



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Špela KRALJ

**UPORABA AFINITETNE KROMATOGRFIJE V
BIOTEHNOLOGIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Špela KRALJ

**UPORABA AFINITETNE KROMATOGRFIJE V
BIOTEHNOLOGIJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**USAGE OF AFFINITY CHROMATOGRAPHY IN
BIOTECHNOLOGY**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2018

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Hrvoja Petkovića.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Hrvoje PETKOVIĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: izr. prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predavitve: 14. 9. 2018

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 602.1:543.544(043.2)
- KG biotehnologija, afinitetna kromatografija, nosilci, ligandi, biotehnološke aplikacije
- AV KRALJ, Špela
- SA PETKOVIĆ, Hrvoje (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
- LI 2018
- IN UPORABA AFINITETNE KROMATOLOGRAFIJE V BIOTEHNOLOGIJI
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VI, 22 str., 3 pregl., 10 sl., 43 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V pričujočem delu so predstavljeni osnovni principi afinitetne kromatografije, na podlagi katerih deluje ta ločevalna tehnika in možnosti njene uporabe. Ločevanje molekul je možno zaradi njihovih kemičnih in fizikalnih lastnosti, kar omogoča tvorbo specifičnih povezav z ligandi. To je osnova na podlagi katere so se razvili številni protokoli afinitetnega ločevanja. V tem diplomskem delu so predstavljeni različni nosilci in ligandi uporabljeni v ločevalnih kolonah. Opisanih je več tehnik afinitetne kromatografije – ločevanje proteinov na podlagi metilacijskih vzorcev pridobljenih v posttranslacijskih modifikacijah, ločevanje nekorirajoče RNA, ločevanje plazmidnih izoform in ločevanje na podlagi stereoizomerije. Številne možne kombinacije nosilcev, ligandov in pogojev kot so pH vrednost, ionska moč etc. uporabljenih med ločevanjem molekul omogočajo izredno aplikativnost uporabe afinitetne kromatografije za ločevanje strukturno najrazličnejših tarčnih molekul. Tehnika predstavlja zelo pomemben korak v čiščenju molekul tako v akademskem kot v industrijskem okolju.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 602.1:543.544(043.2)
- CX biotechnology, affinity chromatography, matrixes, ligands, biotechnological applications
- AU KRALJ, Špela
- AA PETKOVIĆ, Hrvoje (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2018
- TI USAGE OF AFFINITY CHROMATOGRAPHY IN BIOTECHNOLOGY
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 22 p., 3 tab., 10 fig., 43 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Following work presents basic principles of affinity chromatography on which this separation technique is based and its application. This separation approach is based on physical and chemical properties of bioactive molecules, which specifically bind to target ligand. Based on this principle, a number of affinity separation procedures have been developed. Different separation matrices and ligands are reviewed in this seminar work. Therefore, a number of affinity techniques are described such as protein separation approaches based on methylation post-translational modifications, separation of non-coding RNA, separation of plasmid isoforms and separation based on stereochemistry. Various combinations of matrices, ligands and conditions like pH value, ionic strength, etc. that can be used during separations of molecules are making this technique applicable to structurally diverse target molecules. Therefore, this technique presents very important step in purification at academic as well as industrial environment.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VI
1 UVOD	1
2 OSNOVNI PRINCIPI AFINITETNE KROMATOGRFIJE	1
3 MEHANIZMI, KI OMOGOČAJO AFINITETNO LOČEVANJE	3
3.1 IZJEMA POTRJUJE PRAVILO	4
4 NOSILCI	5
5 LIGANDI	7
5.1 PROTEINI, KI VEŽEJO PROTITELESA	8
5.2 FUZIJSKI PROTEINI	9
5.2.1 Ločevanje z imobiliziranimi kovinskimi ioni	10
5.2.2 Glutation S-transferaza	11
5.2.3 Maltoza vezavni protein	12
5.2.4 Strep značka	12
5.2.5 Kalmodulin vezavni peptid	12
5.2.6 Intein-hitin vezavna domena	13
5.2.7 Biarzenski-tetracisteinski sistem	13
6 VEZAVA LIGANDOV NA NOSILEC	14
7 ELUCIJA	16
8 BIOTEHNOLOŠKE APLIKACIJE	17
8.1 LOČEVANJE PROTEINOV NA PODLAGI METILACIJSKIH VZORCEV	17
8.2 ČIŠČENJE NEKODIRAJOČE RNA	17
8.3 ČIŠČENJE PLAZMIDOV	18
8.4 LOČEVANJE NA PODLAGI STEREOIZOMERIJE	18
9 ZAKLJUČEK	19
10 VIRI	19

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Najpogosteje uporabljeni nosilci	6
Preglednica 2: Najpogosteje uporabljeni ligandi	8
Preglednica 3: Mehanizmi elucije	17

KAZALO SLIK

Slika 1: Potek ločevanja pri afinitetni kromatografiji	2
Slika 2: Simulacija kromatograma pri uporabi različnih ravnotežnih konstant K_a	5
Slika 3: Disaharid agarobioza, ki tvori linearni polimer agarozo	6
Slika 4: Nosilec z zrnji in monolitni nosilec	7
Slika 5: Interakcija med histidinsko značko in kovinskim kelatom	11
Slika 6: Mehanizem delovanja inteina	13
Slika 7: Metoda Schiffove baze	14
Slika 8: CDI metoda	15
Slika 9: Epoksi metoda	15
Slika 10: DSC metoda	16

1 UVOD

Afinitetna kromatografija, za razliko od ostalih separacijskih tehnik, za ločevanje tarčnih molekul izkorišča mehanizme, ki so prisotni v naravi in temeljijo na interakcijah, ki se pojavljajo med molekulami. Kompleksnost bioloških interakcij zahteva ozko specifične pogoje v katerih bodo le-te kar najbolje potekale, hkrati pa ravno ti točno določeni pogoji omogočajo veliko natančnost pri ločevanju, so specifični za določen tip interakcije.

Afinitetno ločevanje obsega šest osnovnih korakov (Wilchek in Chaiken, 2000; Magdeldin in Moser, 2012):

1. Aktivacija nosilca.
2. Vezava liganda na nosilec.
3. Inkubacija kolone z vzorcem, med katero se tarčna molekula veže na ligande v koloni.
4. Izpiranje neželenih komponent vzorca.
5. Elucija tarčne molekule, doseže se s spremembo pogojev znotraj kolone, ki destabilizirajo interakcije med tarčno molekulo in ligandi. Navadno so to sprememba ionske moči, pH, temperature, prisotnost kompetitorjev.
6. Regeneracija kolone.

Izvedbo prve afinitetne kromatografije je objavil E. Starkenstein leta 1910. Za izolacijo α -amilaz se je poslužil kolone v kateri je bil kot ligand uporabljen škrob. V članku se je ukvarjal z aktivnostjo α -amilaz ob prisotnosti klora, sama vezava encimov na škrob je bila zanj postranskega pomena in je le kratko omenjena (Pfaunmiller in sod., 2015; Magdeldin in Moser, 2012).

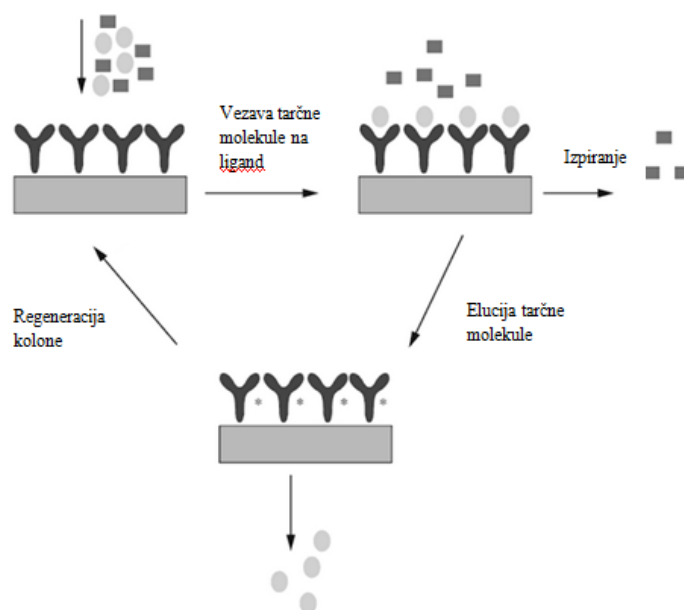
Izraz afinitetna kromatografija se v literaturi prvič pojavi v delu Pedra Cuatrecasasa, Christiana B. Anfinsena in Meira Wilcheka leta 1968 (Cuatrecasas in sod., 1968). V njem opisujejo uporabo afinitetne kromatografije za ločevanje stafilokoknih encimov α -kimotripsina in karboksipeptidaze A s pomočjo v koloni vezanega kompetitivnega inhibitorja.

2 OSNOVNI PRINCIPI AFINITETNE KROMATOGRFIJE

Afinitetna kromatografija je analitska tehnika, ki omogoča ločevanje molekul na podlagi različnih afinitet vezave na nosilec z ligandom kateremu ga izpostavimo v kolonah. Ob izpostavitvi vzorca ligandom v ločevalni koloni, bo med tarčno molekulo, katere separacijo želimo doseči, in ligandi prišlo do tvorbe kompleksa. Gre za šest-stopenjski proces sestavljen iz aktivacije nosilca, vezave liganda na nosilec, adsorpcije tarčne molekule na ligand,

izpiranje in elucijo ter ponovno regeneracijo kolone, ki je tako na voljo za ponovno uporabo (Wilchek in Chaiken, 2000).

Stacionarno fazo v koloni sestavljajo nosilec in nanj vezani ligandi. Le-ta služi kot inertna podlaga, na katero so imobilizirani ligandi, ki reverzibilno vežejo tarčno molekulo.



Slika 1: Potek ločevanja pri afinitetni kromatografiji (Hage in sod., 2017: 320). Prvi korak predstavlja vstop mobilne faze v ločevalno kolono. Sledi reverzibilna vezava tarčne molekule na ligand. Z izpiranjem se odstranijo neželene molekule, katere niso tarča ločevanja. S spremembo mobilne faze se doseže elucija tarčne molekule s kolone. Po potrebi sledi še regeneracija kolone, da je le-ta spet pripravljena na uporabo.

Pri osnovnem ločevanju s pomočjo afinitetne kromatografije se uporabljata dve mobilni fazi. V prvo mobilno fazo oziroma nalagalni puferski, ki teče skozi kolono, je dodan vzorec v katerem je tarčna molekula, katere ločitev želimo doseči. V kolikor so bili glede na tarčno molekulo izbrani primerni ligandi, se bo le-ta reverzibilno vezala, saj ima do ligandov večjo afiniteto kot ostale komponente vzorca v koloni. Sledi izpiranje kontaminantov oziroma molekul, ki jih ne želimo pridobiti z ločevanjem. Neželene ionske interakcije se lahko odpravi z dodajanjem soli ali spreminjanjem vrednosti pH, hidrofobne z zmanjševanjem koncentracije soli, spreminjanjem vrednosti pH ali dodatkom detergentov. Kontaminante se lahko odstranjuje tudi z uporabo kompetitorjev, ki imajo šibko afiniteto do ligandov. Na uspešno izpiranje za čim višjo odstranitev kontaminantov in čim manjšo izgubo tarčne molekule vpliva tudi pretok in količina pufra za izpiranje – med 5 in 10 kolonskih volumnov v določeni časovni enoti. Nato skozi kolono steče druga mobilna faza oziroma elucijski puferski, ki omogoči porušitev vezi med tarčno molekulo in ligandom, saj ob spremenjenih pogojih ta kompleks ni več energijsko ugoden. Elucija tarčne molekule s kolone se doseže s spremembo pH, ionske moči, temperature, prisotnostjo kompetitorjev za ligande, ali dodatkom kaotropnih agentov.

Slednji zmanjšujejo raven urejenosti med vodikovimi vezmi v vodi in tako destabilizirajo nativno obliko tarčne molekule (Salvi in sod., 2005). Po eluciji tarčne molekule kolono zopet tretiramo z nalagalnim pufrom, s čimer dosežemo regeneracijo kolne za ponovno uporabo (Pfaunmiller in sod., 2012).

3 MEHANIZMI, KI OMOGOČAJO AFINITETNO LOČEVANJE

Na učinkovitost ločevanja vpliva več parametrov. Količina v koloni imobiliziranega liganda, moč interakcij med ligandom in tarčno molekulo ter kinetika povezovanja med njima. Kadar opazujemo tvorbo kompleksa med imobiliziranim ligandom (L) in tarčno molekulo (T) med katerima je možna tvorba povezave na samo en način velja Enačba 1.

$$K_a = \frac{k_a}{k_d} = \frac{\{T-L\}}{[T]\{L\}} \quad \dots (1)$$

K_a je asociacijska ravnotežna konstanta za tvorbo kompleksa med tarčno molekulo in ligandom (T-L). k_a in k_d sta konstanti stopnje asociacije in disociacije za vzpostavitev kompleksa (T-L). k_a se izraža v ($M^{-1}s^{-1}$), k_d pa v (s^{-1}). $[T]$ je molarna koncentracija (M) tarčne molekule v mobilni fazi med ravnotežjem, $\{T-L\}$ in $\{L\}$ pa predstavljata površinsko koncentracijo (mol/cm^2) prisotnega kompleksa in liganda v koloni med ravnotežjem. K_a se izraža v (M^{-1}) (Bahraresh in sod., 2003; Pfaunmiller in sod., 2015).

Asociacijska ravnotežna konstanta K_a izraža afiniteto med ligandom in molekulo, ki se veže nanj kadar se med njima znotraj kolone vzpostavi ravnotežje. Če je vrednost K_a višja od $10^5 M^{-1}$, kar je pri afinitetni kromatografiji tudi zaželeno, do elucije zaradi močne afinitete ne pride spontano, temveč je za to potrebna sprememba pogojev v mobilni fazi, ki teče skozi kolono (Pfaunmiller in sod., 2015).

Kadar poteka elucija pri linearnih pogojih in je pretok dovolj nizek, da se med ločevanjem ustvarja lokalno ravnotežje, velja spodnja enačba 2. V tem primeru je retencijski faktor k odvisen od asociacijske ravnotežne konstante K_a .

$$k = K_a m_L / V_M \quad \dots (2)$$

m_L predstavlja množino ligandov (mol), ki so z vezavnimi mesti na voljo v koloni, V_M pa je mrtvi volumen kolone, ki je definiran kot preostali volumen skozi katerega se giba mobilna faza v kromatografskem sistemu, ki ni znotraj kromatografske kolone. Sem spadajo vstop, detektorji, povezovalne cevi in druge morebitne komponente (Hinshaw, 2015). Retencijski faktor lahko pridobimo tudi preko retencijskega časa t_R in časa potrebnega za prehod mobilne

faze od injektorja do detektorja oziroma t_M , kot je vidno v enačbi 3. Če je vrednost retencijskega faktorja k enaka 0, potem ne prihaja do interakcije s kolono in se tarčna molekula izpira skupaj z nalagalnim pufrom. Višja kot je vrednost retencijskega faktorja k , kasneje prihaja do elucije. Zaželeni vrednosti so 1-10 (Zopf in Ohlson, 1990).

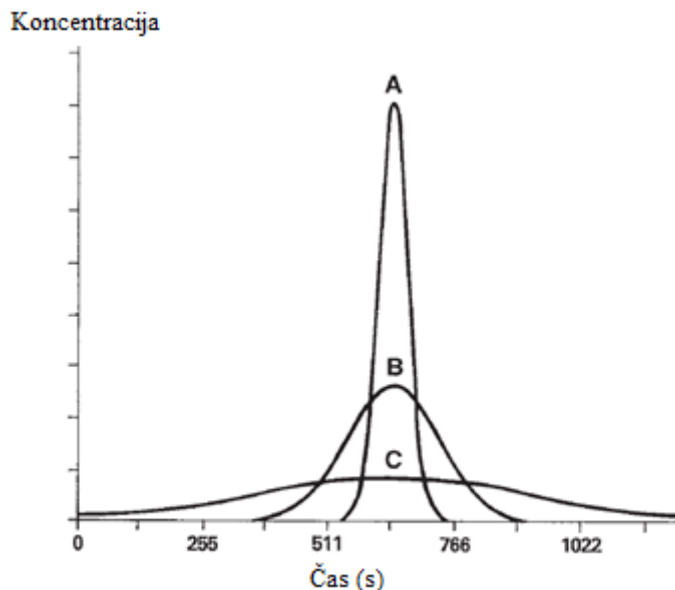
$$k = (t_R - t_M) / t_M \quad \dots (3)$$

3.1 IZJEMA POTRJUJE PRAVILO – NIZKO AFINITETNA KROMATOGRFIJA

Glede na osnovna načela afinitetne kromatografije je za dobro ločevanje z ostrimi in ozkimi vrhovi na kromatogramu potrebna visoka vrednost K_a za vezavo med ligandom in tarčno molekulo. Upoštevajoč enačbo 4, ki definira retencijski faktor (k'), pa se odpira tudi druga možnost, ki omogoča ločevanje pri nizki vrednosti K_a . Ta tehnika se imenuje nizko afinitetna kromatografija (Strandh in sod., 2000).

$$k' = CLK_a \quad \dots (4)$$

L je koncentracija liganda (mg/ml), K_a predstavlja asociacijsko ravnotežno konstanto s katero se vežeta tarčna molekula in ligand, C je konstanta, navadno znaša 0,5-1,0, ki je odvisna od karakteristik nosilca, poroznosti nosilca in mrtvega volumna sistema (Zopf in Ohlson, 1990). Pri običajnih afinitetnih kromatografijah ločitev dosežemo pri visokih vrednostih K_a ($K_a > 10^5/M$) in nizkih vrednostih L , torej nizkih koncentracijah ligandov v koloni. Upoštevajoč enačbo je za uspešno ločevanje mogoče doseči tudi pri nizkih vrednostih K_a ($K_a < 10^5/M$) in visokih koncentracijah liganda v koloni L . Zaradi nižje afinitete tarčne molekule le-ta znotraj večkrat disociira z liganda in se zopet veže ali pa tvori več šibkih interakcij hkrati (Strandh in sod., 2000).



Slika 2: Računalniška simulacija kromatograma pri uporabi različnih ravnotežnih konstant K_a . Retencijski faktor k' ostaja konstanten, medtem ko vrednosti K_a znašajo $A=10^3 \text{ M}^{-1}$, $B=10^4 \text{ M}^{-1}$, $C=10^5 \text{ M}^{-1}$. Koncentracija liganda L se z višjimi asociacijskimi konstantami ravnotežja niža (Strandh in sod., 2000: 9).

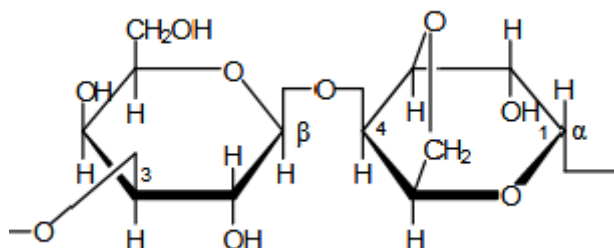
Učinki uporabe različnih vrednosti K_a pri enakem vzorcu na širino vrhov so vidni iz simulacijskega kromatograma. Vrednost k' je konstantna, $K_a(A) = 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_a(B) = 10^4 \text{ M}^{-1}$, $K_a(C) = 10^5 \text{ M}^{-1}$, vrednost L pa se niža z višjimi vrednostmi K_a . Ločevanje z najožjim vrhom se pojavi pri najnižji vrednosti K_a in najvišjih vrednostih L .

Pri K_a vrednostih, ki jih imamo pri šibki afinitetni kromatografiji izpiranje poteče pri izokraskih pogojih zato sprememba sestave mobilne faze v elucijskem pufru ni potrebna (Pfaunmiller in sod., 2015).

4 NOSILCI

Nosilci znotraj kolon morajo poleg ogrodja, ki ga nudijo za vezavo ligandov, delovati stabilno skozi več ciklov ločevanja, vzdržati delovni tlak, ohranjati svoje lastnosti znotraj mobilne faze in tvoriti čim manj, oziroma delovati brez nespecifičnih vezav s komponentami v vzorcu. Poleg zadostne zamreženosti nosilca, da lahko dosežemo kar čim večje število ligandov na nosilec v koloni, pa je za uspešno ločevanje potreben zadosten pretok mobilne faze z vzorcem (Pfaunmiller in sod., 2015).

Kot nosilec se pogosto uporablja polimerizirana agarobioza, ki tvori polimer agarozo. V uporabi so tudi škrobni in celulozni nosilci. Prav tako tudi silicijev dioksid, steklo, in sintetični organski polimeri hidroksipolistiren, polimetakrilat, polietersulfon, agarozakrilamidni kopolimeri in dekstran-akrilamidni (Pfaunmiller in sod., 2015).

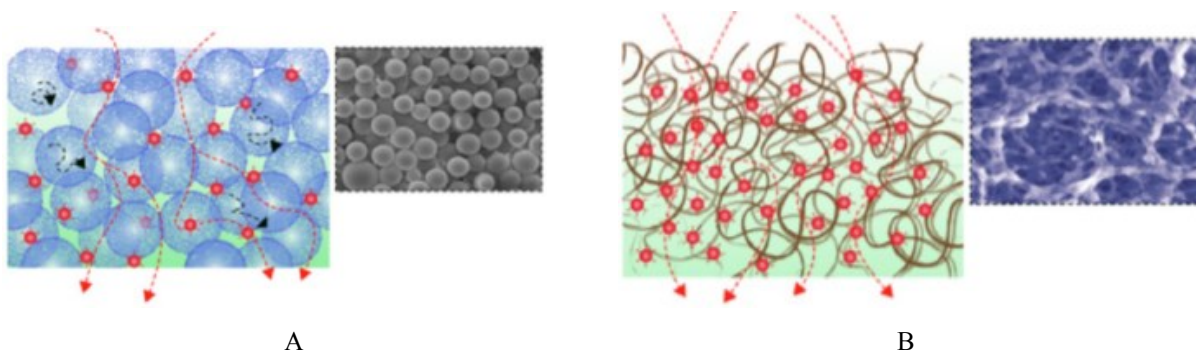


Slika 3: Disaharid agarobioza, ki tvori linearni polimer agarozo. Izmenično si sledijo enote D-galaktoze (levo) in 3,6-anhidro-L-galaktopiranoze (desno), povezane z β (1 \rightarrow 4) vezjo in α (1 \rightarrow 3) vezjo. Znotraj gela se med linearnimi verigami tvorijo vodikove vezi, ki stabilizirajo zamreženo strukturo (Sigma Aldrich, 2018: 1).

Glede na material ki je uporabljen za nosilec v koloni, ločimo visoko in nizko ločljivostne tehnike. Tehnike z visoko ločljivostjo omogočajo ločevanje z ostrejšimi vrhovi na kromatogramu in manj prekrivanja vrhov. Pri kromatografiji nizke ločljivosti so največkrat uporabljeni polimeri ogljikovih hidratov npr. agarosa in sintetični organski polimeri, ki tvorijo zrna velikega premera, katerih struktura ni povsem trdna. Za pretok snovi skozi gel zadostuje sila gravitacije, zato je uporaba takšnih nosilcev cenejša, saj ni potrebno ustvarjanje dodatnega pritiska. Počasen masni prenos in dovzetnost za poškodbe ob večjem pritisku ne dovoljujeta hitrega in zelo natančnega ločevanja. Pri afinitetni kromatografiji visoke ločljivosti so nosilci večinoma trdni monoliti, ki so odporni na visoke delovne pritiske in hitreje pretoke. Kljub temu, da je tehnika dražja, sta hitrost in natančnost le-te razloga za njeno razširjeno uporabo. Med uporabljene materiale spadajo steklo, silicijev dioksid in hidroksipolistiren (Pfaunmiller in sod., 2015).

Preglednica 1: Najpogosteje uporabljeni nosilci

Ogljikohidratni nosilci	Agarosa, celuloza
Modificirani anorganski nosilci	Steklo, silicijev dioksid
Modificirani organski nosilci	Agarosa/akrilamidni kopolimeri, dekstran/akrilamidni kopolimeri, hidroksipolistiren, polimetakrilat, polietersulfon



Slika 4: Nosilec z zrnji in monolitni nosilec. Pod A se nahajata shema in fotografija nosilca z zrnji, ki omogoča izvajanje kromatografij nizke ločljivosti, desno pod B pa shema in fotografija s kanali prepredega monolitnega nosilca, ki omogoča izvajanje kromatografij visoke ločljivosti (Zhao in sod., 2018: 7).

Pri nosilcih iz zrn se ligandi nahajajo na njihovi površini. Pri ločevanju večjih molekul lahko pride do njihovega izpiranja skozi kolono, saj ne morejo vstopiti v pore v gelu. Monolitni nosilci iz trših materialov so prepredegi s kanali poljubnih premerov, znotraj katerih se nahajajo ligandi, ki omogočajo hitro prehajanje mobilne faze in preprečujejo izpiranje večjih molekul (Zhao in sod., 2018).

5 LIGANDI

Z izbiro liganda, ki se uporablja v koloni določimo vrsto in uspešnost ločevanja. Poznamo ozko specifične in splošne ali skupinsko specifične ligande, s katerimi se doseže ločitev družine sorodnih molekul od vzorca. Splošni ligandi so lahko biološkega ali nebiološkega izvora, medtem ko so ozko specifični ligandi večinoma biološkega izvora. So specializirani za tvorbo vezave in ločevanje specifične molekule ali pa zgolj nekaj zelo sorodnih molekul. Specifični ligandi imajo višje asociacijske konstante od splošnih in zato tvorijo močnejše povezave s tarčnimi molekulami. Med ozko specifične ligande spadajo protitelesa, ki vežejo točno določene antigene, substrati in inhibitorji za ločevanje encimov in enoverižne nukleinske kisline, za vezavo komplementarnih DNA ali RNA molekul. Splošni ligandi znotraj kolone omogočijo ločevanje strukturno podobnih molekul. Sem spadajo lektini in boronati, ki omogočajo ločevanje na podlagi prepoznavanja ogljikovih hidratov, barvila za ločevanje encimov in proteinov ter proteina A in G za ločevanje imunoglobulinov.

Preglednica 2: Najpogosteje uporabljeni ligandi.

SPLOŠNI LIGANDI	TARČNE MOLEKULE
Proteini, ki vežejo protitelesa: protein A, protein B, protein G, protein A/G, manan vezavni proteini	Različni deli protiteles
Lektini	sladkorji, polisaharidi, glikoproteini, glikolipidi, glikokonjugati
Boronati: boronična kislina, fenilboronična kislina	sladkorji, kateholi, polisaharidi, glikoproteini, glikolipidi, nukleotidi, nukleinske kisline
Sintetična barvila: Cibacron Blue 3GA, Procion Yellow H-A, Procion Rubine MX-B, Procion Red HE-3B, timol modro, fenol rdeče	Dehidrogenaze, kinaze, hidrolaze, polimeraze, nukleaze, sintetaze, transferaze, CoA odvisni encimi, albumin, α -fetoprotein, imunoglobulini razreda G
Kelatorji kovin	Aminokislina, peptidi in proteini, ki lahko vežejo kovinske ione
SPECIFIČNI LIGANDI	TARČNE MOLEKULE
Molekule, ki vežejo encime: substrati, koencimi, kofaktroji, inhibitorji, protitelesa specifična za encime	Encimi
Nukleinske kisline: enovijačna in dvovijačna DNA in RNA, nukleotidi	Komplementarne nukleinske kisline, DNA ali RNA vezavni proteini in encimi
Protitelesa: Moloklonska in poliklonska protitelesa, Fab regije protiteles	Komplementarni antigeni
Značke fuzijskih proteinov: histidinske, tetraciklinske, glutation S-transferaza, maltoza vezavni protein, Strep značka	Označeni proteini

5.1 PROTEINI, KI VEŽEJO PROTITELESA

Proteini, ki vežejo protitelesa spadajo med biološke ligande. Naravno so prisotni na celični steni bakterij in vežejo različne imunoglobuline. Tako imenovani Protein A proizvaja bakterija vrste *Staphylococcus aureus*. Je eden izmed obrambnih mehanizmov bakterije pred imunskim sistemom gostitelja. Z vezavo konstantne regije imunoglobulinov na vezavne domene proteina A, je onemogočena normalna funkcija protiteles, ki sicer z variabilno regijo vežejo antigene na površini patogenov ter tako spodbujajo fagocitozo le-teh v telesu (Merino in sod., 2008). Protein G izvira iz G skupine rodu bakterij *Streptococcus* (Streptokok ..., 2013; Pfau Miller in sod., 2012). Prav tako veže konstantno regijo protiteles in s tem omogoči patogenu, da se izogne imunskemu sistemu gostitelja. Afiniteta Proteina G za vezavo s protitelesi je višja kot pri Proteinu A, prav tako pa prepozna večje število razredov imunoglobulinov. Poleg nativnega proteina G se uporablja tudi njegova rekombinantna

oblika, ki ima odstranjeno mesto za vezavo albumina. Tako se izognemo neželeni kontaminaciji očiščenega vzorca z albuminom, ki je drugače pogost kontaminant vzorcev, ki se uporabljalo za pridobivanje protiteles (Affinity ..., 2007).

Proteina A in G sta posebej učinkovita za čiščenje IgG imunoglobulinov, medtem ko pri ostalih razredih ne dajeta zadovoljivih rezultatov. Himerni rekombinantni protein A/G, nosi štiri vezavne domene za konstantno regijo (Fc) protiteles s proteina A in dve s proteina B. To omogoča širšo uporabo, saj protein A/G veže večji nabor izotipov imunoglobulinov. Odlično veže humane IgG, IgM, IgE in v šibkejši meri tudi IgD imunoglobuline, medtem ko z mišjimi imunoglobulini ne tvori povezav (Thermo Scientific ..., 2010). Tu velja omeniti PAM protein ali Protein A mimetični protein, ki je učinkovit sintetični ligand za vezavo imunoglobulinov preostalih razredov – IgM, IgA in IgE. Nasprotno kot pri Proteinih A in G, imajo PAM ligandi zaradi sintetične proizvodnje precej nižjo verjetnost za kontaminacijo z virusi, endogenimi pirogeni in DNA fragmenti (Fassina, 2000).

Ob čedalje bolj razširjeni uporabi bioloških zdravil za zdravljenje številnih boleznih, se pojavlja nujna potreba po boljši ekonomiki njihove proizvodnje in s tem omogoči večjo dostopnost. Zagotavljanje potrebne visoke čistosti je nujno, a hkrati težavno. Pri uporabi kolon z vezanimi A ali G proteini, ki sta najbolj razširjena načina za čiščenje protiteles prihaja do številnih težav. Kolona je med elucijo protiteles izpostavljena mobilni fazi z nizko pH vrednostjo, med sterilizacijo pa so vrednosti pH visoke. Zaradi tega prihaja do sprememb v terciarni strukturi proteinov A in G, kar skrajšuje življenjsko dobo kolon, pojavlja se izpiranje ligandov z nosilca in posledičnih kontaminacij vzorca ter pojava denaturiranih protiteles in/ali tvorbe agregatov protiteles, ki kontaminirajo končni vzorec. Poleg naštetih težav, se proteina A in G na kolono vežeta brez določene orientacije, prihaja do steričnega oviranja, zaradi česar so vezavna mesta za tarče nedostopna. To znižuje kapaciteto stacionarne faze. Alternativa se ponuja v uporabi manjših molekul v vlogi ligandov, ki dopuščajo vezavo na nosilec z določeno orientacijo. Na variabilni (Fab) regiji vseh izotipov oz. razredov protiteles se nahaja visoko ohranjena regija za vezavo nukleotidov, ki lahko služi kot tarča za vezavo na ligand znotraj kolone. Primeren ligand za vezavo je IBA oz. indol-3-butirična kislina, ki se veže na nukleotidno vezavno mesto na Fab regiji protiteles. Metoda omogoča očiščenje več kot 95% vseh protiteles v vzorcu z več kot 98% čistostjo, tudi ob prisotnosti kontaminantov, kot so goveji serumski albumin, celični supernatant in peritonealna tekočina. Kolona z vezano IBA se je izkazala za stabilno tekom uporabe, kljub izpostavitvi različnim vrednostim pH (Alves in sod., 2012).

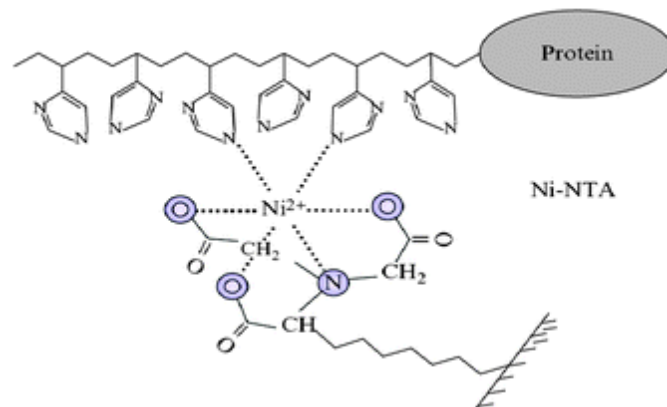
5.2 FUZIJSKI PROTEINI

Pogosto je proteinu, katerega želimo ločevati, težavno najti primeren ligand za vezavo v afinitetni koloni, ki bi dajal zadovoljive rezultate. Takrat se je smiselno poslužiti

rekombinantne tehnologije, katere rezultat je fuzijski protein – naš izvorni protein, ki ga želimo očistiti, označen z značko, za katero imamo na voljo orodja za ločevanje.

5.2.1 Ločevanje z imobiliziranimi kovinskimi ioni

Pogost način je ločevanje s pomočjo kovinskih ionov kot ligandov oziroma uporaba takoimenovane IMAC kromatografije – *immobilized metal affinity chromatography*. Organski kelatorji tvorijo obroč znotraj katerega s koordinacijskimi vezmi zadržujejo kovinski ion. To so ioni kovin prehodnih elementov, največkrat Ni^{2+} , pa tudi Co^{2+} , Cu^{2+} in Zn^{2+} . Delujejo kot kelirajoči ligand, ki nosi kovinski ion, na katerega se nato vežejo različni aminokislinski ostanki. Najmočnejše interakcije tvorijo histidinski ostanki, katerih elektroni na imidazolnih obročih tvorijo koordinacijske vezi s kovinskimi ioni. Skupaj tvorijo kelat. Na kelatne ligande se vežejo proteini označeni s histidinskimi ostanki na C ali N terminalnemu koncu, bodisi s štirimi, šestimi ali desetimi histidinskimi ostanki. Izpiranje se doseže z nižanjem vrednosti pH, dodajanjem imidazola ali EDTA (etilendiamintetraocetna kislina) in EGTA (etilen glikol bis(2-aminoetileter) tetraocetna kislina), v elucijski pufer. Imidazol zaradi obročaste strukture podobne tistim na histidinskih aminokislinskih ostankih tekmuje za vezavna mesta na kovinskih ionih (Bornhorst in Falke, 2000). Proteini označeni s His_{10} značko se močneje vežejo na kovinske katione v koloni, kot tisti označeni s krajšimi histidinskimi značkami, zaradi česar lahko dodajamo večje koncentracije imidazola v elucijski pufer. S tem se dosega izpiranje potencialnih kontaminantov, pred elucijo zelenega proteina. Ker so histidinske značke majhne, njihova odstranitev mnogokrat ni potrebna, saj ne vplivajo nujno na aktivnost proteina. Imidazol preprečuje vezavo neželenih proteinov na Ni^{2+} , zato je v nižjih koncentracijah prisoten tudi v nalagalnem pufru, pri eluciji pa se njegova koncentracija poveča (Recombinant ..., 2009). Zadržki pri uporabi te metode so prisotnost imidazola in nizke pH vrednosti, ki lahko vplivajo na strukturo in aktivnost tarčnega proteina, pojavljajo pa se tudi kontaminacije le-tega s kovinskimi ioni (Ying in Branchaud, 2011). Ločevanje s pomočjo polihistidinskih značk je uspešno v mnogih sistemih, tako bakteriji *Escherichia coli*, kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*, kot sesalčjih celicah. Najpogosteje je uporabljena značka iz šestih histidinskih ostankov. Daljše značke omogočajo izpiranje ob bolj grobih pogojih, kar navadno omogoča večjo čistost, vendar obstaja večja verjetnost, da pride do sprememb ciljnega proteina. Optimalna je uporaba najkrajše značke, ki še omogoča zadovoljive rezultate, da se izognemo morebitnemu vplivu na funkcijo proteina. V kolikor se značka zaradi zvitja proteina znajde v notranjosti le-tega in postane nedostopna površini stacionarne faze se ločevanje lahko izvaja pod denaturirajočimi pogoji, če to ne škoduje produktu (Bornhorst in Falke, 2000).



Slika 5: Interakcija med histidinsko značko in kovinskim kelatom (Rowinska-Zyrek in sod., 2013: 65).

5.2.2 Glutation S-transferaza

Razširjeno je tudi označevanje proteinov z 26 kDa glutation S-transferazo (GST) na N-terminalnem koncu. Na kolono je vezan glutation, ki služi kot substrat za encim glutation S-transferazo, katerega nosijo označeni rekombinantni proteini. Gre za specifični ligand, kar omogoča natančno ločevanje tarčnega proteina. Zaradi počasne kinetike povezovanja med glutationom in GST mora biti pretok nizek, da se doseže čim večjo vezavo GST označenega proteina na kolono. Glutation vezan v koloni je dovzeten za poškodbe s strani γ -glutamil transpeptidaze, ki je prisotna v celičnih lizatih, zato so takšne kolone uporabne zgolj za 4-20 ciklov. Elucijo se izvede z dodajanjem glutationa v kolono ali z uporabo proteaz, ki omogočijo direktno izpiranje produkta brez GST značke, saj delujejo v aminokislinskem zaporedju med označenim proteinom in GST značko. Pri čiščenju evkariontskih produktov je zaradi naravno prisotnih glutation S-transferaz priporočljivo uporabljati gradientalno izpiranje z glutationom. S tem se dosega večjo čistost, s čim manj kontaminacijami tarčne molekule z neželenih naravno prisotnih GST. Ekspresija fuzijskih GST proteinov v bakteriji *Escherichia coli* je navadno visoka in lahko vodi v nastanek inkluzijskih teles. To omogoča visoko produkcijo celici sicer toksičnih produktov, ki se tako združujejo v inkluzijskih telesih ali pa omogoča preprosto ločitev inkluzijskih teles od preostalih komponent celičnega lizata. Za ločevanje z afinitetno kromatografijo je potrebna pravilna 3D struktura glutation S-transferaze, zato je potrebno predhodno zvitje proteinov v nativno obliko. Značka zaradi svoje velikosti 26 kDa lahko vpliva na lastnosti proteina (Recombinant ..., 2009; Kimple in sod., 2013).

5.2.3 Maltoza vezavni protein

Maltoza vezavni protein (MBP) iz bakterije *Escherichia coli* je eden izmed najstarejših in še vedno popularnih proteinov, ki se uporabljajo kot značka za afinitetno ločevanje proteinov. S svojimi 42 kDa celicam predstavlja nezanemarljivo metabolno breme in je primeren za označevanje in ločevanje proteinov do velikosti 40 kDa. Ločevanje MBP označenih proteinov poteka na kolonah, ki imajo na nosilec vezano amilozo. V izvornem organizmu MBP deluje v sklopu maltozo/maltodekstrinskega sistema kot receptor za kemotakso in je udeležen pri transportu maltoze in maltodekstrinov v celico (Nikaido, 1994). Še vedno ostaja priljubljena izbira, saj uspešno odpravlja težave heterologne ekspesije – povečuje topnost produkta, omogoča višje donose. Obenem pa lahko pri proteinih označenih z dvema značkama zaradi svoje izjemne topnosti povečuje topnost proteinov na katere je vezan, omogoča pravilnejše zvijanje in izražaje v višji meri. Preprečuje agregacijo k temu nagnjenih proteinov. Kot tak je edini, ki lahko nastopa v vlogi tako ločevalne značke kot povečevalca topnosti tarčnega produkta. Natančen mehanizem delovanja MBP še ni znan, morda v svojo bližino privlači šaperone, ali tvori micelam podobne strukture v katerih se zadržujejo nepravilno zviti proteini, ali pa deluje kot holdaza – v svoji bližini zadrži proteine, da se ti bodisi spontano, bodisi zaradi delovanja šaperonov zvijejo v nativno obliko (Lebendiker in Danieli, 2011; Austin in sod., 2009; Recombinant ..., 2009).

5.2.4 Strep značka

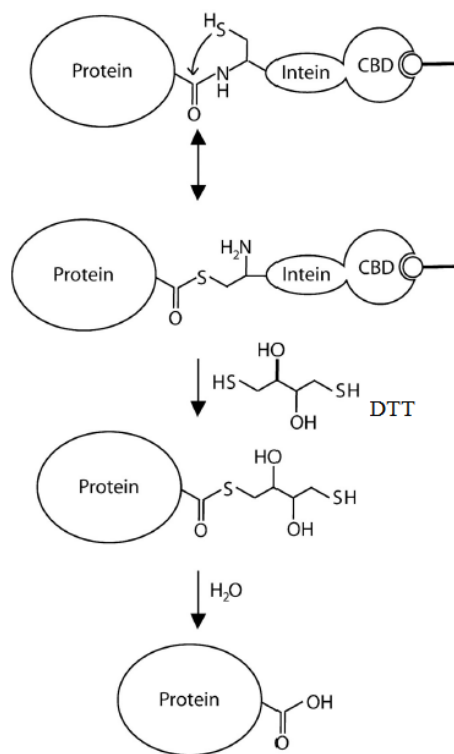
Strep značka je v primerjavi z GST in MBP značkami manjša, sestavljena je samo iz osmih aminokislinskih ostankov v zapredju Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (Recombinant ..., 2009). Tako kot histidinske značke zaradi majhnosti večinoma ne vplivajo na strukturo in aktivnost proteina zaradi česar odstranjevanje navadno ni potrebno. Veže se na streptavidin prisoten v koloni, oz. za boljše rezultate na njegov derivat Strep-Tactin. Elucijo se doseže z dodatkom biotina v elucijski pufer (Zhao in sod., 2013).

5.2.5 Kalmodulin vezavni peptid

Kalmodulin vezavni peptid (CBP) je majhna 4 kDa velika značka sestavljena iz 26 aminokislinskih ostankov, ki se na tarčni protein lahko dodajajo na C ali N terminalnemu koncu. CBP izhaja iz C terminalnega konca kinaze lahke miozinske verige, ki se pri fiziološki vrednosti pH in prisotnosti Ca^{2+} močno veže na kalmodulin v koloni. Elucijo se doseže z dodatkom kelirajoče EGTA (etilen glikol bis(2-aminoetileter) tetraacetna kislina), ki veže Ca^{2+} ione, ker ima za posledico konformacijske spremembe kalmodulina in sprostitev s CBP označenega proteina. Pogoji med elucijo se tako od tistih v nalagalnem pufru razlikujejo le po prisotnosti EGTA (Kimple in sod., 2013; Klein, 2002).

5.2.6 Intein-hitin vezavna domena

Intein-Hitin vezavna domena omogoča ločevanje tako označenih proteinov na kolonah s hitinom. Posebnost tovrstnega sistema je, da ima zmožnost samo-odstranitve značke s tarčnega proteina zaradi narave delovanja inteinov in tako dodaten korak čiščenja s proteazami ni potreben (Kimple in sod., 2013). Inteini so deli proteinov, ki katalizirajo lasten izrez iz zaporedja aminokislinskih ostankov in nato tvorbo peptidne vezi med preostalima koncema. Inteini uporabljeni v te namene vsebujejo mutacijo na C terminalnem koncu inteina, ki preprečuje spontan izrez (aspartat je zamenjan z alaninom). Dodatek spojine s tiolno skupino npr. ditiotreitola (DTT) nato omogoči *in vitro* aktivacijo izrezovanja inteina, oziroma v tem primeru odcep tarčnega proteina (Mitchell in Lorsch, 2015).



Slika 6: Mehanizem delovanja inteina. Ta omogoča odstranitev Intein-Hitin vezavne domene s tarčnega proteina. V prvem koraku tiolna skupina cisteina na inteinu napade karbonilni ogljik v peptidni vezi na N terminalnem koncu eksteina. Tvori se tioesterska vez. Dodatek DTT-ja omogoči odcepitev inteina. Po hidrolizi je s proteina odstranjena celotna značka (Mitchell in Lorsch, 2015: 113).

5.2.7 Biarzenski-tetracisteinski sistem

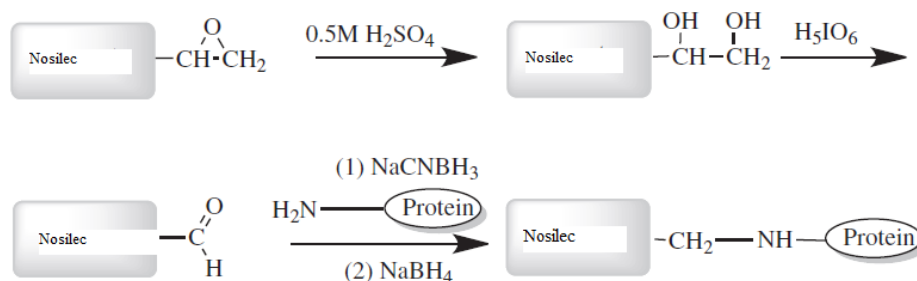
Uveljavlja se uporaba biarzenskega-tetracisteinskega sistema za označevanje proteinov, temelji na označitvi tarčnega proteina s kratkim aminokislinskim zaporedjem, (Cys – Cys – Pro – Gly – Cys – Cys), na enem izmed koncev ali v samem proteinu. Sistem je bil sprva uveljavljen za *in vitro* opazovanje interakcij proteinov v celicah, saj ustrezne molekule ob

vezavi z motivom flourescirajo. Nadomešča uporabo GFP protiena, saj ta zaradi svoje velikosti (238 AK) mnogokrat ovira normalno aktivnosti in interakcije opazovanega proteina. Ob vezavi tetracisteinske značke z biarzenskimi ligandi kompleks flourescira in omogoča opazovanje. Zaradi specifične in močne vezave tetracisteinskega kompleksa na biarzenske ligande, se ta sistem uporablja tudi kot podlaga za ločevanje pri afinitetni kromatografiji. Tračni proteini, ki potujejo skozi kolono so predhodno označeni s tetracisteinsko domeno, ki se veže na biarzenske ligande prisotne v koloni. Ustvajajo se vezi med atomi arzena in tiolnimi skupinami na cisteinskih aminokislinski ostanki (Ying in Branchaud, 2011; Adams in sod., 2002).

6 VEZAVA LIGANDOV NA NOSILEC

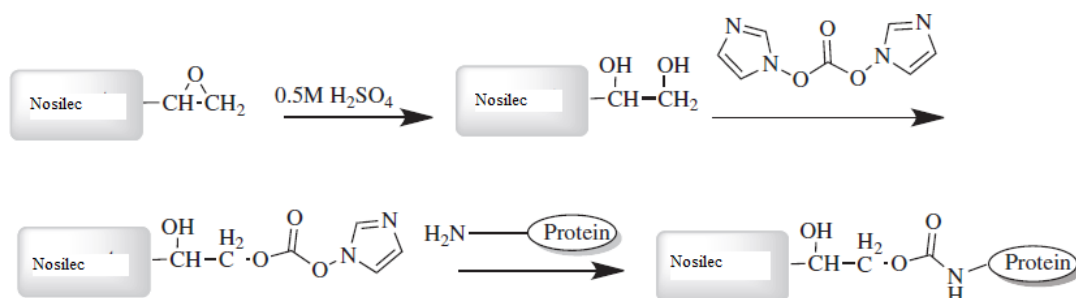
Med monoliti je najpogosteje uporabljen nosilec kopolimer glicidil matakrlata in etilen dimetakrilata ali GMA/EDMA. Na površini se nahajajo epoksi skupine, katere se direktno ali indirektno uporabljajo za vezavo ligandov (Mallik in sod., 2004).

Pri metodi Schiffove baze sprva poteče hidroliza epoksi skupin v kislem okolju, formirajo se dioli. Le-ti po tretiranju z natrijevim periodatom oksidirajo v aldehidno skupino, ki nato lahko tvori vezi s sekundarnimi amini na proteinih ob prisotnosti natrijevega borohidrata.



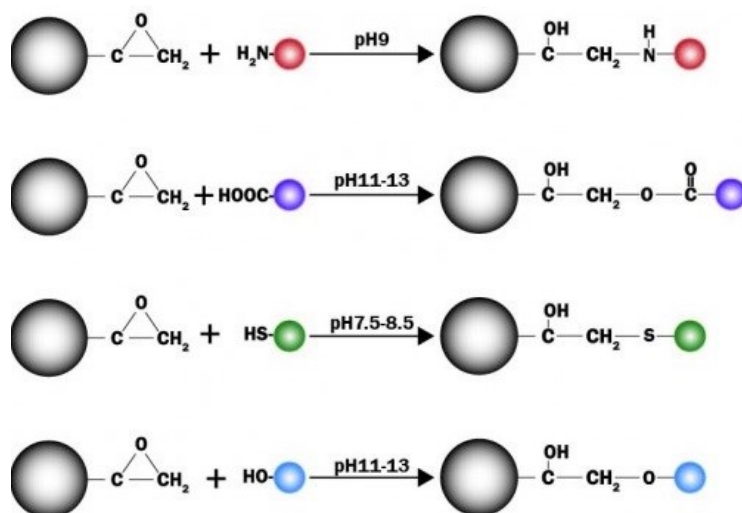
Slika 7: Metoda Schiffove baze (Pfaunmiller in sod., 2015: 468).

CDI metoda je do formacije diolov idnetična metodi Schiffove baze. Po tretiranju diolnih skupin nosilca z 1,1'-karbonildiimidazolom se diolne skupine pretvorijo v imidazolil karbamatne. Med le-temi in primarnimi amini na proteinu poteče nukleofilna substitucija, kar vodi v vzpostavitev stabilne vezi med nosilcem in proteinom.



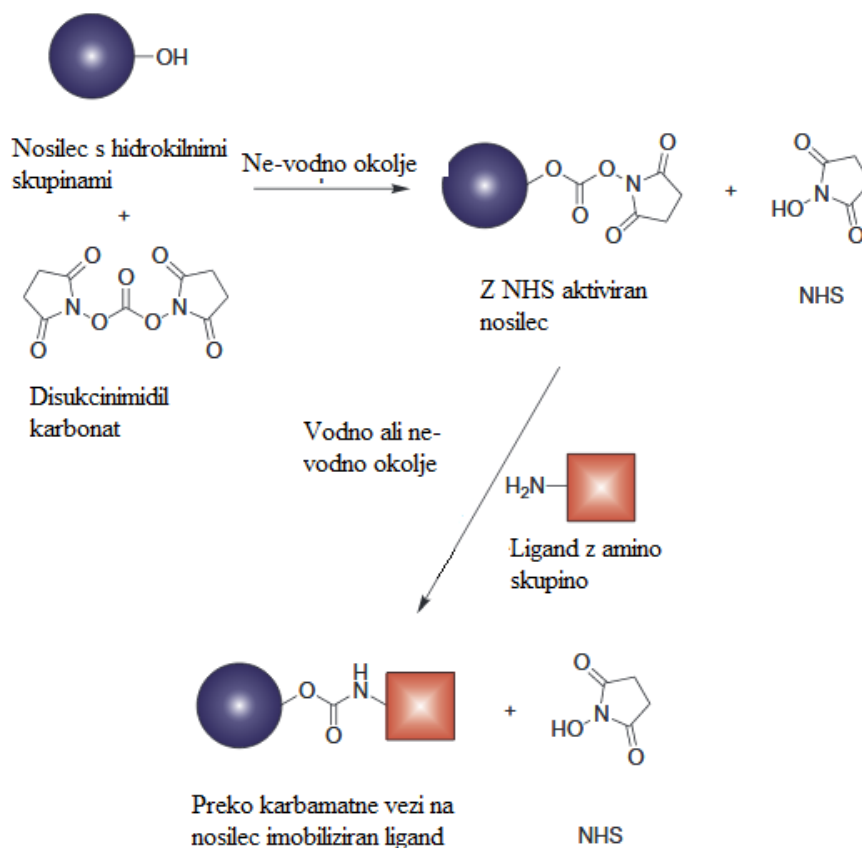
Slika 8: CDI metoda (Pfaunmiller in sod., 2015: 468).

Pri epoksi metodi ogljikova atoma v epoksi skupini nosita delni pozitivni naboj (δ^+), kar omogoča nukleofilni napad nanju s strani nukleofilov. V prisotnosti nukleofila se obroč epoksi skupine razpre, en izmed ogljikov tvori vez z nukleofilom, na drugem se formira hidroksilna skupina. Vzpostavi se lahko več različnih vezi, odvisno od prisotnosti nukleofilov in vrednosti pH (Hermanson, 2013).



Slika 9: Epoksi metoda (G-Biosciences ..., 2018).

Pri DSC metodi do pojava diolov reakcija poteka enako kot pri metodi Schiffove baze, nato pa se diole tretira z DSC(N,N'-disukcinimidil karbonat), kar privede do vezave sukcinimidil karbonatnih skupin na nosilec. Te nato preko karbamatne vezi tvorijo povezavo s primarnimi amini na proteinu (Maillik in sod., 2004).



Slika 10: DSC metoda (Hermanson, 2013: 643).

7 ELUCIJA

Za disociacijo vezanih tarčnih molekul s kolone je potrebna sprememba v mobilni fazi, da kompleks ligand-tarčna molekula ne bo več energetsko ugoden. Zadostne so lahko minimalne spremembe v elucijskem pufru, glede na nalagalni pufer, pri katerih tako stacionarna faza kot tarčna molekula ne utrpita poškodb. Ob močnejših interakcijah so potrebne večje spremembe v npr. pH vrednosti ali intenzivno dodajanje kaotropnih agentov, kar lahko vpliva na kakovost ločevane tarčne molekule in kolone. Najbolj sofisticirana je specifična elucija, pri kateri eluent tekmuje za vezavo bodisi s tarčno molekulo bodisi z ligandom, npr. dodatek kompetitorja pri ločevanju encimov.

Uporaba specifične elucije je smiselna kadar so v ločevalni koloni splošni ligandi in obratno nespecifična elucija, kadar so v koloni specifični ligandi, s čimer se dosega nižje vsebnosti kontaminantov v očiščenih vzorcih. Uporaba kompetitorjev je smiselna tudi pri zelo močnih interakcijah med ligandom in tarčno molekulo.

Elucija lahko poteka gradientalno s postopnim spremnjanjem razmer v elucijskem pufru ali s takojšno spremembo. Gradientalno ločevanje prinaša večjo natančnost, medtem ko hipna sprememba razmer v elucijskem pufru daje hitrejša rezultata (Affinity ..., 2007).

Preglednica 3: Mehanizmi elucije.

ELUENTI	DELOVANJE
Sprememba pH	Spremeni se ionizacija nabitih skupin na ligandih in tarčnih molekulah
Kompetitorji	Tekmujejo za vezavo z ligandi ali tarčno molekulo
Znižanje polarnosti	Z dodatkom etilen glikola eluent postane manj topen in se izloči iz kolone
Kaotropni agenti	Prisotnost uree ali gvanidinijevega hidroklorida spremeni razporeditev vodikovih vezi v vodi, kar vodi v manj urejene strukture v vodi topnih molekul
Kelatorji(EDTA, EGTA)	Kalatorji vežejo kovinske ione(Mg^{2+} , Ca^{2+} ...), ob odsotnosti kovinskih ionov lahko pride do konformacijskih sprememb, bodisi na tarčni molekuli, bodisi na stacionarni fazi, interakcije med ligandom in tarčo se porušijo, doseženo je izpiranje.

8 BIOTEHNOLOŠKE APLIKACIJE

8.1 LOČEVANJE PROTEINOV NA PODLAGI METILACIJSKIH VZORCEV

Ob čedalje bolj razširjeni uporabi biofarmaceutikov v medicinske namene je spremljanje in določanje metilacijskih vzorcev nujno. Metilna skupina je najmanjša, ki se v procesih posttranslacijskih modifikacij lahko doda na protein. Metilacija signifikantno ne vpliva na naboj in izoelektrično točko stranskih verig, kar predstavlja največji izziv ločevanja ciljnega produkta. Pri večini dosedanjih naporov za ločevanje različno metiliranih proteinov so bila v uporabi protitelesa. Vendar so se ta vedno znova izkazala za neustrezna, saj so poleg vzorca metilacije prepoznavala tudi okolico metiliranega mesta in tako niso nespecifično zaznavala vseh mest z iskanim metilacijskim vzorcem.

Nakazuje se možnost uporabe p-sulfonatocalix[4]aren-a, ki ob nekaj modifikacijah lahko služi kot afinitetni ligand. Molekula veže metilirane lizinske amino kislinske ostanke, ob dodatku arilne in karboksilne skupine, pa je mogoča tudi vezava le-te na agarozni nosilec. Ob uporabi afinitetne kolone s tovrstni nosilcem je prišlo do uspešnega ločevanja med različno metiliranimi proteini. Težava ostajajo nespecifične vezave nemetiliranih kationskih analitov, vendar je metoda kljub temu obetavna (Garnett in sod., 2016).

8.2 ČIŠČENJE NEKODIRAJOČE RNA

Čiščenje in izolacija RNA molekul sta težavni, zaradi nestabilne narave molekule in vseprisotnih RNA-az, v vzorcih, na laboratorijski opremi, koži ... Afinitetna kromatografija ponuja krajši pristop k ločevanju posameznih tipov RNA med seboj. Prvo je bilo uveljavljeno

čiščenje z boronati, danes pa se pogosteje uporablja čiščenje preko značk vstavljenih v RNA molekulo ali ločevanje s pomočjo kolon v katerih so kot ligandi uporabljeni amino kislini ostanki. Pri ločevanju z značkami je te potrebno po ločevanju tudi odstraniti, največkrat preko mest za restriksijske encime, ki so bili vstavljeni skupaj z značko, kar predstavlja dodaten korak. Najprivlačnejša je uporaba aminokislinskih kolon, z vezanim histidinom, argininom, lizinom ali tirozinom. Selektivnejša pa je uporaba sintetičnih nukleotidov kot ligandov, s katerimi lahko povsem natančno določimo tarčno RNA molekulo (Pereira in sod., 2016).

8.3 ČIŠČENJE PLAZMIDOV

Uporaba afinitetne kromatografije za čiščenje plazmidov je privlačna, saj se moramo za njihovo uporabo v terapevtske namene – npr. genska terapija, poslužiti metod in protokolov, ki ne vključujejo toksičnih reagentov. Plazmidi zaradi svoje majhnosti predstavljajo izziv – nositi morajo zaporedje, ki se z močno afiniteto veže na dani ligand, hkrati pa so močno omejeni glede velikosti, ki jih lahko dosežajo in ostajajo funkcionalni. Ker iskanje liganda, ki bi ustrezalo zaporedju plazmida največkrat ne da rezultatov, se velja poslužiti drugačnih načinov za ločevanje plazmidov. Posebej primerna sta nekovalentna vezava na mali žleb DNA in dodatek kelatov, ki se vrinejo med bazne pare znotraj dvojne vijačnice. Gre za metodi, ki sta sicer specifični za vezavo na DNA, a sta neodvisni od nukleotidnega zaporedja, zaradi česar sta univerzalni in privlačni. Molekule se vežejo na DNA tudi preko velikega žleba in bis interkalacije. Takšno aktivnost izražajo berenil, berberin, kanamicin in neomicin. Izmed teh ima najvišjo konstanto asociacije z 10^4 M berenil, ki se veže na mali žleb DNA. Ločevanje superzvite in krožne pDNA omogoča močnejša interakcija berenila s superzvito izoformo plazmida. Pri superzviti konfiguraciji so baze v žlebu bolj izpostavljene in zato tvorijo močnejše vezi s berenilom. Visoke koncentracije soli še dodatno vplivajo na intenzivnejše zvitje pDNA in moč interakcije z berenilom. Z nižanjem ionske moči se omogoči elucija krožne pDNA, z odstranitvijo soli iz elucijskega pufra pa tudi superzvite izoforme (Caramelo-Nunes in sod., 2011).

Ločevanje z berenilom je primerno za plazmide velikosti 6 – 12,4 kbp, pri čemer je izkoristek pri večjih plazmidih nižji, čistost pa višja. Pogost in težko odstranljiv kontaminant je RNA. Navadno se za očiščenje vzorca le-tega tretira z visokimi koncentracijami amonijovega sulfata. Ta korak lahko nadomesti dvakratna ponovitev afinitetnega ločevanja z berenilom. To prinaša manjšo porabo močno obremenilnih soli za okolje in izločitev enega izmed korakov. Izkoristek je pri tem nekoliko nižji, čistost pDNA pa ustreza merilom za terapevtsko uporabo (Caramelo-Nunes in sod., 2012).

8.4 LOČEVANJE NA PODLAGI STEREOIZOMERIJE

Spojine, ki vsebujejo kiralni center nastopajo v dveh enantiomerih, S in D. V kolikor spojine nosijo več kiralnih centrov, gre za tako imenovane diastereoizomere. Ti niso zrcalne slike drug drugega, razen če se razlikujejo v prostorski razporeditvi skupin okoli vseh kiralnih

centrov. Pogosto imajo zelo različne fizikalne in kemične lastnosti ter biološko aktivnost (Lien in sod., 2006). Z nizko afinitetno kromatografijo (WAC) je možno učinkovito razlikovati med S in D enantiomeri spojina, saj se zaradi različne afinitete za izbrani ligand ločujejo v dva vrhova. V kolikor ni prišlo do ločitve v dva vrhova, tarčna molekula katero želimo ločiti na S in D enantiomera ni specifično interagirala z izbranim ligandom, temveč nespecifično z nosilcem ali delom liganda, s katerim se sicer ne vrši ločevanje. Po ločitvi tarčne molekule v dva vrhova, se izbrane frakcije testira z masno spektrometrijo. V kolikor gre resnično za enantiomera enake spojine bo vzorec fragmentacije pri masni spektrometriji identičen kljub različni S ali D orientaciji (Duong-Thi in sod., 2013).

9 ZAKLJUČEK

Afinitetna kromatografija kot separacijska tehnika zaradi svoje narave delovanja na osnovi biološkega prepoznavanja, ponuja močno in izredno prilagodljivo orodje. Na voljo je veliko število ligandov, ki omogočajo ločevanje molekul in pri tem izkoriščajo njihove biološke funkcije in ne fizikalno – kemičnih lastnosti. Ločevanje na podlagi biološkega prepoznavanja daje tehniki večjo natančnost in moč v primerjavi z ločevanjem na podlagi velikosti, naboja ali polarnosti. Kot taka je močno orodje za ločevanje ciljnih produktov, kljub temu pa so za praktično uporabo produktov potrebni še drugi kromatografski pristopi ali separacijske tehnike.

Oviro lahko predstavlja iskanje primerne kombinacije stacionarne faze, ligandov in pogojev pri katerih bo tarčna molekula izkazovala primerno biološko aktivnost potrebno za ločevanje. Ta naporna kombinatorika pa je hkrati vir brezmejnega nabora možnosti, ki se ponujajo za ločevanje. Privlačnost metode je v njenih dokaj preprostih konceptih, ki so aplikativni na brezgrajnem naboru različnih kombinacij.

10 VIRI

Adams S.R., Campbell R.E., Gross L.A., Martin B.R., Walkup G.K., Yao Y., Lloopis J., Tsien R.Y. 2002. New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *Journal of the American Chemical Society*, 124: 6063-6076

Affinity chromatography principles and methods. 2007. Uppsala, GE Healthcare Bio-Sciences AB: 159 str.

Alves N.J., Stimle S.D., Handlogten M.W., Ashley J.D., Kiziltepe T., Bilgicer B. 2012. Small-molecule-based affinity chromatography method for antibody purification via nucleotide binding site targeting. *Analytical Chemistry*, 84: 7721-7728

- Austin B. P., Nallamsetty S., Waugh D. S. 2009. Hexahistidine-tagged maltose-binding-protein as a fusion partner for the production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods in Molecular Biology*, 498:157-172
- Axen R., Porath J. Ernback S. 1967. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*, 214: 1302-1304
- Bahravesh E., Sikavitsas V. I., Mikos A. G. 2003. Quantification of ligand surface concentration of bulk-modified biomimetic hydrogels. *Biomaterials*, 24: 4365–4374
- Bornhorst J.A., Falke J.J. 2000. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*, 326: 245-254
- Caramelo-Nunes C., Gabriel M.F., Almeida P., Marcos J.C., Tomaz C.T. 2012. Purification of plasmid DNA from clarified and non-clarified *Escherichia coli* lysates by berenil pseudo-affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, 904: 81-87
- Caramelo-Nunes C., Tente T., Almeida P., Marcos J.C., Tomaz C.T. 2011. Specific berenil–DNA interactions: an approach for separation of plasmid isoforms by pseudo-affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, 412: 153-158
- Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B. 1968. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America*, 61: 636-643
- Duong-Thi M.D., Bergström M., Fex T., Svensson S., Ohlson S., Isaksson R. 2013. Weak affinity chromatography for evaluation of stereoisomers in early drug discovery. *Journal of Biomolecular Screening*, 18: 748-755
- Ettre L.S. 2008. Introduction: One hundred years of chromatography. V: Chapters in the evolution of chromatography. Hinshaw J.V. (ur.). London, Imperial College Press: 1-6
- Ettre L.S. 2008. Introduction: One hundred years of chromatography. V: Chapters in the Evolution of Chromatography. Hinshaw J.V. (ur.). London, Imperial College Press: 49-59
- Fassina G. 2000. Protein A mimetic (PAM) affinity chromatography: immunoglobulins purification. V: Affinity Chromatography Methods and Protocols. Vol. 147. Babilon P., Ehrlich K.G., Fung W-J., Berthold W. (ur.). New Jersey, Humana Press: 57-68
- Garnett G.A.E., Starke M.J., Shaurya A., Li J., Hof F. 2016. Supramolecular affinity chromatography for methylation-targeted proteomics. *Analytical Chemistry*, 88: 3697-3703
- G-Biosciences. Purification & Chromatography: Epoxy-activated agarose (dry form). https://www.gbiosciences.com/Protein-Research/Purification-Chromatography/Epoxy-Activated_Agarose_Dry_Form (26. 8. 2018)

- Hage D. S., Anguizola J. A., Li R., Matsuda R., Papastavros E., Pfaunmiller E., Sobansky M., Zheng X. Affinity chromatography. 2017. V: Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation. Fanali S., Haddad P. R., Poole C., Riekkola M. L. (ur.). New York, Elsevier: 319-341
- Hermanson G. T., 2013. Bioconjugate techniques. Cambridge, Academic Press: 1200 str.
- Hinshaw J. V. 2015. What is "dead" volume and why should chromatographers worry about it? LCGC North America, 33: 850-855
- Kimple M. E., Brill A. L., Pasker R. L. 2013. Overview of affinity tags for protein purification. Current Protocols in Protein Science, 73: 9.9.1. – 9. 9. 23
- Klein W. Calmodulin-binding peptide as a removable affinity tag for protein purification. 2002. V: E. coli Gene Expression Protocols. Vaillancourt P. E. (ur.). New York, Humana Press: 79-97
- Lebendiker M., Danieli T. 2011. Purification of proteins fused to maltose-binding protein. Methods in Molecular Biology, 681: 281-293
- Lien A.N., He H., Pham-Huy C. 2006. Chiral drugs: an overview. International Journal of Biomedical Science, 2: 85-100
- Magdeldin S., Moser A. 2012. Affinity chromatography: principles and applications. V: Affinity Chromatography. Magdeldin S. (ur.). Reka, InTech: 3-28
- Mallik R., Jiang T., Hage D.S. 2004. High-performance affinity monolith chromatography: development and evaluation of human serum albumin columns. Analytical Chemistry, 76: 7013-7022
- Merino N., Toledo-Arana A., Vergara-Irigaray M., Valle J., Solano C., Calvo E., Lopez J.A., Foster T.J., Pende's J.R., Lasai I. 2008. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 191: 832-843
- Mitchell S. F., Lorsch J. R. 2015. Protein affinity purification using intein/chitin binding protein tags. Methods in Enzymology, 559: 111-125
- Nikaido H. Maltose transport system of *Escherichia coli*: an ABC-type transporter. FEBS Letters, 346: 55-58
- Ying L.Q., Branchaud B.P. 2011. Purification of tetracysteine-tagged proteins by affinity chromatography using a non-fluorescent, photochemically stable bisarsenical affinity ligand. Bioconjugate Chemistry, 22: 987-992
- Pfaunmiller E.L., Bas J., Brooks M., Milanuk M., Rodriguez E., Vargas J., Matsuda R., Hage D.S. 2015. Affinity chromatography. V: Analytical Separational Science. Vol. 2. Anderson J.L., Berthod A., Pino V., Stalcup A.M. (ur.). Weinheim, Wiley-VCH: 461-482

- Pfaunmiller E.L., Paulemond M.L., Dupper C.M., Hage D.S. 2012. Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405: 2133-2145
- Pereira P., Queiroz J.A., Figueiras A., Sousa F. 2016. Affinity approaches in RNAi-based therapeutics purification. *Journal of Chromatography B*. 1021: 45-56
- Podlaski J. F., Stern S. A. 2000. Site-specific immobilization of antibodies to protein G-derivatized solid supports. V: *Affinity Chromatography Methods and Protocols*. Vol. 147. Babilon P., Ehrlich K.G., Fung W-J., Berthold W. (ur.). New Jersey, Humana Press: 41-48
- Recombinant protein purification handbook. 2009. Uppsala, GE Healthcare Bio-Sciences AB: 306 str.
- Rowinska-Zyrek M., Witkowska D., Potocki S., Remelli M., Kozlowski H. 2013. His-rich sequences – is plagiarism from nature a good idea? *New Journal of Chemistry*, 37: 58 – 70
- Salvi G., De Los Rios P., Vendruscolo M. 2005. Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins*, 61: 492-499
- Sigma Aldrich. Product information: Agarose. Sigma Aldrich: 8 str.
https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a9539pis.pdf (26. 8. 2018)
- Strandh M., Andersson H.S., Ohlson S. 2000. Weak affinity chromatography. V: *Affinity Chromatography Methods and Protocols*. Vol. 147. Babilon P., Ehrlich K.G., Fung W-J., Berthold W. (ur.). New Jersey, Humana Press: 7-24
- Streptokok (*Streptococcus*) v živilih. 2013. Ljubljana, NIJZ – Center za zdravstveno ekologijo: 2 str.
- Thermo Scientific Pierce Protein Purification Technical Handbook. 2010. Thermo Fisher Scientific Inc.: 84 str.
- Wilchek M., Chaiken I. 2000. An overview of affinity chromatography. V: *Affinity Chromatography Methods and Protocols*. Vol. 147. Babilon P., Ehrlich K.G., Fung W-J., Berthold W. (ur.). New Jersey, Humana Press: 1-6
- Zhao X., Li G., Liang S. 2013. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 581093, doi: 10.1155/2013/581093: 8 str.
- Zopf D., Ohlson S. 1990. Weak-affinity chromatography. *Nature*, 346: 87-88