ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ α-ΛΑΚΤΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ, ΜΙΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Καθαρισμός της α-λακταλβουμίνης

Το γάλα περιέχει αρκετές πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται και οι καζεΐνες (φωσφοπρωτεΐνες), η β-λακτοσφαιρίνη, η α-λακταλβουμίνη, η αλβουμίνη και διάφορες ανοσοσφαιρίνες. Η α-λακταλβουμίνη έχει μοριακό βάρος 15,500 Da και αποτελείται από 129 αμινοξέα. Η συγκέντρωσή της στο γάλα είναι περίπου 1mg/ml και αποτελεί σημαντικό συστατικό του συστήματος της συνθάσης της λακτόζης.

Οι κύριες πρωτεΐνες του γάλακτος είναι οι καζεΐνες, οι οποίες μπορούν να απομακρυνθούν με θερμική κατεργασία σε pH 4,6 **(1^{ο} μέρος του πειράματος)**. Η κατεργασία αυτή οδηγεί στην αλλαγή της διαλυτότητας των καζεϊνών, οι οποίες μπορούν να απομακρυνθούν με φυγοκέντριση. Το διάλυμα που απομένει περιέχει κυρίως β-λακτοσφαιρίνη (Μ.Β. 18000 Da) και α-λακταλβουμίνη (Μ.Β. 15500 Da)

Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να διαχωριστούν με χρωματογραφία διήθησης πηκτής (gel filtration) χρησιμοποιώντας το υλικό Sephadex G-50 ή με χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography) χρησιμοποιώντας Cu(II)-IDA-αγαρόζη **(2^{ο} μέρος του πειράματος).** Οι συγκεκριμένες πλευρικές ομάδες αμινοξέων της α-λακταλβουμίνης στις οποίες οφείλεται η δέσμευσή της στην Cu(II)-IDA-αγαρόζη δεν είναι γνωστές. Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι η α-λακταλβουμίνη είναι μία μεταλλοπρωτεΐνη, η οποία περιέχει ένα κατιόν Ca(II). Η δεσμευμένη στην κολώνα α-λακταλβουμίνη εκλούεται με ένα διάλυμα ιμιδαζολίου.

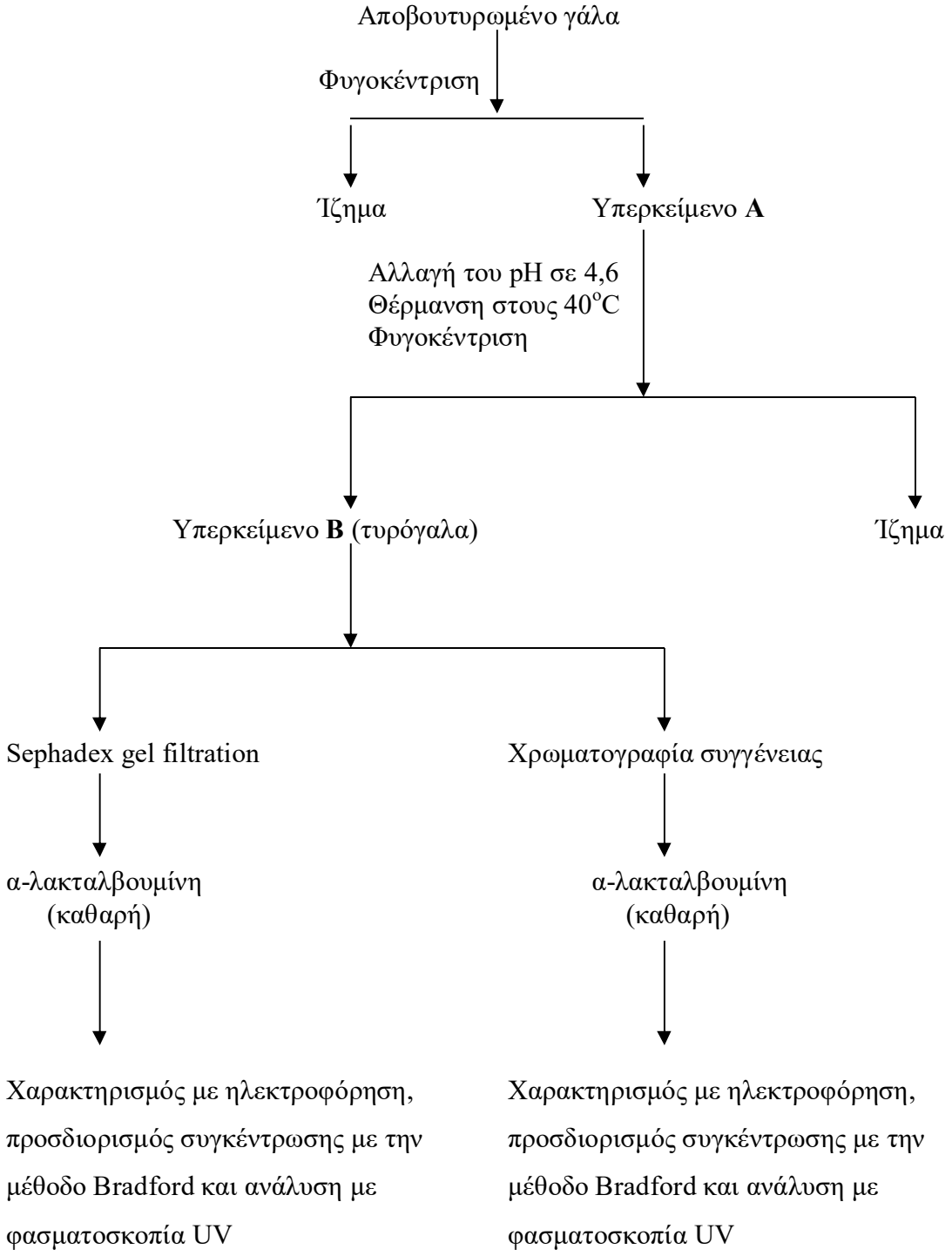
Σημαντική προϋπόθεση για την απομόνωση μιας πρωτεΐνης είναι η ύπαρξη μιας χαρακτηριστικής, εύκολης και ειδικής δοκιμασίας προσδιορισμού ώστε να μπορούμε να την παρακολουθήσουμε σε κάθε στάδιο απομόνωσης. Στον τομέα αυτό η α-λακταλβουμίνη μειονεκτεί επειδή δεν έχει καμιά ξεχωριστή φυσική, χημική ή βιολογική ιδιότητα που να μπορεί να μετρηθεί άμεσα. Η μέτρηση της βιολογικής της ενεργότητας ως πρωτεΐνης – τροποποιητή στο μηχανισμό σύνθεσης της λακτόζης είναι ο πιο ειδικός τρόπος για τη μελέτη της α-λακταλβουμίνης· όμως η διαδικασία αυτή απαιτεί ένα σύστημα συζευγμένων ενζύμων και παρασκευή μεγάλου αριθμού

διαλυμάτων οπότε είναι ακριβή και χρονοβόρα. Εναλλακτικά λοιπόν, η διαδικασία απομόνωσης της α-λακταλβουμίνης θα παρακολουθείται με μέτρηση της απορρόφησης των κλασμάτων που συλλέγονται από τη στήλη χρωματογραφίας, στα 280nm. Το φάσμα απορρόφησης των περισσότερων πρωτεϊνών παρουσιάζει μία ευρεία ταινία απορρόφησης γύρω στα 280nm. Η απορρόφηση αυτή οφείλεται στην ύπαρξη αρωματικού δακτυλίου στα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν μετριέται η συγκέντρωση ή η παρουσία μόνο της α-λακταλβουμίνης, αλλά η συνολική ποσότητα όλων των πρωτεϊνών που είναι παρούσες. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης θα εφαρμοστεί η μέθοδος Bradford **(3^{ο} μέρος του πειράματος)**. Η μέθοδος δεν είναι συγκεκριμένη για κάποιο είδος πρωτεΐνης, αφού υπολογίζει τη συνολική ποσότητα πρωτεϊνών.

Τα κλάσματα τα οποία συλλέγονται από την κολώνα είναι σχεδόν απίθανο να περιέχουν μία μόνο πρωτεΐνη. Πόσα είδη πρωτεϊνών είναι παρόντα; Ποια είναι η σχετική αφθονία κάθε πρωτεΐνης; Είναι η α-λακταλβουμίνη η κύρια πρωτεΐνη; Τις απαντήσεις στις παραπάνω ερωτήσεις θα δώσει η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE την οποία θα εφαρμόσετε στο **4^{ο} μέρος** του πειράματος.

Μια σχηματική περιγραφή της μεθόδου απομόνωσης της λακταλβουμίνης παρουσιάζεται στην εικόνα 1:



ΕΙΚΟΝΑ 1. Διάγραμμα απομόνωσης και καθαρισμού της α-λακταλβουμίνης από το γάλα.

Η πλήρης απομόνωση, δηλαδή ο καθαρισμός και χαρακτηρισμός της α-λακταλβουμίνης απαιτεί περίπου 13 ώρες. Για την παρασκευή του υπερκείμενου **B**, που περιέχει και την α-λακταλβουμίνη, χρειάζονται περίπου 3 ώρες και για το χρωματογραφικό στάδιο άλλες 5 ώρες. Οι διαδικασίες της ανάλυσης απαιτούν περίπου 5 ώρες. Αν είναι απαραίτητο, το υπερκείμενο **B** μπορεί να αποθηκευτεί στον καταψύκτη για αρκετές εβδομάδες.