

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

## **Вопросы медицинской химии**

*ISSN 0042-8809*

1989 том 35 выпуск 3

**Внимание!** Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности.

## **Voprosy meditsinskoï khimii**

The journal archive

*ISSN 0042-8809*

1989 volume 35 issue 3

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ 35

ВЫПУСК 3

МАЙ — ИЮНЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. А. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. И. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. А. ТУТЕЛЬЯН

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)

БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)

БЫЧКОВ С. М. (Москва)

КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)

КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)

ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)

ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)

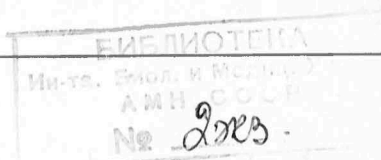
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)

ШАПОВ В. С. (Москва)

ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)

ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



Л. Г. Рашковецкий, В. Н. Прозоровский, Б. Ф. Коровкин

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛДГ-5  
ИЗ МЫШЦ СВИНЬИ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Лактатдегидрогеназа (L-лактат: НАД<sup>+</sup>-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.27) — ЛДГ — повсеместно распространенный фермент гликолиза. Молекула ЛДГ является тетрамером, состоящим из 2 типов субъединиц — Н и М. Известно 5 изоферментов ЛДГ, соответствующих различной комбинации этих субъединиц: ЛДГ-1 (Н<sub>4</sub>), ЛДГ-2 (Н<sub>3</sub>М), ЛДГ-3 (Н<sub>2</sub>М<sub>2</sub>), ЛДГ-4 (НМ<sub>3</sub>) и ЛДГ-5 (М<sub>4</sub>). Было показано, что Н- и М-субъединицы ЛДГ 1 биологического вида иммунологически различны [3]. Антитела к М-субъединицам не взаимодействуют с Н-субъединицами и наоборот. В то же время антитела к М-или Н-субъединицам 1 вида животного реагируют с соответствующими субъединицами ЛДГ других видов [3, 4].

Все 5 изоформ в большем или меньшем количестве присутствуют в сыворотке крови и задачу определения активности изофермента ЛДГ-1, важного в диагностике инфаркта миокарда, можно решить путем удаления из анализируемой сыворотки крови остальных 4 изоферментов и определения остаточной активности ЛДГ, соответствующей активности ЛДГ-1.

Цель настоящей работы — очистка изофермента ЛДГ-5 из скелетных мышц свиньи, содержащего только М-субъединицы, получение антител к этому препарату и изучение возможности их использования для отделения в сыворотке крови человека 4 изоферментов ЛДГ, содержащих в своем составе М-субъединицы, от диагностически значимого изофермента ЛДГ-1, который состоит только из Н-субъединиц.

Разработанные ранее схемы выделения изоферментов ЛДГ из различных источников характеризуются либо низким выходом, либо сложностью, трудоемкостью и большим числом используемых методик [3, 6]. Перед нами стояла задача получения гомогенного препарата ЛДГ-5 с высокой степенью чистоты и большим выходом как непосредственно из скелетных

мышц свиньи, так и из коммерческого препарата ЛДГ («Reanal», ВНР).

## Методика

**Экстракция.** Замороженные скелетные мышцы свиньи (125 г) пропускали через мясорубку, добавляли 300 мл воды и помещали в высокоскоростной гомогенизатор («Virtis», США). Гомогенизировали в течение 1 мин при охлаждении. Гомогенат центрифугировали при 10 000 g 30 мин. Осадок повторно ресуспендировали в 300 мл воды, центрифугировали (10 000 g, 30 мин), надосажок объединяли с первым экстрактом.

**Осаждение сульфатом аммония.** К экстракту медленно при перемешивании добавляли кристаллический сульфат аммония до 40 % насыщения и через 20 мин центрифугировали 5 мин при 40 000 g. К центрифугату добавляли кристаллический сульфат аммония до 70 % насыщения и оставляли на ночь на холоду (4°C). Осадок отделяли центрифугированием (15 мин при 40 000 g).

**Хроматография на гидроксипатите.** Осадок после фракционирования сульфатом аммония растворяли в минимальном объеме дистиллированной воды и диализовали 1 ночь при 4°C против 0,05 М калий-фосфатного буфера pH 7,4. Диализат наносили на колонку (3,6×50 см) с гидроксипатитом («Bio-Rad», Швейцария), уравновешенным 0,05 М калий-фосфатным буфером pH 7,4. Сорбирующийся на носителе белковый материал, содержащий лактатдегидрогеназную активность, после промывки колонки стартовым буфером элюировали в 0,2 М калий-фосфатным буфером pH 7,4 со скоростью 50 мл/ч.

**Хроматография на СМ-сефадексе.** Элюат с гидроксипатита диализовали против 0,02 М калий-фосфатного буфера pH 6,0 (1 ночь при 4°C) и наносили на колонку (3,6×50 см) с СМ-сефадексом С-50 («Pharmacia», Швеция). Элюцию проводили вначале стартовым буфером без соли, затем этим же буфером с повышенной молярностью хлорида натрия (до 0,5 М) со скоростью 45 мл/ч.

**Хроматография на DEAE-сефадексе.** Собранную после разделения на СМ-сефадексе фракцию, содержащую изофермент ЛДГ-5, диализовали в течение ночи против 0,02 М трис-НСI pH 7,5 (при 4°C) и наносили на колонку (2,6×60 см) и DEAE-сефадексом А-50 («Pharmacia», Швеция), уравновешенным этим же буфером. Элюцию проводили пропусканьем исходного буферного раствора со скоростью 45 мл/ч, затем повышали молярность хлористого натрия до 0,5 М.

**Гель-фильтрация на сефадексе G-100.** Фракцию элюата после предыдущей стадии, содержащую ЛДГ-5, концентрировали диализом против насыщенного сульфата аммония и наносили на колонку (2,6×50 см) с сефадексом

Очистка изофермента ЛДГ-5 из 125 г скелетных мышц свиньи

Стадия очистки	Объем раст-вора, мл	Общая активность, Е	Белок, г	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Экстракция	500	171 250	3,56	48,1		100
Осаждение сульфатом аммония (фракция между 40% и 70% насыщением)	103	143 500	1,92	74,7	1,6	83,8
Гидроксиапатит	335	140 700	1,72	81,8	1,7	82,2
СМ-сефадекс С-50	200	46 608	0,129	361,3	7,5	34,0*
DEAE-сефадекс А-50	200	46 472	0,120	387,3	8,1	33,9
Сефадекс G-100	5,4	46 407	0,083	559,1	11,6	33,9
Кристаллизация сульфатом аммония	4,8	44 801	0,037	1210,8	25,2	32,7

Примечание. Звездочка — здесь и далее выход рассчитан исходя из 80% содержания изофермента ЛДГ-5 в суммарном препарате.

G-100 («Pharmacia», Швеция), уравновешенного 0,02 М трис-НСl pH 7,5. Скорость элюции 10 мл/ч.

**Кристаллизация.** К фракции, содержащей ЛДГ-5, медленно при непрерывном перемешивании, добавляли мелкоизмельченный сульфат аммония до помутнения и оставляли на ночь при 4 °С. Суспензию кристаллов центрифугировали 15 мин при 40 000 g. Осадок суспендировали в небольшом объеме сульфата аммония 55 % насыщения.

**Выделение ЛДГ-5 из коммерческого препарата ЛДГ.** Содержимое одного флакона коммерческого препарата ЛДГ из скелетных мышц

свиньи («Reanal», ВНР) 5,8 мл кристаллической суспензии в 2,2 М растворе сульфата аммония, содержащей 0,1 г фермента, — диализовали против 0,02 М трис-НСl pH 7,5. Препарат наносили на колонку (2,6×60 см) с DEAE-сефадексом А-50 («Pharmacia», Швеция), уравновешенную этим же буфером. Элюировали исходным буферным раствором, в котором затем повышали молярность хлористого натрия до 0,5 М. Изофермент ЛДГ-5 получали в кристаллическом виде. Содержание белка в растворах определяли методом Лоури [5].

**Определение активности ЛДГ.** Активность

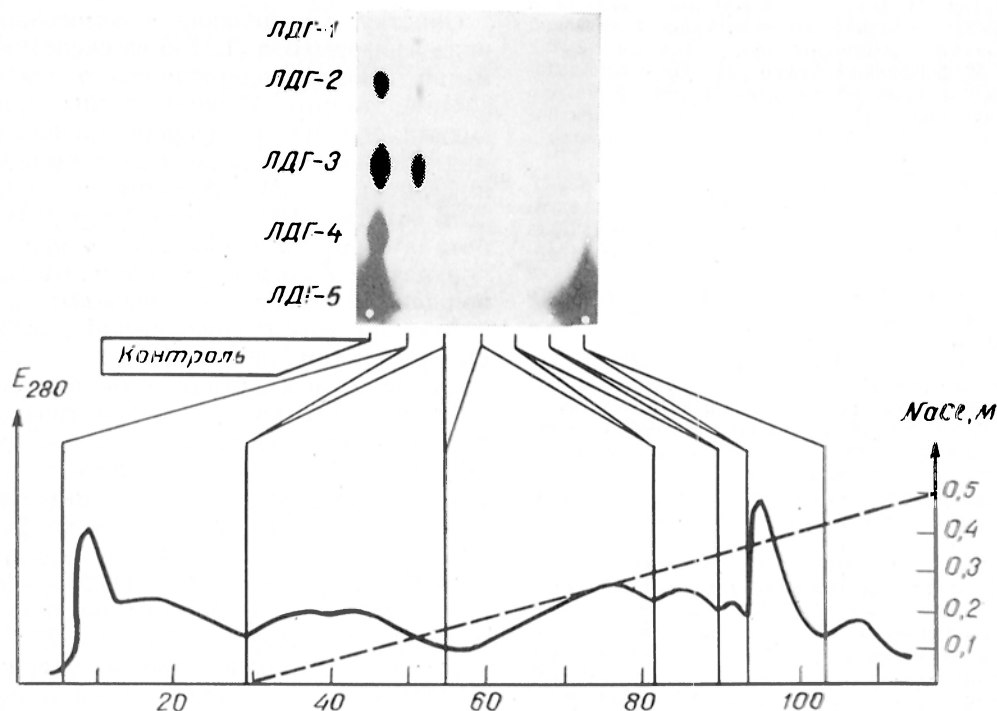


Рис. 1. Фракционирование изоферментов ЛДГ скелетной мышцы свиньи на СМ-сефадексе С-50.

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — порядок фракций.

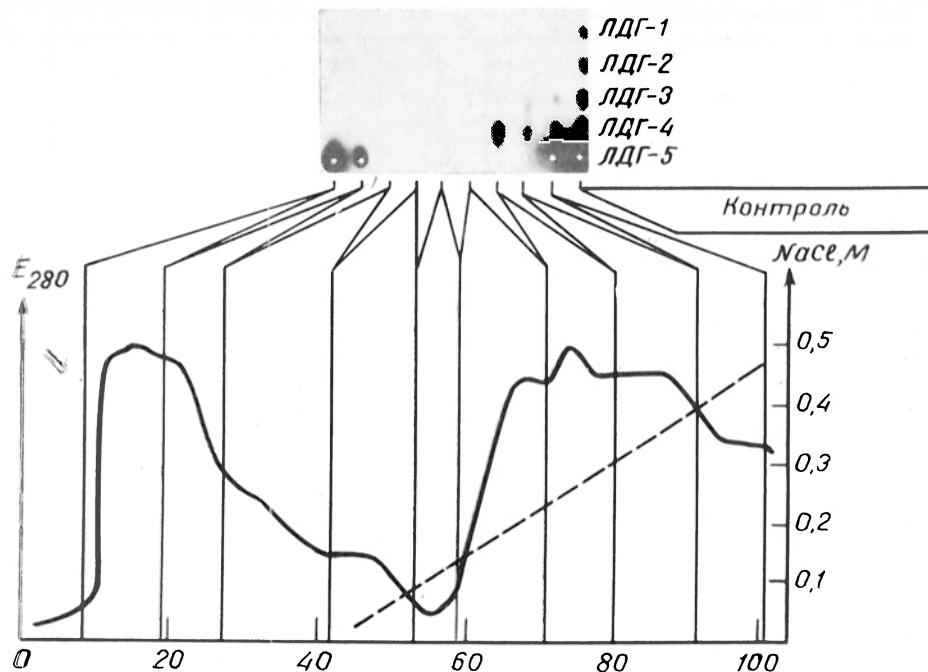


Рис. 2. Фракционирование изоферментов ЛДГ скелетной мышцы свиньи на DEAE-сефадексе А-50.

ЛДГ измеряли на анализаторе скоростей ферментативных реакций «Enzymat» («Advanced products», Италия) по изменению оптической плотности растворов при 340 нм (30 °C, 0,05 М фосфатный буфер pH 7,5) с использованием в качестве субстрата пирувата натрия и кофермента НАД·Н, начальные концентрации которых составляли 0,6 и 0,18 ммоль/л соответственно.

**Электрофорез изоферментов ЛДГ.** Изоферментные спектры получали с помощью электрофореза на тонких 1 % агарозных (толщина 1,5 мм) или 5,5 % полиакриламидных (толщина 0,7 мм) гелевых пластинках с последующим выявлением ферментативной активности ЛДГ известным гистохимическим методом [1] и окрашиванием на белок.

**Иммунизация.** Иммунизацию кроликов, выделенным гомогенным препаратом ЛДГ-5 свиньи, проводили по следующей схеме: эмульсию, полученную в результате гомогенизации 1 мл изотонического раствора солянокислого натрия, содержащего 1 мг белка, и равного объема полного адьюванта Фрейнда, вводили внутримышечно; инъекции повторяли 3 раза через 7 дней. Для повторных инъекций использовали неполный адьювант Фрейнда.

**Двойная радиальная иммунодиффузия и иммуноэлектрофорез.** Двойную радиальную иммунодиффузию по методу Оухтерлопи и иммуноэлектрофорез по Грабар и Уильямс проводили согласно описанным методикам [2]. Электрофоретическое разделение изоферментов ЛДГ проводили в 1 % агарозном геле по методике, приведенной выше. Преципитационные дуги после отмывки геля окрашивали на белок (СВВР-250) и гистохимически выявляли ферментативную активность ЛДГ.

## Результаты и обсуждение

Очистку и выделение в гомогенном виде изофермента ЛДГ-5 из скелетных мышц свиньи, содержащего в своем составе только М-субъединицы, проводили с целью получения препарата для иммунизации животных и выделения антител к М-субъединицам ЛДГ. Для очистки ЛДГ-5 нами была разработана схема выделения, позволяющая получать с большим выходом высокоочищенный препарат, пригодный для получения моноспецифической антисыворотки (см. таблицу).

После первых 3 стадий очистки в полученном препарате присутствовали все изоформы ЛДГ, тогда как в результате ионообменной хроматографии на СМ-сефадексе была выделена фракция, содержащая только изофермент ЛДГ-5 (рис. 1). В результате дальнейшей очистки на DEAE-сефадексе исходным буферным раствором элюируется только изоформа ЛДГ-5, тогда как остальные прочно удерживаются на смоле и элюируются только при повышающейся молярности хлористого натрия.

2 дальнейшие стадии очистки — гelfiltrация на сефадексе G-100 и кри-

К ст. Л. Г. Рашковецкого и соавт.

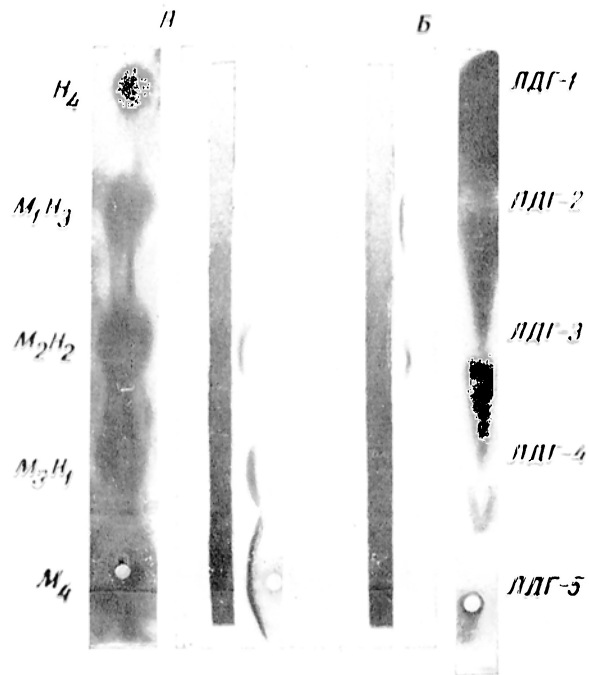


Рис. 3. Электрофорез изоферментов ЛДГ скелетной (А) и сердечной (Б) мышцы свиньи и последующая иммунодиффузия против антисыворотки к ЛДГ-5 свиньи.

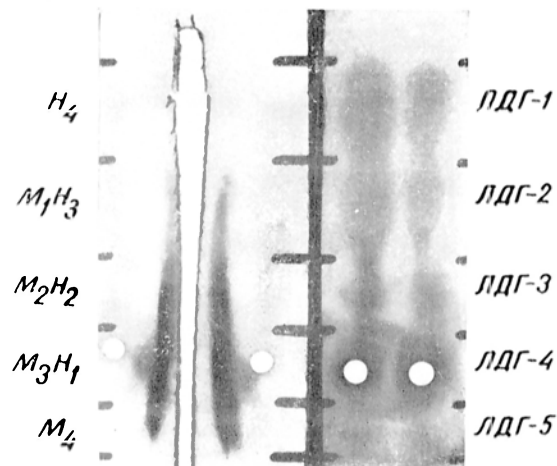


Рис. 4. Электрофорез с последующей иммунодиффузией ЛДГ из сердечной мышцы человека против антисыворотки к ЛДГ-5 свиньи.

сталлизация дают возможность получить в кристаллическом виде с высокой активностью изофермент ЛДГ-5 свиньи, гомогенный по данным электрофореза в ПААГ с окрашиванием на белок и с выходом 33 % ферментной активности из расчета 80 % содержания данной изоформы в суммарном препарате ЛДГ из скелетных мышц свиньи.

В результате двухстадийного выделения ЛДГ-5 из коммерческого препарата ЛДГ из скелетных мышц свиньи с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе (рис. 2) и кристаллизации также был получен кристаллический гомогенный изофермент ЛДГ-5.

Иммунохимическое тестирование полученной антисыворотки к ЛДГ-5 свиньи показано, что она является моноспецифической. При двойной радиальной иммунодиффузии с экстрактами различных органов и тканей свиньи наблюдалась только 1 дуга преципитации, соответствующая ЛДГ (после отмывки геля в изотоническом растворе солянокислого натрия дуга прокрашивалась на ЛДГ-активность). Иммунодиффузией полученной антисыворотки и предварительно разделенных электрофорезом изоферментов ЛДГ свиньи выявлено взаимодействие антител только с изоформами, содержащими М-субъединицы (рис. 3, см. вклейку). Изофермент ЛДГ-1, содержащий в своем составе только Н-субъединицы, преципитата с антисывороткой не образовывал.

Антисыворотка к свиному изоферменту ЛДГ-5 также реагировала с ЛДГ человека, и также со всеми изоферментами, за исключением ЛДГ-1 (рис. 4, см. вклейку). Преципитирующая способность изоферментов уменьшалась в ряду ЛДГ-5 > ЛДГ-4 > ЛДГ-3 > ЛДГ-2, т. е. параллельно уменьшению количества М-субъединиц в молекуле. Эти результаты согласуются с опубликованными ранее данными относительно частичной иммунохимической идентичности М-субъединиц ЛДГ-человека и свиньи при использовании кроличьей антисыворотки к М-субъединицам ЛДГ свиньи [4].

Таким образом, антитела к ЛДГ-5 свиньи образуют преципитирующие иммунные комплексы только с изоферментами, содержащими М-субъединицы как ЛДГ свиньи, так и человека. Полученные результаты указывают на возможность использования гетерологических антител (в данном случае к свиному изоферменту) для отделения диагностики значимого изофермента ЛДГ-1 от других изоформ ЛДГ при исследовании сыворотки крови человека.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов И. И., Коровкин Б. Ф., Маркелов И. М. Введение в клиническую энзимологию. — М., 1974.
2. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радионуклидными методами. — М., 1983.
3. Райдер К., Тейлор К. Изоферменты: Пер. с англ. — М., 1983.
4. Gruber W., Zapf B., Schrappe K.-H., Linke R. // Z. klin. Chem. klin. Biochem. — 1977. — Bd 15, N 10. — S. 575—577.
5. Gerhard W., Hofvendahl S., Ljungdahl L. et al. // Clin. Chem. — 1983. — Vol. 29, N 6. — P. 1057—1060.
6. Liu F., Belding R., Usategui-Gomez M., Reynoso G. // Amer. J. clin. Path. — 1981. — Vol. 75, N 5. — P. 701—707.
7. McCoy M. T., Aguanio J. J., Ritzmann S. E. // Arch. intern. Med. — 1983. — Vol. 143, N 3. — P. 434—436.
8. Usategui-Gomez M., Wicks R. W. Immunochemical LDH<sub>1</sub> Assay (Hoffmann — La Roche Inc.), Pat. 4224406 USA.
9. Usategui-Gomez M., Wicks R. W., Warshaw M. // Clin. Chem. — 1979. — Vol. 25, N 5. — P. 729—734.

Поступила 12.11.87

## ISOLATION AND IMMUNOCHEMICAL PROPERTIES OF LDH<sub>5</sub> FROM PIG MUSCLES

L. G. Rushkovetsky, V. N. Prozorovsky, B. F. Korovkin

Institute of Medical Enzymology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Homogenous crystalline isoenzyme LDH<sub>5</sub> was isolated from pig muscles with a yield of 33 %. Antiserum, developed to the purified LDH<sub>5</sub> preparation from pig muscles, reacted with human and pig LDH isoenzymes containing M subunits and did not interact with LDH<sub>1</sub> isoenzyme. The heterologous antiserum might be used for estimation of LDH<sub>1</sub> content in human blood serum.