

УДК 577.124.1

Р. А. ИСЛАМОВ, О. В. ФУРСОВ

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ БИФУНКЦИОНАЛЬНОГО ИНГИБИТОРА АЛЬФА-АМИЛАЗА/ТРИПСИН ИЗ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

(Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина)

Бифункциональный ингибитор, активный против α -амилазы слюны человека и свиного трипсина, выделен из зерна пшеницы методом биоспецифической хроматографии на трипсин-сефарозе. ДСН-электрофорезом определена его молекулярная масса около 14 кДа. Ингибитор проявил значительную термостабильность при температуре до 90°C, комплекс фермент-ингибитор был устойчив в области pH от 5 до 9. Действием β -меркаптоэтанола показано наличие SH-групп, которые поддерживают нативную структуру ингибитора и обеспечивают его значительную термостабильность.

Природные ингибиторы протеолитических и амилолитических ферментов широко распространены в различных органах и тканях животных и растений. Их также продуцируют многие микроорганизмы, но в отличие от первых многие плесневые грибы и бактерии продуцируют ингибиторы небелковой природы – поли-(L)-органические кислоты, циклодекстрины и другие классы соединений [1]. Большинство ингибиторов участвуют в регуляции метаболических процессов, защите от различных патогенов [2]. Среди ингибиторов белковой природы следует отметить класс соединений, несущих на одной полипептидной цепи два активных центра, специфичных к протеиназе и к α -амилазе. Такие ингибиторы называют бифункциональными. Достаточно подробно изучены бифункциональные ингибиторы α -амилаза/субтилизин, α -амилаза/химотрипсин, α -амилаза/протеиназа-K из пшеницы, ячменя, кукурузы и ржи [3,4].

Настоящая работа посвящена выделению, очистке и изучению некоторых свойств бифункционального ингибитора α -амилаза/трипсин (БФИ) из покоящихся семян пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ингибитор выделяли из 200 г муки цельного зерна пшеницы *Triticum aestivum* L., сорт Саратовская 29, урожая 2004 г. путем экстракции 0.1 М ацетатным буфером, pH 5,0, в соотношении 1:3 в течение ночи при температуре 4 °С. Осадок удаляли центрифугированием при 5000 g (20 мин) и из супернатанта осаждали белки 75%-ным насыщением сульфатом аммония. Полученный осадок диализовали против дистиллированной воды

в течение ночи, при температуре 4 °С, затем осадок отбрасывали. Из полученного супернатанта ингибитор выделяли путем биоспецифического связывания с трипсином, иммобилизованным на BrCN-сефарозе, в соотношении экстракт-аффинный сорбент 10:1. Трипсин, иммобилизованный на BrCN-сефарозе, получали по методу [5]. Для полной очистки от балластных белков аффинный сорбент, содержащий связанный ингибитор, тщательно промывали 1 М раствором NaCl, затем дистиллированной водой в соотношении 200 мл на 1 мл сорбента. Ингибитор элюировали 1 М уксусной кислотой, и сразу после элюции элюат нейтрализовали 0,5 М раствором NaOH до pH 5,5. Полученный ингибитор диализовали против воды и концентрировали на ячейке Amicon UM-10.

Активность ингибитора определяли по степени подавления ферментативной активности свиного панкреатического трипсина и слюнной α -амилазы. Ингибитор инкубировали с ферментом в соотношении 1:1 (по массе белка в препарате) в течение 10 мин при температуре 37 °С в том же буфере, в котором был растворен каждый из субстратов.

Удельную активность трипсина определяли по методу [6] при температуре 37 °С, используя в качестве окрашенного субстрата 1%-ный азоказеин в 0,1 М трис-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем 10 mM CaCl₂. Реакцию останавливали 20%-ной ТХУ, центрифугировали 10 мин при 5000 g и измеряли оптическую плотность раствора при 440 нм. Активность α -амилазы определяли при температуре 37 °С йодокрахмальным методом [6]. За 100 % принимали активность фермента без ингибитора в нормальных условиях.

Нативный электрофорез по Дэвису и ДДС-электрофорез по Лэмли, описанные в [6], проводили с использованием 10%-ного и 15%-ного ПААГ соответственно. Белки после электрофоретического разделения окрашивали кумасси G-250. Для определения молекулярной массы белковых препаратов использовали маркеры фирмы «Sigma». Белки-маркеры: 14 кДа – α -лактальбумин; 21 кДа – ингибитор трипсина из сои; 30 кДа – бычья карбоангидраза; 43 кДа – овалбумин.

Температурную обработку ингибитора проводили в течение 10 мин при соответствующей температуре, затем охлаждали и добавляли к ферменту. Обработку ингибитора вели 1 мМ β -меркаптоэтанолом в различных температурных условиях. Изучение устойчивости и действия комплекса ингибитор–фермент проводили при различных значениях pH, предварительно инкубируя ингибитор с ферментом, с последующим определением остаточной активности в тех же pH-условиях.

Данные экспериментов статистически обрабатывали в программе Microsoft Excel с использованием стандартных функций, (отрезок, срзнач., сумм.)

В работе использовали ферменты, реактивы для определения активности и электрофореза фирмы «Sigma» (США); сефарозу, активированную бромцианом фирмы «Pharmacia» (Швеция), а также реактивы «о.с.ч.» и «ч.д.а.» завода «Реактив» (Россия). Спектрофотометр «Arel» 303-UV (Япония), центрифуга КМ-26, (Германия), ультрафильтрационная ячейка «Amicon UM-10», (Голландия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярная масса и чистота выделенного ингибитора определена ДДС-Na-ПААГ-электрофорезом (рис. 1, а), чистота препарата также была оценена электрофорезом в нативных условиях, (рис. 1, б). Результаты электрофоретического разделения указывали на высокую степень очистки белка-ингибитора. Видно наличие одного компонента с молекулярной массой около 14 кДа.

Ранее нами было показано, что ингибитор трипсина и α -амилазы из пшеницы сохраняет антитриптическую активность при действии на него повышенных температур и становится термолабильным в присутствии β -меркаптоэтанола [7].

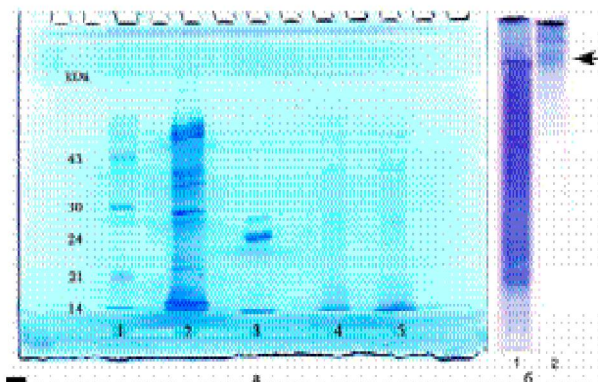


Рис. 1. а – ПААГ-электрофорез в присутствии ДДС-Na, 15% гель 1-белки-маркеры (14 – α -лактальбумин, 21 – ингибитор трипсина из сои, 30 – бычья карбоангидраза, 43 – овалбумин); 2 – грубый экстракт; 3 – трипсин (23,8 кДа); 4 – ингибитор 5,8 мкг, 5 – 14 мкг; 6 – электрофорез в нативных условиях, 10% гель: 1 – суммарный препарат ингибитора; 2 – очищенный препарат ингибитора. Стрелкой указана полоса ингибитора

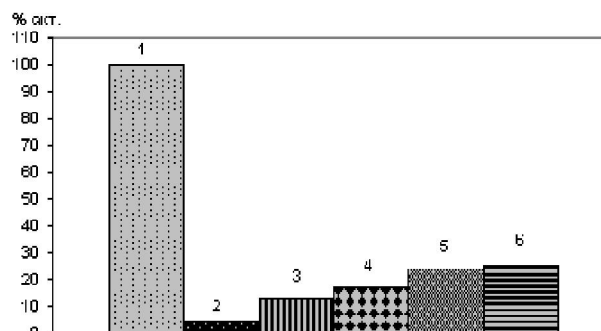


Рис. 2. Влияние температурной обработки ингибитора на его антиамилазную активность. (За 100 % принята удельная активность α -амилазы). 1 – контроль, α -амилаза без ингибитора, 37 °С; 2 – β -амилаза, ингибитор, 30 °С; 3 – то же, 60 °С; 4 – то же, 70 °С; 5 – то же 80 °С; 6 – то же 90 °С

В связи с этим было изучено влияние температуры и агентов, восстанавливающих SH-группы, на антиамилазную активность БФИ. В результате эксперимента было показано, что ингибитор сохранил активность по отношению к амилазе даже при 90 °С, но почти полностью терял активность при 60 °С в присутствии 1 мМ β -меркаптоэтанола (рис. 2, 3). На основании этих данных можно сделать предположение о том, что дисульфидные мостики обеспечивают значительную термостабильность ингибитора, поддерживая нативную конформацию белка.

Одной из важных характеристик взаимодействия и устойчивости комплекса ингибитора с ферментом является pH. Конечно, pH *in vitro* отличается от *in vivo*, но дает дополнительную ин-

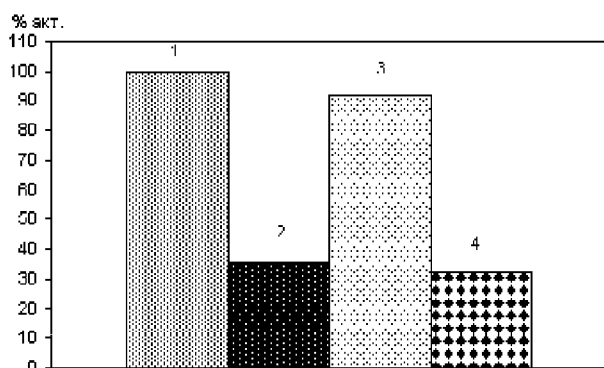


Рис. 3. Влияние β-меркаптоэтанола на активность бифункционального ингибитора α-амилаза/трипсин при температуре 30 °С и 60 °С. (За 100 % принята удельная активность α-амилазы). 1 – α-амилаза с МЭТ, 30 °С; 2 – α-амилаза – ингибитор, 30 °С с МЭТ; 3 – α-амилаза – ингибитор, 60 °С с МЭТ; 4 – α-амилаза – ингибитор, 30 °С

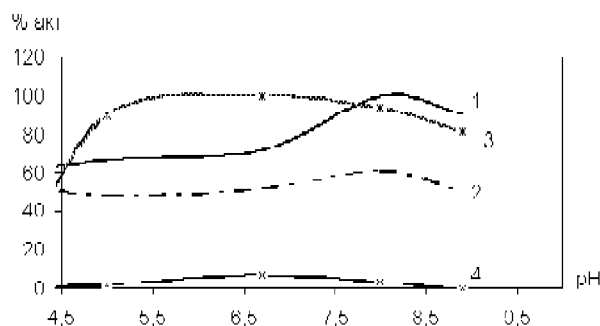


Рис. 4. Устойчивость комплекса ингибитор – фермент при различных рН: 1 – трипсин; 2 – трипсин с ингибитором; 3 – α-амилаза; 4 – α-амилаза с ингибитором

формацию об устойчивости белок-белковых взаимодействий. В работе было изучено действие различных рН на комплекс ингибитора с ферментом, который представлен на рис. 4.

По литературным данным [8] рН-оптимум для трипсина составляет 8,0, для α-амилазы – 6,9. Из графика (рис. 4) видно, что данные эксперимента совпадают с литературными (кривые 1 и 3). В случае инкубации трипсина с (кривая 2) и α-амилазы (кривая 4) с ингибитором комплекс проявил значительную устойчивость и широкий оптимум действия.

Таким образом, очищен бифункциональный ингибитор из зерна пшеницы взаимодействующий как со слюнной α-амилазой, так и с трипсином, и изучены некоторые его свойства. Установлены его молекулярная масса, примерно 14 кДа, и действие различных рН на устойчивость комплекса.

Результаты по выделению, очистке и изучению бифункционального ингибитора α-амилаза/трипсин позволяют заключить, что БФИ α-амилаза/трипсин из зерна пшеницы относится к ранее неизученному классу ингибиторов, активных по отношению сериновым к протеиназам и экзогенным α-амилазам.

В дальнейшем предполагается изучение роли некоторых аминокислотных остатков, участвующих в проявлении активности ингибитора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. М.: Наука, 1971. 404 с.
2. Валуева Т.А., Мосолов В.В. // Успехи биологической химии. 2002. Т.42. С. 193-216.
3. Нестеренко М.В., Мицкевич Л.Г., Мосолов В.В. // Биохимия. 1987. Т. 52, №.10. С. 1665-1669.
4. Zemke J.K., Muller-Fahrnow A., Jany K-D., Pal G.P., Saenger W. // FEBS 1991. V. 279, N2. P. 240-242.
5. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536 с.
6. Гильманов М.К., Фурсов О.В., Францев А.П. Методы очистки и изучения ферментов растений. Алма-Ата: Наука, 1981. 92 с.
7. Исламов Р.А., Хакимжанов А.А., Фурсов О.В. // Биотехнология. Теория и практика. 2005. №2. С. 71-75.
8. Enzymes // Catalogue BDH Chemicals Ltd, 1977. P.100.

Резюме

Бидай дәнінен адам сілекейінің α-амилазасына және шошқа трипсиніне қарсы белсенді бифункционалды ингибитор биоспецификалық хроматография (трипсин-сефароза) әдісі арқылы бөлініп алынды. ДСН-электрофорезі арқылы оның 14кДа шамасында болатын молекулалық салмағы анықталды. Ингибитор 90°С температураға дейін өзінің температураға тұрақтылығын көрсетті. Фермент-ингибитор комплексі рН 5-9 аралығында тұрақты болды. β-меркаптоэтанолдың әсерінен ингибитордың құрылысын ұстап тұратын және оның термотұрақтылығын қамтамасыз ететін SH-тобының бар екендігі анықталды.

Summary

The bifunctional inhibitor fissile against alpha – amylase of the man and pork trypsin is selected from the seeds of the wheat with a method of biospecific chromatography on trypsin – sepharose. The DDS-electrophoresis spots its molecular weight, about 14 kD. The inhibitor has shown considerable at temperature up to 90°C, the complex enzyme – inhibitor was inconvertible in area pH from 5 up to 9. The activity β-mercaptoethanol shows presence of SH-groups, which support native frame of inhibitor and provide its considerable heat stability.