

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Affin-eltávolítások

Az egyik molekulát valamilyen hordozóhoz kovalensen kötik = ligandum

Célszerű közébeépíteni egy távtartó molekularabot (spacer arm).

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Affin-eltávolítások

A ligandumon kötődik meg az oldatból a komplementer partner.

Műveletek:
 Affinkromatográfia
 Affinextrakció
 Affin-ultraszűrés
 Affinkicsapás

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Affinkromatográfia

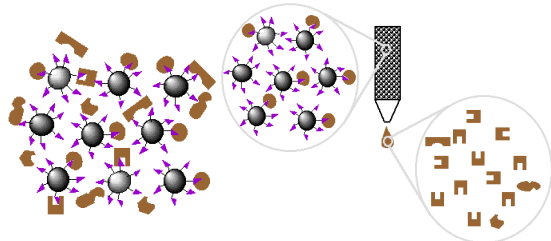
A legelső, a klasszikus technika (1972-). A ligandumok egy szilárd oszloptöltet felületéhez kötődnek.
 A neve kromatográfia, de inkább adszorpció.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Affinkromatográfia



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

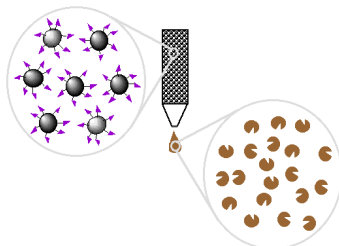
7

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



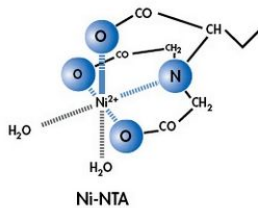
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.



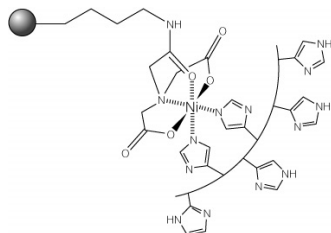
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

Fémkelát kromatográfia

Ha a fehérjében nincs oligo(His) szakasz, akkor hozzáépítenek (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.



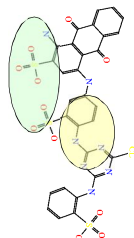
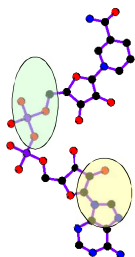
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

Festékkromatográfia

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

NAD



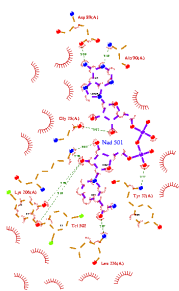
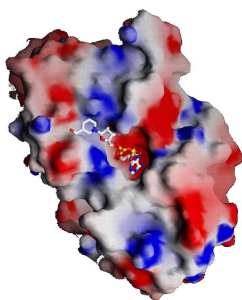
Cibacron
Blue F3G-A



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,
foszfo-diészterázok
Nukleinsav szintázok és
nukleázok
N-heterociklus kötő
enzimek
**Nem szelektív egy
bizonyos enzimre!**

A SZELEKTIVITÁS
JAVÍTHATO:
a megfelelő festék-
ligandum kiválasztásával
(Cibacron sorozat,
Procion sorozat)

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




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

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

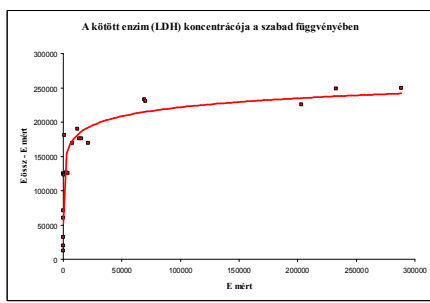

Hordozó-ligand + reakciópartner \leftrightarrow komplex
 HL + R \leftrightarrow HL - R

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


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 16

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

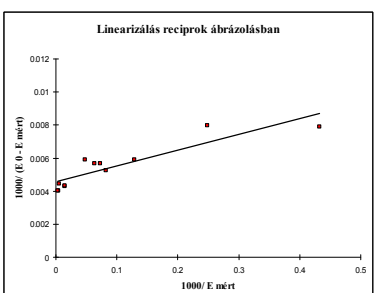
A kötött enzim (LDH) koncentrációja a szabad függvényében

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 17

A kötődés jellemző paraméterei a linearizált görbe egyenletéből meghatározhatók


Linearizálás reciprok ábrázolásban



Csak akkor számíthatunk hatékony elválasztásra, ha

$$K_e < 10^{-4}$$

(mól/dm³)



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

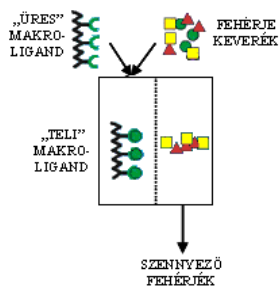
Affin-ultraszűrés

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

Analogia:

Diaszűrés

Félfolytonos adszorpció



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

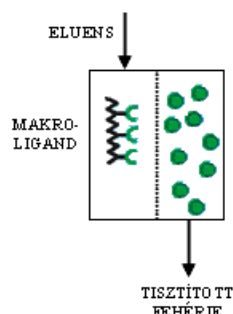
20

Affin-ultraszűrés

Az eluáló oldattal megbontják az affinkomplexet, 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

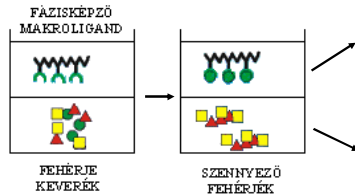


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

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-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 – 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 polimerek amúgy is nagyon drágák.
- Ezekhez minden feladatnál hozzá kell kötni a megfelelő ligandumot.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

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

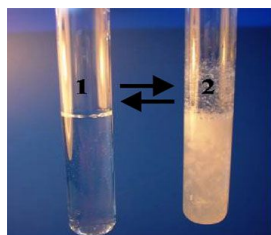


Fig. 1: Reversible thermo-precipitation (2) of an aqueous solution of poly-N-isopropylacrylamide (1).



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
