

Ludwik Bialy, Roman Gondko

UPROSZCZONA METODA IZOLOWANIA HEMOCYJANINY I KAROTENOPROTEIN RAKÓW

Opisano uproszczoną metodę otrzymywania z surowicy i hemolimfy raków hemocyjaniny oraz karotenoprotein. Sprawdzone eksperymentalnie, że tylko karotenoproteiny obecne w surowicy raków wiążą się selektywnie na złożu hydroksyapatytowym przy sile jonowej 0,33 M buforu fosforanowego o pH 6,8. W tych warunkach hemocyjanina nie zostaje zaadsorbowana, eluując się tym samym buforem. Po odwirowaniu eluentu przy 150 000 g przez 6 godzin w temperaturze 4°C otrzymuje się osad „crude” hemocyjaniny.

Zaadsorbowane na kolumnie żółto-czerwone karotenoproteiny eluują się 0,5 M buforem fosforanowym o pH 6,8.

1. WSTĘP

Dominującym białkiem w hemolimfie niektórych przedstawicieli *Mollusca* i *Arthropoda* jest barwnik oddechowy – hemocyjanina (Hc). U raków, jak to stwierdziliśmy uprzednio, hemocyjanina stanowi ok. 90% zawartości wszystkich białek [3].

W obecnie stosowanych procedurach izolowania hemocyjaniny raków, przyjęto dwie podstawowe zasady postępowania. Białko to otrzymuje się na skalę preparatywną bezpośrednio z hemolimfy bądź po wykrzepieniu „fibrinogenu” z surowicy.

W przypadku izolowania hemocyjaniny bezpośrednio z hemolimfy jako antykoagulantu najczęściej używa się 5% EDTA w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,7. Usunięcie białek towarzyszących, tj. glikoprotein, lipokarotenoprotein i białek skrzepu, następuje po ich wytrąceniu (w postaci osadu) w wyniku dializy do dużych objętości wody destylowanej. Ultrawierowanie po usunięciu wytrąconych białek prowadzi do otrzymania niebieskiego osadu surowej hemocyjaniny [8].

W pozostawionej bez antykoagulantu hemolimfie raków następuje szybkie tworzenie skrzepu, po usunięciu którego otrzymujemy surowicę [4]. Poddanie surowicy ultrawiroванию trwającemu 6 godz. przy 150 000 g prowadzi do otrzymania osadu hemocyjaniny [3, 4].

W obu wymienionych procedurach oddzielenie białek towarzyszących Hc, tj. glikoprotein, karotenoprotein, jest czasochłonne i niezupełne.

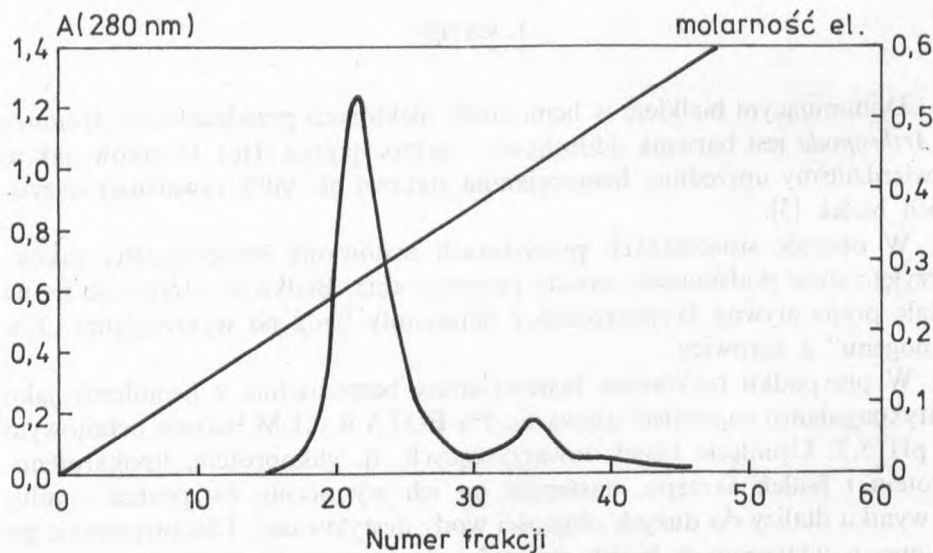
Do izolowania karotenoprotein z surowicy wprowadzono własną modyfikację opisaną poniżej. W zaproponowanym postępowaniu z puli białek towarzyszących hemocyjaninie bardzo szybko usunięte zostają karotenoproteiny.

2. MATERIAŁ I METODY

Hemolimfę pobraną z 1 osobnika (*Astacus astacus*) przez iniekcję dosercową, pozostawiono w temp. pokojowej 2 godz. do wykrzepienia. Skrzep po rozbiciu bagietką i przepuszczaniu przez watę silikonową usuwano przez wirowanie przy 12 000 g przez 15 min.

Otrzymaną surowicę rozcieńczano 1 M buforem fosforanowym o pH 6,8 do końcowego stężenia 0,33 M (2: 1).

Roztwór ten w ilości 3 cm³ наносzono na kolumnę 2,5 × 2 cm wypełnioną hydroksypatytym (Bio-Gel HT), eluując hemocyjaninę tym samym buforem z szybkością 30 cm³/godz.



Rys. 1. Rozdział hemocyjaniny i karotenoprotein raka *A. astacus* na złożu Bio-Gel HT buforem fosforanowym pH 6,8

Ustaliliśmy doświadczalnie, że w podanych warunkach na hydroksyapatycie selektywnie absorbują się tylko karotenoproteiny (rys. 1). Na podstawie powyższego faktu opracowana została metoda izolowania hemocyjaniny i karotenoprotein z surowicy pojedynczego osobnika (skala mikro) oraz z hemolimfy w skali makro. Ogólny tok postępowania preparatywnego przedstawiono schematycznie na rys. 2.

| | |
|-------------------------------------|---|
| HEMOLIMFA | 1. pobranie i pozostawienie hemolimfy do wykrzepienia (2 godz.) 2. homogenizacja skrzepu przesączenie przez watę silikonową, wirowanie 12 000 g – 15 min |
| SUROWICA | rozcieńczenie buforem fosforanowym 1 M pH 6,8 w stosunku 2: 1 |
| HYDROKSYAPATYT (Bio-Gel HT) | elucja hemocyjaniny 0,33 M buforem fosforanowym pH 6,8 |
| HEMOCYJANINA | KAROTENOPROTEINY |
| ultrawirowanie 6 godz. 150 000 g | żółto-czerwone pasmo karotenoprotein zaadsorbowane na kolumnie elucja 0,5 M buforem fosforanowym pH 6,8 |
| osad HEMOCYJANINY | KAROTENOPROTEINY |

Rys. 2. Ogólny schemat postępowania preparatywnego

Celem otrzymania hemocyjaniny w postaci osadu eluent pozbawiony karotenoprotein należy poddać ultrawirowaniu przy 150 000 g przez 6 godz. w temp. 4°C (skala mikro).

Do otrzymania hemocyjaniny w skali makro łączy się hemolimfę z kilku osobników. Następnie w opisanym powyżej postępowaniu otrzymujemy surowicę, którą poddajemy ultrawirowaniu przy 150 000 g przez 6 godz. (temp. 4°C). Otrzymany niebieski osad hemocyjaniny zanieczyszczony jest karoteno-

proteinami. Osad należy rozpuścić w niewielkiej ilości buforu fosforanowego 0,33 M o pH 6,8 i nanieść na kolumnę z hydroksyapatytem. Dalsze postępowanie: wymywanie i ultrawierowanie należy wykonać według opisu podanego powyżej.

Zatrzymane na złożu hydroksyapatytowym karotenoproteiny eluuje się 0,5 M buforem fosforanowym o pH 6,8.

3. KRYTERIA CZYSTOŚCI

Czystość i jednorodność preparatów hemocyjaniny określano na podstawie:

- widma pochłaniania (280: 340),
- rozdziału elektroforetycznego.

Jednorodność frakcji karotenoproteinowej ustalano elektroforetycznie.

Elektroforezę o 10% żelu poliakryloamidowym z SDS wykonano według Laemmli [5].

4. WYNIKI I DYSKUSJA

Na rys. 2 zamieszczono schemat własnego postępowania preparatywnego w stosowanej uproszczonej metodzie otrzymywania hemocyjaniny i karotenoprotein raków. Równolegle otrzymano preparaty hemocyjanin dotychczas stosowanymi dwoma metodami – według: Pilz i wsp. [8].

Przykładowy rozdział karotenoprotein i hemocyjaniny metodą chromatografii kolumnowej na hydroksyapatycie HT przedstawiono na rys. 1.

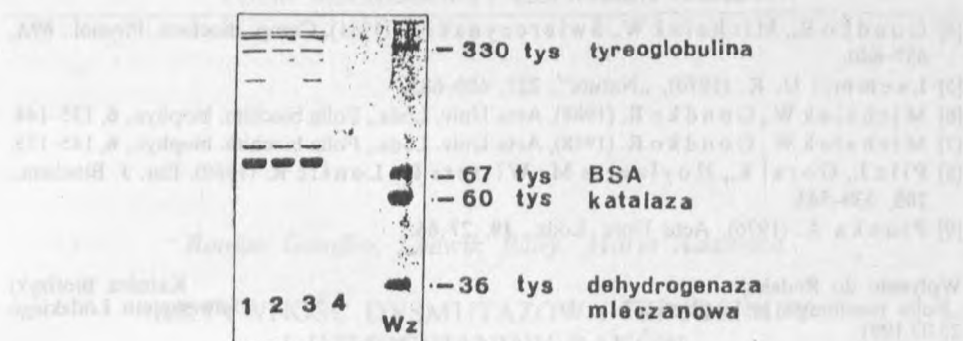
Na podstawie wykonanych widm absorpcji hemocyjanin wyliczone stosunki pochłaniania 280/340 zebrano w tab. 1.

Tabela 1

Stosunki absorbancji preparatów Hc (n = 5)

| Postępowanie preparatywne | A ₂₈₀ : A ₃₄₀ |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| Ultrawierowanie surowicy | 5,61 |
| Ultrawierowanie hemolimfy [5] | 5,95 |
| Oczyszczanie na hydroksyapatycie | 5,48 |

Rozdziały elektroforetyczne porównywanych preparatów hemocyjanin, wyizolowanych karotenoprotein oraz białek wzorcowych w żelu poliakryloamidowym przedstawiono na rys. 3.



Rys. 3. Rozdział elektroforetyczny karotenoprotein (4) i białek wzorcowych (Wz) oraz hemocyjanin: 1 – Hc po ultrawirowaniu surowicy; 2 – Hc po ultrawirowaniu hemolimfy; 3 – Hc po oczyszczeniu na hydroksyapatycie

Otrzymany preparat karotenoprotein okazał się być homogeną frakcją białkową (rys. 3; 4).

Rozdziały elektroforetyczne preparatów hemocyjaninowych (rys. 3; 1, 2, 3) nie różnią się między sobą i pozostają w zgodności z danymi literaturowymi.

Hemocyaniny – miedzioproteiny spełniające w hemolimfie *Arthropoda* i *Mollusca* rolę przenośników tlenu mogą występować u osobników tego samego gatunku w postaci agregatów (składników) o różnych stałych sedymentacji [7]. Ma to miejsce również w przypadku Hc raków, gdzie u jednego osobnika występują składniki 5 S, 16 S i 24 S [6].

Obok hemocyjanin w hemolimfie *Crustacea* obecne są zawsze karotenoproteiny (astaksantyna, karoteny) m. in. odpowiedzialne za charakterystyczne zabarwienie pancerzy skorupiaków [1, 2]. Związki te tworzą trwałe połączenia z białkami występującymi w hemolimfie pod ogólną nazwą karotenoprotein. Im też przypisuje się ważną funkcję zmiataczy wolnorodnikowych, w tym anionorodnika ponadtlenkowego [9].

Zaprezentowane postępowanie preparatywne daje możliwość równoczesnego otrzymania wymienionych białek w stanie czystym, będąc wielce użytecznym do dalszych badań ich struktury i funkcji.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Bauchau A., de Brouwer M. B. (1974), *J. Microsc.*, **19**, 37–46.
- [2] Czczuga B., Krywuta S. (1981), *Comp. Biochem. Physiol.*, **68B**, 339–343.
- [3] Gondko R., Helszer Z., Adamska M. (1985), *Acta Biochim. Polon.*, **32**, 251–257.

- [4] Gondko R., Michalak W., Świerczyński B. (1981), *Comp. Biochem. Physiol.*, **69A**, 637-640.
- [5] Laemmli U. K. (1970), „*Nature*”, **227**, 680-685.
- [6] Michalak W., Gondko R. (1988), *Acta Univ. Lodz., Folia biochim. biophys.*, **6**, 135-144.
- [7] Michalak W., Gondko R. (1988), *Acta Univ. Lodz., Folia biochim. biophys.*, **6**, 145-175.
- [8] Pilz J., Goral K., Hoylaerts M., Witters R., Lontie R. (1980), *Eur. J. Biochem.*, **105**, 539-543.
- [9] Płonka A. (1976), *Acta Univ. Lodz.*, **19**, 27-66.

Wpłynęło do Redakcji
„*Folia biochimica et biophysica*”
25.07.1991

Katedra Biofizyki
Uniwersytetu Łódzkiego

Ludwik Biały, Roman Gondko

SIMPLIFIED METHOD OF THE ISOLATION OF CRAYFISH HAEMOCYANIN AND CAROTENOPROTEINS

The simplified method of the isolation of haemocyanin and carotenoproteins from crayfish hemolymph was described and characterized. It has been hypothesized and confirmed experimentally that only carotenoproteins present in crayfish hemolymph selectively bind to hydroxyapatite bead at the ionic strength corresponding to 0.33 M phosphate buffer pH 6.8. Under these conditions haemocyanin remains unadsorbed in the solution and may be eluted with the same buffer. Following the centrifugation at $150\,000 \times g$ for 6 h (4°C) the residue of „crude” haemocyanin may be harvested. Red-yellowish carotenoproteins, adsorbed at the top of hydroxyapatite bead, may be subsequently eluted with 0.5 M phosphate buffer pH 6.8.