

CROMATOGRAFIA PROTEINELOR

I.

Cromatografia proteinelor pe schimbători de ioni anorganici

A. Cojocaru

Studiul proteinelor plasmaticе, cu deosebire a fracțiunilor interesate în reacția de adaptare la stimuli nespecifici și antigenici a făcut în ultimul deceniu progrese remarcabile. Orizontul cunoștințelor noastre asupra rolului biologic al proteinelor inclusiv asupra funcției imunitare a globulinelor serice s-a lărgit considerabil, datorită introducerii în tehnica de cercetare pe lângă imunelectroforeză și ultracentrifugare, a cromatografiei proteinelor pe schimbători de ioni și geluri filtrante.

Extensiunea pe care a luat-o în ultimii ani procedeul modern de cromatografie a proteinelor pe coloană cu ioniți celulozici și geluri, impune o estimare a utilității sale practice și valorii metodologice, expunerea succintă a rezultatelor obținute în studiul macromoleculelor proteice cu această tehnică, a posibilităților și limitelor ei, a perspectivelor pe care le deschide izolării în stare pură a constituenților biologic activi ai plasmеi sanguine.

Abordarea acestui subiect este determinată și de faptul că deși la noi în țară tehnica de cromatografiere a proteinelor pe coloană cu schimbători de ioni și ge-

luri filtrante este cu succes utilizată în institutele științifice cu tradiții, numeroși savanți de valoare internațională și cercetători de înalt prestigiu acordându-i un credit bine meritat, totuși în numeroase centre medicale ea nu se utilizează curent sau este total neunoscută.

Particularitatea distinctivă a proceselor de schimb ionic, constă din „Inlocuirea ionilor din structura moleculară a ionitului, cu ionii de același semn din soluția electrolitului.” (T. Ionescu, 1965).

După natura ionilor de schimb, se disting schimbători de anioni — *anioniți* — (Dowex-1, Dowex-2, etc.) și schimbători de cationi — *cationiți* — (Dowex-50, Amberlite IRC-50, etc.). Anioniții pot fi puternic bazici ($-N+R_3$) sau slab bazici ($-N+HR_2$), cationiții la rândul lor sînt puternic acizi ($-SO_3$) sau slab acizi ($-COO^-$).

Schimbul ionic este reversibil și decurge pentru anioniții baze după ecuația: $ROH + NaCl \rightleftharpoons RCl + NaOH$, iar pentru cationiții acizi conform ecuației: $HR + NaCl \rightleftharpoons NaR + HCl$.

După tratarea prealabilă cu tamponul de echilibrare a schimbătorului de ioni, el este introdus în coloana cromatografică ale cărei dimensiuni variază după tipul schimbătorului și al procedurii de cromatografiere utilizat. Soluția proteică dializată față de tamponul de echilibrare, se introduce în coloana ionică și după fixarea proteinelor pe adsorbant se eluează discontinuu sau cu gradient, percolînd prin coloana cromatografică soluții tampon de anumit pH și forță ionică. Lichidul efluent este colectat în fracțiuni distincte, prin utilizarea unui colector automat de fracțiuni cu comandă electronică, iar concentrația proteinelor, după desorbție este determinată spectrofotometric în ultraviolet sau prin colorare și fotometrare după Lowry și colab.

Înregistrînd pe un sistem de coordonate carteziene, pe abscisă volumele de efluent, iar pe ordonată valorile de extincție sau direct concentrația proteinelor după o curbă de etalonare stabilită în prealabil, se obține o diagramă, *cromatograma* ale cărei deflexiuni corespund fracțiunilor individualizate. După liofilizare, materialul proteic conținut în fracțiunile cromatografice izolate este utilizat pentru precizarea proprietăților fizico-chimice și biologice ale proteinelor studiate.

Procesele de schimb ionic fiind reversibile, coloana cromatografică este folosită din nou după regenerare, posibilitatea de utilizare a coloanei fiind limitată de degradarea schimbătorului care survine inevitabil după cicluri repetate. Regenerarea cationiților se realizează cu acizi minerali (HCl, H_2SO_4), a schimbătorilor de anioni cu soluții alcaline (NaOH)

Deosebindu-se de cromatografia de adsorbție moleculară (*Tvet*), intrucit pe coloană se rețin ionii, nu moleculele substanțelor din soluția respectivă, cromatografia prin schimb ionic poate fi efectuată cu metode de analiză frontală, de analiză cromatografică prin deplasare sau prin eluție.

Fracționarea cromatografică e dependentă de structura ionitului, de gradul de reticulară a schimbătorilor de natură rezinică, de afinitatea chimică dintre ionii soluției cromatografiate și ionii rețelei rășinii, respectiv de felul ionilor de schimb și natura grupelor polare, de capacitatea de difuziune a substanțelor în interiorul particulelor de adsorbant, de gradul de diluție a soluțiilor de electroliți, de regimul termic și de legea acțiunii maselor etc.

Schimbul ionic are loc la nivelul peliculei subțiri de lichid de la interfața solid — lichid prin mecanisme momentan insuficient elucidate, mai multe modalități fiind presupuse: teoria dublului strat electric, a echilibrului de membrană Donnan, legea acțiunii maselor sau teoria rețelei cristaline. Cert este că aplicarea unilaterală a oricăreia din aceste teorii la schimbul ionic se dovedește insuficientă, în stadiul actual al cunoștințelor noastre, studii sistematice fiind în continuare necesare.

În cursul cromatografierii pe coloană cu schimbători de ioni, hidratarea grupelor hidrofili ($-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NH}_2$) ale rețelei rezinice determină un proces de turgescență a rășinii ionice, potențialul de schimb al unui ion fiind la rîndul său cu atît mai ridicat cu cît hidratarea acestuia este mai exprimată. Selectivitatea rășinilor ionice pentru ioni cu potențiale de schimb diferite, proprietate dependentă de gradul de reticulare a rășinii, permite separarea acestora din soluția de electroliți și recuperarea lor cantitativă. Neelectroliții deși difuzează în interiorul particulelor de adsorbant, nu participă la schimbul ionic și ca atare nu sînt reținuți de rețeaua macromoleculară rezinică.

Pînă la introducerea recentă în tehnică a sitelor moleculare organice s-au utilizat în cromatografia proteinelor, ionizii anorganici pe bază de alumo-silicați, rășinile sintetice schimbătoare de ioni și pe scară largă în ultimul deceniu schimbătorii de ioni derivați ai celulozei.

Dintre schimbătorii de ioni de origine minerală făcînd parte din categoria alumo-silicaților naturali (micele hidratate, montmorillonitul, zeoliții), *Nikkila* și *Oker-Blom* utilizează pentru cromatografierea lipoproteinelor *montmorillonitul*. Caracterizat ca toate mineralele micacee printr-o structură cristalină stratificată, constînd din straturi de oxid de siliciu și oxid de aluminiu, legate prin cationi de sodiu, potasiu, calciu și magneziu, montmorillonitul la pH 8 manifestă o adsorbție selectivă pentru proteinele cu bogat conținut lipidic.

Cu rezultate mai bune s-au folosit *permutiții* alumo-silicați, cu proprietăți de schimb cationic, introduși în tehnică încă din 1906. *Katzman* reușește să purifice gonadotropina corionică de 150 de ori, pe coloane de permutit (Decalso) echilibrat la pH 3,5 utilizînd ca eluent acetatul de amoniu 10% în etanol 33%.

Adsorbantii anorganici folosiți curent sînt *gelul de silice, oxidul și hidroxidul de aluminiu*.

Silicagelul se comportă ca un cationit slab acid în prezența cationilor monovalenți.

Prin adsorbția metalului pe gelul de silice se eliberează o cantitate de hidrogen-ioni echivalentă cu cantitatea de ioni metalici reținuți pe coloană. Schimbul ionic se realizează numai în condițiile saturării prealabile a gelului de silice cu H^+ .

Holt și *Scheel* fixează ovalbumina pe gel de silice în ser fiziologic la pH 5—6, eluînd-o cu fosfat alcalin; capacitatea de adsorbție este dependentă de pH. Silicatul de magneziu (*Florisil*) a fost utilizat de *Rongone* pentru cromatografierea cetoesteroizilor din plasmă și urină.

Introducerea grupelor $-\text{PO}_3\text{H}_2$ dar mai ales a grupelor sulfonice $-\text{SO}_3\text{H}$ în structura gelului de silice conferă cationitului o mare capacitate de fixare a cationilor, de asemenea a alcoolilor, eterilor și bazelor organice din soluțiile apoase.

Kruh fixează hemoglobina de iepure pe oxidul de aluminiu, eluînd cu apă, apoi cu tampon de fosfați 1,75 M la pH 6,8 și obține două fracțiuni cromatografice. Hemoglobina umană adsorbită de același ionit, este eluată în condiții similare dar la pH 6,5 de către *Roques*. *Van Forsan* separă pe oxid de aluminiu hemoglobina fetală de cea adultă, fiecare avînd 3 componente distincte. Pe oxidul de aluminiu la pH 7,0 *von Euler* cromatografiază glicerofosfatiza obținînd cofactorul prin eluție cu NH_4OH 1%; la fel *Adler* reușește o separare parțială a coenzimei lactic-dehidrogenazei prin cromatografiere pe oxid de aluminiu, în fosfat 0,1 M la pH 8,3 prin dezvoltare cu apă.

Hidroxidul de aluminiu $\text{Al}(\text{OH})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ este utilizat la fracționarea hemoglobinei umane permițînd obținerea a două deflexiuni cromatografice (*Altshol*), de asemenea, după echilibrarea la pH 6,2 este folosit la adsorbția fenolazelor și eluția lor consecutivă cu fosfat de sodiu 20% la pH 7,8 (*Enselme*), iar prin amestec cu *Kieselguhr*-ul la fracționarea tireoglobulinei și izolarea unor compuși proteici bogați în tiroxină (*Rivière*)

Caolinul (silicatul de aluminiu hidratat) a fost utilizat la cromatografierea albuminei de cal (*Dzutsch*) și a hemoglobinei, izotermele de adsorbție fiind dependente de pH și concentrația salină, iar *caolinitul* (silicatul natural hidratat de aluminiu) pentru cromatografierea chimotripsinei, tripsinei și lizozimului (*McLaren*).

Pe carbonatul de calciu saturat cu NaHPO_4 s-a obținut o purificare de 10 ori a succindehidrogenazei (von *Euler*), iar dipeptidaza este separată de aminopolipeptidază pe carbonatul de zinc prin spălare cu apă și fosfat de sodiu (*Turba*).

O anumită întrebuintare a găsit *gelul de fosfat de calciu* (*Seeco*, *Glaser*). Dificul ățiile datorite rezistenței de curgere n-au putut fi învinse decât parțial prin amestecul gelului cu „*Supercel*”, prepararea gelului în prezența celulozei sau după *Tiselius* prin precipitarea clorurii de calciu cu un exces de fosfat disodic. Se obțin astfel debite corespunzătoare și posibilitatea cromatografierii proteinelor cu greu-țări moleculare variate de la 44.000 (ovalbumină) pînă la 17.000.000 (virusul mozaicului tutunului).

Tiselius adsoarbe pe fosfat de calciu albumină umană și prin eluție cu clorură de sodiu obține 2—3 componente proteice. La fel, cromatografiază pe același adsorbant carboxihemoglobină bovină, eluind-o cu Na_2HPO_4 0,04—0,05 M, stabilind dependența desorbției de concentrația salină.

Cromatografia proteinelor serice (albumine și globuline) pe fosfatul de calciu amestecat cu „*Supercel*” a fost efectuată de *Drake*; coloana a fost echilibrată cu fosfat 0,035 M la pH 6,7 și eluția s-a făcut cu același tampon cu molaritate crescută (0,105 M).

S-a încercat utilizarea acestui schimbător anorganic în cromatografierea unor enzime. Astfel *Lundqvist* purifică D-aminoacidoxidaza pe fosfatul de calciu echilibrat la pH 7,8 prin creșterea forței ionice a tamponului. *Agner* obține catalaza cristalizată după purificare pe acest ionit anorganic echilibrat la pH 5,5 eluția făcîndu-se cu tampon de fosfați la pH 8,0.

La fel, s-au purificat pe fosfatul de calciu, celuloza cu tampon de fosfați de sodiu și potasiu cu gradient de molaritate (0,001 M — 0,050 M) (*Swingle, Takemoto*), virusul mozaicului tutunului (*Tiselius*), enzimele din lichidul seminal — echilibrare la pH 7,8 și eluție prin creșterea gradată a forței ionice a tamponului (*Lundqvist*). În fine, lactoperoxidaza a fost separată de proteinele inactivate pe un amestec de fosfat de calciu, gel de silice și „celite” echilibrarea făcîndu-se cu K_2HFO_4 0,1 M, iar eluția cu K_2HPO_4 1,0 M (*Calman*).

Recent, transaminazele din creierul de șobolan au fost cromatografiate pe coloana de fosfat de calciu și eluate cu tampon de fosfat de molaritate crescută. Fosfatul de calciu utilizat a fost preparat după metoda lui *Tiselius, Hjertén* și *Levin*. Pentru eluție s-au utilizat soluții tampon de fosfați la pH 7,0, dar de molaritate variabilă: 0,05 M, 0,08 M și 0,20 M.

Indolaminoacid-transaminaza denumită transaminaza III a fost eluată cu tamponul de fosfat 0,08 M, iar fenilaminoacid-transaminaza denumită transaminaza II cu tamponul de fosfat 0,20 M (*Tangen*). În fine, *Björk* purifică endonucleazele din cartofi pe gelul de fosfat de calciu preparat după *Keilin* și *Hartree*.

Utilizarea schimbătorilor de ioni anorganici în cromatografia pe coloană a proteinelor a găsit astfel în prima etapă a perfectării acestei tehnici numeroase aplicații practice în domeniul purificării proteinelor plasmactice și proteid-enzimelor

Progresul rapid al cercetărilor de chimie a macromoleculor a relevat însă dezavantajul utilizării schimbătorilor anorganici de tipul montmorillonitului sau permutițiilor, datorită capacității de schimb redusă a adsorbantului și a introduș în tehnica de cromatografiere pe coloană a proteinelor, rășinile sintetice schimbătoare de ioni, derivații acizi și bazici de celuloză și gelurile filtrante.

Rășinile sintetice cu proprietăți de schimb ionic se obțin în genere prin copolimerizarea stirenului și a acidului metaacrilic cu divinilbenzenul, ionții celulozici prin introducerea de grupe polare în macromolecele celulozei, iar schimbă-

torii Sephadex prin fixarea grupelor ionice pe rețeaua tridimensională a dextranului.

Selectivitatea superioară a acestor schimbători organici a lărgit considerabil sfera lor de utilizare în cromatografia proteinelor.

Prin importanța și perspectivele pe care le deschid în cercetările de biochimie, patologie experimentală și clinică, rezultatele obținute cu schimbătorii organici în diferențierea și purificarea proteinelor cu rol funcțional definit, inclusiv a proteinelor serice, enzimelor și hormonilor de natură proteică, implică o tratare separată.

Scris la redacție: 31 mai 1967.

Bibliografia la autor.