

УДК: 577.152.342:577.15.072

**Виділення та очищення карбоксипептидази А з цисаденоми яєчника жінок
І.Л.Вовчук, С.А.Петров***Одеський національний університет імені І.І.Мечникова (Одеса, Україна)*

Розроблена методика виділення та очистки карбоксипептидази А, яка складається з поетапного осадження сульфатом амонію та гель-хроматографії на сефадексах G-75 та G-100. Поетапне осадження сульфатом амонію призводить до більш ефективного розподілу карбоксипептидази А по фракціях з максимальним виходом ферменту при 80%-му насиченні. Встановлено, що карбоксипептидаза А цисаденоми – доброякісної пухлини яєчника представлена декількома формами, які відрізняються за молекулярними масами та активністю, що може бути пов'язано із змінами, які відбуваються в тканині яєчника за процесу малігнізації.

Ключові слова: карбоксипептидаза А, гель-хроматографія, пухлина, яєчник.

Вступ

В попередніх дослідженнях нами було встановлено підвищення активності карбоксипептидази А (КФ 3.4.2.1) в пухлинах яєчників (Вовчук, 2005), тканин тіла матки (Вовчук та ін., 2004а) та молочної залози (Вовчук та ін., 2004б) порівняно з немалігнізованими тканинами. Вивчення механізмів регуляції активності цих протеолітичних ферментів як на молекулярному, так і на тканинному рівні та порівняльні дослідження біохімічних властивостей карбоксипептидази А немалігнізованої та пухлинних тканин можливі тільки в разі отримання їх в очищеному стані.

Лізосомальна карбоксипептидаза А, яка гідролізує амінокислоти з С-кінця (за винятком аргініну, лізину та проліну), була отримана з деяких тканин людини: підшлункової залози (Marinkovic, Marinkovic, 1975; Moulard et al., 1990), легенів (Goldstein et al., 1989; Reynolds et al., 1989), шкіри (Goldstein et al., 1989; Reynolds et al., 1989) і нирок (Michel et al., 1998). Однак інформація про гомогенність, структуру, фізико-біохімічні та біохімічні властивості отриманих ферментів в багатьох випадках є недостатньою.

В зв'язку з тим, що в сучасній літературі нами не було знайдено інформації щодо виділення та очищення препаратів карбоксипептидази А як з тканини немалігнізованого яєчника, так і з пухлинних тканин яєчника, метою нашої роботи була розробка метода виділення та очищення препарату карбоксипептидази А з тканини доброякісного утворення яєчника жінок для подальшого вивчення її фізико-хімічних та біохімічних властивостей.

Матеріали і методи

Тканину цисаденоми – доброякісного новоутворення яєчника гомогенізували в дистильованій воді у співвідношенні 1:10 і центрифугували при 9 000 g (при +4°C) протягом 45 хв. Осад ресуспендували в дистильованій воді в співвідношенні 1:5, гомогенізували в аналогічних умовах, а супернатанти об'єднували. Отриманий білковий розчин діалізували проти 40 об'ємів дистильованої води з 2 мМ розчином Zn^{++} при +4°C на протязі 12 годин. Поступове фракційне осадження робили сульфатом амонію, насичуючи білковий розчин послідовно до 20, 40, 60 та 80%. Кожну фракцію діалізували в аналогічних умовах та в подальшому використовували в хроматографічних дослідженнях. Хроматографію здійснювали на сефадексах G-75 та G-100 (2,0 см × 28,0 см). Елюцію проводили дистильованою водою з 0,05 М оцтовокислим цинком (pH 5,2) та плавним градієнтом NaCl. Визначення молекулярних мас розраховували за методом Ендрюса (Практическая химия белка, 1989), використовуючи маркерні білки („Serva”, Швеція): білок сироватки людини – 66 500 Да, овальбумін – 43 000 Да, хімотрипсиноген А – 25 000 Да, лізоцим – 17 500 Да та РНК-аза – 13 700 Да. Активність карбоксипептидази А визначали за гідролізом синтетичного субстрату карбобензоксифенілаланіну (Bradshaw et al., 1969) у прирості оптичної щільності при 570 нм за 30 хвилин інкубації при 37°C, питому активність – в перерахуванні на мг білка. Вміст білка визначали спектрофотометричним методом при 280 нм та за методом Лоурі (Lowry et al., 1951).

Статистичну значимість відмінностей між вибірками визначали за допомогою критерію Стьюдента (Рокицкий, 1967).

Результати та їх обговорення

Експериментальним шляхом було встановлено, що діаліз в присутності іонів Zn^{++} призводить до збільшення в 1,49 рази питомої активності та в 1,92 рази процента виходу ферменту, а вихідний розчин білка містить 6,14% низькомолекулярних сполук (табл. 1). При подальшому поступовому

осадженні білків сульфатом амонію була встановлена наявність не менш 4 фракцій з карбоксипептидазною активністю, які осаджувалися при різних ступенях насичення (табл. 1). Щодо показників діалізованого розчину білка, то при 20%-му насиченні сульфатом амонію осаджується 3,7% загального білка та 2,23% ферментативної активності. Відносна активність карбоксипептидази А цієї фракції знижується в 7,65 рази, а питома активність та коефіцієнт очищення збільшуються в 3,50 рази, що свідчить про втрату під час фракціонування факторів, які регулюють ферментативну активність. При 40%-му та 60%-му насиченні сульфатом амонію осаджується 46,73% і 43,90% загального білка та 4,75% і 4,74% ферментативної активності (відповідно), однак коефіцієнт очистки та питома активність нижчі від показників діалізованого розчину білка. Найбільший процент виходу ферменту – 25,40% – був отриманий при 80%-му насиченні сульфатом амонію з коефіцієнтом очистки – в 9,16 рази. В цілому, при поступовому осадженні сульфатом амонію процент виходу карбоксипептидази А становив 37,12%, відносно діалізованого розчину білка.

Подальше використання метода гель-хроматографії дало можливість очистити фракції, що містили карбоксипептидазу А, від 1,03 до 5,08 разів з виходом ферменту від 48,00% до 592,00%. Так, серед водорозчинних білків вихідного розчину цим методом було встановлено наявність 8 білкових піків, які мали карбоксипептидазну активність (рис. 1). Три перших піки (А, В, С), які не сорбувалися на сефадексі, характеризувалися незначним коефіцієнтом очищення з виходом ферменту 6,41, 25,74 і 16,25% та мали молекулярну масу 34116,07, 11943,51 та 7066,74 Да, відповідно (табл. 1, рис. 2). Молекулярну масу останніх 5 піків, які теж гідролізували специфічний для карбоксипептидази А субстрат, неможливо було встановити тому, що вони сорбувалися на носії та вимивалися з нього 0,075, 0,14, 0,23, 0,30 та 0,39 М NaCl, відповідно. Наявність декількох білкових піків, які мали карбоксипептидазну активність і незначну молекулярну масу, свідчить про те, що під час гель-хроматографії певна кількість активного ферменту підлягає частковій деградації без порушення каталітичного центру під впливом протеолітичних ферментів, які знаходяться серед водорозчинних білків вихідного розчину.

Подальше очищення хроматографічним методом фракції 20%-го осадження призводило до значної втрати відносної та питомої активностей, але у 4,9 рази збільшувало процент виходу ферменту (рис. 3, табл. 1). Активність карбоксипептидази А фракції 20%-го осадження була визначена в єдиному білковому піці (D) з молекулярною масою 32766,66 Да, який не сорбувався на сефадексі (рис. 2).

У фракції, що була отримана при 40%-му осадженні сульфатом амонію, хроматографічним методом було встановлено наявність трьох білкових піків з карбоксипептидазною активністю, один з яких сорбувався на сефадексі, вимивався 0,53 М розчином NaCl та мав значну ферментативну активність (рис. 4). Відносна та питома активності ферменту першого піку (Е) з молекулярною масою 57659,65 Да були нижчими за відповідні показники розчину, який піддавали хроматографуванню. Встановлено, що питома активність ферменту другого піка (F), навпаки, значно зростала під час хроматографічного розділення, але його незначна молекулярна маса – 17175,88 Да свідчить про його часткову деградацію (рис. 2, табл. 1).

Хроматографічним методом на сефадексі G-100 серед білків, осаджених при 60%-му насиченні сульфатом амонію, було встановлено наявність чотирьох (G, H, I, J) білкових піків з карбоксипептидазною активністю (рис. 5). Проценти виходу перших трьох піків ферменту (G, H, I) були 27,67, 192,67 та 162,97%, відповідно, але достатньо великий коефіцієнт очищення (в 1,55 рази) був отриманий тільки для першого піка (G) (табл. 1). Вищий коефіцієнт очищення був отриманий для 4-го піка ферменту (J), який мав незначну молекулярну масу (Мм 13481,18), що свідчить про його часткову деградацію (рис. 2, табл. 1). Слід відзначити, що піки ферменту G, H та I мали молекулярні маси 82919,75, 53187,31 та 40094,61 Да, які значно вищі, ніж відомі молекулярні маси карбоксипептидази А різноманітного походження (Колодзейская, Пилявская, 1982).

Хроматографічне дослідження фракції білків 80%-го осадження сульфатом амонію виявило наявність одного білкового піка з карбоксипептидазною активністю (рис. 2, 6, табл. 1) та молекулярною масою (Мм 34116,38 Да), подібною до ферменту, виділеного з підшлункової залози великої рогатої худоби (Колодзейская, Пилявская, 1982; Неорганическая биохимия, 1978).

Таким чином, проведені дослідження свідчать, що карбоксипептидаза А доброякісної пухлини яєчника представлена різними формами, які відрізняються як молекулярними масами, так і активністю. Це може бути пов'язане зі змінами, які відбуваються під час процесу малігнізації тканини яєчника.

Таблиця 1.

Активність карбоксипептидази А на етапах виділення та очищення ($M \pm m$; $n=4$)

Етап виділення	Об'єм, мл	Білок, мг/мл	Активність* ΔE_{570}	Питома активність, $\Delta E_{570}/\text{мг білка}$	Загальна активність, $V \times \Delta E_{570}$	Коефіцієнт очищення	% виходу
Вихідний розчин білка	30,0 $\pm$ 2,60	114,0 $\pm$ 9,1	3,495 $\pm$ 0,310	30,66 $\pm$ 2,734	104,85 $\pm$ 9,86		
Хроматографія на G-75:							
Нанесено	2,5 $\pm$ 0,26	285,0 $\pm$ 29,2			8,74 $\pm$ 0,831	1,00	100,00
Пік А	20,0 $\pm$ 1,83	1,2 $\pm$ 0,104	0,028 $\pm$ 0,003	23,33 $\pm$ 1,984	0,56 $\pm$ 0,051	0,76	6,41
Пік В	45,0 $\pm$ 4,21	2,5 $\pm$ 0,231	0,050 $\pm$ 0,005	20,00 $\pm$ 1,872	2,25 $\pm$ 0,207	0,65	25,74
Пік С	20,0 $\pm$ 1,83	2,3 $\pm$ 0,211	0,071 $\pm$ 0,006	30,87 $\pm$ 3,140	1,42 $\pm$ 0,119	1,00	16,25
Розчин білка після діалізу	31,0 $\pm$ 2,93	107,0 $\pm$ 8,6	4,893 $\pm$ 0,531	45,73 $\pm$ 4,663	151,68 $\pm$ 16,34	1,00	100,00
20% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,3 $\pm$ 0,46	4,0 $\pm$ 0,3	0,640 $\pm$ 0,061	160,00 $\pm$ 16,627	3,39 $\pm$ 0,287	3,50 ⁺	2,23 ⁺
Хроматографія на G-75:							
Нанесено	2,5 $\pm$ 0,2	10,0 $\pm$ 0,090			1,600 $\pm$ 0,142	1,00	100,00
Пік D	70,0 $\pm$ 3,67	0,8 $\pm$ 0,102	0,112 $\pm$ 0,010	140,00 $\pm$ 8,132	7,840 $\pm$ 0,735	0,88	490,00
40% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,8 $\pm$ 0,53	50,0 $\pm$ 4,64	1,280 $\pm$ 0,112	25,60 $\pm$ 2,267	7,42 $\pm$ 0,681	0,56 ⁺	4,75 ⁺
Хроматографія на G-75:							
Нанесено	2,5 $\pm$ 0,23	125,0 $\pm$ 11,9			3,125 $\pm$ 0,287	1,00	100,00
Пік E	15,0 $\pm$ 0,16	4,7 $\pm$ 0,437	0,060 $\pm$ 0,005	12,77 $\pm$ 1,184	0,900 $\pm$ 0,084	0,50	28,80
Пік F	30,0 $\pm$ 2,76	1,0 $\pm$ 0,091	0,171 $\pm$ 0,016	171,00 $\pm$ 18,03	5,130 $\pm$ 0,484	6,68	164,16
60% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8,0 $\pm$ 0,75	47,0 $\pm$ 4,20	0,900 $\pm$ 0,086	19,15 $\pm$ 1,874	7,20 $\pm$ 0,705	0,42 ⁺	4,74 ⁺
Хроматографія на G-100:							
Нанесено	5,0 $\pm$ 0,47	235,0 $\pm$ 21,83			4,500 $\pm$ 0,437	1,00	100,00
Пік G	15,0 $\pm$ 1,23	28,0 $\pm$ 2,61	0,083 $\pm$ 0,009	29,64 $\pm$ 2,844	1,245 $\pm$ 0,108	1,55	27,67
Пік H	30,0 $\pm$ 2,86	20,0 $\pm$ 1,788	0,289 $\pm$ 0,026	14,45 $\pm$ 1,219	8,670 $\pm$ 0,871	0,75	192,67
Пік I	40,0 $\pm$ 3,89	18,0 $\pm$ 1,654	0,183 $\pm$ 0,016	10,17 $\pm$ 0,982	7,320 $\pm$ 0,746	0,53	162,67
Пік J	15,0 $\pm$ 1,34	1,1 $\pm$ 0,009	0,088 $\pm$ 0,009	80,00 $\pm$ 7,864	1,320 $\pm$ 0,119	4,18	29,33
80% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	23,0 $\pm$ 2,20	4,0 $\pm$ 0,38	1,675 $\pm$ 0,154	418,75 $\pm$ 39,457	38,53 $\pm$ 3,574	9,16 ⁺	25,40 ⁺
Хроматографія на G-75:							
Нанесено	15,0 $\pm$ 1,424	60,0 $\pm$ 5,88			25,125 $\pm$ 2,308	1,00	100,00
Пік K	545,0 $\pm$ 4,31	28,0 $\pm$ 2,63	1,248 $\pm$ 0,104	44,57 $\pm$ 4,182	56,160 $\pm$ 5,464	0,16	223,52
Всього:							37,12 ⁺

Примітка: * – активність виражали у величинах приросту екстинкції при довжині хвилі 570 нм за 30 хвилин інкубації; ⁺ – коефіцієнт очищення та процент виходу ферменту по відношенню до показників білкового розчину, отриманого після діалізу.

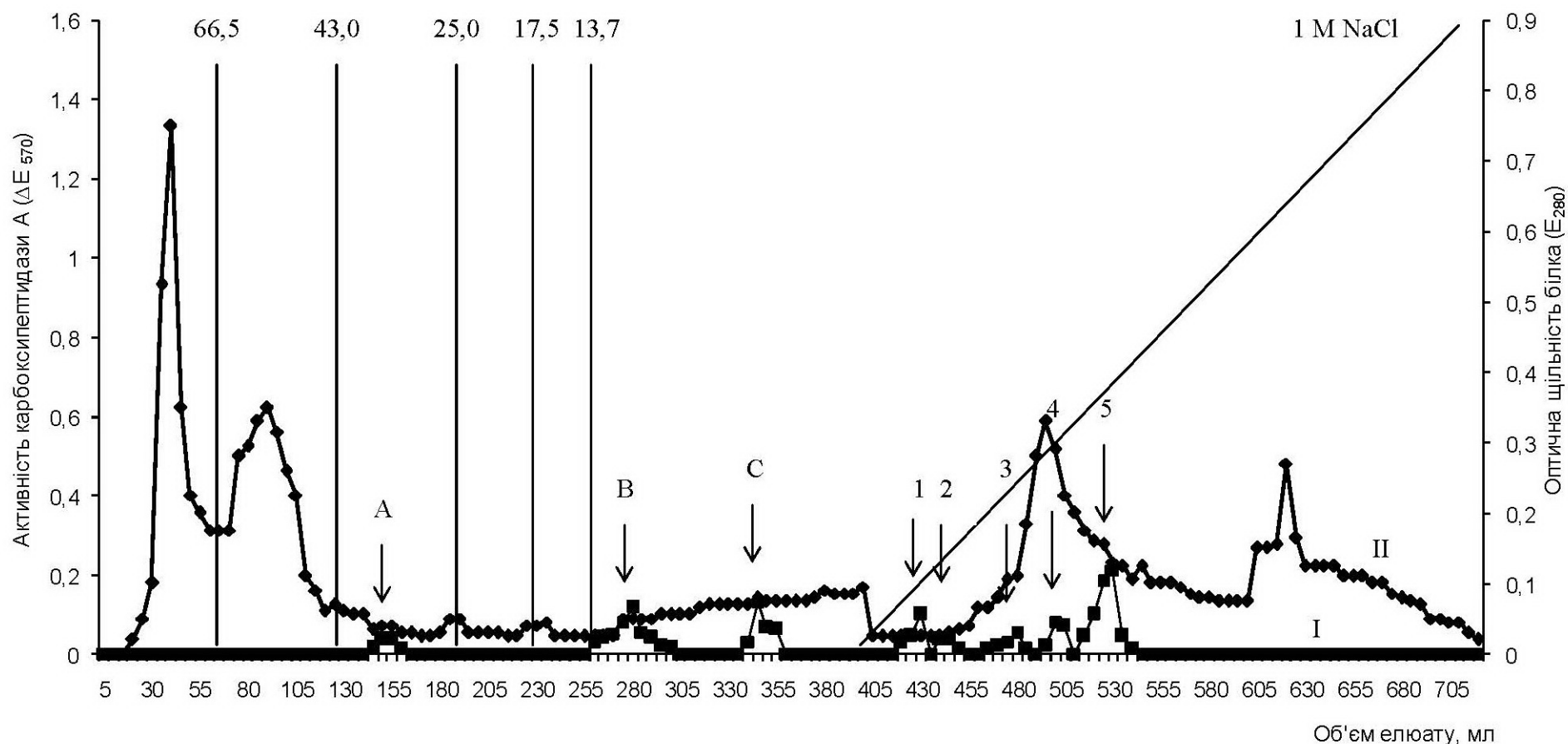


Рис. 1. Хроматографічний розподіл активності карбоксипептидази А і вміст білка у фракції водорозчинних білків тканини цисаденоми яєчника (вихідний розчин). Сефадекс G-75 (2,0 см × 28,0 см). Нанесено 285,0 мг білка; об'єм фракції 5,0 мл, швидкість 27,3 мл/год, елюювання дистильованою водою з 0,05 М оцтовокислим цинком (рН 5,2). Молекулярні маси маркерних білків вказані в кДа

I – активність карбоксипептидази А (ΔE_{570});

II – оптична щільність білка (E_{280});

A, B, C, 1, 2, 3, 4, 5 – вихід карбоксипептидази А.

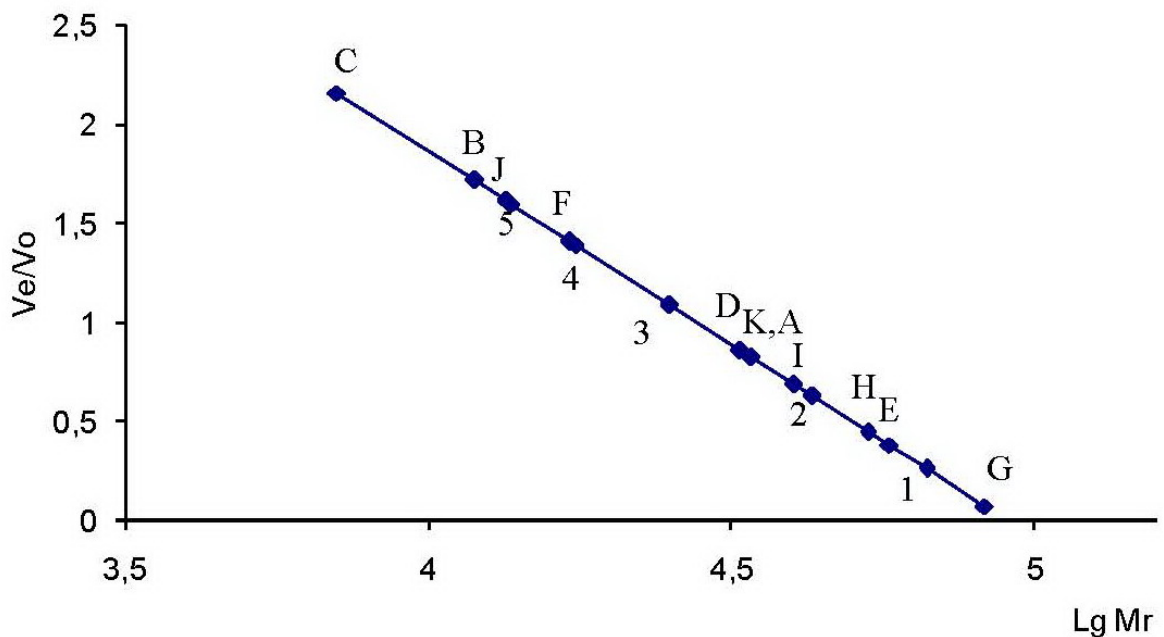


Рис. 2. Молекулярні маси карбоксипептидази А тканини цисаденоми яєчника

G – фермент, отриманий після хроматографії фракції 60%-го осадження сульфатом амонію (I пік, Mr 82919,37 Да);
 1 – альбумін сироватки людини (Mr 66500 Да);
 E – фермент, отриманий після хроматографії фракції 40%-го осадження сульфатом амонію (I пік, Mr 57659,65 Да);
 H – фермент, отриманий після хроматографії фракції 60%-го осадження сульфатом амонію (II пік, Mr 53187,31 Да);
 2 – овальбумін (Mr 43000 Да);
 I – фермент, отриманий після хроматографії фракції 60%-го осадження сульфатом амонію (III пік, Mr 40094,61 Да);
 K – фермент, отриманий після хроматографії фракції 80%-го осадження сульфатом амонію (Mr 34116,38 Да);
 A – фермент, отриманий після хроматографії фракції вихідного розчину білка (I пік, Mr 34116,07 Да);
 D – фермент, отриманий після хроматографії фракції 20%-го осадження сульфатом амонію (Mr 32766,27 Да);
 3 – хімотрипсिनоген А (Mr 25000 Да);
 4 – лізоцим (Mr 17500 Да);
 F – фермент, отриманий після хроматографії фракції 40%-го осадження сульфатом амонію (II пік, Mr 17175,88 Да);
 5 – рибонуклеаза (Mr 13700 Да);
 J – фермент, отриманий після хроматографії фракції 60%-го осадження сульфатом амонію (IV пік, Mr 13481,18 Да);
 B – фермент, отриманий після хроматографії фракції вихідного розчину білка (II пік, Mr 11943,51 Да);
 C – фермент, отриманий після хроматографії фракції вихідного розчину білка (III пік, Mr 7066,74 Да).

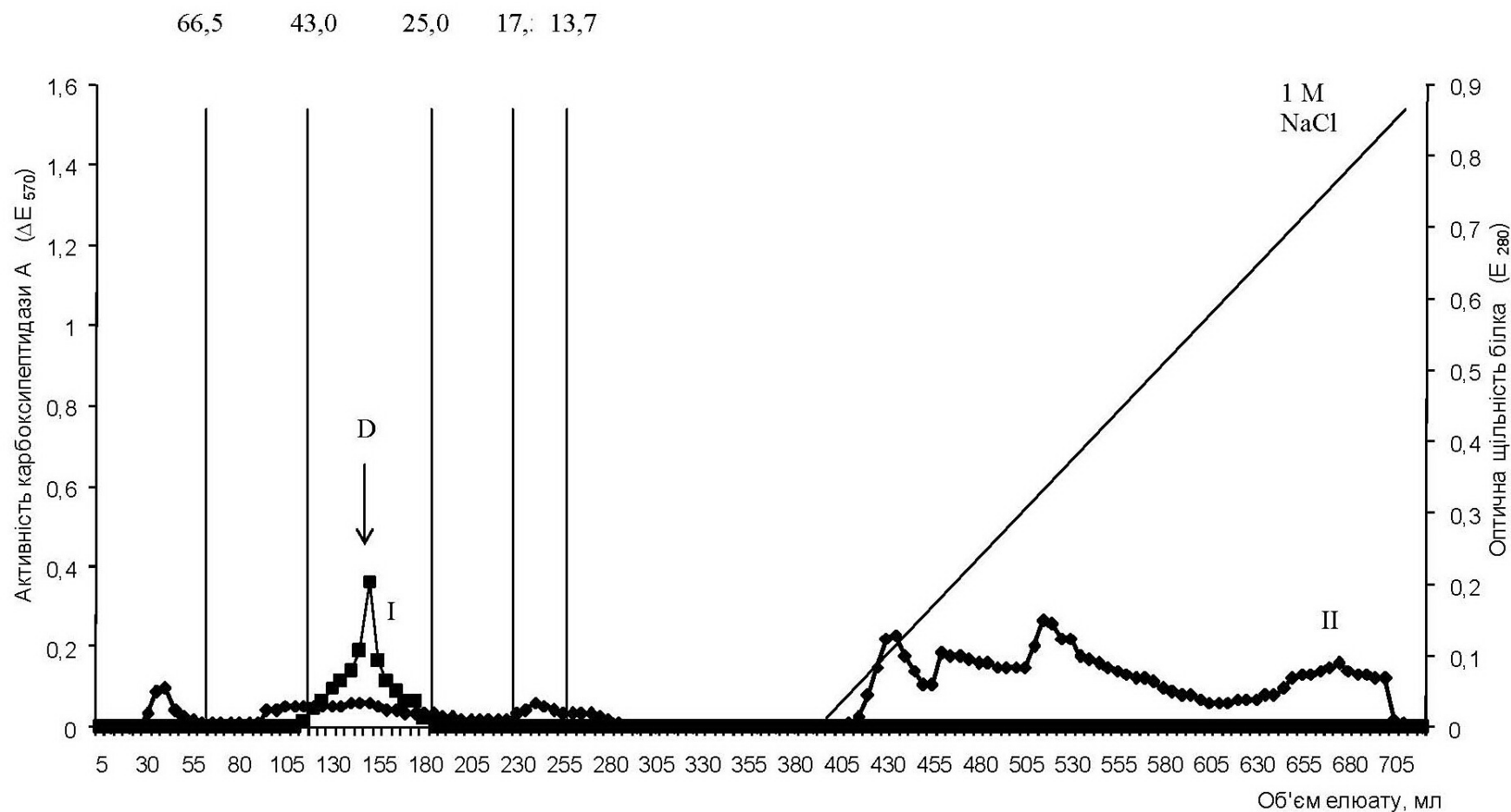


Рис. 3. Хроматографічний розподіл активності карбоксипептидази А і вміст білка у фракції водорозчинних білків тканини цисаденоми яєчника, осаджених при 20%-му насиченні сульфатом амонію. Сефадекс G-75 (2,0 × 28,0 см). Нанесено 10,0 мг білка; об'єм фракції 5,0 мл, швидкість 27,3 мл/год, елюювання дистильованою водою з 0,05 М оцтовокислим цинком (рН 5,2). Молекулярні маси маркерних білків вказані в кДа

I – активність карбоксипептидази А (ΔE_{570});

II – оптична щільність білка (E_{280});

D – вихід карбоксипептидази А.

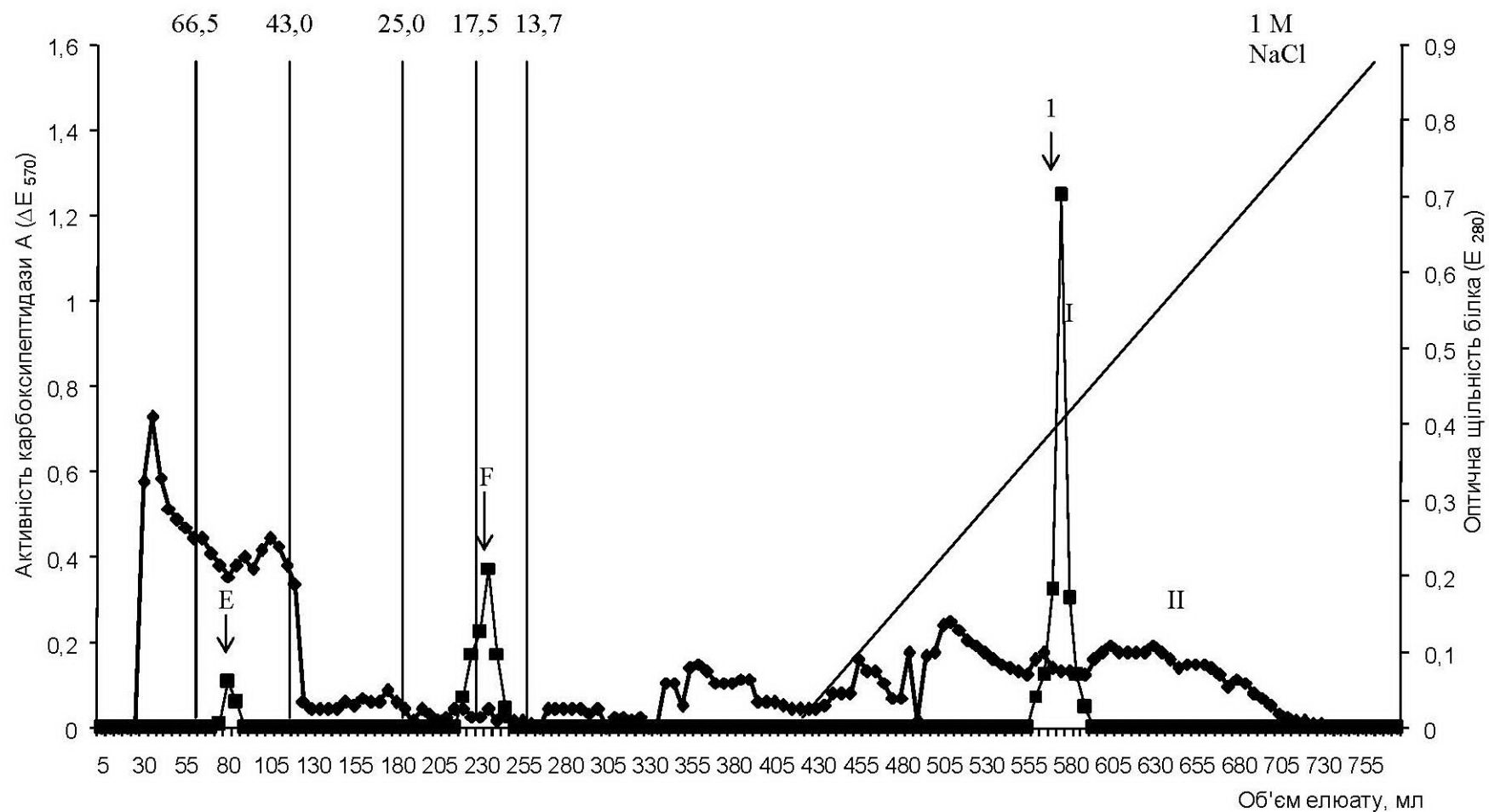


Рис. 4. Хроматографічний розподіл активності карбоксипептидази А і вміст білка у фракції водорозчинних білків тканини цисаденоми яєчника, осаджених при 40%-му насиченні сульфатом амонію. Сефадекс G-75 (2,0 × 28,0 см). Нанесено 125,0 мг білка; об'єм фракції 5,0 мл, швидкість 27,3 мл/год, елюювання дистильованою водою з 0,05 М оцтовокислим цинком (рН 5,2). Молекулярні маси маркерних білків вказані в кДа

I – активність карбоксипептидази А (ΔE_{570});

II – оптична щільність білка (E_{280});

E, F, 1 – вихід карбоксипептидази А.

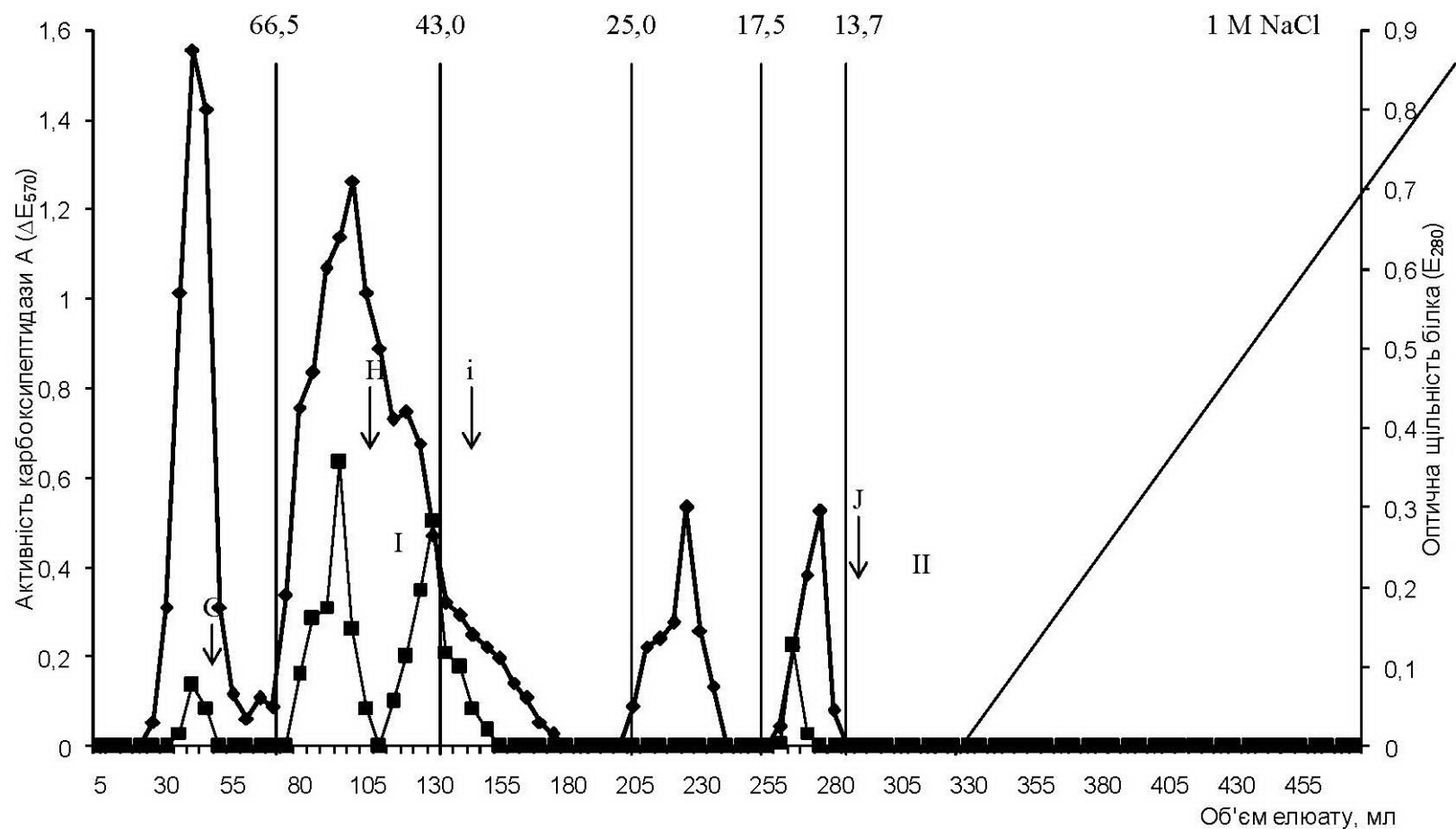


Рис. 5. Хроматографічний розподіл активності карбоксипептидази А і вміст білка у фракції водорозчинних білків тканини цисаденоми яєчника, осаджених при 60%-му насиченні сульфатом амонію. Сефадекс G-100 (2,0 × 28,0 см). Нанесено 235,0 мг білка; об'єм фракції 5,0 мл, швидкість 27,3 мл/год, елюювання дистильованою водою з 0,05 М оцтовокислим цинком (рН 5,2). Молекулярні маси маркерних білків вказані в кДа

I – активність карбоксипептидази А (ΔE_{570});

II – оптична щільність білка (E_{280});

G, H, i, J – вихід карбоксипептидази А.

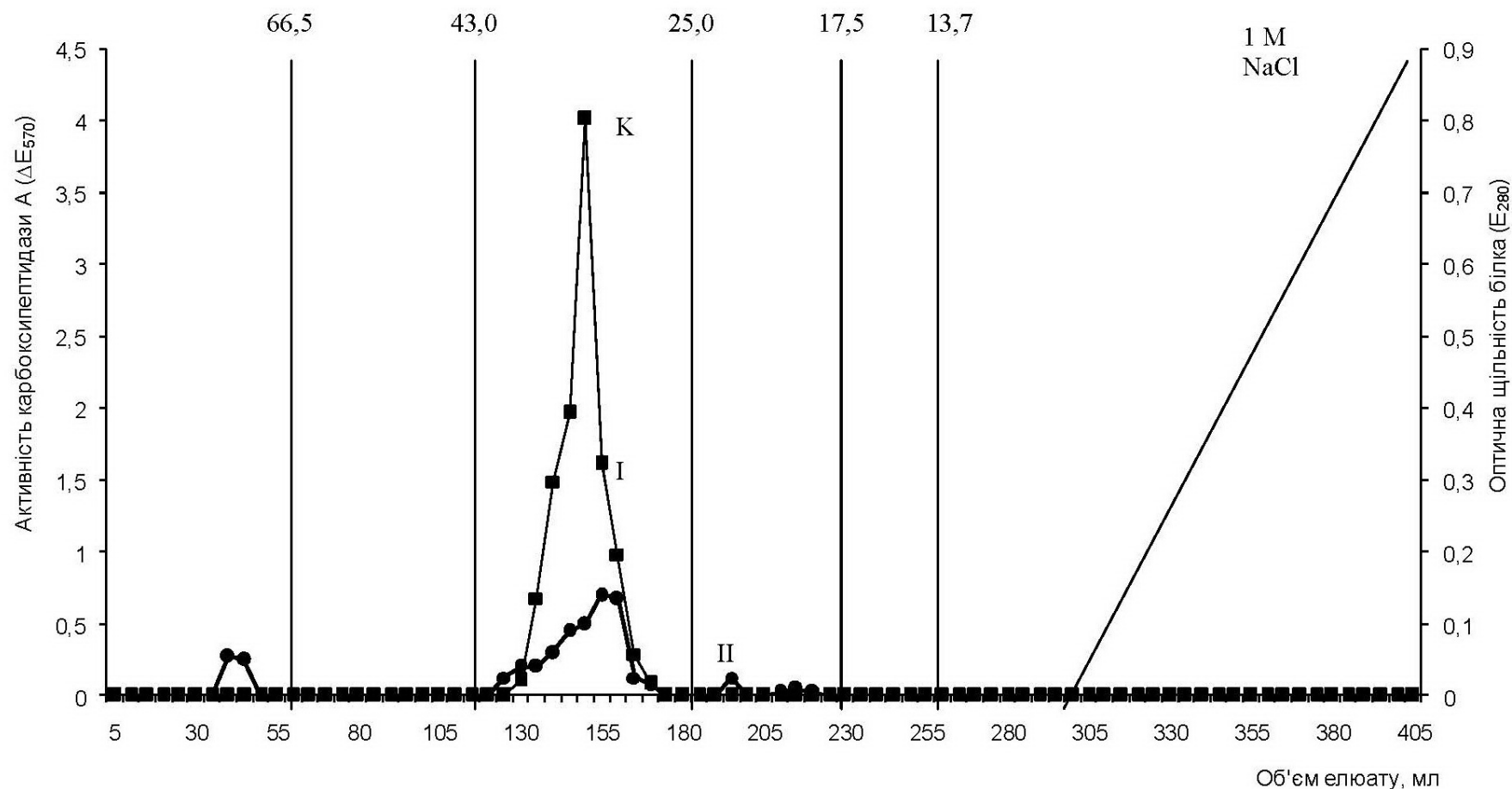


Рис. 6. Хроматографічний розподіл активності карбоксипептидази А і вміст білка у фракції водорозчинних білків тканини цисаденоми яєчника, осаджених при 80%-му насиченні сульфатом амонію. Сефадекс G-75 (2,0 × 28,0 см). Нанесено 60,0 мг білка; об'єм фракції 5,0 мл, швидкість 27,3 мл/год, елюювання дистильованою водою з 0,05 М оцтовокислим цинком (рН 5,2). Молекулярні маси маркерних білків вказані в кДа

I – активність карбоксипептидази А (ΔE₅₇₀);

II – оптична щільність білка (E₂₈₀);

К – вихід карбоксипептидази.

Список літератури

- Вовчук І.Л. Активність карбоксипептидази А в новоутвореннях яєчника // Вісник ОНУ. – 2005. – Т.10, №5. – С. 36–41.
- Вовчук І.Л., Чернадчук С.С., Блохін Ю.В., Раздражнюк Г.С. Активність карбоксипептидаз у тканинах новоутворень тіла матки // Вісник ОНУ. – 2004. – Т.9, №1. – С. 25–33. (а).
- Вовчук І.Л., Чернадчук С.С., Мотрук Н.В. та ін. Активність карбоксипептидази А в новоутвореннях молочної залози // Вісник ОНУ. – 2004. – Т.9, №5. – С. 29–37. (б).
- Колодзейская М.В., Пилявская А.С. Пептидазы. – Киев: Наук. думка, 1982. – 176с.
- Неорганическая биохимия. Т.1. – М.: Мир, 1978. – С. 504–505.
- Практическая химия белка. Пер. с англ. / Под ред. А.Дарбре. – М.: Мир, 1989. – С. 39–43.
- Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1967. – 326с.
- Bradshaw R.S., Ericsson L.H., Walsh K.A., Neurath H. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1969. – Vol.63, №4. – P. 1389–1394.
- Goldstein S.M., Kaempfer C.E., Kealey J.T., Wintroub B.U. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization // J. Clin. Invest. – 1989. – Vol.83, №5. – P. 1630–1636.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.I., Fan A.Z. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol.193. – P. 265–275.
- Marinkovic D.V., Marinkovic J.N. Studies of human carboxypeptidase A purification and properties from human pancreas // Biochem. Med. – 1975. – Vol.14, №1. – P. 125–134.
- Michel A., Nortier J., Humblet A. et al. Cleavage of atrial natriuretic peptide by a kidney membrane-bound carboxypeptidase A // Peptides. – 1998. – Vol.19, №5. – P. 907–912.
- Moulard M., Michon T., Kerfelec B., Chapus C. Further studies on the human pancreatic binary complexes involving procarboxypeptidase A // FEBS Lett. – 1990. – Vol.261, №1. – P. 179–183.
- Reynolds D.S., Stevens R.L., Gurley D.S. et al. Isolation and molecular cloning of mast cell carboxypeptidase A. A novel member of the carboxypeptidase gene family // J. Biol. Chem. – 1989. – Vol.264, №33. – P. 20094–20099.

**Выделение и очистка карбоксипептидазы А из цисаденомы яичника женщин
И.Л.Вовчук, С.А.Петров**

Разработана методика выделения и очистки карбоксипептидазы А, которая состоит из поэтапного осаждения сульфатом аммония и гель-хроматографии на сефадексах G-75 и G-100. Поэтапное осаждение сульфатом аммония приводит к более эффективному разделению карбоксипептидазы А по фракциям с максимальным выходом фермента при 80%-ом насыщении. Установлено, что карбоксипептидаза А цисаденомы – доброкачественной опухоли яичника представлена несколькими формами, различающимися по молекулярным массам и активности, что может быть связано с изменениями, происходящими в ткани яичника в процессе малигнизации.

Ключевые слова: *карбоксипептидаза А, гель-хроматография, опухоль, яичник.*

**Isolation and purification of carboxypeptidase A from women ovarian cysadenoma
I.L.Vovchuk, S.A.Petrov**

The method of isolation and purification of carboxypeptidase A which consists of step-by-step precipitation by ammonium sulfate and gel-chromatography on sephadexes G-75 and G-100 is worked out. Step-by-step precipitation by ammonium sulfate leads to more effective division of carboxypeptidase A to fractions with maximum coming out at 80% saturation. It is established that carboxypeptidase A from cysadenoma – benign tumor of ovary is presented by several forms which differ in their molecular masses and activities. It can be concerned with changes which occur in ovarian tissue under malignization process.

Key words: *carboxypeptidase A, gel-chromatography, tumor, ovary.*

Представлено М.Ф.Леусом
Рекомендовано до друку Н.О.Бабенко