



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Jovita Matukaitytė

**BROMELAINO GRYNINIMAS IŠ ANANASO SULČIŲ NAUDOJANT
MATICINIUS LIGANDUS IR JONŲ MAINŲ CHROMATOGRAFIJĄ**

**BROMELAIN ISOLATION FROM PINEAPPLE JUICE USING MATRIX
LIGANDS AND BY ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY**

Baigiamasis bakalauro darbas

Bioinžinerijos studijų programa

Vadovas: dr. D. Matulis

Vilnius, 2006

Vilniaus Gedimino technikos universitetas

Fundamentinių mokslų fakultetas

Chemijos ir Bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN

Egz. Sk.: 3

Data 2006 06 17

Bioinžinerijos studijų programos baigiamasis bakalauro darbas

Pavadinimas: **Bromelaino gryninimas iš ananaso sulčių naudojant matricinius ligandus ir jonų mainų chromatografiją.**

Autorius: **Jovita Matukaitytė**

Vadovas: **dr.D. Matulis**

Kalba

.

lietuvių

anglų

Anotacija:

Baltymai gryninami įvairiais metodais. Plačiai naudojamas išsūdyimo metodas amonio sulfatu, tačiau jo reikia pridėti labai didelį kiekį į tirpalą. Naujoviškų, efektyvesnių baltymų gryninimo metodų kūrimas yra svarbus biotechnologijos uždavinys.

Darbe buvo lyginami du bromelaino gryninimo metodai: įprastinis chromatografinis jonų mainų ir naujoviškas naudojant sulfonatinius dažus. Jonų mainų chromatografija gautas baltymas buvo nežymiai grynesnis. Tačiau nusodinimo sulfonatiniais dažais metodas yra efektyvesnis, naudotinas, kai reikia gauti didelį baltymo kiekį, greitesnis, reikia dažo mažo kiekio.

Darbo metu nustatyti bromelaino bendras ir specifinis aktyvumai, bei aktyvumo išėiga gauta abiem gryninimo metodais.

Darbą sudaro 6 skyriai, 13 paveikslėlių, 4 lentelės. Literatūros sąrašė – 21 šaltinis.

Reikšminiai žodžiai:

Bromelainas, baltymų gryninimas, jonų mainų chromatografija, MCC ligandai.

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN	ISSN
No. of copies: 3	
Date	2006 06 17

Graduation paper for Bachelor's degree

Title: **Bromelain isolation from pineapple juice using matrix ligands and by ion exchange chromatography.**

Author: **Jovita Matukaitytė** Chief: **dr. D. Matulis**

Language

<input type="checkbox"/>	Lithuanian
<input type="checkbox"/>	English

Annotation:

Proteins are being isolated by various methods. Salting out with ammonium sulfate is a widely used method, however, a large amount is needed to be added to the protein solution. Design of novel and more efficient purification methods is an important task in biotechnology.

Two methods of bromelain isolation, namely, conventional ion exchange chromatography and coprecipitation using matrix dyes were compared in my work. A slightly purer protein was obtained by ion exchange chromatography. However, dye coprecipitation method is simpler, faster, especially useful when there is a need to obtain a large amount of protein, consumes a small amount of dye.

Total and specific activities, yield of bromelain were determined for both purification methods.

The content of the manuscript: 6 sections, 13 pictures, 4 tables and 21 information sources.

Keywords:

Bromelain, ion exchange chromatography, protein isolation, MCC ligands.

SUTRUMPINIMAI

JR – Jurgos raudonasis (Jurga's red)

LRO – Little Rock oranžinis

KR – Kari raudonasis

BIS – Bis (N,N' – metil – bis akrilamidas)

APS – Amonio persulfatas

TEMED – N,N,N,N' – Tetrametiletilendiaminas

MCC – Matriciniai nusodinimo ligandai

y_{ligando} - skaičius ligando molekulių pridėtų pagal molį baltymo

BAAE - N^α- benzoil – L – arginino etilo esteris

BAA - N^α- benzoil – L – arginino amidas

E – 64 - L-3-karboksi – 2,3 trans – epoksiopropionilleucilamido (4-guanidino) butanas

DW – Sausas svoris

MW – Molekulinis svoris

TURINYS

1. ĮVADAS.....	6
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	8
2.1. Cisteino proteazės.....	8
2.1.1. Cisteino proteazės: paplitimas ir struktūra.....	8
2.1.1.1. Virusinės cisteino proteazės.....	8
2.1.1.2. Bakterijos.....	8
2.1.1.3. Grybai.....	9
2.1.1.4. Pirmuonys ir kirmėlės.....	9
2.1.1.5. Augalų cisteino proteazės.....	10
2.1.1.6. Bromelaino fermentai.....	11
2.1.1.7. Žinduolių ir žmonių.....	12
2.2. Jonų mainų chromatografija.....	12
2.2.1. Jonitai	14
2.2.2. Gradiento generatorius.....	15
2.2.3. pH pasirinkimas	15
2.2.4. Jonų mainų chromatografijos startavimas	16
2.3. Matriciniai ligandai ir jų reikšmė apsaugant baltymus nuo rūgštinio streso.....	17
3. EKSPERIMENTINĖ DALIS.....	20
3.1. Medžiagos ir prietaisai.....	20
3.1.1. Medžiagos.....	20
3.1.2. Prietaisai.....	21
3.2. Tyrimo metodai.....	21
3.2.1. Bromelaino išskyrimas iš ananaso vaisiaus su matriciniais ligandais.....	21
3.2.2. Spektrofotometrinis baltymo koncentracijos matavimas.....	22
3.2.3. Spektrofotometrinis dažo koncentracijos matavimas.....	22
3.2.4. Bromelaino koncentracijos nustatymas pagal tirozino kiekį.....	22
3.2.5. Proteazių aktyvumo matavimas.....	23
3.2.5.1. Bendras aktyvumas. Kunitz'o metodas bromelaino aktyvumo nustatymui.....	23
3.2.5.2. Specifinis aktyvumas.....	23
3.2.5.3. Bromelaino aktyvumo vienetų skaičius sultyse	24
3.2.6. Proteazių charakterizavimo elektroforetinis metodas.....	25
3.2.6.1. Natyvi elektroforezė.....	25
3.2.7. Chromatografinis gryninimas.....	26
3.2.7.1. Jonų mainų chromatografija.....	26
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	27
4.1. Darbo apžvalga.....	27
4.2. MCC ligandų ekstinkcijos koeficientų nustatymas.....	27
4.3. Pirktinio bromelaino aktyvumo priklausomybė nuo pridėto dažo kiekio supernatante ir nuosėdose.....	29
4.4. Bromelaino gryninimas iš ananaso sulčių naudojant MCC ligandus.....	30
4.4.1. Bromelaino, nusodinto su trimis skirtingais MCC ligandais, aktyvumo palyginimas....	31
4.4.2. Bromelaino procentinis kiekis bromelaino – dažo komplekso nuosėdose.....	31

4.5. Pirktinio bromelaino gryninimas jonų mainų chromatografija.....	32
4.5.1. Bromelaino koncentracijos nustatymas pagal tirozino kiekį.....	34
4.5.2. Bromelaino aktyvumo vienetų skaičiaus palyginimas gryninant chromatografiškai ir su dažais.....	35
5. IŠVADOS.....	37
Už pagalbą darbe dėkoju:.....	38
6. LITERATŪROS ŠARŠAS.....	39

1. ĮVADAS

Vienas iš klasikinių metodų baltymų biochemijoje yra išsūdyimas naudojant amonio sulfatą. Jis plačiai naudojamas baltymų atskyrimui, tačiau nelabai geras atskyrimo metodas, kadangi retai gaunamas grynas baltymas.

Išsūdyimo metodas vadinamas išstūmimo metodu, kadangi tirpalo savybės pakeičiamos darant netinkamomis baltymo ištirpinimui, t.y. baltymas išstumiamas iš tirpalo. Jeigu baltymas yra labai mažos koncentracijos dideliame tirpalo tūryje, išstūmimo metodas yra neekonomiškas, kadangi reikalingas nuosėdų kiekis yra proporcingas bendram tirpalo tūriui ir dažnai priešingai proporcingas baltymo koncentracijai. Kitas metodas yra traukos metodas, kuriame baltymo savybės pakeičiamos, kai jis būna tirpale. Traukos metodo pavyzdys yra dažų nusodinimas arba jis vadinamas matricos nusodinimu. Baltymai laikosi tirpale dėl jų paviršiuje išsidėsčiusių įkraudų hidrofilinių grupių. Žemame pH jos būna teigiamos, o dideliame pH neigiamos. Dažai yra tipiškos stiprių rūgščių ar bazių druskos su prikabinomomis aromatinėmis grupėmis, turinčiomis pratęstus susijungimus, kurie suteikia spalvą. Jeigu dažas turi neigiamai įkraudą sulfonatinę grupę, tai jo pridedama teigiamai įkraudam baltymui, tada susiformuoja joniniai ryšiai tarp dažo ir baltymo. Didžiulės hidrofobinės grupės prikabinamos prie baltymo teigiamų vietų ir baltymas nusodinamas tirpale. Privalumas šito metodo yra toks, kad reikalingas dažo kiekis proporcingas baltymo moliui, bet ne tirpalo tūriui, taigi jis ypatingai tinkamas išgavimui baltymų iš atskiesto tirpalo.

Po nusodinimo būtina atskirti baltymą nuo dažo komplekso. Tai gali būti atlikta arba jonų mainų chromatografija arba trijų fazių atskyrimu (TPP). TPP didelės druskų koncentracijos nutraukia joninius ryšius ir išlaisvintas dažas ekstrahuojamas į tert-butanolio sluoksnį [1].

Azosulfonatiniai ligandai žinomi kaip matriciniai nusodinimo ligandai (Matrix Coprecipitating and CocrySTALLizing Ligands, MCC ligandai) yra naudingi agentai baltymų atskyrimui juos nusodinant. MCC ligandai rišasi su norimais baltymais ir suformuoja baltymo – ligando komplekso nuosėdas. Tam tikros struktūros ligandai apsaugo baltymus nuo denatūracijos, tokios kaip aukšta temperatūra ar stipri rūgštis. Baltymo apsaugojimas suteikia privalumų, esant denatūracijos sąlygoms

per atskyrimą. Per pirmą atskyrimo žingsnį labai gryni baltymai išgaunami ir tai yra parodyta su bromelaino proteaze ir keletu lektinų [2].

Šitie ligandai yra naudojami atskyrimui norimo baltymo iš neapdirbtų šaltinių (augalas ar gyvūnas). MCC ligandai tvirtai rišasi ir nusodina tikslius baltymus iš tirpalo, esant dideliai koncentracijai nepageidaujamų baltymų ir angliavandenių [2].

Seniai žinoma, kad natūraliai pasitaikančios substrato molekulės, kofaktoriai ir kiti bioaktyvūs junginiai yra geri fermentų gynėjai. Taigi sintetiniai azosulfatinio dažo anijonai suteikia žymią apsaugą fermentams nuo inaktyvacijos rūgštimi [3]. Nusodinimo – apsaugojimo reakcijos yra pilnai grįžtamos. Ligando anijonai gali būti pašalinami su anijonitais. Pilnai aktyvus fermentas tuo būdu išlaisvinamas į tirpalą [4].

Darbo tikslai:

1. Gryninti bromelainą iš ananaso vaisiaus sulčių naudojant matricinius ligandus.
2. Išmatuoti specifinį ir bendrą aktyvumus, baltymo koncentraciją, matricinių dažų koncentraciją.
3. Gryninti bromelainą naudojant jonų mainų chromatografiją.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Cisteino proteazės

Didelė šeima peptidinius ryšius skeliančių hidrolazių (proteazės, EC 3.4), peptidazių gali būti skirstomos kaip endopeptidazės (proteinazės, EC 3.4.21 – 99) ir egzopeptidazės (EC 3.4.11 – 19), pagal vietą, kurioje jos nutraukia peptidinę grandinę. Šitie fermentai gali būti sugrupuoti toliau pagal aktyvias grupes aktyviame centre, apimančias katalizę su serinu (EC 3.4.21), cisteinu (EC 3.4.22) ir asparto endopeptidazėmis (EC 3.4.23), bei metalo endopeptidazėmis (EC 3.4.24). Cisteino karboksipeptidazės, t.y. cisteino klasės egzopeptidazės, kurios nutraukia peptidines grandines C gale, rastos EC 3.4.18 grupėje. Fermentai, kurių mechanizmai nepilnai išaiškinti, priskiriami sugrupei EC 3.4.99 [5]. Serino peptidazės plačiai ištirtos ir yra geriausiai charakterizuota subgrupė. Cisteino proteazės, kurios daugiausia minimos kaip tiolinės proteazės literatūroje, buvo rastos virusuose, bakterijose, pirmuonyse, augaluose ir žinduoliuose . Cisteino proteazės atrastos jau ir grybuose [6].

2.1.1. Cisteino proteazės: paplitimas ir struktūra

2.1.1.1. Virusinės cisteino proteazės

Tam tikri virusai, tokie kaip pikorna virusai, kurie apima raino virusus, poliomielito ir hepatito A virusus (HAV), koduoja baltymus pirmtako, kuris skelia specifiniuose taškuose peptidą [7, 8]. Šitie fermentai yra cisteino proteazės. Publikuotos rentgeno struktūros 3C proteinazės (pikornaino) HA viruso ir raino viruso patvirtina teoriją, kad tretinė struktūra ir katalitinis mechanizmas šitų fermentų yra panašus į serino proteazių veikimo mechanizmą iš chimopapaino šeimos. Virusinės 3C proteazės ir serino proteazės iš tripsino/chimopapaino šeimos turi bendrą prototipą, bet skiriasi jų evoliucija [8].

2.1.1.2. Bakterijos

Stafilakokinė cisteino proteazė (EC 3.4.22.13; MW 13000), išskirta iš *Staphylococcus aureus* kultūros filtrato, pasižymi dideliu substrato toleravimu: skelia baltymus peptidiniuose ryšiuose daugelio aminorūgščių. Fermento gebėjimas degraduoti elastiną turi pataloginį vaidmenį. Streptokokinės cisteino proteazės (streptopapainas; EC 3.4.22.10) yra retos bakterinės proteazės, kadangi formuojasi iš neaktyvių žmogėnų proteolize ir redukcija. Yra žinomos abi žmogėnų sekos (337 aminorūgštys) ir aktyvus fermentas (253 aminorūgštys). Šitos proteazės specifiskumas panašus į papaino šeimos. Identiškumas streptopaino kaip SPE B (streptokokinis pirogeninis egzotoksinas B) yra įrodytas. Klostripainas (EC 3.4.22.8), išskirtas iš *Clostridium histolyticum*, yra dimerinė peptidazė, kuri gali būti aktyvuojama kalciu. Seka trumpesnio polipeptido (MW 15398) yra nustatyta. Šitas fermentas labai specifiskas substratui. Arg – gingipainas (RGP) ir Lys – gingipainas (KGP) yra sudėtinių formų cisteino proteazės *Porphyromonas gingivalis*, lazdelė, kuri vaidina didžiausią vaidmenį patogenezėje chroninio periodentizmo. Šitos proteazės turi tripsininį aktyvumą ir veikia kaip virusinis faktorius periodonto ligose [6].

2.1.1.3. Grybai

Yra keletas pranešimų apie tiolines grupes turinčius fermentus grybuose. 1989 metais katepsinas B buvo rastas ląstelėje homogeniškoje *Aspergillus flavus*. Nuo kalcio priklausoma, prie membranos prisirišanti cisteino endopeptidazė buvo išskirta iš mielių (proteinazė yscF). 1993 metais citoplazminis fermentas buvo išskirtas iš mielių, kuris yra ekvivalentiškas žinduolių bleomicino hidrolazei (BLH). Fermentas yra cisteino aminopeptidazė ir pagal aktyvios vietos seką atitinka cisteino proteazes iš papaino šeimos. Homologo Gal6 BLH mielėse kristalinė struktūra yra žinoma. Fermentas turi heksamerinę struktūrą su iškilusiu centriniu kanalu. Panašios aktyvios vietos į papainą išsidėsčiusios vidinėje kanalo pusėje. Cisteino aminopeptidazės (PepC) iš *Streptococcus thermophilus* ir *Lactococcus lactis* taip pat yra panašios į eukariotinę BLH [9].

2.1.1.4. Pirmuonys ir kirmėlės

Nors parazitiniai pirmuonys yra labai įvairi organizmų grupė, daugelis proteinazių buvo išskirta iš jiems priklausančių cisteino proteazių. Keletas iš šitų fermentų vaidina gyvybinį vaidmenį parazito mityboje ir užkrėtime šeimininko ląstelių. Kruzipainas yra bendras pavadinimas fermento su didžiausiu proteolitiniu aktyvumu *Trypanosoma cruzi*. Žmonės juo užsikrečia per įvairius parazitinius grybus, kurie sukelia Amerikos tripanosomozę (Čagas liga). Žinomos fragmento 60kDa glikoproteino

sekos, jų specifiškumas proteolizei ir inhibicijai E – 64, parodo sąryšį su papaino šeimos proteazėmis, tai įrodyta išaiškinus fermento struktūrą. Taigi fermentas apsaugo parazitą nuo šeimininko imuninės sistemos degraduojant jo IgG. Dvidešimt trys cisteino proteazės rastos *Trichomonas vaginalis*, trichomonadinė rūšis, kuri yra patogeniška žmonėms. Jos skiriasi nuo gerai žinomų cisteino proteazių augaluose ir gyvūnuose, nes turi nepaprastai didelį molekulinį svorį (virš 96 kDa). Proteazės taip pat vaidina svarbų vaidmenį maliarijoje, viena iš reikšmingiausių infekcinių ligų žmonėse. Maliariją sukelia keturių skirtingų tipų *Plasmodium* rūšis. Proteolitinis aktyvumas vienodai pasiskirsto tarp serino, cisteino ir asparto endoproteazių. Cisteino proteazės išskirtos iš *Plasmodium* yra labai panašios į fermentus iš papaino šeimos; pirma, turi sekas, kurios išlaikomos tiksliai *Plasmodium* fermentuose, antra, yra atsakingos už specifinę globino hidrolizę. Vienas iš šitų fermentų pavadintas falcipainu [10].

2.1.1.5. Augalų cisteino proteazės

Šeima sulfidrilinių proteazių iš augalų (papainas, bromelainas, ficinas, aktinidinas, chimopapainas ir papajos proteazė omega) plačiai nagrinėjama dėl kelių priežasčių. Pirmiausiai, šitas proteazes galima išskirti ir gryninti dideliais kiekiais biofizikinių tyrimų. Antra, jų sekos labai panašios. Trečia, bendras skaičius įkraudų aminorūgščių kiekvienoje proteazėje yra panašus, bet santykis teigiamai ir neigiamai įkraudų aminorūgščių žymiai kinta pasiekiant izoelektrinius taškus tokių proteazių. Ketvirta, šitos proteazės nesusivynioja po denatūracijos karščiu ar rūgštimi, todėl jos neturi propeptido sekos, kuri yra apkarpyta per baltymo apdirbimą augaluose. Šita savybė leidžia kontroliuoti baltymo apsaugojimą matuojant fermentinį aktyvumą po rūgštinio streso sumažinimo ir ligando pašalinimo be galimos baltymo renatūracijos [11].

Plačiausiai ištirta augalų cisteino proteazė yra papainas (EC 3.4.22.2) iš *Carica papaya* žievės. Papainas yra monomerinis polipeptidas su molekulinio svoriu 23406 Da, turintis 212 aminorūgščių liekanų grandinę su trimis disulfidiniais tilteliais (Cys22-Cys63, Cys56-Cys95, Cys153-Cys200). Seka ir tretinė struktūra yra nustatyta literatūroje [12]. Rentgeno struktūrinė analizė atlikta su papaino inhibitoriaus kompleksu, inhibitoriais BPACK ir E – 64. Papainas išskirtas neaktyvioje formoje, kur aktyviame centre cisteino liekanos yra blokuojamos disulfidinio ryšio su Cys22 ir Cys63, vietoj to jis turi laisvą tiolinę grupę. Aktyvacija įmanoma pakeitus viduląstelinį disulfidą su tioliniais reagentais ar su redukuojančiais agentais. Papainas yra susiformavęs iš klasikinio zimogeno (propapainas). Kitos augalų proteazės, kurių žinomos fragmento sekos parodo sąryšį su papainu, yra chimopapainas A ir B, taip pat iš *Carica papaya*, ficinas (EC 3.4.22.3) iš *Ficus* žievės, bromelainas (EC 3.4.22.4) iš

ananaso medžio kamieno ir proteazė CC – III išskirta iš kitos *Carica* rūšies. Papainas, katepsinas B [13], virusinė 3C proteinazė, kruzainas ir bleomicino hidrolazė, paminėtos anksčiau, kaip ir aktinidinas iš kivio vaisiaus, ICE ir karikainas (papajos proteazė Ω , EC 3.4.22.30) yra cisteino proteazės, kurių žinomos pilnos aminorūgščių sekos kaip ir ketvirtinė struktūra. Nors aktinidino ir papaino sekos yra 48% identiškios, jų struktūros nepaprastai panašios. Vadinasi, baltymo skėlimo specifiskumas aktinidino yra panašus į papaino [14].

2.1.1.6. Bromelaino fermentai

Bromelaino fermentai randami augalo šeimos *Bromeliaceae* audiniuose, iš kurios ananasas, *Ananas comosus*, yra žinomiausias. Proteolitinis fermentas randamas ananaso kamiene vadinamas kamieno bromelainu, o fermentas vaisiuje pirmiausiai pavadintas bromelainu, dabar vadinamas vaisiaus bromelainu. Sistematinis numeris EC 3.4.22.4 yra duotas kamieno bromelainui ir EC 3.4.22.5 vaisiaus bromelainui.

Skirtingai nuo kamieno bromelaino pagrindinis vaisiaus fermentas yra rūgštinis baltymas. Jo izoelektrinis taškas yra prie pH 4.6, tai nustatyta izoelektrinio fokusavimo metodu. Bromelainas sudarytas iš 212 aminorūgščių sekos, tai parodyta 1 lentelėje. N - galo liekana yra alaninas su seka :

Ala – Val – Pro – Gln – Ser – Ile – Asp – Trp – Arg – Asp – Tyr – Gly – Ala

Svarbiausia C – galo liekana yra glicinas. Molekulinis svoris vaisiaus bromelaino buvo ginčo objektas: 18000 tai nustatyta Sephadex G–75 gelfiltracija ir 31000 poliakrilamido gelio elektroforeze esant SDS ir Sephadex G – 75 gelfiltacija.

1 lentelė. Bromelaino aminorūgščių seka [15].

AVPQSIDWRD	YGAVTSVKNQ	NPCGACWAFA	AIATVESIYK	IKKGILEPLS	EQQVLDCAKG
YGCKGGWEFR	AFEFIISNKG	VASGAIYPYK	AAKGTCCKTDG	VPNSAYITGY	ARVPRNNESS
MMYAVSKQPI	TVAVDANANF	QYYKSGVFNG	PCGTSLNHAV	TAIGYGQDSI	IYPKKWGAKW
GEAGYIRMAR	DVSSSSGICG	IAIDPLYPTL	EE		

Vaisiaus fermentas aktyvesnis dėl N^α- benzoil – L – arginino etilo esterio (BAAE) ir N^α- benzoil – L – arginino amido (BAA) negu kamieno bromelainas. Kiti kinetiniai parametrai pateikiami: BAA K_m = 4,0 mM ir K_{kat} = 0,033 s⁻¹ prie pH 6.0 ir 25⁰ C, o BAAE K_m = 0,043 M prie pH 6.0 ir 25⁰ C. pH optimumas kazeinui ir denatūruotam hemoglobinui yra atitinkamai pH 8.3 ir pH 8.0. Vaisiaus bromelainas katalizuoja sintezę acilaminorūgšties anilido. Fermentas yra inhibuojamas

gyvsidabrio, o aktyvumas atstatomas cisteinu ir merkaptoetanoliu. Aminorūgščių seka aplink reaguojančią cisteino liekaną (Cys) yra Asn – Glx – Asn – Pro – Cys – Gly – Ala – Cys.[16].

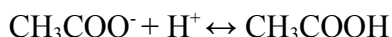
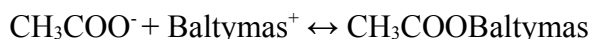
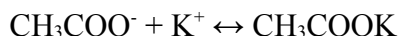
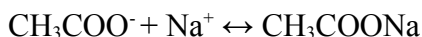
2.1.1.7. Žinduolių ir žmonių

Svarbiausios cisteino proteazės žinduoliuose yra citoplazminiai kalpainai ir lizosominiai katepsinai. Pavadinimas "katepsinas" pasiūlytas Willstätter ir Bamann 1929 metais proteazei, kuri yra aktyvi rūgštiniame pH, bet skiriasi nuo pepsino. 1941 metais Fruton sugebėjo identifikuoti mažiausiai tris katepsino fermentus, katepsiną I, II ir III.. Tallan'as 1952 metais katepsinus perklasifikavo pagrindu jų specifiškumo ir pavadino katepsinu A, B ir C. Jie buvo pasiūlyti viduląsteliniais dublikatams pepsinui, tripsinui ir chimotripsinui. 1957 metais Greenbaum ir Fruton parodė, kad katepsinas B yra cisteino proteazė. 1971 metais Otto ir bendradarbiai nustatė, kad katepsinas B turi du fermentinius aktyvumus. Katepsinas B1 yra endopeptidazė ir dabar žinoma kaip katepsinas B (EC 3.4.22.1), o katepsinas B2 yra lizosominė karboksipeptidazė B (EC 3.4.18.1). Šiuo metu terminas "katepsinas" yra naudojamas kalbant apie viduląstelines proteazes, daugiausiai lokalizuotas lizosomose, kurios yra aktyvios silpnai rūgštiniame pH. [17]. Daugelis lizosominių proteazių yra cisteino proteazės, išskyrus katepsiną G (EC 3.4.21.20) [18] ir egzopeptidazę katepsiną A [19] (EC 3.4.16.1), kurios abi yra serino proteazės, ir atitinkamai asparto proteazės katepsinai D ir E (EC 3.4.23.5). Ribosominis katepsinas R taip pat yra serino proteazė (EC 3.4.21.52) [19].

Kalpainai (EC 3.4.22.17, kalciu aktyvuojama neutrali proteinazė CANP, receptoriaus pernešimo faktorius RTF, kinazę aktyvuojantis faktorius CAF), atrasti 1964 metais, yra citoplazminės proteazės, kurios intensyviai tyrinėjamos. Pavadinimas "kalpainas" pasiūlytas 1981 metais, kalbant apie aktyvaciją šitų fermentų kalcio jonais ir panašumu į cisteino proteazes su papainu [20]. Jie pasitaiko kartu su specifiniais vidugeniniais inhibitoriais, kalpastatiniais, beveik visuose žinduolių ląstelės tipuose. Jų taip pat yra grybuose ir *Drosophila* štame, bet jų nėra augaluose. Du kalpaino tipai buvo išskirti, kurie skyrėsi kalcio kiekio reikalingumu. Kalpainui I (μ CANP) reikia mikromolinės kalcio koncentracijos (1 - 100 μ M), o kalpainui II (mCANP) aktyvuoti reikia milimoliarinės koncentracijos (0,1 – 1 mM) [21].

2.2. Jonų mainų chromatografija

Chromatografija, tai yra metodas gryninimui. Pagrindinės chromatografijos rūšys yra gelfiltracija, hidrofobinė, atvirkščių fazių, jonų mainų, afininė, normalių fazių ir chiralinė chromatografija. Jonų mainų chromatografija remiasi grįžtamaisiais mainais tarp tirpale esančios tiriamosios medžiagos jonų ir jonito jonų. Pavyzdžiui, vienas anijono tipas CH_3COO^- ir skaičius katijono tipų Na^+ , K^+ ir baltymas⁺, kartu egzistuoja vandeniniame tirpale. Šitie jonai nustato dinaminę pusiausvyrą, pavyzdžiui:



Bendra pusiausvyros sąlyga nustatoma pagal reikšmes iš atitinkamų disociacijos konstantų :

$$K_{(\text{CH}_3\text{COONa})} = \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-][\text{Na}^+]}{[\text{CH}_3\text{COONa}]}$$

$$K_{(\text{CH}_3\text{COOK})} = \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-][\text{K}^+]}{[\text{CH}_3\text{COOK}]}$$

$$K_{(\text{CH}_3\text{COOBaltymas})} = \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-][\text{Baltymas}^+]}{[\text{CH}_3\text{COOBaltymas}]}$$

$$K_{(\text{CH}_3\text{COOH})} = \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-][\text{H}^+]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$

Bendra pusiausvyros būseną yra padarinys :

- būdingo giminingumo tarp jonų (išreikšta disociacijos konstantomis),
- konkurencijos tarp jonų (funkcija santykinų koncentracijų jonų).

Vystyti chromatografijos sistemą galima kovalentiškai prijungiant stacionarią fazę ir leidžiant judėti disocijuotiems katijonams su mobiliąja faze; bendras elektrinis neutralumas išlaikomas. Su imobilizuotu anijonu taip bus sudaryta katijono mainų sistema. Atvirkščiai, imobilizacija katijono sudarys anijono mainų sistemą.

Jeigu abu jonai taikomi chromatografiniai sistemai kaip mėginio “kamštis“, tai sistema paskui išplaunama su buferiu, skiriamasis giminingumas jonų pastoviam anijonui yra akivaizdus, esant skirtingiems migracijos greičiams per koloną. Jonai migruoja santykiniais greičiais proporcingais jų atitinkamoms disociacijos konstantoms. Jų giminingumas ir absoliutūs migracijos greičiai priklauso nuo konkurencijos, kai jie susitinka katijoną iš buferio. Didėjant katijono koncentracijai, mėginio katijonai susiduria su konkurencijos didėjimu tarp jų ir imobilizuoto anijono, tada greičiau disociuoja

ir padidėja jų migracijos greičiai per koloną. Šiuo atveju baltymų disociacijos konstanta yra veikiamą pH, taigi išplovimas gali būti atliekamas keičiant pH .

2.2.1. Jonitai

Terminas „derva“ atėjo iš anksčiau polistireno pagrindu jonito, kuris turėjo permatomą geltoną išvaizdą panašią į sakus. Modernūs jonitai, naudojami baltymų gryninimui, dažniausiai yra nepermatomi ir balti.

Visos jonų mainų dervos sudarytos iš matricos, kurioje yra prikabintos pavaduojančios grupės. Mažo slėgio baltymų chromatografijoje dažniausiai matrica sudaryta iš hidrofiliųjų biopolimerų, tokių kaip celiuliozė, Sephadex™ ar agarozė. Šitos medžiagos negali priešintis aukštam slėgiui ir nuo vidutinės iki didelio slėgio skysčių chromatografijai, nukrypti link silikos pagrindu dervų ar sintetinių kaip Trisakrilas™.

Celiuliozė yra polimeras iš β -D-gliukozės vienetų sujungtų 1→4 ryšiais. Palyginti nebrangus ir suteikiantis geras tekėjimo savybes, tačiau dideli tarpai duoda prastą atskyrimą. Sephadex sudarytas iš dekstrano grandinių, susidedančių iš 1→6 sujungtų gliukozės liekanų, kryžmiškai susijungęs su epichloridinu. Pavadinimas „Sephadex“ yra priešingas žodžiui „atskyrimas“, „Farmacija“ ir „dekstranas“. Jis yra parduodamas sauso kserogelio formoje, kuris absorbuoja vandenį ir išbrinksta hidratuotose sferinėse dalelėse. Sephadex jonitas duoda gerą atskyrimą, bet jo tūris kinta, keičiantis joninei jėgai buferyje. Tai yra privalumas, kadangi sunku taikyti tikslų druskos gradientą sumažėjančiam geliui ir tai tampa privalumu perpakuojant koloną po keletos bandymų.

Agarozė yra neutralus agaro polisacharido komponentas išgautas iš rudadumblio, tai yra jūros dumblio tipas. Jis yra linijinis polisacharidas sudarytas iš kintamų liekanų D-galaktozės ir 3,6-nevandeninės - L- galaktozės, susijungęs β 1→4 ir α 1 →3 ryšiais.

Agarozė lengvai tirpsta vandenyje, esant 100°C temperatūrai, o sustingusi tampa ypač stipri, taigi vadinama makrotinkliniu geliu su didelėmis poromis.

Sephadeksas yra pavyzdys mikrotinklinio gelio. Makrotinkliniame gelyje, pavyzdžiui agarozė, gelio skaidulos jungiasi į pluoštus susidarant stipresniam geliui ir didesniam poroms dydžiui duotoje gelio koncentracijoje.

Makrotinklinė agarozės struktūra daro ją labai tinkamą kaip matricą jonų mainams, kad baltymas lengvai patektų į gelio vidų, taigi toks efektas gelyje turi didelį paviršiaus plotą, kur joninės pavaduojančios grupės prijungiamos. Makrotinklinė struktūra taip pat yra mechaniškai stipri, taigi pavaduojančios agarozės jonitai nesumažėja ar nepadidėja, esant pasikeitimams buferio joninės jėgos.

Agarozės gelio struktūra palaikoma nekovalentinių ryšių, todėl agarozės geliai negali būti sudžiovinami ir atkuriami. Dėl tos priežasties jie pateikiami suspensijos pavidale. Jie taip pat negali būti virinami ir autoklavuojami, kadangi nesunkiai tirpsta zolyje didelėje temperatūroje.

Bendra silpna bazinė anijonito grupė yra –DEAE- (dietilaminoetil-) ir kolonos silpna rūgštinė katijonito grupė yra CM- (karboksimetil-). pH sritis yra nuo 2 iki 10 virš kurios šitos grupės yra jonizuotos.

Jonitai susidedantys iš silpnos rūgšties ar silpnos bazės grupių pakaitalų nėra pilnai jonizuoti daugelyje pH reikšmių. Tai galbūt yra didesnis jonizacijos laipsnio pasikeitimo trūkumas naudingoje pH srityje. Jonitai pagrįsti stipriomis rūgštimis ar bazėmis, priešingai, yra pilnai jonizuoti didesnėse pH srityje (2 – 12), taigi jų laipsnis jonizacijos yra mažiau priklausomas nuo pasikeitimų pH.

2.2.2. Gradiento generatorius

Jonų mainų chromatografija dažnai reikalauja išplovimo surištų baltymų keičiant joninę jėgą ar pH. Jeigu komponentų atskyrimo sistema yra gerai žinoma, tada būdingi pasikeitimo žingsniai padaromi. Pavyzdys yra jonų mainų atskyrimas aminorūgščių aminorūgščių analizatoriuje. Nežinant baltymų tikslų komponentų atskyrimo būtina naudoti gradiento generatorių paveikiant joninę jėgą ar pH gradientu.

Gradientai dažniausiai gaminami vienu ar dviem keliais. Naudojamas dviejų ertmių prietaisas su magnetine maišykle, kuri maišo vieną ertmę.

Pradžios tirpalas patalpinamas dešinės rankos inde, o pabaigos tirpalas kairės rankos inde. Tarp indų įtaisomas sifonas siurbimui tirpalo į viršų.

Tobulesnis, bet brangesnis metodas gaminanti gradientą naudoti mikroprocesoriumi kontroliuojamą proporcingą vožtuvą, kuris ištraukia skystį pakaitomis iš vieno indo į kitą mažais kiekiais, kurie tolygiai keičiasi proporcingai su laiku. Mišinys yra patalpinamas tiesėje, pasroviui proporcingo vožtuvo, keičiant mažais žingsniais buferio sudėtį, laipsniškai ir nepertraukiamai. Gradiento generatoriai, kurie pagrįsti proporcingais vožtuvais, yra bendri komponentai užbaigtos chromatografinės sistemos.

2.2.3. pH pasirinkimas

Prieš pradėdant jonų mainų chromatografiją reikia žinoti kokį pH naudoti. pH ir jonito tipo pasirinkimas naudojimui nustatomas iš taip vadinamos titravimo kreivės baltymų mišinio atskyrimui.

Elektroforetinė titravimo kreivė gali būti nustatyta nustatant pH gradientą gelyje ir praleistą elektroforezinį atskyrimą dešiniu kampu link pH gradiento.

2.2.4. Jonų mainų chromatografijos startavimas

Parinkimas jonito tipo, katijonito ar anijonito, galbūt pasirenkamas, nežinant baltymo savybių, pavyzdžiui, jo pI ir/arba jo pH stabilumo srities. Pirmas priartėjimas, geriausiai yra pasirinkti pH su baltymo stabilumo sritimi, kur jį absorbuos jonitai. Dažnai tai reiškia, kad anijonitai privalo būti naudojami prie pH reikšmės virš pI baltymo, tačiau, tas pI nurodo bendrą savybę baltymo, o tuo tarpu jonito rišimasis yra funkcija krūvio ant baltymo paviršiaus. Taigi yra įmanoma turėti baltymą surištą su anijonitu prie pH žemesnio negu jo pI arba su katijonitu prie pH virš jo pI. Tai tapo esminiu dalyku eksperimentiškai tyrinėjant naujo nežinomo baltymo funkcionavimą.

Pasirinkus sorbentą ir pakrovus koloną būtina nupusiusvyrinti koloną su keletu kolonos tūrių pradinio buferio. Buferis yra mažos joninės jėgos ir pH, kuris padeda susirišti baltymams su sorbento dalelėmis. Baltymo mišinys turi turėti mažą druskų koncentraciją, pasiekiamą pusiausvyrinant jį su pradiniu buferiu, arba dialize, ultrafiltracija, molekuline išskyrimo chromatografija arba.

Mėginio tirpalas perleidžiamas per koloną ir praplaunamas su mažiausiai 2 tūriais pradinio buferio, kad išplautų nesurištą frakciją. Išplovimas su pradiniu buferiu sustabdomas vieną kartą, kai saviraštyje piko linija nusileidžia iki bazinės linijos. Šitame taške buferio gradientas panaudojamas. Gradientas padidinantis joninę jėgą yra geriausias pasirinkimas ir taikomas abiems katijonitui ir anijonitui.

Išsiskyrimas pikų yra funkcija panaudojant išplovimo gradientą. Lėkštas gradientas duoda geresnį atskyrimą, bet užtrunka ilgesnį laiką. Su nežinomo baltymo sistema geriausias pirmas būdas naudoti lėkštą gradientą, kai tai duoda greitą įvertinimą skaičiaus lauktų pikų ir atskyrimas gali būti nuosekliai optimizuotas. Tinkamas lėkštas gradientas pirmam priartėjimui yra 0→1M NaCl pradiniame buferyje trims tūriams. Nuoseklus optimizavimas gradiento apribojimų arba skaičius tūrių gali būti pakeistas keičiant gradiento nuolydį.

Po pritaikymo gradiento yra būtina išplauti su mažiausiai vienu tūriu pabaigos buferio garantuojant, kad visas gradientas išsiplautų ir, kad visi pikai, kurie buvo išplauti gradiento yra plaunami iš kolonos.

S – Sepharose yra katijonitas. Jeigu anijonitas buvo naudotas, išplovimas su joninės jėgos gradientu gali veikti tiksliai tokiu pačiu keliu. Skirtinga strategija yra būtina katijonitui ir anijonitui,

jeigu pH gradientas yra naudojamas išplauti surištus baltymus. Katijonito atžvilgiu reikalingas didėjantis pH gradientas, tuo tarpu anijonitui reikalingas mažėjantis pH. gradientas

Užbaigiant chromatografijos paleidimą arba su katijonitais, arba su anijonitais, tvirtai surišti mėginio komponentai išplaunami su didele druskų koncentracija, tokia kaip 1M NaCl. Katijonitų atveju didelė koncentracija gali būti suderinta su dideliu pH, o su anijonitais didelės druskos koncentracijos gali būti suderintos su mažu pH. Kraštutinės pH reikšmės naudojamos žinant stabilumo apribojimus viduje jonitų. Po visko kolona nupusiausvyrinama su keletu tūrių pradinio buferio ir paruošiama sekančiam paleidimui.

Jonų mainų chromatografija tokiu būdu reikalauja cikliškumo per didelius pasikeitimus joninės jėgos ir galbūt taip pat pH. Didžiausias sorbento privalumas yra atlaikyti reikalingą joninę jėgą ir pH pasikeitimus, be sumažėjimo ar padidėjimo, kad jį būtų įmanoma naudoti ilgą laiką tarpą keičiant buferio sudėtį ir neturint perpakuojančios kolonos [1].

2.3. Matriciniai ligandai ir jų reikšmė apsaugant baltymus nuo rūgštinio streso

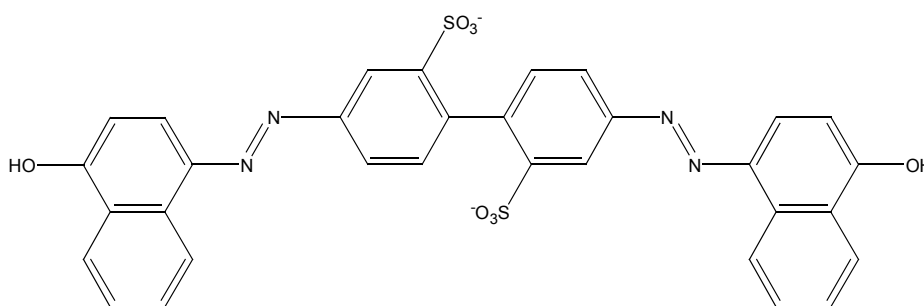
MCC ligandai (1 pav.) yra nusodinimo agentai atskiriami baltymų iš atskiestos žaliavos. Ligandai turi stiprią anijono sulfonatinę galvą, kuri inicijuoja susirišimą su teigiamai įkrautais baltymais. Pirminis tvirtas baltymo konformacijos susirišimas pradeda išstūmimą vandens iš konformačiškai judančių baltymų. Uodegos yra hidrofobinės organinės azoaromatinės grupės, kurios sąveikauja ir kartu sudaro baltymo ligando kompleksus. Baltymų nuosėdos yra kaip svečiai ligando šeimininko matricoje. Ligando uodegos pakeičia vandenį dėl jų tūrio ir mažesnės vidutinės dielektrinės konstantos, artimos įkrautoms grupėms, kurios stiprina elektrostatiškus junginių susirišimą. MCC ligandai apsaugo baltymus valant juos iš atskiestos žaliavos ir tankių nuosėdų. Detergento jonai mažose koncentracijose (10^{-4} – 10^{-5} M) taip pat kartais tarnauja kaip nusodinimo agentai, įpainiodami savo uodegas. Dvivalenčiai metalo jonai (pavyzdžiui, Zn^{++}) kartais yra naudingi pagalbiniai agentai. Paruošiamasis valymas nuo žaliavos yra parodytas pradedant nuo 100 – 200 g žalių žemės riešutų ir žalių ananasų, nusodinant lektiną ir bromelaino fermentą atitinkamai per 1 – 2 h su 80 – 90 % aktyvumo išeiga. Ligandai išlaisvinami nuo nuosėdų keičiant pH ir pagaunant ligandus su jonitais. Baltymo konformacijos suspaudimas tirpale matomas iš klampumo nustatymo [11].

Apsauga fermentų nuo rūgštinių, temperatūrinių ir cheminių inaktyvatorių yra svarbus uždavinys biotechnologijoje. Surišimo ligandai apsaugo baltymus tirpale. Dažniausiai baltymo nusodinimas rūgštiniame tirpale yra palyginamas su baltymo denatūracija. Buvo įrodyta, kad MCC

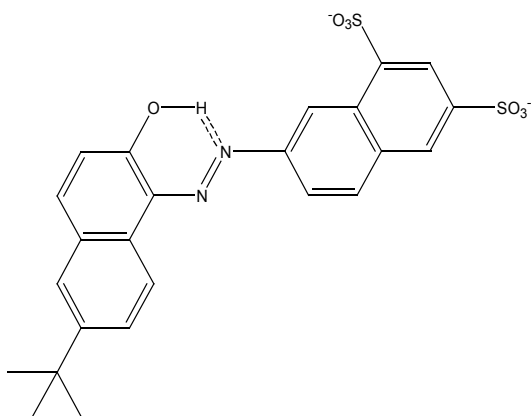
ligandai nusodina ir apsaugo baltymus. Pavyzdžiui, ligando ginamas bromelainas buvo inkubuojamas 1 M HCl vieną valandą ir 60 % aktyvumas po to buvo atgautas.

Fermentiniai aktyvumai išlaikomi po laikymo fermento rūgštyje su apsauginiais ligandais, palyginant jų aktyvumus, kur apsauginiai ligandai buvo praleisti (arba įdėti pabaigoje rūgštinio streso). Jeigu buvimas sulfonatinio ligando per rūgštinį stresą išlaiko fermentinį aktyvumą, ligandas buvo vertinamas esant ginamasis. Ligandai fermentui suteikia priešinamąsi rūgščiai nustatant apsaugojimo indeksą P. Keletas ligandų galėjo pilnai apsaugoti nuo žymaus rūgštinio streso išlaikant 100% pradinį fermentinį aktyvumą.

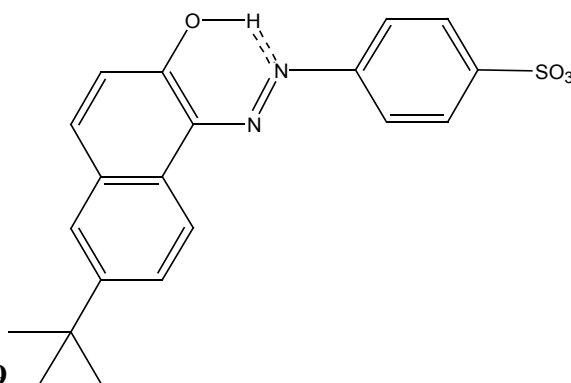
Daugelyje eksperimentų fermento koncentracija buvo 1 mg/ml (apie 0,04 mM), 30 mM buferyje. Rūgštinis pH stresas buvo įvestas 30 mM skruzdžių rūgšties natrio esteriu pH 2.5 – 3.5 srityje, 30 mM druskos rūgšties su natrio chloridu pH 1.5 – 2.5 srityje. Didesnės druskos rūgšties koncentracijos buvo naudojamos pasiekti pH žemesnį nei 1.5.



JR 540



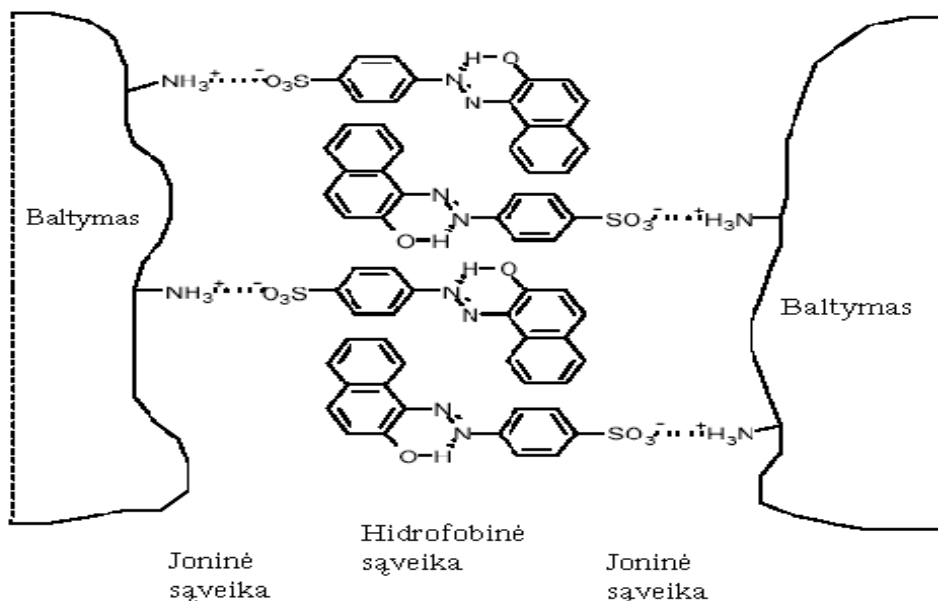
KR 79



LRO 73

1 pav. Azoaromatinių sulfonatų ligandų struktūros, dviejų raidžių pavadinimo sutrumpinimas ir apsaugojimo indeksas P bromelainui.

Aromatinio sulfonato ligando susirišimo su baltymu modelis parodytas 2 paveiksle. Kai teigiamai įkrautas baltymas yra neutralizuojamas susirišant sulfonato anijonams, hidrofobinės aromatinio ligando uodegos sąveikauja viena su kita. Šita sąveika agreguoja ir nusodina baltymo ligando kompleksus. Kiekvienas organinis sulfonato anijonas formuoja matricos nuosėdas, kai y_{ligandas} tampa lygus Z_H⁺ (visas baltymo krūvis) rūgštinėje terpėje.



2 pav. Matricos nuosėdų formavimasis. Anijoniniai sulfonato ligandai yra susirišę su teigiamai įkrautomis baltymo grupėmis susidarant druskos tilteliams (jonų poras). Hidrofobinės sulfonato ligandų liekanos susiriša pirmiausiai viena su kita pagal hidrofobinę sąveiką. Baltymas – baltymas sąveika (neparodyta) taip pat įmanoma.

Du sulfonato ligandai dažniausiai geresni apsaugotojai negu monosulfatiniai ligandai. Taip yra dėl kelių priežasčių. Dvi sulfonato grupės rišasi ir laiko dvi teigiamai įkrautas grupes sutrukdant išsivyniojimui baltymo molekulės. Taip pat disulfonatiniai ligandai stipriau susiriša su baltymais negu monosulfatiniai.

Apsauginis pajėgumas MCC ligandų išplėtė jų naudingumą baltymų išskyrimo. Baltymo apsaugojimas suteikia galimybę naudoti stiprią rūgštį per baltymo išskyrimą ir gryninimą. Pavyzdžiui, stipri rūgštis sterilizuoja baltymo tirpalą ir pabaigoje grynina baltymo produktą. Be to, apsauginė galimybė MCC ligandų prieš temperatūrinę inaktyvaciją leidžia naudoti temperatūros kėlimą baltymo išskyrimo ir gryninimo procesų metu [2].

3. EKSPERIMENTINĖ DALIS

3.1. Medžiagos ir prietaisai

3.1.1. Medžiagos

Natrio fosfatas (NaH_2PO_4), M = 137,99 g/mol;	EM
Natrio bifosfatas (Na_2HPO_4), M = 141,96 g/mol;	Sigma
Perchloro rūgštis (HClO_4), M = 100,5 g/mol;	Реахим
Kalio chloridas (KCl), M = 74,54 g/mol;	Реахим
Natrio chloridas (NaCl), M = 58,50 g/mol;	Sigma
Akrilamidas ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$), M = 71,08 g/mol;	Fluka
Bis (N, N' – metil – bis – akrilamidas) (BIS) (($\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$) $_2\text{CH}_2$), M = 154,17 g/mol;	Bio-Rad
Amonio persulfatas (APS), M = 228,40 g/mol;	Fluka
β – alaninas, M = 89,1 g/mol;	Sigma
N, N, N', N' – Tetrametiletilendiaminas (TEMED);	Roth
Biorex 70	Bio-Rad
Bromelainas, MW = 23000 Da;	Sigma
Kazeinas	Merck
L – cisteinas ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$) M = 121,2 g/mol;	Sigma
Natrio šarmas (NaOH), M = 39,97 g/mol;	Lachema
Kalio šarmas (KOH), M = 56,11 g/mol;	Lachema
Druskos rūgštis (HCl), M = 36,5 g/mol;	Sigma
Anijonitas Dowex 1-8X	Bio-Rad
Kari red (KR), MW = 558,52 Da;	Susintetintas JAV Minesotos universiteto laboratorijoje
Jurga's red (JR), MW = 698,65 Da;	Susintetintas JAV Minesotos universiteto laboratorijoje
Little Rock Orange (LRO), MW = 406,3 Da;	Susintetintas JAV Minesotos universiteto laboratorijoje

Methyl Green	Fluka
Coomasie Blue R-250	Serva
Glicerolis	Bio-Rad
Ledinė acto rūgštis (C ₂ H ₅) ₂ O, M = 74,12 g/mol;	Реахим

Buferiniai tirpalai:

Fermentų aktyvumui matuoti 0,05 M NaH₂PO₄, 0,05 M Na₂HPO₄, pH 6.7

3.1.2. Prietaisai

Automatinės pipetės	GILSON
Svarstyklės	KERN 440-35N (Max 400g, d = 0,01g)
Analitinės svarstyklės	AND GR – 200 (Max 210g, Min 10mg, e = 1mg, d = 0,1 mg)
pH – metras	EV- 74
Magenetinė maišyklė	MM-5
Spektrofotometras	JENWEY 6305 UV/Vis
Centrifuga 5415 R	Eppendorf
Baltymų elektroforezės sistema	Biometra
Baltymų chromatografinė sistema	KB Bromma
Maišyklė	Thermolyne Type 16700 Mixer
Šaldytuvas	Snaigė
Termostatas	MLZ UH
Centrifuga JR – 21	BECKMAN
Srovės šaltinis	Biometra

3.2. Tyrimo metodai

3.2.1. Bromelaino išskyrimas iš ananaso vaisiaus su matriciniais ligandais

Ananaso vaisiaus žievė buvo nulupta, vaisiaus minkštoji dalis supjaustyta gabaliukais ir su grūstuvėle sutrinta. Išsiskyrusios sultys nufiltruotos per Buchnerio kolbą su filtru. Į gautą švarų sulčių tirpalą pridėta atitinkamas dažų kiekis (JR, KR, LRO), kad bromelainas iškristų į nuosėdas. Dažo ir

bromelaino kompleksu nuosėdos atskiriamos nuo supernatanto. Atsargiai nupilamas supernatantas ir tada nuosėdos perkeliama ant petri lėkštelės, kad išdžiūtų. Gautas nuosėdų kiekis pasveriamas. Išdžiūvusios bromelaino nuosėdos supilamos į buteliukus ir laikomos šaldytuve +4°C temperatūroje..

3.2.2. Spektrofotometrinis baltymo koncentracijos matavimas

Bromelaino koncentracija matuota spektrofotometriškai, esant bangos ilgiui. 280 nm.

3.2.3. Spektrofotometrinis dažo koncentracijos matavimas

Dažų absorbcijos spektrai rūgštinėje (0,1 M HCl), šarminėje (0,1 M NaOH) ir neutralioje (H₂O) terpėse matuoti spektrofotometriškai, esant bangos ilgio srityje nuo 400 iki 600 nm. Dažo koncentracija paskaičiuota pagal (1) formulę neutralioje terpėje, žinant jo ekstinkcijos koeficientą:

$$C_{\text{dažo}} = A/\epsilon l, \quad (1)$$

čia: **A** – absorbcija neutralioje terpėje ($\lambda = 495$ nm JR, $\lambda = 503$ nm KR, $\lambda = 488$ nm LRO),

ϵ – ekstinkcijos koeficientas ($M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$),

l – kiuvetės skersmuo, cm,

3.2.4. Bromelaino koncentracijos nustatymas pagal tirozino kiekį

Metodas remiasi skirtinga aminorūgšties tirozino absorbcija neutralioje ir šarminėje terpėje. Šarminėje terpėje (0,1M NaOH) tirozino aminorūgšties radikalo hidroksilo grupės vandenilis disocijuoja ir dėl pasikeitusio krūvio pasiskirstymo aromatinėje sistemoje absorbcijos maksimumas pasislenka nuo 270 iki 295 nm. Esant 295 nm bangos ilgiui kiti junginiai (jei nėra baltyminių priemaišų) mažai absorbuoja, taigi baltymo koncentraciją galima paskaičiuoti iš absorbcijų šarminėje (0,1M NaOH) ir neutralioje (H₂O) terpėje skirtumų. Taikant Bugero-Bero-Lamberto (2) formulę gaunama išraiška:

$$C_{\text{baltymo}} = \Delta A/\epsilon l f, \quad (2)$$

čia: ΔA – absorbcija šarme – absorbcija neutralioje terpėje ($\lambda=295\text{nm}$),

ϵ – Tyr ekstinkcijos koeficientas $2471\text{AU}\cdot\text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$,

l – kiuvetės skersmuo, cm,

f – tirozinų skaičius vienoje baltymo molekulėje.

3.2.5. Proteazių aktyvumo matavimas

3.2.5.1. Bendras aktyvumas. Kunitz'o metodas bromelaino aktyvumo nustatymui.

Proteolitinis aktyvumas bromelaino matuotas Kunitz'o metodu, naudojant Hammerstan kazeiną kaip substratą. Koncentracija kazeino buvo 10 mg/ml , ištirpinta 50 mM natrio fosfatiniame buferyje pH 6.7. L – cisteino (5mM) buvo pridėta apsaugojant aktyvią vietą sulfidrilinės grupės nuo oksidacijos. Po laikymo $20\text{ min. } 37^\circ\text{C}$ temperatūroje, proteolitinė reakcija sustabdyta pridedant vienodą tūrį 1M perchloro rūgšties. Nehidrolizuotas kazeinas pašalintas centrifuguojant. Padidėjimas absorbcijos prie 280 nm buvo proporcingas koncentracijai susidariusių aminorūgščių hidrolizuojant kazeiną. Aktyvumas paskaičiuojamas pagal (3) formulę:

$$\text{Aktyvumas } (U / ml) = \frac{A_{280}}{t_{\min} * V} * \text{praskiedimas}, \quad (3)$$

čia: A_{280} – absorbcija,

t_{\min} – laikas, min,

V – tūris, ml.

3.2.5.2. Specifinis aktyvumas

Specifinis aktyvumas buvo paskaičiuotas pagal (4) formulę, nustačius bendrą aktyvumą ir žinant baltymo koncentraciją:

$$\text{Specifinis_aktyvumas } (U / ml) = \frac{\text{Aktyvumas } (U / ml)}{c_b (mg / ml)}, \quad (4)$$

čia: c_b – baltymo koncentracija, mg/ml.

3.2.5.3. Bromelaino aktyvumo vienetų skaičius sultyse

Iš gautų grafikų ir turimų duomenų paskaičiuojamas bromelaino aktyvumo vienetų skaičius sultyse, t.y. bendras ir specifinis aktyvumai su skirtingais MCC ligandais. 2 lentelėje pateiktas bromelaino nuosėdų paruošimas.

2 lentelė. Bromelaino nuosėdų išvalymas nuo dažo molekulių su Dowex anijonitu.

	JR	KR	LRO
Sulčių tūris, ml	28	30	30
Pridėtas dažo kiekis, mg	7	7,5	7,5
Sausų nuosėdų svoris, mg	13,1	66,1	37,4
Atsvertas nuosėdų kiekis, mg	3,4	2,4	2,4
Tūris, kuriame ištirpintos nuosėdos, ml	2,83	2	2
Pridėtas Dowex tūris su H ₂ O, ml	0,3	0,3	0,3
Aktyvumo vienetai	5,6828	3,0217	5,0142

JR
Bendras aktyvumas 4,5 U/ml.
 $4,5 \text{ U/ml} * 28 \text{ ml} = 126 \text{ U}$
 $5,68/20 = 0,284 \text{ U/ } 100 \mu\text{l}$
 $2,83 + 0,3 = 3,13 \text{ ml}$
 $8,9 \text{ U/ } 3,13 \text{ ml}$
 $3,4/13,1 = 0,26 \quad 26 \%$
 $8,9 \text{ U/ } 0,26 = 34,2 \text{ U} \quad 27,1 \%$
nuosėdose
Specifinis aktyvumas
 $5,68 \text{ U/} 100 \mu\text{l}$
 $8,9 \text{ U/} 3,13 \text{ ml}$
 $\sim 3 \text{ mg baltymo}$
 $3,0 \text{ U/mg baltymo}$
 $8,9 \text{ U/} 3,4 \text{ mg DW} =$
2,61 U/mg DW (sausos svorio)

1,5 mg baltymo
 1,5 U/mg baltymo
 $3,47 \text{ U/} 2,4 \text{ mg DW} =$
1,45 U/mg DW (sausos svorio)

KR
Bendras aktyvumas 4,5 U/ml.
 $4,5 \text{ U/ml} * 30 \text{ ml} = 135 \text{ U}$
 $3,02/20 = 0,151 \text{ U/ } 100 \mu\text{l}$
 $2,0 + 0,3 = 2,3 \text{ ml}$
 $3,47 \text{ U/ } 2,3 \text{ ml}$
 $2,4/66,1 = 0,036 \quad 3,6 \%$
 $3,47 \text{ U/ } 0,036 = 96,4 \text{ U} \quad 71,4 \%$
nuosėdose
Specifinis aktyvumas
 $3,02 \text{ U/} 100 \mu\text{l}$
 $3,47 \text{ U/} 2,3 \text{ ml}$

LRO
Bendras aktyvumas 4,5 U/ml.
 $4,5 \text{ U/ml} * 30 \text{ ml} = 135 \text{ U}$
 $5,01/20 = 0,2505 \text{ U/ } 100 \mu\text{l}$
 $2,0 + 0,3 = 2,3 \text{ ml}$
 $5,76 \text{ U/ } 2,3 \text{ ml}$
 $2,4/37,4 = 0,064 \quad 6,4 \%$
 $5,76 \text{ U/ } 0,064 = 90 \text{ U} \quad 66,66\%$

nuosėdose

Specifinis aktyvumas

5,01 U/100 μ l

5,76 U/2,3 ml

2,5 mg baltymo

2,5 U/mg baltymo

5,76 U/2,4 mg DW =

2,41 U/mg DW (sauso svorio)

3.2.6. Proteazių charakterizavimo elektroforetinis metodas

3.2.6.1. Natyvi elektroforezė

Tirpalai baltymų elektroforezei:

- 30 % akrilamidas + BIS

30g akrilamido ir 0.8g BIS tirpinama dejonizuotame vandenyje ir skiedžiama iki 100ml, tirpalas filtruojamas, laikomas tamsiame inde +4°C temperatūroje iki 30 dienų

- Ledinė acto r. – KOH pH 6.8

48,0 ml 1M KOH ir 2,9 ml ledinės acto rūgšties sumaišoma. Tirpalo pH turi būti 6,8. Praskiedžiama vandeniu iki 100 ml.

- Ledinė acto r. – KOH pH 4.3

48,0 ml 1M KOH ir 17,2 ml ledinės acto rūgšties sumaišoma. Tirpalo pH turi būti 4,3. Praskiedžiama vandeniu iki 100 ml.

- 10 % amonio persulfatas (APS)

1 ml vandens ištirpinama 100 mg amonio persulfato.

- Elektroforezės buferis

31,2 g β – alaninas ištirpinamas 8 ml ledinės acto rūgšties ir praskiedžiama vandeniu iki 100 ml. Tirpalo pH 4,5.

- Methyl green 0,08%

20 mg Methyl green tirpinama 25 ml vandens.

- Dažas Coomasie Brilliant Blue R-250 (CBB R – 250)

0,6g Coomasie Blue R-250, 113ml 95% etanolio, 23ml ledinės acto rūgšties, 113ml H₂O.

- Markeris elektroforezei

125 μ l ledinės acto r.- KOH (pH 6.8), 20 μ l Methyl green (0.002%), 0,7ml glicerolio (10%)

- Blukalas

600 ml vandens kaitinama iki užvirimo su geliu, po to pakeičiamas vanduo 10 kartų.

Mėginio paruošimas:

Mėginiai elektroforezei paruošiami į 15 μ l tiriamojo baltymo įpilama 5 μ l dažo Methyl green.

Gelių paruošimas:

Skiriamasis 12 % poliakrilamidinis gelis		Koncentruojantis 4 % poliakrilamidinis gelis	
30% akrilamidas + BIS	4 ml;	30% akrilamidas + BIS	0,65 ml;
Ledinė acto r.-KOH, pH 4.3	1,25 ml;	Ledinė acto r. – KOH, pH 6.8	1,25 ml;
H ₂ O	4,63 ml;	H ₂ O	3,06 ml;
APS 10 %	75 µl;	APS 10 %	40 µl;
TEMED	50 µl.	TEMED	5µl.

Paruoštas skiriamąjio gelio tirpalas pilamas į sukonstruotą formą iki tam tikros ribos, pažymėtos vietos ir atsargiai užpilama vandens. Polimerizacija vyksta apie 40 min.

Ant sustingusio skiriamąjio gelio pilamas koncentruojančio gelio tirpalas ir įstatomos šukos. Polimerizacija vyksta apie valandą. Jai pasibaigus, šukos ištraukiamos.

Formos ir aparato rezervuarai užpildomi elektroforezės buferiu. Į šulinėlius įnešami mėginiai. Elektroforezė vykdoma pastovios srovės režime: 20 min teka 18 mA srovė, po to iki elektroforezės pabaigos – 25 mA srovė. Dažo frontui priartėjus 0,5 cm iki apatinio stiklo krašto, laukiama apie 10 min ir srovės šaltinis išjungiamas.

Nuplovus koncentruojantį gelį, skiriamasis dedamas į vonelę su CBB R – 250 dažų, vėliau blukinamas blukalo tirpale.

3.2.7. Chromatografinis gryninimas

3.2.7.1. Jonų mainų chromatografija

50 ml tūrio kolonėlė ((2,6 x 9,42), cm), pripildyta Bio – Rex 70, lygsvarinama 10 tūrių 50 mM natrio fosfatinio buferio tirpalu pH 6.7, 200 ml/h greičiu. Užnešus baltymo tirpalą kolonėlė plaunama tuo pačiu buferiu. Tikslinis baltymas desorbuojamas linijiniu gradientu didinant KCl koncentraciją 50 mM natrio fosfatiname buferiniame tirpale pH 6.7 :

- 1) 1 kolonos tūris, KCl koncentracija kinta nuo 0 M iki 0,15 M;
- 2) 2 kolonos tūriai , KCl koncentracija kinta nuo 0,15 M iki 0,3 M;

3) 2 kolonos tūriai, KCl koncentracija kinta nuo 0,3 M iki 1 M.

Frakcijos 8,3 ml tūrio renkamos, esant 125 ml/h greičiui. Baltymas detektuojamas, esant bangos ilgiui 280 nm. Frakcijos, kuriose yra tikslinis baltymas apjungiamos, išmatuojamas tūris ir paimamas mėginys baltymo koncentracijos matavimui, bei aktyvumo nustatymui. Surinkto baltymo tirpalo KCl koncentracija padidinama iki 3 M.

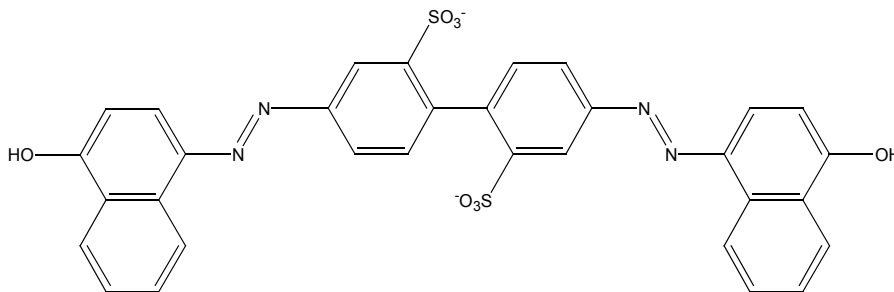
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

4.1. Darbo apžvalga

Darbe buvo planuojama palyginti keletą fermentų gryninimo metodų: įprastinį chromatografinį gryninimą su naujovišku gryninimu naudojant sulfonatinius dažus. Pasirinktas fermentas bromelainas (kamieno bromelainas, *stem bromelain*), kurį galima išsigyti komerciškai arba išsigryninti iš ananaso vaisiaus. Ananaso vaisiaus sultys turi daug augalinės kilmės netirpių dalelių, todėl chromatografiniam gryninimui buvo paimtas pirktas bromelainas, kurio grynumas buvo apie 10%. Gryninimas dažais buvo atliktas tiek su ananaso sultimis, tiek ir su pirktiniu bromelainu. Toks metodas dar labai retai naudojamas baltymų gryninimui, tačiau yra patogus ir žymiai efektyvesnis negu chromatografija, ypač jeigu reikia gauti didelį baltymo kiekį. Į ananaso sultis arba negryno bromelaino tirpalą pridedamas labai nedidelis dažų kiekis (reikia apie 0.1 mg/ml dažo jeigu bromelaino yra apie 1 mg/ml). Tada bromelaino-dažo kompleksas iškrenta į nuosėdas. Išgrynintame bromelaino-dažo komplekse dažas sudaro mažiau nei 10% svorio. Vėliau šis dažas nesunkiai pašalinamas su anijonitais.

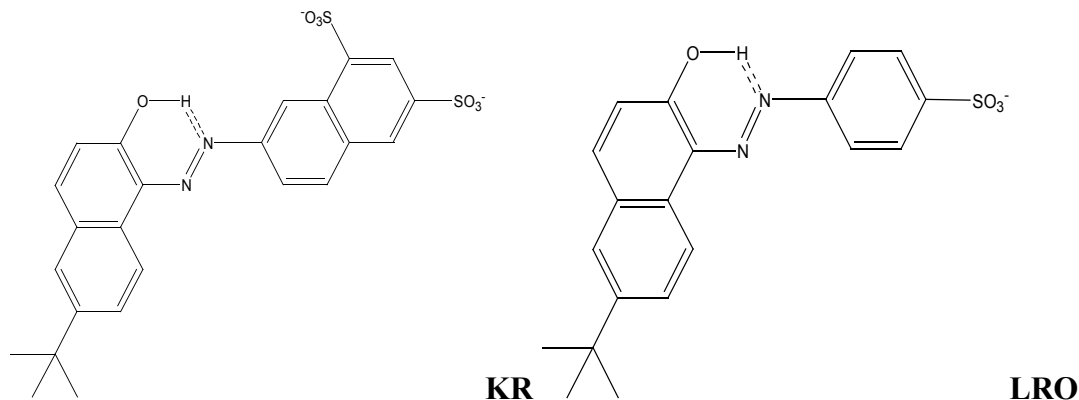
4.2. MCC ligandų ekstinkcijos koeficientų nustatymas

Šiame darbe buvo pasirinkti trys sulfonatiniai dažai: Jurgos raudonasis - JR, Kari raudonasis -KR ir Little Rock oranžinis - LRO, kurių struktūros pavaizduotos 3 paveiksle.



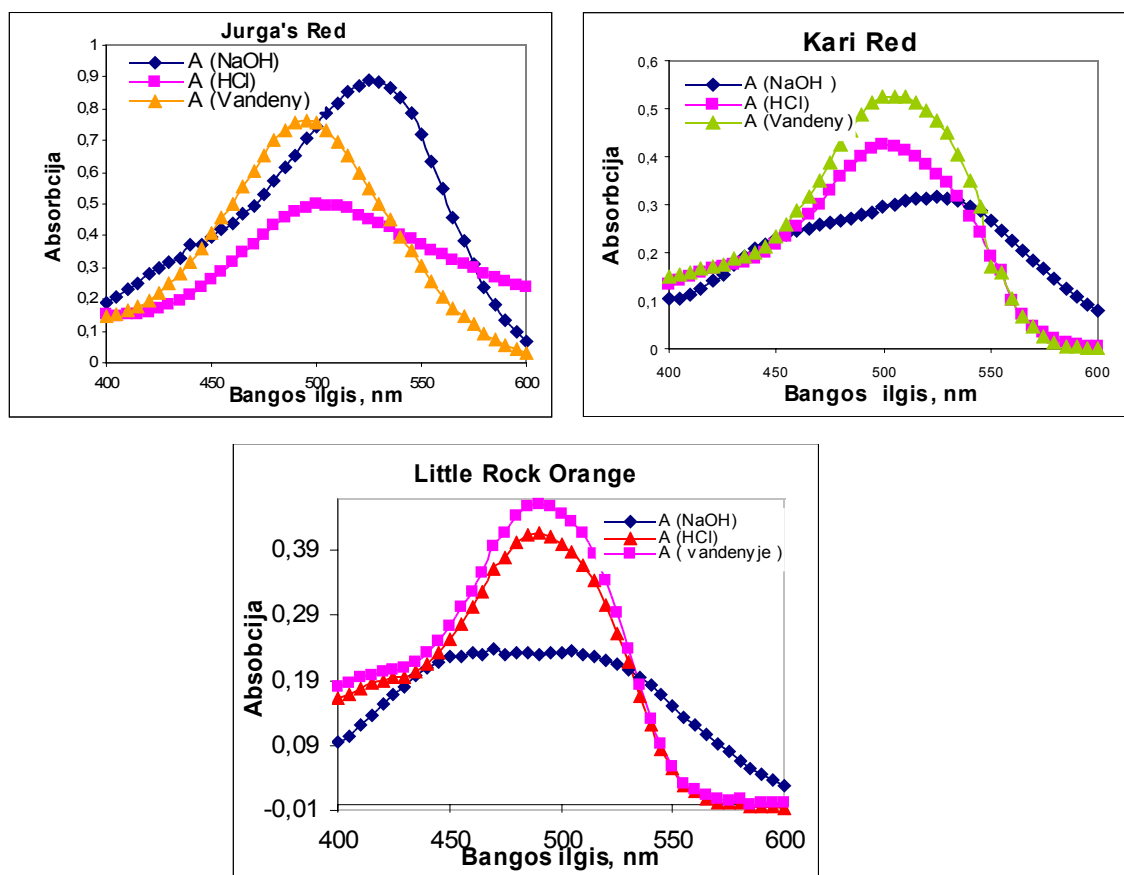
JR

3 pav. Sulfonatinių dažų struktūros.



3 paveikslo tęsinys. Sulfonatinių dažų struktūros.

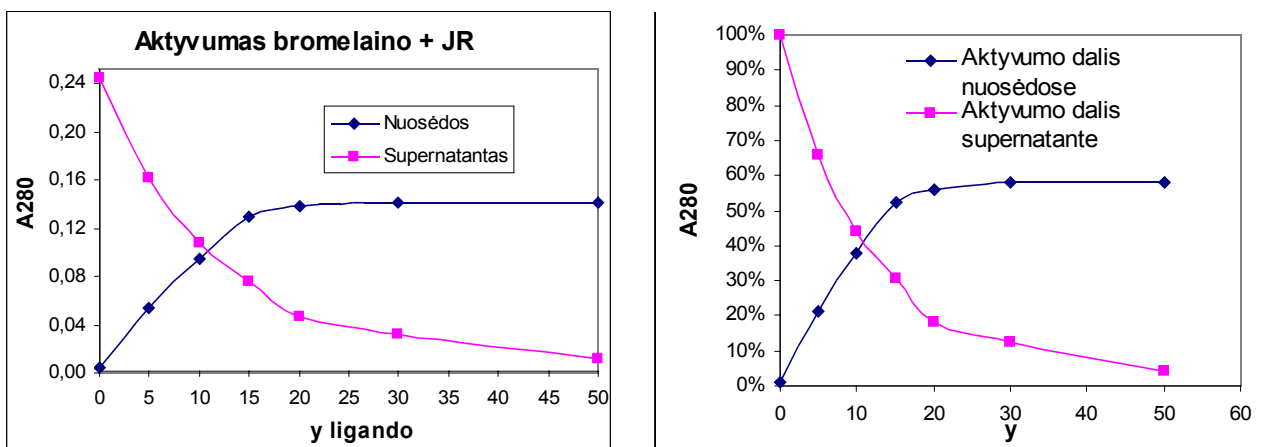
Buvo išmatuoti MCC ligandų JR, KR, LRO absorbcijos spektrai srityje nuo 400 iki 600 nm rūgštinėje, šarminėje ir neutralioje terpėse (4 pav.). Iš grafikų paskaičiuoti ekstinkcijos koeficientai kiekvienam matriciniam ligandui neutralioje terpėje. Mano nustatyti ekstinkcijos koeficientai yra JR $\epsilon_{\lambda 495} = 34583 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, KR $\epsilon_{\lambda 505} = 28212 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LRO $\epsilon_{\lambda 490} = 19908 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, o literatūroje jie yra JR $\epsilon_{\lambda 495} = 42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, KR $\epsilon_{\lambda 505} = 24400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LRO $\epsilon_{\lambda 490} = 20800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.



4 pav. MCC ligandų spektrai srityje nuo 400 iki 600 nm šarminėje, rūgštinėje ir neutralioje terpėje.

4.3. Pirktinio bromelaino aktyvumo priklausomybė nuo pridėto dažo kiekio supernatante ir nuosėdose

Buvo tirta baltymo ir dažo sąveika, naudojant turimą pirktinį negryną bromelainą. Matuota bromelaino aktyvumo priklausomybė nuo dažo kiekio supernatante ir nuosėdose. Tyrimas atliktas su JR dažu, kadangi jis geriausiai sąveikauja su mūsų tiriamu baltymu. Ligandų skaičių vienai molekulei fermento žymime y (JR dažas turi dvi sulfonato grupes, todėl jo y yra 2 kartus didesnis, nei dažo molekulių kiekis vienai baltymo molekulei). Tirti mėginiai turintys y nuo 0 iki 50. Dedant daugiau dažo, vis daugiau bromelaino sudaro netirpų kompleksą, kol ties tam tikra riba visas bromelainas iškrenta į nuosėdas. Teoriškai baltymas įgauna neutralų krūvį ir gali agreguoti y pasiekus 11, tačiau žinoma, kad maksimalus išsodinimas pasiekiamas prie $y = 13$ (5 pav.).



5 pav. Bromelaino pasiskirstymas supernatante ir nuosėdose, priklausomai nuo ligandų skaičiaus, pridėto vienai bromelaino (y) molekulei. Ligandas - JR dažas.

Maksimalus išsodinimas vyksta ten, kur praktiškai visas bromelainas pereina į nuosėdas. Bromelaino pasiskirstymas nuosėdose ir tirpale nustatomas nuosėdas nucentrifugavus ir atskyrus supernatantą. Nuosėdos suspenduojamos buferio tūryje, kuris lygus supernatanto tūriui, bromelainas regeneruojamas valant Dowex anijonito suspensija. Bromelaino fermentinis aktyvumas matuojamas Kunitz'o metodu. y , kuriame pasiektas maksimalus išsodinimas, matuojant supernatanto aktyvumą artimas nuliui, o nuosėdų aktyvumas artimas 60%.

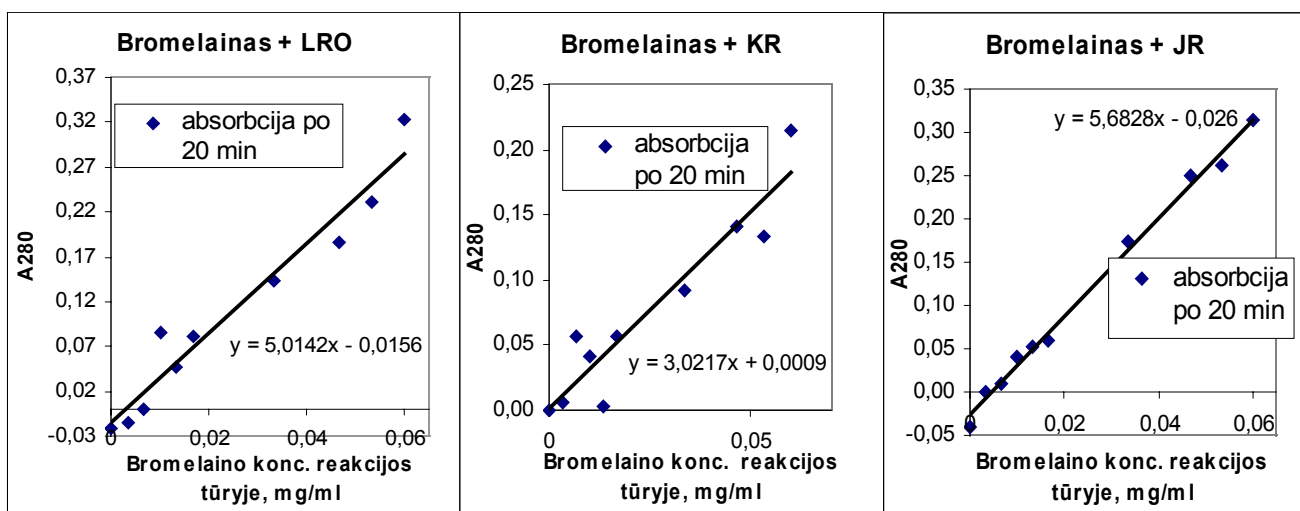
4.4. Bromelaino gryninimas iš ananaso sulčių naudojant MCC ligandus

Bromelaino nusodinimo principas su dažais iš ananaso sulčių yra parodytas 6 paveiksle.



6 pav. Bromelaino nusodinimo su dažu principinė schema.

Tam tikras kiekis gautų bromelaino nuosėdų atsveriamas ir ištirpinamas 50 mM natrio fosfatiniame buferyje pH 6.7. Bromelainas valomas nuo MCC ligandų, atitinkamai JR, KR, LRO, su Dowex anijonitu, kol išnyksta spalva. Po to įpilama 100 μ l tirpalo į ependorfą, kaip substratas naudojamas kazeinas, kurio įpilama 500 μ l. Reakcija vykdoma 20 min. 37⁰ C temperatūroje. Po 20 min. reakcija stabdoma pripilant 700 μ l 1M HClO₄ rūgšties. Nehidrolizuotas kazeinas pašalinamas centrifuguojant 2.5 min 13000rpm. Baltymo absorbcija matuojama, esant bangos ilgiui 280 nm (7 pav.).



7 pav. Ištirpintų bromelaino nuosėdų su skirtingais MCC ligandais, bei išvalytų su Dowex anijonitu, absorbcijos priklausomybė nuo koncentracijos reakcijos tūryje.

4.4.1. Bromelaino, nusodinto su trimis skirtingais MCC ligandais, aktyvumo palyginimas

Bromelainas ananaso sultyse buvo nusodintas su trimis skirtingais MCC ligandais - JR, KR ir LRO. Buvo paskaičiuota gautų nuosėdų, baltymo bendras ir specifinis aktyvumai, bei aktyvumo išeiga. Gauti rezultatai pateikti 3 lentelėje.

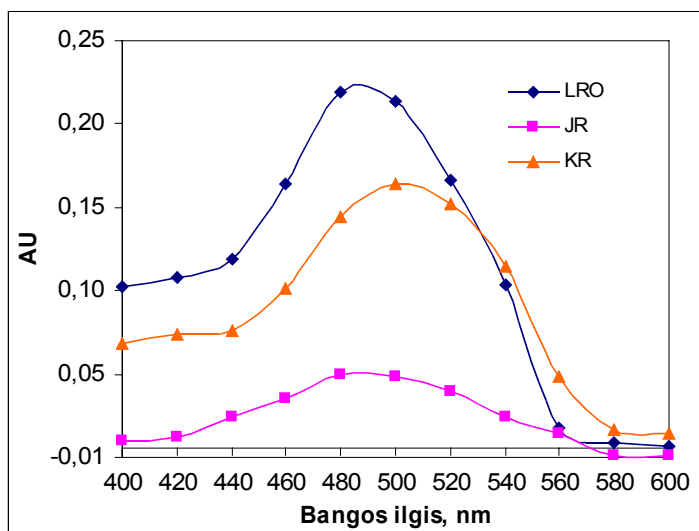
3 lentelė. Bromelaino, nusodinto su trimis skirtingais MCC ligandais, aktyvumo palyginimas.

Sulčių tirpalas			
	KR	JR	LRO
Sulčių tūris, ml	30	28	30
Bendras aktyvumas (4,5 U/ml), U ^a	135	126	135
Baltymo kiekis, mg ^a	33	30,8	33
Sausas svoris, mg ^a	3300	3080	3300
<i>Specifinis aktyvumas, U/mg baltymo</i> ^a	4,09	4,09	4,09
<i>Specifinis aktyvumas, U/mg sauso svorio</i> ^a	0,041	0,041	0,041
Nusodinimas su dažu			
Pridėtas dažo kiekis, mg	7,5	7	7,5
Nuosėdos su dažu ^b			
	KR	JR	LRO
Bendras aktyvumas, U	96,4	34,2	90
Gautų nuosėdų su dažu kiekis, mg	66,1	13,1	37,4
Dažo kiekis nuosėdose, mg	2,38	0,09	1,50
Dažo kiekis supernatante, mg	5,12	6,91	6,00
Baltymo kiekis (atėmus dažą, su priemaišomis), mg	63,7	13,01	35,9
<i>Specifinis aktyvumas, U/mg nuosėdų</i>	1,45	2,61	2,41
<i>Specifinis aktyvumas, U/mg baltymo ir kitų priemaišų</i>	1,51	2,63	2,51
<i>Aktyvumo išeiga, %</i>	71,4	27,1	66,6

a – pagal literatūrą, b – išmatuota spektrofotometriškai.

4.4.2. Bromelaino procentinis kiekis bromelaino – dažo komplekso nuosėdose

Norint sužinoti baltymo, išskirto iš ananaso sulčių, procentinį kiekį buvo išmatuota bromelaino – dažo (JR, LRO, KR) komplekso nuosėdų absorbcijos spektrai 400 – 600 nm srityje neutralioje terpėje (8 pav.). Skaičiavimai atlikti pasinaudojus absorbcijos spektrais MCC ligandų 400 – 600 nm srityje .

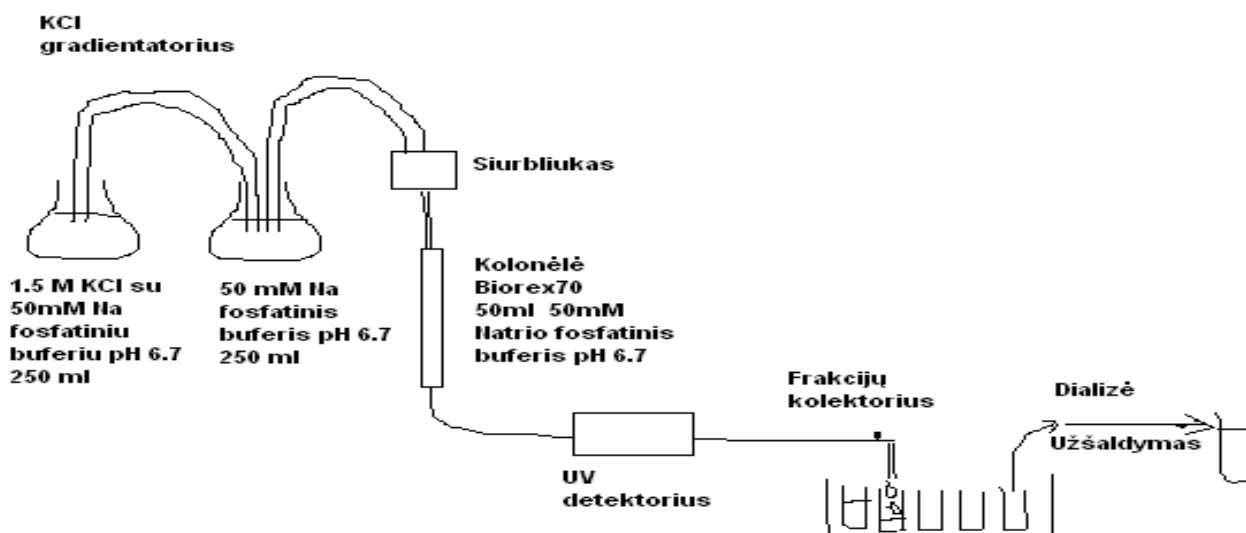


8 pav. Bromelaino su KR, LRO ir JR nuosėdų absorbcijos spektras neutralioje terpėje.

Taigi baltymo yra 96 % LRO ir baltymo komplekse, 99,27 % baltymo yra JR ir baltymo komplekse, o baltymo KR ir baltymo komplekse yra 96,34 %. Daugiausiai baltymo yra JR ir baltymo komplekse.

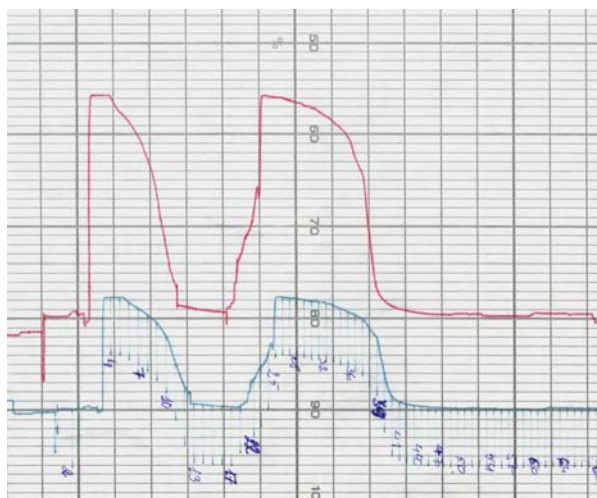
4.5. Pirktinio bromelaino gryninimas jonų mainų chromatografija

Chromatografija yra sudėtingas procesas ir atliekamas pagal principinę schemą, kuri pavaizduota 9 paveiksle. Gautos frakcijos su tiksliniu baltymu yra surenkamos, dializuojamos ir po to baltymas užšaldomas.

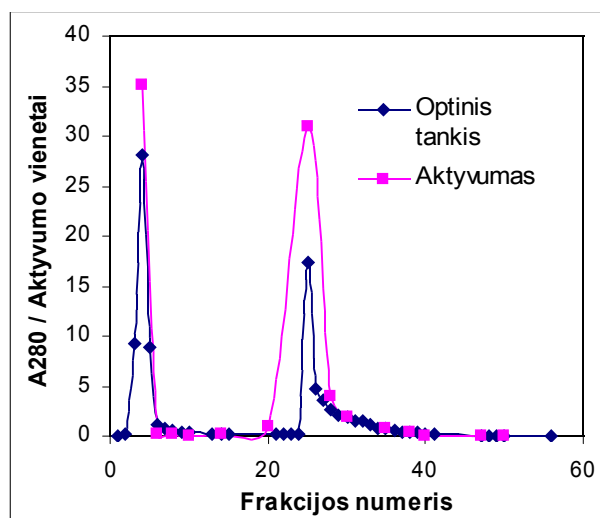


9 pav. Principinė jonų mainų chromatografijos atlikimo schema.

Bromelainas iš Merck firmos buvo gryninamas jonų mainų chromatografija. Bromelaino chromatograma parodyta 10 paveiksle. Išmatuoti surinktų frakcijų optiniai tankiai ir padauginti iš baltymo praskiedimo kartų, taip pat išmatuoti aktyvumai (11 pav.).

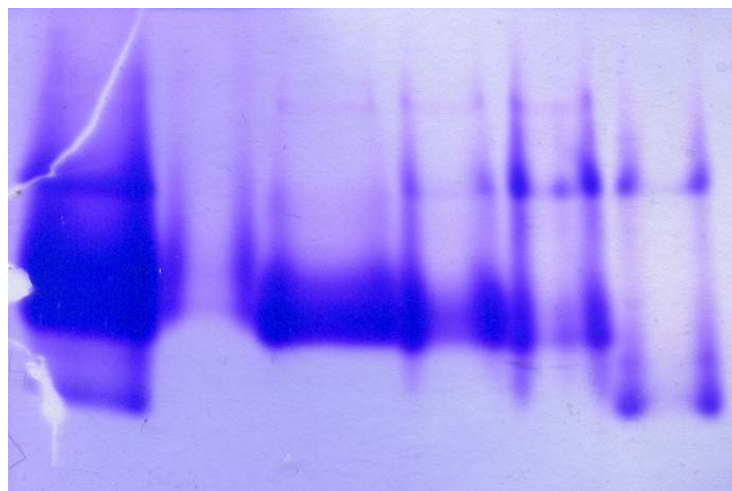


10 pav. Bromelaino jonų mainų chromatografijos analizė.



11 pav. Bromelaino po jonų mainų chromatografijos optinio tankio ir aktyvumo priklausomybė nuo frakcijos numerio

Jonų mainų chromatografijos metu išgrynintas bromelainas buvo patikrintas natyvios elektroforezės metodu (12 pav.).



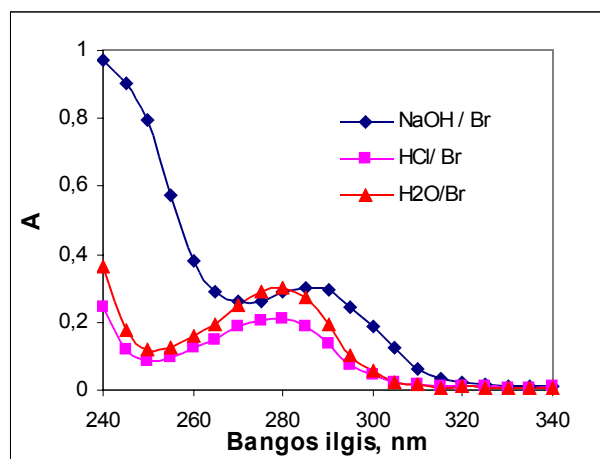
3 4 5 6

1 2

12 pav. Baltymo frakcijų, turinčių bromelainą analizė natyvios elektroforezės metodu. 1 takelis – baltymas prieš jonų mainų chromatografiją; 2 takelis – apjungtos nesorbuotos 3-9 frakcijos; 3 takelis – po jonų mainų chromatografijos 25 frakcija, 4 takelis – apjungtos sorbuotos 27-28 frakcijos, 5 takelis – apjungtos sorbuotos 29-30 frakcijos, 6 takelis – apjungtos sorbuotos 31-34 frakcijos.

4.5.1. Bromelaino koncentracijos nustatymas pagal tirozino kiekį

Išgryninto chromatografiškai bromelaino koncentracija buvo nustatyta pagal tirozino kiekį. Išmatuoti bromelaino absorbcijos spektrai šarminėje, rūgštinėje ir neutralioje terpėse (13 pav.). Šiuo metodu nustatytas bromelaino ($c = 0,004567 \text{ mol/l}$) kiekis yra 7,503 mg/ml, o pagal A_{280} bromelaino ($c = 0,0003558 \text{ mol/l}$) yra 8,183 mg/ml.



13 pav. Chromatografiškai išgryninto bromelaino absorbcijos spektrai šarminiame tirpale (0,1M NaOH), neutraliame tirpale (H_2O) ir rūgštiniame tirpale (0,1M HCl).

4.5.2. Bromelaino aktyvumo vienetų skaičiaus palyginimas gryninant chromatografiškai ir su dažais

Norint palyginti gryninimo metodus su dažais ir chromatografiškai, paskaičiuojamas bromelaimo bendras ir specifinis aktyvumai, bei aktyvumo išeiga. Rezultatai pateikiami 4 lentelėje. Lyginimui pasirenkamas LRO dažas, nes jo specifinis aktyvumas yra mažesnis 2,41 U/mg nuosėdų lyginant su JR dažu 2,61 U/mg nuosėdų, bet aktyvumo išeiga yra didesnė 66,6 % negu JR 27,14 %.

4 lentelė. Bromelaino gryninimo palyginimas su LRO dažu ir jonų mainų chromatografija.

	Pradinis bromelaino tirpalas be dažo	Pradinis bromelaino tirpalas prieš chromatografiją
Bendras aktyvumas, U	135 ^a	3016
Baltymo kiekis, mg	33 ^a	685
Sausas svoris, mg	3300 ^a	1500
Specifinis aktyvumas, U/mg sauso svorio	0,041 ^a	2,01
Specifinis aktyvumas, U/mg baltymo	4,09 ^a	4,40
	Pridėjus LRO dažo	Po jonų mainų chromatografijos 25 frakcija
Bendras aktyvumas, U	90	257
Baltymo kiekis (atėmus dažą arba su priemaišomis), mg	35,90	67,9
Specifinis aktyvumas, U/mg baltymo	2,51	3,79
Aktyvumo išeiga, %	66,6	8,5

a- pagal literatūrą.

Iš pateiktos 4 lentelės duomenų matome, kad gryninimo metodai turi privalumų ir trūkumų.

Jonų mainų chromatografijos privalumai:

- Specifinis aktyvumas yra didesnis, taigi gavosi grynesnis bromelainas;
- Šituo metodu galima gryninti, jeigu po gryninimo nusodinant dažais sunku atskirti dažą nuo baltymo dėl stiprios jų sąveikos.

Baltymo gryninimo, panaudojant nusodinimą dažais privalumai:

- Greitesnis metodas;
- Gryninamas didesnis baltymo kiekis;

- Dažniausiai gaunamas pakankamas grynumas;
- Aktyvumo išeiga didesnė;
- Mažesnių piniginių sąnaudų reikalaujantis metodas;
- Baltymą galima gryninti rūgštinėje terpėje ar aukštesnėje temperatūroje, išsaugant jo aktyvumą.

5. IŠVADOS

1. Bromelaino aktyvumo išeiga po gryninimo panaudojant nusodinimą su trimis skirtingais MCC ligandais, buvo daug didesnė negu naudojant jonų mainų chromatografiją.
2. Gryninant ananaso bromelainą nusodinimo dažais metodu buvo gautos aktyvumo išeigos: su JR aktyvumo išeiga yra 27,1 %, su KR dažų yra 71,4 %, o su LRO dažų yra 66,6 %.
3. Bromelaino, išgryninto panaudojant jonų mainų chromatografiją, geriausios frakcijos aktyvumo išeiga buvo 8,5 %.
4. Bromelaino, išgryninto jonų mainų chromatografijos metodu, specifinis aktyvumas buvo didesnis negu išgryninto nusodinimo dažais metodu, taigi panaudojant jonų mainų chromatografiją gautas grynesnis baltymas.
5. Neigiamai įkrauti sulfonatiniai dažai yra naudingi teigiamai įkrautų baltymų gryninimui nusodinimo būdu. Baltymų – dažų sąveika yra iš dalies elektrostatinė ir iš dalies hidrofobinė.

Už pagalbą darbe dėkoju:

- ❖ Šio darbo vadovui Biotechnologijos instituto “Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo“ laboratorijos vedėjui dr. D. Matuliui.
- ❖ Biotechnologijos instituto “Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo“ laboratorijos j. m. d. M. Zaveckui ir kitiems laboratorijos darbuotojams už visokeriopą ir nuoširdžią pagalbą.
- ❖ Recenzentui mokomosios bioinžinerijos lab. vedėjui Ž. Dapkūnui (VGTU).

6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Dennison C. A guide to protein isolation. London: Kluvert Academic Publishers. 1999, 186 p.
2. Matulis D., Wu C., Pham T. V., Guy C., Lovrien R. Protection of Enzymes by Aromatic Sulfonate Ligands from Inactivation by Acid and Temperature. *Journal of Molecular Catalysis B*. 1998, 7, p. 21-36.
3. Wu C., Lovrien R., Matulis D. Lectin Coprecipitative Isolation from Crudes by Little Rock Orange Ligand. *Analyt. Biochem.* 1998, 257, p. 33-39.
4. Citri N. Conformational Adaptability in Enzymes. *Adv. Enzymol.* 1977, 37, p. 397-648.
5. Committee I.N. Enzyme Nomenclature. Recommendations. New York: Academic Press, 1992. 20 p.
6. Otto H., Schirmeister T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem. Rev.* 1997, 97, p. 133-171.
7. Kemp G., Webster A. In *Essays in Biochemistry*. 1991, 27, p. 1-16.
8. Prushoff W. In *Targets for the Design of Antiviral Agents*. New York: Plenum Press, 1984, 1-27 p.
9. Sharma A., Padwal-Desai S., Ninjoor V. Intracellular hydrolases of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 159(2), p. 464-471.
10. Eckert J. In *Medizinische Mikrobiologie*. 6 ed. Stuttgart: Thieme Verlag. 1986, 344-398 p.
11. Matulis D., Lovrien R., Richardson T.I. Coprecipitation of proteins with matrix ligands: scaleable protein isolation. *J Mol Recognit.* 1996, 9(5-6), p. 433-443.
12. Drenth J. In *The Enzymes*. Academic Press: New York. 1971, p. 485-499.
13. Musil D. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* 1991, 10(9), p. 2321-2330.
14. Kamphuis I., Drenth J, Baker E.N. Thiol proteases. Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain. *J. Mol. Biol.* 1985, 182(2), p. 317-329.
15. Internetas:
[http://srs6.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-id+7BYJR1SYa0J+\[swissprot-ID:BROM2_ANACO\]+-e](http://srs6.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-id+7BYJR1SYa0J+[swissprot-ID:BROM2_ANACO]+-e)
16. Perlmann G.E., Lorand L. *Methods in Enzymology*. Vol. 19. New York, London: Academic Press, 1970. 273-284 p.
17. Barrett A.J. In *Lysosomes*. Amsterdam, London: North-Holland Publishing Co. 1972, p. 46-135.
18. Barrett A., McDonald J.A. *Mammalian Proteases*. Vol. 1. London: Academic Press, 1980. 300 p.

19. McDonald, J., Barrett, A. Mammalian Proteases. Vol. 2. London: Academic Press, 1986. 360 p.
20. Murachi T. Advances in Enzyme Regulation. Vol. 19. New York: Pergamon Press, 1981. 407-424 p.
21. Ojha M. Ca(2+)-dependent protease I from *Allomyces arbuscula*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996, 218(1). p. 22-29.