

OBSAH

I. Úvod	11
A. Struktura proteinů	11
B. Klasické čištění proteinů	13
C. Specifická modifikace klasických postupů	19
D. Afinitní chromatografie	20
Literatura	21
II. Základy afinitní chromatografie	23
A. Tuhý nosič	23
1. Obecné principy	23
2. Různé nerozpustné nosiče	24
a) Celulosa	25
b) Polystyrenové gely	26
c) Příčně zesítěné dextransy	26
d) Polyakrylamidové gely	26
e) Pórovité sklo	28
f) Agarosa	28
B. Omezení způsobená maticí	29
1. Vylučovací účinky matrice	30
2. Oddalující molekuly a sterické vlivy	34
C. Výběr ligandu	44
1. Povaha a mechanismus interakce ligandu s makromolekulou	45
2. Afinita ligandu k makromolekule	46
3. Způsob připojení	47
a) Chorismátmutasa	51
b) Penicilinas	52
4. Koncentrace ligandu	53
D. Další poznámky k přípravě afinitních adsorbentů	56
E. Faktory ovlivňující adsorpci proteinů	57
1. Povaha adsorpční izotermy	58
2. Průtok	61
3. Koncentrace proteinu	63
4. Vliv teploty	63
5. Vsádková adsorpce	65

F. Eluce specificky adsorbovaných makromolekul	65
1. Obecná teorie eluce	65
a) Frontální analýza	65
b) Vytěšňovací analýza	66
c) Eluce zónou vytěšňovacího činidla	68
d) Eluční analýza	68
2. Eluce specificky adsorbovaných makromolekul	70
a) Nespecifické metody eluce	70
b) Speciální metody eluce	73
c) Specifické metody eluce	75
3. Účinnost elučních postupů	83
G. Kapacita afinitního adsorbentu	85
H. Úspěchy afinitní chromatografie	88
I. Povaha nespecifických vlivů	88
J. Kritéria afinitní chromatografie	94
K. Příklady techniky afinitní chromatografie	95
1. Čištění neuraminidasy z <i>Vibrio cholerae</i>	96
2. Čištění stafylokokové nukleasy afinitní chromatografií na imobilizovaném inhibitoru	97
3. Příprava tří kolagenas obratlovců v čisté formě	97
4. Čištění rozpustné estradiol-17 β -dehydrogenasy z lidské placenty	99
5. Specifická eluce pyruvátkinasy ze sloupců CM-celulosity allosterickým efektem	100
Literatura	101
III. Skupinově specifické adsorbenty	105
A. Afinitní chromatografie na imobilizovaných koenzymech	107
1. Pyridinové koenzymy	109
2. Adeninové nukleotidy	123
3. Jiné nukleotidy	125
4. Flavinové nukleotidy	128
5. Pyridoxalové koenzymy	131
6. Folát a jeho analoga	135
7. Biotin	141
8. Lipová kyselina	142
9. Kobalaminy	143
10. Hemové koenzymy	146
B. Enzymy metabolismu nukleových kyselin	147
C. Thiolové enzymy	152
D. Hydrolasy (proteasy)	154
Literatura	165
IV. Některé aplikace a speciální techniky afinitní chromatografie	170
A. Čištění regulačních makromolekul a komplexních biologických struktur	170

1. Protilátky a antigeny	171
2. Vazebné a transportní proteiny	176
3. Receptorové proteiny	180
4. Buňky a viry	186
5. Afinitní změna hustoty	187
6. Konkanavalin A a glykoproteiny	189
7. Použití v molekulární biologii	193
B. Analytická použití	196
1. Oddělování chemicky modifikovaných enzymů	197
2. Čištění afinitně značených peptidů z aktivního místa proteinu	198
3. Čištění komplementárních a syntetických peptidů a proteinů	200
4. Výzkum mechanismů enzymových reakcí	201
5. Použití v biochemii nukleových kyselin	208
C. Speciální techniky	211
1. Hydrofobní afinitní chromatografie	211
2. Kovalentní afinitní chromatografie	214
Literatura	216
V. Chemie afinitní chromatografie	223
A. Nosičové matrice	224
1. Celulosa	224
2. Dextranové gely	224
3. Agarosa	225
4. Polyakrylamidové gely	227
5. Sklo	228
6. Jiné nosiče	229
B. Aktivace a zavádění funkčních skupin do matic	229
1. Polysacharidové matrice	229
a) Halogenkyany	229
b) Triaziny	236
c) Oxidace jodistanem	237
d) Epoxidy	238
e) Činidla se dvěma funkčními skupinami	238
f) Jiné metody	239
2. Polyakrylamid	240
3. Pórovité sklo	242
4. Jiné nosičové matrice	242
C. Oddalující články	243
D. Příprava adsorbentů o velké kapacitě	246
E. Způsoby připojení ligandů k oddalujícím článkům	247
1. Karbodiimidová kondenzace	247
2. Jiné metody syntézy peptidové vazby	250
3. Reakce sukcinanhydridu	250

4. Reakce N-substituovaného hydroxysukcinimidu	251
5. Obecná acylazidová metoda	253
6. Diazotační postupy	254
7. Redukční alkylace	256
8. Isothiokyanátové připojení	258
9. Činidla se dvěma funkčními skupinami	258
a) Deriváty maleinimidu	259
b) Alkylhalogenidy	259
c) Arylhalogenidy	262
d) Isokyanáty	263
e) Acylační činidla	263
f) Imidoestery	263
g) Dialdehydy	264
h) Vinylsulfony	264
10. Thiolační reakce	264
F. Funkční skupiny ligandu	266
G. Metody stanovení množství imobilizovaného ligandu	267
1. Diferenční analýza	267
2. Přímá spektroskopie	267
3. Rozpouštění gelů	273
4. Kyselá nebo enzymová hydrolýza	274
5. Elementární analýza	275
6. Neutralizační titrace	275
7. Radioaktivita	275
8. Speciální metody stanovení thiolových skupin	276
H. Laboratorní techniky	277
1. Promývání a uchování agarosy	277
2. Aktivace agarosy bromkyanem	277
3. Příprava ω -aminoalkylagarosy	280
4. Barevná zkouška s natrium-2,4,6-trinitrobenzensulfonátem	280
5. Připojení ligandu pomocí karbodiimidu rozpustného ve vodě	281
6. Příprava derivátů pro připojení ligandu pomocí azoskupiny	281
7. Chromatografie	282
Literatura	282
Rejstřík	287