

Metody izolace a purifikace antigenů a protilátek

IMUNOCHEMIE

Zuzana Bílková



Cíl izolace

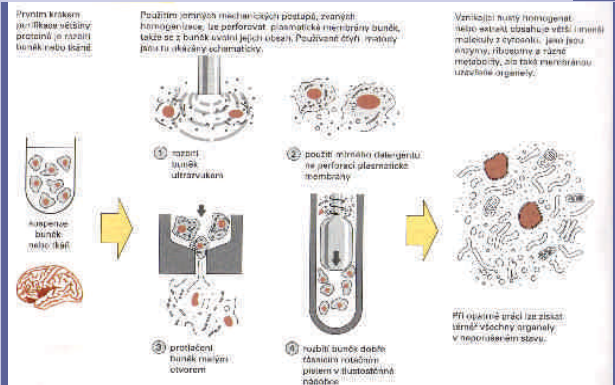
- ♦ Získání biopolymeru (proteiny, polysacharidy, glykoproteiny....) **definované čistoty**
- ♦ Zachování **biologické aktivity**

Získat produkt o patřičné čistotě s vynaložením **přiměřeného (optimálního) úsilí a přiměřeného množství peněz**

Výchozí materiál - úskalí

- ♦ Komplexnost biologické matrice (velké množství doprovodných bílkovin a jiných látek)
- ♦ Malá množství cílového produktu
- ♦ Labilita biologické aktivity produktu
- ♦ Strukturní labilita

Rozbíjení buněk, tkání, homogenizace



Zásady pro práci s biologickým materiálem

1. Pokud možno zpracovat co nejdříve
2. V případě potřeby zmrazit (-20°C , -80°C)
3. Rozmrazování – co nejrychleji x postupně zvyšovat teplotu?
4. Nízká teplota při izolaci
5. Vhodné pH + iontová síla
6. Vhodná koncentrace bílkoviny
7. Zabránit pění
8. Omezení proteolytické aktivity (směs inhibitorů)
9. Přídavek specifických látek (např. ME, EDTA ...)

Separční metody

- A. Separace založené na velikosti molekul (dialýza a ultrafiltrace, centrifugace v hustotním gradientu, gelová filtrační chromatografie)
- B. Separace založené na rozdílech rozpustnosti proteinů (izoelektrická precipitace, vysolování neutrálními solemi, frakcionace organickými rozpouštědly)
- C. Separace založené na základě povrchového náboje (elektroforetické metody, iontově výměnná chromatografie, afinitní chromatografie)

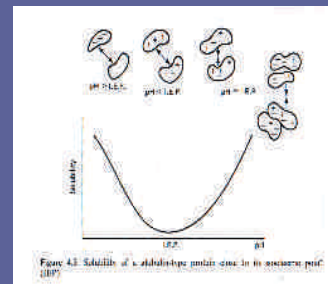
Separáční metody

- ♦ Centrifugace a ultracentrifugace
- ♦ Membrnov separace (ultrafiltrace, dialýza)
- ♦ Selektivn precipitace
- ♦ Ionov vmnn chromatografie (IEC)
- ♦ Chromatografie na molekulových sítech (SEC)
- ♦ Hydrofóbní chromatografie (HIC)
- ♦ Afinitní chromatografie (AC, IAC, HPIAC)
- ♦ Preparativní elektromigraçn techniky

Selektivn precipitace

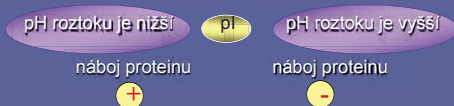
Separace založen na rozdíln rozpustnosti proteinů

Rozpustnost proteinu prudce stoupá, je-li v roztoku o pH nišm nebo v pH všm neš pI proteinu (molekuly mají stejn náboje a odpuzují se).



Selektivn precipitace

- 1) rozpustnost globulárních proteinů ovlivnje pH
- 2) p pH = pI je rozpustnost nejniš, molekuly mají tendenci se shlukovat – mají 0 náboj
- 3) protein m celkov povrchov náboj buď kladn nebo zporn (NH_3^+ nebo COO^- postranních řetězců aminokyselin v proteinu)
- 4) princip izoelektrick precipitace – kašd protein m jin pI a vysrz se ze směsi proteinů v roztoku, kter má pH = jeho pI.



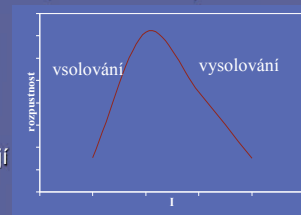
Frakcionov precipitace - vysolování

Hydrofilní aminokyseliny interagují s molekulami vody a vytvárajú s ní vodkov můstky (cm více hydrofilních skupin, tm více je protein rozpustn)

☞ Pdn soli do roztoku odebrá proteinu vodn plášť

☞ Interakce protein/protein je silnější neš protein/roztok

☞ Molekuly proteinu koagulují (agregují) díky hydrofóbním interakcím



P vysok iontov sil se protein kompletn vysrz (mezi 39 a 75 %).

Precipitace

- ♦ Bílkoviny aktivn v nativním stavu, srážením ke zmnm konformace molekuly (porušen fyz.-chem. vlastností), musí biol. aktivita zajistna návratem do fyziol. podmínek
- ♦ Nezamřnovat s denaturací – Ireverzibiln precipitace — sole těžkch kov, koncentrovan minerln kyseliny, organick kyseliny, teplo
- ♦ Látky poušivan pro separaci bílkovin – EtOH, NaCl,
- ♦ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - rozpustnost se mlo mn s teplotou, saturevan roztok 4 M - hustota 1,235g/cm³ umošžuje centrifugaci agregovaných bílkovin (hustota 1,29 g/cm³), levn, cst
- ♦ Filtrace nahrazena centrifugací

Srážení organickými rozpouštdly

- ♦ Kompletn msiteln s vodou
- ♦ Musí mít dobr precipitaçn efekt
- ♦ Srážení za nízké teploty (< 0 °C)!!! X denaturace proteinu

♦ EtOH, aceton, MetOH, propanol, dioxan

- 1) etanol snz dielektrickou konstantu (nišjš neš voda)
- 2) snz se stupeň ionizace a vzst ptažliv sil mezi opaçnmi náboji, tm se snz rozpustnost.

Srážení organickými polymery a sloučeninami

Princip identický jako srážení s org. rozpouštědly

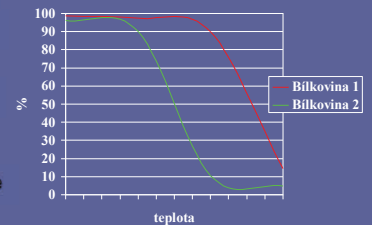
- ♦ DEAE dextran, PEG, Polyakrylová kyselina
- ♦ Rivanol (2-ethoxy-6,9-diaminoakridinlaktát)
- ♦ Kaprylová kyselina

Srážení selektivní denaturací

- ♦ Při této metodě denaturujeme a souč. precipitujeme balastní bílkoviny, cílová bílkovina (enzym) musí zůstat z 85 - 90 % v nativním stavu.
- ♦ Denaturační vlivy – T, pH, org. rozpouštědla

Tepelná denaturace

- ♦ Přidavky některých látek (substráty, koenzymy, inhibitory) zvyšují stabilitu cílových bílkovin
- ♦ pH při tepelné denaturaci musí být přesně definováno
- ♦ Při vyšší teplotě může více probíhat proteolýza



Kapalinová chromatografie v nízkotlakém uspořádání

Low pressure liquid chromatography LPLC

Nízkotlaká (LPLC), střednětlaká (FPLC) a vysokotlaká (HPLC) chromatografie

Kolonová (CC), na tenké vrstvě (TLC), na papíře (PC), vsádková (batch-wise)

Preparativní účely

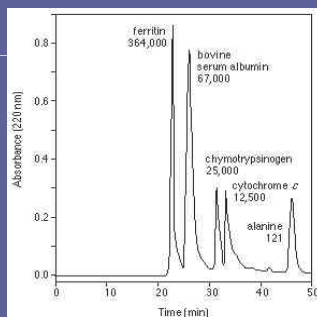
Gelová chromatografie
Ionexová chromatografie
Chromatografie s hydrofóbní interakcí
Afinní chromatografie

Chromatografické metody – základní charakteristika

- ♦ Distribuce složek mezi dvěma fázemi → mobilní a stacionární fáze
- ♦ Mobilní fáze → kapalina (kapalinová chromatografie); plyn (plynová chromatografie)
- ♦ Stacionární fáze → částice tuhé fáze, tenká vrstva kapaliny na částicích, kapalina v pórech chrom. nosiče, film kapaliny na vnitřní straně kapiláry
- ♦ Opakovaný transport složek do stacionární fáze a zpět do fáze mobilní

Terminologie

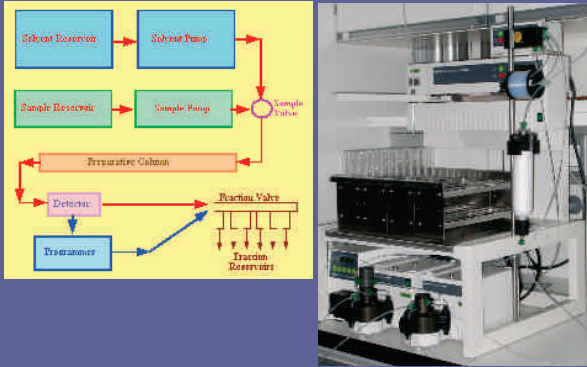
- ♦ Eluční objem
- ♦ Mrtvý objem
- ♦ Retenční poměr
- ♦ Kapacitní poměr
- ♦ Účinnost kolony (teoretické patro)
- ♦ Rozlišení elučních křivek (selektivita, kapacitní poměr, účinnost)
- ♦



Instrumentace pro LPLC

- ♦ Pumpa – peristaltická nebo gravitace
- ♦ Gradient – směšovač mob. fází
- ♦ Podmínky separace – izokratické, gradientové
- ♦ Dávkování – přímo pumpou na kolonu
- ♦ Kolony – skleněné, plastové, kovové (nerozové)
- ♦ Detekce – spektrofotometrická 254, 280 nm, ...nm
- ♦ Vyhodnocování – zapisovač
- ♦ Sběrač frakcí – programovatelný

Chromatografická sestava pro preparativní účely

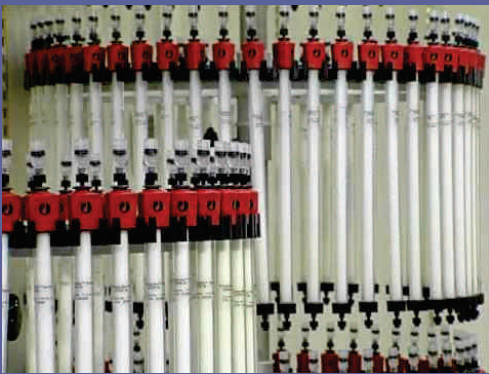


KOLONY

MIKROKOLONY

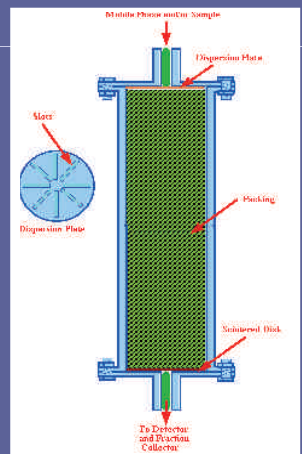
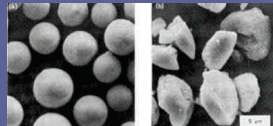
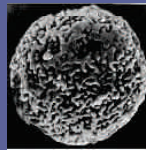


High-through put system

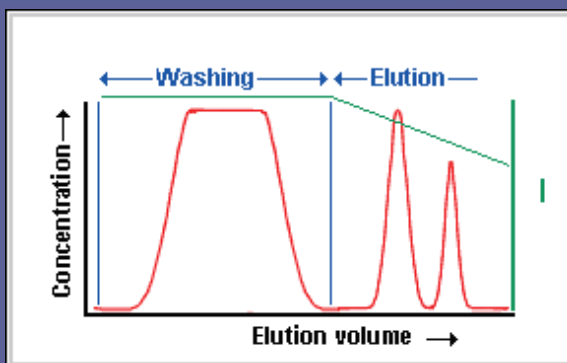


KOLONA pro prep. uspořádání

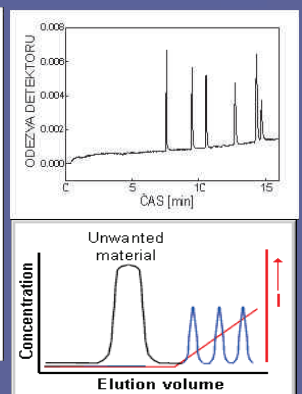
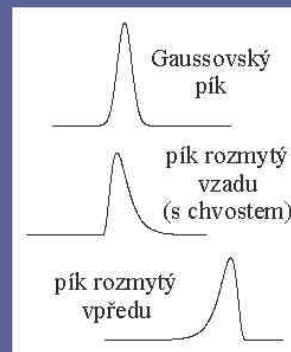
Částice sorbentu



Vzorový chromatogram pro LPLC

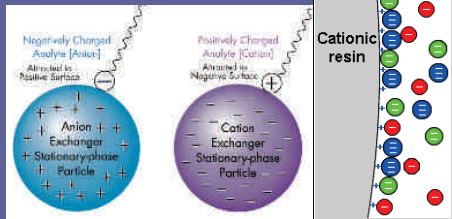


TVARY CHROMATOGRFICKÝCH PÍKŮ



Iontově výměnná chromatografie

- Založena na silných elektrostatických silách mezi ionizovanými funkčními skupinami měniče a ionty látek v okolním roztoku (analyt, ionty soli apod.)
- Určena pro separaci látek nesoucích kladný nebo záporný náboj, afinita iontů k ionexu závisí na velikosti náboje
- V případě proteinů hraje zásadní roli pH prostředí, mobilní fáze!



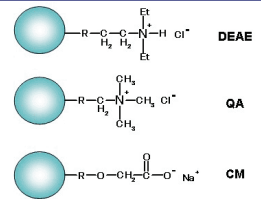
Celulosové a dextranové nosiče

Katexy – záporný náboj → vazba kationtů
 silné – sulfo (S), sulfopropyl (SP) OSO_3^-
 slabé – karboxy (C), karboxymethyl (CM) COO^-

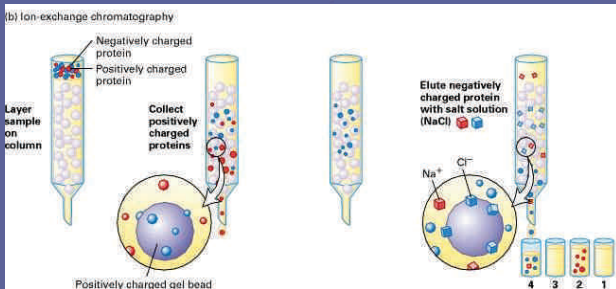
Anexy – kladný náboj → vazba aniontů
 slabé – diethylaminoethyl (DEAE)
 silné – triethylaminoethyl (TEAE)

Stacionární fáze

organické polymery,
materiály na bázi silikagelu



Ionexová chromatografie eluce prteínů vysokou iontovou silou



- Náboj bílkoviny závisí na pH prostředí a isoelektrickém bodu bílkoviny
- $\text{pH} < \text{pI}$ → bílkovina nese kladný náboj → separace na katexu
- $\text{pH} > \text{pI}$ → bílkovina nese záporný náboj → separace na anexu
- $\text{pH} = \text{pI}$ → celkový náboj bílkoviny je nulový → nelze provést ionexovou chromatografii, nebo tzv. negativní izolaci (např. IgG ze séra)

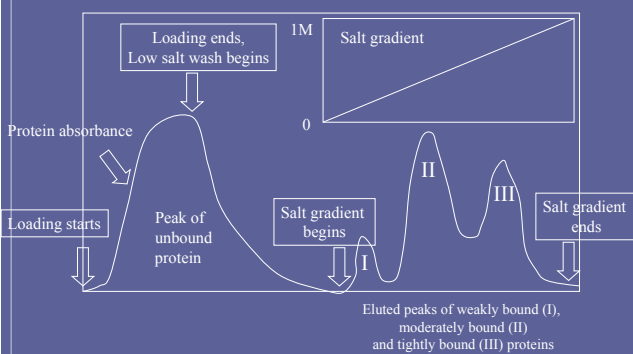
Ionexová chromatografie

- Nanášení vzorku – nízká iontová síla
- Eluce – gradientová
 Zvyšováním iontové síly
 Změnou pH
 retenci lze ovlivnit i teplotou nebo přidavkem org. modifikátoru

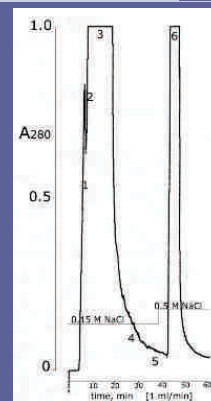
Praktické využití

- purifikace a zakoncentrování proteinu,
- výměna pufru, separace látek s podobnou iontovou povahou (silné i slabé elektrolyty)
- separace neiontových látek

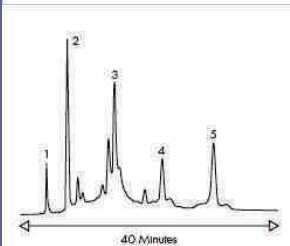
Typická ionexová chromatografie



Typická IEC



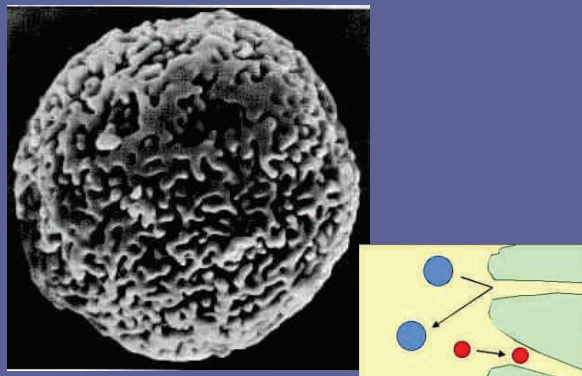
Column: AP-1 Glass Column, 10 x 100 mm
 Buffer A: 20 mM Tris-HCl pH 8.2
 Buffer B: Buffer A with 1M Sodium Chloride
 Flow Rate: 1.55 mL/min
 Gradient: 0 to 25% Buffer B over 38 min
 Load: 0.5 mg protein
 Detection: 280 nm



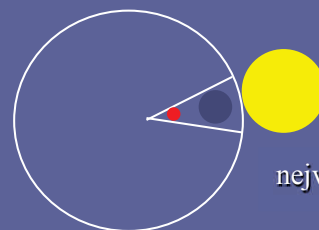
Gelová permeační chromatografie

- ♦ Gelová filtrační chromatografie
- ♦ Molekulová vylučovací chromatografie
- ♦ Chromatografie na molekulových sítích
- ♦ SEC – size exclusion chromatography

Částice sorbentu



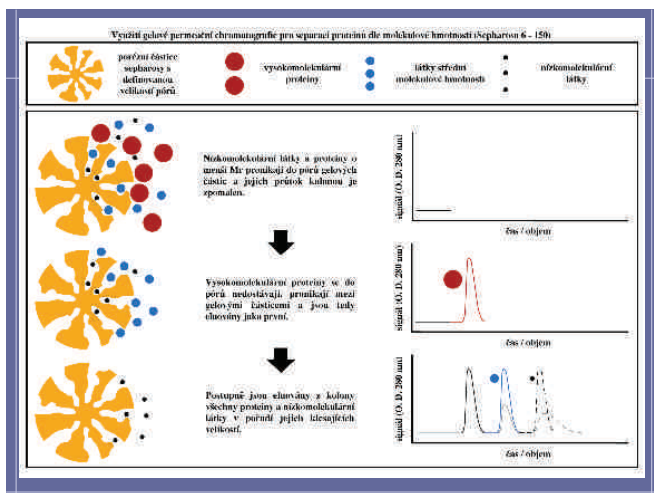
Gelová permeační chromatografie



Pořadí eluce :
největší > střední > nejmenší
molekula

Jev stérického vyloučení (exkluze) větších molekul, malé molekuly pronikají do nitra částic gelu (permeace) a zpožďují se.

Ke skutečné rovnováze mezi koncentrací látek vně a uvnitř částic nedochází.



Optimální gel pro gelovou filtraci

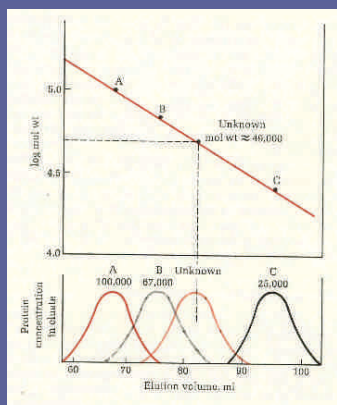
Inertní matrice gelu - chemicky stabilní při různém pH, T

Mechanicky stabilní gel (deformace při tlaku)

Velikost **gelových částic** nesmí být ani příliš malá (rozdělení je přesnější, ale pomalejší) ani příliš velká (rozdělení je rychlejší, ale může být nepřesné).

Na rychlou chromatografii tedy použijeme gel s hrubšími zrny. Na vysoký stupeň rozlišení použijeme gel s malými zrny.

Určení Mr z kalibrační křivky



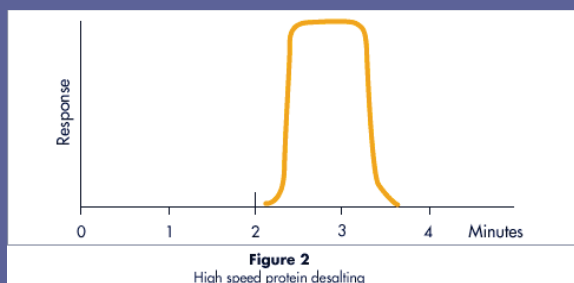
Jednotlivé frakce proteinů se detekují spektrofotometrem.

Rychlost průtoku proteinu je přímo úměrná velikosti molekuly

Rozlišení elučných křivek lze ovlivnit pouze účinností a správnou volbou molekulového síta

Odsolování (rychlejší alternativa k dialýze)

- ♦ Záznam průběhu odsolování



Parametry kolony

- ♦ Objem vzorku < 2 % objemu kolony!!!
- ♦ Celkový objem kolony $V_T = V_M + V_S - V_{GM}$
 - ♦ V_{GM} - objem gelové matrice
 - ♦ V_M - mrtvý objem (aplikace inertní látky na kolonu, Blue dextran - 2MDa), objem, co zaujímá mobilní fáze ($V_M = MR$ pro inert)
 - ♦ V_S - objem stacionární fáze
- ♦ $K_{av} = (V_R + V_M) / V_S$
 - ♦ $K_{av} \sim K_d$ distribuční koeficient
 - ♦ V_R - retenční objem (eluční objem)

DEXTRANOVÉ GELY

- ♦ Sephadex G-10, G-15 pro odsolování peptidů, AMK)
- ♦ Sephadex G-25, G-50 pro odsolování proteinů
- ♦ Sephadex G-75 až G-200 separace proteinů podle M_r do 600 kDa
- ♦ Exclusion limit
- ♦ Exclusion volume
- ♦ Matrice hydroxypropylované – LH -20 pro separaci TG, MK, Stab. objem v prostředí ethanolu, chloroformu

AGAROSOVÉ GELY

- ♦ Přečištěný agar (zbaven polysacharidů)
- ♦ Zesíťování 2,3-dibrompropanolem, epichlorhydrinem
- ♦ CL (cross-linked) – stupeň zesíťování
- ♦ Sepharose CL-2B

POLYAKRYLAMIDOVÉ GELY

- kopolymerací akrylamidu s N,N-methylenbisakrylamidu
- Bio-Gel P-2
- BioBeads S-X1 – na bázi polystyrenu (vhodné pro lipofilní polymery a velké organické látky v organických rozpouštědlech)

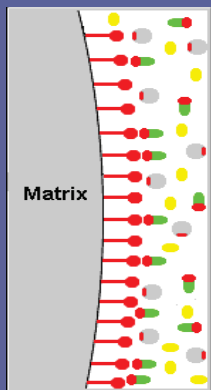
Využití SEC (GPC) v praxi

- ♦ Skupinová separace (odsolení, odstranění extrakčního činidla, detergentu, NML od ostatních, pro labilní proteiny (x dialýza))
- ♦ Frakcionace (purifikační metoda) rozdělení látek podle M_r
- ♦ Stanovení molekulové hmotnosti
- ♦ Určení distribuce biopolymerů a syntetických polymerů
- ♦ Analýza a monitorování vazby ligandu na biopolymer

Hydrofóbní chromatografie (HIC)

- ♦ Hydrophobic interaction chromatography
- ♦ adsorpční chromatografie (hydrofóbní povrch)
- ♦ Separace na nepolární (obrácené) fázi ~ RP-LC
- ♦ Nosiče pro HIC jsou méně hydrofóbní než pro RP-LC – lze tak použít jemné eluční podmínky s cílem zachovat biologickou aktivitu separované látky
- ♦ vhodná pro biopolymery
- ♦ ⊖ malá selektivita (separace látek na základě jejich rozdílné hydrofobicity)
- ♦ ⊕ dostatečná kapacita

Princip separace HIC

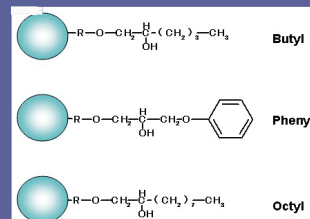


- Hydrophobic groups attached to the matrix.
- Solute molecule with prominent hydrophobic site. Strongly bound.
- Solute molecule with weakly interacting hydrophobic site.
- Low hydrophobicity solute molecule. Not bound.

- sorpce molekul „zdánlivě“ hydrofilních proteinů na nosič s hydrofóbními klastry
- eluce potlačením hydrofóbních interakcí (snížením iontové síly, přidavkem org. rozpouštědla, detergentu)
- nebezpečí denaturace proteinu (v případě silné vazby)
- interakci podporuje vysoká iontová síla mobilní fáze

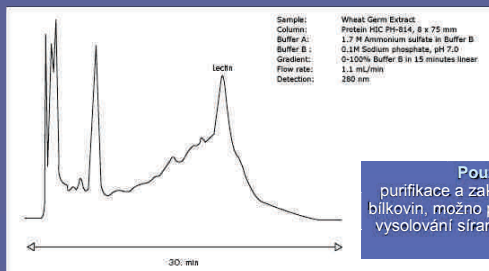
Nosiče pro HIC

- ♦ Matrice methakrylátové (silně hydrofóbní)
- ♦ Matrice polysacharidové (spíše hydrofilní pro hydrofilní proteiny s hydrofóbními kapsami)
- ♦ Phenyl, Octyl, Butyl Sepharose Fast Flow (FF)
- ♦ Butyl + Methakrylátová báze
- ♦ HEMA-co-EDMA
- ♦ Sepharon HEMA



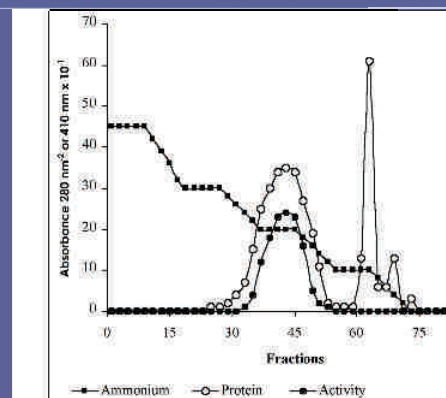
Hydrofóbní chromatografie

- ♦ Stacionární fáze – -C₈, -fenyl
- ♦ Mobilní fáze – vodné roztoky s vysokou koncentrací solí (např. 1,7 M (NH₄)₂SO₄)
- ♦ Eluce – snižováním iontové síly



Použití
purifikace a zakonzentrování bílkovin, možno použít přímo po vysolování síranem amonným

Hydrophobic interaction chromatography of β -glucosidase from the digestive juice of the palm on Phenyl-Sepharose CL-6B.



Co to je HILIC chromatography? HIC x HILIC

- ♦ Hydrofilní interakční chromatografie
- ♦ (Hydrophilic interaction chromatography)
- ♦ pro velmi polární a hydrofilní látky (x RP-LC) – polární báze, kyseliny, AMK, peptidy, sacharidy
- ♦ Nízké pracovní tlaky, vysoké průtoky
- ♦ Dobrá symetrie pík polárních látek
- ♦ Rychlá eluce hydrofóbních komponent
- ♦ Stacionární fáze – velmi polární – silikagel, vázané polární fáze
- ♦ Mobilní fáze – jako v RP-LC, voda, pufr, organická rozpouštědla
- ♦ Retence – čím vyšší obsah organické složky, tím větší retence

Základní zásady purifikačních kroků

- ♦ Na začátek zařadit metody s vysokou kapacitou a malým výtěžkem a rozlišením → velké množství levného vstupního materiálu
- ♦ Později metody s vysokým rozlišením a vyšším výtěžkem, kapacita méně významná → ve vzorku již investovaná práce, množství cílového proteinu je menší
- ♦ Pokud možno řadit metody za sebou racionálně, bez nutnosti mezikroků (např. dialýza nebo ultrafiltrace → možné snížení výtěžku díky ztrátám)
- ♦ Jednotlivé separační metody pokud možno neopakovat
- ♦ Čím méně kroků, tím větší výtěžnost proteinu, polysacharidu!!

Praktické příklady

- ♦ Srážení síranem amonným (vysoká koncentrace soli ve vzorku) → chromatografie s hydrofóbní interakcí
- ♦ Ionexová chromatografie (eluze vysokou iontovou silou) → chromatografie s hydrofóbní interakcí
- ♦ Gelová chromatografie se používá na konci celé purifikační sekvence (odstranění fragmentů a komplexů)

NEVHODNÉ

Srážení síranem amonným a ionexová chromatografie (nutno zařadit odsolovací krok → dialýza, ultrafiltrace)

Sledování průběhu separace

Metoda	Celková bílkovina	Celková aktivita	Specifická aktivita	Přečištění	Výtěžek
extrakt	100	100	1	-	100 %
HIC	50	99	1.99	1.99	99 %
IEX	25	75	3	3.0	75 %

Ultrafiltrace, centrifugace a dialýza

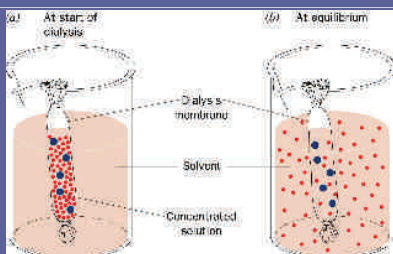
Separací metody založené na rozdílné velikosti molekul

Membránové separační metody

- ♦ Využití polopropustných membrán, které umožňují průchod malých molekul
- ♦ Membránová filtrace (ultrafiltrace) → rozdělení molekul z roztoku na základě jejich velikosti; zakonzentrování proteinů, odstranění nízkomolekulárních látek (např. solí). Probíhá za vyššího tlaku
- ♦ Dialýza → difuze nízkomolekulárních látek membránou; oddělením solí po vysolování bílkovin

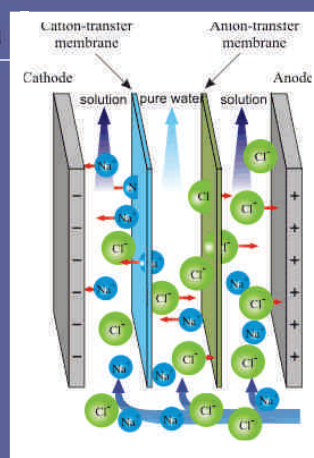
DIALÝZA – odstranění nízkomolekulárních látek

Dialyzační střívka
(Cut off – limitní Mr)

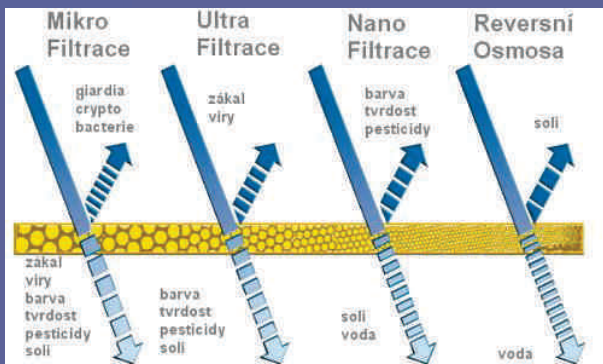


- ☞ Koncentrační gradient částic s povrchovým nábojem
- ☞ Propustnost membrány pro rozpuštěné látky
- ☞ Velikost povrchu membrány
- ☞ Pohyb částic < 1000 Da

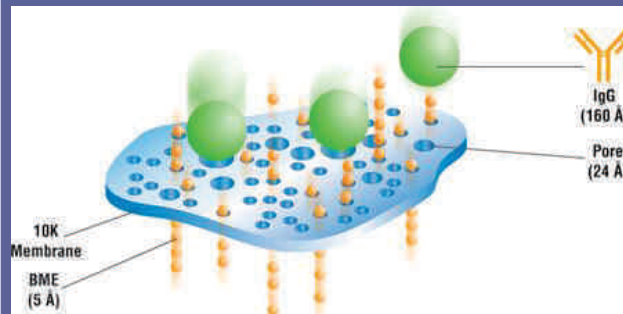
Elektrodialýza



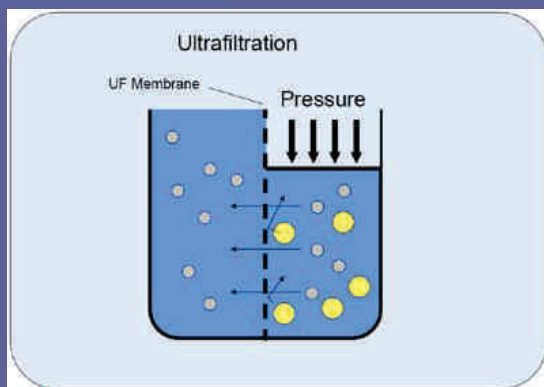
Filtrace



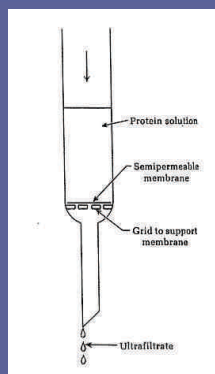
Membránová filtrace



ULTRAFILTRACE

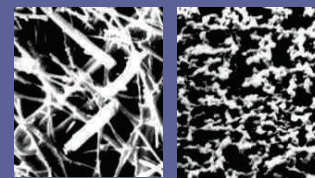


Membránová filtrace (ultrafiltrace)



speciální membrány s definovanou velikostí pórů - tzv. cut-off limit

Afinitní ultrafiltrace – funkcionizace povrchu membrán ligandem



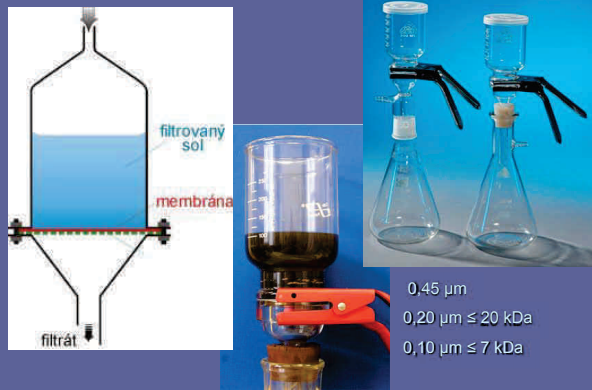
Membrány

- ♦ Na základě chemického složení rozeznáváme membrány organické (polymerní) a anorganické. Starší generace **polymerních membrán** byla vyrobena na bázi přírodních polymerů (celulosa a její deriváty)
- ♦ **syntetické polymery**, např. polysulfon, polyamid, polyetherimid, polyethersulfon, polyvinylidenfluorid, polytetrafluorethylen, které jsou chemicky a fyzikálně stabilnější (odolnost vůči organickým rozpouštědlům, pH, teplotě)
- ♦ Poslední generací jsou **anorganické (keramické) membrány** vyrobené z oxidů hliníku, zirkonu a titánu, silikátových materiálů, karbidů, zeolitů apod., které vynikají extrémní pevností a odolností

Typy membrán

- ♦ a) **isotropní membrána** – homogenní vrstva
- ♦ b) **asymetrická membrána** - aktivní vrstva (tloušťka < 1 μm)
- ♦ porézní nosná vrstva (~100 μm)
- ♦ c) **kompozitní membrána** - aktivní vrstva (tloušťka < 1 μm)
- ♦ porézní vrstva, nosná podložka (100 - 200 μm)
- ♦ selektivita, propustnost
- ♦ ionaktivní membrána, afinitní membrána
- ♦ jednosměrná filtrace, příčný tok
- ♦ zanášení membrány („fouling“ efekt)
- ♦ chemické nebo fyzikální metody regenerace
- ♦ sterilace, životnost membrány

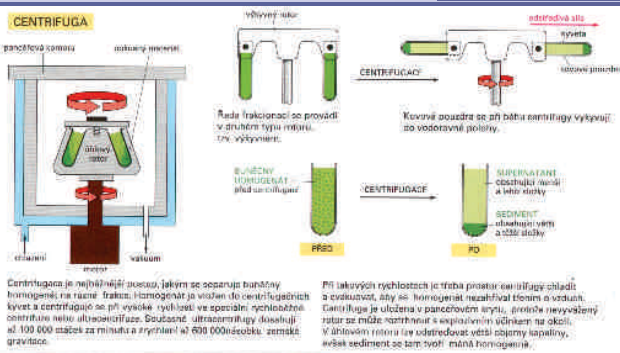
Filtrace – membrány NC



Filtrace – membrány NC



Centrifuga – výkyvný a úhlový rotor



Ultracentrifugace

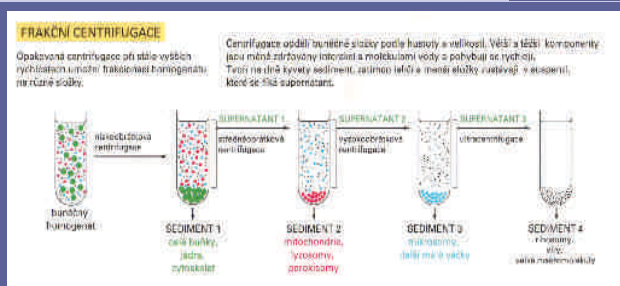
- Centrifugace se používá k oddělení hrubých směsí buněčných komponent.
- Při kvantifikaci rychlosti pohybu molekul v roztoku v centrifugačním poli používáme sedimentační koeficient (s) dle rovnice:

$$s = m(1 - vp)/f$$

kde m je hmotnost částice, v je parciální specifický objem (reciproká hodnota hustoty částice), p je hustota média, f frikční koeficient (závisí na tvaru molekuly)

- $(1 - vp)$ vyjadřuje schopnost prostředí nadnášet částice
- Sedimentační koeficient se obvykle vyjadřuje v jednotkách: Svedberg (S); $S = 10^{-13}$ s.
- Čím je hodnota S nižší, tím pomaleji částice sedimentuje.
- Na tomto principu je založena gradientová nebo jinak zonální centrifugace vedoucí k oddělení částic na základě hodnoty jejich sedimentačních koeficientů.

Frakční centrifugace, ultracentrifugace



Rychlostní gradientová centrifugace

