

AFINITNÍ ULTRAFILTRACE BÍLKOVIN

ZDENĚK GLATZ

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: glatz@chemi.muni.cz

Došlo dne 22.VII.1999

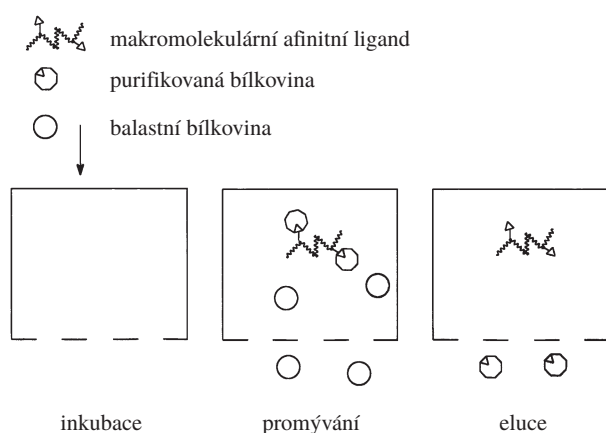
Klíčová slova: afinitní ultrafiltrace, bílkoviny

Obsah

1. Úvod
2. Afinitní ultrafiltrace
3. Postup při afinitní ultrafiltraci
 - 3.1. Vznik afinitní interakce
 - 3.2. Promývání
 - 3.3. Eluce
 - 3.4. Regenerace makromolekulárního afinitního ligandu
4. Makromolekulární afinitní ligandy
5. Závěr

1. Úvod

Membránové filtrace patří mezi běžně používané technologie v biochemickém a farmaceutickém průmyslu. V biotechnologiích jsou řazeny na různých stupních daných procesů – při sklizni buněk, separaci biomakromolekul, při koncentraci nebo dialýze produktů. Jedná se o jednoduché, rychlé a ekonomické procesy, které vyžadují málo energie. Jednou z variant membránové filtrace je ultrafiltrace, což je metoda založená na schopnosti membrán separovat molekuly na základě rozdílné relativní molekulové hmotnosti. Tato metoda prodělala v nedávné době obrovský rozvoj. Současný vývoj v polymerní chemii a konstrukci filtračních modulů dal vznik ultra-



Obr. 1. Princip afinitní ultrafiltrace

filtračním membránám s vysokou chemickou a fyzikální stabilitou v kombinaci s velkou plochou, a tím i vysokými průtoky. Ultrafiltrační zařízení prošla postupně etapami od míchaných ultrafiltračních cel, přes tangenciální ultrafiltrační systémy až po zařízení na bázi dutých vláken, čímž byly odstraněny problémy s koncentrační polarizací separovaných biomakromolekul na membránách. Jistým omezením této metody je nízké rozlišení neboť pro vzájemnou separaci biomakromolekul je potřebný minimálně desetinásobný rozdíl v jejich relativních molekulových hmotnostech.

2. Afinitní ultrafiltrace

Pro dosažení vyšší selektivity při zachování vysokých objemových kapacit byla ultrafiltrace spojena s afinitními interakcemi do metody jediné – metody afinitní ultrafiltrace¹. Obecné schéma této metody je uvedeno na obrázku 1. Za normálních podmínek purifikovaná i balastní bílkovina příslušnou ultrafiltrační membránou prochází. Pokud je však do jejího roztoku přidán makromolekulární afinitní ligand, jehož relativní molekulová hmotnost je větší než jsou póry membrány, dojde k vytvoření makromolekulárního afinitního komplexu s purifikovanou bílkovinou, který je membránou zadržen. Po vymytí balastních bílkovin, které membránou procházejí, je afinitní komplex rozdisociován a uvolněná purifikovaná bílkovina rovněž projde ultrafiltrační membránou. Makromolekulární afinitní ligand je následně regenerován pro opakovanou použití.

Účinnost afinitní ultrafiltrace je silně ovlivněna relativní molekulovou hmotností makromolekulárního afinitního ligandu a purifikované bílkoviny a separačním limitem ultrafiltrační membrány. Obdobně jako v případě klasické ultrafiltrace musí být relativní molekulová hmotnost makromolekulárního afinitního ligandu desetkrát větší než je relativní molekulová hmotnost separovaných bílkovin. Velikost pórů ultrafiltrační membrány by měla být taková, aby jednak nedocházelo k pronikání makromolekulárního afinitního ligandu přes membránu a současně, aby tato membrána byla propustná pro purifikovanou i pro balastní bílkoviny.

Před vlastní afinitní ultrafiltrací je vhodné otestovat chování jak samotného makromolekulárního afinitního ligandu, tak i separovaných bílkovin na příslušné ultrafiltrační membráně. Na membráně totiž může docházet k sorpcím, což silně ovlivňuje její separační vlastnosti. Tuto skutečnost lze eliminovat použitím ultrafiltračních membrán, které nesou na svém povrchu ionizovatelné skupiny. Nezanedbatelné jsou rovněž vzájemné interakce mezi separovanými bílkovinami, které lze potlačit vhodným složením pufru použitého pro inkubaci.

3. Postup při afinitní ultrafiltraci

Celý proces afinitní ultrafiltrace lze rozdělit do následujících kroků:

3.1. Vznik afinitní vazby

Inkubaci separovaných bílkovin s makromolekulárním afinitním ligandem lze provést dvěma způsoby:

- přímým smícháním vzorku s roztokem makromolekulárního afinitního ligandu v ultrafiltračním zařízení, případně v reakční nádobě, ze které je výsledný roztok přiveden do ultrafiltračního zařízení (obr. 2a). Tento způsob je vhodný pro relativně čistší vzorky, které neobsahují pevné částice. Inkubace u většiny doposud publikovaných prací byla prováděna právě tímto způsobem.
- paralelním protékáním vzorku a roztoku makromolekulárního afinitního ligandu na opačných stranách membrány, přičemž k vazbě dochází po přechodu purifikované bílkoviny membránou (obr. 2b). Roztok obsahující vzniklý afinitní komplex je poté přiveden do vlastního ultrafiltračního zařízení. Tento způsob je vhodnější pro hrubé extrakty, případně pro média po kultivacích. Membrána totiž tvoří pro makromolekulární afinitní ligand ochrannou bariéru jak proti pevným částicím, na kterých může docházet k jeho sorpcím, tak i proti infekčním agens. Uvedený postup se s úspěchem využívá v kontinuálních procesech.

Vazebný proces je do značné míry ovlivňován koncentrací makromolekulárního afinitního ligandu. Vazebná kapacita postupně s jeho zvyšující se koncentrací vzrůstá až při určité koncentraci dosahuje maxima, neboť ligand se stává stéricky nepřístupným pro vazbu purifikované bílkoviny. Obdobný jev byl pozorován i u afinitní chromatografie.

3.2. Promývání

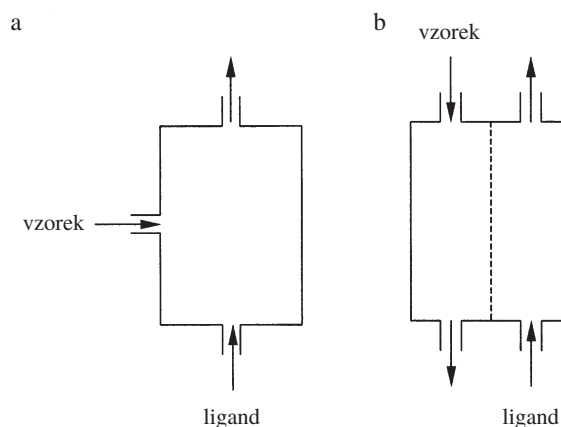
Promývání afinitního komplexu se provádí v diafiltračním modu tj. při zachování konstantního objemu vzorku v ultrafiltračním zařízení. Balastní bílkoviny procházejí přes membránu a jejich koncentrace v ultrafiltračním zařízení se postupně snižuje. Při promývání však rovněž dochází ke ztrátám purifikované bílkoviny. Na počátku promývání se totiž v ultrafiltračním zařízení ustaluje rovnováha mezi volnou a navázanou purifikovanou bílkovinou. Koncentrace volné purifikované bílkoviny se však promáváním snižuje, což vyvolává její další uvolňování z komplexu. Jednou z možností jak tyto ztráty eliminovat je provést promývání velkou filtrační rychlostí, což

však přichází v úvahu pouze u afinitních systémů s dostatečně silnou interakcí. Pokud vzorek obsahuje balastní bílkoviny o vysoké relativní molekulové hmotnosti, je vhodné před afinitní ultrafiltrací provést prostou ultrafiltraci a tyto bílkoviny ze vzorku předem odstranit.

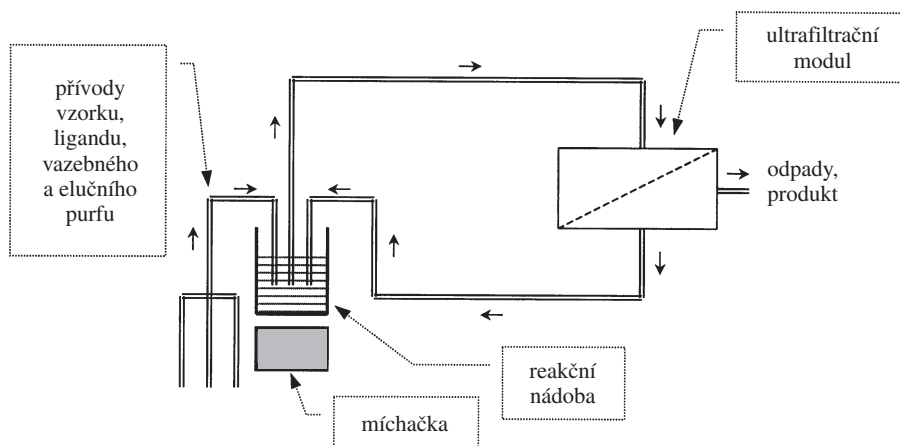
3.3. Eluce

Při eluci je vazebný pufr v ultrafiltračním zařízení postupně nahrazen pufrům disociačním. Dochází tak k pozvolnému uvolňování purifikované bílkoviny z afinitního komplexu a jejímu průchodu ultrafiltrační membránou. Důležitou podmínkou je, aby se purifikovaná bílkovina uvolňovala z komplexu bez nutnosti použít nadměrné množství disociačního pufru.

Stejně jako v případě afinitní chromatografie lze eluci provést specificky volným ligandem, případně nespecificky změnou pH, iontové síly, polaritu roztoku atd. Eluční podmínky přitom musí být příznivé jak pro purifikovanou bílkovinu, tak pro ultrafiltrační membránu. Specifická eluce více vyhovuje tomuto požadavku, neboť jsou při ní zachovány podmínky, které byly použity pro vznik vazby a tedy pro uchování biologické aktivity purifikované bílkoviny. Nevýhodami však jsou cena použitého kompetitivního ligandu a to, že roztok



Obr. 2. Možnosti inkubace separovaných bílkovin s makromolekulárním afinitním ligandem



Obr. 3. Schéma afinitní ultrafiltrace ve vsádkovém uspořádání

Tabulka I

Přehled aplikací afinitní ultrafiltrace využívajících nerozpustné makromolekulární afinitní ligandy

Nosič	Velikost	Ligand	Cílová bílkovina	Ref.
<i>Saccharomyces c.</i>	5 µm	sacharidy	konkanavalin A	1
<i>Streptococcus</i>	5 µm	protein G	IgG	2
Škrob	1–10 µm	Cibacron Blue	ADH ^a	3
Silikagel	12 nm	Cibacron Blue	ADH ^a , LDH ^b	4
Agarosa	45–165 µm	Cibacron Blue	lidský albumin	5
Agarosa	neudáno	PABTG ^c	β-galaktosidasa	6
Sepharosa	45–165 µm	heparin	laktoferin	2
Sepharosa	45–165 µm	protein G	IgG	2
Liposomy	2 µm	biotin	avidin	7,8
Liposomy	6 µm	<i>p</i> -aminobenzamidin	trypsin	9

^a ADH – alkoholdehydrogenasa, ^b LDH – laktátdehydrogenasa, ^c PABTG – *p*-aminobenzyl-1-thio-β-galaktopyranosid

Tabulka II

Přehled aplikací afinitní ultrafiltrace využívajících rozpustné makromolekulární afinitní ligandy

Nosič	Velikost (MW)	Ligand	Cílová bílkovina	Ref.
Dextran	2 000 000	Protein A	IgG	10
Dextran	2 000 000	estradiol	3-oxosteroid isomerasa	11
Dextran	2 000 000	<i>p</i> -aminobenzamidin	trypsin	12
Dextran	2 000 000	STI ^a	trypsin	13
Polyakrylamid	>100 000	<i>m</i> -aminobenzamidin	trypsin	14–17
Polyakrylamid	>100 000	<i>m</i> -aminobenzamidin	urokinasa	18
Chitosan	2 000 000	<i>N</i> -acetyl-glukosamin	lysozym	19

^a Inhibitor trypsinu ze sóji

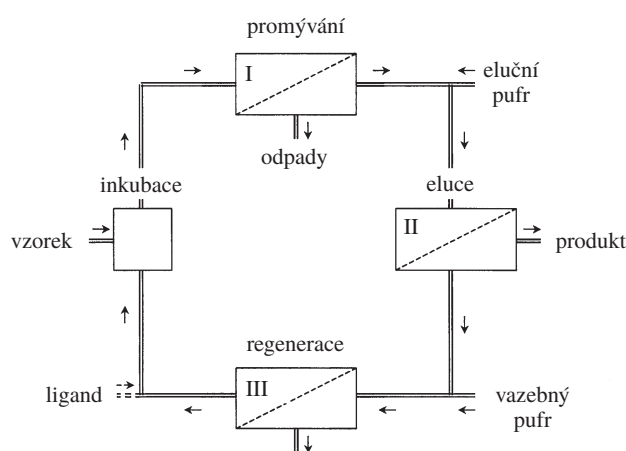
purifikované bílkoviny obsahuje po eluci volný ligand. Nеспецифická eluce je samozřejmě levnější, avšak eluční podmínky nemusí být příliš vhodné pro purifikovanou bílkovinu i pro samotnou ultrafiltrační membránu. Proto je v tomto případě nezbytné, ihned po eluci změnit složení roztoku obsahujícího purifikovanou bílkovinu.

3.4. Regenerace

Makromolekulární afinitní ligand je po eluci získán ve volném stavu a lze jej tedy použít opakovaně. Před opakovaným použitím je však nutné provést jeho regeneraci, při které je disociační pufr nahrazen čerstvým vazebným pufrem, nejlépe přímo v ultrafiltračním zařízení.

Proces afinitní ultrafiltrace může probíhat vsádkovým způsobem nebo kontinuálně. V prvním případě probíhá celý postup – inkubace, promývání, eluce i regenerace v jediné reakční nádobě, do které jsou postupně přiváděny vzorek, vazebný pufr obsahující makromolekulární afinitní ligand, promývací a následně i disociační pufr. Roztok z této reakční nádoby je recirkulován jedinou ultrafiltrační jednotkou (obr. 3).

Při kontinuální afinitní ultrafiltraci je využit systém několika nezávislých ultrafiltračních modulů, ve kterých postupně dochází k promývání, eluci a regeneraci. Makromolekulární afinitní ligand je přiveden do tohoto systému jednorázově na



Obr. 4. Schéma afinitní ultrafiltrace v kontinuálním uspořádání

počátku celého procesu, v dalším průběhu je již využívána jeho regenerovaná forma (obr. 4).

4. Makromolekulární afinitní ligandy

Nejdůležitějším krokem, který určuje úspěšnost dané afinitní ultrafiltrace, je volba makromolekulárního afinitního

ligandu. Makromolekulární afinitní ligand by měl přitom splňovat určité požadavky – měl by se dát lehce rozpustit, případně resuspendovat ve vodném roztoku tak, aby ho bylo možné pumpovat danou ultrafiltrační aparaturou; měl by mít velký specifický povrch; měl by být dostatečně stabilní vůči podmínkám používaným při inkubaci a eluci a neměl by vykazovat nespecifické interakce. Nezanedbatelná je i jeho cena.

Ve většině případů nelze pro danou aplikaci najít odpovídající makromolekulární afinitní ligand. Tento problém se ve většině případů řeší navázáním nízkomolekulárního afinitního ligandu na inertní makromolekulární nosič. Tímto nosičem mohou být částice nerozpustné ve vodě, případně ve vodě rozpustný polymer.

Jako částice byly použity usmrcené bakteriální a kvasniční buňky, škrobová zrna, agarosové a silikagelové chromatografické sorbenty nebo liposomy. Velkou nevýhodou částic je jejich malá mechanická stabilita a malý specifický povrch, což se však podařilo odstranit použitím liposomů. Jako polymery byly použity dextran, různé polyakrylamidové deriváty a chitosan. Jejich výhodou je možnost dosažení mnohem vyšší hustoty ligandu na povrchu polymeru a snazší tvorba afinitního komplexu, což se odráží ve vyšší vazebné kapacitě. Při ultrafiltracích však musí být používány membrány s menšími póry, což způsobuje nižší filtrační průtok. Přehled některých aplikací afinitní ultrafiltrace je uveden v tabulkách I a II.

Jak již bylo uvedeno, je efektivita afinitní ultrafiltrace dána především volbou vhodného makromolekulárního afinitního ligandu. Pro její zvýšení se rovněž nabízí možnost purifikace více bílkovin z jediného vzorku, a to využitím skupinově specifického makromolekulárního afinitního ligandu v kombinaci s různými elučními podmínkami, případně při sekvenčním použití několika makromolekulárních afinitních ligandů.

5. Závěr

Metoda afinitní ultrafiltrace kombinuje vysokou objemovou účinnost filtračních metod se selektivitou danou metodám založeným na afinitních interakcích. Jejimi hlavními výhodami jsou především nízké provozní náklady, rychlé a snadné provedení a možnost přímé práce s hrubými bílkovinnými extrakty. Nezanedbatelná je rovněž možnost kontinuálního uspořádání. V tomto směru lze předpokládat její další rozvoj jako možné alternativy afinitní chromatografie především v poloprovozních a provozních aplikacích. Afinitní interakce tak mohou být řazeny i v ranějších stádiích těchto procesů, což je v případě klasické afinitní chromatografie problematické. Tímto způsobem lze značně zjednodušit používané purifikační postupy.

LITERATURA

1. Matiasson B., Ramstorp M.: *J. Chromatogr.* 283, 323 (1984).

2. Chen J. P.: *J. Bioferment. Bioeng.* 70, 199 (1990).
3. Matiasson B., Ling T. G. I., v knize: *Membrane Separations in Biotechnology* (McGregor, W. C., ed.), str. 99. Marcel Dekker, New York 1986.
4. Ling T. G. I., Matiasson B.: *Biotechnol. Bioeng.* 34, 1321 (1989).
5. Herak D. C., Merrill E. W.: *Biotechnol. Prog.* 5, 9 (1989).
6. Pungor E., Jr., Afeyan N. B., Gordon, N. F., Cooney, C. L.: *Bio/Technology* 5, 604 (1987).
7. Powers J. D., Killpatrick P. K., Carbonell R. G.: *Biotechnol. Bioeng.* 33, 173 (1989).
8. Powers J. D., Killpatrick P. K., Carbonell R. G., v knize: *Progress in Clinical and Biological Research* (Butterfield D. A., ed.), str. 237. Allan R. Liss, New York 1989.
9. Powers J. D., Killpatrick P. K., Carbonell R. G.: *Biotechnol. Bioeng.* 36, 506 (1990).
10. Nylén U.: SE 8006102 (1980).
11. Hubert P., Dellacherie E.: *J. Chromatogr.* 184, 325 (1980).
12. Adamski-Medda D., Nguyen Q. T., Dellacherie E.: *J. Membr. Sci.* 9, 337 (1981).
13. Choe T. B., Masse P., Verdier A.: *Biotechnol. Lett.* 8, 163 (1986).
14. Luong J. H. T., Male K. B., Nguyen A. L.: *Biotechnol. Bioeng.* 31, 439 (1988).
15. Luong J. H. T., Male K. B., Nguyen A. L.: *Biotechnol. Bioeng.* 31, 516 (1988).
16. Male K. B., Luong J. H. T., Nguyen A. L.: *Enzyme Microb. Technol.* 9, 374 (1987).
17. Sigmundsson K., Filippusson H.: *Polym. Int.* 41, 355 (1996).
18. Male K. B., Nguyen A. L., Luong J. H. T.: *Biotechnol. Bioeng.* 35, 87 (1990).
19. Glatz Z., Novák P.: *Chem. Listy* 90, 734 (1996).

Z. Glatz (Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno): **Affinity Ultrafiltration of Proteins**

Affinity ultrafiltration combines high-volume processing capability of membrane filtration with high selectivity, which can be achieved in affinity methods of protein purification. This technique is based on the principle that when a protein to be purified is free in solution, it passes through the ultrafiltration membrane, whereas when it is bound to a macromolecular affinity ligand placed on one side of the membrane, it is constrained to that side of the membrane. Compounds which do not bind to the ligand pass freely through the membrane and are thus separated from the protein-ligand complex. After all the undesired components have been removed, the protein is desorbed from the ligand by addition of an appropriate dissociating medium and then recovered in the filtrate. The review describes basic principles and characteristics of the method. In addition, some applications of affinity ultrafiltration for protein purification are given.