

AFINITNÍ PRECIPITACE 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 precipitace

Obsah

1. Úvod
2. Mechanismy precipitace
3. Afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů
4. Afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů
 - 4.1. Ligandy používané při afinitní precipitaci
 - 4.2. Polymery používané při afinitní precipitaci
 - 4.3. Vazba ligandu na polymer
 - 4.4. Precipitační mody
 - 4.5. Postup při afinitní precipitaci
 - 4.6. Speciální modifikace metody afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů
5. Afinitní precipitace pomocí modifikovaných fosfolipidů
6. Závěr

1. Úvod

Precipitace byly v počátcích chemie bílkovin jedinými dostupnými metodami pro jejich separaci z komplexních směsí. Přestože patří k nejstarším a nejjednodušším metodám nelze jejich význam podceňovat ani v současné době. Klasické precipitační metody při použití neutrálních solí, organických rozpouštědel nebo organických polymerů mají totiž řadu výhod. Lze je snadno převést z laboratorních podmínek do poloprovazního či provozního měřítka, mohou být zařazeny jako počáteční purifikační krok při práci s hrubými extrakty

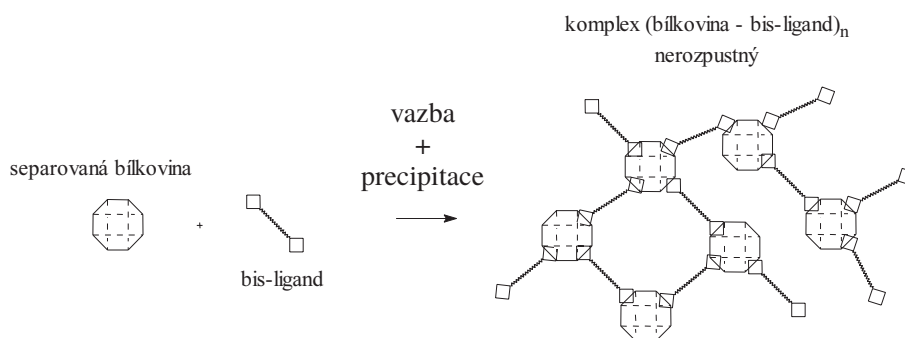
a výsledku je přitom dosaženo v relativně krátkém čase. Jejich většímu využití však brání nedostatek selektivity. Tento problém napomáhá odstranit kombinace afinitních interakcí a precipitace do jediné metody – metody afinitní precipitace. Přestože byla poprvé popsána již v roce 1979 Larssonem a Mosbachem¹, její význam narůstá až nyní, a to i díky rozvoji jiných mechanismů než použili ve své práci Larsson a Mosbach. Cílem tohoto sdělení je podat ucelenou informaci o této slibné metodě purifikace bílkovin.

2. Metody afinitní precipitace

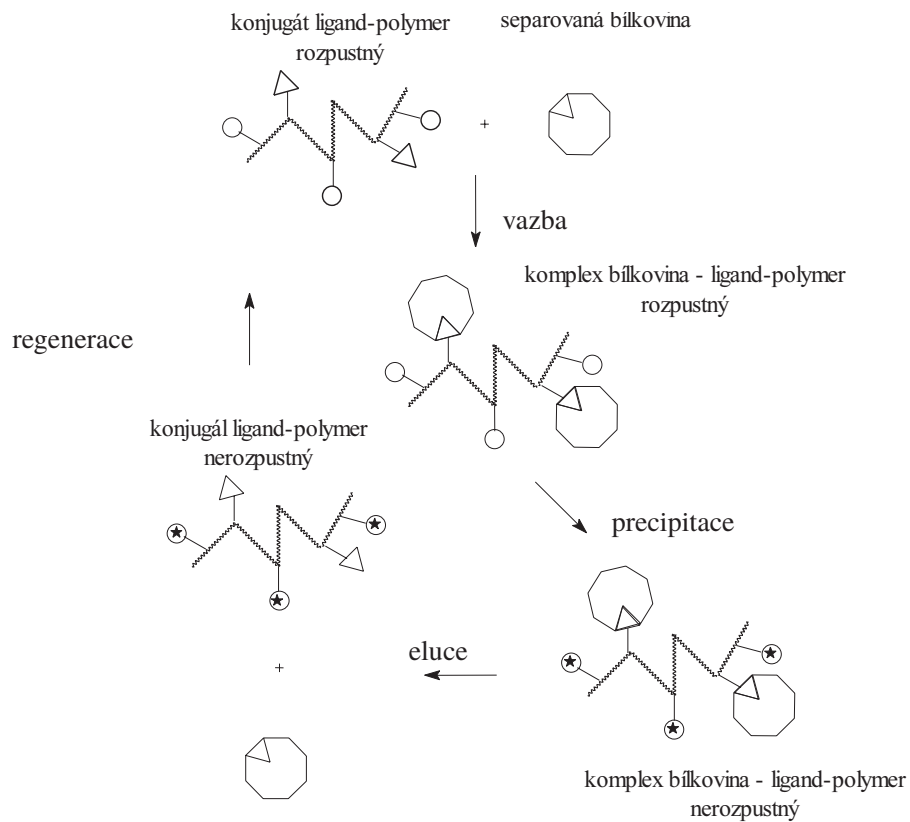
Pro afinitní precipitace bílkovin byly použity tři základní mechanismy. První mechanismus zahrnuje vytváření síťového komplexu mezi polyvalentní bílkovinou a bi- nebo polyligandem. Za vhodných podmínek dochází k trojrozměrnému narůstání tohoto komplexu, který se postupně stává nerozpustným, a dochází k jeho precipitaci (obr. 1). Tato metoda je označována jako afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů a v své podstatě je identická s imunoprecipitační reakcí protilátky s antigenem.

V případě druhého mechanismu dojde nejprve k vytvoření rozpustného komplexu mezi bílkovinou a ligandem, který je navázán na polymeru. K vlastní precipitaci komplexu pak dochází snížením rozpustnosti tohoto polymeru, a to buď změnou fyzikálně chemických vlastností roztoku nebo přidáním činidla, které tento polymer zesíťovává a vyvolává tak jeho precipitaci (obr. 2). Tato metoda je označována jako afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů. Vzhledem ke skutečnosti, že většina v současné době publikovaných prací využívá právě tohoto mechanismu, bude hlavní část tohoto sdělení věnována této modifikaci metody afinitní precipitace.

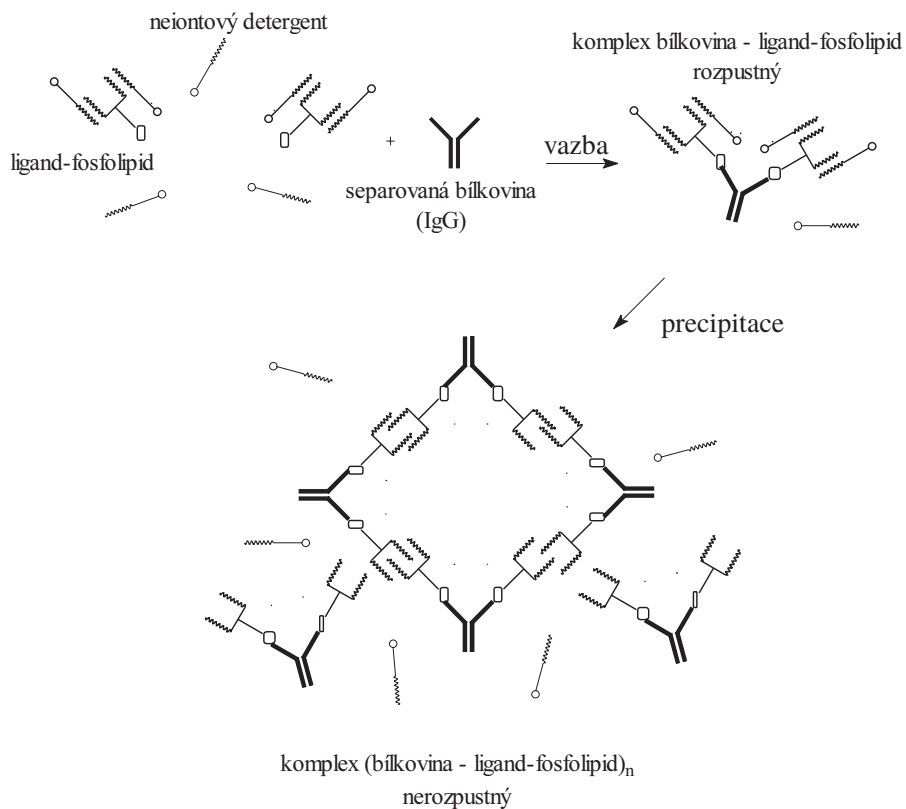
Se zcela novou metodou afinitní precipitace pomocí modifikovaných fosfolipidů přišli Kilpatrick a spol.² Fosfolipidy s navázaným ligandem jsou rozpuštěny ve vodném roztoku neiontového detergentu. Tento roztok je přidán k roztoku purifikované polyvalentní bílkoviny. Přitom dochází k navázání konjugátu ligand–fosfolipid na bílkovinu a současně se snižuje díky zředění výchozího roztoku modifikovaných fosfolipidů koncentrace detergentu. Tím se obnaží nepolární al-



Obr. 1. Princip metody afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů



Obr. 2. Princip metody afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů



Obr. 3. Princip metody afinitní precipitace pomocí modifikovaných fosfolipidů

kylové řetězce fosfolipidů, dochází mezi nimi k hydrofobním interakcím a výsledkem je precipitace komplexu bílkovina – ligand–fosfolipid (obr. 3).

3. Afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů

Afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů bývá také označována jako „pravá“, neboť vlastní precipitace je skutečně vyvolána tvorbou afinitních interakcí mezi ligandem a bílkovinou. Primární podmínkou pro tuto metodu afinitní precipitace je multivalentnost příslušné bílkoviny a použitého ligandu. V případě bílkoviny je tato vlastnost dána její strukturou a nelze ji tedy ovlivnit. U ligandu je uvedené skutečnosti dosaženo spojením dvou molekul ligandu prostřednictvím raménka, vytvořením tzv. bis-ligandu. Délka raménka má přitom podstatný vliv na precipitační vlastnosti daného systému bílkovina – bis-ligand. Pokud je raménko příliš krátké, bis-ligand nedokáže spojit vazebná místa na různých molekulách bílkoviny. Je-li naopak raménko příliš dlouhé, může se bis-ligand navázat na vazebná místa identické molekuly bílkoviny. V obou případech nedojde k precipitaci.

Další důležitou podmínkou pro úspěšnou aplikaci této metody afinitní precipitace je optimální poměr koncentrací intereagujících složek. Stejně jako v systému protilátka – antigen je maximálního výtěžku precipitace dosaženo při poměru ligand : vazebné místo rovnému 1. Proto je nutné před provedením precipitace provést orientační precipitační experimenty při různých poměrech koncentrací obou složek.

S metodou afinitní precipitace poprvé přišli Larsson a Mosbach, kteří jako homobifunkční ligand pro purifikaci laktátdehydrogenasy z hovězího srdce použili bis-NAD⁺. Jedná se o dvě molekuly NAD⁺ kovalentně spojené pomocí dihydrazinu kyseliny adipové. Obdobné deriváty NAD⁺ byly připraveny karbodiimidovou kondenzací³. Bis-NAD⁺ není monospecifickým ligandem, v hrubém homogenátu s ním budou interagovat všechny NAD⁺ dependentní dehydrogenasy, i když různou silou. Specifitu afinitní precipitace pro danou dehydrogenasu lze zvýšit přidávkem substrátového analoga, který zvyšuje sílu interakce. Tato skutečnost platí především u enzymů s uspořádaným sekvenčním mechanismem. Afinitní precipitaci tak lze v případě glutamátdehydrogenasy vyvolat přidávkem glutarátu, u laktátdehydrogenasy přidávkem oxalátu a v případě

alkoholdehydrogenasy přidávkem pyrazolu. Irwin a Tipton dokonce vypracovali metodu afinitní precipitace, pomocí které lze díky přidávku různého substrátového analoga rozseparovat jednotlivé izoenzymy laktátdehydrogenasy⁴. Pro rozpuštění vzniklého precipitátu je možné použít NADH, který se na uvedené dehydrogenasy váže silněji než bis-NAD⁺. Obdobně Beattie a spol.⁵ připravili pro purifikaci fosfofruktokinasy z hovězího srdce bis-ATP. V tomto případě slouží ke zvýšení specifity precipitace citrát, který u tohoto enzymu vystupuje jako allosterický inhibitor.

NAD⁺ a ATP jsou však velmi nestálé látky, což samozřejmě platí i o jejich bis-derivátech. Nezanedbatelná je rovněž jejich cena. Proto byly k identickému účelu, stejně jako v případě afinitní chromatografie, použity jako pseudoafinitní ligandy deriváty triazinových barev – Cibacron Blue F3GA (cit.^{6,7}) a Procion Blue H-B (cit.^{8,9}), které vykazují obdobnou afinitu vůči dehydrogenasám a jiným bílkovinám.

Poslední aplikací afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů je precipitace pomocí tzv. bis-chelátů¹⁰ – ethylenglykoltetraoctové kyseliny – EGTA a polyethylenglykol-bisiminodiocové kyseliny – PEG(IDA)₂ s navázanými kovovými ionty Cu²⁺ nebo Zn²⁺. Tato metoda je použitelná pro bílkoviny s více vazebnými místy pro koordinační vazbu kovových iontů, především s povrchově dostupnými histidinyllovými zbytky. Vzhledem k tomu, že kratší polyhistidinyllové řetězce jsou často využívány v rekombinantních technologiích pro usnadnění purifikace rekombinantních bílkovin, nabízí se zde aplikace právě této metody¹¹.

Identické precipitační chování jako bis-ligandy vykazují rovněž tzv. polyligandy, které ve své molekule obsahují více než dvě molekuly ligandu. Morris a spol.¹² použili biotin navázaný na polyakrylamidovém řetězci jako polyligand pro avidin. Jednalo se však pouze o předběžné experimenty prováděné na modelových směsích a není možné objektivně posoudit potenciální výhody tohoto uspořádání.

Jak je patrné, metoda afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů má řadu problematických míst a nejedná se tedy o metodu univerzální. Nevýhodou je rovněž dlouhá inkubační doba potřebná pro precipitaci, která u některých systémech dosahuje až 20 hodin. Tento mechanismus je však vhodný především pro bílkoviny citlivé na změny fyzikálně chemických vlastností roztoků. Přehled aplikací afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů je uveden v tabulce I.

Tabulka I

Přehled využití afinitní precipitace pomocí homobifunkčních ligandů pro purifikaci bílkovin

Bílkovina	Ligand	Zdroj	Cit.
Laktátdehydrogenasa	bis-NAD ⁺	hovězí srdce	1,4,13–15
Glutamátdehydrogenasa	bis-NAD ⁺	hovězí a krysí játra	13–15
Alkoholdehydrogenasa	bis-NAD ⁺	kvasniční	13,15
Fosfofruktokinasa	bis-ATP	hovězí srdce	5
Laktátdehydrogenasa	bis-Cibacron Blue F3GA	králičí svaly	6,7
Sérový albumin	bis-Cibacron Blue F3GA	hovězí sérum	6,7
Laktátdehydrogenasa	bis-Procion Blue H-B	králičí svaly	8,9
Hemoglobin	(Zn ²⁺) ₂ EGTA	lidský	10
Myoglobin	(Cu ²⁺) ₂ PEG(IDA) ₂	velrybí	10
Galaktosadehydrogenasa	(Zn ²⁺) ₂ EGTA	rekombinatní	11

Tabulka II
Přehled polymerů použitých při afinitních precipitacích

Polymer	Precipitační podmínky	
	rozpustný	nerozpustný
<i>Přírodní polymery</i>		
Chitosan	< pH 5,5	> pH 8,5
Alginát		Ca ²⁺
Dextran		Concanavalin A
Galaktomannan		B ₄ O ₇ ²⁺
<i>Syntetické polymery</i>		
Hydroxypropylmethylcelulosa	< pH 4,2	
Kopolymer methylmethakrylát-methakrylová kyselina Eudragit S100	> pH 5,5	< pH 4,7
Kopolymer <i>N</i> -isopropylakrylamid- <i>N</i> -akryloxysukcinimid NIPAM-NASI		> 34 °C
Kopolymer <i>N</i> -isopropylakrylamid-glycidylmethakrylát NIPAM-GMA		> 27 °C
Poly(<i>N</i> -vinylkaprolaktam) PVCL > 45 °C		
Polyethylenimin PEI		k. polyakrylová PAA

4. Afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů

Jak již bylo uvedeno, v případě metody afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů není precipitace ve skutečnosti vyvolána přímo tvorbou afinitní interakce mezi bílkovinou a ligandem. Za precipitaci je odpovědný polymer, který změnou své rozpustnosti reaguje na cílené změny ve vlastnostech okolního roztoku.

4.1. Ligandy používané při afinitních precipitacích

Pro metodu afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů lze v principu použít identické ligandy jako při afinitní chromatografii. U chromatografie má však bílkovina při průchodu chromatografickou kolonou více příležitostí pro vytvoření afinitní interakce s imobilizovaným ligandem, což samozřejmě neplatí při afinitní precipitaci, kde k interakci dochází přímo v roztoku. Ligandy použité při afinitní precipitaci tedy musí vykazovat silnější interakce než ligandy používané v afinitní chromatografii. Navíc je nutné brát v úvahu, že po vazbě ligandu na polymer dochází k jejímu zeslabení.

4.2. Polymery používané při afinitních precipitacích

Pro potřeby afinitní precipitace jsou využívány polymery rozpustné ve vodných roztocích, které jsou schopny reagovat i na malé změny ve vlastnostech roztoku. Tyto změny vyvolávají tvorbu nové fáze v dosud homogenním roztoku, tj. vznik trojrozměrné struktury. Změna potřebná pro přechod mezi rozpustnou a nerozpustnou formou polymeru by měla být mírná a nesmí mít vliv na samotné afinitní interakce. Ideální polymer pro afinitní precipitace by měl přitom splňovat několik dalších požadavků: (i) měl by obsahovat volné skupiny pro vazbu ligandu, a to v odpovídajícím počtu pro dosažení dostatečné vazebné kapacity; (ii) měl by vykazovat minimální nespécifické interakce; (iii) měl by vytvářet kompaktní preci-

pitát vhodný pro další manipulace s minimem koprecipitovaných nečistot; (iv) měl by být opakovaně použitelný; (v) měl by být levný a dostupný a (vi) neměl by být toxický.

V tabulce II je uveden přehled polymerů, které byly dosud použity při afinitních precipitacích. Jak je patrné, k afinitním precipitacím byly použity jak přírodní tak syntetické polymery. Syntetické polymery vykazují vyšší účinnost precipitace, neboť na rozdíl od polymerů přírodních nejsou polydisperzní. Za zmínku stojí některé aplikace přírodních polymerů chitosanu a alginátu, které slouží nejen jako polymery nezbytné pro precipitaci, ale současně i jako ligandy pro příslušné bílkoviny – lektin z pšenice¹⁶ a celulasu¹⁷, respektive endopolygalakturonasu¹⁸.

Žádný z doposud použitých polymerů nespĺňuje všechny uvedené požadavky. Hlavními nedostatky jsou nekompletní precipitace, nespécifické hydrofobní interakce a zachycení balastních bílkovin ve struktuře precipitátu. Uvedené problémy se pokusili odstranit Sun a Zhou využitím polymerizovaných liposomů pro afinitní precipitace¹⁹. Liposomy připravené z fosfolipidů s diacetylenovými zbytky jsou dostatečně stálé a mají hydrofilní povrch bez nespécifických interakcí, jejich precipitaci lze jednoduše vyvolat osmotickým šokem způsobeným přidávkem soli do roztoku.

4.3. Vazba ligandu na polymer

Pro vazbu ligandu na polymer lze obecně použít reakce, jež jsou používány pro syntézu sorbentů pro afinitní chromatografii či imobilizaci enzymů. Volba reakce bude záviset na dostupných funkčních skupinách polymeru a ligandu. Při této reakci nesmí docházet k zesíťování polymeru, neboť by se snížila dostupnost ligandu pro bílkovinu a rozpustnost modifikovaného polymeru. Získaný konjugát ligand–polymer si přitom musí zachovat afinitu vůči příslušné bílkovině a schopnost precipitace. U precipitační závislosti však po navázání ligandů na polymer dojde k určitým posunům, které se ještě více prohloubí po vazbě bílkoviny.

Ligand je možné vázat přímo na aktivovaný polymer, případně ho lze navázat na monomer a ten použít jako kopolymer

Tabulka III
Přehled aplikací afinitní precipitace vyvolané změnou pH

Bílkovina	Polymer-ligand	pH interakce	pH precipitace	Cit.
Trypsin	NAABA- <i>p</i> -aminobenzamidin	8,0	4,0	20
Protein A	HPMC-IgG	7,2	4,2	21
Protein A	Eudragit S100-IgG	7,0	4,5	22
L-LDH	Eudragit S100-CB	7,6	5,1	23
D-LDH	Eudragit S100	5,5	4,3	24
L-LDH	Eudragit S100-CB	5,5	4,9	25
Xylanasa	Eudragit S100	5,6	4,3	26
Lektin ze sóji	Eudragit S100-N-Ac-D-GalNH ₂		5,2	27
MAB	Eudragit S100-lipasa		4,8	28
Lektin z pšenice	chitosan	5,5	8,5	16
Celulasa	chitosan	5,0	8,0	17
Trypsin	chitosan – STI	5,5	8,5	29

L-LDH – L-laktátdehydrogenasa, N-Ac-D-GalNH₂ – *N*-acetyl-D-galaktosamin, MAB – monoklonální protilátka, HPMC – hydroxypropylmethylcelulosa, STI – inhibitor trypsinu ze sóji, NAABA – *N*-akryloyl-aminobenzoová kyselina, CB – Cibacron Blue 3GA

Tabulka IV
Přehled aplikací afinitní precipitace vyvolané přidávkem polyvalentních iontů

Bílkovina	Polymer-ligand	Sítující činidlo	Cit.
Trypsin	alginát-STI	Ca ²⁺	30
Endogalakturonasa	alginát	Ca ²⁺	18
L-LDH	Eudragit S100-CB	50 mM Ca ²⁺ + 40 °C	31
Pyruvátkinasa	Eudragit S100-CB	50 mM Ca ²⁺ + 40 °C	31
ADH	Eudragit S100-CB	50 mM Ca ²⁺ + 40 °C	32
IgG	galaktomannan-protein A	B ₄ O ₇ ²⁻	33

L-LDH – L-laktátdehydrogenasa, ADH – alkoholdehydrogenasa, STI – inhibitor trypsinu ze sóji, CB – Cibacron Blue 3GA

při syntéze polymeru. K vazbě ligandu se nepoužívá raménko, neboť modifikovaný polymer je při inkubaci se vzorkem v rozpuštěném stavu a jeho řetězce jsou natolik flexibilní, že raménko není nutné. Po reakci je nezbytně důkladně odstranit nezreagovaný ligand, a to opakovanou precipitací modifikovaného polymeru.

4.4. Precipitační módy

Metoda použitelná k precipitaci komplexu bílkovina – ligand–polymer bude především záviset na daném polymeru, nezanedbatelné jsou však rovněž vlastnosti roztoku, ze kterého má být precipitace prováděna.

Precipitace vyvolaná změnou pH. Polymery, které ve své struktuře obsahují jak ionizovatelné, tak i hydrofobní skupiny, jsou při určitém pH nabitě a budou rozpustné v roztoku, při jiném pH naopak náboj ztrácejí a pak převládají jejich hydrofobní vlastnosti a dochází k precipitaci. Tohoto efektu je právě využíváno při afinitních precipitacích. Inkubace bílkoviny s konjugátem ligand–polymer se provádí při takovém pH, při kterém je polymer rozpustný, následně je změnou pH vyvolána jeho precipitace. Přehled některých aplikací precipitace vyvolané změnou pH je uveden v tabulce III.

Precipitace vyvolaná přidávkem polyvalentních iontů. Přídavek opačně nabitých polyvalentních iontů k roztoku nabitého polymeru vyvolává tvorbu komplexu, který postupně narůstá a následně precipituje. Účinnost precipitace je přitom závislá na daném iontu. Typickým příkladem takového polymeru je alginát, který precipituje po přidávku dvojmocných nebo trojmocných iontů např. Ca²⁺. Eudragit S100, který je obvykle precipitován změnou pH, lze rovněž precipitovat přidávkem Ca²⁺ v kombinaci se zvýšenou teplotou. Na identickém principu je rovněž založena precipitace galaktomannamu pomocí iontu B₄O₇²⁻. Přehled některých aplikací precipitace vyvolané přidávkem polyvalentních iontů je uveden v tabulce IV.

Precipitace vyvolaná přidávkem opačně nabitého polymeru. Precipitaci nabitého polymeru lze vyvolat přidávkem opačně nabitého polymeru, vzniklý polyelektrolytový komplex je následně precipitován změnou pH. Při jediné doposud publikované aplikaci uvedeného způsobu precipitace použili Dis-sing a Mattiasson³⁴ pro afinitní precipitaci laktátdehydrogenasy z hovězího srdce jako konjugát Cibacron Blue 3GA navázanou na polyethyleniminu a kyselinu polyakrylovou jako opačně nabitý polymer.

Precipitace vyvolaná změnou teploty. Charakteristickým parametrem některých polymerů je tzv. bod zákalu, což je te-

Tabulka V
Přehled aplikací afinitní precipitace vyvolané změnou teploty

Bílkovina	Polymer-ligand	Precipitační teplota	Cit.
Trypsin	PVCL-STI	45 °C	35
Alkalická proteasa	NIPAM- <i>p</i> -aminobenzamidin	50 °C + 0,94 % NaCl	36
Trypsin	NIPAM-NASI- <i>p</i> -aminobenzamidin	42 °C + 3, % (NH ₄) ₂ SO ₄	37
Trypsin	NIPAM-GMA- <i>p</i> -aminobenzamidin	34 °C + 3,8 % (NH ₄) ₂ SO ₄	37
Protein A	NIPAM-GMA-IgG	34 °C + 3,8 % (NH ₄) ₂ SO ₄	37
Antigen	NIPAM-GMA-MAB	31 °C	38
IgG	NIPAM-NASI-protein A	37 °C	39
Inhibitor trypsinu	VCL-VI-Cu ²⁺	45 °C	40
	NIPAM-VI-Cu ²⁺	35 °C	
Inhibitor a-amylasy	NIPAM-IDA-Cu ²⁺	35 °C	41
	NIPAM-VI-Cu ²⁺	35 °C	
Anti-BSA	IgG PST-NIPAM-GMA-BSA	30 °C	42
	PST-NIPAM-MMA-BSA	40 °C	
Antigen	NIPAM-IgG	32 °C	43
C reaktivní protein	NIPAM-GMA-APPC	32 °C + Ca ²⁺	44

BSA – hovězí sérový albumin, PVCL – polyvinylkaprolaktam, STI – inhibitor trypsinu ze sóji, NIPAM – poly-*N*-isopropylakrylamid, NASI – *N*-akryloxysukcinimid, GMA – glycidylmethakrylát, MAB – monoklonální protilátka, VCL – vinylkaprolaktam, VI – vinylimidazol, IDA – iminodioxová kyselina, PST – polystyren, MMA – methakrylová kyselina, APPC – aminofenylfosforlycholin

plota při které se původně homogenní roztok polymeru separuje do dvou fází – vodné fáze a fáze polymeru. Tento fázový přechod je způsoben asociací polymeru do větších agregátů prostřednictvím hydrofobních interakcí. Pokud tento teplotní přechod leží v rozsahu teplotní stability příslušné bílkoviny, lze polymer použít k afinitní precipitaci. K danému účelu byly použity především syntetické polymery na bázi poly(*N*-isopropylakrylamidu) – NIPAM nebo poly(*N*-vinylkaprolaktamu) – PVCL. Přehled některých aplikací precipitace vyvolané změnou teploty je uveden v tabulce V.

Precipitace vyvolaná přidávkou síťující bílkoviny. K precipitaci komplexu bílkovina – ligand – polymer lze také použít síťujícího efektu jiné polyvalentní bílkoviny. Příkladem může být precipitace komplexu laktátdehydrogenasa – Cibacron Blue 3GA-dextran pomocí lektinu concanavalinu A (cit.⁴⁵). Jedná se vlastně o využití dvou různých afinitních interakcí pro afinitní precipitaci.

4.5. Postup precipitace

Purifikace bílkovin metodou afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů probíhá v několika následných krocích:

- *vazba bílkoviny* – heterobifunkční ligand je přidán ke vzorku za podmínek, které jsou vhodné pro vytvoření afinitní interakce, vzniklý komplex bílkovina – ligand – polymer zůstává v rozpustném stavu,
- *precipitace komplexu* – některou z výše uvedených metod je vyvolána precipitace komplexu, precipitát je poté z roztoku oddělen centrifugací. Rychlost a výtěžek precipitace je možné v některých případech zvýšit přidávkou nemodifikovaného polymeru, který napomáhá vytváření precipitačních center v roztoku,
- *promytí* – pokud je precipitace prováděna z hrubého homogenního, dochází při ní k koprecipitaci nespecificky vázaných

- balastních bílkovin. Část balastních bílkovin je rovněž zachycena ve vnitřní struktuře precipitátu. Pro zvýšení specifity je nezbytné tyto bílkoviny z precipitátu odstranit, což je možné provést rozpuštěním precipitátu a jeho opětovným vysrážením, případně přímým promytím precipitátu,
- *disociace purifikované bílkoviny a odstranění konjugátu ligand – polymer* – při afinitní precipitaci je purifikovaná bílkovina navázaná nejenom na vnějším povrchu precipitátu, ale i v jeho vnitřní struktuře. Vzhledem k této skutečnosti byly testovány dva přístupy disociace bílkoviny z komplexu, a to buď přímo z precipitovaného komplexu nebo po jeho rozpuštění. V prvním případě zůstává konjugát ligand – polymer v precipitovaném stavu, což je výhodné pro jeho odstranění z roztoku separovaně bílkoviny. V druhém případě musí být ze stejného důvodu konjugát opětovně precipitován. Konkrétní metoda disociace bude záviset na daném systému bílkovina – ligand,
- *regenerace konjugátu ligand – polymer* – primární podmínkou pro ekonomicky efektivní metodu afinitní precipitace je opakované použití konjugátu ligand – polymer. Předtím je nezbytné z konjugátu odstranit nejenom všechny navázané nečistoty, ale i činidla použitá k disociaci.

4.6. Speciální modifikace metody afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů

Jedním z problémů metody afinitní precipitace pomocí heterobifunkčních ligandů jsou nespecifické interakce balastních bílkovin se samotným polymerem, které snižují specifickou aktivitu purifikovaných bílkovin. Aby předešli tomuto problému, vypracovali Shu a spol. tzv. sekvenční precipitační proceduru²⁴, při které jsou za sebou provedeny nespecifická a afinitní precipitace. Tuto metodu aplikovali při purifikaci

D-laktátdehydrogenasy z bakterie *Leuconostoc mesenteroides*. Při nespecifické precipitaci byl k hrubému extraktu přidán nemodifikovaný polymer – Eudragit S100, přičemž došlo k precipitaci balastních bílkovin a D-laktátdehydrogenasa zůstala v roztoku. Získaný supernatant byl po úpravě pH podroben vlastní afinitní precipitaci s konjugátem Cibacron Blue 3GA-Eudragit S100. Pomocí této metody došlo nejenom ke zvýšení specifické aktivity výsledného enzymového preparátu, nezanedbatelnou výhodou je rovněž možnost použít pro purifikaci přímo hrubý extrakt, neboť při prvním precipitačním kroku dochází k odstranění zbývajících fragmentů bakteriálních buněk.

Kombinaci metody afinitní precipitace s metodou dvoufázových separací využili pro purifikaci laktátdehydrogenasy z prasečích svalů Guoquiand a spol.²⁵ Vyšli přitom ze skutečnosti, že při dvoufázových separacích v systému polyethylenglykol – dextran se Eudragit S100 separuje z více než 98 % v horní polyethylenglykolové fázi. Hrubý extrakt byl nejprve podroben dvoufázové separaci v systému 6 % polyethylenglykol 8000 – 8 % dextran T250, přičemž LDH se separovala do dolní dextranové fáze. Horní polyethylenglykolová fáze byla nahrazena novou, do které byl navíc přidán konjugát Cibacron Blue 3GA-Eudragit S100. Tím došlo ke změně distribučního koeficientu laktátdehydrogenasy a ta se separovala do horní polyethylenglykolové fáze. Komplex laktátdehydrogenasa – Cibacron Blue 3GA-Eudragit S100 byl z polyethylenglykolové fáze precipitován snížením pH.

5. Afinitní precipitace pomocí modifikovaných fosfolipidů

Také u této metody není precipitace vyvolána přímo tvorbou afinitní interakce mezi příslušnou bílkovinou a konjugátem ligand–fosfolipid. K precipitaci vzniklého komplexu dochází díky hydrofobním interakcím mezi alifatickými řetězci jednotlivých fosfolipidových molekul. Tyto řetězce byly původně komplexovány molekulami neiontového detergentu, avšak po přidavku roztoku fosfolipidu v neiontovém detergentu do roztoku purifikované bílkoviny dochází ke snížení koncentrace detergentu a řetězce přestávají být chráněny proti vzájemným hydrofobním interakcím. Tím se tato metoda afinitní precipitace liší od metody, která využívá heterobifunkční ligandy, neboť pro vyvolání precipitace není nutná změna fyzikálně chemických vlastností výsledného roztoku. Jak afinitní interakce, tak i hydrofobní interakce jsou totiž inicializovány prostým smícháním roztoku bílkoviny s roztokem fosfolipidů. Kilpatrick a spol. použili při svých experimentech syntetický fosfolipid – dimyristoylfosfatidylethanolamin, na který navázali jako ligand biotin, a oktaethylenglykol-n-dodecylether jako neiontový detergent. Uvedený konjugát biotin–fosfolipid byl využit pro purifikaci avidinu z vaječného bílku², respektive pro purifikaci polyklonálních a monoklonálních protilátek proti biotinu⁴⁵.

6. Závěr

Metoda afinitních precipitací kombinuje účinnost a jednoduchost klasických precipitačních metod se selektivitou danou metodám založeným na afinitních interakcích. Jejimi hlavní-

mi výhodami jsou především nízké provozní náklady, rychlé a snadné provedení a možnost přímé práce s hrubými bílkovinnými extrakty. V tomto směru lze předpokládat její další rozvoj jako možné alternativy afinitní chromatografie v polo-provozních a provozních aplikacích.

LITERATURA

1. Larsson P.-O., Mosbach K.: FEBS Lett. 98, 333 (1979).
2. Powers D. P., Carbonell R. G., Willard B. L., Kilpatrick P. K.: Biotechnol. Prog. 8, 436 (1992).
3. Irwin J. A., Tipton K. F.: Essays Biochem. 29, 137 (1995).
4. Irwin J. A., Tipton K. F.: Biochem. Soc. Trans. 23, 365S (1995).
5. Beattie R. E., Buchanan M., Tipton K. F.: Biochem. Soc. Trans. 15, 1043 (1987).
6. Hayet M., Vijayalakshmi M. A.: J. Chromatogr. 376, 157 (1986).
7. Lowe C. R., Pearson J. C., v knize: *Affinity Chromatography and Biological Recognition* (Chaiken I. M., Wilchek M., Parikh I., ed.), str. 421. Academic Press, London 1983.
8. Pearson J. C., Burton S. J., Lowe C. R.: Anal. Biochem. 158, 382 (1986).
9. Pearson J. C., Clonis Y. D., Lowe C. R.: J. Biotechnol. 11, 267 (1989).
10. Van Dam M. E., Wuenschell G. E., Arnold F. H.: Biotechnol. Appl. Biochem. 11, 492 (1989).
11. Lilius G., Persson M., Bülow L., Mosbach K.: Eur. J. Biochem. 198, 499 (1991).
12. Morris J. E., Hoffman A. S., Fisher R. R.: Biotechnol. Bioeng. 41, 991 (1993).
13. Flygare S., Griffin T., Larsson P.-O., Mosbach K.: Anal. Biochem. 133, 409 (1983).
14. Larsson P.-O., Flygare S., Mosbach K., v knize: *Methods in Enzymology* (Jakoby W. B. ed.), sv. 104, str. 364. Academic Press, London 1984.
15. Beattie R. E., Graham L. D., Griffin T. O., Tipton K. F.: Biochem. Soc. Trans. 12, 433 (1985).
16. Senstad C., Mattiasson B.: Biotechnol. Bioeng. 34, 387 (1989).
17. Homma T., Fujii M., Mori J. I., Kawakami T., Kuroda K., Taniguchi M.: Biotechnol. Bioeng. 41, 405 (1993).
18. Gupta M. N., Guoqiang D., Mattiasson B.: Biotechnol. Appl. Biochem. 18, 321 (1993).
19. Sun Y., Yu K., Jin X. H., Zhou X. Z.: Biotechnol. Bioeng. 47, 20 (1995).
20. Schneider M., Guillot C., Lamy B.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 369, 257 (1981).
21. Taniguchi M., Kobayashi M., Natsui K., Fujii M.: J. Ferment. Bioeng. 68, 32 (1989).
22. Kamihara M., Kaul R., Mattiasson B.: Biotechnol. Bioeng. 40, 1381 (1992).
23. Guoqiang D., Kaul R., Mattiasson B.: J. Chromatogr. 668, 145 (1994).
24. Guoqiang D., Kaul R., Mattiasson B.: Bioseparation 3, 333 (1993).
25. Shu H. C., Guoqiang D., Kaul R., Mattiasson B.: J. Biotechnol. 34, 1 (1994).
26. Gupta M. N., Guoqiang D., Kaul R., Mattiasson B.: Biotechnol. Tech. 8, 117 (1994).

27. Linné Larsson E., Mattiasson B.: *J. Biotechnol.* 49, 189 (1996).
28. Taipa M. A., Kaul R., Mattiasson B., Cabral J. M.: *J. Mol. Recognit.* 11, 240 (1998).
29. Senstad C., Mattiasson B.: *Biotechnol. Bioeng.* 33, 216 (1989).
30. Linné E., Garg N., Kaul R., Mattiasson B.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 16, 48 (1992).
31. Guoqiang D., Lali A., Kaul R., Mattiasson B.: *J. Biotechnol.* 37, 23 (1994).
32. Guoqiang D., Benhure M. A. N., Kaul R., Mattiasson B.: *Biotechnol. Prog.* 11, 187 (1995).
33. Bradshaw A. P., Sturgeon R. J.: *Biotechnol. Tech.* 4, 67 (1990).
34. Dissing U., Mattiasson B.: *J. Biotechnol.* 52, 1 (1996).
35. Galaev I. Y., Mattiasson B.: *Biotechnol. Tech.* 6, 353 (1992).
36. Pécs M., Eggert M., Schügerl K.: *J. Biotechnol.* 21, 137 (1991).
37. Nguyen A. L., Luong J. H. T.: *Biotechnol. Bioeng.* 34, 1186 (1989).
38. Monji N., Hoffman A. S.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 14, 107 (1987).
39. Chen J. P., Hoffman A. S.: *Biomaterials* 11, 631 (1990).
40. Galaev I. Y., Kumar A., Agarwal R., Gupta M. N., Mattiasson B.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 68, 121 (1997).
41. Kumar A., Galaev I. Y., Mattiasson B.: *Biotechnol. Bioeng.* 59, 695 (1998).
42. Kondo A., Kaneko T., Higashitani K.: *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1 (1994).
43. Takei Y. G., Matsukata M., Aoki T., Sanui K., Ogata N., Kikuchi A., Sakurai Y., Okano T.: *Bioconjugate Chem.* 5, 579 (1994).
44. Mori S., Nakata Y., Endo H.: *Protein Expression Purif.* 5, 153 (1994).
45. Senstad C., Mattiasson B.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 11, 41 (1989).
46. Powers D. P., Carbonell R. G., Kilpatrick P. K.: *Biotechnol. Bioeng.* 44, 509 (1994).

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

Affinity precipitation combines high performance and simplicity of precipitation methods with high selectivity achieved in affinity methods of protein purification. The affinity precipitation could have a great potential as an alternative or complement to affinity chromatography, mainly in downstream processes. Basic principles and characteristics of the method are given. In addition, the paper describes some special applications of affinity precipitation in protein purification.