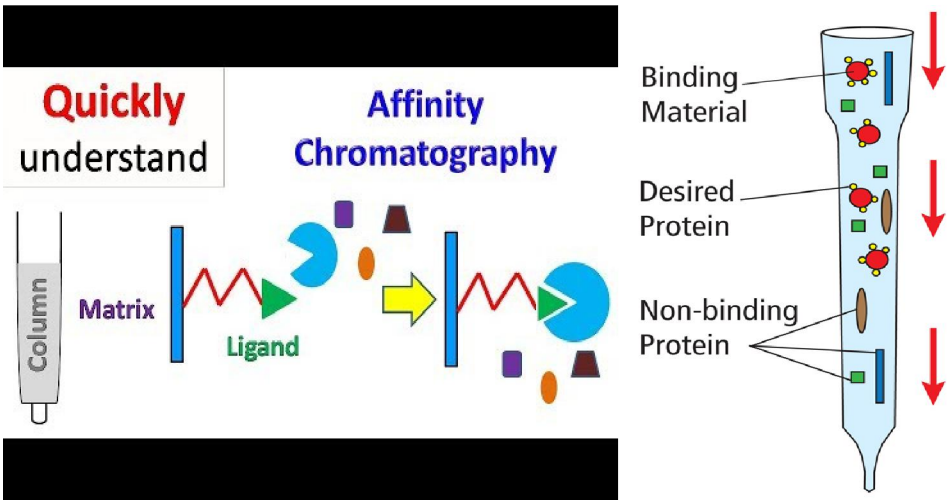
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيوكيمياء
تخصص البيوكيمياء التطبيقية ماستر1

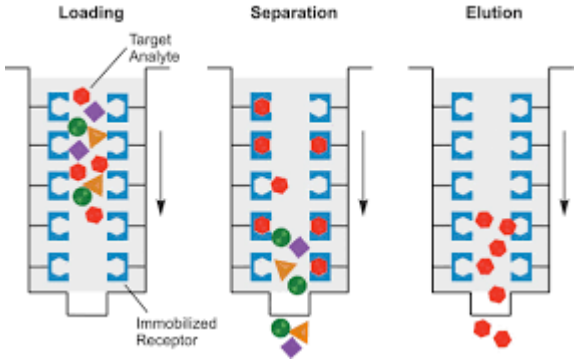
مقياس تقنيات الفصل والتنقية والتخزين

كروماتوغرافيا الشراهة

كروماتوغرافيا الشراهة هي طريقة لفصل الخليط الكيميائي الحيوي على أساس تفاعل محدد للغاية بين المستضد والجسم المضاد ، الإنزيم ومادة تفاله، المستقبلات والربيطة، أو البروتين والحمض النووي.

هو نوع من تقنيات المختبرات الكروماتوغرافية تستخدم لتنقية الجزيئات البيولوجية داخل الخليط من خلال استغلال الخصائص الجزيئية ، على سبيل المثال يمكن استخلاص البروتين بمحلول ربيطة. تتفاعل الجزيئات البيولوجية الكبيرة ، مثل الإنزيمات والبروتينات الأخرى ، مع الجزيئات الأخرى ذات النوعية العالية من خلال عدة أنواع مختلفة من الروابط والتفاعل. وتشمل هذه التفاعلات الترابط الهيدروجيني ، والتفاعل الأيوني ، وجسور ثاني كبريتيد ، والتفاعل مع الماء ، وأكثر من ذلك. يحدث الانتقائية العالية للكروماتوغراف المتقارب بالسماح للجزيء المطلوب بالتفاعل مع الطور الثابت والالتزام داخل العمود من أجل فصله عن المادة غير المرغوب فيها والتي لن تتفاعل تنزل أولاً. يتم التخلص من الجزيئات ير المرغوب فيها أولاً باستخدام محلول منظم مؤقت بينما يتم تبقى البروتينات المطلوبة رتبطتا بالدعامة الى حين إزاحتها (ذو تركيز الملح العالي). تخلق هذه العملية تفاعلًا تنافسيًا بين البروتين المطلوب والجزيئات المثبتة على العامة، والتي تسمح في النهاية بتحرير البروتينات عالية النقاء .





الاستخدامات

يمكن استخدام كروماتوغراف الشراهة لتنقية وتركيز مادة ما من خليط في محلول منظم ، وتقليل كمية المواد غير المرغوب فيها في الخليط ، وتحديد المركبات البيولوجية المرتبطة بمادة معينة ، وتنقية وتركيز الإنزيم. يمكن تثبيت الجزيء محل الاهتمام من خلال الروابط التساهمية. يحدث هذا من خلال دعامة غير قابلة للذوبان كالوسط الكروماتوغرافي مثل السليلوز أو عديد الأكريلاميد. عندما يكون الوسط مرتبطًا بالبروتين محل الاهتمام يصبح ثابتًا.

اختبار كروماتوغرافيا مناعي

يعد الكروماتوغرافيا الشراهة أساسًا لشرائط اختبار كروماتوغرافيا المناعة (ICT) ، والتي توفر وسيلة سريعة لتشخيص المرض عند المرضى.

المبـدأ

باختصار ،تستغل كروماتوغرافيا الشراهة الاختلافات في قوة التفاعلات بين الجزيئات الحيوية المختلفة داخل الطور المتحرك والمرحلة الثابتة. يتم تحميل المرحلة الثابتة أولاً في عمود يحتوي على طور متحرك يحتوي على مجموعة متنوعة من الجزيئات الحيوية. ثم ، يُسمح للمرحلتين بالوقت للربط. ثم يتم سكب محلول الغسيل (محلول منظم) خلال العمود الذي يحتوي على المرحلتين المرتبطتين. يزيل تامحلول المنظم المؤقت للغسيل الجزيئات الحيوية غير المستهدفة عن طريق تعطيل تفاعلاتها الضعيفة مع المرحلة الثابتة. الجزيئات الحيوية المستهدفة لها شراهة أعلى بكثير للمرحلة الثابتة ، وتظل مرتبطة بالمرحلة الثابتة ، ولا يتم غسلها بواسطة محلول الغسيل. ثم يتم صب ربيطة شفط خلال العمود الذي يحتوي على الجزيئات الحيوية المستهدفة المتبقية. تعمل الربيطة على تعطيل التفاعلات بين الجزيئات الحيوية المستهدفة المرتبطة مع ثابتة إلى حد أكبر بكثير من محلول الغسيل ، مما يؤدي الى إزالة الجزيئات الحيوية المستهدفة بشكل فعال. يحتوي هذا المحلول المنقى على محلول شفط والجزيئات الحيوية المستهدفة ، ويسمى محلول الخام.

عادة ما تكون نقطة البداية عبارة عن مجموعة جزيئية غير متجانسة من الجزيئات في مستخلص الخلية بالكامل ، مثل محلول الخلية أو مصل الدم. سيكون للجزيء المعني خاصية معروفة ومحددة ، ويمكن استغلال هذه الخاصية في عملية تنقية الشراهة. يمكن اعتبار العملية نفسها بمثابة الحجز، حيث يصبح الجزيء المستهدف محصورًا ومثبتا في الطور الصلب . لن تصبح الجزيئات الأخرى في الطور المتحرك مثبتة لأنها لا تمتلك هذه الخاصية. يمكن بعد ذلك إزالة الطور الثابت من الخليط وغسله وإخراج الجزيء المستهدف منه في عملية تعرف الميز. بعد التخلص من الجزيئات غير المرغوب فيها بالغسل (الجزيئات غير المتفاعلة) يتم ازاحة الجزيئات المستهدفة باستعمال مواد محددة. ناتج هذه العملية هي مواد جد نقية.

عادة ما تكون المرحلة الثابتة عبارة عن دعامة هلامية ، وغالبًا ما تكون من أغاروز. جزيء سكر خطي مشتق من الطحالب. لمنع التداخل أو التداخل المجسم أثناء عملية ربط الجزيء المستهدف إلى الربيطة، يتم إرفاق مثبط يحتوي على سلسلة هيدروكربونية أولاً بحبة الأغاروز (دعم صلب). يُعرف هذا المانع بسلسلة هيدروكربونية باسم الفاصل بين حبة الأغاروز والجزيء المستهدف.

جدول: يبين بعض المواد المستعملة في التفاعل البيولوجي النموذجي المستخدم في كروماتوغرافيا الشراهة.

Sr. No	Types of Ligand	Target Molecule
1	Enzymes	Substrate analogue
2	Antibody	Antigen
3	Lectin	Polysaccharide
4	Nucleic acid	Complementary base sequence
5	Hormone	Receptor
6	Avidin	Biotin
7	Calmodulin	Calmodulin binding molecule
8	Poly-A	RNA contating poly (U) sequence
9	Glutathione	GST fusion protein
10	Proteins A and G	Immunoglobulins
11	Metal ions	Poly fusion protein

يمكن تحقيق الارتباط بالمرحلة الصلبة عن طريق كروماتوغرافيا العمود حيث يتم تعبئة الوسط الصلب في العمود ، ويسمح للخليط الأولي عبر العمود بالاستقرار ، والمحلول المنظم المستعل للغسل يمر عبر العمود بينمى محلول الازاحة فيستعمل لاحقا على العمود ويتم جمعه . تتم هذه الخطوات عادة عند الضغط المحيط.

يمكن تحقيق الارتباط باستخدام معالجة مجمعة ، على سبيل المثال ، عن طريق إضافة الخليط الأولي إلى المرحلة الصلبة في وعاء ، والخلط ، وفصل المرحلة الصلبة ، وإزالة المرحلة السائلة ، والغسيل ، وإعادة الطرد المركزي ، وإضافة المحلول المنظم المؤقت للتخلص ، إعادة الطرد المركزي وإزالة المزاح.

في بعض الأحيان يتم استخدام طريقة هجينة بحيث يتم الربط بواسطة طريقة الدُفعة ، ولكن المرحلة الصلبة مع ربط الجزيء المستهدف يتم تعبئتها على عمود ويتم الغسل والشفط على العمود.

يتم الحصول على ligands المستخدمة في كروماتوغرافيا الشراهة من المصادر العضوية وغير العضوية. أمثلة المصادر البيولوجية هي بروتينات المصل ، الليكتين والأجسام المضادة. مصادر غير عضوية مثل الأفعال العشوائية ، مخلبات المعادن وصبغات التريزين.

كما تم تطوير طريقة ثالثة، والتي تجمع بين مزايا الطريقتين المذكورة أعلاه. يتم وضع جزيئات الطور الصلب في عمود حيث يتم ضخ الطور السائل من الأسفل والخروج من الأعلى. تضمن جاذبية الجسيمات أن المرحلة الصلبة لا تخرج من العمود مع الطور السائل.

يمكن ازاحت الجزيئات المرغوب فيها من على أعمدة الشراهة عن طريق تغيير تركيزات الملح ، ودرجة الحموضة ، والرقم الهيدروجيني ، والشحنة والقوة الأيونية مباشرة أو من خلال التدرج للحصول الجزيئات ذات الأهمية.

استخدامات محددة

يمكن استخدام كروماتوغرافيا الشراهة في عدد من التطبيقات ، بما في ذلك تنقية الحمض النووي وتنقية البروتين من المستخلصات الخالية من الخلايا والتنقية من الدم.

Affinity chromatography

Affinity chromatography is a method of separating biochemical mixture based on a highly specific interaction between antigen and antibody, enzyme and substrate, receptor and ligand, or protein and nucleic acid. It is a type of chromatographic laboratory technique used for purifying biological molecules within a mixture by exploiting molecular properties, e.g. protein can be eluted by ligand solution. Biological macromolecules, such as enzymes and other proteins, interact with other molecules with high specificity through several different types of bonds and interaction. Such interactions include hydrogen bonding, ionic interaction, disulfide bridges, hydrophobic interaction, and more. The high selectivity of affinity chromatography is caused by allowing the desired molecule to interact with the stationary phase and be bound within the column in order to be separated from the undesired material which will not interact and elute first. The molecules no longer needed are first washed away with a buffer while the desired proteins are let go in the presence of the eluting solvent (of higher salt concentration). This process creates a competitive interaction between the desired protein and the immobilized stationary molecules, which eventually lets the now highly purified proteins be released.

Uses

Affinity chromatography can be used to purify and concentrate a substance from a mixture into a buffering solution, reduce the amount of unwanted substances in a mixture, identify the biological compounds binding to a particular substance, purify and concentrate an enzyme solution. The molecule of interest can be immobilized through covalent bonds. This occurs through an insoluble matrix such as chromatographic medium like cellulose or polyacrylamide. When the medium is bound to the protein of interest it becomes immobilized.

Immunochromatographic test

Affinity chromatography is the basis for immunochromatographic test (ICT) strips, which provide a rapid means of diagnosis in patient care. Using ICT, a technician can make a determination at a patient's bedside, without the need for a laboratory. ICT detection is highly specific to the microbe causing an infection.

Principle

In summary, affinity chromatography exploits the differences in interactions' strengths between the different biomolecules within a mobile phase, and the stationary phase. The stationary phase is first loaded into a column with mobile phase containing a variety of biomolecules from DNA to proteins (depending on the purification experiment). Then, the two phases are allowed time to bind. A wash buffer is then poured through a column containing both bound phases. The wash buffer removes non-target biomolecules by disrupting their weaker interactions with the stationary phase. Target biomolecules have a much higher affinity for the stationary phase, and remain bound to the stationary phase, not being washed away by wash buffer. An elution buffer is then poured through the column containing the remaining target biomolecules. The elution buffer disrupts interactions between the bound target biomolecules with the stationary to a much greater extent than the wash buffer, effectively removing the target biomolecules. This purified solution contains elution buffer and target biomolecules, and is called elution.

The stationary phase is typically a gel matrix, often of agarose; a linear sugar molecule derived from algae. To prevent steric interference or overlap during the binding process of the target molecule to the ligand, an inhibitor containing a hydrocarbon chain is first attached to the agarose bead (solid support). This inhibitor with a hydrocarbon chain is commonly known as the spacer between the agarose bead and the target molecule.

Usually, the starting point is a crude, heterogeneous group of molecules in a whole cell extract, such as a cell lysate, growth medium or blood serum. The molecule of interest will have a well known and defined property, and can be exploited during the affinity purification process. The process itself can be thought of as an entrapment, with the target molecule becoming trapped on a solid or stationary phase or medium. The other molecules in the mobile phase will not become trapped as they do not possess this property. The stationary phase can then be removed from the mixture, washed and the target molecule released from the entrapment in a process known as dialysis. The desired molecules are eluted with specific substances after washing the non-interacting molecules away.

Binding to the solid phase may be achieved by column chromatography whereby the solid medium is packed onto a column, the initial mixture run through the column to allow settling, a wash buffer run through the column and the elution buffer subsequently applied to the column and collected. These steps are usually done at ambient pressure. Alternatively, binding may be achieved using a batch treatment, for example, by adding the initial mixture to the solid phase in a vessel, mixing, separating the solid phase, removing the liquid phase, washing, re-centrifuging, adding the elution buffer, re-centrifuging and removing the elute.

Sometimes a hybrid method is employed such that the binding is done by the batch method, but the solid phase with the target molecule bound is packed onto a column and washing and elution are done on the column.

The ligands used in affinity chromatography are obtained from both organic and inorganic sources. Examples of biological sources are serum proteins, lectins and antibodies. Inorganic sources as moronic acts, metal chelates and triazine dyes.

A third method, expanded bed absorption, which combines the advantages of the two methods mentioned above, has also been developed. The solid phase particles are placed in a column where liquid phase is pumped in from the bottom and exits at the top. The gravity of the particles ensure that the solid phase does not exit the column with the liquid phase.

Affinity columns can be eluted by changing salt concentrations, pH, pI, charge and ionic strength directly or through a gradient to resolve the particles of interest.

Specific uses

Affinity chromatography can be used in a number of applications, including nucleic acid purification, protein purification from cell free extracts, and purification from blood.