

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

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1989

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

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1989

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

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

ТОМ 35

БЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. 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)
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)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

strains. The following material was used in experiments: 5 strains obtained from human spontaneous abortuses (trisomy 7, trisomy 9, triploidy), 6 diploid embryonic strains, 4 strains from patients with Down syndrome, 3 strains from healthy children, 4 strains from healthy adult donors and 3 strains from very old persons (81-107 years old). Various types of col-

lagen were separated by means of electrophoresis. Distinct ontogenetic alterations were not observed in content of collagen III in diploid and aneuploid human cultivated fibroblasts. However, considerable alterations in the ratio of collagens I/III correlated with genetic pathologies only in the patients examined.

УДК 616.153.1:577.152.344.042.2]-078.333

С.-М. Р. Подярене, М. Н. Лецкене, М. М. Маурицас, Р. Р. Планчюнене

ИММУНОАФФИННАЯ ОЧИСТКА α_1 -ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

ЦНИЛ при Каунасском медицинском институте, НПО «Фермент», Вильнюс

α_1 -Антитрипсин, или α_1 -ингибитор протеаз (ИП), является основным ингибитором сериновых протеаз плазмы крови человека. На его долю в норме приходится около 90 % антитрипсиновой активности плазмы крови человека [15]. Содержание ИП в плазме значительно возрастает при воспалительных процессах и стимуляции эстрогенами [3]. Наследственный дефицит ИП у человека сопровождается эмфиземой легких и болезнями печени [16]. Исследование содержания ИП в плазме крови человека имеет большое значение для профилактики и диагностики многих заболеваний. В основе существующих методов определения ИП в плазме крови лежит применение специфических антител против ИП. Однако для получения таких антител необходим иммунохимически чистый антиген — ИП.

В литературе описаны методы [1, 5, 12, 13] очистки ИП из плазмы крови человека, включающие несколько этапов. В настоящей работе мы предлагаем одноэтапный метод аффинной очистки ИП. В основе метода лежит взаимодействие ИП с моноклональными анти-ИП-антителами, ковалентно присоединенными к сефарозе.

Методика

Получение гибридом, синтезирующих моноклональные антитела против ИП, проводили по методу [10]. Результаты этих исследований описаны ранее [2]. Для дальнейшей работы отобрана гибридома НАТ-11, синтезирующая антитела IgG_{2b} класса с легкой цепью κ -типа. Кажущаяся константа связывания НАТ-11 антител с ИП равна $1,48 \cdot 10^{-9}$ М. Титр антител в культуральной среде составлял 1:5120, в асцитической жидкости — 1:2 000 000. Для получения препаративных количеств антител гибридому НАТ-11 выращивали в организме мышей BALB/c в виде асцит-

ной опухоли. Очистку антител из асцитической жидкости проводили методом аффинной хроматографии на протеин-А-сефарозе [9].

Для получения иммуносорбента очищенные НАТ-11 антитела ковалентно присоединяли к бромциан-сефарозе 4В, которую суспендировали в 15 мл 1 М НСl и промывали в течение 15 мин 200 мл того же раствора на стеклянном фильтре. 2 г порошка бромциан-сефарозы 4В при набухании образуют 7 мл геля. 1 г очищенных НАТ-11 антител в 5 мл буфера связывания — 0,1 М NaHCO₃, 0,5 М NaCl (pH 8,3) — смешивали с осадком отмытой сефарозы и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Сорбент отмывали от несвязавшихся антител 200 мл буфера связывания. Полноту отмывки контролировали спектрофотометрически. Отмывку считали завершенной, если оптическая плотность промывной жидкости при 280 нм была меньше 0,01. Свободные активные группы сорбента блокировали, инкубируя сорбент в течение 1 ч в 0,1 М трис-НСl-буфере (pH 8,0). Блокирование проводили при комнатной температуре. Полученный иммуносорбент обрабатывали 3 сменами буфера 1: 0,5 М NaCl, 0,1 М CH₃COONa (pH 4,0) и буфера 2: 0,5 М NaCl, 0,1 М трис-НСl (pH 8,0). Иммуносорбент хранили при 4°C в виде суспензии в забуференном физиологическом растворе (ЗФР): 0,15 М NaCl, 2 мМ KCl, 8 мМ Na₂HPO₄ и 1,5 мМ KH₂PO₄ (pH 7,4), содержащем 0,05 % NaN₃ в качестве консерванта.

Аффинную очистку ИП из плазмы крови человека на полученном иммуносорбенте проводили следующим образом. Колонку с иммуносорбентом уравнивали при 4°C буфером 3: 1,5 М глицина, 3 М NaCl (pH 8,9). Разбавленную в соотношении 1:1 буфером 3 сыворотку крови здоровых доноров наносили на колонку со скоростью 3 мл/ч. Колонку далее промывали буфером 3 до достижения базовой линии показания УФ-детектора. Затем проводили элюцию связавшегося белка с колонки буфером 4—0,1 М лимонной кислоты (pH 3) со скоростью 15 мл/ч. Полученные пикн анализировали против ЗФР и хранили при 4°C до анализа.

Содержание общего белка в исходной сыворотке и во фракциях определяли по методу [4], используя в качестве стандарта сывороточный альбумин человека.

Концентрацию очищенного ИП определяли по поглощению при 280 нм на спектрофото-

метре. Коэффициент экстинкции 1 % раствора очищенного ИП составляет 5,0 ед. опт. пл. [7].

Гомогенность полученного ИП определяли методом электрофореза в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) [11].

Антитрипсиновую активность фракций определяли по [6] с модификациями, используя в качестве субстрата бензил-D, L-аргинин-4-нитроанилид (БАПНА) фирмы «Serva» (ФРГ). Реакцию проводили в ЗФР. Тестируемые фракции в различных разведениях вносили в лунку 96-луночного полистиролового планшета («Flow», Англия) в объеме 10 мкл. Далее в лунку добавляли по 50 мкл 0,078 % раствора трипсина («Flow») в ЗФР. В контрольные лунки первого ряда добавляли только ЗФР, а в контрольные лунки второго ряда — трипсин и ЗФР до конечного объема 60 мкл. Планшеты инкубировали 10 мин при 37 °С. Концентрат БАПНА готовили, растворяя 100 мг субстрата в 2,3 мл диметилсульфоксида. Концентрат хранили при 4 °С в течение 6 мес, перед употреблением его разводили в соотношении 1:100 в теплом (37 °С) ЗФР. Рабочий раствор субстрата вносили по 150 мкл в лунки и инкубировали при 37 °С в течение 10 мин. Реакцию останавливали, добавляя по 50 мкл 30 % раствора уксусной кислоты. Оптическую плотность субстрата в лунках измеряли при 405 нм, используя вертикальный спектрофотометр «Titertek Multiskan» («Flow», Англия). Расчет антитрипсиновой активности (E) проводили по формуле:

$$E \text{ (в мкмоль/мин/мл)} = \frac{V}{10,5} \cdot \frac{\Delta A}{x \cdot y},$$

где V — объем реакционной смеси (в мкл); 10,5 — микромолярное поглощение БАПНА (в мкмоль/л); x — объем исследуемой фракции (в мкл); y — время реакции трипсина — антитрипсина; ΔA — разница поглощения в образце, содержащем только трипсин, и в тестируемом образце.

Для использованных условий уравнение упрощается до $E=0,25 \cdot \Delta A$.

Иммунохимическую чистоту препаратов определяли методом иммуноэлектрофореза. Для исследования использовали следующие антисыворотки: кроличью против ИП человека («Dako», Дания), кроличью против альбумина человека («Dako») и овечью против белков сыворотки крови человека (получена в Московском НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского).

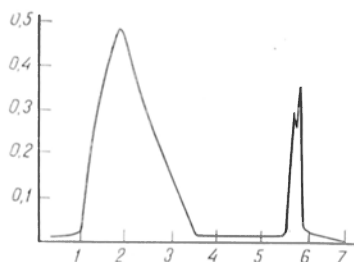


Рис. 1. Хроматография ИП на иммуносорбенте с моноклональными антителами.

По оси абсцисс — номера фракций; по оси ординат — оптическая плотность при 280 нм.

Результаты и обсуждение

Аффинное фракционирование сыворотки крови человека на иммуносорбенте с иммобилизованными ИАТ-11 антителами проводили, как описано в методике. Типичная хроматограмма приведена на рис. 1. В 1-м пике содержатся белки сыворотки, не связавшиеся с адсорбентом, а во 2-м пике присутствуют элюированные белки.

Как видно на электрофореграмме (рис. 2), в пике, элюированном с колонки (пик II), присутствует только 1 белковая фракция с мол. массой 58 кД. В пике I присутствуют практически все фракции, характерные для цельной сыворотки.

Белок, присутствующий в пике II (рис. 3), образует только одну полосу преципитации как с антисывороткой к

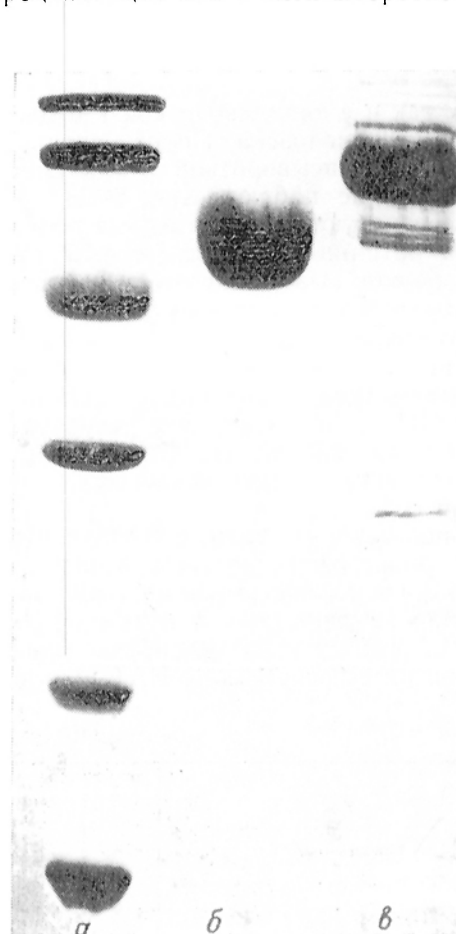


Рис. 2. Электрофорез в 10 % ПААГ в присутствии ДСН.

а — маркеры: фосфоорилаза Б (94 кД), альбумин (67 кД), овальбумин (43 кД), карбоангидраза (30 кД), ингибитор трипсина (20,1 кД), α-лактальбумин (14,4 кД); б — 50 мкг белков пика II (ИП); в — 60 мкг белков пика I.

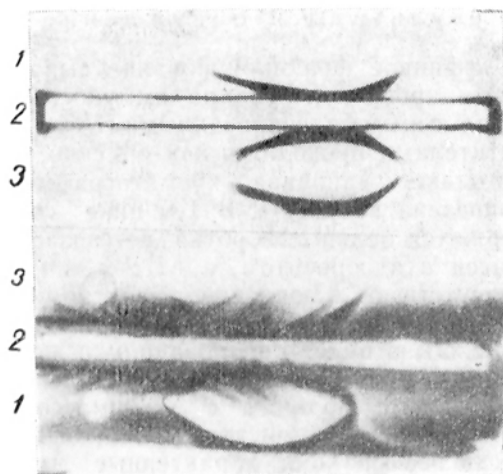


Рис. 3. Иммуноэлектрофоретический анализ пика II (а) и пика I (б). 1 — антисыворотка к человеческому альбумину; 2 — антисыворотка ко всем белкам плазмы крови человека; 3 — антисыворотка к ИП.

ИП, так и с антисывороткой к белкам сыворотки человека. Полоса преципитации с антисывороткой к альбумину человека не наблюдается. Белки пика I образуют множественные полосы преципитации с антисывороткой против белков сыворотки крови человека и одну полосу с антисывороткой к сывороточному альбумину человека. В отличие от пика II белки пика I полосы преципитации с антисывороткой против ИП не образуют. Эти результаты позволяют заключить, что в пике II присутствует иммунохимически чистый ИП.

Сопоставляя данные, полученные при электрофоретическом и при иммуноэлектрофоретическом анализе, можно заключить, что путем аффинной хроматографии сыворотки человека на иммуносорбенте с НАТ-11 моно-

клональными антителами за один этап очистки получен препарат ИП, не содержащий примесей.

Особый интерес представляет вопрос о сохранении антитрипсиновой активности ИП после очистки. Обработка, хоть и кратковременная, при кислом pH может вызвать инактивацию ИП, т. е. полную или частичную потерю ингибирующей активности. Результаты исследования антитрипсиновой активности и содержания белка в исходной сыворотке, в пиках I и II суммированы в таблице, из которой видно, что в конечном препарате содержится 20 % исходной антитрипсиновой активности сыворотки. Потеря 80 % активности, по-видимому, и отражает процесс инактивации ИП в ходе очистки. Следует отметить, что, несмотря на частичную инактивацию ИП при очистке, предложенный метод выделения ингибитора позволяет добиться увеличения удельной антитрипсиновой активности в 61,1 раза.

В схемах очистки, предлагаемых другими авторами, также наблюдается существенная потеря активности — от 77 % [1] до 39 % [14] от исходной. С учетом быстроты и нетрудоемкости процесса очистки, а также электрофоретической и иммунохимической гомогенности конечного продукта очистки разработанный метод выделения ИП может быть рекомендован для получения ингибитора в препаративных масштабах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Басис С. Ю., Бумялис В. А. В., Котова Г. С. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 1. — С. 54—58.
2. Леценко М. П., Подярене С.-М. Р., Маурицас М. М. и др. // Поиск, синтез и исследование биологически активных веществ и лекарственных средств. — Вильнюс, 1988.

Очистка ИП из плазмы крови человека

Стадия очистки	Белок, мг	Активность, мкмоль/мл/мин	Общая активность, мкмоль/мин	Удельная активность, мкмоль/мл/мин	Очистка (кратность)	Выход, %	
						по белку	по активности
Исходная сыворотка	6,05	11	1,1	0,18	1	100	100
Пик I после аффинной хроматографии	5,7	0,00075	0,00375	0,0007	0,004	94,2	3,3
Пик II после аффинной хроматографии	0,02	0,186	0,22	11	61,1	0,3	20

3. Уорд А. М., Уичера Дж. Т. // Иммунохимия в клинической лабораторной практике: Пер. с англ. — М., 1981. — С. 186—195.
4. Bradford M. M. // *Analyt. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248—251.
5. Crawford J. P. // *Arch. Biochem.* — 1973. — Vol. 156. — P. 215—222.
6. Dietz A. A., Rubinstein A. M., Hodges L. // *Clin. Chem.* — 1976. — Vol. 22. — P. 386—399.
7. Feste A., Hoffman W., Gan J. // *J. Chromatogr.* — 1983. — Vol. 275. — P. 283—293.
8. Grabar P., Williams C. A. Jr. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1953. — Vol. 10. — P. 193.
9. Hjelm H., Hjelm K., Sjöquist J. // *FEBS Lett.* — 1972. — Vol. 28. — P. 73—76.
10. Kohler G., Milstein C. // *Nature.* — 1975. — Vol. 256. — P. 495—502.
11. Laemmli O. K. // *Ibid.* — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
12. Murthy R. J., Mercz A. // *FEBS Lett.* — 1973. — Vol. 32. — P. 243—246.
13. Pannell R., Johnson D., Travis J. // *Biochemistry (Wash.)*. — 1974. — Vol. 13. — P. 5439.
14. Travis J., Johnson D. // *Meth. Enzymol.* — 1983. — Vol. 80. — P. 757—763.
15. Vaughan L., Lorier M. A., Carrell R. W. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1982. — Vol. 701. — P. 339—345.
16. Ward A. M., Underwood J. C. E. // *J. clin. Path.* — 1974. — Vol. 27. — P. 467—472.

Поступила 25.05.88

IMMUNOAFFINITY PURIFICATION OF α_1 -INHIBITOR OF PROTEASES FROM BLOOD PLASMA

C. M. P. Podgarene, M. M. Letskene, M. M. Maurilsas, R. R. Planchynene

Central Research Laboratory, Medical School, Kaunas, Scientific-Industrial Association "Enzyme", Vilnius

A single-step procedure is described for isolation of α_1 -inhibitor of proteases (α_1 -IP) from human blood plasma using affinity chromatography on immunosorbent containing monoclonal antibodies against α_1 -IP. Activity of the α_1 -IP preparation, estimated by means of specific trypsin inhibition, was increased 61.1-fold after the chromatography, with a yield of the end product 20 %. The preparation of α_1 -IP obtained exhibited electrophoretic and immunochemical homogeneity.

УДК 616.151.514-07:616.155.25-008.931:577.152.2

Т. Б. Мареева, Я. М. Соковнина, И. И. Вотрин

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГИПОКСАНТИНГУАНИНФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ ТРОМБОЦИТОВ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ А

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (ГГФРТ; КФ 2.4.2.8) является ключевым ферментом обмена пуринов, ответственным за реутилизацию пуриновых оснований (гипоксантина, гуанина) в соответствующие нуклеотиды (ИМФ, ГМФ).

Недостаточность ГГФРТ у человека связана с двумя наследственными заболеваниями. У больных с синдромом Леша — Нихена наблюдается полное отсутствие активности ГГФРТ [12], тогда как частичная недостаточность этого фермента сопровождается гиперурикемией и острой формой подагры [8]. Оба заболевания наследуются по рецессивному, X-сцепленному типу.

Различные исследователи изучали остаточную активность ГГФРТ в эритроцитах, культурах фибробластов и лимфобластов больных подагрой и больных с синдромом Леша — Нихена [16, 17]. Отмечена значительная генетическая гетерогенность заболеваний, связанных с недостаточностью

ГГФРТ, что впоследствии было доказано исследованиями на уровне геномной ДНК [14, 17]. В настоящее время изолированы и охарактеризованы многие структурные варианты гена ГГФРТ [17]. Каждый вариант обусловлен, как правило, уникальной и независимой точковой мутацией в локусе ГГФРТ, вызывающей замену аминокислот в молекуле фермента, и характеризуется измененными каталитическими [5, 7, 11, 17] и некоторыми физико-химическими свойствами, таким, как термолабильность [8, 9, 11], ингибирование метаболитами [6, 7, 9], электрофоретическая подвижность [5—7], изоэлектрический профиль [5] и стабильность *in vivo* [4, 9].

Однако как в отечественной, так и в зарубежной литературе данные о свойствах ГГФРТ тромбоцитов в норме и при патологии отсутствуют. В то же время изучение параметров ГГФРТ имеет общебиологическую ценность, а также практическое значение для медицины.