

RAPORT KOŃCOWY

z wykonania Etapu III. Frakcjonowanie i oczyszczanie homogenatu i supernatantu komórek macierzystych MIC-1

projektu pn. „Pozyskiwanie farmaceutyków drogą analizy chemicznej i ich izolacji do badań podstawowych”.

W ramach etapu 3 wykonano 2 zadania mające na celu frakcjonowanie i oczyszczenie homogenatu i supernatantu komórek macierzystych MIC-1

Zadanie 3.1 Frakcjonowanie homogenatu i supernatantu komórek macierzystych MIC-1

Zadanie 3.2 Oczyszczanie homogenatu i supernatantu komórek macierzystych MIC-1

W ramach Zadania 3.1 frakcjonowano homogenat komórkowy i supernatant z użyciem technik membranowych. Wybierano technikę filtracji i rodzaj użytych membran. Połączono techniki filtracji membranowej i wirowania w oczyszczeniu homogenatu komórkowego i supernatantu. W tym celu dobierano warunki wirowania (m.in. czas, RCF, kroki), aby uzyskać maksymalne ograniczenie liczby składników wchodzących w skład aktywnych frakcji. W ten sposób otrzymano ekstrakty białkowe o różnym poziomie zagęszczenia.

W Zadaniu 3.2 optymalizowano warunki oczyszczania próbek. W celu zmniejszenia złożoności próbki, prowadzącym do zwiększenia sprawności jej rozdziału chromatograficznego, zastosowano różne techniki frakcjonowania. Wykorzystano do tego techniki, w których wytrąca się białka z roztworu przy pomocy związków chemicznych (np. aceton, etanol, siarczan amonu, TCA), dokonuje się ekstrakcji z fazy stałej typu SPE (Solid Phase Extraction) lub wykorzystuje się filtry wirówkowe o różnej wielkości por w membranie posiadającej zdolność zatrzymania substancji od określonej masy cząsteczkowej a przepuszczające substancje o niższej masie cząsteczkowej niż tzw. granica odcięcia dla danego filtra.

W celu optymalizacji warunków rozdziału chromatograficznego i izolacji czynników wzrostu testowano różne rodzaje kolumn chromatograficznych (rodzaj liganda do danego typu chromatografii oraz rodzaj nośnika), a także skład fazy ruchomej (typ solwentu, rodzaj i stężenie soli, stężenie jonów wodorowych (pH) i optymalnego jej przepływu, temperatury rozdziału oraz czasu trwania rozdziału). Wykorzystano różne typy chromatografii: jonowymienna – IEC, oddziaływań hydrofilowych (HILIC), oddziaływań hydrofobowych (HIC),

wykluczania (SEC), w układzie faz odwróconych (RP-LC). Testowano różne typy chromatografii bądź ich kombinacji w celu uzyskania najwyższej wydajności i czystości w izolacji czynników wzrostu.

Oczyszczano i stabilizowano frakcje po chromatografii zawierające czynniki wzrostu przy pomocy precypitacji, dializy, filtracji przez filtry wirówkowe.

Zastosowanie kombinacji technik frakcjonowania materiału wyjściowego w połączeniu z metodami chromatograficznymi, tak przygotowanych preparatów, dało najlepsze rezultaty pod względem stopnia zagęszczenia poszczególnych składników frakcji.

Frakcje otrzymane w ramach zadania przekazano do dalszych badań w ramach zadania 4.

Szczegółowe wyniki znajdują się w załącznikach.