

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ НАИБОЛЕЕ ДОСТУПНЫХ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ЛИЗОЦИМА ПРЕСНОВОДНЫХ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ

Карнаухова И.В.¹, Ширяева О.Ю.¹, Шукшина С.С.¹, Соловых Г.Н.², Осинкина Т.В.²

¹ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный педагогический университет», Оренбург, Россия (460014, Оренбург, ул. Советская, 19), e-mail: karnauhova-irina@mail.ru

²ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург, Россия (460000, Оренбург, пр-т Парковый, 7), e-mail: bio_ogma@mail.ru

Проведено сравнительное исследование эффективности двух наиболее доступных методов выделения и очистки лизоцима двустворчатых моллюсков - аффинной и катионообменной хроматографии. Сравнение выбранных методов осуществлялось по следующим показателям: степень очистки, количество выделенного фермента, загрязненность солями. Метод хроматографии на хитине по сравнению с хроматографией на карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ) является более доступным, позволяет получить большее количество фермента менее загрязнённого солями. Однако в ходе эксперимента обнаружено, что степень очистки лизоцима, полученного методом ионообменной хроматографии на карбоксиметилцеллюлозе выше, чем на хитине. Данный факт следует учитывать при необходимости получения чистого препарата лизоцима моллюсков для дальнейшего тестирования в ходе биохимических исследований.

Ключевые слова: лизоцим, *Unio pictorum*, хитин, карбоксиметилцеллюлоза, аффинная хроматография, ионообменная хроматография.

STUDYING OF SOME MOST AVAILABLE METHODS OF ALLOCATION AND LIZOTSIM'S CLEANING FRESH-WATER TWO-FOLD MOLLUSCS

Karnauhova I.V.¹, Shiryaeva O.Y.¹, Shukshina S.C.¹, Solovykh G.N.², Osinkina T.B.²

¹GBOU VPO "Orenburg State Pedagogical University", Orenburg, Russia (460014, Orenburg, Sovetskaya St., 19), e-mail: karnauhova-irina@mail.ru

²GBOU VPO "Orenburg State Medical University" of the Russian Ministry of Health, Orenburg, Russia (460000, Orenburg, Parkovy Ave, 7), e-mail: bio_ogma@mail.ru

Comparative research of efficiency of two most available methods of allocation and cleaning of a lizotsim of two-fold mollusks - an affine and kationobmennyy chromatography is conducted. Comparison of the chosen methods was carried out on the following indicators: extent of cleaning, amount of the emitted enzyme, impurity with salts. The chromatography method on chitin in comparison with a chromatography on carboxymethylcellulose (KMTs) is more available, allows to receive bigger amount of the enzyme which was less polluted by salts. However during experiment it is revealed that extent of cleaning of the lizotsim received by method of an ion-exchange chromatography on carboxymethylcellulose above than on chitin. This fact should be considered in need of receiving a pure preparation of a lizotsim of mollusks for further testing during biochemical researches.

Key words: lysozyme, *Unio pictorum*, chitin, carboxymethyl cellulose, affine chromatography, cation exchange chromatography.

Для выделения и очистки лизоцима наиболее часто используется метод жидкостной ионообменной хроматографии на катионитах. Самыми распространенными катионитами являются амберлит и карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) [2, 6]. В ряде методик используется аффинная хроматография, где в качестве сорбента выступает хитин [4].

Поскольку каждый из методов имеет определённые сложности, достоинства и недостатки, в ходе работы представилось актуальным провести сравнительное исследование эффективности данных сорбентов для хроматографического выделения и очистки лизоцима.

В качестве объекта исследования использовали двухстворчатых моллюсков семейства перловицы (*Unionidae*), вид *Unio pictorum*, являющихся типичными представителями гидробиоценозов среднего течения р. Урал в районе г. Оренбурга. Моллюсков собирали вручную и определяли их видовую принадлежность общепринятыми в гидробиологии методами [2, 5].

В качестве сорбента использовали хитин и карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ). Хитин является наиболее доступным сорбентом, методика получения которого является достаточно простой и хорошо воспроизводимой. Кроме того, хитин позволяет работать с большими объемами биологической жидкости, по простой схеме элюции с небольшой трудоёмкостью. В данном случае отсутствует засоленность получаемых препаратов фермента, что значительно снижает погрешность метода, исключая необходимость обессоливания [3]. В отличие от хитина, КМЦ – сорбент дорогостоящий, для реализации данного метода необходимо выполнение более сложной и продолжительной схемы элюции. При использовании в качестве сорбента КМЦ, в элюатах присутствуют соли, что требует последующего обессоливания, сопряжённого, как правило, с большей потерей препарата [2].

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили гомогенаты тканей пресноводного двухстворчатого моллюска *U. pictorum*, полученные при растирании на холоду с прокаленным кварцевым песком в фосфатном буферном растворе (рН=6,2). Далее гомогенаты подвергали многократному замораживанию и оттаиванию.

В целях освобождения от балластных белков проводили этап рН-обработки: отделённый центрифугированием от тканей супернатант обрабатывали 0,1М ацетатом аммония (рН=4,5), инкубацию проводили при 4°C в течение 17 часов, затем раствор центрифугировали при 13000 оборотов/минуту в течение 10 минут. Осадок отбрасывали.

Для ионнообменной хроматографии использовали колонку (2,0×20см), заполненную сорбентом карбоксиметилцеллюлоза (BUDAPEST·HUNGARY) с номинальной ёмкостью 0,70±0,10 мэкв/г, уравновешенную 0,05М ацето-аммонийным буферным раствором (рН=5,8) и соединённую с перистальтическим насосом со скоростью протекания жидкости через колонку 0,1 мл/мин. На колонку наносили 30 мл очищенного экстракта, нейтрализованного до рН=5,8. Далее колонку промывали 150мл 0,1М ацетата аммония – для освобождения от сопутствующих не связавшихся белков. Лизоцим десорбировали 0,8М ацетатом аммония (рН=4,5). Собирали фракции объёмом 2мл; во всех определяли лизоцимную активность. Для дальнейших исследований отбирали наиболее активные [1, 2].

При проведении афинной хроматографии в качестве сорбента использовали хитин, полученный из панцирей речных раков [3].

В целях уменьшения сорбции посторонних белков проводили предварительную подготовку экстрактов. Учитывая тот факт, что лизоцим устойчив в пределах pH 3,0–5,0, экстракты сначала подкисляли 5%-ной уксусной кислотой до pH 4,0 и выдерживали на холоду 10 мин, осадок удаляли центрифугированием. Затем pH супернатанта доводили до 8,5 2н раствором NaOH и выпавший осадок отделяли центрифугированием в том же режиме. После центрифугирования получали осветленные препараты.

В работе использовали хроматографическую колонку (2,0×20см), заполненную хитиновым сорбентом, суспензированным в 0,1М фосфатном буфере (pH 8,0 – 8,5). Прозрачный экстракт объемом 30 мл наносили на колонку, уравновешенную 0,1М фосфатным буфером (pH 8,5). После нанесения всего объема экстракта колонку промывали тем же буфером, объемом 200 мл, до исчезновения в элюатах белка. Затем промывали 100 мл дистиллированной воды для удаления солей. Лизоцим элюировали 5%-ной уксусной кислотой, объемом 100 мл, путем резкого изменения pH среды. Собирали фракции объемом 5 мл (20 фракций), во всех фракциях определяли лизоцимную активность [5].

Лизоцимную активность элюатов определяли в суспензиях тест-культуры *M. lysodeikticus* (штамм № 2665 ГИСК им. Л.А Тарасевича) с исходной оптической плотностью $D_{540} = 0,40$ при 27°C и длине оптического пути 10мм спектрофотометрическим методом на цифровом спектрофотометре PD – 303 UV [2].

О лизоцимной активности полученных препаратов судили по изменению светопропускания опытной взвеси *M. lysodeikticus* по сравнению с исходной, расчёт производили по формуле:

$$E_a = \frac{\Delta D_{540}}{\tau * 0,001 * V}$$

E_a – единица лизоцимной активности, E_a /мл;

ΔD_{540} – изменение оптической плотности опытной взвеси *M. lysodeikticus* во время инкубации;

τ – время инкубации, 15минут;

0,001 – снижение величины оптической плотности раствора за 1 минуту;

V – объём препарата лизоцима, 1 мл.

За единицу литической активности (E_a /мл) элюата принимали такое его количество, которое вызывало снижение исходной оптической плотности раствора на 0,001 за 1 минуту.

Удельную литическую активность выражали в условных единицах на мг белка (E (уд.акт.), ед./мг белка). Содержание белка в исследуемых элюатах определяли по методу М. Брэдфорда [6].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием компьютерной программы «Microsoft Excel 2010» [5].

Результаты и их обсуждение Для выделения и очистки лизоцима *U. pictorum* методом ионообменной хроматографии на КМЦ подготовленную колонку предварительно стандартизировали яичным лизоцимом фирмы «Ферейн» с концентрацией белка 1 мкг/мл. Результаты хроматографии представлены на рисунке 1. Яичный лизоцим элюировался в данных условиях хроматографии во фракциях №11 – 13.

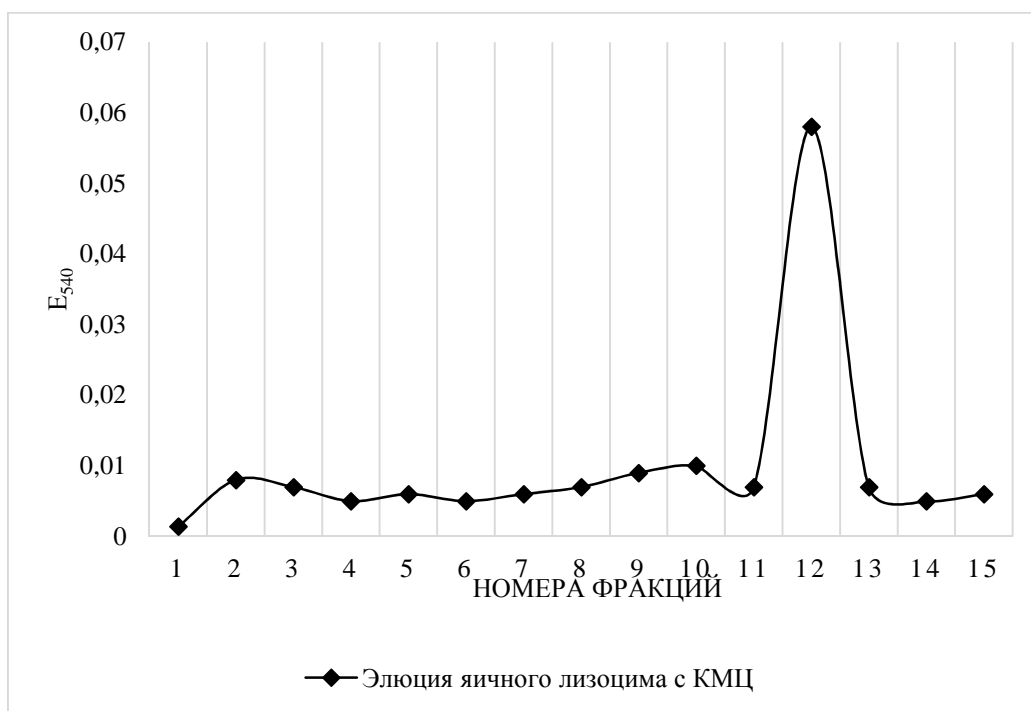


Рис. 1. Элюция яичного лизоцима с карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ)

Следует отметить, что наибольшая лизоцимная активность элюатов регистрировалась в этих же фракциях.

Результаты хроматографии лизоцима моллюсков на КМЦ отображены на рисунке 2. Белок выходил преимущественно одним пиком – во фракциях №8 – 10: в них же фиксировалась лизоцимная активность в отношении культуры *M. lysodeikticus*.

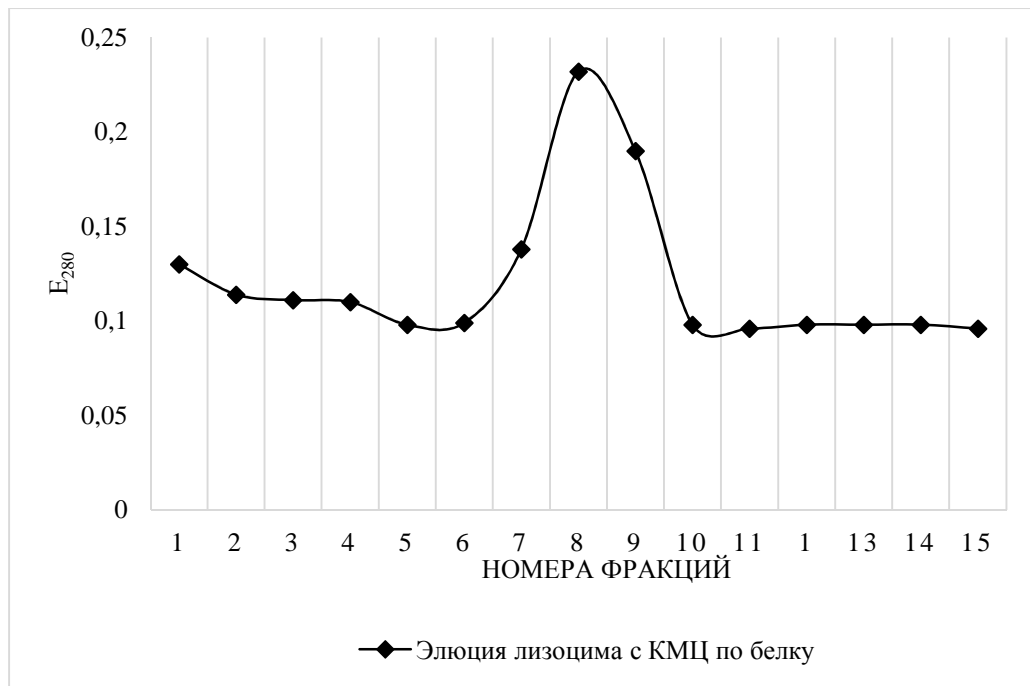


Рис. 2. Кривая элюции лизоцима с карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) (по белку)

Анализ полученных данных показывает, что лизоцим моллюсков *U.pictorum* менее основной по сравнению с яичным лизоцимом. Наибольшая концентрация белка в случае яичного лизоцима фиксируется в 12 фракции с изоэлектрической точкой, равной $pI \approx 11,0$, а активные элюаты лизоцима моллюсков во фракциях №8 – 10. Следовательно, лизоцим моллюсков имеет более низкое значение изоэлектрической точки.

Для идентификации лизоцима в полученных элюатах проводили спектрофотометрическое исследование в диапазоне 240 – 320 нм. Значения экстинкции элюатов практически совпадают со значениями экстинкции препарата яичного лизоцима, что подтверждает наличие фермента в опытных элюатах.

Для выделения и очистки лизоцима *U.pictorum* методом аффинной хроматографии на хитине подготовленную колонку также предварительно стандартизировали яичным лизоцимом фирмы «Ферейн» с концентрацией белка 1 мкг/мл. Результаты хроматографии отображены на рисунке 3. Яичный лизоцим элюировался в данных условиях хроматографии во фракциях №11 – 13.



Рис. 3. Кривая выхода элюции яичного лизоцима с хитина

Результаты хроматографии лизоцима моллюсков приведены на рисунке 4. Белок постоянно выходил одним пиком – фракции №8 – 12: лизоцимная активность по отношению к культуре *M. Lysodeikticus* фиксировалась в этих же фракциях.



Рис. 4. Кривая выхода элюции лизоцима с хитина по белку

Для идентификации лизоцима в полученных элюатах проводили спектрофотометрическое исследование в диапазоне 240 – 320 нм. Кривая экстинкции элюатов совпадает с кривой экстинкции препарата яичного лизоцима.

Спектрофотометрическое исследование элюатов в диапазоне от 240 до 320 нм подтверждает присутствие лизоцима моллюсков в исследуемых фракциях.

Согласно проведенным исследованиям, возможно оценить эффективность используемых сорбентов. Результаты ионообменной и аффинной хроматографии экстрактов моллюсков *U. pictorum* показали хорошую воспроизводимость исследуемых методов: белок постоянно выходил одним пиком – во фракциях №8 – 12 при хроматографии на хитине, и – во фракциях №8 – 10 при хроматографии на КМЦ. Активность фермента была локализована в этих же пробах.

По методу М. Брэдфорда была определена концентрация белков экстрактов моллюсков (400 мкг/мл); всего было нанесено 30 мл препарата, то есть 12000 мкг белка. В элюатах определяли концентрацию белка по Варбургу и Кристиану: в случае хроматографии на КМЦ концентрация белков в элюатах составила 200 мкг/мл, так как активность локализована в 6 мл, было выделено 1200 мкг белка из 12000 мкг белка, нанесенного на колонку. В случае хроматографии на хитине концентрация белков в элюатах составила 40 мкг/мл. Активность была локализована в 25 мл, следовательно, было выделено 1000 мкг белка. Таким образом, степень очистки лизоцима моллюсков при использовании в хроматографии сравниваемых сорбентов приблизительно одинаковая: 1200 мкг при хроматографии на КМЦ и 1000 мкг - на хитине.

Выводы

В зависимости от цели получения препарата лизоцима можно использовать разные методы его выделения и очистки. При необходимости большого объема препарата в качестве сорбента можно использовать хитин. Если задача эксперимента состоит в выделении препарата высокой концентрации, то в качестве сорбента следует использовать КМЦ. Однако для выделения лизоцима моллюсков среди сорбентов наиболее подходящим является хитин, так как лизоцим пресноводных двустворчатых моллюсков чувствителен к ионной силе раствора, при увеличении которой определение активности исследуемого фермента существенно усложняется и замедляется.

Список литературы

1. Алехина Г. П. Влияние поллютантов различной химической природы на микрофлору внутренних органов двустворчатого моллюска *Unio pictorum* // Вестник ОГУ. – 2012. - №10 (146). – С.58 – 60.
2. Минакова В. В. Двустворчатые моллюски родов *Unio* и *Anadonta* – компоненты биологических ресурсов р. Урал и участие их лизоцима в процессах регуляции бактериоценозов: Автореф. дис. канд. биол. наук. - Оренбург, 2005. – 23 с.

3. Немцев С. В. Комплексная технология хитина и хитозана из панциря ракообразных. – М.: Изд-во ВНИРО, 2006. – 134 с.
4. Скрыбина К. Г. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. – М.: Наука, 2002. – 365 с.
5. Соловых Г. Н. Особенности формирования бактериоценоза в присутствии лизоцима двустворчатого моллюска *Unio pictorum* // Тезисы докл. III регион. науч.- практ. конференции областного благотворит. фонда памяти Д.М. Соловых. – Оренбург, 2000. – С. 54 – 55.
6. Хеншен А. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии: пер. с англ. – М.: Мир, 1988. – 688 с.

Рецензенты:

Филиппова А.В., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой биоэкологии и природопользования Института управления рисками и комплексной безопасности ФГБОУ ВПО «ОГАУ», г. Оренбург;

Сафонов М.А., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой общей биологии, экологии и методики обучения биологии ФГБОУ ВПО «ОГПУ», г. Оренбург.