

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2016**

**Zuzana Saňáková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Chromatografické metody v purifikaci  
rekombinantních proteinů**

**Bakalářská práce**

**Zuzana Saňáková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2016**

**Vedoucí práce: Mgr. Michal Křupka, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Michala Křupky, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne.....

.....  
Zuzana Saňáková

## **Souhrn**

Chromatografie v dnešní době patří mezi nejúčinnější a nejvšestrannější biochemické analytické či preparativní metody. Je hojně využívána pro dělení směsí různých látek na jednotlivé komponenty. Představuje metodu, která má obrovské využití v různých průmyslových, biochemických či biomedicínských a jiných oblastech.

Náplní práce byla souhrnná charakterizace principiálních chromatografických technik, zejména kapalinových metod. V praktické části práce pak byla použita gelová permeační chromatografie, která separuje látky na základě rozdílné velikosti a iontově výměnná chromatografie, která dělí látky pomocí iontoměničů. Pomocí těchto metod byl úspěšně separován lidský polymerní imunoglobulin IgA od ostatních proteinů krevní plasmy.

## **Summary**

In present, chromatography ranks among the most effective and universal biochemical analytical or preparative methods. It is frequently used for the division of the mixtures of various substances to individual components. It represents a method that has great application in various industrial, biochemical, biomedical and other domains.

The purpose of the thesis was an overall characterization of principal chromatographic techniques, especially of liquid methods. Gel permeation chromatography, that separates substances on the basis of size difference, and ion exchange chromatography, that divides substances using ion meters, were used in the practical part. By means of these methods, human polymeric immunoglobulin IgA was successfully separated from the other proteins of blood plasma.

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Mgr. Michalovi Křupkovi, Ph.D. za odborné vedení, strávený čas a ochotu při zpracování teoretické i experimentální části mé bakalářské práce a také za možnost pracovat v laboratoři na Ústavu imunologie LF UP v Olomouci.

# Obsah

1.	Úvod.....	8
2.	Cíle práce .....	9
3.	Literární přehled.....	10
3.1.	Historie chromatografie.....	10
3.2.	Princip chromatografie .....	12
3.3.	Rozdělení chromatografických metod .....	12
3.4.	Kapalinová chromatografie (LC) .....	15
3.5.	Gelová chromatografie (GPC) .....	17
3.5.1.	Princip GPC.....	17
3.5.2.	Gely pro GPC .....	20
3.6.	Iontově výměnná chromatografie (IEC) .....	23
3.6.1.	Hlavní fáze IEC .....	26
3.7.	Chromatofokusace (CF) .....	29
3.8.	Afinitní chromatografie (AC).....	30
3.8.1.	Ligand.....	32
3.8.2.	Nosiče pro AC .....	32
3.8.3.	Aktivace nosičů .....	34
3.9.	Adsorpční chromatografie.....	35
3.9.1.	Stacionární fáze .....	36
3.9.2.	Mobilní fáze (MF) .....	38
3.10.	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	38
3.11.	Plynová chromatografie (GC).....	39
4.	Materiál a metody .....	42
4.1.	Chemikálie .....	42
4.2.	Seznam použitých roztoků .....	43
4.3.	Metodika.....	45
5.	Výsledky a diskuze .....	52
6.	Závěr .....	53
7.	Seznam použitých zkratk.....	54
8.	Použitá literatura .....	55

# 1. Úvod

Historie chromatografie sahá do poloviny 19. století. Ovšem až raným začátkem 20. století, zásluhou M. S. Cveta, který je pokládán za otce chromatografie, byla pojmenována a popsána. Nové techniky a typy této metody byly rozvinuty pak především v letech 1930 – 1940, čímž se stala chromatografie široce využívanou technikou pro rozsáhlou škálu separačních procesů. Obrovský rozvoj této metody zapříčinil, že chromatografie je v současné době jednou z nejpoužívanějších metod v analytické chemii a v řadě jiných odvětvích.

Základním principem chromatografických metod je dělení složek směsi mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní (pohyblivá) a druhá stacionární (nepohyblivá). Podstatou separování látek u kapalinové chromatografie je odlišná afinita složek vzorku k mobilní a stacionární fázi. Čím větší afinitu látka vykazuje ke stacionární fázi, tím více je zbržděn její pohyb chromatografickým systémem a látky tak opouští systém v různých časech.

V této práci byl vypracován přehled základních chromatografických metod se zaměřením na kapalinovou chromatografii. V praktické části práce pak byla aplikována gelová permeační a iontově výměnná chromatografie k separaci lidského polymerního imunoglobulinu IgA od ostatních proteinů krevní plasmy.



## **2. Cíle práce**

Cílem práce bylo zpracování literární rešerše zabývající se charakterizací chromatografických metod se zaměřením na kapalinovou chromatografii. V praktické části bylo cílem osvojení si metod kapalinové chromatografie, konkrétně gelové permeační chromatografie a iontově výměnné chromatografie a následná separace proteinů z krevní plazmy, zaměřená na separaci a purifikaci IgA.

## 3. Literární přehled

### 3.1. Historie chromatografie

Počátek chromatografie můžeme datovat do poloviny 19. století. K prvním vědcům zabývajících se touto metodou patřil německý chemik Friedlieb Ferdinand Rung, který v roce 1850 publikoval knihy věnující se tématu papírové chromatografie. Později skupina německých chemiků provedla experimenty, které vedly k prohloubení znalostí a popsání chromatografické metody. Pozorovali vznikající soustředěné barevné kroužky kapáním roztoků anorganických sloučenin do středu filtračního papíru. Tuto metodu později sepsal roku 1861 Friedrich Goppelsröder a pojmenoval ji jako kapilární analýza (Bussemas, Harsch & Ettore, 1994; Keller & Giddings, 2016).

Nicméně objev chromatografie je všeobecně připisován ruskému botanikovi a chemikovi Michailovi Semionovičovi Cvetovi (možno rovněž Tsvett, Tswett, Tswet, Zwet, Cvet, Cvět). Byl to právě Cvet, který sestrojil separační techniku, známou jako adsorpční chromatografie. Tuto separační techniku vynalezl v roce 1900 v průběhu jeho výzkumu na rostlinných pigmentech a pojmenoval ji chromatografie. Tento název vznikl složením dvou řeckých slov, a to *chroma* - barva a *graphy* - psaní. Údajně Cvet do tohoto názvu zakomponoval i své jméno, neboť *cvět* v ruštině znamená barva (Ahuja, 2003; Keller & Giddings, 2016; Švec, 2009).

Cvet studoval pigmenty chloroplastů. Při filtraci jejich petroletherového roztoku úzkou skleněnou kolonou naplněnou uhličitanem vápenatým zjistil, že původní směs se dělí na barevné proužky podle míry adsorpce složek na adsorbent, které postupovaly různou rychlostí. V případě, že místo roztoků směsí pigmentů přiléval na kolonu jen rozpouštědlo, proužky pokračovaly v posunu, až došlo k jejich úplnému rozdělení. Podle toho Cvet nazval tuto metodu chromatografickou, ačkoliv v dnešní době většina sloučenin separovaná touto technikou není barevných a ani detekce není založena na pozorování barev. Poté obsah kolony vytlačil z trubice, rozřezal a extrahoval každou zónu zvlášť, popřípadě pokračoval

v přilévání rozpouštědla až do postupného vymytí zón z trubice a jejich roztoky odpařil. Tato vysoce účinná metoda bohužel zůstala na dlouhou dobu nevyužita (Mikeš et al., 1980).

Své renesance a hojného využití dosáhla až v roce 1931, kdy Kuhn, Lederer a Winterstein publikovali své práce o dělení karotenoidů. O významné zlepšení všech kolonových chromatografických metod se zasloužili Ziseliuss a Claesson, kteří zavedli gradientovou eluci a roztřídili chromatografické procesy všeho druhu do tří skupin, lišících se od sebe principem provedení a mechanismem probíhajících pochodů. Ovšem největší rozvoj této separační metody je datován až po druhé světové válce.

Významným mezníkem v historii chromatografie byly práce dvou britských chemiků A. J. P. Martina a R. L. M. Syngeho, kteří sestrojili extrakční přístroj na dělení acetylovaných aminokyselin na základě jejich rozdílných rozdělovacích koeficientů ve vodné fázi a ve fázi chloroformové. Ovšem přístroj byl ještě téhož roku nahrazen chromatografickou kolonou, naplněnou zrnky silikagelu. Další inovací této metody byla výměna silikagelu za celulosu, která byla výhodnější, protože se aminokyseliny nemusely acetylovat. Za objev rozdělovací chromatografie byla v roce 1952 Martinovi a Syngemu udělena Nobelova cena za chemii (Scott, 2003).

V roce 1944 Condsden, Gordon a Martin popsali princip dvourozměrné papírové chromatografie. Započala éra moderní plynové a kapalinové chromatografie. Obrovský rozvoj této metody zapříčinil, že se chromatografie stala jednou z nejpoužívanějších metod v analytické chemii (Heftmann, 2004; Mikeš et al., 1980).

Základy plynové adsorpční chromatografie se datují do roku 1936. V roce 1952 James a Martin zavedli metodu chromatografie plyn-kapalina a v následujícím roce český chromatografista Janák významně přispěl k rozvoji chromatografie plyn-tuhá látka.

Chromatografie na tenkých vrstvách se začala šířit kolem roku 1956, a to zásluhou Stahla. Gelová chromatografie byla navržena v roce 1959 Porathem a Flodinem. V roce 1967 došlo k rozvoji afinitní chromatografie (Ahuja, 2003; Buie, 2011; Heftmann, 2004; McNair & Miller, 2009; Scott, 2003).

## 3.2. Princip chromatografie

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) postuloval v roce 1993 tuto definici: „*Chromatografie je fyzikální separační metoda, při níž jsou separované složky distribuovány mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární, zatímco druhá se pohybuje v daném směru*“ (Ettre, 1993).

Tyto složky držené přednostně ve stacionární fázi (SF) jsou zdržovány v systému déle než ty, které jsou selektivně distribuovány v mobilní fázi (MF). Tím pádem se rozpuštěné látky eluují ze systému v mobilní fázi v pořadí podle jejich rostoucích distribučních koeficientů.

Chromatografie je hojně využívána pro dělení směsí různých látek na jednotlivé komponenty. Progresivně se vyvíjí jak ve svých podobách, tak i v technikách a v dnešní době patří mezi nejúčinnější a nejvšestrannější analytické či preparativní metody. Rozsah využití chromatografie je opravdu široký. Používá se v chemických, biochemických i biologických laboratořích, ale široké uplatnění má také v mnoha průmyslových odvětvích (Giddings, 2016; Poole & Schuette, 1984; Scott, 2003).

V jednom kroku může být separována směs na jednotlivé složky a zároveň může být provedeno kvantitativní stanovení jednotlivých látek. Jako vzorek můžeme užít látku v jakémkoliv skupenství o různé složitosti (Scott, 2003).

V konečném důsledku je tedy cílem všech chromatografických metod separace jednotlivých složek ve vzorku (Hettrmann, 2004).

## 3.3. Rozdělení chromatografických metod

Metody chromatografie můžeme dělit podle mnoha kritérií.

**Podle účelu:**

- analytická
- (semi)preparativní

*Analytická chromatografie* je používána k identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek zkoumané směsi a množství vzorku je většinou velmi malé. Kdežto *úkol preparativní chromatografie* je jednotlivé složky směsi od sebe rozdělit v dostatečném množství, aby vzorek/ky bylo možné poté dál zpracovat a využít. Proto u preparativní chromatografie bývá množství vzorku větší než u analytické chromatografie.

#### **Podle fyzikálně-chemického principu:**

- Adsorpční chromatografie
- Rozdělovací chromatografie
- Ionexová chromatografie
- Gelová permeační chromatografie
- Afinitní chromatografie.
- + případně další druhy

Rozdíl mezi adsorpční a rozdělovací chromatografií se stal obtížně odlišitelný a rovněž méně významný. Proto v současné době místo adsorpční a rozdělovací chromatografie dělíme chromatografii na normální fázi, kde stacionární fáze je polárnější než mobilní a obrácenou fázi, kde je polárnější mobilní fáze.

Plynová chromatografie se dělí pak klasicky na adsorpční a rozdělovací (Anzenbacher & Kovář, 1986; Klouda, 2003; Sharma, 2014).

#### **Podle mobilní fáze a techniky**

System rozdělení primárně podle skupenského stavu mobilní fáze. Další dělení je podle uspořádání a složení stacionární fáze, popřípadě se můžou uplatnit další faktory, např. tlak mobilní fáze.

#### **1) Kapalinová (LC)**

##### *a. sloupcová (kolonová)*

- nízkotlaká
- vysokoúčinná (vysokotlaká)

- b. *plošná*
  - tenkovrstvá
  - papírová

## 2) **Plynová (GC)**

- a. *náplňová*
- b. *kapilární*

### **Podle pracovní techniky**

Eluce slouží k vytěsnění jednotlivých frakcí vzorku z chromatografické kolony. Může být rozdělena na:

#### 1) **Eluční**

- a. *izokratická* (eluční činidlo – konstantní složení)
- b. *gradientová* (gradient elučního faktoru - pH, iontové síly, polarity apod.; u GC – gradient teploty)

#### 2) **Vytěšňovací**

#### 3) **Frontální**

#### 1. **Eluční**

Eluce klasická může být jak u kapalinových, tak i plynových chromatografií. Po nanesení relativně malého množství vzorku se na kolonu přivádí relativně velké množství elučního činidla. Eluční chromatografii můžeme dělit dále na další dva typy.

- a. *Izokratická eluce*: složení elučního činidla (LC) nebo teplota kolony (GC) je neměnná
- b. *Gradientová eluce*: složení elučního činidla (LC) nebo teplota kolony (GC) se s časem mění. Změny mohou být souvislé nebo skokové.

## **2. Vytěšňovací**

Užití vytěšňovací chromatografie není tak časté. Funguje na principu, kdy eluční činidlo obsahující nějaké agens vytěsňuje pevně zachycenou dělenou látku ze stacionární fáze.

## **3. Frontální**

Tato technika spočívá v kontinuálním přivádění roztoku vzorku, který slouží současně jako mobilní fáze, na kolonu. Na koloně dochází k dělení složek vzorku, ovšem jen nejméně zadržovaná složka je získána v čisté podobě. Druhá eluovaná složka je ve směsi s první, třetí je ve směsi s první a druhou atd. Frontální chromatografie je prakticky využívána pouze u přípravy deionizované vody (Anzenbacher & Kovář, 1986; Klouda, 2003; Sharma, 2014).

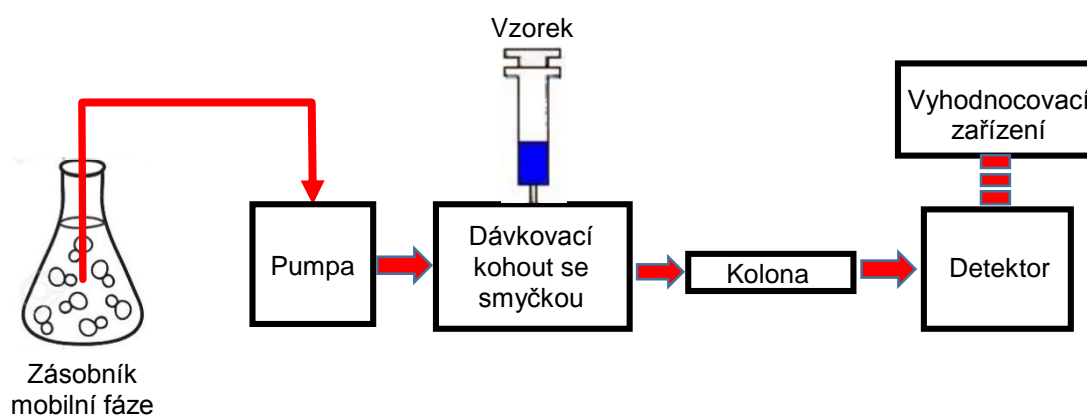
## **3.4. Kapalinová chromatografie (LC)**

V LC je dělení látek založeno na selektivní distribuci analytů mezi mobilní a stacionární fází (Niessen, 1999).

Principem této metody je umístění lože sorbentu v koloně, kde v horní části je přívod mobilní fáze (eluentu) a dole je kolona opatřena jímačem eluátu. Vzorek je vnesen přímo na lože sorbentu a průtok mobilní fáze je regulován obvykle tlakem nebo lineárním dávkovačem či jiným typem čerpadla. Detekce je zpravidla prováděna v jednotlivých frakcích refraktometricky nebo spektrofotometricky.

Dle množství vzorku, který má být podroben analýze jsou voleny i rozměry kolony. Větší rozměry kolon a hrubší zrnění zhoršuje obvykle rozlišení a účinnost separace. Chromatografickou kolonu je možno plnit adsorbenty nebo měniči iontů (Mikeš et al., 1980).

**Obr. 1:** Schéma kapalinového chromatografu



U kapalinové chromatografie je MF kapalina, která mimo interakce analytu se SF, rovněž rozhoduje o separaci vzorku. SF pak může být buď pevná látka, nebo kapalina, která je s kapalinou MF nesmíselná, popřípadě mísitelná jen omezeně. Při čemž stacionární kapalná fáze musí být zakotvena na vhodném pevném nosiči. Podle toho můžeme dělit LC na tyto podskupiny:

- *chromatografie kapalin-pevná látka*
- *chromatografie kapalina-kapalina*

Z provozního hlediska lze LC dělit i podle pracovního tlaku na chromatografii:

- *nizkotlakou nebo též gravitační* kdy průtok MF je pouze důsledkem gravitace
- *středotlakou* (např. FPLC – fast protein liquid chromatography) – již za použití mechanického zařízení regulujícího průtok, cca do 3 MPa
- *vysokotlakou (HPLC)* – 7-20 MPa

(Anzenbacher & Kovář, 1986; Klouda, 2003; Wilson & Poole, 2009)



## 3.5. Gelová chromatografie (GPC)

Gelová permeační chromatografie, často uváděná v odborné literatuře jako *size exclusion chromatography* (SEC), patří ke kolonové chromatografii, kdy dělení je založené na velikosti molekul analyzovaných látek (Lin & Dence, 1992).

GPC je vhodná pro biomolekuly, které jsou citlivé na změnu pH, koncentraci kovových iontů nebo kofaktorů a na jiné okolní vlivy. Hraje klíčovou roli v purifikaci enzymů, polysacharidů, nukleových kyselin, proteinů a dalších biologických makromolekul. Má obrovský význam při stanovování molekulové hmotnosti látek a slouží k analýze směsí oligomerních sloučenin. GPC je nejjednodušší a nejelegantnější chromatografickou technikou, která separuje složky dělené směsi podle velikosti a struktury molekul analyzovaných látek (Amersham Biosciences, 2002; Horák, Jurková, Čulík, Čejka, & Kellner, 2002).

U GPC téměř vůbec nezáleží na chemické povaze látky. Dle chemické vlastnosti separovaných látek můžeme určit pouze systém, v němž je separaci možné provádět – hydrofobní či hydrofilní gel a vhodná volba elučního činidla. Pomocí této metody je možno separovat molekuly o různých velikostech, pokud se rozpouštějí dobře v daném rozpouštědle. Touto metodou je možno separovat látky od nízkomolekulárních až po vysokomolekulární s molekulovou hmotností v rozmezí od  $10^2$  do  $10^7$  g.mol<sup>-1</sup>. Podmínkou je jejich rozpustnost ve vhodném rozpouštědle (Churáček, 1981).

### 3.5.1. Princip GPC

Princip GPC spočívá v tom, že je chromatografická kolona nejdříve naplněna kulovitými, malými částčkami gelu, ve kterých jsou póry o různých rozměrech. Kolona naplněna porézním gelem má dva měřitelné kapalně objemy. Vnější objem  $V_0$ , který obestupuje póry gelu a vnitřní objem  $V_i$ , kterým je kapalina uvnitř pórů gelu. Celkový objem označovaný  $V_t$  představuje součet vnějšího a vnitřního objemu gelu. Objem mezi hodnotami  $V_t$  a  $V_0$  je určen elučním objemem  $V_e$ . Rozdělovací koeficient  $K_{av}$ , který se týká těchto hodnot je uveden v následující rovnici (Deutscher & Burgess, 2009).

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Roztok vzorku je nanesen na vstup do kolony a postupně je pufrem (MF) vymýván, přičemž molekuly složek se snaží difundovat z roztoku i do nitra pevné fáze a vstupovat tak do jejích pórů. Pokud je velikost pórů vhodně volena, mohou zcela zabraňovat difúzi velkých molekul, částečně brzdít difúzi středně velkých molekul a umožňovat pronikání molekul malých. Rovnováha nerovnoměrného rozdělení molekul je v tomto dvoufázovém systému brzy ustanovena.

Bez zábran v obou fázích se šíří malé molekuly, velké molekuly se vyskytují jen v kapalně fázi, kdežto středně velké molekuly se převážně vyskytují ve fázi kapalně, ale částečně pronikly i do pevné fáze. Vhodným materiálem k distribuci látek podle velikosti molekul jsou různé gely. Obvykle jsou vyráběny ve formě zrněk a používají se zbobtnalé v příslušných roztocích. Slouží jako náplň do chromatografické kolony, jako SF. Rozlišná distribuce molekul mezi fázemi zapříčiní postupné dělení složek na základě jejich velikosti. Kde jako první opouští kolonu složka s největší velikostí molekul, které do gelu vůbec nepronikly, a proto jsou MF nejvíce unášeny. Středně velké molekuly, které difundují částečně do SF, jsou mírně bržděny. Malé molekuly, jež během průtoku pronikly difúzí bez zábran do obou fází, jsou značně zbržděny, což znamená, že jejich distribuce v porovnání s ostatními byla posunuta ve prospěch gelu. Vzorky jsou eluovány isokraticky. Rozhodujícím faktorem na separaci látek jsou tedy rozměry molekul analyzovaného vzorku. Koncentrace vzorku v eluátu na výstupu z kolony je zaznamenávána vhodným detektorem (Amersham Biosciences, 2002; Amersham Biosciences 2001; Churáček, 1981; Mikeš et al., 1980; Stellwagen E. 1990).

Mezi nejpoužívanější detektory v GPC patří refraktometrické detektory, fluorescenční detektory a fotometrické detektory, do kterých spadají i UV detektory, které byly využity v experimentální části této práce.

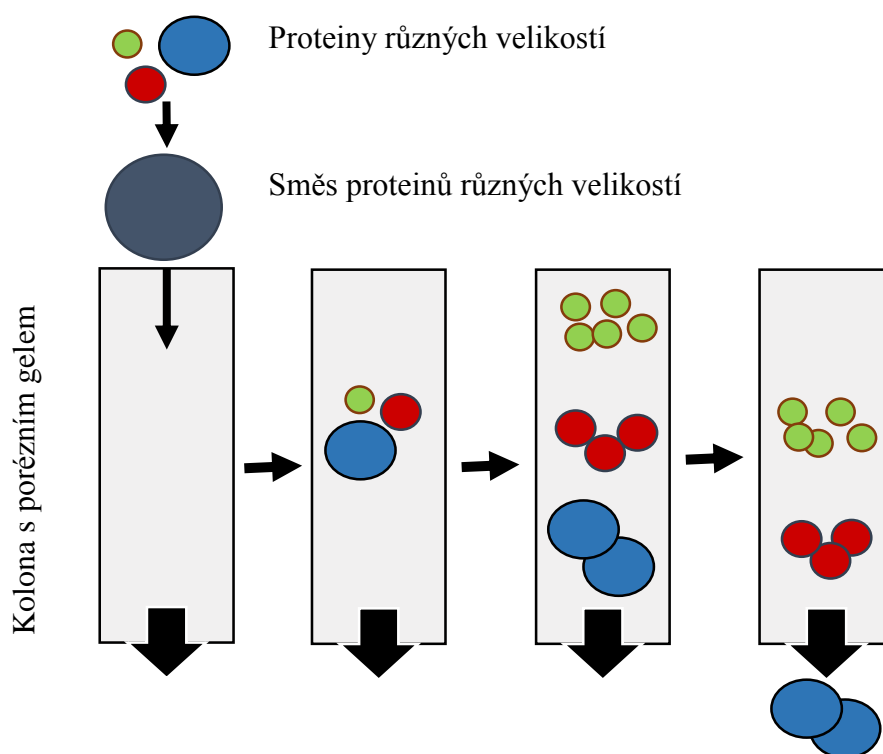
UV detektory pracují při pevné vlnové délce nebo je možné vlnovou délku v závislosti na analyzovaném solutu měnit. UV detektory pracující ve více vlnových délkách používají nejčastěji jako zdroj záření deuteriové lampy, ze kterých se pomocí monochromátorů získá požadovaná vlnová délka, při které se následně měří absorpce záření. Absorpce UV záření se řídí Lambert-Beerovým zákonem, který určuje absorbanci. Lambert-

Beerův zákon má podobu  $A=\varepsilon.l.c$ , kde je absorbance závislá na molárním absorpčním koeficientu  $\varepsilon$ , délce optické dráhy  $l$  a molární koncentraci roztoku  $c$  (Berek et al., 1983; Klouda, 2003).

## Aplikace vzorku

Způsob aplikace vzorku do značné míry závisí na objemu vzorku a na dostupném zařízení, které je voleno podle velikosti kolony, typu gelové filtrace média a rovněž objemu vzorku. Vzorek může být aplikován automaticky nebo manuálně. Je možné ho aplikovat přímo na kolonu pomocí chromatografického systému, pomocí peristaltické pumpy nebo injekční stříkačky přes nástřikový ventil s výměnnou smyčkou (Amersham Biosciences, 2002).

**Obr. 2:** Schematické znázornění průběhu GPC



### 3.5.2. Gely pro GPC

Rozměr, tvar, množství a relativní objem pórů gelu a polarita povrchu gelu jsou rozhodující charakteristiky pro separaci látek. Matrice gelu musí být chemicky i fyzikálně stabilní a inertní jak vůči mobilní fázi, tak i chromatografovaným látkám, a to i při použití v širším rozsahu pH.

#### Gely můžeme rozdělit na:

*Xerogely*, které tvoří makromolekuly s póry dané velikosti. S použitím rozpouštědla bobtnají a zvětšují tak svůj objem.

*Aerogely* jsou tvořeny maticí s pevnou inertní strukturou a obsahují póry dané velikosti, které jsou v suchém stavu naplněné vzduchem. V použitém rozpouštědle nedochází k objemovým změnám.

Některé gely mají vlastnosti obou těchto typů gelu a nazývají se *hybridní* nebo taky *nehomogenní gely*. Tvoří pevnou matici představovanou hustě zesítěným polymerem s velkým množstvím pórů různých velikostí.

Afinita k vodě je dalším kritériem při klasifikaci gelů. Z tohoto hlediska dělíme gely na **hydrofilní** - dextranové, agarosové, glykolmethakrylátové atd. Jsou vhodné pro separaci látek rozpustných ve vodě. Dalším typem jsou gely **hydrofobní**, které našly využití při práci v prostředí organických rozpouštědel a využívají se hlavně k analýzám syntetických makromolekulárních látek, např. styren-divinylbenzenové, akrylátové, polyvinylacetátové gely a jiné. I v tomto případě existují i gely univerzální. Tedy takové, které mohou pracovat jak ve vodném prostředí, tak i v prostředí organických rozpouštědel (Amersham Biosciences, 2002; Churáček, 1981; Mikeš et al., 1980).

## Přehled nejčastěji používaných gelů

### Dextranové gely

Vyrábí se z fragmentů dextranu, což je produkt bakteriální přeměny sacharosy bakterií *Leuconostoc mesenteroides*, zesíťovaného epichlorhydrinem v alkalickém prostředí. Změnou poměru reaktantů lze ovlivnit stupeň zesíťení a tím i velikost pórů.

Dextranové gely v laboratorním použití mají komerční označení Sephadex a hlavním výrobcem je Amersham Biosciences.

- *Sephadex G-10 a G-15* s malými póry jsou vhodné k dělení nízkomolekulárních látek (peptidy, aminokyseliny, koenzymy)
- *Sephadex LH 20* je možno použít při dělení triacylglycerolů, mastných kyselin a steroidních hormonů.
- *Sephadex G-25* je používán pro rozsáhlou skupinu látek zahrnující rovněž globulární proteiny, má výborné vlastnosti pro odsolování roztoků a obecně oddělování jiných nízkomolekulárních látek od molekul, u kterých je  $M_r > 5\,000$  g/mol
- *G-50* se používá hlavně pro odsolování roztoků proteinů
- *Sephadex G-75, G-100, G-150 a G-200* jsou určeny pro separace proteinů do velikosti  $M_r \sim 600\,000$  g/mol
- *matrice řady LH* (hydroxypropylované) mají využití při práci v nepříliš hydrofobním prostředí (ethanol, chloroform).

(Amersham Biosciences, 2002; Churáček, 1981; Mikeš et al., 1980)

### Agarosové gely

Agarosa je polysacharid, který je získáván purifikací agaru z mořských řas. Zpracováním agaru se odstraní nabitě polysacharidy, zahřátý roztok elektroneutrální agarosy po ochlazení spontánně tvoří gel. Zesíťování (“cross-linking”) agarosy se provádí reakcí s 2,3-dibrompropanolem v alkalickém prostředí, popřípadě reakcí s epichlorhydrinem. Podíl agarosy ovlivňuje velikost pórů.

Hlavními výrobci agarosových gelů jsou Amersham Biosciences a Bio-Rad Laboratories.

V laboratorním použití jsou dostupné pod komerčními názvy:

- *Sepharose 2B, 4B, 6B*
- *Sepharose CL-2B, CL-4B, CL-6B* (“cross-linked”)
- *Superose 6, 12*
- *Bio-Gel A*

Porozita gelu je určena procentuálním zastoupením agarosy v matrixu. Firma Bio-Rad nabízí šest typů agarosových gelů s elučními limity 0.5, 1.5, 5, 15 a 50 milionů daltonů (Berek et al., 1983; Bio-Rad Laboratories, 2000; Churáček, 1981; Mikeš et al., 1980).

### **Polyakrylamidové a metakrylátové gely**

Polyakrylamidové gely se připravují kopolymerací akrylamidu a *N,N'*-metylenbisakrylamidu. Jejich výhodami oproti polysacharidovým dextranovým či agarosovým gelům jsou odolnosti proti mikrobiálnímu růstu a dobrá mechanická odolnost. Také jsou prosté všech nabitých skupin.

- Bio-Gel P-2 (P-4, -6, -10, -30, -60, -100, -150, -200 a -300) firmy Bio-Rad Laboratories.

Další výhodou metakrylátových gelů je, že lze do jejich skeletu zabudovat potřebné funkční skupiny ovlivňující jejich polaritu i reaktivitu (Berek et al., 1983; Mikeš et al., 1980).

### **Polystyrenové gely**

Jedná se o kopolymer styrenu a divinylbenzenu. Patří mezi xerogely. Náplně jsou vhodné pro separaci polymerů rozpuštěných ve středně polárních až polárních organických rozpouštědlech.

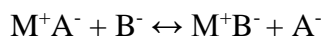
Výrobci jsou například Polymer Laboratories Ltd. (komerční označení PL gel), Waters Associates (Styragel), Tosoh Bioscience (TSK-GEL H) a Bio-Rad Laboratories (BioBeads S-X). Použití tohoto typu gelů pro analýzu polymerů v organických rozpouštědlech je značně rozšířené (Berek et al., 1983; Churáček, 1981; Mikeš et al., 1980).

## Polyvinylacetátové gely

Jedná se o kopolymer vinylacetátu a butandiol 1, 4 - divinyleteru, které jsou vhodné pro středně polární až polární rozpouštědla. Vyrábí je firma E. Merck, Darmstadt a NSR pod názvem Fractogel PVA (Berek et al., 1983; Churáček, 1981; Mikeš et al., 1980).

## 3.6. Iontově výměnná chromatografie (IEC)

Chromatografie na měničích iontů neboli iontově výměnná chromatografie byla představena začátkem roku 1960 a hraje významnou roli při separaci a purifikaci biomolekul. IEC je jedna z nejčastěji používaných technik k purifikaci biomolekul jakou jsou proteiny, peptidy, nukleové kyseliny a jiné nabitě molekuly. IEC je možné oddělit i molekuly, které se jen velmi nepatrně liší stavbou (Amersham Biosciences, 2004). Ionty elektrostaticky vázané k pevnému a chemicky inertnímu podkladu se reversibilně vyměňují za ionty z roztoku.



$M^+A^-$  je měnič iontů s navázaným aniontem  $A^-$  (anex) a  $B^-$  zastupuje anionty v roztoku. Měnič kationtů (katex) obsahuje záporně nabitě skupiny, které reversibilně vážou kationty (Haddad & Jackson, 1990).

Afinita iontů k ionexu není stejná, závisí na velikosti náboje a na poloměru hydratovaného iontu, což je základ pro separaci látek ionexovou chromatografií. Výhodou této metody je možnost oddělit od sebe i látky velmi podobných vlastností. Síla vazby iontu na ionex může být ovlivněna různými vlivy, např. van der Waalsovými a polárními interakcemi, iontovou silou a hodnotou pH prostředí. Rovněž látky nesoucí stejný náboj jako ionex nebudou vůbec zachyceny. Významnou skupinu látek jsou ty, jejichž nábojové vlastnosti závisí na pH, např. aminokyseliny, peptidy a bílkoviny, proto mohou být separovány jak na anexech, tak i na katexech (Káš et al., 2006).

V tomto případě závisí volba ionexu zejména na hodnotě izoelektrického bodu: při pH nižším než je izoelektrický bod nese látka kladný náboj a váže se na katex, při pH nad

izoelektrický bod má látka záporný náboj a váže se na anex. U separace proteinů je nutno brát v potaz jejich stabilitu v závislosti na pH.

Inertní matrice pro ionexovou chromatografii mají na svém povrchu kovalentně navázané kladně nebo záporně nabitě funkční skupiny. Charakter funkčních skupin udává sílu ionexu, jejich celkové množství a využitelnost určuje kapacitu ionexu. Označení slabé, střední a silné ionexy značí stupeň disociace skupin v závislosti na pH. Silné ionexy jsou úplně disociovány v širokém rozmezí pH, naopak disociace slabých ionexů je na pH silně závislá. Slabé katexy ztrácejí náboj při pH pod 6 a slabé anexy při pH nad 9 (Amersham Biosciences 2004; Káš et al., 2006).

**Tab. 1:** Funkční skupiny ionexu (Upraveno dle Káš et al., 2006)

Anexy	Funkční skupina
Aminoethyl (AE-)	$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$
Diethylaminoethyl (DEAE-)	$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
Kvarterní aminoethyl (QAE-)	$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
(ECTEOLA)	$\text{OCH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$
Katexy	
Karboxymethyl (CM-)	$\text{OCH}_2\text{COO}^-$
Fosfo (P-)	$\text{PO}_4\text{H}_2^-$
Sulfopropyl (SP-)	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$

## Matrice

Média pro IEC jsou vyráběná z porézních nebo neporézních matric, volené pro jejich fyzikální stabilitu, jejich chemickou odolnost a nízkou míru nescifických interakcí. Tyto matrice jsou substituovány funkčními skupiny, které určují náboj média (Amersham Biosciences 2004).



V ionexové chromatografii jsou nejpoužívanější tři druhy materiálů jako matrice:

### **Ionexové pryskyřice:**

Tvoří je hustá síť hydrofobních polymerů, jež jsou do značné míry substituovány ionogenními skupinami. Mají velkou kapacitu pro malé ionty. Vzhledem k vysokému stupni zesílení jsou oka v síti matrice malá, tudíž kapacita ionexových pryskyřic pro biopolymery je nízká. Vysoká hustota náboje způsobuje velmi silnou vazbu. Lze je připravit s různými funkčními skupinami, jsou použitelné v širokém rozsahu pH a do teploty 100 °C. Hydrofobní charakter ionexu může způsobit denaturaci proteinů. Dobrý průtok kolonou umožňuje tuhost částic ionexu a jejich tvar v podobě kuliček. Lze je snadno připravit v požadovaném tvaru, porozitě a chemickém složení (Coufal, 1996; Káš et al., 2006; Mikeš et al., 1980).

### **Ionexové celulosy:**

Tvoří je celuloza nebo modifikovaná celuloza, která je substituována nabitými skupinami. Stupeň substituce je nízký, proto jejich kapacita pro malé ionty je malá. Před ionexovými pryskyřicemi se upřednostňují díky jejich hydrofilní matici s velkými póry, která jen velmi zřídka denaturuje bílkoviny. Průtok celulosovými ionexy je spíše horší, díky částicím nepravidelného tvaru, jež jsou měkké či křehké. Není zde možnost separace bílkovin s celulolytickou aktivitou. Využití nachází zejména při chromatografii nukleových kyselin (Coufal, 1996; Káš et al., 2006; Mikeš et al., 1980).

### **Ionexové deriváty polydextranu a agarosy:**

Podobají se strukturou pryskyřičným ionexům, jejichž porozita vzniká nabotáním. Struktura ionexové matrice je otevřená s velkými póry. Pro malé ionty mají nižší kapacitu, díky zesílení polysacharidových řetězců, jež umožnilo užít vyššího stupně substituce. Hydrofilní sacharidová matrice obvykle nedenaturuje labilní látky, např. proteiny, a interakce jiného než iontového typu jsou velmi malé. Separace může být rovněž ovlivněna síťovým efektem této gelové matrice (Coufal, 1996; Káš et al., 2006; Mikeš et al., 1980).

### **3.6.1. Hlavní fáze IEC**

#### **Ekvilibrace ionexu**

IEX medium je ekvilibrováno startovním pufrům před tím, než je na kolonu aplikován vzorek. Pokud je iontová síla pufru příliš nízká, zapříčiňuje zdlouhavou a obtížnější ekvilibraci ionexu, zpomaluje se výměnná kinetika, čímž se zhoršuje chromatografické rozlišení. Může docházet ke smršťování ionexu a tím se měnit i průtok kolonou. Obvykle je doporučena iontová síla 0,05 – 0,1 mol/l. Výběr vhodného pufru i pH hraje důležitou roli (Amersham Biosciences, 2004; Káš et al., 2006).

#### **Navázání látek ze vzorku a vymytí nenavázaných složek**

Separční proces probíhá ve dvou fázích. V prvním kroku probíhá sorpce látky určené k separaci na ionex. Ve druhé fázi jsou pak navázané látky z kolony desorbovány. Na kolonu je aplikován vzorek rozpuštěný v ekvilibračním pufru, nebo s pH odpovídající zvolené hodnotě a nízkou iontovou silou. Při IEC nezáleží na objemu aplikovaného vzorku, důležité je množství separovaných látek ve vzorku. Pokud je množstvím vzorku přesažena kapacita kolony, část separovaných látek se nenaváže, není separována a je vymyta z kolony v mrtvém objemu. Za ideální stav můžeme považovat, pokud vzorek obsahuje množství dělených látek, které odpovídá cca 80-90 % kapacity ionexu (Amersham Biosciences, 2004; Káš et al., 2006).

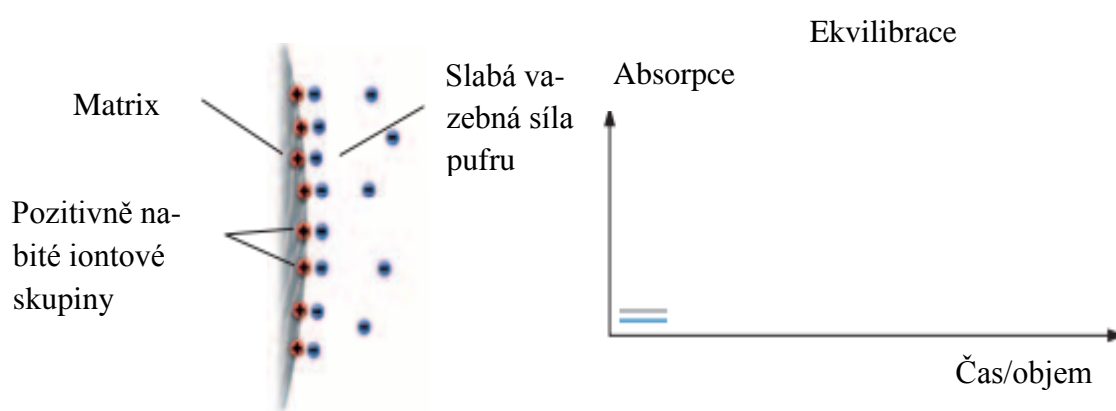
#### **Změna podmínek vedoucích k desorpci**

Desorpce látek vázaných na ionexu je obvykle prováděna změnou složení elučního pufru, a to buď změnou pH, iontové síly roztoku, popřípadě změnou obou těchto faktorů. Gradienty pH je možno obecně použít k eluci látek, jejichž nábojové vlastnosti se mění se změnou pH. Jejich výhodou je, že nezasahují do změn objemu chromatografické náplně u silných ionexů. pH gradienty by měly směřovat k izoelektrickým bodům látek, jež jsou vázány na ionexy. Čili pro anexy by měl gradient směřovat k nižším hodnotám pH, pro katexy směrem k vyššímu pH.

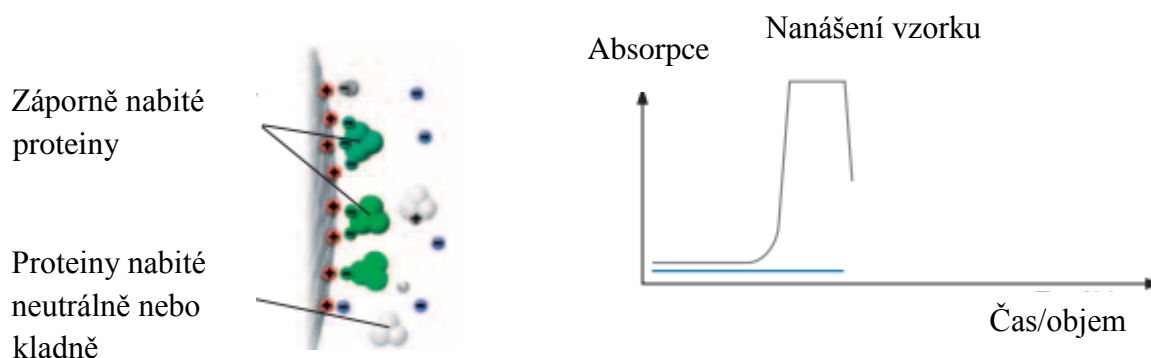
Rychle měnící se složení elučního roztoku způsobuje vymývání látek s mnohem menším objemem eluentu a rozlišení může být nižší.

Maximálního rozlišení a současně rovnoměrného rozložení chromatografických vrcholů lze docílit, pokud jsou vlastnosti separovaných látek známy. Gradient by měl být mírný v oblasti, kde se eluuje najednou několik látek, naopak strmých gradientů by se mělo užít tam, kde se od sebe chromatografické vrcholy příliš vzdalují. Výjimečně lze provést eluci startovním pufrem. Jedná se o *izokratickou eluci*. Tento typ eluce je použitelný tehdy, pokud jsou látky na kolonu vázány nepříliš pevně (Biosciences, 2004; Káš et al., 2006).

**Obr. 3:** Ekvilibrace ionexu startovním pufrem

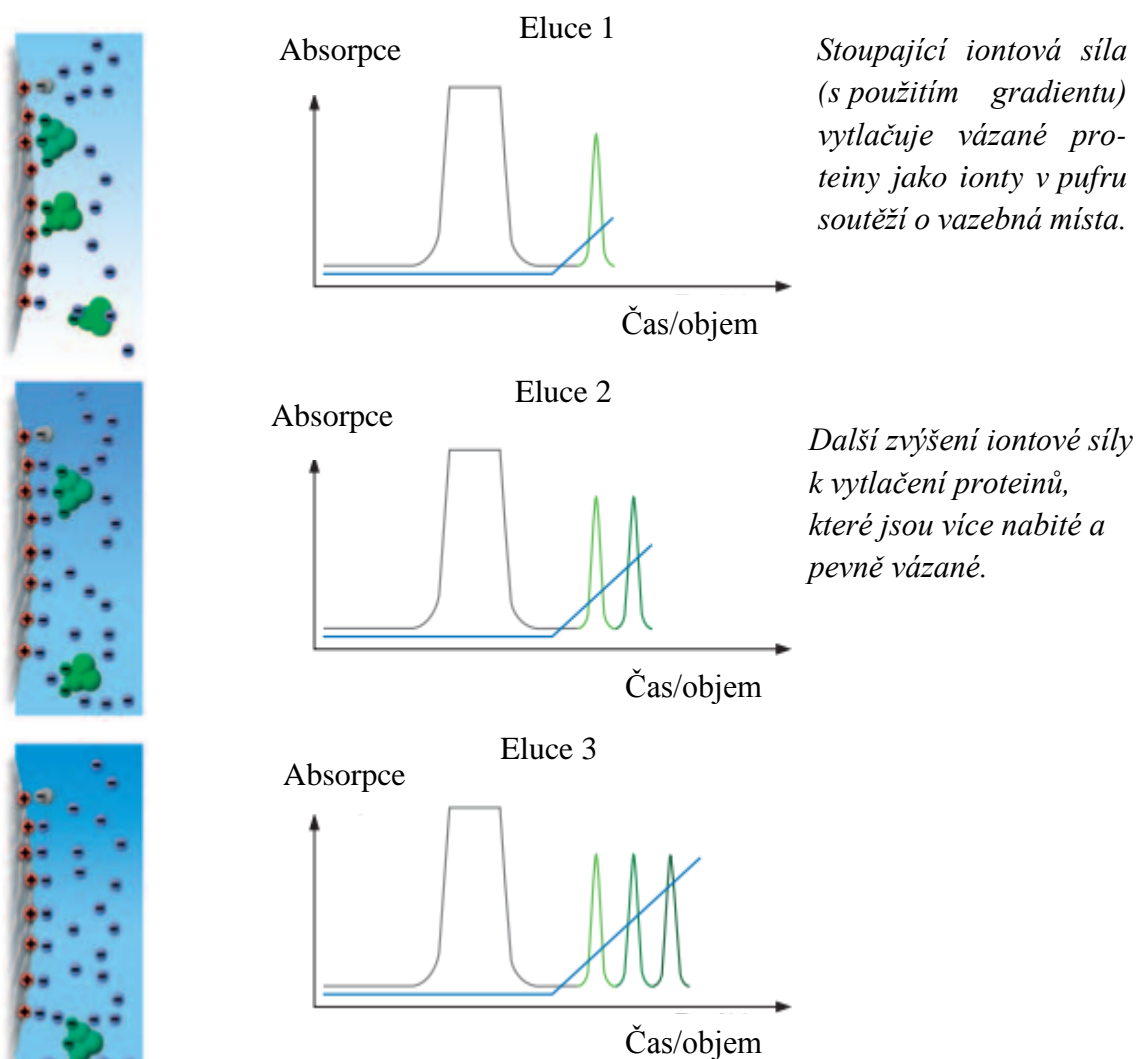


**Obr. 4:** Nanášení vzorku



*Opačně nabitě proteiny se váží na iontové skupiny IEX média a začínají se koncentrovat na koloně. Nenabitě proteiny či proteiny mající stejný náboj jako iontové skupiny, se eluují během nebo bezprostředně po aplikaci vzorku (Amersham Biosciences, 2004).*

**Obr. 5:** Eluce



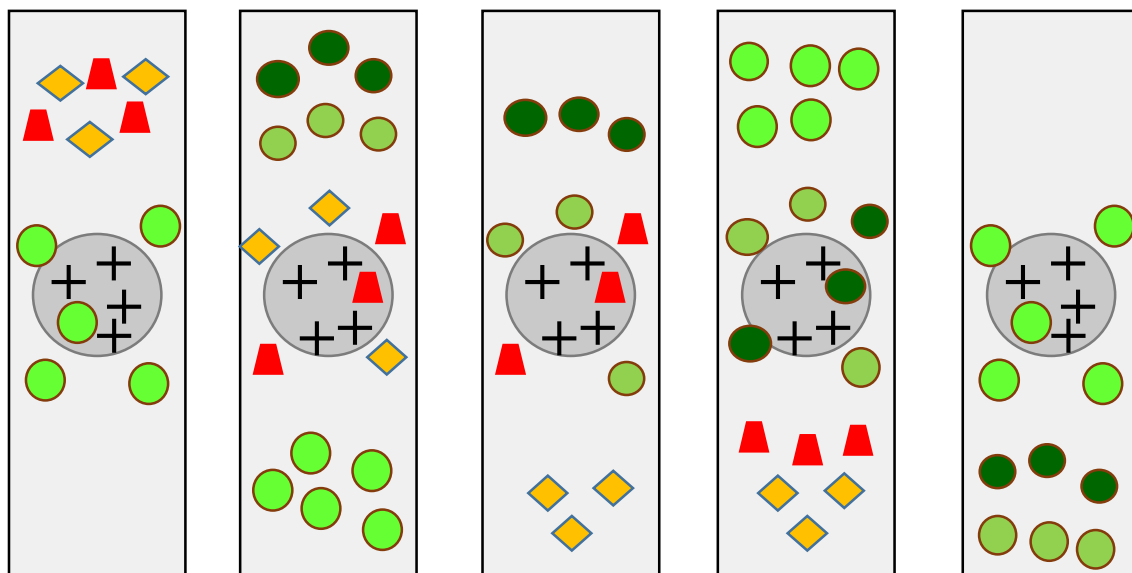
(Amersham Biosciences 2004; Káš et al., 2006)




### **Regenerace ionexu**

Po skončení eluce je provedena obvykle regenerace ionexu. Regenerace je provedena promytím startovním pufrům, jestliže všechny látky předem již byly eluovány. Kontrola ekvilibrace se provádí změřením pH a vodivosti ve vytékající kapalině. Pokud zůstanou některé látky v koloně zadrženy, je vhodné je vymýt zvýšením iontové síly. K tomuto účelu

se často používá 2M roztok vhodné soli (NaCl), která svou velkou iontovou silou vytěsňuje zbylé balastní ionty (Káš et al., 2006; Mikeš et al., 1980).

**Obr. 6:** Schematické znázornění průběhu IEC



-  Startovní pufr k navázání iontů
-  Látky určené k separaci
-  Gradientní ionty

### 3.7. Chromatofokusace (CF)

CF je metoda na separaci bílkovin založená na rozdílném izoelektrickém bodě pI separovaných bílkovin.

Gradient pH je vytvářen přímo na koloně. Tento gradient je vytvořen pomocí speciálního pufrového systému obsahujícího směs oligopeptidů s velkým počtem amino- a karboxylových skupin v postranních řetězcích, s hodnotami pI, jež pokrývají určitý interval pH.

Pokud takový pufr o určitém (nižším) pH protéká ionexovou kolonou, ekvilibrovanou na odlišné (vyšší) pH, vytváří se na koloně pH gradient. Jestliže je takový pH gradient použit k eluci proteinů navázaných na anex, proteiny se eluují v pořadí podle svých hodnot pI. V průběhu eluce je uplatňován fokusační efekt, jehož výsledkem je zaostřování zón na koloně, koncentrace vzorku a v důsledku toho i vysoká rozlišovací schopnost. Tato vysoká rozlišovací schopnost může být především užitečná k separaci velmi podobných substancí. CF je možné oddělit bílkoviny, jejichž pI hodnoty se liší o pouhých 0,02 jednotek pH, což je efektivní pro separaci velmi podobných látek. Nicméně tato metoda není úplně vhodná pro izolaci proteinů, které se ireversibilně srážejí (Amersham Biosciences 2004; Káš et al., 2006).

### **3.8. Afinitní chromatografie (AC)**

Jde o metodu izolace biologicky aktivních látek, která je založena na specifických či biospecifických interakcích. Biospecifickými interakcemi mohou být vodíkové vazby, hydrofobní interakce, Londonovy disperzní síly a coulombické interakce. Tyto biologicky aktivní látky jsou schopny specificky a reverzibilně vázat látky komplementárních struktur označované jako afinanty podle Reiner a Walche nebo afinantní ligand podle Lova a Deana, které se kovalentně vážou na pevný nosič (Mikeš et al., 1980).

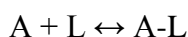
#### **Princip**

AC spočívá ve schopnosti biologicky aktivních látek vázat specificky a reversibilně komplementární struktury. Jedná se o chemicky vázaný afinant, který při průtoku roztoku kolonou zachytí jen biologicky aktivní látky a ostatní složky volně projdou. AC je použitelná např. pro soustavy antigen - protilátka (Ag-Ab), enzym - inhibitor, enzym - substrát, receptor - hormon, imunoglobuliny - protein A nebo G, lektin - glykoproteiny a další. Afinant může být uvolněn ze systému více způsoby: specificky použitím kompetitivního ligandu nebo

nespecificky – změnou pH, změnou iontové síly, teploty či za použití rozpouštědla (Amersham Biosciences, 2002; Bailon et al., 2000).

Jeden z partnerů se vždy pevně chemicky naváže jako ligand na vhodný nosič, kde tvoří společně stacionární fázi. Druhý z partnerů je obsažen ve vzorku, kde za vhodných podmínek je specificky navázán právě na onen ligand na koloně.

Molekula afinantu (A) reaguje s ligandem (L) za vzniku komplexu molekula-ligand (A-L). Tvorbu tohoto komplexu vyjadřuje rovnovážná konstanta  $K$  (Rajagopalan, (1966).

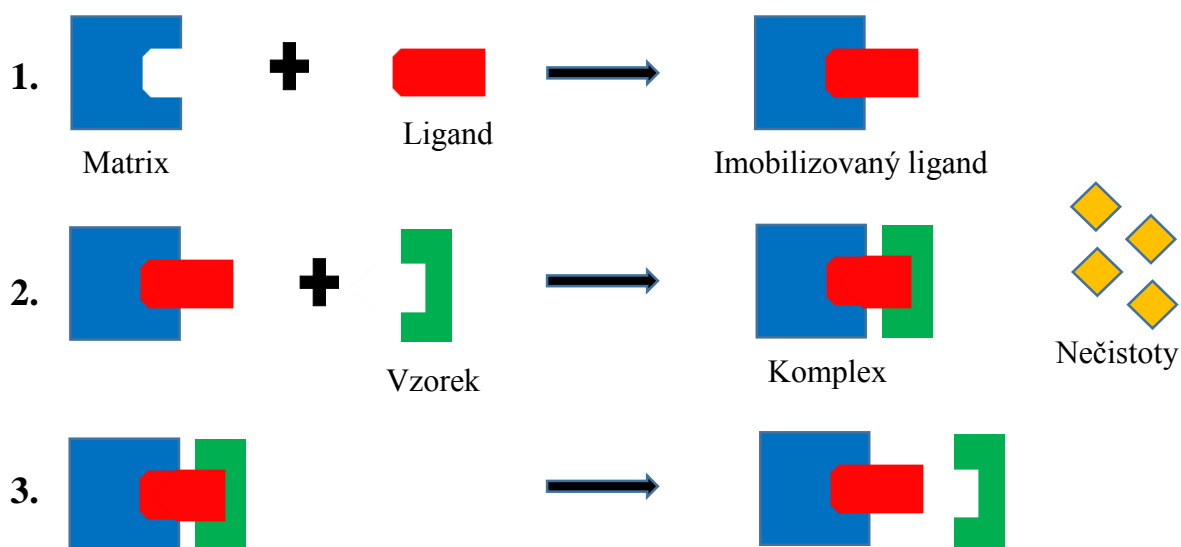


$$K = \frac{[A - L]}{[A] \times [L]}$$

Rovnovážná konstanta  $K$  musí splňovat určitá kritéria, aby došlo ke tvorbě komplexu. Ligandy mohou být monospecifické nebo skupinově specifické. Monospecifické ligandy mají silnější vazbu než ligandy skupinově specifické a rovnovážné konstanty se pohybují řádově mezi  $10^6$  až  $10^8$  mol/l. Jestliže jsou jejich hodnoty v rozmezí  $10^3$  až  $10^5$  mol/l, dochází spíše ke zpomalování látek než ke tvorbě stabilního komplexu. Kinetika sorpce je u afinitní chromatografie pomalejší než např. v iontové výměnné chromatografii.

Často se u AC používají biologické ligandy např. enzymy, receptory, protilátky, protein A, lektiny, nukleové kyseliny atd., avšak jejich aplikace je omezena vysokou cenou a/nebo jejich relativní nestabilitou. Proto se čím dál častěji nahrazují přírodní ligandy syntetickými, robustnějšími ligandy jako jsou např. chelatovné kovy, thiofilní ligandy, nízkomolekulární ligandy jako barviva a deriváty kyseliny borité. Nevýhodou syntetických ligandů je jejich obvykle skupinová selektivita, proto je snaha zvýšit selektivitu separace. Pro izolaci rekombinantních proteinů je velmi účinná AC na vázaných kovových iontech s chelatovnými kovy jako jsou  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  (Vařilová, 2005).

**Obr. 7:** Schéma průběhu afinitní chromatografie



1. Příprava gelové matrice
2. Nanesení vzorku
3. Eluce purifikované látky

### 3.8.1. Ligand

Vhodný výběr ligandu pro AC je ovlivněn dvěma faktory. Jeden z nich je schopnost selektivně a reverzibilně vázat specifické molekuly nebo skupiny molekul. Další podmínkou je, že musí obsahovat chemicky modifikovatelné skupiny pro navázání k matrici, aniž by omezoval vazebnou aktivitu.

Disociační konstanta  $K_D$  pro komplex ligand – cílová molekula by měla být v rozsahu  $10^{-4}$  až  $10^{-8}$  M (Amersham Biosciences, 2002).

### 3.8.2. Nosiče pro AC

Volba vhodného nosiče je velmi důležitá. Nosič musí mít dostatečné množství funkčních skupin schopných reakce s afinantem a především minimálně interagovat s izolovanými látkami, aby nedocházelo k nespecifické sorpci. Rovněž musí mít dobré průtokové vlastnosti, které musí zůstat zachovány i po navázání afinantu. Je zapotřebí, aby byl mechanicky tak i chemicky stálý nejen za podmínek vazby afinantu, ale i při změně pH,



iontové síly či teploty. Struktura nosiče by měla být tvořena volnou pórovitou síťovinou, díky níž je umožněno snadného vstupu i výstupu makromolekul různých velikostí (Churáček, 1981; Mikeš et al., 1980; Turková, 1993).

## **Silikagel**

Patří do často používaných nosičů pro přípravu SF u AC. Jeho povrch je nutné nejdříve zaktivovat, aby mohl být navázán afinitní ligand, poté může reagovat s ligandem, který obsahuje hydroxylové, thiolové nebo aminoskupiny. Snese vysoké tlaky, ale vůči kyselému nebo alkalickému pH je nestabilní, využitelný rozsah pH se pohybuje v oblasti  $2 < \text{pH} < 8$ . Hlavními výhodami silikagelu jsou velký povrch a tím velká kapacita pro vzorky, vysoká účinnost a mechanická odolnost ve srovnání s měkkými gely. Nevýhodou je výše zmíněný omezený rozsah pH.

## **Agarosové nosiče a jejich deriváty**

Sepharosa je nejběžnějším agarosovým nosičem. Obsahuje dvě polysacharidové jednotky a je stabilní v rozmezí pH 4-9 a snese teploty do 40 °C. Je odolná vůči běžným organickým rozpouštědlům, nevykazuje nespecifické interakce a lze ji používat i při velké koncentraci soli a močoviny. Její nevýhodou je nízká tlaková stabilita.

## **Polyakrylamidové gely**

Jsou to hydrofilní kopolymery založené na bázi akrylamidu a akrylamidových derivátů. Nejsou napadány mikroorganismy a mají delší trvanlivost. Stabilní jsou i ve zředěných roztocích solí, detergentů močoviny a v organických rozpouštědlech. Nejpoužívanější z polyakrylamidových nosičů jsou Bio-Gely.

## **Hydroxyalkylmethakrylátové nosiče**

Přeprogramují se polymerací hydroxyalkylesterů kyseliny methakrylové s alkylenbis(methakryláty). Jsou chemicky i mechanicky stabilní a rovněž jejich výhodou je rezistence vůči mikroorganismům. Mezi nevýhody patří částečně hydrofobní charakter, a tudíž i náchylnost k nespecifickým hydrofobním interakcím.

## **Dextranové gely**

Dextran je větvený polysacharid složený z jednotek glukosy vznikající ze sacharózy působením některých mikroorganismů. Dextranové gely, pod komerčním názvem Sephadex, jsou chemicky velmi stálé. Při nízkých hodnotách pH jsou však glykosidické vazby citlivé k hydrolýze a mechanická stabilita je rovněž nižší (Mikeš et al., 1980; Turková, 1993; Vařilová, 2005).

### **3.8.3. Aktivace nosičů**

Nosič může být aktivován přímo od výrobce, pokud aktivovaný není, je nutné ho ještě před navázáním ligandu aktivovat. Aktivačních reakcí existuje celá řada, mezi běžně používané reakce patří:

- Bromkvanová metoda (CNBr) – především pro aktivaci polysacharidových nosičů
- Aktivace divinylsulfonem (DVS) – pro aktivaci nosičů s hydroxylovými skupinami
- Aktivace epoxy skupinami (bisoxiranem) – zavádění epoxy skupiny do hydroxylovaných polymerů, aktivačním činidlem je 1,4-butandioldiglycidylether
- Aktivace organickými sulfonylchloridy – používá se pro aktivaci agarosy
- Triazinová metoda – lze použít pro aktivaci agarosových nosičů

Reakční podmínky imobilizace pro různé funkční skupiny jsou uvedeny v Tab. 2.

**Tab. 2:** Reakční podmínky imobilizace pro různé funkční skupiny

Aktivní skupina	Reagující skupiny ligandu	Reakční podmínky pH; čas $t$ [h]; teplota $T$ [°C]
Bromkyan	-NH <sub>2</sub>	7-10; 1-12; 4-25
Divinylsulfon	-NH <sub>2</sub> -OH -SH	6-11; 2-24; 4-25
Epoxy	-NH <sub>2</sub> -OH -SH -COOH	5-12; 4-72; 4-60
Tresyl	-NH <sub>2</sub>	7-9; 2-16; 4-25
Aldehyd	-NH <sub>2</sub>	3-10; 1-12; 4-25

(Upraveno dle Vařilová, 2005)

### 3.9. Adsorpční chromatografie

Je nejstarším typem chromatografie. Mobilní fází může být buď kapalina či plyn, ty pak jsou adsorbovány na povrchu stacionární fáze (Mikeš et al., 1980).

Jde zde o rovnováhu mezi jednou fází o daném objemu a povrchem adsorbentu. Při adsorpci molekul z plynu nebo z roztoku na tuhých adsorbentech je předpokladem, že tyto molekuly jsou zachycovány v silovém poli na povrchu tuhé fáze a že na tomto povrchu setrvávají. Látky, jež jsou za daných podmínek silněji vázány sorpčními silami a mají tak větší hodnotu adsorpčního koeficientu v daném systému, zůstávají v jednotlivých úsecích adsorbovány déle než látky jiné. Jsou stacionární fází více zdržovány a mobilní fáze je tak unáší kolonou či plošným médiem pomaleji. Proto mají v kolonových metodách vyšší retenční časy nebo větší eluční objemy. Což je podmíněno polaritou rozpuštěných látek. Jestliže molekuly pronikají přes rozhraní tuhé fáze a difundují do jejího objemu a stávají se tak její součástí, kde vytvářejí tuhé roztoky, jedná se o *absorpci* (Churáček, 1981).

Adsorpce může být dvojího typu:

*Fyzikální adsorpce*, která je založena na van der Waalsových silách působících mezi adsorbátem a adsorbentem. Energie těchto interakcí jsou obvykle velmi malé, avšak fyzikální rychlost adsorpce je velká. V případě fyzikální adsorpce z roztoků vytváří složka na povrchu adsorbentu většinou pouze monomolekulární vrstvu, protože musí při sorpci předem vytěsnit již adsorbovanou mobilní fázi. V případě sorpce plynů na tuhých sorbentech může dojít k interakci mezi první sorbovanou vrstvou a molekulami vzorku v plynné fázi. Jedná se o vícevrstvou adsorpci (Churáček, 1981).

V *chemisorpci* naopak vzniká iontová nebo kovalentní vazba a energie řádově odpovídá vzniku vazby při chemické reakci. Složka zde reaguje pouze na aktivních centrech adsorbentu, a tudíž kapacita povrchu je značně menší než při fyzikální adsorpci. Chemisorpční rychlost je menší a zvyšuje se s teplotou exponenciálně. Chemisorpce nejčastěji vzniká přenosem elektronů a acidobazickou interakcí mezi adsorbátem a adsorbentem nebo silnou vazbou mezi vodíkovými můstky (Churáček, 1981).

Sorbenty používané v adsorpční chromatografii pro SF se od sebe mohou lišit svou polaritou, případně i kyselostí či zásaditostí. Příkladem může být aktivní uhlí resp. moderní uhlíkové sorbenty získané karbonizací termosetů na vhodném nosiči, což je extrémně nepolární sorbent. Jako polární kyselý sorbent může být hydratovaný oxid křemičitý. Do polárních bazických sorbentů patří např. hydratované oxidy hlinitý a hořečnatý.

Mobilní fázi u adsorpční LC volíme z tzv. eluotropní řady rozpouštědel, která jsou v ní seřazena podle své vzrůstající polarity. K nejčastěji používaným patří: pentan, hexan, benzen, chloroform, aceton, acetonitril, ethanol, methanol, kyselina octová, voda. U plynové adsorpční chromatografie mobilní fázi zastupuje nosný plyn, kterým je obvykle dusík, helium, vodík či argon (Strain, 1942).

### **3.9.1. Stacionární fáze**

Látky používané jako adsorbenty musí splňovat základní požadavky.

Mezi něž patří:

- nerozpustnost a chemická inertnost k elučním systémům i chromatografované látce,
- velká adsorpční kapacita při zachování reverzibilitnosti adsorpce,

- rychlé ustalování rovnováhy,
- snadná příprava chromatografické kolony a reprodukovatelnost výsledků.

Adsorbenty jsou látky pórovité struktury. Svou stavbou částic a rozdílností zrnění se mohou dělit na adsorbenty určené pro konvenční gravitační chromatografii, nebo pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii.

### **Silikagel**

Silikagely jsou nejpoužívanější SF adsorpční chromatografie. Mají amorfni a porézní strukturu, která může být různě formována. Rovněž velikost pórů je důležitou vlastností adsorbentu. K přednostem silikagelu patří dobrá inertnost, velká adsorpční kapacita, snadná příprava různých typů a dobrá dostupnost (Cazes, 2004; Mikeš et al., 1980).

### **Oxid hlinitý**

Oxid hlinitý po silikagelu patří k nejvíce používaným adsorbentům. Je snadno připravitelný v různých druzích a má velkou adsorbční kapacitu.

### **Hydroxylapatit**

Uplatnění našel především v preparativní biochemii při chromatografickém dělení proteinů, fosfoproteinů, polynukleotidů, částic virů a fosfolipidů.

### **Uhlí**

Je typickým představitelem nepolárních adsorbentů, u nichž adsorpce probíhá na základě působení disperzních sil. Má malou selektivitu pro různé látky a jeho chromatografické vlastnosti jsou závislé na výchozím materiálu.

K dalším běžně používaným adsorbentům pro adsorpční kolonovou chromatografii patří – křemičitan hořečnatý, florisil, oxid hořečnatý a v poslední době často používané polyamidy (Mikeš et al., 1980).

### 3.9.2. Mobilní fáze (MF)

MF hraje zásadní roli v adsorpční chromatografii. Pro dosažení nejlepšího rozdělení chromatografované směsi látek je zapotřebí použití MF se vzrůstající eluční schopností. Tu ovlivňují tři faktory:

1. interakce mezi molekulami mobilní fáze a molekulami chromatografovaných látek v roztoku,
2. interakce mezi adsorbovanými molekulami BF a molekulami adsorbovaných chromatografovaných látek,
3. interakce mezi adsorbovanými molekulami MF a molekulami adsorbentu.

Rozpouštědla, která jsou silněji adsorbována, jsou silnějšími eluenty. Měřítkem eluční schopnosti rozpouštědel je  $\mathcal{E}^{\circ}$ , které udává adsorpční energii rozpouštědla na plošné jednotce povrchu adsorbentu o standardizované aktivitě (Cazes, 2004; Mikeš et al., 1980).

### 3.10. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC patří mezi široce využívané chromatograficko-analytické metody. Využívá kapalnou MF k separaci směsi analytů. Analyty jsou nejdříve rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle a poté prochází pod vysokým tlakem skrz chromatografickou kolonu, kde je směs rozdělena na jednotlivé komponenty. Důležitá je zde vysoká rozlišovací schopnost, která je závislá na rozsahu interakcí mezi rozpuštěnými složkami a SF. HPLC je velmi účinná metoda nacházející uplatnění pro široké spektrum chemických směsí (Kazakevich & LoBrutto, 2007).

Nejlepším průkazem potvrzujícím vysokou výkonnost HPLC kolon od kolon jiných je stanovením účinnosti kolon z rovnice:

$$n = 16 (t_r^2)/(t_w)$$

Kde  $n$  je měřítkem účinnosti,  $t_r$  je retenční čas pro daný vrchol molekul vzorku a  $t_w$  je šířka píku. Typické hodnoty  $n$  pro běžné kolony se pohybují kolem  $<500$ . Pro HPLC, a to jen z minimálního množství vzorku může hodnota snadno převyšovat 10 000 (Bird, 1989).

### **3.11. Plynová chromatografie (GC)**

Základy GC vytvořili v roce 1952 Martin a James. Demonstrovali výhody této techniky při separaci těkavých mastných kyselin. Výhody GC jsou při porovnání s LC dány nízkou viskozitou plynu. Ve stejném roce v tehdejší Československu patentoval přístroj analýzy plynů na chromatografické koloně s oxidem uhličitým jako MF J. Janák (Křivánková, 2010; Mikeš et al., 1980).

Základním principem GC je odpařování vzorku ve vyhřívaném vstupu nebo injektoru plynového chromatografu s následnou separací složek směsi ve speciálně připravené koloně.

Nosný plyn, obvykle vodík nebo helium, se uplatňuje k přenášení vzorku z injektoru přes kolonu do detektoru nebo hmotnostního spektrometru. Separace jednotlivých složek je určena podle rozdělení složek mezi mobilní a stacionární fázi. Složky zadržující ve SF jsou eluovány rychle. Po eluci z kolony každá složka obsažená v nosném plynu proudí do detektoru nebo hmotnostního spektrometru (Sparkman et al., 2011).

#### **Instrumentace**

##### **Zdroj nosného plynu**

Nosný plyn používaný jako MF je volen podle detekčního systému. Hlavním požadavkem nosného plynu je jeho inertnost vůči analyzovanému vzorku a chromatografické náplni. Důležitými faktory pro výběr vhodného plynu jsou bezpečnost práce s plynem, netoxicity, viskozita a také cena. K nejhojněji používaným plynům patří dusík, helium, argon a vodík (Klouda, 2003; Mikeš et al., 1980).

## Čistící zařízení

Funkcí čistícího zařízení je zachycování vlhkosti a nečistot v nosném plynu.

## Regulační systém

Regulační systém usměrňuje průtok nosného plynu, jenž může být stálý či programově se měnící. Dnes se využívá k elektronické regulaci, jejíž pomocí lze docílit daného průtoku i při změnách teploty v průběhu separace (Klouda, 2003).

## Dávkovač

Dávkovač zprostředkovává zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Správná technika dávkování je důležitá pro rychlé odpaření vzorku (Klouda, 2003).

## Kolona

*Náplňové kolony* jsou trubice, které jsou vyrobeny z oceli nebo skla a jsou naplněné sorbenty nebo nosiči pokrytými kapalnou fází. Jejich kapacita je vyšší než u kapilárních kolon.

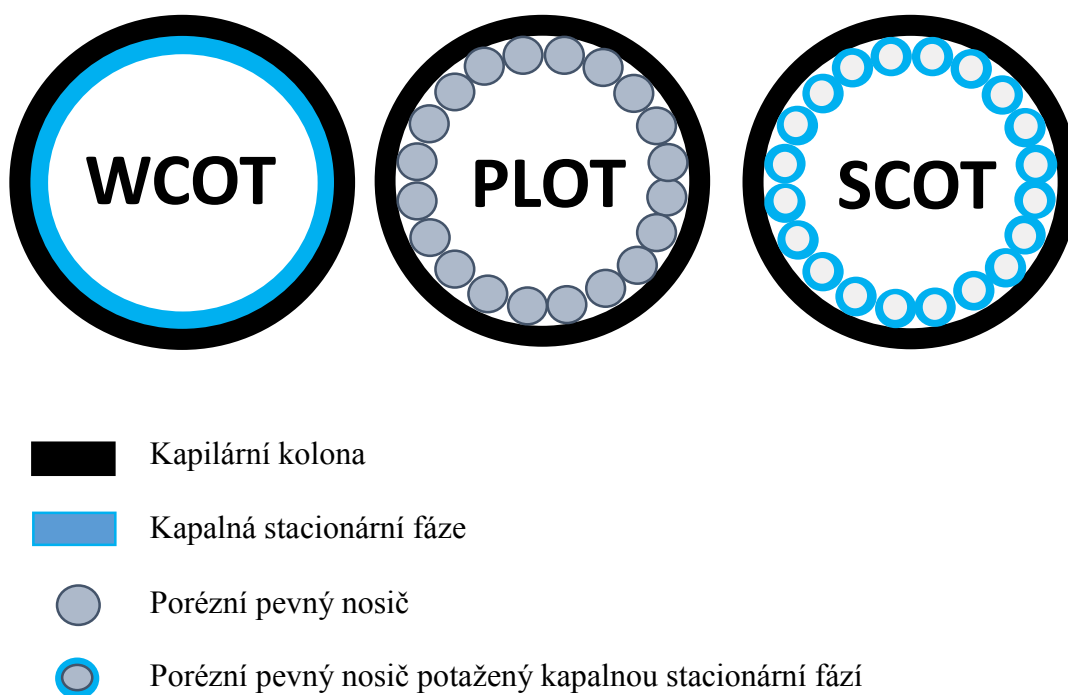
*Kapilárním kolonám* slouží jejich vnitřní stěny jako nosiče SF. Poskytují vyšší rozlišení, kratší čas na analýzu, vyšší citlivost a nižší kapacitu. Vyrábějí se z taveného křemene.

Dle uložení mobilní fáze se rozlišují tři typy kapilárních kolon.

- WCOT (*Wall Coated Open Tubular*) je kolona, kde kapalná SF tvoří na vnitřní stěně kapiláry tenký film. K zajištění dostatečného styku mobilní fáze se stacionární fází musí být kolony velmi úzké.
- PLOT (*Porous Layer Open Tubular*) kolony mají na vnitřní stěně tenkou vrstvu pevného pórovitého materiálu, např. aluminy, jako adsorbentu.
- SCOT (*Support Coated Open Tubular*) jsou variací typu PLOT kolon, které jsou pokryty na vnitřní stěně vrstvou nosiče se zakotvenou kapalinou.



**Obr. 8:** Typy kapilárních kolon



(Harris, 2010; Kellner et al., 2004; Klouda, 2003; Sparkman et al., 2011)

### Detektor

Detektor zaznamenává změny ve složení eluátu.

Mezi nejpoužívanější detektory patří:

- *Teplně-vodivostní detektor (TCD)*
- *Plamenový ionizační detektor (FID)*
- *Hmotnostní spektrometr (MSD)*

### Termostat

Zajišťuje dostatečně vysokou teplotu dávkovače, kolony a detektoru, čímž umožňuje udržení vzorku v plynném stavu (Klouda, 2003).

### Vyhodnocovací zařízení

Zpracovává signál vycházející z detektoru, zakresluje chromatografickou křivku – chromatogram a provádí její vyhodnocení (Klouda, 2003).

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Chemikálie

- 2-merkaptoethanol (Lach-Ner)
- Akrylamid/bis-akrylamid – 30% roztok (Sigma Aldrich)
- BSA (hovězí sérový albumin; Calbiochem)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner)
- Ethanol 96% (Lach-Ner)
- Gel Filtration Standard (BioRad)
- Glycerol (Sigma Aldrich)
- Glycin (Lach-Ner)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner)
- Chlorid draselný (Lach-Ner)
- Chlorid sodný (Lach-Ner)
- Isopropanol (Lach-Ner)
- Kyselina octová 99,8% (Lach-Ner)
- Manual Fixing Bath (AGFA)
- Methanol (Lach-Ner)
- *o*-phenylenediamine dihydrochloride
- PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)
- Sacharosa (Lach-Ner)
- SDS (dodecylsulfát sodný, Merck)
- SuperBlock Blokovací pufr (Pierce, Thermo Scientific)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine, Serva)
- Tween-20 (Calbiochem)

## 4.2. Seznam použitých roztoků

<b>PBS pufr</b>
240 g NaCl + 6 g KCl + 40 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O + 6 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4 (10x koncentrovaný roztok, množství na 3 l)
<b>PBST (PBS s Tween-20)</b>
Do 1 l PBS pufru se přidá 0,5 ml Tween-20
<b>1% BSA/PBST</b>
Do 500 ml PBST pufru se přidá 5 g BSA
<b>PBS-azid</b>
Do 90 ml PBS se přidá 10 ml azidu
<b>TBS pufr</b>
0,5 M TRIS + 9% NaCl; pH 7,5
<b>2x vzorkovací pufr (redukující)</b>
0,755 g TRIS + 7,95 ml glycerol + 2,3 g SDS + 5 ml 2-merkaptoethanol + 37,5 ml dd H <sub>2</sub> O; pH 6,8 (pozn. bez přídavku 2-merkaptoethanolu se jedná o neredukující vzorkovací pufr)
<b>5x SDS elektrodoový pufr</b>
15,1 g TRIS + 72 g glycin + 5 g SDS a přidat 1 l dd H <sub>2</sub> O
<b>4x TRIS pufr, pH 8,8</b>
45,5 g TRIS + 1 g SDS + 150 ml dd H <sub>2</sub> O; pH 8,8
<b>4x TRIS pufr, pH 6,8</b>
15, 125 g TRIS + 1 g SDS + 150 ml dd H <sub>2</sub> O; pH 6,8
<b>Towbinův pufr</b>
9,09 g TRIS + 43,2 g glycin + 600 ml methanol; doplnit na 3 l dd H <sub>2</sub> O
<b>Barvicí roztok</b>
10% kyselina octová + 70 mM Coomassie Brilliant Blue R-250
<b>Odbarvovací roztok</b>
150 ml methanol + 210 ml kyselina octová + 2640 ml dd H <sub>2</sub> O

## **Biologický materiál**

Krevní plazma pacienta.

Byla použita plazma získaná plasmafarézou u pacienta trpícího hyperviskózním syndromem z důvodu IgA myelomu. Materiál byl poskytnut III. interní klinikou (nefrologická, revmatologická a endokrinologická) Fakultní nemocnice v Olomouci. K další práci byla použita proteinová frakce získaná precipitací 20% saturovaného roztoku síranu amonného. Precipitát byl před dalším postupem rozpuštěn v PBS.

## **Ostatní materiál**

Náplň na gelovou permeační chromatografii Superosa 6 (GE HealthCare), PVDF membrána (BioRad), náplň do iontoměničové kolony DEAE Sepharose CL-6B

### **4.3. Seznam použitých laboratorních přístrojů**

- Gradientová pumpa (Beta)
- Vstřikovací ventil SYKAM S 6021
- Průtokový fotometr (BioRad)
- Centrifuga laboratorní velká 3.12 (Trigon-plus)
- Napěťový a proudový zdroj BioRad Power Pac 3000 (BioRad)
- Spektrofotometr UV/VIS Boeco S-30 (Boeco)
- Tank elektroforetický vertikální s nalévací vaničkou (BioRad)
- Termoblok (Stuart)
- Třepačka KS 130 basic (IKA)

## 4.3. Metodika

### Gelová permeační chromatografie (GPC)

#### Příprava náplně (Superosa 6) do separační kolony:

Superosa 6 byla rozmíchána ve 400 ml dd H<sub>2</sub>O a nechala se sedimentovat na dno kádinky. Voda byla odstraněna a bylo přidáno dalších 400 ml dd H<sub>2</sub>O. Promývání bylo opakováno ještě dvakrát. Po odstranění vody byl přidán PBS pufr, ze kterého byl odstraněn vzduch pomocí vodní vývěvy. Po sedimentaci byl přidán čistý PBS pufr. Nakonec byla Superosa 6 nalita do skleněné kolony o rozměru 75×1,5 cm. Sedimentace v koloně trvala cca 75 hodin.

#### Příprava vzorku před nanesením na separační kolonu:

Proteinová frakce byla centrifugována 10 min při 10 000 x g, 4°C. Poté byly odebrány 2 ml a pomocí injekční stříkačky byly vstříknuty do nástřikového ventilu s dávkovací smyčkou.

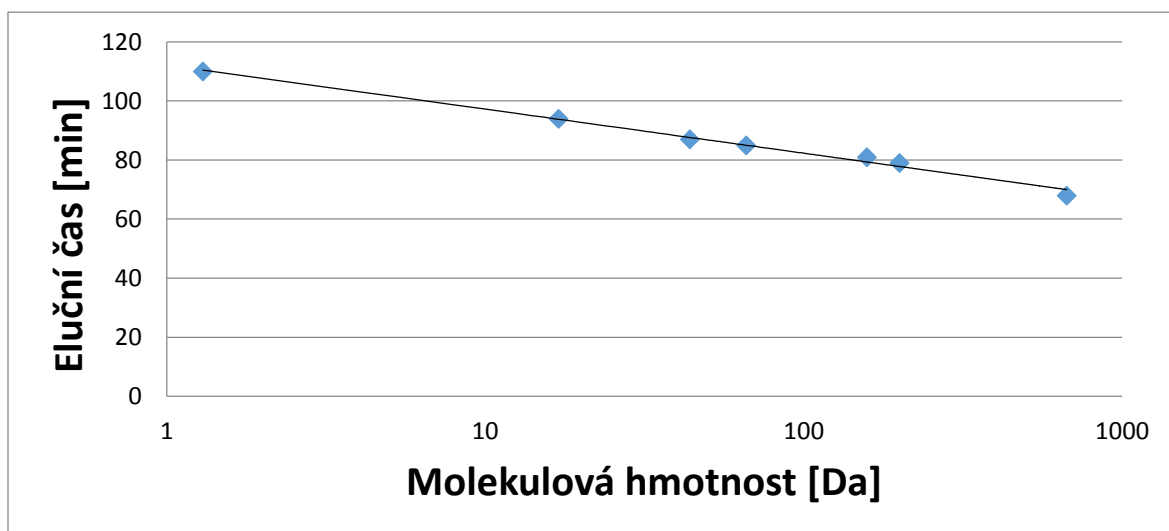
#### Příprava standardu na kalibraci kolony:

Jako standard byla použita lyofilizovaná směs markerů molekulové hmotnosti 1 300 až 670 000 Da.

Standard ve formě lyofilizátu byl rozpuštěn v 1 ml dd H<sub>2</sub>O a řádně promíchán pomocí vortexu. Poté byl 2 až 3 minuty chlazen v ledové lázni a znova promíchán. Na kolonu o rozměru 75×1,5 cm bylo naneseno 0,5 ml standardu, který se skládal z následujících látek o určitých molekulárních hmotnostech, které byly eluovány v odlišné časy, viz Tab. 3.

**Tab. 3:** Molekulové standardy

Zdroj	MW [Da]	Eluční čas [min]
thyroglobulin, bovinní	670 000	68
$\beta$ -amyláza	200 000	79
$\gamma$ -globulin, bovinní	158 000	81
hovězí sérový albumin (BSA)	66 000	85
ovalbumin, slepičí	44 000	87
myoglobin	17 000	94
kobalamin	1 300	110

**Graf 1:** Kalibrace kolony pomocí molekulových standardů

Ke stanovení mrtvého objemu chromatografické kolony byl použit vysokomolekulární modrý derivát polysacharidu dextransu Blue Dextran (SIGMA-Aldrich, USA),  $M_r$  2 000 000.

Hodnoty aproximativní relativní molekulové hmotnosti  $M_r$  jednotlivých proteinových MW markerů byly získány z informací dodavatele SIGMA-Aldrich, USA.

### **Pracovní postup při separaci na koloně:**

Jako eluční pufr byl zvolen PBS pufr. Ten byl odvzdušněn pomocí vodní vývěvy. Průtok kolony o rozměrech 75×1,5 cm byl zvolen 1ml/min. Po nanesení 2 ml vzorku byly eluáty odebírány od 55 minuty a frakce sbírány do zkumavek po 2 ml. Bylo sbíráno prvních 18 frakcí.

### **Příprava vzorku na gradientovou elektroforézu:**

Ke 100  $\mu$ l vzorku bylo přidáno 100  $\mu$ l neredukujícího pufru a směs byla poté inkubována 10 minut při 95°C.

## **Iontová výměnná chromatografie (IEX)**

Jako náplň do iontoměničové kolony byla použita DEAE Sepharose CL-6B, což je makroporézní iontový měnič odvozený od zesítěného agarosového gelu Sepharosy CL-6B. DEAE skupiny jsou připojeny ke gelu etherovými vazbami na monosacharidových jednotkách.

DEAE má dobrou chemickou a fyzikální stabilitu a je vhodný k separaci látek s vysokou molekulovou hmotností.

### **Postup:**

Nejdříve byla kolona promyta vodou. Poté byla naplněna ionexovým médiem a zformováno gelové lože. To bylo ekvilibrováno vhodným startovním eluentem. Poté byl nanesen vzorek, který byl nejdříve zcentrifugován. Vzorek byl kolonou 2x prolit. Cílový protein vzorku byl navázán pevně na sloupec ionexu a současně byly eluovány kontaminanty. Kolona byla propláchnuta 50 mM Trisem. Poté byla změněna iontová síla eluentu, a to promýváním kolony eluční řadou roztoku NaCl v odlišných koncentracích. Zadržené proteiny byly uvolněny a eluovány.

### Příprava vzorku na gradientovou elektroforézu:

Ke 100  $\mu$ l vzorku bylo přidáno 100  $\mu$ l neredukujícího purfru a směs byla poté inkubována 10 minut při 95°C.

### **Gradientová elektroforéza**

#### **Postup:**

Skleněné destičky byly nejprve umyty ethanolem, vysušeny a upevněny do držáku k nalévání gelu. V jedné kádince byl připraven 5% zaostřovací gel a ve druhé 12% dělicí gel (viz Tab. 4).

**Tab. 4:** Příprava dělicího a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE

Dělicí gel	12%	Zaostřovací gel	5%
30% akrylamidbisakrylamid	6 ml	30% akrylamidbisakrylamid	2,5 ml
4x Tris pufr, pH 8,8	3,75 ml	4x Tris pufr, pH 6,8	3,75 ml
dd H <sub>2</sub> O	5,25 ml	dd H <sub>2</sub> O	8,75 ml
APS (persíran amonný)	75 $\mu$ l	APS (persíran amonný)	50 $\mu$ l
TEMED	15 $\mu$ l	TEMED	10 $\mu$ l

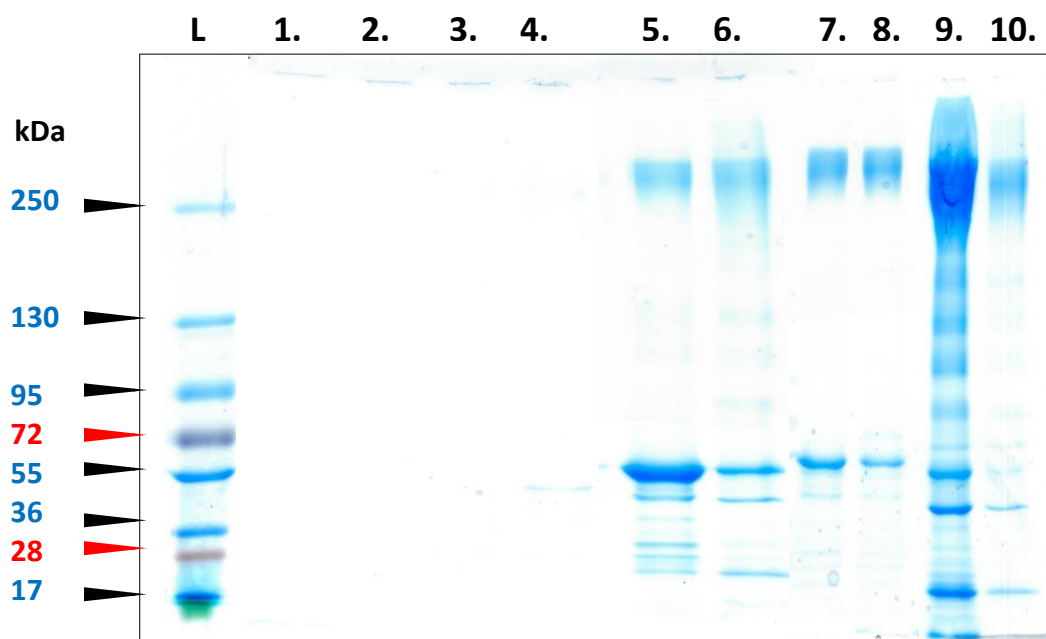
Do kádinky byly smíchány první tři složky. Jako poslední byl přidán APS a TEMED. Před zahájením polymerace bylo do 15 % gelu ještě přidáno 0,25 g sacharosu a 65  $\mu$ l bromfenolové modři. Tím byla zahájena polymerace gelu. Nejprve byl nabrán 5 % gel a poté do zbytku objemu byl nasán 15 % gel. Směs byla promíchána a rychle napipetována mezi připravená skla. Poté byl gel převrstven *n*-butanolem. Nechalo se polymerovat cca 20 minut. Během tuhnutí dělicího gelu byl připraven zaostřovací gel. Po 20 minutách byl *n*-butanol vymyt vodou a vysušen filtračním papírem. Poté byl dle tabulky připraven zaostřovací gel, který byl nanesen na dělicí gel a ihned byl do něj zasunut hřebínek. Gel polymeroval při laboratorní teplotě cca 20 minut.

Skla s gelem byla vložena do elektroforetické komůrky, hřebínek byl vysunut a komůrka byla po okraj naplněna elektrodovým pufrům. Do jamek bylo nanesen



požadované množství vzorku. Nádoba byla zavřena víkem a připojena ke zdroji elektrického proudu. Napětí bylo nastaveno na 150 V a čas na cca 80 minut. Před doputováním bromfenolové modři k spodnímu okraji bylo napětí vypnuto, odstraněno víko a elektrodový pufr byl vylit. Plastovou špachtlí byla skla od sebe oddělena, zaostřovací gel odříznut a přenesen do misky s fixačním roztokem. Miska byla dána na třepačku na cca 10 minut. Poté byl fixační roztok vylit a ke gelu byl přidán barvicí roztok. Gel byl nechán cca 20 minut na třepačce v barvicím roztoku. Po obarvení byl slit barvicí roztok zpět do zásobní láhve a gel vložen do misky s odbarvovacím roztokem. Gel byl odbarvován alespoň 30 minut a roztok několikrát vyměněn.

**Obr. 9:** Separace imunoglobulinu IgA pomocí IEC



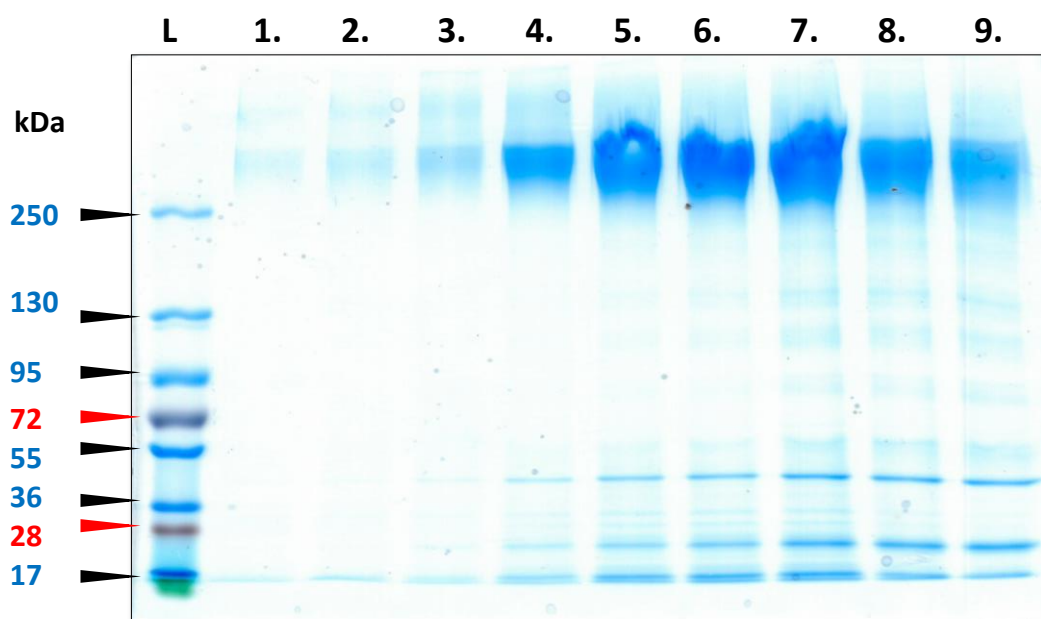
L: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder;

1. – 10. – jednotlivé vzorky po promytí eluční řadou roztoku NaCl [mM]

1.–0,40; 2.–0,35; 3.–0,30; 4.–0,25; 5.–0,20; 6.–0,15; 7.–0,10; 8.–0,05;

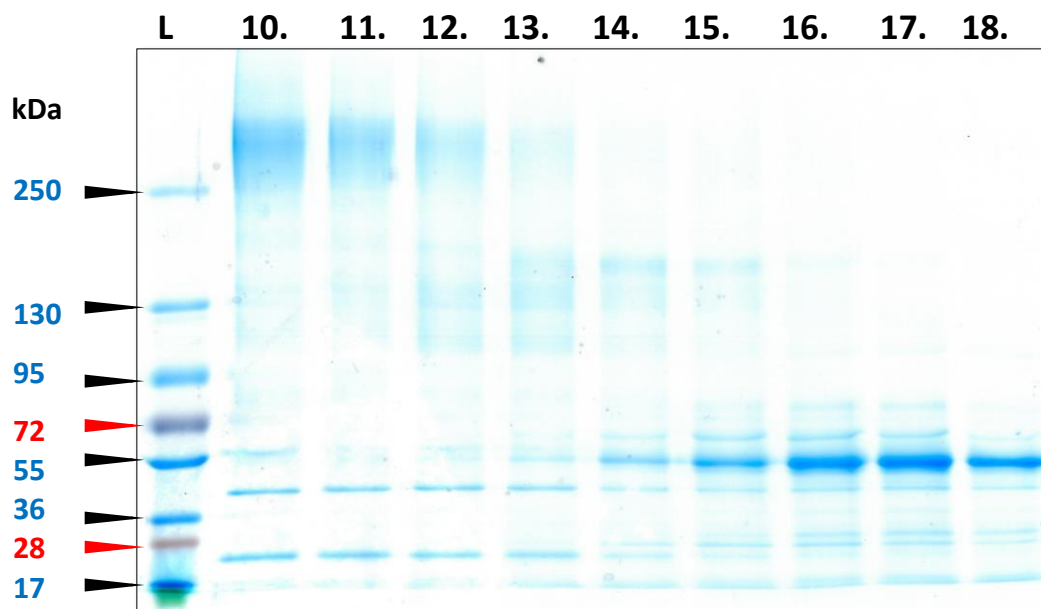
9.- zcentrifugovaný vzorek; 10.- pufr

**Obr. 10:** Separace imunoglobulinu IgA pomocí GPC



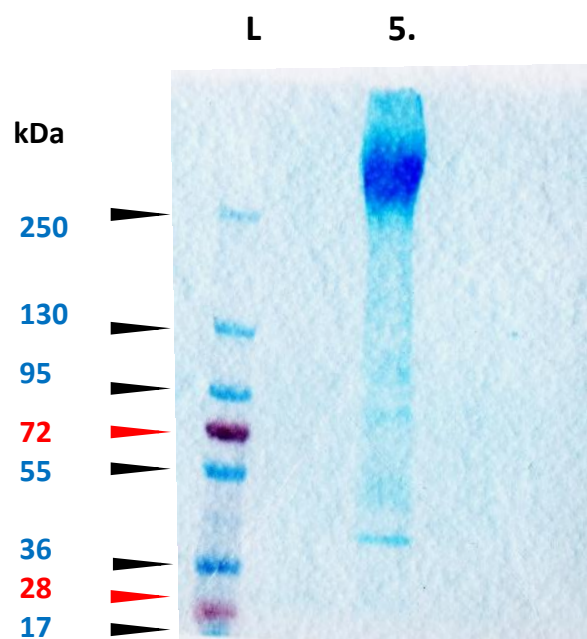
L: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder; 1 – 9 jednotlivé vzorky

**Obr. 11:** Separace imunoglobulinu IgA pomocí GPC



L: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder; 10 - 18 jednotlivé vzorky

**Obr. 12:** Potvrzení identity vzorku č. 5 z GPC elektroforézou za redukčních podmínek



L: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder; 5. - vzorek

## 5. Výsledky a diskuze

Pro separaci lidského polymerního imunoglobulinu IgA od ostatních proteinů krevní plasmy byly použity dvě metody kapalinové chromatografie. Jako první použitá metoda byla zvolena gelová permeační chromatografie, kde probíhá separace proteinů na základě porozity SF. Největší molekuly jsou eluovány v nejkratším čase, naopak malé molekuly se dostávají do pórů SF různých velikostí, a proto protékají společně s MF později. Ke správné separaci a zdárným výsledkům bylo zapotřebí nejdříve provést ekvilibraci kolony pomocí molekulových standardů o příslušných hmotnostech. Bylo analyzováno 7 vzorků proteinových MW markerů a Blue Dextran pro stanovení mrtvého objemu kolony  $V_0$ . Relativní molekulové hmotnosti  $M_r$  a eluční objemy  $V_e$  analyzovaných vzorků MW markerů jsou uvedeny v Tab. 3. Po zjištění vhodného elučního času k jímání vzorků s největší koncentrací polymerního imunoglobulinu IgA, bylo eluováno 18 frakcí. Přičemž rychlost průtoku mobilní fáze kolonou byla  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Vzorky za neredukujících podmínek po povaření byly aplikovány na gradientovou elektroforézu a závěrem byla možná detekce separovaného a purifikovaného polymerního imunoglobulinu IgA od ostatních proteinů.

Druhou použitou metodou byla iontově výměnná chromatografie, kde probíhá separace proteinů pomocí iontoměníčů. Při této metodě vyměňuje sorbent určitý typ iontů za jiné ionty. Sorbované ionty poté difundují z okolního roztoku do iontoměníče a za pomoci chemické reakce vytěsňují a nahrazují stejně nabitě ionty vázané na SF. Čili první fází bylo navázání vzorku na SF. Poté byla připravena eluční řada roztoku NaCl v různých koncentracích a ve finální fázi byl vzorek postupně touto koncentrační řadou vymýván. Upravené vzorky za neredukujících podmínek po povaření byly obdobně jako u GPM naneseny na gradientovou elektroforézu a závěrem byla možná detekce separovaného a purifikovaného polymerního imunoglobulinu IgA od ostatních proteinů.

Identita vzorku byla potvrzena i za redukčních podmínek, kdy došlo k rozpadu na jednotlivé podjednotky, a to těžký řetězec, lehký řetězec a J-řetězec.

Pro separaci a purifikaci polymerního imunoglobulinu A se ukázala GPC jako vhodnější metoda, a to díky své nenáročnosti na přípravu.

## 6. Závěr

Bakalářská práce, zpracovaná formou literární studie, je zaměřena na souhrnnou charakterizaci principiálních chromatografických technik. Pozornost je soustředěna na kapalinovou chromatografii a její jednotlivé konkrétní metody.

Experimentální část práce je zaměřena na přiblížení techniky a metodiky separace a purifikace lidského polymerního imunoglobulinu IgA pomocí gelové permeační chromatografie a iontově výměnné chromatografie.

Z výsledků je patrné, že separace pomocí iontově výměnné chromatografie se neukázala jako příliš vhodná pro tento typ vzorku. Nedošlo k dostatečnému oddělení IgA a ostatních proteinů obsažených ve vzorku.

Pomocí gelové permeační chromatografie došlo k úspěšné separaci lidského polymerního imunoglobulinu IgA od ostatních proteinů krevní plasmy. Proto se gelová permeační chromatografie ukázala jako účinná a vhodná metoda, jak vzhledem ke své nenáročnosti přípravy, tak i k samotné manipulaci.

## 7. Seznam použitých zkratek

Ab	protilátka (z angl. antibody)
APS	persíran amonný
AC	afinitní chromatografie
CF	chromatofokusace
DEAE	diethyl aminoethyl
GPC	gelová permeační chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEX	ionexová chromatografie
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
MW marker	marker molekulové hmotnosti
MW standard	standard molekulové hmotnosti
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů
$pI$	izoelektrický bod
$t_m$	mrtvý čas chromatografické kolony
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan,
$t_r$	retenční čas
$t_w$	šířka píku
$V_0$	mrtvý objem chromatografické kolony
$V_e$	eluční objem
$V_i$	objem kapaliny v nitru gelové matrice
$V_s$	objem stacionární fáze
$V_t$	celkový objem chromatografické kolony

## 8. Použitá literatura

- Ahuja, S. (2003). *Chromatography and Separation Science* (Vol. 4). USA: An Elsevier Science Imprint. Amersham Biosciences (2001) Protein Purification Handbook, Edition AC, pp. 5-23; 71-92, (produced - Snits & design AB / TK), Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden. Code No. 18-1132-29.
- Amersham Biosciences (2002) Affinity Chromatography Principles and Methods, Edition AD, pp. 9-21; 97-105; 123-127, (produced - RAK Design AB), Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden. Code No. 18-1022-29.
- Amersham Biosciences (2002) Gel Filtration Principles and Methods, Edition AI, pp. 9-23; 35-77; 87-91, (produced - RAK Design AB), Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden. Code No. 18-1022-18.
- Amersham Biosciences (2004) Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing Principles and Methods, Edition AA, pp. 11-59; 119-129, Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, England. Code No. 11-0004-21.
- Anzenbacher P., Kovář J. (1986) Metody chemického výzkumu pro biochemiky, pp. 38-41; 45-66, VN MON, Praha, ČSR
- Bailon P., Ehrlich G. K., Fung W-J., Berthold W., (2000), American Chemical Society, Methods in Molecular Biology, Affinity Chromatography, Methods and Protocols, vol. 147, ISBN 0-89603-694-4
- Bio-Rad Laboratories, 2000, Bio-Gel, A Gels, Instruction Manual, Alfred Nobel Dr., Hercules CA 94547
- Bird, I. M. (1989). High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 299(6702), 783-7. <http://doi.org/10.1136/bmj.299.6702.783>
- Buie, J. (2011), Lab Manager, Evolution of Chromatography Columns, dostupné na: <http://www.labmanager.com/lab-product/2011/05/evolution-of-chromatography-columns?fw1pk=2#.ViiRWit42KK%29%20>; aktualizováno 4. 5. 2011
- Bussemas, H. H., Harsch, G., & Ettre, L. S. (1994). Friedlieb Ferdinand Runge: "Self-Grown Pictures" as Precursors of Paper Chromatography. *Chromatographia*, 38.
- Cazes, J. (2004). *Encyclopedia of Chromatography*. New York: Marcel Dekker.

- Coufal P. Ion exchange chromatography, IEC [online]. Datum aktualizace: 15. 7. 1996 [citováno 15. 1. 2016]. dostupné na www: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/iec.pdf>
- Deutscher, R. R., & Burgess, M. P. (2009). Methods in Enzymology. In *Guide to Protein Purification, Volume 463*. USA: Elsevier.
- Ettre, L. S. (1993). Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). *Pure and Applied Chemistry*, 65(4), 819–872. <http://doi.org/10.1351/pac199365040819>
- Giddings, J. Calvin & Keller, Roy A., Encyclopædia Britannica, Chromatography, dostupné na: (<http://www.britannica.com/science/chromatography>), poslední aktualizace 15.2.2016
- Haddad, P. R., & Jackson, P. E. (1990). Ion Chromatography. In *Journal of Chromatography Library* (Vol. 46). USA: Elsevier.
- Harris, D. C. (2010), *Quantitative Chemical Analysis. 8th ed.* New York: W. H. Freeman and Co., 1429293276.
- Heftmann, E. (2004). Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods (Vol. 69A). The Netherlands: Elsevier.
- Horák, T., Jurková, M., Čulík, J., Čejka, P., & Kellner, V. (2002). Využití gelové permeační chromatografie pro stanovení organických polutantů ve sladovnickém ječmeni. *Kvasný Průmysl*, 48(3), 58–61.
- Churáček, J. et al. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, ISBN 80-030-0569-8.
- Káš J., Kodíček M., Valentová O.: *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006. ISBN 80-7080-586-2
- Kazakevich, Y., & LoBrutto, R. (2007). *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Kellner, R., Mermet, J.-M., Otto, M., Valcarcel, M., and Widmer, H. M. (2004). *Analytical chemistry: A Modern Approach to Analytical Science. 2nd ed.* Weinheim: Wiley-VCH, Wienheim.
- Klouda, P. (2003). *Moderní analytické metody*. Ostrava: Tiskárna Harok v Šenově.
- Lab Manager, (2009), Lab Manager, Gas Chromatography, dostupné na: <http://www.labmanager.com/productfocus/2009/06/gaschromatography#.VsTQBuZhMcA>



- McNair, M. H., & Miller, M. J. (2009). *Basic Gas Chromatography*. Canada: John Wiley & Sons.
- Lin, S. Y., & Dence, C. W. (1992). *Methods in Lignin Chemistry*. New York: Springer-Verlag.
- Mikeš, O. (1980). *Laboratorní chromatografické metody*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury.
- Niessen, W. M. A. (1999). *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. Second Edition*. USA: Marcel Dekker.
- Poole, C. F., & Schuette, S. A. (1984). *Contemporary practice of chromatography*. Amsterdam: ELSEVIER.
- Rajagopalan T. G., Moore S., Stein W. H.: J. Biol. Chem. 241, 4940 (1966)
- Scott, R. P. W. (2003). Liquid Chromatography. *Chrom-Ed Book Series*, (Book 3), 1–104.
- Scott, R. P. W. (2003). Principles and Practice of Chromatography. *Chrom-Ed Book Series*, (Book 1), 108–109. [http://doi.org/10.1016/0965-2299\(93\)90106-N](http://doi.org/10.1016/0965-2299(93)90106-N)
- Sharma, B. K. (2014), *Chromatography*, Krishna Prakashan Media, India, 6th ed., 8182831016
- Sparkman, O. D., Penton Z. E., Kitson F. G., (2011) *Gas Chromatography and Mass Spectrometry, A Practical Guide, Second Edition*. Oxford : Academic Press - Elsevier, 978-0-12-373628-4.
- Strain H. H., (1942), *Chromatographic Adsorption Analysis*, Interscience Publ., Inc., New York
- Švec, F. (2009). Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií? *Chemické Listy*, 270(103), 266–270.
- Turková, J. (1993). Bioaffinity Chromatography. In *Journal of Chromatography Library* (Vol. 55), second edition. The Netherlands: Elsevier.
- Vařilová, T. (2005). Stacionární fáze v afinitní chromatografii. *Chemické Listy*, 99, 570–577.
- Wilson, I. D., & Poole, C. F. (2009). *Handbook of Methods and Instrumentation in Separation Science*. USA: Elsevier.