

AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE NA IMOBILIZOVANÝCH KOBALTNATÝCH IONTECH A JEJÍ POUŽITÍ

EVA ZATLOUKALOVÁ

Ústav patologické fyziologie 1. LF UK Praha,
U nemocnice 5, 128 53 Praha 2
ezatl@lf1.cuni.cz

Došlo 11.2.2003, přepracováno 5.12.03, přijato 3.2.04.

Klíčová slova: afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech, proteiny, histidinová značka, kobaltnaté ionty

Obsah

1. Úvod
2. Vazebná místa bílkovin
3. Kovové ionty
4. Chelatující ligandy
5. Vliv chromatografických podmínek
6. Aplikace a výhody afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech

1. Úvod

Afinitní chromatografie je metoda, při níž afinitní ligand (afinant) vázaný na matici specificky a reversibilně reaguje s určitým biopolymerem, respektive specifickým místem tohoto biopolymeru.

Afinitní sorbenty mohou obsahovat buď afinanty biospecifické, tj. takové, u nichž je interakce založena na biologické aktivitě bílkoviny (protilátky, inhibitory, receptory, lektiny), nebo ligandy skupinově specifické, které interagují s určitým seskupením aminokyselin na povrchu bílkoviny (hydrofobní sorbenty, barviva, imobilizované ionty kovů). Na vazbě biopolymeru k imobilizovanému afinitnímu ligandu se podílejí různé molekulární síly a interakce (iontové síly, hydrofobní interakce, vodíkové můstky, van der Waalsovy síly, Londonovy dispersní síly, interakce dipólů). Sorpce zpravidla zahrnuje několik typů interakcí¹.

Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech je separační metoda založená na specifických interakcích biopolymerů v roztoku s ionty kovů, které jsou vázány na stacionární fázi. Podmínkou separace je, aby biopolymer, nejčastěji bílkovina, byl schopen tvořit s iontem dostatečně stabilní komplex. Účinnost metody je srovnatelná s biospecifickými sorbenty³.

Původně se tato metoda nazývala afinitní chromatografie na kovových chelátech. Vzhledem k tomu, že nejde jen o cheláty, byl název v roce 1983 změněn na afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech, pro který se

vžila zkratka IMAC² (Immobilized metal ion affinity chromatography).

Kovové ionty jsou na nerozpustné matici imobilizovány chelatujícími ligandy. Separovaný biopolymer se pak k iontu kovu váže přes vhodnou reaktivní skupinu. Kovové ionty jako akceptory elektronů interagují se skupinami, které elektrony mohou naopak poskytnout. Takovými donory elektronů jsou v biomolekulách atomy dusíku, síry a kyslíku, případně fosforu. K vazbě bílkovin dochází vytěsněním některých slabě vázaných molekul ligandů (vody) z komplexů a jejich nahrazením molekulami bílkovin.

Afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech (IMAC-Co²⁺) se používá pro separaci a charakterizaci biologických makromolekul. Jelikož tak lze úspěšně separovat proteiny značené histidinem, má IMAC-Co²⁺ význam i pro izolaci rekombinantních proteinů.

2. Vazebná místa bílkovin

Bílkoviny se na kov vážou přes povrchové aminokyseliny jako histidin, cystein, tryptofan, kyselina glutamová, kyselina asparagová, tyrosin, lysin, arginin, případně fosfatové skupiny fosfoproteinů⁴. U metaloproteinů je možná i interakce přes jejich vazebné místo pro kov. Skupiny na povrchu bílkoviny interagují s různými ionty kovů kvantitativně i kvalitativně odlišně.

Dvojvalné ionty jako Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ a Co²⁺ preferují vazbu k dusíku. Vazbu bílkovin na IMAC-Co²⁺ tedy zprostředkují převážně imidazolové skupiny histidinů přítomných na povrchu proteinu. Skutečnost, že histidinu je v průměrné molekule bílkovin relativně málo (jen asi 2 %, z toho jen část na povrchu), umožňuje bílkoviny dělit dle počtu histidinových zbytků přítomných na povrchu⁵.

V roce 1989 Sulkowski definoval minimální vazebné požadavky pro imobilizované kovové ionty. Podle této definice imobilizované Cu²⁺ ionty mohou vázat protein obsahující alespoň jeden povrchový histidin. Ni²⁺ a Zn²⁺ ionty potřebují pro vazbu proteinu dva sousední histidiny a imobilizované Co²⁺ ionty vyžadují přítomnost alespoň dvou histidinů, které jsou na povrchu bílkoviny blízko sebe⁶. Asociační konstanta komplexu Cu²⁺-protein bude tedy v průměru vyšší než u komplexu Co²⁺-protein⁷. Díky tomu je IMAC-Co²⁺ i účinným nástrojem pro studium topografie proteinů⁸.

Pro izolaci bílkovin metodami genetického inženýrství se používá tzv. histidinová značka (His-tag), kterou lze do molekuly přidat (obvykle na její N-konec).

3. Kovové ionty

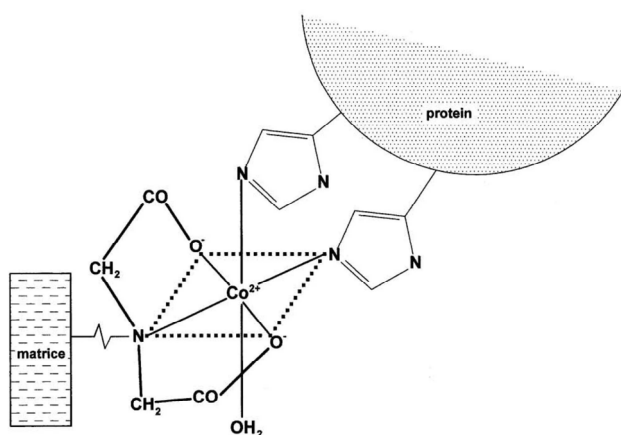
Vazebné vlastnosti komplexu imobilizovaný kov – protein se liší podle typu použitého kovu. Kovové ionty můžeme rozdělit podle míry jejich polarizovatelnosti na

tvrdé a měkké. Povaha kovových iontů, jakožto tvrdých či měkkých Lewisových kyselin, určuje jejich afinitu k nukleofilním skupinám biopolymerů. Ionty kovů s vlastnostmi tvrdých Lewisových kyselin (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} a In^{3+}) mají nejvyšší afinitu ke kyslíku, tvrdé Lewisově bázi. Ionty kovů (Cd^{2+} , Hg^{2+} a Tl^{3+}), které se chovají jako měkké Lewisovy kyseliny a jsou polarizovatelné snáze než tvrdé ionty kovů, preferují interakci se sírou, jako měkkou Lewisovu bázi. Ionty Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} a Co^{2+} patří ke kovům středního typu a přednostně interagují s dusíkem, ale v menší míře i s kyslíkem a sírou⁹. Vazby mezi biopolymery a tvrdými ionty kovů mají iontový charakter, vazby s měkkými ionty kovů mají především kovalentní povahu a se středními ionty kovů se tvoří hlavně vazby koordinační. Vedle těchto typů vazeb se na interakci podílejí i slabší, ale často početnější, coulombické a hydrofobní interakce¹⁰.

4. Chelatující ligandy

Afinita komplexu kov – protein je také značně ovlivněna typem chelatujícího ligandu. Imobilizace kovu na nosič prostřednictvím vhodného chelatujícího ligandu umožňuje ponechat kovovému iontu právě takový počet stupňů volnosti, aby mohl definovaně vázat molekulu proteinu. Pokud bude kov na nosič imobilizován příliš silně, nebudou kovovému iontu dost afinity pro vazbu proteinu a interakce kov – protein bude nedostačující. Naopak, bude-li kov vázán k nosiči příliš slabě, mohl by jeden kovový ion vázat několik molekul proteinů a tvořit agregáty se změněnými vlastnostmi. Může se též uvolnit kovový ion z nosiče do roztoku³.

Seřadíme-li chelatující ligandy podle vzrůstajícího počtu vazeb, kterými k sobě poutají kovový ion, zjistíme, že zároveň klesá počet vazeb, kterými může kovový ion poutat molekulu proteinu. Pro kovy středního typu, tedy i pro Co^{2+} , je nejpoužívanějším chelatujícím ligandem iminodiacetátová kyselina (IDA). Na obr. 1 je schématická vazba matrice,



Obr. 1. Domnělá struktura hexakoordinovaného kobaltnatého komplexu

chelatujícího ligandu s kobaltnatým iontem a adsorbovaného proteinu. Ve schématu je ponechána slabě navázaná molekula vody.

5. Vliv chromatografických podmínek

Adsorpci bílkovin ovlivňuje nejen typ kovu a chelatujícího ligandu, vlastnosti matrice a raménka (distanční spojky, spaceru), ale i další faktory, jako množství kovu imobilizovaného k nosiči, složení a pH mobilní fáze, koncentrace solí, případně přítomnost různých aditiv.

Matrice pro IMAC musí splňovat stejné podmínky jako pro ostatní chromatografické metody. Ze studovaných materiálů se nejlépe osvědčují agarosové gely². Lepší sterickou přístupností molekul bílkovin k imobilizovaným kovovým iontům umožňuje použití raménka, které tvoří můstek mezi matricí a chelatujícím ligandem.

Chování sorbentů před a po imobilizaci kovových iontů se může výrazně lišit. Vliv imobilizace kovového iontu na afinitu bílkovin k danému sorbentu nelze předem předpovědět.

Vlastnosti chromatografického nosiče ovlivňuje i množství navázaných kovových iontů. Se vzrůstajícím množstvím imobilizovaného kovu adsorpce bílkovin i selektivita vazby roste^{10,11}.

Pro nasycení sorbentu kovem je nutné ze sloupce slabě navázané kovové ionty odstranit promýváním. Ionty kovu, které zůstanou vázány na sorbentu po promytí, pak tvoří prakticky uniformní soubor adsorpčních míst. Hrozí-li nebezpečí uvolňování kovu do mobilní fáze, je vhodné zařadit sloupec se sorbentem bez kovu, který uvolněný kovový ion zachytí. V některých případech se pro tento účel používá i sloupec chelatujícího sorbentu, který s danými kovovými ionty tvoří pevnější komplex než použitý sorbent. Výhodné je také použití iontů, které jsou barevné nebo tvoří zbarvené komplexy. Takové kovy je možné snadno detegovat v eluátu¹².

Průběh chromatografie dále závisí na vlastnostech mobilní fáze. Eluční síla mobilní fáze je ovlivněna jejím složením. Pro IMAC- Co^{2+} platí, že eluční síla roste v řadě acetát < fosfát < chlorid¹³.

Adsorpce proteinů obecně roste s klesajícím pH a s klesající iontovou silou. U IMAC naopak vyšší iontová síla potlačuje nespecifický ionexový charakter nosiče a adsorpce proteinů roste s iontovou silou a s pH (cit.^{14,15}). Vliv pH na adsorpci proteinů lze vysvětlit tím, že na IMAC- Co^{2+} se proteiny váží hlavně přes své histidinové zbytky. Ty jsou při nízkém pH protonizovány a vzájemně se s kovovými ionty odpuzují¹⁰.

Faktory ovlivňující retenci biopolymerů ovlivňují také jejich uvolnění. Eluce může být nespecifická, např. snížením koncentrace solí, změnou (obvykle snížením) pH pufru, zvýšením teploty nebo přidávkem detergentů či denaturačních činidel (dodecylsírán sodný, Tween 80, močovina)¹⁶, nebo specifická přidávkem látek soutěžících o vazebná místa (pufry obsahující imidazol, histidin či histamin), které molekuly biopolymeru vytěšňují. Také lze použít pufr

Tabulka I
Aplikace afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech

Aplikace	Biopolymer	Experimentální podmínky / Vazebné vlastnosti	Lit.
Separace bílkovin	interferon β	vazba přes thiolovou skupinu Cys na pozici číslo 17	17
	transferin	při izolaci ze séra či plazmy je transferin eluován v druhém vrcholu (po imunoglobulinu); afinita k Co^{2+} klesá s rostoucí saturací transferinu železem	18, 36
	albumin	IDA- Co^{2+} navázána na 1,4-butanediol diglycidyl Sepharosu 6B nebo na Sephacryl S-300	18
	imunoglobulin (Ig)	dtto; modifikace histidinových zbytků v Ig diethyl-dikarbonátem způsobuje porušení vazebných vlastností	18
	perforin	izolace v přítomnosti 1 M-NaCl a 10 % betainu; IMAC- Co^{2+} na rozdíl od IMAC- Cu^{2+} neváže současně i granzymy	19
	jednořetězcové fragmenty monoklonální protilátky proti <i>terc</i> -butylester-S-(2,4-dinitrofenyl)glutathionu	izolace v přítomnosti 8 M močoviny; po skončení IMAC- Co^{2+} renaturace <i>in vitro</i> gelovou permeační chromatografií	20
	přenašeč γ -aminomáselné kyseliny	izolace v přítomnosti 1% dodecylmaltosidu a inhibitorů proteas; k eluovanému proteinu přidána 0,5 mM-EDTA minimalizující proteolýzu	21
	granzym B (značený histidinem)	izolace ve formě neaktivního zymogenu; odstranění nespecificky navázaných proteinů 0,1 M-NaCl, eluce 0,5 M imidazolem; po IMAC- Co^{2+} aktivace enterokinasou	22
	Vir B4 ATPasa (značená histidinem)	izolace v přítomnosti 2 % modifikovaného Eaglova média (Dulbecco), k navázání proteinu použita vsádková metoda	23
	„myoglobin – like“ kyslíkový přenašeč (značený histidinem)	izolace při nízké (0,5 mM imidazol) i vysoké (4 M-KCl) iontové síle, FPLC uspořádání	24
	laktosový (Lac) represor	separace Lac represoru jako hlavního kontaminantu při izolaci histidinem značených proteinů z buněk nesoucích <i>lacI^q</i> gen; izolace na nosiči TALON, vymytí pufrů o pH 5 a 6 a pufrům s 15 mM imidazolem	25
	lecitin:cholesterolacyltransferasa (LCAT) (značená histidinem)	k navázání proteinu použita vsádková metoda, eluce pufrům s 50 mM imidazolem a 10% glycerolem	26
	transkripční faktor HIF 2 α (faktor indukovaný hypoxií)	vazba HIF 2 α na Co^{2+} přes vysoce konzervovanou degrační doménu; izolace v přítomnosti 0,5% Tritonu X-100	27
	selenoprotein P	FPLC uspořádání; ze studovaných kovových iontů (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} a Cd^{2+}) poskytuje IMAC- Co^{2+} nejvyšší selektivitu	28
	laktátdehydrogenasa (LDH)	studium vazebných vlastností peptidů vzniklých štěpením LDH bromcyanem – za vazbu je odpovědný 32. aminokyselinový zbytek na N-konci LDH; izolace v přítomnosti 9 mM imidazolu, eluce 75 mM imidazolem	29
	N-terminální ektodoména receptoru pro TSH (tyreotropní hormon) (značená histidinem)	navázání receptoru vsádkovou metodou; izolace v přítomnosti 5 mM imidazolu, eluce gradientem imidazolu (10–500 mM)	30

Tabulka I – pokračování

Aplikace	Biopolymer	Experimentální podmínky / Vazebné vlastnosti	Lit.
	β -glukuronidasa (značená histidinem)	IMAC- Co^{2+} poskytuje vyšší selektivitu než IMAC na jiných kovových iontech (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+})	31
	ATPasa přenášející měď	vazba přes Cys; izolace ve formě fúzního proteinu s glutathion-S- transferasou	32
Imunoafinitní nosiče	antigeny	izolace proteinů pomocí protilátek orientovaně navázaných na imobilizovaných kobaltitých iontech (protilátky se nejprve reverzibilně naváží na Co^{2+} ionty, Co^{2+} se pak oxidují H_2O_2 na Co^{3+} , čímž se vazba protilátek stane ireverzibilní)	33
	glukosaoxidasa	dtto; metoda využita i k vícevrstvé imobilizaci enzymu přes protilátku či její fragmenty F(ab)_2 ; takto imobilizovaný enzym je stabilnější vůči denaturačním podmínkám (vysoká iontová síla, teplota, organická rozpouštědla)	34
Negativní adsorpce	jednotlivé isoformy enzymů, konkurenční proteiny	požadovaný protein se neváže na nosič a protéká kolonou, zatímco konkurenční látky jsou zadržovány	7
Diagnostické účely	PSMA (prostate-specific membrane antigen)	izolace a stanovení markeru pro karcinom prostaty; pryskyřice TALON s navázanými Co^{2+} ionty byla vsádkově inkubována s buněčným lyzátem, eluce gradientem (10–200mM) imidazolu	35
Separace DNA a oligonukleotidů	DNA, oligonukleotidy	vazba přes histidinové zbytky vnesené genovým inženýrstvím	7
Studium struktury a funkce metaloproteinů	apokarboxypeptidasa A	enzym deaktivovaný chelatujícími činidly lze reaktivovat průtokem přes tandemové kolony IDA- Zn^{2+} , IDA- Co^{2+} a IDA- Ni^{2+}	10
Studium topografie bílkovin	modelové proteiny vybrané na základě různého chromatografického chování (thioredoxin, ubikvitin, kalmodulin, lysozym, cytochrom c, myoglobin)	stanovení distribuce histidinových molekul, jejich přístupnost koordinaci, počet, zda jsou sousední či vzdálené a vliv okolních aminokyselin	8
	receptor pro estradiol (Er)	zjištěna vazebná místa pro Co^{2+} ; interakce receptoru s imobilizovanými Co^{2+} ionty inhibuje vazbu Er k estradiolu, možnost podobných vlastností i u receptorů pro ostatní steroidní hormony	37
Katalýza	enzymy	kolona slouží jako reaktor pro katalytické reakce	3
Imobilizace biopolymerů	enzymy (např. alkalická fosfatasa, maltosadehydrogenasa, laktátdehydrogenasa); citlivé bílkoviny, které v roztoku snadno denaturují	kovalentní vazba na IDA- Co^{2+} (IDA- Cu^{2+} , IDA- Zn^{2+}), zvýšení stability proteinů, možnost jejich opětovného uvolnění (pomocí EDTA)	38

s kovovým iontem, pro který má bílkovina vyšší afinitu, než pro kov imobilizovaný¹⁰.

6. Aplikace a výhody afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech

Využití metody je shrnuto v tabulce I.

Parametry IMAC dovolují různé typy jejího uspořádání, počínaje nízkotlakou chromatografií, přes HPLC, až po uspořádání multimodální či tandemové.

Sorbenty pro IMAC-Co²⁺ svými vlastnostmi dovolují použít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, která může v jednom stupni vyčistit bílkoviny až desettisíckrát. Metoda proto bývá označována jako vysoce selektivní (HS-IMAC, cit.¹⁰).

IMAC-Co²⁺ je metodou, při níž má vysoká iontová síla příznivý vliv na pevnost sorpce, a proto může být výhodně kombinována s metodami jako ionexová, hydrofobní nebo thiofilní chromatografie. Pro tyto doplňující se metody je vžitě označení multimodální chromatografie¹⁰.

Při tandemovém uspořádání jsou kolony obsahující různé sorbenty řazeny do série a jsou používány pro současnou separaci více bílkovin. Další možností je využití kaskádových kolon, kdy po eluci z jedné kolony následuje sorpce na jiném nosiči, založená na odlišném sorpčním principu. Vzorek protéká postupně více kolonami, které se liší např. typem kovového iontu či chelatajícího ligandu³.

IMAC je charakteristická vysokou kapacitou. Chelatající činidla jsou v sorbentu přítomna v koncentraci 10 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ gelu. Chelatající činidla tvoří s kovovými ionty stechiometrický komplex (1:1). Teoreticky může 1 ml gelu vázat 1 až 10 g bílkoviny o molekulové hmotnosti 100 kDa. Prakticky lze využít 10–20 % této kapacity, což odpovídá maximálně 200 mg bílkoviny na 1 ml gelu.

Další výhodou IMAC-Co²⁺ je vysoká selektivita frakcionace, která je určována pouze chelatajícím ligandem a kovem. Nezanedbatelný je i stabilizační efekt používaného prostředí (vysoká iontová síla, přítomnost kovových iontů) na molekuly bílkovin. Vzhledem k tomu, že kovem neobsazené chelatající skupiny nosiče váží kationty přítomné v roztoku, nerostou v IMAC kolonách mikroorganismy a eluované roztoky jsou zpravidla sterilní³.

Ionty kovů mohou být ze sloupce snadno odstraněny, např. roztokem EDTA. Gel může být proto regenerován až několikrát během několika let bez ztráty chelatajících schopností. Po odstranění předchozího kovu lze na tentýž nosič navázat jiný kovový ion.

Problematika tohoto výzkumu je podporována MŠMT ČR (grant MSM 111100003).

LITERATURA

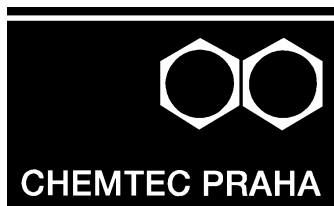
1. Turková J.: *Bioaffinity Chromatography*. Elsevier, Amsterdam 1993.
2. Porath J., Belew M.: *Affinity Chromatography and Biological Recognition*. Academic Press, New York 1983.
3. Kučerová Z.: Chem. Listy 85, 526 (1991).
4. Hemdan E. S., Porath J.: J. Chromatogr. 323, 255 (1985).
5. Klapper M. H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 1018 (1977).
6. Sulkowski E.: BioEssays 10, 170 (1989).
7. Chaga G. S.: J. Biochem. Biophys. Methods 49, 313 (2001).
8. Hemdan E. S., Zhao Y. J., Sulkowski E., Porath J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 1811 (1989).
9. Pearson R. G.: J. Am. Chem. Soc. 85, 3533 (1963).
10. Gooding K. M., El Rassi Z., Horváth C.: *HPLC of Biological Macromolecules* (Gooding K. M., Regnier F. E., ed.), kap 6. Marcel Dekker, New York 2002.
11. Kagedal L.: *Protein Purification* (Janson J. C., Ryden L., eds.), str. 227 – 251. VCH, New York 1989.
12. Scopes R. K.: *Protein Purification. Principles and Practice*. Springer-Verlag, New York 1994.
13. El Rassi Z., Bacolod M. D.: J. Chromatogr. 512, (1990).
14. El Rassi Z., Horváth C.: J. Chromatogr. 359, 241 (1986).
15. Kato Y., Nakamura K., Hashimoto T.: J. Chromatogr. 354, 511 (1986).
16. Porath J., Olin B.: Biochemistry 22, 1621 (1983).
17. Sulkowski E., Vastola K., Oleszek D., von Muenchhausen W.: *Affinity Chromatography and Related Techniques*. Proc. 4th International Symposium, Veldhoven, 22–26 June 1981 (Gribnau T.C.J., Visser J. and Nivard R.J.F., eds.), str. 313. Elsevier, New York 1982.
18. Al-Mashikhi S. A., Nakai S.: J. Dairy Sci. 71, 1756 (1988).
19. Winkler U., Pickett T. M., Hudig D.: J. Immunol. Methods 191, 11 (1996).
20. Ren X., Gao S., You D., Huang H., Liu Z., Mu Y., Liu J., Zhang Y., Yan G., Luo G., Yang T., Shen J.: Biochem. J. 359, 369 (2001).
21. Li X., Villa A., Gownley C., Kim M. J., Song J., Auer M., Wang D.: FEBS Lett. 494, 165 (2001).
22. Sun J., Bird C. H., Buzza M. S., McKee K. E., Whistock J. C., Bird P. I.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 261, 251 (1999).
23. Dang T. A., Zhou X. R., Graf B., Christie P. J.: Mol. Microbiol. 32, 1239 (1999).
24. Piatibratov M., Hou S., Brooun A., Yang J., Chen H., Alam M.: Biochim. Biophys. Acta 1524, 149 (2000).
25. Owens R. M., Grant A., Davies N., O'Connor C. D.: Protein Expression Purif. 21, 352 (2001).
26. Chisholm J. W., Gebre A. K., Parks S. J.: J. Lipid Res. 40, 1512 (1999).
27. Yuan Y., Beitner-Johnson D., Millhorn D. E.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 288, 849 (2001).
28. Sidenius U., Farver O., Jons O., Gammelgaard B.: J. Chromatogr., B: Biomed. Appl. 735, 85 (1999).
29. Chaga G., Hopp J., Nelson P.: Biotechnol. Appl. Biochem. 29, 19 (1999).
30. Cornelis S., Uttenweiler-Joseph S., Panneels V., Vassart G., Costagliola S.: Biochemistry 40, 9860 (2001).
31. Zhang C. M., Reslewic S. A., Glatz C. E.: Biotechnol.

- Bioeng. 68, 52 (2000).
32. DiDonato M., Narindrasorasak S., Forbes J. R., Cox D. W., Sarkar B.: *J. Biol. Chem.* 272, 33279 (1997).
 33. Hale J. E.: *Anal. Biochem.* 231, 46 (1995).
 34. Jan U., Husain Q., Saleemuddin M.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 34, 13 (2001).
 35. Xiao Z., Jiang X., Beckett M. L., Wright G. L. Jr.: *Protein Expression Purif.* 19, 12 (2000).
 36. Sulkowski E.: *Frontiers in Bioprocessing* (Sikdar S. K., Bier M., Todd P., ed.). CRC Press, Boca Raton 1990.
 37. Medici N., Minucci S., Nigro V., Abbondanza C., Armetta I., Molinari A. M., Puca G. A.: *Biochemistry* 28, 212 (1989).
 38. Coulet P. R., Carlsson J., Porath J.: *Biotechnol. Bioeng.* 23, 663 (1981).

E. Zatloukalová (*Institute of Pathophysiology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague*): **Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography and Its Application**

Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) is a group-specific affinity separation technique,

which is based on specific interactions between molecules in solution and metal ions fixed to a solid support. Metal ions, being electron acceptors, react with ligands and electron-donor groups of biomolecules. In biomolecules, electron donors are surface-exposed atoms of nitrogen, sulfur and oxygen, potentially also phosphorus. As biomolecules (e.g. proteins) are bound to metal chelates, weakly bound ligands (e.g. water) are displaced from the metal chelate complex. Elution of the target proteins is achieved mostly by protonation (lowering pH) or by addition of a competing agent (e.g. imidazole). The IMAC with Co^{2+} relies on the formation of weak coordination bonds between Co^{2+} ions and basic groups of proteins, in particular histidine residues. The use of the IMAC with Co^{2+} shows distinct advantages such as high loading, mild elution conditions, simple regeneration and low cost. The technique is therefore used for various purposes, including preparative and analytical purification of proteins and study of their surface topography. Efficient purification of recombinant proteins with engineered histidine affinity tags attached to the N- or C- terminus is another important application of this method.



11. ročník mezinárodního veletrhu chemie a plastů

6. – 8. října 2004
Areál Výstaviště Praha

11. ročník veletrhu CHEMTEC PRAHA se bude tradičně konat v prostorách Průmyslového paláce na pražském Výstavišti. Souběžně ve stejném termínu proběhne ve střední hale Průmyslového paláce mezinárodní veletrh čistící a úklidové techniky, čistících technologií, chemie, pomůcek a služeb CLEANTEC 2004. V levém křídle Průmyslového paláce se představí zástupci chemického průmyslu z ČR včetně zahraničních vystavovatelů, v pravém křídle se budou prezentovat firmy zabývající se dovozem a výrobou laboratorní techniky, laboratorního nábytku, zpracování plastů, životního a pracovního prostředí, odborné spolky. Novinkou letošního ročníku bude stánek *Chemická informatika*, jehož cílem je ucelená prezentace veškeré dostupné literatury v oboru, včetně její elektronické podoby. Na stánku bude probíhat živá prezentace databází s chemickou tematikou dislokovaných po celém světě a v návaznosti na tuto prezentaci bude na veletrhu představen nově otevíraný studijní obor na VŠCHT *Informatika a chemie*. Současně v rámci odborných seminářů proběhne série přednášek na téma: Informace – nejcennější chemický produkt.

CHEMTEC PRAHA vstupuje do druhé desítky své existence s cílem přispět k prezentaci chemie jako moderního oboru, který pozitivním způsobem ovlivňuje kvalitu našeho života. Stal se místem setkání předních manažerů, odborníků a specialistů z odvětví chemického průmyslu a chemie. O jeho významu svědčí každoroční záštita Ministerstva průmyslu a obchodu ČR a přítomnost jeho předních představitelů na této akci.

Nedílnou součástí veletrhu je doprovodný program odborných seminářů, které pořádá Svaz chemického průmyslu. Letošní témata odráží vstup České republiky do EU:

- Nová chemická politika v EU po jejím rozšíření. Vývoj REACH a jeho důsledky pro chemickou legislativu v ČR, postoje Ministerstva životního prostředí ČR k tomuto vývoji.
- Změny předpisů regulujících zahraniční obchod i obchod mezi členskými zeměmi EU po jejím rozšíření. Panelová diskuze k otázkám souvisejícím s legislativou obchodu chemickými látkami podléhajícími zvláštnímu režimu, postoje Ministerstva průmyslu a obchodu k této problematice. Regulace obchodu chemickými látkami podléhajícími zvláštnímu režimu, postoje Ministerstva zdravotnictví k této problematice.

Organizátorem akce je společnost INCHEBA PRAHA za odborné garance Svazu chemického průmyslu. Bližší informace o veletrhu jsou uvedeny na stránkách www.chemtecp Praha.cz.