

Upotreba lentil lektina za detekciju glikoproteina na nitroceluloznoj membrani

*Detekcija glikoproteina je važna u analitičkoj biohemiji prilikom karakterizacije i prečišćavanja proteina. Metoda za detekciju glikoproteina koristi lektine zbog njihove sposobnosti da specifično vežu ugljene hidrate. Cilj ovog rada bio je da se ispita efikasnost lentil lektina izolovanog iz sočiva *Lens culinaris* u detekciji glikoproteina, zbog njegove pristupačnosti i jednostavnog izolovanja. U radu je korišćeno šest proteina za analizu. Detekcija glikoproteina vršena je dvema varijantama metoda da bi se odredilo kojim se postiže veća osetljivost metode. Prvi način podrazumevao je korišćenje prečišćenog rastvora lentil lektina, a drugi korišćenje rastvora lentil lektina prethodno kuplovanog sa peroksidazom. U obe varijante metoda varirane su koncentracije lentil lektina. U prvoj varijanti, pri višim koncentracijama lektina detektovani su TLP, invertaza, a pri nižim TLP, invertaza i X protein. U drugoj varijanti metode detektovani su isti proteini kao i u prvoj, ali pri najnižoj koncentraciji lektina drugom varijantom metoda nisu bili detektovani TLP i invertaza. Dobijeni rezultati ukazuju da je lentil lektin veoma pogodan za detekciju glikoproteina i da su dovoljne i niske koncentracije za dobijanje reprezentativnih rezultata, kao i da se prvim načinom metode dostiže veća osetljivost lektina.*

Uvod

Glikoproteini su makromolekuli građeni od proteina i ugljenih hidrata. Nalaze se u svim živim organizmima i imaju brojne funkcije. U glikoproteine spadaju brojni enzimi, transportni proteini, receptori, hormoni i strukturni glikoproteini (Voet i Voet 2000).

Lektini predstavljaju grupu proteina koji se specifično vežu za ugljene hidrate. Imaju više vezivnih mesta i to je razlog zašto mogu da aglutiniraju molekule koji na svojoj površini sadrže saharidne ostatke (Vujčić 2002). Njihova sposobnost specifičnog vezivanja ugljenih hidrata ima ključnu ulogu u detekciji glikoproteina.

Specifičnost interakcije lektina sa ugljenim hidratom zavisi od vrste monosaharidne jedinice koja se nalazi na kraju oligosaharidnog lanca gliko-

*Vladan Martinović
(1988), Banatsko
Karadorđevo, Đure
Jakšića BB, učenik 2.
razreda Zrenjaninske
gimnazije*

proteina. Lektini su složeni proteini koji osim proteinske komponente sadrže ugljene hidrate i dvovalentne jone metala, najčešće Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} . Gubitkom ovih jona dolazi do denaturacije većine lektina. Lektini obavljaju važnu ulogu u odbrambenom mehanizmu biljaka prilikom napada različitih agenasa. Koriste se i kao reagensi za identifikaciju i utvrđivanje strukture ugljenih hidrata i glikoproteina (Petronijević 2000).

U ovom radu ispitivan je lentil lektin (LcH, LCA, *Lens culinaris* agglutinin), izolovan iz sočiva *Lens culinaris*, kao efikasnije rešenje prilikom detekcije glikoproteina. Prvi razlog zašto je izabran lentil lektin jeste njegova struktura koja uslovljava njegovu funkciju prepoznavanja manoznih, fukoznih i glukoznih ostataka. Sastavljen je iz 4 subjedinice: dve od 17 kDa i dve od 8 kDa. Posедуje dva vezivna mesta, dok su za njegovu biološku aktivnost neophodni joni Ca^{2+} i Mn^{2+} (Arki 1999). Drugi razlog je pristupačnost lentil lektina i cena komercijalnog rastvora prilikom kupovine u odnosu na druge lektine koji se koriste u iste svrhe na tržištu (konkavalin A). Kao podloga za imobilizaciju glikoproteina, izabrana je nitrocelulozna membrana (NC) jer nudi ekonomičnije rešenje od drugih koje se koriste prilikom imobilizaciji proteina.

Cilj rada je da se ispita efikasnost lentil lektina pri detekciji glikoproteina na nitroceluloznoj membrani.

Materijal i metode

Izolovanje lentil lektina iz sočiva *Lens culinaris*

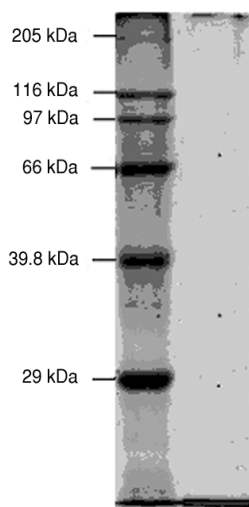
Lentil lektin je izolovan modifikovanom referentnom metodom (Vujčić 2002). Sočivo je isprano česmenom, a zatim destilovanom vodom. 250 g sočiva potopljeno je u 750 mL 3% rastvora natrijum hlorida (NaCl) preko noći u frižideru. Sutradan je homogenizovano u istom rastvoru i procedeno. Nakon toga postavljena je protočna dijaliza ekstrakta u vodi preko noći. Korišćeno je crevo za dijalizu promera pora od 12 kDa (Sigma-Aldrich Chem Comp.). Posle dijalize ekstrakt je centrifugiran 15 min na 3000 obr/min, a zatim stacionarno dijalizovan u 10 mM rastvoru MnCl_2 i CaCl_2 .

Koncentracija glukoze iznosila je približno 0.04 %, a određena je metodom sa fenol-sumpornom kiselinom po Duboisu (Dubois 1956).

Urađena je afinitetna hromatografija, ekstrakta *batch* metodom: ekstrakt je pomešan sa 40 mL Sephadex G-150. Ovako pripremljena suspenzija Sephadex-ekstrakt korišćena je za punjenje kolone za hromatografiju. Rastvori za eluiranje bili su 10 mM MnCl_2 i CaCl_2 i 0.2 M rastvor glukoze u 10 mM MnCl_2 i 10 mM CaCl_2 . Merena je apsorbancija sakupljenih frakcija na spektrofotometru (GBC Spectral, San Francisco) na talasnoj

dužini od 280 nm. Dobijena količina lektina dijalizovana je u 10 mM MnCl₂ i 10 mM CaCl₂.

Koncentracija lektina u ekstraktu iznosila je 0.0629 mg/mL, utvrđena po Bradfordovom testu. Homogenost preparata je urađena SDS-PAGE elektroforezom po Laemli-ju. Elektroforegram je dat na slici 1. U levoj traci su markeri, a u desnoj uzorak prečišćenog lektina. Protein se nalazi na približno 17 kD, što je i očekivano, jer je masa veće subjedinice 17 kD (Vujčić 2002.).



Slika 1.
Određivanje
homogenosti preparata

Figure 1.
Homogeneity of the
lectin extract

Priprema proteina za analizu

Za detekciju glikoproteina korišćeno je šest proteina: Thaumatin like kiwi allergen protein (TLP), za koji je dokazano da je konkanavalin A vezujući protein (Gavrilović-Jankulović 2002); invertaza; kivi cistatin; bromelain; X, delimično okarakterisan protein koji je deo mentorovog nepublikovanog rada. To je razlog zašto naziv proteina nije spomenut u ovo radu; Hemoglobin, korišćen samo u prvoj probi.

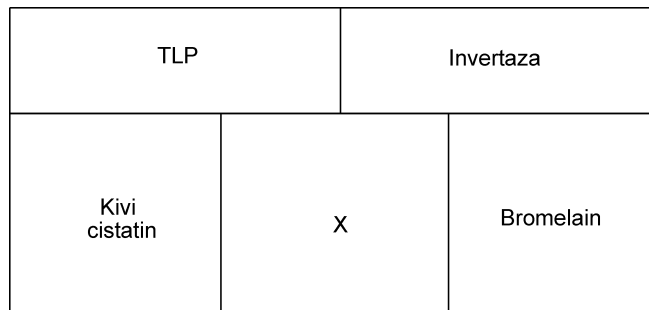
Za imobilizaciju proteina korišćena je nitrocelulozna, membrana (Sigma-Aldrich Chem Comp). Zbog tehničkih problema prva proba je rađena na membrani trakastog oblika (šema 1), a ostale probe rađene su na membranama kvadratnog oblika (šema 2).

Nakon nanošenja uzoraka proteina od po 5 µL membrana je inkubirana u 0.3% rastvoru BSA 1 h. Zatim je ispirana 30 min (dva puta po 10 min u tTBS-u i jedanput u TBS-u).

TLP	Invertaza	Kivi cistatin	X	Bromelain	Hemoglobin
-----	-----------	---------------	---	-----------	------------

Šema 1.
Raspored proteina na
trakastoj membrani

Scheme 1.
Protein order on the NC
membrane



Šema 2.
Raspored proteina na kvadratnoj membrani

Scheme 2.
Protein order on the square membrane

Detekcija glikoproteina

Rad je obuhvatio dva načina detekcije:

1. delovanje na membranu sa čistim lektinom
2. delovanje na membranu lektinom prethodno kuplovanim sa peroksidazom

Prvi način

Membrana sa imobilisanim proteinima inkubirana je 1 sat u rastvoru čistog lektina da bi se molekuli lektina jednim svojim vezivnim mestom vezali za glikoproteine. Zatim je ispirana približno 30 minuta (dva puta po 10 minuta u tTBS-u i jedanput u TBS-u), pa inkubirana 1 sat sa razblaženom peroksidazom (1 mLHRP u 9 mL tTBS) da bi se drugim vezivnim mestom lektin vezao za molekul peroksidaze, koji je po strukturi glikoprotein. Membrana je potom ponovo ispirana 30 minuta (dva puta po 10 minuta u tTBS-u i jednom u TBS-u).

Drugi način

Lektin je kuplovan sa peroksidazom na sledeći način: u 10 mL rastvora lektina dodato je 3 mL razblažene peroksidaze (1 mL peroksidaze iz rena aktivnosti 18U) u 9 mL tTBS-a, a zatim je dodato 150 µL glutaraldehida. Inkubacija je trajala 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Membrana sa imobilisanim proteinima inkubirana je 2 sata sa umreženom peroksidazom i lektinom, a potom ispirana 30 min (dva puta po 10 minuta u tTBS-u i jednom u TBS-u).

Vidljiv rezultat za oba načina metode dobijen je inkubacijom membrane 20 min sa 0.5 mg diaminobenzidina (DAB) rastvorenog u 1 mL 100 mM TRIS pH 7.5 sa 5 L H₂O₂. Postupak za obe varijante metode ponovljen je još dva puta bez hemoglobina, a zatim su rađene probe sa različitim razblaženjima rastvora lektina koja su iznosila 2, 5, 10, 100, 1000 i 10000 puta.

Rezultati i diskusija

Prvom varijantom metode u prvoj probi detektovani su TLP, invertaza, bromelain i hemoglobin (slika 3). Detekcija TLPa potvrdila je da lentil lektin može da detektuje glikoproteine kao i ConA. Detektovana je i invertaza, što potvrđuje od ranije poznate podatke (Rahman 2001).

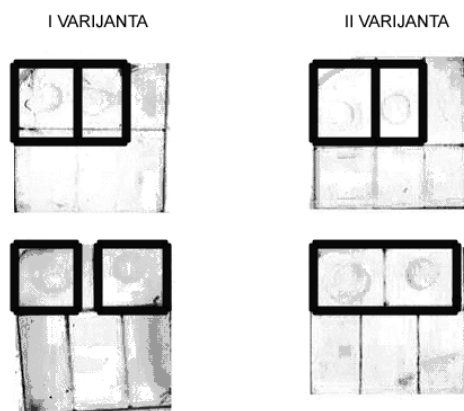
Hemoglobin je crvene boje, koja daje lažno pozitivnu reakciju zbog sličnosti boje sa produktom oksidacije DAB-a. Rastvor bromelaina je zbog visoke koncentracije ostavljao trag na membrani i to žute boje. Hemoglobin je izostavljen iz daljeg istraživanja, a rastvor bromelaina razblažen pet puta. Ostali proteini (kivi cistatin, X) nisu detektovani.



Slika 3.
Glikoproteini detektovani na membrani, prva proba

Figure 3.
Glycoproteins detected on membrane, first test

Sledeće ponavljanje koje nije sadržalo hemoglobin, i u kome je korišćen razblaženi uzorak bromelaina, detektovani su samo TLP i invertaza. Postupak je ponovljen još jedanput i dobijeni su isti rezultati tj. detektovani su samo TLP i invertaza (slika 4).



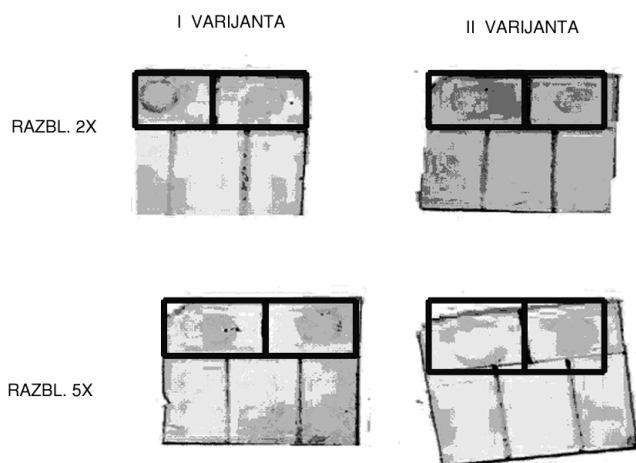
Slika 4.
Glikoproteini detektovani na membrani, drugo i treće ponavljanje

Figure 4.
Glycoproteins detected on the membrane, second and third analysis

Drugim načinom metode u prvoj probi nije detektovan nijedan glikoprotein. Postupak je ponovljen dva puta i detektovani su TLP i invertaza (slika 4). Pretpostavlja se da su u prvoj probi napravljene greške u toku inkubiranja lektina, ili pripreme same analize, pa je ta proba isključena iz istraživanja.

Radi bolje karakterizacije osetljivosti lektina korišćene su različite koncentracije rastvora lektina.

Pri koncentracijama lektina od 2 puta razblaženja za oba načina metode opet su detektovani TLP i invertaza. Isti slučaj je i sa razblaženjima od 5 puta i 10 puta (slika 5).

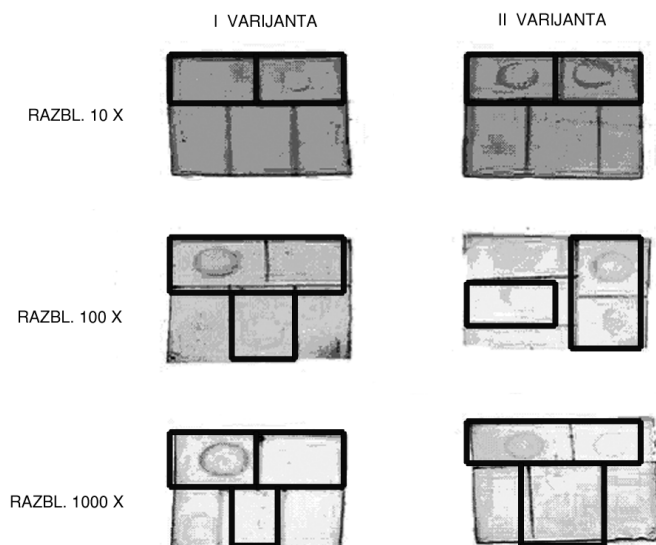


Slika 5. Glikoproteini detektovani na membrani, razblaženje 2 i 5 puta

Figure 5. Glycoproteins detected on the membrane, 2 and 5 times dilution

Pri razblaženjima rastvora lektina od 100 puta, 1000 puta ponovo su detektovani TLP i invertaza, ali ovog puta detektovan je i X protein. Ova pojava je uočena prilikom oba načina metode (slika 6).

Pri koncentracijama lektina od 10000 puta razblaženja prvim načinom metode detektovani su TLP, invertaza i X, a u drugim samo X protein



Slika 6. Glikoproteini detektovani na membrani pri razblaženju od 10, 100 i 1000 puta

Figure 6. Glycoproteins detected on membrane, 10, 100 and 1000 times dilution



Slika 7.
Glikoproteini
detektovani na
membrani, razblaženje
10 000 puta

Figure 7.
Glycoproteins detected
on membrane, 10 000
times dilution

(slika 7). Dokazano je da je X glikoprotein. Moguće je da X protein ima različite šećerne ostatke od ostalih detektovanih proteina i da je potrebna niža koncentracija lektina da bi se vezali za taj šećer.

Od svih proteina korišćenih za analizu glikoproteina dokazano je da su TLP, invertaza i X protein glikoproteini. TLP i invertaza bili su detektovani u svim probama, dok je X detektovan samo pri niskim koncentracijama lektina. Prvom varijantom metoda, dostignuta je veća osetljivost u odnosu na drugi način jer je X protein pri najnižoj koncentraciji lektina detektovan samo prvom varijantom metoda.

Zaključak

Lentil lektin je pogodan za detekciju glikoproteina koji sadrže glukozne, manozne i fukozne ostatke. Veća osetljivost je postignuta ako se koristi čist rastvor lektina nego rastvor lektina prethodno kuplovanog sa peroksidazom. Pogodan je jer su dovoljne i jako niske koncentracije lektina da bi se dobili reprezentativni rezultati. Radi bolje karakterizacije vezivanja lektina za glikoproteine potrebno je uraditi šire istraživanje koje uključuje više različitih koncentracija lektina, više proteina i za analizu, kao i druge komercijalne lektine da bi se odredila efikasnost lentil lektina u odnosu na njih.

Literatura

- Compre P., Jaspard-Versali M.-F., Goffinet G. 2001. Glycoproteins from the Cuticle of the Atlantic Shore Crab *Carcinus maenas*: I. Electrophoresis and Western-Blot Analysis by Use of Lectins. *Biol. Bull.*, **202**: 61.
- Dubois M., Gilles, K. A., Hamilton J. K., Rebers, P. A. and Smith F. 1956 *Anal. Chem.*, **28**: 350.
- Enzymes, Biochemicals: Worthington Biochemical Corporation – <http://www.worthington-biochem.com/CONA/default.html>

- Gavrilović–Jankulović. 2002. Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen. *Journal of Allergies and Clinical Immunology*, **110** (5): 805.
- Habibur Rahman M., Aynul Haque Akand A. S., Yeasmin T., Uddin S., R. Mahbubur. 2001. Purification and properties of invertase from mango fruit. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **4** (10): 1271.
- Petronijević Ž. 2000. *Opšta i primenjena enzimologija*. Leskovac: Tehnološki fakultet
- Varki A., Cummings R., Esko J., Hart. G. 1999. *The essentials of glyco-biology*. New York: CSHL Press
- Vujčić Z. 2002. *Eksperimentalna biohemija – praktikum*. Beograd: Hemijski fakultet
- Voet D. Voet J. 2003 *Biochemistry – third edition*. New York: Wiley

Vladan Martinović

Use of Lentil Lectin in Detection of Glycoproteins on Nitrocellulose Membrane

Glycoproteins are macromolecules made of protein and carbohydrates. They can be found in all living organisms and have numerous functions. Glycoproteins include many enzymes, transport proteins, receptors, hormones and structural glycoproteins.

Lectins are proteins with specific ability to agglutinate molecules which on their surface have saccharide compounds. Lentil lectin (LcH, LCA, *Lens culinaris* agglutinin) is lectin isolated from plant *Lens culinaris*. It includes 4 subunits: two of 17 kD and two of 8kD. Lentil lectin binds to manose, glucose and fucose residues. LcH is metaloprotein and it binds Ca^{2+} i Mn^{2+} ions, that are necessary for its biological activity.

Proteins were immobilised on nitrocellulose membrane. In the first group, proteins were treated with solution of lectin, in order to achieve binding of molecules of lectin to glycoproteins with one binding-site. Then the membranes were treated with the solution of peroxidase so as to bind molecules of peroxidase, which are structurally glycoproteins, to another lectin's binding-site. In the second group, immobilised proteins were treated with lectin, previously binded to peroxidase. An obvious result was acquired by the reaction of peroxidase with its supstrates (DAB and H_2O_2).

Five proteins were used for detection of glycoproteins with lentil lectin: Thaumatin-like protein (TLP), invertase, bromelain, unfamiliar protein and kiwi cistatine.

Procedure for detection of glycoproteins was repeated nine times with variation of concentration of lectin.

Lentil lectin is very useful for detection of glycoproteins which have glucose, manose and fucose residues. Because of its accesibility and simple isolation, lentil lectin offers more efective solution for detection of glycoproteins. It is appropriate because low concentrations are enough for getting representative results. Larger sensitivity can be achieved by using pure lectin, rather than one which was binded to peroxidase. For better characterisation of binding of lectin for glycoproteins, it is necessary to conduct a wider research which would include more diferent concentrations of lectin, more proteins and glycoproteins for analysis.

