

8. Chromatografia powinowactwa (*affinity chromatography* - AC)

Chromatografia powinowactwa jest szczególnym typem chromatografii adsorpcyjnej, w której wykorzystuje się wzajemne powinowactwo dwóch substancji. Ze względu na swe unikalne właściwości pozwala znacznie uprościć procedurę izolowania wybranej substancji, przy jednoczesnym zachowaniu jej biologicznej aktywności.

8.1. Podstawy teoretyczne chromatografii powinowactwa

Interakcja substancji rozpuszczonej w fazie ruchomej z unieruchomionym ligandem może mieć różny charakter, może to być oddziaływanie pomiędzy:

- hormonem i receptorem,
- enzymem i substratem,
- enzymem i inhibitorem,
- przeciwciałem i antygenem lub haptenem,
- komplementarnymi odcinkami kwasów nukleinowych,
- kwasami nukleinowymi i białkami,
- lektynami i glikoproteinami,
- dopełniaczem i przeciwciałami z grupy IgG, itp.

Warto zwrócić uwagę na to, że w przypadku każdej pary oddziałujących cząsteczek, nie ma znaczenia, która z nich zostanie wybrana jako ligand. Przykładowo, jeżeli dysponujemy czystym antygenem możemy wyizolować monospecyficzne przeciwciała poliklonalne z surowicy odpornościowej, ale działając odwrotnie, możemy wyodrębnić antygen po przygotowaniu złoża, które zawiera unieruchomione odpowiednie przeciwciała.

Chromatografię powinowactwa przeprowadza się zwykle w dwóch etapach. W pierwszym etapie przez kolumnę przepuszcza się materiał zawierający molekuly komplementarne do liganda. Przemieszczające się w obrębie złoża molekuly odnajdują unieruchomiony ligand i wiążą się z nim. Po odmyciu nieswoiście zaadsorbowanych molekuł rozpoczyna się drugi etap, w którym dochodzi do dysocjacji powstałych kompleksów i elucji swoiście związanych makromolekuł. Dysocjacji kompleksów można dokonać w różny sposób. Można zastosować specyficzny eluent, zawierający kompetytor współzawodniczący o miejsca wiążące z ligandem. Na przykład plazminogen związany z unieruchomioną lizyną można odmyć kwasem ϵ -aminokapronowym, który - podobnie jak lizyna - jest inhibitorem plazminy, aktywnej formy plazminogenu. Zarówno kwas ϵ -aminokapronowy jak i lizyna wiążą się do tego samego miejsca w cząsteczce plazminogenu. Można jednak eluować związane substancje w sposób niespecyficzny, za pomocą buforów o niskiej lub wysokiej

wartości pH (np. bufor octanowy, bufor węglanowy, itp.), roztworów o wysokiej sile jonowej (2,5 M roztwór NaCl), czy związków rozrywających wiązania wodorowe (4-8 M roztwór mocznika, 6 M roztwór guanidyny). Po zakończeniu elucji należy usunąć zastosowane w tym celu substancje od wyizolowanych makromolekuł. Można to zrobić różnymi metodami, np. stosując dializę, ultrafiltrację lub filtrację żelową.

Zalety i wady metody chromatografii powinowactwa

Zalety:

- brak ograniczeń w stosunku do objętości nanoszonej na kolumnę próbki oraz do stężenia separowanego materiału w próbce
- możliwość silnego zateżenia izolowanej molekuly
- bardzo wysoka specyficzność
- możliwość uzyskania w czystej postaci molekuly, które często nie mogą być izolowane innymi metodami
- wyizolowany materiał charakteryzuje się bardzo wysokim stopniem czystości pomimo zastosowania tylko jednego kroku preparatywnego.

Wady:

- trudności z uzyskaniem niektórych specyficznych ligandów
- częsta konieczność przygotowania złoża we własnym zakresie
- niska trwałość niektórych ligandów.

8.2. Złoża stosowane do chromatografii powinowactwa

Jako nośniki w chromatografii powinowactwa stosowane są złoża, które tradycyjnie wykorzystuje się do filtracji żelowej, z tym, że przed użyciem wymagają one odpowiedniej aktywacji. Są to pochodne dekstranowe (**Sephadex**), agarozowe (**Sepharose**) lub czasami poliakrylamidowe. Do aktywacji żeli dekstranowych i agarozowych powszechnie stosuje się reakcję z bromocyjanem. Oprócz nośników, które można przygotować do celu chromatografii powinowactwa we własnym zakresie, dostępne są również złoża przystosowane już do chemicznego wiązania liganda, np. **CNBr-Sepharose 4B**. Charakter wiązania między ligandem i nośnikiem zależy zarówno od rodzaju substancji używanej jako ligand, jak i od nośnika. Powstające podczas aktywacji żelu bromocyjanem ugrupowania karboimidowe reagują wyłącznie z grupami aminowymi przyłączanej substancji. Z aktywnym nośnikiem można związać chemicznie wszystkie typy biopolimerów zawierające grupy aminowe. Ligandy białkowe można także związać za pomocą grup karboksylowych (Glu, Asp), reszt hydroksylowych (Tyr, Ser, Thr) oraz reszt sulfhydrylowych (Cys). Kwasy nukleinowe można

przyłączyć do nośnika za pośrednictwem reszt fosforanowych lub grup enolowych zasad azotowych, a cukrowce przez grupy wodorotlenowe reszt cukrowych. Tabela 8.1. podaje rodzaje nośników, reagujące z nimi grupy funkcyjne ligandów oraz ligandy mogące być wiązane w ten sposób do nośnika.

Tabela 8.1.

Zestawienie najczęściej stosowanych złożeń przeznaczonych do samodzielnego wiązania ligandów. Dane zaczerpnięto z aktualnego (2000 r.) katalogu firmy Amersham Pharmacia Biotech.

Ligand który może być związany z nośnikiem	Grupa funkcyjna liganda przeznaczona do wiązania z nośnikiem	Nazwa złoża (nośnika)
Białka, peptydy, aminokwasy, kwasy nukleinowe i polinukleotydy	aminowa	CNBr-activated Sepharose 4B CNBr-activated Sepharose 4B Fast Flow Activated CH-Sepharose 4B NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow Epoxy-activated Sepharose 6B CH-Sepharose 4B
Białka, peptydy, aminokwasy	karboksylowa	AH-Sepharose 4B
Cukry	hydroksylowa	Epoxy-activated-Sepharose 6B
Kwasy nukleinowe przez koniec 5'	aldehydowa	Agarose Adipic Acid Hydrazide
Białka, peptydy, aminokwasy i nukleotydy zawierające siarkę	tiolowa	Thiopropyl-Sepharose 6B Activated-Thiol-Sepharose 4B
Antybiotyki, hormony, koenzymy, inne niskocząsteczkowe biomolekuły	grupy dystansowe: aminowa, tiolowa hydroksylowa karboksylowa, aldehydowa	NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow CH-Sepharose 4B AH-Sepharose 4B Epoxy-activated-Sepharose 6B Activated-Thiol-Sepharose 4B Thiopropyl-Sepharose 6B Agarose Adipic Acid Hydrazide

Wprowadzenie grup dystansowych pozwala wydatnie zwiększyć możliwości wiązania makromolekuł do niskocząsteczkowych ligandów. Eliminuje się w ten sposób efekty steryczne reszt cukrowych nośnika podczas sorpcji makromolekuł. Jest to szczególnie istotne wówczas, gdy ligandem jest krótki peptyd, a substancja izolowana przy jego pomocy jest znacznie większa i może mieć przysłonięte przestrzennie miejsce wiążące ligand. Można w takich sytuacjach zastosować odpowiednio zmodyfikowane nośniki, np. **AH** i **CH-Sepharose** czy **NHS-ctivated Sepharose FF**, które mają wbudowane kilkuwęglowe (najczęściej 6-cio atomowe) łańcuchy alifatyczne. Za ich pośrednictwem dochodzi do wiązania liganda z nośnikiem.

W wielu przypadkach ten sam ligand może być wykorzystany do izolowania różniących się makromolekuł. Przykładowo, po zastosowaniu złoża ze związanym białkiem A można wyodrębnić większość immunoglobulin klasy G, a na złożu ze związanym polinukleotydem (PolyU) można specyficznie izolować mRNA ale też RNA pochodzenia roślinnego. W tabeli 8.2. zestawione są aktualnie dostępne złoża przeznaczone do izolowania różnych grup biopolimerów.

Tabela 8.2.

Zestawienie specyficznych złożeń przeznaczonych do chromatografii powinowactwa. Dane zaczerpnięto z katalogów firmy Amersham Pharmacia Biotech (1999 r. i 2000 r.).

Specyficzność w stosunku do liganda	Nazwa handlowa złoża
Region F _c immunoglobulin G, umożliwia frakcjonowanie podklas IgG	Protein A Sepharose CL-4B Protein A Sepharose 4 FF rProtein A Sepharose FF Protein G Sepharose 4B Protein G Sepharose 4 FF Protein G Sepharose CL-6B STREAMLINE rProtein A
Przeciwciała IgM (hybridoma i ludzkie) Przeciwciała IgY z żółtka jaja	HiTrap IgM purification column HiTrap IgY purification column
α-D-mannoza, α-D-glukoza strukturalnie podobne cząsteczki	Lentil Lectin Sepharose 4B Con A Sepharose 4B Agarose Wheat Germ Lectin
N-acetyl-D-glucosamina, α-2-makroglobulina, ceruloplazmina, polimer haptoglobina- hemoglobina,	Wheat Germ Lectin Sepharose 6 MB
Eukariotyczny mRNA, dehydrogenazy zależne od NADP, dehydrogenazy zależne od NAD, Polimeraza DNA, polimeraza RNA białka wiążące DNA poli(A) i poli(U) nukleotydy, białka wiążące RNA, interferon mRNA i rybosomy,	7-Methyl-GTP Sepharose 4B 2'5'ADP Sepharose 4B 5' AMP Sepharose 4B DNA(denaturated)-Agarose DNA(native)-Agarose Oligo(dT)-cellulose Poly(U) Sepharose 4B Poly(A) Sepharose 4B AGPOLY(I) · POLY(C) AGPOLY(U)
Rybosomalny RNA, podwójna nić DNA, plazminogen, aktywator plazminogenu,	Lysine Sepharose 4B
Szeroka klasa enzymów zależnych od nukleotydów, interferon, albumina i inne białka	Blue Sepharose CL-6B Blue Sepharose 6 FF Red Sepharose CL-6B

Endotoksyny	Lentil Lectin Sepharose 4B Con A Sepharose 4B
Czynniki wzrostu, czynniki krzepnięcia, lipoproteiny, proteazy	Heparin Sepharose CL-6B STREAMLINE Heparin
Białko A i białko G oraz ich koniugaty	IgG Sepharose 6 FF
Fibronektyna	Gelatin Sepharose 4B
Białka oddziałujące z kalmoduliną, neurotransmitery, kinazy białkowe	Calmodulin Sepharose 4B
Białka zależne od glutationu, S-transferazy	Glutathione Sepharose 4B
Proteazy serynowe	Beznamidine Sepharose 6B Arginine Sepharose 4B
Biotynlowane substancje	Streptavidin Sepharose HP
Jony metali, molekuly wiążące jony metali	Chelating Sepharose FF STREAMLINE Chelating

Warto zauważyć, że chromatografia powinowactwa może być z powodzeniem użyta również w celu eliminacji niepotrzebnych substancji z interesującego nas preparatu. Dla przykładu, końcowym etapem izolowania fibrynogenu może być przepuszczenie izolatu przez złoża **Gelatin-Sepharose 4B** i **Lysine-Sepharose 4B**, dzięki czemu otrzymany preparat fibrynogenu będzie wolny od śladowych ilości fibronektyny i plazminogenu. W innych sytuacjach dobrze jest zastosować dodatkowe oczyszczanie preparatów, tak aby pozbyć się endotoksyn (**Lentil Lectin Sepharose 4B**, **Con A Sepharose 4B**) lub proteaz serynowych (**Benzamidine Sepharose 6B**, **Arginin Sepharose 4B**).

Szereg złożeń przedstawionych w tabeli 8.2. dostępnych jest w postaci gotowych kolumniek typu **HiTrap**, które mogą być z powodzeniem instalowane zarówno w systemach HPLC i FPLC jak i w systemach chromatografii niskociśnieniowej. Co więcej, przepływ solwentów i próbek przez te kolumny może być wymuszany przy pomocy zwykłej strzykawki. Dostępne w tej wersji są:

- **HiTrap NHS-Activated**
- **HiTrap Protein A, HiTrap rProtein A**
- **HiTrap Protein G**
- **HiTrap Peanut Lectin, HiTrap Lentil Lectin, HiTrap Wheat Germ Lectin**
- **HiTrap Con A**
- **HiTrap Heparin**
- **HiTrap Chelating**
- **HiTrap Blue**
- **HiTrap IgM purification column**

- **HiTrap IgY purification column**
- **HiTrap Streptavidin**
- **GSTrap for GST fusion proteins**

Należy również zwrócić uwagę na dostępność złożeń typu **STREAMLINE**, pozwalających pracować w technice ekspansji złoża. Technika ta, opisana szczegółowo w przykładzie 5.6., pozwala ominąć pracochłonny proces przygotowania do chromatografii materiału pochodzącego z hodowli komórkowej (klaryfikacji materiału). Możliwym jest naniesienie na specjalną kolumnę, typu **STREAMLINE**, materiału bezpośrednio z bioreaktora. W przykładzie 5.6. opisano zastosowanie złoża **STREAMLINE Q XL** do oczyszczania rekombinowanego białka A z hodowli transfekowanych komórek *E. coli*. Nic nie stoi jednak na przeszkodzie zastosowania złożeń adsorpcyjnych innych niż jonowymieniacze. Obecnie w technice chromatografii powinowactwa dostępne są złoża:

- **STREAMLINE rProtein A**
- **STREAMLINE Heparin**
- **STREAMLINE Chelating.**

8.3. Przykłady zastosowań chromatografii powinowactwa

Przykład 8.1.

Aktywowanie żelu Sepharose w reakcji z bromocyjanem i wiązanie liganda białkowego (1)

Wprowadzenie:

Uważa się, że bromocyjan reaguje z grupami wodorotlenowymi reszt cukrowych agarozy i tworzy cykliczne i niecykliczne ugrupowania karboimidowe. W polarnym środowisku wodnym grupy te są nietrwałe. Dlatego natychmiast po ich utworzeniu należy użyć żel do wiązania z ligandem. Innym wyjściem może być szybka liofilizacja żelu w obecności stabilizatora (dextran lub laktoza). Podczas reakcji wiązania liganda białkowego z **CNBr-Sepharose**, z aktywnymi grupami żelu reagują grupy aminowe białek.

Material:

1. **Sepharose 4B.**
2. Albumina wołowa (BSA)

Odczynniki:

1. 0,5 M bufor fosforanowy, pH 11,5 (0,5 M Na_2HPO_4 doprowadzony do pH 11,5 za pomocą 0,5 M NaOH).
2. Bromocyjan (świeżo przygotowany wodny roztwór, o stężeniu 100 mg/ml).

Uwaga! Ze względu na silnie drażniące i niezwykle toksyczne działanie par łatwopalnego halogenocyjanu, wszystkie czynności należy wykonywać pod dobrze działającym wyciągiem.

3. 0,1 M bufor boranowy, pH 8,3.
4. 0,1 M bufor octanowy w 1,0 M roztworze NaCl (pH 4,0).
5. 0,2 M glicyna w 0,1 M buforze boranowym
6. Roztwór białka (BSA 20 mg/ml) w 0,1 M buforze boranowym, pH 8,3.

Aparatura:

1. Wirówka laboratoryjna z rotorem horyzontalnym (1000 x g, 4 x 50 ml).

Przebieg doświadczenia:

a) Aktywowanie żelu.

- Do czystej konikalnej probówki o pojemności 50 ml pobrać 5 ml żelu **Sepharose 4B**, przemyć 3-krotnie wodą destylowaną (30 ml)
- Zmieszać żel z 10 ml 0,5 M buforu fosforanowego, pH 11,5.
- Probówkę umieścić w łaźni lodowej pod dobrze działającym wyciągiem. Do żelu dodać, małymi porcjami (500 μl) ciągle mieszając, 5 ml świeżo przygotowanego roztworu CNBr i całość ostrożnie mieszać w zamkniętej probówce, w temp. 4°C przez 15 min. (bardzo wolne obroty na mieszadle rotacyjnym).
- Zawiesinę przemyć małymi porcjami (25 ml), najpierw 250 ml wody, a następnie 250 ml 0,1 M buforu boranowego, pH 8,3.

b) Wiązanie liganda białkowego.

- Do 5 ml żelu **CNBr-Sepharose 4B** dodać 5 ml roztworu białka i pozostawić w temperaturze 4° C przez 16-24 godziny (lub 2 godz. w temperaturze pokojowej). Mieszaninę należy delikatnie mieszać bez użycia dipoli magnetycznych, które mogłyby niszczyć ziarna złoża.
- Inkubację zakończyć, gdy oznaczona w supernatancie ilość swobodnego białka spadnie poniżej 90% wartości początkowej.
- Zwirować żel i po usunięciu supernatantu zawiesić go w 20 ml 0,2 M roztworu glicyny, w celu zablokowania pozostałych wolnych grup aktywnych.
- Inkubować 2 godziny w temperaturze pokojowej (lub 16 godz. w 4° C).
- Nieswoiście związane białko usunąć z żelu przemywając kolejno 20 ml porcjami:
 - a) 3-krotnie 0,1 M buforem boranowym (pH 8,3),
 - b) wodą,
 - c) 3-krotnie 0,1 M buforem octanowym zawierającym 1 M NaCl (pH 4,0),
 - d) 2-krotnie wodą,
 - e) 2-krotnie 0,1 M buforem boranowym.
- Przygotowane złożo przechowywać z dodatkiem środka bakteriostatycznego (20 % etanol lub 0,01% azydek sodu) w temperaturze 4°-8° C.

Przykład 8.2.

Izolowanie monospecyficznych przeciwciał poliklonalnych z surowicy odpornościowej (2)

Wprowadzenie:

Surowica odpornościowa królika szczepionego fibronektyną zawiera populację immunoglobulin, wśród których zawarta jest pula immunoglobulin skierowanych przeciw fibronektynie. W puli tej znajdują się przeciwciała, które specyficznie rozpoznają sekwencję Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) w cząsteczce fibronektyny, biorącą udział w oddziaływaniach z niektórymi receptorami integrinowymi. Monospecyficzne przeciwciała poliklonalne stanowią bardzo czułe i specyficzne narzędzie do badania zmian konformacyjnych zachodzących w obrębie regionu, w którym cząsteczka posiada dla nich epitop. W tym konkretnym przypadku monospecyficzne przeciwciała rozpoznające sekwencję RGDS mogą być pomocne w badaniu zmian konformacyjnych zachodzących w obrębie domeny fibronektyny zawierającej tę sekwencję. Warto wiedzieć, że wyizolowane w ten sposób monospecyficzne przeciwciała, rozpoznające sekwencję RGDS w cząsteczce fibronektyny, nie są w stanie wiązać się do analogicznego regionu zawierającego RGDS w cząsteczce fibrynogenu (2), co świadczy o wysokiej ich specyficzności. Co więcej, monospecyficzne przeciwciała poliklonalne, w odróżnieniu od wielu przeciwciał monoklonalnych, są bardzo odporne na wszelkie zmiany wywołane w ich środowisku.

Material:

1. Surowica odpornościowa królika szczepionego ludzką fibronektyną.
2. Fibronektyna-**Sepharose 4B**.
3. RGDS-**Sepharose 4 FF**.

Uwaga!

Złoża Fibronektyna-**Sepharose 4B** i RGDS-**Sepharose 4 FF** przygotować dokładnie tak jak opisano w Przykładzie 8.1.

Aparatura:

1. Spektrofotometr UV-VIS **Ultrospec 2000**.

Odczynniki:

1. Fibronektyna ludzka.
2. Fibrynogen ludzki.
3. Kozie-antykrólicze IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową.
4. 4-chloro-1-naftol.

Uwaga! Związek ten jest silnie kancerogenny. Jego odważaniu, rozpuszczaniu w metanolu oraz używaniu do barwnej reakcji enzymatycznej musi towarzyszyć szczególna uwaga. Zaleca się wykonywanie powyższych czynności pod wyciągiem, a ręce należy chronić lateksowymi rękawicami.

5. Nadtlenek wodoru.
6. Azotan celulozy.

7. 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
8. 10 mM Tris/HCl zawierający 150 mM NaCl i 0,01% Tween 20, pH 7,5.
9. 1% roztwór odtłuszczonego mleka (lub BSA) w 10 mM Tris/HCl
10. 0,5 M kwas octowy.
11. 0,5 M zasada Tris.
12. 0,01% azydek sodu.
13. 20% etanol.
14. Metanol.

Przygotowanie kolumn chromatograficznych:

- Przygotować 10 ml złoża fibronektyna-**Sepharose 4B**, upakować w plastikowej kolumnie **PD-10** i przepuścić przez nią 50 ml 10 mM buforu Tris/HCl. Zrównoważoną kolumnę zabezpieczyć przed wyschnięciem.
- Przygotować 5 ml złoża RGDS-**Sepharose 4FF**, upakować w plastikowej kolumnie **PD-10** i przepuścić przez nią 25 ml buforu Tris/HCl. Zrównoważoną kolumnę zabezpieczyć przed wyschnięciem.

Przebieg doświadczenia:

a) Izolowanie przeciwciał anty-fibronektynowych.

- Króliczą surowicę odpornościową (10 ml), zawierającą przeciwciała skierowane przeciw fibronektynie, rozcieńczyć dziesięciokrotnie 10 mM buforem Tris/HCl i przepuścić przez przygotowaną kolumnę fibronektyna-**Sepharose 4B**.
- Przemyc kolumnę buforem Tris/HCl (20 ml), a następnie buforem Tris/HCl z dodatkiem Tween 20 oraz roztworem NaCl (50 ml) i ponownie buforem Tris/HCl.
- Sprawdzić spektrofotometrycznie ($\lambda = 280$ nm), czy w efluencie nie ma śladowych ilości białka.
- Wymyć specyficznie związane na fibronektynie przeciwciała przy pomocy 0,5 M kwasu octowego.
- Zbierać 2 ml frakcje i spektrofotometrycznie ($\lambda = 280$ nm) zidentyfikować frakcje zawierające białko.
- Zebrać te frakcje i poddać uzyskany materiał dializie wobec buforu Tris/HCl, pH 7,5.

b) Izolowanie przeciwciał rozpoznających sekwencję RGDS w cząsteczce fibronektyny (RGDS_{fm})

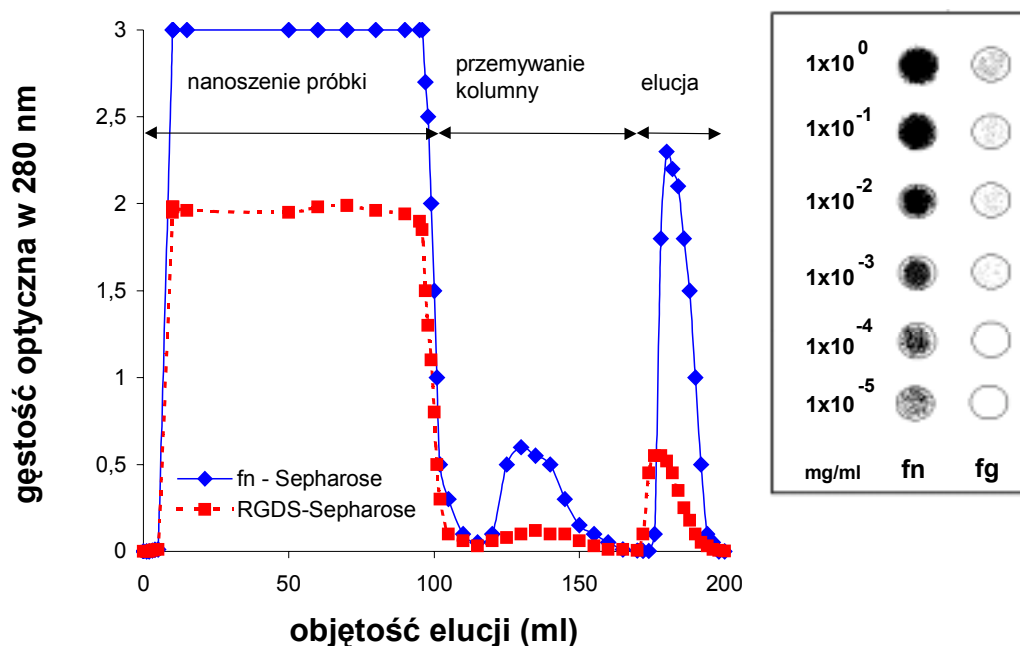
- Wyizolowane wcześniej przeciwciała, skierowane przeciw fibronektynie, rozcieńczyć 5-10 razy za pomocą 10 mM buforu Tris/HCl (tak aby stężenie białka nie przekraczało 0,5 mg/ml).
- Przepuścić roztwór przeciwciał przez przygotowaną kolumnę RGDS-**Sepharose 4 FF** w celu związania immunoglobulin rozpoznających sekwencję RGDS.
- Przemyc kolumnę w celu usunięcia niespecyficznie zaadsorbowanych białek.
- Wyeluować przeciwciała postępując według schematu podanego powyżej.
- Zbierać 2 ml frakcje i oznaczyć w nich zawartość białka.
- Frakcje zawierające przeciwciała anty-RGDS_{fm} zebrać razem i doprowadzić pH do wartości 7,5 – 8,0 przy pomocy 0,5 M zasady Tris.

c) Sprawdzenie specyficzności uzyskanych przeciwciał.

- Przygotować serię rozcieńczeń fibrynogenu i fibronektyny, w zakresie od 1 ng/ml do 1 mg/ml.
- Przyciąć niewielki arkusz azotanu celulozy i nanieść nań, w dwóch rzędach, w odstępach 1,5 cm, po 2 μ l poszczególnych rozcieńczeń fibronektyny

i fibrynogenu.

- Nanoszenie próbek rozpocząć od roztworu o najniższym stężeniu białka używając osobnej końcówki do pipety dla fibronektyny i dla fibrynogenu.
- Wysuszyć arkusz azotanu celulozy, a następnie zamoczyć go w 1% roztworze odtłuszczonego mleka (lub 1% BSA) stosując płaskie naczynie.
- Po 30 min. inkubacji, dodać oczyszczone przeciwciała anti-RGDS_{fn}, do końcowego stężenia około 1 µg/ml (rozcieńczenie 1:1000).
- Inkubację z przeciwciałami prowadzić w temperaturze pokojowej przez 3 godz. (lub 4°C przez 10 godz.), a następnie trzykrotnie przemyć arkusz azotanu celulozy, używając w tym celu 100 ml 1% roztworu mleka z dodatkiem 0,01% Tween 20.
- Dodać kozich przeciwciał dla króliczych IgG związanych z peroksydazą chrzanową, do końcowego stężenia około 1 µg/ml (lub zgodnie z instrukcją producenta).
- Inkubować w ciągu 1,5 – 2 godz., nadmiar przeciwciał odmyć przez trzykrotnie płukanie porcjami 1% roztworu odtłuszczonego mleka z dodatkiem 0,01% Tween 20.
- W celu wywołania barwy, przygotować roztwór substratu (po rozpuszczeniu 3 mg 4-chloro-1-naftolu w 3 ml metanolu i uzupełnieniu wodą do 10 ml, dodać 6 µl 30% H₂O₂) i wybarwić arkusz azotanu celulozy w temperaturze pokojowej przez 3-8 min. Następnie przemyć go wodą i porównać intensywność barwy obu rzędów.



Rys. 8.1.

Przykład izolowania monospecyficznych przeciwciał poliklonalnych z zastosowaniem techniki chromatografii powinowactwa. Pierwszy etap izolowania przeciwciał anti-fibronektynowych przedstawiony jest linią ciągłą. Linia przerywana pokazuje wyniki izolowania monospecyficznych przeciwciał rozpoznających sekwencję RGDS w cząsteczce fibronektyny. Uzyskane przeciwciała wykazywały wysoki stopień specyficzności w stosunku do fibronektyny, co zilustrowane jest przy pomocy dot-immunoblotu.

Oczekiwane wyniki:

W pierwszym etapie doświadczenia z surowicy odpornościowej wyizolowana jest cała pula przeciwciał anti-fibronektynowych. Dopiero w drugim etapie uzyskane będą monospecyficzne przeciwciała rozpoznające region zawierający sekwencję RGDS w cząsteczce fibronektyny. O ich specyficzności można przekonać się w trzeciej części przykładu, gdzie zastosowano je do rozpoznawania swoistego antygeny w cząsteczce fibronektyny i – dla kontroli – w cząsteczce fibrynogenu (zawierającego również sekwencję RGDS). Należy spodziewać się, że wybarwienie powinno wystąpić tylko w rzędzie, w którym naniesiono fibronektynę.

Regeneracja i przechowywanie złożeń:

Kolumnę zawierającą złożenie Fibronektyna-**Sepharose 4B** przemyć wodą z dodatkiem 0,01% azydku sodu (50 ml) i przechowywać w 4° C. Kolumnę wypełnioną złożeniem RGDS-**Sepharose 4 FF** przemyć również wodą (25 ml), a następnie 20 % etanolem (25 ml) i przechowywać w 4°C.

Uwagi:

1. Złożenia fibronektyna-**Sepharose 4B** i RGDS-**Sepharose 4 FF** należy przygotować dokładnie według schematu z przykładu 8.1. W przypadku wiązania peptydu RGDS należy zastosować złożenie **NHS-activated Sepharose 4 FF**.
2. Przeciwciała anti-(RGDS_{fin}) można wyizolować w jednym kroku bezpośrednio z surowicy odpornościowej. Postępowanie takie wiąże się jednak z większym ryzykiem utraty monospecyficzności
3. Dobre efekty w chromatografii powinowactwa daje rozcieńczenie próbki buforem startowym do stężenia białka poniżej 1 mg/ml.

Przykład 8.3.

Izolowanie peptydu przy użyciu złożenia zawierającego unieruchomione przeciwciała (3)

Wprowadzenie:

Za pomocą złożenia zawierającego kowalencyjnie związane przeciwciała (monoklonalne lub monospecyficzne poliklonalne) można stosunkowo łatwo wyizolować rozpoznawany przez nie antygen nawet wtedy, gdy znajduje się on w niewielkim stężeniu w roztworze razem z innymi cząsteczkami. W tym celu należy przez kolumnę, wypełnioną uprzednio przygotowanym złożeniem zawierającym unieruchomione przeciwciała, przepuścić próbkę

zawierającą poszukiwany antygen (rozcieńczone osocze, ekstrakt komórek, itp.). Po związaniu antygeny z kolumną i wymyciu nieswoiście zaadsorbowanych białek, wymywa się specyficznie związany antygen, najczęściej przez zmianę wartości pH eluentu. Oprócz wyodrębnienia interesującego nas antygeny, technika ta pozwala również na wielokrotne jego zagęszczenie w jednym etapie preparatyki.

Material.

1. Osocze ludzkie.
2. Surowica odpornościowa królika immunizowanego ludzkim fibrynogenem.
3. Złoże RGDS-**Sepharose 4 FF**.
4. Złoże CNBr-**Sepharose 4B**.

Aparatura:

1. Spektrofotometr UV VIS **Ultrospec 2000**.

Odczynniki:

1. Bufor PBS, pH 7,4
2. 1 M NaCl z dodatkiem 0,1 % Tween 20 w PBS, pH 7,4.
3. 0,5 M kwas octowy.
4. 0,5 M zasada Tris.
5. 1 mM HCl.
6. 0,1 M bufor boranowy, pH 8,3.
7. 0,2 M glicyna w buforze boranowym.
8. 0,1 M bufor boranowy z dodatkiem 1 M NaCl, pH 8,3.
9. 0,1 M bufor octanowy z dodatkiem 1 M NaCl, pH 4,0.
10. 20% etanol.

Przygotowanie kolumn chromatograficznych:

a) RGDS-Sepharose 4 FF**.**

- Przygotować 10 ml złoże ze związanym peptydem RGDS, upakować je w kolumnie **PD-10**, a następnie przemyć 50 ml buforu PBS.
- Tak zrównoważone złoże zabezpieczyć przed wyschnięciem.

b) anty-RGDS_{fg}-Sepharose 4B**.**

- Przygotowane w drugiej części przykładu złoże (około 3,5 ml) ze związanymi przeciwciałami anty-RGDS_{fg} upakować w plastikowej kolumnie **PD-10** i przepuścić przez nią 10 ml buforu PBS.
- Zabezpieczyć przed wyschnięciem.

Przebieg doświadczenia:

a) Izolowanie przeciwciał rozpoznających sekwencję RGDS w cząsteczce fibrynogenu (RGDS_{fg}).

- Króliczą surowicę odpornościową (20 ml), uzyskaną od królika immunizowanego ludzkim fibrynogenem, rozcieńczyć 10-cio krotnie buforem PBS i przepuścić przez przygotowaną wcześniej kolumnę. Ma to na celu związanie tych immunoglobulin, które rozpoznają sekwencję RGDS.
- Przemyć kolumnę buforem PBS (20 ml), następnie buforem PBS z dodatkiem Tween 20 oraz NaCl (50 ml) i ponownie buforem PBS. Sprawdzić spektrofotometrycznie ($\lambda = 280$ nm), czy w wypływającym z kolumny eluencie nie ma śladowych ilości białka.

- Wymyć specyficznie związane przeciwciała przy pomocy 0,5 M kwasu octowego.
- Zbierać 2 ml frakcje i spektrofotometrycznie ($\lambda = 280 \text{ nm}$) oznaczyć w nich zawartość białka.
- Wybrać frakcje zawierające przeciwciała anti-RGDS_{fg} i poddać uzyskany materiał dializie wobec 0,1 M buforu boranowego, pH 8,3.

b) Wiązanie przeciwciał anti-RGDS_{fg} do CNBr-Sepharose 4B.

- Odważyć 1g żelu **CNBr-Sepharose 4B**. Ta ilość suchego żelu, po uwodnieniu, daje około 3,5 ml złoża.
- Przenieść żel na lejek ze szklanym filtrem i przemyć go porcjami 1 M HCl (700 ml).
- Natychmiast przemyć żel 0,1 M buforem boranowym (15 ml)
- Zawiesinę żelu zmieszać z wyizolowanymi wcześniej przeciwciałami anti-RGDS_{fg}, znajdującymi się również w buforze boranowym. Na żadnym z tych etapów nie wolno doprowadzić do wyschnięcia żelu.
- Zawiesinę inkubować w ciągu 2 godz. w temperaturze pokojowej (lub przez 16-24 godz. w 4° C) delikatnie mieszając bez użycia dipoli magnetycznych.
- Inkubację można przerwać wcześniej, jeżeli oznaczona spektrofotometrycznie ($\lambda = 280 \text{ nm}$) w supernatancie ilość białka spadnie poniżej 90% początkowej ilości.
- Po zakończeniu inkubacji żel należy odwirować i po usunięciu supernatantu zawiesić w 10 ml 0,2 M roztworu glicyny. Dodanie glicyny powoduje zablokowanie pozostałych wolnych grup aktywnych żelu.
- Inkubację z glicyną kontynuować w ciągu następnych 2 godz. w temperaturze pokojowej (lub przez 16-24 godz. w 4° C), z delikatnym mieszaniem.
- Nieswoiście związane białko usunąć z żelu przemywając kolejno 20 ml porcjami:
 - a) 3-krotnie 0,1 M buforem boranowym zawierającym 1 M NaCl (pH 8,3),
 - b) wodą,
 - c) 3-krotnie 0,1 M buforem octanowym zawierającym 1 M NaCl (pH 4,0),
 - d) 2-krotnie wodą,
 - e) 2-krotnie 0,1 M buforem boranowym.
- Przygotowane złoże użyć do izolowania peptydów zawierających RGDS lub przechowywać z dodatkiem środka bakteriostatycznego (20 % etanol, 0,1% azydek sodu, itp.) w temperaturze 4-8° C.

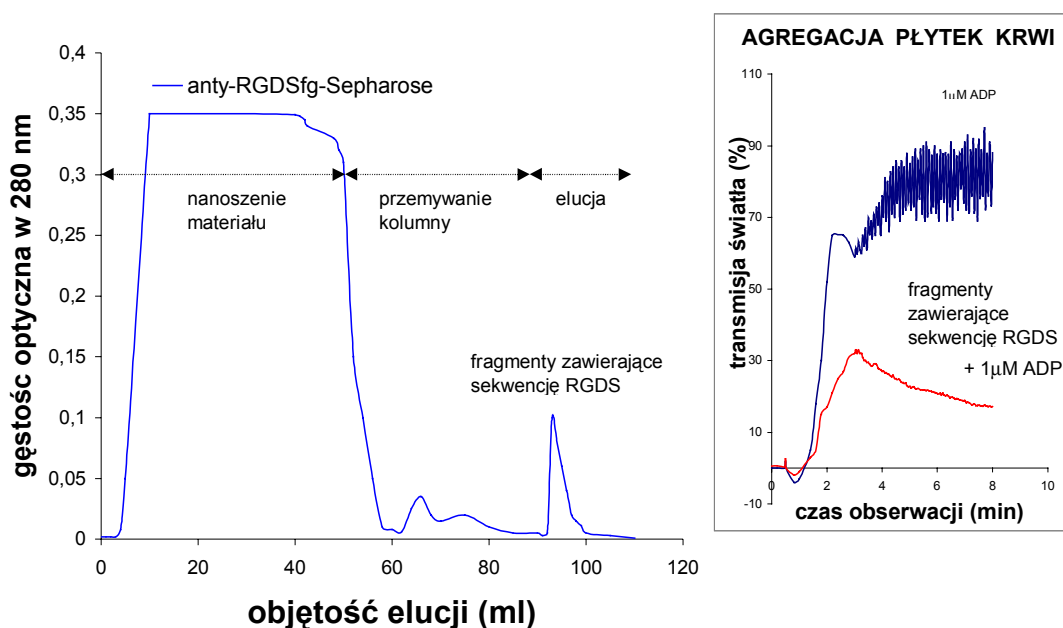
c) Izolowanie z przesączu osoczowego fragmentów degradacji fibrynogenu zawierających sekwencję RGDS.

- Osocze ludzkie (10 ml) rozcieńczyć 5-krotnie buforem BBS i przesączyć przez filtr AMICON YM-10.
- W przesączu osoczowym znajdują się tylko peptydy i fragmenty degradacji białek o masie cząsteczkowej mniejszej niż 10 000.
- Przez przygotowaną kolumnę (ze złożem anti-RGDS_{fg}-**Sepharose 4B**) przepuścić przesącz osoczowy.
- Odmyć niespecyficznie zaadsorbowane cząsteczki, najpierw buforem PBS (10 ml), a następnie 1 M NaCl i w końcu 0,1 M roztworem Tween 20 w buforze PBS (10 ml).
- Po ponownym przemyciu kolumny buforem PBS (10 ml), specyficznie związane cząsteczki wyeluować przy użyciu 0,5 M roztworu kwasu octowego.

- Zbierać 1 ml frakcje i natychmiast zobojętnić je przez dodanie 1 ml 0,5 M roztworu Tris.
- Stężenie wyizolowanego materiału oznaczyć metodą spektrofotometryczną lub metodą mikrobiuretową.

Oczekiwane wyniki:

W pierwszym etapie doświadczenia wyizolowane zostaną przeciwciała anty-fibrynogenowe rozpoznające w specyficzny sposób fragment fibrynogenu zawierający sekwencję RGDS. W następnym etapie, przeciwciała te związane zostaną ze złożem CNBr **Sepharose 4B**, stanowiąc dogodne narzędzie do późniejszego izolowania fragmentów degradacji fibrynogenu zawierających sekwencję RGDS. Obecność wyizolowanych fragmentów degradacji fibrynogenu, zawierających sekwencję RGDS, można oznaczyć w funkcjonalnym teście kompetycyjnego hamowania wiązania fibrynogenu do aktywowanych płytek krwi lub w teście agregacji płytek krwi.



Rys. 8.2.

Przykład izolowania z osocza ludzkiego fragmentów degradacji fibrynogenu zawierających sekwencję RGDS. Wyizolowany materiał poddany został testowi funkcjonalnemu, w którym wykazał hamujący wpływ na agregację płytek krwi wywołaną ADP.

Regeneracja i przechowywanie złoża:

a) Po zakończonej pracy kolumnę wypełnioną złożem RGDS-Sepharose 4 FF przemyć wodą (30 ml) a następnie 20 % etanolem (30 ml) i przechowywać w 4°C.

b) Kolumnę zawierającą anty-RGDS_{fg}-**Sepharose 4B**, po zakończonej pracy, przemyć 15 ml buforu PBS (jeżeli będzie ponownie wykorzystana w krótkim czasie do izolowania peptydów lub białek), albo wodą (15 ml), potem 20% roztworem etanolu (15 ml) i przechowywać w 4°C.

Uwagi:

1. Dobre efekty w chromatografii powinowactwa daje rozcieńczenie próbki buforem startowym do stężenia białka poniżej 1 mg/ml.
2. Metoda prezentowana w tym przykładzie zastosowana została do izolowania fragmentów degradacji fibrynogenu z ludzkiego osocza, dostarczając dowodu na znacznie podwyższony poziom tych fragmentów w osoczu pacjentów cierpiących na przewlekłą niewydolność nerek (3). Pokazano tam, że dzięki chromatografii powinowactwa można efektywnie izolować interesujące nas molekuly nawet wtedy, gdy ich stężenie jest bardzo niskie i stanowią one tylko niewielką część wszystkich znajdujących się tam molekuł.

Przykład 8.4.

Fracjonowanie podklas mysich immunoglobulin G z surowicy z zastosowaniem białka A (4,5)

Wprowadzenie:

Białko A o masie cząsteczkowej około 42 k produkowane jest przez *Staphylococcus aureus*. Wiąże ono specyficznie fragment Fc IgG, przy czym powinowactwo wiązania w znacznym stopniu zależy zarówno od pochodzenia gatunkowego IgG, jak i jej podklasy. Dla przykładu, białko A wiąże silnie wszystkie podklasy ludzkich immunoglobulin z wyjątkiem IgG₃. Równie silnie wiązane są cząsteczki IgG pochodzące od królika, świnki morskiej, świni i psa. Słabiej wiązane są cząsteczki IgG pochodzące od krowy, kozy i myszy. Bardzo słabe jest wiązanie cząsteczek IgG pochodzących od konia, owcy i szczura. Różna siła wiązania poszczególnych rodzajów immunoglobulin G pozwala na łatwe ich frakcjonowanie metodą chromatografii powinowactwa. W pierwszym etapie, wiąże się zwykle całą pulę IgG ze złożem **Protein A - Sepharose**, aby następnie po odmyciu niespecyficznie zaadsorbowanych białek, frakcjonować IgG należące do różnych podklas, stosując eluent o narastającej sile rugowania (rosnącym lub malejącym pH eluentu).

Material:

1. Surowica mysia.

Aparatura:

1. Pompa perystaltyczna **P1**.
2. Kolumna **HiTrap Protein A**, 1 ml
3. Aplikator próbek **SA-50**.
4. Zawór **LV4**.
5. Zawór **LV3**, dwie sztuki.
6. Detektor **UV1** z filtrem 280 nm.
7. Rejestrator **Rec-111**.
8. Kolektor frakcji **RediFrac**.

Uwaga! Alternatywnie zamiast detektora **UV1** i rejestratora **Rec-111** można zastosować spektrofotometr **Ultrospec 2000** z celką przepływową 75 μ l i modułem programu komputerowego **Swift TimeDrive**, co pozwala gromadzić dane w pamięci komputera.

Odczynniki:

1. Bufor A - 0,2 M bufor fosforanowy, pH 8,0.
2. Bufor B - 0,1 M bufor cytrynianowy, pH 3,5
3. 20% etanol.

Przygotowanie systemu i kolumny chromatograficznej:

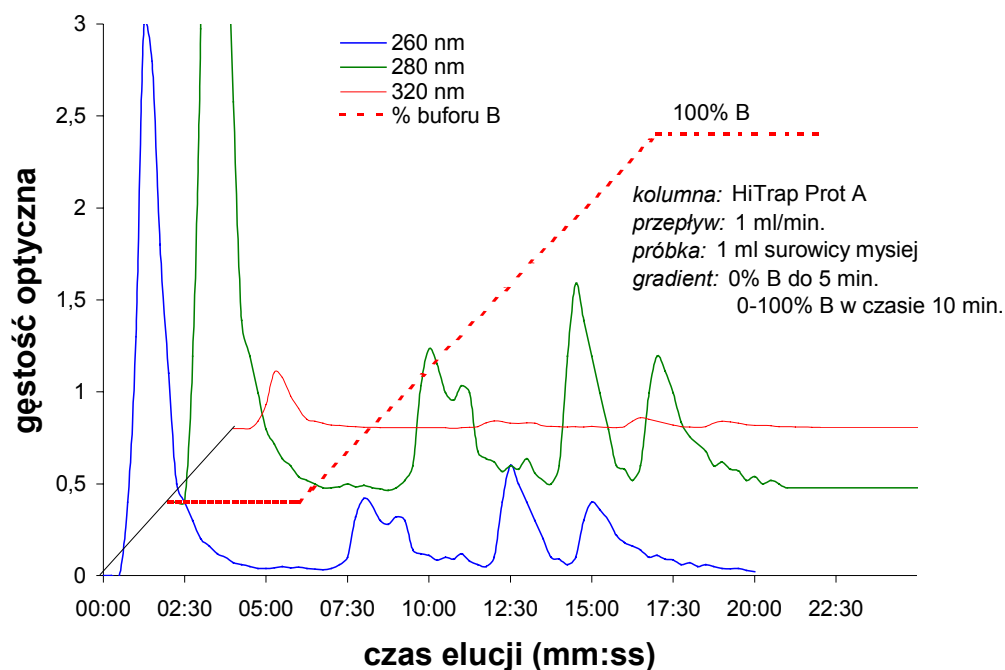
- Kolumna **HiTrap Protein A** (1 ml) jest gotową do użycia kolumną chromatograficzną przeznaczoną do prac z cząsteczkami IgG różnych podklas. Kolumna jest firmowo zabezpieczona 20% etanolem.
- Przygotowane bufony A i B przepuścić przez filtr (0,45 μ m) i odpowietrzyć pod próżnią.
- Bufory nalać do odpowiednich naczyń. Bufor A (0,5 l) do naczynia A oraz do pierwszego naczynia **GM1** (50 ml). Bufor B (50 ml) do drugiego naczynia **GM1** (rysunek 5.1).
- Zamontować kolumnę **HiTrap protein A** w miejsce kolumny **XK**, uruchomić system tak jak opisano w przykładzie 5.1 i przepuścić przez kolumnę 10 ml buforu A, przy objętościowej prędkości przepływu 2 ml/min.

Przebieg doświadczenia:

- Surowicę mysią (0,2 ml) rozcieńczyć 10-krotnie buforem A i nanieść przy pomocy strzykawki do naczynia aplikacyjnego **SA-50**.
- Po ustaleniu się linii bazowej na rejestratorze przełączyć położenie zaworu **LV4** w pozycję umożliwiającą naniesienie próbki na kolumnę.
- Pozwolić aby próbka została naniesiona na kolumnę (3 ml buforu A) i wtedy włączyć naczynie **GM1** oraz kolektor frakcji.
- Zawory **LV3** przełączyć w położenia umożliwiające formowanie gradientu oraz zbieranie frakcji.

Oczekiwane wyniki:

Na chromatogramie zarejestrowanym przez rejestrator powinny pojawić się cztery osobne szczyty. W pierwszym z nich, największym, zawarte są immunoglobuliny: IgM, IgA, IgE, oraz pozostałe białka surowicy. Białka te przepłynęły przez kolumnę bez oddziaływania z białkiem A. Kolejny szczyt wymyty przy pH około 6,0 zawiera IgG₁, następnie eluowane są IgG_{2a} (pH 4,5) i w końcu IgG_{2b} (pH 3,5).



Rys 8.3.

Separacja podklas IgG z surowicy mysiej. W doświadczeniu zamiast detektora **UV1** i rejestratora **Rec-111** użyto spektrofotometru **Ultrospec 2000**. Zamiana ta pozwoliła na jednoczesną rejestrację zmian gęstości optycznej wypływającego z kolumny materiału w trzech długościach fali (260 nm, 280 nm, 320 nm) i szybką ocenę ilości białka we frakcjach przy pomocy formuły Warburga (patrz uwagi). Linia przerywaną zaznaczono zmianę składu buforu realizowaną przez naczynie **GM-1**.

Regeneracja i przechowywanie kolumny:

Po zakończonej elucji kolumnę przemyć ponownie buforem fosforanowym (10 ml). Tak przygotowane złożo jest gotowe do powtórnego użycia. W przypadku dłuższego przechowywania, złożo należy przemyć wodą (10 ml), a następnie 20 % roztworem etanolu (3 ml) i pozostawić w temperaturze pokojowej.

Uwagi:

1. Takie same rezultaty można uzyskać stosując zamiast całego systemu chromatograficznego tylko kolumnę **HiTrap Protein A** oraz zwykłą strzykawkę. Do elucji związanych cząsteczek IgG można wtedy przygotować porcje buforów o malejącej wartości pH, a zawartość białka we frakcjach, zbieranych ręcznie, można oznaczyć za pomocą spektrofotometru.
2. Nie dysponując kolumnką **HiTrap Protein A** można z powodzeniem pracować z kolumną własnej konstrukcji wypełnioną złożem **Protein A Sepharose CL-4B**.
3. Zastosowanie spektrofotometru **Ultrospec 2000** pozwala na szybką i dokładną ocenę ilości białka we frakcjach dzięki równaniu Warburga:

$$c \text{ (mg/ml)} = 1,55 (E_{280} - E_{320}) - 0,76 (E_{260} - E_{320})$$

gdzie: E_{260} , E_{280} i E_{320} odpowiadają ekstynkcjom światła zmierzonym w odpowiednich długościach fali.

Przykład 8.5.

Izolowanie fragmentów Fab i Fc immunoglobulin za pomocą białka A (5,6)

Wprowadzenie:

Złoże z kowalencyjnie związanym białkiem A może być wykorzystane do szybkiego oczyszczenia fragmentów Fab i (Fab')₂ od fragmentów Fc. W wyniku hydrolizy IgG za pomocą papainy lub pepsyny odcięte zostają fragmenty Fc i pozostają jedno- lub dwuwalencyjne fragmenty odpowiednio Fab i (Fab')₂. W celu ich wyodrębnienia produkty hydrolizy przepuszcza się przez kolumnę ze złożem zawierającym kowalencyjnie związane białko A. W trakcie przepływu przez kolumnę, z mieszaniny białek selektywnie wychwytywane są przez białko A fragmenty Fc, oraz niestrawione cząsteczki IgG. W materiale wypływającym z kolumny znajdują się natomiast, w zależności od użytego enzymu, fragmenty Fab lub (Fab')₂. Możliwe jest dalsze oczyszczenie fragmentów Fc od całych cząsteczek IgG na drodze filtracji żelowej. Pozwala na to znaczna różnica między masami cząsteczkowymi obu tych białek (160 k dla IgG oraz 25 k dla Fc).

Material:

1. Produkty hydrolizy IgG powstałe po trawieniu papainą.
2. **Protein A-Sepharose CL-4B.**

Aparatura:

1. Spektrofotometr UV VIS **Ultrospec 2000**

Odczynniki:

1. Bufor A - 0,2 M bufor fosforanowy, pH 7,5.
2. Bufor B - 0,2 M bufor fosforanowy, 1 M NaCl, pH 7,5.
3. Bufor C - 0,1 M bufor cytrynianowy, pH 3,5.
4. 20% etanol

Przygotowanie kolumny chromatograficznej:

- Złoże **Protein A-Sepharose CL-4B** (2 ml) umieścić w plastikowej kolumnie **PD-10** i przemyć buforem A (10 ml).
- Zabezpieczyć przed wyschnięciem złoża i pozostawić do dalszego użytku.

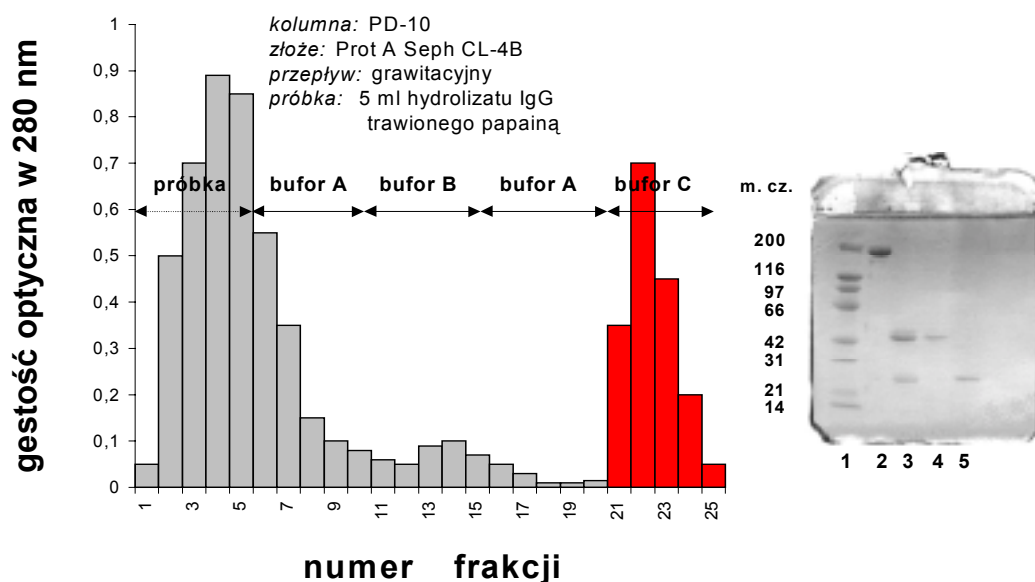
Przebieg doświadczenia:

- Próbkę hydrolizatu IgG (5 ml), po trawieniu papainą, rozcieńczyć buforem A do stężenia białka nie przekraczającego 1 mg/ml.
- Przepuścić tak przygotowaną próbkę przez kolumnę.
- Zbierać wypływający z kolumny materiał w postaci 2 ml frakcji.
- Spektrofotometrycznie oznaczyć frakcje zawierające białko ($\lambda = 280 \text{ nm}$).
- Przemyć kolumnę buforem A (10 ml), buforem B (10 ml) i ponownie buforem A (10 ml).
- Specyficznie związane białka eluować za pomocą buforu C (bufor cytrynianowy, pH 3,5).

- Zbierać frakcje o objętości 2 ml.
- Spektrofotometrycznie oznaczyć w nich zawartość białka ($\lambda = 280 \text{ nm}$)
- Frakcje zawierające fragmenty Fc poddać dializie wobec buforu A.

Oczekiwane wyniki:

W trakcie przepływu próbki przez kolumnę dojdzie do adsorpcji na białku A fragmentów Fc i niestrawionych cząsteczek IgG, natomiast fragmenty Fab wypłyną z kolumny bez oddziaływań. Czystość i jakość uzyskanych fragmentów Fab i Fc można ocenić na drodze elektroforezy, rozdzielając uzyskane preparaty w 12,5% żelu poliakrylamidowym, zawierającym SDS, w warunkach nieredukujących. Fragmenty Fab i Fc powinny wędrować w żelu jako białka o masach odpowiednio 45 k i 25 k.



Rys. 8.4.

Przykład separacji fragmentów Fab i Fc immunoglobulin G trawionych papainą. Analiza elektroforetyczna uzyskanych fragmentów wskazuje na ich wysoką homogenność. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy użyciu automatycznego systemu elektroforezy **PhastSystem** w żelu **PhastGel 12,5%**. W poszczególnych ścieżkach rozdzielano: 1 - standardy białkowe, 2 - IgG przed trawieniem, 3 - IgG poddane trawieniu papainą, 4 - fragmenty Fab, 5 - fragmenty Fc.

Regeneracja i przechowywanie złoża:

Po rozdziale, złoże przemyć wodą (40 ml), a następnie 20% etanolem (10 ml) i przechowywać w 4°C.

Uwagi:

1. Jeżeli uzyskany preparat fragmentów Fc zawiera znaczną domieszkę całych immunoglobulin (160 k) to można te białka rozdzielić stosując technikę filtracji żelowej tak jak w przykładzie 4.2.
2. Fragment (Fab')₂ są bardzo przydatnym narzędziem stosowanym w badaniach oddziaływania przeciwciał z komórkami. Wiele komórek wyposażonych jest w powierzchniowe receptory Fc, wiążące całe cząsteczki IgG przez ich fragment Fc. Pozbawienie cząsteczki IgG tego fragmentu eliminuje ten rodzaj oddziaływań w prowadzonych badaniach.

Przykład 8.6.**Fracjonowanie glikoprotein osocza krwi z zastosowaniem konkanawaliny A (7)****Wprowadzenie:**

Konkanawalina A oddziałuje z resztami cukrowymi. Reakcja ta wykorzystywana jest powszechnie do frakcjonowania cząsteczek białkowych i lipoprotein, które zawierają boczne łańcuchy wielocukrowe. W zależności od liczby i umiejscowienia grup cukrowych, zawierające je cząsteczki różnią się pod względem powinowactwa w oddziaływaniu z unieruchomioną na nośniku konkanawaliną. Zastosowanie eluentów, które w różnym stopniu współzawodniczą o miejsca wiążące na konkanawalinie A, pozwala na kontrolowane wymywanie przyłączonych do złoża cząsteczek.

Materiał:

1. Mrożone osocze ludzkie lub wieprzowe.
2. Złoże **Con A-Sepharose 4B**.

Aparatura:

1. Spektrofotometr UV VIS **Ultrospec 2000**
2. Wirówka laboratoryjna (10 000 x g, 4 x 50 ml)

Odczynniki:

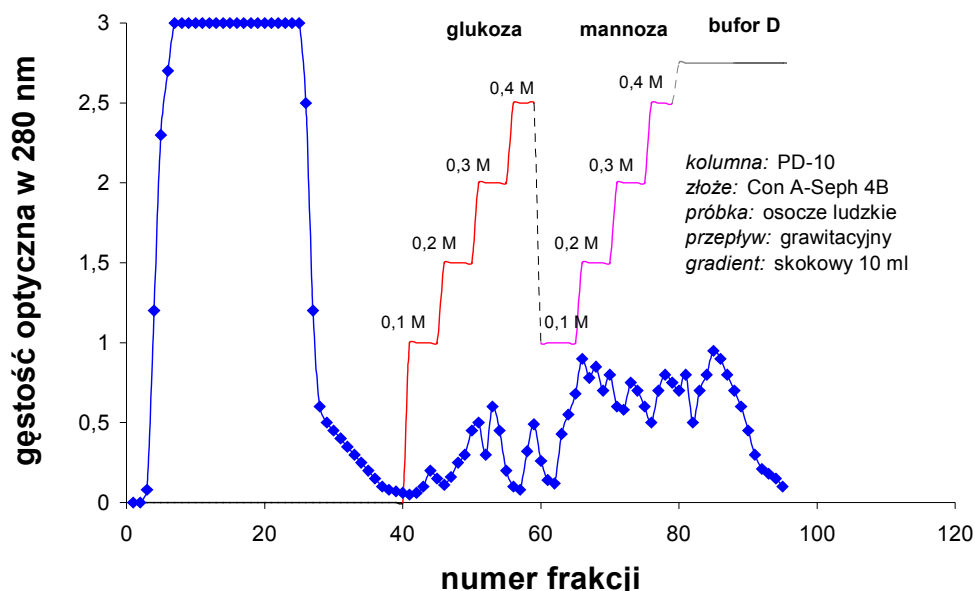
1. Bufor A - 0,1 M bufor fosforanowy zawierający: 0,5 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, pH 7,5.
3. Bufor B - 0,5 M glukoza w buforze fosforanowym.
4. Bufor C - 0,5 M mannoza w buforze fosforanowym.
5. Bufor D - 0,1 M bufor boranowy, pH 6,5.
6. 0,01% azydek sodu w buforze fosforanowym

Przygotowanie kolumny chromatograficznej:

- Złoże **Con A-Sepharose 4B** (10 ml) upakować w plastikowej kolumnie **PD-10** i przemyć buforem A (100 ml).
- Zabezpieczyć przed wyschnięciem i pozostawić do użytku w trakcie doświadczenia.

Przebieg doświadczenia:

- Rozmrożone osocze (5 ml) rozcieńczyć do 50 ml przy pomocy buforu A i odwirować.
- Korzystając z wyjściowych roztworów glukozy i mannozy o znanym stężeniu, przygotować ich rozcieńczenia (0,1, 0,2, 0,3 i 0,4 M, po 10 ml każdego rozcieńczenia) używając w tym celu buforu A.
- Na przygotowaną wcześniej kolumnę, zawierającą **Con A-Sepharose 4B**, nanieść próbkę rozcieńczonego osocza.
- Przemyc kolumnę buforem A (30 ml).
- Białka eluować kolejno najpierw glukozą, przepuszczając przez złożę po 10 ml roztworów o narastającym stężeniu.
- Następnie eluować w podobny sposób roztworami mannozy.
- W końcowym etapie przepuścić przez kolumnę bufor D o pH 6,5 (40 ml).
- W trakcie elucji zbierać 2 ml frakcje i oznaczyć w nich stężenie białka przy użyciu metody spektrofotometrycznej.



Rys 8.5.

Fracjonowanie glikoprotein osocza krwi z zastosowaniem konkanawaliny A. Zaadsorbowane na kolumnie cząsteczki glikoprotein eluowane były przy pomocy glukozy i mannozy podawanych na kolumnę w narastających stężeniach.

Oczekiwane wyniki:

W wyniku narastania stężenia najpierw glukozy, a później mannozy należy spodziewać się wymywania z kolumny glikoprotein osoczowych w porządku wynikającym z ilości reszt cukrowych eksponowanych na powierzchni tych molekuł. Należy spodziewać się istnienia w wymywanym materiale glikolipidów, również posiadających boczne łańcuchy cukrowe.

Regeneracja i przechowywanie złoza:

Po zakończonym rozdziale, kolumnę przemyć 100 ml buforu A a następnie 20 ml tego samego buforu z dodatkiem azydku sodu (0,01 %) i przechowywać w 4°C.

Uwagi:

1. Selektywność rozdziału można znacznie poprawić stosując do elucji zaadsorbowanego materiału liniowy gradient stężenia glukozy i mannozy.

Przykład 8.7.

Izolowanie enzymów zależnych od NAD^+ i NADP^+ z zastosowaniem złoza Blue Sepharose (8)

Wprowadzenie:

Związany z żelzem **Sepharose CL-6B** barwnik Cibacron Blue F3G-A wykazuje wysokie powinowactwo do wielu enzymów i białek, w tym do enzymów wymagających NAD^+ i NADP^+ , albumin, czynników krzepnięcia krwi, a także interferonu. Stosując złoże **Blue Sepharose CL-6B** można z łatwością oczyścić te białka. Poniższy przykład dotyczy metody wyodrębniania dehydrogenaz z ekstraktu komórek drożdży.

Material:

1. Ekstrakt białkowy drożdży piekarniczych.
2. **Blue Sepharose CL-6B.**

Aparatura:

1. Spektrofotometr UV VIS **Ultrospec 2000**
2. Wirówka laboratoryjna (10 000 x g, 4 x 50 ml)

Odczynniki:

1. Bufor A - 0,02 M Tris/HCl zawierający: 5 mM MgCl_2 , 0,4 mM EGTA, 2mM 2-merkaptoetanol, pH 6,4.
2. Bufor B - 0,02 M Tris/HCl zawierający: 5 mM MgCl_2 , 0,4 mM EGTA, 2mM 2-merkaptoetanol, pH 8,6.
3. Bufor C - 5 mM NAD^+ w 0,02 M Tris/HCl, pH 6,4.
4. Bufor D - 10 mM NAD^+ w 0,02 M Tris/HCl, pH 6,4.
5. Bufor E - 10 mM NADP^+ w 0,02 M Tris/HCl pH 6,4.
6. 20 % etanol.

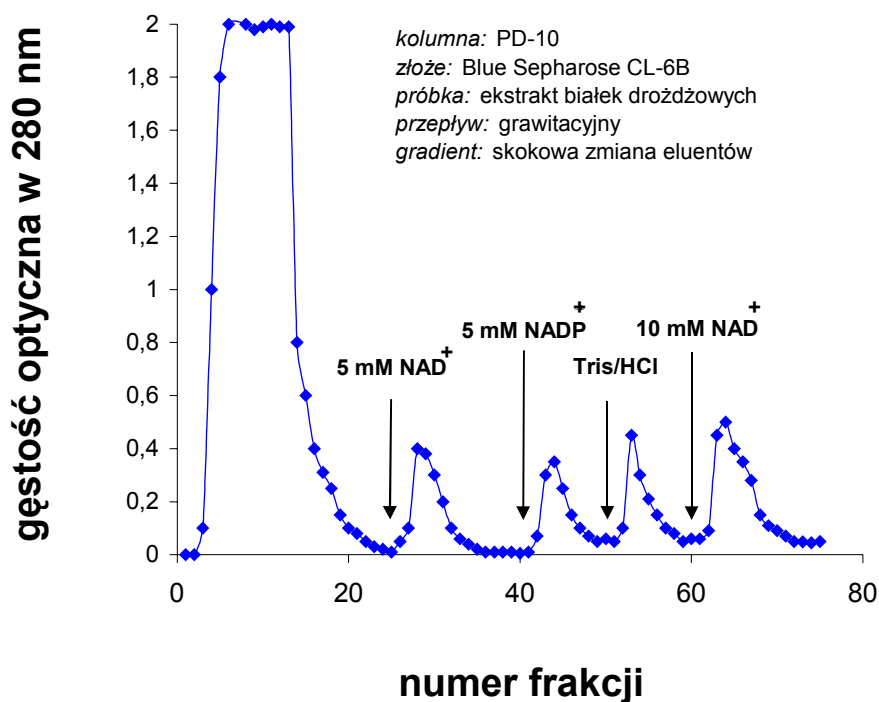
Przygotowanie kolumny chromatograficznej:

- Odważyć 3 g suchego złoza **Blue Sepharose CL-6B** i zamoczyć je w 20 ml buforu A.

- Po około 30 min. upakować złoże w plastikowej kolumnie **PD-10** i przemyć je 60 ml powyższego buforu.
- Tak przygotowane złoże zabezpieczyć przed wyschnięciem i pozostawić do użycia w trakcie doświadczenia

Przebieg doświadczenia:

- Ekstrakt białek drożdży rozcieńczyć buforem A do stężenia 2 mg/ml, odwirować, i przepuścić 20 ml tak przygotowanego ekstraktu przez uprzednio przygotowaną kolumnę, zawierającą złoże **Blue Sepharose CL-6B**.
- Używając tego samego buforu, odmyć niespecyficycznie zaadsorbowane na złożu białka (30 ml).
- Swoiście związane białka eluować za pomocą buforu C (20 ml). Zbierać 2 ml frakcje.
- W następnych etapach, kolumnę przemyć buforem A (10 ml), a kolejne białka związane swoiście eluować kolejno buforem E (20 ml) buforem B (20 ml) i w końcu buforem D (20 ml).
- Cały czas zbierać wypływający z kolumny materiał. W zebranych frakcjach oznaczyć spektrofotometrycznie ($\lambda = 280 \text{ nm}$) stężenie białka.



Rys. 8.6.

Przykład izolowania dehydrogenaz z ekstraktu drożdży piekarniczych przy zastosowaniu złoża **Blue Sepharose**. Kolejno wmywane z kolumny są: niezwiązany materiał, dehydrogenaza alkoholowa, dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa, heksokinaza i dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa.

Oczekiwane wyniki:

W pierwszym pikcie białkowym, wmytym 5 mM roztworem NAD^+ , znajduje się dehydrogenaza alkoholowa. W drugim, wmytym pod wpływem 10 mM roztworu NAD^+ , występuje dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa. W kolejnym pikcie, po elucji bardziej

zasadowym buforem Tris/HCl (pH 8,6), znajduje się heksokinaza i w końcu w ostatnim, eluuje się dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa (10 mM NAD⁺). Końcową identyfikację wyizolowanych enzymów można przeprowadzić stosując testy enzymatyczne.

Regeneracja i przechowywanie złoża:

Po zakończeniu elucji kolumnę przemyć buforem Tris/HCl o pH 6,4 (100 ml), a następnie wodą (100 ml) i 20% etanolem (30 ml). Kolumnę przechowywać w 4°C do ponownego użycia.

Przykład 8.8.

Izolowanie mRNA z zastosowaniem złoża zawierającego Poly(U) (9)

Wprowadzenie:

Złoże **Poly(U)-Sephrose 4B** jest adsorbentem, który specyficznym i odwracalnym sposobem wiąże kwasy nukleinowe zawierające struktury poli(A). Złoże przygotowane jest przez związanie z żelami **Sephrose 4B** długich łańcuchów kwasów poliurydylowych (około 100 podjednostek). Prawie wszystkie cząsteczki mRNA posiadają w swej strukturze sekwencję kwasu poliadenylowego (poli(A)), komplementarną do sekwencji poli(U). Dzięki temu, wykorzystując komplementarność obu molekuł, z łatwością można wyizolować cząsteczki mRNA na drodze chromatografii powinowactwa.

Material:

1. Odwodniony preparat całkowitego RNA.
2. **Poly(U)-Sephrose 4B.**

Aparatura:

1. Spektrofotometr UV VIS **Ultrospec 2000**

Odczynniki:

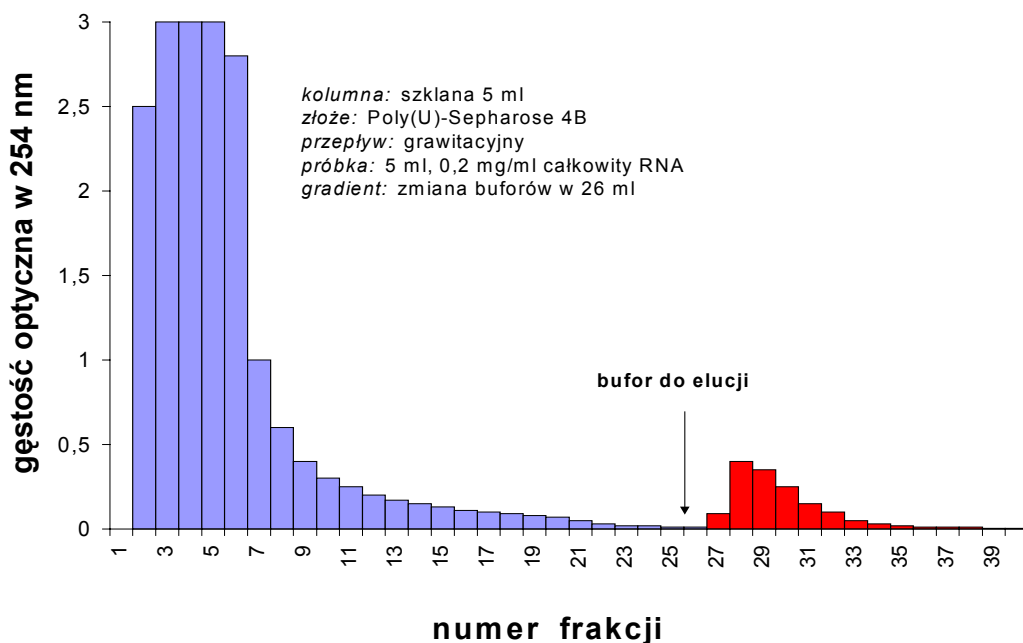
1. Destylowana woda poddana działaniu 0,1% DEPC (diethylpyrocarbonate) i następnie autoklawowana.
2. 0,1 M NaCl.
3. Bufor ekstrakcyjny: 50 mM Tris/HCl zawierający 1% N-lauroylsarkozyny, 30 mM EDTA, pH 7,5.
4. Bufor startowy: 25% roztwór formamidu w 0,7 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5.
5. Bufor do elucji: 90% roztwór formamidu w 10 mM K₂HPO₄, 10 mM EDTA, 0,2% N-lauroylsarkozyny, pH 7,5.

Przygotowanie kolumny:

- Odważyć 1g żelu **Poly(U)-Sepharse 4B**, nanieść na filtr szklany i przemyć 100 ml 0,1 M roztworu NaCl.
- Upakować złoże w szklaną kolumnę (5-10 ml), uprzednio autoklawowaną.
- Przemyć kolumnę 100 ml buforu startowego, zamknąć ją i pozostawić do użycia w trakcie doświadczenia.

Przebieg doświadczenia:

- Destylowaną wodę poddać działaniu 0,1% DEPC przez 12 godz., a następnie autoklawować. Wszystkie bufora muszą być sporządzone z tak przygotowanej wody.
- Próbkę RNA (około 1-3 mg) rozpuścić w buforze ekstrakcyjnym (1 ml), podgrzać do temperatury 65° C i utrzymywać w tej temperaturze przez 5 min.
- Szybko schłodzić próbkę w łaźni lodowej i rozcieńczyć 5-krotnie buforem startowym.
- Tak przygotowaną próbkę przepuścić przez kolumnę z **żelem Poly(U)-Sepharse 4B**.
- Kolumnę przemyć buforem startowym (20 ml) w celu usunięcia niespecyficznie zaadsorbowanych cząsteczek.
- Specyficznie związane, przez wiązania wodorowe, cząsteczki mRNA można wymyć buforem do elucji, zawierającym dużą ilość (90%) formamidu (15 ml), i zbierać 1 ml frakcje.
- Frakcje zawierające mRNA zidentyfikować spektrofotometrycznie ($\lambda=254$ nm), pamiętając o tym, aby jako próbkę referencyjną zastosować bufor do elucji.



Rys. 8.7.

Izolowanie mRNA z całkowitego RNA z zastosowaniem chromatografii powinowactwa na kolumnie **Poly(U)-Sepharse 4B**.

Oczekiwane wyniki:

W wyniku oddziaływań cząsteczki mRNA zawierającej fragment poli(A), komplementarny do unieruchomionego na złożu liganda poli(U), dojdzie do adsorpcji

cząsteczek mRNA na kolumnie. Zastosowanie eluentu o wysokim stężeniu formamidu pozwala na rozerwanie wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi cząsteczkami i wymycie cząsteczek mRNA.

Regeneracja i przechowywanie złoża:

Po zakończeniu pracy kolumnę przemyć buforem do elucji (20 ml), a następnie buforem startowym (20 ml) i przechowywać w 4°C w okresie do czterech tygodni.

Uwagi:

1. Niezwykle istotne jest stosowanie w trakcie całego eksperymentu odpowiednio przygotowanej wody. Ma to na celu wyeliminowanie aktywności enzymów trawiących cząsteczki RNA (RNaz).

Przykład 8.9.

Izolowanie białek zawierających wolne grupy –SH (10)

Wprowadzenie:

Chromatografia kowalencyjna, szczególnie rodzaj chromatografii powinowactwa, znalazła szczególne zastosowanie w przypadku izolowania cząsteczek zawierających grupy tiolowe. Białka pasma 3 należą do rodziny tio-glikoprotein, znajdujących się w błonach erytrocytów. Białka te biorą udział w transporcie jonów przez błonę erytrocytarną. Kowalencyjna chromatografia powinowactwa pozwala stosunkowo łatwo, w jednym etapie, wyizolować te białka w postaci aktywnej.

Material:

1. Erytrocyty krwi ludzkiej lub wieprzowej.
2. **Activated Thiol-Sepharose 4B.**

Aparatura:

1. Spektrofotometr UV VIS **Ultrospec 2000.**
2. Wirówka laboratoryjna (10 000 x g, 4 x 50 ml)

Odczynniki.

1. 10% roztwór Tritonu X-100.
2. 0,9% roztwór NaCl.
3. Bufor startowy: 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5.
4. Bufor do elucji: 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM L-cysteiny, pH 8,0.
5. Bufor do regeneracji złoża: 10 mM Tris/HCl, 1,5 mM dwusiarczku dwupirydyłu, pH 8,0.

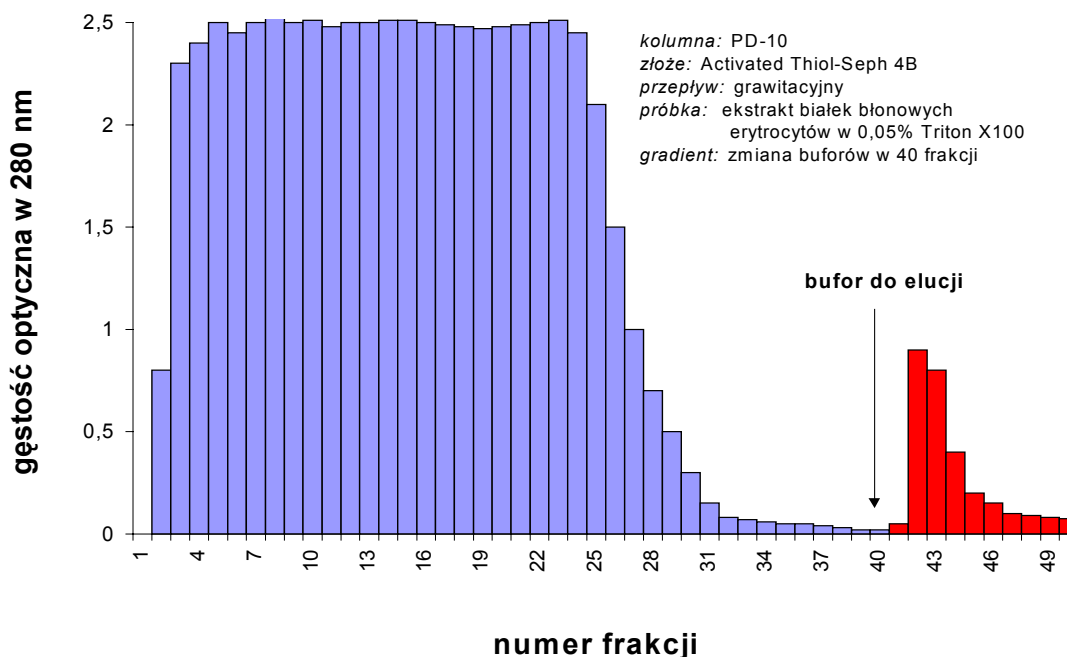
Uwaga! Wszystkie bufora wykonać korzystając z dobrze od powietrzonej wody dejonizowanej.

Przygotowanie kolumny chromatograficznej:

- Odważyć 1 g złoże **Activated Thiol-Sepharose 4B**, nanieść na szklany filtr i przemyć 200 ml destylowanej i odpowietrzonej wody.
- Bezpośrednio po tym upakować żel w szklanej kolumnie i zrównoważyć buforem startowym (30 ml).
- Zabezpieczyć kolumnę przed wysychaniem.

Przebieg doświadczenia:

- Erythrocyty (5 ml) przemyć 3-krotnie solą fizjologiczną i dokonać ich lizy w odpowietrzonej wodzie.
- Przemyć błony erytrocytarne i zawiesić w buforze startowym (10 ml) z dodatkiem 0,1% Triton X-100.
- Ekstrakcję białek błonowych prowadzić przez dwie godziny w temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając próbkę.
- Mieszanicę odwirować a supernatant zebrać, rozcieńczyć pięciokrotnie i przepuścić przez uprzednio przygotowaną kolumnę zawierającą złoże **Activated Thiol-Sepharose 4B**.
- Stosując bufor startowy (30 ml), usunąć z kolumny niespecyficzenie zaadsorbowane cząsteczki.
- Przystąpić do wymywania kowalencyjnie związanego materiału przy pomocy buforu do elucji (20 ml).
- Wypływający z kolumny materiał zbierać w 2 ml frakcjach i określić spektrofotometrycznie ($\lambda=280$ nm) frakcje zawierające białka pasma 3.



Rys. 8.8.

Izolowanie białek pasma 3 z ekstraktu białkowego błon erytrocytarnych z zastosowaniem chromatografii powinowactwa wykorzystującej złoże **Activated Thiol-Sepharose 4B**.

Oczekiwane wyniki:

Na skutek oddziaływania grup tiolowych, znajdujących się w cząsteczkach erytrocytarnego białka pasma 3, z wolnymi grupami tiolowymi unieruchomionymi na złożu dochodzi do specyficznej sorpcji cząsteczek białka pasma 3. Wiązanie pomiędzy grupami tiolowymi ma charakter kowalencyjny i powstaje spontanicznie. Wiązanie to nie jest jednak trwałe i można je z łatwością rozbić w obecności cysteiny, co pozwala na wymycie z kolumny zaadsorbowanego białka. Testy aktywności biologicznej pokazują, że wyizolowane tą metodą cząsteczki białka pasma 3 zachowują swą aktywność, co jest trudne do osiągnięcia innymi metodami.

Regeneracja i przechowywanie złoża:

Kolumnę przemyć buforem do regeneracji złoża (30 ml) i ponownie zrównoważyć buforem startowym (30 ml). Kolumnę taką można użyć ponownie lub przechowywać w 4° C przez jeden miesiąc.

Przykład 8. 10.

Izolowanie białek wiążących jony metali (11)

Wprowadzenie:

Większość cząsteczek białkowych w różnym stopniu oddziałuje z jonami metali. Siła tego oddziaływania uzależniona jest od struktury przestrzennej cząsteczki (domeny wiążące jony metali), od zawartości reszt aminokwasowych, które bezpośrednio mogą wiązać jony metali (histydyna, tryptofan i cysteina) oraz od pH otoczenia (optimum w przedziale pH 6-8). Elucja specyficznie zaadsorbowanego materiału możliwa jest przez obniżenie pH i jednoczesne podwyższenie siły jonowej eluentu lub zastosowanie do elucji silnego chelatora jonów dwuwartościowych - EGTA.

Material:

1. Surowica krwi ludzkiej lub wieprzowej.
2. **Chelating Sepharose 6B.**

Aparatura:

1. Spektrofotometr UV VIS **Ultrospec 2000.**
2. Wirówka laboratoryjna (10 000 x g, 4 x 50 ml)

Odczynniki:

1. 20 mM bufor fosforanowy, pH 7,0.
2. 1 mg/ml CuSO₄ w buforze fosforanowym.
3. Eluent A - 100 mM bufor cytrynianowy zawierający 100 mM NaCl, pH 6,0.
4. Eluent B - 100 mM bufor cytrynianowy zawierający 400 mM NaCl, pH 5,0.
5. Eluent C - 100 mM bufor cytrynianowy zawierający 700 mM NaCl, pH 4,0.
6. Eluent D - 100 mM bufor cytrynianowy zawierający 1 M NaCl, pH 3,0.
7. 50 mM EDTA, 1 M NaCl.
8. 20% etanol.

Przygotowanie kolumny chromatograficznej:

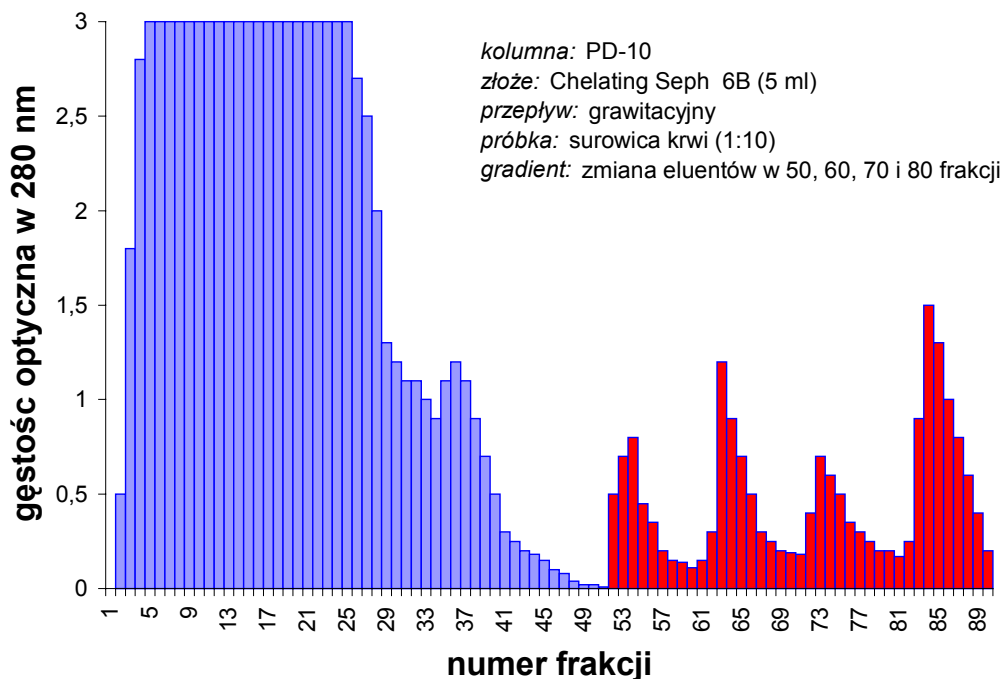
- Pobrać 5 ml złoza i upakować w plastikowej kolumnie **PD-10**.
- Złoże przemyć wodą destylowaną (50 ml) a następnie buforem fosforanowym, pH 7,0 (50 ml).
- Przepuścić przez kolumnę roztwór siarczanu miedzi (20 ml) w celu związania jonów miedzi ze złożem. W wyniku tej operacji złoże powinno zmienić barwę z białej na niebieską.
- Nadmiar jonów miedzi usunąć przemywając kolumnę buforem fosforanowym (20 ml).
- Kolumnę zabezpieczyć przed wyschnięciem.

Przebieg doświadczenia:

- Surowicę krwi (5 ml) rozcieńczyć dziesięciokrotnie w buforze fosforanowym, odwirować i przepuścić przez wcześniej przygotowaną kolumnę.
- Niespecyficzenie zaadsorbowane białka usunąć z kolumny przez ponowne przemycie jej buforem fosforanowym (50 ml).
- Stosując kolejno bufor cytrynianowy o malejącej wartości pH i rosnącej sile jonowej (20 ml każdego z buforów) eluować z kolumny białka związane z jonami miedzi.
- Wypływający z kolumny materiał zbierać w 2 ml frakcjach.
- Metodą spektrofotometryczną ($\lambda=280$ nm) oznaczyć frakcje zawierające białko.

Oczekiwane wyniki:

U podstaw tego rodzaju chromatografii powinowactwa leży możliwość odwracalnego wiązania (chelatowania) jonów metali przez specjalnie przygotowany nośnik. Związane ze złożem jony metali (Zn, Cu, Cd, Hg, Co lub Ni) mogą z kolei specyficzenie adsorbować peptydy i białka wykazujące do nich powinowactwo. Należy spodziewać się, że w trakcie przepuszczania przez kolumnę związaniu ulegną te białka, które wykazują powinowactwo do jonów miedzi. W wyniku zastosowania eluentu o narastającej sile jonowej i malejącej wartości pH dojdzie do selektywnego wymywania tych cząsteczek, które w zmieniających się warunkach zmieniają swą konformację w ten sposób, że zmienia się ich ładunek powierzchniowy i zdolność wiązania jonów miedzi. Cząsteczki, które bardzo silnie związały się z jonami miedzi i nie ulegają elucji w warunkach niskiego pH mogą być usunięte z kolumny wraz z jonami miedzi przez zastosowanie silnego chelatora jonów miedzi – EDTA.



Rys. 8.9.

Fracjonowanie białek surowicy wykazujących powinowactwo do jonów metali.

Regeneracja i przechowywanie złoża:

Kolumnę przemyć 50 mM EDTA (50 ml) co spowoduje usunięcie z niej jonów miedzi a następnie 50 ml destylowanej wody i użyć ponownie lub zakonserwować 20% etanolem (30 ml) i przechowywać w 4°C.

Przykład 8. 11.

Badanie dynamicznej adhezji komórek na unieruchomionych białkach adhezywnych (12)

Wprowadzenie:

Zdolność normalnych komórek eukariotycznych do adhezji powierzchniowej jest jedną z podstawowych cech niezbędnych dla sprawnego ich funkcjonowania i prawidłowego podziału. W procesie adhezji udział biorą wyspecjalizowane białka błonowe komórek, zwane adhezywnymi, oraz białka pozakomórkowe, głównie kolageny, wyściełające powierzchnię kontaktu. Zjawisko adhezji dotyczy również płytek krwi, które z racji braku jądra

komórkowego nie podlegają podziałom, ale są niezbędne dla zabezpieczenia układu krążenia przed wynaczynianiem krwi. Jeżeli z jakiegoś powodu przerwana zostanie ciągłość naczynia krwionośnego to odsłonięte zostaną warstwy podśródbłonka, bogate w kolagen i inne białka adhezywne. Dochodzi wtedy do masywnej adhezji płytek krwi i zaczopowania nieciągłości ściany naczynia. Z drugiej jednak strony adhezja płytek krwi jest przyczyną patologicznych zmian powierzchni ścian naczyń krwionośnych. Każda zmiana struktury powierzchni wewnętrznej naczynia krwionośnego staje się potencjalnie miejscem adhezji płytek krwi i tworzenia się blaszek miażdżycowych. Wynika stąd, że zbyt reaktywne płytki krwi mogą być przyczyną szybko rozwijającej się arteriosklerozy. Właściwa ocena stanu reaktywności płytek krwi może być bardzo pomocna w diagnostyce chorób układu krążenia oraz we właściwej prewencji. Poniższy przykład opisuje możliwość śledzenia adhezji płytek krwi do kolagenu *in vitro* w obecności sił ścinających zbliżonych do tych, które występują w naczyniach krwionośnych.

Material:

1. Krew ludzka (wołowa lub wieprzowa) pobrana na 3.8 %cytrynian sodowy (9:1)
2. Kolagen typ I
3. Albumina wołowa (BSA)
4. **CNBr-Sepharose 4B**

Aparatura:

1. Spektrofotometr UV VIS **Ultrospec 2000** z 75µl kuwetą przepływową.
2. Pompa **P-50**
3. Zawór **LV4**, szt. 2
4. Wirówka laboratoryjna (10 000 x g, 4 x 50 ml)

Odczynniki:

1. Bufor Tyroda - 0,02 M bufor fosforanowy zawierający: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM glukozy, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,4.
2. 0,1 M bufor boranowy, pH 8,3.
3. 0,1 M bufor octanowy w 1,0 M roztworze NaCl (pH 4,0).
4. 0,2 M Glicyna w 0,1 M buforze boranowym.
5. 20% etanol

Przygotowanie ziół: kolagen-Sepharose 4B i BSA-Sepharose 4B:

- Wszystkie czynności należy wykonać dokładnie jak w przykładzie 8.1, pkt b, pamiętając cały czas o tym, żeby wzajemnie nie zanieczyścić przygotowywanych ziół.
- Przygotować po 5 ml każdego ze ziół. Po zakończeniu preparatyki zioła zakonserwować 20% etanolem i przechowywać w temp. 4°C.

Przygotowanie osocza bogatopłytkowego:

- Osocze bogatopłytkowe (PRP) przygotować dokładnie tak, jak opisano w przykładzie 4.4.
- Uzyskane osocze rozcieńczyć 10-cio krotnie buforem Tyroda i użyć do badań w ciągu dwóch godzin od pobrania krwi.

Rys. 8.10.

Schemat systemu do badania adhezji komórkowej. W skład systemu wchodzi:

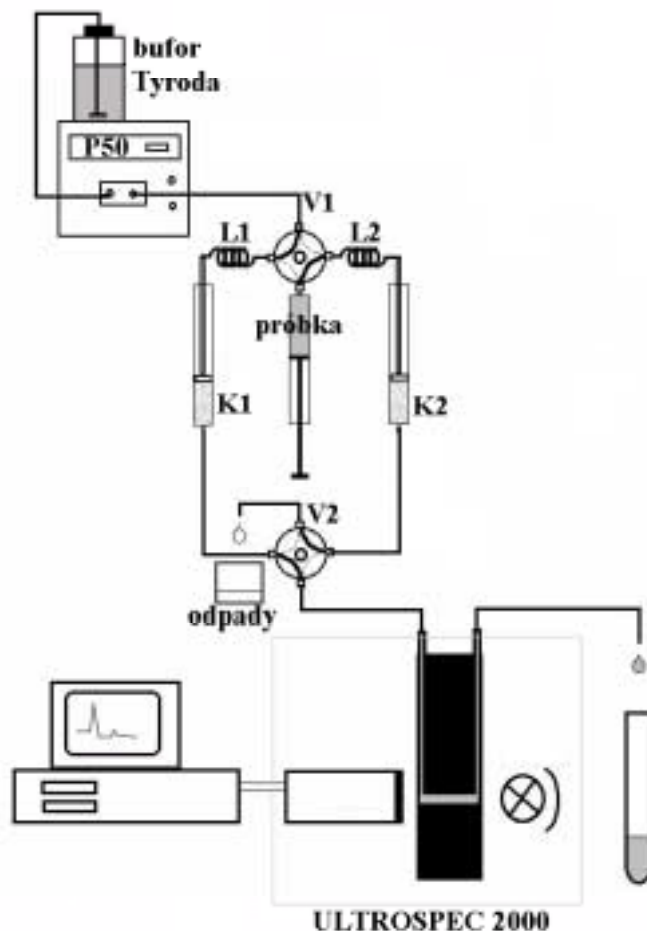
- pompa **P-50**
- spektrofotometr **Ultrospec 2000**
- komputer z programem **SWIFT TD**
- zawory **LV4** (V1 i V2)
- kolumny K1 i K2
- pętle L1 i L2
- naczynie zawierające bufor Tyroda
- strzykawka z próbka
- naczynie na płynne odpady.

Kolumny K1 i K2 wypełnione są żelami:

- kolagen-**Sepharose 4B**
- BSA-**Sepharose 4B**

Próbkę można nanieść do pętli L1 lub L2 uprzednio przestawiając położenie zaworów V1 i V2. Nanoszenie próbki na jedną z kolumn nie koliduje z przepływem buforu i próbki przez drugą z kolumn.

Wypływający z kolumny materiał kierowany jest albo do pojemnika na odpady (podczas podawania próbki na pętlę), albo do kuwety przepływowej zainstalowanej w spektrofotometrze (podczas pomiaru) i stamtąd do probówek.



Przygotowanie systemu i kolumn do pracy:

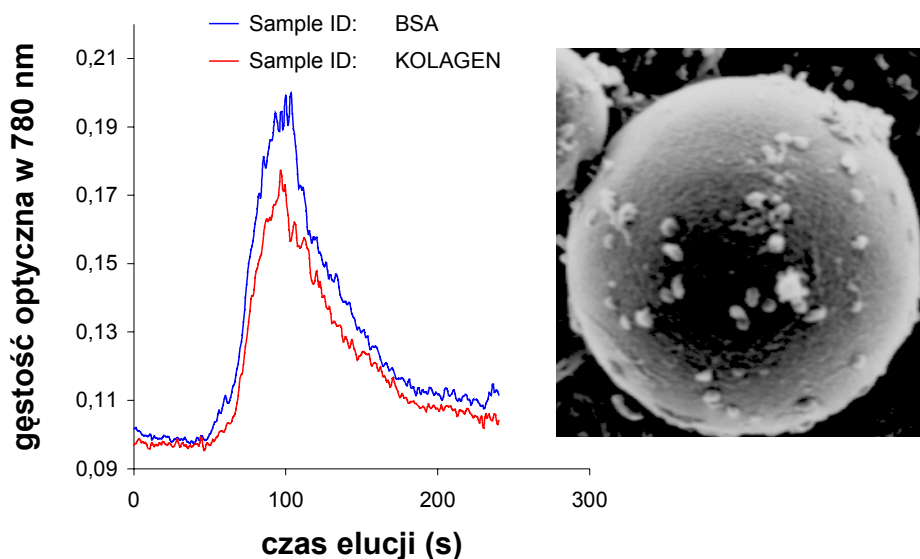
- Zmontować manualny system chromatograficzny zgodnie ze schematem przedstawionym na rys. 8.10.
- Jako kolumny zastosować dwie 1 ml strzykawki "insulinówki".
- Wylot strzykawek zabezpieczyć kawałkami nylonowej pończochy.
- Do pierwszej ze strzykawek (K1) nanieść 0,25 ml złoża kolagen-**Sepharose 4B**. Do drugiej (K2) nanieść taką samą ilość złoża **BSA-Sepharose 4B**. Kolumny zamknąć od dołu, aby nie dopuścić do wycieku buforów. Pozwolić złożu na swobodną sedimentację.
- Zamontować kolumny w systemie jak na rysunku 8.10.
- Gumki tłoczków przekłuć i przeprowadzić przez nie wężyki połączone z zaworem. Wężyki wypełnić buforem Tyroda.
- Do pierwszej z kolumn nanieść 0,5 ml buforu Tyroda i wprowadzić tłoczek z zamocowanym wężykiem. Powoli, przy otwartym zaworze V1, przesuwać tłoczek w dół, aż do zetknięcia z powierzchnią złoża.
- Te same czynności powtórzyć dla drugiej kolumny.
- Przy pomocy pompy **P-50** wymusić przepływ buforu Tyroda przez pierwszą kolumnę. Utrzymywać przepływ na poziomie 0,5 ml/min i przepuścić przez kolumnę 2 ml buforu.
- Te same czynności wykonać dla drugiej kolumny.
- Uruchomić spektrofotometr **Ultrospec 2000** i program **SWIFT TimeDrive**.
- Wybrać długość fali światła $\lambda = 780 \text{ nm}$, a czas obserwacji 250 s.

Przebieg doświadczenia:

- Wybierając odpowiednie położenia zaworów V1 i V2 nanieść do pętli pierwszej kolumny (K1) 250 μ l, rozcieńczonego dziesięciokrotnie buforem Tyroda, osocza bogatopłytkowego.
- Ponownie zmieniając położenie zaworów skierować przepływ buforu Tyroda na pierwszą kolumnę (K1) z jednoczesnym uruchomieniem gromadzenia danych w pamięci komputera.
- Po zakończeniu obserwacji pierwszej kolumny (K1) powtórzyć wszystkie czynności dla kolumny drugiej (K2).

Oczekiwane wyniki:

Płytki krwi przepływając między ziarnami żelu opłaszczonym kolagenem będą oddziaływać z tym białkiem adhezywnym i w wyniku tego część z nich przylgnie do powierzchni żelu i nie będzie mogła opuścić kolumny. Na rys. 8.11 wyraźnie widoczne są płytki krwi przylegające do powierzchni ziarna żelu. Natomiast płytki krwi przepływające przez kolumnę opłaszczoną albuminą wołową nie będą ulegać adhezji i praktycznie wszystkie powinny opuścić kolumnę. Uzyskane krzywe można poddać obróbce matematycznej i wyznaczyć pola powierzchni pod krzywymi. Różnica pól powierzchni jest miarą adhezji płytek krwi do kolagenu. W prezentowanym przypadku około 30% płytek krwi uległo adhezji do kolagenu.



Rys. 8.11.

Przykład badania adhezji płytek krwi do kolagenu w warunkach dynamicznych. Różnica między polami powierzchni pod krzywymi może być traktowana jako miara adhezji do kolagenu. Z przeprowadzonych obliczeń wynika, że około 30% płytek krwi uległo adhezji do kolagenu. Prezentowany obraz ziarna żelu z przylegającymi do jego powierzchni płytkami krwi pochodzi z danych uzyskanych przez dr Renatę Polanowską-Grabowską, (Department of Biochemistry, University of Virginia, USA) i jest prezentowany za zgodą autorki.

Regeneracja i przechowywanie złożeń:

Złoże przeznaczone do badania adhezji komórkowej nie nadaje się do powtórnego użycia. Z tego też powodu zarówno złoże jak i kolumny traktowane są jako przedmioty jednorazowego użytku.

Uwagi:

1. W podobny sposób można badać adhezję płytek krwi do innych białek adhezywnych, takich jak fibrynogen, fibronektyna, czynnik vonWillebranda i inne.
2. Zaprezentowaną metodykę można z powodzeniem zastosować do układu innych komórek i innych białek adhezywnych.
3. Płytki krwi (komórki) które uległy adhezji, jak i płytki wymyte z kolumny mogą być z łatwością rozpuszczone w buforze do próbek elektroforetycznych i poddane analizie fosforylacji białek towarzyszącej procesowi adhezji.

Przykład 8. 12.

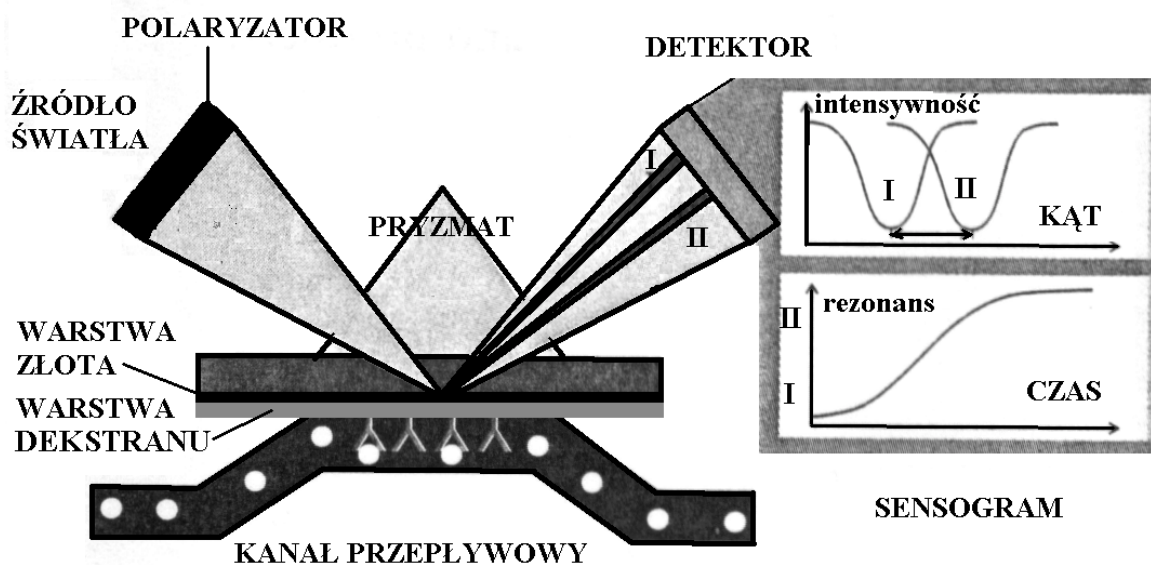
Badanie powstawania kompleksu antygen-przeciwciało przy zastosowaniu systemu BIAcore X (13)

Wprowadzenie:

System **BIAcore**, wprowadzony do laboratoriów naukowych i przemysłowych w 1990 roku, zawiera w sobie elementy chromatografii powinowactwa połączone z zupełnie nowym sposobem detekcji oddziałujących molekuł. Sercem systemu jest sensor (patrz rys. 8.12.), w którym wykorzystano zjawisko optyczne zwane powierzchniowym rezonansem plazmonowym (*ang. surface plasmon resonance*). Opis procesów zachodzących w sensorze wygodnie jest rozpocząć od zjawiska całkowitego wewnętrznego odbicia (*ang. total internal reflection*). Zgodnie z prawami optyki klasycznej zjawisko to zachodzi wtedy, gdy fala świetlna - rozchodząca się w ośrodku optycznie gęstszym - pada na granicę z ośrodkiem optycznie rzadszym pod kątem większym od kąta granicznego. Oznacza to, że fala świetlna nie opuszcza w miejscu padania ośrodka optycznie gęstszego. Okazuje się jednak, że w takich warunkach pewna infinityzimalnie mała fala świetlna wnika do ośrodka optycznie rzadszego na głębokość kilkuset nanometrów. Utrzymując geometrię całkowitego wewnętrznego odbicia i wsuwając na granicy ośrodków bardzo cienki film metalowy można uzyskać całkowicie nowe jakościowo zjawisko optyczne. Pewne metale (np. złoto czy srebro) posiadają chmury kolektywnych elektronów mogących łączyć się w pary, wykazujące wypadkowy wektor falowy. Taka chmura elektronowa, zwana plazmonem, może rezonować

ze światłem padającym pod odpowiednim kątem. W warunkach rezonansu ściśle określona ilość energii padającej fali świetlnej jest pochłaniana przez plazmon, co skutkuje spadkiem energii fali odbitej. Rezonans plazmonowy jest bardzo czuły na zmiany właściwości dielektrycznych ośrodka optycznie rzadszego. Każda zmiana stałej dielektrycznej tego ośrodka wiąże się ze zmianą warunków rezonansu plazmonowego, a więc ze zmianą kąta padania światła pochłanianego rezonansowo. Biorąc pod uwagę dobrze znany fakt istnienia zależności pomiędzy wartością współczynnika załamania światła (wartością stałej dielektrycznej) roztworu a stężeniem makromolekuł, można powiedzieć, że istnieje jednoznaczna relacja pomiędzy warunkami zachodzenia rezonansu plazmonowego a masą makromolekuł związanych z powierzchnią sensora.

Celem ćwiczenia jest obserwacja powstawania i rozpadu kompleksu antygen-przeciwciało w realnym czasie trwania procesu, z zastosowaniem manualnego systemu **BIAcore X**.



Rys. 8.12.

Schemat budowy i działania sensora systemu **BIAcore**. Sensor składa się z płasko-równoległej płytki szklanej z napyłoną cienką warstwą złotą (50 nm) pokrytą dodatkowo dekstranem (100 nm). Płytkę tą, od strony dekstranu, kontaktuje się z kanałem przepływowym, a z drugiej strony z podstawą pryzmatu wykonanego ze szkła o identycznych właściwościach jak płytka sensora. Na powierzchni dekstranu można trwale związać różnego rodzaju makromolekuły (na schemacie w postaci odwroconych liter Y). Przemieszczające się przez kanał przepływowy cząsteczki mogą wiązać się z unieruchomionymi receptorami, zmieniając w ten sposób właściwości dielektryczne ośrodka optycznie rzadszego i wpływając na warunki rezonansu plazmonowego. Zmiana właściwości dielektrycznych przy powierzchni sensora, wynikająca z wiązania dodatkowych molekuł, rejestrowana jest jako kąt odbicia światła, przy którym obserwowane jest rezonansowe pochłanianie światła padającego.

Material:

1. Przeciwciała monoklonalne G6, G23 i H2, skierowane przeciwko podjednostce GPIIb płytkowego receptora fibrynogenu.
2. Preparat zawierający podjednostkę GPIIb płytkowego receptora fibrynogenu.
3. Królicze przeciwciała poliklonalne (RAMFc) skierowane przeciwko fragmentowi Fc mysich IgG

Aparatura:

1. Manualny system **BIAcore X**.

Odczynniki:

1. Bufor HBS - 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, 0,05% surfaktant P20, pH 7,4.
2. NHS - 100 mM N-hydroksysukcinimid w wodzie.
3. EDC - 400 mM N-etyln-N'(dimetylamino)propylkarbodiimid w wodzie.
4. RAMFc - 25 µg/ml przeciwciał RAMFc w 10 mM octanie sodu, pH 4,75.
5. ETA - 1 mM etanolamina - HCl w wodzie, pH 8,5.
6. 10 mM HCl

Przygotowanie sensora:

- Zamontować sensor w systemie **BIAcore X** i przygotować protokół immobilizacji przeciwciał RAMFc według schematu:

CZAS (s)	CZYNNOŚĆ
0	uruchomienie przepływu buforu HBS - 5 µl/min
300	aktywacja sensora - 20 µl mieszaniny NHS i EDC (1:1)
640	wiązanie przeciwciał RAMFc - 20 µl preparatu
880	blokowanie wolnych miejsc wiążących - 35 µl/min ETA
1300	konserwacja sensora - 15 µl HCl (10 mM)
1480	koniec cyklu przygotowania sensora

Przebieg doświadczenia:

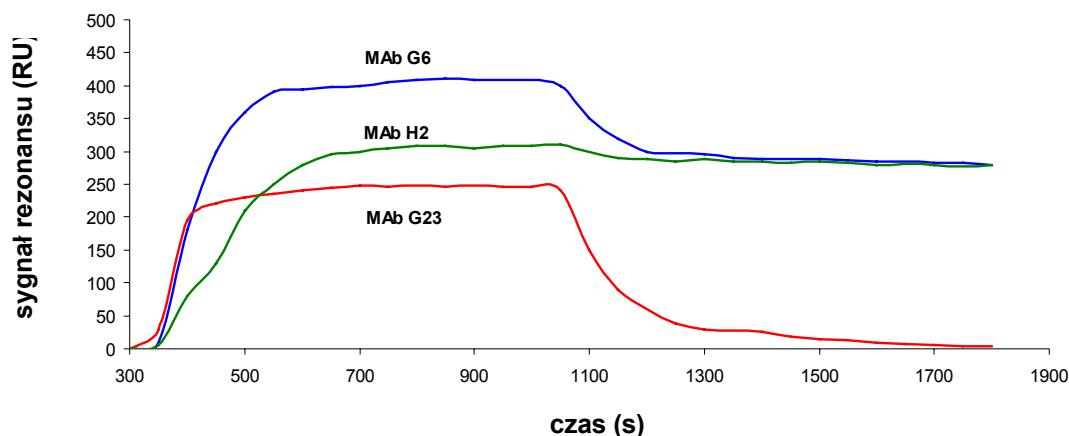
- Używając kolejno supernatantów z hodowli linii komórkowych G6, G26 i H2 wykonać analizy zgodnie z poniższym protokołem:

CZAS (s)	CZYNNOŚĆ
0	uruchomienie przepływu buforu HBS - 3 µl/min
20	wiązanie analizowanych przeciwciał - 9 µl G6, G26 lub H2
320	monitorowanie wiązania antygeny - 36 µl GPIIb (2 µg/ml)
1040	monitorowanie dysocjacji - HBS 3 µl/min
2040	regeneracja sensora - 9 µl 10 mM HCl
2220	koniec cyklu

Oczekiwane wyniki:

Unieruchomione na powierzchni sensora przeciwciała będą wiązały przepływający swobodny antygen. W wyniku tego należy spodziewać się wzrostu wartości sygnału rezonansu. Po pewnym czasie wszystkie miejsca wiążące zostaną wysyczone przez

przeptywający antygen i wartość sygnału ulegnie ustaleniu na określonym poziomie. Układ pozostanie w stanie równowagi wymiany aż do momentu, gdy zabraknie w otoczeniu swobodnych cząsteczek antygeny. Brak dopływu antygeny rozpoczyna proces dysocjacji kompleksu. Na wykresie przejawia się to początkowym szybkim spadkiem wartości sygnału rezonansu - gdy brak napływu wolnych molekuł, a następnie wolniejszym już spadkiem wartości tego sygnału - zmniejszanie ilości białka przy powierzchni sensora w wyniku dysocjacji kompleksu antygen-przeciwciała.



Rys. 8.13.

Przykład zastosowania systemu **BIAcore X** do analizy oddziaływań typu antygen-przeciwciała.

Regeneracja i przechowywanie sensora:

Każdy cykl pracy kończy się regeneracją sensora. Zregenerowany sensor może być przechowywany (4-8° C) w tej postaci do czasu ponownego zastosowania.

Uwagi:

1. Należy zwrócić uwagę na fakt, że przeciwciała H2 formuje ze swym antygenem stosunkowo trwały kompleks, który nie ulega mierzalnej dysocjacji w warunkach eksperymentu. Kompleks ten usuwany jest z powierzchni sensora podczas jego regeneracji.
2. Zregenerowany sensor może być użyty wielokrotnie do podobnej analizy.
3. W celu wyznaczenia wartości stałych szybkości powstawania k_{ass} i dysocjacji k_{dys} kompleksu należy przeprowadzić pełną analizę kinetyki oddziaływań. Trzeba wtedy prześledzić wiązanie antygeny podawanego w różnych stężeniach. Dokładny opis metody postępowania można znaleźć w pracy (13).
4. System **BIAcore** może być zastosowany do wysoce specyficznego izolowania molekuł metodą chromatografii powinowactwa. Selektywnie eluowane z powierzchni sensora molekuły mogą być zbierane u jego wylotu.
5. Warto zauważyć, że zastosowanie systemu **BIAcore** pozwala na zastosowanie preparatów zawierających interesujące nas biomolekuły znajdujące się w mieszaninie innych cząsteczek. Detekcja oddziaływania komplementarnych molekuł idzie

- tutaj w parze z ich separacją z mieszaniny.
6. Zużycie preparatów i odczynników chemicznych jest w tej technice bardzo małe. Wystarczy kilkanaście mikrolitrów preparatu dla kompleksowej analizy procesu oddziaływania makrocząsteczek.

8.4. Literatura

1. Cuatrecasas, P., Wilchek, M., Anfinsen, C.B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 636, 1968.
2. Cierniewski, CS., Świątkowska, M., Poniowski, J., Niewiarowska, J. *Eur. J. Biochem.*, **177**, 109, 1988.
3. Walkowiak, B., Michalak, E., Borkowska, E., Koziolkiewicz, W., Cierniewski CS. *Thromb. Res.*, **76**, 133, 1994.
4. Ey, PL., Prowse, SJ., Jenkin, CR. *Immunochemistry*, **15**, 429, 1978.
5. Walkowiak B. Use of ULTROSPEC 2000 as a full range Multi-Wavelength detector for liquid chromatography. Pharmacia Biotech (Biochrom) Application Note 53, 1998.
6. Stingl, G., Wolff-Schreiner, EC., Pichler, WJ., Gschuait, F., Knapp, W., Wolff, K. *Nature*, **268**, 245, 1977.
7. Shore, VG., Shore, B. *Biochemistry*, **12**, 502, 1973.
8. Lamkin, GE., King, EE. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **72**, 560, 1976.
9. Taylor, JM., Tse, TPH. *J. Biol. Chem.*, **251**, 7461, 1976.
10. Kahlenberg, A., Walker, C. *Anal. Biochem.*, **7**, 337, 1976.
11. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. *Nature*, **258**, 598, 1975.
12. Polanowska-Grabowska R., Gear ARL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5754, 1992.
13. Karlson R., Hakan R., Fagerstam L., Persson B. *A companion methods in enzymology*, **6**, 99, 1994.