

AFFIN-KÖLCSÖNHATÁSON ALAPULÓ ELVÁLASZTÁSOK

Dr. Pécs Miklós
Dr. Fehér Csaba



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

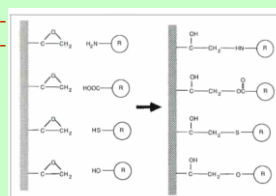


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

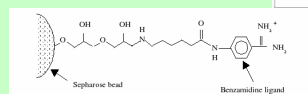
3

Affin-elválasztások

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



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

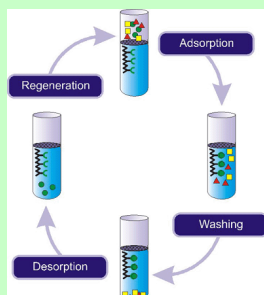
4

Affin-elválasztások

A ligandumon kötődik meg az oldatból a komplementer partner.

Műveletek:

- Affinkromatográfia
- Affinextrakció
- Affin-ultraszűrés
- Affinkicsapás



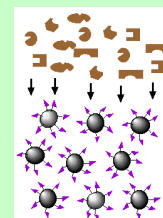
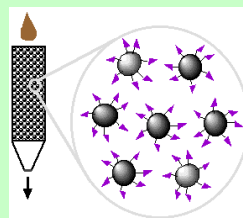
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Affinkromatográfia

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

A neve kromatográfia, de inkább adszorpció.



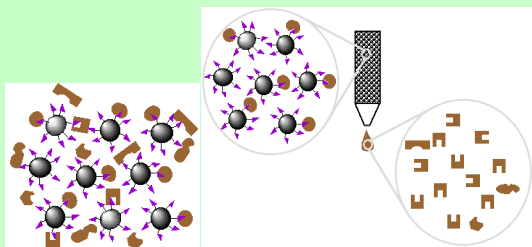
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Affinkromatográfia



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

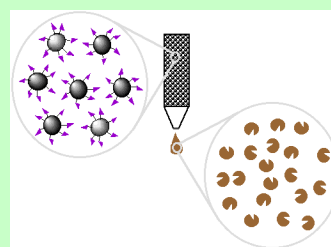
7

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 vízoldható polimerekre kötni = makroligand → új műveletek:

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



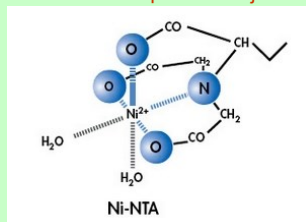
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.



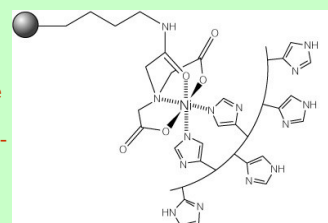
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

Fémkelát kromatográfia

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

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



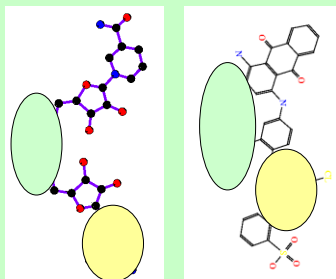
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

Festékkromatográfia

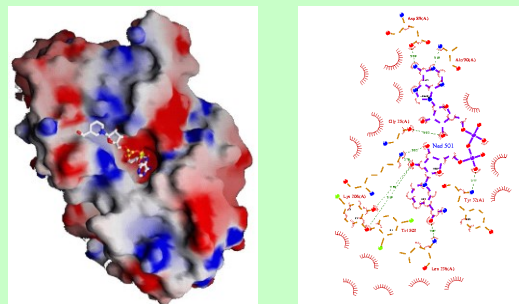
A ligandumok klór-triazin típusú vegyületek (eredetileg textil-festékek), amelyek nukleotid analógok

NAD



Cibacron
Blue F3G-A

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



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)

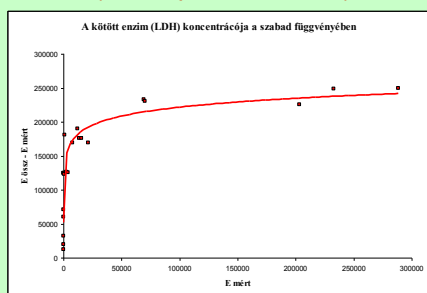
a kötődés paramétereinek optimalizálásával (pH, ionerősség, koncentrációk, polaritás)

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

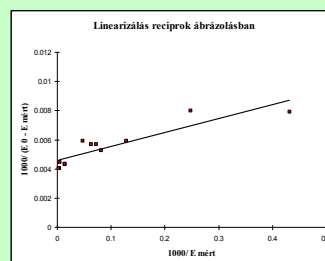


$$K_e = \frac{(\text{HL}) \cdot (\text{R})}{(\text{HL} - \text{R})}$$

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



A kötődés jellemző paramétereit a linearizált görbe egyenletéből meghatározhatók



Csak akkor számíthatunk hatékony elválasztásra, ha

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

AZ ELÚCIÓ KIVITELEZHETŐ:

Kompetitív molekulákkal (NAD, adenin, szerkezet-analógok)

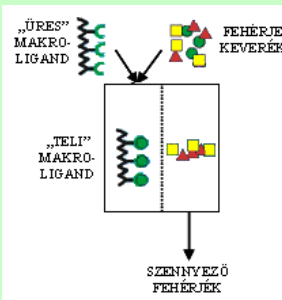
A körülmények módosításával (pH, ionerősség, ionok, kaotróp anyagok)

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 affinkomplexet, a termék átmegy a membránon, a makroligand marad a retentátban (→ diaszűrés)

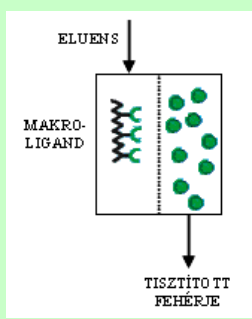
Nehézségei:

Ilyen nagy molekulánál 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)

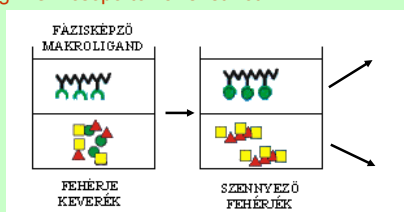
E. Coli béta-galaktózidáz enzim kinyerés (ligand p-amino-benzil-1-tio-beta-D-galaktopiranozid agarózra (szuszpenzió-mikroszűrés) pH változtatással elúció)

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 affinkextrakció 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 diszúréssel, 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): vízdoldható 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

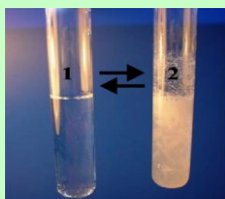


Fig. 1: Reversible thermo-precipitation (2) of an aqueous solution of poly-N-isopropylacrylamide (1).



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.

