ОТДЕЛЕНИЕ НУКЛЕАЗ ОТ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ЭКСТРАКТЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРС

© Заболоцкая Елена Романовна, Виноходов Дмитрий Олегович

190013, Россия, Санкт-Петербург, Московский проспект, дом 26 Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Кафедра МБТ., E-mail: gelios86@mail.ru

Ключевые слова: хроматография, ферменты, РНКаза, ДНКаза, трипсин, химотрипсин.

Введение. В природе ферменты встречаются в клетках животных и растений в виде сложных смесей различных органических веществ. Для получения ферментного препарата и изучения свойств отдельного фермента его прежде всего нужно очистить. В работе описывается хроматографический способ отделения нуклеаз от протеолитических ферментов в экстракте поджелудочной железы КРС.

Цель исследования. Целью исследования является получение фракций, содержащих ферменты, пригодные для получения из них лекарственных препаратов. Поскольку использование ферментов в медицине предполагает высокую степень их очистки, которая начинается с удаления нерастворимого остатка: дебрисса клеток или измельченного сырья. Для этого применяют физические методы: центрифугирование и фильтрацию на различном оборудовании и/или с применением различных фильтрующих материалов. Это могут быть бумажные или тканевые фильтры, волокнистые или гранулированные фильтрующие материалы, пористые стеклянные или керамические фильтры с применением давления или вакуума или же без них. Более тонкой очистки от нерастворимых остатков можно добиться использованием химических методов: смещение pH экстаркта, внесение осадителей. Выбор способа предварительной очистки экстаркта подбирается экспериментально и чаще всего включает в себя последовательное применение названных приемов. Основная задача на данном этапе — получить максимально прозрачный раствор, содержащий удовлетворительное количество искомого биологически активного вещества (БАВ).

Для дальнейшего получения чистых продуктов в настоящее время очень широко применяют хроматографическую очистку, которая происходит посредством различных механизмов взаимодействия подвижной и неподвижной фаз

Материалы и методы. Лабораторная посуда стеклянная и пластиковая, концентраторы центрифужные Amicon Ultra-4, Merk, Millipore (мембраны с различным размером отсечения), якорьки для магнитной мешалки, пипетки мерные на 0,1-10 мл стеклянные, пипетки автоматические переменного объема «Ленпипет», кюветы спектрофотометричские из кварцевого стекла, сорбент YMC- BioPro 75S (фирмаYMC), колонки Econo-Column разных размеров и адаптеры к ним Econo-Column (производитель Bio-Rad), колонка для ВЭЖХ Jupiter C18, 300 Å, 150x4,6 мм (фирма Phenomenex), магнитная мешалка «Экрос», хроматограф для препаративного разделения BioRad DuoFlow, хроматограф для аналитического разделения методом ВЭЖХ Shimadzu., химические реактивы, ячейка для проведения вертикального гель-электрофореза BioRad, спектрофотометр BioRad. Для определения концентраций белка в пробах применяли биуретовый метод и спектрофотометрические методы. Для определения ферментативной активности в образцах применяли модифицированные методы, описанные в литературе. Молекулярные массы белков (свыше 10 кДа) в исследуемых образцах проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли (SDSPAGE) с использованием маркеров Low-Range SDS-PAGE Standards, фирмы BioRad. По данным электрофореза идентифицируют наличие или отсутствие ферментов в соответствии с их молекулярными массами, определенными по стандартным веществам. Качественный анализ белка в образцах проводили путем обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Jupiter C18, 300 Å, 150x4,6 мм, фирмы Phenomenex.

Результаты. В подобранных условиях: буфера, pH, электропрводности, осветления, пробоподготовки и объема экстракта на сорбент YMC-BioPro 75S наблюдалась наиболее эффективная сорбция всех четырех ферментов. Потери конечных продуктов в проскоке незначительны и лежат в пределах погрешности измерений активностей и концентрации белка.

Полученные результаты определения активностей, ВЭЖХ и электрофореза показали эффективное разделение смеси трипсиногена и химотрипсиногена в первом пике от нуклеаз во втором. Выходы по активности также оказались удовлетворительными. Эти результаты позволяют продолжить последующую очистку для получения трипсина, химотрипсина, РНКазы и ДНКазы в отдельных фракциях.

Заключение. В настоящее время не теряют своей актуальности препараты высокоочищенных протеаз поджелудочной железы — трипсин и химотрипсин. Оба фермента обладают высокой протеолитической активностью, воздействуют только на некротическую ткань, не оказывая литического действия на живые клетки вследствие наличия в них специфических ингибиторов. Нуклеазы поджелудочной железы — РНКаза и ДНКаза, обладают в первую очередь противовирусным, противовоспалительным эффектом. Рекомбинантная человеческая ДНКаза применяется для разжижения и выведения мокроты при муковисцидозе. Оба фермента могут применятся для лечения вирусных инфекций, таких как герпес, энцефалит, лихорадка Эбола, вирусный конъюктивит. РНКазы различных типов широко используются в биохимических лабораториях, поскольку каждый тип имеет специфичность к своему типу реакции расщепления РНК. В данной работе описан способ отделения протеолитических ферментов от нуклеаз в экстракте поджелудочной железы КРС, что является первым шагом для получения отдельных продуктов. Как видно, получение чистого фермента — интересная, творческая задача. Она требует от исследователя обширных знаний в области химии, биотехнологии и многих других наук. Зачастую требуется креативный, комплексный подход для подбора оптимальных условий для получения чистого и биологически активного фермента.