

2. Przygotowanie materiału dla chromatografii cieczonej

W zależności od celów i potrzeb stawianych badaniom stosowane są różne techniki ekstrakcji i separacji biomolekuł. W przypadku prac analitycznych często mniej uwagi poświęca się zachowaniu aktywności biologicznej analizowanych makromolekuł przy większym wysiłku skierowanym na dobór metod charakteryzujących się odpowiednią specyficnością i selektywnością. Prace mające na celu uzyskanie preparatów o akceptowanej aktywności biologicznej muszą być często prowadzone w warunkach kompromisu między zachowaniem pożądanego aktywności oraz jednorodności i czystości uzyskanego preparatu. Uświadomienie sobie tej dość oczywistej prawdy już na etapie projektowania badań pozwala właściwie sprecyzować cel oraz dokonać wyboru odpowiednich metod na wszystkich etapach pracy badawczej. Zwykle niedoceniane pierwsze etapy pracy eksperymentalnej, dotyczące doboru materiału wyjściowego oraz metod ekstrahowania interesujących nas obiektów, są podstawą sukcesu całego projektu badawczego.

Wybór materiału - stanowi pierwsze zadanie rzutujące na efektywność całego przedsięwzięcia. Niezmiernie istotne jest, aby materiał wyjściowy przeznaczony do ekstrakcji spełniał jak najwięcej warunków spośród niżej wymienionych: dostępność, zasobność w interesujące nas biomolekuły, stabilność tych biomolekuł, brak lub niska koncentracja innych cząsteczek podlegających ekstrakcji w zbliżonych warunkach oraz niski koszt uzyskania tego materiału. Bywa, że źródła materiału wyjściowego opisane w literaturze mogą być z powodzeniem zastąpione przez inne, lepiej spełniające wymienione warunki.

Wybór warunków ekstrakcji - jest kolejnym zadaniem, które odpowiednio zrealizowane wydatnie zwiększa szansę na końcowy sukces. W pierwszym rzędzie należy określić warunki, w których interesująca nas makromolekuła jest stabilna. Następnie należy dobrać warunki pozwalające na najbardziej efektywną ekstrakcję. Zwykle konieczny jest kompromis pomiędzy powyższymi warunkami, pozwalający na uzyskanie odpowiednio dobrej wydajności ekstrakcji przy zachowaniu wystarczającego poziomu aktywności. Spośród różnych czynników mogących znacząco wpływać tak na wydajność ekstrakcji jak i na stabilność ekstrahowanego materiału należy wymienić te, które mogą być przez nas kontrolowane. Są to:

a) *Temperatura i czas procesu ekstrakcji.* Zwykle obniżenie temperatury jest korzystne ze względu na znaczne ograniczenie rozwoju szkodliwych mikroorganizmów oraz spowolnienie procesów litycznej degradacji ekstrahowanych makromolekuł. Powoduje to jednak znaczne

wydłużenie czasu potrzebnego dla efektywnej ekstrakcji, co z kolei naraża cenny dla nas materiał na dłuższą ekspozycję na działanie mikroorganizmów oraz atak enzymów litycznych. Pewne zabezpieczenie przed niepożądaną degradacją ekstrahowanego materiału umożliwiają inne kolejno omawiane czynniki.

b) *Wartość pH.* Zazwyczaj wartość pH dobiera się tak, aby ekstrahowana molekula wykazywała maksimum swojej aktywności. Jednakże nie zawsze oznacza to zachowanie odpowiedniej stabilności cząsteczek. Bywa, jak w przypadku trypsyny, że obniżenie wartości pH znacznie poprawia stabilność izolatu dzięki ograniczeniu autolizy, przy pełnym odtworzeniu aktywności enzymatycznej w optymalnym pH. Ekstremalna zmiana wartości pH, jeżeli nie powoduje nieodwracalnych zmian w aktywności biologicznej izolowanej molekuly, może być również pożądana ze względu na ograniczenie aktywności litycznej enzymów obecnych w mieszaninie.

c) *Rodzaj soli buforujących.* Większość cząsteczek białkowych jest dobrze rozpuszczalna w buforach o średniej sile jonowej, z przedziału 0,05-0,1 M. Kompozycja składu buforu powinna brać pod uwagę ten warunek przy dodatkowym uwzględnieniu, że buforujące sole skutecznie utrzymują wartość pH tylko w dość bliskim otoczeniu ich wartości pK_a (około jednej jednostki). Dobór soli buforujących musi uwzględniać również i inne właściwości tych soli. Przykładowo cytrynian sodowy, często stosowany do sporządzania buforów, jest chelatorem jonów dwuwartościowych i fakt ten należy brać pod uwagę przy próbie ekstrakcji cząsteczek białkowych wymagających, dla zachowania aktywności, obecności jonów wapnia czy magnezu. Należy również zwrócić uwagę na to, że same cząsteczki białkowe działają jak bufony i mogą skutecznie wpływać na wypadkową wartość pH mieszaniny. Dobrze jest więc monitorować wartość pH mieszaniny ekstrakcyjnej, szczególnie wtedy, gdy mamy do czynienia ze słabym buforem (o małej pojemności buforowej) i wysokim stężeniem białka.

d) *Detergenty.* W wielu przypadkach molekula białkowa, będąca przedmiotem ekstrakcji, jest związana z błonami komórkowymi, lub układem innych molekuł, siłami pochodzącymi z oddziaływania hydrofobowego. W takiej sytuacji niezbędnym jest zredukowanie siły takiego oddziaływania, np. przez zastosowanie detergentów. Większość dostępnych detergentów nie ma negatywnego wpływu na stabilność ani aktywność ekstrahowanych molekuł, jednak niektóre - jak SDS (*sodium dodecyl sulphate* - siarczan dodecyłu sodu) - powodują zdecydowanie silną i często nieodwracalną denaturację cząsteczek. Należy zwrócić uwagę na inne aspekty stosowania detergentów. Niektóre białka ekstrahowane z błon komórkowych wymagają stałej obecności

niskich stężeń detergentu dla zachowania ich funkcjonalnych właściwości. Wynika to stąd, że cząsteczki detergentu wyparły w procesie ekstrakcji cząsteczki fosfolipidów, silnie oddziałujących z hydrofobowymi strukturami cząsteczki białka. Pozbawienie takiej cząsteczki obecności fosfolipidów, a później detergentu, prowadzi do nieodwracalnych zmian strukturalnych i utraty aktywności biologicznej. Jako przykład może posłużyć kompleks glikoprotein płytkowych GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$), który dla utrzymania swych właściwości receptora fibrynogenu, po ekstrakcji z błon płytek krwi, wymaga obecności jonów wapnia oraz detergentu. W przypadku innych molekuł białkowych często zachodzi potrzeba usunięcia nadmiaru detergentu przed kolejnymi etapami preparatyki. Wtedy równie ważne jak rodzaj zastosowanego detergentu jest jego stężenie. Zbyt wysokie stężenie detergentu, wyższe od wartości krytycznej dla tworzenia miceli, może być przyczyną poważnych trudności z jego usunięciem łatwo dostępnymi środkami (dializa, filtracja żelowa). Przykładowo, Triton X-100 tworzy micelle już przy stężeniu przekraczającym nieznacznie 0,02%, a Octyl glucoside przy stężeniu 0,7%. Korzystnie w tym kontekście prezentuje się Nonidet P40, który bardzo niechętnie tworzy micelle, nawet w znacznych stężeniach. Trudności z usunięciem detergentu nakazują rozważenie w jego wyborze również wtedy, gdy wyizolowane molekuly będą użyte do badań technikami spektrofotometrycznymi, a szczególnie spektrofluorescencyjnymi. Zdecydowana większość dostępnych detergentów silnie pochłania i/lub emituje światło w szerokim zakresie widmowym, interferując ze stosowanymi fluoroforami. W tym przypadku zdecydowanie korzystnie wyróżnia się Chaps, który traktowany jest jako cichy elektrycznie i optycznie.

e) *Czynniki chaotropowe.* Efektywność ekstrakcji podobną do osiąganą w obecności detergentów można uzyskać dzięki czynnikom chaotropowym, to jest takim, które pomagają makromolekułom pozostać w środowisku wodnym, przy jednoczesnym osłabieniu oddziaływań hydrofobowych. Właściwości takie wykazują bardzo różnorodne substancje organiczne, takie jak mocznik czy chlorowodorek guanidyny, jak również nieorganiczne jony zgrupowane w prawej części szeregu Hofmeistera (1), szczególnie aniony Cl^- , Br^- czy I^- . Stosowanie mocznika lub chlorowodoru guanidyny jest bardzo przydatne dla ekstrakcji i utrzymania w środowisku wodnym bakteryjnych ciałek inkluzyjnych (2), co jest często podstawowym warunkiem izolowania i oczyszczania białek rekombinowanych. Stosowanie nieorganicznych czynników chaotropowych pozwala również efektywnie ekstrahować białka z błon komórkowych. Przykładowo, do ekstrakcji receptora $\text{Fc}\gamma\text{R}_{II}$ z błon płytek krwi z powodzeniem zastosowano bromek potasu w stężeniu 2M (3). W praktycznych zastosowaniach należy unikać jednoczesnego

stosowania detergentów i środków chaotropowych. Połączenie tych środków nie potęguje ich działania, a wręcz przeciwnie utrudnia ekstrakcję większości molekuł białkowych.

f) *Czynniki redukujące.* Wewnątrzkomórkowe molekuly białkowe mają często wyeksponowane grupy tiolowe, które mogą z łatwością ulegać utlenieniu w warunkach ekstrakcji i w dalszych etapach preparatyki. Grupy te mogą być skutecznie zablokowane przez czynniki redukujące takie jak DTE (1,4-*ditioerytriol*), DTT (1,4-*ditiotreitol*) czy merkaptoetanol. Stężenie rzędu 10-25 mM czynnika redukującego jest zwykle wystarczające dla zabezpieczenia wolnych grup tiolowych bez obserwowanej redukcji wewnątrz-cząsteczkowych wiązań dwusiarczkowych.

g) *Jony metali oraz ich chelatory.* Jak zostało to przedstawione przy okazji dyskusji stosowania detergentów, obecność niektórych jonów dwuwartościowych w mieszaninie ekstrakcyjnej, szczególnie jonów wapnia i magnezu, może być niezbędna dla utrzymania funkcjonalnych właściwości ekstrahowanych molekuł białkowych. Jednak w większości przypadków obecność jonów metali ciężkich prowadzi do powstawania wielkocząsteczkowych kompleksów, co znacznie komplikuje proces ekstrakcji. Problem ten można rozwiązać dzięki zastosowaniu związków chemicznych wykazujących duże powinowactwo do tych jonów. Związki takie nazwano chelatorami, a proces wiązania jonów - chelatowaniem. Najczęściej stosowanymi chelatorami są: EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid* - kwas etylenodiaminotetraoctowy) oraz EGTA (*ethyleneglycol-O-O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N' tetraacetic acid* - kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetraoctowy), stosowane zwykle w stężeniach rzędu 5-25 mM. Warto zwrócić uwagę, że EGTA chelatuje z dużą preferencją jony wapnia, przez co często nazywa się ten związek chelatorem wapnia. EDTA jest stanowczo mniej selektywnym chelatorem, a jednocześnie jest dość silnym związkiem buforującym i należy uwzględnić jego wkład przy projektowaniu składu buforu lub dodawać go przed końcowym ustaleniem wartości pH.

h) *Inhibitory proteolityczne oraz czynniki bakteriostatyczne.* Obecność proteaz w mieszaninie ekstrakcyjnej jest właściwie nieunikniona. Aby ograniczyć destrukcyjny wpływ proteaz na ekstrahowane cząsteczki białka najlepiej jest prowadzić proces ekstrakcji w niskiej temperaturze, co znakomicie obniża aktywność lityczną proteaz oraz ograniczyć czas trwania ekstrakcji. Niestety, jednoczesne spełnienie obu tych warunków jest najczęściej niemożliwe. Można próbować zmienić pH do wartości, w której aktywność proteolityczna jest znacznie ograniczona, ale jest to możliwe tylko wtedy, gdy takie zmiany wartości pH tolerowane są przez ekstrahowane molekuly białkowe. Jeżeli i ten sposób zawodzi, niezbędne jest stosowanie dość kosztownych

inhibitorów proteaz. Najczęściej stosuje się połączenie inhibitorów proteaz serynowych - 0.5 mM PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*) lub 1 μ M Leupeptyna, proteaz kwaśnych - 1 μ M Pepstatyna A, oraz metalo-proteaz - 5 mM EDTA. Niepożądanym i trudnym do kontroli źródłem proteaz oraz innych białek mogą być bakterie, łatwo rozwijające się w preparatach bogatych w białko. Najlepszym sposobem uniknięcia infekcji bakteryjnej w mieszaninie ekstrakcyjnej jest stosowanie jałowych buforów i naczyń. Jednak długotrwałe procesy ekstrakcji zawsze zagrożone są infekcją bakteryjną. W takiej sytuacji należy rozważyć zastosowanie czynników bakterio-statycznych, takich jak azydek sodowy (0.01%) czy n-butanol (1%). W niektórych przypadkach wskazane jest, podobnie jak w hodowli komórkowej, stosowanie antybiotyków.

Wszystkie dyskutowane powyżej czynniki należy uwzględniać w kolejnych po ekstrakcji etapach oczyszczania i separacji makromolekuł białkowych. Powyższy przegląd został skupiony na problemach związanych z ekstrakcją peptydów i białek. Kwasy nukleinowe nie są tak czułe na zmiany strukturalne jak cząsteczki białkowe, co znacznie ułatwia proces ich ekstrakcji. Ważnym jest jednak aby podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych nie dopuścić do ich degradacji, co jest szczególnie istotne w odniesieniu do RNA, bardzo podatnego na działanie RNaz. Metody ekstrakcji i izolowania kwasów nukleinowych, w przeciwieństwie do metod stosowanych przy ekstrakcji białek i peptydów, doczekały się unifikacji i obecnie wiele firm działających w obszarze biologii molekularnej oferuje gotowe zestawy służące do ekstrakcji i oczyszczania DNA i RNA.

Wstępne frakcjonowanie ekstraktu - precypitacja. Proces ekstrakcji makromolekuł nie wieńczy dzieła, a wręcz przeciwnie stawia kolejne zadanie, polegające na wyodrębnieniu interesującej nas molekule z uzyskanej mieszaniny poekstrakcyjnej (ekstraktu). Proces separacji wyekstrahowanych makromolekuł często nazywa się procesem frakcjonowania, a jedną z najprost-szych metod frakcjonowania ekstraktu jest jego precypitacja. Precypitacja polega na selektywnym wytrącaniu makromolekuł z roztworu przy zastosowaniu czynnika precypitującego, użytego w odpowiednim stężeniu i działającego w odpowiednich warunkach. Najczęściej stosowanymi czynnikami precypitującymi są:

- a) sole o własnościach antychaotropowych - znajdujące się w lewej części serii Hofmeistera (siarczan amonu, siarczan sodu, i inne),
- b) b) rozpuszczalniki organiczne (aceton, etanol),

c) c) polimery organiczne (glikol polietylenowy – *polyethylene glycol* PEG).

Sole o właściwościach antychaotropowych powodują zwiększoną ekspresję hydrofobowych regionów cząsteczki, skutkiem czego staje się ona słabiej rozpuszczalna w środowisku wodnym, a bardziej podatna na tworzenie dużych agregatów, co z kolei ułatwia wypadanie jej z roztworu - czyli precypitację. Organiczne rozpuszczalniki oraz polimery ograniczają aktywność dipoli cząsteczek wody w oddziaływaniu z makromolekułami poprzez proste wypieranie tych dipoli, co również skutkuje zwiększoną ekspresją hydrofobowych regionów makrocząsteczki, tendencją do tworzenia agregatów i w rezultacie wypadaniem cząsteczek z roztworu. Istnieje jeszcze inny sposób wytrącania cząsteczek białkowych z roztworu. Otóż molekuly białkowe są najslabiej rozpuszczalne w środowisku o pH odpowiadającym wartości ich punktów izoelektrycznych, co pozwala strącać je poprzez zmiany wartości pH. Każda cząsteczka białkowa wypada z roztworu w dość dokładnie zdefiniowanych warunkach. Stosując narastające stężenie czynnika precypitującego, lub zmieniając wartość pH, i kojarząc to z wirowaniem frakcjonowanego ekstraktu, można z dużym powodzeniem uzyskać szereg frakcji, charakteryzujących się różnym składem cząsteczkowym, czyli uzyskać efekt separacji makromolekuł.

Warto zauważyć, że wydajność procesu precypitacji uzależniona jest od możliwości tworzenia dużych agregatów, co niestety ogranicza możliwość stosowania precypitacji rozcieńczonych roztworów. Choć technicznie proces precypitacji nie jest skomplikowany, to jednak selektywność tej metody nie jest zadowalająca. W związku z tym precypitację stosuje się często jako wstępną metodę frakcjonowania ekstraktów, po której następują kolejne etapy separacji, najczęściej techniki chromatografii cieczowej.

Niezmiernie ważnym jest aby proces precypitacji makromolekuł przebiegał w niskiej temperaturze, co może skutecznie zabezpieczać aktywność biologiczną frakcjonowanych makrocząsteczek. Dodanie do ekstraktu soli lub rozpuszczalników organicznych skutecznie obniża temperaturę krzepnięcia i umożliwia prowadzenie precypitacji w temperaturze poniżej 0°C. Wytrącone z roztworu molekuly białkowe (strął lub precypitat) zwykle z łatwością można przywrócić ponownie do stanu rozpuszczonego stosując odpowiedni dla danych molekuł rozpuszczalnik. W takiej też formie stosuje się wstępnie rozfrakcjonowany materiał w kolejnych etapach separacji molekuł.

Czasami proces precypitacji pozwala pozbyć się z roztworu niepożądanych cząsteczek, a pozostawić w roztworze molekuly, które są przedmiotem naszego zainteresowania. Niestety, znaczne w tym przypadku stężenie czynnika precypitującego wymaga zwykle przygotowania

preparatu przed kolejnymi etapami separacji molekuł (dializa, wymiana buforowa przez filtrację żelową, ultrafiltracja).

Podział w fazach ciecz-ciecz. Całkowicie odmiennym podejściem pozwalającym na wstępne frakcjonowanie ekstraktu jest technika podziału molekuł między dwie fazy ciekłe o różnych właściwościach. Najczęściej fazy ciekłe zawierają różne polimery (PEG, dextran) lub sole. Stosując roztwór wodny PEG, jako pierwszą fazę, oraz roztwór wodny dextranu jako fazę drugą, można uzyskać podział molekuł ekstraktu między te dwie fazy. Często bywa, że na granicy obu faz również układają się pewne molekuły, których preferencje w stosunku do obu faz są zbliżone. Technika jest stosunkowo prosta. Płynny ekstrakt miesza się z obydwoma fazami i po odczekaniu aż fazy rozdzielią się, zbiera się je wraz z zawartymi w nich makromolekułami. Proces ten można powtarzać wielokrotnie, zmieniając nieco składy faz, uzyskując w ten sposób dalsze frakcjonowanie użytego materiału. Znaczącą modyfikacją procesu podziału między fazy, bardzo zwiększającą specyficznosc procesu, jest zastosowanie chemiczne związane z cząsteczkami polimeru jednej z faz liganda selektywnie wiążącego interesującą nas molekułę (4). Postępowanie takie pozwala zwykle uzyskać dobrze oczyszczony materiał w kilku krokach preparatyki.

Ultrafiltracja. Jest to kolejny sposób na wstępne frakcjonowanie ekstraktu. Stosowanie membran o dokładnie zdefiniowanej porowatości pozwala na separację makromolekuł ze względu na ich wielkość. Dolny limit odcięcia (*ang. cutoff limit*) przypada na wartość masy cząsteczkowej około 1000 i przy dużym wyborze wartości pośrednich limit ten sięga wartości 300 000. Limit odcięcia mówi o maksymalnej wielkości molekuł białkowych, mierzonej ich masą cząsteczkową MW, które mogą penetrować porowatości membrany i w ten sposób być usunięte z mieszaniny poddanej ultrafiltracji. Proces ten przypomina nieco proces dializy, ale zastosowanie sił zewnętrznych, ciśnień wymuszających przepływ rozpuszczalnika wraz z molekułami o masach poniżej dolnego limitu odcięcia, pozwala na szybką i efektywną separację molekuł. Warto pamiętać również o tym, że technika ultrafiltracji pozwala na łatwą wymianę składu buforu, w tym odsalanie oraz na zagęszczanie preparatu, co może być przydatne gdy zawodzi precypitacja zbyt rozcieńczonych roztworów.

Łatwo zauważyć, że frakcjonowanie przez ultrafiltrację pozwala wstępnie rozdzielić makromolekuły ze względu na ich wielkość, podczas gdy precypitacja pozwalała frakcjonować

makromolekuły ze względu na ich hydrofobowość (wysalanie i stosowanie rozpuszczalników organicznych) oraz ich właściwości elektryczne (wytrącanie przez zmianę pH). Można w tych metodach dojrzyć idee, które legły u podstaw technik chromatografii ciekowej. Prekursorem chromatografii oddziaływań hydrofobowych (*hydrophobic interaction chromatography* – HIC) oraz chromatografii odwróconej fazy (*reversed phase chromatography* – RPC) jest precypitacja, związana ze zmianami w ekspozycji regionów hydrofobowych makrocząsteczek w obecności jonów chaotropowych, rozpuszczalników polarnych lub polimerów organicznych. Chromatografia jonowymienna (*ion exchange chromatography* – IEC) odpowiada precypitacji wywołanej zmianami pH, co wiąże się ściśle z właściwościami elektrycznymi makromolekuły, natomiast filtracja żelowa (*gel filtration chromatography* – GFC), inaczej zwana sączeniem molekularnym (*size exclusion chromatography* – SEC), jest rozwinięciem procesu ultrafiltracji. Natomiast odpowiednikiem chromatografii adsorpcyjnej jest technika podziału makromolekuł pomiędzy fazy wodnych roztworów polimerów. Ten rodzaj frakcjonowania, zmodyfikowany poprzez wprowadzenie chemicznie związanych z polimerem ligandów, jest odpowiednikiem chromatografii powinowactwa (*affinity chromatography* – AC). Należy jednak stwierdzić, że pomimo dużych podobieństw różnych technik frakcjonowania makromolekuł z technikami chromatografii ciekowej, ta ostatnia pozwala na znacznie lepszą kontrolę procesów separacji makromolekuł, ich skalowanie i automatyzację.

2.1. Literatura

1. Hofmeister F. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **24**, 247, 1988.
2. Marston F.A.O. *Biochem. J.*, **240**, 1, 1986.
3. Cheng C.M., Hawiger J. *J. Biol. Chem.*, **254**, 2167, 1979.
4. Walter H., Brooks D.E., Fisher D. *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Theory, Methods, Uses, and Applications in Biotechnology*, Academic Press, Orlando 1985.