



УДК 543.544.5.068.7

Хроматографическое разделение и очистка низкомолекулярных пептидных комплексов из икры морских ежей

Морозова П.Ю., Морозова А.Ю., Колобов А.А

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

СОЛОВЬЁВ А.Ю.

*Учреждение российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН,
Санкт-Петербург*

ЖИЛИНСКИЙ Д.В.

*Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН,
Санкт-Петербург*

Поступила в редакцию 20.05.2011 г.

Аннотация

Проведены выделение и очистка низкомолекулярных пептидов из икры морских ежей *Strongylocentrotus pallidus* и *Strongylocentrotus droebachiensis* с использованием методов стерилизующей микрофилтрации, твердофазной экстракции, обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной и высокоэффективной тонкослойной хроматографии. Показано, что выделенные пептиды обладают выраженной стимулирующей активностью по отношению к тканям мезодермального генеза (селезенка, сердце, печень).

Ключевые слова: низкомолекулярные пептиды, икра морских ежей, ВЭЖХ, ВЭТСХ, органотипическая культура тканей

Cross-flow microfiltration, solid phase extraction, reversed-phase high performance liquid chromatography and high performance were used for separation and purification of low molecular weight peptides from the sea urchin eggs *Strongylocentrotus pallidus* and *Strongylocentrotus droebachiensis*. It was shown that the isolated peptides have pronounced stimulating activity with respect to tissues of mesodermal origin (spleen, heart, liver).

Keywords: low molecular weight peptides, sea urchin eggs, HPLC, HPTLC, organotypic tissue culture

Введение

Последние два десятилетия характеризуются интенсивными исследованиями структур и функций регуляторных пептидов (РП). Большинство практических работ

в этой области посвящено выделению и очистке РП из органов и тканей млекопитающих и использованию полученных препаратов в медицинской практике [1-3]. Ограниченность сырьевых источников этого типа заставляет исследователей искать пути химического или генно-инженерного синтеза РП [4]. Альтернативный путь развития фармакогнозии и медицинской биотехнологии заключается в расширении сырьевых источников за счёт использования органов и тканей беспозвоночных. К настоящему времени известны иммуностимулирующие препараты β -тимозинов из морских звёзд [5] и нуклеопротеиновые комплексы из пекарских дрожжей, активирующие лимфоциты [6].

В работе исследовалась возможность разделения ранее полученных пептидных препаратов с биологической активностью из икры морских ежей, обитающих на шельфе северных морей – от литорали до глубины моря в несколько километров, в частности, в южных и юго-западных частях Баренцева моря. На этой территории наиболее часто встречаются два вида морских ежей: *Strongylocentrotus pallidus* и *Strongylocentrotus droebachiensis*. Наложение карт распространения *S.pallidus* так и *S.droebachiensis* в Баренцевом и Белом морях, а также в Кандалакшском заливе обнаруживает их практически полное совпадение. По-видимому, икра морских ежей, добыча которой осуществляется по запросам пищевой промышленности, может принадлежать как *S.pallidus* так и *S.droebachiensis*. Однако подробных исследований биохимического состава этой икры не проводилось.

Среди низкомолекулярных биогенных регуляторов в икре морских ежей обнаружены эйкозаноиды и их производные, которые, по-видимому, участвуют в метаболизме липидов и синтезе простагландинов. Эйкозаноиды, находящиеся в составе икры, являются кислотами [10].

Из икры морских ежей выделен и исследован белок *биндин* с молекулярной массой 35 кДа, необходимый для адгезии спермы к яйцеклетке и для надёжного оплодотворения [11]. Исследование структуры этого белка обнаружило в его составе низкомолекулярный пептид, обладающий способностью видоспецифически ингибировать присоединение к яйцеклетке чужеродной спермы [12].

Всё вышеуказанное служит основанием для поиска и выделения из икры морских ежей (далее ИМЕ) низкомолекулярных биологически активных пептидов, обладающих геропротекторной активностью. Поэтому экспериментальные образцы замороженной икры морских ежей, полученные по ТУ 9264-010-45248252- 05, были использованы нами в настоящей работе для апробации стандартных хроматографических методов выделения и фракционирования низкомолекулярных регуляторных пептидов.

Эксперимент

Микрофильтрация осуществлялась с использованием мембранного фильтра ПМФ-800. ОФ ВЭЖХ выполнялась на хроматографе АКТА Explorer 10 (Amersham, Швеция), колонка Supelco C18, 4.6*250 mm, 5 мкм (Supelco, США), оптическую плотность измеряли при длине волны $\lambda = 260, 280, 225$ нм. Для сбора проб использовали коллектор фракций Frac-950 (Amersham, Швеция) и вакуумную центрифугу CentriVar (Labconco, США). Высокоэффективная хроматография проводилась на пластинках ВЭТСХ «Сорбфил» ПТСХ-П-В (РОССИЯ); 5x10, 10x10 см. Биологическую активность определяли с помощью метода органо-типической культуры тканей на эксплантатах ткани нейроэктодермального и мезодермального генеза крыс линии Вистар в возрасте 3 месяцев [13]. Визуализацию эксплантатов

осуществляли с помощью микротеленасадки для фазово-контрастного микроскопа (серия 10, МТН-13 "Альфа-Телеком", Россия).

Для приготовления подвижной фазы, пробоподготовки и рабочего раствора нингидрина использовались: изопропанол, этилацетат, 25%-ый водный аммиак, ацетон, ледяная уксусная кислота, нингидрин. Все вещества класса (х.ч.), производство (Вектон, РФ); ацетонитрил (Криохром, РФ), трифторуксусная (ТФУ) (Sigma, США), бидистиллированная вода, раствор Хенкса, среда Игла, сыворотка крови плодов коровы, раствор глюкозы, раствор инсулина и гентамицина (Биолот, РФ).

Обсуждение результатов

Схема выделения пептидных препаратов из ИМЕ.

Процесс выделения и очистки пептидов состоял из следующих этапов:

1) Экстракция пептидных компонентов из ИМЕ буферным раствором при pH = 3,8; соотношение объемов икры и экстрагента 1:10.

2) Микрофльтрация экстракта в тангенциальном режиме с использованием мембранного фильтра ПМФ-800 с номинальным размером пор 0,37 мкм при скорости фильтрации 1,8 - 2,5 л · час⁻¹.

3) Твёрдофазная экстракция (сорбция) пептидов из фильтрата на катионите Dowex 50 WX 8 в противоточном режиме в условиях взвешенного слоя твёрдой фазы.

4) После окончания сорбции и отмывки катионита сорбент был использован в качестве стационарной фазы в хроматографической колонке низкого давления. Для десорбции и фракционирования пептидов использовали режим вытеснительной ионообменной хроматографии [14]. Вытеснение осуществлялось в две стадии – нейтральным и щелочным буферными растворами для группового фракционирования пептидов в соответствии с кислотностью их боковых ионогенных групп [15]. В ходе хроматографии были выделены две фракции пептидных препаратов: кислая (А) и щелочная (Б).

Определение биологической активности пептидного экстракта методом органо-типической культуры ткани.

Пептидные препараты, полученные после лиофильного высушивания были использованы для оценки их влияния на развитие эксплантатов в органотипической культуре различных тканей. Эксперименты проведены на 2200 эксплантатах тканей нейроэктодермального генеза (кора головного мозга) и мезодермального генеза (селезенка, сердце, семенники) крыс линии Вистар в возрасте 3 месяцев. Отпрепарированные органы разделяли на фрагменты величиной около 1 мм³, которые помещали в чашки Петри с коллагеновым покрытием дна и заливали 3 мл питательной среды. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 37° С. Пептидные препараты вводили в культуральную среду в концентрациях 0,1 и 0,01 нг/мл. На 3-и сутки эксплантаты просматривали под фазово-контрастным микроскопом, определяли индекс площади (ИП), который рассчитывался в условных единицах как соотношение площади всего эксплантата к площади центральной зоны. Контролем служили эксплантаты без добавления пептидов в культуральную среду. Достоверность различий ИП оценивали с помощью t- критерия Стьюдента. На развитие культивируемых тканей коры головного мозга, тормозящее действие оказывали пептиды, так же и их смесь -зона роста эксплантатов уменьшалась на 10% по сравнению с контролем. Другие явления отмечались в тканях мезодермального

генеза. В них клеточную пролиферацию стимулировали регуляторные пептиды с различной биологической активностью: селезенка +31,6% В(2нг/мл); сердце 31,7% А(0.01нг/мл); семенники +46% смесь(0,1нг/мл).

Хроматографическое разделение пептидного экстракта.

Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

Анализ суммарного пептидного препарата (А+Б) выполнялся с использованием следующей системы растворителей: ацетонитрил – вода с 0,1% ТФУ (линейное градиентное элюирование 0.1% ТФУ - ацетонитрил от 0% до 60% за 60 мин). Объем вводимого образца составил 1 мл.

Пробы по 1 мл собирали на коллекторе фракций Frac-950 (Amersham, Швеция) при скорости элюции 1 мл/мин, затем высушивали с помощью центрифугирования под вакуумом на установке CentriVar (Labconco, США) и перерастворили в 300 мкл Н₂О.

На рисунке 1 представлена хроматограмма препарата из ИМЕ.

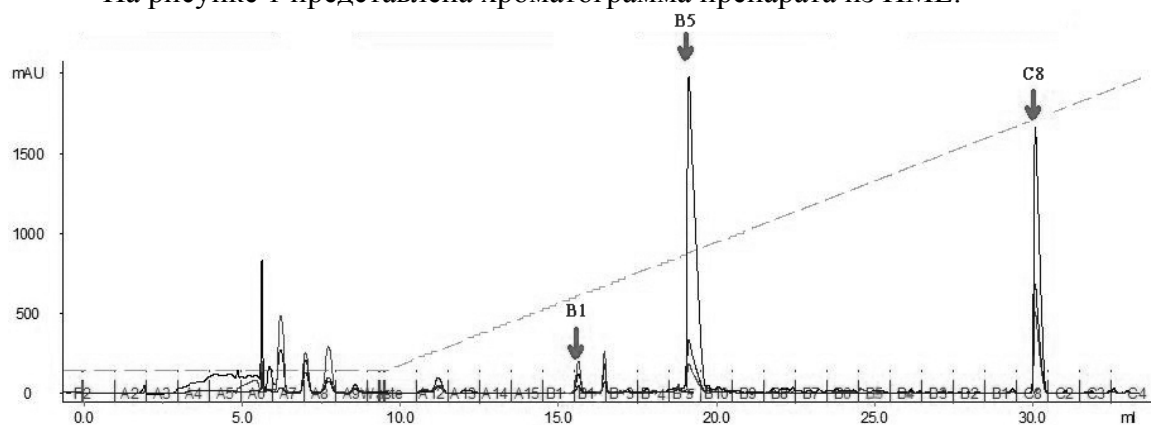


Рис. 1. Профиль элюции при проведении обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии пептидного комплексного препарата из ИМЕ

Высокоэффективная тонкослойная хроматография.

Гомогенность полученных фракций после проведения ОФ ВЭЖХ, в которых поглощение на длинах волн 225, 260, 280 нм было достоверным, была оценена с помощью высокоэффективной тонкослойной хроматографии. Анализ полученных фракций показал что целевой продукт содержится во фракциях В1, В5, С8. Для разделения компонентов использовали восходящее, одномерное элюирование в насыщенной камере; время насыщения 1 час при 20°C. Для анализа пептидных препаратов была использована следующая элюирующая система растворителей: изопропанол-этилацетат-25%-ый водный аммиак-вода (30:10:3,5:10,v/v). Перед хроматографированием ВЭТСХ-пластинки активировали при 100°C в течение 20 мин. Образцы исследуемого материала наносили на пластинку с помощью микрошприца (Hamilton). Помещали пластину в камеру для хроматографии и хроматографировали в течении 60 минут. Далее пластину высушивали в течение 15 мин при 20°C, выдерживали при 100 °C и охлаждали до комнатной температуры и опрыскивали раствором нингидринового реактива (0.3 г нингидрина + 97 мл ацетона + 3 мл ледяной уксусной кислоты) для проявления пептидных компонентов. После этого пластину сушили при комнатной температуре в течение 5 мин и выдерживали 20 мин при 70 °C. Наблюдали появление малиновых пятен пептидов на белом фоне.

На рисунке 2 представлена хроматограмма фракций, включающая фракции где присутствуют пептиды.

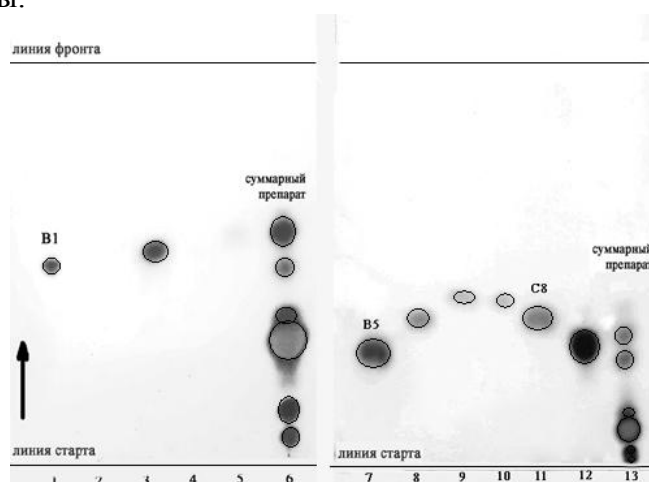


Рис. 2. ВЭТСХ фракций полученных после ВЭЖХ. 1-В1, 2- В3, 3- В5, 4-В10, 5-В15, 6-К, 7-В5, 8-В8, 9-В15, 10-С1, 11-С8, 12-лейцин, 13-К. Подвижная фаза: изопропанол-этилацетат-25%-ый водный аммиак-вода (30:10:3,5:10, v/v); фронт элюента $l = 6$ см, время разделения 60 мин

Определение биологической активности пептидных препаратов, выделенных ОФ ВЭЖХ методом органо-типической культуры ткани.

Пептидные препараты, полученные после ОФ ВЭЖХ были исследованы для определения их биологической активности на развитие эксплантатов в органотипической культуре тканей мезодермального генеза. Эксперименты проведены на 2000 эксплантатах тканей мезодермального генеза (селезенка, сердце, печень) крыс линии Вистар в возрасте 3 месяцев по выше описанной методике. На развитие культивируемых тканей мезодермального генеза пептидные препараты оказывали стимулирующие действие с различной биологической активностью. Результаты представлены на рисунке 3.

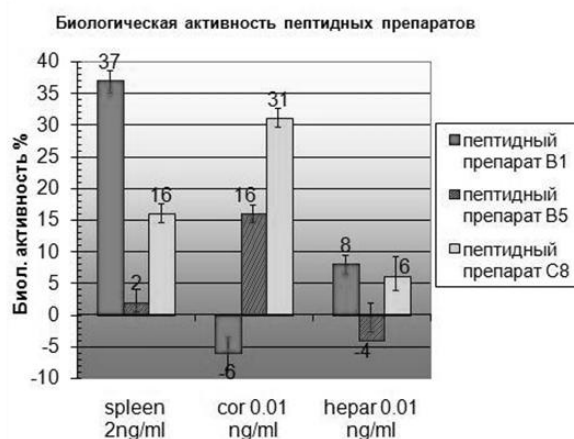


Рис. 3. Диаграмма биологической активности пептидных препаратов, соответствующих фракциям после ВЭЖХ: В1, В5, С8. Регуляторные пептиды проявляли стимулирующую пролиферативную активность в тканях мезодермального генеза в различной степени. Препараты В1 и С8 оказывали стимулирующее действие на эксплантаты селезенки +34.3% и +10.3%, соответственно. Препараты В5 и С8 оказывали стимулирующее действие на эксплантаты сердца +19.2% и +34.7% соответственно. Препарат В1 оказывал стимулирующее действие на эксплантаты печени + 8.4%

При культивировании фрагментов тканей селезенки наблюдалась стимуляция развития эксплантатов: под влиянием препаратов В1 ИП возрастал на 34.3%, а в присутствии С8 – на 10,3% по сравнению с ИП контрольных эксплантатов. Препараты В5 и С8 оказывали стимулирующее действие на эксплантаты сердца +19.2% и +34.7% соответственно. Тогда как на эксплантаты печени стимуляция проявлялась только под воздействием препарата В1 + 8.4%.

Заключение

Таким образом, в составе препарата из икры морских ежей методом ОФ ВЭЖХ выявлены 3 фракции активных низкомолекулярных пептидов. Установлено, что данные пептиды обладают выраженной тканеспецифичностью по отношению к тканям мезодермального генеза.

Эксперименты по разделению и очистке низкомолекулярных пептидов с помощью метода ОФ ВЭЖХ были проведены совместно с сотрудниками и на оборудовании (хроматограф АКТА Explorer 10) Ресурсного центра «Биохимическая диагностика» биолого-почвенного факультета СПбГУ.

Список литературы

1. Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. Пептидные биорегуляторы и старение. Санкт-Петербург. «Наука», 2003. 224 с.
2. Коркушко О.В., Хавинсон В.Х., Бутенко Г.М., Шатило В.Б. Пептидные препараты тимуса и эпифиза в профилактике ускоренного старения. Санкт-Петербург. «Наука» 2002. 202 с.
3. Морозов В.Г., Рыжак Г.А., Малинин В.В. ЦИТАМИНЫ. Биорегуляторы клеточного метаболизма. ИКФ «Фолиант». С-Петербург, 1999. 119 с.
4. Иванов В.Т., Берлин Ю.А. Молекулярная биология в 2000 году: прогнозы, реальность и снова прогнозы // Биоорганич. химия. 2000. Т. 26, № 10. С.752-755.
5. Safer D., Chowrashi P.K. β -thymosins invertebrates: primary structure and interaction with actin. // Cellmotility and Cytoskeleton. 1997. V.38. N 2. P.163-171.
6. Butylina S., Shataeva L.K., Nystrom M. Separation of nucleoprotein complexes with antioxidant activity from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. // Separation and purification technology. 2007, V.53. N 1. P.64-70.
7. Stewart P. L., Makabi M., Lang J., et al., Sea urchin vault structure, composition, and differential localization during development. // BMC Developmental Biology. 2005, V. 5(3).
8. Краткая Химическая Энциклопедия, М.: 1965, Т.4, С. 996.
9. Canellakis Z.N., Bondy P.K., Infante A.A. Spermidine is bound to a unique protein in early sea urchin embryos. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985. V. 82. P.613-615.
10. Hawkins D.J., Brash A.R. Eggs of the Sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, contain a prominent (11R) and (12R) Lipoxigenase activity. // J. Biolog. Chem., 1987. V. 262. N 16, P.7629-7634.
11. Gao B., Klein L.E., Britten R.J., Davidson E.H. Sequence of mRNA coding for bindin, a species-specific sea urchin sperm protein required for fertilization. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986. V.83. P.8634 – 8638.

12. Minor J.E., Britten R.J., Davidson E.H. Species-specific inhibition of fertilization by a peptide derived from the sperm protein bindin. // *Molec. Biol. of the Cell*. 1993. V.4. N 4. P. 375 – 387.
13. Чалисова Н.И., Пенниайнен В.А., Комашня А.В., Ноздрачёв А.Д. Стимуляция клеточной пролиферации и апоптоза при действии аминокислот в органотипической культуре тканей с различной степенью зрелости. // *Докл. АН*, 2006, Т.406. № 1. С.1-4.
14. Самсонов Г. В. Ионный обмен. Сорбция органических веществ. Наука: Ленинград, 1969. 330 С.
15. Melis S., Marcos J., Cao G. et al., *Industr. Engineering Chem. Res.*, 35(6), 1912 – 1920 (1996).

Морозова Полина Юрьевна — студентка каф. биохимии, Санкт-Петербургский государственный университет, С-Петербург.

Жилинский Дмитрий Владимирович — аспирант, Институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, С-Петербург.

Морозова Антонина Юрьевна — студентка каф. биохимии, Санкт-Петербургский государственный университет, С-Петербург.

Колобов Александр Александрович — инженер каф. биохимии, Санкт-Петербургский государственный университет, С-Петербург.

Соловьев Андрей Юрьевич — с.н.с., к.х.н., Учреждение российской академии наук институт высокомолекулярных соединений РАН, С-Петербург.

Morozova P.Yu., student of the chair of biochemistry, St Petersburg State University, St Petersburg., e-mail: aravenko.polina@yahoo.com.

Zhilinski D.V. – graduate student, Institute of bioregulation and gerontology of the North-Western Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St Petersburg, St Petersburg.

Morozova A.Yu. - student of the chair of biochemistry, St Petersburg State University, St Petersburg.

Kolobov A.A. - engineer of the chair of biochemistry, St Petersburg State University, St Petersburg.

Solovyev A.Yu. - senior researcher, Institute of macromolecular compounds of RAS, St Petersburg.