

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ УЗБЕКИСТАНА ИМЕНИ МИРЗО
УЛУГБЕКА

Биолого-почвенный факультет

Цой Владимир Эдуардович

ОЧИСТКА ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

**ВЫПУСКНАЯ
КВАЛИФИКАЦИОННАЯ
РАБОТА**

Научный руководитель:

Д.б.н. Ташмухамедова Ш.С.

Ташкент – 2013

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
I глава. Литературный обзор	5
1.1. Функции и химико-физические свойства окислительных ферментов.....	5
1.2. Механизм действия глюкозооксидазы.....	8
1.3. Выделение, очистка и применение ферментных препаратов.....	12
II глава. Экспериментальная часть	21
2.1. Материалы и методы исследования.....	20
2.2. Оборудование и реактивы	21
2.3. Высаливание глюкозооксидазы из технического ферментного препарата.....	21
2.4. Определение активности глюкозооксидазы.....	22
2.5. Определение белка твердофазным методом Бредфорда.....	22
2.6. Ионообменная хроматография.....	23
2.7. Электрофорез в ПААГ.....	23
III глава. Результаты и их обсуждения	24
3.1. Подбор концентрации сульфата аммония для высаливания глюкозооксидазы из технического ферментного препарата.....	24
3.2. Ионно-обменная и гель-хроматография глюкозооксидазы.....	25
3.3. Электрофорез очищенного препарата.....	27
Выводы	29
Список использованной литературы	30

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

В настоящее время в различных отраслях науки и промышленности широко используются ферменты. Несмотря на определенные успехи в области энзимологии имеются проблемы в плане получения высокоочищенных ферментов. Так как многие ферментные препараты, особенно технические в своем составе содержат большое количество различных соединений. Известно, что эти примеси могут отрицательно влиять на основной белок препарата, что приводит к различным нежелательным эффектам, в результате ферментативная активность препарата существенно снижается в условиях хранения и применения. [1]. Надо отметить, что в настоящее время достаточно много совершенных методов, позволяющих выделить и в значительной степени очистить глюкозооксидазу. Наиболее эффективными среди них являются: высаливание нейтральными солями, ионообменная и гель-хроматография. [2] Именно эти методы мы решили применить при очистке глюкозооксидазы.

Объект исследования. В работе в качестве объекта исследования был использован технический ферментный препарат глюкозооксидазы из *Aspergillus niger*.

Целью настоящей работы является очистка технического препарата глюкозооксидазы из *Aspergillus niger* и характеристика полученного очищенного ферментного препарата. Для осуществления этой цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Высаливание технического ферментного препарата
2. Ионообменная и гель-хроматография глюкозооксидазы
3. Электрофорез очищенного препарата.

Краткая характеристика структуры работы

Данная работа состоит из 33 страниц, 3 глав, 13 параграфов. Содержит 6 рисунков и 3 таблицы.

I ГЛАВА. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Функции и физико-химические свойства окислительных ферментов

Оксидоредуктазы – ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Субстрат, подвергающийся окислению, рассматривается как донор водорода. Систематическое название составляется по типу «донор: акцептор оксидоредуктаза». Это ферменты, участвующие в биологическом окислении и восстановлении и, следовательно, связанные с дыханием и процессами брожения. Рекомендованное название включает, там, где это возможно, термин «дегидрогеназа»; в качестве альтернативы можно использовать термин «редуктаза». Термин «оксидаза» употребляется только в тех случаях, когда акцептором является кислород. Однако этот класс включает не только дегидрогеназы и оксидазы, но также пероксидазы, которые используют в качестве окислителя H_2O_2 , а также оксигеназы и гидроксилазы, которые катализируют включение молекулярного кислорода в окисляемую молекулу (молекулы). [3]

Дегидрогеназы. В этот подкласс входят ферменты, катализирующие реакции дегидрирования (отщепления водорода). В качестве акцепторов электронов используются коферменты NAD^+ , $NADP^+$, FAD , FMN . Все ферменты этой группы обладают высокой субстратной специфичностью.

В подгруппу 1.1 входят ферменты, которые катализируют превращение $CH-OH$ группы многих спиртов, сахароспиртов, оксикислот, сахаров и оксистероидов в $C=O$ -группу. В подгруппу 1.2 помимо нескольких неспецифических ферментов катализирующих реакции окисления альдегидов, входят несколько специфических ферментов, действие которых связано с аккумулярованием энергии; процессы окисления, катализируемые этими ферментами, ведут к образованию таких «богатых энергией» соединений, как тиоловые эфиры или смешанные

ангидриды. Поскольку глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.12) играет важную роль в обмене углеводов, она была тщательно исследована.

В подгруппу 1.3 входят ферменты, катализирующие реакции переноса двух атомов водорода от СН-СН-групп с образованием С=С-групп, т.е. эти ферменты катализируют образование ненасыщенных соединений. Сукцинатдегидрогеназа – хорошо известный фермент, играющий важную роль в цикле лимонной кислоты; она стоит под номером 1.3.99.1, поскольку неизвестна природа акцептора в катализируемых ею реакциях. Ферменты 1.3.99.2 и 3 играют ключевую роль в метаболизме жиров; в соответствующих реакциях цитохром С может действовать как акцептор, если в системе имеется другой флавопротеид, «электронпереносящий флавопротеид». [4]

В подгруппу 1.4 входят ферменты, катализирующие реакции окислительного дезаминирования; исключение составляют ферменты 1.4.1.6 и 1.4.4.1, катализирующие процесс циклизации 5-аминовалерианата. Ферменты подгруппы 1.5 катализируют окисление замещенных аминов без освобождения аммиака.

Ферменты подгруппы 1.6 необычны в том отношении, что донором водорода служат для них восстановленные формы коферментов. Большая часть этих ферментов функционирует как «коферментдегидрогеназы», и в клетке они действуют как часть цепи переноса водорода, связывающей восстановленные коферменты с O_2 . Они мало специфичны в отношении акцепторов, поэтому нецелесообразно построение классификации, рассматривающей коферменты как акцепторы. Ферменты 1.6.6.1-4 катализируют реакцию восстановления нитрата до аммиака или аминогрупп у растений и бактерий. В подгруппы 1.9 и 1.10 объединены важные ферменты, которые действуют на конечных стадиях в цепи реакций, связанных с переносом водорода. Очень важную роль в дыхании большого числа аэробных организмов играет фермент цитихромоксидаза (КФ 1.9.3.1). Многие ферменты этой подгруппы содержат медь в своем

составе.

Пероксидазы. В подгруппу 1.11 входит целый ряд ферментов, использующих в качестве окислителя H_2O_2 . Классические пероксидазы (Миелопероксидаза КФ1.11.1.7), представляющие собой гемопротеиды, специфичны только в отношении акцептора водорода, т.е. перекиси, а в качестве доноров они могут использовать различные соединения. Каталаза (КФ 1.11.1.6), которая разрушает H_2O_2 , включена в эту группу ферментов по той причине, что она в общем подобна им по структуре и свойствам и способна окислять ряд субстратов с участием перекиси водорода. Разрушение H_2O_2 может рассматриваться как окисление одной молекулы другой. Эта реакция широко распространена в аэробных клетках и, возможно, имеет какое-то еще не выясненное значение. Пероксидазы коферментов (ферменты 1.11.1.1 и 2) не являются гемопротеидами; по крайней мере одна из них представляет собой флавопротеид. Другие флавопротеиды, такие, как ксантинооксидаза (КФ 1.2.3.2), также используют H_2O_2 , но наряду с другими акцепторами. Пероксидазы коферментов более похожи на эту группу ферментов, чем на классические пероксидазы, поскольку они, как и эти ферменты, не специфичны в отношении H_2O_2 .

Оксигеназы. В подгруппы 1.13 и 1.14 входят ферменты, катализирующие включение в свои субстраты атомов кислорода из O_2 . Ферменты подгруппы 1.13 функционируют с одной молекулой донора; при этом происходит включение либо двух атомов кислорода, обычно с раскрытием кольца донора по двойной связи (диоксигеназы 1.13.11), либо одного атома кислорода (с одновременным образованием молекулы воды) (монооксигеназы 1.13.12). В реакциях последней группы происходит также декарбоксилирование (по крайней мере по всем исследованным до настоящего момента случаям).

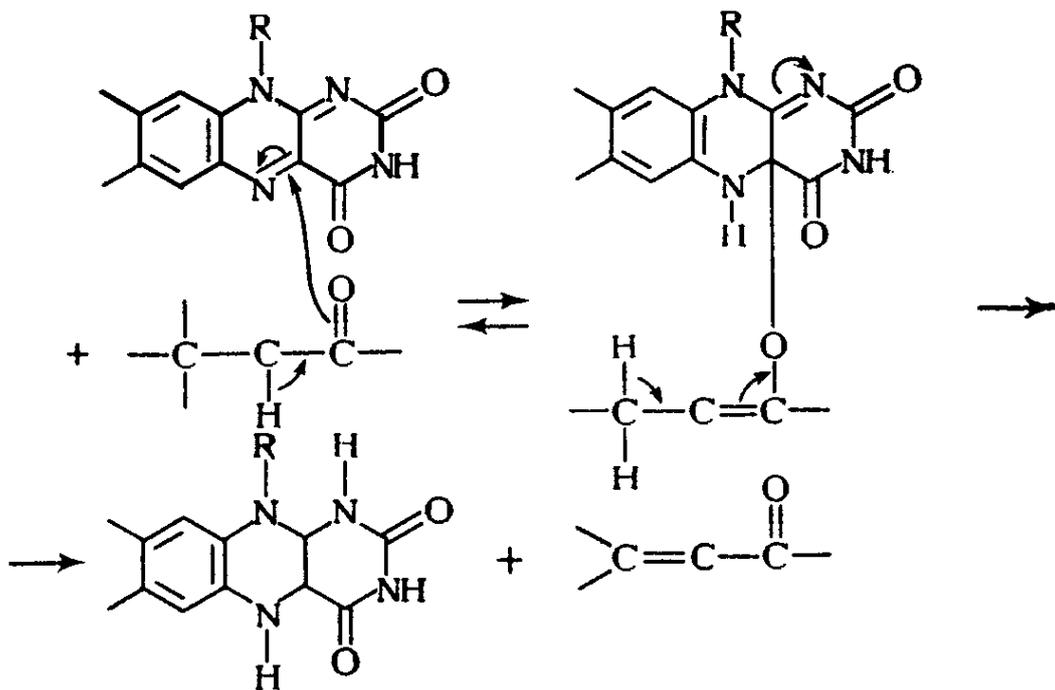
Ферменты подгруппы 1.14 катализируют более сложную реакцию, в которой два различных донора водорода взаимодействуют с O_2 . Атом

кислорода внедряется либо в одну молекулу донора, либо в обе молекулы. Большинство этих ферментов, обычно известных под названием гидроксилаз, осуществляют введение гидроксильной группы в один из субстратов; другой субстрат-донор (им может быть восстановленная форма одного из коферментов, флавопротеид, птеридин, 2-оксоглутарат) – должен присутствовать в стехиометрических количествах. Разделение на подгруппы основано на природе второго донора, а также на характере процесса включения атомов кислорода в молекулы обоих доноров или в молекулу одного донора (и в том, и в другом случае ферменты называют диоксигеназами), либо происходит включение одного атома кислорода в молекулу одного донора (монооксигеназы). [5]

1.2. Механизм действия глюкозооксидазы

Механизм реакции, катализируемый глюкозооксидазой, изучался рядом исследователей. Глюкозооксидаза относится к флавопротеинам, которые в большинстве своем являются дегидрогеназами, исходя, из этого был поставлен вопрос, каким же образом происходит окисление глюкозы. Происходит ли перенос двух атомов водорода от глюкозы или ее гидратно-альдегидной формы на молекулярный кислород, являющийся акцептором водорода, или путем активации молекулярного кислорода, в результате чего один из кислородных атомов соединяется с альдегидной группой глюкозы, а другой взаимодействует с водой и образует перекись. Для выяснения этого механизма Р.Бентлей и А.Нейберг (1949) при изучении культуры *P. notatum* использовали меченые воду (H^{18}_2O) и кислород ($^{16}\text{O}_2$). Результаты этих опытов позволили авторам прийти к выводу, что изучаемый фермент катализирует перенос водорода от глюкозы на кислород. Так как в процессе этого переноса не наблюдается образование свободного радикала, они считали более вероятным перенос двух электронов. Позднее С.Нокамура и др. (1967), использовав в своих опытах высокоочищенный фермент глюкозооксидазы *P. amagasakiense* на

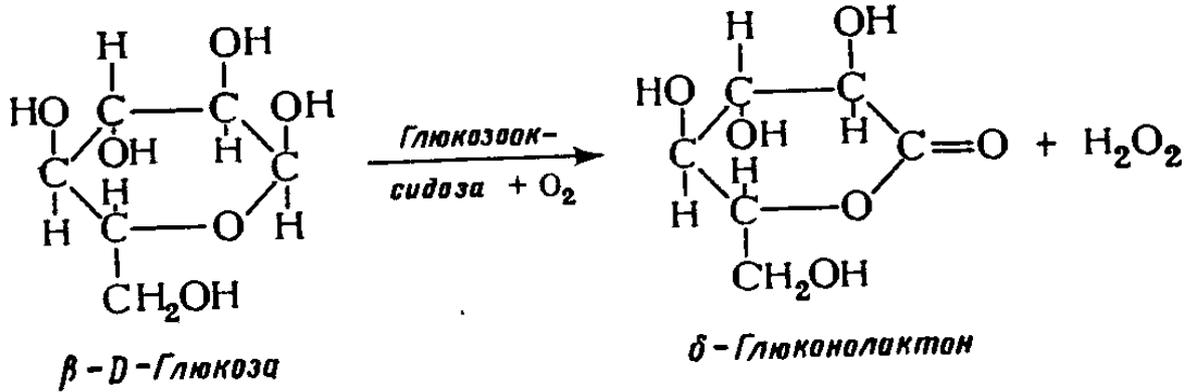
основании кинетических исследований установили, что во время реакции флавинадеиндинуклеотидная (ФАД) группа глюкозооксидазы не превращается в сколько-нибудь заметных количествах в семихинон. Ученые, разбирая общие вопросы механизма реакций, катализируемых флавопротеннами, пришли к заключению, что картина общего механизма восстановления следующая: оба водорода переносятся в виде протонов, а субстрат образует ковалентное соединение с системой колец флавина. Образование и расщепление этих промежуточных соединений предусматривает механизм транспорта электронов, который отражает суть протекаемой ферментативной реакции. А соответствующие места расположения на поверхности белка кислых и основных групп обеспечивают катализ дегидрирования и отвечают за быстроту ферментных реакций.



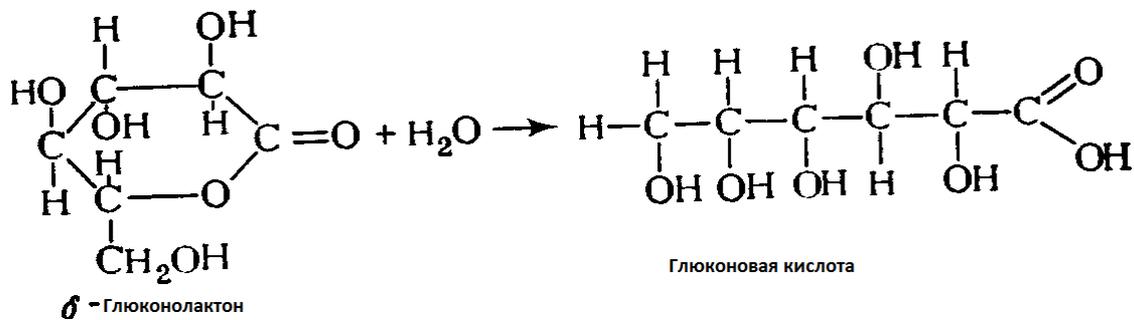
Т

утверждать, что в процессе катализа ФАД-часть фермента может находиться либо в полностью окисленной, либо в полностью восстановленной форме. Таким образом, в самом общем виде процесс окисления β -D-глюкозы глюкозооксидазой можно представить в два этапа.

Первоначально β -D-глюкоза в присутствии кислорода превращается в δ -глюконолактон:

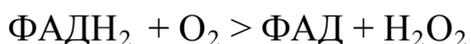


Второй этап происходит самопроизвольно без участия фермента. В присутствии воды δ -глюконолактон превращается в глюконовую кислоту:



Глюкозооксидаза подобно другим флавиновым ферментам не катализирует реакции непосредственного окисления субстрата молекулярным кислородом. Вместо этого происходит перенос атомов водорода через промежуточные соединения с участием ФАД, который играет роль простетической группы в ферменте:





Из схемы видно, что два атома водорода переносятся на флавиновую группу фермента, а лишь потом – на молекулярный кислород. Глюкозооксидаза является сложным ферментом, состоящим из простетической группы (две молекулы ФАД) и гликопротеида. По своей структуре глюкозооксидазы микроорганизмов имеют много общего. Так, глюкозооксидаза *A.niger* характеризуется высоким содержанием аспарагиновой и глутаминовой кислот, глицина и аланина и низким содержанием цистеина, метионина и триптофана. [5,6]

Глюкозооксидаза, D-глюкоза-1-оксидаза (КФ 1.1.3.4)- фермент, окисляющий β-D-глюкозу до глюконо-1,5-лактона, который спонтанно гидролизуется до глюконовой кислоты. При этом образуется пероксид водорода. Согласно международной иерархической классификации ферментов, глюкозооксидаза относится к классу оксидоредуктаз, подклассу алкогольоксидоредуктаз. Впервые наличие фермента, катализирующего окисление глюкозы за счет кислорода воздуха, не сопровождающееся выделением CO₂, было обнаружено в 1904 г. М.А.Максимовым в отпрессованной жидкости *Aspergillus niger*, которые содержали фермент, катализирующий окисление глюкозы. При потреблении кислорода, связанном с окислением глюкозы, Максимов наблюдал подкисление растворов. В 1928 г. Мюллер подтвердил и дальше развил данные Максимова. Мюллер показал, что потребление кислорода в равной мере связано как с окислением глюкозы, так и с образованием кислоты. Он подтвердил данные Максимова о том, что отпрессованная жидкость из *Aspergillus niger* содержит фермент оксидазу, который катализирует окисление глюкозы в кислоту только в присутствии кислорода. Окисления не наблюдается ни в присутствии других акцепторов водорода, ни в анаэробных условиях. Кислота, образующаяся в результате окисления глюкозы указанным ферментом, является

монокарбоновой глюконовой кислотой. Мюллер назвал этот фермент глюкозооксидазой. [5] Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4, ГО), обнаруженная у *Aspergillus niger* и у мицелиальных грибов различных родов, является гомодимерным гликопротеином с молекулярной массой ~160 кДа и содержит прочно связанный ФАД в качестве ко-фактора в каждой из субъединиц. [7]

1.3. Выделение, очистка и применение ферментных препаратов

Выделение и очистка ферментных препаратов – трудоемкий и дорогостоящий процесс, поэтому, если ферментный препарат можно использовать в виде неочищенной культуры микроорганизмов, его очистку не проводят. В таких отраслях, как спиртовая и кожевенная, целесообразнее использовать именно неочищенную культуру микроорганизма; то же самое можно сказать и об использовании культур микроорганизмов в сельском хозяйстве при приготовлении комбикормов и при непосредственной обработке кормов на фермах. Однако в большинстве отраслей пищевой промышленности, а так же в текстильной, меховой, микробиологической промышленности и особенно медицине можно использовать только очищенные препараты ферментов. [8]

В последние годы все более пристальное внимание исследователей привлекается к разработке экспрессных методов анализа, характеризующихся высокой доступностью и обладающих достаточными уровнями чувствительности и избирательности. Особенный интерес вызывает возможность миниатюризации подобных аналитических устройств. Наиболее яркими представителями аналитических систем, сочетающих в себе перечисленные качества, являются биосенсоры. [9] Биосенсоры находят все более широкое применение в целом ряде отраслей науки, промышленности, сельского хозяйства, медицины и здравоохранения, так как позволяют быстро и качественно анализировать сложные, многокомпонентные смеси веществ. [10,11,12].

Важное место в биохимических исследованиях занимает выделение индивидуальных белков из органов и тканей. Очищенные индивидуальные белки нужны для изучения их первичной структуры, получения кристаллов белков с целью исследования их пространственной структуры методом рентгеноструктурного анализа, установления взаимосвязи между первичной, пространственной структурой белка и его функцией. Некоторые очищенные индивидуальные белки используют в медицине как лекарственные препараты, например гормон инсулин применяют для лечения сахарного диабета, а пищеварительные ферменты поджелудочной железы назначают при нарушении её функций в качестве заместительной терапии. Кроме того, очищенные ферменты часто используют в биохимических исследованиях в качестве химических реактивов для определения веществ в биологических жидкостях. Большинство методов, используемых для очистки индивидуальных белков, основано на различиях их физико-химических свойств, а также возможности специфично связываться с лигандом[13,14].

Получение индивидуальных белков из биологического материала (тканей, органов, клеточных культур) требует проведения последовательных операций, включающих:

- дробление биологического материала и разрушение клеточных мембран;
- фракционирование органелл, содержащих те или иные белки;
- экстракцию белков (перевод их в растворённое состояние);
- разделение смеси белков на индивидуальные белки.

Для разрушения биологического материала используют методы: гомогенизации ткани, метод попеременного замораживания и оттаивания, а также обработку клеток ультразвуком. Затем, ткань, находящуюся в буферном растворе с определённым значением рН и концентрацией солей, помещают в стеклянный сосуд (гомогенизатор) с пестиком. Вращающийся

пестик измельчает и растирает ткань о притёртые стенки сосуда.

В результате попеременного замораживания и оттаивания образующиеся кристаллы льда разрушают оболочки клеток.

После разрушения ткани нерастворимые части осаждают центрифугированием. Последующее центрифугирование гомогената с разной скоростью позволяет получить отдельные фракции, содержащие клеточные ядра, митохондрии и другие органеллы, а также надосадочную жидкость, в которой находятся растворимые белки цитозоля клетки. Искомый белок будет содержаться в одной из этих фракций.

Если искомый белок прочно связан с какими-либо структурами клетки, его необходимо перевести в раствор. Так, для разрушения гидрофобных взаимодействий между белками и липидами мембран в раствор добавляют детергенты; чаще всего используют тритон X-100 или додецилсульфат натрия.

Нуклеиновые кислоты, липиды и другие небелковые вещества можно удалить из раствора, используя их особые физико-химические свойства. Так, липиды легко удаляются из раствора добавлением органических растворителей, например ацетона. Однако воздействие должно быть кратковременным, так как ацетон вызывает денатурацию некоторых белков. Нуклеиновые кислоты осаждают добавлением в раствор стрептомицина. Наиболее трудоёмкий этап получения индивидуальных белков - их очистка от других белков, находящихся в растворе, полученном из данной ткани. Часто изучаемый белок присутствует в небольших количествах, составляющих доли процента от всех белков раствора. Так как белки обладают конформационной лабильностью, при работе с белками следует избегать денатурирующих воздействий, поэтому выделение и очистка белков происходят при низких температурах. На первых стадиях очистки белков целесообразно использовать методы, учитывающие какую-либо характерную особенность данного белка, например термостабильность или устойчивость в кислых растворах.

Первыми методами очистки необходимо удалить из раствора основную массу балластных белков, которые значительно отличаются от выделяемого белка физико-химическими свойствами. Впоследствии применяют всё более тонкие методы очистки белка.

Большинство белков денатурирует и выпадает в осадок уже при кратковременном нагревании раствора до 50-70 °С или подкислении раствора до рН 5. Если выделяемый белок выдерживает эти условия, то с помощью избирательной денатурации можно удалить большую часть посторонних белков, отфильтровав выпавшие в осадок-белки, или осадить их центрифугированием. Метод очистки белков, основанный на различиях в их растворимости при разной концентрации соли в растворе. На практике биохимии белков чаще всего используют разные концентрации солей сульфата аммония - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Концентрацию выражают в относительно насыщенного раствора соли используя стандартную «таблицу сульфата аммония» [15] или используя онлайн калькулятор сульфата аммония[16]. Метод разделения белков с помощью гель-фильтрационной хроматографии основан на том, что вещества, отличающиеся молекулярной массой, по-разному распределяются между неподвижной (пористый гель) и подвижной фазами (рис. 1). Хроматографическая колонка заполняется гранулами пористого вещества (сефадекс, агароза и др.). Для проведения гель-фильтрации под давлением разработаны жёсткие гели (сефакрил, TSK-гели)[13]. Метод разделения также основан на различии в молекулярных массах белков. Скорость седиментации веществ в процессе вращения в ультрацентрифуге, где центробежное ускорение достигает 100 000-500 000 g, пропорционально их молекулярной массе. На поверхность буферного раствора, помещённого в кювету, наносят тонкий слой смеси белков. Кювету помещают в ротор ультрацентрифуги. При вращении ротора в течение 10-12 ч более крупные молекулы (с большей молекулярной массой) оседают в буферном растворе с большей скоростью. В результате в кювете происходит расслоение смеси белков на отдельные

фракции с разной молекулярной массой (рис. 2). После расслоения белковых фракций дно кюветы прокалывают иглой и по каплям собирают содержимое небольшими порциями в пробирки.

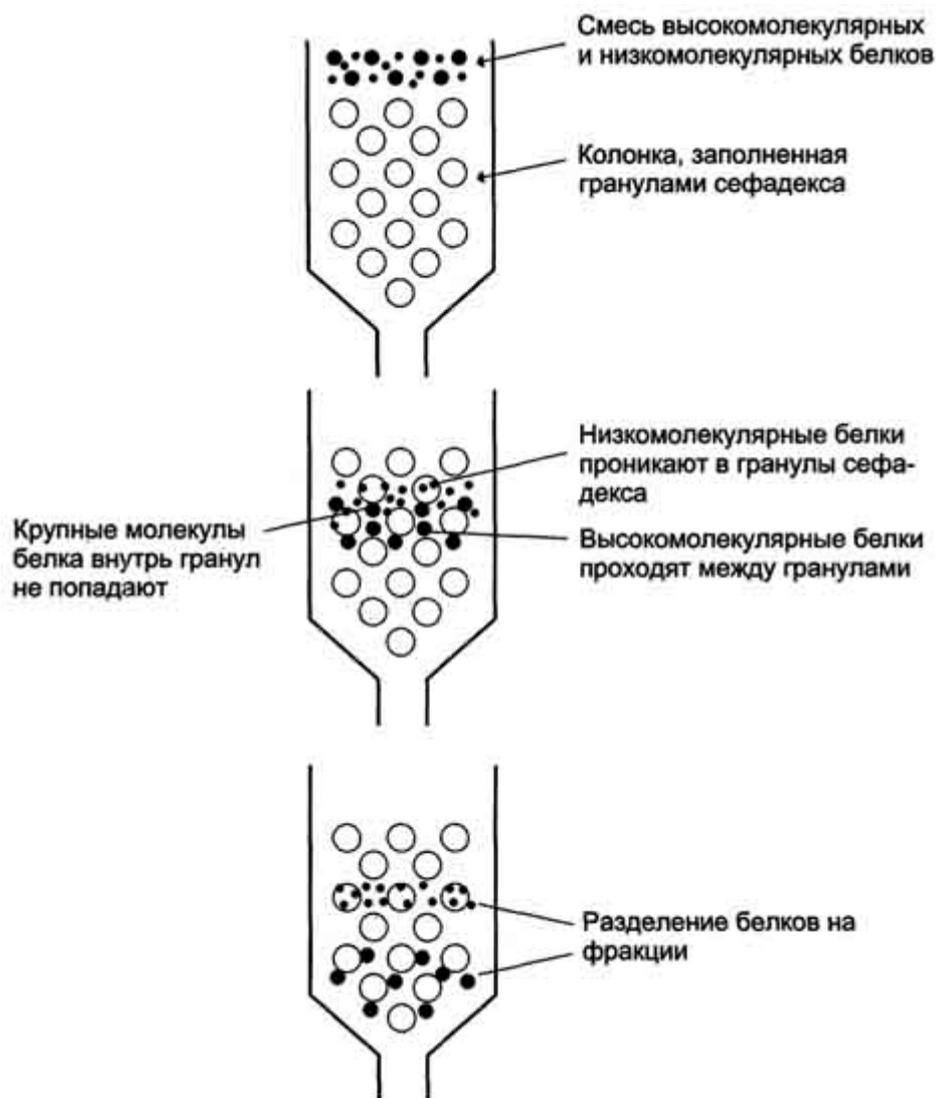


Рис.1. Разделение смеси белков методом гель-фильтрации.



Рис.2. Кювета, заполненная буферным раствором с разделёнными белковыми фракциями.

Электрофорез белков. Метод основан на том, что при определённом значении pH и ионной силы раствора белки двигаются в электрическом поле со скоростью, пропорциональной их суммарному заряду. Белки, имеющие суммарный отрицательный заряд, двигаются к аноду (+), а положительно заряженные белки - к катоду (-). [18] Электрофорез проводят на различных носителях: бумаге, крахмальном геле, полиакриламидном геле и др. В отличие от электрофореза на бумаге, где скорость движения белков пропорциональна только их суммарному заряду, в полиакриламидном геле скорость движения белков пропорциональна их молекулярным массам. Разрешающая способность электрофореза в полиакриламидном геле выше, чем на бумаге. Так, при электрофорезе белков сыворотки крови человека на бумаге обнаруживают только 5 главных фракций: альбумины, α_1 глобулины, α_2 -глобулины, β -глобулины и γ -глобулины (рис. 3). Электрофорез тех же белков в полиакриламидном геле позволяет получить до 18 различных фракций. Для обнаружения белковых фракций полоски бумаги или столбики геля обрабатывают красителем. Окрашенный комплекс белков с красителем выявляет расположение различных фракций на носителе.

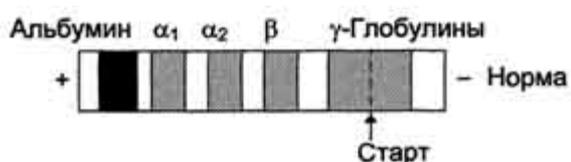
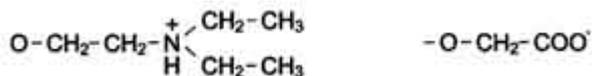


Рис.3. Электрофорез белков сыворотки крови здорового человека на бумаге.

Ионообменная хроматография. Так же как и электрофорез, метод основан на разделении белков, различающихся суммарным зарядом при

определённых значениях pH и ионной силы раствора. При пропускании раствора белков через хроматографическую колонку, заполненную твёрдым пористым заряженным материалом, часть белков задерживается на нём в результате электростатических взаимодействий.[19] В качестве неподвижной фазы используют ионообменники - полимерные органические вещества, содержащие заряженные функциональные группы. Различают положительно заряженные анионообменники, среди которых наиболее часто используют диэтиламиноэтилцеллюлозу (ДЭАЭ-целлюлозу), содержащую катионные группы, и отрицательно заряженные катионообменники, например карбоксиметилцеллюлозу (КМ-целлюлозу), содержащую анионные группы.



Выбор ионообменника определяется зарядом выделяемого белка. Так, для выделения отрицательно заряженного белка используют анионообменник. При пропускании раствора белка через колонку прочность связывания белка с анионообменником зависит от количества отрицательно заряженных карбоксильных групп в молекуле. Белки, адсорбированные на анионообменнике, можно смыть (элюировать) буферными растворами с различной концентрацией соли, чаще всего NaCl, и разными значениями pH. Ионы хлора связываются с положительно заряженными функциональными группами анионообменника и вытесняют карбоксильные группы белков. При низких концентрациях соли элюируются белки, слабо связанные с анионообменником. Постепенное увеличение концентрации соли или изменение pH, что меняет заряд белковой молекулы, приводит к выделению белковых фракций, в одной из которых находится искомый белок[20].

Аффинная хроматография, или хроматография по сродству. Это наиболее специфичный метод выделения индивидуальных белков,

основанный на избирательном взаимодействии белков с лигандами, прикреплёнными (иммобилизованными) к твёрдому носителю. В качестве лиганда может быть использован субстрат или кофермент, если выделяют какой-либо фермент, антигены для выделения антител и т.д. Через колонку, заполненную иммобилизованным лигандом, пропускают раствор, содержащий смесь белков. К лиганду присоединяется только белок, специфично взаимодействующий с ним; все остальные белки выходят с элюатом [17]. Белок, адсорбированный на колонке, можно снять, промыв её раствором с изменённым значением рН или изменённой ионной силой. В некоторых случаях используют раствор детергента,рывающий гидрофобные связи между белком и лигандом. Аффинная хроматография отличается высокой избирательностью и помогает очистить выделяемый белок в тысячи раз.(рис.4)[21]



Рис.4. Аффинная хроматография.

Для удаления низкомолекулярных соединений, в частности сульфата аммония после высаливания, применяют диализ. Метод основан на том, что через полупроницаемую мембрану, пропускающую низкомолекулярные вещества, не проходят белки, имеющие более высокую молекулярную массу. В стакан большой ёмкости (около 1 л) с буферным раствором помещают полупроницаемый мешочек, заполненный раствором белка с солью. Скорость выхода соли из мешочка в буферный

раствор пропорциональна градиенту его концентраций по обе стороны от мембраны. По мере выхода соли из мешочка буферный раствор в стакане меняют. Для очистки белков от низкомолекулярных примесей используют также метод гель-фильтрации.

Для определения чистоты (гомогенности) выделенного белка применяют методы с высокой разрешающей способностью, например электрофорез в полиакриламидном геле, высокоэффективная хроматография высокого давления. От чистоты лекарственного белкового препарата зависят его биологическая эффективность и аллергенность (т.е. способность вызывать аллергические реакции). Чем качественнее очищен препарат, тем меньше вероятность осложнений при его применении. [22]

II ГЛАВА. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы и методы исследования. В качестве основных методов очистки ферментного препарата были использованы высаливание сульфатом аммония, ионообменная хроматография и метод геле-электрофореза.

2.2 Оборудование и реактивы: в работе использованы центрифуги 5810Rи 5424 Eppendorf (Германия), профиль хроматографии контролировали с помощью UvicordSIILKB (Швеция), колориметрические измерения проводили с помощью iMarkmicroplatereaderBio-Rad (США). В качестве источника фермента использовали технический препарат глюкозооксидазы. Химические реактивы производства Sigma-Aldrich (США).

2.3 Высаливание глюкозооксидазы из технического ферментного препарата

В мерную колбу помещали 150 мг технического ферментного препарата и растворяли в 10 мл дистиллированной воды, помешивая стеклянной палочкой и не допуская вспенивания. После растворения сухого препарата смесь центрифугировали 5 минут при 10 тыс.об/мин, супернатант отбирали для дальнейшего высаливания. Белки из технического препарата осаждали ступенчато увеличивая насыщение сульфата аммония: от 30% до 90% от насыщения. Расчеты количества соли (сульфата аммония) проводили с помощью «таблицы насыщения сульфата аммония при»[15]. На каждой ступени осадок собирали центрифугированием 2 минуты при 10000 об/мин и супернатант использовали для осаждения белка при следующей ступени. Собранные осадки далее растворяли в дистиллированной воде по объему равной

исходному объему раствора белка и использовали для определения белка и измерения активности.

2.4 Определение активности глюкозооксидазы

Рабочий раствор: 2 мг пероксидазы растворяли в 5 мл дистиллированной воды, приливали 1 мл 1М фосфатного буфера и 100 мкм о-дианизидина и доводили до 10 мл дистиллированной водой.

Субстрат: 0,1% раствор глюкозы

Проведение анализа: В пробирку вместимостью 2 мл вносят 100мкл рабочего раствора, 100 мкл раствора глюкозооксидазы, смесь перемешивают, затем добавляют 100мкл глюкозы. Контрольную пробирку готовят точно так же, но до внесения глюкозы смесь инактивируют 100мкл 1М H_2SO_4 . Содержимое пробирки инкубируют в ультратермостате при 37° 10 мин. Для остановки реакции добавляем 100 мкл 1М H_2SO_4 . Интенсивность образовавшейся окраски смотрели на фотоэлектроколориметре при длине световой волны 440нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 5мм, в сравнении с контрольным раствором.

2.5 Определение белка твердофазным методом Бредфорда

1. В центр каждого квадрата наносили 5 мкл белкового раствора и высушивали
2. Вымывали фильтровальные диск абсолютным этанолом при 4 С° и высушивали
3. Каждый квадратик помещали в колбу.
4. Добавляли 100 мкл Кумасси бриллиантовый голубой G-250, инкубировали в течении 15 минут.

5. Избавлялись от лишнего красителя и промывали диски 1.0мл 10% уксусной кислотой.
6. Добавляли 400 мкл 1 Н NaOH
7. Инкубировали в течении 15 минут и добавляли 425 мкл 1Н HCL
8. Определяли оптическую плотность при 600 нм.[23]

2.6 Ионообменная хроматография

Ионообменную хроматографию проводили на колонке заполненную QAE Sephadex A-50. Элюирование проводили ступенчатым градиентом NaCl.

На аналитических весах отвешивали 1 грамм QAE Sephadex A-50 и помещали в мерный стакан, залили 15 мл дистиллированной воды и оставили набухать в течении суток при комнатной температуре на магнитной мешалке. После набухания заполняли колонку размерами 0,5×5см. Уравновешивали колонку Tris-HCl буфером pH 6,8. Наносили фермент на колонку. Элюирования проводили ступенчатым градиентом NaCl с концентрацией 100мМ, 200мМ, 300мМ, 500мМ и 1М. Каждую фракцию отбирали и проверяли активность глюкозооксидазы.

2.7 Электрофорез в ПААГ

Денатурирующий электрофорез в ПААГ (T=12% общая концентрация Акриламид+бис-акриламид, C=3,6% относительная концентрация бис-акриламида) проводили в буферной системе Леммли[19,20]. Окрашивание белков проводили в 0,05% Куммасы бриллиантовый синий R-250. Отмывку гелей от избытка красителя проводили промыванием в смеси: изопропанол 10%, уксусная кислота 7,5%. Фотографирование и калькуляцию молекулярных масс проводили с помощью Alphaimager 3400 (Alpha Innotech, США).

III глава. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Подбор концентрации сульфата аммония для высаливания глюкозооксидазы из технического ферментного препарата

Как показали наши данные по высаливанию технического препарата глюкозооксидазы сульфатом аммония (таблица 1) активность фермента оказывается во фракции, осажденной в пределах насыщения 70-90%. Более наглядно распределение белка и активности представлено на таблице 1. В дальнейших экспериментах из технического препарата в первой стадии осаждали белки до 70 % насыщения и эту фракцию выбрасывали как не активную.

Таблица 1

Высаливание технического препарата глюкозооксидазы сульфатом аммония

% насыщения сульфата аммония	Концентрация белка, в мг	Активность глюкозооксидазы*
30	40.5	9.02
40	21.2	0.44
45	12.1	0.46
50	10.2	0.44
55	22.1	0.44
60	29.8	0.44
65	19.8	0.44
70	10.3	7.48
75	31.2	13.64
80	62.3	27.5
85	30.4	16.5
90	11.0	7.83

Примечание. * - одна международная единица окисляет 1 мкМ 0-дианизидина за мин при 25оС и рН 7,0.

Процесс высаливание позволил увеличить удельную активность от 5.2 Ед/мг до 27.5 Ед/мг.

3.2 Ионно-обменная и гель-хроматография глюкозооксидазы

Фракцию, полученную путем высаливания (70-90%) объединяли, диализовали против воды, затем против 50 мМ Tris-HCl pH 6,8 и наносили на QAE-Sephadex A50 уравновешенный тем же буфером.

Таблица 2

Ионообменная хроматография глюкозооксидазы на QAE Sephadex A50

Фракция	Белок	Активность *
Проскок	80,5	1,54
0,1 М	41,2	3,3
0,2 М	12,5	330
0,3М	7,8	1,98
0,4 М	3,4	0,44
1 М	1,0	0,44

Примечание. * - одна международная единица окисляет 1 мкМ 0-дианизидина за мин при 25°C и pH 7,0.

Как видно из данных таблицы 2 глюкозооксидаза из исследуемого образца в примененных условиях ионообменной хроматографии проявляет свойства анионного белка и элюируется из QAE-Sephadex преимущественно 0,2 М NaCl. Степень очистки на данной стадии (относительно предыдущей, высаливания) составляет около 12 раз (удельная активность 330 Ед/мг)

С целью фракционирования по размерам молекул фракцию, полученную ионообменной хроматографией (элюат 0,2М) после диализа против воды высушивали лиофильно, растворяли в минимальном объеме и наносили на колонку 1x65 см с сефадексом G-150 F. Подвижной фазой служил 50 мМ Tris-HCl pH 7,0 содержащий 0,14 М NaCl. (скорость элюции 60 мл/ч). Пробы отбирались по 6 мл. Профиль элюции контролировали с помощью Uvicord SII при длине волны 206 нм, временная шкала 1,0 с и шкала поглощения 0,5. Профиль хроматограммы представлен на рис. 5. По результатам определения активности в пиках, пик промываемый с 30-48 мл

(заштрихован) оказался активным (фракции G-5-8). Все фракции с максимальной активностью глюкозооксидазы собирались вместе. Удельная активность глюкозооксидазы в данном пике был равен 1287 ед/мг и степень очистки от предыдущей стадии (ионообменная хроматография фр. 0,2M) составляет 3,9 раз.

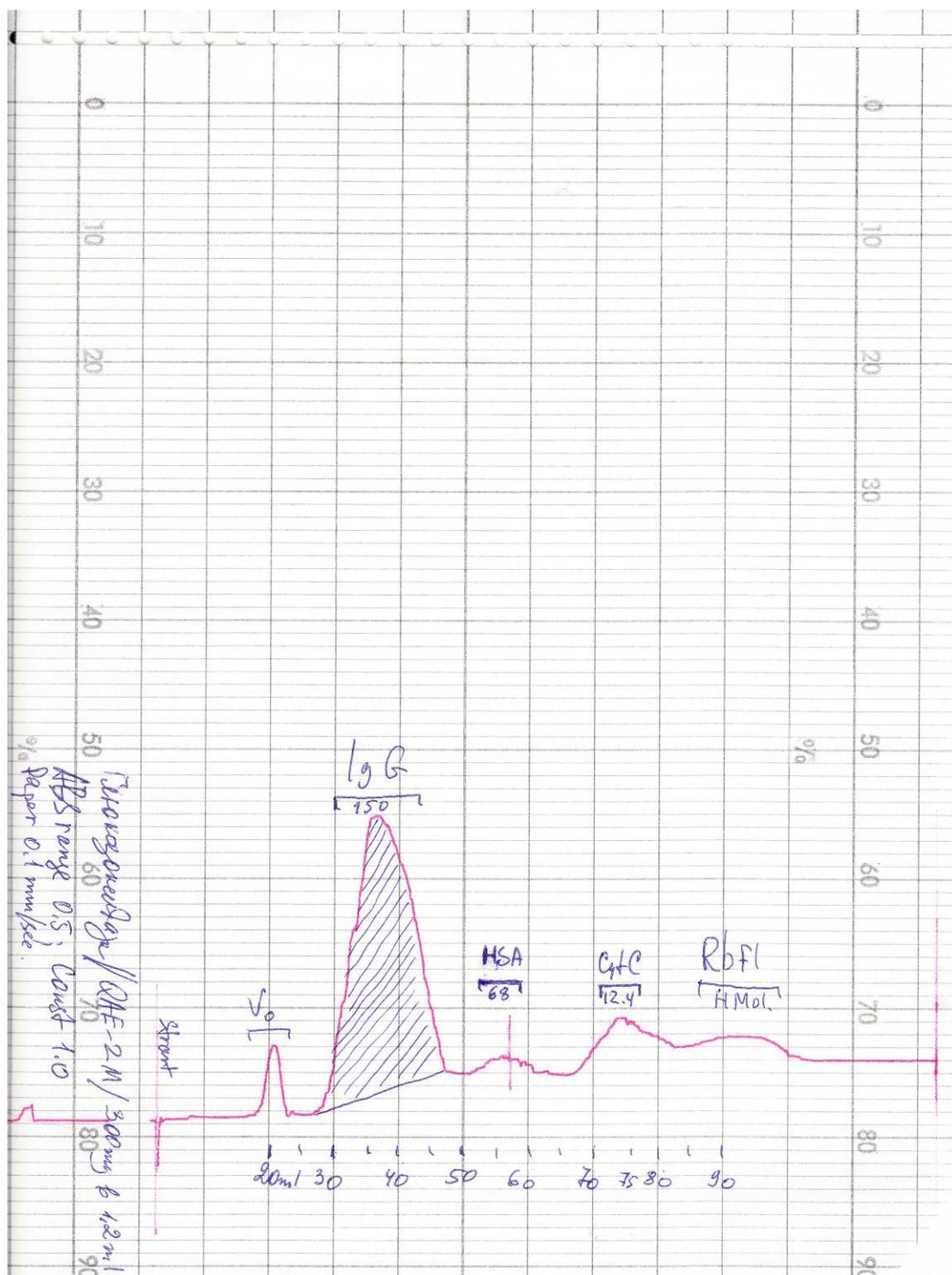


Рис 5. Профиль хроматограммы

3.3. Электрофорез очищенного препарата

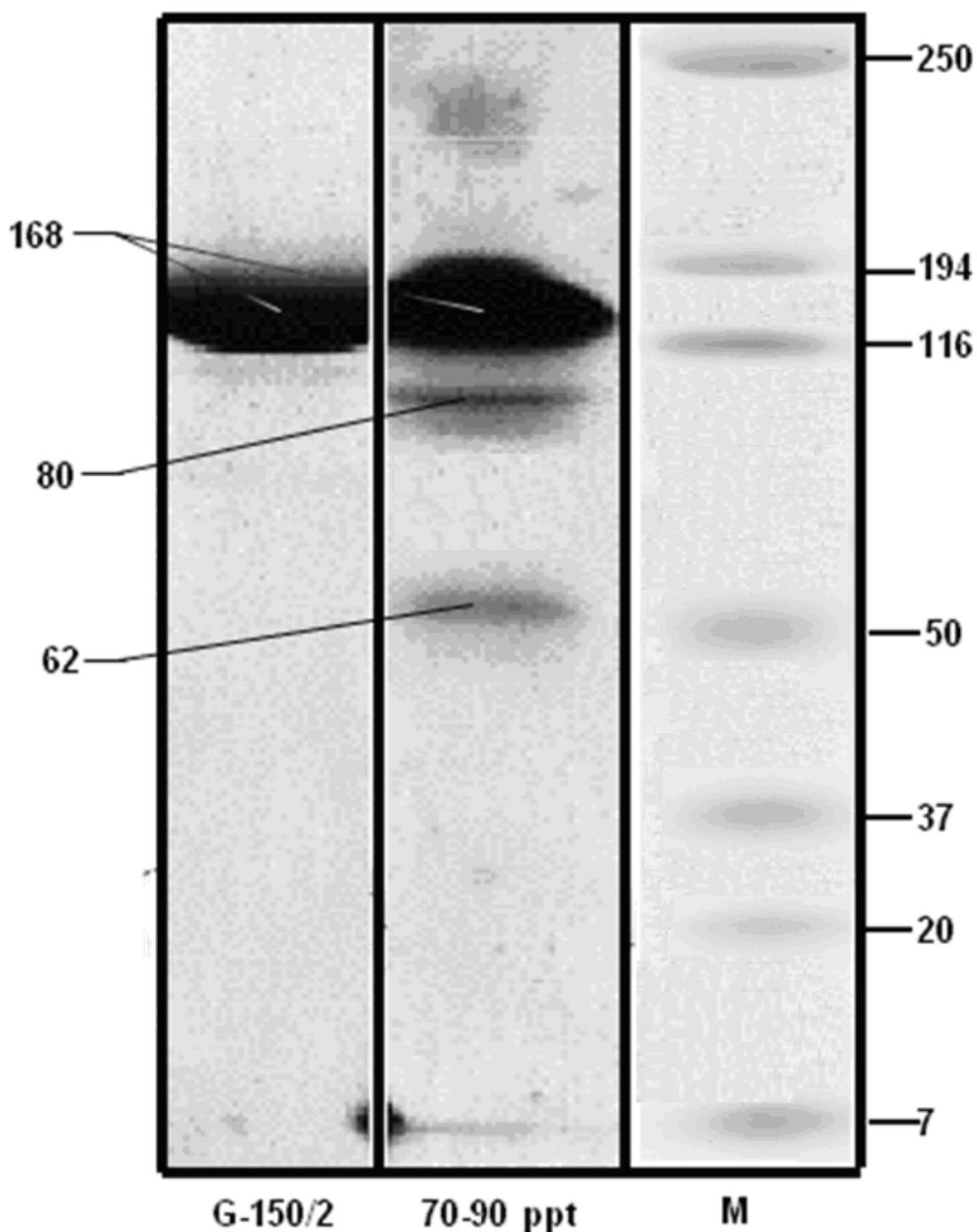


Рисунок 6. Характеристика гомогенности фракций глюкозооксидазы с помощью ПААГ электрофореза. «М»- смесь маркеров Bio-Rad 161-0318 (цифры справа указывают на размер маркеров в кДа) «70-90ppt»- фракция полученная высаливанием, G-150/2 – активный пик фермента при геле-фильтрации.

Эффективность выбранного нами метода очистки и степень чистоты конечного образца ферментного препарата испытывали с помощью ПААГ электрофореза. Как показали наши результаты (рис. 6) фракция фермента после конечной стадии (гель-фильтрации) представляет собой высокоочищенный белок с чистотой не менее 90%. Данные сканирования геля полученные с помощью программы Quantity One (www.bio-rad.com) показали 92.3% чистоты.

Таблица 3

Этапы очистки глюкозооксидазы из технического ферментного препарата
Aspergillus niger

Фракция	Специфическая активность глюкозоок-сидазы*, Ед/мг	Общее содержание белка, мг	Степень очистки
Технический ферментный препарат	5,2±0,2	285±20	1,0
Осаждение 90% (NH ₄) ₂ SO ₄	27,5±0,35	49±10	5,3
Ионообменная хроматография на QAE Sephadex A50	330±0,9	3.92±1,48	12
Гель-фильтрация на сефадексе G-150 F	1287±24,3	1.01±0,02	3,9

ВЫВОДЫ

1. Разработана технологическая схема очистки технического ферментного препарата глюкозооксидазы *Aspergillus niger*.
2. Была подобрана оптимальная концентрация сульфата аммония для осаждения глюкозооксидазы из ферментного препарата, равная 70-90% от насыщения. Данный этап позволил очистить фермент в 5,3 раз и повысить активность фермента с 5,2 до 27,5 Ед/мг.
3. Были проведена ионообменная хроматография и гель-хроматография, которая позволила очистить препарат в 12 и 3,9 раз соответственно и увеличить активность до 1287 Ед/мг.
4. Процедура электрофореза позволила убедиться в гомогенности полученного нами белка.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. Диксон, Э.Уэбб. Ферменты. В 3 томах// Пер. с англ.- М.: Мир, 1982. 1-Т. с 310-31.
2. Хаджиев Д.Д. Выделение, очистка и свойства глюкозооксидазы из *Aspergillus niger*// Автореферат, Ташкент, 2009, с 5-7.
3. Зимин Ю.В., Сяткин С.П., Березов Т.Т., Надмолекулярная регуляция активности некоторых оксидоредуктаз клетки в норме и патологии// Вопросы медицинской химии, 2001, том:47(3), с 279-287.
4. Гулый М.Ф., Скорик Л.В., Шевченко М.И., Мельничук Д.А., Романенко А.В., Влияние различных уровней углекислоты на активность дегидрогеназ// Украинский Биохимический Журнал, 1979, т.51, №2, с 161-167.
5. М.Ф.Гулый, В.И.Билай, и др. Фермент глюкозооксидаза и его применение// Киев «Науково думка», АН Украинской ССР, 1964, с 3.
6. И.М.Грачева, Технология ферментных препаратов// Москва «АГРОПРОМИЗДАТ», 1987, с 276-278.
7. Е.И.Карасёва, Е.И.Тарун, Д.И.Метелица Ультразвуковая инактивация глюкозооксидазы *Aspergillus niger* в водных растворах//Прикладная биохимия и микробиология, 2009, том 45, №1, с 14-22.
8. Julio Raba and Horacio A.Mottola, Glucose Oxidase as an Analytical Reagent// Critical Reviews in Analytical Chemistry, 25(1), p 1–42 (1995).
9. Wilson R., Turner A. P. F. // Biosens. Bioelectr. 1992. 7. p 165.
- 10.Л.С. Солдатова, О.О.Бабич, А.Ю.Просеков, Электрохимический биосенсор глюкозы на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной

- на наноматериале// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1995, №8, С 218-221.
11. Brahim Sean, et.al Bio-smart materials: kinetics of immobilized enzymes in p(HEMA)/p(pyrrole) hydrogels in amperometric biosensors// Macromolecular Symposia, 2007.
 12. Brahim Sean, et.al.// Kinetics of glucose oxidase immobilized in p(HEMA)-hydrogel microspheres in a packed-bed bioreactor// Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (2002), 18(1-3), 69-80.
 13. Зайцев М. Г., Владимиров В. И., Журикова Е. М., Ильницкий М. Ю. Выделение фермента алкогольоксидазы из клеток метилотрофных дрожжей родов *Pichia*, *Hansenula*, // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2012. №2. С.219-225
 14. Михайлова Е.В., Сафонова О.А., Попова Т.Н.// Применение хроматографических методов для очистки цитоплазматической НАД-зависимой малатдегидрогеназы из печени крыс в норме и при токсическом гепатите// Сорбционные и хроматографические процессы, 2008. Т.8. Вып.6. С. 1027-1034
 15. Jakoby W.B., Crystallization as a purification technique// Enzyme Purification and Related Techniques, in Methods in Enzymology, , 1971 Vol. 22, Jakoby, W.B., Ed., Academic Press.
 16. <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>
 17. Сова В.В., Кусайкин М.И., Методическое пособие к практическим занятиям по очистке белков// Владивосток «Дальневост. ун-та», 2006, с 37.
 18. Cooke R.J. The standartization of electrophoresis methods for variety identification// In: Biochemical Identification of varieties (Materials III International Symposium ISTA, Leningrad, USSR, 1978), VIR, Leningrad, USSR, 1988: 14-27.
 19. Остерман Л.А., Хроматография белков и нуклеиновых кислот// М.: Изд-во Наука, 1985, с. 412

- 20.Ежова Г. П. , Бабаев А. А. , Новиков В. В., Биоинформационные аспекты протеомики и деградации белка//Нижний Новгород, 2007, с 10
- 21.Скоупс Р., Методы очистки белков// М.: Изд-во Мир., 1985, с 287.
- 22.Северин.Е.С., Биохимия// М.: Изд-во ГЭОТАР-МЕД, 2004, с 69-73.
- 23.Salvador Said-Fernandez, Maria Teresa Gonzalez-Garza, Benito David Mata-Cardenas and Leticia Navarro-Marolejo, A Multipurpose Solid-Phase Method for Protein Determination with Coomassie Brilliant Blue G-250// Analytical Biochemistry 191, 119-126, 1990.
- 24.Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685
- 25.Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Изд-во Наука, 1981, с 285.