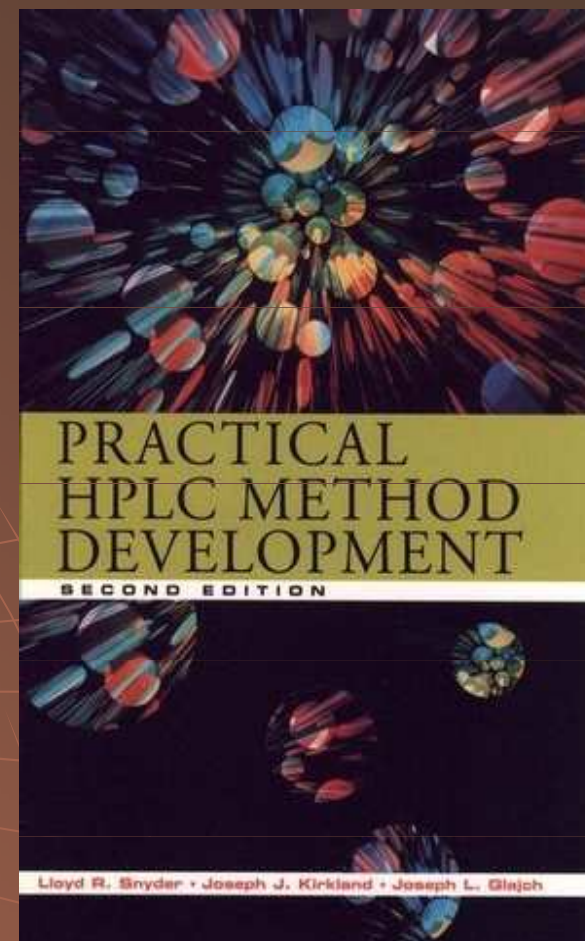
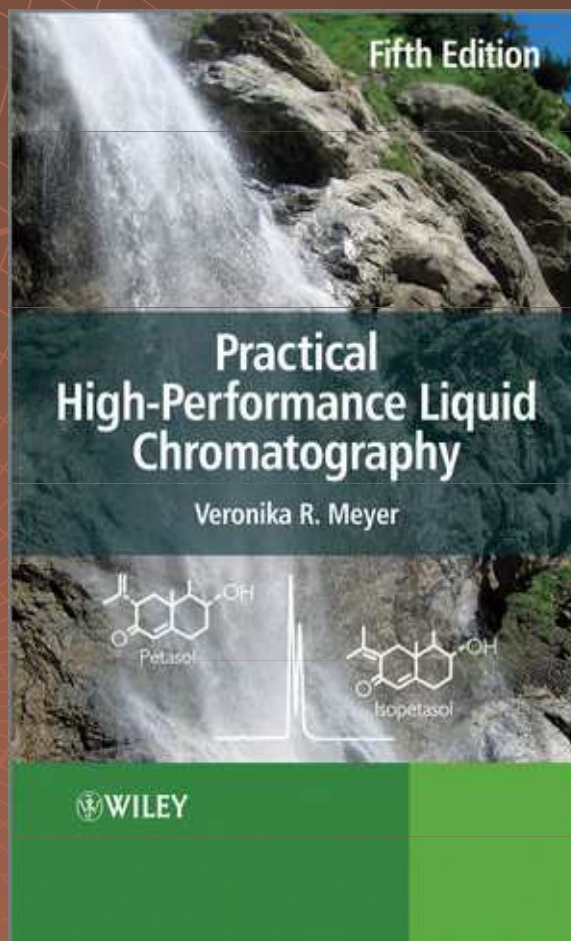
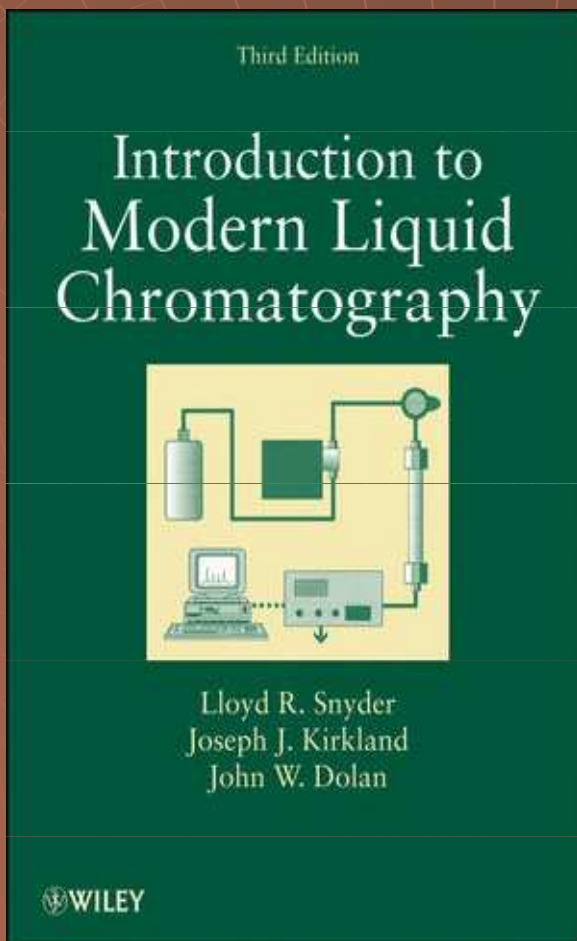


Chromatografické metody I.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Literatura



Historie chromatografie

- ◆ 1906 Tswett (Cvět)

Poprvé použit pojem chromatografie, chromatogram z řeckých slov χηρομα (barva) a γραφειν (psáti).

- ◆ 1931 Kuhn a Lederer

znovu objevení chromatografie

- ◆ 1940-49 Martin Syngde

Papírová a tenkovrstvá chromatografie

Historie chromatografie

- ◆ 1950 Aminokyselinový analyzátor

- ◆ 1950-1960

Sober, Peterson a Gutter zavedli používání médií na bázi celulosy (iontoměniče).

Porath a Flodin poprvé použili média na bázi dextransu pro gelovou filtraci.

Hjerten popsal použití separačních médií na bázi agarosy.

Historie chromatografie

- ◆ 1970-79 Halasz, Horvath, Kirkland
HPLC ("High Performance Liquid Chromatography")

1980-1989 Pharmacia

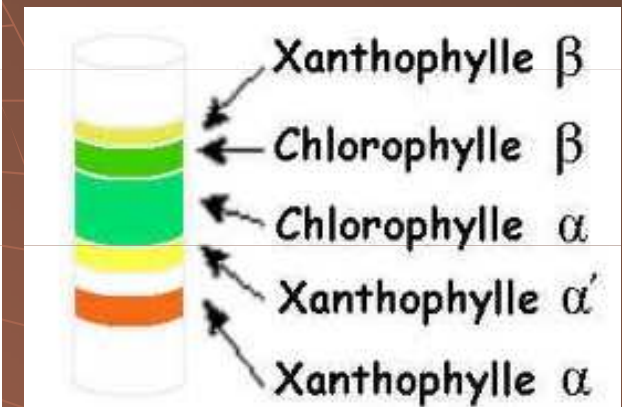
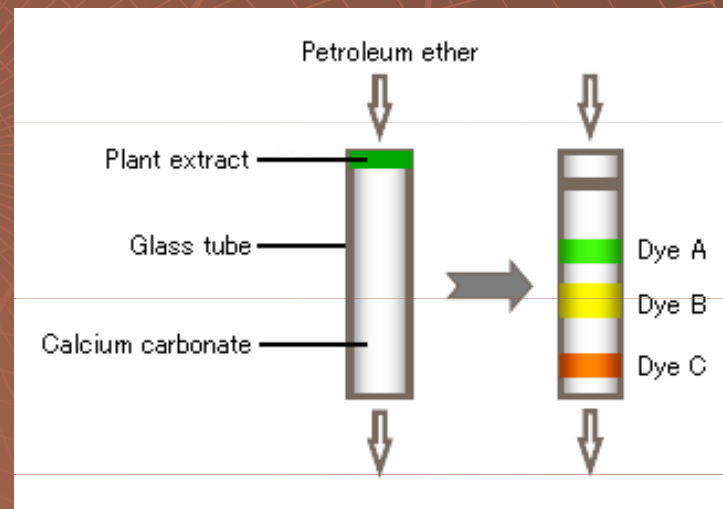
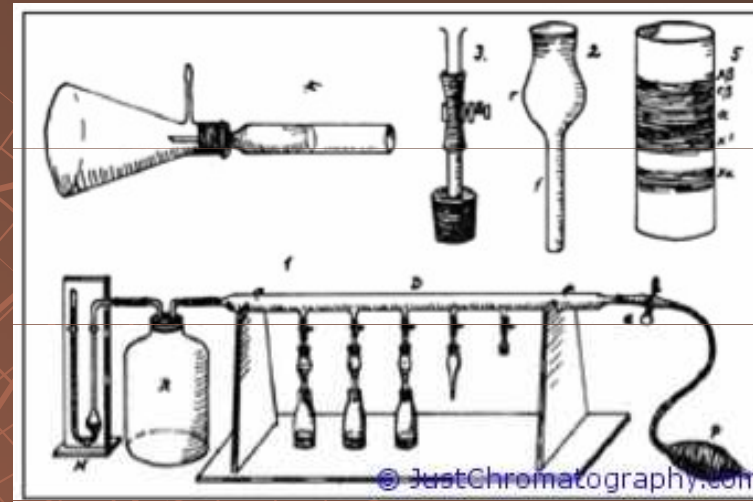
Nová média s vyšší mechanickou odolností (CL-agarosa, "cross-linked") umožňují použití vyšších tlaků pro separaci; nový střednětlaký systém "Fast Protein Liquid Chromatography" (FPLC)

- ◆ 2004 Waters

UPLC ("Ultra Performance Liquid Chromatography")

Mikhail Semyonovich Tsvet

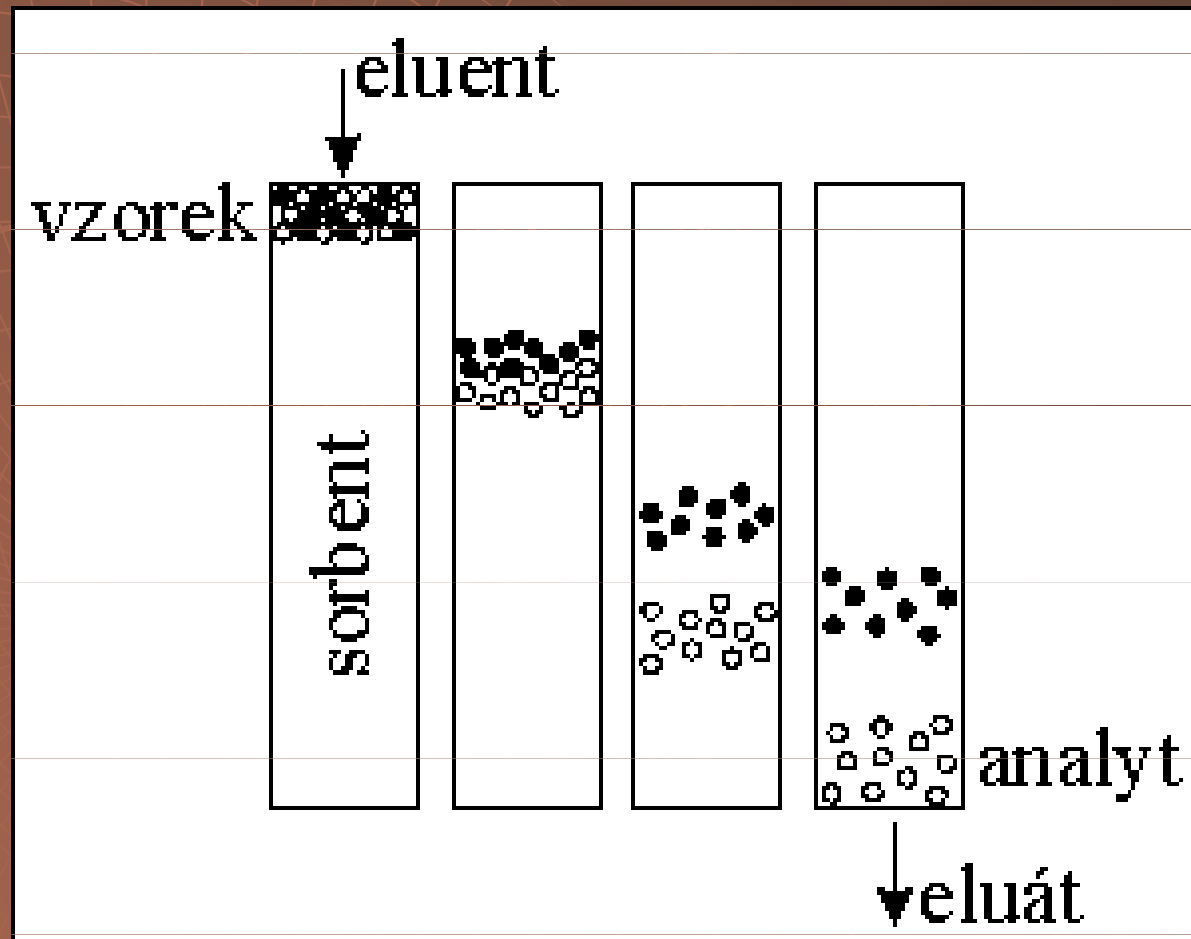
Chromatographia 1906



Podstata

„Při chromatografii dochází k neustálému vytváření rovnovážných stavů separované látky mezi dvě fáze – stacionární a mobilní.“

Chromatografie



Chromatografie

- ◆ Mobilní fáze - kapalina – LC
plyn – GC
- ◆ Eluce - Izokratická – stejná eluční síla
Gradientová – rostoucí eluční síla
- ◆ Použití - analytická
preparativní

Kapalinová chromatografie LC

- ◆ Mobilní fáze - kapalina
- ◆ Stacionární fáze - pevná fáze,
kapalina

Provedení LC

- ◆ Papírová PC
- ◆ Tenkovrstvá TLC
- ◆ Kolonová CC

The background features a faint, light-brown grid pattern typical of a chromatogram. The grid consists of concentric semi-circular arcs and radial lines. A hand-drawn, slightly irregular line in a similar color starts from the left and extends towards the right, crossing several of the grid lines. A small, solid red dot is placed on this line, roughly in the middle of the horizontal span of the text.

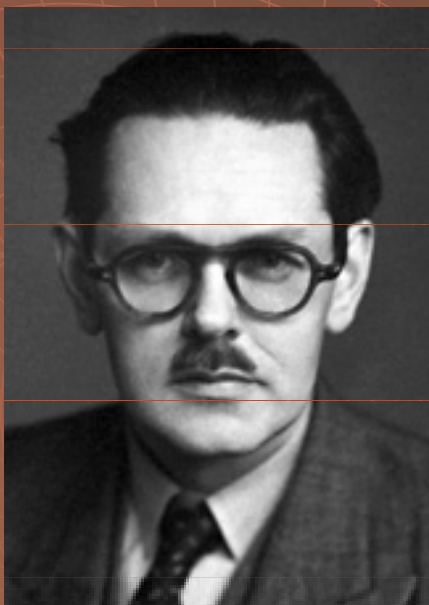
Teoretické aspekty chromatografie

The background features a dark brown gradient with a faint, light brown grid pattern overlaid on a spherical shape, resembling a globe or a dome. The grid consists of concentric circles and radial lines, creating a perspective effect.

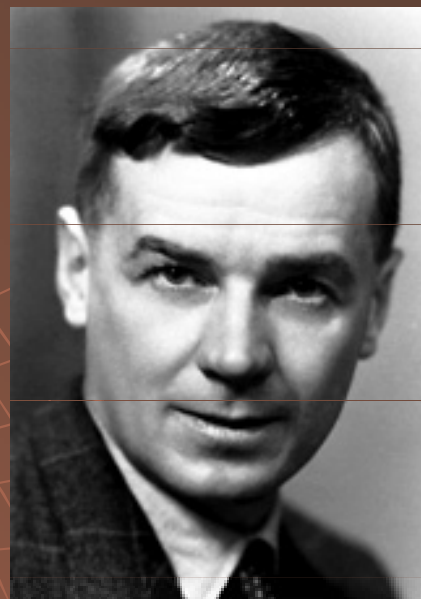
Teorie „Ideální lineární chromatografie“

Martin, Synge

Martin



Synge



Nobelova cena za chemii
1952

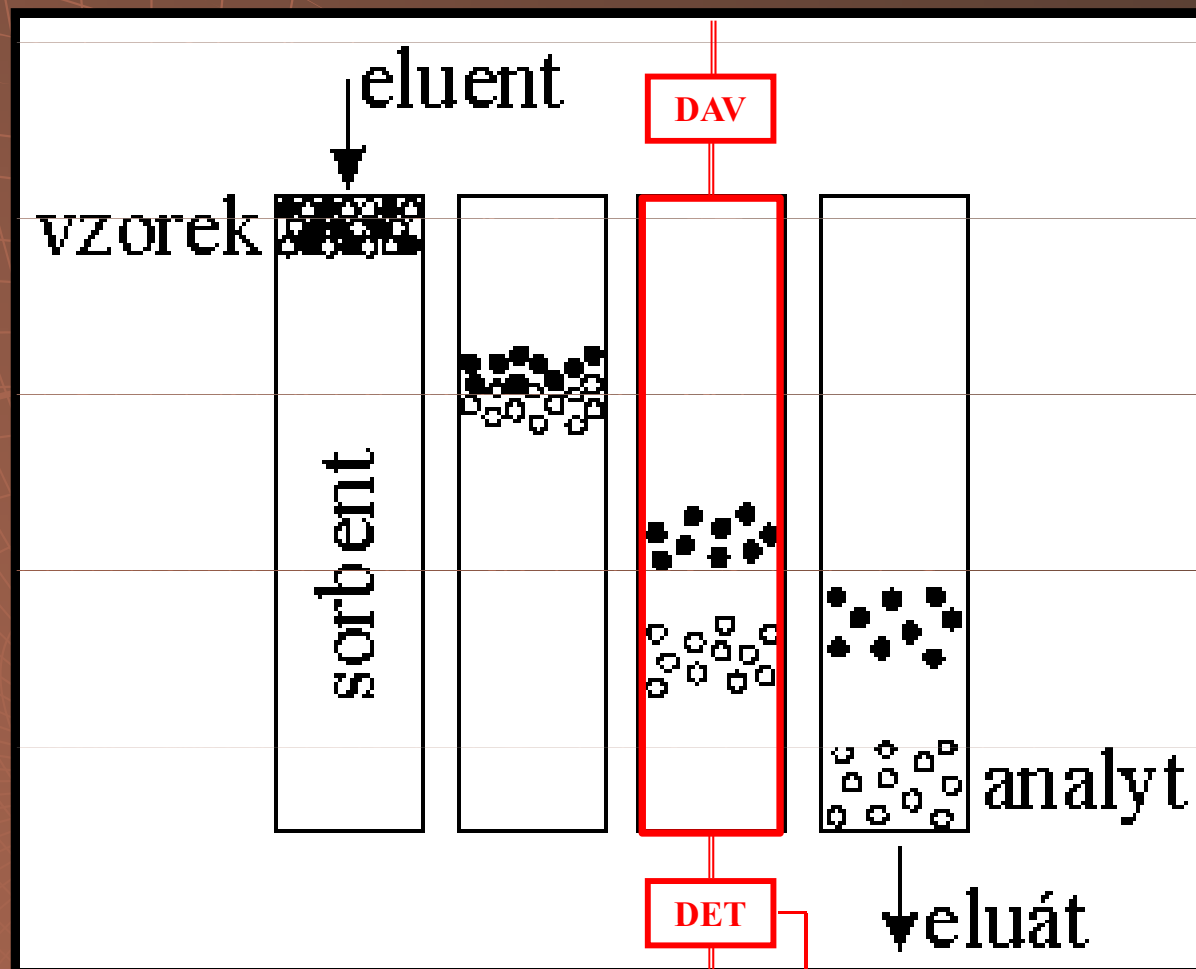
Teorie

„Ideální lineární chromatografie“

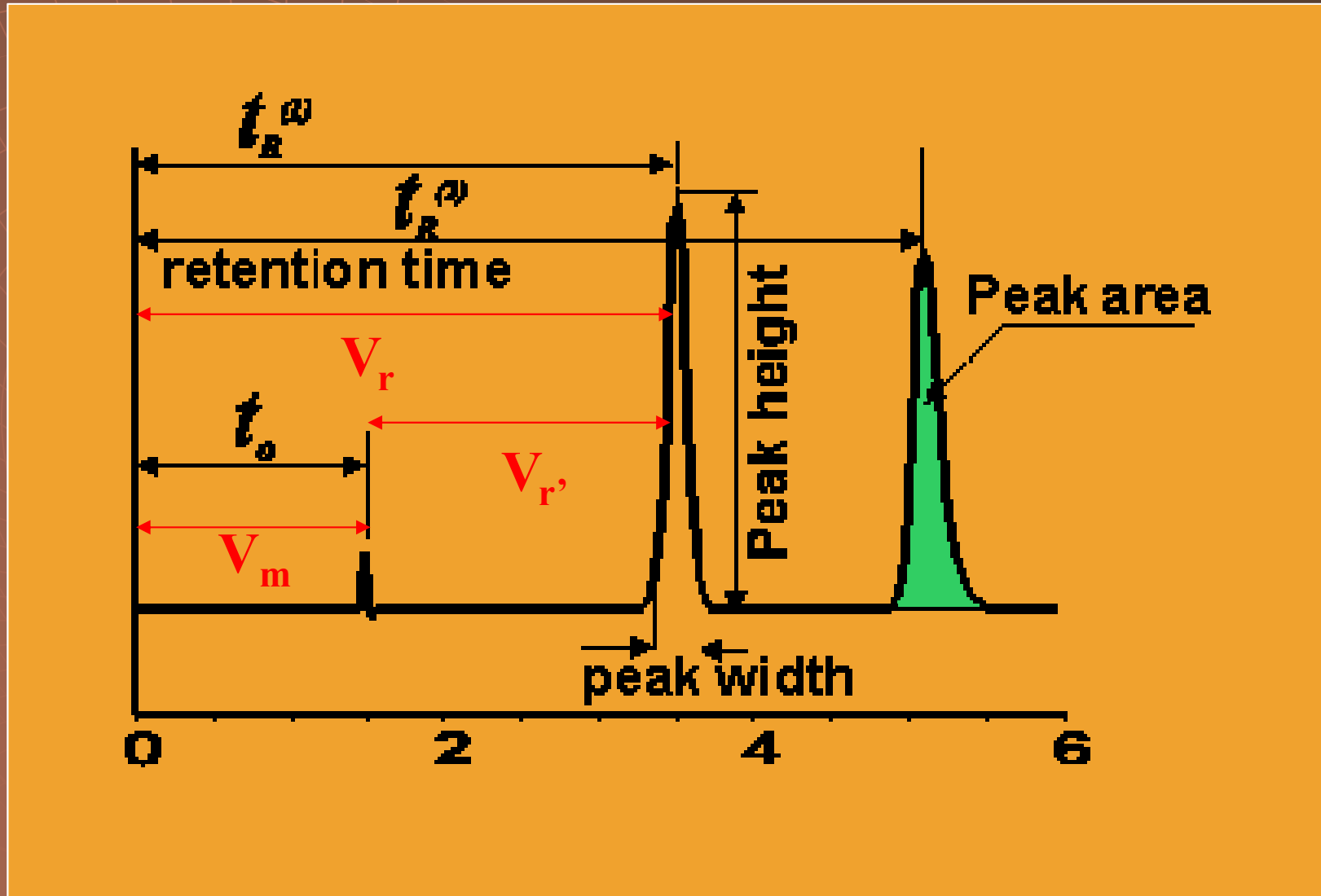
GC

1. Nekonečně rychlé ustavení rovnováh
2. Pístový tok mobilní fáze
3. Nulová difuze
4. Lineární sorpční isoterma

Chromatografie



Chromatogram



Retenční – eluční čas t_r

- ◆ Doba od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky

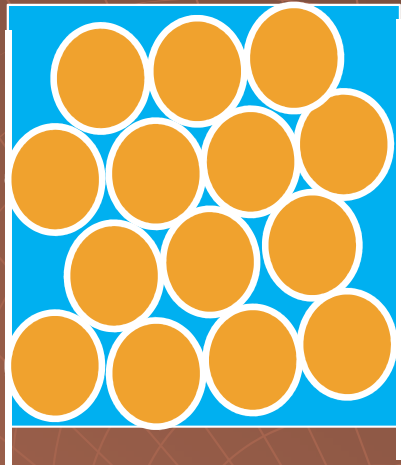
Retenční – eluční objem V_r

- Objem mobilní fáze proteklý od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky

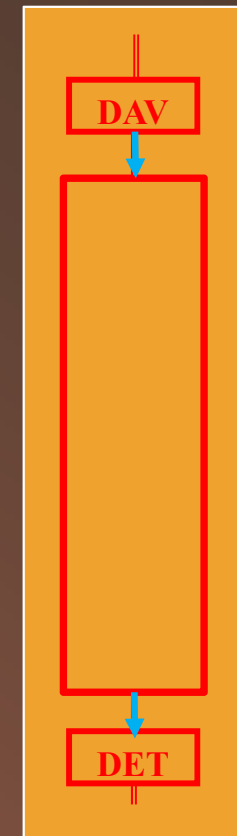
$$V_r = t_r \cdot F_m$$

F_m – objemová rychlost mobilní fáze

Mrtvý objem



$$V_r = V_m + V_{r'}$$



V_r – zdánlivý retenční objem

$V_{r'}$ – redukovaný (skutečný) retenční objem

V_m – mrtvý objem – mimokolonové příspěvky
+ mimočasticový objem kolony

Kapacitní faktor k'

$$k' = \frac{V_r - V_m}{V_m} = \frac{V_{r'}}{V_m} = K_D \cdot \frac{V_S}{V_M}$$

$$k' = 1 - 10$$

V_S – objem stacionární fáze

V_M – objem mobilní fáze

Distribuční koeficient

$$K_D = \frac{c_S}{c_M}$$

c_S – rovnovážná koncentrace látky ve stacionární fázi

c_M – rovnovážná koncentrace látky ve mobilní fázi

Selektivita

Retenční faktor α

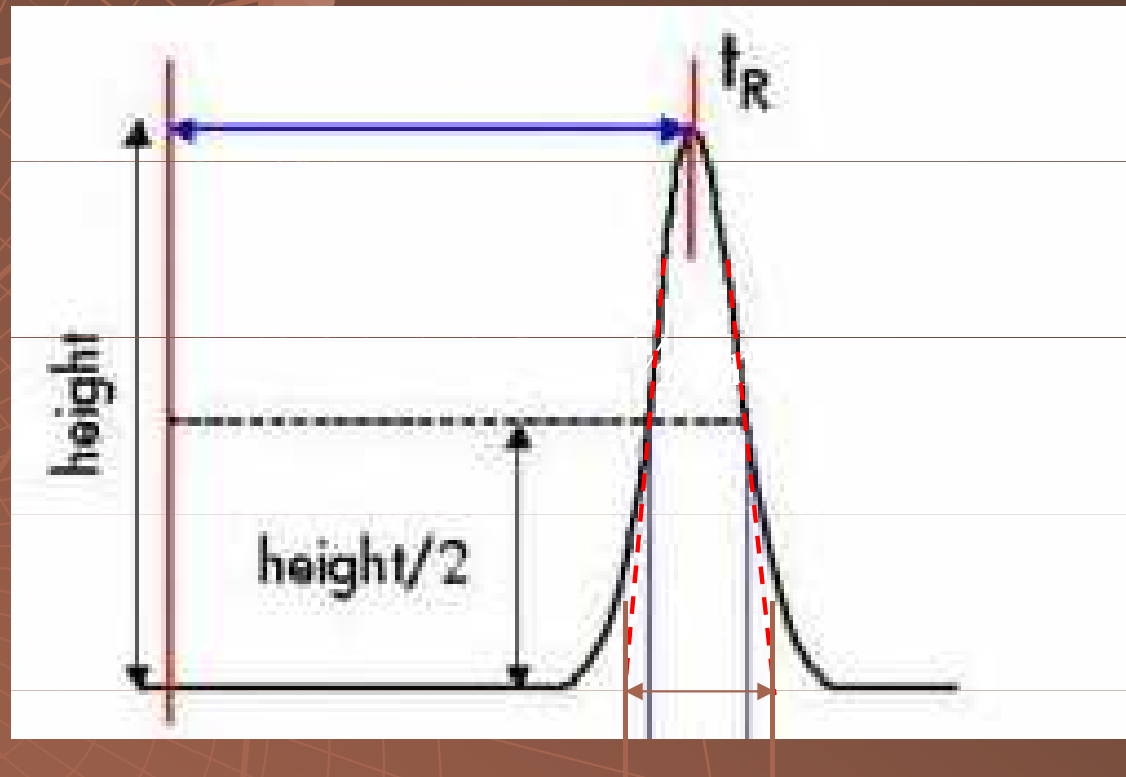
$$\alpha = \frac{V_{r2}}{V_{r1}} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Účinnost kolony (izokratická eluce)

počet teoretických pater N

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{Y_r} \right)^2$$

$$N = 5.545 \cdot \left(\frac{t_r}{1/2 Y_r} \right)^2$$

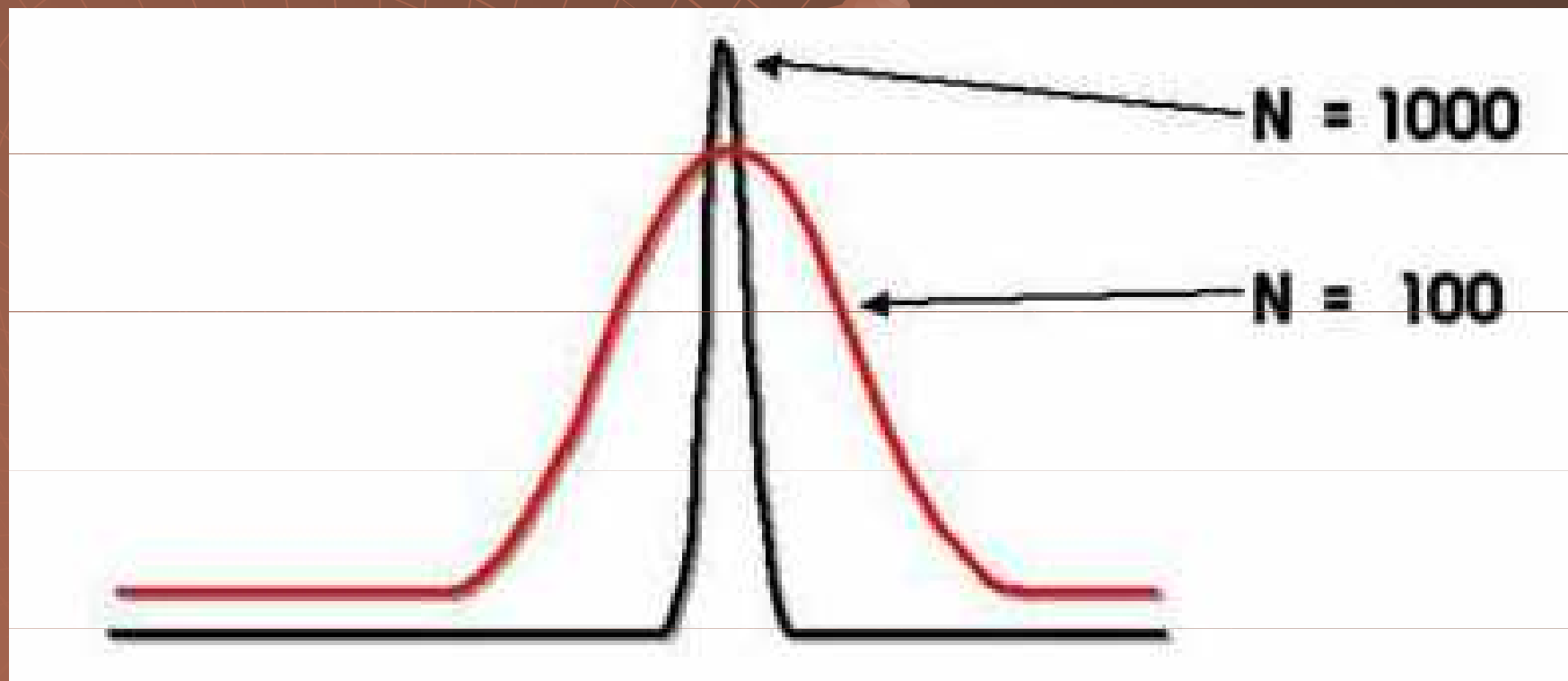


Účinnost kolony (izokratická eluce) výškový ekvivalent teoretického patra H

$$H = \frac{l}{N}$$

l – délka kolony

Účinnost kolony



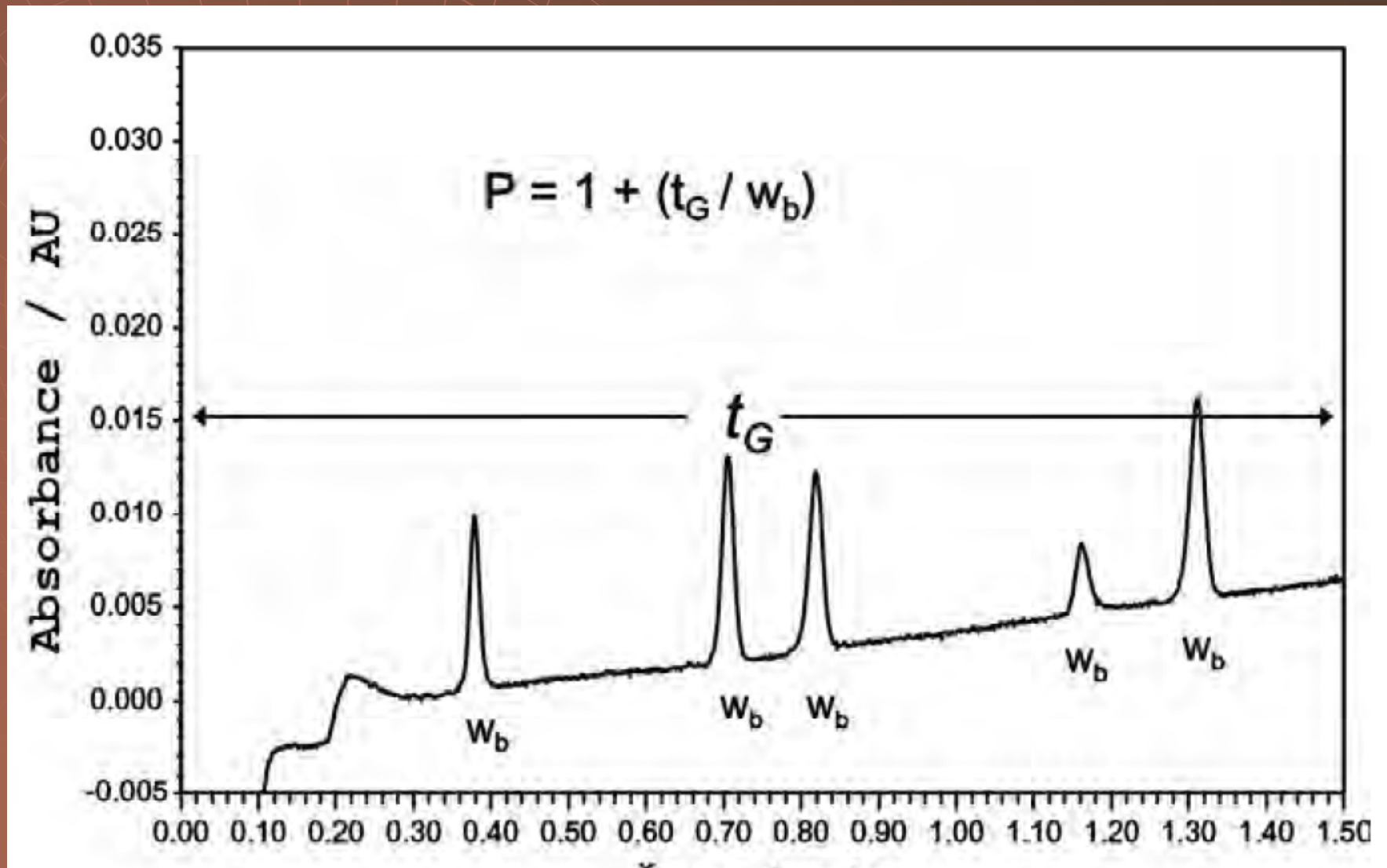
Účinnost kolony (gradientová eluce)

kapacita píku P

$$P = 1 + \frac{t_g}{(1/n) \sum_1^n w_b}$$

t_g – celková doba gradientu

Účinnost kolony (gradientová eluce) kapacita píku P

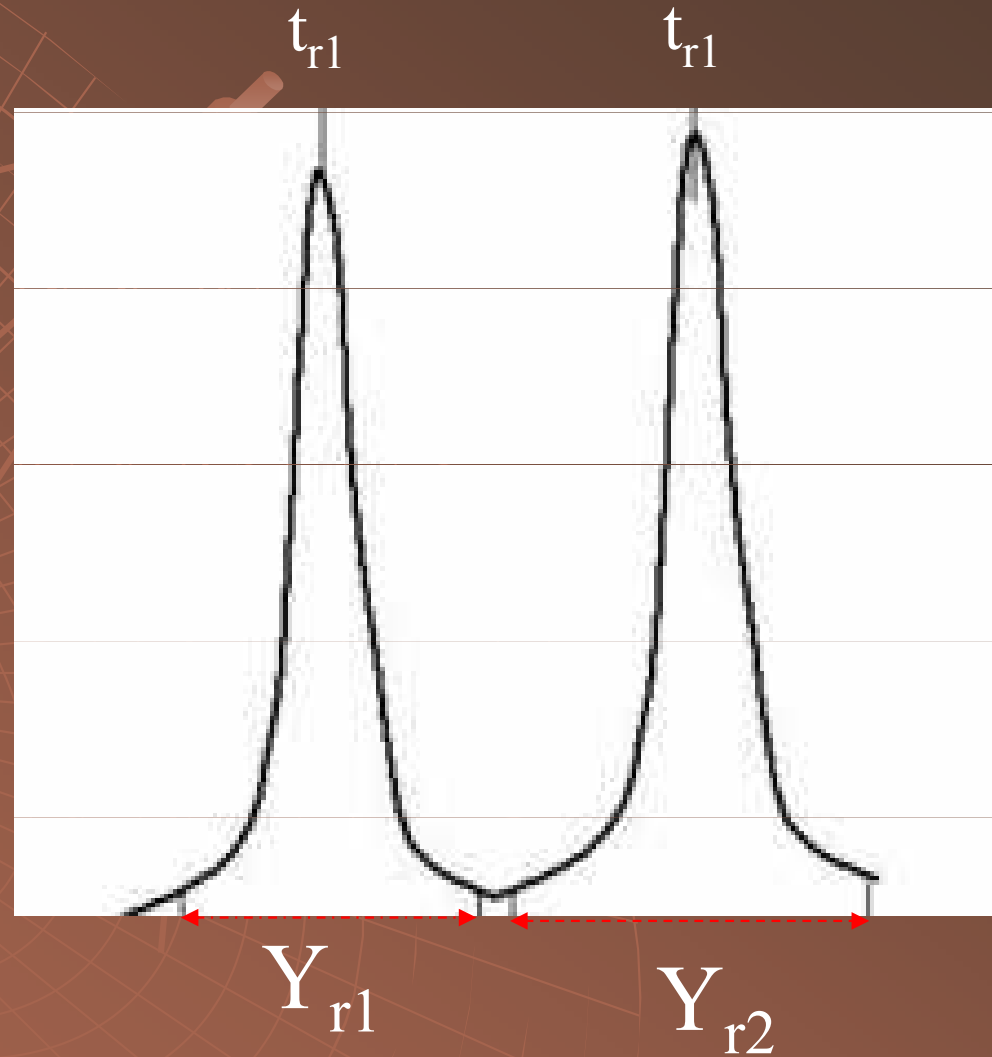


Rozlišení

$$R_{12} = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{Y_{r1} + Y_{r2}}$$

$R_{12}=1.5$ – nulové překrytí

$R_{12}=1.0$ – překrytí 2 %



Rozlišení

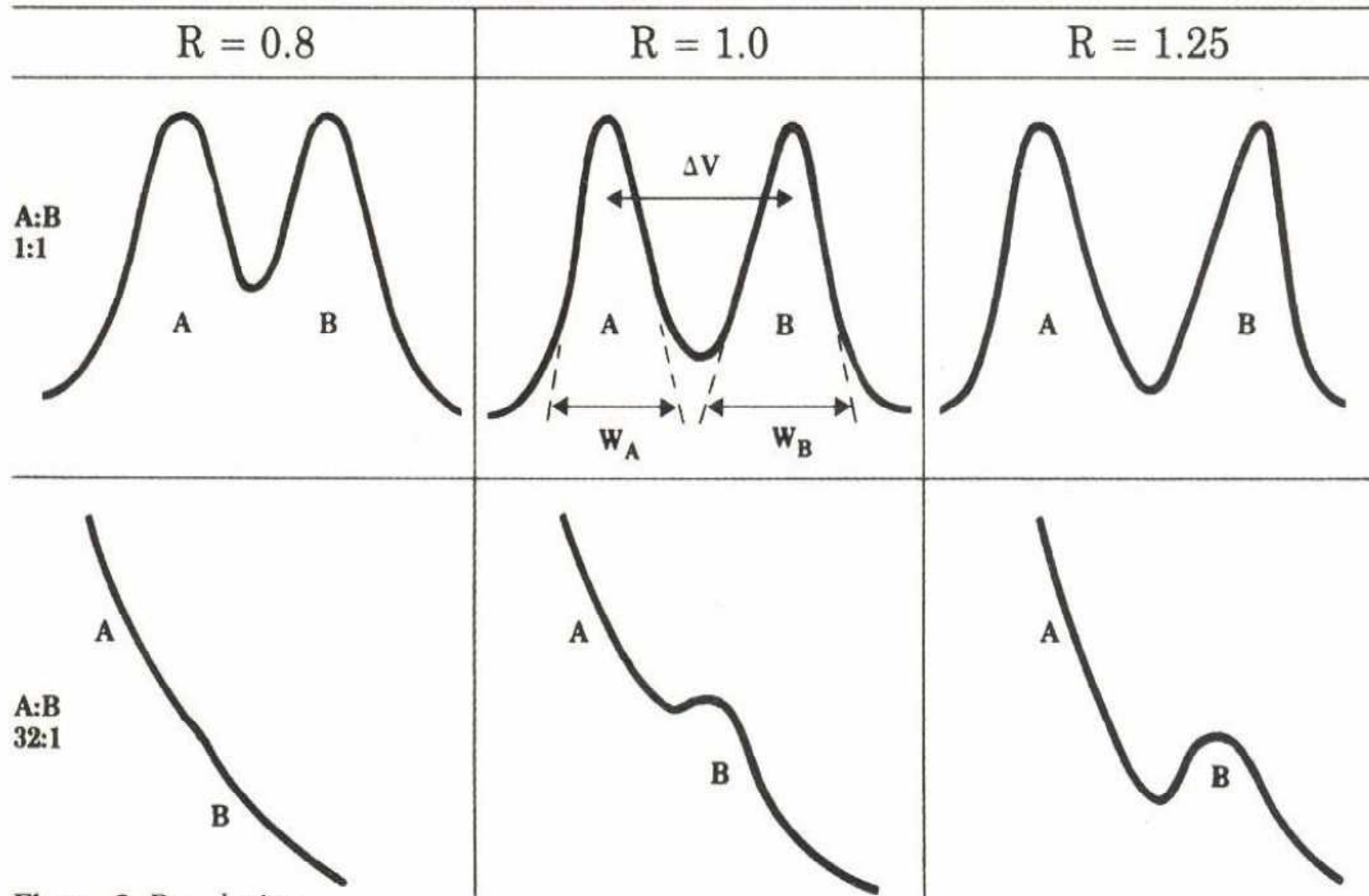


Figure 3. Resolution.

Vliv jednotlivých faktorů na rozlišení

$$R_{12} = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{1 + k'} \cdot \sqrt{N}$$

Selektivita

Kapacita

Účinnost

Vliv jednotlivých faktorů na rozlišení

- **faktor selektivity lze ovlivnit:**
 - změnou stacionární fáze
 - změnou mobilní fáze
 - současnou změnou obou fází
 - změnou rychlosti toku mobilní fáze

Vliv jednotlivých faktorů na rozlišení

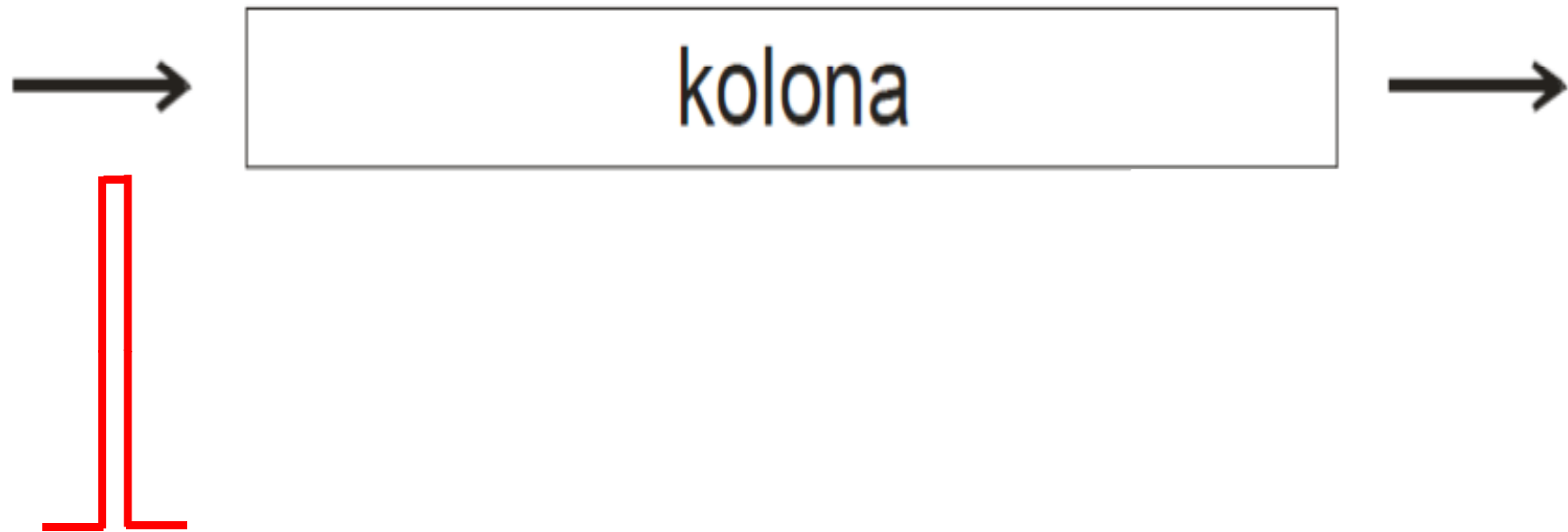
•faktor kapacity lze ovlivnit:

- množstvím stacionární fáze v koloně
- změnou stacionární nebo mobilní fáze
- změnou teploty kolony

Vliv jednotlivých faktorů na rozlišení

- faktor účinnosti lze ovlivnit:
 - délkou kolony
 - rychlostí průtoku mobilní fáze
 - velikostí částic sorbentu
 - teplotou, viskozitou mobilní i stacionární fáze

Vznik eluční křivky – peaku (píku)





„Dynamická difuzní teorie“

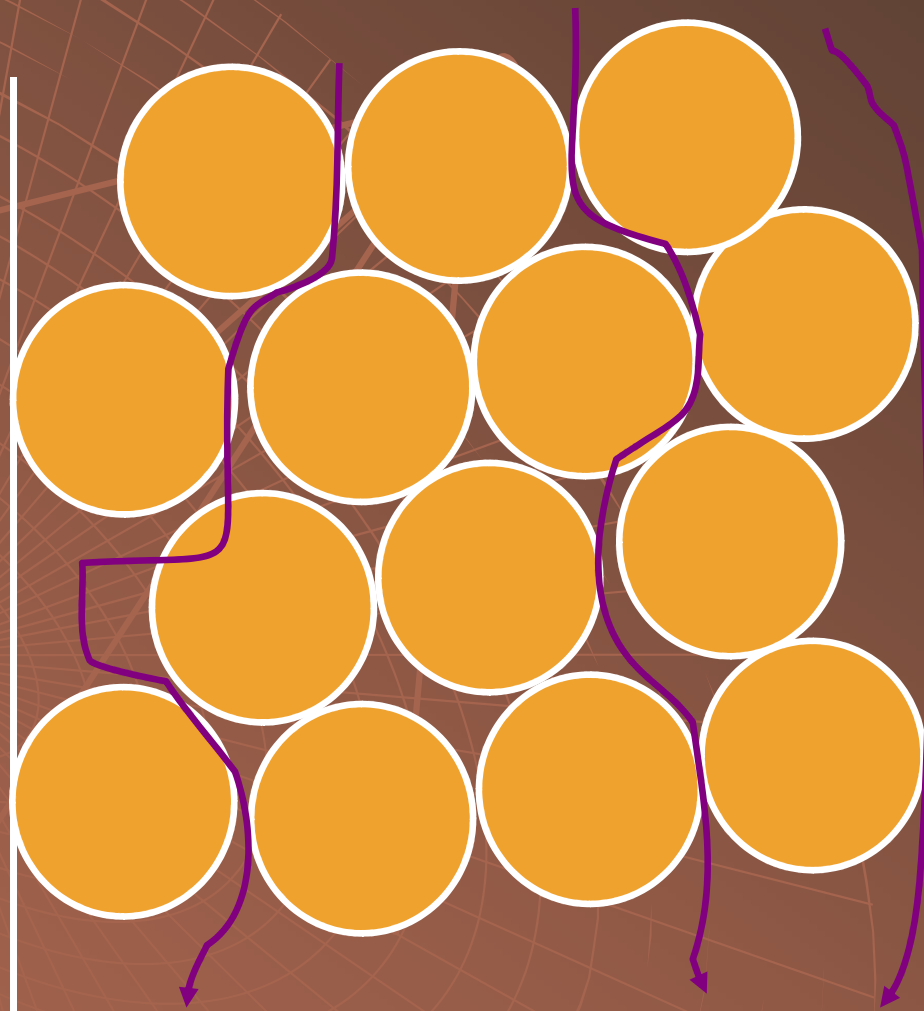
vliv rychlosti mobilní fáze na rozšiřování zón

Van Deemter

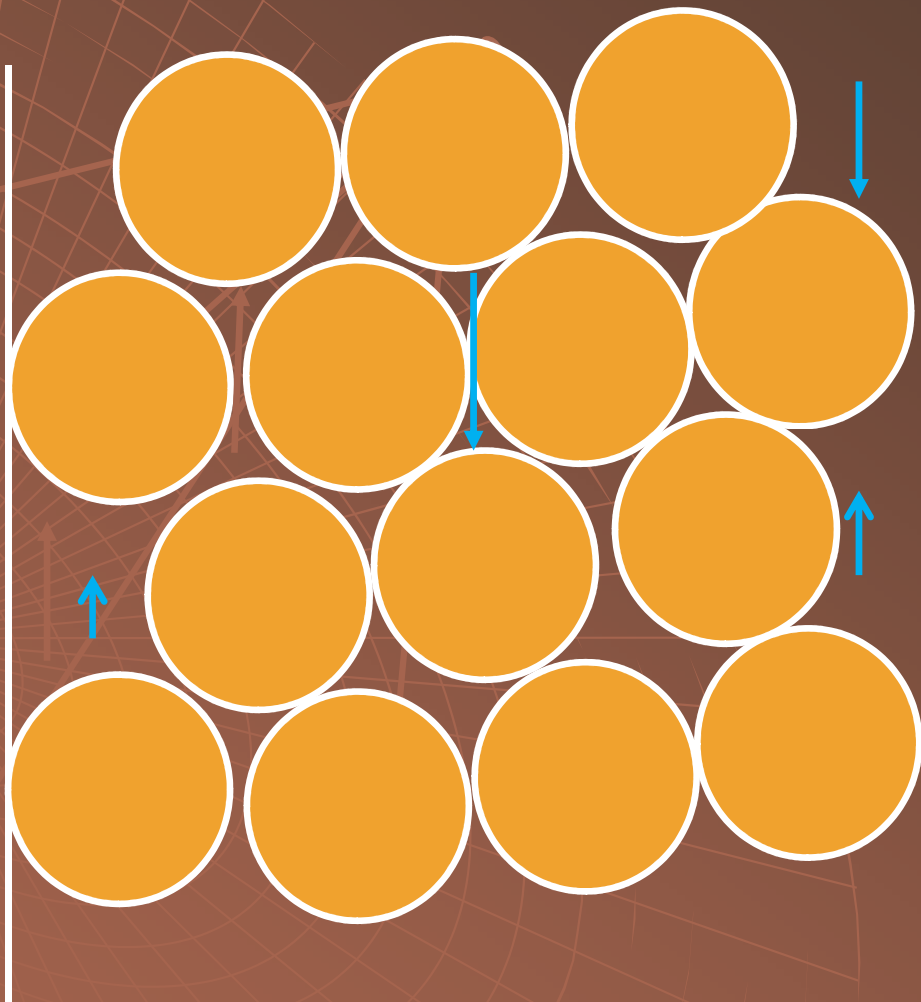
Van Deemterova difuzní teorie

- ◆ Difuze turbulentní
- ◆ Difuze molekulová
- ◆ Odpor proti převodu hmoty

Difuze turbulentní A



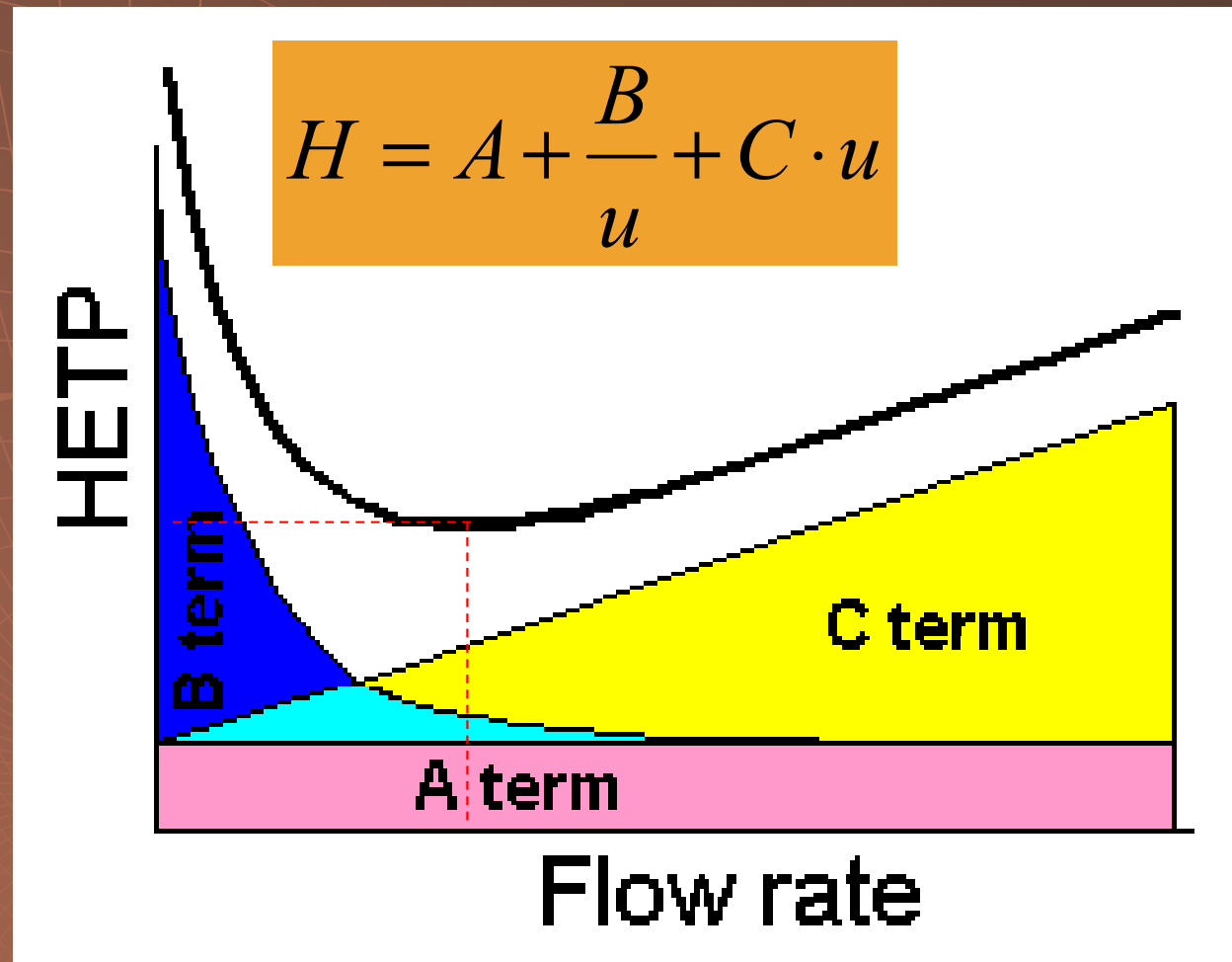
Difuse molekulová B



Odpor proti převodu hmoty **C**



Van Deemterova rovnice



- minimum křivky \approx optimální průtoková rychlost
- daná kolona vykazuje největší účinnost, nejméně rozšiřuje zóny analytů

Síly a efekty využívané při separaci

◆ Iontové síly

Silné elektrostatické interakce mezi stacionární a analyzovanou látkou – **ionexová chromatografie**

◆ Polární síly

interakce dipólů a protondonorní, resp. protonakceptorní vlastnosti (tvorba vodíkových můstků) separovaných látek, mobilní a stacionární fáze – **adsorpční chromatografie**

Síly a efekty využívané při separaci

- ◆ **Nepolární síly (disperzní, van der Waalsovy)**

Nejslabší, tyto interakce se vyskytují u látek, které nejsou permanentní dipóly – **adsorpční, reverzně fázová a hydrofobní chromatografie**

- ◆ **Efekt velikosti molekul**

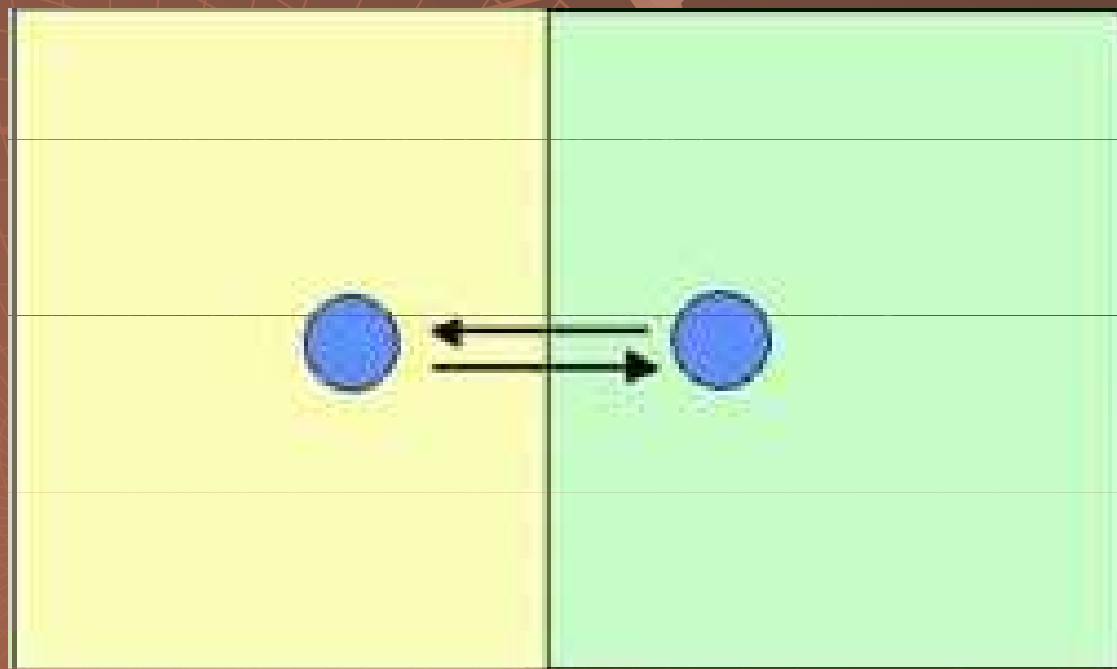
Rozdíly ve velikosti a tvaru molekul – **gelová permeační chromatografie**

Síly a efekty využívané při separaci

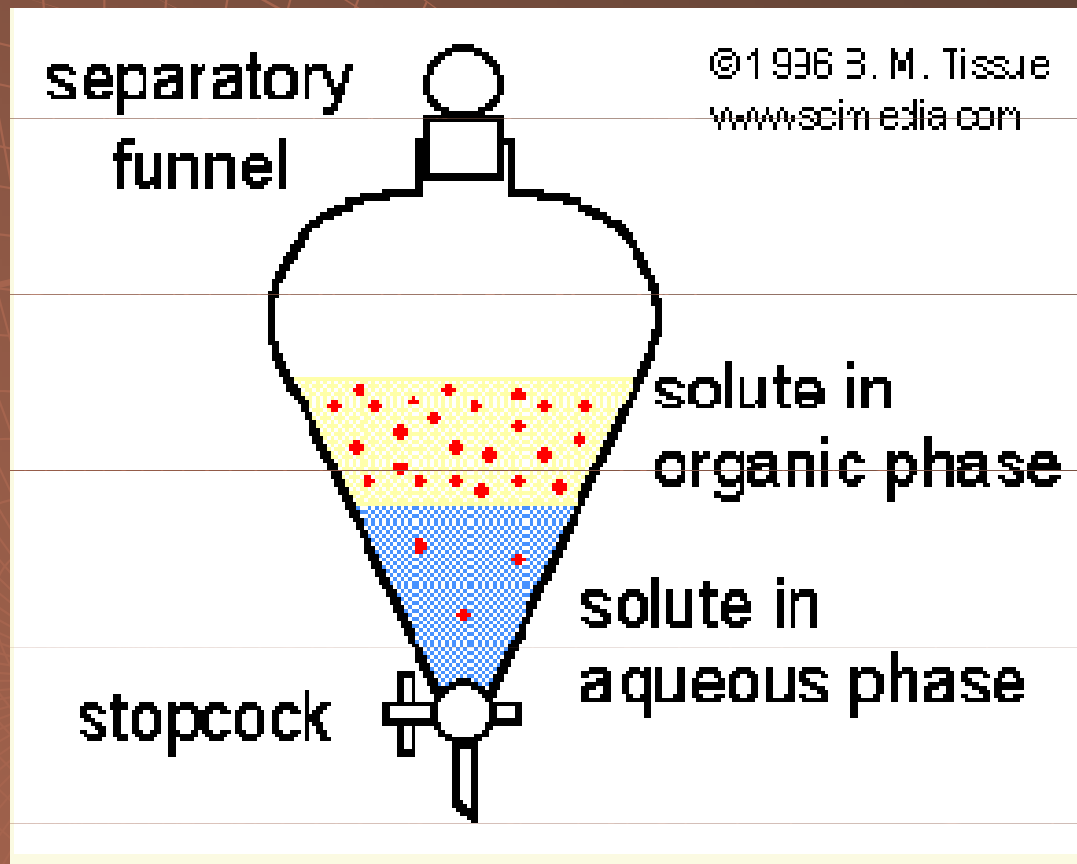
- ◆ Sterické interakce

Komplexní specifická interakce ligand biomakromolekula kombinující všechny výše uvedené interakce a efekty – **afinitní chromatografie**

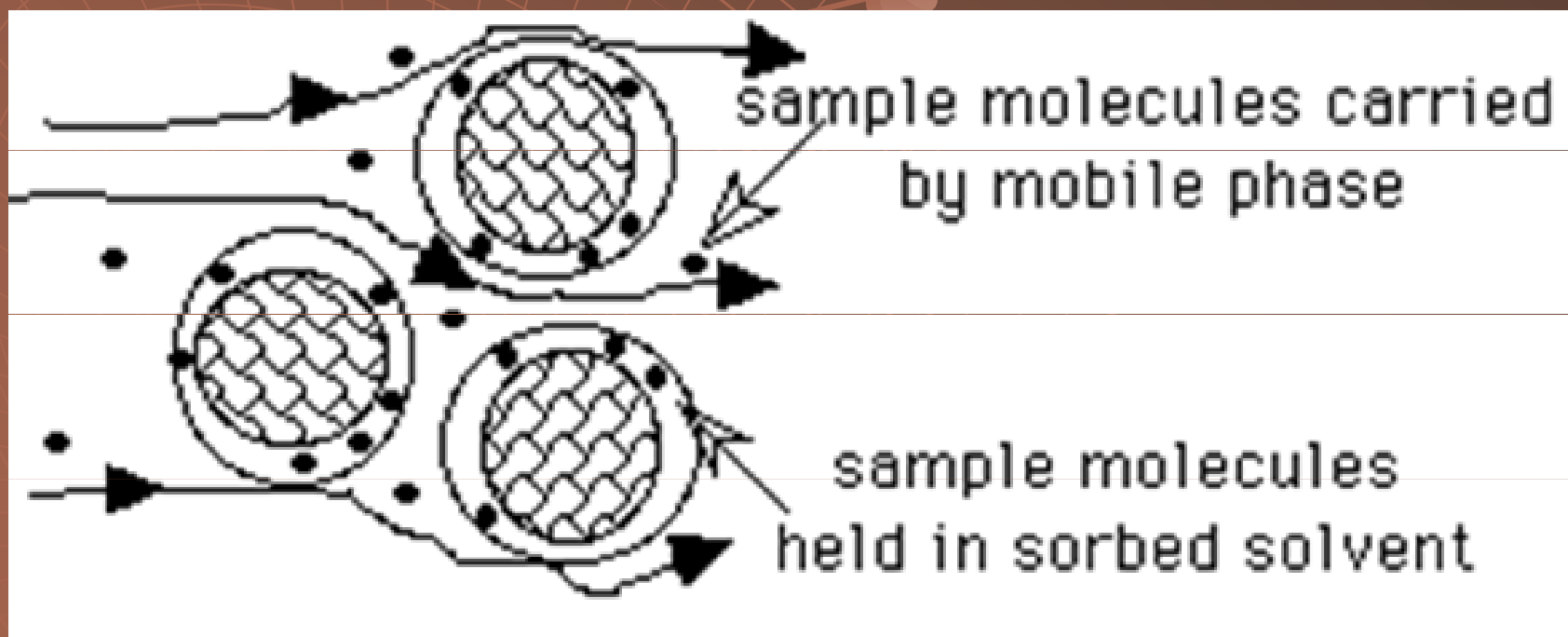
Rozdělovací chromatografie



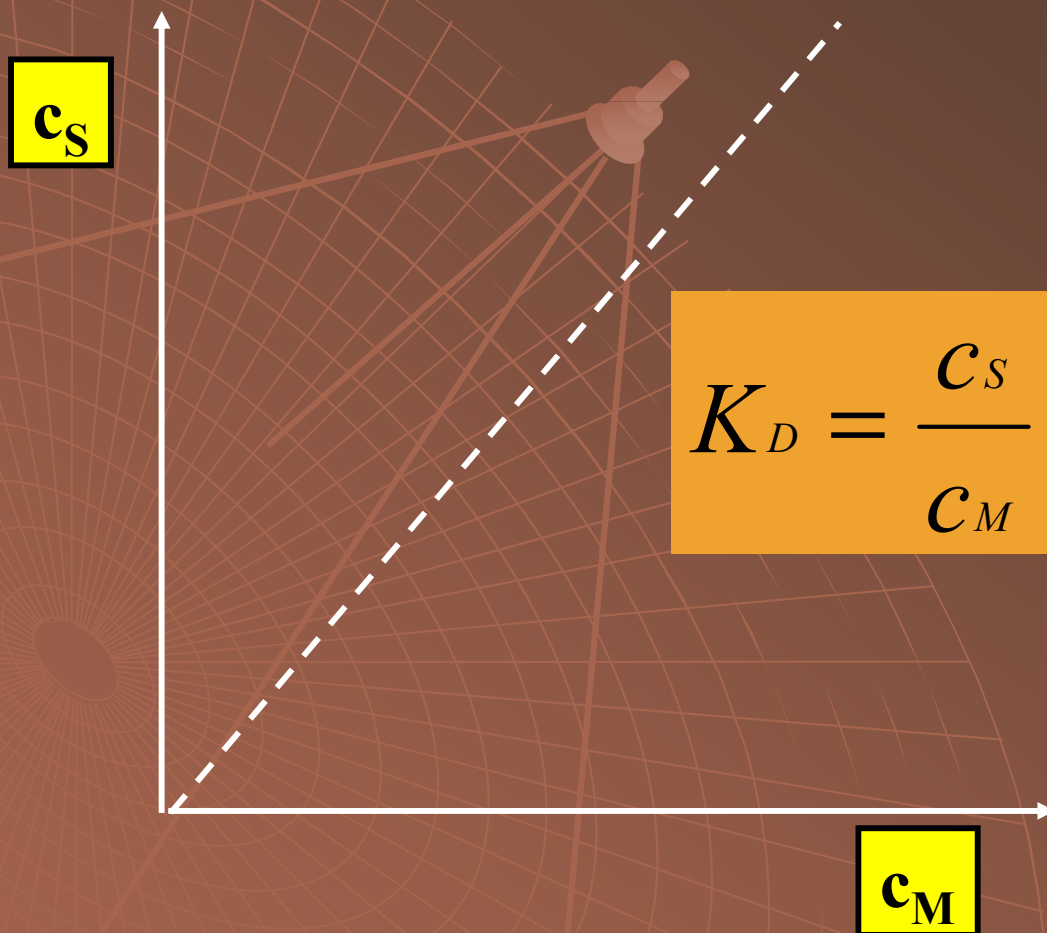
Rozdělovací chromatografie



Rozdělovací chromatografie

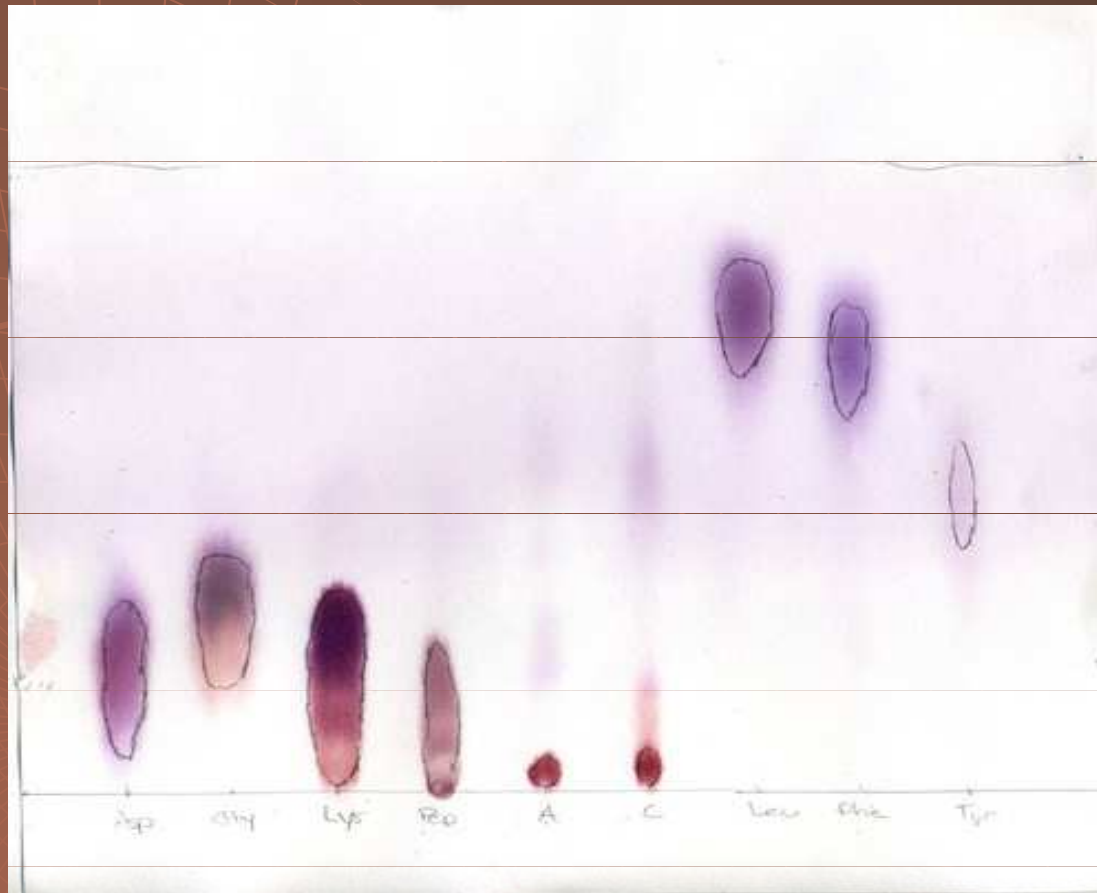


Rozdělovací chromatografie



Použití – analytická PC, TLC

Papírová chromatografie AMK

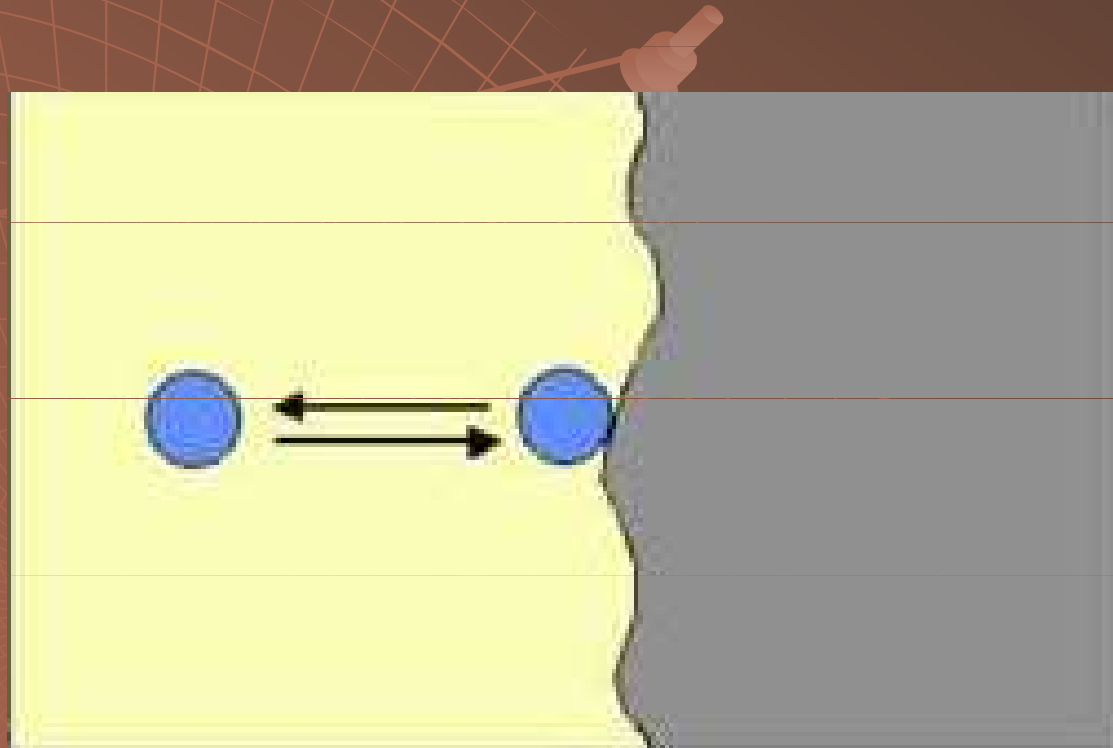


■ stacionární fáze: voda

■ mobilní fáze: butanol-kyselina octová-voda (12:3:5)

Adsorpční chromatografie

chromatografie s normálními fázemi



Adsorpční chromatografie

- ◆ Stacionární fáze – polární

nese aktivní centra, jejich počet, rozložení a schopnost poutat molekuly rozdělované směsi závisí na charakteru adsorbentu, velikosti povrchu a na vlastnostech separovaných látek

Adsorpční chromatografie

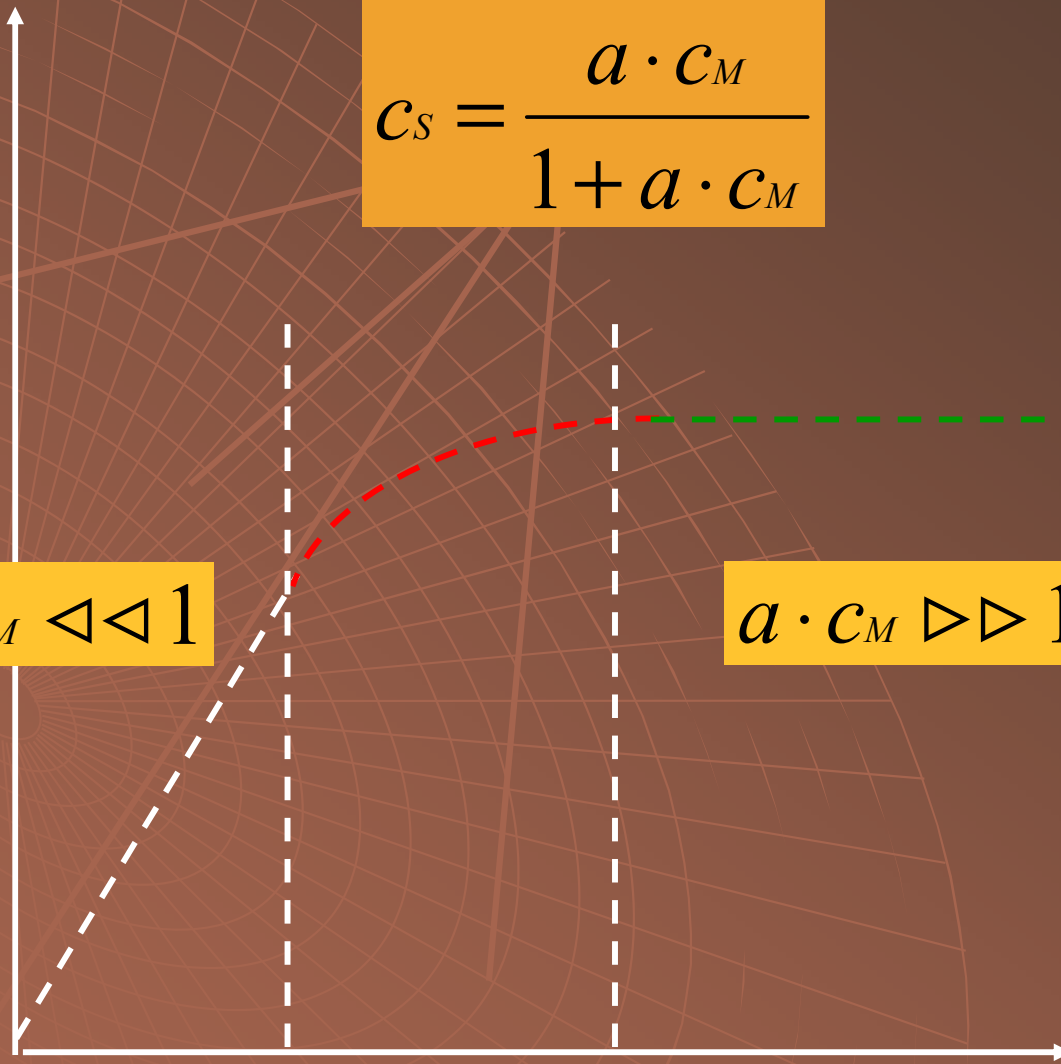
c_S

$$c_S = \frac{a \cdot c_M}{1 + a \cdot c_M}$$

$a \cdot c_M \lll 1$

$a \cdot c_M \ggg 1$

c_M



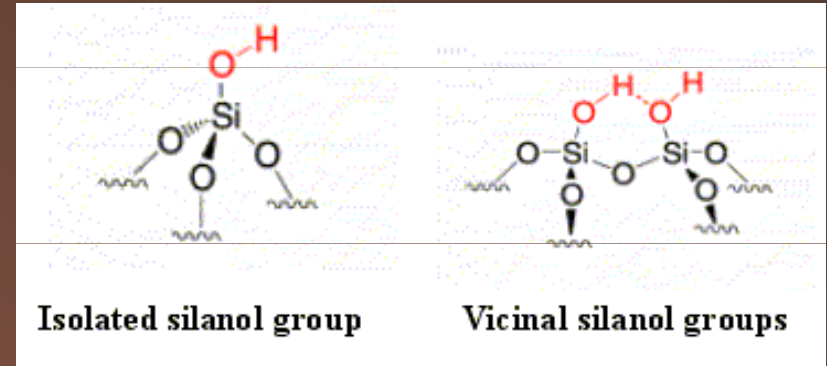
Adsorpční chromatografie

◆ Stacionární fáze

Silikagel $\text{SiO}_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$

Vysoký specifický povrch a relativně velký objem pórů. Hlavní součástí aktivních center jsou **hydroxylové (silanolové) skupiny**, na něž je vodíkovou vazbou adsorbována voda. Zahřátím na 150°C dojde k odstranění vody → “aktivace silikagelu”. Labilní nad $\text{pH } 8$. $> 200^\circ\text{C}$ rozklad.

Adsorpce: interakce se silanolovými skupinami; povrch silikagelu je slabě kyselý (má protodonorní vlastnosti). Lépe jsou zadržovány bazické látky.



Adsorpční chromatografie

◆ Stacionární fáze

Oxid hlinitý Al_2O_3 ,

Obdobné vlastnosti jako u silikagelu (povrch, póry).
Vyskytuje se v řadě modifikací, dle množství vázané vody, krystalické struktury. “Aktivace” vysušením
 $[\text{Al}(\text{OH})_3 \rightarrow \text{AlO}(\text{OH}) \rightarrow \text{Al}_2\text{O}_3]$.

Při vysokém obsahu vody (15%) se projevují rozdělovací efekty. Vedle protondonorních hydroxylů se na povrchu vyskytují i centra s protonakceptorními vlastnostmi.

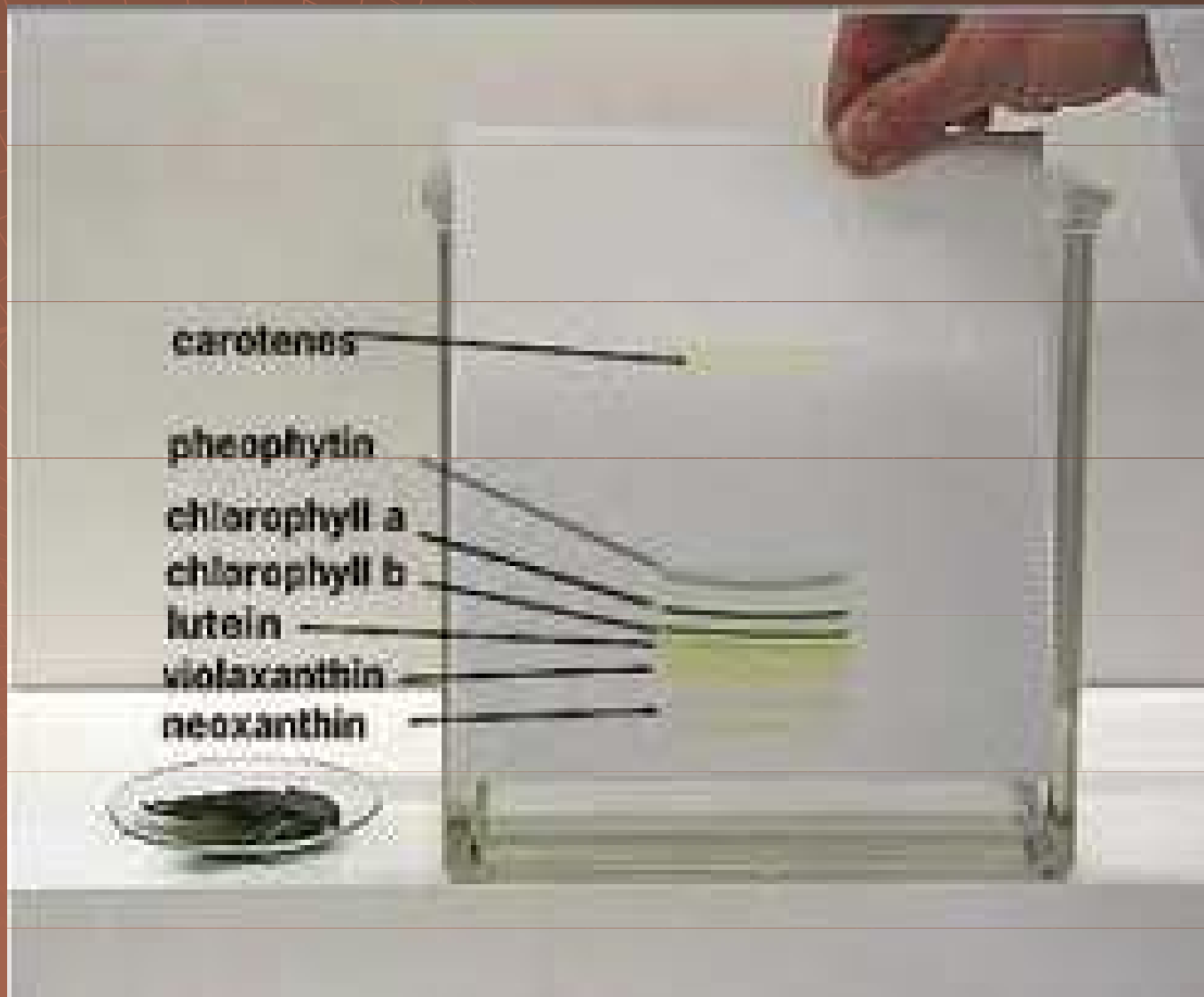
Adsorpční chromatografie

- ◆ Mobilní fáze – nepolární
- ◆ Eluce - zvyšováním polariry mobilní fáze

Eluotropická řada:

uhlovodíky < subst.uhlovodíky < ketony <
aldehydy < alkoholy < voda

Adsorpční chromatografie chlorofylů



Adsorpční chromatografie

◆ Stacionární fáze

Hydroxyapatit $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$

připravuje se z $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.
Jemná sraženina fosfátu vápenatého se vaří s 1%
NaOH při 96-98°C.

Při interakci polární až iontové síly. Karboxylové skupiny bílkovin či fosfátové skupiny nukleových kyselin reagují s Ca^{2+} na povrchu adsorbentu. Eluce se provádí gradientem iontové síly - rostoucí koncentrací fosfátu.

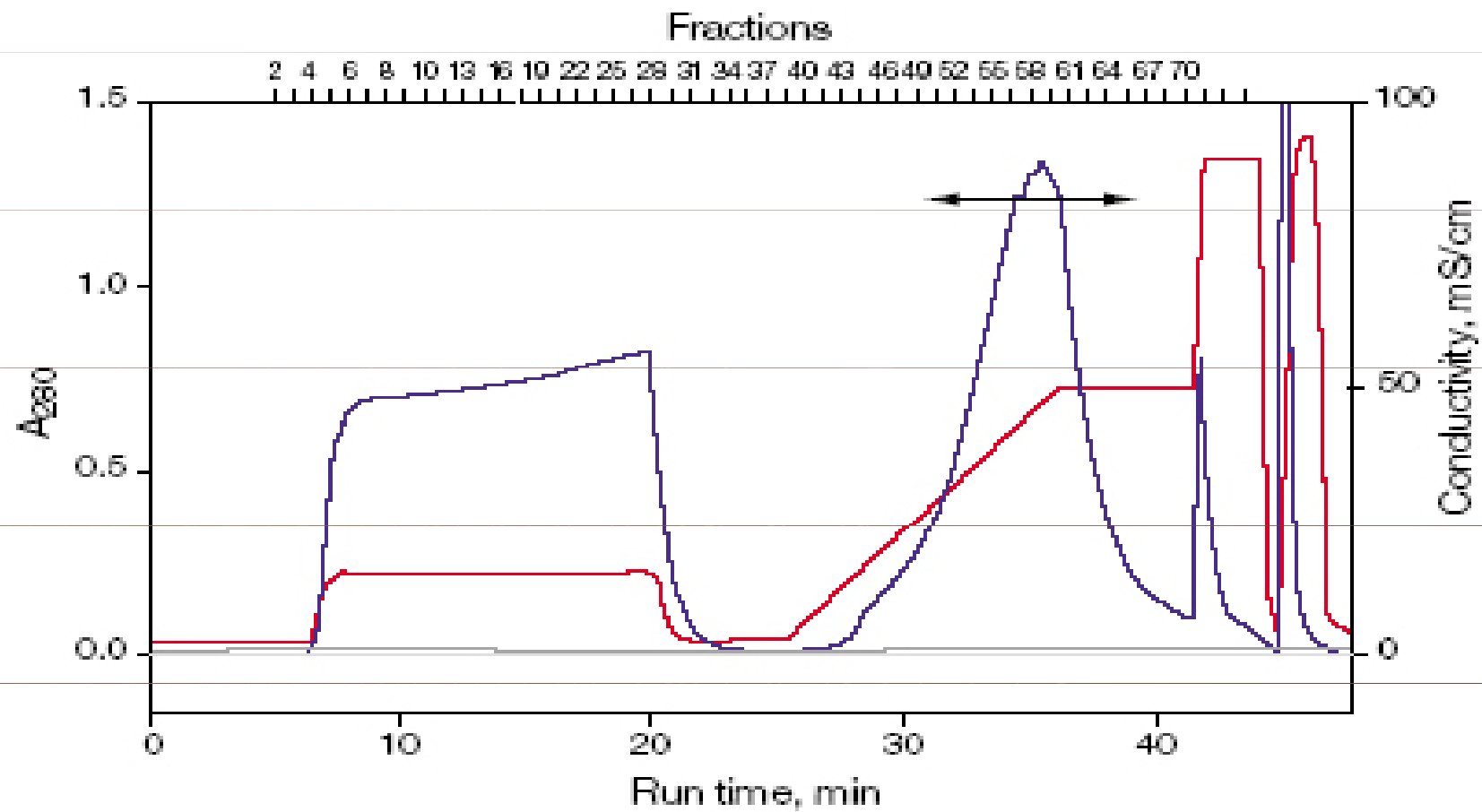
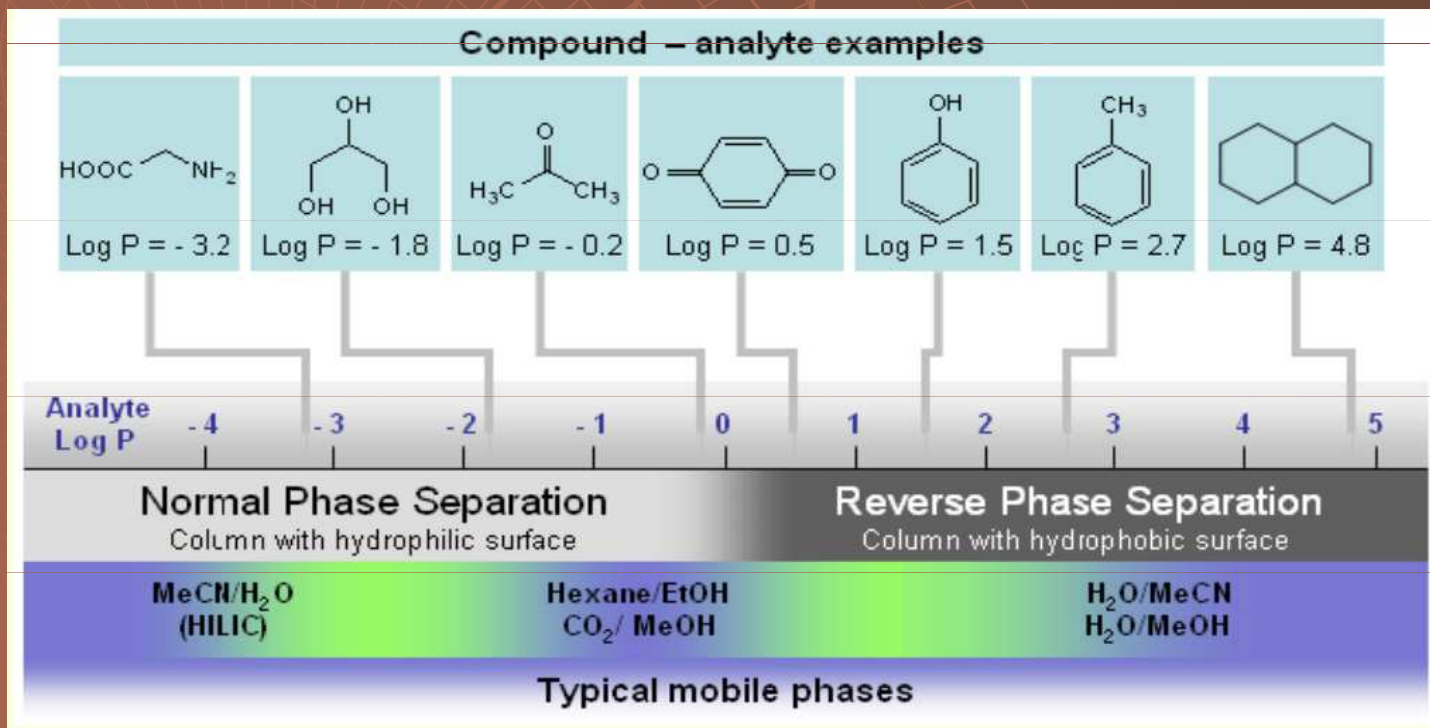


Fig. 1. Chromatogram of murine IgG₁ purification on the UNOsphere S column during small-scale process development. Diluted cell culture (20 ml) was loaded onto an UNOsphere S 0.7 x 5 cm column at a flow rate of 600 cm/hr in 20 mM phosphate-citrate buffer, pH 4.0. The sample was eluted in 10 column volumes (CV) of a 0–0.5 M NaCl gradient, followed by 5 CV of 1 M NaCl in the same buffer. The column was then cleaned in 1 M NaOH. The double-headed arrow indicates the fractions (1 ml each) containing IgG₁ (see Figure 2). Blue trace, A₂₈₀; red trace, conductivity profile.

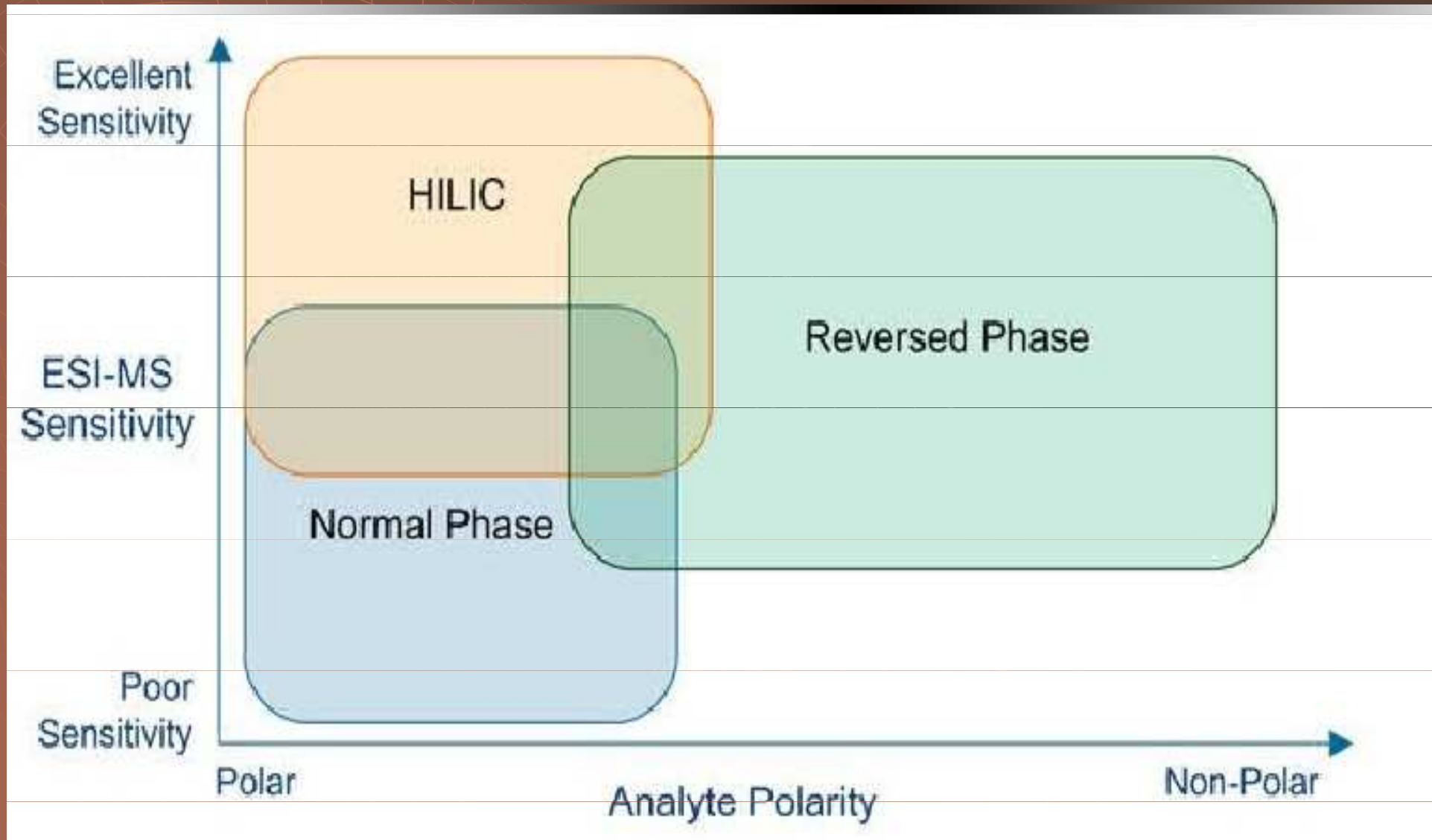
HILIC chromatografie

◆ HILIC

Hydrophilic Interaction Chromatography (1990)
varianta chromatografie s normálními fázemi
nepoužívající rozpouštědla nemísitelná s vodou



HILIC chromatografie



HILIC chromatografie

◆ Stacionární fáze

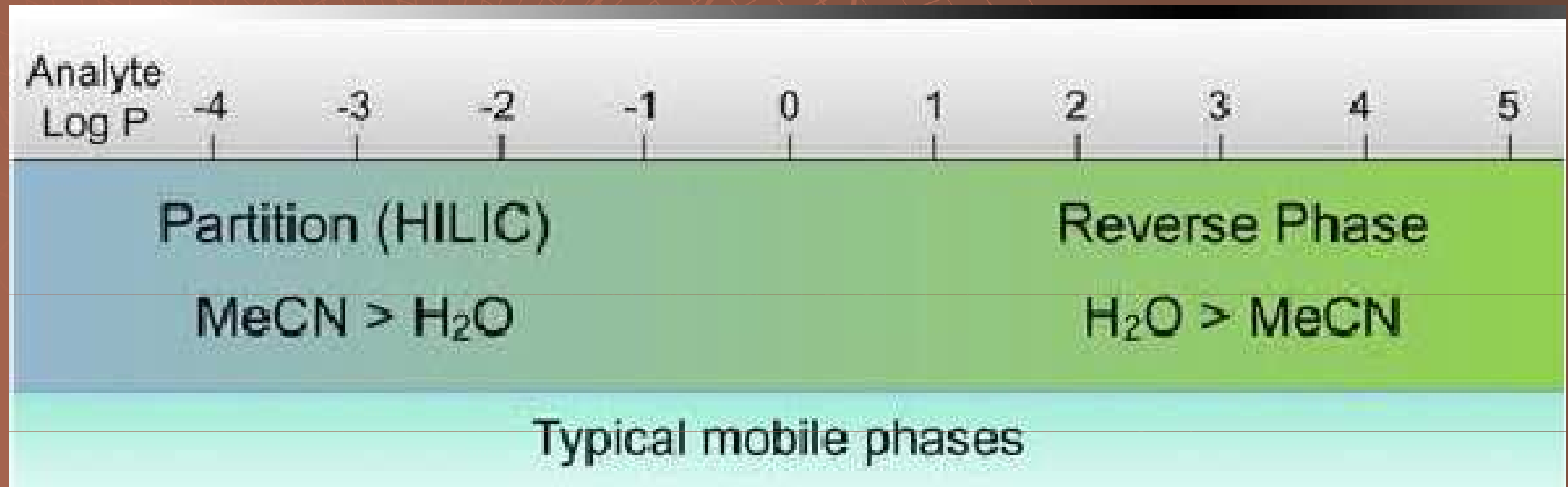
polární - silikagel,
kyano, amino, diol,
zwitterionty etc.

stacionární fáze	chemická struktura
a.	
silikagel	$-\text{OH}$
kyanopropyl	$-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$
aminopropyl	$-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
diol	$-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{OH}$
b.	
PAC	$-(\text{CH}_2-\underset{\text{C}=\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{CH}}})_n$
c.	
ZIC	$-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{N}^{\oplus}}}-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3^{\ominus}$

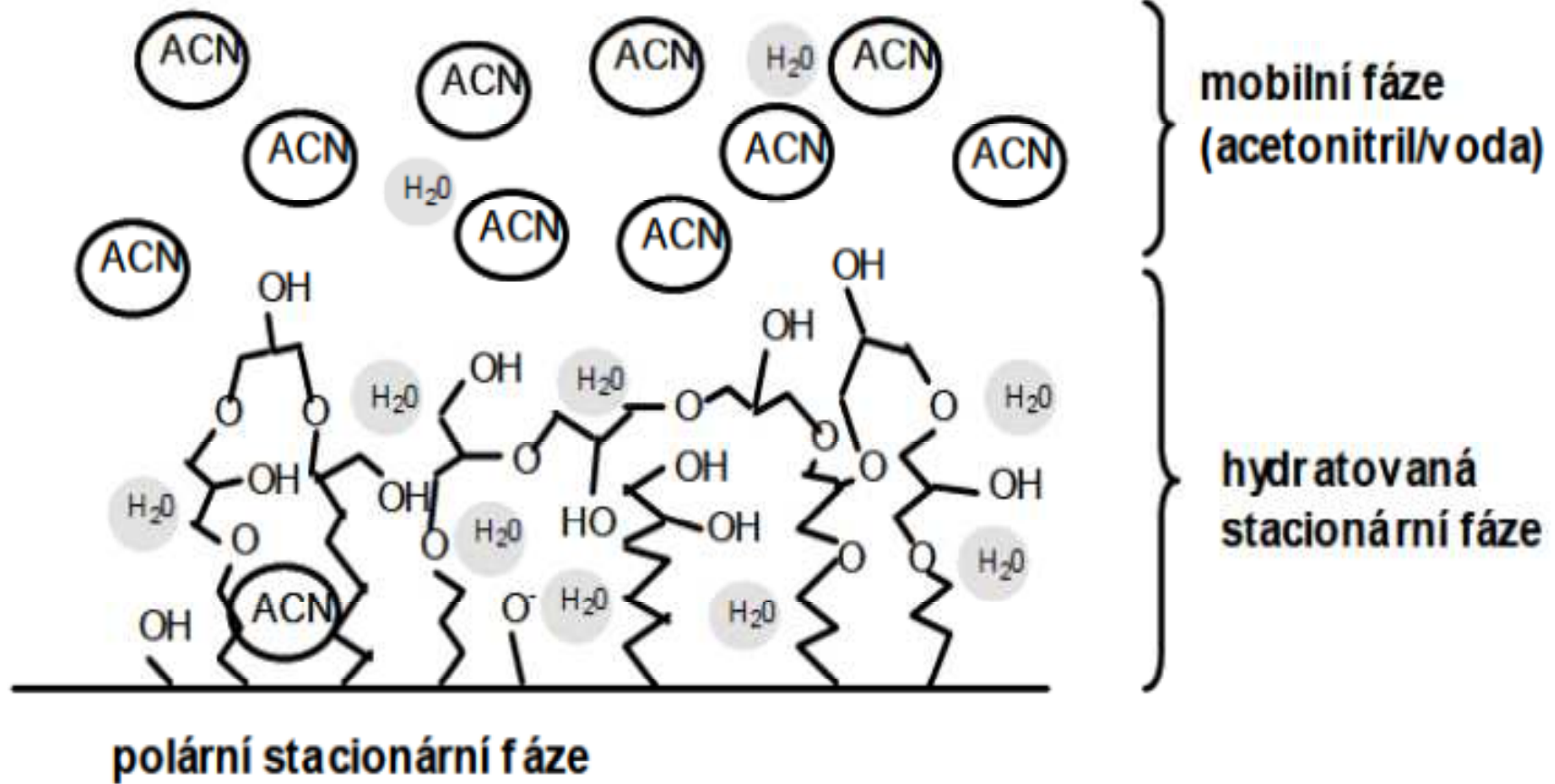
HILIC chromatografie

- ◆ Mobilní fáze

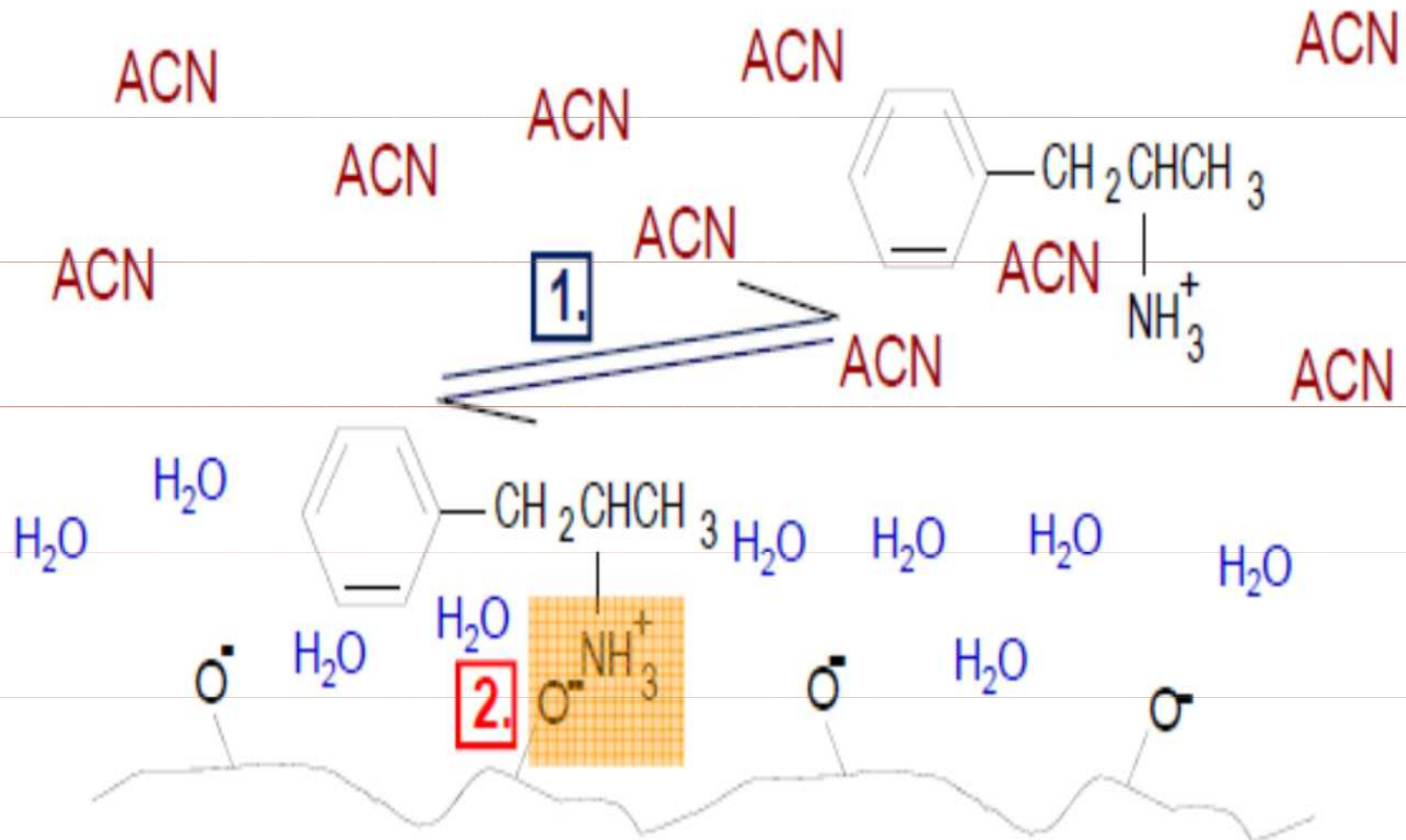
Velký obsah organického rozpouštědla ACN (> 80%) s malým množstvím vody nebo jiného polárního rozpouštědla



HILIC chromatografie

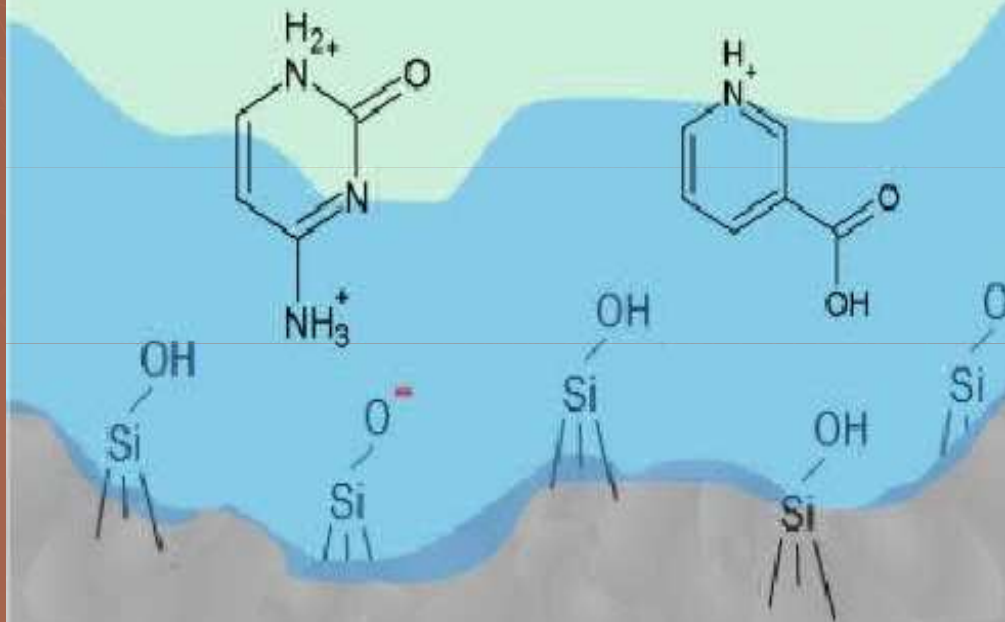
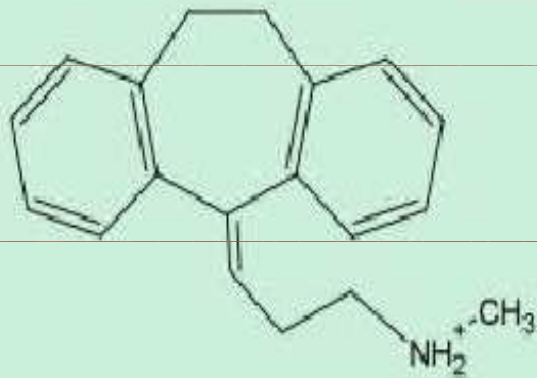
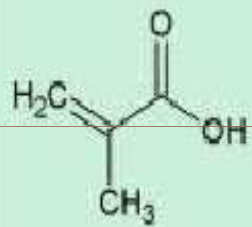


HILIC chromatografie

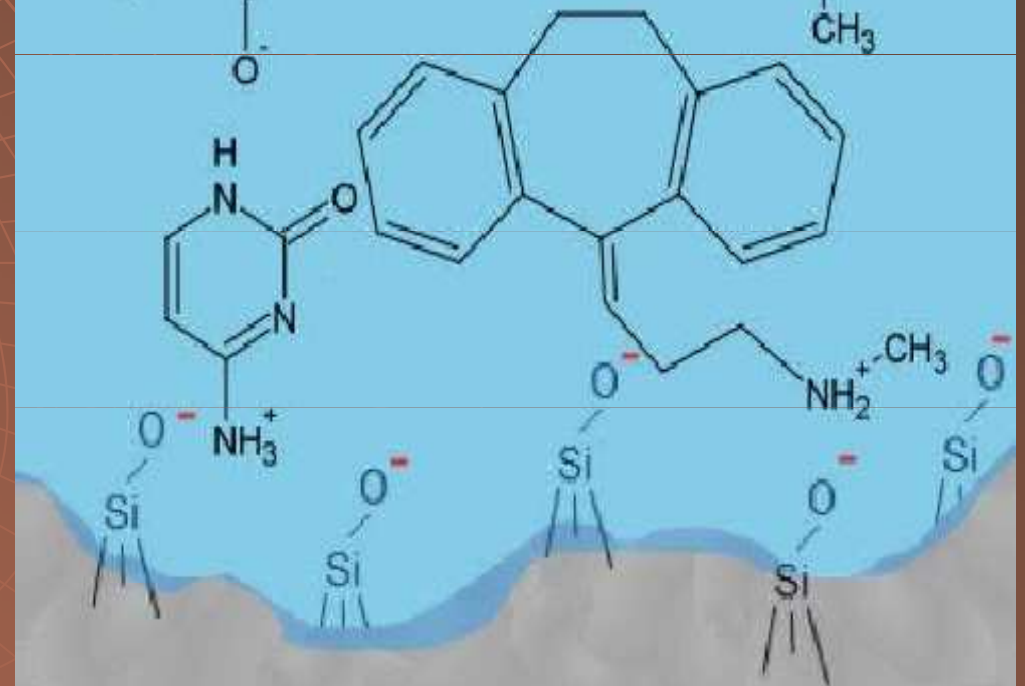
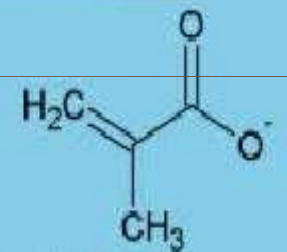
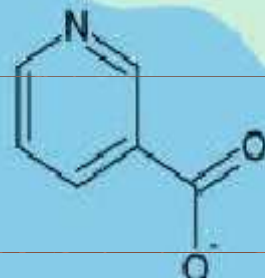


HILIC chromatografie

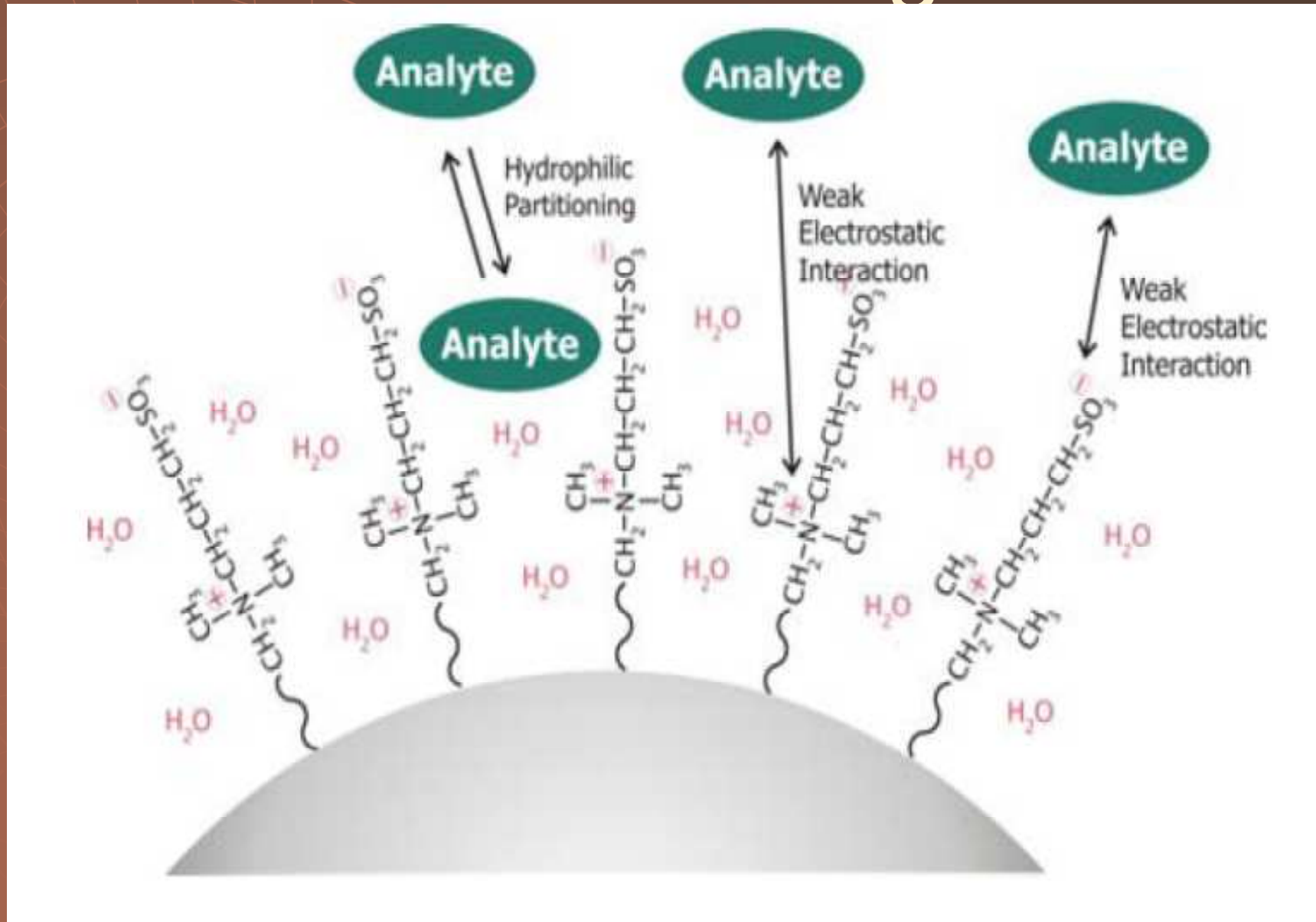
pH -3



pH -9



HILIC chromatografie



HILIC chromatografie

- ◆ Nanášení vzorku – vzorek rozpuštěn v mobilní fázi
- ◆ Eluce – zvyšováním polaritý mobilní fáze

Dioxan > Aceton > ACN > THF > IPOH > EtOH > MetOH > H₂O

Použití : analýza polárních látek

HILIC chromatografie

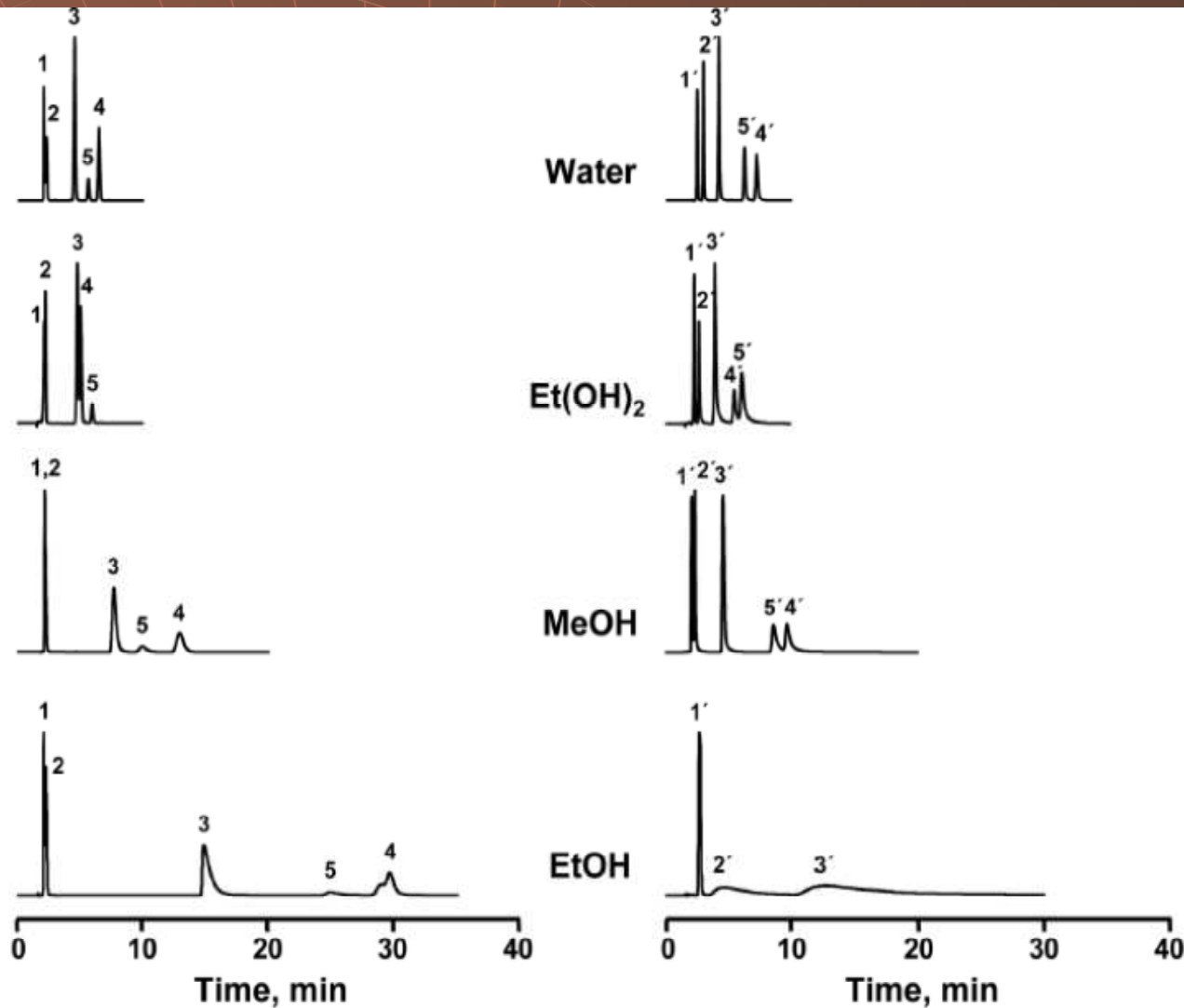


Figure 5. Separation of the sets of nucleobases and nucleosides on (a) the TG, (b) the TGO and (c) the bare silica (Daisogel) packing in AQ-HILIC (water as modifier) and NA-HILIC (Et(OH)₂, MeOH, EtOH as modifiers) elution mode. Mobile phase: 5 mM ammonium acetate in ACN/modifier (90:10 v/v). Further chromatographic details are given in Section 2. Analytes: (1) thymine, (2) uracil, (3) adenine, (4) cytosine, (5) guanine; (1') thymidine, (2') uridine, (3') adenosine, (4') cytidine and (5') guanosine.

HILIC chromatografie

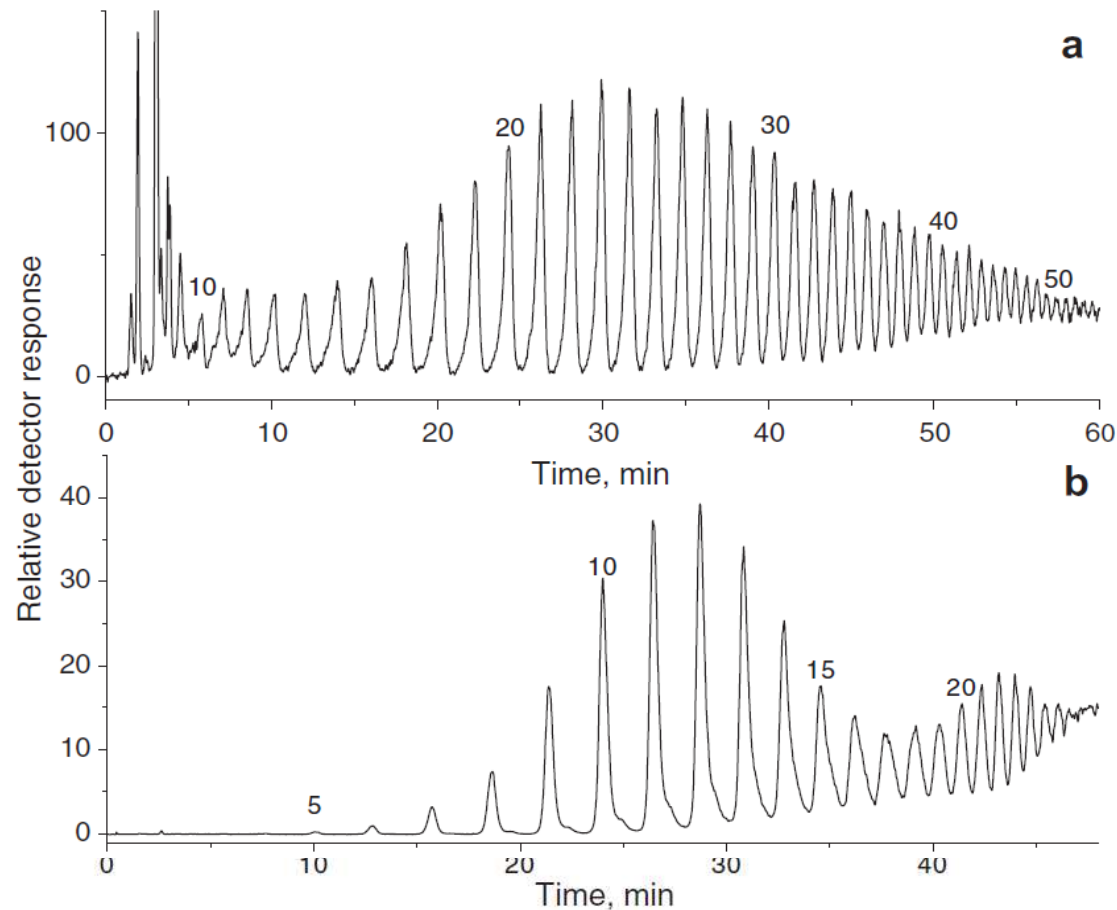
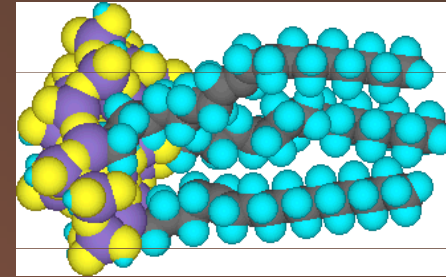


Figure 3. The chromatograms for the separation of (a) higher molecular weight fructooligosaccharides and (b) chitooligosaccharides on an analytical 'click' maltose column (100×4.6 mm id) with gradients 1 and 2, respectively. The numbers on the peaks are the DPs of the oligosaccharides. Gradient 1: 0–60 min, water–acetonitrile: 30:70 (v/v)→50:50 (v/v). Gradient 2: 0–60 min, acetonitrile–ammonium formate buffer (100 mM, pH 3.0): 65:35 (v/v)→55:45 (v/v). Flow rate: 1.0 mL/min. Column temperature: 30 °C. ELS detector: gas pressure 30 psi, tube temperature 85 °C, gain 100.

Reverzně fázová chromatografie

- ◆ Stacionární fáze – nepolární

C_8, C_{18}



- ◆ Mobilní fáze – polární – vodné roztoky
pH → potlačit disociaci

- ◆ Eluce – snižováním polarity mobilní fáze
ACN, MetOH,

Reverzně fázová chromatografie



Silikagel

- poresní silika gel – zvýšení efektivního povrchu
- inertní materiál
- stabilní v pH 2-7,5



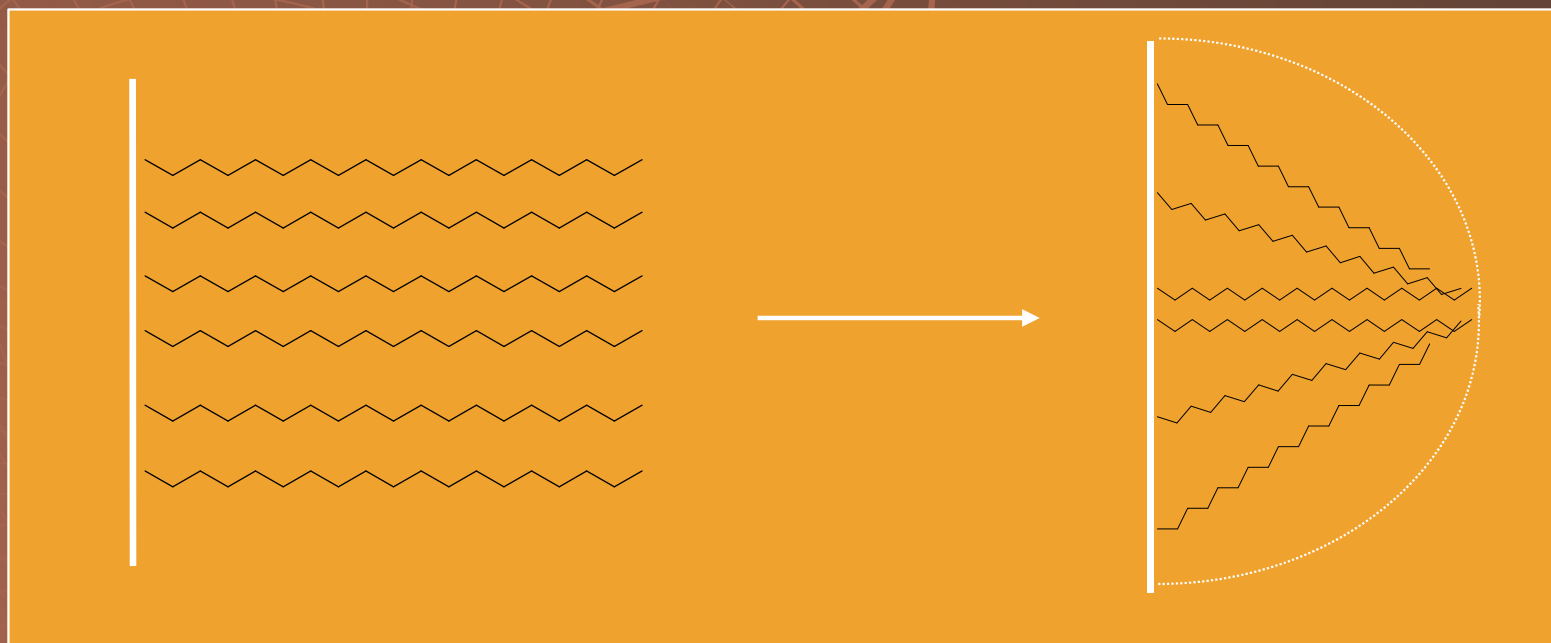
Polymerní nosič

- poresní polymer – zvýšení efektivního povrchu
- nepolární
- stabilní v pH 2-11

Reverzně fázová chromatografie

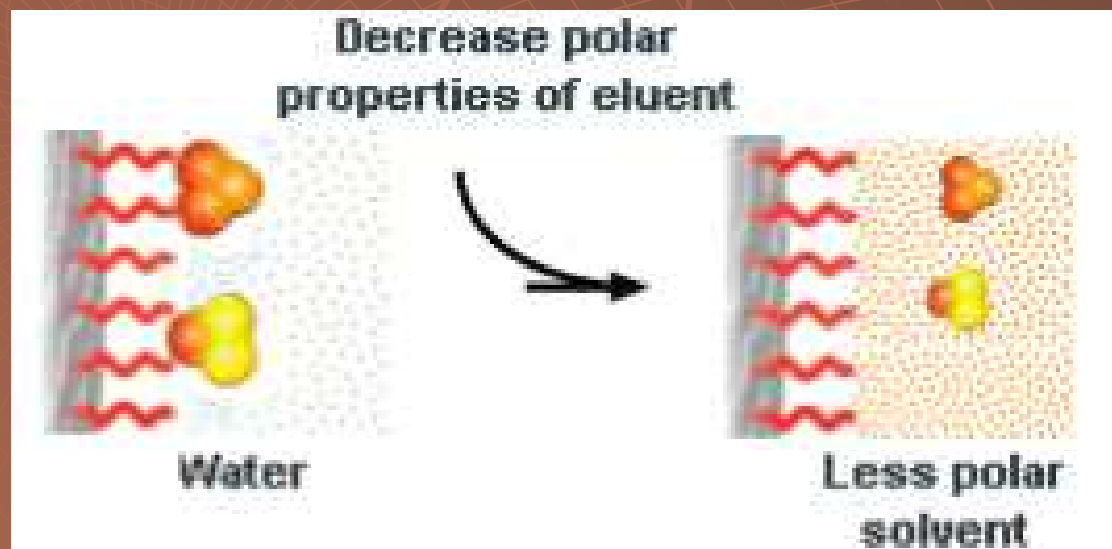
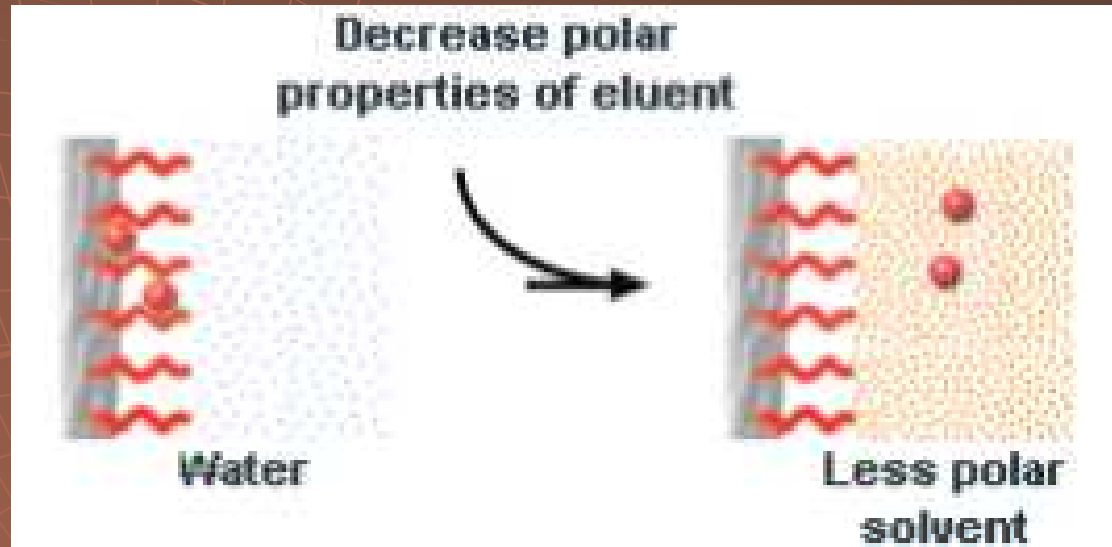
Kartáčový typ stacionární fáze

H₂O



Použití : analytické – až 90 % analýz

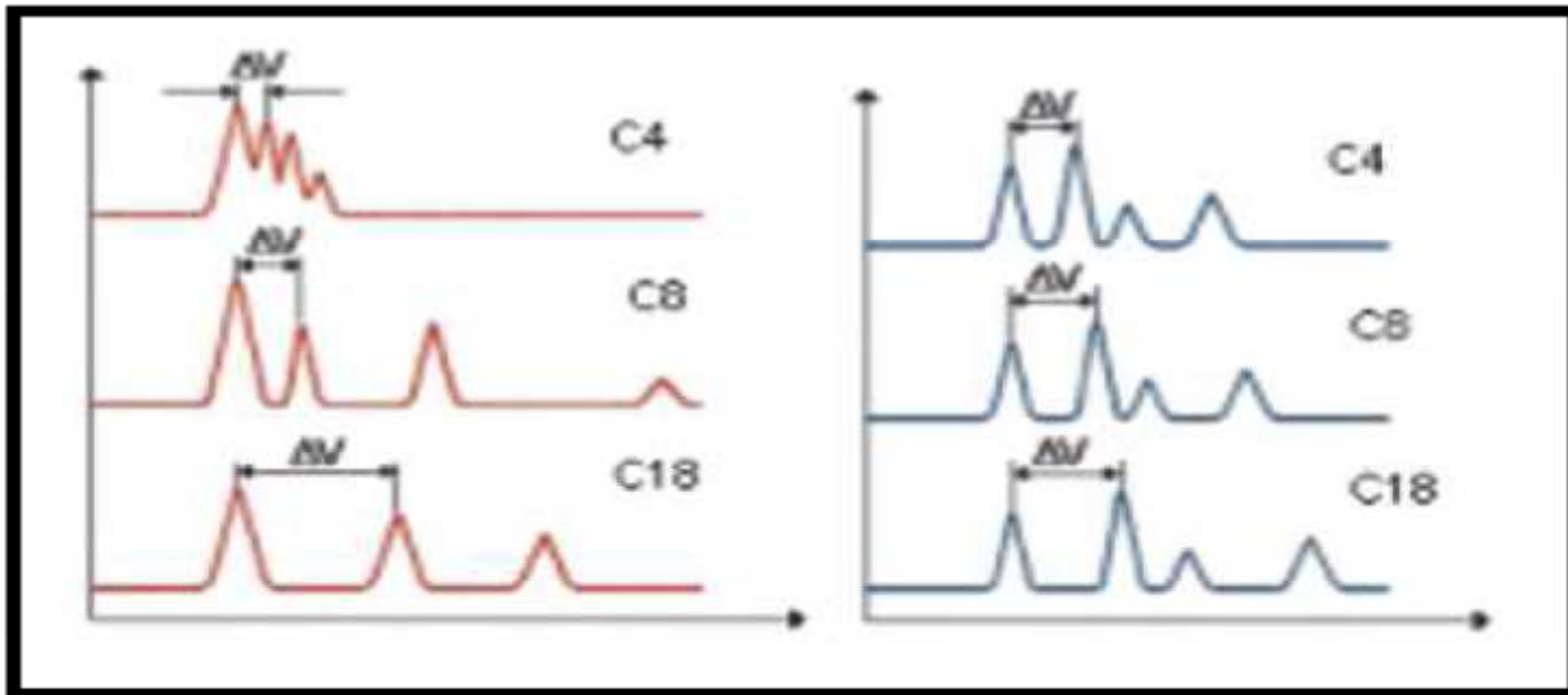
Reverzně fázová chromatografie



Reverzně fázová chromatografie

Vliv délky řetězce na rozlišení

hydrofobní
organické látky peptidy, proteiny



Reverzně fázová chromatografie

Organické rozpouštědlo	Vhodné pro:	Viskositata	Poznámka
Methanol	•Org. molekuly	Střední-nízká	možná destabilisace struktury
Ethanol	•Org. molekuly	Střední-nízká	možná destabilisace struktury
Isopropanol	•Proteiny •Peptidy	Vysoká	nejmenší efekt na strukturu
Acetonitril (ACN)	•Org. molekuly •Proteiny •Peptidy	Nízká	nízký efekt na strukturu

Reverzně fázová chromatografie

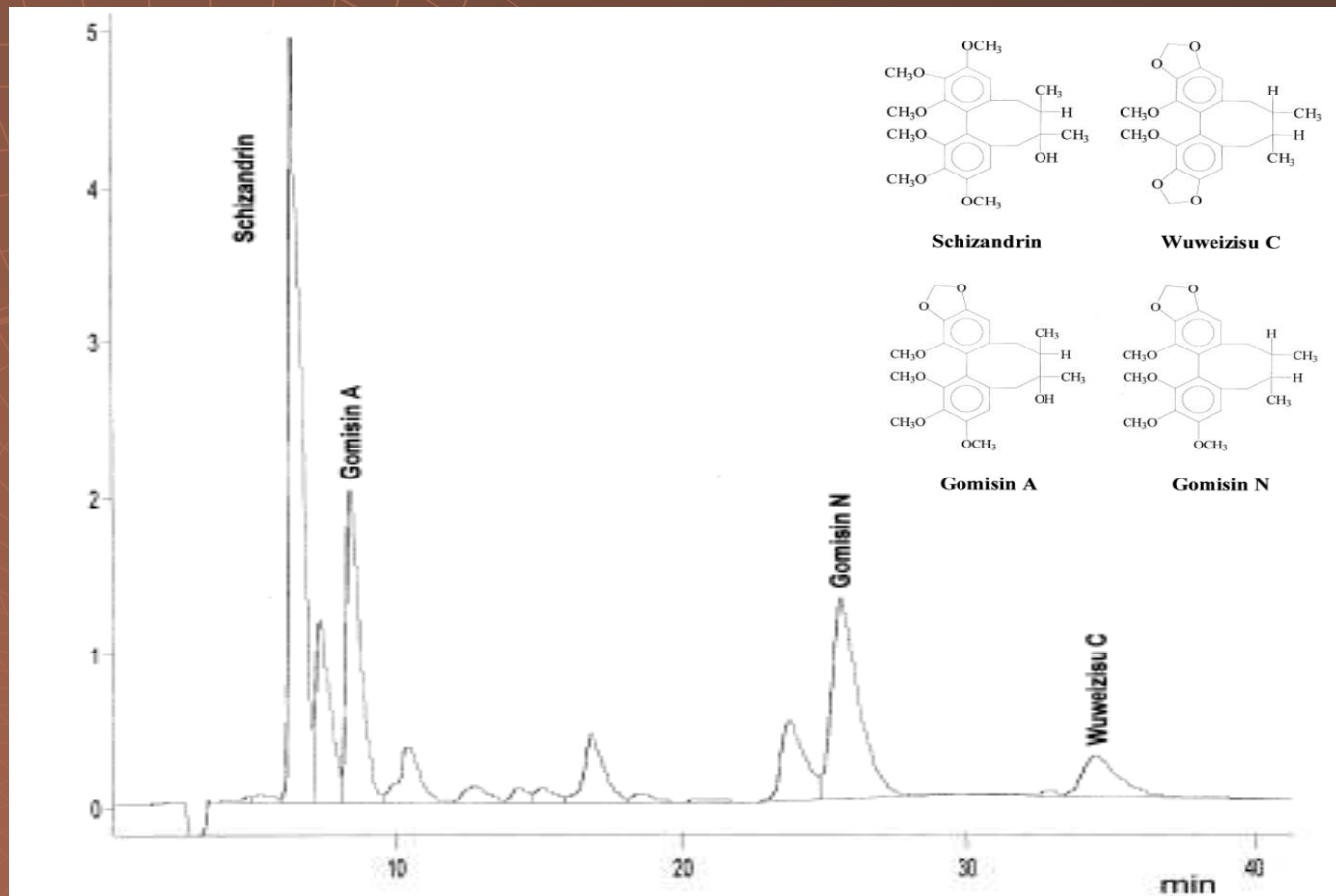
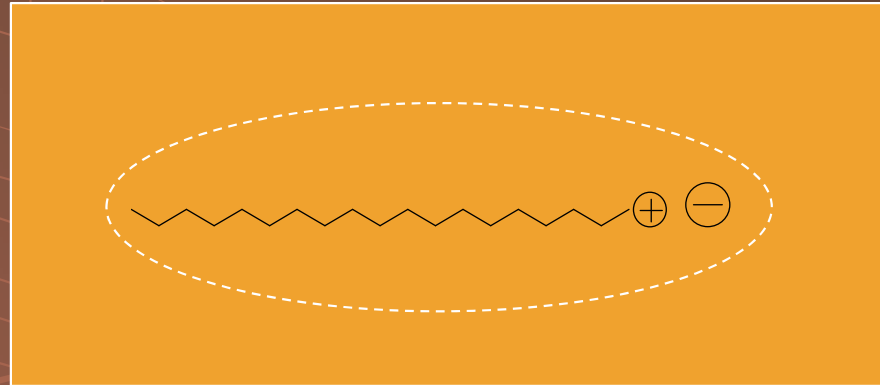


Fig. 5. HPLC analysis of *Schisandra* extract. Experimental conditions: column, Separon SGX C₁₈ 5 μ m, 150 \times 3 mm I.D.; mobile phase, methanol–deionised water (75:25); flow-rate, 0.3 ml/min; detection at 254 nm. Twenty μ l of *Schisandra* extract were loaded on the column.

Iontově párová chromatografie



iontově párující činidlo

analyt

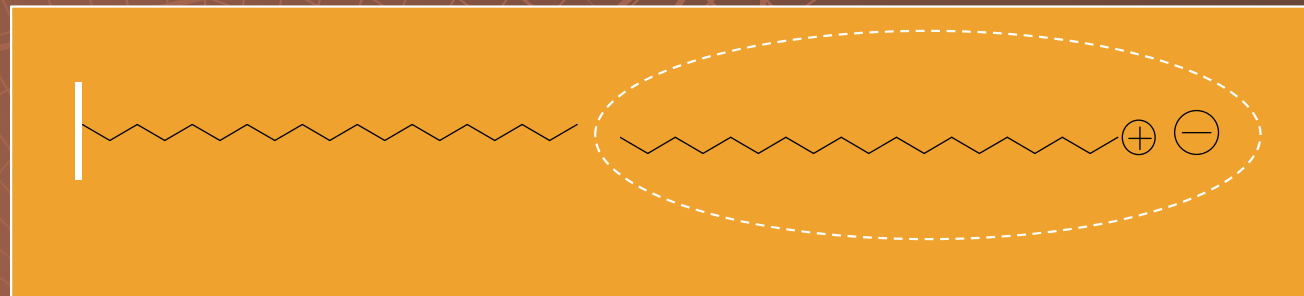
+ - SDS, HClO_4

- - tetrabutylamonium

Iontově párová chromatografie

sorbent C₁₈

iontový pár



Stacionární, mobilní faze, eluce – RPC

pH → plná ionizace analytu

Iontově párová chromatografie

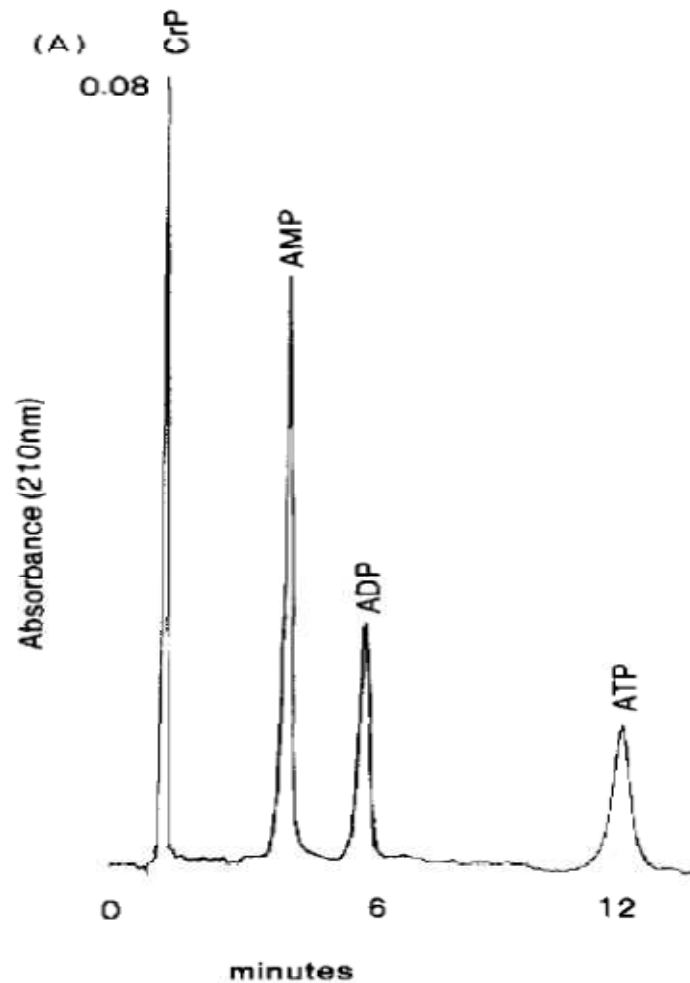


Fig. 1. Chromatogram of standards. Separation of standard containing $76.4 \mu\text{M}$ CrP, $72 \mu\text{M}$ AMP, $58.53 \mu\text{M}$ ADP and $45.35 \mu\text{M}$ ATP. Injection volume: $10 \mu\text{l}$. Flow-rate: 2 ml/min . Buffer: $0.52 \mu\text{M}$ potassium dihydrogen phosphate, 0.04% TBAP and 1.25% methanol, pH 4.0. Column: Supelcosil LC-18, $5 \mu\text{m}$ ($25 \text{ cm} \times 0.46 \text{ cm}$). Detection: UV 210 nm.

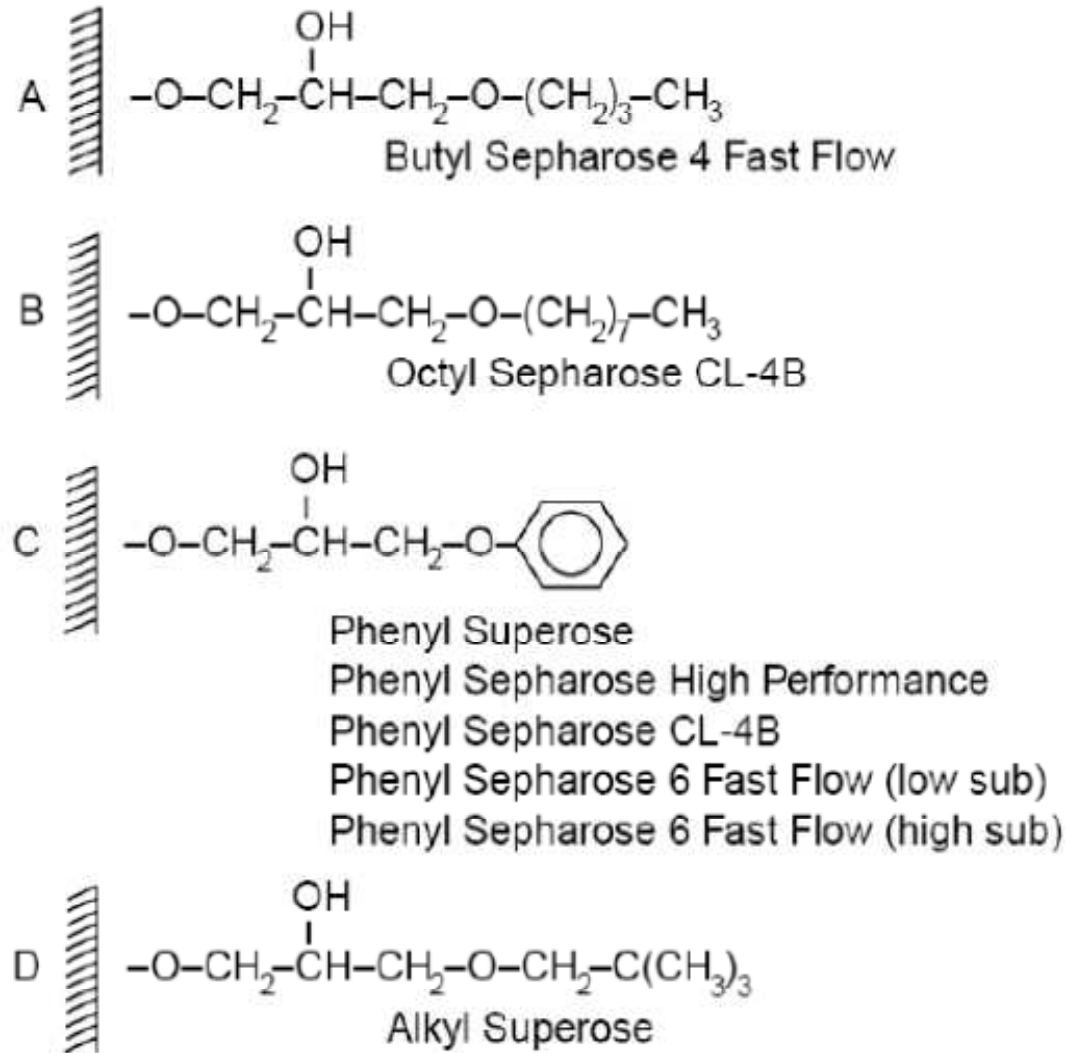
Hydrofobní chromatografie

- ◆ Stacionární fáze – -C₄, -C₈, -fenyl
- ◆ Mobilní fáze – vodné roztoky (pufry)
1.7 M (NH₄)₂SO₄
- ◆ Eluce – snižováním iontové síly

Použití : purifikace bílkovin

Hydrofobní chromatografie

◆ Stacionární fáze –



Isopropyl < Butyl < Octyl < Phenyl

Hydrofobní chromatografie

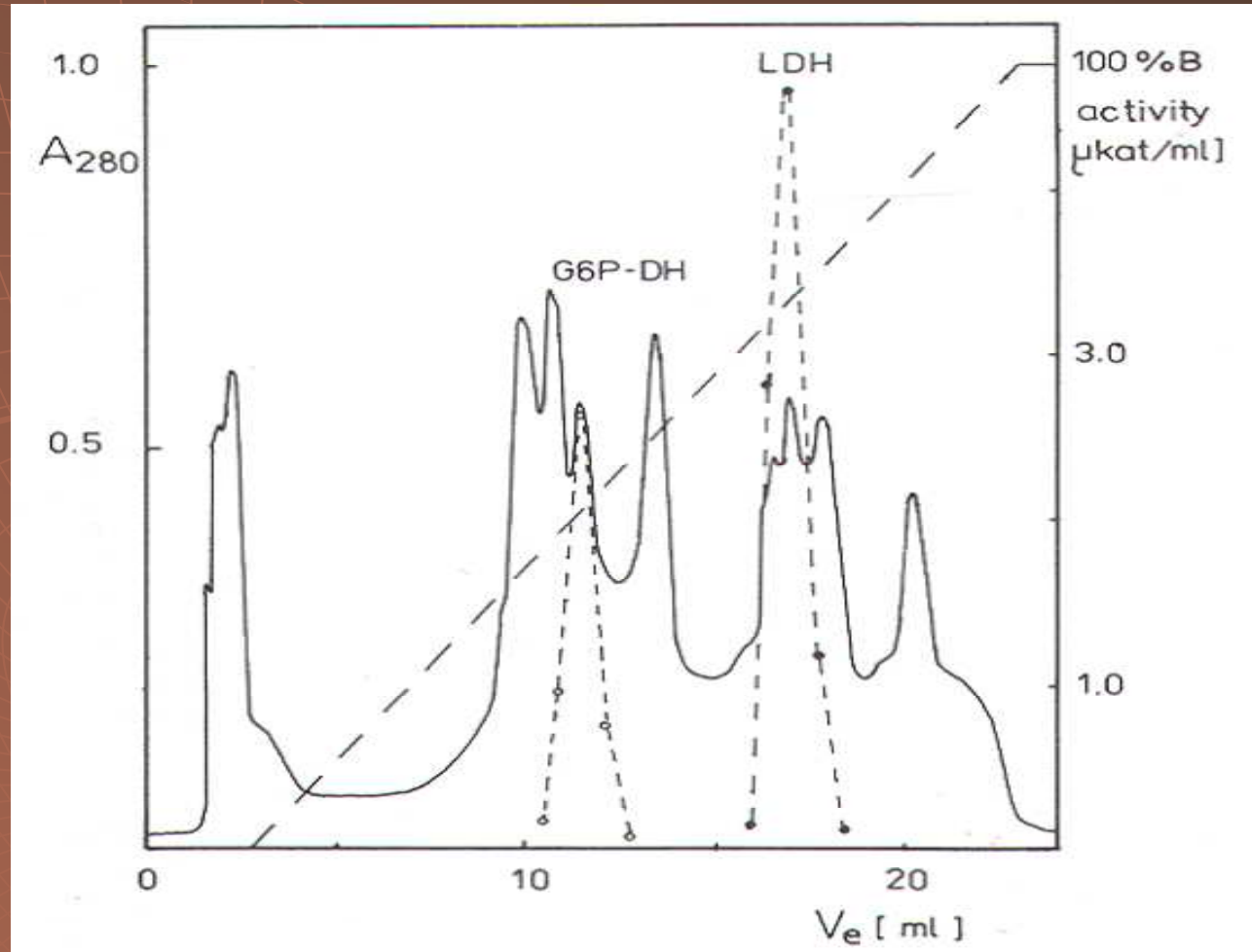


Fig. 1. Chromatography of crude enzyme preparation on a Phenyl-Superose column. Buffers: (A) 0.05 *M* sodium phosphate (pH 7.4) with 1.7 *M* sodium sulphate and 1 *mM* EDTA; (B) 0.05 *M* sodium phosphate (pH 7.4); flow-rate, 0.5 ml/min. V_e , elution volume; solid line, absorbance at 280 nm (A_{280}); dashed lines, gradient; (\circ) G6P-DH activity; (\bullet) LDH activity. Approximately 10 mg of protein were applied to the column.

Hydrofobní chromatografie

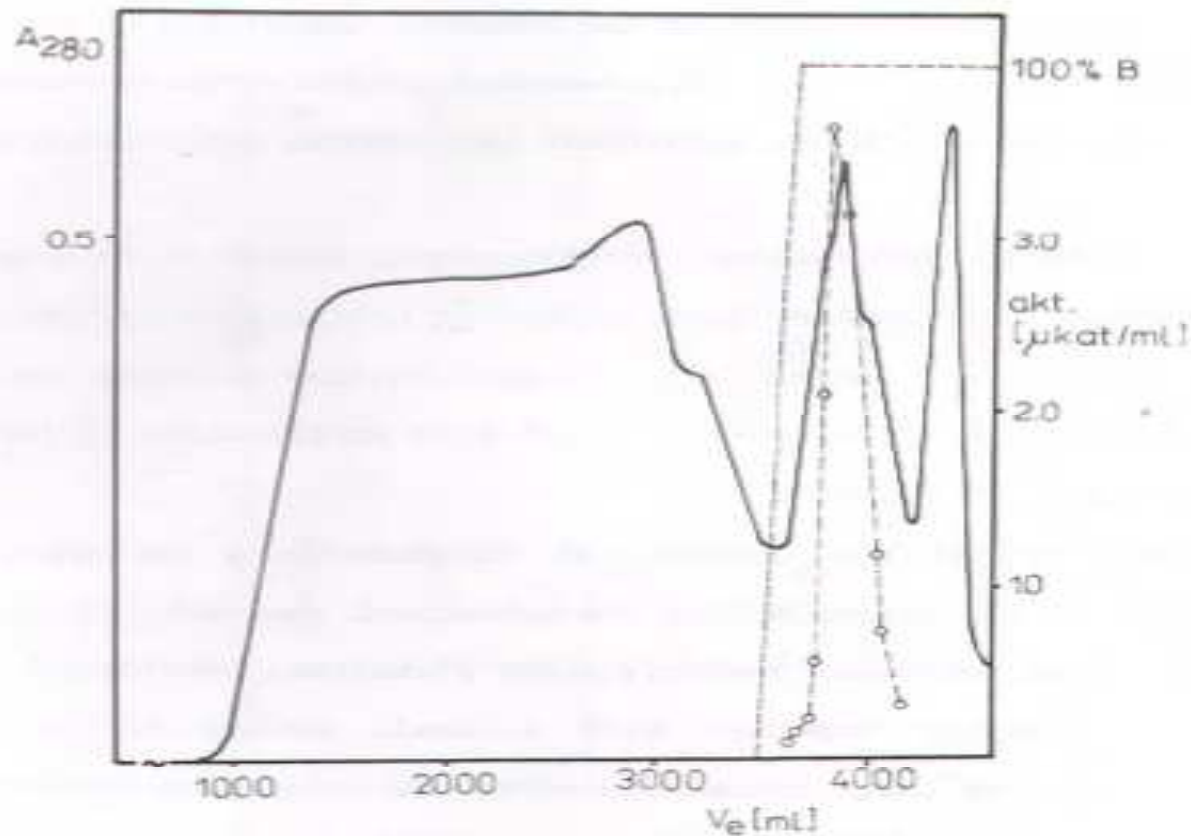
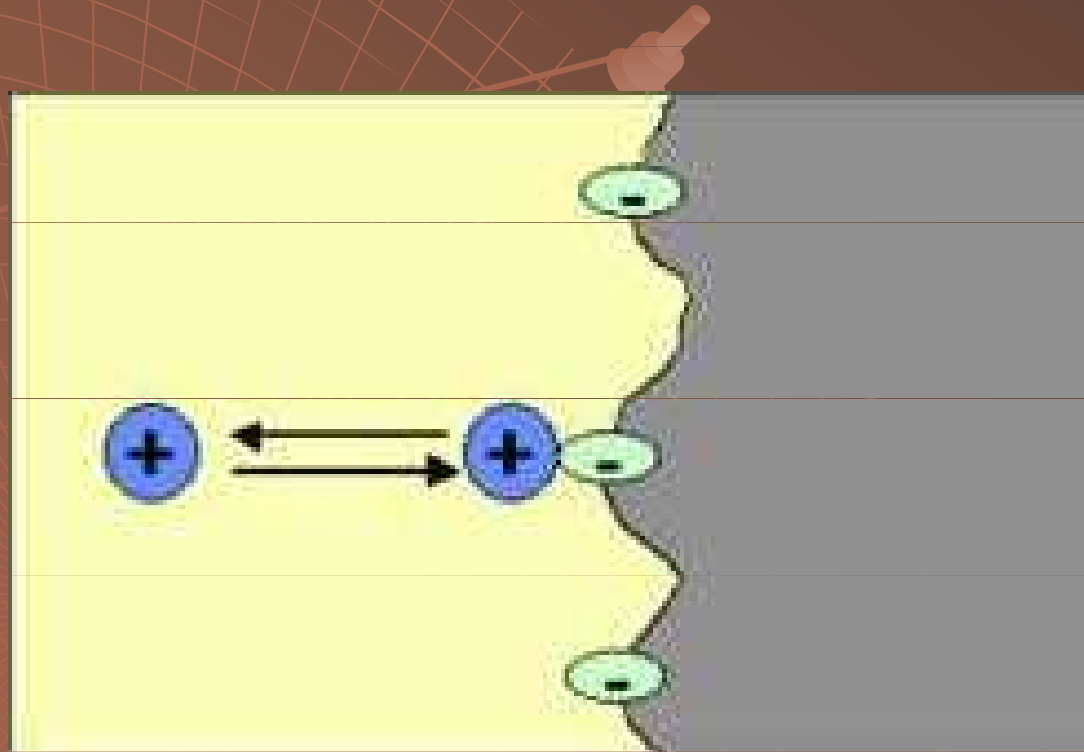


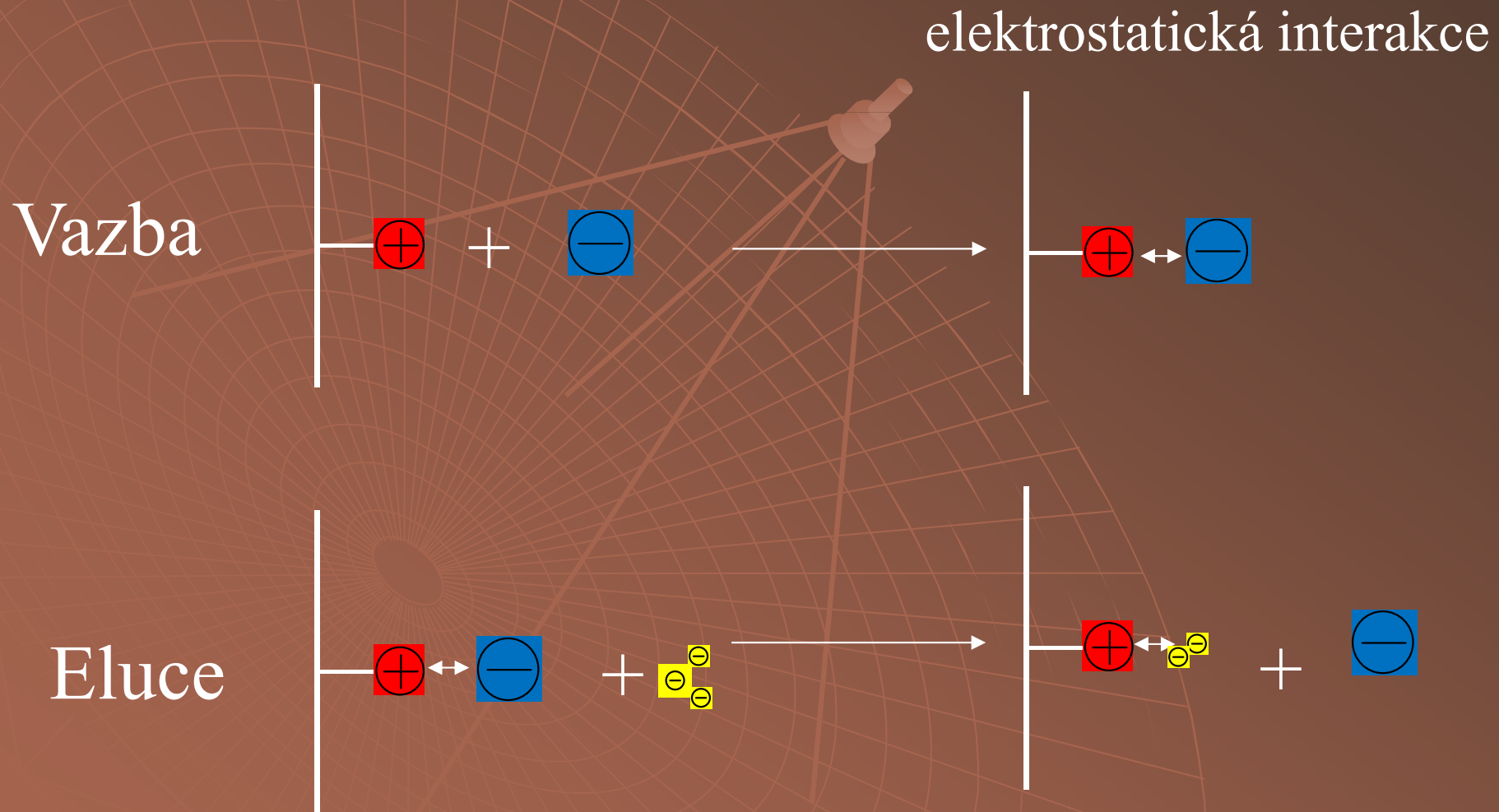
Figure 1

Chromatography of the crude enzyme preparation on a Spheron 1000 column. Buffers : A, 0.05 M potassium phosphate (pH 6.0) with 1.3 M ammonium sulphate and 1 μM CuSO_4 ; B, 0.05 M potassium phosphate (pH 6.0) with 1 μM CuSO_4 ; flow-rate 4.5 ml/min; V_e - elution volume; ———absorbance at 280 nm (A_{280}); - - - - -gradient; - - - o - - -DAO activity ($\mu\text{kat}\cdot\text{ml}^{-1}$). Approximately 30 g of protein were applied to the column.

Ionexová chromatografie



Ionexová chromatografie

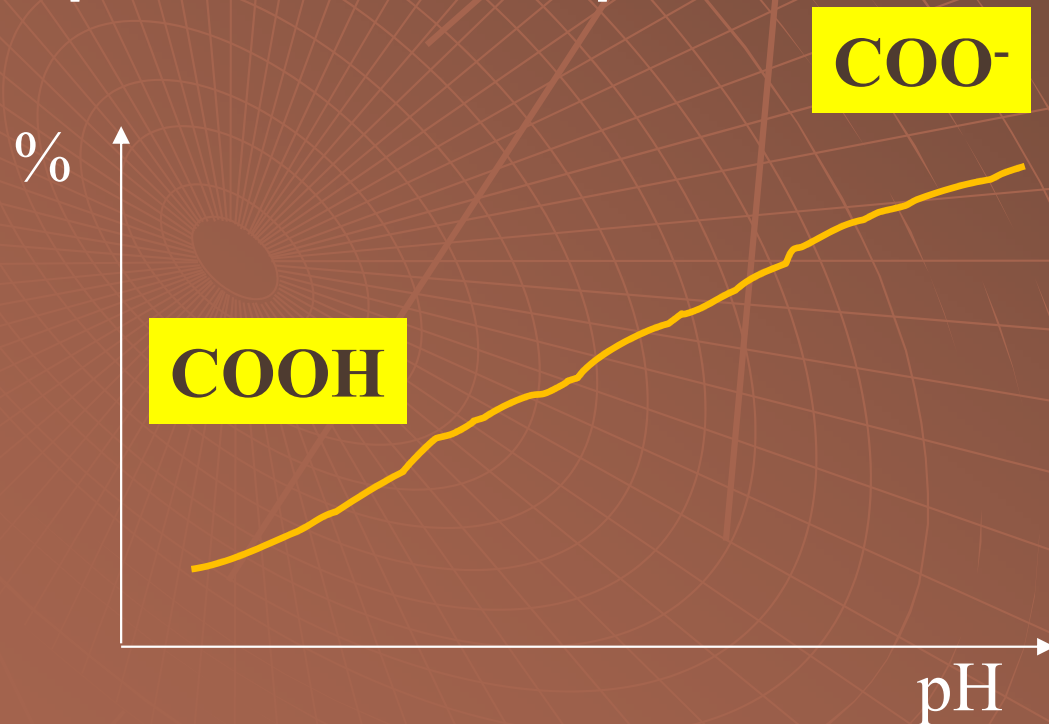


Ionexy

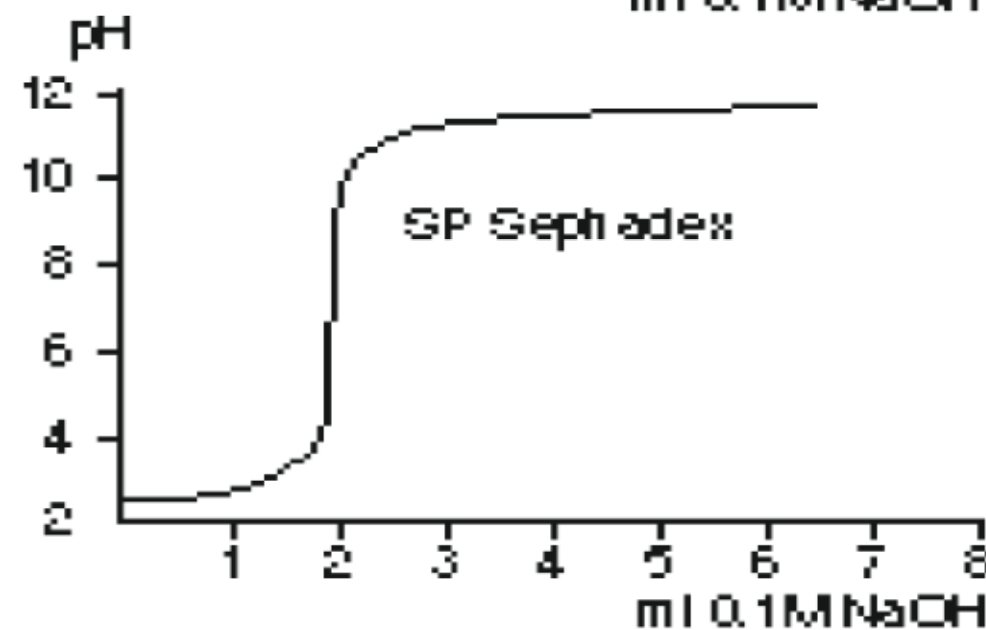
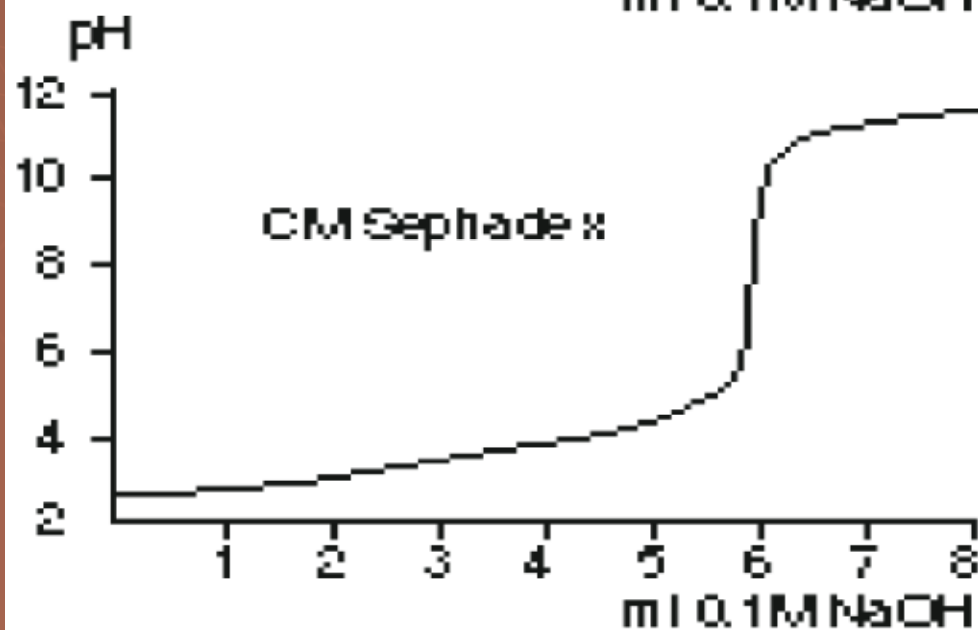
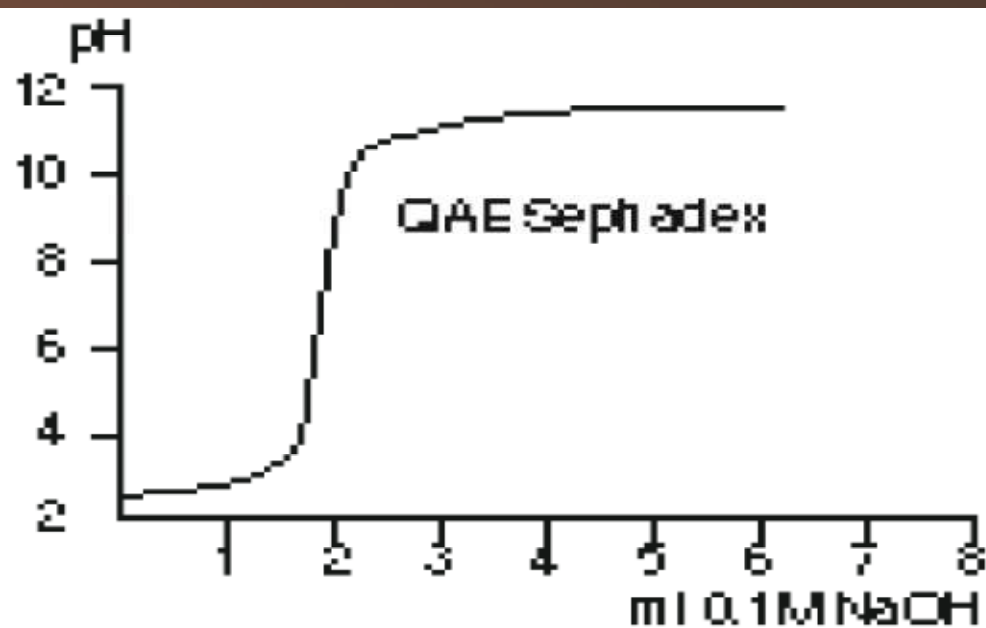
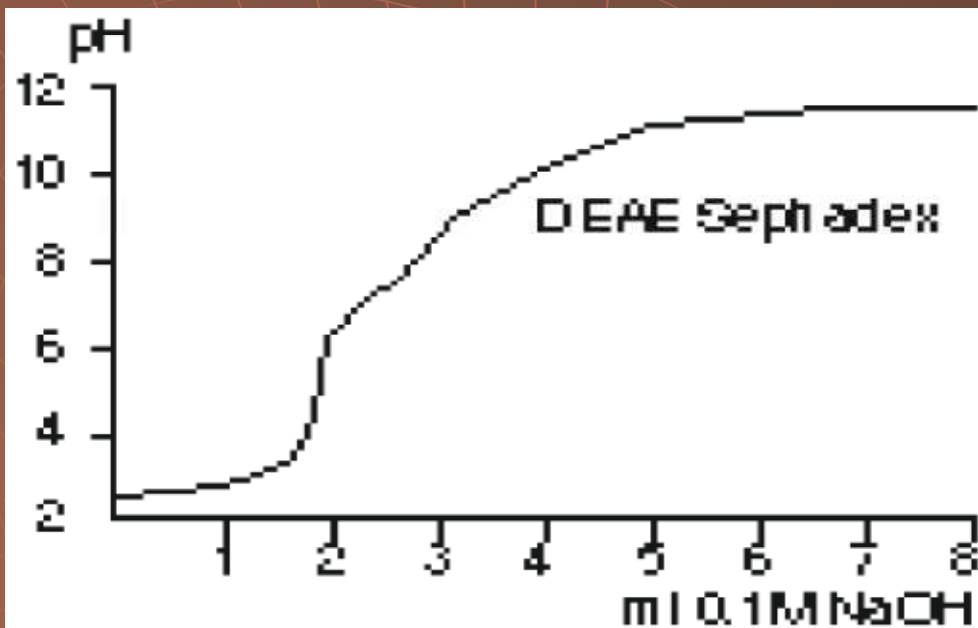
- ◆ **Katexy** - - vazba kationtů
 - silné - sulfo(S), sulfopropyl(SP) **OSO_3^-**
 - slabé - karboxy(C), karboxymetyl(CM)
 COO^-
- ◆ **Anexy** - + vazba aniontů
 - slabé - **diethylaminoetyl(DEAE)**
 - silné - **triethylaminoetyl(TEAE)**

Slabý ionex

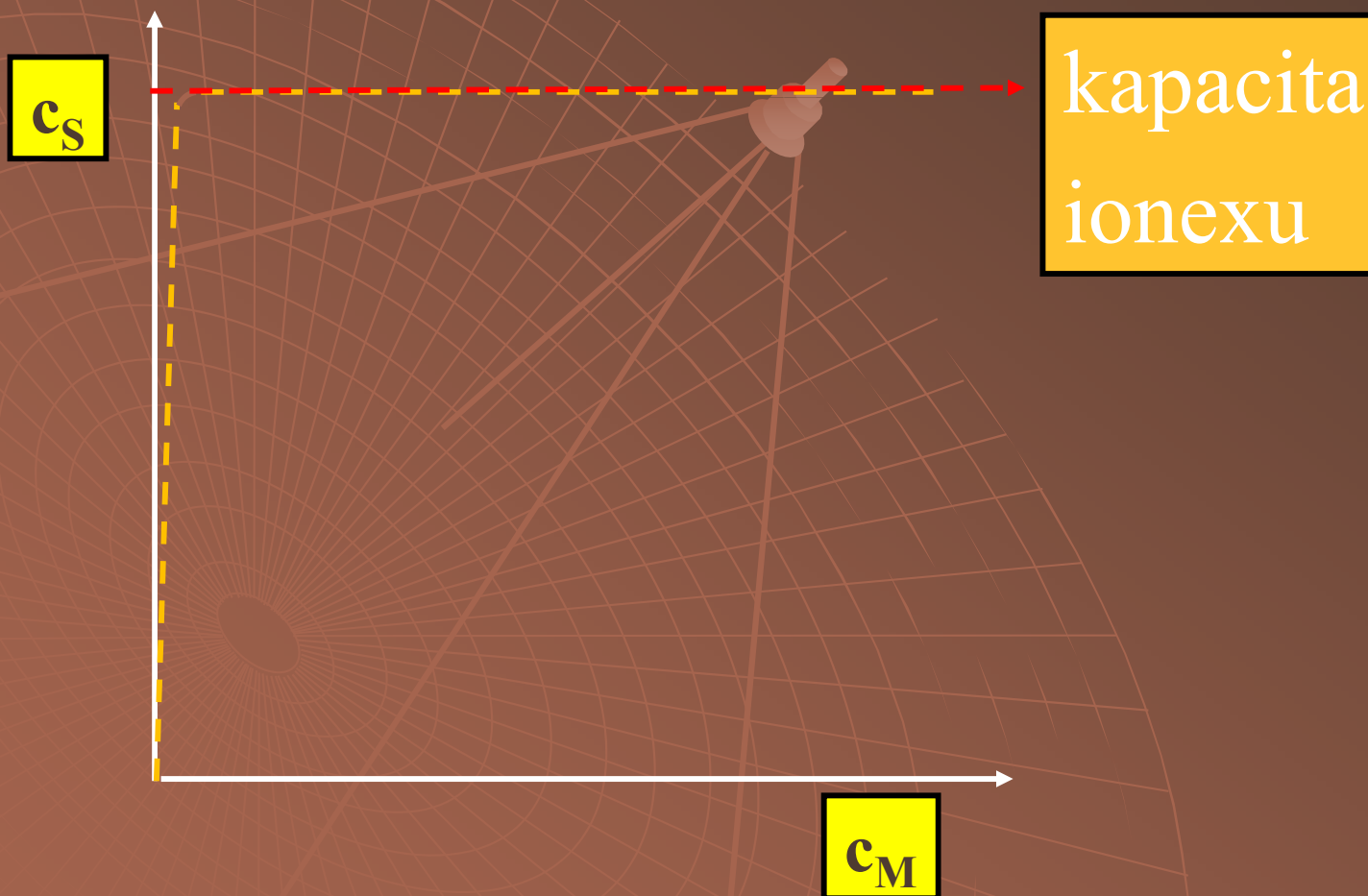
- ◆ Vykazuje změny vazebné kapacity v závislosti na pH
- ◆ Má pufrační kapacitu



Slabý versus silný ionex

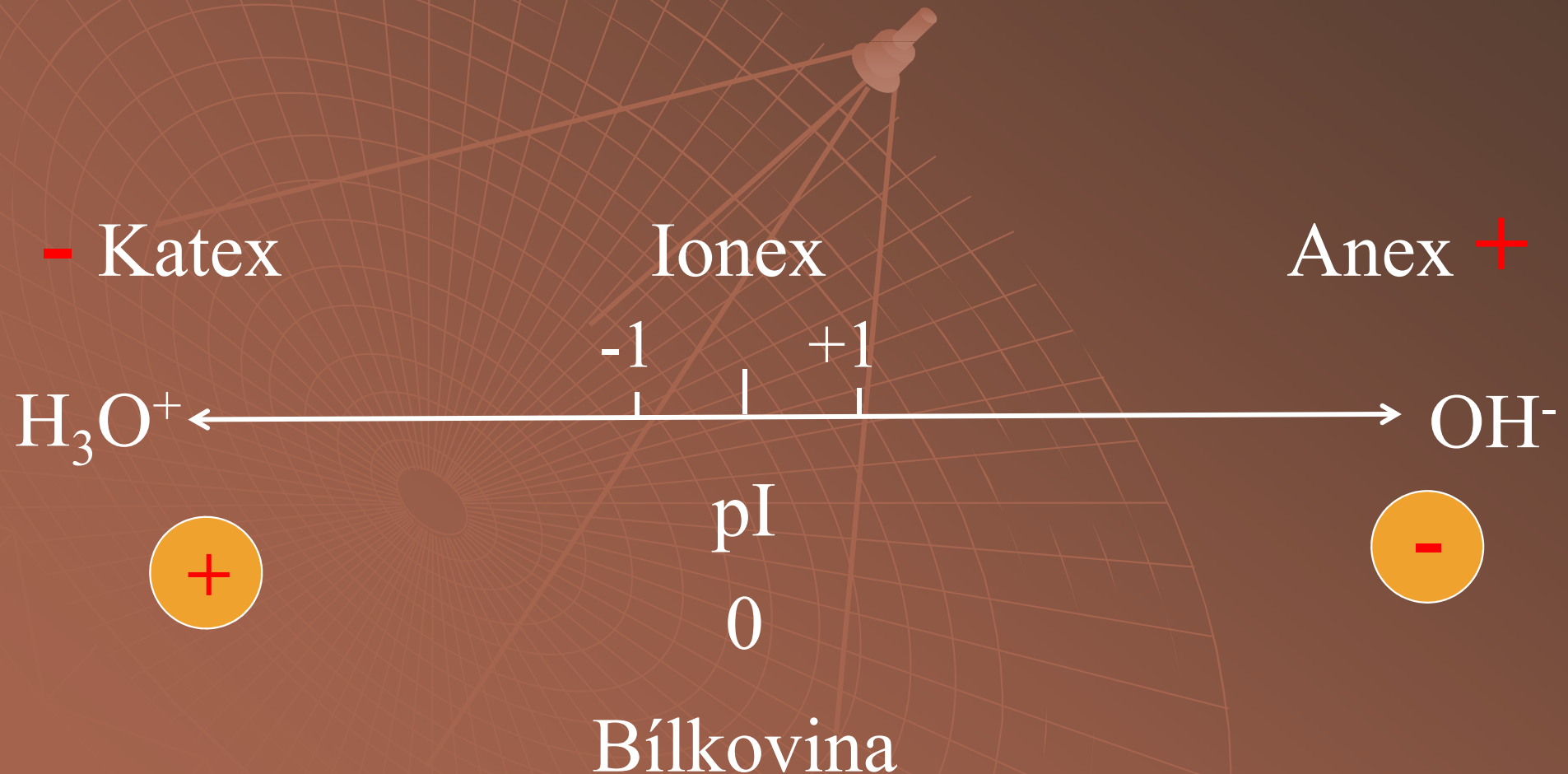


Ionexová chromatografie

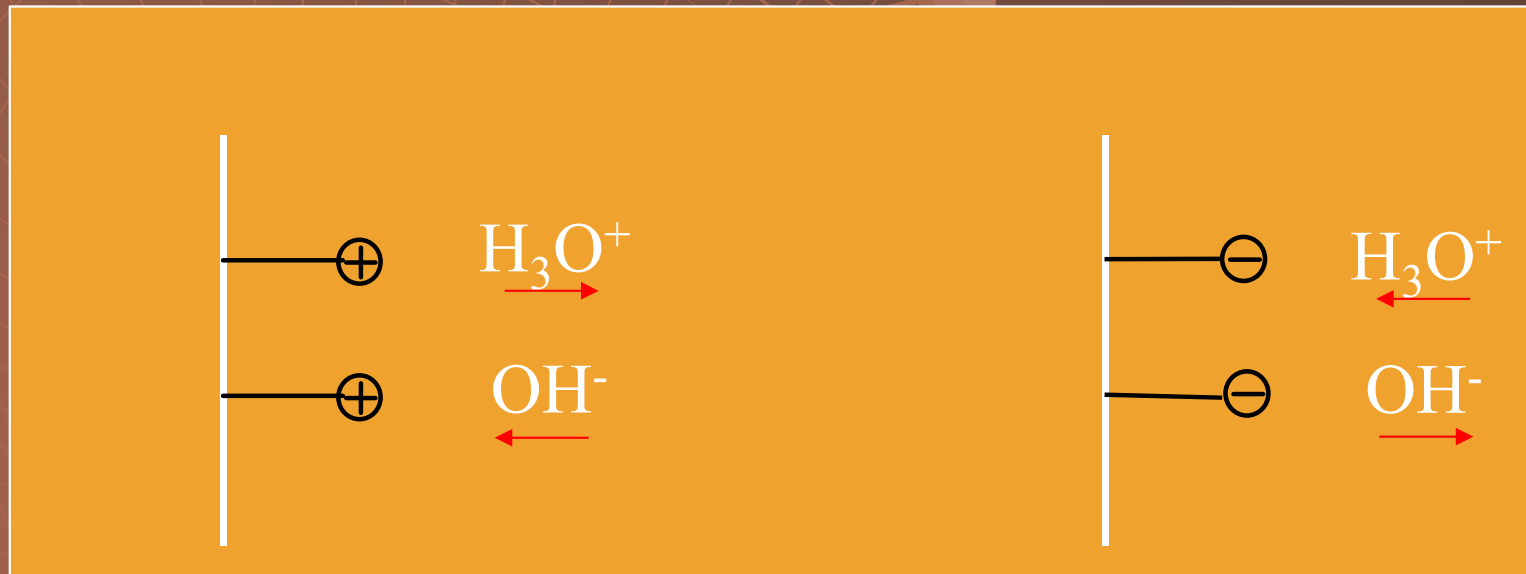


Volba podmínek – pH + typ ionexu

pI bílkoviny je znám



Donanův efekt



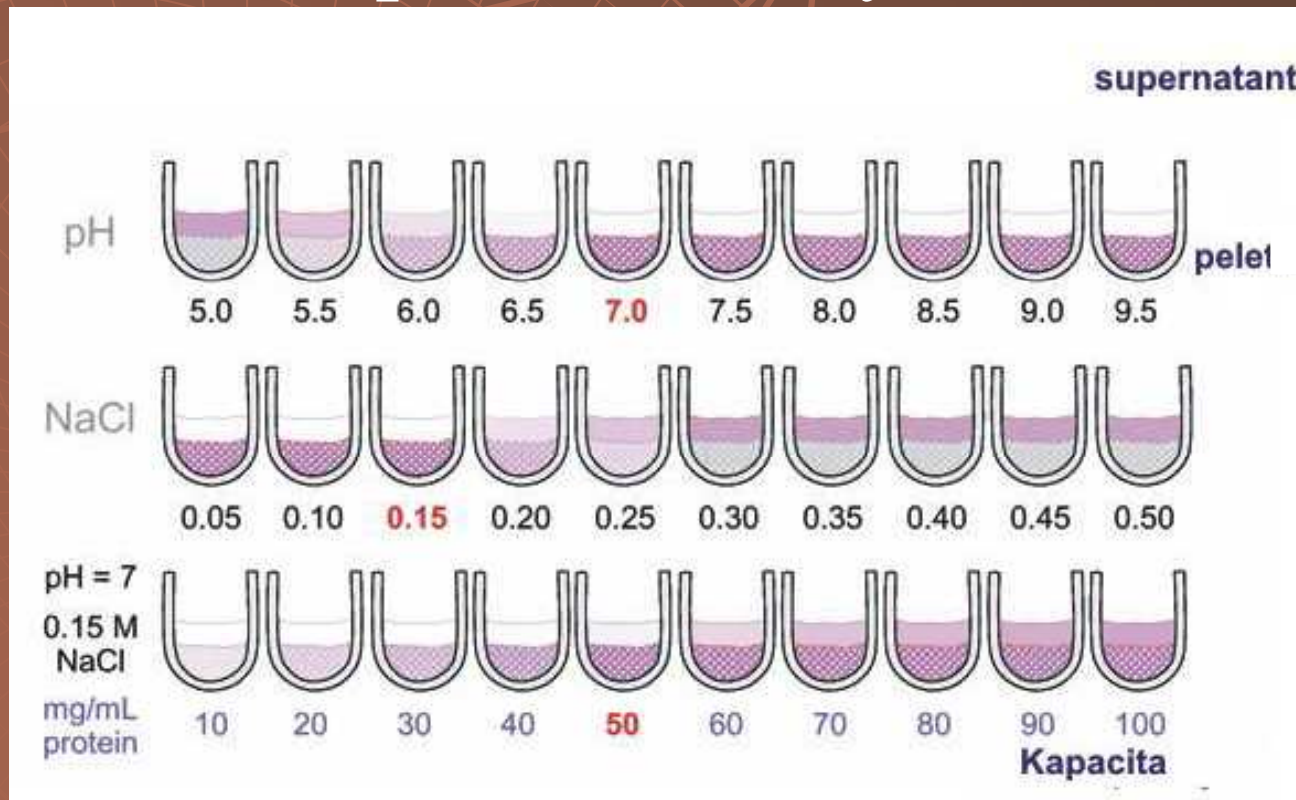
zvyšování pH

snižování pH

Volba podmínek – pH + typ ionexu

pI bílkoviny není znám

- Metoda pokusů a omylů

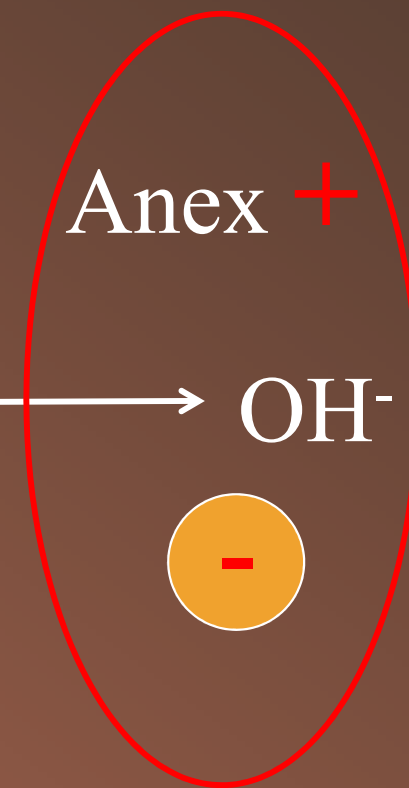
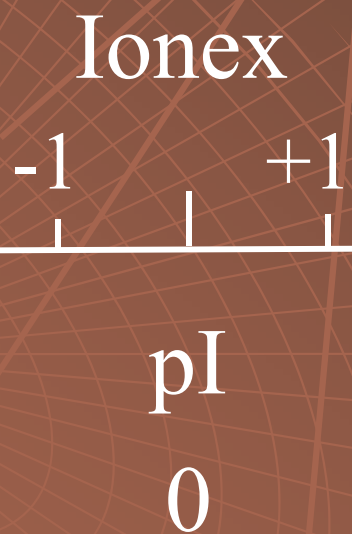
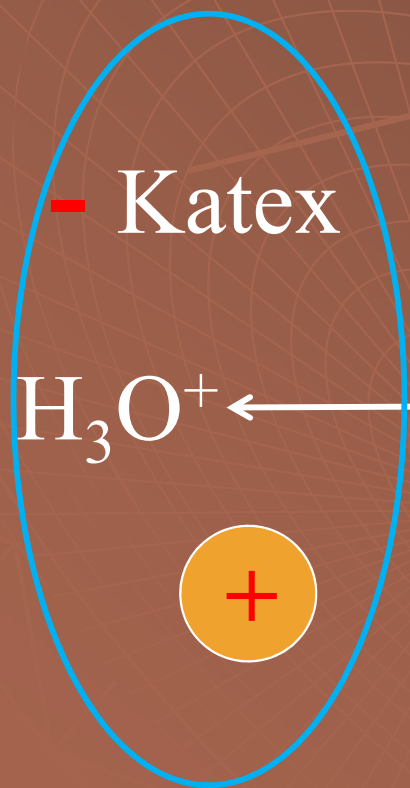


- Metoda titračních křivek

Ionexová chromatografie

- ◆ Nanášení vzorku – nízká iontová síla
- ◆ Eluce – gradientová
 - ◆ Zvyšováním iontové síly
 - ◆ Změnou pH
 - ◆ Afinitní eluce

Použití – purifikace, zakoncentrování,
výměna pufru



Bílkovina

Protein

Ionexová chromatografie

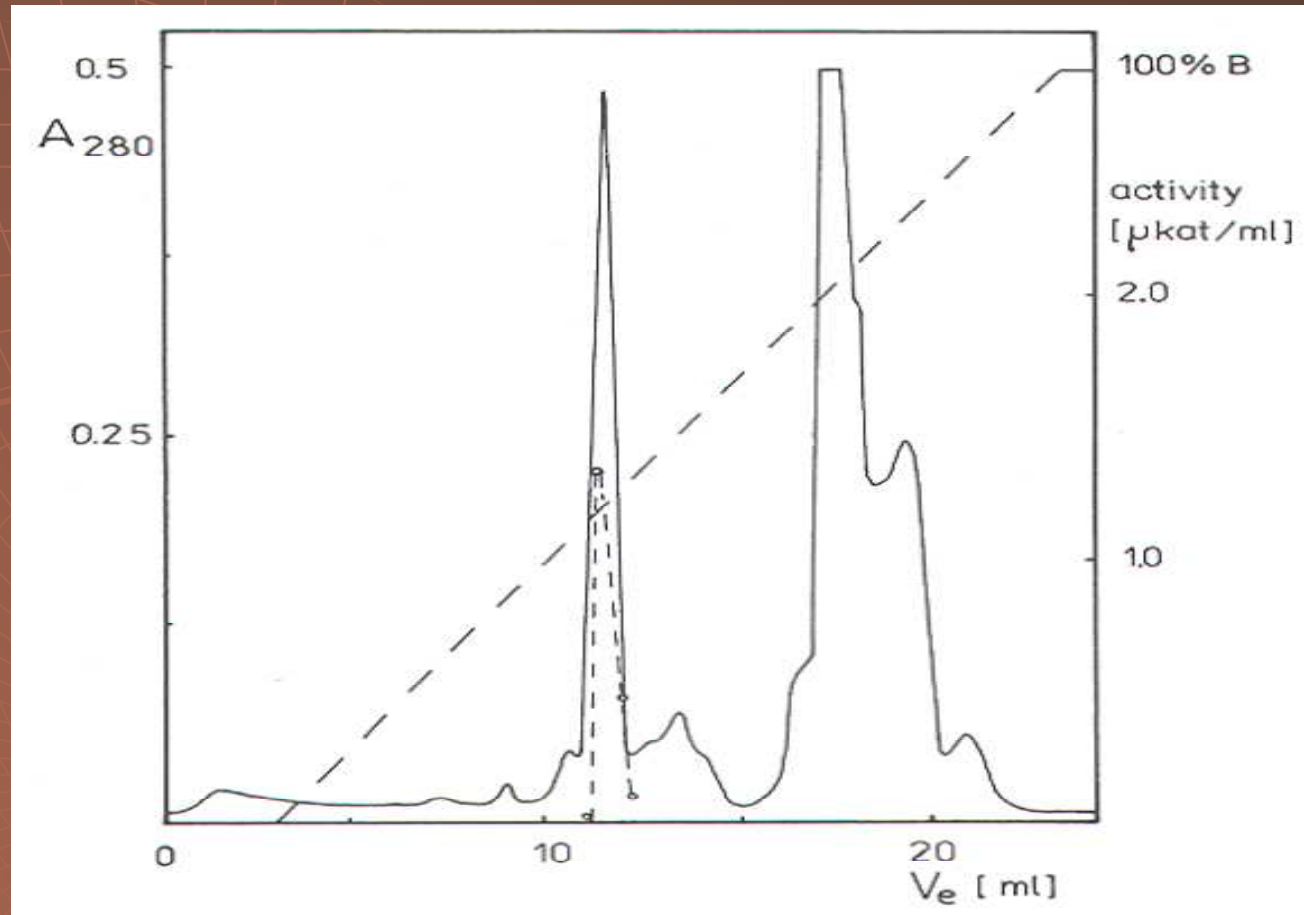


Fig. 2. Chromatography of partially purified G6P-DH on a Mono Q column. Buffers: (A) 0.05 M sodium phosphate (pH 7.4); (B) same as A but with 1 M sodium chloride; flow-rate, 1 ml/min. Lines symbol as in Fig. 1. Approximately 10 mg of protein were applied to the column.

Ionexová chromatografie

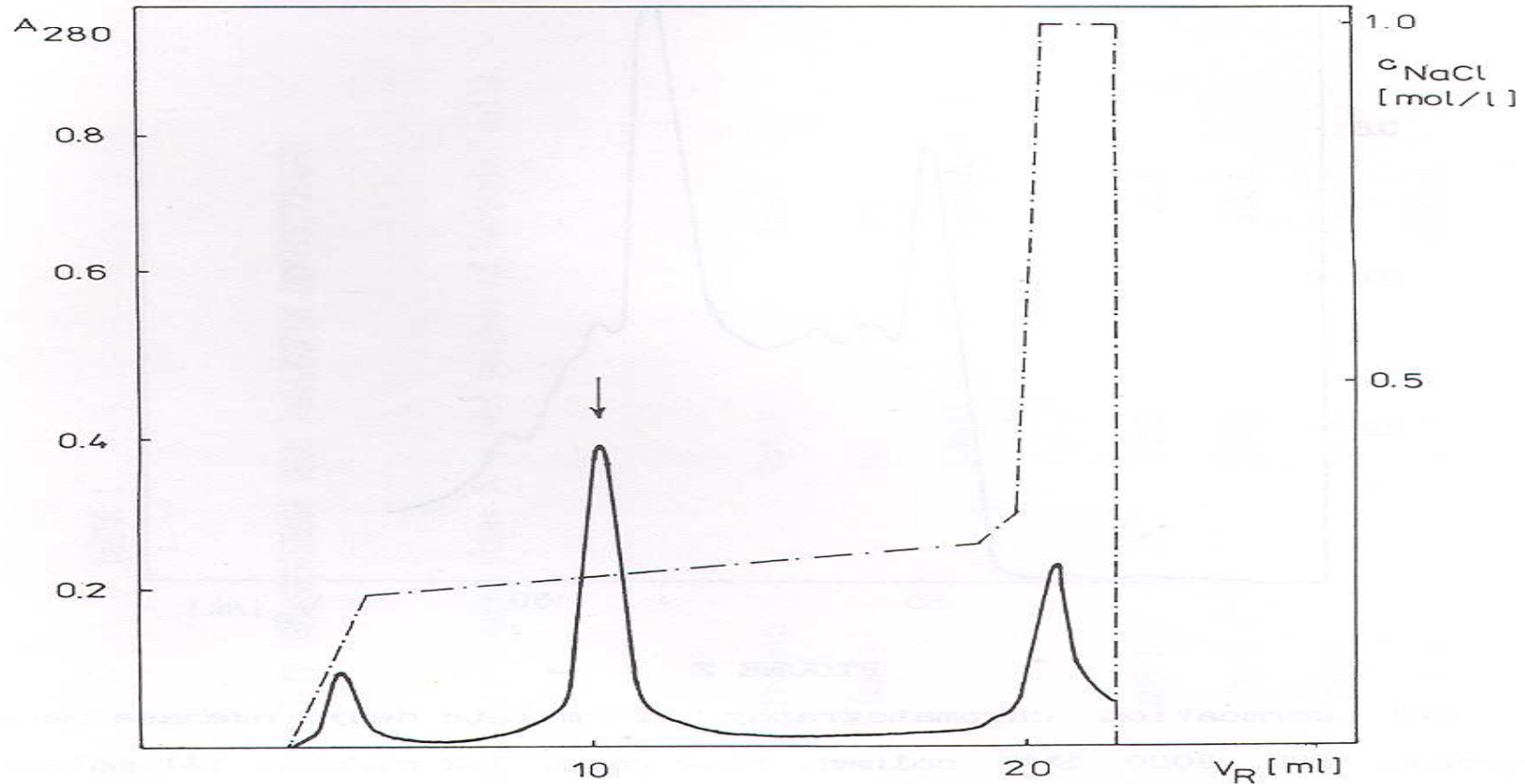
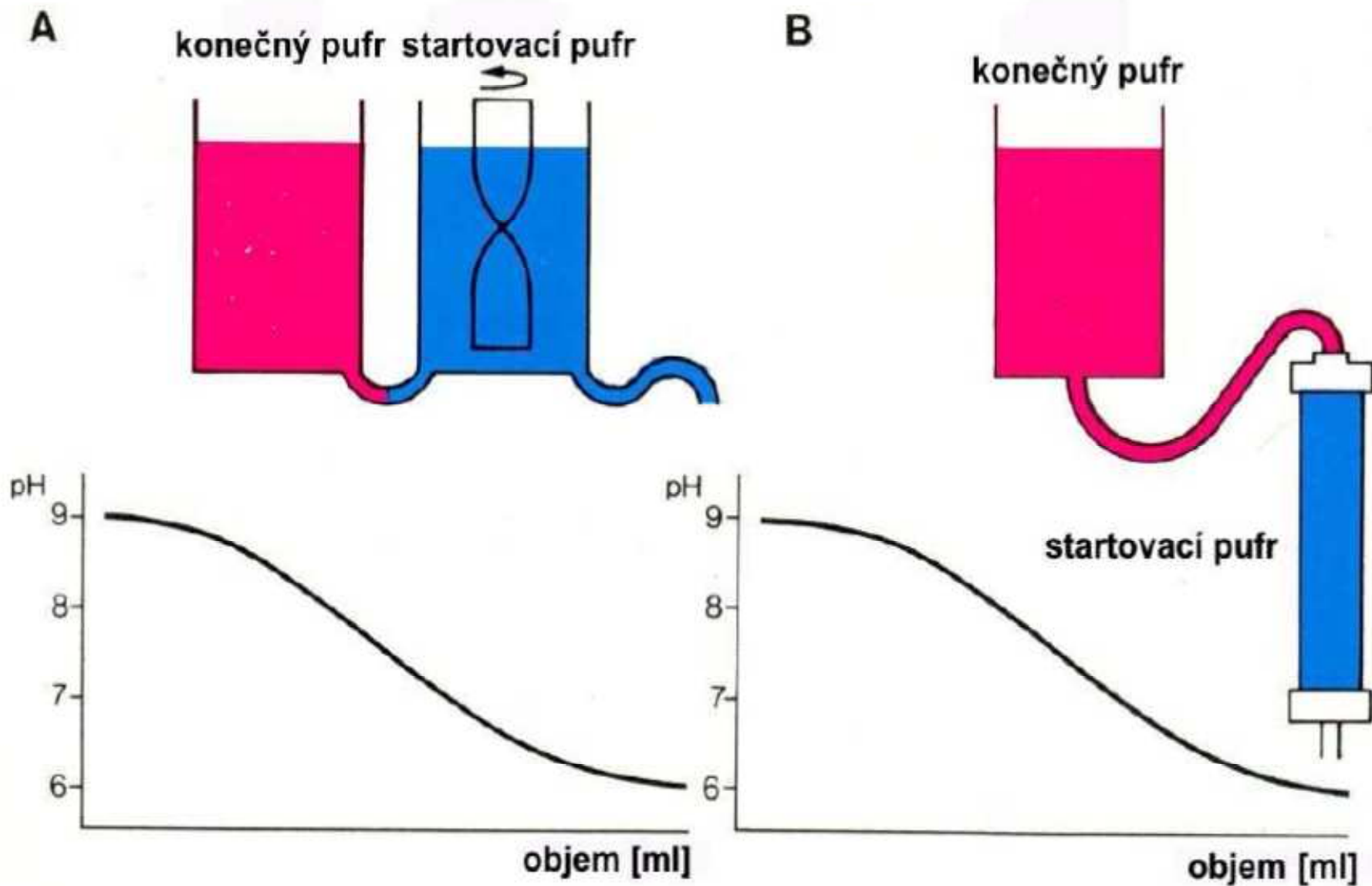


FIGURE 3

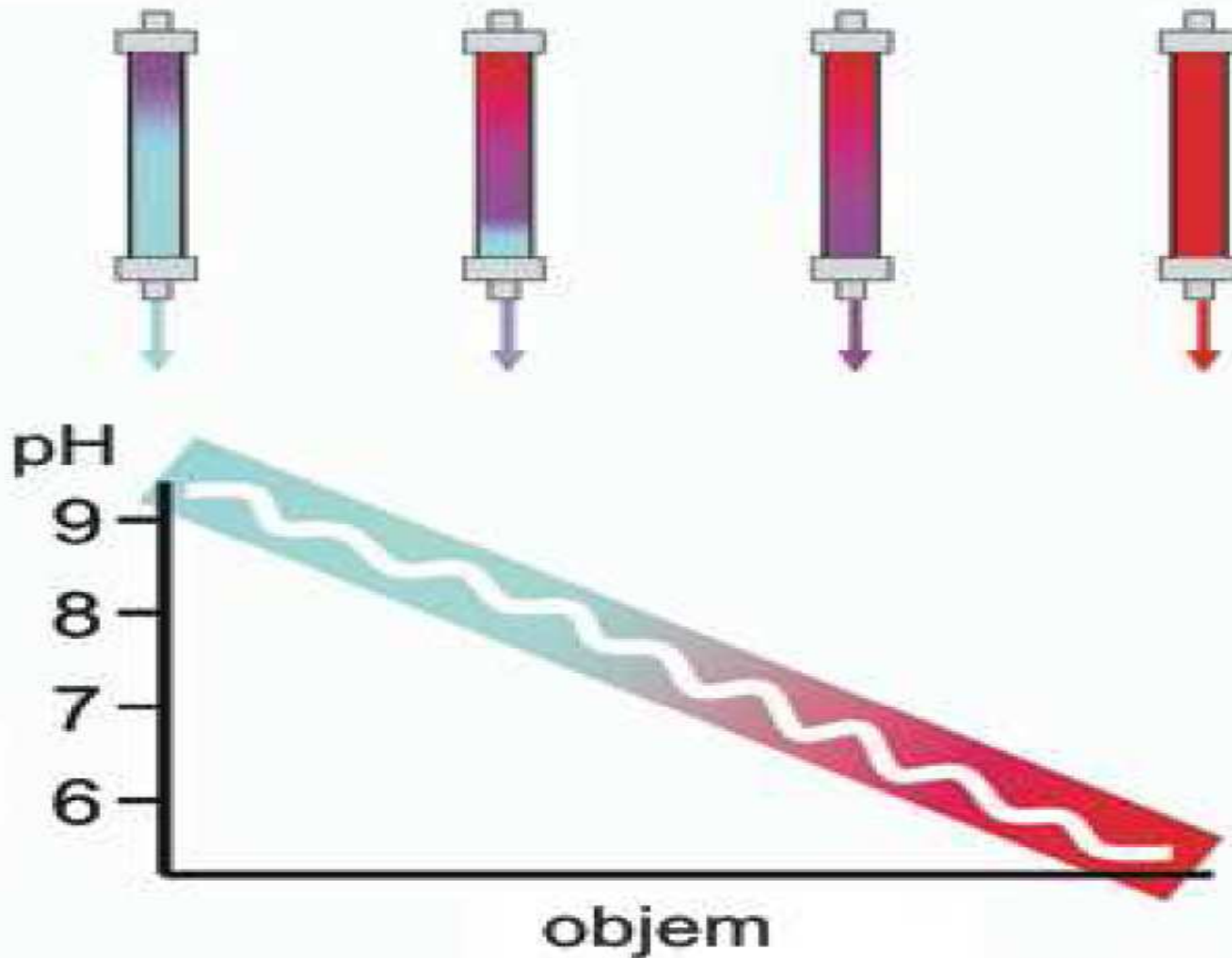
Ionex chromatography of malate dehydrogenase on a Mono Q column. V_e , elution volume; —, absorbance at 280 nm (A_{280}); (\downarrow) malate dehydrogenase activity; ----, NaCl gradient (buffer A, 0.02 mol/l sodium phosphate (pH 6.0); buffer B, the same as buffer A but with 1.0 mol/l NaCl); flow rate, approx. 1.2 ml/min.

Chromatofokusace

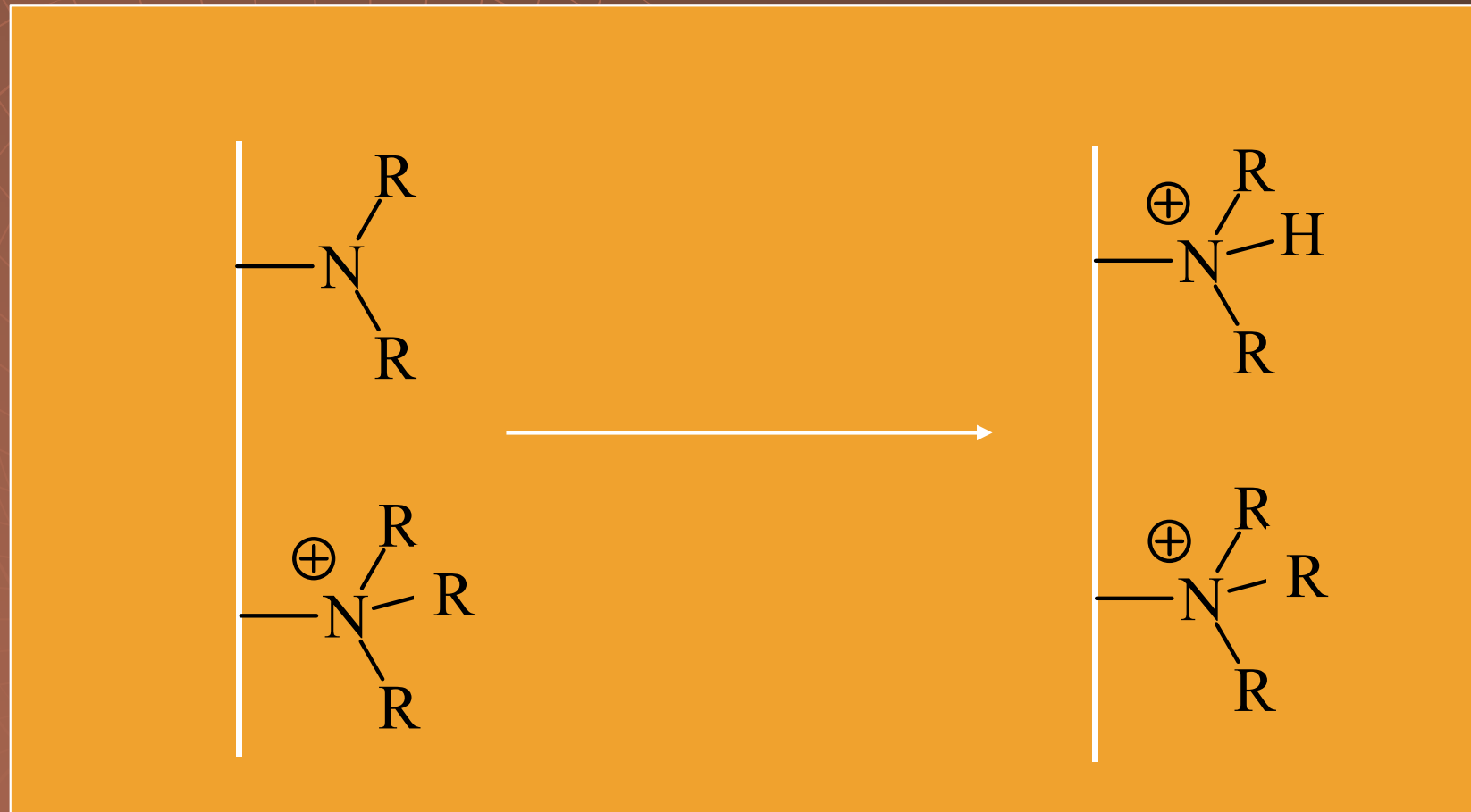


Chromatofokusace

- Polybuffer (pulypufr) obsahuje ampholyty - směs látek majících různé pKa



Chromatofokusace děj na koloně



pH = 9

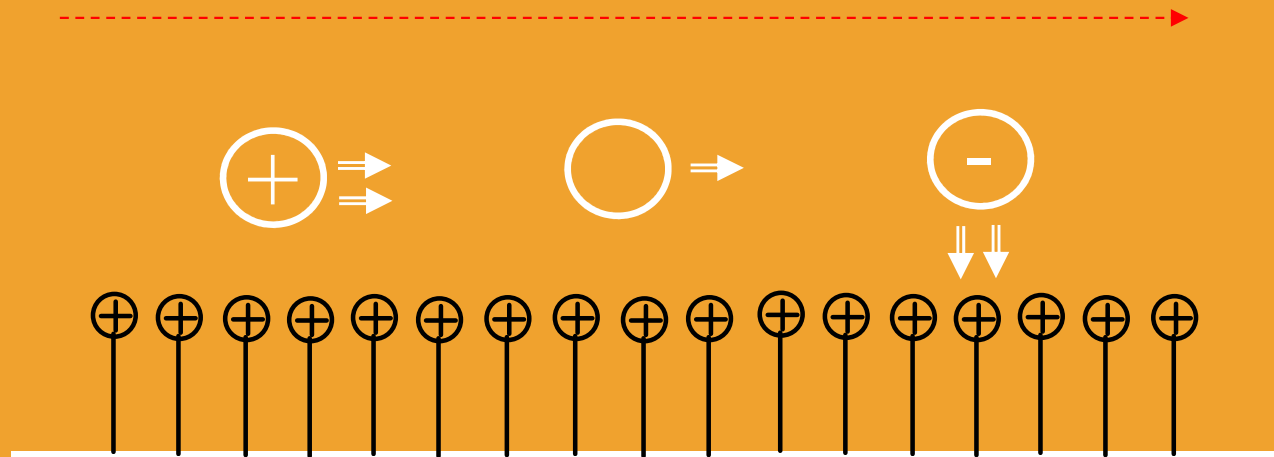
pH = 4

Chromatofokusace chování vzorku

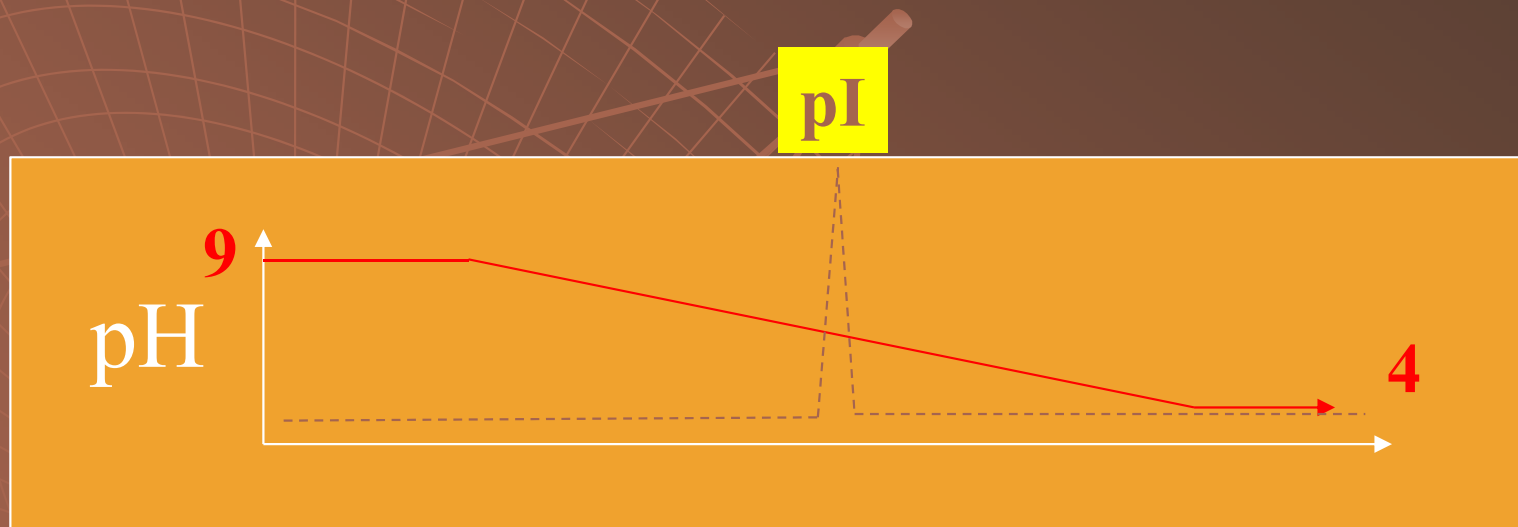
$pH \triangleleft pI$

$pH = pI$

$pH \triangleright pI$

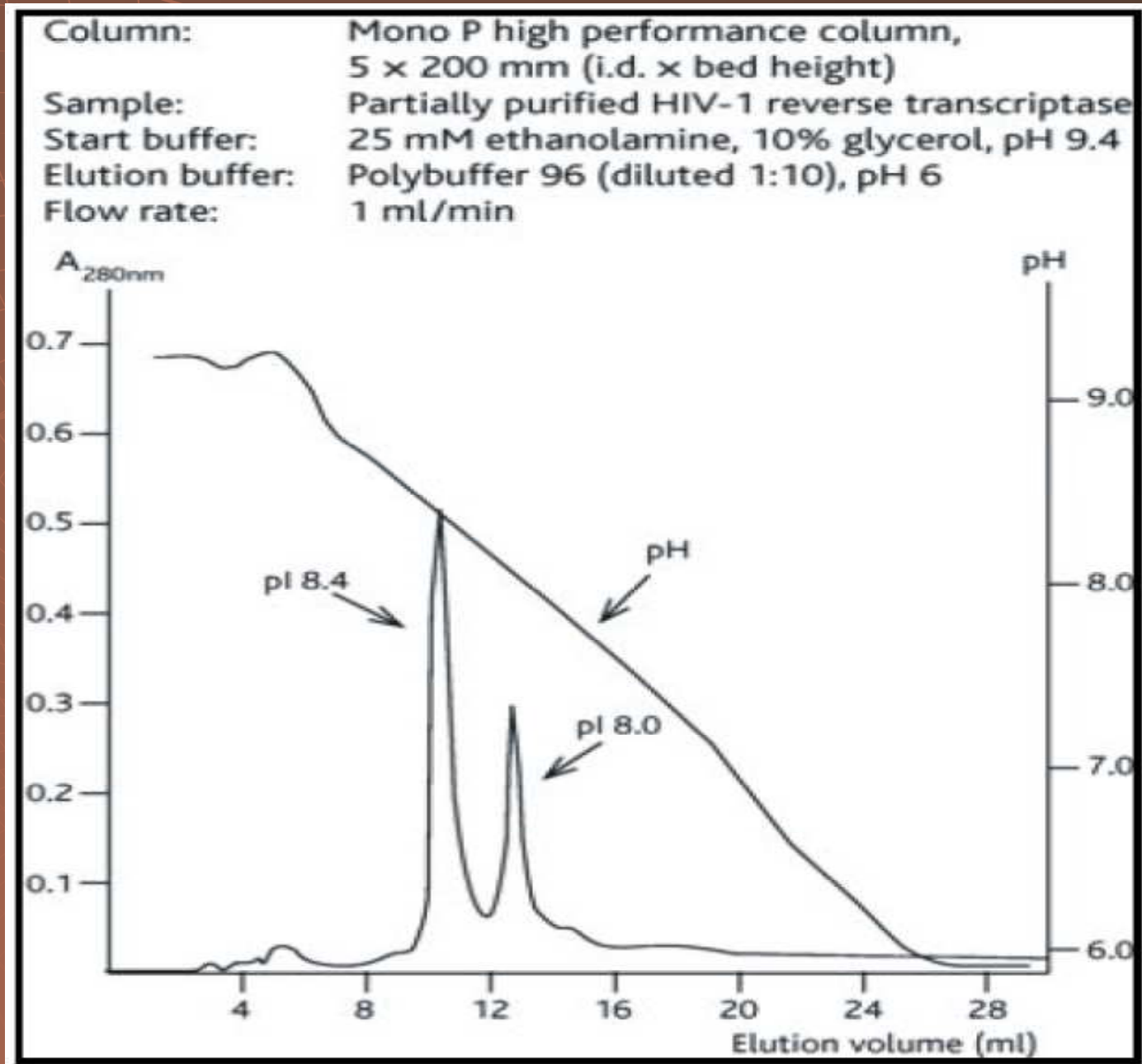


Chromatofokusace chování vzorku



Použití : analytické – stanovení pI
preparativní – purifikace bílkovin

Chromatofokusace



Chromatofokusace

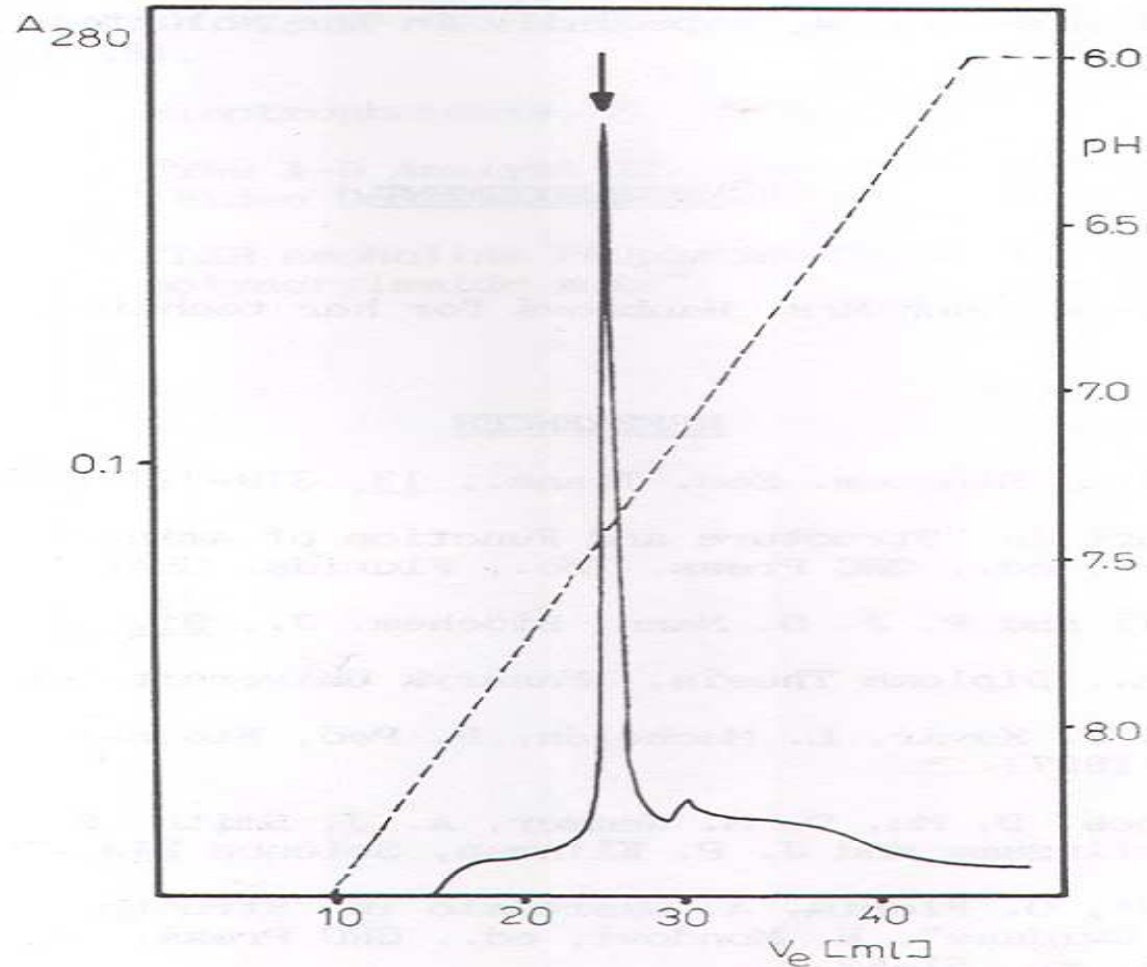
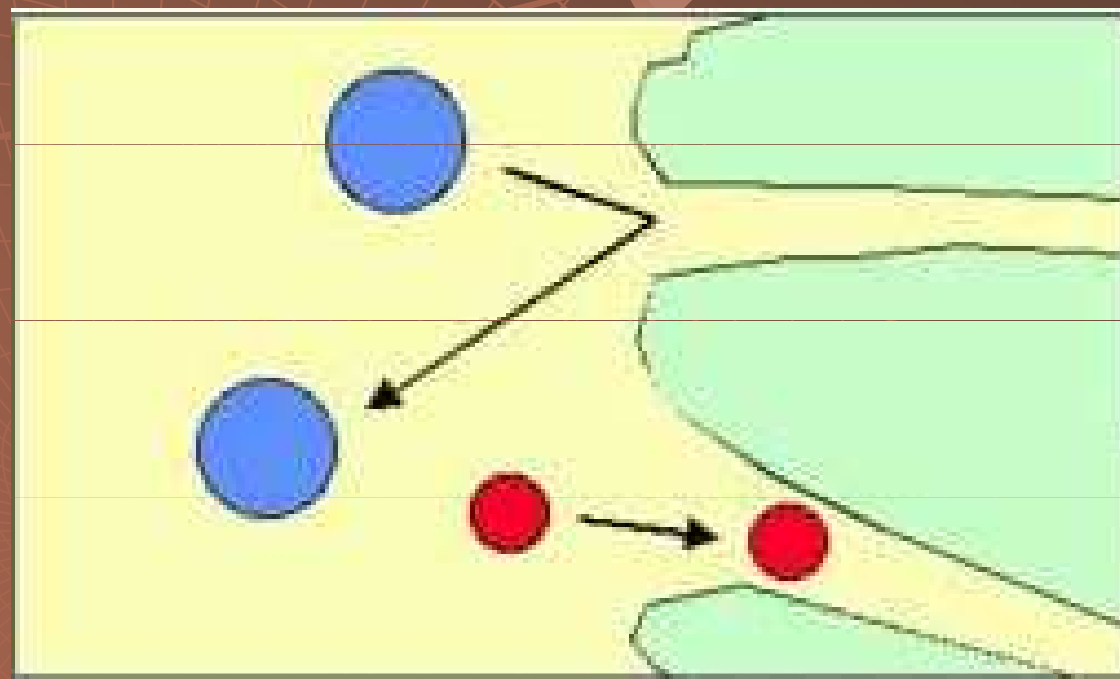


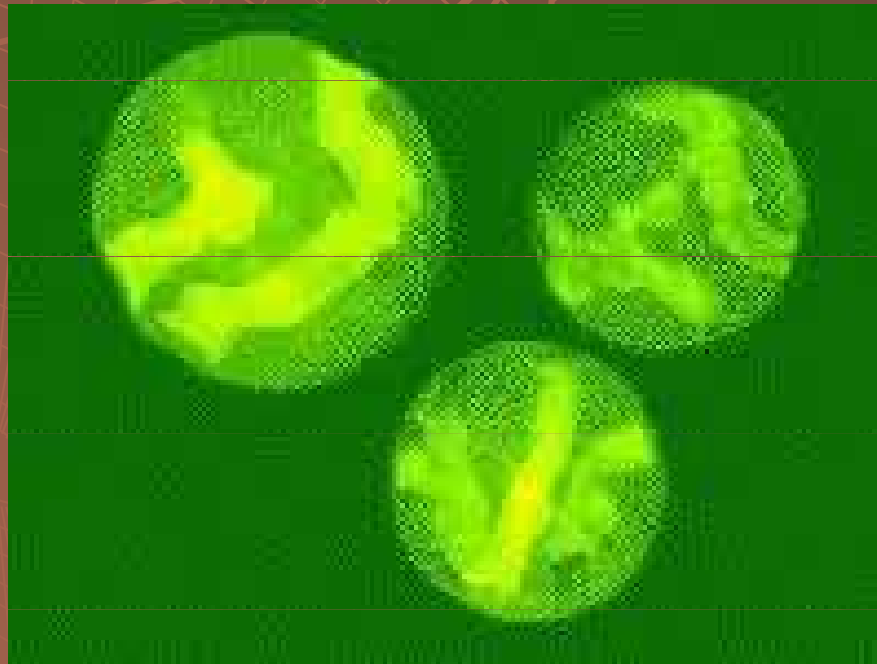
Figure 6

Chromatofocusing of the homogeneous DAO on Mono P column; ---- pH value of the eluate, flow-rate 0.7 ml/min, the other symbols as in Fig. 1. DAO activity is indicated by an arrow.

Gelová permeační chromatografie

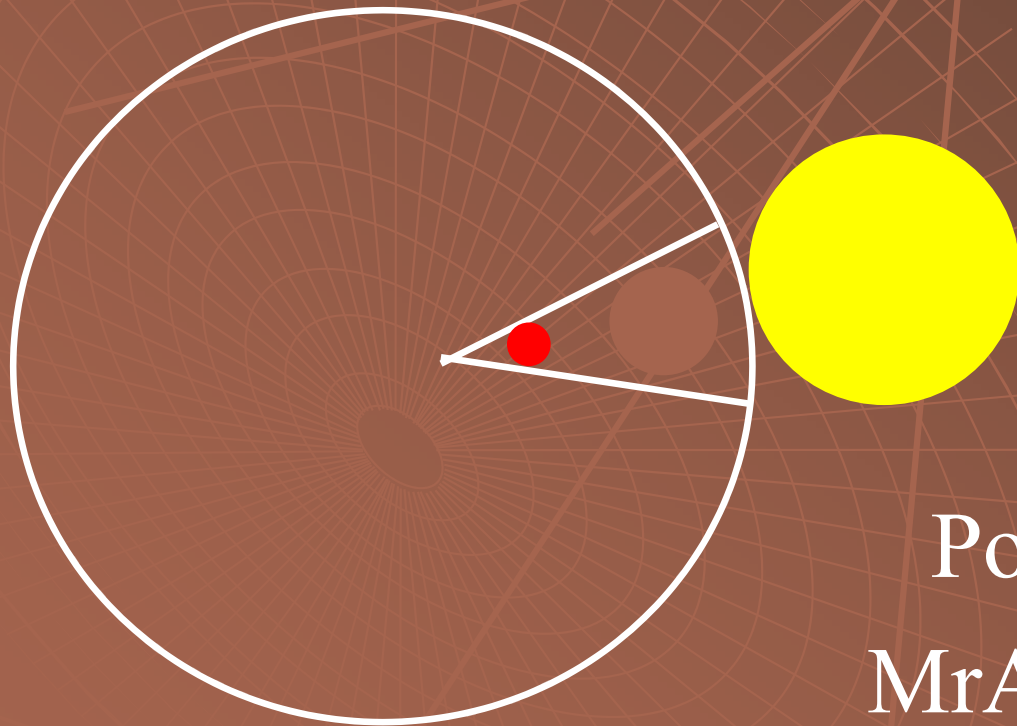


Gelová permeační chromatografie



Gelová permeační chromatografie

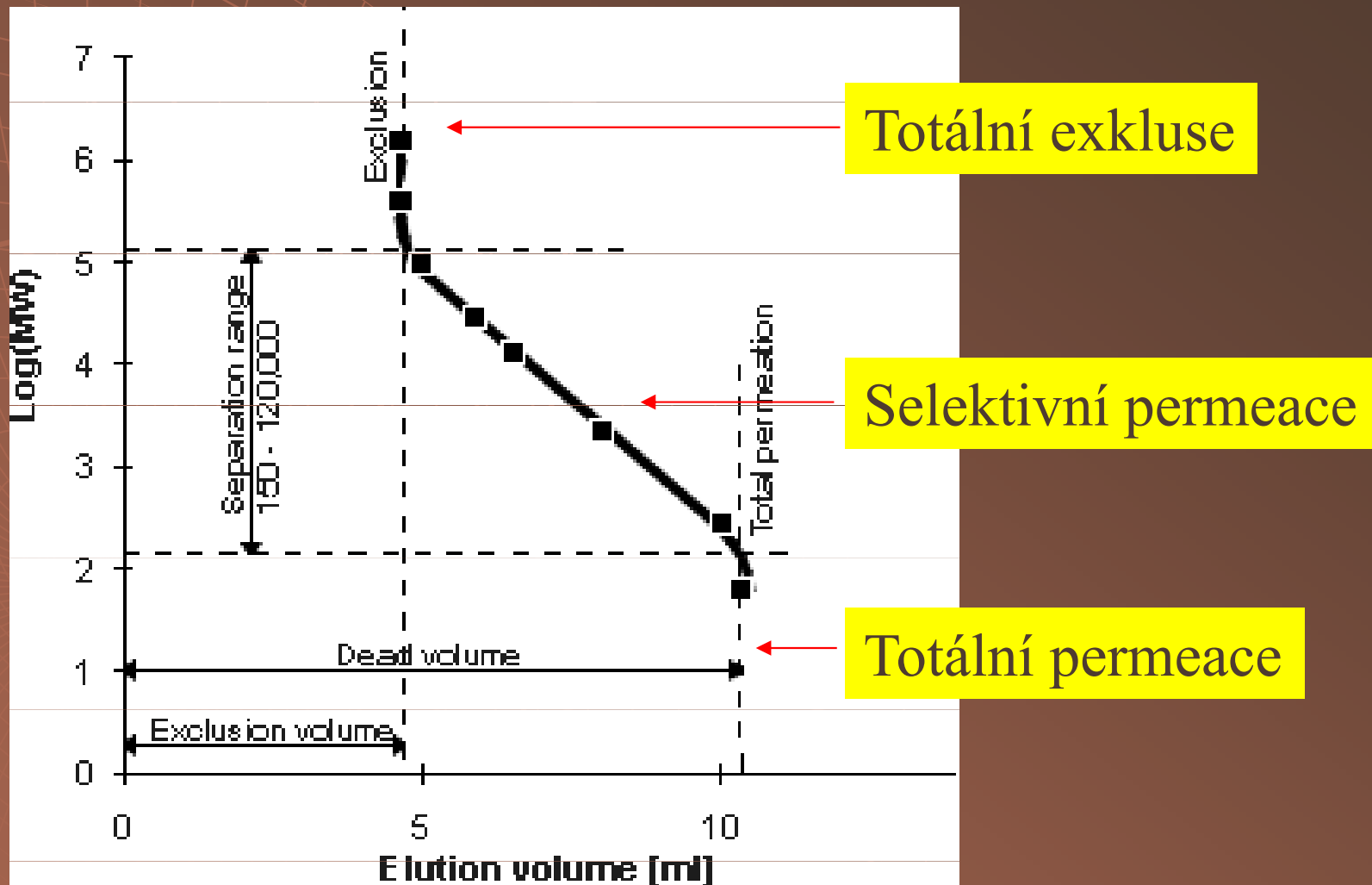
Princip - stérická exkluze
- omezená difuze



Pořadí eluce :

$MrA > MrB > MrC$

Gelová permeační chromatografie



Gelová permeační chromatografie

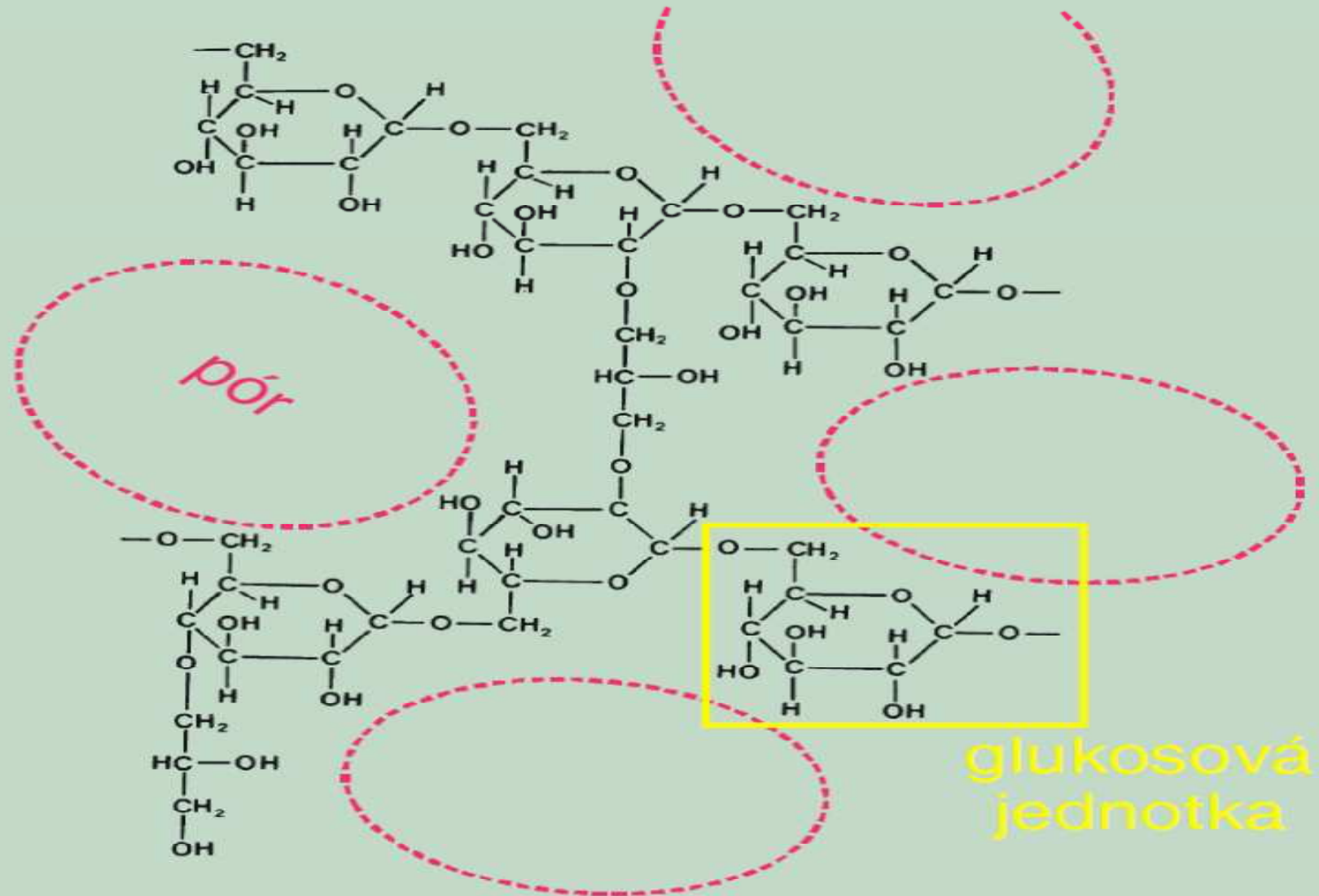
Pharmacia LPC

- Sephadex dextran
- Sepharose agarosa
- Sephacryl glukosa + akryamid
- Sephacel cellulosa

Pharmacia FPLC

- Superose agarosa
- Superdex síťovaná agarosa a dextran

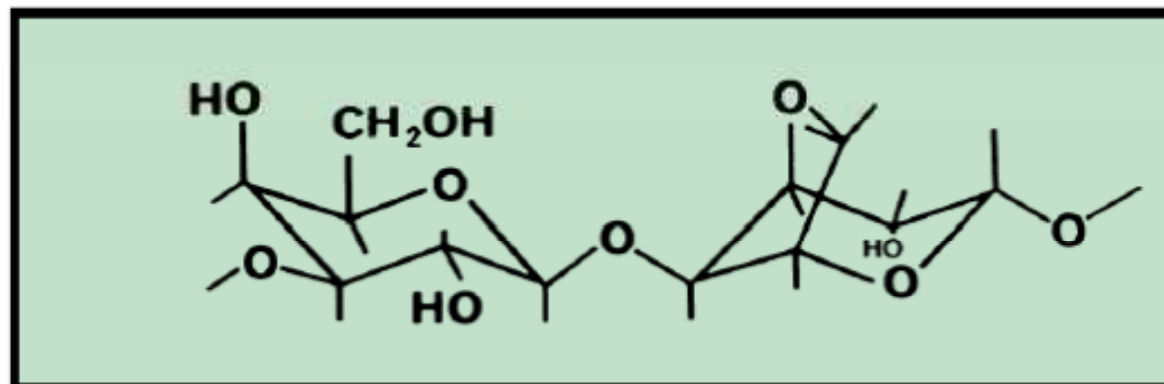
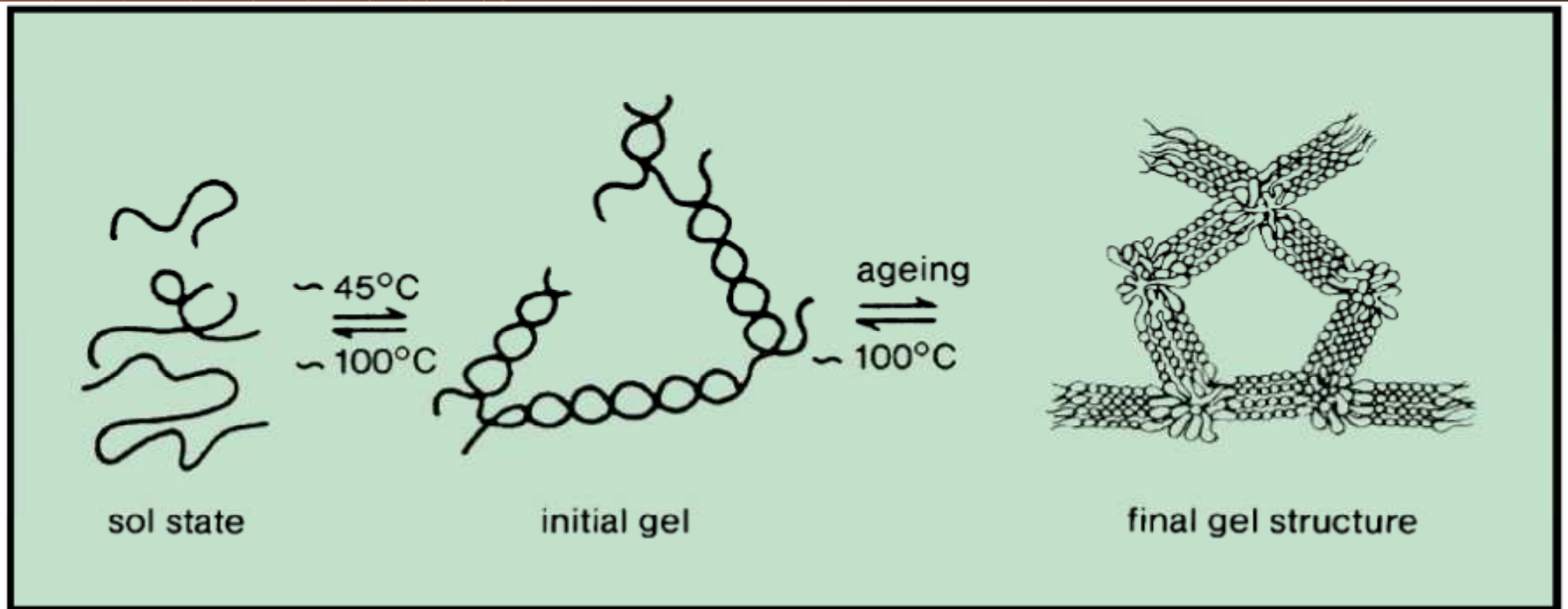
Sephadex



Sephadex

Gel type	Dry bead size µm	Fractionation range		Fractionation range		Swelling factor ml/g
		Globular proteins		Dextrans		
Sephadex G-10	40 – 120	–	700	–	700	2 – 3
Sephadex G-15	40 – 120	–	1 500	–	1 500	2.5 – 3.5
Sephadex G-25 Coarse	100 – 300	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Medium	50 – 150	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Fine	20 – 80	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Superfine	10 – 40	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-50 Coarse	100 – 300	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Medium	50 – 150	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Fine	20 – 80	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Superfine	10 – 40	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-75	40 – 120	3 000 –	80 000	1 000 –	50 000	12 – 15
Sephadex G-75 Superfine	10 – 40	3 000 –	70 000	1 000 –	50 000	12 – 15
Sephadex G-100	40 – 120	4 000 –	150 000	1 000 –	100 000	15 – 20
Sephadex G-100 Superfine	10 – 40	4 000 –	100 000	1 000 –	100 000	15 – 20
Sephadex G-150	40 – 120	5 000 –	300 000	1 000 –	150 000	20 – 30
Sephadex G-150 Superfine	10 – 40	5 000 –	150 000	1 000 –	150 000	18 – 22
Sephadex G-200	40 – 120	5 000 –	600 000	1 000 –	200 000	30 – 40
Sephadex G-200 Superfine	10 – 40	5 000 –	250 000	1 000 –	150 000	20 – 25

Sepharosa



Sepharosa

Gel type	Approx. % agarose	Bead size μm	Fractionation range Globular proteins.	Fractionation range Dextrans
Sepharose 6B	6	45 – 165	10 000 – 4 000 000	10 000 – 1 000 000
Sepharose 4B	4	45 – 165	60 000 – 20 000 000	30 000 – 5 000 000
Sepharose 2B	2	60 – 200	70 000 – 40 000 000	100 000 – 20 000 000

Gel type	Bead size μm	Fractionation range Globular proteins	Fractionation range Dextrans
Superose 12 prep grade	20 – 40	1 000 – 300 000	ND
Superose 12	8 – 12	1 000 – 300 000	ND
Superose 6 prep grade	20 – 40	5 000 – 5 000 000	ND
Superose 6	11 – 15	5 000 – 5 000 000	ND

Gelová permeační chromatografie

Bio-Rad

- BioGel P
- BioGel A

akrylamid
agarosa

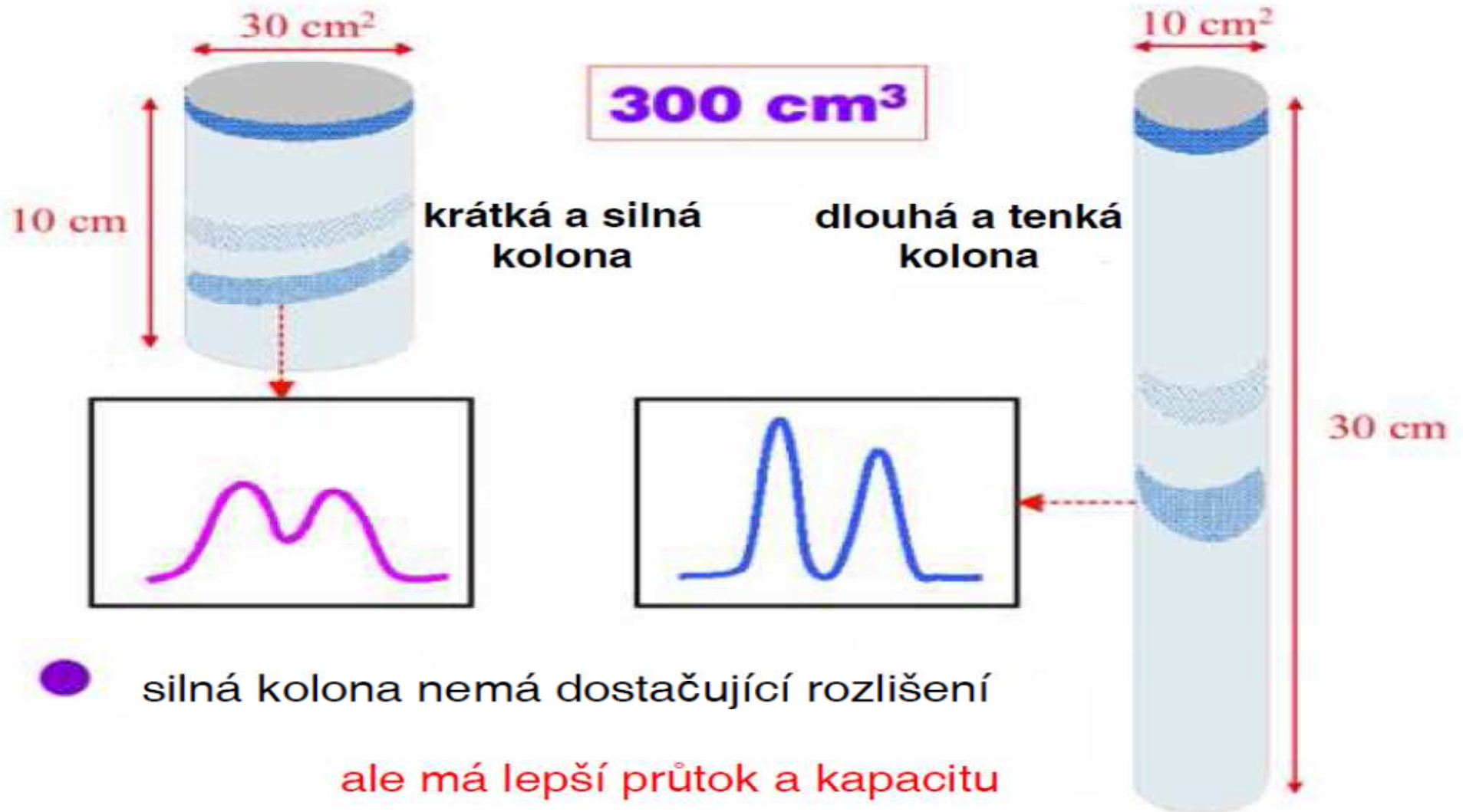
Tosoh Bioscience

- Toyopearl a TSKgel
- hydroxylovaný methacrylát

BioGel P

Gel	Particle Size Range, Hydrated Beads (μM)	Typical Hydrated Bed Volume, ml/g of Dry Gel	Typical Flow Rates (cm/hr)*	Typical Fractionation Range/Nominal Exclusion Limit (Daltons)**, †
Bio-Gel P-2 Gel, Fine	45-90	3	5.0-10	100-1,800
Bio-Gel P-2 Gel, Extra Fine	< 45		<10	100-1,800
Bio-Gel P-4 Gel, Medium	90-180	4	15-20	800-4,000
Bio-Gel P-4 Gel, Fine	45-90		10.0-15	800-4,000
Bio-Gel P-4 Gel, Extra Fine	< 45		<10	800-4,000
Bio-Gel P-6 Gel, Medium	90-180	6.5	15-20	1,000-6,000
Bio-Gel P-6 Gel, Fine	45-90		10.0-15	1,000-6,000
Bio-Gel P-6 Gel, Extra Fine	< 45		<10	1,000-6,000
Bio-Gel P-6DG Gel	90-180	6.5	15-20	1,000-6,000
Bio-Gel P-10 Gel, Medium	90-180	7.5	15-20	1,500-20,000
Bio-Gel P-10 Gel, Fine	45-90		10.0-15	1,500-20,000
Bio-Gel P-30 Gel, Medium	90-180	9	7.0-13	2,500-40,000
Bio-Gel P-30 Gel, Fine	45-90		6.0-11	2,500-40,000
Bio-Gel P-60 Gel, Medium	90-180	11	4.0-6	3,000-60,000
Bio-Gel P-60 Gel, Fine	45-90		3.0-5	3,000-60,000
Bio-Gel P-100 Gel, Medium	90-180	12	4.0-6	5,000-100,000
Bio-Gel P-100 Gel, Fine	45-90		3.0-5	5,000-100,000

Gelová permeační chromatografie



Gelová permeační chromatografie

- ◆ Nanášení vzorku – objem vzorku < 2% objemu kolony
- ◆ Eluce – izokratická

Použití : stanovení Mr, odsolování,
" purifikace

Gelová permeační chromatografie

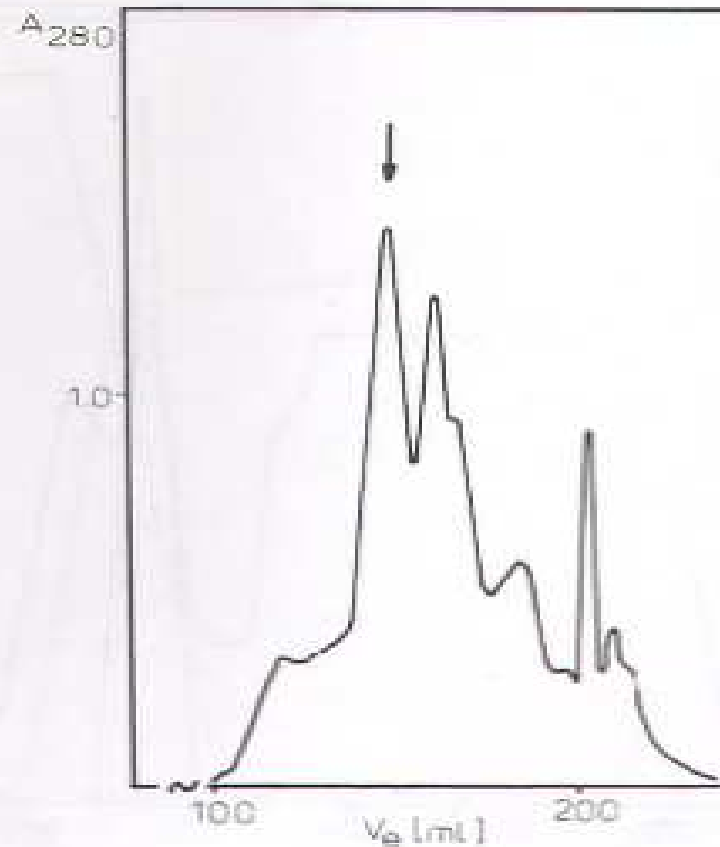


Figure 3

Chromatography of partially purified DAO on TSK 3000 SWG column. Buffer: 0.05 M potassium phosphate (pH 6.5) with 0.15 M sodium chloride; flow rate 5 ml/min. The symbols are as in Fig. 1. DAO activity is indicated by an arrow. Approximately 100 μ g of protein were applied to the column.

Gelová permeační chromatografie

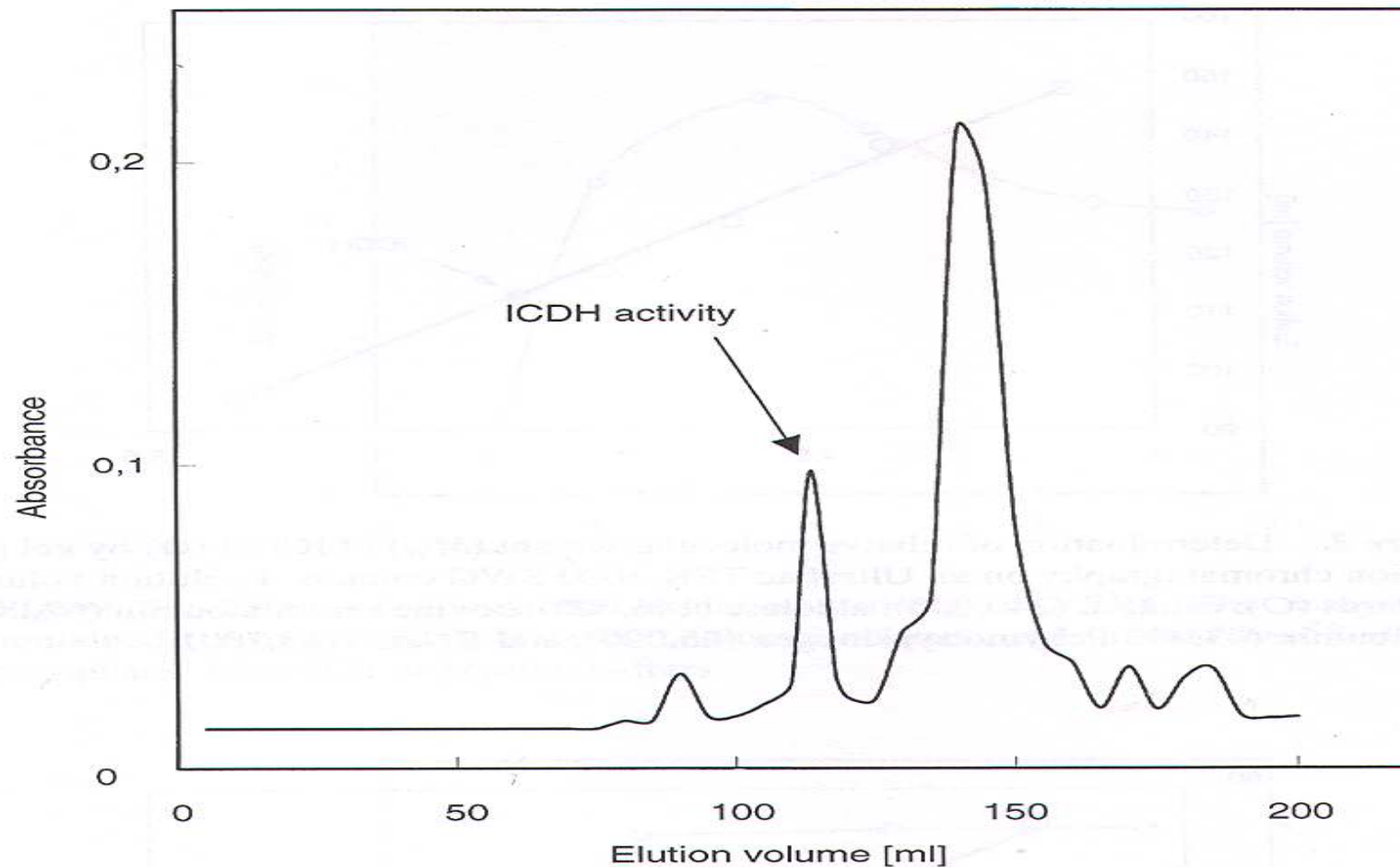


Figure 2. Chromatography of partially purified ICDH (after ammonium sulphate fractionation and ion exchange chromatography) on an UltroPac TSK G3000 SWG column. Buffer—20 mM sodium phosphate, pH 6.8; flow-rate 5 mL/min. (V_e) elution volume; (—) A_{280} ; (---) ICDH activity. Approximately 10 mg of protein was loaded onto the column.

Gelová permeační chromatografie

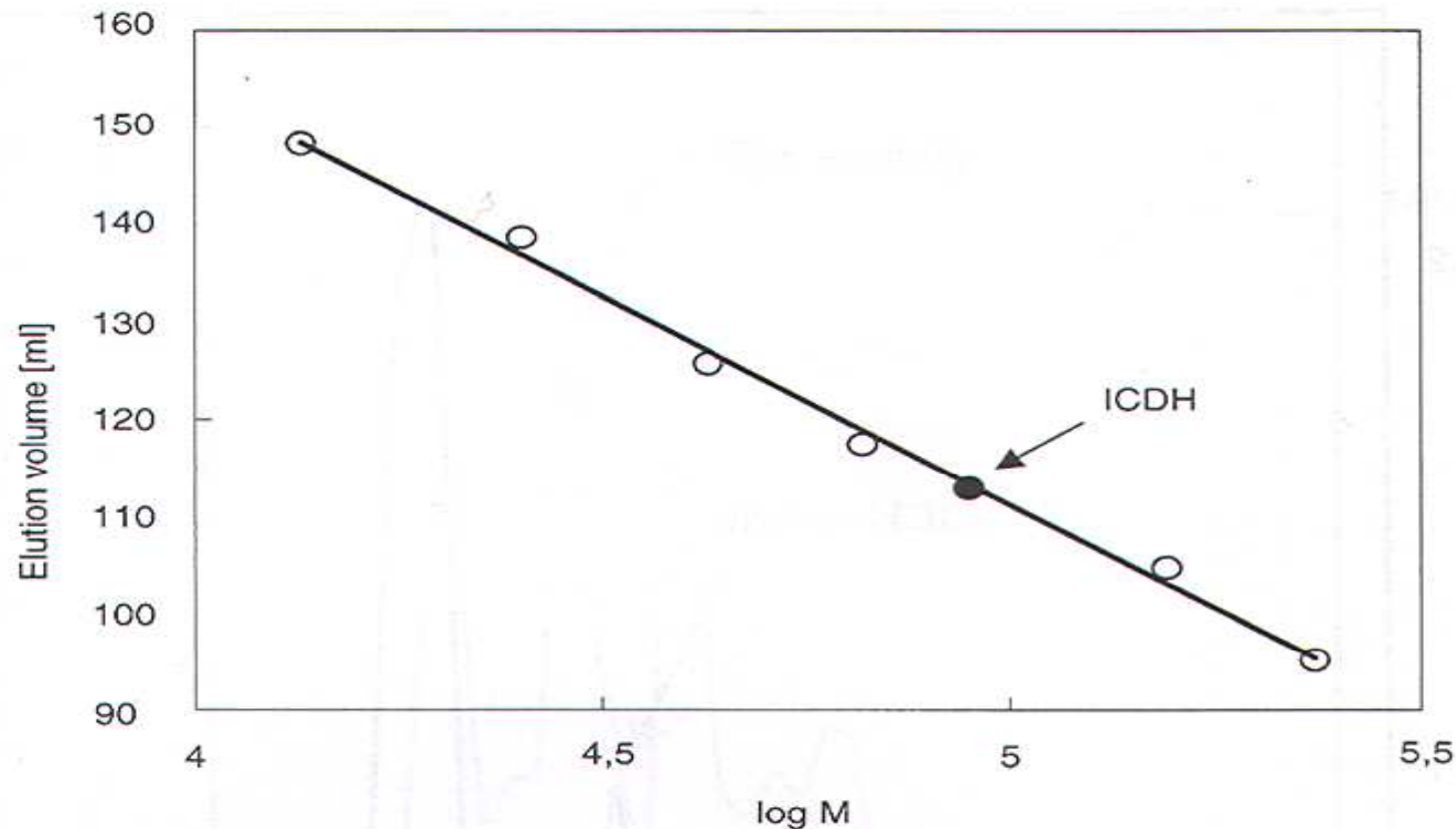
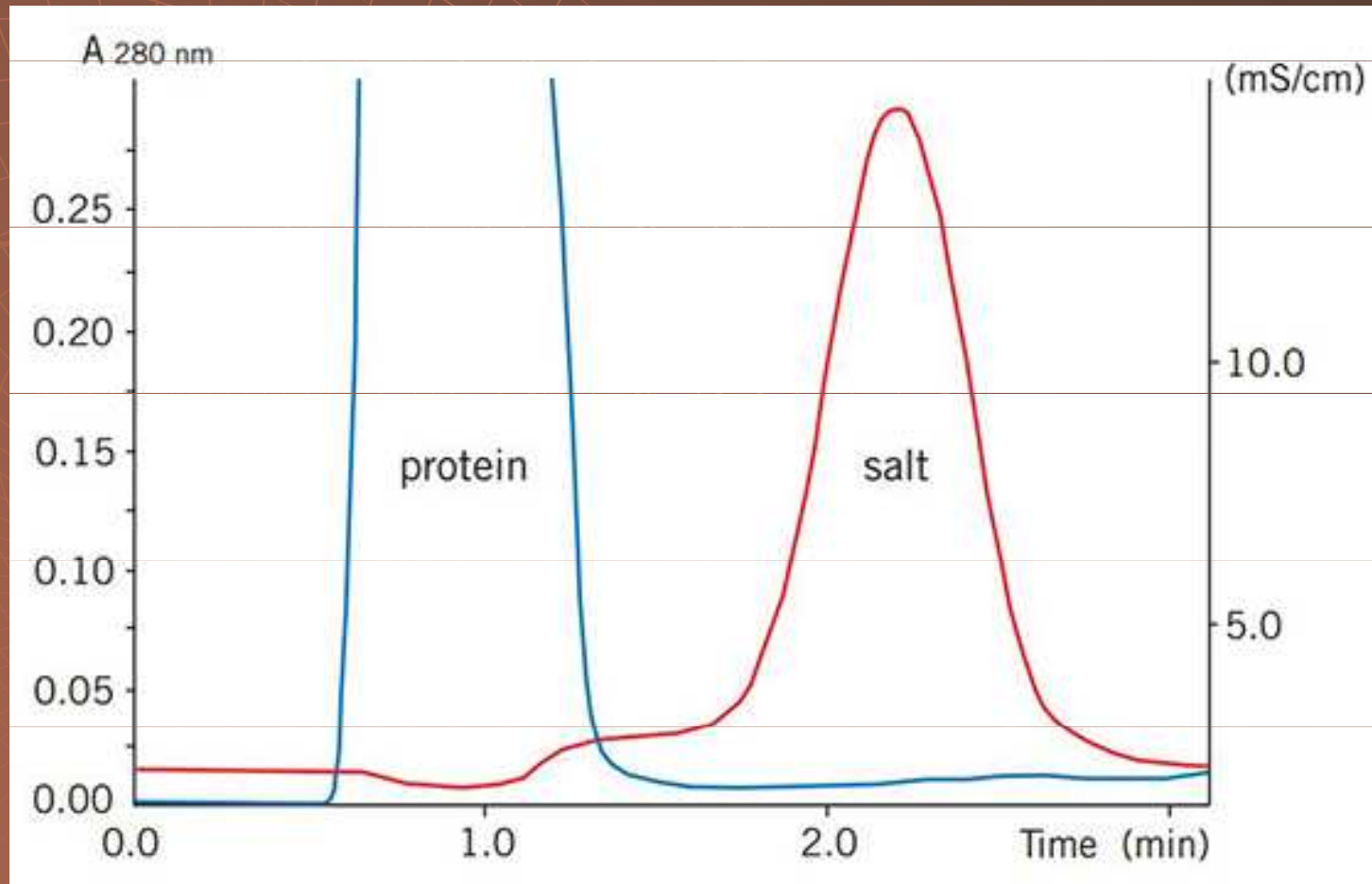
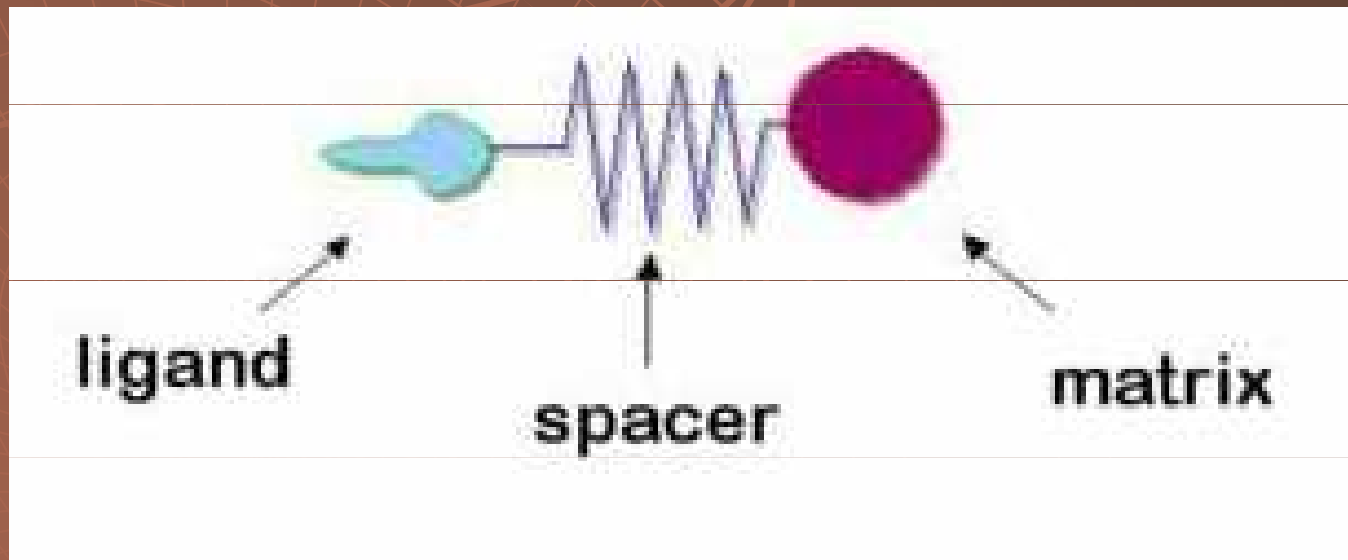


Figure 3. Determination of relative molecular weight (M_w) of ICDH (●) by gel permeation chromatography on an UltroPac TSK 3000 SWG column. V_e elution volume; standards (○): catalase (240,000), aldolase (146,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), chymotrypsinogen (25,000), and RNase (13,700).

Gelová permeační chromatografie



Afinní chromatografie

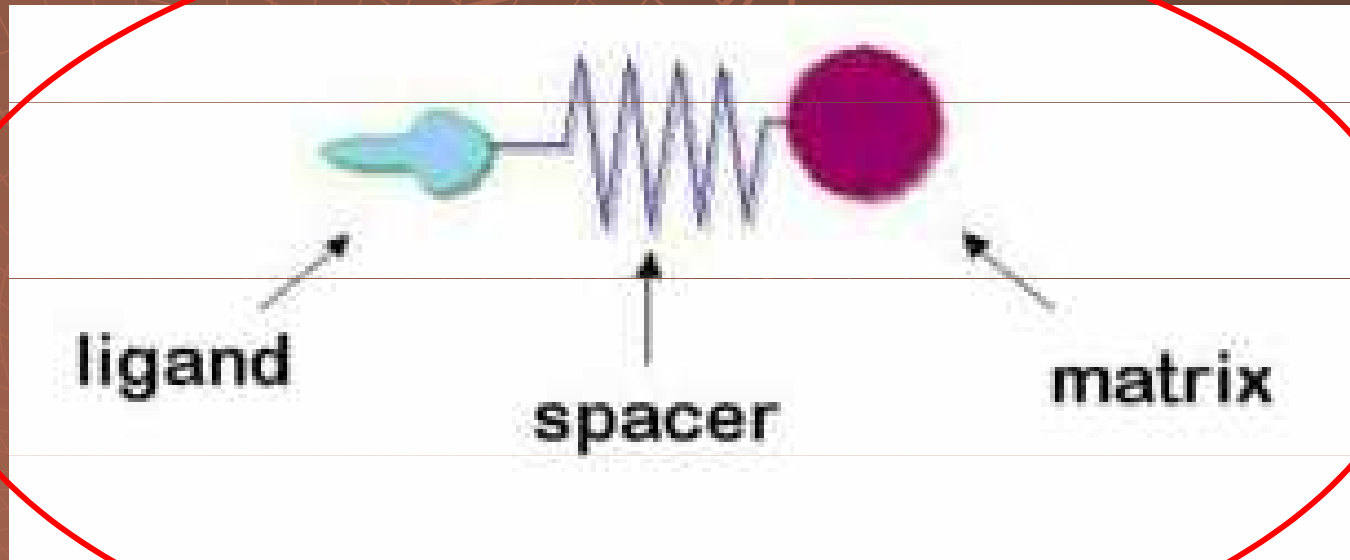


Afinitní interakce

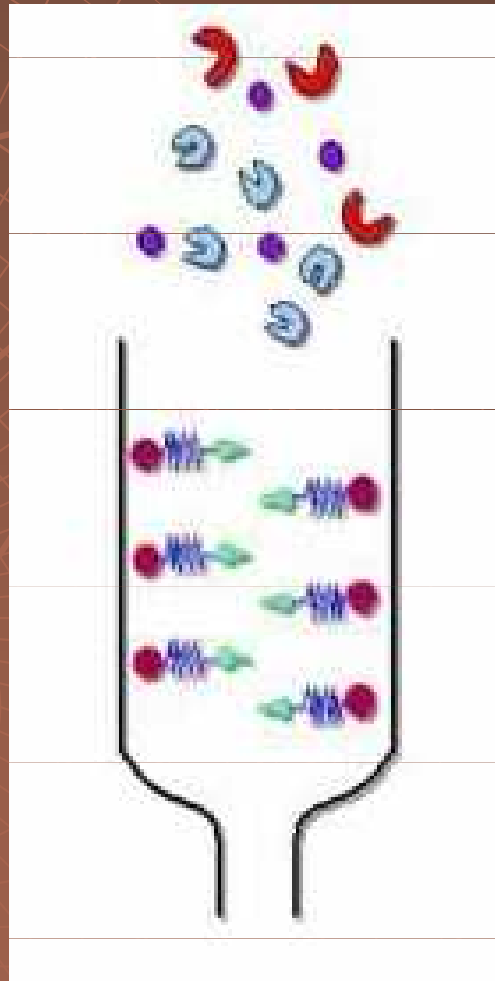


Afinní chromatografie

Afinant

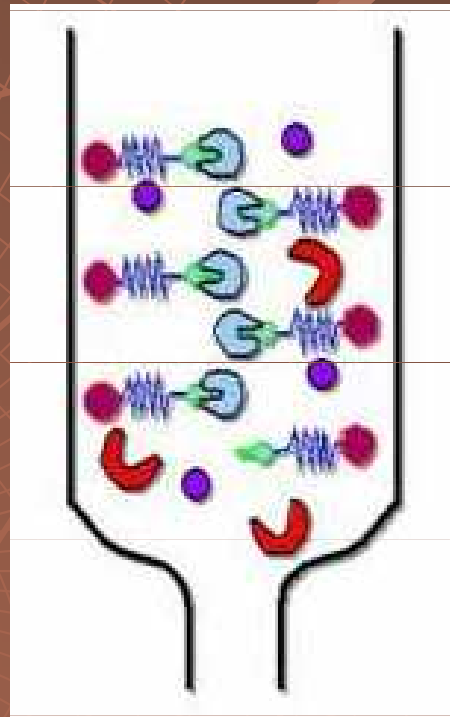


Afinitní chromatografie nanesení vzorku



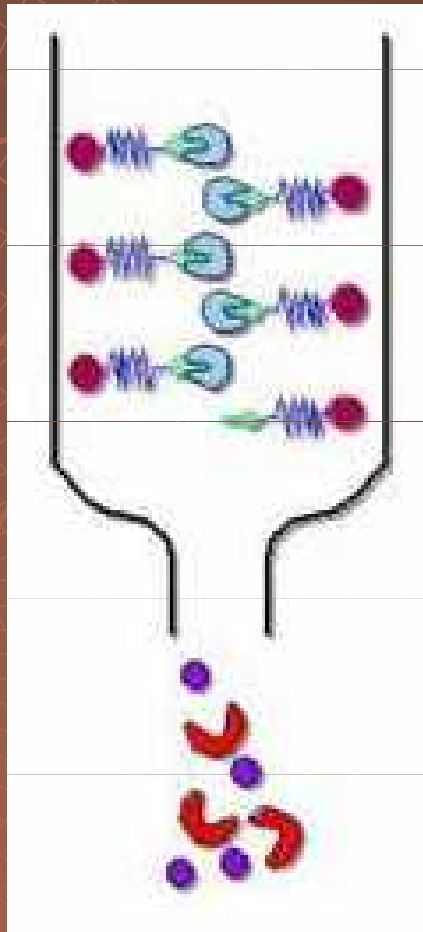
Afinní chromatografie vznik interakce

SPECIFICITA



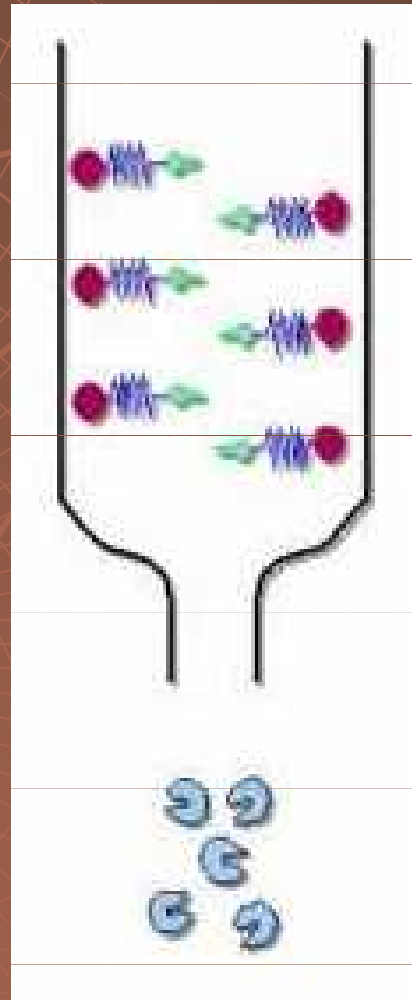
Afinní chromatografie vymytí balastů

STABILITA

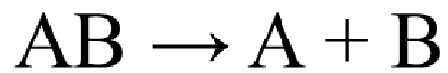


Afinní chromatografie eluce

REVERZIBILITA



Afinitní páry



$$K_D = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

Ligand	Bílkovina	K_D (M)
antigen	polyklonální protilátka	$10^{-8} - 10^{-6}$
antigen	monoklonální protilátka	$10^{-12} - 10^{-8}$
biotin	avidin	10^{-15}
sacharid	lektin	$10^{-6} - 10^{-3}$
hormon, toxin	vazebný protein	$10^{-9} - 10^{-12}$
substrát	enzym	$10^{-7} - 10^{-3}$
inhibitor	enzym	$10^{-14} - 10^{-6}$

Afinitní interakce

elektrostatické

polární

hydrofobní

van der Waalovy síly

interakce

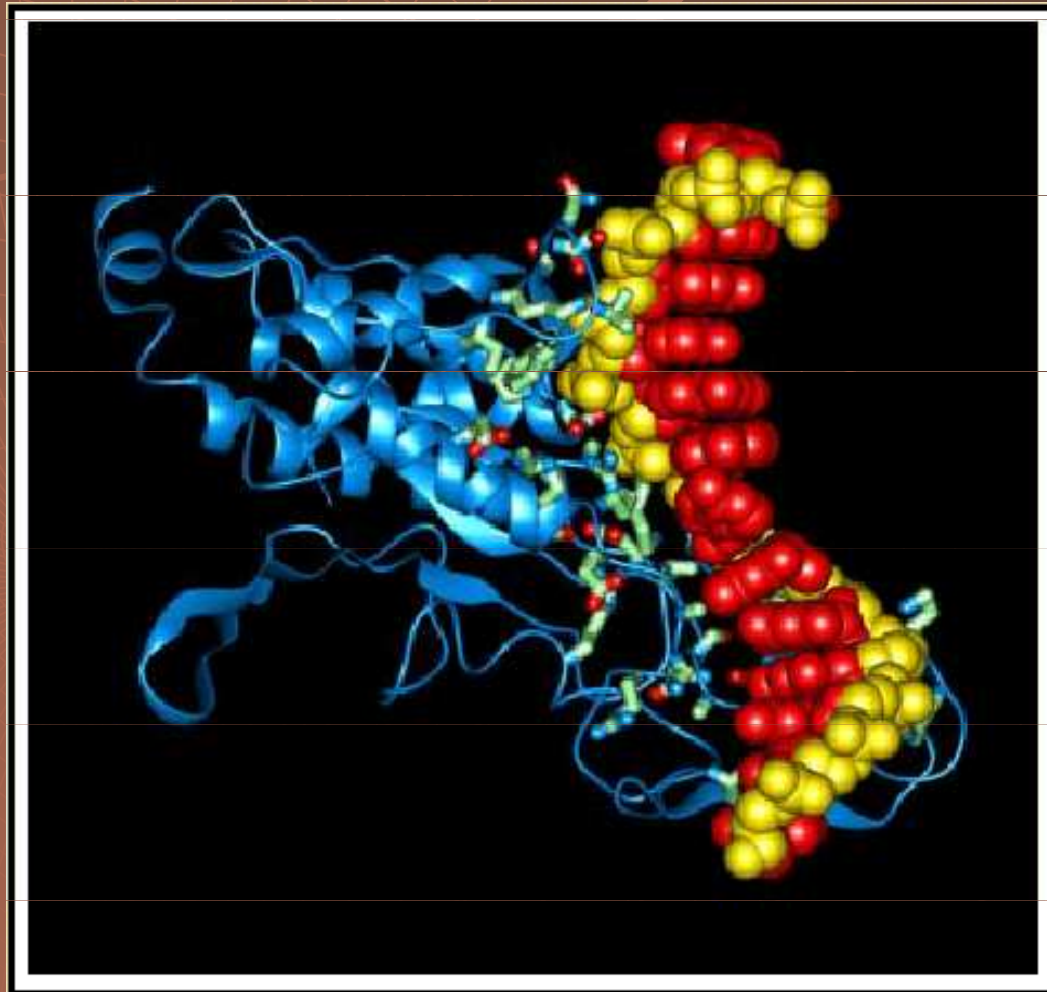


prostorové
uspořádání



vlastnosti
prostředí

Interakce mezi DNA a endonukleasou

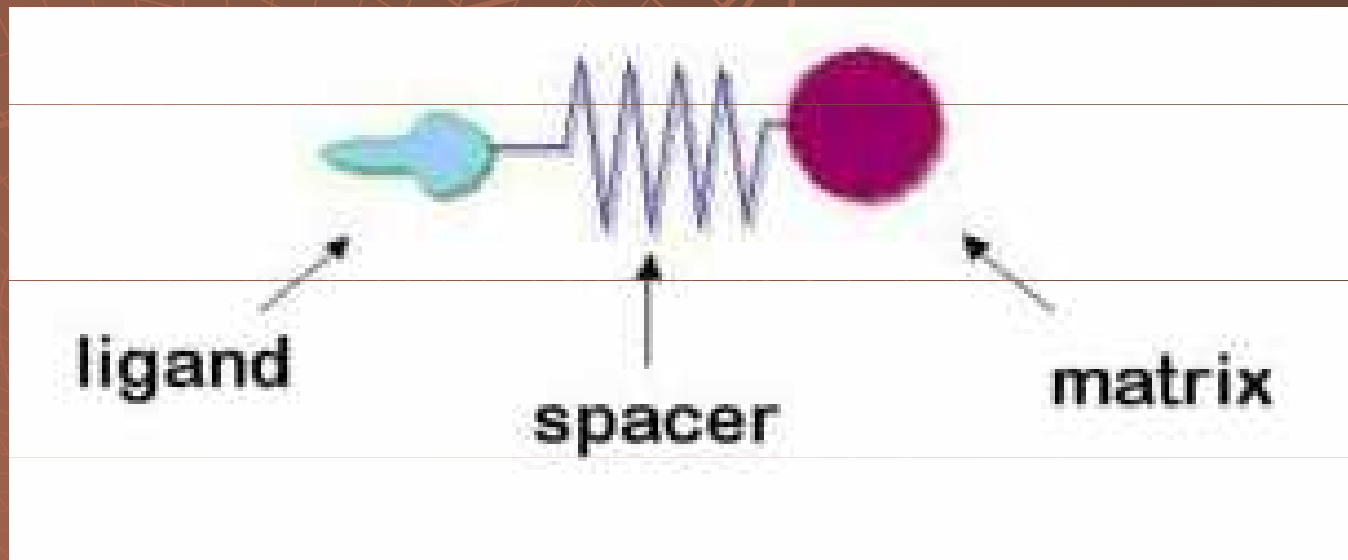


Předpoklady pro vznik komplexu

- ◆ Sterické – použití raménka (spacer)

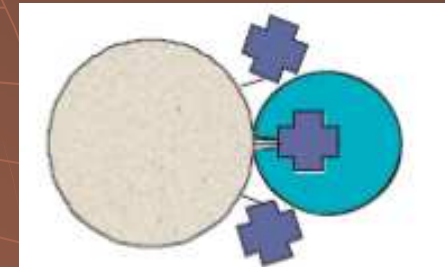
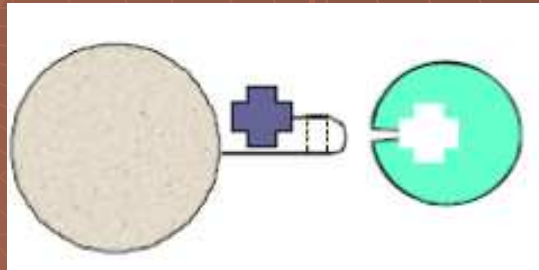
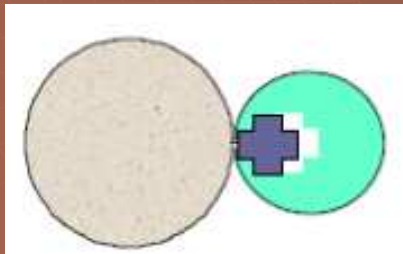


Afinní chromatografie



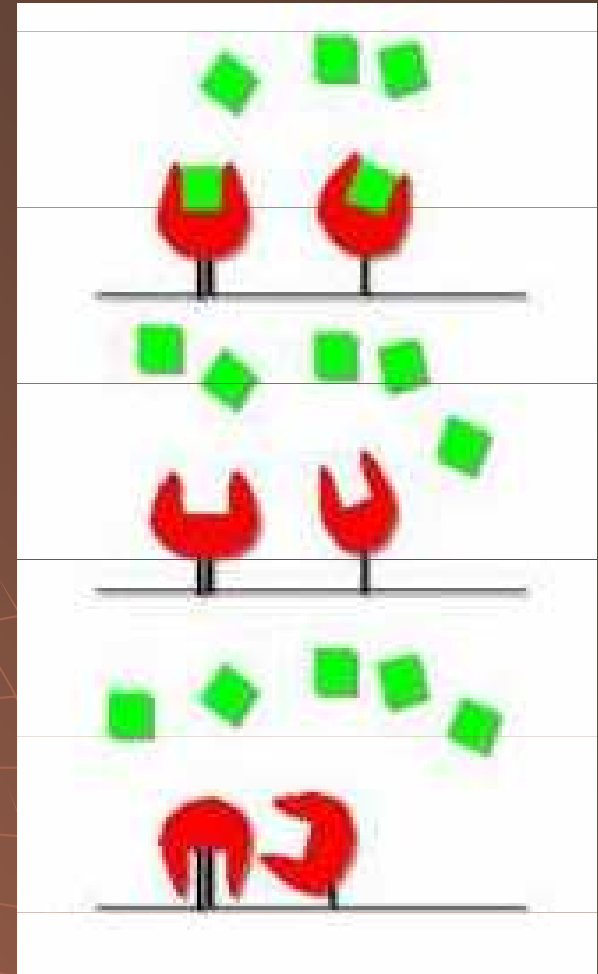
Předpoklady pro vznik komplexu

- ◆ Sterické – použití raménka (spacer)



Předpoklady pro vznik komplexu

◆ Konformační →



◆ Vazebné →

◆ Optimální pH, iontová síla

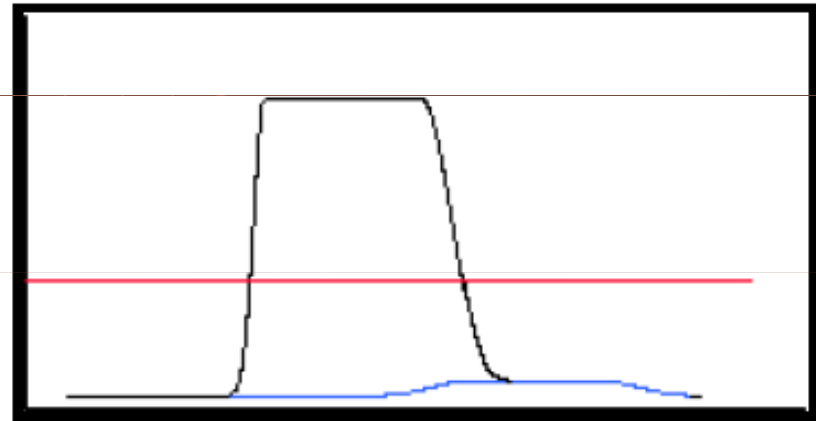
Stacionární fáze

- velké póry umožňující průnik velkých molekul
- co nejnižší nespecifické adsorpce
- nejčastěji agarosa (Sepharosa)
- ligand kovalentně navázaný přes $-OH$ skupinu
cukerné jednotky nosiče

Provedení

- ◆ Nanesení vzorku – nízká iontová síla

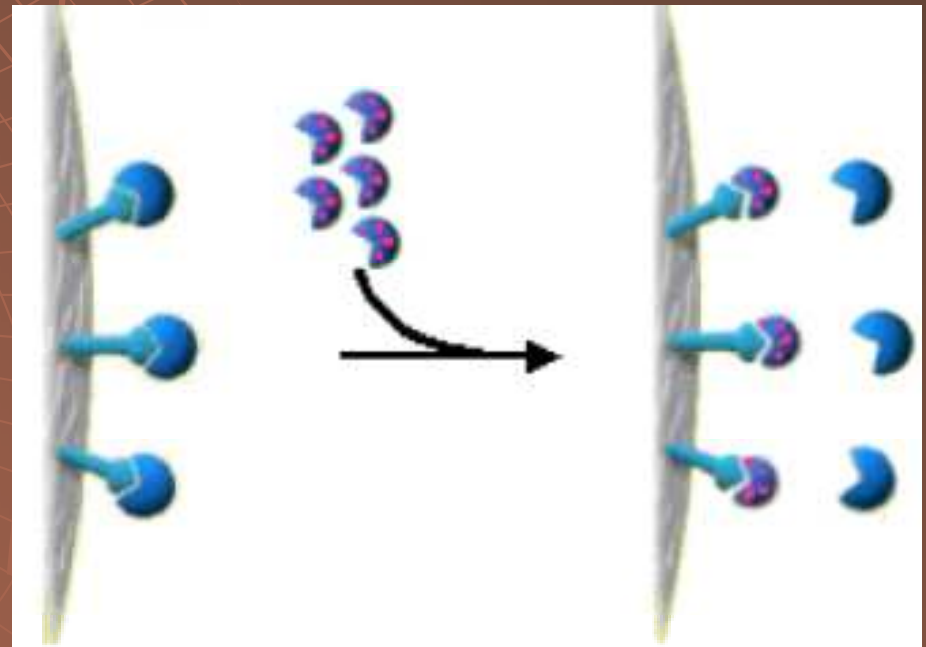
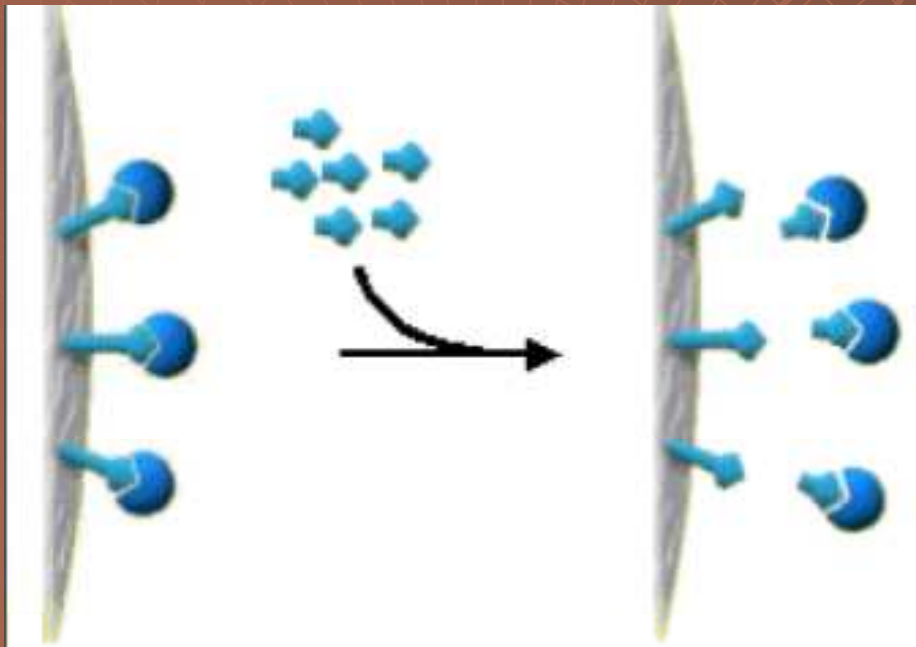
$K_D > 10^{-4}$ ~ slabá interakce



$K_D < 10^{-6}$ ~ silná interakce → obtížná eluce

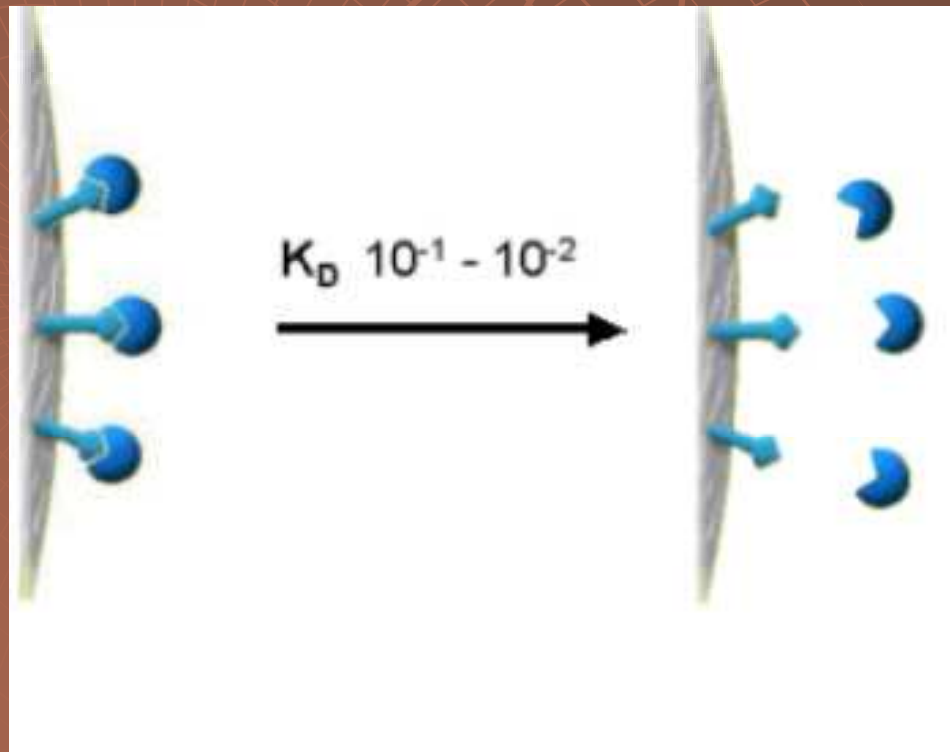
Eluce

- ◆ Eluce – selektivní - volným ligandem nebo kompetičním činidlem



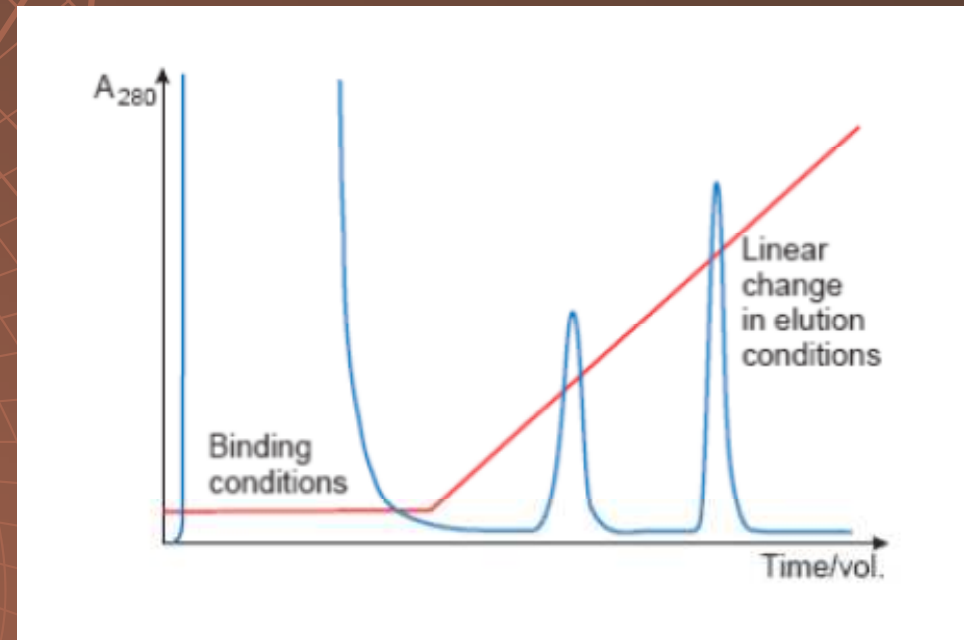
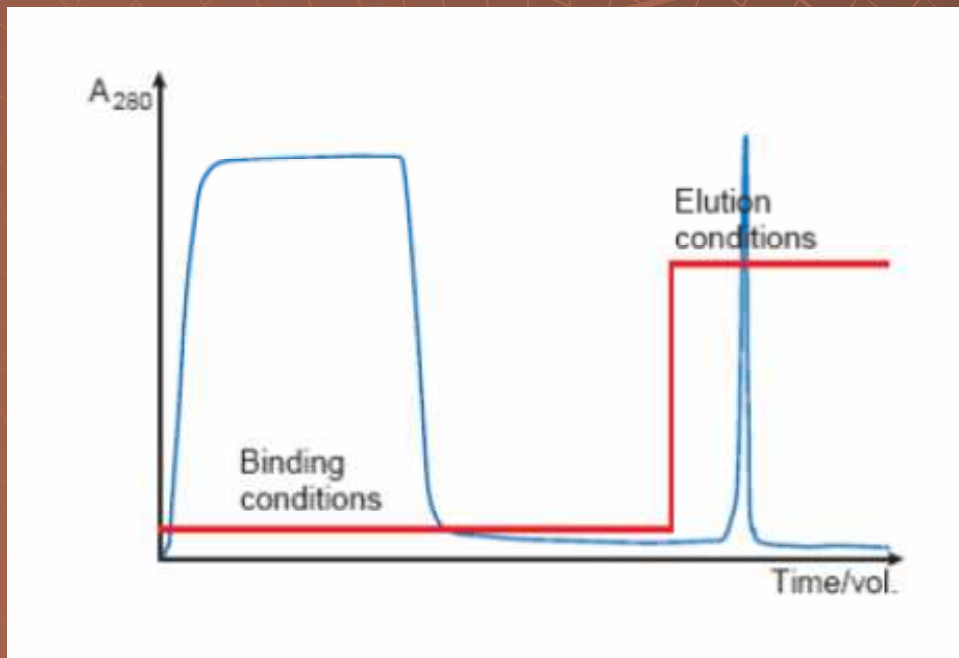
Eluce

- ◆ Eluce – neselektivní - změna pH, iontové síly, polarity



Eluce

- ◆ Eluce – pulsní x gradientová



Ligandy

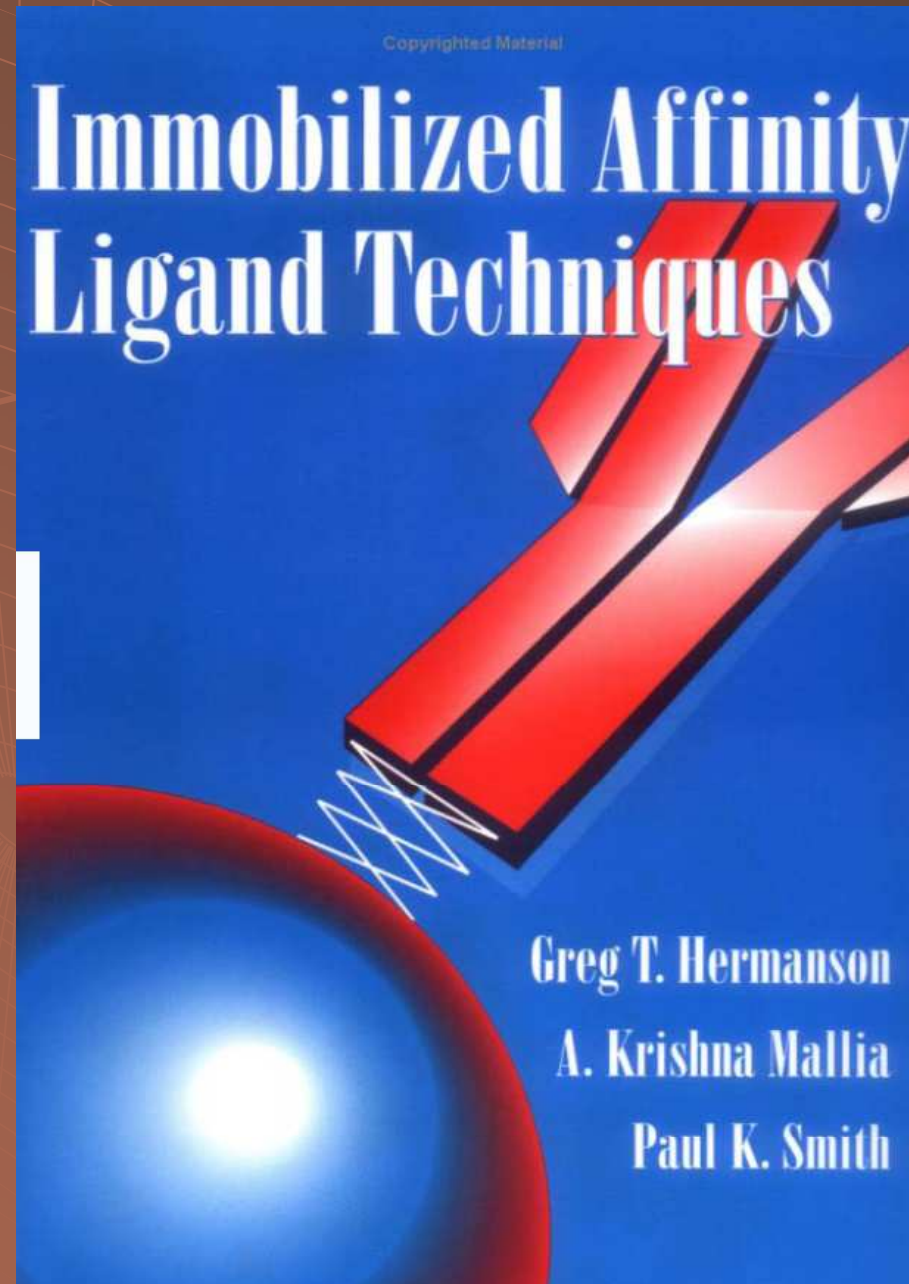
Monospecifické

- váží pouze jedinou biomakromolekulu
- nutné si připravovat individuálně

Skupinově specifické

- váží biomakromolekuly s podobnými vlastnostmi
- komerčně dostupné

Immobilizace ligandů



Imobilizace ligandů

N-hydroxysukcinimid (NHS)

-NH₂

CNBr

-NH₂

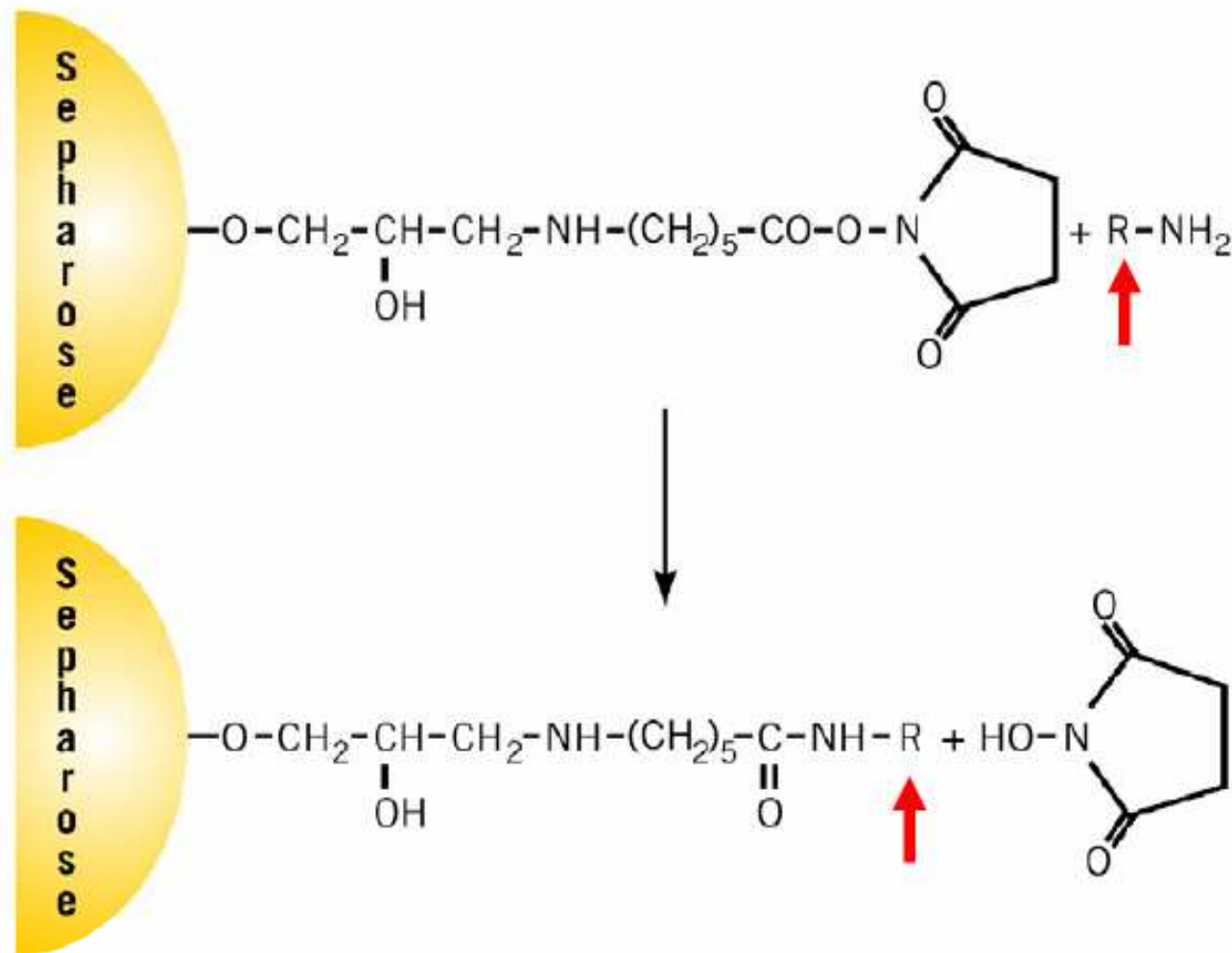
Karbodiimid

-NH₂, -COOH

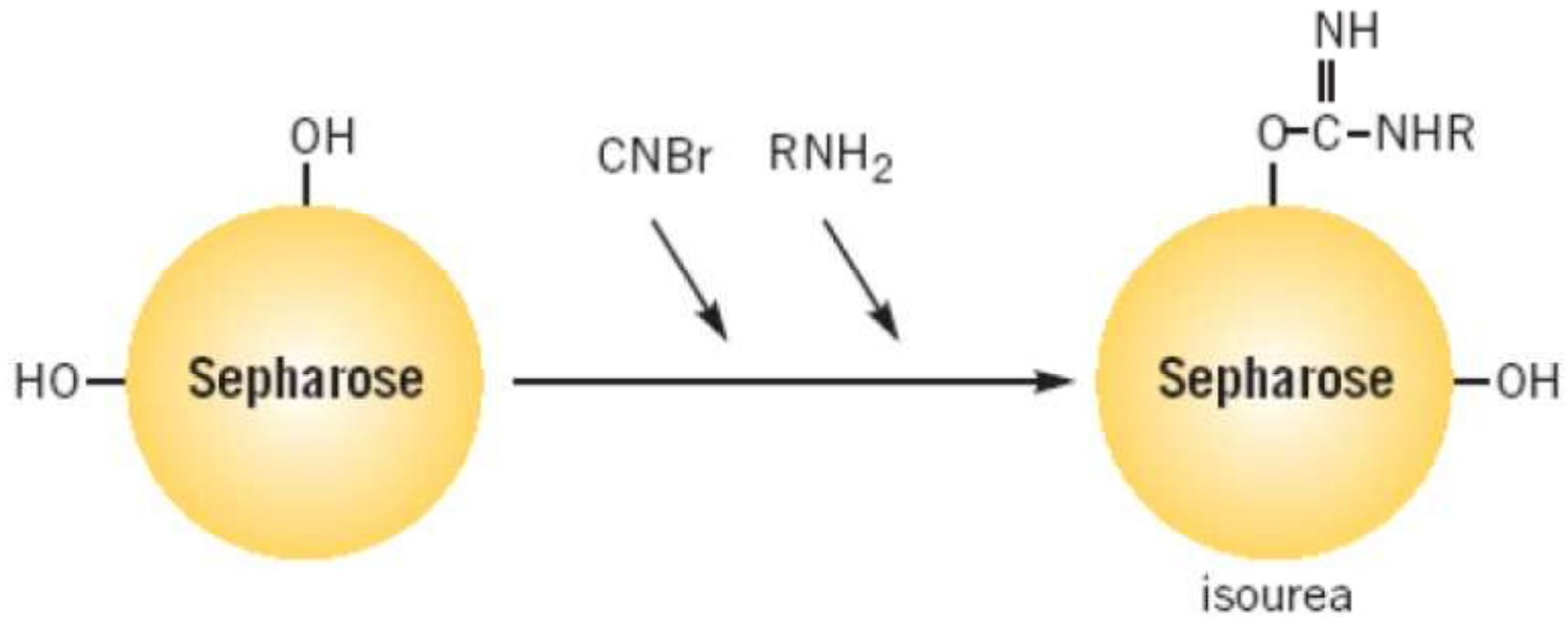
Epoxid

-SH, -NH₂, -OH

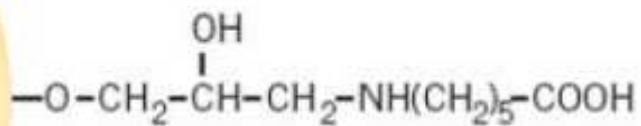
N-hydroxysukcinimid (NHS-Sepharosa)



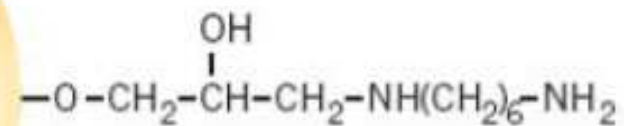
CNBr (CNBr aktivovaná Sepharosa)



N, N'-disubstituovaný karbodiimid

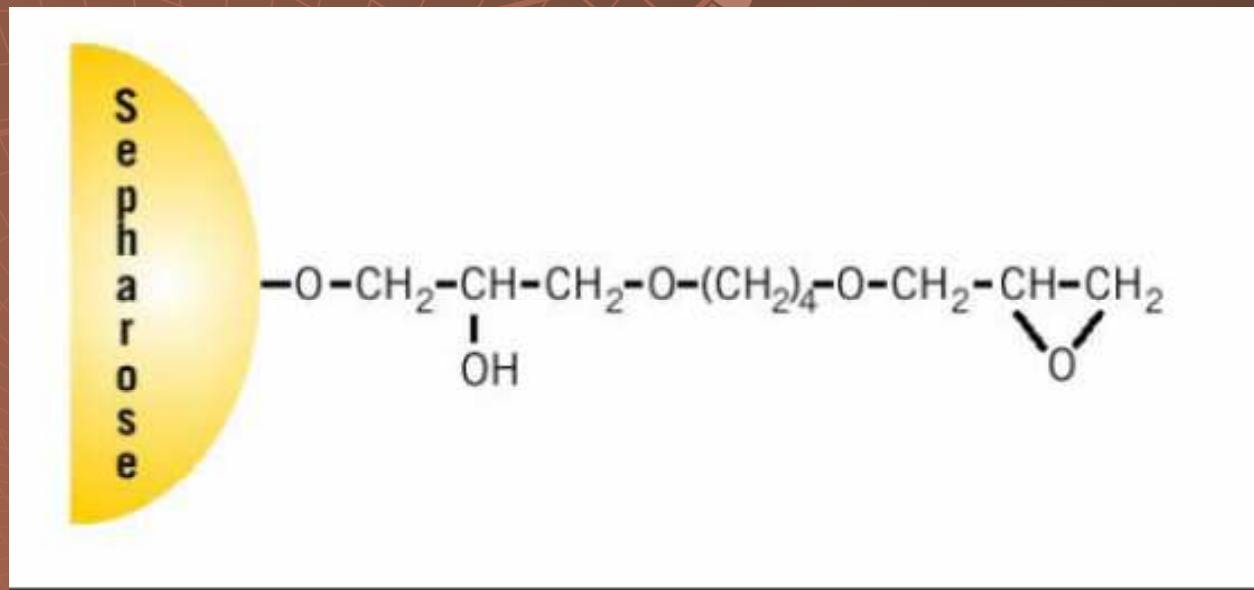


ECH Sepharose



EAH Sepharose

Epoxid (Epoxy-aktivovaná Sepharsa 6B)



Skupinově specifické ligandy

skupinově specifický ligand	specifita
Protein A	Fc region IgG
Protein G	Fc region IgG
Lektiny	glukopyranosylové a mannopyranosylové skupiny
Cibacron Blue	široká skupina enzymů, NAD ⁺ dependentní enzymy, sérový albumin
Procion Red	NADP ⁺
Lysin	plasminogen, rRNA
Arginin	serinové proteasy
Benzamidin	serinové proteasy
Kalmodulin	proteiny regulované kalmodulinem
Heparin	kolagulační faktory, lipoproteiny, lipasy, hormony, steroidní receptory, nukleové kyseliny vázající enzymy
Streptavidin	Biotin a biotinylované látky
Oligo (dT, dA, ...)	mRNA, nukleasy
Kovové ionty	proteiny a peptidy obsahující dostupný His

Skupinově specifické ligandy

Protein A a Protein G

protein A – *Staphylococcus aureus*

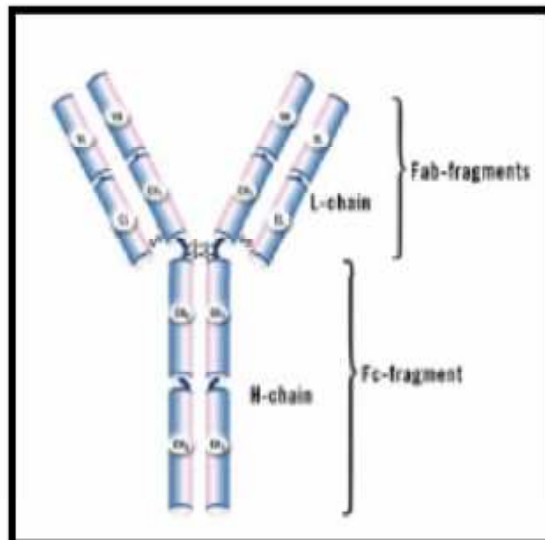
protein G – *Streptococcus*

purifikace:

monoklonální protilátky IgG

polyklonální protilátky IgG

imunokomplexy



Species	Subclass	Protein A binding	Protein G binding
Human	IgA	variable	-
	IgD	-	-
	IgE	-	-
	IgG ₁	++++	++++
	IgG ₂	++++	++++
	IgG ₃	-	++++
Chicken	IgG ₄	++++	++++
	IgM ^A	variable	-
Avian egg yolk	IgY ^B	-	-
Cow		++	++++
Dog		++	+
Goat		-	++
Guinea pig	IgG ₁	++++	++
	IgG ₂	++++	++
Hamster		+	++
Horse		++	++++
Koala		-	+
Llama		-	+
Monkey (rhesus)		++++	++++
Mouse	IgG ₁	+	++++
	IgG _{2a}	++++	++++
	IgG _{2b}	+++	+++
	IgG ₃	++	+++
	IgM ^A	variable	-
Pig		+++	+++
Rabbit	no distinction	++++	+++
Rat	IgG ₁	-	+
	IgG _{2a}	-	++++
	IgG _{2b}	-	++
	IgG ₃	+	++
Sheep		+/-	++

Skupinově specifické ligandy Protein A a Protein G

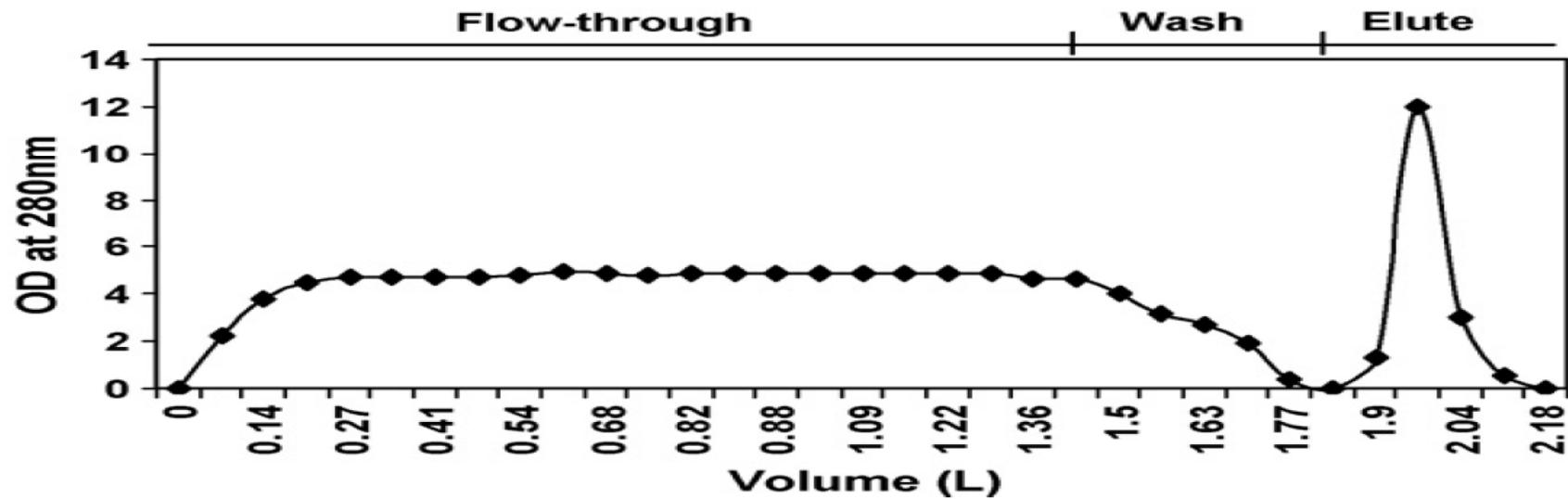


Fig. 3. Chromatogram of affinity chromatography using ProSep-vA Ultra. Antibody fragment $[F(ab)_2]$ did not bind to ProSep-vA Ultra (fraction 0–1.4 l) and majority of the contaminants $[Fc$ fragment] that bound to the affinity matrix eluted at pH 3.0 (fraction 1.84–2.18 l).

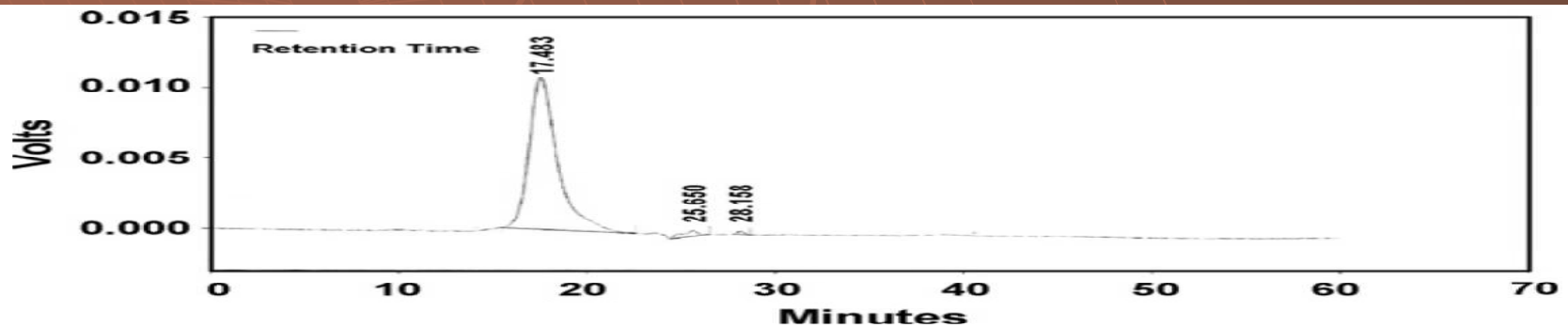
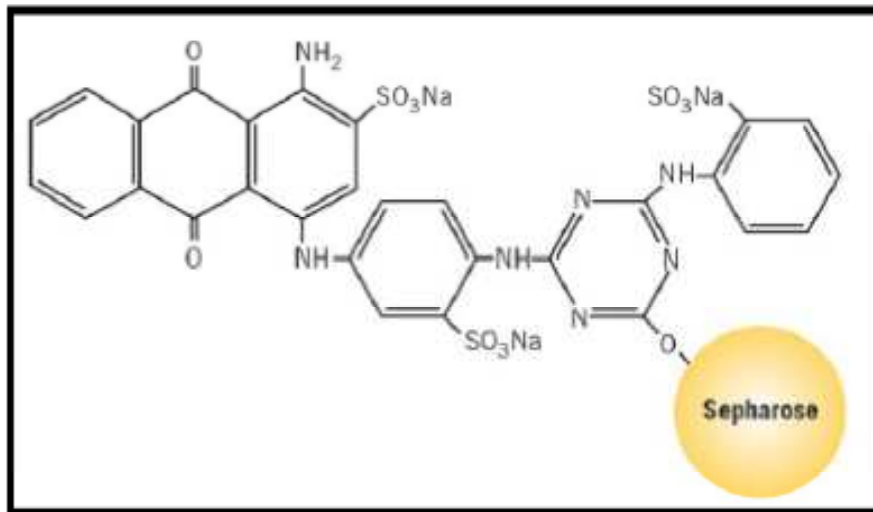


Fig. 5. HPLC analysis of purified $F(ab)_2$. Elution profile of $F(ab)_2$ as single homogeneous peak represents >99% purity of the product. Column: SEC, TSK Gel-3000 SWXL (TosoHass). Sample: 20 μ l of purified $F(ab)_2$; eluent: 20 mM phosphate buffer in 150 mM sodium chloride solution, pH 7.2, Detection at 280 nm; flow-rate: 1 ml min^{-1} .

Skupinově specifické ligandy „dye ligand“

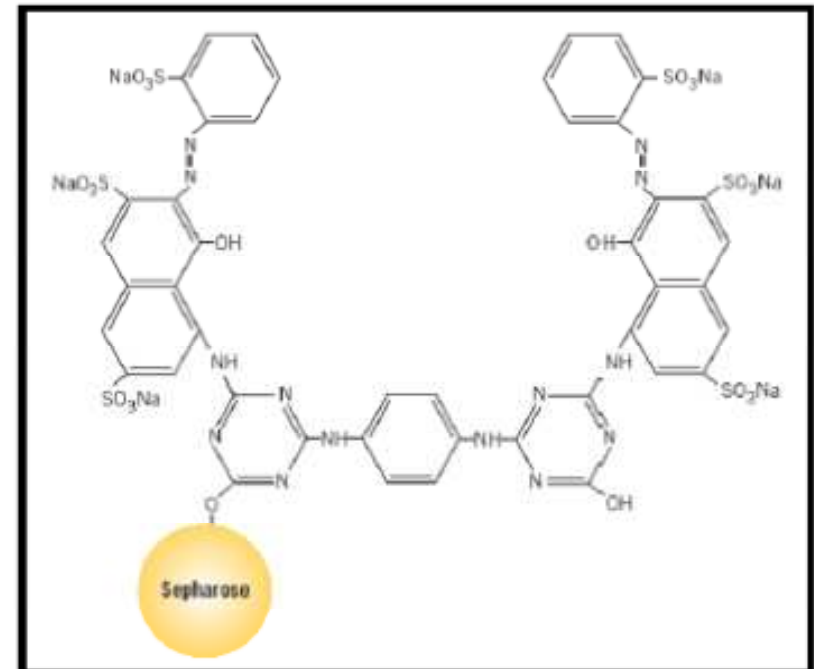
Cibacron™ Blue F3G-A
(Blue Sepharosa)



NAD⁺

Dependentní dehydrogenasy

Procion™ Red
(Red Sepharosa)



NADP⁺

Skupinově specifické ligandy Cibacron Blue F4G-A

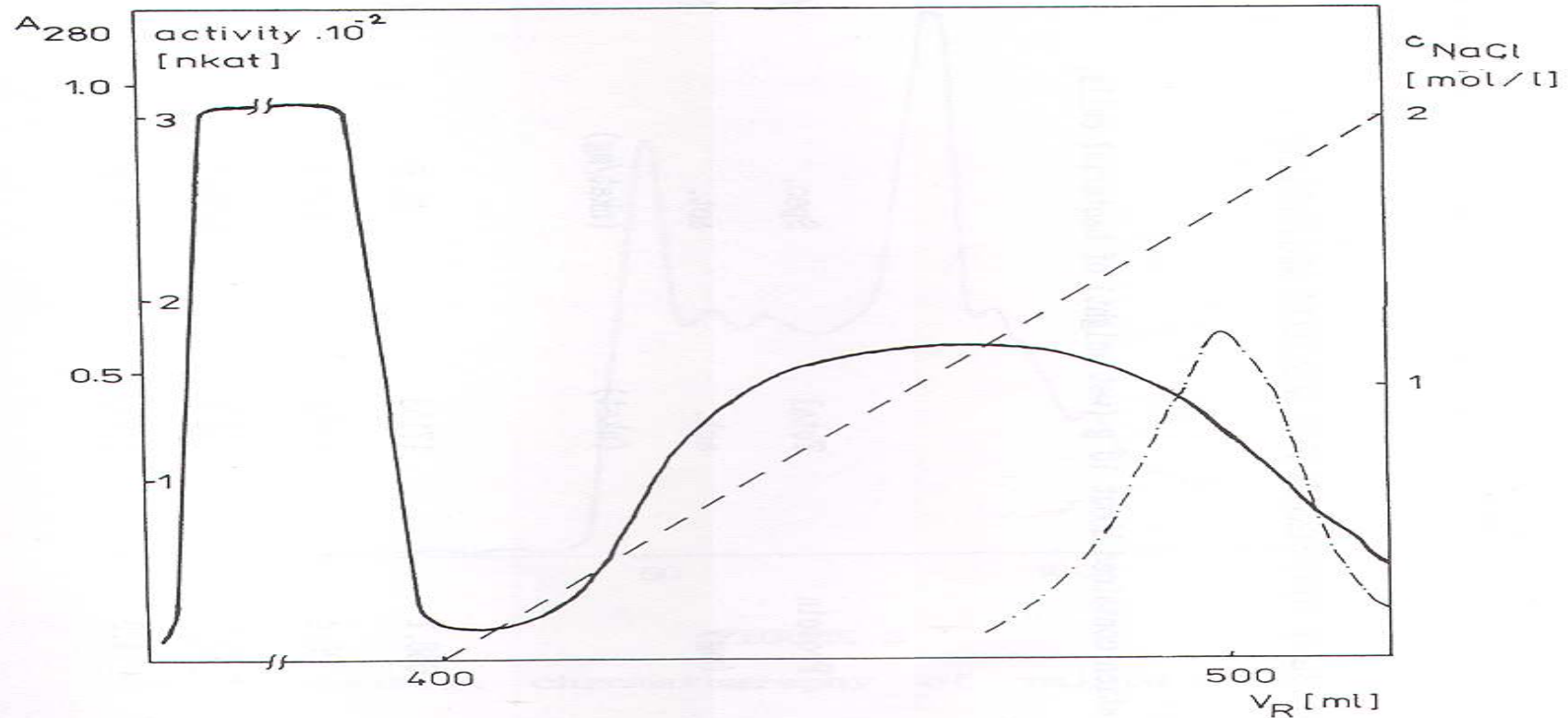


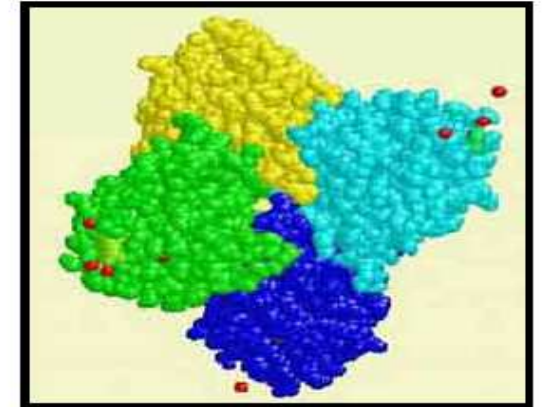
FIGURE 1

Affinity chromatography of malate dehydrogenase from *P. denitrificans* on Matrex Gel Blue A (step 2). V_e , elution volume; —, absorbance at 280 nm (A_{280}); -•-, enzyme activity; ----, NaCl gradient (buffer A, 0.02 mol/l sodium phosphate (pH 8.0); buffer B, the same as buffer A but with 1.8 mol/l NaCl and 5% ethylene glycol); flow rate, approx. 0.7 ml/min.

Skupinově specifické ligandy lektiny

Konkavalin A

- lektin z *Canavalia ensiformis* (jack bean)
- tetramerní metalloprotein
- větvené mannosidy, cukry s terminální mannosou nebo glukosou ($\alpha\text{Man} > \alpha\text{Glc} > \text{GlcNAc}$)



- purifikace glycoproteinů, polysacharidů a glykolipidů
- detekce změn ve složení látek obsahujících cukry
- izolace povrchových buněčných glykoproteinů

„Lentil“ lektin

- lektin z *Lens culinaris* (čočka)
- větvené mannosidy obsahující fukosu α -1,6 vázanou na N-acetylglukosamin ($\alpha\text{Man} > \alpha\text{Glc} > \text{GlcNAc}$)
- membranové glykoproteiny, povrchové buněčné antigeny, virální glykoproteiny

Skupinově specifické ligandy Con A

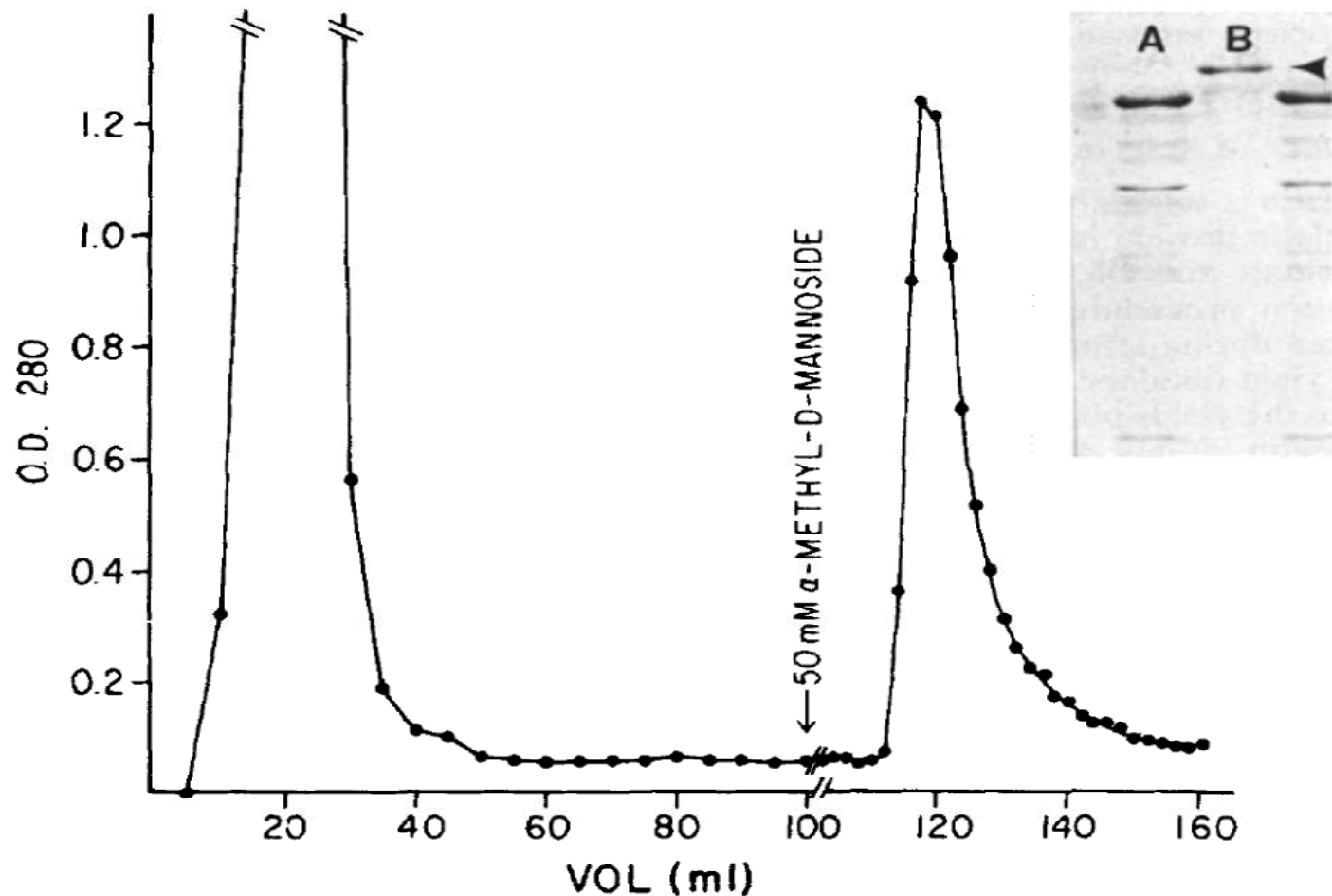


FIG. 2. Step-elution profile of sciatic nerve protein from concanavalin A-agarose. Sciatic nerve protein was applied to a 0.9×20 cm column of concanavalin A-agarose and eluted with Con A buffer at a flow rate of 10 ml/h. When the A_{280} of the effluent fell below 0.05, bound glycoproteins were desorbed with 50 mM- α -methylmannoside in Con A buffer. (*Inset*) Lane A: SDS electrophoretic profile of proteins eluted in the wash peak (21 μ g protein); lane B: SDS electrophoretic profile of glycoproteins eluted by 50 mM- α -methylmannoside (12 μ g protein). Arrowhead marks position of the sciatin band. Note the absence of this band in the wash peak (lane A).

Skupinově specifické ligandy

Con A

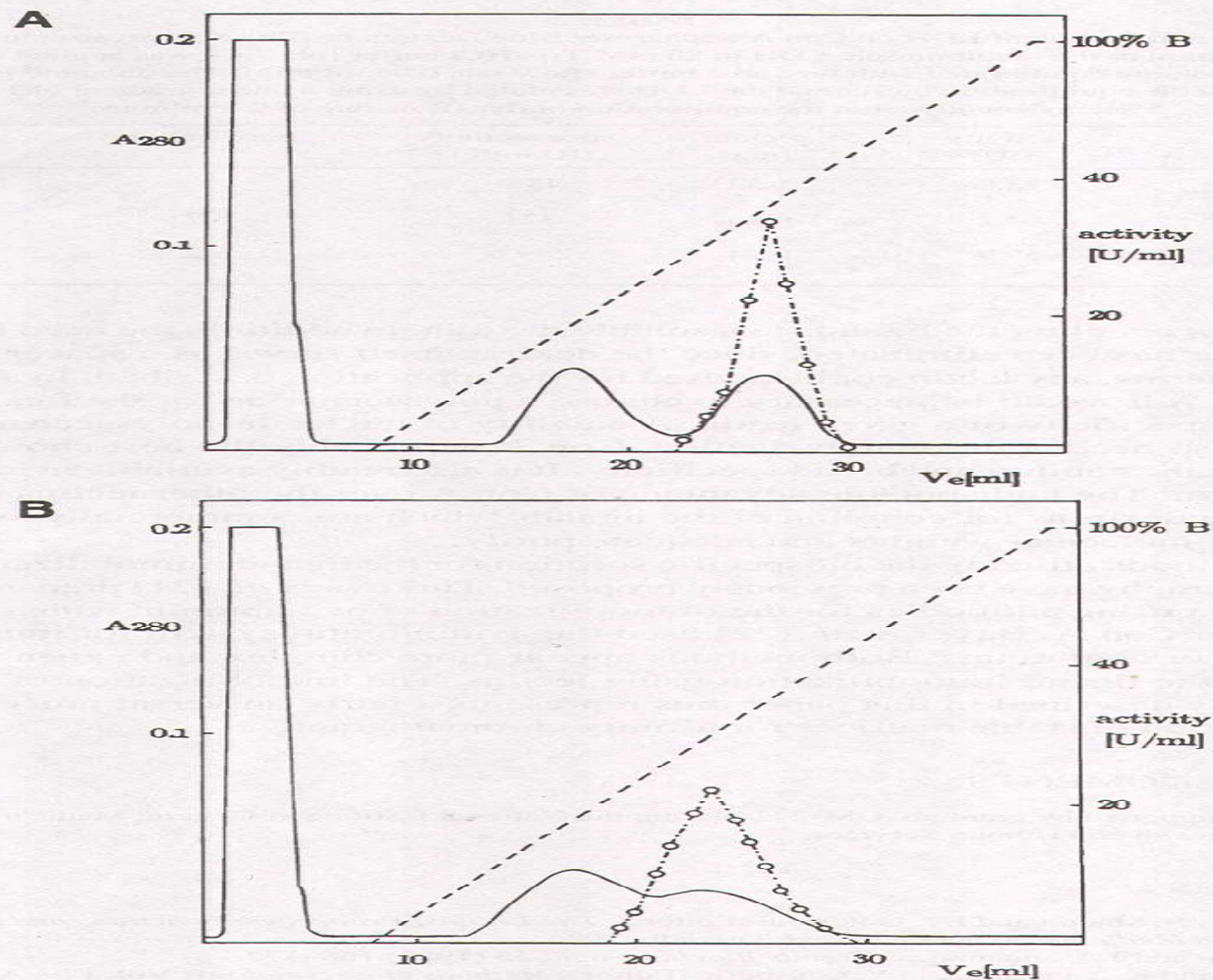
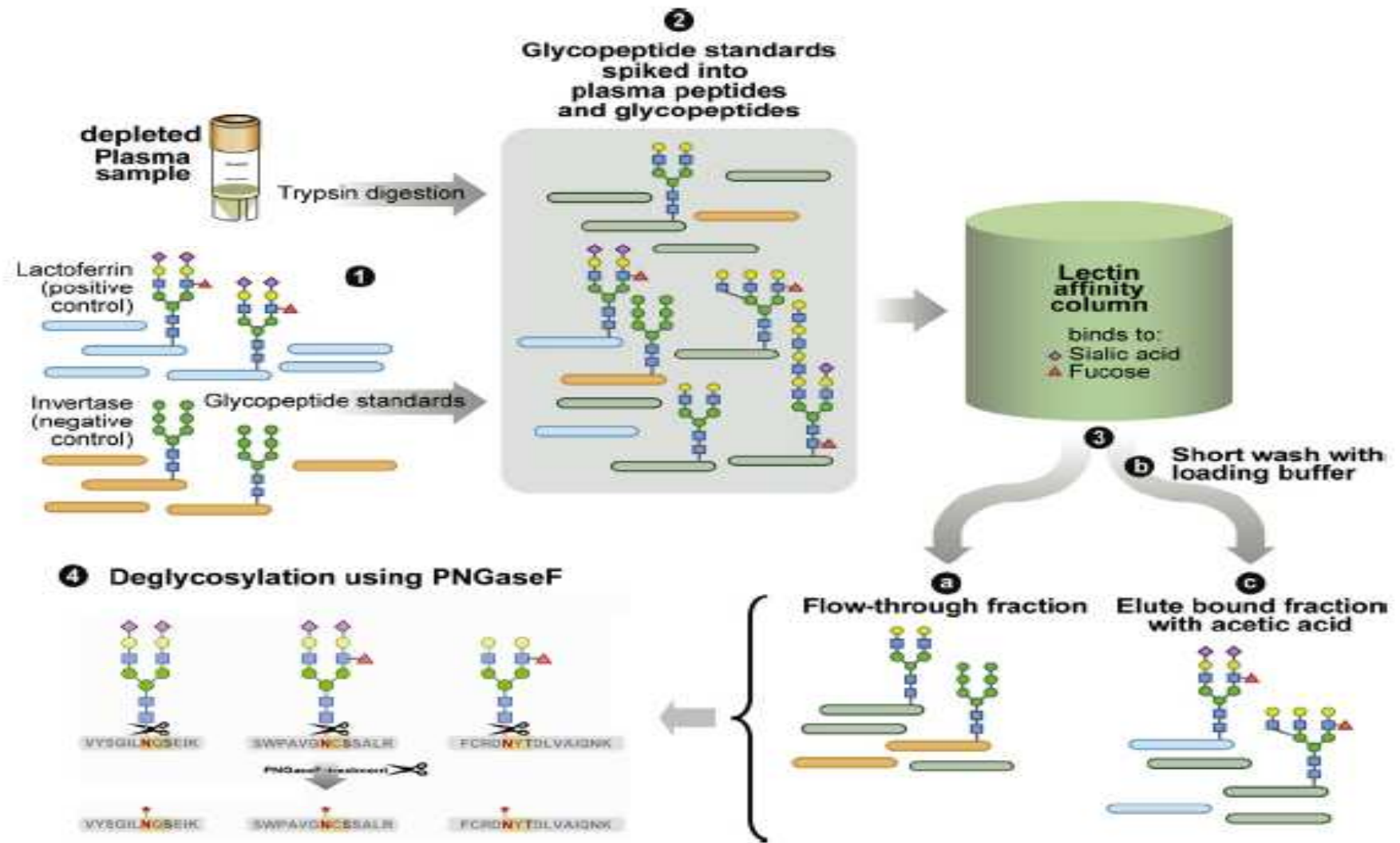
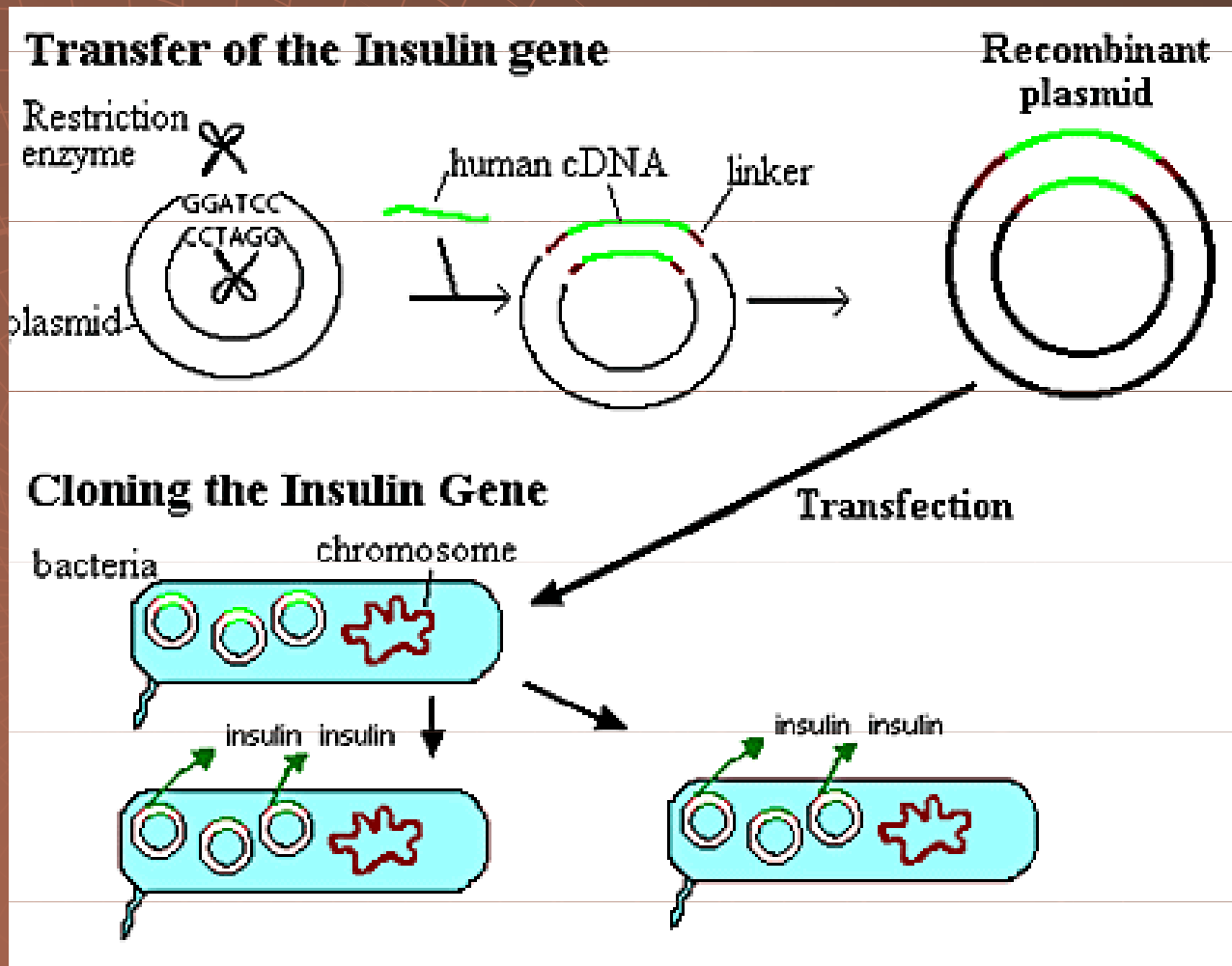


FIGURE 1 Partial purification of the crude preparation of the rabbit muscle LDH on Con A Sepharose/Blue Dextran (Figure 1.A) or Blue Sepharose (Figure 1.B) columns. Approximately 1.5 mg of protein were applied on the column. Buffers: A = 20 mM Tris HCl (pH 7.4) B = 20 mM Tris HCl (pH 7.4) with 1 M NaCl and 5% ethylene glycol flow rate = 0.05 ml/min during the loading of sample 0.5 ml/min during the elution V_e – elution volume; ----- absorbance at 280 nm; ——— gradient B; --o-- activity of LDH.

Skupinově specifické ligandy lektiny



Genetické inženýrství



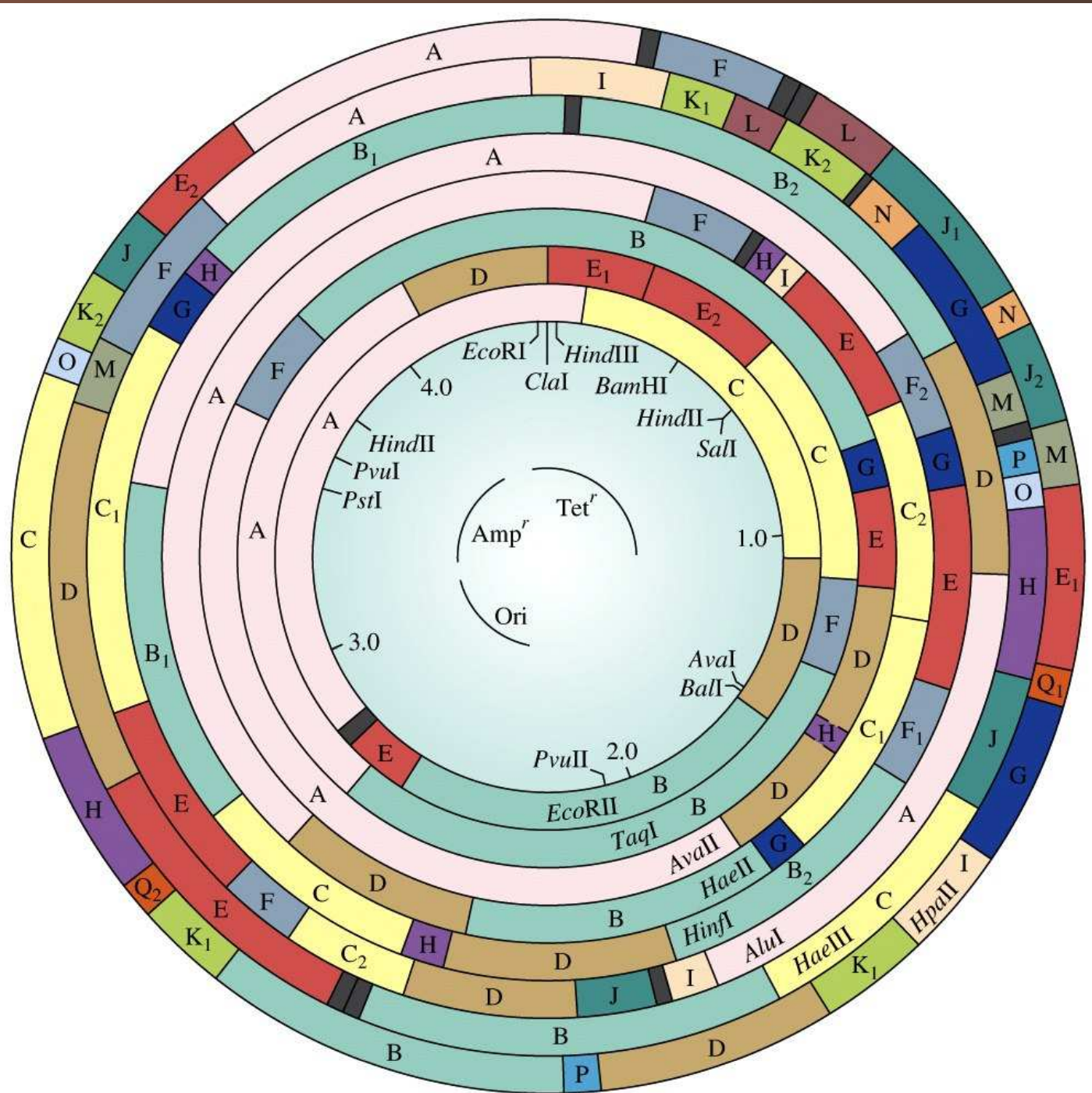


Figure 13-8 Concepts in Biochemistry, 3/e
 © 2006 John Wiley & Sons

Expresní systému

◆ Prokaryota (*E.coli*)

- + snadná kultivace
- + vysoký výtěžek
- + levný
- neumí pracovat s introny
- neumí postranslační modifikace

Expresní systému

- ◆ **Eukaryota (*kvasinky, savčí a rostlinné tkáňové kultury*)**

- + umí pracovat s introny

- + umí postranslační modifikace

- malý výtěžek

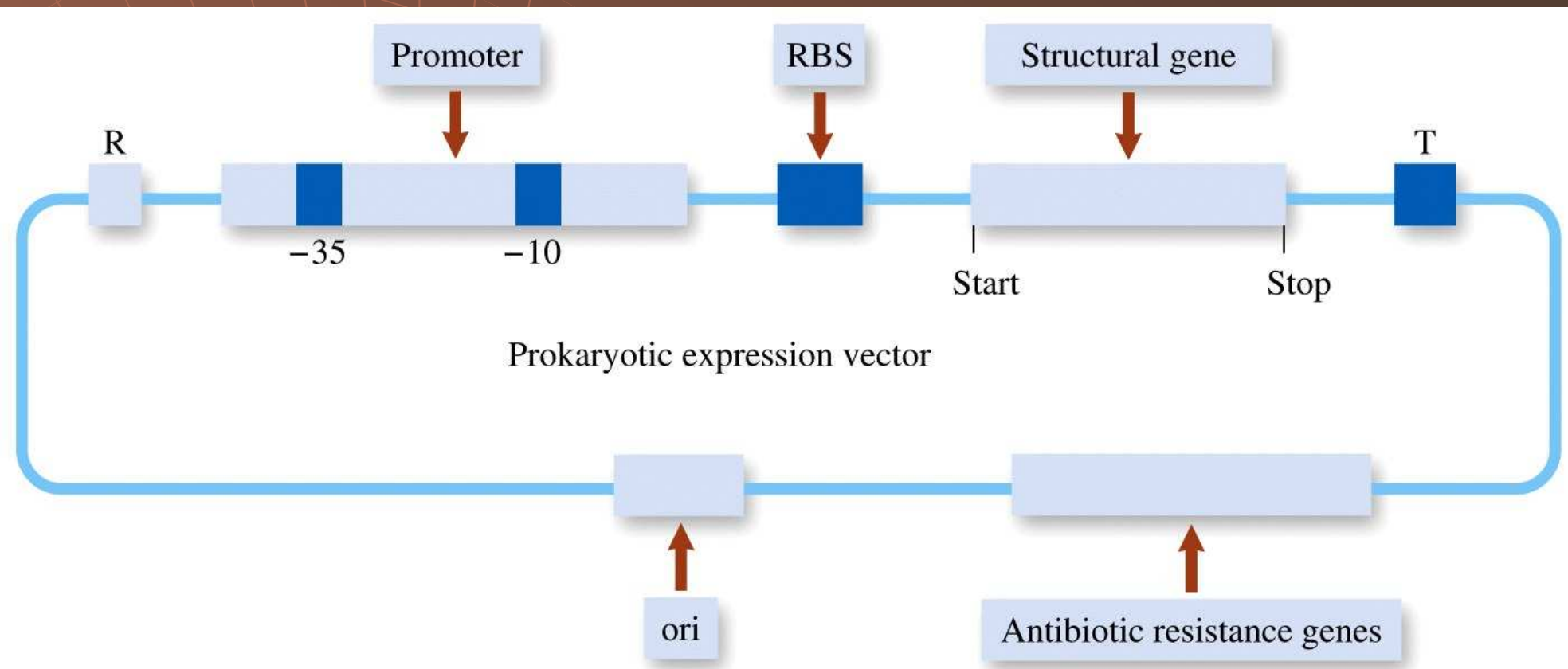
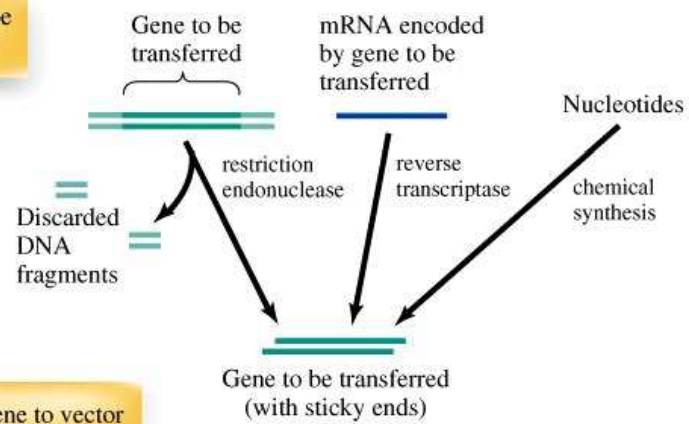
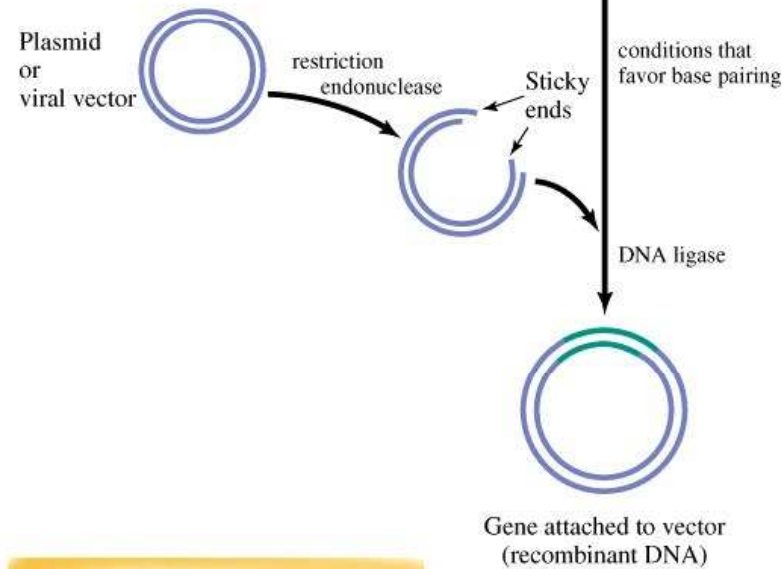


Figure 13-3 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Step 1. Obtain gene to be transferred.



Steps 2 and 3. Attach gene to vector



Steps 4 and 5. Introduce recombinant DNA into host cell.

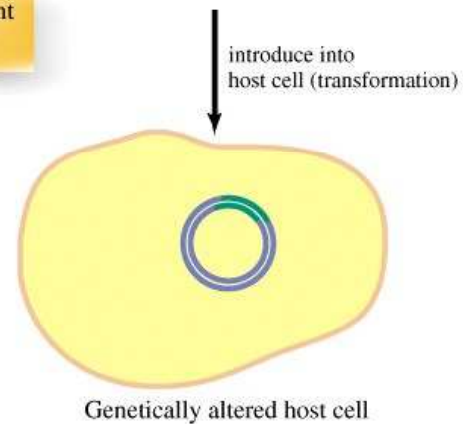


Figure 13-1 Concepts in Biochemistry, 3/e

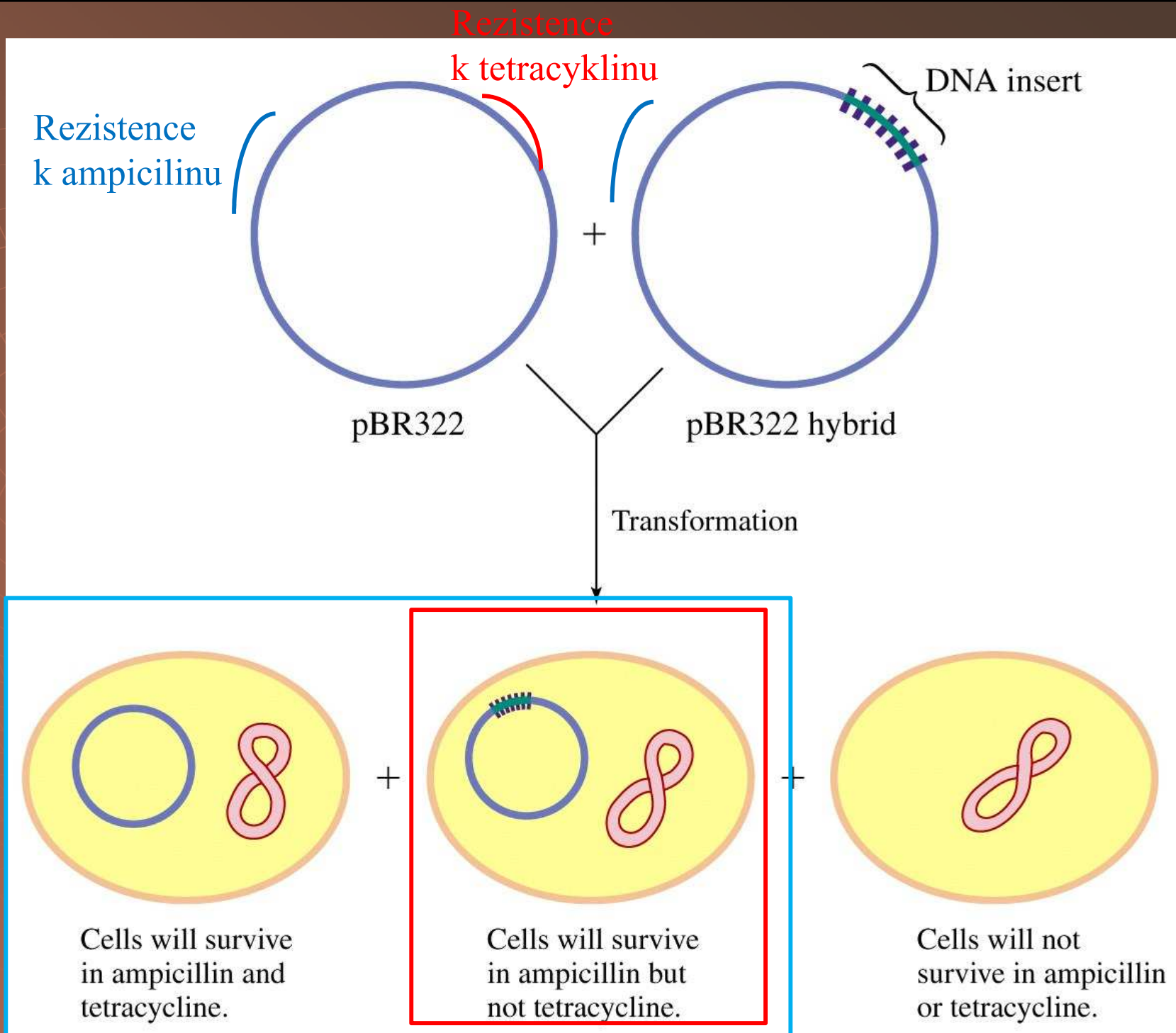


Figure 13-6 part 3 Concepts in Biochemistry, 3/e
 © 2006 John Wiley & Sons

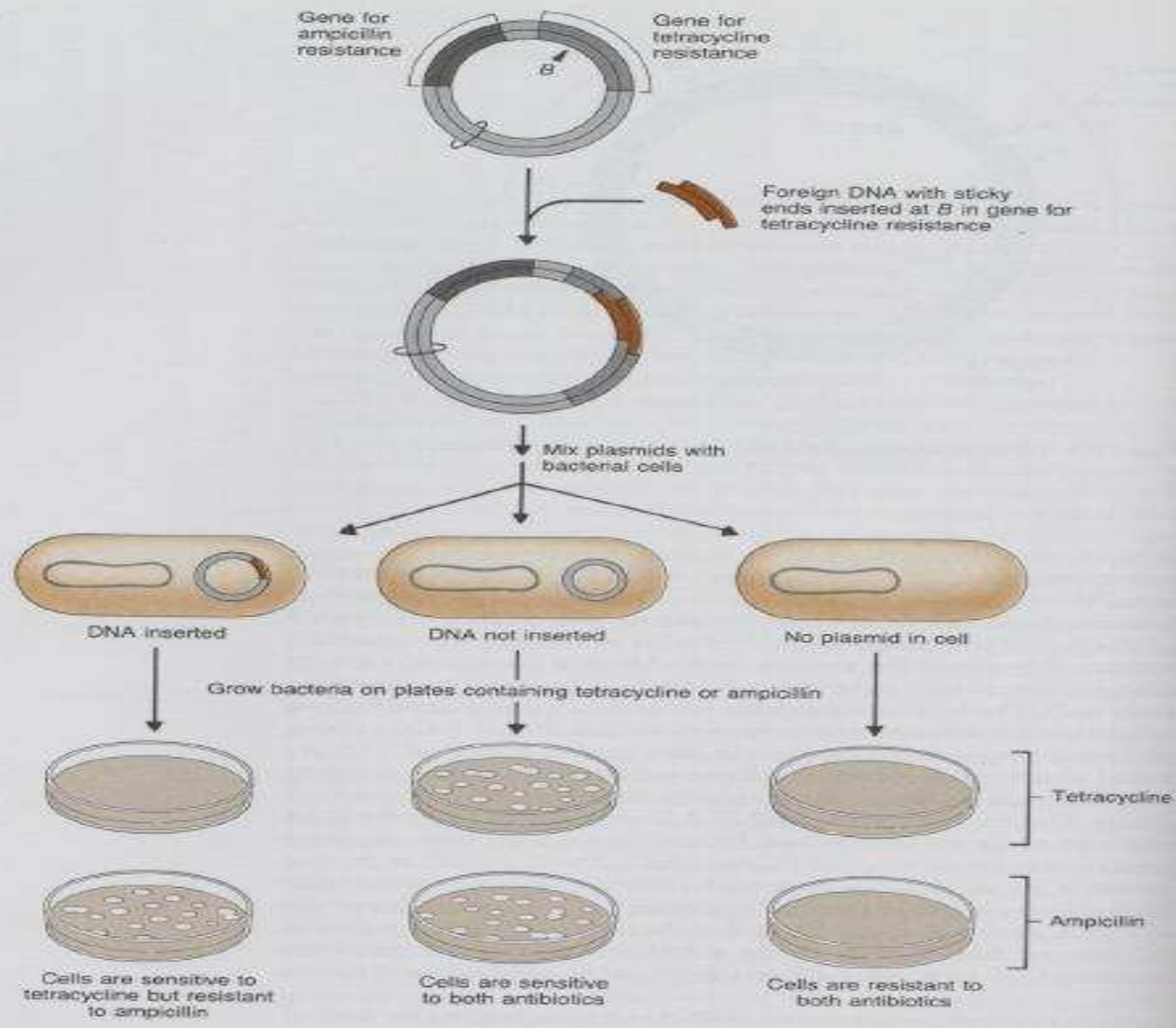
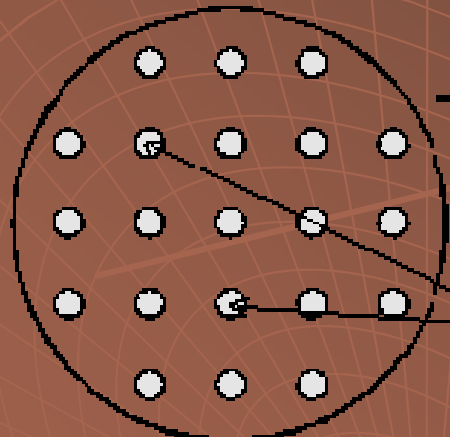


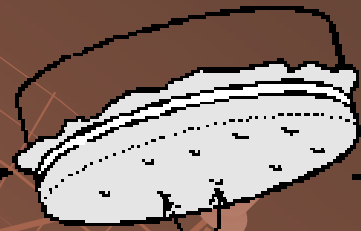
Figure 5.2 A plasmid vector with two genes for antibiotic resistance facilitates isolation of recombinants.

master (tetracycline) plate



grid pattern of colonies makes identification easier

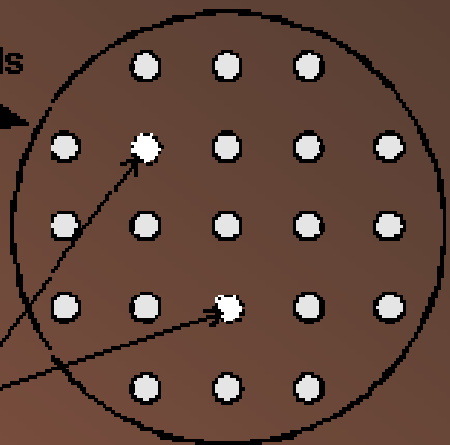
press to pick up cells



cells stuck to sterile velvet surface

press to deposit cells

replica (ampicillin) plate

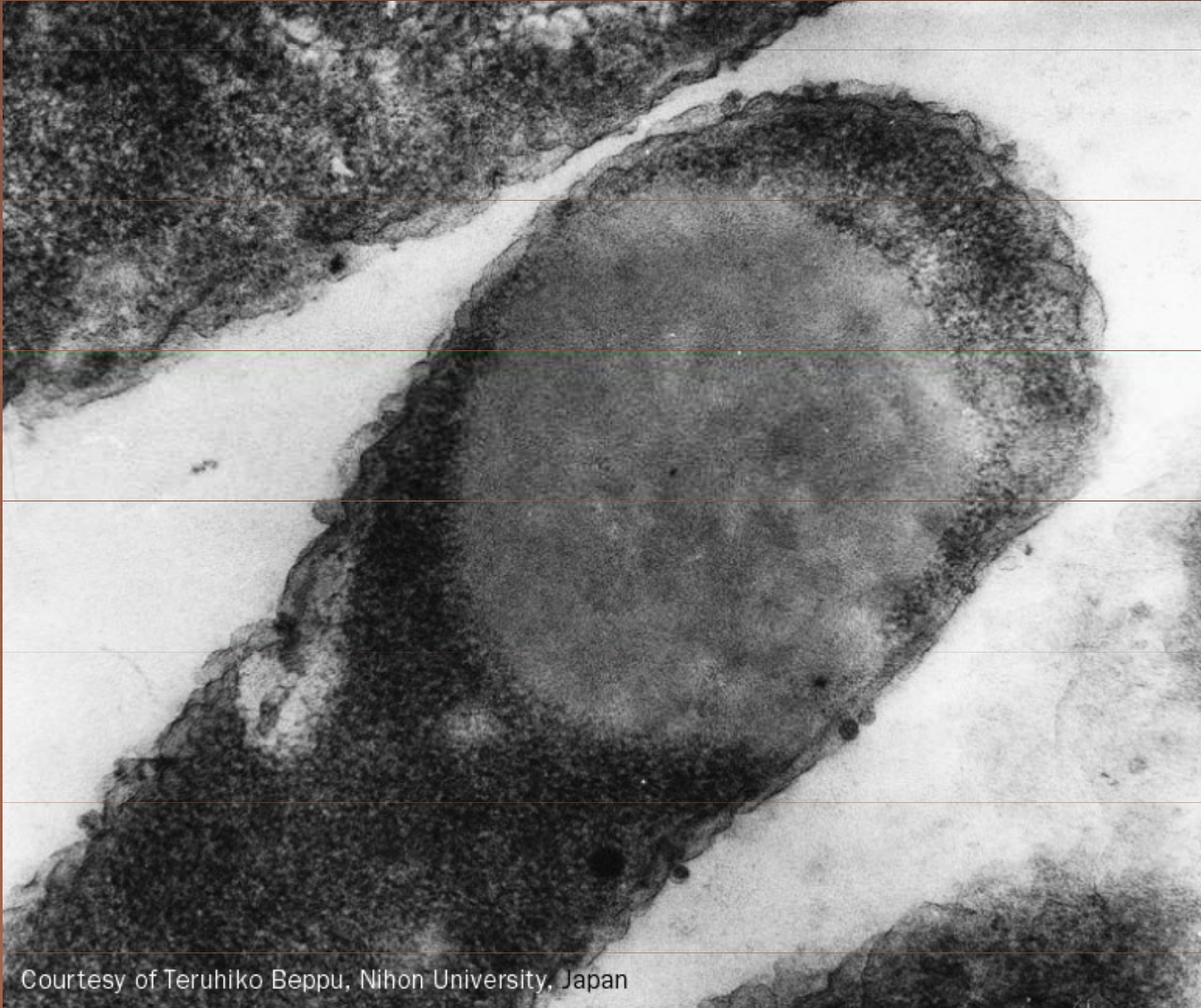


missing colonies indicate cells with hybrid vector

identify these colonies

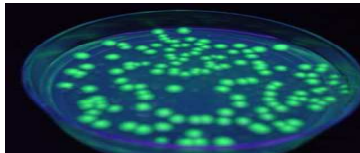
transfer to another plate

Inklusní tělíska

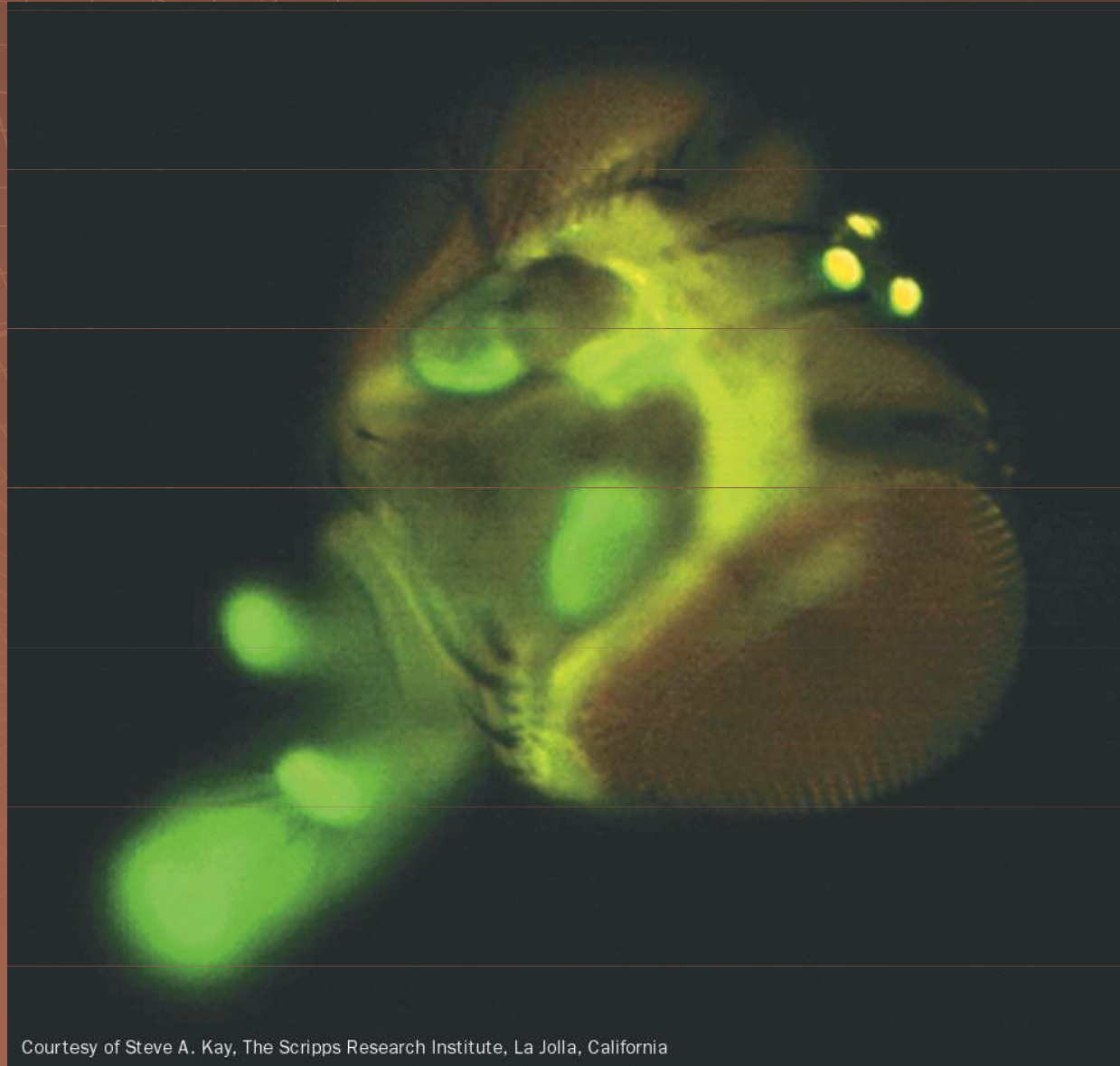


Courtesy of Teruhiko Beppu, Nihon University, Japan

Využití AC pro purifikaci rekombinantních proteinů

řízní kotva	imobilizovaný ligand	podmínky vazby	podmínky eluce
Glutathion S-transferasa GST	redukovaný glutathion	Neutrální pH, nedenaturující prostředí, glutathion musí být redukovaný a GST musí být aktivní	volný redukovaný glutathion
Histidinová kotva His-tag	Chelatovaný nikl nebo kobalt	Neutrální pH bez redukčních a oxidačních látek	>200 mM Imidazol, nízké pH, silné chelatační činidlo
Maltose Binding Protein MBP	Amylosa	Neutrální pH, nedenaturující prostředí; přídavek NaCl k snížení nespecifické sorbce	maltosa
Protein A	IgG	Neutrální pH, nedenaturující prostředí	změna pH, iontové síly
Green Fluorescent Protein GFP	Anti-GFP antibody 	Neutrální pH, nedenaturující prostředí	nízké pH, iontová síla

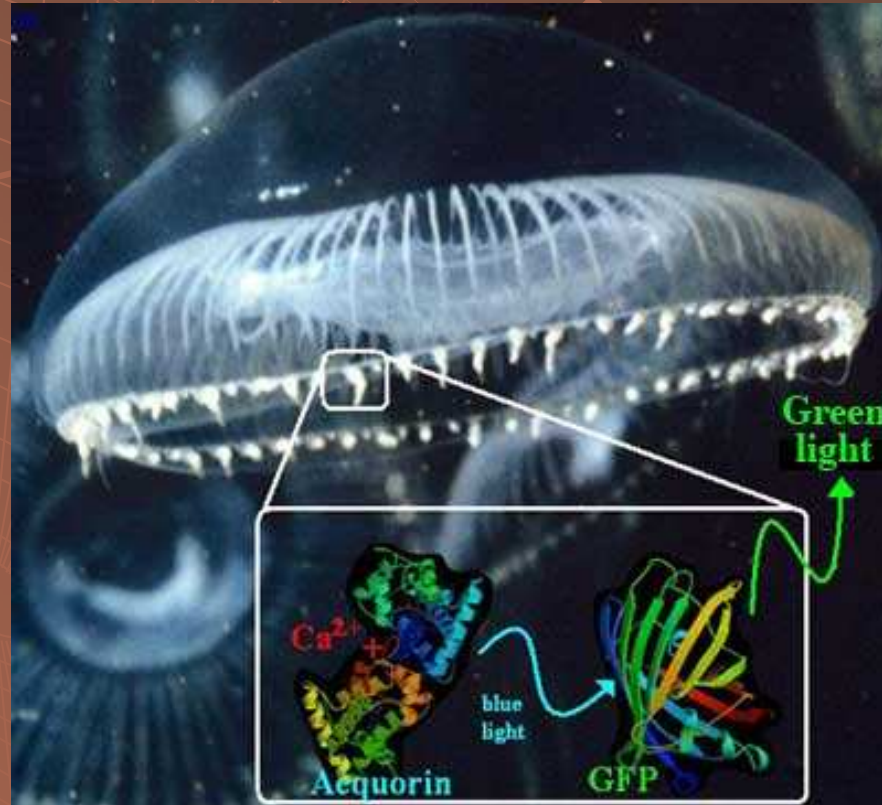
Green Fluorescent Protein



Courtesy of Steve A. Kay, The Scripps Research Institute, La Jolla, California

Green Fluorescent Protein

Aequorea victoria



Green Fluorescent Protein

NC 2008

Osamu Shimomura

Martin Chalfie
Tsien

Roger



izoloval GFP z medúzy



jak GFP navázat na jiné proteiny

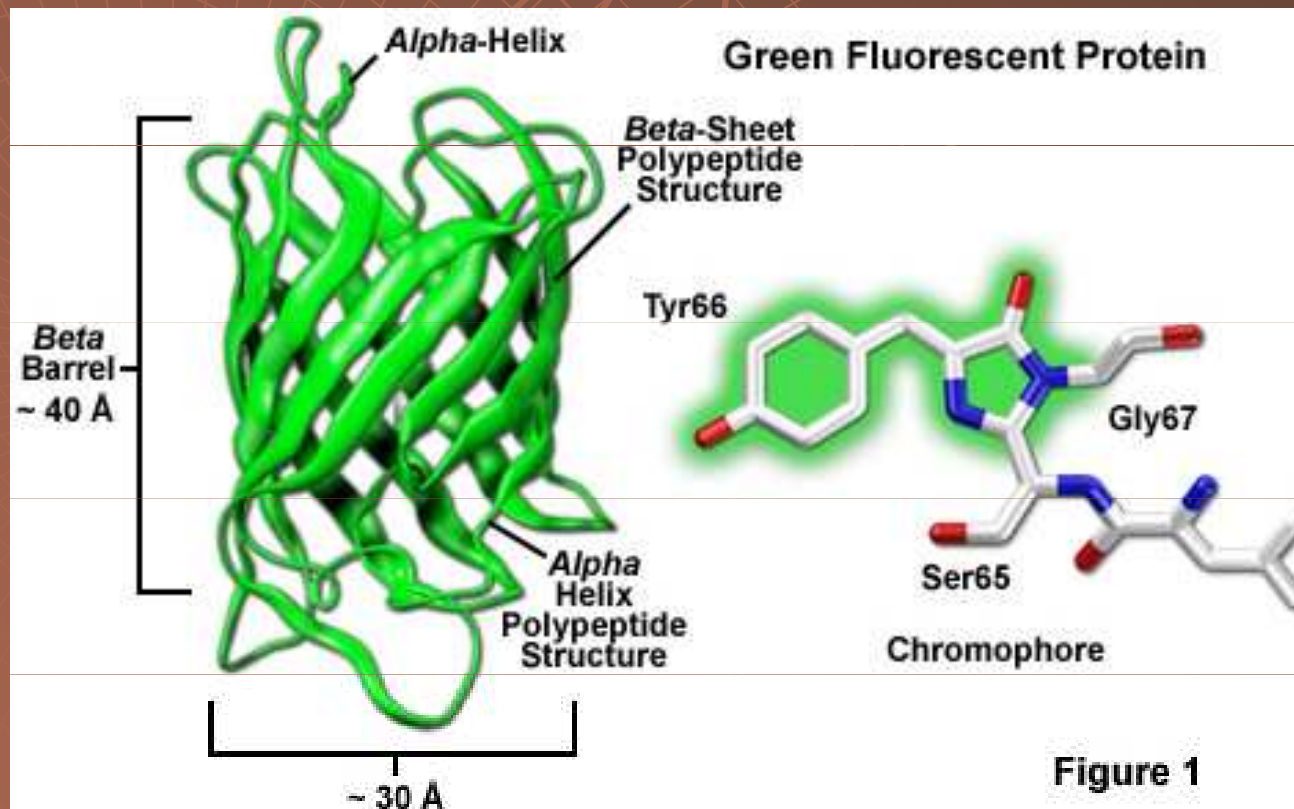


vysvětlil fluorescenci

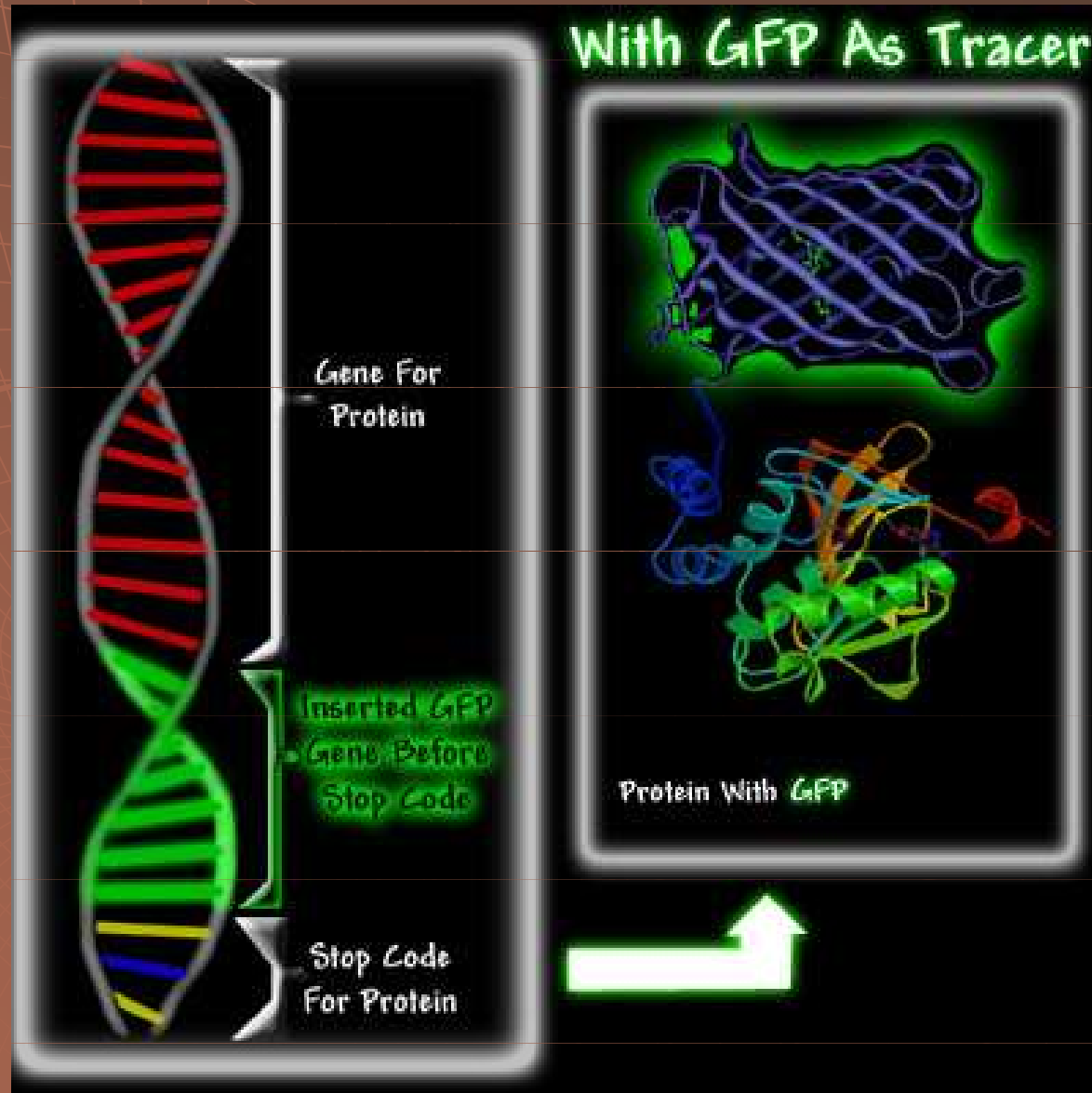
Green Fluorescent Protein

GFP AMK sekvence – 238 AMK

MSKGEELFTGVPVLVELDGDVNGQKFSVSGEGEGDATYGKLTNFICT
TGKLPVPWPTLVTTFSYGVOCFSTRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTI
FYKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKMEYNYNS
HNVYIMGDKPKNGIKVNFKIRHNIKDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLP
DNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMILLEFVTAARITHGMDELYK



Green Fluorescent Protein



Reportérový gen

Green Fluorescent Protein

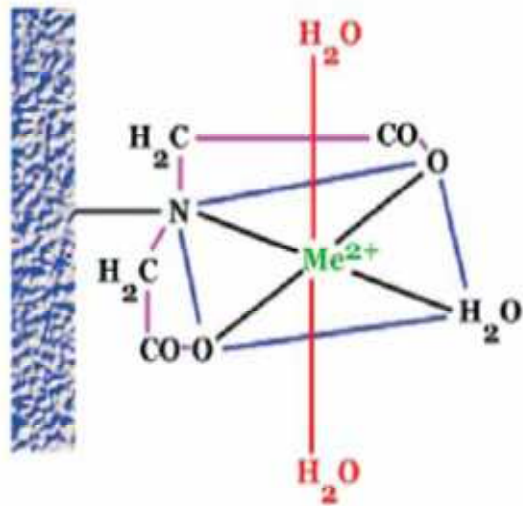


Green Fluorescent Protein

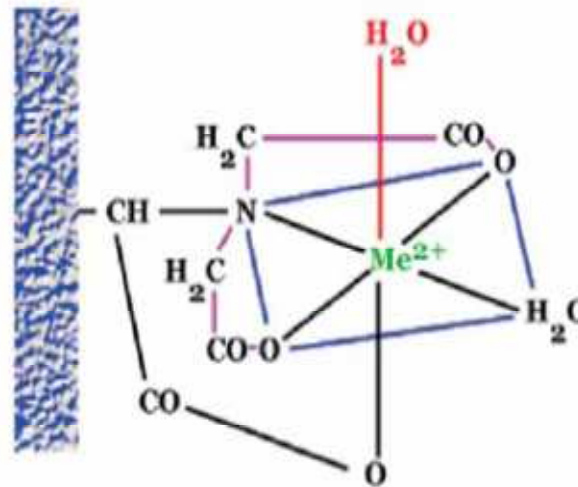


Ch. na imobilizovaných kovových iontech

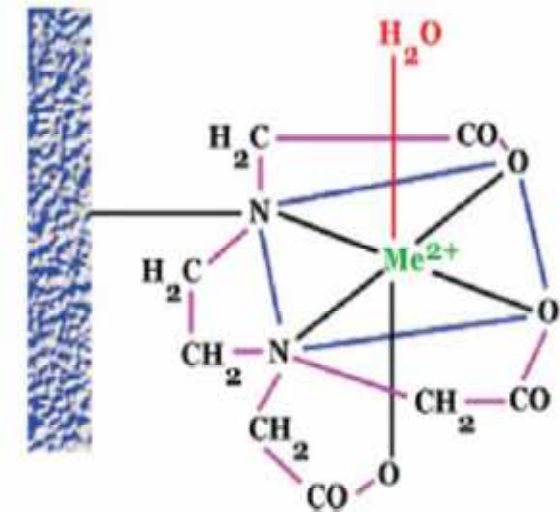
IDA



NTA



TED



iminodiacetic acid (IDA)

nitrilotriacetic acid (NTA)

N, N, N-tris-carboxymethyl ethylene diamine (TED)

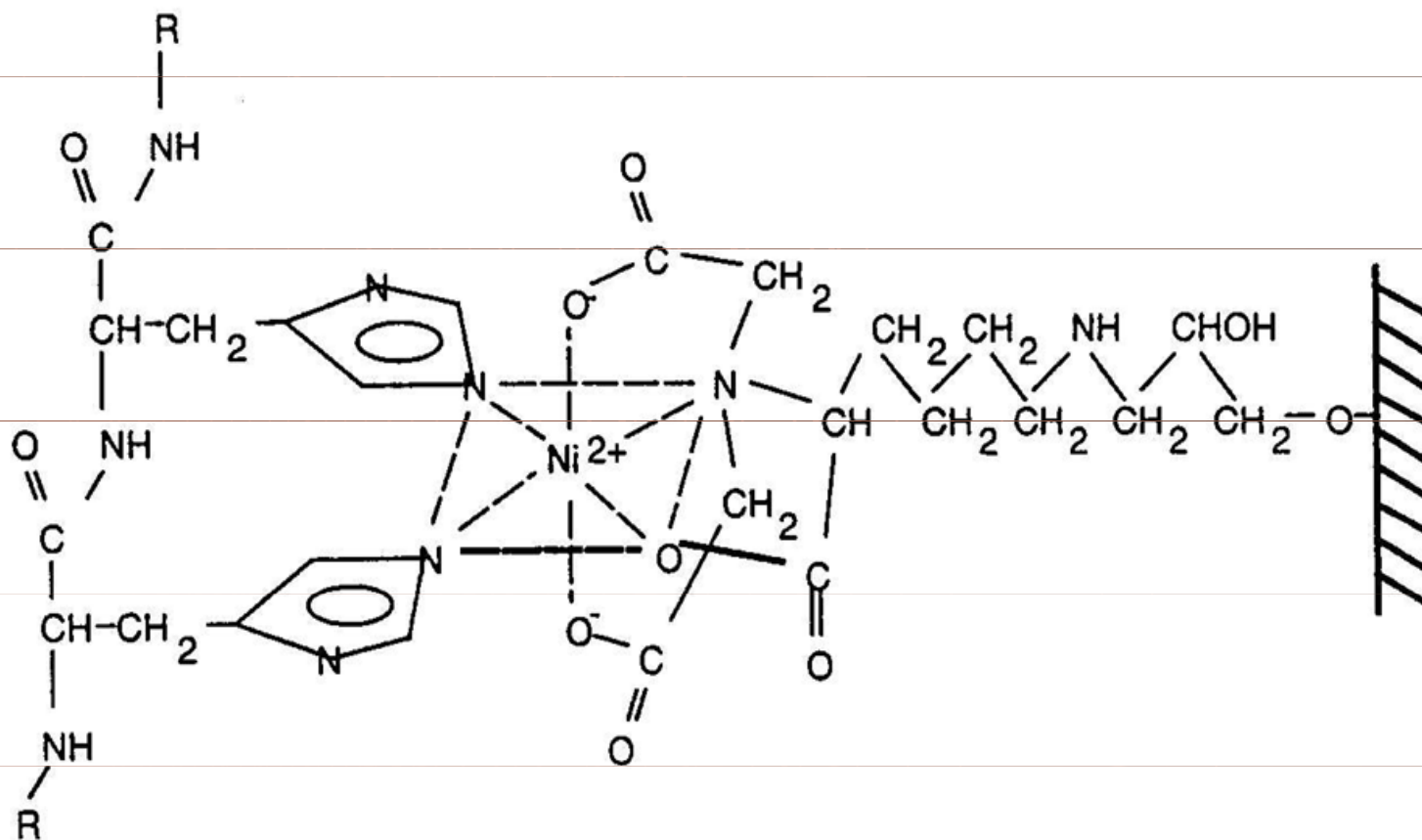
Ch. na imobilizovaných kovových iontech

- ◆ Ekvilibrace – imobilizace kovového iontu (50 mM)
- ◆ Používané ionty - používají se především ionty Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} a Mg^{2+} , preferující dusík jako koordinační ligand

Ch. na imobilizovaných kovových iontech

Chelating compound	Coordination	Metal-ions
Salicylaldehyde	Bidentate	Cu(II)
8-hydroxyquinoline (im-8-HQ)	Bidentate	Al(III), Ca(II), Fe(III), Yb(III)
N-methacryloyl-(L)-histidine methyl ester (MAH)	Bidentate	Fe(III)
Dipicolylamine (DPA)	Tridentate	Ni(II), Zn(II)
Iminodiacetic acid (IDA)	Tridentate	Cu(II), Ni(II), Zn(II), Ga(III)
O-phosphoserine (im-OPS)	Tridentate	Al(III), Ca(II), Fe(III), Yb(III)
Tris(2-aminoethyl)amine (TREN)	Tridentate	Cu(II)
1,4,7-triazocyclononane (tacn)	Tridentate	Cu(II), Cr(III), Mn(II), Co(II), Zn(II), Ni(II)
Nitrilotriacetic acid (NTA)	Tetradentate	Cu(II), Ni(II), Zn(II)
Carboxymethylated aspartic acid (CM-Asp)	Tetradentate	Ca(II), Co(II)
N-methacryloyl-(L)-cysteine methyl ester (MAC)	—	Fe(III)

Ch. na imobilizovaných kovových iontech

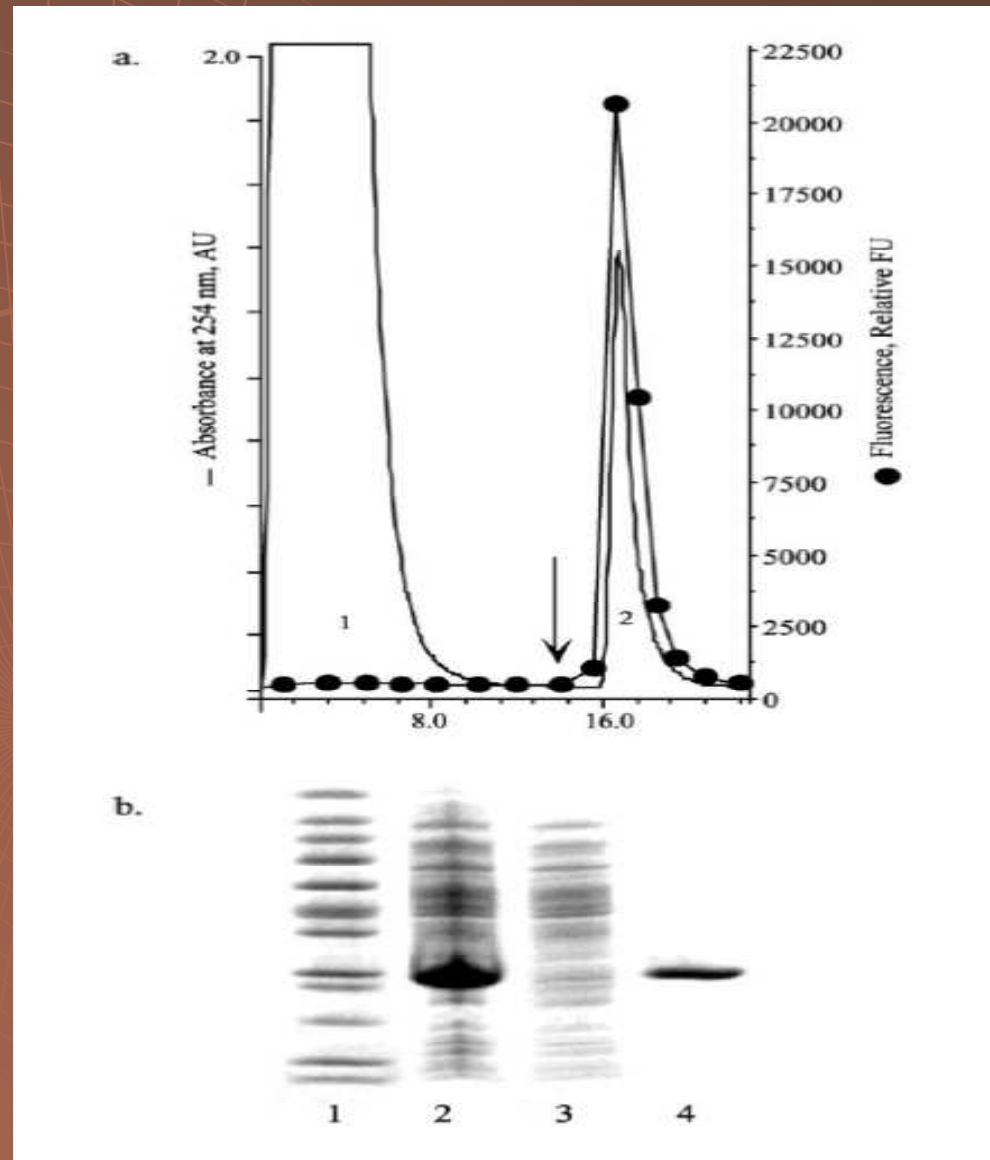


Ch. na imobilizovaných kovových iontech

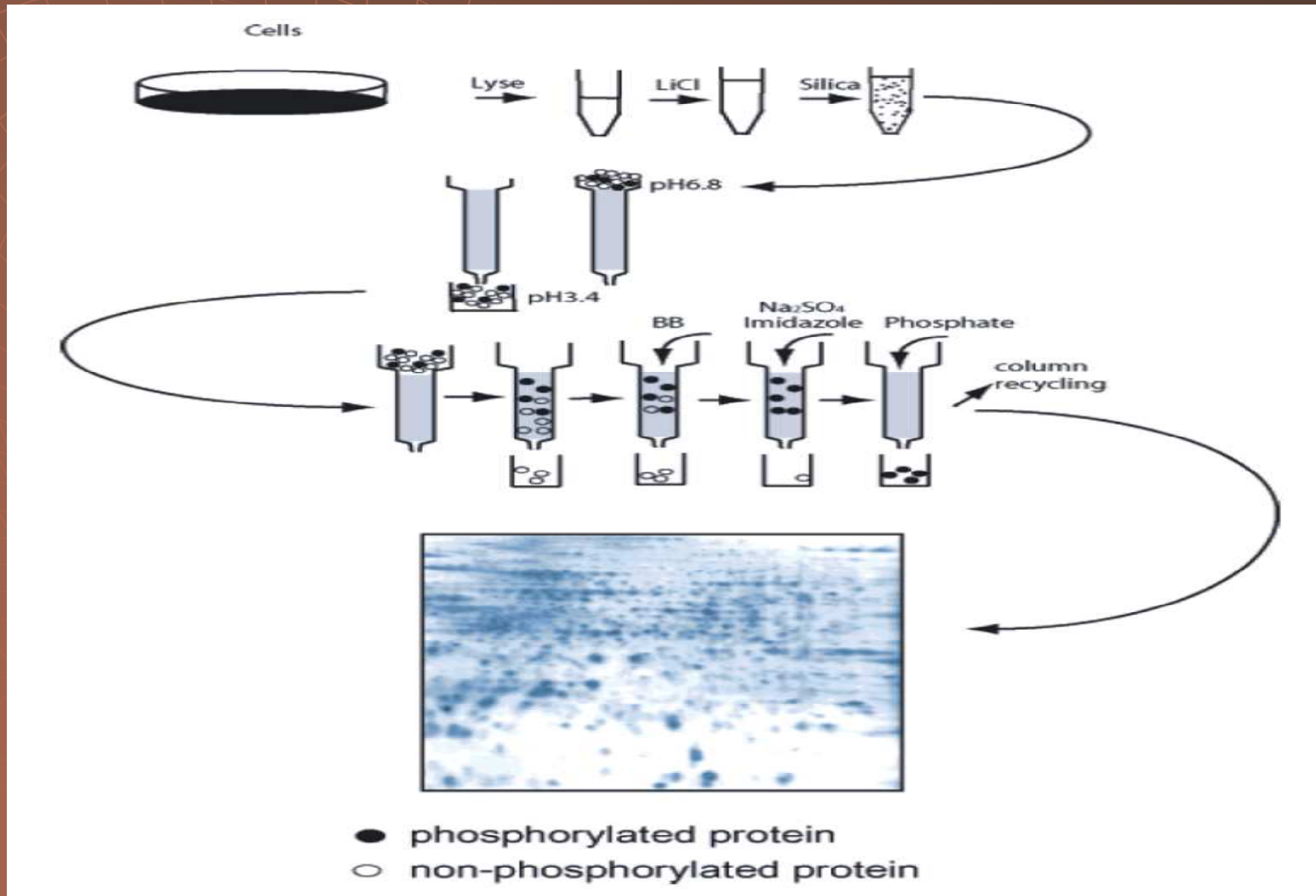
- ◆ Nanášení vzorku – pufr s vyšší iontovou silou (0.5 M NaCl)
- ◆ Eluce – snížení pH (3-4), kompetující látka (histidin, imidazol, glycin, fosfát), EDTA

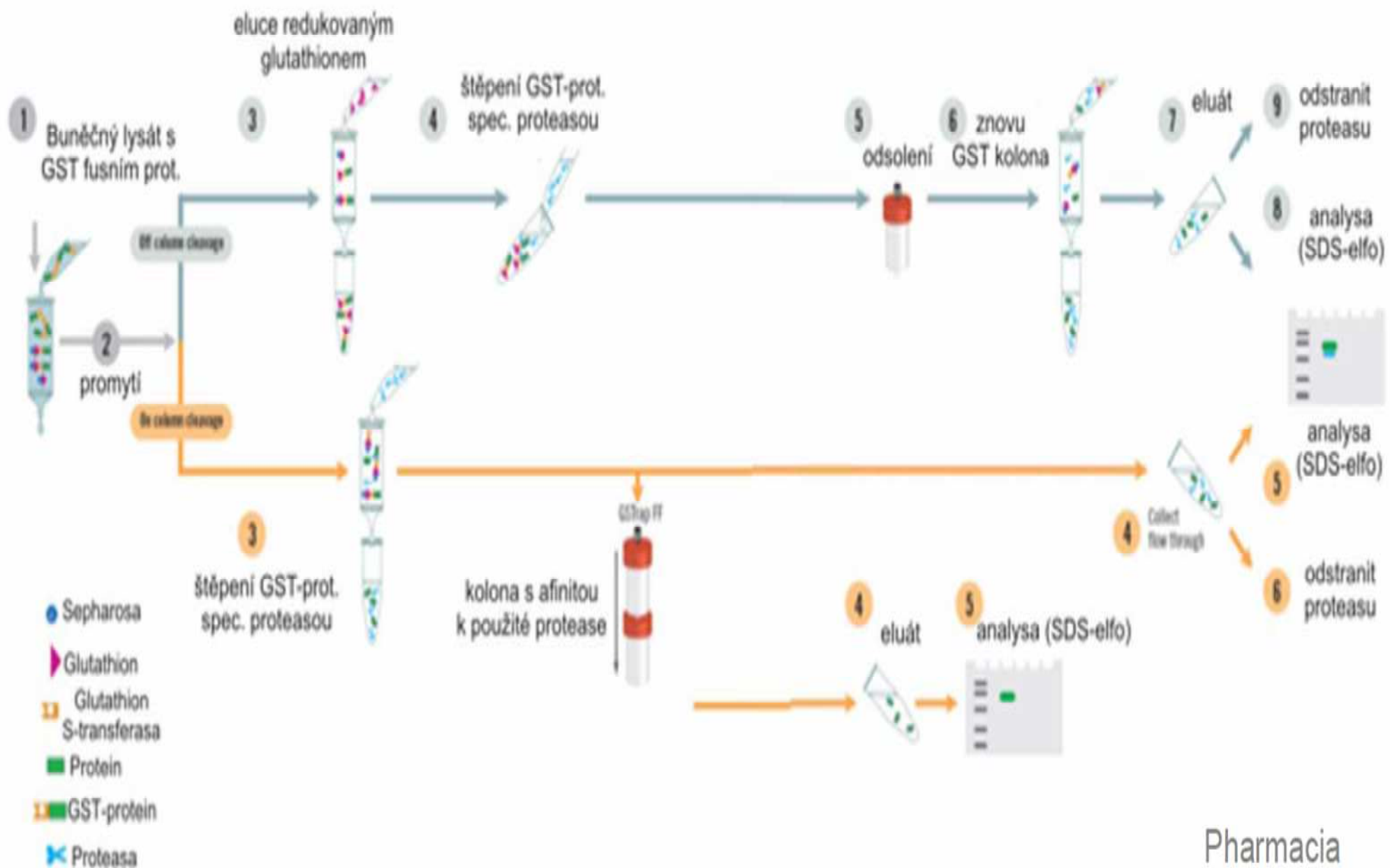
Použití : purifikace normálních a rekombinantních bílkovin

Ch. na imobilizovaných kovových iontech



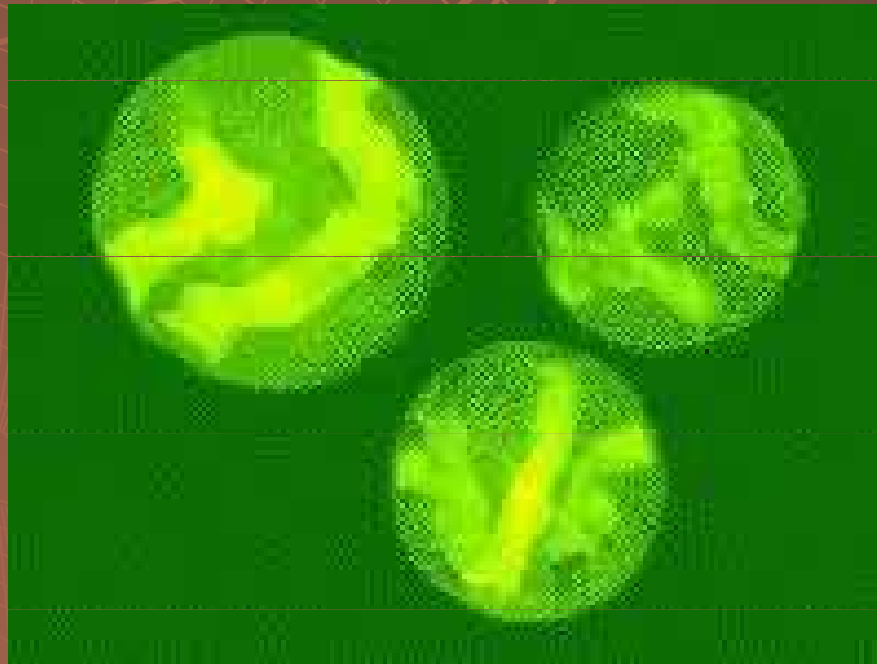
Ch. na imobilizovaných kovových iontech





Pharmacia

Gelová permeační chromatografie

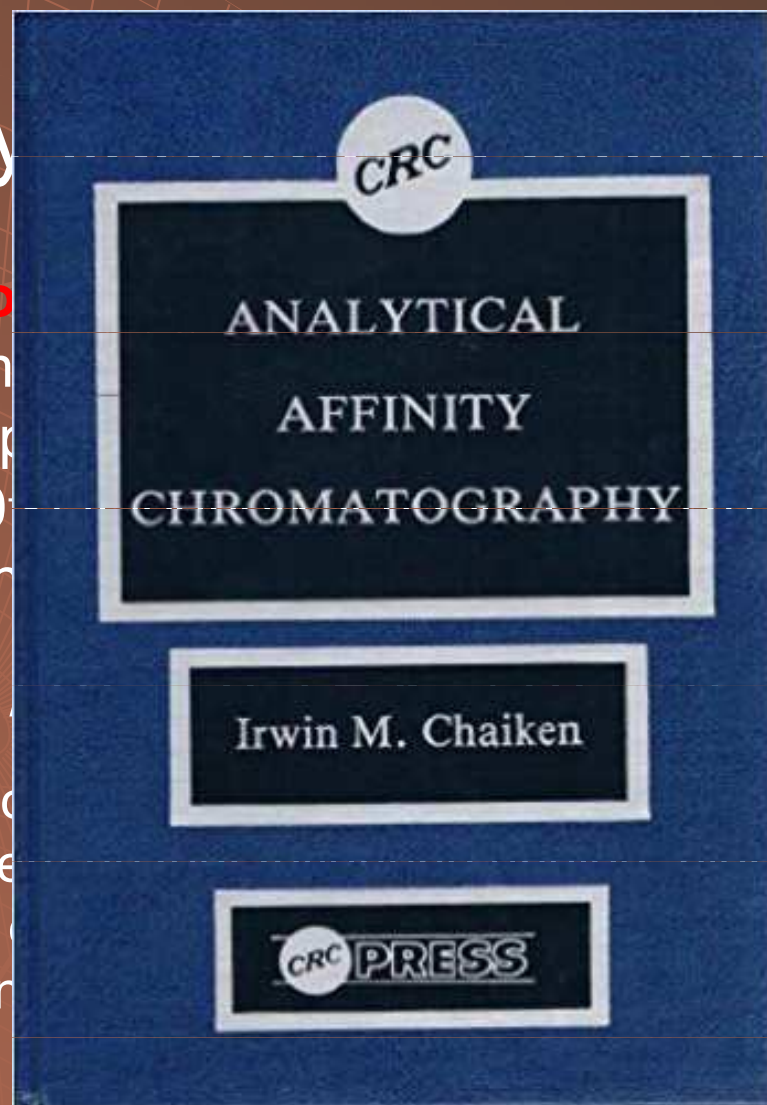


Analytická afinitní chromatografie

Analýza vazby

Určení disociační konstanty (K') má význam zejména pro afinantem z hlediska p...
v intervalu (10^{-6} - $5 \cdot 10^{-6}$)
bývá zpravidla slabší než

V_M - mrtvý objem
 V_O - el. objem
 V_R - eluční objem
 c_L - koncentrace



polymer

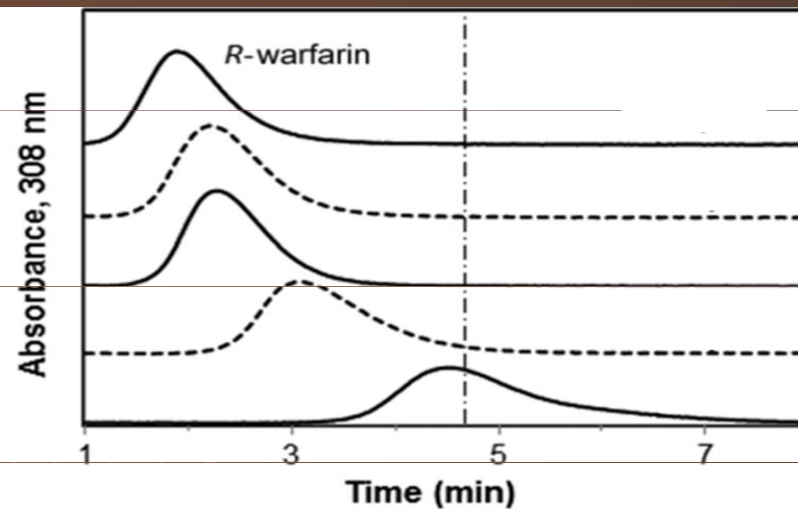
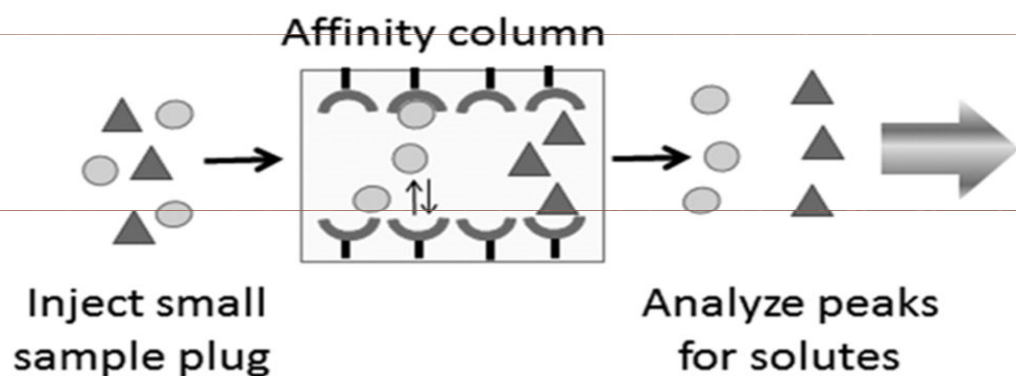
polymer - zakotvený ligand
... nosiče se zakotveným
... K' se musí nacházet
... na imobilizovaný ligand

$* C_L$

polymeru (M_r)

Analytická afinitní chromatografie

A Zonal elution



Analytická afinitní chromatografie

Analýza vazby ligandu na biopolymer

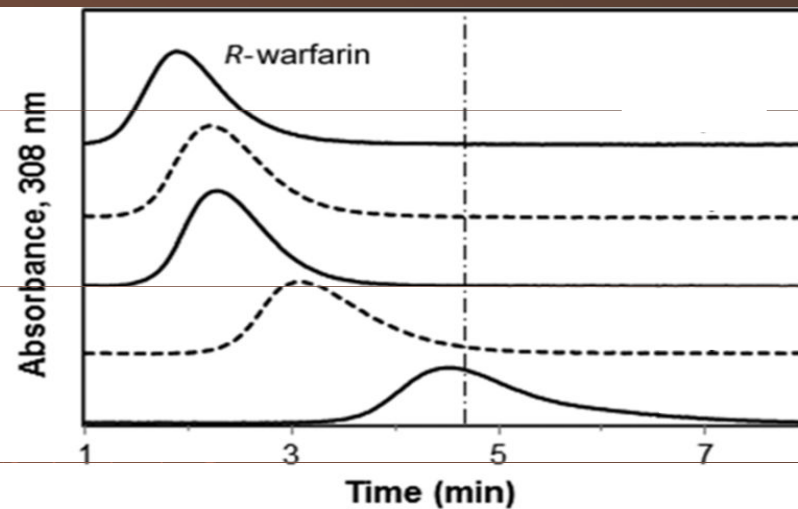
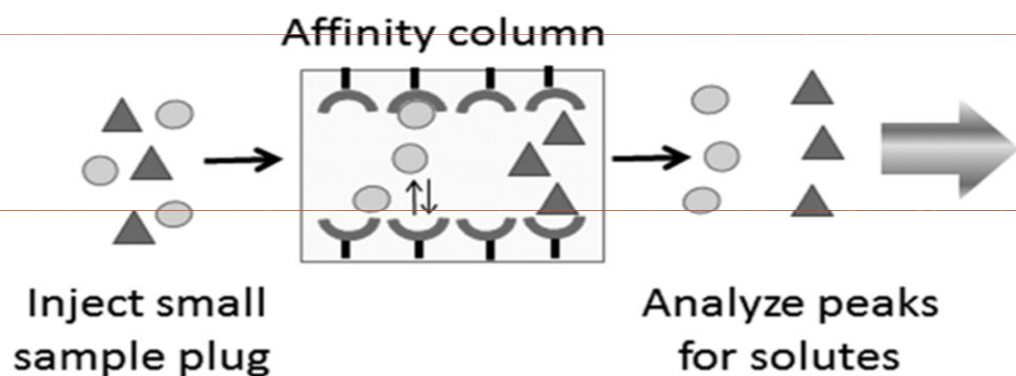
Určení disociační konstanty komplexu biopolymer - volný ligand (K)

vychází z předpokladu, že oba ligandy (volný i zakotvený) se vážou na biopolymer kompetitivně (metoda kompetitivní eluce). Na kolonu obsahující nosič s vhodným afinantem nanese se biopolymer, k eluci použijeme určitou koncentraci kompetitivního ligandu (c_L') a změříme eluční objem biopolymeru V_R . Provedeme sérii pokusů s různými koncentracemi ligandu, získáme různé eluční objemy.

$$1 / (V_R - V_0) = K' / (V_0 - V_M) * c_L' + [K'' * c_L] / [(V_0 - V_M) * c_L' * K]$$

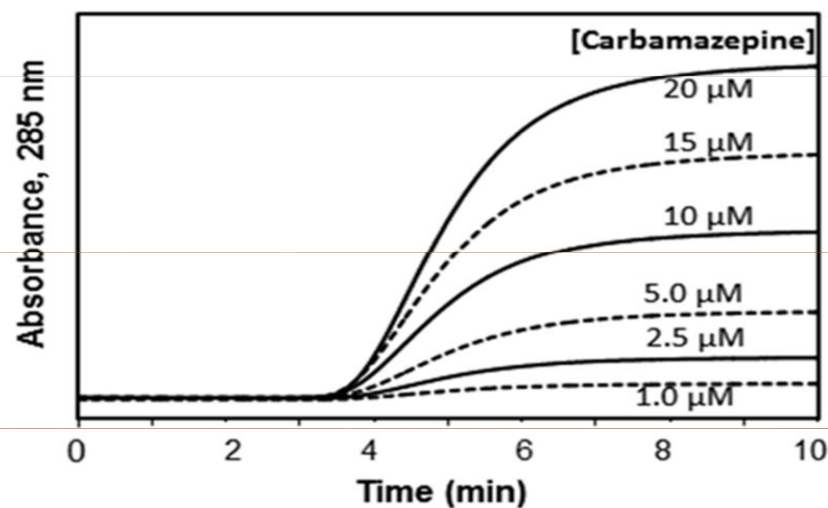
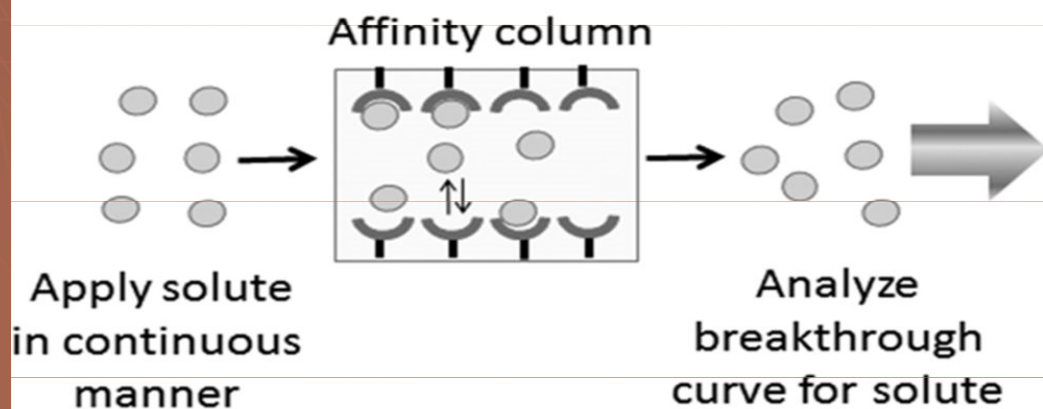
Analytická afinitní chromatografie

A Zonal elution



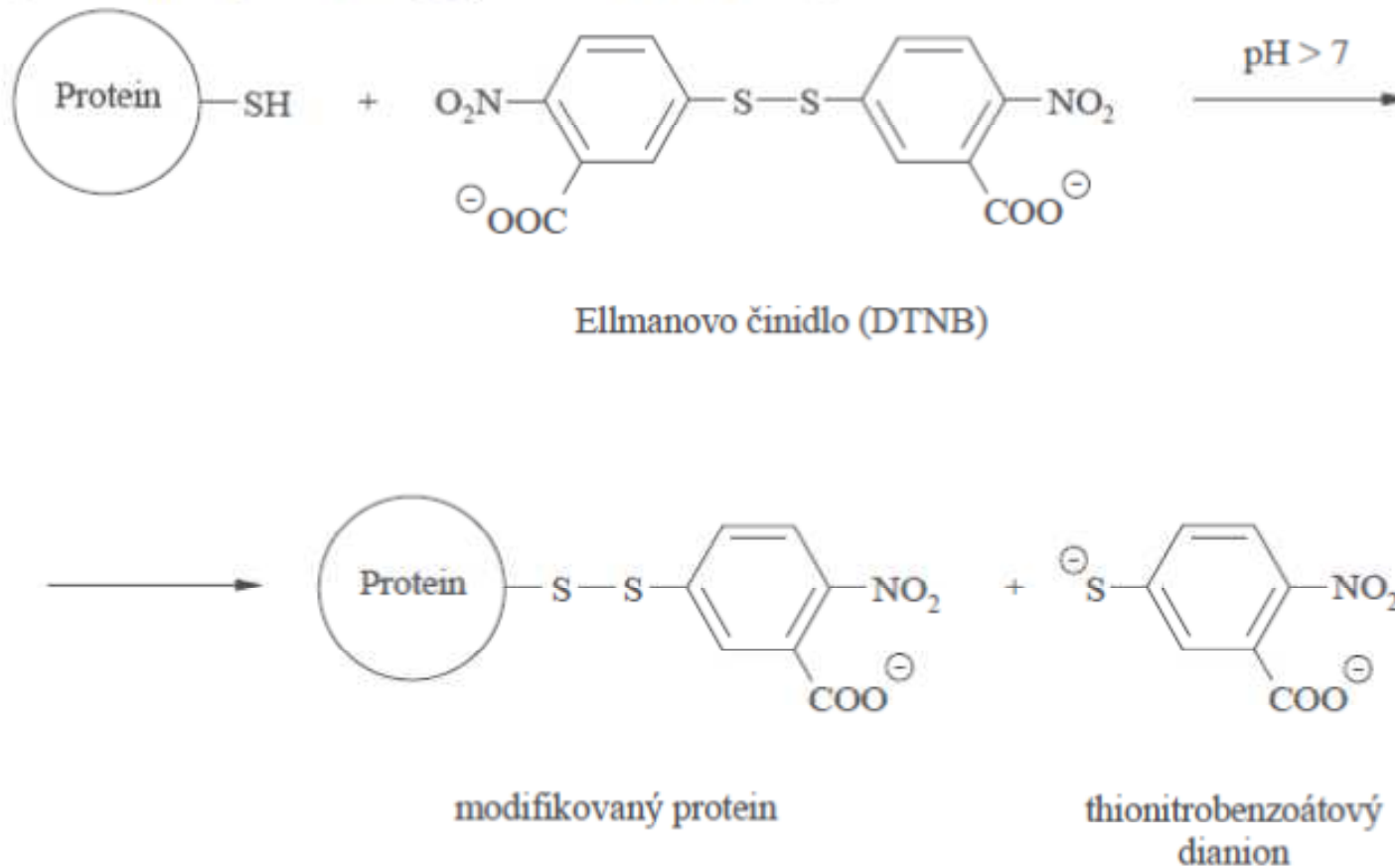
Analytická afinitní chromatografie

B Frontal analysis



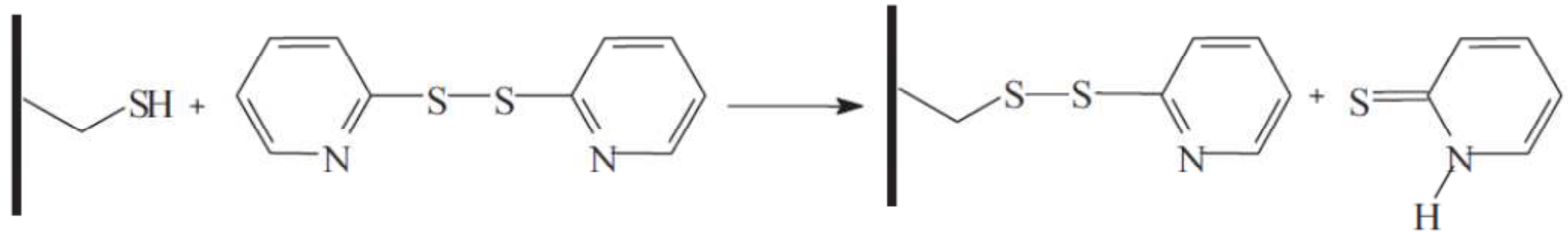
Kovalentní chromatografie thiol-disulfidická výměna

Ellmanovo činidlo, tj. kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová (DTNB), selektivně reaguje s volnými sulfhydrylovými skupinami. Intenzivně žlutě zbarvený redukční produkt (thionitrobenzoátový dianion), lze stanovit při 412 nm ($\epsilon_{412} = 13\,600 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

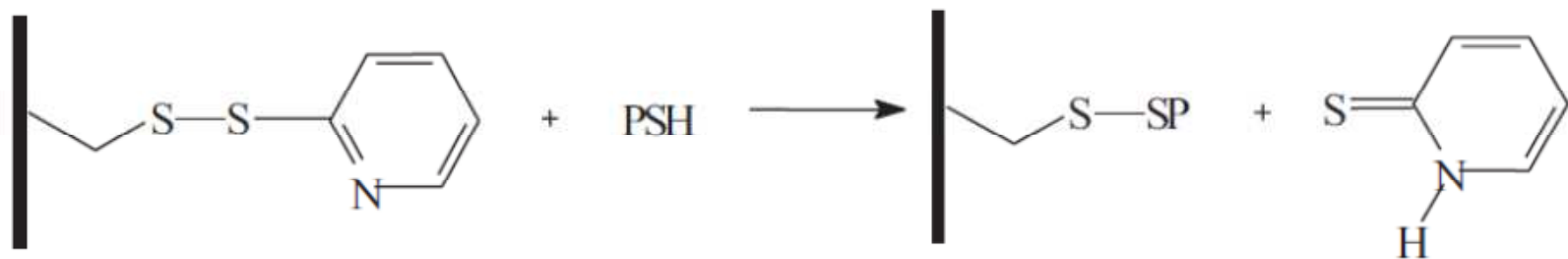


Kovalentní chromatografie

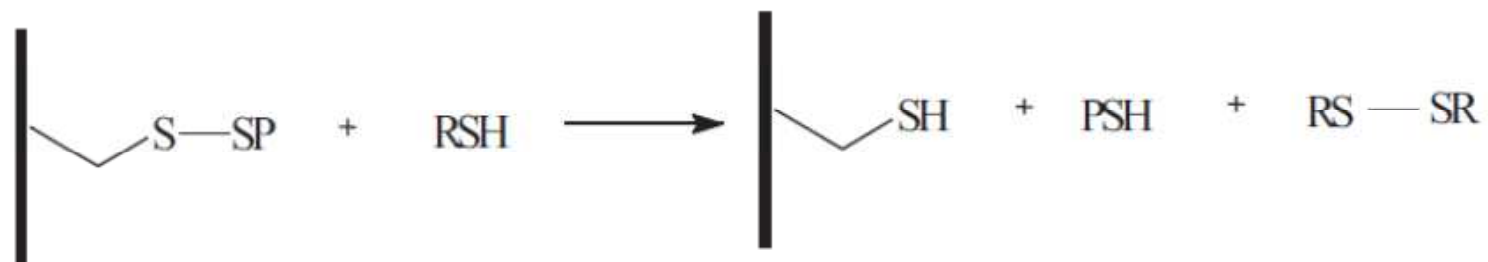
Aktivace



Vazba bílkoviny PSH



Eluce bíkoviny PSH

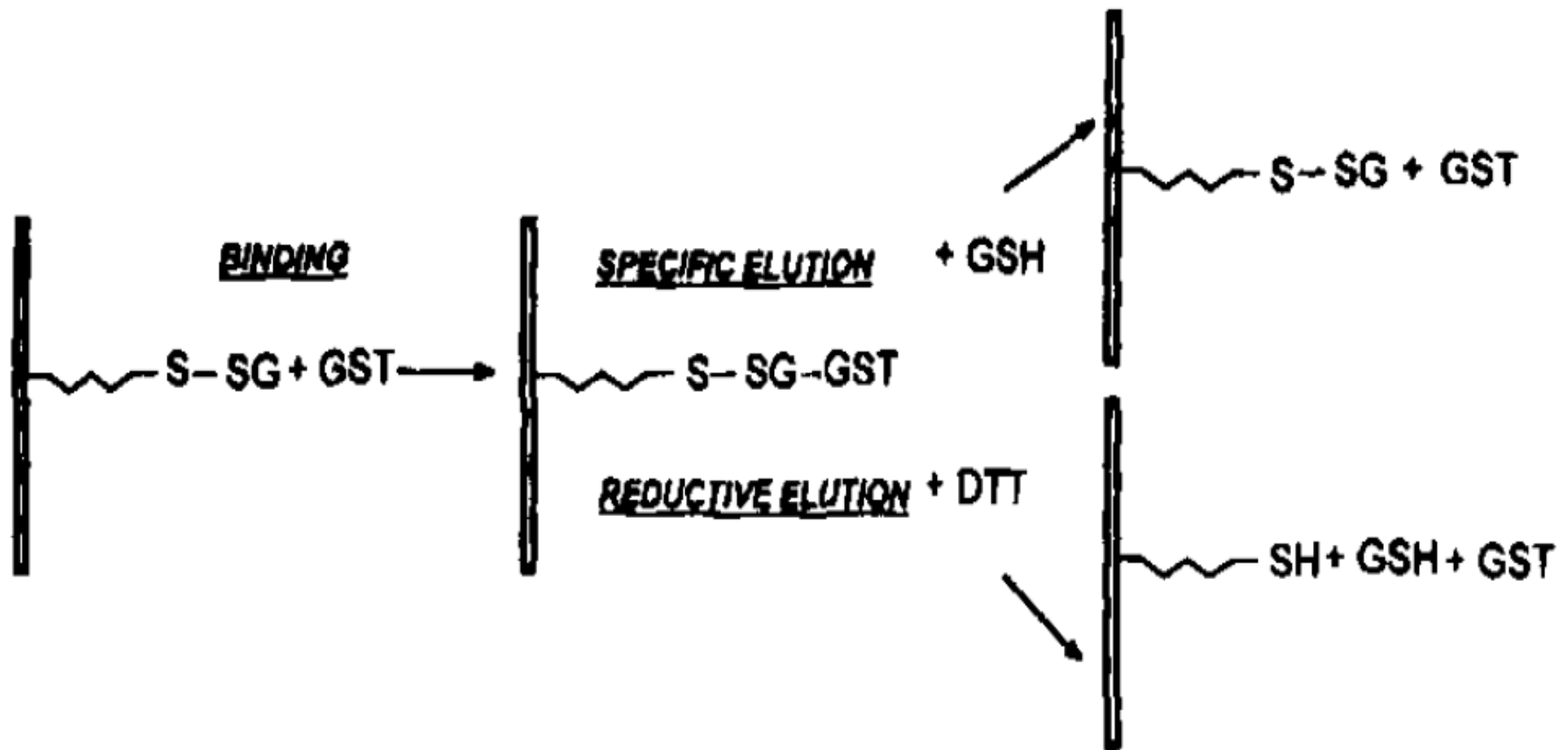


Kovalentní chromatografie

- ◆ Nanášení vzorku – monitorování při 343 nm
- ◆ Eluce – redukční eluce
 - ◆ 10-25 mM DTT
 - ◆ 25-50 mM β -merkaptoethanol
- ◆ Reaktivace – reakce s reaktivním disulfidem
 - ◆ 20 mM 2,2'-dipyridyldisulfid

Použití : izolace bílkovin a peptidů obsahujících SH skupin

Kovalentní chromatografie GST



Kovalentní chromatografie GST

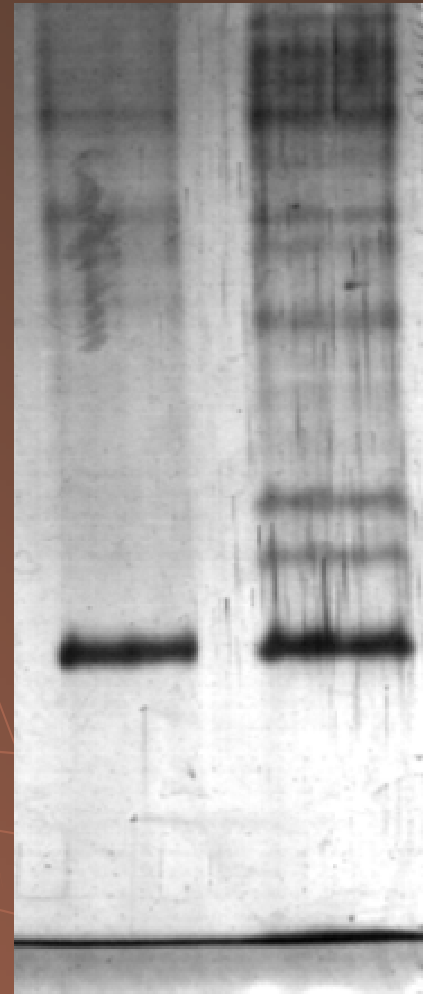
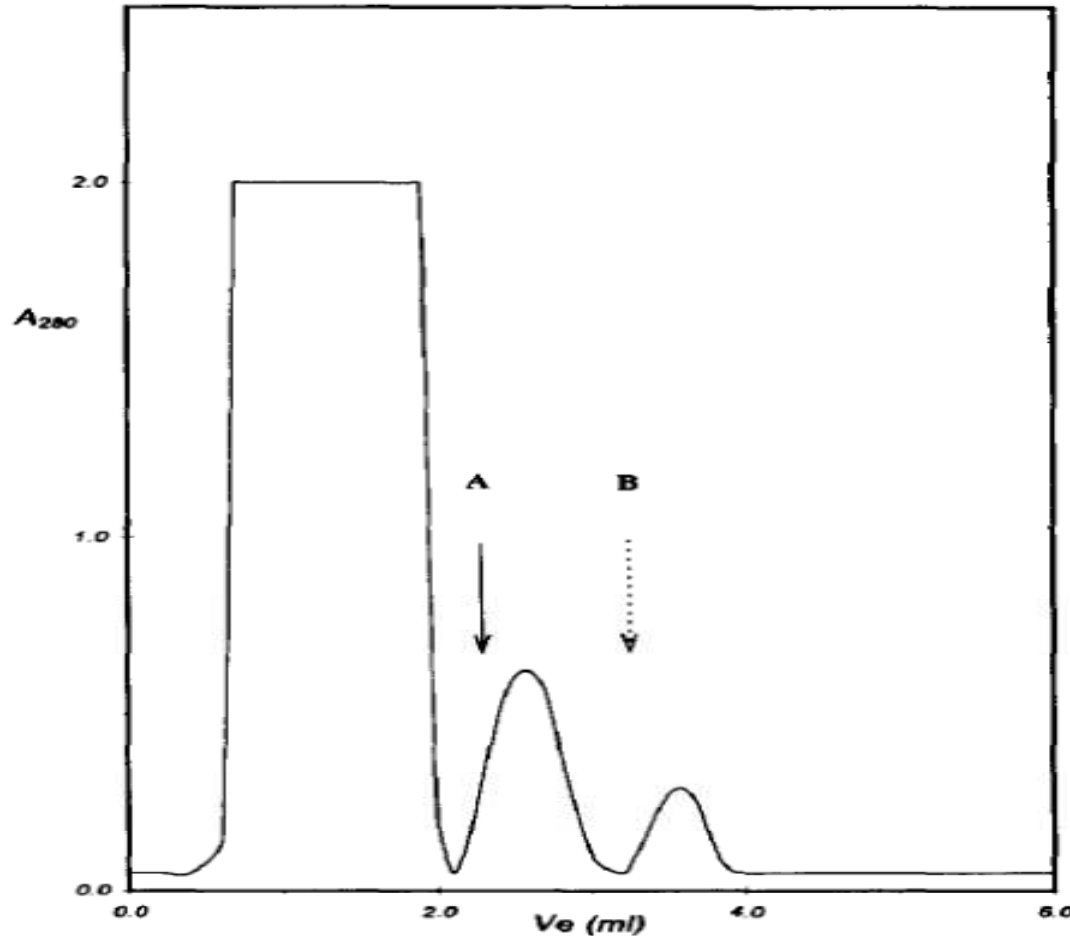
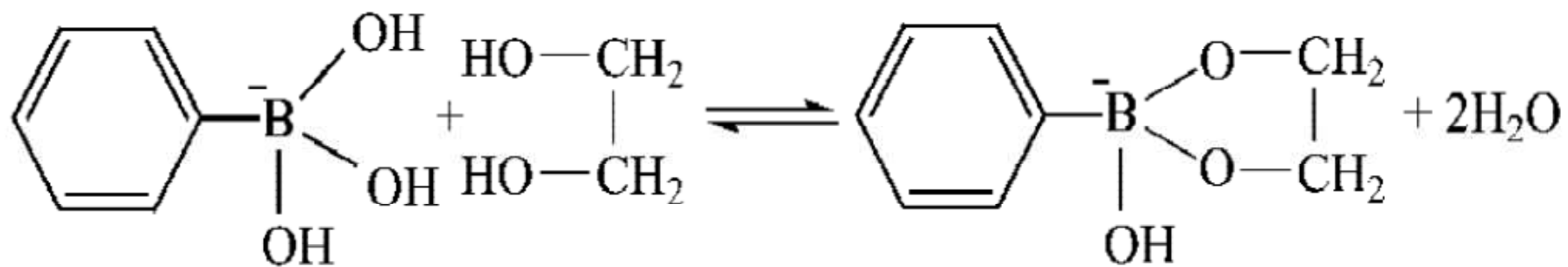
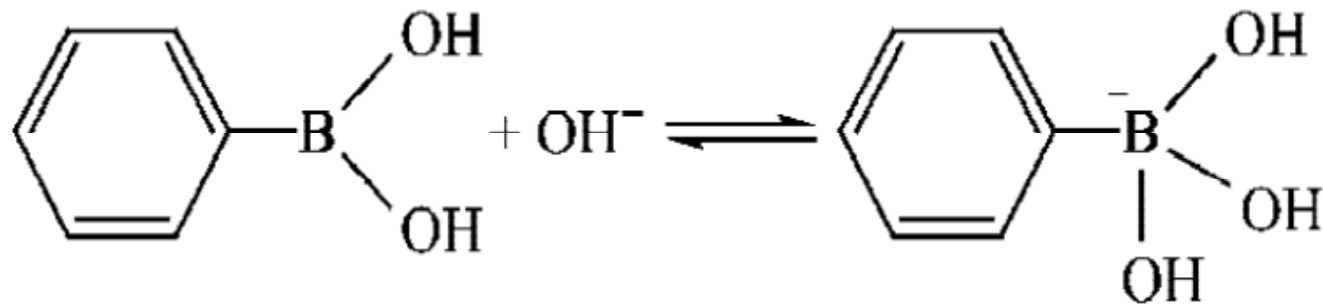
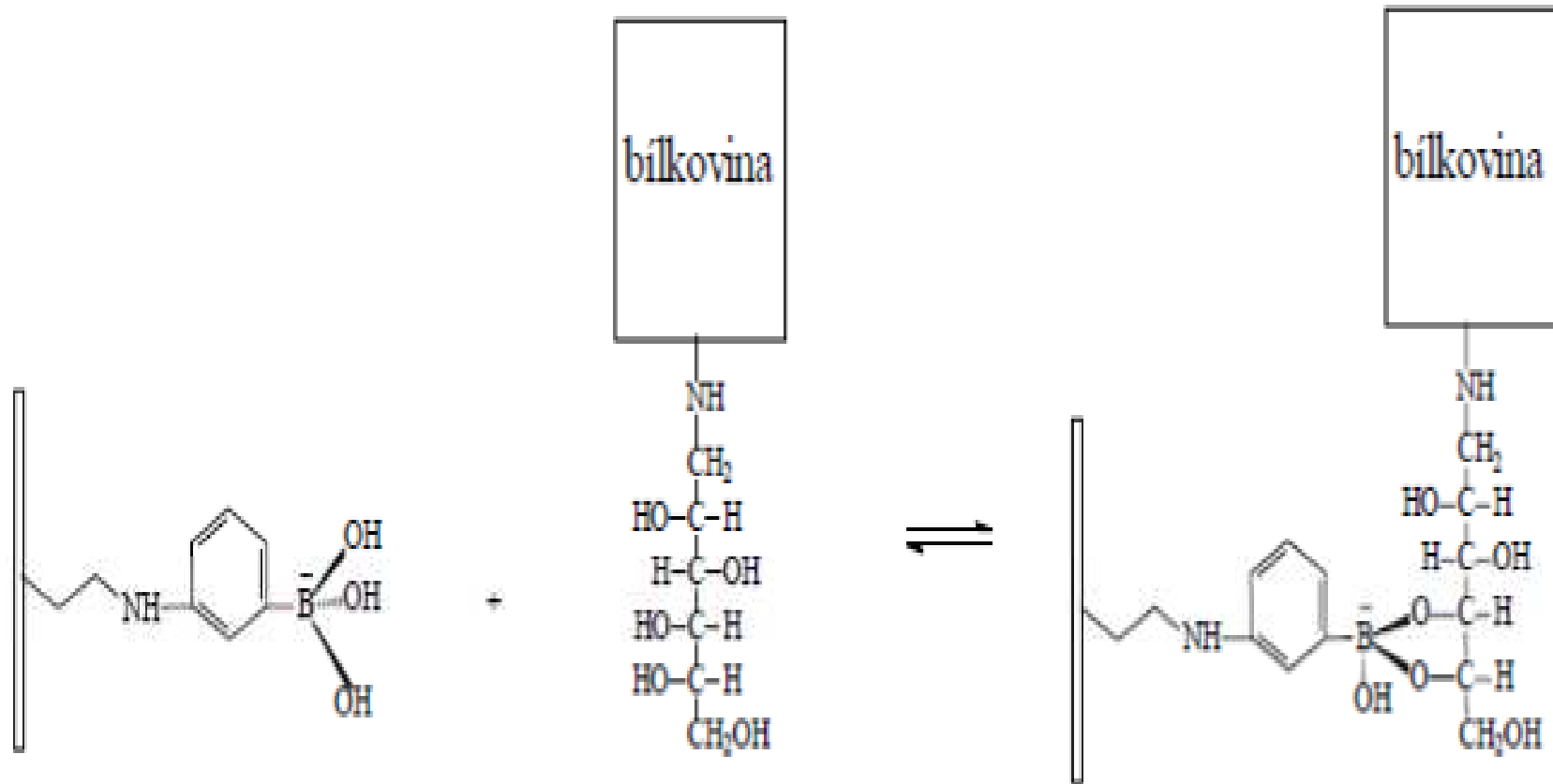


Fig. 2. Partial purification of the crude preparation of pig kidney GST on glutathione-thiopropyl Sepharose column. Approximately 50 mg of protein were applied on the column equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.8 containing 1 mM EDTA. After washing the column with equilibrating buffer, the same buffer containing 0.2 M NaCl (A) and 0.2 M NaCl with 10 mM GSH or 20 mM DTT (B) were applied at the positions marked with arrows (A) and (B). The flow-rate was 0.1 ml/min. V_E =elution volume; solid line: absorbance at 280 nm.

Boronátová chromatografie



Boronátová chromatografie



Boronátová chromatografie

- ◆ Nanášení vzorku – vyšší iontová síla
(0,2 M pufr)
- ◆ Eluce – polyoly (200 mM sorbitol)

Použití : purifikace glyko- proteinů a peptidů, stanovení GlyHb

Boronátová chromatografie

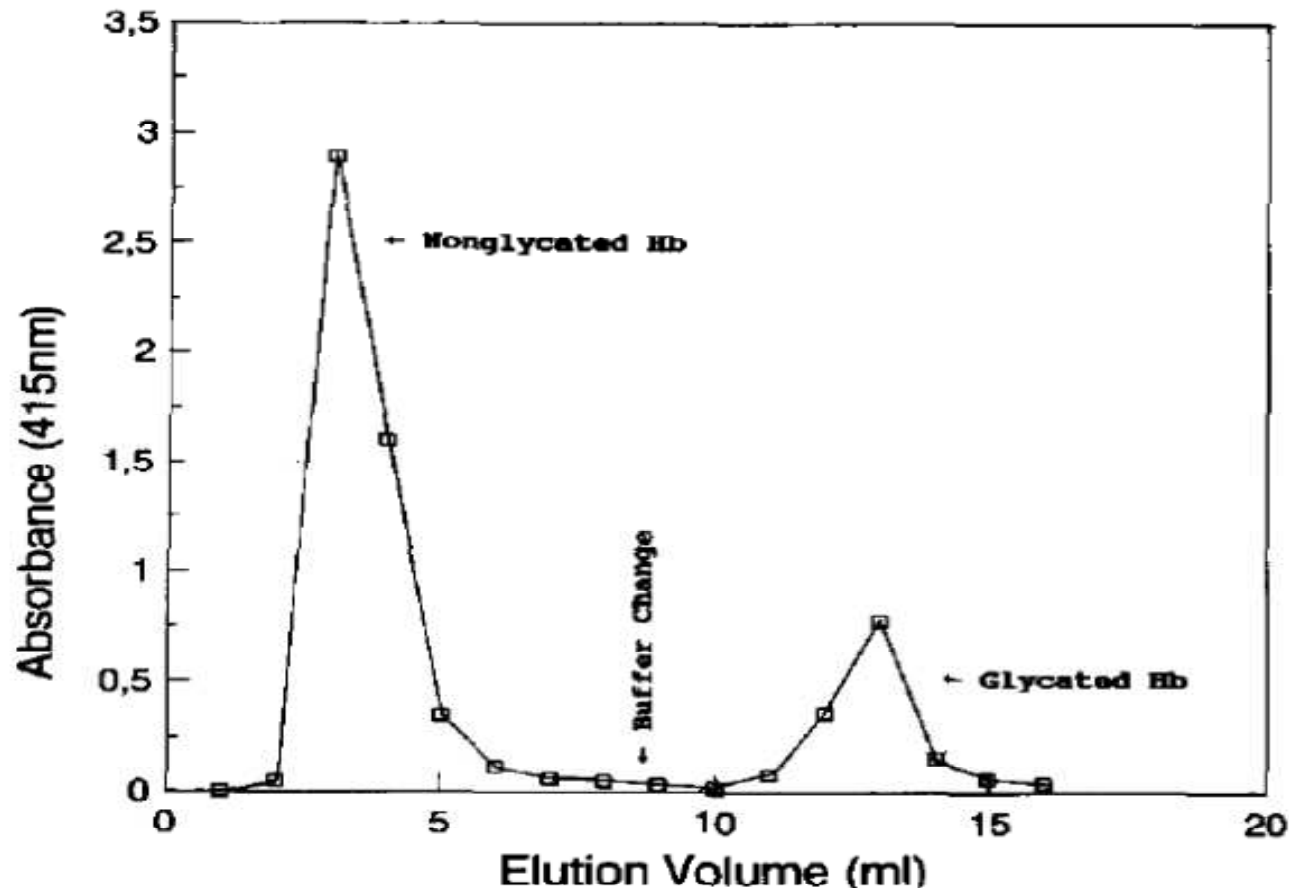


Fig. 3. Separation of glycated Hb and non-glycated Hb on a 3-ml boronate Sephacryl column. Chromatographic conditions were as described in Experimental; 100 μ l of sample were applied to the column, and 1-ml fractions were collected.

Thiofilní chromatografie

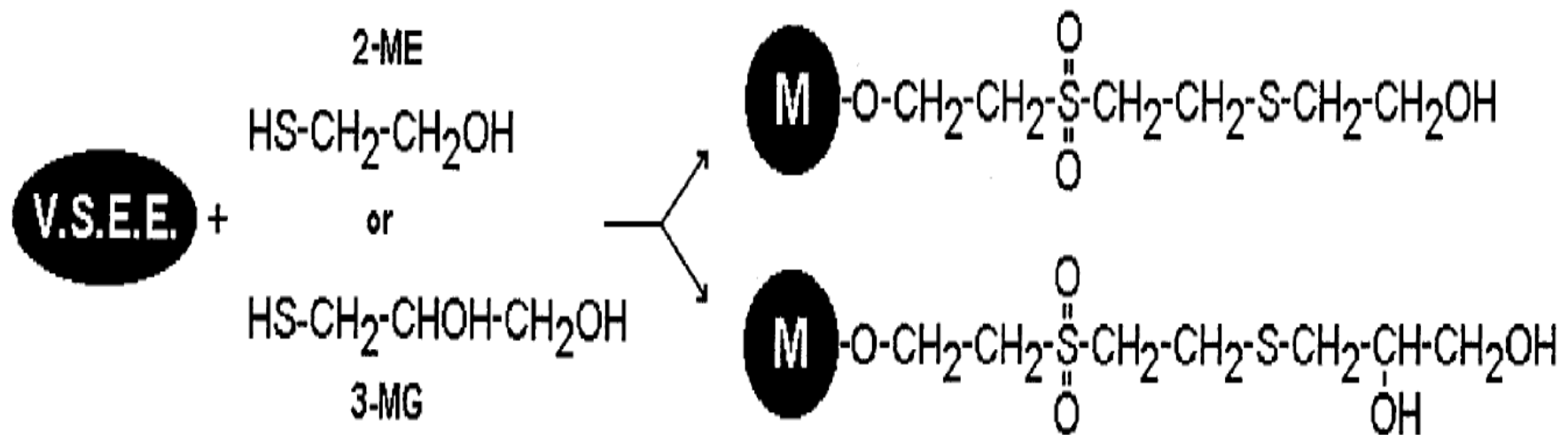
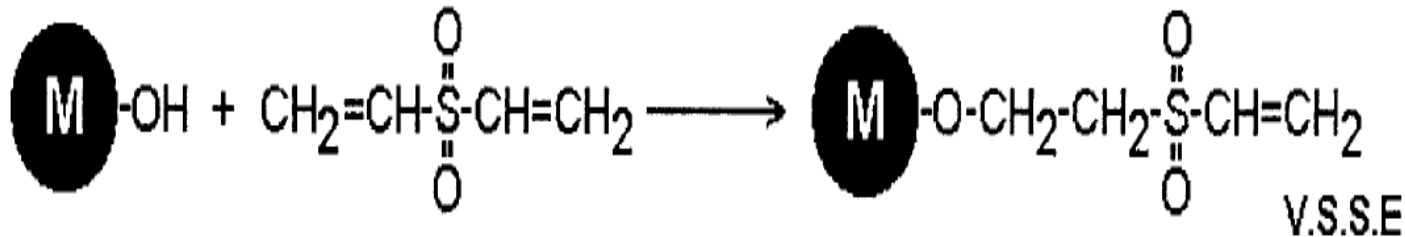


Fig. 1. Preparation of thiophilic "T-gel": chemical reaction schemes and structure. M = matrix (e.g., agarose); V.S.E.E. = vinyl-sulfonyl-ethyl ether; 2-ME = 2-mercapto-ethanol; 3-MG = 3-mercaptoglycerol.

Thiofilní chromatografie

- ◆ Nanášení vzorku – pufr s vyšší iontovou silou (0,5 M Na_2SO_4 nebo NaCl)
- ◆ Eluce – snižováním iontové síly, snižováním pH

Použití : izolace poly- a monoklonálních protilátek a jejich fragmentů

Thiofilní chromatografie

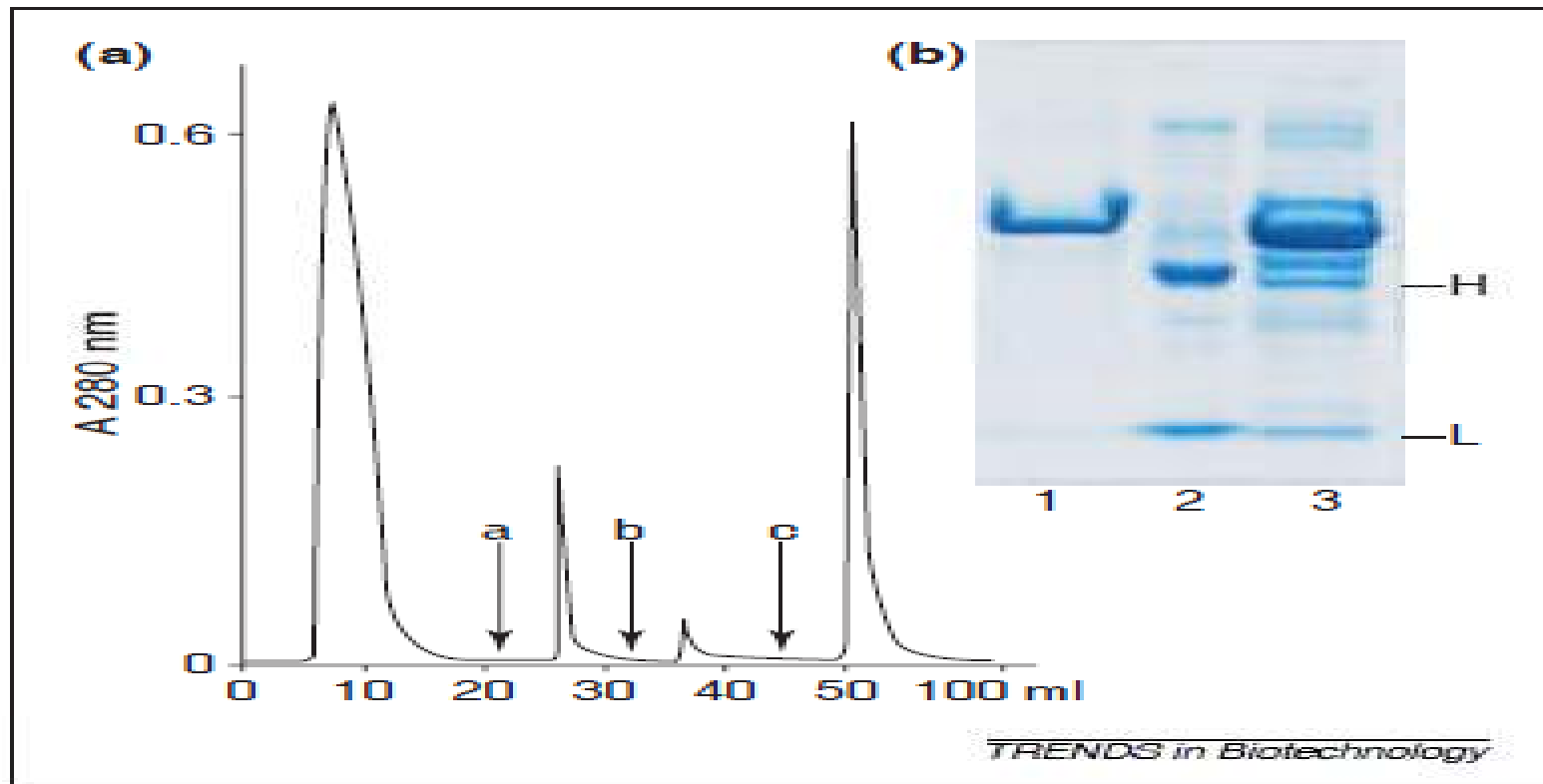
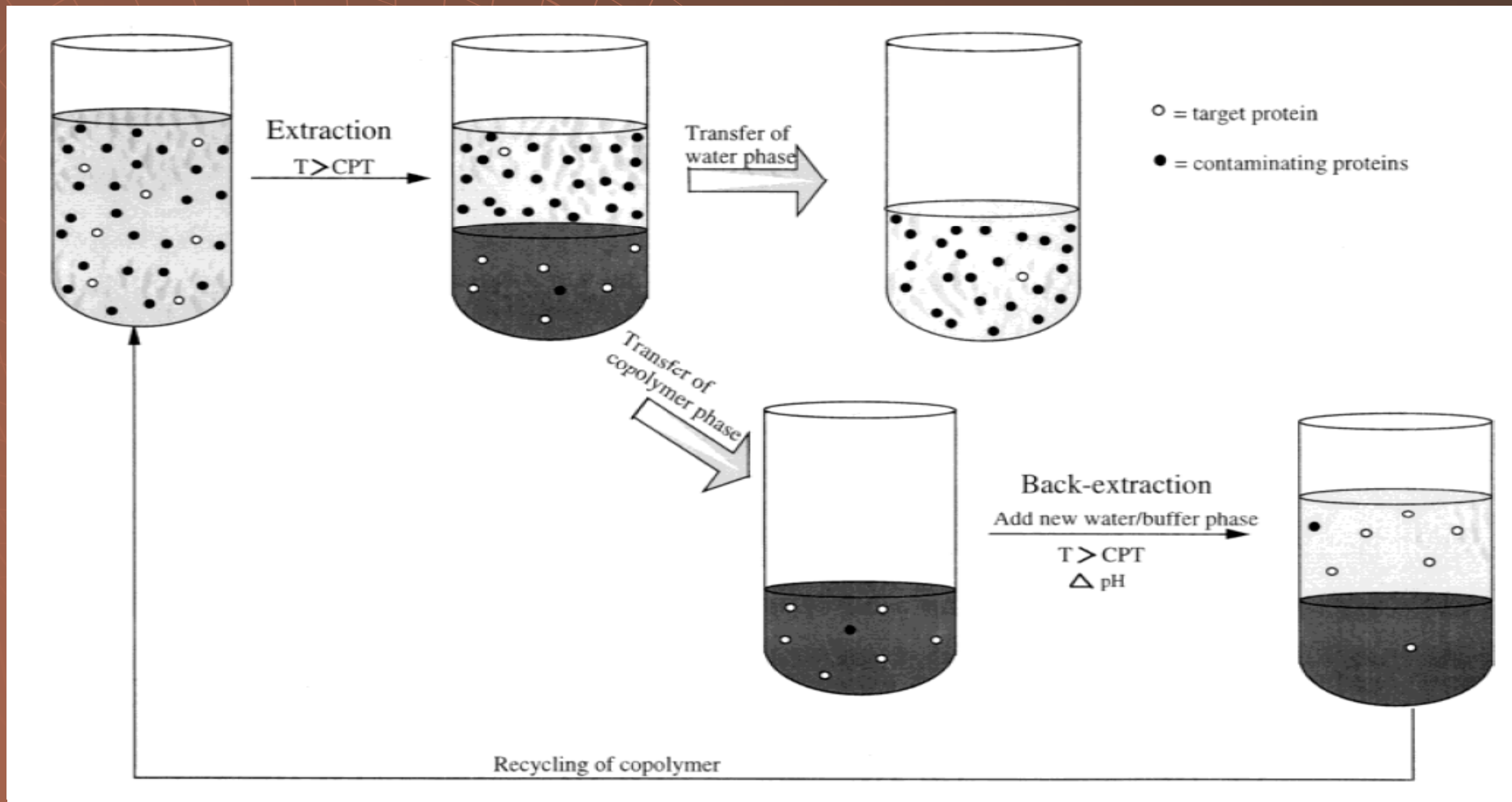
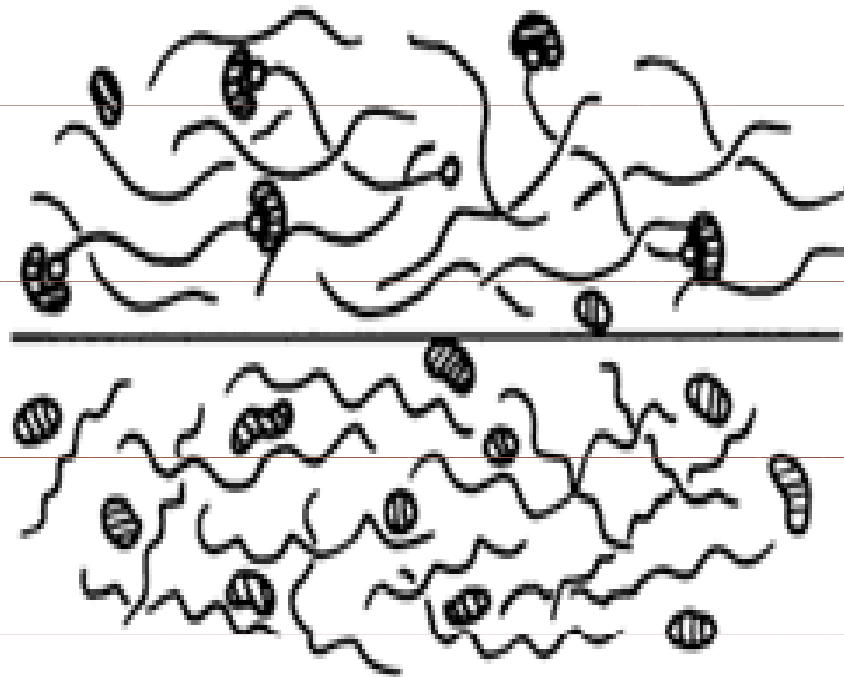


Fig. 2. Separation of monoclonal IgG2a (immunoglobulin G) antibodies from an ascites fluid on a column of 4-mercapto-ethyl-pyridine (MEP) resin. After filtration and dilution with a 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5, ascites fluid was loaded. The column was then washed twice with water (arrow 'a') and 25 mM sodium caprylate in Tris buffer (arrow 'b'), respectively. Finally, IgG2a antibodies were desorbed with a 50 mM acetate buffer, pH 4.0 (arrow 'c'). (Column: 3.0 mm I.D. \times 10 mm height; sample volume: 5 ml of diluted ascites fluid; linear flow rate all along the process for both columns: 85 cm hour⁻¹.) Insert: Polyacrylamide gel electrophoresis in reduced conditions of fractions collected from the column (Lane 1: bovine albumin; lane 2: elution at pH 4.0; lane 3: crude ascites fluid; the purity of separated antibody is estimated at ~90%). Abbreviations: H, heavy chain; L, light chain.

Dvoufázové separace



Afinitní dvoufázové separace



PEG-rich phase
Dextran-rich phase

 PEG molecule
with affinity ligands

 Enzyme molecule

  Other proteins

Afinitní dvoufázové separace

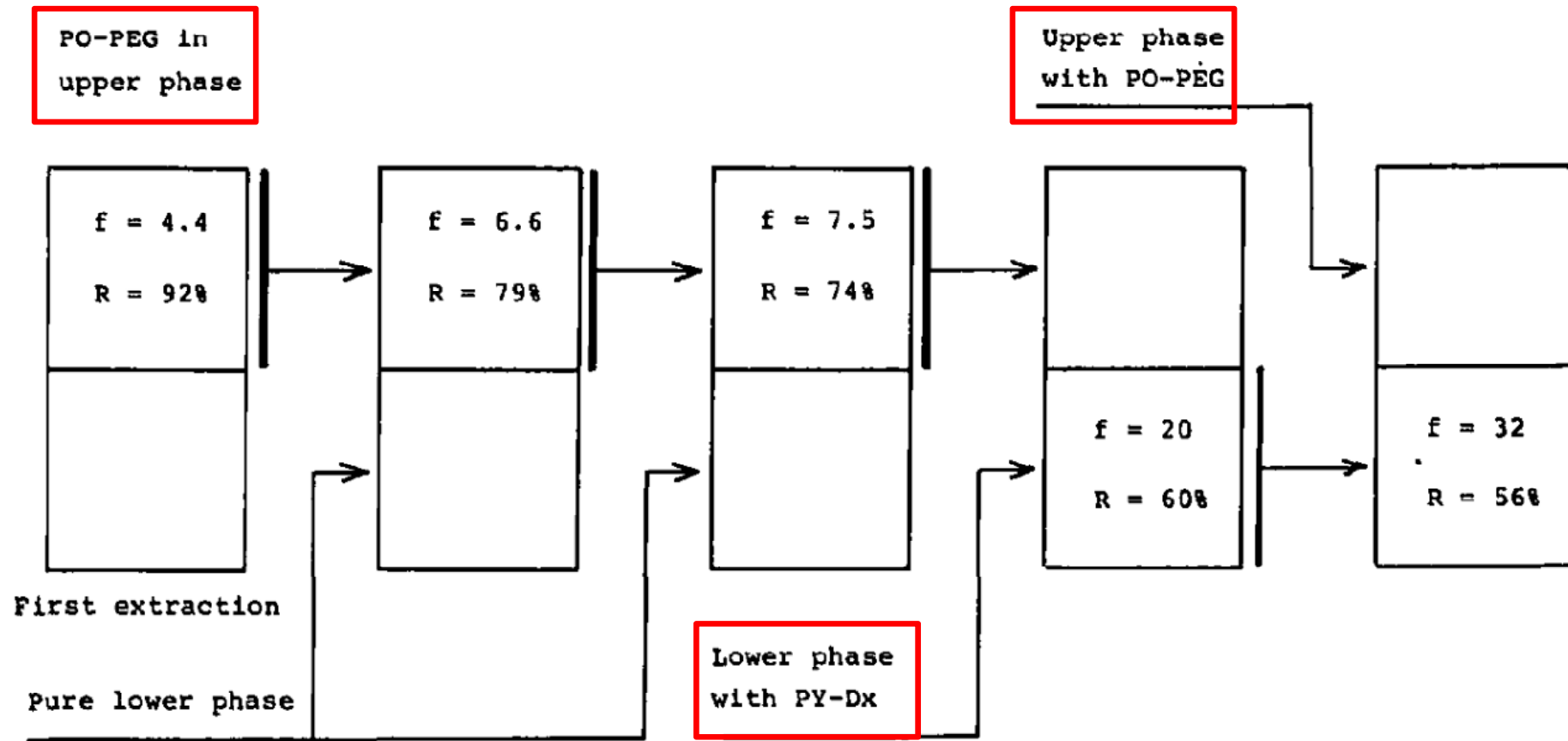


Fig. 1. Multistep extraction of glucose-6-phosphate dehydrogenase from a protein extract of baker's yeast. Procion olive MX-3G PEG (PO-PEG) and Procion yellow HE-3G dextran (PY-Dx) were included in a two-phase system containing 9% dextran (M_r 70000), 5.5% PEG (M_r 40000) and 45 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. R = recovery of the enzyme; f = total purification factor. From Johansson and Andersson (1984b).

Afinní ultrafiltrace



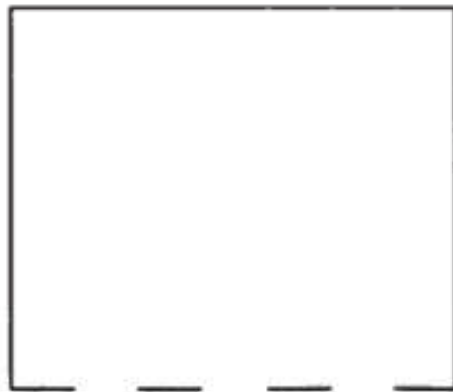
makromolekulární afinní ligand



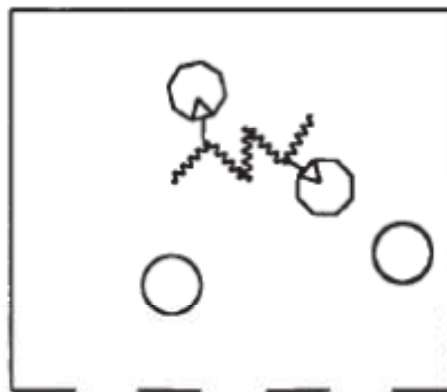
purifikovaná bílkovina



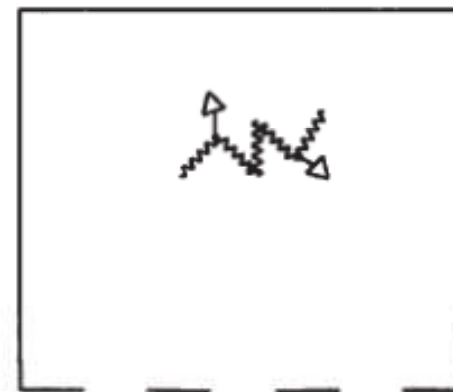
balastní bílkovina



inkubace

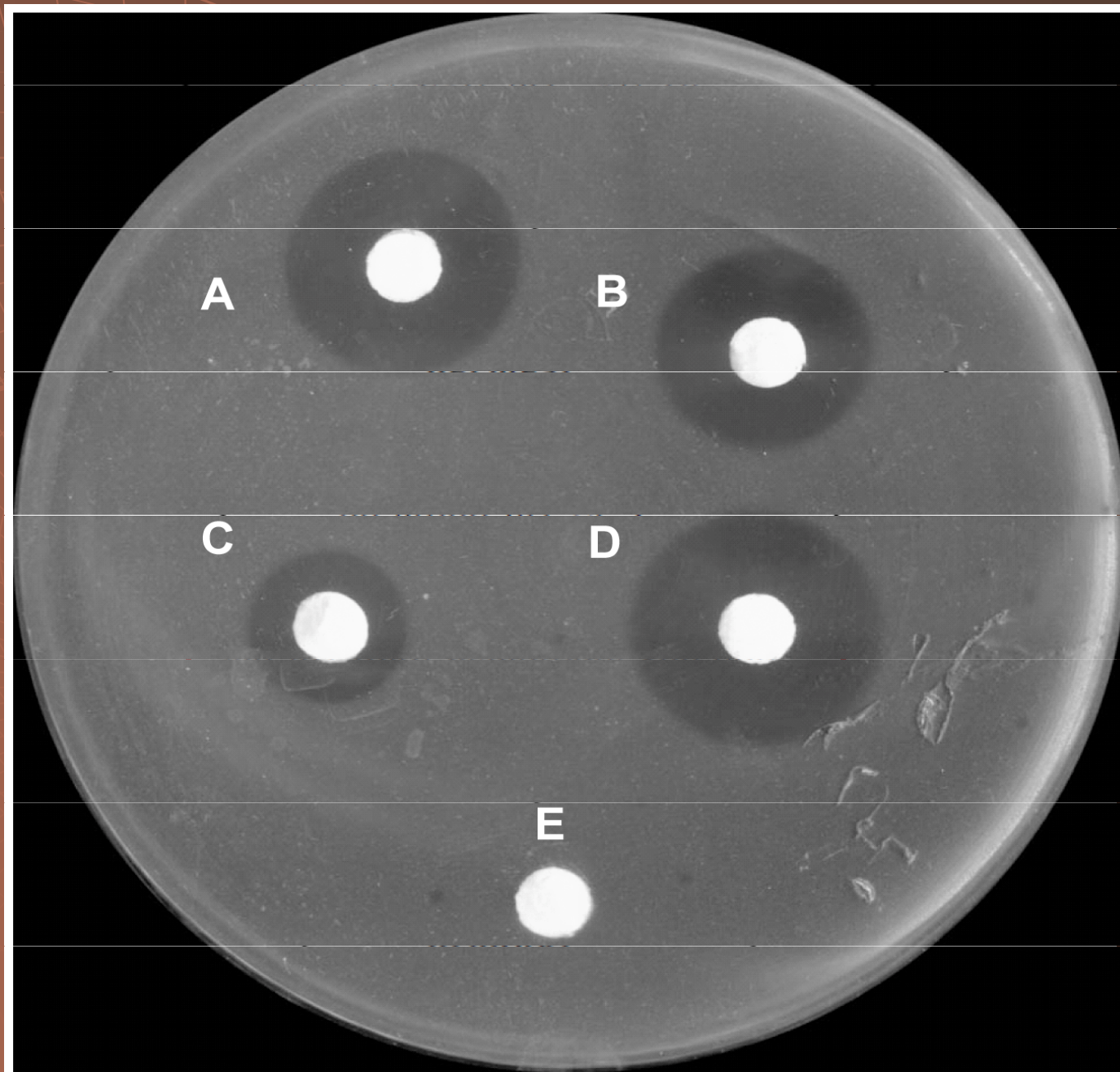


promývání



eluce

Afinitní ultrafiltrace

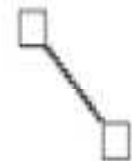


Afinitní precipitace

separovaná bílkovina



+

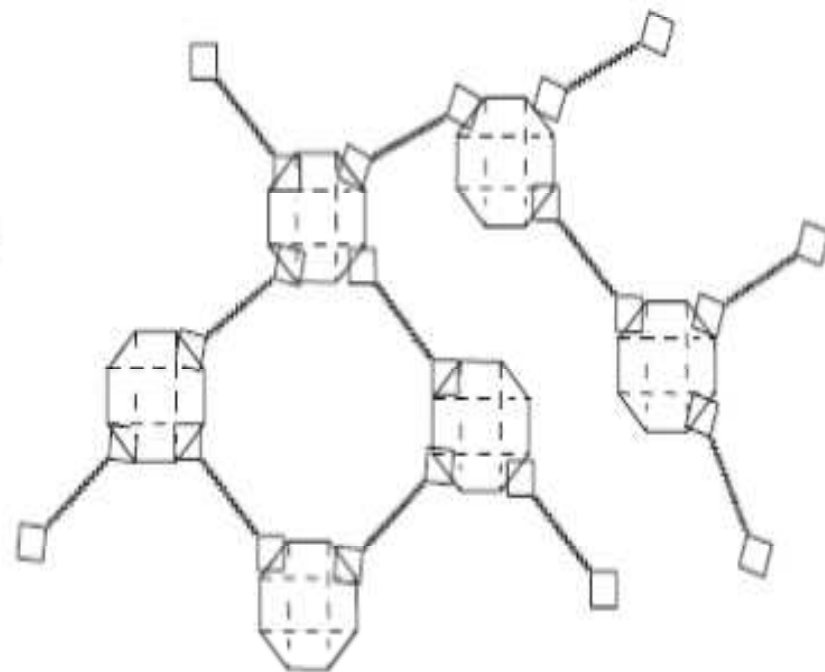


bis-ligand

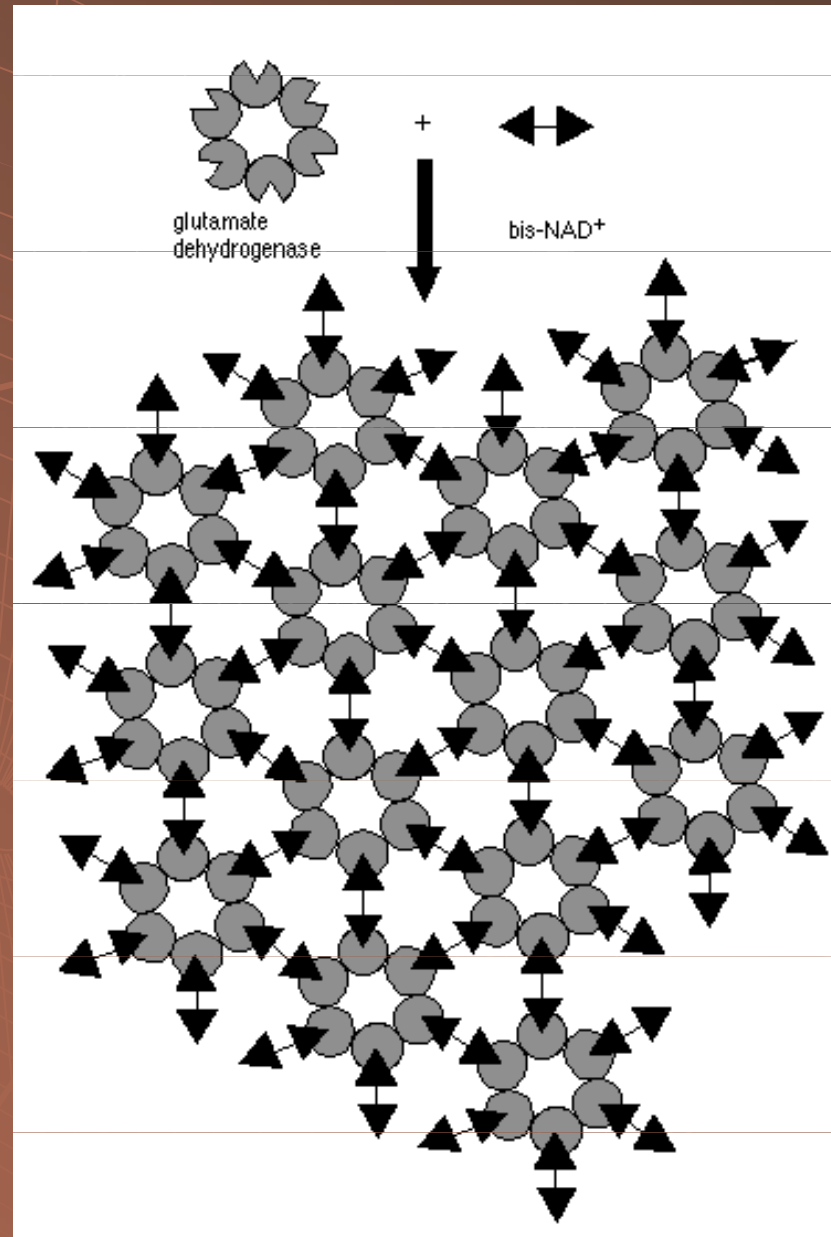
vazba
+
precipitace



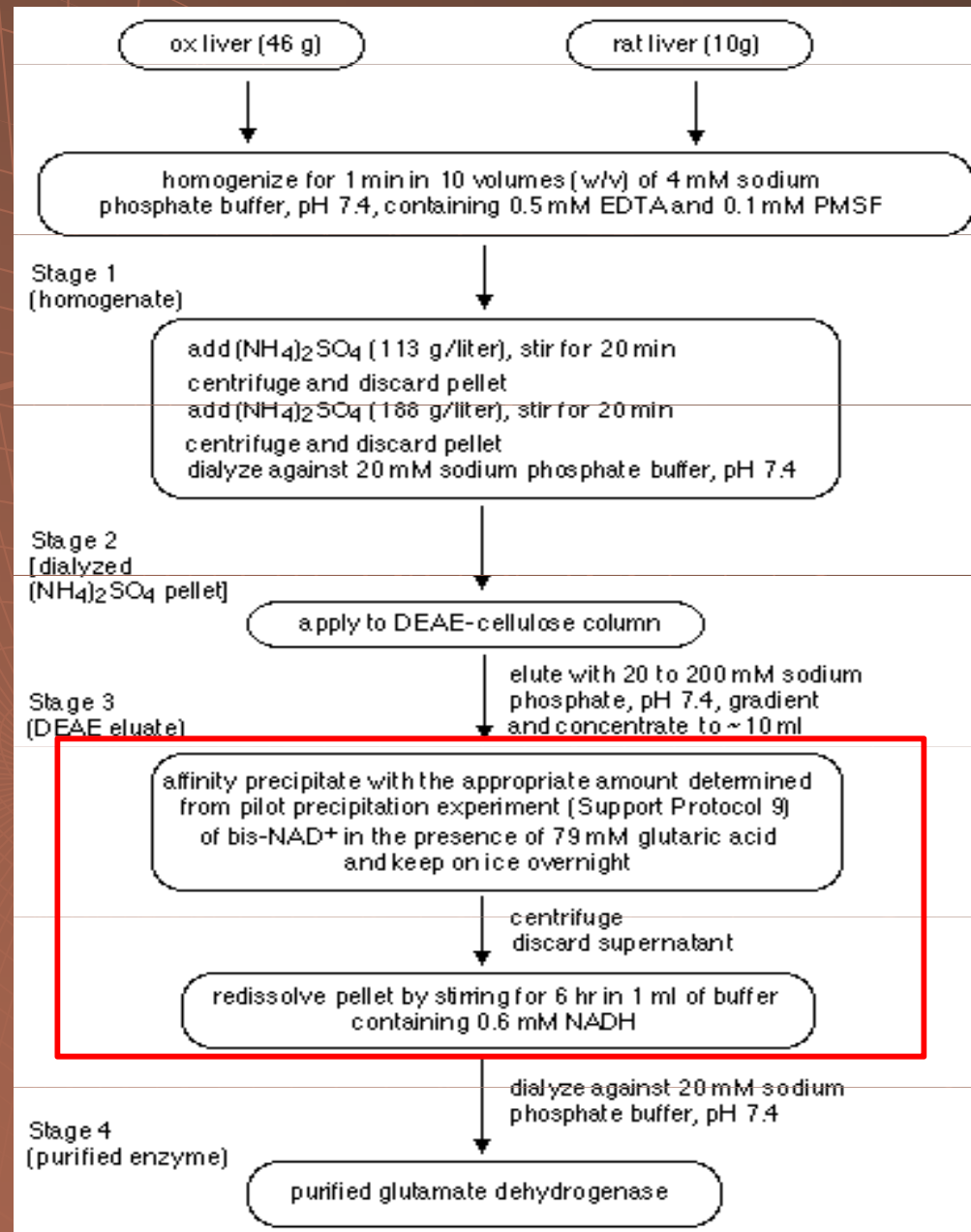
komplex (bílkovina - bis-ligand)_n
nerozpustný



Afinitní precipitace



Afinitní precipitace



Afinitní precipitace

Table 1.4.7 Purification of Glutamate Dehydrogenase From Ox Liver According to Alternate Protocol 1

Stage (see Fig. 1.4.4)	Volume (ml)	Total protein (mg) ^a	Total activity (μmol/min)	Specific activity (μmol/min/mg)	Purification (x-fold)	Yield (%)
1	370	8580	1920	0.2	1	100
2	75	2010	1640	0.3	4	86
3	8.4	139	408	2.9	13	21
4	1.2	9.4	376	40	180	20

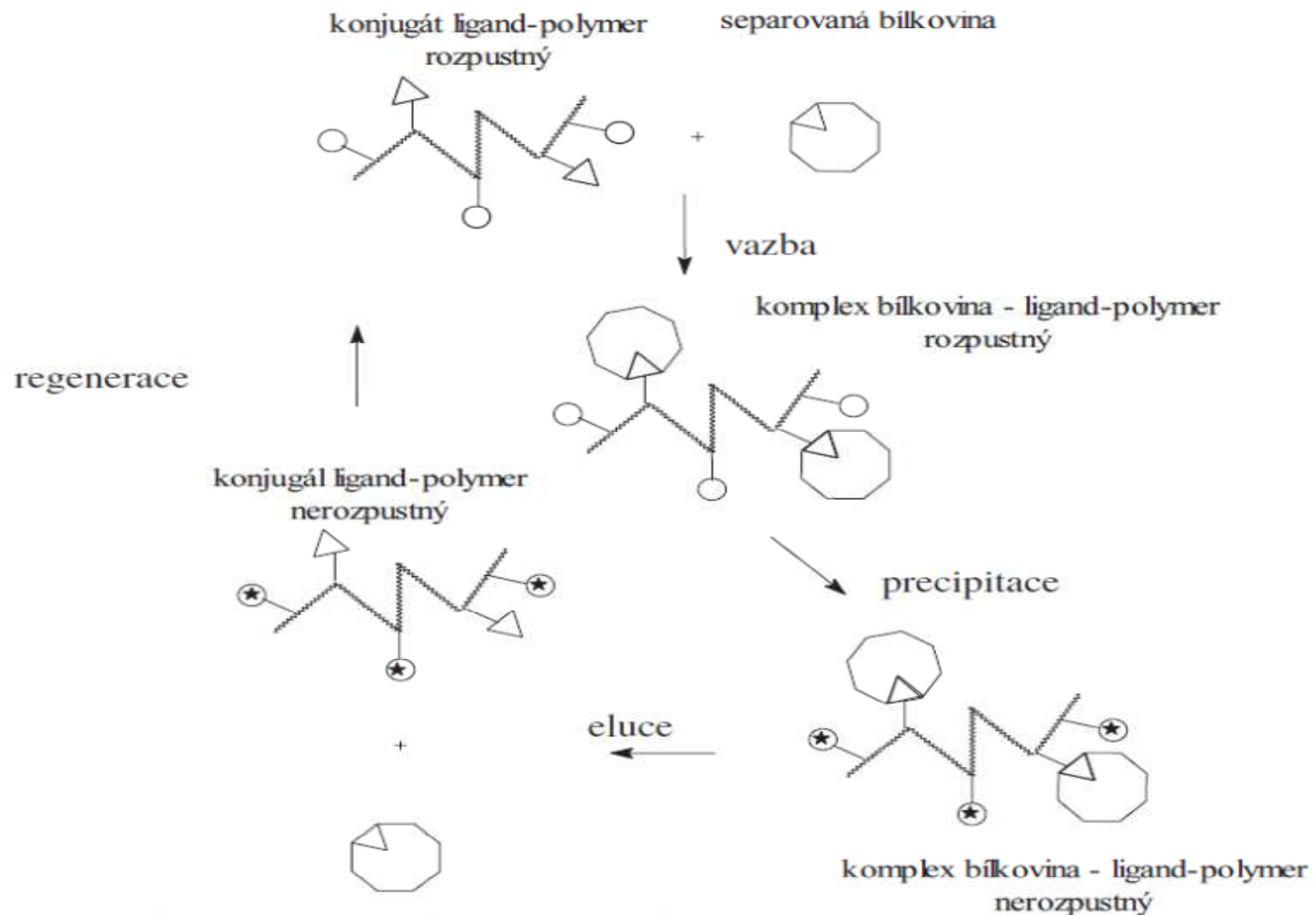
^aProtein concentration determined by the Lowry method.

Table 1.4.8 Purification of Glutamate Dehydrogenase From Rat Liver According to Alternate Protocol 1

Stage (see Fig. 1.4.4)	Volume (ml)	Total protein (mg) ^a	Total activity (μmol/min)	Specific activity (μmol/min/mg)	Purification (x-fold)	Yield (%)
1	90	2720	760	0.3	1	100
2	35	980	505	0.5	2	67
3	9.8	130	195	1.5	5	26
4	1.0	9.4	190	37	140	25

^aProtein concentration determined by the Lowry method.

Afinitní precipitace



Afinitní precipitace

