

Disciplina de fiziopatologie (cond.: șef de lucrări Magda Mózés, doctor în medicină)
a I.M.F. Tg.-Mureș

CROMATOGRAFIA PROTEINELOR

II. Rășinile sintetice schimbătoare de ioni

A. Cojocaru

Într-un articol precedent (Revista Medicală—Orvosi Szemle 1967) ne-am referit la posibilitățile de utilizare a schimbătorilor de ioni anorganici în cromatografia proteinelor și am relevat limitele impuse de acest procedeu de fracționare. În articolul de față ne-am propus să prezentăm succint, rășinile sintetice schimbătoare de ioni, care au găsit înaintea apariției lucrărilor fundamentale ale grupului de cercetători din Bethesda asupra ioniților celulozei, o frecventă utilizare în cromatografia pe coloană a proteinelor.

Produse macromoleculare cu grupe polare capabile să efectueze schimbul ionic, rășinile schimbătoare de ioni sînt insolubile în apă, avînd un grad de reticulare adecvat penetrării ionilor din soluție în interiorul rășinii; datorită capacității lor hidrofile ele sînt umflă la contactul îndelungat cu apa.

Prima rășină schimbătoare de cationi a fost preparată de Adams și Holmes în 1934 prin condensarea taninului cu formaldehida.

Rășinile ionice se obțin prin reacții de policondensare și de polimerizare sau copolimerizare.

Rășinile cationice de policondensare (obținute de ex. prin policondensarea acizilor fenol-sulfonici cu aldehide, prin sulfonarea rășinilor fenol-formaldehide etc.) după natura grupelor ionogene din structura lor macromoleculară pot fi puternic acide (cu grupe $-SO_3H$, $-PO/OH_2$), acide (cu grupe $-COOH$) și slab acide (cu grupe $-OH$ fenolic).

Rășinile fenol-formaldehydice avînd grupe sulfonice legate de nucleul benzoic sînt puternic acide, pe cînd cele cu grupe sulfonice adîionate la catene laterale sînt mai puțin acide. Capacități de schimb mai reduse decît cele ale rășinilor sulfonice au rășinile obținute prin condensare cu formaldehida în mediu alcalin al derivaților fenolici fosforilați (rășini fosfonice cu grupe $-PO/OH_2$ sau fosfinice cu grupe $-P/OH_2$) și carboxilați (rășini carboxilice).

Rășinile cationice de polimerizare au cunoscut o largă răspîndire datorită stabilității lor și posibilităților superioare de schimb ionic. Ele se obțin prin polimerizarea monomerilor cu grupe polare acide (sulfonice, fosforice, carboxilice) sau prin introducerea acestora în polimerul sintetizat.

Rășinile polistirenice preparate prin copolimerizarea cu divinil-benzen permit obținerea unui grad de reticulare determinat, după cantitatea de divinil-benzen utilizată în sinteză.

Rășinile anionice sînt puternic bazice, mediu bazice sau slab bazice după poziția grupelor aminice din structura lor moleculară. Adîionarea grupelor aminice la catena alifatică conferă o bazicitate mai exprimată rășinii decît în cazul legării acestora direct de nucleul aromatic. Rășinile anionice de policondensare se obțin prin policondensarea bazelor organice alifactice, aromatice sau hetero-

ciclize cu aldehide sau cetone, iar anioniții de polimerizare prin introducerea grupelor amino în macromolecula unui polimer sau, copolimer format.

Până la introducerea în tehnică a ionizilor celulozici și a sitelor moleculare organice s-au utilizat în cromatografia proteinelor frecvent Dowex-50, Amberlite IR-100, Nalcite HGR (rășini cationice sulfonate), Amberlite IRC-50 (rășină cationică carboxilică), Dowex-1, Dowex-2 (rășini anionice) sau schimbatori de ioni cu utilizări echivalente.

Numeroase fracționări cromatografice au fost efectuate pe coloane de Dowex-50. Rășină cationică sulfonată (grupe active $-SO_3H$) pe bază de stiren și divinil-benzen (copolimer stiren-divinil-benzen) Dowex-50 are o capacitate de schimb de 4.50 mval/g respectiv 2.00 mval/ml. Temperatura maximă de lucru este $150^\circ C$. Tipul normal conține 8% divinil-benzen, tipurile speciale avind un conținut de 1—16% divinil-benzen. Are ca echivalenți rășinile KY-2 C1B (URSS), Amberlite IR-120 (SUA), Chempro C-29 (SUA), Imac C-12 (Olanda), Lewatit S-100 (R. F. a Germaniei), Permutit RS (R. F. a Germaniei), Permutit Q (SUA), Ionac C—240 (SUA), Permutit C-50 D (Franța), Resex P (Anglia), Wofatit KPS-200 (R. D. Germană), Zeo-Karb 225 (Anglia).

Rășina este utilizată cu succes la dezionizarea și deproteinizarea soluțiilor de proteine și electroliți (coloane de Dowex-50 (H^+) și Amberlite IR-4B (OH^-)). *Fluharty și Ballou*. Urmele de acizi aminați și amoniac pot fi îndepărtate cu ușurință din soluțiile proteice prin cromatografierea pe Dowex-50 X8 (H^+).

Pentru purificarea beta-lactoglobulinei de substanțele micromoleculare, o soluție de 3% în acetat de amoniu 0.01 M se trece cu debitul de 2 ml/min. printr-o coloană 20×2 cm umplută cu Amberlite IR-120 (H^+) (echivalent al rășinii Dowex-50) amestecat cu Amberlite IR-400 (OH^-), avind un strat de 5 mm de Amberlite IR-120 (H^+) la fundul coloanei. Se obține o recuperare a proteinelor de 8.5% (*Davie și Newman*). Rășina a dat rezultate excelente în cromatografierea acizilor aminați și peptidelor (*Crampton și Petermann, Siet și colab., Hirs și colab.*).

Sober și colab. cromatografiază ovalbumina și carboxihemoglobina umană pe Dowex-50 cu tampon de fosfat de sodiu 0.01—0.10 μ , pH 5.6—8.6. Efectuind analiza frontală a amestecului de bovalbumină cu hemoglobină, autorii identifică doi componenți albuminici. *Boman* purifică de aproximativ 60 ori prin recromatografiere pe Dowex-50, echilibrat cu citrat-fosfat la pH 5.2 și eluție prin gradient de pH (6.8) fosfatiza, iar analiza frontală semicantitativă a ovomucoidului, conalbuminei și ovalbuminei din proteinele albușului de ou pe aceeași rășină cu fosfat de amoniu 0.1 μ pH 7 a fost efectuată de *Sober și colab.*

Studiind mucopolizaharidele, *Pogell și Koenig* adsorb hidrolizatul de cornee pe Dowex-50 (H^+); prin eluție cu 0.75 N HCl pe Dowex-50, hexozaminele sînt recuperate cantitativ, pe cînd acizii aminați sînt reținuți de rășină, cei bazici fiind complet îndepărtați prin procedeul descris.

A devenit un model de cercetare, cromatografia peptidelor și acizilor aminați pe Dowex-50 efectuată de *Hirs, Moore și Stein* în cursul studiilor lor asupra ribonucleazei. După tehnica descrisă de *Moore* a fost făcută analiza cromatografică a hidrolizatului de enolază din drojdia de bere pe rășina sulfonată polistirenică.

Dowex-50 a fost utilizat cu succes în studiul peptidelor, acizilor aminați, acizilor uronici, hexozelor și a altor substanțe cu moleculă incomparabil mai mică decît a macromoleculelor proteice (*Shellar, Decker, Verrett și Cerecedo, Wolf, Ogle și colab., Mechanic și colab., Soru și colab.*). Sinteze ale acestor cercetări au apărut în mai multe lucrări (*Calmon și Kressman, Schroeder, Stamm*).

Pectinaza a fost purificată pe Amberlite IR-100 (H^+), rășină cationică fenolică sulfonată (grupări active $-OH$, $-SO_3H$), preparată pe bază de fenol și formaldehidă, avind o capacitate de schimb de 1.75 mval/g respectiv 0.65 mval/ml echivalentă cu KY-S (URSS), Duolite G-3 (SUA), Lewatit PN (R. F. a Germaniei), Zeo-Karb 315 (Anglia). Prin eluție la pH 6.1 sau cu tampon la pH 3.9 se separă pe rășina menționată metilesteraza de poligalacturonază.

Numeroase încercări de purificare a proteinelor inclusiv cele cu funcții enzimice s-au făcut pe rășina cationică carboxilică *Amberlite IRC-50*.

Sintetizată pe bază de acid metacrilic și divinil-benzen (SUA), cu grupe active -COOH, rășina are o capacitate de schimb superioară celei precedente de 10 mval/g respectiv 4,20 mval/ml iar temperatura maximă de lucru 125° C. Rășina are ca echivalent: AB-27 (URSS), Duolite CS-101 (SUA), Permutit C (R. F. a Germaniei), Permutit H-70 (SUA), Resanex HB (Anglia), De Acidite FF (Anglia). Pentru indicarea granulației se utilizează notații speciale; de ex. *Amberlite XE-64* este rășina *Amberlite IRC-50* fiind măcinat.

Prins și *Huisman* cromatografiază pe *Amberlite XE-64* carboxihemoglobina umană cu citrat de sodiu la pH 6.5 eluind cu gradient de molaritate de la 0.2—0.3 M. *Boardman* și colab. pe aceeași rășină cu o granulație diferită însă, utilizând citrat de sodiu 0.1 M, 0.34 g ioni Na⁺/l. la pH 5.8, separă carboxihemoglobina fetală și adultă obținută de la toate speciile animale. *Morrison* și *Cook* pe coloane echilibrate cu tampon de citrat-fosfat 0.03 M la pH 6.3 fixează oxihemoglobina pe care o separă în 3 componente prin eluție cu gradient de molaritate (0.03—0.20 M).

Rasmussen purifică trombina prin eluție cu fosfat de sodiu 0.3 M pH 8.0 după o prealabilă adsorbție pe coloana echilibrată cu același tampon de molaritate redusă (0.05 M) și pH neutru. Recent *Baglioni* studiază pe această rășină hemoglobina anormală *Lepore-Boston* cu metoda descrisă de *Allen* și colab.

Chimotripsinogenul alfa a fost izolat din extractele native, prin cromatografie cu fosfat de sodiu, 0.2 M la pH 6.02 obținându-se în unele preparate două spike-uri active; la fel, cu tamponul de aceeași molaritate dar la pH 6.47 s-a izolat ribonucleaza pancreatică. Procedul a permis obținerea unor enzime de înaltă puritate.

Purificarea hialuronidazei prin eluție cu HCl 0.1 M la pH 1.5 după echilibrarea cu săruri de amoniu s-a dovedit de câteva ori mai eficientă decât cea obținută prin eluția cu fosfat de sodiu 0.12 M la pH 7.4. După echilibrarea rășinei cu borax 0.2 M/HCl la pH 8.0 miokinaza este eluată cu HCl 0.05 M.

Cromatografia lizozimului din albușul de ou pe rășina cu granulații fine (*XE-64*), permite prin eluția cu fosfat de sodiu 0.2 M la pH 7.18 obținerea unei enzime omogene; în condiții similare, din lizozimul obținut de la iepuri se fracționează două componente enzimatic active.

Au mai fost purificate pe această rășină pectinaza prin eluție cu HCl 0.1 M după echilibrarea coloanei la pH 7.6; ribozid-hidrolaza prin eluție cu NaCl 2.5 M, după echilibrare la pH 7.3; citocromul prin eluție cu hidroxid de amoniu/acetat de amoniu 0.1 M cu pH variind între 9—10.8 și alte enzime (*Tang* și colab., *Discoll*).

Purificarea de aproximativ 3 ori a angiotoninei a fost obținută prin eluție cu H₂SO₄ 0.1 M, după echilibrare cu fosfat de sodiu la pH 6.5. Din histonele extrase din timusul de vițel s-au obținut pe această rășină 5 sau mai mulți componente prin adsorbția materialului la pH 6.7 și eluție cu acetat de bariu cu gradient de molaritate (0.1—2.0 M). Îndepărtarea impurităților formate în timpul izolării metmioglobinei s-a făcut cu tamponul de fosfat 0.2 M la pH 6.5.

Pe *Amberlite IRC-50* au mai fost purificate fotohemaglutinina (*Prager* și *Speer*), unele virusuri —virusul rabic, al encefalitei japoneze — și unii hormoni (*Kirshner* și colab.).

În fine, dintre rășinile cationice sulfonate *Nalcite HGR* (ionit cu grupare activă-SO₃H, compus din stiren și divinil-benzen, cu capacitatea de schimb 4.5 mval/g respectiv 2.0 mval/ml și temperatura maximă de lucru 120° C, produs în SUA) a fost utilizată pentru cromatografierea virusului influenței, a bacteriofagului T₁ și T₂.

Dintre rășinile anionice s-au folosit curent Dowex-1 și Dowex-2 (Wright, Pasternak și Handschumacher, Bishop și colab.)

Dowex-1 este un anionit puternic bazic avind ca grupare activă $-N\text{CH}_3/3$. Este un polistiren cu un conținut de 8%, divinilbenzen cu capacitatea de schimb 3.50 mval/g respectiv 1.33 mval/ml. Temperatura maximă de lucru pentru forma R-OH este de 50°C iar pentru forma R-Cl 150°C. Cunoscută și ca Nalcite SBR (SUA), rășina are ca echivalenți AB-15 (URSS) Amberlite IRA-400 (SUA), Duolite A-42, Lewatit MN (R. F. a Germaniei), Permutit ESB (R. F. a Germaniei), Ionac C-270 (SUA), Permutit S-1 (SUA), Ionac A-540 (SUA), Zeo-Karb. De Acidite FF (Anglia).

Dowex-2 la fel, este un anionit puternic bazic. E cunoscut și sub numele de Nalcite SAR (SUA); are ca grupare funcțională $\begin{matrix} \text{H}_3\text{C} \\ | \\ \text{H}_3\text{C}-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH} \end{matrix}$ fiind sintetizat pe bază de polistiren și divinilbenzen (dimetil-etanol-benzil-amoniu). Are capacitatea de schimb de 3.50 mval/g respectiv 1.39 mval/ml, temperatura maximă de lucru fiind de 30°C pentru forma ROH respectiv 150°C pentru forma RCl. Conținutul în divinil-benzen variază între 1—16%. Rășina are ca echivalent Amberlite IRA-410 (SUA), Duolite A-40 (SUA), Permutit ES (R. F. a Germaniei), Permutit S-2 (SUA), Ionac A-550, Zeo-Karb. De Acidite FF (Anglia).

Pe coloana cu Dowex-1 X2, a fost parțial purificată fosfodiesteraza separind-o de 5-nucleotidaza prin eluție cu acetat 1.0 M la pH 6.5 după prealabila echilibrare cu acetat 0.2 M la pH 6.0. Din albumina serică s-au obținut pe Dowex-2 doi componenți utilizind pentru adsorbție TRIS 0.02 M la pH 7.2 și eluind cu același tampon 0.40 M. La fel, hemoglobina fixată pe Dowex-2 echilibrată cu TRIS 0.02 M pH 8.3 este eluată diferențiat cu tampon de molaritate crescută (0.10 M). Prin cromatografierea proteinelor serice, se obțin pe același anionit 5 fracțiuni cromatografice, spike-ul albuminic fiind bine delimitat; rășina este tratată cu TRIS 0.02 M pH 7.2 iar eluția se face cu gradient de molaritate (soluție 1.0 M).

Dintre enzime, pe Dowex-2 au fost purificate fosfatazele. Fosfataza acidă este eluată cu TRIS 0.20 M după fixarea materialului cromatografiat cu TRIS 0.02 M pH 7.2; s-a obținut pe acest anionit o purificare a fosfatazelor de 60 ori la recromatografiere, utilizind tamponul de citrat-fosfat pH 5.2 și eluția cu gradient de pH (5.2—6.8).

Cromatografierea proteinelor pe coloană cu rășini sintetice schimbătoare de ioni a marcat un progres sensibil în tehnica de cromatografiere a proteinelor în comparație cu procedeul bazat pe utilizarea ionizilor anorganici. Ea s-a dovedit utilă atât în cercetările privind purificarea hormonilor și proteid-enzimelor, dar mai ales în fracționarea cromatografică a peptidelor și acizilor aminați și în dezinizarea și deproteinizarea soluțiilor proteice și de electroliti.

În ultimul deceniu, fracționarea macromoleculilor proteice s-a dovedit incomparabil mai eficientă prin utilizarea schimbătorilor de ioni derivați ai celulozei (DEAE-, CM-, TEAE- celuloza etc.) și a sitelor moleculare organice (Sephadex etc.). Datorită capacității mari de adsorbție a macromoleculilor proteice și a posibilităților de diferențiere mult mai exprimate, utilizarea ionizilor celulozici și a gelurilor filtrante cunoaște în prezent o extensiune care impune tratarea distinctă a acestui procedeu de cromatografiere a proteinelor.

Sosit la redacție: 4 martie 1968.

Bibliografie la autor.