

6. Chromatografia oddziaływań hydrofobowych (*hydrophobic interaction chromatography* – HIC)

Przeważająca większość makrocząsteczek posiada skomplikowaną strukturę wewnętrzną, w której można wyróżnić zarówno obszary hydrofilowe – eksponowane na zewnątrz cząsteczki w polarnym otoczeniu wody, jak i obszary hydrofobowe – ukryte w jej wnętrzu i eksponowane na zewnątrz przy zmianie środowiska na niepolarne. Zarówno ilość takich obszarów hydrofobowych, jak i ich umiejscowienie w strukturze cząsteczki stanowią indywidualną cechę makrocząsteczek. Umożliwia to ich rozdział ze względu na odmienne właściwości hydrofobowe.

6.1. Podstawy teoretyczne chromatografii oddziaływań hydrofobowych

Chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC) jest szeroko wykorzystywana do separacji i oczyszczania makrocząsteczek białkowych. Białka adsorbowane są na złożu dzięki występowaniu oddziaływań hydrofobowych fragmentów białka z silnie hydrofobowymi grupami ligandów, trwale umocowanych na powierzchni nośnika pozbawionego ładunku elektrycznego. Różne czynniki mają wpływ na zachowanie się cząsteczek białkowych w kontakcie z hydrofobowym adsorbentem. Niektóre z nich mają krytyczny wpływ na rozdzielczość i selektywność metody, a także zdolność wiązania cząsteczek przez złoże. Poniżej są wymienione i omówione najważniejsze czynniki, tj:

- typ liganda oraz jego gęstość na powierzchni nośnika,
- rodzaj nośnika,
- rodzaj i stężenie soli,
- stężenie jonów wodorowych - pH,
- temperatura,
- skład solwentów.

Typ liganda unieruchomionego na nośniku (łańcuch alkilowy lub aromatyczne grupy aryłowe) determinuje sposób adsorpcji makrocząsteczek. Liniowe łańcuchy alkilowe wykazują zdolność do czysto hydrofobowego oddziaływania, podczas gdy ligandy aryłowe mają mieszane własności, tj. oddziałują zarówno przez liniowe fragmenty łańcucha, jak i wykorzystują wiązania typu π - π (z aromatycznych pierścieni grup aryłowych). Przy stałej gęstości powierzchniowej liganda, pojemność złoża do wiązania białek wzrasta wraz z długością łańcuchów alkilowych, jednakże siła z jaką ulegną wiązaniu duże

makromolekuły z długimi łańcuchami alkilowymi może być na tyle duża, że trudno będzie przeprowadzić desorpcję tych makromolekuł ze złoża. Wybór między ligandem alkilowym a arylowym dokonywany jest zwykle drogą prób, osobno dla każdego rodzaju rozdzielanych makromolekuł oraz warunków, w jakich separacja ta ma się odbywać. Pomocne są w tym względnie zestawy złożów z różnymi rodzajami związanych ligandów (kolumny – **HiTrap**), pozwalające w bardzo prosty sposób, z zastosowaniem strzykawki, dokonać wyboru odpowiedniego złoża oraz liganda.

Gęstość powierzchniowa liganda w zdecydowany sposób wpływa na pojemność wiązania makromolekuł i na siłę tego wiązania. Wraz ze wzrostem gęstości liganda wzrasta pojemność wiązania, aż do osiągnięcia stanu wysycenia przy około 30 milimolach liganda na 1 ml żelu. Dzięki możliwości realizacji wielopunktowego oddziaływania wzrasta również siła wiązania makromolekuł do liganda. Jednak zbyt silnie związane makromolekuły trudno później usunąć z żelu, dlatego istotny jest odpowiedni dobór liganda i jego gęstości powierzchniowej.

Rodzaj zastosowanego nośnika ma duże znaczenie przy wyborze warunków wiązania i elucji zaadsorbowanych makromolekuł. Zasadniczo stosowane są trzy rodzaje nośnika:

- usieciowana agaroz (Sephacrose)
- syntetyczne polimery silikonowe
- polimery akrylamidowe.

Wszystkie typy stosowanego nośnika wykazują właściwości hydrofobowe, ale o różnym natężeniu. Jest to przyczyną różnic w oddziaływaniu makromolekuł z hydrofobowym ligandem unieruchomionym na odmiennie hydrofilowej powierzchni. Z tego też powodu trudno jest przenosić doświadczenie uzyskane przy udziale jednego typu nośnika na inny jego typ. Zmiana nośnika wymaga często zmiany warunków adsorpcji i elucji.

Rodzaj i stężenie soli bardzo silnie wpływają na oddziaływanie białko-ligand w chromatografii hydrofobowej. Ze wzrostem stężenia soli wzrasta ilość białka związanego z hydrofobowymi ligandami. Początkowo wzrost ten jest liniowy, ale powyżej pewnego stężenia ilość białka związanego przez ligandy wzrasta wykładniczo. Wykładniczy wzrost ilości związanego białka obserwuje się przy stężeniu soli, w którym zachodzi wysalanie tego białka. Białko wytrąca się wówczas na kolumnie chromatograficznej. Efekt ten, pomimo obserwowanego wzrostu ilości wiązania białka, ma ujemny wpływ na selektywność rozdzielania chromatograficznego i należy go unikać. Poza stężeniem soli również jej rodzaj ma duże znaczenie dla wydajności i selektywności wiązania oraz elucji białek. Wszystkie typy soli rozpuszczalne w wodzie zostały uszeregowane ze względu na zdolność wysalania białek (seria Hofmeistera). Nie wszystkie sole mają jednak podobne znaczenie w praktyce

chromatograficznej. Najważniejsze z nich, uszeregowane według intensywności efektu wysalania, podane są poniżej (1):



Jak widać, siarczany sodu, potasu i amonu mają najsilniejszy efekt wysalania białek i one też powodują największe ilościowo wiązanie białek do hydrofobowych ligandów. Nieco słabsze są fosforan i chlorek sodu, które jednak pozwalają uzyskać zdecydowanie lepszą selektywność wiązania i elucji białek. Większość białek związanych z hydrofobowym ligandem daje się stosunkowo łatwo odmyć stosując jako eluent tę samą sól, ale w niższym stężeniu.

Stężenie jonów wodorowych (wartość pH) jest czynnikiem, który musi być uwzględniany przy optymalizacji rozdziału w technice HIC. Zaobserwowano, że siła oddziaływań hydrofobowych białka z hydrofobowym ligandem jest tym większa, im niższa jest wartość pH. Z drugiej strony, podwyższenie wartości pH umożliwia rozbitcie wielopunktowych oddziaływań hydrofobowych pomiędzy makromolekułą a długimi alifatycznymi łańcuchami, gęsto unieruchomionymi na powierzchni nośnika. Jednak wartość pH powyżej 8,5 sprzyja występowaniu silnych oddziaływań hydrofobowych.

Temperatura odgrywa istotną rolę we właściwym przeprowadzeniu rozdziału HIC. Ogólnie rzecz biorąc obserwuje się znaczne różnice w selektywności separacji makromolekuł w różnych temperaturach. Wynika to stąd, że oddziaływania hydrofobowe makromolekuł z hydrofobowym ligandem mają charakter sił van der Waalsa, które są zależne od temperatury. Im wyższa temperatura, tym oddziaływania hydrofobowe są silniejsze. Jednak pewne białka wykazują nieco odmiennie właściwości hydrofobowe w funkcji temperatury. Te odstępstwa od reguły przypisuje się odwrotnym zmianom konformacyjnym i związanym z nimi zmianom w rozpuszczalności tych białek w funkcji temperatury.

Skład solwentów może decydować zarówno o sile oddziaływań hydrofobowych makromolekuł z hydrofobowym ligandem, jak i o selektywności tych oddziaływań. Wpływ różnych rodzajów i stężeń soli został omówiony powyżej. Zastosowane inne czynniki, takie jak alkohole i detergenty, zdecydowanie obniżają siłę wiązania białka z ligandami, konkurując z nimi o miejsca wiążące na ligandzie. Efekt ten może być wykorzystywany do poprawienia selektywności wiązania i elucji białek. Należy jednak zawsze mieć na uwadze możliwość denaturacji makromolekuł przez alkohole, oraz trwałe zmiany konformacyjne dokonywane w strukturze białka przez detergenty. Niezależnie od tego, alkohole i detergenty mogą być bardzo przydatne w czyszczeniu (sanityzacji) kolumn.

Zalety i wady techniki chromatografii oddziaływań hydrofobowych

Zalety:

- w technice gradientowej objętość próbki nanoszonej na kolumnę może być wielokrotnie większa od objętości kolumny, a stężenie separowanych substancji może być bardzo niskie;
- technika ta pozwala na wielokrotne zateżenie wyjściowego materiału;
- pojemność kolumny jest zwykle bardzo duża;
- rozdzielczość metody jest wysoka.

Wady:

- składniki eluowane w solwencie o dużym stężeniu soli muszą być dializowane lub poddawane rechromatografii techniką filtracji żelowej w celu usunięcia nadmiaru soli.

6.2. Złoża stosowane w chromatografii oddziaływań hydrofobowych

Złoża do chromatografii oddziaływań hydrofobowych różnią się zarówno rodzajem nośnika jak i rodzajem oraz długością hydrofobowych ligandów. W tabeli 6.1. zestawiono niektóre właściwości złożeń najczęściej stosowanych w technice HIC. Należy zwrócić uwagę, że złoża te zostały przewidziane dla technik chromatografii niskociśnieniowej i nie spełniają warunków wymaganych w systemach **FPLC** lub **HPLC**. Dla tych systemów przewidziano złoża, których nośniki charakteryzują się lepszymi parametrami mechanicznymi (tabela 6.2.).

Tabela 6.1.

Zestawienie wybranych złożeń do chromatografii HIC. Dane na podstawie aktualnego (2000 r.) katalogu firmy Amersham Pharmacia Biotech.

	Phenyl Sephacrose 6 FF (low /high sub)	Butyl Sephacrose 4 FF	Octyl Sephacrose 4FF	SOURCE 15 PHE	SOURCE 15 ISO	SOURCE 15 ETH
Rodzaj liganda	fenyl	n-butyl	n-octyl	Fenyl	izopropyl	Eter
Powierzchniowa gęstość liganda ($\mu\text{moli/ml}$ żelu)	20/40	50	5	30-40	30-40	30-40
Rodzaj nośnika	Sieciowana agarozą (6%)	sieciowana agarozą (4%)	sieciowana agarozą (4%)	polistyren sieciowany z dwuwinyloben- zenem	polistyren sieciowany z dwuwinyloben- zenem	Polistyren sieciowany z dwuwinyloben- zenem
Maksymalne ciśnienie pracy złoża (MPa)	0,3	0,3	0,3	1,5	1,5	1,5
Pojemność wiązań (mg HSA /ml żelu)	24/36	27	27	25	25	25

W kolumnie dotyczącej żelu **Phenyl Sepharose 6 FF** podano dane dla złożeń o niskiej i wysokiej gęstości powierzchniowej liganda.

Dla szybkiego sprawdzenia warunków separacji wybranego materiału techniką chromatografii oddziaływań hydrofobowych, z zastosowaniem złożeń podanych w tabeli 6.1., firma Amersham Pharmacia Biotech oferuje zestaw kolumnienek **HiTrap HIC**. Kolumnienki te (1 ml każda) mogą być użyte w dowolnym systemie chromatograficznym (HPLC, **FPLC**, **ÄKTA**, systemy niskociśnieniowe **GradiFrac** lub **ÄKTAprime**), ale mogą być również operowane za pomocą zwykłej strzykawki.

Tabela 6.2.

Zestawienie wybranych kolumn do wysokociśnieniowej chromatografii oddziaływań hydrofobowych. Dane na podstawie katalogu firmy Amersham Pharmacia Biotech (1999 r.).

	Alkyl Superose	Phenyl Superose
Rodzaj liganda	Neopentyl	Fenyl
Rodzaj nośnika	Superose 12	Superose 12
Maksymalne ciśnienie (MPa)	2,5	2,5
Zakres temperatur (°C)	4 - 40	4 - 40
Zakres pH	2 - 13	2 - 13
Odporność chemiczna	mocznik, chlorowodorek guanidyny, detergenty, rozpuszczalniki organiczne	mocznik, chlorowodorek guanidyny, detergenty, rozpuszczalniki organiczne
Pojemność wiązania (mg białka/ ml żelu)	HSA - 60	Chymotrypsynogen - 50

6.3. Przykłady zastosowań techniki chromatografii oddziaływań hydrofobowych

Przykład 6.1.

Rozdzielanie α -laktoalbuminy i β -laktoglobuliny z zastosowaniem złoża Phenyl-Sepharose 6 FF (2)

Wprowadzenie:

Struktura przestrzenna wielu białek podlega zmianom indukowanym obecnością jonów metali. Zmiany te, poza regulacją funkcji tych białek, prowadzą do zmian ich właściwości hydrofobowych. Zjawisko to może być wykorzystane do izolowania i oczyszczania białek

wiążących jony metali. Dwie obecne w mleku proteiny, α -laktoalbumina i β -laktoglobulina, mają zdolność wiązania jonów Ca^{2+} . Obecność jonów wapnia powoduje zmniejszenie hydrofobowości α -laktoalbuminy. Natomiast właściwości hydrofobowe β -laktoglobuliny słabo zależą od obecności tych jonów. Można więc stosunkowo łatwo dokonać separacji tych dwóch białek z wykorzystaniem złoża **Phenyl-Sepharose 6 FF**. W pierwszym etapie separacji przez kolumnę przepuszcza się mieszaninę tych białek w obecności EDTA. W takich warunkach α -laktoalbumina wiąże się ze złożem, a β -laktoglobulina przepływa przez kolumnę praktycznie bez oddziaływań. W drugim etapie wystarczy wyeluować zaadsorbowane na kolumnie białko, korzystając z buforu zawierającego jony wapnia.

Material:

1. Białka α -laktoalbumina i β -laktoglobulina.

Aparatura:

1. System chromatografii niskociśnieniowej **GradiFrac**.
2. Kolumna **HiTrap Phenyl Sepharose 6 FF**.

Odczynniki:

1. Bufor A - 50 mM Tris/HCl, zawierający 0,2 M EDTA, pH 7,5.
2. Bufor B - 50 mM Tris/HCl, zawierający 1 mM CaCl_2 , pH 7,5.
3. 20% etanol.

Przygotowanie systemu i kolumny chromatograficznej:

a) Przygotowanie systemu.

- Do naczyń na solwenty nalać po 500 ml odpowiednio buforów A i B.
- Sprawdzić, czy w wężykach doprowadzających solwenty do pompy znajduje się ciecz. Jeżeli nie, to napełnić je przy pomocy strzykawki, zgodnie z instrukcją użytkowania systemu.
- Ustawić %B = 50 i przepuścić przez system 20 ml mieszaniny buforów A i B.
- Ustawić %B = 0 i przepuścić 20 ml buforu A.
- Sprawdzić czy pętla zamocowana w zaworze iniekcyjnym ma wystarczającą objętość (1 lub 2 ml).
- Sprawdzić czy w detektorze **UV1** zainstalowany jest w filtr 280 nm, ustawić rodzaj pracy na AU, a zakres na 1.0 i włączyć zasilanie. Stabilną pracę lampy uzyskuje się po około 1 godzinie od włączenia.
- Uruchomić rejestrator **Rec-112** i ustawić zakres pracy kanału niebieskiego (sygnał z detektora) na zakres 10 mV, a kanału czerwonego (% B) na 1 V.
- Do koszyczka kolektora frakcji wstawić 10 probówek o objętości 4 ml.

b) Przygotowanie kolumny.

- Zamocować kolumnę **HiTrap Phenyl Sepharose 6 FF** w systemie **GradiFrac**, zwracając uwagę, aby nie dopuścić do dostania się powietrza do wnętrza kolumny przez jej wlot. Najłatwiej to wykonać przy całkowicie wypełnionym wężyku doprowadzającym solwent do kolumny.
- Przepuścić przez pętlę i kolumnę 10 ml buforu A.
- Zatrzymać przepływ solwentów.

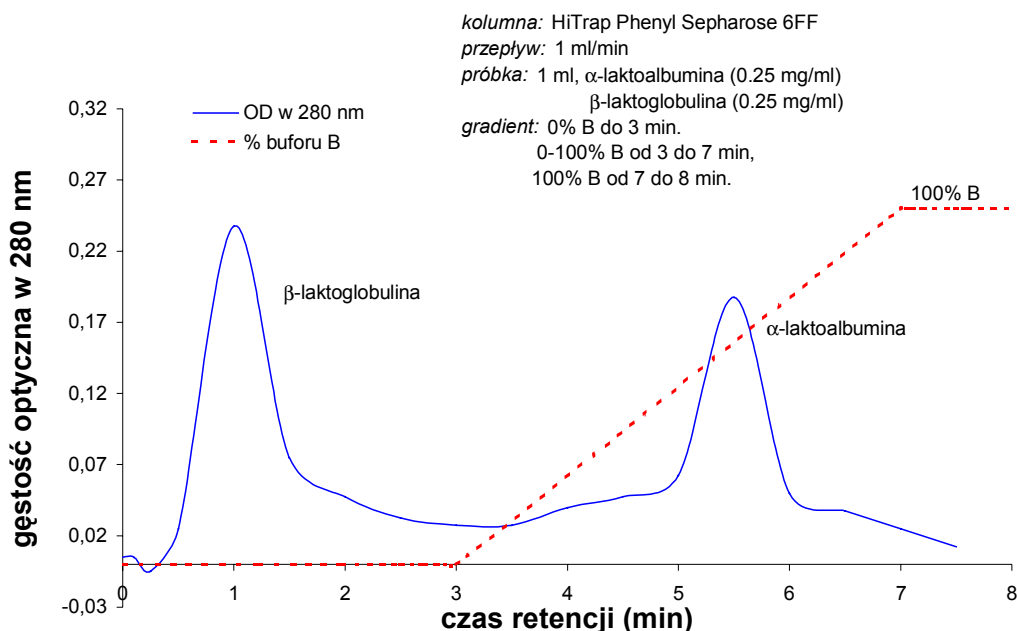
Przebieg doświadczenia:

- Zmieszać 500 μl (2 mg/ml) α -laktoalbuminy z 500 μl (2 mg/ml) β -laktoglobuliny.

- Dodać 1 ml buforu A i inkubować w temperaturze pokojowej w ciągu 30 minut.
- W tym czasie wprowadzić do systemu program chromatograficzny wg schematu:
METHOD BASE: VOLUME (ml)
FRACTIONATION BY: VOLUME (ml)
VOLUME 0,0; CONC %B 0,0; FLOW 1 ml/min.; FRACTION 1,0
VOLUME 3,0; CONC %B 0,0; FLOW 1 ml/min.; FRACTION 1,0
VOLUME 7,0; CONC %B 100,0; FLOW 1 ml/min.; FRACTION 1,0
VOLUME 8,0; CONC %B 100,0; FLOW 1 ml/min.; FRACTION 0,0
VOLUME 9,0; CONC %B 0,0; FLOW 1 ml/min.; FRACTION 0,0
VOLUME 12,0; CONC %B 0,0; FLOW 1 ml/min.; FRACTION 0,0
- Uruchomić przepływ buforu A przez kolumnę i obserwować linię bazową rysowaną przez rejestrator.
- Po ustaleniu się linii bazowej, ustawić zawór iniekcyjny **IV-7** w pozycję **LOAD** i przy pomocy strzykawki z filtrem (0,45 μm) nanieść separowany materiał (1 ml) do pętli.
- Wcisnąć przycisk start i jednocześnie przestawić zawór iniekcyjny w pozycję **INJECT**.
- Dalej proces separacji będzie nadzorowany i wykonany przez system **GradiFrac**.

Oczekiwane wyniki:

β -laktoglobulina powinna opuścić kolumnę bez oddziaływań i znaleźć się w 1 i 2 frakcji. Natomiast α -laktoalbumina powinna być wyeluowana wtedy, gdy EDTA zostanie w znacznej mierze usunięte z kolumny i zastąpiony jonami wapnia, tj we frakcjach powyżej numeru 5.



Rys. 6.1.

Przykładowy wynik separacji białek wiążących jony metali z wykorzystaniem chromatografii oddziaływań hydrofobowych. Zmiany konformacyjne białek, wynikające z braku jonów wapnia, powodują bardzo istotne różnice właściwości hydrofobowych separowanych molekuł.

Regeneracja i przechowywanie kolumny:

Zakończenie programu chromatograficznego pozostawia kolumnę w stanie gotowości do ponownego użycia. Po zakończonej pracy kolumnę przemyć wodą destylowaną (10 ml), następnie 20% etanolem (3 ml) i przechowywać w temperaturze pokojowej chroniąc przed nadmiernym nasłonecznieniem. Przed ponownym użyciem wystarczy kolumnę przemyć 20 ml wody.

Uwagi:

1. Wszystkie bufony stosowane do chromatografii cieczowej oraz nanoszone próbki należy filtrować przed użyciem. Próbki zamiast filtrowania można poddać wirowaniu (5000 x g, 10 min). Ma to na celu zabezpieczenie kolumny przed zatkaniami.
2. Bufory dobrze jest przygotować na kilka godzin przed użyciem, ale bezpośrednio przed ich zastosowaniem należy sprawdzić wartość pH i w razie konieczności ponownie doprowadzić do potrzebnej wartości.
3. Podobny rezultat można uzyskać wymuszając przepływ solwentów przez kolumnę HiTrap przy pomocy strzykawki. W takim przypadku należy przygotować skokową zmianę buforów na kolumnie.

Przykład 6.2.

Izolowanie białek z mieszaniny z zastosowaniem złoża Phenyl-Sepharose (3)

Wprowadzenie:

Sól obecna w wysokich stężeniach w roztworze białek wywołuje liczne zmiany konformacyjne tych białek. W krańcowych przypadkach zmiany te prowadzą do wytrącenia niektórych z nich z roztworu. Zjawisko to (wysalanie białek) często stosowane jest do szybkiej, wstępnej separacji białek. Pozostałe w roztworze białka wykazują silne właściwości hydrofobowe i mogą być rozdzielane z zastosowaniem techniki chromatografii oddziaływań hydrofobowych. Po naniesieniu na kolumnę mieszaniny białek, znajdujących się w środowisku o wysokim stężeniu soli, dojdzie do oddziaływania hydrofobowych fragmentów tych białek z hydrofobowymi łańcuchami ligandów związanych trwale z nośnikiem. Po odmyciu niespecyficznie zaadsorbowanych molekuł można eluować związane białka w funkcji ich hydrofobowości, stosując eluenty o malejącym stężeniu soli.

Material:

1. Standardy białkowe: cytochrom c, mioglobina, rybonukleaza, lizozym, oraz chymotrypsynogen A.

Aparatura:

1. System chromatografii niskociśnieniowej **GradiFrac**.
2. Kolumna **HiTrap Phenyl Sepharose 6 FF**.

Odczynniki:

1. Bufor A - 50 mM bufor fosforanowy, pH 7.0.
2. Bufor B - 50 mM bufor fosforanowy, zawierający 1,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0.
3. 20% etanol.

Przygotowanie systemu i kolumny chromatograficznej:

- Wszystkie czynności przygotowania systemu i kolumny należy wykonać tak jak w ćwiczeniu 6.1.

Przebieg doświadczenia:

- Korzystając z **buforu A**, zawierającego 1,7 M siarczanu amonu, przygotować mieszaninę białek standardowych: cytochrom c (1 mg/ml), mioglobina (2 mg/ml), rybonukleaza (5 mg/ml), lizozym (1 mg/ml), chymotrypsynogen A (3 mg/ml).

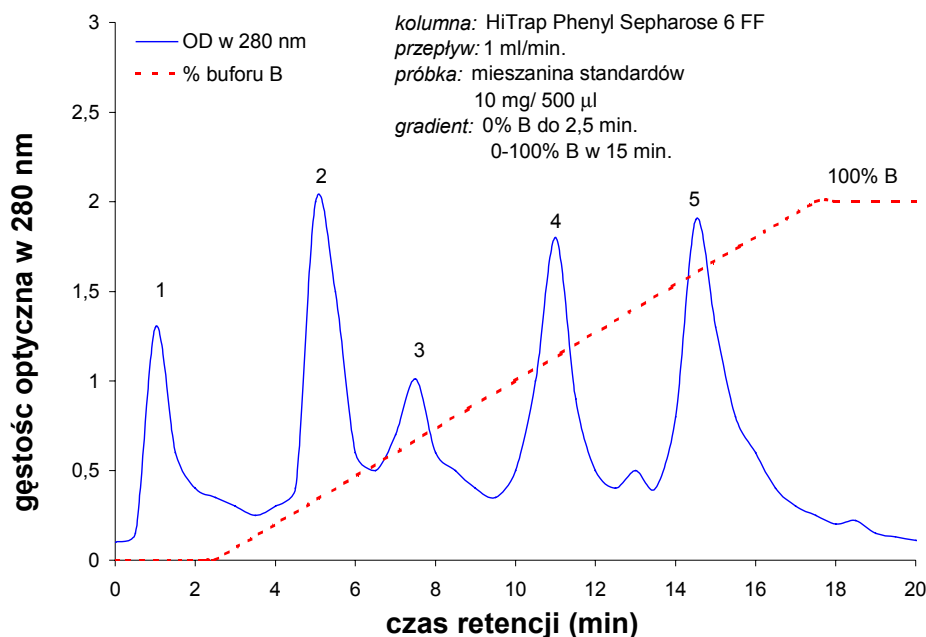
- Przygotować program chromatograficzny wg schematu:

METHOD BASE: **VOLUME (ml)**
FRACTIONATION BY: **VOLUME (ml)**

VOLUME 0,0;	CONC %B 0,0;	FLOW 1 ml/min.;	FRACTION 1,0
VOLUME 2,5;	CONC %B 0,0;	FLOW 1 ml/min.;	FRACTION 1,0
VOLUME 18,0;	CONC %B 100,0;	FLOW 1 ml/min.;	FRACTION 1,0
VOLUME 20,0;	CONC %B 100,0;	FLOW 1 ml/min.;	FRACTION 0,0
VOLUME 21,0;	CONC %B 0,0;	FLOW 1 ml/min.;	FRACTION 0,0
VOLUME 25,0;	CONC %B 0,0;	FLOW 1 ml/min.;	FRACTION 0,0

- Przy pomocy strzykawki uzbrojonej w filtr (0,45 μ m) nanieść 1 ml mieszaniny do pętli zaworu iniekcyjnego (zawór w pozycji LOAD).

- Po ustaleniu się linii bazowej uruchomić program oraz przestawić zawór w pozycję INJECT.



Rys. 6.2.

Separacja standardów białkowych: cytochrom (1), mioglobina (2), rybonukleaza (3), lizozym (4), chymotrypsynogen (5) w technice chromatografii oddziaływań hydrofobowych. Rozdział przeprowadzono na kolumnie **HiTrap Phenyl Sepharose 6 FF** zainstalowanej w systemie chromatograficznym **GradiFrac**.

Oczekiwane wyniki:

Kolejność wymywania białek przedstawiona jest na rysunku 6.2.

Regeneracja i przechowywanie kolumny:

Zakończenie programu chromatograficznego pozostawia kolumnę w stanie gotowości do ponownego użycia. Po zakończonej pracy kolumnę przemyć wodą destylowaną (10 ml), a następnie 20% etanolem (3 ml) i przechowywać w temperaturze pokojowej. Przed ponownym użyciem kolumnę przemyć 20 ml wody.

Uwagi:

Zastosowanie mają wszystkie uwagi jak w przykładzie 6.1.

Przykład 6.3.**Oczyszczanie przeciwciał monoklonalnych z zastosowaniem techniki chromatografii oddziaływań hydrofobowych (4)****Wprowadzenie:**

W przykładzie 5.2. opisano sposób izolowania przeciwciał monoklonalnych z mysiego płynu wysiękowego z zastosowaniem chromatografii jonowymiennej. Niestety, często spotyka się przeciwciała, których cząsteczki są niezwykle czułe na niewielkie zmiany wartości pH, a zmiany takie zachodzą w sposób słabo kontrolowany na jonowymieniaczu. W takiej sytuacji może dojść do nieodwracalnej utraty aktywności biologicznej przeciwciała. Alternatywną metodą może być zastosowanie chromatografii oddziaływań hydrofobowych. Każda cząsteczka immunoglobuliny posiada regiony hydrofobowe mogące uczestniczyć w oddziaływaniach z nieruchomymi ligandami złoża, umożliwiając tym samym izolowanie ich z mieszaniny.

Material:

1. Mysi płyn wysiękowy

Aparatura:

1. System chromatografii ciekowej **ÄKTA_{FPLC}**
2. Kolumna **Alkyl Superose HR 5/5**

Odczynniki:

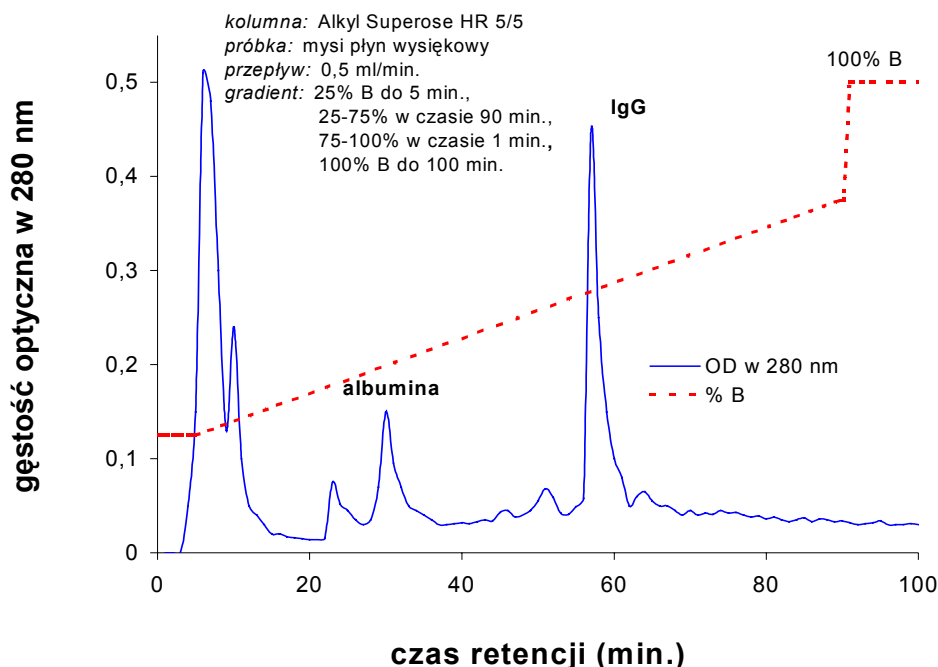
1. Bufor A - 100 mM bufor fosforanowy z dodatkiem 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,0.
2. Bufor B - 100 mM bufor fosforanowy, pH 7,0.
3. Bufor C - 100 mM bufor fosforanowy z dodatkiem 0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,0
4. 20% etanol.

Przygotowanie systemu i kolumny chromatograficznej:

- Bufory przepuścić przez filtry (0,45 μm) i dokładnie odpowietrzyć pod próżnią.
- Wypełnić odpowiednimi buforami wężyki systemu ÄKTA_{FPLC}.
- Zainstalować kolumnę Alkyl Superose HR 5/5 i przepuścić przez nią 5 ml buforu A przy przepływie 0,5 ml/min.
- Korzystając z programu komputerowego UNICORN, sterującego systemem ÄKTA, przygotować program separacji próbki, wprowadzając następujące parametry:
 - a) prędkość przepływu 0,5 ml/min.,
 - b) detekcja w 280 nm,
 - c) frakcje 2 ml,
 - d) 25 % B w czasie 10 min.,
 - e) iniekcja próbki
 - f) 25% B w czasie 5 min.,
 - g) 25-75% B w czasie 90 min.,
 - h) 75-100% B w czasie 1 min.,
 - i) 100% B w czasie 10 min.,
 - j) 100-25% B w czasie 5 min.,

Przebieg doświadczenia:

- Płyn wysiękowy (200 μl) rozcieńczyć trzykrotnie buforem C i odwirować (10 min, 5000 x g, RT) a następnie zebrać supernatant i pobrać go do 1 ml strzykawki.
- Uruchomić program UNICORN sterujący systemem ÄKTA_{FPLC}, oraz gromadzący dane z detektorów i pozwalający na ewaluację uzyskanych wyników.
- Nanieść 600 μl przygotowanej próbki do pętli (1 ml) zaworu iniekcyjnego INV-907, stosując filtr (0,45 μm).
- Uruchomić przygotowany wcześniej program separacji użytego materiału.



Rys. 6.3.

Izolowanie przeciwciała monoklonalnego z mysiego płynu wysiękowego z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofobowych. Linią ciągłą przedstawiono zmiany gęstości optycznej w 280 nm, podczas gdy linia przerywana obrazuje % buforu B na kolumnie w trakcie realizacji programu separacji.

Oczekiwane wyniki:

Białka zawarte w próbce mysiego płynu wysiękowego poddane działaniu siarczanu amonu w stężeniu 0,8 M ulegną częściowemu wytrąceniu z roztworu. Dotyczy to głównie białek silnie hydrofobowych. Pozostałe w roztworze cząsteczki, a wśród nich immunoglobuliny, mogą być użyte do chromatografii. W pierwszych frakcjach z kolumny wypłyną hydrofilowe białka, które słabo lub wcale nie oddziałują z hydrofobowymi ligandami złoza. W kolejnych frakcjach eluowane będą białka wykazujące średnie właściwości hydrofobowe, między innymi albuminy. Dopiero gdy stężenie siarczanu amonu obniży się do około 1M (około 50% B) kolumnę opuszczą interesujące nas immunoglobuliny (rysunek 5.3).

Regeneracja i przechowywanie kolumny:

Zakończenie programu chromatograficznego pozostawia kolumnę w stanie gotowości do ponownego użycia w tym samym celu. Po zakończonej pracy kolumnę przemyć wodą destylowaną (10 ml), a następnie 20% etanolem (3 ml) i przechowywać w temperaturze pokojowej. Przed ponownym użyciem kolumnę przemyć 20 ml wody.

Uwagi:

1. Zastosowanie mają wszystkie uwagi jak w przykładzie 6.1.
2. Zastosowana w tym przykładzie kolumna nie może być obsługiwana przez systemy chromatografii niskociśnieniowej. Przy braku systemu wysokociśnieniowego można wykonać podobną procedurę izolowania immunoglobulin stosując kolumny **HiTrap Octyl**, **HiTrap Phenyl** lub **HiTrap Butyl**. Zastosowanie tych kolumn wymaga jednak wcześniejszego, doświadczonego sprawdzenia warunków niezbędnych dla związania konkretnych białek.
3. System **ÄKTA_{FPLC}** wraz z programem **UNIKORN** pozwala bardzo łatwo odtworzyć przeprowadzoną separację. Kolumna **Alkyl Superose HR 5/5** może współpracować również z innymi systemami wysokociśnieniowymi.

6.4. Literatura

1. Hofmeister F. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **24**, 247, 1988.
2. Lindahl L., Vogel HJ. *Anal. Biochem.*, **140**, 394, 1984.
3. Szepesy L., Horvath C. *Chromatographia*, **28**, 13, 1988.
4. Monoclonal Antibody Purification - Handbook. Pharmacia Biotech. 18-1037-46, 1997.