

# IPARI KINYERÉSTECHNIKA GYAKORLAT BIOMÉRNÖK MSc

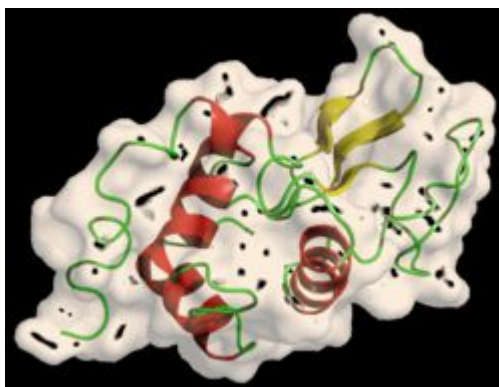
## V. LIZOZIM TISZTÍTÁSA TOJÁSFEHÉRJÉBŐL IONCSERÉLŐ KROMATOGRÁFIÁVAL

DE TTK Biomérnöki Tanszék Kémia épület D6

Gyakorlatvezető: Molnár Ákos Péter

### 1. LIZOZIM

A **lizozim** egy enzim, amely a *Gram-pozitív* baktériumok lízisét képes előidézni sejtfaluk roncsolása révén. Fontos szerepet játszik az immunrendszer működésében, elsősorban a szervezet „kapuinál” (száj, szem, orr). Megtalálható a könnyben, a nyálban, a verejtékben, az anyatejben, az orrváladékban és gyomornedvben egyaránt. Egyes növényekben (pl. toma) is előfordul. Az emlősök lizozimje csak kis mértékben különbözik egymástól, mindegyikük 129 aminosavból felépülő, kb. 14,6 kDa molekulatömegű polipeptid. Ezzel szemben a bakteriofágokban megtalálható lizozim 164 aminosavból áll, molekulatömege 18 kDa.



1. ábra A lizozim 3D szerkezete

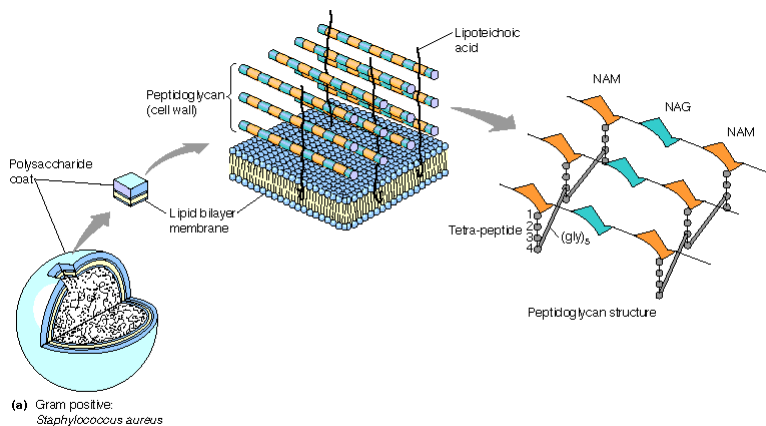
Gyakran emlegetik a szerkezet saját "antibiotikumaként". A szerkezet nem specifikus baktérium elleni védelmét biztosítja. A baktériumsejtek falát a benne levő poliszacharid lebontásával teszi tönkre.

Az első lizozim felfedezése Alexander Fleming nevéhez fűződik, aki 1922-ben tyúktojás fehérjében talált rá az antibiotikus hatású enzimre.

**Hatásmechanizmusa:** A baktériumok sejtfalának alapanyagául szolgáló murein (N-acetil-glükóz-amin és N-acetilmuraminsav egységekből álló mukopoliszacharid, aminosav oldalláncokkal) alapláncának glikozidkötéseit bontja.

**Használata:** Élelmiszeradalékként E 1105 kóddal használják, mint tartósítószer (kizárólag érett sajtokhoz engedélyezett).

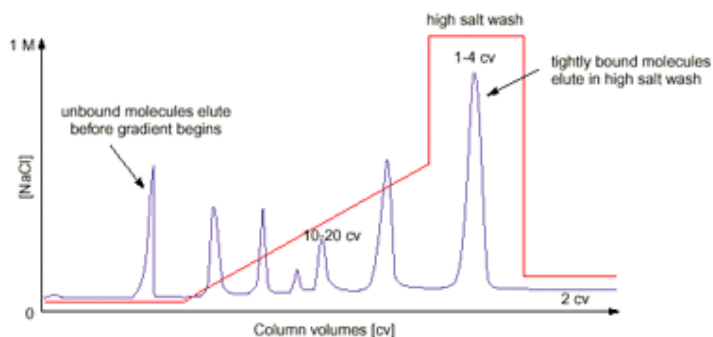
**Előállítás:** A lizozimot rendszerint a tyúktojás fehérjéből vonják ki. Emellett genetikailag módosított mikroorganizmusok használata is lehetséges a fehérje termeltetésére.



2. ábra Gram pozitív baktérium sejtfa szerkezete

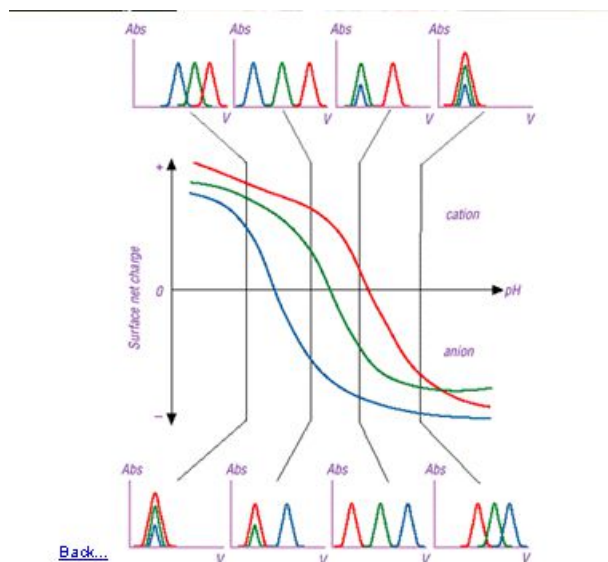
## 2. IONCSERÉLŐ KROMATOGRÁFIA (IEX)

Az **ioncserélő kromatográfia** a töltéssel rendelkező fehérjéket választja el. Az elválasztás alapja, a töltéssel rendelkező fehérje és az ellentétes töltésű ioncserélő közötti reverzibilis kölcsönhatás. A fehérjék úgy kötődnek, ahogy az oszlopra jutnak. A körülményeket úgy változtatjuk, hogy a kötődő komponensek különböző módon eluálódjanak. Az elúciót általában növekvő só koncentrációval vagy a pH változtatásával tudjuk befolyásolni. A NaCl koncentráció gradiens a leggyakoribb elúciós technika, amint azt az 3. ábra mutatja.



3. ábra

A célfehérje a kötődéskor koncentrálódik és tisztított, koncentrált formában összegyűjthető. A fehérje nettó töltése az aminosav összetételtől függ, és a közeg pH-jával változtatható, ahogy azt a 4. ábra egy 3 komponensű, eltérő izoelektromos ponttal rendelkező fehérjéket tartalmazó elegy példáján bemutatja.



4. ábra

**Ioncserélők típusai:** Egy ioncserélő lehet anion cserélő, ha pozitív töltéseket tartalmaz a felületén vagy kation cserélő, negatív töltésekkel. Az erős ioncserélők, mint a Q (anion), S és SP (kation) széles pH tartományban töltött állapotban vannak. Az anion cserélők akkor kötik meg a fehérjét, ha az negatív töltésű (vagyis az izoelektromos pontja feletti pH-n). A kation cserélők a pozitív töltést hordozó fehérjéket kötik (vagyis az izoelektromos pont alatti pH értéken) ld. 4. ábra.

**Ioncserélő közegek:** A Q Sepharose Fast Flow és SP Sepharose Fast Flow nagyszámú erős ioncserélő csoportot tartalmaznak a felületükön. Ezek a csoportok széles (2-12 és 4-13) pH tartományban megtartják töltésüket és nagy kötési kapacitással rendelkeznek. Ez lehetővé teszi a pH érték olyan megválasztását, ami a mintának legjobban megfelel. A Sepharose Fast Flow ioncserélő erősen keresztlinkált, nagy kémiai stabilitással bíró 6%-os agaróz ágyat tartalmaz. Az átfolyási karakterisztika miatt ez az ioncserélő lehet az első lehetőség durva keverékek elválasztására a tisztítási séma korai szakaszában. Ilyenkor a gyors eltávolítás, a jó felbontás és a magas áramlási sebesség alapvető feltétel. Ezek a fázisok nagyon népszerűek és széles körben alkalmazzák őket a kutatásban és az ipari termelésben egyaránt.

### 3. GYAKORLAT

#### 3.1. ESZKÖZÖK, ANYAGOK:

oszlop (4 g CM-Trisacryl, 0,05 M TRIS-HCl pufferrel átmosva, pH 8,2)

kémcsövek, kémcsőállvány

pipetta, pipettahegyek

üvegtölcsér, vatta

fotométer, küvetta

tojásfehérje oldat: 1 db tojás fehérjéje 5x-re hígítva TRIS-HCl pufferrel

puffer: 0,05 M TRIS-HCl puffer, pH 8,2

eluáló puffer: 0,05 M TRIS-HCl puffer, pH 8,2, amely 0,1 ill. 0,75 M NaCl-t tartalmaz

sejtszuszpenzió: *Micrococcus lysodeikticus* baktériumsejtek 0,2 g/l szuszpenziója

puffer lizozim aktivitás méréshez: 0,05 M foszfát puffer, pH 6,3

fehérje standard oldat: BSA 10 mg/ml

Biuret reagens

**A gél:** A gyakorlaton CM-Trisacryl ioncserélő gélt használunk. Ez egy szintetikus ioncserélő mátrix, amely akril-kopolimer gyöngyökből áll. A polimerhez kötött ioncserélő csoportok (karboxi-metil) a polimer gömbök teljes 3D szerkezetében megtalálhatók, úgy a felületükön, mint a belsejükben. A mátrix anyaga hidrophil csoportokat tartalmaz, amelyek biztosítják a biokompatibilitást és megakadályozzák a nem specifikus adszorpciót. Az állófázis makroporozus szerkezetű és nagy kötési kapacitással rendelkezik fehérjékre nézve. Kizárási mérete nagyobb mint  $10^7$  Da, így a legtöbb fehérje elválasztására alkalmas. Teljesen szintetikus anyagának köszönhetően mikrobiális fertőzésre teljesen rezisztens, lúgra viszont érzékeny.

**A lizozim** ideális enzim laboratóriumi gyakorlatokhoz. Jól karakterizált, ellenálló enzim, amely könnyen és olcsón hozzáférhető (tyúktojás fehérje). A tojásfehérjét alkotó egyik fehérjétől könnyen elválasztható, mivel

- 1) kicsi a molekulatömege:  $M_r=14,6 \times 10^3$  Da, és
- 2) magas az izoelektromos pontja:  $pI=11,0$ .

Mivel a tojásfehérjét alkotó fehérjénél kisebb a móltömege, a lizozim méretkizárási kromatográfiával is jól elválasztható. Magas  $pI$  értéke pedig lehetővé teszi, hogy ioncserélő kromatográfiával különítsük el a többi fehérjétől.

Egy fehérje molekula töltése függ a  $pH$ -tól és a fehérje izoelektromos pontjától. Az izoelektromos pontnál alacsonyabb  $pH$  tartományban a fehérjének pozitív töltése van. A lizozim még jóval a semleges  $pH$  tartomány fölötti  $pH$  értékeknél is pozitív töltéssel bír ( $pI=11,0$ ), ezért kation cserélővel jól tisztítható. A kation cserélő megköti a pozitív töltésű lizozimot, míg a többi negatív töltésű fehérje a tojásfehérjéből áthalad az oszlopon. A lizozim az össz tojásfehérje 8-10 %-t alkotja, így módon kationcserélővel az össz fehérje 10 %-a kötődik meg, míg a „szennyező” 90 % átmegy az oszlopon.

### 3.2. FELADAT:

A gyakorlaton **tojásfehérje oldatot kromatografálunk** ioncserélő CM-TRISACRYL oszlopon. Meghatározzuk az eredeti tojásfehérje oldat, valamint az oszlopról eluált frakciók fehérjetartalmát és lizozim aktivitását. A fehérje koncentrációt biuret reakcióval mérjük, a lizozim aktivitást *Micrococcus lysodeikticus* sejtuszpenzió zavarosság csökkenésével határozzuk meg.

1 db tojásfehérjét 5x-re hígítunk TRIS-HCl pufferrel, s az így kapott oldatot átszűrjük vattán, üvegtölcsérben. Ez lesz az  $F_0$  oldat. Az előkészített oszlopok 4 g gélt tartalmaznak, TRIS-HCl pufferrel átmosva.

Engedjük a puffert a géloszlop tetejéig lefolyni, majd zárjuk el a kifolyó nyílást. Pipetázzunk óvatosan 5 ml tojásfehérje oldatot ( $F_0$ ) az oszlopra. A frakciószedés innen kezdődik, 3 ml-s frakciókat szedünk. A kifolyó nyílást megnyitva az oszlop beszívja a mintát, majd az eluáló pufferrel (TRIS-HCl) mossuk tovább az oszlopot. Szedjük 7 db frakciót.

Ezután puffercsere következik, a második eluáló pufferrel mossuk tovább az oszlopot, további 5 db 3 ml-s frakciót szedve. A második eluáló puffer 0,05 M TRIS-HCl puffer,  $pH$  8,2, amely 0,1 M NaCl-t tartalmaz. Ezzel szennyező fehérjék távoznak az oszlopról.

Ismét puffercsere, a harmadik eluáló puffer 0,05 M TRIS-HCl puffer,  $pH$  8,2, amely 0,75 M NaCl-t tartalmaz. Szedjük ismét 5 db 3 ml-s frakciót, ezekben fog a lizozim eluálódni az oszlopról.

tojásfehérjét 5x-re hígítani 0,05 M TRIS-HCl pufferrel → F<sub>0</sub>  
 ↓  
 5 ml F<sub>0</sub> az oszlopra; mosás 0,05 M TRIS-HCl pufferrel →  
 1-7 frakció, (3 ml)  
 ↓  
 puffercsere: 0,05 M TRIS-HCl puffer, pH 8,2, + 0,1 M NaCl →  
 8-12 frakció, (3 ml)  
 ↓  
 puffercsere: 0,05 M TRIS-HCl puffer, pH 8,2, + 0,75 M NaCl →  
 13-17 frakció, (3 ml)

### Mérések:

**Lizozim aktivitásmérés:** A lizozim szubsztátjaként *Micrococcus lysodeikticus* baktérium sejtek oldatát használjuk (0,2 g/l, 0,05 M foszfát pufferben, pH 6,3). A mérés alapja, hogy a baktérium oldat zavarossága csökken, mivel a lizozim feloldja a baktériumok sejtfalát. Ezt a zavarosság csökkenést követjük fotométerrel, 450 nm-n kell mérni az abszorbancia változást. A *Micrococcus lysodeikticus* baktériumszuszpenzió abszorbanciája 0,6-0,8 között van. A lizozim koncentrációt úgy kell megválasztani, hogy az abszorbancia csökkenés 1 perc alatt kb. 0,1 legyen.

A fotométert a foszfát pufferre nullázzuk. A küvettába pipetázzunk 1 ml *Micrococcus lysodeikticus* sejtuszuszpenziót, ennek megmérjük az abszorbanciáját, majd 1 ml enzimoldatot adunk hozzá, s mérjük az 1 perc alatti A<sub>450</sub> csökkenést.

A lizozim aktivitását az abszorbancia csökkenésből számítjuk ki;

$$\text{aktivitás} = \Delta A_{450} \times \text{hígítás}$$

1 U az az aktivitás, ami 1 perc alatt 1  $\Delta A_{450}$  változást okoz!

Az aktivitás méréshez az F<sub>0</sub> oldatot 200x-ra kell hígítani, míg a frakciókat 50x-re. Kivétel a 13-14-es frakciók, melyekben a lizozim töményen eluálódik az oszlopról, ezeket 200 - 400x-ra kell hígítani.

**Fehérje koncentráció mérés:** A frakciók fehérje tartalmának meghatározásához kalibrációt készítünk BSA oldat felhasználásával. A standard oldat 10 mg/ml BSA-t tartalmaz, a fehérje koncentrációt Biuret reagenssel mérjük.

Állítsuk össze az alábbi referencia sort:

Oldatok (ml)						
Kémcsövek	1	2	3	4	5	6
Fehérje standard	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
TRIS-HCL puffer	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Biuret reagens	4	4	4	4	4	4
Fehérje konc. a mérendő 1 ml mintában (mg/ml)						

Az oldatokat összerázzuk, majd 30 percig állni hagyjuk. Ezután megmérjük az abszorbanciájukat 540 nm-nél. A vak oldatban csak TRIS-HCl puffer és Biuret reagens lesz. Ez alapján kalibrációs egyenest készítünk. A kalibrációs egyenesen ábrázolni kell az A<sub>540</sub>-t a fehérje koncentráció függvényében.

Ezután végezzük el a Biuret próbát a frakciók 1-1 ml-ével, valamint az F<sub>0</sub> oldat 0,5 ml-ével! Számítsuk ki a referenciasor alapján a frakciók és a tojásfehérje oldat fehérjetartalmát!

Az eredményeket foglaljuk táblázatba, mely tartalmazza az alábbiakat:

Frakció	Térfogat (ml)	Feh. konc. (mg/ml)	Össz feh. tart. (mg)	Lizozim akt. (U/ml)	Össz lizozim (U)	Spec. akt. (U/mg)
F <sub>0</sub>						
1						
2						
stb.						

Számítsuk ki, hogy az oszlopra felvitt 5 ml F<sub>0</sub> oldat fehérjetartalmának és lizozim aktivitásának hány %-t kaptuk vissza az eluált frakciókban. Hogyan változott a lizozimra vonatkoztatott specifikus aktivitás?