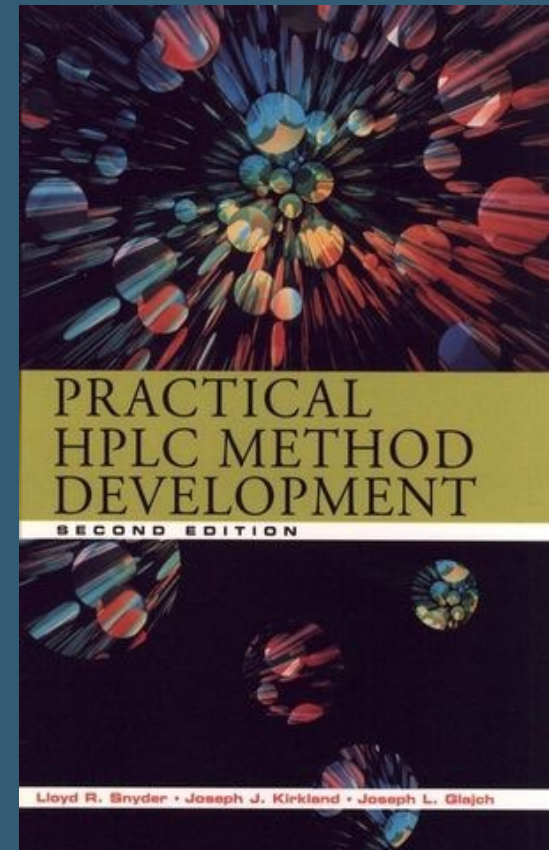
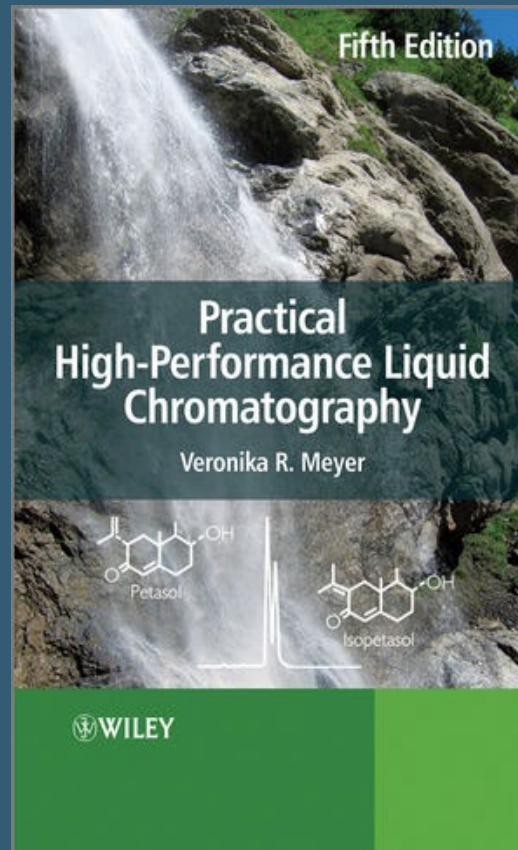
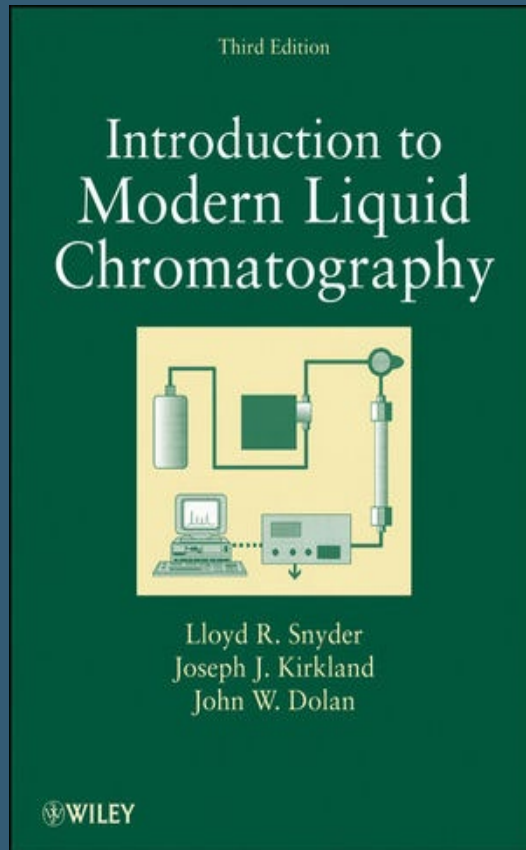


# CHROMATOGRAFICKÉ METODY I.

# LITERATURA



# HISTORIE CHROMATOGRRAFIE

- 1906 Tswett (Cvět - barva)

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

- 1970-79 Halasz, Horvath, Kirkland

**HPLC** (“High (Pressure) Performance Liquid Chromatography”)

5  $\mu\text{m}$  částice, kolona 25 cm/4 mm, tlak 40 MPa

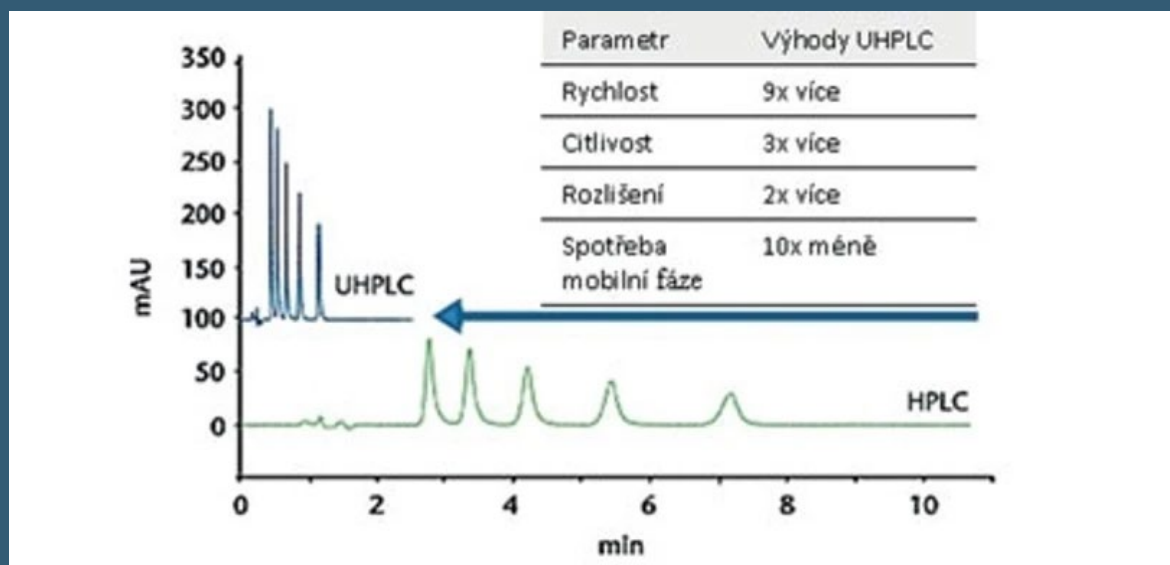
- 2004 Waters

**U(H)PLC** (“Ultra (High) Performance Liquid Chromatography”)

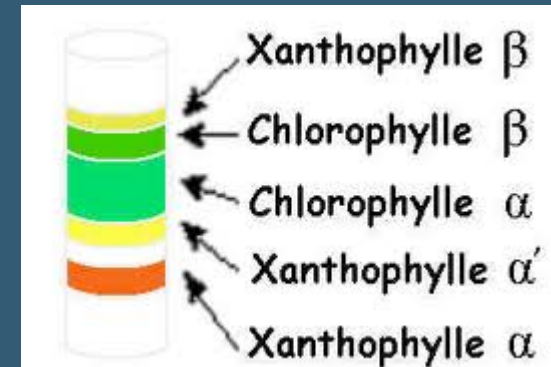
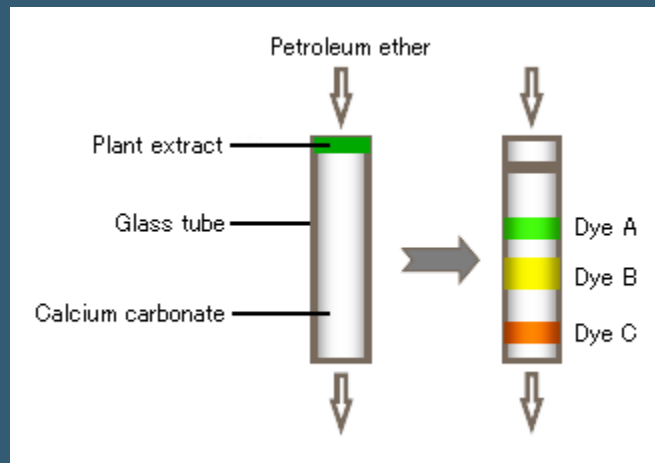
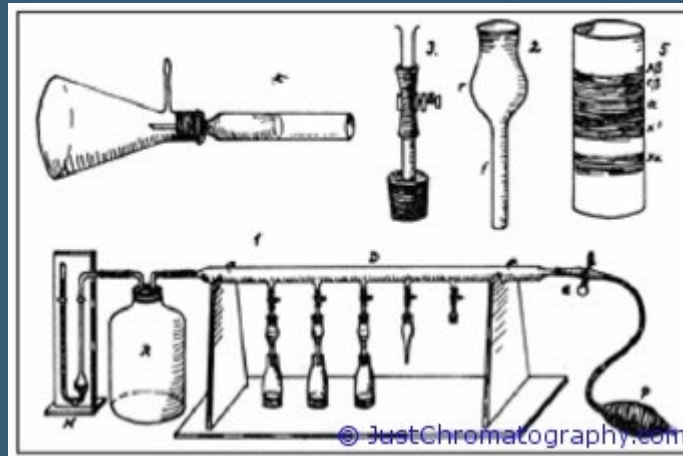
< 2  $\mu\text{m}$  částice, kolona 5 cm/2 mm, tlak > 100 MPa



# HPLC VERSUS UHPLC

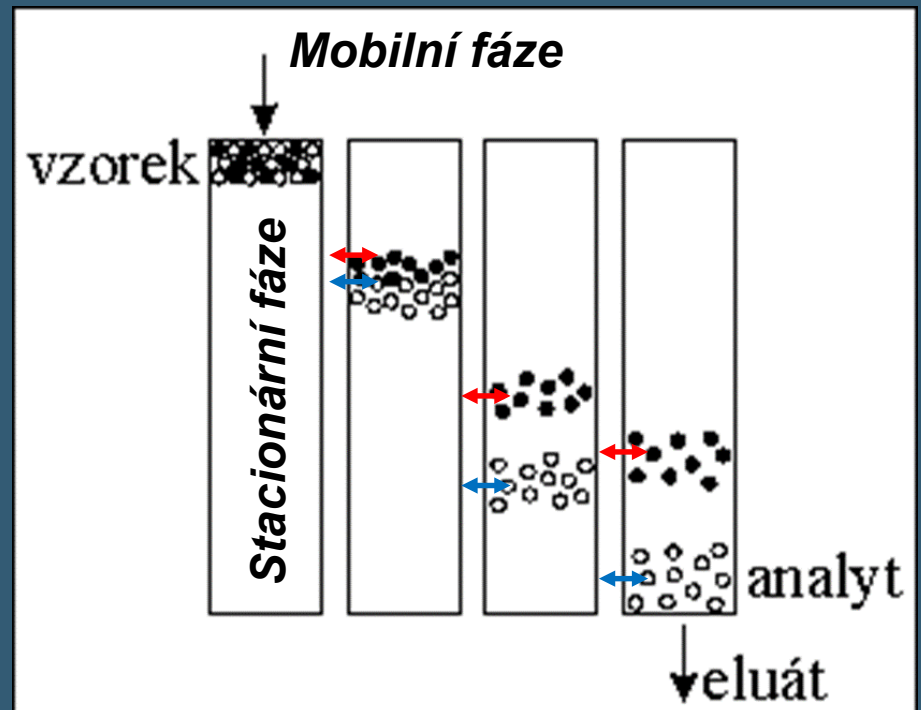


# MIKHAIL SEMYONOVICH TSVET CHROMATOGRAPHIA 1906



# PODSTATA CHROMATOGRRAFIE

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



# CHROMATOGRRAFIE

## Mobilní fáze

- kapalina – LC
- plyn – GC

## Stacionární fáze

- pevná fáze
- kapalina

Eluce - **Izokratická** – stejná eluční síla ( LC - složení mobilní fáze se nemění)

**Gradientová** – rostoucí eluční síla (LC - složení mobilní fáze se mění)

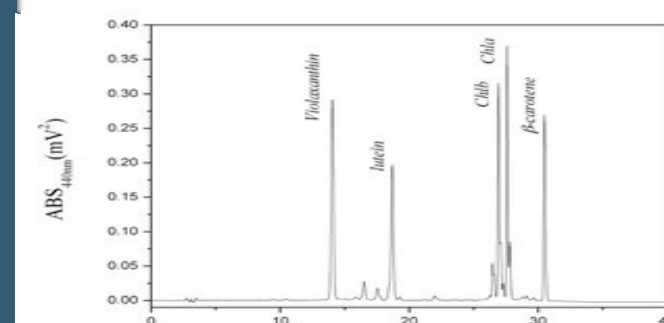
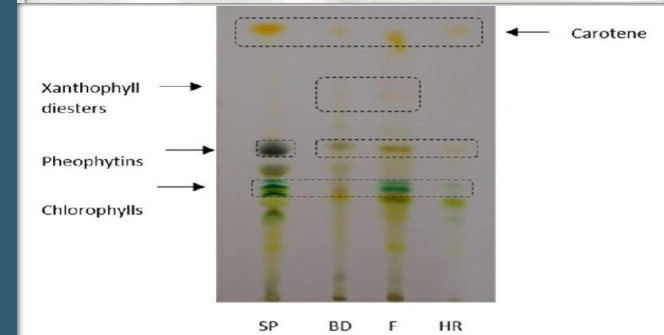
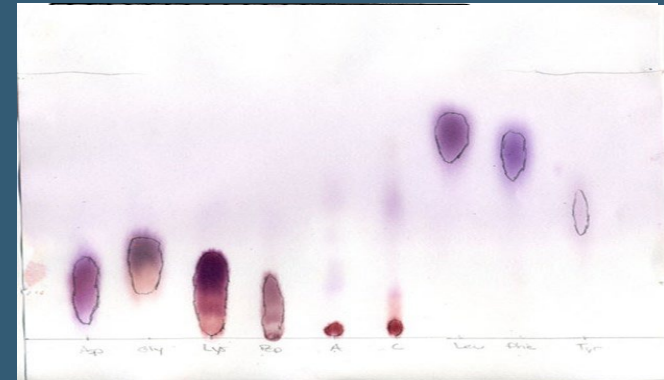
**Použití** - analytická  
preparativní

# KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE LC

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

# PROVEDENÍ LC

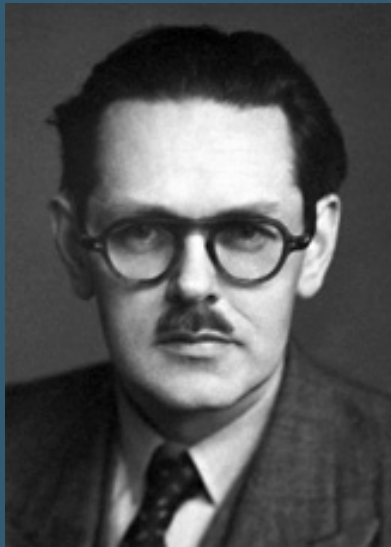
- **Papírová PC** (SF – voda nebo polární rozpouštědlo zakotvené na vláknech papíru)
- **Tenkovrstvá TLC** (silikagel, alumina, celulóza aj.) rozprostřená na inertní podložce
- **Kolonová CC** – SF tvoří náplň kolony, nebo je nanesena n. chemicky vázána na nosné částice, případně přímo na vnitřním povrchu kolony



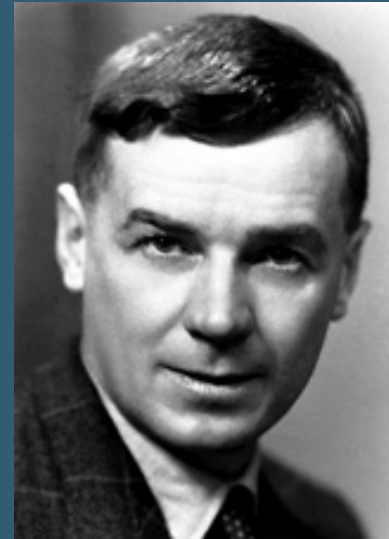
# TEORETICKÉ ASPEKTY CHROMATOGRRAFIE

# TEORIE „IDEÁLNÍ LINEÁRNÍ CHROMATOGRRAFIE“

MARTIN



SYNGE



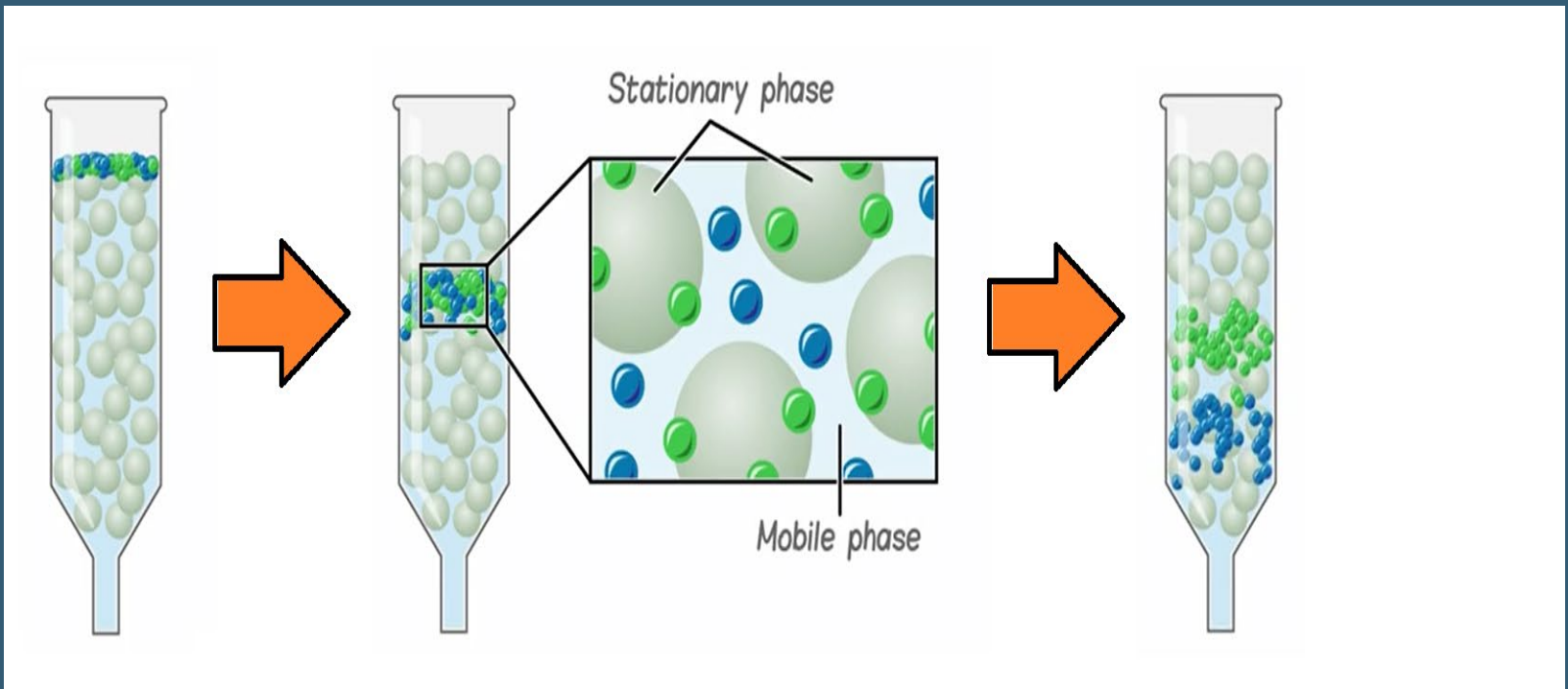
MUNI  
SCI

Nobelova cena za chemii 1952



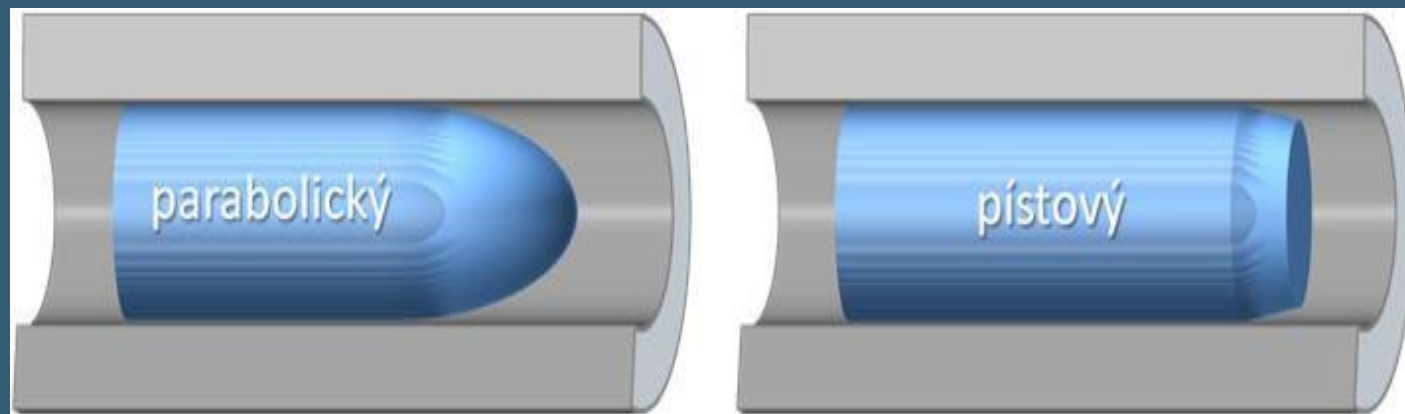
# TEORIE „IDEÁLNÍ LINEÁRNÍ CHROMATOGRAFIE“

## 1. Nekonečně rychlé ustavení rovnovah



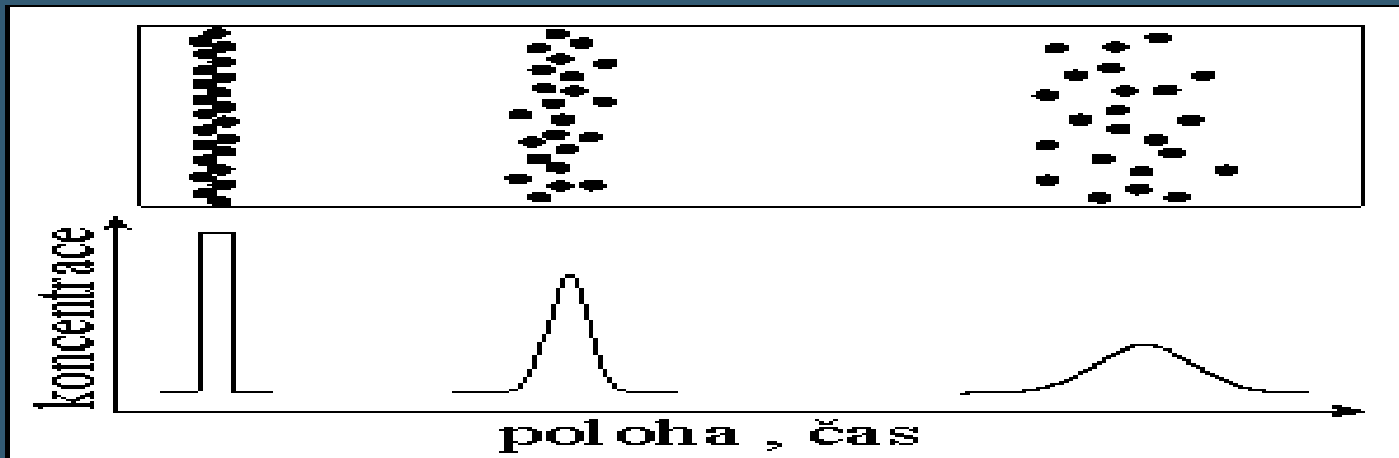
# TEORIE „IDEÁLNÍ LINEÁRNÍ CHROMATOGRRAFIE“

1. Nekonečně rychlé ustavení rovnovah
2. Pístový tok mobilní fáze



# TEORIE „IDEÁLNÍ LINEÁRNÍ CHROMATOGRRAFIE“

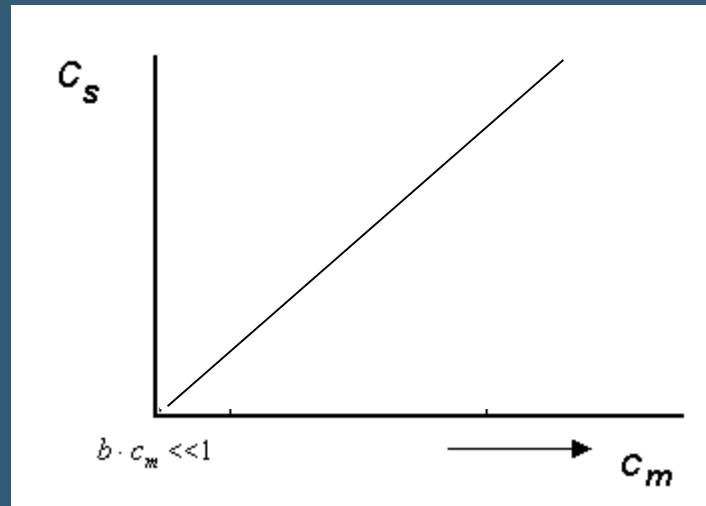
1. Nekonečně rychlé ustavení rovnovah
2. Pístový tok mobilní fáze
3. Nulová difuze



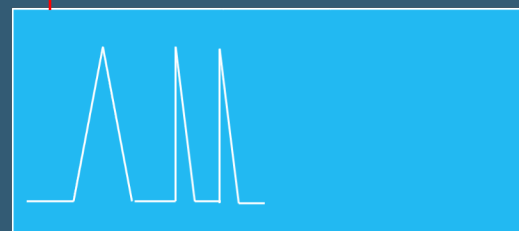
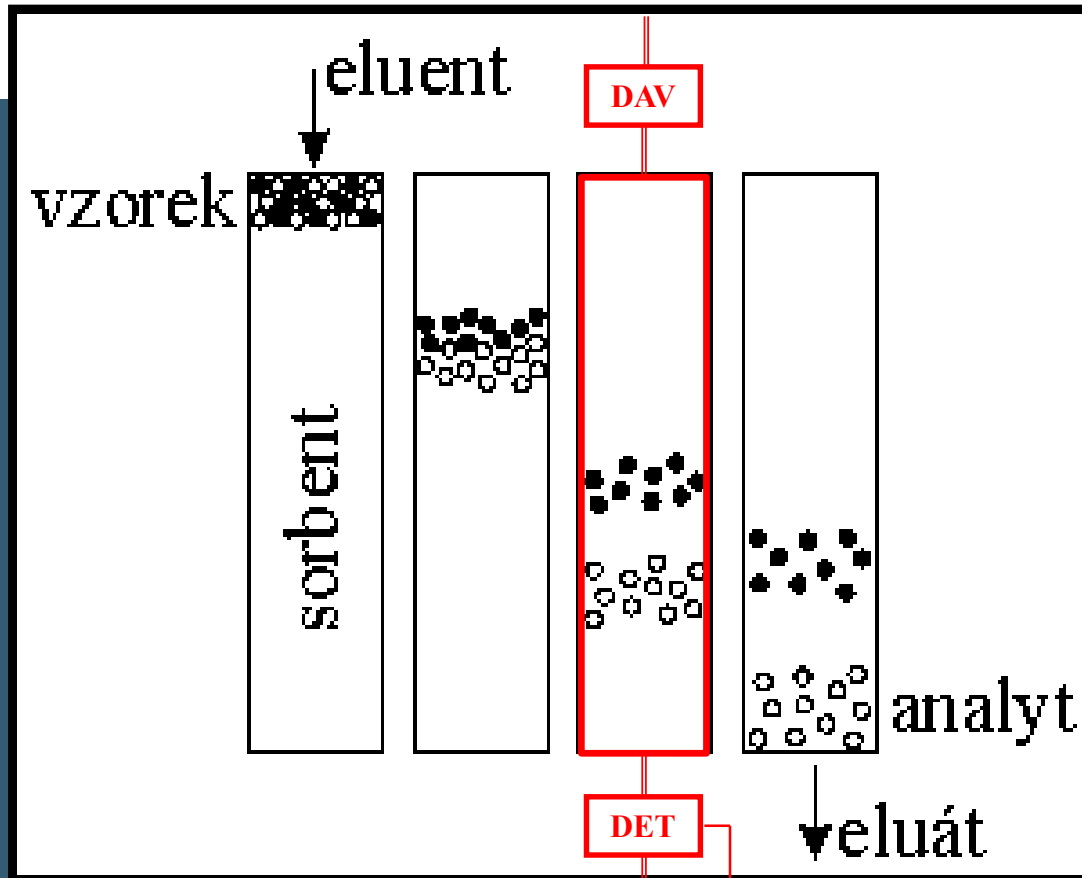
# TEORIE „IDEÁLNÍ LINEÁRNÍ CHROMATOGRRAFIE“

Platí pouze GC!!

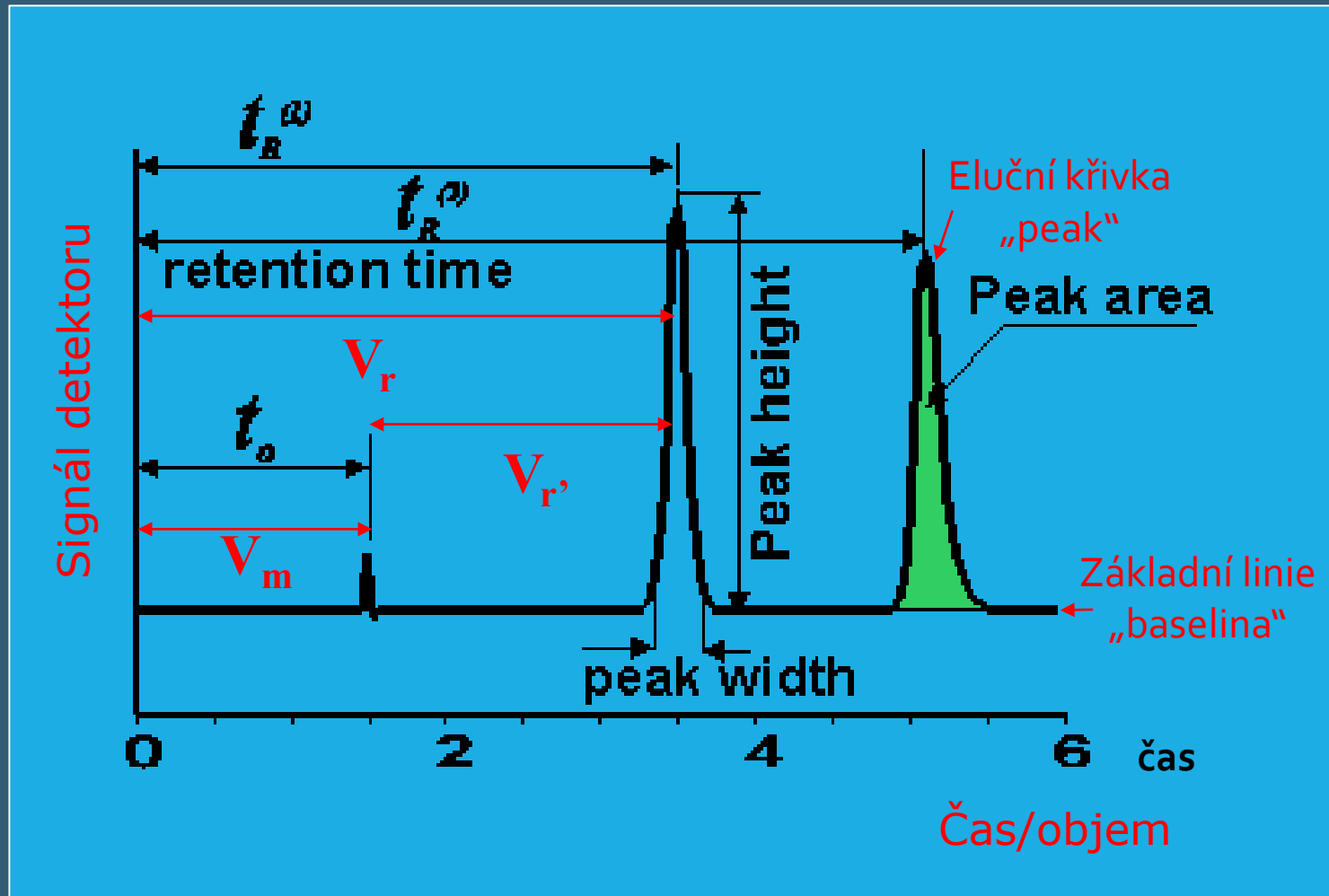
1. Nekonečně rychlé ustavení rovnovah
2. Pístový tok mobilní fáze
3. Nulová difuze
4. Lineární sorpční isoterma



# CHROMATOGRRAFIE

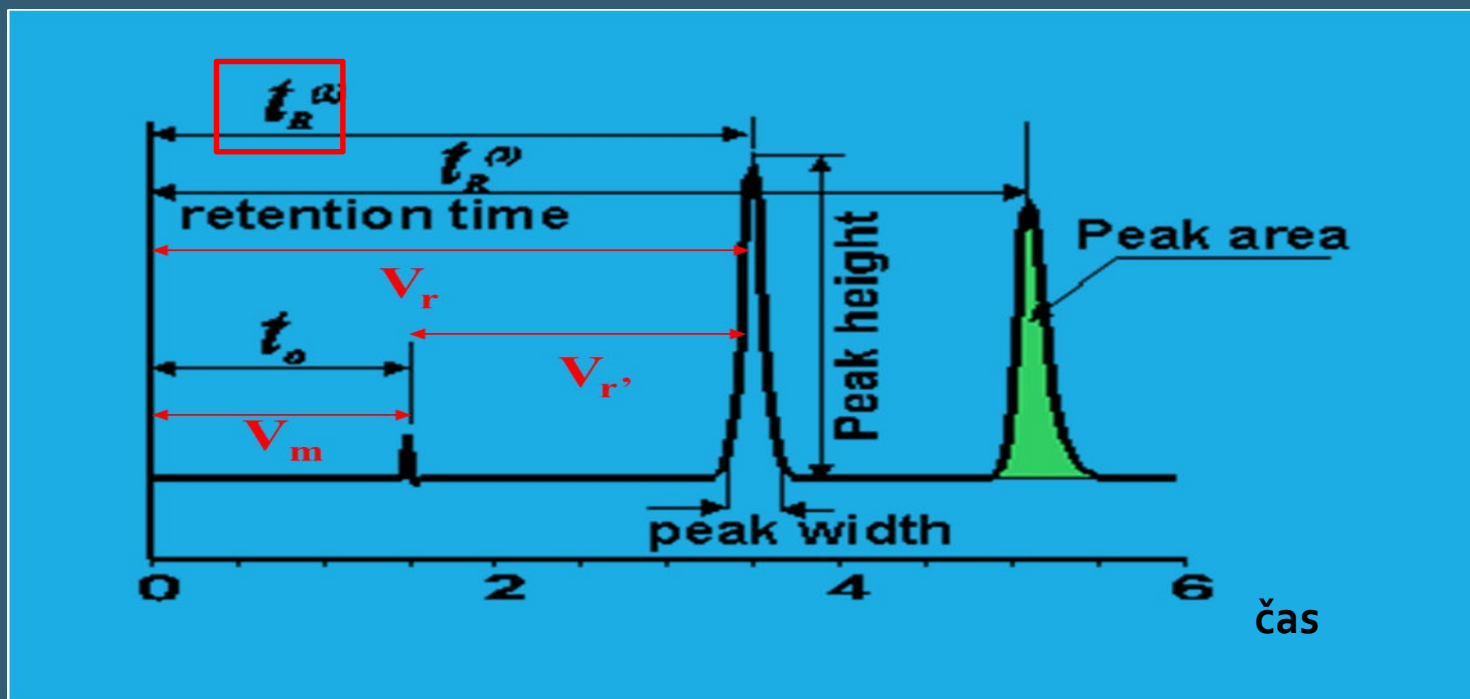


# CHROMATOGRAM



# RETENČNÍ – ELUČNÍ ČAS $t_R$

- Doba od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky

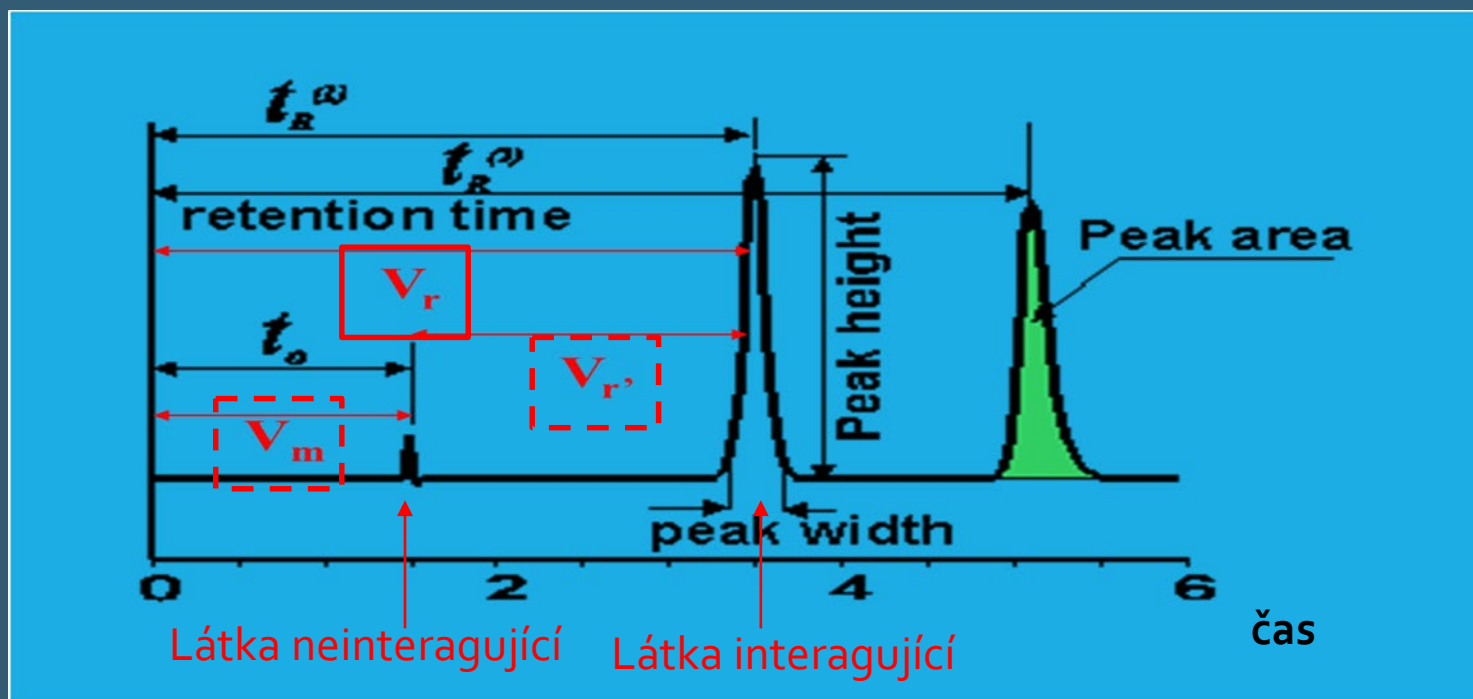


# RETENČNÍ – ELUČNÍ OBJEM $V_r$

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

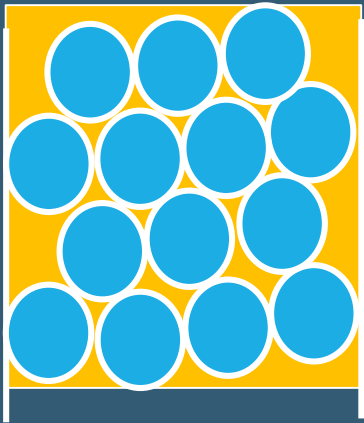
$$V_r = t_r \cdot F_m$$

$F_m$  – objemová rychlost mobilní fáze

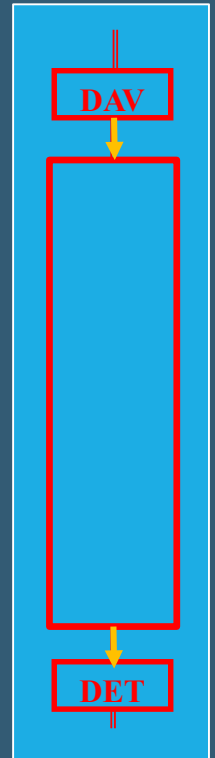




# MRTVÝ OBJEM $V_m$



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



$V_r$  – zdánlivý retenční objem

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

$V_m$  – mrtvý objem = mimokolonové příspěvky

+ mimočásticový 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

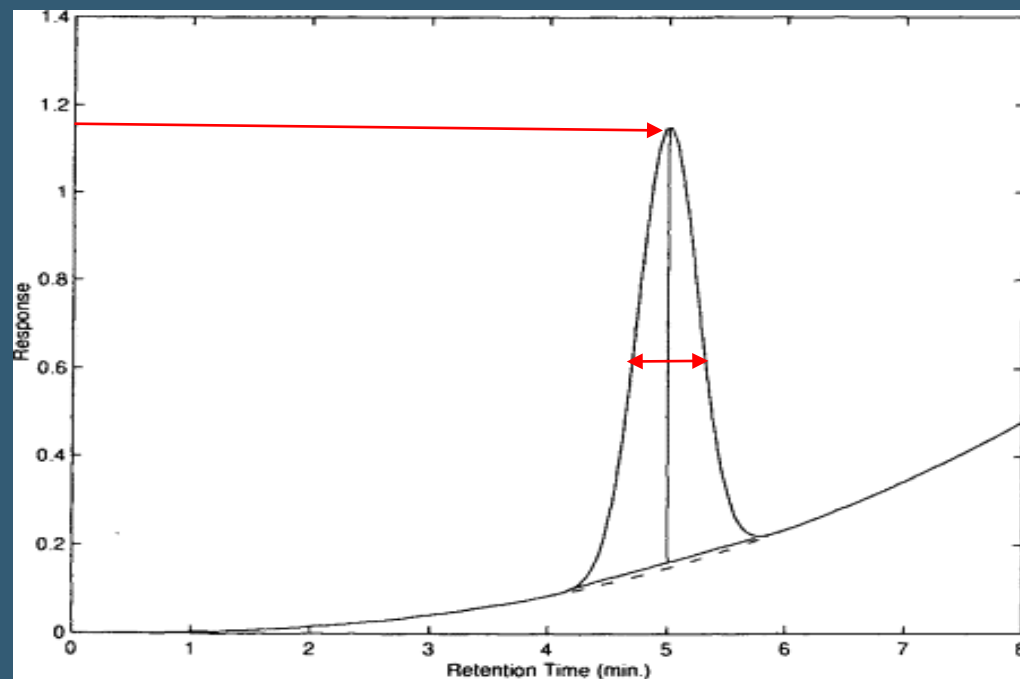
# ÚČINNOST KOLONY

(IZOKRATICKÁ ELUCE)

## POČET TEORETICKÝCH PATER N

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

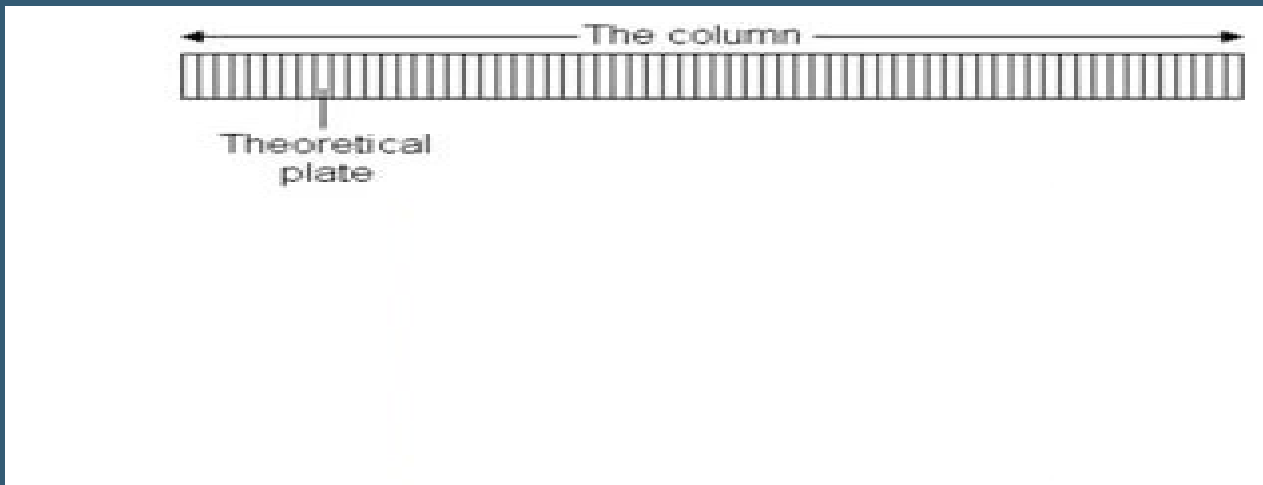
$$N = 5.545 \cdot \left( \frac{t_r}{1/2 Y_r} \right)^2$$



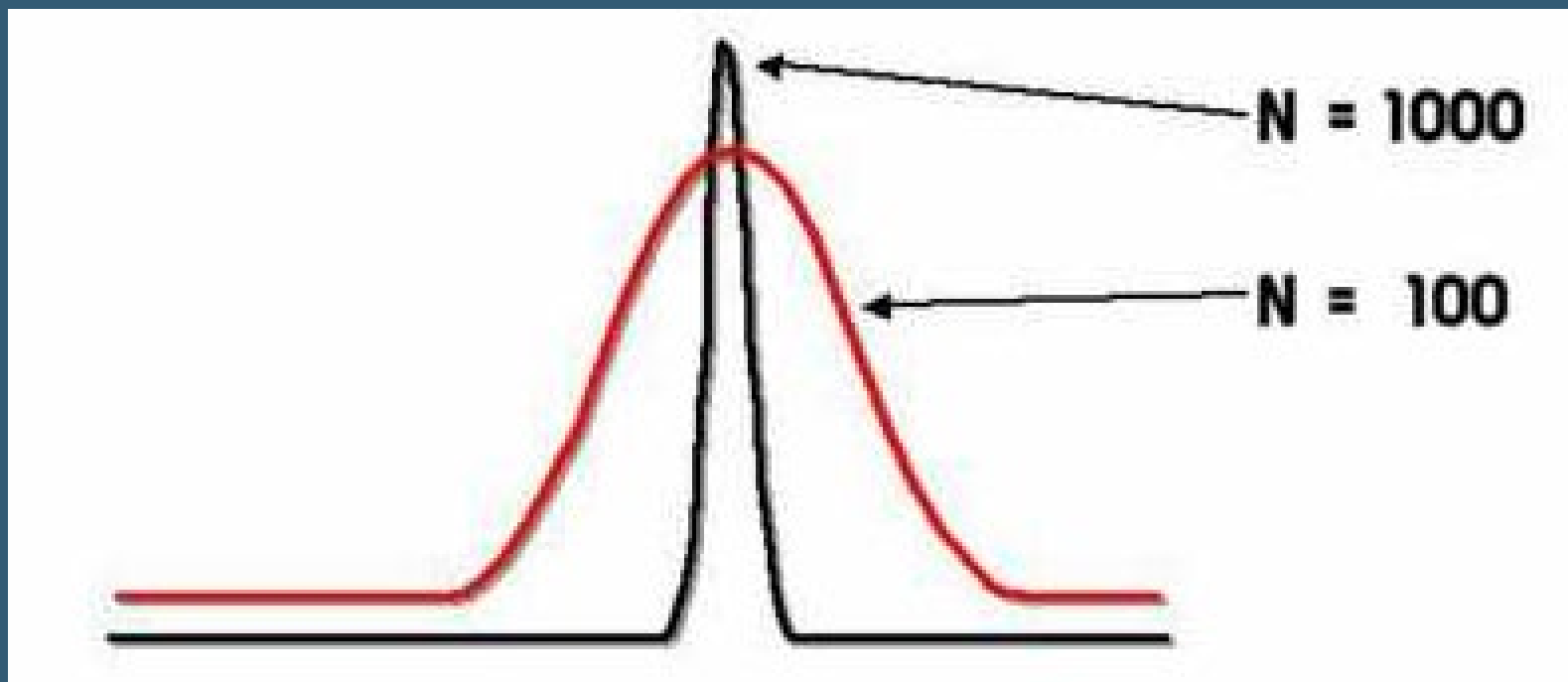
# ÚČINNOST KOLONY (IZOKRATICKÁ ELUCE) VÝŠKOVÝ EKIVALENT TEORETICKÉHO PATRA $H$

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

$l$  – délka kolony



# ÚČINNOST KOLONY N

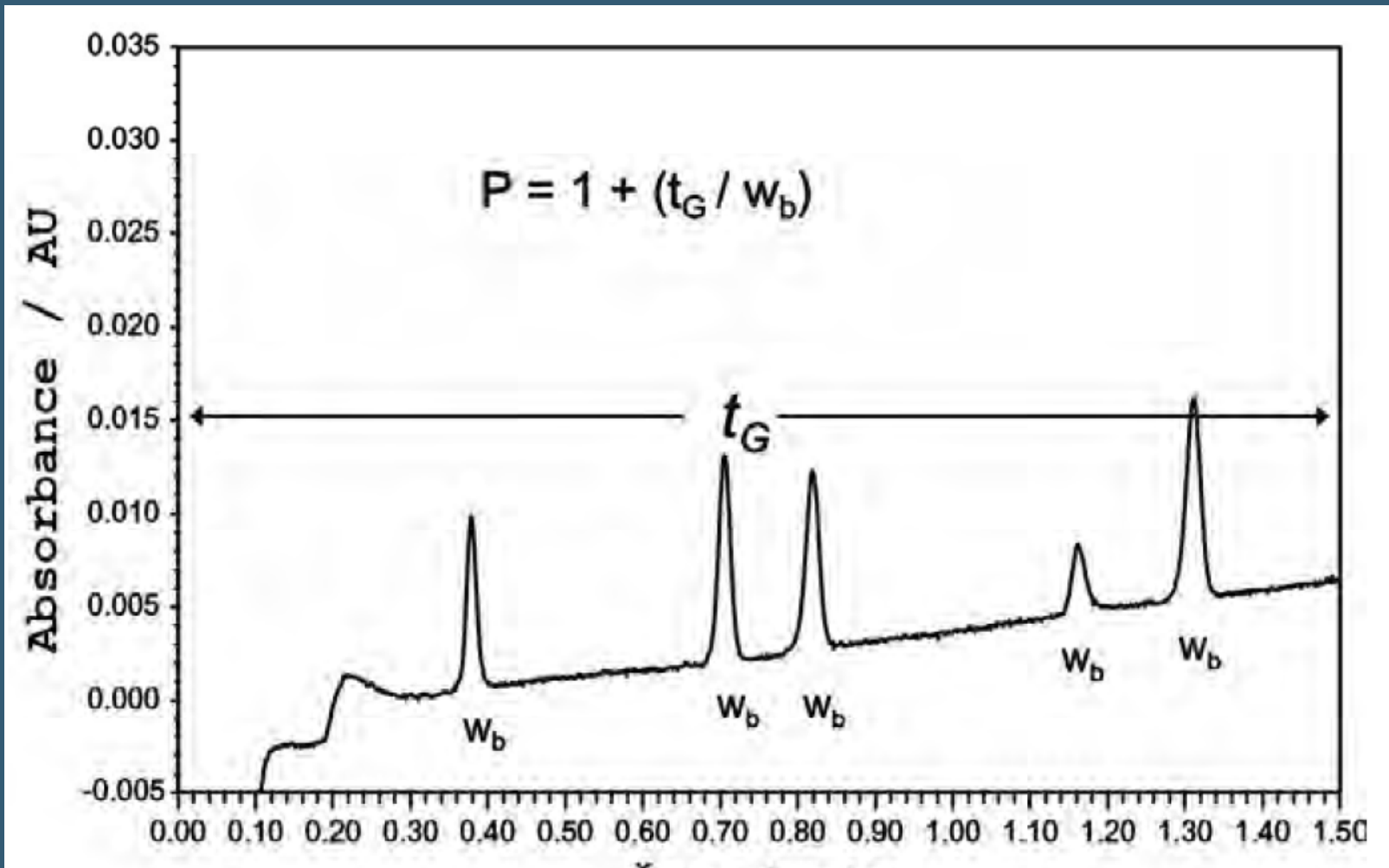


# ÚČINNOST KOLONY (GRADIENTOVÁ ELUCE) KAPACITA PÍKU $P$

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

$t_g$  – celková doba gradientu

# ÚČINNOST KOLONY (GRADIENTOVÁ ELUCE) KAPACITA PÍKU P



# RETENČNÍ FAKTOR $\alpha$

## DVĚ LÁTKY

Míra selektivity

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

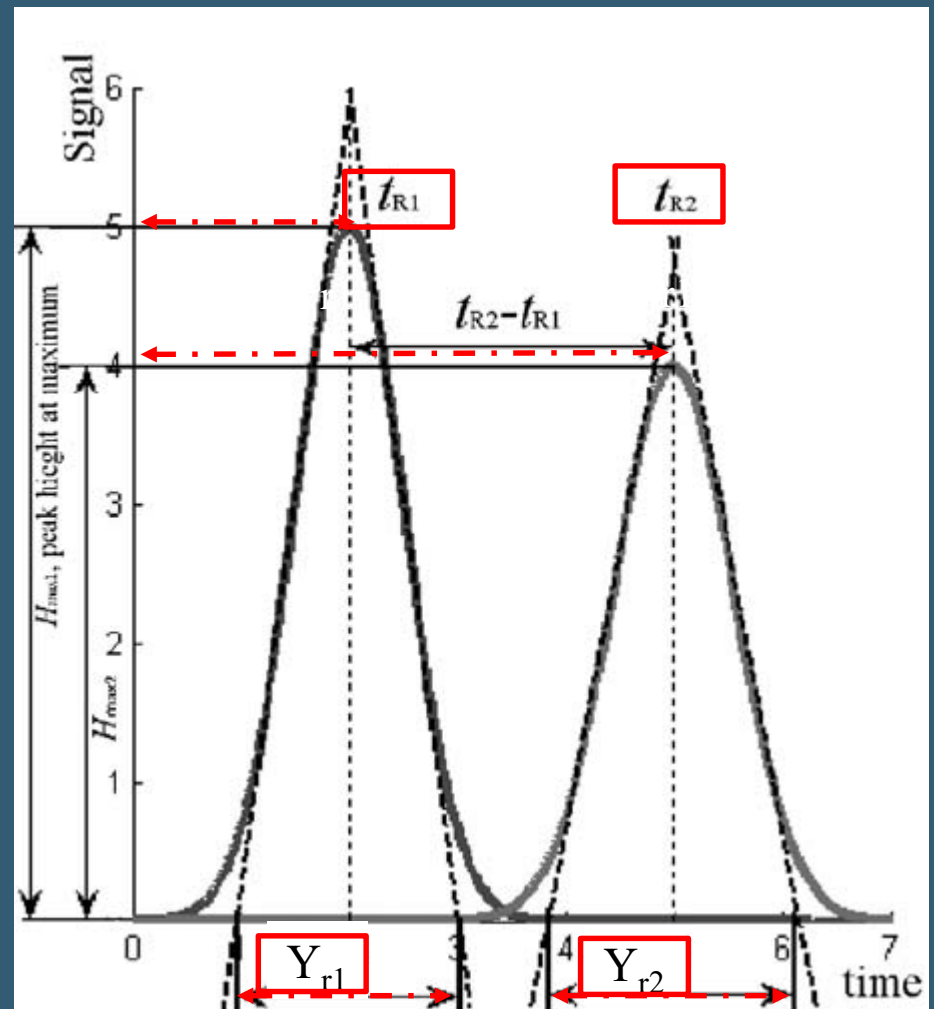
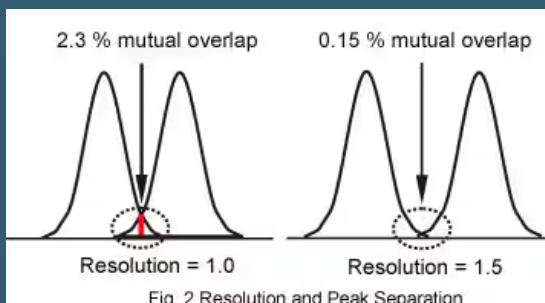


# ROZLIŠENÍ DVĚ LÁTKY

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

$R_{12}=1.5$  – nulové překrytí

$R_{12}=1.0$  – překrytí 2 %



# ROZLIŠENÍ

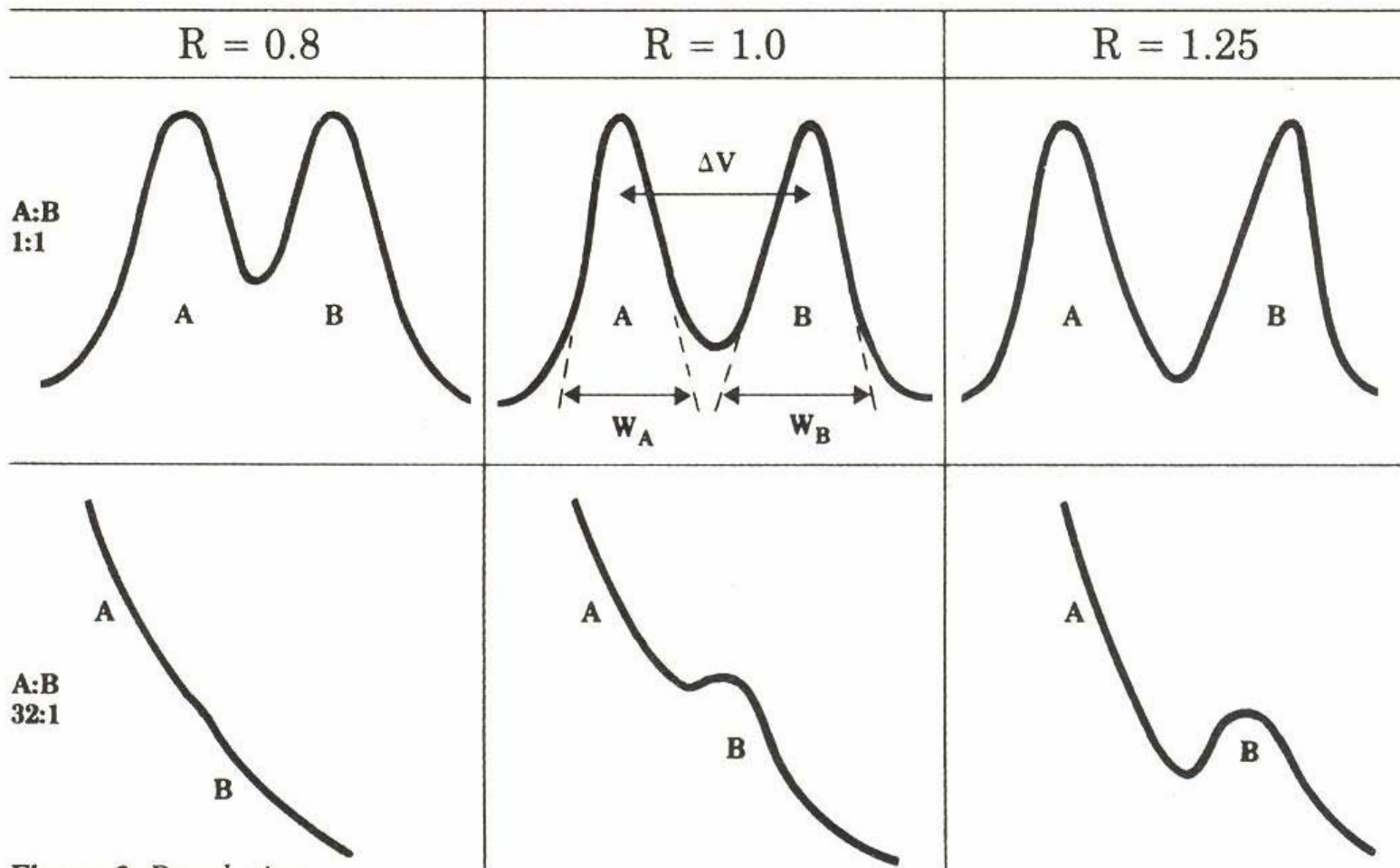


Figure 3. Resolution.

# VLIV JEDNOTLIVÝCH FAKTORŮ NA ROZLIŠENÍ

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

The diagram illustrates the relationship between resolution ( $R_{12}$ ) and its constituent factors. The equation  $R_{12} = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{1 + k'} \cdot \sqrt{N}$  is presented on a blue background. Three dashed yellow circles highlight the factors  $\frac{\alpha - 1}{\alpha}$ ,  $\frac{k'}{1 + k'}$ , and  $\sqrt{N}$ . Dashed yellow arrows point from these circles to the labels 'Selektivita', 'Kapacita', and 'Účinnost' respectively, positioned below the equation.

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

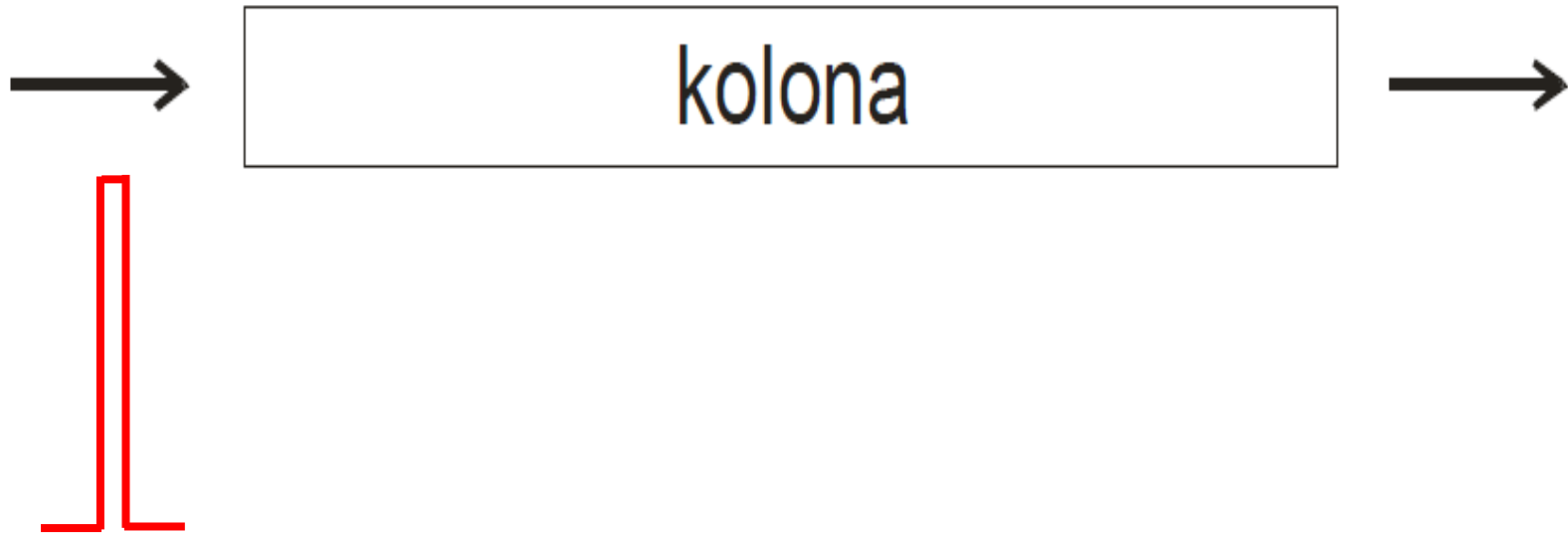
# VLIV JEDNOTLIVÝCH FAKTORŮ NA ROZLIŠENÍ

- 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)

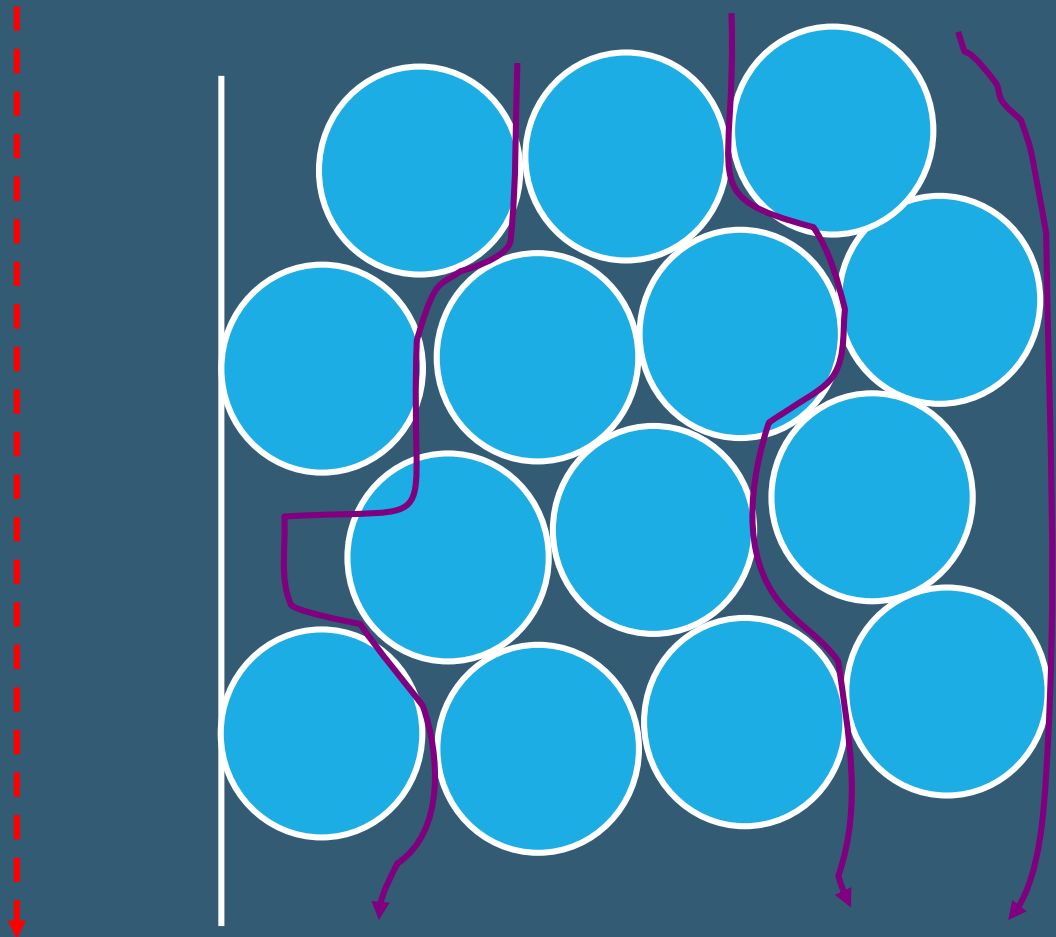


# VAN DEEMTEROVA DIFUZNÍ TEORIE

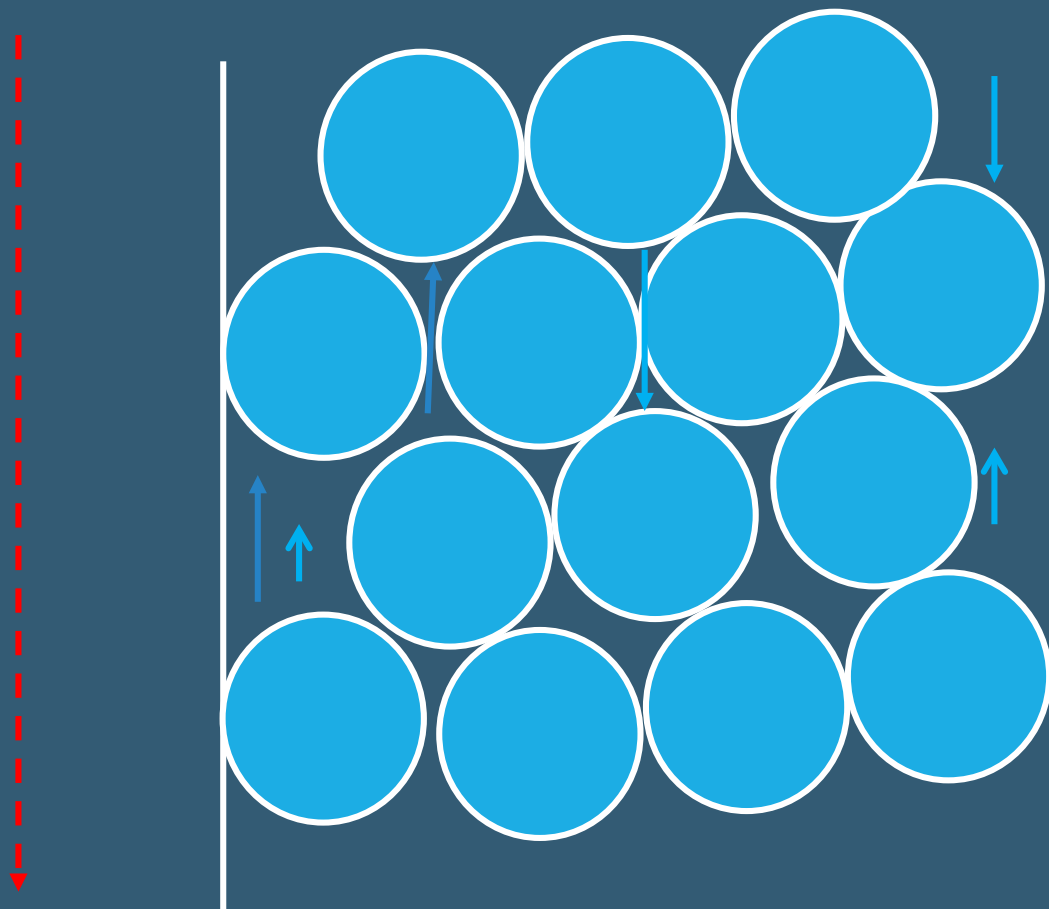
- Difuze turbulentní **A**
- Difuze molekulová **B**
- Odpor proti převodu hmoty **C**



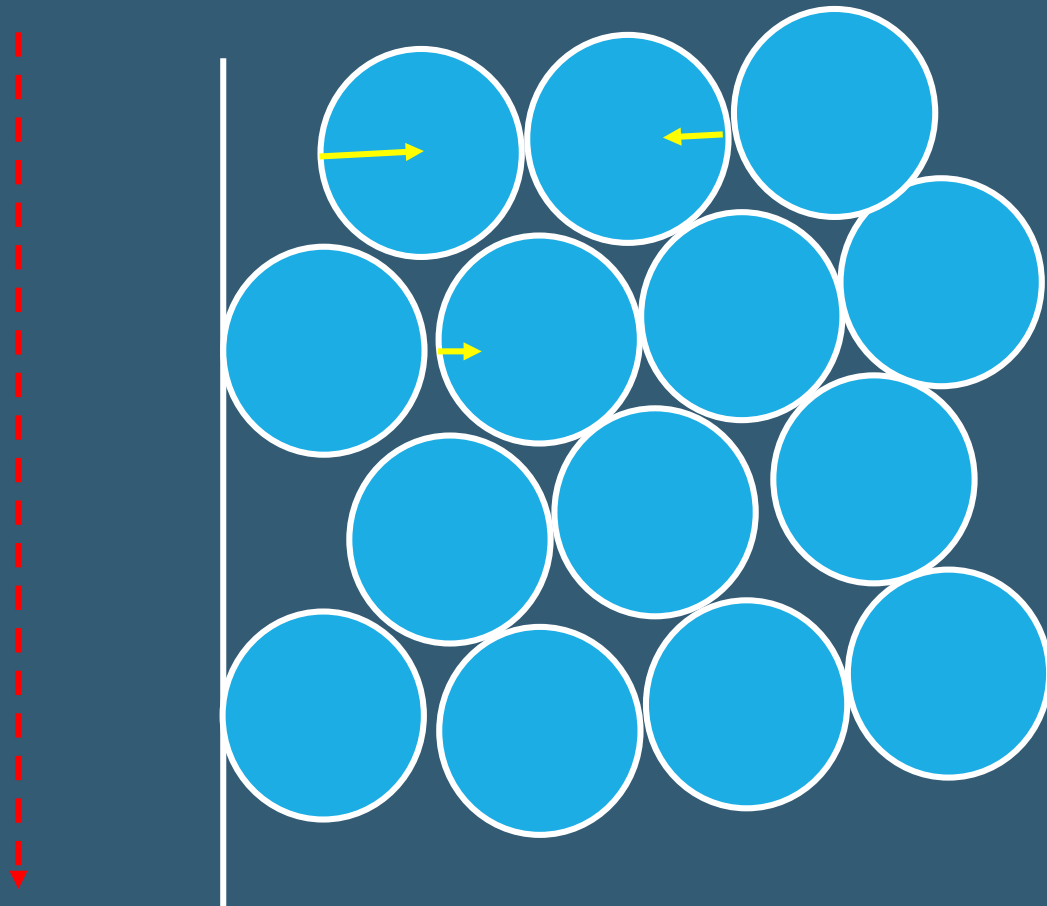
# DIFUSE TURBULENTNÍ A



# DIFUSE MOLEKULOVÁ B



# ODPOR PROTI PŘEVODU HMOTY C



# VAN DEEMTEROVA DIFUZNÍ TEORIE

vliv rychlosti mobilní fáze  $u$  na rozšiřování zón

$$H = A + \frac{B}{u} + C u$$

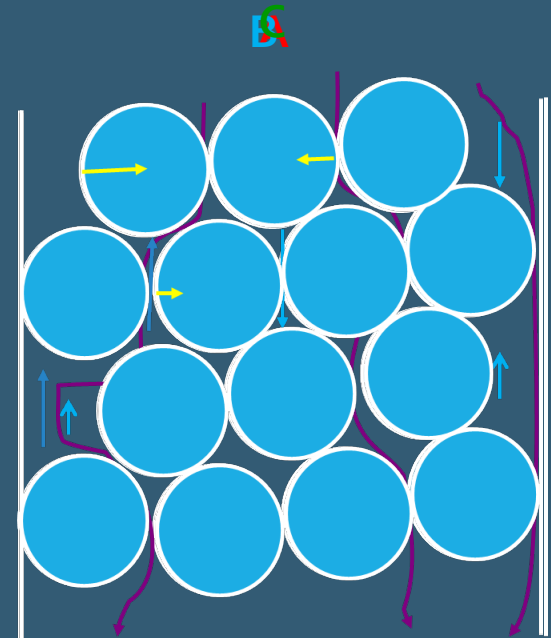
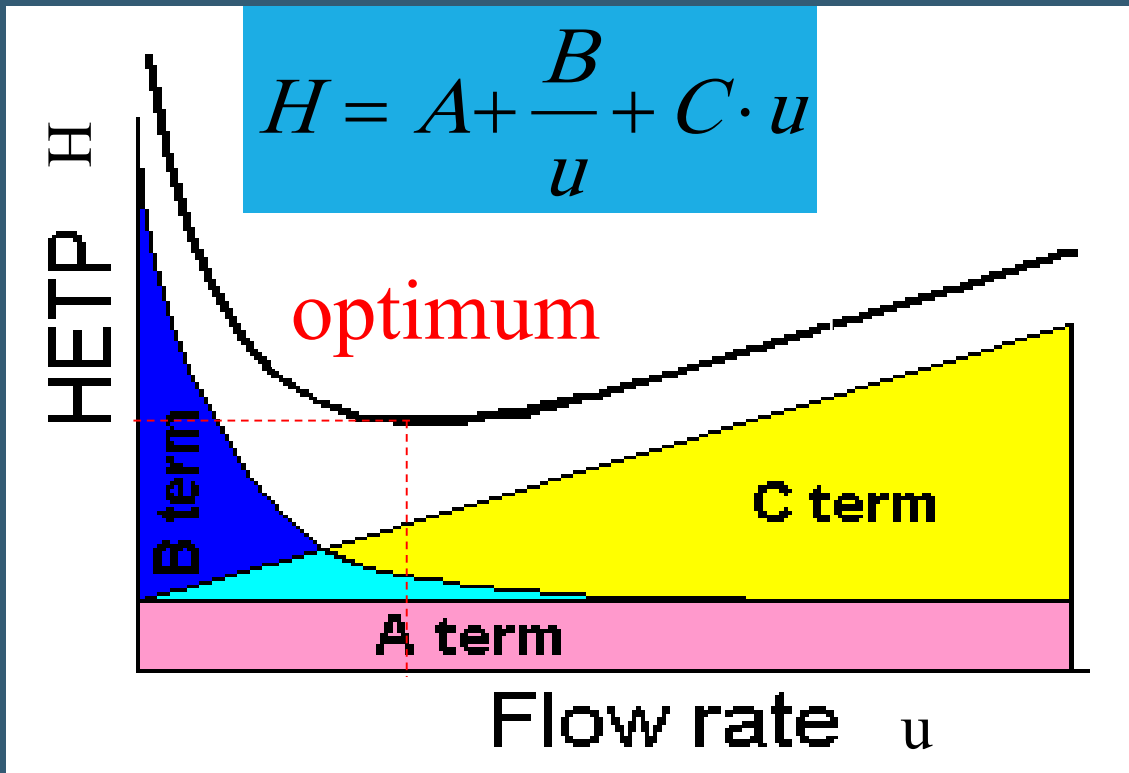
H-výškový ekvivalent teoretického patra

U-průtoková rychlost

A-vířivá (turbulentní) difúze, B-podélná molekulární difúze,

C-odpor proti převodu hmoty

# 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 – **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**



# SÍLY A EFEKTY VYUŽÍVANÉ PŘI SEPARACI

Nabité AA postranní řetězce  
(Asp, Glu, Lys, Arg, His)

**Ionexová chromatografie**

Vazebné místo

**Afinitní chromatografie**

Hydrofobní oblast  
(Phe, Tyr, Ile, Leu, Val, atd.)

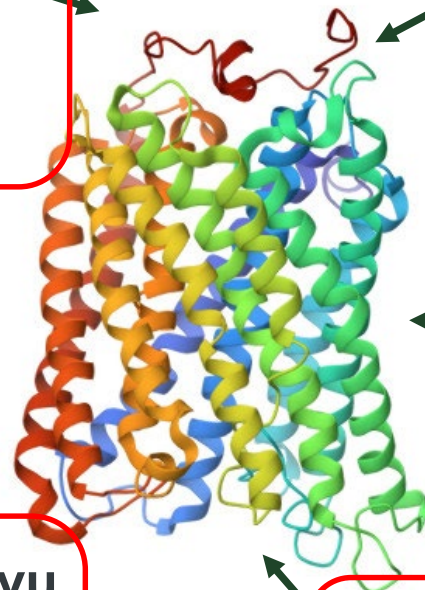
**Hydrofobních chromatografie**

Skupiny chelatující ionty kovu  
(His, Trp, Cys)

**Chelatační afinitní chromatografie**

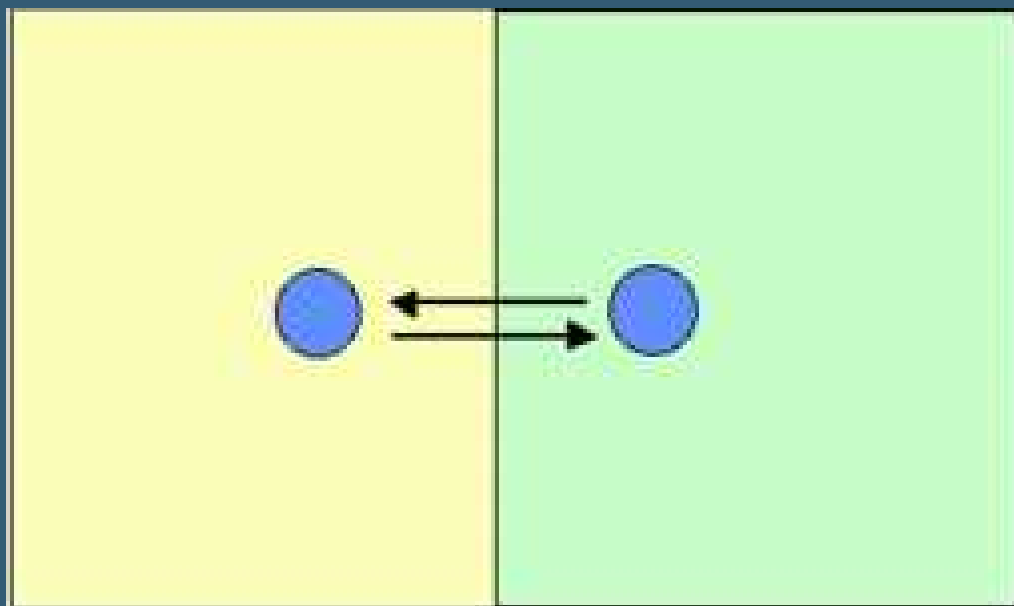
Velikost a tvar

**Gelová permeační chromatografie**

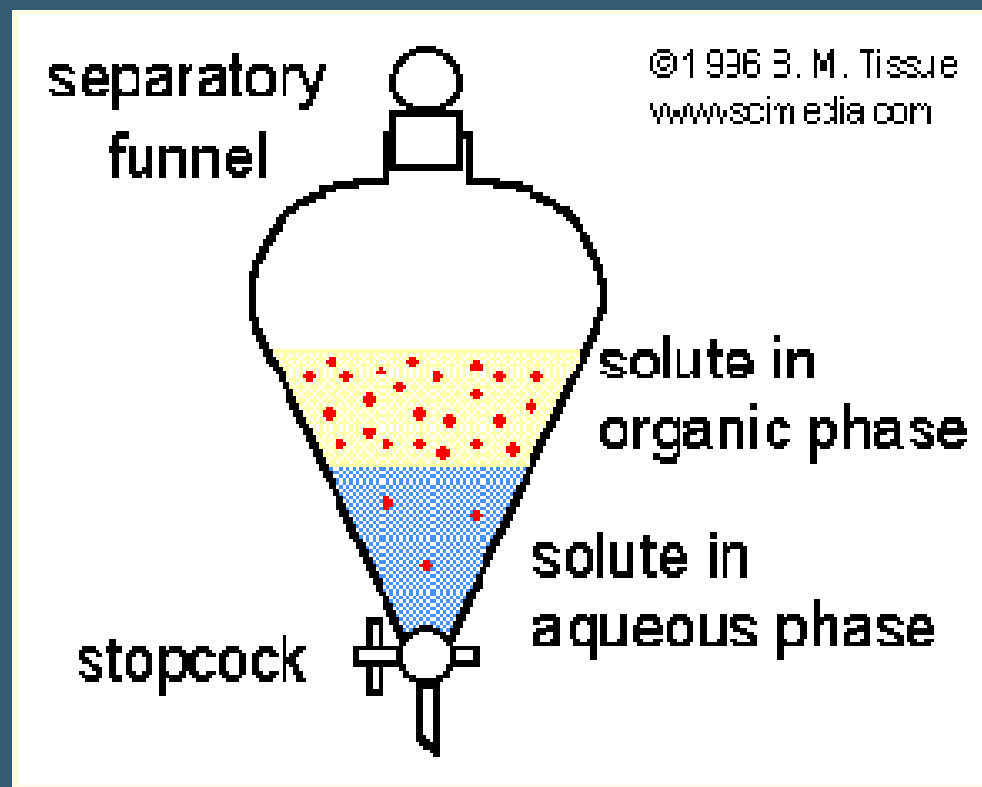


# ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE

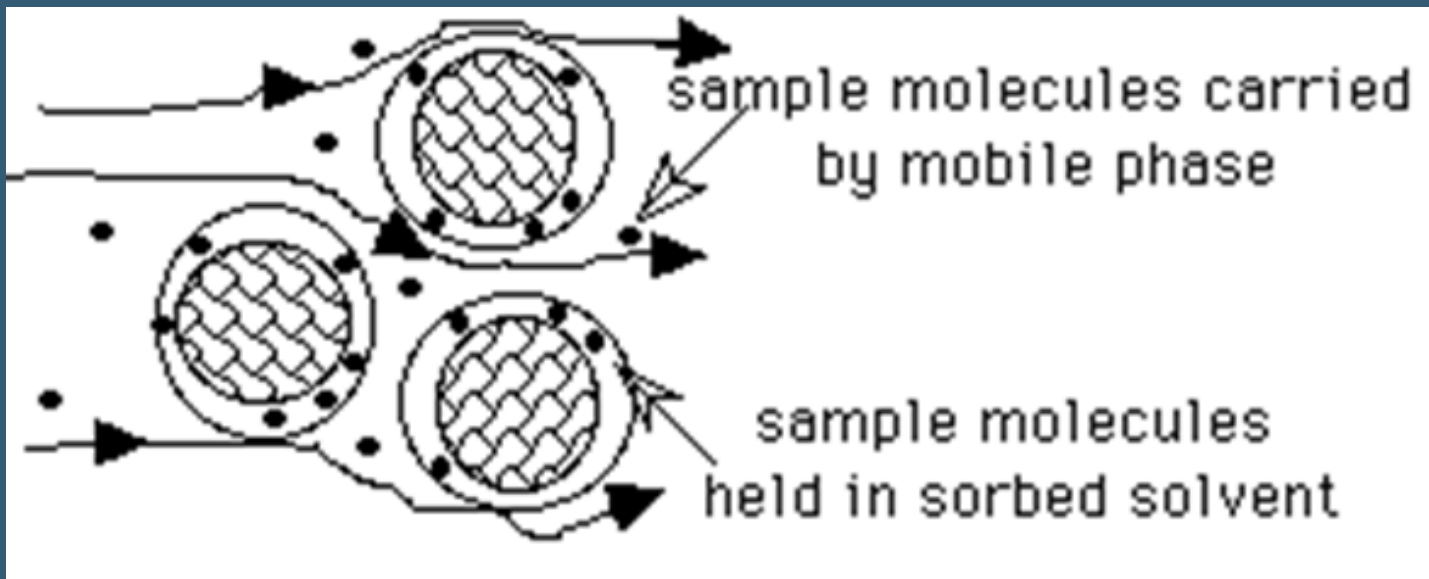
Látky dělí mezi dvě kapalně, navzájem nemísitelné fáze.



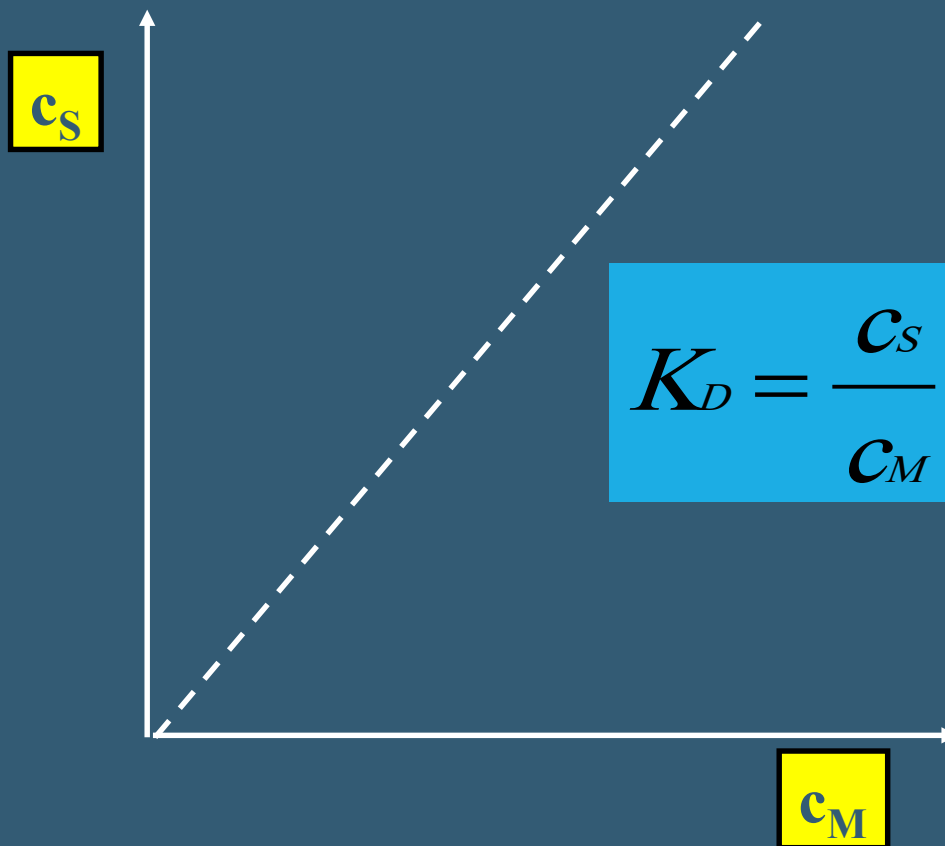
# ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE



# ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE

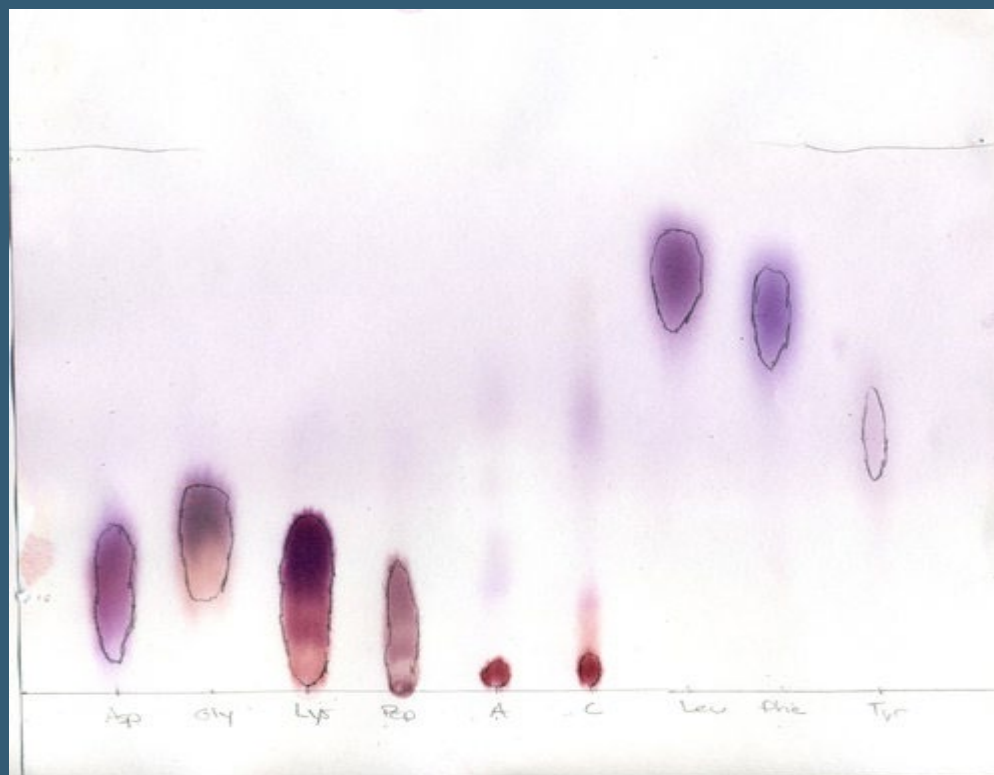


# ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE



Použití – analytická PC, TLC

# PAPÍROVÁ CHROMATOGRAFIE AMK

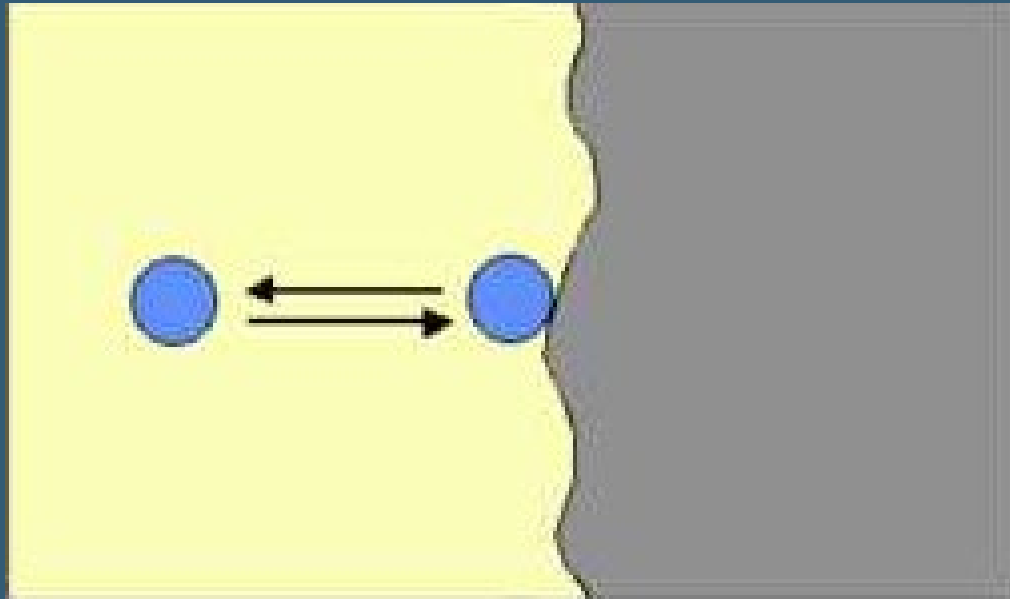


- stacionární fáze: voda
- mobilní fáze: butanol-kyselina octová-voda (12:3:5)

# ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

## CHROMATOGRRAFIE S NORMÁLNÍMI FÁZEMI

Látky dělí podle intenzity jejich vazebných interakcí s adsorbentem a podle polariry mobilní fáze.



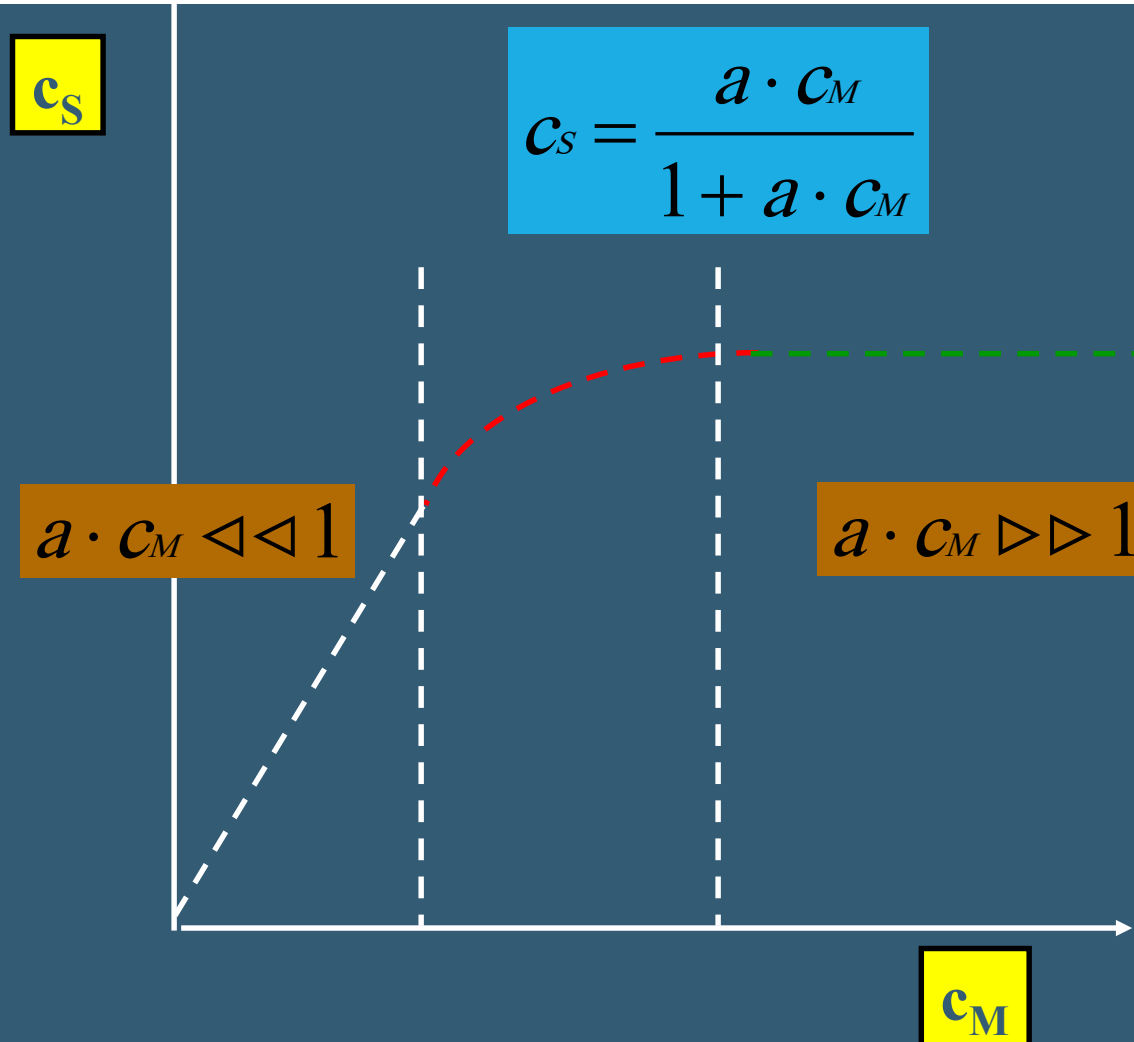
# ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

- 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 CHROMATOGRRAFIE



# ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

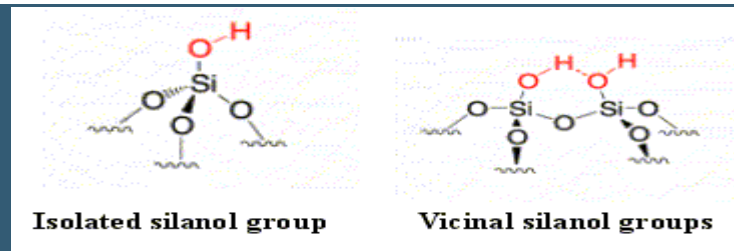
## · Stacionární fáze

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

Hlavní součástí aktivních center jsou **hydroxylové (silanolové) skupiny**, na něž je vodíkovou vazbou adsorbována voda.

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

Zahřátím na 150 °C dojde k odstranění vody “aktivace silikagelu”. Labilní nad pH 8. > 200 °C rozklad.



# ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

- Stacionární fáze

## Oxid hlinitý $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,

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

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

# ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

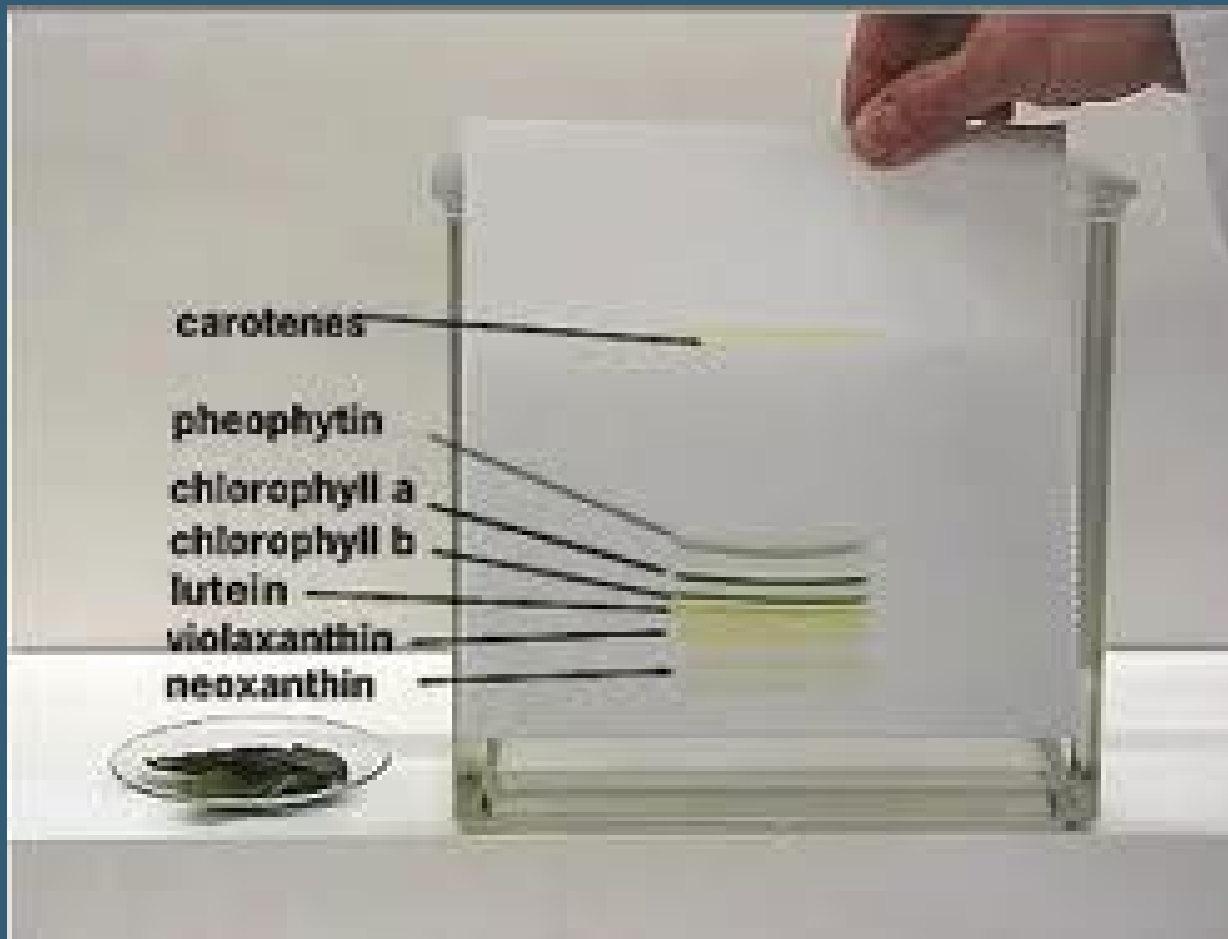
- Mobilní fáze – nepolární
- Eluce - zvyšováním polarity mobilní fáze

Eluotropická řada:

uhlovodíky < subst.uhlovodíky < ketony <

aldehydy < alkoholy < voda

# ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE CHLOROBYLŮ



# ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

- Stacionární fáze

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

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

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.

# ADSORPČNÍ CHROMATOGRAFIE

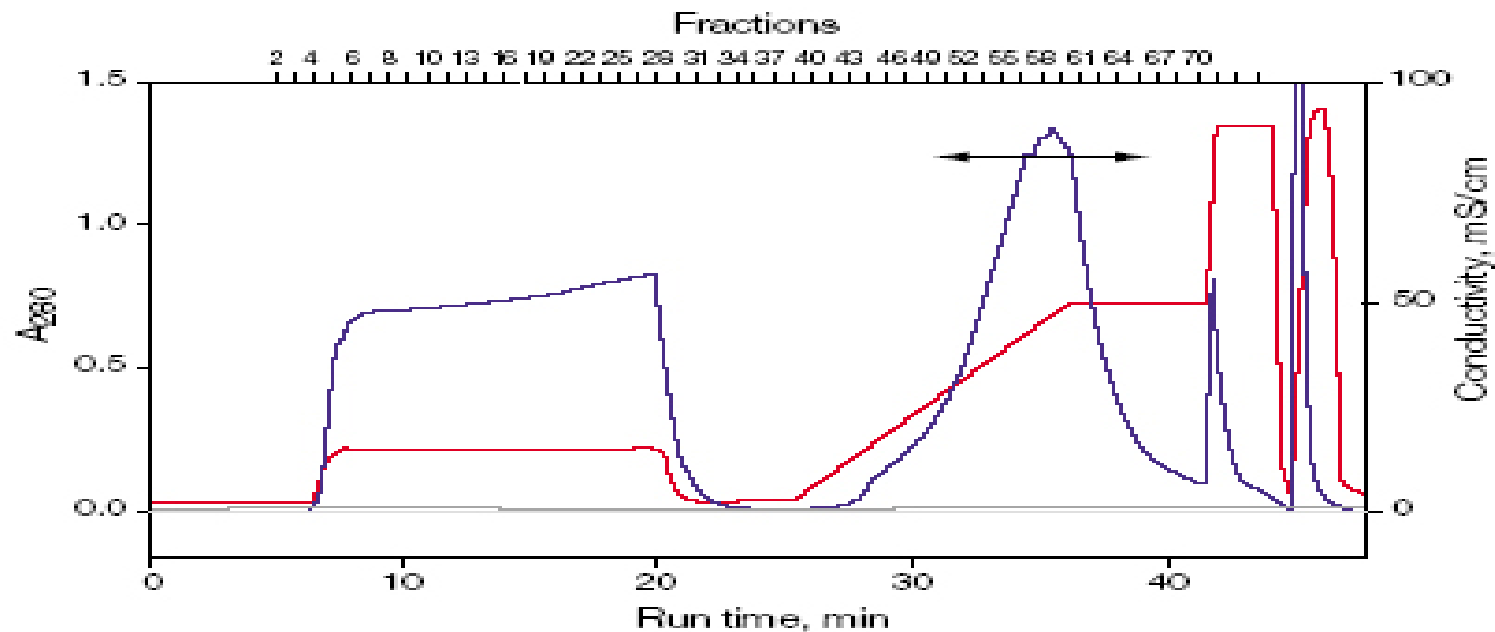
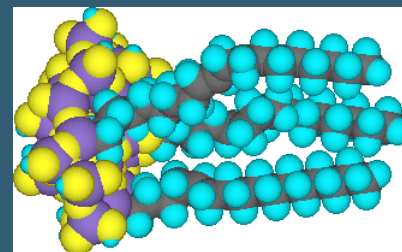


Fig. 1. Chromatogram of murine IgG<sub>1</sub> purification on the UNOsphere S column during small-scale process development. Diluted cell culture (20 ml) was loaded onto an UNOsphere S 0.7 x 5 cm column at a flow rate of 600 cm/hr in 20 mM phosphate-citrate buffer, pH 4.0. The sample was eluted in 10 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 IgG<sub>1</sub> (see Figure 2). Blue trace, A<sub>280</sub>; red trace, conductivity profile.

# REVERZNĚ FÁZOVÁ CHROMATOGRRAFIE

- Stacionární fáze – nepolární

$C_8, C_{18}$



- Mobilní fáze – polární – vodné roztoky

pH → potlačit disociaci

- Eluce – snížením polarity mobilní fáze

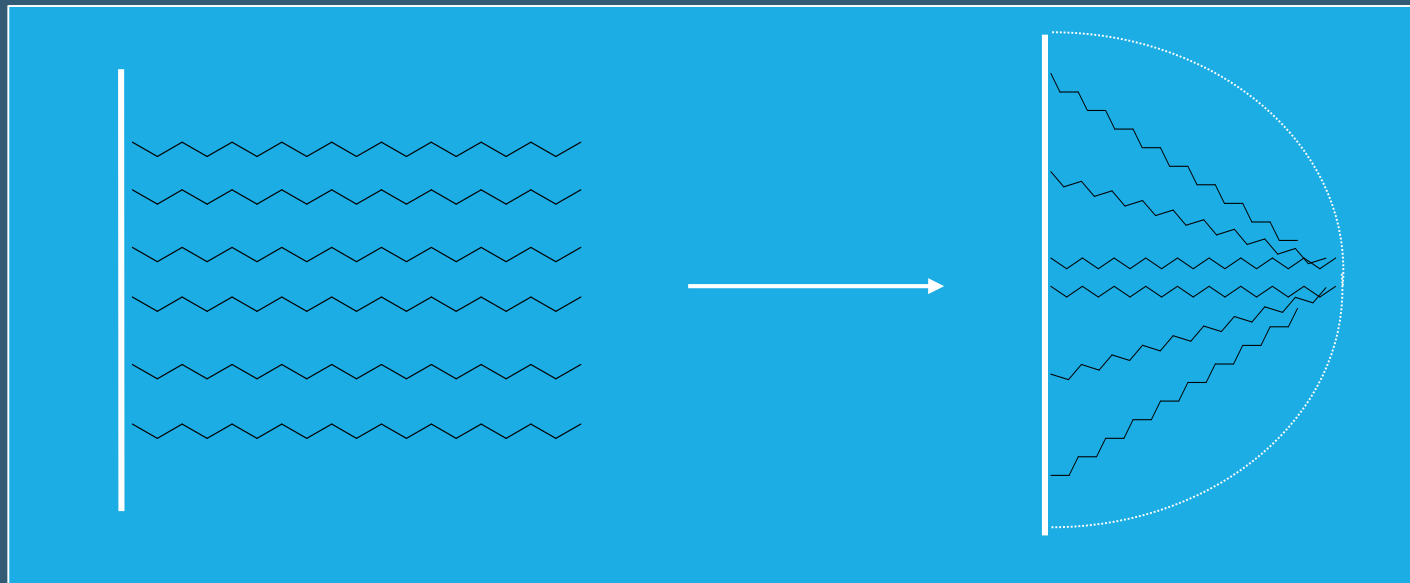
ACN, MetOH,



# REVERZNĚ FÁZOVÁ CHROMATOGRRAFIE

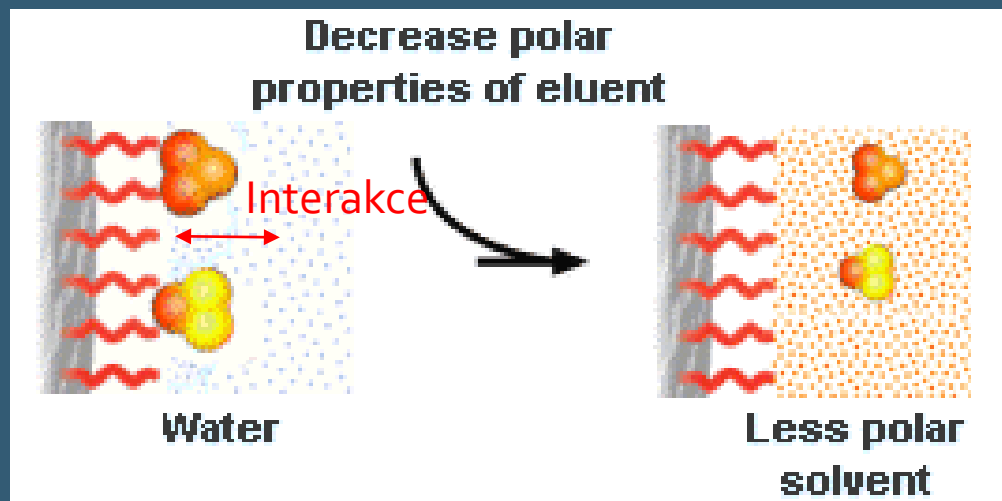
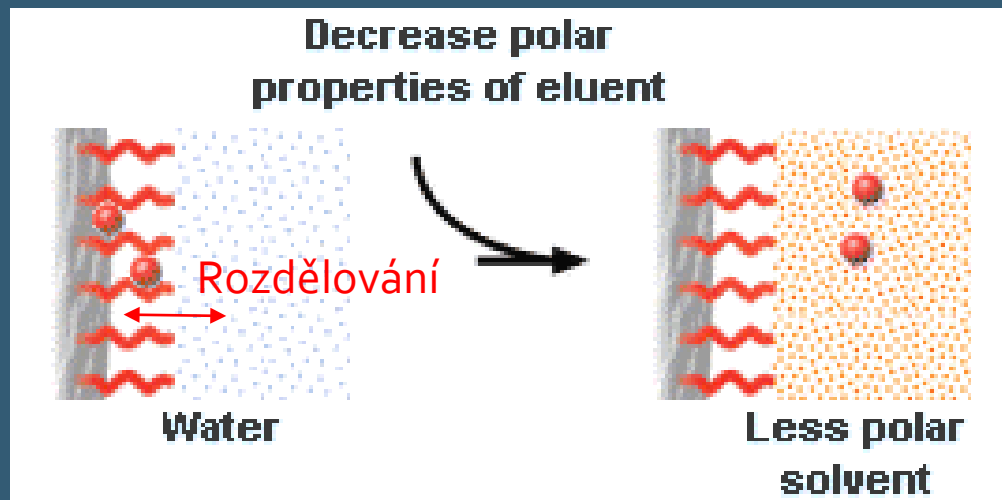
Kartáčový typ stacionární fáze

H<sub>2</sub>O



Použití : analytické – až 90 % analýz

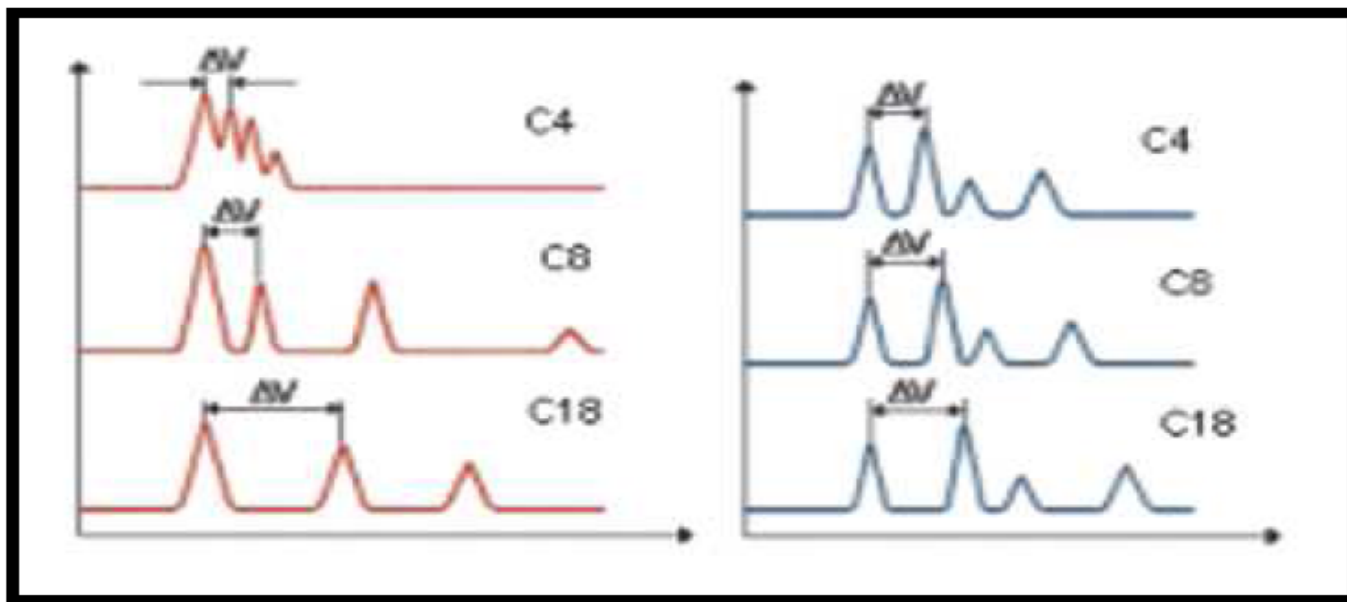
# REVERZNĚ FÁZOVÁ CHROMATOGRRAFIE



# REVERZNĚ FÁZOVÁ CHROMATOGRRAFIE

## Vliv délky řetězce na rozlišení

hydrofobní  
organické látky      peptidy, proteiny

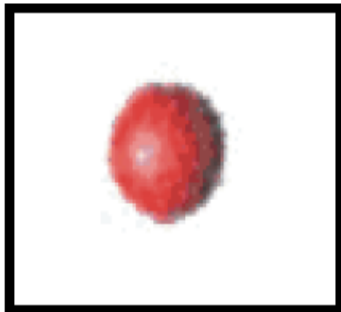


# REVERZNĚ FÁZOVÁ CHROMATOGRRAFIE



## Silikagel

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



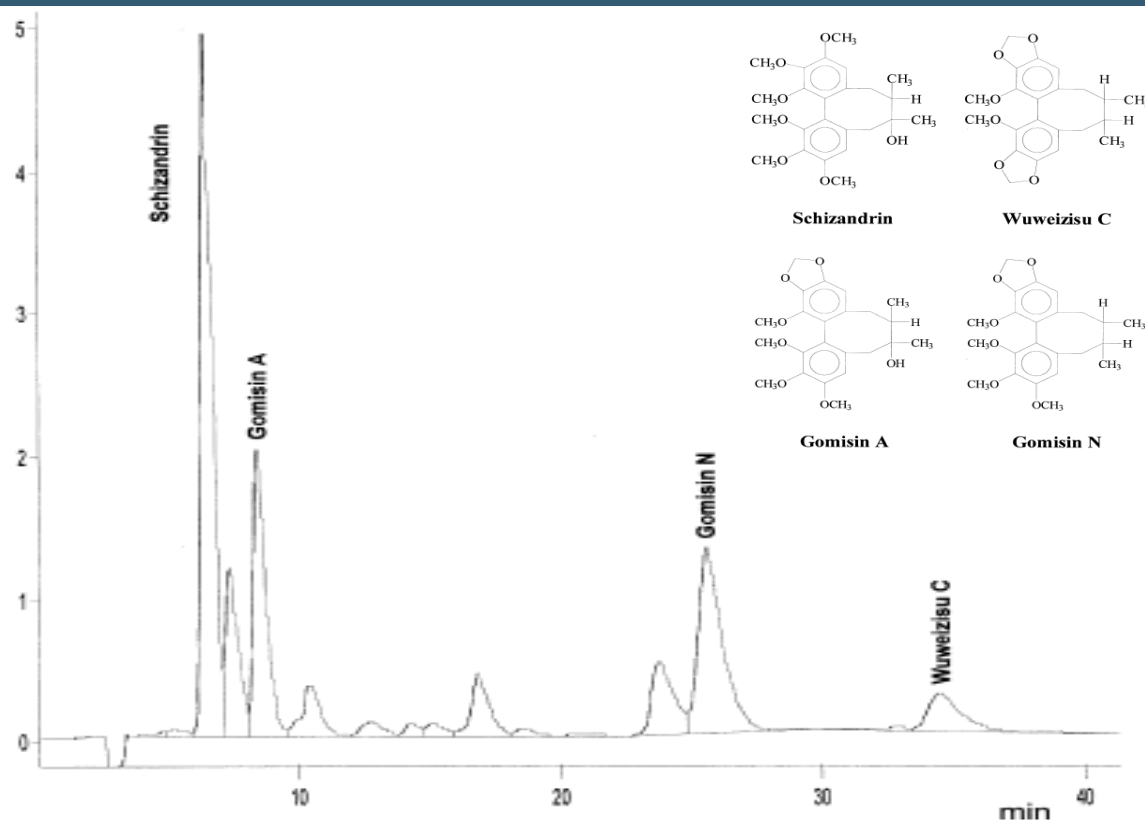
## Polymerní nosič

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

# REVERZNĚ FÁZOVÁ CHROMATOGRRAFIE

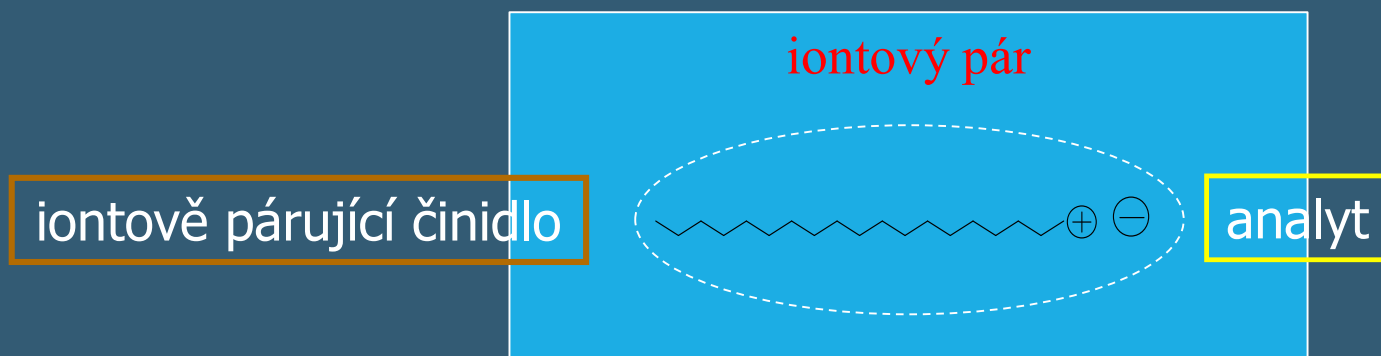
Organické rozpouštědlo	Vhodné pro:	Viskosita	Poznámka
Methanol	•Org. molekuly	Střední-nízká	možná destabilizace struktury
Ethanol	•Org. molekuly	Střední-nízká	možná destabilizace struktury
Isopropanol	•Proteiny •Peptidy	Vysoká	nejmenší efekt na strukturu
Acetonitril (ACN)	•Org. molekuly •Proteiny •Peptidy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

# REVERZNĚ FÁZOVÁ CHROMATOGRRAFIE



**Fig. 5. HPLC analysis of *Schisandra* extract. Experimental conditions: column, Separon SGX C<sub>18</sub> 5 μm, 150×3 mm I.D.; mobile phase, methanol–deionised water (75:25); flow-rate, 0.3 ml/min; detection at 254 nm. Twenty μl of *Schisandra* extract were loaded on the column.**

# IONTOVĚ PÁROVÁ CHROMATOGRRAFIE



+ - SDS,  $\text{HClO}_4$

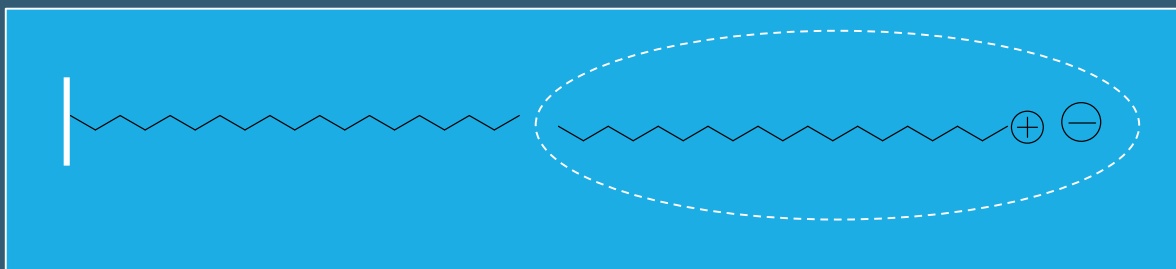
MP - 0.05 %

- - tetrabutylamonium

# IONTOVĚ PÁROVÁ CHROMATOGRRAFIE

sorbent C<sub>18</sub>

iontový pár



pH → plná ionizace analytu

Stacionární, mobilní faze, eluce – RPC



# IONTOVĚ PÁROVÁ CHROMATOGRAFIE

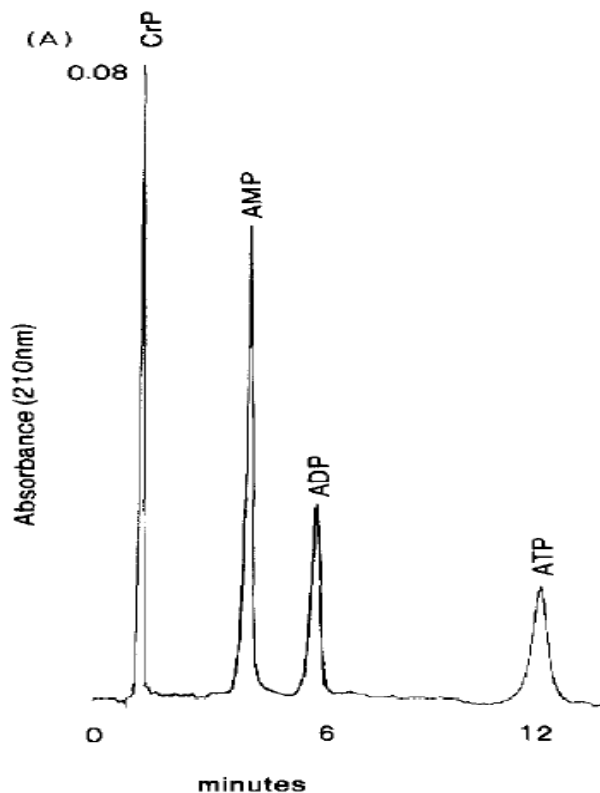


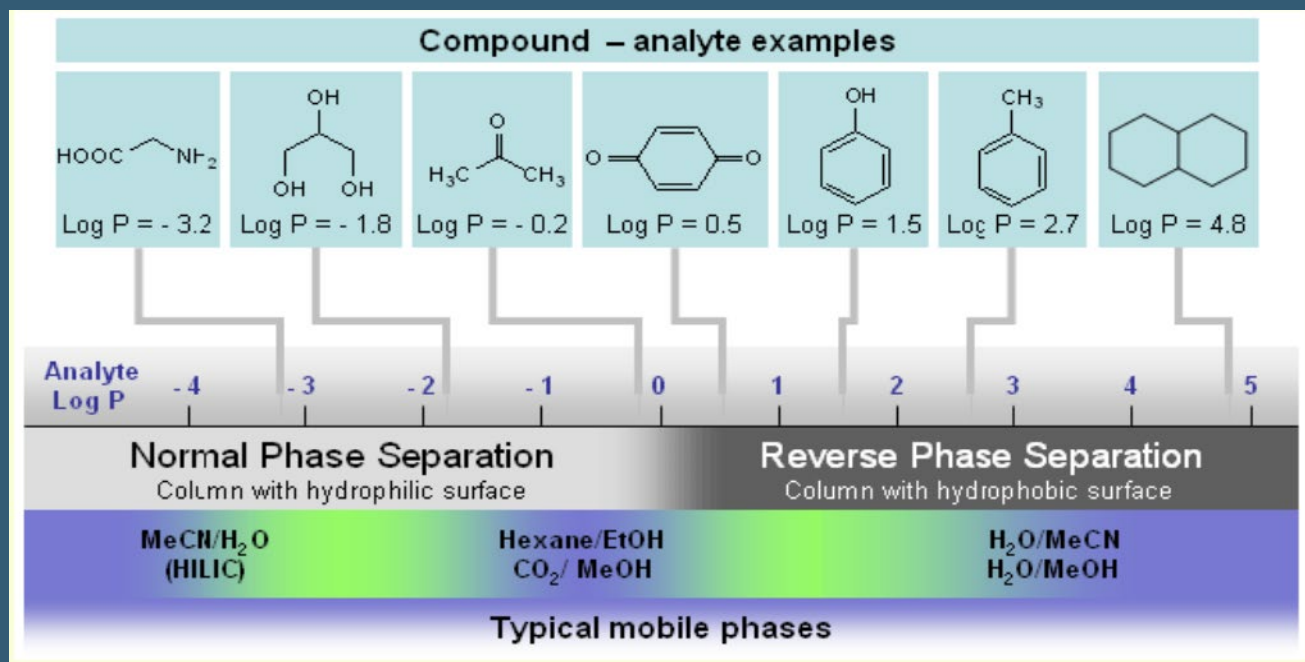
Fig. 1. Chromatogram of standards. Separation of standard containing  $76.4 \mu\text{M}$  CrP,  $72 \mu\text{M}$  AMP,  $58.53 \mu\text{M}$  ADP and  $45.35 \mu\text{M}$  ATP. Injection volume:  $10 \mu\text{l}$ . Flow-rate:  $2 \text{ ml/min}$ . Buffer:  $0.52 \mu\text{M}$  potassium dihydrogen phosphate,  $0.04\%$  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.

# HILIC CHROMATOGRAFIE

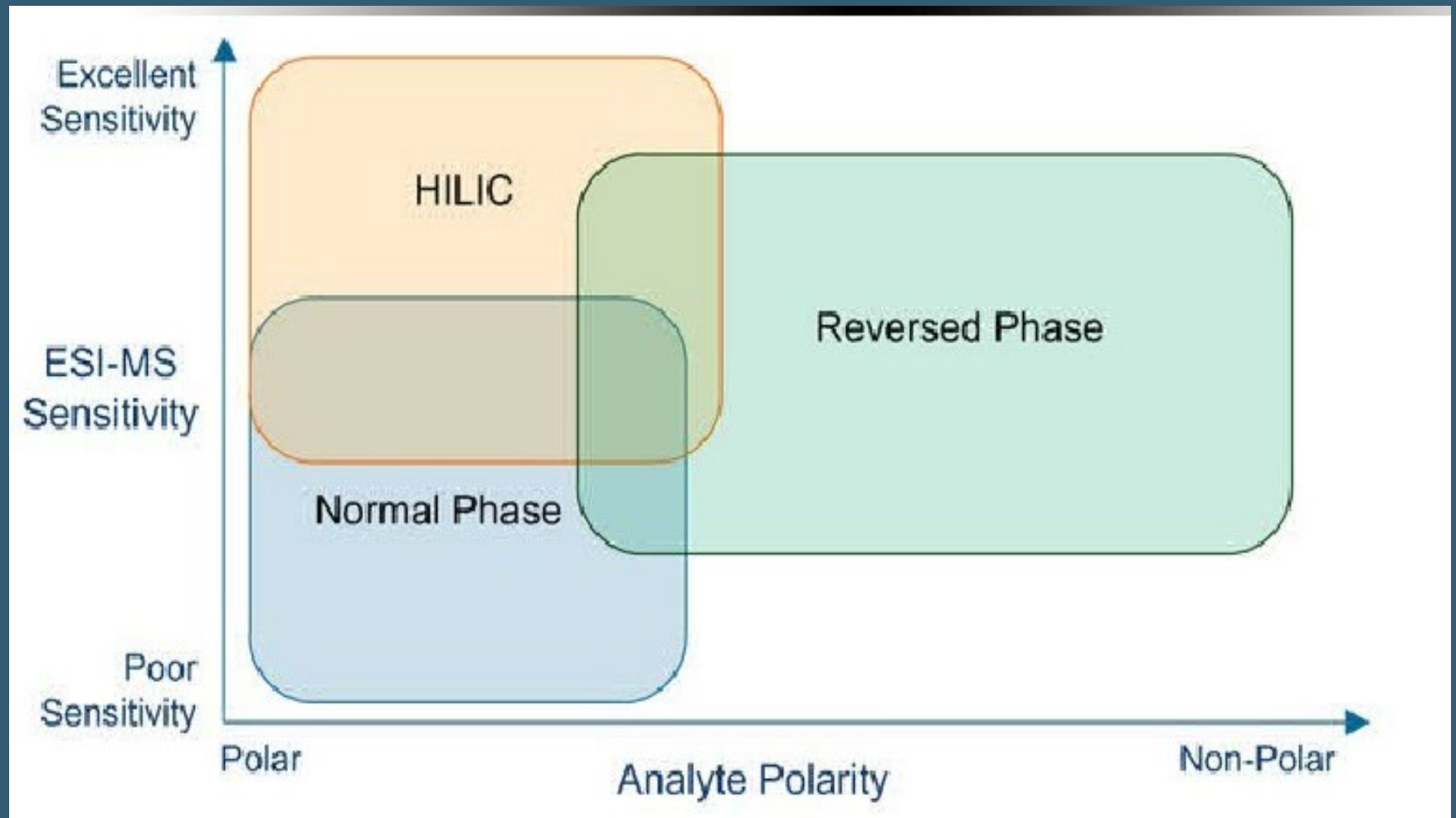
## Hydrophilic Interaction Chromatography (1990)

Varianta chromatografie s normálními fázemi používající organická rozpouštědla mísitelná s vodou.

Retence analytu se zvyšuje společně s jeho polaritou a naopak snižuje s rostoucí polaritou (koncentrací vodné složky) mobilní fáze



# HILIC CHROMATOGRAFIE



# HILIC CHROMATOGRAFIE

- Stacionární fáze

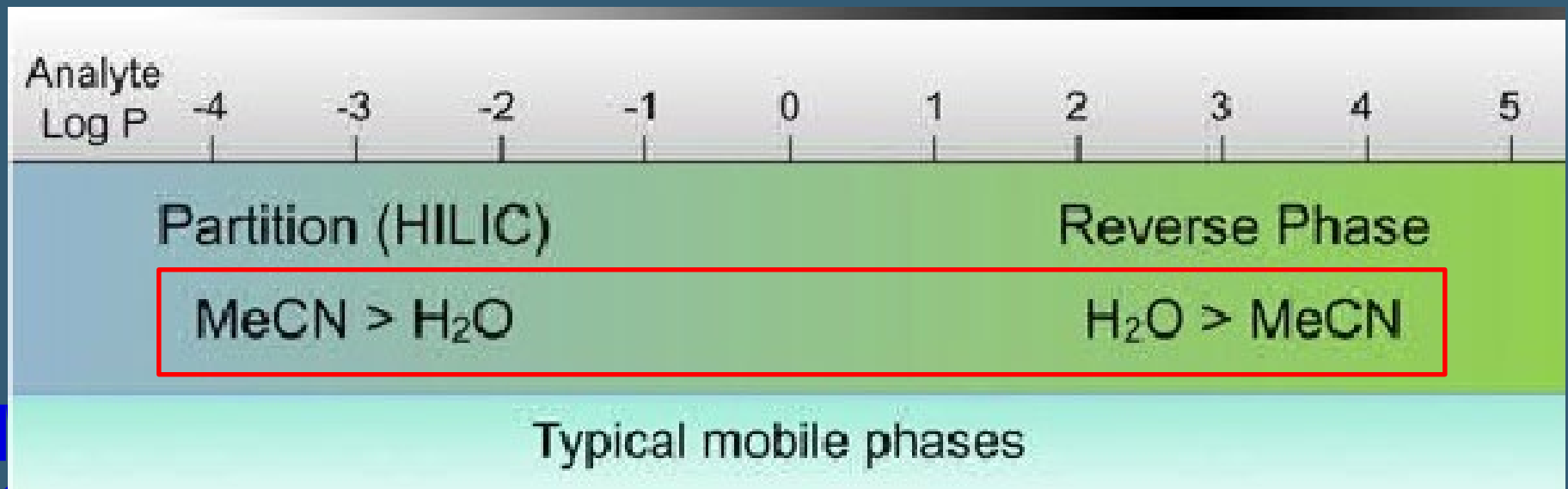
polární - silikagel,  
kyano, amino, diol,  
zwitterionty etc.

stacionární fáze	chemická struktura
a.	
silikagel	-OH
kyanopropyl	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CN
aminopropyl	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>
diol	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---CH}_2\text{---OH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$
b.	
PAC	$\begin{array}{c} \text{---(CH}_2\text{---CH---)}_n \\   \\ \text{C=O} \\   \\ \text{OH} \end{array}$
c.	
ZIC	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{---CH}_2\text{---N}^{\oplus}\text{---(CH}_2\text{)}_3\text{---SO}_3^{\ominus} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$

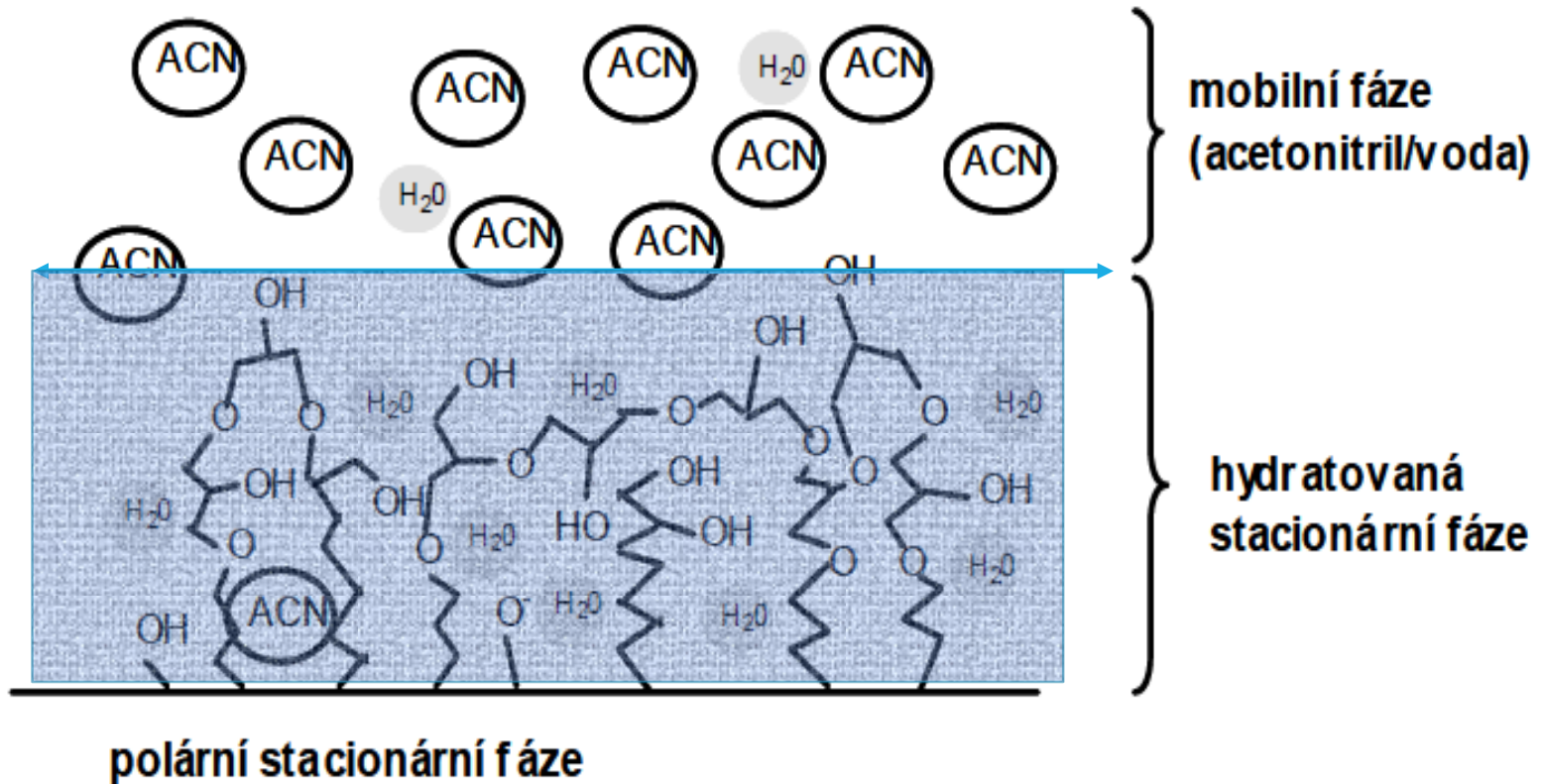
# HILIC CHROMATOGRRAFIE

- Mobilní fáze

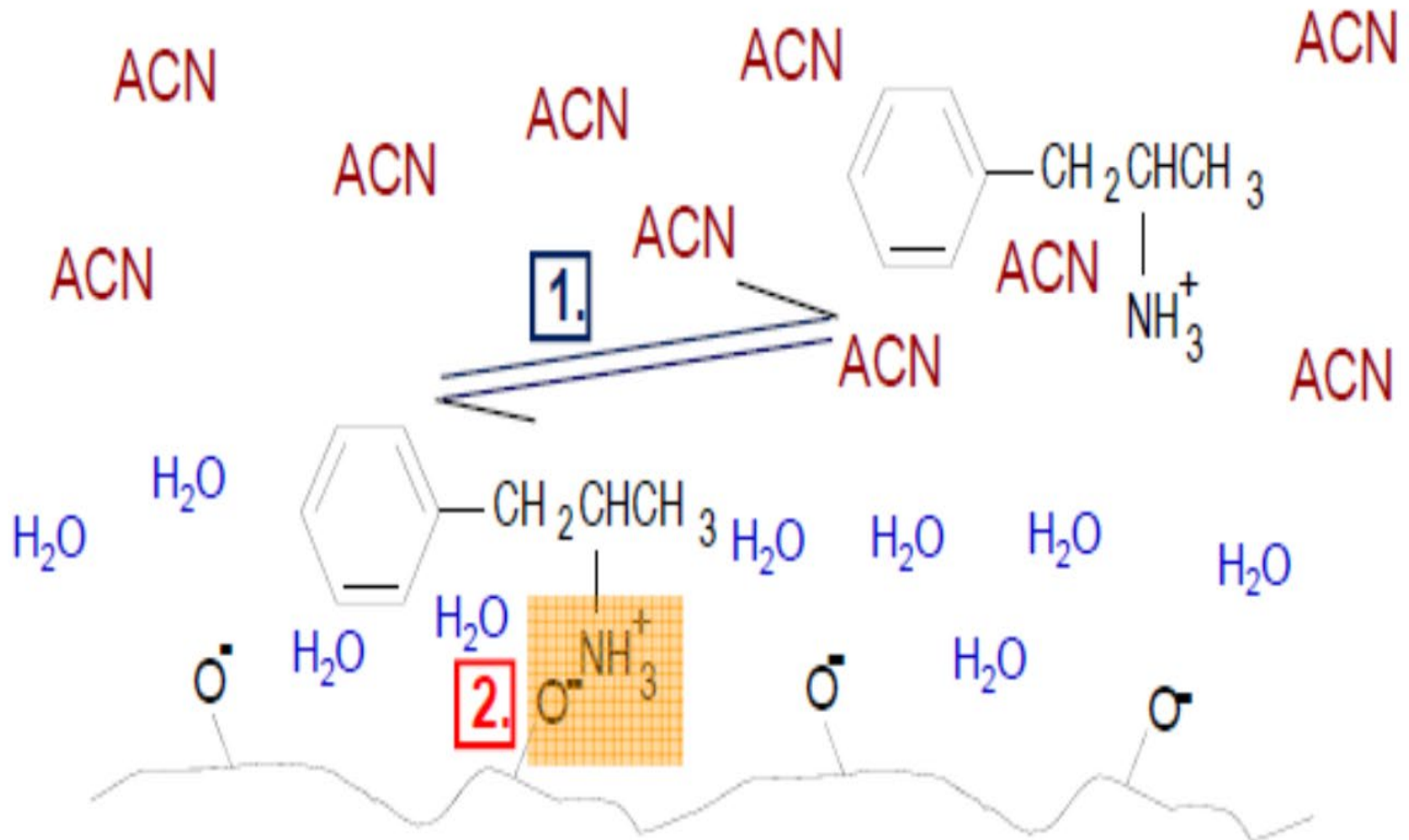
Velký obsah organického rozpouštědla ACN (> 80%)  
s malým množstvím vody nebo jiného polárního  
rozpouštědla



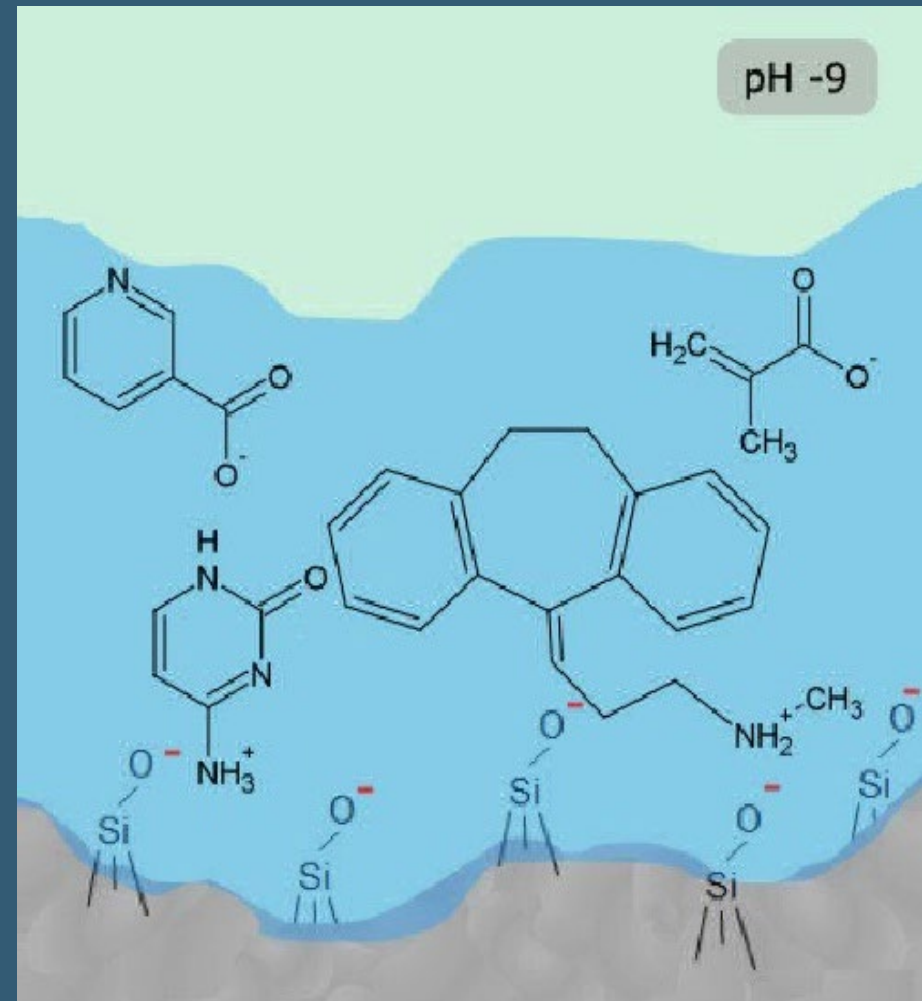
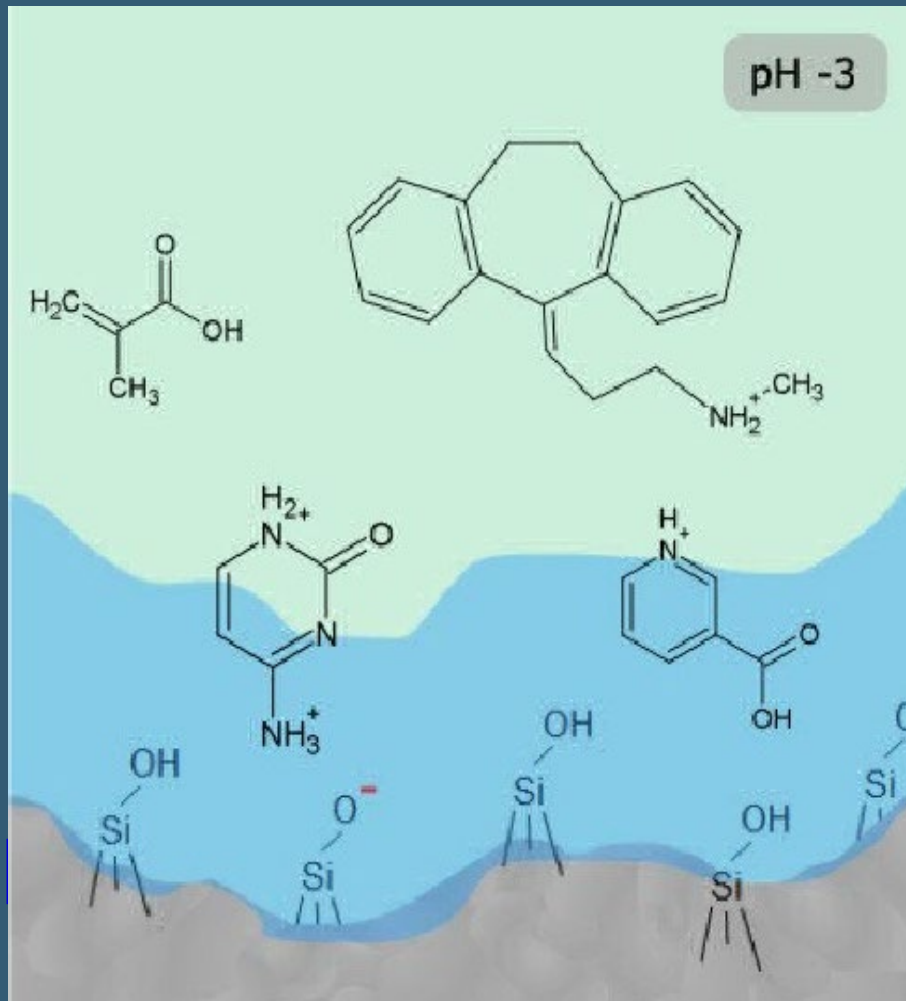
# HILIC CHROMATOGRAFIE



# HILIC CHROMATOGRAFIE

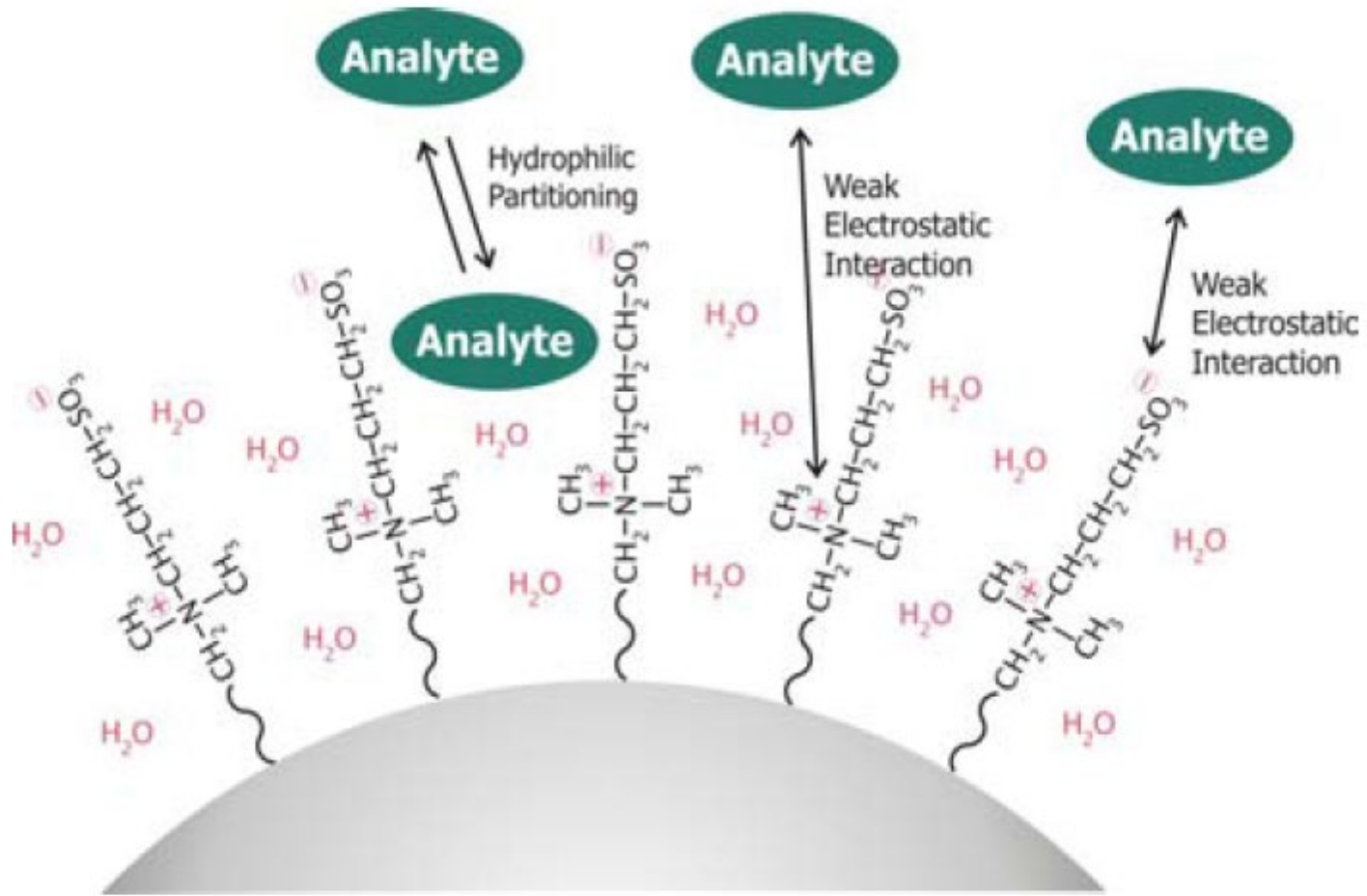


# HILIC CHROMATOGRAFIE





# HILIC CHROMATOGRAFIE



# HILIC CHROMATOGRAFIE

- **Nanášení vzorku** – vzorek rozpuštěn v mobilní fázi
- **Eluce** – zvyšováním polarity mobilní fáze

Dioxan>Aceton>ACN>THF>IPOH>EtOH>MetOH>H<sub>2</sub>O

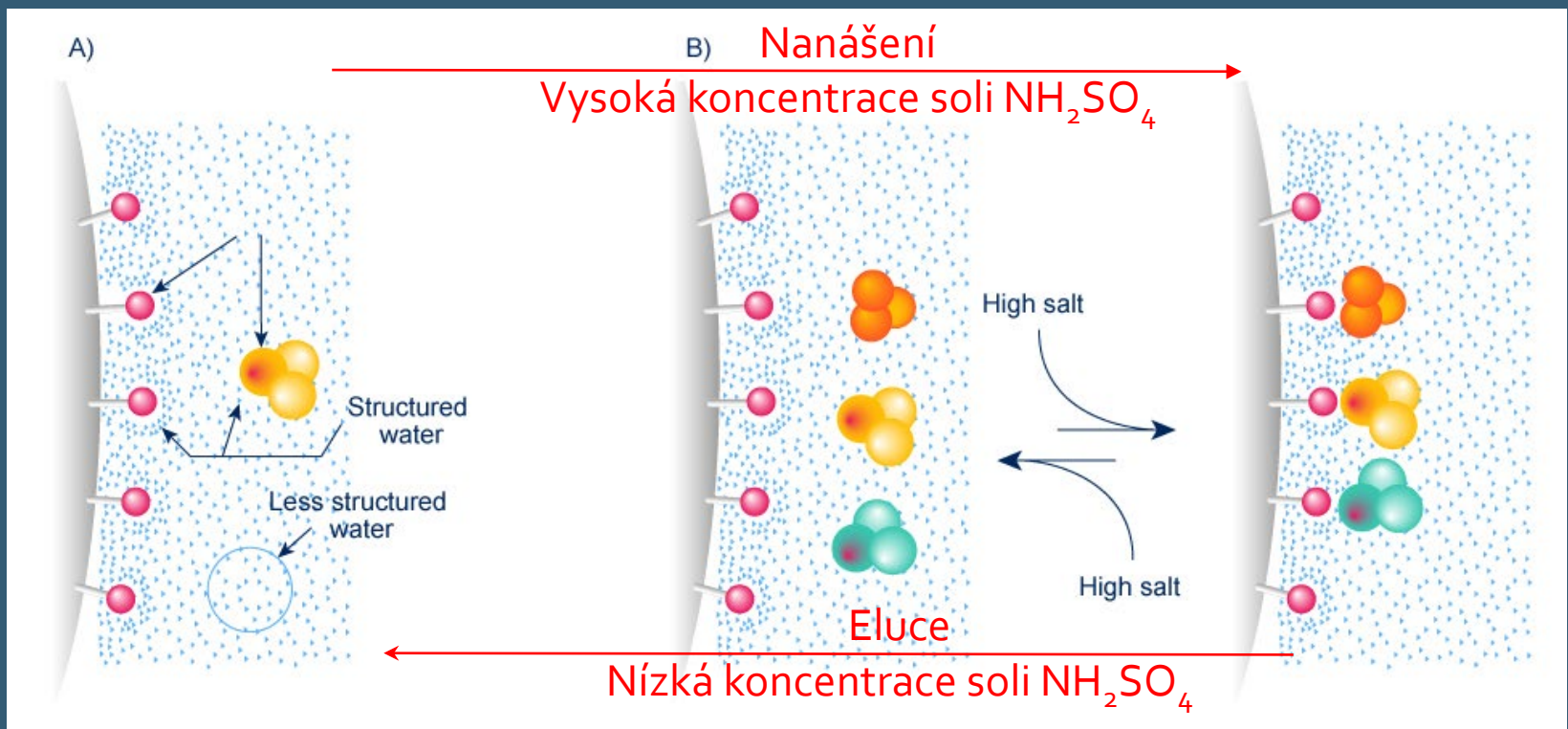
**Použití** : analýza polárních látek

# HYDROFOBŇÍ CHROMATOGRADIE

- Stacionární fáze – -C<sub>4</sub>, -C<sub>8</sub>, -fenyl
- Mobilní fáze – vodné roztoky (pufry)  
1.7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Eluce – snižováním iontové síly

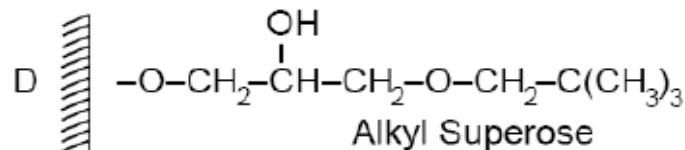
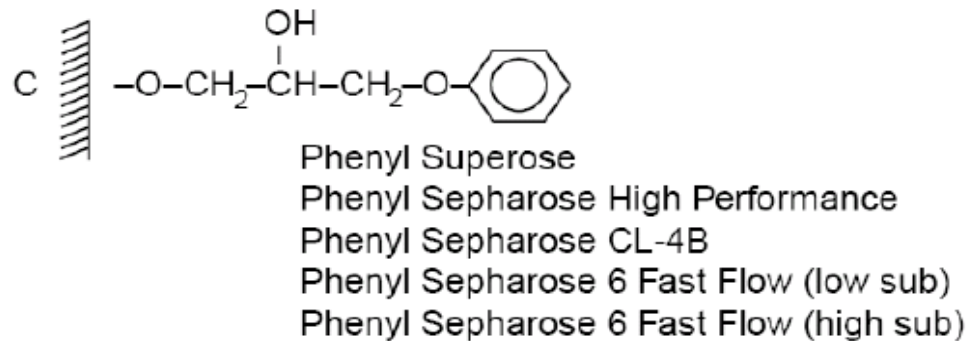
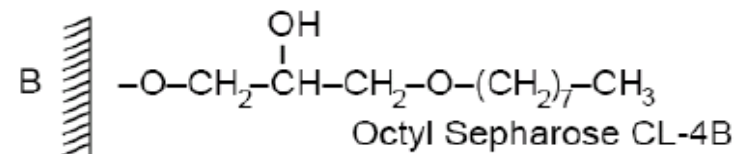
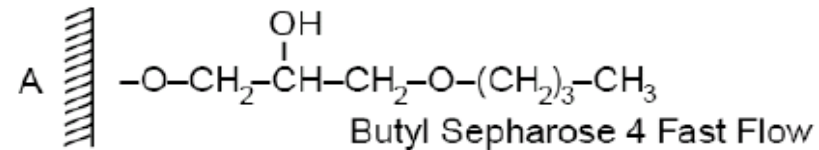
Použití : purifikace bílkovin

# HYDROFOBNI CHROMATOGRRAFIE



# HYDROFOBNI CHROMATOGRRAFIE

## • Stacionární fáze –



MUNI

Isopropyl < Butyl < Octyl < Phenyl

# HYDROFOBNÍ CHROMATOGRAFIE

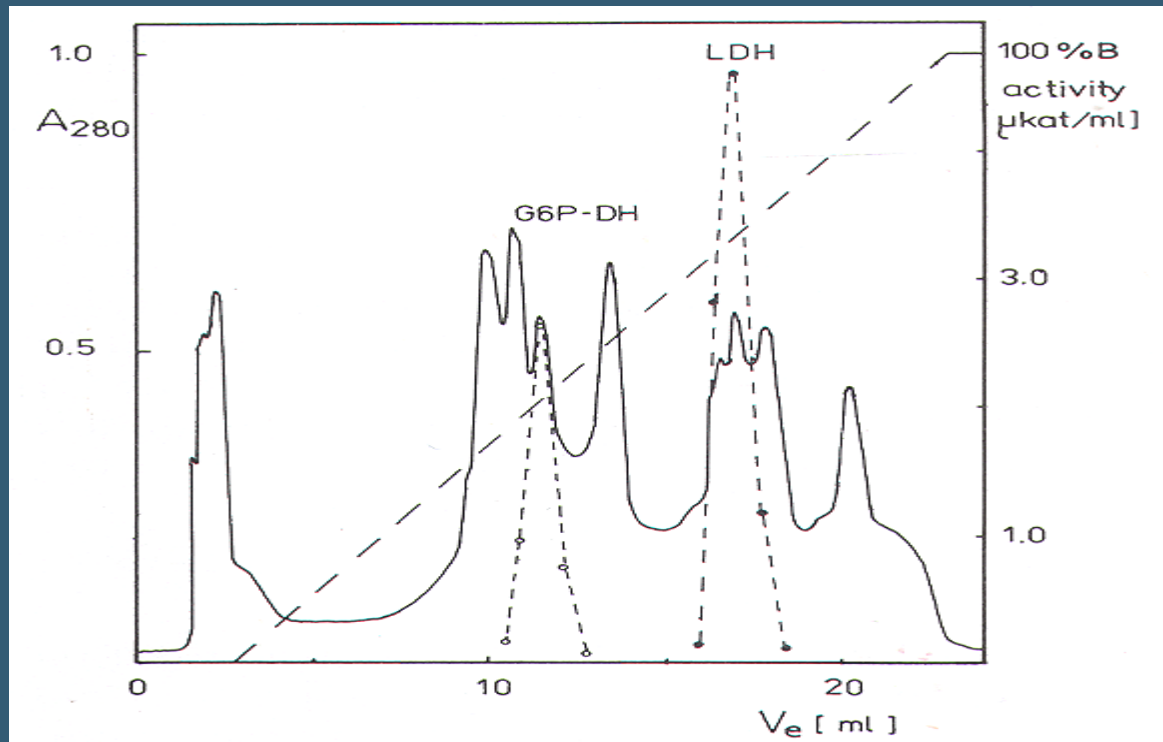


Fig. 1. Chromatography of crude enzyme preparation on a Phenyl-Superose column. Buffers: (A) 0.05 M sodium phosphate (pH 7.4) with 1.7 M sodium sulphate and 1 mM EDTA; (B) 0.05 M sodium phosphate (pH 7.4); flow-rate, 0.5 ml/min.  $V_e$ , elution volume; solid line, absorbance at 280 nm ( $A_{280}$ );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

# HYDROFOBNI CHROMATOGRRAFIE

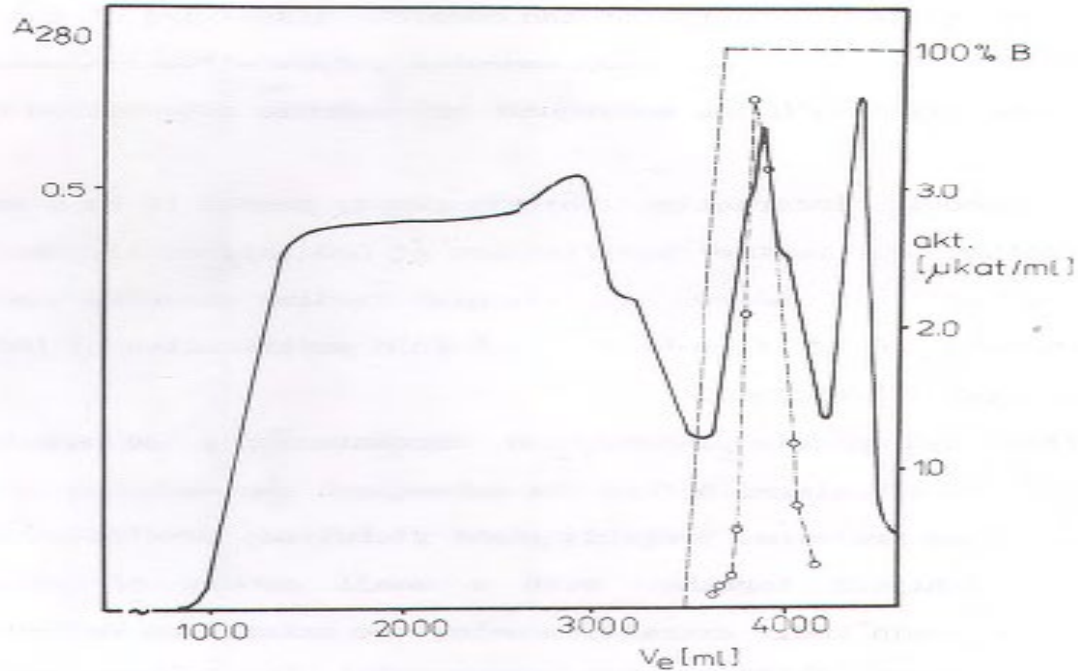
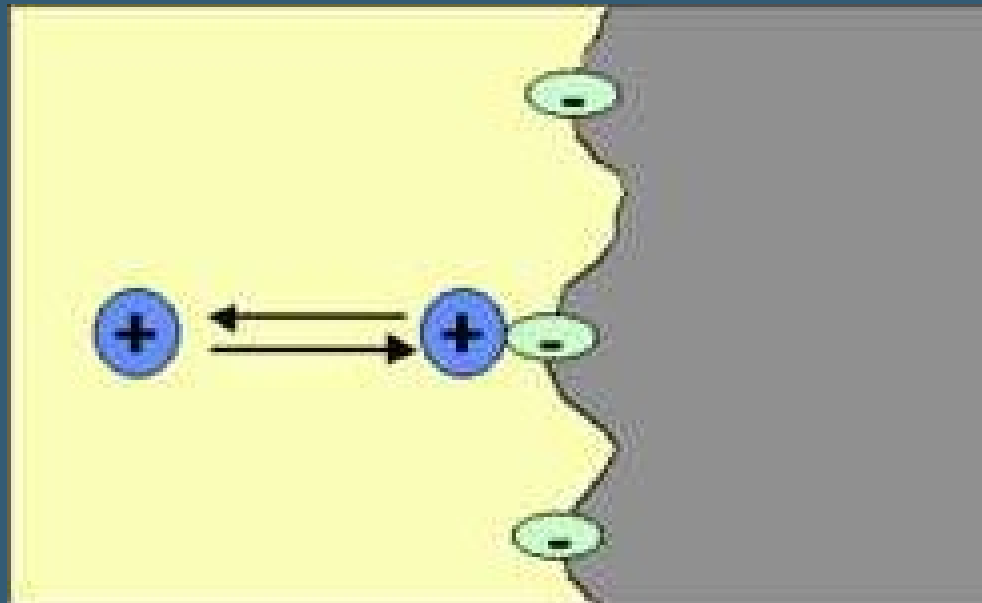


Figure 1

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  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ; B, 0.05 M potassium phosphate (pH 6.0) with 1  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ; flow-rate 4.5 ml/min;  $V_e$  - elution volume; — absorbance at 280 nm ( $A_{280}$ ); - - - gradient; - - -  $\circ$  - - - DAO activity ( $\mu\text{kat}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Approximately 30 g of protein were applied to the column.

# IONEXOVÁ CHROMATOGRRAFIE

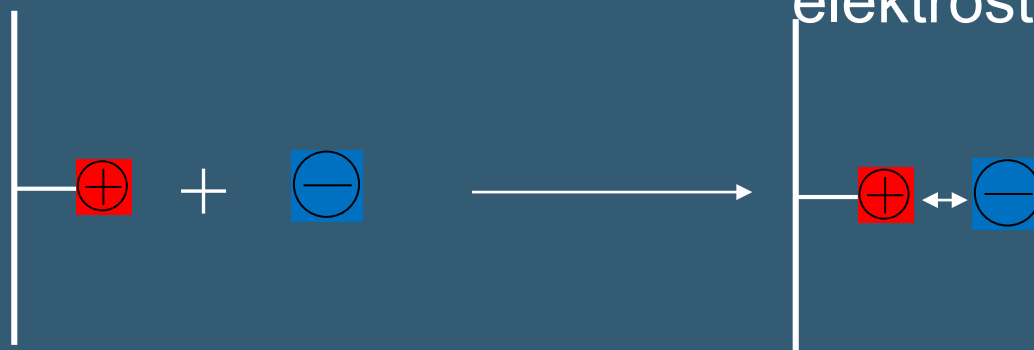
Založena na elektrostatické interakci



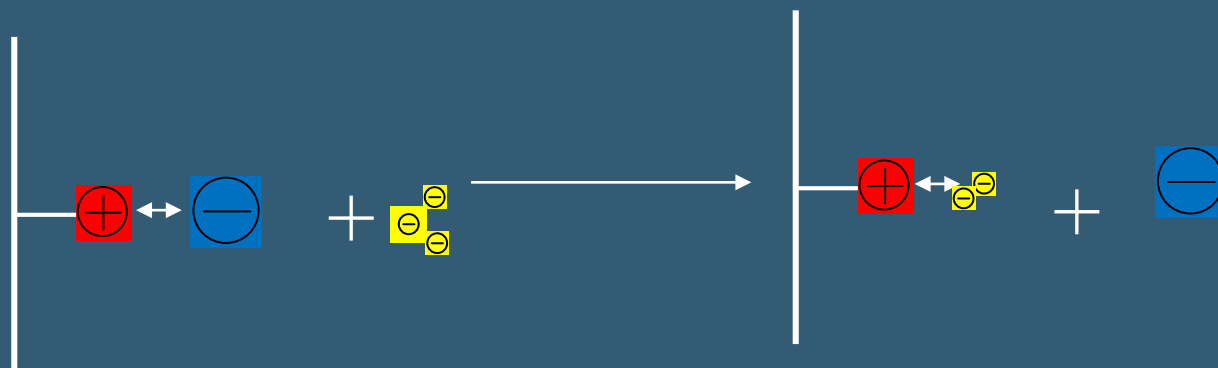


# IONEXOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Vazba



Eluce



# IONEXY

· Katexy -  $\ominus$  vazba kationtů

silné - sulfo(S), sulfopropyl(SP) –  $\text{OSO}_3^-$

slabé - karboxy(C), karboxymetyl(CM) –  $\text{COO}^-$ ,  $\text{CH}_2\text{COO}^-$

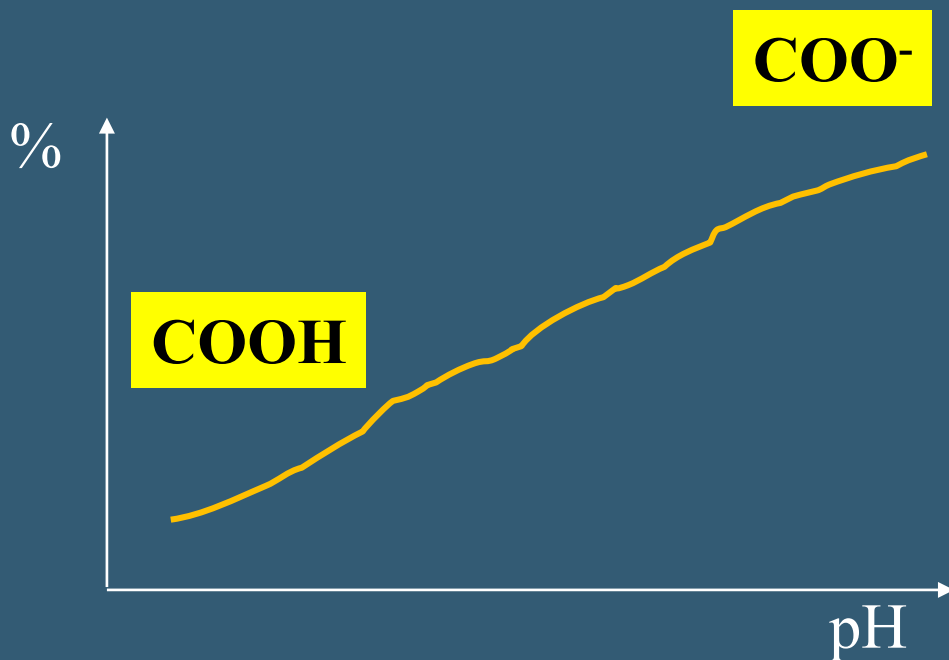
· Anexy -  $\oplus$  vazba aniontů

slabé - diethylaminoetyl (DEAE) –  $(\text{CH}_2)_2\text{-NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$

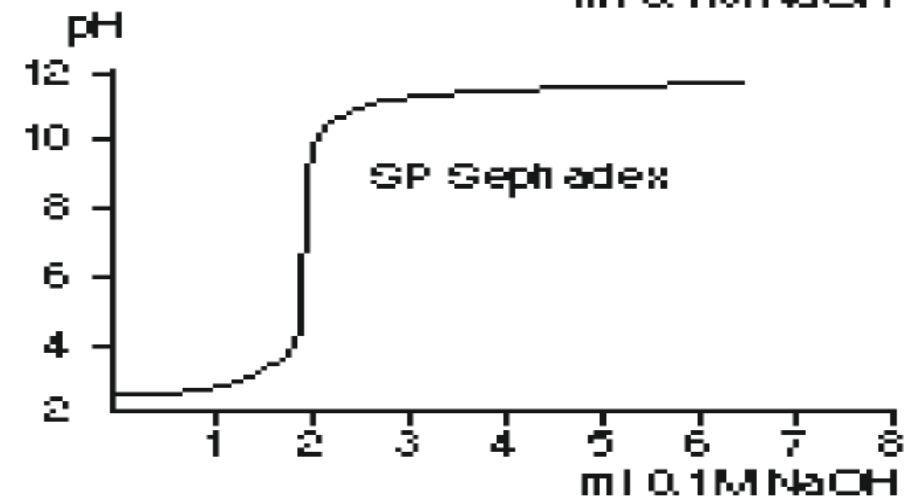
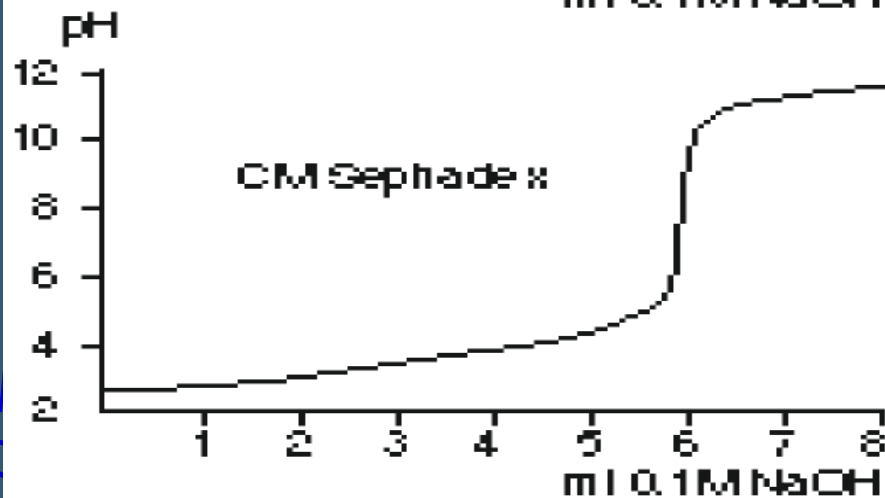
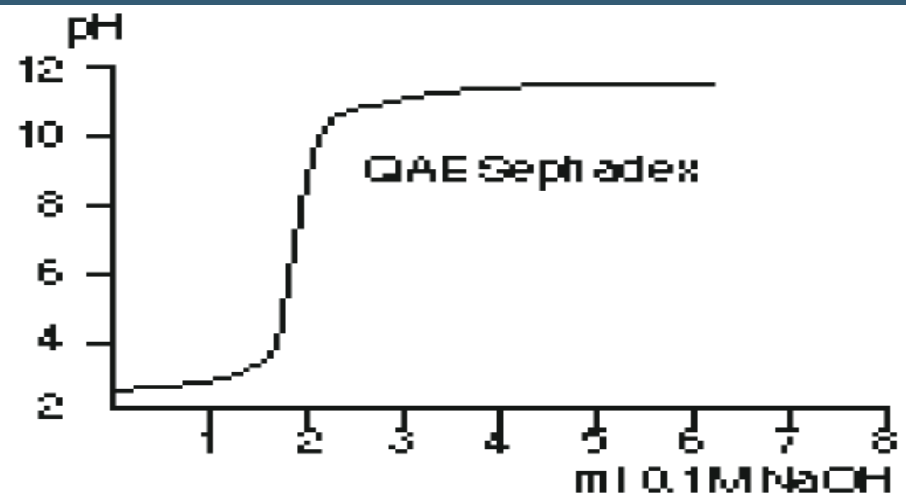
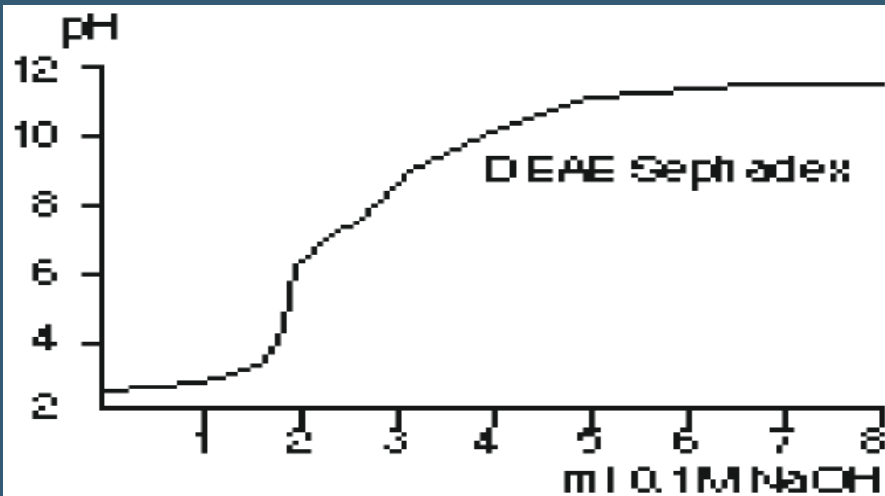
silné - triethylaminoetyl (TEAE) –  $(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$

# SLABÝ IONEX

- Vykazuje změny vazebné kapacity v závislosti na pH
- Má pufrální kapacitu



# SLABÝ VERSUS SILNÝ IONEX



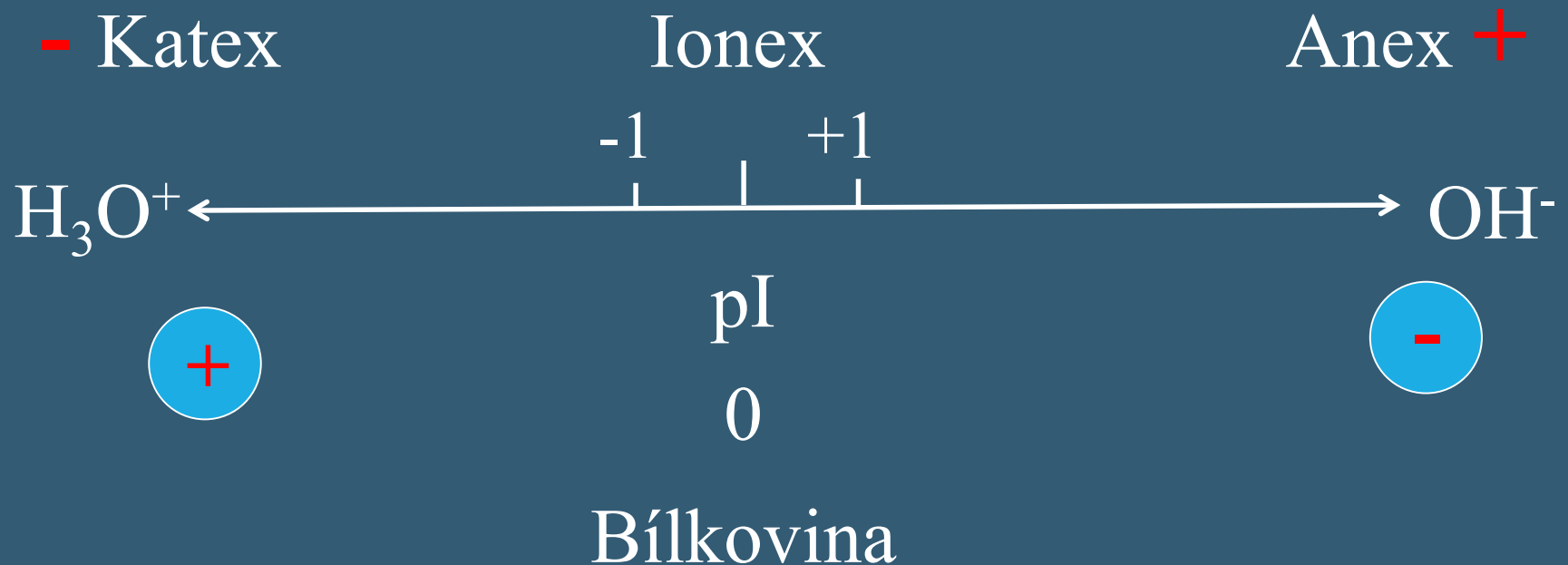
# IONEXOVÁ CHROMATOGRRAFIE

## ADSORPČNÍ IZOTERMA

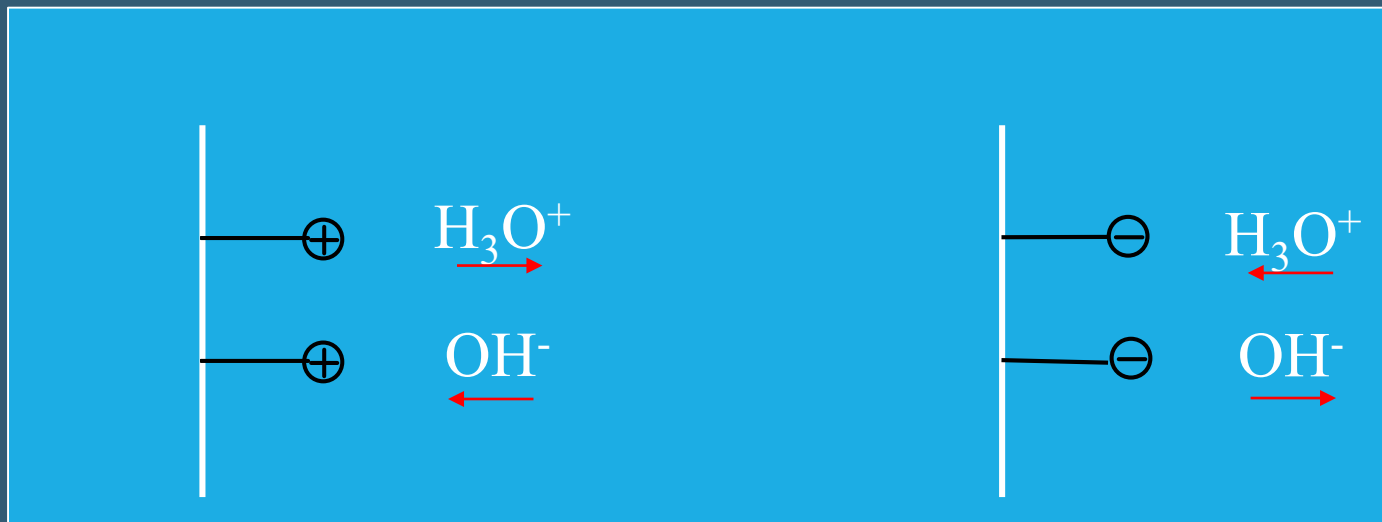


# VOLBA PODMÍNEK – pH + TYP IONEXU

pl bílkoviny je znám



# DONANŮV EFEKT



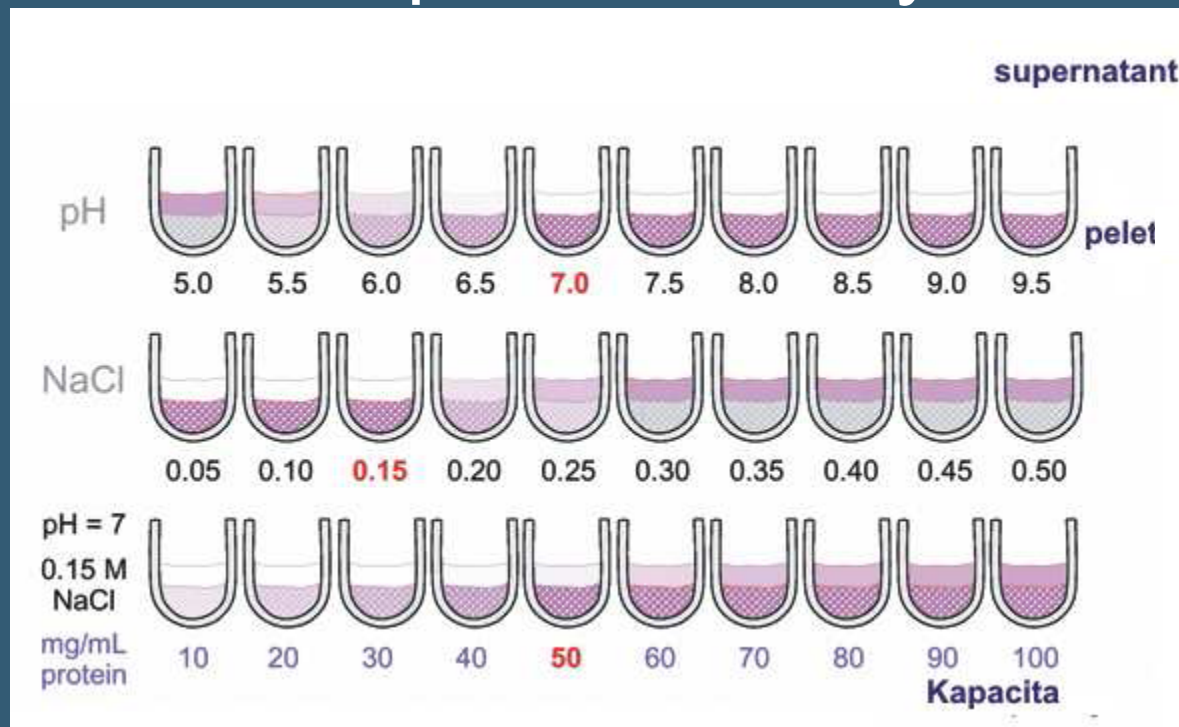
zvyšování pH

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
  - Afinity eluce

Použití – purifikace, zakoncentrování,

výměna pufru,

peptidy, proteiny, nukleotidy, oligonukleotidy,  
nukleové kyseliny

# IONEXOVÁ CHROMATOGRAFIE

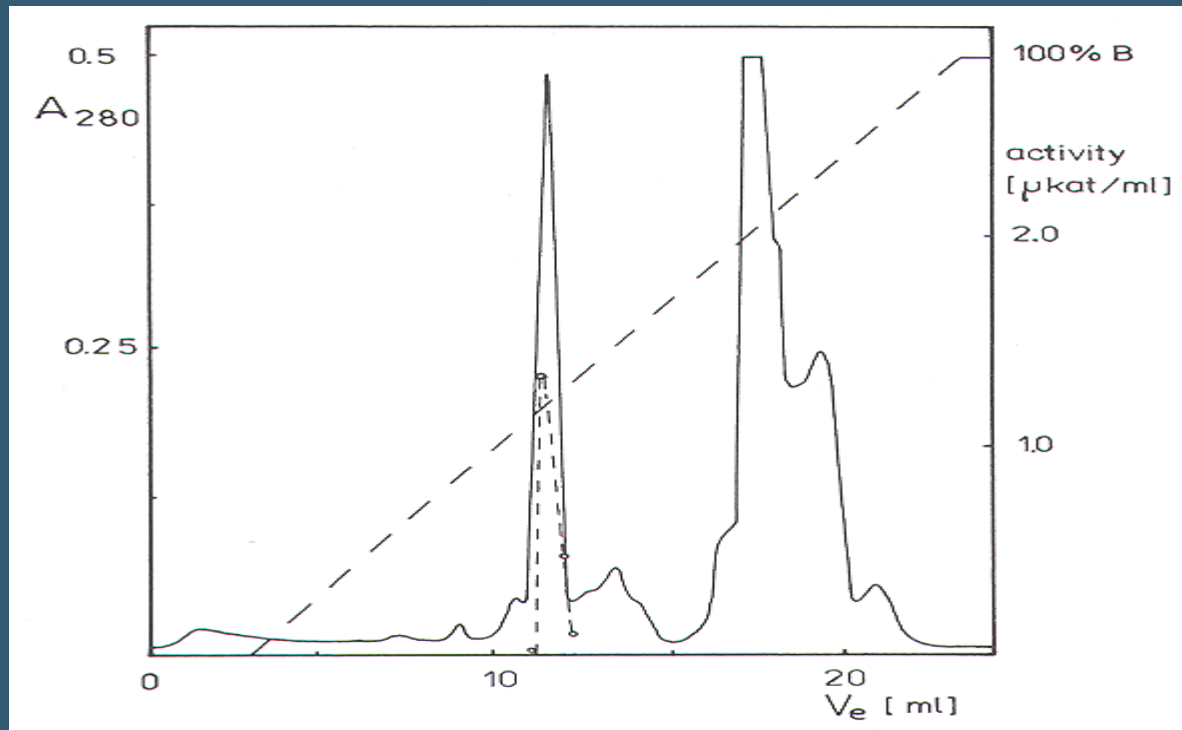


Fig. 2. Chromatography of partially purified G6P-DH on a Mono Q column. Buffers: (A) 0.05 M sodium phosphate (pH 7.4); (B) same as A but with 1 M sodium chloride; flow-rate, 1 ml/min. Lines symbol as in Fig. 1. Approximately 10 mg of protein were applied to the column.

# IONEXOVÁ CHROMATOGRRAFIE

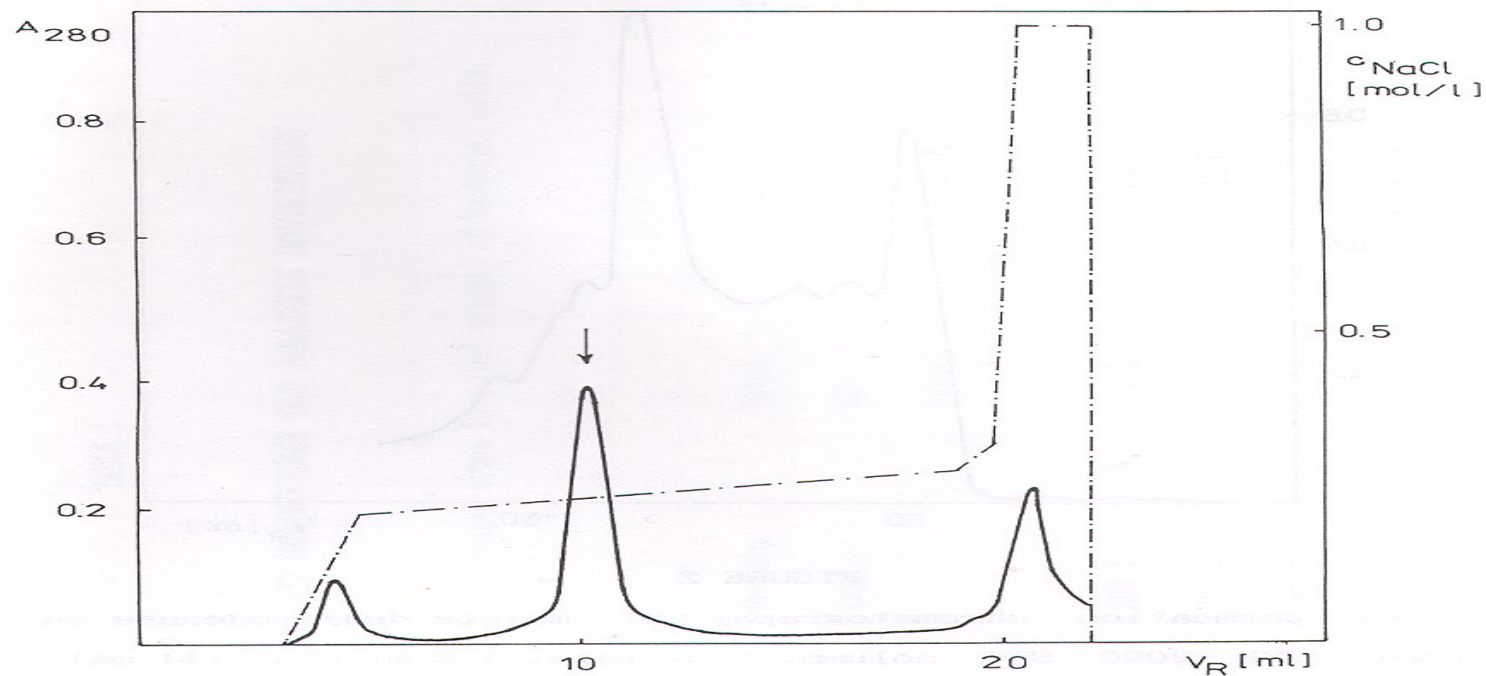
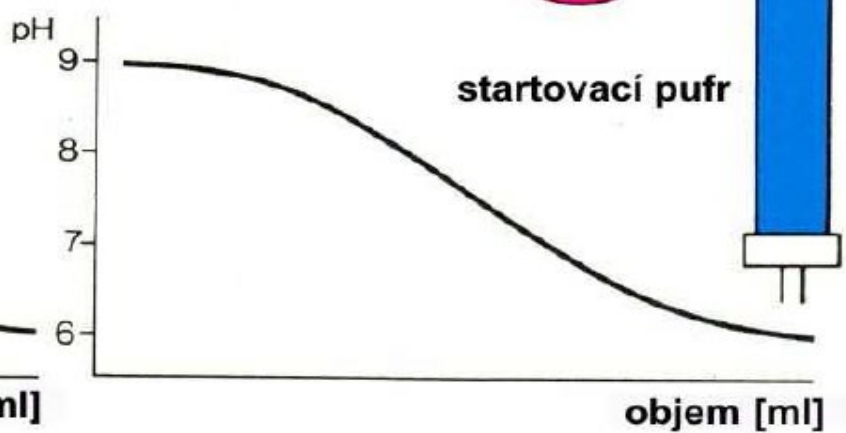
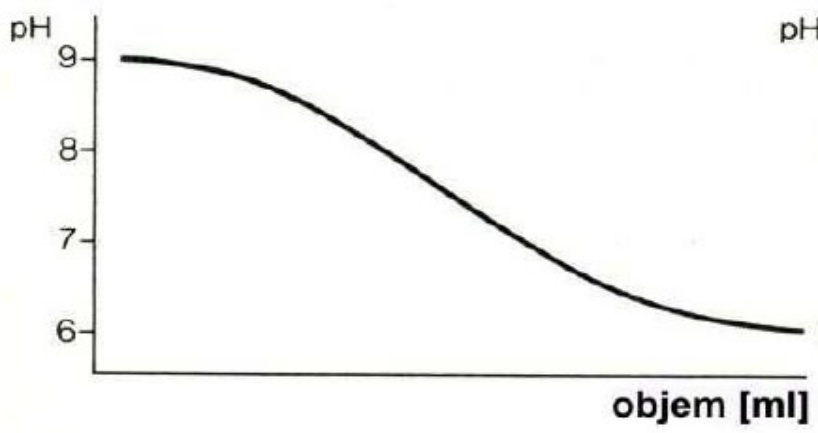
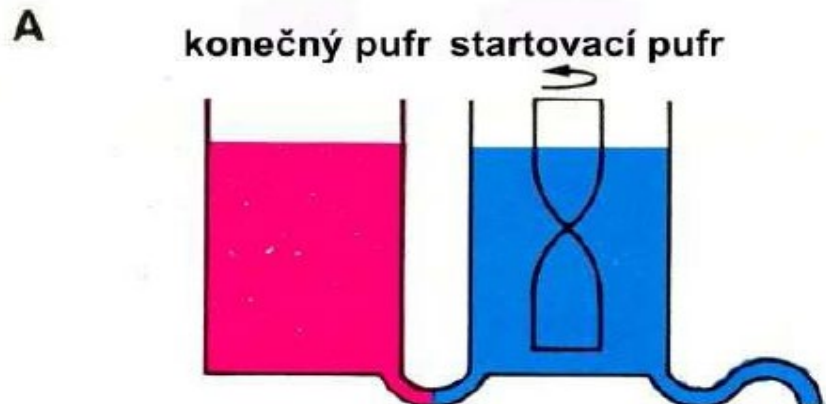


FIGURE 3

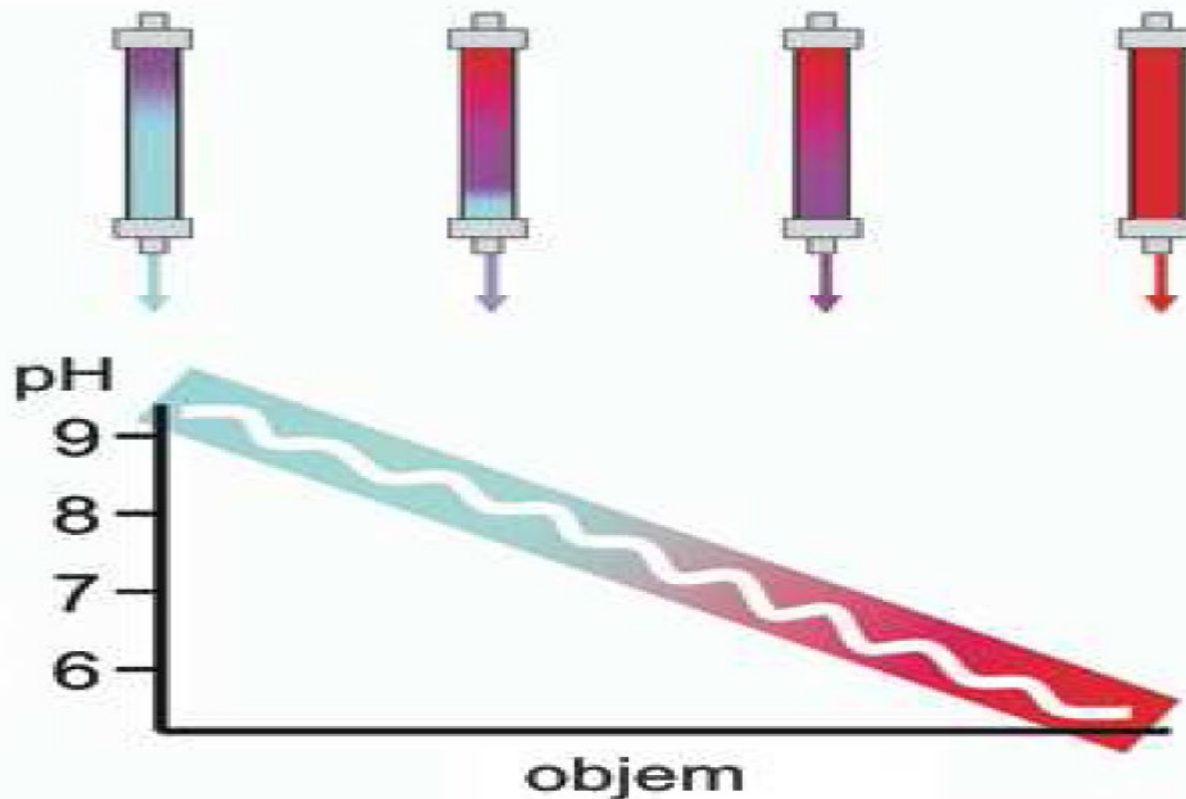
Ionex chromatography of malate dehydrogenase on a Mono Q column.  $V_e$ , elution volume; —, absorbance at 280 nm ( $A_{280}$ ); ( $\downarrow$ ) malate dehydrogenase activity; ----, NaCl gradient (buffer A, 0.02 mol/l sodium phosphate (pH 6.0); buffer B, the same as buffer A but with 1.0 mol/l NaCl);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

# CHROMATOFOKUSACE

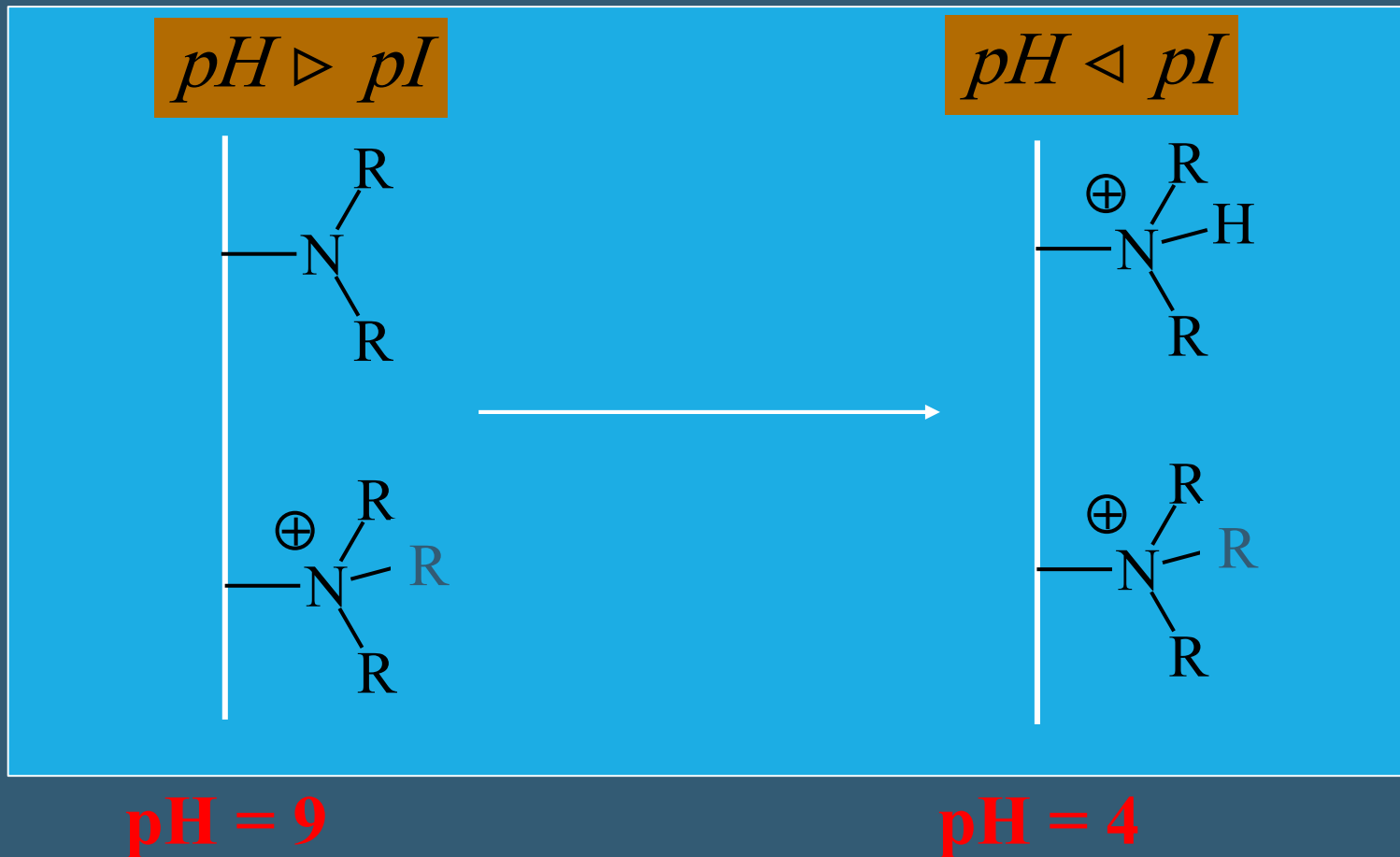


# CHROMATOFOKUSACE

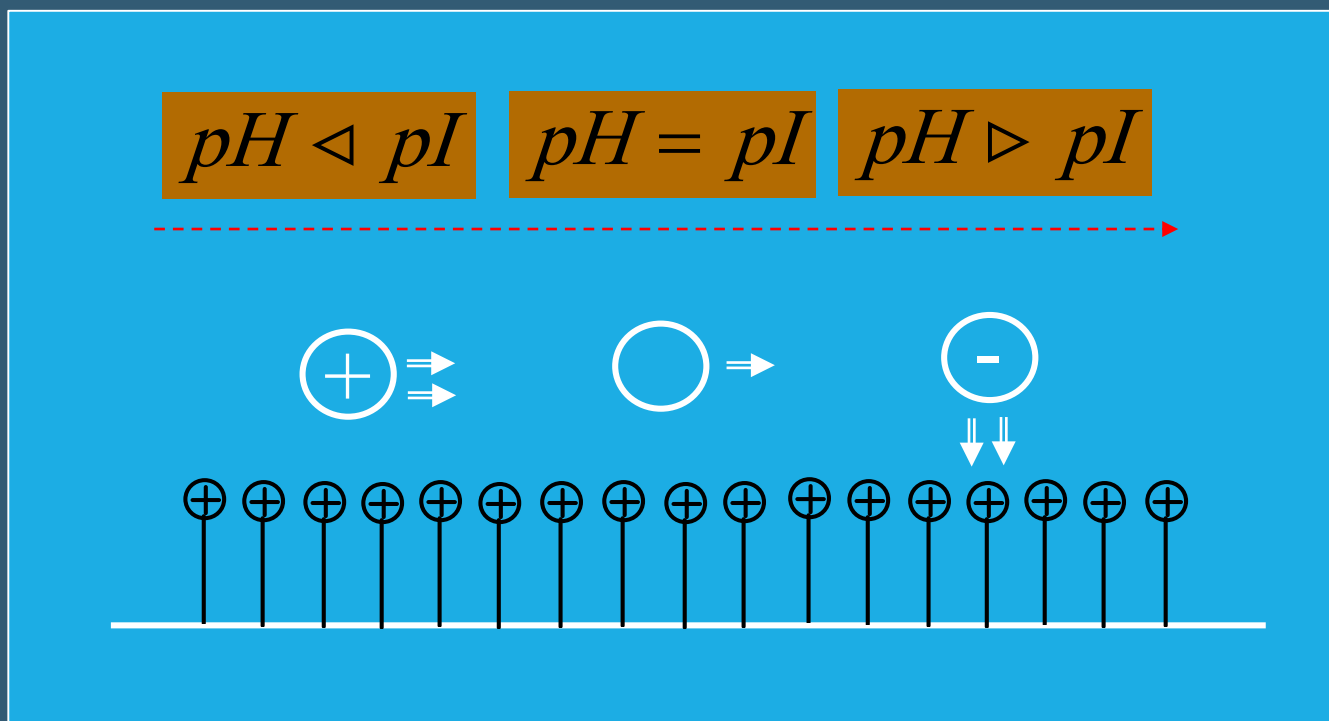
- Polybuffer (pulypufr) obsahuje ampholyty - směs látek majících různé  $pK_a$



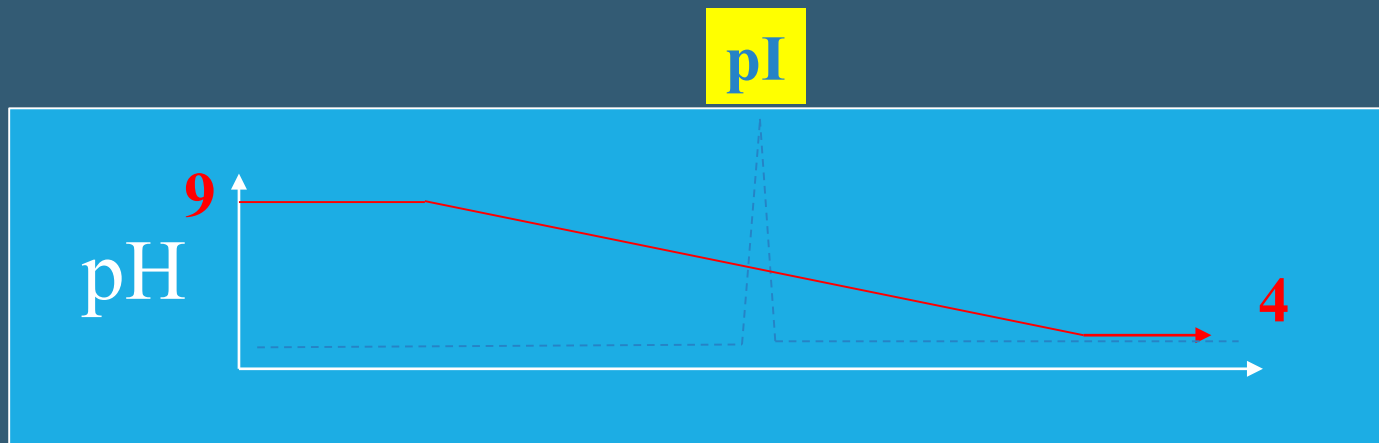
# CHROMATOFOKUSACE DĚJ NA KOLONĚ



# CHROMATOFOKUSACE CHOVÁNÍ VZORKU



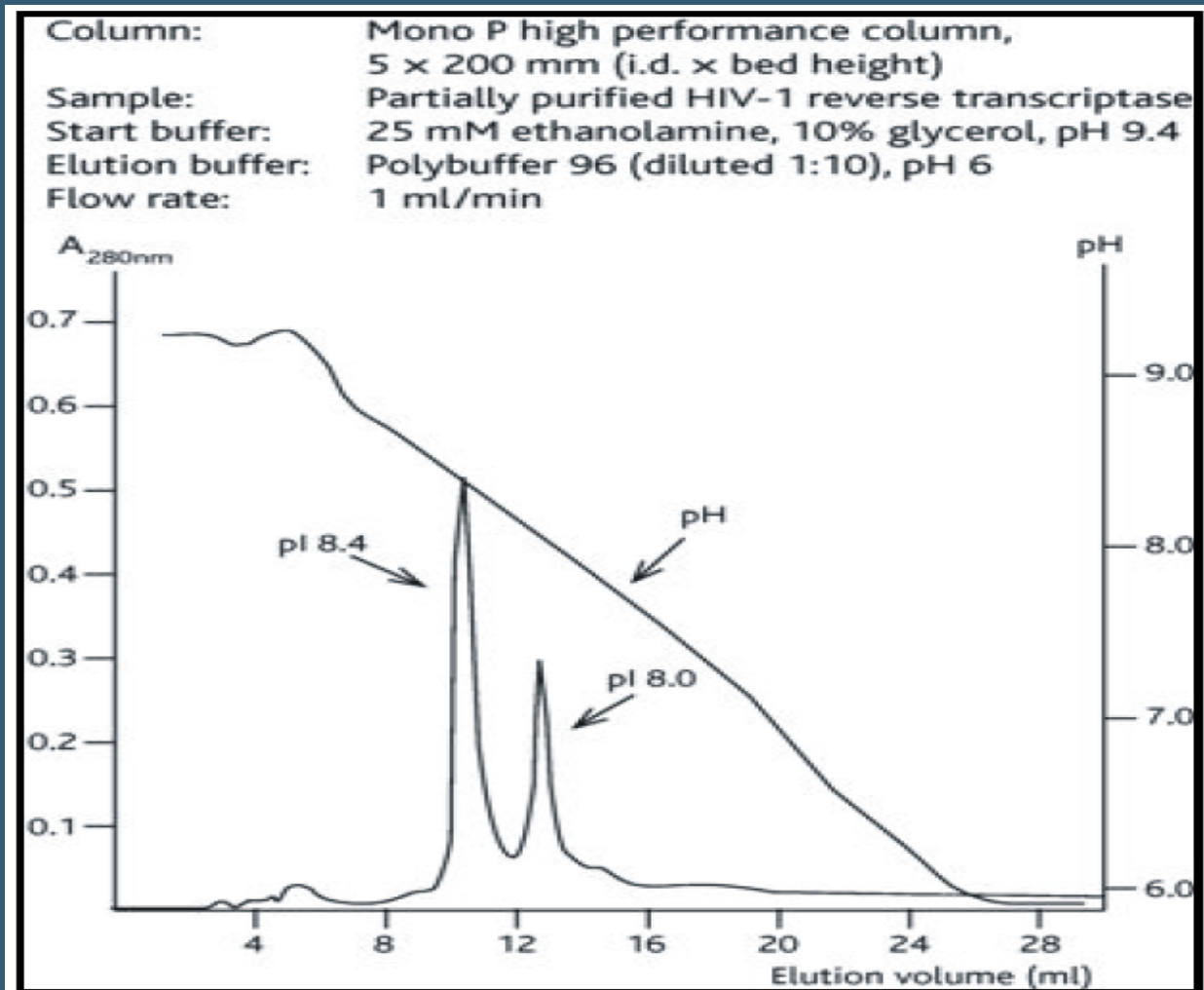
# CHROMATOFOKUSACE CHOVÁNÍ VZORKU



Použití : analytické – stanovení pI  
preparativní – purifikace bílkovin



# CHROMATOFOKUSACE



# CHROMATOFOKUSACE

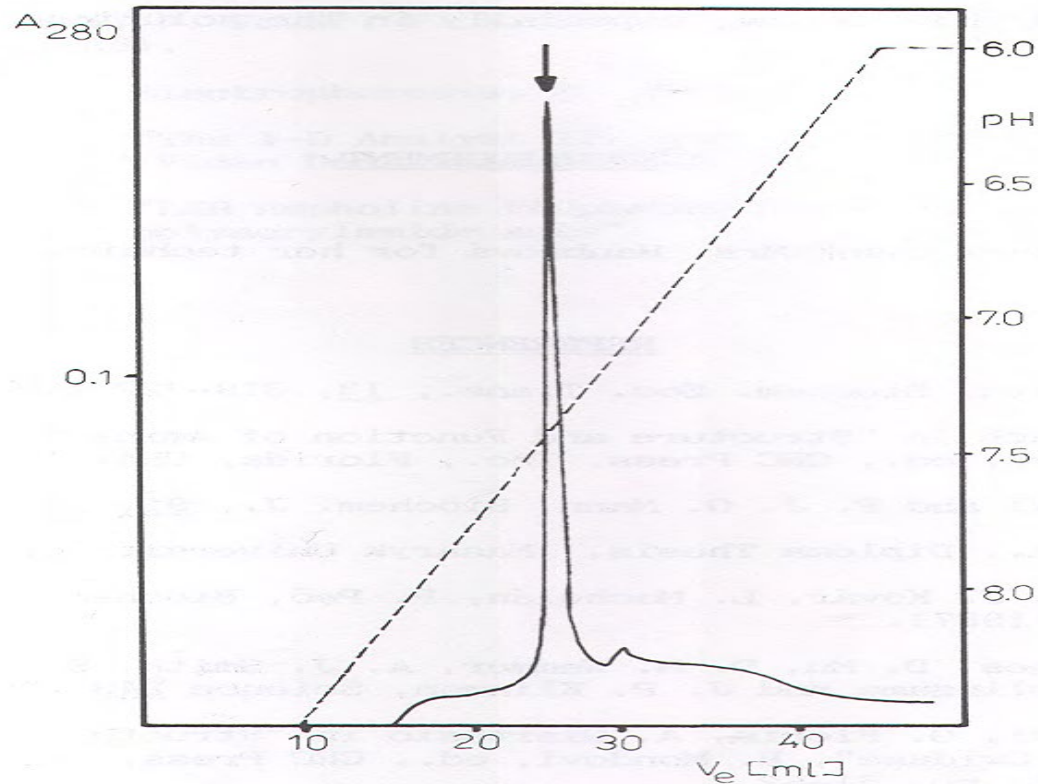
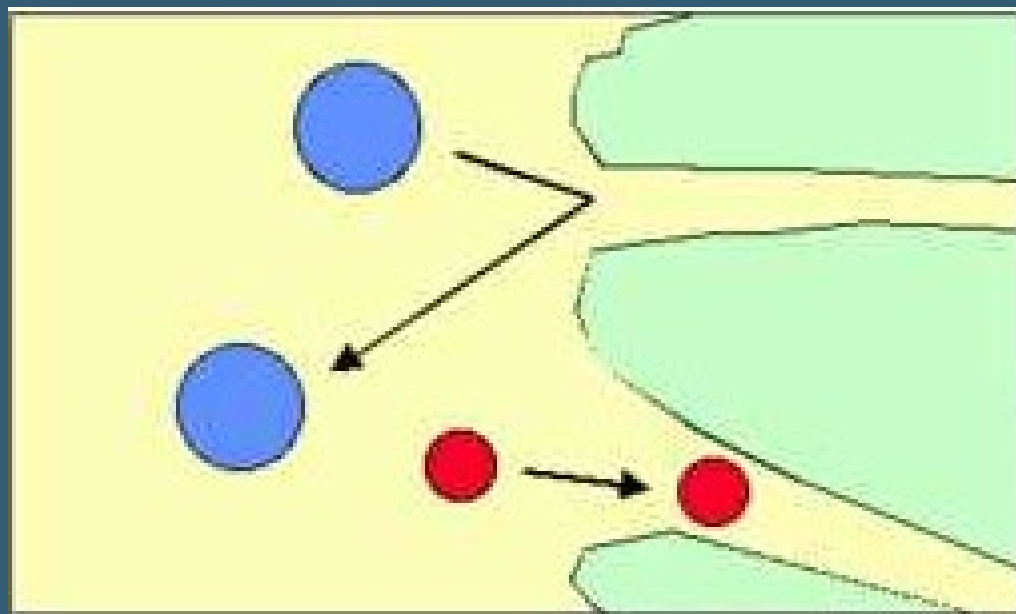


Figure 6

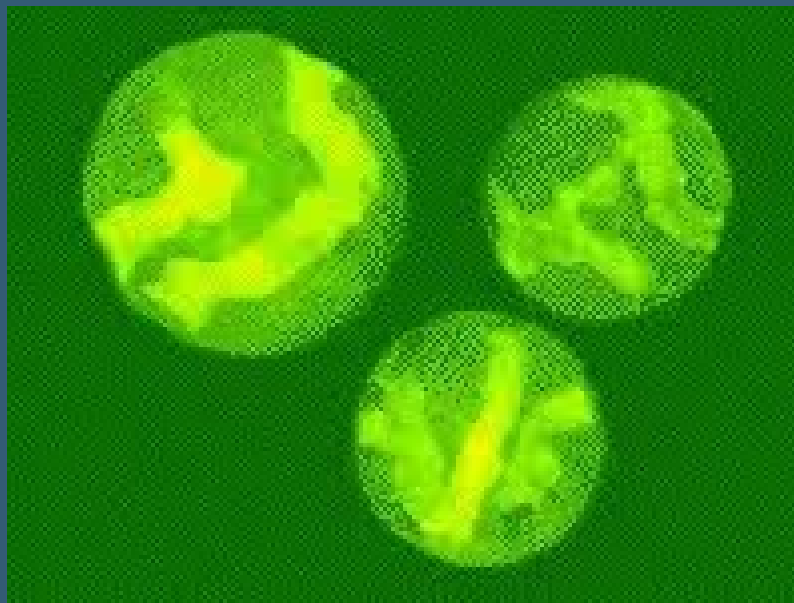
Chromatofocusing of the homogeneous DAO on Mono P column;  
---- pH value of the eluate, flow-rate 0.7 ml/min, the other  
symbols as in Fig. 1. DAO activity is indicated by an arrow.

# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE

Založena na rozdílné velikost (tvaru) molekul

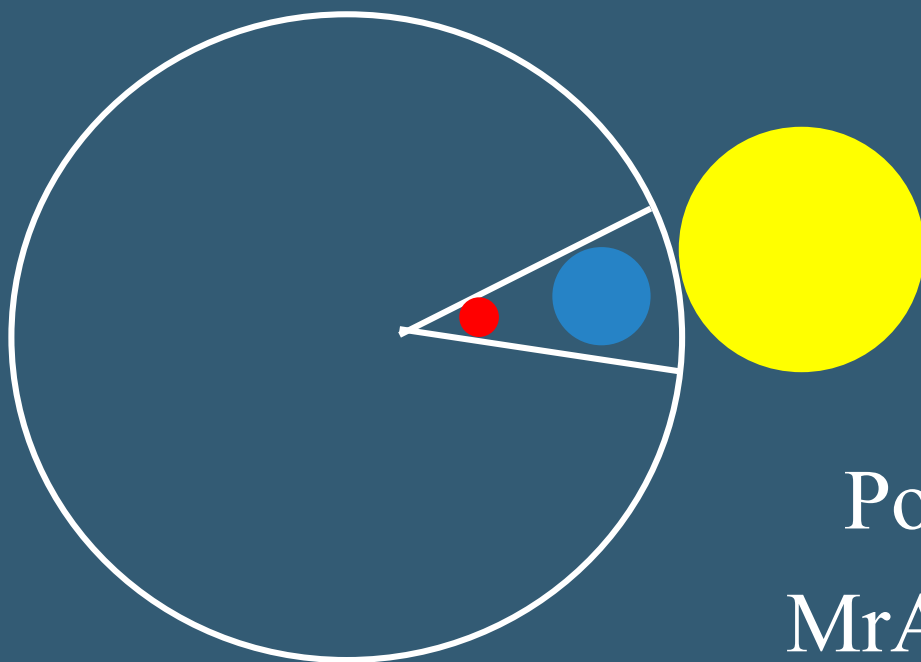


# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE



# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

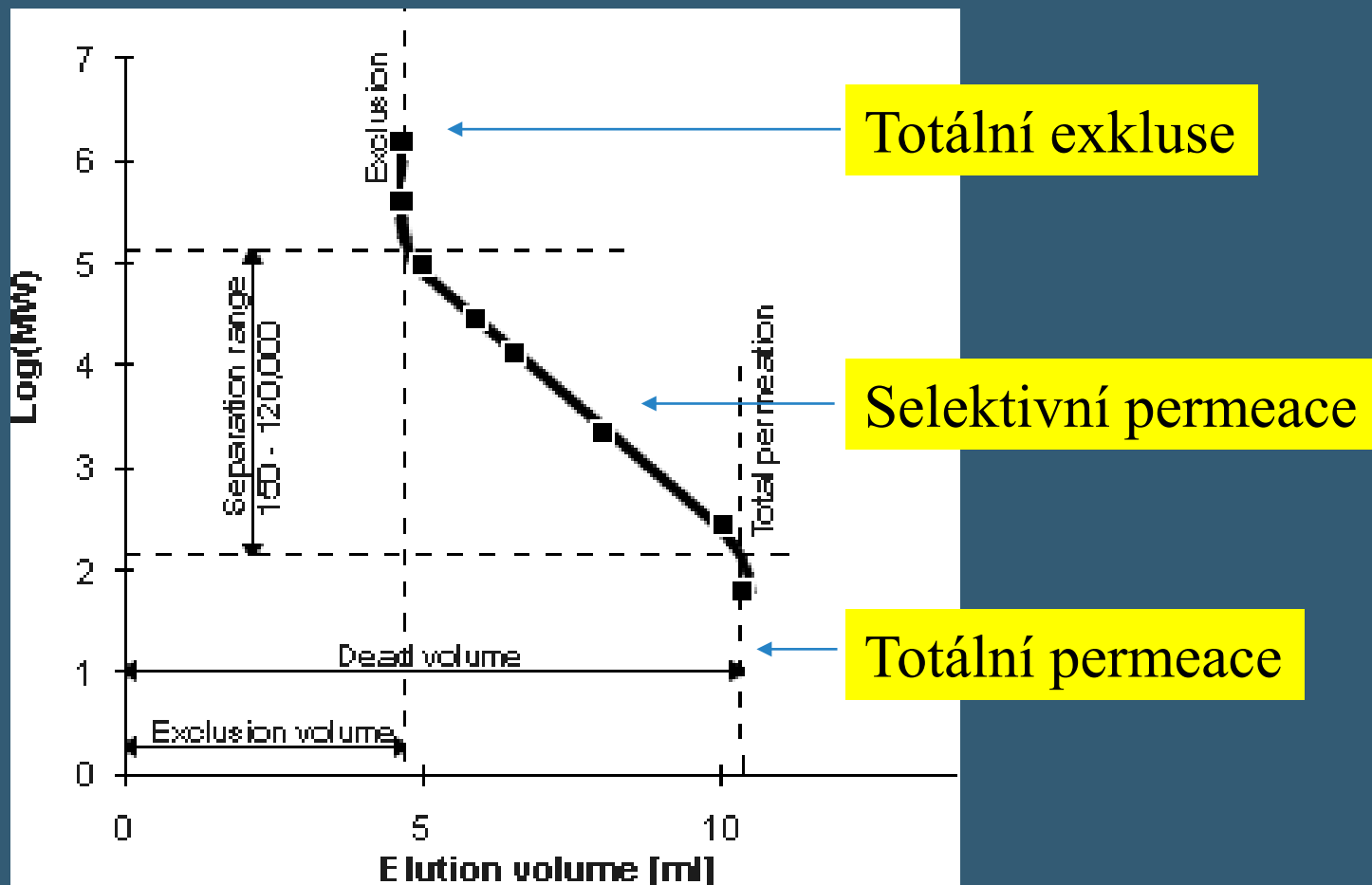
Princip - stérická exkluze  
- omezená difuze



Pořadí eluce :

$MrA > MrB > MrC$

# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE



# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

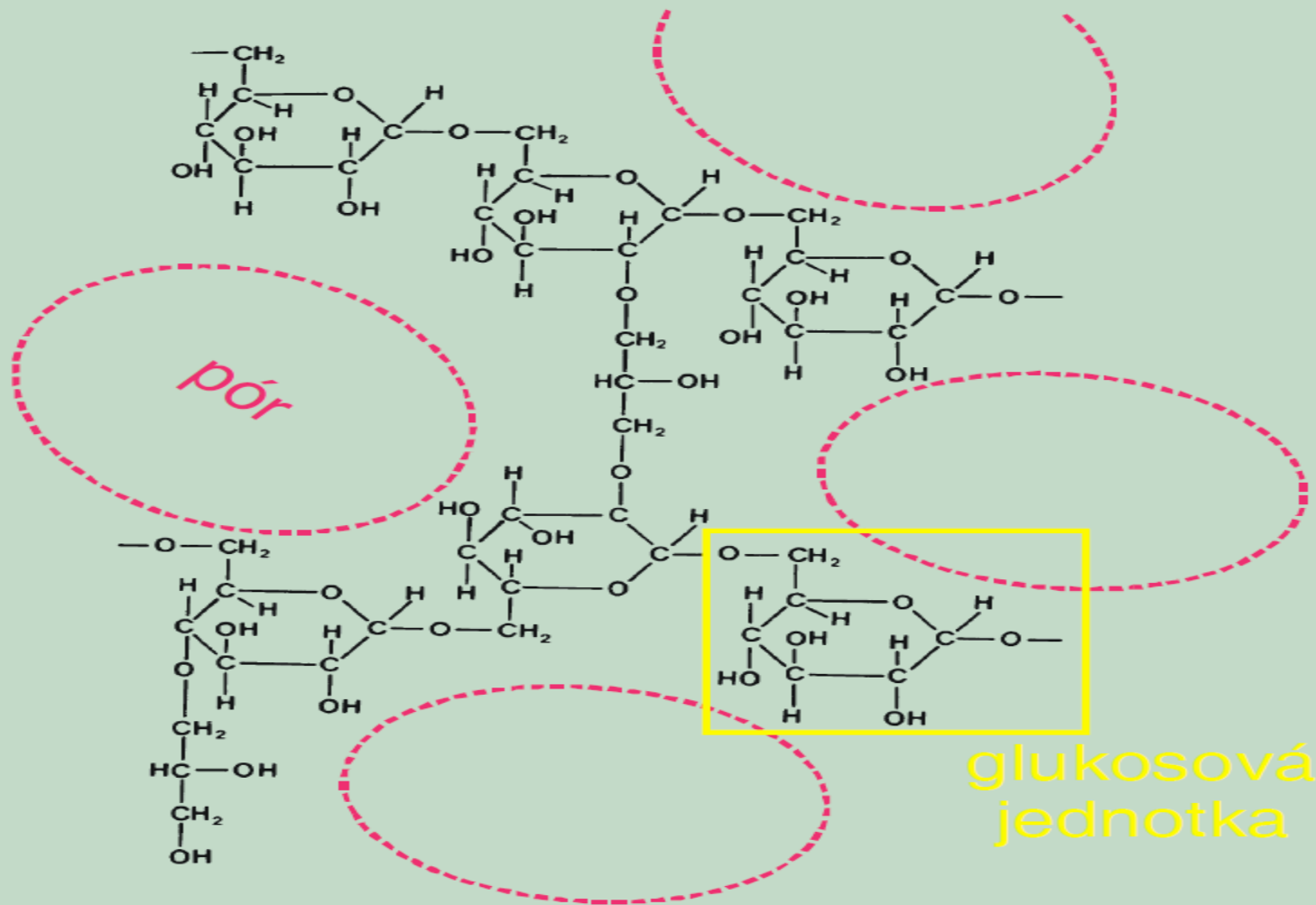
## Pharmacia LPC

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

## Pharmacia FPLC

- Superose            agarosa
- Superdex            síťovaná agarosa a dextran

# SEPHADEX

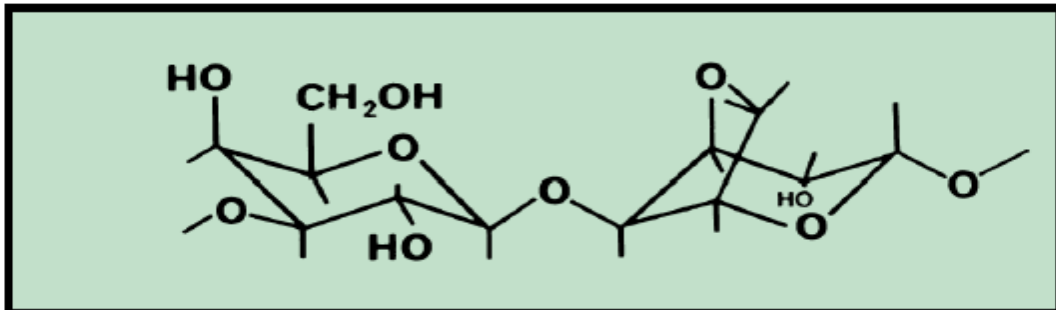
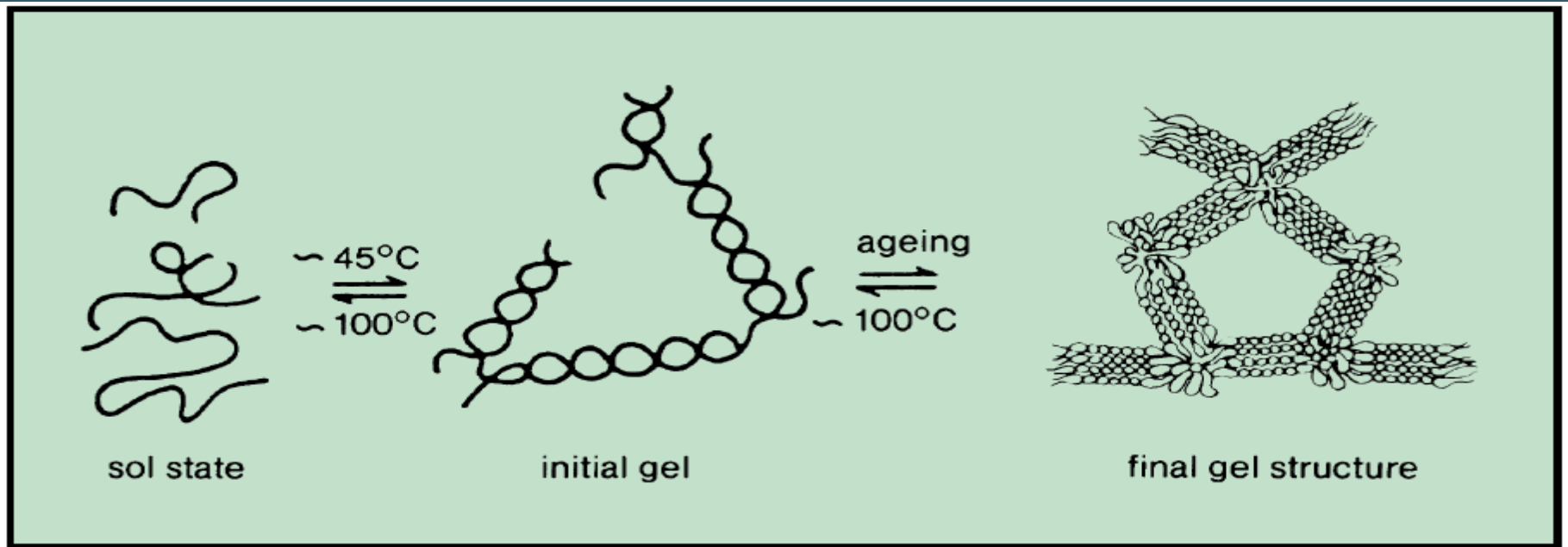




# SEPHADEX

Gel type	Dry bead size µm	Fractionation range Globular proteins	Fractionation range Dextrans	Swelling factor ml/g
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 $\mu\text{m}$	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 $\mu\text{m}$	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 CHROMATOGRRAFIE

## Bio-Rad

- BioGel P akrylamid
- BioGel A agarosa

## Tosoh Bioscience

- Toyopearl a TSKgel hydroxylovaný methacrylát

# BIOGEL P

<b>Gel</b>	<b>Particle Size Range, Hydrated Beads (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Typical Hydrated Bed Volume, ml/g of Dry Gel</b>	<b>Typical Flow Rates (cm/hr)*</b>	<b>Typical Fractionation Range/Nominal Exclusion Limit (Daltons)**, †</b>
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 CHROMATOGRRAFIE

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

Použití : purifikace, stanovení Mr, odsolování,  
..

# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAPHIE PURIFIKACE

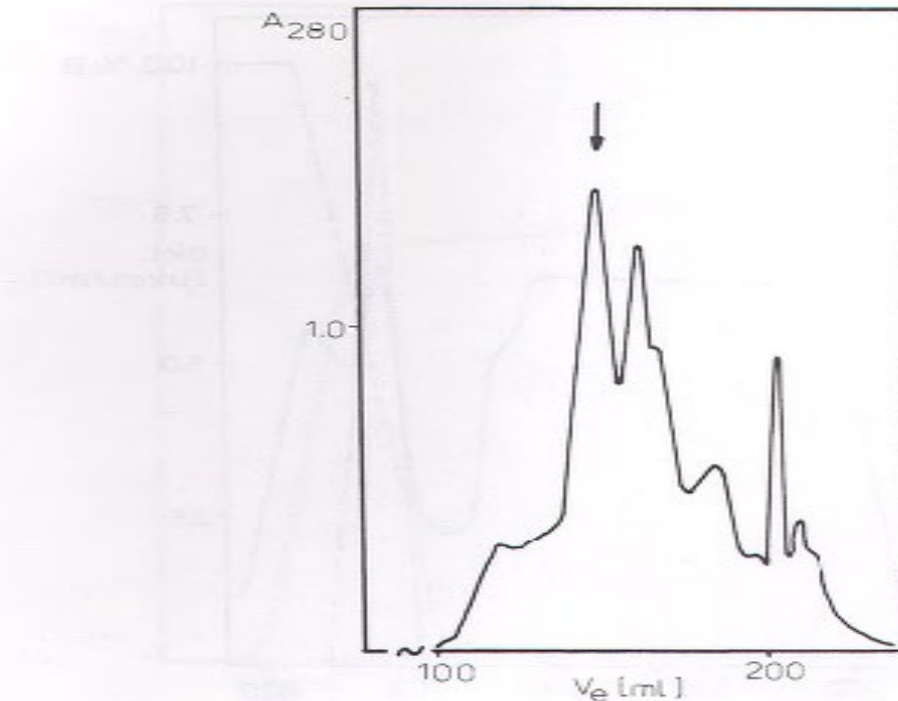
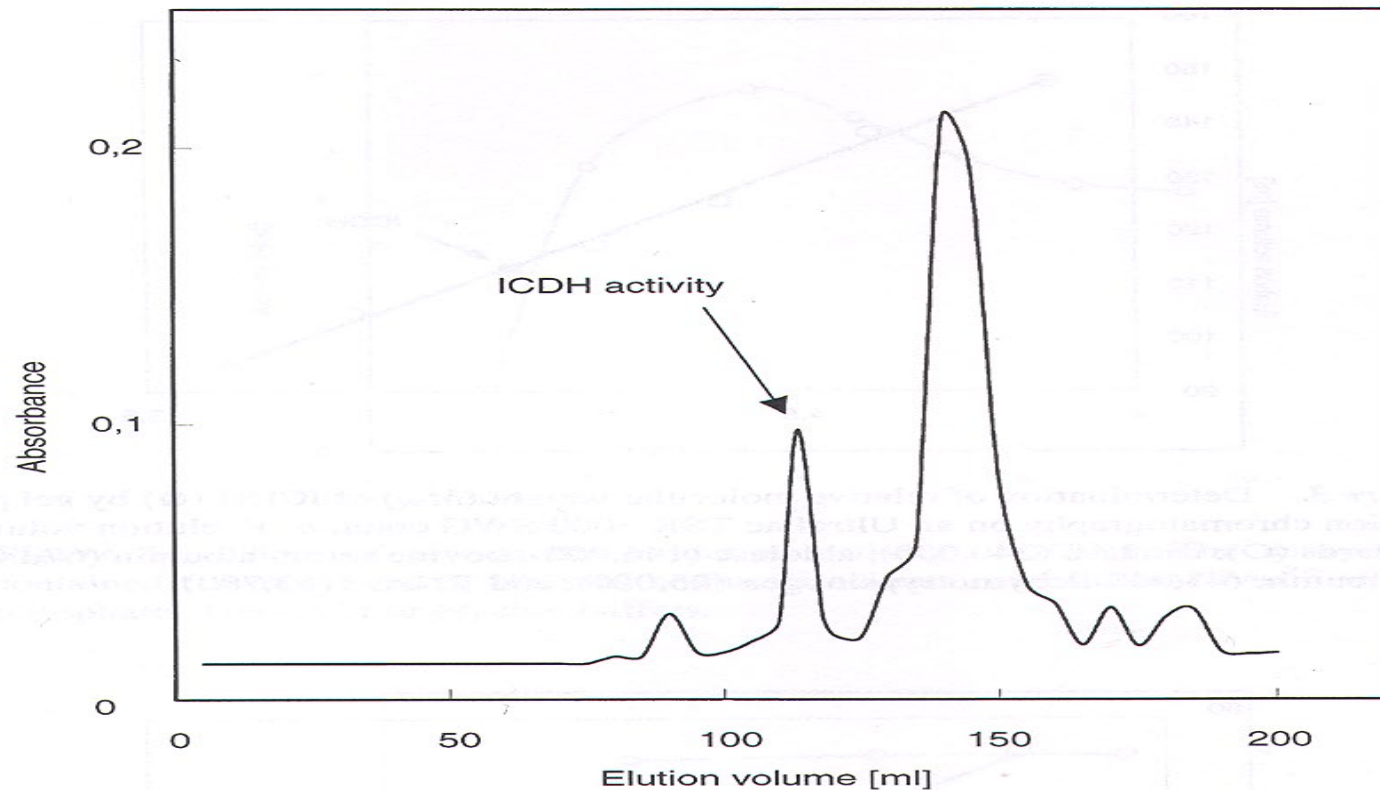


Figure 3

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 mg of protein were applied to the column.

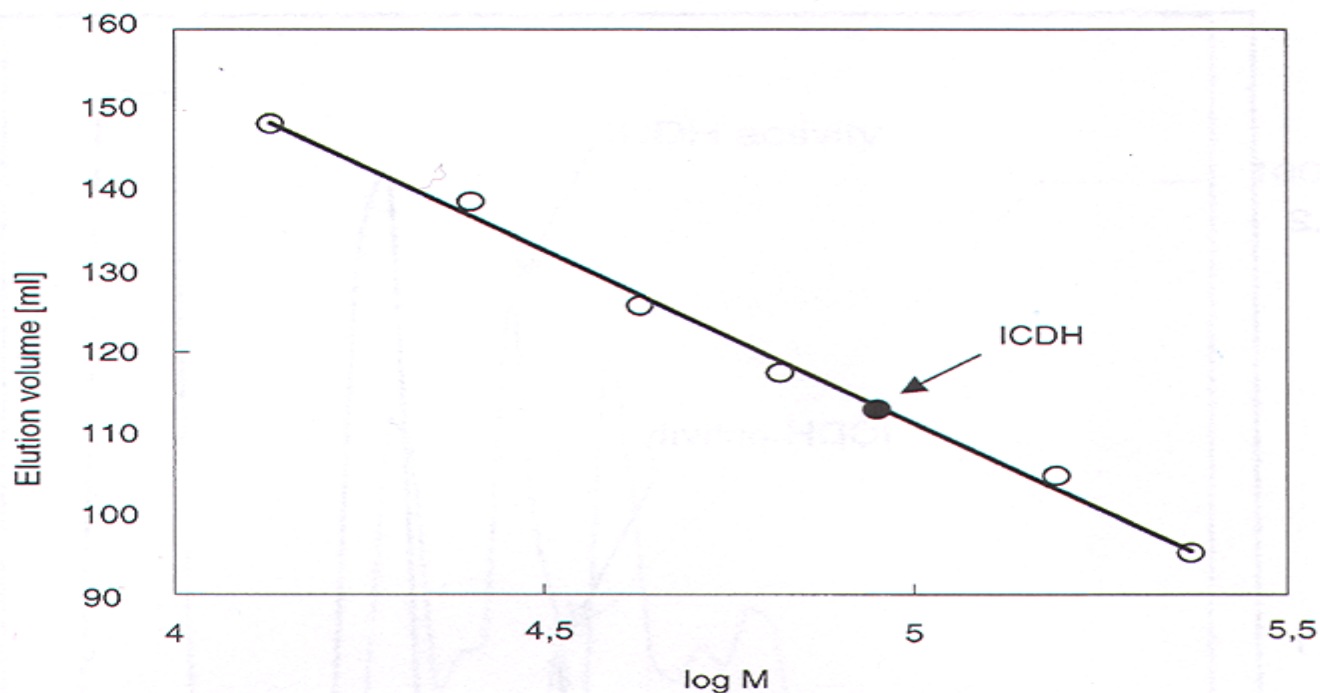


# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE STANOVENÍ MW



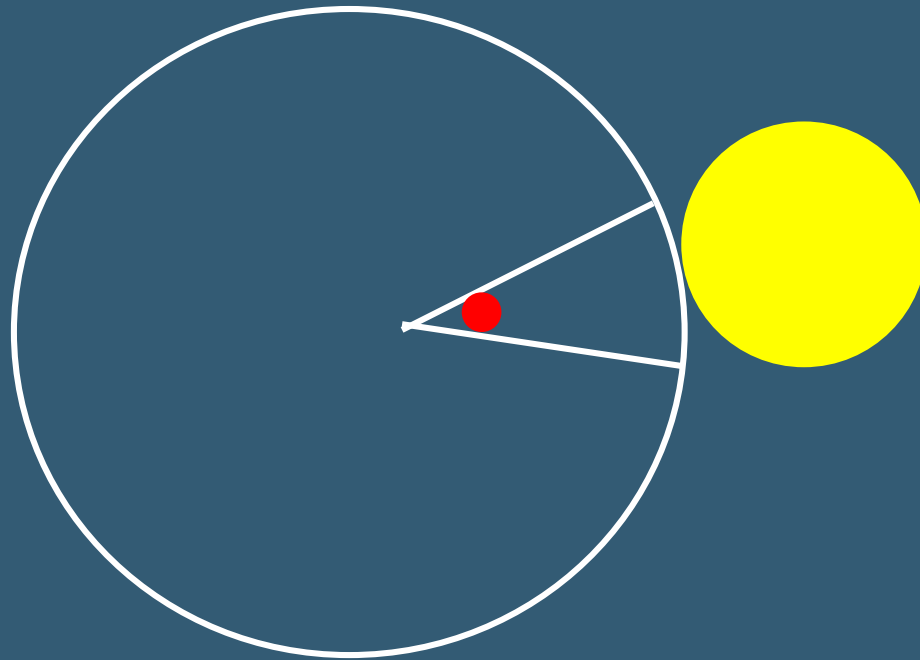
**Figure 2.** Chromatography of partially purified ICDH (after ammonium sulphate fractionation and ion exchange chromatography) on an UltraPac TSK G3000 SWG column. Buffer—20 mM sodium phosphate, pH 6.8; flow-rate 5 mL/min. ( $V_e$ ) elution volume; (—)  $A_{280}$ ; (---) ICDH activity. Approximately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

# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE STANOVENÍ MW

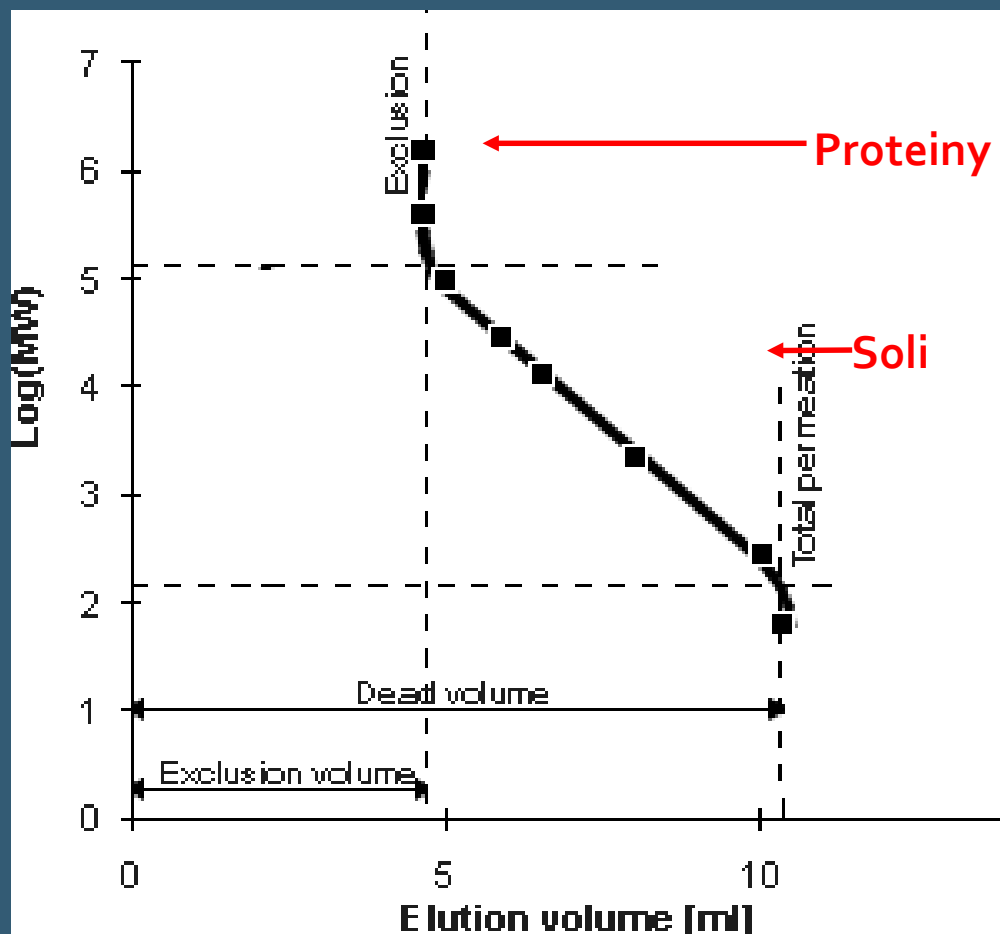


**Figure 3.** Determination of relative molecular weight ( $M_w$ ) of ICDH (●) by gel permeation chromatography on an UltroPac TSK 3000 SWG column.  $V_e$  elution volume; standards (O): catalase (240,000), aldolase (146,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), chymotrypsinogen (25,000),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

# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE ODSOLENÍ (VÝMĚNA PUFRŮ)

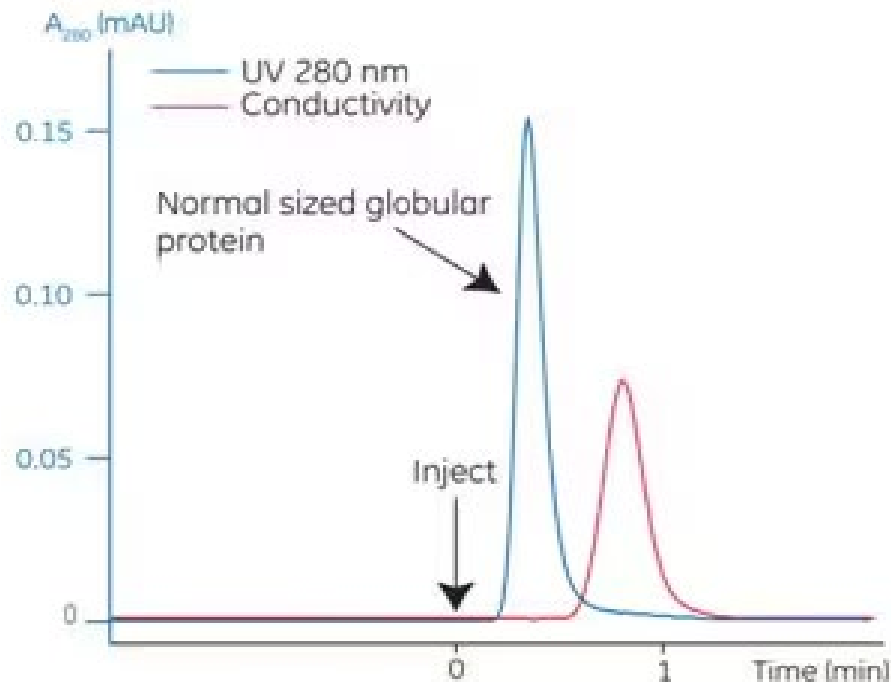


# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE ODSOLENÍ (VÝMĚNA PUFRŮ)

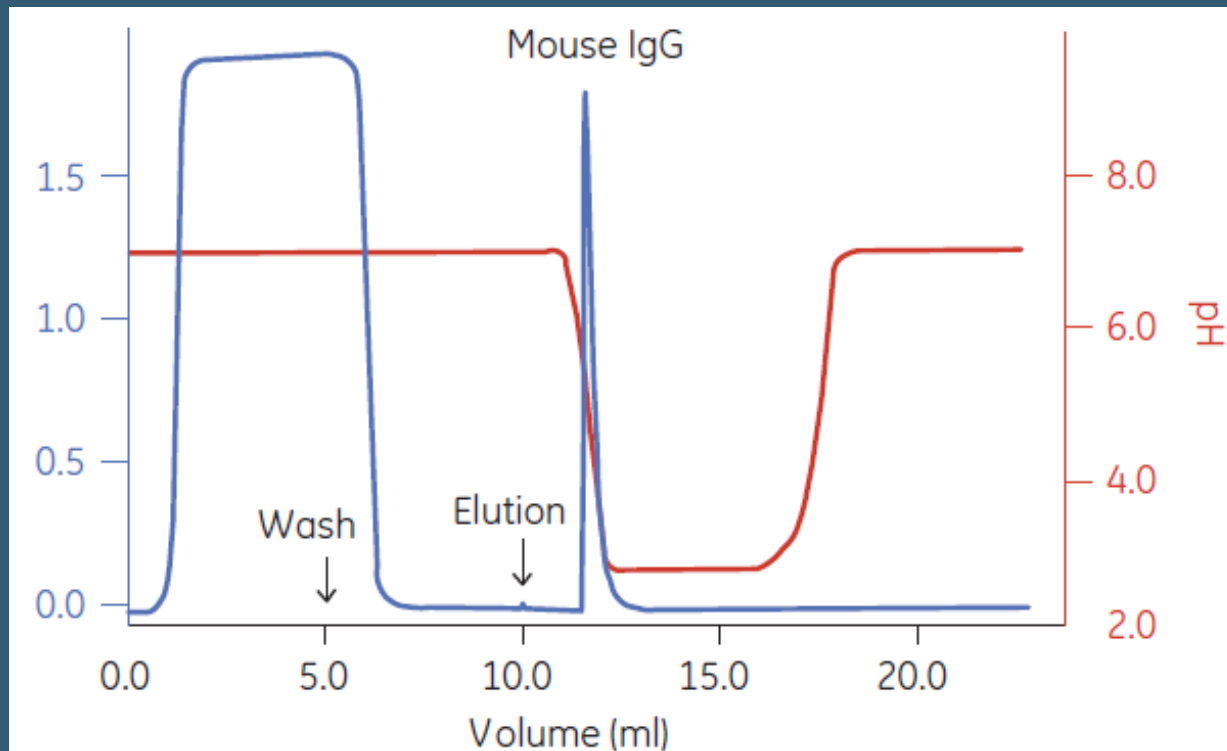


# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE ODSOLENÍ

Column: HiTrap Desalting  
Sample: Normal sized globular protein in 20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, 500 mM imidazole, pH 7.4  
Buffer port (A1): 20 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride, pH 7.0

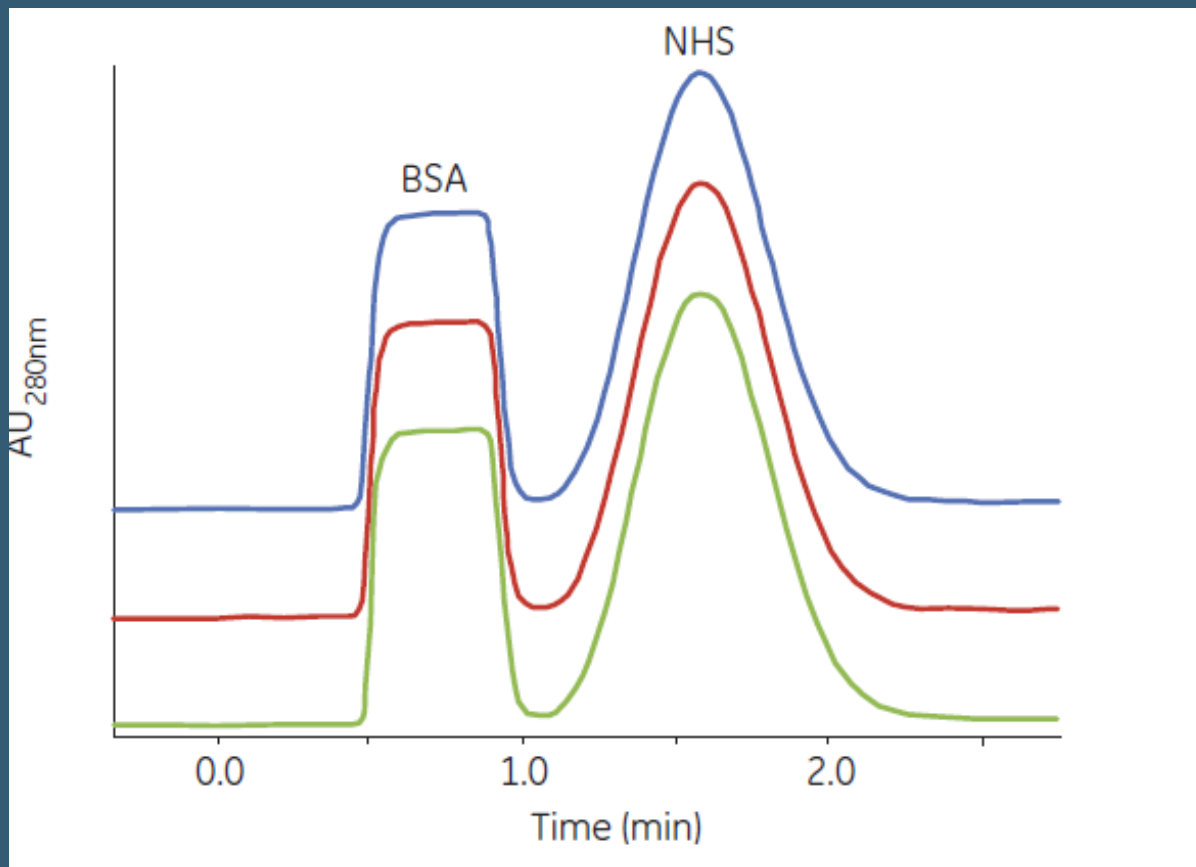


# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE VÝMĚNA PUFRŮ

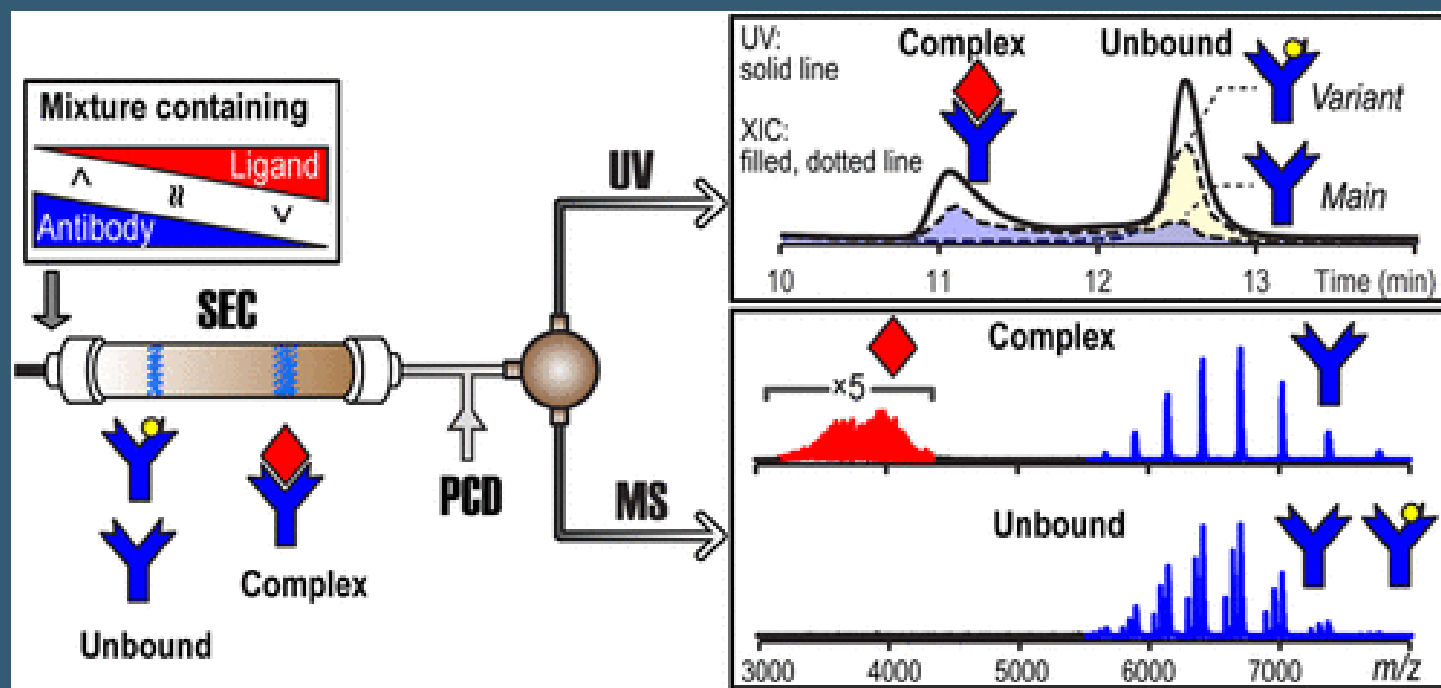


# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

„ODSOLENÍ“



# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE STUDIUM AFINITNÍCH INTERAKCÍ



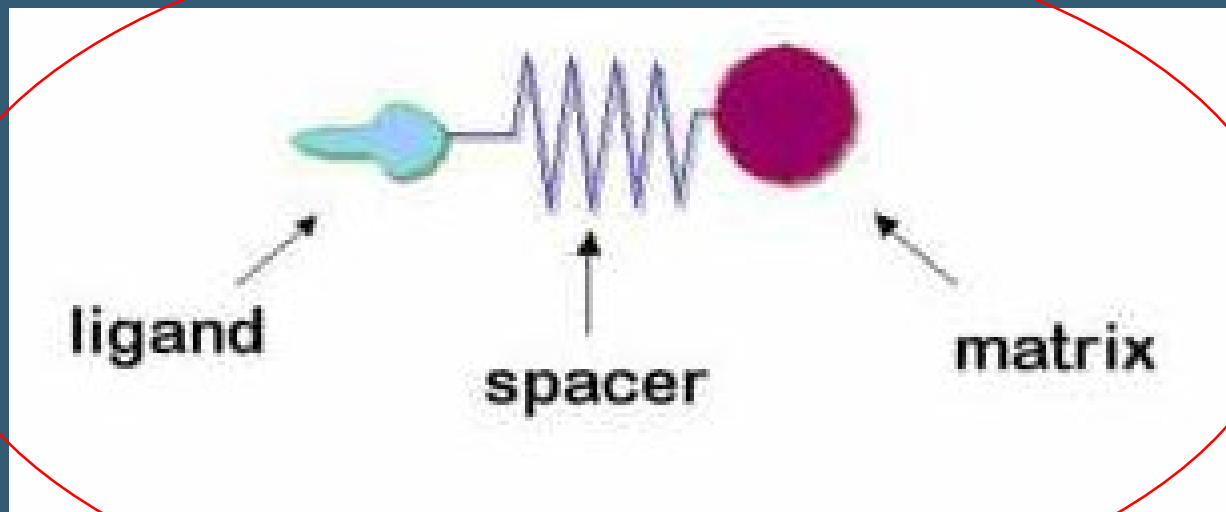


# GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE KOLONY

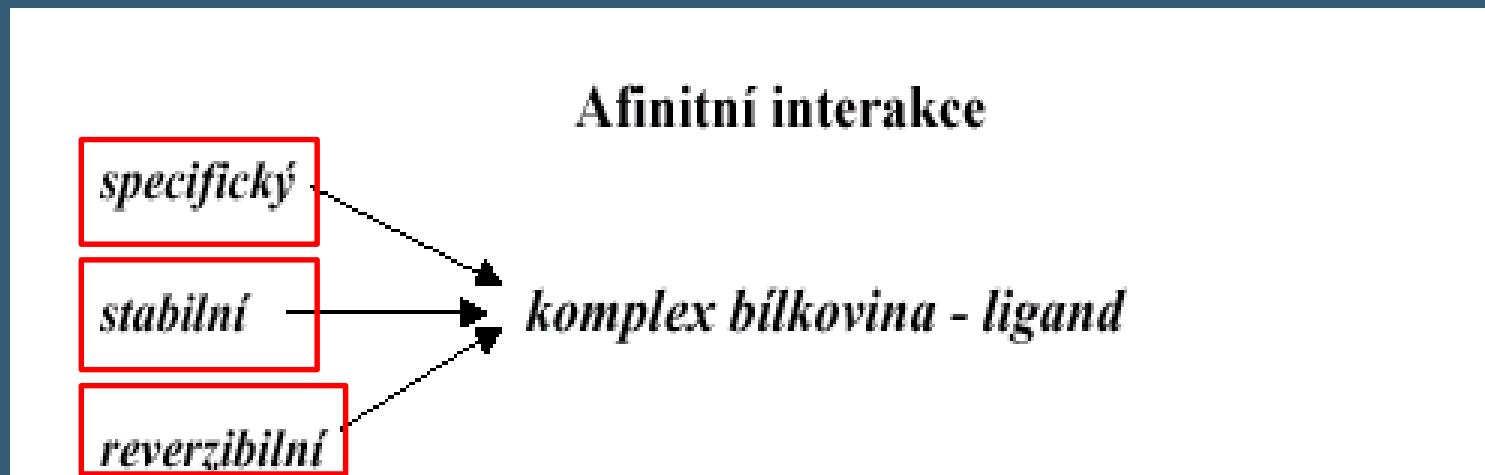


# AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

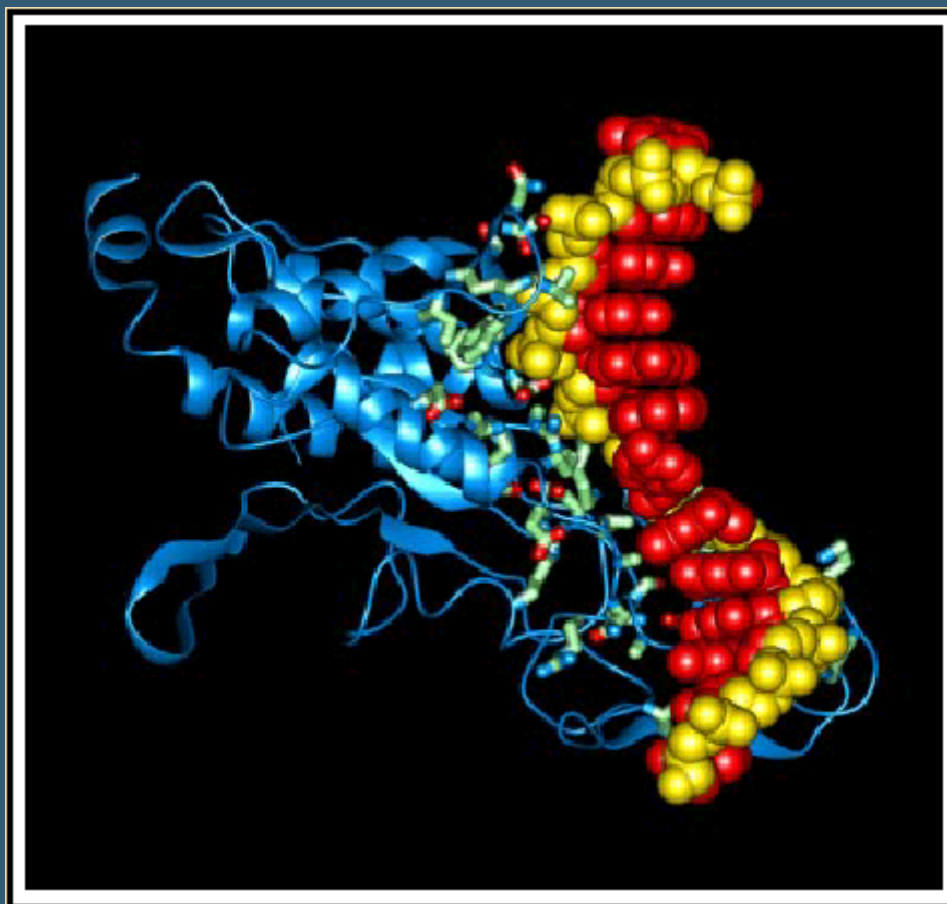
Afinant



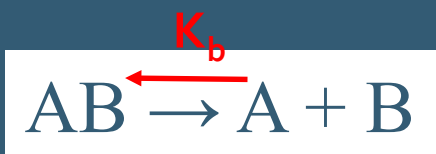
# AFINITNÍ INTERAKCE



# INTERAKCE MEZI DNA A ENDONUUKLEASOU



# AFINITNÍ PÁRY

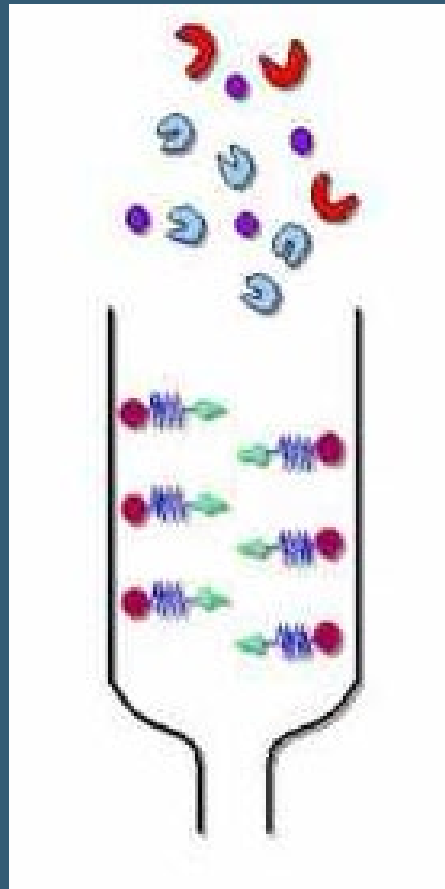


$$K_D = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

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	$10^{-14} - 10^{-6}$

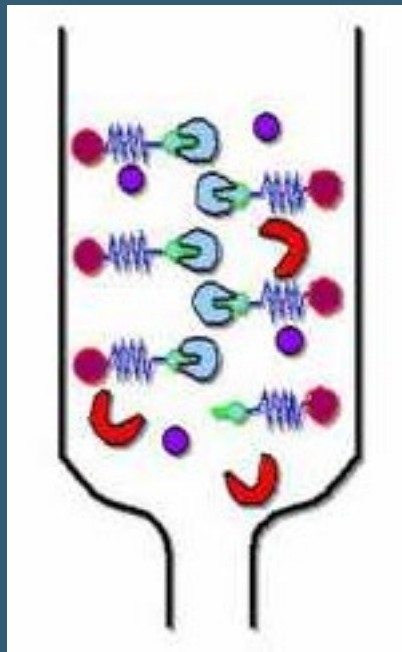
# AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

## NANESENÍ VZORKU



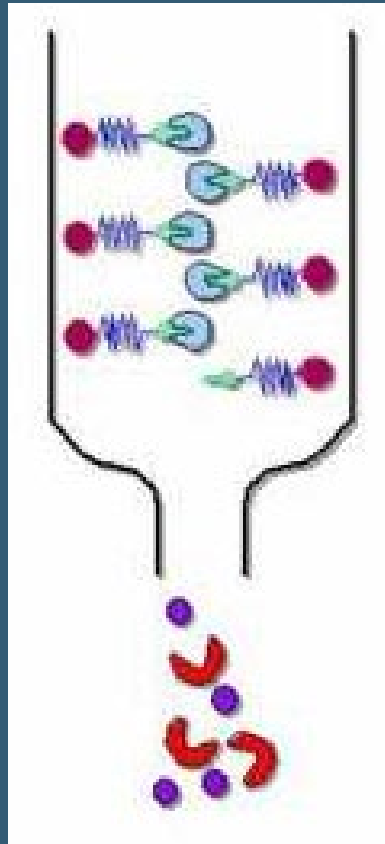
# AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

## VZNIK INTERAKCE



# AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

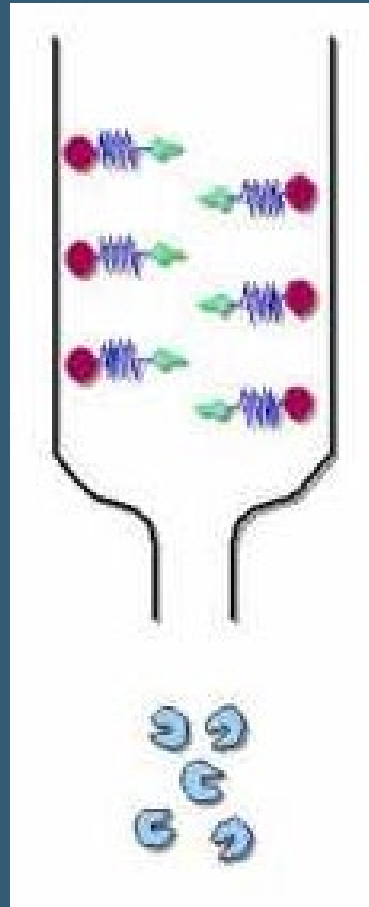
## VYMYTÍ BALASTŮ



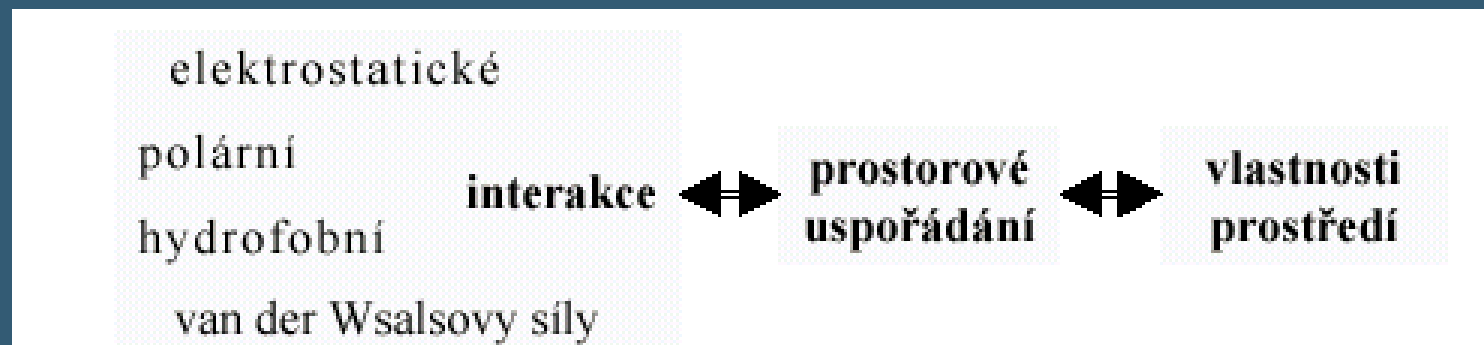


# AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

## ELUCE

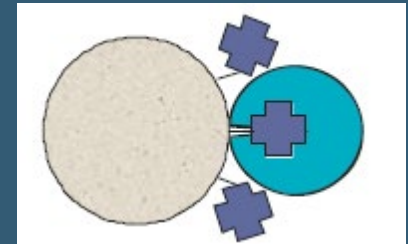
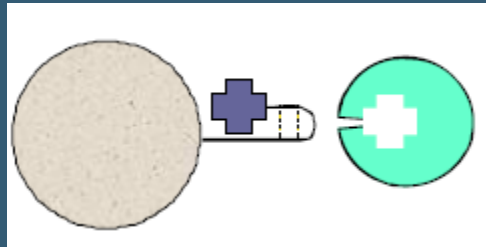
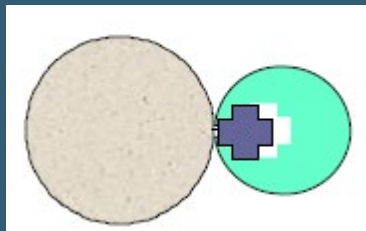
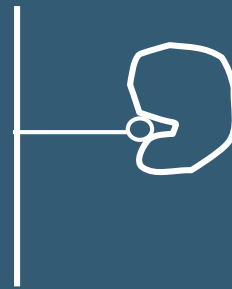


# AFINITNÍ INTERAKCE



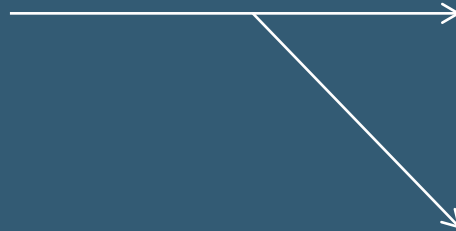
# PŘEDPOKLADY PRO VZNIK KOMPLEXU

- Sterické – použití raménka (spacer)



# PŘEDPOKLADY PRO VZNIK KOMPLEXU

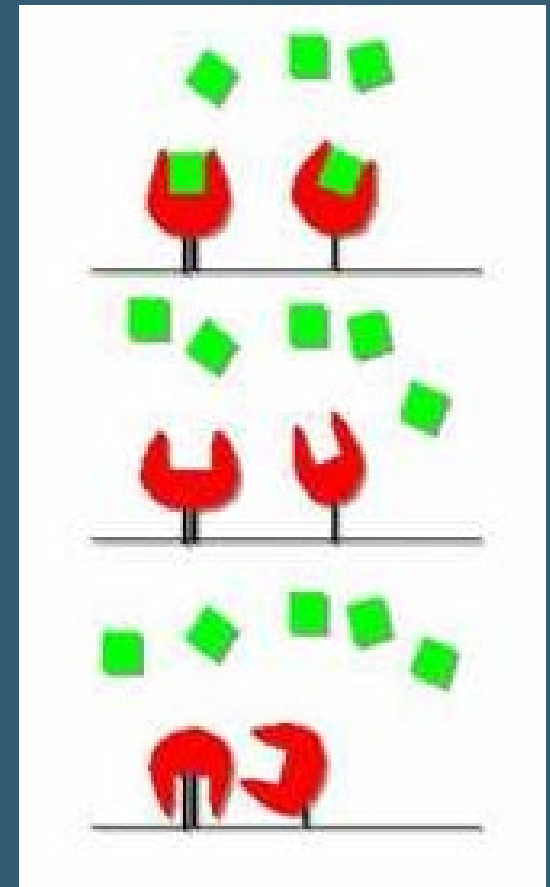
• Konformační



• Vazebné



• Optimální pH, iontová síla



# STACIONÁRNÍ FÁZE

- velké póry umožňující průnik velkých molekul
- co nejnižší nespecifické adsorpce

nejčastěji agarosa (Sepharosa)

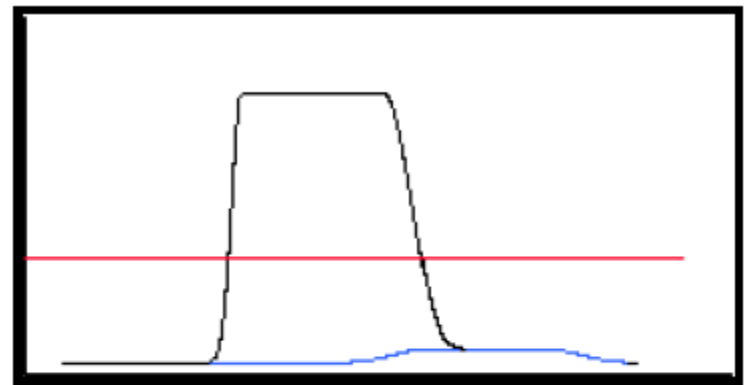
ligand kovalentně navázaný přes –OH skupinu

cukerné jednotky nosiče

# PROVEDENÍ

## Nanesení vzorku – nízká iontová síla

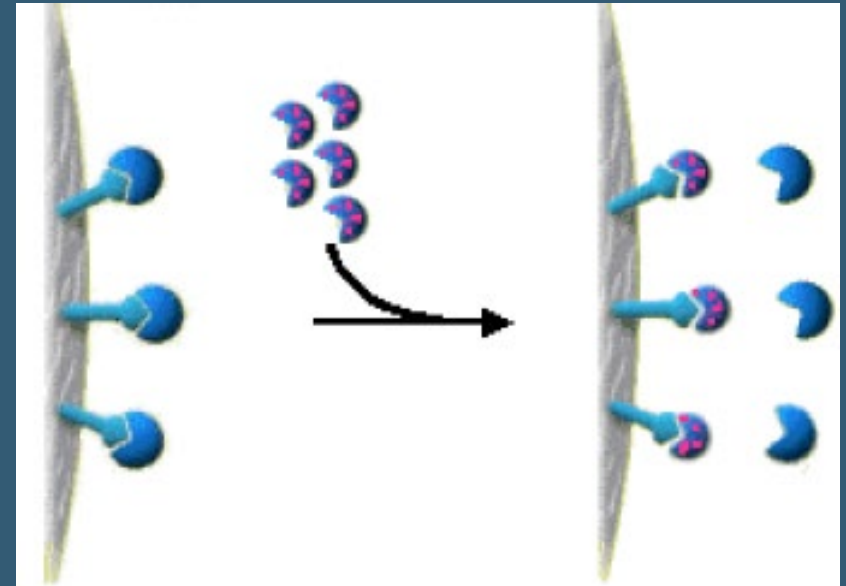
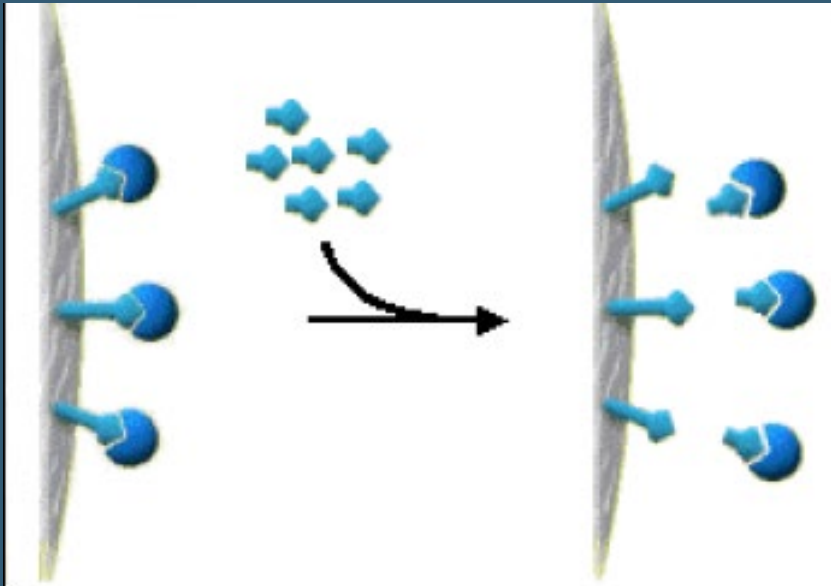
$K_D > 10^{-4}$  ~ slabá interakce



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

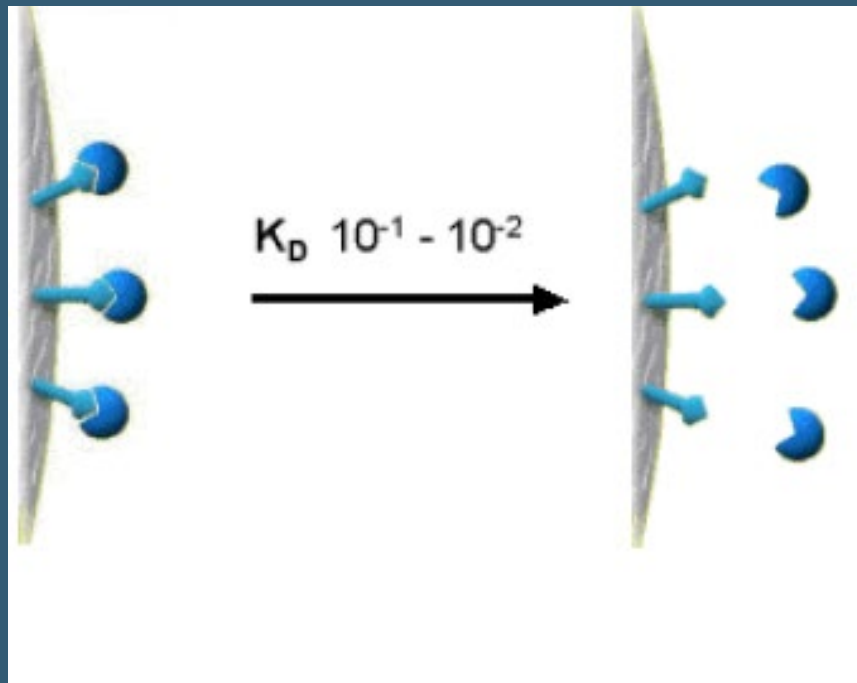
# ELUCE

- Eluce – selektivní - volným ligandem nebo kompetičním činidlem



# ELUCE

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



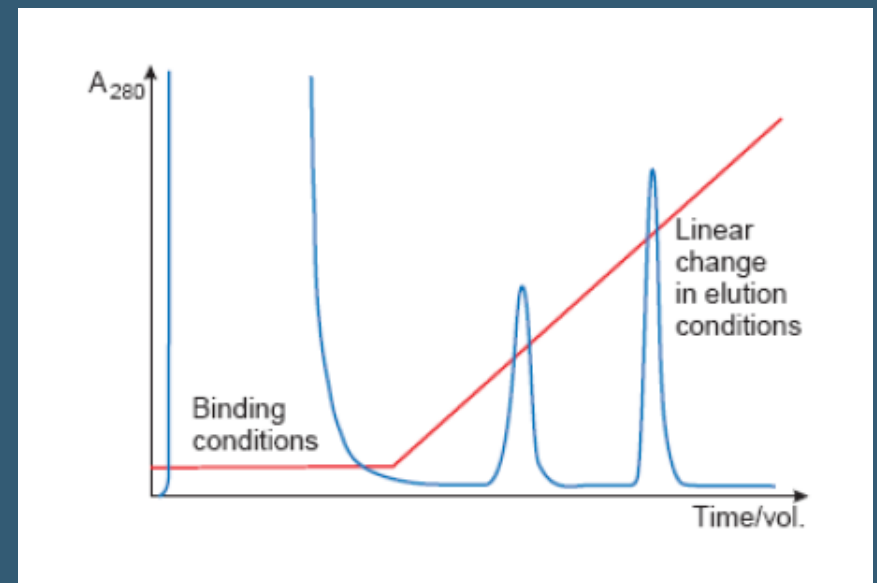
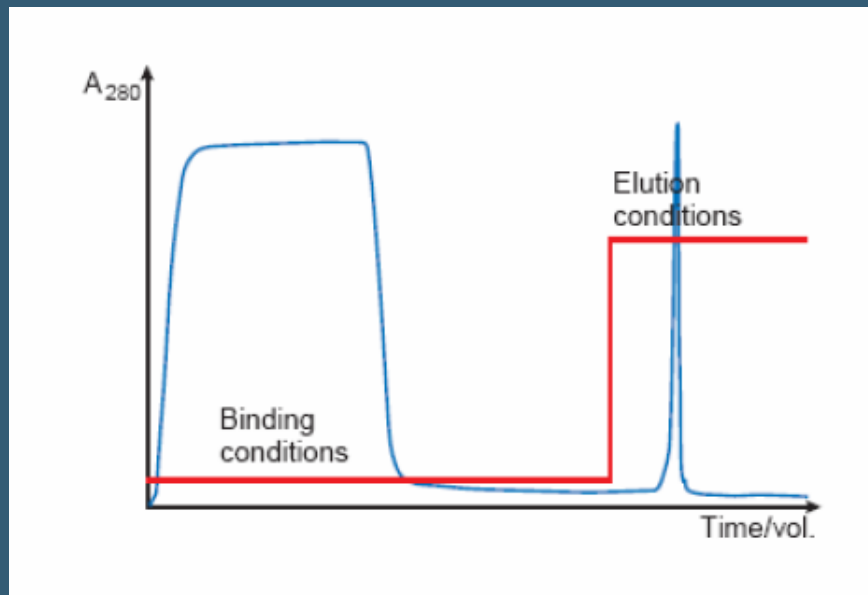


# ELUCE

pulsní

x

gradientová



# LIGANDY

## Monospecifické

- váží pouze jedinou biomakromolekulu
- **nutné si připravovat individuálně**

## Skupinově specifické

- váží biomakromolekuly s podobnými vlastnostmi
- **komerčně dostupné**

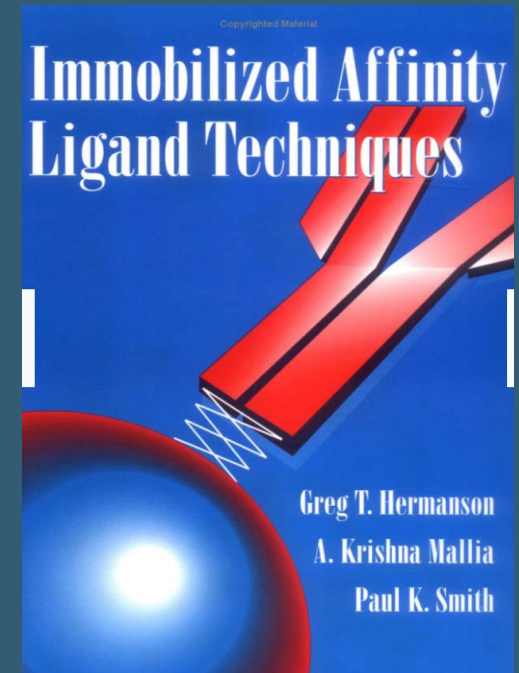
# IMOBILIZACE LIGANDŮ

N-hydroxysukcinimid  
(NHS)  $-NH_2$

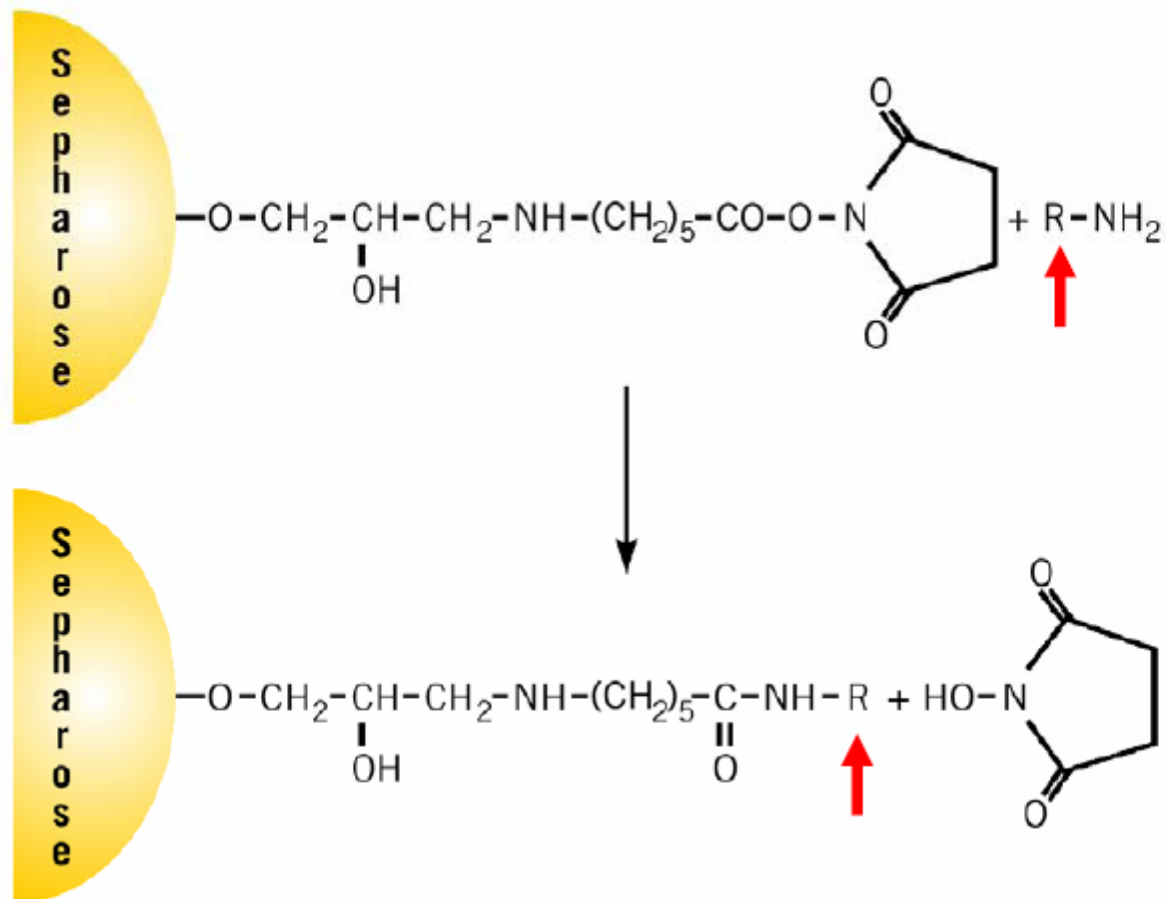
CNBr  $-NH_2$

Karbodiimid  $-NH_2, -COOH$

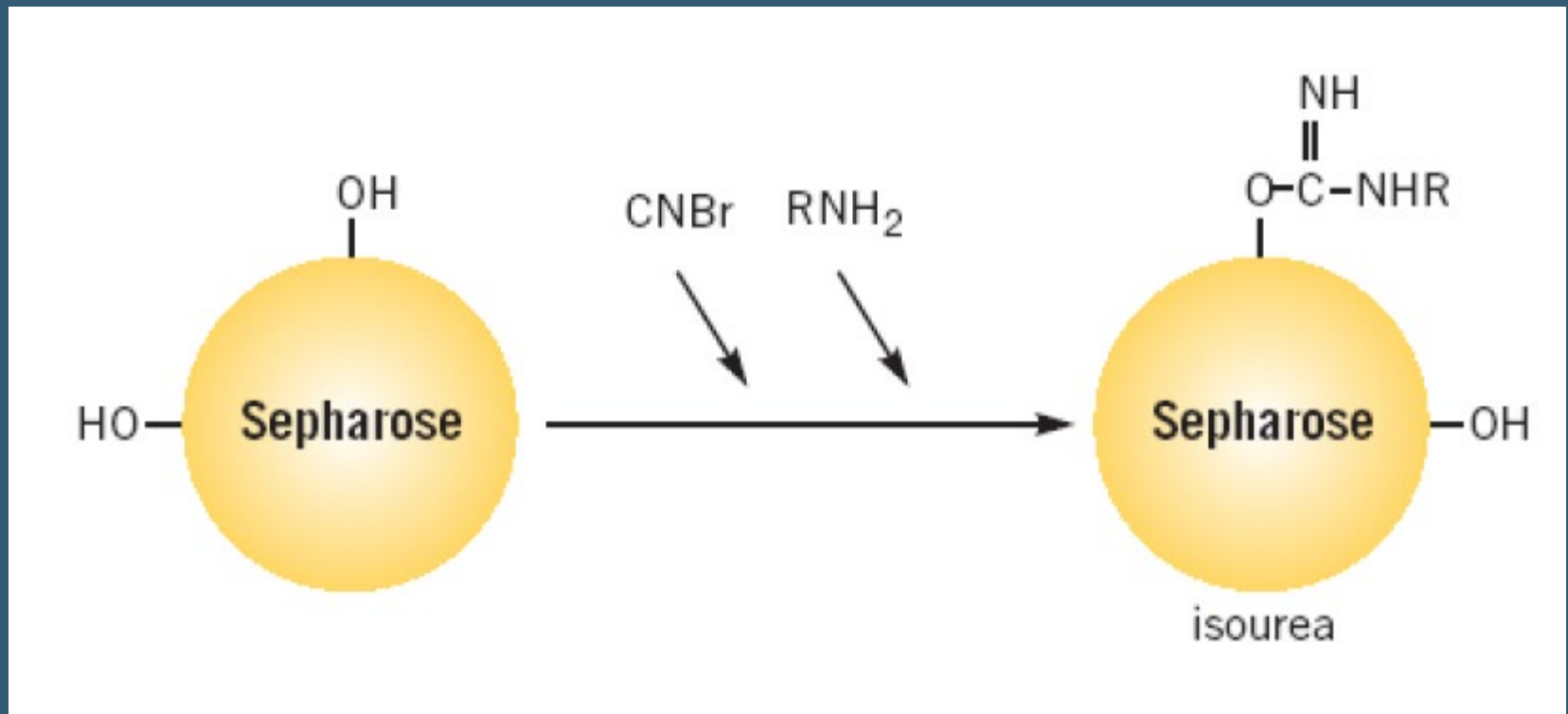
Epoxid  $-SH, -NH_2, -OH$



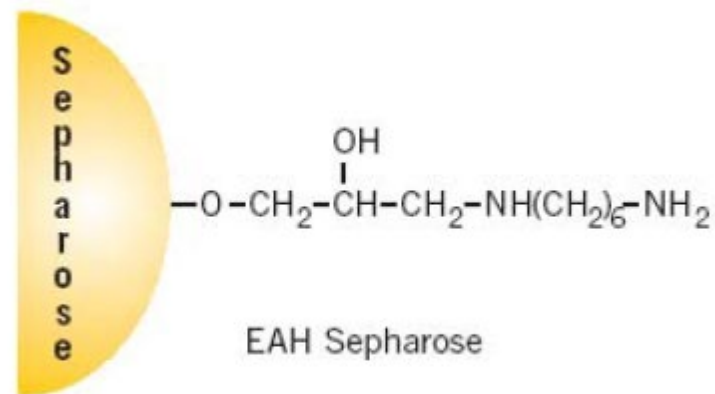
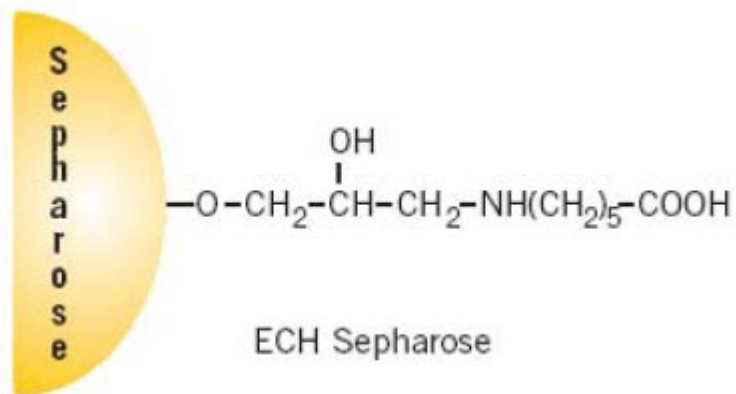
# N-HYDROXYSUKCINIMID (NHS-SEPHAROSA)



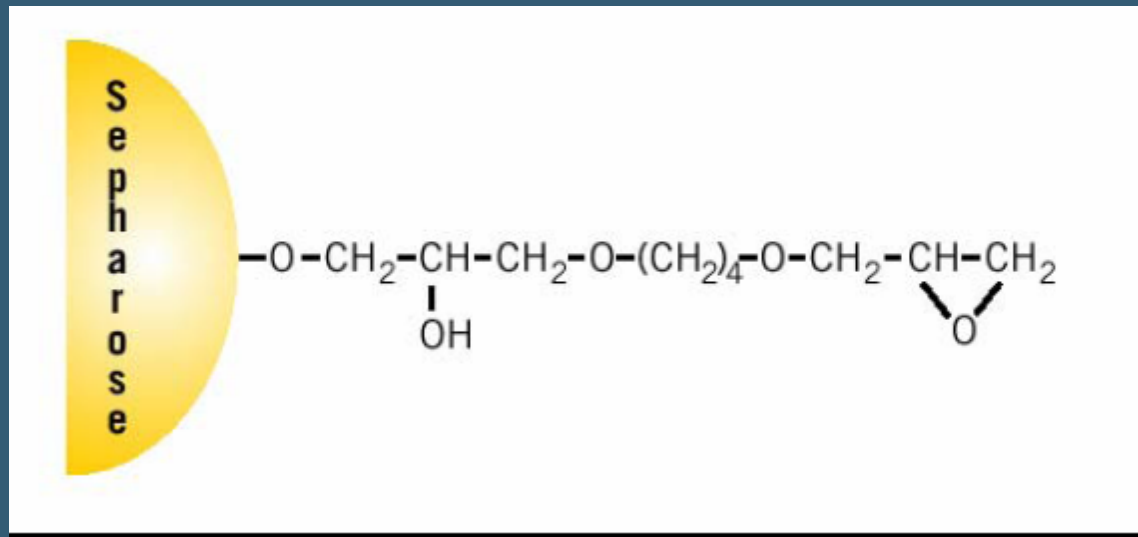
# CNBR (CNBR AKTIVOVANÁ SEPHAROSA)



# N, N'-DISUBSTITUOVANÝ KARBODIIMID



# EPOXID (EPOXY-AKTIVOVANÁ SEPHAROSA 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 <sup>+</sup> dependentní enzymy, sérový albumin
Procion Red	NADP <sup>+</sup>
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*

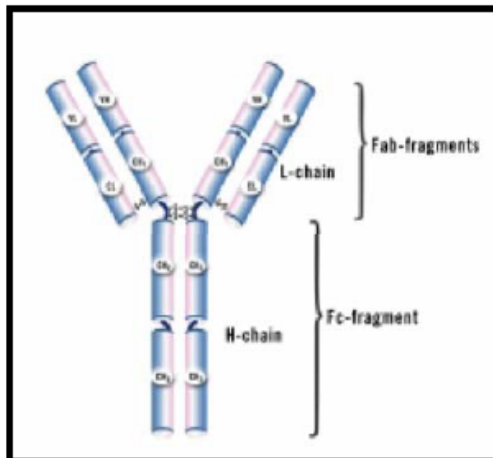
protein G – *Streptococcus*

purifikace:

monoklonální protilátky IgG

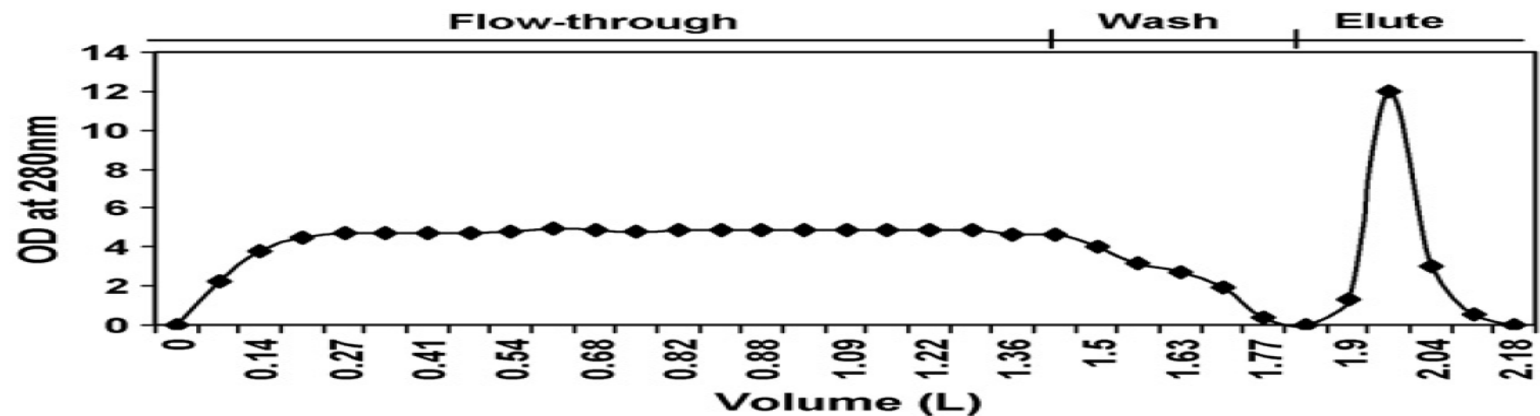
polyklonální protilátky IgG

imunokomplexy

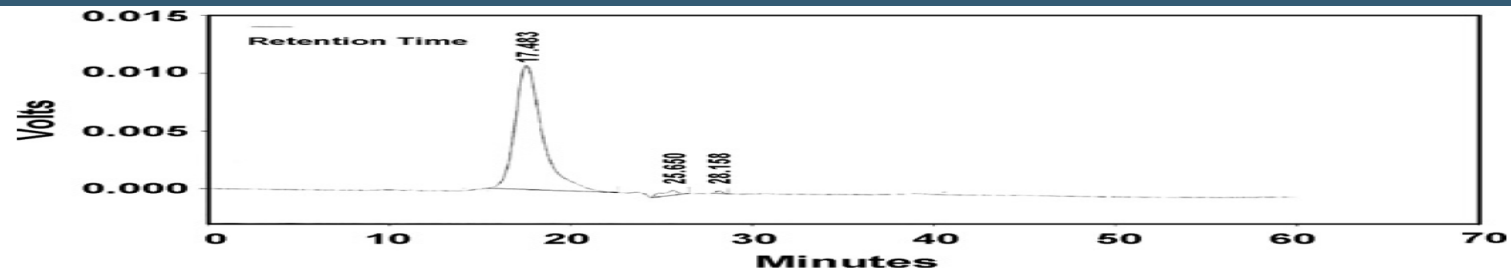


Species	Subclass	Protein A binding	Protein G binding
Human	IgA	variable	-
	IgD	-	-
	IgE	-	-
	IgG <sub>1</sub>	++++	++++
	IgG <sub>2</sub>	++++	++++
	IgG <sub>3</sub>	-	++++
Chicken	IgG <sub>4</sub>	++++	++++
	IgM <sup>A</sup>	variable	-
	IgY	-	-
Avian egg yolk	IgY <sup>B</sup>	-	-
Cow		++	++++
Dog		++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

# SKUPINOVĚ SPECIFICKÉ LIGANDY PROTEIN A A PROTEIN G



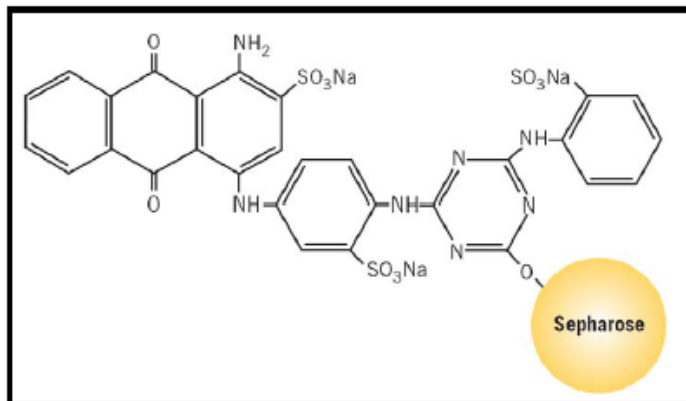
**Fig. 3.** Chromatogram of affinity chromatography using ProSep-vA Ultra. Antibody fragment  $[F(ab)_2]$  did not bind to ProSep-vA Ultra (fraction 0–1.41) and majority of the contaminants  $[Fc$  fragment] that bound to the affinity matrix eluted at pH 3.0 (fraction 1.84–2.181).



**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  $\mu$ 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“

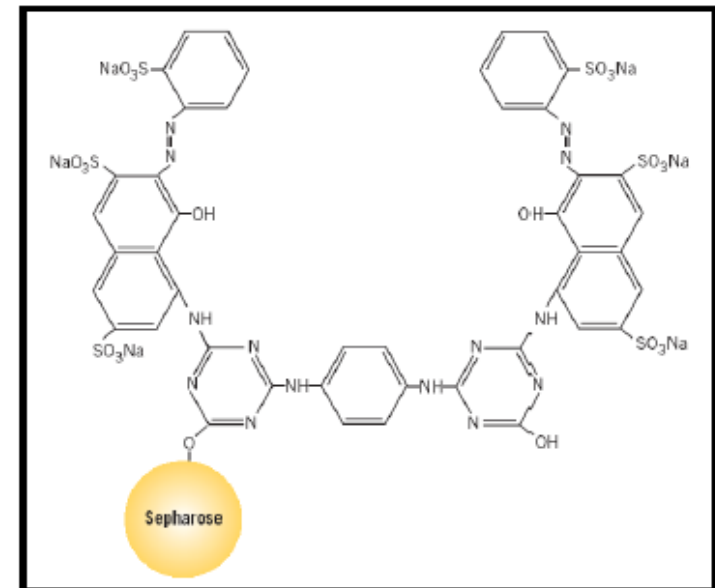
**Cibacron™ Blue F3G-A**  
(Blue Sepharosa)



**NAD<sup>+</sup>**

Dependentní dehydrogenasy

**Procion™ Red**  
(Red Sepharosa)



**NADP<sup>+</sup>**

# Skupinově specifické ligandy

## Cibacron Blue F<sub>4</sub>G-A

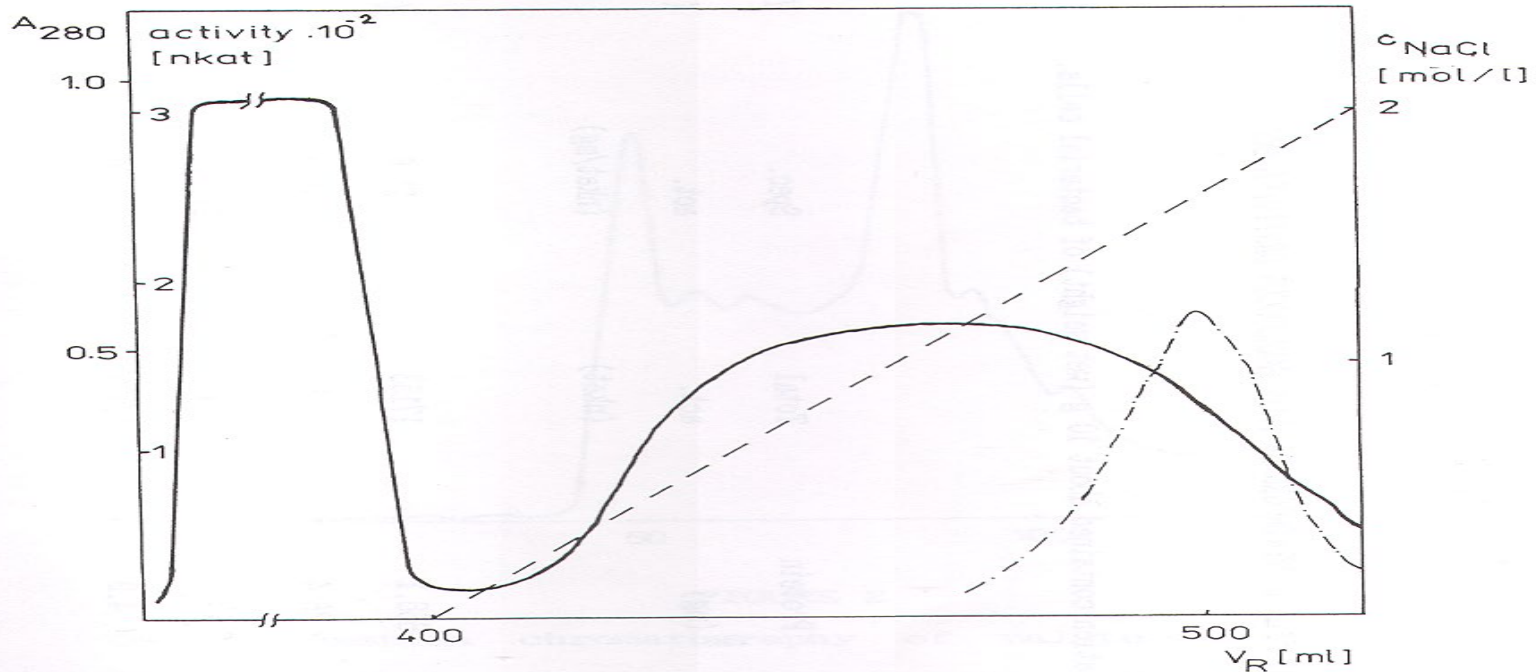


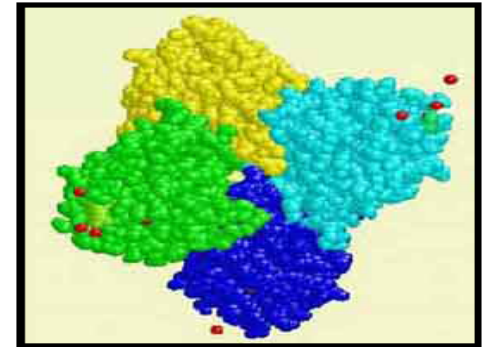
FIGURE 1

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

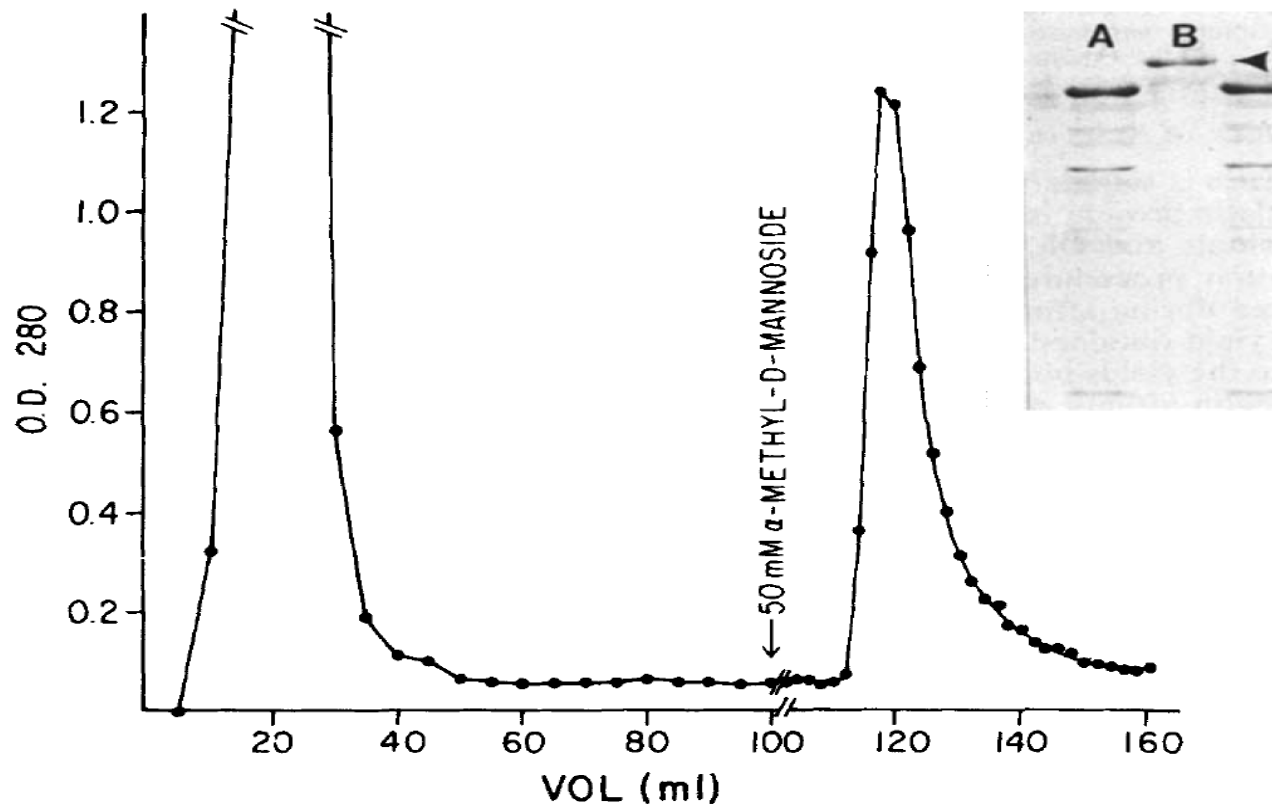
- lektin z *Canavalia ensiformis* (jack bean)
- tetramerní metalloprotein
- větvené mannosidy, cukry s terminální mannosou nebo glukosou ( $\alpha\text{Man} > \alpha\text{Glc} > \text{GlcNAc}$ )
  - purifikace glycoproteinů, polysacharidů a glykolipidů
  - detekce změn ve složení látek obsahujících cukry
  - izolace povrchových buněčných glykoproteinů



## „Lentil“ lektin

- lektin z *Lens culinaris* (čočka)
- větvené mannosidy obsahující fukosu  $\alpha-1,6$  vázanou na N-acetylglukosamin ( $\alpha\text{Man} > \alpha\text{Glc} > \text{GlcNAc}$ )
- membránové 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  $0.9 \times 20$  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- $\alpha$ -methylmannoside in Con A buffer. (*Inset*) Lane A: SDS electrophoretic profile of proteins eluted in the wash peak (21  $\mu$ g protein); lane B: SDS electrophoretic profile of glycoproteins eluted by 50 mM- $\alpha$ -methylmannoside (12  $\mu$ 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

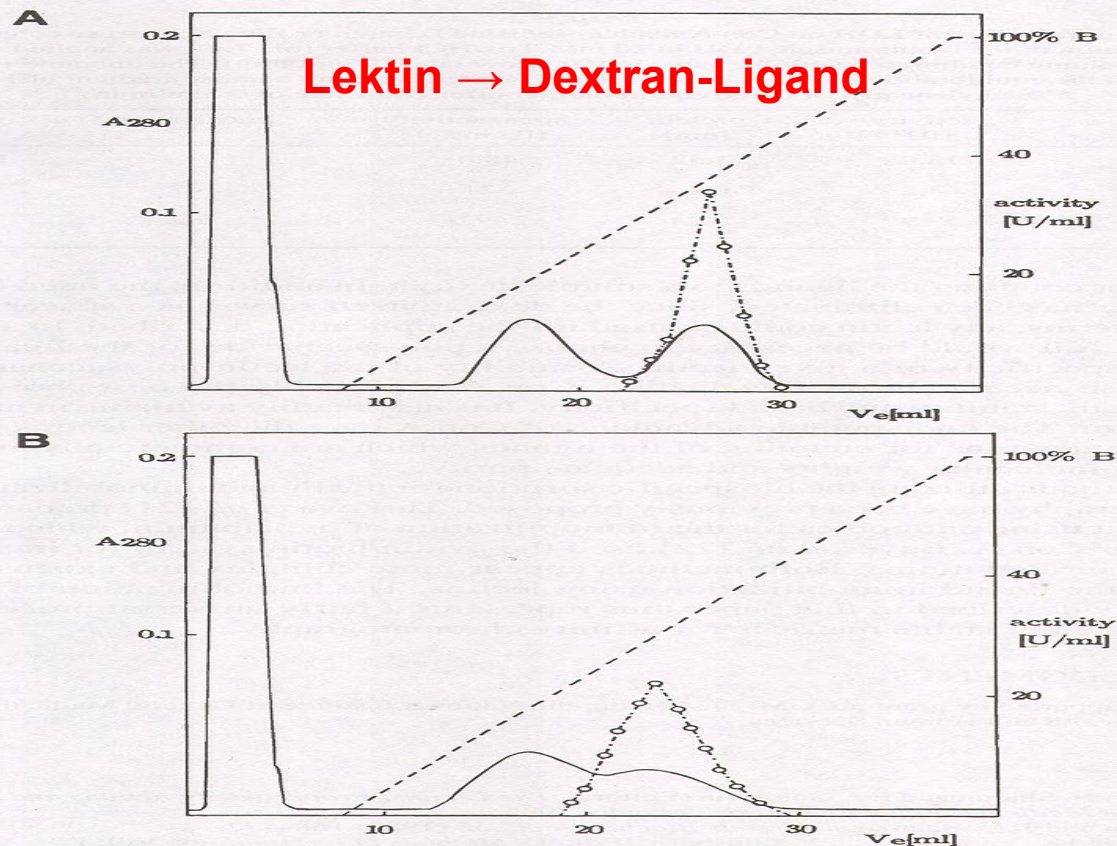
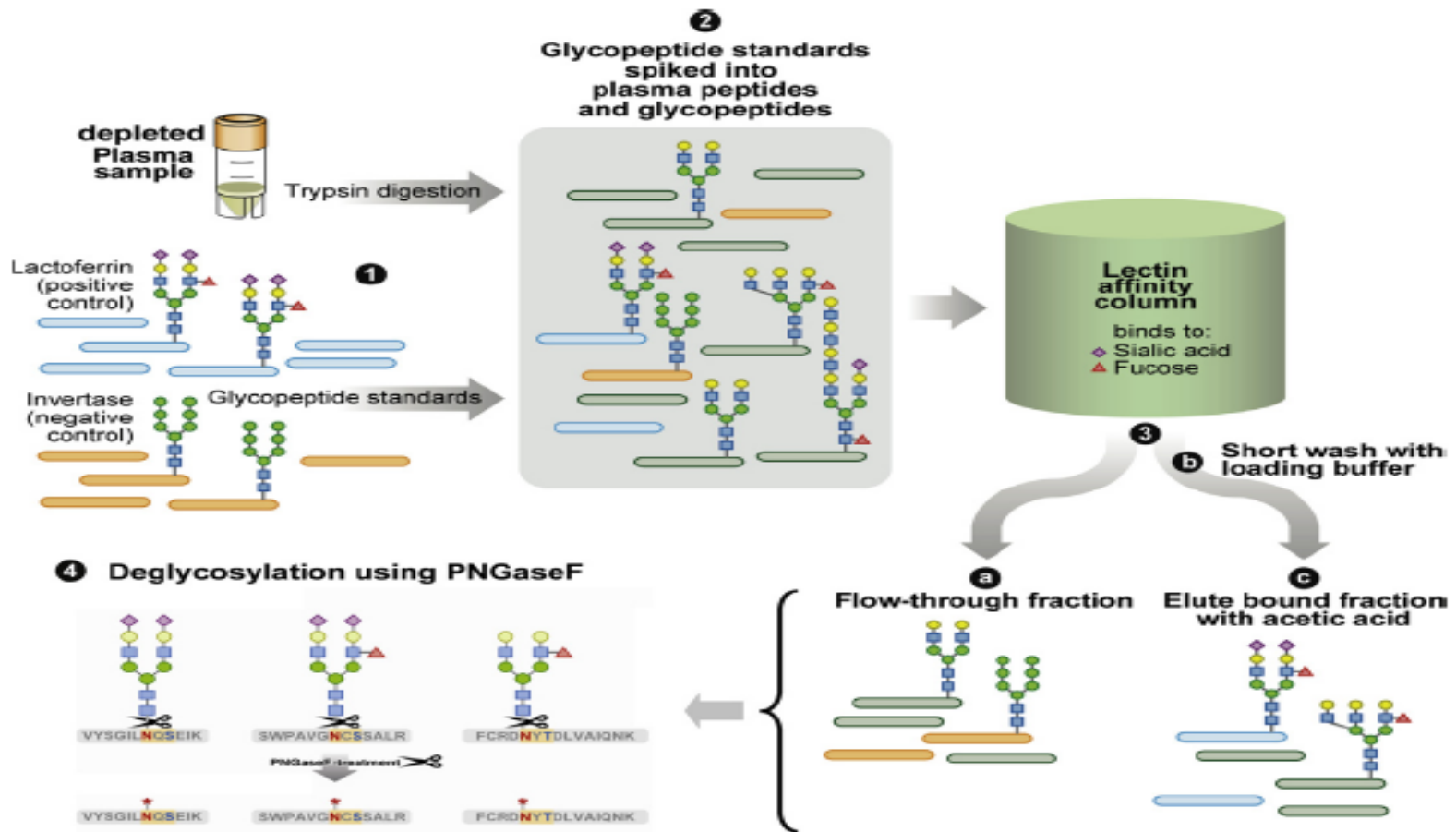


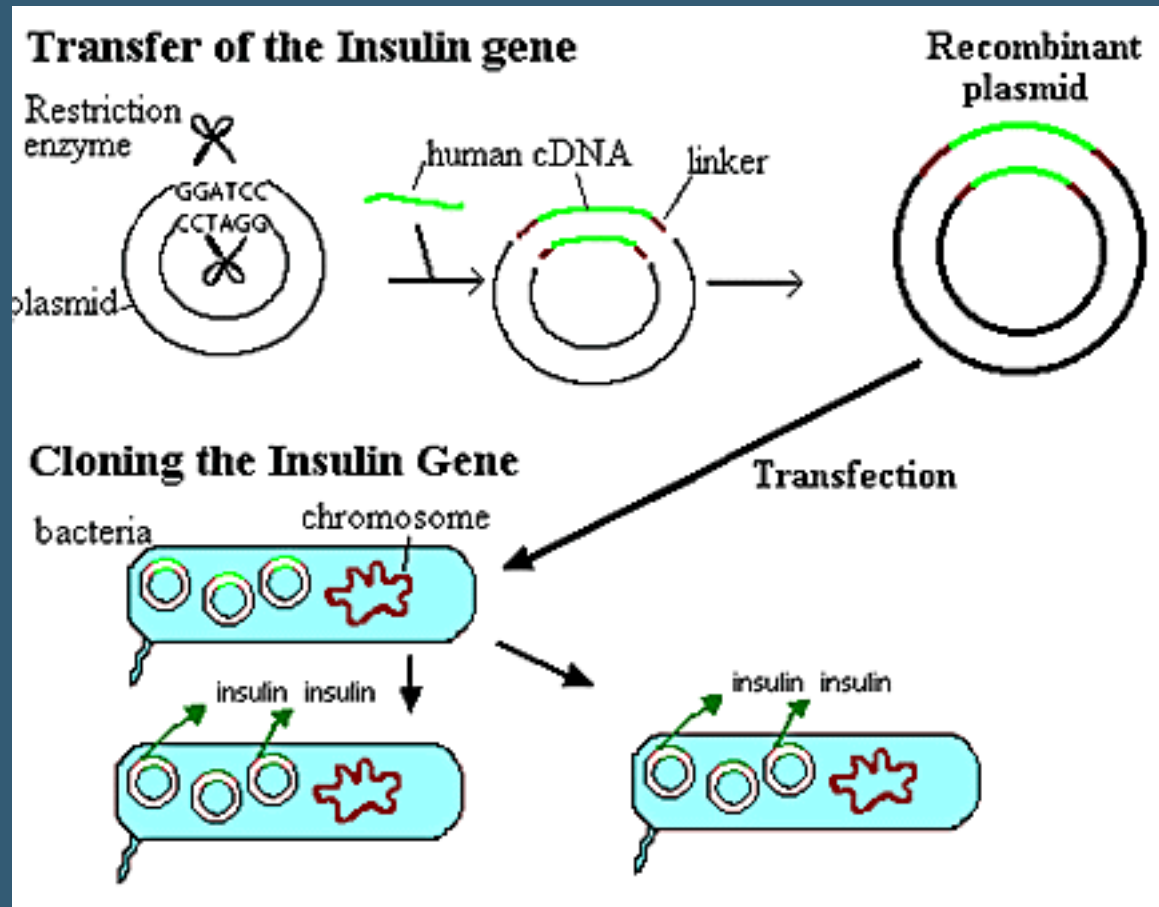
FIGURE 1 Partial purification of the crude preparation of the rabbit muscle LDH on Con A Sepharose/Blue Dextran (Figure 1.A) or Blue Sepharose (Figure 1.B) columns. Approximately 1.5 mg of protein were applied on the column. Buffers: A = 20 mM Tris HCl (pH 7.4) B = 20 mM Tris HCl (pH 7.4) with 1 M NaCl 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



# EXPRESNÍ SYSTÉMU

- Prokaryota (*E.coli*)

- + snadná kultivace

- + vysoký výtěžek

- + levný

- neumí pracovat s introny

- neumí postranlační modifikace

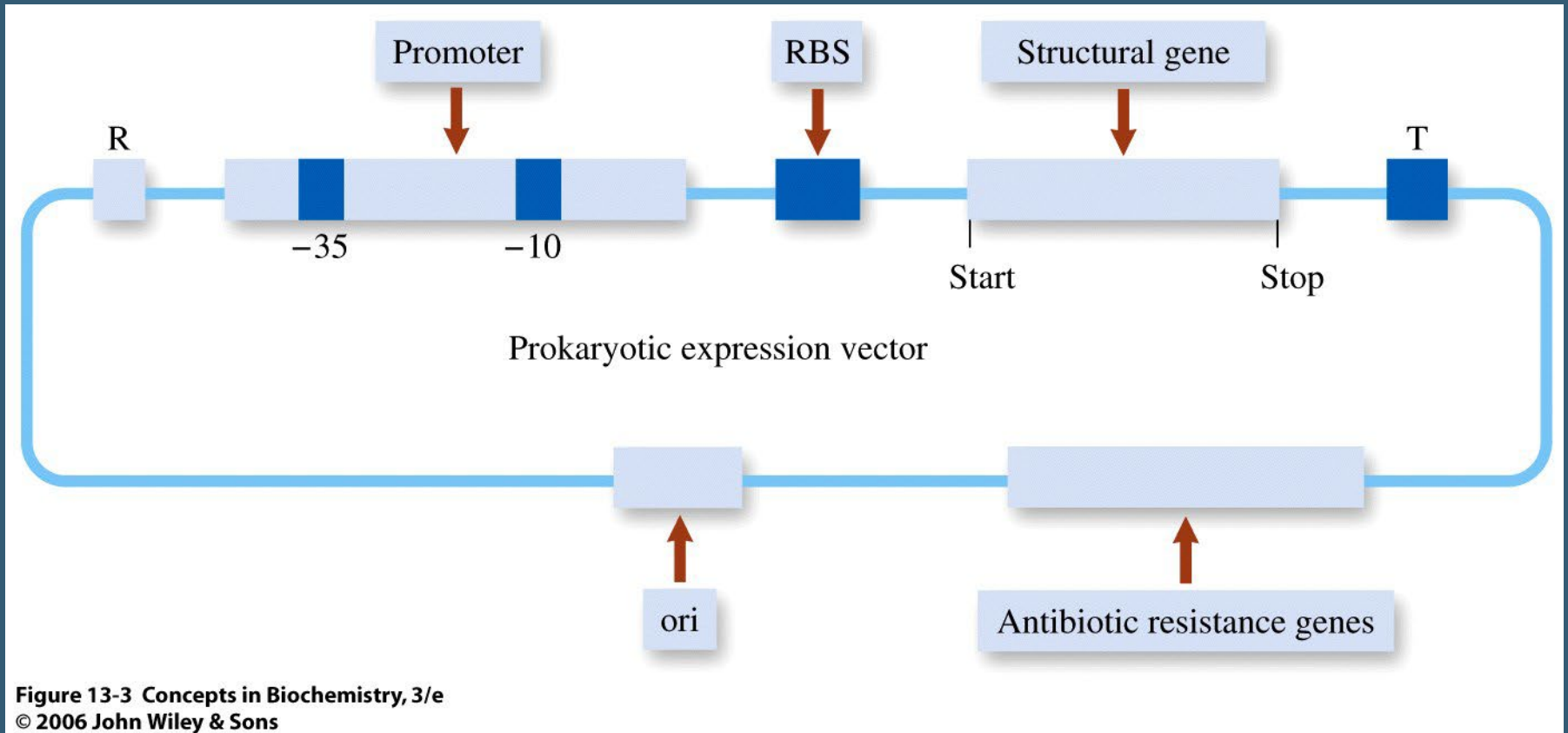
# EXPRESNÍ SYSTÉMU

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

- + umí pracovat s introny

- + umí postranslační modifikace

- malý výtěžek



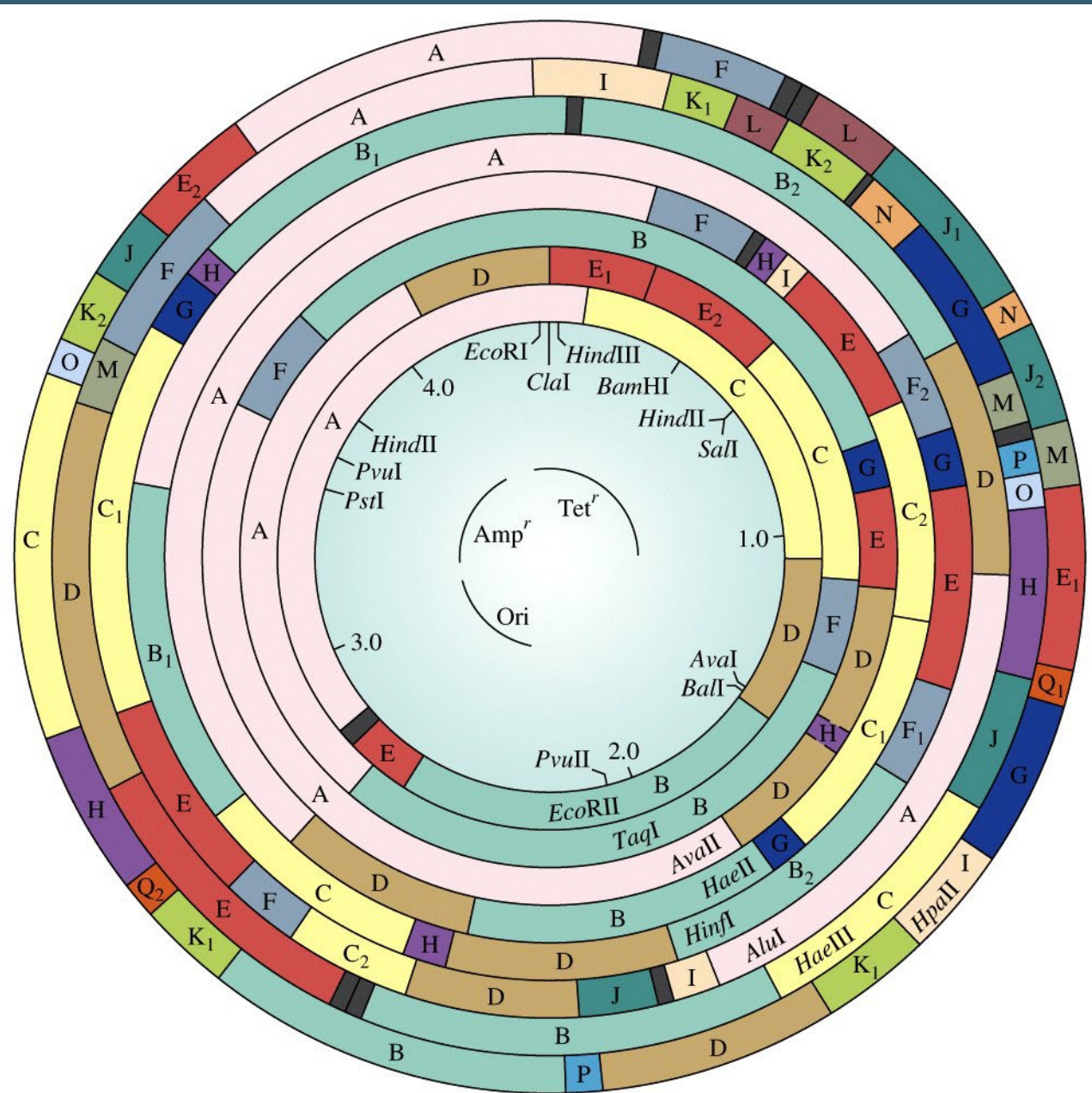
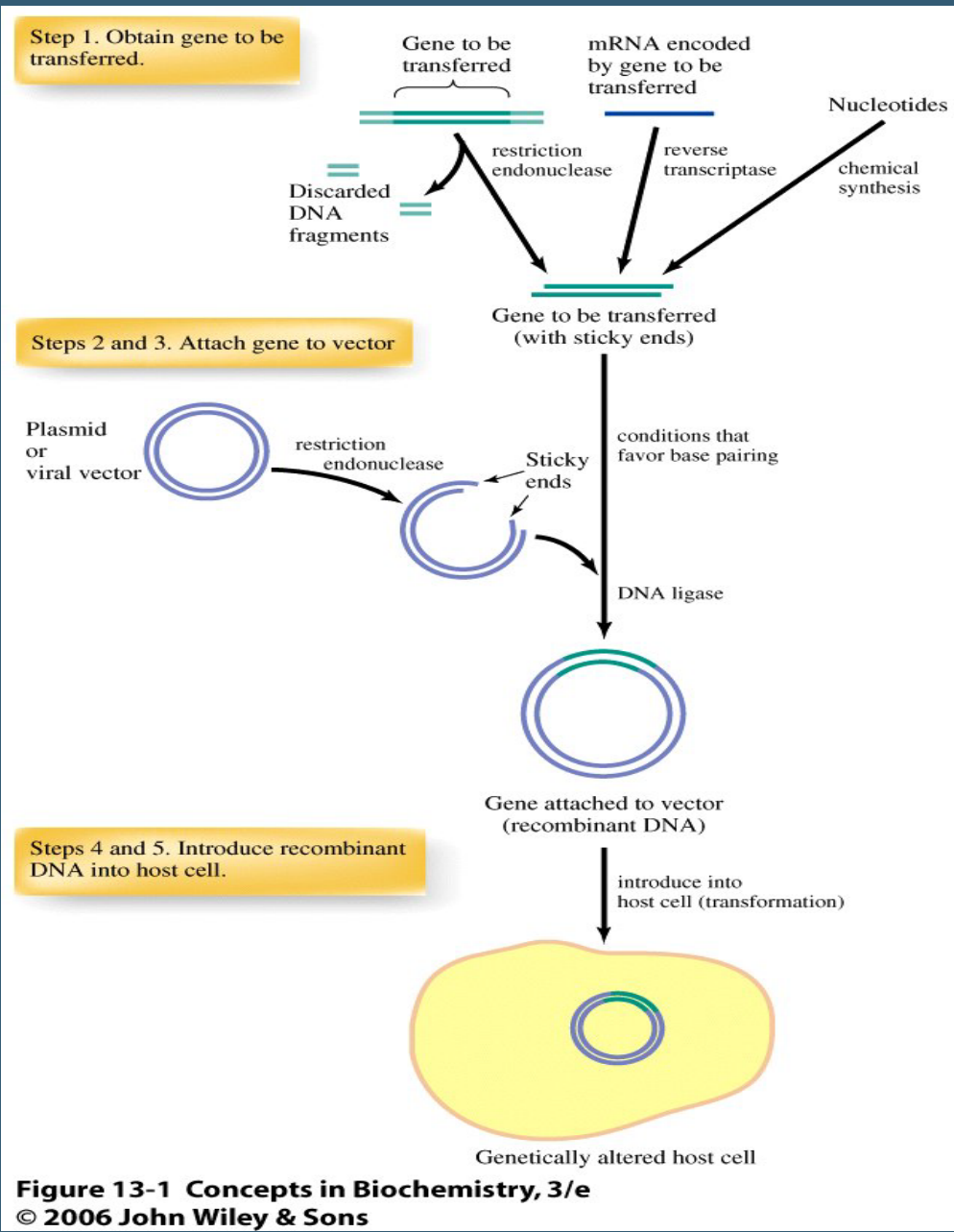
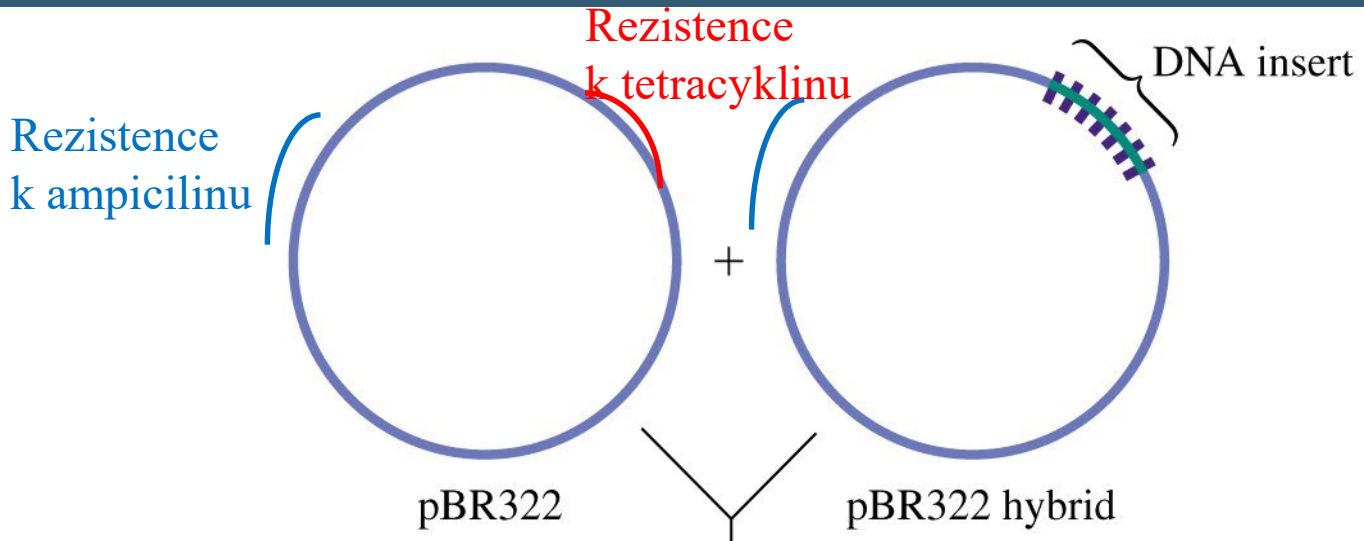


Figure 13-8 Concepts in Biochemistry, 3/e  
 © 2006 John Wiley & Sons



**Figure 13-1 Concepts in Biochemistry, 3/e**  
 © 2006 John Wiley & Sons



Transformation

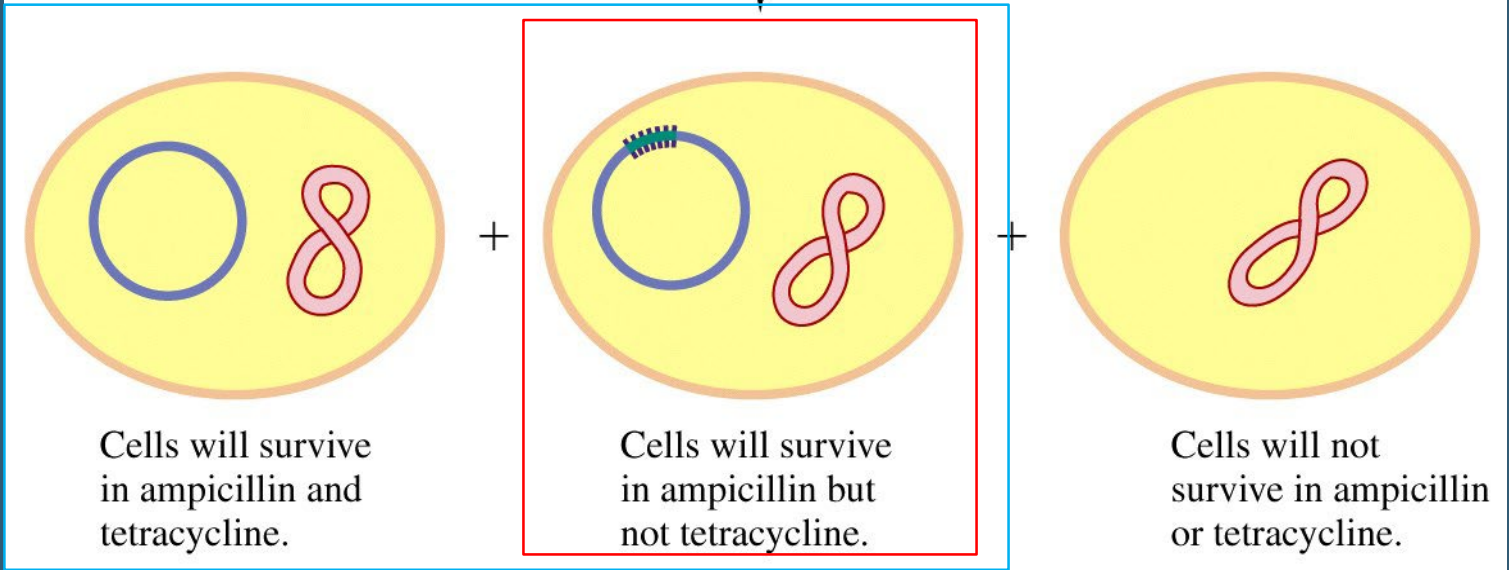
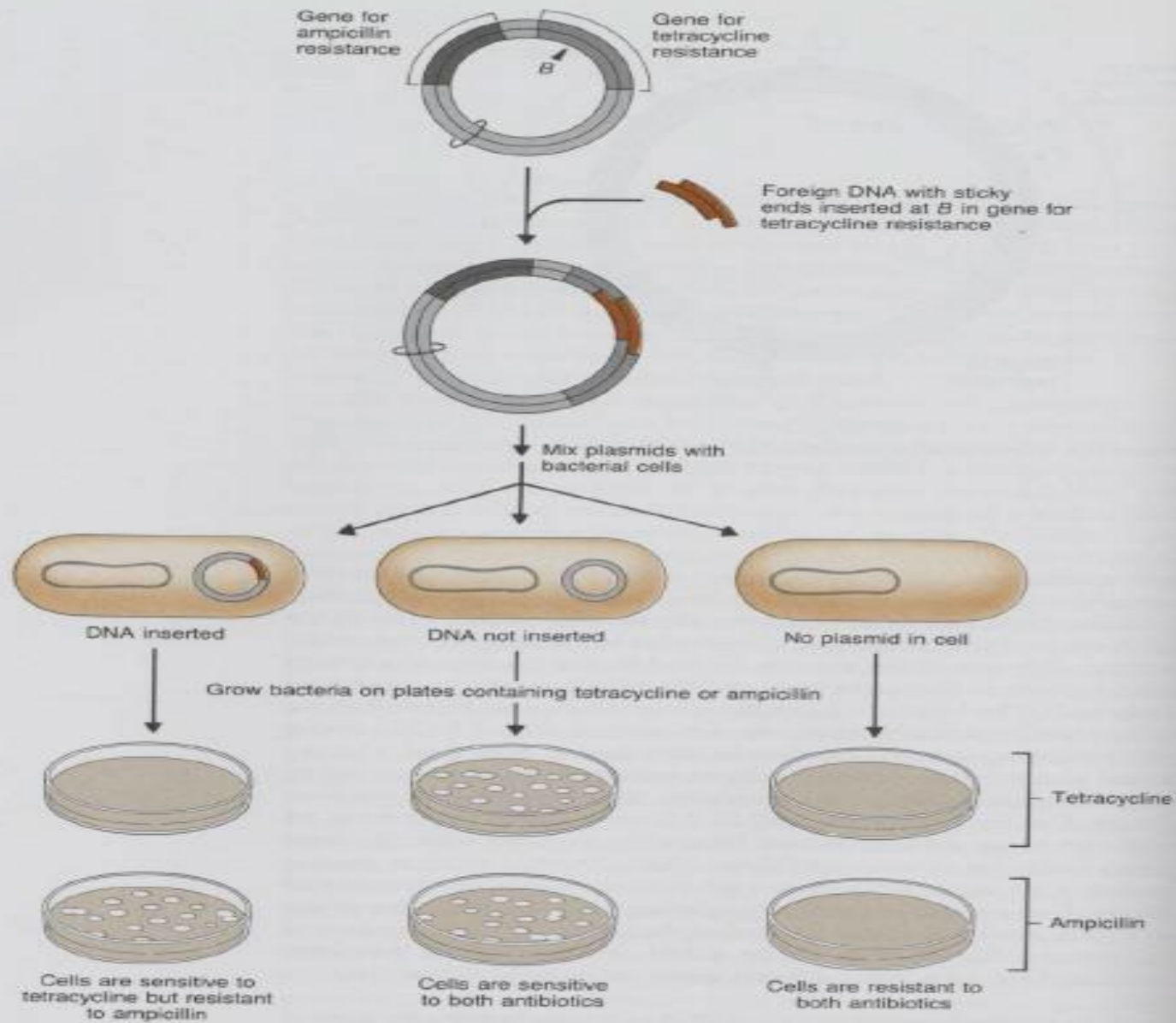


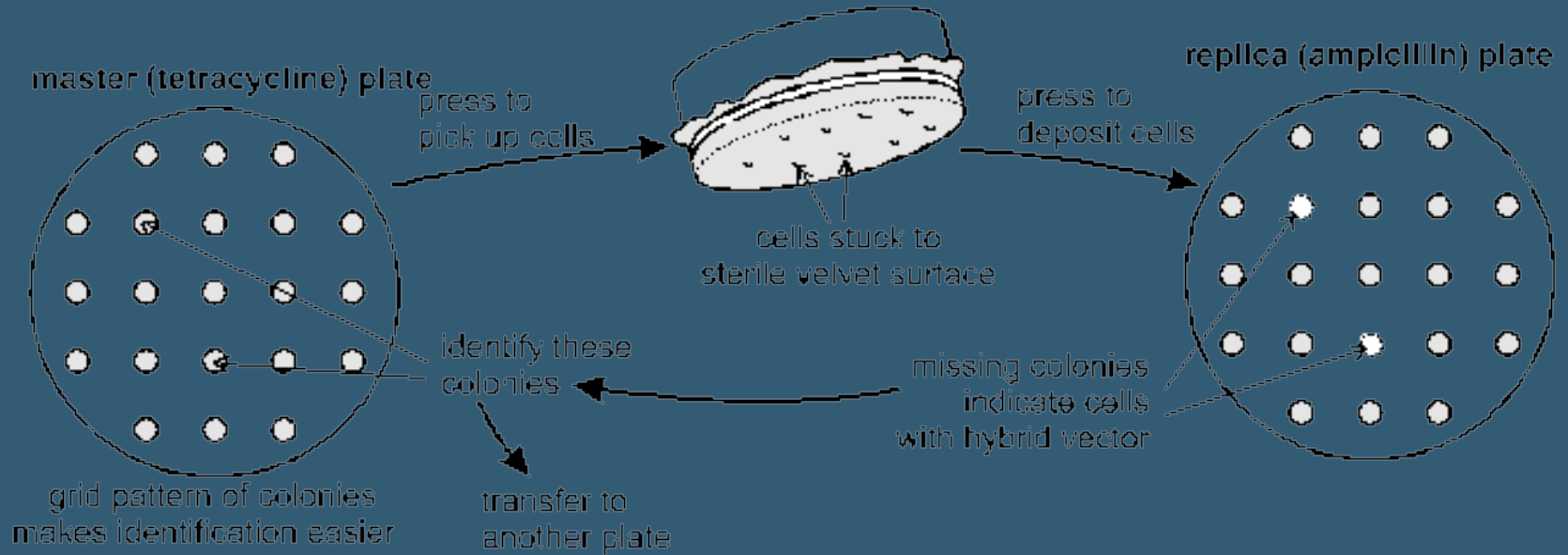
Figure 13-6 part 3 Concepts in Biochemistry, 3/e  
 © 2006 John Wiley & Sons



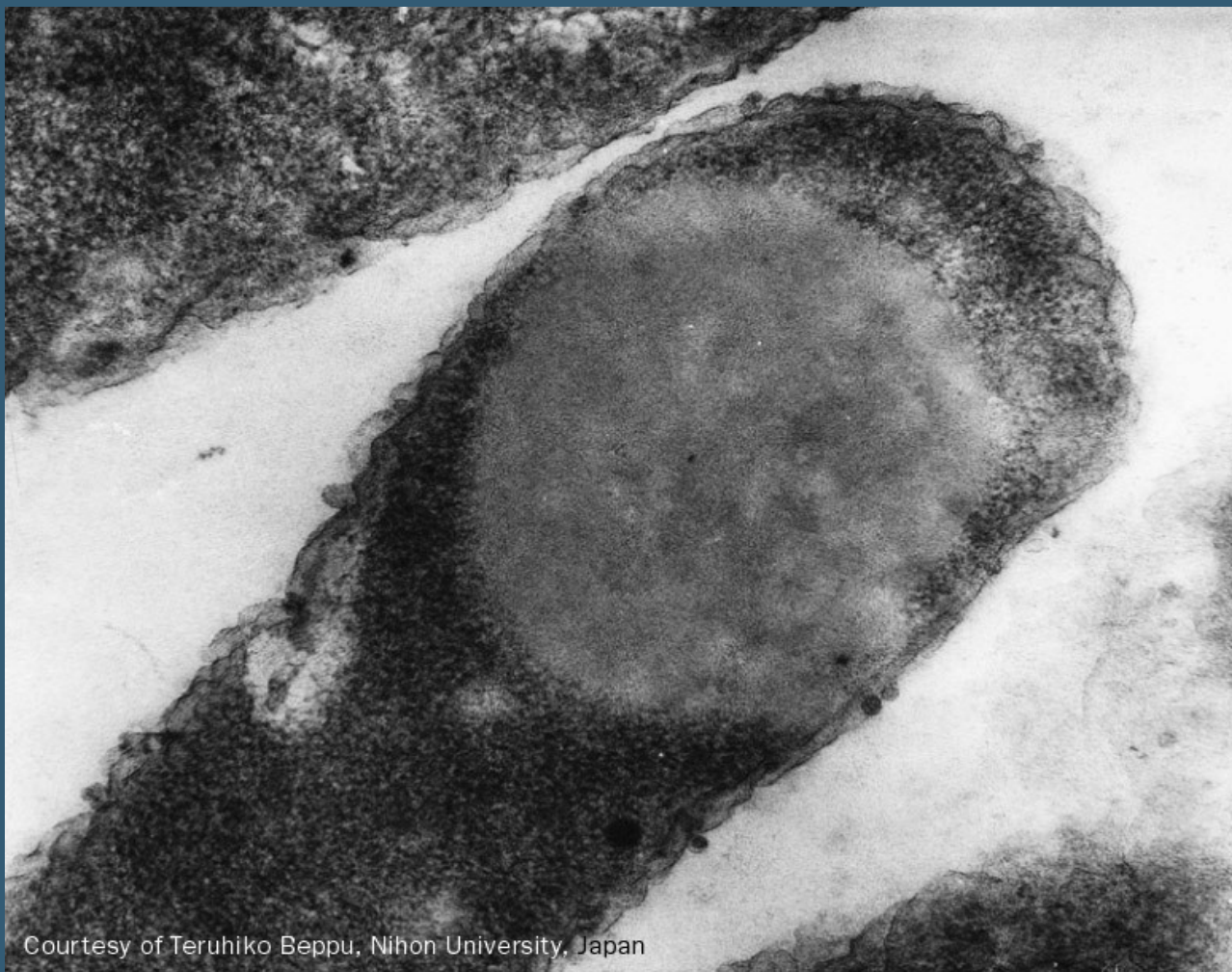


**Figure 5.2** A plasmid vector with two genes for antibiotic resistance facilitates isolation of recombinants.



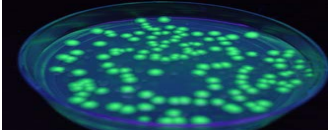


# INKLUSNÍ TĚLÍSKA

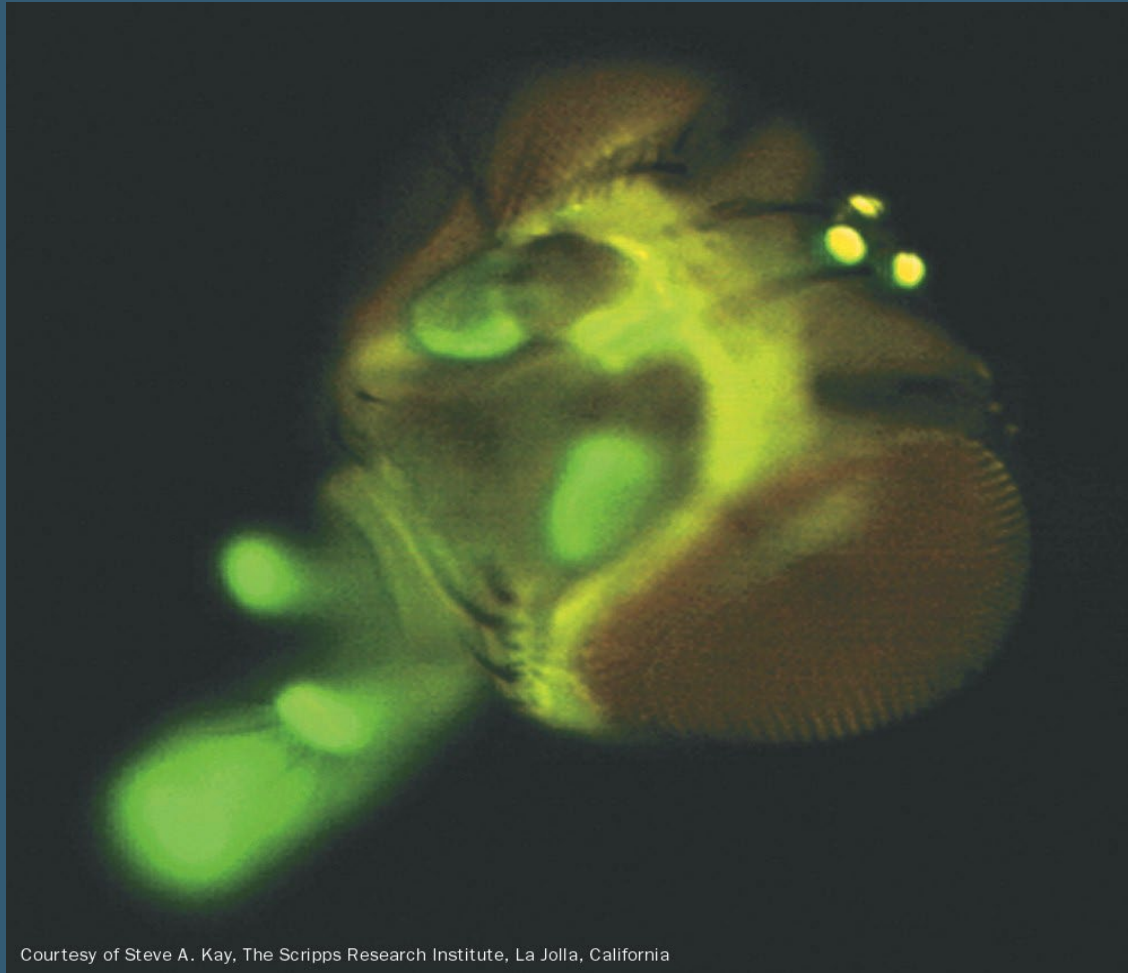


Courtesy of Teruhiko Beppu, Nihon University, Japan

# VYUŽITÍ AC PRO PURIFIKACI REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

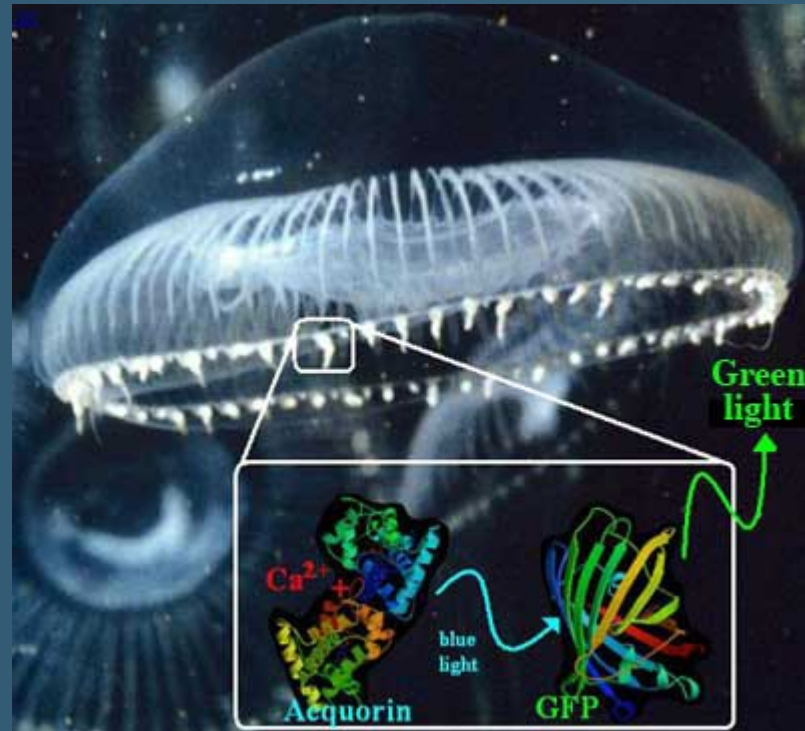
fúzní kotva	imobilizovaný ligand	podmínky vazby	podmínky eluce
Glutathion S-transferasa <b>GST</b>	redukovaný glutathion	Neutrální pH, nedenaturující prostředí, glutathion musí být redukovaný a GST musí být aktivní	volný redukovaný glutathion
Histidinová kotva <b>His-tag</b>	Chelatovaný nikl nebo kobalt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

*ROGERTSIEN*



izoloval GFP z medúzy



jak GFP navázat na jiné proteiny

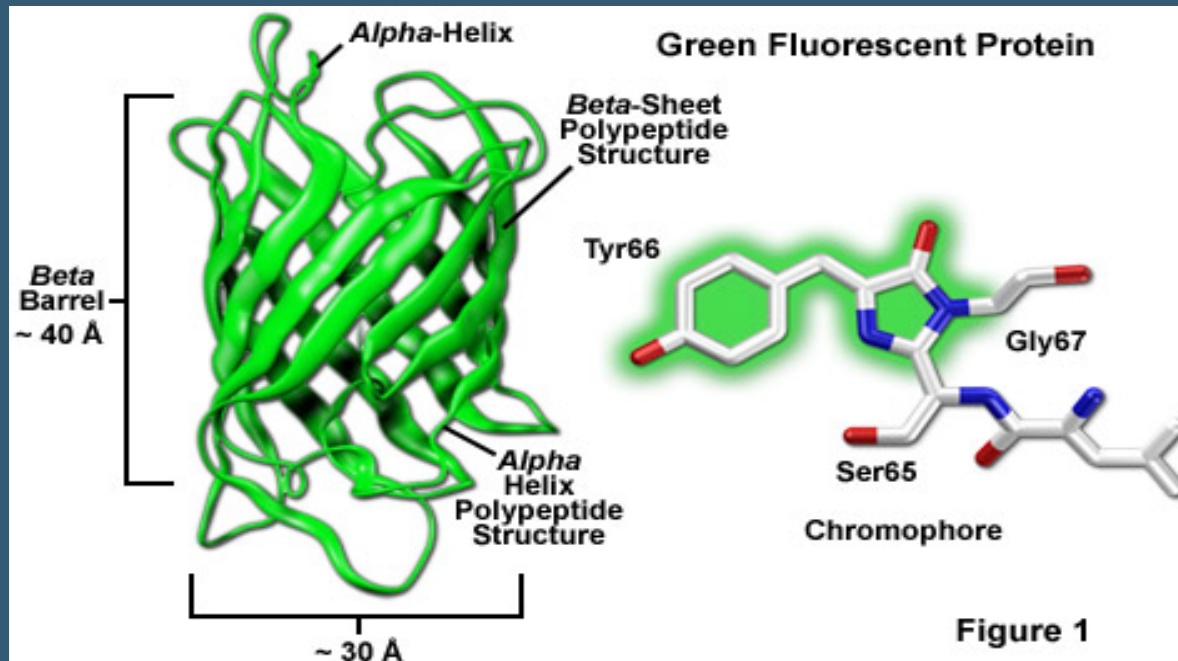


vysvětlil fluorescenci

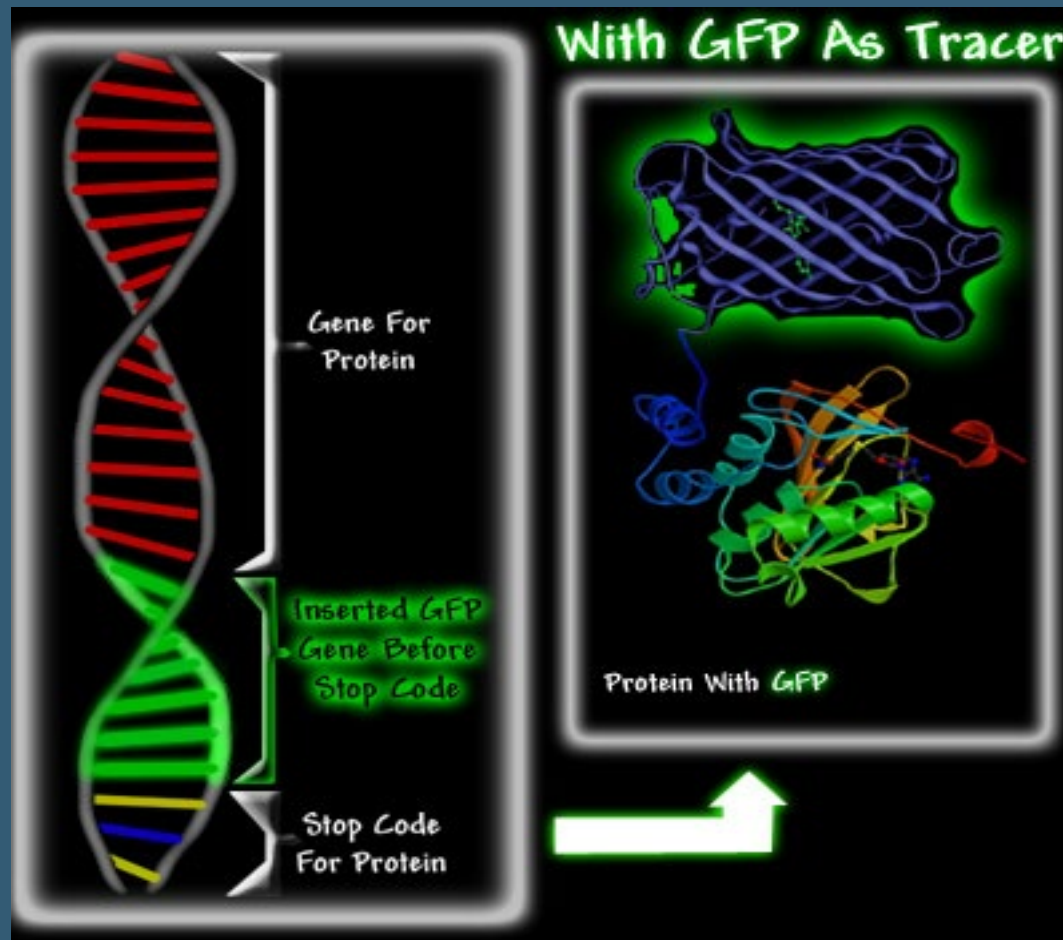
# GREEN FLUORESCENT PROTEIN

## GFP AMK sekvence – 238 AMK

MSKGEELFTGVVPVLVELDGDVNGQKFSVSGEGEGDATYGKLTNFICT  
TGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTI  
FYKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKMEYNYNS  
HNVIYIMGDKPKNGIKVNFKIRHNIKDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLP  
DNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMILLEFVTAARITHGMDELYK



# GREEN FLUORESCENT PROTEIN



Reportérový gen



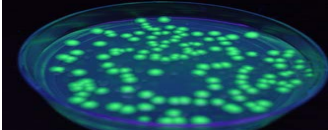
# GREEN FLUORESCENT PROTEIN



# GREEN FLUORESCENT PROTEIN

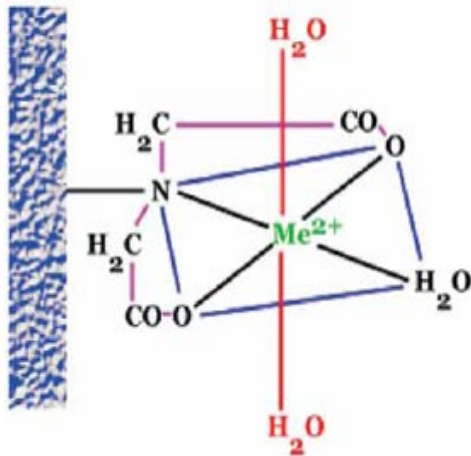


# VYUŽITÍ AC PRO PURIFIKACI REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

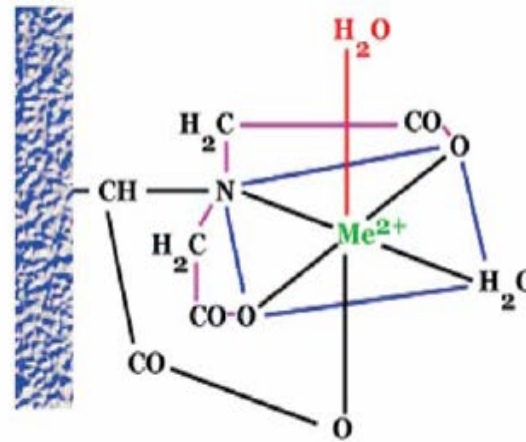
fúzní kotva	imobilizovaný ligand	podmínky vazby	podmínky eluce
Glutathion S-transferasa <b>GST</b>	redukovaný glutathion	Neutrální pH, nedenaturující prostředí, glutathion musí být redukovaný a GST musí být aktivní	volný redukovaný glutathion
Histidinová kotva <b>His-tag</b>	Chelatovaný nikl nebo kobalt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

# CH. NA IMOBILIZOVANÝCH KOVOVÝCH IONTECH

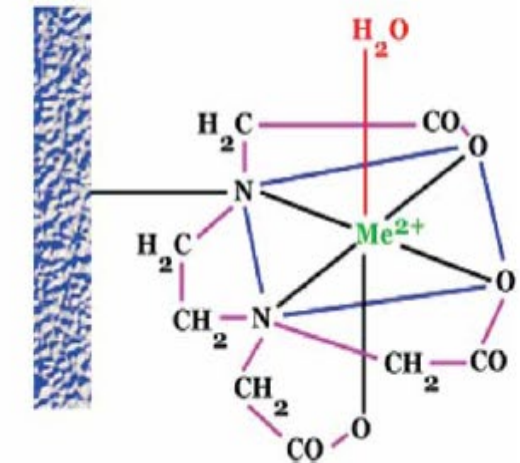
IDA



NTA



TED



iminodiacetic acid (IDA)

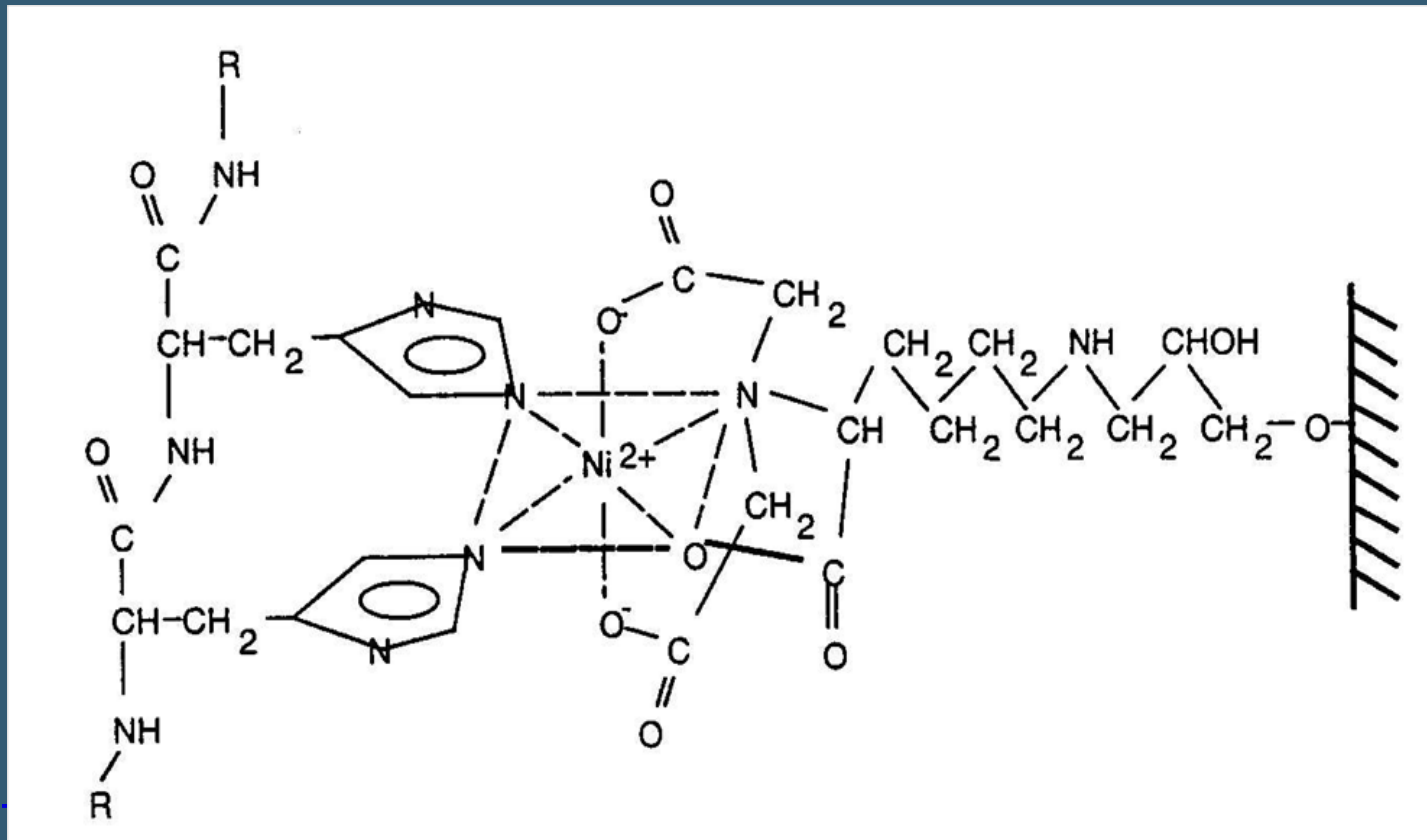
nitrilotriacetic acid (NTA)

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  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  
 $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ ,  
preferující dusík jako  
koordinační ligand

# CH. NA IMOBILIZOVANÝCH KOVOVÝCH IONTECH

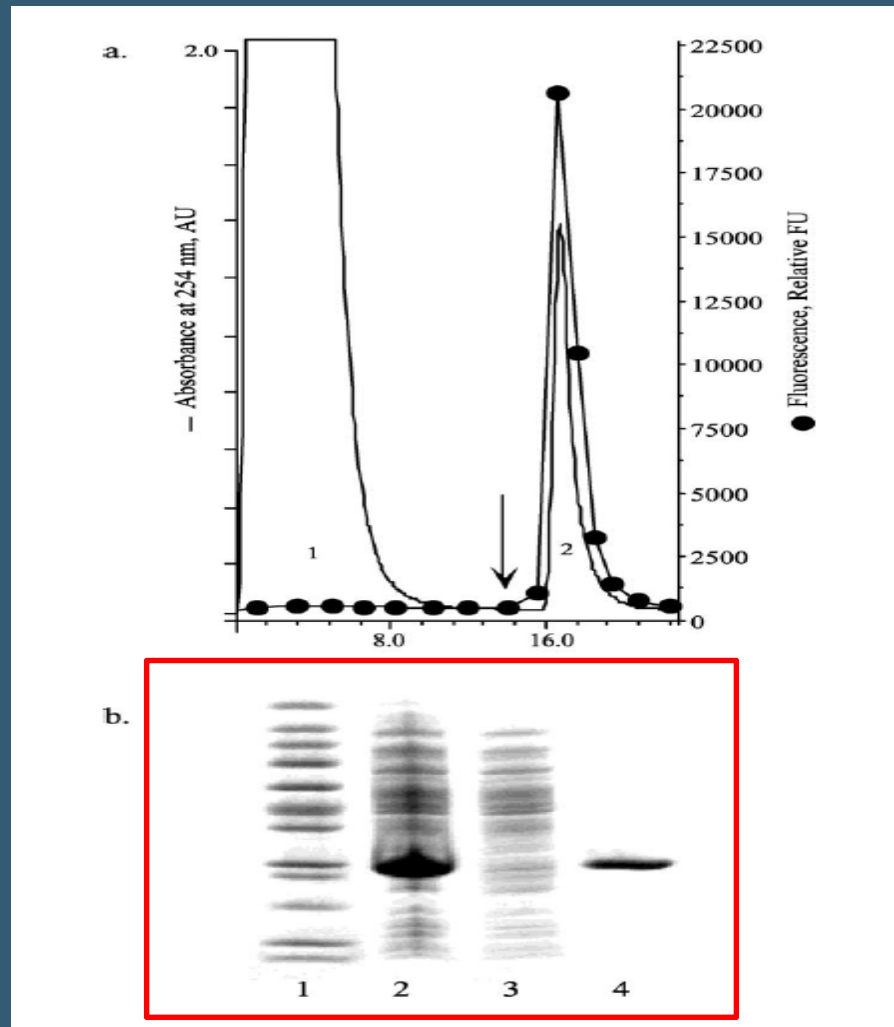


# CH. NA IMOBILIZOVANÝCH KOVOVÝCH IONTECH

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

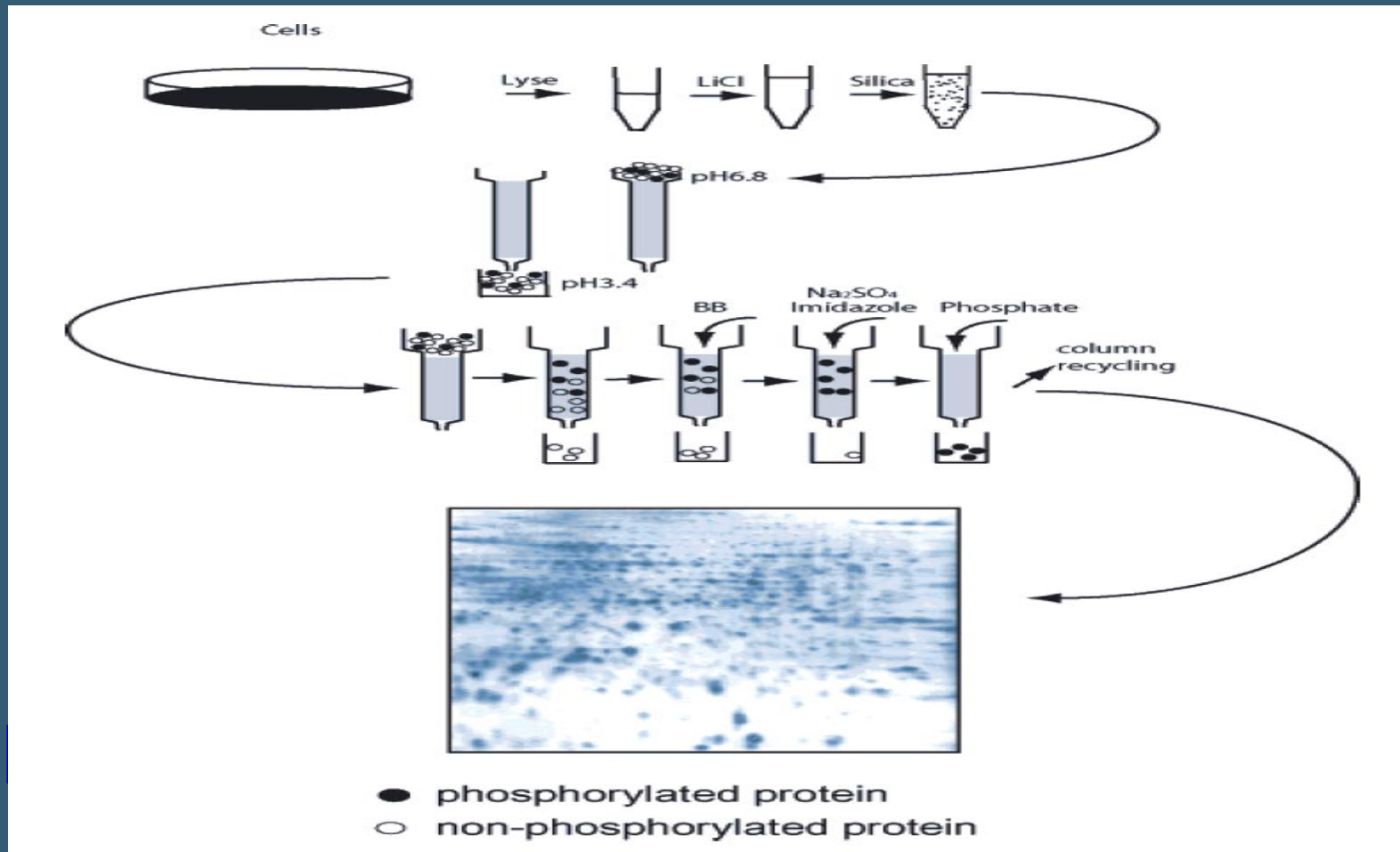
Použití : purifikace normálních a rekombinantních bílkovin

# CH. NA IMOBILIZOVANÝCH KOVOVÝCH IONTECH

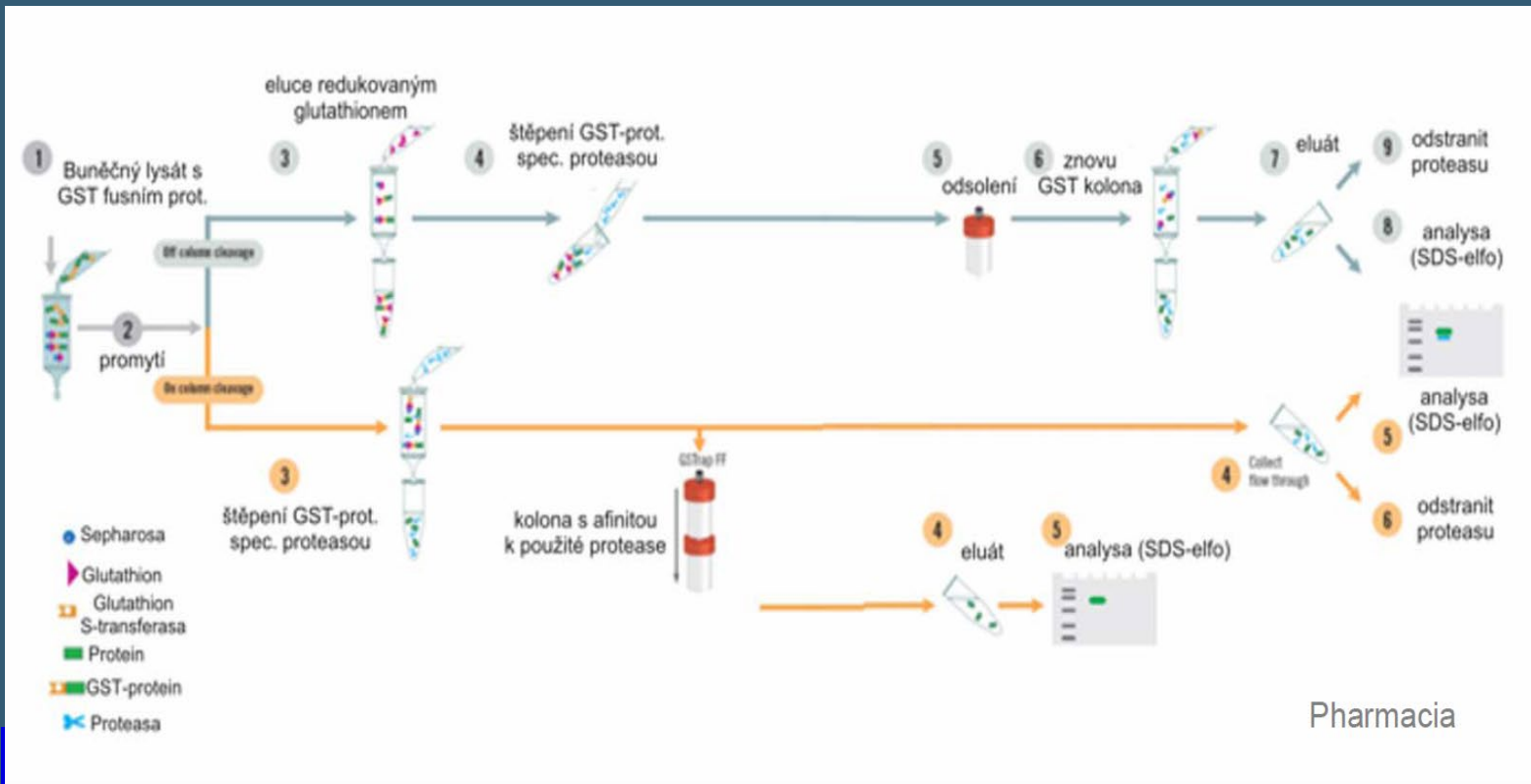




# CH. NA IMOBILIZOVANÝCH KOVOVÝCH IONTECH



# GST



Pharmacia

# Analytická afinitní chromatografie

## Analýza vazby

**Určení disociační konstanty ( $K'$ )** má význam zejména pro stanovení afinity analytu k nosiči.  $K'$  se musí nacházet v intervalu ( $10^{-6}$  -  $5 \cdot 10^{-4}$ ).  $K'$  bývá zpravidla slabší než  $K$ .

$$1 / (V_R - V_M)$$

$V_M$  - mrtvý objem

$V_O$  - el. objem

$V_R$  - eluční objem

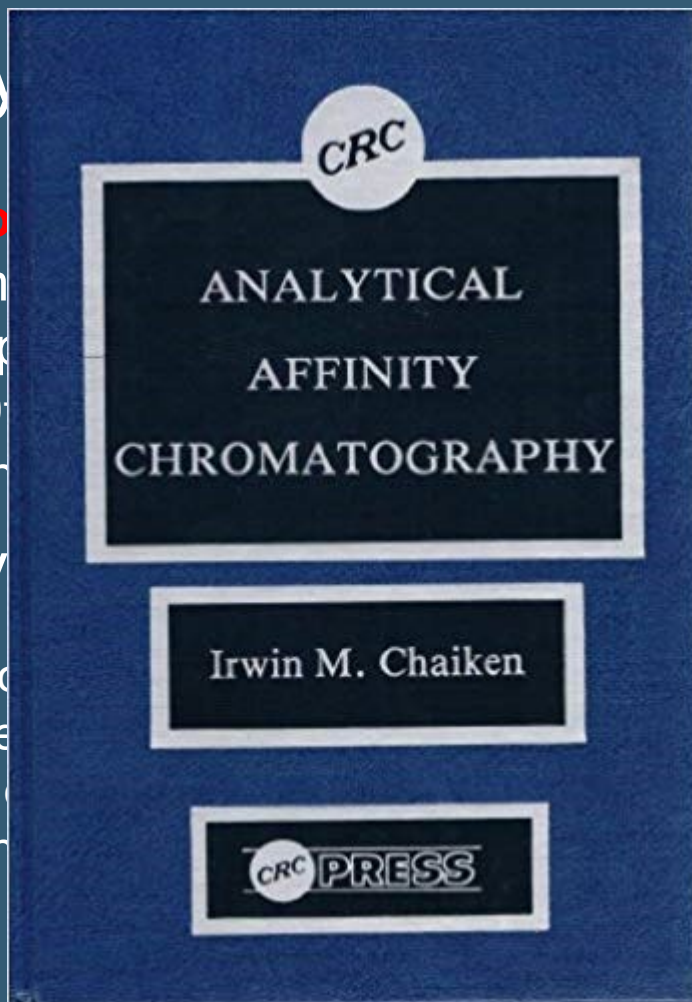
$c_L$  - koncentrace

## Polymer

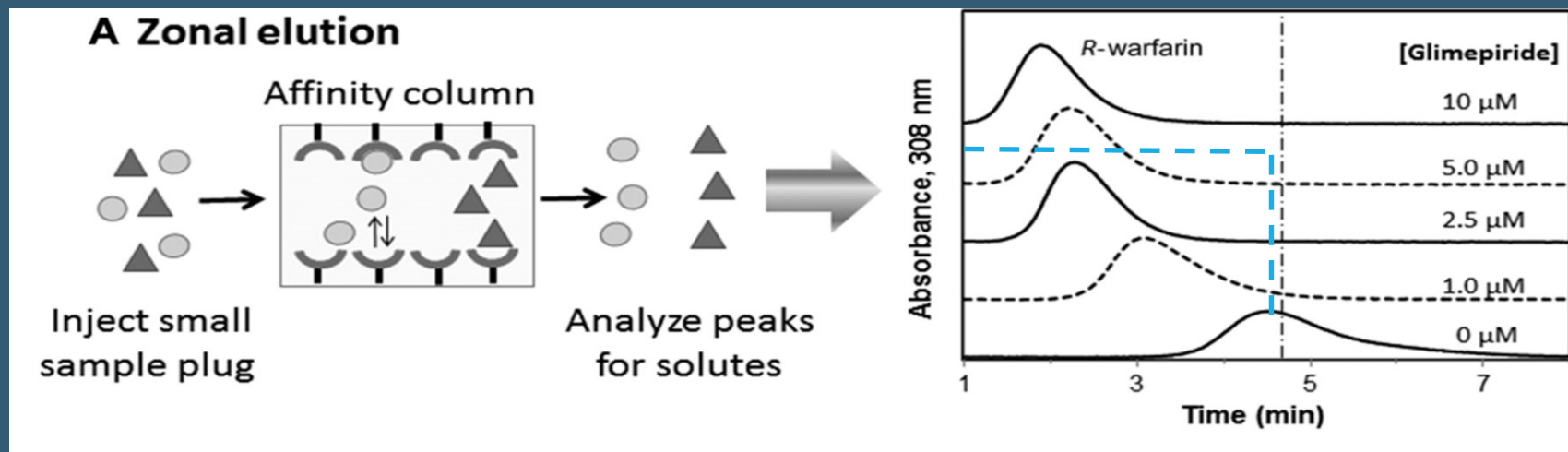
**Polymer - zakotvený ligand**

U analýzy nosiče se zakotveným ligandem je třeba  $K'$  se musí nacházet v intervalu ( $10^{-6}$  -  $5 \cdot 10^{-4}$ ).  $K'$  bývá zpravidla slabší než  $K$ .

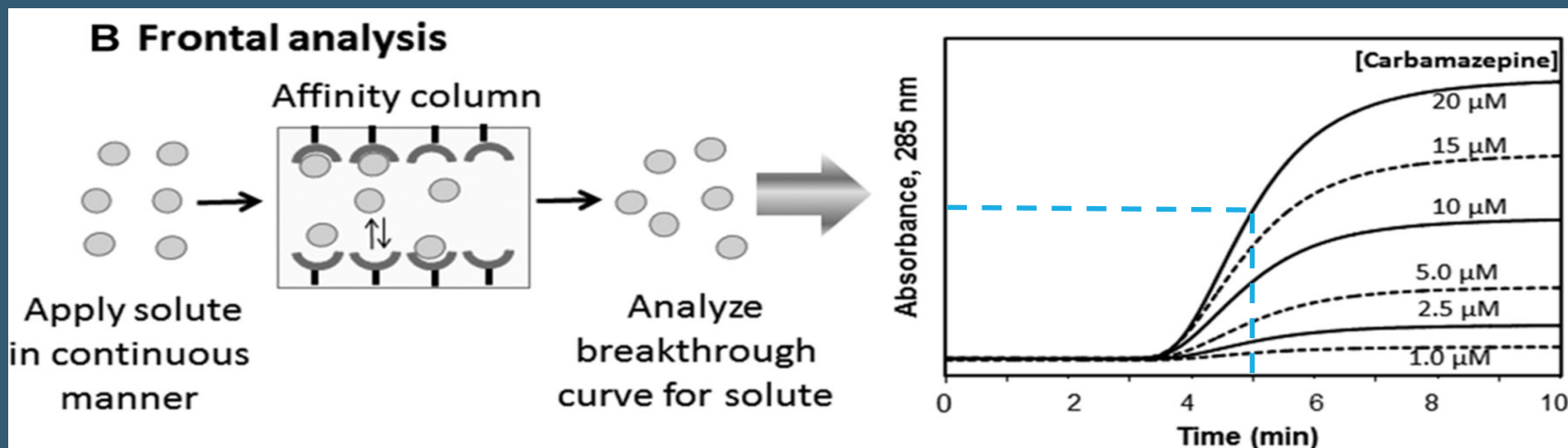
polymery ( $M_r$ )



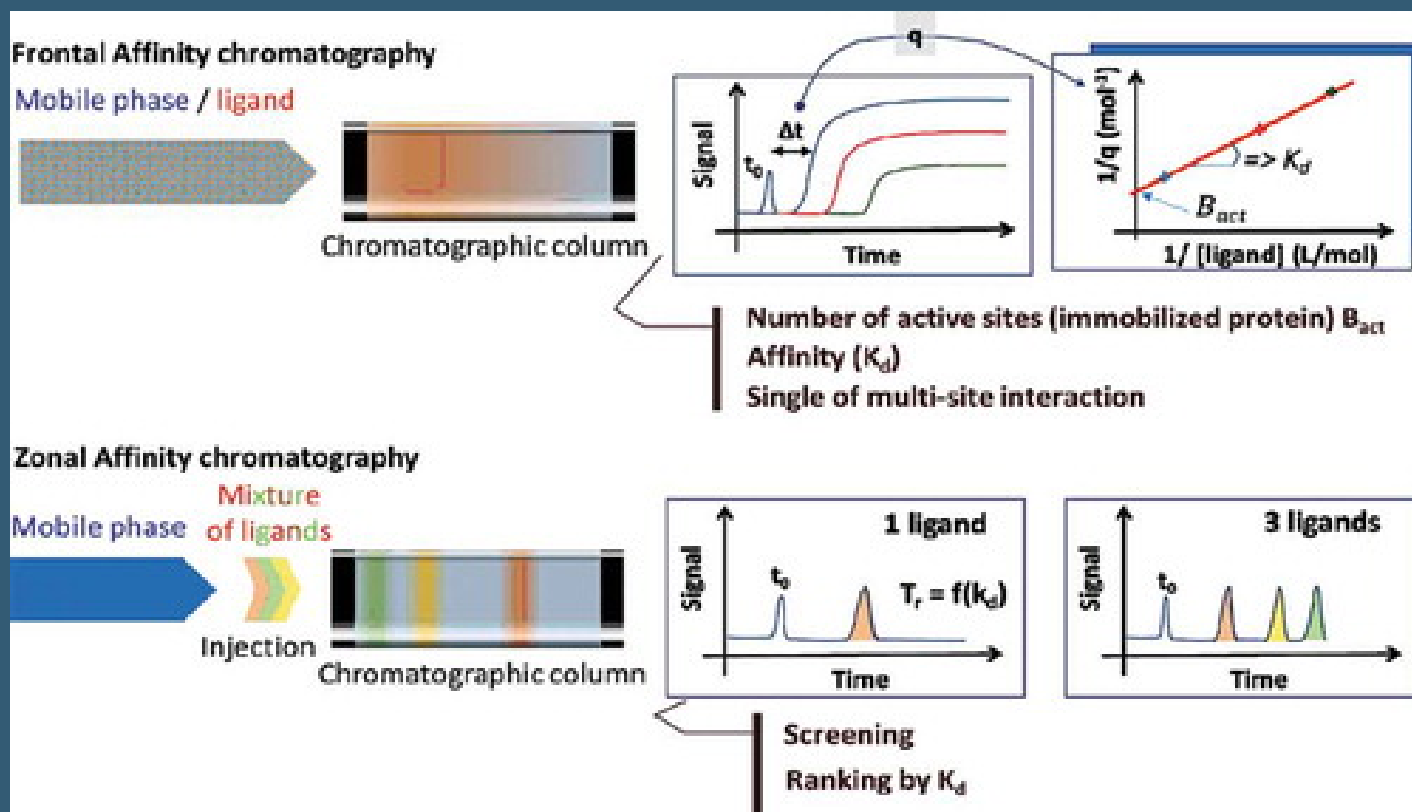
# Analytická afinitní chromatografie



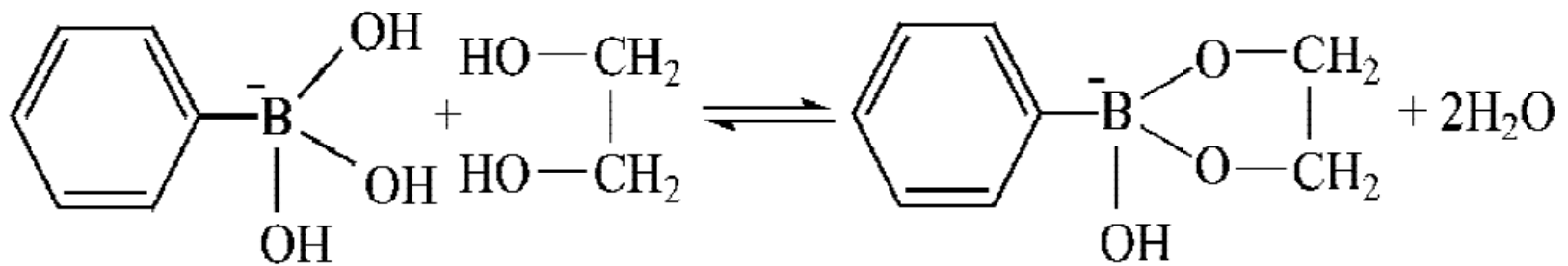
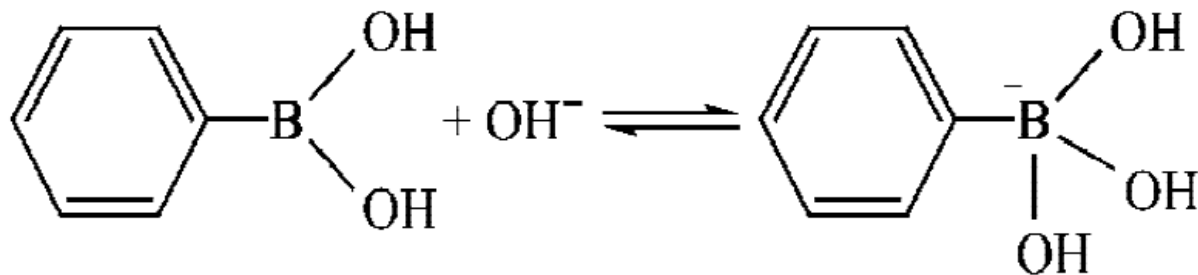
# Analytická afinitní chromatografie



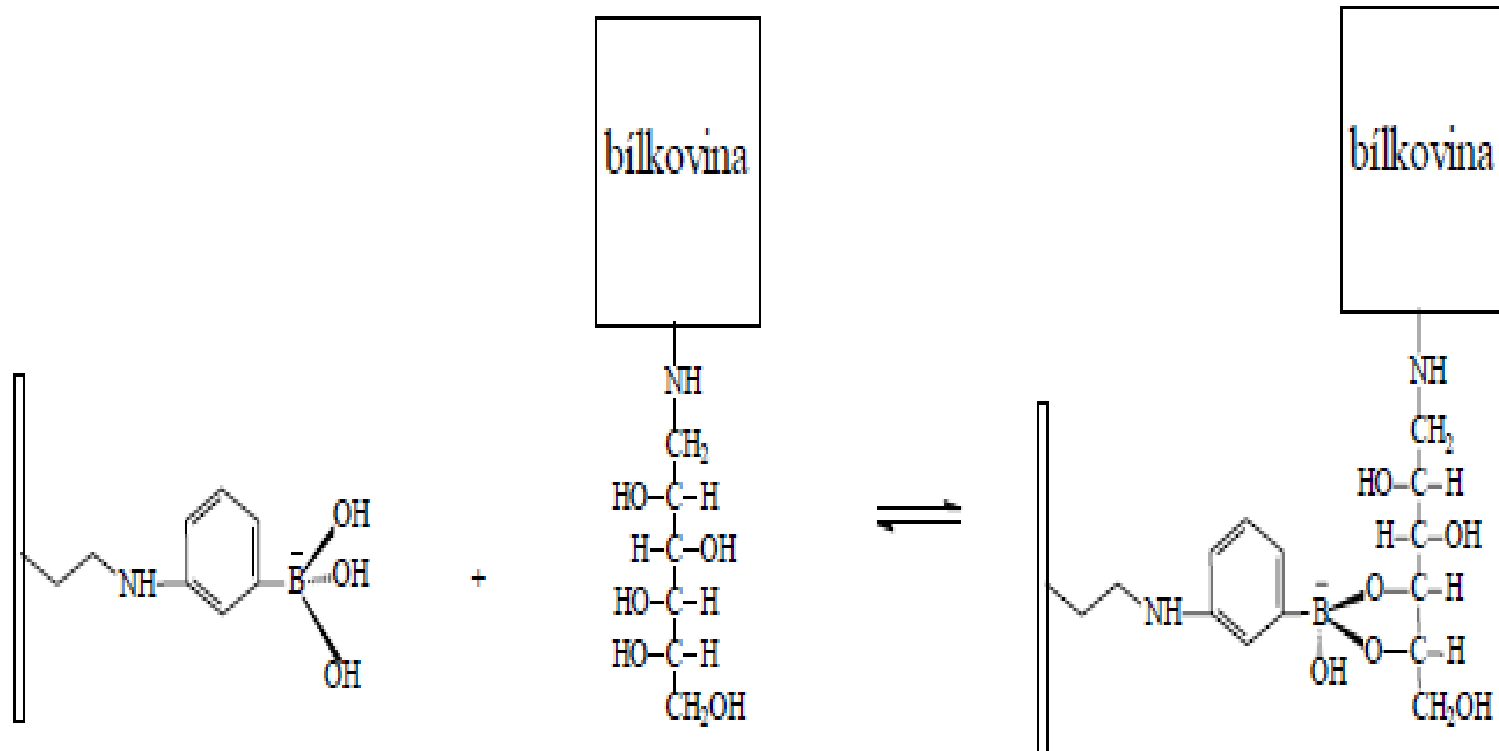
# Analytická afinitní chromatografie



# BORONÁTOVÁ CHROMATOGRRAFIE



# BORONÁTOVÁ CHROMATOGRRAFIE





# 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 CHROMATOGRRAFIE

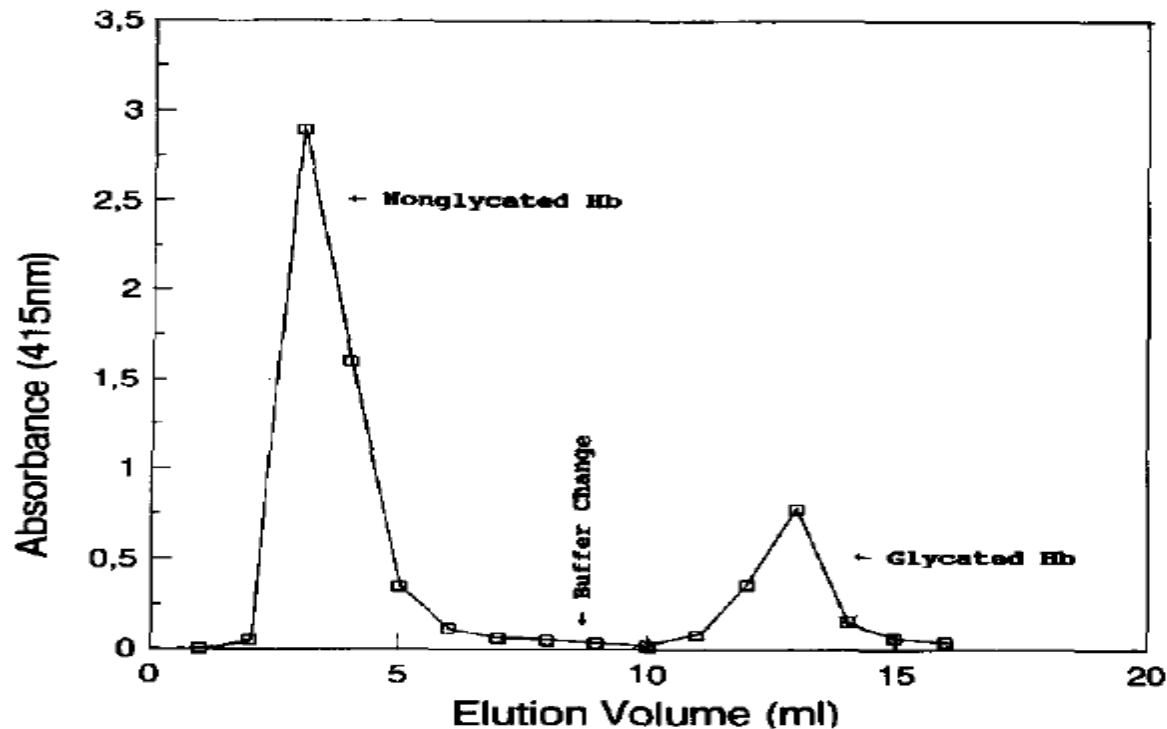


Fig. 3. Separation of glycated Hb and non-glycated Hb on a 3-ml boronate Sephacryl column. Chromatographic conditions were as described in Experimental; 100  $\mu$ l of sample were applied to the column, and 1-ml fractions were collected.

# AFINITNÍ ULTRAFILTRACE



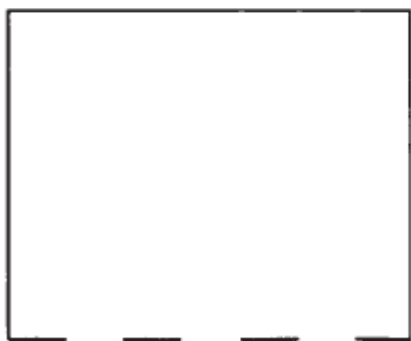
makromolekulární afinitní ligand



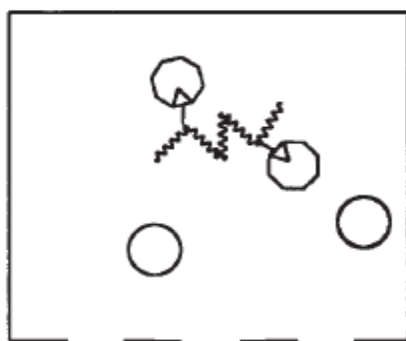
purifikovaná bílkovina



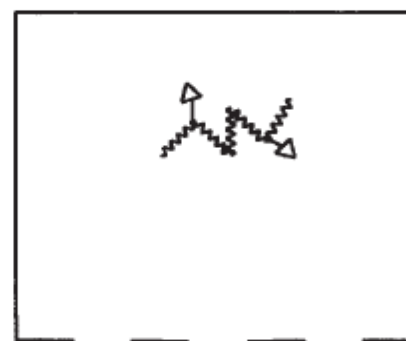
balastní bílkovina



inkubace

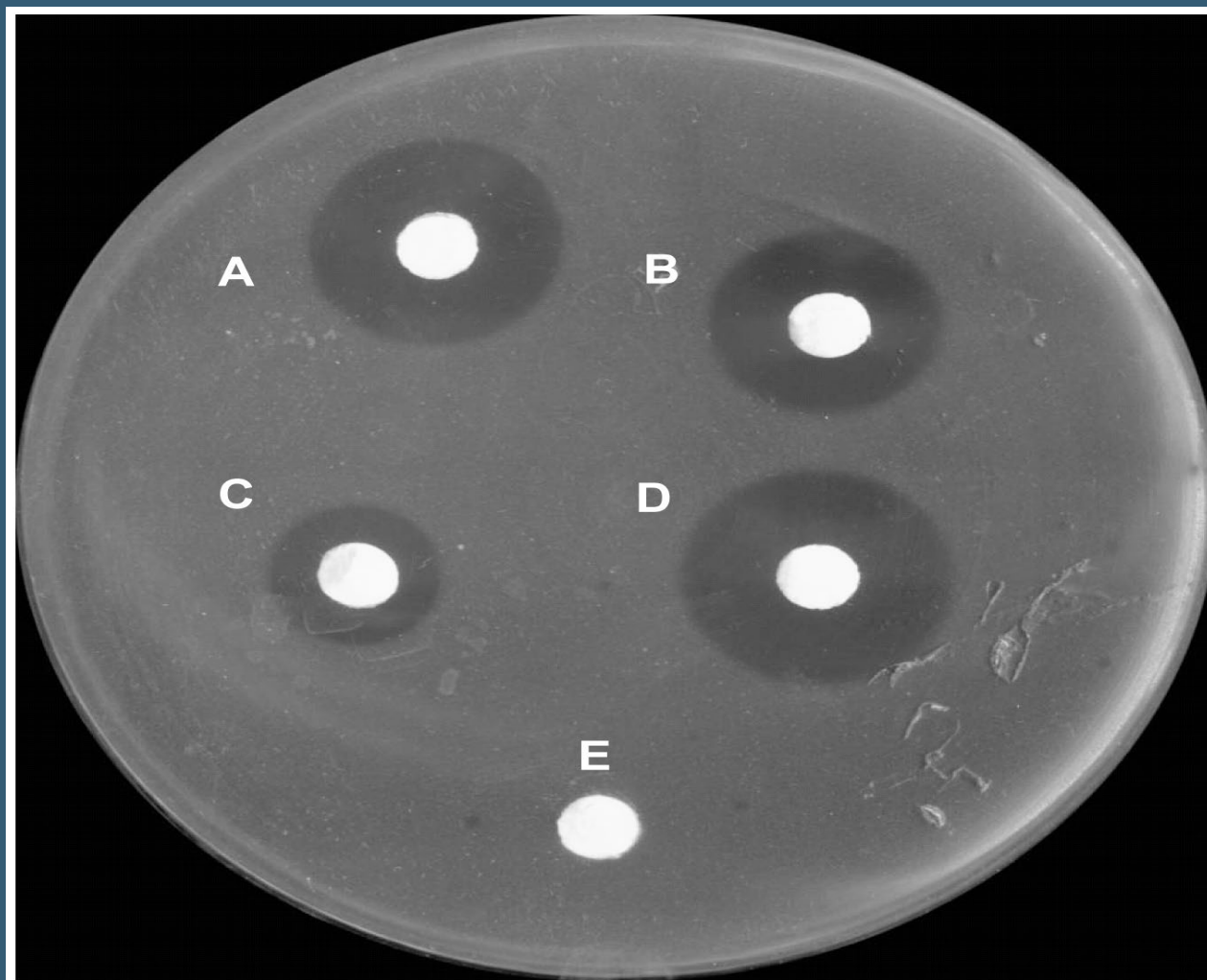


promývání

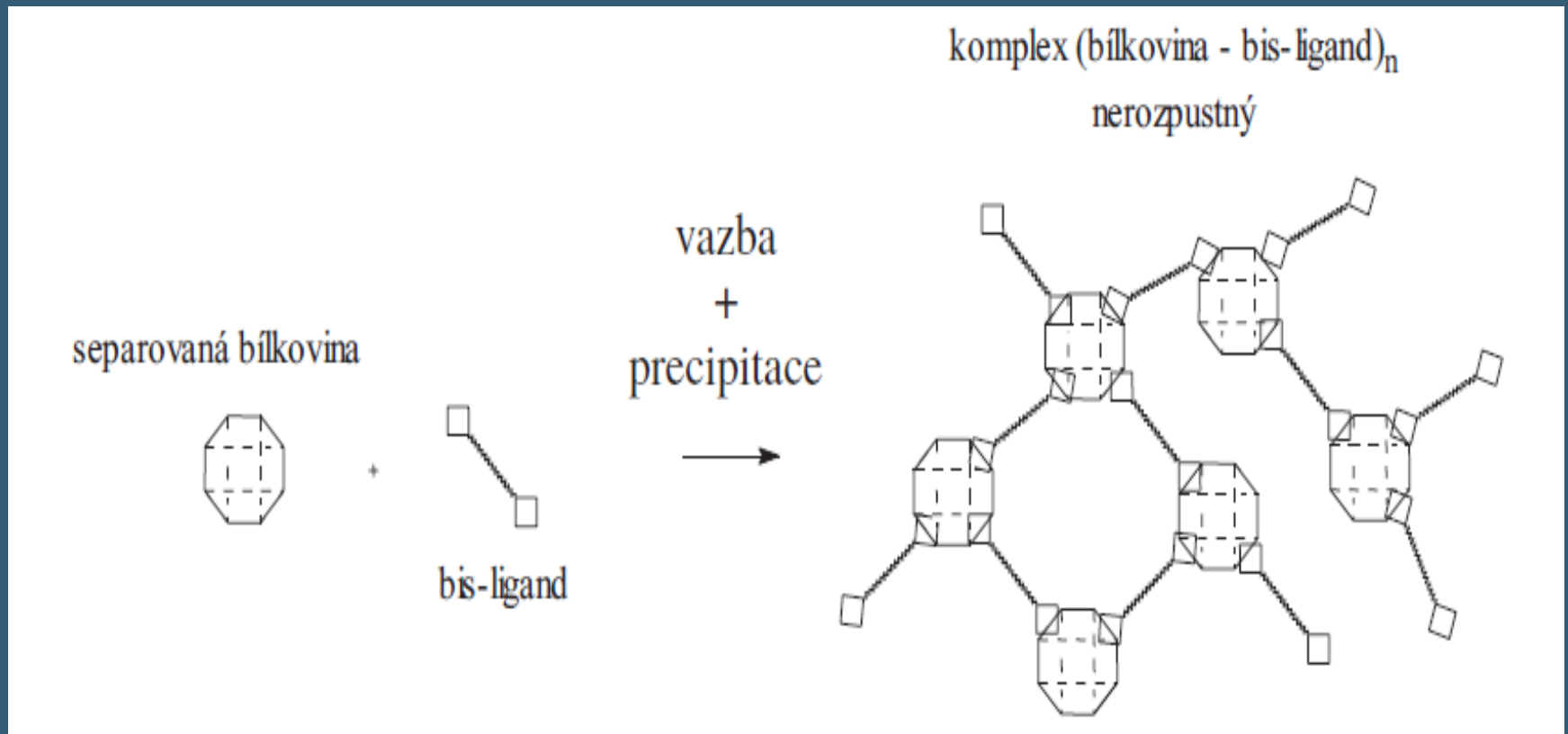


eluce

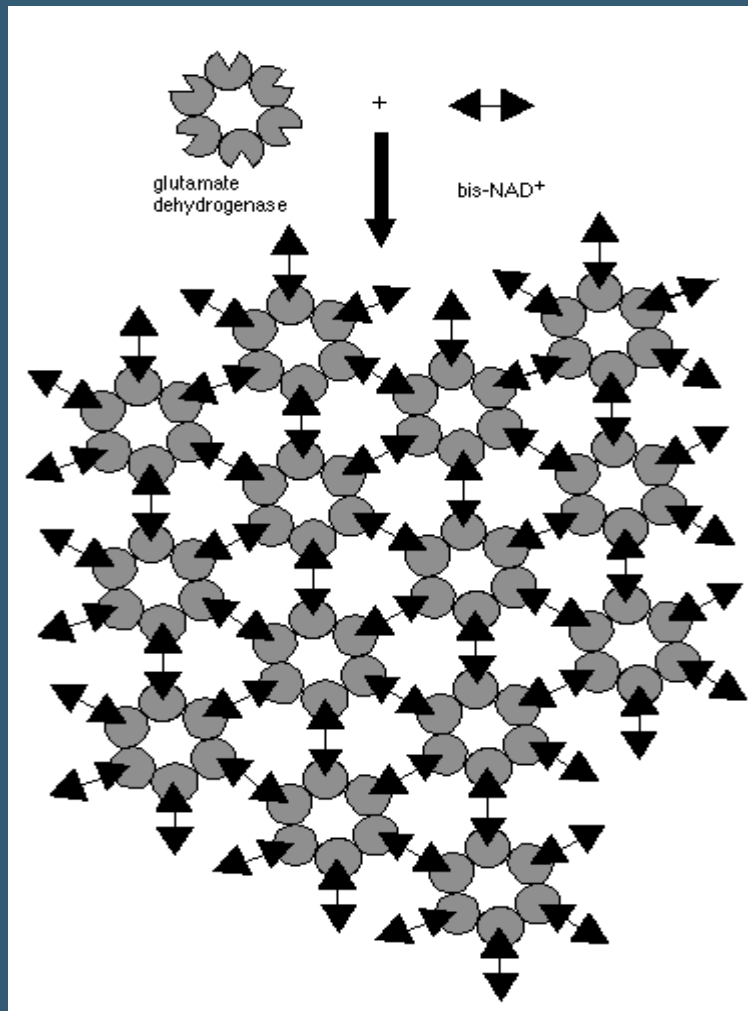
# AFINITNÍ ULTRAFILTRACE



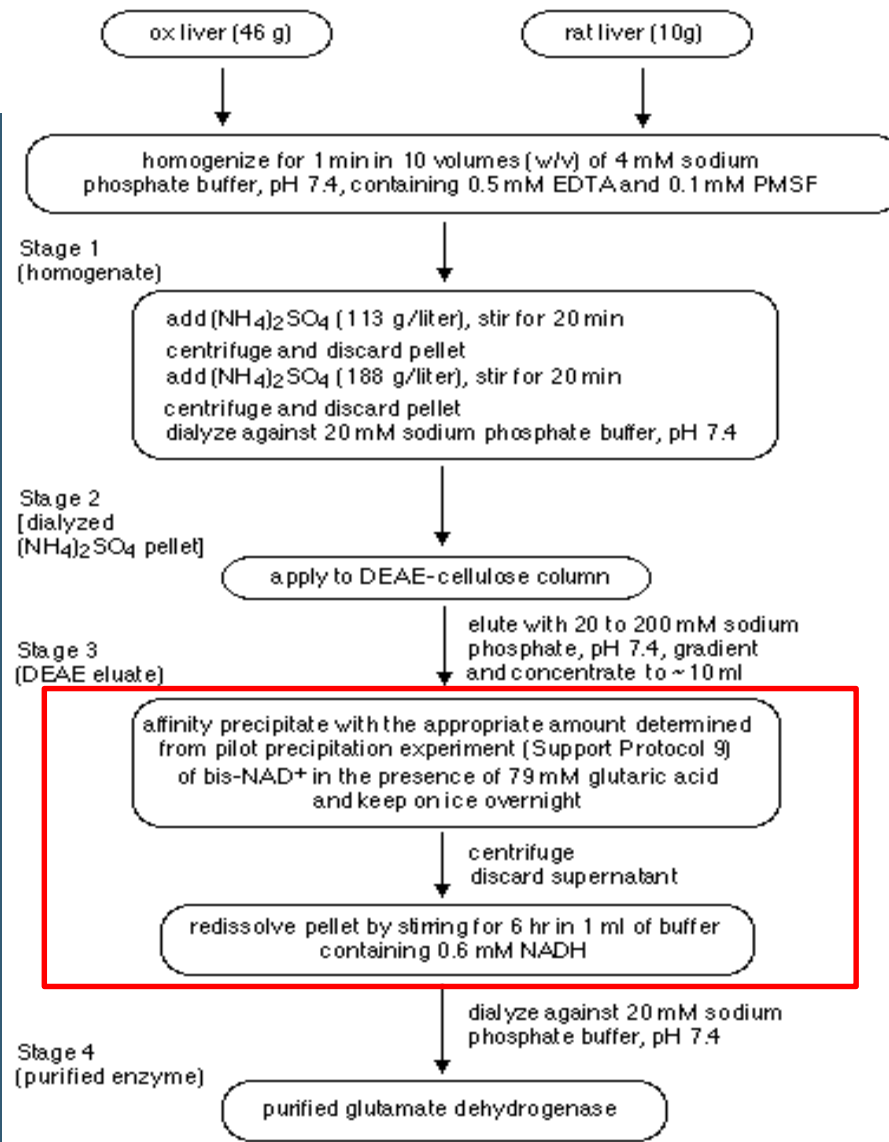
# AFINITNÍ PRECIPITACE



# 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) <sup>a</sup>	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

<sup>a</sup>Protein concentration determined by the Lowry method.

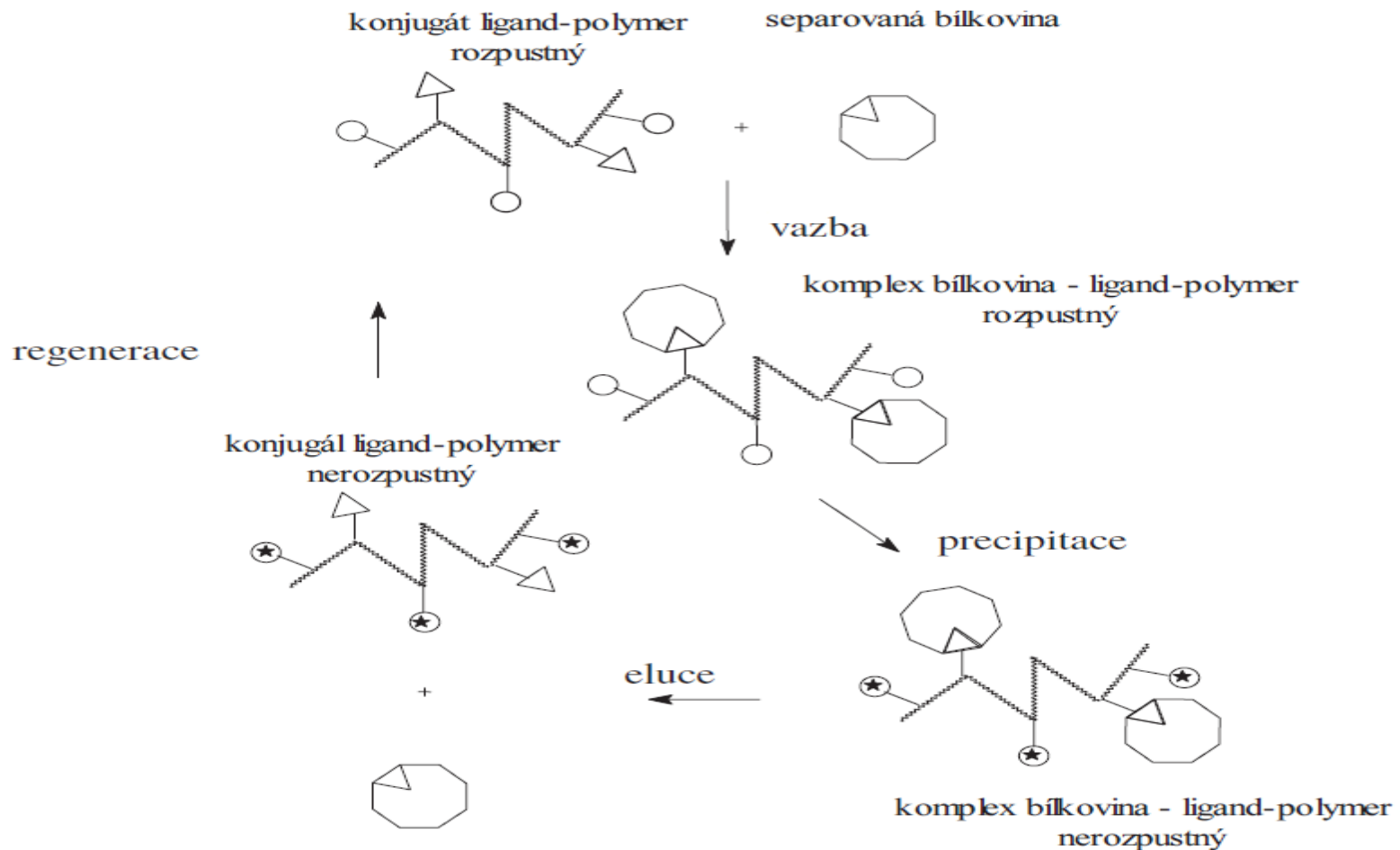
**Table 1.4.8** Purification of Glutamate Dehydrogenase From Rat Liver According to Alternate Protocol 1

Stage (see Fig. 1.4.4)	Volume (ml)	Total protein (mg) <sup>a</sup>	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

<sup>a</sup>Protein concentration determined by the Lowry method.



# AFINITNÍ PRECIPITACE



# AFINITNÍ PRECIPITACE

