



UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

β -*N*-Acetylhexosaminidasa

z *Talaromyces flavus*:

produkce a purifikace

Bakalářská práce

Obor: Klinická a toxikologická analýza

Vypracovala: Anna Drozdová

Školitel: Ing. Lenka Weignerová, PhD

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Karel Bezouška, CSc.

2007

Bakalářská práce:

β -*N*-Acetylhexosaminidasa
z *Talaromyces flavus*:
produkce, purifikace

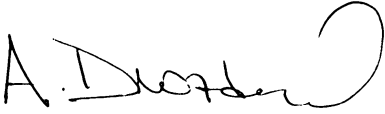
Vypracováno na Mikrobiologickém ústavu Akademie věd
České republiky, Centrum biokatalýzy a biotransformací,
za podpory grantu č. 203/05/0172 GAČR a MŠMT LC 06010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky Ing. Lenky Weignerové, PhD. a konsultanta Prof. RNDr. Karla Bezoušky, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Mikrobiologický ústav AV ČR je možné pouze po písemném souhlasu těchto institucí.

V Praze dne 1. 6. 2004



.....

podpis

Poděkování

Na této stránce bych chtěla poděkovat své školitelce Ing. Lence Weignerové, PhD. za podporu a mnohé rady při práci, vedoucímu bakalářské práce Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, CSc. za umožnění práce v tomto ústavu a v nemalé řadě patří mé díky i Kristýně Slámové za její ochotu, trpělivost a podporu při mé práci a všem dalším členům Centra biokatalýzy a biotransformací Mikrobiologického ústavu AV ČR.

Dále bych zde chtěla poděkovat svým rodičům za umožnění studia na vysoké škole a za stálou podporu.

Obsah

Prohlášení	3
Poděkování	4
Obsah	5
Seznam zkratk	7
1. ÚVOD	8
1.1 Glykosidasy	8
1.2 β-N-Acetylhexosaminidasa	8
1.2.1 Zařazení β -N-acetylhexosaminidas do systému enzymů.....	8
1.2.2 β -N-Acetylhexosaminidasa u hub.....	9
1.2.3 Substrátová specifita β -N-acetylhexosaminidasy	10
1.3 <i>TALAROMYCES FLAVUS</i>	11
1.3.1 Taxonomické zařazení	11
1.3.2 β -N-Acetylhexosaminidasa z <i>Talaromyces flavus</i>	11
2. METODIKA	13
2.1 Producent	13
2.1.1 Submerzní kultivace	13
2.1.2 Kultivační podmínky	13
2.2 Analytické metody	14
2.2.1 Stanovení enzymové aktivity.....	14
2.2.2 Stanovení koncentrace katalytické aktivity β -N-acetylhexosaminidasy	14
2.2.3 Stanovení koncentrace proteinů.....	16
2.3 Purifikace	17
2.3.1 Zpracování kultivačního média	17
2.3.2 Dialýza.....	17
2.3.3 Katexová chromatografie	17
2.3.4 Ultrafiltrace	17
2.3.5 Gelová filtrace	18
2.4 Elektroforesa	18
2.4.1 SDS-PAGE	18
2.4.2 Vizualizace gelu	20
3. VÝSLEDKY	21
3.1 Kultivace	21
3.2 Purifikace	21

3.2.1 Dialýza.....	21
3.2.2 Katexová chromatografie	21
3.2.3 Gelová filtrace	23
3.2 Bilanční tabulka.....	26
3.3 SDS-PAGE	28
4. DISKUSE.....	29
4.1 Kultivace.....	29
4.2 Purifikace	29
4.2.1 Dialýza.....	29
4.2.2 Zamražení	29
4.2.3 Katexová chromatografie	29
4.2.4 Gelová filtrace	29
4.3 SDS-elektroforéza	30
5. ZÁVĚR	31
Seznam chemikálií:.....	32
Seznam přístrojů:	33
Literatura:	34

Seznam zkratek

β -GalNAc	2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosid
β -GlcNAc	2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosid
CAZY	Carbohydrate – Aktive enZYme
CCF	Culture Collection of Fungi
Da, kDa	jednotka atomové hmotnosti (amu)
g	jednotka hmotnosti
g.l^{-1}	jednotka specifické koncentrace
IUB – MB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
$\text{M} = \text{mol.l}^{-1}$, mM	jednotky molární koncentrace
ml.min^{-1}	jednotka průtokové rychlosti
μl , ml	jednotky objemu
<i>p</i> NP-OH	<i>para</i> -nitrofenol
U	jednotka enzymové aktivity
U.ml^{-1}	jednotka objemové aktivity
U.mg^{-1}	jednotka specifické aktivity

1. ÚVOD

Tato práce navazuje na diplomovou práci Kristýny Slámové „Fungální β -*N*-acetylhexosaminidasy a jejich aplikace“ (VŠCHT Praha 2007) a jejím cílem je produkce a optimalizace purifikace extracelulární β -*N*-acetylhexosaminidasy z vláknité houby *Talaromyces flavus*.

1.1 Glykosidasy

Glykosidasy reprezentují širokou paletu enzymů, podílejících se v živých systémech na odbourávání homo- i heteroglykosidů. Existují dvě skupiny glykosidas: *exo*-glykosidasy, které odštěpují sacharidové jednotky z neredukujícího konce sacharidu a *endo*-glykosidasy štěpí sacharidové řetězce uvnitř. V přírodě jsou hojně zastoupeny, ve srovnání s glykosyltransferasami jsou snadněji izolovatelné, komerčně dostupnější a levnější. Glykosidasy jsou za fyziologických podmínek schopny štěpit glykosidovou vazbu. Většina z nich je selektivní k charakteru štěpené glykosidové jednotce, některé glykosidasy akceptují více typů glykosidu na neredukujícím konci oligosacharidů (popř. polysacharidů). Příkladem je právě β -*N*-acetylhexosaminidasa, která je schopna odštěpovat jak β -*N*-acetylglukosamin, tak β -*N*-acetylgalaktosamin [1, 2].

1.2 β -*N*-Acetylhexosaminidasa

1.2.1 Zařazení β -*N*-acetylhexosaminidas do systému enzymů

β -*N*-Acetylhexosaminidasa (β -*N*-acetyl-D-hexosaminid-*N*-acetylhexosaminohyrolasa) je enzym, který se podle enzymové nomenklatury IUB-MB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) řadí mezi:

- 3.-.-.- hydrolasy
- 3.2.-.- glykosidasy
- 3.2.1.- glykosidasy hydrolyzující *O*- a *S*- glykosidické vazby

Přesné zařazení do číselného systému EC je pak, EC 3.2.1.52.

β -*N*-Acetylhexosaminidasa je součástí enzymů chitolytického komplexu a dříve byla také nazývána chitobiasa (EC 3.2.1.29) nebo β -*N*-acetylglukosaminidasa (EC 3.2.1.30).

Kromě výše zmíněného rozdělení, které příkládá důraz zvláště k substrátové specifitě, je možné systém glykosidas zařadit na základě podobnosti jejich aminokyselinových sekvencí do rodin a podle strukturních motivů do klanů. K takovému rozdělení glykosidas slouží databáze CAZY (Carbohydrate-Active enZymes).

V současné době obsahuje CAZY 110 rodin glykosyl-hydrolas, ale s přibývajícimi informacemi o jednotlivých sekvencích a strukturách se systém stále mění. β -*N*-Acetylhexosaminidasa patří v systému CAZY do klanu GH-K a rodiny 20 [3].

1.2.2 β -*N*-Acetylhexosaminidasa u hub

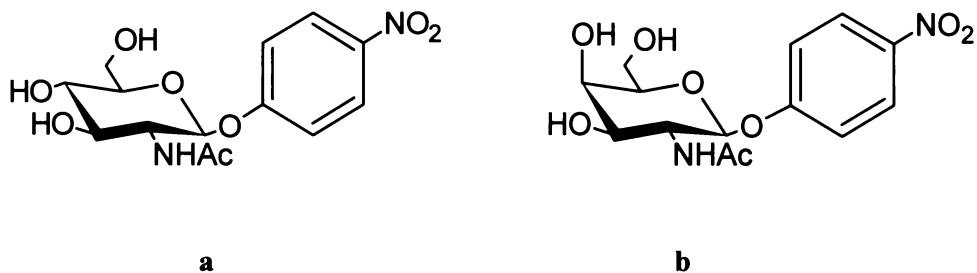
U vláknitých hub má β -*N*-acetylhexosaminidasa velmi zajímavou a zvláštní funkci. Je součástí chitinolytického systému v buněčné stěně rostoucích hyf. Rostoucí houby produkují, za režimu tzv. katabolické represe, komplexní chitinolytický systém enzymů sestávající se z chitinasy a β -*N*-acetylhexosaminidasy. Tyto dva enzymy spolupracují jako tzv. binární tandemový systém, který zpracovává chitin. Chitin je metabolizován chitinasami na chitobiosu, kterou β -*N*-acetylhexosaminidasa štěpí na 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosid (β -GlcNAc), který je pak v buňce zpracováván jako zdroj uhlíku a dusíku.

Kromě výše zmíněné funkce je enzymový systém také velice důležitý pro regulaci růstu hyf. Při růstu hyf je důležité kontrolovat lyzi buněčné stěny a regulovat syntézu chitinu, který tvoří fibrilární kostru buněčné stěny. Kromě toho je třeba dbát na to, aby nedošlo k narušení buněk bez chitinové opory a aby byl zajištěn růst hyf na koncích a v místech jejich větvení.

β -*N*-Acetylhexosaminidasy je při procesu růstu hyf značně důležitá neboť zajišťuje rovnováhu mezi hydrolýzou a syntézou chitinu [4].

1.2.3 Substrátová specifita β -*N*-acetylhexosaminidasy

Mezi přirozené substráty plísňové β -*N*-acetylhexosaminidasy patří zejména *N*-acetylchitooligosacharidy, *N,N*-diacetylchitobiososa a sacharidy obsahující β -GlcNAc a β -GalNAc [5, 6]. Pro stanovení aktivity β -*N*-acetylhexosaminidasy se standardně používají glykosidy *para*-nitrofenolu (Obr.1).



Obr.1: Substráty β -*N*-acetylhexosaminidasy

- a- *p*-nitrofenyl- β -*N*-acetyl-glukosamid
- b- *p*-nitrofenyl- β -*N*-acetyl-galaktosamid

1.3 TALAROMYCES FLAVUS

Talaromyces flavus je vláknitá mikroskopická houba produkující β -*N*-acetylhexosaminidasu s velmi širokou substrátovou specifikou, díky tomu byl zvolen jako vhodný a zajímavý producent.

1.3.1 Taxonomické zařazení

Rod *Talaromyces* byl definován v roce 1972. Je to běžná plíseň, hojně rozšířená. Vyskytuje se zejména v rostlinném odpadu a v půdě. Jedná se vřecovýtrusné houby produkující aska v řetízcích. Postupným zkoumáním byl rod *Talaromyces* rozdělen na další čtyři sekce právě podle rozdílů ve stavbě askospor (a dalších vlastností) na: *Talaromyces*, *Emersonii*, *Thermophylla* a *Purpurea* [7].

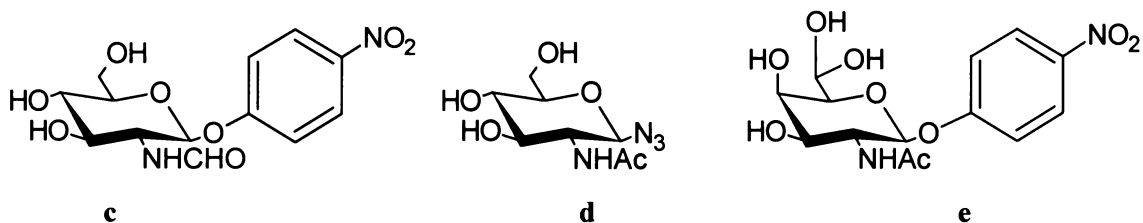
Taxonomické zařazení *Talaromyces flavus* [8]:

Doména:	Eukaryota
Říše:	Fungi
Kmen:	Ascomyceta
Třída:	Eurotiomycetes
Řád:	Eurotiales
Čeleď:	Trichocomaceae
Rod:	<i>Talaromyces</i>
Druh:	<i>Talaromyces flavus</i>

1.3.2 β -*N*-Acetylhexosaminidasa z *Talaromyces flavus*

T. flavus produkuje mnoho enzymů se zajímavými vlastnostmi. Zejména se jedná o enzymy působící na sacharidy ze třídy hydrolas a oxidoreduktas. Též β -*N*-acetylhexosaminidasa produkovaná touto plísní má zajímavé vlastnosti. Předmětem výzkumu se stala zejména pro svoji širokou substrátovou specifikou.

β -*N*-Acetylhexosaminidasa dokáže přijímat modifikované substráty, např. Obr.2, a byla úspěšně použita pro syntézu nepřírodných disacharidů [6, 9].



Obr.2: Modifikované substráty β -*N*-acetylhexosaminidasy

- c- *p*-nitrofenyl -2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-formamid
- d- 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-azid
- e- *p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy β -D-galakto-hexodialdo-1,5-pyranosyl

2. METODIKA

2.1 Producent

Předmětem zkoumání se stal zástupce mikroskopických vláknitých hub rod *Talaromyces flavus*. *T. flavus* pochází ze sbírky CCF (Culture Collection of Fungi), kde byl uchováván ve zkumavkách na šikmých agarech (sladinový, sporulační) při teplotě 5°C.

2.1.1 Submerzní kultivace

Jako vhodné médium pro kultivaci bylo zvoleno médium minerální, jehož složení je uvedeno v Tab. 1.

Po sterilizaci bylo pH média upraveno na 4.

Do 500 ml baněk bylo připraveno 100 ml média a zaočkováno 3 ml suspenze spor v roztoku sterilního Tweenu 80.

Tab. 1: Složení kultivačního média

	[g.l ⁻¹]	[g.100 ml ⁻¹]
KH ₂ PO ₄	3,0	0,3
NH ₄ H ₂ PO ₄	5,0	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	0,2
Yeast extract	0,5	0,05
GlcNAc	5,0	0,5
NaCl	15	1,5

2.1.2 Kultivační podmínky

Připraveno bylo 6 kónických baněk (500 ml) se 100 ml.kultivačního média.

Kultivace probíhala po dobu 10 dní, při teplotě 28 °C a při 200 otáčkách za minutu.

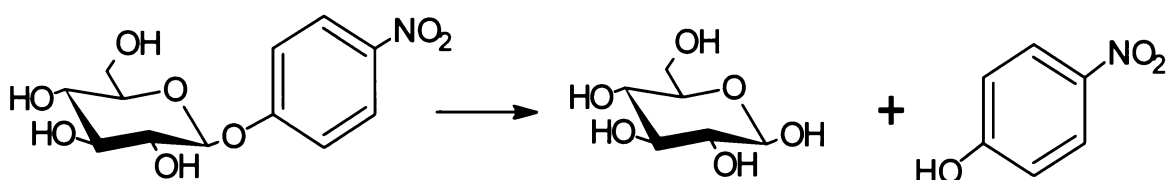
Po 10 dnech byly jednotlivé frakce slity a dále zpracovány.

2.2 Analytické metody

2.2.1 Stanovení enzymové aktivity

Katalytická aktivita enzymu byla stanovena spektrofotometrickou metodou pomocí chromatogenního substrátu ve VIS oblasti. Koncentrace uvolněného produktu je přímo úměrná absorbanci.

Při stanovení je měřena absorbance *p*-nitrofenolu (*p*NP-OH) v alkalickém prostředí, kdy vzniká žlutě zbarvená, záporně nabitá, forma, mající absorpční maximum v oblasti 405 nm – 420 nm. Enzymovou aktivitu pak stanovujeme při vlnové délce 420 nm. Schéma reakce viz. Obr.3.



Obr.3: Schéma reakce hydrolysy substrátu

Jednotka enzymové aktivity [U] je definována jako množství enzymu nutné k uvolnění jednoho μ gramu *p*NP-OH z chromatogenního substrátu za jednu minutu (při definované teplotě a pH). Podle SI je ale základní jednotkou enzymové aktivity 1 katal, což je $6 \cdot 10^7$ U. Pro jednodušší srovnání s ostatními autory však v této práci bude použita jednotka [U]. Častěji se však uvádí tzv. koncentrace katalytické aktivity [$\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$]. Specifická aktivita je udávána v jednotkách [$\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$], je to koncentrace katalytické aktivity enzymu vztažená na hmotnost všech proteinů.

2.2.2 Stanovení koncentrace katalytické aktivity β -N-Acetylhexosaminidasy

Stanovení aktivity enzymu je obvykle počítáno jako tzv. koncentrace katalytické aktivity, což je katalytická aktivita enzymu vztažena na jednotku objemu kapaliny. Udává se v jednotkách [$\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$]. A lze ji vypočítat:

$$n(p\text{NP-OH})$$

$$t * V_{\text{vz.}}$$

$n(p\text{NP-OH})$... látkové množství uvolněného ($p\text{NP-OH}$)

t ... doba reakce [min]

$V_{\text{vz.}}$... objem vzorku [ml]

Látkové množství $p\text{NP-OH}$ získáme ze vztahu:

$$n(p\text{NP-OH}) = c(p\text{NP-OH}) * V_{\text{RS.}}$$

$n(p\text{NP-OH})$... látkové množství uvolněného ($p\text{NP-OH}$) [mol]

$c(p\text{NP-OH})$... molární koncentrace $p\text{NP-OH}$ [mM]

$V_{\text{RS.}}$... objem reakční směsi [ml]

Molární koncentraci $p\text{NP-OH}$ lze získat z rovnice regrese kalibrační přímky $p\text{NP-OH}$ (Graf 1.), kdy

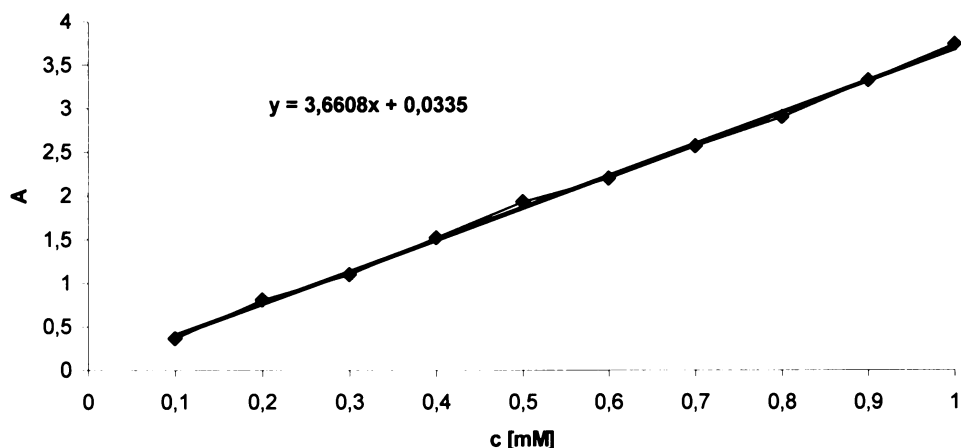
$$c(p\text{NP-OH}) = A * k$$

A ... Absorbance $p\text{NP-OH}$

k ... $1 / 3,66 = 0,2732$

Dosazením do původního vzorce pak získáme vztah pro výpočet objemové aktivity:

$$\text{Akt.}_{\text{obj.}} = A * k * V_{\text{RS.}} * t^{-1} * V_{\text{vz.}}^{-1} \quad [\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}]$$



Graf 1.: Kalibrační křivka $p\text{NP-OH}$

Pro stanovení enzymové aktivity byla připravena směs obsahující Mc Ilvaine pufr (10 μ l, 50 mM, pH 5), vzorek (30 μ l) a chromatogenní substrát (10 μ l, 10 mM). Reakční směs byla inkubována při 900 ot/min a teplotě 35°C (Termomixer Compact Eppendorf, DE). Po deseti minutách byla reakce ukončena přidáním Na₂CO₃ (1 ml, 0,1 M). Absorbanci uvolněného *p*NP-OH byla měřena proti slepému vzorku při vlnové délce 420 nm v semimikrokyvetách (Shimadzu UVmini-1240). Vhodné absorbance použitelná pro další výpočty by měla ležet v rozmezí 0,100 - 0,250. Během celého procesu přečištění vzorku na chromatografických kolonách je nutné stanovovat enzymatickou aktivitu ve velkém množství frakcí. Pro zjednodušení byla pro tyto účely využita metoda stanovení enzymatické aktivity na mikrotitračních destičkách pomocí spektrofotometru Sunrise (Tekan, AT), vyhodnocena softwarem Magellan 4.0 (Tekan, AT).

2.2.3 Stanovení koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů byla zvolena metoda podle Bradfordové. Princip metody spočívá ve vazbě barviva Coomassie Brilliant blue na protein (zvláště pak na bazické nebo aromatické aminokyseliny).

Po reakci s proteinem získává reakční směs z původní hnědé barvy barvu intenzivně modrou a její absorpční maximum se posouvá z původních 465 nm na 595 nm, při kterých je směs proměřována.

Ke vzorku (100 μ l) byl přidán 1 ml činidla. Po pěti minutách a promíchání byla směs proměřena při 595 nm na spektrometru (Shimadzu UVmini-1240), proti slepému vzorku, kde bylo místo vzorku použito 100 μ l vody.

2.3 Purifikace

2.3.1 Zpracování kultivačního média

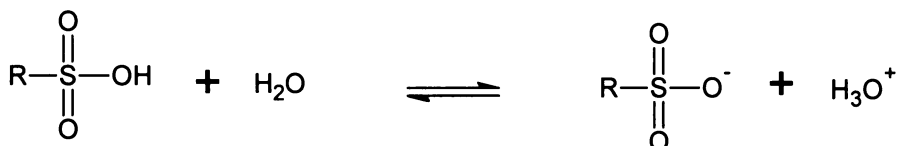
Všechny kultivační média byla slita a přefiltrována přes papírový filtr.

2.3.2 Dialýza

Dialýza je membránový separační proces. K dělení molekul dochází na základě jejich velikosti díky polopropustné membráně a také díky gradientu chemického potenciálu, kdy membrána zadržuje jen makromolekuly a malé molekuly a ionty propouští. K metodě byl použit pufr Mc Ilvaine (pH 3,5), dialyzační trubice.

2.3.3 Katexová chromatografie

Katexová chromatografie je separační metoda dělicí látky podle jejich náboje při daném pH. Mezi stacionární fází, tzv. katex (jehož aktivovaná forma nese záporný náboj, (viz. schéma Obr.4) a ionty opačného náboje v roztoku, vznikají elektrostatické interakce. Tyto interakce mění svou sílu se změnou pH nebo změnou iontové síly mobilní fáze. Pro separaci byl použit silný katex Fractogel EMD SO_3^- (Merck), jako pufr A (Mc Ilvaine pH 3,5; 10 mM) a pufr B (Mc Ilvaine pH 3,5; 10 mM s 1M NaCl). K eluci byl zvolen gradient 0 % - 100 % pufru B. Chromatografie byla testována při dvou různých gradientech. Maximální tlak byl nastaven na 0,35 MPa.



Obr.4: Schéma mechanismu funkce silného katexu Fraktogel

2.3.4 Ultrafiltrace

Před gelovou filtrací bylo médium zakoncentrováno metodou ultrafiltrace. K tomu byly použity centrifugační zkumavky a propustností do 30000 Da.

2.3.5 Gelová filtrace

Gelová filtrace je separační metoda dělicí molekuly podle jejich velikosti a tvaru v závislosti na velikosti pórů stacionární fáze, kdy větší molekuly postupují rychleji. Pro tuto separaci byla použita kolona s náplní Superdex 200 (Triton Superdex 200 10/300 GL) jako stacionární fáze a pufr Mc Ilvaine (pH 5; 50 mM; se 150 mM NaCl). Kromě separace byla gelová chromatografie využita i pro stanovení molekulové hmotnosti proteinů metodou kalibrační přímky proteinů o známé molekulové hmotnosti.

2.4 Elektroforesa

Elektroforesa je elektromigrační metoda dělicí látky podle velikosti a vytvořeného náboje v nabitém prostředí. Tato metoda byla využita pro stanovení molekulové hmotnosti proteinů a pro ověření čistoty vzorku během purifikačních metod.

2.4.1 SDS-PAGE

SDS-PAGE je elektroforesa prováděná za přítomnosti dodecylsírany sodného. Proteiny jsou rozdělovány na základě své pohyblivosti, která je dána molekulovou hmotností, ve stejnosměrném elektromagnetickém poli. Molekulová hmotnost proteinu je zjištěna porovnáním relativních mobilit vzorku se standardy. Pro elektroforesu byl zvolen 10 % gel.

SDS-PAGE byla prováděna po gelové chromatografii, pro určení čistých frakcí a na závěr celého purifikačního procesu. Složení zaostřovacího i dělicího gelu je uvedeno v Tab.2..

Tab.2: Složení 10% gelu pro elektroforesu proteinů

	10 % zaostřovací gel [ml]	10 % dělicí gel [ml]
H ₂ O	2,1	4
30 % akrylamidová směs ^a	0,5	3,3
1,5 M Tris (pH 8,8)	0,38	2,5
10% SDS	0,3	0,1
10% amonium persulfát	0,3	0,1
TEMED	0,003	0,004

^a Složení směsi: 29 % (w/v) akrylamid

1 % (w/v) N, N' - methylenbisakrylamid

Složení vzorkovacího pufu:

50 mM Tris . HCl (pH 6,8)

100 mM dithiothreitol

2 % SDS

0,1 % bromphenol blue

10 % glycerol

Složení vzorkovacího pufu:

10 mM Tris

250 mM glycin

0,1 % SDS

Parametry v průběhu elektroforesy byly (pro dva nasazené gely) nastaveny takto:

Pro průnik vzorku zaostřovacím gelem: U = 80 V, I = 30 mA, P = 3 W.

Pro průnik vzorku dělicím gelem, byly parametry upraveny na: U = 130 V, I = 50 mA,
P = 7 W.

2.4.2 Vizualizace gelu

Po elektroforese byl dělicí gel barven v roztoku Coomassie Brilliant blue, cca 5 hodin.

Dále byl gel odbarven a uchováván v 1 % kyselině octové.

Složení barvicí lázně:

0,25 g Coomassie Brilliant blue

90 ml MeOH : H₂O (1:1)

10 ml 99 % kyselina octová

Složení odbarvovací lázně:

55 ml H₂O

35 ml EtOH

10 ml kyselina octová

3. VÝSLEDKY

3.1 Kultivace

Po deseti dnech kultivace byly jednotlivé frakce slity, zfiltrovány a v takto upraveném roztoku byla stanovena aktivita a obsah proteinů.

3.2 Purifikace

3.2.1 Dialýza

Objem zfiltrovaného média byl rozdělen do dialyzačních trubic a dialyzován při 4°C přes noc. Druhý den byly dialyzační trubice vyprázdněny, přeměřen objem, aktivita a poté byl retenát rozdělen na dvě části a zamražen (- 20 °C).

3.2.2 Katexová chromatografie

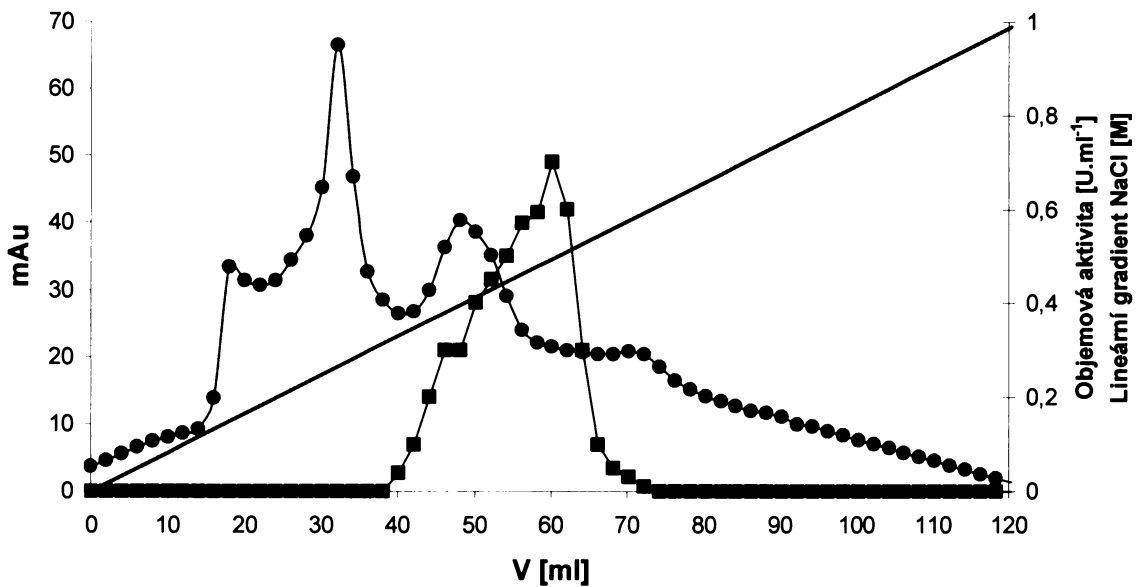
Vzorek 1: 50% retenátu

Průtoková rychlost: 2 ml . min⁻¹

Frakce 1 – 6 V = 5 ml

Frakce 7 – 70 V = 1,2 ml

Gradient nastaven na 120 ml do 1 M pufru B.



Graf 2: Chromatogram katexové chromatografie při gradientu 120 ml pufru B.

- Absorbance proteinů [280 nm]
- Objemová aktivita β-N-acetylhexosaminidasy [U . ml⁻¹]
- Lineární gradient NaCl [0 – 1 M]

Je patrné, že β-N-acetylhexosaminidasa je z kolony vymyta zhruba v polovině gradientu pufru B. Její objemová aktivita je maximální cca v 60 ml, 0,7 U.ml⁻¹ (Graf 2).

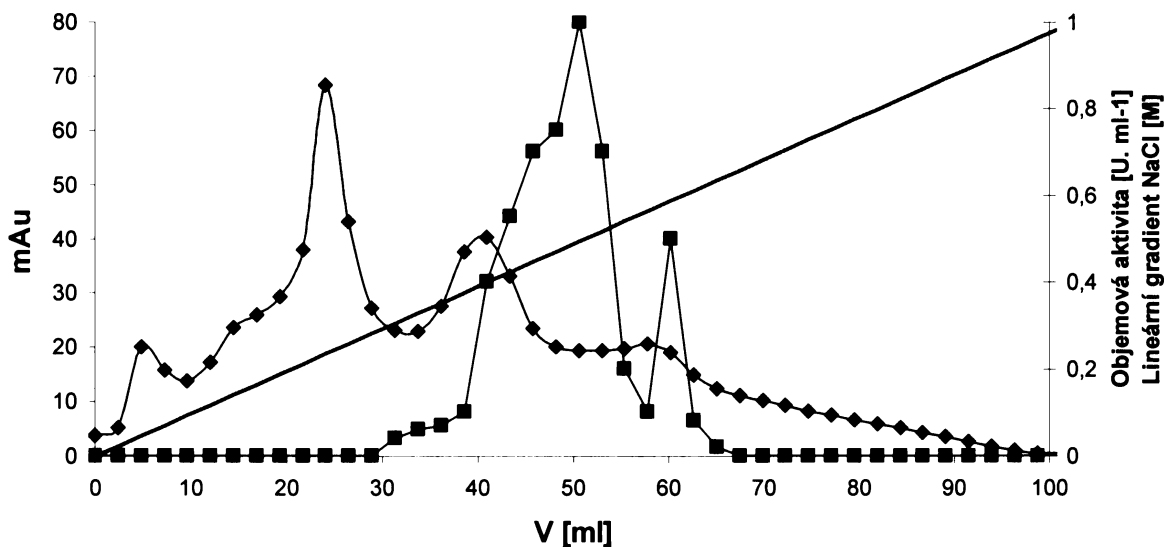
Vzorek 2: 50% retenátu

Průtoková rychlost: 2 ml . min⁻¹

Frakce 1 – 6: V = 5 ml

Frakce 7 – 70: V = 1,2 ml

Gradient nastaven na 100 ml do 1 M pufru B.



Graf 3: Chromatogram katexové chromatografie při gradientu 100 ml pufru B

- Absorbance proteinů [280 nm]
- Objemová aktivita β-N-acetylhexosaminidasy [U. ml⁻¹]
- Lineární gradient NaCl [0 – 1 M]

Je patrné, že β-N-acetylhexosaminidasa je z kolony vymyta zhruba v polovině gradientu pufru B. Její objemová aktivita je maximální cca v 50 ml, 1 U.ml⁻¹ (Graf 3).

3.2.3 Gelová filtrace

Gelová filtrace kromě purifikačního využití posloužila také pro stanovení velikosti enzymu metodou kalibrační přímky.

Vzorek 1: Zakoncentrovaná frakce po Fraktogelu s grad. 120 ml.

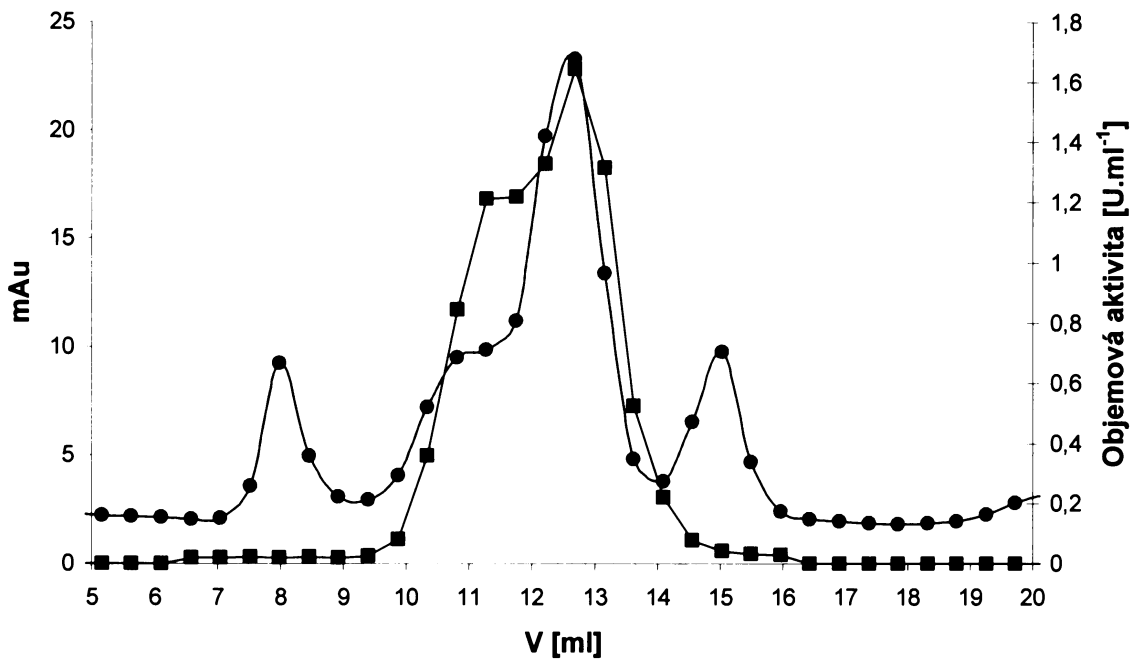
Dávkováno: Akt. = 12,02 U,

proteiny = 0,11 mg

Průtok: **0,2 ml.min⁻¹**

Frakce 1 – 2 : V = 3,5 ml

Frakce 3 – 22 : V = 0,5 ml



Graf 4.: Chromatogram Vz.1 po gelové chromatografii při průtoku $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

—●— Absorbance proteinů [280 nm]

—■— Objemová aktivita β -N-acetylhexosaminidasy [$\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$]

Při nastaveném průtoku $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ je β -N-acetylhexosaminidasa vymývána mezi 12 a 13 ml, zde má i svoji nejvyšší objemovou aktivitu $1,64 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Graf 4.).

Z kalibrační přímky vychází molární hmotnost enzymu cca 180 kDa.

Vzorek 2: Zakoncentrovaná frakce po Fraktogelu s grad. 100 ml

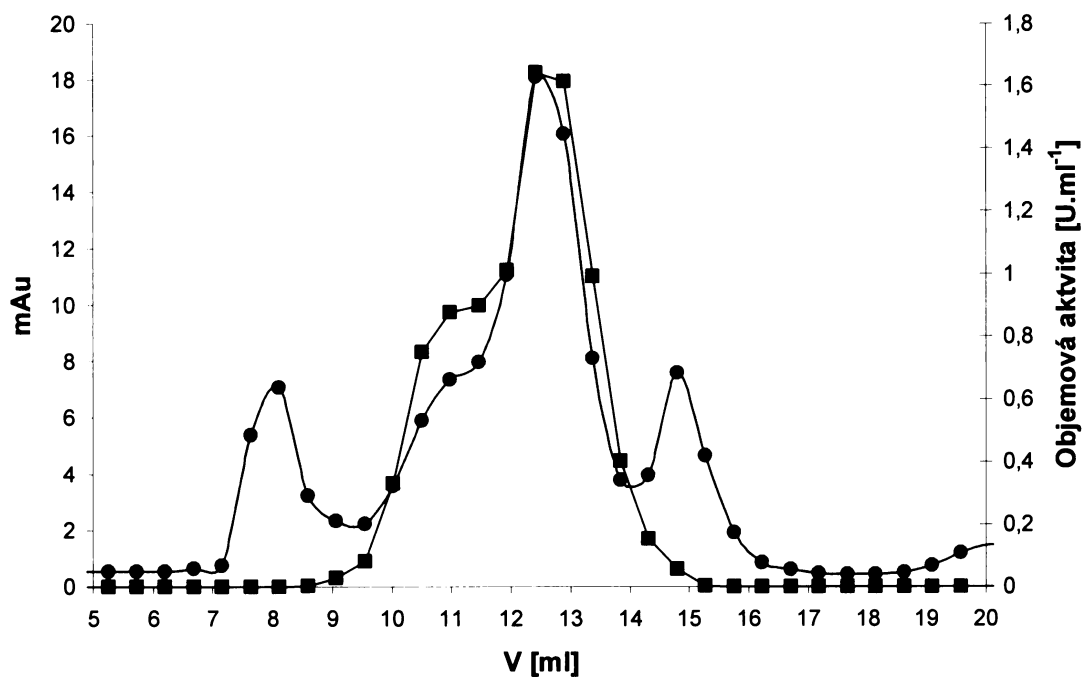
Dávkováno: Akt. = 13,17 U,

proteiny = 0,074 mg

Průtok: $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Frakce 1 – 2: V = 3,5 ml

Frakce 3 – 20: V = 0,5 ml



Graf 5: Chromatogram Vz.2 po gelové chromatografii při průtoku 0,3 ml.min⁻¹

—●— Absorbance proteinů [280 nm]

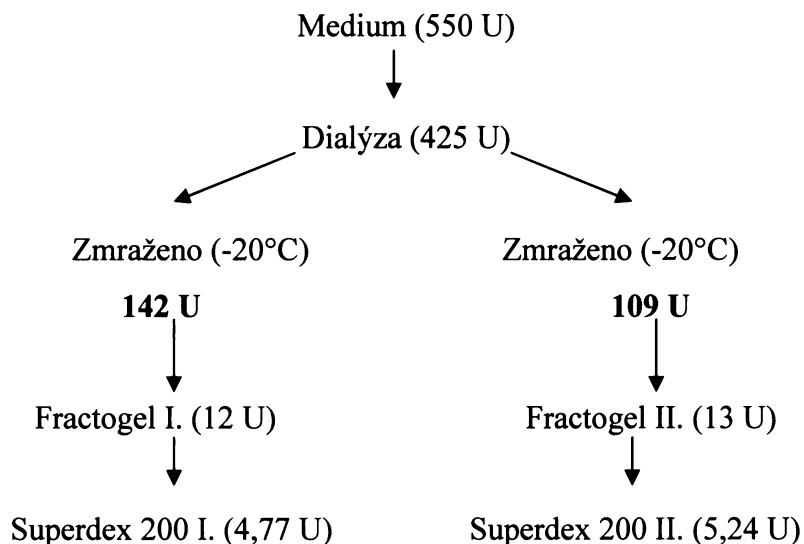
—■— Objemová aktivita β-N-acetylhexosaminidasy [U . ml⁻¹]

Při nastaveném průtoku 0,3 ml.min⁻¹ je β-N-acetylhexosaminidasa vymývána mezi 12 a 13 ml, zde má i svoji nejvyšší objemovou aktivitu 1,64 U . ml⁻¹ (Graf 5.).

Z kalibrační přímky vychází molární hmotnost enzymu cca 175 kDa.

3.2 Bilanční tabulka

Bilanční schéma purifikace je znázorněna na obr.5..Celková bilance je pak znázorněna v tabulkách 3, 4. Celkový výtěžek purifikace je vztažen na hodnoty po rozmražení média.



Obr. 5.:Bilanční schéma purifikace

Tab.3: Bilanční tabulka vzorku 1.

	Proteiny [mg]	Aktivita [U]	Specifická aktivita [U . mg ⁻¹]	Purifikační faktor
Médium	6,03	550,02	91,15	-
Dialýza	6,33	452,53/2 ^b	71,53	0,79
Po rozmrazení	1,64	142,79	86,94	-
Fractogel.	0,11	12,02	107,62	1,23
Superdex 200	0,04	4,77	127,92	1,19
Výtěžek		3,3%		

^b Médium bylo rozděleno na dvě stejné části a zamraženo. Vzorku 1. odpovídá cca ½ celkové aktivity média.

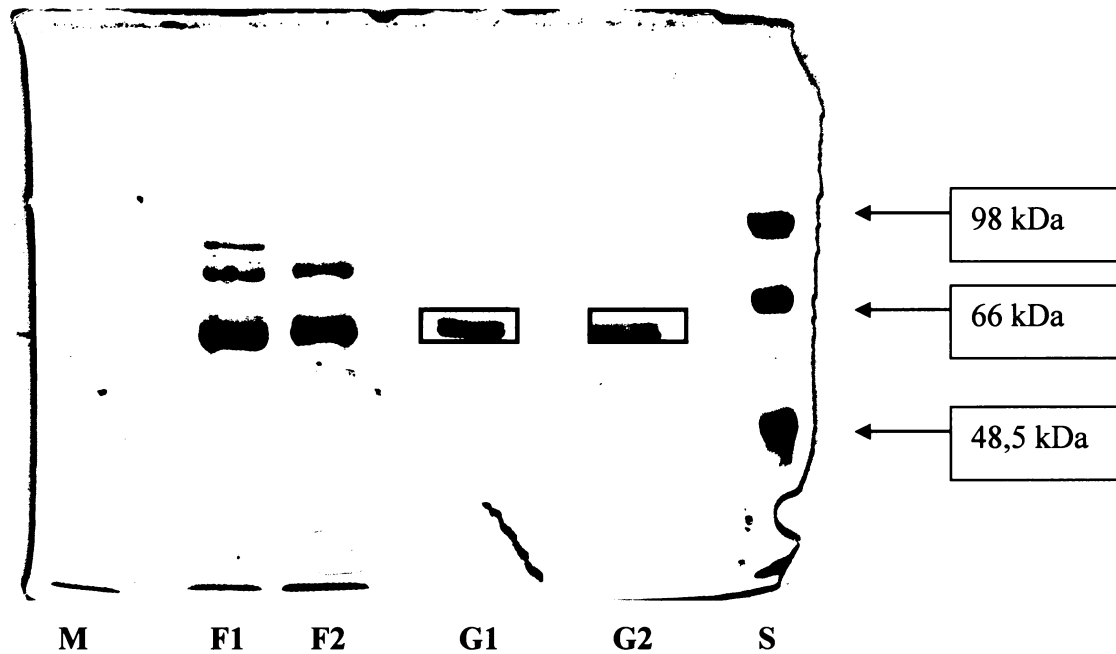
Tab.4: Bilanční tabulka vzorku 2.

	Proteiny [mg]	Aktivita [U]	Specifická aktivita [U . mg ⁻¹]	Purifikační faktor
Médium	6,03	550,02	91,15	-
Dialýza	6,33	452,53/2 ^c	71,53	0,79
Po rozmrazení	1,91	109,73	57,44	-
Fractogel .	0,074	13,17	178,56	3,1
Superdex 200	0,037	5,24	169,52	0,95
Výtěžek		4,8%		

^c Médium bylo rozděleno na dvě stejné části a zamraženo. Vzorku 2. odpovídá cca ½ celkové aktivity média.

3.3 SDS-PAGE

Elektroforetogram jednotlivých podílů během přečištění v prostředí SDS, Obr.5.



Obr.5.: SDS-elektroforeogram na 10% gelu

M – Medium

F1 – Vzorek 1 po katexové chromatografii

F2 – Vzorek 2 po katexové chromatografii

G1 – Vzorek 1 po gelové chromatografii

G2 – Vzorek 2 po gelové chromatografii

S – Standard

Pravděpodobná lokalizace β -N-acetylhexosaminidasy po gelové chromatografii je označena červeně.

4. DISKUSE

4.1 Kultivace

Kultivační podmínky a medium bylo zvoleno podle nejlepších výsledků předchozích prací.

4.2 Purifikace

4.2.1 Dialýza

Z předchozích prací vyplývá, že oproti standardnímu srážení síranem amonným dialýza sice není tak účinná, ale jsou u ní nižší ztráty. Proto byla zvolena tato metoda.

4.2.2 Zamražení

Jako velkým problémem se ukázalo zamražení média při -20°C , při kterém enzym ztrácí cca polovinu své aktivity. Proto by bylo vhodné optimalizovat i tyto podmínky a uvažovat o zamražení např. při -80°C , mrazení tekutým dusíkem a jiné alternativy.

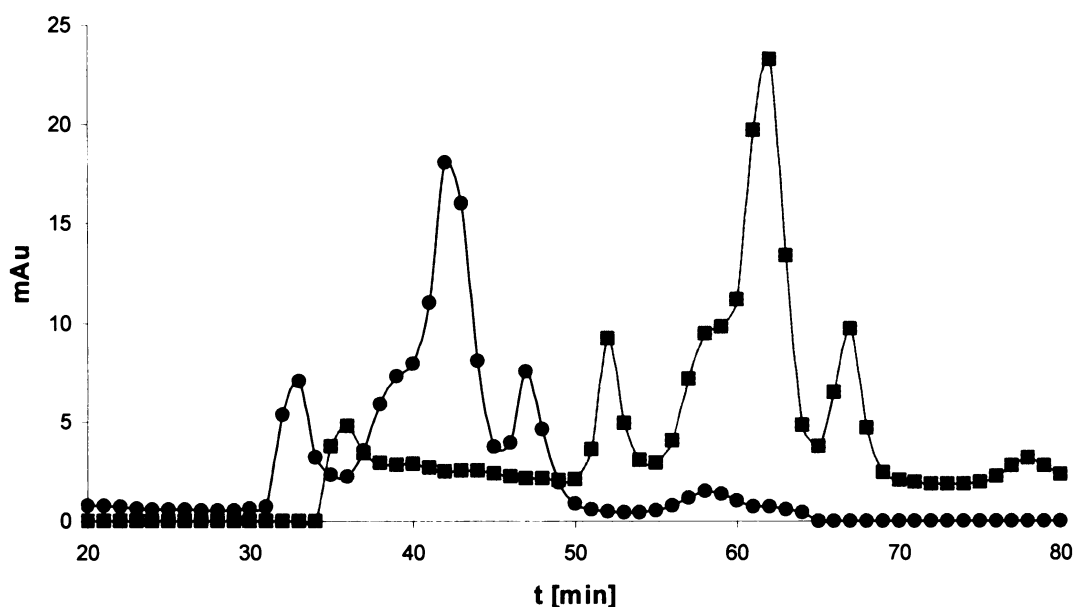
4.2.3 Katexová chromatografie

Při katexové chromatografii byly pro srovnání zvoleny dva různě dlouhé gradienty elučního pufru B. První gradient byl zvolen na 120 ml pufru B a druhý na 100 ml pufru B. Z grafu 1, 2 je patrné, že při různé velikosti gradientu je β -*N*-acetylhexosaminidasa eluována cca v polovině gradientu pufru B, nicméně rozdíl je patrný v hodnotách objemové aktivity. V prvním případě je objemová aktivita β -*N*-acetylhexosaminidasy rovna $0,7 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ a v případě druhém $1 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z tohoto hlediska pak velikost gradientu na separaci vliv má a je výhodnější použít gradient kratší.

4.2.4 Gelová filtrace

Pro gelovou filtraci byly také zvoleny různé podmínky. Provedení se lišilo v různé velikosti průtokové rychlosti. Srovnání viz *Graf 5*.

Při nižší průtokové rychlosti, tj. $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, byl vzorek eluován v 62 minutě a při vyšší průtokové rychlosti, tj. $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, byl vzorek eluován již ve 42 minutě. Z hlediska separace (při zvolených průtokových rychlostech) k zásadním změnám nedochází, mění se pouze rychlost eluce. Z tohoto hlediska se zdá být výhodnější vyšší průtoková rychlost.



Graf 6: Porovnání průtokových rychlostí u gelové filtrace v závislosti na čase

—●— Absorbance proteinů G1

—■— Absorbance proteinů G2

4.3 SDS-elektroforéza

Z výsledků SDS-elektroforetogramu vyplývá, že pravděpodobná velikost monomerní denaturované jednotky β -N-acetylhexosaminodasy je 65 kDa (Obr.5), což odpovídá výsledkům z předchozích studií, kde se velikost proteinu pohybuje mezi 60 – 70 kDa. Dále je patrné, že se protein nepodařilo zcela vyčistit a tomuto problému by měla být věnována pozornost v další fázi výzkumu.

5. ZÁVĚR

- Byla provedena kultivace a purifikace β -*N*-acetylhexosaminidasy z vláknité plísně *Talaromyces flavus*.
- Katexová chromatografie: Při katexové chromatografii byl optimalizován gradient a jako vhodnější byl zvolen gradient 100 ml od 0 – 1 M NaCl, kdy enzym vykazoval vyšší objemovou aktivitu.
- Gelová filtrace: Testované průtokové rychlosti neměly na separaci zásadní vliv. Pouze z časového hlediska lze zvýhodnit vyšší průtokovou rychlost.
- Je patrné, že přečištění není dostačující a proto se zkoumají další alternativy separačních procesů. Momentálně probíhá optimalizace podmínek chromatofokusační techniky, ovšem to už přesahuje rámec této práce a je předmětem dalšího výzkumu.
- Jako velký problém se ukázalo zamražení média při -20°C , při kterém enzym ztrácí cca polovinu své aktivity. Proto by bylo vhodné optimalizovat i tyto podmínky a uvažovat o zamražení např. při -80°C , mrazení tekutým dusíkem a jiné alternativy.

Seznam chemikálií:

Kultivace *T. flavus*:

kvasinkový extrakt (Oxoid), *N*-acetylglukosamin (Senn Chemicals), Tween 80 (Aldrich), bakteriologický agar (Oxoid).

Stanovení enzymové aktivity a koncentrace proteinů:

p-nitrofenyl- β -D-*N*-acetylglukosamin (Sigma)

Pufry:

McIlvaine: 0,1 mol.l⁻¹ kys. citronová (Lach-Ner)/ 0,2 mol.l⁻¹ Na₂HPO₄.12H₂O (Lachema), 2x ředěné vodou

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu:

Protein molecular weights standards MW 6500 – 205000 (Amersham Pharmacia, Biotech), TEMED (N,N,N',N'-tetramethylediamin) (Sigma), Coomassie™ Brilliant Blue R-250; C.I. 42600 (USB), glycin (SERVA), persíran amonný (USB), Tris (SERVA), Bromfenolová modř (SERVA), dithiothreitol (Sigma), akrylamid (Sigma), N, N'-metylenbisakrylamid (SERVA), SDS (dodecylsíran sodný) (SERVA).

Organická rozpouštědla:

Použitá rozpouštědla jsou v HPLC čistotě nebo destilovaná.

Methanol (Lach-Ner), ethanol (Merck)

Soli:

Použité soli byly v čistotě p. a. a pokud není uvedeno jinak pochází z firmy Lachema. KH₂PO₄, NH₄H₂PO₄, MgSO₄.7H₂O (Lach-Ner), (NH₄)₂SO₄ (Lach-Ner), NaCl (Lach-Ner), CuSO₄.5H₂O, NH₄NO₃, Na₂CO₃.

Seznam přístrojů:

Inkubační box s regulací otáček a teploty (SANYO, JP)
Biohazard flow box – JOUAN MSG9 (JOUAN BIO-OMEGA, FR)
Spektrofotometr – Shimadzu UVmini-1240 (Schimadzu, JP)
Spektrofotometr – Sunrise (TECAN, AT)
Vyhodnocovací software – Magellan 5.0 (TECAN, AT)
Centrifuga na zkumavky „eppendorf“ – Universal 16R (Hettich, DE)
Centrifuga – Beckman J2-21 (Beckman Instruments. Inc., USA)
Vortex – IKA-VERKE VF 2 (JANKE&KUNKEL, DE)
pH metr – Gryf HB (P-LAB, CZ)
pH elektroda – THETA '90 (gdw) HC 114 (P-LAB, CZ)
pH elektroda – THETA '90 (jdw) HC 153 (P-LAB, CZ)
Thermomixer Compact (Eppendorf, DE)
Analytické váhy Mettler AE200 (Mettler-Toledo, USA)
Sada pro elektroforézu Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, USA)
Zdroj pro elektroforézu EPS601 (Amersham Pharmacia, SE)
Centricon YM-3; 30 000 MW cut off (Millipore, USA)
Kapalinový chromatograf – Äkta Prime Plus (Amersham Biosciences, SE)
Obslužný software – PRIMEVIEW 5.0 (Amersham Biosciences, SE)
Kolona Tricorn Superdex 200 10/300 GL (Amersham Biosciences, SE)
Kolona s náplní Fractogel EMD SO₃⁻ (Merck, DE)

Literatura:

- [1] Weignerová, L., Rajnochová-Herkommerová, E., Křen, V.: Enzymová reverzní glykosylace, *Chem. Listy* **93**, 781-789 (1999)
- [2] www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/ [9.5.2007]
- [3] www.cnrs-mrs.fr/CAZY/fam/acc_GH.html [9.5.2007]
- [4] Horsch, M., Mayer, Ch., Sennhauser, U., Rast, D.: β -*N*-Acetylhexosaminidase: a target for the design of antifungal agents, *Pharmacol* **76**, 187- 218, (1997)
- [5] Ščigelová, M., Crout H.G., D.: Mikrobiální β -*N*-acetylhexosaminidasy a jejich biotechnologické aplikace, *Enzyme and Microbial Technology* **25**, 3-14, (1999)
- [6] Fialová, P., Namdjou, D. J., Ettrich, R., Přikrylová, V., Rauvolfová, J., Křenek, K., Kuzma, M., Elling, L., Bezouška, K., Křen, V.: Kombinovaná aplikace galaktózy oxidázy a β -*N*-acetylhexosaminidasy v syntéze komplexního imunoreaktivního *N*-acetyl-D-galaktosaminidu, *Adv. Synth. Catal* **347**, 997-1006, (2005)
- [7] Stolk, A.C. and Samson, R.A.: The genus *Talaromyces*, Studies on *Talaromyces* and related genera, *Study. Mycol.* **2**, (1972)
- [8] www.ncbi.nih.gov/Taxonomy [9.5.2007]
- [9] Fialová, P., Weignerová, L., Rauvolfová, J., Přikrylová, V., Pišvejcová, A., Ettrich, R., Kuzma, M., Sedmera, P., Křen, V. : Hydrolytické a transglykosylační reakce *N*-acetylmodifikovaných substrátů katalyzované β -*N*-acetylhexosaminidasy, *Tetrahedron* **60**, 693-701, (2004)
- [10] Krajhanzl, A., Hladík, J., a kol.: Biochemické metody, návody k pokročilým praktickým cvičením, Univerzita Karlova, Karolinum, Praha 1991
- [11] Voet, D., Voetová, J.G.: Biochemie, Victoria publishing 1990
- [12] Opekkar, F., Jelínek, I., Rychnovský, P., Plzák Z.: Základní analytická chemie, Univerzita Karlova, Karolinum, Praha 2003