

УДК 577.152.342:577.15.072

І. Л. Вовчук, канд. біол. наук, докторантОдеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра біохімії,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна.

Тел.: (0482) 68-78-75; e-mail: irvov@ukr.net

ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А З ТКАНИНИ ЯЄЧНИКА МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФІЇ

Розроблена методика виділення та очищення карбоксипептидази А з тканин яєчника, що складається з поступового осадження ферменту сульфатом амонію та гель-хроматографії на сефадексах G-75 та G-100. Встановлено, що градієнтне висолення призводить до ефективного розподілу карбоксипептидази А по фракціях з максимальним виходом ферменту при 80%-ному насиченні $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Показано, що стабільні за умов хроматографії молекулярні форми карбоксипептидази А вихідного розчину та фракції, отриманної за 20%-ного насичення сульфатом амонію, мають близькі молекулярні маси, а ферменти фракцій, що отримані за 40%-ного та 60%-ного насичення, під час хроматографії піддаються обмеженому протеолізу без порушення активного центру.

Ключові слова: карбоксипептидаза А, виділення ферментів, гель-хроматографія.

В попередніх дослідженнях нами було встановлено підвищення активності карбоксипептидази А (КФ 3.4.2.1) в пухлинах яєчників [1], тканин тіла матки [2] та молочної залози [3] порівняно з немалігнізованими тканинами. Вивчення механізмів регуляції активності цих протеолітичних ферментів як на молекулярному, так і на тканинному рівні та порівняльні дослідження біохімічних властивостей карбоксипептидази А немалігнізованої та пухлинних тканин можливі тільки в разі отримання їх в очищеному стані. В зв'язку з тим, що в доступній літературі відсутня інформація щодо виділення та очищення препаратів карбоксипептидази А з тканин яєчника, метою нашої роботи була розробка методу виділення та очищення препарату карбоксипептидази А з метою подальшого вивчення фізико-хімічних та біохімічних властивостей цього ферменту.

Матеріали і методи

Тканину яєчника гомогенізували в дистильованій воді у співвідношенні 1:10 і центрифугували при 9 000 g (при +4°C) протягом 45 хв. Осад ресуспендували в дистильованій воді в співвідношенні 1:5, гомогенізували в аналогічних умовах, а супернатанти об'єднували. Отриманий білковий розчин діалізували проти 40 об'ємів ди-

стильованої води при $+4^{\circ}\text{C}$ протягом 12 годин. Поступове фракційне осадження здійснювали сульфатом амонію, насичуючи білковий розчин до 20, 40, 60 та 80%. Кожну фракцію діалізували в аналогічних умовах та в подальшому використовували у хроматографічних дослідженнях. Хроматографію провадили на сефадексах G-75 та G-100 ($2,0 \times 28,0$ см). Елюцію провадили дистильованою водою та плавним градієнтом NaCl. Визначення молекулярних мас провадили за методом Ендрюса [4], використовуючи маркерні білки ("Serva" Швеція): білок сироватки людини — 66 500 Да, овальбумін — 43 000 Да, хімотрипсиноген А — 25 000 Да, лізоцим — 17 500 Да та РНК-аза — 13 700 Да. Активність карбоксипептидази А визначали за швидкістю гідролізу синтетичного субстрату карбо-бензоксифенілаланіну [5], тобто по приросту оптичної щільності при 570 нм за 30 хвилин інкубації при 37°C , питому активність — в одиницях оптичної щільності на мг білка. Вміст білка визначали спектрофотометричним методом при 280 нм та за методом Лоурі [6].

Статистичну значимість відмінностей між вибірками визначали за допомогою критерію Ст'юдента [7].

Результати та їх обговорення

Експериментальним шляхом було встановлено, що діаліз — найбільш розповсюджений метод очищення білкових розчинів від низькомолекулярних сполук — призводить до збільшення в 2 рази загальної та питомої активностей, а також проценту виходу ферменту. Вихідний розчин білка після діалізу містить 12,5% низькомолекулярних сполук (табл. 1). За подальшого поступового осадження білків сульфатом амонію виявлялося не менш 4 фракцій карбоксипептидази А, які осаджувалися на різних ступенях насичення (табл. 1). Щодо показників діалізованого розчину білка, то при 20%-ному насиченні сульфатом амонію осаджується 7,14% загального білка та 4,31% ферментативної активності. Відносна активність карбоксипептидази А цієї фракції знижується в 4,0 рази, а питома активність та коефіцієнт очищення збільшуються в 3,5 рази, що свідчить про втрату під час фракціонування факторів, які регулюють ферментативну активність. При 40%-ному та 60%-ному насиченні сульфатом амонію осаджувалося відповідно 48,9% і 40,80% загального білка та 16,07% і 7,40% ферментативної активності, однак коефіцієнт очистки та питома активність ферменту були менші, ніж показники діалізованого розчину білка. Найбільший процент виходу ферментів — 36,67% — виявився при 80%-ному насиченні сульфатом амонію з коефіцієнтом очистки — 10,8 рази. В цілому при осадженні сульфатом амонію процент виходу карбоксипептидази А становив 54,5% відносно діалізованого розчину білка.

Таблиця 1

Активність карбоксипептидази А на етапах виділення та очищення ($M \pm m$; $n = 4$)

Етап виділення	Об'єм, мл	Білок, мг/мл	Активність* ΔE_{570}	Питома активність, $\Delta E_{570}/\text{мг білка}$	Загальна активність, $V \times \Delta E_{570}$	Коефіцієнт очищення	% виходу
Вихідний розчин білка	36,0 $\pm$ 3,20	112,0 $\pm$ 7,4	1,200 $\pm$ 0,110	10,71 $\pm$ 0,984	43,20 $\pm$ 3,96		
Хроматографія на G-75:							
Нанесено	2,5 $\pm$ 0,27	280,0 $\pm$ 28,2			3,05 $\pm$ 0,347	1,00	100,00
На виході з колонки	40,0 $\pm$ 3,46	2,7 $\pm$ 0,238	0,147 $\pm$ 0,016	54,44 $\pm$ 4,931	5,88 $\pm$ 0,612	5,08	192,80
Розчин білка після діалізу	36,0 $\pm$ 2,19	98,0 $\pm$ 6,1	2,500 $\pm$ 0,267	25,51 $\pm$ 1,937	90,00 $\pm$ 9,24	1,00	100,00
20% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$							
Хроматографія на G-75:							
Нанесено	6,2 $\pm$ 0,53	7,0 $\pm$ 0,4	0,625 $\pm$ 0,071	89,29 $\pm$ 7,427	3,88 $\pm$ 0,412	3,50 ⁺	4,31 ⁺
На виході з колонки	2,5 $\pm$ 0,3	17,5 $\pm$ 0,134			1,563 $\pm$ 0,182	1,00	100,00
40% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	40,0 $\pm$ 3,67	1,1 $\pm$ 0,162	0,101 $\pm$ 0,009	91,82 $\pm$ 8,726	4,042 $\pm$ 0,357	1,03	258,60
Хроматографія на G-75:							
Нанесено	8,4 $\pm$ 0,72	48,0 $\pm$ 3,12	0,650 $\pm$ 0,072	13,54 $\pm$ 1,167	5,46 $\pm$ 0,572	0,53 ⁺	6,07 ⁺
На виході з колонки:	2,5 $\pm$ 0,21	120,0 $\pm$ 11,7			1,625 $\pm$ 0,172	1,00	100,00
Фракція 1	5,0 $\pm$ 0,16	4,8 $\pm$ 0,427	0,052 $\pm$ 0,006	10,83 $\pm$ 1,107	0,780 $\pm$ 0,081	0,80	48,00
Фракція 2	25,0 $\pm$ 2,19	2,8 $\pm$ 0,261	0,254 $\pm$ 0,022	90,71 $\pm$ 8,723	6,350 $\pm$ 0,594	3,91	390,77
Фракція 3	65,0 $\pm$ 6,38	3,0 $\pm$ 0,284	0,148 $\pm$ 0,016	49,33 $\pm$ 4,707	9,620 $\pm$ 1,009	3,64	592,00

Закінчення таблиці 1

Етап виділення	Об'єм, мл	Білок, мг/мл	Активність* ΔE_{570}	Питома активність, $\Delta E_{570}/\text{мг білка}$	Загальна активність, $V \times \Delta E_{570}$	Коефіцієнт очищення	% виходу
60% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Хроматографія на G-100: Нанесено На виході з колонки: Фракція 1 Фракція 2	7,2±0,61	40,0±3,21	0,925±0,085	23,13±1,934	6,66±0,715	0,91 ⁺	7,40 ⁺
	5,0±0,44	200,0±18,23			4,625±0,485	1,00	100,00
	55,0±5,13	3,0±0,287	0,223±0,025	74,33±7,238	12,265±1,317	3,21	264,87
	35,0±3,28	8,0±0,788	0,755±0,079	94,38±9,211	26,430±2,410	4,08	571,46
80% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Хроматографія на G-75: Нанесено На виході з колонки	24,0±1,38	5,0±0,34	1,375±0,151	275,00±22,467	33,00±2,971	10,78 ⁺	36,67 ⁺
	15,0±1,29	75,0±6,38			20,625±1,908	1,00	100,00
	50,0±4,81	20,0±1,84	0,260±0,024	13,000±1,186	13,000±1,164	0,47	63,03
Всього:							54,48 ⁺

Примітка: * — активність ферменту виражали у величинах приросту екстинкції при довжині хвилі 570 нм за 30 хвилин інкубації; + — коефіцієнт очищення та процент виходу ферменту у порівнянні з показниками білкового розчину, отриманого після діалізу.

Подальше використання методу гелі-хроматографії дало можливість очистити фракції, що містили карбоксипептидазу А, до 5,0 разів з виходом ферменту від 48,0% до 592,0%. Цим методом було встановлено, що значна кількість водорозчинних білків вихідного розчину представлена як високо-молекулярними білками масою від 63,5 кДа до 43,0 кДа, так і низькомолекулярними пептидами, які вимиваються із сефадексу плавним градієнтом NaCl (рис. 1). Коефіцієнт очистки карбоксипептидази А вихідного розчину, активність якої була найвищою у білковій фракції з молекулярною масою 41746,30 Да, становив 5,1, а процент виходу — 192,8 (рис. 2, табл. 1).

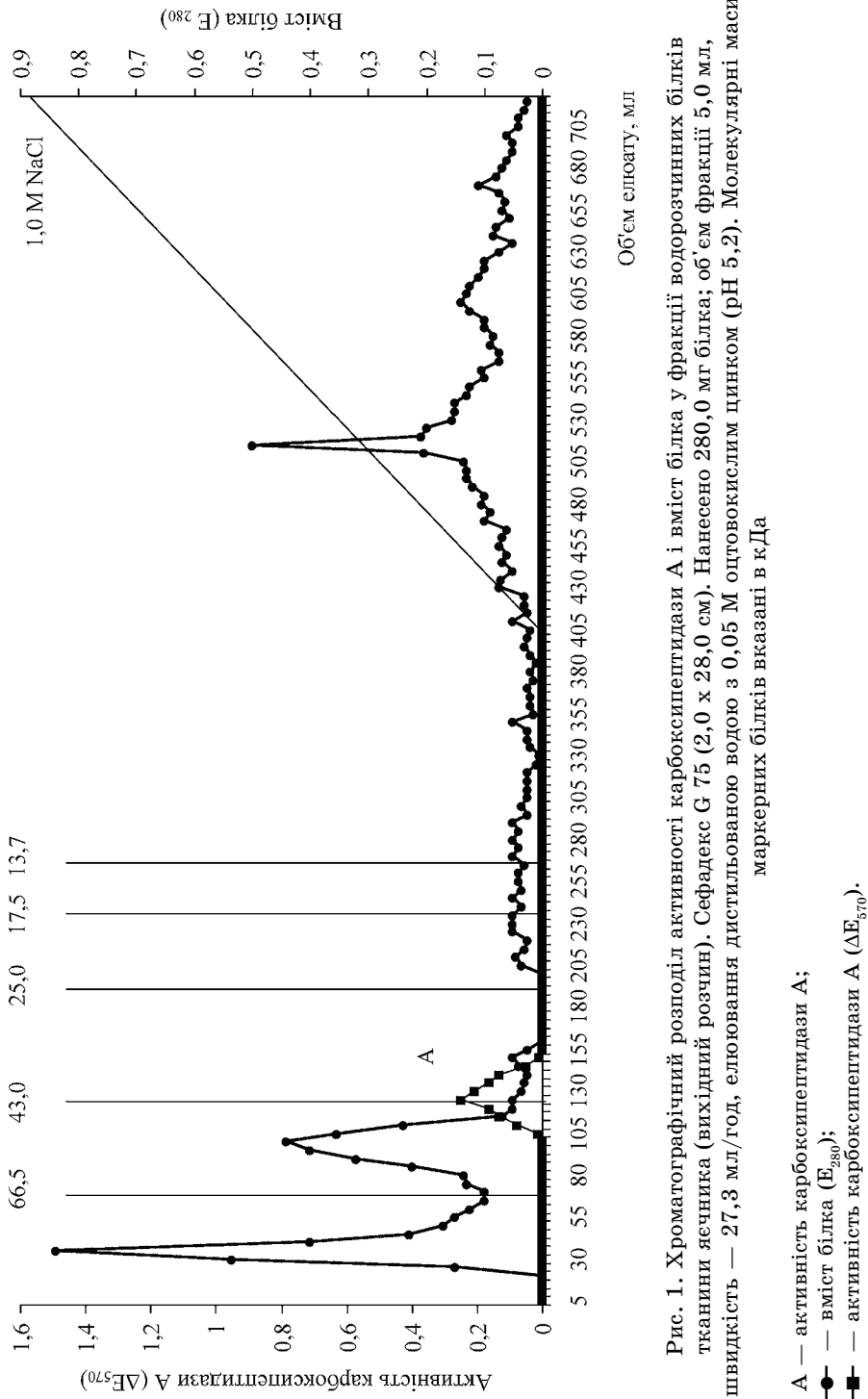
На відміну від результатів, отриманих при осадженні сульфатом амонію, подальше очищення цієї фракції хроматографічним методом призводило до значної втрати відносної активності, але у 2,5 рази збільшувало процент виходу ферменту (рис. 3, табл. 1). Як у вихідному розчині, так і у фракції, отриманій після 20%-ного насичення, активність карбоксипептидази А виявлялася в єдиній білковій фракції з молекулярною масою біля 40094,61 Да, що може свідчити про ідентичність ферментів (рис. 2).

У розчині, що був отриманий хроматографією матеріалу, накопиченого після 40%-ного насичення сульфатом амонію, було встановлено наявність трьох білкових фракцій з карбоксипептидазною активністю, одна з яких (на хроматограмі пік III) сорбувалася на сефадексі та вимивалася 0,5 М розчином NaCl (рис. 4). Відносна та питома активності ферменту першої фракції (Mr 47120,84 Да) були нижчими за відповідні показники вихідного досліджуваного розчину, а другої (Mr 5546,63 Да) та третьої (Mr 1059,81 Да) фракцій — навпаки, значно вищими (рис. 2, табл. 1).

Хроматографічним методом на сефадексі G-100 серед білків, осаджених при 60%-ному насиченні сульфатом амонію, було встановлено наявність двох білкових фракцій з карбоксипептидазною активністю. Питома активність ферменту з Mr 76488,12 Да, що був очищений в 3,2 рази, зросла при цьому до 264,9. Молекулярна маса іншої карбоксипептидази, яка сорбувалася на сефадексі і вимивалася 0,2–0,3 М NaCl, була незначною — 6787,16 Да (рис. 2, 5, табл. 1). Отримані результати свідчать про те, що під час хроматографії певна кількість ферменту зазнала обмеженого протеолізу без порушення активного центру.

Хроматографічний розподіл фракції білків, попередньо отриманої за 80%-ного насичення сульфатом амонію, виявив наявність однієї білкової фракції з карбоксипептидазною активністю (рис. 2, 6, табл. 1) та молекулярною масою (Mr 36984,69 Да), властивою для ферменту, виділеного з підшлункової залози великої рогатої худоби [8].

Отримані результати свідчать про те, що попереднє градієнтне осадження білків сульфатом амонію призводить до розподілу карбоксипептидази А по фракціях. Слід зазначити, що, на відміну від даних інших авторів [9] про осадження цього ферменту при



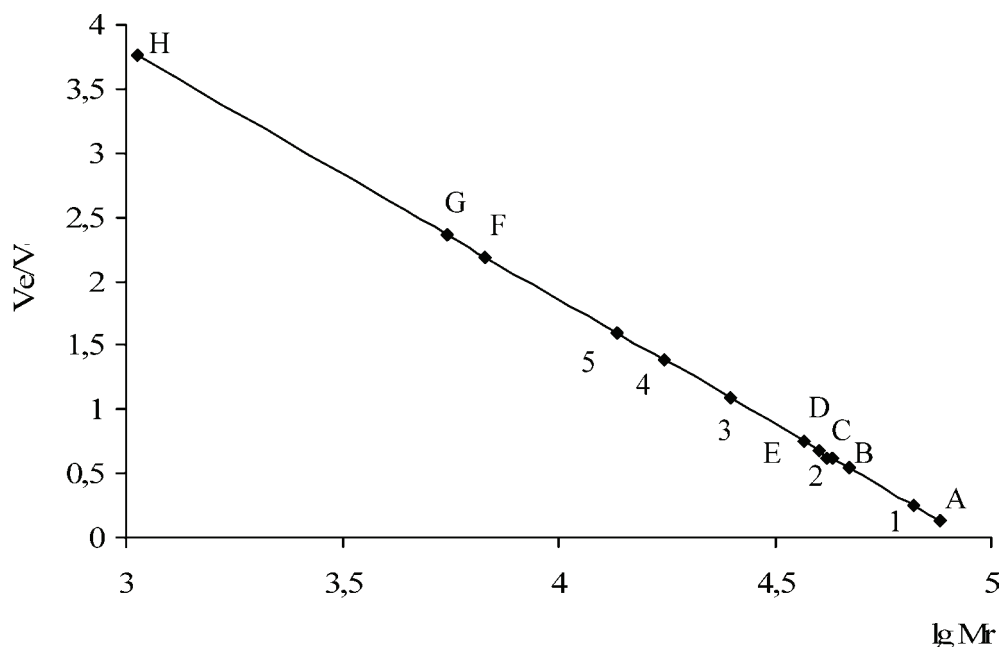


Рис. 2. Визначення молекулярних мас карбоксипептидази А яєчника методом гел-фільтрації на сефадексі G-75.

А — фермент, отриманий методом хроматографії із фракції 60% -ного насичення сульфатом амонію (І Пік, Mr 76488,12 Да);
 1 — альбумін сироватки людини (Mr 66500 Да);
 В — фермент, отриманий методом хроматографії із фракції 40% -ного насичення сульфатом амонію (І Пік, Mr 47120,84 Да);
 2 — овальбумін (Mr 43000 Да);
 С — фермент, отриманий методом хроматографії із фракції вихідного розчину білка (Mr 41746,30 Да);
 D — фермент, отриманий методом хроматографії із фракції 20% -ного насичення сульфатом амонію (Mr 40094,61 Да);
 Е — фермент, отриманий методом хроматографії із фракції 80% -ного насичення сульфатом амонію (Mr 36984,69 Да);
 3 — хімотрипсиноген А (Mr 25000 Да);
 4 — лізоцим (Mr 17500 Да);
 5 — рибонуклеаза (Mr 13700 Да);
 F — фермент, отриманий методом хроматографії із фракції 60% -ного насичення сульфатом амонію (ІІ пік, Mr 6787,16 Да);
 G — фермент, отриманий методом хроматографії із фракції 40% -ного насичення сульфатом амонію (ІІ пік, Mr 5546,63 Да).
 H — фермент, отриманий методом хроматографії із фракції 40% -ного насичення сульфатом амонію (ІІІ пік, Mr 1059,81 Да).

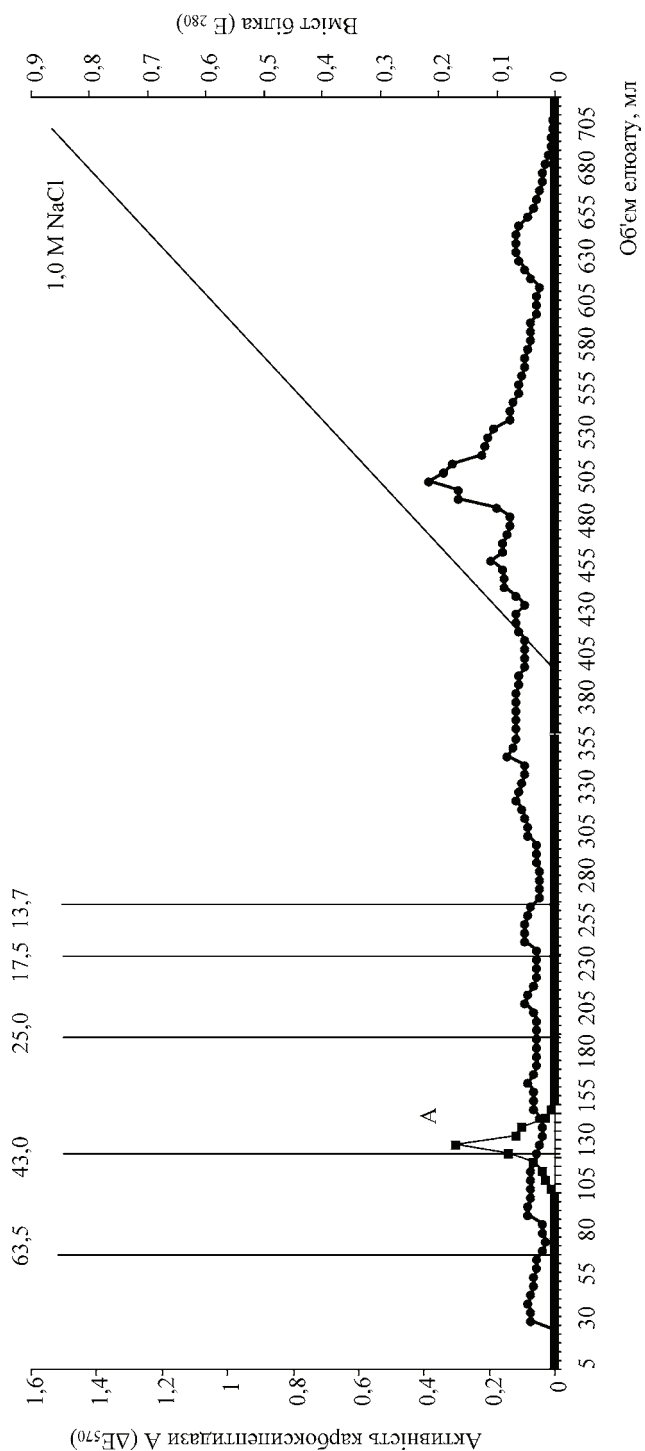


Рис. 3. Активність карбоксипептидази А і вміст білка в елюатах, зібраних під час хроматографії. Досліджуваний матеріал — білки яєчника, попередньо осаджені при 20%-ному насиченні сульфатом амонію. Сефадекс G-75 (2,0 x 28,0 см). Нанесено 17,5 мг білка; об'єм фракції 5,0 мл, швидкість 27,3 мл/год, елюювання дистильованою водою з 0,05 М ортово-кислим цинком (рН 5,2). Молекулярні маси маркерних білків вказані в кДа.

А — активність карбоксипептидази А;

1 — вміст білка (E_{280});

2 — активність карбоксипептидази А (ΔE_{570}).

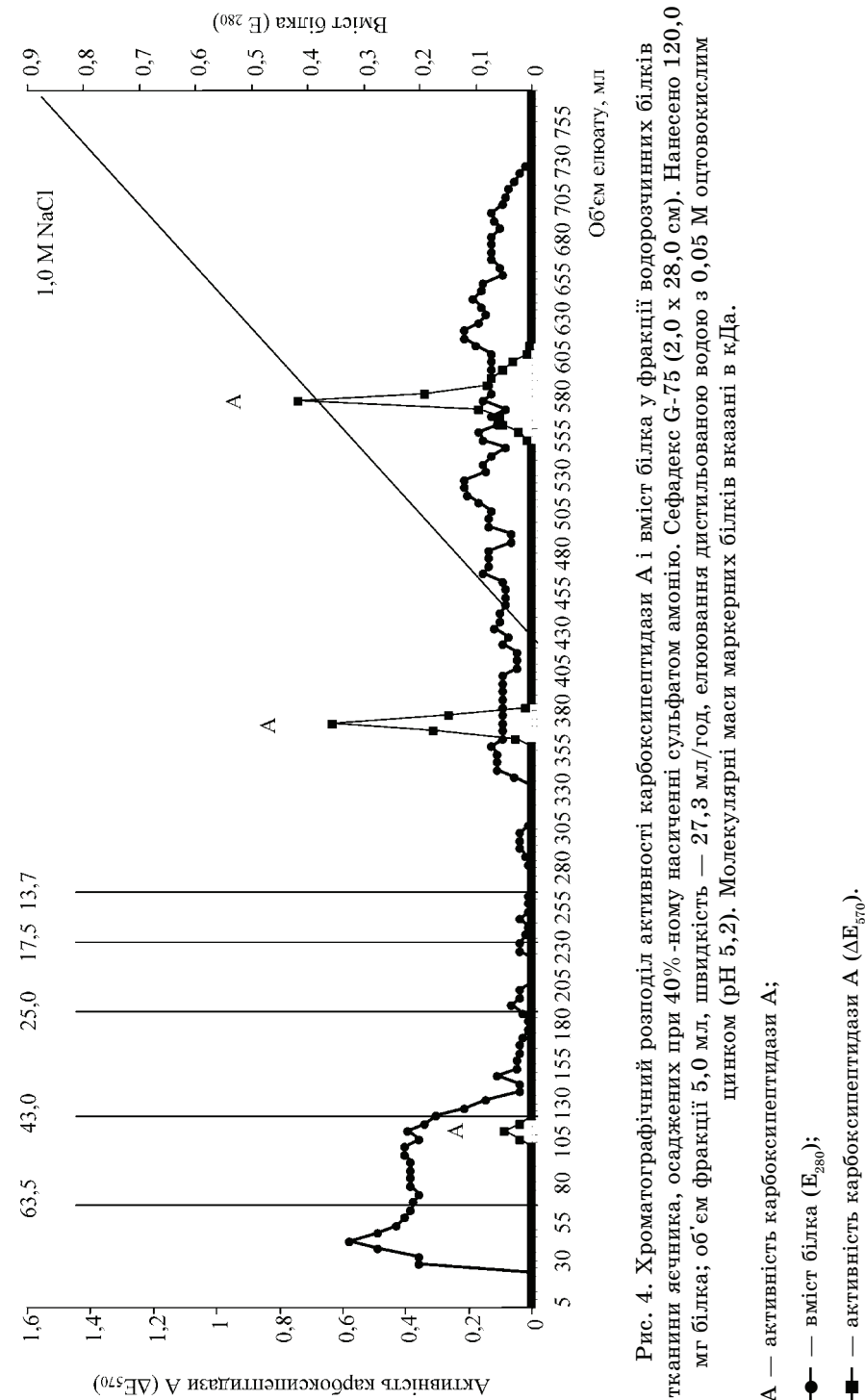


Рис. 4. Хроματοграфічний розподіл активності карбоксипептидази А і вміст білка у фракції водорозчинних білків танини ячменя, осаджених при 40% -ному насиченні сульфатом амонію. Сефадекс G-75 (2,0 x 28,0 см). Нанесено 120,0 мг білка; об'єм фракції 5,0 мл, швидкість — 27,3 мл/год, елюювання дистильованою водою з 0,05 М оцтовокислим цинком (рН 5,2). Молекулярні маси маркерних білків вказані в кДа.

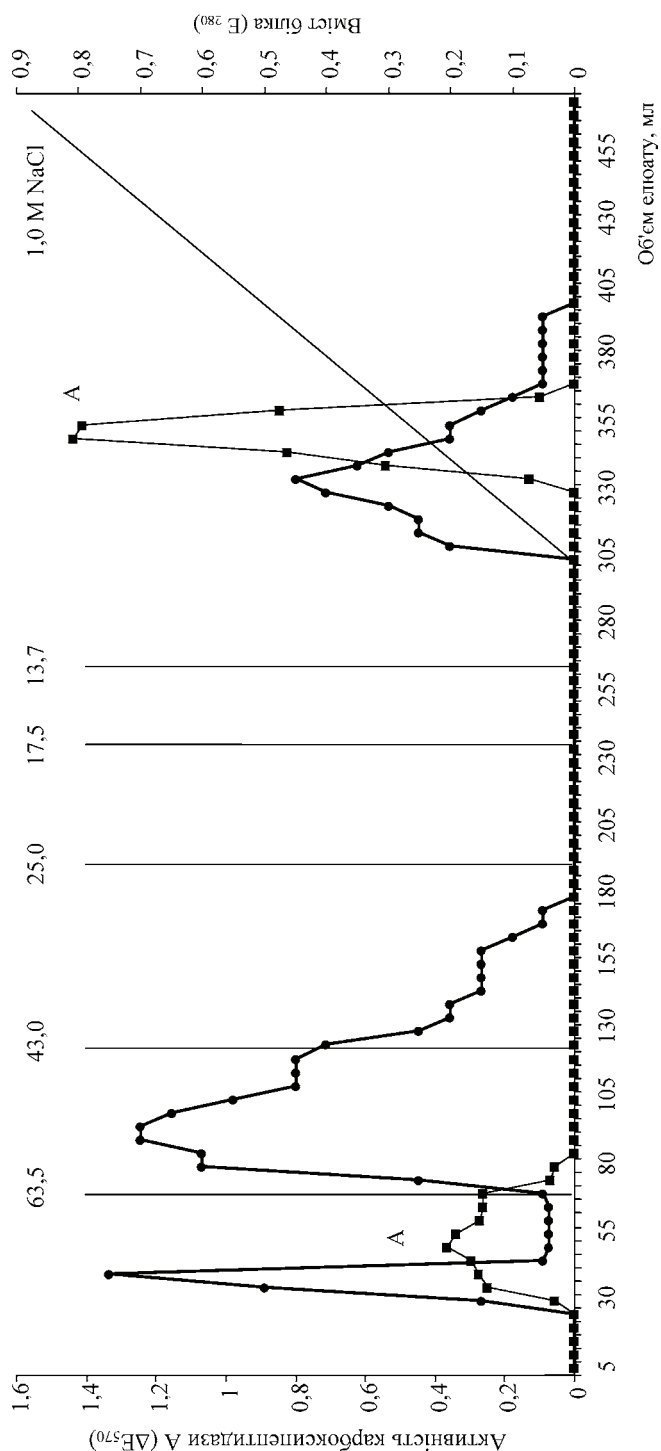


Рис. 5. Хроматографічний розподіл активності карбоксипептидази А і вмісту білка у фракції водорозчинних білків тканини яєчника, осаджених при 60%-ному насиченні сульфатом амонію. Сефадекс G-100 (2,0 x 28,0 см). Нанесено 200,0 мг білка; об'єм фракції 5,0 мл, швидкість — 27,3 мл/год, елюювання дистильованою водою з 0,05 М оцтовокислим цинком (рН 5,2). Молекулярні маси маркерних білків вказані в кДа.

А — активність карбоксипептидази А;

● — вміст білка (E_{280});

■ — активність карбоксипептидази А (ΔE_{570}).

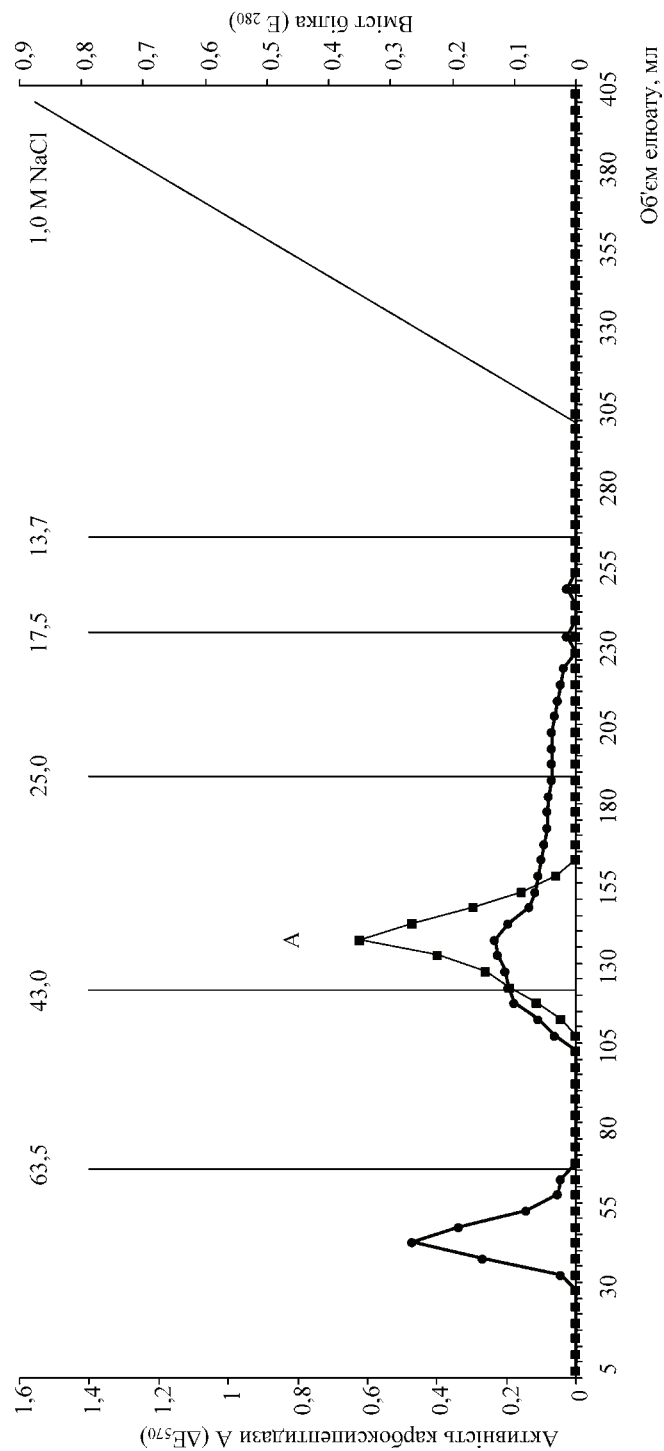


Рис. 6. Хроматографічний розподіл активності карбоксипептидази А і вміст білка у фракції водорозчинних білків тканини яєчника, осаджених при 80%-ному насиченні сульфатом амонію. Сефадекс G-75 (2,0 x 28,0 см). Нанесено 75,0 мг білка; об'єм фракції 5,0 мл, швидкість — 27,3 мл/год, елюювання дистильованою водою з 0,05 М оцтовокислим цинком (рН 5,2). Молекулярні маси маркерних білків вказані в кДа.

А — активність карбоксипептидази А;
 ● — вміст білка (E_{280});
 ■ — активність карбоксипептидази А (ΔE_{570})

60–80%-ному насиченні сульфатом амонію, в наших дослідах 67,3% загальної кількості ферменту випадає в осад в більш вузькому діапазоні концентрації солі, а саме при 80%-ному насиченні.

Хроматографічними дослідженнями було встановлено наявність у вихідному розчині білка та після 20%-ного насичення розчину сульфатом амонію молекулярної форми карбоксипептидази А з дуже близькими молекулярними масами, що свідчить про їх ідентичність. Після 40%-ного та 60%-ного насичення розчину білка сульфатом амонію у досліджуваному хроматографічно матеріалі появляються додаткові низькомолекулярні білки, що мають карбоксипептидазну активність. Можна вважати, що за наявності в розчині цих карбоксипептидаз під час хроматографії карбоксипептидаза А піддається обмеженій деградації.

В протилежність цьому, карбоксипептидаза А, отримана за 80%-ного насичення сульфатом амонію, є достатньо стабільною і може бути використана для подальшого вивчення фізико-хімічних та біохімічних властивостей цього ферменту.

Висновки

1. Розроблена методика виділення та очищення карбоксипептидази А, основана на поступовому осадженні білків сульфатом амонію та наступній їх гелі-хроматографії.
2. Ступінчасте осадження білків $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ призводить до більш ефективного фракціонування карбоксипептидази А з максимальним виходом ферменту при 80%-ному насиченні.
3. Стабільні за умов хроматографії молекулярні форми карбоксипептидази А у вихідному розчині та у фракції, що отримана після 20%-ного насичення сульфатом амонію, мають близькі молекулярні маси.
4. Карбоксипептидаза А, отримана після 40%-ного та 60%-ного насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, під час хроматографії піддається обмеженій деградації із збереженням ферментативної активності.

Література

1. Вовчук І. Л. Активність карбоксипептидази А в новоутвореннях яєчника // Вісник ОНУ. — 2005. — Т. 10, № 5. — С. 36–41.
2. Вовчук І. Л., Чернадчук С. С., Блохін Ю. В., Раздразнюк Г. С. Активність карбоксипептидаз у тканинах новоутворень тіла матки // Вісник ОНУ. — 2004. — Т. 9, № 1. — С. 25–33.
3. Активність карбоксипептидази А в новоутвореннях молочної залози / І. Л. Вовчук, С. С. Чернадчук, Н. В. Мотрук, К. А. Філіпцова, С. І. Каланча, Л. М. Буюклі // Вісник ОНУ. — 2004. — Т. 9, № 5. — С. 29–37.
4. *Практическая химия белка*. Пер. с англ. / Под ред. А. Дарбре. — М.: Мир, 1989. — С. 39–43.
5. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A. / Bradshaw R. A., Ericsson L. H., Walsh K. A., Neurath H. // Proc. Natl. Acad. Sci USA. — 1969. — Vol. 63. — P. 1389–1394.

6. Protein measurement with the Folin phenol reagent / Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr F. Z., Randal L. J. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.
7. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Высшая школа, 1967. — 326 с.
8. Неорганическая биохимия. Т. 1. — М.: Мир, 1978. — С. 504–505.
9. Колодзейская М. В., Пилявская А. С. Пептидазы. — К.: Наук. Думка, 1982. — 176 с.

І. Л. Вовчук

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра биохимии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А ИЗ ТКАНИ
ЯИЧНИКА МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ**

Резюме

Разработана методика выделения и очистки карбоксипептидазы А, состоящая из последовательного осаждения сульфатом аммония и гель-хроматографии на сефадексах G-75 и G-100. Установлено, что последовательное осаждение белков с помощью $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ приводит к более эффективному разделению карбоксипептидазы А по фракциям с максимальным выходом фермента при 80%-ном насыщении. Стабильные при условиях хроматографии молекулярные формы карбоксипептидазы А исходного раствора и фермента, осажденного при 20%-ном насыщении сульфата аммония, имеют близкие молекулярные массы, а фермент из фракций, полученных после 40%-ного та 60%-ного насыщения, во время хроматографии подвергается ограниченному протеолизу без нарушения активности.

Ключевые слова: карбоксипептидаза А, выделение ферментов, гель-хроматография.

I. L. Vovchuk

I. I. Mechnikov Odessa National University, Department of Biochemistry
Dvoryanskaya str., 2, Odessa, 65026, Ukraine

**EXTRACTING AND PURIFICATION OF CARBOXYPEPTIDASE A
FROM THE TISSUES OF OVARIUM BY GEL-CHROMATOGRAPHY
METHOD**

Summary

The method of extracting and purification of carboxypeptidase A consisting of step-by-step ammonium sulfate sedimentation and gel-chromatography on Sefadex G-75 and G-100 was obtained. It was studied that step-by-step sedimentation leads to more effective carboxypeptidase A division to fractions with the maximal exiting by 80% saturation. It was shown that stable under chromatography molecular forms of carboxypeptidase A from the initial solution and the 20% saturation fraction have similar molecular masses but the enzyme from 40% and 60% saturation fractions undergo limited proteolysis without breach of the activity.

Keywords: carboxypeptidase A, enzyme extracting, gel-chromatography