

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Purifikace proteinů s využitím chromatografických metod,  
zejména gelové permeační chromatografie

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jindřich Mixa
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí bakalářské práce:	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 14. května 2010

Mé poděkování patří vedoucímu bakalářské práce Prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr. za odborné vedení, rady a připomínky při tvorbě této bakalářské práce. Také děkuji panu Oldřichu Tokarovi z firmy Iontosorb v Ústí nad Labem za zaslání vzorku Perlozy.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora	Jindřich Mixa
Název práce	Purifikace proteinů s využitím chromatografických metod, zejména gelové permeační chromatografie
Typ práce	bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého
Vedoucí práce	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	Náplní práce je souhrnná charakterizace principiálních chromatografických technik, využívaných pro separaci a purifikaci proteinů. Důraz je kladen na vysvětlení pojmů, principů a procesů v chromatografické separaci proteinů. Pozornost je také soustředěna na jednotlivé konkrétní techniky, zejména gelovou permeační chromatografií. Jsou diskutovány faktory, které mají na separaci významný vliv a uvedeny přednosti a omezení každé chromatografické techniky. Také jsou popsány zásady efektivní kombinace technik v rámci třífázové purifikační strategie. Praktickým přínosem práce je studium selektivity komerčních gelových filtračních médií Perlozy MT 300 a 500. Část dosažených výsledků je porovnávána se souvisejícími výsledky získanými od firmy Iontosorb, která Perlozu MT vyvinula. Je zhodnocena použitelnost obou médií pro separace proteinů.
Klíčová slova	purifikace proteinů, třífázová purifikační strategie, chromatografie, gelová permeační chromatografie, ionexová chromatografie, hydrofobní chromatografie, afinitní chromatografie
Počet stran	67
Počet příloh	0
Jazyk	český

## **Bibliographical identification:**

Autor's first name and surname	Jindřich Mixa
Title	Protein purification using chromatographic methods, especially gel permeation chromatography
Type of thesis	bachelor
Department	Department of biochemistry, Faculty of Science, Palacký University
Supervisor	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2010
Abstract	This thesis is focused on a summarizing description of fundamental chromatography techniques that are used for protein separation and purification. Emphasis is made here on the explanation of terms, principles and processes in protein chromatography. The accent is also put on particular techniques, especially gel permeation chromatography. Factors of significant influence on the separation have been discussed as well as advantages and limits of each chromatographic technique. Principles of effective combination of techniques within the framework of the three phase purification strategy have been described as well. In the experimental part, the selectivity of commercial gel filtration media Perloza MT 300 a 500 has been investigated. A part of the results achieved was compared with related results obtained from the private firm Iontosorb that has developed the media Perloza MT. Suitability of both media for protein separation was evaluated.
Keywords	protein purification, three phase purification strategy, chromatography, gel permeation chromatography, ion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography
Number of pages	67
Number of appendices	0
Language	czech

## Obsah

Cíle práce .....	- 7 -
TEORETICKÁ ČÁST .....	- 8 -
1. Úvod.....	- 9 -
2. Snadný přístup k purifikaci proteinů.....	- 10 -
2.1 Plánování purifikačního procesu .....	- 10 -
2.2 Třífázová purifikační strategie (CIPP).....	- 10 -
3. Obecná charakteristika chromatografické separace proteinů.....	- 14 -
3.1 Vymezení pojmu chromatografie .....	- 14 -
3.2 Dělení chromatografických technik separace proteinů.....	- 14 -
3.3 Teoretické aspekty chromatografické separace proteinů.....	- 15 -
3.3.1 Termodynamicko – kinetický mechanismus separace .....	- 15 -
3.3.2 Obecný proces separace směsi proteinů na chromatografické koloně .....	- 16 -
3.3.3 Charakteristika mobilní fáze pro proteinové separace .....	- 17 -
3.3.4 Hlavní parametry separace v kolonové chromatografii.....	- 17 -
3.4 Selektce a kombinace chromatografických technik pro CIPP .....	- 22 -
4. Technika GPC při purifikaci proteinů.....	- 25 -
4.1 Princip techniky .....	- 25 -
4.2 Gelová náplň chromatografické kolony.....	- 26 -
4.3 Charakterizace chování separovaných látek v GPC .....	- 26 -
4.4 Selektivita a rozlišení v GPC .....	- 28 -
4.4.1 Selektivita.....	- 28 -
4.4.2 Rozlišení.....	- 29 -
4.5 Gelová filtrační média pro purifikaci proteinů .....	- 31 -
4.6 Přednosti GPC v purifikační strategii CIPP.....	- 37 -
5. Techniky IEX, HIC a AC při purifikaci proteinů .....	- 38 -
5.1 Ionexová chromatografie (IEX).....	- 38 -
5.1.1 Princip techniky .....	- 38 -
5.1.2 Stacionární fáze .....	- 39 -
5.1.3 Průběh separace.....	- 39 -
5.1.4 Volba chromatografického média .....	- 40 -
5.1.5 Další faktory ovlivňující separaci .....	- 40 -
5.1.6 IEX v purifikační strategii CIPP .....	- 41 -
5.2 Chromatofokusace (CF) .....	- 41 -
5.3 Hydrofobní chromatografie (HIC).....	- 42 -
5.3.1 Princip techniky .....	- 42 -

5.3.2	Stacionární fáze .....	- 42 -
5.3.3	Průběh separace.....	- 43 -
5.3.4	Volba chromatografického média .....	- 43 -
5.3.5	Další faktory ovlivňující separaci .....	- 43 -
5.3.6	HIC v purifikační strategii CIPP .....	- 44 -
5.4	Chromatografie na reverzních fázích (RPC) .....	- 44 -
5.5	Afinitní chromatografie (AC).....	- 45 -
5.5.1	Princip .....	- 45 -
5.5.2	Stacionární fáze .....	- 45 -
5.5.3	Průběh separace.....	- 46 -
5.5.4	Volba chromatografického média .....	- 46 -
5.5.5	Další faktory ovlivňující separaci .....	- 46 -
5.5.6	AC v purifikační strategii CIPP.....	- 47 -
	<b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	- 48 -
6.	Metodika .....	- 49 -
6.1	Materiály a chemikálie .....	- 49 -
6.1.1	Gelové filtrační médium.....	- 49 -
6.1.2	Mobilní fáze pro GPC .....	- 50 -
6.1.3	Markery molekulových hmotností pro GPC .....	- 50 -
6.1.4	Ostatní chemikálie.....	- 50 -
6.2	Použité přístrojové vybavení .....	- 51 -
6.2.1	Nízkotlaký kapalinový chromatograf.....	- 51 -
6.2.2	Chromatografické kolony.....	- 51 -
6.2.3	Standardní laboratorní vybavení .....	- 51 -
6.3	Provedení gelové filtrační chromatografie .....	- 52 -
6.3.1	Příprava chromatografického nosiče .....	- 52 -
6.3.2	Naplnění a ekvibrace chromatografické kolony .....	- 52 -
6.3.3	Příprava vzorků pro GPC .....	- 52 -
6.3.4	Měření retence MW markerů a zjišťování mrtvého objemu kolony .....	- 52 -
6.3.5	Stabilizace gelového filtračního média .....	- 53 -
7.	Výsledky a diskuze .....	- 54 -
7.1	Separace MW markerů na Perloze MT 300.....	- 54 -
7.2	Separace MW markerů na Perloze MT 500.....	- 58 -
7.3	Zhodnocení selektivity Perlozy MT 300 a Perlozy MT 500.....	- 60 -
8.	Závěr .....	- 64 -
	Seznam použité literatury .....	- 65 -
	Seznam použitých symbolů a zkratk.....	- 66 -

## **Cíle práce**

V předkládané práci se budu zabývat charakterizací chromatografických metod, zejména gelové permeační chromatografie, pro účely purifikace proteinů. Budou blíže charakterizovány všechny hlavní chromatografické techniky využívané pro separace proteinů na bázi rozdílných separačních principů. Pro posouzení purifikačních možností těchto technik je nutné zabývat se především základními faktory ovlivňujícími separační proces, které vycházejí z teoretických aspektů chromatografie a do jisté míry jsou regulovatelné optimalizací jednotlivých technik. Budou také objasněny základy metodiky selekce nejefektivnější posloupnosti jednotlivých chromatografických purifikačních kroků při vícekrokové purifikaci. Cílem praktické části bude testování selektivity dvou komerčních gelových filtračních médií Perlozy MT 300 a Perlozy MT 500 metodou měření retence proteinových markerů molekulových hmotností na chromatografických kolonách naplněných uvedenými médii. Na základě dosažených výsledků a v případě Perlozy MT 500 také z jejich porovnání se souvisejícími výsledky dodanými firmou Iontosorb bude zhodnocena využitelnost obou médií pro separace proteinů.

## **TEORETICKÁ ČÁST**



## 1. Úvod

Vývoj metod a postupů pro purifikaci proteinů je zásadním předpokladem mnoha pokroků v biochemických disciplínách. Purifikace proteinu je proces, vedoucí k izolaci jednoho cílového proteinu (produktu) jako chemického individua ze složitější směsi, a kolísá od prostých jednokrokových procedur až ke komplexním validovaným produkcím prováděným ve velkém měřítku, které mohou zahrnovat soubor rozmanitých technologií (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001). K dosažení vysokého stupně čistoty, který je zapotřebí zejména pro účely analytické nebo terapeutické, je obvykle nezbytné provést více po sobě následujících purifikačních kroků (tzv. multi-kroková purifikace). Klíčem k úspěšné a efektivní purifikaci je výběr nejvhodnějších metod, optimalizace jejich separačních podmínek vyhovující konkrétním požadavkům a jejich kombinace logickým způsobem pro maximalizaci výtěžku. Při každém purifikačním procesu by mělo být současně usilováno o minimalizaci počtu jednotlivých kroků (Asenjo & Andrews, 2008). K plánování a uskutečnění celého procesu lze přesto přistupovat snadno s aplikací třífázové purifikační strategie CIPP, přičemž postačí základní znalost detailů aplikovaných technik (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001).

Většina purifikačních schémat zahrnuje alespoň některou chromatografickou techniku. Chromatografie se proto stala nepostradatelným nástrojem každé laboratoře, kde se purifikace provádí (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001). Pro separaci proteinů je dostupná řada chromatografických technik, separujících na základě několika různých vlastností proteinové molekuly. Každá z těchto technik tedy poskytuje rozdílnou selektivitu a jejich vhodná kombinace má potenciál pro purifikaci jakéhokoli proteinu do extrémně vysokého stupně čistoty. Moderním přístupem k purifikaci je využití počítačových algoritmů k volbě nejefektivnějších metod separace na základě iniciální proteomické charakterizace vzorku a k analýze produktu a kontaminantů po jednotlivých purifikačních krocích (Asenjo & Andrews, 2008).

## 2. Snadný přístup k purifikaci proteinů

### 2.1 Plánování purifikačního procesu

Při plánování purifikační strategie je vhodné postupovat systematicky. Nejprve je třeba popsat základní scénář procesu a zvolit jednotlivé purifikační techniky. Předpokladem k tomu je objasnění následujících okruhů otázek:

- a) *Otázky týkající se finálního produktu* – zejména jeho zamýšlené použití, z čehož plynou nároky na čistotu produktu ve srovnání se zdrojovým materiálem (kolikrát musí být produkt přečištěn, resp. Požadavek na procentuální stupeň čistoty), požadavky na eliminaci určitých kontaminantů (které musí být odstraněny zčásti a které kompletně), nároky na zachování 3D struktury a biologické aktivity proteinového produktu.
- b) *Druh zdrojového materiálu a jeho charakteristika* – zajištění vhodného způsobu manipulace se vzorkem, shromáždění všech dostupných informací ohledně vlastností cílového proteinu a dalších komponent směsi, které tvoří těžiště dalších úvah o volbě a optimalizaci purifikačních technik.
- c) *Finální měřítko purifikace* – nároky na kvantitu, méně podstatné úvahy (např. zvážení důsledků na zvolené purifikační schéma v případě potřeby následného navýšení produkce).
- d) *Ekonomická omezení a prostředky a zařízení k dispozici* – definovat ekonomický a časový rámec pro práci.

Výbornou investicí mohou být některé nenáročné experimenty k další charakterizaci vzorku a cílové molekuly, pokud se dostupné informace zdají být nedostatečné. Ke sledování průběhu purifikace a hodnocení její efektivity je nezbytné zařadit rychlou a spolehlivou analytickou metodu. Je-li výchozím materiálem surová biologická tkáň, je třeba zajistit takovou přípravu a extrakční procedury, které odpovídají nastavení vhodných podmínek pro první chromatografický separační krok (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001).

### 2.2 Třífázová purifikační strategie (CIPP)

Tato strategie je založena na představě tří fází purifikace: záchyt, intermediální purifikace a čištění (zkratka CIPP z angl. capture, intermediate purification and polishing). Strategie CIPP je využívána ve farmaceutickém průmyslu i výzkumných laboratořích s cílem umožnit rychlejší vývoj purifikačních metodik, dosáhnout zkrácení času potřebného k získání produktu a zajistit dobrou ekonomii purifikačního procesu. Tento přístup je doporučen pro libovolnou vícekrokovou purifikaci proteinu. Celému procesu předchází fáze přípravná,

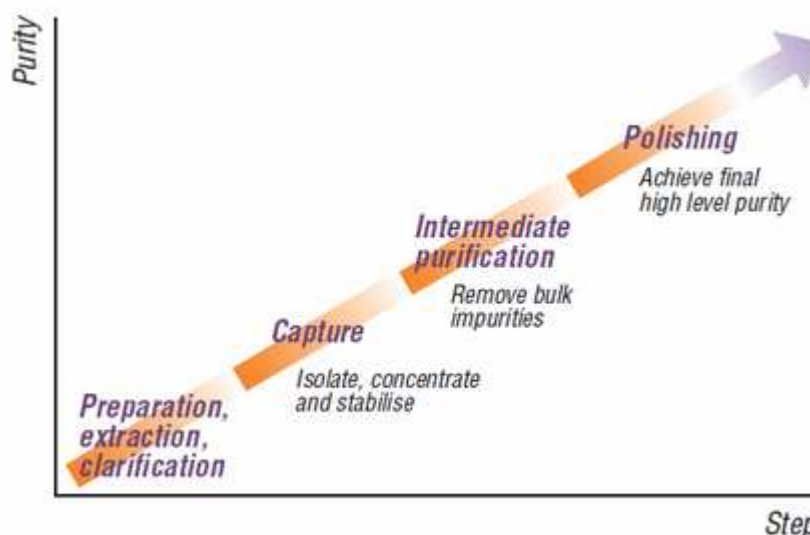
zahrnující obvykle extrakci a homogenizaci surového biologického materiálu s cílem stabilizace produktu a přípravy homogenního vzorku pro následnou purifikaci. V praxi se většinou jedná o přípravu vzorku pro chromatografické separace. Přitom by mělo být dosaženo eliminace tuhých nečistot a jiných kontaminantů nekompatibilních s chromatografií. Pouze v nemnohých případech může být tato fáze vynechána (např. je-li produkt obsažen v supernatantu po zcentrifugování buněčné suspenze) a vzorek biologického materiálu je nanesen na chromatografickou kolonu přímo nebo pouze s mírnou úpravou jeho parametrů jako je pH a iontová síla. Nejčastěji je však nějaká forma extrakční a homogenizační procedury vyžadována. Jednotlivým fázím CIPP jsou pak přiřazeny obecné cíle:

*Záchyt* – izolace, zakoncentrování a stabilizace cílového produktu (produkt by měl být převeden do prostředí, kde bude zachována jeho biologická aktivita).

*Intermediální purifikace* – odstranění většiny balastních kontaminantů, jako jsou ostatní proteiny, nukleové kyseliny, endotoxiny a viry.

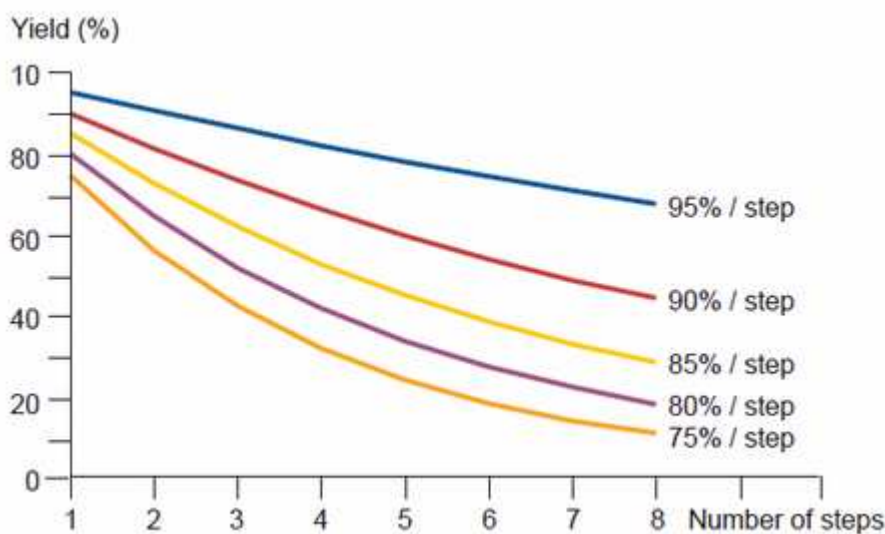
*Čištění* – dosažení finálního stupně čistoty eliminací zbývajících stopových nečistot nebo blízce příbuzných substancí.

Podle této koncepce pak každý krok v purifikačním procesu spadá do některé z uvedených fází. Nicméně, konkrétní problémy a cíle spojené s určitým krokem značně závisí na vlastnostech výchozího materiálu, a proto mohou vyžadovat zvláštní pozornost. Schéma vyjadřující postupné zvyšování čistoty produktu v důsledku postupu v jednotlivých fázích purifikace při aplikaci strategie CIPP je zobrazeno na obrázku 1 (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001).



**Obr. 1:** Postupné zvyšování čistoty produktu jako následek pokroku v jednotlivých stádiích purifikačního procesu; aplikace strategie CIPP (převzato z manuálu firmy Amersham Biosciences, 2001).

Víceokrová purifikace někdy vyžaduje mezi jednotlivými kroky další, tzv. kondiční kroky, nezbytné k převedení produktu vzešlého z jedné techniky do podmínek vhodných k provedení techniky následující. Každý krok v procesu znamená nějakou ztrátu produktu. Např. je-li v každém kroku konkrétní purifikační procedury dosaženo výtěžku 80%, pak bude celkový výtěžek po 8 provedených krocích činit pouze 20%, jak je ukázáno na obrázku 2. Proto je nutné minimalizovat počet jednotlivých kroků (jediná výjimka platí v případě snadno dostupných preparátů, kdy lze pro dosažení požadované čistoty jednoduše přidávat nebo opakovat jednotlivé kroky). Je uznáván empirický předpoklad, že i pro velmi komplikované směsi s vysokými nároky na čistotu, biologickou aktivitu a výtěžek postačí 3 nebo 4 vhodně zvolené a optimalizované separační kroky s logickou návazností. Je nanejvýš vhodné vyhnout se potřebám kondičních kroků, které často znamenají časové prodlevy mezi separacemi, a tím se zvyšuje riziko narušení biologické aktivity produktu. Např. v případě dvou následujících kroků chromatografické separace by měl být produkt eluovaný z první kolony v takovém stavu, aby byl bez složitějších manipulací aplikovatelný na kolonu další (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001).



**Obr. 2:** Relativní celkový výtěžek produktu po provedení příslušného počtu purifikačních kroků při specifikovaných dílčích výtěžcích v každém kroku (převzato z manuálu firmy Amersham Biosciences, 2001).

V CIPP strategii nemusí být vždy přítomny všechny tři fáze. Záchyt a intermediální purifikace mohou být obsaženy v jediném kroku, stejně jako intermediální purifikace a čištění. Někdy jsou požadavky na finální čistotu tak nízké, že jeden rychlý krok záchytu postačí pro získání výsledného produktu (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001).

Zásadním rysem purifikačních technik je skutečnost, že komponenty vzorku jimi mohou být separovány na základě diferencí v různých vlastnostech jejich molekul. V naprosté většině případů se přitom jedná o techniky chromatografické, kterými se zabývají následující kapitoly této práce. Výběrem optimální kombinace technik pro každou z fází CIPP strategie se dosáhne jejich rychlé návaznosti, a tím i zkrácení času potřebného k získání finálního produktu a uspokojivé ekonomie (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001).

### **3. Obecná charakteristika chromatografické separace proteinů**

Mezi současnými separačními metodami používanými v chemii mají největší význam metody chromatografické společně s elektromigračními. V rámci preparativních, zvláště pak purifikačních aplikací zaujímá chromatografie dokonce čelné místo. Tento široký a pestrý soubor technik umožňuje separovat a analyzovat prakticky všechny organické látky a některé techniky jsou vhodné i pro separaci proteinů, obecně biopolymerů (Anzenbacher & Kovář, 1986).

#### **3.1 Vymezení pojmu chromatografie**

Chromatografie je definována jako fyzikálně chemická separační, a současně analytická metoda určená k separaci a analýze směsi látek, jejímž základním principem je nestejnoměrná distribuce složek směsi mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je označována jako mobilní a druhá jako stacionární. Je to metoda migrační, protože dělení složek směsi probíhá na základě jejich různé pohyblivosti v chromatografickém systému (Churáček et al., 1990).

Mobilní fáze je ta, která se v chromatografickém systému pohybuje a její průtok je hybnou silou migrace separovaných látek. Mobilní fází může být kapalina nebo plyn, nicméně všechny techniky vhodné pro separaci proteinů využívají mobilní fázi kapalnou, a obecně se taková chromatografie nazývá kapalinová chromatografie. V některých případech se složení nebo parametry mobilní fáze záměrně mění, aby došlo k eluci určitých komponent, proto se pro ni vžilo označení eluční činidlo nebo eluent (Bílková & Králová, 1997).

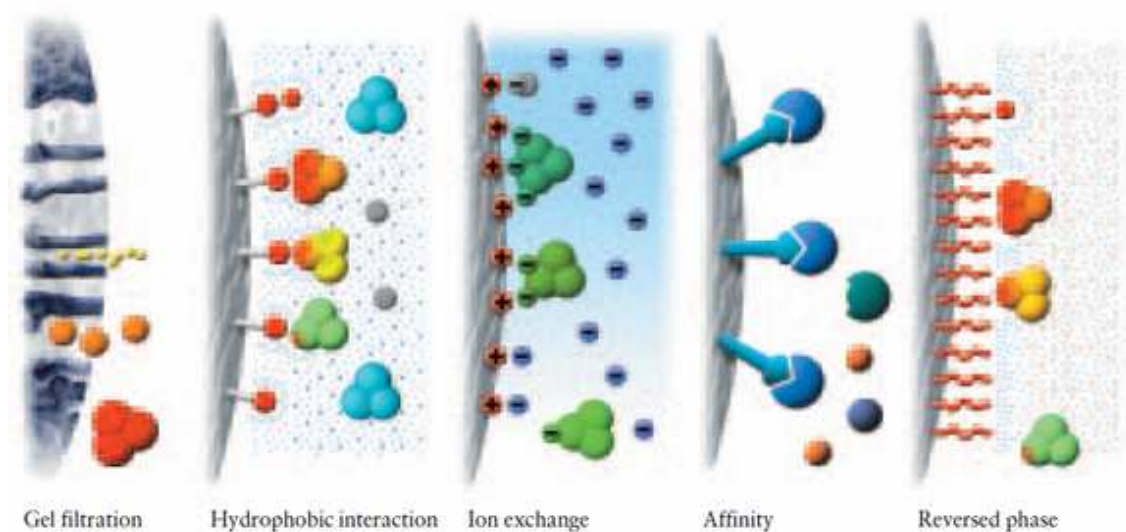
Stacionární fáze je v chromatografickém systému ta, která je nepohyblivá a obecně se označuje jako sorbent. Může mít velmi rozdílné formy v závislosti na typu chromatografie a provedení techniky. Sorbentem v případě separace proteinů bývá nejčastěji pevná látka, ale může to být i kapalina zakotvená na povrchu nebo v pórech pevné látky (Bílková & Králová, 1997).

#### **3.2 Dělení chromatografických technik separace proteinů**

K separacím proteinů za účelem jejich purifikace jsou dnes využívány zejména následující chromatografické techniky, a to výhradně v sloupcovém provedení (na chromatografických kolonách): ionexová chromatografie, chromatofokusace, hydrofobní chromatografie, chromatografie na reverzních fázích, afinitní chromatografie a molekulová vylučovací chromatografie. V tabulce 1 je zpracován přehled těchto technik a na obrázku 3 jsou zobrazeny principy separace prostřednictvím jednotlivých technik (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001).

**Tab. 1:** Zařazení chromatografických technik k separaci a purifikaci proteinů podle principu separace a systému fází (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

název chromatografické techniky (zkratka)	princip separace (specifická vlastnost molekuly)	chromatografický systém	
		stacionární fáze	mobilní fáze
ionexová chromatografie (IEX) Chromatofokusace (CF)	chemisorpce (náboj)		
hydrofobní chromatografie (HIC) chromatografie na reverzních fázích (RPC)	adsorpce (hydrofobicita)	pevná látka	kapalina
afinitní chromatografie (AC)	bioselektivní interakce (ligandová komplementarita)		
gelová permeační chromatografie (GPC)	molekulové síto (velikost)	kapalina	



**Obr. 3:** Principy chromatografické separace proteinů (převzato z manuálu firmy Amersham Biosciences, 2002b).

### 3.3 Teoretické aspekty chromatografické separace proteinů

#### 3.3.1 Termodynamicko – kinetický mechanismus separace

Během chromatografického dělení dochází k opakovanému transportu složek směsi do stacionární fáze a zpět do fáze mobilní difúzním pohybem. Přitom se chromatografický systém natolik přiblíží rovnováze, že distribuci složky mezi obě fáze lze popsat *distribučním*

(rozdělovacím) koeficientem  $K_d$ , který vyjadřuje poměr koncentrace složky ve stacionární fázi  $c_s$  ku koncentraci složky ve fázi mobilní  $c_m$ :

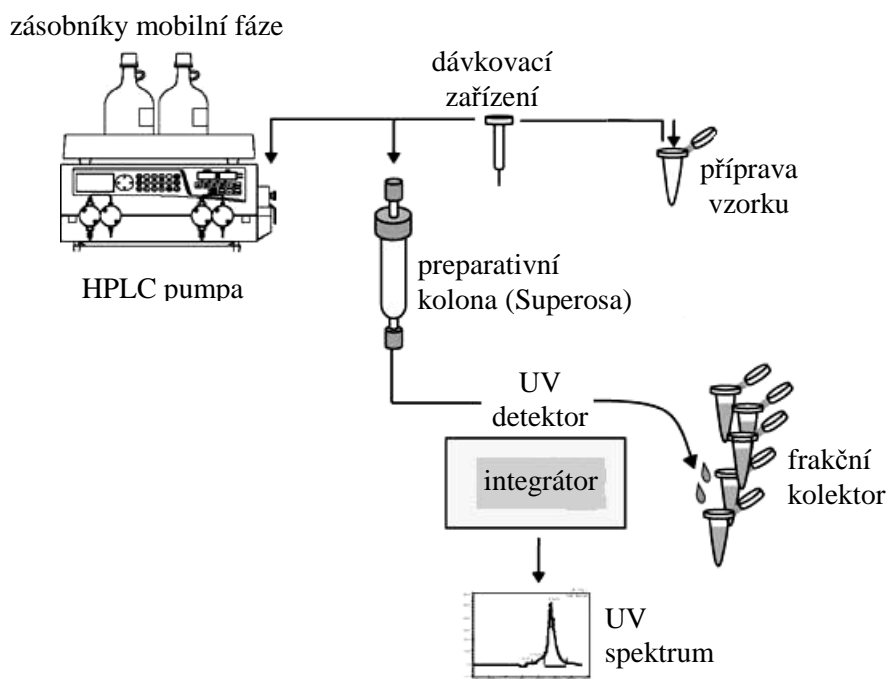
$$K_d = \frac{c_s}{c_m} . \quad (1)$$

Tato přibližná rovnováha je však neustále porušována vlivem konvektivního toku mobilní fáze, který molekuly separovaných látek kontinuálně unáší z míst jejího ustavení. Důsledkem porušování rovnovážného rozdělení určité komponenty mezi obě fáze je pak její snaha o obnovování této distribuce difúzním pohybem. Relativní rychlost pohybu určité složky vzhledem k rychlosti mobilní fáze je tím nižší, čím vyšší afinitu ke stacionární fázi vykazuje neboli čím vyšší je její hodnota  $K_d$ . Teoreticky lze separovat dvě látky od sebe, liší-li se alespoň v některé fyzikálně chemické veličině, jež určuje míru jejich interakce ve stacionární a v mobilní fázi (Bílková & Králová, 1997; Churáček et al., 1990).

### 3.3.2 Obecný proces separace směsi proteinů na chromatografické koloně

Tento proces se neliší, ať už se jedná o účel analytický nebo preparativní. Sorbentem naplněná chromatografická kolona je nahoře opatřena zásobníkem eluentu, jímž je promývána nejčastěji prostřednictvím pumpy. Po aplikaci vzorku směsi látek na vrchní část sorbentu se v koloně vytvoří nejprve směsný eluční pás. V průběhu putování kolonou se jednotlivé složky vzorku na sloupci sorbentu různou měrou zpomalují a tím dochází k jejich separaci, ideálně do úzkých elučních zón. Po výstupu látky z kolony indikuje detektor její přítomnost v eluátu a registrační zařízení zaznamená odezvu detektoru v závislosti na čase nebo objemu eluované kapaliny jako tzv. chromatogram, neboli eluční profil. Jednotlivé frakce eluátu jsou jímány do zkumavek kolektoru. V současnosti je pozornost soustředěna zejména na vysokoúčinnou formu těchto separací (zkratka HPLC z angl. „High Performance Liquid Chromatography“), která se vyznačuje extrémním vzrůstem rychlosti a účinnosti (viz dále) oproti klasické nízkotlaké metodě, ale také vyžaduje náročnou instrumentaci a poměrně nákladné komerční sorbenty nebo předplněné kolony. Pro purifikační účely je výhodné používat kolony preparativní, které jsou objemnější než analytické (Churáček et al., 1990; Anzenbacher & Kovář, 1986). HPLC specificky upravená pro separace biopolymerů se označuje jako FPLC (z angl. „Fast Protein Liquid Chromatography“) a její základní instrumentální schéma je ukázáno na následujícím obrázku 4.





**Obr. 4:** Schematický náčrt FPLC pro purifikační účely.

### 3.3.3 Charakteristika mobilní fáze pro proteinové separace

Používaným rozpouštědlem bývá zpravidla voda. Lze připravit různé typy pufrů s variabilními hodnotami pH v závislosti na konkrétních aplikacích (tvorba vhodných podmínek pro interakci proteinů se sorbentem a nutnost tolerance sorbentu a vzorku ke zvoleným podmínkám). Opatrně by se mělo pracovat s teplotními podmínkami (udržování nízké teploty je zapotřebí hlavně pro minimalizaci aktivity proteolytických enzymů ve vzorku). Hydrolýza peptidových vazeb proteasami se někdy stává větším problémem v pokročilejších stádiích purifikační procedury, kdy je cílový protein zakoncentrováván a je pak nezbytné přidávat do eluentu nákladná aditiva (proteolytické inhibitory). Iontová síla každého eluentu by měla být minimálně  $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ , aby se zamezilo nespecifické interakci proteinů s náplní kolony elektrostatickými nebo van der Waalsovými silami. Do startovního eluentu pro ekvilibraci skleněných kolon by měl být přidáván 0,02% azid sodný pro zamezení růstu mikroorganismů (není-li azid přidáván již do komerčních náplní kolon) (Stellwagen, 1990).

### 3.3.4 Hlavní parametry separace v kolonové chromatografii

#### Retenční čas a objem

Základní charakteristické veličiny pro každou chromatografovanou látku jsou její *retenční čas*  $t_r$  a *retenční (eluční) objem*  $V_e$ . Retenční čas je časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce odpovídající průchodu maximální koncentrace dané látky detektorem. Retenční objem

pak představuje objem mobilní fáze, který za dobu  $t_r$  vyteče z kolony. Nejčastěji se změří buď  $t_r$  nebo  $V_e$  a druhá veličina se vypočítá podle rovnice (2)

$$V_e = t_r \cdot F_m, \text{ kde} \quad (2)$$

$F_m$  je *průtoková rychlost*, neboli objem mobilní fáze, který proteče průřezem kolony za 1 sekundu.

Protože se retenční časy jednotlivých separovaných látek v daném chromatografickém systému liší pouze o dobu, kterou daná látka strávila ve stacionární fázi, je možno retenční čas rozložit jako součet dvou dalších veličin:

$$t_r = t'_r + t_m, \text{ kde} \quad (3)$$

$t'_r$  je *redukovaný retenční čas*, neboli doba, po kterou se separovaná látka zdrží interakcemi ve stacionární fázi;  $t_m$  představuje *mrtvý čas kolony*, neboli časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce maximální koncentrace složky, jež není stacionární fází zadržována.

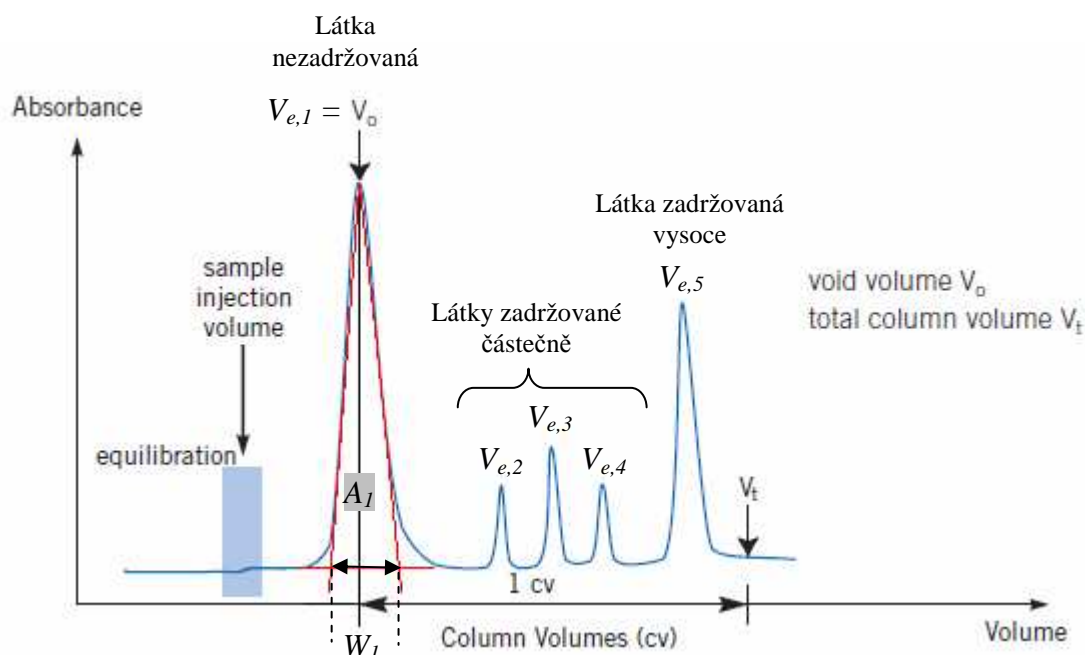
Analogické veličiny představuje *redukovaný eluční objem*  $V'_e$  a *mrtvý objem kolony*  $V_0$ .  $V_0$  fakticky představuje objem, který v koloně zaujímá mobilní fáze a experimentálně se určí ze stanovení  $V_e$  inertní látky, která na koloně není zadržována (její  $V_e$  se přímo rovná  $V_0$ ) (Anzenbacher & Kovář, 1986; Churáček et al., 1990).

#### Veličiny popisující eluční profil

Zóny separovaných látek procházející detektorem jsou v elučním profilu zaznamenány jako tzv. eluční křivky (chromatografické píky). Teoretický eluční profil při kapalinové chromatografii je znázorněn na obrázku 5. Eluční objem látky se odečítá nejčastěji jako vzdálenost maxima píku této látky od startu aplikace vzorku, příp. od aplikace poloviny objemu vzorku. Na chromatogramu jsou kromě odečtených hodnot retenčních charakteristik  $t_r$  nebo  $V_e$  často podstatné i veličiny charakterizující chromatografický pík, mezi které patří:

- *šířka píku*  $W$ , která se odečítá buď na úrovni základní linie (z angl. „baseline“), v polovině výšky píku nebo v poloze inflexních bodů, a udává se v časových jednotkách nebo jednotkách objemu.
- *výška píku*  $h$ , označující vzdálenost mezi maximem píku a jeho nulovou linií.
- *plocha píku*  $A$ , vymezená tečnami vzestupné a sestupné linie píku v inflexních bodech a základní linií, určuje se výhradně metodou numerické integrace. Porovnávání ploch

píků těž látky dovoluje kvantifikaci jejího množství (např. stanovení výtěžku), pokud byly tyto píky generovány odezvou výlučně na danou látku (Churáček et al., 1990; manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).



**Obr. 5:** Teoretický eluční profil kolonové kapalinové chromatografické frakcionace s vysokým rozlišením (převzato z manuálu firmy Amersham Biosciences, 2002b). Byla aplikována směs pěti látek (ozn. 1 až 5). Nejprve je eluována inertní látka, která není zadržována ve stacionární fázi ( $V_{e,1}$ ). Poté jsou eluovány ostatní složky směsi v pořadí podle vzrůstající interakce se stacionární fází ( $V_{e,2}$  až  $V_{e,5}$ ). Je znázorněn obvyklý způsob určení šířky píku látky 1 v základně, kde tečny v inflexních bodech protínají základní linii ( $W_1$ ). Plocha píku látky 1 ( $A_1$ ) je vymezena obsahem červeného trojúhelníku.

### Selektivita a kapacita

Poměr redukovaných retenčních časů nebo objemů dvou chromatografovaných látek se nazývá *retenční poměr* nebo *relativní retence*. Pro separované látky 1 a 2 vyjadřuje selektivitu rozdělení těchto dvou látek v daném chromatografickém systému:

$$r_{12} = \frac{V'_{e,1}}{V'_{e,2}} \quad (4)$$

Analogické *retenční poměry*  $r_{is}$  charakterizují danou látku v porovnání se standardem podobné struktury:

$$r_{is} = \frac{V'_{e,látka}}{V'_{e,standard}} \quad (5)$$

Kapacitu kolony pro danou látku postihuje *kapacitní (retenční) poměr k*, který je definován jako poměr množství separované látky ve stacionární a mobilní fázi:

$$k = K_d \cdot \frac{V_s}{V_0}, \text{ kde} \quad (6)$$

$V_s$  je *objem stacionární fáze* a  $K_d$  *distribuční koeficient*, který lze vyjádřit rovnicí (1) nebo následovně:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_s} \quad (7)$$

Dosazením vztahu pro  $K_d$  z rovnice (7) lze pak upravit rovnici (6) do tvaru rovnice (8)

$$k = \frac{V_e - V_0}{V_0} \quad (\text{Anzenbacher \& Kovář, 1986; Štulík et al., 2004}). \quad (8)$$

### Účinnost separačního procesu

Účinnost chromatografické kolony charakterizuje rychlost rozmývání elučních zón separovaných látek. S rostoucí rychlostí rozšiřování zón účinnost separace klesá. Jedním z pohledů na kinetiku procesu rozmývání zón je teorie chromatografického patra, která vychází z hypotetického předpokladu, že chromatografická kolona je rozdělena na sled elementárních jednotek – teoretických pater. V rámci jednoho patra se ustavuje rovnováha charakterizovaná  $K_d$  a je uskutečněn kompletní elementární separační krok. Pro praxi přináší tato teorie výhodné vyjadřování účinnosti chromatografických kolon počtem teoretických pater a výškou teoretického patra. Za předpokladu Gaussova symetrického píku lze *počet teoretických pater n* vyjádřit rovnicí:

$$n = 16 \cdot \left( \frac{V_e}{W} \right)^2 \quad (9)$$

Údaj o počtu teoretických pater musí být vždy doprovázen informací o délce kolony a o použité testovací látce. Účinnost je pak definována jako odmocnina z počtu teoretických pater.

K porovnání účinností kolon různých délek se používá údaj o počtu teoretických pater na jednotku délky kolony nebo údaj o výšce *teoretického patra*  $H$  (správněji *výškový ekvivalent teoretického patra*), která lze vypočítat podle vztahu:

$$H = \frac{L}{n}, \text{ kde} \quad (10)$$

$L$  je *délka chromatografické kolony* (Anzenbacher & Kovář, 1986; Bílková & Králová, 1997; Churáček et al., 1990).

### Rozlišení a jeho regulace

Nejzřetelnějším ukazatelem pro posouzení chromatografické separace je *rozlišovací koeficient*  $R_s$ , jehož hodnota umožňuje číselně vyjádřit míru rozdělení látek 1 a 2. Rozlišení ve smyslu  $R_s$  je pak definováno rovnicí (11)

$$R_s = \frac{2 \cdot (V_{e,2} - V_{e,1})}{W_1 + W_2} . \quad (11)$$

Látky považujeme za zcela rozdělené, jestliže hodnota  $R_s$  je vyšší nebo rovna 1,5. V případě symetrických píků často postačí hodnota 1,0 (Bílková & Králová, 1997; Štulík et al., 2004).

Důležitá je znalost způsobů, kterými lze rozlišení ovlivnit a měnit. Existuje rovnice (12), zahrnující vliv faktorů selektivity, kapacity a účinnosti na celkovou míru separace:

$$R_s = \frac{F_{sel} \cdot F_{kap} \cdot F_{úč}}{4}, \text{ kde} \quad (12)$$

$F_{sel}$  je *faktor selektivity*,  $F_{kap}$  je *faktor kapacity* a  $F_{úč}$  je *faktor účinnosti*.

Faktor selektivity je definován rovnicí (13)

$$F_{sel} = \frac{r_{12} - 1}{r_{12}} . \quad (13)$$

Faktor selektivity souvisí s termodynamikou separačního procesu. Je určen volbou stacionární a mobilní fáze. Lze také ovlivnit změnou rychlosti průtoku mobilní fáze. Ve většině případů má pro finální rozlišení největší význam.

Faktor kapacity je definován rovnicí (14)

$$F_{kap} = \frac{k_2}{k_2 + 1} . \quad (14)$$

Faktor kapacity je vždy nižší než číslo 1, a přibližuje se mu se vzrůstající hodnotou kapacitního poměru (separované látky 2). Je možné jej ovlivnit množstvím stacionární fáze v koloně, změnou stacionární nebo mobilní fáze a změnou teploty.

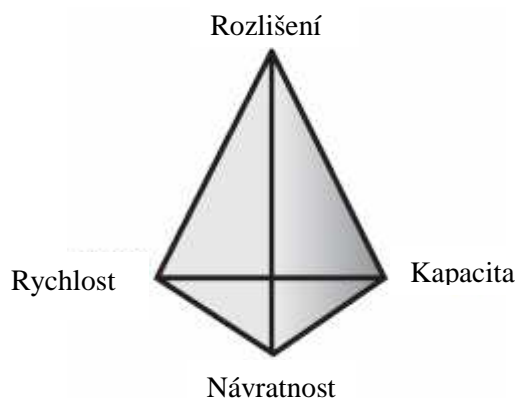
Faktor účinnosti je definován stejně jako účinnost, tedy rovnicí (15)

$$F_{úč} = \sqrt{n} . \quad (15)$$

Faktor účinnosti souvisí s kinetikou separačního procesu. Je určen počtem teoretických pater chromatografické kolony. Počet teoretických pater lze ovlivnit délkou kolony, rychlostí průtoku mobilní fáze, velikostí zrn stacionární fáze (často udávanou jako průměr zrna) a teplotou (Bílková & Králová, 1997; Churáček et al., 1990; Štulík et al., 2004).

### 3.4 Selektce a kombinace chromatografických technik pro CIPP

Každá purifikační technika poskytuje určitý kompromis mezi rozlišením, kapacitou, rychlostí a návratností, jak je ukázáno na obrázku 6. Kapacita se vztahuje k množství cílového proteinu zpracovaného v průběhu purifikační procedury. V některých případech je kapacita limitována aplikovatelným objemem (při GPC) nebo velkým množstvím kontaminantů, nežli množstvím cílového proteinu. Rychlost je nejdůležitějším faktorem na počátku purifikačního procesu, kde je nutné co nejrychleji eliminovat některé kontaminanty, jako např. proteasy. Důležitost faktoru návratnosti se s průběhem purifikace postupně zvyšuje, neboť vzrůstá finanční hodnota purifikovaného produktu. Návratnost je ovlivněna destruktivními procesy ve vzorku a nevhodnými podmínkami při separaci na chromatografických kolonách. Faktor rozlišení je obecně důležitý ve všech stádiích purifikace, ale nejvýznamnější roli hraje ve finálních čistících krocích purifikace, kdy dosažení jeho uspokojivé úrovně může být velmi komplikované, protože zbývající kontaminanty a cílový protein vykazují velmi podobné vlastnosti (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001).



**Obr. 6:** Každá purifikační technika poskytuje určitý kompromis mezi rozlišením, kapacitou, rychlostí a návratností (převzato z manuálu firmy Amersham Biosciences, 2001).

Výběr jednotlivých technik a jejich logických kombinací by měl být založena na posouzení hlavního užítku příslušné techniky a stavu vzorku na počátku a na konci každého kroku. Využívá se skutečnosti, že každá technika může být optimalizována se zaměřením na 1 až 2 z dříve diskutovaných faktorů. Poté taková technika poskytuje poněkud odlišné výsledky, nežli tatáž technika optimalizovaná pro faktory alternativní. Přehled vhodnosti použití každé chromatografické purifikační techniky pro jednotlivé fáze CIPP je zpracován v tabulce 2. Nejčastěji jsou techniky IEX, HIC a AC zařazeny v dřívějších stádiích purifikačního procesu a technika GPC, příp. RPC v módu s vysokým rozlišením je ideální pro finální čistící krok. Následuje typický příklad logické návaznosti technik:

*Po precipitaci balastních proteinů síranem amonným zůstane produkt v supernatantu s vysokou iontovou silou prostředí. Proto je ideální volbou pro následující krok HIC, která takové podmínky vyžaduje k efektivní adsorpci. Po eluci z HIC kolony je výrazně snížena koncentrace solí a celkový objem příslušné frakce s produktem. Z tohoto stavu lze produkt efektivně připravit pro následující IEX nebo AC krok jeho zředěním nebo rychlou výměnou prostředí na odsolovací koloně. Konečný krok představuje GPC s vysokým rozlišením, která toleruje stav vzorku vzešlého z předchozí techniky (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001; manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).*

Pokud nejsou o cílovém proteinovém produktu známy žádné informace, standardním protokolem je použití kombinace technik IEX-HIC-GPC (anuál firmy Amersham Biosciences, 2001).

**Tab. 2:** Přehled použitelnosti základních chromatografických technik pro jednotlivé fáze purifikační strategie CIPP (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001).

technika	hlavní rysy	záchyt	inter. pur.	čištění	počáteční stav vzorku	konečný stav vzorku
IEX	vysoké rozlišení, kapacita a rychlost	***	***	***	- nízká iontová síla - objem vzorku není limitující	- vysoká iontová síla nebo pH - zakoncentrovaný
HIC	dobré rozlišení a kapacita, vysoká rychlost	**	***	*	- vysoká iontová síla - objem vzorku není limitující	- nízká iontová síla - zakoncentrovaný
AC	vysoké rozlišení, kapacita a rychlost	***	***	**	- specifické podmínky navázání vzorku - objem vzorku není limitující	- specifické eluční podmínky - zakoncentrovaný
GF	vysoké rozlišení při použití Superdexu		*	***	- objem vzorku max. 5% celkového objemu kolony - rychlost je limitující	- výměna pufru (pokud je zapotřebí) - zředěný
RPC	vysoké rozlišení		*	***	- vyžaduje organická rozpouštědla	- riziko ztráty biologické aktivity - zakoncentrovaný



## 4. Technika GPC při purifikaci proteinů

Pro tento typ chromatografie se obvykle uvádějí tři rovnocenné názvy: gelová permeační chromatografie (zkr. GPC z angl. „gel permeation chromatography“), gelová filtrace (zkr. GF z angl. „gel filtration“) a molekulová vylučovací chromatografie (zkr. SEC z angl. „size-exclusion chromatography“). Termín SEC je nejobecnější a nejlépe vystihuje podstatu dělicího efektu. Dále v této práci bude používán termín GPC (Anzenbacher & Kovář, 1986; manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

GPC se začleňuje jako zvláštní typ rozdělovací chromatografie v systému kapalina – kapalina, kde stacionární fází je kapalina zakotvená v nitru porézních částic (zrn) gelové náplně chromatografické kolony, čímž je zajištěna její nemísitelnost s mobilní fází, tvořenou toutéž kapalinou (Anzenbacher & Kovář, 1986; Bílková & Králová, 1997).

### 4.1 Princip techniky

Rozhodující vliv na separaci látek mají rozměry jejich molekul. Přesněji řečeno, závisí na tzv. hydrodynamickém průměru molekuly. Tato specifická vlastnost je definována jako průměr sférického objemu vytvořeného molekulou rychle se pohybující v roztoku. V porézním gelu tak dochází ke sterickému vyloučení, neboli exkluzi molekul přesahujících určitou mezní hodnotu hydrodynamického průměru. Takové molekuly totiž nemohou ze sterických důvodů vstupovat do nitra jednotlivých pórů a setrvávají pouze v intersticiální kapalině mezi částicemi gelu s níž se společně eluují z kolony. Látky s nižšími hodnotami hydrodynamického průměru molekuly jsou pak zadržovány úměrně své schopnosti prostupovat částicemi gelového sloupce. Pořadí eluce směsi separovaných látek z kolony je tedy inverzní k jejich vzrůstajícím hydrodynamickým průměrům. Lze tvrdit, že v případě molekul majících přibližně stejný tvar (např. globulární proteiny) probíhá separace podle jejich molekulových hmotností. Při tomto typu chromatografie však téměř vůbec nezávisí na chemické povaze separovaných látek. Jejich chemické vlastnosti určují pouze systém, v němž bude separace prováděna (volbu hydrofilního či hydrofobního gelu a s tím související volbu mobilní fáze) (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b; Stellwagen, 1990).

Bylo vypracováno několik teorií vysvětlujících mechanismus separace látek touto chromatografií, které se však více či méně rozcházejí se skutečnou situací, neboť předpokládají diskrétní geometrii pórů. Je totiž zřejmé, že póry gelových zrn jsou poměrně nepravidelné vláknité struktury a rozhodujícím kritériem pro separaci není jejich objem, ale dostupnost částí jednotlivých pórů (vnitřní architektura gelové matrice). Vychází se z představy, že čím větší podíl objemu pórů je schopna molekula využívat, tím déle je v koloně zadržována (Anzenbacher & Kovář, 1986; Bílková & Králová, 1997).

Další důležitý dělicí efekt představuje omezená difúze. Difuzní pohyb molekul mezi mobilní a stacionární fází je řízen difuzní konstantou, která je u velkých molekul nízká, proto je jejich aktuální koncentrace v pórech ještě nižší, než by byla koncentrace rovnovážná (Anzenbacher & Kovář, 1986).

#### **4.2 Gelová náplň chromatografické kolony**

Při technice GPC se chromatografická kolona plní gelovým filtračním médiem za tvorby tzv. gelového lože (gelové náplně). Gelové filtrační médium má formu mikroskopických pórovitých částic, které jsou vybudovány z 3D sítě různě uspořádaných a provázaných vláken inertního polymeru. Tento stavební materiál je označován jako gelová matrice, protože v kapalném prostředí botná, a představuje tak nosič stacionární fáze. Gelová matrice v případě GPC již není dále chemicky modifikována a dělení je založeno pouze na efektu molekulového síta (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

Částičky gelu mají kulovitý tvar a obsahují póry o definované velikosti. Rozsah velikostí zrn a další parametry bývají rovněž známy. Médium by nemělo obsahovat žádné specificky ani nespecificky adsorbující skupiny nebo skupiny nesoucí náboj, aby nedocházelo k ovlivnění separace jinými faktory než velikostí a tvarem molekuly, a mělo by vykazovat různý stupeň prostupnosti k jednotlivým složkám separovaného vzorku (Bílková & Králová, 1997).

Vývoj gelových filtračních médií je řízen úsilím o umožnění co nejvyšších rychlostí průtoku mobilní fáze při současném zachování co nejvyššího rozlišení. Separace a její rozlišení na určitém médiu je ovlivněna různými parametry tohoto média (viz dále). Snahy o optimalizaci každého z těchto parametrů vedly ke vzniku různých sérií gelových filtračních médií. Zásadním předpokladem při výrobě médií je řízení úrovně velikostí pórů a velikostí částic (velikost pórů je obvykle determinována stupněm kovalentního prokřížení vláken polymeru). Tyto a další modifikovatelné parametry umožňují produkci širokého rozmezí médií v rámci určité série, přičemž každé z nich má vysokou selektivitu v určitém rozsahu *relativních molekulových hmotností*  $M_r$  (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

#### **4.3 Charakterizace chování separovaných látek v GPC**

Mnohé analytické aplikace GPC, jako např. testování separačních charakteristik gelových filtračních médií, často poskytují zcela zásadní informace pro vypracovávání proteinových purifikačních procedur. Přitom však většinou není dobré hodnotit výsledky přímo na základě retenčních, nebo redukovaných retenčních charakteristik analyzovaných látek, neboť tyto veličiny závisí na objemu chromatografické náplně a způsobu naplnění kolony (poměru hmoty gelu k intersticiálnímu prostoru kolony), a nejsou proto vhodné pro srovnávání výsledků

z různých experimentů. Možným řešením tohoto problému se zdá být počítání *distribučního koeficientu*  $K_d$  pro jednotlivé analyty podle rovnice (7), který popisuje chování separované látky nezávisle na parametrech a způsobu naplnění chromatografické kolony. V případě ideálního chování při chromatografické separaci nabývá  $K_d$  hodnot v intervalu od 0 (látky exkludované v intersticiální kapalině) do 1 (látky využívající celý objem pórů) a v případě podobnosti tvaru molekul jednotlivých analytů jsou získané hodnoty  $K_d$  funkcí jejich *relativních molekulových hmotností*  $M_r$ . V technice GPC se nicméně zavádí osobitý distribuční koeficient  $K_{av}$ , který je definován rovnicí (16)

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}, \text{ kde} \quad (16)$$

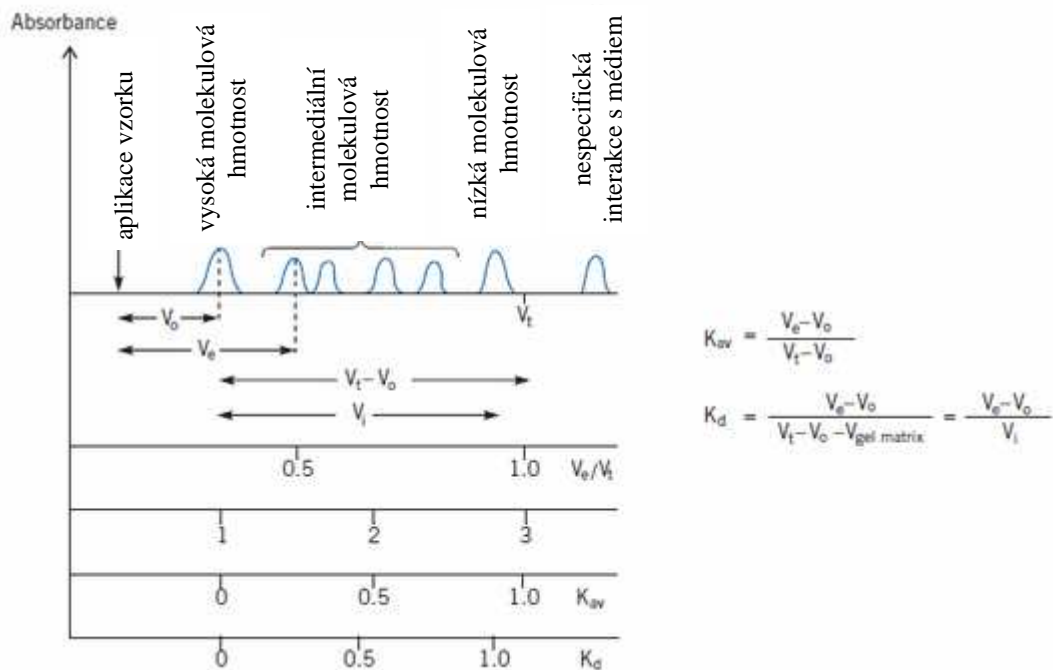
$V_t$  je *celkový objem chromatografické kolony*, který lze snadno vypočítat z výšky a šířky gelového lože (pomocí známých rozměrů příslušné kolony). Tuto veličinu zavádíme namísto distribučního koeficientu  $K_d$ , protože objem stacionární fáze  $V_s$ , který v tomto případě zahrnuje veškerou kapalinu v pórech gelové matrice, se určuje velmi obtížně, ale jeho znalost je k výpočtu  $K_d$  podle rovnice (7) nutná. Namísto toho člen  $V_t - V_0$  vystupující v rovnici (16) zahrnuje do stacionární fáze i objem samotné gelové matrice, neboť:

$$V_t = V_0 + V_s + V_{gm}, \text{ kde} \quad (17)$$

$V_{gm}$  je *objem gelové matrice*. Proto platí, že

$$V_t - V_0 = V_s + V_{gm} \quad (18)$$

a hodnota  $K_{av}$  tedy není skutečným distribučním koeficientem, neboť  $V_{gm}$  je zcela nepřístupný separovaným molekulám analytů. Pro dané médium nicméně existuje konstantní poměr  $K_{av} : K_d$ , který je nezávislý na charakteru molekuly analytu nebo její koncentraci. Aproximativní závislosti mezi diskutovanými veličinami jsou zobrazeny na obrázku 7. Z obrázku je vidět, že  $K_d$  je přesnější pro malé molekuly (tj. s vysokou hodnotou  $V_e$ ). V případě  $K_{av}$  závisí jeho maximální hodnota na typu gelu a ani pro velmi malé molekuly se nedosahuje hodnoty 1. Malé molekuly jsou proto hůře identifikovatelné. V případě, že hodnota  $K_{av}$  leží mimo interval 0-1, pak došlo k nespecifické interakci molekul analytu s gelovým filtračním médiem (Anzenbacher & Kovář, 1986; Bílková & Králová, 1997; manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).



**Obr. 7:** Vztah mezi některými veličinami používanými pro zobecnění retenčního chování molekul analytů (převzato z manuálu firmy Amersham Biosciences, 2002b).  $V_i$  představuje objem kapaliny v nitru gelové matrice přístupný velmi malým molekulám a je roven objemu stacionární fáze  $V_s$ .

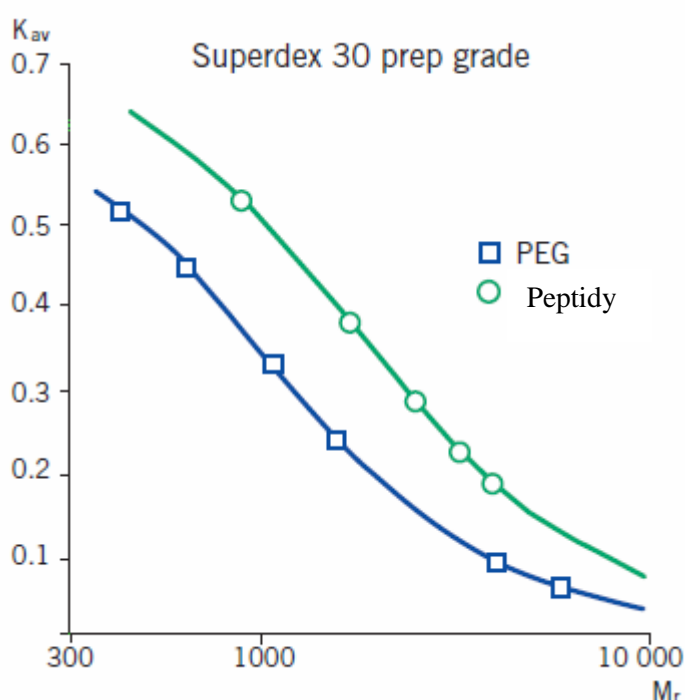
#### 4.4 Selektivita a rozlišení v GPC

Úspěch při aplikaci GPC jako purifikační techniky závisí primárně na zvolení podmínek, které poskytnou uspokojivou selektivitu dělení a omezí efekty difúzního rozšiřování elučních zón během separace, a tím i rozmývání píků na chromatogramu a zředění produktu vzhledem ke koncentraci původního vzorku (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

##### 4.4.1 Selektivita

Konkrétní gelové filtrační médium má selektivitu, neboli separační schopnost, v takovém rozmezí relativních molekulových hmotností  $M_r$ , v němž změna hydrodynamického průměru dvou molekul způsobuje změnu v jejich elučním objemu. Toto rozmezí je také označováno jako frakcionační rozsah gelu. Vynesím  $K_{av}$  série proteinových standardů podobného tvaru a hustoty v závislosti na logaritmu jejich  $M_r$  se získá křivka selektivity pro dané médium. Křivka selektivity má sigmoidní charakter a významná část uprostřed této závislosti vykazuje linearitu. Ze strmosti průběhu křivky selektivity lze posoudit rozlišovací schopnost média ve zvolených intervalech  $M_r$ . Ukázky křivek selektivity jsou na obrázku 8. Selektivita média závisí pouze na distribuci velikostí pórů v zrnech gelové náplně. Gelové filtrační médium by mělo být

voleno tak, aby se na něm hodnoty  $K_{av}$  pro cílový protein a odstraňované komponenty vzorku co nejvíce lišily. Zároveň by se látky s nejvyššími molekulovými hmotnostmi měly eluovat již v mrtvém objemu kolony  $V_0$  ( $K_{av} = 0$ ), čímž se také dosáhne zkrácení doby setrvání látek na koloně. Je nutné si uvědomit, že selektivita média v okolí  $V_0$ , ale především ve velmi široké oblasti  $V_t$  ( $K_{av} = 1$ ) bývá již značně neuspokojivá. Proto není prakticky možné využívat maximálně celý frakcionační rozsah gelu. Obecně gely s úzkým a poměrně strmým frakcionačním rozsahem se hodí pro separace méně složitých směsí proteinů s blízkými hodnotami  $M_r$  a pro komplexnější směsi je lepší použít gely s širokým frakcionačním rozsahem (Bílková & Králová, 1997; manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).



**Obr. 8:** Křivky selektivity pro komerční médium Superdex 30 prep grade (převzato z manuálu firmy Amersham Biosciences, 2002b). PEG je zkratka pro polyethylenglykol.

#### 4.4.2 Rozlišení

Stupeň rozlišení se posuzuje z hodnoty *rozlišovacího koeficientu*  $R_s$  (viz kapitola 3.3.4). Kromě selektivity samotného média závisí finální rozlišení při GPC na mnoha faktorech: objem aplikovaného vzorku a podíl objemu vzorku k celkovému objemu kolony, rozměry chromatografické kolony, velikost zrn gelové náplně a distribuce velikostí zrn, podíl objemu pórů v gelové matici, průtoková rychlost mobilní fáze, poměr gelové náplně v koloně (hustota náplně) a viskozita vzorku a eluentu (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

Pro optimální separaci v módu s vysokým rozlišením by objem aplikovaného vzorku měl činit asi 1-5 % objemu gelového lože (výpočet z hodnoty  $V_t$ ), v závislosti na použitém médiu. Aplikace vyššího objemu vzorku znamená navýšení kapacity separace, ale rozlišení klesá. Často je proto vhodné hledat určitý kompromis experimentálně. Někdy je možno dávkovat více vzorku pro zabránění přílišnému naředění separovaných komponent (Bílková & Králová, 1997; manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

Pro dobré rozlišení jsou obecně vhodné delší kolony s nižším průměrem. Vzdálenost mezi vrcholy píků vzrůstá úměrně s délkou gelového sloupce a šířka zón vzrůstá přibližně úměrně s druhou odmocninou délky sloupce (Bílková & Králová, 1997). Při velkém průměru gelového sloupce dochází ke značnému naředění separovaných látek, ale při příliš malém je zase třeba počítat se vztlínáním kolem pláště kolony (Bílková & Králová, 1997).

Šířku separovaných zón ovlivňuje velikost zrn gelové náplně a distribuce velikostí deklarovaného rozsahu zrn. Při použití jemnější zrnitosti gelu se dosáhne užších zón a lepšího rozlišení, protože je usnadněn difuzní pohyb molekul vzorku do nitra gelových částic a zpět a je redukován čas k dosažení rovnovážné distribuce (klesá výškový ekvivalent teoretického patra). Při chromatografii na jemně zrněných materiálech lze proto zkracovat délku gelového sloupce. Limitujícím faktorem na těchto gelech však většinou bývá průtoková rychlost, protože s klesající velikostí zrna také rapidně klesá propustnost vrstvy gelu. Šíře elučních zón sice klesá s klesající rychlostí průtoku v širokém rozsahu, ovšem na úkor delší doby trvání separace. Naopak při použití vyšší rychlosti průtoku zase roste pracovní tlak, který může být limitující pro méně rigidní gely kvůli riziku jejich stlačování a snižování propustnosti vrstvy (Bílková & Králová, 1997; manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

Uniformita gelového sloupce a gelových částic ovlivňuje rovnoměrnost průtoku mobilní fáze a potenciálně tedy ovlivňuje tvar, příp. šířku píků. Na gelových sloupcích s vysokou uniformitou zrn (nižší stupeň distribuce jejich velikostí) probíhá eluce separovaných látek v užších zónách (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

Podíl objemu pórů v gelové matici má vliv na propustnost gelové vrstvy, a tím i aplikovatelnou průtokovou rychlost. Média s vysokým podílem objemu pórů tak poskytují možnost vyšších průtokových rychlostí, avšak obvykle také nižší rozlišovací schopnost ve svém frakcionačním rozsahu (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

Viskozita se může stát limitujícím faktorem pro rozlišení, jestliže je vzorek záměrně zakoncentrován, aby bylo možno aplikovat vyšší množství proteinu ve stejném objemu. Zakoncentrování vzorku sice zvýší kapacitu separace bez vlivu na finální rozlišení, ale koncentrace proteinu kolem  $70 \text{ mg.ml}^{-1}$  už představuje riziko vysoké viskozity. Při zvyšování viskozity vzorku nad určitou hranici totiž dochází ke zhoršování rozlišení, které mívá rapidní spád (Bílková & Králová, 1997; manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

#### 4.5 Gelová filtrační média pro purifikaci proteinů

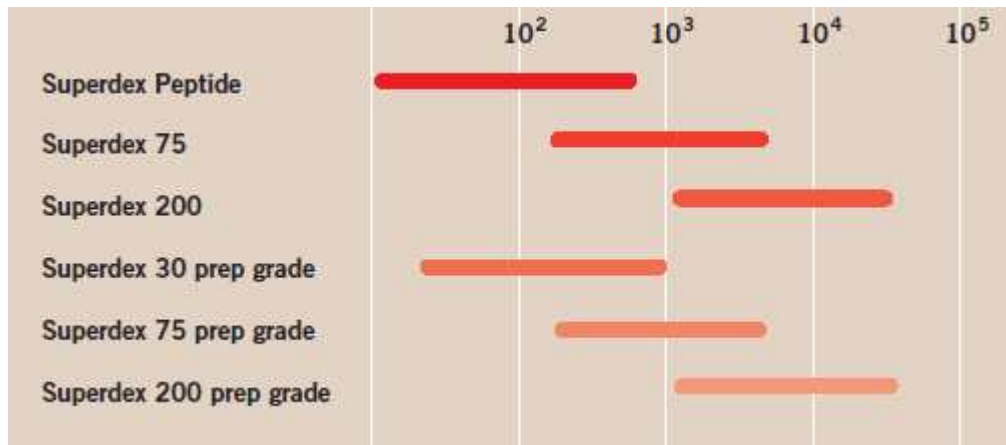
GPC proteinů se nejčastěji provádí v systému vodná fáze – vodná fáze, proto se používají hlavně hydrofilní gely na bázi polysacharidů, příp. polyakrylamidu. Vyrábějí se i materiály, které tvoří gely jak ve vodném, tak nevodném prostředí (obvykle se jedná o hydrofilní matrice s navázanými hydrofobními řetězci) a mají tedy širší využití pro separace. Obecně existují tři základní charakteristiky gelové matrice:

*Xerogely* – matrice tvořené lineárními polymerními řetězci propojenými kovalentně křížovými můstky nebo fyzikálními interakcemi. Vlákná jsou vysoce solvatována a tyto gely tedy bobtnají na mnohonásobek svého objemu v suchém stavu, a proto poskytují vysokou kapacitu. Kvůli své mechanické labilitě netolerují aplikaci vyšších tlaků, a proto bývá jejich použití limitováno nízkými průtokovými rychlostmi. Jejich nevýhodou je také neprostupnost pro takové makromolekuly, které ze sterických důvodů již neprojdou intersticiálním prostorem mezi gelovými zrny. Typickými představiteli vhodnými pro separaci proteinů jsou dextranové gely (Sephadexy).

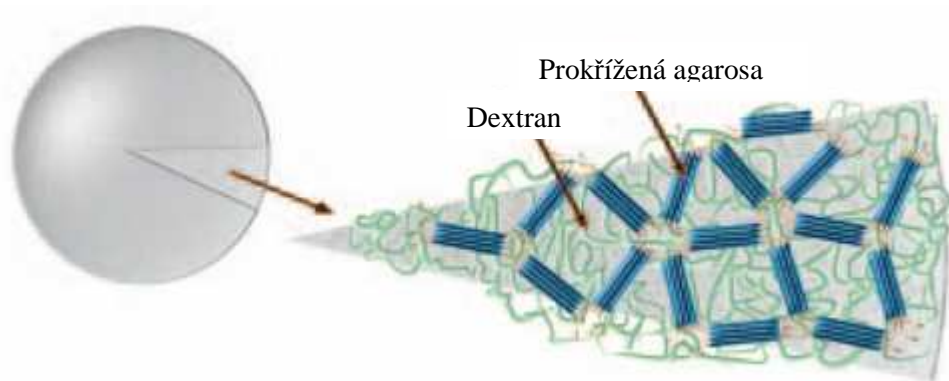
*Aerogely* – v pravém slova smyslu se nejedná o gely. Skládají se z pevné (rigidní) matrice, obsahující póry, které jsou v suchém stavu vyplněny vzduchem. Při naplnění kolony rozpouštědlo vytěsňuje vzduch z pórů gelu, přičemž vlastní matrice nebobtná. Hlavní výhodou je aplikovatelnost vysokých průtokových rychlostí.

*Xerogely–aerogely* – hybridy obou předchozích forem, které mají rysy obou skupin. Jejich polymerní matrice má semirigidní strukturu, která se pouze mírně solvuje při tvorbě gelu. Hlavní výhodou tedy spočívá v aplikovatelnosti vyšších průtokových rychlostí při současném zachování vysokého rozlišení separace. Pro purifikaci proteinů jsou vhodné hlavně agarosové gely (Sepharosa, Superosa) a gely kompozitní (Superdex, Sephacryl). Je možno zmínit také makroporézní perlovou celulózu (Perloza MT) (Bílková & Králová, 1997; manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

Superdex bývá prvním zvažovaným médiem při požadavku na vysoké rozlišení, krátkou dobu trvání separace a dobrou návratnost. Frakcionační rozsah Superdexu je však limitující při práci s proteiny o vyšších molekulových hmotnostech, jak ukazuje obrázek 9. Superdex je kompozitní médium, jehož základem je vysoce prokřížená a makroporézní agarosová matrice, na níž jsou kovalentně navázány vlákna dextranu (viz obrázek 10). Výsledkem je médium s vysokou fyzikální a chemickou stabilitou a excelentními separačními vlastnostmi determinovanými hlavně dextranovými řetězci. Superdex s přívlastkem prep grade je zvláště vhodný pro použití při průmyslových produkcích, kde jsou kromě vysoké stability vyžadovány také vysoké průtokové rychlosti a rychlé a efektivní možnosti čištění (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).



**Obr. 9:** Frakcionační rozsah pro jednotlivé typy komerčního gelu Superdex; platí pro globulární proteiny (převzato z manuálu firmy Amersham Biosciences, 2002b).



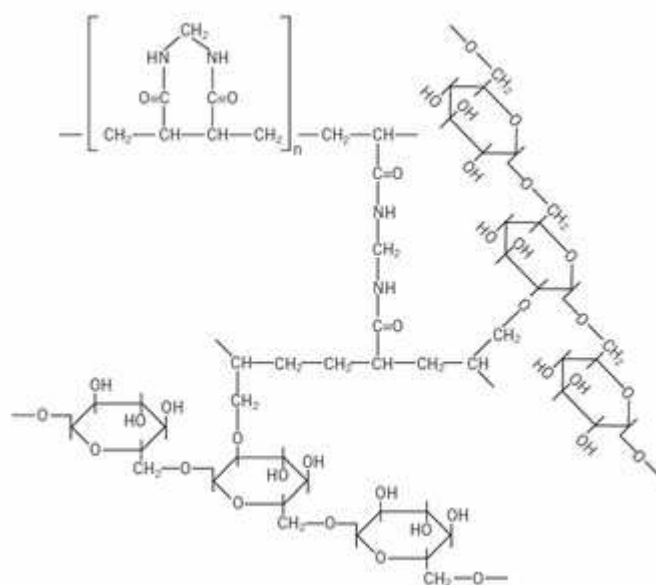
**Obr. 10:** Schematický výsek z částičky Superdexu. V jeho struktuře jsou vlákna dextranu kovalentně připojena k vysoce prokřížené agarosové matici (převzato z manuálu firmy Amersham Biosciences, 2002b).

Sephacryl se vyznačuje rychlými separacemi s vysokou návratností, a to zejména v průmyslovém měřítku. Průmyslové použití je zvláště vhodné vzhledem ke značné chemické stabilitě a toleranci vysokých průtokových rychlostí. Sephacryl HR (High Resolution) média poskytují vhodné doplnění k médiím Superdex prep grade pro aplikace vyžadující poněkud širší frakcionační rozsah (srovnej obrázek 11 a 9). Sephacryl je kompozitní médium připravené kovalentním křížovým provázáním allyldextranu N,N'-methylenbisakrylamidem za tvorby hydrofilní matrice vysoké mechanické odolnosti. Částečná struktura média Sephacryl HR je zobrazena na obrázku 12. Porozitní vlastnosti média jsou determinovány dextranovou složkou (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).



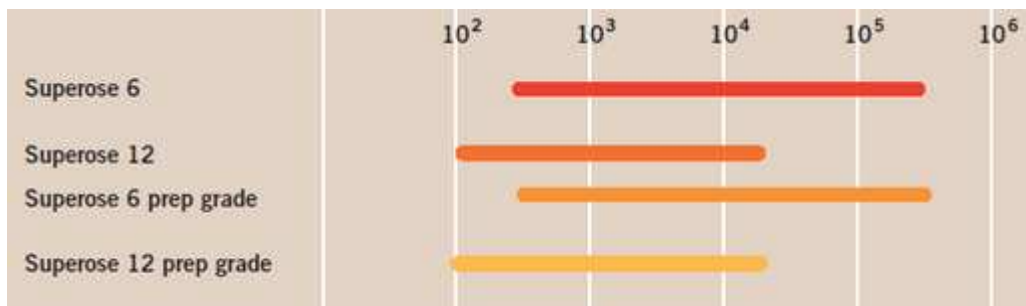


**Obr. 11:** Frakcionační rozsah pro jednotlivé typy komerčního gelu Sephacryl HR; platí pro globulární proteiny (převzato z manuálu firmy Amersham Biosciences, 2002b).



**Obr. 12:** Částečná chemická struktura komerčního gelu Sephacryl HR (převzato z manuálu firmy Amersham Biosciences, 2002b).

Superosa tvoří gely s vysokou fyzikální a chemickou stabilitou a jednotlivá média této série se vyznačují širokým frakcionačním rozsahem, jak je ukázáno na obrázku 13. Excelentní mechanická rigidita Superosy a vysoká propustnost gelové vrstvy umožňují používání značně viskózních eluentů při současném zachování dostatečné průtokové rychlosti. Separace na těchto médiích bývá v některých případech pozitivně či negativně ovlivněna nescifickou hydrofobní interakcí. Všechny tyto atributy jsou dány chemickou povahou Superosy, která je vybudována z 3D sítě vysoce prokřížené agarosy s vysokým podílem dosti nepravidelných pórů v gelové matici. Vysoká porozita Superosy ji činí velmi vhodnou pro „binding“ techniky jako např. afinitní chromatografie, kde pozitivně ovlivňuje kapacitu kolony. Kvůli nemožnosti snadného čištění není Superosa vhodná pro použití při průmyslových produkcích (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

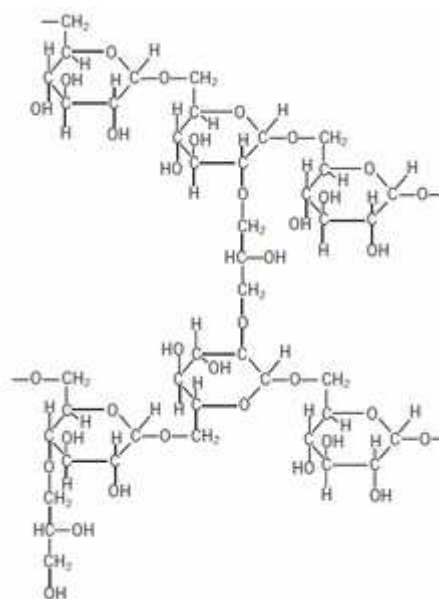


**Obr. 13:** Frakcionační rozsah pro jednotlivé typy komerčního gelu Superosa; platí pro globulární proteiny (převzato z manuálu firmy Amersham Biosciences, 2002b).

Sephadex je vhodný pro práci v módu rychlých skupinových separací, a to substancí vysokomolekulárních i nízkomolekulárních. Přípravuje se kovalentním křížovým provázáním fragmentů dextranových vláken epichlorhydrinem, jak je ukázáno na obrázku 14. Jednotlivé typy Sephadexu se liší zejména různým stupněm zesítění gelové matrice, což ovlivňuje i různý stupeň botnání a selektivitu pro různé rozsahy molekulových hmotností. Pro skupinové separace v rámci purifikace proteinů (zejména odsolení vzorku) jsou vhodné zejména 2 varianty Sephadexu s různým stupněm zesítění; jejich příklady společně se základními vlastnostmi jsou uvedeny v tabulce 3 (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

**Tab. 3:** Varianty Sephadexu lišící se stupněm zesítění, které jsou vhodné pro skupinové separace v rámci purifikace proteinů (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

produkt	frakcionační rozsah, ( $M_r$ , pro globulární proteiny)	objem gelového lože, (ml / g suchého Sephadexu)	rozsah velikostí zrn, ( $\mu\text{m}$ , v zbotnalém stavu)
Sephadex G-25 Fine	$1 \cdot 10^3 - 5 \cdot 10^3$	4 – 6	35 – 140
Sephadex G-50 Fine	$1 \cdot 10^3 - 3 \cdot 10^4$	9 – 11	40 – 160



**Obr. 14:** Částečná chemická struktura komerčního gelu Sephadex (převzato z manuálu firmy Amersham Biosciences, 2002b).

Perloza MT je obchodní název makroporézní perlové celulózy. Jedná se o regenerovanou celulózu s heterogenní, částečně mikrokrytalickou matrix, a polymerní strukturou stabilizovanou pouze vodíkovými vazbami. Vyznačuje se zejména excelentní mechanickou a chemickou odolností a vysokou kapacitou a návratností, plynoucí z vysoké porozity (podíl objemu pórů v gelové matici u většiny typů přesahuje 90%). Vysoká propustnost vrstvy gelového lože umožňuje dosažení dostatečných průtokových rychlostí při současné aplikaci poměrně nízkých tlaků. Vysoká uniformita v distribuci velikostí částic gelu má pozitivní vliv na finální rozlišení separace (médiá označená přívláskem Fine mají rozsah velikostí zrn mezi 80 a 100  $\mu\text{m}$  deklarovaný z 95%). Frakcionační rozsah gelu je široký a selektivita separace dostatečná. Základní vlastnosti jednotlivých typů Perlozy MT jsou uvedeny v tabulce 4. Na obrázku 15 je fotografie Perlozy MT 100 z pohledu pod optickým mikroskopem (převzato z <http://www.iontosorb.cz/bead.htm> a <http://www.perloza.cz/en/dmte.htm>; prohlíženo 12.4.2010). Perloza MT, stejně jako jiné sorbenty na bázi gelové matrice z perlové celulózy (pro jiné typy chromatografie, např. IEX, HIC a AC), mají široké uplatnění při purifikacích přírodních látek a jsou předmětem analytických studií, což budu prezentovat pouze stručně, formou literárních odkazů některých vědeckých prací:

Kavoosi M., Meijer J., Kwan E., Creagh A. L., Kilburn D. G., Haynes C. A. (2004) Inexpensive one-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with the family 9 carbohydrate-binding module of xylanase 10A from *T. maritima*. *J. Chromatogr. B* **807**, 87-94.

Kavoosi M., Sanaie N., Dimer F., Hubbuch J., Kilburn D. G., Haynes C. A. (2007) A novel two-zone protein uptake model for affinity chromatography and its application

to the description of elution band profiles of proteins fused to a family 9 cellulose binding module affinity tag. *J. Chromatogr. A* **1160**, 137-149.

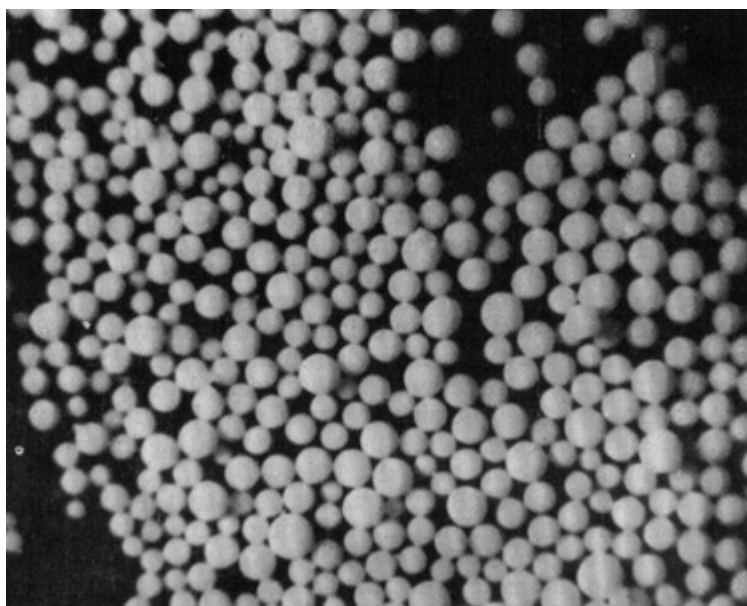
Mišťová E., Parschová H., Matějka Z. (2007) Selective Sorption of Metal Oxoanions from Dilute Solution by Bead Cellulose Sorbent. *Sep. Sci. Technol.* **42**, 1231–1243.

Safarik I., Sabatkova Z., Tokar O., Safarikova M. (2007) Magnetic Cation Exchange Isolation of Lysozyme from Native Hen Egg White. *Food Technol. Biotechnol.* **45**, 355–359.

**Tab. 4:** Základní porézní charakteristiky jednotlivých typů komerčního gelu Perlozy MT lišících se svým frakcionačním rozsahem

(převzato z <http://www.iontosorb.cz/bead.htm>; prohlíženo 12.4.2010).

produkt	frakcionační rozsah, ( $M_r$ , pro globulární proteiny)	objem gelového lože, (ml / g suché Perlozy)	střední průměr póru, (nm)
Perloza MT 50 Fine	$20 \cdot 10^3 - 70 \cdot 10^3$	3-5	7,4
Perloza MT 100 Fine	$30 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^6$	9-11	27
Perloza MT 200 Fine	$200 \cdot 10^3 - 2 \cdot 10^6$	13-16	32
Perloza MT 300 Fine	nedostupné	nedostupné	39
Perloza MT 500 Fine	$300 \cdot 10^3 - 4 \cdot 10^6$	18-21	38



**Obr. 15:** Fotografie Perlozy MT 100 z pohledu pod optickým mikroskopem (převzato z <http://www.iontosorb.cz/photos.htm>; prohlíženo 12.4.2010). Částičky nejsou tříděny podle velikosti.

#### 4.6 Přednosti GPC v purifikační strategii CIPP

Při izolaci a purifikaci proteinů se používá GPC především v módu frakcionace s vysokým rozlišením. Účelem tohoto módu je separace komponent vzorku, jejichž molekulové hmotnosti se příliš neliší. Nejlepších výsledků bývá dosaženo se vzorky, které obsahují pouze několik komponent s dostatečně rozdílnou  $M_r$ , nebo se vzorky, které již byly částečně purifikovány chromatografickými technikami založenými na odlišném principu separace (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

Frakcionace s vysokým rozlišením dobře vyhovuje pro poslední fázi CIPP, kterou je čištění. Objem vzorku vstupujícího do této fáze je totiž již redukován a aplikace menších objemů na GPC kolonu pak má pozitivní vliv na rychlost a rozlišení separace. Proto je také výhodné zařazovat GPC krok po kterýchkoli technikách, které vzorek zakoncentrují (IEX, HIC, AC). Prakticky lze GPC bezprostředně zařazovat po libovolných chromatografických krocích, neboť má velmi vysokou toleranci k parametrům vzorku bez důsledků na finální separaci (produkt může být rozpuštěn v libovolném pufru, tolerované rozsahy pH a iontové síly bývají vysoké v závislosti na použitém gelu). Prostřednictvím GPC lze například separovat monomery od agregátů (čehož se těžko dosahuje kteroukoli jinou chromatografickou technikou) a produkt přitom může být převeden do pufru vhodného pro následný purifikační krok, analýzu nebo uskladnění. Média pro finální čištění produktu by měla poskytovat nejvyšší možné rozlišení. První volbou pro purifikace v laboratorním měřítku bývá Superdex, v průmyslovém měřítku pak Superdex prep grade (podrobnosti v kapitole 4.5) (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

GPC je také často používána pro odsolení a výměnu pufru během přípravy vzorku pro CIPP, příp. pro následná přečištění proteinového produktu od nízkomolekulárních nečistot. Obvykle se v těchto případech jako gelové filtrační médium používá Sephadex G-25 a objemy aplikovaného vzorku mohou dosahovat až 30% objemu gelového lože (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002b).

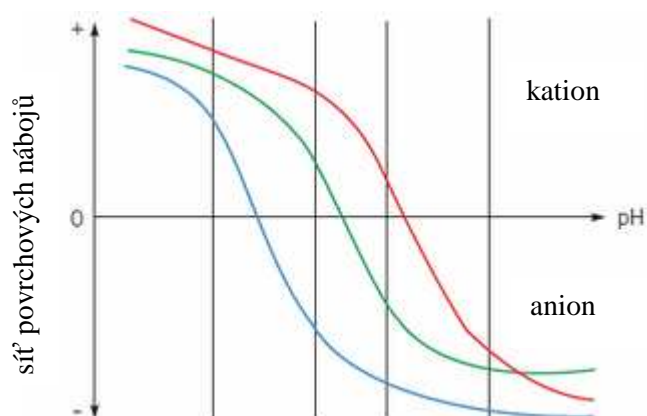
## 5. Techniky IEX, HIC a AC při purifikaci proteinů

### 5.1 Ionexová chromatografie (IEX)

#### 5.1.1 Princip techniky

Molekuly proteinů obsahují množství disociovatelných slabě kyselých a bazických skupin o různých hodnotách kyselých disociačních konstant (vyjádřených nejlépe jako  $pK_a$ , tedy hodnoty pH, při kterých je kyselá skupina disociována z 50%). Tyto skupiny mohou být exponovány na povrchu molekuly, kde formují tzv. síť povrchových nábojů, nebo uvnitř molekuly, kde také přispívají k výslednému náboji proteinu. Nábojové vlastnosti proteinů jsou závislé na hodnotě pH prostředí. Pokud vzrůstá pH, dochází ke změnám ve stupni disociace jednotlivých ionizovatelných skupin proteinu a jeho výsledný náboj postupně přechází od kladného k zápornému. Pro každý protein existuje unikátní závislost výsledného náboje na hodnotě pH, jak je ukázáno na obrázku 16 (manuál firmy Amersham Biosciences, 2004).

Z uvedených poznatků čerpá IEX, která separuje proteiny na základě diferencí v jejich síti povrchových nábojů. Uplatňuje se hustota a povrchová distribuce náboje, ale zejména výsledný náboj molekuly proteinu. Jednotlivé nabité proteiny jsou vystavovány různým stupňům reverzibilní interakce s opačně nabitým ionexovým médiem, kterou lze kontrolovat hodnotou pH, příp. iontovou silou mobilní fáze, aby byly molekuly specifického proteinu vázány nebo eluovány a separování tak bylo dosaženo. Pokud je pH prostředí nad hodnotou *izoelektrického bodu*  $pI$  určitého proteinu, mají jeho molekuly výsledný záporný náboj a budou se vázat na pozitivně nabité médium a analogicky při pH prostředí pod hodnotou  $pI$  proteinu mají jeho molekuly celkový kladný náboj a váží se pouze na negativně nabité médium (manuál firmy Amersham Biosciences, 2004).



**Obr. 16:** Teoretické titrační křivky tří proteinů, které naznačují možné tendence změn v síti povrchových nábojů při vzrůstajícím pH prostředí (převzato z manuálu firmy Amersham Biosciences, 2004).

### 5.1.2 Stacionární fáze

Stacionární fázi představuje zpravidla tuhý sorbent označovaný jako ionex (ionexové médium). Média vhodná pro chromatografii proteinů sestávají z gelové matrice sférických částic substituovaných ionizovatelnými funkčními skupinami, které determinují jeho náboj a na něž jsou elektrostaticky vázány protiionty. Tyto protiionty jsou za určitých podmínek schopné se z vazby uvolnit a zaměnit se za jiný iont se souhlasným nábojem. Médium je tedy schopno vyměňovat ionty s kapalnými fázemi. Pokud jsou kovalentně vázané skupiny nabitě kladně a vyměnitelný iont je aniont, takové ionexy se nazývají anexy. Analogicky, nesou-li skupiny záporný náboj a vyměnitelný iont je kationt, takové ionexy se nazývají katexy. Používají se hydrofilní matrice a nejčastěji také makroporézní, aby poskytovaly co nejvyšší obsah vnitřního povrchu. Tento vnitřní povrch částic matrice totiž obsahuje většinu z efektivních nabitých skupin iontoměničů a separované molekuly musí být schopny do něj proniknout. Póry částic by také měly být dostatečně velké, není-li současně zamýšlena separace na principu molekulového síta. Ukázalo se, že nejvhodnějšími materiály pro přípravu gelové matrice pro IEX jsou polysacharidy jako celulóza, agaróza nebo dextran. Interakce proteinů s takovými ionexy je komplexního charakteru, elektrostatické síly však převládají (manuál firmy Amersham Biosciences, 2004; Anzenbacher & Kovář, 1986).

### 5.1.3 Průběh separace

IEX patří mezi tzv. „binding“ techniky, kdy po aplikaci vzorku dochází k navázání cílových proteinů na kolonu a jejich efektivnímu zakoncentrování. Chromatografická kolona se naplní ionexovým médiem a zformuje gelové lože, analogicky jako v případě GPC. Tato vrstva je poté ekvilibrována vhodným startovním eluentem, jehož pH a iontová síla se volí takové, aby se po nanesení vzorku cílový protein vázal na sloupec ionexu co nejpevněji a současně bylo eluováno co nejvíce kontaminantů. Poté je změněno pH, častěji však iontová síla eluentu, aby byly zadržené proteiny uvolněny a eluovány. Pokud vzroste iontová síla eluentu, ionty solí kompetují s navázanými molekulami proteinů o nabitě skupiny na povrchu média a jeden nebo více proteinů tak eluuje z kolony. Čím větší je náboj na povrchu proteinu, tím vyšší iontová síla je zapotřebí k jeho eluci. Kontrolovanými změnami iontové síly za použití různých forem gradientu mohou být proteiny eluovány diferencně v jednotlivých přečištěných, zakoncentrovaných frakcích. Provedení může být i obrácené, tzn. navázáním co nejvíce kontaminantů na kolonu a současná eluce cílového proteinu (manuál firmy Amersham Biosciences, 2004).

#### **5.1.4 Volba chromatografického média**

Důležitým předpokladem pro volbu média je znalost elektrických vlastností cílového proteinu a kontaminantů ve vzorku. V ideálním případě by měly být k dispozici titrační křivky a hodnoty  $pI$  cílového produktu i kontaminantů ve směsi, příp. další experimentálně zjištěné strukturální charakteristiky. V závislosti na použitém médiu a pH, při kterém se separace uskuteční, nabízí IEX technika různou selektivitu. Pro kyselé a neutrální proteiny se obvykle používají anezy a pro bazické a neutrální proteiny katexy. Pro většinu purifikačních procedur je vhodné zvažovat nejprve silné ionexy, které dovolují práci v širokém rozmezí pH, protože je v něm zachován potřebný stupeň disociace nabitých skupin média. Důležitým faktorem pro výběr média jsou také vlastnosti samotné gelové matrice, jejichž vliv na separaci je přibližně analogický jako při GPC (viz kapitola 4.4.2). Některé vlivy matrice na separaci osobitě pro IEX jsou uvedeny v následujícím odstavci (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001; manuál firmy Amersham Biosciences, 2004).

Vysoká porozita poskytuje značný prostor pro interakci a navázání cílových proteinů a tím i vysokou kapacitu. Přesto, je-li extrémně vysoké rozlišení separace důležitější než vysoká kapacita kolony, bývají preferovány neporézní matrice, aby se zabránilo difúzním efektům. Takovéto matrice bývají vyrobeny na bázi polystyrenu. Vysoká fyzikální stabilita mimo jiné zajišťuje konstantní objem gelového lože navzdory extrémním změnám pH a iontové síly eluentu, čímž se zvyšuje reprodukovatelnost a zároveň odpadá potřeba přeplňování kolony v krátkých časových intervalech (manuál firmy Amersham Biosciences, 2004).

#### **5.1.5 Další faktory ovlivňující separaci**

Při IEX není důležitý objem aplikovaného vzorku, ale koncentrace proteinu, který má být navázán na sloupec ionexu. Toto množství proteinu by nemělo přesáhnout celkovou adsorpční kapacitu kolony. Pro optimální rozlišení separace s gradientovou elucí by mělo být použito množství odpovídající maximálně 30% celkové adsorpční kapacity kolony. Pro zajištění efektivního navázání proteinu by aplikovaný vzorek měl mít podobné pH a iontovou sílu jako startovní eluent při IEX. Kromě selektivity média, parametrů gelové matrice a množství aplikovaného proteinu závisí finální rozlišení ionexové separace na podmínkách navázání a eluce proteinu, parametrech kolony, aplikované průtokové rychlosti a hustotě náplně kolony (viz kapitola 4.4.2). Čím nižší je strmost gradientové eluce, tím vyššího se dosáhne rozlišení. (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001; manuál firmy Amersham Biosciences, 2004).



### 5.1.6 IEX v purifikační strategii CIPP

IEX hraje významnou a flexibilní roli ve většině multi-krokových purifikačních procedurách. Je možné zařadit ji více než jednou v konkrétním schématu, a to ve všech třech fázích CIPP, neboť variabilita selektivity je možná kromě volby média i modifikací pH vzorku během purifikace, čímž dochází k pozměnění elektrických vlastností jednotlivých komponent. IEX může být efektivně použita v módu s nízkým rozlišením během fáze záchytu (rychlá separace se skokovou změnou podmínek), ale i v módu s vysokým rozlišením během fáze čištění (pomalejší separace s aplikací gradientové eluce). Ionexová média pro fázi záchytu by měla poskytovat především vysokou rychlost a kapacitu, ale současně je nutné řídit se podle množství purifikovaného proteinu a charakteru vzorku. Ionexová média pro fázi intermediální purifikace musí poskytovat hlavně vysokou kapacitu a rozlišení při současném zachování uspokojivé rychlosti zpracování vzorku. Obvykle je nutné použít gradientovou eluci a pro dosažení optimálních výsledků také pečlivě zvážit tu nejvhodnější selektivitu. Ionexová média pro fázi čištění se musí vyznačovat tím nejvyšším možným rozlišením (manuál firmy Amersham Biosciences, 2004).

### 5.2 Chromatofokusace (CF)

CF je modernější variantou techniky IEX. Ve svém principu je velmi podobná technice IEX, ale proteiny jsou separovány pouze podle diferencí v jejich izoelektických bodech, a to s velmi vysokým rozlišením (lze od sebe rozdělit dva proteiny lišící se svými hodnotami  $pI$  o pouhých 0,05 jednotek pH). Tato technika se vyznačuje hlavně specifickým provedením, kdy je generován gradient pH, a to samovolně přímo na sloupci ionexu v chromatografické koloně, zatímco v případě běžné IEX je využíváno gradientové eluce. CF vyžaduje specifický typ ionexového média a elučního pufru, které bývají nákladnější než běžné materiály pro IEX a vyznačují se lineárním průběhem titrační křivky v definovaném rozmezí pH (v daném rozmezí mají stále stejnou pufráční schopnost) (Bílková & Králová, 1997; manuál firmy Amersham Biosciences, 2004).

V purifikační strategii CIPP nalézá CF uplatnění především během fáze čištění, kdy je k dispozici částečně purifikovaný produkt s malým množstvím kontaminantů ve vzorku. Zvláště vhodná je tehdy, pokud tyto kontaminanty již není možné odstranit prostřednictvím jiných chromatografických technik. Naopak není vhodná pro izolaci proteinů, které irreverzibilně precipitují v nebo blízko jejich  $pI$ , protože hrozí jejich precipitace přímo na koloně, přesáhnou-li určitou lokální koncentraci (manuál firmy Amersham Biosciences, 2004).

## 5.3 Hydrofobní chromatografie (HIC)

### 5.3.1 Princip techniky

Výsledná 3D struktura proteinové molekuly v roztoku je výsledkem intramolekulárních interakcí, stejně jako interakcí s molekulami obklopujícího rozpouštědla. V případě samotného proteinu závisí vše na sekvenci jeho postranních aminokyselinových řetězců, které mohou být nepolární (hydrofobní), polární, příp. polární s nábojem. Příkladně ve vodném prostředí se protein snaží maximalizovat omezení kontaktu svých hydrofobních postranních skupin s molekulami vody, čehož nejnáze dosáhne lokalizací těchto skupin dovnitř molekuly, kde mohou různým způsobem společně asociovat. Lze tvrdit, že finální konformační struktura molekuly proteinu je jakýmsi termodynamickým kompromisem, který nejlépe vyhovuje prostředí obklopujícímu tuto molekulu (manuál firmy GE Healthcare, 2006).

HIC separuje proteiny na základě diferencí v jejich povrchové hydrofobicitě prostřednictvím reverzibilní interakce mezi těmito proteiny a hydrofobním povrchem HIC média. Tato interakce má charakter fyzikální adsorpce, při níž se uplatňují zejména disperzní van der Waalsovy síly (slabé mezimolekulární síly soudržnosti mezi nepolárními částmi molekul). Separace jednotlivých proteinů je umožněna rozdíly v architektuře jejich povrchu (rozložení povrchových postranních řetězců). Není žádná universálně akceptovaná teorie na přesné mechanismy uplatňující se při HIC, ale existuje řada předpokladů plynoucích z experimentálních studií (manuál firmy GE Healthcare, 2006).

Klíčové ovlivnění selektivity i kapacity separace představuje druh a koncentrace iontů solí v prostředí, v němž je separace uskutečněna. Síla hydrofobní interakce se obecně zvyšuje se vzrůstající iontovou silou eluentu, ale závisí také na charakteru iontů iontovou silou generujících, přičemž je třeba vyhýbat se chaotropním iontům (manuál firmy GE Healthcare, 2006).

### 5.3.2 Stacionární fáze

Stacionární fázi představuje zpravidla tuhý nepolární adsorbent (HIC médium). Média vhodná pro chromatografii proteinů sestávají z gelové matrice sférických částic substituované ligandy, obsahujícími alkylové nebo arylové skupiny. Tyto ligandy determinují hydrofobní vlastnosti média. Používají se matrice s vlastnostmi obdobnými jako při IEX, tedy hydrofilní a makroporézní. Pouze v případech separace proteinů s větší částí povrchu hydrofobní povahy je vhodné použít hydrofobnější matrice, např. na bázi kopolymeru polyhydroxyethylmethakrylátu. Novodobá HIC média jsou připravována na bázi syntetických polymerů nebo agarosy, aby splňovala požadavky kladené na fyzikální a chemickou stabilitu, vysokou kapacitu a přesně definovatelné velikosti zrn (manuál firmy GE Healthcare, 2006; Anzenbacher & Kovář, 1986).

### 5.3.3 Průběh separace

HIC patří stejně jako IEX mezi tzv. „binding“ techniky, kdy po aplikaci vzorku dochází k navázání cílových proteinů na kolonu a jejich efektivnímu zakoncentrování. Chromatografická kolona se naplní HIC médiem a zformuje gelové lože, analogicky jako v případě GPC. Tato vrstva je poté ekvilibrována vhodným startovním eluentem, který zpravidla obsahuje poměrně vysokou koncentraci solí (nejčastěji 1 – 3 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nebo NaCl). Typ použité soli a její koncentrace se volí takové, aby po nanesení vzorku na kolonu došlo ke kvantitativní adsorpci cílového proteinu na HIC médium, a současně bylo eluováno co nejvíce méně hydrofobních kontaminantů. Poté je snížena iontová síla eluentu a zadržené komponenty eluují v pořadí podle vzrůstající hydrofobicity. Kontrolovanými změnami iontové síly za použití různých forem gradientu mohou být proteiny eluovány diferenčně v jednotlivých přečištěných, zakoncentrovaných frakcích. Alternativně lze také zaměnit některý iont generující iontovou sílu eluentu za jiný s nižší vysolovací schopností, nebo modifikovat složení samotného elučního rozpouštědla za účelem snížení polaroty prostředí. Jsou i další, méně používané způsoby eluce látek. Provedení HIC může být i obrácené, tzn. navázáním co nejvíce kontaminantů na kolonu a současná eluce cílového proteinu (manuál firmy GE Healthcare, 2006; Anzenbacher & Kovář, 1986).

### 5.3.4 Volba chromatografického média

Důležitým předpokladem pro volbu média je znalost hydrofobních vlastností cílového proteinu a kontaminantů ve vzorku. V ideálním případě je experimentálně prostudováno chování cílového produktu a dalších složek směsi na zamýšleném médiu za daných podmínek. Zásadní charakteristikou každého HIC média je jeho stupeň hydrofobicity. Problém může nastat např. při adsorpci značně hydrofobních proteinů na vysoce hydrofobní ligandy média, kdy vznikne natolik pevná vazba, že jejich následná eluce vyžaduje příliš extrémní podmínky. Selektivita separace závisí kromě typu média také na druhu a koncentraci solí ve startovním eluentu. Proto je nutné dbát na to, aby zvolené médium poskytovalo uspokojivé rozlišení a kapacitu při rozumně nízké iontové síle prostředí. Důležitým faktorem pro výběr média jsou také vlastnosti samotné gelové matrice, jejichž vliv na separaci je přibližně obdobný jako při IEX (viz kapitola 5.1.4), neboť jak IEX tak HIC patří mezi „binding“ techniky (manuál firmy Amersham Biosciences, 2001; manuál firmy GE Healthcare, 2006).

### 5.3.5 Další faktory ovlivňující separaci

Pro objem vzorku a množství proteinu aplikovaného na kolonu při HIC platí totéž, jako při IEX (viz kapitola 5.1.5). Příprava vzorku pro HIC vyžaduje minimální úsilí a týká se zajištění

dostatečné koncentrace přijatelného druhu soli a přímého upravení pH na hodnotu podobnou pH startovního eluentu. Také by měly být eliminovány chaotropní reagentie ze vzorku (výměnou pufru), např. po iniciální solubilizaci cílového proteinu, protože chaotropní látky jako močovina nebo guanidinydrochlorid inhibují hydrofobní interakci. Finální rozlišení hydrofobní separace dále závisí na stejných faktorech, jako v případě IEX (viz kapitola 5.1.4) (manuál firmy GE Healthcare, 2006).

### **5.3.6 HIC v purifikační strategii CIPP**

HIC je velmi vhodná technika pro použití po takovém purifikačním kroku, ve kterém bylo dosaženo vysoké koncentrace solí ve vzorku, např. po precipitaci kontaminantů síranem amonným ve fázi záchytu CIPP, nebo bezprostředně po IEX separaci ve fázi intermediální purifikace. HIC podobně jako IEX může být efektivně použita pro rychlou separaci se skokovou změnou podmínek během fáze záchytu, nebo pro pomalou separaci s využitím gradientové eluce během fáze čištění. HIC média pro fázi záchytu by měla poskytovat především vysokou rychlost a kapacitu, pro fázi intermediální purifikace vysokou kapacitu a rozlišení, pro fázi čištění je prioritou to nejvyšší možné rozlišení. Zejména ve fázi čištění je nutné volit médium obezřetně, s nejnižší možnou zrnitostí, a experimentálně optimalizovat operační podmínky (především průběh gradientové eluce), aby bylo dosaženo dostatečného rozlišení (manuál firmy GE Healthcare, 2006).

### **5.4 Chromatografie na reverzních fázích (RPC)**

RPC stejně jako HIC separuje proteiny na základě různě silných reverzibilních interakcí mezi hydrofobními místy na povrchu těchto biomolekul a hydrofobními povrchy chromatografického sorbentu. V praxi jsou však obě techniky velmi odlišné. Povrch RPC média je obvykle hydrofobnější než povrch HIC média, což vede k tvorbě silnějších interakcí a k nutnosti použít extrémnější podmínky k eluci navázaných látek (např. použití organických rozpouštědel a jejich různých směsí namísto vody). Takové podmínky však pro většinu proteinů představují riziko irreverzibilní denaturace. Proto se RPC pro purifikaci nativních proteinů nedoporučuje, je-li návratnost biologické aktivity a molekulární 3D struktury neuspokojivá (a zpětná konformační změna již není možná). Nicméně v případech, kdy je cílový protein dostatečně odolný k organickým rozpouštědlům (malé kompaktní proteiny), se může tato technika stát nezastupitelnou k jeho finálnímu přečištění, protože poskytuje extrémně vysokou selektivitu a rozlišení. Je velmi flexibilní v možnostech variability operačních podmínek. Využívá se široce pro analýzu kontroly čistoty produktu (manuál firmy GE Healthcare, 2006; manuál firmy Amersham Biosciences, 2001).

## 5.5 Afinitní chromatografie (AC)

### 5.5.1 Princip

Každá biomakromolekula (tedy i protein) má specifickou schopnost rozpoznat jinou, obvykle menší, molekulu, označovanou jako ligand. Taková bioselektivní interakce mezi ligandem a cílovou molekulou může být výsledkem působení elektrostatických nebo hydrofobních interakcí, van der Waalsových sil a/nebo vodíkových vazeb (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002a). Především však záleží na detailní struktuře vazebného místa makromolekuly pro ligand; vazebné místo je do značné míry stericky komplementární k molekule ligandu (Anzenbacher & Kovář, 1986).

AC separuje proteiny na základě bioselektivní reverzibilní interakce mezi proteinem (nebo skupinou proteinů) a imobilizovaným ligandem, tzv. afinantem, navázaným kovalentně na povrchu chromatografického nosiče. Afinant musí být schopen za daných podmínek specificky adsorbovat pouze cílové proteinové molekuly, které musí být následně možno uvolnit po takové změně podmínek, která nemá za následek nevratnou ztrátu 3D struktury proteinu. Pomocí techniky AC tedy lze izolovat libovolný protein, pokud je k dispozici vhodný afinant. Běžně užívané afinanty pro příslušné skupiny proteinů jsou následující:

- *substrát, koenzym* nebo *inhibitor* pro enzymy
- *protilátky* pro proteinové antigeny
- *antigeny* pro protilátky
- *hormon* nebo *léčivo* pro receptorové proteiny na membránách nebo plazmatické transportní proteiny
- *oligosacharidy* pro lektiny
- *lektiny* pro glykoproteiny
- *nukleové kyseliny* pro proteiny vážící nukleové kyseliny
- *kovové ionty* pro rekombinantní proteiny s His-TAG koncem nebo nativní proteiny s histidinovými, cysteinovými a/nebo tryptofanovými rezidui lokalizovanými na jejich povrchu (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002a; Anzenbacher & Kovář, 1986)

### 5.5.2 Stacionární fáze

Stacionární fázi představuje afinitní adsorbent (afinitní médium). Médium sestává z gelové matrice sférických částic substituované afinantem. Tento afinant je obvykle vázán nepřímo přes raménko (z angl. „spacer“), které usnadňuje bioselektivní interakci eliminací vlivů sterické zábrany. Použitý afinant determinuje vazebné vlastnosti média. Matrice tvoří pouze inertní nosič a musí se vyznačovat především extrémně nízkým stupněm nespecifických interakcí s molekulami separovaných látek. Nejčastěji používané matrice pro techniku AC jsou

Sepharosy na bázi agarózy, která obecně poskytuje dobré průtokové vlastnosti a vysoký obsah dobře přístupného povrchu. Dnes existuje celá řada těchto matric, vyhovujících konkrétním aplikacím. Polysacharidové matrice navíc tvoří ideální platformu pro kovalentní substituci (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002a; Anzenbacher & Kovář, 1986).

### **5.5.3 Průběh separace**

Chromatografická kolona je naplněna afinitním médiem, které se ekvilibruje startovním eluentem, generujícím podmínky vhodné pro navázání cílového proteinu (podmínky jsou velmi variabilní pro konkrétní aplikace). AC patří mezi „binding“ techniky. Obvykle je možné nanášet na kolonu i velmi složité směsi látek. Eluce navázaného cílového proteinu v izolované frakci je dosaženo buď specificky za použití kompetitivního ligandu, nebo nespecificky změnou pH, iontové síly nebo polaritě eluentu. Dosahuje se vysokého stupně přečištění cílového proteinu, často až 1000 násobného (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002a; Anzenbacher & Kovář, 1986).

### **5.5.4 Volba chromatografického média**

Důležitým předpokladem pro volbu média je znalost přibližné síly interakce cílového proteinu a kontaminantů ve vzorku s plánovaným afinantem. Je třeba mít na paměti, že vazba proteinu na imobilizovaný ligand bývá zpravidla slabší než na ligand volný. V ideálním případě je experimentálně zjištěna disociační konstanta komplexu protein – ligand zakotvený daným způsobem. Nejjednodušší možností je zakoupení komerčně přeplněné kolony, je-li v nabídce vhodné afinitní médium, zejména s potřebným afinantem. Odpadá tak potřeba optimalizace procesu a je zajištěna vysoká reprodukovatelnost. Další variantou je zakoupení aktivovaného chromatografického nosiče, který lze snadno substituovat potřebným ligandem. Pokud k dispozici potřebný ligand dosud není, měly by se zvážít nejprve alternativní separační techniky (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002a; Anzenbacher & Kovář, 1986).

### **5.5.5 Další faktory ovlivňující separaci**

V obecné rovině platí pro objem vzorku a množství proteinu aplikovaného na kolonu totéž, jako při IEX a HIC. Při přípravě vzorku pro AC je nutné odstranit kontaminanty, které by se mohly nespecificky vázat na kolonu (např. lipidy), protože by byla snížena její kapacita pro cílový protein. Vzorek by měl být prostý veškerých pevných nečistot a reagentů, které mohou poškodit zakotvený afinant a znehodnotit tak separační vlastnosti afinitního média, které bývá citlivější než v případě ostatních chromatografických technik. Ostatní faktory, jako je průtoková rychlost a parametry kolony, závisí na konkrétních aplikacích. Rychlost průtoku eluentu je

limitována hlavně nutností zachování dostatečné efektivity bioselektivní interakce. Pro techniku AC se používají kolony se specifickými rozměry (krátké a široké), s objemem náplně odpovídajícím množství zpracovávaného produktu (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002a; Anzenbacher & Kovář, 1986).

#### **5.5.6 AC v purifikační strategii CIPP**

Díky vysoké selektivitě AC je možno touto technikou izolovat i malé množství cílového proteinu nebo kontaminantu (např. proteasy) od velkého množství a počtu ostatních složek směsi. Koncentrační efekt umožňuje zpracovávat velké objemy vzorku. AC umožňuje excelentně odlišit nativní formu od denaturovaných forem téhož proteinu. Ve většině případů pak stačí pouze jediný sekundární krok (nejčastěji GPC) k odstranění zbylých menších molekul a agregátů a dosažení požadovaného stupně čistoty. V řadě případů se tak dosáhne výrazného ušetření času a práce, než kdyby byla aplikována méně selektivní multi-kroková procedura zahrnující všechny 3 fáze CIPP. Pouze při finálním čištění produktu je zařazení techniky AC nevhodné. Naopak mezi běžně prováděné operace patří purifikace polyklonálních imunoglobulinů (velmi častá je izolace různých podtříd IgG prostřednictvím imobilizovaného bakteriálního proteinu A nebo proteinu G) nebo rekombinantních proteinů s His-TAG koncem (manuál firmy Amersham Biosciences, 2002a).

## **PRAKTICKÁ ČÁST**



## 6. Metodika

### 6.1 Materiály a chemikálie

#### 6.1.1 Gelové filtrační médium

Byla použita makroporézní perlová celulosa pod obchodními názvy Perloza MT 300 a Perloza MT 500. Tato média, vyvinuta firmou Iontosorb, jsou určena speciálně pro separace biomolekul (podrobnosti v kapitole 4.5). Média byla dodána firmou Iontosorb jako vlhký „předbotnalý“ materiál s přísadou 0,02 % azidu sodného (stabilizátor proti bakteriím). Zrnitost, průtokové charakteristiky, informace o porozitě a stabilitě obou použitých médií jsou uvedeny v tabulce 5.

**Tab. 5:** Přehled vlastností Perlozy MT 300 a Perlozy MT 500 týkajících se zrnitosti, průtokových charakteristik, porozity a stability (převzato z <http://www.iontosorb.cz/bead.htm>; prohlíženo 5.4.2010).

vlastnost	Perloza MT 300	Perloza MT 500
rozsah velikosti zrn <sup>(1)</sup>	100 – 250 $\mu\text{m}$ (ozn. Medium)	100 – 250 $\mu\text{m}$ (ozn. Medium)
propustnost vrstvy gelového lože <sup>(2)</sup>	nedostupné	250 $\text{ml}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{hod}^{-1}\cdot\text{bar}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$
maximální objemová průtoková rychlost <sup>(3)</sup>	nedostupné	1,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
tlaková odolnost	nedostupné	1,0 – 1,5 bar
objem pórů min.	94%	95%
střední průměr póru	39 nm	38 nm
objem sítě nabotnalých zrn <sup>(4)</sup>	7,32 $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$	7,43 $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$
objem vrstvy	nedostupné	18 – 21 $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$
teplotní rezistence <sup>(5)</sup>	120°C	120°C
stabilita v rozsahu pH	1,0 – 14,0	1,0 – 14,0
iontová síla prostředí max.	10 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

<sup>(1)</sup> obsah částic v deklarovaném rozmezí je zaručen v min. množství 95,0%

<sup>(2)</sup> pro destilovanou vodu při 20°C

<sup>(3)</sup> pro velikost zrn v rozsahu 50-80  $\mu\text{m}$  a gelové lože 60 x 1 cm

<sup>(4)</sup> nezahrnuje intersticiální prostory

<sup>(5)</sup> v mokřém stavu při pH 7,0 autoklávováno po dobu 60 min

### 6.1.2 Mobilní fáze pro GPC

Mobilní fázi představoval K–fosfátový pufr pH 7.0; 0,2 M vodný roztok. Pufr byl průběžně připravován do 2 l zásobních lahví rozpuštěním vypočítaných navážek dihydrogenfosforečnanu draselného (Lachema, ČR) a hydrogenfosforečnanu didraselného (Lachema, ČR) v menším množství destilované vody a následným doplněním vodou do 2000 ml. Tento pufr byl používán také jako rozpouštědlo pevných substancí při přípravě vzorků pro GPC.

### 6.1.3 Markery molekulových hmotností pro GPC

Pracovalo se s následujícími globulárními proteinovými MW standardy (standardy molekulových hmotností, z angl. „molecular weight standards“) o deklarované čistotě p.a.:

albumin, z hovězího séra (SIGMA-Aldrich, USA),  $M_r$  66 000

alkoholdehydrogenasa, z kvasinky (SIGMA-Aldrich, USA),  $M_r$  150 000

apoferritin – podjednotka, z koňské sleziny (MP Biomedicals, USA),  $M_r$  20 000

$\beta$ -amylasa, z rostliny *Ipomoea batatas* (SIGMA-Aldrich, USA),  $M_r$  200 000

cytochrom C, z koňského srdce (MP Biomedicals, USA),  $M_r$  12 400

glukosaoxidas, z houby *Aspergillus niger* (SIGMA-Aldrich, USA),  $M_r$  160 000

karboanhydrasa, z hovězího séra (SIGMA-Aldrich, USA),  $M_r$  29 000

katalasa, z hovězích jater (SIGMA-Aldrich, USA),  $M_r$  240 000

myoglobin, z koňského srdce (SIGMA-Aldrich, USA),  $M_r$  17 000

thyroglobulin, z hovězí štítné žlázy (SIGMA-Aldrich, USA),  $M_r$  669 000

trypsin, z hovězího pankreatu (MP Biomedicals, USA),  $M_r$  23 000

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

Všechny uvedené substance byly dodány ve formě práškových lyofilizátů. SIGMA-Aldrich komerčně dodala některé z těchto standardů v sadě, určené speciálně pro GPC. Hodnoty aproximativní relativní molekulové hmotnosti  $M_r$  jednotlivých proteinových MW markerů byly získány z informací dodavatele.

### 6.1.4 Ostatní chemikálie

azid sodný (Lachema, ČR), pro sanitaci kolony

## **6.2 Použité přístrojové vybavení**

### **6.2.1 Nízkotlaký kapalinový chromatograf**

Pracovalo se na dvou sestavených nízkotlakých kapalinových systémech. Aparatury byly sestaveny z následujících součástí:

#### sestava A

- peristaltická pumpa P-3 (Pharmacia, USA)
- UV detektor UV-1 a kontrolní jednotka (Pharmacia, USA)
- liniový zapisovač LKB 2210 (GE Healthcare, United Kingdom)

#### sestava B

- ventil selekce průtoku V9-8 (Bio-Rad, USA)
- peristaltická pumpa P-1 (Pharmacia, USA)
- UV detektor UV-1 a kontrolní jednotka (Pharmacia, USA)
- liniový zapisovač REC112 (GE Healthcare, United Kingdom)

Kromě zapisovače byly všechny komponenty umístěny v chladících komorách (Snaige, Litva).

### **6.2.2 Chromatografické kolony**

Byly použity 2 skleněné kolony:

#### kolona A

- Kontes Flex Column (50 x 2,5 cm; SIGMA-Aldrich, USA)

#### kolona B

- Kontes Flex Column (30 x 1 cm; SIGMA-Aldrich, USA)

### **6.2.3 Standardní laboratorní vybavení**

- digitální předvážky (OHAUS, USA)
- analytické váhy (Sartorius, Německo)
- elektromagnetická míchačka RCT-Basic (IKA, Německo)
- vortex SA8 (Stuart Scientific, Velká Británie)
- membránová vývěva (KNF Neuberger, USA)
- digitální pH-metr (WTW, Německo)
- sada nastavitelných pipet 10, 20, 100, 200, 1000 a 5000 µl (Eppendorf, Německo)
- mikrozkumavky 1,5 ml (Eppendorf, Německo)
- běžné laboratorní sklo a pomůcky

## **6.3 Provedení gelové filtrační chromatografie**

### **6.3.1 Příprava chromatografického nosiče**

Objemové množství předbotnalé Perlozy MT 300 nebo Perlozy MT 500 přibližně odpovídající celkovému objemu přichystané chromatografické kolony bylo vsypáno a rozptýleno v nadbytku destilované vody (pro kolonu A bylo odměřeno 250 ml média a pro kolonu B 25 ml média). Nosič byl ponechán asi půl hodiny v klidu při laboratorní teplotě, dokud neutvořil zřetelný sediment. Pro přečištění nosiče byla z povrchu sedimentovaného gelu dekantována přebytečná kapalina a gel byl znovu rozptýlen ve vodě. Odvzdušnění média bylo dosaženo přelitím gelové suspenze do odsávací baňky a evakuací vnitřního prostoru pomocí připojené membránové vývěvy za stálého jemného mísení suspenze po dobu asi 10 minut. Poté byl nosič ponechán sedimentovat a přebytečná kapalina opětovně dekantována.

### **6.3.2 Naplnění a ekvilibrace chromatografické kolony**

Chromatografická kolona s nasazeným průtokovým adaptérem byla uchycena do stojanu a zvlhčena mobilní fází. Nosič byl rozptýlen v menším množství mobilní fáze a převeden do kolony, která byla následně promývána mobilní fází rychlostí  $1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  prostřednictvím pumpy. Po zformování gelového lože byl jeho povrch upraven tak, aby byl rovný a lokalizován přibližně 3 cm pod svrškem kolony. Nakonec byla provedena kontrola ekvilibrace kolony mobilní fází měřením pH eluátu vytékajícího z kolony na pH-metru. V případě hodnoty pH 7.0 byla kolona připravena k separaci vzorků.

### **6.3.3 Příprava vzorků pro GPC**

Vzorky pro analýzu byly připraveny navážením lyofilizátů MW markerů a následným rozpuštěním navážek v pufru, použitém jako mobilní fáze pro GPC. Rozpuštění bylo dosaženo obvykle mírným vortexováním po dobu několika minut s následnou vizuální kontrolou. Každý vzorek byl roztokem jediného markeru, všechny byly připravovány do mikrozkušavek v objemu 2 ml a použitá koncentrace byla  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

### **6.3.4 Měření retence MW markerů a zjišťování mrtvého objemu kolony**

Retenční čas každého MW markeru byl stanoven v samostatném průběhu. Mrtvý objem kolony byl vypočítán z retenčního času Blue Dextranu, který byl stanoven stejným způsobem jako v případě proteinových MW markerů.

Vzorky byly dávkovány na kolonu A nebo B v objemu 2 ml, a to buď ručně nebo nasávány přes ventil selekce průtoku. Průtok mobilní fáze byl konstantní, aplikovaná objemová

průtoková rychlost v rozmezí 2,0 – 2,6 ml.min<sup>-1</sup>. Teplota aparatur v chladících komorách byla udržována na 3°C. Signál byl snímán UV detektorem UV-1 s průtočnou kyvetou při vlnové délce 280 nm. Liniový zapisovač LKB 2210 nebo REC112 registroval analogový záznam elučního profilu při rychlosti pohybu papíru 0,5 mm.min<sup>-1</sup> nebo 0,1 mm.min<sup>-1</sup>. Eluát byl při každém měření jímán do zvláštních nádob, z nichž byl následně pomocí odměrných válců orientačně zjišťován retenční objem pro kontrolu rychlosti průtoku. Změřená data byla vyhodnocena manuálním zpracováním elučního profilu vysunutého na papírovém pásu.

### **6.3.5 Stabilizace gelového filtračního média**

Před delší dobou nepoužívání bylo gelové lože v chromatografické koloně konzervováno a stabilizováno důkladným promytím kolony 0.02% vodným roztokem azidu sodného dle doporučení výrobce Perlozy MT. Důvodem bylo zabránění množení mikroorganismů v koloně a tím i znehodnocení média. Nepoužívané médium pak bylo možno znovu regenerovat po delší době.

## 7. Výsledky a diskuze

Při prováděných experimentech separace MW markerů na Perloze MT 300 a Perloze MT 500 byly na registrovaných elučních profilech označeny vrcholy píků odpovídajících jednotlivým proteinovým MW markerům nebo Blue Dextranu a změřena vzdálenost každého takového maxima píku od vyznačeného místa aplikace vzorku příslušného MW markeru. Z takto zjištěných vzdáleností bylo možno vypočítat retenční časy a ze znalosti objemové průtokové rychlosti pak eluční objemy jednotlivých MW markerů. Pro každý marker byla následně vypočítána hodnota distribučního koeficientu  $K_{av}$ , která již umožňuje zhotovení křivky selektivity (viz kapitola 4.4.1) a porovnávání výsledků z různých experimentů. Byla zhotovena i další grafická znázornění závislostí vyjadřujících separační charakteristiku obou typů Perlozy MT. Na základě posouzení a vzájemného porovnání těchto závislostí bylo zhodnoceno využití obou typů média pro separaci a purifikaci proteinů.

### 7.1 Separace MW markerů na Perloze MT 300

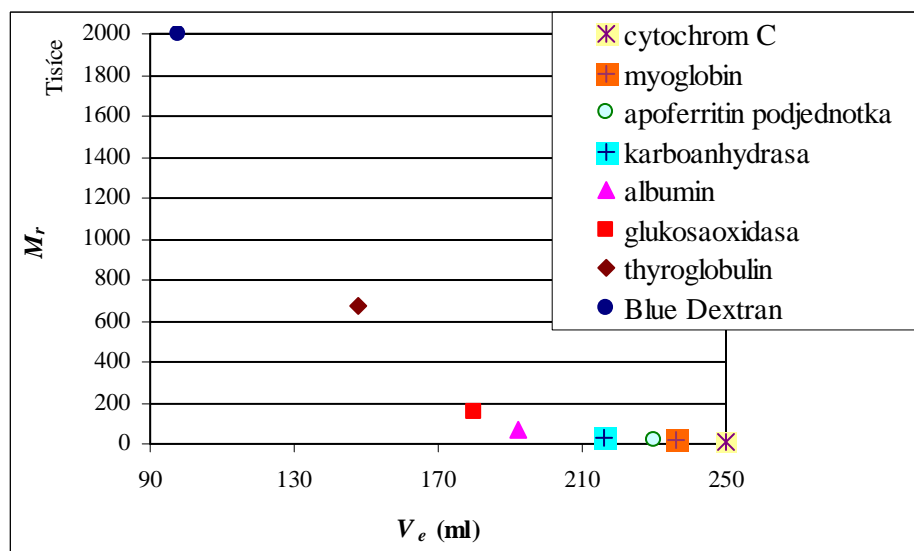
#### Experiment I

Byla použita Perloza MT 300 a kolona A. Vypočítaný celkový objem  $V_t$  kolony A podle výšky sloupce gelu byl  $240 \text{ cm}^3$ . Pracovalo se na aparaturní sestavě A. Rychlost průtoku mobilní fáze byla  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a rychlost pohybu papíru v zapisovači  $0,5 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Bylo analyzováno 7 vzorků proteinových MW markerů a Blue Dextran pro stanovení mrtvého objemu kolony.

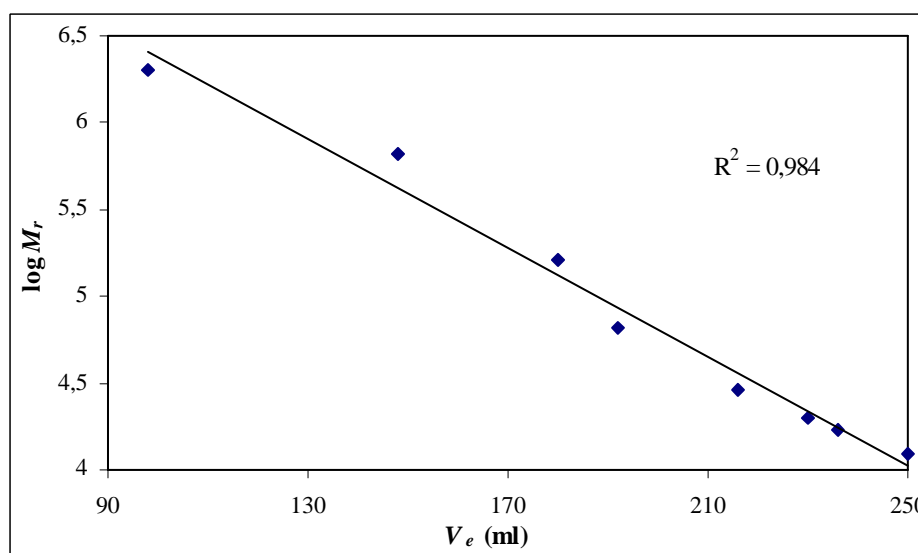
Stanovený mrtvý objem  $V_0$  kolony A byl  $98 \text{ cm}^3$  (jedná se o  $V_e$  Blue Dextranu). Relativní molekulové hmotnosti  $M_r$ , eluční objemy  $V_e$  a distribuční koeficienty  $K_{av}$  analyzovaných vzorků MW markerů jsou uvedeny v tabulce 6. Závislost  $M_r$  na  $V_e$  analyzovaných vzorků je zobrazena na obrázku 17. Pro posouzení selektivity média ve stanoveném rozsahu  $M_r$  je zobrazena semilogaritmičká závislost  $\log M_r$  na  $V_e$  analyzovaných vzorků na obrázku 18.

**Tab. 6:** Relativní molekulové hmotnosti  $M_r$ , eluční objemy  $V_e$  a distribuční koeficienty  $K_{av}$  vzorků MW markerů separovaných na Perloze MT 300.

vzorek	aprox. $M_r$	$V_e$ (ml)	$K_{av}$
cytochrom C	12 400	250	1,070
myoglobin	17 000	236	0,972
apoferritin podjednotka	20 000	230	0,930
karboanhydrasa	29 000	216	0,831
albumin	66 000	192	0,662
glukosaoxidas	160 000	180	0,577
thyroglobulin	669 000	148	0,352
Blue Dextran	2 000 000	98	0



**Obr. 17:** Závislost  $M_r$  na  $V_e$  vzorků MW markerů separovaných na Perloze MT 300 (jsou použity údaje z tabulky 6).



**Obr. 18:** Semilogaritmičká závislost  $\log M_r$  na  $V_e$  vzorků MW markerů separovaných na Perloze MT 300 (jsou použity údaje z tabulky 6).  $R^2$  je determinační koeficient lineární regresní přímky (čím bližší je hodnotě +1, tím těsnější je závislost mezi veličinami  $V_e$  a  $M_r$  a tím více se blíží přímce).

### Experiment II

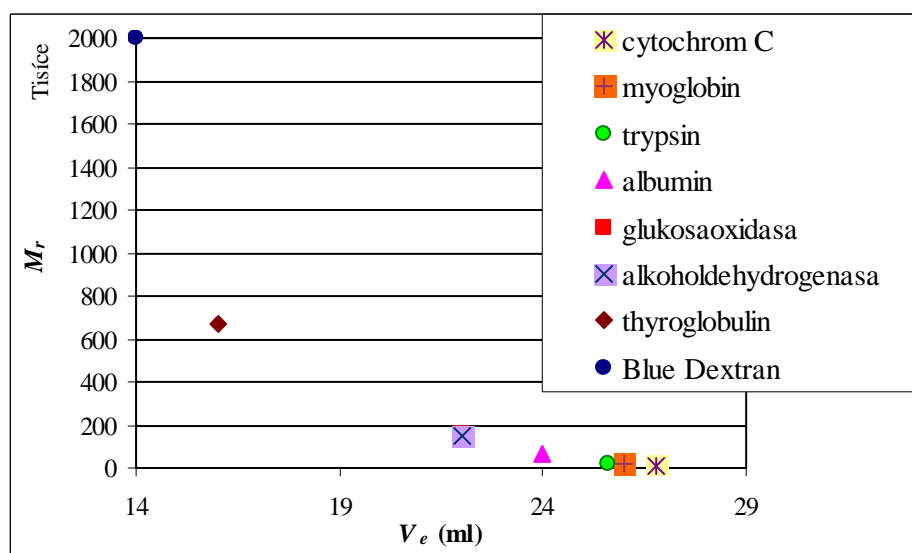
Byla použita Perloza MT 300 a kolona B. Vypočítaný celkový objem  $V_t$  kolony B podle výšky sloupce gelu byl  $23,5 \text{ cm}^3$ . Pracovalo se na aparatuře sestavě B. Rychlost průtoku mobilní fáze byla  $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a rychlost pohybu papíru v zapisovači  $0,5 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ . Bylo analyzováno 7 vzorků proteinových MW markerů a Blue Dextran pro stanovení mrtvého objemu kolony.

Stanovený mrtvý objem  $V_0$  kolony B byl  $14 \text{ cm}^3$  (jedná se o  $V_e$  Blue Dextranu). Relativní molekulové hmotnosti  $M_r$ , eluční objemy  $V_e$  a distribuční koeficienty  $K_{av}$  analyzovaných vzorků MW markerů jsou uvedeny v tabulce 7. Závislost  $M_r$  na  $V_e$  analyzovaných vzorků je zobrazena na obrázku 19. Semilogaritmičká závislost  $\log M_r$  na  $V_e$  analyzovaných vzorků je zobrazena na obrázku 20.

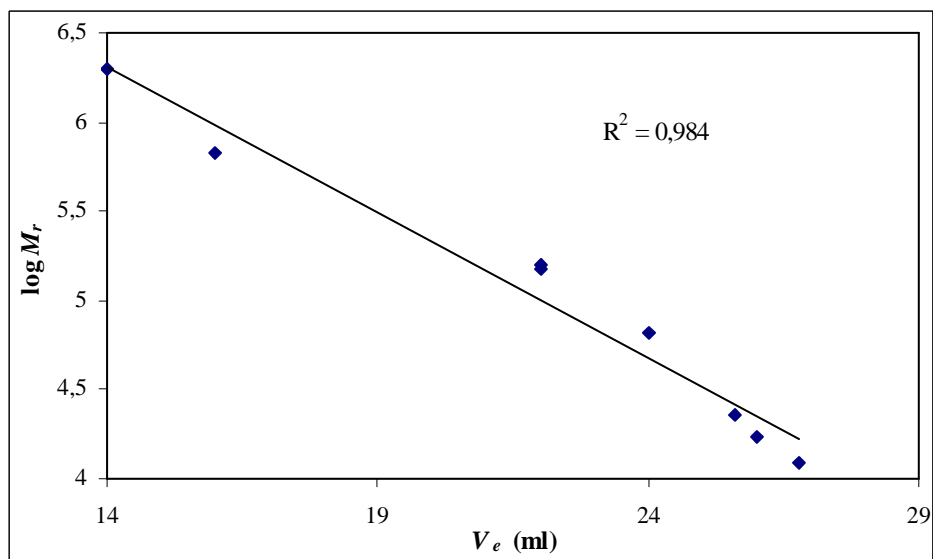


**Tab. 7:** Relativní molekulové hmotnosti  $M_r$ , eluční objemy  $V_e$  a distribuční koeficienty  $K_{av}$  vzorků MW markerů separovaných na Perloze MT 300.

vzorek	aprox. $M_r$	$V_e$ (ml)	$K_{av}$
cytochrom C	12 400	26,8	1,347
myoglobin	17 000	26,0	1,263
trypsin	23 000	25,6	1,221
albumin	66 000	24,0	1,053
alkoholdehydrogenasa	150 000	22,0	0,842
glukosaoxidas	160 000	22,0	0,842
thyroglobulin	669 000	16,0	0,211
Blue Dextran	2000 000	14,0	0



**Obr. 19:** Závislost  $M_r$  na  $V_e$  vzorků MW markerů separovaných na Perloze MT 300 (jsou použity údaje z tabulky 7).



**Obr. 20:** Semilogaritmická závislost  $\log M_r$  na  $V_e$  vzorků MW markerů separovaných na Perloze MT 300 (jsou použity údaje z tabulky 7).  $R^2$  je determinační koeficient lineární regresní přímky.

Z obr. 18 a 20 je zřejmé vyjádření významné části rozsahu  $M_r$ , v němž je Perloza MT 300 selektivní ke globulárním proteinům. Jedná se o rozmezí 12 – 2 000 kDa. Je patrný přibližně lineární průběh celé závislosti, který naznačuje, že selektivita média má klesající tendenci se vzrůstající molekulovou hmotností proteinu (ve shodě s obr. 17 a 19).

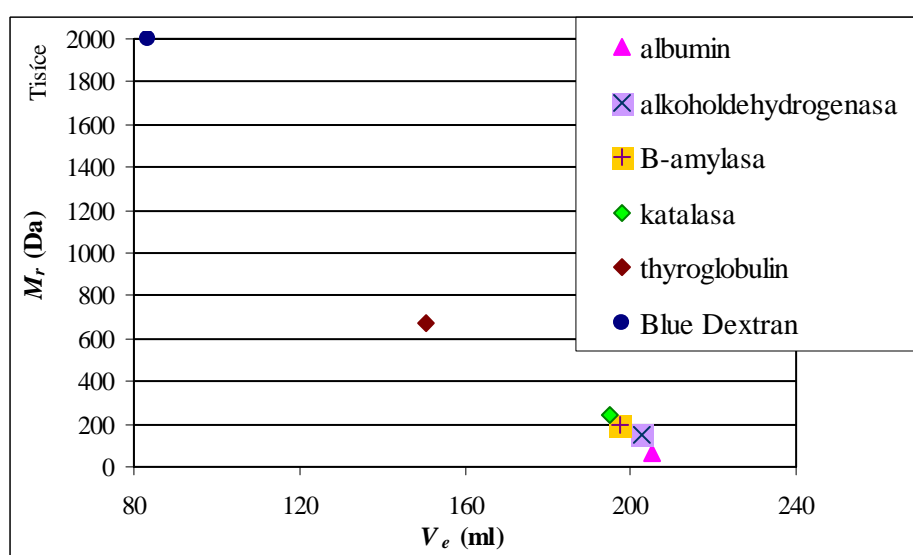
## 7.2 Separace MW markerů na Perloze MT 500

Byla použita Perloza MT 500 a kolona A. Vypočítaný celkový objem  $V_t$  kolony A podle výšky sloupce gelu byl 220 cm<sup>3</sup>. Pracovalo se na aparatuřní sestavě A. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 2,6 ml.min<sup>-1</sup> a rychlost pohybu papíru v zapisovači 0,5 mm.min<sup>-1</sup>. Bylo analyzováno 5 vzorků proteinových MW markerů a Blue Dextran pro stanovení mrtvého objemu kolony.

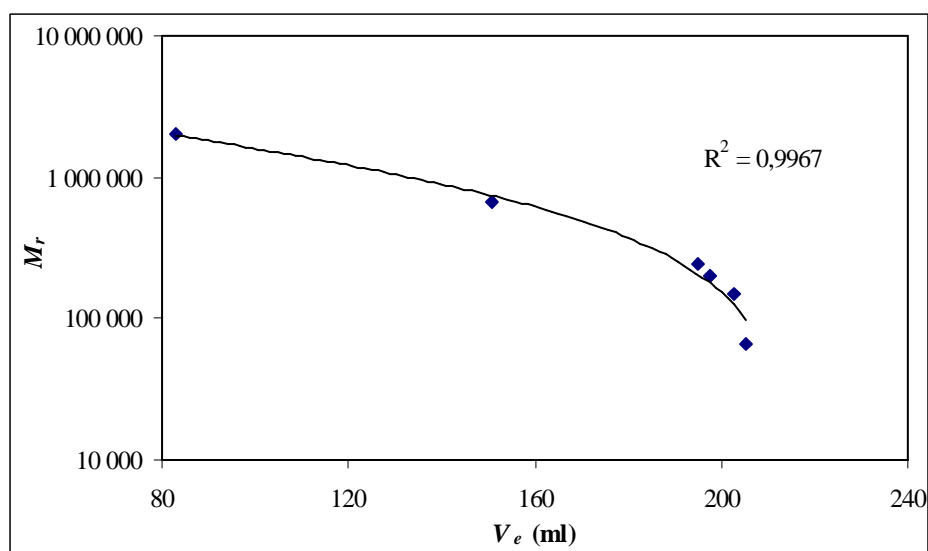
Stanovený mrtvý objem  $V_0$  kolony A byl 83,2 cm<sup>3</sup> (jedná se o  $V_e$  Blue Dextranu). Relativní molekulové hmotnosti  $M_r$ , eluční objemy  $V_e$  a distribuční koeficienty  $K_{av}$  vzorků MW markerů jsou uvedeny v tabulce 8. Závislost  $M_r$  na  $V_e$  analyzovaných vzorků je zobrazena na obrázku 21. Semilogaritmická závislost  $\log M_r$  na  $V_e$  analyzovaných vzorků je zobrazena na obrázku 22.

**Tab. 8:** Relativní molekulové hmotnosti  $M_r$ , eluční objemy  $V_e$  a distribuční koeficienty  $K_{av}$  vzorků MW markerů separovaných na Perloze MT 500.

vzorek	aprox. $M_r$	$V_e$ (ml)	$K_{av}$
albumin	66 000	205,4	0,893
alkoholdehydrogenasa	150 000	202,8	0,874
$\beta$ -amylasa	200 000	197,6	0,836
katalasa	240 000	195,0	0,817
thyroglobulin	669 000	150,8	0,494
Blue Dextran	2000 000	83,2	0



**Obr. 21:** Závislost  $M_r$  na  $V_e$  vzorků MW markerů separovaných na Perloze MT 500 (jsou použity údaje z tabulky 8).



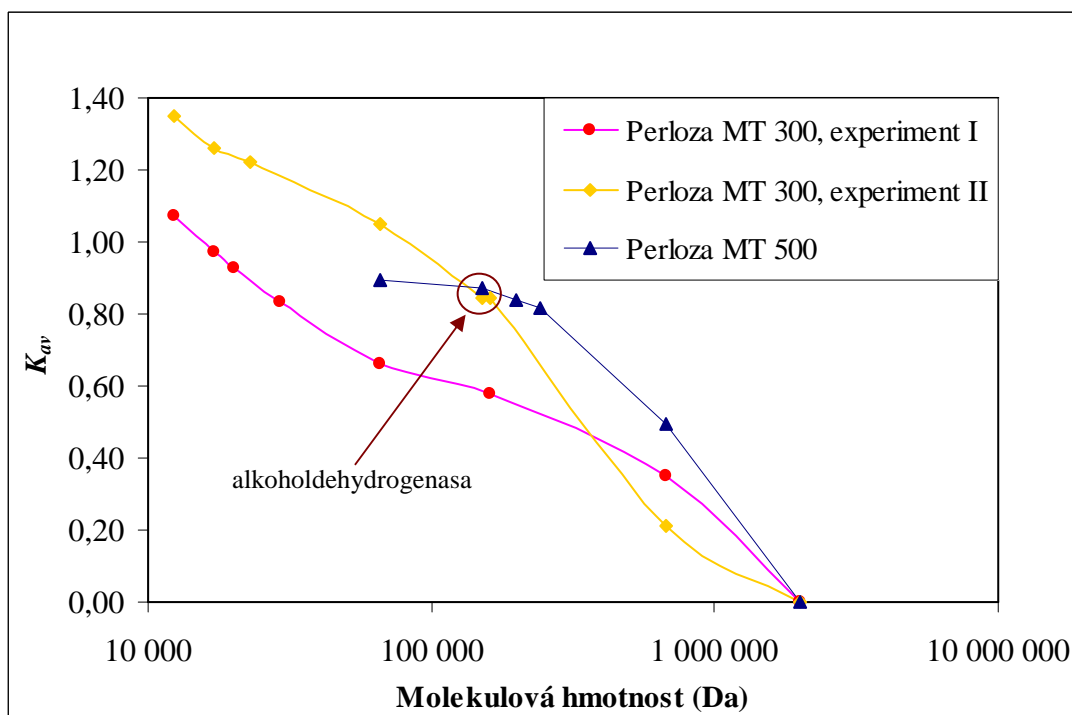
**Obr. 22:** Semilogaritmická závislost  $\log M_r$  na  $V_e$  vzorků MW markerů separovaných na Perloze MT 500 (jsou použity údaje z tabulky 8).  $R^2$  je determinační koeficient logaritmické regresní křivky.

### 7.3 Zhodnocení selektivity Perlozy MT 300 a Perlozy MT 500

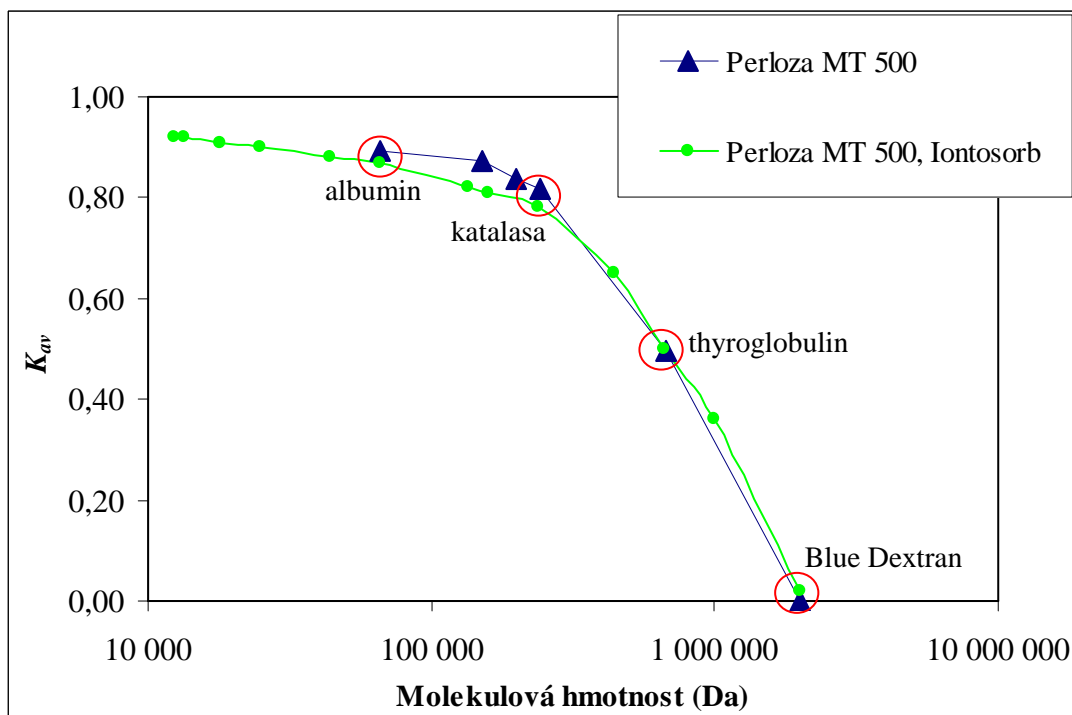
Křivky selektivity obou typů Perlozy MT zhotovené na základě provedených experimentů jsou graficky znázorněny na obrázku 23. Při porovnání průběhu červené a žluté křivky na obr. 23 je zřejmá bohužel vyšší míra diferencí, než se očekávalo. Předpokládám, že směrodatným ukazatelem selektivity Perlozy MT 300 je v tomto případě křivka červená, protože kolona použitá při experimentu II vykazovala příliš nízkou účinnost (eluce MW markerů probíhala v nízkých retenčních časech kvůli malému objemu gelového lože), což vedlo ke značným nepřesnostem při určování vzdáleností maxim píků od startů aplikace vzorku. Podle červené křivky se selektivita Perlozy MT 300 poněkud zvyšuje v oblasti od jejího 5. bodu zleva směrem k nižším molekulovým hmotnostem (tento bod odpovídá albuminu; 66 kDa). K prodloužení křivky směrem doleva a vyznačení její levé krajní prodlevy, signalizující eluci látek v okolí  $V_r$ , by bylo zapotřebí proměřit další MW markery o molekulových hmotnostech nižších než byla nejnižší použitá (12,4 kDa náležící cytochromu C; viz tabulka 6). Pro cytochrom C však již byla vypočítána hodnota  $K_{av}$  vyšší než 1, což signalizuje možnou přítomnost nespecifických interakcí a pokračovat nad tyto hodnoty by bylo nesmyslné.

Na obrázku 24 je ukázáno porovnání dvou křivek selektivity pro Perlozu MT 500; první modrá je totožná s modrou křivkou na obrázku 23 (vyhotovená na základě vlastního experimentu) a druhá zelená byla sestrojena podle experimentálních výsledků získaných od firmy Iontosorb. Tendence v průběhu obou křivek na obr. 24 vykazuje značnou shodu (v obou byly navíc použity hodnoty  $K_{av}$  vs.  $M_r$  čtyř stejných MW markerů, které se chovaly téměř

identicky). Domnívám se však, že molekulová hmotnost Blue Dextranu v tomto případě zřejmě nebyla dostatečná pro stanovení meze vyloučení a Perloza MT 500 má vysokou selektivitu i při hmotnostech vyšších. Za spodní hranici vhodné selektivity Perlozy MT 500 lze považovat molekulovou hmotnost katalasy (aprox. 240 kDa), pod kterou je na obou křivkách na obr. 24 patrná zlomová tendence. Lze předpokládat, že eluce globulárních proteinů na Perloze MT 500 v oblasti hmotností nižších než je molekulová hmotnost alkoholdehydrogenasy (150 kDa) bude probíhat až v okolí  $V_r$ , kde je selektivita zcela nevhodná. Z porovnání průběhu křivek selektivity pro Perlozu MT 500 a 300 (obr. 23) je vidět, že Perloza MT 500 v rozsahu molekulových hmotností 240 – 2000 kDa vykazuje vyšší selektivitu než Perloza MT 300.

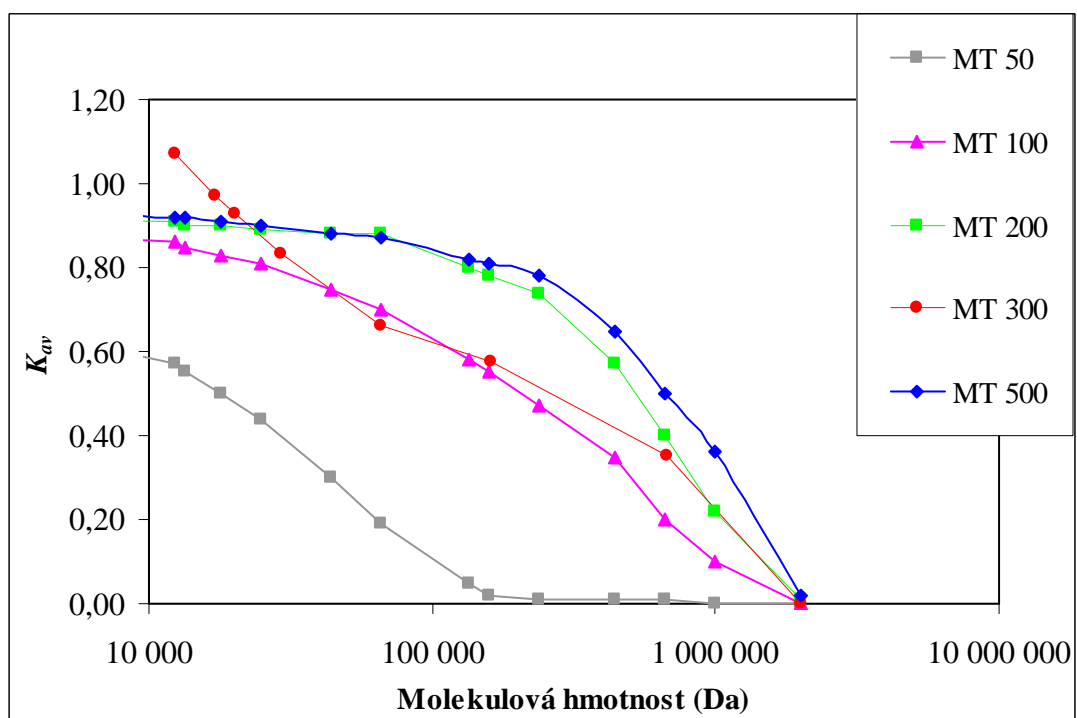


**Obr. 23:** Křivky selektivity pro Perlozu MT 300 a Perlozu MT 500 s možností jejich vzájemného porovnání (zhotovení na základě provedených experimentů; jsou použity údaje z tabulek 6-8). Hnědé zakroužkování náleží bodům alkoholdehydrogenasy, které vykazují vysokou shodu na modré a žluté křivce.



**Obr. 24:** Křivky selektivity pro Perlozu MT 500 ze dvou různých zdrojů: modrá je zhotovena na základě vlastního experimentu (totožná s modrou křivkou na obr. 23) a zelená na základě experimentálních dat převzatých z internetových stránek firmy Iontosorb (<http://www.iontosorb.cz/bead.htm>; prohlíženo 23.4.2010). Červeně zakroužkované jsou společné body na obou křivkách, které náležejí stejným MW markerům a vykazují obdivuhodnou shodu.

Selektivita dalších porositních typů Perlozy MT byla již dříve prozkoumána a porovnání jejich křivek selektivity je ukázáno na obrázku 25. Je zajímavé, že červená křivka selektivity pro Perlozu MT 300 (z vlastních experimentálních dat, viz obr. 23) na tomto obrázku není lokalizována mezi křivkami pro Perlozu MT 200 a 500 (zelenou a modrou) jak by bylo možno očekávat, ale blíží se spíše křivkám pro Perlozu MT 100 a 200 (růžové a zelené) a její tři levé krajní body (odpovídající nejmenším MW markerům) jsou již lokalizovány abnormálně.



**Obr. 25:** Křivky selektivity pro jednotlivé porositní typy Perloxy MT (převzato z <http://www.iontosorb.cz/bead.htm>; prohlíženo 23.4.2010). Pouze červená křivka pro Perlozu MT 300 vyplývá z vlastních experimentálních dat.

## 8. Závěr

Perloza MT jsou média určená pro gelovou permeační chromatografii biomolekul. Jejich materiálem je poměrně nově vyvinutá matrice z makroporézní perlové celulózy, u níž byly prokázány vynikající vlastnosti fyzikální i chemické (jak je blíže popsáno v teoretické části této práce) s vysokým potenciálem pro širokou škálu separačních aplikací, a proto je v současné době podrobována studiím parametrů. Dnes se tato matrice používá navíc i jako platforma k výrobě dalších sérií sorbentů pro ostatní typy chromatografie, a to zejména díky kombinaci masivního vnitřního povrchu se současnou excelentní mechanickou rigiditou.

Přínosem této práce k problematice separace a purifikace proteinů chromatografickými metodami bylo testování selektivity dvou komerčních gelových filtračních médií: Perloza MT 300 a Perloza MT 500. Tato média se liší stupněm velikostí pórů, a proto také vykazují poněkud odlišnou selektivitu. Selektivita Perlozy MT 300 otestovaná v experimentu I nedopadla zcela podle očekávání, protože se blíží spíše porostním typům 100 a 200 než aby byla situována mezi typy 200 a 500 (selektivita všech těchto ostatních porostních typů již testována byla a výsledky zveřejněny na internetových stránkách firmy Iontosorb). Při porovnání obou křivek selektivity pro Perlozu MT 500 (vycházející z vlastních i převzatých experimentálních dat) se však ukázala excelentní shoda, což dokazuje správnost mých výsledků i v případě experimentu I s Perlozou MT 300, protože tento experiment byl proveden za podobných podmínek jako experiment III s Perlozou MT 500. Závěry plynoucí z jednotlivých křivek selektivity lze sice zobecňovat pro proteiny spíše globulárního tvaru, přesto však představují zásadní charakteristiku porositních typů 300 a 500 Perlozy MT, kterou lze využívat pro další studie parametrů těchto médií, ale i v praxi při volbě médií pro preparativní separace jednoduchých i komplexních směsí proteinů.



## Seznam použité literatury

- 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.
- Asenjo J. A., Andrews B. A. (2008) Protein purification using chromatography: selection of type, modelling and optimization of operating conditions. *J. Mol. Recognit.* **22**, 65-76.
- Bílková K., Králová B. (1997) Izolace biomakromolekul, pp. 37-47; 70-82; 95-99, VŠCHT, Praha, ČR.
- GE Healthcare (2006) Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography Principles and Methods, Edition AA, pp. 9-53; 79-90, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden. Code No. 11-0012-69.
- Churáček J. a kol. (1990) Analytická separace látek, pp. 44-48; 58-63; 69-76, SNTL, Praha, ČR.
- Stellwagen E. (1990) Gel Filtration. In *Methods in Enzymology, Vol. 182 Guide to Protein Purification* (Murray P. Deutscher ed.), pp. 317-328, Academic Press, San Diego, Kalifornia, USA.
- Štulík K. a kol. (2004) Analytické separační metody, pp. 36-38, Karolinum, Praha, ČR.

## Seznam použitých symbolů a zkratek

$A$	plocha chromatografického píku
AC	afinitní chromatografie
CF	chromatofokusace
CIPP	třífázová purifikační strategie
$c_m$	koncentrace látky v mobilní fázi
$c_s$	koncentrace látky ve stacionární fázi
$F_{kap}$	faktor kapacity
$F_m$	volumetrická průtoková rychlost mobilní fáze
$F_{sel}$	faktor selektivity
$F_{úč}$	faktor účinnosti
GF	gelová filtrace
GPC	gelová permeační chromatografie
$H$	výškový ekvivalent teoretického patra
$h$	výška chromatografického píku
HIC	hydrofobní chromatografie
His-TAG konec	úsek několika histidinových zbytků na N- nebo C-konci rekombinantního proteinu
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEX	ionexová chromatografie
IgG	imunoglobulíny třídy G
$k$	kapacitní poměr
$K_{av}$	korigovaný distribuční koeficient (v GPC)
$K_d$	distribuční koeficient
$L$	délka chromatografické kolony
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
MW marker	marker molekulové hmotnosti
MW standard	standard molekulové hmotnosti
$n$	počet teoretických pater
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů
$pI$	izoelektrický bod
$pK_a$	hodnota pH, při které je kyselá skupina disociována z 50%
$r_{12}$	retenční poměr pro látky 1 a 2
$r_{is}$	retenční poměr pro látku a standard
RPC	chromatografie na reverzních fázích
$R_s$	rozlišovací koeficient

SEC	molekulová vylučovací chromatografie
$t_m$	mrtvý čas chromatografické kolony
$t_r$	retenční čas
$t'_r$	redukovaný retenční čas
$V_0$	mrtvý objem chromatografické kolony
$V_e$	eluční objem
$V_{gm}$	objem gelové matrice
$V_i$	objem kapaliny v nitru gelové matrice
$V_s$	objem stacionární fáze
$V_t$	celkový objem chromatografické kolony
$V'_e$	redukovaný eluční objem
$W$	šířka chromatografického píku