

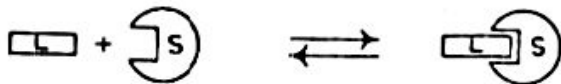
Аффинная хроматография

Студент гр. Х-450007 Десятова Евгения

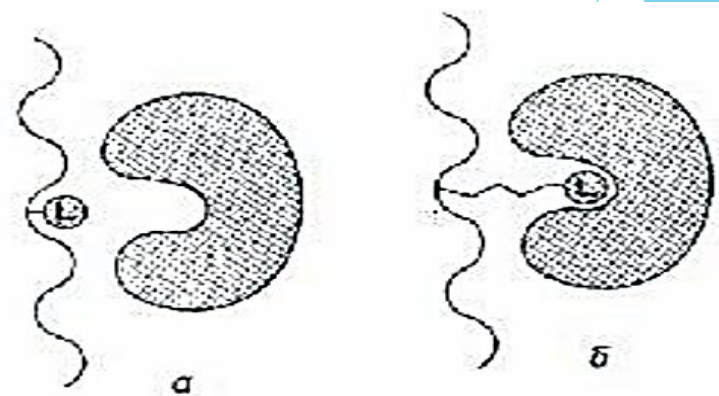
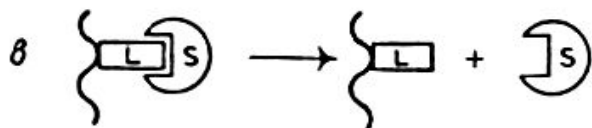
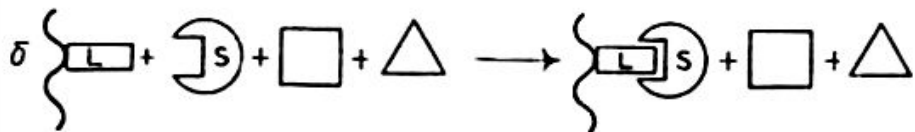
Аффинная хроматография

- ▶ Аффинная хроматография (АХ) представляет собой метод разделения биологических молекул, который основан на различии не физико-химических признаков молекулы (заряда, формы и размера), а специфичности функциональных свойств, отличающих данный фермент от множества других биополимеров.
- ▶ Биологическое взаимодействие между лигандом и молекулой-мишенью может быть результатом образования:
 1. Водородных связей
 2. Электростатического взаимодействия
 3. Ван-дер-Ваальсового взаимодействия
 4. Гидрофобного взаимодействия
- ▶ Один шаг аффинной очистки дает огромную экономию времени по сравнению с менее селективными многоступенчатыми процедурами.

Механизм разделения в АХ



а

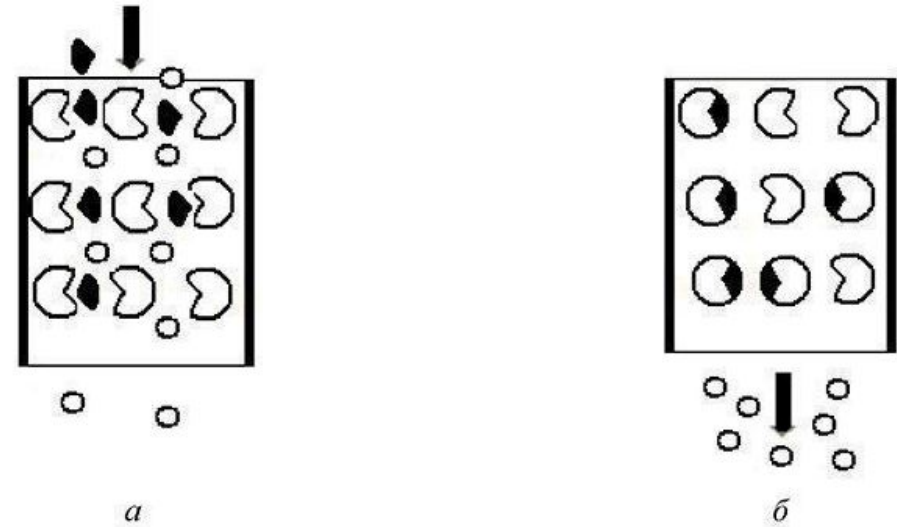


Если лиганд присоединяется непосредственно к носителю, эффективность специфического взаимодействия заметно снижается вследствие пространственных затруднений - активные центры многих биологически активных веществ часто локализованы в середине глобулы и недоступны для небольших молекул лигандов, непосредственно связанных с матрицей.

а - иммобилизация лиганда (ковалентно); б - связывание целевого вещества (нековалентно) и удаление сопутствующих примесей; в - десорбция целевого вещества

Проведение процесса хроматографии

- ▶ В аффинной хроматографии выделяют две фазы: подвижной фазой служит жидкость, неподвижной фазой может быть твердый сорбент. Разделение в аффинной хроматографии обычно проводят на хроматографических колонках в две фазы (адсорбция и десорбция); иногда разделяемую смесь помещают в сосуд с сорбентом и выдерживают до полного связывания исследуемого компонента. Затем сорбент промывают буферным раствором для удаления не связавшихся веществ, после чего десорбируют исследуемый компонент.



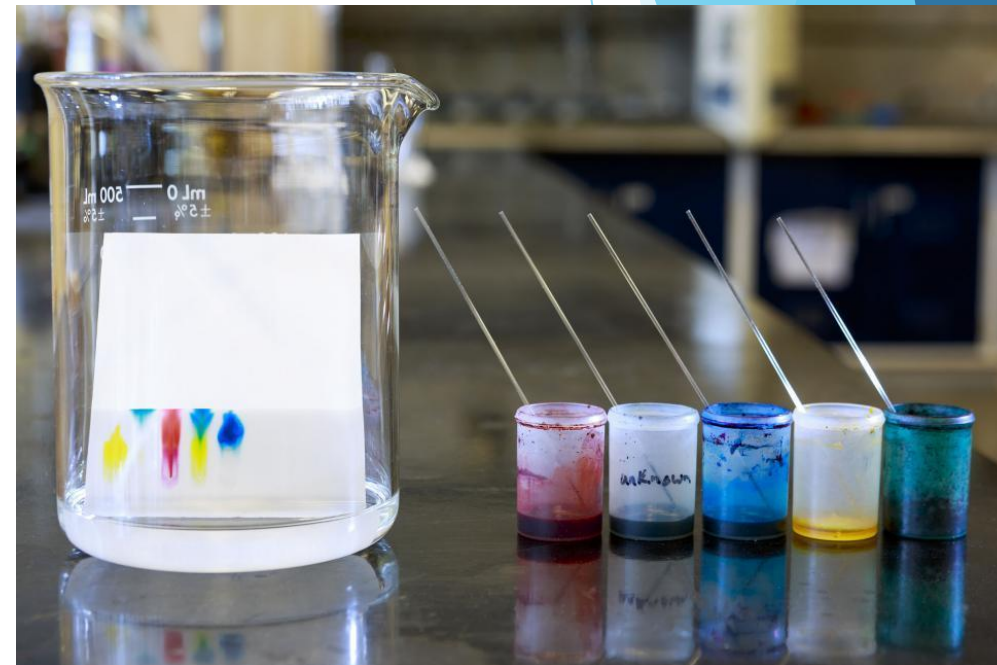
В виде частиц различной формы изображены молекулы с различными химическими структурами, из которых только одна вступает в специфическое взаимодействие с частицами геля.

Подвижная фаза

Подвижная фаза аффинной хроматографии должна:

- ✓ обладать низкой вязкостью;
- ✓ обеспечивать необходимый уровень селективности;
- ✓ быть дешевой;
- ✓ быть нетоксичной;
- ✓ быть инертной;
- ✓ быть совместимой с методами детектирования (например, с УФ-детектором нельзя использовать в качестве элюента бензол).

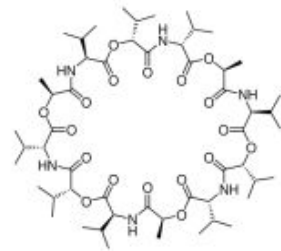
Обычно используют углеводороды (гексан, гептан, изооктан, циклогексан) с добавлением небольших количеств CHCl_3 или диизопропилового эфира.



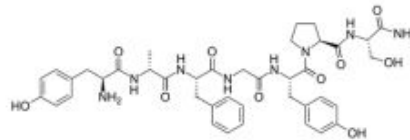
Лиганды, используемые в АХ

- ▶ Выбор лиганда для аффинной хроматографии зависит от двух факторов:
 1. лиганд должен обладать обратимым сродством к целевому белку;
 2. лиганд должен содержать химические группы, через которые он может быть иммобилизован на матрице без нарушения связывающей активности.

Лигандами могут служить такие субстраты как крахмал или гликоген, однако их превращение в ходе аффинной хроматографии, катализируемое разделяемым ферментом, постоянно изменяет свойства сорбента. Поэтому, как правило, применяют аналоги субстратов, устойчивые к дальнейшему превращению, т.е. ингибиторы ферментов. Так, для выделения протеиназ используют нерасщепляемые ими пептиды D-аминокислот.



Valinomycin
(D-valine)



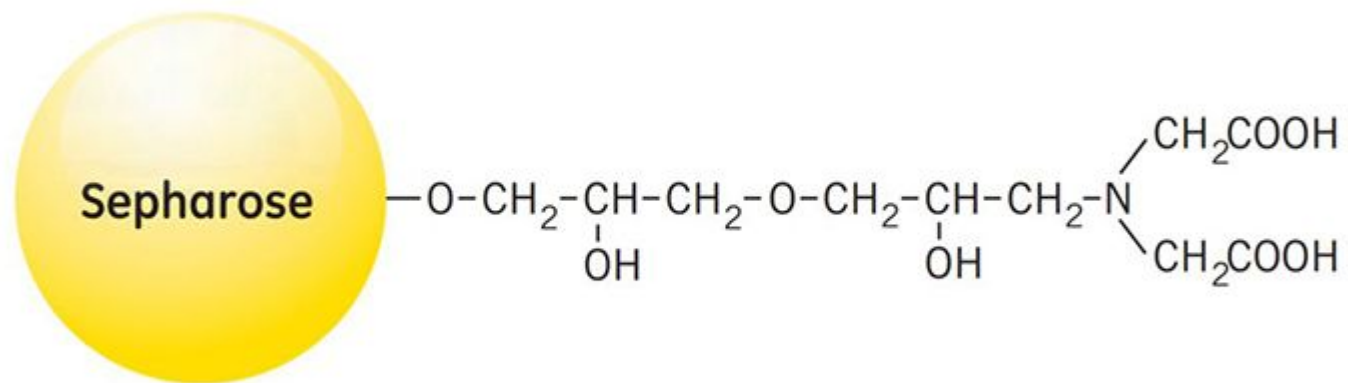
Dermorphin
(D-alanine)

Сорбенты, используемые в АХ

Матрица является инертным носителем, с которым лиганд может быть ковалентно или не ковалентно связан. Основные свойства хроматографических матриц:

1. Чрезвычайно низкая неспецифическая адсорбция
2. Открытая пористая структура, обеспечивающая высокую связывающую способность даже для больших биомолекул;
3. Стабильность в диапазоне условий эксперимента, таких как высокий и низкий pH, детергенты и т.д.

Сефароза - агароза в форме шариков, демонстрирует многие из этих свойств. Сефарозы изменяют и модифицируют в соответствии с конкретными требованиями разделения. В качестве сорбентов для аффинной хроматографии применяются гели на основе агарозы: сефароза 4В, сефароза CL, аффи-гель.



Разрушение аффинной связи

Аффинную связь вещества с сорбентом можно нарушить либо:

1. путем создания неблагоприятных для биоспецифического взаимодействия условий;
2. путем конкурентной аффинной элюции.



Аппаратурное оформление процесса

- Современный жидкостной хроматограф включает емкости для элюентов, насосы высокого давления, дозатор, хроматографическую колонку, детектор, регистрирующий прибор, систему управления и математической обработки результатов.
- Колонки для ВЭЖХ изготавливают чаще всего из нержавеющей стальной полированной трубки длиной 10- 25 см и внутренним диаметром 3-5 мм.
- Для увеличения чувствительности детектора иногда применяют послеколоночную дериватизацию компонентов смеси. Для этого с потоком элюента вводят такие реагенты, которые, взаимодействуя с разделенными веществами, образуют производные с более выраженными свойствами, например, сильнее поглощают в УФ или видимой области спектра или обладают большей флуоресцирующей способностью и т. д. Иногда дериватизацию проводят до хроматографического анализа и разделяют производные, а не исходные вещества.



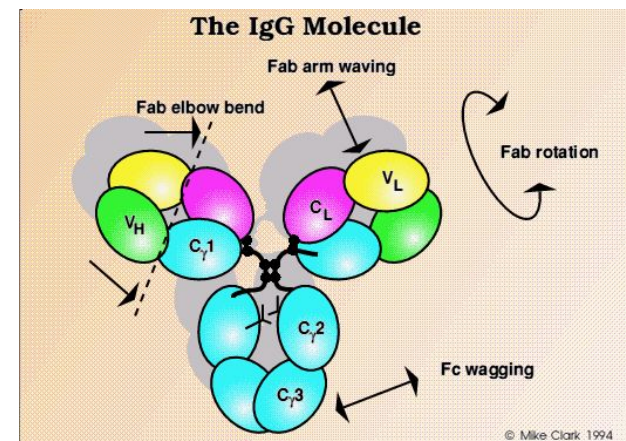
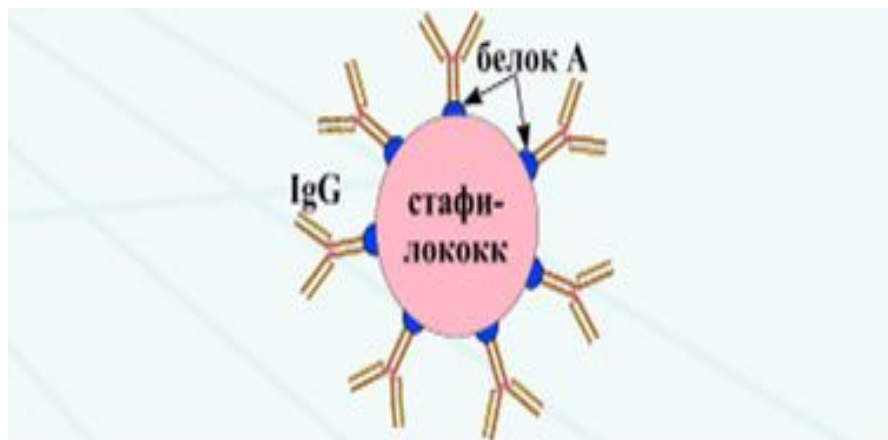
Некоторые белки, разделяемые АХ

- Иммуноглобулины

Разнообразие антиген - антитело взаимодействий создало множество приложений для антител и их фрагментов. Они используются в терапии, диагностике и научных исследованиях. Использование технологии рекомбинантных ДНК дало возможность манипулировать их свойствами для решения многих задач. Значительным преимуществом для очистки антител и их фрагментов является то, что известно много информации о свойствах молекул - мишеней антител.

- IgG, фрагменты IgG и подклассы

Разделение IgG и его фрагментов основано на высоком сродстве к белку А. Аналогичный белок G связывается с Fc-фрагментом IgG. Белки А и G - это бактериальные протеины (из *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus*, соответственно) которые на сефарозной матрице образуют чрезвычайно полезный и простой сорбент для многих рутинных процедур.



Заключение

«+»:

- высокая специфичность
- очень высокая степень очистки препарата - АХ может обеспечить полную очистку продукта из сложной многокомпонентной смеси - культуральной жидкости, экстракта клеток - в одну стадию, в то время как более традиционные методы осаждения и ионообменной хроматографии требуют многоэтапной очистки, сопряженной с большими затратами труда и времени

«-»:

- относительная дороговизна материалов для аффинной хроматографии, в частности, веществ, используемых в качестве лигандов
- быстрый выход колонки из строя при пропускании через нее смесей, компоненты которых забивают промежутки между гелевыми частицами (именно поэтому в производственных условиях колонки используются в периодическом, а не в непрерывном режиме)

