



Прочистување на ензимот алииназа од лук

Теодора Ѓорѓева^{*1}, Катарина Смилков¹, Џавад Насим², Клаус Јакоб²

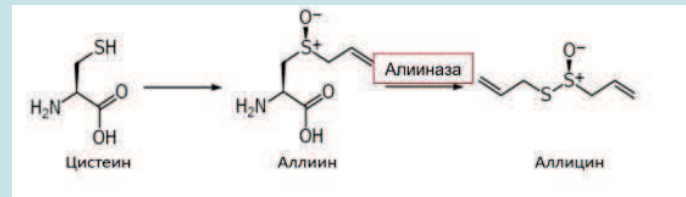
^{*1} Оддел Фармација, Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип, Северна Македонија, ул. Крсте Мисирков 10 А, 2000, Штип, (teodora.152757@student.ugd.edu.mk)



² Институт за Биоорганска хемија, Универзитет во Саарланд, Сарбрукен, Германија, 66123 Сарбрукен, Германија

ВОВЕД

Ензимот алииназа е одговорен за потенцијални здравствени придобивки на лукот. Целта на ова истражување беше да се развие протокол за прочистување на изолирана алииназа, преку комбинација на хроматографски методи.



ХЕМИСКИ СУПСТАНЦИ И РЕАГЕНСИ

- Пуфер А, В, С и D (pH=7,2)
- Полиетилен гликол

КОРИСТЕНИ МЕТОДИ

- Екстракција на алииназа
- Почистување на алииназа со афинитетна хроматографија
- Концентрирање на алииназа со гел филтрација и филтација со полупропустлива мембрана
- Определување на концентрација на алииназа со метод на Бредфорд.

А

Екстракција на алииназа - спроведена на 4°C користејќи водена бања со мраз.

- Хомогенизација со тријалник и пистил



Б

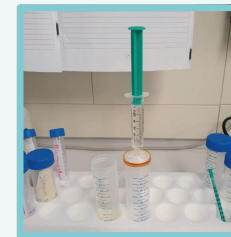
Груба филтрација со газа и центрифугирање



В

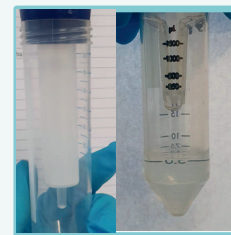
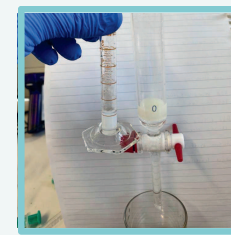
Афинитетна хроматографија

- стационарна фаза - кон. А сефароза
- мобилна фаза - пуфер В
- раствор за елуција - пуфер С
- примерок за анализа - раствор добиен од процесот на екстракција



Г

Гел филтрација и филтација со полупропустлива мембрана



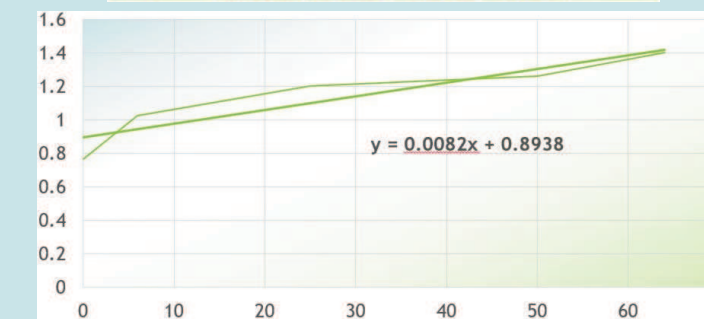
РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Резултатите кои беа добиени потврдуваат дека во зависност од користениот метод на прочистување, се добиваат и различни концентрации на алииназа.

- **Афинитетната хроматографија** - елуирање на онечистувањата со празниот волумен на хроматографијата.
- **PD-10 гел-филтрацијата** - изолација на алииназа од онечистувањата со поголема молекулска маса.
- **Ультрафилтрација со полупропустлива мембрана** - отстранување на онечистувања со молекулска маса помала од 30 kDa како соли и остатоци од пуфери.

*Комбинација на овие три методи - добивање на прочистен и концентриран ензим

595 nm	1	2	3	4	5
A	0,748	1,026	1,201	1,262	1,393
B	0,757	1,028	1,217	1,279	1,408
C	0,795	1,020	1,181	1,240	1,402
D	1,248	1,392	0,832	0,976	
E	1,280	1,384	0,827	1,025	
F	1,257	1,363	0,858	1,033	



Протеински раствор	Концентрација на алииназа (µg/mL)
Афинитетната хроматографија	89,82
Гел филтрација	118,51
Ультрафилтрација со полупропустлива мембрана (разреден 10 пати)	66,829
Ультрафилтрација со полупропустлива мембрана (разреден 5 пати)	71,665

ЗАКЛУЧОК

Секој метод на прочистување дава различни нивоа на чистота и концентрација на алииназа. Додека пак, комбинирањето на сите три методи овозможува добивање на концентриран и прочистен ензим кој понатаму може да се користи во истражувачки цели.