

УДК 577.152.344:577.15.072

К. А. Філіпцова, асп., **І. Л. Вовчук**, канд. біол. наук, доц.Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра біохімії,
вул. Дворянська 2, Одеса, 65082, Україна. Тел: (0482) 68-78-75; e-mail: irvov@mail.ru

ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А З НЕМАЛІГНІЗОВАНОЇ ТКАНИНИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

Розроблена методика виділення та очищення карбоксипептидази А з немалігнізованої тканини молочної залози. Методика складається з поступового осадження сульфатом амонію та препаративного електрофорезу. Методом препаративного електрофорезу в ПААГ з'ясовано спектри ізоформ та ідентифіковані окремі ізоформи карбоксипептидази А досліджуваної тканини. Встановлено, що поступове осадження призводить до ефективного розподілу карбоксипептидази А по фракціях. Аналіз електрофореграм білкового спектра показав наявність тканеспецифічного для немалігнізованої тканини молочної залози білка, характерного для кожного насичення. Серед білків, виділених з немалігнізованої тканини молочної залози методом висолення та препаративного електрофорезу, 41% складають білки, що мають ферментативну А-карбоксипептидазну активність.

Ключові слова: карбоксипептидаза А, молочна залоза, електрофорез.

Вивчення механізмів регуляції активності карбоксипептидази А (КФ 3.4.2.1) як на молекулярному, так і на тканинному рівні та дослідження біохімічних властивостей цієї пептидази можливе тільки за умов отримання її в очищеному стані. Виділення ферменту і очищення його до гомогенного стану є найважливішим і дуже важким завданням. Електрофоретичний метод часто використовують для підтвердження гомогенності виділеного ферменту та ідентифікації його ізоформ. Так, електрофоретичним методом було виділено з комерційного препарату "Pronasa" [1] компонент, що має А-карбоксипептидазну активність. Використання методу препаративного електрофорезу дозволило отримати з тканини шлунку людини ізоферменти гексокінази та вивчити їх біохімічні властивості [2]. Однак, в сучасній літературі нами не знайдено інформації, присвяченої виділенню та очищенню препаратів карбоксипептидази А із тканини молочної залози.

В зв'язку з цим метою роботи було вивчення електрофоретичних спектрів водорозчинних білків та білків, фракціонованих з немалігнізованої тканини молочної залози, а також ідентифікація ізозимів карбоксипептидази А безпосередньо в гелевому блоці.

Матеріали і методи

Зразки немалігнізованої тканини молочної залози гомогенізували в дистильованій воді (у співвідношенні 1 : 10) і центрифугували при 9000 g/хв при +4°C протягом 45 хв. Для очищення екстракту від низькомолекулярних домішок використовували метод діалізу проти 20-кратного об'єму дистильованої води в присутності 2 мМ Zn⁺⁺ [3]. Розчини білків, отримані після діалізу, поетапно фракціонували сульфатом амонію [3, 4]. Для очищення від надлишку

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, що заважав визначенню білка по методу Lowry [5], фракції, отримані при 20-ти, 40-ка, 60-ти і 80-ти відсотковому насиченні сульфатом амонію, піддавали повторному діалізу за тих же умов. У фракціях визначали активність карбоксипептидази А по гідролізу синтетичного субстрату карбобензоксиглутам ілфенілаланіну – 2 мМ [6].

Вертикальний електрофорез проводили на пластинах $140 \times 140 \times 1$ мм в лужному (трис-гліцеринний буфер, рН 8,3) середовищі в 10%-му поліакриламідному гелі ("Reanal", Угорщина) при температурі 25°C протягом 3,5 годин [7]. Зразки вносили в слоти в об'ємі 30 мкл в 15 мкл 60%-го розчину сахарози. Початкове концентрування білків проводили протягом 20 хв. при 20 мА (з розрахунку на два гелеві блоки), а подальший розподіл білків – при 40 мА. В якості лідируючого барвника використовували 0,1%-ий розчин бромфенолового синього. Після закінчення електрофорезу гелеві блоки багаторазово відмивали дистильованою водою і фарбували протягом 30 хв. 0,25%-им розчином Кумасі R-250 ("Serva", Швеція) в 45,0%-му етанолі, що містить 9,0%-ну оптову кислоту. Електрофореграми отримували скануванням вологих гелевих блоків з наступною комп'ютерною обробкою електрофореграм за допомогою програми ANAIS.

Методом препаративного електрофорезу [2] за допомогою зафарбованих Кумасі R-250 білкових смуг ідентифікували ділянки непофарбованого гелю, що містили іммобілізовані білки, в яких далі визначали активність карбоксипептидази А [6]. Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 570 нм, питому активність ферменту виражали в мкмоль фенілаланіну на мг білка. В якості контролю брали ділянки гелевого блоку після електрофорезу за тих же умов, але без внесення в слоти досліджуваного матеріалу. Результати дослідження були оброблені статистично з визначенням коефіцієнта Ст'юдента [8].

Результати та їх обговорення

Аналіз електрофореграм за лужного електрофорезу показав, що в немалігнізованій тканині молочної залози спектр водорозчинних білків до діалізу був представлений як малорухливими, так і помірноухливими і швидкорухливими білками з Rf 0,085, Rf 0,230 і Rf 0,390 відповідно, а після діалізу – тільки помірноухливими і швидкорухливими білками з Rf від 0,210 до 0,230 та Rf 0,400 відповідно (табл. 1, рис. 1).

При аналізі електрофореграми поетапного фракціонування білків сульфатом амонію 20%, 40%, 60% та 80% насичення було встановлено наявність білків, характерних для кожного етапу насичення. Так, білки немалігнізованої тканини молочної залози, осаджені при 20% насиченні, як і в розчині після діалізу, представлені помірноухливими і швидкорухливими формами з Rf 0,210, Rf 0,240 та Rf 0,390 відповідно (табл. 1, рис. 1).

При 40% насиченні сульфатом амонію білковий спектр був представлений найбільшою кількістю білків (табл. 1, рис. 1). Встановлено, що серед білків, отриманих при 40% насиченні, як і в спектрі водорозчинних білків до діалізу, після діалізу та отриманих при 20% насиченні, присутні характерні помірноухливі та швидкорухливі білки з Rf 0,210, Rf 0,230 і Rf 0,390. Встановлено, що кількість білків на даному етапі висолення збільшується насамперед за рахунок малорухливої (Rf 0,023) та помірноухливої (Rf 0,160) форм.

Таким чином білковий спектр немалігнізованої тканини молочної залози в основному представлений білками з Rf 0,210 – 0,240 і Rf 0,390.

За даними літератури, карбоксипептидаза А осаджується за 60–80% насичення сульфатом амонію [9]. Однак використання методу поетапного висолення приводить до більш ефективного фракціонування білків, що мають А-карбоксипептидазну активність, і дозволяє отримати високоочищені індивідуальні ізоформи карбоксипептидази А з високою питомою активністю ферменту. Білковий спектр немалігнізованої тканини молочної залози на 41% представлений білками, що мають А-карбоксипептидазну активність (табл. 2).

Таблиця 1

Електрофоретичні спектри білків немалігнізованої тканини молочної залози, n = 2

Електрофортична рухливість білків (Rf)	Спектр водорозчинних білків		Фракціонування білків (NH ₄) ₂ SO ₄			
	до діалізу	після діалізу	20% насичення	40% насичення	60% насичення	80% насичення
0.011						
0.014						
0.023				+		
0.036						
0.050						
0.058						
0.062						
0.065						
0.066						
0.067						
0.068						
0.070						
0.073						
0.074						
0.075						
0.076						
0.085	+					
0.089						
0.090						
0.097						
0.100						
0.110						
0.120						
0.140						
0.160				+		
0.170						
0.180						
0.190						
0.200						
0.210		+	+	+		
0.230	+	+		+		
0.240			+		+	
0.350						
0.360						
0.370						
0.390	+		+	+	+	+
0.400		+				

Примітка: * - фракції, що мають ферментативну активність до субстрату карбоксипептидази А - карбобензоксиглутамілфеніланіну.

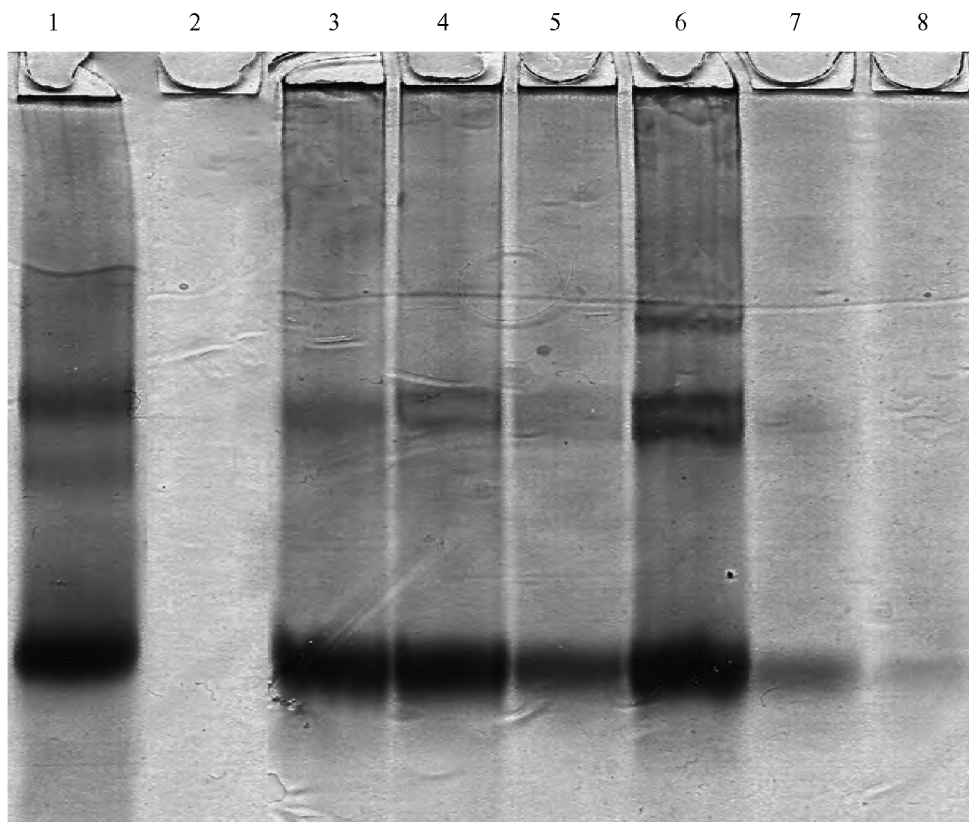


Рис. 1. Електрофореграма водорозчинних білків та білків, осаджених сульфатом амонію з екстрактів немалігнізованої тканини молочної залози

Примітка:

- 1 - сироватковий альбумін людини, Мг 66500 Да (нанесено 50,0 мкг білка);
- 2 - контрольний гель (без білка);
- 3 - водорозчинні білки (до діалізу, нанесено 24,0 мкг білка);
- 4 - водорозчинні білки (після діалізу, нанесено 22,2 мкг білка);
- 5 - фракція білків, осаджених при 20%-му насиченні $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 2,7 мкг білка);
- 6 - фракція білків, осаджених при 40%-ному насиченні $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 21,6 мкг білка);
- 7 - фракція білків, осаджених при 60%-ному насиченні $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 1,5 мкг білка);
- 8 - фракція білків, осаджених при 80%-ному насиченні $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 1,2 мкг білка).

При 60% насиченні сульфатом амонію білковий спектр представлений лише помірнорухливими та швидкорухливими білками з R_f 0,240 і R_f 0,390, а при 80% насиченні — тільки одним швидкорухливим білком з R_f 0,390 (табл. 1, рис. 1).

Таблиця 2

Виділення ізоферментів карбоксипептидази А з немалігнізованої тканини молочної залози методом препаративного електрофорезу в поліакриламідному гелі, $n = 3$

Фракція	Вихідна фракція білка і ізоформи	Вміст білка в фракції, г	ПА, мкмоль фен / мг білка	Коефіцієнт очищення
Розчинні білки до діалізу	Вихідна фракція білка	$0,0240 \pm 0,0024$	$0,044 \pm 0,004$	1,00
	Ізозим Rf 0,390	$0,0137 \pm 0,0014$	$0,056 \pm 0,006$	1,27
Розчинні білки після діалізу	Вихідна фракція білка	$0,0222 \pm 0,0022$	$0,047 \pm 0,005$	1,00
	Ізозим Rf 0,210	$0,0022 \pm 0,0002$	$0,359 \pm 0,036$	7,64
	Ізозим Rf 0,400	$0,0145 \pm 0,0015$	$0,067 \pm 0,007$	1,43
20% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Вихідна фракція білка	$0,0027 \pm 0,0003$	$0,378 \pm 0,038$	1,00
	Ізозим Rf 0,210	$0,0001 \pm 0,00001$	$8,000 \pm 0,800$	21,16
40% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Вихідна фракція білка	$0,0216 \pm 0,0022$	$0,049 \pm 0,005$	1,00
	Ізозим Rf 0,390	$0,0104 \pm 0,0010$	$0,075 \pm 0,008$	1,53
60% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Вихідна фракція білка	$0,0015 \pm 0,0002$	$1,753 \pm 0,175$	1,00
	Ізозим Rf 0,390	$0,0010 \pm 0,0001$	$0,833 \pm 0,083$	0,48
80% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Вихідна фракція білка	$0,0012 \pm 0,0001$	$1,507 \pm 0,151$	1,00
	Ізозим Rf 0,390	$0,0009 \pm 0,0001$	$0,937 \pm 0,094$	0,62

Використання методу препаративного електрофорезу дозволило встановити, що коефіцієнт очищення індивідуальних ізоформ даного ферменту становить від 1,27 до 21,16 в залежності від етапу фракціонування (табл. 2).

Встановлено, що питома активність форм карбоксипептидази А з Rf 0,210 зростає під час електрофоретичного розподілу (табл. 2). Це може свідчити про іммобілізацію ферменту в ПААГ, яка призводить до конформаційних змін з підвищенням питомої активності, що співпадає з результатами попередніх досліджень активності карбоксипептидази А немалігнізованої тканини яєчника та ендометрію [10, 11], а також з результатами інших авторів за дослідження деяких ферментів [2, 9].

В окремому досліді (варіант кислого електрофорезу) було показано відсутність лужних форм карбоксипептидази А у фракції водорозчинних білків та білків, осаджених сульфатом амонію.

Таким чином, встановлено факт тканинспецифічності ферменту немалігнізованої молочної залози. Електрофоретична рухливість цього ензиму (Rf 0,390) відрізняється від електрофоретичної рухливості ферменту, отриманого в аналогічних умовах з тканини яєчника (Rf 0,320) та ендометрію (Rf 0,310) [10, 11].

Висновки

1. Спектр водорозчинних білків та білків, осаджених сульфатом амонію з екстрактів немалігнізованої тканини молочної залози, в основному представле-

ний помірно рухливими білками з Rf 0,210–0,240 та швидко рухливим білком з Rf 0,390.

2. Серед білків, виділених методом препаративного електрофорезу, 41% припадає на ізоформи ферменту з Rf 0,210 та Rf 0,390, що мають А- карбоксипептидазну активність.

Література

1. Oshima G., Nagasawa K. Purification of carboxypeptidase A using sepharose 4B-bounds-phenylpropionate // J. Biochem (Tokyo). - 1997. - Vol. 81, N 5. - P. 1285-1291.
2. Шварцман А. Л. О структуре и функциях гексокиназы в раковых клетках человека. - Автореф. ... дис. канд. биол. наук. - Ленинград, 1975. - 28 с.
3. Практическая химия Белка. - М.: Мир, 1989. - С. 39-43.
4. Marks N., Sachs L., Stern F. Conversion of Met-enkephalin-Arg 6-Phe 7 by a purified brain carboxypeptidase (cathepsin A) // Peptides. - 1981. - Vol. 2, N 2. - P. 159-164.
5. Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Fan A. Z., Randol R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. - 1951. - Vol. 193. - P. 265-275.
6. Bradshaw R. S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci USA. - 1969. - Vol. 63. - P. 1389-1394.
7. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). - М.: Наука, 1982. - 288 с.
8. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. - Минск: Высш. школа. - 1967. - 326 с.
9. Колозейская М. В., Пилявская А. С. Пептидазы - К.: Наукова думка, 1982. - 176 с.
10. Вовчук И. Л. Выделение и идентификация изоферментов карбоксипептидазы А с опухолевых тканей яичников // Вісник ОНУ - 2006. - Т. 11, № 1. - С. 34-50.
11. Вовчук И. Л., Кучеров В. А., Петров С. А. Выделение и идентификация молекулярных форм карбоксипептидазы А опухолевой ткани эндометрия матки женщин // Вісник Харківського національного університету - 2006. - Вип. 4, № 748. - С. 21-32.

Е. А. Филиппова, И. Л. Вовчук

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра биохимии,
ул. Дворянская 2, Одесса, 65082, Украина. Тел: (0482) 68-78-75,
e-mail: irvov@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А ИЗ НЕМАЛИГНИЗИРОВАННОЙ ТКАНИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

Резюме

Разработан метод выделения и очистки карбоксипептидазы А из немалігнізованої ткани молочної залози. Метод состоит из поэтапного осаждения сульфатом аммония и препаративного электрофореза. Методом препаративного электрофореза в ПААГ установлено спектры изоформ и идентифицированы отдельные изозимы карбоксипептидазы А исследуемой ткани. Установлено, что поэтапное осаждение способствует эффективному разделению карбоксипептидазы А по фракциям по их солерастворимости. Анализ электрофореграм белкового спектра показал наличие тканеспецифического для немалігнізованої ткани молочної залози белка, характерного для каждого насыщения. Среди белков, выделенных из немалігнізованої ткани молочної залози методом высаливания и препаративного электрофореза, 41% составляют белки, которые имеют ферментативную А-карбоксипептидазную активность.

Ключевые слова: карбоксипептидаза А, молочная железа, электрофорез.

E. A. Filipcova, I. L. Vovchuk

Odessa National I. I. Mechnikov University, Department of Biochemistry,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65082, Ukraine. Tel: (0482) 68-78-75,
e-mail: irvov@mail.ru

EXTRACTION AND PURIFICATION OF CARBOXYPEPTIDASE A FROM THE NON-MALIGNIZED TISSUE OF THE MAMMALIAN GLAND BY THE METHOD OF ELECTROPHORESIS

Summary

Method of extraction and purification of carboxypeptidase A from the non-malignized tissue of mammalian gland has been created. This method includes gradual sedimentation with the help of ammonium sulfate and preparative electrophoresis. The protein spectrum and isozyme of carboxypeptidase A from the non-malignized tissue of mammalian gland were studied and identified by the PAGE electrophoretic native and preparative method. It has been established that gradual sedimentation promotes effective separating of carboxypeptidase A for salt-solubility on the fractions. Analysis of protein spectrum showed the presence of specific for non-malignized tissue of mammalian gland of protein is characteristic for all fractions. The extracted of method gradual sedimentation and preparative electrophoresis proteins of non-malignized tissue of mammalian gland on 41% is presented by proteins possessed enzymatic A-carboxypeptidase activity.

Keywords: carboxypeptidase A, mammalian gland, electrophoresis.