

# 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 peptidrész	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

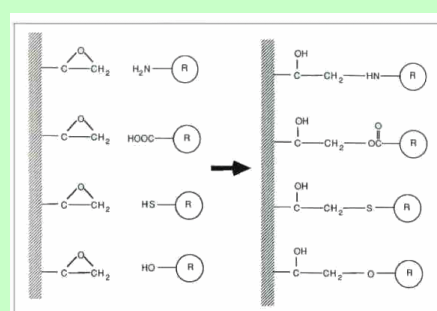


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

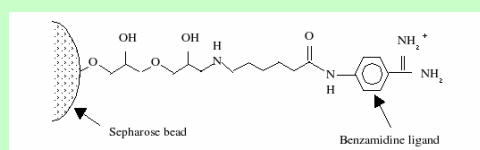
3

## Affin- elválasztások

Az egyik molekulát valamilyen hordozóhoz kovalensen kötik = ligandum



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

## Affin-eltávolítások

A ligandumon kötődik meg az oldatból a komplementer partner.

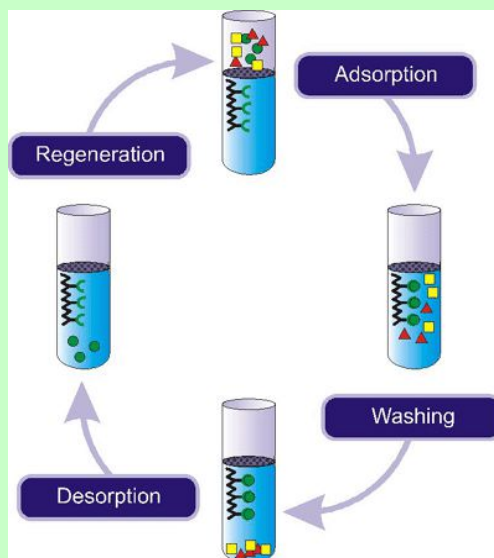
Műveletek:

Affinkromatográfia

Affinextrakció

Affin-ultraszűrés

Affinkicsapás



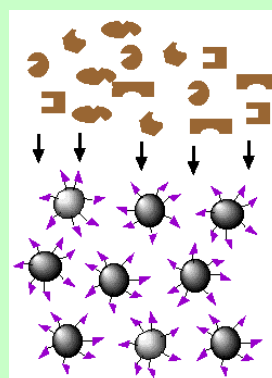
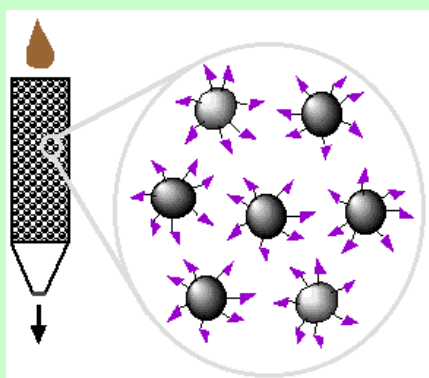
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

## Affinkromatográfia

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

A neve kromatográfia, de inkább adszorpció.



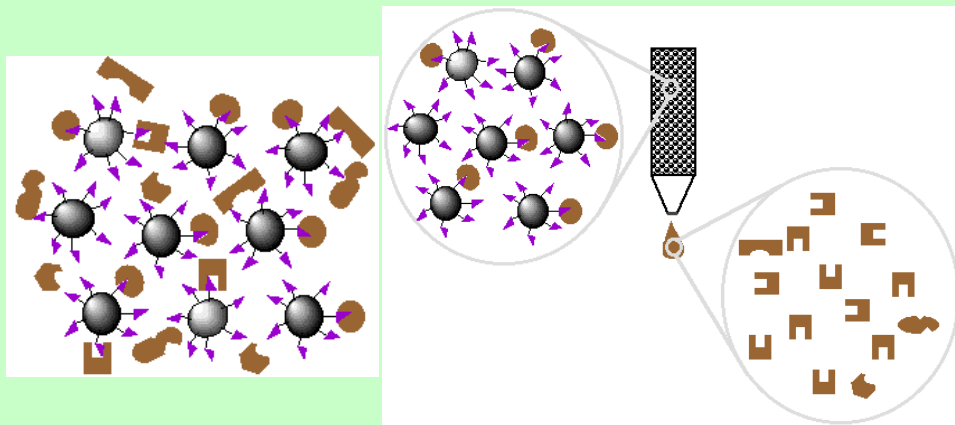
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

## Affinkromatográfia



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

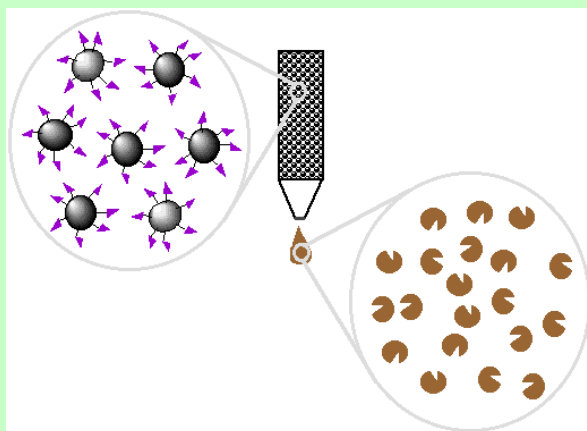
7

## 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 hozatal

### Gyengéi:

Lassúság → a makromolekulák lassan mozognak

Rövid élettartam → a biomolekulák bomlókonyak

Minden töltet más → minden feladatra mást kell előállítani

Makropórusos töltet kell ↔ mechanikailag nem elég szilárd



## 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

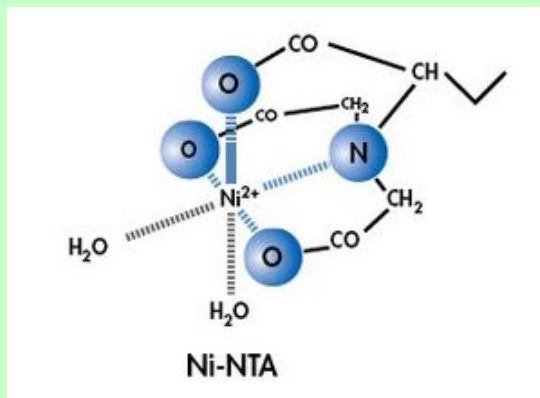
» Affin-kicsapás



## 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 fém-ionokat.



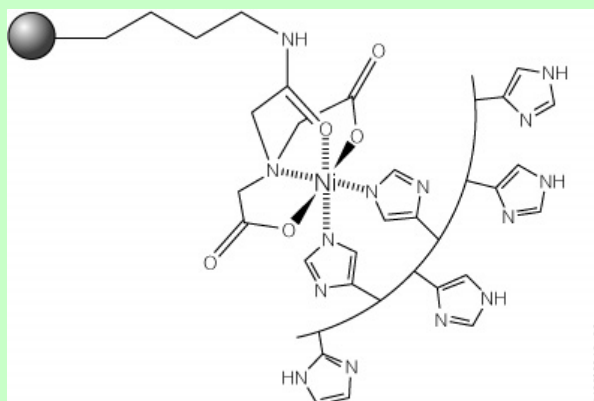
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.



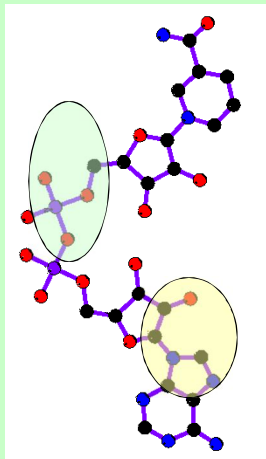
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

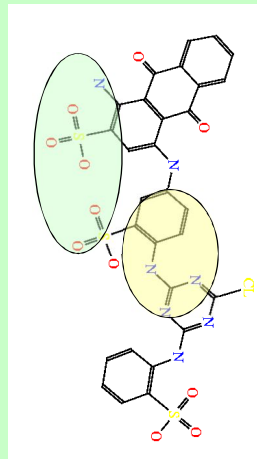
## Festékkromatográfia

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

NAD



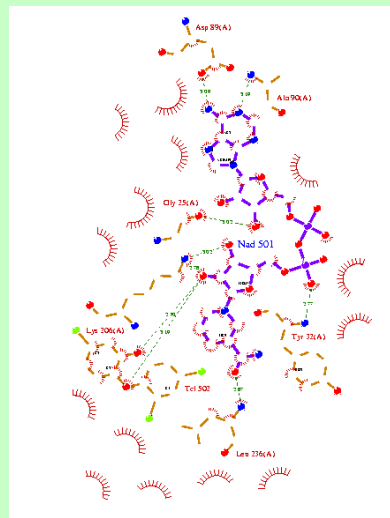
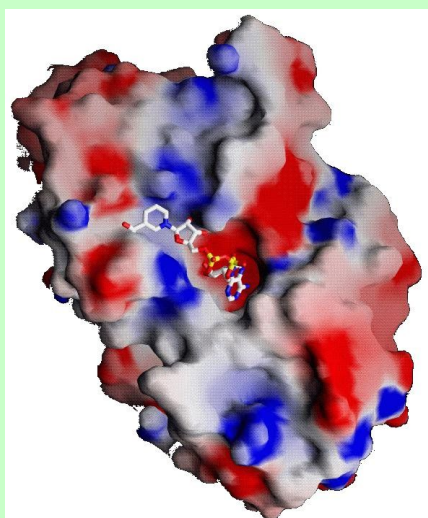
Cibacrone  
Blue F3G-A



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-  
lignadum kiválasztásával  
(Cibacron sorozat,  
Procion sorozat)

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



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

Hordozó-ligand + reakciópartner  $\leftrightarrow$  komplex

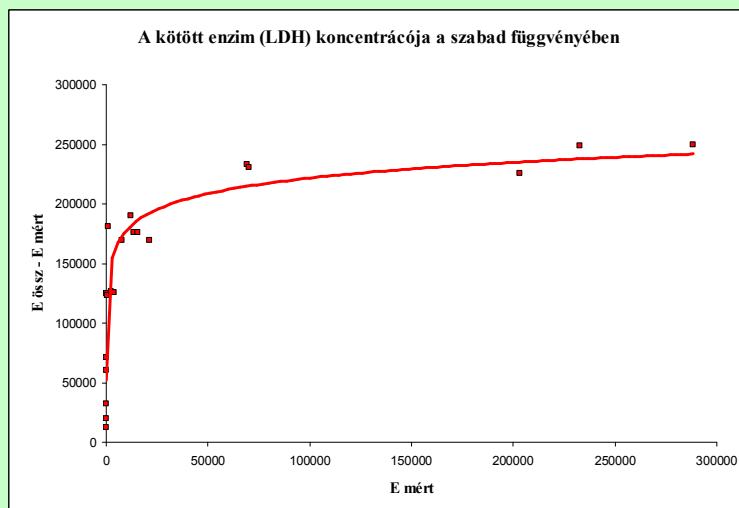


$$K_e = \frac{(HL) \cdot (R)}{(HL - R)}$$





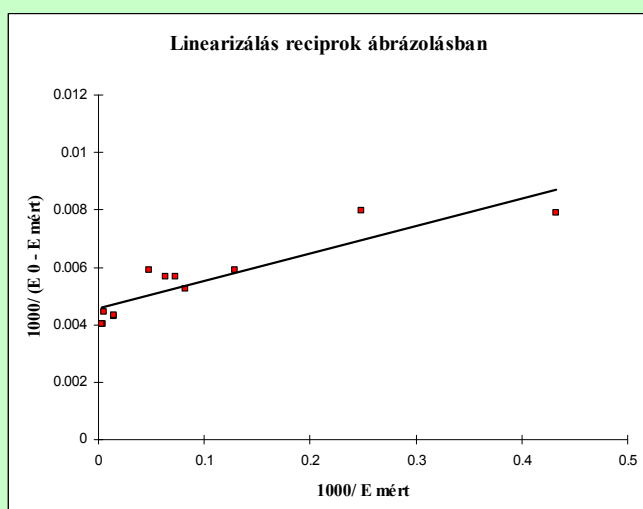
## Az adszorpció erőssége az egyensúlyi állandóval és az egyensúlyi görbével jellemezhető (adszorpció izoterma)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

## A kötődés jellemző paramétereit a linearizált görbe egyenletéből meghatározhatók



Csak akkor számíthatunk hatékony elválasztásra, ha

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

(mól/dm<sup>3</sup>)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

## AZ ELÚCIÓ KIVITELEZHETŐ:

Kompetitív molekulákkal (NAD, adenin, szerkezet-analógok)  
A körülmények módosításával (pH, ionerősség, ionok, kao-  
tróp anyagok)

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

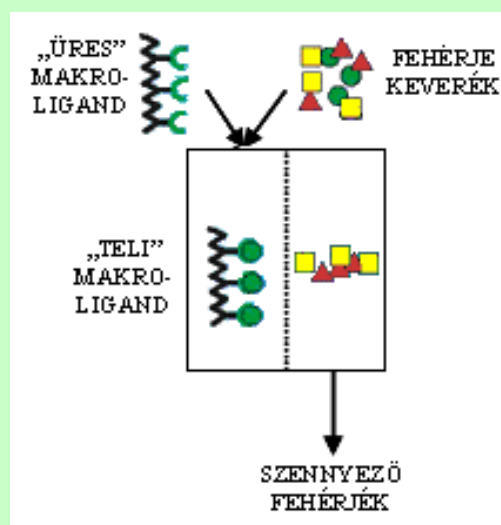
## Affin-ultraszűrés

A ligandumokat nagymé-  
retű (~500.000 Da) víz-  
oldható polimerre kötik.  
A szennyező fehérjék át-  
mennek a membránon, a  
makroligandhoz kötődők  
nem.

Analógia:

Diaszűrés

Félfolytonos adszorpció



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

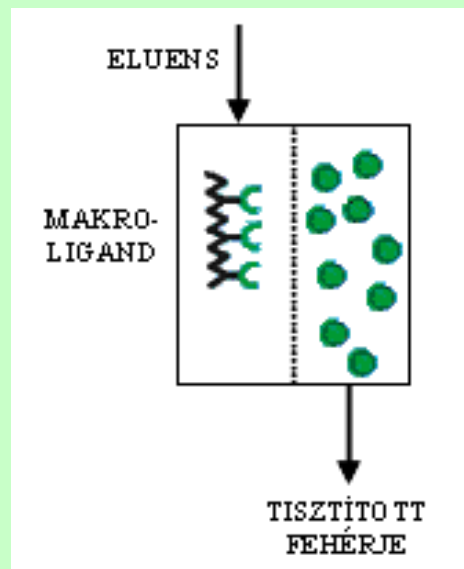
20

## Affin-ultraszűrés

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

Nehézségei:

- Ilyen nagy molekulánál fennáll a kicsapódás veszélye
- Minden feladatra meg kell csinálni a makroligandot

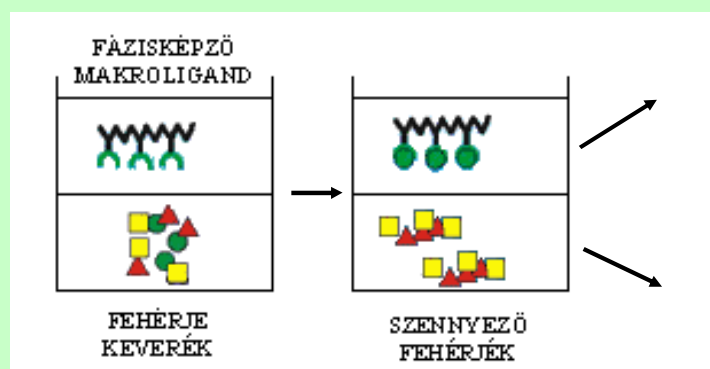


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.



## 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)



## 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



## 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

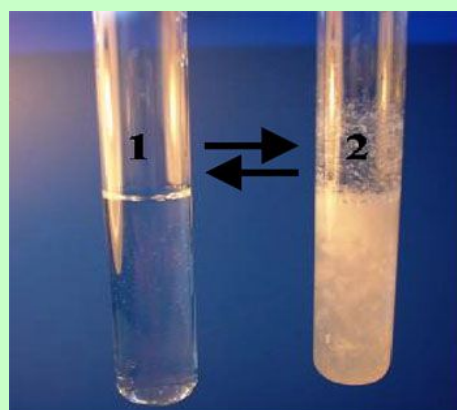


Fig. 1: Reversible thermo-precipitation (2) of an aqueous solution of poly-N-isopropylacrylamide (1).



## Affin-kicsapás

Visszanyerés: sokszor a terméket nem lehet leoldani a csapadékról, előbb vissza kell oldani, aztán disszociáltatni.

