7 โครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี

- ❑บทนำ
- ❑ประโยชน์ของโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี
- ❑ขั้นตอนการทำโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี
- ❑ชนิดของตัวกลาง
- ❑คุณสมบัติของตัวกลาง
- ❑คุณสมบัติของลิแกนด์
- ❑วิธีการชะสารออกจากคอลัมน์แบบแอฟฟินิตี

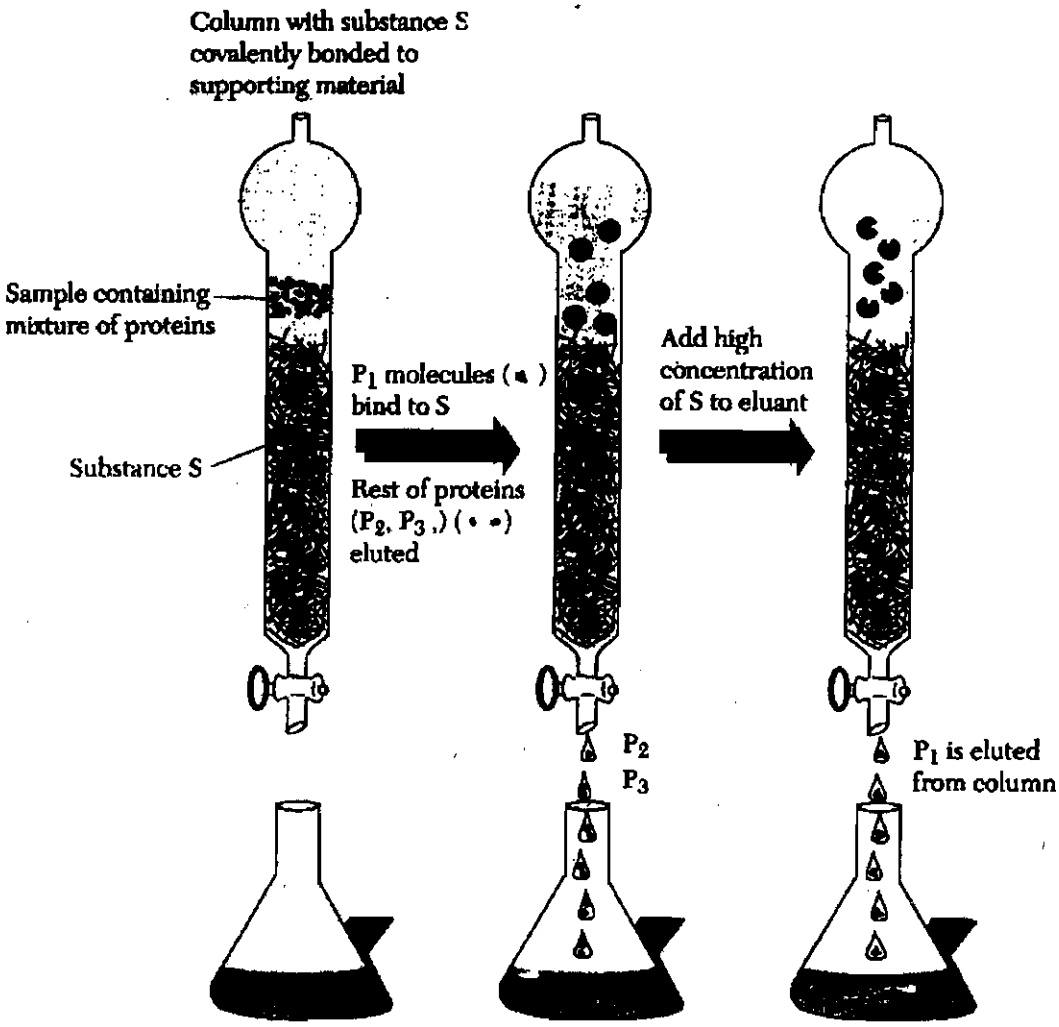
บทนำ

โครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี (affinity chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสาร โดยอาศัยความจำเพาะทางชีวภาพระหว่างโมเลกุลของสารที่ต้องการแยกกับตัวเชื่อมโยงที่เรียกว่าลิแกนด์ (ligand) เนื่องจากในธรรมชาตินั้นสารบางชนิดมีการจับกันอย่างจำเพาะ (specific affinity) เช่น การจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน เอนไซม์กับสับสเตรท หรือเอนไซม์กับโคแฟคเตอร์ เป็นต้น จึงใช้คุณสมบัตินี้ในการแยกสารชีวโมเลกุลที่ต้องการด้วยระบบโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี ยกตัวอย่างการแยกเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) โดยใช้สับสเตรทหรือโคเอนไซม์เป็นลิแกนด์ เช่น lactate, pyruvate, NAD^+ หรือ NADH

ลิแกนด์ที่นำมาใช้ในการแยกสารจะถูกตรึงไว้กับตัวกลางที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble matrix) และบรรจุไว้ในคอลัมน์ ทำหน้าที่เป็นตัวค้ำจุน เมื่อใส่สารละลายผสมที่ต้องการแยกและปล่อยให้ไหลผ่านตัวค้ำจุน สารที่ต้องการจะจับกับลิแกนด์ ในขณะที่สารปนเปื้อนอื่นๆ จะไหลออกมาจากคอลัมน์ จากนั้นเปลี่ยนสภาวะเพื่อทำให้สารที่ต้องการหลุดออกจากลิแกนด์และเก็บสารที่ต้องการนั้น ดังรูปที่ 7.1 แสดงการแยกโปรตีนชนิดที่ 1 (protein1; P1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ต้องการที่ผสมอยู่กับโปรตีนปนเปื้อน คือโปรตีนชนิดที่ 2 (protein2; P2) และโปรตีนชนิดที่ 3 (protein3; P3) คอลัมน์บรรจุด้วยตัวค้ำจุนซึ่งมีสาร S เป็นลิแกนด์ (S_l) ที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับโปรตีนชนิดที่ 1 เมื่อทำการชะคอลัมน์ โปรตีนที่ไม่จับกับ S ลิแกนด์ คือโปรตีนชนิดที่ 2 และโปรตีนชนิดที่ 3 จะหลุดออก ในขณะที่โปรตีนชนิดที่ 1 ยังคงจับอยู่กับ S ลิแกนด์ เมื่อชะคอลัมน์ด้วย S อิสระ (S_f) ในปริมาณมากๆ โปรตีนชนิดที่ 1 จะหลุดจาก S ลิแกนด์ มาจับกับ S อิสระ และไหลออกจากคอลัมน์

ประโยชน์ของโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี

เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีเป็นการแยกสารชีวโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพสูงมาก เป็นวิธีการทำให้สารบริสุทธิ์โดยใช้ขั้นตอนน้อย บางกรณีไม่สามารถใช้วิธีอื่นแยกได้เนื่องจากสารมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกันมาก แต่เมื่อใช้คุณสมบัติที่จับกันอย่างจำเพาะ ทำให้สามารถแยกสารที่ต้องการได้ โครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตียังเป็นเทคนิคที่นำมาใช้แยกสารชีวโมเลกุลที่มีปริมาณน้อยออกจากสารเจือปนอื่นๆ ที่มีปริมาณมาก และสามารถแยกสารที่มีสภาพธรรมชาติออกจากสารชนิดเดียวกันที่เสียสภาพธรรมชาติได้



รูปที่ 7. 1 แสดงขั้นตอนการแยกโปรตีนโดยโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี

โครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีนำมาแยกสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เอนไซม์, แอนติบอดี, โปรตีนขนส่ง, โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ของฮอร์โมน (hormone receptor proteins) โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter proteins) หรือกรดนิวคลีอิก การแยกจึงเลือกสารซึ่งเป็นโมเลกุลขาดเล็กเป็นลิแกนด์ซึ่งถูกตรึงไว้กับตัวกลาง เช่น แยกเอนไซม์โดยใช้สับสเตรท โคแฟคเตอร์ (cofactor) หรือตัวยับยั้ง (inhibitor) เป็นลิแกนด์ของเอนไซม์ แยกแอนติบอดีโดยใช้เอนติเจนเป็นลิแกนด์ แยกฮอร์โมนโดยใช้รีเซพเตอร์เป็นลิแกนด์ หรือแยกกรดนิวคลีอิกโดยใช้เบสคู่สม (complementary base) เป็นลิแกนด์ เป็นต้น

เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตียังถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่น การตรึงเอนไซม์ (immobilized enzyme) โดยตรึงไว้กับตัวกลาง ทำให้เอนไซม์ที่ถูกตรึงมีความเสถียรทนความร้อนและทำหน้าที่ได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ อีกทั้งได้ผลิตผลที่ต้องการโดยไม่ต้องเสียเวลาในการแยกเอนไซม์ออก และเอนไซม์สามารถนำกลับมาใช้งานได้อีก

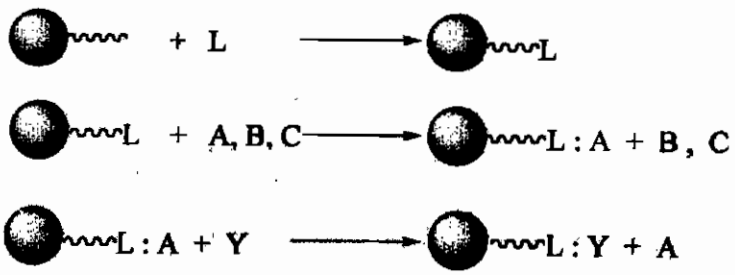
ขั้นตอนการทำโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี

การแยกสารด้วยโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี มีขั้นตอนในการทำดังได้กล่าวในข้างต้น โดยอาศัยหลักการที่ลิแกนด์สามารถจับกับสารที่ต้องการแยกอย่างจำเพาะและแข็งแรง แต่สามารถผันกลับได้ (reversible) สามารถแบ่งขั้นตอนในการทำโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีได้ 3 ขั้นตอน ดังรูปที่ 7. 2

1. ขั้นตอนการเตรียมตัวค้ำจุน (coupling) คือการเตรียมตัวกลางให้จับกับลิแกนด์ (ligand; L)

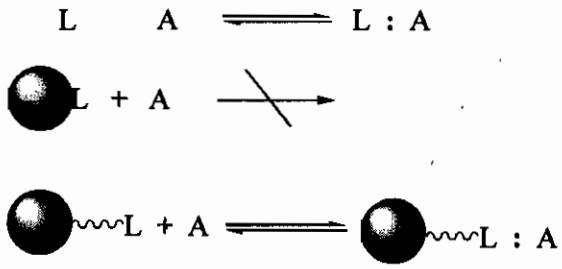
2. ขั้นตอนการทำให้สารที่ต้องการจับกับลิแกนด์อย่างจำเพาะ (specific adsorption) เริ่มต้นจากการเตรียมคอลัมน์ และการใส่สารที่ต้องการแยกลงสู่คอลัมน์ สาร A เป็นสารที่ต้องการซึ่งผสมอยู่กับสาร B และสาร C สาร A สามารถจับอยู่กับลิแกนด์ได้อย่างจำเพาะ

3. ขั้นตอนการชะคอลัมน์ (elution หรือ desorption) เป็นการชะด้วยสาร Y ซึ่งสามารถดึงสาร A ออกจากลิแกนด์



รูปที่ 7. 2 ขั้นตอนในการทำโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี สัญลักษณ์ต่างๆ ที่ใช้มีความหมายดังนี้ L คือลิแกนด์ A คือสารที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์, B และ C คือสารอื่นที่ผสมอยู่ Y คือสารที่ใช้ชะคอลัมน์

โดยทั่วไปบริเวณที่มีความจำเพาะของชีวโมเลกุลในการจับกับสารอื่น เช่น บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ซึ่งเป็นที่จับกับสับสเตรท มักอยู่ภายในโมเลกุล เมื่อต้องการแยกชีวโมเลกุลโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีทำให้โมเลกุลเข้าจับกับลิแกนด์ได้ยาก จึงทำการดัดแปลงให้มี spacer arm ต่อเข้ากับตัวกลางก่อนเชื่อมกับลิแกนด์ ทำให้การจับกันระหว่างลิแกนด์กับชีวโมเลกุลที่ต้องการแยกมีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังรูปที่ 7.3



รูปที่ 7.3 แสดงการใช้ spacer arm ต่อเข้ากับตัวกลาง

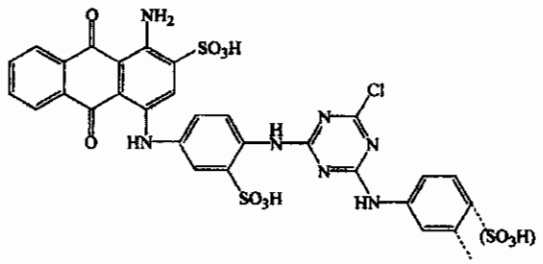
(1) ปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างลิแกนด์กับสาร A

(2) ลิแกนด์ที่เชื่อมกับตัวกลางไม่สามารถจับกับสาร A

(3) spacer arm ช่วยให้โมเลกุลของสาร A เข้าจับกับลิแกนด์ได้ดี

ชนิดของตัวกลาง

ตัวกลางที่ใช้ในโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีเป็นสารพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นเจลซึ่งมีรูปร่างกลม (spherical beads) มีความแข็งแรง (rigid) เช่น เด็กซ์แทรน อะกาโรส พอลิอะศริลาไมด์ พอลิไวนิล (polyvinyl) หรือไยแก้วที่ควบคุมขนาดของรูพรุน (controlled porosity glass; CPG) พอลิเมอร์เหล่านี้สามารถจับอยู่กับลิแกนด์ด้วยพันธะโควาเลนท์ เช่น Cibacron Blue Sepharose มี Sepharose เป็นตัวกลาง และมี Cibacron Blue เป็นลิแกนด์ รูปที่ 7.4 แสดงโครงสร้างของ Cibacron Blue 3G ซึ่งเป็นลิแกนด์ที่เหมาะสมในการแยกเอนไซม์ชนิดที่มีนิวคลีโอไทด์เป็นโคแฟคเตอร์ เช่น เอนไซม์ในกลุ่ม kinase, dehydrogenase, DNA polymerase เป็นต้น



รูปที่ 7.4 โครงสร้างของ Cibacron Blue 3G

คุณสมบัติของตัวกลาง

ตัวกลางที่นำมาใช้ในการทำโครมาโตกราฟีแบบแอฟฟินิตีต้องมีคุณสมบัติดังนี้

1. มีหมู่เคมีที่เหมาะสมซึ่งสามารถต่อเข้ากับลิแกนด์ด้วยพันธะโควาเลนท์

2. มีความเสถียรแม้จะเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ คือ สภาวะที่ทำให้เกิดการจับกันระหว่างตัวกลางกับลิแกนด์ สภาวะที่ทำให้โมเลกุลของสารที่ต้องการต่ออยู่กับลิแกนด์ และสภาวะที่ทำการชะสารออกจากลิแกนด์

3. ตัวกลางต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ไม่ต้องการ ทั้งนี้เพื่อลดการปนเปื้อน

4. ตัวกลางต้องไม่ขัดขวางการไหลผ่านของบัฟเฟอร์

คุณสมบัติของลิแกนด์

การเลือกลิแกนด์ที่จะนำมาต่อกับตัวกลางเพื่อแยกสารที่ต้องการนั้น ลิแกนด์ต้องมีคุณสมบัติสำคัญดังนี้

1. ลิแกนด์ต้องมีความจำเพาะต่อสารที่ต้องการแยก และสามารถผันกลับได้

2. ลิแกนด์ต้องมีหมู่เคมีที่เหมาะสมในการต่อกับตัวกลาง โดยหมู่เคมีนั้นต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการแยก หรือมีผลในการจับกันระหว่างลิแกนด์กับสารที่ต้องการ

การแยกสารแต่ละประเภทต้องทำการตรึงลิแกนด์เข้ากับตัวกลางก่อนนำมาใช้แยกสาร ปัจจุบันมีบริษัทที่ผลิตสารประกอบของตัวกลางและลิแกนด์ขึ้น ดังตารางที่ 7.1 ทำให้ประหยัดเวลาในการเตรียม แต่บางชนิดมีราคาแพง จึงต้องพิจารณาถึงความเหมาะสมในการเลือกนำไปใช้

วิธีการชะสารออกจากคอลัมน์แบบแอฟฟินิตี

ตัวกลางที่ต่ออยู่กับลิแกนด์ซึ่งรวมเรียกว่าตัวดูดซับ (adsorbing material) นั้น จะถูกบรรจุลงในคอลัมน์ โดยวิธีทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ทั่วไป คอลัมน์จะถูกชะด้วยบัฟเฟอร์ที่มี pH และ ionic strength ค่าหนึ่ง เพื่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างลิแกนด์กับสารที่ต้องการแยก เมื่อใส่สารที่ต้องการแยกที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ลงสู่คอลัมน์ โมเลกุลของสารที่ต้องการแยกจะถูกดูดซับหรือจับกับลิแกนด์ จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์อีกชนิดหนึ่ง เพื่อไล่สารที่ไม่จำเพาะออกไป ในขั้นตอนสุดท้ายจึงชะสารที่ต้องการออกจากคอลัมน์ วิธีการชะสารออกจากคอลัมน์มี 2 แบบ

1. ชะด้วยสารที่มีความจำเพาะ (affinity elution) โดยการชะคอลัมน์ด้วยสารอิสระที่จับกับสารที่ต้องการแยกอย่างจำเพาะ สามารถใช้สารที่เป็นลิแกนด์หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายลิแกนด์เป็นตัวชะ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารที่ชะสูง ทำให้มีการดึงสารที่ต้องการออกจากลิแกนด์มาจับกับตัวชะ หรือสามารถใช้สารที่จับกับลิแกนด์ได้ดีว่าสารที่ต้องการ สารนั้นจึงเข้าแทนที่และทำให้สารที่ต้องการหลุดออกมา

2. ชะด้วยสารละลายของเกลือที่มีความเข้มข้นสูง (high–salt elution) เป็นการทำให้ค่า ionic strength เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจะทำลายพันธะที่จับกันระหว่างสารกับลิแกนด์ ในบางกรณีสามารถใช้สารละลาย กรดซิตริกหรือแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เพื่อทำให้โครงรูปสามมิติของโมเลกุลของสารเปลี่ยนแปลงไป สารจึงหลุดออกจากลิแกนด์

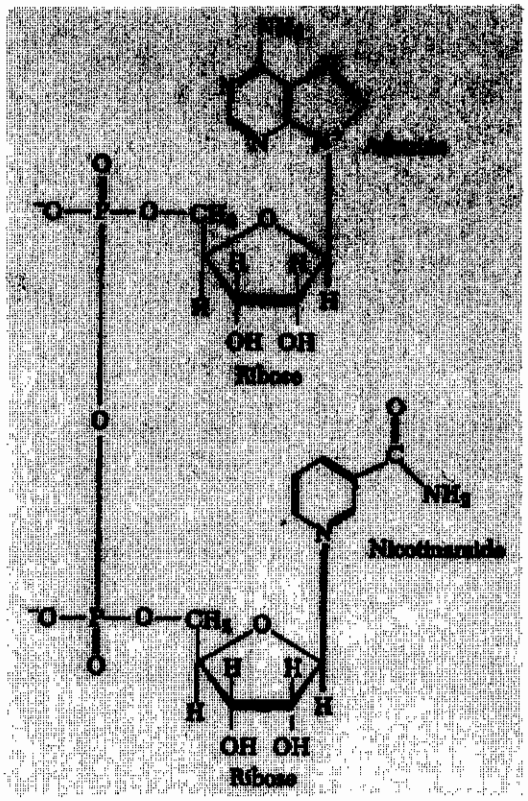
ตารางที่ 7.1 ชนิดของตัวค้ำจุนที่ใช้แยกสารด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี

ชนิดของตัวค้ำจุน	ชนิดของสารที่ต้องการแยก
Concanavalin A–agarose	Glycoproteins and glycolipids
Cibacron Blue–agarose	Enzymes with nucleotide cofactors
Boronic acid–agarose	Compounds with Cis–diol groups
Protein A–agarose	IgG – type antibodies
Poly(A)– agarose	Nucleic acids containing poly(U) sequences
Poly(U)–agarose	Nucleic acids containing poly(A) sequences
Iminodiacetate–agarose	Proteins with heavy metal affinity
5′–AMP–agarose	Enzymes with NAD^+ cofactors, ATP–dependent kinases
Gibacron Blue–Sepharose	Enzymes with nucleotide cofactors
Benzamidine–Sepharose	Serine proteases
Lysine–Sepharose	Nucleic acids
Heparin–Sepharose	Nucleic acid–binding proteins, restriction endonucleases, lipoproteins
Lentil lectin–Sepharose	Detergent – soluble membrane proteins
Thiopropyl–Sepharose	–SH containing proteins

การทดลองที่ 7.1

การแยกเอนไซม์ LDH โดยโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี

เอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) เป็นเอนไซม์ที่พบในไซโตซอล (citosol) เนื้อเยื่อที่พบเอนไซม์ในปริมาณมาก คือเนื้อเยื่อหัวใจ การทดลองนี้ใช้โครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี เพื่อแยกเอนไซม์ LDH โดยใช้ Cibacron Blue-Sepharose เป็นตัวค้ำจุน ทำการทดสอบแอคติวิตีของ LDH โดยใช้ NAD^+



โครงสร้างของ NAD^+

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

คอลัมน์ขนาด 1.5 × 15 เซนติเมตร

หลอดทดลอง

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

สารเคมี

Cibacron Blue-Sepharose

0.02 M sodium phosphate, pH 6.0

0.02 M sodium phosphate, pH 6.0 ใน NaCl เข้มข้น 0.2 M, 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M และ 1.0 M

0.14 M CAPS buffer, pH 10.0

6 mM NAD^+

0.15 M lactate

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมคอลัมน์ Cibacron Blue-Sepharose

1.1 เตรียม Cibacron Blue-Sepharose ในบัฟเฟอร์ 0.02 M sodium phosphate, pH 6.0

1.2 นำ Cibacron Blue-Sepharose ไปดูดฟองอากาศออก โดยใช้ water suction

1.3 เตรียมคอลัมน์โดยใส่สำลีที่ปลายคอลัมน์ จากนั้นใส่บัฟเฟอร์ 0.02 M sodium phosphate pH 6.0 ลงในคอลัมน์ และไล่ฟองอากาศที่ปลายคอลัมน์และในสายยางออกให้หมด

1.4 บรรจุ Cibacron Blue-Sepharose ลงคอลัมน์ ให้ความสูงของ Cibacron Blue-Sepharose อยู่ที่ประมาณ 10 เซนติเมตร

2. การแยก LDH

2.1 ดูดสารละลายผสมที่ต้องการแยกเอนไซม์ LDH ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในคอลัมน์

2.2 ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ 0.02 M sodium phosphate pH 6.0 เก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลองหลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่า A_{280} ชะคอลัมน์จนกระทั่งค่า A_{280} ที่วัดได้เป็นศูนย์

2.3 ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ 0.02 M sodium phosphate pH 6.0 ใน NaCl ความเข้มข้น 0.2 M, 0.4 M, ... 1.0 M ตามลำดับ หรือชะด้วย 0.14 M CAPS buffer pH 10.0 โดยใช้ปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ชะเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่า A_{280}

2.4 นำสารละลายจากหลอดทดลองที่ให้ค่า A_{280} สูงสุดมาทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ LDH โดยใช้ NAD^+ และ lactate บันทึกผลการทดลองลงในตาราง นำข้อมูลจากตารางไปเขียนกราฟเพื่อวิเคราะห์ผลการแยก

ตารางบันทึกผลการแยก LDH

หลอดที่	ปริมาตรของสารละลายที่ได้จากคอลัมน์	ชนิดของบัฟเฟอร์	A_{280}	แอคติวิตีของ LDH

คำถาม

1. Cibacron Blue-Sepharose มีลักษณะอย่างไร นำมาใช้ในการแยกเอนไซม์ LDH ได้อย่างไร

.....

.....

.....

2. เมื่อทำการแยก LDH การชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีเกลือ NaCl มีผลอย่างไรต่อสภาวะของคอลัมน์

.....

.....

.....

3. การนำสารละลายที่ได้จากคอลัมน์แต่ละหลอดมาหาค่า A_{280} มีประโยชน์อย่างไร

.....

.....

.....

4. จงอธิบายการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ LDH

.....

.....

.....

5. จงออกแบบการทดลองเพื่อแยก mRNA ออกจาก RNA ชนิดอื่นๆ

.....

.....

.....