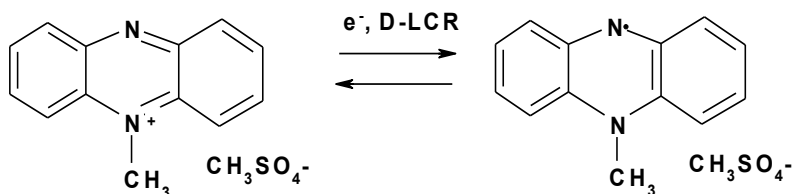


Afinitní chromatografie

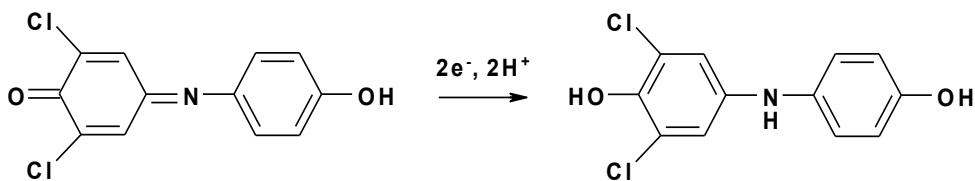
Jako příklad využití afinitní chromatografie bude provedena izolace D-specifické laktátdehydrogenasy (D-LDH) z pekařského droždí. Poněvadž kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* může v závislosti na podmínkách obsahovat až 5 různých laktátdehydrogenas, podrobíme ji nejprve inkubaci v podmínkách, kdy se tvoří prakticky výlučně enzym specifický pro D-laktát. Toho dosáhneme ca 4-5 hodinovou inkubací s glukosou nebo lépe metylglyoxalem. Tyto substráty produkují endogenně D-laktát, který je patrně vlastním induktorem enzymu.

Enzym se vyskytuje v mitochondriálních membránách, ty získáme po rozbití buněk diferenční centrifugací. Z mitochondriální frakce enzym získáme extrakcí pomocí detergentu (Triton X-100). Enzymovou aktivitu laktátdehydrogenasy určíme pomocí oxidoredukčních indikátorů (fenzinmetosulfát – **PMS** a dichlorfenolindofenol – **DCIP**.)

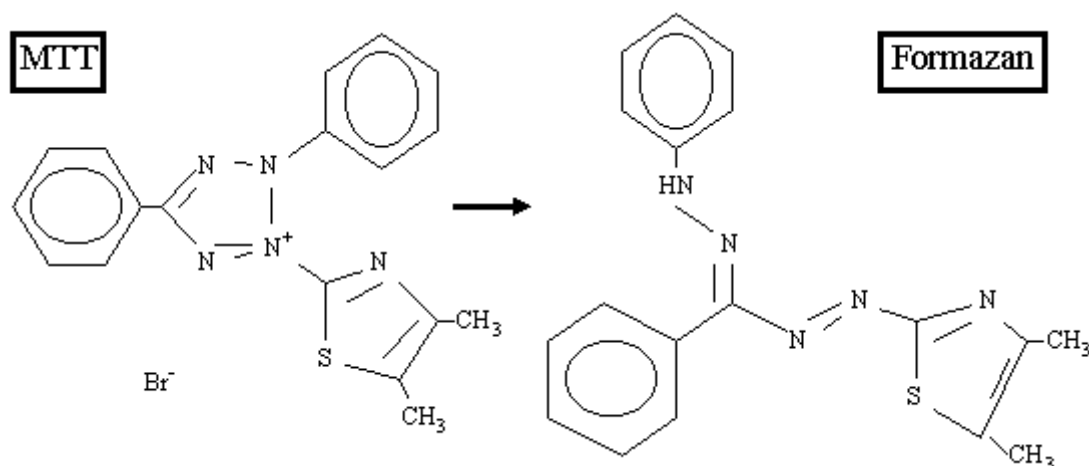
PMS:



DCIP:



V poslední době se užívá pro stanovení aktivit dehydrogenas (a odvozeně ke stanovení viability buněk, cytotoxicity a dalším účelům) tetrazoliová sůl 3(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (**MTT**). Ta je redukována buď přímo nebo opět prostřednictvím PMS za rozštěpení kruhu na barevný produkt – derivát **formazanu**.



Pro vlastní afinitní chromatografii si připravíme vhodný afinitní nosič. Poněvadž enzym není NAD-dependentní dehydrogenasou, nemůžeme použít žádný z komerčních materiálů, ale připravíme si jej sami. Na kolonce připraveného nosiče pak provedeme afinitní chromatografii extraktu. Získané aktivní frakce nejsou ještě čistým enzymem vhodným ke studiu jeho molekulárních vlastností, představují však dostatečně čistý a aktivní preparát např. k přípravě enzymového biosensoru pro stanovení D-laktátu.

Indukce enzymu

Připraví se roztoku o složení 1 g $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, 0,7 g KH_2PO_4 , 10 g NaCl, 3,3 mg ZnSO_4 a 5,3 mg citronanu železitého v 1 litru, pH se upraví na 7,0. V 1 litru tohoto roztoku se rozsuspenduje 20 g komerční pasty pekařského droždí a přidá se 1 g glukosy nebo 1 ml 30% methylglyoxalu. Suspense se inkubuje za intenzivního provzdušňování (s výhodou akvarijním motorkem a kamínkem či fritou) za laboratorní teploty 4-5 hodin. Pak se suspense zcentrifuguje 10 min. při 5000 ot.min^{-1} , promyje destilovanou vodou a konečný sediment se rozsuspenduje ve 350 ml 0,01M fosfátového pufru (KH_2PO_4 se upraví NaOH), pH 7,0.

Desintegrace buněk a extrace aktivity LDH

Osvědčeným způsobem je drcení bakteriálním lisem, jsou však možné i jiné způsoby. Sestavený lis vychlazený na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ i níže naplníme 40 ml suspense (objem se řídí velikostí

válce) a necháme vymrazit na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ s max. rozdílem $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu nejméně 6 hod. Poté zmrzlou suspensi protlačíme pomocí hydraulického lisu přes otvůrek do druhé části válce. Lis rozložíme a zmrzlou suspensi necháme roztát v kádince za laboratorní teploty. Homogenát pak centrifugujeme 10 minut při $3500\text{ RPM ot.min}^{-1}$, supernatant pak dalších 60 minut při 14000 ot.min^{-1} , supernatant vylijeme. Získaný vysokoobrátkový sediment rozsusedujeme v 1-2ml $0,01\text{M}$ fosfátového pufru pH 7,0 – viz výše. V části suspence stanovíme aktivitu a bílkovinu, ke zbytku přidáme tolik zásobního 10% roztoku Tritonu X-100, aby jeho výsledná koncentrace byla 1%. Směs zhomogenisujeme v Potter-Elvehjemově homogenisátorku několikerým protažením pístem a vložíme na 60 min. do chladničky, každých 10-15 min. ji 2-3 x protáhneme pístem. Nakonec suspensi zcentrifugujeme 10 min, při $14\ 000\text{ ot.min}^{-1}$. V supernatantu stanovíme bílkovinu postupem dle Folina (návod nalezneme ve skriptech základního cvičení) a enzymovou aktivitu.

Měření aktivity laktátdehydrogenasy:

Zapneme spektrofotometr a zvolíme vlnovou délku 600 nm. Do plastové kyvety spektrofotometru napipetujeme 3 ml $30\ \mu\text{M}$ DCIP v $0,1\ \text{M}$ fosfátovém pufru pH 7,0, $20\ \mu\text{l}$ $1\ \text{M}$ D,L-laktátu a $50\ \mu\text{l}$ $10\ \text{mM}$ PMS. Vložíme do přístroje a zahájíme měření stisknutím tlačítka Run. Sledujeme změnu absorbance (slepá hodnota) a po 1 minutě přidáme $20\ \mu\text{l}$ enzymového preparátu (suspence nebo extraktu). Sledujeme pokles absorbance, je-li příliš pomalý můžeme přidat další objem preparátu.

Výpočet enzymové aktivity:

Rychlost katalysované reakce v vypočteme ze vztahu

$$v [\text{mol.s}^{-1}] = (\Delta A.\text{min}^{-1} \cdot V)/(\epsilon \cdot 60)$$

kde $\Delta A.\text{min}^{-1}$ je změna absorbance za minutu, V objem reakční směsi v litrech (zde $1 \cdot 10^{-3}$) a ϵ molární absorpční koeficient (pro DCIP je 21000, pro formazan při 570 nm je 17700).

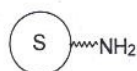
Získanou hodnotu přepočítáme na standartní objem (obvykle 1 ml) – získáme (s jistou výhradou) hodnotu katalytické koncentrace, po jejím vydělení koncentrací bílkovin v 1 ml pak specifickou aktivitu. Vynásobením celkovým objemem preparátu pak získáme celkovou aktivitu.

Porovnejte celkové a specifické aktivity a koncentrace v původní suspensi a extraktu a vypočítejte výtěžek (% celkové aktivity extraktu vzhledem k suspensi) a stupeň přečištění při extrakci (poměr specifických aktivit extraktu a suspence)!

Příprava afinitního nosiče

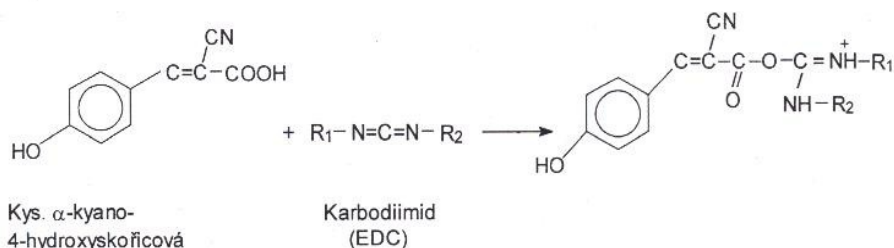
Výchozím materiálem je aminosyl Sepharosa 4B (AH-Sepharosa 4B), jejíž příprava je delší než aby ji bylo možno zařadit do této úlohy, samotná aktivace Sepharosy je risikovou operací v případě užití CNBr. AH-Sepharosa je universálním výchozím materiálem pro zakotvení afinantů přes -COOH jako je v tomto případě, kdy afinantem je kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová, známá původně jako inhibitor laktátových přenašečů. K jejímu navázání použijeme kondensační činidlo N'-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC), ve vodě rozpustný derivát karbodiimidu. Schéma vazby je znázorněno na následujícím schematu:

1.

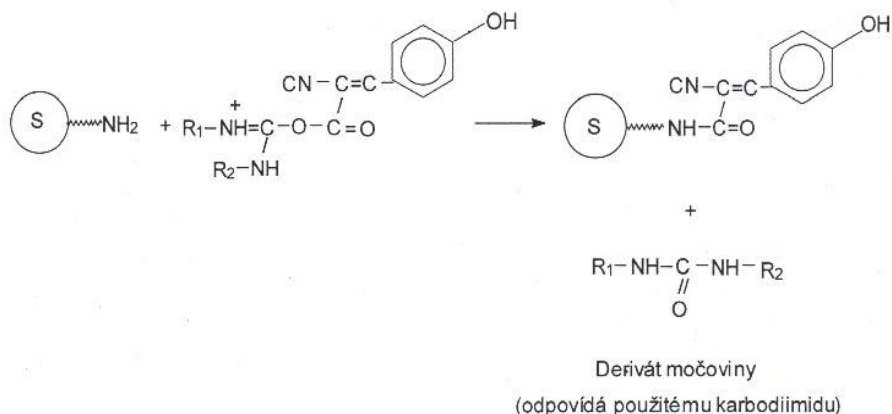


AH-Sepharosa 4B

2.



3.



Postup:

10 ml suspenze AH-Sepharosy v 50% etanolu několikrát promyjeme destilovanou vodou a pak rozsuspendujeme v 10 ml MES pufru pH 4,7. 0,1 g kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicové se rozpustí v 10 ml 0,1 mol.l⁻¹ Na₂CO₃, přidá se 0,15 g kondenzačního agens EDC a naleje se k suspensi AH-Sepharosy za míchání. POZOR! Směs je nutno míchat mechnickým michadlem shora, užití spodního magnetického michadla by způsobilo drcení zrnček Sepharosy! Upravíme pH na 5,0 a necháme 12 hodin intenzivně míchat při laboratorní teplotě. Pak promyjeme 2 litry vody, 1 litrem 0,1 mol.l⁻¹ octanu sodného (pH=4,7) a 1 litrem 0,5 mol.l⁻¹ NaHCO₃. Takto připravený nosič se uchová v 10% ethanolu při laboratorní teplotě.

Chromatografie

Přípraveným gelem naplníme chromatografickou kolonku 10/100, necháme dobře usadit a upevníme do sestavy FPLC. Připravíme 2 pufrů, pufr A je 10 mM fosfát (KH_2PO_4 upravený NaOH) o pH 7,4, pufr B obsahuje navíc 2 M síran amonný. Pomocí ultrazvukové lázně je zbavíme vzduchu a vložíme do nich odpovídající přívodní hadičky sestavy FPLC. Zapeme přístroj a necháme naplnit válce čerpadel pufrů A a B. Mezitím nainstalujeme dávkovací smyčku 100 μl a připravíme jimač frakcí (1 ml na frakci). Rychlostí 0,5 ml.min⁻¹ pak promyjeme kolonku i smyčku (ca 1 min.), až se absorbance eluátu při 280 nm nemění.

Mezitím pod dohledem vedoucího naprogramujeme průběh:

průtok 0,5 ml.min⁻¹, pufr B 0% do objemu 5 ml, při objemu 15 ml pufr B 100%, při 20 ml B 100%, při 20 ml B 0%, při 25 ml B 0%, end.

Naplníme smyčku vzorkem (extraktem z membránové frakce), jehož parametry (aktivita a bílkovina) jsme předtím změřili. Zastavíme promývání a spustíme program. Po ca 30 s otočením páčky vneseme vzorek na kolonku a zaznamenáváme absorbanci eluátu při 280 nm.

Po skončení experimentu stanovíme aktivitu LDH ve frakcích odpovídajících vrcholům elučního profilu (záznamu z přístroje). Stanovíme rovněž bílkoviny a vypočteme specifické aktivity LDH v aktivních frakcích a rovněž celkové aktivity pro celý objem frakcí.

Vypočtete stupeň přečištění v neaktivnější frakci jako poměr specifických aktivit této frakce a výchozího materiálu (extraktu)!

Vypočtete výtěžek purifikace! Celková vnesená aktivita (tj. 100%) je reprezentována součinem objemu vzorku a katalytické koncentrace LDH extraktu. Celková získaná aktivita je součet aktivit ve všech aktivních frakcích (Y%).