

УДК 577.15.152:577.15.072/08/082

И. Л. Вовчук, канд. биол. наук, докторант
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра биохимии,
ул. Дворянская 2, Одесса, 65026, Украина. Тел: (0482) 68-78-75,
e-mail: irvov@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗОФЕРМЕНТОВ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А ИЗ ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЕЙ ЯИЧНИКОВ

Методом электрофореза в полиакриламидном геле изучены белковый спектр и многообразие молекулярных форм карбоксипептидазы А немалигнизированной и опухолевой тканей яичников. Разработан метод выделения изоферментов карбоксипептидазы А и идентификации их в гелевом блоке. Изучены электрофоретические характеристики идентифицированных изоферментов. Показано, что процесс опухолеобразования сопровождается увеличением белкового спектра и появлением новых форм карбоксипептидазы А.

Ключевые слова: карбоксипептидаза А, изоферменты, электрофорез.

Выделение ферментов и очистка их до гомогенного состояния является одной из самых сложных задач биохимии и в каждом конкретном случае включает целый ряд последовательно применяемых методов. Наиболее часто применяемыми методами являются диализ, фракционирование солями или органическими растворителями, ионообменная, ковалентная, адсорбционная хроматография и гель-хроматография. С появлением высокоэффективных методов очистки, таких как электрофорез, изоэлектрическое фокусирование и особенно аффинная хроматография, стало возможным уменьшить количество процедур и в два-три этапа добиться очистки ряда ферментов до гомогенного состояния.

Так, в один этап с помощью аффинной хроматографии был получен гомогенный препарат карбоксипептидазы из легких [1], а с помощью ионообменной хроматографии — препарат прокариотической карбоксипептидазы поджелудочной железы человека [2]. В два этапа с помощью ионообменной и аффинной хроматографии был получен препарат карбоксипептидазы из плаценты [3] и мембраносвязанная карбоксипептидаза А из почек [4]. Последовательное применение аффинной хроматографии и гель-фильтрации позволило получить гомогенный препарат карбоксипептидазы из семенной жидкости [5] и карбоксипептидазы А из культуры клеток карциномы легких человека [6].

В вышеперечисленных работах определение гомогенности препаратов проводили с помощью электрофореза в 7-10%-ном полиакри-

ламидном геле. Однако, как было показано А. Л. Шварцманом [7], для ферментов, выделенных из опухолевой и нормальной тканей желудка человека, метод препаративного электрофореза позволяет не только подтвердить гомогенность препаратов ферментов, но и получить индивидуальные изоферменты.

В связи с этим, цель работы состояла в изучении электрофоретической характеристики водорастворимых белков и белков, полученных при солевом фракционировании из немалигнизированной и опухолевой тканей яичников, а также в идентификации изоферментов карбоксипептидазы А непосредственно в гелевом блоке.

Материалы и методы

Биологическим источником исследуемых белков служили образцы немалигнизированной ткани яичников и ткани доброкачественной (цисаденома) и злокачественной (умереннодифференцированная аденокарцинома) опухолей, которые были получены операционным путем у женщин, не проходивших дооперационного медикаментозного лечения. Патоморфологические диагнозы были верифицированы по международной классификации ВОЗ [8].

Образцы тканей гомогенизировали в дистиллированной воде (в соотношении 1:10) и центрифугировали при 12000 оборотов/мин при +4°C в течение 45 минут. Для удаления низкомолекулярных примесей применяли метод диализа против 20-кратного объема дистиллированной воды, содержащей 2 мМ Zn^{++} [9]. Растворы белков, полученные после диализа, подвергали поэтапному фракционированию сульфатом аммония [9]. Для удаления избытка $(NH_4)_2SO_4$, препятствующего определению белка по методу Lowry [10], фракции, полученные при 20, 40, 60 и 80%-ном насыщении сульфатом аммония, подвергали повторному диализу в тех же условиях. Во фракциях определяли активность карбоксипептидазы А по гидролизу 2 мМ синтетического субстрата карбобензоксифенилаланина [11]. Оптическую плотность определяли при длине волны 570 нм. Относительную активность выражали в ммоль фенолаланина на мг ткани за 1 мин инкубации при 37°C, удельную активность — в ммоль фенолаланина на мг белка за 1 мин инкубации при 37°C.

Вертикальный электрофорез проводили на пластинах 140×140×1 мм в кислой (аланин-уксусный буфер, рН 4,5) и щелочной (трис-глициновый буфер, рН 8,3) средах в 10%-ном полиакриламидном геле ("Reanal", Венгрия) при температуре 25°C в течение 4,5 часов [12]. Образцы вносили в слоты объемом 30 мкл в 15 мкл 60%-ного раствора сахарозы. Начальное концентрирование белков проводили в течение 20 мин при 20 мА (в расчете на 2 гелевых блока), а дальнейшее разделение белков — при 40 мА. В качестве лидирующих красителей применяли 0,1%-ный раствор бромфенолового синего (щелочной электрофорез) и 0,1%-ной раствор метилового зеленого (кислый электрофорез). По окончании электрофореза

гелевые блоки многократно отмывали дистиллированной водой и окрашивали в течение 30 мин 0,25%-ным раствором Кумасси R-250 ("Serva", Швеция) в 45,0%-ном этаноле, содержащем 9,0%-ную уксусную кислоту. Электрофореграммы получали сканированием влажных гелевых блоков с последующей компьютерной обработкой электрофореграмм с помощью программы ANAIS.

Методом препаративного электрофореза [7] на окрашенных Кумасси R-250 белковых полосах идентифицировали участки неокрашенного геля, содержащие иммобилизованные белки, в которых далее определяли активность карбоксипептидазы А. В качестве контроля был взят участок гелевого блока после электрофореза в идентичных условиях, но без наличия исследуемого материала в слотах.

Результаты и их обсуждение

Анализ электрофореграмм щелочного электрофореза фракций водорастворимых белков немалигнизированной и опухолевых тканей яичников показал, что процесс опухолеобразования сопровождается увеличением количества регистрируемых белков (рис. 1, 2, 3). Так, в образце доброкачественного и злокачественного новообразования обнаружены малоподвижные белки с R_f 0,042 и 0,064–0,065, которые отсутствовали в образце немалигнизированной ткани (табл. 1, 2, 3). Следует отметить, что для всех исследованных образцов тканей характерно наличие "мажорных", не специфических белков с R_f 0,330–0,350. Диализ приводил к потере белков со средней электрофоретической подвижностью (R_f 0,082, 0,140, 0,200) в образце немалигнизированной ткани (табл. 1) и малоподвижных белков с R_f 0,042, 0,093, 0,220 — в образце злокачественной опухоли (табл. 3). Напротив, в образце доброкачественной опухоли (табл. 2) отмечено появление "быстрых" белков (R_f 0,420, 0,550, 0,570), которые не регистрировались ранее и могут быть продуктом деградации "мажорного" белка с R_f 0,340.

Нами установлено, что в процессе поэтапного фракционирования белков сульфатом аммония изменяются как спектр белков, так и распределение активности карбоксипептидазы А. Так, при 20%-ном насыщении сульфатом аммония из немалигнизированной ткани и ткани доброкачественной опухоли был фракционирован белок с близкой электрофоретической характеристикой: R_f 0,330 и R_f 0,300 соответственно (табл. 1, 2). В то же время из образца злокачественной опухоли, кроме "мажорного" белка с R_f 0,310, были фракционированы два дополнительных белка с R_f 0,071 и 0,150 (табл. 3). Наибольшее количество белков во всех исследованных образцах было зарегистрировано при 40%-ном насыщении сульфатом аммония (табл. 1, 2, 3). Во всех образцах были зарегистрированы белки с R_f 0,017–0,018, R_f 0,160–0,180 и "мажорный" белок с R_f 0,310–0,340. Характерной особенностью немалигнизированной ткани являлось наличие "медленных" белков (R_f 0,023, 0,036), а для ткани доброка-

качественной опухоли — появление "быстрого" белка с R_f 0,430 (табл. 1, 2). Последующее насыщение белкового раствора сульфатом аммония до 60% приводит к осаждению всех белков с R_f 0,170–180 и R_f 0,310–0,340, а в образце доброкачественной опухоли — к осаждению специфических белков с R_f 0,270, 0,360 и 0,380 (табл. 1, 2, 3). При 80%-ном насыщении из всех исследованных тканевых образцов был фракционирован один белок с идентичной электрофоретической характеристикой (табл. 2, 3).

Для выделения изоэнзимов карбоксипептидазы А из опухолевой и немалигнизированной тканей яичника был применен метод препаративного электрофореза в ПААГ, который позволял фракционировать до 40 мг белка в одном опыте. Нами установлено, что процесс опухолеобразования сопровождается не упрощением изоферментного состава, как отмечалось ранее другими исследователями [7], а его усложнением. Так, исходная фракция водорастворимых белков немалигнизированной ткани яичника характеризовалась наличием одной, "мажорной" формы карбоксипептидазы А, в то время как водорастворимые белки образцов доброкачественной и злокачественной опухолей содержали по три новых формы фермента, отличающиеся между собой электрофоретическими характеристиками (табл. 4–6). Изоферментный спектр ткани доброкачественной опухоли был представлен дополнительными среднеподвижными формами карбоксипептидазы А, а ткани злокачественной опухоли — изоферментами с небольшой электрофоретической подвижностью.

После диализа фракция растворимых белков в образце немалигнизированной ткани была представлена двумя изоферментами с близкой электрофоретической характеристикой (табл. 4), в образце злокачественной опухоли яичника — одним изоферментом (табл. 6), а в образце доброкачественной опухоли — двумя резко отличающимися по электрофоретической подвижности изоформами (табл. 5).

Данные литературы свидетельствуют о том, что карбоксипептидаза как индивидуальный белок может быть фракционирована из белкового раствора при 60–80%-ном насыщении его сульфатом аммония [13]. Однако, мы установили, что поэтапное фракционирование приводит к более четкому разделению изоферментного спектра и позволяет получить высокоочищенные индивидуальные изоформы карбоксипептидазы А с высокой удельной активностью фермента.

Так, фракции, полученные при 20%-ном насыщении сульфатом аммония, во всех исследованных образцах были представлены одной формой фермента с близкими значениями электрофоретической подвижности, что, скорее всего, свидетельствует об идентичности этих форм. При 40%-ном насыщении сульфатом аммония во всех исследованных образцах тканей была обнаружена малоподвижная форма фермента с R_f 0,160–0,180 и высокоподвижные формы, представленные в образце злокачественной опухоли белками с R_f 0,320–0,340 (табл. 6), а в образце доброкачественной опухоли — белками с R_f 0,310 и 0,430 (табл. 5).

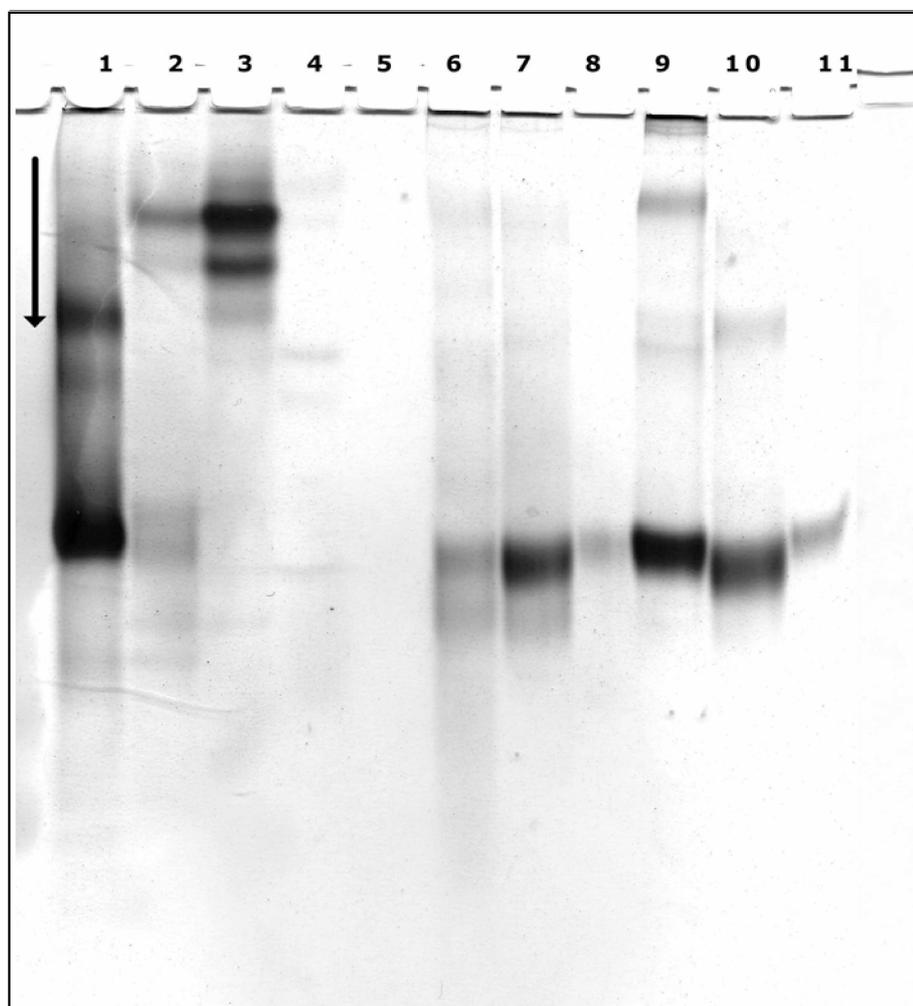


Рис. 1. Электрофореграмма растворимых белков и белков, фракционированных сульфатом аммония, из немалигнизированной ткани яичника

1 — сывороточный альбумин человека, Mr 66 500 Да (нанесено 50 мкг белка); 2 — трипсин поджелудочной железы крупного рогатого скота, Mr 23 800 Да (нанесено 100 мкг белка); 3 — химотрипсиноген поджелудочной железы крупного рогатого скота, Mr 23 240 Да (нанесено 100 мкг белка); 4 — протеиназа К, Mr 28 930 Да (нанесено 200 мкг белка); 5 — контрольный гель (без белка); 6 — водорастворимые белки (до диализа, нанесено 34 мкг белка); 7 — водорастворимые белки (после диализа, нанесено 30 мкг белка); 8 — фракция белков, осаждаемых при 20%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 2,3 мкг белка); 9 — фракция белков, осаждаемых при 40%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 18 мкг белка); 10 — фракция белков, осаждаемых при 60%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 15 мкг белка); 11 — фракция белков, осаждаемых при 80%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 1,6 мкг белка)

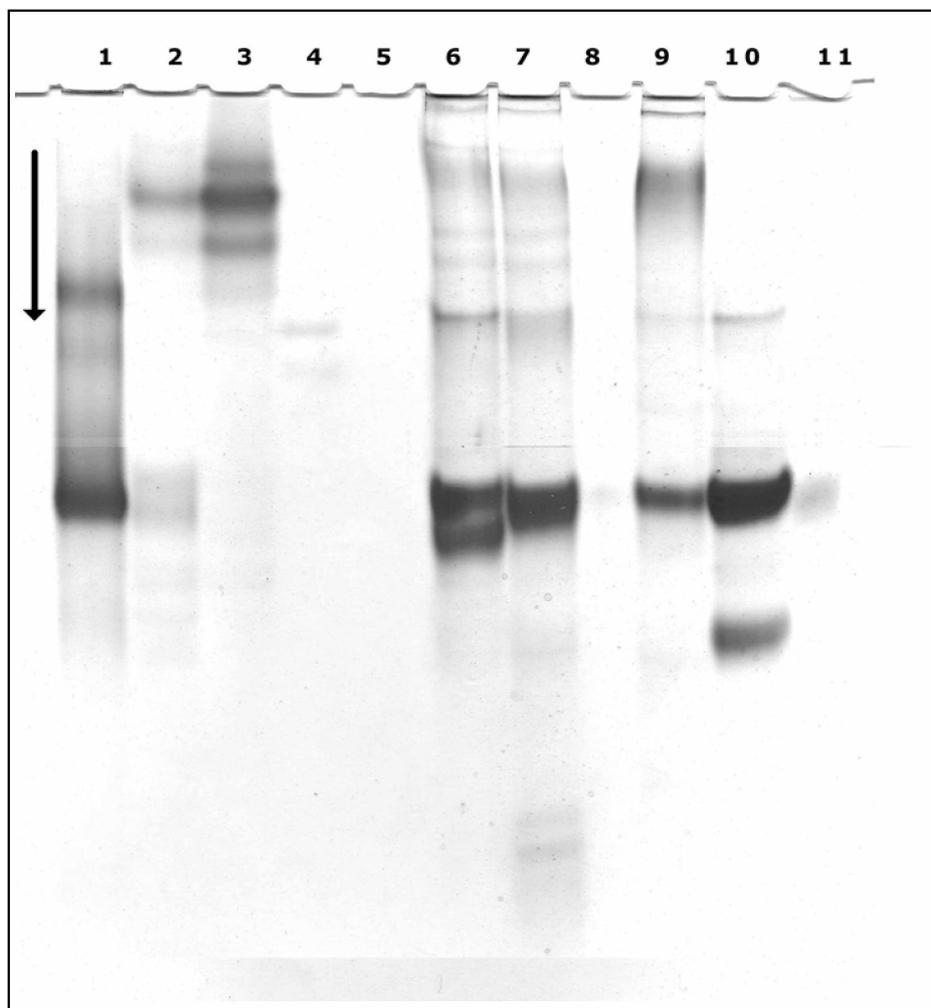


Рис. 2. Электрофореграмма растворимых белков и белков, фракционированных сульфатом аммония, из ткани доброкачественной опухоли яичника

1 — сывороточный альбумин человека, Mr 66 500 Да (нанесено 50 мкг белка); 2 — трипсин поджелудочной железы крупного рогатого скота, Mr 23 800 Да (нанесено 100 мкг белка); 3 — химотрипсиноген поджелудочной железы крупного рогатого скота, Mr 23 240 Да (нанесено 100 мкг белка); 4 — протеиназа К, Mr 28 930 Да (нанесено 200 мкг белка); 5 — контрольный гель (без белка); 6 — водорастворимые белки (до диализа, нанесено 34 мкг белка); 7 — водорастворимые белки (после диализа, нанесено 32 мкг белка); 8 — фракция белков, осаждаемых при 20%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 2 мкг белка); 9 — фракция белков, осаждаемых при 40%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 20 мкг белка); 10 — фракция белков, осаждаемых при 60%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 19 мкг белка); 11 — фракция белков, осаждаемых при 80%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 1,3 мкг белка)

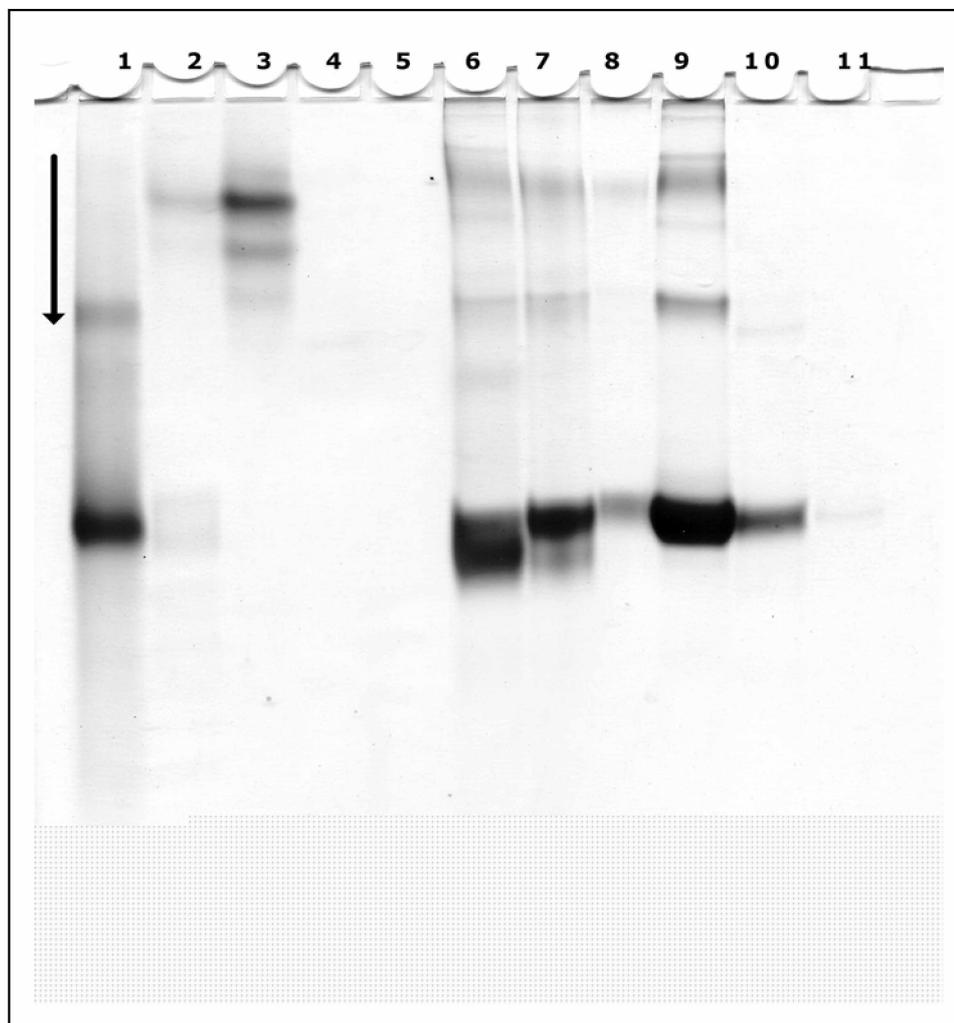


Рис. 3. Электрофореграмма растворимых белков и белков, фракционированных сульфатом аммония, из ткани злокачественной опухоли яичника

1 — сывороточный альбумин человека, Mr 66 500 Да (нанесено 50 мкг белка); 2 — трипсин поджелудочной железы крупного рогатого скота, Mr 23 800 Да (нанесено 100 мкг белка); 3 — химотрипсиноген поджелудочной железы крупного рогатого скота, Mr 23 240 Да (нанесено 100 мкг белка); 4 — протеиназа К, Mr 28 930 Да (нанесено 200 мкг белка); 5 — контрольный гель (без белка); 6 — водорастворимые белки (до диализа, нанесено 34 мкг белка); 7 — водорастворимые белки (после диализа, нанесено 30 мкг белка); 8 — фракция белков, осаждаемых при 20%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 2,3 мкг белка); 9 — фракция белков, осаждаемых при 40%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 28 мкг белка); 10 — фракция белков, осаждаемых при 60%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 11 мкг белка); 11 — фракция белков, осаждаемых при 80%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 0,7 мкг белка)

Таблица 1

Электрофоретическая характеристика белкового спектра немалигнизированной ткани яичников

| Электрофоретическая подвижность белков (Rf) | Спектр водорастворимых белков | | Фракционирование белков (NH ₄) ₂ SO ₄ | | | |
|---|-------------------------------|---------------|---|----------------|----------------|----------------|
| | до диализа | после диализа | 20 % насыщение | 40 % насыщение | 60 % насыщение | 80 % насыщение |
| 0,013 | - | - | - | - | - | - |
| 0,014 | - | - | - | - | - | - |
| 0,017 | - | - | - | + | - | - |
| 0,018 | + | - | - | - | - | - |
| 0,019 | - | + | - | - | - | - |
| 0,023 | - | - | - | + | - | - |
| 0,036 | - | - | - | + | - | - |
| 0,042 | - | - | - | - | - | - |
| 0,044 | - | - | - | - | - | - |
| 0,047 | - | - | - | - | - | - |
| 0,063 | - | - | - | - | - | - |
| 0,064 | - | - | - | - | - | - |
| 0,065 | - | - | - | - | - | - |
| 0,071 | - | - | - | - | - | - |
| 0,073 | - | - | - | - | - | - |
| 0,074 | - | - | - | + | - | - |
| 0,082 | + | - | - | - | - | - |
| 0,093 | - | - | - | - | - | - |
| 0,095 | - | - | - | - | - | - |
| 0,097 | - | - | - | - | - | - |
| 0,110 | - | - | - | - | - | - |
| 0,130 | - | - | - | - | - | - |
| 0,140 | + | - | - | - | - | - |
| 0,150 | - | - | - | - | - | - |
| 0,160 | - | - | - | + | - | - |
| 0,170 | - | - | - | - | + | - |
| 0,180 | - | - | - | + | - | - |
| 0,200 | + | - | - | - | - | - |
| 0,220 | - | - | - | - | - | - |
| 0,240 | - | - | - | - | - | - |
| 0,270 | - | - | - | - | - | - |
| 0,300 | - | - | - | - | - | - |
| 0,310 | - | - | - | - | - | - |
| 0,320 | - | - | - | - | - | + |
| 0,330 | - | - | + | + | - | - |
| 0,340 | + | + | - | - | + | - |
| 0,350 | - | - | - | - | - | - |
| 0,360 | - | - | - | - | - | - |
| 0,380 | + | + | - | - | - | - |
| 0,410 | - | - | - | - | - | - |
| 0,420 | - | - | - | - | - | - |

Окончание таблицы 1

| Электрофоретическая подвижность белков (Rf) | Спектр водорастворимых белков | | Фракционирование белков (NH ₄) ₂ SO ₄ | | | |
|---|-------------------------------|---------------|---|----------------|----------------|----------------|
| | до диализа | после диализа | 20 % насыщение | 40 % насыщение | 60 % насыщение | 80 % насыщение |
| 0,430 | – | – | – | – | – | – |
| 0,550 | – | – | – | – | – | – |
| 0,570 | – | – | – | – | – | – |

Примечание: * — фракции, обладающие ферментативной активностью к субстрату карбоксипептидазы А — карбобензоксифенилаланину.

Таблица 2

Электрофоретическая характеристика белкового спектра ткани доброкачественной опухоли яичников

| Электрофоретическая подвижность белков (Rf) | Спектр водорастворимых белков | | Фракционирование белков (NH ₄) ₂ SO ₄ | | | |
|---|-------------------------------|---------------|---|----------------|----------------|----------------|
| | до диализа | после диализа | 20 % насыщение | 40 % насыщение | 60 % насыщение | 80 % насыщение |
| 0,013 | + | – | – | – | – | – |
| 0,014 | – | + | – | – | – | – |
| 0,017 | – | – | – | + | – | – |
| 0,018 | – | – | – | – | – | – |
| 0,019 | – | – | – | – | – | – |
| 0,023 | – | – | – | – | – | – |
| 0,036 | – | – | – | – | – | – |
| 0,042 | + | – | – | – | – | – |
| 0,044 | – | + | – | – | – | – |
| 0,047 | – | – | – | – | – | – |
| 0,063 | – | – | – | + | – | – |
| 0,064 | + | – | – | – | – | – |
| 0,065 | – | – | – | – | – | – |
| 0,071 | – | + | – | – | – | – |
| 0,073 | – | – | – | – | – | – |
| 0,074 | – | – | – | – | – | – |
| 0,082 | – | – | – | – | – | – |
| 0,093 | – | – | – | – | – | – |
| 0,095 | – | – | – | – | – | – |
| 0,097 | – | – | – | – | – | – |
| 0,110 | + | + | – | – | – | – |
| 0,130 | + | + | – | – | – | – |
| 0,140 | – | – | – | – | – | – |
| 0,150 | – | – | – | – | – | – |
| 0,160 | – | – | – | – | – | – |
| 0,170 | + | – | – | + | + | – |
| 0,180 | – | + | – | – | – | – |

Окончание таблицы 2

| Электрофоретическая подвижность белков (Rf) | Спектр водорастворимых белков | | Фракционирование белков (NH ₄) ₂ SO ₄ | | | |
|---|-------------------------------|---------------|---|----------------|----------------|----------------|
| | до диализа | после диализа | 20 % насыщение | 40 % насыщение | 60 % насыщение | 80 % насыщение |
| 0,200 | – | – | – | – | – | – |
| 0,220 | – | – | – | – | – | – |
| 0,240 | – | – | – | + | – | – |
| 0,270 | – | – | – | – | + | – |
| 0,300 | +* | – | +* | – | – | +* |
| 0,310 | – | +* | – | +* | +* | – |
| 0,320 | – | – | – | – | – | – |
| 0,330 | – | – | – | – | – | – |
| 0,340 | +* | – | – | – | – | – |
| 0,350 | – | – | – | – | – | – |
| 0,360 | – | – | – | – | +* | – |
| 0,380 | – | – | – | – | – | – |
| 0,410 | – | – | – | – | +* | – |
| 0,420 | – | + | – | – | – | – |
| 0,430 | – | – | – | +* | – | – |
| 0,550 | – | + | – | – | – | – |
| 0,570 | – | + | – | – | – | – |

Примечание: * — фракции, обладающие ферментативной активностью к субстрату карбоксипептидазы А — карбобензоксифенилаланину.

Таблица 3

Электрофоретическая характеристика белкового спектра ткани злокачественной опухоли яичников

| Электрофоретическая подвижность белков (Rf) | Спектр водорастворимых белков | | Фракционирование белков (NH ₄) ₂ SO ₄ | | | |
|---|-------------------------------|---------------|---|----------------|----------------|----------------|
| | до диализа | после диализа | 20 % насыщение | 40 % насыщение | 60 % насыщение | 80 % насыщение |
| 0,013 | – | – | – | – | – | – |
| 0,014 | + | – | – | – | – | – |
| 0,017 | – | – | – | – | – | – |
| 0,018 | – | – | – | + | – | – |
| 0,019 | – | – | – | – | – | – |
| 0,023 | – | – | – | – | – | – |
| 0,036 | – | – | – | – | – | – |
| 0,042 | + | – | – | – | – | – |
| 0,044 | – | – | – | – | – | – |
| 0,047 | – | – | – | + | – | – |
| 0,063 | – | – | – | – | – | – |
| 0,064 | – | – | – | – | – | – |

Окончание таблицы 3

| Электрофоретическая подвижность белков (Rf) | Спектр водорастворимых белков | | Фракционирование белков (NH ₄) ₂ SO ₄ | | | |
|---|-------------------------------|---------------|---|----------------|----------------|----------------|
| | до диализа | после диализа | 20 % насыщение | 40 % насыщение | 60 % насыщение | 80 % насыщение |
| 0.065 | 1* | — | — | 1 | — | — |
| 0.071 | — | — | + | — | — | — |
| 0.073 | — | + | — | — | — | — |
| 0.074 | — | — | — | — | — | — |
| 0.082 | | | | | | |
| 0.093 | 1 | — | — | — | — | — |
| 0.095 | — | — | — | — | — | — |
| 0.097 | — | — | — | + | — | — |
| 0.110 | — | — | — | — | — | — |
| 0.130 | | | | | | |
| 0.140 | — | — | — | — | — | — |
| 0.150 | — | — | + | — | — | — |
| 0.160 | ++ | + | — | ++ | — | — |
| 0.170 | — | — | — | — | — | — |
| 0.180 | | | | | —* | |
| 0.200 | — | — | — | — | — | — |
| 0.220 | + | — | — | — | — | — |
| 0.240 | — | — | — | — | — | — |
| 0.270 | — | — | — | — | — | — |
| 0.300 | | | | | | ++ |
| 0.310 | — | — | ++ | — | — | — |
| 0.320 | — | — | — | ++ | —* | — |
| 0.330 | ++ | + | — | — | — | — |
| 0.340 | — | — | — | 1* | — | — |
| 0.350 | ++ | —* | | | | |
| 0.360 | — | — | — | — | — | — |
| 0.380 | — | — | — | — | — | — |
| 0.410 | — | — | — | — | — | — |
| 0.420 | — | — | — | — | — | — |
| 0.430 | | | | | | |
| 0.550 | — | — | — | — | — | — |
| 0.570 | — | — | — | — | — | — |

Примечание. * — фракции, обладающие ферментативной активностью к субстрату карбоксицефтидазы А — карбобензоксифенилаланину.

Таблица 4

Выделение изоферментов карбоксипептидазы А из немалигнизированной ткани яичника методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, n = 3

| Фракция | Исходная фракция белка и изозимы | Содержание белка во фракции, мг | Относительная активность, ммоль ферм/мг ткани | Удельная активность, мкмоль ферм/мг белка | Кэф-фициент очистки |
|--|----------------------------------|---------------------------------|---|---|---------------------|
| Растворимые белки до диализа | Исходная фракция белка | 0,0340±0,0032 | 0,0020±0,0003 | 0,059±0,006 | 1,00 |
| | Изозим Rf 0,340 | 0,0129±0,0013 | 0,0031±0,0003 | 0,240±0,024 | 4,08 |
| Растворимые белки после диализа | Исходная фракция белка | 0,0294±0,0030 | 0,0020±0,0002 | 0,068±0,007 | 1,00 |
| | Изозим Rf 0,340 | 0,0218±0,0022 | 0,0027±0,0003 | 0,124±0,013 | 1,82 |
| | Изозим Rf 0,380 | 0,0048±0,0005 | 0,0031±0,0003 | 0,646±0,066 | 9,50 |
| 20 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄ | Исходная фракция белка | 0,0021±0,0002 | 0,0009±0,0001 | 0,429±0,044 | 1,00 |
| | Изозим Rf 0,330 | 0,0021±0,0003 | 0,0031±0,0002 | 1,476±0,148 | 3,44 |
| 40 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄ | Исходная фракция белка | 0,0144±0,0015 | 0,0009±0,0001 | 0,063±0,007 | 1,00 |
| | Изозим Rf 0,180 | 0,0009±0,0001 | 0,0023±0,0003 | 2,555±0,258 | 40,56 |
| | Изозим Rf 0,330 | 0,0083±0,0009 | 0,0028±0,0003 | 0,337±0,036 | 5,35 |
| 60 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄ | Исходная фракция белка | 0,0120±0,0014 | 0,0010±0,0001 | 0,083±0,009 | 1,00 |
| | Изозим Rf 0,170 | 0,0032±0,0004 | 0,0025±0,0003 | 0,781±0,080 | 9,41 |
| | Изозим Rf 0,340 | 0,0088±0,0009 | 0,0027±0,0003 | 0,307±0,032 | 3,70 |
| 80 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄ | Исходная фракция белка | 0,0015±0,0002 | 0,0014±0,0002 | 0,933±0,098 | 1,00 |
| | Изозим Rf 0,320 | 0,0015±0,0001 | 0,0029±0,0003 | 1,933±0,199 | 2,07 |

Таблица 5

**Выделение изоферментов карбоксипептидазы А из ткани
доброкачественной опухоли яичника методом препаративного
электрофореза в полиакриламидном геле, n = 3**

| Фракция | Исходная фракция белка и изозимы | Содержание белка во фракции, мг | Относительная активность, ммоль фен/мл ткани | Удельная активность, ммоль фен/мл белка | Коэффициент очистки |
|--|----------------------------------|---------------------------------|--|---|---------------------|
| Растворимые белки до диализа | Исходная фракция белка | 0.0342±0.0040 | 0.0054±0.0006 | 0.158±0.016 | 1.00 |
| | Изозим Rf 0.130 | 0.0006±0.0001 | 0.0004±0.0001 | 0.667±0.069 | 4.22 |
| | Изозим Rf 0.170 | 0.0056±0.0006 | 0.0005±0.0001 | 0.089±0.009 | 0.56 |
| | Изозим Rf 0.300 | 0.0112±0.0013 | 0.0027±0.0003 | 0.241±0.028 | 1.53 |
| | Изозим Rf 0.340 | 0.0090±0.0010 | 0.0034±0.0004 | 0.378±0.040 | 2.39 |
| Растворимые белки после диализа | Исходная фракция белка | 0.0321±0.0033 | 0.0059±0.0006 | 0.183±0.020 | 1.00 |
| | Изозим Rf 0.180 | 0.0053±0.0006 | 0.0044±0.0005 | 0.830±0.088 | 4.54 |
| | Изозим Rf 0.310 | 0.0135±0.0015 | 0.0048±0.0005 | 0.356±0.039 | 1.95 |
| 20 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄ | Исходная фракция белка | 0.0012±0.0002 | 0.0009±0.0001 | 0.750±0.078 | 1.00 |
| | Изозим Rf 0.300 | 0.0012±0.0003 | 0.0053±0.0006 | 4.417±0.460 | 5.89 |
| 40 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄ | Исходная фракция белка | 0.0150±0.0016 | 0.0013±0.0002 | 0.087±0.009 | 1.00 |
| | Изозим Rf 0.170 | 0.0007±0.0001 | 0.0025±0.0003 | 3.571±0.380 | 41.05 |
| | Изозим Rf 0.310 | 0.0053±0.0007 | 0.0043±0.0005 | 0.811±0.090 | 9.32 |
| | Изозим Rf 0.430 | 0.0010±0.0001 | 0.0033±0.0004 | 3.300±0.340 | 37.93 |
| 60 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄ | Исходная фракция белка | 0.0141±0.0016 | 0.0010±0.0001 | 0.071±0.008 | 1.00 |
| | Изозим Rf 0.170 | 0.0012±0.0002 | 0.0055±0.0006 | 4.583±0.468 | 64.55 |
| | Изозим Rf 0.310 | 0.0066±0.0008 | 0.0027±0.0003 | 0.409±0.050 | 5.76 |
| | Изозим Rf 0.360 | 0.0010±0.0001 | 0.0045±0.0005 | 4.500±0.462 | 63.38 |
| | Изозим Rf 0.410 | 0.0042±0.0005 | 0.0043±0.0005 | 1.024±0.113 | 14.42 |
| 80 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄ | Исходная фракция белка | 0.0012±0.0002 | 0.0034±0.0004 | 2.833±0.302 | 1.00 |
| | Изозим Rf 0.300 | 0.0012±0.0003 | 0.0045±0.0005 | 3.750±0.391 | 1.32 |

Таблица 6

**Выделение изоэнзимов карбоксипептидазы А из ткани злокачественной
опухоли яичника методом препаративного электрофореза
в полиакриламидном геле, n = 3**

| Фракция | Исходная фракция белка и изоэтимы | Содержание белка во фракции, мг | Относительная активность, ммоль фен / мг ткани | Удельная активность, мкмоль фен / мг белка | Коэффициент очистки |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|--|--|---------------------|
| Растворимые белки до диализа | Исходная фракция белка | 0.0306±0.0041 | 0.0026±0.0003 | 0.085±0.0087 | 1.00 |
| | Изоэтим Rf 0.065 | 0.0042±0.0005 | 0.0044±0.0005 | 1.047±0.106 | 12.32 |
| | Изоэтим Rf 0.160 | 0.0022±0.0003 | 0.0071±0.0008 | 3.227±0.341 | 37.96 |
| | Изоэтим Rf 0.330 | 0.0064±0.0007 | 0.0027±0.0003 | 0.422±0.044 | 4.96 |
| | Изоэтим Rf 0.350 | 0.0110±0.0012 | 0.0077±0.0008 | 0.700±0.073 | 8.24 |
| Растворимые белки после диализа | Исходная фракция белка | 0.0276±0.0030 | 0.0028±0.0003 | 0.101±0.011 | 1.00 |
| | Изоэтим Rf 0.350 | 0.0052±0.0006 | 0.0052±0.0006 | 1.000±0.113 | 9.90 |
| 20 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄ | Исходная фракция белка | 0.0021±0.0003 | 0.0008±0.0001 | 0.381±0.039 | 1.00 |
| | Изоэтим Rf 0.310 | 0.0010±0.0001 | 0.0044±0.0005 | 4.400±0.462 | 11.55 |
| 40 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄ | Исходная фракция белка | 0.0144±0.0016 | 0.0009±0.0001 | 0.063±0.007 | 1.00 |
| | Изоэтим Rf 0.160 | 0.0016±0.0002 | 0.0008±0.0001 | 0.500±0.054 | 7.94 |
| | Изоэтим Rf 0.320 | 0.0029±0.0003 | 0.0027±0.0003 | 0.931±0.095 | 14.78 |
| | Изоэтим Rf 0.340 | 0.0068±0.0007 | 0.0073±0.0008 | 1.074±0.112 | 17.05 |
| 60 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄ | Исходная фракция белка | 0.0102±0.0011 | 0.0012±0.0002 | 0.118±0.014 | 1.00 |
| | Изоэтим Rf 0.180 | 0.0024±0.0003 | 0.0050±0.0006 | 2.083±0.213 | 17.65 |
| | Изоэтим Rf 0.320 | 0.0078±0.0008 | 0.0044±0.0005 | 0.564±0.057 | 4.78 |
| 80 % насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄ | Исходная фракция белка | 0.0006±0.0001 | 0.0013±0.0002 | 2.167±0.223 | 1.00 |
| | Изоэтим Rf 0.300 | 0.0006±0.0001 | 0.0073±0.0008 | 12.167±1.180 | 5.61 |

Изоферментный спектр белков, полученный при 60%-ном насыщении сульфатом аммония, характеризуется наличием малоподвижных (Rf 0,170–0,180) и высокоподвижных (Rf 0,310–0,340) форм карбоксипептидазы А во всех исследованных образцах, а в образце доброкачественной опухоли (табл. 5) — появлением минор-

ных высокоподвижных (R_f 0,360–0,410) фракций, которые могут являться продуктами протеолитического расщепления белковой части мажорной формы фермента без нарушения его каталитических свойств.

При 80%-ном насыщении сульфатом аммония во всех исследованных образцах обнаружена одна форма карбоксипептидазы А с одинаковой электрофоретической подвижностью и молекулярной массой (M_r 32 000 Да).

Анализ удельной активности и коэффициента очистки позволяет отметить важную особенность изоферментов карбоксипептидазы А, выделенных из опухолевых тканей. Обнаружено, что во многих случаях удельная активность и коэффициент очистки препаратов изоферментов ткани доброкачественной опухоли значительно выше, чем из немалигнизированной ткани яичника (табл. 4, 5). Установлено, что удельная активность очищенной до гомогенного состояния карбоксипептидазы А, фракционированной при 80 %-ном насыщении сульфатом аммония, увеличивается по мере усиления процесса малигнизации. По всей видимости, метод электрофоретического разделения способствует иммобилизации карбоксипептидазы А в ПААГ, которая приводит к конформационным изменениям, способствующим повышению активности и стабильности фермента, что было показано и другими исследователями для других ферментов [7, 14].

В отдельном эксперименте (вариант кислого электрофореза) нами было показано отсутствие щелочных форм карбоксипептидазы А во фракции водорастворимых и осаждаемых сульфатом аммония белков.

Таким образом, в отличие от общепринятого мнения, процесс малигнизации сопровождается увеличением белкового состава и изоферментного спектра карбоксипептидазы А и повышением удельной активности иммобилизованных в ПААГ изоферментов за счет их конформационных изменений.

Выводы

1. Разработан метод выделения и очистки до гомогенного состояния индивидуальных изоферментов карбоксипептидазы А из немалигнизированной и опухолевых тканей яичника.
2. При малигнизации происходит увеличение изоферментного состава карбоксипептидазы А, сопровождающееся появлением опухлеассоциированных изоформ с R_f 0,065, 0,300 и 0,310.
3. Удельная активность препаратов изоферментов карбоксипептидазы А из опухолевых тканей яичника выше, чем из немалигнизированной ткани.
4. Иммобилизация в ПААГ приводит к конформационным изменениям молекулы карбоксипептидазы А, способствующим увеличению удельной активности и повышению стабильности фермента.

Автор выражает благодарность кафедре генетики и молекулярной биологии ОНУ им. И. И. за любезно предоставленные технические средства.

Литература

1. Goldstein S. M., Kaempfer C. E., Kealey J. T., Wintroub B. U. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization // *J. Clin. Invest.* — 1989. — Vol. 83, N 5. — P. 1630-1636.
2. Pascual R., Burgos F. J., Salva M., Soriano F., Mendez E., Aviles F. X. Purification and properties of five different forms of human procarboxypeptidases // *Eur. J. Biochem.* — 1989. — Vol. 179, N 3. — P. 609-616.
3. Skigel R. A., Davis R. M., Tan F. Human carboxypeptidase M. Purification and characterization of a membrane-bound carboxypeptidase that cleaves peptide hormones // *J. Biol. Chem.* — 1989. — Vol. 264, N 4. — P. 2236-2241.
4. Michel A., Nortier J., Humblet A., Paradis C., De Prez E., Deschodt-Lanckman M. Cleavage of atrial natriuretic peptide by a kidney membrane-bound carboxypeptidase A. // *Peptides.* — 1998. — Vol. 19, N 5. — P. 907-912.
5. Skigel R. A., Deddish P. A., Davis R. M. Isolation and characterization of a basic carboxypeptidase from human seminal plasma // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1988. — Vol. 267, N 2. — P. 660-667.
6. Esswein A., Hanseler E., Montejano Y., Vitols K. S., Huennekens F. M. Construction and chemotherapeutic potential of carboxypeptidase A / monoclonal antibody conjugate // *Adv. Enzyme Regul.* — 1991. — Vol. 31. — P. 3-12.
7. Шварцман А. Л. О структуре и функциях гексокиназы в раковых клетках человека. — Автореф. дис... канд. биол. наук. — Ленинград, 1975. — 28 с.
8. Всемирная Организация Здравоохранения // Материалы ежегодных отчетов. — С.Пб. — 1981. — 286 с.
9. Ферменты / Под ред. А. Е. Браунштейна. — М.: Наука, 1964. — 312 с.
10. Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Fan A. Z., Randol R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — V. 193. — P. 265-275.
11. Bradshaw R. S., et all. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* — 1969. — V. 63. — P. 1389-1394.
12. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). — М.: Наука, 1981. — 288 с.
13. Колодзейская М. В., Пилявская А. С. Пептидазы. — К.: Наукова думка, 1982. — 176 с.
14. Тривен М. Имобилизованные ферменты. — М.: Мир, 1983. — 213 с.

І. Л. Вовчук

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра біохімії,
вул. Дворянська 2, Одеса, 65026, Україна. Тел: (0482) 68-78-75, e-mail:
irvov@mail.ru

ВИДІЛЕННЯ Й ІДЕНТИФІКАЦІЯ ІЗОФЕРМЕНТІВ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А З ПУХЛИННИХ ТКАНИН ЯЄЧНИКІВ

Резюме

Методом електрофорезу в поліакриламідному гелі вивчено білковий спектр і різноманітність молекулярних форм карбоксипептидази А немалігнізованої та пухлинної тканин яєчників. Розроблений метод виділення ізоферментів карбоксипептидази А та ідентифікації їх у гелевому блоці. З'ясовано електрофоретичні ха-

рактеристики ідентифікованих ізоферментів. Показано, що процес пухлиноутворення супроводжується збільшенням білкового спектру і появою нових форм карбокси-пептидази А.

Ключові слова: карбоксипептидаза А, ізоферменти, електрофорез.

I. L. Vovchuk

Odessa National I. I. Mechnikov University, Department of Biochemistry,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine. Tel: (0482) 68-78-75,
e-mail: irvov@mail.ru

EXTRACTING AND IDENTIFICATION OF THE CARBOXYPEPTIDASE A ISOENZYMES FROM TUMOUR OVARIAN TISSUES

Summary

Protein spectrum and molecular forms variety of carboxypeptidase A from the unalignized and tumour ovarian tissues were studied with the help of polyacrylamide gel electrophoresis. The method of extracting of carboxypeptidase A isoenzymes and their identification in the gel blocs was created. The electrophoretic characteristics of the identified isoenzymes were studied. It has been proved that tumour process accompanied with increasing of protein spectrum and appearance of new forms of carboxypeptidase A.

Keywords: carboxypeptidase A, isoenzymes, electrophoresis.