

ПОДБОР МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИПСИНА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА, И ЕГО КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

О. О. Логинова, М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов, А. С. Беленова

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 08.02.2013 г.

Аннотация. Подобрана методика определения количества иммобилизованного на матрице хитозана трипсина и его каталитической активности. Показано, что для решения поставленной нами задачи наиболее целесообразно использовать модифицированный метод Лоури (без добавления в реакционную среду сульфата меди), так как его применение позволяет минимизировать вклад в ход реакции молекул самого хитозана, а также процессов связывания БСА с матрицей хитозана и реакции автолиза трипсина.

Ключевые слова: трипсин, хитозан, иммобилизация, метод Лоури, метод Бредфорда, нингидриновая реакция

Abstract. The method to determine the immobilized trypsin's amount on the chitosan matrix and its catalytic activity is chosen. It is shown that for the solution of this problem is most advisable to use a modified Lowry method (without adding to the reaction mixture of copper sulfate), because its application allows to minimize the contribution of chitosan's molecule in reaction, as well as the binding process of BSA with chitosan matrix and reaction of trypsin autolysis.

Keywords: trypsin, chitosan, immobilization, Lowry method, Bradford method, ninhydrin reaction

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительное число работ, посвященных получению ферментных препаратов, в клиническую практику из них введены единицы, поэтому разработка новых методов иммобилизации протеаз и методик корректного определения каталитической активности гетерогенных образцов остается актуальной.

Для иммобилизованных ферментов число возможных инактивирующих механизмов существенно меньше, чем в случае растворимых белков. Молекулы фермента могут связываться с матрицей полимерных носителей за счет относительно слабых электростатических и гидрофобных взаимодействий, а также водородных связей.

Накопленный экспериментальный материал свидетельствует о том, что использование одного и того же метода иммобилизации в качестве стандартной процедуры приводит в случае различных белков к резко отличающимся конечным результатам. Характеристики получаемых методами адсорбции ферментных препаратов существенным

образом зависят от исходного образца фермента и природы носителя.

Аминосодержащие полимеры – гомо- и гетерогликоны и их аналоги, успешно используются в фармации и медицине. Хитозан является перспективным сорбентом природного происхождения, обладающим антибактериальными, противогрибковыми и ранозаживляющими свойствами.

Пространственно-структурированные хитозаны пользуются значительным спросом в фармации и медицине. Происходит интенсивное развитие исследований, связанных с применением пространственно-структурированных хитозанов в качестве носителей лекарственных субстанций в виде гелей, гранул, микрочастиц, микросфер [1-5].

Целью работы было подобрать методику количественного определения трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана, и его каталитической активности.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования был выбран бычий трипсин фирмы «MP biomedical»,

субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Sigma-Aldrich», носителем для иммобилизации – хитозан (ХТЗ), синтезированный на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии Воронежского государственного университета.

Иммобилизацию трипсина на матрице хитозана осуществляли методом простой адсорбции белка на носителе. 30 мг носителя предварительно оставляли на 1 час при комнатной температуре в 1 мл фосфатного буфера (рН 7,0), затем 1 мл раствора трипсина ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) добавляли к суспензии носителя и инкубировали в течение 24 часов в пробирке с периодическим перемешиванием. Полученную смесь центрифугировали в течение 5 мин. О степени адсорбции судили по количеству белка в надосадочной жидкости, отобранной после инкубации фермента с носителем и центрифугирования смеси.

Для достижения поставленной цели мы сравнили эффективность и корректность применения для количественного определения трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана, и его каталитической активности следующих методов: метод Лоури [6], метод Лоури с модификацией (без добавления в реакционную среду сульфата меди) [7], метод Бредфорда [8], метод, основанный на реакции белка с нингидрином [9].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одной из проблем при определении активности иммобилизованных протеаз и количества связанного белка в фазе носителя является выбор наиболее корректной и эффективной методики, применение которой позволяет минимизировать вклад в ход реакции молекул носителя, а также процессов связывания белка-субстрата с его матрицей и реакции автолиза исследуемой протеазы. Необходимо также учитывать, что каждый из методов определения концентрации белка и его активности предназначен для работы в строго определенном диапазоне концентраций и определенных условиях проведения эксперимента.

В ходе первых попыток определения количества трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана, и его каталитической активности, выяснилось, что сам хитозан дает синюю окраску в реакции Лоури, поэтому нами был исследован вклад каждого компонента реакционной смеси в процесс окрашивания раствора при использовании тестируемых нами методов определения количества белка.

С помощью четырех указанных в разделе «Методика эксперимента» методов мы исследовали образцы, содержащие хитозан, трипсин, бычий сывороточный альбумин (БСА), хитозан и БСА, трипсин и БСА, смесь трипсина, хитозана и БСА (рис. 1-4, табл. 1-4). Этот подход, на наш взгляд, позволит минимизировать погрешность определения каталитической активности и количества трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана, возникающую вследствие связывания БСА с матрицей хитозана и реакции автолиза трипсина.

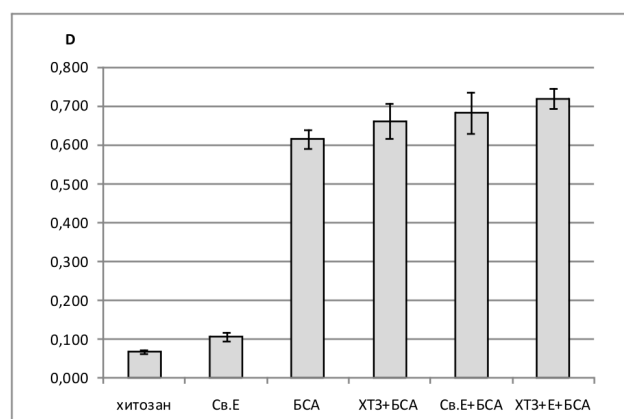


Рис. 1. Определение содержания белка методом Лоури

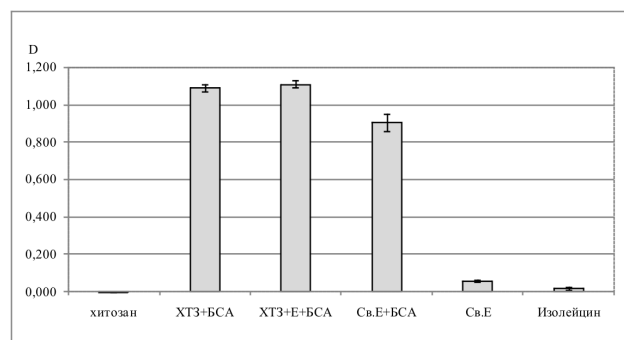


Рис. 2. Определение содержания белка модифицированным методом Лоури (без сульфата меди)

В процессе сравнения ряда методик определения количества белка в растворе мы установили, что наименьший вклад в окрашивание реакционной среды матрица хитозана вносит при использовании модифицированного метода Лоури (без добавления сульфата меди). Кроме того, данный метод незначительно «реагирует» на отдельные аминокислоты, в частности изолейцин. Напротив, метод с использованием нингидриновой реакции существенно образом «реагирует» на присутствие аминокислот в среде, и порог чувствительности данного метода ниже той области концентрации, которая обычно используется при

иммобилизации фермента на матрицу хитозана. Порог чувствительности метода Бредфорда также оказался ниже применяемой нами рабочей концентрации, что требовало многократных разведений образца.

Таким образом, рассмотрев несколько способов определения белка: метод Лоури, метод Лоури с модификацией (без сульфата меди), метод Бредфорда и реакция с нингидрином, мы

пришли к выводу, что наиболее корректным и эффективным для определения каталитической активности и количества иммобилизованного на матрице хитозана трипсина является модифицированный метод Лоури, так как его применение позволяет минимизировать вклад в ход реакции молекул самого хитозана, а также процессов связывания БСА с матрицей хитозана и реакции автолиза трипсина.

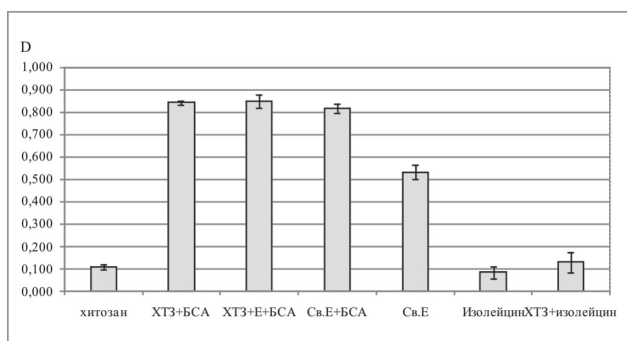


Рис. 3. Определение содержания белка методом Бредфорда

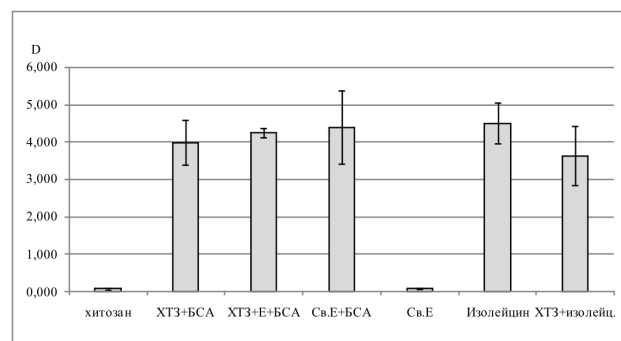


Рис. 4. Определение содержания белка в реакции с нингидрином

Таблица 1.

Определение содержания белка методом Лоури

	хитозан	Св.Е	БСА	ХТЗ+БСА	Св.Е+БСА	ХТЗ+Е+БСА
D (750 нм)	0.073	0.125	0.654	0.586	0.642	0.712
	0.066	0.1	0.606	0.596	0.752	0.78
	0.068	0.118	0.58	0.674	0.772	0.736
	0.077	0.09	0.59	0.74	0.614	0.7
	0.068	0.096	0.606	0.704	0.594	0.682
	0.062	0.117	0.66	0.672	0.68	0.71
среднее	0.069	0.108	0.616	0.662	0.682	0.720

Таблица 2.

Определение содержания белка модифицированным методом Лоури (без сульфата меди)

	Контроль	хитозан	ХТЗ + БСА	ХТЗ+Св.Е +БСА	Св.Е + БСА	Св.Е	Изолейцин
D (750 нм)	0.073	0.081	1.174	1.214	0.996	0.126	0.095
	0.077	0.072	1.152	1.19	1.032	0.137	0.078
	0.072	0.071	1.138	1.162	0.902	0.137	0.095
	0.072	0.078	1.186	1.17	0.982	0.121	0.096
среднее	0.074	0.076	1.163	1.184	0.978	0.132	0.091

Таблица 3.

Определение содержания белка методом Бредфорда

	К	хитозан	ХТЗ+БСА	ХТЗ+Св.Е +БСА	Св.Е+БСА	Св.Е	Изолейцин	ХТЗ+изолейцин
D (595нм)	0.316	0.405	1.16	1.198	1.094	0.912	0.406	0.395
	0.301	0.424	1.142	1.136	1.126	0.836	0.402	0.49
	0.298	0.402	1.134	1.154	1.152	0.832	0.4	0.465
	0.297	0.42	1.15	1.122	1.116	0.838	0.341	0.383
среднее	0.303	0.413	1.147	1.153	1.122	0.835	0.387	0.433

Таблица 4.

Определение содержания белка в реакции с нингидрином

	хитозан	ХТЗ+БСА	ХТЗ+Е+БСА	Св.Е+БСА	Св.Е	Изолейцин	ХТЗ+изолейцин
D (570 нм)	0.101	3.375	4.135	5.388	0.057	3.945	2.82
	0.053	4.59	4.365	3.396	0.093	5.065	4.45
среднее	0.077	3.983	4.250	4.392	0.075	4.505	3.635

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Janvikul Wanida. Новый способ получения гидрогелей из карбоксиметилхитозана / Janvikul Wanida, Thavornuytikarn Boonlom // J. Appl. Polym. Sci. — 2003. — V. 90, № 14. — P. 4016-4020.
2. Гидрогели хитозана: кинетика сшивки и свойства гелей / Lin Gibson Sheng [et al.] // Amer. Chem. Soc. — 2003. — P. 199-200.
3. Oliveira B.F. Хитозановые микросферы, полученные сушкой распылением, поперечно-сшитые D, L-глицеральдегидом, как потенциальные системы доставки лекарственных веществ: получение и свойства / B.F. Oliveira, M.H. Santana, M.I. Ry // J. Chem. Eng. — 2005. — V. 22, № 3. — P. 353-360.
4. Одностадийный способ получения микросфер хитозана / Kuo Shyh Ming [et al.] // J. Appl. Polym. Sci. — 2004. — V. 94, № 5. — P. 2150-2157.
5. Song Peng-fei. Получение и свойства гидрогелей на основе хитозана и поливинилпирролидона, чувствительных к изменению pH / Song Peng-fei, Wang Rong-min, Wang Yun-pu // J. Northw. Norm. Univ. Natur. Sci. — 2004. — V. 40, № LP. — P. 53-55.
6. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents / O.H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.
7. Folin O. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins / O. Folin, V. Ciocalteu // J. Biol. Chem. — 1929. — Vol. 73. — P. 627.
8. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248-254.
9. Hwang M. Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci / M. Hwang, G.M. Ederer // J. Clin. Microbiol. — 1975. — Vol. 1. — P. 114.

Логинава Ольга Олеговна — аспирант, кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет; e-mail: loginova00@gmail.ru

Loginova Olga O. — postgraduate student, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University; e-mail: loginova00@gmail.ru

Холявка Марина Геннадьевна — научный сотрудник, кандидат биологических наук, кафедра биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет; e-mail: holyavka@rambler.ru

Holyavka Marina G. — Ph.D., researcher, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University; e-mail: holyavka@rambler.ru

Артюхов Валерий Григорьевич — профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, e-mail: avg@main.vsu.ru

Artyukhov Valeriy G. — professor, head of biophysics and biotechnology department, Voronezh State University; e-mail: artuykhov@bio.vsu.ru

Беленова Алена Сергеевна — младший научный сотрудник, кафедра фармацевтической химии и фармацевтической технологии ВГУ, кандидат биологических наук

Belenova Alena S. — Ph.D., junior researcher, the pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology department, Voronezh State University, candidate of biology science