

УДК 595.3.574

## МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ ФРАКЦИИ ТРИПСИНОПОДОБНЫХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ (НА ПРИМЕРЕ АНТАРКТИЧЕСКОГО КРИЛЯ)

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

*НИЦ Институт биологии Киевского национального университета имени Тараса Шевченко,  
пр. Глушкова, 2, г. Киев, 03022, Украина, gladunk91@gmail.com*

Стремительное развитие биотехнологии и фармакологии наших дней так или иначе связано с целенаправленным поиском биологически активных веществ в тканях самых разных организмов, в том числе и антарктических морских гидробионтов. Данная группа организмов привлекает внимание исследователей за счет того, что является разумной альтернативой классическим видам сырья из-за своей дефицитности, а также наличия разнообразного белкового состава. Перспективным направлением является создание фармакологических препаратов на основе белков, выделенных из тканей антарктических гидробионтов. Особый интерес вызывает возможность получения молекул направленного действия – ферментов различной специфичности. В нашей работе представлена разработка методических подходов для выделения и тестирования фракции трипсиноподобных ферментов из тканей антарктического криля (*Euphausia superba*).

### Методичні підходи до отримання фракції трипсиноподібних ферментів з морських гідробіонтів (на прикладі антарктичного крилю).

Д.В. Гладун, О.Н. Савчук, Л.І. Остапченко

**Реферат.** Нинішній стрімкий розвиток біотехнології та фармакології так чи інакше пов'язаний з цілеспрямованим пошуком біологічно активних речовин у тканинах різноманітних організмів, у тому числі й антарктичних морських гідробіонтів. Дана група організмів привертає увагу дослідників за рахунок того, що є розумною альтернативою класичним видам сировини, а також завдяки наявності різноманітного білкового складу. Перспективним напрямком є створення фармакологічних препаратів на основі білків, виділених з тканин антарктичних гідробіонтів. Особливий інтерес викликає можливість отримання молекул спрямованої дії – ферментів різної специфічності. У нашій роботі представлено розробку методичних підходів до виділення і тестування фракції трипсиноподібних ферментів з тканин антарктичного крилю (*Euphausia superba*).

**Abstract.** The rapid development of biotechnology and pharmacology of the our days, one way or another, related to the targeted search of biologically active substances in the tissues of a wide variety of organisms, including the antarctic marine organisms. This group of organisms has attracted the attention of researchers due to its scarcity, as well as the presence of various protein composition. A promising direction is the creation of pharmaceutical products, based on proteins extracted from tissues of antarctic marine animals. Of particular interest is the possibility of molecules with directed action – enzymes with different specificity. In our work submitted the development methodological approaches for the isolation and testing fraction of trypsin-like enzymes from the tissues of the antarctic krill (*Euphausia superba*).

**Keywords:** antarctic marine organisms, krill, proteins, trypsin-like enzymes.

### 1. Вступление

Постоянный прогресс в области фармакологии обусловлен непрерывными исследованиями и разработкой методик получения биологически активных молекул, которые можно использовать для создания эффективных фармакологических препаратов.

Особого внимания заслуживают препараты белковой природы, так как они могут обладать направленным действием. В последнее время появилось множество литературных данных о присутствии в тканях морских гидробионтов биотехнологически ценных молекул. Препараты такого типа в перспективе могут иметь диагностическую и клиническую ценность, а также использоваться в разного рода исследованиях. Постоянно растущая цена на новые биотехнологические продукты животного и растительного происхождения является ключевой предпосылкой, которая мотивирует необходимость поиска биологически активных веществ среди метаболитов таких животных, как морские гидробионты. Распространенность и стоимость морских гидробионтов априори делает рентабельным добычу морских биоресурсов, особенно нетрадиционных (Быкова, Шуст, Немцев, 2008). Среди продуктов жизнедеятельности морских организмов были обнаружены биологически активные вещества, представляющие большой интерес для клиницистов и представителей фарминдустрии, – группа цефалоспориновых антибиотиков, нуклеозиды, нереизтоксин, еледоизин, тритерпеновые гликозиды и многие другие субстанции с различным спектром фармакологического действия (Buchholz, Reinhard, 1976). Существуют определенные технологические подходы и созданы препараты белкового происхождения из антарктических организмов (например, антарктического криля), которые используются в медицине, косметологии, агропромышленной отрасли, пищевой промышленности. Ежегодно интерес к препаратам белкового происхождения из антарктических организмов, преимущественно морских гидробионтов, растет, появляется много отчетов, рекомендаций и научных публикаций о перспективных разработках технологий производства биотехнологических продуктов на основе белков, особенно пептидов, полученных при переработке данного сырья (Kimoto, Kusama, Murakami, 1983; Campell et al., 1987). Учитывая все вышесказанное, представляет определенный интерес разработка оптимальных методологических подходов для получения, а также тестирования белков и пептидов из антарктических организмов с целью дальнейшего внедрения этих белковых молекул в биотехнологическое производство.

## **2. Материалы и методы исследований**

Разделение белковых фракций проводилось методом диск-электрофореза в 10-процентном полиакриламидном геле с додецилсульфатом-Na согласно методике (Laemmli, 1970). Энзим-электрофоретическое разделение проводилось согласно указанной методике (Ostapchenko, Savchuk, Burlova-Vasilieva, 2011). Фракцию трипсиноподобных ферментов получали на колонке с бензамидин-сефарозой (Amersham Pharmacia Biotech, 2001). В случае если концентрация белка в препарате достаточно низкая (от 0,2 до 0,5 мг/мл), для получения четкой картины в полиакриламидном геле (ПААГ) применяли метод концентрирования образцов с помощью трихлоруксусной кислоты (ТХУ) (Дарбре, 1989). Количество белка определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976), который основан на способности белков связываться с кумасси бриллиантовым синим G-250. Статистическая обработка полученных результатов проводилась методами вариационной статистики с помощью компьютерных программ Origin 7.0, TotalLab 2.04 (Гланц, 1999; Сергиенко, Бондарева, 2006). Кривые, представленные на рисунках, являются типичными для серии повторных опытов (минимум три в каждой серии).

## **3. Результаты и обсуждения**

Ткани антарктического криля гомогенизировались в жидком азоте с последующим добавлением экстрагирующего буфера и центрифугированием со скоростью 10 000 об. при температуре 4°C на протяжении 20 мин. Супернатант отбирался и лиофилизировался для оптимизации условий хранения. В качестве экстрагирующего буфера применяли 0,1 М Na-фосфатный буфер pH 7,4, который содержал 0,15 М NaCl, 0,15 мМ ЕДТА (этилендиамин-

тетрауксусная кислота), 0,1% Тритон X-100, с добавлением ПМСФ (фенилметансульфонилфлуорид) на каждые 10 мл образца. Лиофилизированные образцы растворяли в дистиллированной воде и проводили осаждение белков с помощью ТХУ.

Для выяснения наличия в данных фракциях белковых молекул нами было проведено электрофоретическое разделение качественного состава белков и пептидов образцов тканей криля и морской звезды (*Odontaster validus*) методом диск-электрофореза в 10% ПААГ с добавлением додецилсульфата натрия. Результаты данного исследования представлены ниже (рис.1).

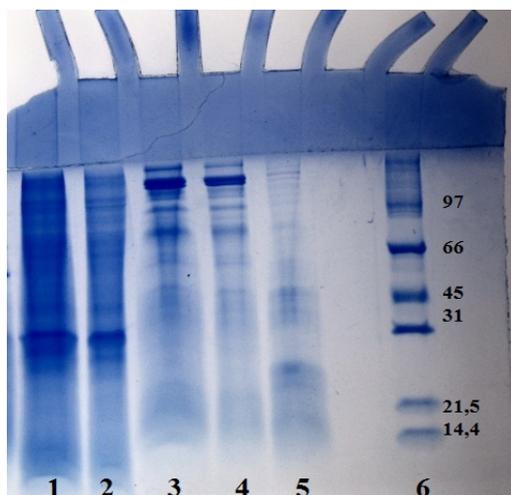


Рис. 1. Электрофореграмма разделения образцов тканей криля и морской звезды. 1-2 – образцы тканей криля, 3-5 – образцы тканей морской звезды, 6 – маркеры молекулярных масс (кДа).

Как видно из представленных результатов, образцы тканей криля имеют богатый белковый набор молекул, молекулярная масса которых колеблется от 126 до 3 кДа. С помощью использования программы TotalLab 2.04 были проанализированы молекулярные массы и содержание отдельных белков в экстракте криля (таблица).

Таблица

**Молекулярные массы и содержание белков тканей антарктического криля**

Мол. масса, кДа	126	116	100	96	85	73	62	52	42	29	25	24	3
Мг/г гомогената	3,12	227,12	61,44	59,2	18,4	116,32	98,8	0,08	74,48	784,32	0,56	1,04	153,04

Следующим этапом нашей работы было выявление возможного присутствия фракции трипсиноподобных ферментов в исследуемых образцах. Для этого мы использовали хроматографическое разделение образцов криля на колонке с бензамидин-сефарозой (рис. 2). На колонку, уравновешенную 20 mM трис-HCl буфером, pH 8.0 наносили 5 мл белковой фракции со скоростью 0,5 мл/мин. После этого отмывали неспецифически связанные белки буфером нанесения и проводили элюции трипсиноподобных ферментов 50 mM глицин-HCl буфером, pH 3.0. Скорость всех этапов хроматографического разделения составляла 0,5 мл/мин. Изменение оптического поглощения регистрировали с помощью УФ-датчика при длине волны 280 нм.

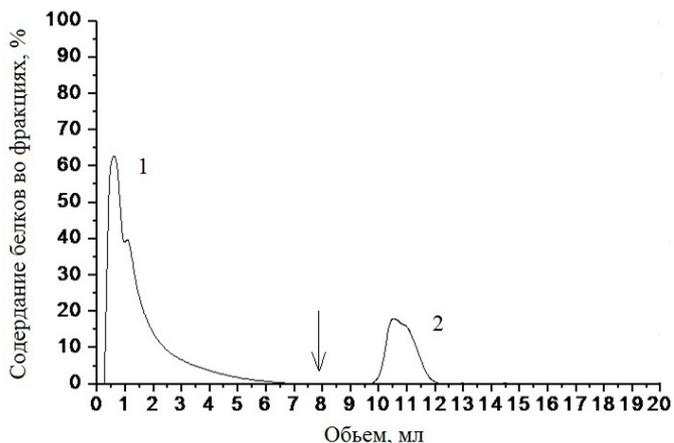


Рис. 2. Хроматограмма разделения белковой фракции исследуемых образцов на колонке с бензамидин-сефарозой: 1 – несвязанная фракция, 2 – фракция трипсиноподобных ферментов. Стрелкой указана смена рабочего буфера на буфер элюции.

Фракцию неспецифически связанных белков и фракцию трипсиноподобных ферментов собирали, измеряли содержание белка с помощью метода Бредфорд. Для получения информации о качественном составе фракции трипсиноподобных ферментов в исследуемых образцах мы проводили электрофоретическое разделение фракции 2 с помощью диск-электрофореза в ПААГ с добавлением додецилсульфата натрия (рис. 3).

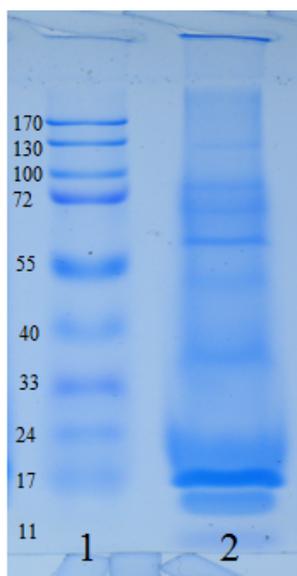


Рис. 3. Электрофореграмма трипсиноподобной фракции креветок после хроматографии на бензамидин-сефарозе. 1 – маркеры молекулярной массы (170, 130, 100, 72, 55, 40, 33, 24, 17, 11 кДа); 2 – фракция трипсиноподобных ферментов после бензамидин-сефарозы.

Энзиматическую активность в очищенной фракции трипсиноподобных ферментов тестировали методом энзим-электрофореза (рис. 4), который показал присутствие трипсинообразной активности.

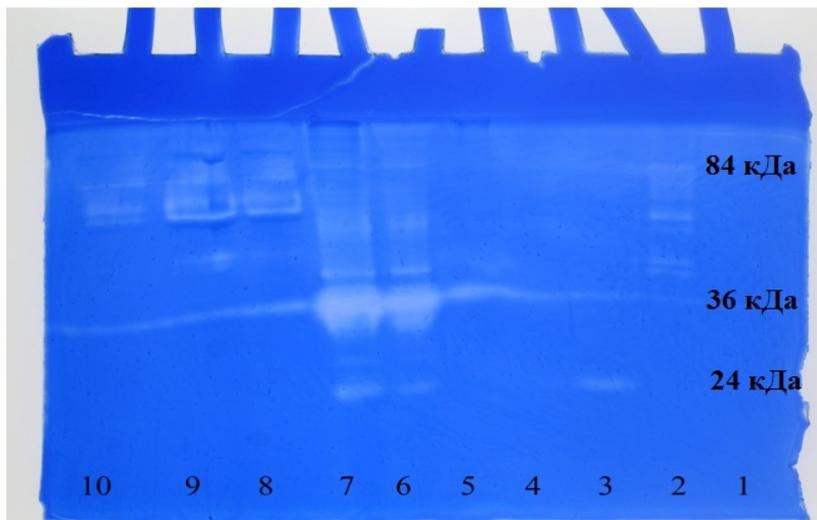


Рис. 4. Энзим-электрофореграмма образцов тканей гидробионтов: 2 – плазмид, 3 – трипсин, 4, 5 – образцы морской звезды, 7, 6 – образцы криля, 10-8 – образцы немертины.

Во фракции трипсиноподобных ферментов присутствуют 9 белковых полос различной молекулярной массы. Белковые полосы с молекулярной массой ниже 14–10 кДа могут быть фрагментами трипсиноподобных ферментов, подвергшихся процессу автолиза. Эти данные показывают перспективность более углубленного изучения и очистки отдельных трипсиноподобных ферментов с целью нахождения потенциальных целевых молекул для биотехнологического применения.

#### 4. Выводы

Полученные результаты проведенной работы свидетельствуют о наличии у испытуемого объекта белковых молекул, которые могут быть коммерчески привлекательными биотехнологическими продуктами. Проведенный подбор методов, которые позволили реализовать поставленные задачи, показывает возможность применения и оптимизации этих методических разработок для работы с другими организмами данного региона. Перспективным направлением является дальнейший анализ качественного и количественного состава белковых молекул антарктических гидробионтов и их свойств. Разработанные методики позволяют выделять и накапливать эти объекты в определенных количествах и условиях, что в свою очередь дает возможность хранить их продолжительное время без потери ими своей активности.

**Авторы** выражают благодарность Национальному антарктическому научному центру Государственного комитета Украины по вопросам науки, инноваций и информатизации за предоставление образцов для исследований и поддержку.

#### Список литературы

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. **Гланц С.** // Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. 459 с.
3. **Дарбре А.** // Практическая химия белка. – М.: Мир, 1989. 623 с.

Д.В. Гладун: МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ ФРАКЦИИ ТРИПСИНОПОДОБНЫХ ...

4. **Сергиенко В.И., Бондарева И.Б.** // Математическая статистика в клинических исследованиях. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 304 с.
5. **Affinity Chromatography. Principles and Methods** // Amersham Pharmacia Biotech AB, 2001. P. 89–96.
6. **Bradford M.** // Analytical Biochemistry. – 1976. – V. 6. – P. 193–200.
7. **F. Buchholz, S. Reinhard.** "Metabolic and enzymatic adaptations in northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, and Antarctic krill, *Euphausia superba*". Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 2000. – V. 57. – P. 115–129.
8. **D. Campell, L. Hellgren, B. Karlstam** and J. Vincent. "Debriding ability of a novel multi-enzyme preparation isolated from Antarctic krill (*Euphausia superba*)" *Experientia*. – 1987. – V. 43. – P. 578-579.
9. **K. Kimoto, S. Kusama and K. Murakami.** "Purification and characterization of serine proteinases from *Euphausia superba*". *Agric. Biol. Chem.* – 1983. – V. 47. – P. 529–534.
10. **Laemmli K.** / *Nature*. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
11. **L. Ostapchenko, O. Savchuk, N. Burlova-Vasilieva.** // Enzyme electrophoresis method in analysis of active componenets of hemostasis system. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. – 2011. – V. 2. – № 1. – P. 20–26.