

УДК: 577.152.344:577.15.072

Выделение и очистка тиаминпирогосфокиназы немалигнизированного миометрия и при наличии в нем опухолей

О.В.Оришака, И.Л.Вовчук, С.А.Петров

Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова (Одесса, Украина)

Разработана методика выделения и очистки тиаминпирогосфокиназы, путём последовательного осаждения белка из ткани миометрия сульфатом аммония и последующей гель-хроматографии на сефадексе G-100. Установлено, что немалигнизированная ткань содержит множественные формы фермента, осаждаемые при 20%, 40%, 80% насыщении сульфатом аммония, тогда как тиаминпирогосфокиназа злокачественной и доброкачественной опухолей фракционируется при 40% и 60% насыщении сульфатом аммония.

Ключевые слова: *тиаминпирогосфокиназа, выделение ферментов, гель-хроматография, миометрий, опухоль.*

Виділення та очищення тіамінпирогосфокінази немалігнізованого міометрію та при наявності в ньому пухлин

О.В.Оришака, І.Л.Вовчук, С.А.Петров

Розроблена методика виділення та очищення тіамінпирогосфокінази, що складається з послідовного осаження сульфатом амонію і гель-хроматографії на сефадексі G-100. Встановлено, що очищення препаратів досліджуваного ферменту методом гель-хроматографії призводить до збільшення їх питомої активності, коефіцієнту їх очищення. Встановлено, що немалігнізована тканина містить множинні форми ферменту, які осаджуються за умов 20%, 40%, 80% насичення сульфатом амонію, тоді як тіамінпирогосфокіназа злоякісної та доброякісної пухлин фракціонується за умов 40% та 60% насичення сульфатом амонію.

Ключові слова: *тіамінпирогосфокіназа, виділення ферментів, гель-хроматографія, міометрій, пухлина.*

Extracting and purification of thiamine pyrophosphokinase from non-malignant myometrium and at presence of tumors in it

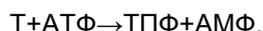
O.V.Orishaka, I.L.Vovchuk, S.A.Petrov

The method of extracting and purification of thiamine pyrophosphokinase which consists of step-by-step ammonium sulfate sedimentation and gel-chromatography on Sefadex G-100 has been elaborated. It has been shown, that purification of the enzyme by the method of gel-chromatography leads to increase of their specific activity, coefficient of their purification. There has been revealed, that non-malignant tissue contains multiple forms of the enzyme, which are precipitated at 20%, 40%, 80% saturation by ammonium sulfate, while thiamine pyrophosphokinase of malignant and benign tumors is fractionated at 40% and 60% saturation by ammonium sulfate.

Key words: *thiamine pyrophosphokinase, enzymes extracting, gel-chromatography, myometrium, tumor.*

Введение

Процессы синтеза тиаминпирогосфата (ТПФ) не отличаются в клетках животных, растений и микроорганизмов, хотя у последних возможно существование некоторых дополнительных путей. Фосфорилирование тиамин (Т) осуществляется тиаминпирогосфокіназой (ТПФК) (КФ 2.7.6.2) путем одноэтапной транслокации дифосфатной группировки:



В некоторых работах показана возможность биосинтеза ТПФ из тиаминмонофосфата (ТМФ) (Seiyo, Arnaiz, 1970; Thoai, Chevillard, 1949; Tokudo, 1964). Однако в этих случаях опыты проводились

с препаратами ТПФК, содержащими примеси фосфатаз, расщепляющих ТМФ до свободного тиамин, из которого в дальнейшем мог синтезироваться ТПФ.

Впервые грубоочищенный белковый препарат с удельной активностью ТПФК 8 нмоль ТПФ/ч был получен из экстракта пекарских дрожжей (Weil-Malherbe, 1939), а спустя 10 лет из печени крыс (Mano, 1960a). В ряде работ были изучены кинетические и физико-химические свойства ТПФК различной степени очистки, из печени и мозга крыс (Johnson, Gubler, 1968; Mano, 1960a, б, в; Mano, Tanaka, 1960), пекарских дрожжей (Forsander, 1956; Kaziro, 1957; Kaziro, 1959a, б; Stein-Parve, 1952; Thome-Bean et al., 1969), сердца (Suzuoki, 1955), мозга свиньи (Peterson et al., 1975, Wakabayashi, 1978a, б), листьев петрушки (Mitsuda et al., 1975a, б, в), бактерий (Sanemory, Kawasaki, 1980).

Однако сведений об активности и свойствах данного фермента в миометрии в норме и при новообразованиях в литературе нет. В связи с этим, продолжая начатые нами ранее исследования (Оришака, Петросян, 2009), мы поставили перед данной работой следующие задачи: усовершенствовать получение и очистку ТПФК для дальнейшего изучения ее физико-химических и биохимических свойств; определить активность фермента во фракциях, полученных из нормального и малигнизированного миометрия; оценить молекулярные массы ТПФК из разных фракций.

Материалы и методы

Исследования проводили с 5-ю образцами немалигнизированной ткани, а также образцами новообразований миометрия (5 образцов доброкачественной опухоли – узловой фибролейомиомы матки и 5 образцов злокачественной опухоли – умеренно-дифференцированной лейомиосаркомы матки). Образцы были получены операционным путем у женщин, которые не подвергались дооперационному медикаментозному лечению. Образцы немалигнизированного миометрия были предоставлены клинической лабораторией медицинского учреждения, обеспечивающего соблюдение всех этических норм. Патоморфологические диагнозы были верифицированы по международной классификации ВОЗ: определяли морфологическое состояние опухолевой ткани и степень дифференцировки клеток злокачественного новообразования (Всемирная Организация Здравоохранения, 1981). Материал для исследования любезно предоставлен Одесским областным онкодиспансером.

Образцы миометрия гомогенизировали с шестью объемами 0,25 М раствора сахарозы в условиях, предотвращающих разрушение субклеточных фракций. Гомогенат центрифугировали 90 мин при 20 000 g при +4°C. Осадок ресуспендировали в половинном объеме 0,25 М раствора сахарозы, гомогенизировали в аналогичных условиях; супернатанты объединяли. Белковый экстракт доводили 0,5 М трис-НСI буфером до pH 7,7 и диализировали против 40 объемов дистиллированной воды при +4°C в течение 12 часов. Постепенное фракционное осаждение проводили сульфатом аммония, насыщая им белковый раствор до 20, 40, 60 и 80%. Каждую фракцию диализировали в условиях, аналогичных описанным; белок собирали центрифугированием, сохраняли при -4°C; использовали для дальнейших хроматографических исследований. Хроматографию проводили на сефадексе G-100 (2,0 × 28,0 см). Колонку уравнивали 0,01 М трис-НСI буфером pH 7,7. Элюцию белков фракций проводили 0,01 М трис-НСI буфером pH 7,7 и линейным градиентом NaCl. Определение молекулярных масс проводили по методу Эндрюса (Практическая химия белка, 1989), используя маркерные белки („Serva” Швеция): альбумин сыворотки крови человека – 66,5 кДа, овальбумин – 43,0 кДа, химотрипсиноген А – 25,0 кДа, лизоцим – 17,5 кДа, РНК-аза – 13,7 кДа. Активность ТПФК определяли после инкубации образцов (источников фермента) в течение 60 минут при 37°C (Елисеева, 1953). В инкубационную смесь, содержащую 0,2 мл раствора исследуемого белка, вносили следующие компоненты: 0,3 мкмоль тиаминбромида; 12 мкмоль АТФ; 40 мкмоль MgSO₄; 50 мкмоль ацетатного буфера pH 5,5. Объем пробы доводили до 1,0 мл буферным раствором. Контролем служили аналогичные пробы с денатурированным белком. Активность фермента выражали, как показано в табл. 1. Содержание белка во фракциях определяли спектрофотометрически при 280 нм и по методу Lowry (Lowry et al., 1951). Статистическую достоверность отличий между выборками определяли с помощью критерия Стьюдента (Рокицкий, 1967).

Результаты и обсуждение

Установлено, что исходный раствор белка содержал 52% низкомолекулярных примесей, которые были удалены в процессе диализа (табл. 1), что не изменило ни относительную, ни удельную

ферментативную активность в немалигнизированном миометрии. При дальнейшем осаждении белков сульфатом аммония было найдено не менее 3 фракций с ТПФК активностью, осаждаемых при разной степени насыщения белкового раствора сульфатом аммония (табл. 1).

Таблица 1.
Активность тиаминпирофосфокиназы немалигнизированного миометрия на этапах выделения и очистки (M±m; n=5)

Этап выделения	Объем фракции (V), мл	Содержание белка, мг/мл	Относительная активность (ОА), нмоль тиамин / г ткани за 1 мин	Удельная активность, пмоль тиамин / мг белка за 1 мин	Общая активность, V x ОА	Коэффициент очистки
Исходный раствор белка	35,5±3,2	645±54	15,8±1,7	24,4±3,2	561±54	
Хроматография на G-100:						
Нанесено	5,0±0,5	3225±321			79±7,8	1,0
Пик I	10,0±1,0	5,8±0,5	4,9±0,5	845±83	49,0±4,5	34,6
Пик II	15,0±1,1	20,0±1,0	6,2±0,7	310±33	93,0±9,4	12,7
Раствор белка после диализа	50,0±4,2	309±31	0,000	0,000	0,000	0,00
20% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	10,0±0,9	36±4	903±89	25091±2511	9033±891	1024*
Хроматография на G-100:						
Нанесено	5,0±0,5	180±17			4516±453	1,00
Пик I	5,0±0,5	4,9±0,5	63,1±6,5	12878±1289	315±32	0,5
Пик II	5,0±0,5	6,8±0,7	655±66	96294±9627	3274±329	3,8
Пик III	5,0±0,5	9,2±0,9	34,2±3,3	3717±368	171±17	0,1
Пик IV	5,0±0,5	6,1±0,6	54,2±5,5	8885±883	271±28	0,3
Пик V	5,0±0,4	9,5±1,0	63,1±6,4	6642±663	315±34	0,3
40% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	11,5±0,9	134±12	802±84	5965±598	9222±934	244*
Хроматография на G-100:						
Нанесено	5,0±0,5	670±67,			4009±401	1,0
Пик I	5,0±0,5	10,6±1,2	387±38	36481±3648	1933±193	6,1
Пик II	5,0±0,5	8,3±0,9	393±39	47193±4719	1958±196	7,9
Пик III	5,0±0,5	8,0±0,8	310±31	38850±3886	1554±161	6,5
Пик IV	5,0±0,5	9,7±0,9	1019±101	105072±10508	5096±509	17,6
60% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	15,0±1,6	220±32	0,000	0,000	0,000	0,00
Хроматография на G-100:						
Нанесено	5,0±0,5	1100±112	0,000	0,000	0,000	0,00
80% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	36,0±3,4	4,0±3,4	710±69	162212±16222	25548±2555	6638*
Хроматография на G-100:						
Нанесено	5,0±0,5	20,0±2,5			3548±356	1,00
Пик I	10,0±1,0	1,3±0,1	1,3±0,14	1038±104	13,5±1,4	0,01
Пик II	10,0±1,1	1,3±0,1	2,5±0,28	1923±192	25,0±2,5	0,01

При 20% насыщении осаждалось 11,7% общего белка, полученного после диализа. Относительная активность фермента возрастала в 57,2 раза, удельная активность и коэффициент очистки повышались в 1024 раза. Во фракции с 40% насыщением сульфатом аммония осаждалось 43,4% общего белка, коэффициент очистки составил 244 раза. Несмотря на то, что при 60% насыщении осаждался 71% общего белка, ферментативная активность не обнаруживалась. При 80% насыщении сульфатом аммония осаждалось 1,3% общего белка, относительная и удельная активности возрастали в 45 и 6638 раз соответственно.

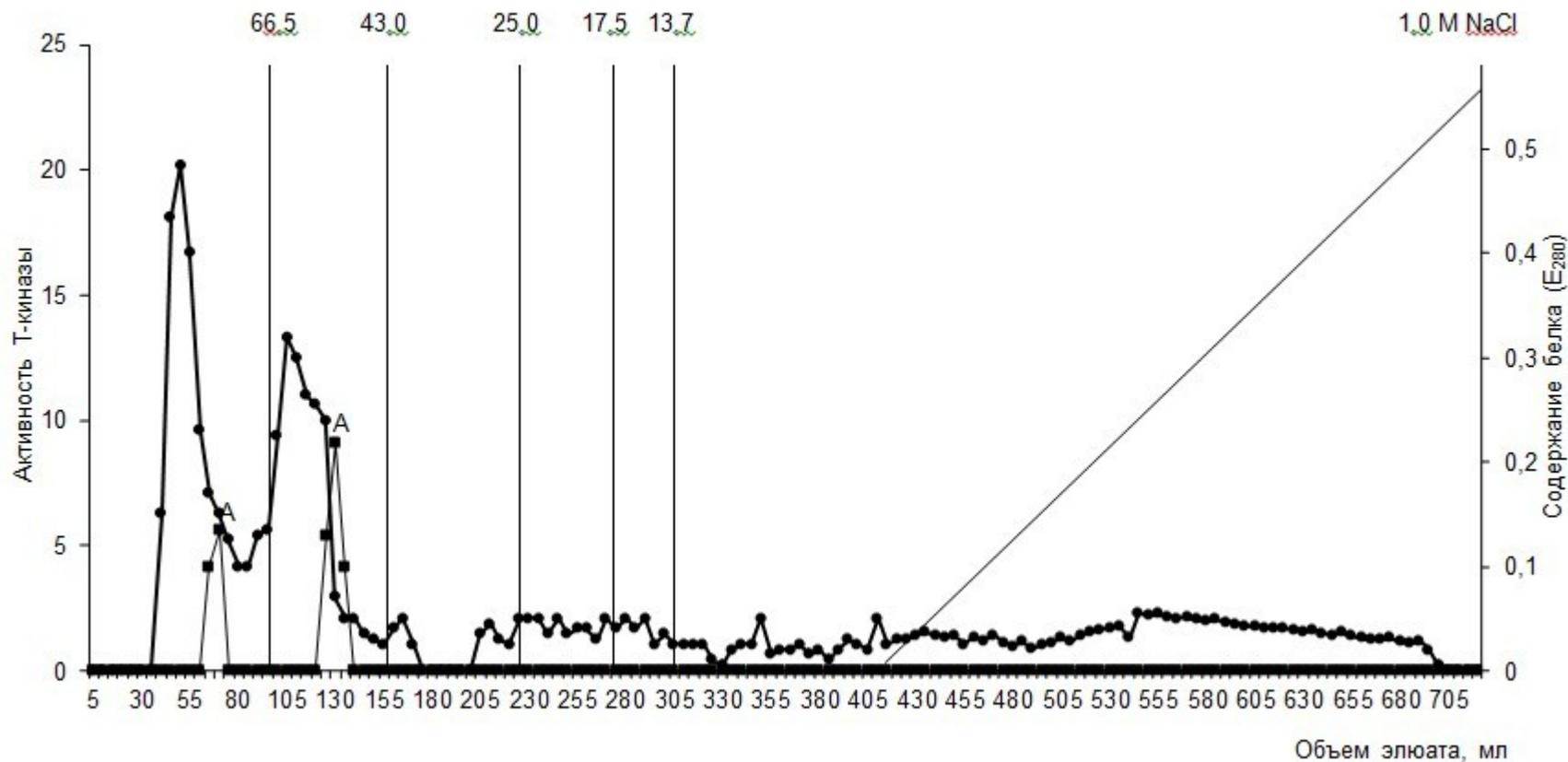


Рис. 1. Хроматографическое распределение активности тiamинпирoфoсфокиназы и содержание белка во фракции водорастворимых белков ткани немалігнізованого міометрія (исходный раствор). Сефадекс G-100 (2,0 × 28,0 см). Нанесено 645,0 мг белка, объем фракции 5,0 мл, скорость 27,3 мл/час, уравнивали 0,01 М трис-НСl-буфером (рН 7,7) и проводили элюцию линейным градиентом NaCl. Молекулярные массы маркерных белков указаны в кДа

Примечания: А – выход тiamинпирoфoсфокиназы;

- 1 — ● — содержание белка (E₂₈₀);
2 — ■ — активность тiamинпирoфoсфокиназы.

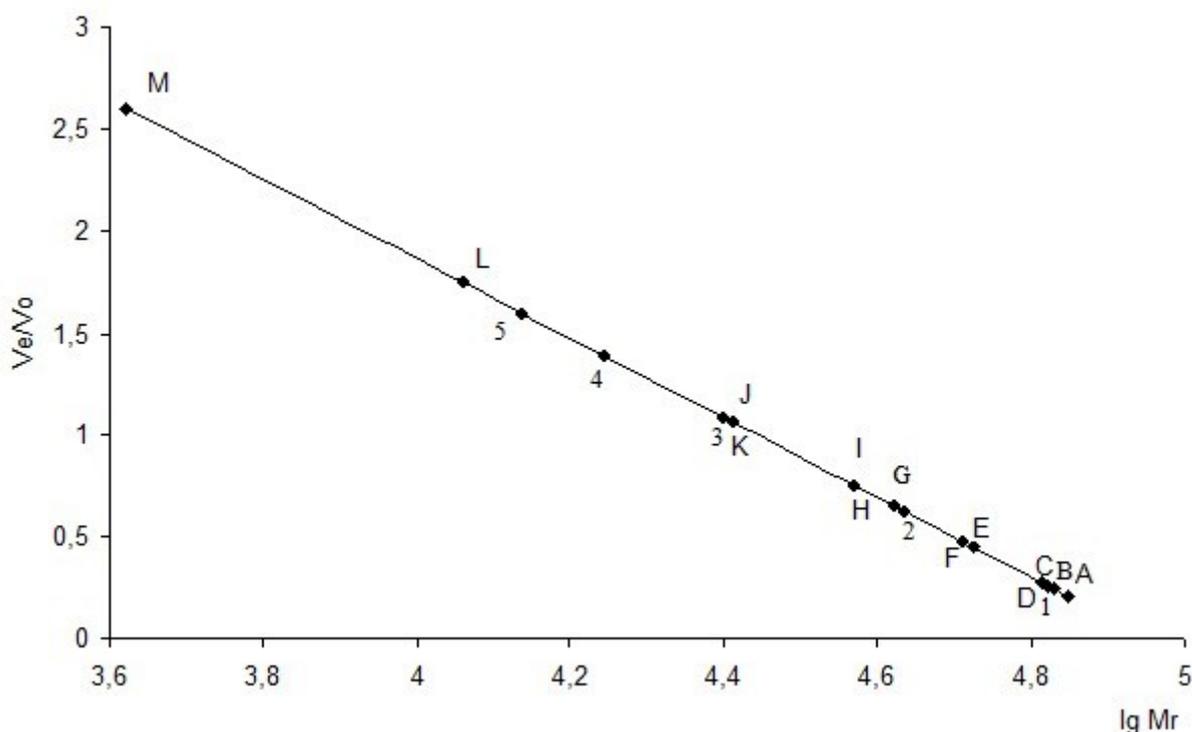


Рис. 2. Определение молекулярных масс тиаминпирофосфокиназы немалигнизированной ткани миометрия методом гель-фильтрации на сефадексе G-100

Примечания: А – фермент, полученный после хроматографии фракции 20%-ного осаждения сульфатом аммония (I пик, Mr 70555,53 Да);
В – фермент, полученный после хроматографии исходного раствора белка (I пик, Mr 67764,04 Да);
1 – альбумин сыворотки человека (Mr 63500 Да);
С – фермент, полученный после хроматографии фракции 20%-ного осаждения сульфатом аммония (II пик, Mr 65082,99 Да);
D – фермент, полученный после хроматографии фракции 80%-ного осаждения сульфатом аммония (I пик, Mr 65082,99 Да);
E – фермент, полученный после хроматографии фракции 20%-ного осаждения сульфатом аммония (III пик, Mr 53187,38 Да);
F – фермент, полученный после хроматографии фракции 40%-ного осаждения сульфатом аммония (I пик, Mr 51083,05 Да);
2 – овальбумин (Mr 43000 Да);
G – фермент, полученный после хроматографии исходного раствора (II пик, Mr 41746,29 Да);
H – фермент, полученный после хроматографии фракции 20%-ного осаждения сульфатом аммония (IV пик, Mr 36984,74 Да);
I – фермент, полученный после хроматографии фракции 40%-ного осаждения сульфатом аммония (II пик, Mr 36984,74 Да);
J – фермент, полученный после хроматографии фракции 40%-ного осаждения сульфатом аммония (III пик, Mr 25717,96 Да);
K – фермент, полученный после хроматографии фракции 80%-ного осаждения сульфатом аммония (II пик, Mr 25717,96 Да);
3 – химотрипсिन (Mr 25000 Да);
4 – лизоцим (Mr 17500 Да);
5 – рибонуклеаза (Mr 13700 Да);
L – фермент, полученный после хроматографии фракции 20%-ного осаждения сульфатом аммония (V пик, Mr 11470,99 Да);
M – фермент, полученный после хроматографии фракции 40%-ного осаждения сульфатом аммония (IV пик, Mr 4181,25 Да).

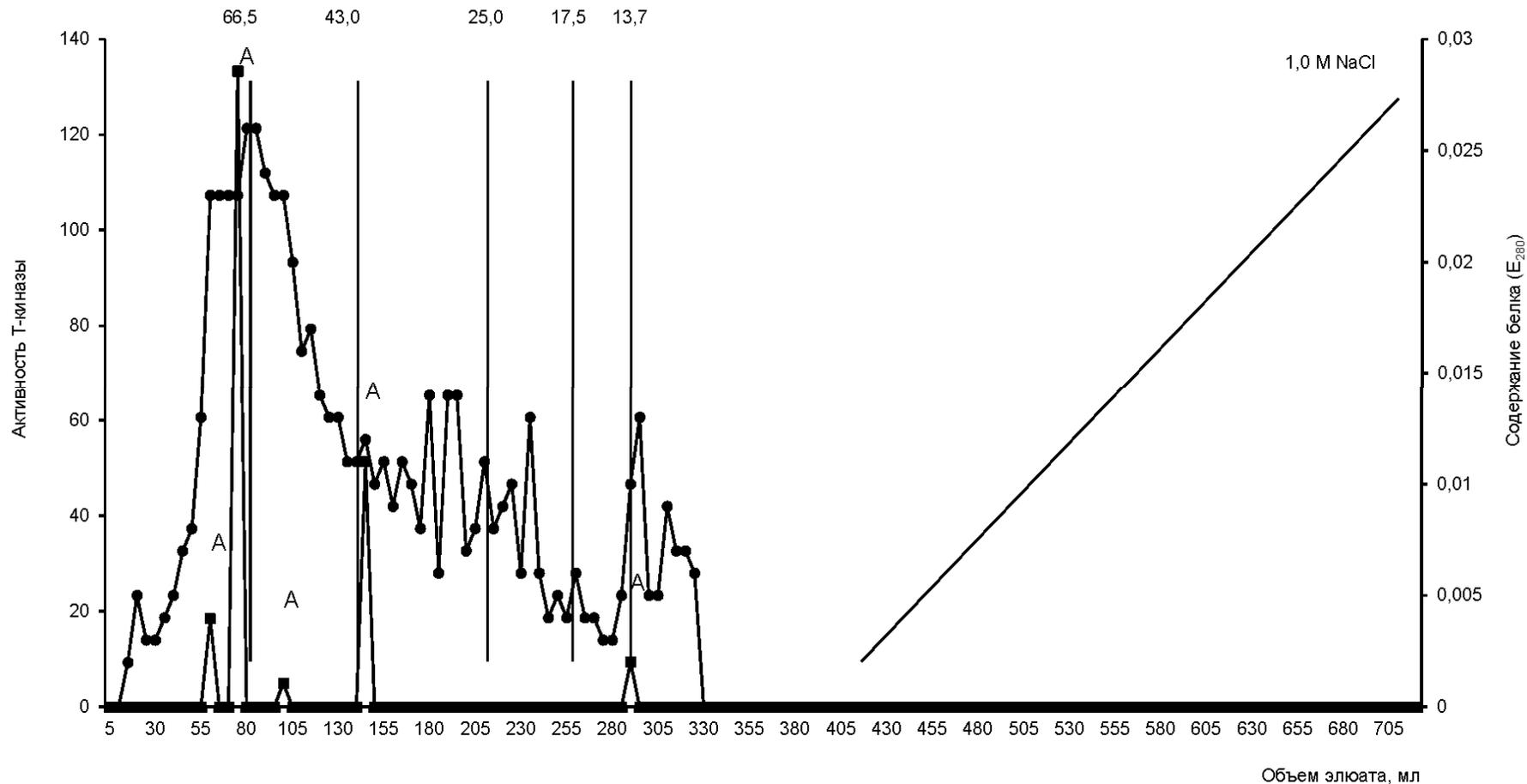


Рис. 3. Хроматографическое распределение активности тiamинпірофосфокиназы и содержание белка во фракции водорастворимых белков ткани немалигнізованного миометрия, осажденных при 20%-ном насыщении сульфатом аммония. Сефадекс G-100 (2,0 × 28,0 см). Нанесено 36,0 мг белка, объем фракции 5,0 мл, скорость 27,3 мл/час, уравнивали 0,01 М трис-НСІ-буфером (рН 7,7) и проводили элюцию линейным градиентом NaCl. Молекулярные массы маркерных белков указаны в кДа

Примечания:

А – выход тiamинпірофосфокиназы;

1 —●— — содержание белка (E_{280});

2 —■— — активность тiamинпірофосфокиназы.

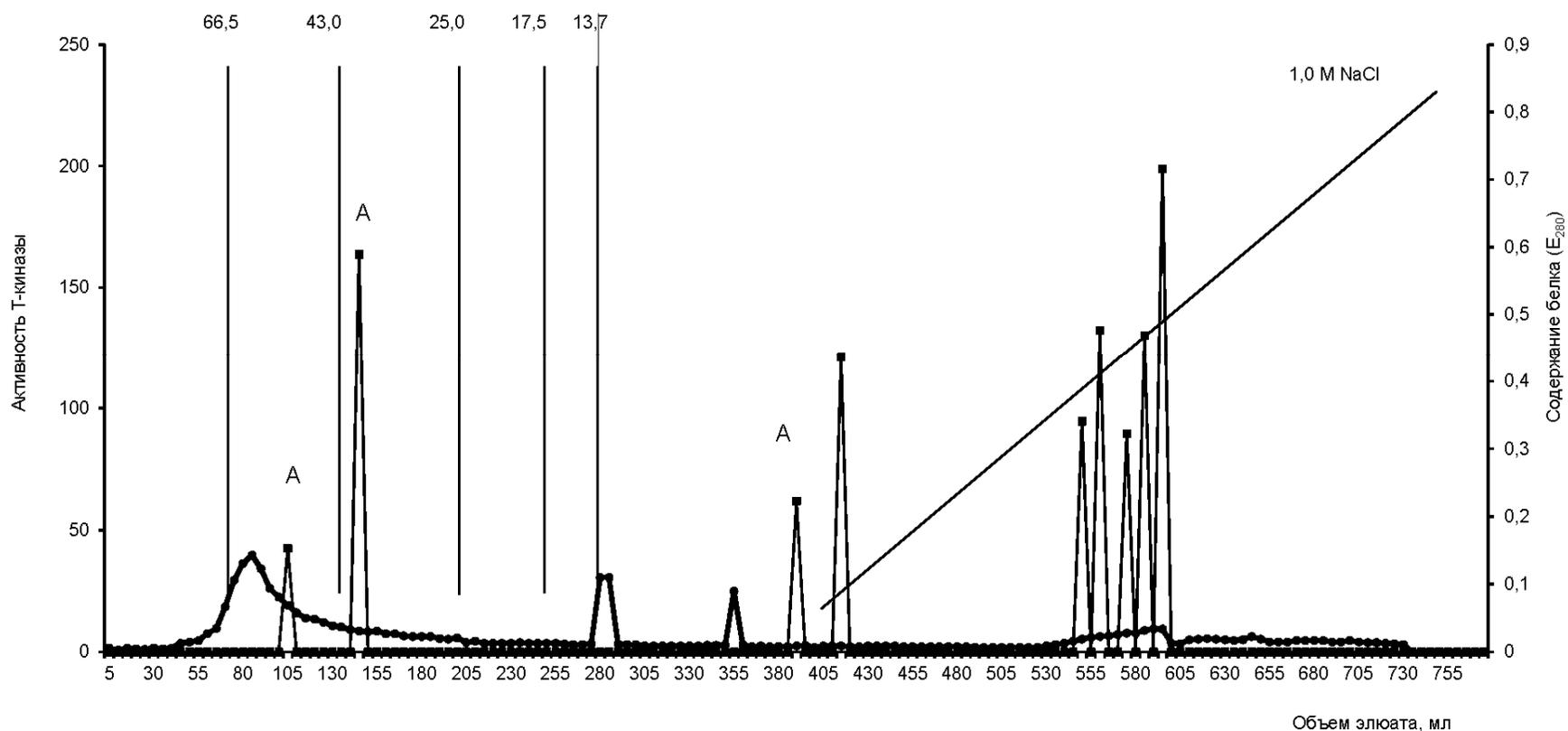


Рис. 4. Хроматографическое распределение активности тиаминпирофосфокиназы и содержание белка во фракции водорастворимых белков ткани немалигнизированного миометрия, осажденных при 40%-ном насыщении сульфатом аммония. Сефадекс G-100 (2,0 × 28,0 см). Нанесено 134 мг белка, объем фракции 5,0 мл, скорость 27,3 мл/час, уравнивали 0,01 М трис-НСI-буфером (рН 7,7) и проводили элюцию линейным градиентом NaCl. Молекулярные массы маркерных белков указаны в кДа

Примечания:

- A – выход тиаминпирофосфокиназы;
- 1 ● — содержание белка (E₂₈₀);
- 2 ■ — активность тиаминпирофосфокиназы.

Дальнейшая очистка ТПФК немалігнізованого міометрія гель-хроматографією дала можливість очистити фракції фермента в 34,6 разів. Водорастворимі білки вихідного розчину були представлені як відносно високомолекулярними фракціями (молекулярні маси від 43,0 кДа до 63,5 кДа), так і низкомолекулярними пептидами, які вимивалися з сефадекса плавним градієнтом NaCl (рис. 1). Було знайдено 2 білкових піків з активністю ТПФК (рис. 1, табл. 1). Високий коефіцієнт очищення і відсоток виходу першого ферментативного піка (M_r 67,7 кДа) свідчать про те, що вихідний білковий розчин містив велику кількість сполук, які інгібували активність ТПФК (рис. 2, табл. 1). Наявність другого піка з ТПФК активністю, але з меншою молекулярною масою (M_r 41,7 кДа), можливо, свідчить про певну деградацію молекули фермента в процесі гель-хроматографії (рис. 2).

В фракції, отриманій при 20%-ному насиченні сульфатом амонію, було знайдено 5 піків ферментативної активності. Їх вдалося додатково очистити в 3,84 разів (рис. 3, табл. 1). Молекулярні маси перших двох піків (70,5 кДа і 65,2 кДа відповідно) були близькі до молекулярної маси фермента з першого піка, отриманого з вихідного розчину білка. Молекулярна маса третього знаходилася в діапазоні 66,5 кДа – 43,0 кДа, четвертого – була менше 43 кДа, п'ятого – 11,5 кДа (рис. 2). Вероятно, в часі хроматографії відбувався частковий гідроліз фермента. При хроматографії фракції з 40%-ним насиченням сульфатом амонію було виявлено 4 білкових піків з ферментативною активністю (рис. 4, табл. 1). Молекулярна маса першого білкового піка (51,1 кДа) порівняно мало відрізнялася від молекулярної маси фермента з другого білкового піка вихідного розчину (рис. 2, 4, табл. 1). Фермент 2-го білкового піка мав молекулярну масу 36,9 кДа і був очищений в 7,9 разів (рис. 2, 4, табл. 1). Молекулярна маса фермента третього піка становила 25,7 кДа, четвертого – 41,8 кДа (рис. 2). Можливо, при хроматографії значуща кількість фермента зазнала деградації, не порушуючи структуру активного центру фермента. Решта білкових піків були отримані в результаті елюції NaCl з сефадекса при 0,005–0,925 М (рис. 2, 4, табл. 1). Значущий коефіцієнт очищення фермента пов'язаний з можливою наявністю ендogenous інгібітора фермента в осаджуваній фракції і відокремлюваній при хроматографії.

Очищення хроматографічної фракції, отриманої при осадженні 60% сульфатом амонію, не виявило ферментативної активності (табл. 1).

Молекулярна маса білків першого піка фракції, отриманої при 80% осадженні сульфатом амонію (M_r 65,1 кДа), збігалася з молекулярною масою 2-го білкового піка фракції при 20% насиченні сульфатом амонію (рис. 2, рис. 5). Значущо менша молекулярна маса фермента другого піка (M_r 25,7 кДа) також свідчить про часткову деградацію молекули фермента в часі гель-хроматографії без порушення її каталітичного центру (рис. 2).

Діаліз білкового розчину доброякісної опухли міометрія призвів до втрати активності досліджуваного фермента, ймовірно, внаслідок інактивності фермента в часі діалізу. Вихідний розчин білка містив 48% низкомолекулярних домішок (табл. 2). Насичення білкового розчину до 20 і 40% не привело до виявлення активності ТПФК. Найвищий коефіцієнт очищення – в 41,6 разів – і осадження 70,1% загального білка були отримані при 60% насиченні сульфатом амонію. Далі насичення білкового розчину до 80% призводило до осадження 0,041% загального білка; ферментативна активність при цьому не реєструвалася.

З допомогою гель-хроматографії була очищена в 2747 разів ТПФК доброякісної опухли. Водорастворимі білки вихідного розчину були представлені білками з молекулярною масою від 63,5 кДа до 43,0 кДа; присутували також низкомолекулярні домішки, які вимивалися з сефадекса плавним градієнтом NaCl (рис. 6). Знайдено 4 білкових піків з ферментативною активністю (рис. 6, табл. 2). Невисокий коефіцієнт очищення першого ферментативного піка (M_r 67,8 кДа) свідчить про те, що вихідний розчин містив велику кількість сполук, які інгібували активність фермента (рис. 7, табл. 2).

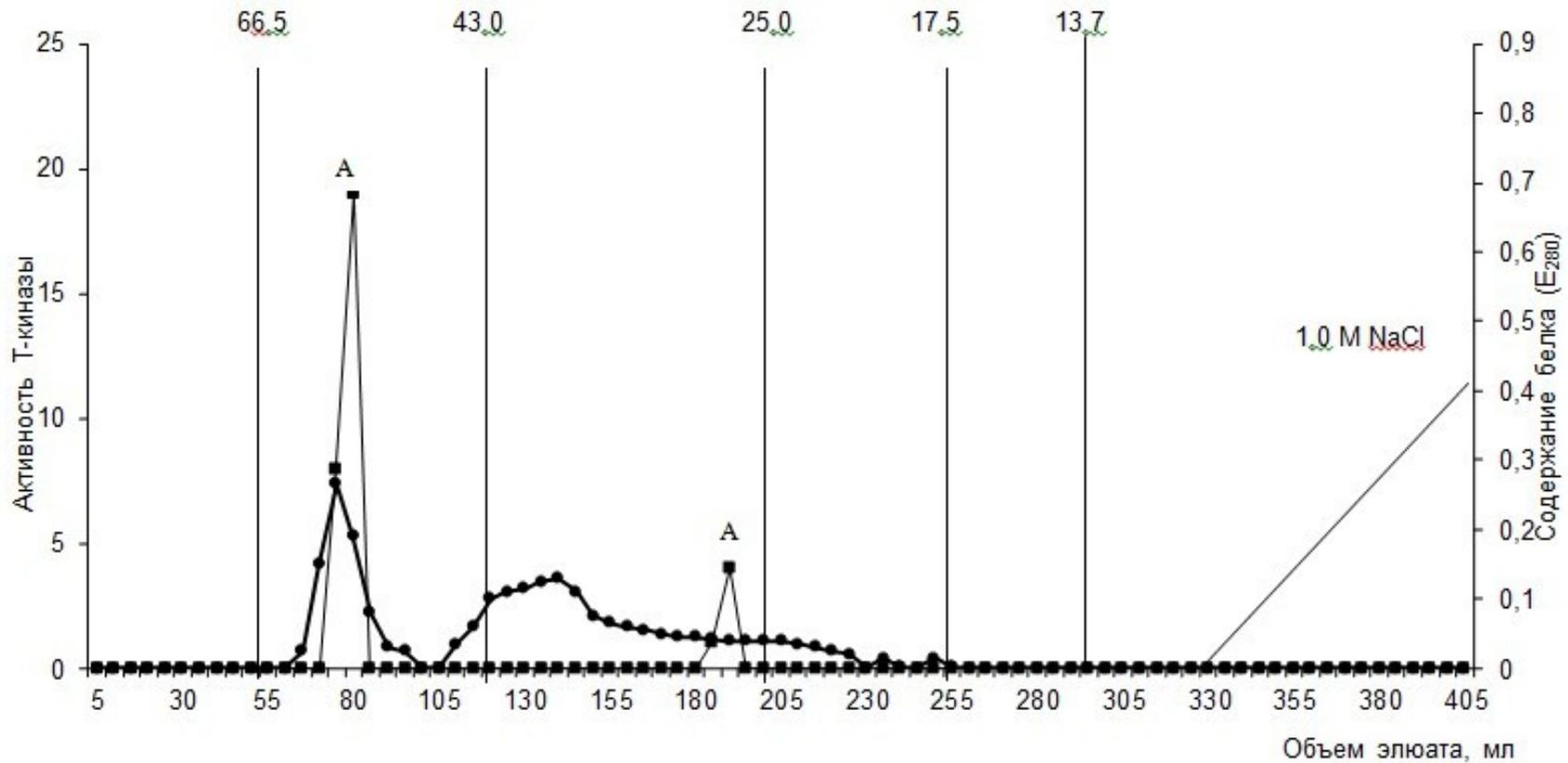


Рис. 5. Хроматографическое распределение активности тиаминпирофосфокиназы и содержание белка во фракции водорастворимых белков ткани немалигнизированного миометрия, осажденных при 80%-ном насыщении сульфатом аммония. Сефадекс G-100 (2,0 × 28,0 см). Нанесено 4,0 мг белка, объем фракции 5,0 мл, скорость 27,3 мл/час, уравнивали 0,01 М трис-НСI-буфером (рН 7,7) и проводили элюцию линейным градиентом NaCl. Молекулярные массы маркерных белков указаны в кДа

Примечания:

A – выход тиаминпирофосфокиназы;

1 —●— содержание белка (E₂₈₀);

2 —■— активность тиаминпирофосфокиназы.

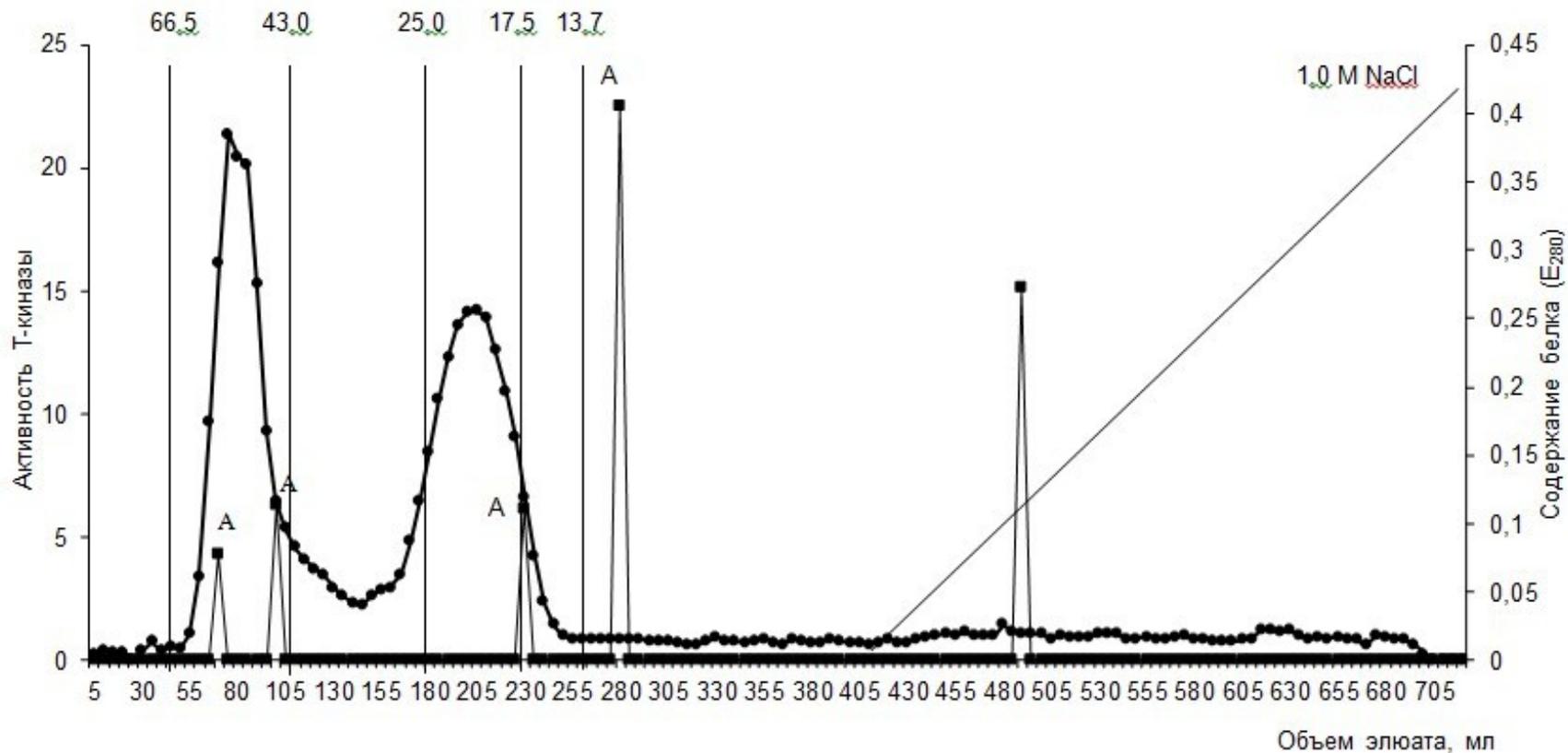


Рис. 6. Хроматографическое распределение активности тiamинпірофосфокиназы и содержание белка во фракции водорастворимых белков ткани с доброкачественной патологией миометрия (исходный раствор). Сефадекс G-100 (2,0 × 28,0 см). Нанесено 930,0 мг белка, объем фракции 5,0 мл, скорость 27,3 мл/час, уравновешивали 0,01 М трис-НСІ-буфером (рН 7,7) и проводили элюцию линейным градиентом NaCl. Молекулярные массы маркерных белков указаны в кДа

Примечания:

A – выход тiamинпірофосфокиназы;

1 —●— — содержание белка (E₂₈₀);

2 —■— — активность тiamинпірофосфокиназы.

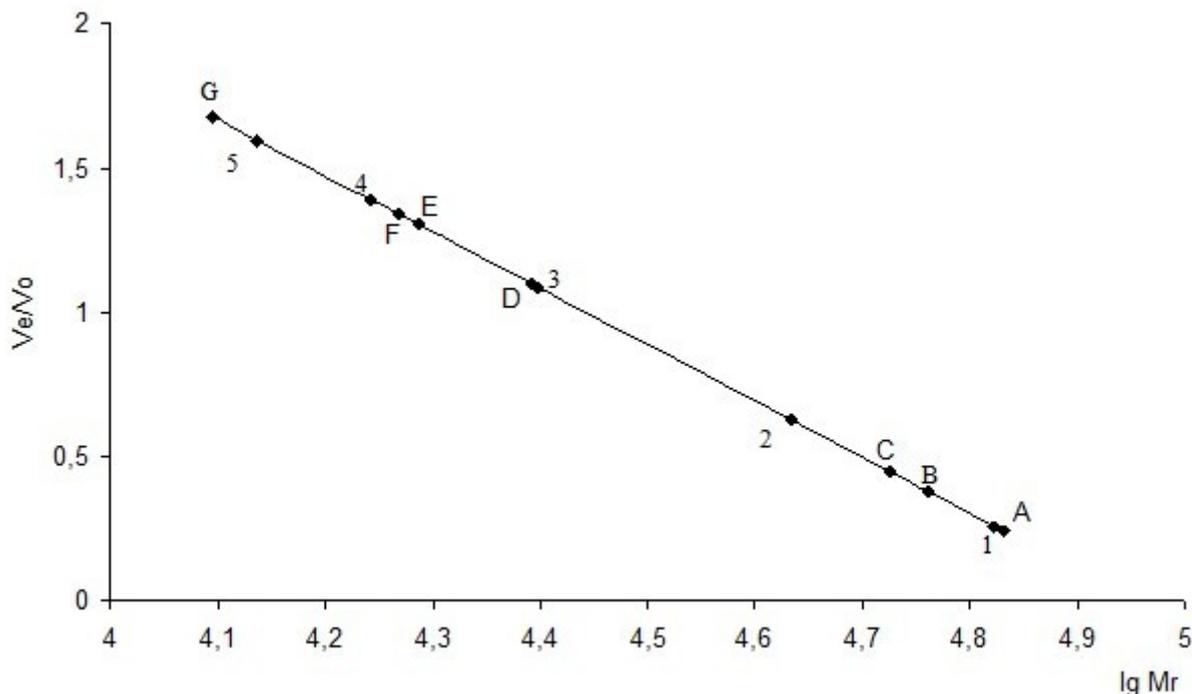


Рис. 7. Определение молекулярных масс тиаминпирофосфокиназы ткани с доброкачественной патологией миометрия методом гель-фильтрации на сефадексе G-100

Примечания: А – фермент, полученный после хроматографии исходного раствора белка (I пик, Mr 67764,04 Да);

1 – альбумин сыворотки человека (Mr 63500 Да);

В – фермент, полученный после хроматографии фракции 60%-ного осаждения сульфатом аммония (I пик, Mr 57659,67 Да);

С – фермент, полученный после хроматографии исходного раствора (II пик, Mr 53187,38 Да);

2 – овальбумин (Mr 43000 Да);

3 – химотрипсиноген (Mr 25000 Да);

Д – фермент, полученный после хроматографии фракции 60%-ного осаждения сульфатом аммония (II пик, Mr 24700,45 Да);

Е – фермент, полученный после хроматографии фракции 60%-ного осаждения сульфатом аммония (III пик, Mr 19387,16 Да);

Ф – фермент, полученный после хроматографии исходного раствора (III пик, Mr 18620,12 Да);

4 – лизоцим (Mr 17500 Да);

5 – рибонуклеаза (Mr 13700 Да);

Г – фермент, полученный после хроматографии исходного раствора (IV пик, Mr 12435,54 Да).

Очистка хроматографических фракций, полученных осаждением при 20%, 40% и 80% насыщении сульфатом аммония, не выявила ферментативной активности (табл. 2). Однако хроматографический метод позволил установить наличие 3 пиков с активностью ТПФК во фракции, полученной при 60% насыщении и дополнительно их очистить в 42,3 раза (рис. 8, табл. 2). Молекулярная масса первого пика (Mr 57,7 кДа) не очень существенно отличалась от молекулярной массы фермента второго пика исходного раствора белка, а молекулярные массы второго и третьего пиков (24,7 кДа и 19,4 кДа соответственно) были в несколько раз меньше (рис. 7).

Диализ белкового раствора злокачественной опухоли миометрия приводил к потере активности исследуемого фермента, вероятно, из-за инактивации фермента во время диализа. Исходный раствор белка содержал 48% низкомолекулярных примесей (табл. 3). Дальнейшее насыщение белкового раствора сульфатом аммония до 20% и 60% позволило осадить 10,0% и 64,9% общего

белка, соответственно, но в полученных фракциях активность фермента не обнаружена. Наибольший коэффициент очистки ТПФК – в 70,4 раза – был получен при 40% насыщении сульфатом аммония (осаждение 52,5% общего белка). При 80% насыщении осаждается 1,13% общего белка, а ферментативная активность не регистрировалась.

Таблица 3.

Активность тиаминпирофосфокиназы миометрия со злокачественной опухолью на этапах выделения и очистки ($M \pm m$; $n=5$)

Этап выделения	Объем фракции (V), мл	Содержание белка, мг/мл	Относительная активность (ОА), нмоль тиамин / г ткани за 1 мин	Удельная активность, пмоль тиамин / мг белка за 1 мин	Общая активность, V x ОА	Коэффициент очистки
Исходный раствор белка	39,0±3,2	686±64	11,2±1,3	16,4±1,8	640±62	
Хроматография на G-100:						
Нанесено	5,0±0,54	3430±341			56,0±5,8	1,00
Пик I	15,0±1,61	20,0±2,1	10,0±1,1	501,5±48,6	150±15	30,6
Пик II	10,0±1,11	25,0±2,6	5,6±0,6	224,0±23,1	56,0±5,9	13,7
Раствор белка после диализа	59,0±4,2	354±35,4	0,000	0,000	0,000	0,00
20% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	10,0±0,97	35±3,4	0,000	0,000	0,000	0,00
Хроматография на G-100:						
Нанесено	5,0±0,6	175±18	0,000	0,000	0,000	0,00
40% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	11,0±1,0	186±19	215±24	1157±114	2364±237	70,4 ⁺
Хроматография на G-100:						
Нанесено	5,0±0,5	930±9			1074±108	1,00
Пик I	20,0±2,1	26,5±2,5	471±46	17766±1776	9416±943	15,4
Пик II	5,0±0,6	16,4±1,7	497±49	30287±3027	2483±249	26,2
Пик III	15,0±1,5	13,8±1,9	870±87	63065±6307	13054±1306	56,0
Пик IV	10,0±1,1	9,8±9,6	597±59	60969±6097	5975±598	53,0
Пик V	5,0±0,4	7,3±7,4	922±92	126260±12627	4608±462	109,3
Пик VI	5,0±0,5	8,3±0,9	667±66	80325±8034	3333±333	69,5
Пик VII	5,0±0,5	8,8±0,9	730±76	82954±8294	3650±365	71,8
Пик VIII	5,0±0,5	5,9±0,6	762±76	129237±12924	3812±366	112,0
Пик IX	5,0±0,5	6,9±0,9	526±51	76217±7623	2629±264	66,0
60% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	13,5±1,4	230±21	0,000	0,000	0,000	0,00
Хроматография на G-100:						
Нанесено	5,0±0,5	1150±115	0,000	0,000	0,000	0,00
80% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	58,0±5,4	4,0±0,3	0,000	0,000	0,000	0,00
Хроматография на G-100:						
Нанесено	5,0±0,6	20,0±2,1	0,000	0,000	0,000	0,00

Дальнейшая очистка ТПФК методом гель-хроматографии дала возможность очистить фракции фермента до 182 раз. Водорастворимые белки исходного раствора были представлены как высокомолекулярными фракциями, так и низкомолекулярными пептидами, которые вымывались из сефадекса плавным градиентом NaCl (рис. 11). Этим методом было установлено наличие 2 белковых пиков с ТПФК активностью (рис. 9, табл. 3). Значительный коэффициент очистки (в 31 раз) первого ферментативного пика (Mг 76,5 кДа) свидетельствует о том, что исходный раствор содержал большое число соединений, ингибирующих активность фермента (рис. 2, табл. 3). Наличие второго пика с ТПФК активностью, который отличался по молекулярной массе (Mг 47,1 кДа), свидетельствует о частичной деградации молекулы фермента в процессе гель-хроматографии (рис. 2).

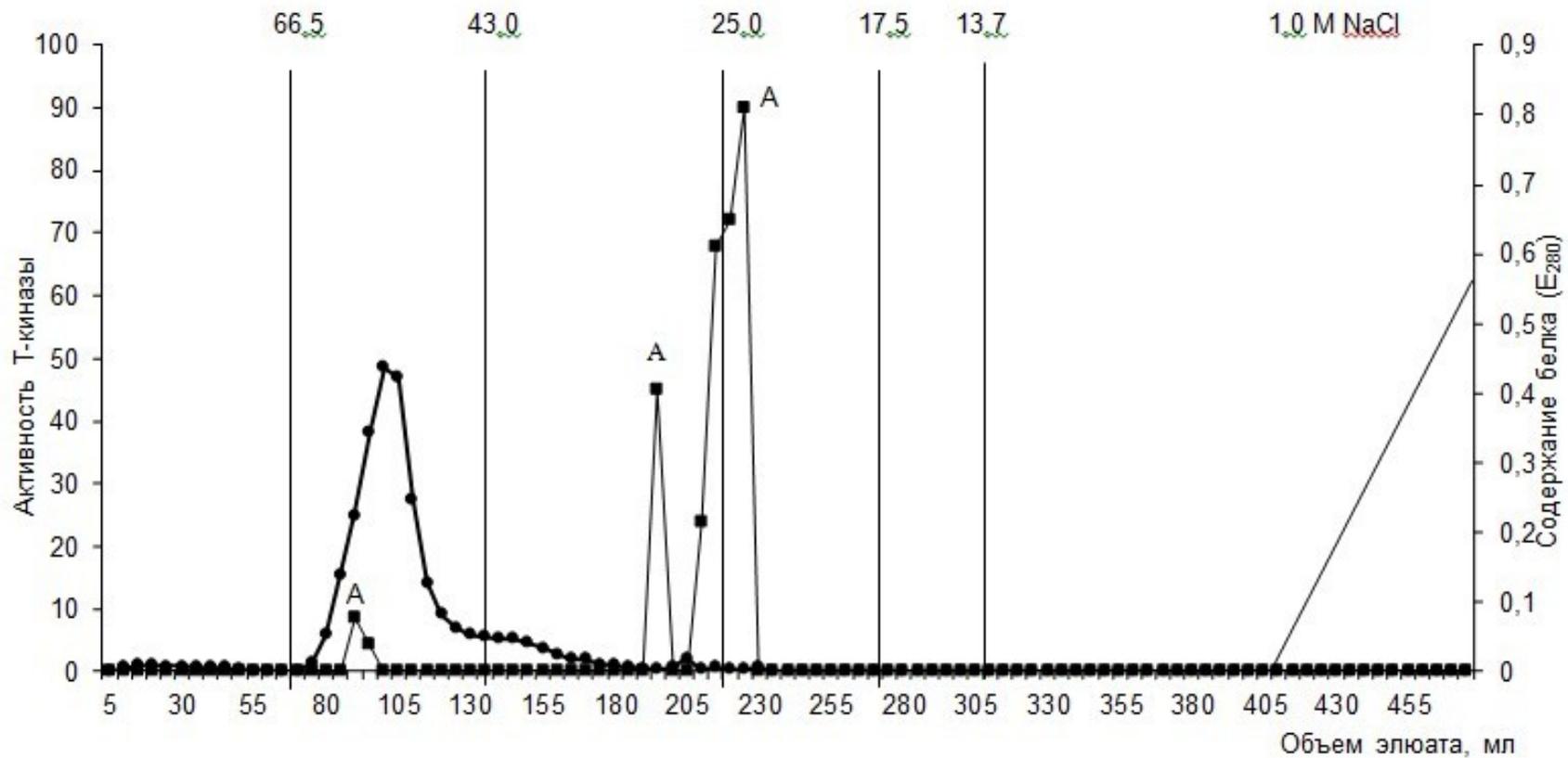


Рис. 8. Хроматографическое распределение активности тиаминпирофосфокиназы и содержание белка во фракции водорастворимых белков ткани с доброкачественной патологией миометрия, осажденных при 60%-ном насыщении сульфатом аммония. Сефадекс G-100 (2,0 × 28,0 см). Нанесено 340,0 мг белка, объем фракции 5,0 мл, скорость 27,3 мл/час, уравнивали 0,01 М трис-НСІ-буфером (рН 7,7) и проводили элюцию линейным градиентом NaCl. Молекулярные массы маркерных белков указаны в кДа

Примечания:

- A – выход тиаминпирофосфокиназы;
 1 —●— содержание белка (E₂₈₀);
 2 —■— активность тиаминпирофосфокиназы.

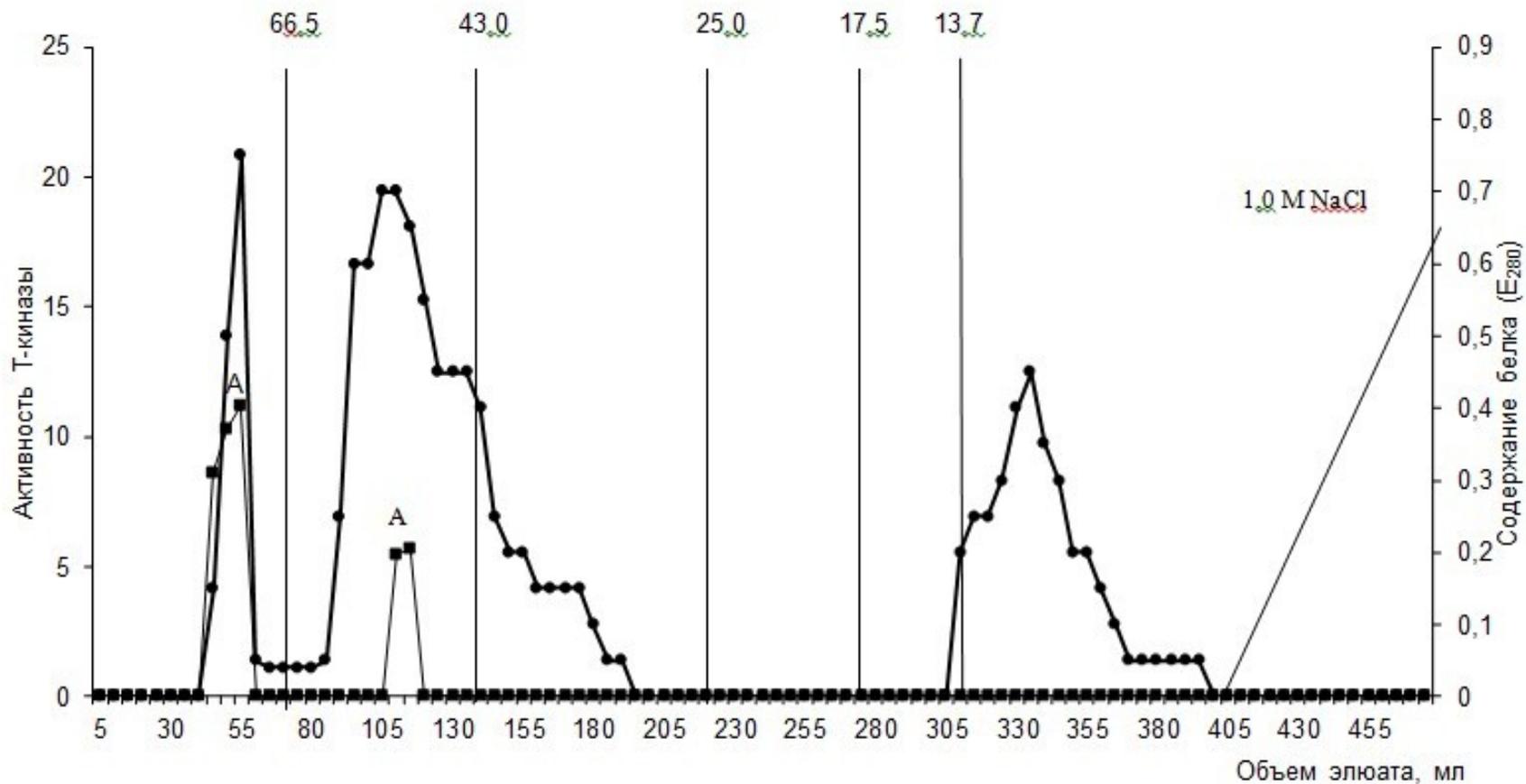


Рис. 9. Хроматографическое распределение активности тiamинпирoфoсфокиназы и содержание белка во фракции водорастворимых белков ткани со злокачественной патологией миометрия (исходный раствор). Сефадекс G-100 (2,0 × 28,0 см). Нанесено 686,0 мг белка, объем фракции 5,0 мл, скорость 27,3 мл/час, уравнивали 0,01 М трис-НСl-буфером (рН 7,7) и проводили элюцию линейным градиентом NaCl. Молекулярные массы маркерных белков указаны в кДа

Примечание: А – выход тiamинпирoфoсфокиназы;

- 1 —●— — содержание белка (E₂₈₀);
2 —■— — активность тiamинпирoфoсфокиназы.

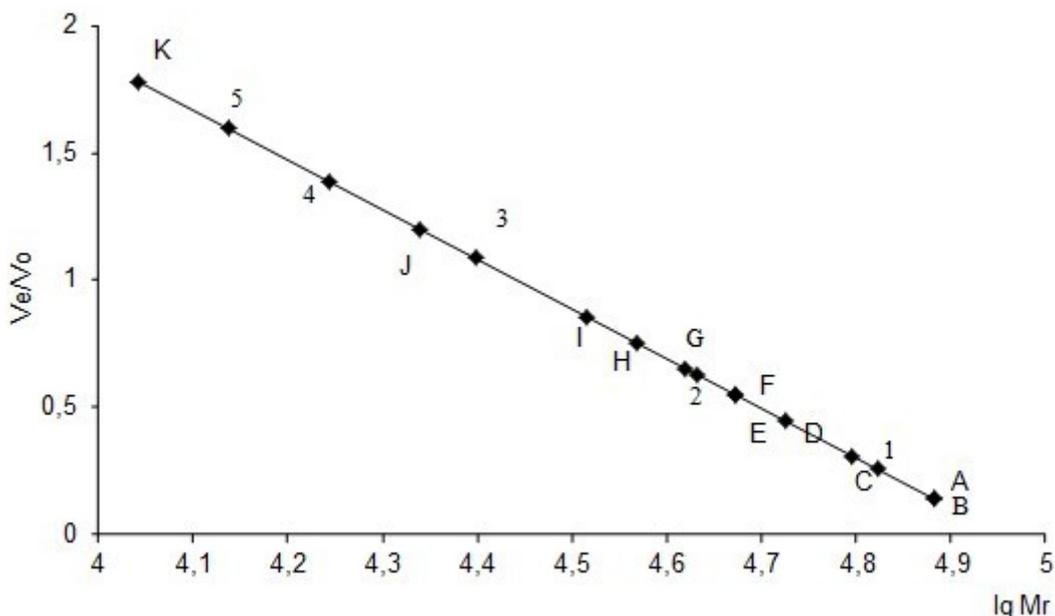


Рис. 10. Определение молекулярных масс тиаминпирофосфокиназы ткани со злокачественной патологией миометрия методом гель-фильтрации на сефадексе G-100

Примечания: А – фермент, полученный после хроматографии исходного раствора белка (I пик, Mr 76488,23 Да);

В – фермент, полученный после хроматографии фракции 40%-ного осаждения сульфатом аммония (I пик, Mr 76488,23 Да);

1 – альбумин сыворотки человека (Mr 63500 Да);

С – фермент, полученный после хроматографии фракции 40%-ного осаждения сульфатом аммония (II пик, Mr 62508,02 Да);

Д – фермент, полученный после хроматографии фракции 40%-ного осаждения сульфатом аммония (III пик, Mr 53187,38 Да).

Е – фермент, полученный после хроматографии фракции 40%-ного осаждения сульфатом аммония (IV пик, Mr 47120,87 Да);

F – фермент, полученный после хроматографии исходного раствора (II пик, Mr 47120,87 Да);

2 – овальбумин (Mr 43000 Да);

G – фермент, полученный после хроматографии фракции 40%-ного осаждения сульфатом аммония (V пик, Mr 41746,29 Да);

Н – фермент, полученный после хроматографии фракции 40%-ного осаждения сульфатом аммония (VI пик, Mr 36984,74 Да);

І – фермент, полученный после хроматографии фракции 40%-ного осаждения сульфатом аммония (VII пик, Mr 32766,29 Да).

3 – химотрипсиноген (Mr 25000Да);

Ј – фермент, полученный после хроматографии фракции 40%-ного осаждения сульфатом аммония (VIII пик, Mr 21883,13 Да).

4 – лизоцим (Mr 17500 Да);

5 – рибонуклеаза (Mr 13700 Да);

К – фермент, полученный после хроматографии фракции 40%-ного осаждения сульфатом аммония (IX пик, Mr 11017,15 Да).

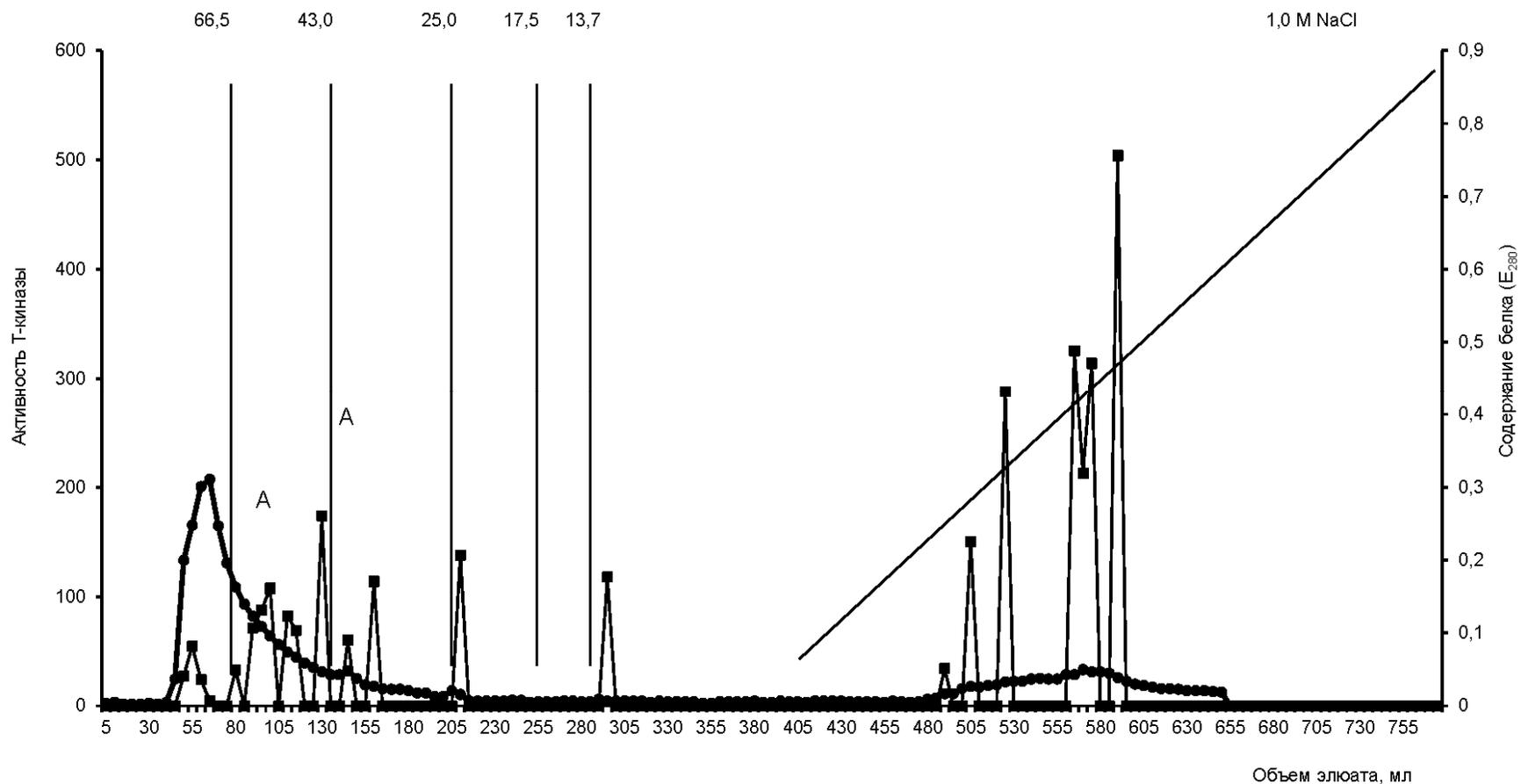


Рис. 11. Хроматографическое распределение активности тiamинпірофосфокиназы и содержание белка во фракции водорастворимых белков ткани со злокачественной патологией миометрия, осажденных при 40%-ном насыщении сульфатом аммония. Сефадекс G-100 (2,0 × 28,0 см). Нанесено 186,0 мг белка, объем фракции 5,0 мл, скорость 27,3 мл/час, уравнивали 0,01 М трис-НСІ-буфером (рН 7,7) и проводили элюцию линейным градиентом NaCl. Молекулярные массы маркерных белков указаны в кДа

Примечания:

- А – выход тiamинпірофосфокиназы;
 1 — ● — содержание белка (E₂₈₀);
 2 — ■ — активность тiamинпірофосфокиназы.

Очистка хроматографических фракций, полученных после 20%, 60% и 80% осаждений сульфатом аммония, не обнаружила в них ферментативной активности (табл. 3). Однако хроматографический метод позволил установить наличие 9 белковых пиков с ферментативной активностью во фракции, полученной при 60% осаждении сульфатом аммония, которые были очищены в 15,4–182 раза (рис. 11, табл. 3). Молекулярная масса первого пика (Mг 76,5 кДа) не отличалась от молекулярной массы фермента первого пика исходного раствора белка, а молекулярные массы ферментов остальных белковых пиков находились в диапазоне от 62 кДа до 11,0 кДа (рис. 10). Были зарегистрированы также белковые пики, которые обладали ферментативной активностью и вымывались из сефадекса градиентом 0,4–0,9 М NaCl (рис. 11, табл. 3). Значительный коэффициент очистки пиков фракции, полученной при 40% осаждении сульфатом аммония, можно объяснить возможным наличием эндогенного ингибитора ТПФК, присутствующего в осаждаемой фракции и отделяемого в процессе хроматографии.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гель-хроматография дает существенный дополнительный эффект очистки ТПФК по сравнению с высаливанием и диализом, что можно объяснить наличием в исходной фракции соединений, ингибирующих фермент. Гель-хроматографическая очистка фракций, полученных в результате насыщения исходного белкового раствора сульфатом аммония до 20, 40, 60 и 80%, приводит к увеличению коэффициента очистки ТПФК. Процесс малигнизации характеризуется изменением физико-химических свойств препаратов ТПФК. Немалигнизированная ткань содержит множественные формы фермента с разной способностью к высаливанию при 20, 40 и 80% насыщении сульфатом аммония, тогда как фермент злокачественной и доброкачественной опухолей фракционируется при 40 и 60% насыщении сульфатом аммония, соответственно. Наличие в каждом случае по крайней мере двух белковых пиков с разными молекулярными массами свидетельствует о частичной деградации молекулы фермента в ходе очистки, в то время как высокая удельная активность пиков с меньшей молекулярной массой говорит о том, что гидролиз не вызывает нарушений каталитического центра фермента.

Список литературы

- Всемирная Организация Здравоохранения / Материалы ежегодных отчетов. – Санкт-Петербург, 1981. – 286с. /Vsemirnaya Organizatsiya Zdravookhraneniya / Materialy ezhegodnykh otchetov. – Sankt-Peterburg, 1981. – 286s./
- Елисеева Г.Д. Флуориметрическое определение тиамина, кокарбоксылазы и рибофлавина в биологических объектах // Витамины. – 1953. – Т.1. – С. 38–57. /Yeliseyeva G.D. Fluorimetriceskoye opredeleniye tiamina, kokarboksilazy i riboflavina v biologicheskikh obyektakh // Vitaminy. – 1953. – Т.1. – С. 38–57./
- Оришака О.В., Петросян А.Л. Особенности функциональной активности тиаминпирофосфокиназы миометрия женщин в ткани без новообразований и при доброкачественных новообразованиях // Матеріали круглого столу «Проблеми та перспективи формування гуманітарної політики в Україні». – Сімферополь–Ялта, 2009. – С. 80–81. /Orishaka O.V., Petrosyan A.L. Osobennosti funktsional'noy aktivnosti tiaminpirofosfokinazy miometriya zhenshchin v tkani bez novoobrazovaniy i pri dobrokachestvennykh novoobrazovaniyakh // Materialy kruglogo stolu «Problemy ta perspektyvy formuvannya humanitarnoi polityky v Ukraini». – Simferopol'–Yalta, 2009. – S. 80–81./
- Практическая химия белка. – М.: Мир, 1989. – С. 39–43. /Prakticheskaya khimiya belka. – M.: Mir, 1989. – S. 39–43./
- Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Вышш. школа, 1967. – 326с. /Rokitskiy P.F. Biologicheskaya statistika. – Minsk: Vyssh. shkola, 1967. – 326s./
- Forsander O. Studies on the phosphorylation of thiamine by thiaminokinase from baker's yeast // Comment. Phys. Math. Helsingfors. – 1956. – Vol.19, №2. – P. 3–42.
- Johnson L.R., Gubler C.J. Studies on the physiological functions of thiamine. The phosphorylation of thiamine in brain // Biochim. biophys. acta. – 1968. – Vol.156, №1. – P. 85–91.
- Kaziro Y. Quantitative determination of thiamine pyrophosphate using apocarboxylase and alcohol dehydrogenase // J. Biochem. – 1957. – Vol.44, №7. – P. 827–838.
- Kaziro Y. Studies of thiaminokinase from baker's yeast. Nucleotide specificity // J. Biochem. – 1959a. – Vol.46, №12. – P. 1587–1596.
- Kaziro Y. Studies on thiaminokinase from baker's yeast. Purification and properties // J. Biochem. – 1959b. – Vol.46, №11. – P. 1523–1539.
- Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.Z., Randol R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol.193. – P. 265–275.

- Mano Y. Studies on enzymatic synthesis of cocarboxylase in animal tissue. Purification and properties of thiaminokinase from rat liver // J. Biochem. – 1960a. – Vol.47, №3. – P. 283–290.
- Mano Y. Studies on enzymatic synthesis of cocarboxylase in animal tissue. Fundamental properties of the reactions // J. Biochem. – 1960b. – Vol.47, №1. – P. 24–36.
- Mano Y. Studies on enzymatic synthesis of cocarboxylase in animal tissue. External factors which influence thiaminokinase activity // J. Biochem. – 1960в. – Vol.47, №2. – P. 159–166.
- Mano Y., Tanaka R. Studies on enzymatic synthesis of cocarboxylase in animal tissue. Effect of metallic ions and various nucleotides and thiamine derivatives on thiaminokinase // J. Biochem. – 1960. – Vol.47, №4. – P. 401–413.
- Mitsuda H., Takii Y., Iwami K. Enzymic formation of thiamine pyrophosphate in plants // J. Nutr. Sci. Vitaminol. – 1975a. – Vol.21, №1. – P. 16–21.
- Mitsuda H., Takii Y., Iwami K. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf // J. Nutr. Sci. Vitaminol. – 1975b. – Vol.21, №2. – P. 103–115.
- Mitsuda H., Takii Y., Yasumoto K. Mechanism and regulation of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf // J. Nutr. Sci. Vitaminol. – 1975в. – Vol.21, №3. – P. 189–198.
- Peterson J.W., Gubler C.J., Kuby S.A. Partial purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig brain // Biochim. biophys. acta. – 1975. – Vol.397, №2. – P. 377–394.
- Sanemory H., Kawasaki T. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase in *Paracoccus denitrificans* // J. Biochem. – 1980. – Vol.88, №1. – P. 223–230.
- Seiyo L., Arnaiz R.L. Subcellular distribution of thiamine pyrophosphatase in rat cerebral cortex // Biochim. biophys. acta. – 1970. – Vol.211, №3. – P. 555–561.
- Stein-Parve E.P. Partial purification and properties of thiaminokinase from yeast // Biochim. biophys. acta. – 1952. – Vol.8, №1. – P. 310–324.
- Suzuoki Z. Thiamine uptake by yeast cells // J. Biochem. – 1955. – Vol.47, №1. – P. 27–39.
- Thoai N., Chevillard L. Purification of thiamine phosphorylation proteins // Bull. Soc. Chem. Biol. – 1949. – Vol.31, №1. – P. 204–212.
- Thome-Bean, Loen L.Y., Olomucki A., Thoai N.L. ATP: Thiamine pyrophosphotransferase. Purification et etude du mechanisms de reaction // Biochim. biophys. acta. – 1969. – Vol.182, №1. – P. 111–121.
- Tokudo Y. Studies on thiamine biosynthesis. Enzymatic synthesis of thiamine diphosphate from thiamine monophosphate // Vitamins. – 1964. – Vol.29, №1. – P. 40–46.
- Wakabayashi Y. Purification of thiamin pyrophosphokinase from pig brain // Vitamins. – 1978a. – Vol.52, № 5–6. – P. 223–228.
- Wakabayashi Y. Some properties of the purified thiamin pyrophosphokinase from pig brain // Vitamins. – 1978b. – Vol.52, № 5–6. – P. 229–236.
- Weil-Malherbe H. The enzymic phosphorylation of vitamin B₁ // J. Biochem. – 1939. – Vol.33. – P. 1997–2007.

Представлено: А.П.Левицький / Presented by: A.P.Levyts'ky

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 22.03.2012