

METODA PERFEȚIONATA PENTRU EXTRAȚIA PROTEINELOR DIN ORGANE ȘI ȚESUTURI

E. Módy

Alături de studiul proteinelor din umorile corpului, o însemnătate din ce în ce mai mare capătă cercetarea proteinelor solubile, din diferite organe și țesuturi (4, 5, 16, 25, 53, 58, 59, 69). Studiul acestor proteine ne poate furniza date prețioase referitoare la interdependențele existente pe de o parte între metabolismul proteinelor și unele procese patologice tisulare sau organice, iar pe de altă parte între disproteinemii și metabolismul protidic tisular.

Dintre metodele uzuale de fracționare a proteinelor (precipitare salină, ultra-centrifugare, electroforeză, polarografie, 46) metoda fracționării electroforetice, și anume, așa numita electroforeză „în zonă”, efectuată pe hirtie, respectiv în gel de amidon sau geloză, s-a dovedit a fi cea mai corespunzătoare. Astfel au fost elaborate o serie de metode pentru studiul electroforetic al proteinelor solubile din cele mai variate țesuturi (piele (70), tumori (23, 29, 52) și organe (creier) (1, 3, 7—9, 17, 20, 25, 38, 43, 44, 46, 54, 47, 60, 61—63, 67, 73, 78), stomac (29, 66), mușchi striati (2, 6, 10, 17—19, 20, 21, 24, 25, 28, 32, 36, 40, 42, 45, 56), mușchi netezi (5), inimă (13, 14, 22, 31, 33, 34, 47—52), ficat (11, 12, 26, 29, 39, 41, 56, 64, 66, 71, 78), piămîni (56, 65), rinichi (56, 67) etc.). Evaluarea rezultatelor experiențelor este considerabil îngreunată, pe de o parte de eterogenitatea metodelor utilizate, iar pe de altă parte — într-o oarecare măsură — de caracterul lor inadecvat.

Unii recomandă pentru extracție o soluție izotonică de ClNa (3, 4, 39, 46, 54), de ClK și fosfați cu molaritate și pH-uri variabile (13, 28, 45, 51), precum și soluții tampon cu diferiți componenți, cu pH și forță ionică variabilă. Alții folosesc congelarea omogenizatului de țesut sau de organ, cu ajutorul aerului lichid (17, 54) sau în frigorifer, pentru distrugerea structurii celulare și pentru asigurarea unei eluții și mai bune a proteinelor celulare.

Inconvenientul comun al metodelor de pînă acum — al căror studiu comparativ ar depăși limitele acestei publicații —, constă în faptul, că acestea asigură fie extracția numai a unei părți a proteinelor (din cauza cantității mici, a pH-ului necorespunzător, a solventului), fie în urma folosirii lor, extractele conțin și o suspensie labilă de scleroproteine greu solubile. Precipitarea acestora începe, de obicei, în cursul elaborării și are loc regulat, într-o măsură mai mică sau mai mare cu ocazia fracționării electroforetice. Precipitarea pe bandă de hirtie, sau în gel a componentelor suspendate sau greu solubile duce la apariția unei pete accentuate la punctul de aplicare (apariția așa zisei „fracțiuni a punctului de start”), care îngreunează mult, sau chiar face imposibilă evaluarea rezultatelor.

Pe baza considerentelor de mai sus, ni s-a părut utilă elaborarea unei metode perfecționate, care pe lângă remedierea inconvenientelor metodelor cunoscute să nu fie nici prea laborioasă, iar prin asigurarea condițiilor stabile să dea rezultate unitare.

În urma studiului critic al metodelor existente precum și pe baza unui număr mare de experiențe proprii, rezultatele cele mai fidele au fost furnizate prin executarea succesivă a următoarelor trei manipulări:

1. — *omogenizarea* părților de organe sau țesuturi;
2. — *extracția* proteinelor solubile;
3. — *standardizarea conținutului în proteine* al extractului.

1. — Pentru scopul *omogenizării* fragmentelor de organe sau de țesuturi, metodele obișnuite (măcinare, triturare în mojar cu nisip de cuarț, etc.) sînt corespunzătoare. Noi am folosit omogenizatorul electric cu 50.000 turații/min, care în 5 minute triturează materialul de analizat pînă la fragmente de celulă.

Cantitatea de solvent folosită pentru triturare, în cazul metodelor cunoscute pînă acum, se stabilește în funcție de conținutul protidic al extractului. Folosirea unei cantități mai mari de solventi duce la o diluție atît de mare a extractului, încît împiedică fracționarea electroforetică. Din acest motiv, raportul dintre cantitatea de organ sau de țesut și solvent se stabilește în general la 1:2, sau 1:3. Inconvenientul acestor diluții constă în faptul că randamentul extracției scade, iar forța ionică, de obicei crescută, favorizează apariția nedorită a suspensiilor de scleroproteine hidrofobe.

2. În alegerea calității solventului de *extracție* trebuie să ținem cont de solubilitatea proteinelor și în primul rînd, de exigențele analizei electroforetice ulterioare. Ionii, care nu intră în compoziția soluției tampon folosită pentru electroforeză, desigur contribuie la apariția unor erori tehnice. Cu ajutorul unei dialize ulterioare acest inconvenient poate fi înlăturat, dar duce atît la prelungirea timpului necesar pentru cercetări, cît și la creșterea gradului de denaturare al proteinelor extrase.

Pare deci utilă folosirea soluției tampon (întrebuințată și la electroforeză) atît la omogenizare cît și la extracție. În urma cercetărilor noastre nu am putut proba vre-o diferență între proteinogramele obținute în urma unei omogenizări cu soluții saline sau cu soluții tampon. Principiul metodei noastre constă în faptul că prin utilizarea în cantitate mare a unei soluții tampon cu o forță ionică redusă ($\mu = 0,05$), cu un pH mai alcalin decît punctul izoelectric al proteinelor tisulare (pH 8, 6. tampon medinal-veronal) se obține pe de o parte o îmbunătățire considerabilă a extracției proteinelor solubile, iar pe de altă parte o descreștere pronunțată a stabilității de suspensie a scleroproteinelor hidrofobe precum și a celorlalte fracțiuni insolubile, astfel încît ele pot fi separate prin centrifugare.

3. Conținutul în proteine al lichidului supernatant poate fi adus la o concentrație dorită cu ajutorul ultrafiltrării.

Mersul metodei elaborate, pe baza considerentelor de mai sus, este următorul:

Fragmentele de organe sau țesuturi proaspăt obținute vor fi spălate întîi cu o soluție cloruro-sodică izotonică, pentru îndepărtarea singelui, apoi cu soluția tampon folosită pentru omogenizare și electroforeză. După spălare, fragmentele vor fi tamponate cu precauție (fără a le apăsa prea tare) cu ajutorul unor benzi de hirtie de filtru, iar după tamponare vor fi cîntărite pe balanța tehnică. Într-un cilindru gradat se toarnă un volum de soluție tampon de 10—20 ori mai mare decît greutatea fragmentului de organ sau țesut. Bucățile vor fi fragmentate cu ajutorul unor foarfeci sau măcinător, apoi vor fi supuse omogenizării. În cazul unei triturări cu nisip de cuarț, soluția tampon va fi adăugată succesiv, în cantități mici, folosind însă un omogenizator electric, cantitatea de tampon va fi adăugată dintr-o dată.

Pentru extracția proteinelor solubile, omogenizatul va fi pus la frigifer la $+4^{\circ}\text{C}$ timp de 12—24 ore, în eprubete cu volum corespunzător. Eprubetele vor fi agitate între timp de câteva ori.

Conținutul în proteine al extractului va fi adus la valoarea dorită prin ultrafiltrarea supernatantului obținut în urma centrifugării. Extractul va fi supus centrifugării cu 6.000 t/min timp de 30 min, (resp. cu 3.000 t/min timp de 60 min). Supernatantul care conține 0,2—0,4 g % proteine și care nu poate fi folosit direct pentru fracționare electroforetică, va fi ultrafiltrat, în săculețe de colodiu cu pori de dimensiuni corespunzătoare și la o presiune negativă de —30, —40 mm Hg, până la a 30—40-a parte a volumului său inițial. Ultrafiltrarea are loc în 2—3 ore. Pentru acest scop am folosit un aparat confecționat de noi (35), dar în principiu poate fi utilizat orice fel de aparat de ultrafiltrare, cu condiția ca concentrarea extractului să fie efectuată contra soluției tampon și nu contra apei distilate, deoarece în cazul din urmă are loc precipitarea fracțiunii euglobulinice, insolubile în apă.

După terminarea ultrafiltrării, conținutul în proteine al extractului este de 6—8 g%, soluția fiind omogenă și stabilă. La nevoie poate fi păstrată la frigifer timp de mai multe zile. La fracționarea electroforetică a extractelor tisulare sau de organe pot fi separate de obicei cinci fracțiuni bine delimitate, dintre care pe-tele corespunzătoare fracțiunii a treia se separă în două subfracțiuni. La nivelul punctului de aplicare nu apare nici o precipitare.

Metoda descrisă am folosit-o până acum pentru studiul proteinelor solubile din creier, ficat, plămîn, mușchi sriați și cu preferință pentru studiul proteinelor din cord. Figura 1/a reprezintă proteinograma cordului normal de iepure, iar figura 1/b proteinograma cordului unui iepure tratat cu acidul silicic coloidal. Este evidentă diminuarea fracțiunii globulinice cu o mobilitate înaltă în favoarea fracțiunilor mai lente.

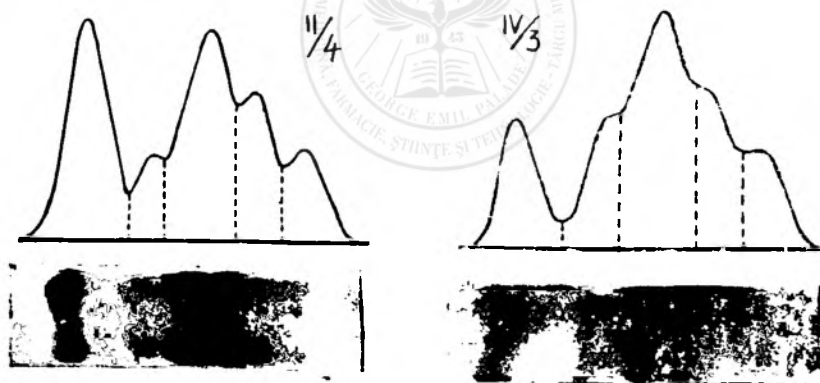


Fig. 1 a).

Fig. 1 b).

Această metodă poate fi utilizată cu succes pentru studiul proteinelor, lipos și glicoproteinelor tuturor organelor și țesuturilor cu excepția țesuturilor bogate în sine, deoarece hemoglobina prezintă modifică într-o măsură inapreciabilă rezultatele examinărilor.

Concluzii: Extracția proteinelor solubile în urma omogenizării țesuturilor și organelor cu o cantitate de 10—20 ori mai mare de tampon cu o forță ionică redusă și cu un pH alcalin, va fi mai completă, iar îndepărtarea scleroproteinelor hidrofobe precum și a celorlalte particule insolubile va fi mai bună. Conținutul în proteine al extractului poate fi adus la valoarea dorită prin ultrafiltrare în

săculețe de colodiu. Cu ocazia fracționării electroforetice a extractului concentrat prin ultrafiltrare la un conținut de 6—8 g % de proteine, se separă 5—6 fracțiuni bine delimitate.

Sosit la redacție: 24 octombrie 1964.

Bibliografie

1. ALLEGGRANZA A., MAROBBI O.: *Atti Accad. Med. Lombarde* (1960), 15, 1, 32; 2. BENAS A.: *Pflügers Arch. ges. Physiol.* (1959), 269, 404; 3. BERNSOHN J., BARRON K. D., HESS A. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1961), 107, 4/773; 4. BIRO E.: *Kotnu*, II, (1954), 399; 5. BLASIUS RUTH, SCHUCK J.: *Kl. Wsch.* (1955), 33, 11/12, 276; 6. BUSCAINO G. A., CORSI A.: *Acta Neurol. (Napoli)*, (1959), 14/4, 397; 7. CHATAGNOIU C. et P.: *Ann. biol. Clin.* (1960), 18, 7/9, 156; (1960), 34, 140; 8. CORSI A., BARGELLINI P.: *Arch. di Sci. Biol.* (1958), 42, 6, 552; 9. CONGIU L.: *G. Biochim* (1959), 8, 255; 10. CONGIU L.: *Ital J. Biochem* (1959), 8, 5, 261; 11. CRUCK S.: *Arch. Internat. Physiol.* (1957), 65, 97; 12. GRUCK S.: *Arch. Internat. Physiol.* (1957), 65, 117; 13. DEMLING K.: *Kl. Wschr.* (1952), 3, 4, 74; 14. DENIS L. J., PROUT G. R., VAN SANDE M., VAN CAMP K.: *Jama* (1961), 178, 11, 1093; 15. DIANZANI MOR M. A.: *Experientia (Suisse)*, (1959), 15, 12, 461; 16. DOLCINI C., DOLCINI B. C.: *Riv. Biol.* (1960), 52, 1, 75; 17. DREYFUS J. C.: *J. Physiol. (Paris)*, (1959), 51, 3, 45; 18. DREYFUS J. C., SCHAPIRA G., LAURENT G.: *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, (1959), 153, 6, 928; 19. DVORNYKOVA D. D.: *Acta. physiol. Acad. Sci. Hung.* (1960), 17, 117; 20. EMMART E. W., HECAIUDEK G.: *Arch. Path. (Chicago)*, (1960), 70, 6, 730; 21. FISCHER R., MONNIER J.: *Experientia* (1961), 17, 2, 78; 22. GEMACHLICH M., SCHEIFFARTH F., FRENGER W.: *Z. ges. exp. Med.* (1958), 130, 4 312; 23. GOFFART L.: *Arch. Int. Physiol.* (1959), 67, 3, 427; 24. GORANOV I., TODOROV Y., SZAKCSOKOVA X.: *Nature (Lond.)*, (1959), 184, 4688, 64; 25. HOFFMANN G., SCHINKO H.: *Klin. Wsch.* (1956), 34, 1, 86; 26. HUGHES B. P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1959), 1, 194; 27. ILKOV A., NIKOLOV T.: *Vopr. med. klin.* (1959), 5, 388; 28. INESSI G., DEZSI P.: *Bull. Soc. Ital. Biol. sper.* (1957), 33, 7; 29. IVANOV I. I., ZSAKOVA Z. N., ZINOVJEVA I. P.: *Biochimija* (1959), 24, 3, 451; 30. JACKSON C. E., BLOCK W. D.: *J. lab. Clin. Med.* (1956), 820; 31. KAPLAN M. H., ALLENBACH F. D.: *J. Exp. Med.* (1961), 113, 1, 1; 32. KAPLAN M. H., MOYESERIAN MARYAM KUSHNER I.: *J. Exp. Med.* (1961), 113, 1, 17; 33. PAPS G.: *Arch. Psychiatr. Nervenkrankh.* (1954), 192, 115; 34. KEELER R. F., YOUNG S.: *Biochem J.* (1961), 81, 1, 93; 35. KEREKES M., MODY J.: *Sub tipar*; 36. KIYOTA K., FUJIYOSHI T., MAESAKI K.: *Folia psychiatr. neurol. jap.* (1959), 13, 1, 23; 37. KUZOVLEVA O. B., VAN-CSUN-IAN: *Biochimija* (1959), 24, 3, 350; 38. KRONMAN M. J., WEINBERGER L. G., WINTERBOTTOM R. J.: *Arch. Biochem.* (1960), 86, 238; 39. KUZOVLEVA O. B., VANG-CSUNG-YEN: *Biochimija* (1959), 24, 550; 40. LAURENT R., DREYFUS J. C., SCHAPIRA G.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1961), 43, 2—3, 423; 41. LOWENTHAL A., KARCHER D., VAN SANDE N.: *Exp. Neurol.* (1959), 1, 3, 233; 42. MISSERE G., RISIO C. D., TONINI G.: *Bull. Soc. Ital. Biol. sper.* (1957), 33, 204; 43. MOREAU-COLLINET C., HAMOIR G.: *Arch. internat. Physiol. Biochim. Belg.* (1960), 68, 1, 221; 44. MOTET-GRIGORAȘ D.: *Studii Cerc. Bioch.* (1959), 2, 449; 45. NOWY H.: *Zschr. exper. Med.* (1955), 126, 1, 46; NOWY H., SEITZ W.: *Zschr. ges. exp. Med.* (1955), 126, 1, 1; 47. NOWY H., BLASIUS R., KARL O.: *Zschr. ges. exp. Med.* (1955), 126, 1, 12; 48. NOWY H., FRINGS H. D., WALCHER A., TENDERICH L.: *Zschr. ges. exp. Med.* (1959), 131, 5; 49. NOWY H., FRINGS H. D., FENDERICH L.: *Naturwiss.* (1959), 46, 1, 18; 50. NOWY H., FRINGS H. D., WALCHER A., TENDERICH L.: *Zschr. ges. exp. Med.* (1960), 131, 5, 478; 51. OSTROWSKI K., KOMENDER J., KWARECKI K.: *Experientia* (1961), 17, 4, 183; 52. PALLADIN A. V., POLZAKOVA N. M.: *Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R.* (1956), 107, 4, 268; 53. PALLADIN A. V., POLZAKOVA N. M.: *Ukrain. biol. Zs.* (1959), 31, 3, 307; 54. PINTOZZI A.: *Clin. pediatr. Ital.* (1959), 41, 7, 571; 55. POLZAKOVA N. M.: *Ukr. biol. Zs.* (1959), 31, 3, 314; 56. PORTOCALE R., BOERU V.: *Vopr. Med. Him.*

(1959), 5, 4, 310; 57. REJNEK J., BEDNARIL: *Physiol. Bohem.* (1961), 10, 1, 89; 58. ROBERTSON D. M.: *Neurochem* (1961), 1, 358; 59. ROBERTSON D. M.: *J. Neurochem.* (1960), 5, 2, 145; 60. ROBERTSON D. M.: *J. Neurochem.* (1960), 6, 105; 61. ROBERTSON D. M.: *J. Neurochem* (1960), 6, 2, 111; 62. SATO T., AKIBA S., ISE H., YAMANAKA V.: *Tohoku J. exp. Med.* (1958), 68, 2, 193, 63. SCHMIDT H., HABECK: *Zschr. ges. exp. Med* (1959), 131, 3, 255; 64. SCHWARTZMANN V.: *Rev. Fr. et Clin. Biol.* (1959), 4, 3, 265; 65. ȘERBAN M.: *Studii Cerc. Bioch.* (1959), 2, 369; 66. SOBEL H., MYERS S. M., COHEN F.: *Exp. Med. Surg.* (1959), 17, 119, 128; 67. SOROF S., YOUNG E. M., SPENCE M. M., FETTERMAN P. C.: *Biochem. biophys.* (1960), 38, 559; 68. SPIER R. W., RÖCKL H., PASCHER G.: *Kl. Wschr.* (1954), 33/34, 770; 69. SUNDERMANN A., ALTENBRUNN H. J. *Zschr. ges. inn. Med.* (1956), 3, 105; 70. SZABÓ I., MÓDY J., SZEKELY J.: *Ses. Acad. R.P.R. Baza de cerc. Tg.-Mureș* (1960), 10, 12; 71. TRUFANOV A. V.: *Vopr. Med. Him.* (1959), 5, 6, 403; 72. VOSKOBOJNIKOV G. V.: *Biochimija* (1959), 24, 3, 404; 73. WUHRMANN F., NIGGLI S.: *Zschr. f. Kreislaufforsch.* (1959), 48, 967; 74. WUHRMANN F.: *Wiener Med. Wschr.* (1959), 109, 41, 788.

