

# AFFIN-KÖLCSÖNHATÁSON ALAPULÓ ELVÁLASZTÁSOK

Dr. Pécs Miklós  
Dr. Fehér Csaba



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,  
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



# Affinkölcsönhatások

Gyakran (ki)használt kölcsönhatások:

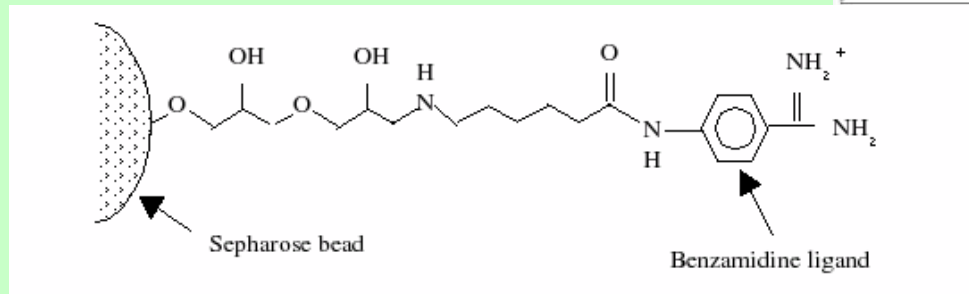
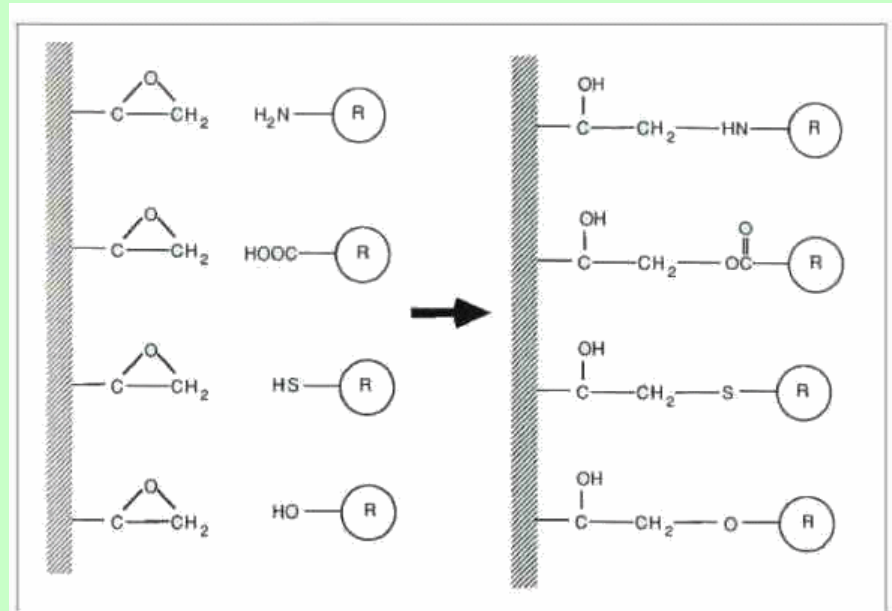
oligo-hisztidin peptidrész	fémkelátok (Ni, Cu)
Tripszin	p-amino-benzamidin (PABA)
Tripszin	szója tripszin-inhibitor (STI)
(Staphylococcus) protein A	immunoglobulin G (IgG, MAb)
búzacsíra agglutinin (WGA)	kitozán (kitin származék)
avidin (madár fehérje)	biotin
NAD vagy ATP kötő enzimek	triazin színezékek



# Affin-elválasztások

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

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



# Affin-elválasztások

A ligandumon kötődik meg az oldatból a komplementer partner.

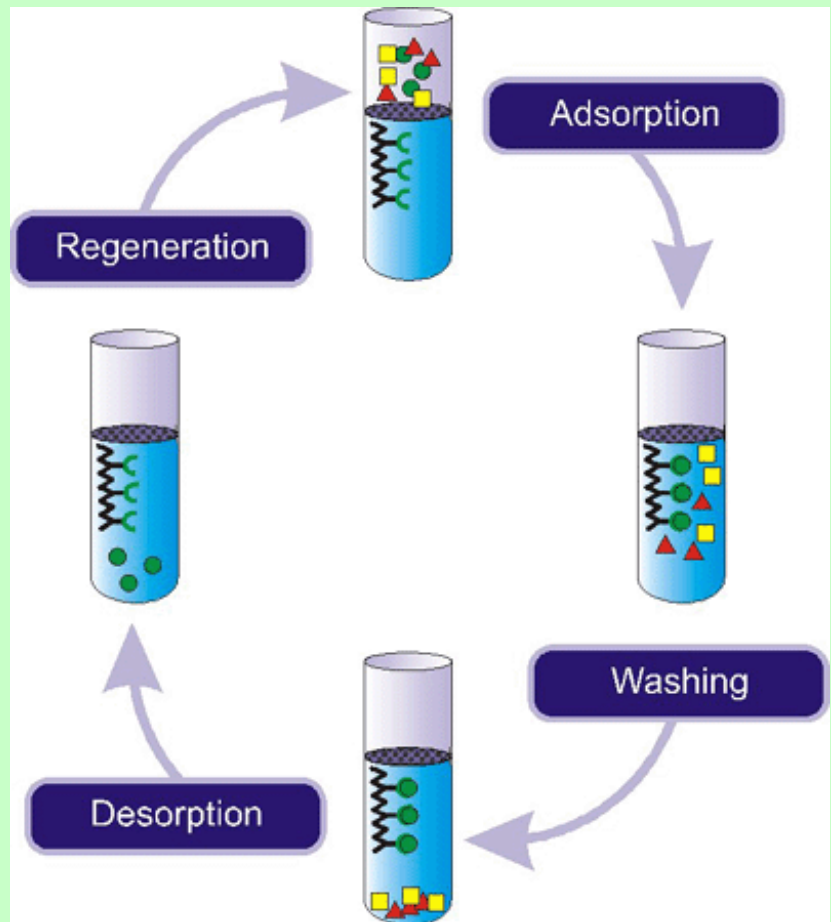
Műveletek:

Affinkromatográfia

Affinextrakció

Affin-ultraszűrés

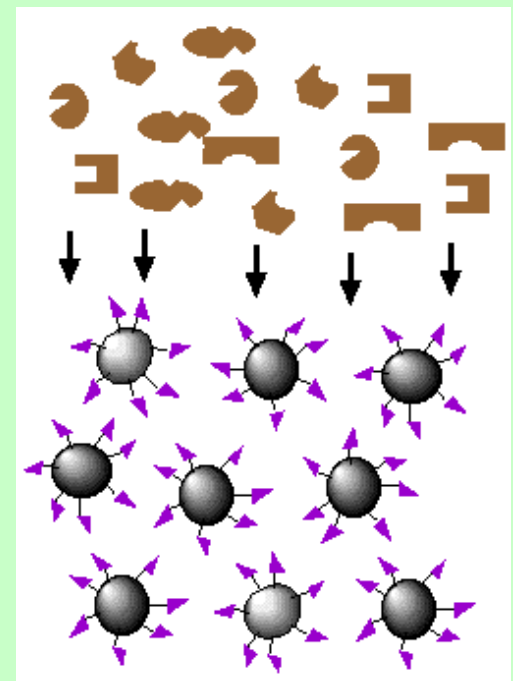
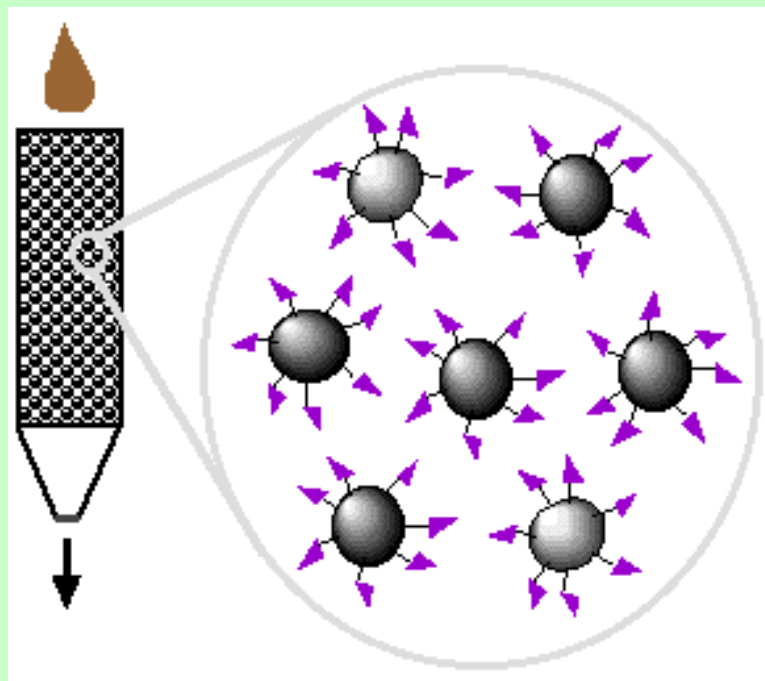
Affinkicsapás



# Affinkromatográfia

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

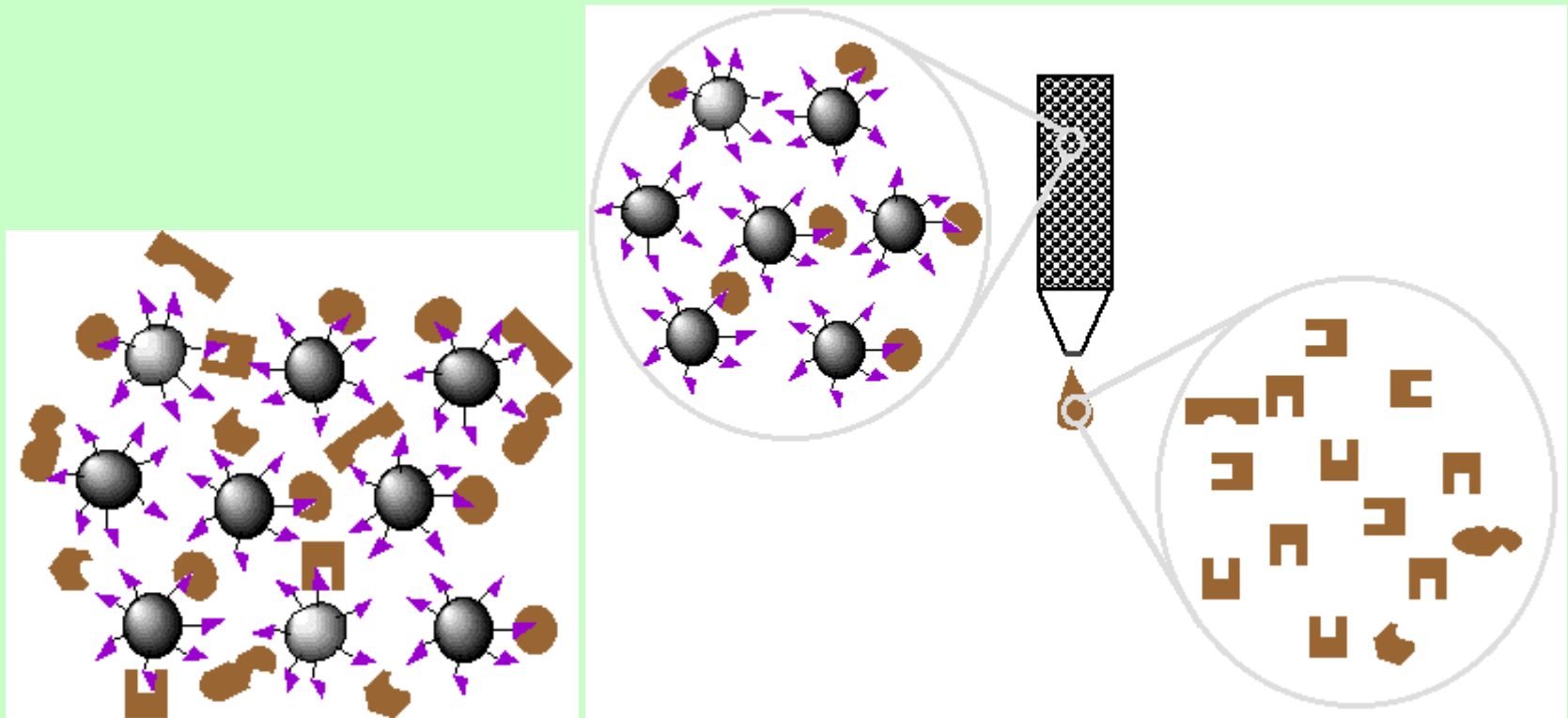
A neve kromatográfia, de inkább adszorpció.



# Affinkromatográfia



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

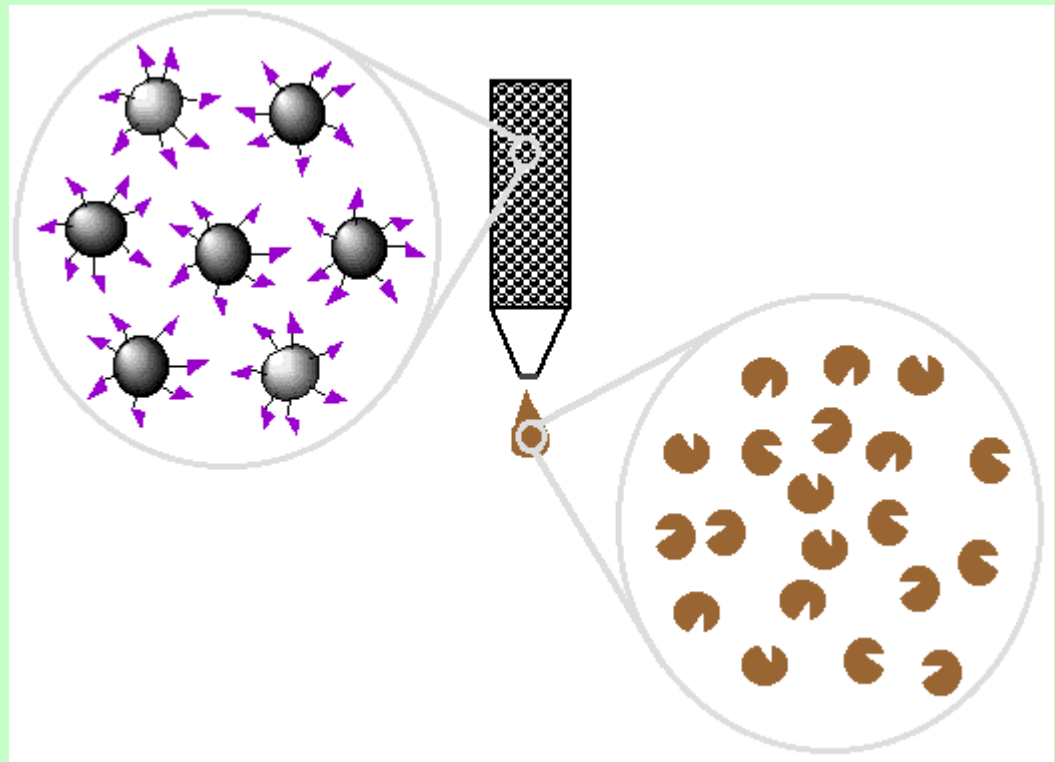


# Affinkromatográfia

A megkötött célterméket aztán eltérő összetételű eluenssel deszorbeáljuk.

Általánosan használt eluensek:

- Sóoldatok (ionerősség)
- Pufferek (pH)
- Kompetitív molekulák





# 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



# 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

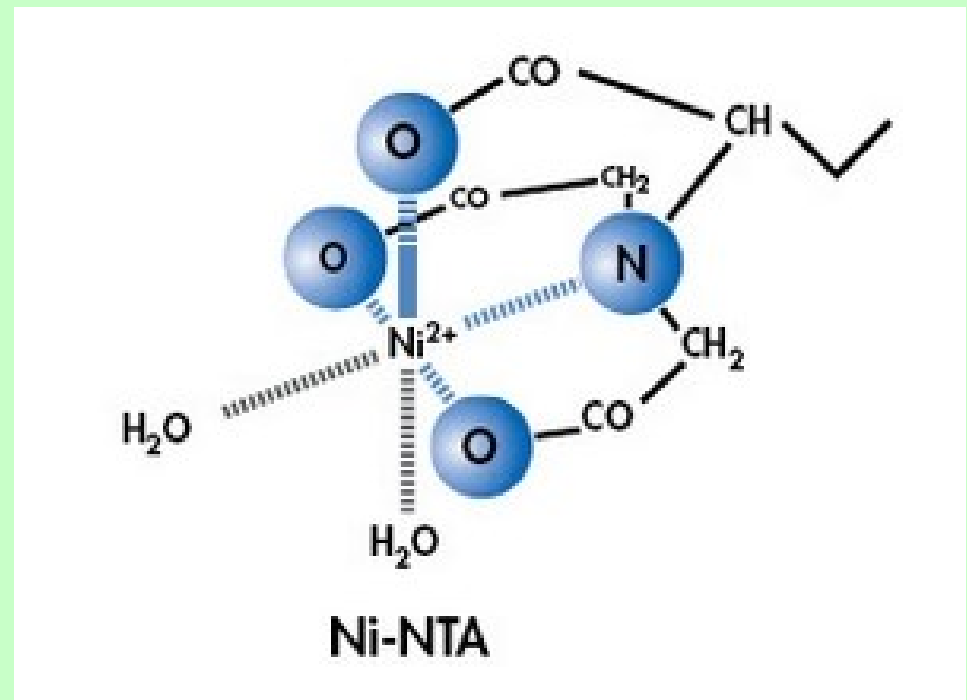
» Affin-kicsapás



# Fémkelát kromatográfia

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

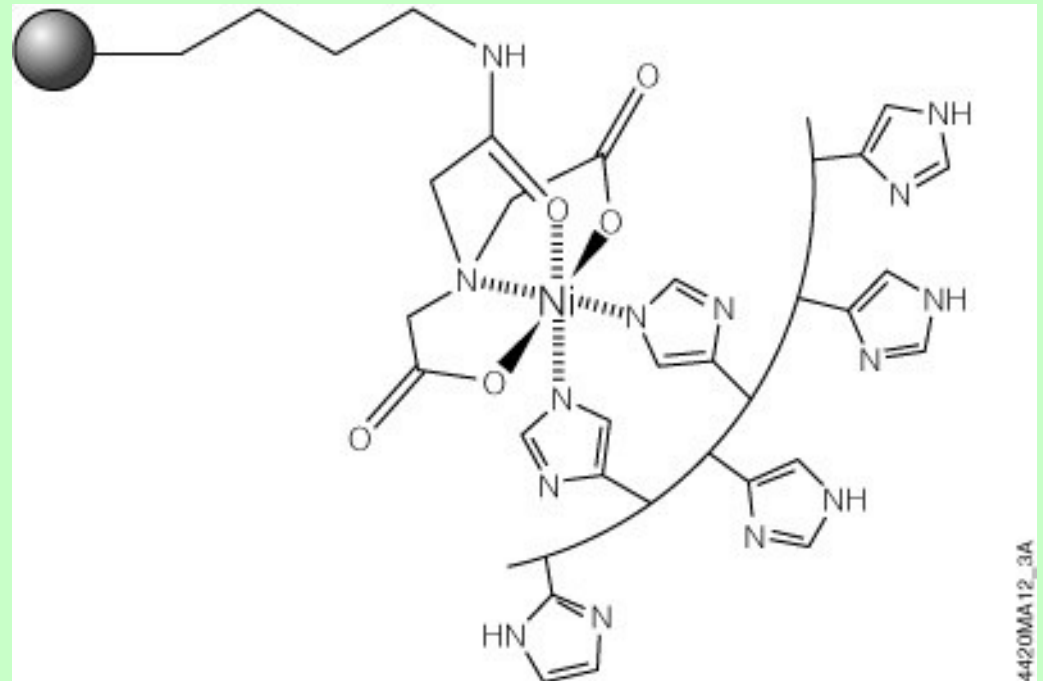
A töltet felületén imino-triacetsav csoportok tartják a fémionokat.



# Fémkelát kromatográfia

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

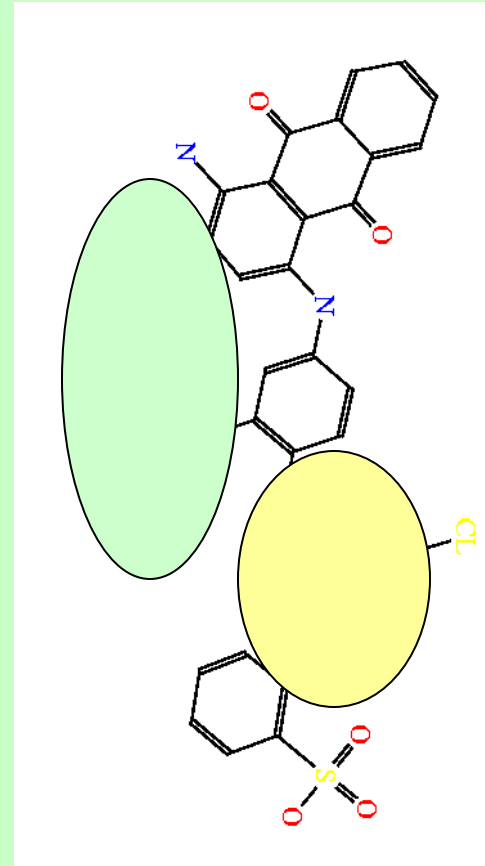
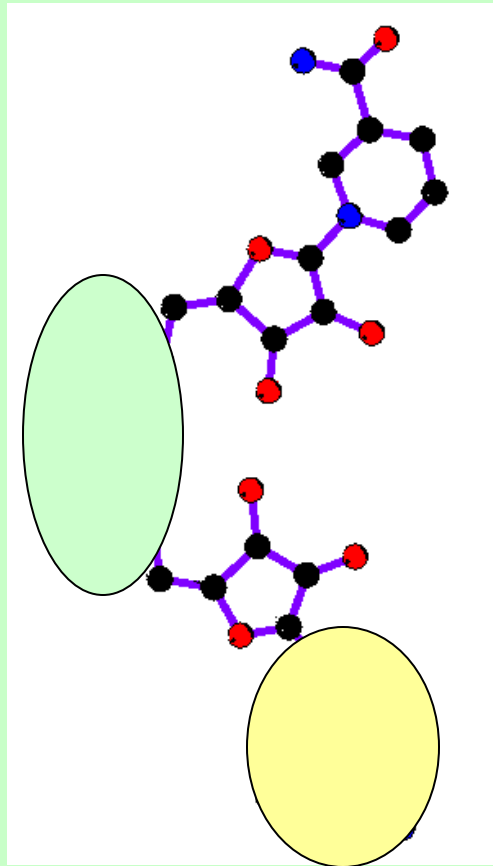
→ Nem csak a fehérje kifejeződését tervezik meg, hanem a kinyerését is.



# Festékkromatográfia

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

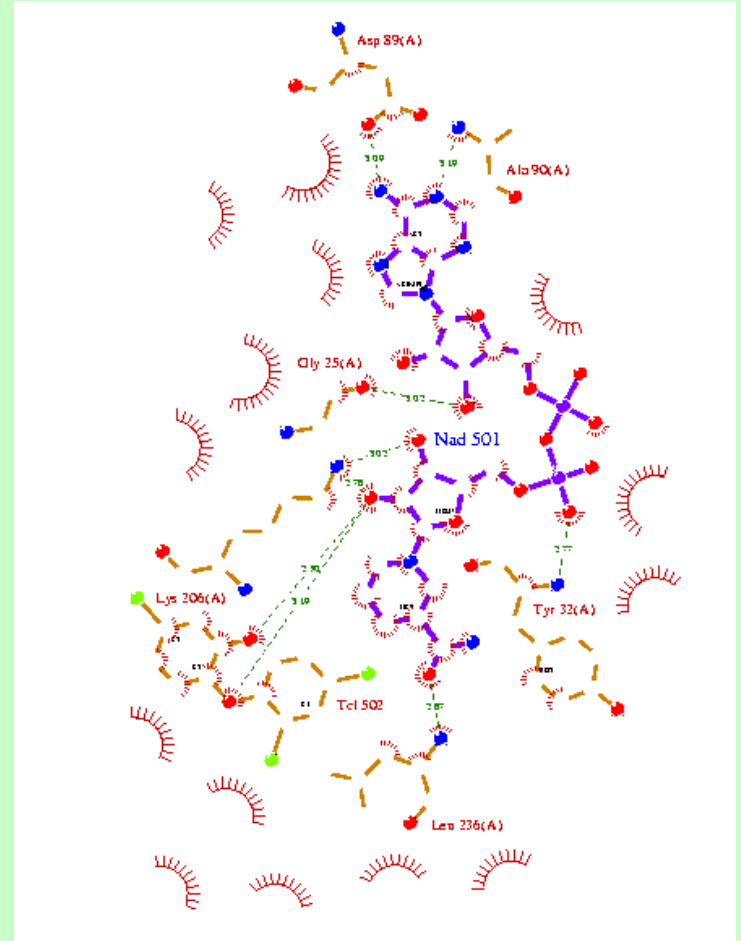
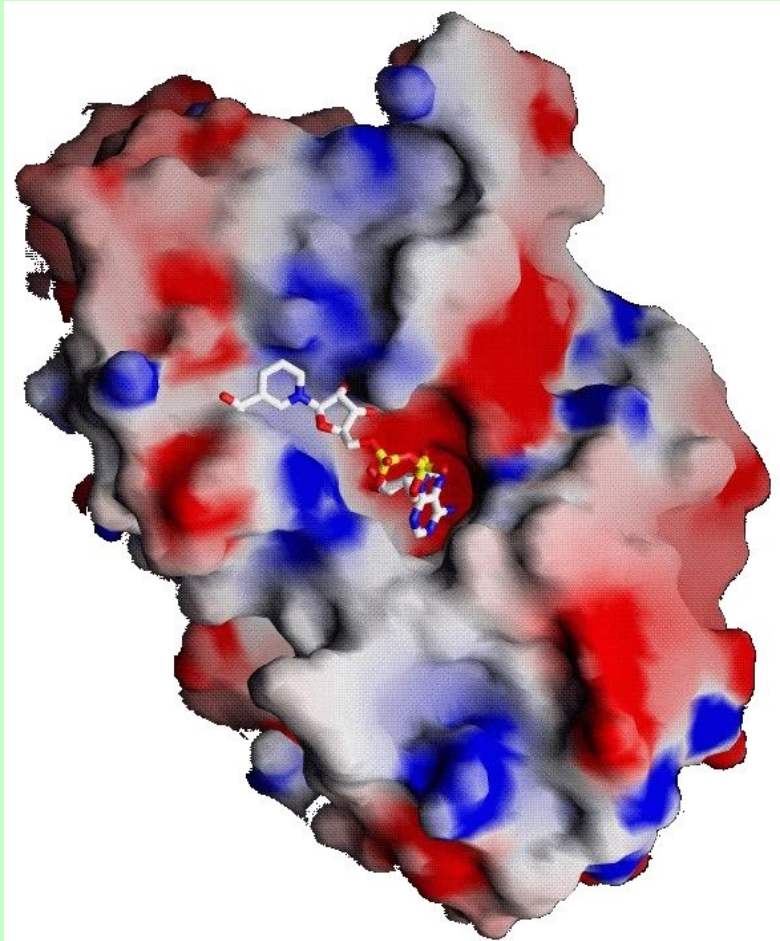
NAD



Cibacrone  
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-  
lignadum kiválasztásával  
(Cibacron sorozat,  
Procion sorozat)

a kötődés paramétereit-  
nek optimálásával (pH,  
ionerősség, koncentrá-  
ciók, polaritás)



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

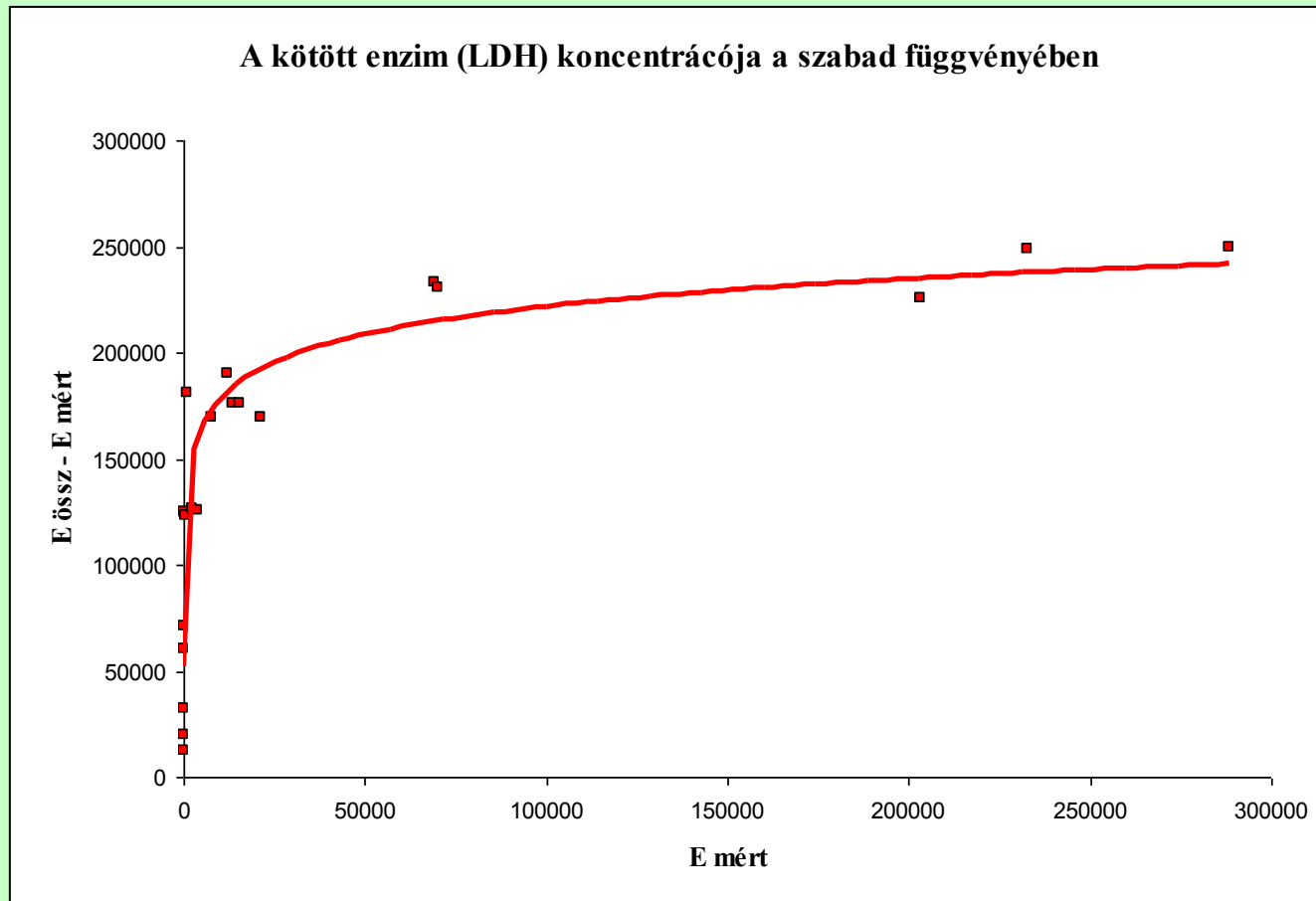


$$K_e = \frac{(\text{HL}) \cdot (\text{R})}{(\text{HL - R})}$$

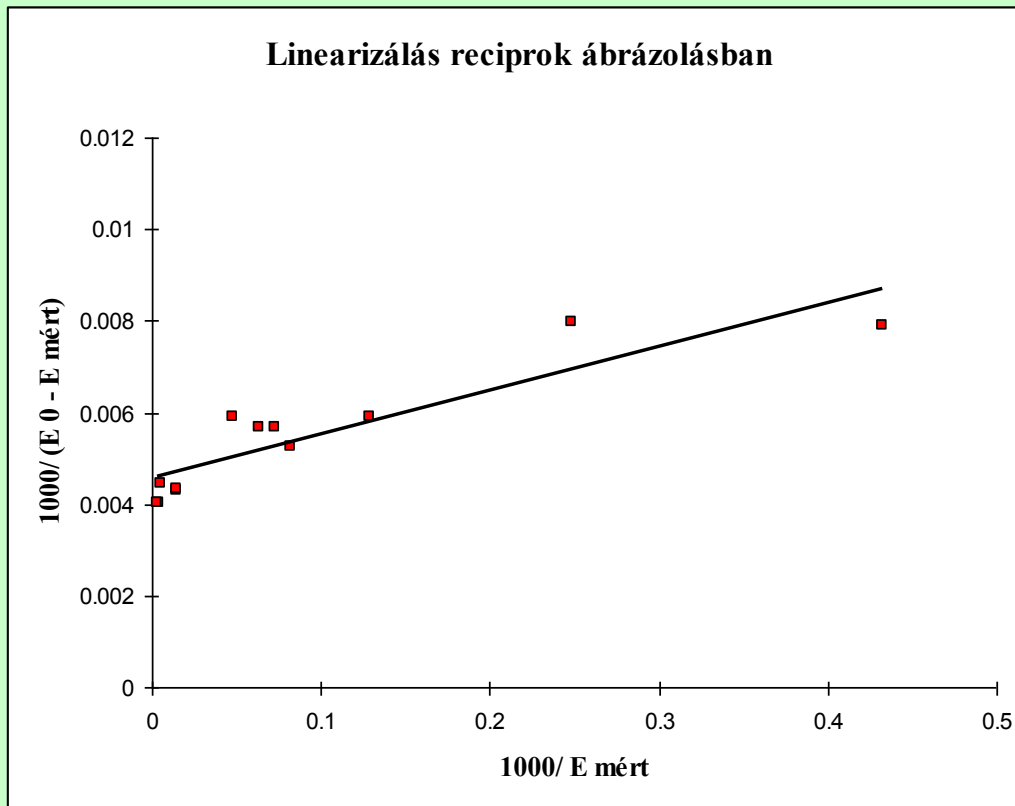




# Az adszorpció erőssége jellemezhető az egyensúlyi állandóval és az egyensúlyi görbével (adszorpciós izoterma)



# A kötődés jellemző paramétere a linearizált görbe egyenletéből meghatározhatók



Csak akkor számíthatunk hatékony elválasztásra, ha

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

$$(\text{mól/dm}^3)$$



# 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



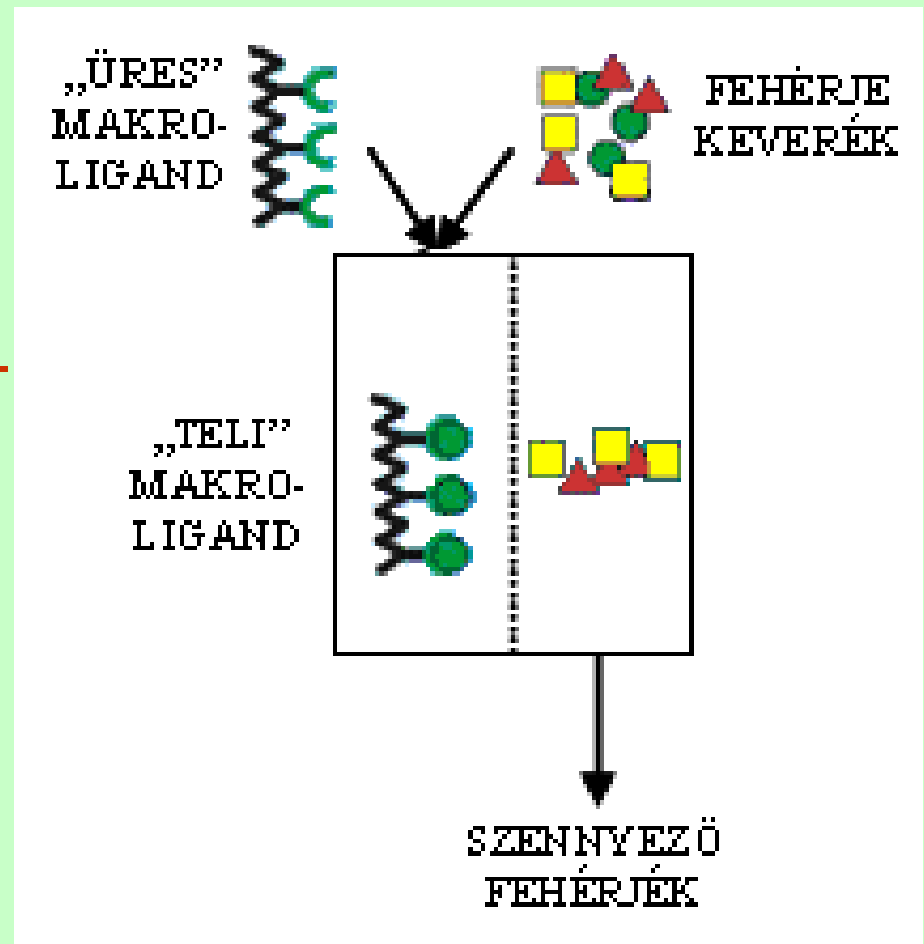
# Affin-ultraszűrés

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 affin-komplexet, a termék átmegy a membránon, a makroligand marad a retentátban (→ diaszűrés)

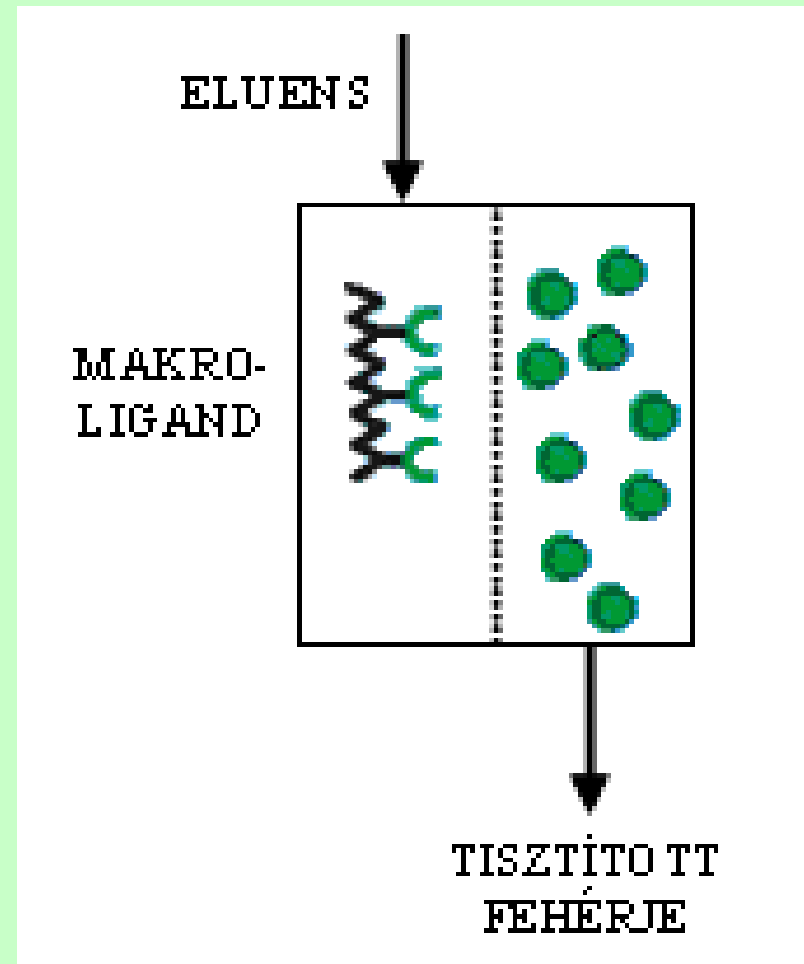
Nehézségei:

Ilyen nagy molekuláknál fennáll a kicsapódás veszélye

Minden feladatra meg kell csinálni a makroligandot

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)

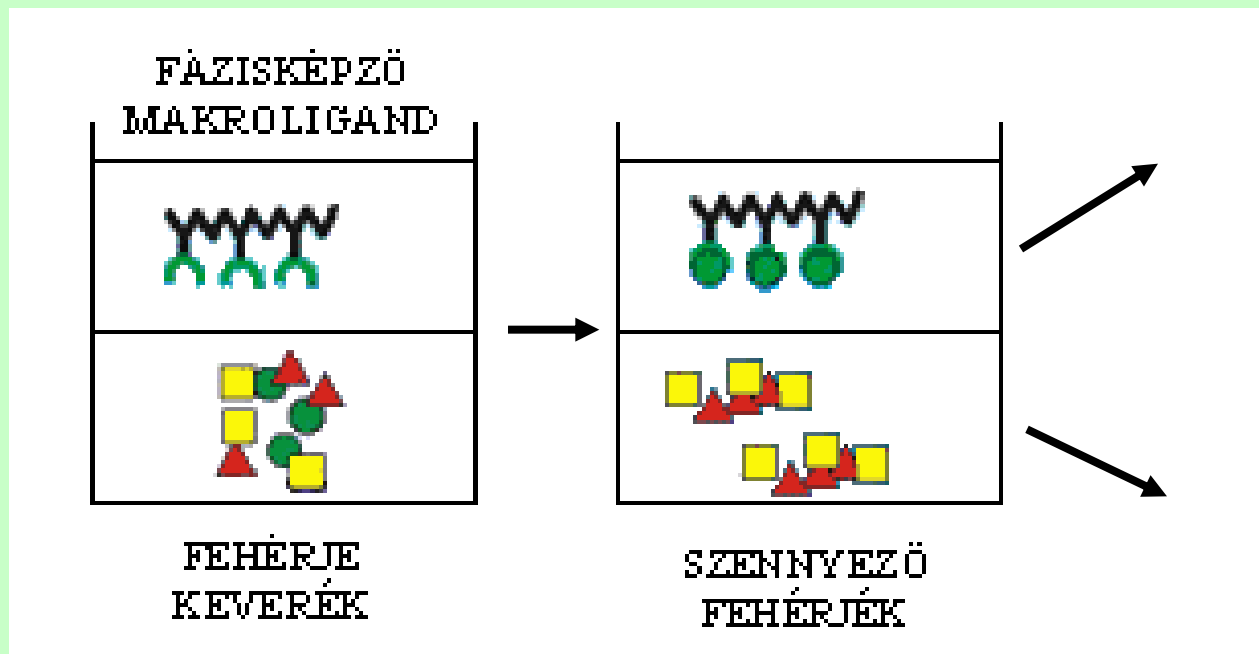
E. Coli béta-galaktozidáz enzim kinyerés (ligand p-amino-benzil-1-tio-beta-D-galaktopiranozid agarózra (szuszpenzió-mikorszűrés) pH változtatással elúció)

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 (ligandum nélküli) extrakcióval

Szennyezők csökkentése azokra spec. liganddal

Többszöri extrakció (tisztá makroligandos fázissal)

Makroligandos fázis mosása az affin-extrakció 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 diszűréssel, 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): 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 visszاسzorítható (poliakrilsavak, alginát, kitozánok, gyógyszerformulázó polimerek)
- Hőmérséklet: a poli-(N-izopropilakrilamid) 28-31 °C körül kicsapódik
- Ionerősség (de disszoc veszélye)
- Spec keresztkötések létrehozó ágensek

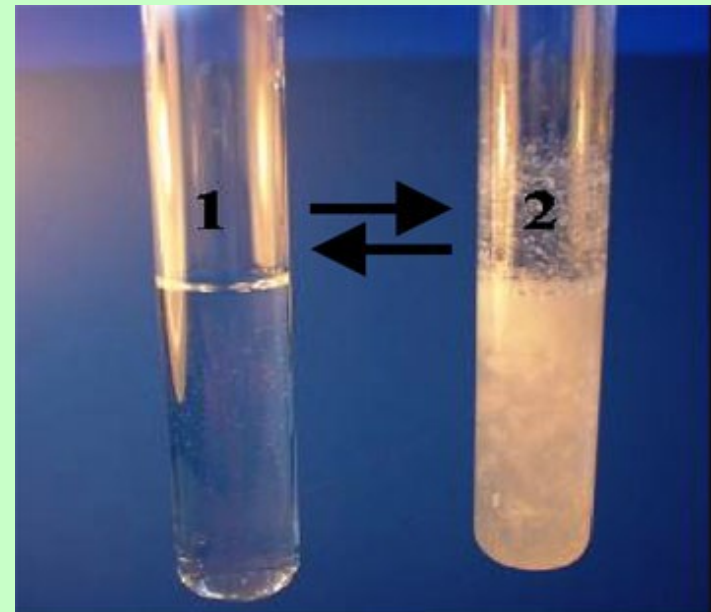


Fig. 1:  
Reversible thermo-precipitation (2)  
of an aqueous solution of  
poly-N-isopropylacrylamide (1).



# 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 határfok / visszanyerés.

