

УДК 595.3.574

ВИКОРИСТАННЯ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ ЕКСПРЕС-АНАЛІЗУ БІЛКІВ МОРСЬКИХ ГІДРОБІОНТІВ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ

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

Навчально-науковий центр «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601, Україна, e-mail: nkudina@ukr.net

Апробовано кілька методологічних підходів (на прикладі *Odontaster validus* та *Euphausia superba*), які дозволяють здійснити комплексний експрес-аналіз зразків тканин морських гідробіонтів з метою встановлення якісного складу білкових фракцій та виявлення ферментативно-активних молекул. Проведений нами підбір методів дозволяє рекомендувати їх для аналізу білкового складу інших організмів Антарктичного регіону, що становлять певний біотехнологічний інтерес.

Использование электрофоретических методов для экспресс-анализа белков морских гидробионтов Антарктического региона

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

Реферат. Апробированы несколько методологических подходов (на примере *Odontaster validus* и *Euphausia superba*), которые позволяют проводить комплексный экспресс-анализ образцов тканей морских гидробионтов с целью идентификации качественного состава белковых фракций и выявления ферментативно-активных молекул. Проведенный нами подбор методов позволяет рекомендовать их для анализа белкового состава других организмов Антарктического региона, которые представляют определенный биотехнологический интерес.

Use of electrophoretic methods for the rapid analysis of proteins of Antarctic region marine organisms

N.G. Raksha, D.V. Gladun, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko

Abstract. Several methodological approaches for integrated rapid analysis of tissue samples of marine organisms on an example of *Odontaster validus* and *Euphausia superba* were tested. These methods can be recommended for analysis of the protein composition and enzymatic activity of tissue samples from other organisms of Antarctic region that represents a specific biotechnological interest.

Key words: Antarctic marine organisms, proteins, enzyme, - 2D, - PAAG-electrophoresis.

1. Вступ

Серед нагальних потреб сучасної біохімії в галузі біомедичних досліджень особливо гостро постає проблема пошуку нових джерел біологічно-активних сполук як основи для розробки оригінальних та ефективних фармакологічних препаратів. Гострий дефіцит сировини для фармацевтичної індустрії і відповідно постійно зростаюча ціна на нові лікарські засоби, основу яких становлять досить коштовні біологічно-активні речовини рослинного та тваринного походження, а також переоцінка традиційних підходів до експлуатації багатств Світового океану привернули увагу дослідників до морських гідробіонтів, які є фактично необмеженим ресурсом для створення нових фармакологічних препаратів (Быкова и др., 2008, Воробьев и др., 2008, Allen et al., 2009). У результаті систематичного дослідження морських організмів серед продуктів їх життєдіяльності було виявлено метаболіти різної

хімічної природи, які володіють широким спектром біологічної активності, а саме – виявляють антибактеріальну, протигрибкову, антивірусну, антизапальну, імуномодулюючу, протипухлинну, протиапоптотичну, антикоагулянтну, антитромбоцитарну дію (Glaser et al., 2009, Li et al., 2009).

Окремо слід виділити біотехнологічні продукти білкової природи – це, власне, білки й особливо пептиди, які нині позиціонуються як «біологічно активні молекули направленої дії» (Хавинсон и др., 2010). Отримання даного класу біотехнологічних препаратів суттєво обмежується сировинною базою, яка повинна відповідати певним критеріям, і це перш за все якість, стабільність, кількість та дешевизна. Тому в даному сегменті розробки нових біотехнологічних продуктів особливо перспективним є пошук нових джерел сировини серед представників морських гідробіонтів. Слід відзначити, що з року в рік інтерес до препаратів білкового походження, створених на основі антарктичних організмів, стабільно зростає, з'являється багато рекомендацій, розробок та наукових публікацій щодо перспективності впровадження нових технологій виробництва біотехнологічних продуктів на основі білків та пептидів, отриманих під час переробки основної сировини не лише як цільовий, а й як побічний продукт (Allen et al., 2009, Li et al., 2009, Sarkar et al., 2010).

Зважаючи на рентабельність, розповсюдженість та відтворюваність морських біоресурсів, тенденції щодо їх активного використання в медицині, косметології, харчовій промисловості, агропромисловій галузі порівняно з традиційними джерелами сировини будуть посилюватись. Саме тому оптимізація вже існуючих методологічних підходів та розробка індивідуальних методів одержання, очистки й тестування білкових і пептидних молекул з антарктичних організмів з метою їх подальшого впровадження у біотехнологічне виробництво може стати одним з пріоритетних напрямків науково-технологічного розвитку в галузі медицини та біології.

2. Матеріали і методи дослідження

Зразки тканин антарктичних гідробіонтів морської зірки *Odontaster validus* та крилю *Euphausia superba* гомогенізували в рідкому нітрогені з використанням екстрагуючого буфера. Одновимірний електрофорез у поліакриламідному гелі проводили згідно з методикою Лемлі (Laemmli, 1970). Двовимірний (2Д) електрофорез здійснювали відповідно до стандартного протоколу (Westermeyer et al., 2005, Rabus et al., 2012). Ензим-електрофорез проводили згідно з методикою (Ostapchenko et al., 2011). Аналіз одержаних електрофореграм здійснювали з використанням програми TotalLab 2.04. Електрофореграми, представлені на рисунках, є типовими для серії повторних дослідів (щонайменше три в кожній серії).

3. Результати та їх обговорення

Зростаючий попит на препарати, створені на основі білкових та пептидних молекул, нерентабельність використання традиційних джерел сировини, а також відсутність глобальних фундаментальних досліджень щодо виділення, очистки та оцінки впливу окремих білкових компонентів гідробіонтів Антарктичного регіону на перебіг окремих біохімічних процесів в організмі людини та тварин створює досить привабливі передумови для розробки й тестування біотехнологічних продуктів білкової природи з антарктичних організмів.

Перший етап нашої роботи було присвячено апробації нового методологічного підходу до одержання первинного матеріалу з тканин досліджуваних об'єктів для подальшого аналізу білкового складу. Даний метод базується на одночасному використанні рідкого нітрогену та екстрагуючого буфера й досить добре зарекомендував себе у дослідженнях, пов'язаних з отриманням білкового матеріалу з мохів і лишайників. Тканини морських гідробіонтів з Антарктичного регіону, зокрема, крилю *Euphausia superba* та морської зірки *Odontaster validus*, гомогенізували з послідовним додаванням рідкого нітрогену та

екстрагуючого буфера (0,1 М Na-фосфатний буфер, що містив 0,15 М NaCl, 0,15 мМ ЕДТА, 0,1% тритон Х-100 з розрахунку 5 мл екстрагуючого буфера на кожні 10 грам матеріалу). Після центрифугування проб (10000 г при 4 °С, 20 хв.) надосадову рідину відбирали та ліофілізували для оптимізації умов зберігання.

З метою якісного аналізу білкового складу ми проводили електрофоретичний поділ білків зразків тканини крилю та морської зірки за допомогою методу одновимірного диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію. Використання концентруючого гелю дозволило ефективно розділяти білки у діапазоні молекулярних мас від 10 до 150 кДа, що цілком відповідало вимогам експерименту, а можливість у рамках даної системи варіювати щільність поліакриламідного гелю дала змогу досягти максимально ефективного поділу. Електрофорез проводили в камерах для вертикального гель-електрофорезу (BioRad, США) у пластинах товщиною 1 мм за сили струму 19 мА для концентруючого та 35 мА для розділюючого гелів. Гелі фіксували в розчині 7,5% оцтової кислоти, 37,5% ізопропілового спирту впродовж 10 хв. та фарбували в розчині, що містив 2,5% Coomassie Brilliant Blue G 250, 10% етанол, 10% оцтову кислоту та 15% ізопропанол. Як маркери для одновимірного електрофорезу використовували LMW Calibration Kit (BioRad, США), до складу якого входять білки з молекулярними масами: 97, 66, 45, 31, 21,5, 14,4 кДа. У випадку ензим-електрофорезу як маркери використовували трипсин (24 кДа), плазмін (36 і 84 кДа) та колагеназу (120 кДа).

На рис. 1 представлено типову електрофореграму розділення зразків тканин крилю та морської зірки. Як видно з наведених результатів, досліджувані зразки характеризуються широким спектром білкових молекул, що різняться за молекулярними масами. Проведений нами якісний аналіз електрофореграм з використанням програми TotalLab виявив присутність у досліджуваних зразках мажорних білкових фракцій, молекулярна маса яких знаходиться в діапазоні від 3 до 130 кДа. (Рис. 1–4 див. на кольоровій вклейці 4.)

Так, у зразках тканин крилю показано присутність 13 білкових фракцій з молекулярними масами від 3 до 126 кДа, зокрема, 3, 24, 25, 29, 42, 52, 62, 73, 85, 96, 100, 116, 126 кДа, а для зразків тканин морської зірки виявлено 15 смуг білків – 11, 18, 23, 27, 33, 39, 48, 59, 78, 95, 103, 108, 112, 114, 124 кДа.

Інтенсифікація використання біологічних ресурсів Світового океану, зокрема, метаболітів морських гідробіонтів, для потреб фармакології, косметології, медицини та сільського господарства обумовлює актуальність розробки та впровадження індивідуальних методів очистки й виділення цільових молекул з тканин гідробіонтів. Тому для одержання більш детальної інформації про склад білкових фракцій у проаналізованих об'єктах морського генезу ми проводили двовимірний електрофорез зразків, зокрема, тканин крилю. Даний методичний підхід дозволяє розділяти білки не лише за молекулярними масами, а й відповідно до їх ізоелектричної точки. Застосування двовимірного гель-електрофорезу за умов нашого експерименту особливо доцільне з огляду на те, що зразки тканин гідробіонтів – це складна суміш різноманітних білкових молекул та пептидів. Тому при використанні лише одновимірного електрофорезу деякі білкові зони можуть перекриватися. Електрофоретичне розділення в другому напрямку забезпечує більш повне розділення досліджуваних білкових фракцій, що є особливо важливим, беручи до уваги перспективність використання морських гідробіонтів як джерела біологічно активних сполук та створення на їх основі нових лікарських засобів направленої дії.

Перший напрямок двовимірного електрофорезу – ізоелектрофокусування здійснювали на 7-сантиметрових стріпах поліакриламідного гелю Immobiline DryStrip Gels з нанесеним градієнтом рН 3,0–10,0. Стрипи регідрували в DeSteak Rehydration Solution упродовж 12 годин, після чого наносили досліджуваний зразок та проводили ізоелектрофокусування при напрузі 10000 В упродовж 6–8 годин. Для проведення електрофорезу у другому напрямку стріпи переносили на пластини поліакриламідного гелю відповідної щільності (4–20%). Розділення білків за молекулярними масами відбувалося при напрузі 400 В та силі струму, що дорівнювала 100–200 мА на один трек. Всі операції здійснювали при температурі 4–6°С.

Візуалізацію плям білків проводили у відповідності з аналогічною процедурою за одновимірною електрофорезу.

На рис. 2 наведено типову 2Д-електрофореграму розділення зразків тканин крилю. Згідно з одержаними результатами, застосування методу двовимірною електрофорезу дозволяє виявити значно більше індивідуальних білків, у тому числі й мінорних, порівняно з результатами одновимірною диск-електрофорезу.

Таким чином, аналіз білкового складу з використанням методу 2Д-електрофорезу можна рекомендувати як один з ключових інструментів для системного опису окремих білків та створення фінгерпринтових карт багатокomпонентних білково-пептидних сумішей з морських гідробіонтів для подальшого протеомного аналізу.

Стрімке зростання попиту на використання ферментних препаратів як у промисловості, так і в фармакології й медицині актуалізує проблему пошуку нових економічно обґрунтованих природних джерел сировини і розробку нових ефективних підходів до швидкого скринінгу та виділення цільових молекул з вираженою ферментативною активністю. Оскільки морські організми за вмістом ряду ферментів, зокрема, класу гідролаз, значно переважають наземних теплокровних, їх можна розглядати як перспективну сировинну базу.

З огляду на вищевикладене, наступним етапом нашої роботи було виявити присутність у досліджуваних зразках активних гідролаз. Для досягнення поставленої мети ми проводили електрофоретичне розділення зразків тканин гідробіонтів з подальшою ідентифікацією активних форм ферментів методом ензим-електрофорезу. Особливість даного методичного підходу полягає в тому, що в розділюючий гель заполімеризовують субстратні білки. Для встановлення найбільш оптимальних загальних субстратів для гідролаз морських гідробіонтів ми використовували желатин і фібриноген з розрахунку 1 мг/мл. Концентрація розділюючого гелю не нижче 12% унеможливила міграцію заполімеризованих у гель субстратних білків. Після закінчення електрофоретичного розділення для видалення залишків додецилсульфату натрію гель відмивали у 2,5% розчині тритону X-100 впродовж години. Після чого пластини залишали у 50 мМ трис-НСІ буфері, рН 7,4, на 10–12 годин для проявлення в аналізованих зразках ферментативної активності. Подальшу фіксацію та фарбування гелів здійснювали відповідно до стандартної методики диск-електрофорезу. Чутливість методу становила менше 0,01 МО гідролази на трек.

Аналіз досліджуваних зразків тканин крилю *Euphausia superba* та морської зірки *Odontaster validus* за присутності в якості субстрату фібриногену та желатину дозволив отримати наступні результати, які наведено відповідно на рис. 3 та 4.

Враховуючи досить широкий діапазон встановлених нами молекулярних мас білків, можна стверджувати, що досліджувані зразки містять молекули з різною функціональною активністю, особливо це стосується білків, молекулярна маса яких складає 50 кДа або нижче. Білки, що мають молекулярну масу нижче 50 кДа, з огляду на певні теоретичні уявлення та ряд експериментальних підтверджень характеризуються різноманітними функціональними активностями. Більше того: окремі їх фрагменти, обумовлені протеолітичною деградацією вихідної молекули, можуть володіти активностями, нетиповими для цілої білкової молекули.

Поява в площині гелю активних зон переконливо свідчить про наявність у досліджуваних зразках гідробіонтів певної кількості активних гідролаз різної молекулярної маси. Візуальний аналіз одержаних електрофореграм дозволяє зробити висновок про вищу активність гідролаз щодо желатину як субстрату. Подібна картина характерна як для зразків тканин морської зірки, так і для зразків крилю, причому гідролази крилю порівняно з ферментами морської зірки виявились дещо активнішими.

Для точного визначення молекулярних мас ідентифікованих нами активних ферментів електрофореграми було обраховано з використанням програми TotalLab. У випадку використання в якості субстрату фібриногену було показано присутність активних зон з чітко вираженою ферментативною активністю лише в області, що відповідає 60 кДа для морської зірки та 21 кДа – для крилю.

З огляду на одержані результати можна стверджувати, що желатин є більш прийнятним субстратом для гідролаз аналізованих гідробіонтів, оскільки ензим-електрофорез з заполімеризованим желатином виявив значно більше активних зон, ніж за використання фібриногену. Також варто відзначити такий факт: серед виявлених зон є й ті, що були ідентифіковані ензим-електрофорезом з фібриногеном. Це активні зони в межах 60 і 21 кДа, відповідно для зразків тканин морської зірки і крилю. У цілому для морської зірки показана присутність 6 смуг, які відповідають ферментам з молекулярними масами 28, 46, 57, 85, 95, 109 кДа. У зразках тканин крилю ідентифіковано 9 активних зон з молекулярними масами 17, 25, 38, 57, 69, 89, 98, 108, 118 кДа.

Узагальнення результатів використання електрофоретичних методів для аналізу білків морських гідробіонтів Антарктичного регіону наведено в таблиці.

Таблиця

Кількість білкових фракцій у зразках тканин морських гідробіонтів при використанні різних електрофоретичних методів

Метод	Морська зірка <i>Odontaster validus</i>	Криль <i>Euphausia superba</i>
Одновимірний електрофорез	15	13
Двовимірний електрофорез	–	близько 50
Ензим-електрофорез з фібриногеном у якості субстрату	1	1
Ензим-електрофорез з желатином у якості субстрату	6	9

Систематизуючи представлені дані, для одержання первинної інформації про білковий спектр аналізованих зразків можна рекомендувати застосування одновимірного диск-електрофорезу, в той час як детальніша оцінка білкових продуктів генної експресії певного об'єкта, виявлення конкретних мінорних білків чи окремих ізоформ потребує залучення протеомних технологій, зокрема, двовимірного електрофорезу. За потреби аналізу загальної ензиматичної активності доцільним є використання ензим-електрофорезу, причому застосування желатину в якості субстрату більш оптимальне.

Таким чином, застосований нами комплексний підхід з використанням методів одно- і двовимірного електрофорезу та ензим-електрофорезу дозволяє провести швидкі скринінгові дослідження зразків тканин гідробіонтів з метою встановлення якісного складу білкових фракцій та відтестувати проби на предмет наявності загальної ферментативної активності. Одержані нами результати свідчать про перспективність проведення подальших, більш поглиблених досліджень в напрямку виділення, очистки та характеристики окремих індивідуальних білкових молекул з метою знаходження серед них перспективних об'єктів біотехнологічних розробок і створення на їх основі нових біотехнологічних продуктів.

Список літератури

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. **Воробьев В.В.** Создание биоактивных фармакологических субстанций и лекарственных средств из морских гидробионтов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2008, Т. 4, № 1. – С. 33–39.
3. **Хавинсон В.Х., Рыжак Г.А.** Пептидная регуляция основных функций организма // Вестник Росздравнадзора. – 2010. – № 6. – С. 58–62.

4. **Allen M.J., Jaspars M.** Realizing the potential of marine biotechnology: Challenges & Opportunities. *Industrial Biotechnology*. – 2009. – Vol. 5(2). – P. 77–83.
5. **Electrophoresis in Practice**, 4th, Revised and Updated Edition. – Westermeier R. – Wiley-Blackwell, 2004, 426 p.
6. **Glaser K.B., Mayer A.M.** A renaissance in marine pharmacology: from preclinical curiosity to clinical reality. *Biochemical Pharmacology*. – 2009. – Vol. 78(5). – P. 440–448.
7. **Laemmli K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / Laemmli K. // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, № 1. – P. 680–685.
8. **Li J.W.H., Vederas J.C.** Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? – *Science*. – 2009. – Vol. 325(5937). – P. 161–165.
9. **Rabus R.** An overview of 2D DIGE analysis of marine (environmental) bacteria // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 854. – P. 355–372.
10. **Sarkar S., Pramanik A., Mitra A.** et al. // *Bioprocessing Data for the Production of Marine Enzymes*. – *Mar. Drugs*. – 2010, № 8. – P. 1323–1372.