

ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ І ВЛАСТИВОСТЕЙ ВИДІЛЕНОГО З ХРОНУ ПРЕПАРАТУ ПЕРОКСИДАЗИ

З коренів хрону способом осадження білків сульфатами цинку й амонію, шляхом використання полімеру і діалізу виділено препарат пероксидази (RZ 0,70) з виходом білка 1,7 %, питомою окисно-відновною активністю 7,6 Од. Із застосуванням SDS-електрофорезу показано отримання частково очищеного препарату пероксидази з молекулярною масою основної фракції (43±0,5) кДа. Методом нативного електрофорезу встановлено, що 80,8 % загального білка препарату мають виражену пероксидазну активність.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пероксидаза хрону, електрофорез, біохімічні властивості.

ВСТУП. Пероксидаза хрону (ПОХ) – глікопротеїд з молекулярною масою близько 44 кДа, двосубстратно-двопродуктний фермент, який містить протогематин IX, що відіграє роль активного центру, і власне білок та проявляє високу специфічність щодо окиснювача – пероксиду водню. Найбільш типовими субстратами пероксидази є феноли, індоли, ароматичні аміни і сульфонати [1]. Даний ензим – лідер використання в ферментативному каталізі – застосовують як модельний об'єкт, для розробки імунологічних тестів, тест-смужок, створення біосенсорів; елімінування фенольних поллютантів, у генній терапії та органічному синтезі [4].

Сучасні технології отримання пероксидази трудомісткі й пов'язані з використанням сезонної сировини, токсичних органічних розчинників, низької температури, дорогих імпортованих хроматографічних сорбентів, що визначає високу вартість препаратів пероксидази [3]. Тому вдосконалення способу виділення ПОХ і дослідження особливостей складу ензиму є актуальними завданнями.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Частково очищений препарат ПОХ отримували шляхом подрібнення 1 кг коренів хрону, відокремлення соку і жмиху, екстракції жмиху дистильованою водою та 1 М NaCl із центрифугуванням 20 хв при 20 000 г, 4 °С. Далі насичували об'єднані отримані супернатанти сульфатами цинку, по-

© І. І. Романовська, О. В. Севастьянов, В. А. Топтіков, 2015.

тім амонію до 35–100 % насичення при ~0 °С із послідовним центрифугуванням протягом 1 год при 10 000 г. Осад ресуспендували в дистильованій воді, додавали відповідну концентрацію поліетиленгліколю (ПЕГ-1500), центрифугували (0 °С, 30 хв, 2500 г) з наступним діалізом верхньої фази проти дистильованої води. У виділеному препараті ПОХ визначали вміст білка за методом Брадфорда [2], концентрацію пероксидази – за величиною оптичної густини при 403 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання $\epsilon=102\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; окисно-відновну активність – за пірогалолом [6]. За одиницю пероксидазної активності брали кількість ферменту, що каталізує утворення 1 мкмоль пурпурогаліну з пірогалолу за 1 хв при рН 6,0 і 25 °С [4]. В отриманому ферментному препараті визначали спектральний показник чистоти ($RZ=A_{403}/A_{275}$). Білково-фракційний склад препарату досліджували за допомогою SDS-електрофорезу в 10 % ПААГ у системі Леммлі, забарвлення здійснювали з використанням Кумасі R-250. Нативний електрофорез проводили в 10 % ПААГ за Орнстейн і Девіс [5]. Одну частину гелю забарвлювали Кумасі R-250 для прояву білкових фракцій, іншу – обробляли субстратом ПОХ для виявлення ферментативної активності.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Із соку і жмиху коренів хрону шляхом поєданого використання сульфату цинку і міжфазного розподілу пероксидази хрону ПЕГ-1500 виділили частко-

во очищений препарат ензиму. Основні етапи виділення і біохімічні властивості препарату ПОХ із коренів хрону наведено в таблиці 1.

Отримано препарат ПОХ із виходом білка 1,7 %, питомою активністю 7,6 Од. Показано, що додавання $ZnSO_4$ для видалення баластних білків та фенолів з подальшим висолюванням сульфатом амонію сприяло збільшенню RZ в 1,6 і 13,2 раза

відповідно. Встановлено, що додавання полімеру ПЕГ-1500 після $(NH_4)_2SO_4$ для фракціонування ензиму методом розділення фаз [7] призвело до підвищення питомої активності та ступеня чистоти препарату ПОХ, відповідно, в 1,1 і 30 разів, а наступний діаліз дозволив збільшити питому пероксидазну активність ще на 21 %, RZ – на 23 %.

Таблиця 1 – Характеристика етапів виділення пероксидази хрону

Препарат	Вміст білка		Пероксидазна активність		RZ
	всього, мг	вихід білка, %	Од	всього, Од	
Сік хрону	2678±40	100	5,62±0,17	12649±367	0,028
Водний екстракт жмиху	2021±92		5,71±0,0	8613±115	0,028
Сольовий екстракт жмиху	5381±94		2,76±0,03	5942±63	0,013
	2480±43		5,99±0,07		
Об'єднаний екстракт* після додавання $ZnSO_4$	4832±110	66,8	4,12±0,08	20815±323	0,03
Фракція 35–100 % насичення $(NH_4)_2SO_4$	671±28	9,35	5,64±0,02	7162±330	0,25
Фракція після додавання полімеру	177±8	2,48	6,29±0,05	5048±200	0,57
Препарат після діалізу	121±5	1,7	7,6 ±0,05	4010±125	0,70

Примітка. * – значення RZ в об'єднаному екстракті до обробки $ZnSO_4$ становило 0,019.

Електрофоретичні дослідження білково-фракційного складу отриманого препарату (рис. 1, а) показали наявність трьох білкових фракцій з М.м. основної фракції (43±0,5) кДа, що відповідає такій пероксидази. З використанням нативного електрофорезу в препараті ПОХ виявлено три білкові фракції (рис. 1, б). Дані таблиці 2

свідчать про те, що чистота отриманого препарату становить 80,8 % (сума фракцій № 1–3; фракція № 4 представлена неактивним білком). Представлені білкові фракції є ізоформами пероксидази, що узгоджується з даними літератури [6, 7]. Встановлено, що найбільшу пероксидазну активність мають фракції № 2, 3.

Таблиця 2 – Розподіл білка і пероксидазної активності в препараті пероксидази хрону

Фракція (Rf)	№ 3 (0,004) Практично на старті	№ 2 (0,015)	№ 1 (0,172)	Неактивна зона білка (0,20–0,26)
Вміст білка, %	37,8±5,29	26,40±4,35	16,60±2,55	19,2±2,85
Пероксидазна активність, %	39,70±2,82	41,90±1,68	18,40±1,19	0,0

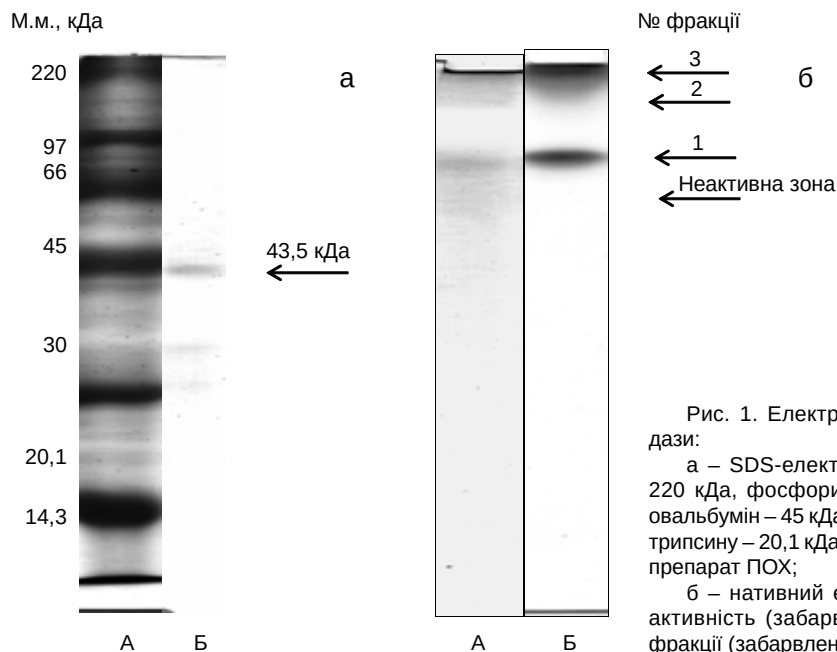


Рис. 1. Електрофореграми препарату пероксидази:

а – SDS-електрофорез, А – маркери: міозин – 220 кДа, фосфорилаза в – 97 кДа, БСА – 66 кДа, овальбумін – 45 кДа, карбоангідраза – 30 кДа, інгібітор трипсину – 20,1 кДа, лізоцим – 14,3 кДа; Б – отриманий препарат ПОХ;

б – нативний електрофорез, А – пероксидазна активність (забарвлення бензидином); Б – білкові фракції (забарвлення Кумасі R-250).

ВИСНОВКИ. Удосконалено спосіб виділення пероксидази з коренів хрону шляхом додавання стадій висолювання білків за допомогою сульфату цинку і міжфазного розділення за допомогою ПЕГ-1500, що сприяли збільшенню

ступеня чистоти ферменту в 37 разів. Методом SDS-електрофорезу підтверджено молекулярну масу ПОХ. З використанням нативного електрофорезу показано, що три білкові фракції (80,8 % загального білка ПОХ) мають пероксидазну активність.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Газарян И. Г. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений / И. Г. Газарян, Д. М. Хушпульян, В. И. Тишков // Успехи биол. химии. – 2006. – **46**, № 2. – С. 303–322.
2. Гаспаров В. С. Определение белка по связыванию с красителем Кумасси бриллиантовым голубым G-250 / В. С. Гаспаров, В. Г. Дегтярев // Биохимия. – 1994. – **59**, № 6. – С. 763–777.
3. Глазова Н. В. Наноструктуры, включающие пероксидазу, антибиотики и циклодекстрины для создания различных фармацевтических композиций / Н. В. Глазова, А. Н. Серкова // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2013. – **13**, № 3. – С. 377–384.
4. Захарова Г. С. Peroxidase из корней хрена: модулирование свойств химической модификацией белковой глобулы и гема / Г. С. Захарова, И. В. Упоров, В. И. Тишков // Успехи биол. химии. – 2011. – **51**, № 2. – С. 37–64.
5. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л. А. Остерман. – М. : Наука, 1981. – 288 с.
6. Shannon L. M. Peroxidase isosymes from horseradish roots / L. M. Shannon, E. Kay, I. J. Lew // J. Biol. Chem. – 1979. – **24**. – P. 2166–2172.
7. Veitch N. C. Horseradish peroxidase: a modern view on a classic enzyme / N. C. Veitch // Phytochemistry. – 2004. – **65**. – P. 249–259.

И. И. Романовская¹, О. В. Севастьянов¹, В. А. Топтиков²
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ А. В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ¹, ОДЕССА
ОДЕССКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. И. МЕЧНИКОВА²

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И СВОЙСТВ ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ХРЕНА ПРЕПАРАТА ПЕРОКСИДАЗЫ

Резюме

Из корней хрена способом осаждения белков сульфатами цинка и аммония, путем использования полимера и диализа выделен препарат пероксидазы (RZ 0,70) с выходом белка 1,7 %, удельной окислительно-восстановительной активностью 7,6 Ед. С применением SDS-электрофореза показано получение частично очищенного препарата пероксидазы с молекулярной массой основной фракции (43±0,5) кДа. Методом нативного электрофореза установлено, что 80,8 % общего белка препарата обладают выраженной пероксидазной активностью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пероксидаза хрена, электрофорез, биохимические свойства.

I. I. Romanovska¹, O. V. Sevastyanov¹, V. A. Toptikov²
A. V. BOHATSKYI PHYSICO-CHEMICAL INSTITUTE OF NAS OF UKRAINE¹, ODESA
I. I. MECHNYKOV ODESA NATIONAL UNIVERSITY²

INVESTIGATION OF PEROXIDASE PREPARATION COMPOSITION AND PROPERTIES ISOLATED FROM HORSERADISH ROOTS

Summary

Using the precipitation of proteins by zinc and ammonium sulfates, then by polymer and subsequent dialysis, the peroxidase preparation from horseradish roots was isolated (RZ=0.7), with yield by protein 1.7 % and specific peroxidative activity 7.6 U. By SDS-electrophoresis method it was verified the obtaining of partially purified peroxidase preparation with molecular mass (43±0.5) kDa. By the native electrophoresis method it was determined, that 80.8 % of the total preparation protein possesses expressed peroxidase activity.

KEY WORDS: horseradish peroxidase, electrophoresis, biochemical properties.

Отримано 12.10.15

Адреса для листування: I. I. Романовська, Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна, e-mail: romarina@gmail.com.