

ВЛИЯНИЕ ТРИТОНА X-100 НА ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ИЗ ГАНГЛИЕВ КАЛЬМАРОВ

Исследовано влияние детергента тритона X-100 на экстрактивность холинэстеразы из мороженных и сублимированных ганглиев кальмаров. Определена молекулярная масса препарата фермента холинэстеразы.

Ключевые слова: тритон X-100, холинэстераза, субстратная специфичность.

N.N. Kovalev, E.V. Mikheev, J.M. Pozdnyakova

THE INFLUENCE OF TRITON X-100 ON THE ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF CHOLINESTERASE FROM THE SQUID GANGLIA

The Triton X-100 detergent influence on the cholinesterase extractive capacity from the frozen and dehydrated squid ganglia is researched. The molecular mass of cholinesterase enzyme preparation is determined.

Key words: Triton X-100, cholinesterase, substrate specificity.

Введение. Экстракция мембраносвязанных белков с помощью детергентов – один из широко распространенных приемов в практической биохимии и биотехнологии. В состав детергентов входят липофильные цепи, которые, взаимодействуя с гидрофобными поверхностями молекулы белка, вытесняют его из комплекса с мембраной. Одним из наиболее широко применяемых детергентов являются тритоны (в частности, тритон X-100). Tritоны в большинстве своем неионные детергенты на основе полиэтиленгликоля. Детергенты способны вытеснять белок, прочно связанный с мембраной гидрофобными взаимодействиями, благодаря тому, что они, во-первых, растворяют мембрану и, во-вторых, замещают компоненты мембраны алифатическими или ароматическими цепями, которые составляют липофильную часть детергента [1].

В литературе есть данные об использовании тритона X-100 для выделения холинэстеразы (ХЭ) из различных источников [2, 3]. Так, было показано, что обработка осадка голов мух после водной экстракции тритоном X-100 в концентрациях 0,1 и 1,0 % приводила к переходу в раствор дополнительно от 6 до 10 % общей активности ХЭ [3]. Было установлено, что в концентрации 1 % тритон X-100 повышает значения V_m для гидролиза АТХ [4]. Также тритон X-100 в концентрации 1% применялся для солюбилизации ХЭ различного происхождения [5–8].

Цель работы. Исследование влияния детергента тритона X-100 на экстрактивность холинэстеразы из ганглиев кальмаров, а также влияния тритона X-100 на свойства препарата фермента ХЭ (активность, чувствительность к фосфорорганическим ингибиторам и субстратную специфичность), полученного с его использованием.

Материалы и методы. В качестве источников фермента использовали сублимированные и мороженные ганглии тихоокеанского кальмара *Todarodes pacificus* и кальмара Бартрама *Ommastrephes bartramii*.

В качестве субстратов холинэстераз использовали тиохолиновые эфиры карбоновых кислот – ацетил-, пропионил- и бутирилтиохолин иодиды (ICN, США).

Скорость холинэстеразного гидролиза определяли методом Элмана [9]. Кинетические параметры ферментативного гидролиза (V_m и K_m) – графически по методу Лайнуивера-Берка [10].

В качестве ингибиторов использовали: диизопропилфторфосфат (ДФФ) – $[(CH_3)_2CHO]_2P(O)F$; О-этил-S-(β-этилмеркаптоэтил) метилтиофосфанат (ГД-42) – $C_2H_5O(CH_3)P(O)SC_2H_4S^+(CH_3)C_2H_5$. Исследованные фосфорорганические соединения (ФОС) синтезированы в Институте элементарной органической химии им. А.Н. Несмеянова РАН [11]. Бимолекулярную константу скорости взаимодействия ХЭ с ФОС рассчитывали по уравнению [12].

Ультрафильтрацию проводили на колонках с мембранами волоконного типа, с пределом пропускания пор 100 кДа (GE Healthcare, США).

Электрофорез ферментных препаратов проводили в 10 %-м (C = 3,2) полиакриламидном геле (ПААГ) [13]. Для выявления ХЭ-активности в гелях использовали тиохолиновый метод [14].

Результаты и обсуждение. Исследования по выделению фермента из различных источников показали, что большинство ХЭ не переходит в раствор без разрушения ткани детергентами или солюбилизирующими агентами.

В связи с этим проведено исследование влияния детергента тритона X-100 в концентрации 1–3 % от массы сырья на экстрактивность ХЭ из мороженных и сублимированных ганглиев различных видов кальмаров.

Установлено, что обработка 3 %-м тритоном X-100 мороженных ганглиев тихоокеанского кальмара приводила к переходу в раствор 34 % общей активности в гомогенате ткани, при этом экстракция водой приводила к переходу в раствор 27 % общей активности в гомогенате (рис. 1).

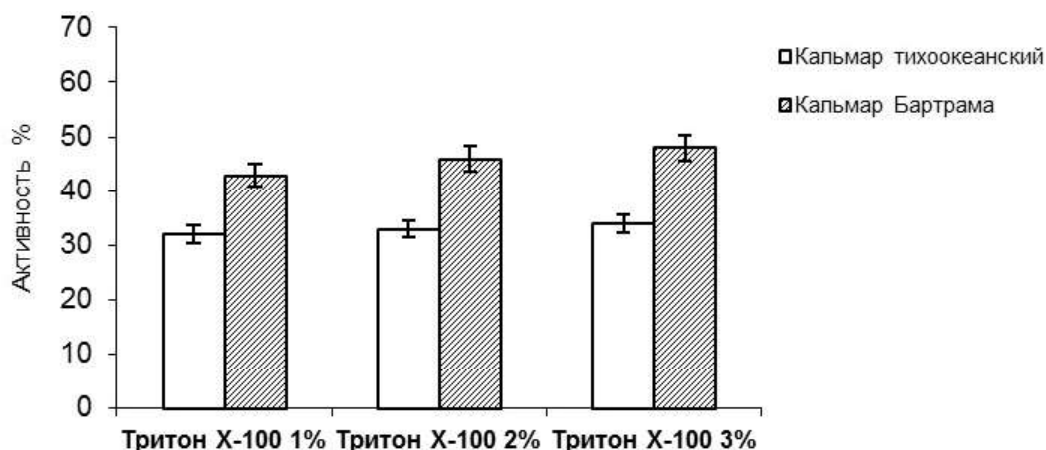


Рис. 1. Влияние различных концентраций тритона X-100 на экстрактивность ХЭ из мороженных ганглиев кальмаров (за 100 % принята активность в гомогенате) ($p \leq 0,05$)

В случае кальмара Бартрама экстракция 3 %-м тритоном приводила к переходу в раствор 48 % активности (при использовании тритона в концентрации 1 и 2 % в раствор переходило соответственно 43 и 46 % активности), при этом экстракция водой приводила к переходу в раствор 32 % общей активности фермента.

Таким образом, концентрации тритона X-100 в интервале 1–3 % для различных видов кальмаров приводили к переходу в раствор от 32 до 48 % активности. По сравнению с водной экстракцией наибольший прирост экстрактивности ХЭ из мороженных ганглиев (16 %) характерен для кальмара Бартрама, наименьший (7 %) – для тихоокеанского кальмара.

В опытах на сублимированных ганглиях тихоокеанского кальмара показано, что тритон X-100 в концентрациях 0,5 и 1,0 % способствует переходу в раствор 57–60 % активности ХЭ. Увеличение выхода фермента в раствор следует признать незначительным, поскольку при экстракции водой в раствор переходит 50 % активности ХЭ, содержащейся в сырье (рис. 2).

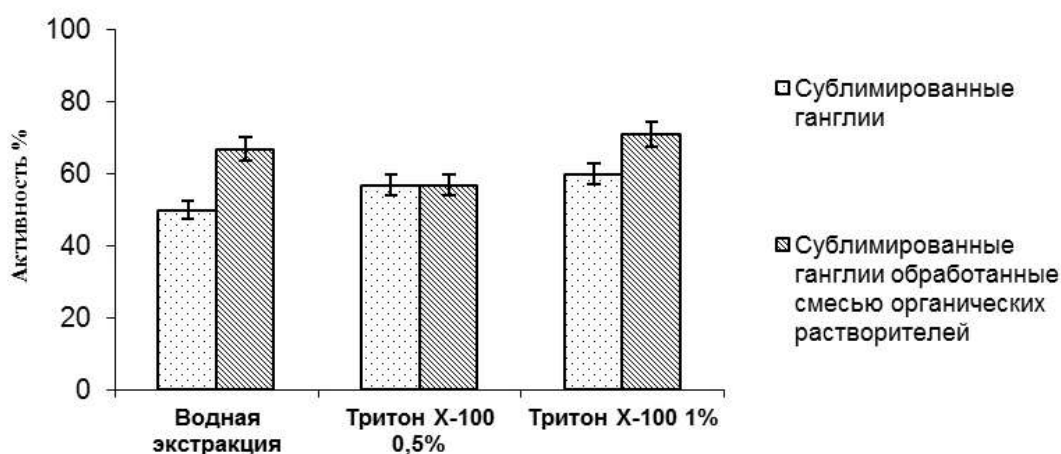


Рис. 2. Влияние различных концентраций тритона X-100 на экстрактивность ХЭ из сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара (за 100 % принята активность в гомогенате) ($p \leq 0,05$)

Ранее, на примере сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара, было показано, что обработка сырья смесью органических растворителей приводит к повышению выхода фермента в раствор при водной экстракции на 17 % [14]. Представляло интерес исследование влияния на экстрактивность ХЭ различных концентраций тритона X-100 (из обработанных смесью органических растворителей ганглиев кальмаров).

Солюбилизация ХЭ из сублимированных, обработанных органическими растворителями ганглиев кальмара 0,5 %-м тритоном X-100, как и в случае сублимированных необработанных ганглиев, не приводила к значительному увеличению степени солюбилизации фермента. Обработка сублимированных ганглиев органическими растворителями и последующая экстракция 1 %-м тритоном X-100 приводит к повышению на 20 % активности фермента в экстракте по сравнению с водной экстракцией из сублимированных ганглиев (рис. 3).

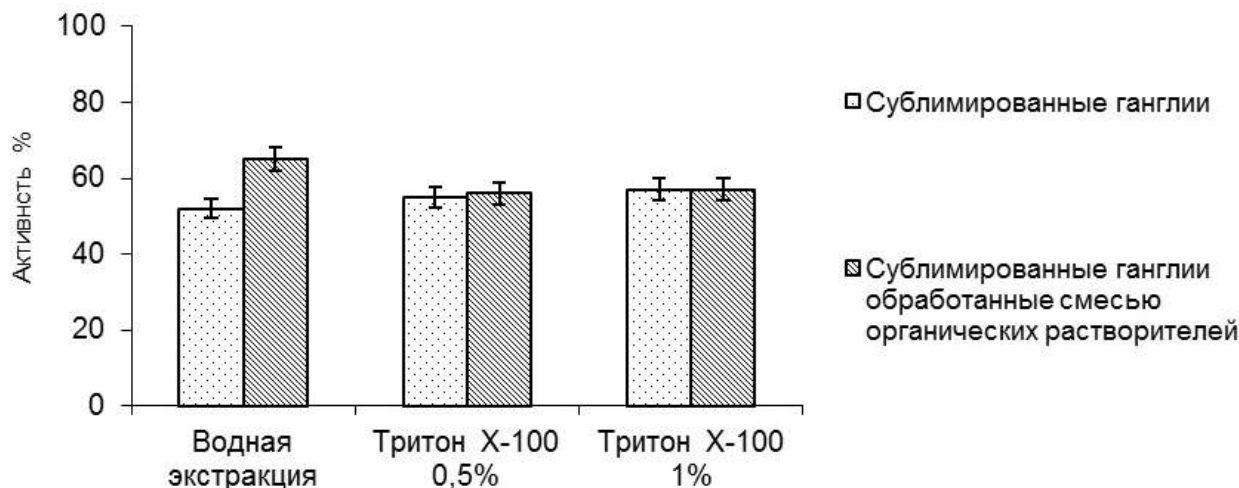


Рис. 3. Влияние тритона X-100 на экстрактивность ХЭ из сублимированных ганглиев кальмара Бартрама. Гидромодуль 3 : 1, время экстракции 15 ч, $t = -20 \pm 2$ °С, pH – 6,8 (за 100 % принята активность в гомогенате) ($p \leq 0,05$)

Обработка 1 %-м раствором тритона сублимированных ганглиев кальмара Бартрама (рис. 4) привела к переходу в раствор 57 % активности как сублимированных ганглиев необработанных, так и сублимированных, обработанных смесью органических растворителей. При этом водная экстракция необработанных ганглиев без добавления детергента приводила к переходу в раствор 52 % активности, а водная экстракция сублимированных обработанных ганглиев кальмара Бартрама – 65 % общей активности.

Исследования зависимости экстракции ХЭ тритоном X-100 из сублимированного сырья показали, что экстракция 0,5 %-м детергентом не оказывала существенного влияния на экстрактивность ХЭ из сублимированных ганглиев (как обработанных, так и необработанных) исследованных видов кальмаров. Использование тритона в 1,0 %-й концентрации при экстракции ХЭ из сублимированных, обработанных смесью органических растворителей ганглиев тихоокеанского кальмара позволило перевести в раствор 71 % общей активности в сырье (солюбилизация ХЭ смесью органических растворителей приводила к переходу в экстракт 67 % активности фермента). В то же время увеличение концентрации детергента не приводило к улучшению экстрактивности фермента из ганглиев кальмара Бартрама различных способов обработки. Исследования по влиянию тритона X-100 на экстрактивность ХЭ из мороженых ганглиев кальмаров показали, что в раствор переходит не более 48 % общей ферментативной активности (в случае кальмара Бартрама).

Основываясь на описанных выше параметрах процессов, был получен препарат фермента холинэстеразы из сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара путем обработки смесью органических растворителей (бутанол : гексан 1,5 : 1,0) с последующей обработкой тритоном X-100 (1 % массы сырья) и дальнейшей очисткой ультрафильтрацией.

Экстракцию ХЭ из сырья, обработанного смесью органических растворителей, после добавления тритона X-100 проводили при 18 ± 2 °С при соотношении сырье : вода – 3 : 1.

По окончании процесса экстракции очистку центрифугата от тритона X-100 проводили с помощью ультрафильтрации на мембранах с пределом пропускания пор 100 кДа, при добавлении 0,1 M NaCl.

В концентрате производили отмывку низкомолекулярных компонентов. Полученный препарат был характеризован по величине удельной активности и чувствительности к ФОС (табл.).

Свойства препарата ХЭ из сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара, обработанных смесью органических растворителей и тритоном X-100

Субстрат	V_m (отн),%	Удельная активность, мМ АТХ/мин/мг белка	Выход, % от экстракта	ГД-42 $K_{II} \cdot 10^9$, М мин ⁻¹	ДФФ, $K_{II} \cdot 10^7$ М мин ⁻¹
АТХ	100	11,60±0,03	18	1,90±0,01	1,20±0,01
ПТХ	77				
БТХ	78				

Полученный препарат ХЭ катализировал гидролиз всех изученных субстратов, скорость гидролиза уменьшалась при увеличении концентрации субстрата (рис. 4).

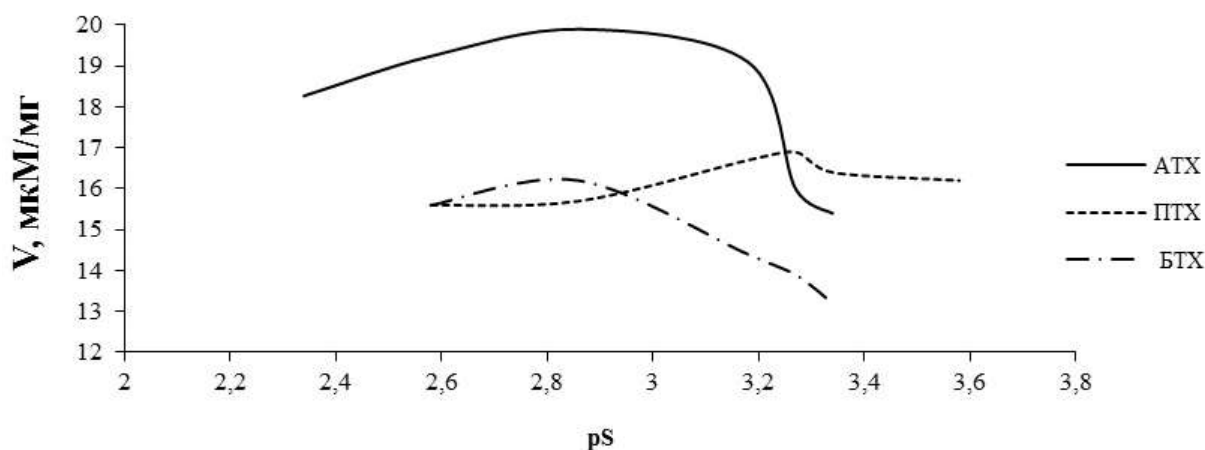


Рис. 4. Зависимость скорости гидролиза (мкМ/мг навески) субстратов от их концентрации (pS) под действием препарата ХЭ из сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара, полученного с использованием тритона X-100

Фермент, полученный с использованием детергента, с наибольшей скоростью гидролизует АТХ. При этом скорость гидролиза ПТХ и БТХ была одинаковой. Удельная активность препарата составляла 11,6 Е/мг белка, выход препарата – 18 % от активности в сырье (сублимированные ганглии) (см. табл.).

С целью определения фракционного состава и молекулярной массы компонентов препарата был проведен SDS-электрофорез в полиакриламидном геле (рис. 5).

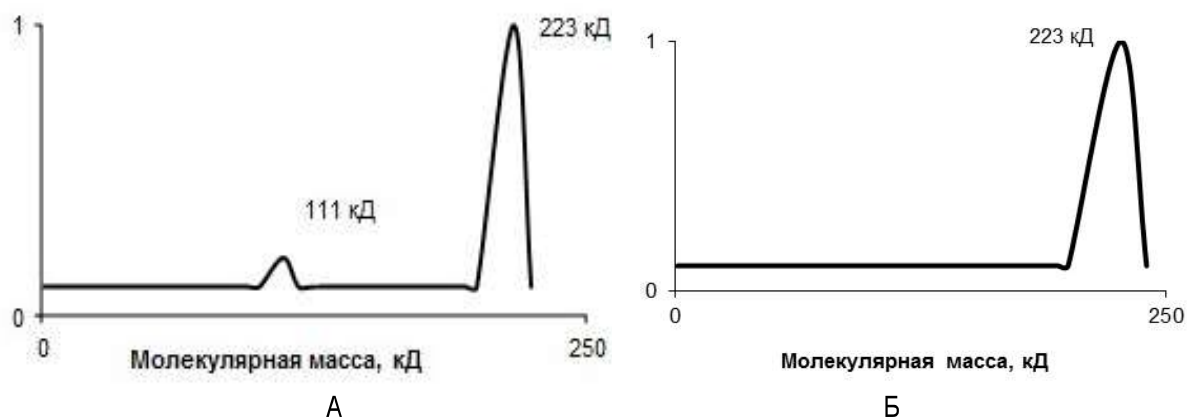


Рис. 5. Денситограммы препарата ХЭ из сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара, полученного обработкой смесью органических растворителей и последующей экстракцией 1 %-м тритоном X-100: А – окраска кумасси; Б – окраска по Карновскому

Как видно на рисунке 5, в препарате присутствует два белковых компонента с молекулярной массой 117 и 217 кДа. Специфическая окраска по Карновскому показала, что холинэстеразной активностью обладает белковая фракция с молекулярной массой 223 кДа.

Выводы. Таким образом, проведенное исследование показало возможность получения гомогенного фермента при использовании органических растворителей и 1 %-го тритона X-100 из сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара, с удельной активностью 11,6 Е/мг белка. Выход по активности составил 18 % от сублимированного сырья.

Литература

1. Скоупс Р. Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985. – 358 с.
2. Бресткин А.П., Вяземская М.М., Майзель Е.Б. Влияние тритона X-100 на свойства ацетилхолинэстеразы из эритроцитов крови человека // Биохимия. – 1978. – Т. 43, № 1. – С. 94–99.
3. Выделение и каталитические свойства растворимой и мембранной холинэстеразы мозга капустной мухи *Delia brassicae* / Г.М. Григорьева, Т.И. Краснова, А.Е. Хованских [и др.] // Биохимия. – 1987. – Т. 52, № 7. – С. 1192–1200.
4. Rosenfeld C., Kousba A., Sultatos L.G. Interactions of rat brain acetylcholinesterase with the detergent Triton X-100 and the organophosphate paraoxon // *Toxicological Sciences*. – 2001. – Vol. 63, Iss 2. – P. 208–213.
5. Molecular properties of acetylcholinesterase in mouse spleen / S. NietoCeron, M.T. MoralNaranjo, E. MunozDelgado [et al.] // *Neurochemistry International*. – 2004. – Vol. 45, Iss 1. – P. 129–139.
6. Hussein A.S., Grigg M.E., Selkirk M.E. *Nippostrongylus brasiliensis*: Characterisation of a somatic amphiphilic acetylcholinesterase with properties distinct from the secreted enzymes // *Experimental Parasitology*. – 1999. – Vol. 91, Iss 2. – P. 144–150.
7. Purification and characterization of acetylcholinesterase from oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis* (Hendell)) (Diptera: Tephritidae) / Y.M. Hsiao, J.Y. Lai, H.Y. Liao [et al.] // *J. of Agricultural and Food Chemistry*. – 2004. – Vol. 52, Iss 17. – P. 5340–5346
8. Amphiphilic and hydrophilic forms of acetylcholinesterase from sheep platelets / M.R. Marcos, J. Sanchez Yague, A. Hernandez Hernandez [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. – 1998. – Vol. 1415, Iss 1. – P. 163–173.
9. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity / G.L. Ellman, K.D. Courtney, V.Jr. Andres [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 1961. – Vol 7, № 1. – P. 88–95.
10. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. – М.: Мир, 1979. – 280 с.
11. Кабачник М.И. Фосфорорганические физиологически активные вещества // Вестн. АН СССР. – 1964. – № 40. – С. 60–68.
12. Яковлев В.А. Кинетика ферментативного катализа. – М.: Наука, 1965. – 248 с.
13. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука, 1981. – 286 с.
14. Karnovsky M., Roots L.A. "Direct-colouring" thiocholine method for cholinesterases // *Histochem. Cytochem.* – 1964. – Vol. 12. – P. 219–226
15. Михеев Е.В., Ковалев Н.Н. Технологические характеристики ганглиев кальмаров как сырья для получения фермента холинэстеразы // Изв. ТИПРО. – 2012. – Т. 169. – С. 238–245.

