

Metody izolace a purifikace antigenů a protilátek

Afinitní chromatografie

IMUNOCHEMIE

Zuzana Bílková



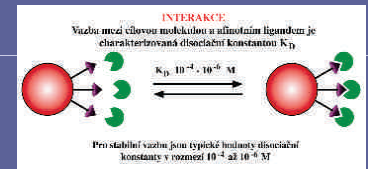
Afinitní a imunoafinitní chromatografie

AC, IAC
Affinity Chromatography
Immunoaffinity Chromatography

Afinitní chromatografie - princip

- ♦ Využití schopnosti biologicky aktivních látek specificky rozpoznat jinou molekulu → látky mají k sobě afinitu (jsou vzájemně biospecifické)
- ♦ Typ adsorpční chromatografie využívající specifické interakce (nekovalentní vazby)
- ♦ Látka navázaná na nosič → afinitní ligand
- ♦ Vazba ligandu přes raménko (spacer)

Reverzibilní biospecifická interakce



enzym	substrát kompetitivní inhibitor koenzym
protilátka	antigen hapten
lektin	Glykoproteiny, oligo(poly)sacharidy
histony	DNA
DNA	Kompl. NA
buněčný povrchový receptor, léčivo	hormon

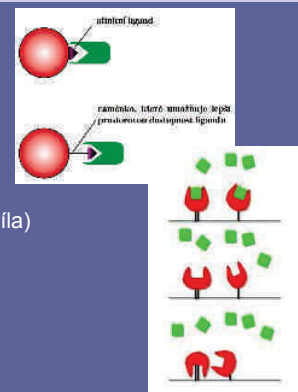
Afinitní páry

Ligand	Bílkovina	K_D (M)
antigen	polyklonální protilátka	$10^{-8} - 10^{-6}$
antigen	monoklonální protilátka	$10^{-12} - 10^{-8}$
biotin	avidin	10^{-15}
sacharid	lektin	$10^{-6} - 10^{-3}$
hormon, toxin	vazebný protein	$10^{-9} - 10^{-12}$
substrát	enzym	$10^{-7} - 10^{-3}$
inhibitor	enzym	$10^{-14} - 10^{-6}$

$K_D = 10^{-8} - 10^{-6}$ M

Předpoklady pro vznik biospecifického komplexu

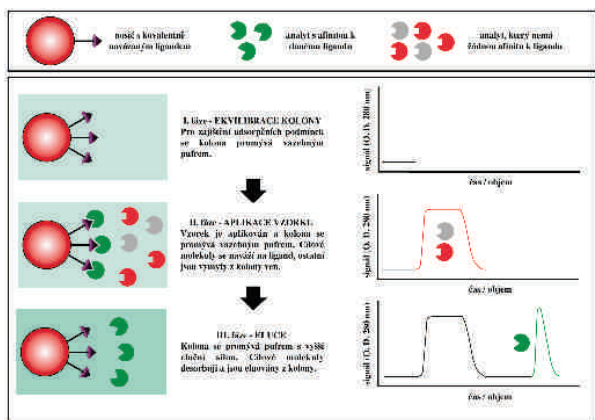
- ♦ Sterické (spacer)



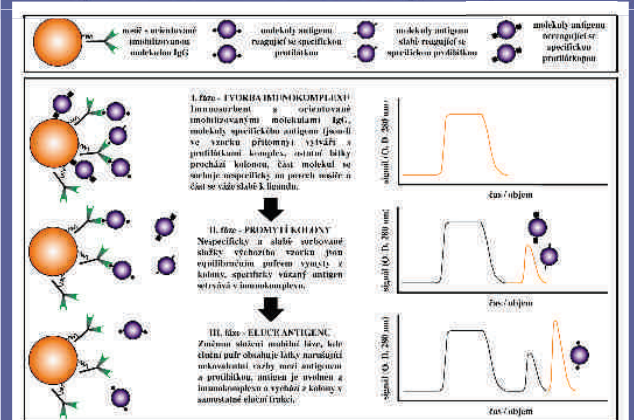
- ♦ Vazebné (optimální pH, iontová síla)

- ♦ Konformační

Princip afinitní chromatografie



Princip imunoafinitní chromatografie (IAC, HPIAC)



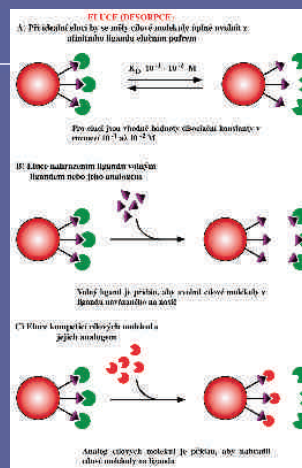
Eluční techniky

Eluce = disociace komplexu ligand-cílová látka, při ideální eluci by se měly cílové molekuly úplně uvolnit z afinitního ligandu elučním pufrům

Způsoby eluce:

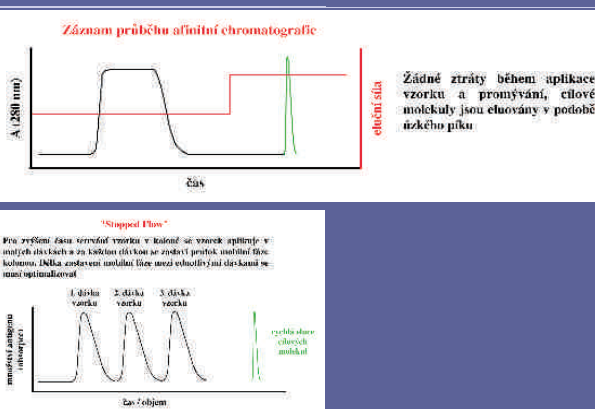
- 1) eluce náhradou ligandu volným ligandem nebo jeho analogem
- 2) eluce kompeticí cílové molekuly s jejím analogem
- 3) eluce změnou pH (kroková či lineární gradientová eluce)
- 4) eluce změnou iontové síly
- 5) eluce přidávkem chaotropního iontu, detergentu (např. thiokyanát amonný, močovina)

Desorpce



ELUCE

Afinitní chromatografie



Nosiče v afinitní chromatografii

Základní vlastnosti nosiče vhodného pro afinitní chromatografii:
 velký specifický povrch, makroporézní struktura
 mechanická stabilita
 chemická stabilita
 snadno derivatizovatelný
 povrch snadno přístupný ligandu
 chemicky inertní povrch zabraňující nespecifické sorpci
 dobré chromatografické vlastnosti (průtoková rychlost)

Typy nosičů: jednosložkové x složené
 vláknitá struktura x partikule

Nosiče v afinitní chromatografii

Dělení nosičů pro afinitní chromatografii:

Jednosložkové:

A) **Organické nosiče:**

- celulosa (Perloza MT)
- dextran (Sephadex)
- agarosa (Sepharosa), aj.



Obr. 2: CNBr aktivovaná Sepharose

B) **Anorganické nosiče:**

- křemičité nosiče
- skleněné nosiče, aj.

C) **Syntetické nosiče:**

- polyakrylamid (Enzacryl)
- metakrylát (Spheron), aj.

Složené: polysacharid-polyakrylamid (Sephacryl HR)
magnetické částice (Magnogel)

Nosiče v afinitní chromatografii

Volba nosiče: záleží na typu ligandu, průtokové rychlosti, podmínkách separace, aplikaci

Nosič	Aplikace
Celulosa (vláknitá, granulární)	vsádkové uspořádání
Celulosa (partikule)	nizkotlaké kolonové uspořádání
Dextran	vhodný pro vazbu protein, a lektin, ligandů
Agarosa	nizko- až střednětlaké kolonové uspořádání
Polyakrylamid	nizko- až střednětlaké kolonové uspořádání
Magnetické nosiče	vsádkové a „on-line“ (MSFB) uspořádání
Křemičité nosiče	vysokoučinné chromatografické separace
Skleněné nosiče	vysokoučinné chromatografické separace

Ligandy a jejich imobilizace

vlastnosti ligandu:

- 1) specifická a reverzibilní vazba na izolovanou látku
- 2) přítomnost chemicky modifikovatelné skupiny pro vazbu na nosič

používané ligandy:

- 1) proteiny (např. enzymy, koenzymy, Ab, Ag, protein A)
- 2) nukleové kyseliny (DNA i RNA)
- 3) lektiny (např. Concanavalin A)
- 4) textilní barviva (např. Cibacron Blue, Orange A, Green A)

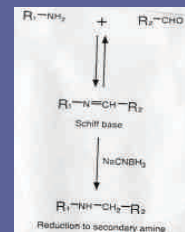
Ligandy a jejich imobilizace

Postup imobilizace ligandu: vazba ligandu na nosič musí být pevná => aktivace nosiče před vazbou ligandu

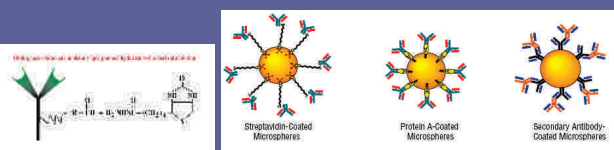
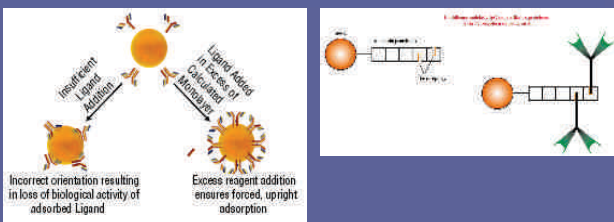


Činidla užívaná pro aktivaci nosiče:

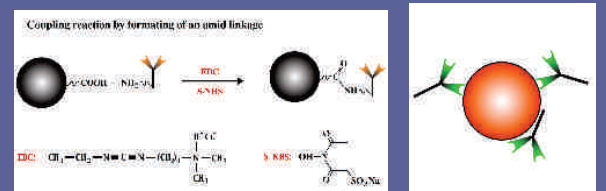
- 1) Kyan bromid (CNBr-act. Sepharose 4B)
- 2) Oxidace jodistanem
- 3) Karbodiimid (např. CDI, EDAC)+S-NHS
- 4) Thiol (Thiol-act. Sepharose 4B)
- 5) Triazin
- 6) Epoxy (Epoxy-activated Sepharose 6B)
- 7) Hydrazidem akt. nosič



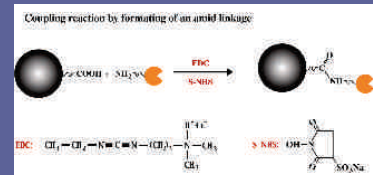
Orientované imobilizace ligandů – protilátek

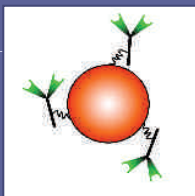


Kovalentní vazba ligandu na COO-částice

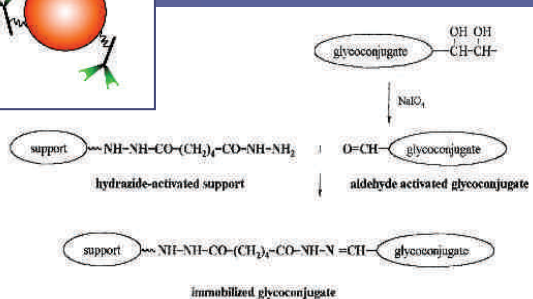


Kovalentní vazba ligandu neorientovaně





Orientovaná imobilizace ligandu - glykoproteinů



Protein A (G, L) – dvojitý využití

Izolace IgG molekul i jejich podtříd

Imobilizace IgG molekul

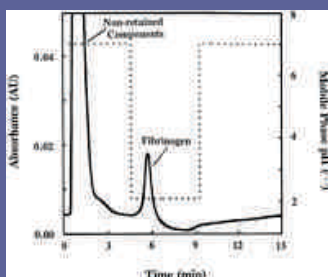


Protein A – Staphylococcus aureus
 Protein G – rod Streptococcus
 Protein L – ros Peptostreptococcus

HPIAC

– high pressure immunoaffinity chromatography

Fibrinogen in human plasma, using an anti-fibrinogen immobilized antibody column



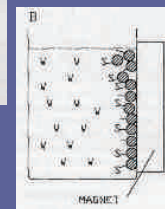
Kolonové uspořádání



Vsádkové uspořádání



Magnetická separace

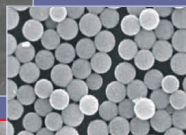


Magnetické částice

Macroporous bead cellulose
 \varnothing 100 – 250 μm (750 x)

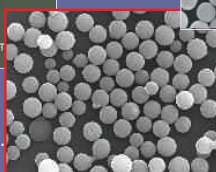


Alginate acid-coated magnetite particles (-COOH)
 \varnothing 7 – 10 μm (zv. 4 000 x)

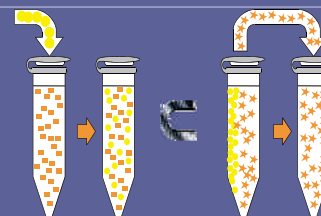
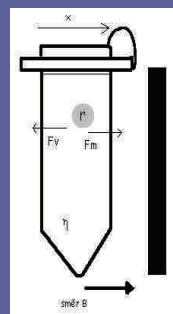


Poly(GMA) microparticles
 \varnothing 2,9 μm (5 000 x)

PolyNIPAM nanoparticles (-COOH) 0,29 μm (electron microscopy, 50 000 x)



Princip magnetické separace

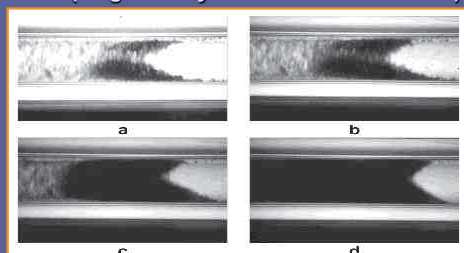


MSFB

Magnetické mikročástečky jako integrální součást průtokového systému



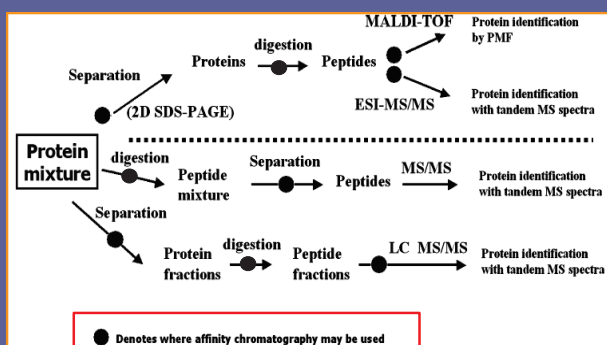
MSFB (magnetically stabilized fluidized bed)



Výhody magnetických nosičů

- ♦ **Vysoká rychlost separace** (zkrácení doby reakce, separace, prodloužení životnosti reaktorů)
- ♦ Vysoká reprodukovatelnost reakcí díky nulovým ztrátám nosiče
- ♦ Snadná manipulace a práce se systémem
- ♦ Postup separace šetrný vůči fragilním bílkovinám a bioaktivním látkám (- centrifugace)
- ♦ Vše probíhá v jednom reakčním prostředí - snižuje se pracnost, riziko kontaminace a inaktivace substrátu

Schematický diagram strategie analýzy proteinů



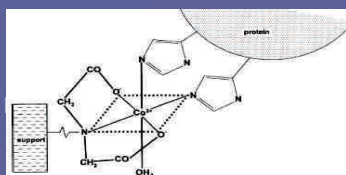
Chromatografie na imobilizovaných barvivech

- ♦ Dye-binding chromatography
- ♦ Reaktivní barviva vázaná na chromatografických nosičích
- ♦ Barviva částečně podobná některým kofaktorům
- ♦ Izolace enzymů i neenzymových bílkovin (např. albumin apod.)
- ♦ Cibacron Blue 3G pro NAD⁺ a NADP⁺ dependentní dehydrogenázy
- ♦ Procion Red HE 3B pro NADP⁺ dependentní enzymy

Chelatační afinitní chromatografie

IMAC – immobilized metal affinity chromatography

- ♦ Vzájemná interakce mezi biopolymerem v roztoku a ionty kovů vázanými na pevné fázi
- ♦ Chelatační ligand – např. IDA (iminodiacetát)
- ♦ Ionty „měkkých“ kovů – Zn, Cu, Ni, Co, Fe, Mn, Mg
- ♦ Nosiče – biopolymery (agarosa, sepharosa)
- ♦ Stabilita x reverzibilita (*ligand-kov versus ligand-peptid, protein*)
- ♦ Koordinační vazba mezi akceptorem elektronů (kovem) a donorem elektr. (AMK – His, Cys, Trp – vysoká elektronová hustota)



IMAC pro izolaci rekombinantních proteinů

- ♦ 1 kroková purifikace rekombinantních proteinů obsahujících tzv. histidinovou kotvu (**His-tag**)
- ♦ Interakce kovových iontů (Ni²⁺) s exponovanými histidylovými zbytky na povrchu molekuly proteinu
- ♦ Vhodné i pro nekorektní formy rek. Proteinů, tzv. inkluzní tělíska, jež se rozpouštějí vysokou koncentrací močoviny nebo guanidinium chloridu, protože se IMAC dá provádět i za denaturačních podmínek!!
- ♦ Renaturace (refolding) proteinů zachycených na koloně postupným snižováním denaturačního činidla