

O. KIRRET, I. ARRO, H. HEINLO

TEMPERATUURI MÕJUST VALKUDE MOLEKULKAALU MÄÄRAMISEL GEELFILTRATSIOONI ABIL*

Viimasel ajal on proteiinide ja peptiidide analüüsimiseks kasutatud järjest enam geelfiltratsiooni «Sephadexi» tüüpi dekstraangeelidel. Nime- tatud meetodi eeliseks on suhteliselt lihtne aparatuur, täidise praktiline inertsus uuritavate ühendite suhtes ja küllaltki suur lahutusteravus. Üle- vaate dekstraangeelide kasutamisest valkude lahutamisel on andnud P. Flodin (1962). Märksa vähem on tutvustatud «Sephadexi» geelide kasu- tamist valkude molekulkaalu määramiseks, kuigi sel meetodil võib ühe ja sama operatsiooniga eraldada uuritavad ühendid ning leida saadud frakt- sioonide molekulkaalud.

Esimesena on valkude molekulkaalu määramist geelfiltratsiooni abil laiemalt uurinud P. Andrews (1963, 1964). Kasutades 50 cm pikkust ja 2,5 cm läbimõõduga kolonni, määras ta mitmesuguste «Sephadexi» tüüpi täidiste optimaalsed tööpiirkonnad. Ühtlasi leidis ta, et ei proteiini hulk ega kasutatava eluendi pH mõjuta eriti saadud tulemusi. Analüüsi viga sel meetodil ei ületa Andrews' andmeil 10%.

Põhjalikult uuris molekulkaalu määramist «Sephadexide» abil J. R. Whitaker (1963) ja leidis, et uuritava ühendi molekulkaalu logaritmi sõltub lineaarselt kasutatud täidise vabaruumala ja uuritava ühendi elueerimisruumala suhtest. Uurimisel kasutati «Sephadexi» G-100 ja G-75. Leiti, et proovi hulk, kontsentratsioon ning kolonni dimensioonid ei avalda erilist mõju täidise vabaruumala ja elueerimisruumala suhtele, s. t. mää- ramiste tulemustele. Et selgitada olenevust temperatuurist, selleks uuris J. R. Whitaker elueerimisruumalade muutusi 3,3° ja 25—27° C juures ning leidis, et madalamal temperatuuril olid nad üldiselt väiksemad. Erandi moodustas ainult γ_1 -globuliin, mille elueerimisruumala jäi praktiliselt konstantseks.

Esitatus selgub, et molekulkaalude määramisel «Sephadexi» geelide abil on olemas küllaldaselt andmeid geelide optimaalsete tööpiirkondade, proteiini hulga ja kontsentratsiooni mõju, pH mõju jt. tingimuste kohta. Vähem andmeid leidub temperatuuri toime kohta. Kõigest sellest lähtudes otsustati käesoleva tööga täpsemalt selgitada molekulkaalude määramise olenevust temperatuurist. Selleks tehti rida katseid, kus erinevatel tem- peratuuridel määrati mitmete valkude suhtelised elueerimisruumalad.

Töö eksperimentaalses osas kasutati seadet, mis koosnes jahutus- mantliga klaaskolonnist (1,2 × 140 cm), ultratermostaadist, fraktsiooni-

* Eksperimentaalse osa töötlemisest võttis osa A. A r u j a.

kogujast («Fraksiomat») ja eluendinõust, kust vastav lahus isevoolu teel kolonni juhiti. Täidiseks kasutati «Sephadexi» G-100 ja etaloonainetena valke, mida iseloomustatakse tabelis 1.

Tabel 1

Katses kasutatud etaloonained

Proteiin	Päritolu	Molekulkaal	Kirjandus
γ -globuliin (<i>bovin</i>)	Союзреактив	156 000 150 000	Whitaker, 1963
Fosfoglükomutaas (jänese muskleist)	Reanal, Budapest	77 700	Reanal
Seerumialbumiin	Austrowaren, Wien, Laboratoriums- Reagenzien	70 000	Whitaker, 1963
Trüpsiin	SPOFA, Praga	23 800	Whitaker, 1963
Ribonukleas	Reanal, Budapest	13 600	Whitaker, 1963

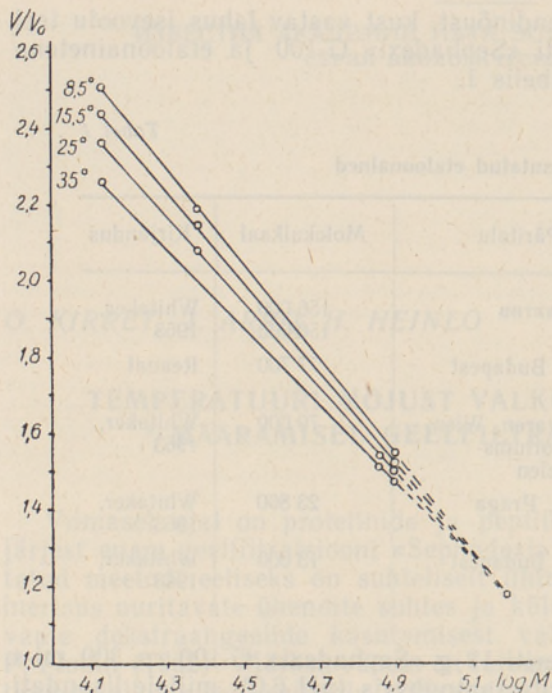
Kolonni täitmiseks suspendeeriti 12 g «Sephadexi» G-100 ca 300 ml-s elueerimiseks kasutatavas 0,1M atsetaatpuhvril (pH 6,0), millele lisandati NaCl kuni lahuse üldise ioontugevuseni $\mu = 0,5$ ja jäeti 2–3 päevaks paisuma. Seejärel täideti alt suletud klaaskolonn, mille põhjas oli klaasvatist tropp, poolest saadik puhvriga ja lisandati ettevaatlikult geelispensiooni. Kui kolonni alumisse ossa oli sadenenud 5–6 cm kõrgune «Sephadexi» kiht, vallandati kolonni alumine ava ja pidevalt suspensiooni lisandades täideti kolonn lõplikult. Lõpuks kaeti «Sephadexi» kiht filterpaberist kettakesega, et vältida geeli segunemist lisandatava prooviga. Pakitud kolonni pesti eespool nimetatud puhverlahusega kuni tasakaalu saavutamiseni (s. o. vähemalt 24 tundi), mille üle otsustati valkude elueerimisruumalade konstantsuse järgi. Määramiseks pipeteeriti geelikihile 1 ml-s puhvril lahustatud proteiinid. Pärast nende imendumist geelis alustati elueerimist. Fraktsioonid koguti 1 ml suuruses mahus.

Tabel 2

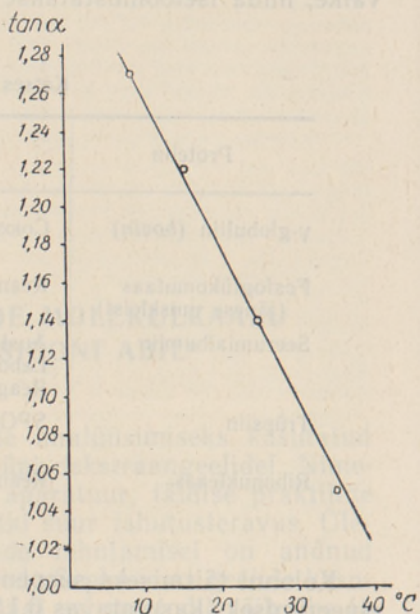
Etaloonvalkude elueerimisruumalad γ_2 -globuliini suhtes

Etaloonaine	Suhteline elueerimisruumala °C juures			
	8,5	15,5	25	35
γ_2 -globuliin	1,00	1,00	1,00	1,00
γ_1 -globuliin	1,17	1,16	1,14	1,12
Fosfoglükomutaas	1,55	1,52	1,50	1,47
Seerumialbumiin	—	—	1,54	1,51
Trüpsiin	2,19	2,15	2,08	—
Ribonukleas	2,51	2,44	2,36	2,26

ruumalaks loeti geelfiltratsioonil eraldunud γ_2 -globuliini elueerimisruumala, sest oma suure molekulkaalu tõttu (156 000) ei ole see komponent praktiliselt võimeline tungima «Sephadexi» G-100 geeli. Määramistel saadud tulemused esitatakse tabelis 2 ning joonistel 1 ja 2.



Joon. 1.



Joon. 2.

Esitatud andmetest selgub, et temperatuuri mõju molekulkaalu määramisele «Sephadexi» geelide abil onoleb uuritavate ühendite molekulkaalust. Nii näit. sõltub γ_1 -globuliini suhteline elueerimisruumala vähe kolonni temperatuurist. Molekulkaalu vähenemisel avaldab aga temperatuur järjest suuremat mõju suhtelise elueerimisruumala väärtusele. Temperatuuri langeses suureneb kolonni lahutusvõime ja ühtlasi molekulkaalu määramise täpsus. Erinevatel temperatuuridel määratud kolonni kalibratsioonijooned lõikuvad kõik ühes punktis, kusjuures sirgete tõusunurga tangens sõltub lineaarselt temperatuurist. Kalibratsioonijoonete lõikepunkt, nagu selgub jooniselt 1, vastab molekulkaalule ca 150 000. Firma «Pharmacia» andmeil osutub molekulkaal 150 000 «Sephadexi» G-100 kasutamisel ülemiseks globulaarse valguosakese fraksioneerimise piiriks.

Esitatud seaduspärasused võimaldavad kalibreerida kolonni arvutuslikul teel väga mitmesugustele temperatuurirežiimidele, toetudes seejuures minimaalsele hulga katseandmetele.

KIRJANDUS

- Andrews P., 1964. *Biochem. J.* **91** : 222.
 Andrews P., Folley S. J., 1963. *Biochem. J.* **87** : 3.
 Flodin P., 1962. *Dextran Gels and Their Applications in Gel Filtration*. Uppsala. «Pharmacia», Sephadex and Other Separation Products. Uppsala.
 Whitaker J. R., 1963. *Anal. Chem.* **35** : 1950.

O. KIRPET, I. ARRO, H. HEINLO

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА МЕТОДОМ ГЕЛЕВОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

Резюме

Для выявления влияния температуры на определение молекулярного веса белков методом гелевой фильтрации использовалась колонна диаметром 1,2 см и длиной 140 см. Наполнителем колонны служил Сефадекс Г-100, и вымывание проводилось 0,1-молярным ацетатным буферным раствором. Ионная сила буферного раствора была доведена до $\mu = 0,5$ добавлением поваренной соли.

Полученные результаты показали, что влияние температуры зависит от молекулярного веса изучаемых соединений. Так, например, относительный объем вымывания γ_1 -глобулина мало зависит от температуры колонны. Однако по мере уменьшения молекулярных весов исследуемых соединений влияние температуры на относительный объем вымывания возрастает. С уменьшением температуры разделительная способность колонны увеличивается, в то же время увеличивается и точность определения молекулярного веса. При этом все линии на калибровочных графиках, определенных при различных температурах, пересекаются в одной точке и тангенс угла подъема линии линейно зависит от температуры. Точка пересечения калибровочных линий на графике соответствует величине молекулярного веса 150 000.

По данным фирмы «Фармация», молекулярный вес 150 000 является верхним пределом фракционирования глобулярных белков при использовании в качестве наполнителя колонны Сефадекс Г-100.

Выявленные закономерности позволяют произвести калибровку колонны для различных температурных режимов расчетным методом по минимальному количеству экспериментальных данных.

Институт химии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
14/1 1966

O. KIRRET, I. ARRO, H. HEINLO

INFLUENCE OF TEMPERATURE AT THE DETERMINATION OF THE MOLECULAR WEIGHT OF PROTEINS BY GEL-FILTRATION

Summary

In order to state the influence of temperature at the determination of the molecular weight of proteins by gelfiltration, a column was used with a cross-section of 1.2 cm and length of 140 cm. The filling was composed of Sephadex G-100. The eluent was 0.1 molar acetate buffer (pH 6.0), whose ionic strength was increased to $\mu = 0.5$ by adding sodium chloride. The results obtained showed that the influence of temperature at the determination of molecular weight depends on the molecular weight of the compounds investigated. Thus, for example, the relative elution volume of the γ_1 -globulin is in a slight dependence on the temperature. With decreasing the molecular weight, the temperature exerts an increasing influence on the relative elution volume. With the decreasing of the temperature the separative ability of the column increases as well as the precision of the definition of molecular weight. At different temperatures the fixed calibration lines of the column cross all at one point, the tangent of the gradient of straight lines depending linearly on the temperature. The crossing-point of the calibration lines in the diagram corresponds to the value of the molecular weight about 150 000. According to the data of the firm "Pharmacia", at the application of Sephadex G-100 the molecular weight 150 000 turns out to be the upper fractioning limit of the globular protein particle. The above regularities allow to effect the calibration of the column for various temperature regimes by computational methods proceeding from a minimal number of experimental data.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Chemistry

Received,
Jan. 14, 1966