

Кудренко Иван Валерьевич,  
студент,  
Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова,  
г. Москва

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ИНГИБИТОРА  
СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ ИЗ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ  
И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВ  
ISOLATION AND PURIFICATION OF A SERINE PROTEASE  
INHIBITOR FROM POTATO TUBERS  
AND THE STUDY OF SOME OF ITS PROPERTIES**

**Аннотация:** Ингибиторы протеаз – группа разнообразных белков, играющая ключевую роль в защите растения от патогенных организмов. Большое количество данных белков содержится в представителях семейства паслёновых (*Solanaceae*). Например, клубни картофеля накапливают ингибиторы при механических поражениях и заражении.

**Abstract:** Protease inhibitors are a group of diverse proteins that play a key role in protecting plants from pathogens. A large number of these proteins are found in representatives of the Solanaceae family. For example, potato tubers accumulate inhibitors in case of mechanical damage and infection.

**Ключевые слова:** ингибиторы протеаз, фитофтора, трипсин, химотрипсин, хроматография

**Keywords:** protease inhibitors, phytophthora, trypsin, chymotrypsin, chromatography

Белки-ингибиторы протеолитических ферментов обнаружены у растений различных систематических групп. К числу объектов с наибольшим содержанием ингибиторов протеаз принадлежат многие представители семейства пасленовых (*Solanaceae*). Одним из представителей данного семейства является картофель (*Solanum tuberosum*), который содержит в своих клубнях большое количество ингибиторов протеолитических ферментов различных классов [1]. В своей структуре белковые ингибиторы содержат пептидные петли, зачастую стабилизированные дисульфидными мостиками. Такие петли могут встраиваться в активные центры протеаз, образуя прочные комплексы, в составе которых ингибиторы протеаз подвергаются крайне медленному протеолизу. Иногда ингибиторы протеаз приобретают циклическую форму за счет образования пептидной связи между N и C-концевыми участками. Ингибиторы протеаз имеют небольшую молекулярную массу (40, 20, 4 кДа), их структура стабилизирована дисульфидными, водородными связями и солевыми мостиками [3, 4].



Таблица 1

Перечень ингибиторов протеаз, выделенных из картофеля [3].

name	fraction	MW ( $\pm 5$ Da)	pI
PI-1	I	7,683–7,873	5.1–6.3
	IN	7,683–7,873	7.2, 7.8
	IC2, IC3	7,683–7,873	5.1, 6.3
PI-2	IIA2, IIB1	20,279	6.5
	IIB2	20,023	6.0
	IC3, IID3	20,273	6.1
	IC4	20,674	5.8
	IID2	20,676	5.5
	IE2	20,315	5.9
	IINA2, IINA3	20,265	6.9
PIG	IC4	19,987	6.2
NID	IINB2	20,039	8.4
PDI	IIND2, IINE2	22,025	8.6
PI-8	IINC1	19,878	8.7
PI-13	IINC2	20,141	7.5
PAPI-8.15	IINA3	19,883	8.2
PCPI-23 kDa	IIA1	22,755	6.7
PCPI-6.6	IC1	22,769	6.6
PCPI-5.9	IID1	22,674	5.8
PCPI-7.1	IINA1	22,773	7.1
PCPI-8.0	IINB2	20,096	8.0
PCPI-8.6	IIND1, IINE1	20,127	8.6
PCPI-9.4	IINF1, IING1	20,134	>9.0
PCPI-8.3	IINF2, IING2, IIG3	20,433	8.3
PKPI-9.0	IINH1	20,237	>9.0
PKPI-8.0	IINH2, IING2	20,194	8.0
HLE inh.	IINE2	21,025	8.8
22 kDa inh.	IINA2, IINA3	21,804	7.5
PCI	IIB	4,274	nd <sup>c</sup>

Все данные в таблице 1. В клубнях картофеля содержатся представители ингибиторов протеаз из 3 классов: potato inhibitor I (PI-1) – пентамерные белки с молекулярной массой около 40 кДа, состоящие из мономеров с молекулярной массой около 8 кДа, potato inhibitor II (PI-2) – класс димерных ингибиторов, где каждый мономер имеет молекулярную массу около 20 кДа, 3-ий класс состоит из 20-22 кДа белков, которые представлены различными семействами – ингибиторы сериновых протеаз Куница, ингибиторы цистеиновых протеаз, аспартильных протеаз, карбоксипептидаз и металлопротеаз.

Белки-ингибиторы из семейства сериновых протеаз Куница являются димерными, 2 субъединицы связаны между собой дисульфидными мостиками [4].

**Материалы и методы.** Было взято 0,6 кг прошлогоднего картофеля и тщательно отмыто от земли. Схема выделения приведена на рисунке 1. Далее картофель гомогенизировали с помощью соковыжималки Moulinex Juice extractor JU655H30, был получен сок объемом 440 мл. К гомогенату добавляли 300 мл раствора, содержащего 2 % поливинилпирролидона – он играет роль восстановителя. Далее центрифугировали гомогенат 15 минут при 10000 об/мин на роторе JA-14 для удаления твердых остатков картофеля и поливинилпирролидона.

Отбирали супернатант и доводили его до pH 4,2 5M HCl. В этих условиях крахмал выпадал в осадок, который отделяли центрифугированием 15 минут 10000 об/мин на роторе JA-14, супернатант отбирали. Порциями добавляли к супернатанту сульфат аммония до 75% насыщения и оставляли на ночь при 4°C. Потом центрифугировали смесь 15 минут при 10000 об/мин на роторе JA-14, т.к. осадок был рыхлым, после чего растворяли осадок в минимальном объеме 50 mM гидрокарбоната аммония.



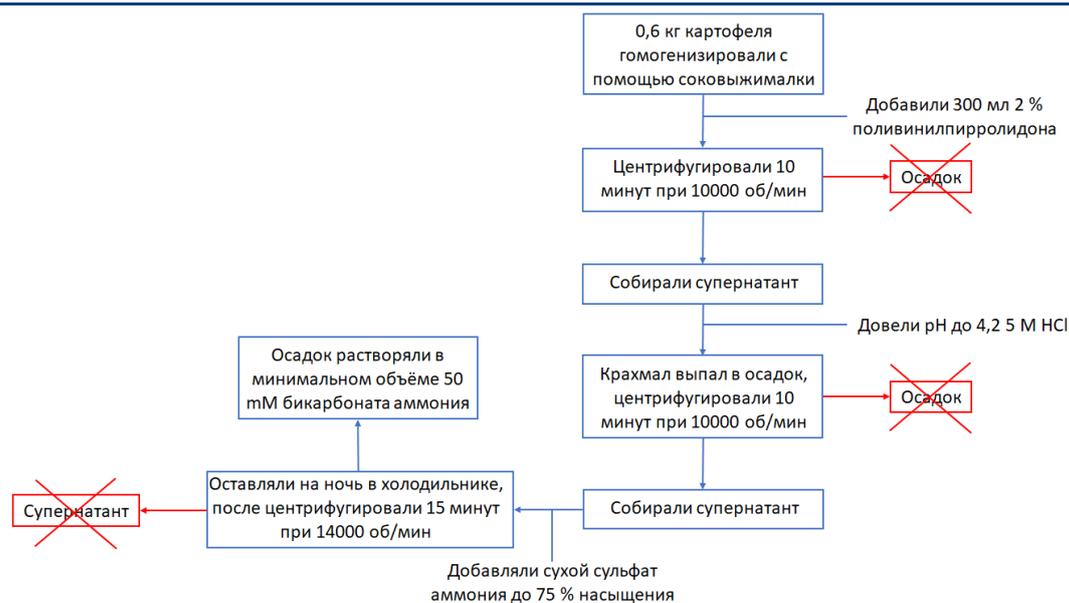


Рис. 1 Схема выделения ингибиторов протеаз из клубней картофеля.

Раствор объемом 10 мл наносили на предварительно уравновешенную 50 мМ  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$  колонку (2,5\*90 см) Sephadex G-75. За элюцией белков следили по поглощению при 280 нм на проточном спектрофотометре Uvicord II (Швеция), собирали фракции по 5 мл, скорость элюции 102 мл/ч. Белок элюировался в виде четырех не полностью разрешенных пиков. Определяли оптическую плотность фракций при 280 нм на спектрофотометре, также была определена ингибиторная активность по отношению к трипсину. Объединяли фракции 2-го пика и проводили диализ против 2 л 20 мМ Tris HCl pH 8,0 два раза подряд по 4 часа. Была измерена электропроводность и pH раствора белка, буфера, наносившийся на колонку, и буфера, выходящий из колонки. Полученные растворы белков наносили на гранулированную DEAE-целлюлозу-52 (размер колонки 1,6\*3,2 см), уравновешенную 20 мМ Tris-HCl pH 8,0, проводили градиентную элюцию 0 – 0,2 М NaCl 100 мл, устанавливали скорость подачи элюента 97 мл/ч, собирали фракции по 2 мл. Объединяли определённые фракции с ионообменной хроматографии, объем составил 20 мл, и проводили диализ против 2 л 10 мМ Tris HCl pH 7,0 два раза подряд по 4 часа. Финальную стадию очистки проводили методом гидрофобной хроматографии на фенил-сефарозе, предварительно уравновешенной 10 мМ Tris-HCl pH 7,0 с 1,5 М сульфата аммония, колонка (1\*1,5 см), элюцию проводили градиентом сульфата аммония от 1,5 – 0 М, устанавливали скорость подачи элюента 60 мл/ч, собирали фракции по 0,5 мл. Все электрофорезы были проведены по методике Лэммли [8], реактивы были приготовлены по описанию в учебно-методическом пособии [7]. Буфер для образцов мог не содержать меркаптоэтанола. Определение концентрации белка проводилось по методу Лоури, приготовление необходимых реактивов и методику измерения проводил по описанию из учебно-методического пособия, но все объемы были уменьшены в 2 раза, чтобы потратить, как можно меньше белка [7]. 1 г казеина по Граммерстеду растворяли в 100 мл 0,1 М фосфатного буфера pH=7,6 и нагревали в течение 10 минут на кипящей водяной бане. Были приготовлены растворы трипсина и химотрипсина в 2,5 мМ HCl, с концентрацией 1,32 и 0,75 мг/мл соответственно. Для определения оптимального времени инкубации и концентрации протеаз смешивали 0,4 мл казеина и 0,4 мл трипсина или химотрипсина разной концентрации и варьировали время инкубации при 35°C, схема определения активности на рисунке 2. Останавливали реакцию добавлением 0,5 мл 10% ТХУ, инкубировали 10 минут в



холодильнике и центрифугировали на настольной центрифуге при 13400 об/мин 3 минуты, после чего отбирали супернатант, разбавляли его в 2 раза дистиллятом и определяли оптическую плотность при длине волны 280 нм.

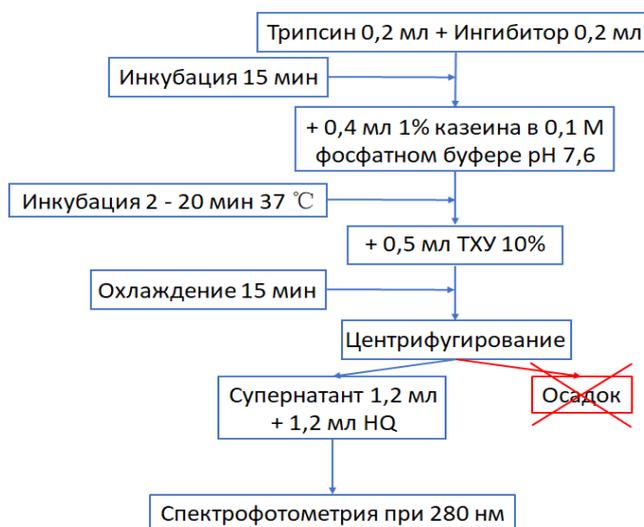
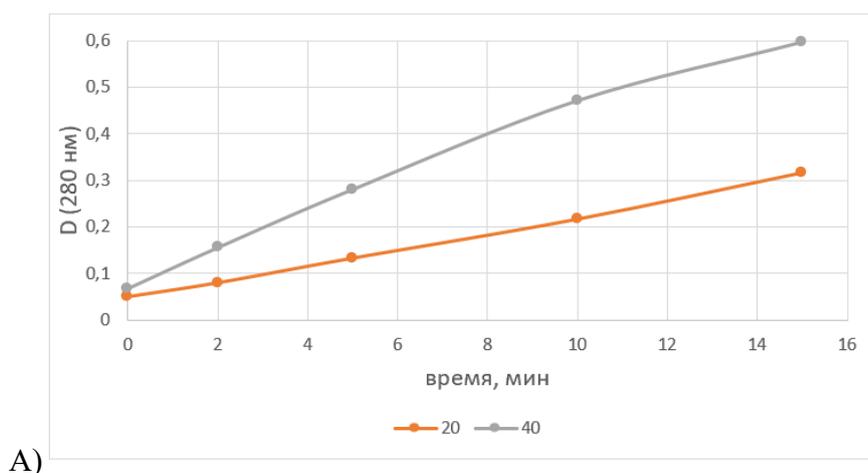
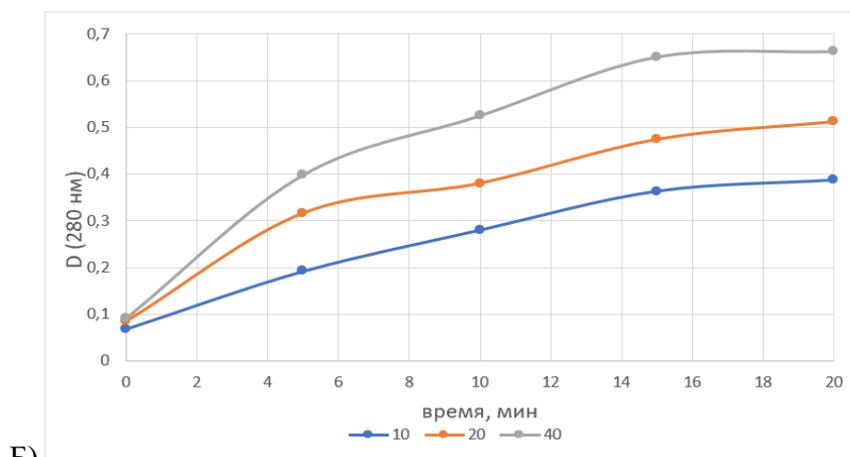


Рис. 2 Схема определения активности трипсина и химотрипсина.

Для определения оптимального количества ингибитора протеазы, смешивали 0,4 мл ингибитора трипсина (разной концентрации) и 0,4 мл трипсина (40 мкг), инкубировали 10 минут, после чего отбирали 0,4 мл смеси и добавляли к 0,4 мл казеина, инкубировали 15 минут при 35°C. Останавливали реакцию добавлением 0,5 мл 10% ТХУ, инкубировали 10 минут при 4°C и центрифугировали на настольной центрифуге при 13400 об/мин 3 минуты, после чего отбирали супернатант, разбавляли его в 2 раза и определяли оптическую плотность при длине волны 280 нм.

**Результаты.** Для определения активности фермента нам необходимо работать на линейном участке изменения активности фермента, а также, в нашем случае, оптическими плотностями, входящими в рабочий диапазон спектрофотометра. Таким образом, мы проводили реакцию с 20, 40 мкг химотрипсина и смотрели кинетику – инкубировали пробы в термостате при 35°C 2, 5, 10, 15 минут. В случае трипсина реакция проводилась с 10, 20, 40 мкг, пробы инкубировали 5, 10, 15, 20 минут при 35°C.





Б) Рис. 3 Кинетика протекания протеолитической реакции с химотрипсином (А) и трипсином (Б) при разных массах (мкг) фермента.

Если рассматривать кинетику реакции с трипсином, продемонстрирована на рисунке 3Б, то в нашем случае оказалось удобным использовать 20 мкг фермента и время инкубации 10 минут. Для химотрипсина оптимальными условиями оказались – 20 мкг фермента, время инкубации 10 минут, показано на рисунке 3А. Из 0,6 кг клубней картофеля было получено 20 мл раствора, содержащего белки. На электрофореграмме, изображённой на рисунке 5А, видно, что в результате грубой очистки мы получали препарат, где в основном содержатся белки с молекулярной массой  $\approx 40, 20, 15$  кДа. С помощью метода Лоури определил концентрацию белка (калибровка по БСА) 3,38 мг/мл, график изображён на рисунке 4. Общее масса белка после грубой очистки равнялась 67,6 мг.

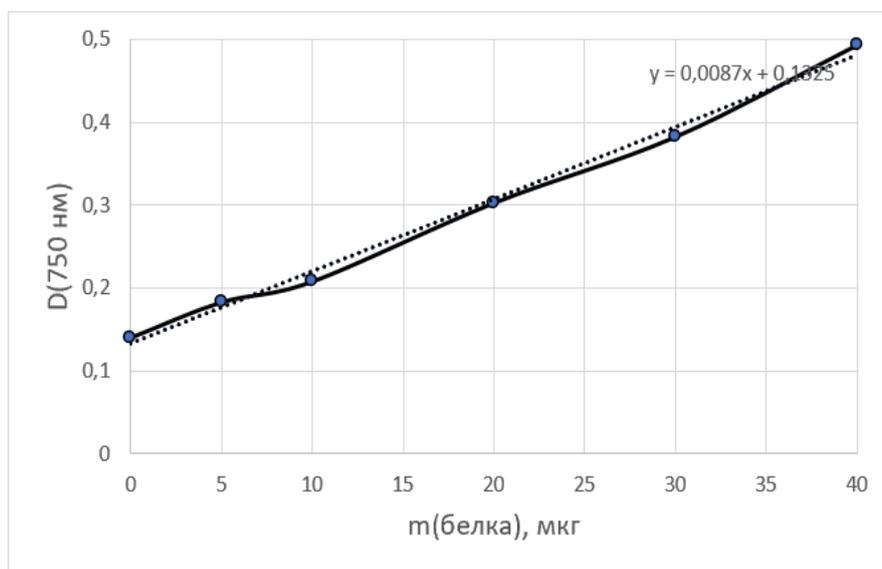


Рис. 4 Калибровочная кривая по Лоури

На колонку наносили 10 мл препарата, полученного после грубой очистки и содержащего 33,8 мг белка. Первые 100 мл сливали в химический стакан, далее собирали фракции по 5 мл.



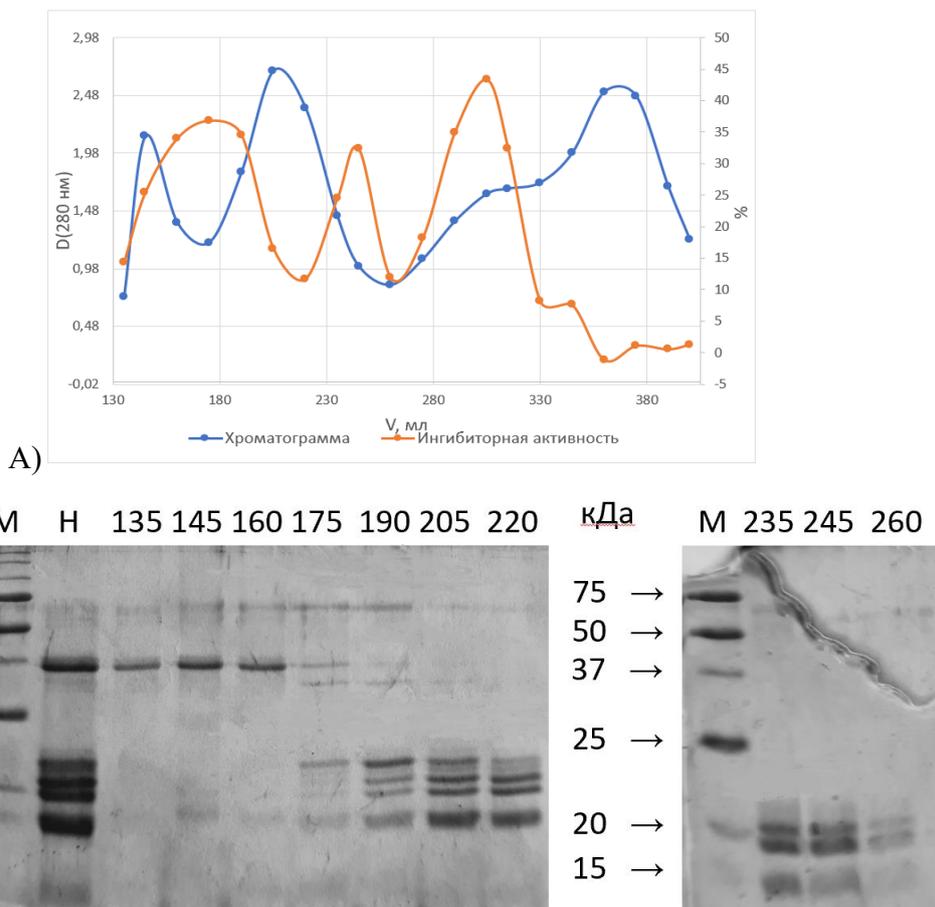
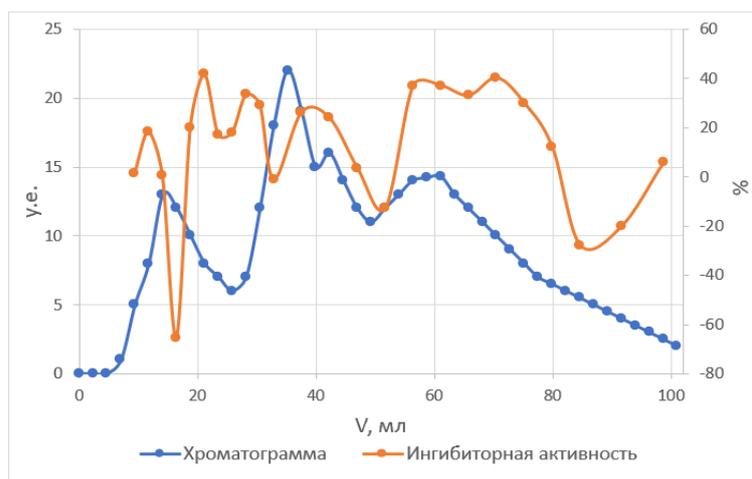


Рис. 5 А) Гель-фильтрация белков из клубней картофеля на колонке Sephadex G-75 (2,5\*90 см). Синий – оптическая плотность при 280 нм, оранжевый – ингибиторная активность трипсина (в % от активности трипсина без ингибитора). Б – SDS-Na-15% ПААГ-электрофорез фракций после гель-хроматографии на Sephadex G-75. Белковые стандарты Bio Rad Precision Plus Protein Unstained Standarts. Номера над дорожками соответствуют миллилитрам на хроматограмме. Н – нанесение. М – маркёры

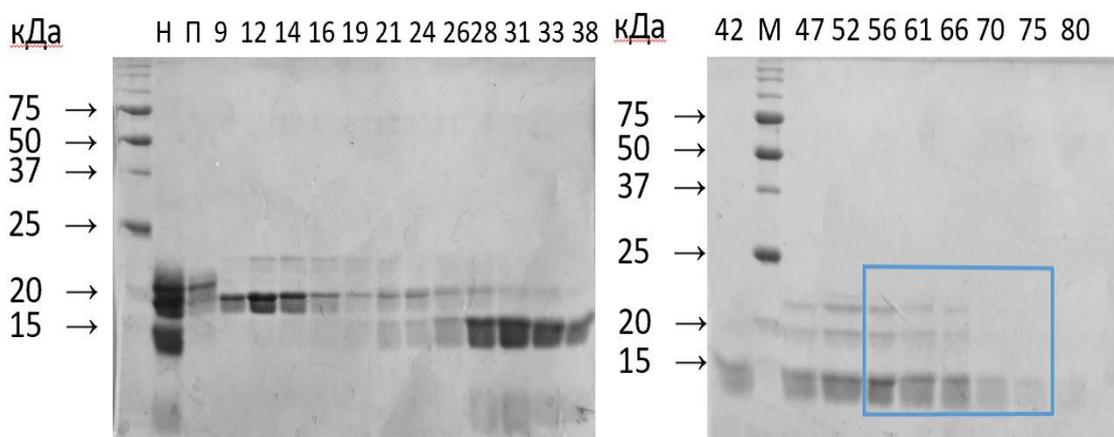
По результатам гель-фильтрации, изображённой на рисунке 5А, наибольшую ингибиторную активность проявляет второй пик с профиля элюции. Как показали результаты электрофореза, нанесенный препарат содержал белки с молекулярной массой  $\approx 40, 23, 21, 15$  кДа. Первый пик содержал в основном белки массой 40 кДа, второй – 25-15 кДа, в третьем пике белка не было видно на электрофорезе, но ингибирующая активность была, скорее всего в данном пике находились ингибиторы с молекулярной массой 4 кДа, они указаны в Таблице 1. В связи с высокой ингибиторной активностью и подходящей молекулярной массой собрали фракции 2 пика для дальнейшей очистки, то есть с 210 до 260 мл.

Наносили 50 мл диализованного раствора белка, концентрация равнялась 0,64 мг/мл, общая масса наносимого белка 32 мг. На рисунке 6А изображена хроматограмма, элюция градиентом 0-0,2 М NaCl, во фракциях с 56 по 75 мл мы наблюдаем высокую ингибирующую активность, а также 2 тонкие и 1 толстую полосу белка. Данные фракции объединяли и подвергали дальнейшей очистке. Во фракциях после 80 мл белков обнаружено не было.





А)



Б)

Рис. 6. А – Ионообменная хроматография на колонке с гранулированной DEAE-целлюлозой, уравновешенной 20 мМ Tris-HCl рН 8,0, с градиентной элюцией 0-0,2 М NaCl. Синий – условные единицы, показывающие оптическую плотность, оранжевый – ингибиторная активность трипсина (в % от активности без ингибитора). Б – SDS-Na-15% ПААГ-электрофорез фракций после ионообменной хроматографии с градиентной элюцией на гранулированной DEAE-целлюлозе. Белковые стандарты Bio Rad Precision Plus Protein Unstained Standarts. Номера над дорожками соответствуют миллилитрам на хроматограмме. Н – нанесение, П – проскок. М – маркёры.

Мы объединили фракции с ИОХ с 55 до 75 мл и провели гидрофобную хроматографию. Фракции с 56 до 67 мл содержали 1 основную белковую полосу и имели высокую ингибирующую активность, что показано на рисунке 7А, поэтому данные фракции были объединены и использовались как финальный препарат ингибитора. В ходе гидрофобной хроматографии удалось избавиться от двух полос других белков, которые мы видели на электрофореграмме белковых фракций после ионообменной хроматографии. Собранные фракция сконцентрировали на центриконе с 10 мл до 1 мл. С помощью метода Лоури была определена концентрация белка, калибровочный график был построен по БСА и изображён на рисунке 8. Концентрация равнялась 1,85 мг/мл, масса белка равняется 1,85 мг. Выход белка после 3 хроматографий составил 5,4 %.



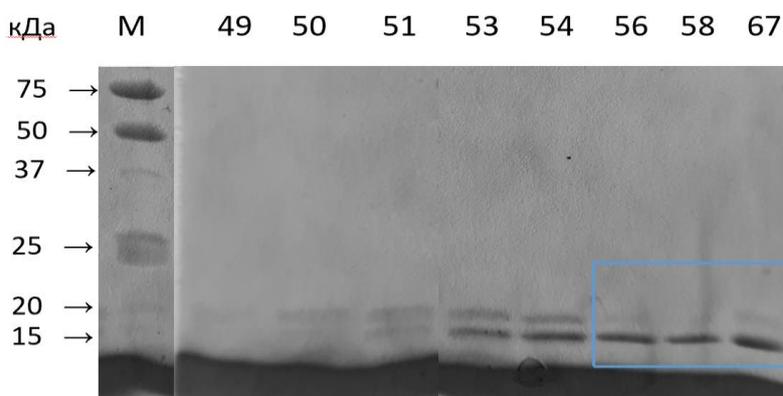
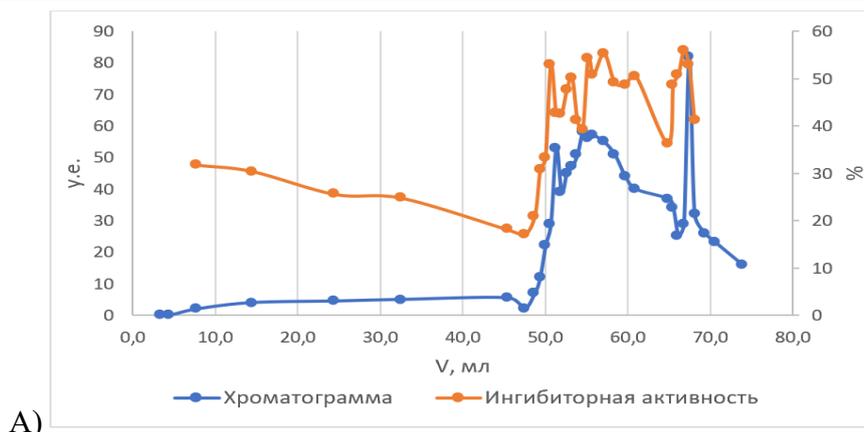


Рис. 7 А) Гидрофобная хроматография на колонке с фенил-сефарозой, уравновешенной 10 мМ Tris-HCl pH 7,0 с 1,5 М сульфата аммония, с градиентной элюцией 1,5-0 М сульфата аммония. Синий – условные единицы, показывающие оптическую плотность, оранжевый – ингибиторная активность трипсина (в % от активности без ингибитора). Б) SDS-Na 10-17 % градиентный ПААГ-электрофорез фракций гидрофобной хроматографии. Белковые стандарты Bio Rad Precision Plus Protein All Blue Standarts. Номера над дорожками соответствуют миллилитрам на хроматограмме. М – маркёры.

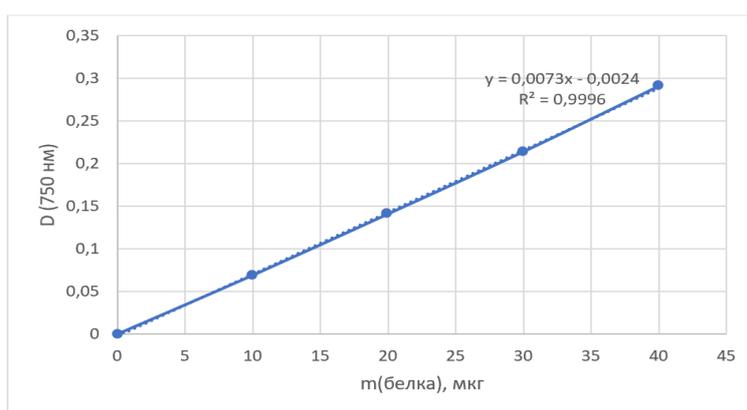


Рис. 8 Калибровочная кривая по Лоури

Полученный препарат имеет одну молекулярную массу, но в присутствии меркаптоэтанола полоса смещалась ниже, то есть кажущаяся молекулярная масса выделенного белка уменьшалась при добавлении меркаптоэтанола.



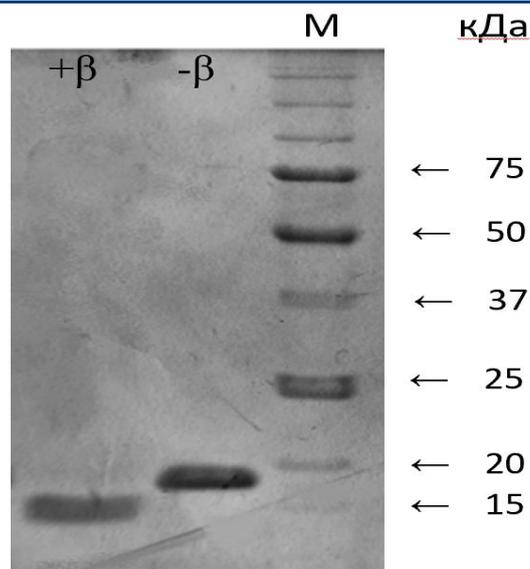


Рис. 9 SDS-На градиентный 12-20 % ПААГ-электрофорез очищенной фракции после гидрофобной хроматографии на фенол-сефарозе.

В действительности, в отсутствие меркаптоэтанола препарат вел себя, как белок массой 16,8 кДа, в присутствии меркаптоэтанола 14,5 кДа, электрофорез изображён на рисунке 9. Молекулярные массы определяли по калибровочному графику, изображённому на рисунке 10. Вероятно, выделенный белок состоит из двух полипептидных цепей, связанных дисульфидной связью, поэтому при добавлении меркаптоэтанола белок разделяется на два полипептида.

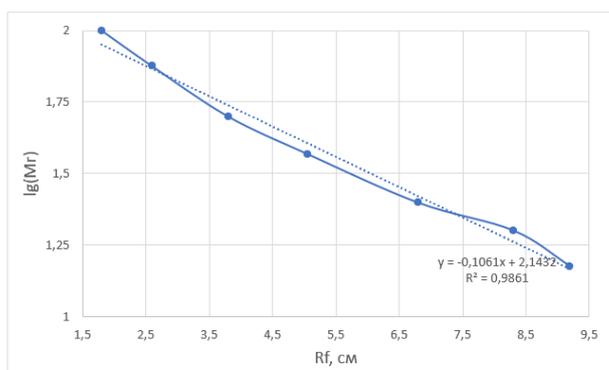
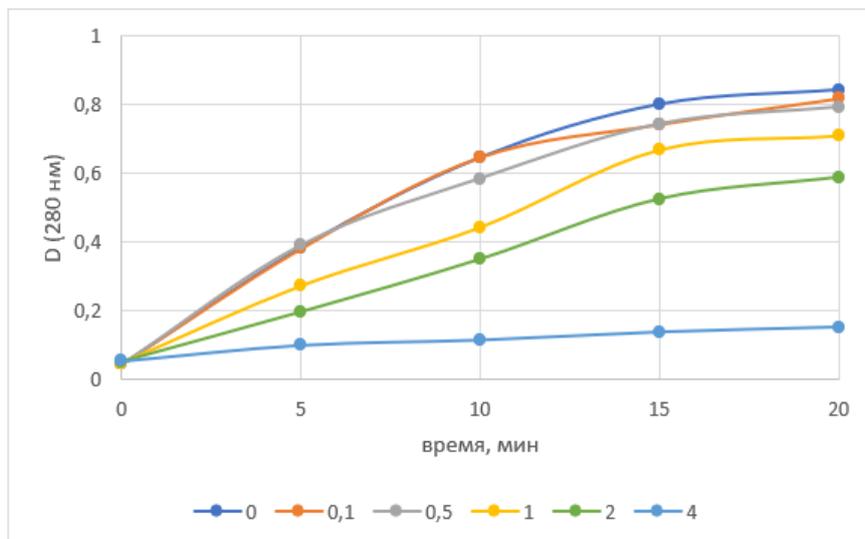


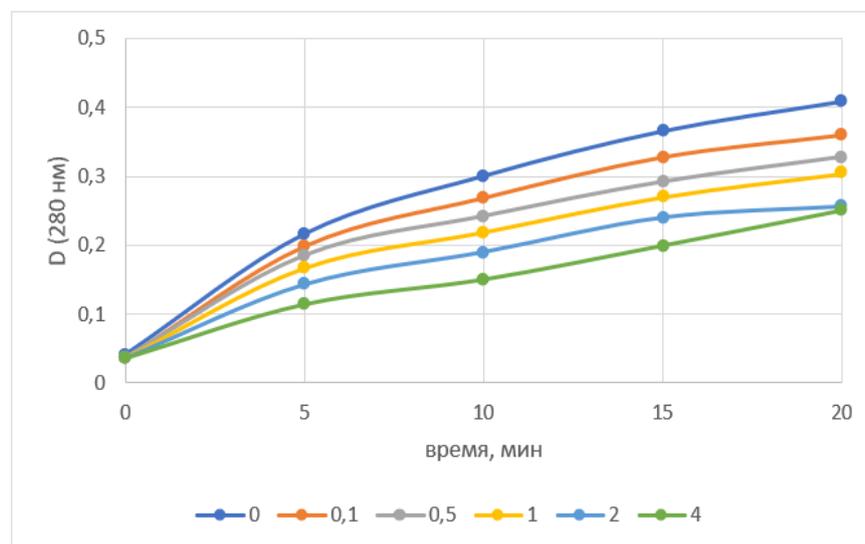
Рис. 10. График зависимости логарифма его молекулярной массы от относительной подвижности белка.

Результаты изучения влияния возрастающих концентраций полученного препарата на активность трипсина и химотрипсина приведены на рис. 13. Масса ферментов в реакционной смеси всегда была равна 20 мкг, так как вносили 0,2 мл с концентрацией 0,1 мг/мл. Как видно из таблицы 2, трипсин ингибируется даже при молярном соотношении 0,1, химотрипсин начинает ингибироваться при молярном соотношении 0,5, при высоком молярном соотношении химотрипсин ингибируется лучше, чем трипсин, 55 % и 89 % для трипсина и химотрипсина при молярное соотношение 4 ингибитор: 1 фермент. Как видно из таблицы 3, значительных отличий между пробами с меркаптоэтанолом и без него нет, значит меркаптоэтанол не повлиял на работу ингибитора.





А)



Б)

Рис. 11. Цифрами указаны молярные соотношения ингибитор: фермент  
 А) Ингибирующая активность полученного препарата по отношению к химотрипсину  
 и Б) по отношению к трипсину

Таблица 2

Процент ингибирования фермента в зависимости от молярного соотношения ингибитор: фермент, при инкубации 7 минут

Молярное соотношение ингибитор: фермент	Процент ингибирования, %	
	Трипсин	Химотрипсин
0,1	7,42	-0,16
0,5	15,42	10,01
1	25,14	34,22
2	38,85	50,41
4	55,42	89,98



Влияние меркаптоэтанола на ингибирование трипсина и химотрипсина.  
Ферменты с казеином инкубировались в течение 7 минут,  
в таблице указаны оптические плотности при 280 нм.

трипсин		химотрипсин	
+ меркаптоэтанол	- меркаптоэтанол	+ меркаптоэтанол	- меркаптоэтанол
0,199	0,232	0,155	0,159
0,211	0,230		

**Выводы.** Выделенный ингибитор протеаз по данным электрофореза по Лэмли в отсутствие меркаптоэтанола имеет кажущуюся молекулярную массу 16,8 кДа, с меркаптоэтанолом кажущаяся молекулярная масса 14,5 кДа, Выделенные белки ингибируют химотрипсин на 90 % в молярном соотношении ингибитор: фермент соотношении 4:1, трипсин на 55 % в массовом соотношении 4:1.  $\beta$ -Меркаптоэтанол не влиял на активность ингибитора. Выход белка составил 5,4 %.

*Список литературы:*

1. Ревина Т.А., Валуева Т.А., Ермолова Н.В., Кладницкая Г.В., Мосолов В.В Выделение и характеристика нового ингибитора трипсина и химотрипсина из клубней картофеля // БИОХИМИЯ. – том 60 вып. 11 с. 1844-1852. – 1995
2. David Turra, Matteo Lorito Potato type I and II proteinase inhibitors: modulating plant physiology and host resistance. Curr Protein Pept Sci., 12, 374-385. – 2011
3. L. Pouvreau, H. Gruppen, S. R. Piersma, L. A. M. van den Broek, G. A. van Koningsveld, A. G. J. Voragen Relative Abundance and Inhibitory Distribution of Protease Inhibitors in Potato Juice from cv. Elkana. J. Agric. Food Chem., 49, 6, 2864–2874. – 2001.
4. S Bateman K, NG James M. Plant protein proteinase inhibitors: structure and mechanism of inhibition. Curr Protein Pept Sci., 12, 341-347. – 2011.
5. Laurice Pouvreau Occurrence and physico-chemical properties of protease inhibitors from potato tuber. – 2004.
6. База данных UniProt [www.uniprot.org/uniprotkb](http://www.uniprot.org/uniprotkb), Q41433 · SPI6\_SOLTU
7. М.И. Сафронова, А.М. Рубцов, А.С. Рыжавская, Н.Б. Гусев Основы практической биохимии белка. МГУ, биологический факультет, Москва. – 2017
8. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4: 5259 // Nature. Nature Publishing Group. – 1970. – Vol. 227. – № 5259. – P. 680–685.
9. Валуева Т.А., Ревина Т.А., Мослов В.В Белки-ингибиторы протеиназ из клубней картофеля, относящиеся к семейству соевого ингибитора Кунитца // БИОХИМИЯ. – том 62 – вып. 12, – С. 1600-1608. – 1997.

