

KOVALENTNÍ CHROMATOGRRAFIE

ZDENĚK GLATZ

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
e-mail: glatz@chemi.muni.cz*

Došlo dne 19.VII.1999

Klíčová slova: kovalentní chromatografie

Obsah

1. Úvod
2. Princip metody
3. Syntéza sorbentů pro kovalentní chromatografii
4. Experimentální podmínky pro kovalentní chromatografii
 - 4.1. Vazba bílkovin
 - 4.2. Eluce
 - 4.3. Regenerace sorbentu
5. Využití kovalentní chromatografie
 - 5.1. Izolace bílkovin a peptidů
 - 5.2. Imobilizace ligandů pro afinitní chromatografii
 - 5.3. Ostatní aplikace
6. Závěr

1. Úvod

Během posledních dvaceti let došlo k nebývalému rozvoji molekulární biologie a biochemie. Tato expanze byla umožněna především rozvojem technologie rekombinantní DNA, metody hybridomů a buněčných kultur a v neposlední řadě rozvojem metod a technik pro separaci a purifikaci biomakromolekul.

Jednou z těchto metod je rovněž kovalentní chromatografie. Zatímco většina chromatografických metod používaných pro separaci bílkovin a jiných biomakromolekul je založena na nekovalentní interakci mezi příslušnou biomakromolekulou a chromatografickým sorbentem, kovalentní chromatografie, jak již vyplývá z názvu, naopak využívá tvorby kovalentní vazby mezi danou biomakromolekulou a sorbentem. Tato vazba přitom musí být dostatečně stabilní a současně reverzibilní, přičemž podmínky pro její rozrušení musí být natolik mírné, aby nedošlo k denaturaci separované biomakromolekuly.

Potenciálním místem pro kovalentní vazbu u bílkovin jsou různé skupiny aminokyselinových zbytků polypeptidického řetězce. NH_2 a COOH skupiny jsou využívány především k ireverzibilní imobilizaci bílkovin, což determinuje chemismus příslušných reakcí. Jediným případem funkční skupiny, který splňuje v plné míře uvedené požadavky, jsou SH skupiny cysteinylových zbytků. Tyto skupiny se vyskytují u bílkovin v hojné míře a velice často se podílejí na jejich funkci např. u enzymů, hormonů, receptorů atd¹. Liší se přitom ve své reaktivitě, a co je neméně významné, mohou být do molekuly

bílkoviny cíleně vneseny. Tyto skutečnosti dělají z kovalentní chromatografie relativně univerzální techniku, která však ještě v současné době není dostatečně doceněna.

Kovalentní chromatografie, jejíž koncept byl vypracován již před delší dobou, je založena až na několik výjimek na reakcích SH skupin. Jednou z prvních metod pro kovalentní chromatografii vypracovali Eldjarn a Jellum², kteří pro vazbu SH skupin využili Hg imobilizovanou na Sephadexovém nosiči. Tuto vazbu lze rozrušit nadbytkem alifatického thiolu nebo HgCl_2 , který je rovněž možné použít pro regeneraci sorbentu.

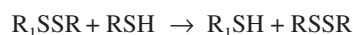
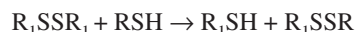
Schechter a spol.³ použili pro vazbu bílkovin prostřednictvím methioninových zbytků sorbent obsahující reaktivní halogen ve formě $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{Cl}$. Vzniklý sulfoniový komplex je možné rozrušit 2-merkaptioethanolem, daný sorbent však již nelze zregenerovat.

V roce 1973 Brocklehurst a spol.⁴ publikovali metodu, která doposud nejlépe splňuje požadavky na „ideální“ kovalentní chromatografii. Tato metoda je založena na thiol-disulfidické výměnné reakci mezi 2-pyridyldisulfidovým zbytkem navázaným na sorbentu a SH skupinami příslušné bílkoviny. S poslední inovací metody kovalentní chromatografie přišli Carlsson a Batista-Viera^{5,6}, kteří pro vazbu sloučenin obsahujících SH skupiny použili sorbent nesoucí disulfidoxidové skupiny. Vzhledem ke skutečnosti, že kovalentní chromatografie založená na thiol-disulfidické výměnné reakci a na reakci s disulfidoxidy zaujímá dominantní postavení, bude uvedeným metodám věnována hlavní část tohoto sdělení.

Ve výčtu metod nelze opomenout práci Podhradského a spol.⁷, kteří pro separaci látek obsahujících SH skupiny, jako jsou glutathion, 3-sulfanylpropionová kyselina, koenzym A a N-acetylcystein, použili sorbent s navázaným 4[(2-dikyanmethylen)hydrazino]-3-nitrofenylovým ligandem. Eluce je dosaženo díky neustále se obnovující rovnováze mezi ligandem, separovanými thioley a protony elučního roztoku.

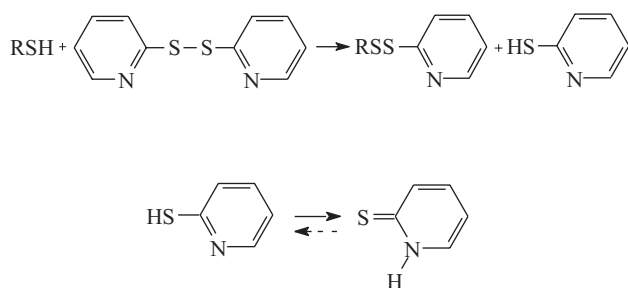
2. Princip metody

Thiol-disulfidická výměnná reakce je speciální forma alkylace – tzv. S-alkylace. Jedná se o dvojestupňovou výměnu, při které je nejprve tvořen směsný disulfid jako meziproduct:



Tato reakce může být rovněž označena jako redoxní proces, neboť při ní dochází ke změně oxidačního stavu atomů síry.

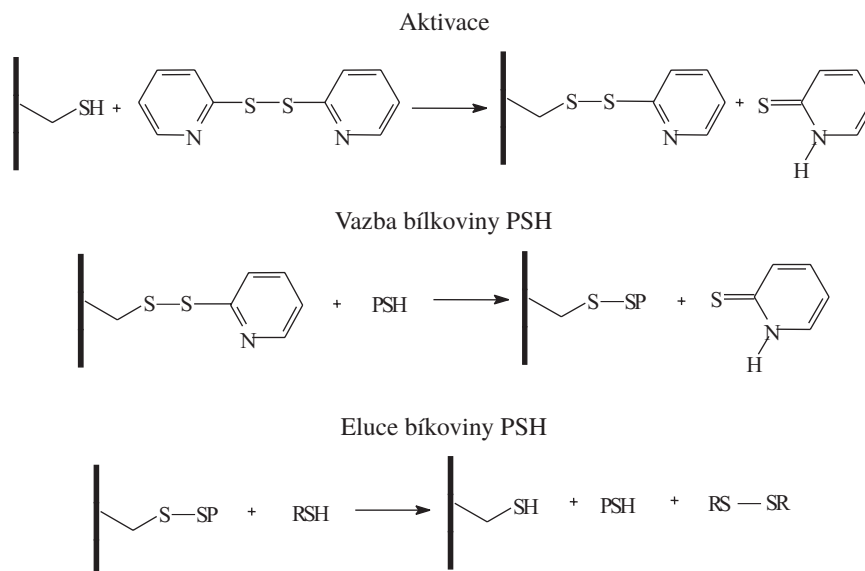
Zvláštním případem thiol-disulfidické výměnné reakce je reakce mezi alifatickými thioley a tzv. „reaktivními“ disulfidy, jako jsou 2,2'-dipyridyldisulfid, 6-[(5-karboxy-2-pyridyl)disulfanyl]nikotinová kyselina a 3-[(5-karboxy-2-nitrofenyl)disulfanyl]-4-nitrobenzoová kyselina. Jde o aromatické disulfidy, jejichž odpovídající thiolová forma je stabilizována rezonančně nebo thiol – thionovou tautomerií. Rovnováha uvedené reakce je díky tomu posunuta na stranu tvorby thiolu na rozdíl od thiol-disulfidické výměnné reakce alifatických



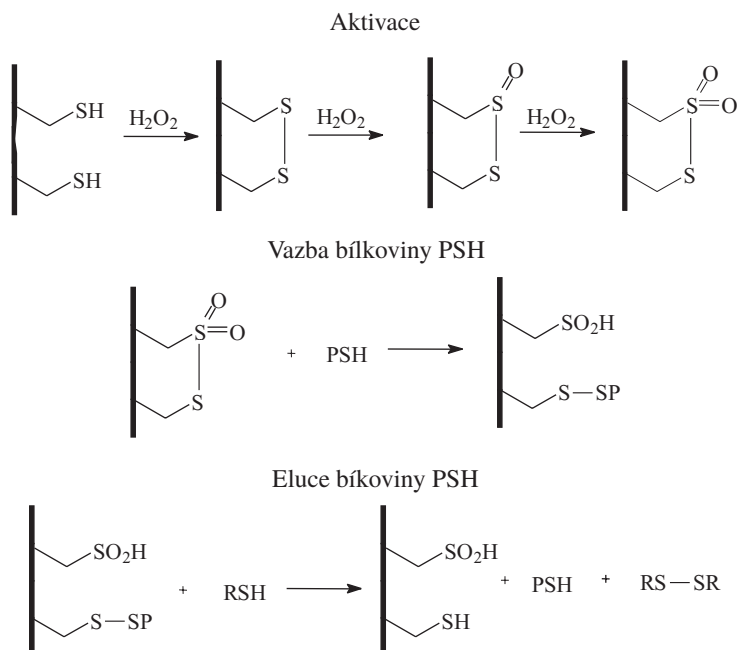
Obr. 1. Reakce 2,2'-dipyridyldisulfidu s alifatickým thiolem RSH

disulfidů, u kterých se rovnovážná konstanta reakce blíží 1. Typickým příkladem je reakce mezi alifatickým thiolem a 2,2'-dipyridyldisulfidem, při které je alifatický thiol kvantitativně převeden na směsný disulfid a ekvimolární množství thionu (obr. 1). Těto vlastnosti reaktivních disulfidů bylo využito v celé řadě aplikací, jako např. pro stanovení volných SH skupin bílkovin^{8,9}, pro detekci bílkovin obsahujících SH skupiny po izoelektrické fokusaci¹⁰, pro pre- a postkolonovou derivatizaci thiolů při HPLC^{11,12} a CZE¹³ atd.

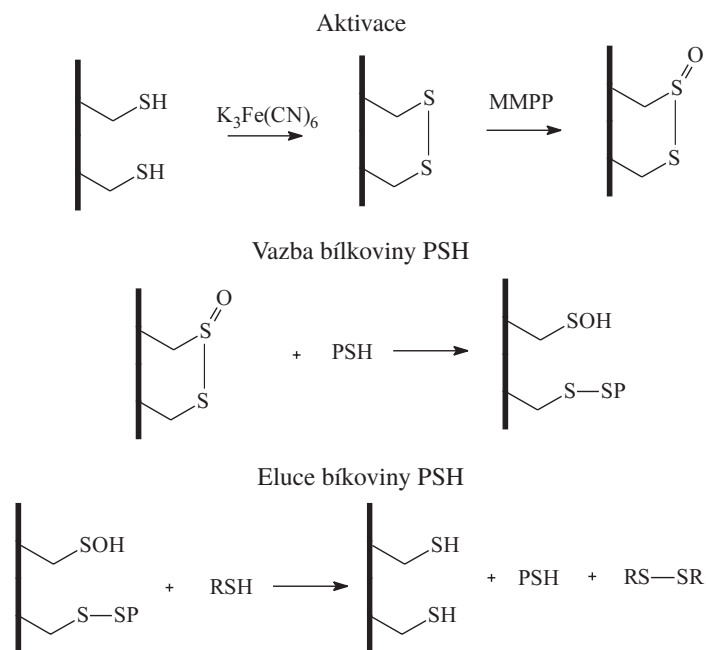
Na identickém principu je rovněž založena metoda kovalentní chromatografie. Thiolové skupiny navázané na chromatografickém sorbentu jsou aktivovány reakcí s 2,2'-dipyridyl-



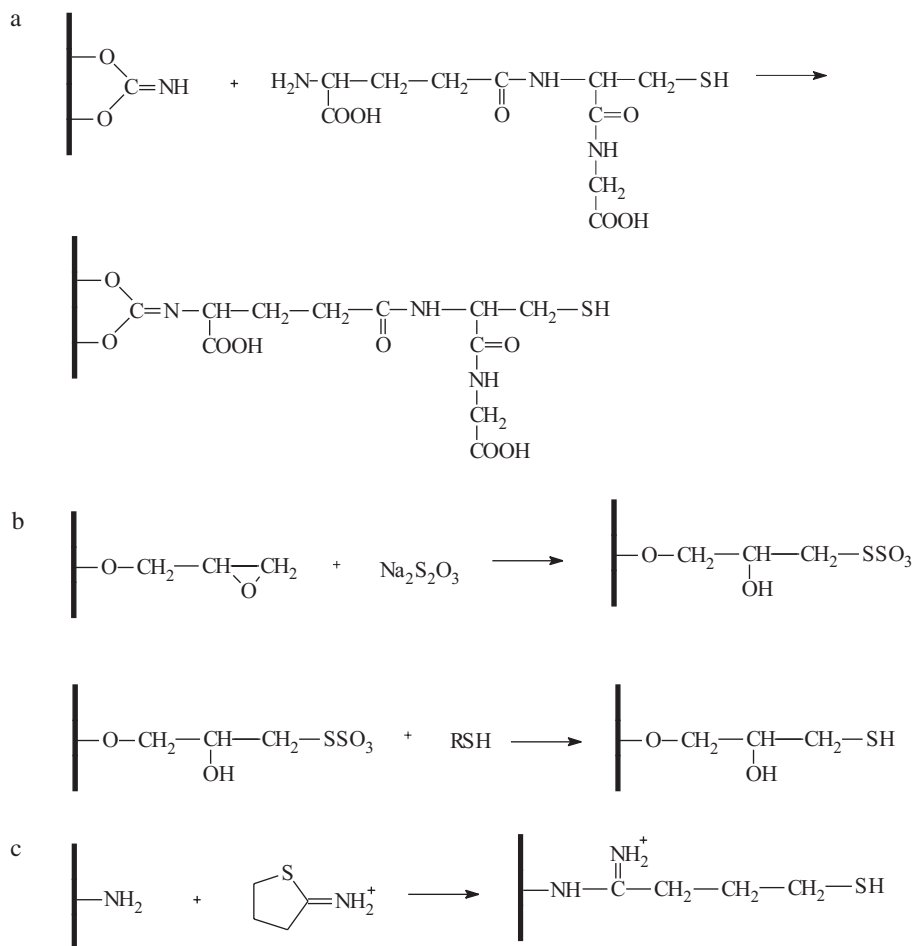
Obr. 2. Princip kovalentní chromatografie založené na thiol-disulfidické výměnné reakci



Obr. 3. Princip kovalentní chromatografie založené na reakci s disulfidoxidy



Obr. 4. Princip kovalentní chromatografie založené na reakci s disulfidoxidy



Obr. 5. Syntéza sorbentů pro kovalentní chromatografii dle Brocklehursta (a), Axéna (b) a Jayabaskarana (c)

disulfidem za vzniku směsného disulfidu – 2-pyridyldisulfidu. Ten reaguje s SH skupinou bílkoviny, přičemž dochází ke vzniku disulfidické vazby mezi bílkovinou a sorbentem a uvolnění 1,2-dihydro-2-pyridinthionu. K eluci se následně použije v přebytku některý z alifatických thiolů – cystein, redukovaný glutathion, β -merkptoethanol nebo dithiothreitol (obr. 2).

Obdobnou reaktivitu vykazují imobilizované disulfidoxidy – disulfid-1,2-dioxid nebo disulfidoxid. Lze je připravit oxidací sorbentu obsahujícího thiolové skupiny peroxidem vodíku, respektive ferrikyanidem draselným a magnesium monoperoxyftalátem – MMPP. Carlsson a Batista-Viera nejprve syntetizovali sorbent s imobilizovanou disulfidoxidovou skupinou⁵. U tohoto sorbentu však dochází při vazbě látek obsahujících thiolovou skupinu ke vzniku sulfinátové skupiny $-SO_2H$, která se již nedá regenerovat (obr. 3). Sorbent tak při opakovaném používání ztrácí vždy polovinu své vazební kapacity. Tento problém se podařilo odstranit syntézou sorbentu nesoucího disulfidoxidovou skupinu⁶. Při vazbě totiž vzniká sulfenylolá skupina – SOH, která je při eluci plně regenerována zpět na skupinu thiolovou (obr. 4). Také u těchto sorbentů se eluce provádí pomocí alifatických thiolů.

3. Syntéza sorbentů pro kovalentní chromatografii

Jak je zřejmé z předchozích údajů, výchozí sorbent pro kovalentní chromatografii musí obsahovat volné thiolové skupiny, které jsou aktivovány nebo oxidovány. Pro jeho přípravu bylo použito několik metod. Brocklehurst a spol.⁴ použili agarosu aktivovanou CNBr, na kterou vážali glutathion prostřednictvím NH_2 skupiny (obr. 5a). Takto imobilizovaný glutathion však obsahuje dvě ionizovatelné COOH skupiny, vzniklý sorbent je tedy záporně nabitý a je nutné při jeho použití potlačit nespecifické iontové interakce.

Jiný přístup zvolili Axén a spol.¹⁴, kteří jako výchozí matici využili agarosu aktivovanou epichlorhydrinem, tj. s navázanou epoxy skupinou. Ta reaguje s thiosíranem za vzniku Bunteho soli, která je redukována dithiothreitem (obr. 5b). Vzniklé thiopropylové raménko neobsahuje na rozdíl od glutathionu nabitě skupiny. Obě metody se rovněž liší dosaženým stupněm substituce, který se u glutathion-agarosy pohybuje okolo 1 μ molu thiolových skupin na ml matrice, u thiopropyl-agarosy 20 μ molů na ml.

Jayabaskaran a spol.¹⁵ připravili sorbent s thiopropylovým raménkem reakcí aminosubstituované Sepharosy s 2-iminothiolanem (obr. 5c). Dosáhli přitom substituce 1–2 μ molu thiolových skupin na ml.

Tabulka I
Přehled komerčně dostupných sorbentů pro kovalentní chromatografii

Sorbent	Příprava	Dodavatel
Cystein-agarosa	CNBr + cystein	Sigma
Thiopropyl-agarosa	epichlorhydrin + + $Na_2S_2O_3$ + DTT	Pharmacia
Glutathion-agarosa	CNBr + glutathion	Pharmacia

Řada sorbentů pro kovalentní chromatografii na bázi thiol-disulfidické výměnné reakce je komerčně dostupná, liší se přitom způsobem přípravy, přítomností raménka a stupněm substituce (tab. I). Je samozřejmé, že uvedené sorbenty v jejich thiol formě je možné použít pro přípravu sorbentu s disulfidoxidovými skupinami.

4. Experimentální podmínky pro kovalentní chromatografii

Vzhledem k téměř identickému principu obou uvedených modifikací kovalentní chromatografie, jsou experimentální podmínky pro jejich provedení velice blízké.

4.1. Vazba bílkovin

Vazba bílkovin obsahujících SH skupiny na příslušný chromatografický sorbent probíhá za mírných podmínek (pH 4–8) spontánně, k vazbě přitom může docházet jak na koloně, tak vsádkově. Maximální vazebné kapacity je dosahováno při nižším pH (4–5), což však vyžaduje delší inkubační dobu. Naopak při neutrálním pH je reakce rychlejší s nižším stupněm vazby. Tato skutečnost je dána zvyšující se stabilitou a snižující se reaktivitou SH skupin při nižších hodnotách pH.

U 2-thiopyridyldisulfidových sorbentů dochází při vazbě bílkovin k uvolňování 1,2-dihydro-2-pyridinthionu, který absorbuje při 343 nm, a lze tak sledovat vazebný proces. 1,2-dihydro-2-pyridinthion však absorbuje rovněž při 260 nm a pokud je vlastní průběh separace monitorován spektrofotometricky při 280 nm, dochází k interferenci.

Nenavázané a nespecifické vázané bílkoviny je nutné před vlastní elucí z kolony vymýt. Složení promývacího pufru je dáno stabilitou navázaných bílkovin. Obvykle je nezbytné zvýšit iontovou sílu použitého pufru pro minimalizaci iontových interakcí přidávkem 0,1–0,3 M-NaCl, v některých případech je nezbytný přídavek detergentů jako jsou Triton nebo Tween pro eliminaci hydrofobních interakcí. Ve většině aplikací lze přitom použít stejný pufr jak pro nanášení vzorku, tak i eluci.

4.2. Eluce

Kovalentně vázané bílkoviny se po promytí uvolní činnými redukujícími disulfidické můstky, nejčastěji alifatickými nízkomolekulárními thioley, a to při neutrálním nebo slabě alkalickém pH. U sorbentů pro kovalentní chromatografii založené na thiol-disulfidické výměně však identickým způsobem reaguje nezreagovaný 2-thiopyridyldisulfidový zbytek za uvolnění 1,2-dihydro-2-pyridinthionu, který kontaminuje eluované bílkoviny a interferuje při detekci. U sorbentů s disulfidoxidovými skupinami tento problém nenastává. Uvolněné bílkoviny však v obou případech obsahují přebytek alifatického thiolu a jeho disulfidické formy. Ty je vhodné před následnou manipulací se vzorkem odstranit, nejčastěji gelovou permeační chromatografií.

Pro selektivní eluci bílkovin lišících se počtem a charakterem thiolových skupin lze použít sekvenční eluční metodu vypracovanou Hillsonem¹⁶. Bílkoviny jsou postupně eluovány L-cysteinem (5–25 mM), redukovaným glutathionem (50 mM), β -merkptoethanolem (20–50 mM) a dithiothreitem

Tabulka II
Přehled využití kovalentní chromatografie pro purifikaci bílkovin a peptidů

Purifikovaná bílkovina nebo peptid	Zdroj	Lit.
Papain	<i>Carica papaya</i>	4
Ureasa	<i>Canavalia ensiformis</i>	17,18
Kolagen	telecí chrupavka	19
Merkaptoalbumin	hovězí serum	20,21
Actinidin	<i>Actinidia chinensis</i>	22,23
Chymopapain	<i>Carica papaya</i>	23,24
Membránové bílkoviny typ 3	membrána erytrocytů	25
Metallothionein	telecí játra	26
Histon F3	telecí thymus	27
Cys-Met-hexadekapeptid	syntetický	28
Thiol-disulfidoxidoreduktasa	hovězí játra	29
Protein-disulfidomerasa + glutathion-insulintranshydrogenasa	hovězí játra	30
Ficin	<i>Ficus glabrata</i>	31
Aldehyddehydrogenasa	ovčí játra	32
Sulfhydryloxidasa	kravské mléko	33,34
Receptor pro glukokortikoidy	kryší játra	35
Kathepsin	hovězí slezina	36
Lecithin-cholesterol-acyltransferasa	lidská plazma	37
Penicilinacylase	<i>Escherichia coli</i>	38
Δ -(L-a-aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valin	kultivační medium	39
Thymidylátsynthasa	<i>Lactobacillus casei</i>	40,41
Membránová bílkovina M1	vir chřipky	42

Tabulka III
Přehled využití kovalentní chromatografie pro imobilizaci ligandů pro afinitní chromatografii

Použitý ligand	Purifikovaná bílkovina	Lit.
Cytochrom c	cytochrom c oxidasa	43,44
3-(2-Pyridyldithio)propionylcalmodulin	cNMP fosfodiesterasa	45
Monoklonální protilátka anti β -galaktosidasa (Fab fragment)	β -galaktosidasa	15
Redukovaný glutathion	glutathion-S-transferasa	46

(20–50 mM) v Tris – HCl, fosfátovém nebo acetátovém pufru pH 7–8. Touto metodou lze separovat i strukturně podobné bílkoviny.

4.3. Regenerace sorbentu

Před opakovaným použitím je nutné sorbent, který je po eluci v thiolové formě, regenerovat. Sorbenty pro thiol-disulfidickou výměnnou reakci se aktivují reakcí s 2,2'-dipyridyldisulfidem. Stupeň substituce sorbentu určuje koncentraci tohoto činidla. Regenerace sorbentů pro reakci disulfidoxidových skupin se provádí opakovanou oxidací thiolových skupin.

5. Využití kovalentní chromatografie

5.1. Izolace bílkovin a peptidů

Kovalentní chromatografie našla uplatnění především při separaci bílkovin a peptidů obsahující SH skupiny. Pokud

daná bílkovina SH skupinu neobsahuje, lze ji do její struktury cíleně vnést reakcí např. s N-sukcinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionátem. V tabulce II je uveden přehled bílkovin a peptidů, pro jejichž izolaci byla použita metoda kovalentní chromatografie.

5.2. Imobilizace ligandů pro afinitní chromatografii

Sorbenty pro kovalentní chromatografii byly rovněž využity pro imobilizaci ligandů pro afinitní chromatografii; jedná se přitom o orientovanou imobilizaci. Uvedený ligand musí samozřejmě obsahovat volnou SH skupinu pro vazbu na sorbent, příslušná SH skupina se však nesmí podílet na interakci ligandu s cílovou biomakromolekulou. Další výhodou této metody imobilizace je její reverzibilní charakter. Po regeneraci a opakované aktivaci lze sorbent využít i v jiných aplikacích. Některé příklady imobilizace za použití kovalentní chromatografie jsou uvedeny v tabulce III.

5.3. Ostatní aplikace

Enzymové imunostanovení. Yamamota a spol.^{47,48} použili kovalentní chromatografii pro zvýšení citlivosti enzymového imunostanovení protilátek Ab^x v krevním séru. Ke vzorku séra je přidán příslušný antigen značený β-galaktosidasou Ag^{*}. Po inkubaci je vzorek nanášen na kolonku s protilátkou Ab proti IgG, imobilizovanou prostřednictvím thiol-disulfidické výměnné reakce. Tato protilátka váže binární komplex protilátka–antigen značený enzymem Ab^x–Ag^{*}, čímž dochází k jeho zakoncentrování. Po vymytí balastních bílkovin a nenávaného antigenu, je vzniklý ternární komplex Ab–Ab^x–Ag^{*} uvolněn pomocí dithiothreitolu. Na základě změřených enzymové aktivity eluátu je tak možné stanovit koncentraci původní protilátky Ab^x.

Obdobným způsobem je rovněž možné stanovit koncentraci antigenů Ag^x, přičemž do vzorku séra je přidáván jak značený antigen Ag^{*}, tak i odpovídající protilátka Ab^x. Vlastní stanovení je přitom založeno na kompetitivní reakci protilátka–značený antigen Ab^x–Ag^{*} versus protilátka–neznačený antigen Ab^x–Ag.

Extrakce na pevné fázi. Kabzinski a spol.⁴⁹⁻⁵² využili kovalentní chromatografii pro extrakci a kvantifikaci metallothionenů z nejrůznějších vzorků biologického materiálu. Tyto bílkoviny se podílejí na příjmu, transportu, uchování esenciálních kovů (Cu, Zn,) a těžkých kovů (Cd, Hg, Pb, atd.) a na jejich případné detoxikaci. Koncentrace metallothionenů je tedy dobrým měřítkem expozice organismu působení těžkých kovů jak v životním prostředí, tak i v průmyslu.

Imobilizace enzymů. Kabzinski⁵³ použil sorbent pro kovalentní chromatografii pro imobilizaci enzymů za účelem konstrukce enzymové elektrody na stanovení ureasy.

6. Závěr

Kovalentní chromatografie by se měla stát neodmyslitelnou metodou pro separaci bílkovin a jiných makromolekul. Cílem tohoto sdělení je tuto nepříliš známou a používanou metodu přiblížit širší odborné veřejnosti, poukázat na její výhody a nevýhody a napomoci tak jejímu většímu rozvoji. Obdobné sdělení v češtině nebylo dosud publikováno.

LITERATURA

- Friedman M.: *The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Group in Amino Acids, Peptides and Proteins*. Academic Press, London 1992.
- Eldjarn L., Jellum E.: *Acta Chem. Scand.* 17, 2610 (1963).
- Schechter Y., Rubinstein M., Patchornik A.: *Biochemistry* 16, 1424 (1977).
- Brocklehurst K., Carlsson J., Kierstan M. P. J., Crook E. M.: *Biochem. J.* 133, 573 (1973)
- Carlsson J., Batista-Viera F.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 14, 114 (1991)
- Batista-Viera F., Manta C., Carlsson J.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 44, 1 (1994).
- Podhradský D., Antalík M., Šturdík E.: *J. Chromatogr.* 455, 344 (1988).
- Ellman G. L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70 (1959)
- Schmidt U., Pfeleiderer G., Bartkowiak F.: *Anal. Biochem.* 138, 217 (1984).
- Bours J., Ahrend M. H. J.: *Anal. Biochem.* 190, 244 (1990).
- Kuwata K.; Uebori M.; Yamada K.; Yamazaki Y.: *Anal. Chem.* 54, 1082 (1982).
- Nozal M. J., Bernal J. L., Toribio L., Marinero P., Moral O., Manzanos L., Rodriguez E.: *J. Chromatogr.* 778, 347 (1997).
- Rusell J., Rabenstein D. L.: *Anal. Biochem.* 242, 136 (1996).
- Axén R., Drevin H., Carlsson J.: *Acta Chem. Scand. Ser. B* 29, 471 (1975).
- Jayabaskaran Ch., Davison P. F., Paulus H.: *Prep. Biochem.* 17, 121 (1987).
- Hillson D. A.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 4, 101 (1981).
- Norris R., Brocklehurst K.: *Biochem. J.* 159, 245 (1976).
- Carlsson J., Olsson I., Axén R., Drevin H.: *Acta Chem. Scand. Ser. B* 30, 180 (1986)
- Sykes B.C.: *FEBS Lett.* 15, 180 (1976).
- Carlsson J., Svenson A.: *FEBS Lett.* 42, 183 (1974).
- Millot M. C., Sebille B.: *J. Chromatogr.* 408, 263 (1987).
- Paul J., Malthouse J. P., Brocklehurst K.: *Biochem. J.* 159, 221 (1976).
- Brocklehurst K., Baines B. S., Malthouse J. P.: *Biochem. J.* 197, 739 (1981).
- Baines B. S., Brocklehurst K., Carey P. R., Jarvis M., Salih E., Storey A. C.: *Biochem. J.* 233, 119 (1986).
- Thomas M. P., Verma C. Boyd S. M., Brocklehurst K.: *Biochem. J.* 306, 39 (1995).
- Kahlenberg A., Walker C.: *Anal. Biochem.* 74, 337 (1976).
- Squibb K. S., Cousins R. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 806 (1977).
- Oster O., Buchlow G.: *Z. Naturforsch.* 32, 12 (1977).
- Lindeberg G., Tengborn J., Bennich H., Rangarsson U.: *J. Chromatogr.* 156, 366 (1978).
- Hillson D. A., Freedman R. B.: *Biochem. Soc. Trans.* 7, 573 (1979).
- Hillson D. A., Freedman R. B.: *Biochem. J.* 191, 373 (1980).
- Kitson T. M.: *J. Chromatogr.* 234, 181 (1982).
- Sliwowski M. X., Sliwowski M. B., Horton H. R., Swaisgood H. E.: *Biochem. J.* 209, 731 (1983).
- Janolino V. G., Swaisgood H. E.: *J. Dairy Sci.* 73, 308 (1990).
- Idziorek T., Sablonniere B., Formstecher P., Dumur V., Dautrevaux M.: *J. Steroid Biochem.* 23, 593 (1985).
- Willenbrock F., Brocklehurst K.: *Biochem. J.* 227, 511 (1985).
- Holmquist L.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 14, 323 (1987).
- Boccu E., Gainferrara T., Gardossi L., Veronese F. M.: *Farmaco* 45, 203 (1990).
- Orford C. D., Adlard M. W., Perry D.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 50, 523 (1991).
- Bradshaw T. P., Dunlap R. B.: *Biochim. Biophys. Acta* 1163, 165 (1993).
- Bradshaw T. P., Dunlap R. B.: *Biochemistry* 32, 12774 (1993).

42. Fedorova N. V., Ksenofontov A. L., Viryasov M. B., Baratova L. A., Tomofeeva T. A., Zhirnov O. P.: *J. Chromatogr. B* 706, 83, (1998).
43. Bill K., Casey R. P., Broger C., Azzi A.: *FEBS Lett.* 120, 248 (1980).
44. Bill K., Azzi A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 1203 (1982).
45. Kincaid R. L., Vaughan M.: *Biochemistry* 22, 826 (1983)
46. Glatz Z., Psoťová J., Janiczek O., Chroust K., Jowett T.: *J. Chromatogr. B* 688, 239 (1997).
47. Yamamoto R., Umeda Y., Kosaka A., Kato K.: *J. Biochem. (Tokyo)* 89, 223 (1981).
48. Yamamoto R., Hattori S., Inukai T., Matsuura A., Yamashita K., Kosaka A., Kato K.: *Clin. Chem.* 27, 1721 (1981).
49. Kabzinski A. K. M., Takagi T.: *Biomed. Chromatogr.* 9, 123 (1995).
50. Kabzinski A. K. M.: *J. Chromatogr.* 766, 121 (1997).
51. Kabzinski A. K. M.: *Biomed. Chromatogr.* 12, 281 (1998).
52. Kabzinski A. K. M.: *Talanta* 46, 335 (1998).
53. Kabzinski A. K. M.: *Chromatographia* 43, 513 (1996).

Z. Glatz (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Covalent Chromatography**

Covalent chromatography is an important, highly specific separation technique. In covalent chromatography, proteins and other ligands bearing accessible thiol groups form a mixed disulfide with the gel. The proteins are thus covalently linked to the stationary phase from which they can be subsequently eluted by addition of a reducing agent. Basic principles of the method are given together with the methods for the synthesis of gels. In addition, the paper describes several special applications of covalent chromatography.

Vedoucí oddělení výzkumu a vývoje
ve farmaceutické firmě v americkém vlastnictví přijme:

asistentu/asistentku

pro vědeckou mezinárodní komunikaci a řešerše v oblastech chemie a farmakologie.
Dobrá znalost psané a mluvené angličtiny a počítačů nutná. Znalost němčiny vítána.

Písemné nabídky:

*Interpharma Praha, a.s.,
Komořanská 955, 143 10 Praha 12*