

## 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 peptidrészt	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

---

---

---

---

---

---

---

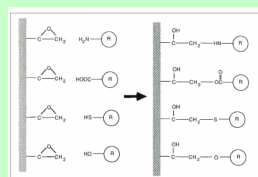
---

---

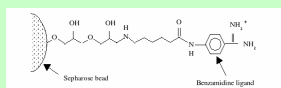
---

## Affin-eltávolítások

Az egyik molekulát valamilyen hordozóhoz kovalensen kötik = ligandum



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

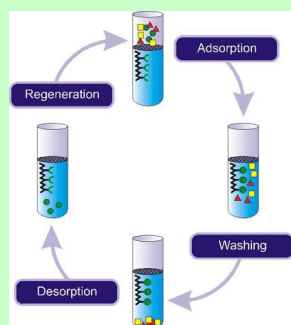
---

## Affin-eltávolítások

A ligandumon kötődik meg az oldatból a komplementer partner.

Műveletek:

- Affinkromatográfia
- Affinextrakció
- Affin-ultraszűrés
- Affinkicsapás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

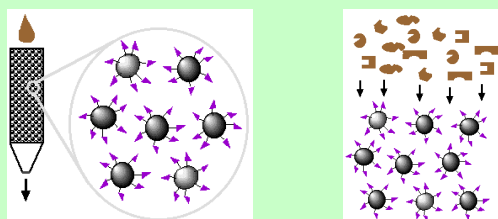
---

---

## 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

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

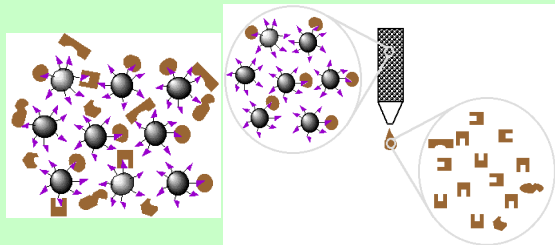
---

---

## Affinkromatográfia



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

---

---

---

---

---

---

---

---

---

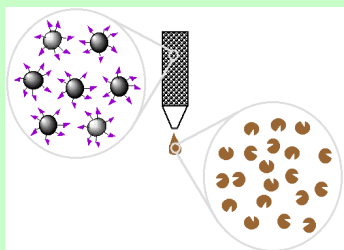
---

## 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 polimerre kötni = makroligand → új műveletek:

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

---

---

---

---

---

---

---

---

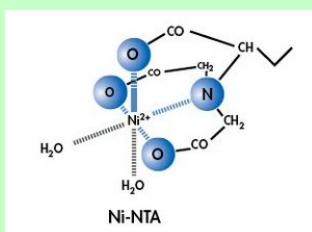
---

---

## Fémkelát kromatográfia

Jó komplexképző fémek (Ni, Cu) hajlamosak a fehérjék (His)<sub>n</sub> szakaszaival kölcsönhatásba lépni.

A töltet felületén imino-triacetsav csoportok tartják a fémionokat.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

---

---

---

---

---

---

---

---

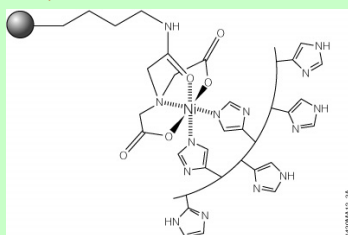
---

---

## 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

---

---

---

---

---

---

---

---

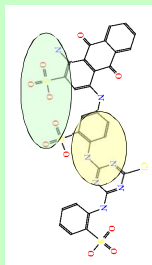
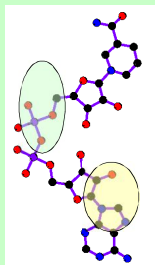
---

---

## Festékkromatográfia

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

NAD



Cibacron  
Blue F3G-A



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

---

---

---

---

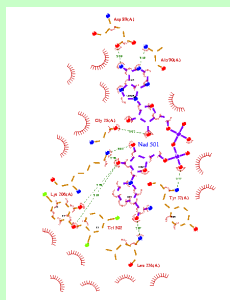
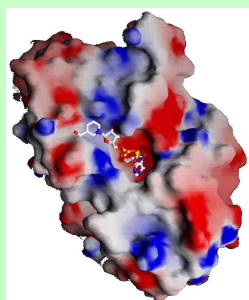
---

---

---

---

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,  
foszfodiészterázok  
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)



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




---

---

---

---

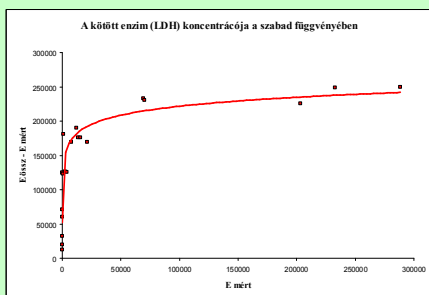
---

---

---

---

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




---

---

---

---

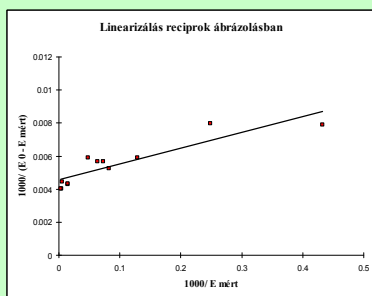
---

---

---

---

A kötődés jellemző paraméterei 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, kationotrop anyagok)

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

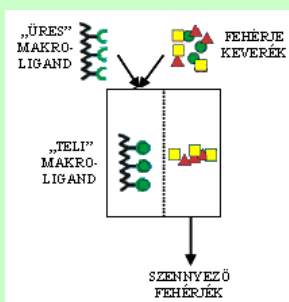
## Affin-ultraszűrés

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

Analógia:

Diaszűrés

Félfolytonos adszorpció



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

---

---

---

---

---

---

---

---

---

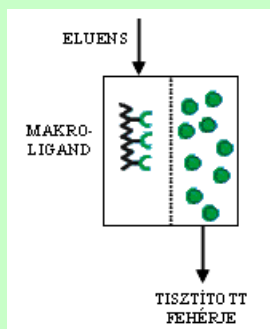
---

## 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

---

---

---

---

---

---

---

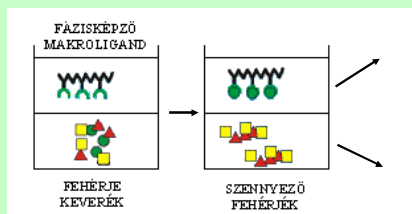
---

---

---

## 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 visszazsírozható (poliakrilsavak, kitozánok, gyógyszerformulázó polimerek)

- Hőmérséklet: a poli-(N-izopropil-akrilamid) 28-31 °C körül kicsapódik

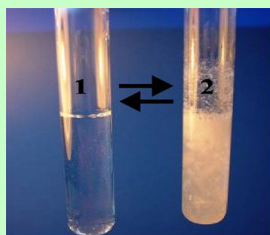


Fig. 1: Reversible thermo-precipitation (2) of an aqueous solution of poly-N-isopropylacrylamide (1).



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

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---