

## Κεφάλαιο 3. Χρωματογραφία συγγένειας

### Σύνοψη – Περίληψη

Βιομόρια μικρού μοριακού βάρους, όπως αμινοξέα, ολιγοπεπτίδια, ολιγοσακχαρίτες και διάφορα είδη λιπιδίων που βρίσκονται στο αίμα ή λοιπές βιολογικές εκκρίσεις ή σε διαλύματα υγρών, ανιχνεύονται, διαχωρίζονται και ποσοτικοποιούνται σε σύντομο χρόνο με τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων. Οι χρωματογραφικές μέθοδοι χρησιμοποιούν μια κινητή φάση, η οποία μπορεί να είναι υγρή ή αέρια και μία στατική φάση η οποία είναι υγρή ή στερεή. Για τον διαχωρισμό των διαφόρων βιομορίων οι μέθοδοι αυτές εκμεταλλεύονται τις διαφορές τους ως προς το ηλεκτρικό φορτίο και τις οξεοβασικές ιδιότητές τους (χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής), το μέγεθος των μορίων (χρωματογραφία μοριακής διήθησης), την προσρόφησή τους σε διάφορα προσροφητικά μέσα (χρωματογραφία προσρόφησης), ή και την κατανομή τους μεταξύ δύο φάσεων (αέρια - υγρή χρωματογραφία), αλλά και διαφορές στον βαθμό προσροφήσεώς τους στην κυτταρίνη ή σε άλλα υλικά (χρωματογραφία επί χάρτου, χρωματογραφία λεπτής στιβάδας). Η μέθοδος της χρωματογραφίας συγγένειας εκμεταλλεύεται τη χημική συγγένεια ορισμένων πρωτεϊνών για ειδικές χημικές ομάδες. Η στήλη παρασκευάζεται από υλικό που φέρει αυτή τη χημική ομάδα και η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει δεσμεύεται σταθερά σε αυτή, σε αντίθεση με άλλα βιομόρια που συνυπάρχουν στο διάλυμα. Στη συνέχεια εκλύεται με τη μεταβολή του pH ή της αλατότητας του περιβάλλοντος της στήλης ή με ανταγωνισμό με περίσσεια της ανταγωνιστικής χημικής ομάδας στη διαλυτή της μορφή. Χρησιμοποιείται κυρίως όταν οι αλληλεπιδράσεις είναι εξειδικευμένες. Η χρωματογραφία συγγένειας περιλαμβάνει μια διαφορετική σειρά από μεθόδους καθαρισμού, οι οποίες εν γένει βασίζονται σε μια εξειδικευμένη σχέση μεταξύ μιας πρωτεΐνης και του προσδέτη της. Ο προσδέτης μπορεί να είναι εξειδικευμένο βιολογικό μόριο, όπως ένα πεπτίδιο, αντίσωμα ή νουκλεϊκό οξύ ή μπορεί να αλληλεπιδρά μη ειδικά με το μόριο - στόχο (π.χ. λεκτίνες ή υδρόφοβες ομάδες). Αν και οι διαχωρισμοί που βασίζονται σε ειδικές συγγένειες πρωτεϊνών - προσδετών τείνουν να είναι μοναδικοί για κάθε πρωτεΐνη (άρα αναφερόμαστε ουσιαστικά σε εξατομικευμένα και προσαρμοσμένα κατά περίπτωση πρωτόκολλα καθαρισμού), εντούτοις ο στόχος των παρακάτω παραγράφων είναι να παρουσιάσουμε στον εκπαιδευόμενο επιστήμονα, πρωτόκολλα με την ευρύτερη δυνατή εφαρμογή, ταυτόχρονα με χρήσιμες κατευθυντήριες γραμμές για την επιλογή εναλλακτικών τρόπων πρόσδεσης, αλλά και προσεγγίσεων έκλυσης των μορίων που μας ενδιαφέρουν.

### Προαπαιτούμενη γνώση

Για την κατανόηση και ουσιαστικότερη εμπέδωση των ακολούθων, απαιτείται μια επαφή με ορισμένα βασικά θέματα ανοσολογίας, όπως για παράδειγμα η αλληλεπίδραση αντιγόνου - αντισώματος. Χρήσιμα σχετικά μπορούν να αναζητηθούν στο σύγγραμμα: Abbas & Lichtman. Βασική Ανοσολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2004. Απαντήσεις σε περισσότερο εξειδικευμένα θέματα μπορούν να αναζητηθούν στις βιβλιογραφικές παραπομπές που παρατίθενται στο τέλος της ενότητας.

### 3.1 Εισαγωγή

Η χρωματογραφία αποτελεί μια ετερογενή ομάδα μεθόδων διαχωρισμού ανόργανων, οργανικών ή οργανομεταλλικών ενώσεων, με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες. Βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των ουσιών ενός δείγματος μεταξύ μιας κινητής και μιας στατικής φάσης, ενώ ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφορών συγγένειας των ουσιών ως προς τις δύο φάσεις.

Η στατική φάση (ή ακίνητη) μπορεί να είναι στερεή (στρώμα στερεού) ή υγρή (στρώμα υγρού), ακινητοποιημένη επάνω σε ένα στερεό υπόστρωμα. Η κινητή φάση μπορεί να είναι υγρή ή αέρια και κινείται διαμέσου και κατά μήκος της στατικής φάσης.

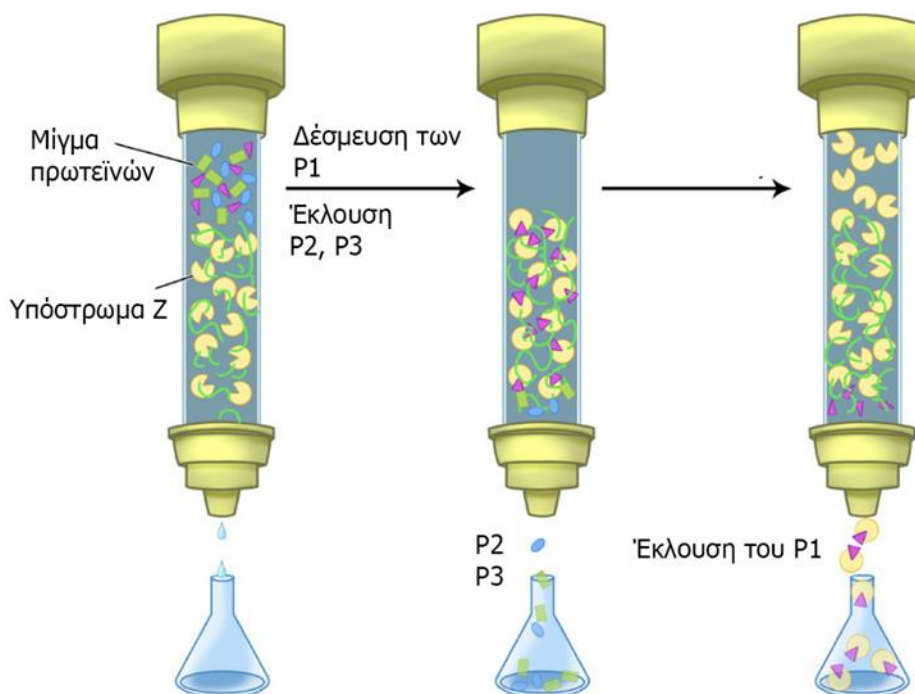
Οι δύο φάσεις επιλέγονται έτσι ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ κινητής και στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό και η επιλογή τους συσχετίζεται με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών του δείγματος. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στην εκλεκτική αλληλεπίδραση της στατικής φάσης με την υπό προσδιορισμό ουσία (Εικόνα 3.1). Συνήθως χρησιμοποιούνται υποκαταστάτες, συνδεδεμένοι στην επιφάνεια του φορέα (στατική φάση) με ικανότητα να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν ειδικά και αντιστρεπτά συγκεκριμένα μόρια - προσδέματα (ligands). Για να επιτευχθεί ένας αποτελεσματικός καθαρισμός, απαιτείται ένας αυστηρά εξειδικευμένος υποκαταστάτης, ο οποίος θα συνδεθεί ομοιοπολικά (άρα ισχυρά και σταθερά) στο χρωματογραφικό υπόστρωμα (στατική φάση). Ο υποκαταστάτης πρέπει αφενός να διατηρεί τη δυνατότητα

εξειδικευμένης αλληλεπίδρασης με ειδικά μόρια - προσδέτες και αφετέρου, μετά την έκλυση των αδέσμευτων ή ασθενώς αλληλεπιδρώντων μορίων, να επιτρέπει στα μόρια - στόχους να απομακρύνονται από τη στήλη στη δραστική τους μορφή (αντιστρεπτή πρόσδεση).

Οποιοδήποτε συστατικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκαταστάτης - προσδέτης για τον καθαρισμό ενός μορίου που προσδέεται ειδικά σε αυτόν (πρόσδεμα). Τα είδη προσδετών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα αντίστοιχα μόρια - προσδέματα, με τα οποία συνδέονται ειδικά είναι τα εξής:

- Αντισώματα: αντιγόνα, ιοί, κύτταρα.
- Νουκλεϊκά οξέα: συμπληρωματική αλληλουχία βάσεων, πρωτεΐνες που προσδέονται στα νουκλεϊκά οξέα.
- Λεκτίνες: ολιγοσακχαρίτες, γλυκοπρωτεΐνες, υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων, κύτταρα.
- Μεταλλικά ιόντα: πρωτεΐνες με πολύ - His ουρά, πρωτεΐνες που περιέχουν κατάλοιπα κυστεΐνης ή θρυπτοφάνης στην επιφάνειά τους.
- Υδρόφοβα μόρια: η υδρόφοβη ομάδα του προσδέτη συνδέεται με μια υδρόφοβη ομάδα του προσδέματος.

Ο καθαρισμός μέσω χρωματογραφίας συγγένειας μπορεί να προσφέρει εξοικονόμηση χρόνου και επιτρέπει την επεξεργασία μεγάλου όγκου δείγματος. Τα επιθυμητά μόρια καθαρίζονται από πολύπλοκα βιολογικά δείγματα, ακόμα και όταν αυτά βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις.



**Εικόνα 3.1** Γενική αρχή λειτουργίας της χρωματογραφίας συγγένειας. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στην εκλεκτική αλληλεπίδραση της στατικής φάσης με την υπό προσδιορισμό ουσία. Η επιθυμητή πρωτεΐνη δεσμεύεται στη στήλη στο υλικό υποστρώματος - προσδέτη. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες εκλύονται χωρίς να δεσμεύονται στο υπόστρωμα.

### 3.2 Προετοιμάζοντας μια στήλη συγγένειας

Η υψηλή εξειδίκευση της χρωματογραφίας συγγένειας επιτρέπει να πραγματοποιούνται διαχωρισμοί σε ένα μόνο βήμα. Μια μεγάλη ποικιλία προπαρασκευασμένων στηλών είναι εμπορικά διαθέσιμη, για πολύ μεγάλο αριθμό εφαρμογών και σε σχετικά χαμηλές τιμές. Ωστόσο, για τις εφαρμογές που απαιτούν αυστηρά εξειδικευμένες στήλες συγγένειας θα περιγραφεί στη συνέχεια η διαδικασία παρασκευής και ενεργοποίησης μιας στήλης.

Η ακινητοποίηση ενός προσδέτη σε ένα υπόστρωμα μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση ποικίλων αντιδραστηρίων. Γενικά, εφαρμόζεται μια διαδικασία δυο σταδίων. Κατά το πρώτο στάδιο πραγματοποιείται σύνδεση μιας αντιδρώσας ομάδας με το υπόστρωμα, ενώ κατά το δεύτερο στάδιο συνάπτεται ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ της αντιδρώσας ομάδας και του προσδέτη. Σε κάθε περίπτωση πρέπει να γίνεται επιλογή της αντιδρώσας ομάδας και του υποστρώματος (Harlow & Lane, 1988, Pepper, 1992, Pharmacia, 1993).

### **3.2.1 Επιλογή υποστρώματος**

Ο επιτυχής καθαρισμός με την εφαρμογή χρωματογραφίας συγγένειας στηρίζεται στην επιλογή κατάλληλων υποστηρικτικών υλικών και προσδετών. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται, ιδανικά θα πρέπει να είναι μακροπορώδη, με μεγάλη χημική και φυσική σταθερότητα και πρέπει να δεσμεύουν επιλεκτικά μόνο τα μόρια - στόχους, ενώ ταυτόχρονα να παρουσιάζουν χαμηλή μη ειδική δέσμευση και να επιτρέπουν εύκολη ροή της κινητής φάσης. Προτιμώνται επίσης φθηνά υλικά, εύκολα διαθέσιμα και απλά στη χρήση.

### **3.2.2 Γενικά χαρακτηριστικά υλικών με ρόλο υποστρώματος**

Το μέγεθος των πόρων (διάκενα μεταξύ των μονομερών του υλικού - υποστρώματος) της στατικής φάσης είναι αντιστρόφως ανάλογο με την επιφάνεια, γεγονός το οποίο επηρεάζει την ποσότητα των ακινητοποιημένων προσδετών, καθώς και τη χωρητικότητα του συστήματος. Το μέγεθος των πόρων συσχετίζεται με το όριο αποκλεισμού, το οποίο είναι το μέγεθος (μοριακή μάζα) ή εύρος μεγεθών των πρωτεϊνών που δεν μπορούν να εισέλθουν στους πόρους. Οι μεγάλοι πόροι επιτρέπουν την ανεμπόδιστη πρόσβαση μεγάλων μορίων στους ακινητοποιημένους στο υπόστρωμα προσδέτες, αλλά δημιουργούν περιορισμένη επιφάνεια πρόσδεσης και συνεπώς μικρότερη πυκνότητα προσδετών, που μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερη χωρητικότητα (σε μόρια του προσδέματος - στόχου) του συστήματος. Συνήθως, το μέγεθος των πόρων είναι τουλάχιστον 5 φορές μεγαλύτερο από το μέσο μέγεθος ενός βιομορίου, για την εύκολη πρόσβασή του στους ακινητοποιημένους προσδέτες.

### **3.2.3 Επιλογή προσδέτη**

Η επιλογή του κατάλληλου προσδέτη προϋποθέτει την κατανόηση της φύσης των αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν μεταξύ του προσδέτη και του μορίου - στόχου (πρόσδεμα). Ο προσδέτης οφείλει να είναι σταθερός σε διαφορετικές συνθήκες πρόσδεσης και έκλουσης.

### **3.2.4 Γενικά για τον σχεδιασμό προσδετών και την επιλογή τους**

Η συγγένεια μεταξύ του μορίου - στόχου και του προσδέτη είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που πρέπει να ληφθεί υπόψη όταν πραγματοποιείται καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας. Χαμηλή συγγένεια μπορεί να μειώσει την ειδικότητα της πρόσδεσης, έχοντας ως αποτέλεσμα χαμηλή απόδοση, ενώ υψηλή συγγένεια μπορεί να οδηγήσει σε μη αποτελεσματική έκλουση ή αδρανοποίηση της πρωτεΐνης - στόχου, λόγω ακραίων - μετουσιωτικών συνθηκών έκλουσης, καταστάσεις οι οποίες επίσης συνεπάγονται χαμηλή απόδοση.

Συνήθως, η πρόσδεση μεταξύ προσδέτη και πρωτεϊνών - στόχων επιβεβαιώνεται δοκιμαστικά πριν τη δημιουργία της στήλης, αλλά πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι η συγγένεια στο διάλυμα μπορεί και να διαφέρει από τη συγγένεια μετά την ακινητοποίηση του προσδέτη στο υπόστρωμα ή μπορεί η πρόσδεση να οδηγήσει ακόμα και σε αλλαγή της εξειδίκευσης του προσδέτη.

Όταν ο προσδέτης προσδένεται στο υπόστρωμα, αναπτύσσονται συνήθως ομοιοπολικοί δεσμοί, γεγονός που διασφαλίζει τη σταθερότητα του συμπλόκου και αποτρέπει τον κίνδυνο έκλουσης του προσδέτη κατά τον καθαρισμό και την αναγέννηση της στήλης. Ωστόσο, μη ομοιοπολικές συνδέσεις, όπως η μη ειδική προσρόφηση και οι βιοειδικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μειώσουν τον κίνδυνο αλλοίωσης του προσδέτη.

Εκτός από πιθανή χαμηλή συγγένεια, η περιορισμένη σύνδεση μεταξύ προσδέτη και της πρωτεΐνης - στόχου, μπορεί να οφείλεται σε στερεοχημική παρεμπόδιση που προκαλείται είτε από το υλικό του υποστρώματος είτε από άλλους χαμηλότερης συγγένειας προσδέτες που πιθανά συνυπάρχουν στο δείγμα. Η προσθήκη

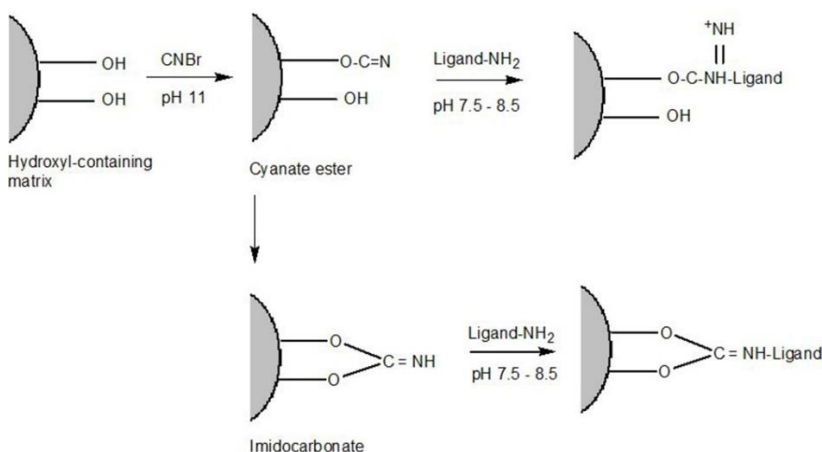
ενός «διαχωριστικού» μεταξύ του υποστρώματος και του προσδέτη μπορεί να μειώσει τη στερεοχημική παρεμπόδιση που πιθανόν να προκαλείται από το υπόστρωμα. Όταν σχεδιάζεται ένας διαχωριστικός «βραχίονας» πρέπει να ληφθούν υπόψη το μήκος και ο υδροφοβικός χαρακτήρας του, καθώς προτιμώνται υδρόφιλα μόρια για να περιοριστούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με μόρια εκτός των μορίων – στόχων. Η βελτιστοποίηση του μήκους του διαχωριστικού βραχίονα είναι επίσης σημαντική, καθώς τα βραχύτερα διαχωριστικά δεν απαλλάσσουν από τη στερεοχημική παρεμπόδιση του υποστρώματος και οι επιμήκεις βραχίονες μπορούν να οδηγήσουν σε μη ειδική αλληλεπίδραση ή να προσδένονται μεταξύ τους, μειώνοντας έτσι τον αριθμό των ειδικών αλληλεπιδράσεων. Πρέπει επίσης να βελτιστοποιηθεί και η πυκνότητα του προσδέτη. Πολύ υψηλή πυκνότητα του προσδέτη μπορεί να οδηγήσει, είτε στην μείωση της δεσμευτικής ικανότητας του συστήματος, λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης (μικρή απόσταση μεταξύ των προσδετών) είτε στην ελάττωση της απόδοσης, λόγω ισχυρής πρόσδεσης, που μπορεί να μειώνει την αποτελεσματικότητα της έκλουσης. Άλλοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την επιλογή του προσδέτη είναι η δυνατότητα αποστείρωσής του, η σταθερότητά του, οι συνθήκες αποθήκευσης και το κόστος.

### 3.2.5 Ακίνητοποίηση προσδέτη σε σεφαρόζη (Sephargose) ενεργοποιημένη από βρωμιούχο κυάνιο (CNBr)

Η σεφαρόζη που ενεργοποιείται από CNBr αποτελεί μια επιλογή για την προσρόφηση μεγάλων προσδετών. Το CNBr αντιδρά με τις υδροξυλομάδες της σεφαρόζης για να σχηματιστούν δραστικές ομάδες κυανικών εστέρων. Πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα, λεκτίνες ή νουκλεϊκά οξέα, μπορούν να προσδεθούν σε σεφαρόζη ενεργοποιημένη από CNBr, κάτω από ήπιες συνθήκες, μέσω πρωτοταγών αμινομάδων ή νουκλεοφιλικών ομάδων τους. Οι ενεργοποιημένες ομάδες αντιδρούν με τις α-αμινομάδες του προσδέτη και σχηματίζουν δεσμούς ισοουρίας (Εικ. 3.2). Η αντίδραση πρόσδεσης είναι αυθόρμητη και δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό. Το αποτέλεσμα είναι η πρόσδεση σε πολλά σημεία, που εξασφαλίζει ότι ο προσδέτης δεν θα υδρολυθεί από το υπόστρωμα. Η διαδικασία ενεργοποίησης διασυνδέει τα μόρια σεφαρόζης, ενισχύοντας έτσι τη χημική σταθερότητα του υποστρώματος και επιτρέποντας ευελιξία στην επιλογή των συνθηκών έκλουσης.

Για ένα πεπτίδιο, πρωτεΐνη ή νουκλεϊκό οξύ η ομοιοπολική πρόσδεση πραγματοποιείται συνήθως μέσω μιας αμινομάδας του προσδέτη και της αμινικής ομάδας της ρητινικής επιφάνειας. Το πιο συνηθισμένο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι ένα ανθρακικό ιμίδιο που προκύπτει από την αντίδραση της ενεργοποιημένης από βρωμιούχο κυάνιο σεφαρόζης με μια πρωτοταγή αμινομάδα. Στα αρνητικά αυτής της μεθόδου περιλαμβάνονται:

- Ατελής σύνδεση που οδηγεί σε έκπλυση του προσδέτη από τη ρητίνη - υπόστρωμα.
- Πρόσδεση του προσδέτη απευθείας στην επιφάνεια του υποστρώματος, χωρίς διαχωριστικό.
- Απαιτήση για περαιτέρω προφυλάξεις λόγω της τοξικότητας του CNBr.



**Εικόνα 3.2** Ενεργοποίηση σεφαρόζης από CNBr. Το CNBr αντιδρά με τις υδροξυλομάδες της σεφαρόζης για να σχηματιστούν δραστικές ομάδες κυανικών εστέρων.

### 3.2.6 Πειραματική διαδικασία

1. Αιωρήστε ήπια 2 g CNBr - ενεργοποιημένης Sepharose σε 1 mM HCl, σε πορώδες - γυάλινο χωνί (sintered-glass funnel). Αναδεύστε το διάλυμα με μια γυάλινη ράβδο για περίπου 20 λεπτά, μέχρι να διογκωθεί το υπόστρωμα και έπειτα εφαρμόστε κενό για να αφαιρέσετε το υγρό.
  - 1 g ξηρών κόκκων (σφαιριδίων) του υλικού, δίνουν περίπου 3,5 ml διογκωμένου πύγματος, που μπορεί να δεσμεύσει 30 – 200 nmol προσδέτη.
  - Το HCl διατηρεί την αντιδραστικότητα των ενεργών ομάδων.
2. Εκπλύνετε το υπόστρωμα με  $3 \times 200$  ml, 1 mM HCl, και στεγνώστε υπό κενό κάθε φορά.
3. Ακολούθως εκπλύνετε το υπόστρωμα με 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος σύνδεσης (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3).
  - Το βήμα αυτό θα πρέπει να εκτελείται ταχύτατα, επειδή η ενεργός ομάδα μπορεί να υδρολύεται στο pH του διαλύματος σύνδεσης.
4. Μεταφέρετε την ενεργοποιημένη Sepharose σε μια φιάλη που περιέχει 60 – 400 nmol προσδέτη σε 30 ml ρυθμιστικού διαλύματος σύνδεσης.
  - Βεβαιωθείτε ότι έχετε αποθηκεύσει ποσότητα από το διάλυμα του προσδέτη για να υπολογίσετε ακολούθως το ποσοστό πρόσδεσης.
5. Αναμείξτε ήπια, ανακινώντας για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή καθόλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight) στους 4 °C (να μην χρησιμοποιήσετε μαγνητικό αναδευτήρα που μπορεί να τεμαχίσει τα σφαιρίδια Sepharose).
6. Εκπλύνετε το υπόστρωμα με 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος σύνδεσης σε ένα πορώδες γυάλινο χωνί και ξηράνετε με προσεκτική αναρρόφηση υπό κενό.
7. Μεταφέρετε το υπόστρωμα στη φιάλη και επώαστε με 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος παρεμπόδισης (1 M αιθανολαμίνης, ρυθμισμένο σε pH 8,0 με HCl), για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή όλη τη νύχτα στους 4 °C.
8. Σε ένα πορώδες γυάλινο χωνί, εκπλύνετε το υπόστρωμα με 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος σύνδεσης, έπειτα με 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος (0,1 M CH<sub>3</sub>COONa, 0,5 M NaCl, pH 4).
9. Εκπλύνετε 4 φορές με 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος σύνδεσης και ακολούθως με 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος (0,1 M CH<sub>3</sub>COONa, 0,5 M NaCl, pH 4).
10. Ολοκληρώστε τις πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης που να περιέχει 0,02% νατραζίδιο (NaN<sub>3</sub>) (συντηρητικό - αντιβακτηριδιακός παράγοντας) πριν την αποθήκευση.
11. Το υπόστρωμα είναι τώρα έτοιμο για στοίβαση μέσα στη στήλη.
  - Οι στήλες χρωματογραφίας συγγένειας συχνά είναι μικρού ύψους και μεγάλης διαμέτρου, με το ύψος του υποστρώματος να είναι περίπου δύο φορές η διάμετρος της στήλης.

### Παρατηρήσεις

Για να εκτιμηθεί το ποσοστό πρόσδεσης του προσδέτη στο υλικό του υποστρώματος, πρέπει να καθοριστεί η συγκέντρωση του προσδέτη πριν και μετά το βήμα σύνδεσης. Κάτι τέτοιο μπορεί για παράδειγμα να γίνει με τη χρήση φασματοφωτομέτρου και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στο διάλυμα του προσδέτη, πριν και μετά την πρόσδεση (Perper, 1992). Γενικά, πρόσδεση της τάξεως του 70 - 80% είναι ικανοποιητική, καθώς μικρότερη πρόσδεση συνεπάγεται μειωμένη χωρητικότητα στήλης, ενώ υψηλότερη πρόσδεση μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη απόδοση πρόσδεσης εξαιτίας στερεοχημικής παρεμπόδισης.

Παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε φτωχή σύνδεση είναι η χαμηλή συγκέντρωση προσδέτη, προσδέτης ανεπαρκούς καθαρότητας, ατελώς προετοιμασμένο υπόστρωμα, μη κατάλληλος προσδέτης ή ακατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης. Ρυθμιστικά διαλύματα όπως το Tris, που περιέχουν αμινομάδα, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται.

Εάν ο προσδέτης είναι ασταθής σε βασικό pH, η σύνδεση μπορεί να διεξαχθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλότερου pH, αλλά η απόδοση της διαδικασίας θα είναι μειωμένη.

### 3.2.7 Στρατηγικές μη ειδικής εξαγωγής του προσδέματος από τη στήλη

Οι πρωτεΐνες (προσδέματα) που έχουν συνδεθεί σε μια στήλη συγγένειας μπορούν να εκλουστούν από αυτή σε συνθήκες κορεσμού της στήλης με υπόστρωμα που ανταγωνίζεται με το πρόσδεμα για τις δεσμευτικές θέσεις της στήλης. Εναλλακτικά μπορούν να τροποποιηθούν οι συνθήκες περιβάλλοντος, ώστε να ελαττωθεί η συγγένεια πρωτεΐνης (προσδέματος) - προσδέτη. Η πρώτη περίπτωση επιτρέπει καλό καθαρισμό (ικανοποιητικό ποσοστό έκλουσης) της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει, χωρίς να διαταράσσει τις συνθήκες της στήλης (Scores, 1994). Πιο ήπιες συνθήκες εξαγωγής απαιτούνται εάν η πρωτεΐνη - στόχος είναι ασταθής. Για να γίνει επιτυχής καθαρισμός απαιτείται να κατανοηθούν πλήρως οι τύποι των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεΐνης και προσδέτη. Ο καθορισμός των κατάλληλων συνθηκών εξαγωγής μπορεί να γίνει με διαδοχικές δοκιμές μικρής κλίμακας. Μπορεί επί παραδείγματι να προσροφηθεί μέχρι κορεσμού ποσότητα προσδέτη σε πλακίδια ELISA, στα οποία στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα πρωτεΐνης (προσδέματος). Έπειτα, δοκιμάζονται διαφορετικά διαλύματα έκλουσης και επιλέγεται ο εκλούτης που επιτυγχάνει το υψηλότερο ποσοστό έκλουσης (έπειτα από τη μέτρηση της μεταβολής της οπτικής απορρόφησης των πλακιδίων σε ειδικό φασματοφωτόμετρο - ELISA reader). Το σύνηθες είναι να δοκιμάζονται αρχικά ήπιες συνθήκες και σταδιακά να μεταβαίνουμε σε πιο ακραίες.

## 3.3 Εξειδικευμένες τεχνικές καθαρισμού με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας

### 3.3.1 Καθαρισμός αντισωμάτων με τη χρήση αντιγόνου

#### 3.3.1.1 Εισαγωγή

Το ευρύ φάσμα των αντιδράσεων μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος έχει οδηγήσει στη χρήση τόσο ακέραιων μορίων, όσο και τμημάτων των αντισωμάτων σε μια ποικιλία εφαρμογών. Τα αντισώματα έχουν θεραπευτικές και διαγνωστικές εφαρμογές και χρησιμοποιούνται σε ανοσοχημικές τεχνικές για ερευνητικούς σκοπούς (Harlow & Lane, 1988). Η χρήση τεχνικών της μοριακής βιολογίας, μέσω της οποίας ανασυνδυάζονται τα αντισώματα, έχει διευρύνει την ικανότητα των ερευνητών να τροποποιούν τα χαρακτηριστικά των μορίων αυτών προς όφελός τους. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του καθαρισμού αντισωμάτων και τμημάτων τους είναι ότι ένας μεγάλος αριθμός πληροφοριών είναι διαθέσιμος για τις ιδιότητες αυτών των μορίων - στόχων και κυρίως των προσμείξεων που μπορεί να υπάρχουν, ανεξάρτητα από το εάν το μόριο είναι στη φυσική του κατάσταση ή έχει υποστεί γενετική τροποποίηση.

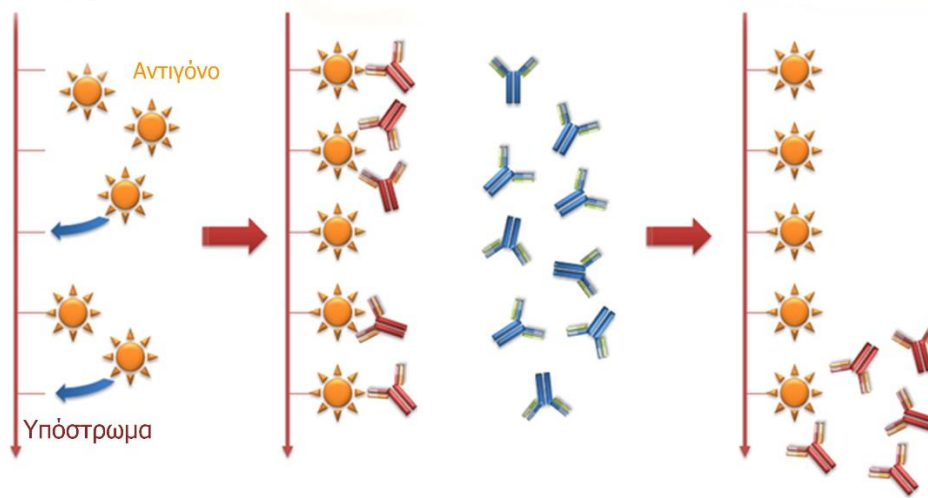
Τα αντισώματα συνήθως απομονώνονται από τον ορό του αίματος. Η βάση για τον καθαρισμό τόσο των IgG αντισωμάτων, όσο και των τμημάτων τους είναι η υψηλή συγγένεια που παρουσιάζουν ορισμένες αντιγονικές δομές, όπως η πρωτεΐνη A και η πρωτεΐνη G για την Fc (σταθερή) περιοχή των IgG (Εικόνα 3.3). Η πρωτεΐνη A και η πρωτεΐνη G είναι βακτηριακές πρωτεΐνες από το *Staphylococcus aureus* και *Streptococcus sp.* αντίστοιχα. Άλλες πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται τελευταία είναι η πρωτεΐνη B, που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα του *Streptococcus sp.* και δεσμεύει IgA αντισώματα και η πρωτεΐνη L, από το *Peptostreptococcus magnus*, που αντιδρά με τις ελαφριές αλυσίδες των αντισωμάτων, χωρίς να επηρεάζει την περιοχή πρόσδεσης του αντιγόνου με το αντίσωμα (antigen binding site) και άρα χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό αντισωμάτων από τα οποία απουσιάζουν οι Fc περιοχές (Fab τμήματα).

Στις περισσότερες περιπτώσεις η πρόσδεση των αντισωμάτων επιτυγχάνεται σε ουδέτερο pH ή σε σχεδόν ουδέτερο pH, αλλά το ιδανικό pH σε κάθε δείγμα μπορεί να διαφέρει και εξαρτάται από την πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται. Η πρωτεΐνη A προσδένεται ισχυρά σε αντισώματα σε pH 8,2. Η πρωτεΐνη L σε pH 7,5 και η G σε pH 5, αν και μπορεί να προσδεθεί επίσης σε pH 7 - 7,5. Για την έκλουση συχνά χρησιμοποιούνται διαλύματα με όξινο pH (2,5 - 3), ενώ τα δείγματα συλλέγονται σε διαλύματα με ουδέτερο ή ελαφρά βασικό pH για να αποφευχθεί η μετουσίωση ή η απώλεια δραστηριότητας (εξουδετέρωση της οξύτητας του διαλύματος έκλουσης).

Η πρόσδεση των αντισωμάτων (προσδεμάτων) σε πρωτεΐνες (προσδέτες) επηρεάζεται από το pH, τη συγκέντρωση του άλατος και τη θερμοκρασία.

Για τον καθαρισμό των αντισωμάτων χρησιμοποιούνται και παραδοσιακές μέθοδοι καθαρισμού, που περιλαμβάνουν μεθόδους καθίζησης (π.χ. θειικό αμμώνιο ή καπρυλικό οξύ), ή εναλλακτικές χρωματογραφικές μεθόδους (ιοντοανταλλαγής ή διήθηση σε πηκτική). Όμως, αυτές οι μέθοδοι απαιτούν πολλαπλά βήματα καθαρισμού, ώστε προτείνονται μόνο εάν οι μέθοδοι συγγένειας δεν είναι αποτελεσματικές. Μια επιπλέον επιλογή είναι να χρησιμοποιηθεί μια στήλη ανοσοσυγγένειας αντισώματος, αποτελούμενη από ένα ειδικό αντίσωμα για το τμήμα Fc του αντισώματος - στόχου. Είναι σημαντικό να ελέγχεται η δραστηριότητα του αντισώματος κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων καθαρισμού του, ώστε να πιστοποιείται η διατήρηση της δομής και άρα η καλή του κατάσταση.

Ομοιοπολική σύνδεση αντιγόνου στο υπόστρωμα. Δέσμευση των επιθυμητών αντισωμάτων. Έκλυση των υπολοίπων. Έκλυση επιθυμητών αντισωμάτων



**Εικόνα 3.3** Απομόνωση αντισωμάτων σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας. Κατάλληλο αντιγόνο - προσδέτης ακινητοποιείται στο υπόστρωμα. Μείγμα αντισωμάτων διατρέχει τη στήλη και αντισώματα με συγγένεια για το αντιγόνο δεσμεύονται στη στήλη, ενώ τα μη ειδικά εκλούνται εύκολα. Τα επιθυμητά αντισώματα εκλούνται από τη στήλη με διάφορους τρόπους.

### 3.3.1.2 Πειραματική διαδικασία

Τα αντισώματα που δεσμεύονται σε στήλες πρωτεϊνών A και G, εξάγονται κατά κύριο λόγο σε χαμηλό pH, καθώς σε βασικές συνθήκες η σταθερότητα του αντισώματος είναι περιορισμένη.

- Προετοιμασία της στήλης πρωτεΐνη A / G - Sepharose
  1. Η πρωτεΐνη A ή G προσκολλάται σε CNBr - ενεργοποιημένη Sepharose.
  2. Το υπόστρωμα, πρωτεΐνη A - Sepharose (ή πρωτεΐνη G - Sepharose) ενυδατώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα (100 mM Tris - HCl pH 7,5, 100 mM NaCl), σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Απαιτούνται 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος / 1g υποστρώματος, το οποίο θα προκαλέσει διόγκωση του υλικού 3 - 4 φορές.
  3. Το υπόστρωμα τοποθετείται σε μια στήλη και πλένεται καλά με 5 - 10 όγκους στήλης με το προηγούμενο ρυθμιστικό διάλυμα. Η ροή θα πρέπει να είναι μέχρι και 1 ml/ min.
  4. Οι ανεπιθύμητες ουσίες απομακρύνονται από τη στήλη με τη χρήση 3 - 5 όγκων στήλης, 0.1 M γλυκίνης - HCl pH 2,5.
  5. Η στήλη εξισορροπείται με 5 - 10 όγκους στήλης του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος. Εάν η στήλη αποθηκευτεί σε αυτό το στάδιο, πρέπει να συμπεριληφθούν 0,02% νατραζιδίου (NaN<sub>3</sub>) και να ακολουθήσει αποθήκευση στους 4 °C.
- Προετοιμασία του διαλύματος του αντισώματος



1. Φυγοκέντριση του διαλύματος του δείγματος στα  $10.000 \times g$  για 10 λεπτά, προκειμένου να αφαιρεθεί το υλικό που έχει καθιζάνει και να συλλεγεί το υπερκείμενο υγρό.
  2. Το δείγμα αραιώνεται με έναν ισοδύναμο όγκο του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος ή προστίθεται ένα δέκατο του όγκου,  $10 \times$  του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος για να επιτευχθεί το κατάλληλο pH και το ιοντικό σθένος.
- *Εφαρμογή δείγματος*
    1. Το δείγμα τοποθετείται στην κορυφή της στήλης (μέχρι 2 ml ορού πολυκλωνικού αντισώματος ανά ml του στοιβαγμένου πηγματος ή μέχρι 20 ml διαλύματος μονοκλωνικού αντισώματος, εφόσον το ολικό IgG είναι  $< 80\%$  της συνολικής χωρητικότητας της στήλης). Οι στήλες μπορούν να δεσμεύσουν 5 - 20 mg αντισώματος ανά ml των υγρών σφαιριδίων.
    2. Έκπλυση στήλης με 10 όγκους στήλης του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος.
  - *Έκλυση δείγματος*
    1. Εκλούετε με 5 - 10 όγκους στήλης διαλύματος γλυκίνης 0,1 M - HCl pH 2,5, συλλέγοντας κλάσματα 1 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες, που περιέχουν 0,1 ml 1 M Tris - HCl pH 8,0 για να εξουδετερωθεί η οξύτητα του εκλουόμενου διαλύματος.
    2. Διατηρούνται τα κλάσματα έκλυσης με  $A_{280}$  πάνω από 0,2.
    3. Για να αλλάξετε το ρυθμιστικό διάλυμα στα κλάσματα ή να αφαιρέσετε άλατα, εφαρμόστε διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM  $Na_2HPO_4$ , 1,5 mM  $KH_2PO_4$ ) ή περάστε από μια στήλη διήθησης πηκτής ή χρησιμοποιήστε υπερδιήθηση.
    4. Συσκευάστε δείγματα όγκου 1 ml και αποθηκεύστε στους 4 °C για άμεση χρήση ή στους -20 °C για μεγαλύτερης διάρκειας αποθήκευση.
    5. Εκπλύνετε τη στήλη με 5 όγκους στήλης 0.1 M γλυκίνης - HCl pH 2,5 και εξισορροπήστε με 10 όγκους στήλης αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος (προσθέστε 0,02% νατραζίδιο για αποθήκευση).

## Παρατηρήσεις

1. Σωστά συντηρημένες στήλες πρωτεΐνης A και G μπορούν να χρησιμοποιηθούν τουλάχιστον 10 φορές, χωρίς να επέλθει απώλεια της δραστηρότητάς τους.
2. Χρησιμοποιούνται πρωτεΐνη A καθώς και ανασυνδυασμένη (recombinant) πρωτεΐνη A με παραπλήσια δομή στην περιοχή τους που προσδένεται στην Fc περιοχή των IgG αντισωμάτων. Η ανασυνδυασμένη A πρωτεΐνη έχει τροποποιηθεί γενετικά έτσι ώστε να περιλαμβάνει μια C-τελική κυστεΐνη που επιτρέπει την πρόσδεση σε ένα μόνο σημείο της στήλης σεφαρόζης, γεγονός που ενισχύει τη χωρητικότητα της στήλης, λόγω ελάττωσης της στερεοχημικής παρεμπόδισης μεταξύ των μορίων του προσδέτη.
3. Γενετικά τροποποιημένα αντισώματα και τμήματα αντισωμάτων μπορεί να έχουν παραλλαγμένες φυσικοχημικές ιδιότητες οι οποίες πιθανόν και να διευκολύνουν τον καθαρισμό τους. Για παράδειγμα, αλληλουχίες σήμανσης (tags) μπορεί να προστεθούν σε μόρια - στόχους, για τα οποία δεν υπάρχουν κατάλληλες στήλες καθαρισμού και απομόνωσης και να δημιουργηθεί μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, που μπορεί να καθαριστεί αποτελεσματικά με χρωματογραφία συγγένειας, στην οποία ο προσδέτης αναγνωρίζει την αλληλουχία σήμανσης του προσδέματος (π.χ His - tagged πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από χρωματογραφικές στήλες που περιέχουν ιόντα νικελίου).
4. Η αποθήκευση των αντισωμάτων θα πρέπει να γίνεται σε ουδέτερο pH. Η επί μακρόν αποθήκευση πρέπει να γίνεται στους -20 °C ή και χαμηλότερα, όπου μπορούν να διατηρηθούν για χρόνια. Η συνεχής τήξη - πήξη και η αποθήκευση στους 4 °C, μπορεί να προκαλέσει την απενεργοποίηση ορισμένων αντισωμάτων (Harlow & Lane, 1988).



5. Τα χαρακτηριστικά πρόσδεσης των απομονωμένων αντισωμάτων μπορούν να ελεγχθούν με τη μέθοδο της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσροφητικής μεθόδου (ELISA), της ανοσοαποτύπωσης ή της ανοσοκαθίζησης (Harlow & Lane, 1988).
6. Για την παραλαβή μονοκλωνικού αντισώματος από διάλυμα πολυκλωνικού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στήλη συγγένειας με ακινητοποιημένο το κατάλληλο αντιγόνο - προσδέτη.

### 3.3.1.3 Ανοσοκαθαρισμός

Η χρωματογραφία συγγένειας με τη χρήση αντισωμάτων στον ρόλο προσδέτη, είναι μια αξιόπιστη και υψηλής απόδοσης μέθοδος καθαρισμού πρωτεϊνών, που επιτρέπει πολύ καλό καθαρισμό σε ένα μόνο βήμα. Όταν η εξειδίκευση πρόσδεσης ενός αντισώματος για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει έχει αποσαφηνιστεί και η διαδικασία έκλουσης της πρωτεΐνης από τη στήλη δεν την τροποποιεί αμετάκλητα, ο καθαρισμός ανοσοσυγγένειας είναι μια εξαιρετική μέθοδος, ειδικότερα στα τελικά στάδια της διαδικασίας καθαρισμού.

Μια στήλη ανοσοσυγγένειας προϋποθέτει την ομοιοπολική πρόσδεση του αντισώματος στη μήτρα της στήλης. Εναλλακτικά, το αντίσωμα μπορεί να είναι δεσμευμένο με την πρωτεΐνη A ή G και μέσω αυτών ακινητοποιημένο στο υπόστρωμα (Harlow & Lane, 1988). Αυτή η διαδικασία, με δεδομένο ότι οι πρωτεΐνες A ή G δεσμεύουν την περιοχή Fc του αντισώματος, επιτρέπει τον κατάλληλο προσανατολισμό του μορίου, ώστε διασφαλίζεται η καλύτερη δυνατή προσέγγιση της πρωτεΐνης - στόχου (πρόσδεμα) στη θέση πρόσδεσης στο αντίσωμα (προσδέτης). Η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει παραλαμβάνεται σχετικά εύκολα από τη στήλη, έπειτα από τη διέλευση του δείγματος που την περιέχει και την ακόλουθη έκλουσή της με το κατάλληλο διάλυμα έκλουσης. Παρόλα αυτά, εάν η φύση της πρωτεΐνης πρόσδεσης δεν έχει κατανοηθεί επαρκώς, η εξαγωγή της από μια στήλη ανοσοσυγγένειας μπορεί να είναι επίπονη διαδικασία. Άλλες αναφορές για λεπτομέρειες σχετικά με τη χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας περιλαμβάνονται στους Kenney *et al.* (1998), Harlow & Lane (1988) και Pharmacia (1993).

Η ποιότητα του χρωματογραφικού ανοσοκαθαρισμού εξαρτάται επίσης από την καθαρότητα του διαλύματος του αντισώματος (προσδέτης). Συνεπώς, οι στήλες ανοσοσυγγένειας είναι συνήθως αρκετά ακριβές, λόγω της απαίτησης σε αντίσωμα υψηλής καθαρότητας, και ταυτόχρονα η χωρητικότητά τους μπορεί να είναι σχετικώς χαμηλή (συχνά, λιγότερο από 1 mg του προσδέματος δεσμεύεται ανά ml στήλης).

Η ανοσοκαθίζηση μπορεί να θεωρηθεί ως μια άλλη εκδοχή του καθαρισμού ανοσοσυγγένειας. Εδώ το σύμπλοκο αντιγόνου - αντισώματος καταβυθίζεται σε διάλυμα και η επιθυμητή πρωτεΐνη παραλαμβάνεται από το σύμπλοκο με ειδικό χειρισμό. Μια παραλλαγή της χρωματογραφίας ανοσοσυγγένειας αποτελεί ο «αρνητικός ανοσοκαθαρισμός», όπου ένα συγκεκριμένο ανεπιθύμητο στοιχείο αφαιρείται από ένα διάλυμα σε μια στήλη αντισώματος, όπου το αντίσωμα αναγνωρίζει το ανεπιθύμητο στοιχείο.

### 3.3.1.4 Πειραματική διαδικασία

Το ακόλουθο πρωτόκολλο εργασίας προϋποθέτει ότι η χρωματογραφική στήλη με το αντίσωμα - προσδέτη, είναι ήδη έτοιμη, δηλαδή έχει «πακεταριστεί». Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί ένα ρυθμιστικό διάλυμα, συγκεκριμένου pH, το οποίο θα σταθεροποιήσει τον προσδέτη. Δεν επιτρέπεται να παραμείνει η στήλη χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα. Όλα τα διαλύματα θα πρέπει να διηθηθούν - αποστειρωθούν μέσω ενός φίλτρου με πόρους 0,22 μ, για να μεγιστοποιηθεί ο χρόνος ζωής της στήλης. Για να καθοριστεί η χωρητικότητα μιας στήλης σε αντιγόνο, ένα δοκιμαστικό πείραμα σύνδεσης μπορεί να διεξαχθεί σε γυάλινους σωλήνες με την ανάμειξη αυξανόμενων ποσών αντιγόνου με ορισμένο και σταθερό ποσό αντισώματος και τον έλεγχο της συγκέντρωσης κορεσμού του αντιγόνου.

Στην ακόλουθη διαδικασία εφαρμόζεται χαμηλό pH για την έκλουση, θεωρώντας δεδομένη τη σταθερότητα του αντιγόνου σε αυτές τις συνθήκες.

- *Εξισορρόπηση της στήλης*
1. Εκπλύνετε τη στήλη με ρυθμιστικό διάλυμα (για παράδειγμα, PBS). Χρησιμοποιήστε 5 - 10 όγκους στήλης.
  2. Απομακρύνετε τα ανεπιθύμητα ή μολυσματικά στοιχεία από τη στήλη με 3 - 5 όγκους στήλης του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (για παράδειγμα, 0.1 M γλυκίνης - HCl pH 2.5).

3. Εξισορροπήστε αμέσως τη στήλη με 5 - 10 όγκους στήλης του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος.
- *Φόρτωση του δείγματος*
    1. Πριν τη φόρτωση στη στήλη πραγματοποιήστε φυγοκέντριση του δείγματος ( $100.000 \times g / 3 \text{ min}$ ) ή διήθηση (μέσω φίλτρου με μέγεθος πόρων  $0,22 \mu$ ). Εξισορροπήστε το δείγμα σε αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα (π.χ με διαπίδυση, διήθηση πήγματος ή με την προσθήκη  $1/10$  του όγκου του, από πυκνό,  $10 \times \text{stock}$  αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος).
    2. Τοποθετήστε το δείγμα στη στήλη. Ελεγχόμενη ροή μικρής κλίμακας επιτρέπει την καλύτερη πρόσδεση αντιγόνου - αντισώματος. Το δείγμα μπορεί επίσης να επαναφορτωθεί για αρκετές φορές στη στήλη.
  - *Έκπλυση της στήλης*
    1. Εκπλύνετε με 5 - 10 όγκους στήλης του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος ή μέχρι το  $A_{280}$  να ελαττωθεί πολύ. Εάν η αλληλεπίδραση αντισώματος - αντιγόνου είναι ισχυρή, συμπεριλάβετε άλας στο αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα (για παράδειγμα  $0,5 \text{ M KCl}$ ) για να περιορίσετε τη μη ειδική πρόσδεση.
  - *Έκλουση της πρωτεΐνης*
    1. Εκλούετε με την προσθήκη 2 όγκων στήλης του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (για παράδειγμα,  $0,1 \text{ M}$  γλυκίνης -  $\text{HCl}$  pH 2,5), συλλέγοντας κλάσματα όγκου  $1 \text{ ml}$  σε σωλήνες που περιέχουν  $0,1 \text{ ml}$   $1 \text{ M}$  Tris -  $\text{HCl}$  pH 8,0 για την εξουδετέρωση του όξινου pH του κλάσματος.
    2. Προσδιορίστε τη δραστηριότητα των κλασμάτων και ενώστε τα ενεργά εξ αυτών.
    3. Αντικαταστήστε το ρυθμιστικό διάλυμα (άμεσα εάν το αντιγόνο έχει περιορισμένη σταθερότητα) με διαπίδυση ή διήθηση πήγματος.
  - *Αναγέννηση της στήλης*
    1. Εκπλύνετε με 10 όγκους στήλης  $0,2 \text{ M}$  γλυκίνης -  $\text{HCl}$  pH 2,5, έπειτα με 10 - 20 όγκους στήλης PBS (που να περιέχει  $0,02\%$  νατραζίδιο εάν πρόκειται να αποθηκεύσετε τη στήλη).

## Παρατηρήσεις

1. Αν και υψηλή συγγένεια αντιγόνου - αντισώματος είναι επιθυμητή (ειδικότερα για καθαρισμό αντιγόνου από αραιά διαλύματα), σε μεγάλο βαθμό, η ισχυρή πρόσδεση μπορεί να εμποδίσει την ανάκτηση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Μια ενδιάμεση συγγένεια πρόσδεσης ( $10^{-7} \text{ M}$ ) είναι συχνά καλύτερη.
2. Ακόμα και η πιο ήπια μικροβιακή επιμόλυνση μιας στήλης ανοσοσυγγένειας μπορεί να καταλήξει σε πρωτεόλυση του αντισώματος, οπότε επιβάλλεται αυστηρά η χρήση στείρων διαλυμάτων σε όλα τα στάδια.
3. Η χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας μπορεί συχνά να εκτελεστεί σε θερμοκρασία δωματίου και αυτό την κάνει προσιτή από την άποψη της ευκολίας εφαρμογής της.

## 3.3.2 Χρωματογραφία συγγένειας νουκλεϊκού οξέος

### 3.3.2.1 Εισαγωγή

Η χρωματογραφία συγγένειας νουκλεϊκού οξέος αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για τον καθαρισμό και τον χαρακτηρισμό μιας ευρείας κλίμακας πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που προσδένονται σε νουκλεϊκά οξέα μπορεί να

δεσμεύσουν μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA ή RNA. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες που προσδέονται στο DNA μπορεί να αναγνωρίζουν ορισμένη αλληλουχία ή να αλληλεπιδρούν με το DNA μη ειδικά.

Οι πρωτεΐνες που καθαρίζονται με αυτήν την τεχνική είναι οι εξής:

- Πρωτεΐνες που δεσμεύουν το γενετικό υλικό, όπως: αυτές που εμπλέκονται στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης (π.χ μεταγραφικοί παράγοντες, transcription factors), τη διόρθωση και την αντιγραφή του χρωμοσώματος (π.χ πολυμεράσες και ένζυμα επιδιόρθωσης λαθών), η DNA λιγάση καθώς και αυτές που εμπλέκονται στον γενετικό ανασυνδυασμό.
- Αναστολείς πρωτεάσης της σερίνης, όπως η αντιθρομβίνη III.
- Αυξητικοί παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor, FGF) και ο παράγοντας αύξησης των ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial Cell Growth Factor ECGF).
- Υποδοχείς ορμονών, όπως τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα.
- Λιποπρωτεΐνες.

Πριν την εφαρμογή καθαρισμού συγγένειας με τη χρήση νουκλεοτιδίων, πρέπει να ικανοποιηθούν κάποιες θεμελιώδεις απαιτήσεις. Χρειάζεται να καθοριστεί το ελάχιστο ικανό μέγεθος της αλληλουχίας πρόσδεσης του νουκλεϊκού οξέος. Ο Kadonaga (1991) σημειώνει ότι επιτυχημένοι καθαρισμοί συγγένειας έχουν χρησιμοποιήσει ολιγονουκλεοτίδια με μήκος μεταξύ 14 και 51 βάσεων. Έπειτα, το μήκος του ολιγονουκλεοτιδίου πρέπει να είναι τέτοιο, ώστε να μη δημιουργείται κενό στο υπόστρωμα (μήτρα), γεγονός που καθιστά δύσκολη την πρόσδεση της επιθυμητής πρωτεΐνης στα μόρια του ακινητοποιημένου προσδέτη. Τέλος, το υπόστρωμα που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να έχει ιδιότητες ροής κατάλληλες, ενώ παράλληλα να επιτρέπει την πρόσβαση της πρωτεΐνης ή πολυμερούς αυτής στην αλληλουχία του νουκλεοτιδίου. Στις περισσότερες εφαρμογές χρησιμοποιείται Sepharose 4B ως υπόστρωμα και το παρακάτω πρωτόκολλο θα περιγράψει τη χρήση σφαρόζης ενεργοποιημένης με CNBr, για την ακινητοποίηση νουκλεϊνικού προσδέτη και την εκτέλεση χρωματογραφίας συγγένειας.

### 3.3.2.2 Πειραματική διαδικασία

Το ακόλουθο πρωτόκολλο περιγράφει τη σύνδεση ολιγονουκλεοτιδίου με, ενεργοποιημένη με βρωμιούχο κιάνιο, στήλη Sepharose 4B. Η σύνδεση του DNA με τη στήλη επιτελείται διαμέσου των αζωτούχων βάσεων του μορίου. Ο έλεγχος ενσωμάτωσης - πρόσδεσης μπορεί να επιτευχθεί με τη μέτρηση της απορρόφησης του υποστρώματος στα 260 nm ή αντίστοιχο έλεγχο στο διάλυμα των νουκλεοτιδίων υπό κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και συγκρίσιμους όγκους πριν και μετά τη διέλευσή του από τη στήλη. Για περιγραφές του πώς προετοιμάζουμε και καθαρίζουμε ολιγονουκλεοτίδια, συμβουλευτείτε τον Kadonaga (1991).

1. Αιωρείστε 1,5 g ξηρού CNBr-Sepharose 4B σε νερό (θα πρέπει να γίνουν περίπου 5 ml διογκωμένου πηγματος). Διηθήστε μέσω ενός πορώδους γυάλινου χωνιού, υπό κενό, διακόπτοντας τη διαδικασία ενώ το πήγμα θα είναι ακόμα υγρό.
2. Σε ένα χωνί, πλύνετε με 200 ml, 1 mM HCl και ακολούθως με 200 ml νερού και 200 ml, 10 mM φωσφορικού καλίου, pH 8,0. Όλα τα διαλύματα θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία 4 °C.
3. Μορφοποιήστε τη στήλη σε έναν σωλήνα των 15 ml που περιέχει 2 ml, 10 mM φωσφορικού καλίου, pH 8.0.
4. Στην ενεργοποιημένη στήλη, προσθέστε 50 μl ολιγονουκλεοτιδίου (παρέχοντας περίπου 2 nmol νουκλεοτιδίου ανά ml πηγματος) και ανακινήστε σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες.
5. Μεταφέρετε σε ένα πορώδες, γυάλινο χωνί και αφαιρέστε το υγρό υπό κενό.
6. Εκπλύνετε τη στήλη με 200 ml νερού και έπειτα με 100 ml, 1 M αιθανολαμίνης - HCl pH 8,0.
7. Επαναιωρήστε τη στήλη σε 7 ml 1 M αιθανολαμίνης - HCl pH 8,0 και ανακινήστε σε σωλήνα πολυπροπυλενίου σε θερμοκρασία δωματίου για 4 - 6 ώρες. Αυτό το βήμα απενεργοποιεί τα ελεύθερα σωματίδια - κόκκους της στήλης.
8. Εκπλύνετε τη στήλη με 100 ml, 10 mM φωσφορικού καλίου pH 8,0, έπειτα με 100 ml 1 M φωσφορικού καλίου pH 8,0, μετά με 100 ml 1 M KCl, έπειτα με 100 ml νερού, μετά με 100 ml

ρυθμιστικού διαλύματος αποθήκευσης (10 mM Tris - HCl pH 7,6, 0,3 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,02% NaN<sub>3</sub>).

9. Αποθηκεύστε στους 4 °C μέχρι περίπου έναν χρόνο.

Πριν την εφαρμογή του διαλύματος της πρωτεΐνης (πρόσδεμα) σε μια στήλη συγγένειας νουκλεϊκού οξέος, συνίσταται ο καθαρισμός του δείγματος με μια άλλη μέθοδο καθαρισμού (όπως η καθίζηση θειικού αμμωνίου, χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής ή χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή). Το πρόσθετο βήμα καθαρισμού θα αφαιρέσει τα περισσότερα μολυσματικά στοιχεία και θα μειώσει την πιθανότητα μη ειδικής πρόσδεσης. Οι στήλες χρωματογραφίας συγγένειας είναι γενικά ευρείες και χαμηλού ύψους (αναλογία ύψους - διαμέτρου 2:1).

10. Εξισορροπήστε τη στήλη με 10 όγκους στήλης του ρυθμιστικού διαλύματος (Ρυθμιστικό διάλυμα AC για παράδειγμα, που περιέχει 20 mM Tris - HCl pH 8,0, 0,15 M KCl, 1 mM EDTA).
11. Προσαρμόστε το δείγμα της πρωτεΐνης σε παρόμοια ιοντική συγκέντρωση (0,15 M KCl).
12. Προσθέστε μη ειδικό DNA στο δείγμα της πρωτεΐνης σε συγκέντρωση 100 ng/μg πρωτεΐνης και επωάστε σε πάγο για 10 λεπτά. Το μη ειδικό DNA, συχνά μήκους 1 kilobase μπορεί να γίνει δίκλωνο πολύ (dI-dC) ή πολύ (dA-dT). Για να αφαιρέσετε μη ειδικά σύμπλοκα που μπορεί να σχηματιστούν με αυτή τη μέθοδο, συνιστάται φυγοκέντριση 10 λεπτών στα 10.000 × g.
13. Τοποθετήστε αργά το διάλυμα της πρωτεΐνης στη στήλη συγγένειας (15 ml/hr).
14. Εκπλύνετε το φορτισμένο υπόστρωμα με 5 όγκους στήλης ρυθμιστικού διαλύματος AC.
15. Οι δεσμευμένες πρωτεΐνες εκκλύονται διαδοχικά με 1 όγκο στήλης ρυθμιστικού διαλύματος AC, που περιέχει διάφορες συγκεντρώσεις άλατος, δηλαδή 0,2, 0,3, 0,6, 1 M KCl.
16. Ελέγξτε τα εκλουσθέντα κλάσματα για δραστηριότητα. Επειδή οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών είναι συχνά χαμηλές, το μη ιοντικό απορρυπαντικό Triton X-100 (0,05%) συχνά προστίθεται για να μειώσει την προσρόφηση της πρωτεΐνης στο τοίχωμα του δοχείου (αν και αυτό το απορρυπαντικό επηρεάζει τις μετρήσεις απορρόφησης στα 280 nm).
17. Αποθηκεύστε τα κλάσματα ενεργής πρωτεΐνης στους -70 °C.
18. Η στήλη συγγένειας αναγεννάται με έκπλυση με 10 όγκους στήλης ρυθμιστικού διαλύματος AC, που περιέχει 2,5 M NaCl και 0,5 M EDTA, και εξισορροπείται προς αποθήκευση με ρυθμιστικό διάλυμα AC που περιέχει επιπλέον 0,02% NaN<sub>3</sub>.

## Παρατηρήσεις

1. Η έκλυση ορισμένων και συγκεκριμένων πρωτεϊνών, που προσδένονται σε στήλη νουκλεϊκών οξέων μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση διαλύματος των νουκλεοτιδίων σε υψηλή συγκέντρωση.
2. Η αφαίρεση μολυσματικού DNA από το διάλυμα της πρωτεΐνης μπορεί να βελτιώσει την απόδοση του χρωματογραφικού καθαρισμού. Το DNA μπορεί να αφαιρεθεί με τη χρήση DNase ή να καθιζάνει με 1% polyethyleneimine ή θειική στρεπτομυκίνη (μέχρι 5%). Τα ρυθμιστικά διαλύματα που θα προστεθούν στη συνέχεια, θα πρέπει να περιέχουν EDTA για να αφαιρέσουν δισθενή κατιόντα και να απενεργοποιήσουν τη DNase.
3. Η πρόσδεση στο υπόστρωμα κατά την προετοιμασία της στήλης μπορεί να υπολογιστεί με τη μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος του DNA στα 260 nm πριν και μετά τη διέλευσή του από τη στήλη.
4. Μεταβλητές που μπορούν να επηρεάσουν την αλληλεπίδραση DNA - πρωτεΐνης και την έκλυση είναι η θερμοκρασία, το pH και η συγκέντρωση μαγνησίου.
5. Η πρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA μπορεί να απαιτεί συμπαραγόντες (ATP, Mg, S-adenosylmethionine). Έτσι, η απομάκρυνση των συμπαραγόντων επιτρέπει την εξαγωγή (Alberts and Herrick, 1971).
6. Οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με νουκλεϊκό οξύ, μπορούν να καθαριστούν περαιτέρω με μη ειδικές μεθόδους χρωματογραφίας, συμπεριλαμβανομένης και της χρωματογραφίας λεκτινής.
7. Μια εκτεταμένη λίστα των αυθεντικών αναφορών με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας DNA μπορεί να βρεθεί στον Kadonaga (1991).

### 3.3.3 Χρωματογραφία συγγένειας λεκτίνης

#### 3.3.3.1 Εισαγωγή

Οι λεκτίνες είναι πρωτεΐνες που προσδένουν αντιστρεπτά τους υδατάνθρακες. Αφού οι περισσότερες λεκτίνες περιέχουν τουλάχιστον δυο θέσεις πρόσδεσης υδατανθράκων ανά μόριο, μπορούν να καθιζάνουν τις γλυκοπρωτεΐνες και τα κύτταρα που περιέχουν στην επιφάνειά τους γλυκοπρωτεΐνες. Λόγω της παραπάνω ιδιότητας είναι χρήσιμες ως προσδέτες σε στήλες χρωματογραφίας συγγένειας για γλυκοπρωτεΐνες, επιτρέποντας ήπια έκλουση των πρωτεϊνών αυτών. Αν και η χρωματογραφία συγγένειας λεκτίνης δεν είναι υψηλά επιλεκτική, οι στήλες λεκτίνης έχουν παρόλα αυτά γίνει, πολύτιμα εργαλεία καθαρισμού πρωτεϊνών, σε κάποιο τουλάχιστον στάδιο της συνολικής διαδικασίας. Μια στήλη λεκτίνης μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση ανεπιθύμητου παράγοντα που φέρει μόρια γλυκοπρωτεΐνης.

- **Μαννόζη/λεκτίνες που δεσμεύουν γλυκόζη**, Lentil Lectin και Concanavalin A (Con A). Εξειδίκευση πρόσδεσης (μόρια αναγνώρισης): Διακλαδισμένες μαννόζες με φουκόζη και υδατάνθρακες με τελική μαννόζη ή γλυκόζη.
- **Λεκτίνες δέσμωσης N-ακετυλογλυκοζαμίνης**, Wheat Germ Lectin. Εξειδίκευση πρόσδεσης (μόρια αναγνώρισης): Πυρήνας χιτοβιόζης N-συνδεδεμένων ολιγοσακχαριτών (Lotan & Nicolson, 1979).

Οι λεκτίνες επιλέγονται για τη χρωματογραφία συγγένειας σύμφωνα με την εξειδίκευσή τους και τη σταθερότητα της πρόσδεσης. Για παράδειγμα, η Κονκαναβαλίνη Α (ConA) προσδένει πρωτεΐνες που περιέχουν γλυκόζη ή μαννόζη, ενώ λεκτίνη φύτρου σίτου προσδένει πρωτεΐνες με N-acetylglucosamine (Lotan & Nicolson, 1979). Αφού σε πολλές περιπτώσεις η ακριβής σύνθεση της γλυκοπρωτεΐνης που πρόκειται να καθαριστεί δεν είναι γνωστή, είναι συχνά χρήσιμο να ελέγχουμε μια ποικιλία λεκτινών για πρόσδεση με την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.

Κάποιες γενικές θεωρήσεις που είναι μοναδικές στη χρωματογραφία συγγένειας λεκτίνης είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη. Ορισμένες λεκτίνες απαιτούν μη συχνά απαντώμενα δισθενή κατιόντα για τη δομική τους ακεραιότητα. Αφού η χρωματογραφία συγγένειας λεκτίνης περιλαμβάνει συχνά πρωτεΐνες μεμβράνης, απαιτούνται απορρυπαντικά ώστε να διατηρηθούν διαλυτές αυτές οι πρωτεΐνες. Αν και οι λεκτίνες είναι μάλλον σταθερές στα μη ιοντικά απορρυπαντικά, τα ιοντικά απορρυπαντικά μπορούν να μειώσουν σημαντικά την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τα μόρια - στόχους.

#### 3.3.3.2 Πειραματική διαδικασία

Η χρωματογραφία συγγένειας λεκτίνης είναι σχετικά εύκολη στην εφαρμογή της. Η λεκτίνη μπορεί να ακινητοποιηθεί πάνω στο υπόστρωμα με ποικίλες μεθόδους. Η σύνδεση λεκτίνης με υπόστρωμα CNBr - ενεργοποιημένης σεφαρόζης μπορεί να υλοποιηθεί με την προσθήκη 1 - 10 mg λεκτίνης ανά ml υλικού του υποστρώματος. Είναι σημαντικό να συμπεριληφθεί το κατάλληλο δισθενές κατιόν (σε συγκέντρωση 0,1 mM), καθώς και προστατευτικό σάκχαρο (5%, w/v), έτσι που η θέση αλληλεπίδρασης με το πρόσδεμα να μην είναι προσιτή κατά τη διάρκεια της σύνδεσης του προσδέτη στο υπόστρωμα. Πολλές στήλες συγγένειας λεκτίνης είναι εμπορικά διαθέσιμες.

Το ακόλουθο πρωτόκολλο περιγράφει τον καθαρισμό ορισμένης πρωτεΐνης σε στήλη συγγένειας ConA (Sutton, 1989). Παραπλήσιες διαδικασίες εφαρμόζονται και για άλλες στήλες λεκτίνης, με την αντικατάσταση κάθε φορά του σακχάρου - ανταγωνιστή, που χρησιμοποιείται για την έκλουση του προσδέματος από τη στήλη. Οι στήλες χρωματογραφίας με σχετικά μεγάλο ύψος και μικρή διάμετρο παρέχουν την καλύτερη ανάλυση, ενώ οι μικρού ύψους και μεγαλύτερης διαμέτρου, επιτρέπουν κλίμακες μεγαλύτερης ροής με τις πρωτεΐνες να εκκλύονται σε μικρότερο όγκο. Μικρές δοκιμαστικές στήλες ή έλεγχοι χρωματογραφίας σε σωλήνες Eppendorf, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της χωρητικότητας της στήλης.

1. Προετοιμάστε και στοιβάξτε (πακετάρετε) τη στήλη ConA.
2. Εξισορροπήστε τη στήλη εκπλένοντας με 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος (20 mM Tris - HCl pH 8,0, 0,15 M NaCl, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 mM οκτυλο-γλυκοζίτη).

3. Προετοιμάστε τη γλυκοπρωτεΐνη με διαπίδυση στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα χρωματογραφίας ή με αραίωση 1:1 με ρυθμιστικό διάλυμα χρωματογραφίας. Φυγοκεντρήστε ή διηθήστε το διάλυμα της πρωτεΐνης για να αφαιρέσετε το ίζημα.
4. Μεταφέρετε το διάλυμα της πρωτεΐνης στη στήλη.
5. Εκπλύνετε με το παραλαμβανόμενο ρυθμιστικό διάλυμα και επανεισάγετε στη στήλη, μέχρι η απορρόφηση στα 280 nm να επιστρέψει στη βασική γραμμή.
6. Εκλούετε με 5 όγκους στήλης 10 mM methyl- $\alpha$ -D-mannoside, σε ρυθμιστικό διάλυμα χρωματογραφίας.
7. Συνεχίστε τα βήματα εξαγωγής με πέντε όγκους στήλης 20 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM και 500 mM methyl- $\alpha$ -D-mannoside, σε ρυθμιστικό διάλυμα χρωματογραφίας.
8. Αναλύστε τα κλάσματα της επιθυμητής πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν, μπορούν να υποστούν διαπίδυση, για να αφαιρεθεί το σάκχαρο που χρησιμοποιήθηκε για την έκλουσή τους.
9. Αναγεννάτε τη στήλη με ρυθμιστικό διάλυμα χρωματογραφίας που περιέχει 1 M NaCl.
10. Η στήλη μπορεί να αποθηκευτεί σε ρυθμιστικό διάλυμα χρωματογραφίας, που περιέχει 0,02% αζίδιο του νατρίου ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση της στήλης.

## Παρατηρήσεις

1. Για δείγματα που περιέχουν πολλές γλυκοπρωτεΐνες με διαφορετική συγγένεια για τη λεκτίνη, μία σταδιακή έκλυση (με κλιμάκωση της ισχύος του εκλούτη) μπορεί να βελτιώσει την ανάλυση. Η αναγέννηση της στήλης μπορεί να βελτιωθεί σταματώντας τη ροή για μερικά λεπτά κατά τη διάρκεια της έκλυσης.
2. Ουσίες που προσδένονται ισχυρά, εκλούνται μειώνοντας το pH. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν συνίσταται έκλυση σε pH <4 και ότι σε pH <5 τα Mn<sup>2+</sup> αρχίζουν να απομακρύνονται από το υπόστρωμα ConA και η στήλη χρειάζεται να εμπλουτιστεί με Mn<sup>2+</sup> πριν χρησιμοποιηθεί ξανά.

## 3.3.4 Χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου

### 3.3.4.1 Εισαγωγή

Πρωτεΐνες και πεπτίδια που εμφανίζουν συγγένεια με μεταλλικά ιόντα μπορούν να απομονωθούν χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου. Τα μέταλλα στη στήλη ακινητοποιούνται με τον σχηματισμό χηλικών συμπλόκων (Sulkowski, 1985). Συγκεκριμένα αμινοξέα (π.χ. ιστιδίνη, κυστεΐνη) σχηματίζουν σύμπλοκα με τα χηλιωμένα μέταλλα σε ουδέτερο pH και η περιεκτικότητα μιας πρωτεΐνης σε ιστιδίνες ευθύνεται για την πρόσδεση της πρωτεΐνης αυτής σε ένα χηλιωμένο μέταλλο. Το είδος αυτό της χρωματογραφίας είναι εξαιρετικό για τον καθαρισμό ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που φέρουν 6 ιστιδίνες καθώς και για πολλές φυσικές πρωτεΐνες.

Πριν από τη χρήση, το υπόστρωμα «φορτίζεται» με διάλυμα ιόντων δισθενών μετάλλων, όπως νικέλιο, ψευδάργυρος, χαλκός, ασβέστιο, κοβάλτιο ή σίδηρος. Η αντίδραση πρόσδεσης με την πρωτεΐνη - στόχο εξαρτάται από το pH και τα μόρια που έχουν προσδεθεί, συνήθως εκλούνται με ελάτωση του pH και αύξηση της ιοντικής ισχύος του ρυθμιστικού διαλύματος ή με την προσθήκη EDTA ή ιμιδαζολίου στο ρυθμιστικό διάλυμα.

### Επιλογή μεταλλικού ιόντος

- **Cu<sup>2+</sup>**: διασφαλίζει ισχυρή πρόσδεση και ορισμένες πρωτεΐνες προσδένονται μόνο στον χαλκό. Πρέπει να φορτώνεται διάλυμα δείγματος ίσο με το 60% του όγκου της πακεταρισμένης στήλης, για να αποφευχθεί η διαρροή των μεταλλικών ιόντων κατά τη διάρκεια της τοποθέτησης του δείγματος.
- **Zn<sup>2+</sup>**: δίνει λιγότερο ισχυρή πρόσδεση και αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλεκτική έκλυση συστατικών του πρωτεϊνικού μίγματος. Πρέπει να φορτώνεται διάλυμα ίσο με το 85% του όγκου της στήλης προκειμένου αυτή να «φορτιστεί» ικανοποιητικά.

- **Ni<sup>2+</sup>**: χρησιμοποιείται συνήθως για τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που έχουν poly-His ουρά. Διάλυμα ιόντων ίσο με το μισό του όγκου της στήλης είναι συνήθως επαρκές για να «φορτιστεί» η στήλη.

Για να «φορτιστεί» η στήλη με τα κατάλληλα επιλεγμένα ιόντα, τοποθετείται σε αυτή το αντίστοιχο διάλυμα άλατος, π.χ. ZnCl<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>. Τα άλατα με χλώριο μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη «φόρτιση» και με άλλα μέταλλα.

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για να προσδιοριστεί αν η στήλη είναι «φορτισμένη». Εάν κατά τη διάρκεια της «φόρτισης» χρησιμοποιείται διάλυμα μεταλλικού άλατος σε απεσταγμένο νερό, το εκλούόμενο διάλυμα έχει αρχικά χαμηλό pH και αποκτά ουδέτερο pH όσο το υπόστρωμα κορέννεται σε μεταλλικά ιόντα. Η διαδικασία της «φόρτισης» με Cu<sup>2+</sup> είναι εμφανής καθώς η στήλη χρωματίζεται μπλε. Όταν η στήλη «φορτίζεται» με Zn<sup>2+</sup> μπορεί να χρησιμοποιηθεί NaCO<sub>3</sub> για να ανιχνευθεί η παρουσία Zn στο διάλυμα έκλουσης.

### Επιλογή διαλύματος πρόσδεσης

Για τη διαδικασία της πρόσδεσης, χρησιμοποιούνται διαλύματα με ουδέτερο ή ελαφρά αλκαλικό pH. Κατάλληλα ρυθμιστικά είναι: Tris - acetate 0,05 M, Tris - HCl 0,02 - 0,05 M και Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,02 - 0,05 M. Το Tris - HCl τείνει να περιορίζει την πρόσδεση και πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο όταν υπάρχει μεγάλη συγγένεια μεταξύ μετάλλου - πρωτεΐνης.

### Επιλογή διαλύματος έκλουσης

Διαφορική και διακριτή έκλυση των προσδεμένων πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση βαθμίδωσης συγκέντρωσης ενός παράγοντα, που ανταγωνίζεται είτε τον προσδέτη είτε το μόριο - στόχο. Αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (0 - 0,5 M), χλωριούχου αμμωνίου (0 - 0,15 M) ή ουσίες όπως είναι η ισταμίνη ή η γλυκίνη, με συγγένεια προς τα χηλικά μέταλλα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν.

Εφόσον το pH ρυθμίζει τον βαθμό ιονισμού των φορτισμένων ομάδων στα σημεία πρόσδεσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια κλιμακωτή μείωση του pH για τη μη ειδική έκλυση των συνδεδεμένων μορίων. Το εύρος pH που χρησιμοποιείται είναι 4 - 7, ενώ οι περισσότερες πρωτεΐνες εκλούνται σε pH 4,2 -6. Χρησιμοποιούνται επίσης αποδιατακτικοί παράγοντες στα διαλύματα έκλουσης, όπως 8 M ουρία και 6 M υδροχλωρική γουανιδίνη.

### 3.3.4.2 Πειραματική διαδικασία

- *Φόρτωση υποστρώματος*
  1. Πακετάρετε μια στήλη με 10 ml IDA - Sepharose 6B. Οι διαστάσεις της στήλης μπορούν να ποικίλουν ανάλογα με το πόσο ισχυρές είναι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει και του υποστρώματος.
  2. Εκπλένετε τη στήλη με 3 όγκους στήλης νερού.
  3. Φορτώστε τη στήλη με 3 όγκους 1 mg/ml CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O.
  4. Εκπλένετε τη στήλη με 5 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος (20 mM φωσφορικού νατρίου pH 7,5, 0,5 M NaCl).
- *Φόρτωση του δείγματος πρωτεΐνης*
  1. Προετοιμάστε το δείγμα της πρωτεΐνης εξισορροπώντας το με ρυθμιστικό διάλυμα (χρησιμοποιήστε διαπίδυση ή αραιώστε σε αναλογία όγκων 1:1 με ρυθμιστικό διάλυμα). Έπειτα πραγματοποιήστε φυγοκέντρωση ή διήθηση. Η χωρητικότητα του υποστρώματος θα καθορίσει πόση ποσότητα πρωτεΐνης μπορεί να φορτωθεί με ασφάλεια: τα δοκιμαστικά πειράματα είναι χρήσιμα για τον καθορισμό της χωρητικότητας του υποστρώματος. Μια λογική εκτίμηση της χωρητικότητας είναι 10 - 100 mg πρωτεΐνης ανά ml υποστρώματος.
  2. Φορτώστε το διάλυμα της πρωτεΐνης (1 - 10 mg/ml) στη στήλη IMAC.



3. Εκπλύνετε με το παραλαμβανόμενο ρυθμιστικό διάλυμα και επανεισάγετε στη στήλη, μέχρι η απορρόφηση στα 280 nm να επιστρέψει στη βασική γραμμή.
- *Έκλυση της πρωτεΐνης και αναγέννηση της στήλης*
1. Εκλούστε την επιθυμητή πρωτεΐνη εκπλένοντας τη στήλη με 5 όγκους στήλης ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης (100 mM οξικού νατρίου pH 5,0, 0,5 M NaCl).
  2. Οι πρωτεΐνες που είναι σθεναρά συνδεδεμένες μπορούν να εξαχθούν και να αναγεννηθεί η στήλη, με 50 mM EDTA σε ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος.

### Παρατηρήσεις

1. Διαφορετικές συγκεντρώσεις μεταλλικού ιόντος στη στήλη, μπορούν να επιτύχουν διαφορετικά αποτελέσματα καθαρισμού.
2. Όταν η έκλυση γίνεται με μικρότερο pH, βεβαιωθείτε ότι δεν έχετε απενεργοποιήσει την επιθυμητή πρωτεΐνη και δεν προκλήθηκε ισοηλεκτρική καθίζηση (Sulkowski, 1985).
3. Μια στρατηγική για την ποσοτικοποίηση του βαθμού έκλυσης της πρωτεΐνης είναι να συμπεριλαμβάνετε ίχνη ποσοτήτων σημασμένων μεταλλικών ιόντων κατά τη διάρκεια της «φόρτισης» και να απεικονίσετε τα εξαγόμενα κλάσματα για ραδιενέργεια.
4. Μια άλλη στρατηγική έκλυσης είναι η συναγωνιστική έκλυση με την αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου. Χαοτροπικά ιόντα (ουρία) ή απορρυπαντικά μπορούν επίσης να είναι χρήσιμα για την αναίρεση ισχυρών δεσμών μεταξύ πρωτεϊνών και υποστρώματος και την ανάκτηση των επιθυμητών μορίων.

### 3.3.5 Χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης

Η χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης (HIC) βασίζεται στη συγγένεια μιας υδρόφοβης ομάδας που βρίσκεται ακινητοποιημένη στο υπόστρωμα και υδρόφοβων περιοχών σε μια πρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης για παράδειγμα διαθέτουν σημαντικές υδρόφοβες περιοχές για την αγκυροβόληση (anchoring) της πρωτεΐνης στη μεμβράνη (Kennedy, 1990). Επιπλέον, οι διαλυτές πρωτεΐνες μπορούν να εκθέσουν υδρόφοβες περιοχές στην εξωτερική τους επιφάνεια ή μπορούν να περιέχουν μία υδρόφοβη θέση πρόσδεσης. Τέτοιες εκτεθειμένες υδρόφοβες περιοχές είναι ιδανικές για διαχωρισμό των πρωτεϊνών με HIC. Αν και η HIC εκμεταλλεύεται περισσότερο μη ειδικές συγγένειες και δεν παρέχει υψηλή αναλυτική ισχύ και δυνατότητες εξειδικευμένων αναλύσεων, εντούτοις είναι πολύ χρήσιμη, αφού οι αρχές λειτουργίας της είναι σημαντικά διαφορετικές από εκείνες άλλων τεχνικών χρωματογραφίας.

Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις γίνονται πιο ισχυρές καθώς η συγκέντρωση άλατος του διαλύματος αυξάνεται. Τα περισσότερα πρωτόκολλα HIC προτείνουν φόρτωση της πρωτεΐνης σε υψηλή συγκέντρωση άλατος και έκλυση με την ελάττωση της συγκέντρωσης του άλατος. Έτσι, η HIC μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί ως επόμενο στάδιο καθαρισμού, έπειτα από καθίζηση θειικού αμμωνίου ή χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Αυτές οι ήπιες συνθήκες έκλυσης μαζί με την υψηλή χωρητικότητα της στήλης σε πρωτεΐνη (10 - 100 mg/ml), καθιστούν τη HIC πολύτιμο ενδιάμεσο βήμα σε πολλούς καθαρισμούς πρωτεΐνης και εναλλακτική μέθοδο για την αντικατάσταση του ρυθμιστικού διαλύματος.

## Βιβλιογραφία

- Alberts B. and Herrick G. (1971). *Methods Enzymol.* 21, 198 – 217.
- Harlow E. and Lane D. (1988). *Antibodies: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.
- Kadonaga JT. (1991). Purification of sequence-specific binding proteins by DNA affinity chromatography. *Methods Enzymol.* 208, 10-23.

- Kennedy, R. M. (1990). Hydrophobic chromatography. *Methods in enzymology*, 182, 339-343.
- Kenney, R. R., Forsyth, R. J., & Jahansouz, H. (1998). Solid-phase extraction and liquid chromatographic quantitation of the antiarrhythmic drug L-768673 in a microemulsion formulation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 17(4), 679-687.
- Lotan, R., & Nicolson, G. L. (1979). Purification of cell membrane glycoproteins by lectin affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 559(4), 329-376.
- Pharmacia LKB Biotechnology. (1993). Hydrophobic Interactions Chromatography: *Principles and Methods*.
- Scopes, R. K. (1994). *Protein purification: principles and practice*. Springer-Verlag New York
- Sulkowski, E. (1985). Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, 3(1), 1-7.
- Sutton, C. (1989). Lectin affinity chromatography. In Harris E.L.V and Angal S., (Eds), *Protein Purification Protocols: A Practical Approach* (268-283). Oxford: Oxford University Press.