

Parametr	Operace	Typický purifikační faktor
Tepelná stabilita	Tepelná denaturace	2–20
Rozpustnost	Precipitace solemi	2–20
	Precipitace organickými rozpouštědly	2–15
	Precipitace polymerními látkami	2–15
	Izoelektrická precipitace	5–20
	Partice mezi dvoufázové vodné systémy	5–20
Velikost a tvar molekuly	Gelová permeace	2–20
	Ultrafiltrace	2–5
	Gelová elektroforéza	2–10
Náboj	Volná elektroforéza	2–5
	Zónová elektroforéza	2–5
	Izotachoforéza	2–10
	Ionexová chromatografie	2–40
Izoelektrický bod	Izoelektrické zaostřování	2–10
Hydrofobicita	Chromatografie založená na hydrofobních interakcích	2–30
	Chromatografie na obrácených fázích	2–200
(Biologická) funkce	Biorekogniční postupy (afinitní chromatografie)	50–10 000
Antigenicita	Imunoadsorpce (monoklonální protilátky)	20–10 000
Obsah cukerných zbytků	Lektinová afinitní chromatografie	2–10
Obsah volných sulfhydrylových skupin	Kovalentní chromatografie	2–10
Dostupné histidinové zbytky	Chromatografie kovových chelátů	2–10
Dostupný kovový iont (metaloproteiny)	Chelátová afinitní chromatografie	2–10
Jiné sorpční vlastnosti	Chromatografie na hydroxyapatitu. Afinitní chromatografie s využitím barviv	2–40

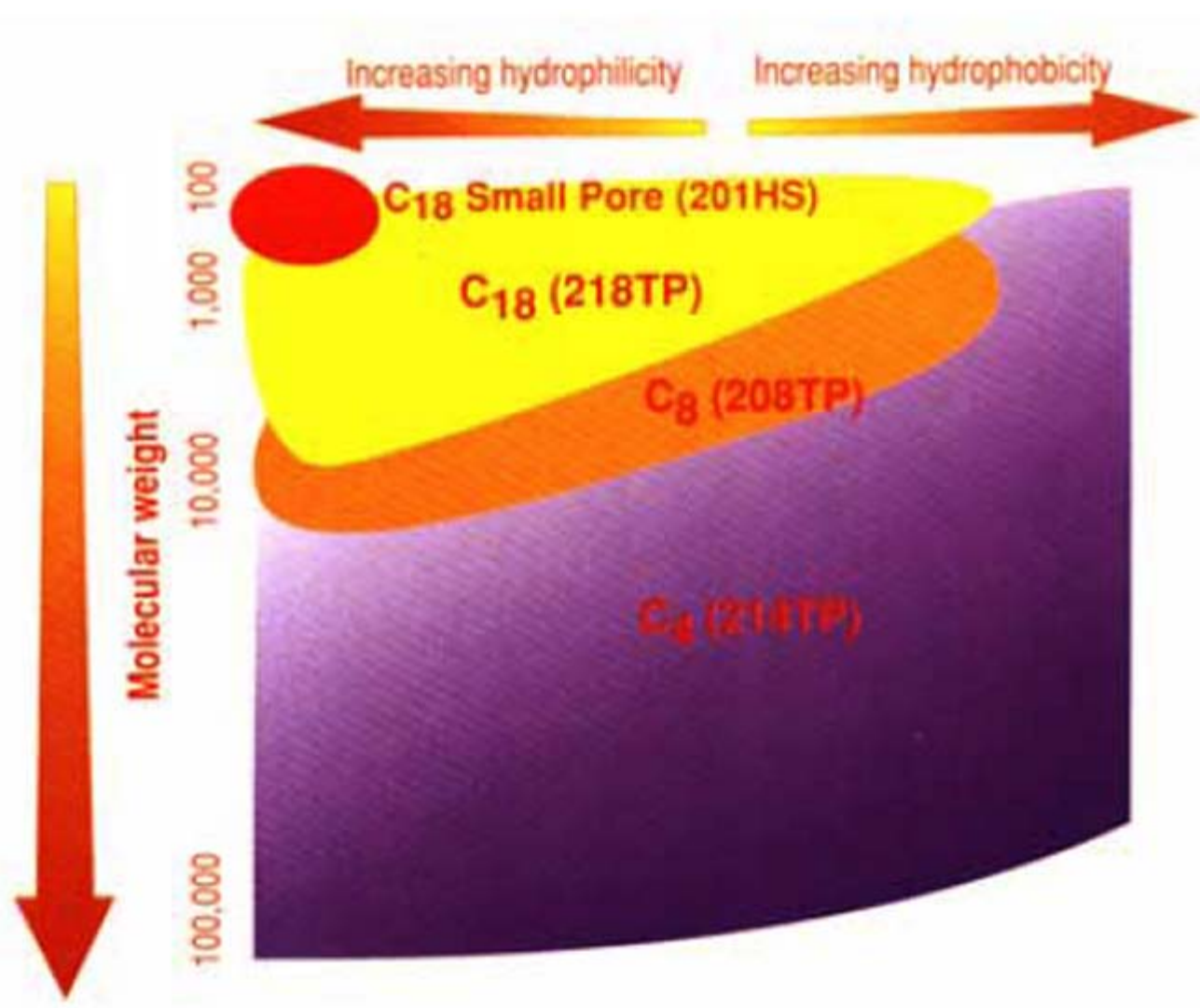
Separační parametry využívané v purifikaci, preseparaci a analýze bílkovin

Separační metody

- Chromatografické metody
 - 1-rozměrné
 - Reversed-phase (obrácená fáze)
 - Ion-exchange (iontově-výměnné, např. SCX)
 - Gel chromatography (gel-permeační chromatografie)
 - Hydrophilic (hydrofilní)
 - Affinity (afinitní)
 - More-dimensional (vícerozměrné)
 - 2D – nejběžnější SCX+RP
 - Chromatofokusace – Beckman-Coulter
- Elektromigrační metody
 - SDS PAGE
 - 2DE
 - IEF
 - SDS PAGE
 - Nativní elektroforéza
 - Kapilární elektroforéza
 - Elektroforéza ve volném toku

Doporučené HPLC kolony pro separaci polypeptidů

<u>Polypeptide Application</u>	<u>Recommended RP Column</u>
<ul style="list-style-type: none">✓ peptides < 5,000 MW✓ enzymatic digest fragments✓ natural and synthetic peptides	C18 (218TP)
<ul style="list-style-type: none">✓ polypeptides > 5,000 MW✓ hydrophobic polypeptides	C4 (214TP)
<ul style="list-style-type: none">✓ peptides < 20,000 MW✓ enzymatic digest fragments✓ natural and synthetic peptides	C8 (208TP)
<ul style="list-style-type: none">✓ large, hydrophobic proteins✓ peptides with aromatic side-chains	Phenyl (219TP)
<ul style="list-style-type: none">✓ small peptides (2-10 aa)✓ basic or very hydrophilic peptides	Small pore C18 (201HS)

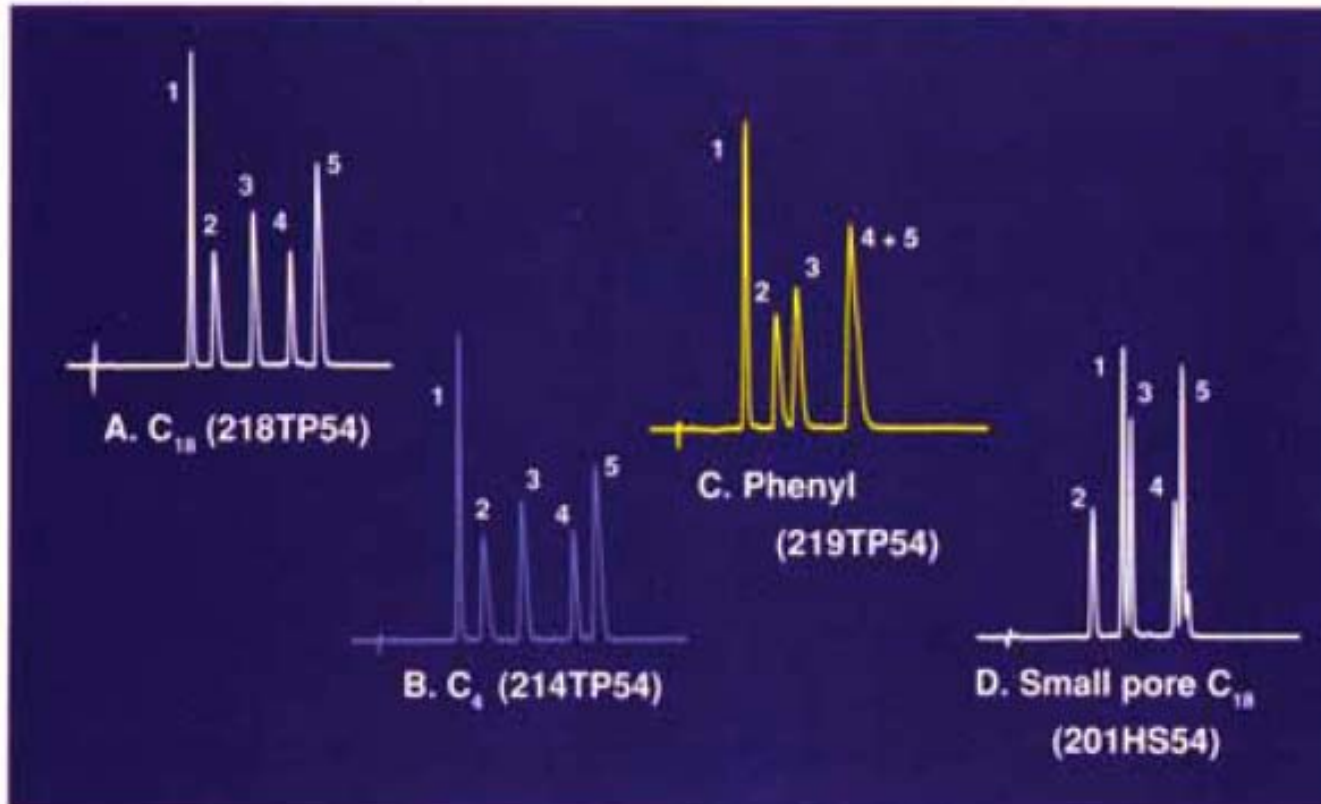


Conditions:

Columns: Vydac 218TP54 (C18); 214TP54 (C4); 219TP54 (phenyl); 201HS54 (Small pore C18);

Eluent: 15 - 30 % ACN in 0.1% aqueous TFA over 30 minutes at 1.0 ml/min.

Sample: 1. oxytocin, 2. bradykinin, 3. angiotensin II, 4. neurotensin, 5. angiotensin I.



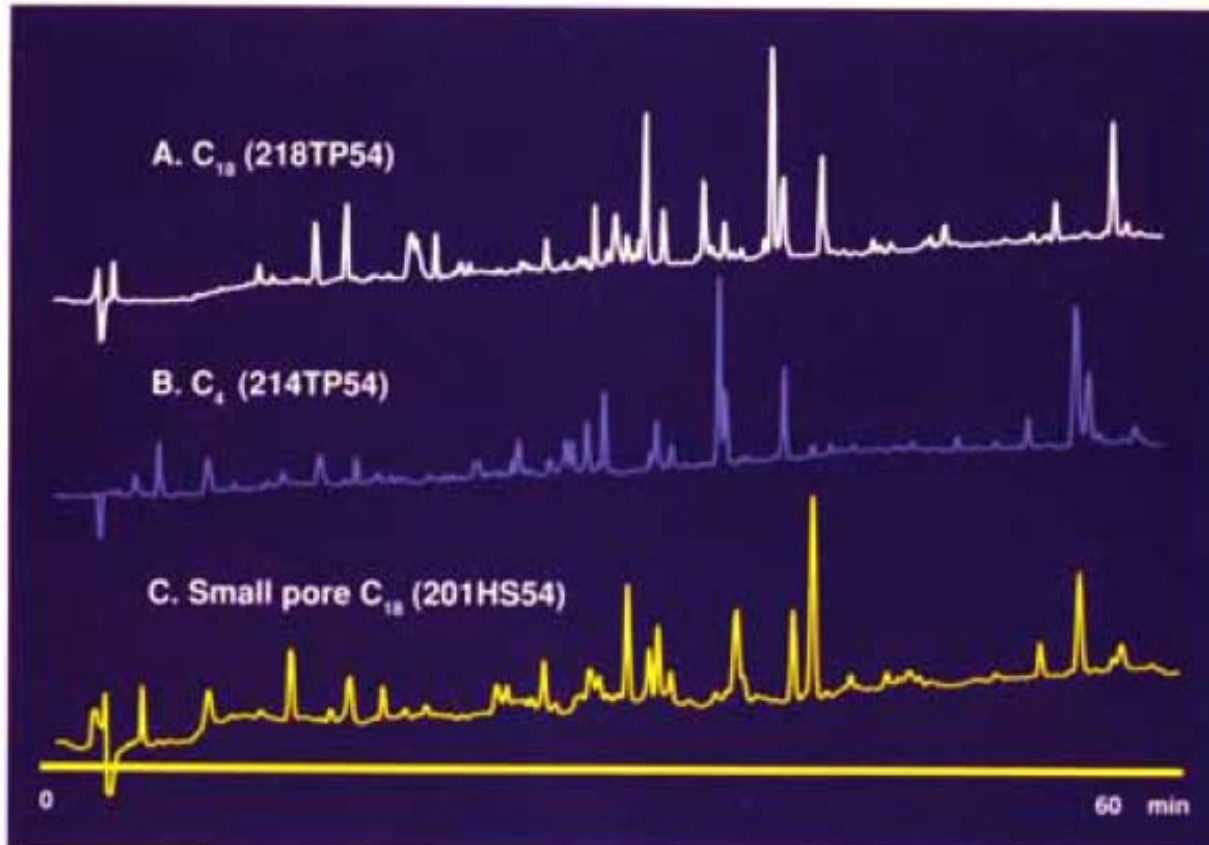
Separation of a tryptic digest on different reversed-phase columns

Conditions:

Columns: Vydac 218TP54 (C18); 214TP54 (C4); 201HS54 (Small pore C18);

Eluent: 0 - 30 % ACN in 0.1% aqueous TFA over 60 minutes at 1.0 ml/min.

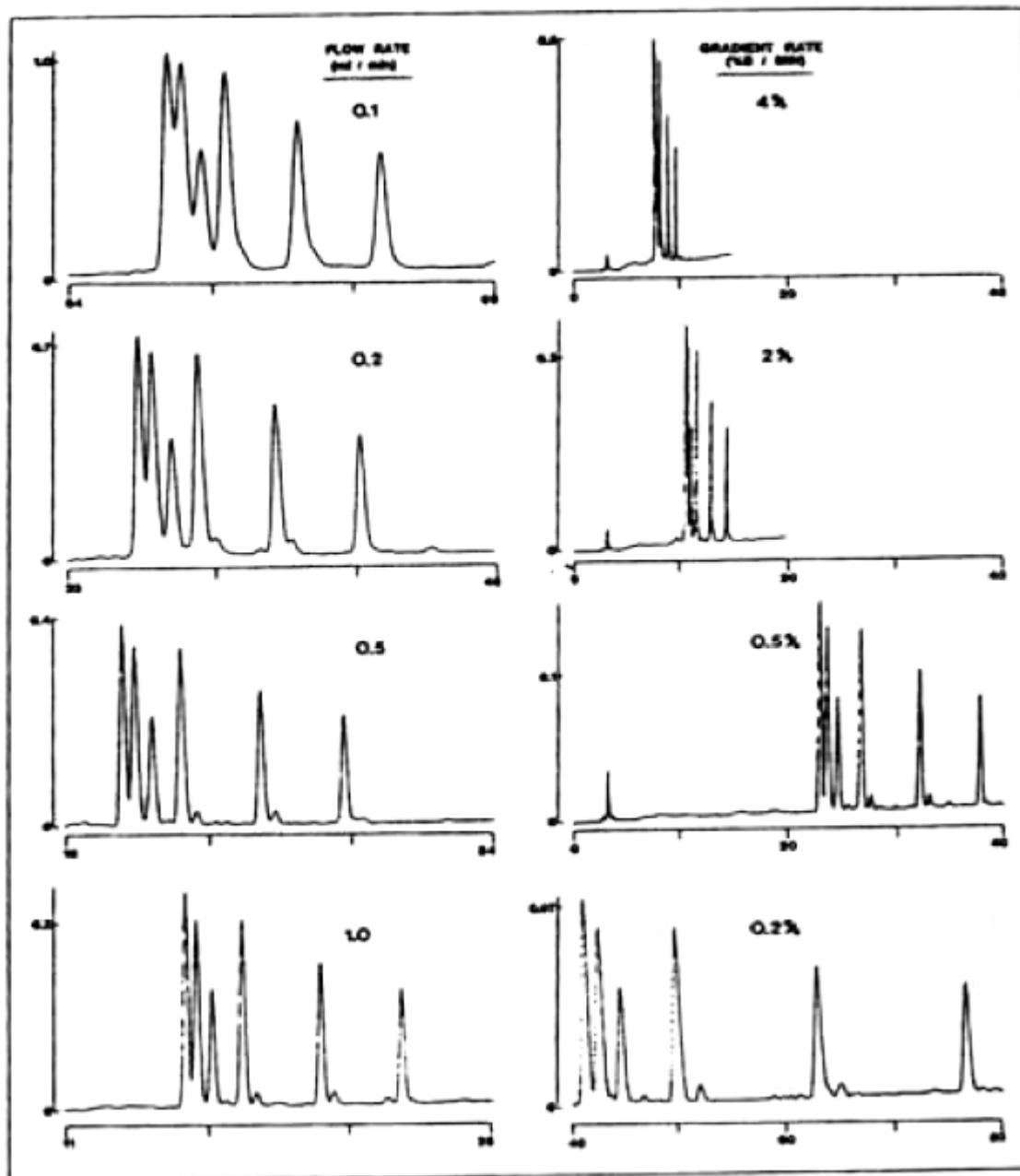
Sample: tryptic digest of β -lactoglobulin A



1%B / MIN

1 ML / MIN

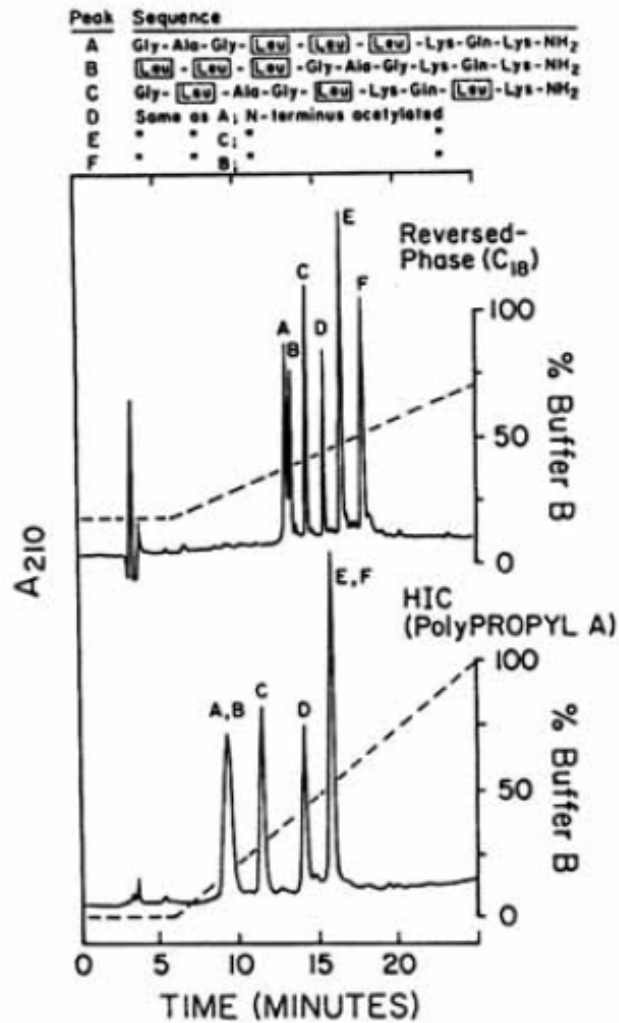
ABSORBANCE 210 nm (AU)



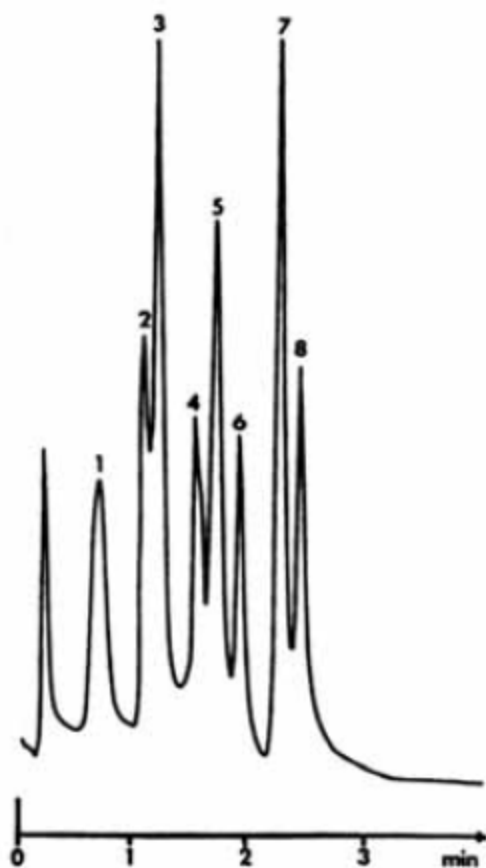
Vliv průtoku a změny gradientu na dělení peptidů pomocí RP-HPLC

Vlevo: vliv průtokové rychlosti (0,1; 0,2; 0,5 a 1 ml/min) při konstantní změně gradientu (1% B/min)

Vpravo: vliv změny gradientu (4; 2; 0,5% B/min) při konstantním průtoku (1 ml/min)

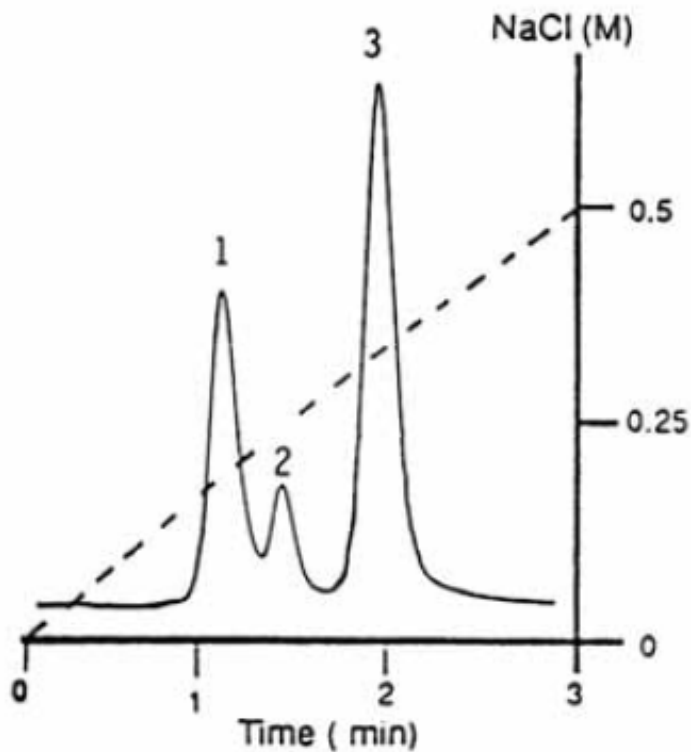


Comparison of separation of peptides by reversed-phase (RPC) and hydrophobic-interaction chromatography (HIC). RPC: eluent A, 0.1% aqueous trichloroacetic acid (TFA); eluent B, 0.1% TFA in 50% acetonitrile; HIC: eluent A, 2 M ammonium sulfate with 25 mM potassium phosphate (pH 6.5); eluent B, 25 mM potassium phosphate (pH 6.5).



Dělení proteinové směsi na amidové HIC koloně.

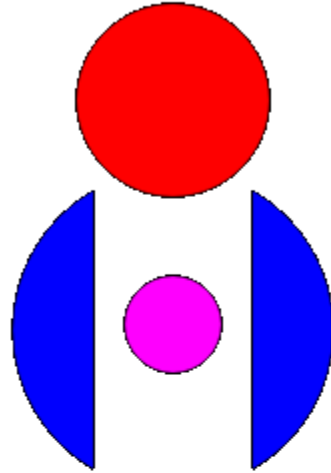
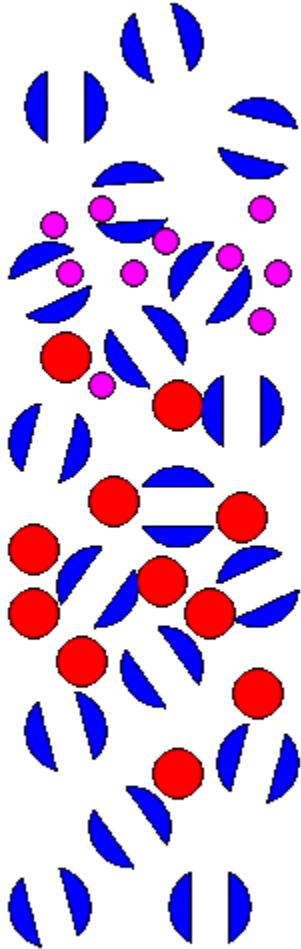
Separation of protein mixture using an amide bonded HIC column with non-porous silica support. Detection is by UV absorbance. Gradient: 2.5 – 0 M ammonium phosphate, 0.1 M phosphate, in 2.5 min, pH 7.0. Peaks: (1) cytochrome c, (2) myoglobin, (3) ribonuclease, (4) lysozyme, (5) ovalbumin, (6) lactate dehydrogenase, (7) catalase (8) ferritin.



Dělení proteinů na silném katexu.

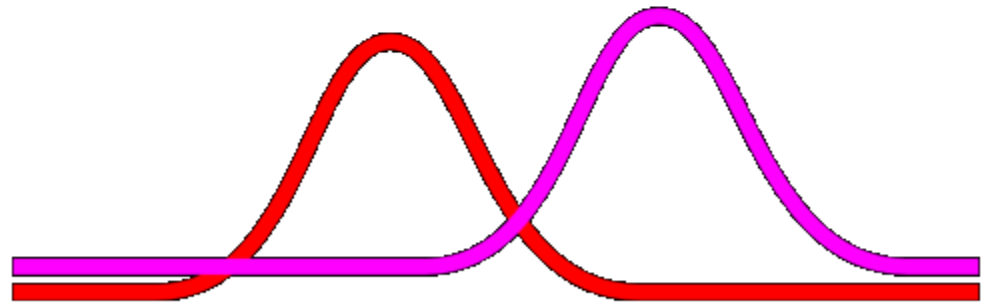
Separation of proteins using a strong cation exchange perfusion phase. Peaks: (1) chymotrypsin, (2) cytochrome c and (3) lysozyme. Salt gradient indicated on y-axis.

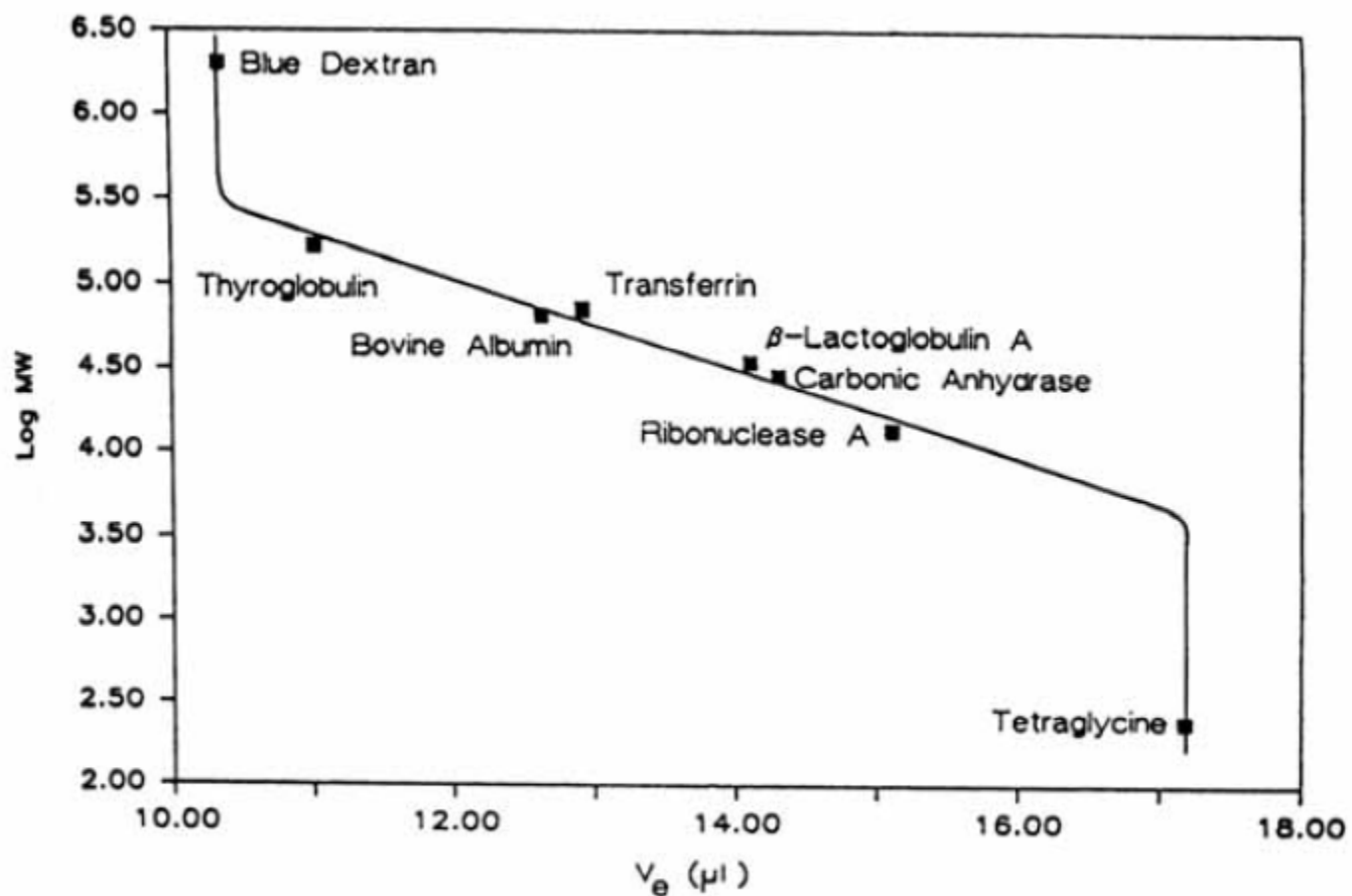
Separate SEC – size exclusion chromatography



Large particles cannot enter gel and are excluded. They have less volume to traverse and elute sooner.

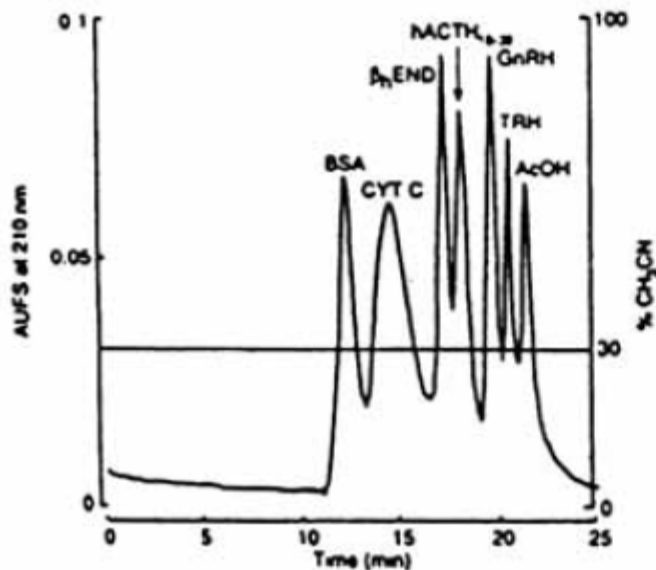
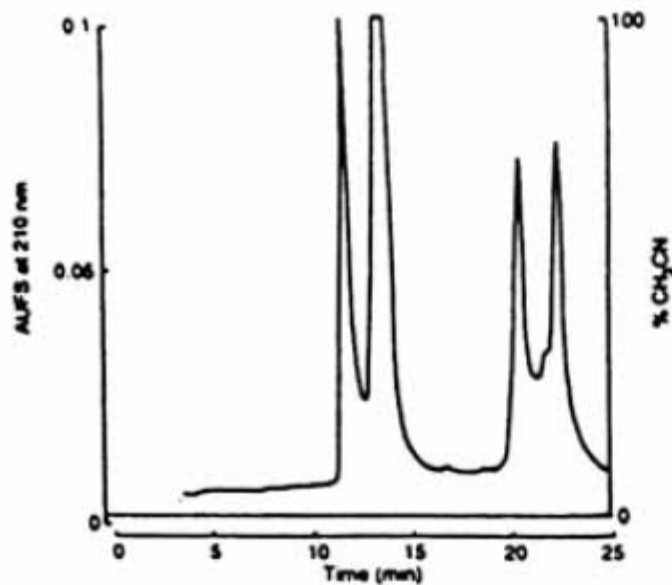
Small particles can enter gel and have more volume to traverse. They elute later.





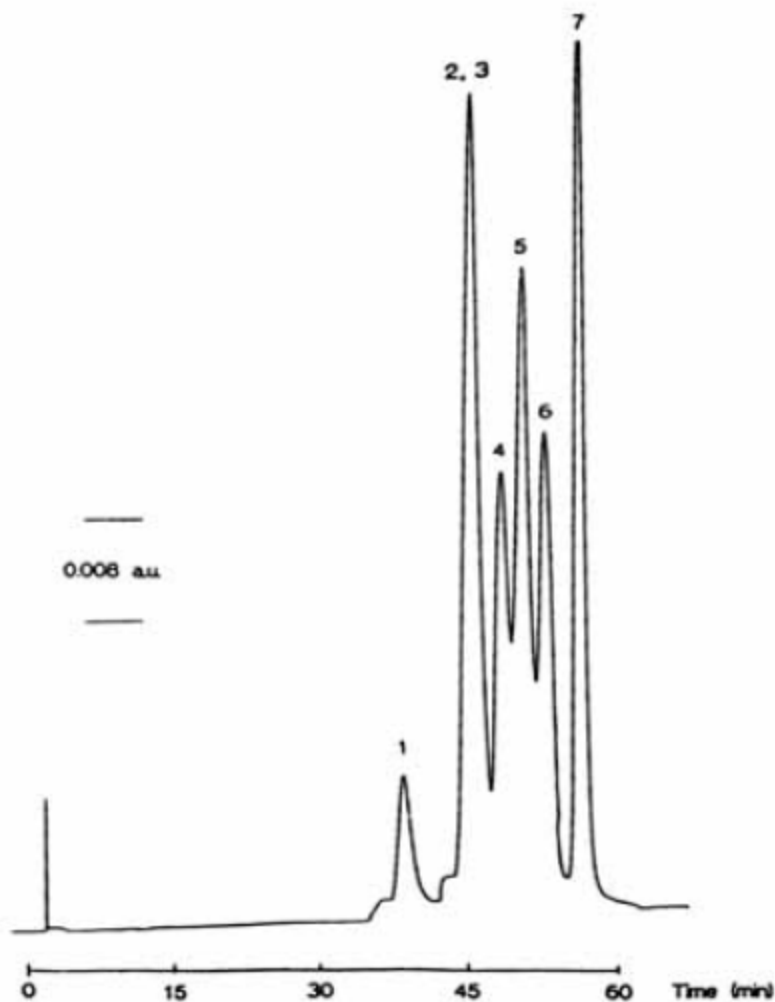
Vztah mezi molekulovou hmotností a elučním objemem pomocí SEC.

Relationship between protein molecular weight and elution volume using a SEC microcolumn (250 μm i.d.) packed with GPC 300.



BSA	Bovine serum albumin
CYT C	Cytochrome c
β_h END	β -Endorphin
hACTH	Human adrenocorticotropin hormone
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
TRH	Thyrotropin releasing hormone
AcOH	Acetic acid

Influence of acetonitrile concentration on the resolution of different peptides and proteins (size exclusion chromatography).



Dělení proteinů pomocí SEC.

Separation of proteins using a SEC microcolumn (250 μm i.d.) packed with GPC 300. Detection is UV absorbance at 215 nm. Peaks: (1) thyroglobulin, (2) transferrin, (3) β -lactoglobulin, (4) bovine albumin, (5) carbonic anhydrase and (6) ribonuclease A.

(Bio)afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je založena na selektivní nekovalentní interakci mezi analytem a určitými molekulami. Je velmi specifická ale není robustní. Je často využívána v biochemii pro purifikaci proteinů navázaných na tagy (značky). Tyto směsi proteinů jsou značeny látkami jako jsou His-tagy, biotin nebo antigeny, které se specificky vážou na stacionární fázi. Po purifikaci jsou většinou tyto tagy odstraněny a získáme čistý protein.

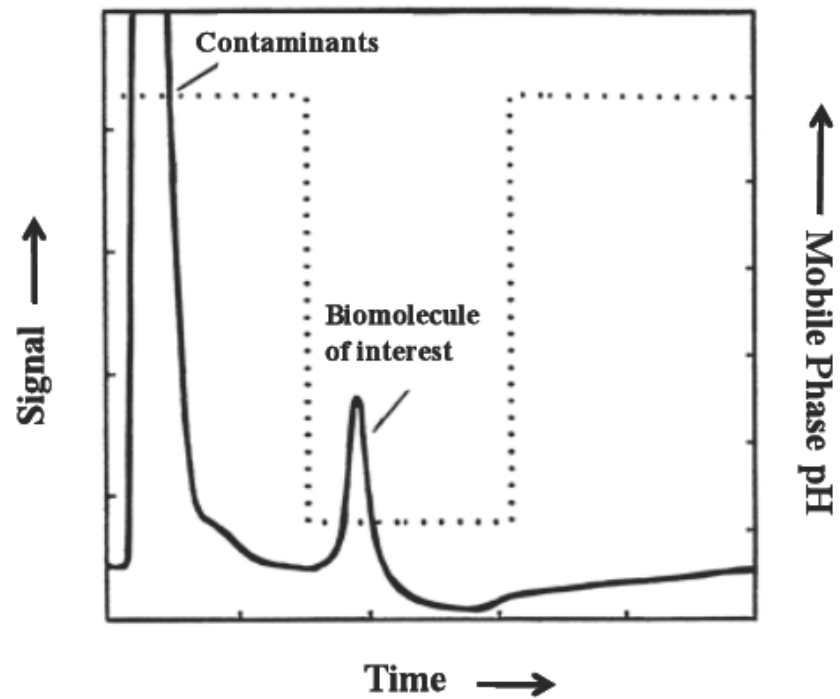
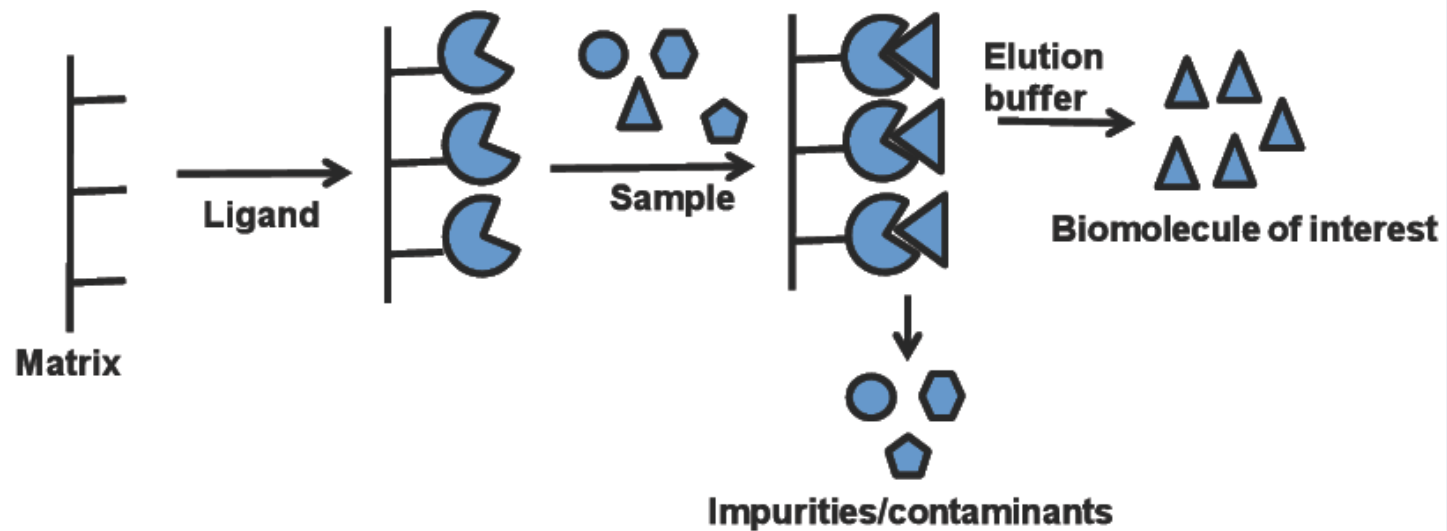
Tato metoda je založena na unikátních vlastnostech biologicky aktivních látek tvořit specifické, robustní a reverzibilní komplexy s látkami obsahujícími komplementární místa.

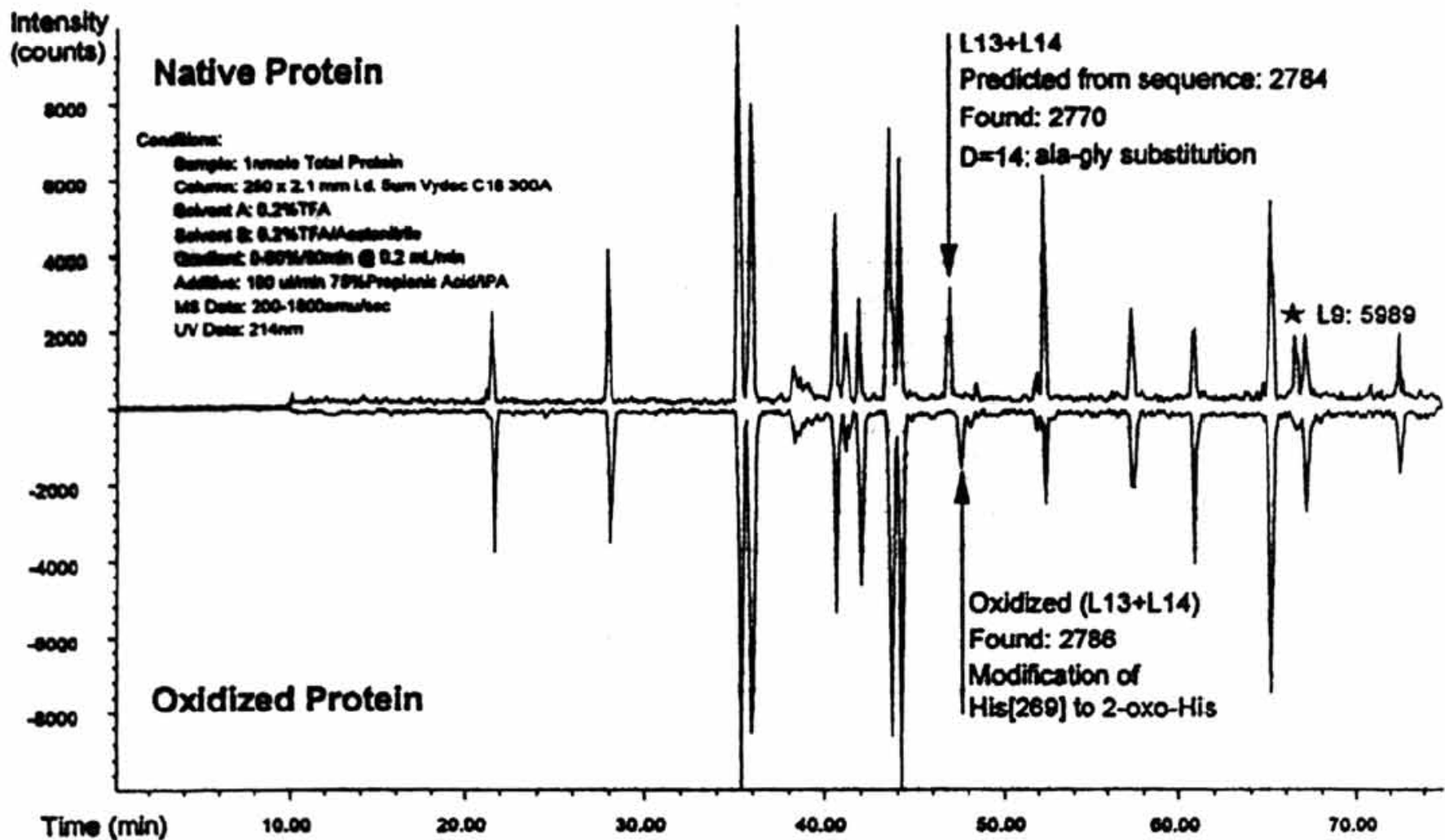
Některé specifické interakce: protilátka x antigen; enzym x substrát)

Kolony musí být často připraveny individuálně. Afinitní kolony jsou tradičně používány jako preparativní krok k odstranění nežádoucích biomolekul.

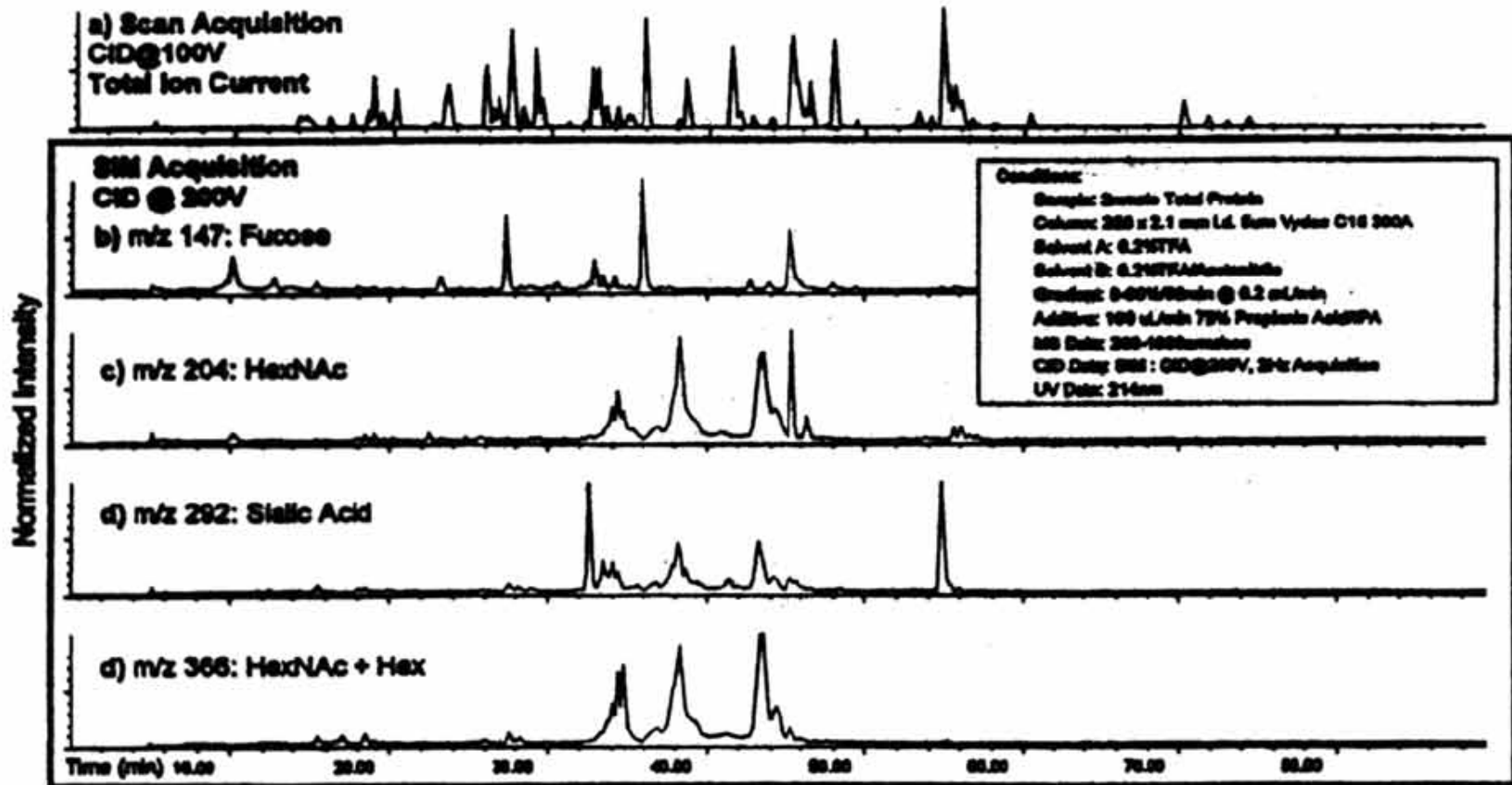
Některé biospecifické komplexy:

- Enzymy, jejich inhibitory, substráty, ko-faktory
- Protilátky a jejich antigeny nebo hapteny
- Lektiny s odpovídajícími sacharidy, polysacharidy a glykoproteiny
- Komplexy nukleotidů a nukleových kyselin
- Hormony a jejich receptory
- Buňky a viry s receptory nebo receptorovými proteiny



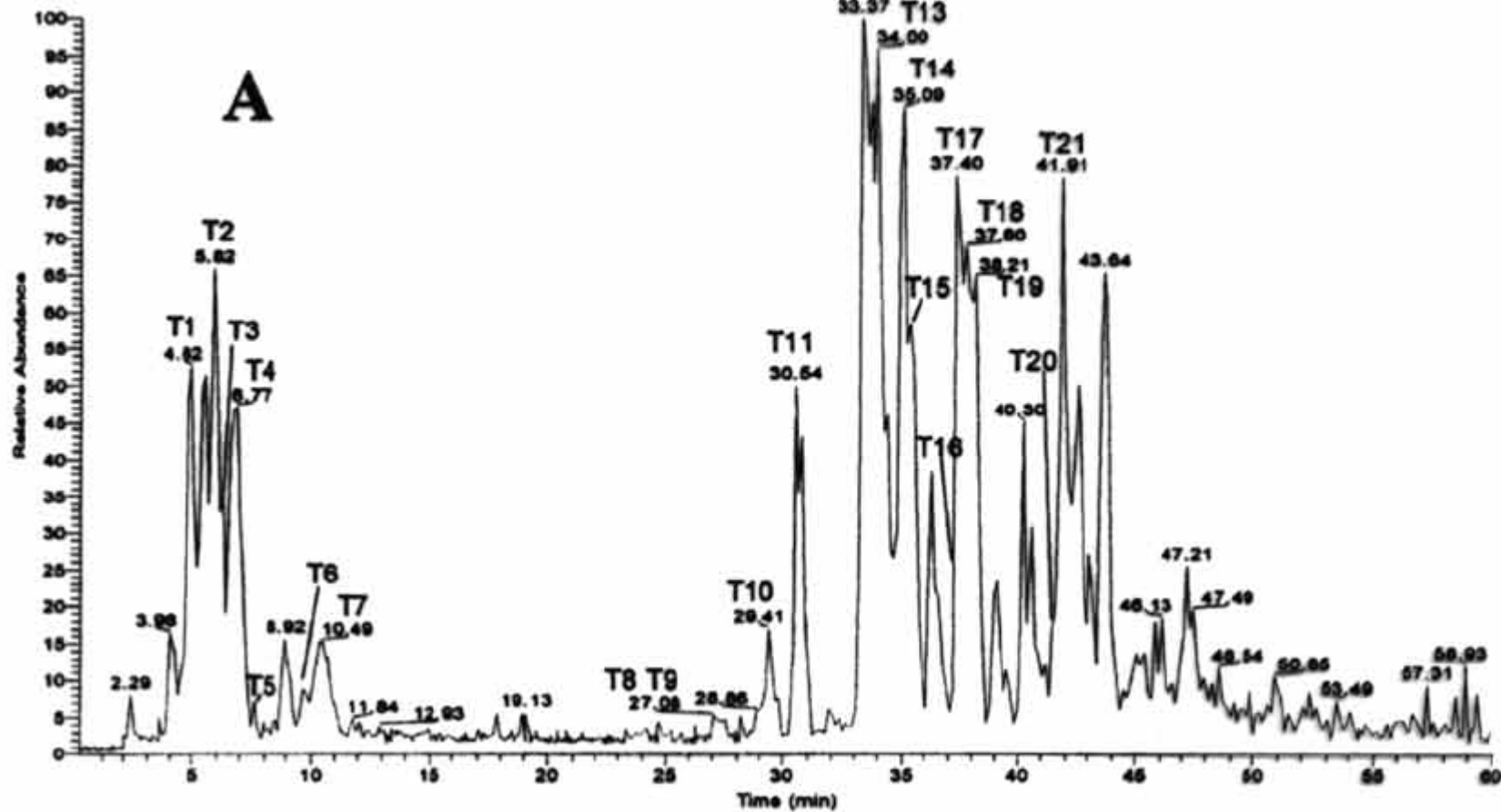


Identification of oxidative modifications in endoproteinase Lys C digests of glutamine synthetase.



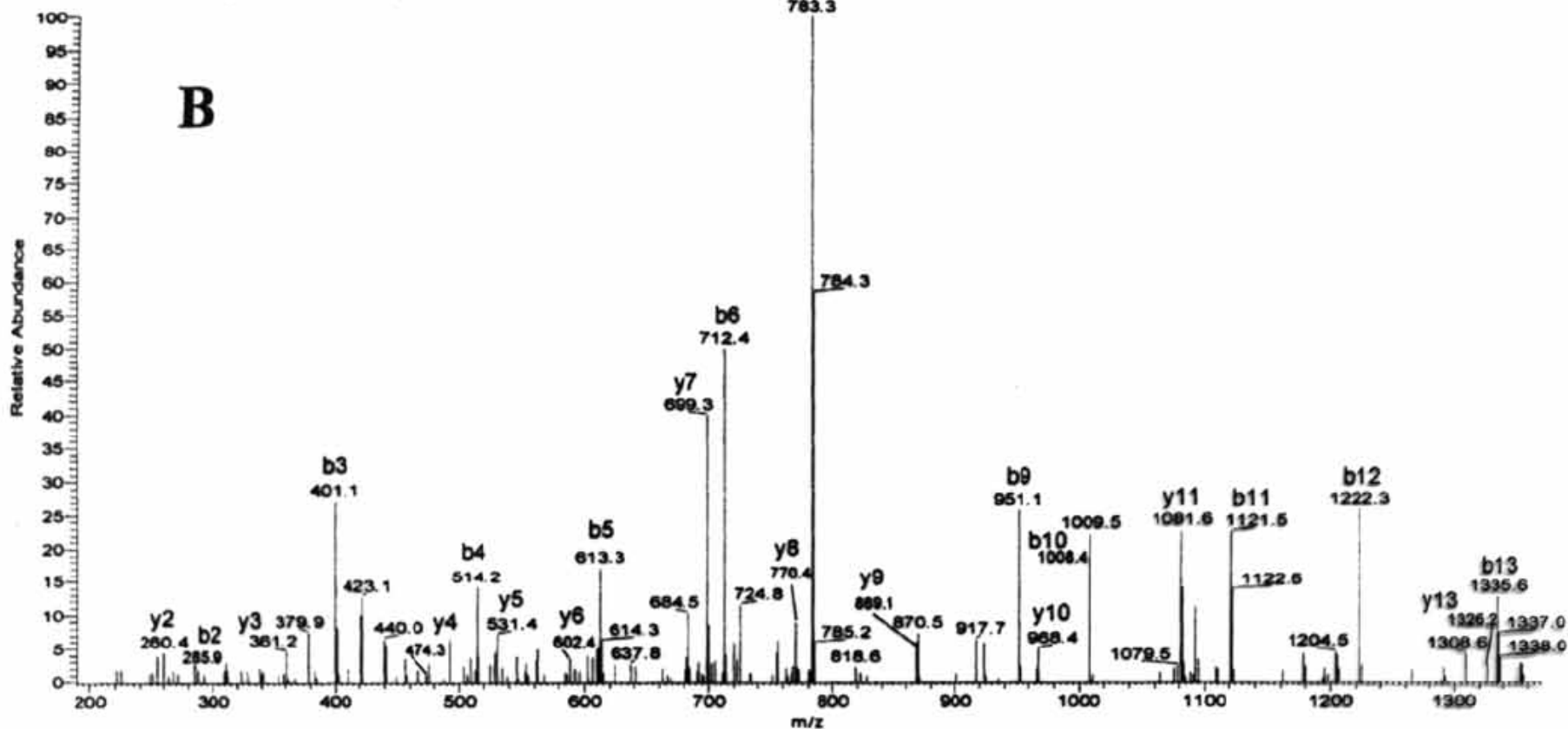
Detection of glycosylation in endoproteinase Arg C digest of single-chain plasminogen activation factor. (a) Scan acquisition with low CID energy (CapEx, 100 V). (b)–(d) SIM acquisition with high CID energy (CapEx, 200 V).

RT: 0.02 - 60.12



NL:
5.09E9
Base Peak F:
+ o Full ms [
400.00 -
2000.00]

S#: 796 RT: 33.46 AV: 1 NL: 1.46E6
 T: + c d Full ma2 741.60 [190.00 - 1495.00]



b	<u>157.1</u>	<u>286.1</u>	<u>401.2</u>	<u>514.3</u>	<u>613.3</u>	<u>712.4</u>	<u>783.4</u>	880.5	<u>951.5</u>	<u>1008.5</u>	<u>1121.6</u>	<u>1222.7</u>	<u>1335.8</u>	1481.8
	R	E	D	L	V	V	A	P	A	G	I	T	L	K
y	1481.8	<u>1325.7</u>	1196.7	<u>1081.7</u>	<u>968.6</u>	<u>869.5</u>	<u>770.5</u>	<u>699.4</u>	<u>602.4</u>	<u>531.3</u>	<u>474.3</u>	<u>361.2</u>	<u>260.2</u>	147.1

LC-MS analysis of tryptic digests from spot 591. (A) Base peak chromatogram showing the peptide peaks from which 21 peptides (T1–T21) were confidently matched to IMPDH-II. (B) MS/MS spectrum of the doubly charged precursor ion with m/z 741.60 (T12) at the retention time 33.46 min. A sequence is confirmed from the labeled b- and y-ions in the spectrum. Fragments observed in the spectrum are underlined and assigned.

Chromatographic methods

- Multidimensional liquid chromatography
 - Ion exchange + reversed phase
SCX-RPLC, WAX-RPLC
 - Gel permeation + reversed phase
SEC-RPLC
 - Affinity + reversed phase
AC-RPLC
 - Reversed phase + capillary electrophoresis
RPLC-CE