

УДК 577.151.644

ОТРИМАННЯ ЦІЛЮВИХ БІЛКОВИХ ФРАКЦІЙ З МОРСЬКИХ ГІДРОБІОНТІВ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ

Д.В. Гладун, Т.Б. Вовк, Н.Г. Ракша, О.М. Савчук, Л.І. Остапченко

*НДЦ Інститут біології Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
пр. Глушкова, 2, м. Київ, 03022, Україна, gladunk91@gmail.com*

Антарктичний регіон характеризується великою різноманітністю видів тварин. Ті з них, яких можна використати для отримання біологічно активних речовин і подальшого створення фармакологічних препаратів, становлять для практичної біотехнології певний інтерес. Тканини тварин Антарктичного регіону посідають широкий спектр білків та пептидів. Молекули білкової природи з механізмами направленої дії, тобто з ферментами різної специфічності, особливо цікавлять дослідників. У даній статті описано розробку і застосування методичних підходів для отримання та подальшої роботи з білковими молекулами й пептидами тканин морських гідробіонтів Антарктичного регіону.

Получение целевых белковых фракций из морских гидробиентов Антарктического региона.

Д.В. Гладун, Т.Б. Вовк, Н.Г. Ракша, А.Н. Савчук, Л.И. Остапченко

Реферат. Антарктический регион характеризуется большим разнообразием видов животных. Те из них, что могут быть использованы для получения биологически активных веществ и дальнейшего создания фармакологических препаратов, представляют для практической биотехнологии определенный интерес. Ткани животных Антарктического региона имеют широкий спектр белков и пептидов. Молекулы белковой природы с механизмами направленного действия, то есть с ферментами различной специфичности, особенно интересуют исследователей. В данной статье описаны разработка и применение методических подходов для получения и дальнейшей работы с белковыми молекулами и пептидами тканей морских гидробиентов Антарктического региона.

Obtaining target protein fractions from marine organisms of Antarctic Region.

D. Gladun, T. Vovk, N. Raksha, A. Savchuk, L. Ostapchenko.

Abstract. Antarctic region has a great diversity of species, among them there are representatives that outline practical for Biotechnology some interest from the point of view of production of biologically active substances with the possibility of their further use for the creation of pharmaceuticals. Animal tissue Antarctic region have a wide range of proteins and peptides. The molecules of protein nature, having mechanisms directed action, that is, the enzymes of different specificity - are of particular interest to researchers. In this paper describes the development and application of methodological approaches for further work and to protein molecules and peptides tissues of marine aquatic Antarctic region.

Keywords: Antarctic region, aquatic organisms, proteins, peptides

1. Вступ

Сучасна біотехнологія та фармацевтика потребують постійного пошуку біологічно активних речовин, особливо молекул з направленою дією, наприклад, ферментів різної специфіки. Препарати, які можна створити на основі таких молекул, дуже перспективні, оскільки становлять певну діагностичну та клінічну цінність. Субстанції, створені на основі білкових молекул, можуть бути використані в академічній науці та практиці для вивчення

різноманітних білок-білкових взаємодій. Пошук альтернативних джерел біологічно активних речовин обумовлений також постійно зростаючою ціною на препарати такого типу. Серед метаболітів морських гідробіонтів були ідентифіковані такі біологічно активні речовини, як нуклеозиди, нереізтоксин, еледозин, тритерпенові глікозиди та багато інших субстанцій з різним спектром дії. У літературі представлено дані про успішну практику створення й застосування в багатьох галузях промисловості та медицини препаратів білкової природи з антарктичних гідробіонтів (Быкова, Шуст, Немцев, 2008). Враховуючи перспективність даного напрямку досліджень, у першу чергу привертають інтерес розробка та вдосконалення методологічних підходів для роботи з білковими молекулами та пептидами, які можна отримати з тканин морських антарктичних гідробіонтів.

2. Матеріали та методи

Кількість білка визначали за методом Бредфорд, що базується на здатності білків зв'язуватися з кумасі діамантовим синім G-250 (M. Bradford, 1976) Електрофоретичне розділення проводилось у 10% поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію згідно з методикою (Laemmli, 1970). Якщо концентрація білка в препараті низька (від 0,2 до 0,5 мг/мл), то для отримання чіткої картини в ПААГ застосовують метод концентрування зразків за допомогою ТХО (Дарбре, 1989). Низькомолекулярні пептиди отримували шляхом додавання до зразка досліджуваного біологічного об'єкта, який знаходиться в рідкому стані, такого ж об'єму 1,2 М хлорної кислоти з подальшим центрифугуванням протягом 15–20 хв. при 5000–9000 г. Надосад відділяли та нейтралізували 2 М K_2CO_3 (Н. Габриэлян, 1985). Для очищення розчинів білків від небілкових домішок та заміни одного буфера на інший використовували хроматографію, що поділяє за розмірами, в якості ж носія використовували сефадекс G 25 (Amersham Pharmacia Biotech AB, 2001). Для отримання у досліджуваних зразках фракції глікопротеїдів нами було використано афінну хроматографію на конконовалін А-сефарозі. У якості носія використовували конконовалін А-сефарозу 4В, робочий буфер 20 мМ трис-НСІ, 0,5 М NaCl, 1 мМ $MnCl_2$, 1 мМ $CaCl_2$, рН 7,4, для елювання фракції глікопротеїдів – 20 мМ трис-НСІ, 0,5 М NaCl, рН 7,4 (Н. Tsumogi, 1983). Статистична обробка отриманих результатів здійснювалась за методами варіаційної статистики за допомогою комп'ютерних програм Origin 7.0, TotalLab 2.04 (Гланц, 1999; Лопач, 2000).

3. Результати та обговорення

Спираючись на результати досліджень, проведених минулого року, ми проаналізували певний білковий спектр у деяких зразках морських гідробіонтів з Антарктичного регіону, а саме: крилю (*Euphausia superba*); морської зірки (*Odontaster validus*); немертини (*Parborlasia corrugatus*). На відміну від попередніх досліджень, де ми застосовували диференційне осадження та осадження хлорною кислотою, у даній роботі для отримання з метою подальшого аналізу первинного матеріалу (білкового складу) з тканин дослідних зразків було використано новий методологічний підхід. Особливості цього підходу – використання рідкого нітрогену та певного екстрагуючого буфера, який досить добре себе зарекомендував у попередніх дослідженнях, пов'язаних з отриманням білкового матеріалу з мохів та лишайників.

Тканини відповідного гідробіонту гомогенізували з додаванням рідкого нітрогену та екстрагуючого буфера – 0,1 М Na-фосфатного буфера, який містив 0,15 М NaCl, 0,15 мМ ЕДТА, 0,1% Тритон X-100. На кожні 10 грамів матеріалу додавали 5 мл екстрагуючого буфера. Гомогенізацію проводили протягом 60 с за кімнатної температури. Після перенесення гомогенату в центрифужну пробірку додавали на кожні 10 мл гомогенату 10 мкл 0,3 М розчину інгібітору протеїназ – ПМСФ. Гомогенати центрифугували протягом 20 хв. зі швидкістю 10 000 об/хв. при 4 °С. Після центрифугування супертанант відбирали, розфасо-

ували у флакони по 5–10 мл та ліофілізували за допомогою ліофільної сушарки. Отриманий таким чином первинний матеріал може досить довго зберігатися при температурі -20°C , а білки та пептиди, що знаходяться в ньому, не втрачають функціональних властивостей.

Наступним етапом роботи було здійснення електрофоретичного аналізу отриманого матеріалу за допомогою методів одновимірного диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію та двовимірного електрофорезу в денатуруючих умовах. На рис. 1 представлено результати електрофоретичного аналізу зразків: крилю – *Euphausia superba*; морської зірки – *Odontaster validus*; немертини – *Parborlasia corrugatus*.

Якісний обрахунок отриманих електрофореграм за допомогою програми TotalLab дозволив довести наявність у досліджуваних зразках мажорних білкових фракцій з різною молекулярною масою в діапазоні від 150 до 1 кДа:

криль – 126, 116, 100, 96, 85, 73, 62, 52, 42, 29, 25, 22, 3 кДа;

морська зірка – 147, 124, 114, 112, 108, 103, 95, 78, 59, 48, 39, 33, 27, 23, 18, 11 кДа;

немертина – 149, 123, 120, 116, 111, 108, 101, 88, 76, 67, 54, 47, 42, 36, 30, 26, 25, 15 кДа.

Отримані дані показують, що в досліджуваних об'єктах присутні білки з широким діапазоном молекулярних мас. Це, в свою чергу, свідчить про наявність у цих зразках білків з різною функціональною здатністю, особливо це стосується білків, молекулярна маса яких становить 50 кДа і нижче. Дане твердження можливе, тому що є певні теоретичні припущення, підкріплені практичними експериментами, де показано, що білкам з молекулярними масами, нижчими за 50 кДа, притаманні різноманітні функціональні активності, а певні їх фрагменти також мають активності, які іноді не відповідають активностям цілої білкової молекули.

Також представляє певний практичний інтерес аналіз пулу пептидних молекул у досліджуваних зразках гідробіонтів. Цей інтерес пов'язаний з тим, що зараз у біохімії білків та пептидів існує певна теорія про пептидні пули, що існують в організмі. Компоненти цих пулів беруть участь у регуляції нервової, імунної, ендокринної та інших систем. Наявність певних екзогенних пептидів, яким притаманна направлена активність, може сприяти їх застосуванню в корекції деяких патологічних станів організму та в діагностиці.

Для отримання фракцій пептидів, молекулярна маса яких нижча за 5 кДа, ми застосували осадження за допомогою хлорної кислоти первинних зразків. До 10 мл гомогенату досліджуваного зразка додавали такий же об'єм 1,2 М хлорної кислоти. Суміш залишали на 10 хв, після чого центрифугували протягом 15–20 хв при 5000–9000 g. Надосад видаляли та нейтралізували 2 М K_2CO_3 (з розрахунку 0,2 мл на 1 мл надосаду). Після додавання K_2CO_3 проби залишали на льоду протягом 15–20 хв та знову центрифугували 15–20 хв при 2500–3000 g. Після центрифугування до надосаду додавали 96% етанол (об'ємне співвідношення 4:1) та залишали на 10 хв. Осад, що утворився, видаляли центрифугуванням протягом 10–15 хв при 2500–3000 g. Надосад використовували для якісного та кількісного аналізу пептидної фракції. Кількісний аналіз показав наступні результати: для *Euphausia superba* пептидна фракція з молекулярною масою до 5 кДа в середньому складає $1,9 \pm 0,3$ мг/г зразка; для *Odontaster validus* – $1,7 \pm 0,2$ мг/г зразка; для *Parborlasia corrugatus* – $2,4 \pm 0,6$ мг/г зразка.

Враховуючи, що молекулярна маса досліджуваних пептидів менша за 5 кДа, ми користувались 18% поліакриламідним гелем, який дозволяє аналізувати білкові молекули в діапазоні від 10 до 0,5 кДа. Зразки супернатанту досліджуваних гідробіонтів висушували в ліофільній сушарці, що давало змогу їх сконцентрувати, розчиняли в буфері для отримання електрофоретичних зразків та досліджували за допомогою методу диск-електрофорезу. На рисунку 2 представлено результати даних досліджень.

На наступному етапі роботи ми здійснювали хроматографічне розділення первинного матеріалу досліджуваних гідробіонтів на колонці з конконовалін А-сефарозою 4В для отримання фракції глікопротеїдів. Для цієї хроматографії ми також розчиняли у 2 мл дистильованої води ліофільно висушений первинний матеріал та переводили його в 50 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7.4, за допомогою хроматографії на сефадексі G 25. 2 мл фракції

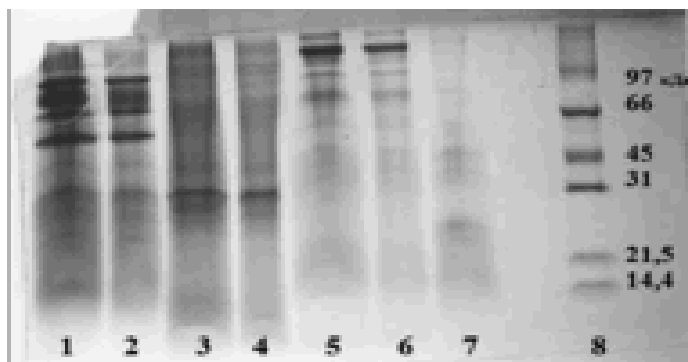


Рис. 1. Електрофореграма розділення зразків досліджуваних гідробіонтів: 1-2 – зразки тканин немертин; 3-4 – зразки тканин креветок; 5-7 – зразки тканин морської зірки; 8 – маркери молекулярних мас.

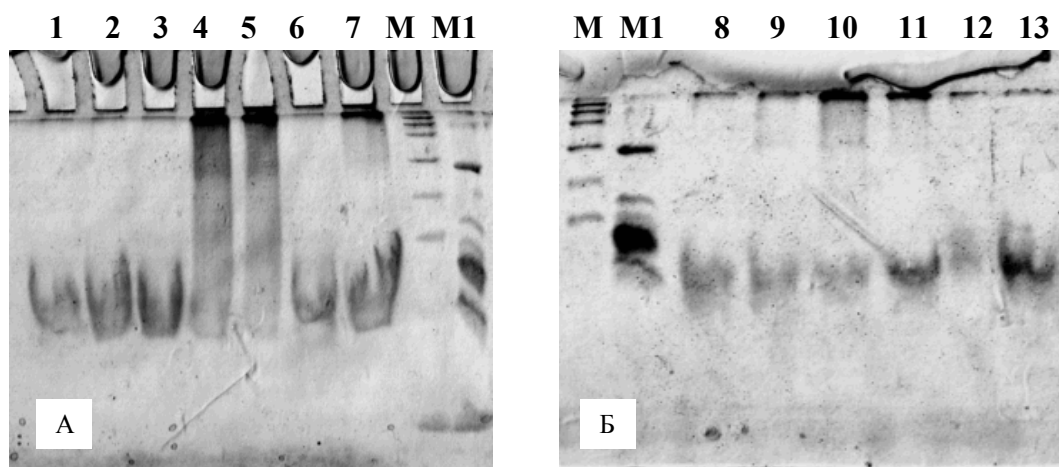


Рис. 2. Електрофореграма пептидної фракції крилю (А), немертини (А, Б), морської зірки (Б): 1-3 – зразки крилю; 6-10 – зразки немертин; 11-13 – зразки морської зірки. М – маркери молекулярної маси (94, 67, 43, 30, 20, 14,4 кДа), М1 – маркери молекулярної маси (26.6, 16.9, 14.4, 6.5, 3.4, 1.4 кДа).

наносили на сефадекс G 25, урівноважений 50 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7.4, зі швидкістю 10 мл/хв. Зону виходу білкової фракції та зміни кондуктивності контролювали за допомогою УФ- та кондуктометричного датчиків.

На колонку з конконовалін А наносили 5 мл білкової фракції та відмивали неспецифічно зв'язані білки 20 мМ трис-НСІ буфером, що містив 0.5 М NaCl, 1 мМ MnCl₂, 1 мМ CaCl₂, рН 7.4. Елюцію фракції глікопротеїдів проводили за допомогою 20 мМ трис-НСІ, 0.5 М NaCl, рН 7.4, що містить 0.3 М methyl- α -D-glucopyranoside (methyl- α -D-glucoside). Швидкість усіх кроків хроматографічного процесу становила 0,2 мл/хв. Зміну оптичного поглинання реєстрували за допомогою УФ-датчика при довжині хвилі 280 нм. Результати хроматографічного розділення показано на рис. 3.

Отриману фракцію глікопротеїдів було проаналізовано на вміст білка та на якісний склад методом диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (рис. 4). Вимірювання вмісту загального білка у фракції глікопротеїдів дало наступні результати: криль – $1,9 \pm 0,1$ мг/г зразка, немертини – $1,2 \pm 0,2$ мг/г зразка, морська зірка – $1,3 \pm 0,3$ мг/г.

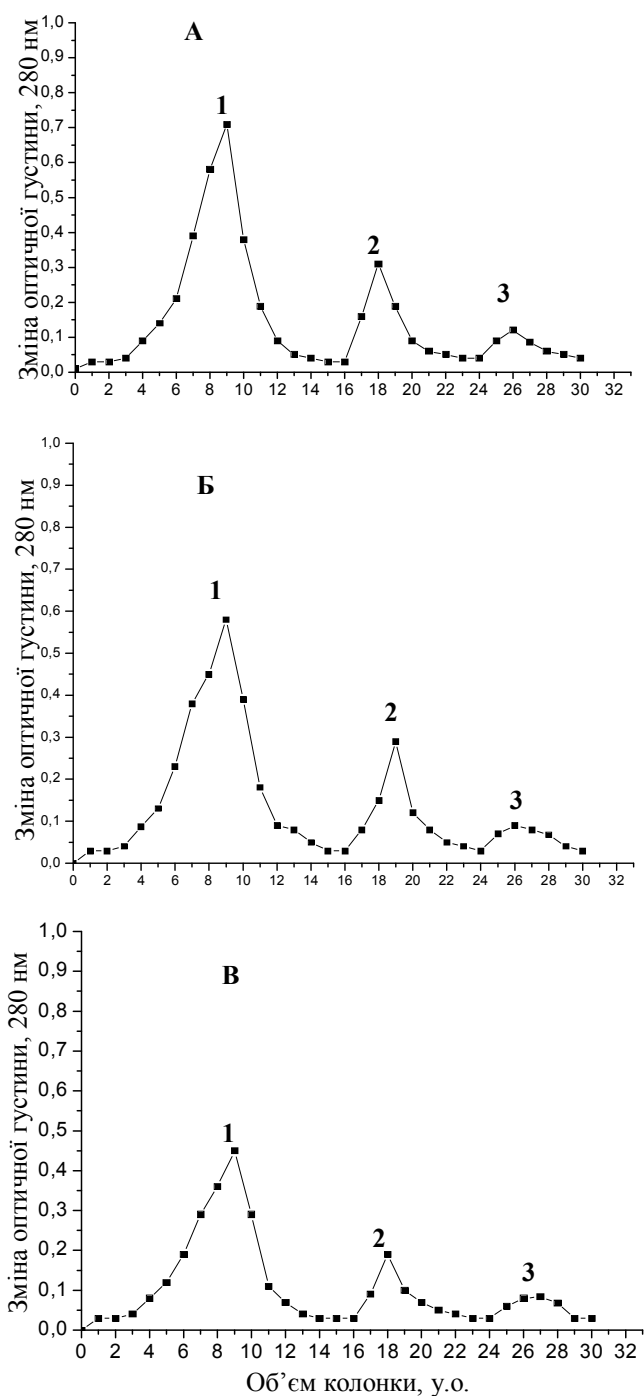


Рис. 3. Хроматограма розділення білкової фракції досліджуваних зразків на колонці з конконовалін А-сефарозою (А – криль (*Euphausia superba*); Б – немертини (*Parborlasia corrugatus*); В – морська зірка (*Odontaster validus*)) : 1 – незв'язаний матеріал; 2 – фракція глікопротеїдів; 3 – фракція, що елюювалась 0,5 М NaOH.

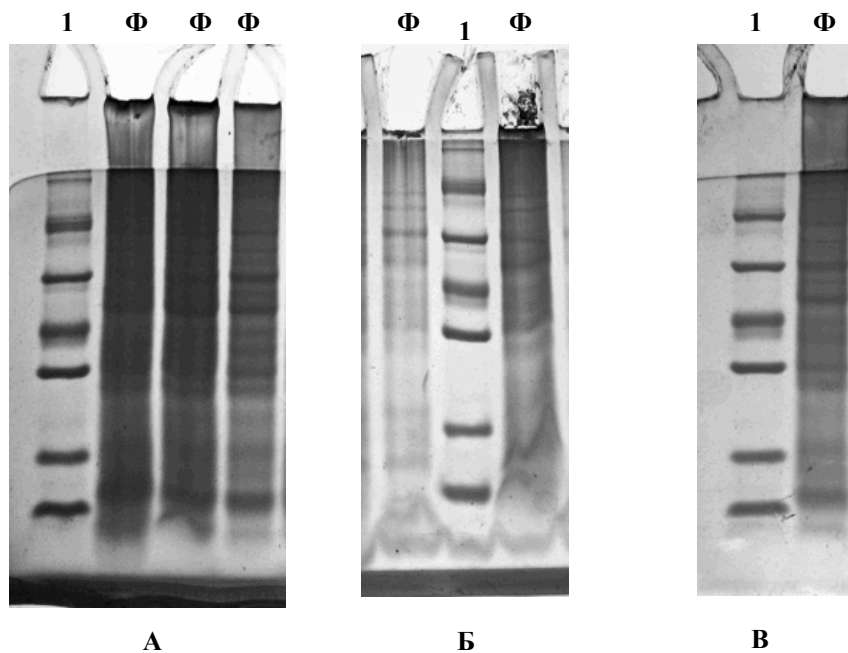


Рис. 4. Електрофореграма фракції глікопротеїдів, отриманої з крилю (А), немертин (Б), морської зірки (В) після хроматографії на конконовалін А-сефарозі: 1 – маркери молекулярної маси (96, 67, 43, 30, 20, 14 кДа); Ф – трипсиноподібная фракція у досліджуваних зразках.

Отримані результати показують присутність у досліджуваних зразках певної кількості глікопротеїдів різної молекулярної маси. Різноманіття цих білків дозволяє планувати подальші дослідження, які можуть бути здійснені у двох напрямках. Перший: порівняння окремих фракцій білків та пептидів з аналогічними фракціями інших тварин, не обов'язково морських гідробіонтів, з тими об'єктами, що мешкають в Антарктиці.

Другий напрямок суто практичний – це пошук серед цього різноманіття білків цільових молекул направленої дії для розробки біотехнологічних продуктів.

Отримана інформація про знаходження в досліджуваних зразків перерахованих вище білкових молекул, що дає підстави для подальшого, більш поглибленого аналізу та очистки окремих білкових молекул з метою знаходження серед них перспективних об'єктів біотехнологічних розробок. Апробовано та підібрано сучасні методологічні підходи до отримання фракцій білків та пептидів з *Euphausia superba*; *Odontaster validus*; *Parborlasia corrugatus*, що можуть бути перенесені як на аналогічні антарктичні організми, так і на весь спектр біологічних організмів з цього регіону, які мають певних біотехнологічний інтерес.

4. Висновки

Отримані результати засвідчують наявність у досліджуваного об'єкта білкових молекул та пептидів, які можуть стати в майбутньому комерційно успішними та виробничо вигідними біотехнологічними продуктами. Розроблено методологічні підходи, які дозволяють успішно отримувати з морських антарктичних організмів білкові молекули і пептиди та працювати з ними. Доведено існування можливості застосовувати та оптимізувати дані методи в роботі з біологічним матеріалом рослинного і тваринного походження. Оптимізація методик з максимального збереження властивостей та активності

Д.В. Гладун: ОТРИМАННЯ ЦІЛЬОВИХ БІЛКОВИХ ФРАКЦІЙ З МОРСЬКИХ ГІДРОБІОНТІВ ...

білкових молекул при отриманні їх з тканин антарктичних гідробіонтів є перспективним напрямком подальшої роботи.

Автори висловлюють подяку Національному антарктичному науковому центру Державного комітету України з питань науки, інновацій та інформатизації за надання зразків для досліджень і за підтримку.

Література

1. **Быкова В.М., Шуст К.В., Немцев С.В.** Перспективы возрождения отечественного промысла и переработки антарктического криля. // **Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.** –2008. – Т.4. – № 1.– С. 39–43.
2. **Габриэлян Н.И., Левицкий Е.Р., Дмитриев А.А.** // М.: Медицина, 1985. – 18 с.
3. **Гланц С.** Медико-биологическая статистика // Практика : М., 1999. – 459 с.
4. **Дарбре А.** // Практическая химия белка. – М.: Мир, 1989. 623 с
5. **Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н.** // Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2000. – 320 с.
6. **Affinity Chromatography.** Principles and Methods // Amersham Pharmacia Biotech AB, 2001. P. 89–96.
7. **Bradford M.** // Analytical Biochemistry. – 1976. – V. 86. – P. 193–200.
8. **Hideaki Tsumori, Atsunari Shimamura and Hidehiko Mukasa** // Purification and Properties of Extracellular Glucosyltransferases from Streptococcus mutans Serotype a. Journal of General Microbiology. – 1983. – V. 129/ – P.3251–3259.
9. **Laemmli K.** / Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.