

УДК 595.3.574

ПІДБІР ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ ДЛЯ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ТЕСТУВАННЯ ЕКСТРАКТІВ ТКАНИН ГІДРОБІОНТІВ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ

Д. В. Гладун, Т. Б. Вовк, Н. Г. Ракша, 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

Реферат. На прикладі гідробіонту *Adamussium colbecki* було підібрано умови для забезпечення оптимального фракціонування екстрактів тканин методом гель-фільтрації. Подальший ензим-електрофоретичний аналіз фракцій, одержаних після хроматографічного розділення, виявив присутність у екстрактах гідробіонтів *Actinaria* та *Sterechinus neumayer* активних форм ферментів.

Подбор оптимальных условий для хроматографического тестирования экстрактов тканей гидробионтов Антарктического региона.

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

Реферат. На примере гидробионта *Adamussium colbecki* были подобраны условия для обеспечения оптимального фракционирования экстрактов тканей методом гель-фильтрации. Дальнейший энзим-электрофоретический анализ фракций, полученных после хроматографического разделения белков, обнаружил присутствие в экстрактах гидробионтов *Actinaria* и *Sterechinus neumayer* активных форм ферментов.

The optimization of chromatographic conditions for testing of Antarctic region hydrobionts tissue extracts.

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

Abstract. Conditions for providing optimal fractionation of tissue extracts by gel filtration chromatography were selected. Further enzyme-electrophoretic analysis of the obtained protein fractions revealed the presence in extract of *Actinaria* and *Sterechinus neumayer* the active forms of the enzymes.

Key words: Antarctic marine hydrobionts, gel filtration chromatography, enzyme-electrophoresis.

Вступ

Стрімке зростання попиту на продукцію, активною діючою складовою якої є гідролітичні ферменти, зумовлює актуальність пошуку нових економічно обґрунтованих природних джерел сировини та розробку нових ефективних підходів щодо швидкого скринінгу, виділення та очистки цільових молекул з вираженою ферментативною активністю з метою їх подальшого впровадження у біотехнологічне виробництво.

У даному контексті увагу дослідників привертають морські безхребетні (Быкова и др., 2008, Воробьев и др., 2008, Allen et al., 2009). Особливості існування морських організмів, на життєдіяль-

ність яких безпосередньо впливає ряд факторів, зокрема солоність океанічних вод, низьке освітлення або повна його відсутність, гідростатичний тиск, коливання температур, обумовлюють не лише значне структурно-функціональне різноманіття метаболітів, а й присутність ферментів з рядом унікальних властивостей, що становить певний інтерес як для наукових досліджень, так і для промислового застосування. Як еволюційні попередники протеїназ вищих тварин гідролази гідробіонтів холодних кліматичних зон володіють, як правило, дещо ширшою субстратною специфічністю, значно вищою загальною протеолітичною активністю, а також здатні проявляти активність при нижчих температурах (Songklanakarın et al., 2008, Fuchise et al., 2014). Усе це зумовлює перспективність їх застосування в медицині, біотехнології, різних галузях харчової промисловості.

Зважаючи на певні відмінності фізико-хімічних та біологічних характеристик метаболітів з морських організмів від традиційних фармакологічних субстанцій, оптимізація існуючих та розробка нових методів їх виділення, а також вивчення їх властивостей без перебільшення можна віднести до одного з пріоритетних напрямів розвитку науково-технологічного прогресу.

З огляду на викладене вище метою нашої роботи було оптимізувати умови фракціонування екстрактів гідробіонтів з Антарктичного регіону та протестувати досліджувані об'єкти на предмет наявності ферментативних активностей.

2. Матеріали і методи дослідження

У роботі було використано два види гідробіонтів — представників типів кишковопорожнинних (Coelenterata) та голкошкірих (Echinodermata). Це, зокрема, Актинія *Actinaria*, та Антарктичний морський їжак *Sterechinus neumayer*. Вибрані нами види дещо різняться за стратегією добування корму та харчовими перевагами, що може вплинути на спектр ферментативних активностей, присутній у тканинах даних гідробіонтів. Для одержання екстрактів зразки гідробіонтів гомогенізували з послідовними додаванням рідкого нітрогену та екстрагуючого буферу – 0,1 М Na-фосфатного буферу, що містив 0,15 М NaCl, 0,15 мМ ЕДТА, 0,1 % тритон X-100 та 2 мМ ПМСФ з розрахунку 5 мл екстрагуючого буферу на кожні 10 грам матеріалу. Після центрифугування проб при 10000 g, 40 хв, 4 °С надосадову рідину відбирали та ліофілізували для оптимізації умов зберігання. Фракціонування екстрактів проводили методом гель-фільтрації з використанням колонки HiLoad 26/60 Superdex 75 PG. Електрофоретичний поділ білків проводили згідно з методом Лемлі (Laemmli, 1970). Ензим-електрофорез здійснювали відповідно до (Ostapchenko et al., 2011). Розділяючий гель полімеризували за присутності желатину з розрахунку 1 мг/мл. Концентрація розділяючого гелю становила 15 %, що унеможливило міграцію заполімеризованого у гель субстрату. Аналіз одержаних електрофореграм здійснювали з використанням програми TotalLab 2.04. Представлені електрофореграми є типовими для серії повторних дослідів (щонайменше три в кожній серії).

3. Результати та їх обговорення

Враховуючи перспективність та актуальність детального вивчення властивостей метаболітів з гідробіонтів, першочерговим нашим завданням було підібрати оптимальні умови для забезпечення належного фракціонування екстрактів тканин гідробіонтів, а також виділити окремі фракції білків для подальшого їх вивчення на наявність певних ферментативних активностей.

Для того, щоб одержати вихідну інформацію щодо білково-пептидного складу тканин Актинії та Антарктичного морського їжака та оцінити доцільність використання саме даних видів гідробіонтів для проведення подальших досліджень, на першому етапі роботи було проаналізовано якісний склад білків екстрактів гідробіонтів із застосуванням методу одновимірного диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію. Використання концентруючого гелю дозволило ефективно розділити білки у діапазоні молекулярних мас від 10 до 150 кДа, що цілком відповідало вимогам експерименту, а можливість в рамках даної системи варіювати щільність розділяючого гелю дала змогу досягти максимально ефективного поділу.

На рис. 1. наведено типову електрофореграму розділення екстрактів тканин гідробіонтів з Антарктичного регіону. Як видно з одержаних нами даних, досліджувані екстракти характеризуються широким спектром білкових молекул, що різняться за молекулярними масами. Проведені дослідження показали, що середньостатистичні електрофоретичні спектри білків обох досліджуваних видів містять в середньому 16 білкових смуг на трек.

Для встановлення точних молекулярних мас білкових фракцій одержані електрофореграми були проаналізовані з використанням програми TotalLab 2.04, що дозволило виявити присутність

білкових смуг у діапазоні молекулярних мас від 3 до 150 кДа (таблиця). Варто зазначити, що для всіх досліджуваних гідробіонтів близько 60 % від загальної кількості білкових фракцій мали молекулярну масу нижчу за 50 кДа. З огляду на певні теоретичні уявлення та ряд експериментальних підтверджень, білки з подібною молекулярною масою зазвичай характеризуються різноманітними функціональними активностями, зокрема й ферментативними.

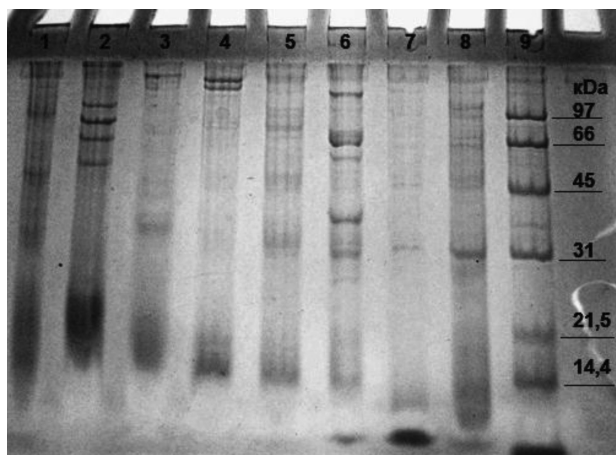


Рис.1. Типова електрофореграма екстрактів тканин гідробіонтів: 1 — Актинія *Actinaria*, 2 — *Parborlasia corrugatus*, 3 — *Adamussium colbecki*, 4 — *Odontaster validus*, 5 — Антарктичний морський їжак *Sterechninus neumayer*, 6 — *Glyptonotus antarcticus*, 7, 8 — *Euphausia superba*, 9 — маркери молекулярних мас (кДа)

З огляду на зазначене вище перспективним видається виділити та охарактеризувати окремі фракції білків, що можуть бути пов'язані з проявом певного виду ферментативної активності, що і було головним завданням нашої роботи.

Таблиця

Молекулярні маси білків у екстрактах гідробіонтів (кДа)

Актинія <i>Actinaria</i>	Антарктичний морський їжак <i>Sterechninus neumayer</i>
157,65	154,95
144,17	141,47
132,04	125,30
119,91	99,69
102,39	86,62
69,31	74,20
50,44	49,17
47,30	45,63
43,73	36,93
39,48	33,13
34,57	25,81
33,13	22,54
25,93	21,34
21,96	19,97
15,02	16,06
4,614	4,038

Оскільки молекулярні маси білків та пептидів, які становлять певний інтерес для біотехнології, зазвичай перебувають у діапазоні мас від 5 до 120 кДа, для фракціонування досліджуваних екстрактів нами було застосовано метод гель-фільтрації з використанням як носія Superdex 75 PG. Враховуючи залежність ефективності поділу білково-пептидних фракцій від ряду факто-

рів, як то об'ємна швидкість потоку, робочий буфер для хроматографування, концентрація зразка при нанесенні та ін., важливим є коректно підібрати умови для належного хроматографічного розділення. Підбір умов фракціонування екстрактів був здійснений на прикладі Антарктичного морського гребінця *Adamussium colbecki*. Спочатку були проведенні дослідження по підборі оптимального сорбента для здійснення фракціонування саме даного виду сировини. Були протестовані такі сорбенти, як Superdex 75 PG та Superdex 200 PG, що характеризуються високою фізико-хімічною стабільністю і практично не проявляють неспецифічних взаємодій з компонентами аналізованого зразка. У результаті проведених досліджень було показано, що оптимальне розділення білково-пептидного складу екстракту Антарктичного морського гребінця спостерігається при використанні як носія HiLoad 26/60 Superdex 75 PG та за швидкості потоку 1 мл/хв (рис. 2).

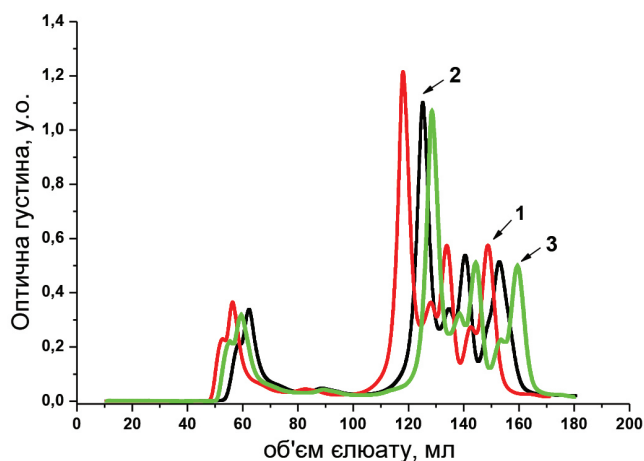


Рис. 2. Хроматограма розділення екстрактів тканин Антарктичного морського гребінця на колонці з Superdex 75 PG: 1 — за швидкості потоку 1 мл/хв; 2 — за швидкості потоку 0,75 мл/хв; 3 — за швидкості потоку 0,5 мл/хв

Враховуючи результати проведених досліджень, ми можемо рекомендувати застосовувати як буфер для хроматографування 50 мМ трис-НСІ, рН 7,4 з додаванням 0,15 М NaCl (рис. 3), оскільки це дозволяє одержати дещо кращі результати у порівнянні з використанням буферу без NaCl.

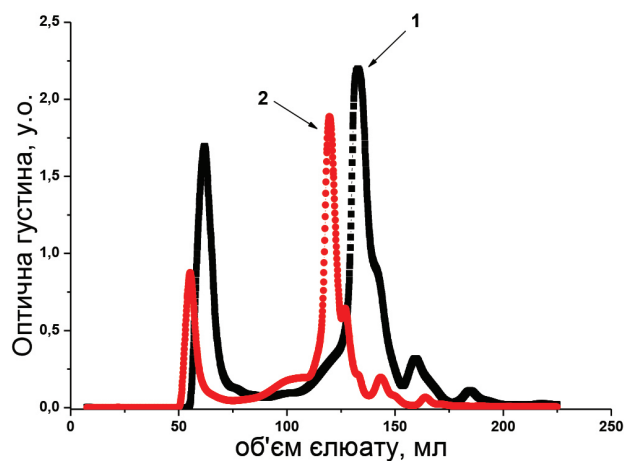


Рис. 3. Хроматограма розділення екстрактів тканин Антарктичного морського гребінця на колонці з Superdex 75 PG: 1 — за використання як робочого буферу 0,05 М трис-НСІ, рН 7,4 з 0,15 М NaCl; 2 — за використання як робочого буферу 0,05 М трис-НСІ, рН 7,4.

Варто зазначити, що застосування саме даного буферного розчину або буферів з еквівалентною іонною силою дає змогу уникнути неспецифічних взаємодій зразка із носієм, перешкоджає взаємодії між білками під час елюції, що є важливою умовою для ефективного та стандартизованого поділу білкових зразків (Волков и др., 2009).

На рис. 4 наведено результати хроматографічного розділення за нанесення на колонку зразка у різній концентрації. Згідно з одержаними результатами оптимальною для нанесення на колонку виявилася концентрація зразка 50 мг/мл.

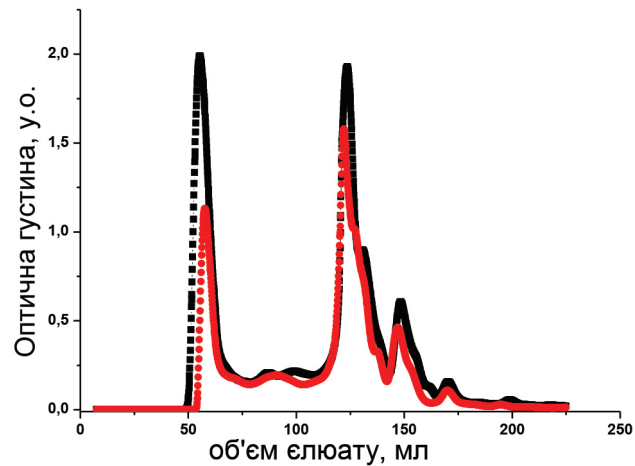


Рис. 4. Хроматограма розділення екстрактів тканин Антарктичного морського гребінця на колонці з Superdex 75 PG: 1 — за нанесення зразка в концентрації 50 мг/мл; 2 — за нанесення зразка в концентрації 12,5 мг/мл

Також нами було показано, що розчинення зразків у буферах різної іонної сили жодним чином не впливало на характер розділення білкових фракцій (рис. 5).

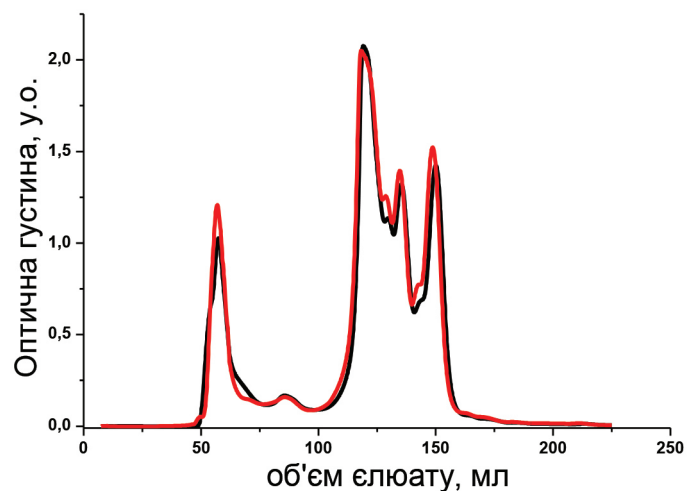


Рис. 5. Хроматограма розділення екстрактів тканин Антарктичного морського гребінця на колонці з Superdex 75 PG: 1 — за розчинення зразка у 0,05 М трис-НСІ, рН 7,4 з 0,5 М NaCl; 2 — за розчинення зразка у 0,05 М трис-НСІ, рН 7,4.

Результати фракціонування екстрактів досліджуваних нами гідробіонтів методом гель-фільтрації з додержанням всіх вищезазначених параметрів представлено на рис. 6.

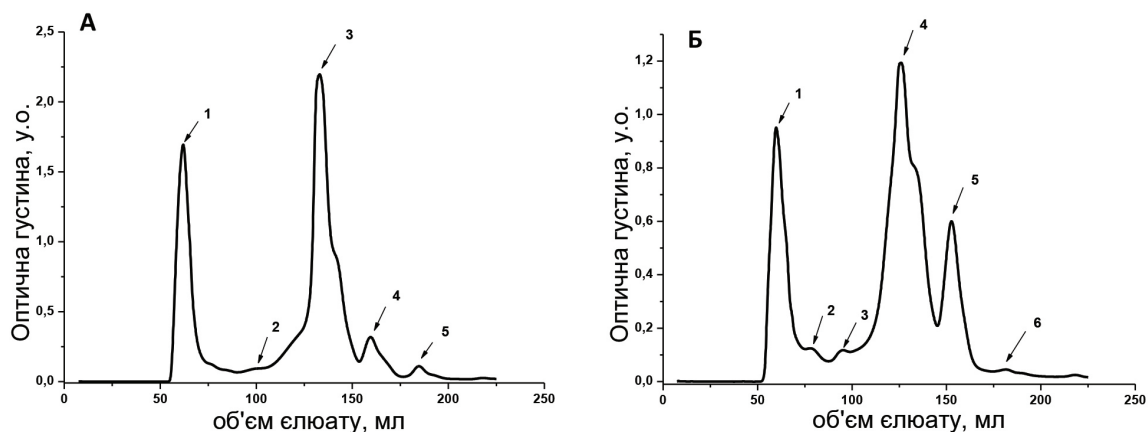


Рис. 6. Хроматограма розділення екстрактів Актинії (А) та Антарктичного морського їжака (Б) на колонці з Superdex 75 PG: 1-8 — кількість піків.

Так, екстракти Актинії та Антарктичного морського їжака розділилися на 5 та 6 піків, які відповідають білковим фракціям з молекулярними масами від 3 до 75 кДа. Подібний розподіл в цілому узгоджується з даними електрофорезу та дозволяє припустити існування серед білків екстракту тканин гідробіонтів активних молекул з різними ферментативними активностями.

Тому доцільним було протестувати отримані нами фракції на предмет наявності активних ферментів. Для чого було використано метод ензим-електрофорезу з подальшим аналізом ензим-електрофореграм за допомогою програми TotalLab 2.04. Використання в даному методі желатину, заполімеризованого в розділюючий гель, дало змогу ідентифікувати ферменти підкласу протеїназ. На рис. 7 наведено результати дослідження протеолітичної активності у білкових фракціях, одержаних після гель-фільтрації екстрактів гідробіонтів.

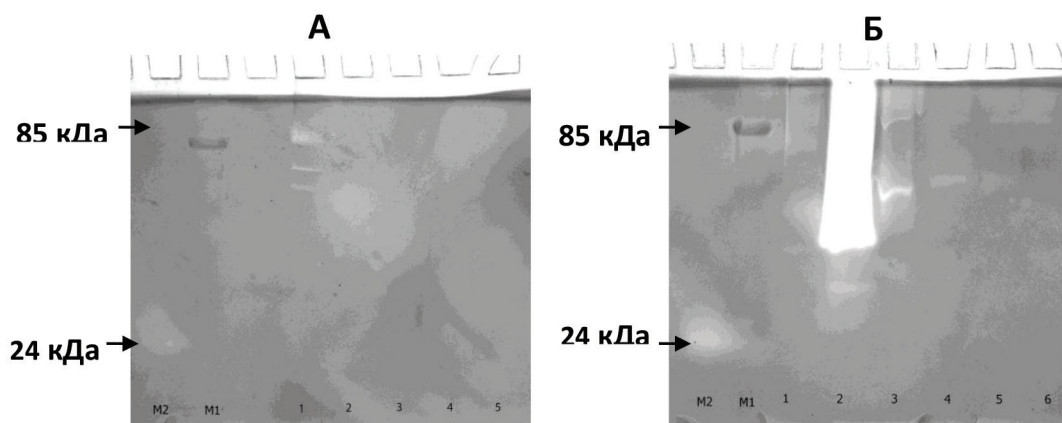


Рис. 7. Ензим-електрофореграма білкових фракцій екстрактів Актинії (А), Антарктичного морського їжака (Б) після хроматографії на колонці з Superdex 75 PG: М1 — плазмін (85 кДа); М2 — трипсин (24 кДа); 1-8 — номер піків

Нами було показано присутність активних ферментів у 1, 2, 3, 4 та 5 піках для Антарктичного морського їжака і лише в 1 піку для Актинії. Присутність на електрофореграмах активних зон гідролізу, безумовно, свідчить про наявність в екстрактах протеолітичних ферментів з желатиназною та колагеназною активностями, що можуть належати до класу серинових протеїназ чи металопротеїназ. Варто зазначити, що найбільш виражена активність як за інтенсивністю гідролізу субстрату, так і за розподілом по піках спостерігалася в екстрактах Антарктичного морського їжака. Встановлені

нами відмінності прояву активності у різних видів гідробіонтів можуть бути обумовлені фізіологічними особливостями даних гідробіонтів та їх таксономічною приналежністю.

Отже, підібрані нами умови фракціонування допомогли досягти найкращого поділу білково-пептидного складу аналізованих екстрактів за відносно короткий проміжок часу. Одержані нами результати вказують на перспективність проведення подальших, більш глибоких досліджень, спрямованих на виділення окремих ферментів та їх детальнішої характеристики з використанням різних субстратів та специфічних інгібіторів.

Подяка. Автори висловлюють подяку Державній установі «Національний антарктичний науковий центр» МОН України за надання зразків для досліджень і за підтримку.

4. 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. **Волков Г. Л.**, Краснобрижая Е. Н., Гаврилюк С. П., Карбовский В. Л. Промышленная хроматография белков с близкими физико-химическими свойствами // Биофармацевтический журнал. — 2009. Т. 1, № 4. — С. 20 — 34.
3. **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.
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. **Fuchise T.**, Sekizaki H., Kishimura H., Klomkloa S., Nalinanon S., Benjakul S., Chun, B. Simple preparation of pacific cod trypsin for enzymatic peptide synthesis // *Journal of Amino Acids*. — 2014. № 8. — С.1 — 8.
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. **Songklanakarin S. K.** Digestive proteinases from marine organisms and their applications // *J. Sci. Technology*. — 2008. № 30 (1). — С. 37 — 46.
9. **Ostapchenko L.**, Savchuk O., Burlova-Vasilieva N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active componenets of hemostasis system // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. — 2011. № 2. — С. 20 — 26.