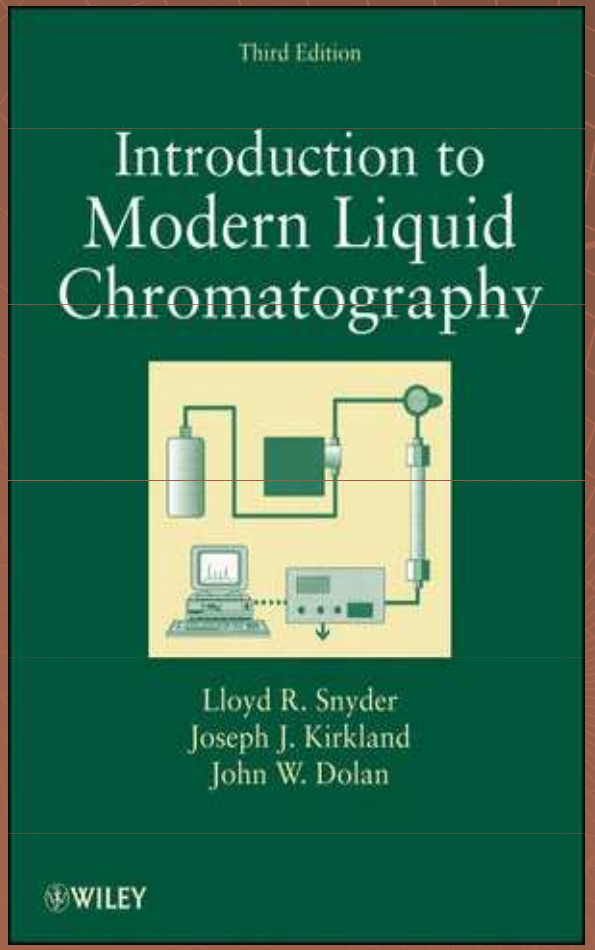
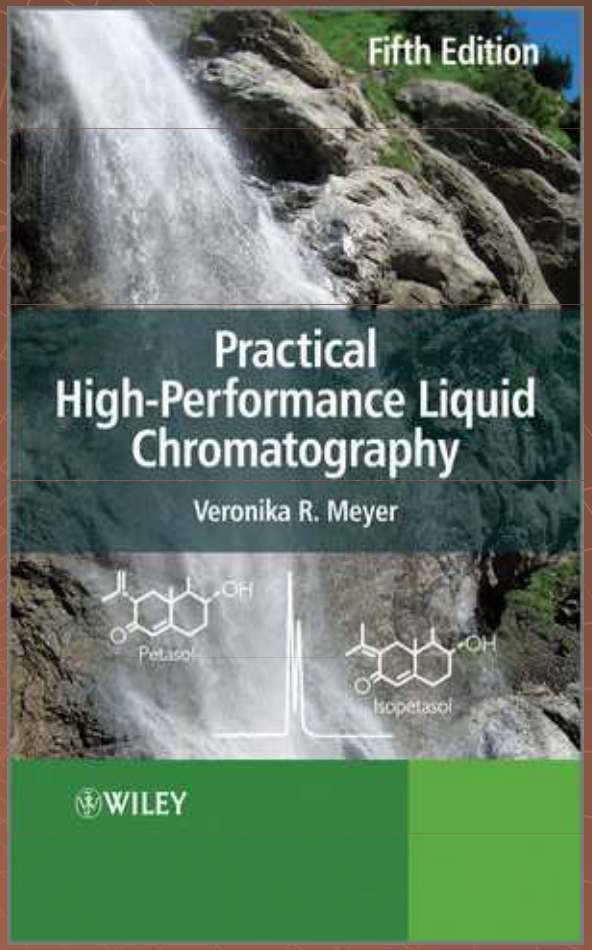
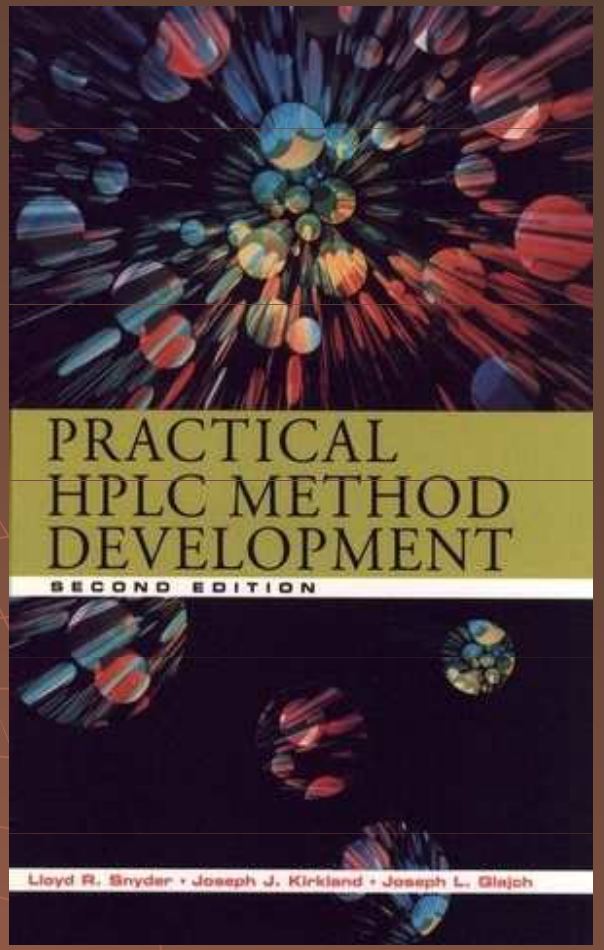
# Chromatografické metody I.

# Literatura


Third Edition
Introduction to Modern Liquid Chromatography
Lloyd R. Snyder
Joseph J. Kirkland
John W. Dolan
WILEY


Fifth Edition
Practical High-Performance Liquid Chromatography
Veronika R. Meyer
Petasol
Isopetasol
WILEY


PRACTICAL HPLC METHOD DEVELOPMENT
SECOND EDITION
Lloyd R. Snyder • Joseph J. Kirkland • Joseph L. Glajch

# Historie chromatografie

- 1906 Tswett (Cvět)

Poprvé použit pojem chromatografie, chromatogram z řeckých slov χηρομα (barva) a γραφειν (psáti).

- 1931 Kuhn a Lederer

znovu objevení chromatografie

- 1940-49 Martin Synge

Papírová a tenkovrstvá chromatografie

# Historie chromatografie

- 1950 Aminokyselinový analyzátor

- 1950-1960

Sober, Peterson a Gutter zavedli používání médií na bázi celulosy (iontoměniče).

Porath a Flodin poprvé použili média na bázi dextranu pro gelovou filtraci.

Hjerten popsal použití separačních médií na bázi agarosy.

# Historie chromatografie

- 1970-79 Halasz, Horvath, Kirkland

HPLC ("High Performance Liquid Chromatography")

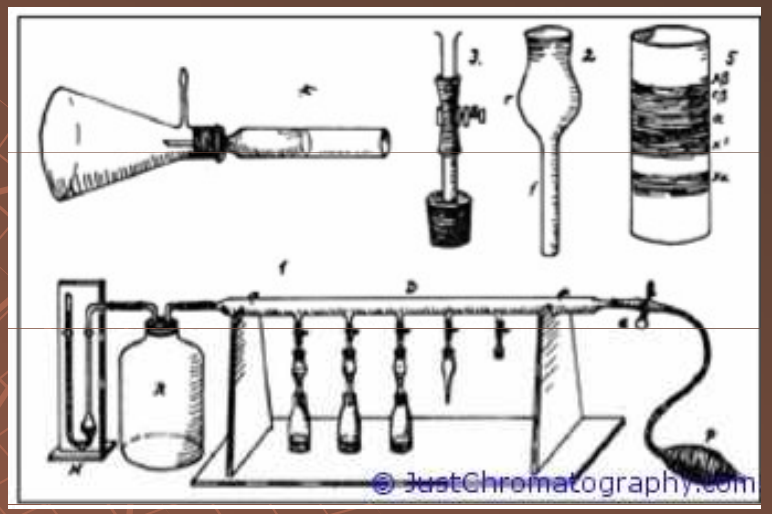
1980-1989 Pharmacia

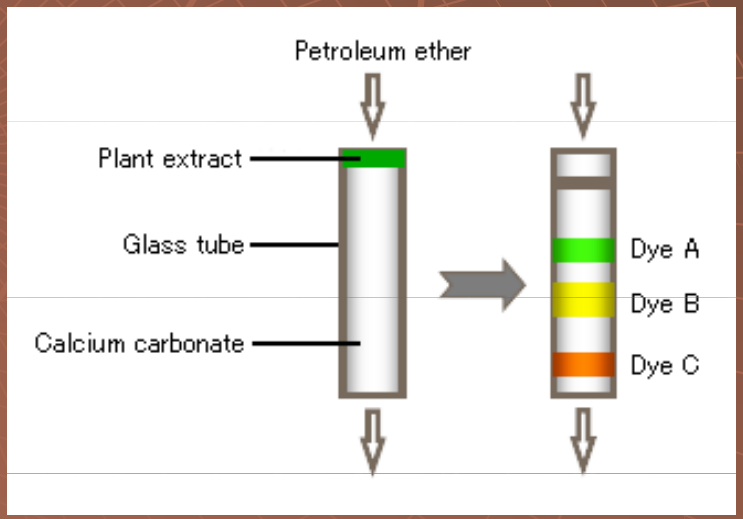
Nová média s vyšší mechanickou odolností ( CL-agarosa, "cross-linked") umožňují použití vyšších tlaků pro separaci; nový střednětlaký systém "Fast Protein Liquid Chromatography" (FPLC)

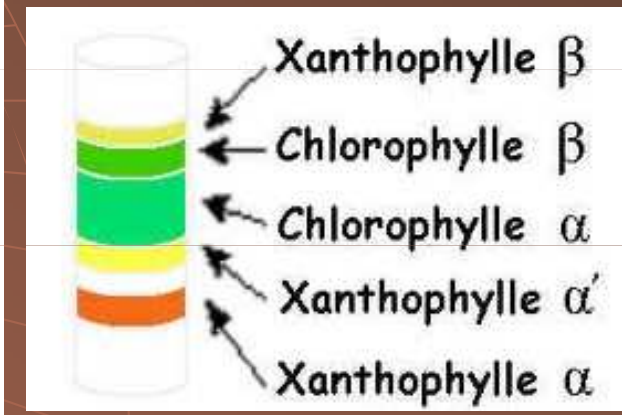
- 2004 Waters

UPLC ("Ultra Performance Liquid Chromatography")

# Mikhail Semyonovich Tsvet Chromatographia 1906



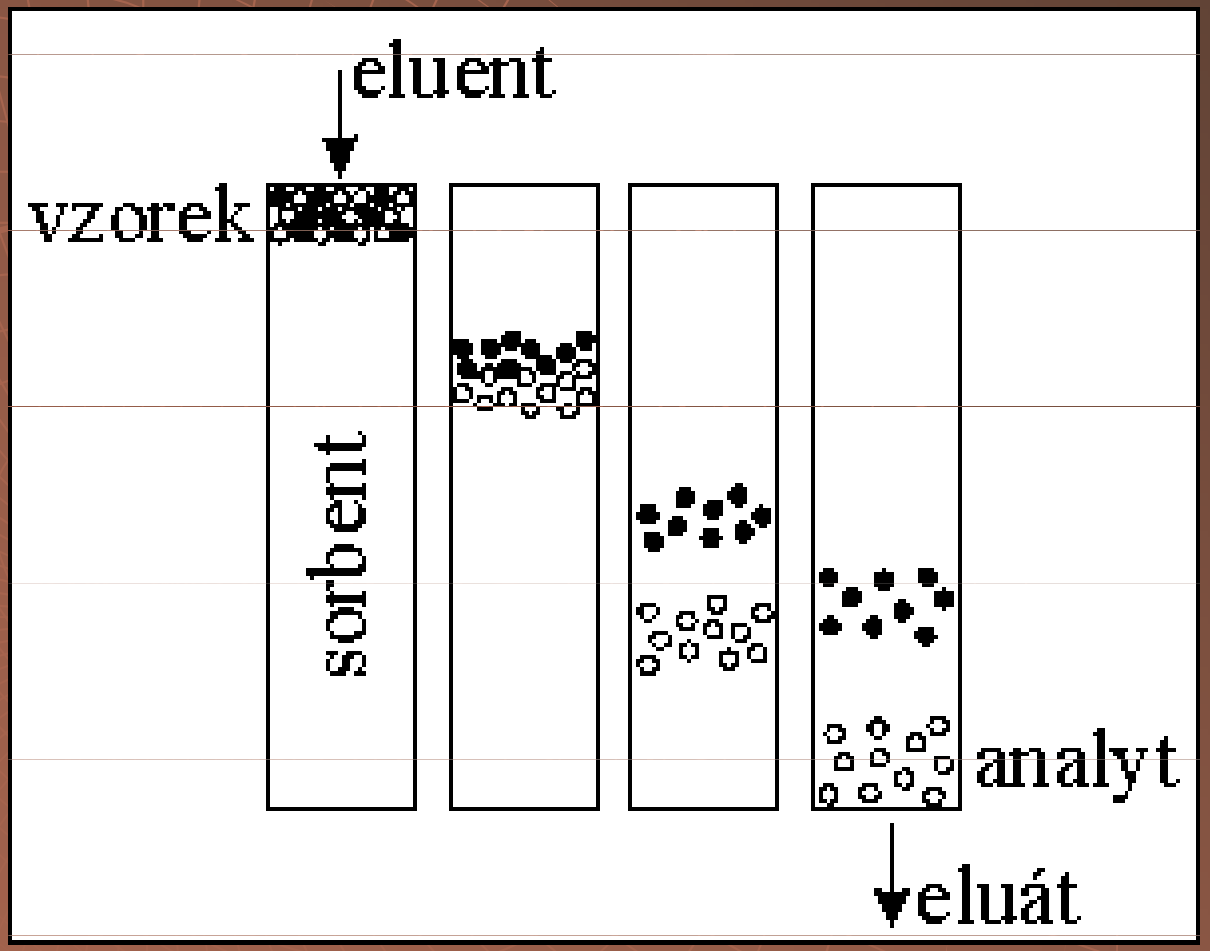



# Podstata

*„Při chromatografii dochází k neustálému vytváření rovnovážných stavů separované látky mezi dvě fáze – stacionární a mobilní.“*

# Chromatografie



# Chromatografie

- Mobilní fáze - kapalina – LC
  plyn – GC
- Eluce - Izokratická – stejná eluční síla
  Gradientová – rostoucí eluční síla
- Použití - analytická
  preparativní

# Kapalinová chromatografie LC

- Mobilní fáze - kapalina
- Stacionární fáze - pevná fáze, kapalina

# Provedení LC

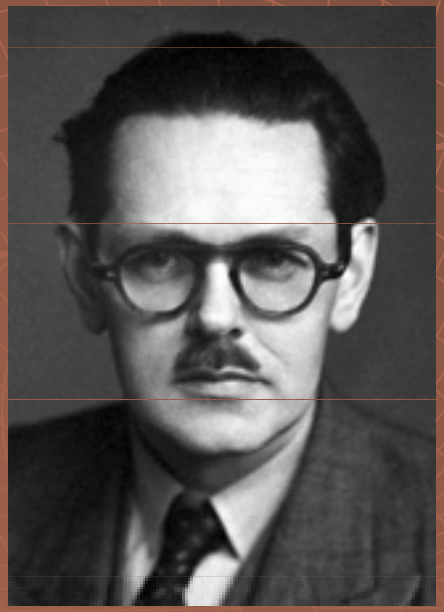
- Papírová PC
- Tenkovrstvá TLC
- Kolonová CC

# Teoretické aspekty chromatografie

# Teorie „Ideální lineární chromatografie“

Martin, Synge

Martin Synge

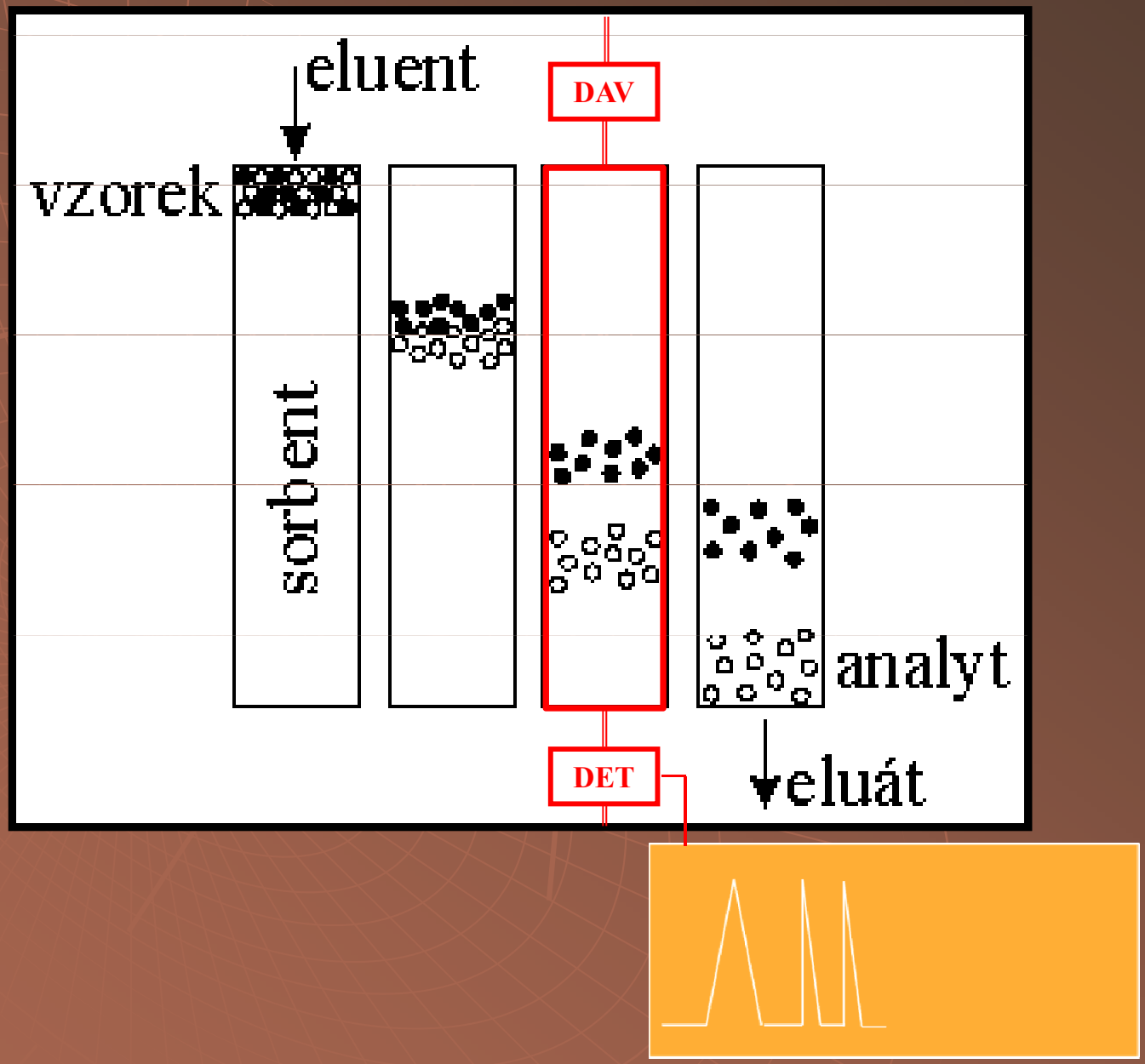


Nobelova cena za chemii
1952

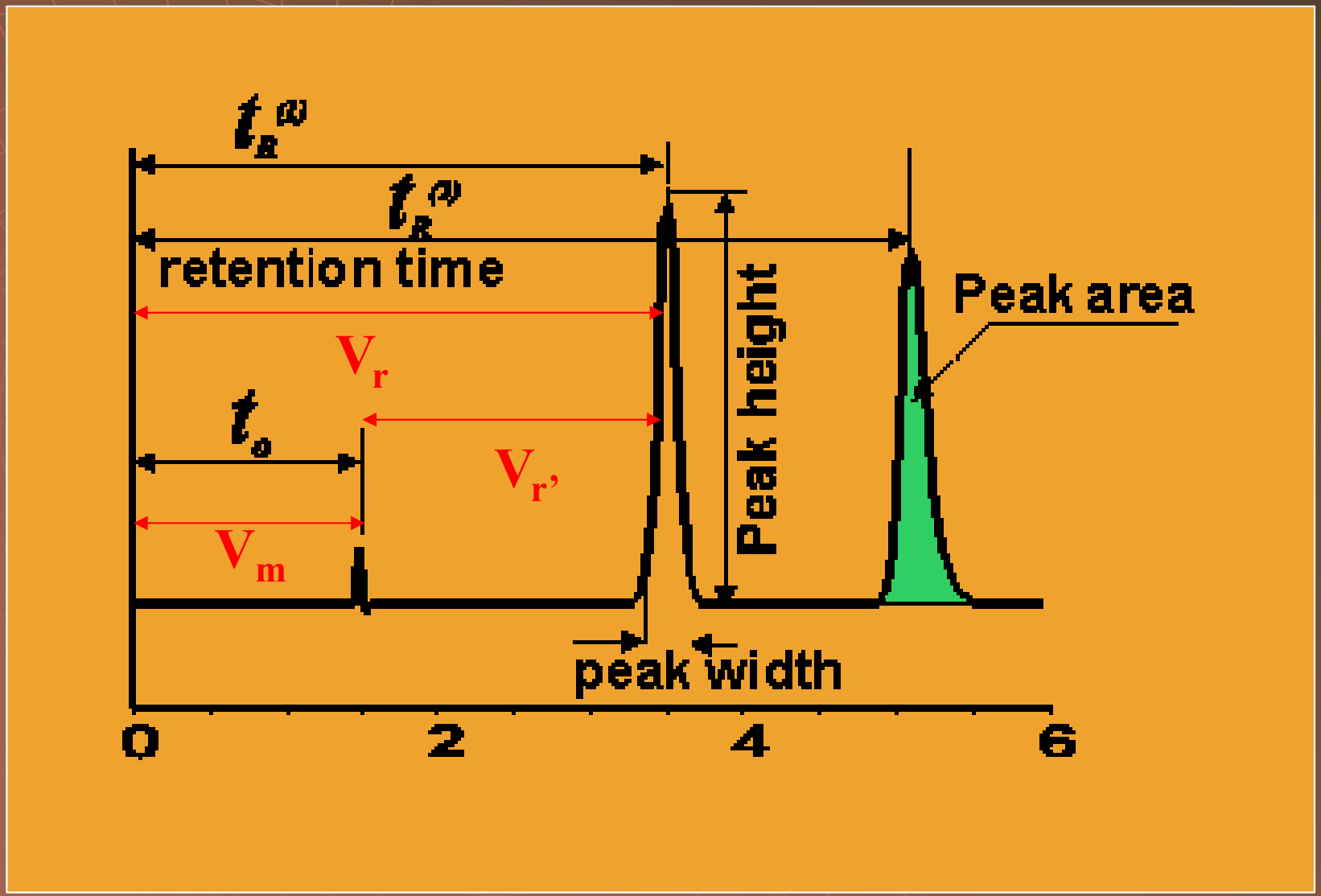
# Teorie „Ideální lineární chromatografie“

1. Nekonečně rychlé ustavení rovnovah
2. Pístový tok mobilní fáze
3. Nulová difuse
4. Lineární sorpční isoterma

# Chromatografie



# Chromatogram



# Retenční – eluční čas $t_r$

- Doba od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky

# Retenční – eluční objem $V_r$

- Objem mobilní fáze proteklý od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křuvky

$$V_r = t_r \cdot F_m$$

$F_m$ – objemová rychlost mobilní fáze

# Mrtvý objem

$$V_r = V_m + V_{r'}$$

$V_r$ – zdánlivý retenční objem

$V_{r'}$- redukovaný (skutečný) retenční objem

$V_m$- mrtvý objem – mimokolonové příspěvky
+ mimočásticový objem kolony

# Kapacitní faktor k’

$$k' = \frac{V_r - V_m}{V_m} = \frac{V_{r'}}{V_m} = K_D \cdot \frac{V_S}{V_M}$$

k’= 1 – 10

$V_s$ – objem stacionární fáze

$V_M$ – objem mobilní fáze

Distribuční koeficient $K_D = \frac{c_S}{c_M}$

$c_s$ – rovnovážná koncentrace látky ve stacionární fázi

$c_M$ – rovnovážná koncentrace látky ve mobilní fázi

# Selektivita
# Retenční faktor α

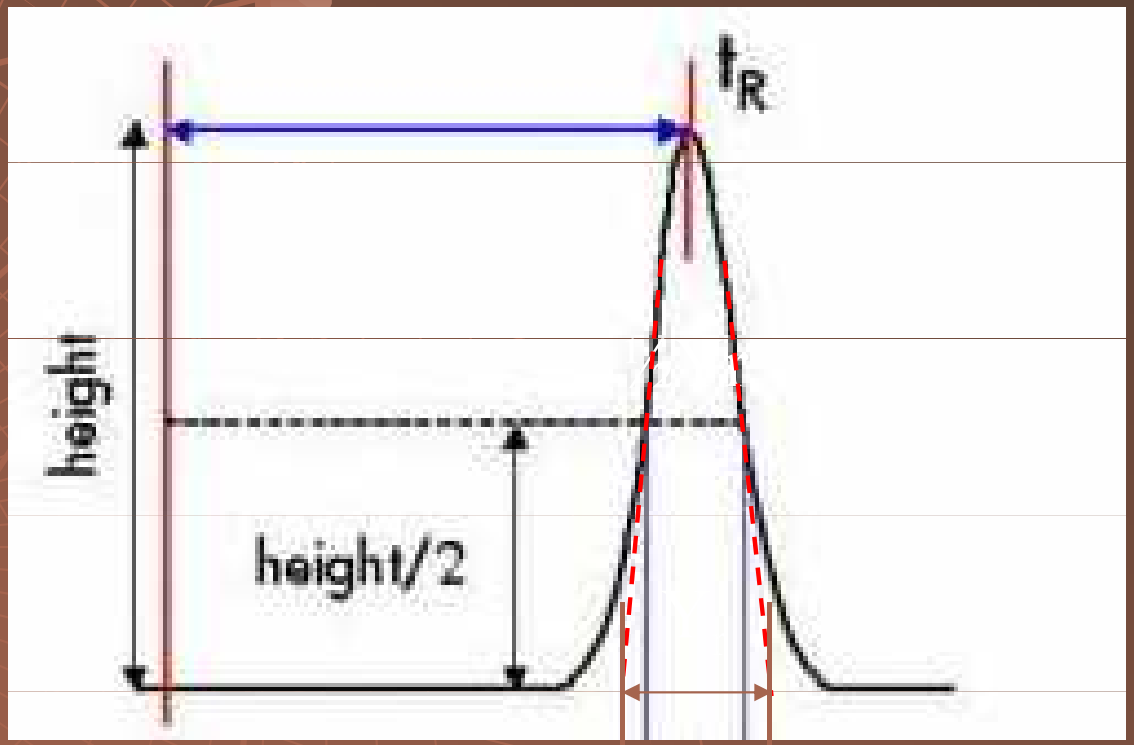
$$\alpha = \frac{V_{r2}}{V_{r1}} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

# Účinnost kolony (izokratická eluce)

## počet teoretických pater N

$$N = 16 \cdot \left( \frac{t_r}{Y_r} \right)^2$$

$$N = 5.545 \cdot \left( \frac{t_r}{1/2 Y_r} \right)^2$$



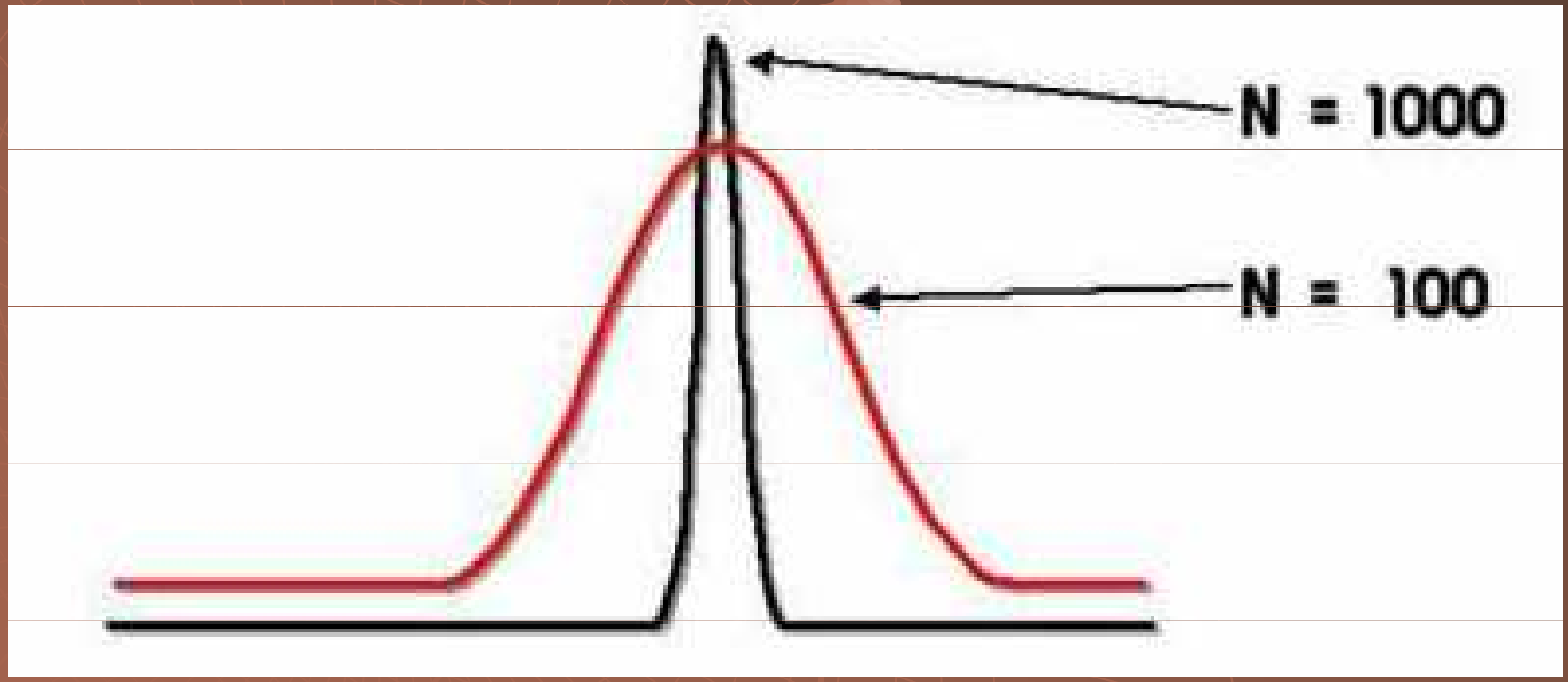
# Účinnost kolony (izokratická eluce)

## výškový ekvivalent teoretického patra H

$$H = \frac{l}{N}$$

l – délka kolony

# Účinnost kolony



# Účinnost kolony (gradientová eluce)

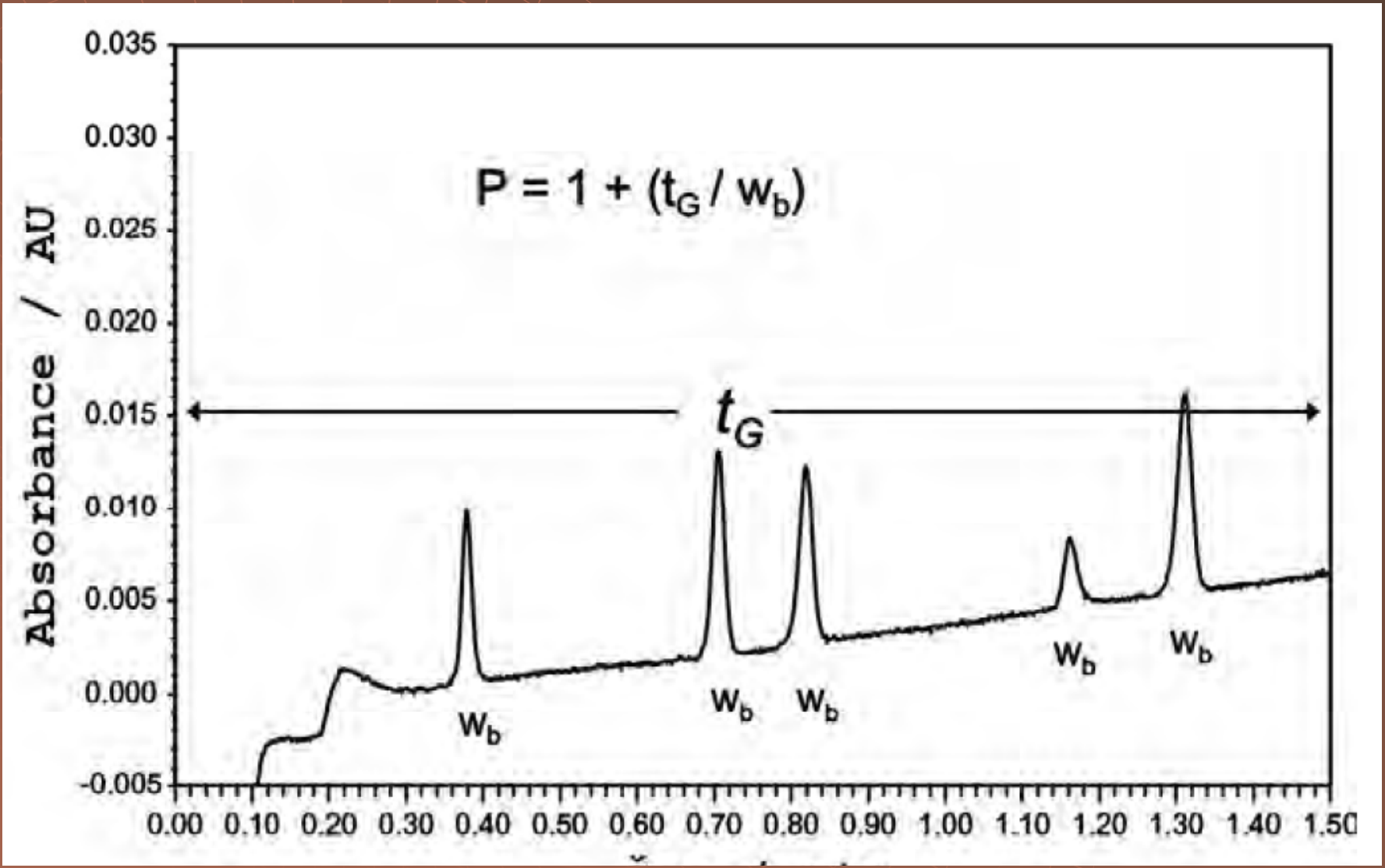
## kapacita píku P

$$P = 1 + \frac{t_g}{(1/n)\sum_{1}^{n} w_b}$$

$t_g$ – celková doba gradientu

# Účinnost kolony (gradientová eluce)

## kapacita píku P

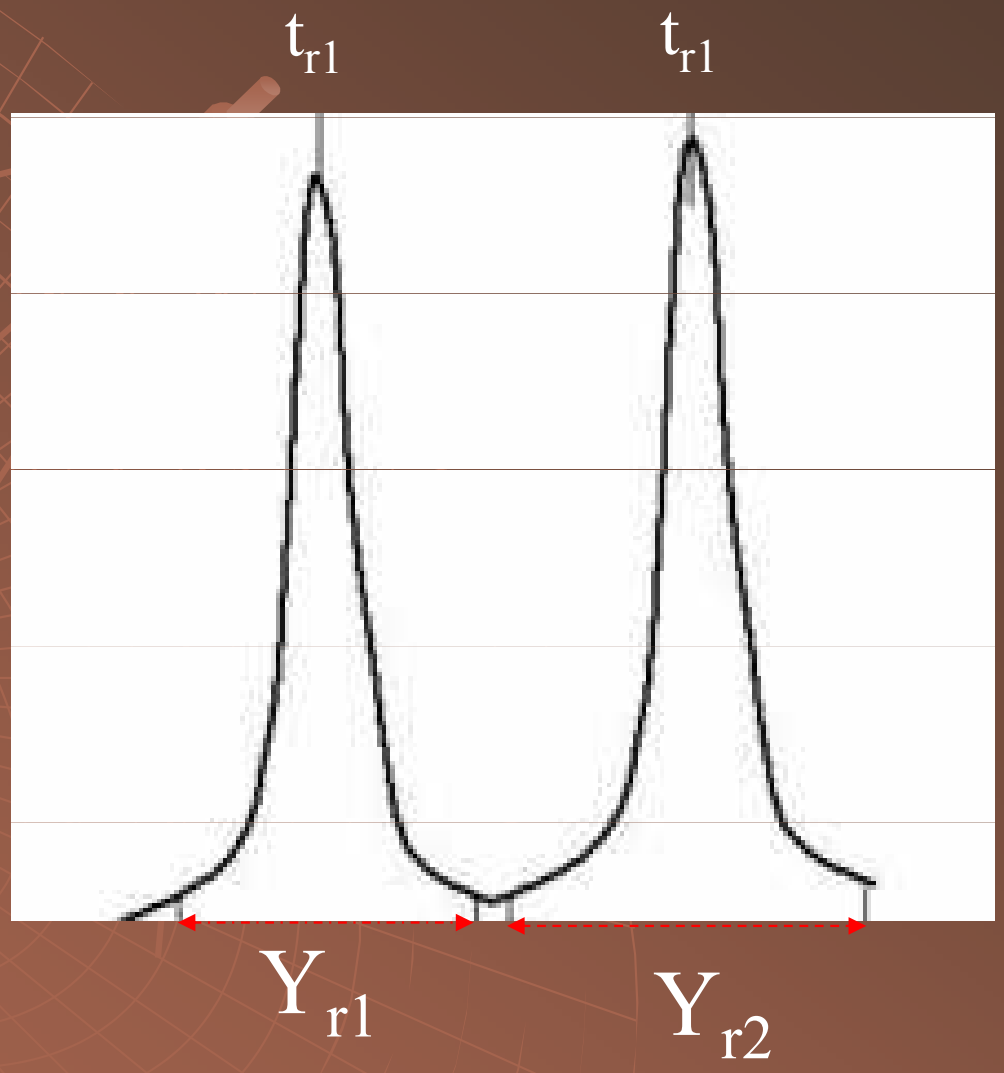


# Rozlišení

$$R_{12} = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{Y_{r1} + Y_{r2}}$$

$R_{12}$=1.5 – nulové překrytí

$R_{12}$=1.0 – překrytí 2 %



# Rozlišení

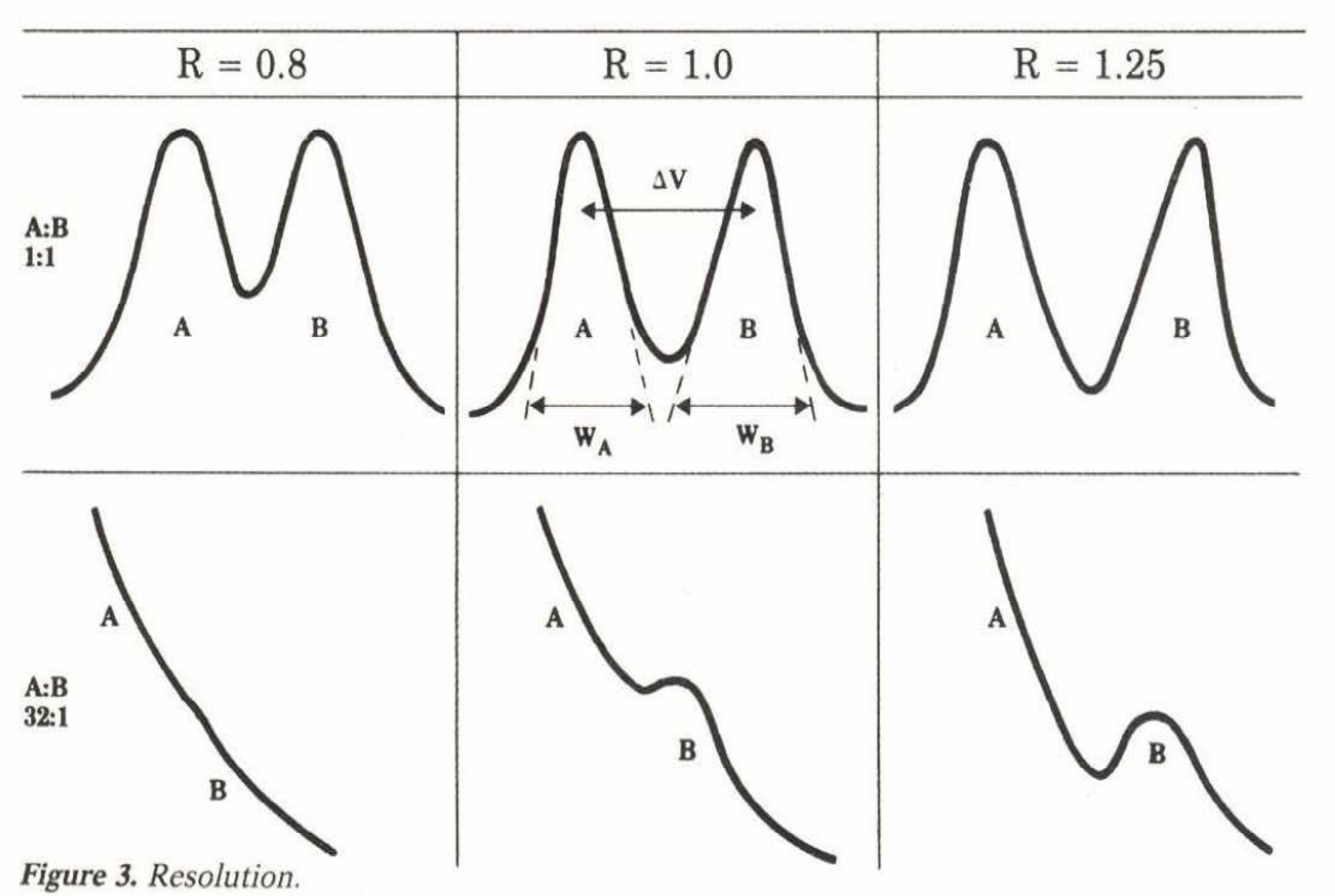



*Figure 3. Resolution.*

# Vliv jednotlivých faktorů na rozlišení

$$R_{12} = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{1 + k'} \cdot \sqrt{N}$$

Selektivita

Kapacita

Účinnost

# Vliv jednotlivých faktorů na rozlišení

- **faktor selektivity** lze ovlivnit:

-změnou stacionární fáze
-změnou mobilní fáze
-současnou změnou obou fází
-změnou rychlosti toku mobilní fáze

# Vliv jednotlivých faktorů na rozlišení

- **faktor kapacity** lze ovlivnit:

-množstvím stacionární fáze v koloně

-změnou stacionární nebo mobilní fáze

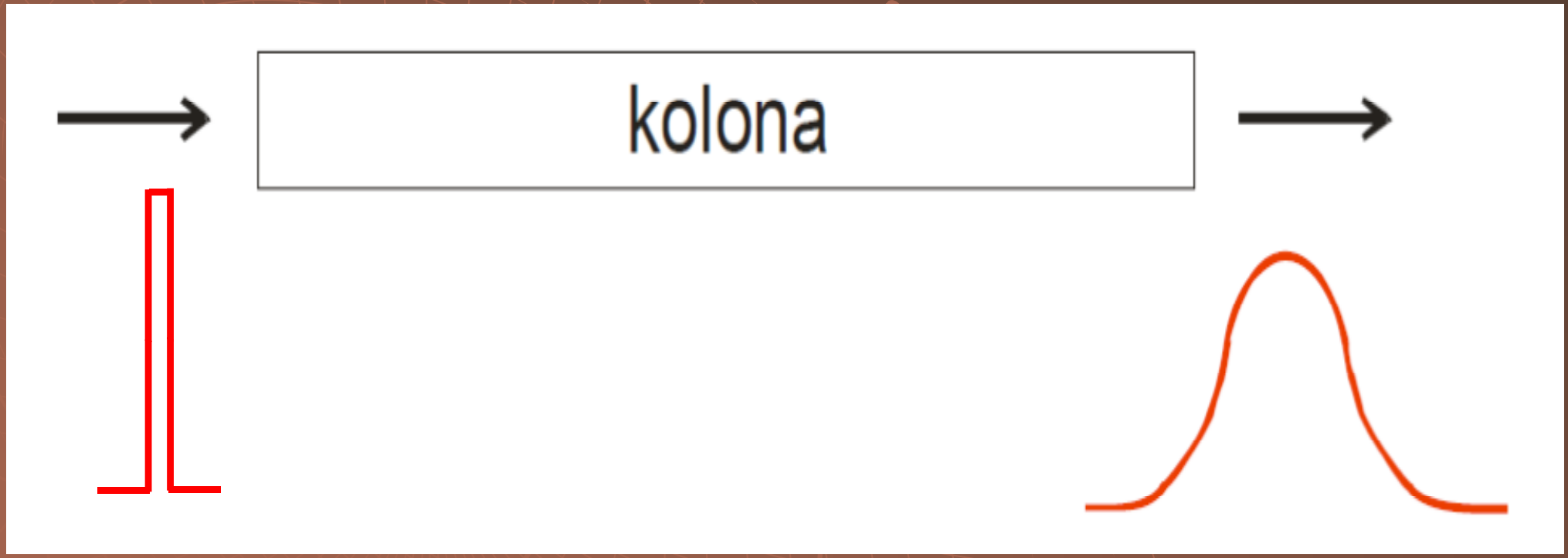
-změnou teploty kolony

# Vliv jednotlivých faktorů na rozlišení

- **faktor účinnosti** lze ovlivnit:

-délkou kolony
-rychlostí průtoku mobilní fáze
-velikostí částic sorbentu
-teplotou, viskozitou mobilní i stacionární fáze

# Vznik eluční křivky – peaku (píku)



# „Dynamická difuzní teorie“

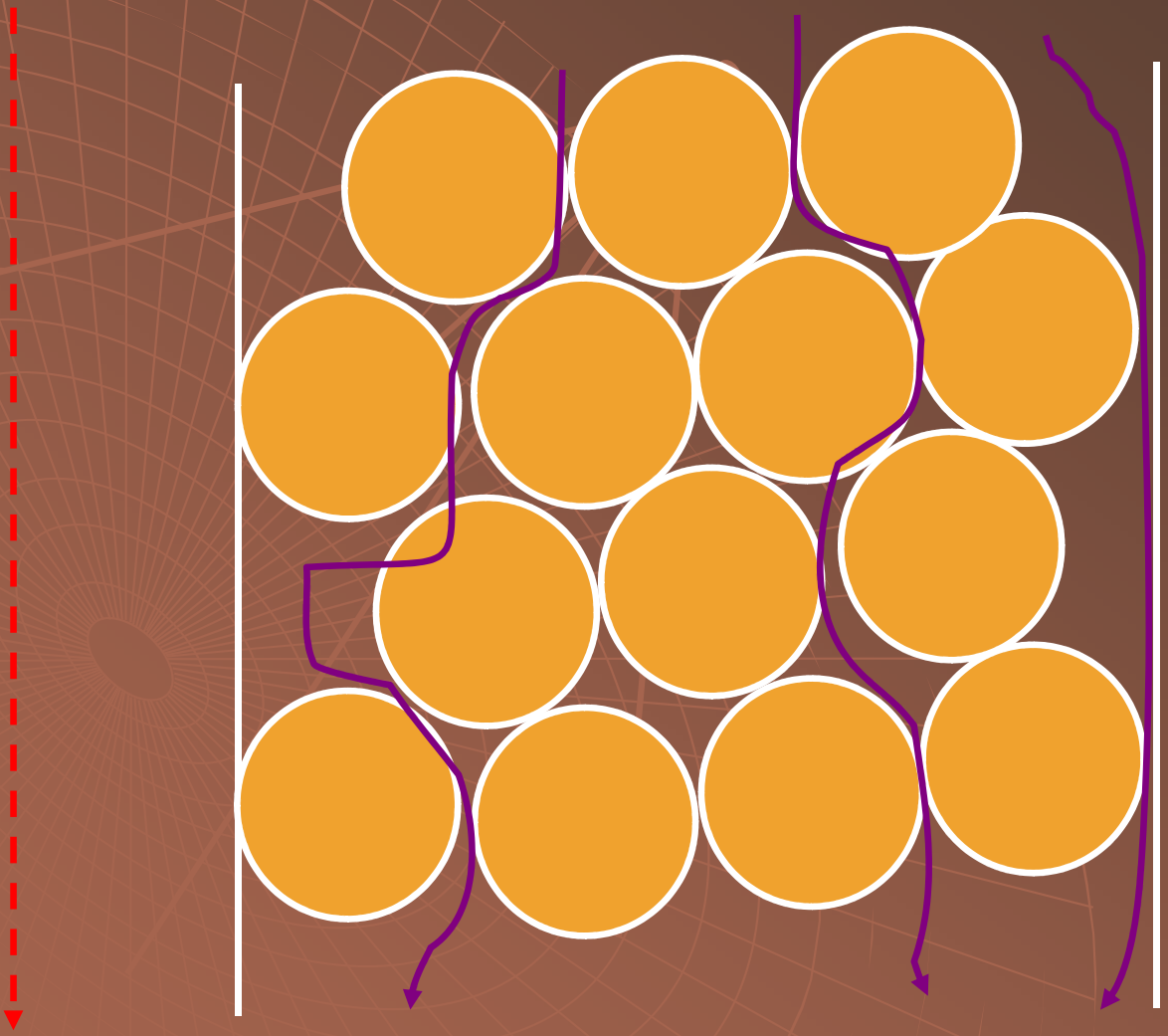
**vliv rychlosti mobilní fáze na rozšiřování zón**

## Van Deemter

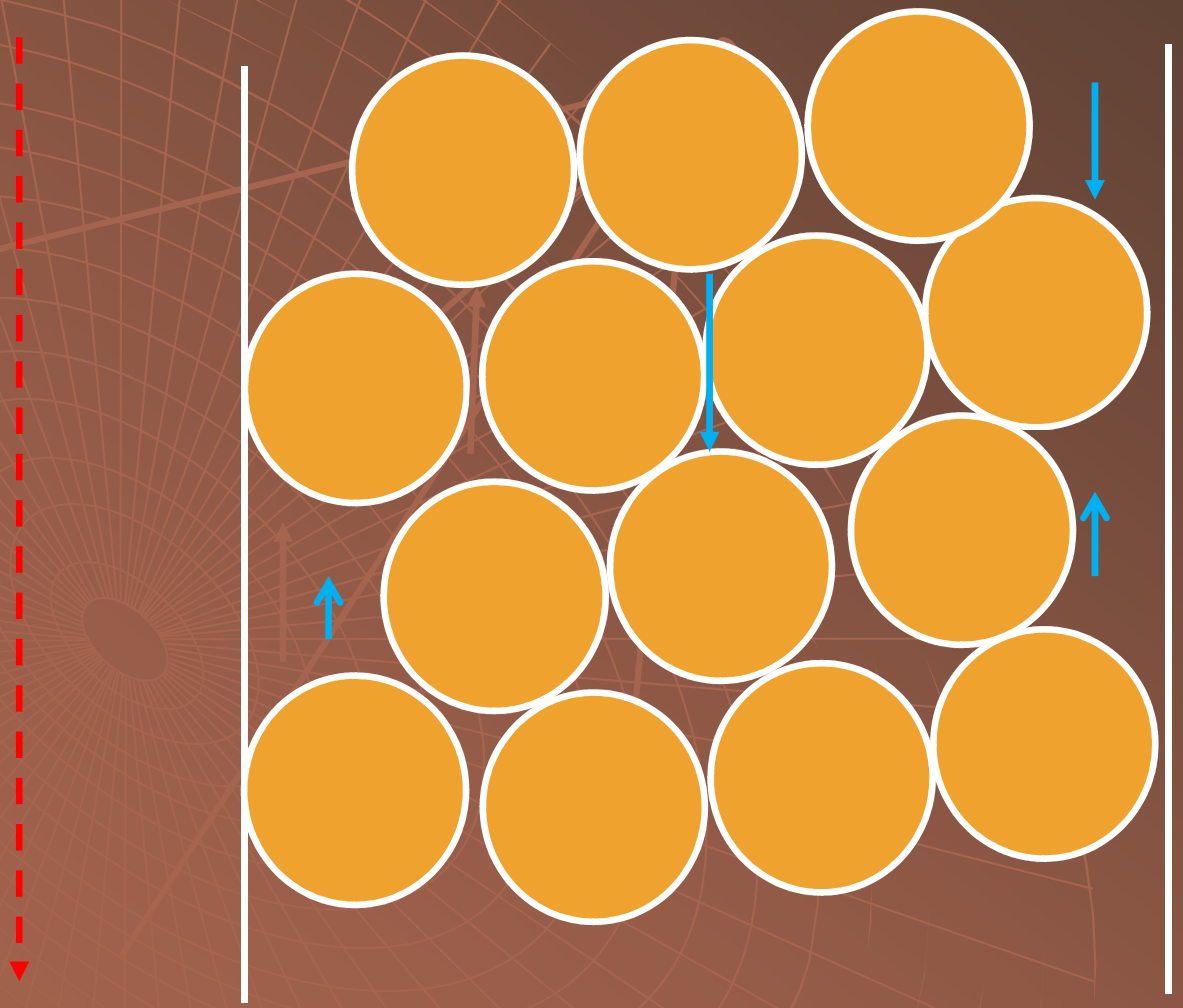
# Van Deemterova difuzní teorie

- Difuse turbulentní
- Difuse molekulová
- Odpor proti převodu hmoty

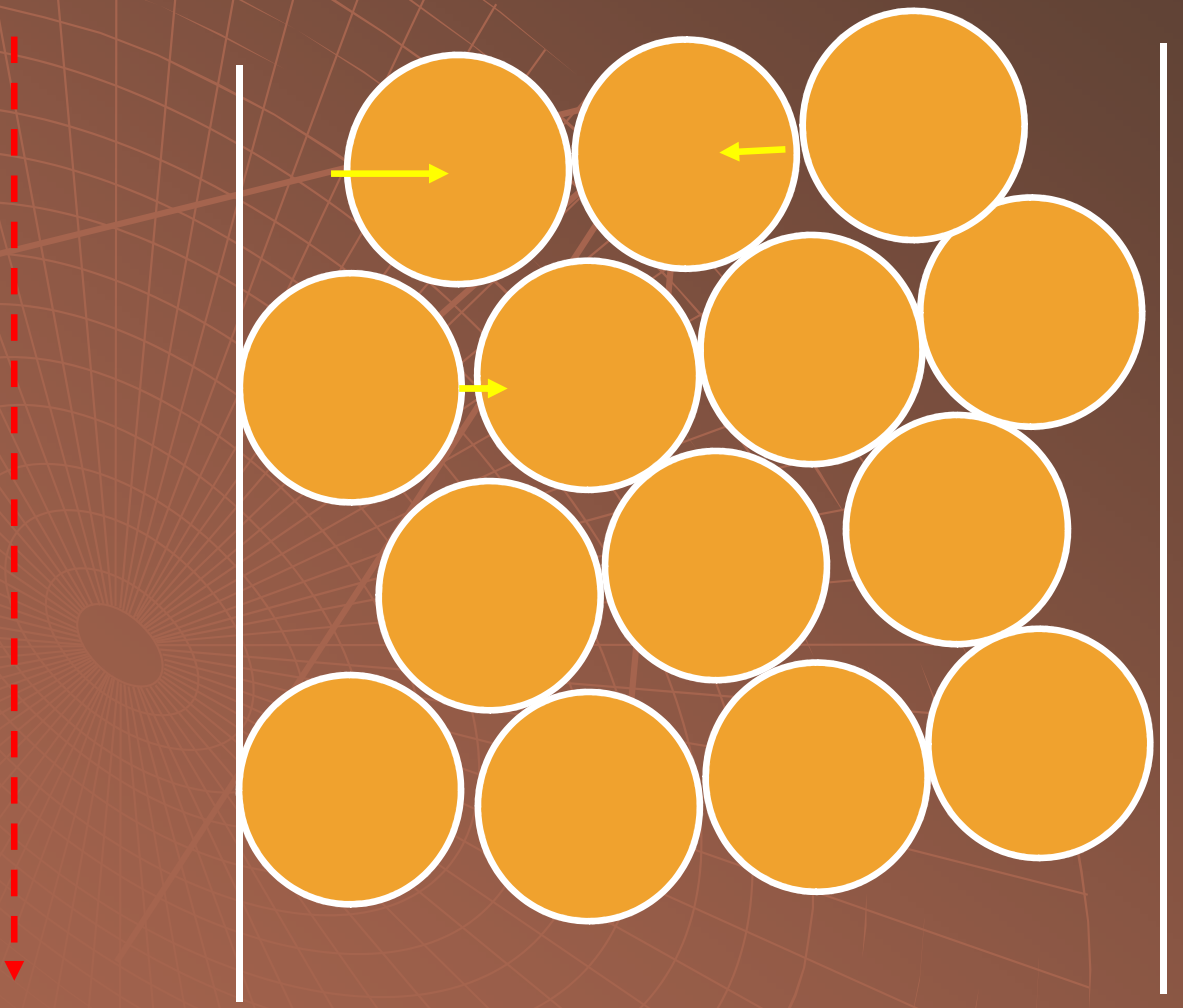
# Difuse turbulentní A



# Difuse molekulová B

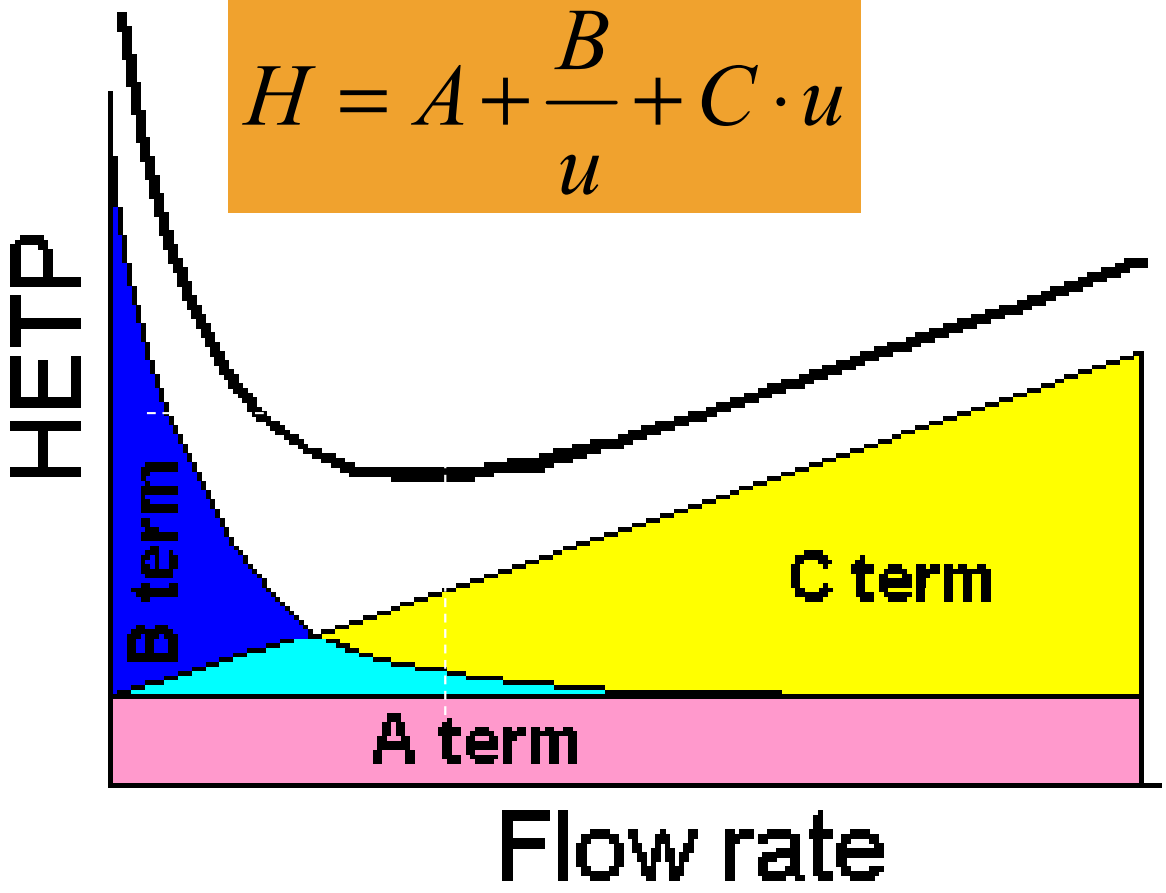


# Odpor proti převodu hmoty C



# Van Deemterova rovnice

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$




- minimum křivky ≈ optimální průtoková rychlost
- daná kolona vykazuje největší účinnost, nejméně rozšiřuje zóny analytů

# Síly a efekty využívané při separaci

- Iontové síly

Silné elektrostatické interakce mezi stacionární a analyzovanou látkou– **ionexová chromatografie**

- Polární síly

interakce dipólů a protondonorní, resp. protonakceptorní vlastnosti (tvorba vodíkových můstků) separovaných látek, mobilní a stacionární fáze – **adsorpční chromatografie**

# Síly a efekty využívané při separaci

- Nepolární síly (disperzní, van der Waalsovy)

Nejslabší, tyto interakce se vyskytují u látek, které nejsou permanentní dipóly – **adsorpční, reverzně fázová a hydrofobní chromatografie**

- Efekt velikosti molekul

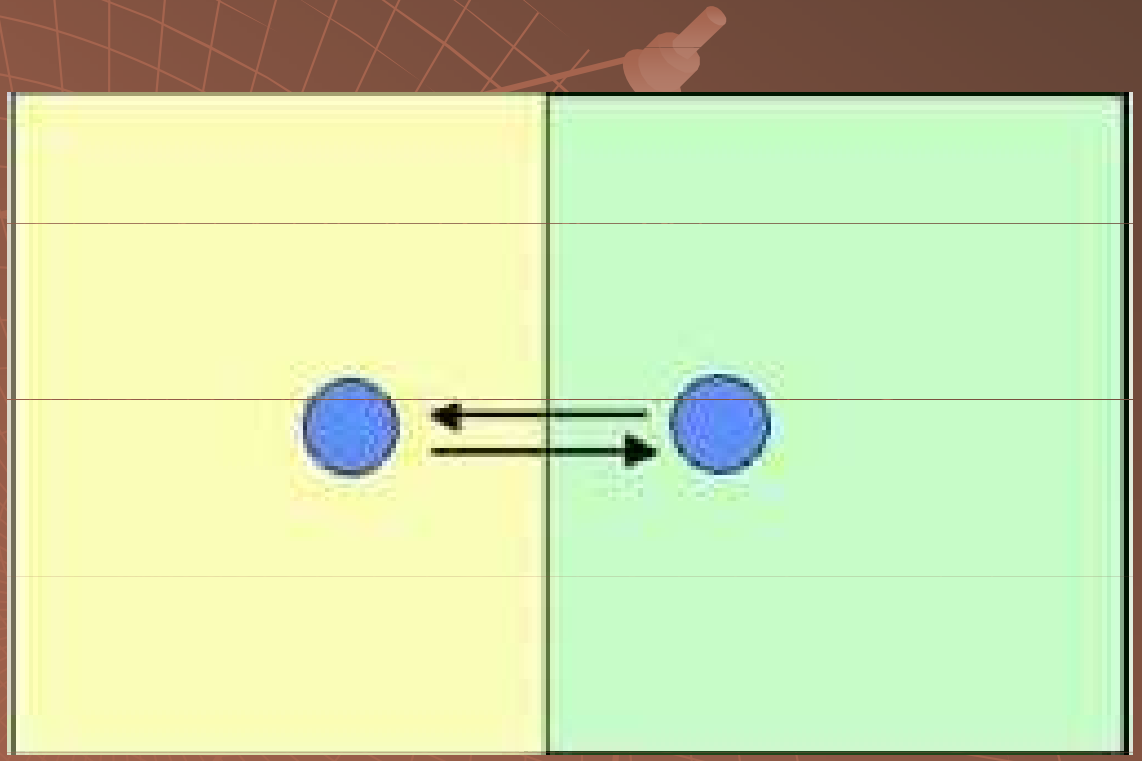
Rozdíly ve velikosti a tvaru molekul – **gelová permeační chromatografie**

# Síly a efekty využívané při separaci

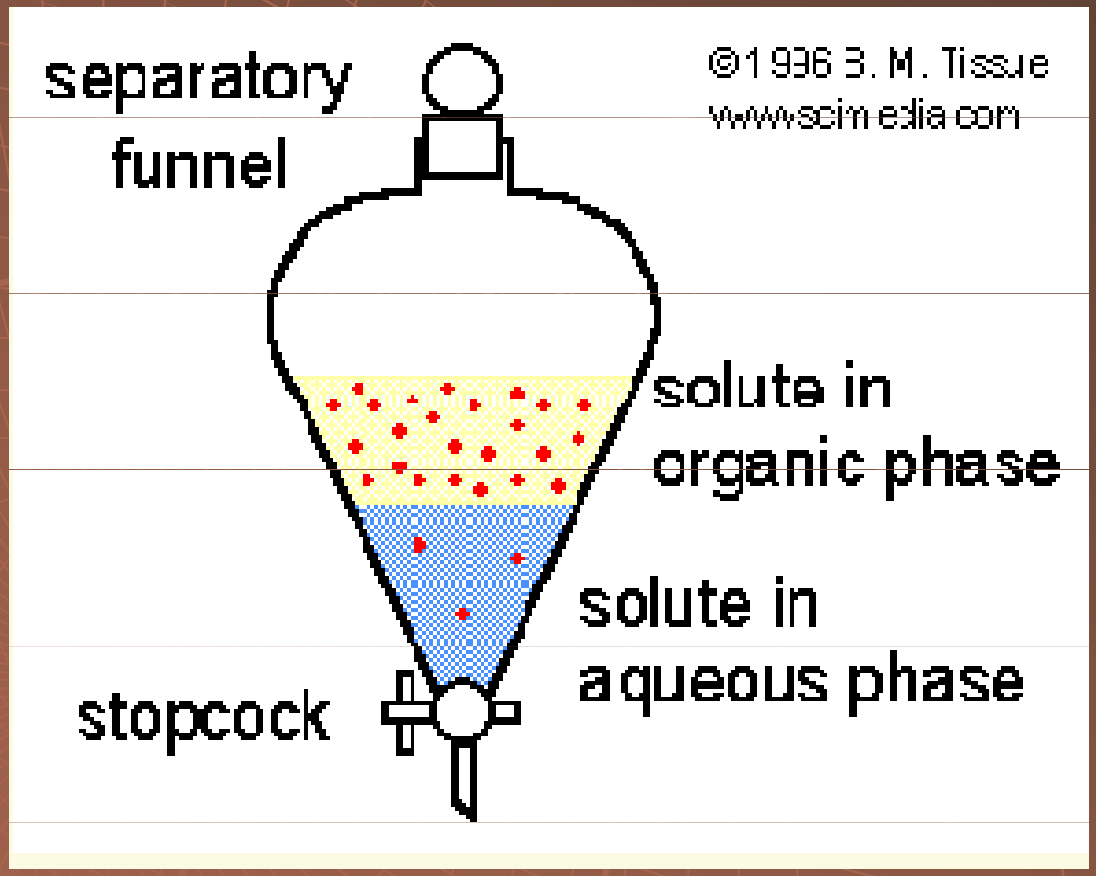
- Sterické interakce

Komplexní specifická interakce ligand biomakromolekula kombinující všechny výše uvedené interakce a efekty – **afinitní chromatografie**

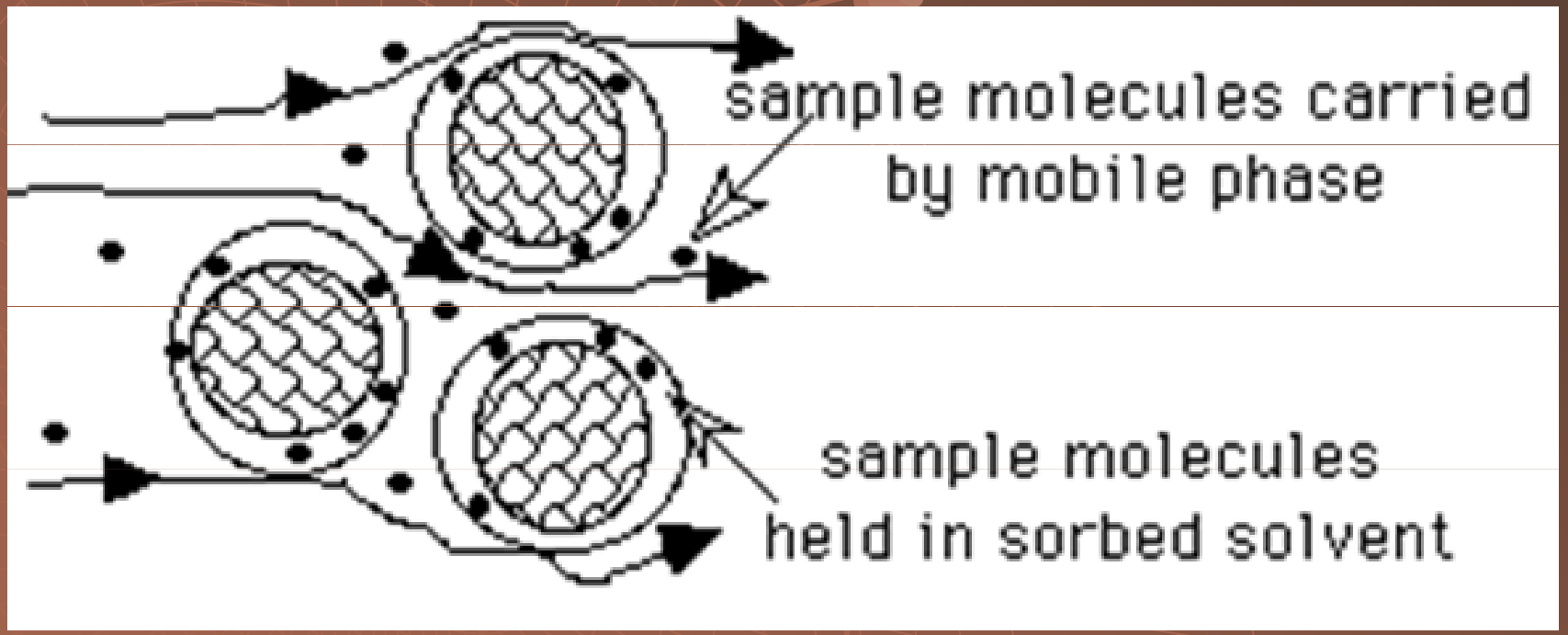
# Rozdělovací chromatografie



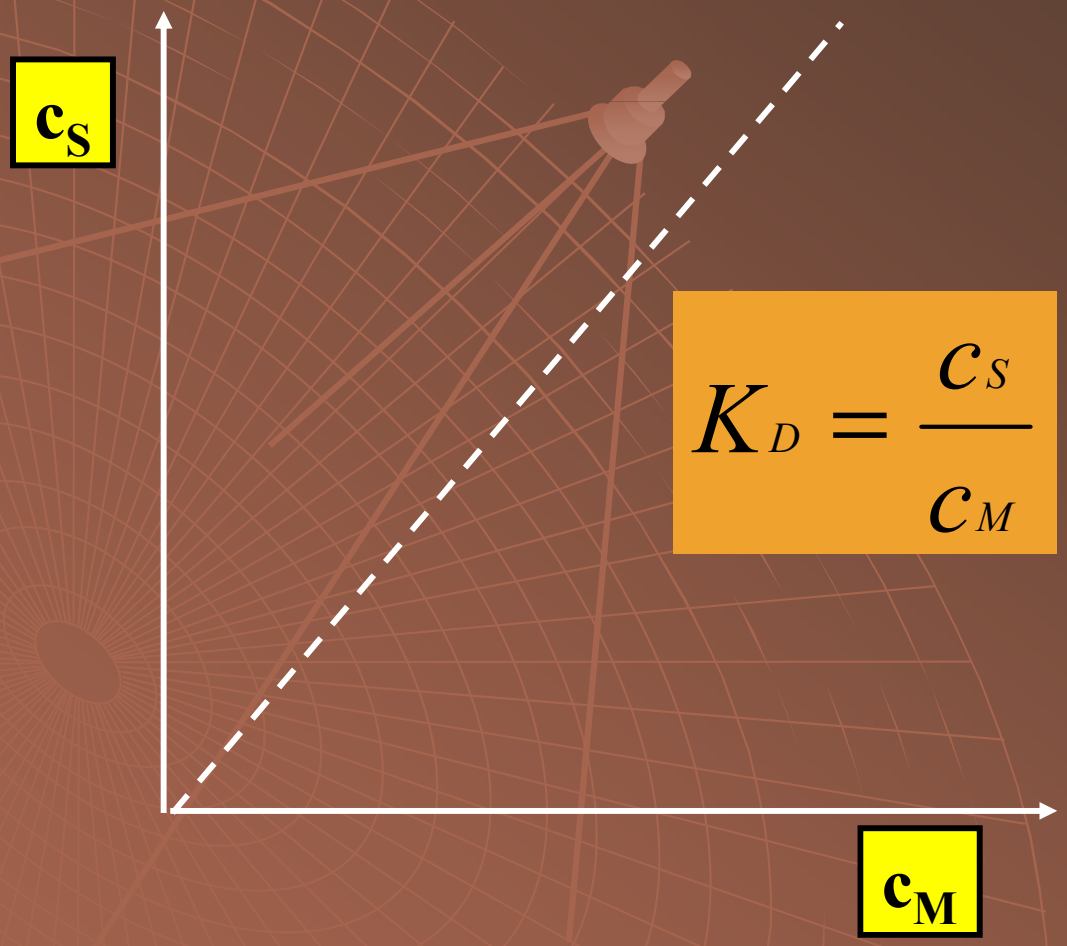
# Rozdělovací chromatografie



# Rozdělovací chromatografie



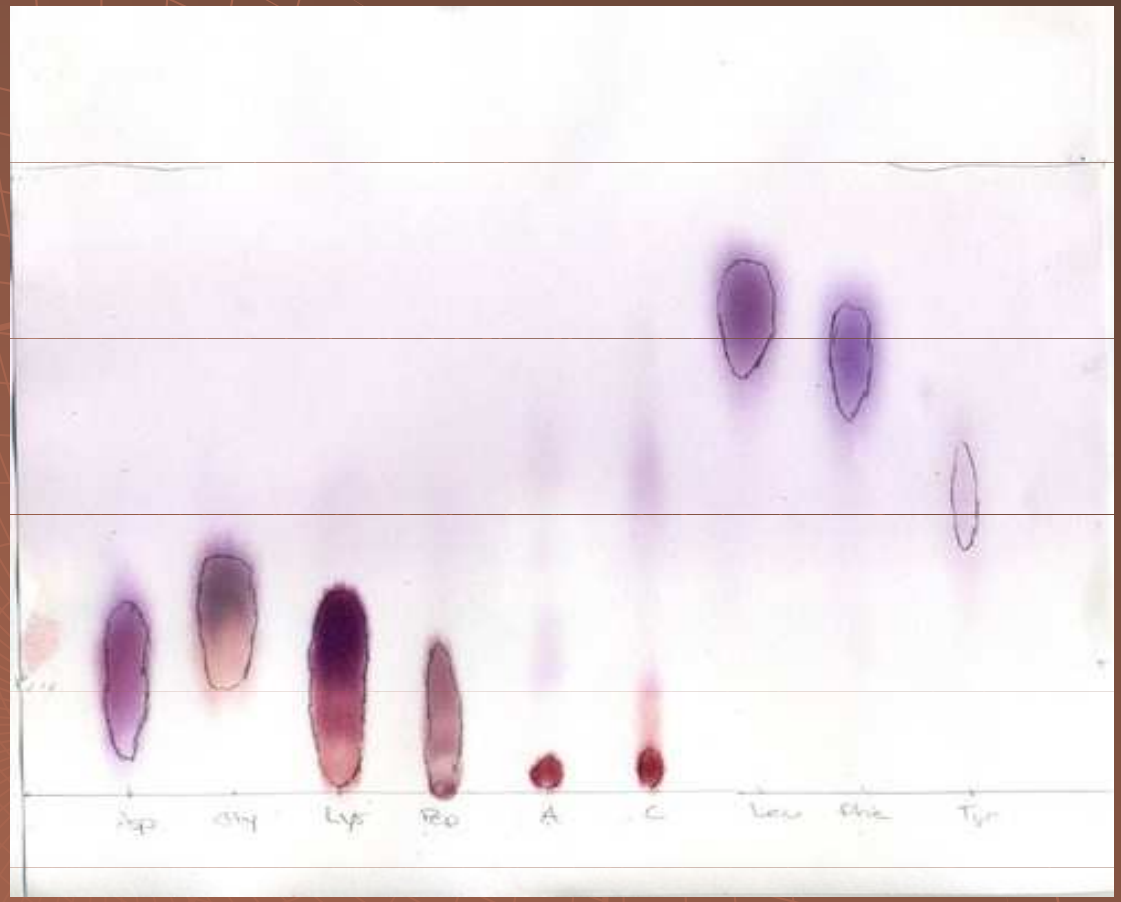
# Rozdělovací chromatografie




$$K_D = \frac{c_S}{c_M}$$

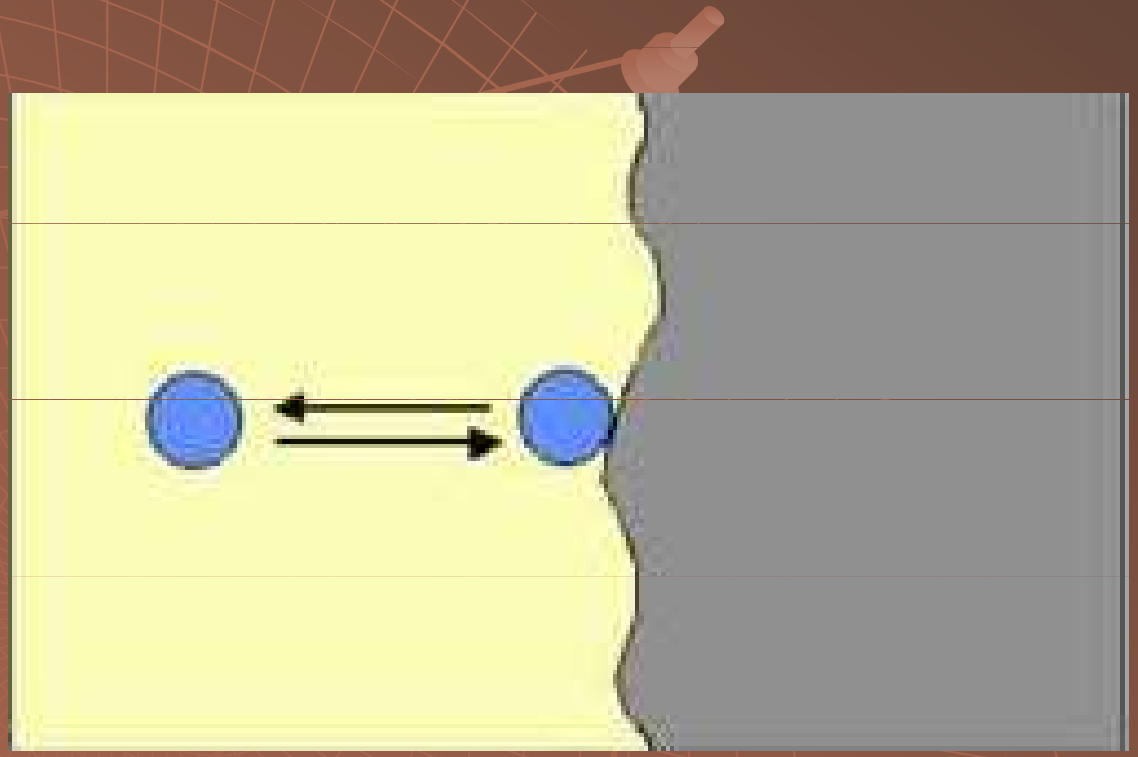
Použití – analytická PC, TLC

# Papírová chromatografie AMK



- stacionární fáze: voda
- mobilní fáze: butanol-kyselina octová-voda (12:3:5)

# Adsorpční chromatografie
# chromatografie s normálními fázemi

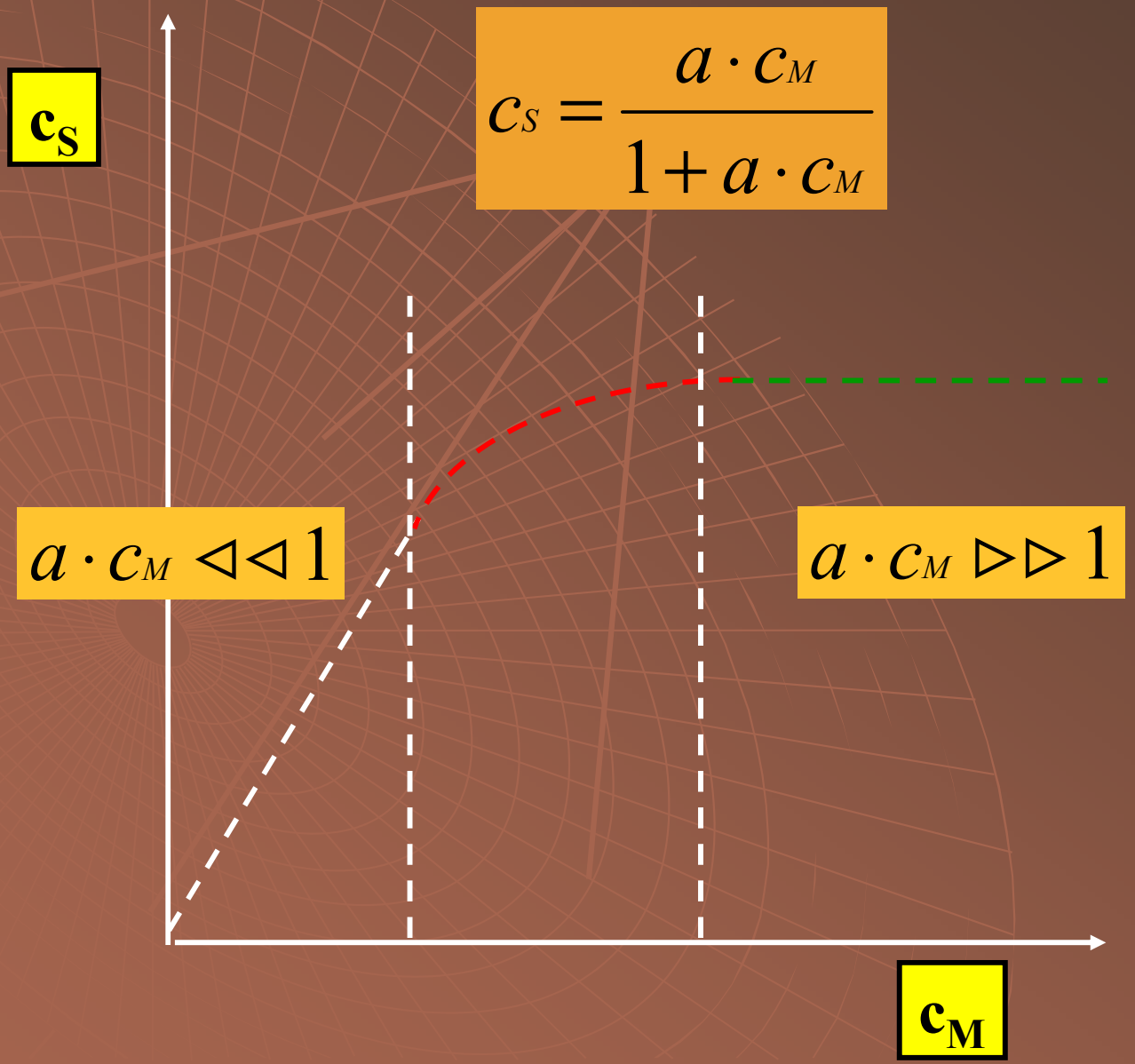


# Adsorpční chromatografie

- Stacionární fáze – polární

nese aktivní centra, jejich počet, rozložení a schopnost poutat molekuly rozdělované směsi závisí na charakteru adsorbentu, velikosti povrchu a na vlastnostech separovaných látek

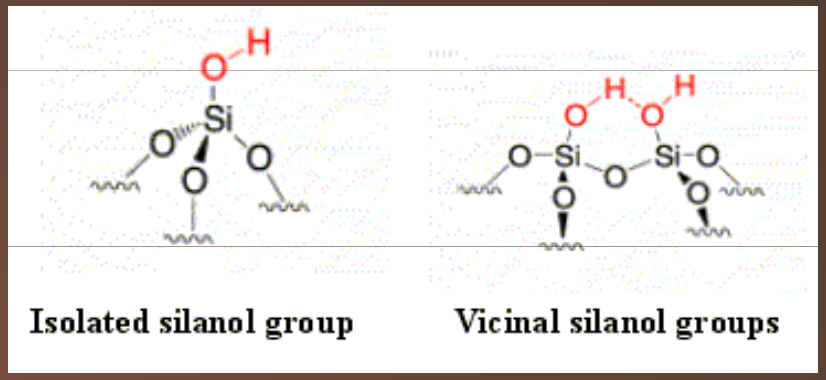
# Adsorpční chromatografie



# Adsorpční chromatografie

- Stacionární fáze

Silikagel $SiO_2$ . n $H_2O$




Vysoký specifický povrch a relativně velký objem pórů. Hlavní součástí aktivních center jsou **hydroxylové (silanolové) skupiny**, na něž je vodíkovou vazbou adsorbována voda. Zahřátím na 150°C dojde k odstranění vody → "aktivace silikagelu". Labilní nad pH 8. > 200°C rozklad.

Adsorpce: interakce se silanolovými skupinami; povrch silikagelu je slabě kyselý (má protondonorní vlastnosti). Lépe jsou zadržovány

# Adsorpční chromatografie

- Stacionární fáze

Oxid hlinitý $Al_2O_3$,

Obdobné vlastnosti jako u silikagelu (povrch, póry). Vyskytuje se v řadě modifikací, dle množství vázané vody, krystalické struktury. “Aktivace” vysušením [$Al(OH)_3 \rightarrow AlO(OH) \rightarrow Al_2O_3$].

Při vysokém obsahu vody (15%) se projevují rozdělovací efekty. Vedle protondonorních hydroxylů se na povrchu vyskytují i centra s protonakceptorními vlastnostmi.

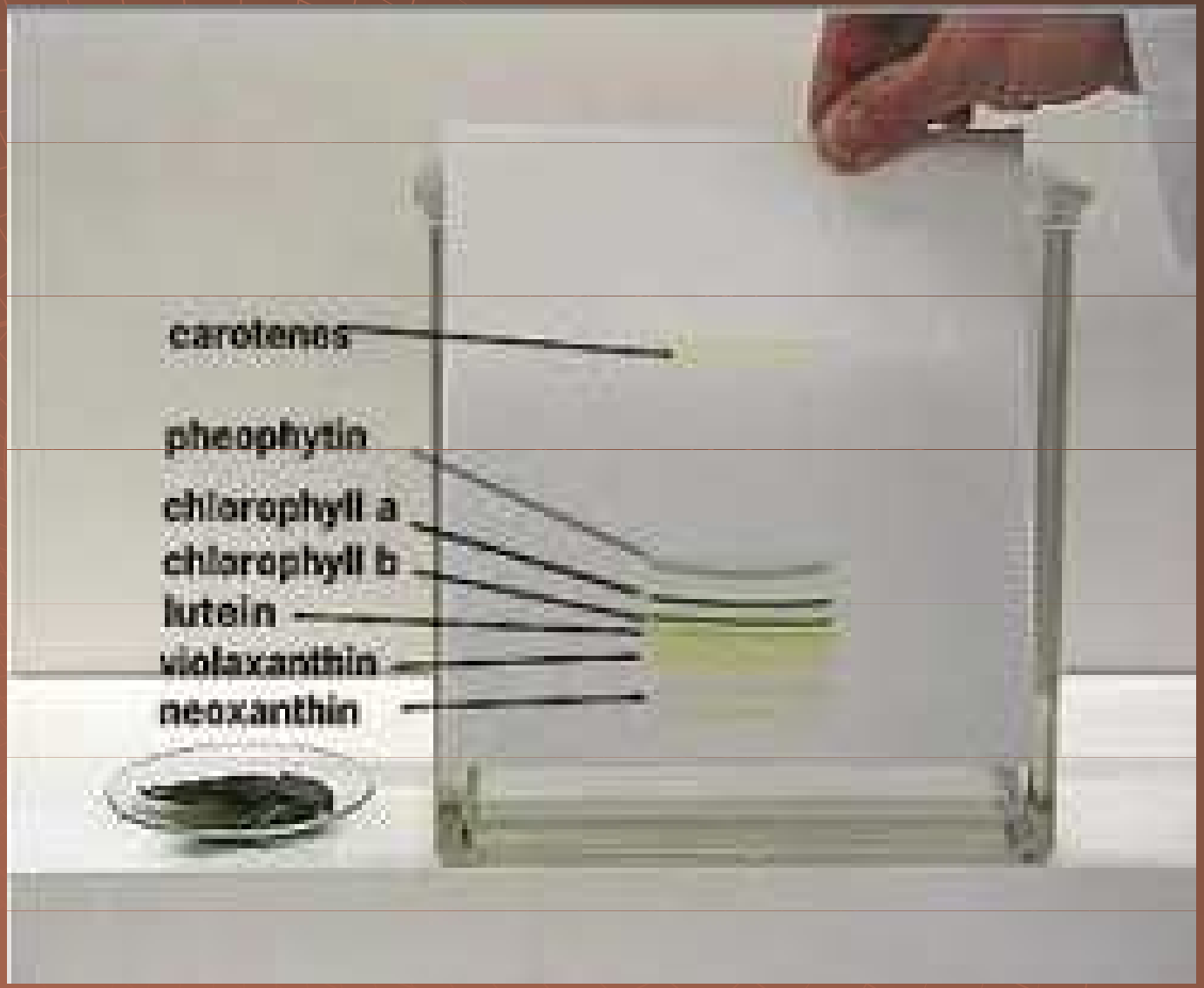
# Adsorpční chromatografie

- Mobilní fáze – nepolární
- Eluce - zvyšováním polarity mobilní fáze

Eluotropická řada:

uhlovodíky<subst.uhlovodíky<ketony<aldehydy<alkoholy<voda

# Adsorpční chromatografie chlorofylů



# Adsorpční chromatografie

- Stacionární fáze

Hydroxyapatit [$Ca_5(PO_4)_3OH$]

připravuje se z $CaCl_2.6H_2O$ a $Na_2HPO_4.12H_2O$. Jemná sraženina fosfátu vápenatého se vaří s 1% NaOH při 96-98$^oC$.

Při interakci polární až iontové síly. Karboxylové skupiny bílkovin či fosfátové skupiny nukleových kyselin reagují s $Ca^{2+}$ na povrchu adsorbentu. Eluce se provádí gradientem iontové síly - rostoucí koncentrací fosfátu.

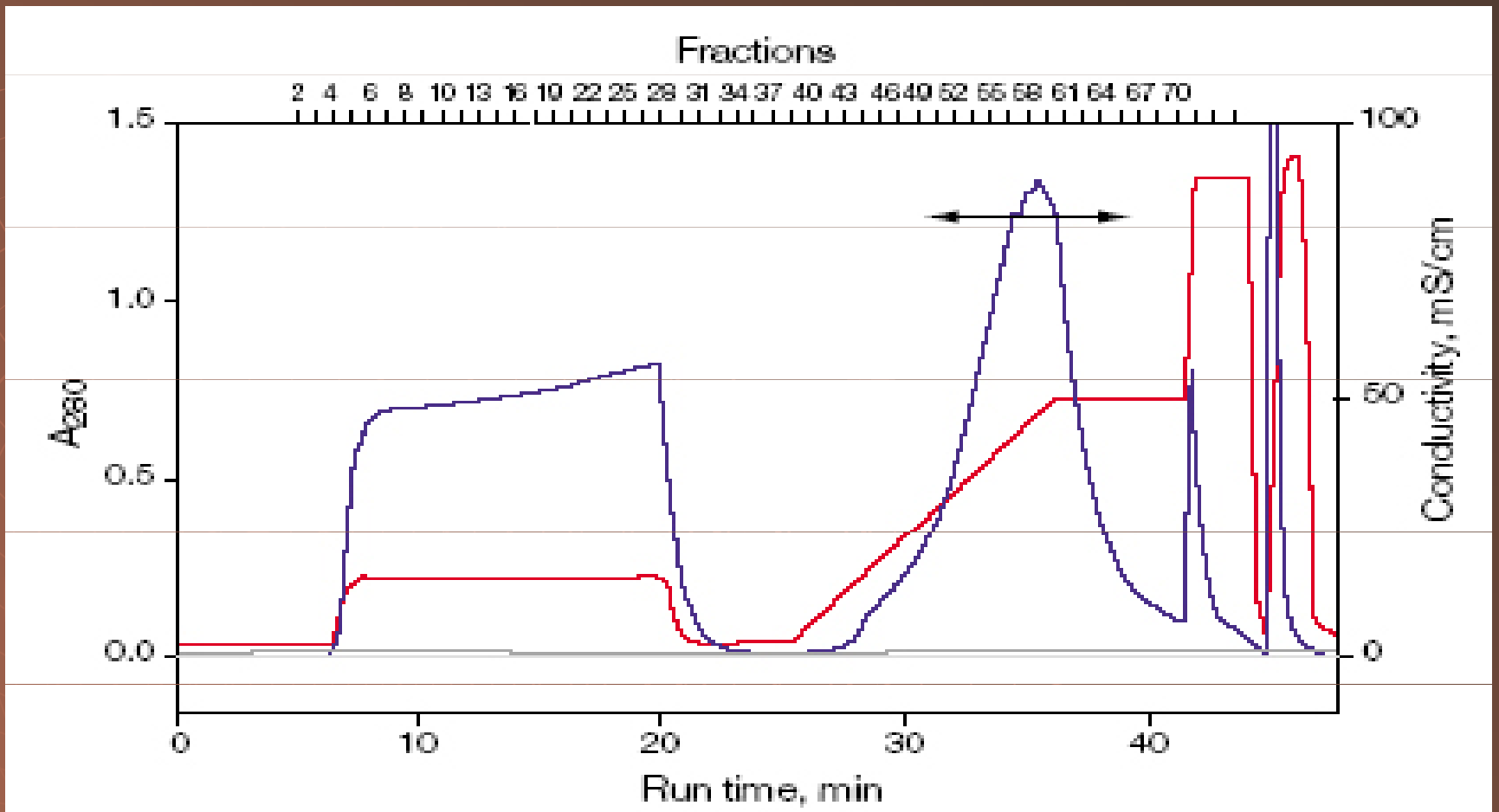


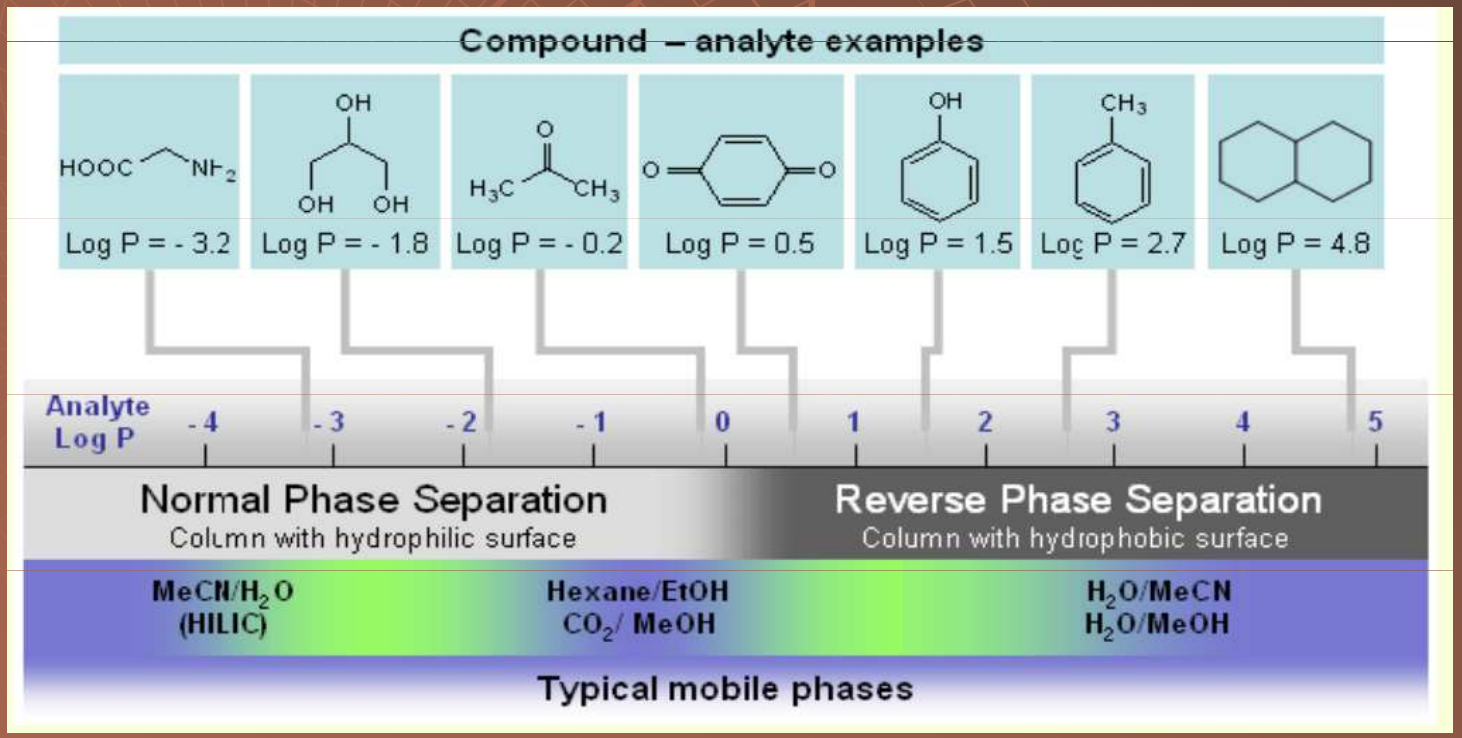

Fig. 1. Chromatogram of murine $IgG_1$ purification on the UNOsphere S column during small-scale process development. Diluted cell culture (20 ml) was loaded onto an UNOsphere S 0.7 x 5 cm column at a flow rate of 600 cm/hr in 20 mM phosphate-citrate buffer, pH 4.0. The sample was eluted in 10 column volumes (CV) of a 0–0.5 M NaCl gradient, followed by 5 CV of 1 M NaCl in the same buffer. The column was then cleaned in 1 M NaOH. The double-headed arrow indicates the fractions (1 ml each) containing $IgG_1$ (see Figure 2). Blue trace, $A_{280}$; red trace, conductivity profile.

# HILIC chromatografie

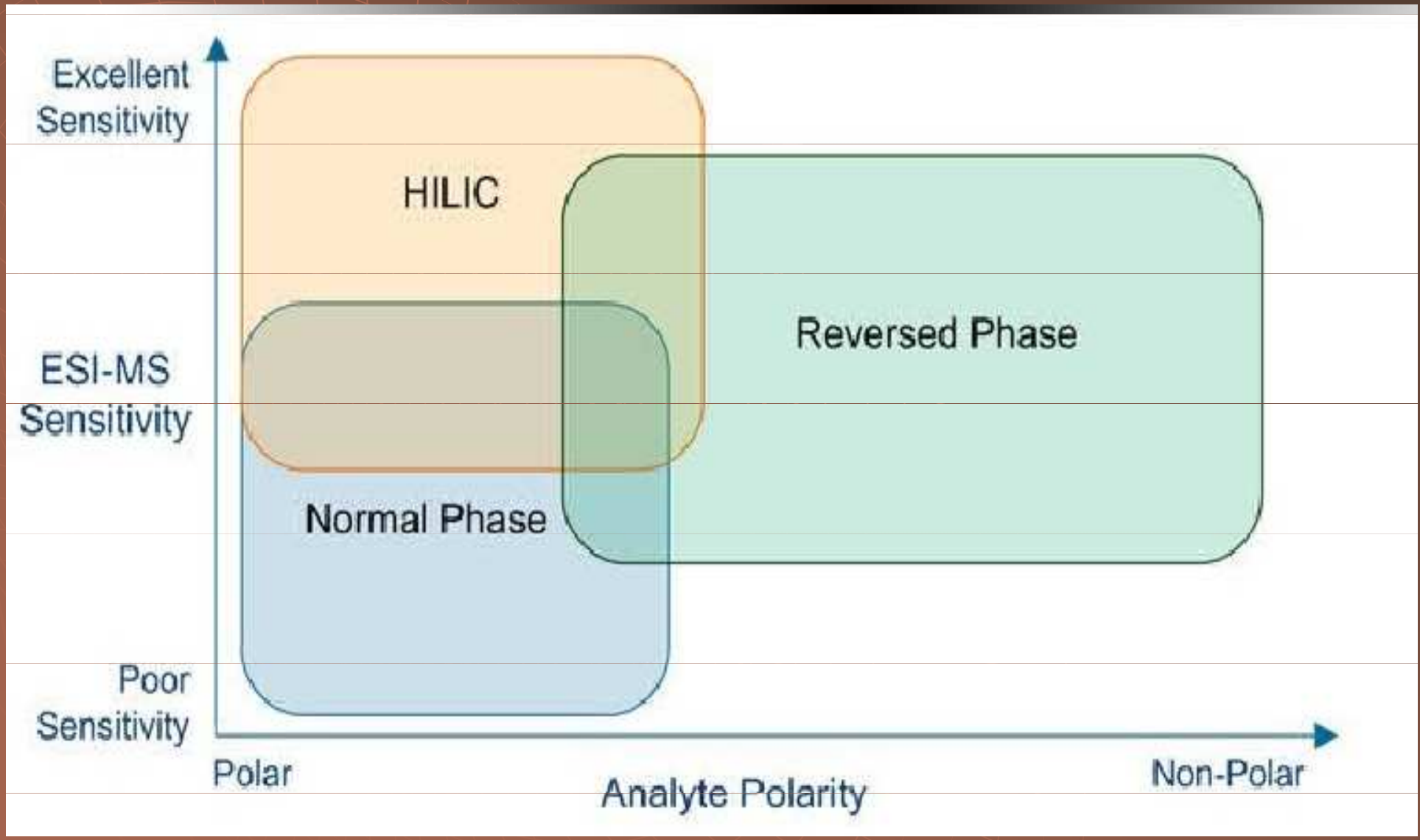
- HILIC

Hydrophilic Interaction Chromatography (1990)

*varianta* chromatografie s normálními fázemi nepoužívající rozpouštědla nemísitelná s vodou



# HILIC chromatografie



# HILIC chromatografie

- Stacionární fáze

polarní - silikagel, kyano, amino, diol, zwitterionty etc.

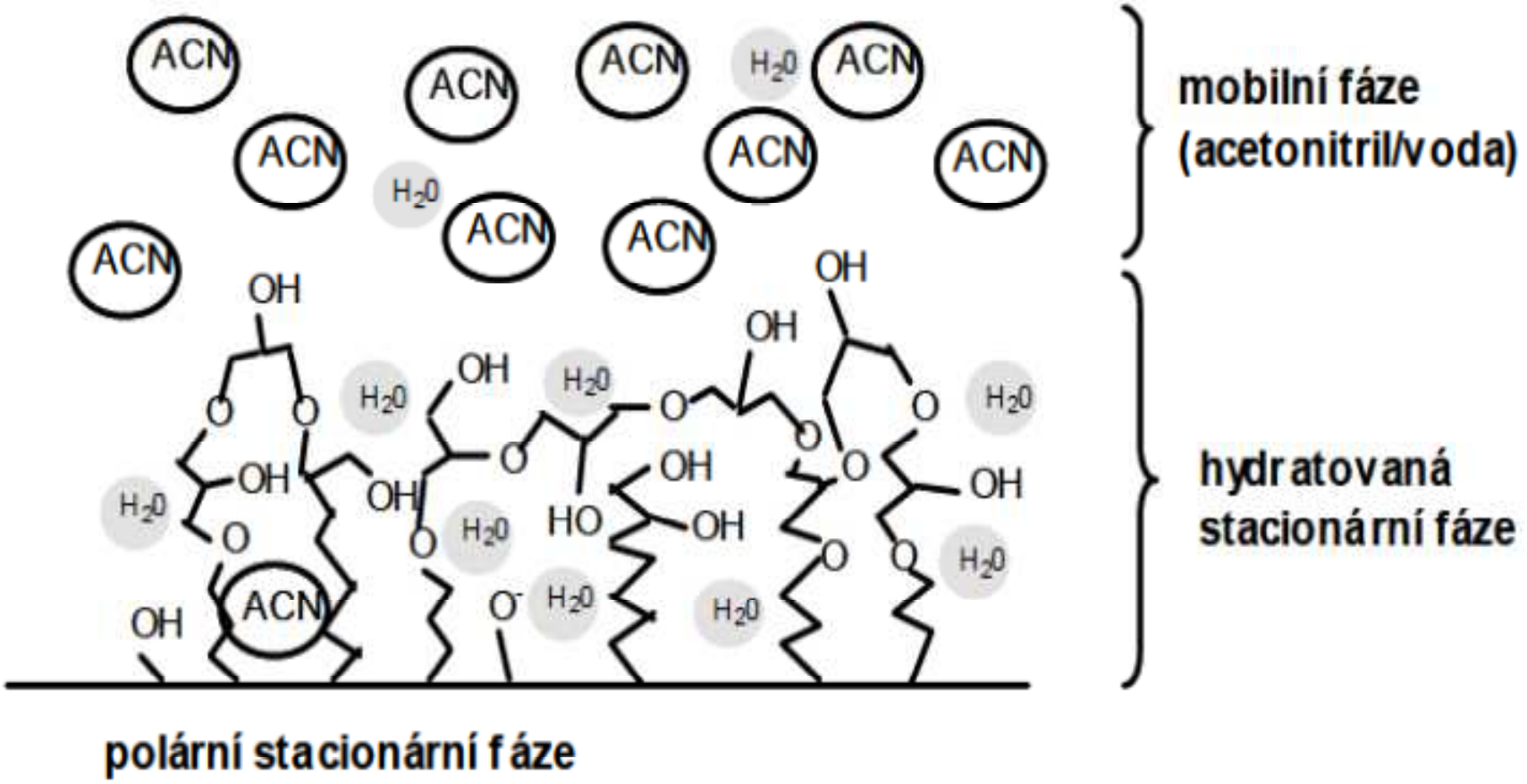
| stacionární fáze | | chemická struktura |
|---|---|---|
| a. | silikagel | –OH |
| | kyanopropyl | $-(CH_2)_3-CN$ |
| | aminopropyl | $-(CH_2)_3-NH_2$ |
| | diol | $-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ |
| b. | PAC | $-(CH_2-CH)_n-$ <br> $C=O$ <br> $OH$ |
| c. | ZIC | $-CH_2-N^{\oplus}(CH_3)-(CH_2)_3-SO_3^{\ominus}$ <br> $CH_3$ |

# HILIC chromatografie

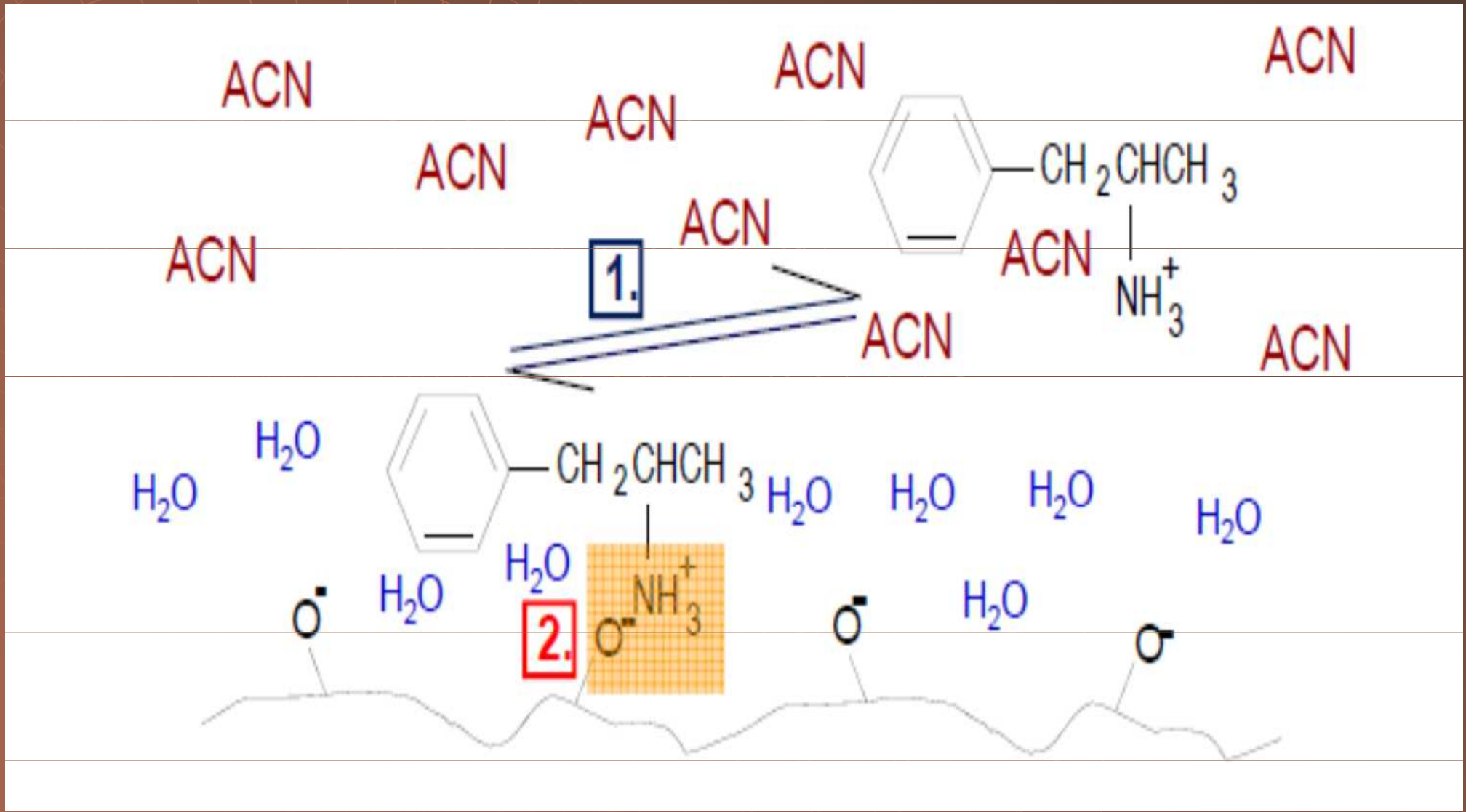
- Mobilní fáze

Velký obsah organického rozpouštědla ACN (> 80%) s malým množstvím vody nebo jiného polárního rozpouštědla

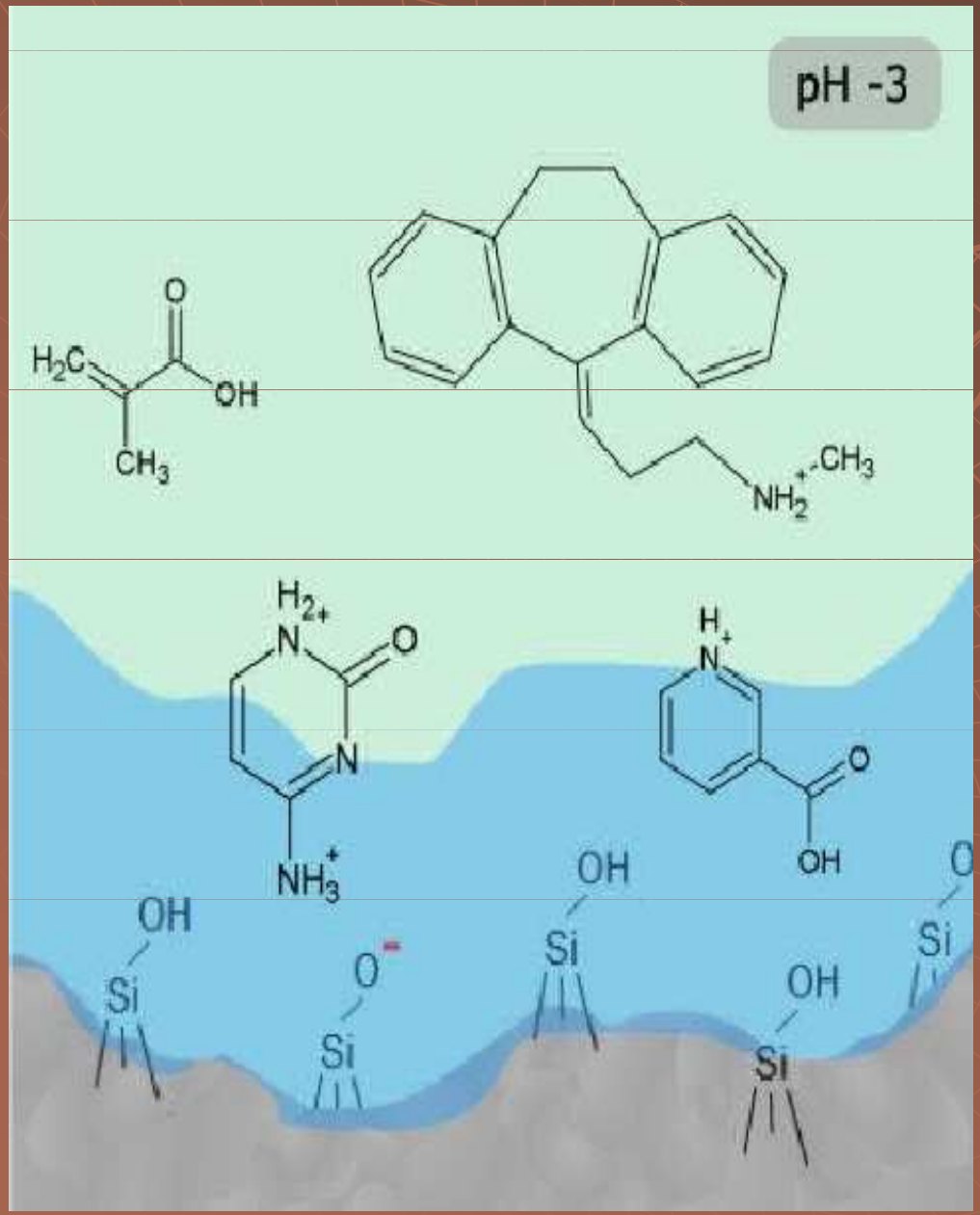
# HILIC chromatografie

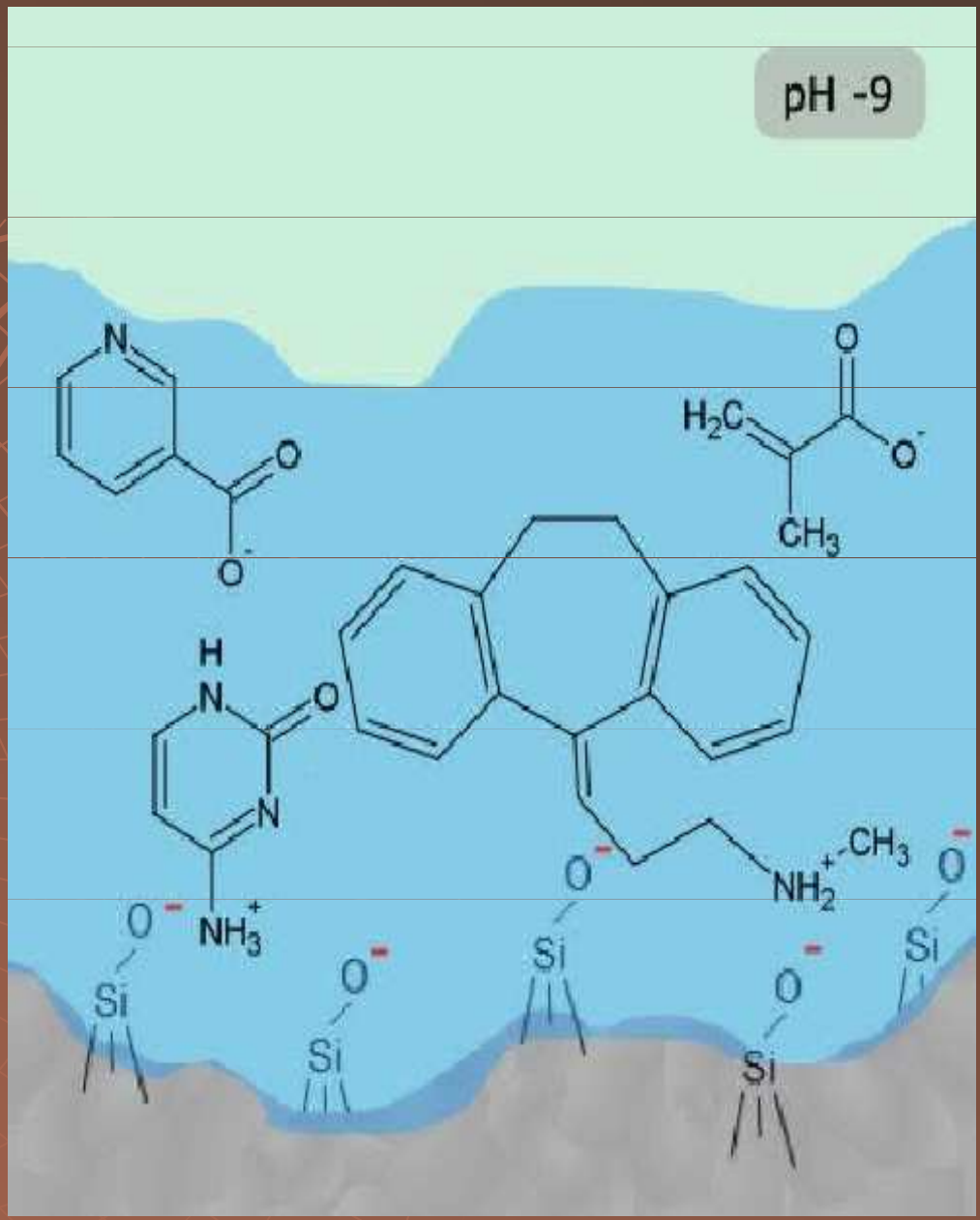


# HILIC chromatografie

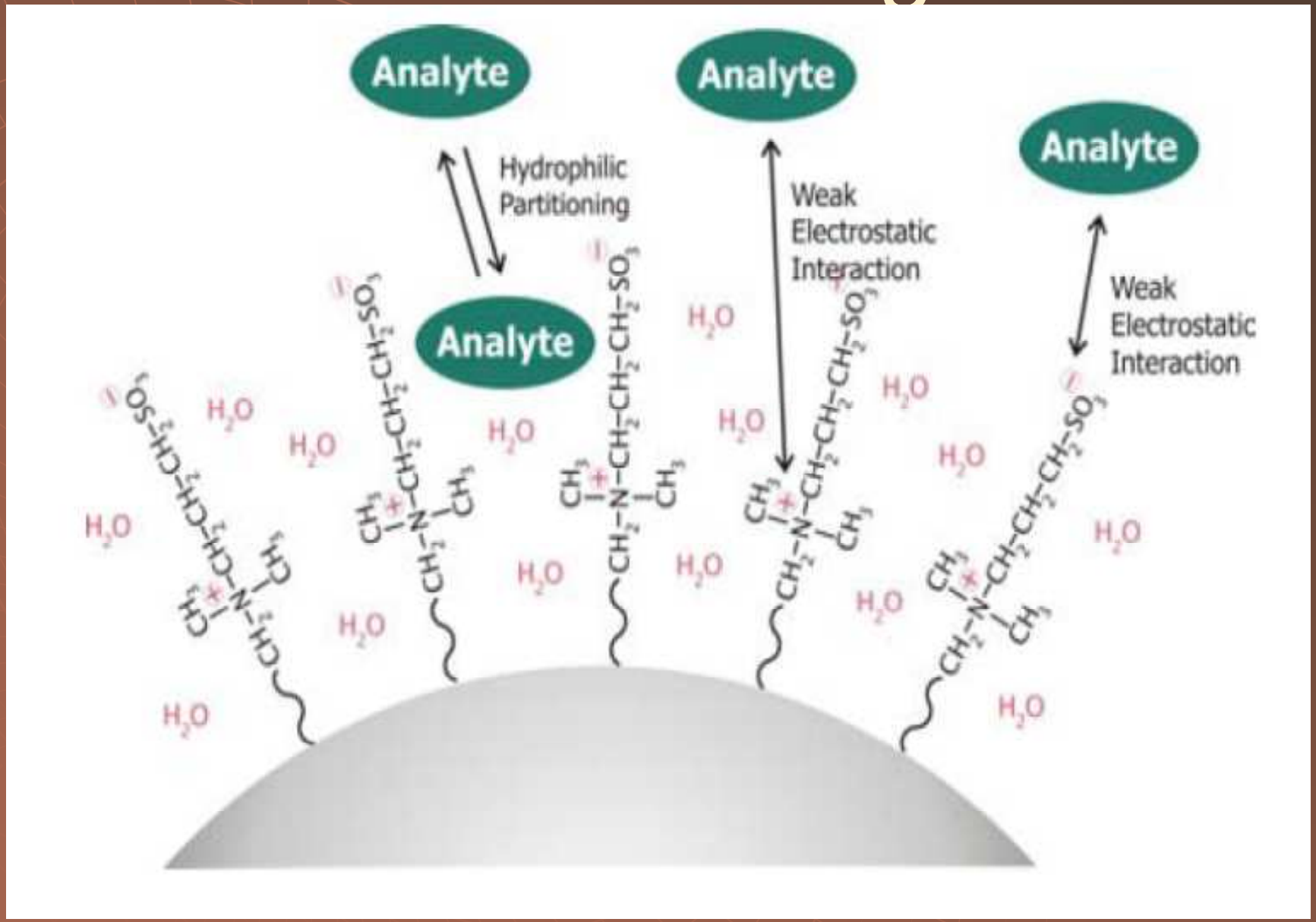


# HILIC chromatografie



# HILIC chromatografie



# HILIC chromatografie

- Nanášení vzorku – vzorek rozpuštěn v mobilní fázi

- Eluce – zvyšováním polarity mobilní fáze

Dioxan>Aceton>ACN>THF>IPOH>EtOH>MetOH>$H_2O$

Použití : analýza polárních látek

# HILIC chromatografie

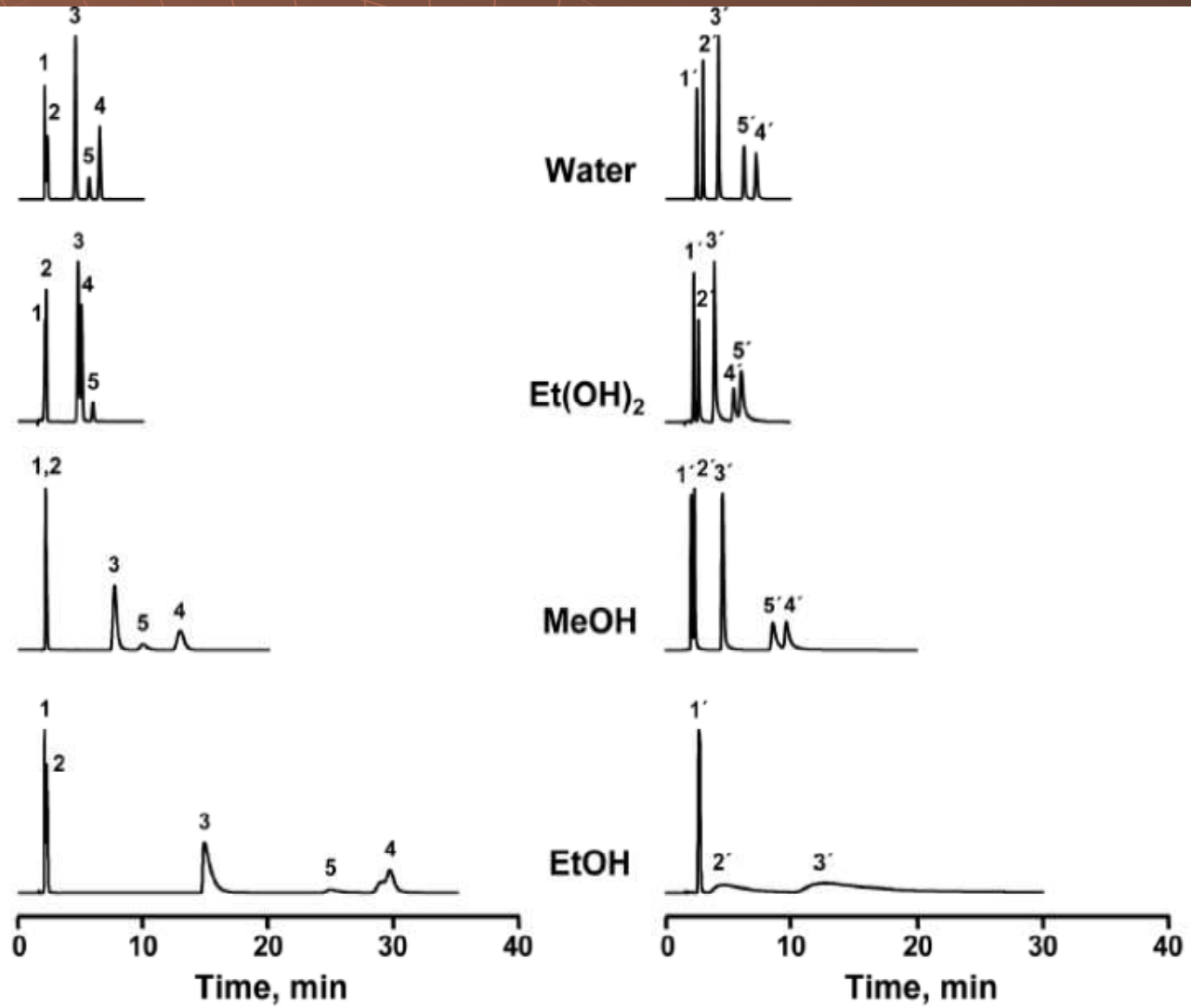



**Figure 5.** Separation of the sets of nucleobases and nucleosides on (a) the TG, (b) the TGO and (c) the bare silica (Daisogel) packing in AQ-HILIC (water as modifier) and NA-HILIC ($Et(OH)_2$, MeOH, EtOH as modifiers) elution mode. Mobile phase: 5 mM ammonium acetate in ACN/modifier (90:10 v/v). Further chromatographic details are given in Section 2. Analytes: (1) thymine, (2) uracil, (3) adenine, (4) cytosine, (5) guanine; (1′) thymidine, (2′) uridine, (3′) adenosine, (4′) cytidine and (5′) guanosine.

# HILIC chromatografie

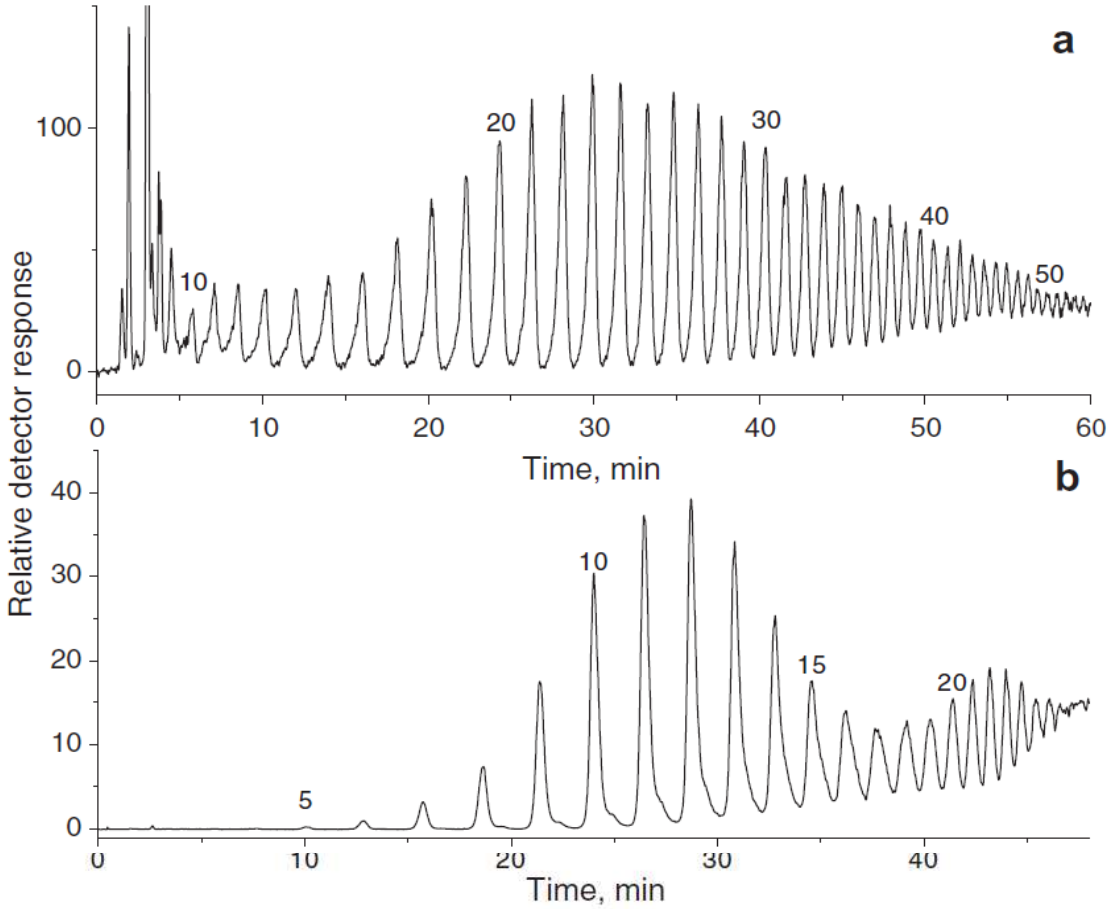
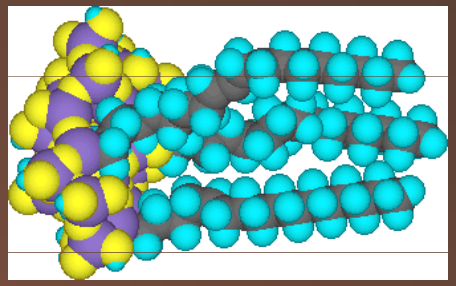



**Figure 3.** The chromatograms for the separation of (a) higher molecular weight fructooliogsaccahrides and (b) chitooligosaccharides on an analytical 'click' maltose column (100 × 4.6 mm id) with gradients 1 and 2, respectively. The numbers on the peaks are the DPs of the oligosaccharides. Gradient 1: 0–60 min, water–acetonitrile: 30:70 (v/v)→50:50 (v/v). Gradient 2: 0–60 min, acetonitrile–ammonium formate buffer (100 mM, pH 3.0): 65:35 (v/v)→55:45 (v/v). Flow rate: 1.0 mL/min. Column temperature: 30 °C. ELS detector: gas pressure 30 psi, tube temperature 85 °C, gain 100.

# Reverzně fázová chromatografie

- Stacionární fáze – nepolární

  $C_8$, $C_{18}$



- Mobilní fáze – polární – vodné roztoky

  pH $\rightarrow$ potlačit disociaci

- Eluce – snižováním polarity mobilní fáze

  ACN, MetOH,

# Reverzně fázová chromatografie

## Silikagel

- poresní silika gel – zvýšení efektivního povrchu
- inertní materiál
- stabilní v pH 2-7,5

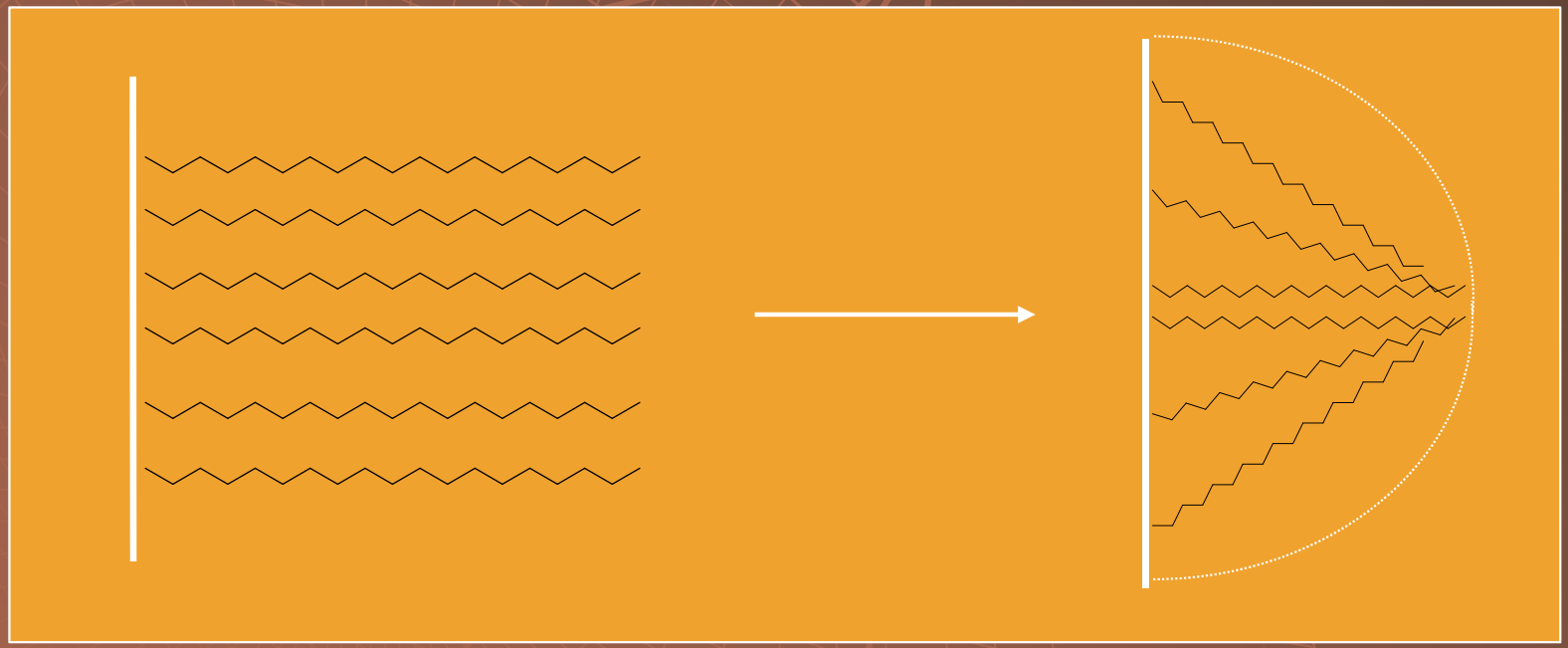
## Polymerní nosič

- poresní polymer – zvýšení efektivního povrchu
- nepolární
- stabilní v pH 2-11

# Reverzně fázová chromatografie

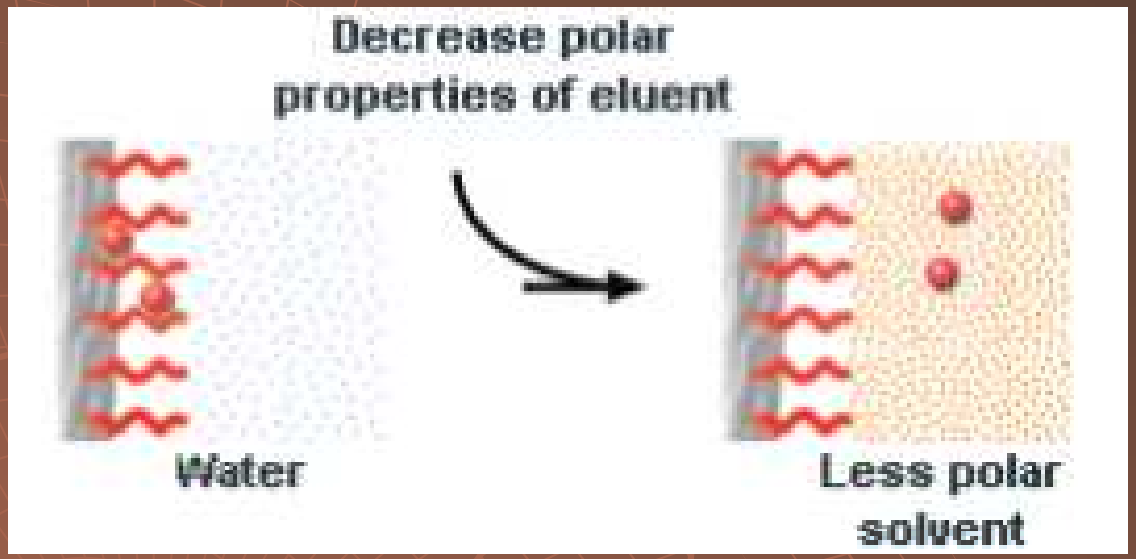
**Kartáčový typ stacionární fáze**

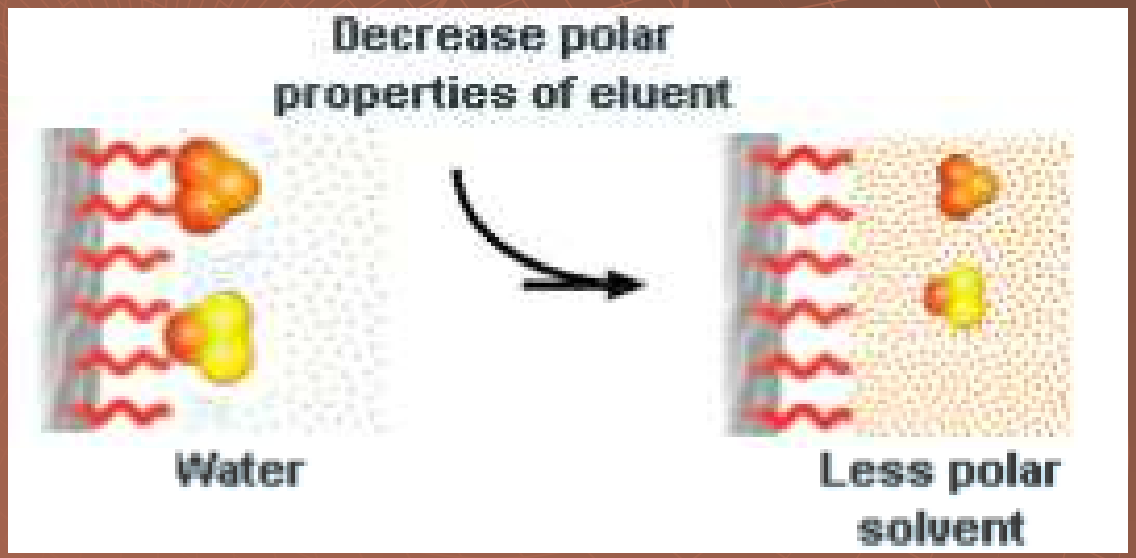
$H_2O$



Použití : analytické – až 90 % analýz

# Reverzně fázová chromatografie



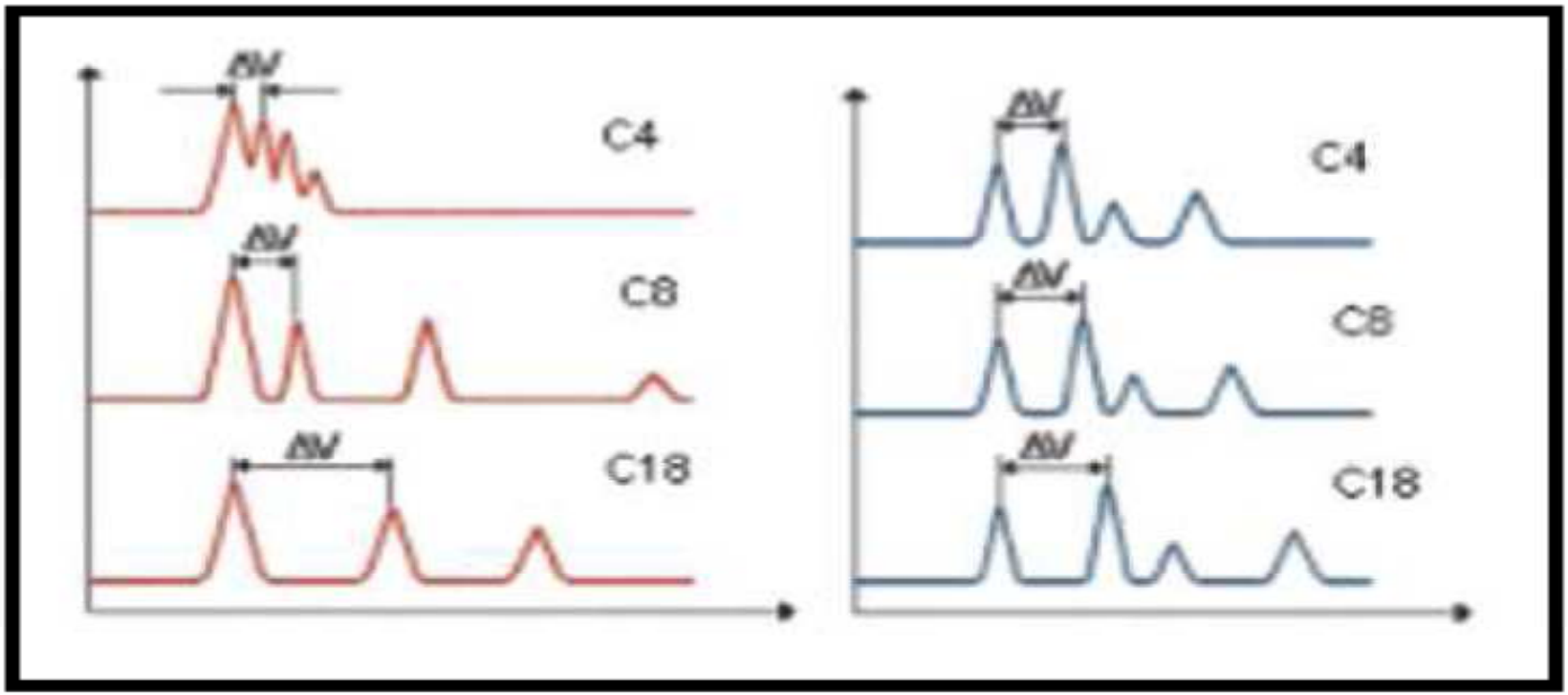



# Reverzně fázová chromatografie

## Vliv délky řetězce na rozlišení

hydrofobní organické látky

peptidy, proteiny



# Reverzně fázová chromatografie

| Organické rozpouštědlo | Vhodné pro: | Viskosita | Poznámka |
|---|---|---|---|
| Methanol | •Org. molekuly | Střední-nízká | možná destabilisace struktury |
| Ethanol | •Org. molekuly | Střední-nízká | možná destabilisace struktury |
| Isopropanol | •Proteiny<br>•Peptidy | Vysoká | nejmenší efekt na strukturu |
| Acetonitril (ACN) | •Org. molekuly<br>•Proteiny<br>•Peptidy | Nízká | nízký efekt na strukturu |

# Reverzně fázová chromatografie

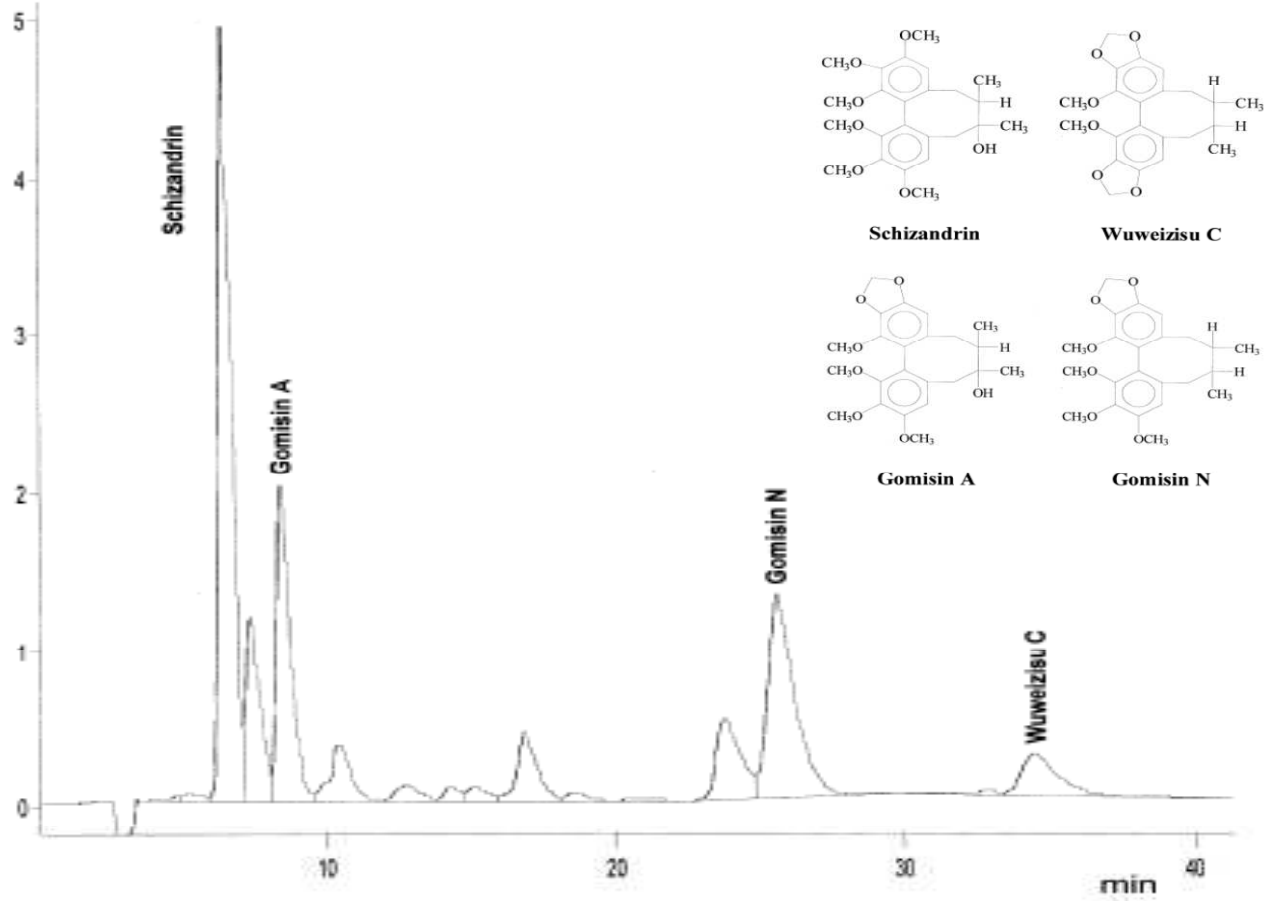
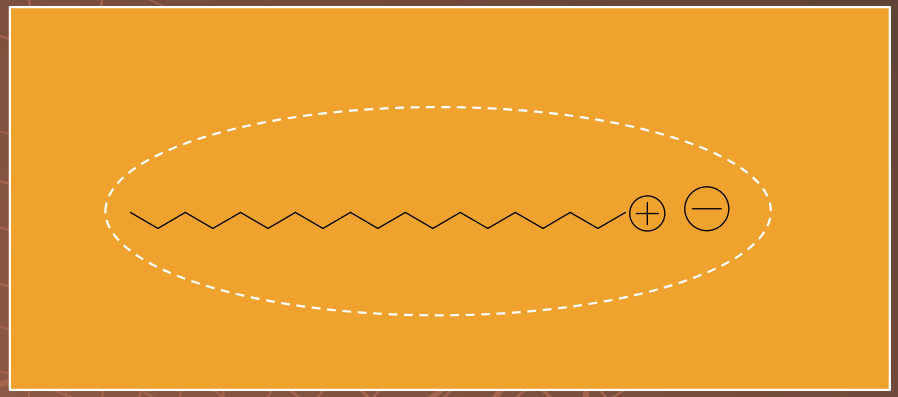



Fig. 5. HPLC analysis of *Schisandra* extract. Experimental conditions: column, Separon SGX $C_{18}$ 5 μm, 150×3 mm I.D.; mobile phase, methanol–deionised water (75:25); flow-rate, 0.3 ml/min; detection at 254 nm. Twenty μl of *Schisandra* extract were loaded on the column.

# Iontově párová chromatografie



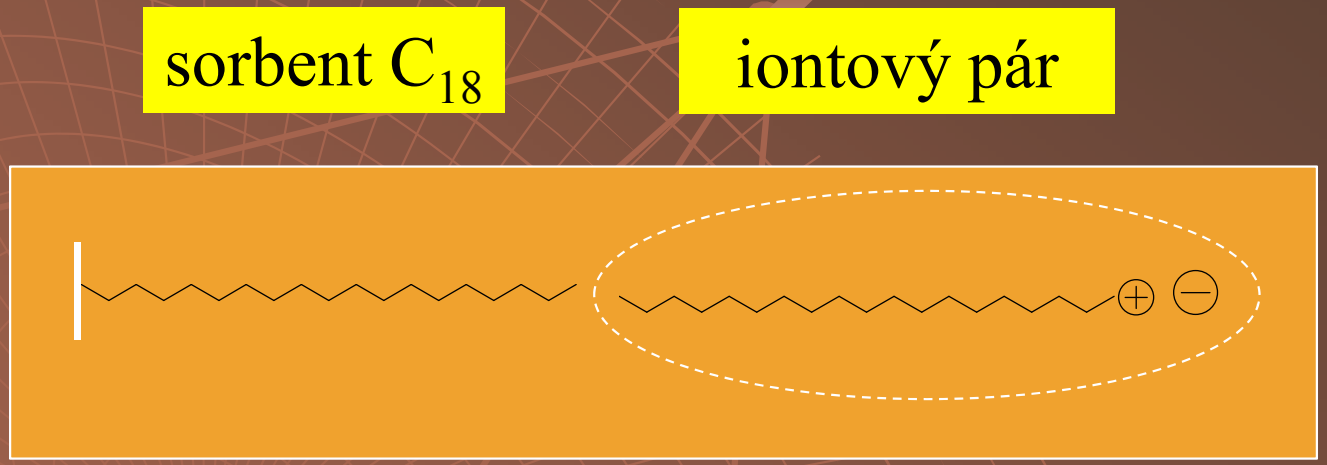
iontově párující činidlo

analyt

\+ - SDS, $HClO_4$

\- - tetrabutylamonium

# Iontově párová chromatografie




Stacionární, mobilní faze, eluce – RPC

pH → plná ionizace analytu

# Iontově párová chromatografie

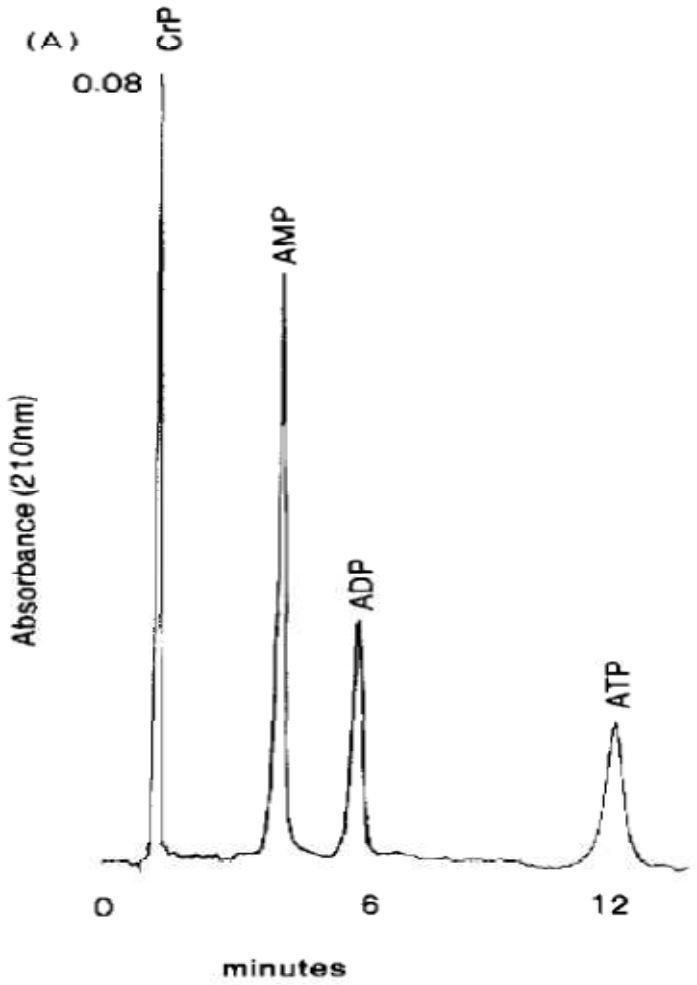



Fig. 1. Chromatogram of standards. Separation of standard containing 76.4 $\mu M$ CrP, 72 $\mu M$ AMP, 58.53 $\mu M$ ADP and 45.35 $\mu M$ ATP. Injection volume: 10 $\mu$l. Flow-rate: 2 ml/min. Buffer: 0.52 $\mu M$ potassium dihydrogen phosphate, 0.04% TBAP and 1.25% methanol, pH 4.0. Column: Supelcosil LC-18, 5 $\mu$m (25 cm × 0.46 cm). Detection: UV 210 nm.

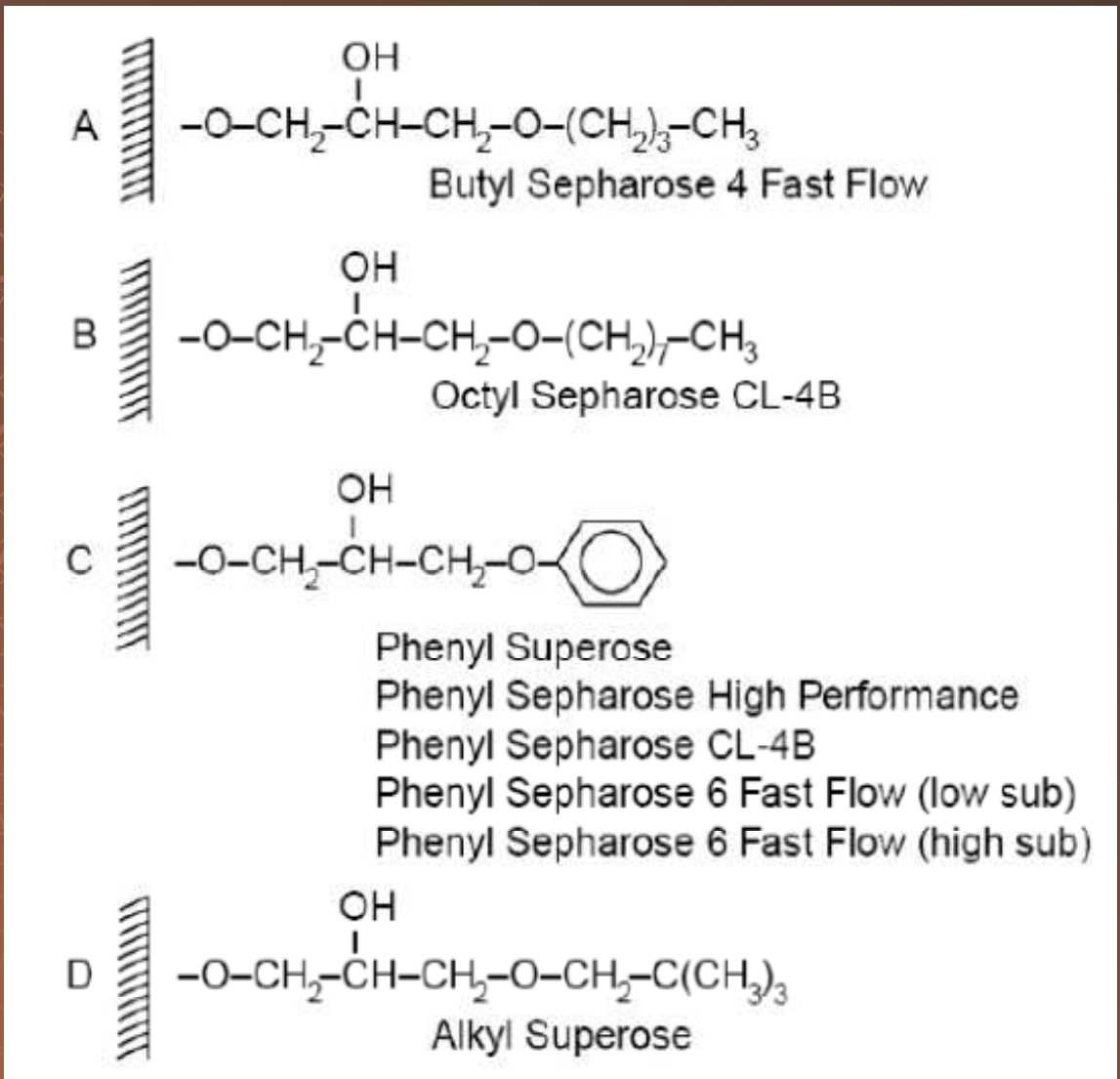
# Hydrofobní chromatografie

- Stacionární fáze – -$C_4$, -$C_8$, -fenyl
- Mobilní fáze – vodné roztoky (pufry)
  1.7 M $(NH_4)_2SO_4$
- Eluce – snižováním iontové síly

Použití : purifikace bílkovin

# Hydrofobní chromatografie

- Stacionární fáze –




**Isopropyl < Butyl < Octyl < Phenyl**

# Hydrofobní chromatografie

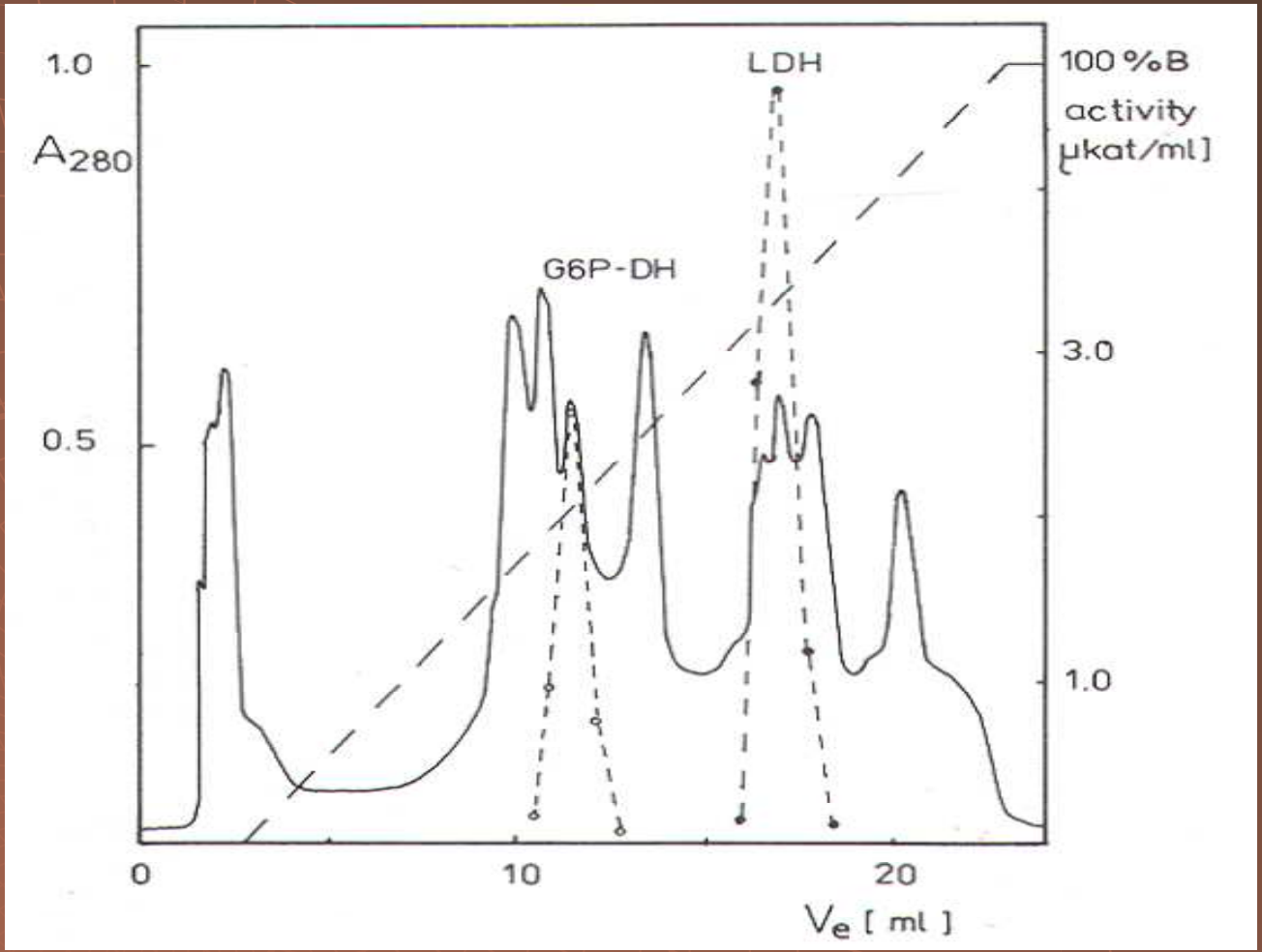



Fig. 1. Chromatography of crude enzyme preparation on a Phenyl-Superose column. Buffers: (A) 0.05 *M* sodium phosphate (pH 7.4) with 1.7 *M* sodium sulphate and 1 m*M* EDTA; (B) 0.05 *M* sodium phosphate (pH 7.4); flow-rate, 0.5 ml/min. $V_e$, elution volume; solid line, absorbance at 280 nm ($A_{280}$); dashed lines, gradient; (○) G6P-DH activity; (●) LDH activity. Approximately 10 mg of protein were applied to the column.

# Hydrofobní chromatografie

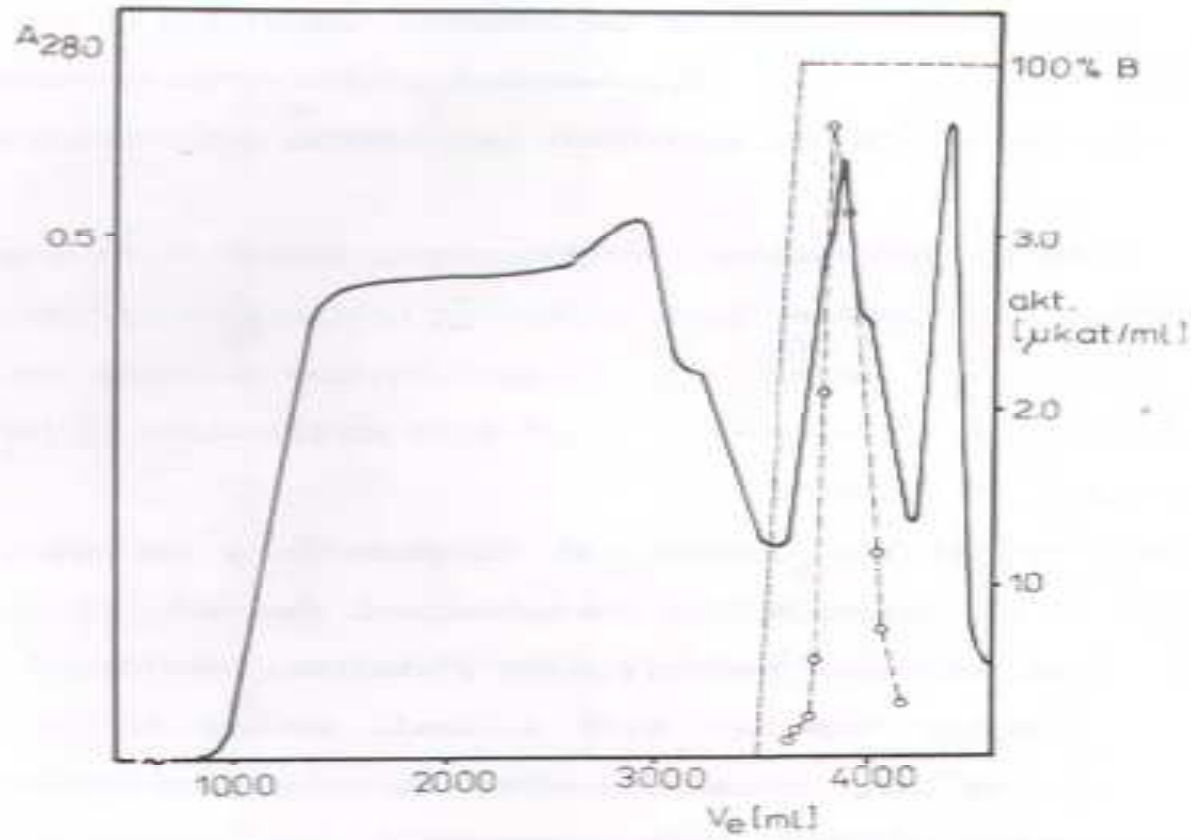
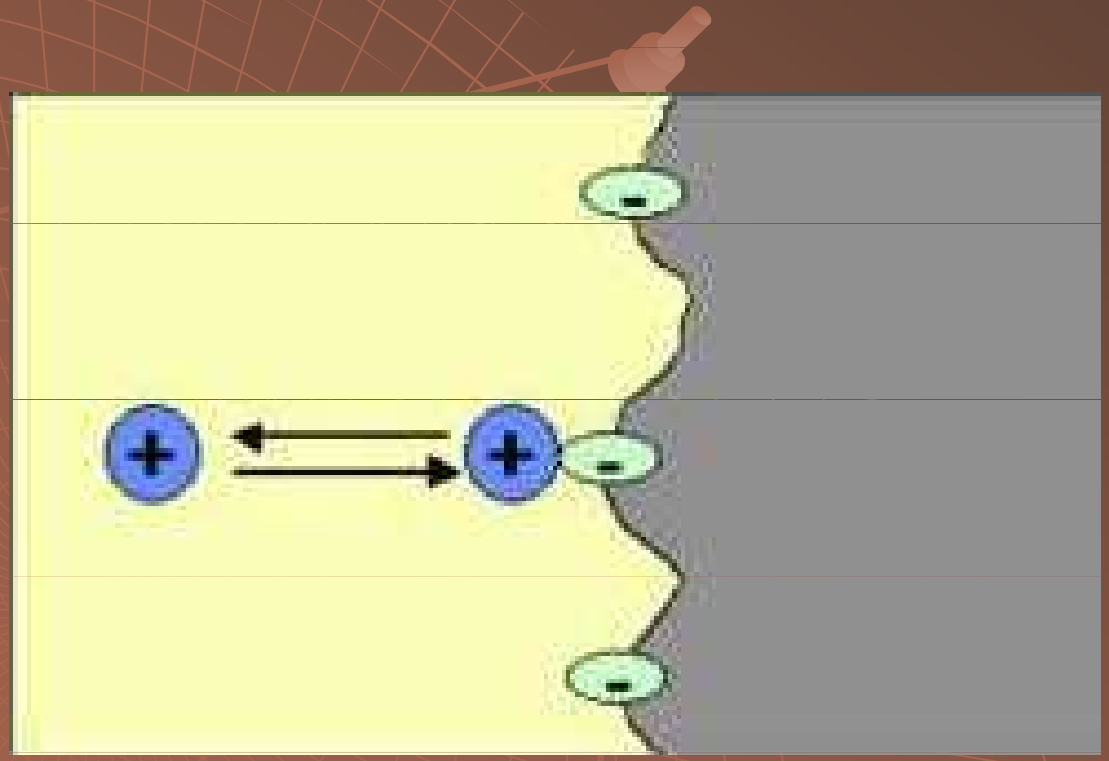


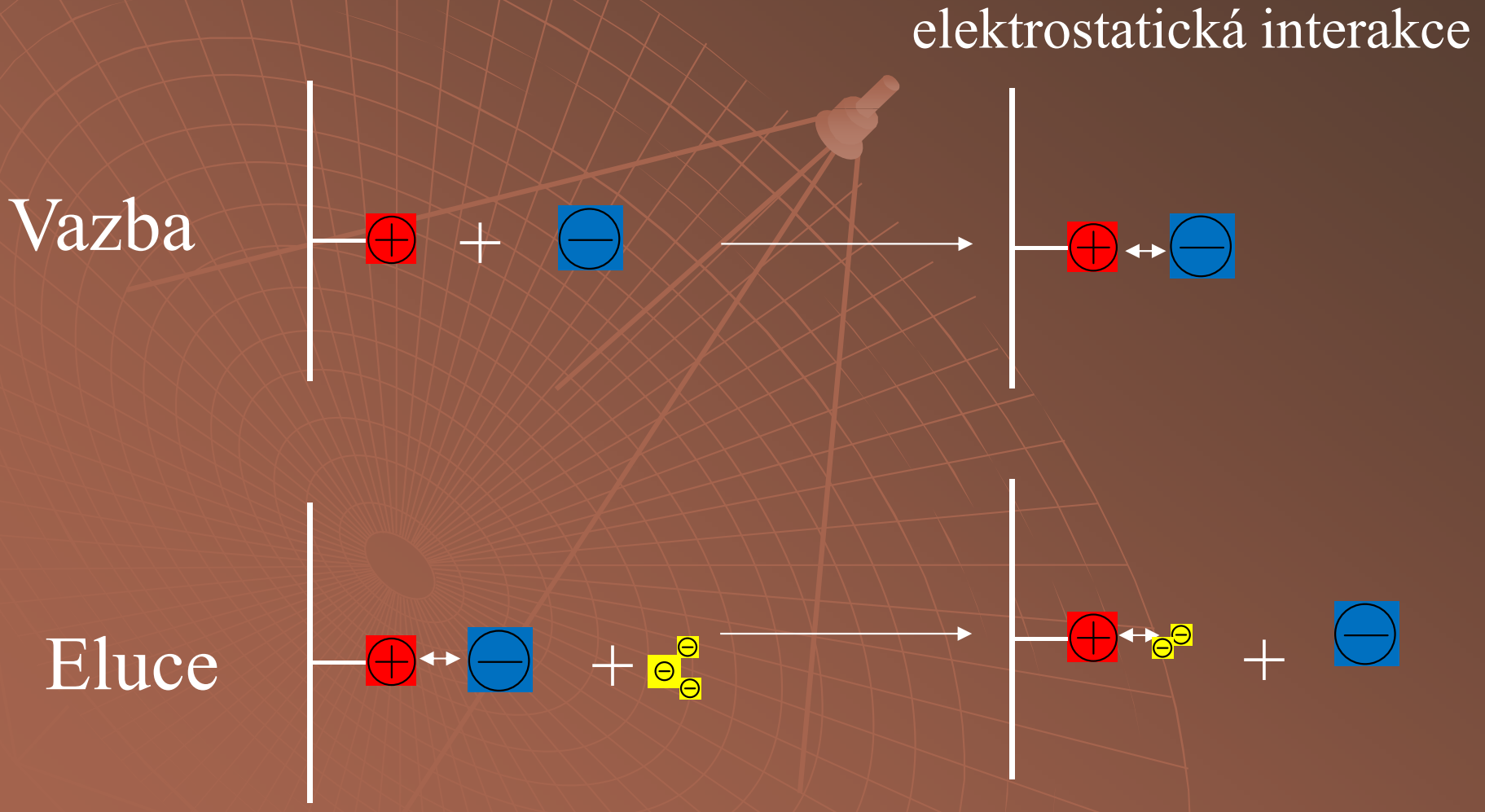

Figure 1

Chromatography of the crude enzyme preparation on a Spheron 1000 column. Buffers : A, 0.05 M potassium phosphate (pH 6.0) with 1.3 M ammonium sulphate and 1 uM $CuSO_4$; B, 0.05 M potassium phosphate (pH 6.0) with 1 uM $CuSO_4$; flow-rate 4.5 ml/min; $V_e$ - elution volume; ——— absorbance at 280 nm ($A_{280}$); - - - - - - - gradient; —·—o—·— DAO activity (ukat.ml$^{-1}$. Approximately 30 g of protein were applied to the column.

# Iontexová chromatografie



# Ionexová chromatografie



# Ionexy

- Katexy - **-** vazba kationtů

silné - sulfo(S), sulfopropyl(SP) **$OSO_3^-$**

slabé - karboxy(C), karboxymetyl(CM) **$COO^-$**

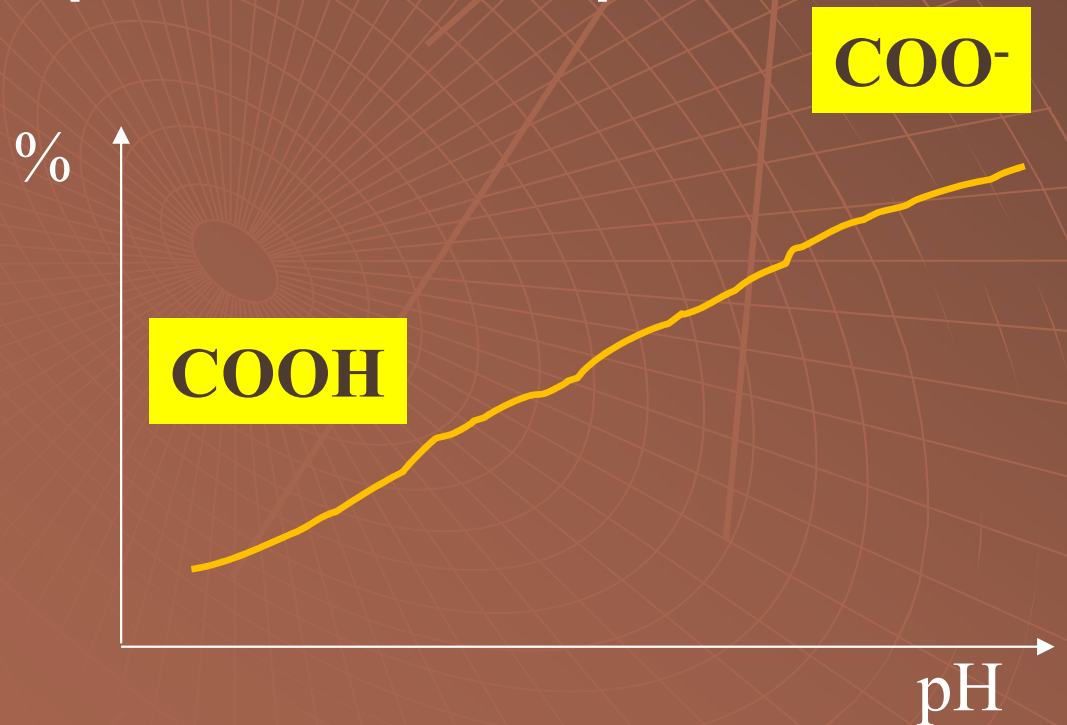
- Anexy - **+** vazba aniontů

slabé - **dietylaminoetyl**(DEAE)

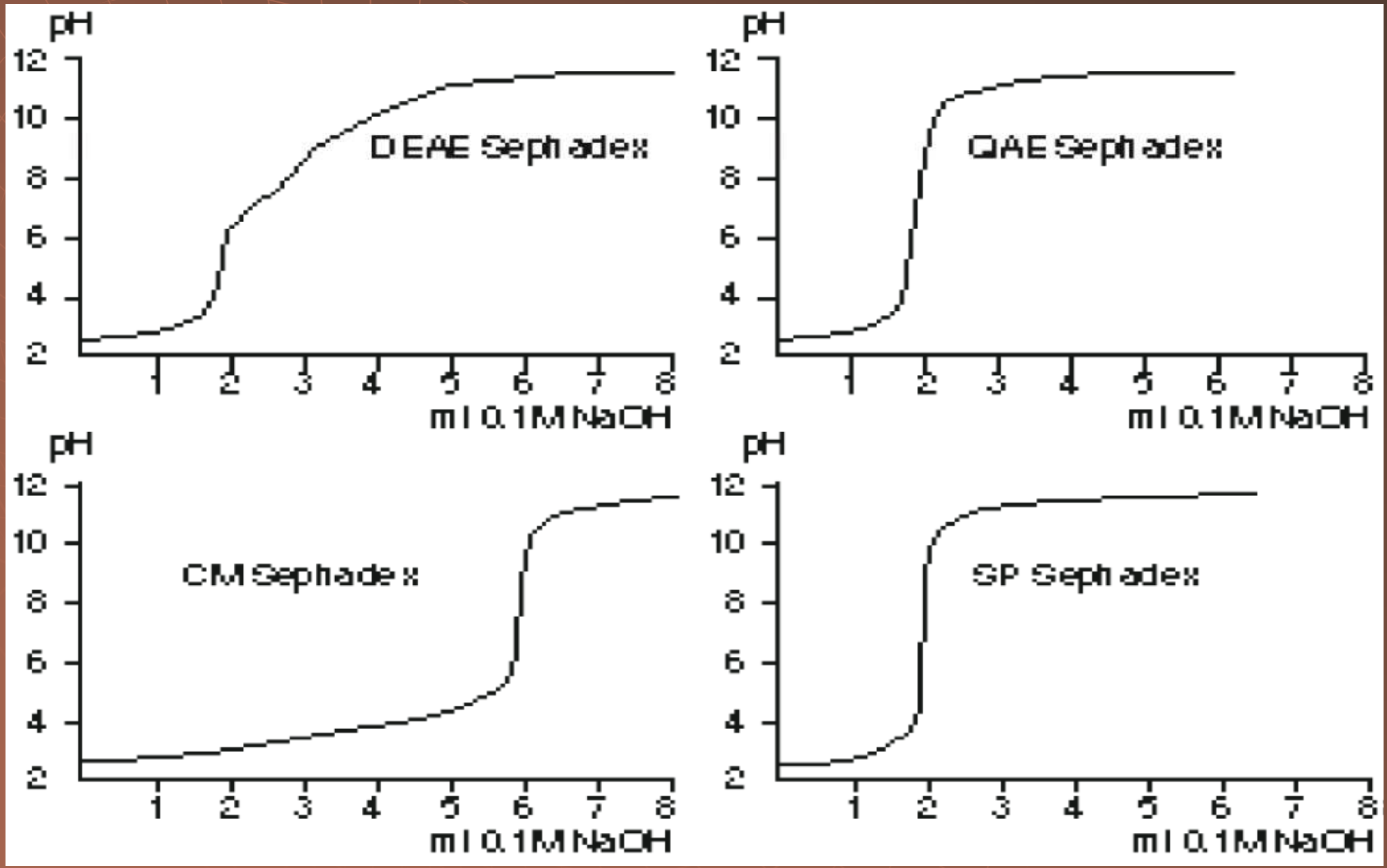
silné - **trietylaminoetyl**(TEAE)

# Slabý ionex

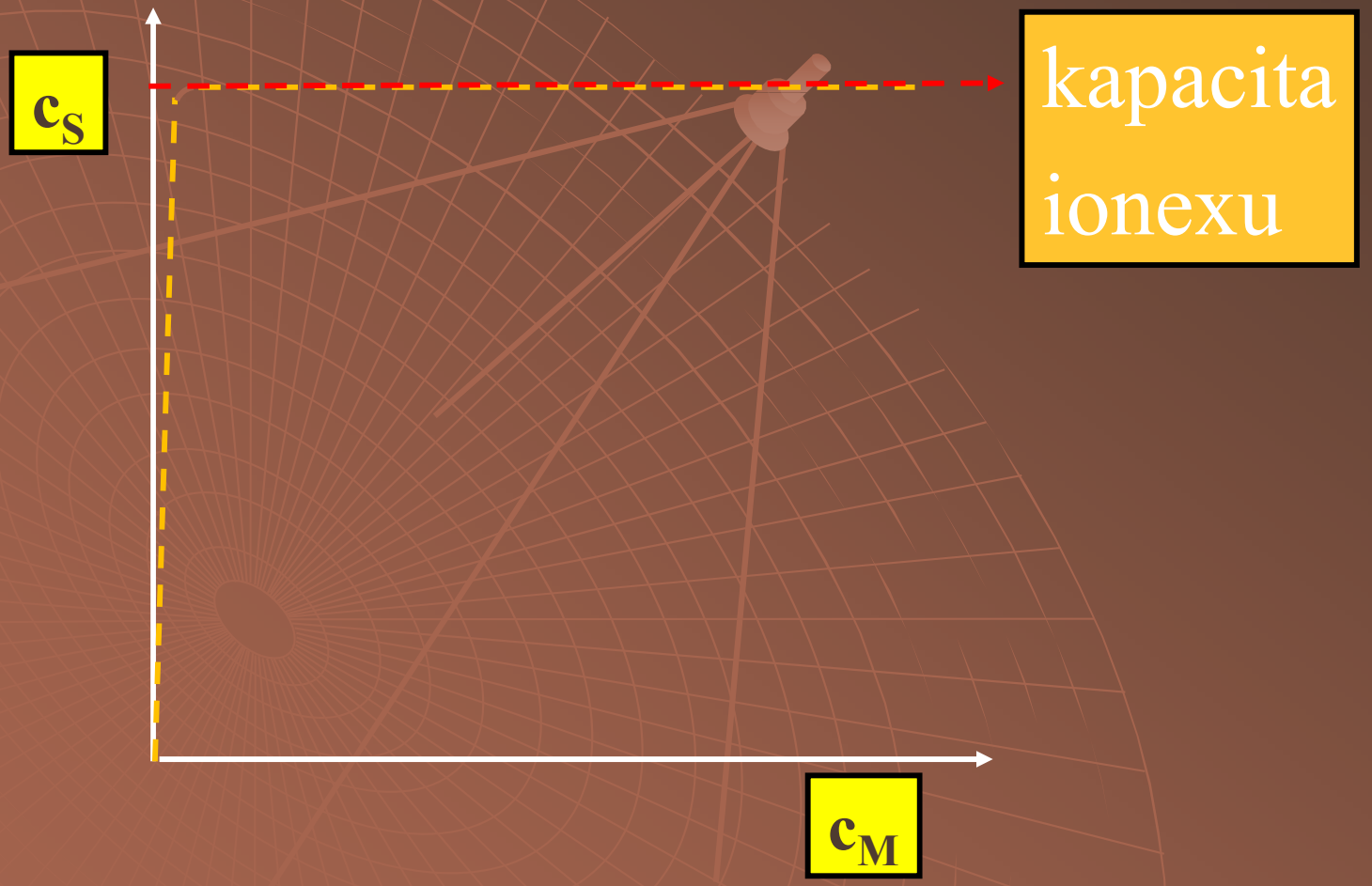
- Vykazuje změny vazebné kapacity v závislosti na pH
- Má pufrační kapacitu



# Slabý versus silný ionex

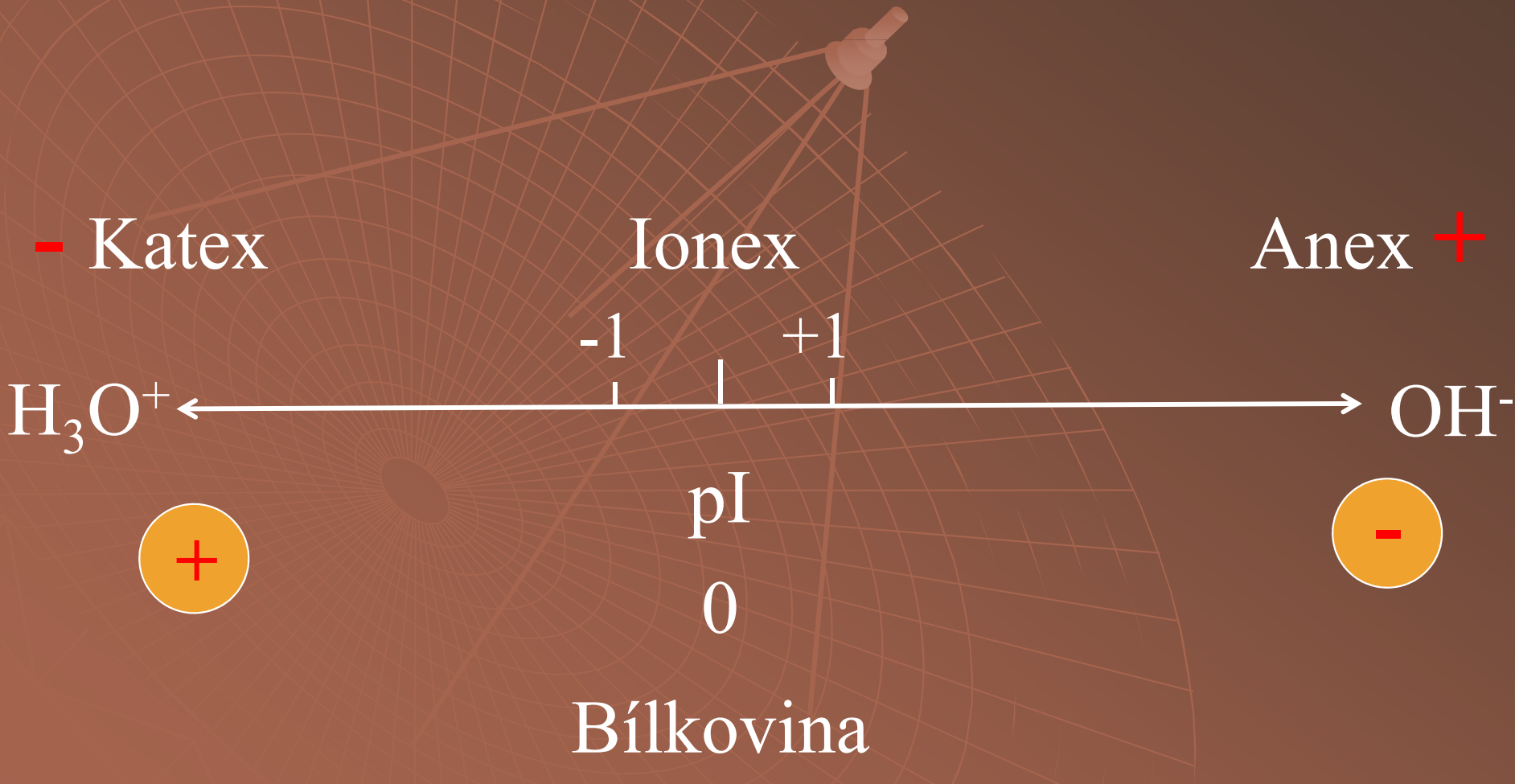


# Ionexová chromatografie

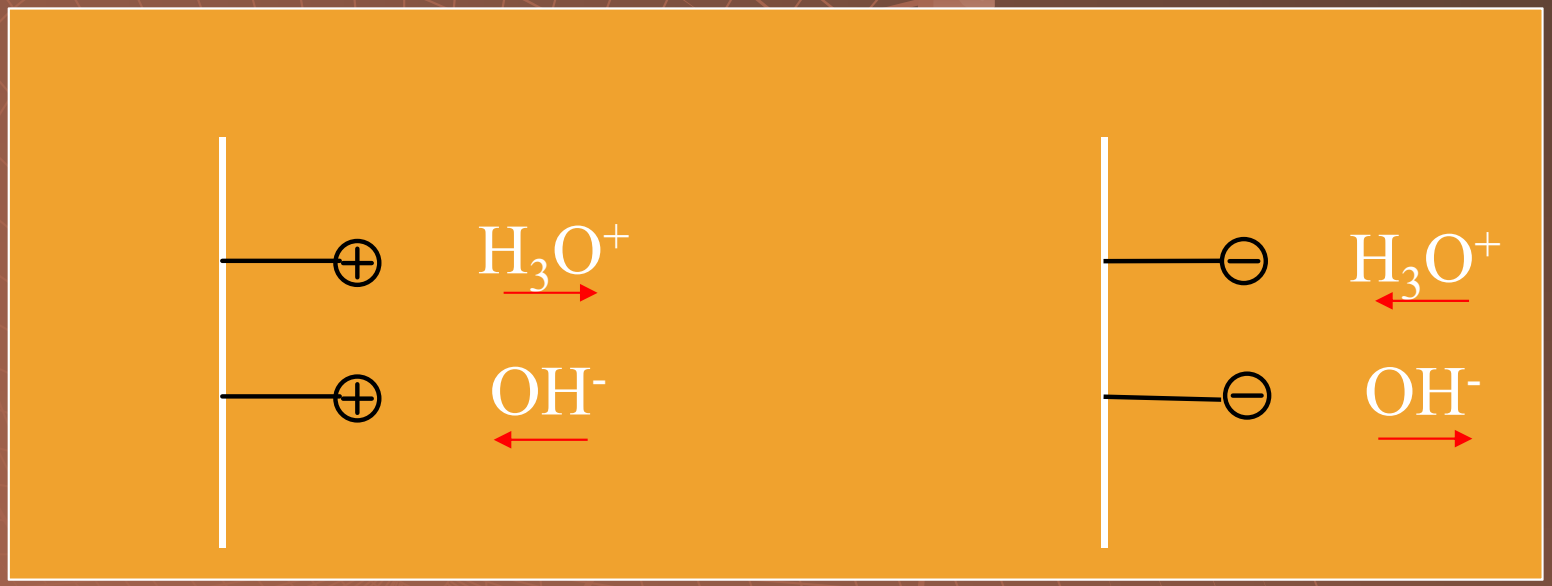


# Volba podmínek – pH + typ ionexu

## pI bílkoviny je znám



# Donanův efekt



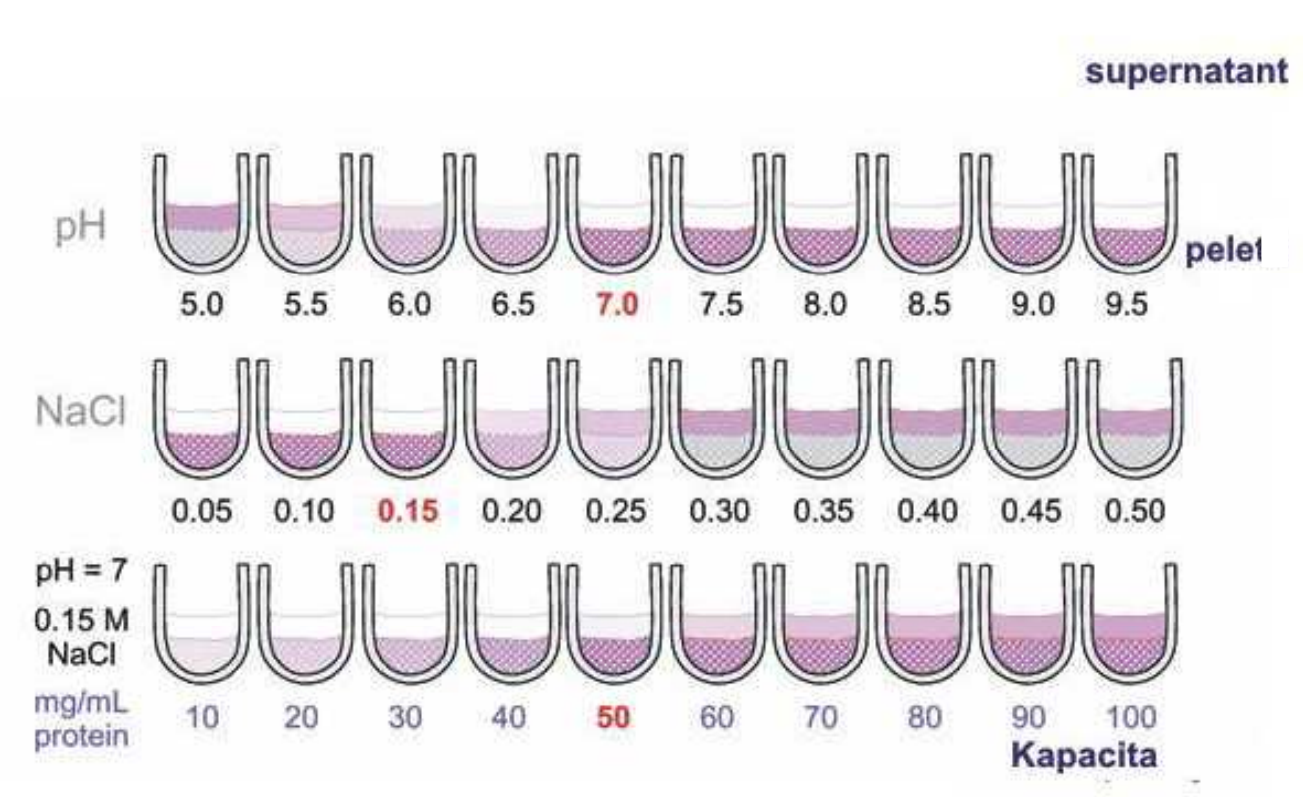

zvyšování pH

snižování pH

# Volba podmínek – pH + typ ionexu

## pI bílkoviny není znám

- Metoda pokusů a omylů




- Metoda titračních křivek

# Iontová chromatografie

- Nanášení vzorku – nízká iontová síla
- Eluce – gradientová
  - Zvyšováním iontové síly
  - Změnou pH
  - Afinitní eluce

Použití – purifikace, zakoncentrování, výměna pufru

# Ionexová chromatografie

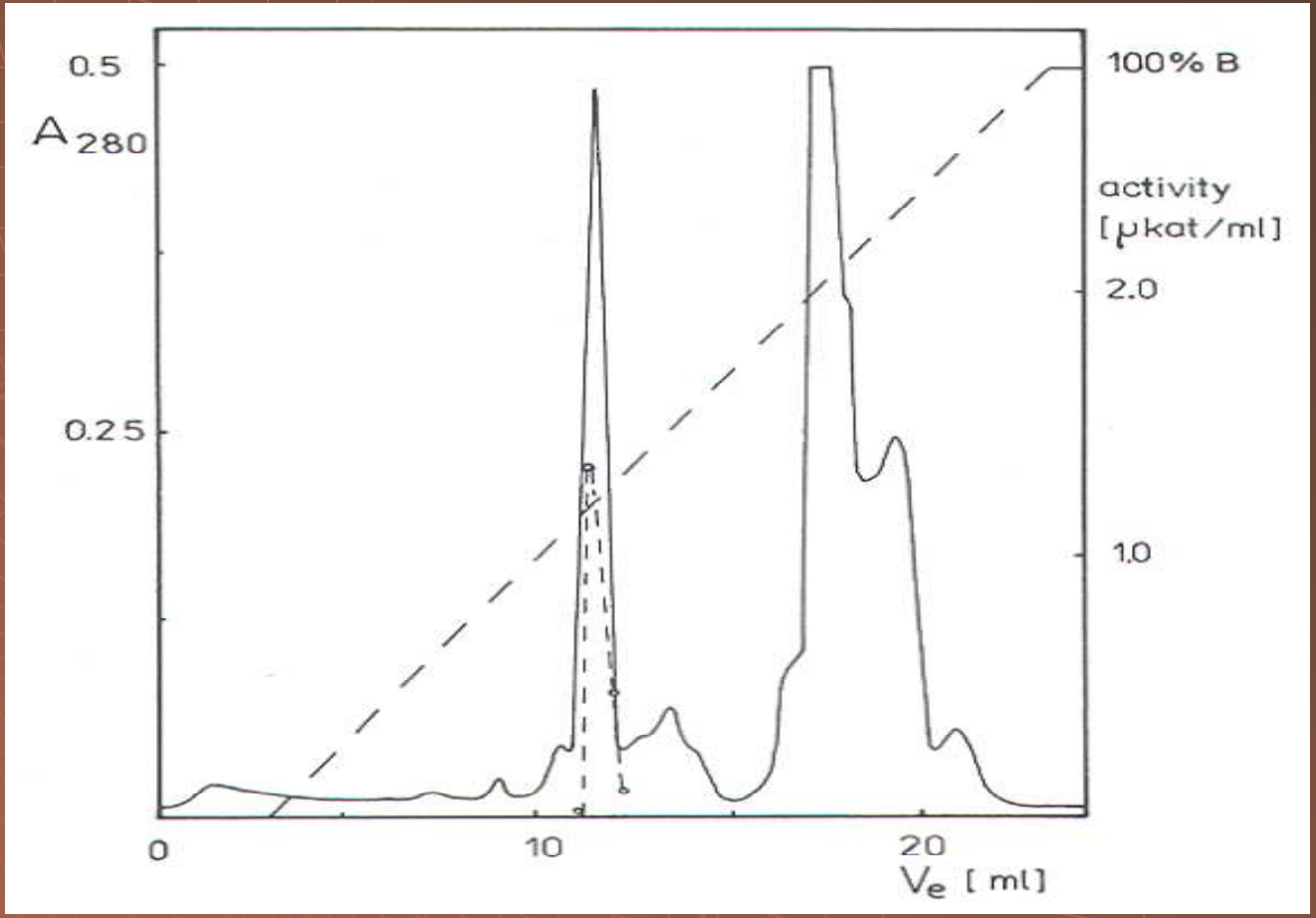



Fig. 2. Chromatography of partially purified G6P-DH on a Mono Q column. Buffers: (A) 0.05 *M* sodium phosphate (pH 7.4); (B) same as A but with 1 *M* sodium chloride; flow-rate, 1 ml/min. Lines symbol as in Fig. 1. Approximately 10 mg of protein were applied to the column.

# Ionexová chromatografie

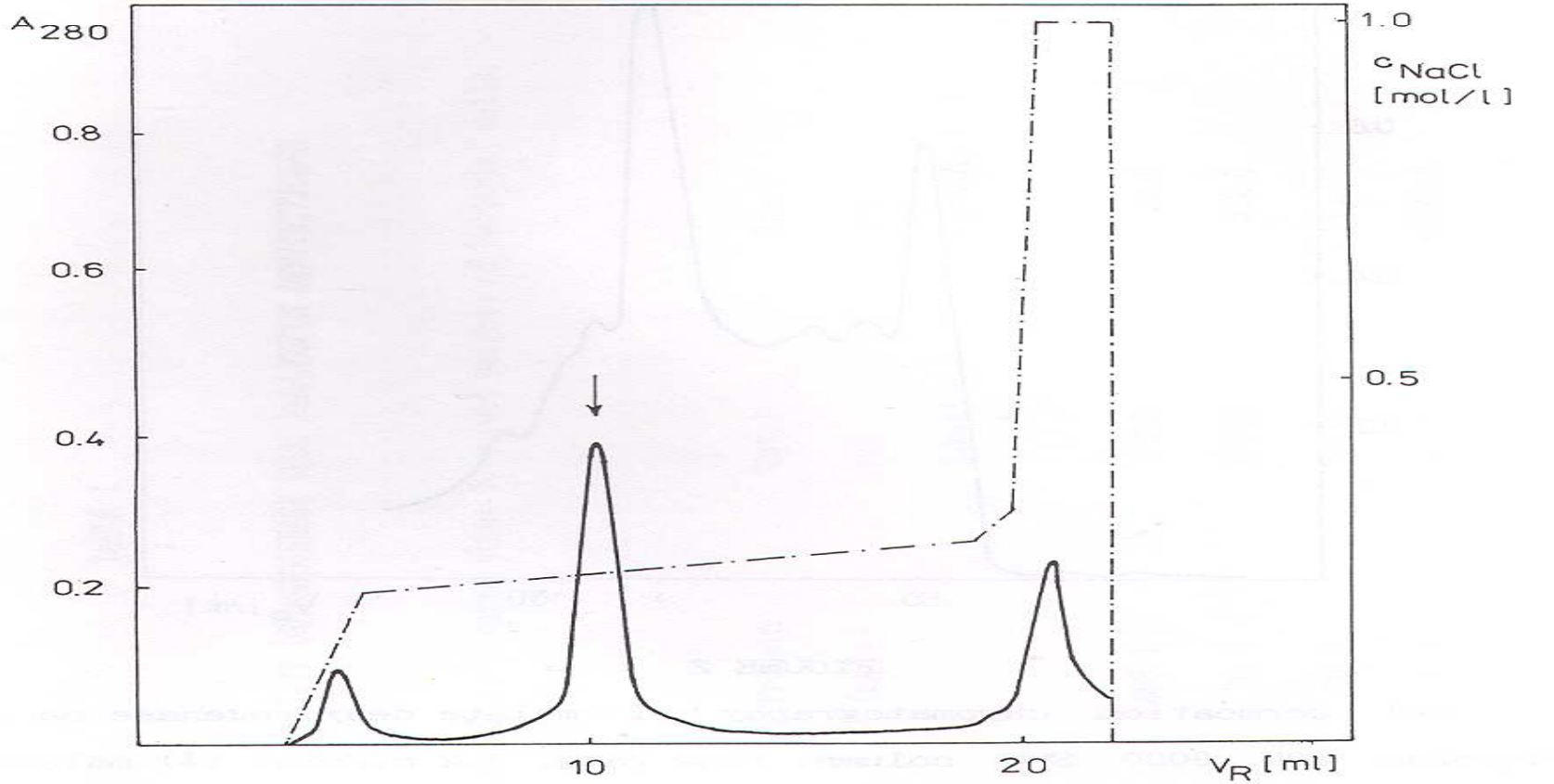
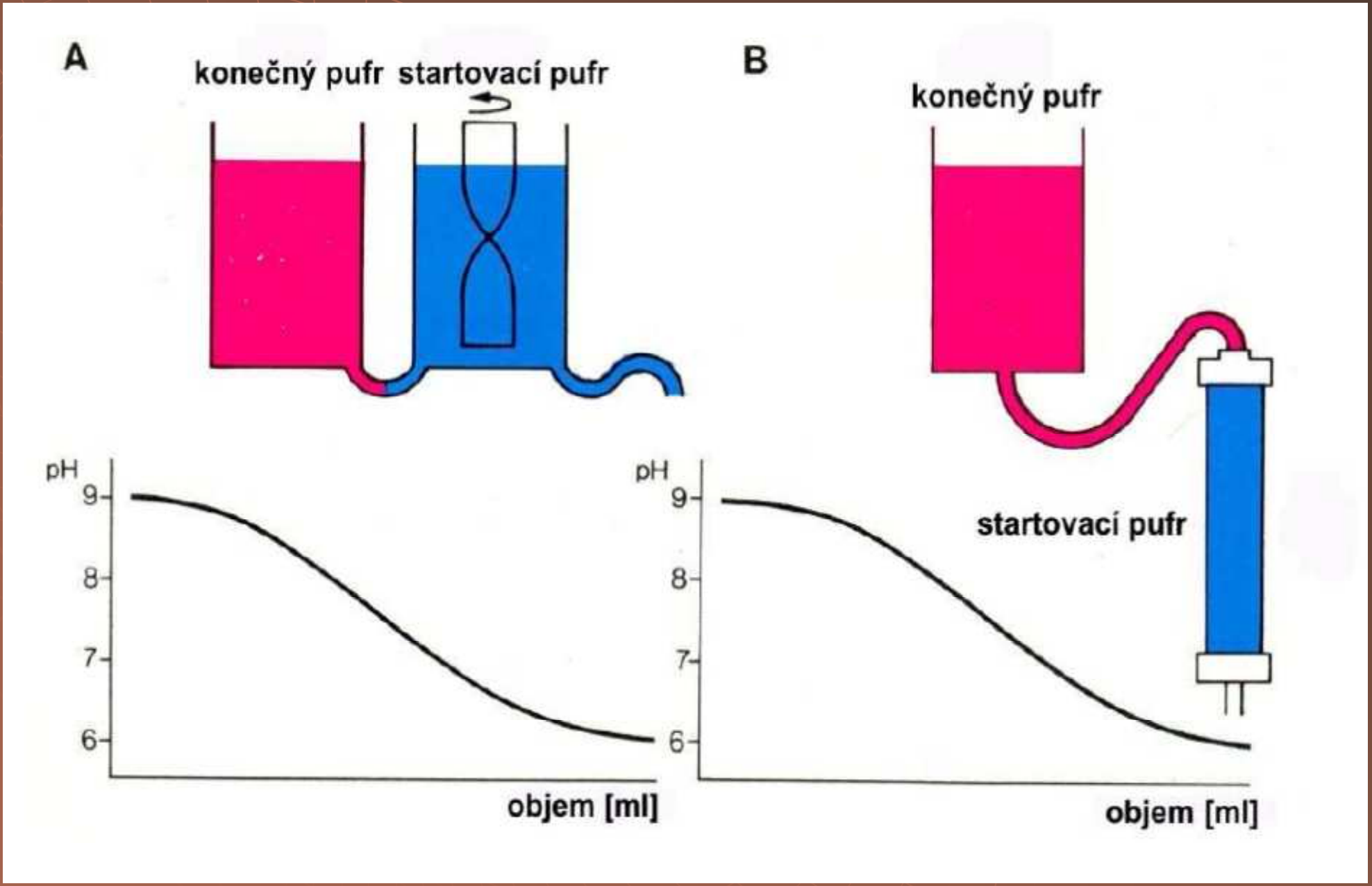



FIGURE 3

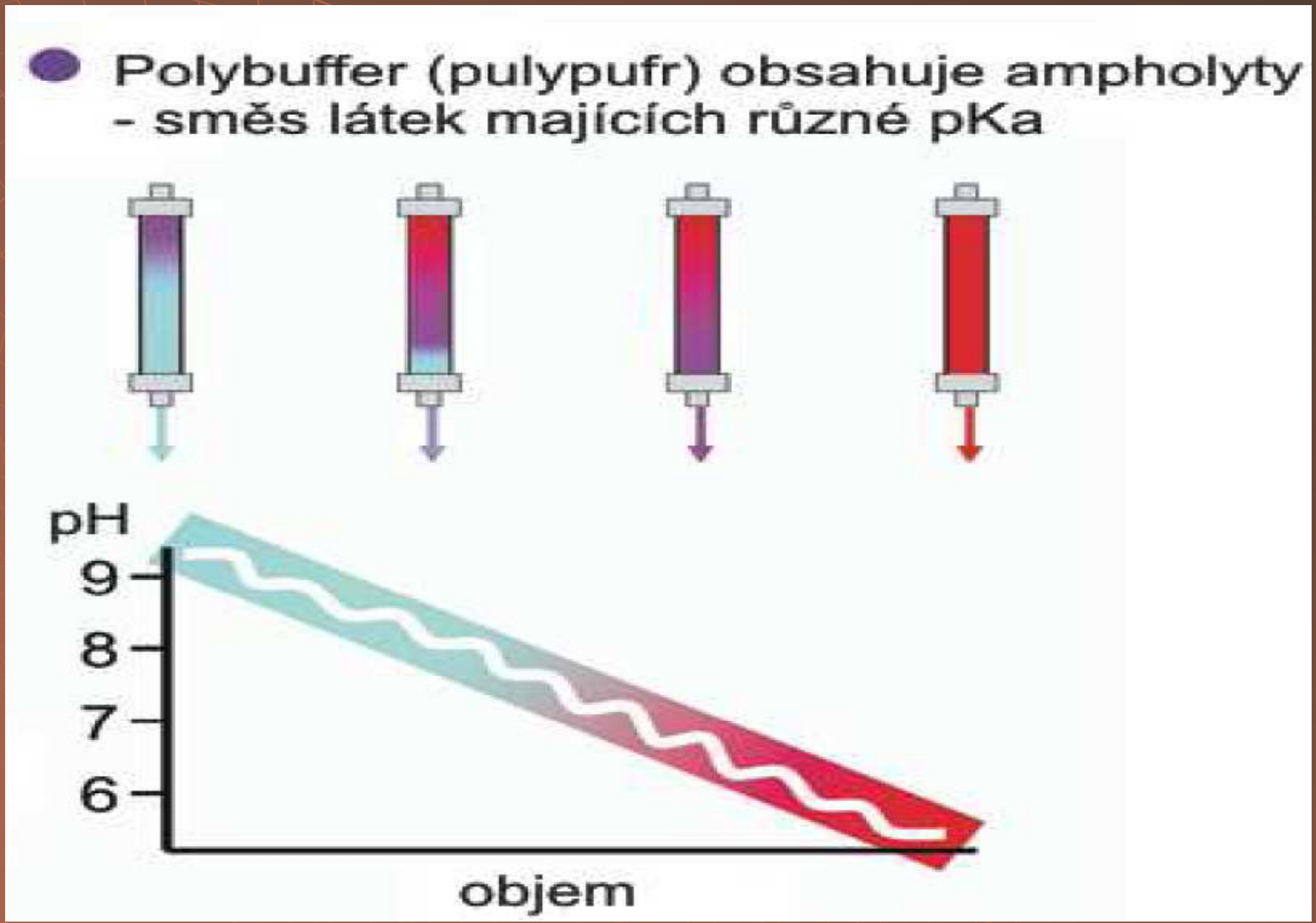
Ionex chromatography of malate dehydrogenase on a Mono Q column. $V_e$, elution volume; ——, absorbance at 280 nm ($A_{280}$); (↓) malate dehydrogenase activity; -----,NaCl gradient (buffer A, 0.02 mol/l sodium phosphate (pH 6.0); buffer B, the same as buffer A but with 1.0 mol/l NaCl); flow rate, approx. 1.2 ml/min.

# Chromatofokusace

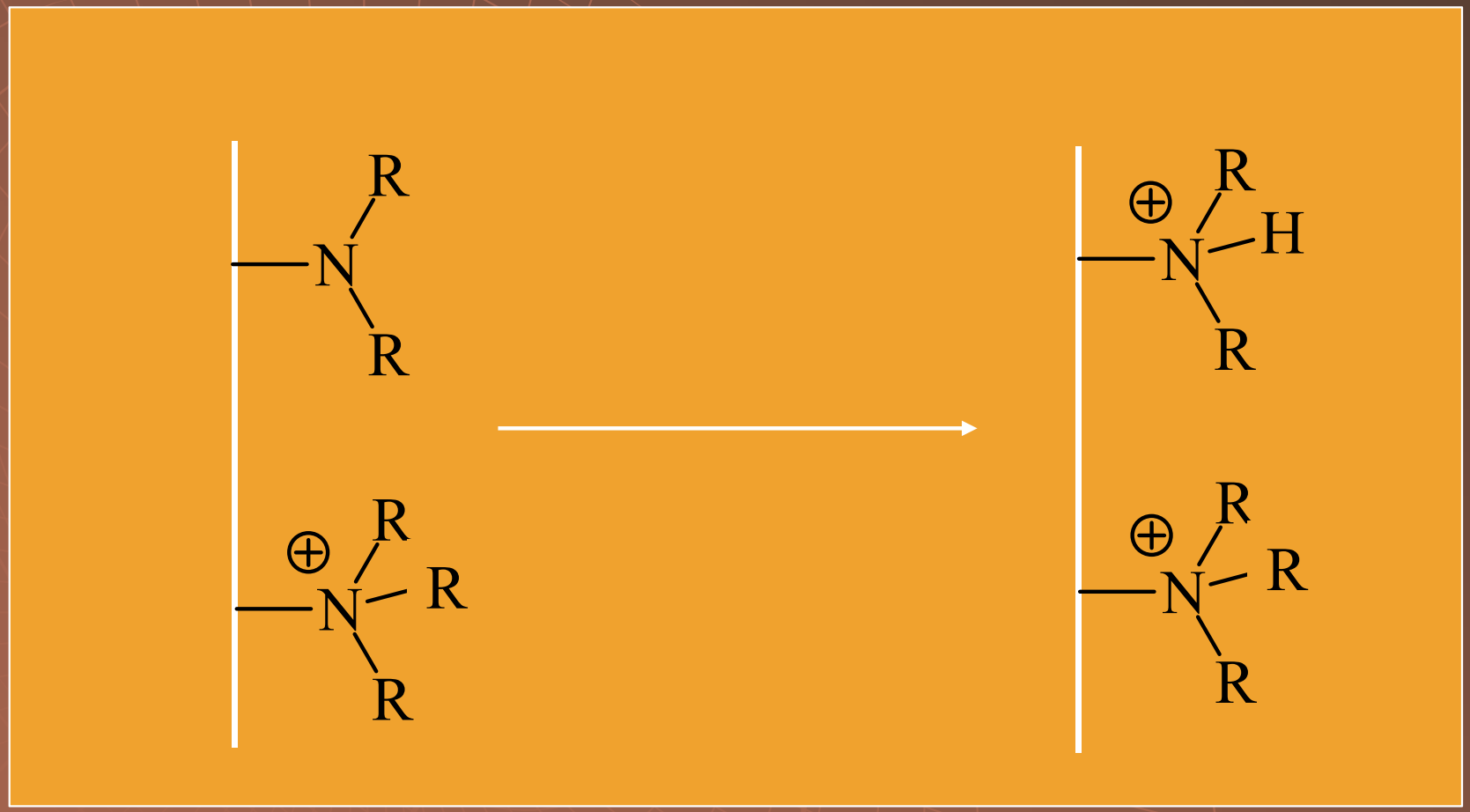


# Chromatofokusace

- Polybuffer (pulypufr) obsahuje ampholyty - směs látek majících různé pKa

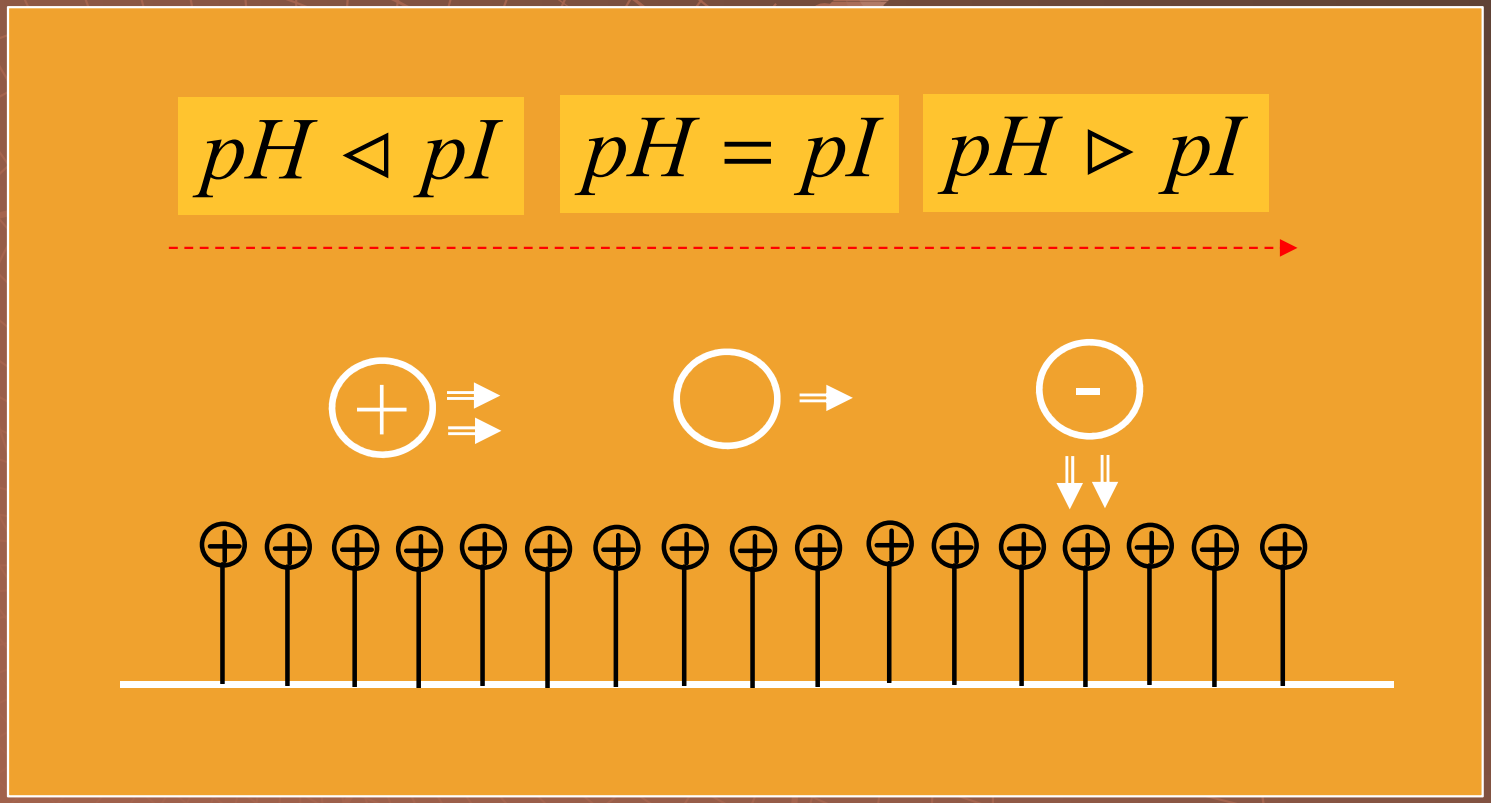


# Chromatofokusace
# děj na koloně

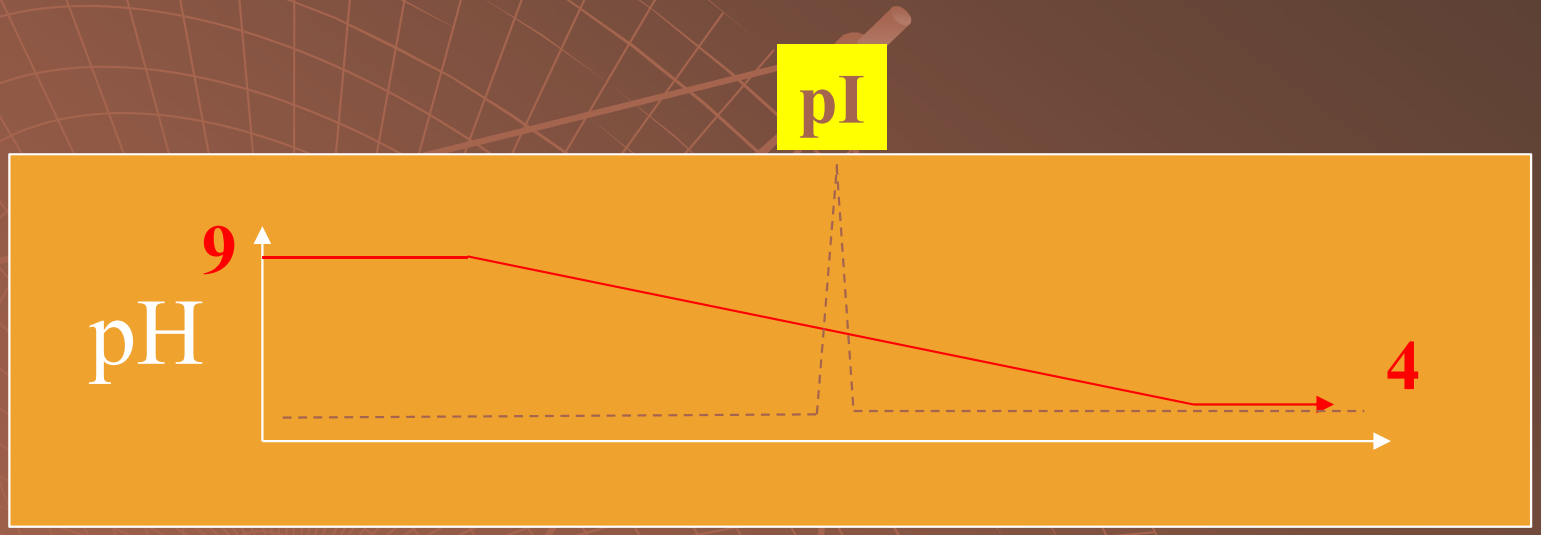



**pH = 9** **pH = 4**

# Chromatofokusace
# chování vzorku



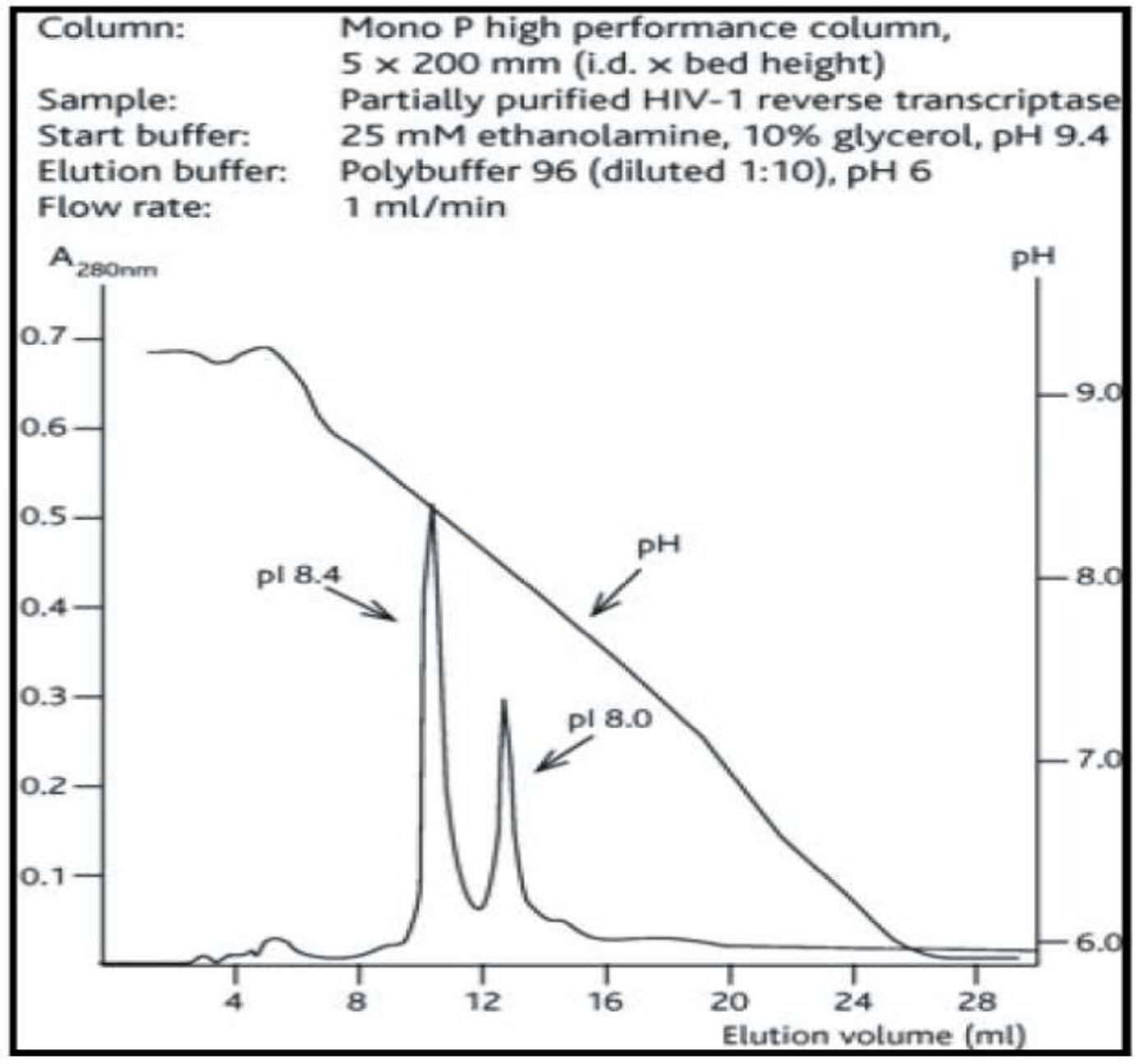
# Chromatofokusace
# chování vzorku




Použití : analytické – stanovení pI

preparativní – purifikace bílkovin

# Chromatofokusace



# Chromatofokusace

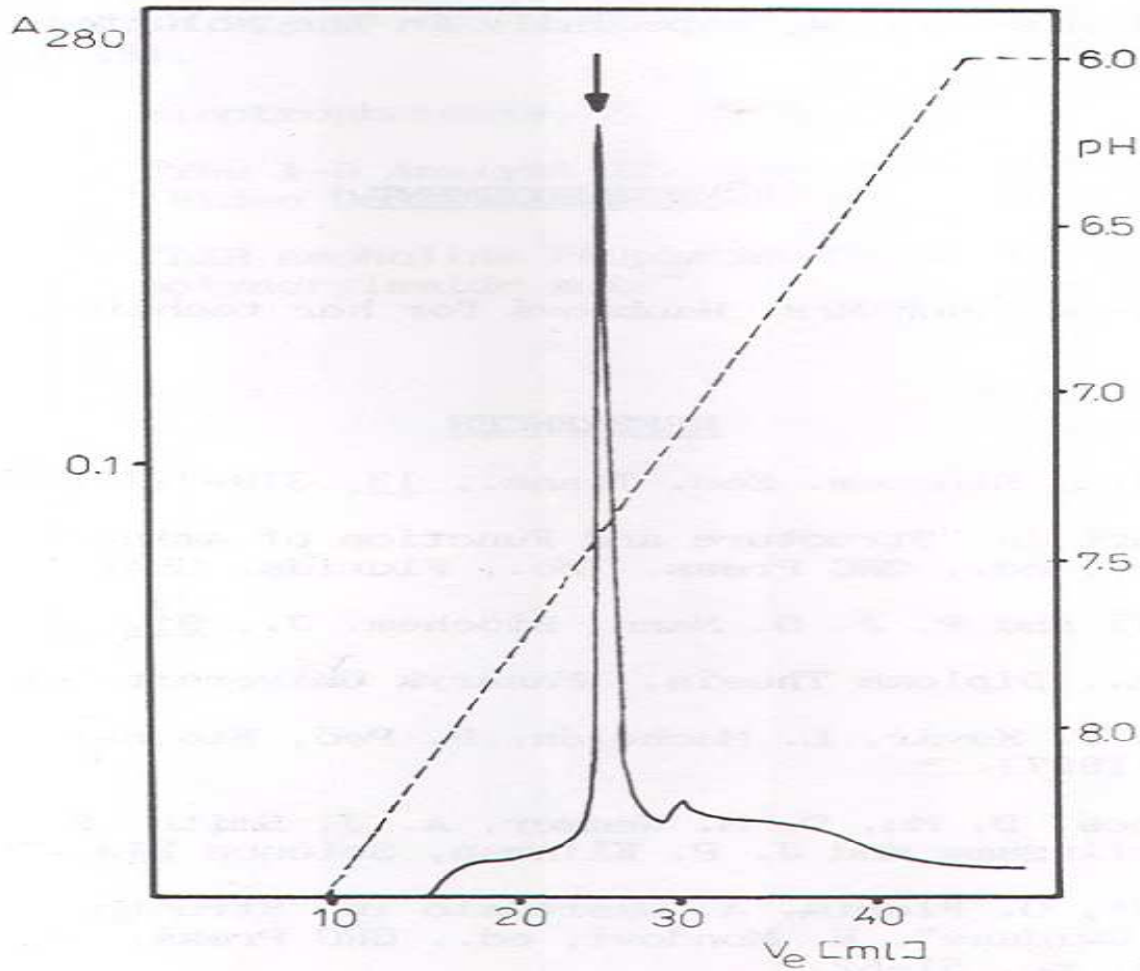
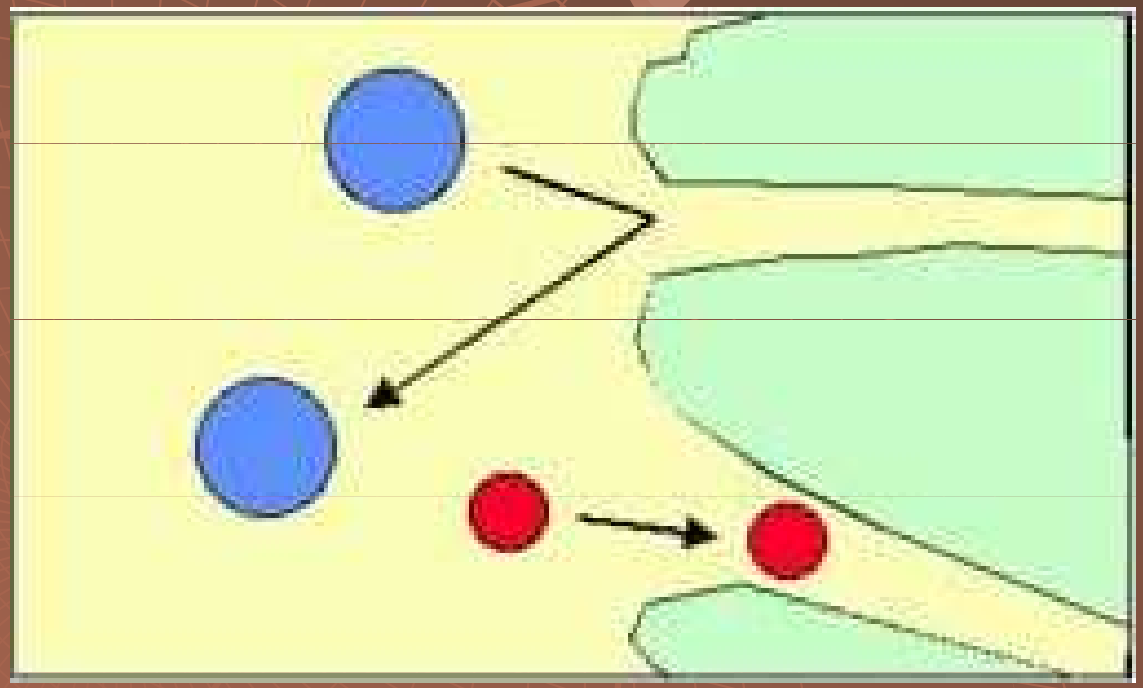


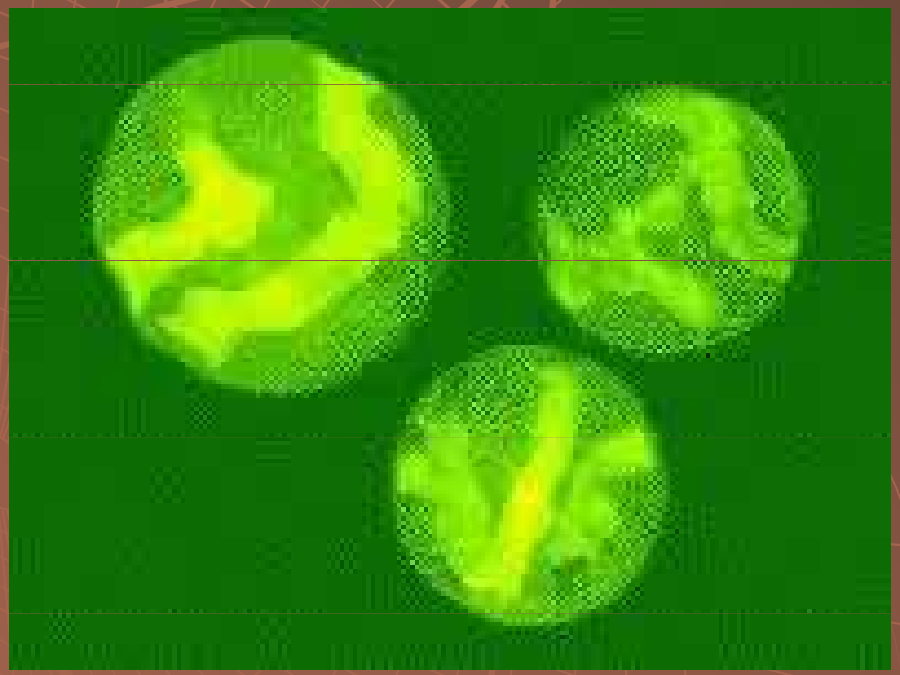

**Figure 6**

Chromatofocusing of the homogeneous DAO on Mono P column; ---- pH value of the eluate, flow-rate 0.7 ml/min, the other symbols as in Fig. 1. DAO activity is indicated by an arrow.

# Gelová permeační chromatografie



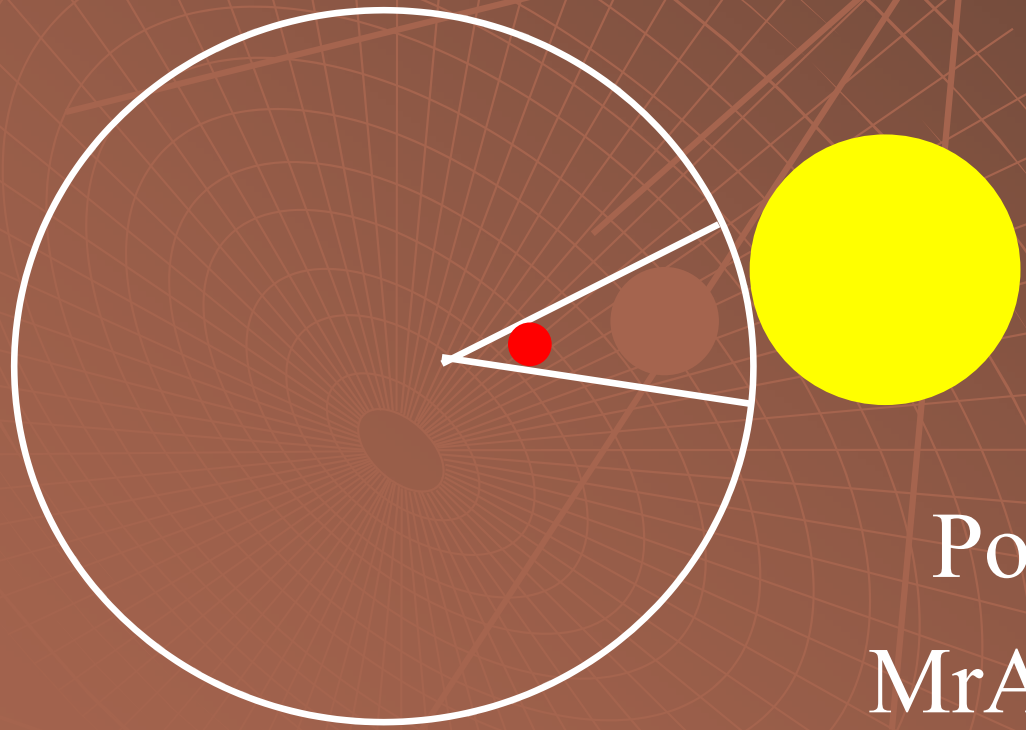
# Gelová permeační chromatografie



# Gelová permeační chromatografie

Princip - stérická exkluse

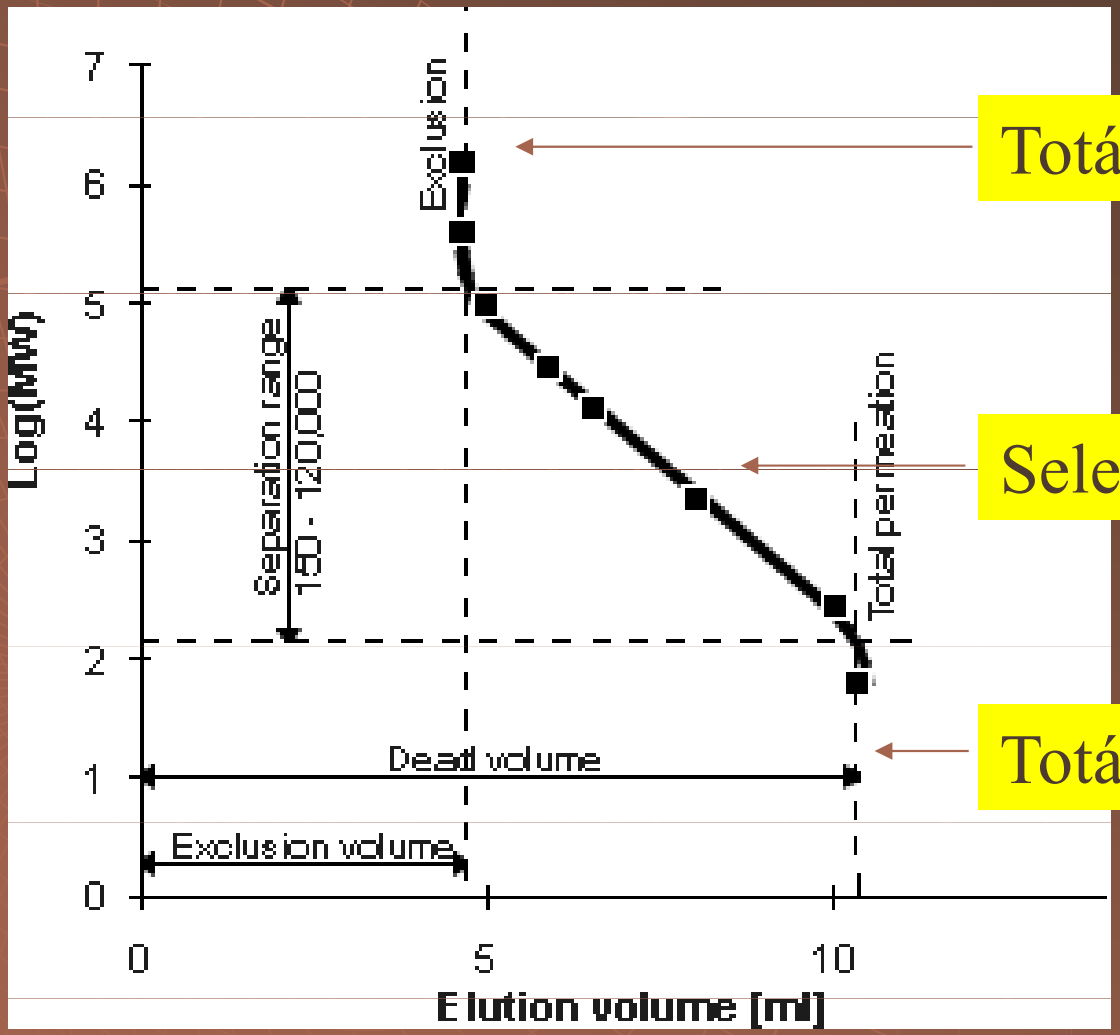
- omezená difuse



Pořadí eluce :

MrA>MrB>MrC

# Gelová permeační chromatografie




Totální exkluse

Selektivní permeace

Totální permeace

# Gelová permeační chromatografie

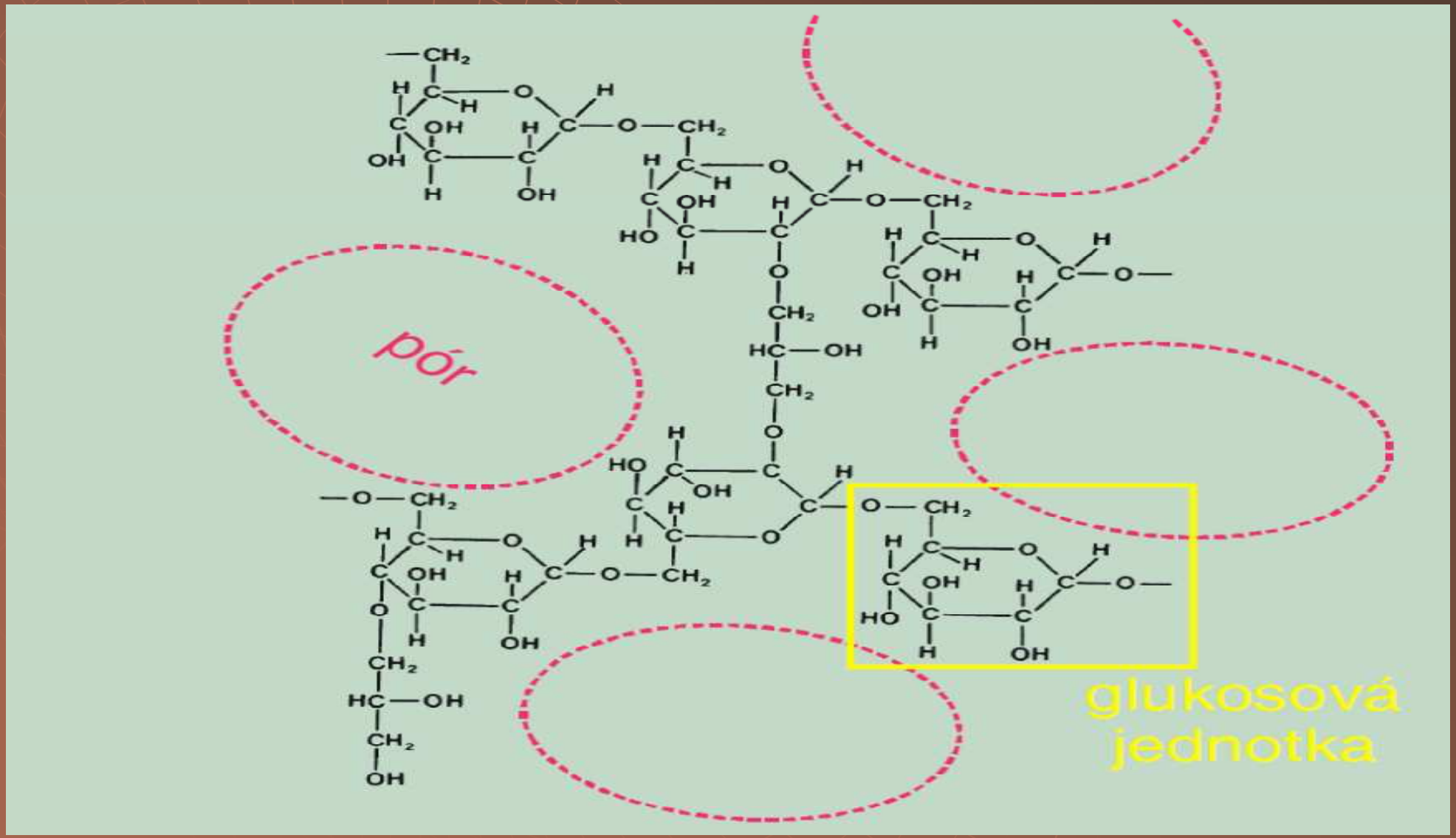
**Pharmacia LPC**

- **Sephadex** dextran
- **Sepharose** agarosa
- **Sephacryl** glukosa + akryamid
- **Sephacel** cellulosa

**Pharmacia FPLC**

- **Superose** garosa
- **Superdex** síťovaná agarosa a dextran

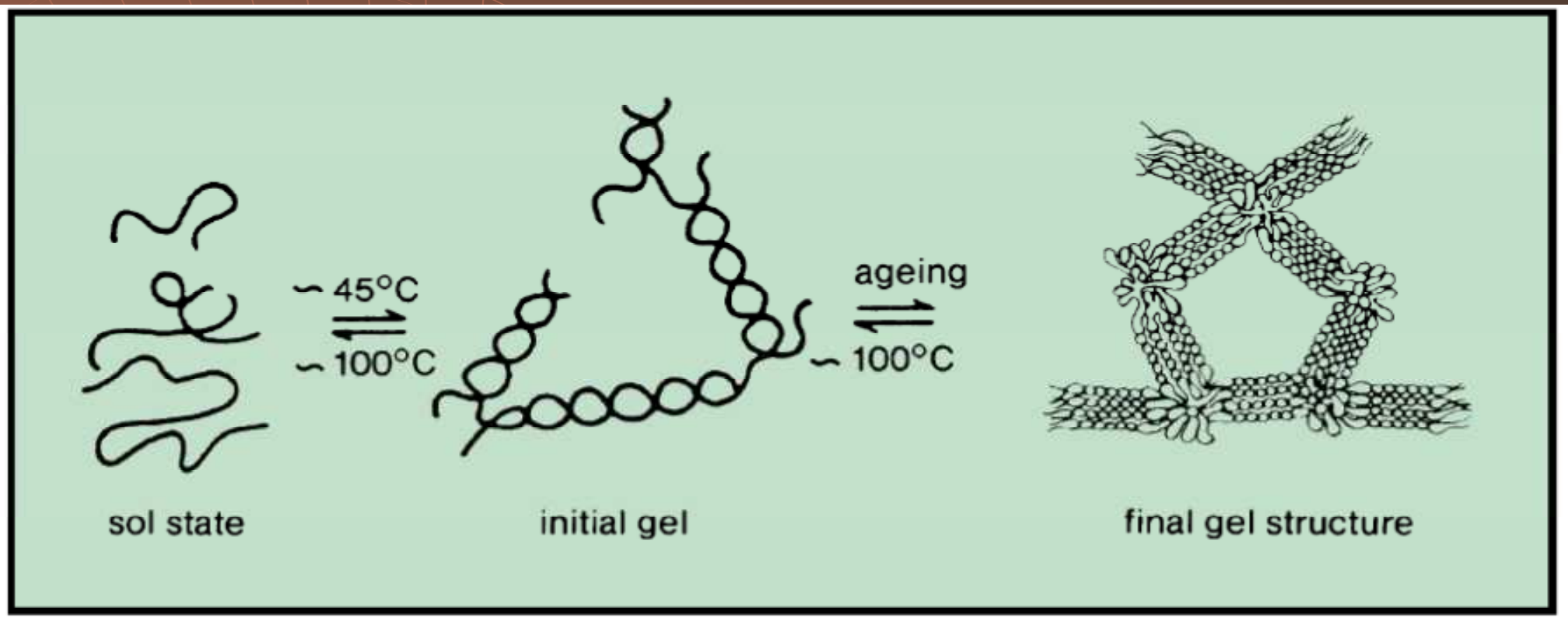
# Sephadex

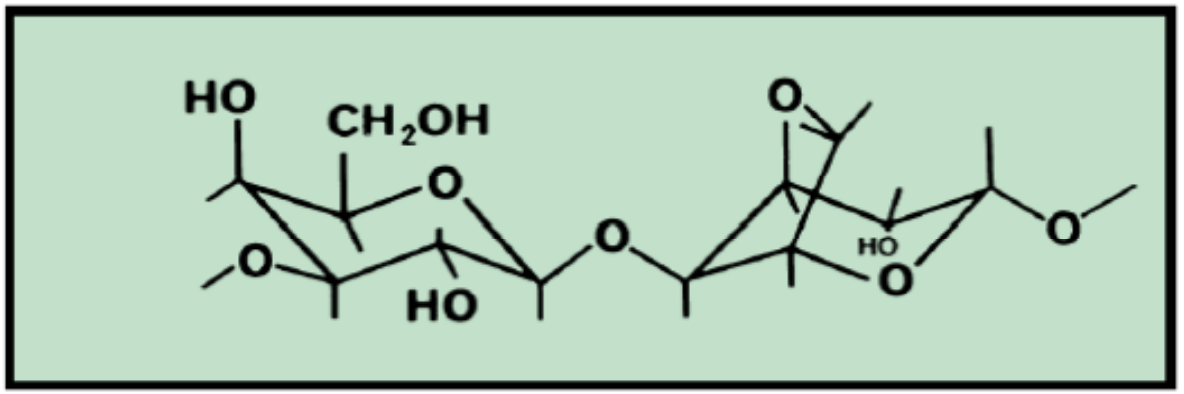


# Sephadex

| Gel type | Dry bead size µm | Fractionation range Globular proteins | Fractionation range Dextrans | Swelling factor ml/g |
|---|---|---|---|---|
| Sephadex G-10 | 40 – 120 | – 700 | – 700 | 2 – 3 |
| Sephadex G-15 | 40 – 120 | – 1 500 | – 1 500 | 2.5 – 3.5 |
| Sephadex G-25 Coarse | 100 – 300 | 1 000 – 5 000 | 100 – 5 000 | 4 – 6 |
| Sephadex G-25 Medium | 50 – 150 | 1 000 – 5 000 | 100 – 5 000 | 4 – 6 |
| Sephadex G-25 Fine | 20 – 80 | 1 000 – 5 000 | 100 – 5 000 | 4 – 6 |
| Sephadex G-25 Superfine | 10 – 40 | 1 000 – 5 000 | 100 – 5 000 | 4 – 6 |
| Sephadex G-50 Coarse | 100 – 300 | 1 500 – 30 000 | 500 – 10 000 | 9 – 11 |
| Sephadex G-50 Medium | 50 – 150 | 1 500 – 30 000 | 500 – 10 000 | 9 – 11 |
| Sephadex G-50 Fine | 20 – 80 | 1 500 – 30 000 | 500 – 10 000 | 9 – 11 |
| Sephadex G-50 Superfine | 10 – 40 | 1 500 – 30 000 | 500 – 10 000 | 9 – 11 |
| Sephadex G-75 | 40 – 120 | 3 000 – 80 000 | 1 000 – 50 000 | 12 – 15 |
| Sephadex G-75 Superfine | 10 – 40 | 3 000 – 70 000 | 1 000 – 50 000 | 12 – 15 |
| Sephadex G-100 | 40 – 120 | 4 000 – 150 000 | 1 000 – 100 000 | 15 – 20 |
| Sephadex G-100 Superfine | 10 – 40 | 4 000 – 100 000 | 1 000 – 100 000 | 15 – 20 |
| Sephadex G-150 | 40 – 120 | 5 000 – 300 000 | 1 000 – 150 000 | 20 – 30 |
| Sephadex G-150 Superfine | 10 – 40 | 5 000 – 150 000 | 1 000 – 150 000 | 18 – 22 |
| Sephadex G-200 | 40 – 120 | 5 000 – 600 000 | 1 000 – 200 000 | 30 – 40 |
| Sephadex G-200 Superfine | 10 – 40 | 5 000 – 250 000 | 1 000 – 150 000 | 20 – 25 |

# Sepharosa


~ 45°C
~ 100°C
ageing
~ 100°C
sol state
initial gel
final gel structure


HO
CH2OH
O
O
HO
O
O
HO
O
O

# Sepharosa

| Gel type | Approx. % agarose | Bead size µm | Fractionation range Globular proteins. | Fractionation range Dextrans |
|---|---|---|---|---|
| Sepharose 6B | 6 | 45 – 165 | 10 000 – 4 000 000 | 10 000 – 1 000 000 |
| Sepharose 4B | 4 | 45 – 165 | 60 000 – 20 000 000 | 30 000 – 5 000 000 |
| Sepharose 2B | 2 | 60 – 200 | 70 000 – 40 000 000 | 100 000 – 20 000 000 |

| Gel type | Bead size µm | Fractionation range Globular proteins | Fractionation range Dextrans |
|---|---|---|---|
| Superose 12 prep grade | 20 – 40 | 1 000 – 300 000 | ND |
| Superose 12 | 8 – 12 | 1 000 – 300 000 | ND |
| Superose 6 prep grade | 20 – 40 | 5 000 – 5 000 000 | ND |
| Superose 6 | 11 – 15 | 5 000 – 5 000 000 | ND |

# Gelová permeační chromatografie

**Bio-Rad**

- **BioGel P** akrylamid
- **BioGel A** agarosa

**Tosoh Bioscience**

- **Toyopearl a TSKgel** hydroxylovaný methacrylát

# BioGel P

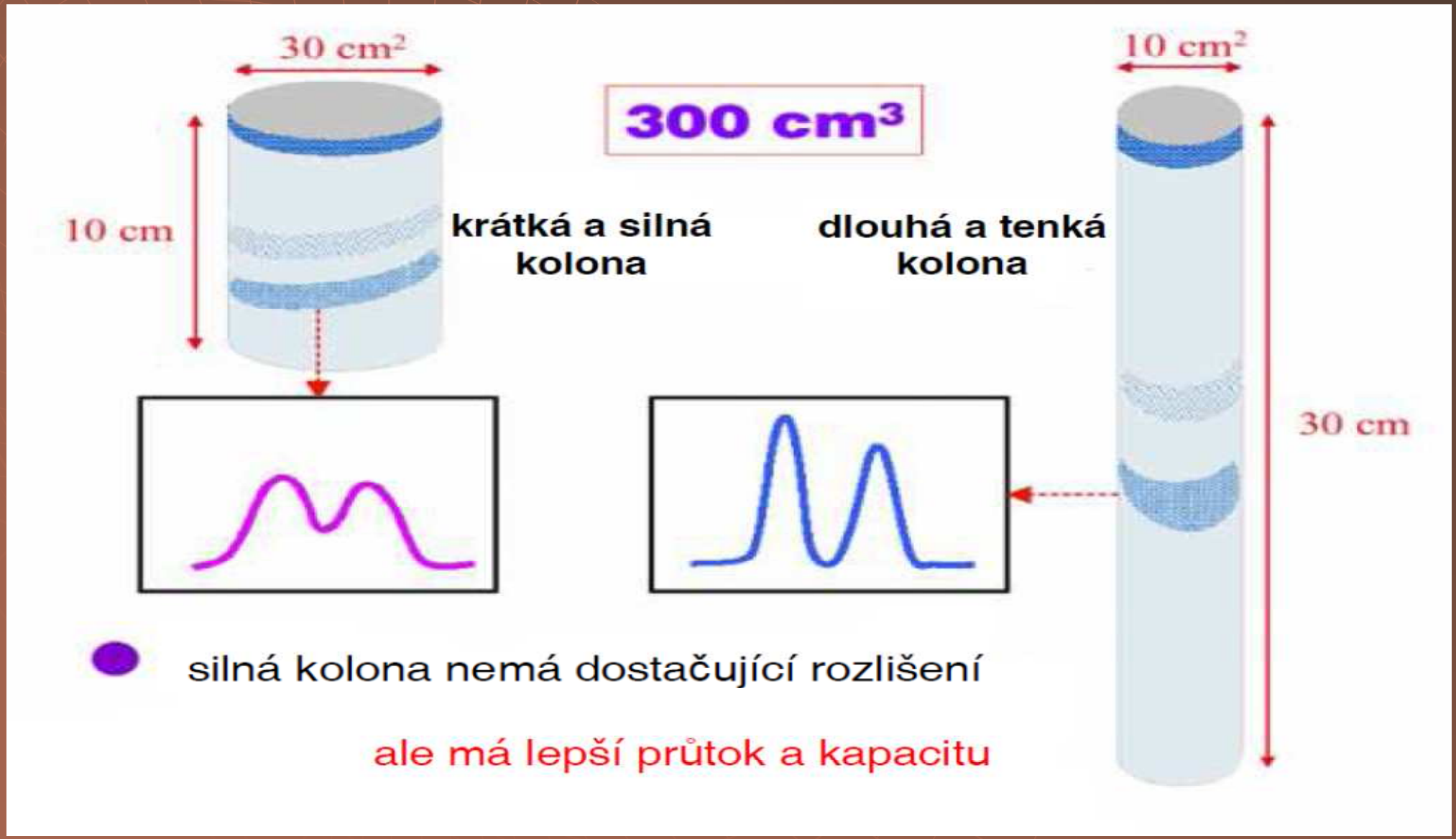
| Gel | Particle Size Range, Hydrated Beads (μM) | Typical Hydrated Bed Volume, ml/g of Dry Gel | Typical Flow Rates (cm/hr)* | Typical Fractionation Range/Nominal Exclusion Limit (Daltons)**, † |
|---|---|---|---|---|
| Bio-Gel P-2 Gel, Fine | 45-90 | 3 | 5.0-10 | 100-1,800 |
| Bio-Gel P-2 Gel, Extra Fine | < 45 | | <10 | 100-1,800 |
| Bio-Gel P-4 Gel, Medium | 90-180 | 4 | 15-20 | 800-4,000 |
| Bio-Gel P-4 Gel, Fine | 45-90 | | 10.0-15 | 800-4,000 |
| Bio-Gel P-4 Gel, Extra Fine | < 45 | | <10 | 800-4,000 |
| Bio-Gel P-6 Gel, Medium | 90-180 | 6.5 | 15-20 | 1,000-6,000 |
| Bio-Gel P-6 Gel, Fine | 45-90 | | 10.0-15 | 1,000-6,000 |
| Bio-Gel P-6 Gel, Extra Fine | < 45 | | <10 | 1,000-6,000 |
| Bio-Gel P-6DG Gel | 90-180 | 6.5 | 15-20 | 1,000-6,000 |
| Bio-Gel P-10 Gel, Medium | 90-180 | 7.5 | 15-20 | 1,500-20,000 |
| Bio-Gel P-10 Gel, Fine | 45-90 | | 10.0-15 | 1,500-20,000 |
| Bio-Gel P-30 Gel, Medium | 90-180 | 9 | 7.0-13 | 2,500-40,000 |
| Bio-Gel P-30 Gel, Fine | 45-90 | | 6.0-11 | 2,500-40,000 |
| Bio-Gel P-60 Gel, Medium | 90-180 | 11 | 4.0-6 | 3,000-60,000 |
| Bio-Gel P-60 Gel, Fine | 45-90 | | 3.0-5 | 3,000-60,000 |
| Bio-Gel P-100 Gel, Medium | 90-180 | 12 | 4.0-6 | 5,000-100,000 |
| Bio-Gel P-100 Gel, Fine | 45-90 | | 3.0-5 | 5,000-100,000 |

# Gelová permeační chromatografie

- Nanášení vzorku – objem vzorku < 2% objemu kolony
- Eluce – izokratická

Použití : stanovení Mr, odsolování, purifikace

# Gelová permeační chromatografie



# Gelová permeační chromatografie

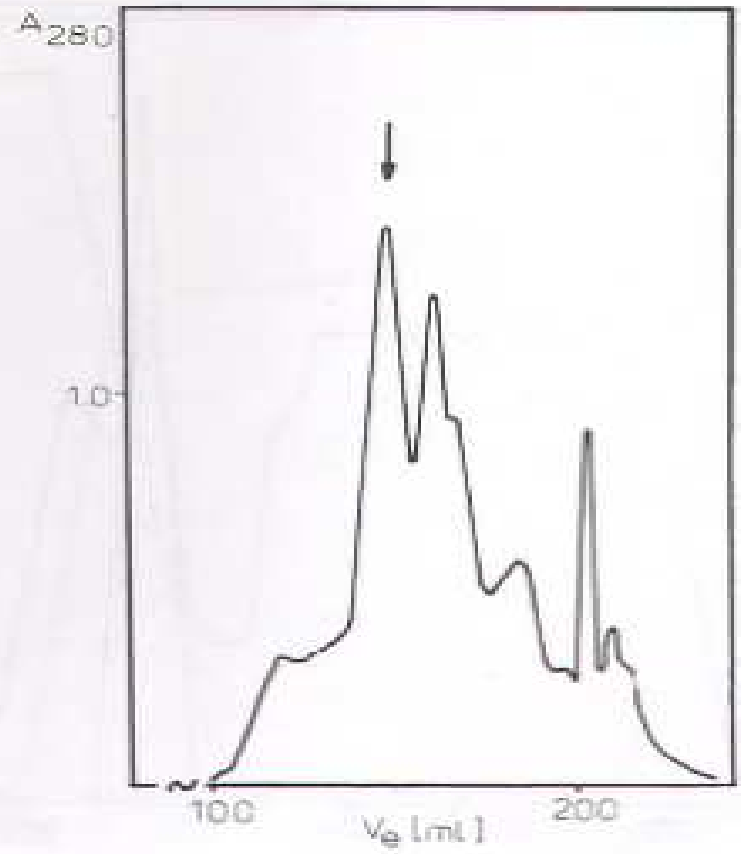



Figure 3

Chromatography of partially purified DAO on TSK 3000 SWG column. Buffer: 0.05 M potassium phosphate (pH 6.5) with 0.15 M sodium chloride; flow rate 5 ml/min. The symbols are as in Fig. 1. DAO activity is indicated by an arrow. Approximately 100 mg of protein were applied to the column.

# Gelová permeační chromatografie

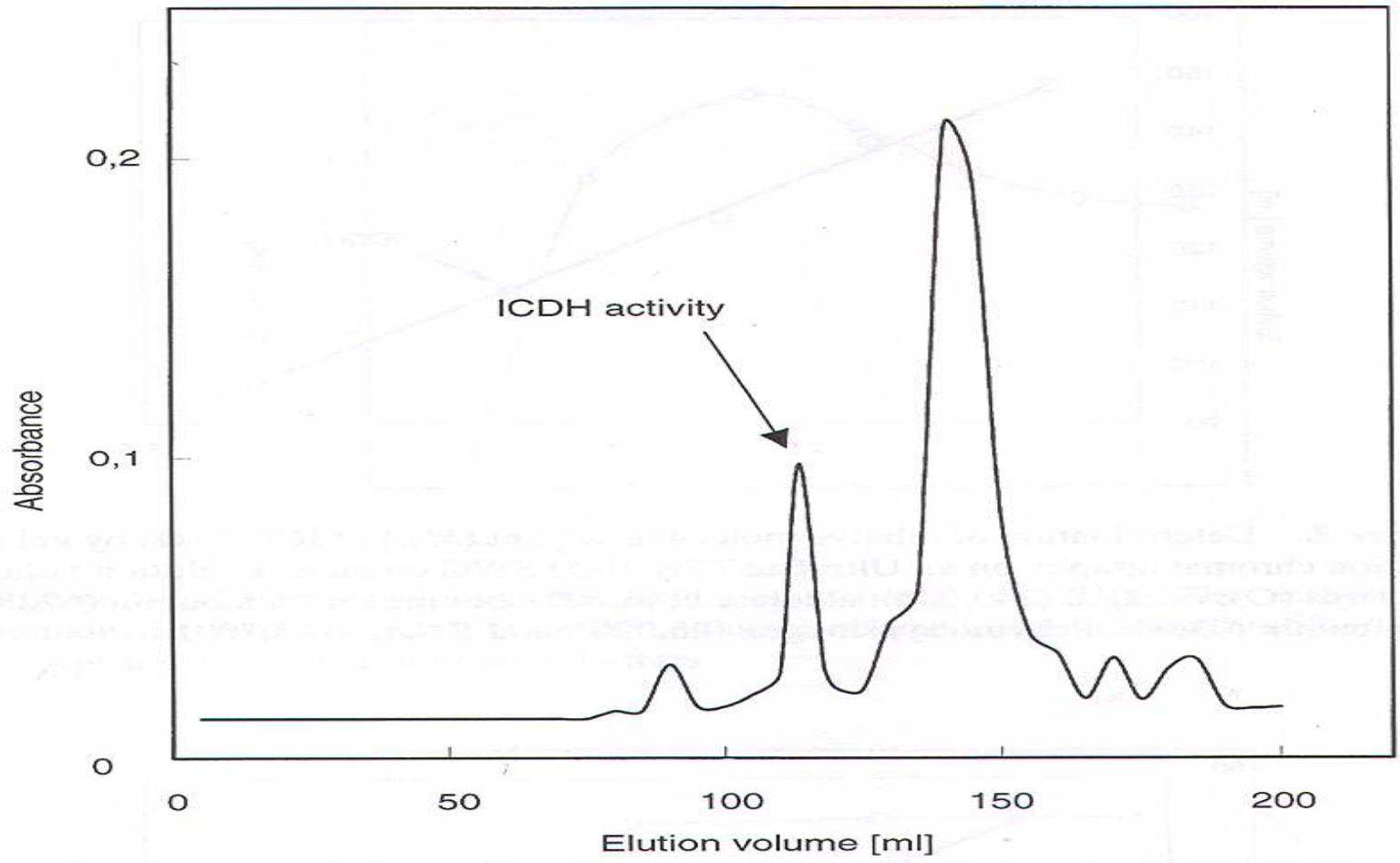



***Figure 2.*** Chromatography of partially purified ICDH (after ammonium sulphate fractionation and ion exchange chromatography) on an UltroPac TSK G3000 SWG column. Buffer—20 mM sodium phosphate, pH 6.8; flow-rate 5 mL/min. ($V_e$) elution volume; (———) $A_{280}$; (⟶) ICDH activity. Approximately 10 mg of protein was loaded onto the column.

# Gelová permeační chromatografie

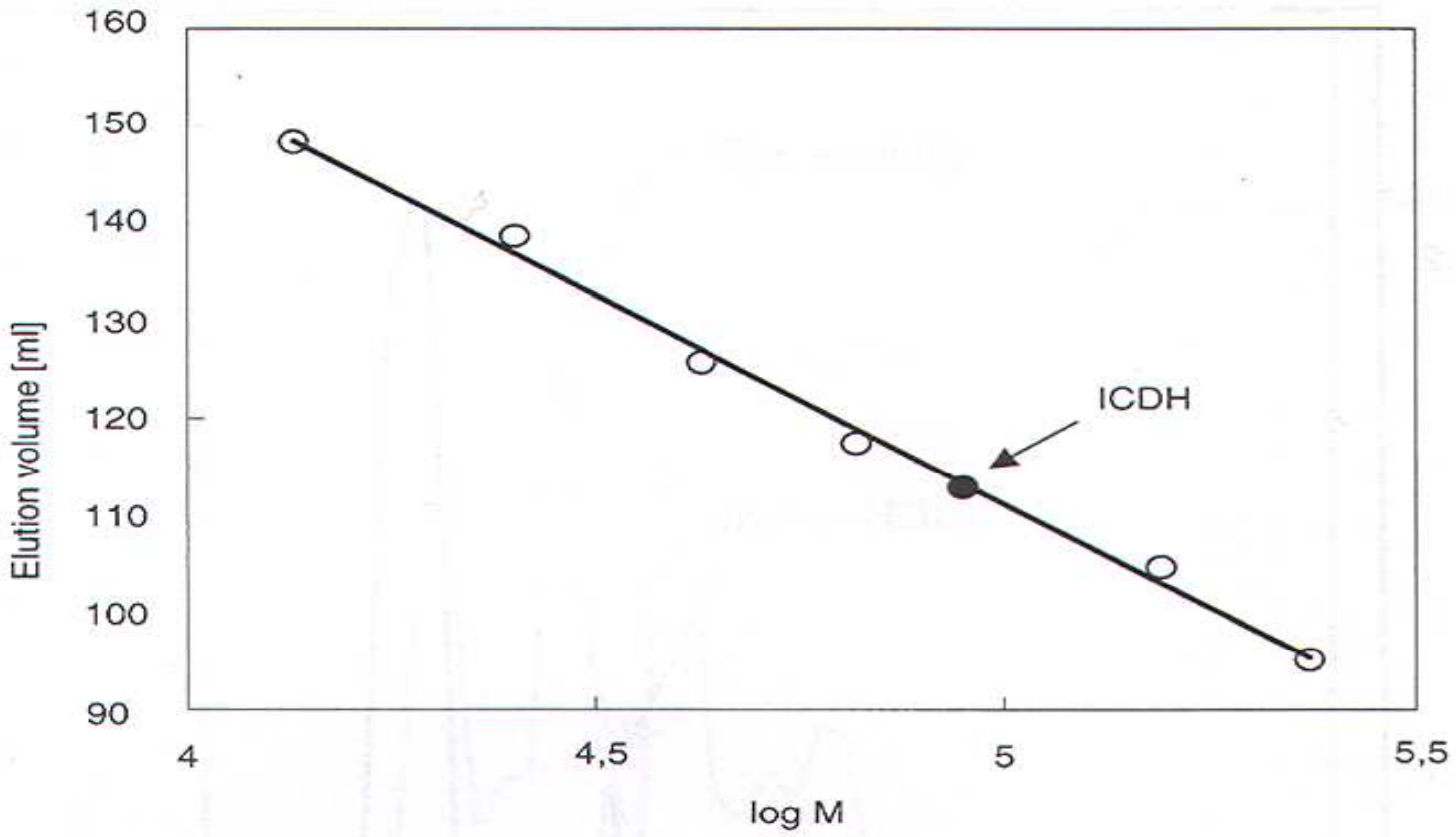
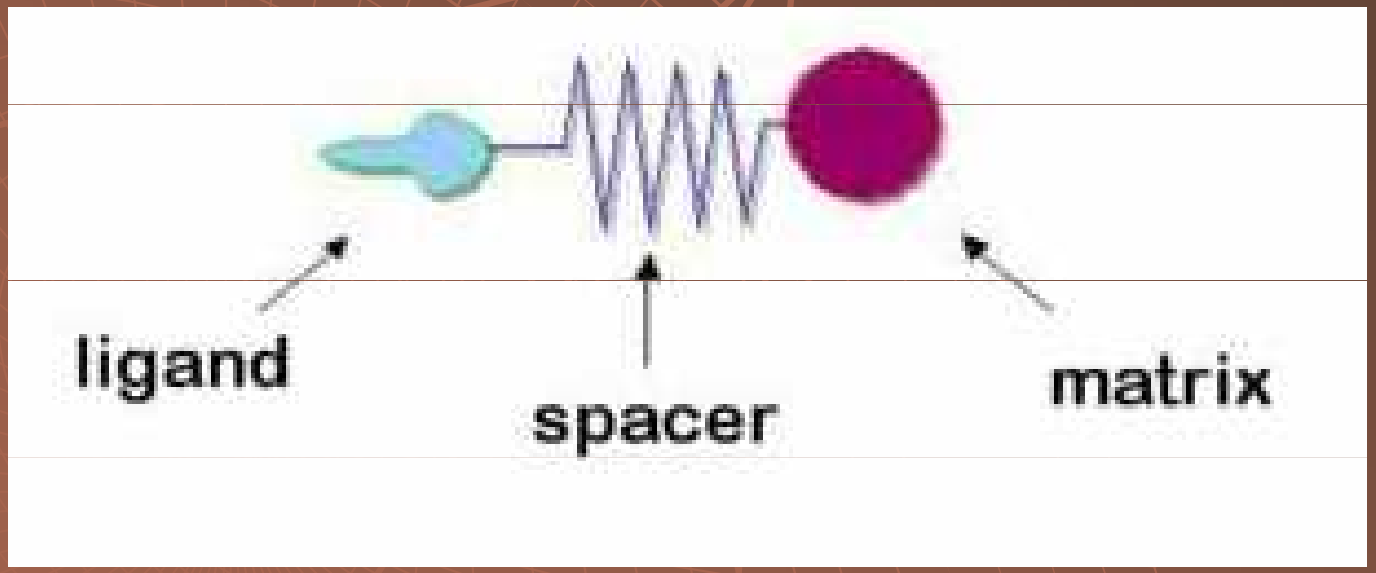
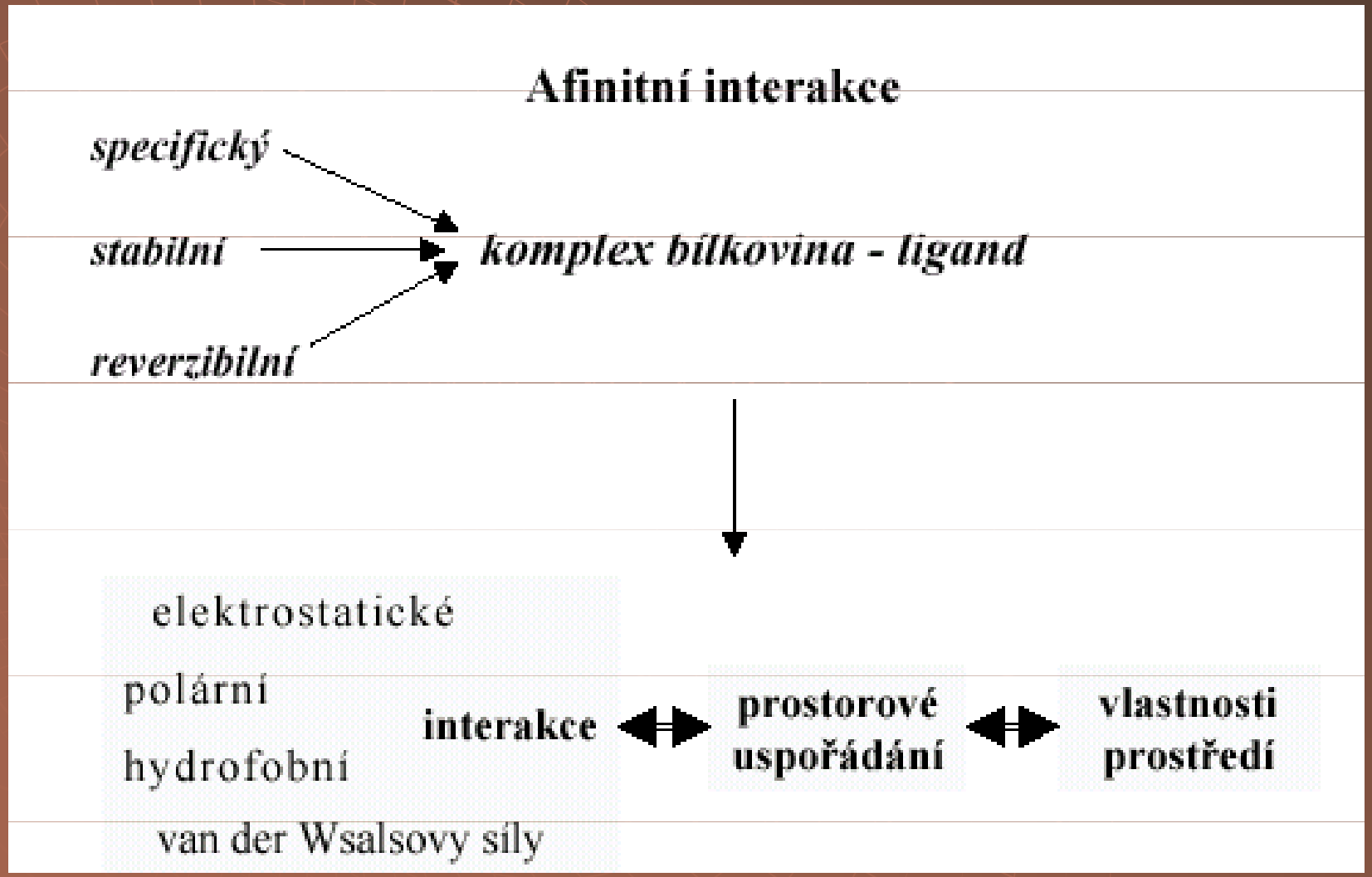



***Figure 3.*** Determination of relative molecular weight ($M_W$) of ICDH (●) by gel permeation chromatography on an UltroPac TSK 3000 SWG column. $V_e$ elution volume; standards (○): catalase (240,000), aldolase (146,000), bovine serum albumin (67,000), ovoalbumin (43,000), chymotrypsinogen (25,000), and RNAse (13,700).

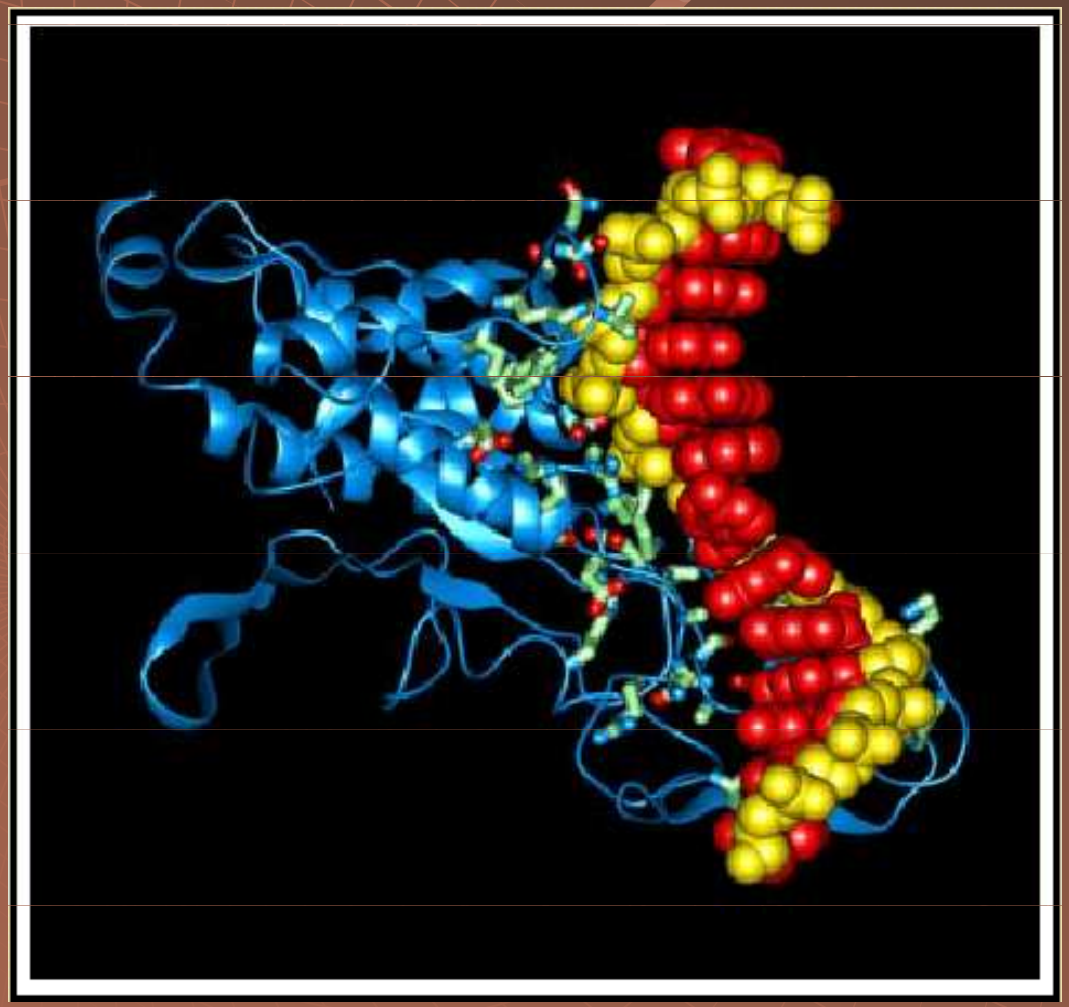
# Afinitní chromatografie



# Afinitní interakce



# Interakce mezi DNA a endonukleasou

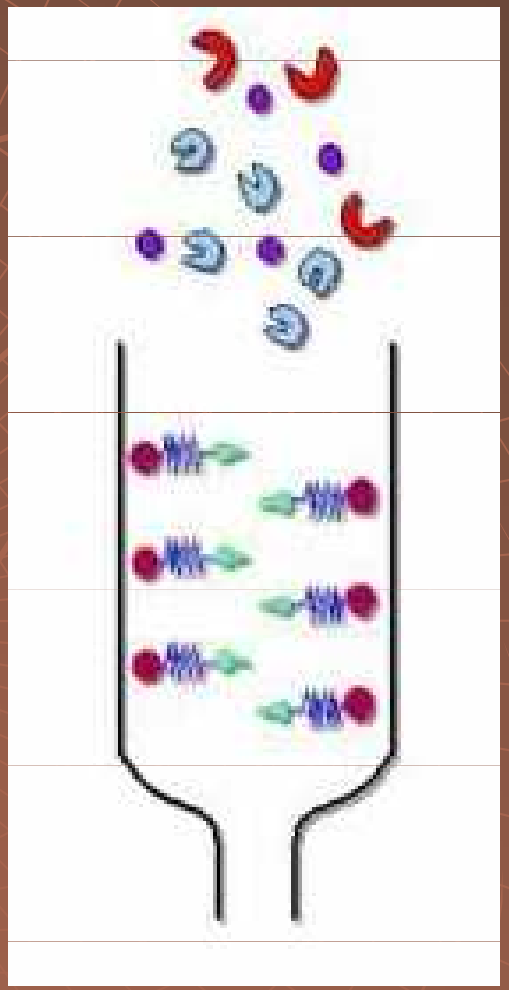


# Afinitní páry

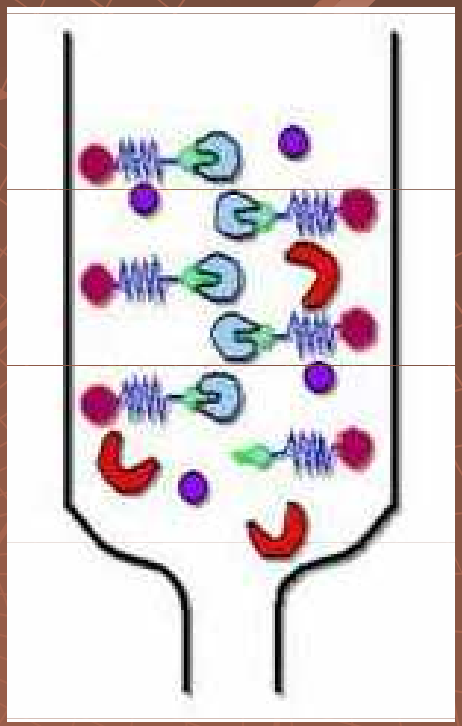
| Ligand | Bílkovina | $K_D$ (M) |
|---|---|---|
| antigen | polyklonální protilátka | $10^{-8} – 10^{-6}$ |
| antigen | monoklonální protilátka | $10^{-12} – 10^{-8}$ |
| biotin | avidin | $10^{-15}$ |
| sacharid | lektin | $10^{-6} – 10^{-3}$ |
| hormon, toxin | vazebný protein | $10^{-9} – 10^{-12}$ |
| substrát | enzym | $10^{-7} – 10^{-3}$ |
| inhibitor | enzym | $10^{-14} – 10^{-6}$ |

**$K_D = 10^{-8} – 10^{-6}$ M**

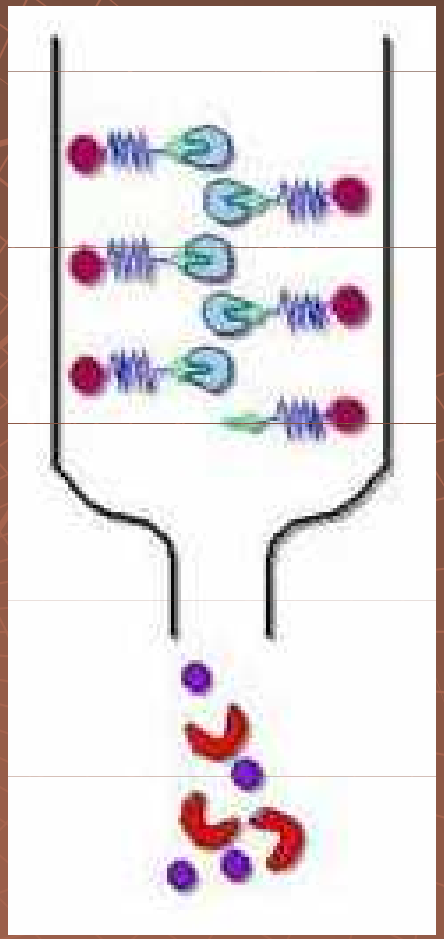
# Afinitní chromatografie nanesení vzorku



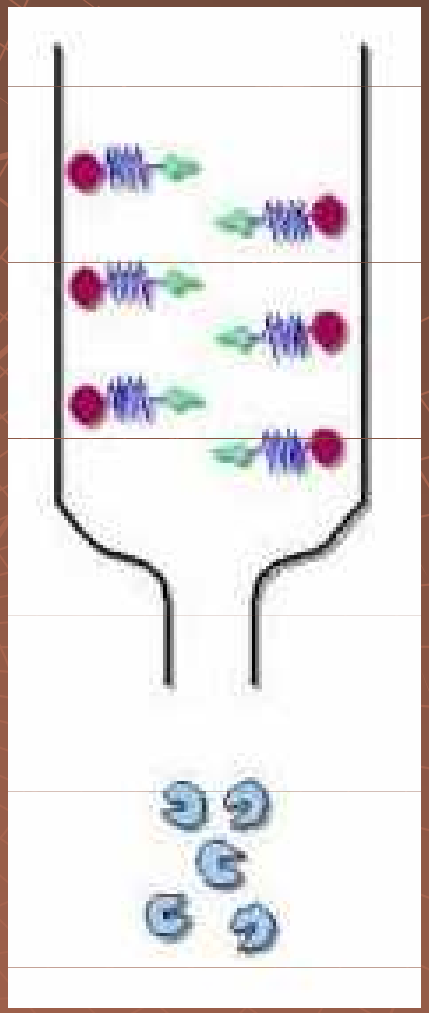
# Afinitní chromatografie vznik interakce



# Afinitní chromatografie vymytí balastů

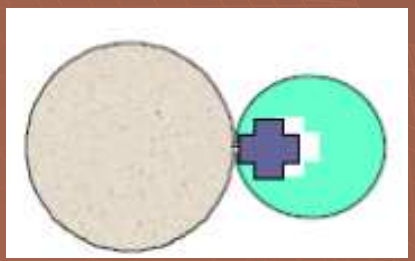


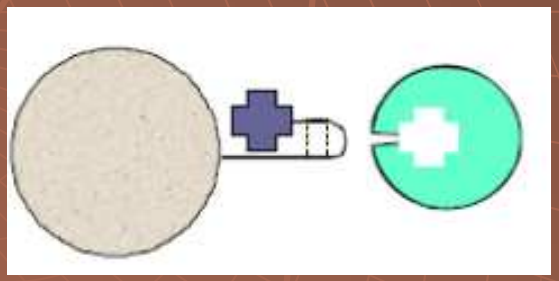
# Afinitní chromatografie eluce

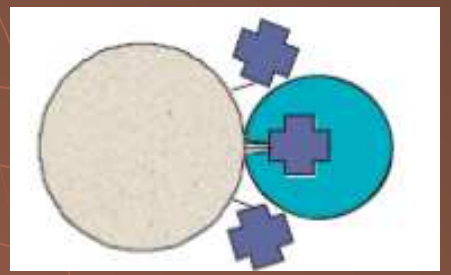


# Předpoklady pro vznik komplexu

- Sterické – použití raménka (spacer)

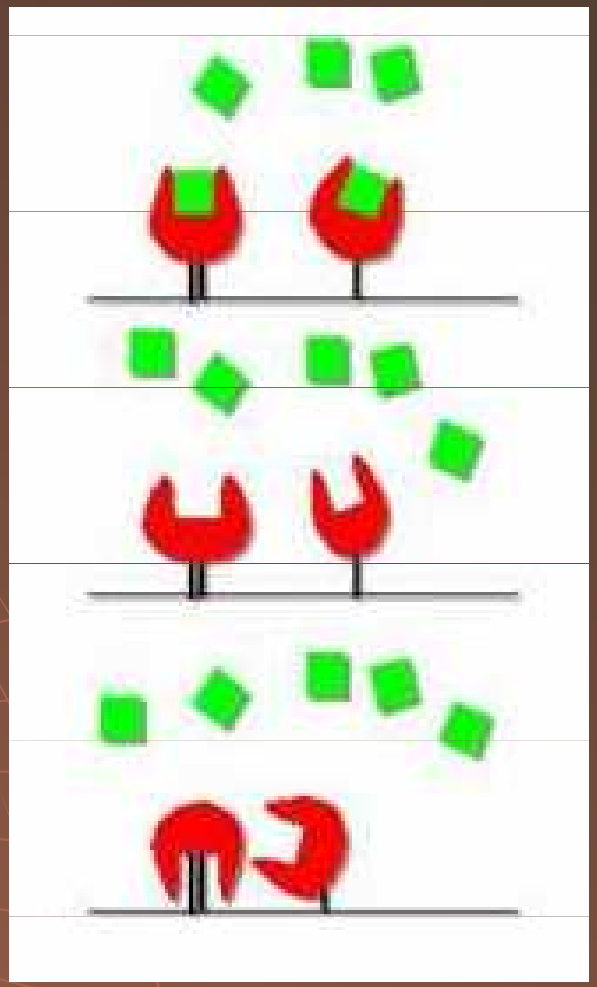






# Předpoklady pro vznik komplexu

- Konformační
- Vazebné
- Optimální pH, iontová síla



# Stacionární fáze

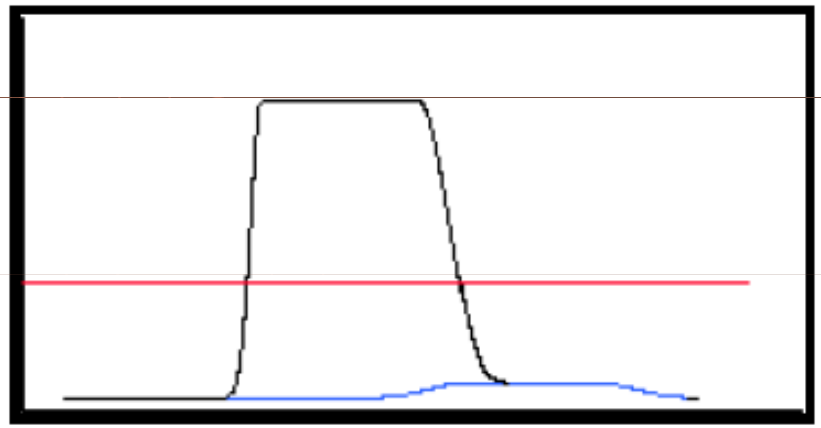
- velké póry umožňující průnik velkých molekul
- co nejnižší nespecifické adsorpce

- nejčastěji agarosa (Sepharosa)
- ligand kovalentně navázaný přes –OH skupinu cukerné jednotky nosiče

# Provedení

- Nanesení vzorku – nízká iontová síla

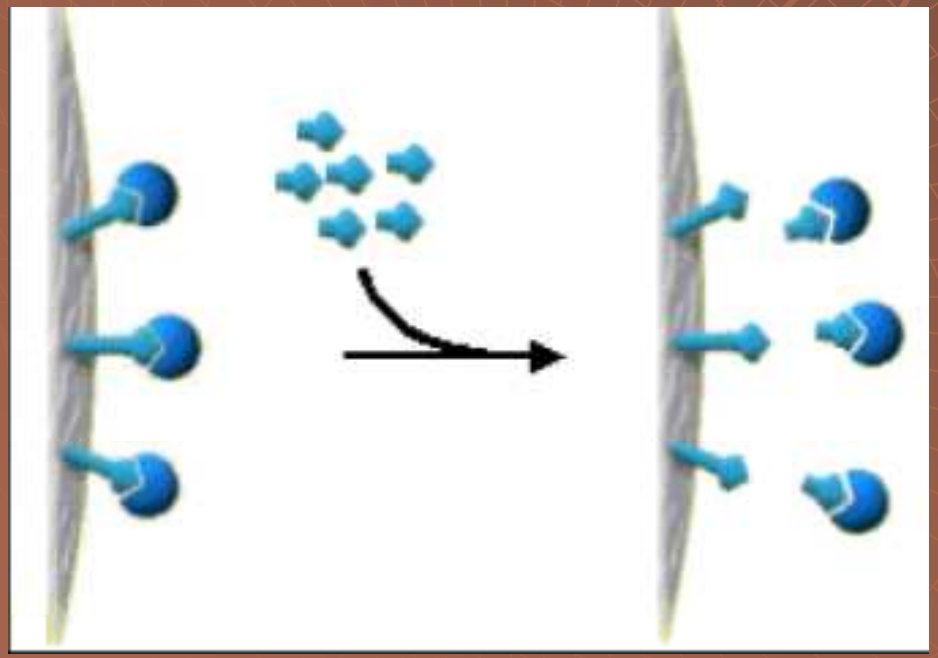
$K_D > 10^{-4}$ ~ slabá interakce

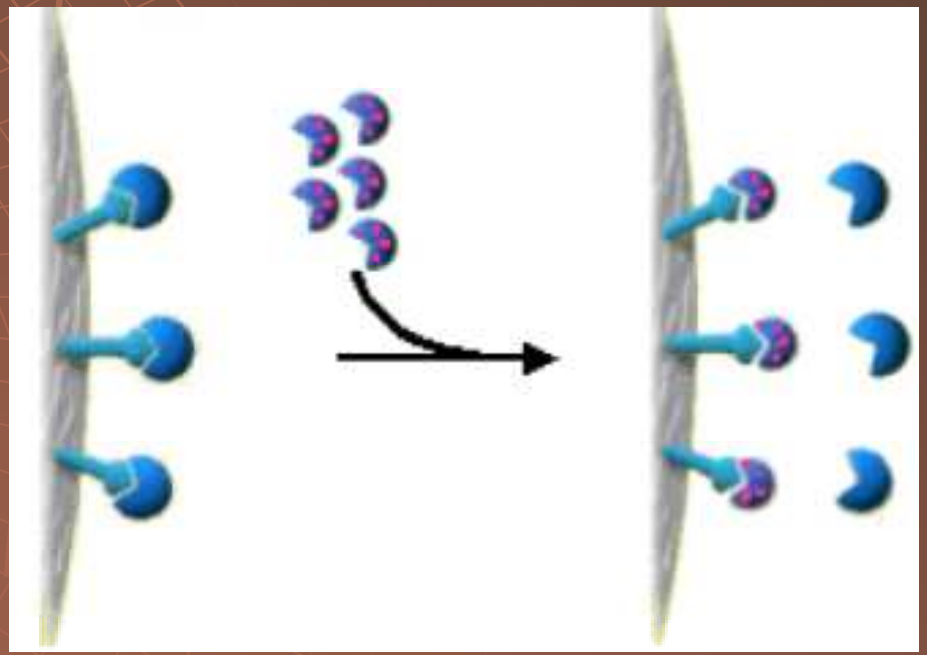


$K_D < 10^{-6}$ ~ silná interakce ➡ obtížná eluce

# Eluce

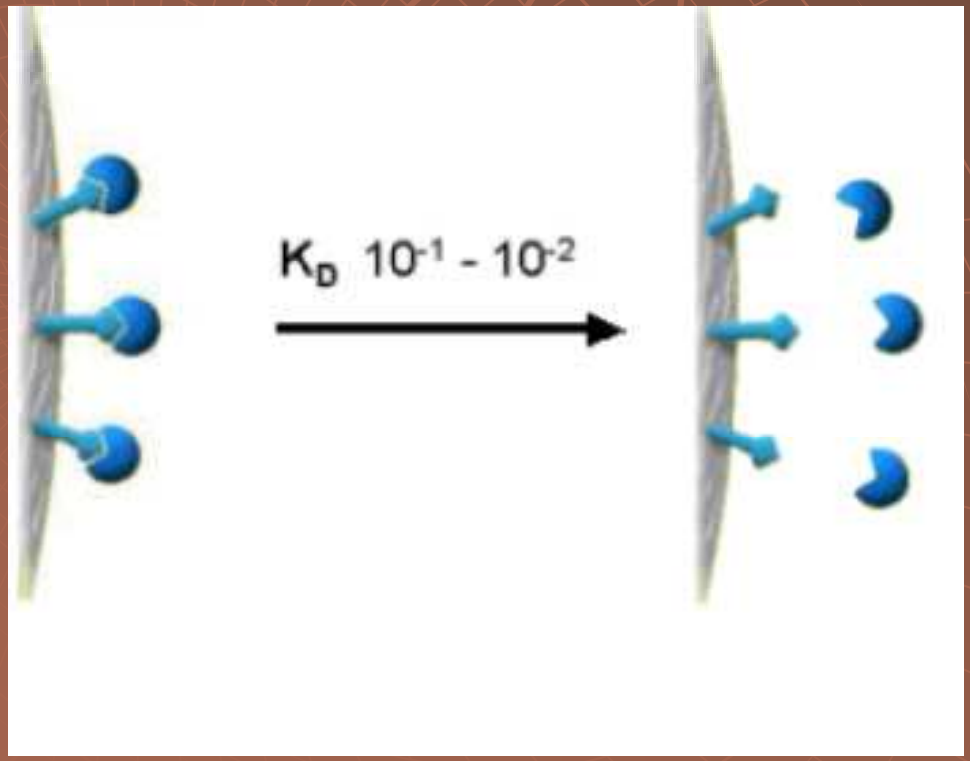
- Eluce – selektivní - volným ligandem nebo kompetičním činidlem





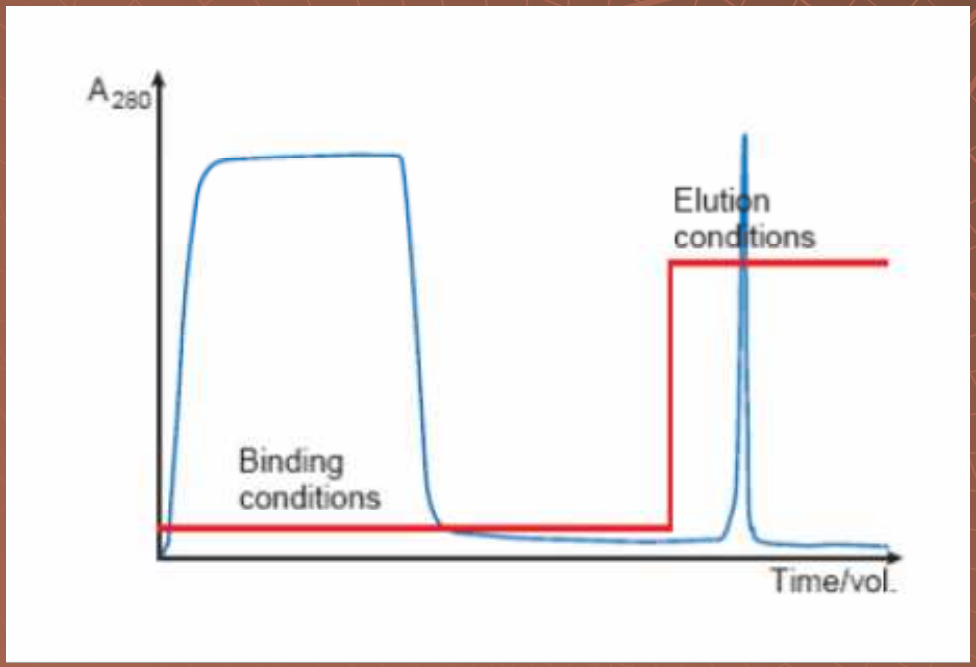
# Eluce

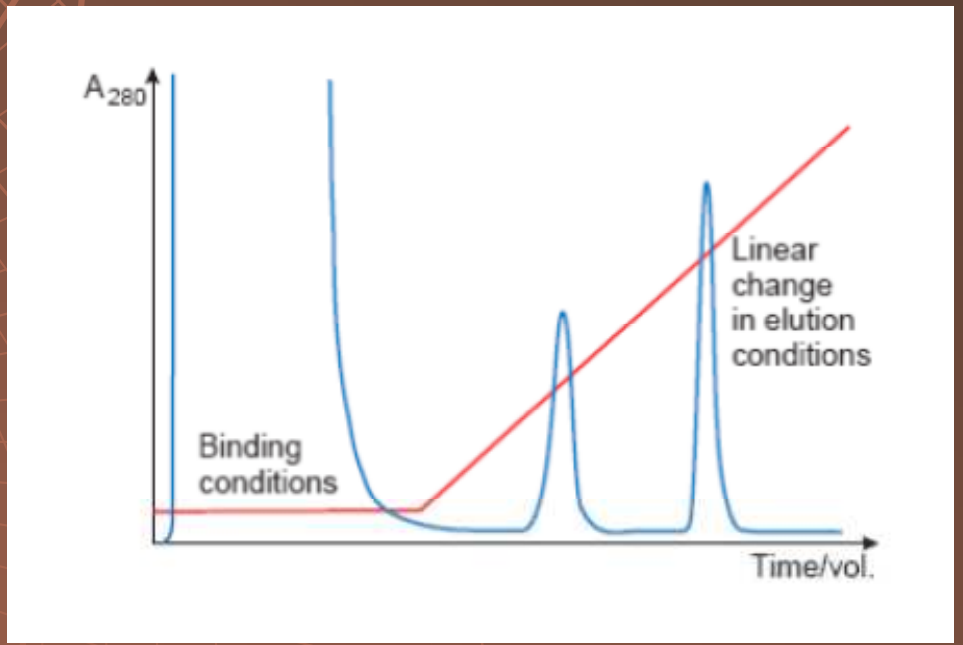
- Eluce – neselektivní - změna pH, iontové síly, polarity



# Eluce

- Eluce – pulsní x gradientová



# Ligandy

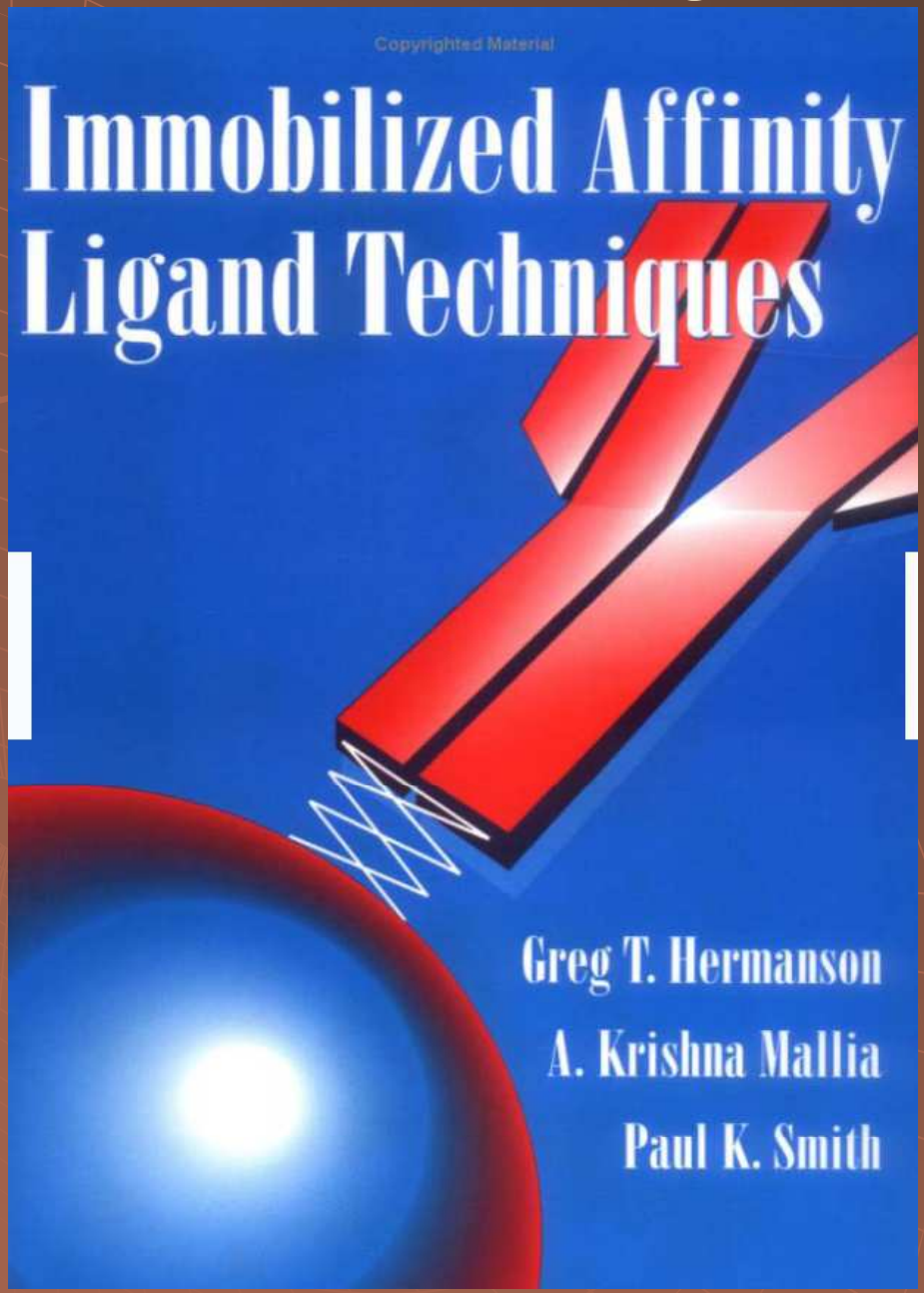
**Monospecifické**

- váží pouze jedinou biomakromolekulu
- nutné si připravovat individuálně

**Skupinově specifické**

- váží biomakromolekuly s podobnými vlastnostmi
- komerčně dostupné

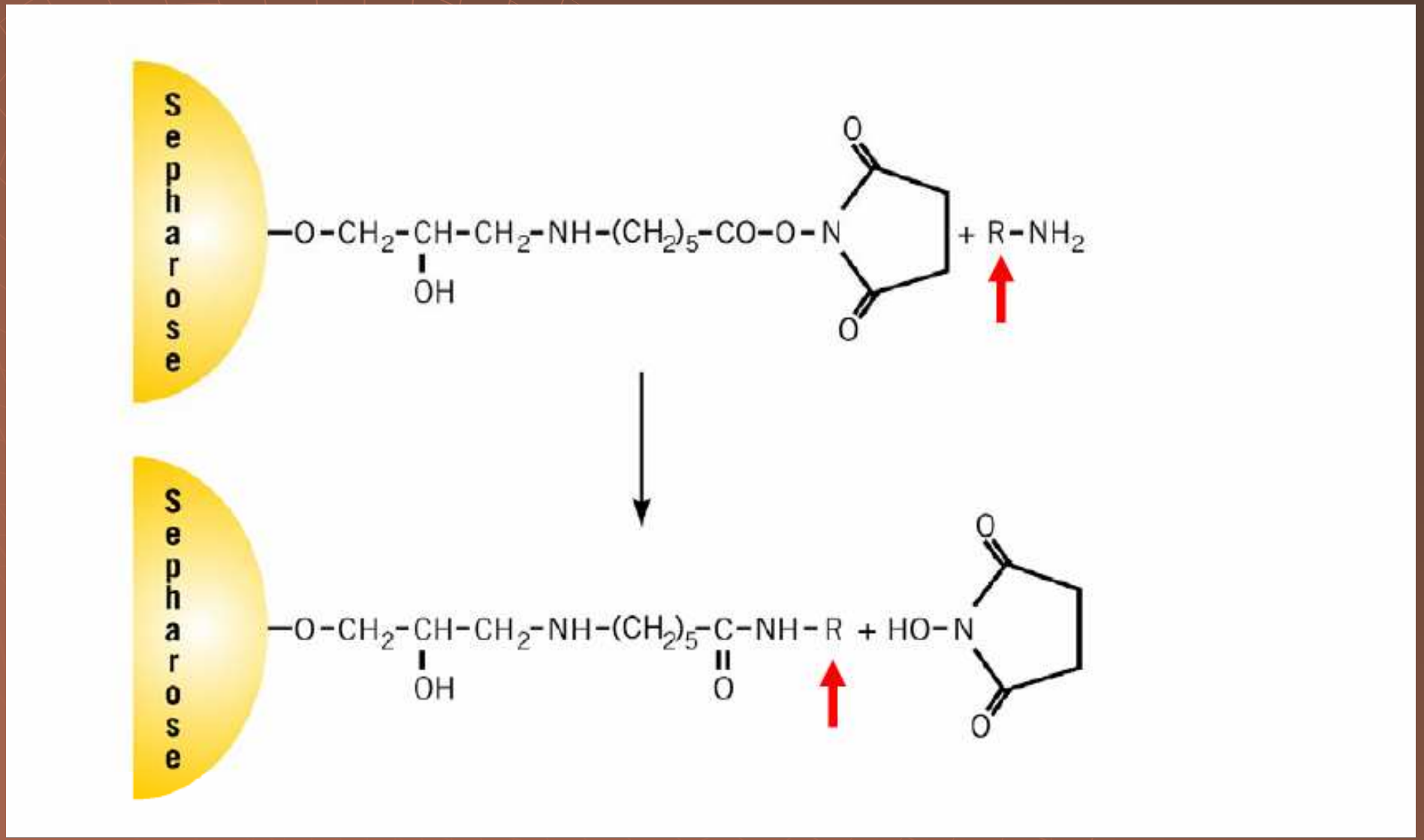
# Imobilizace ligandů



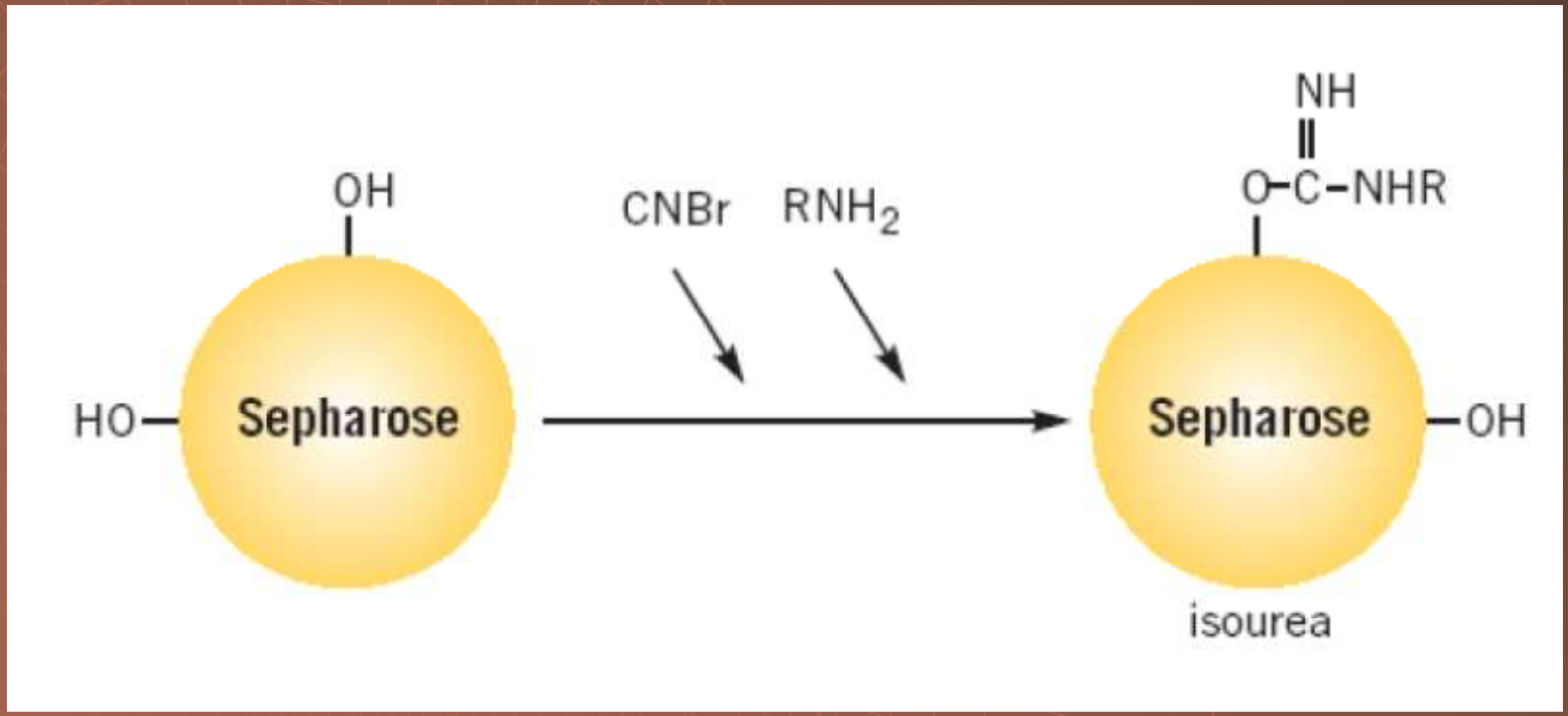
# Imobilizace ligandů

| | |
|---|---|
| N-hydroxysukcinimid (NHS) | $-NH_2$ |
| CNBr | $-NH_2$ |
| Karbodiimid | $-NH_2$, -COOH |
| Epoxid | -SH, $-NH_2$, -OH |

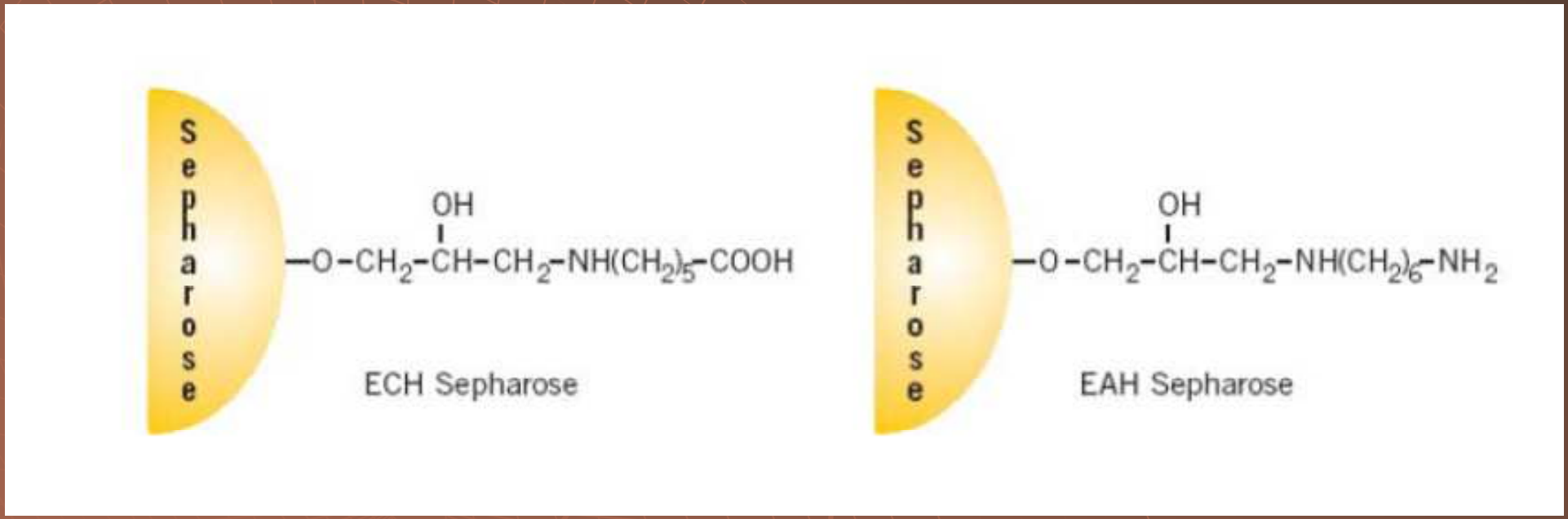
# N-hydroxysukcinimid (NHS-Sepharosa)



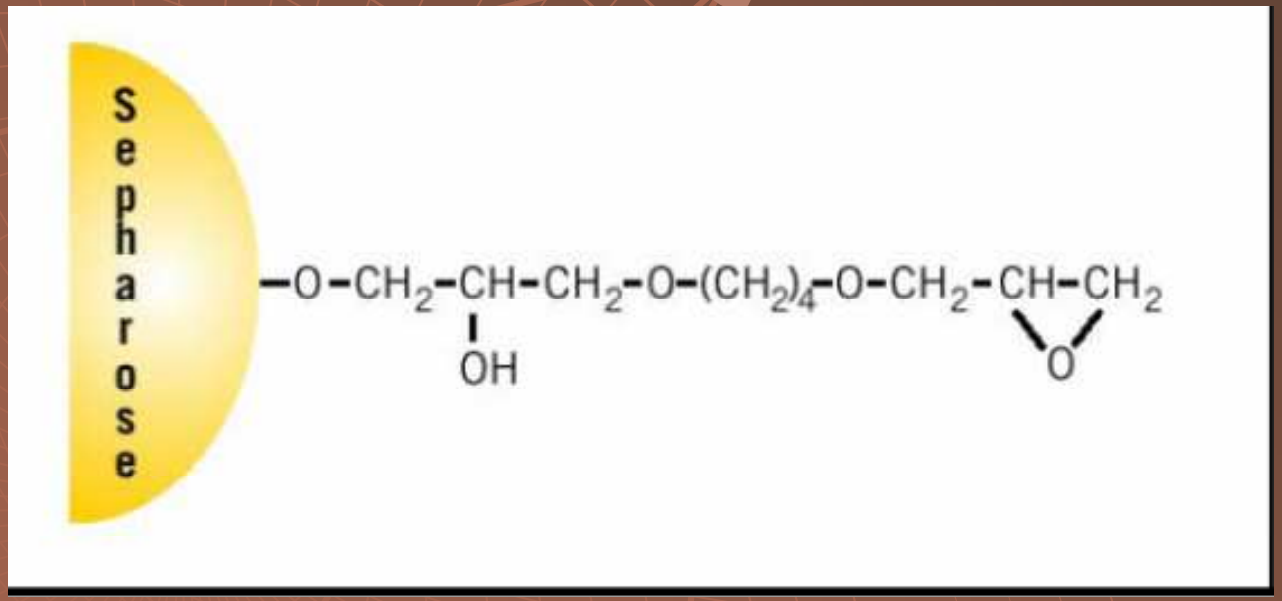
# CNBr (CNBr aktivovaná Sepharosa)



# N, N'-disubstituovaný karbodiimid



# Epoxid (Epoxy-aktivovaná Sepharosa 6B)

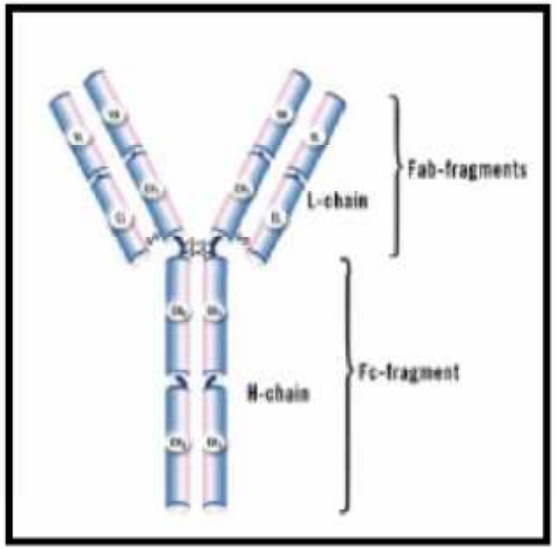


# Skupinově specifické ligandy

| skupinově specifický ligand | specifita |
|---|---|
| Protein A | Fc region IgG |
| Protein G | Fc region IgG |
| Lektiny | glukopyranosylové a mannopyranosylové skupiny |
| Cibacron Blue | široká skupina enzymů, $NAD^+$ dependentní enzymy, sérový albumin |
| Procion Red | $NADP^+$ |
| Lysin | plasminogen, rRNA |
| Arginin | serinové proteasy |
| Benzamidin | serinové proteasy |
| Kalmodulin | proteiny regulované kalmodulinem |
| Heparin | kolagulační faktory, lipoproteiny, lipasy, hormony, steroidní receptory, nukleové kyseliny vázající enzymy |
| Streptavidin | Biotin a biotinylované látky |
| Oligo (dT, dA, ...) | mRNA, nukleasy |
| Kovové ionty | proteiny a peptidy obsahující dostupný His |

# Skupinově specifické ligandy Protein A a Protein G

protein A – *Staphylococcus aureus*
protein G – *Streptococcus*
purifikace:
monoklonální protilátky IgG
polyklonální protilátky IgG
imunokomplexy




| Species | Subclass | Protein A binding | Protein G binding |
|---|---|---|---|
| Human | IgA | variable | - |
| | IgD | - | - |
| | IgE | | |
| | $IgG_1$ | ++++ | ++++ |
| | $IgG_2$ | ++++ | ++++ |
| | $IgG_3$ | - | ++++ |
| | $IgG_4$ | ++++ | ++++ |
| | $IgM^A$ | variable | - |
| Chicken | IgY | - | - |
| Avian egg yolk | $IgY^B$ | - | - |
| Cow | | ++ | ++++ |
| Dog | | ++ | + |
| Goat | | - | ++ |
| Guinea pig | $IgG_1$ | ++++ | ++ |
| | $IgG_2$ | ++++ | ++ |
| Hamster | | + | ++ |
| Horse | | ++ | ++++ |
| Koala | | - | + |
| Llama | | - | + |
| Monkey (rhesus) | | ++++ | ++++ |
| Mouse | $IgG_1$ | + | ++++ |
| | $IgG_{2a}$ | ++++ | ++++ |
| | $IgG_{2b}$ | +++ | +++ |
| | $IgG_3$ | ++ | +++ |
| | $IgM^A$ | variable | - |
| Pig | | +++ | +++ |
| Rabbit | no distinction | ++++ | +++ |
| Rat | $IgG_1$ | - | + |
| | $IgG_{2a}$ | - | ++++ |
| | $IgG_{2b}$ | - | ++ |
| | $IgG_3$ | + | ++ |
| Sheep | | +/- | ++ |

# Skupinově specifické ligandy Protein A a Protein G

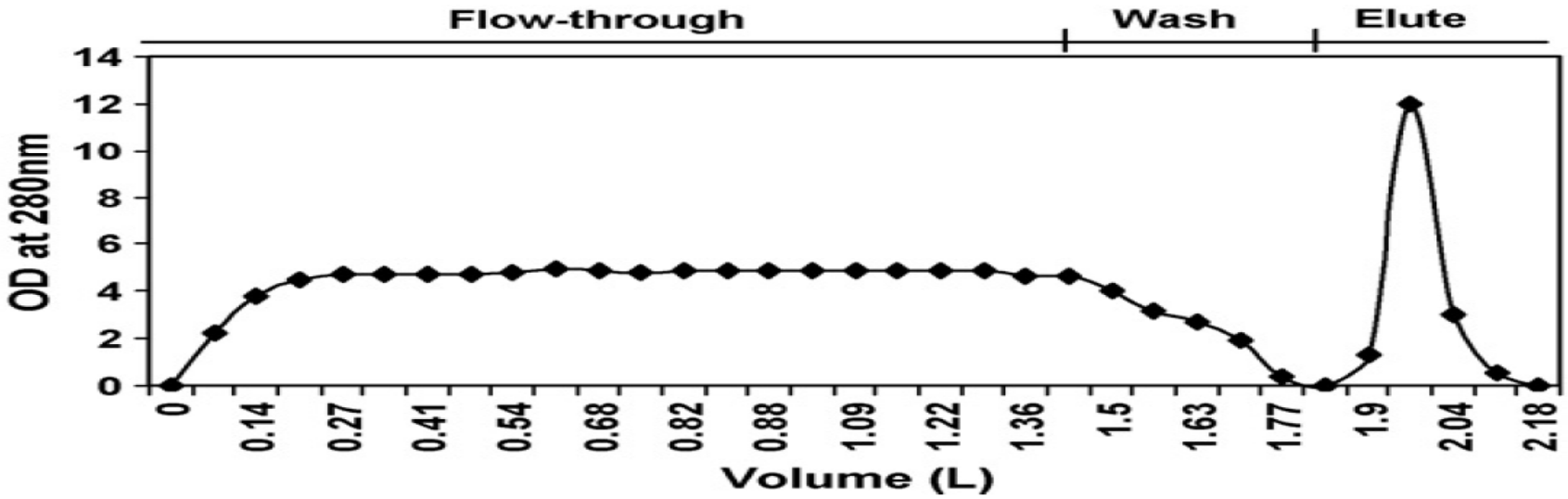



**Fig. 3.** Chromatogram of affinity chromatography using ProSep-vA Ultra. Antibody fragment [$F(ab)_2$] did not bind to ProSep-vA Ultra (fraction 0–1.4 l) and majority of the contaminants [Fc fragment] that bound to the affinity matrix eluted at pH 3.0 (fraction 1.84–2.18 l).

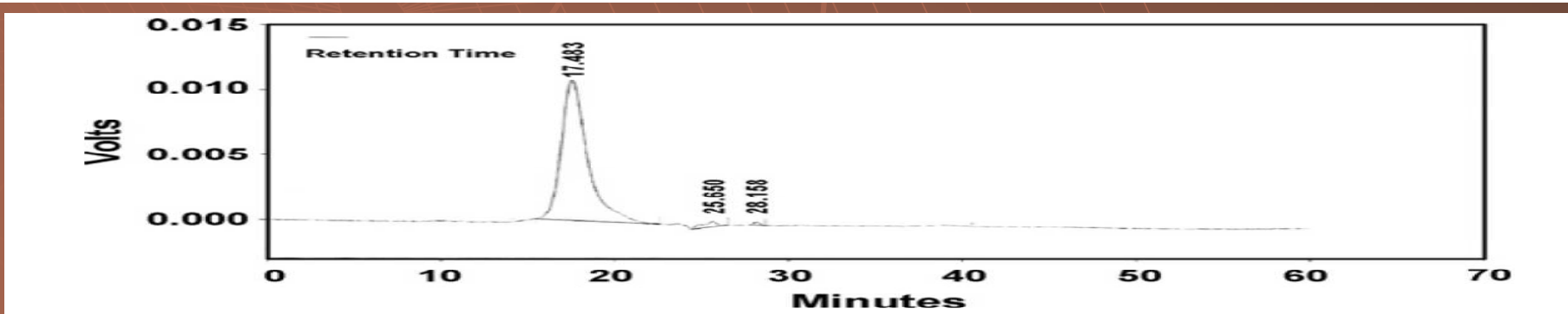
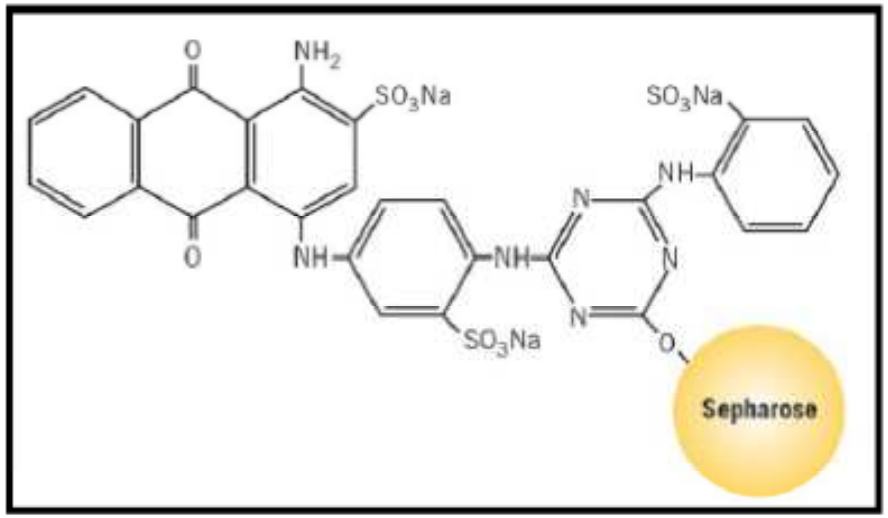


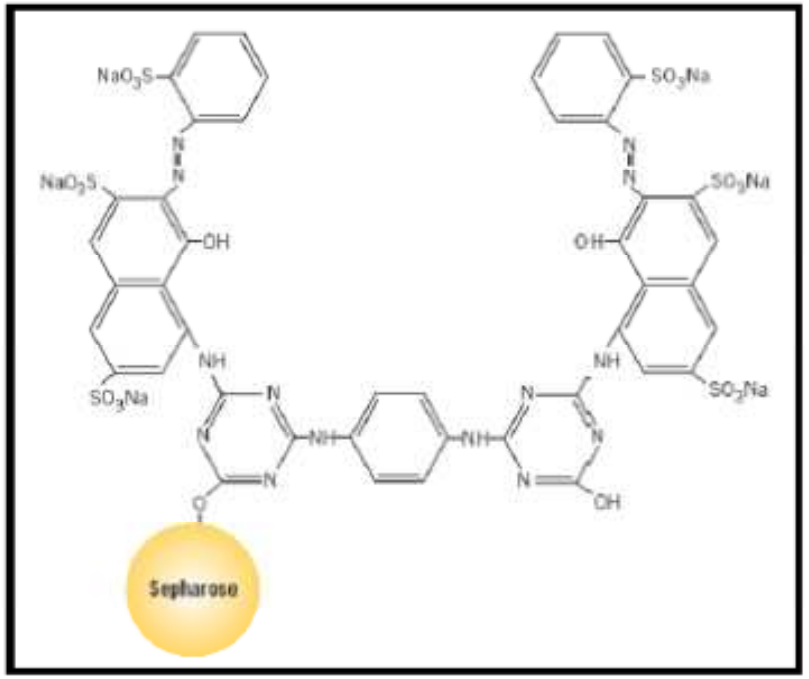

**Fig. 5.** HPLC analysis of purified $F(ab)_2$. Elution profile of $F(ab)_2$ as single homogenous peak represents >99% purity of the product. Column: SEC, TSK Gel-3000 SWXL (TosoHass). Sample: 20 µl of purified $F(ab)_2$; eluent: 20 mM phosphate buffer in 150 mM sodium chloride solution, pH 7.2, Detection at 280 nm; flow-rate: 1 ml $min^{-1}$.

# Skupinově specifické ligandy „dye ligand“

**Cibacron™ Blue F3G-A**
**(Blue Sepharosa)**




**Procion™ Red**
**(Red Sepharosa)**




$NAD^+$ $NADP^+$

Dependentní dehydrogenasy

# Skupinově specifické ligandy Cibacron Blue F4G-A

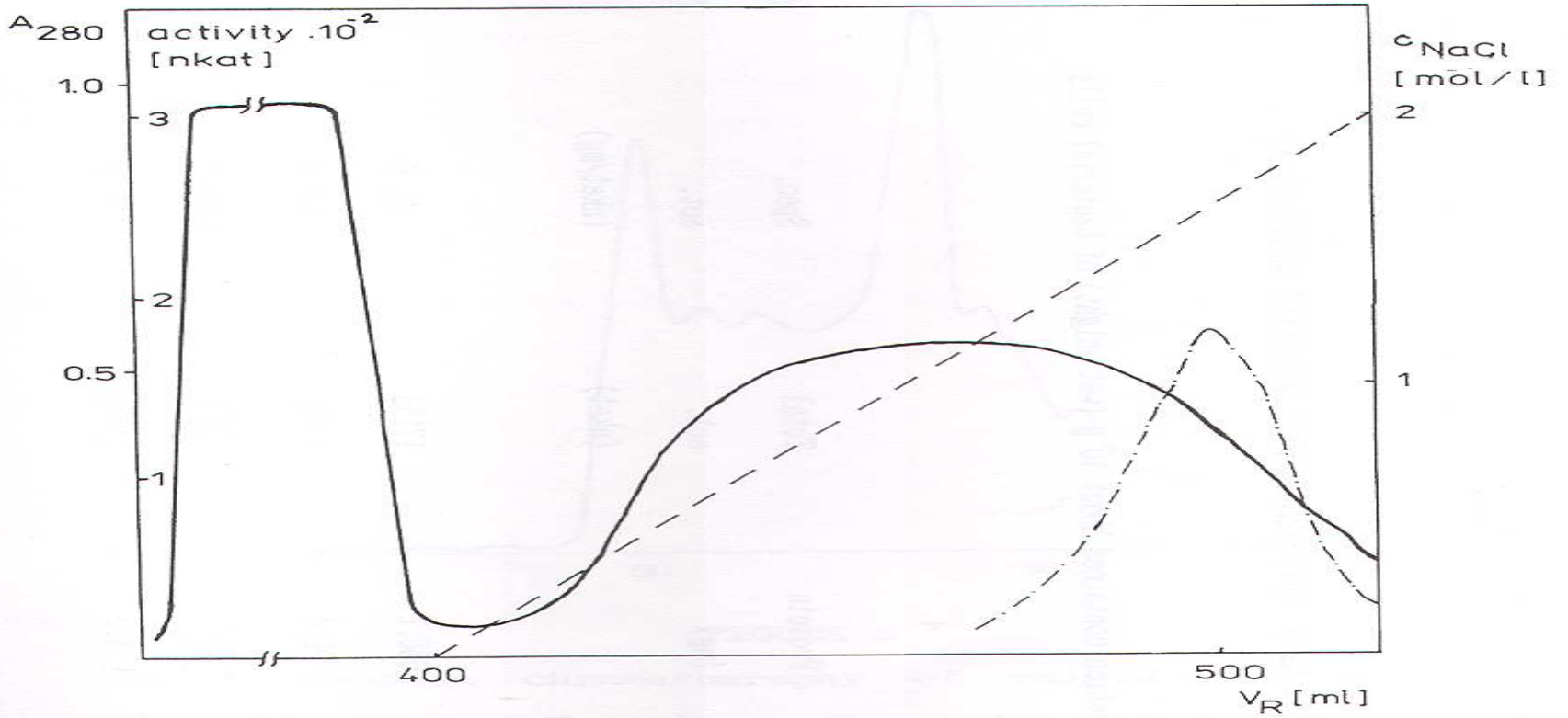
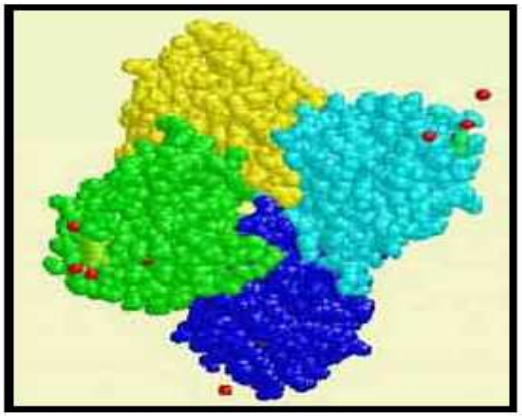



FIGURE 1

Affinity chromatography of malate dehydrogenase from P.denitrificans on Matrex Gel Blue A (step 2). $V_e$, elution volume; ——, absorbance at 280 nm ($A_{280}$); -•-, enzyme activity; -----, NaCl gradient (buffer A, 0.02 mol/l sodium phosphate (pH 8.0); buffer B, the same as buffer A but with 1.8 mol/l NaCl and 5% ethylene glycol); flow rate, approx. 0.7 ml/min.

# Skupinově specifické ligandy lektiny

## Konkavalin A



- lektin z *Canavalia ensiformis* (jack bean)
- tetramerní metalloprotein
- větvené mannosidy, cukry s terminální mannosou nebo glukosou ($\alpha$Man > $\alpha$Glc > GlcNAc)

- purifikace glycoproteinů, polysacharidů a glykolipidů
- detekce změn ve složení látek obsahujících cukry
- isolace povrchových buněčných glykoproteinů

## „Lentil“ lektin

- lektin z *Lens culinaris* (čočka)
- větvené mannosidy obsahující fukosu $\alpha$–1,6 vázanou na N-acetyl-glukosamin ($\alpha$Man > $\alpha$Glc > GlcNAc)
- membranové glykoproteiny, povrchové buněčné antigeny, virální glykoproteiny

# Skupinově specifické ligandy Con A

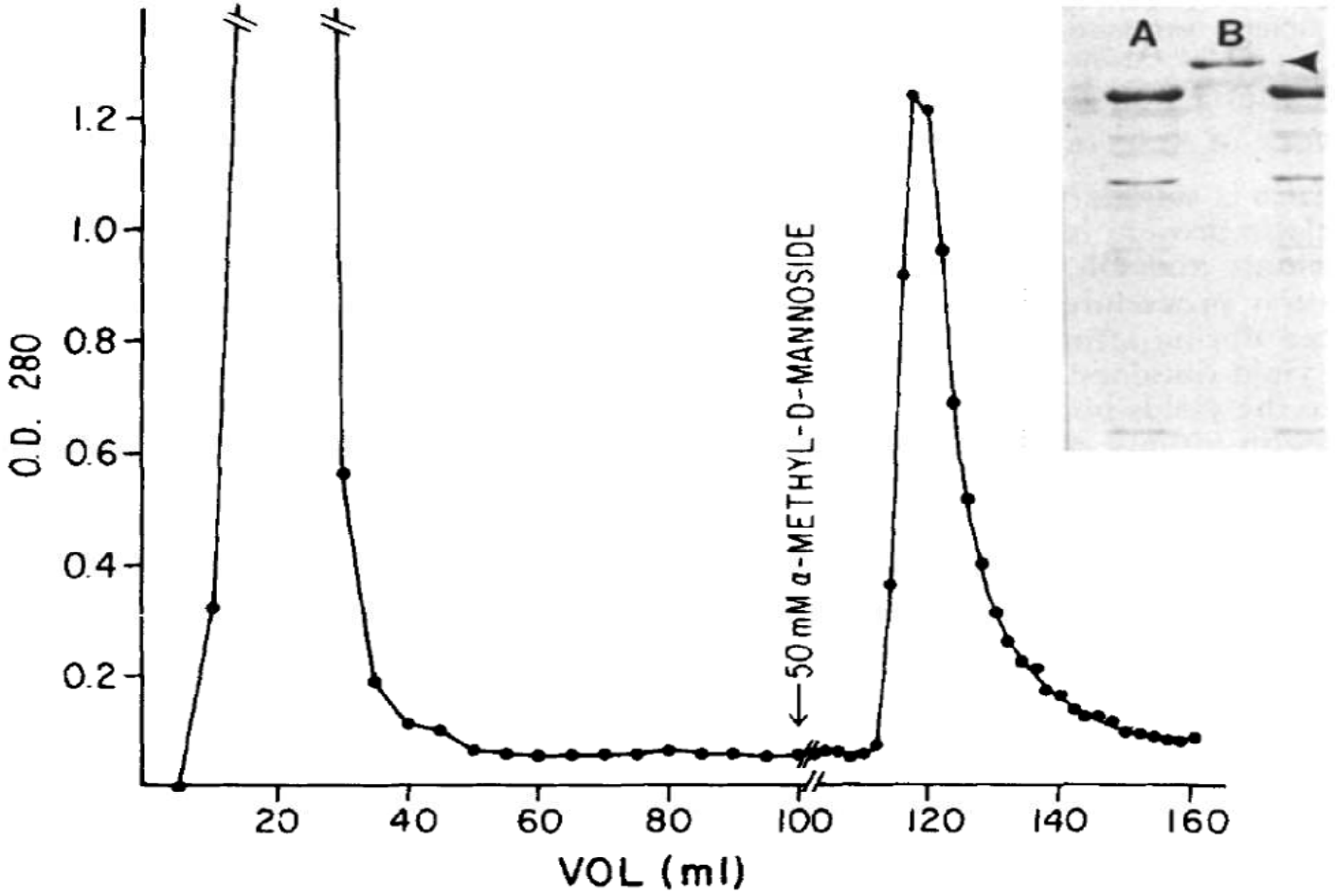



**FIG. 2.** Step-elution profile of sciatic nerve protein from concanavalin A-agarose. Sciatic nerve protein was applied to a 0.9 × 20 cm column of concanavalin A-agarose and eluted with Con A buffer at a flow rate of 10 ml/h. When the $A_{280}$ of the effluent fell below 0.05, bound glycoproteins were desorbed with 50 mM-α-methylmannoside in Con A buffer. (*Inset*) Lane A: SDS electrophoretic profile of proteins eluted in the wash peak (21 μg protein); lane B: SDS electrophoretic profile of glycoproteins eluted by 50 mM-α-methylmannoside (12 μg protein). Arrowhead marks position of the sciatin band. Note the absence of this band in the wash peak (lane A).

# Skupinově specifické ligandy Con A

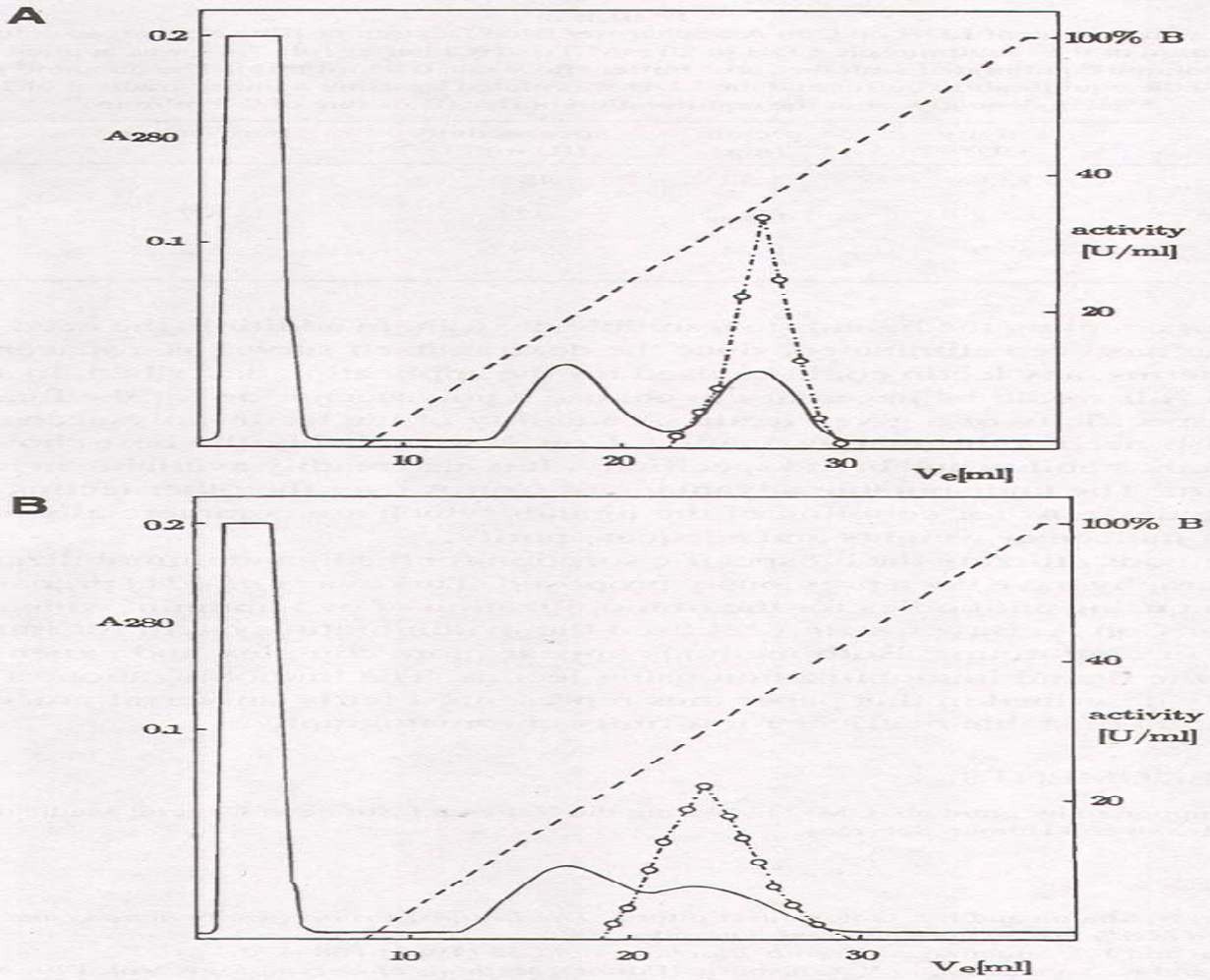
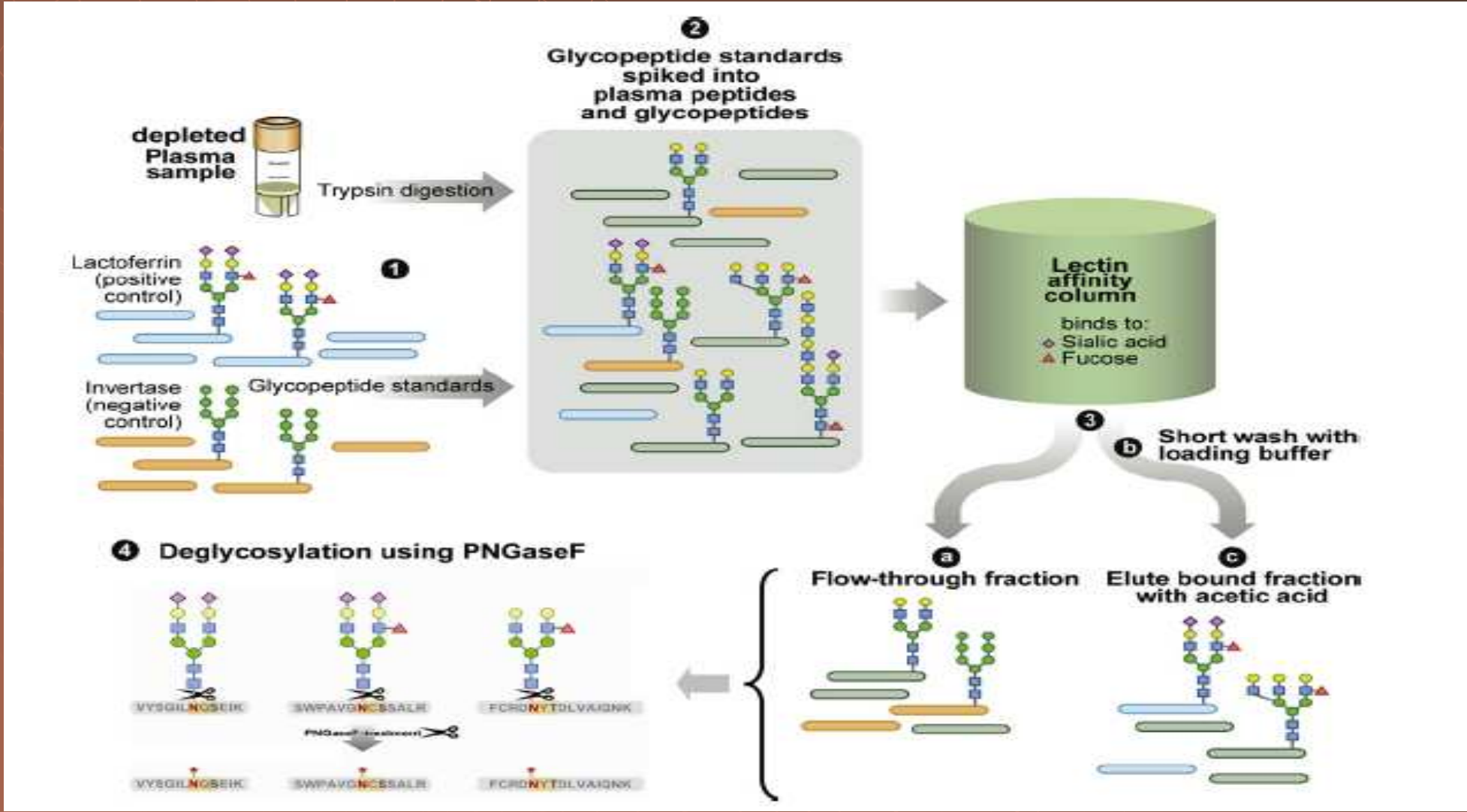
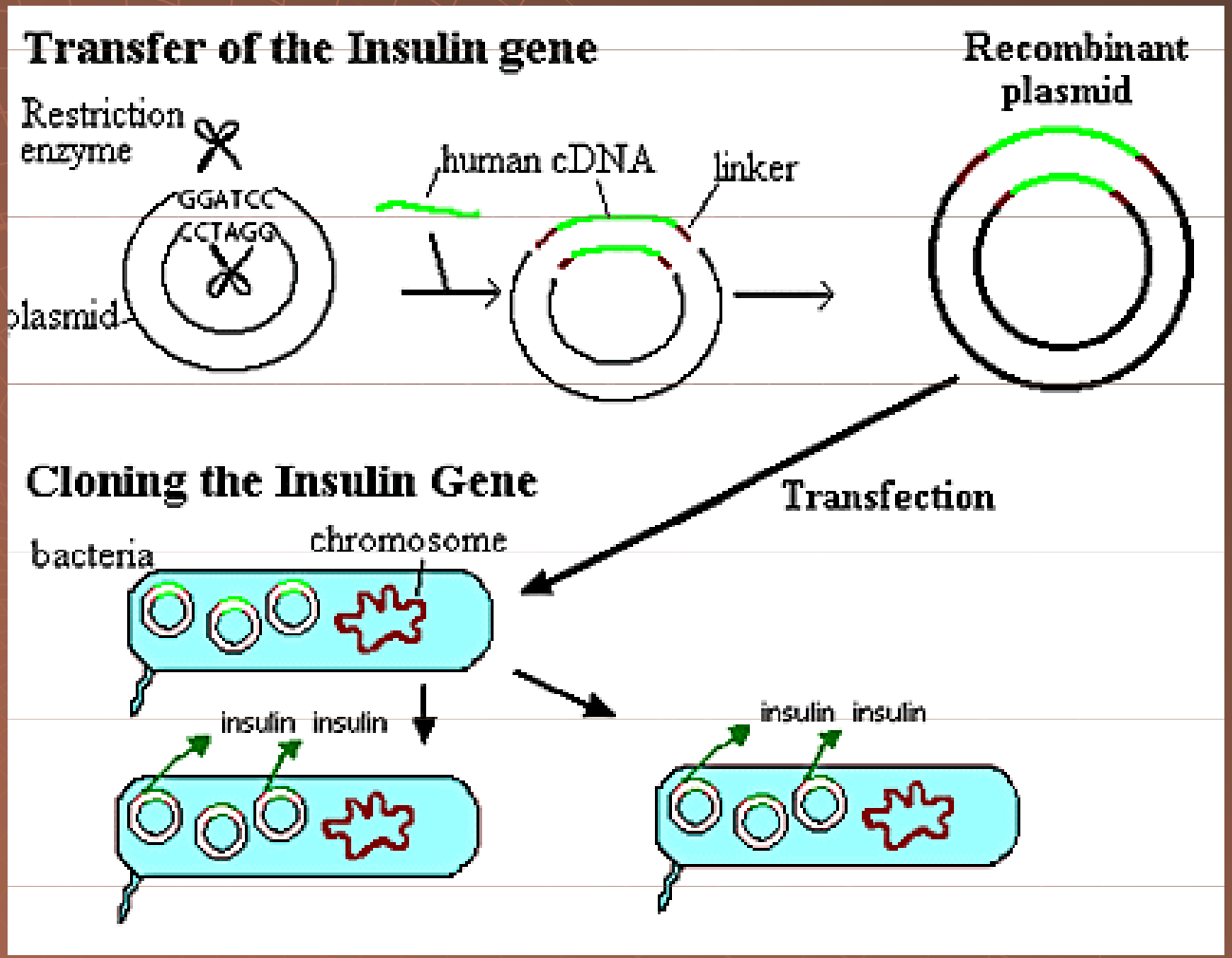



FIGURE 1 Partial purification of the crude preparation of the rabbit muscle LDH on Con A Sepharose/Blue Dextran (Figure 1.A) or Blue Sepharose (Figure 1.B) columns. Approximately 1.5 mg of protein were applied on the column. Buffers: A = 20 mM Tris HCl (pH 7.4) B = 20 mM Tris HCl (pH 7.4) with 1 M NaCl and 5% ethylene glycol flow rate – 0.05 ml/min during the loading of sample 0.5 ml/min during the elution $V_e$ – elution volume; ----- absorbance at 280 nm; ——— gradient B; -.-o-.- activity of LDH.

# Skupinově specifické ligandy lektiny



# Genetické inženýrství



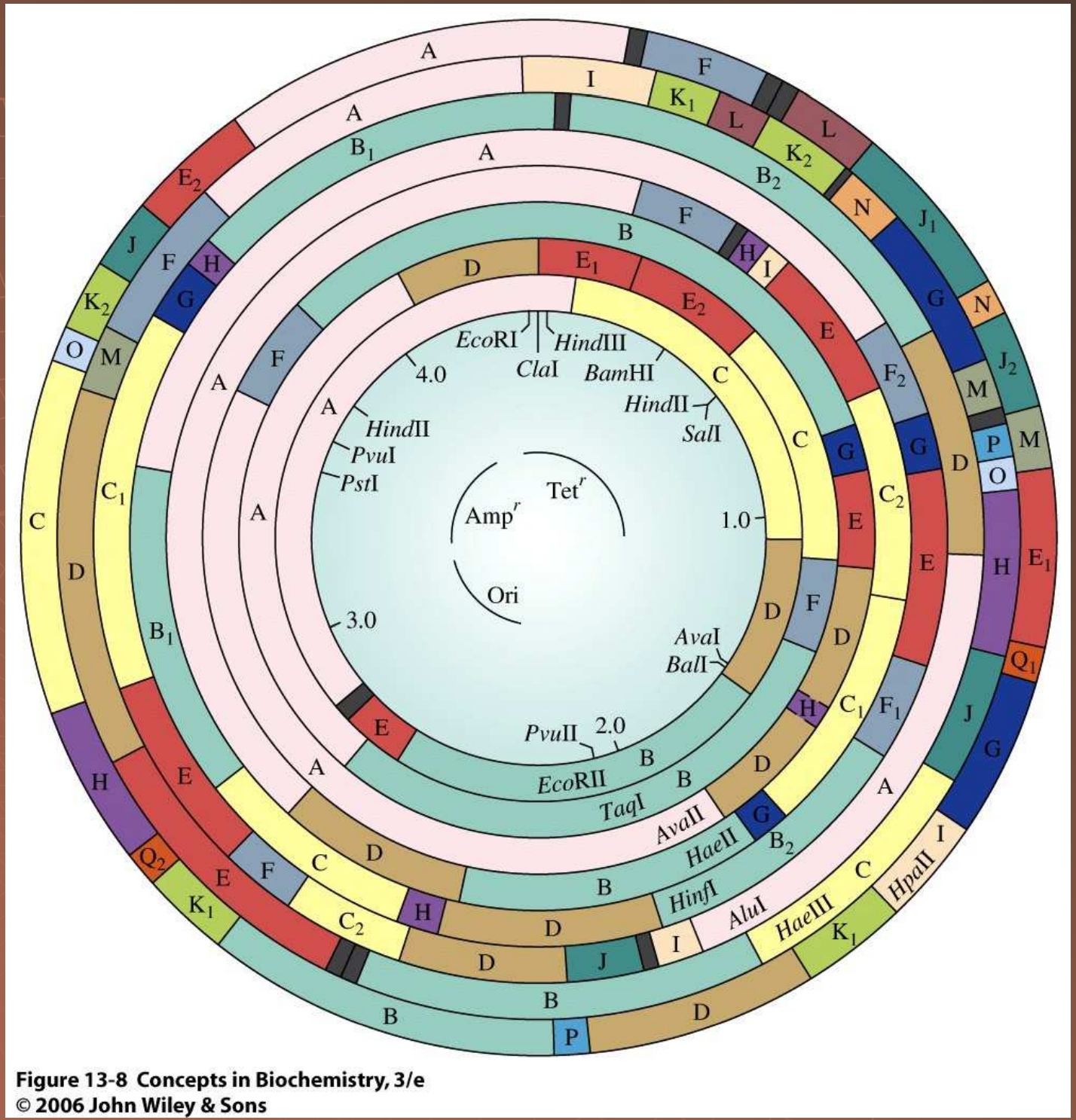



**Figure 13-8 Concepts in Biochemistry, 3/e**
**© 2006 John Wiley & Sons**

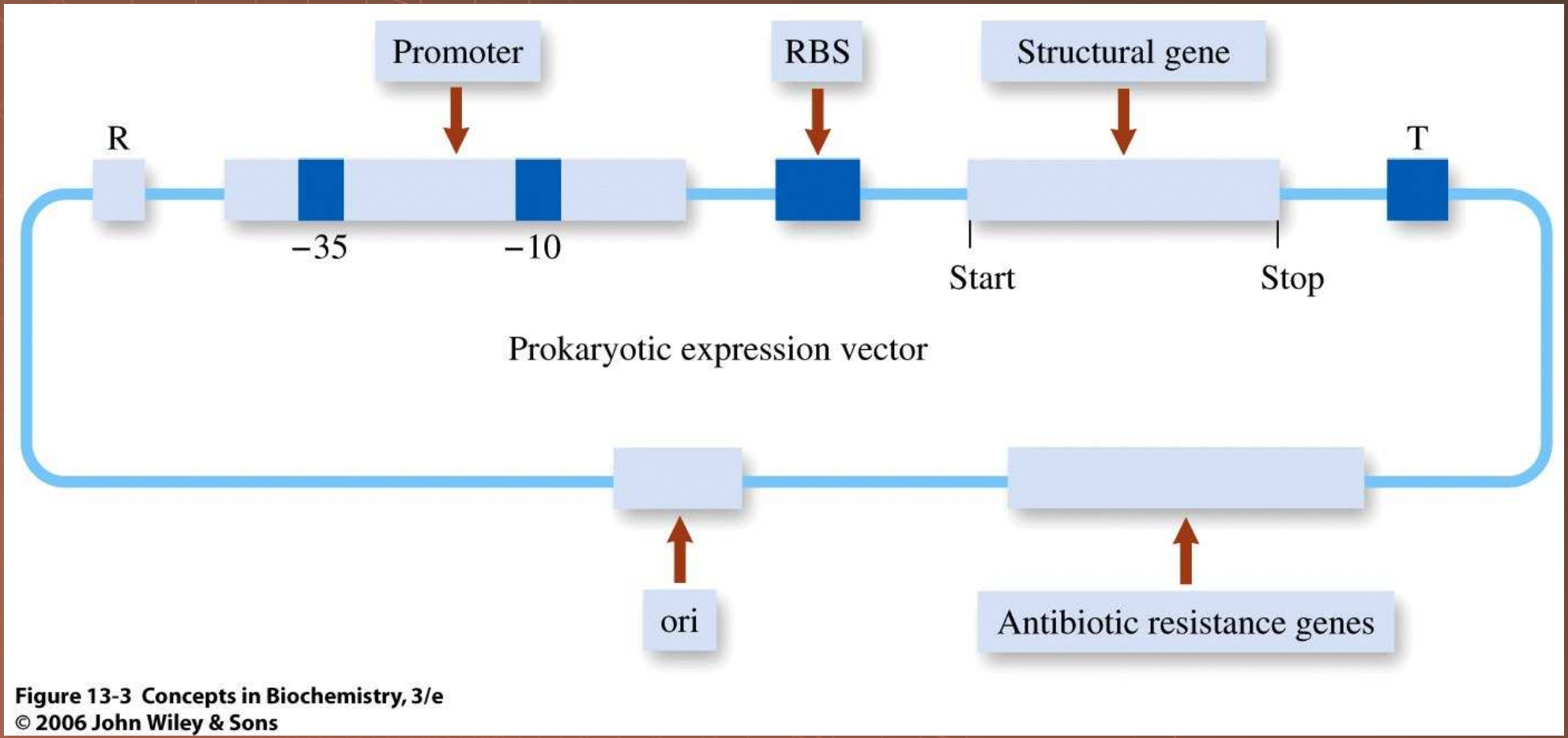



**Figure 13-3 Concepts in Biochemistry, 3/e**
**© 2006 John Wiley & Sons**

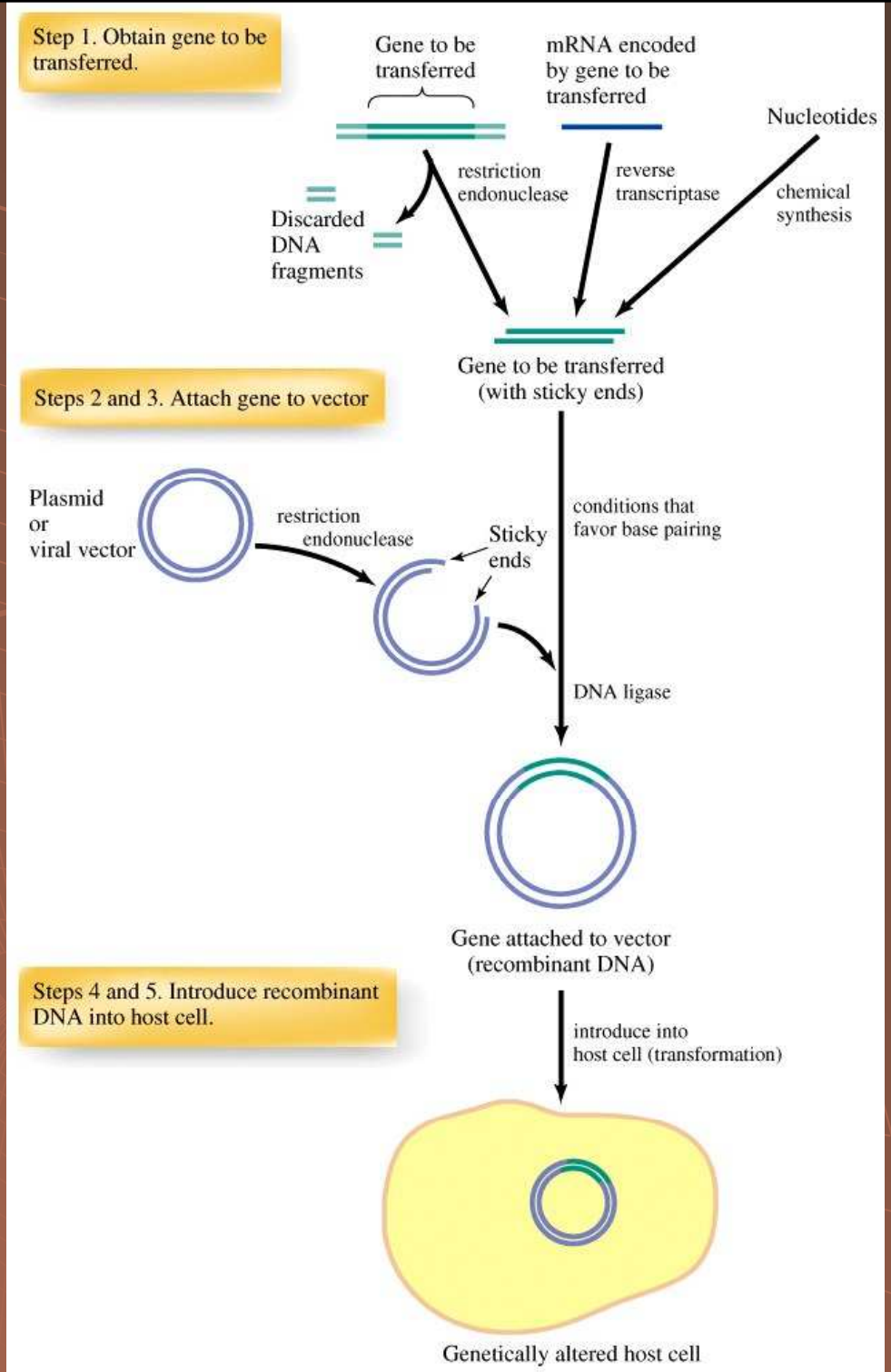



**Figure 13-1 Concepts in Biochemistry, 3/e**

© 2006 John Wiley & Sons

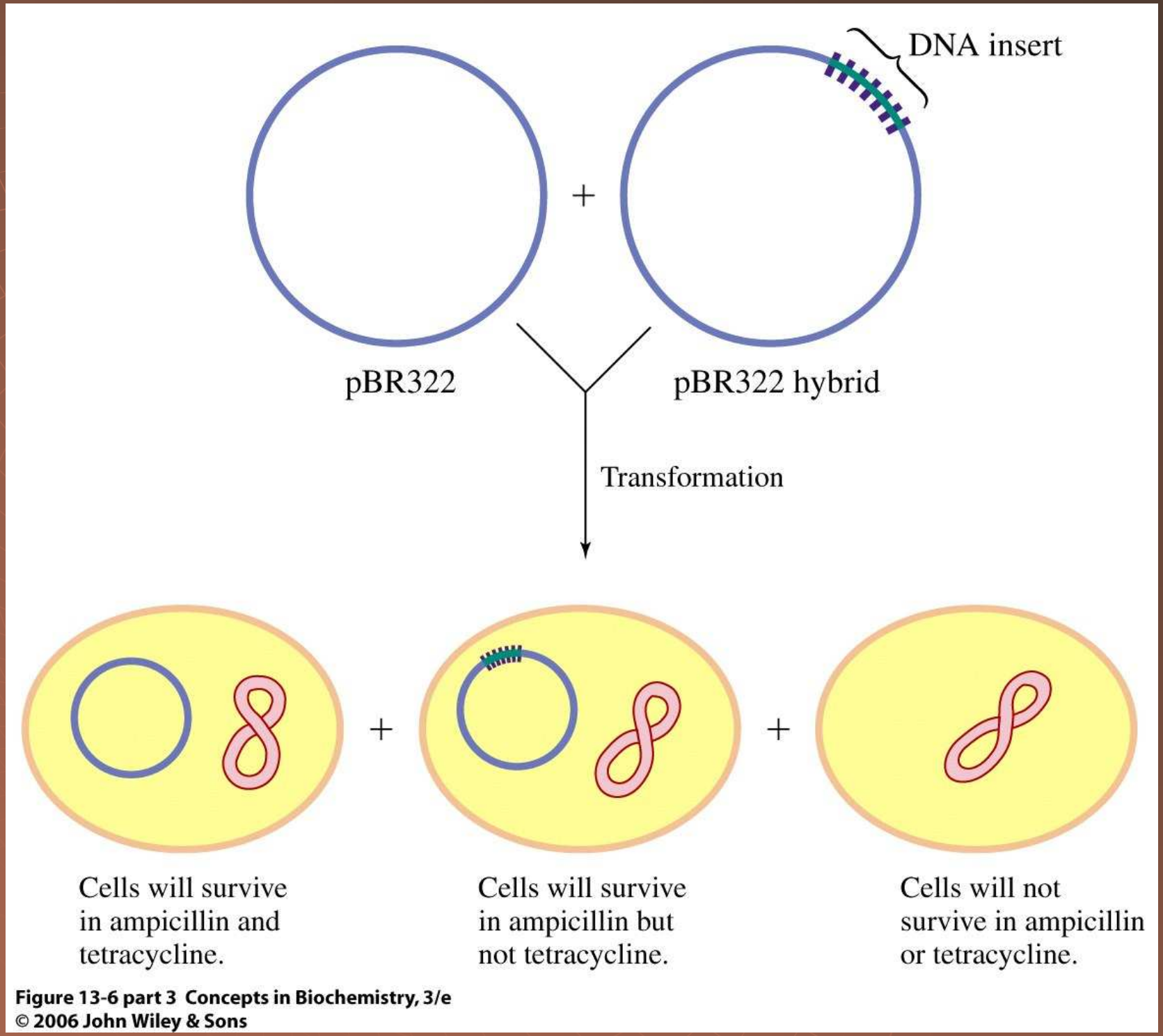
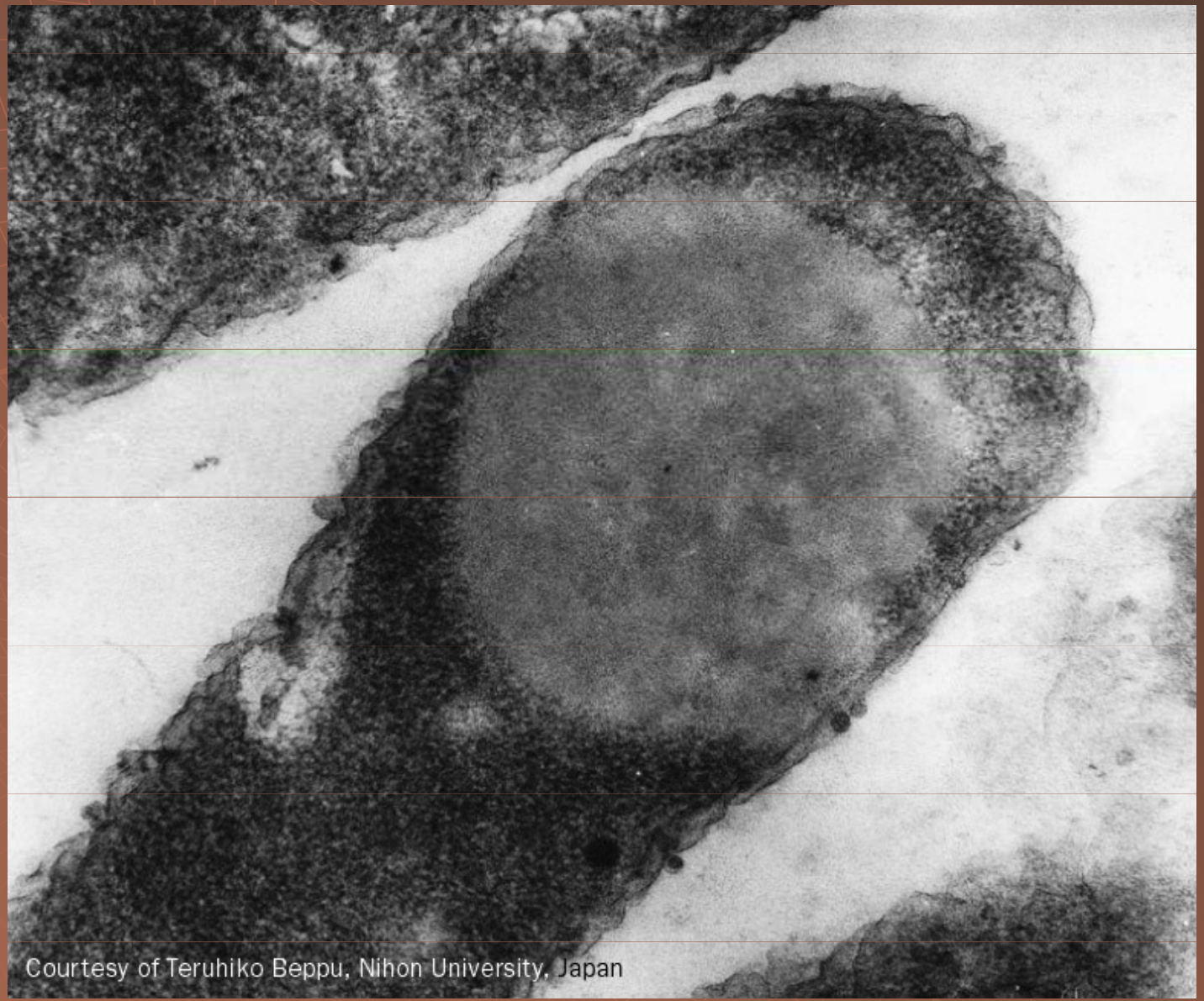



**Figure 13-6 part 3 Concepts in Biochemistry, 3/e**

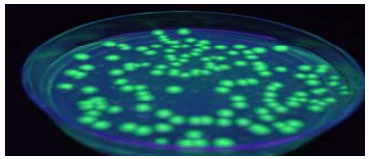
**© 2006 John Wiley & Sons**

# Inklusní tělíska

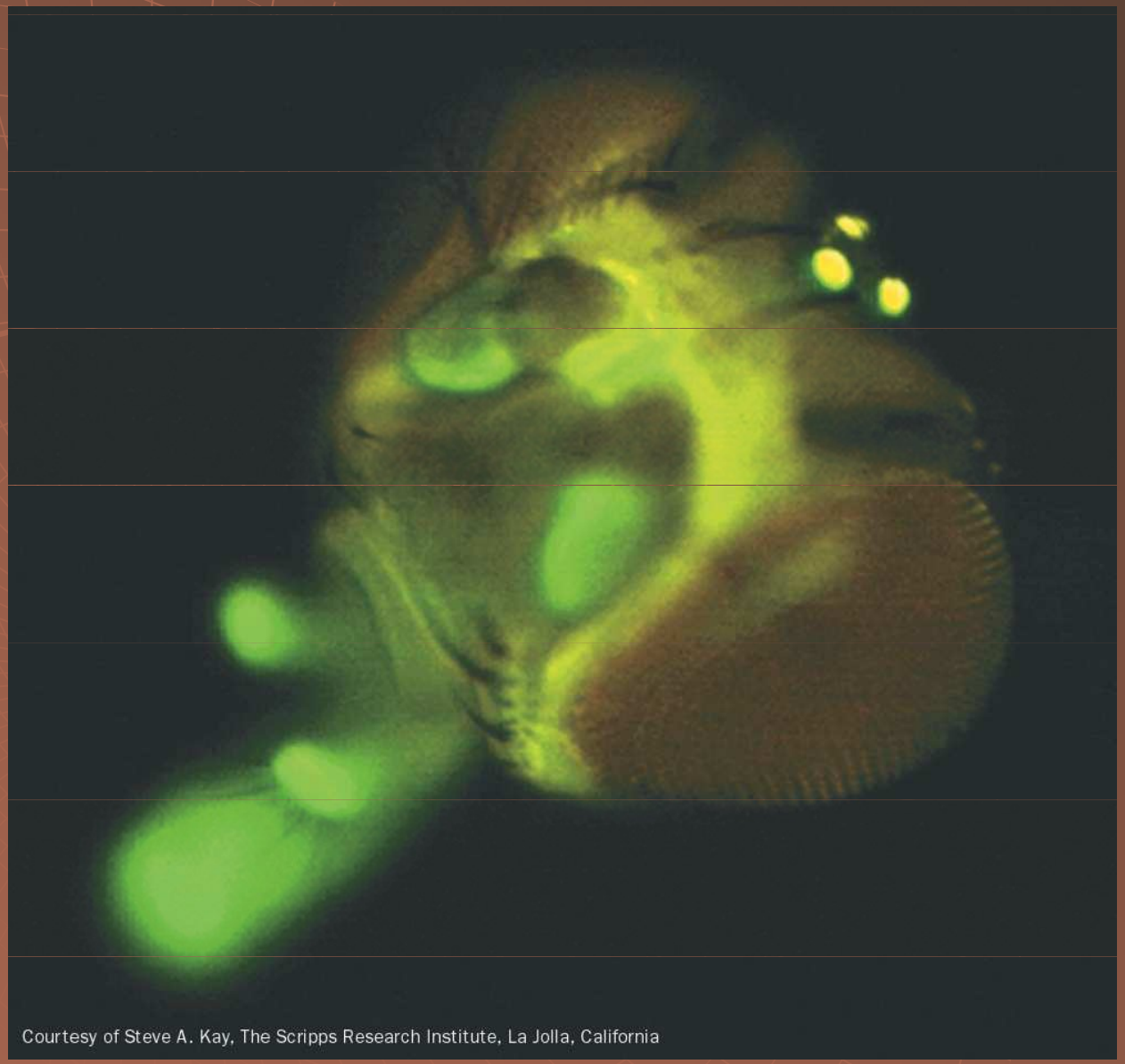


Courtesy of Teruhiko Beppu, Nihon University, Japan

# Využití AC pro purifikaci rekombinantních proteinů

| fůzní kotva | imobilizovaný ligand | podmínky vazby | podmínky eluce |
|---|---|---|---|
| Glutathion S-transferasa **GST** | redukovaný glutathion | Neutrální pH, nedenaturující prostředí, glutathion musí být redukovaný a GST musí být aktivní | volný redukovaný glutathion |
| Histidinová kotva **His-tag** | Chelatovaný nikl nebo kobalt | Neutrální pH bez redukčních a oxidačních látek | >200 mM Imidazol, nízké pH, silné chelatační činidlo |
| Maltose Binding Protein **MBP** | Amylosa | Neutrální pH, nedenaturující prostředí; přídavek NaCl k snížení nespecifické sorbce | maltosa |
| Protein A | IgG | Neutrální pH, nedenaturující prostředí | změna pH, iontové síly |
| Green Fluorescent Protein **GFP** | Anti-GFP antibody  | Neutrální pH, nedenaturující prostředí | nízké pH, iontová síla |

# Green Fluorescent Protein



Courtesy of Steve A. Kay, The Scripps Research Institute, La Jolla, California

## Table 13.1
### Recombinant proteins and their use

| Protein | Use |
|---|---|
| Human insulin | Treatment of diabetes |
| Human somatotropin (growth hormone) | Treatment of dwarfism |
| Bovine somatotropin (BST) | Enhances milk production in dairy cattle |
| Porcine somatotropin | Enhances growth in pigs |
| Pulmozyme (DNase) | Treatment of cystic fibrosis |
| Tissue plasminogen activator (TPA) | Treatment of heart attack, stroke victims; dissolves blood clots |
| Erythropoietin | Stimulates erythrocyte production in anemia |
| Interferons | Antiviral agent; treatment of cancers |
| Atrial natriuretic factor | Reduces high blood pressure |
| Leptin | Treatment of obesity |
| Hepatitis B vaccine | Treatment of hepatitis |
| Herceptin | Monoclonal antibody to treat metastatic breast cancer |
| Superoxide dismutase | Destroys reactive oxygen species; treatment of arthritis |

Table 13-1 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

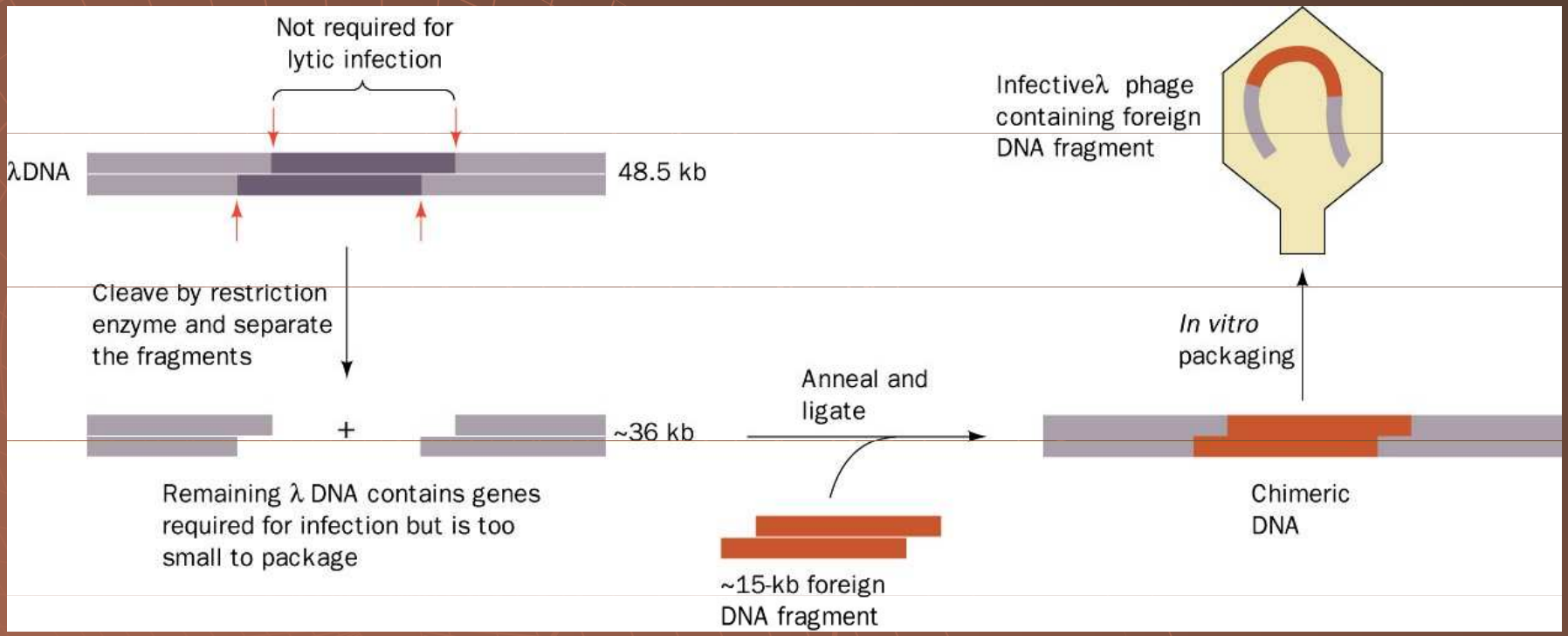

Not required for
lytic infection
λDNA
48.5 kb
Cleave by restriction
enzyme and separate
the fragments
+
~36 kb
Remaining λ DNA contains genes
required for infection but is too
small to package
Anneal and
ligate
~15-kb foreign
DNA fragment
Chimeric
DNA
In vitro
packaging
Infectiveλ phage
containing foreign
DNA fragment

**Table 13.2**

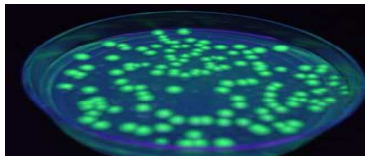
**Human gene therapy projects currently in or preparing for clinical trials**

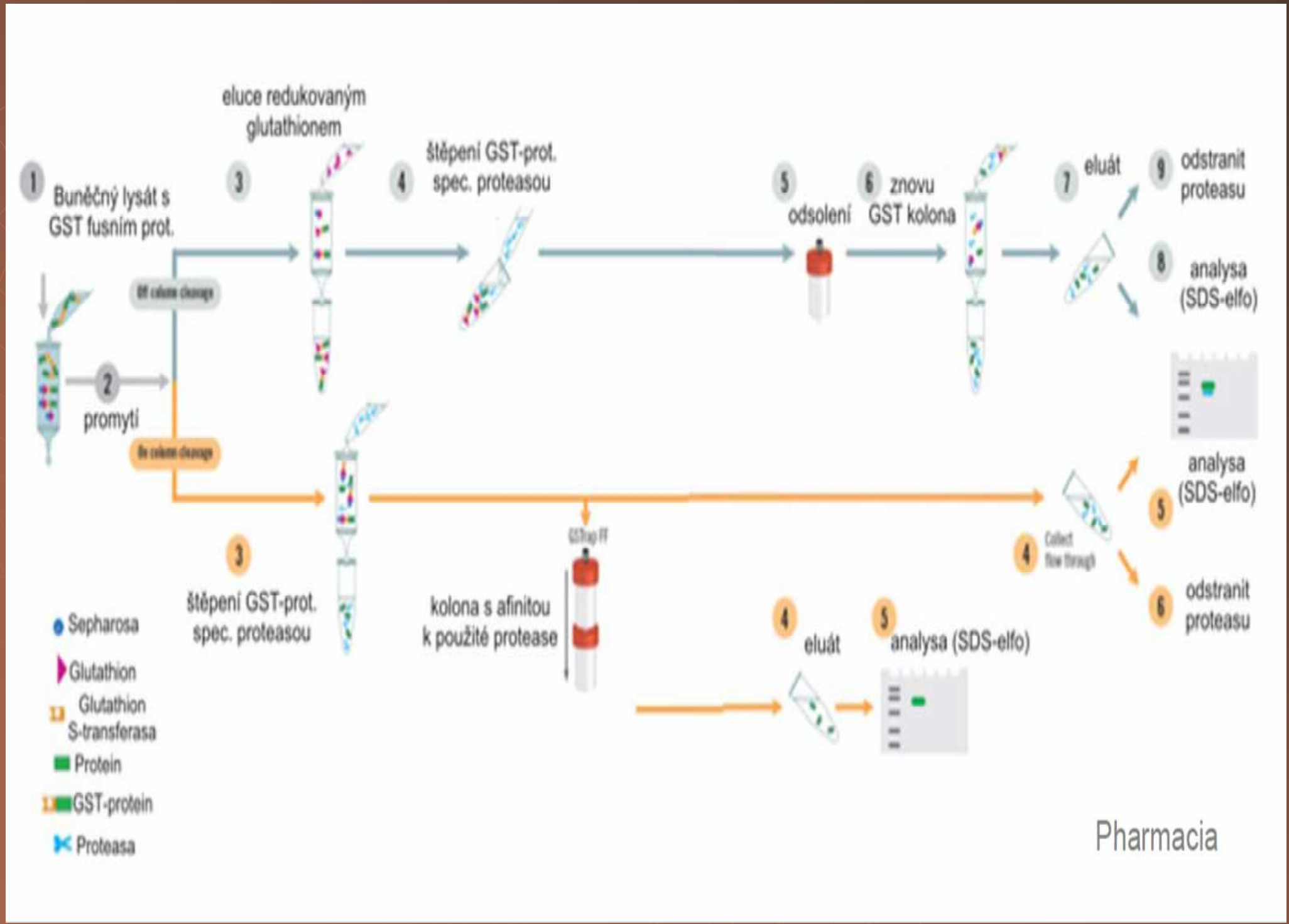
| Disease | Defective Protein, Gene, or Inserted DNA |
|---|---|
| Lesch-Nyhan syndrome | Hypoxanthine–guanine phosphoribosyl transferase (Section 19.5) |
| Amyotrophic lateral sclerosis (ALS, Lou Gehrig's disease) | Superoxide dismutase |
| Adrenoleukodystrophy (ALD) | Very long chain fatty acid synthetase transporting protein |
| Severe combined immunodeficiency (SCID) | Adenosine deaminase |
| β-Thalassemia | β-Globin, a polypeptide of hemoglobin |
| Familial hypercholesterolemia | Liver receptor for low density lipoprotein (LDL) (Section 18.5) |
| Hemophilia | Blood-clotting factors |
| Duchenne's muscular dystrophy | Dystrophin |
| AIDS | The gene to produce a ribozyme that cleaves HIV RNA |
| Inherited emphysema | $\alpha_1$-Antitrypsin |
| Cystic fibrosis | A product that unclogs lung mucus is inhaled in a nasal spray |
| Cancer | E1A and p53 tumor suppressor genes |

Table 13-2 Concepts in Biochemistry, 3/e

© 2006 John Wiley & Sons

# Využití AC pro purifikaci rekombinantních proteinů

| fůzní kotva | imobilizovaný ligand | podmínky vazby | podmínky eluce |
|---|---|---|---|
| Glutathion S-transferasa **GST** | redukovaný glutathion | Neutrální pH, nedenaturující prostředí, glutathion musí být redukovaný a GST musí být aktivní | volný redukovaný glutathion |
| Histidinová kotva **His-tag** | Chelatovaný nikl nebo kobalt | Neutrální pH bez redukčních a oxidačních látek | >200 mM Imidazol, nízké pH, silné chelatační činidlo |
| Maltose Binding Protein **MBP** | Amylosa | Neutrální pH, nedenaturující prostředí; přídavek NaCl k snížení nespecifické sorbce | maltosa |
| Protein A | IgG | Neutrální pH, nedenaturující prostředí | změna pH, iontové síly |
| Green Fluorescent Protein **GFP** | Anti-GFP antibody  | Neutrální pH, nedenaturující prostředí | nízké pH, iontová síla |


1 Buněčný lysát s GST fusním prot.
2 promytí
3 eluce redukovaným glutathionem
4 štěpení GST-prot. spec. proteasou
5 odsolení
6 znovu GST kolona
7 eluát
8 analysa (SDS-elfo)
9 odstranit proteasu
3 štěpení GST-prot. spec. proteasou
kolona s afinitou k použité protease
4 eluát
5 analysa (SDS-elfo)
4 Collect flow through
5 analysa (SDS-elfo)
6 odstranit proteasu
Sepharosa
Glutathion
Glutathion S-transferasa
Protein
GST-protein
Proteasa
Pharmacia

# Analytická afinitní chromatografie

## Analýza vazby ligandu na biopolymer

**Určení disociační konstanty komplexu biopolymer - zakotvený ligand (K´)** má význam zejména pro posouzení vhodnosti nosiče se zakotveným afinantem z hlediska praktické použitelnosti. Hodnota K´ se musí nacházet v intervalu ($10^{-6}$ - $5.10^{-3}$) v jednotkách $mol.l^{-1}$. Vazba na imobilizovaný ligand bývá zpravidla slabší než na ligand volný.

$$1 / (V_R - V_0) = K´ / (V_0 - V_M)^* c_L$$

$V_M$ - mrtvý objem kolony
$V_O$ - el. objem nezadržovaného analog. biopolymeru (Mr)
$V_R$ - eluční objem studovaného biopolymeru
$c_L$ - koncentrace vázaného ligandu

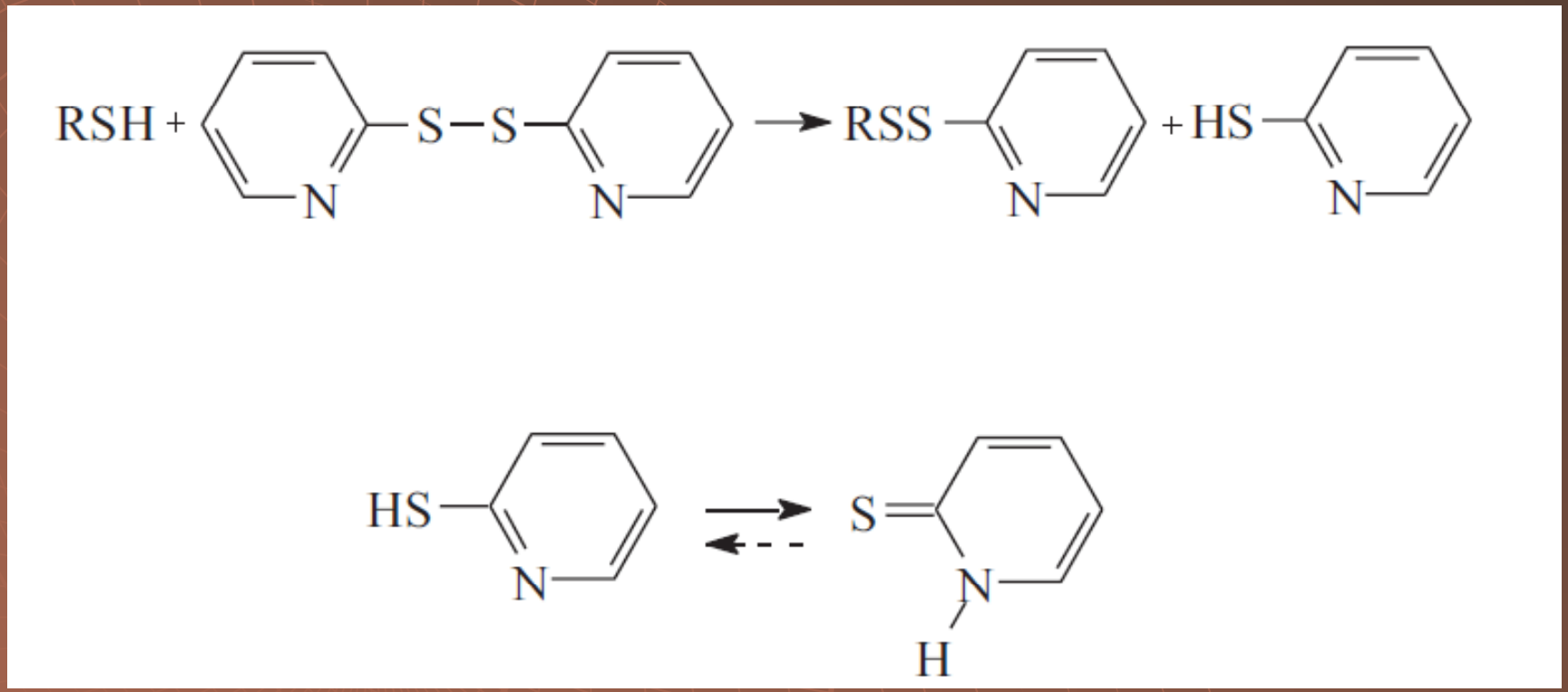
# Analytická afinitní chromatografie

## Analýza vazby ligandu na biopolymer

**Určení disociační konstanty komplexu biopolymer - volný ligand (K)** vychází z předpokladu, že oba ligandy (volný i zakotvený) se vážou na biopolymer kompetitivně (metoda kompetitivní eluce). Na kolonu obsahující nosič s vhodným afinantem naneseme biopolymer, k eluci použijeme určitou koncentraci kompetitivního ligandu ($c_L´$) a změříme eluční objem biopolymeru $V_R$. Provedeme sérii pokusů s různými koncentracemi ligandu, získáme různé eluční objemy.

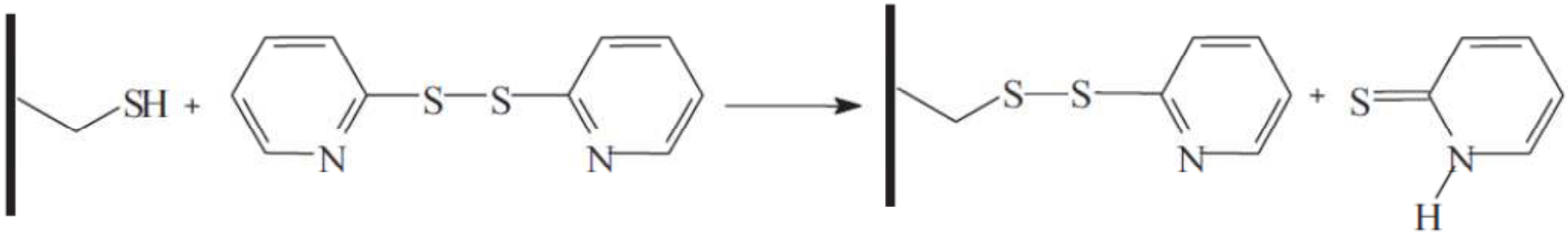
$$1 / (V_R - V_0) = K´/ (V_0 - V_M)* c_L´ + [K´* c_L] / [(V_0 - V_M)*c_L´* K]$$

# Kovalentní chromatografie tiol .disulfidická výměna

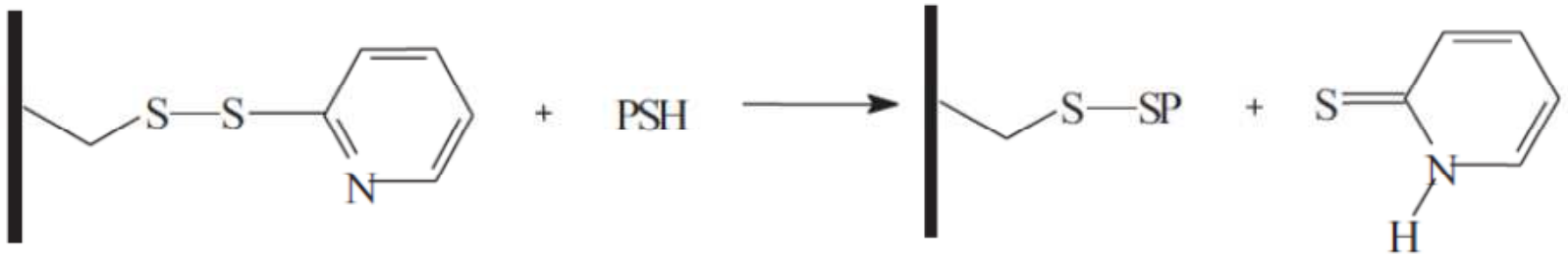


# Kovalentní chromatografie

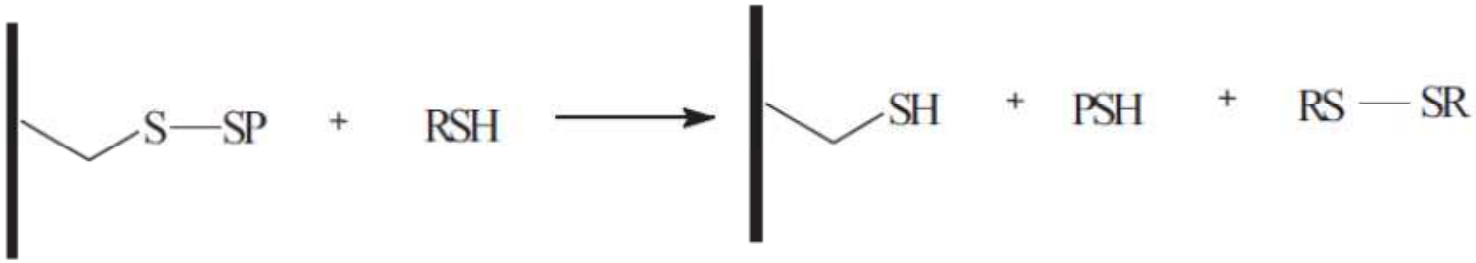
Aktivace




Vazba bílkoviny PSH




Eluce bíkoviny PSH

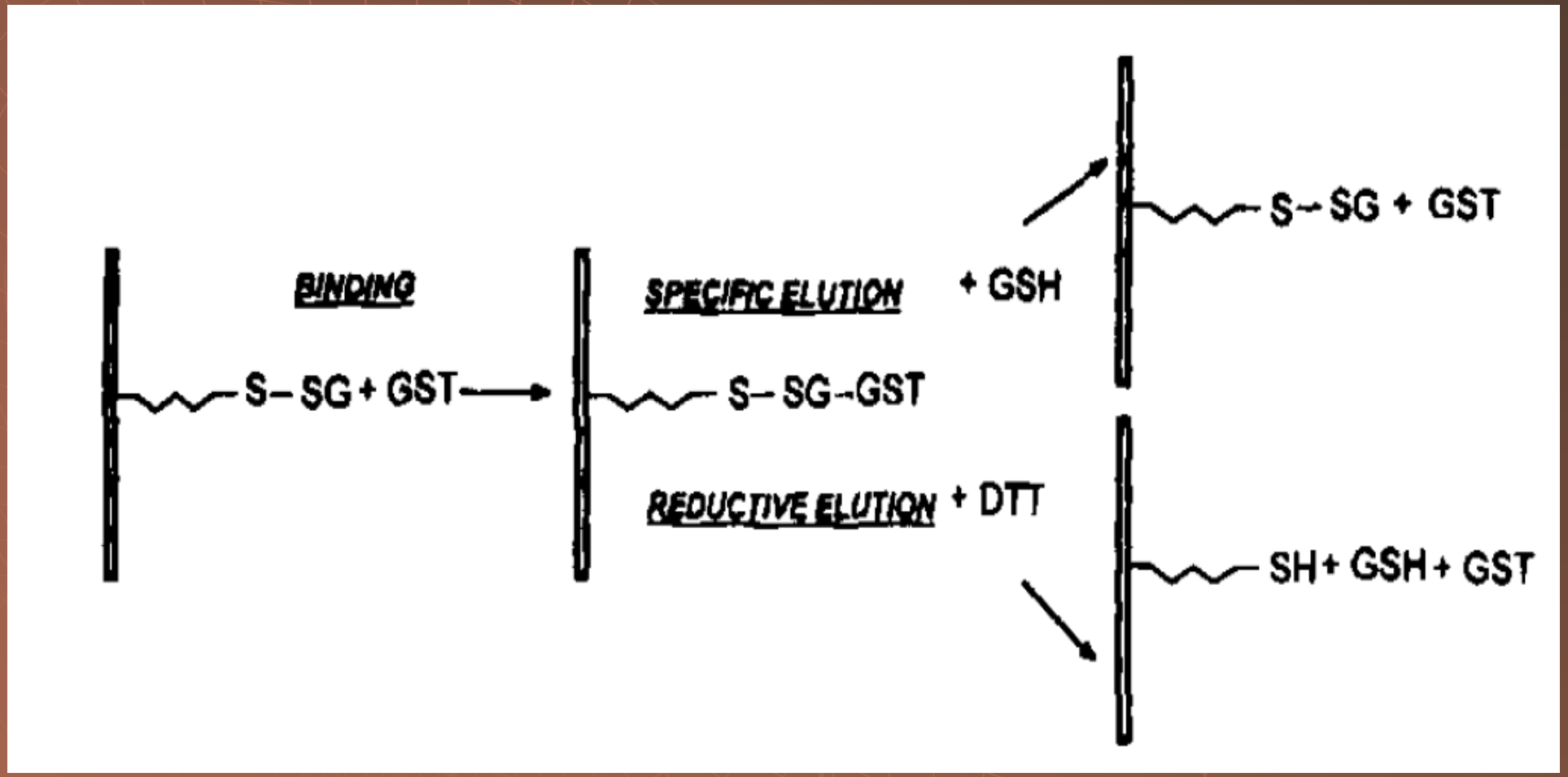


# Kovalentní chromatografie

- Nanášení vzorku – monitorování při 343 nm
- Eluce – redukční eluce
  - 10-25 mM DTT
  - 25-50 mM β-merkaptoethanol
- Reaktivace – reakce s reaktivním disulfidem
  - 20 mM 2,2’-dipyridyldisulfid

Použití : isolace bílkovin a peptidů obsahujících SH skupin

# Kovalentní chromatografie GST



# Kovalentní chromatografie GST

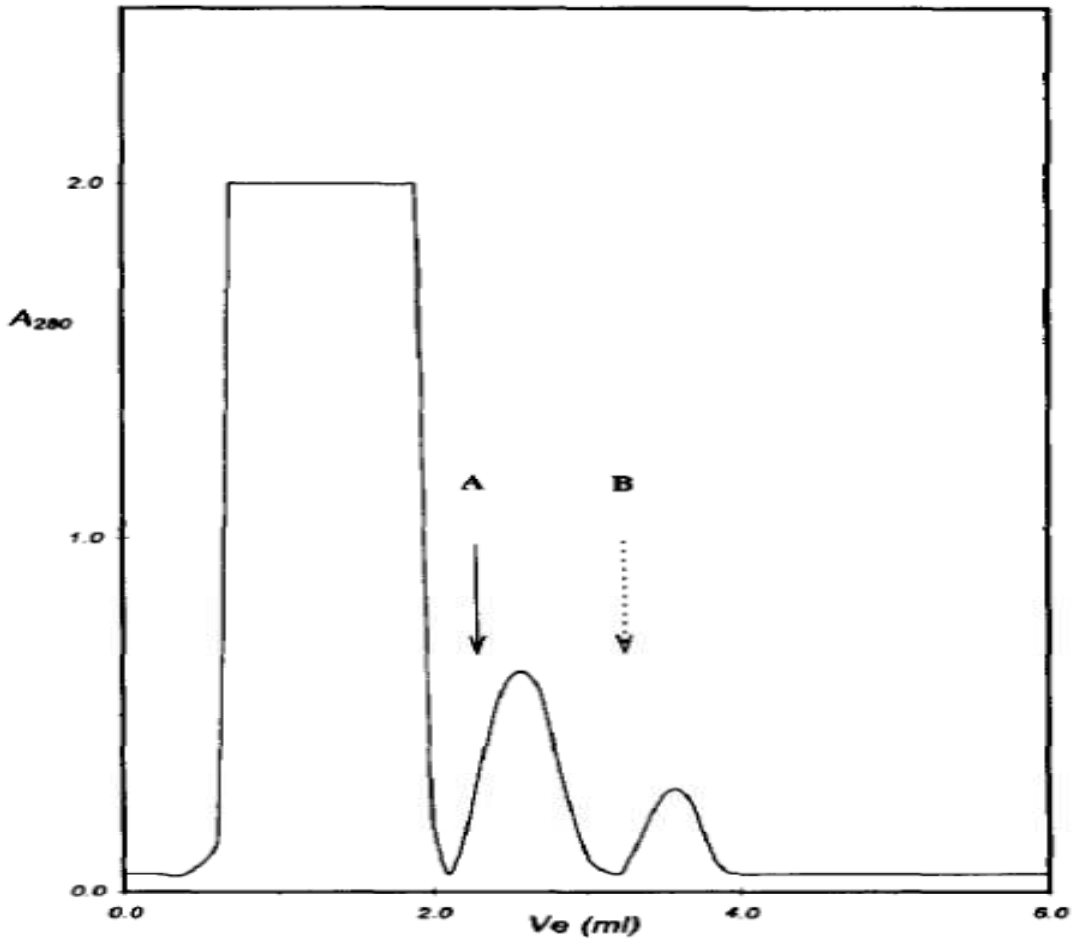
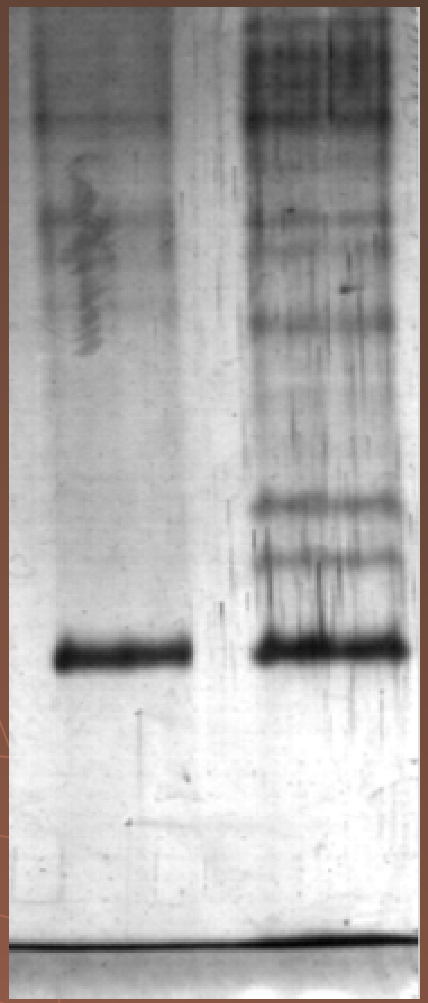
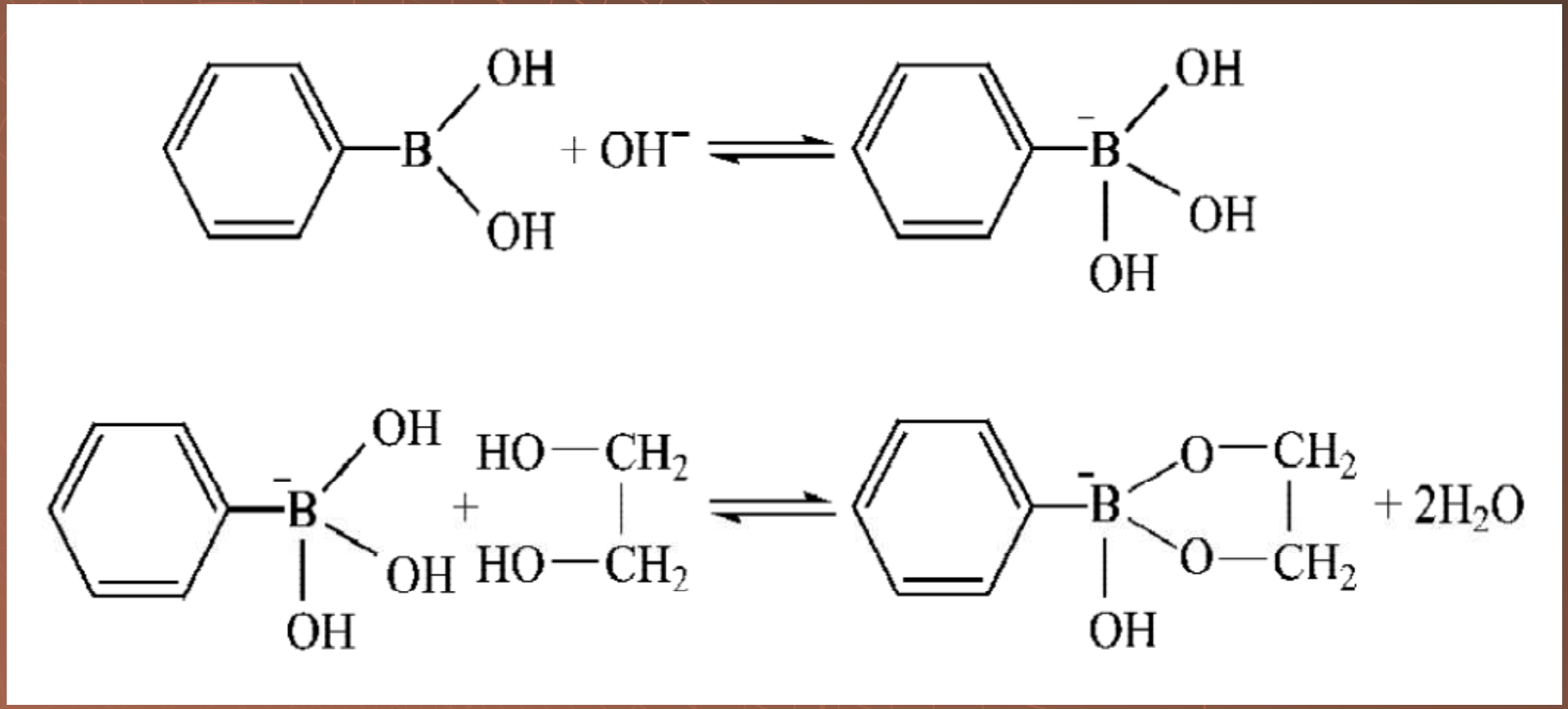


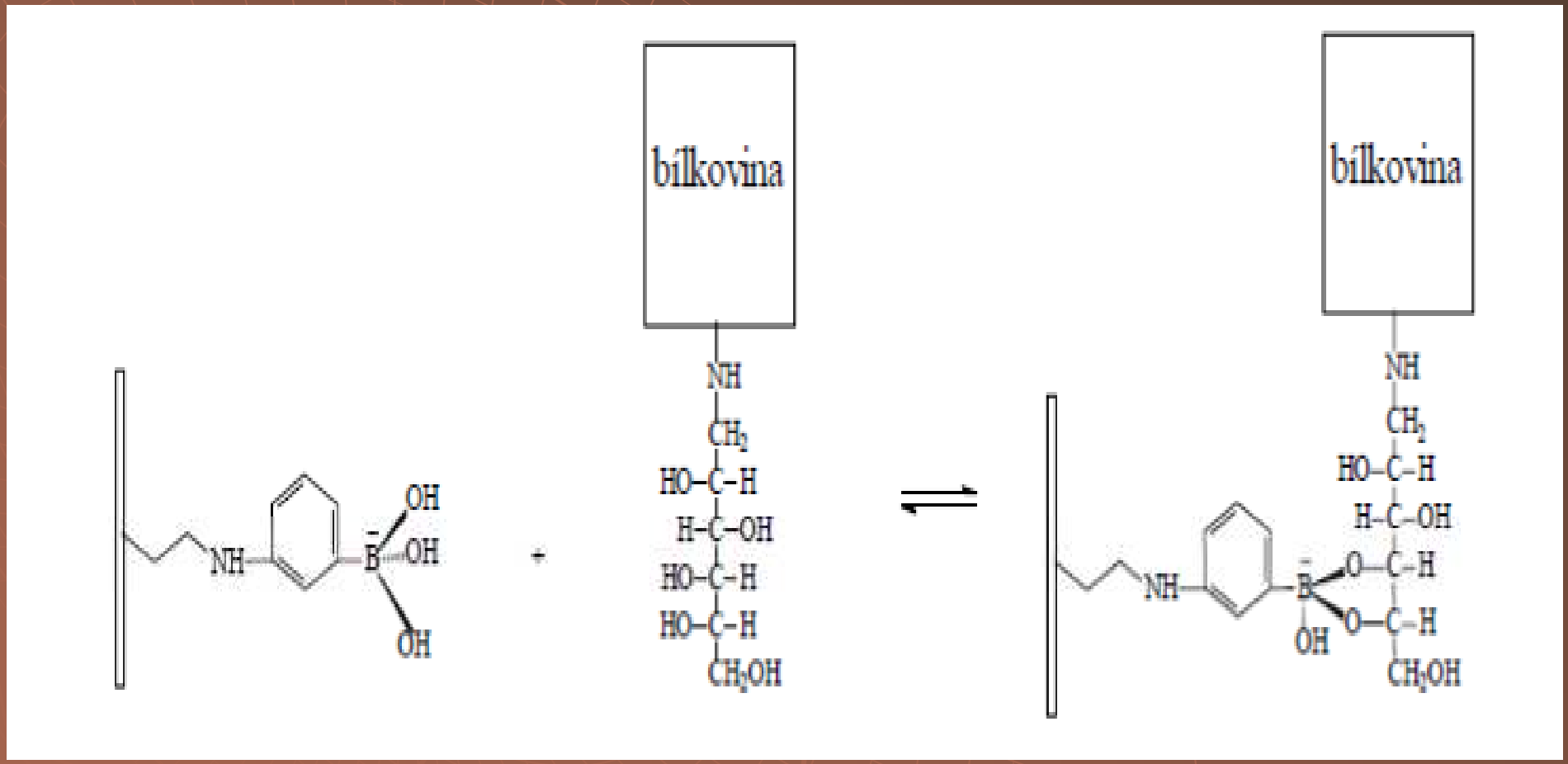

Fig. 2. Partial purification of the crude preparation of pig kidney GST on glutathione-thiopropyl Sepharose column. Approximately 50 mg of protein were applied on the column equilibrated with 50 m*M* Tris–HCl pH 7.8 containing 1 m*M* EDTA. After washing the column with equilibrating buffer, the same buffer containing 0.2 *M* NaCl (A) and 0.2 *M* NaCl with 10 m*M* GSH or 20 m*M* DTT (B) were applied at the positions marked with arrows (A) and (B). The flow-rate was 0.1 ml/min. $V_E$=elution volume; solid line: absorbance at 280 nm.



# Boronátová chromatografie



# Boronátová chromatografie



# Boronátová chromatografie

- Nanášení vzorku – vyšší iontová síla (0,2 M pufr)
- Eluce – polyoly (200 mM sorbitol)

Použití : purifikace glyko- proteinů a peptidů, stanovení GlyHb

# Boronátová chromatografie

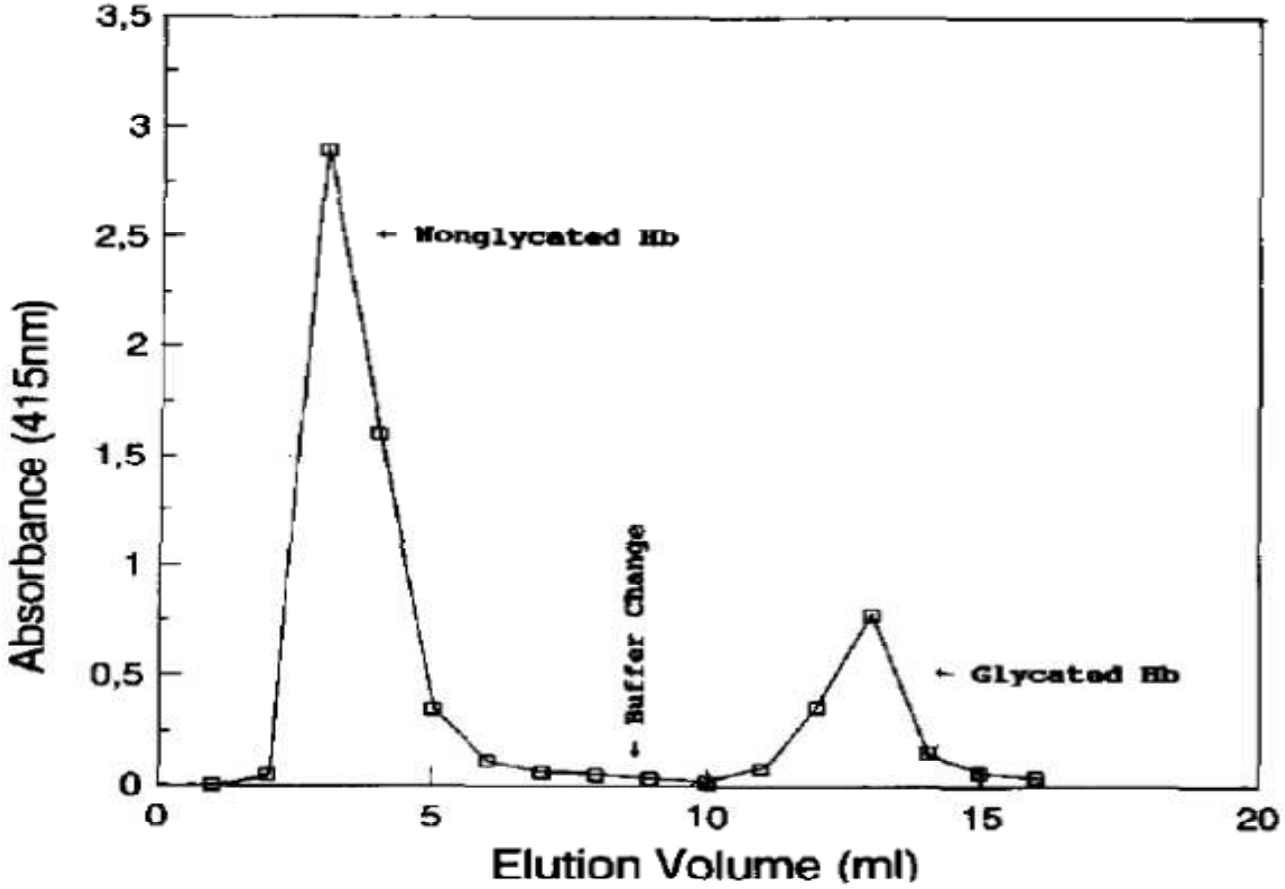



Fig. 3. Separation of glycated Hb and non-glycated Hb on a 3-ml boronate Sephacryl column. Chromatographic conditions were as described in Experimental; 100 $\mu$l of sample were applied to the column, and 1-ml fractions were collected.

# Thiofilní chromatografie

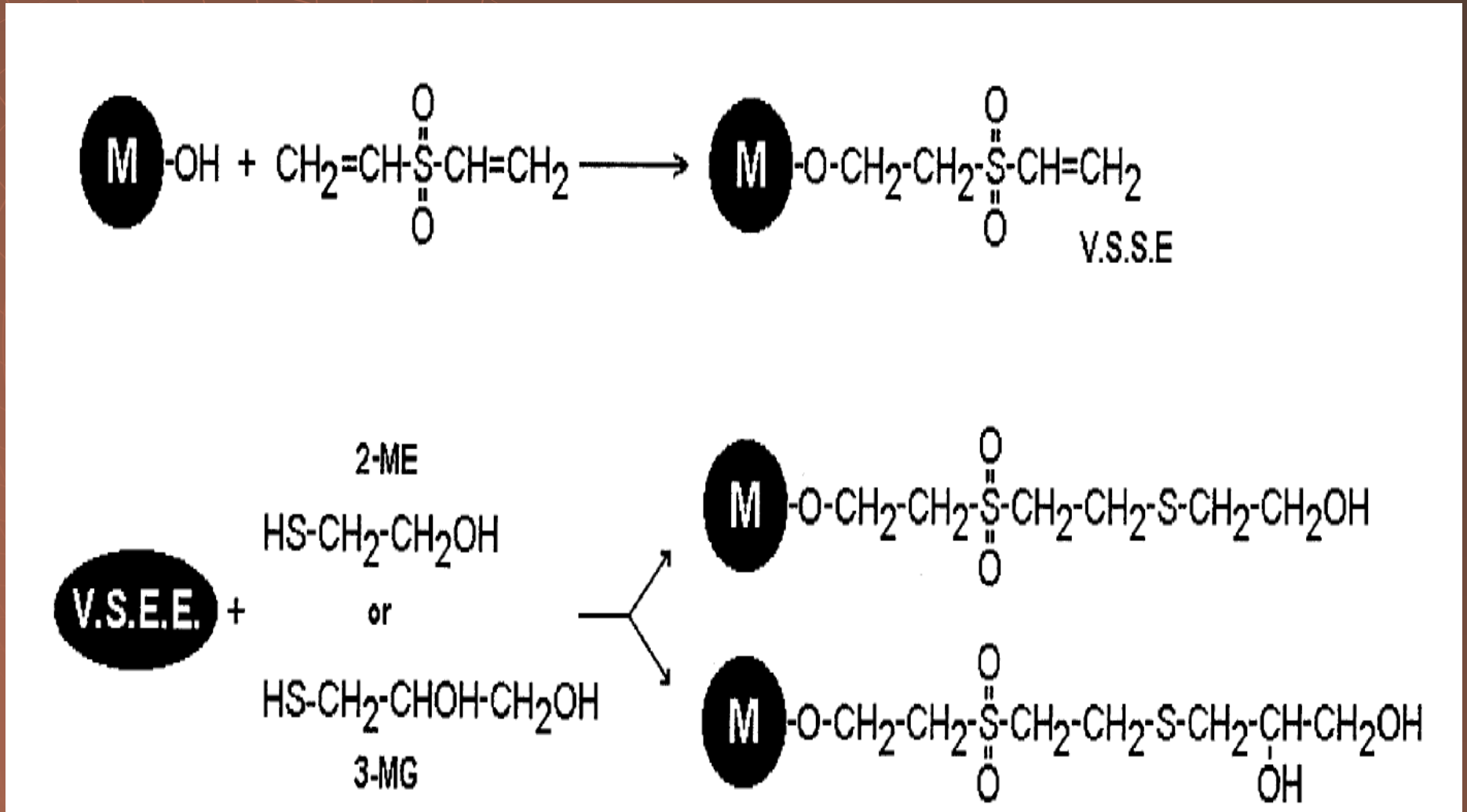



Fig. 1. Preparation of thiophilic "T-gel": chemical reaction schemes and structure. M = matrix (e.g., agarose); V.S.E.E. = vinyl-sulfonyl-ethyl ether; 2-ME = 2-mercapto-ethanol; 3-MG = 3-mercaptoglycerol.

# Thiofilní chromatografie

- Nanášení vzorku – pufr s vyšší iontovou silou (0,5 M $Na_2SO_4$ nebo NaCl)

- Eluce – snižováním iontové síly, snižováním pH

Použití : isolace poly- a monoklonálních protilátek a jejich fragmentů

# Thiofilní chromatografie

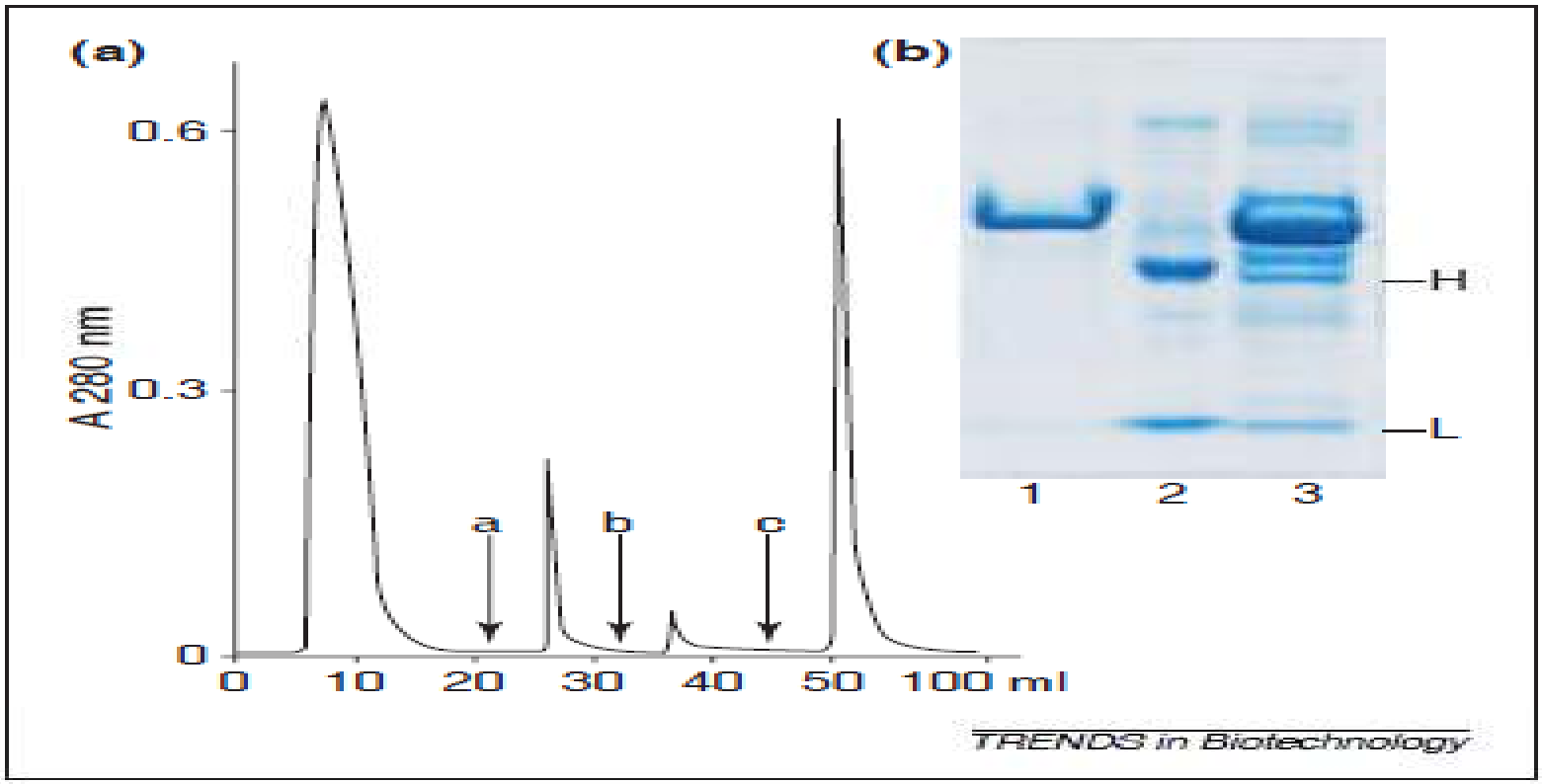
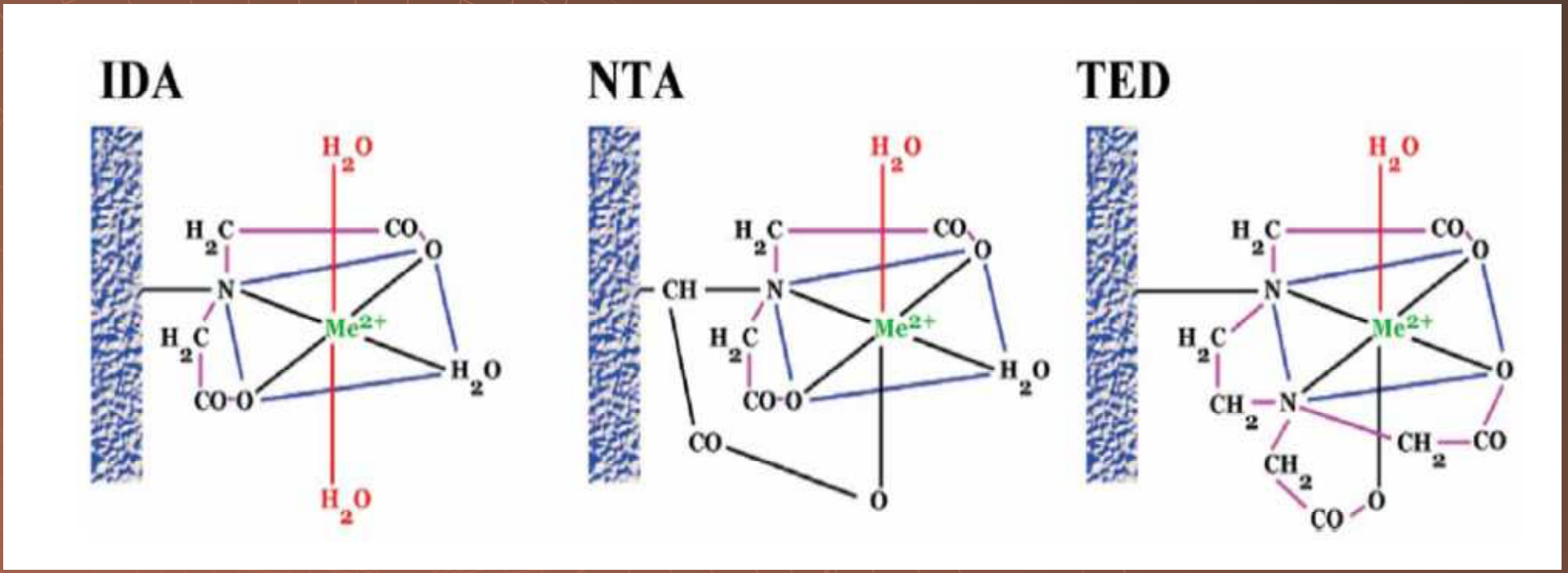



**Fig. 2.** Separation of monoclonal IgG2a (immunoglobulin G) antibodies from an ascites fluid on a column of 4-mercapto-ethyl-pyridine (MEP) resin. After filtration and dilution with a 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5, ascites fluid was loaded. The column was then washed twice with water (arrow 'a') and 25 mM sodium caprylate in Tris buffer (arrow 'b'), respectively. Finally, IgG2a antibodies were desorbed with a 50 mM acetate buffer, pH 4.0 (arrow 'c'). (Column: 3.0 mm I.D. × 10 mm height; sample volume: 5 ml of diluted ascites fluid; linear flow rate all along the process for both columns: 85 cm hour$^{-1}$.) Insert: Polyacrylamide gel electrophoresis in reduced conditions of fractions collected from the column (Lane 1: bovine albumin; lane 2: elution at pH 4.0; lane 3: crude ascites fluid; the purity of separated antibody is estimated at ~90%). Abbreviations: H, heavy chain; L, light chain.

# Ch. na imobilizovaných kovových iontech




iminodiacetic acid (IDA)
nitrilotriacetic acid (NTA)
N, N, N0-tris-carboximethyl ethylene diamine (TED)

# Ch. na imobilizovaných kovových iontech

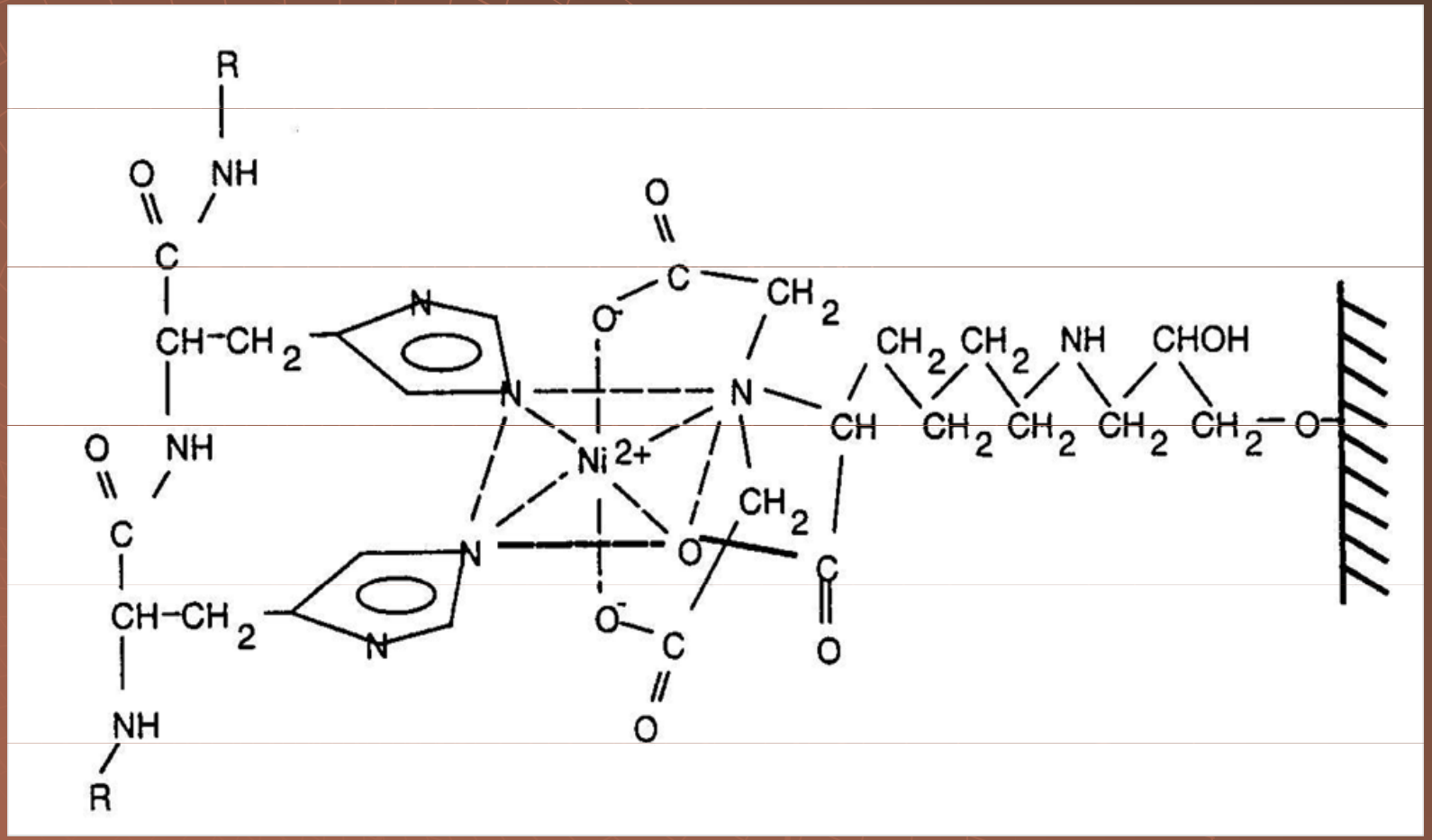
- Ekvilibrace – imobilizace kovového iontu (50 mM)

- Používané ionty - používají se především ionty $Cu^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Ni^{2+}$, $Fe^{3+}$, $Co^{2+}$, $Mn^{2+}$ a $Mg^{2+}$, preferující dusík jako koordinační ligand

# Ch. na imobilizovaných kovových iontech

| Chelating compound | Coordination | Metal-ions |
|---|---|---|
| Salicylaldehyde | Bidentate | Cu(II) |
| 8-hydroxyquinoline (im-8-HQ) | Bidentate | Al(III), Ca(II), Fe(III), Yb(III) |
| N-methacryloyl-(L)-histidine methyl ester (MAH) | Bidentate | Fe(III) |
| Dipicolylamine (DPA) | Tridentate | Ni(II), Zn(II) |
| Iminodiacetic acid (IDA) | Tridentate | Cu(II), Ni(II), Zn(II), Ga(III) |
| O-phosphoserine (im-OPS) | Tridentate | Al(III), Ca(II), Fe(III), Yb(III) |
| Tris(2-aminoethyl)amine (TREN) | Tridentate | Cu(II) |
| 1,4,7-triazocyclononane (tacn) | Tridentate | Cu(II), Cr(III), Mn(II), Co(II), Zn(II), Ni(II) |
| Nitrilotriacetic acid (NTA) | Tetradentate | Cu(II), Ni(II), Zn(II) |
| Carboxymethylated aspartic acid (CM-Asp) | Tetradentate | Ca(II), Co(II) |
| N-methacryloyl-(L)-cysteine methyl ester (MAC) | — | Fe(III) |

# Ch. na imobilizovaných kovových iontech

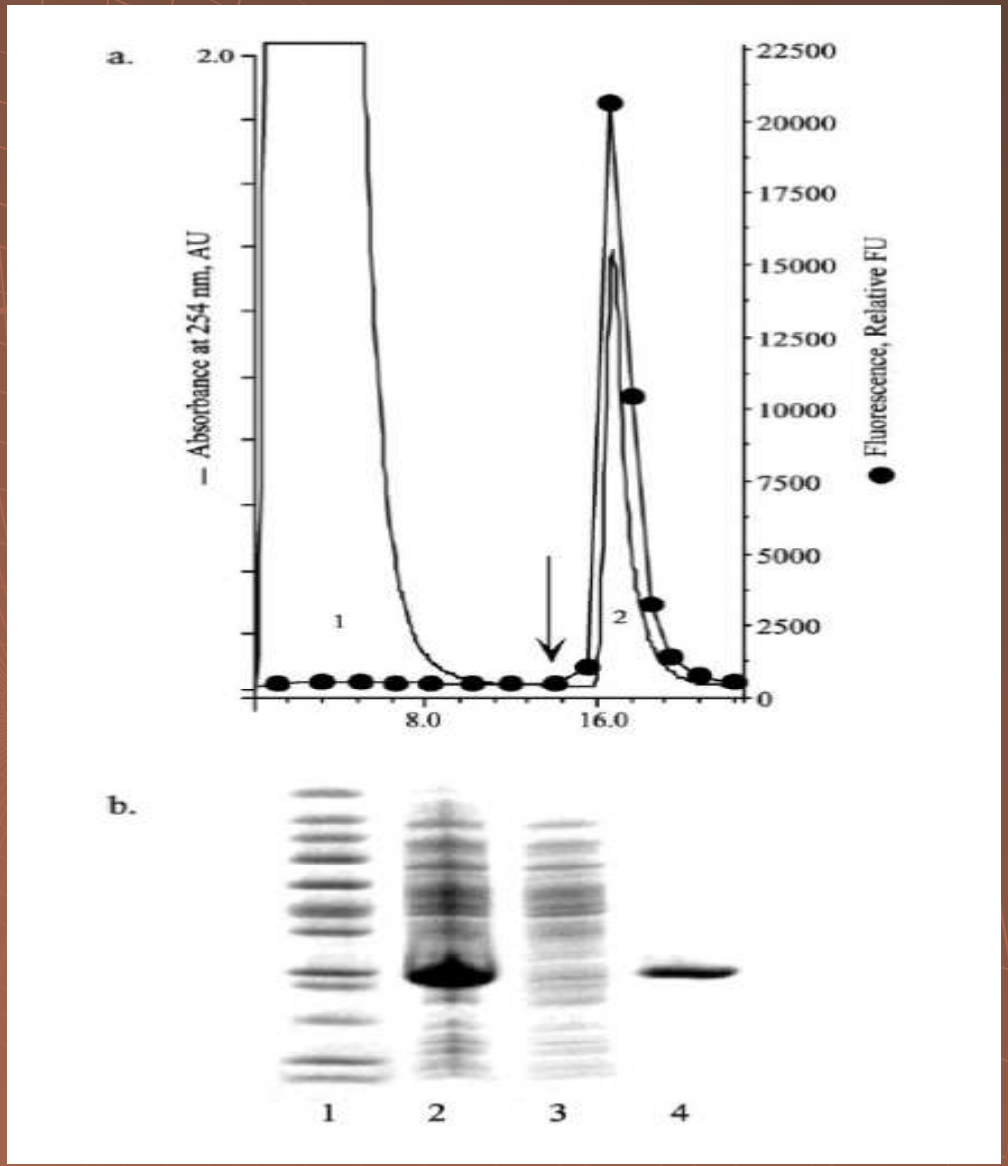


# Ch. na imobilizovaných kovových iontech

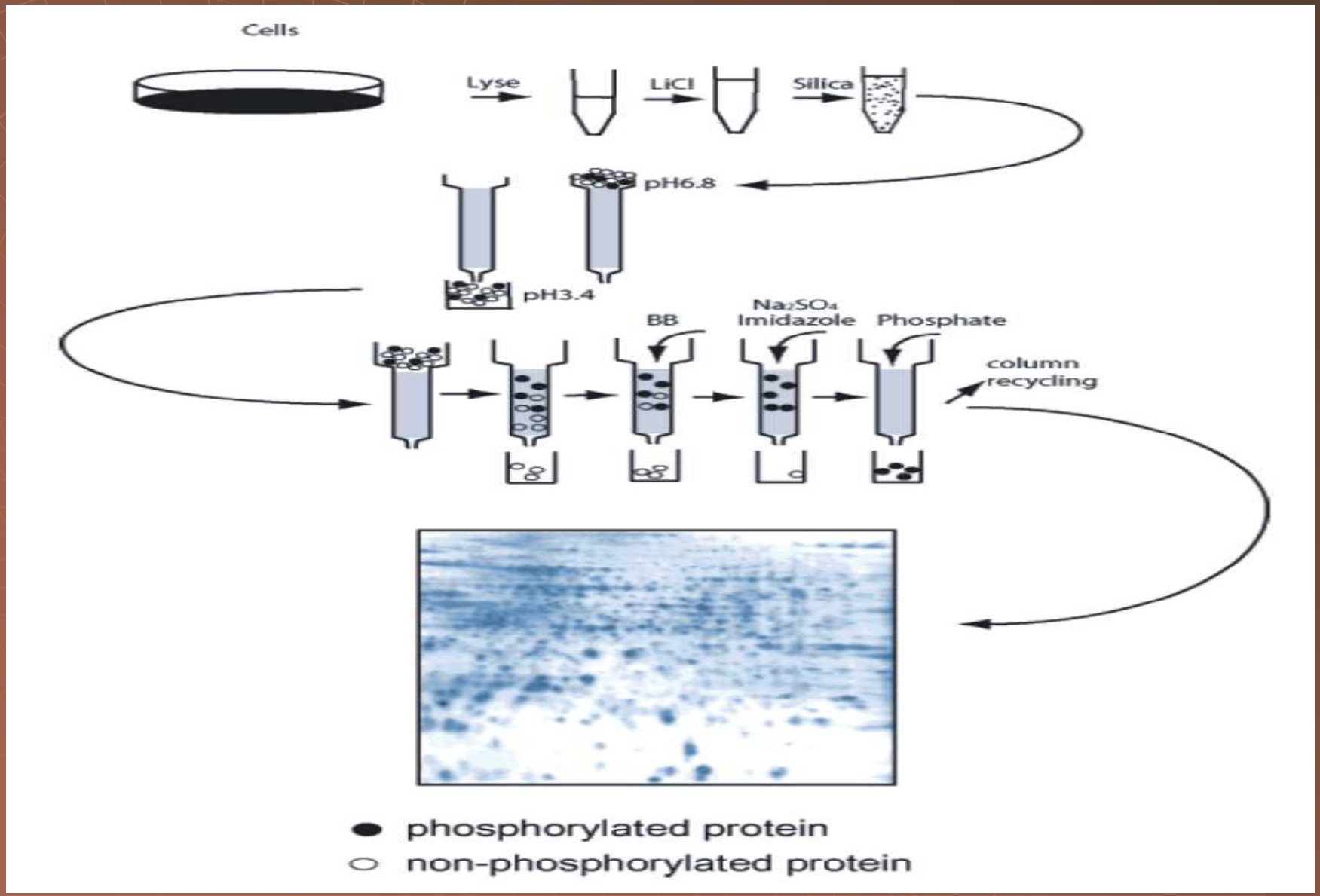
- Nanášení vzorku – pufr s vyšší iontovou silou (0.5 M NaCl)
- Eluce – snížení pH (3-4), kompetitující látka (histidin, imidazol, glycin, fosfát), EDTA

Použití : purifikace normálních a rekombinantních bílkovin

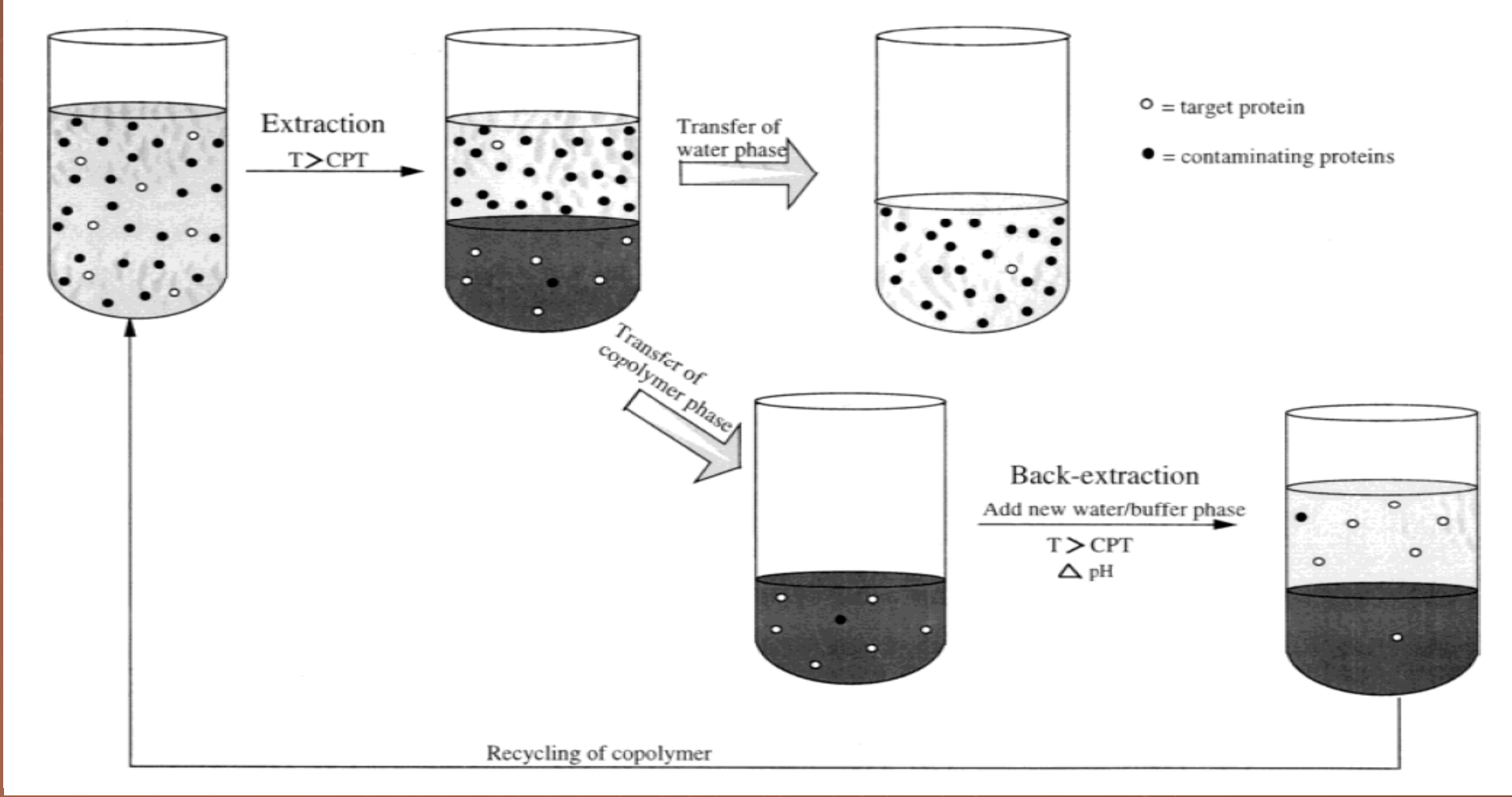
# Ch. na imobilizovaných kovových iontech



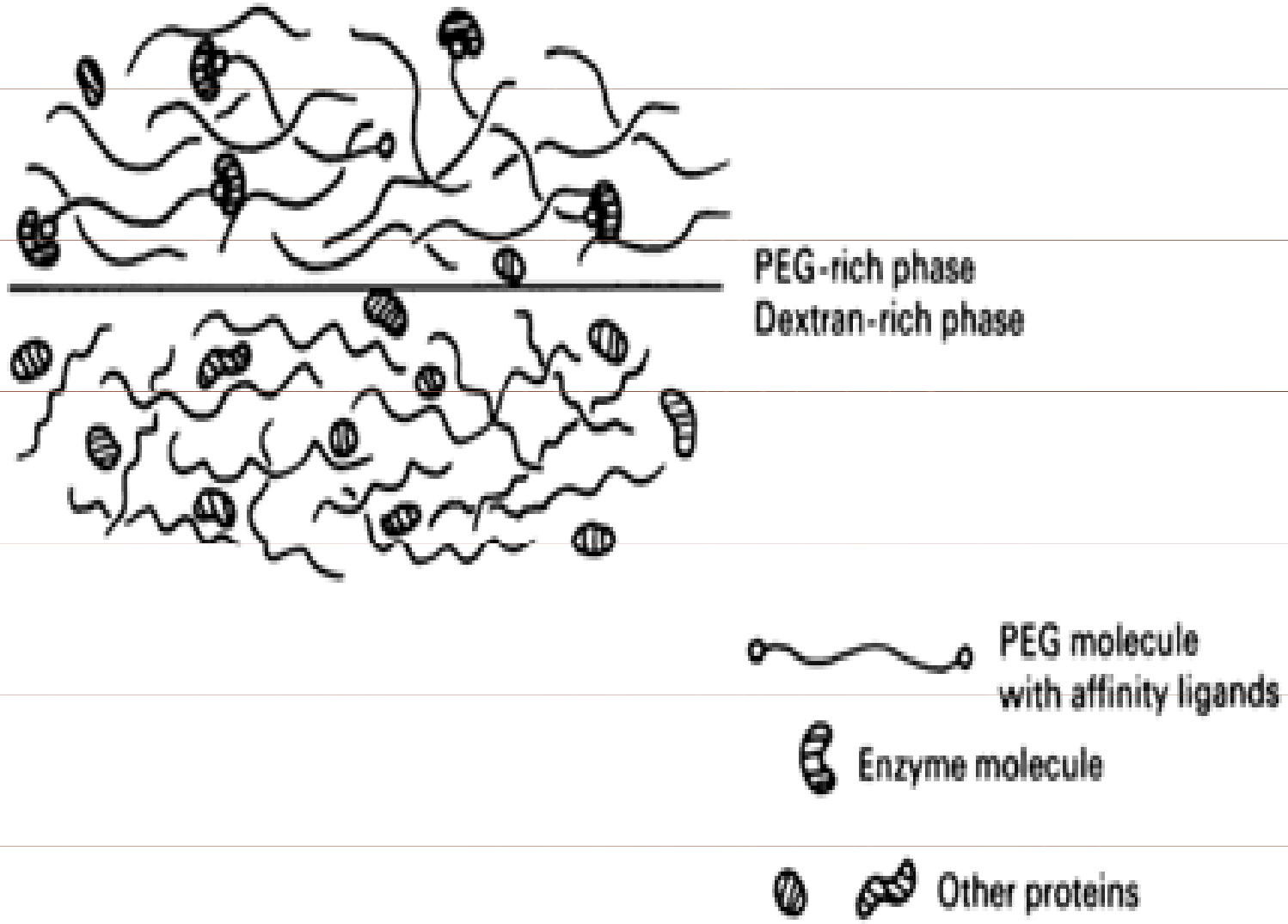
# Ch. na imobilizovaných kovových iontech



# Dvoufázové separace



# Afinitní dvoufázové separace



# Afinitní dvoufázové separace

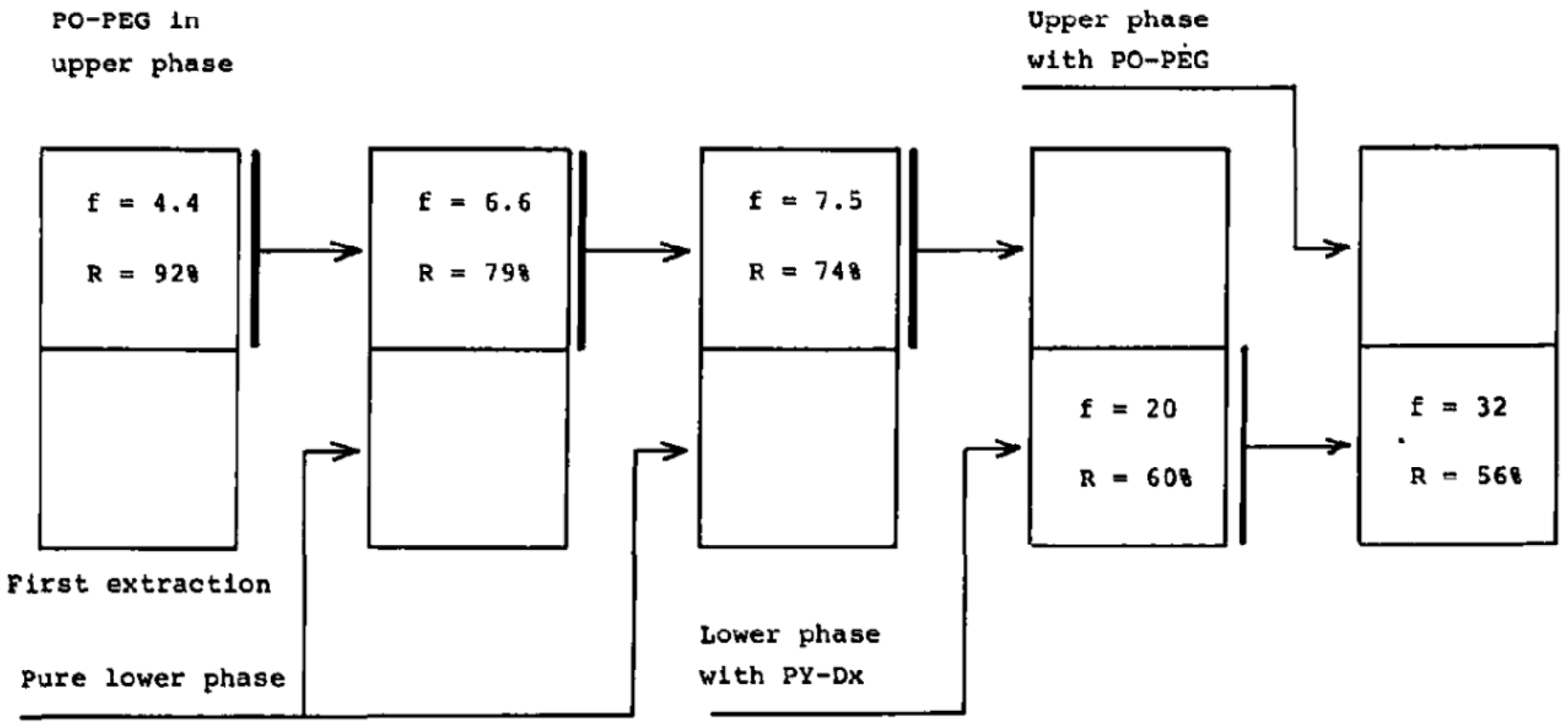
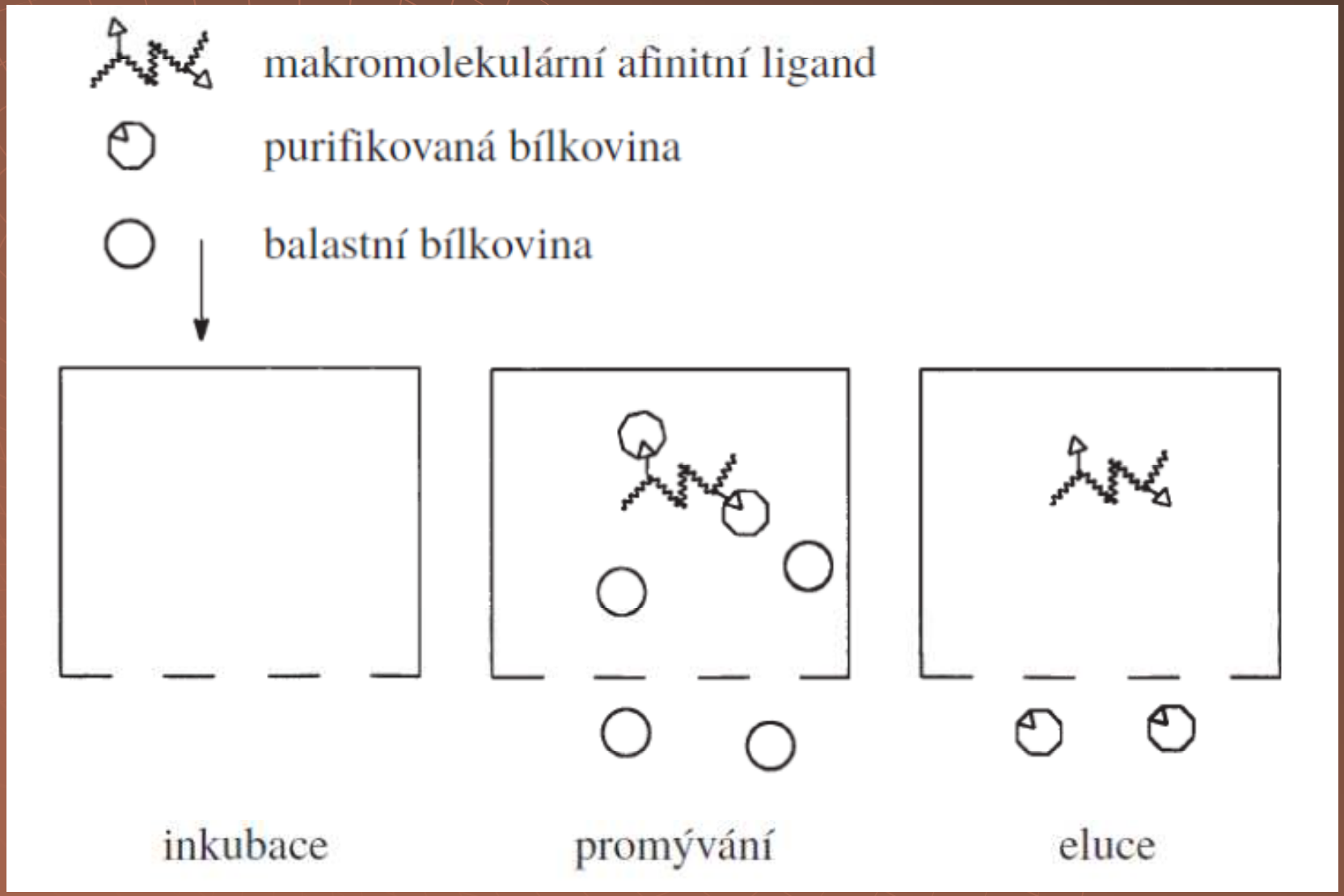
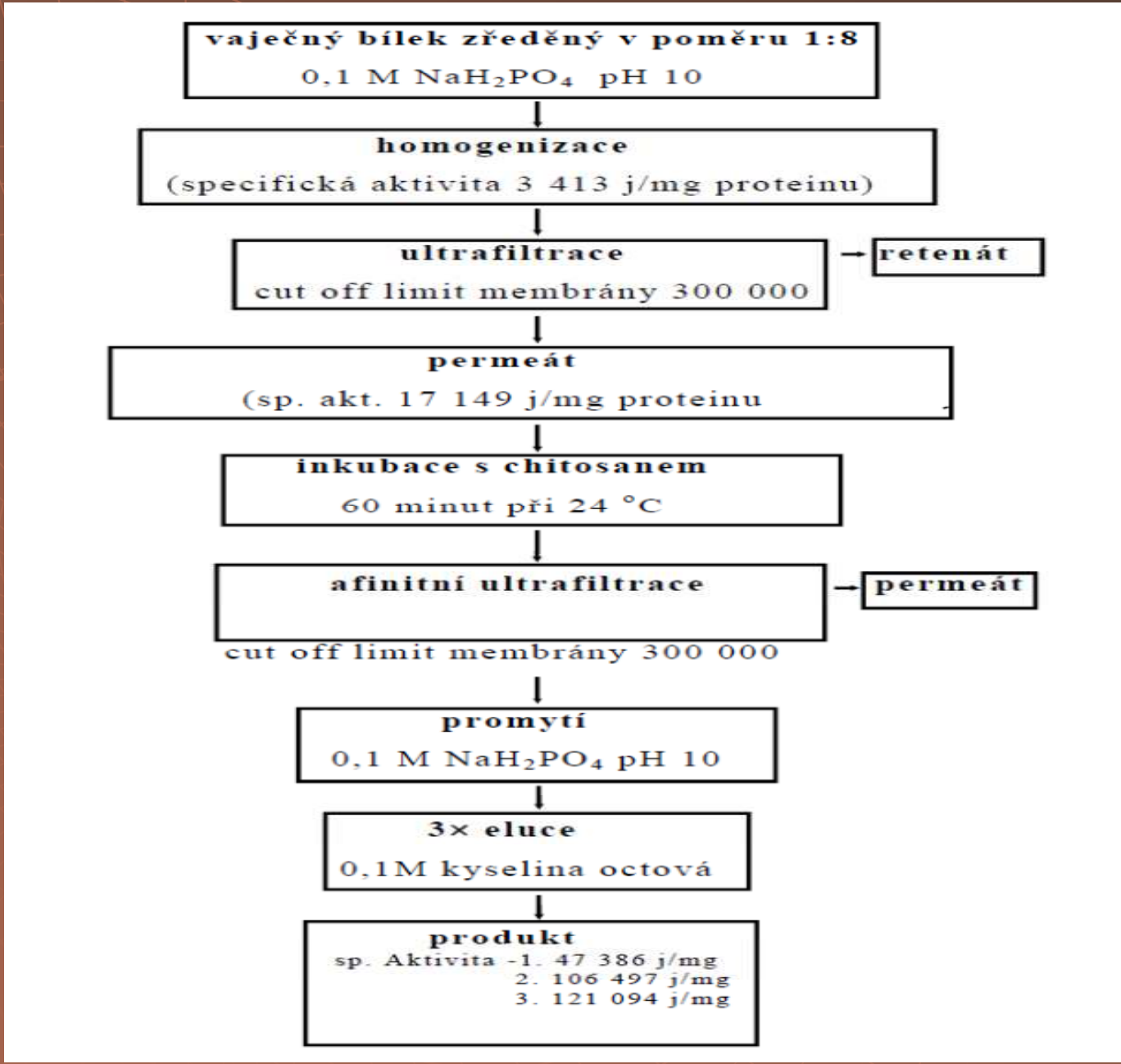



Fig. 1. Multistep extraction of glucose-6-phosphate dehydrogenase from a protein extract of baker's yeast. Procion olive MX-3G PEG (PO-PEG) and Procion yellow HE-3G dextran (PY-Dx) were included in a two-phase system containing 9% dextran ($M_r$ 70000), 5.5% PEG ($M_r$ 40000) and 45 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. $R$ = recovery of the enzyme; $f$ = total purification factor. From Johansson and Andersson (1984b).

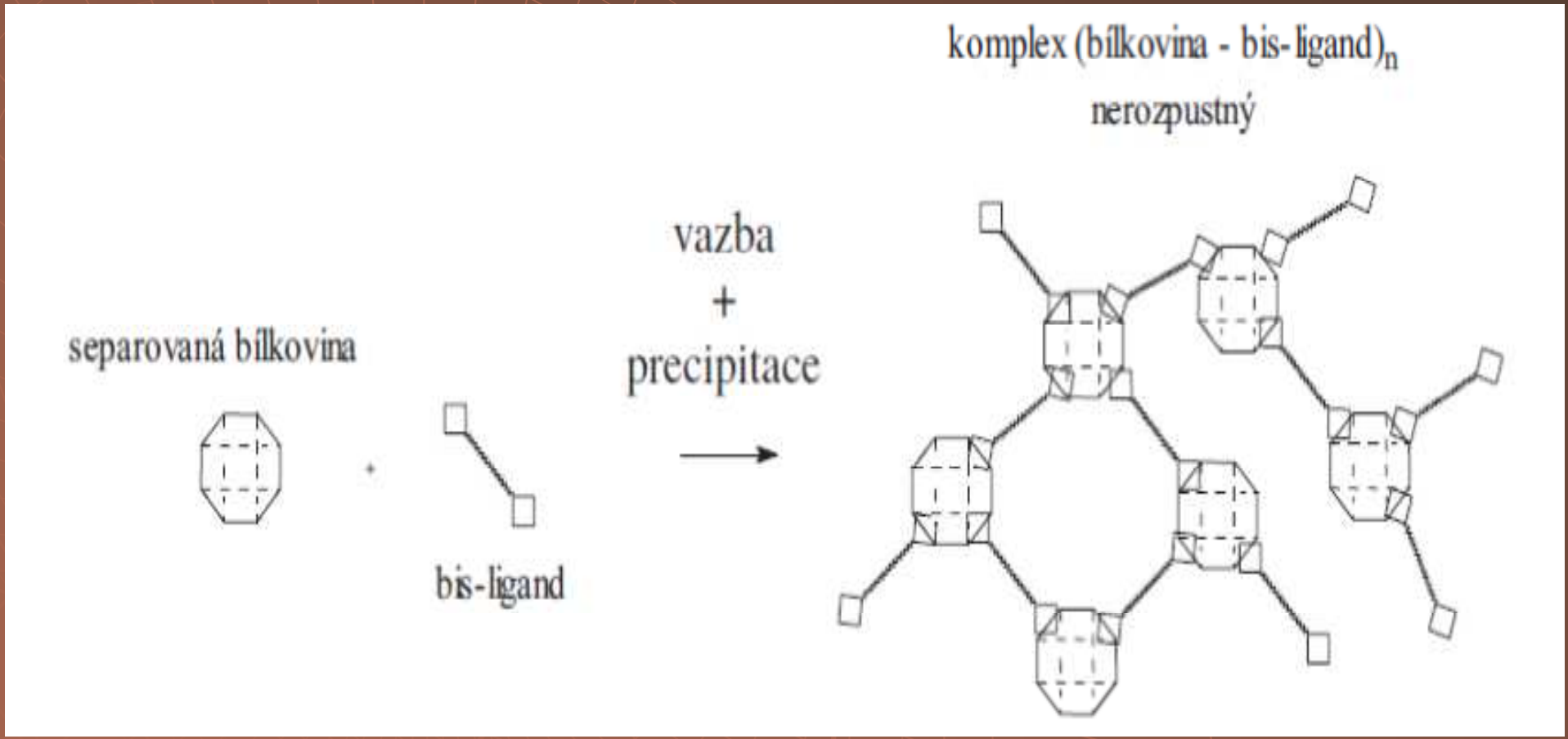
# Afinitní ultrafiltrace



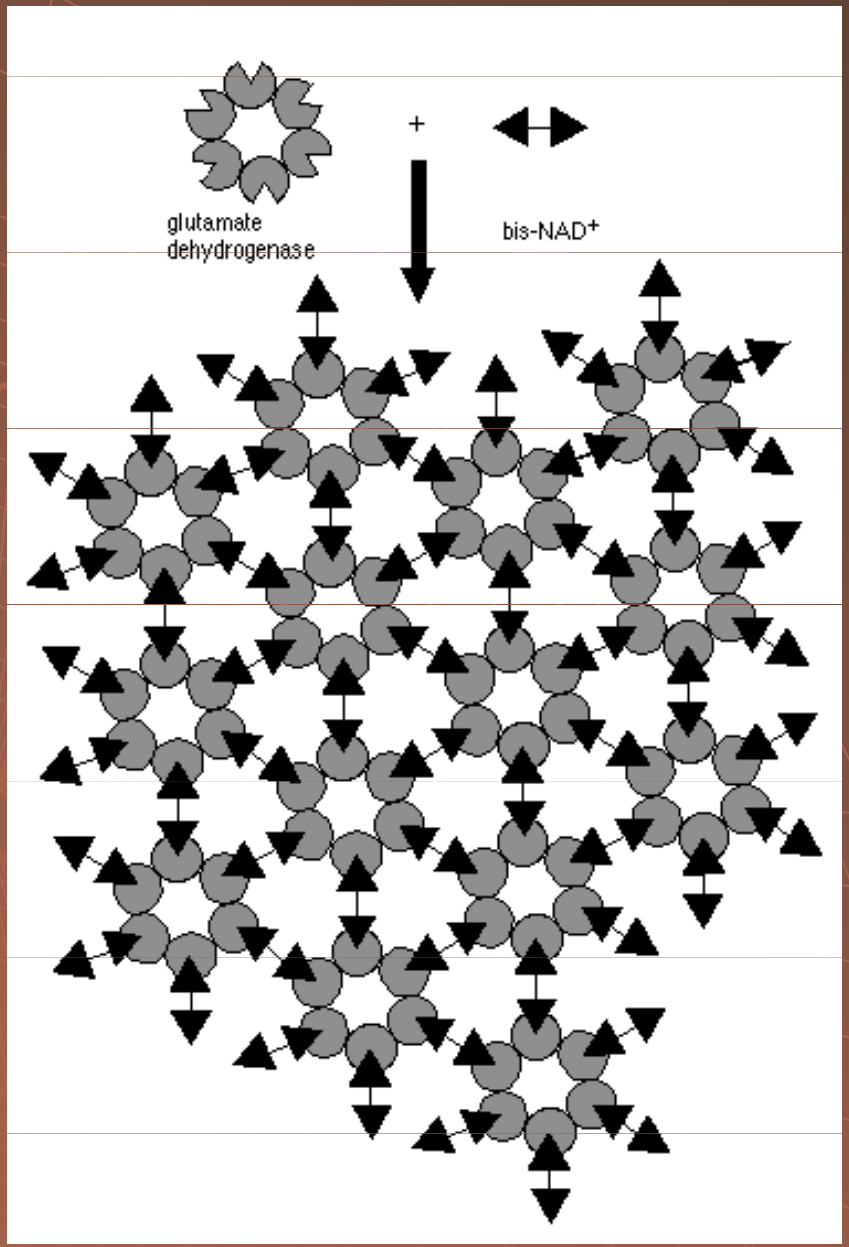
# Afinitní ultrafiltrace



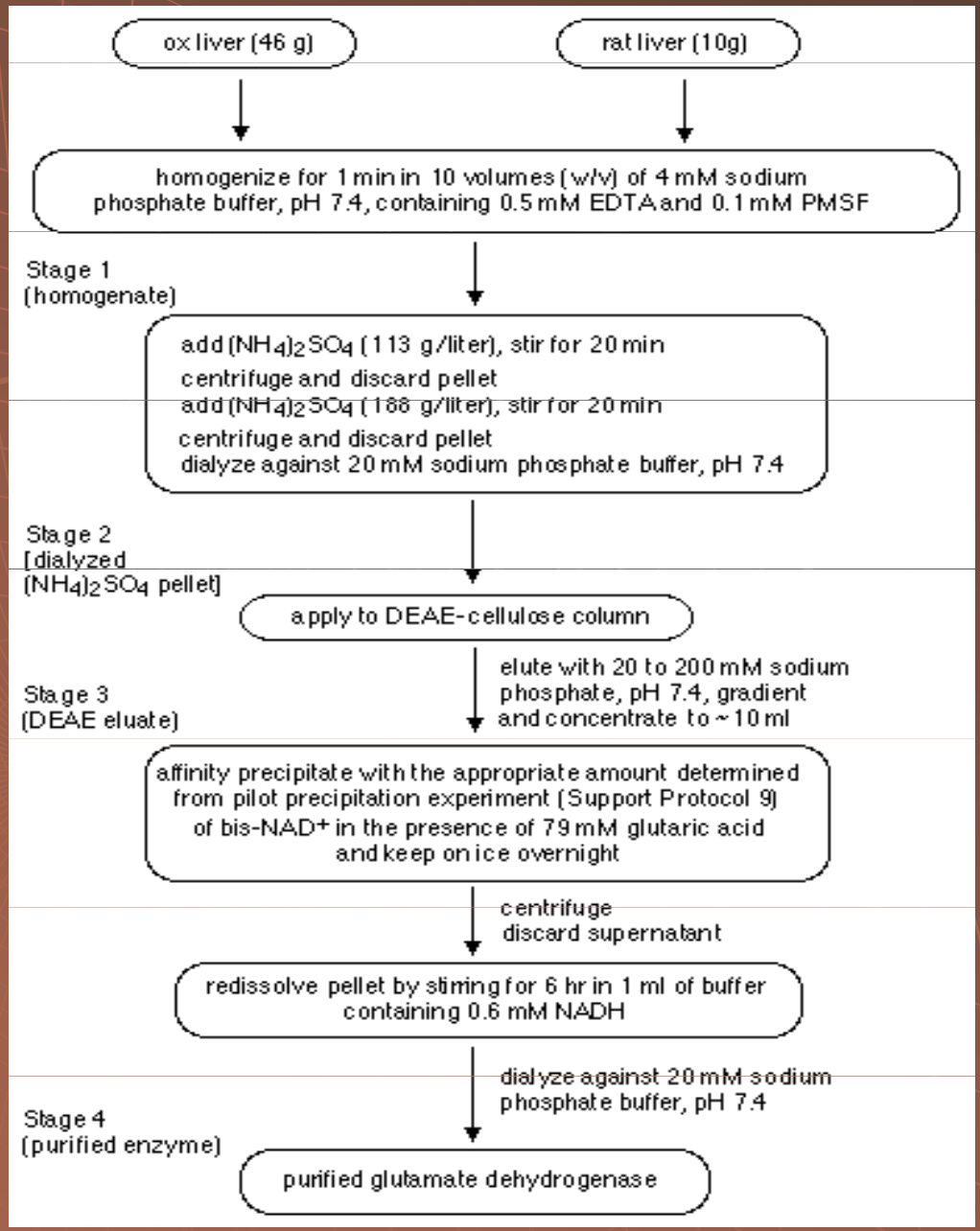
# Afinitní precipitace



# Afinitní precipitace



# Afinitní precipitace



# Afinitní precipitace

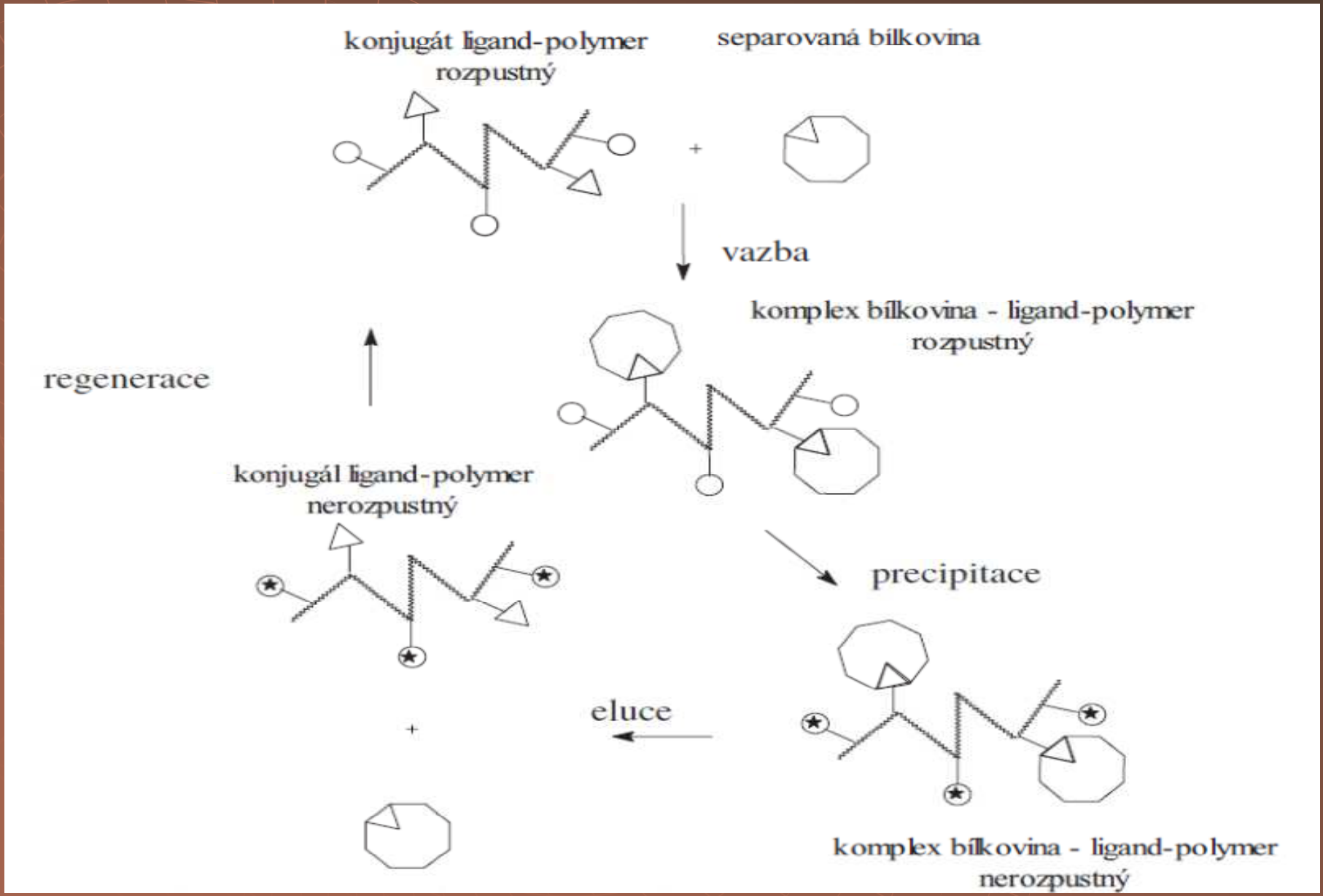
**Table 1.4.7** Purification of Glutamate Dehydrogenase From Ox Liver According to Alternate Protocol 1

| Stage (see Fig. 1.4.4) | Volume (ml) | Total protein (mg)[a] | Total activity (µmol/min) | Specific activity (µmol/min/mg) | Purification (*x*-fold) | Yield (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 370 | 8580 | 1920 | 0.2 | 1 | 100 |
| 2 | 75 | 2010 | 1640 | 0.3 | 4 | 86 |
| 3 | 8.4 | 139 | 408 | 2.9 | 13 | 21 |
| 4 | 1.2 | 9.4 | 376 | 40 | 180 | 20 |

[a]Protein concentration determined by the Lowry method.

**Table 1.4.8** Purification of Glutamate Dehydrogenase From Rat Liver According to Alternate Protocol 1

| Stage (see Fig. 1.4.4) | Volume (ml) | Total protein (mg)[a] | Total activity (µmol/min) | Specific activity (µmol/min/mg) | Purification (*x*-fold) | Yield (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 90 | 2720 | 760 | 0.3 | 1 | 100 |
| 2 | 35 | 980 | 505 | 0.5 | 2 | 67 |
| 3 | 9.8 | 130 | 195 | 1.5 | 5 | 26 |
| 4 | 1.0 | 9.4 | 190 | 37 | 140 | 25 |

[a]Protein concentration determined by the Lowry method.

# Afinitní precipitace