

P Ő V O D N Ě O Z N Ā M E N I A

FRAKCIONÁCIA TRYPTICKÉHO HYDROLYZÁTU HEMOGLOBÍNU
NA STĽPCI CELULÓZY

PAVEL MĀSIAR

Katedra biochémie Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika v Košiciach

Rozvoj rozdeľovacích techník pomocou vymieňačov iónov a modifikovaných celulóz prakticky vytlačil použitie obyčajnej celulózovej drviny z arzenálu nosičov pre chromatografiu aminokyselín a peptidov. Dôvodom pre odklon od celulózy bol jednak rýchly rozvoj technológie vymieňačov iónov na Západe, jednak ich značné prednosti čo do rozdeľovacej schopnosti zmesi často fyzikálno-chemicky značne príbuzných látok. Často sa však zdá, že tento metódický vývoj prišiel pre mnohé, najmä menšie laboratóriá predčasne, pretože nebolo dostatočne rozvinuté štúdium dobrých vlastností lacného a dobre dostupného materiálu.

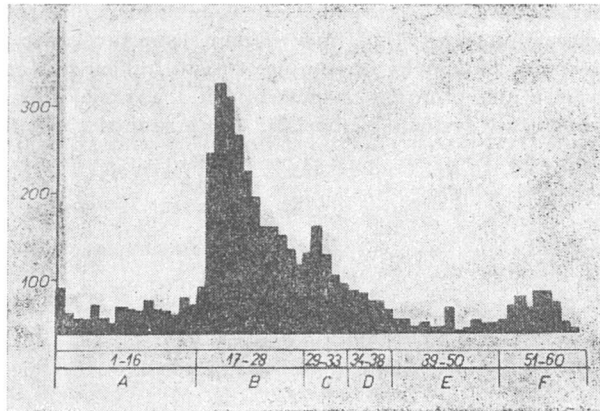
Frakcionácia pomocou rozdeľovacej chromatografie na stĺpci (nemodifikovaná celulóza) má prednosti v tom, že umožňuje reprodukovat' podmienky papierovej chromatografie a dovoľuje pracovať pohodlne za šetrnejších podmienok pre materiál. Pre frakcionáciu vyšších peptidov je táto otázka obzvlášť aktuálna, pretože dlhé procedúry na kolóne z vymieňačov iónov môžu niekedy viesť k deštrukcii niektorých väzieb [1].

V tejto práci sme vypracovali podmienky pre frakcionáciu peptidovej zmesi získanej tryptickou hydrolyzou hemoglobínu.

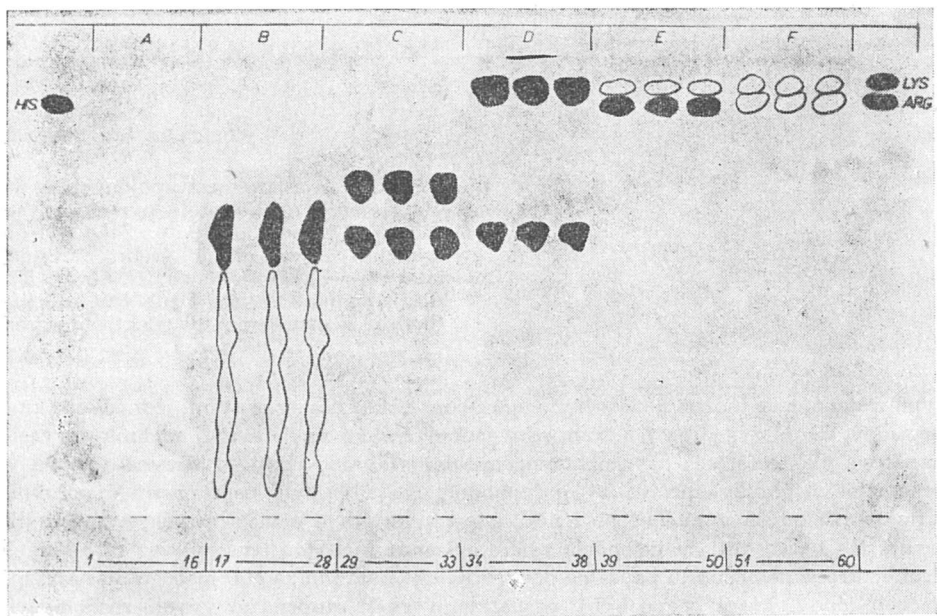
Experimentálna časť

100 mg globínu získaného z dvakrát kryštalovaného hemoglobínu sa natrávilo kryštallickým trypsinom (fy Organofarma, n. p. Praha). Za účelom zvýšenia aktivity a zistenia vyššej špecifičnosti sa trypsin prečistil štvornásobnou rekryštalizáciou v našom laboratóriu podľa J. H. Northropa [2]. Príprava globínu, ako aj podmienky jeho trávenia sa stanovili obdobne ako v predchádzajúcej práci [3]. Vzniknutý hydrolyzát globínu sa vysušil lyofilizáciou. Pre frakcionáciu hemoglobínu sa použil celulózový prášok Genuine Whatman Cellulose Powderstandard grade. 50 g suchého celulózového prášku sa suspendovalo v 250 ml rozpúšťadla v zložení: *n*-butanol—pyridín—kyselina octová—voda (30 : 20 : 6 : 24), ktoré sa pre jednorozmernú zostupnú papierovú chromatografiu vyskúšalo v jednej z predchádzajúcich prác [4]. Takto pripravená suspenzia sa v niekoľkých častiach naliala do sklenej chromatografickej trubice o rozmeroch 1,5 × 150 cm, opatrnej na spodnom okraji pórovitým skleneným dnom. Celulóza sa nechala voľne sedimentovať za mierneho odtoku rozpúšťadla. Na vzniknutý stĺpec (120 cm) sa naniesol roztok peptidov v 3 ml vyššie uvedeného rozpúšťadla. Chromatogram sa vyvíjal v systéme S₁ za podmienok: *a*) prietok kolónou 30 ml/hod., *b*) frakcie odobierané automatickým zberačom frakcií v množstve 10 ml. Celá procedura sa robila v temperovanej miestnosti pri teplote 28 °C. Cellkove sa odobralo 80 frakcií. Priebeh chromatografie sa sledoval spektrofotograficky.

metricky a elektroforetický. Všetky frakcie, tak ako postupne vychádzali z kolóny, zmerali sa na spektrofotometri SF₄ pri vlnovej dĺžke $\lambda = 313,5 \text{ m}\mu$. Namerané hodnoty sa vyjadrili graficky a z priebehu krivky sa usudzovalo na elúciu jednotlivých frakcií (obr. 1). Alikvotná časť (0,3 ml) z každej frakcie sa odparila a podrobila elektroforéze



Obr. 1. Vyhodnotenie priebehu chromatografie na spektrofotometri SF₄ pri vlnovej dĺžke $\lambda = 313,5 \text{ m}\mu$. X = jednotlivé skúmavky, Y = hodnoty extinkcie. Číslo značia počty skúmaviek, A, B, C, D, E, F jednotlivé frakcie.



Obr. 2. Elektroforegram alikvotnej časti eluátov. Elektroforéza v systéme S₂ (pyridín—kyselina octová—voda (1 : 10 : 89), pH 3,5) pri potenciálovom spáde 50 V/cm. Číslo označujú čísla skúmaviek, veľké písmená hore jednotlivé frakcie. Doba trvania elektroforézy 2 hod. Plné škrvny obsahujú Paulyho negatívne fragmenty.

v systéme S_2 za použitia potenciálového spádu 50 V/cm po dobu dvoch hodín. Elektroforegramy sa detegovali ninhydrínom a po označení ninhydrín—pozitívnych škvŕn Paulyho reagentom na prítomnosť histidín pozitívnych zón (obr. 2).

Ako vidieť na obr. 1, znázorňujúcim spektrofotometrické vyhodnotenie priebehu chromatografie, došlo za uvedených podmienok k oddeleniu šiestich zón, ktoré aj elektroforeticky javili charakteristické chovanie (obr. 2). Kombináciou elektroforegramu s krivkou získanou spektrofotometricky boli sme schopní jednotlivé zóny presne ohraničiť a oddelené frakcie spojiť. Skúmavky obsahujúce tú istú frakciu sme spojili, odparili na rotačnom odparovači a alikvotnú časť odpovedajúcu 1 % danej frakcie sme podrobili papierovej chromatografii v systéme S_1 (obr. 3). Ako je zrejmé z obr. 3, použitím tohto



Obr. 3. Chromatogram spojených frakcií v systéme S_1 (*n*-butanol—pyridín—kyselina octová—voda 30 : 20 : 6 : 24). Číslo 1 a Z označujú zmesi aminokyselín chromatografované ako referenčné, B, C, D, E, F značia spojené frakcie. Označenie frakcií sa zhoduje s označením na elektroforegrame na obr. 1.

typu frakcionácie možno nenáročným spôsobom získať pomerne veľmi jednoduché zmesi peptidov, ktoré zvyčajne použitím ešte jednej rýchlej rozdeľovacej techniky (vysokonapäťová elektroforéza) dávajú homogénne individuálne peptidy. Hlavná výhoda vypracovanej techniky spočíva v jej jednoduchosti a časovej úspornosti. V porovnaní s frakcionáciou na vymieňačoch iónov, kde predpríprava a vlastný pokus značne dlhohtrvajú (14 i viac dní), frakcionácia vyššie opísanou metódou trvá najviac 24 hodín. Na druhej strane nemožno ju paušálne odporúčať ako náhradu za chromatografiu na vymieňačoch iónov, ktoré bezpochyby predstavujú vyšší stupeň vo vývoji rozdeľovacích techník a umožňujú v konkrétnych prípadoch dosiahnuť neobyčajnú jemnosť oddelenia. Pre frakcionáciu peptidickej zmesi predstavuje však vhodnú rozdeľovaciu techniku. V našom laboratóriu sa pre frakcionáciu tryptických hydrolyzátoŧ pouŧili viaceré hemoglobíny, pričom výsledky boli úplne reprodukovateľné.

Súhrn

Opisujú sa podmienky pre frakcionáciu tryptického hydrolyzáту hemoglobínu chromatografiou na kolóne celulózovej drviny.

Ako rozdeľovací systém sa použil *n*-butanol — pyridín — kyselina octová — voda (30 20 6 24). Pre vyhodnotenie chromatografie sa použila spektrofotometria pri vlnovej dĺžke $\lambda = 313,5 \text{ m}\mu$ a vysokovoltová elektroforéza pri potenciálovom spáde 50 V/cm.

ФРАКЦИОНАЦИЯ ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗАТА
ГЕМОГЛОБИНА НА ЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ КОЛОНКЕ

ПАВЕЛ МАСИАР

Кафедра биохимии Медицинского факультета Университета имени П. И. Шафарика в Кошицах

Выводы

В работе описываются условия фракционирования триптического гидролизата гемоглобина помощью хроматографии на целлюлозной колонке.

Распределительным системом служил раствор *n*-бутаноль—пиридин—уксусная кислота—вода (30 20 6 :24). Для оценки хроматографии автор применил спектрофотометрию с длиной волны $\lambda = 313,5 \text{ m}\mu$ и высоковольтный электрофорез с потенциальным падением 50 V/cm.

Поступило в редакцию 15. 4. 1960 г.

FRAKTIONIERUNG EINES TRYPTISCHEN HYDROLYSATS
VON HÄMOGLOBIN AUF DER CELLULOSESÄULE

PAVEL MÄSIAR

Lehrstuhl für Biochemie der Medizinischen Fakultät an der P. J. Šafárik-Universität in Košice

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit beschreibt der Autor die Bedingungen für die Fraktionierung eines tryptischen Hydrolysats von Hämoglobin mittels der Chromatographie auf einer Kolonne aus Zellstoff.

Als Trennungssystem wurde *n*-Butanol—Pyridin—Essigsäure—Wasser (30 : 20 : 6 : 24) verwendet. Für die Auswertung der Chromatographie verwendete der Autor die Spektrophotometrie bei einer Wellenlänge $\lambda = 313,5 \text{ m}\mu$ und die Hochspannungselektrophorese bei einem Potentialgefälle von 50 V/cm.

In die Redaktion eingelangt den 15. 4. 1960

LITERATÚRA

1. Whitaker J., Deatherage F. E., J. Am. Chem. Soc. 77, 3360 (1955). — 2. Northrop J. H., J. Gen. Physiol. 16, 267 (1932). — 3. Mäsiar P., Chem. zvesti 12, 713 (1958). — 4. Mäsiar P., Jurovčík M., Chem. zvesti 13, 58 (1959).

Do redakcie došlo 15. 4. 1960

Adresa autora:

Doc. MUDr. Pavel Mäsiar, Košice, Šrobárova 57, Katedra biochémie Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika.