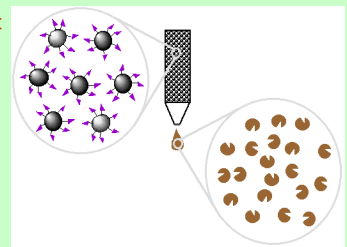
7

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

Affinkromatográfia

Előnyei:

- Nagy szelektivitás → hatékony tisztítás
- Nagy affinitás → nagymértékű koncentráció → jó kihozatal

Gyengéi:

- Lassúság → a makromolekulák lassan mozognak
- Rövid élettartam → a biomolekulák bomlékonyak
- Minden töltet más → minden feladatra mást kell előállítani
- Makropórusos töltet kell ↔ mechanikailag nem elég szilárd



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

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 vízzoldható polimerekre kötni = makroligand → új műveletek:

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



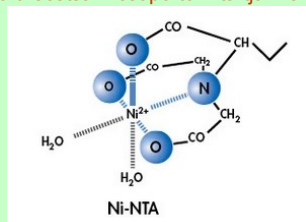
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

Fémkelát kromatográfia

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

A töltet felületén imino-triacetsav csoportok tartják a fémionokat.



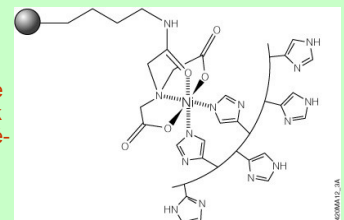
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

Fémkelát kromatográfia

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

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



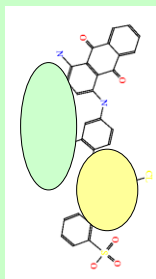
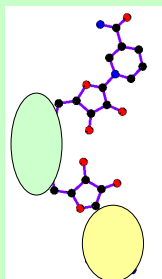
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

Festékkromatográfia

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

NAD



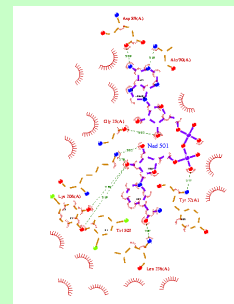
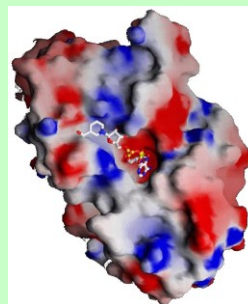
Cibacron
Blue F3G-A



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

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 paramétere-
inek optimalizálásával (pH,
ionerősség, koncentrá-
ciók, polaritás)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

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

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

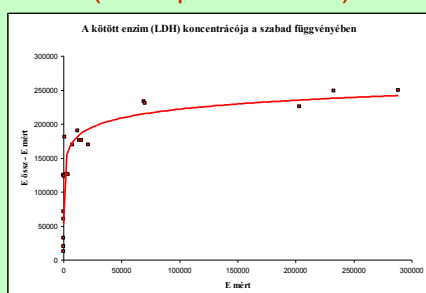
$$K_e = \frac{(HL) \cdot (R)}{(HL - R)}$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

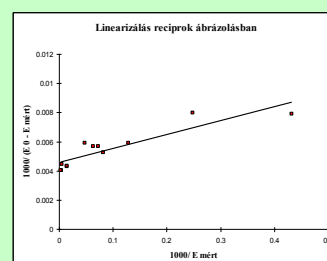
Az adszorpció erőssége jellemezhető az egyensúlyi állandóval és az egyensúlyi görbével (adszorpciós izoterma)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

A kötődés jellemző paramétereit 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)

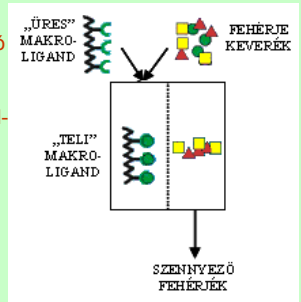
A körülmények módosításával (pH, ionerősség, ionok, kaotróp anyagok)

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



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



Affin-ultraszűrés

Az eluáló oldattal megbontják az affin-komplexet, a termék átmegy a membránon, a makroligand marad a retentátban (→ diaszűrés)

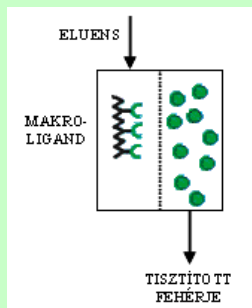
Nehézségei:

Ilyen nagy molekuláknál fennáll a kicsapódás veszélye

Minden feladatra meg kell csinálni a makroligandot

Megfelelő membrán

Előny: nagy viszkozitású levek. Folyamat elején is lehet



Affin-ultraszűrés

Alkalmazás:

Konkanavalin-A kinyerés növényi extraktumból (élesztősejt ligand(szénhidrát), elúció D-glükózzal)

Élesztő alkohol-dehidrogenáz kinyerés (ligand Cibracon blue keményítőn, elúció sóoldattal)

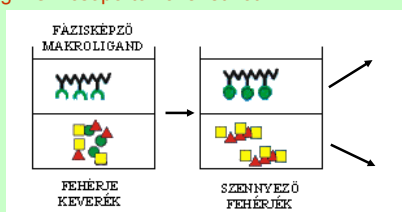
E. Coli béta-galaktózidáz enzim kinyerés (ligand p-amino-benzil-1-tio-beta-D-galaktopiranozid agarózra (szuszpenzió-mikorszűrés) pH változtatással elúció)

Tripszin (kimotripszin): Dextrán(PABA) helyett vízoldható akrilamid polimer



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.



Affin-extrakció

A ligandumok hatékonyságát a megoszlási hányados megváltozásával jellemzik:

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

Hatékonyság javítása:

Szennyezések (nagy K) eltávolítása előzetes (ligand nélküli) extrakcióval

Szennyezők csökkentése azokra spec. liganddal

Többszöri extrakció (tisztá makroligandos fázissal)

Makroligandos fázis mosása az affin-extrakció után



Affin-extrakció

Fázisképzőként sóoldat nem alkalmazható, mert az ionerősség rendszerint megbontja az affin-komplexet. Viszont ha az elválasztott felső fázishoz sót adunk – az megbontja a kötést és újra két fázis alakul ki. Sós fázis tisztítása diszűrrel, dialízissel.

Vagy lassú hígítás sóoldattal, utána ioncserélő oszlop

Nehézségek:

A fázisképző polimerek amúgy is nagyon drágák (reg. nehéz)
Ezekhez minden feladatnál hozzá kell kötni a megfelelő ligandumot.

Előny: folytonosítható (pl.: glükóz-6P-dehidrogenáz, tejsav-dehidrogenáz)



Affin-extrakció

Alkalmazás:

Tripszin elválasztás: PEG(p-amino-benzamidin)-Dextrán

Humán vérszérumból albumin: PEG(palmitinsav)-Dextrán

Glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (*Saccharomyces cerevisiae*): Triazin (PEG-Dextrán)

Formiát-dehidrogenáz (*Candida boidinii*): Triazin (PEG-Dextrán)



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) (ezután pl. gélkromatográfia)



Affin-kicsapás

2. Makroligandok (heteropolifunkciós): 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



Affin-kicsapás

Kicsapási lehetőségek:

- pH változtatás: gyenge savak, gyenge bázisok disszociációja visszاسzorítható (poliakrilsavak, alginát, kitozánok, gyógyszerformulázó polimerek)
- Hőmérséklet: a poli-(N-izopropil-akrilamid) 28-31 °C körül kicsapódik
- Ionerősség (de disszoc veszélye)
- Spec keresztkötéseket létrehozó ágensek

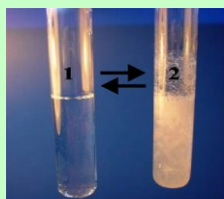


Fig. 1: Reversible thermo-precipitation (2) of an aqueous solution of poly-N-isopropylacrylamide (1).



Affin-kicsapás

Visszanyerés: sokszor a terméket nem lehet leoldani a csapadékról, előbb vissza kell oldani, aztán disszociáltatni. Ezután jó esetben a makromolekula újra kicsapható.

(tripszin izolálás, pH 8 kötés, pH 4 kicsapás, pH 2 disszoc)

Előny: gyors (különösen előny, ha pl. proteázok vannak jelen), a feldolgozási technológia korábbi szakaszaiban is lehet, jó hatások / visszanyerés.

