

Коханов Александр Владимирович, доктор медицинских наук, доцент кафедры биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская 121, тел. (8512) 52-51-64, e-mail: kokhanov@mail.ru

Белопасов Владимир Викторович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нервных болезней ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000 г. Астрахань, ул. Бакинская, 121, тел. (8512) 52-51-64.

Метелкина Елена Владимировна, главный специалист отдела организации медицинской помощи «Министерство здравоохранения Астраханской области», Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Татищева, 16-В, тел. (8512) 54-16-03

Кривенцев Юрий Алексеевич, доктор медицинских наук, доцент кафедры биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121, тел. (8512) 52-53-21, e-mail: rabbit1630@mail.ru

УДК 577.112.083

© М.В. Рамазанов, Ю.А. Кривенцев, Е.А. Гребнева, А.И. Носков, 2011

М.В. Рамазанов¹, Ю.А. Кривенцев¹, Е.А. Гребнева², А.И. Носков¹

НОВЫЙ СПОСОБ ОЧИСТКИ ФЕРРИТИНА

¹ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России

²НУЗ «Медико-санитарная часть», г. Астрахань

Разработан простой, эффективный и экономичный способ выделения и очистки тканевого ферритина человека.

Ключевые слова: ферритин, очистка, способ.

M.V. Ramazanov, Yu.A. Kriventsev, E.A. Grebneva, A.I. Noskov

A NEW METHOD OF TREATING FERRITIN

A simple, effective and economical method for isolation and purification of human tissue ferritin was worked out.

Key words: ferritin, cleaning, fashion.

Ферритин (Ф) – высокомолекулярный водорастворимый железосодержащий белок. Наибольшее его количество находится в клетках печени, селезенки, костного мозга, где наиболее интенсивно проходят процессы синтеза, созревания и деградации гемоглобина. Ферритин активно участвует в метаболизме и перераспределении железа в организме. Вследствие различий по составу субъединиц молекулярная масса изоферритинов колеблется от 440000 дальтон у легких фракций изоферритинов селезенки до 500000 дальтон у тяжелых мышечных мультимеров [1, 2, 3, 4, 5]. Ферритин является термостабильным протеином [6]. Это его свойство практически всегда используют при выделении и очистке белка. Одной из важнейших проблем при очистке Ф является очень низкая его концентрация в экстракте после термической обработки, вынуждающая методистов прибегать к трудоемким и неэкономичным процессам концентрирования [7].

Цель исследования: разработка простого и экономичного способа выделения и очистки ферритина.

Материалы и методы. Биоматериалом для выделения и очистки Ф являлись ткани человеческой плаценты, получаемые в отделении патологической анатомии ГБУЗ АО «Александр-Маринская областная клиническая больница» г. Астрахани согласно нотариально заверенному договору, с письменного согласия родильниц. Всего было получено 24,4 кг плацентарной ткани.

В процессе работы использовали методы механически-термической гомогенизации, тепловой обработки, центрифугирования, ионообменной хроматографии на QAE-sephadex A-50, электрофорез в полиакриламидном геле и оптические методы определения концентрации белка в растворе. Контроль концентрации Ф проводили методом ИФА. Для статистического анализа результатов исследования был использован лицензионный пакет прикладных программ статистического анализа Excel-2003 (Microsoft), Statistica 6.0 (StatSoft. Inc.).

Результаты и обсуждение. В ходе работы разработан оригинальный алгоритм выделения и очистки Ф, включающий последовательные этапы:

1. *Гомогенизация биоматериала.* Плацентарная ткань измельчалась и подвергалась механической гомогенизации с использованием в качестве абразива мелкодисперсной стеклянной крошки. Полученную кашицу замораживали при -18°C и оттаивали. Экстрагирование цитозольных белков проводили добавлением 0,85% раствора хлорида натрия в объемном соотношении ткань-раствор: 1 к 2. После центрифугирования при 8000 об/мин в течение 30 мин осадок отбрасывали.

2. *Термическая обработка.* Полученный на предыдущем этапе супернатант подвергали термической обработке при 70°C в течении 120 мин с постоянным контролем температуры. После охлаждения до 22°C раствор подвергали повторному центрифугированию при 8000 об/мин в течении 30 мин, осадок отбрасывали, а супернатант подвергали фильтрации.

3. *Ионообменная хроматография на QAE-sephadex A-50* – ключевой этап, позволяющий не только очищать, но и значительно концентрировать Ф, полученный на предыдущем этапе.

QAE-sephadex был выбран как сорбент в силу его чрезвычайно высокой емкости, что является преимуществом при обработке больших объемов материала. В качестве рабочего буфера был выбран 0,05М трис-HCl буфер, pH 6,5. Гель замачивали, декантировали, вносили в колонку и проводили его «раскачивание» поочередной обработкой 0,5М раствором HCl, дистиллированной водой и 0,5М раствором NaOH (5-кратным объемом колонки в каждом случае). Затем гель промывали рабочим буфером до достижения элюатом кислотности буферного раствора. Материал, предназначенный для хроматографии предварительно доводили до pH 6,5 путем диализа против рабочего буфера в течение 8 часов. Белковый раствор вносили в колонку из расчета: 10 мл раствора на 1 мл геля. Элюцию фиксированного на геле белка проводили резким однократным подъемом ионной силы буфера до 0,5 моль/л (добавлением NaCl). В таких условиях весь фиксированный на геле белок быстро элюируется в малом объеме (эффект концентрирования). Контроль качества очистки проверяли электрофорезом полученных белковых препаратов в полиакриламидном геле.

Эффективность разработанного способа получения Ф оценивали по основным характеристикам очистки: абсолютным количествам искомого белка в препарате, относительной массовой доле искомого белка, степени очистки и выходу продукта (табл.).

Таблица

Анализ качества выделения Ф (М±m)

Основные этапы выделения	Общий белок, мг/л	Кол-во продукта, мг/л	Целевой продукт, %	Степень очистки Ф
Экстракт плаценты	856,00±19,00	39,00±4,20	4,56±0,07	1,00
Термическая обработка	94,00±6,40	35,00±2,80	37,23±1,20	8,16±0,30
Ионообменная хроматография	11150,00±301,90	9950,00±211,40	89,24±4,60	19,57±0,94

Приведенные данные демонстрируют следующие преимущества предлагаемого способа:

1. Простота – для получения очищенного препарата Ф достаточно всего трех доступных этапов;
2. Экономичность:
 - а) финансовых затрат – все необходимые реактивы и оборудование недороги;
 - б) трудозатрат – благодаря простоте, для реализации достаточно одного лаборанта;
3. Скорость – все этапы процесса занимают не более суток;
4. Способность обработки больших объемов материала;
5. Многократность использования ионообменного сорбента;
6. Концентрирование материала – заключительный этап реализует сразу две задачи: тонкая очистка белка и параллельное эффективное его концентрирование в 250-300 раз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бугланов А.А. Метаболизм железа и металлопротеиды (обзор) // Вопросы медицинской химии. – 1988. – № 1. – С. 2-7.
2. Верболович П.А., Утешев А.Б. Железо в животном организме. – Алма-Ата, 1967. – 263 с.
3. Ивашкина С.Г., Деречинская Е.Л., Немов В.В. Оценка уровня ферритина при гастроэнтерологических заболеваниях // Клиническая лабораторная диагностика. – 1995. – № 2. – С. 8-11.
4. Ивашкина С.Г., Немов В.В., Корблев С.Б. [и др.]. Динамика сывороточного ферритина при термической травме // Гематология и трансфузиология. – 1997. – № 6. – С. 42-43.
5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. – Мн., Беларусь, 2002. – Т. 2. – 318 с.
6. Митерев Ю.Г., Назаретян М.К., Андреева А.П. [и др.]. Ферритин: структура, функция и клинические аспекты // Гематология и трансфузиология. – 1983. – № 6. – С. 38-44.
7. Тарасенко В.В., Кривенцев Ю.А. Разработка метода очистки ферритина и создание диагностического набора на его основе // Материалы международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования университетов, интеграция в региональный инновационный комплекс». – г. Астрахань. – 2010. – Т. 5. – С. 138-139.

Рамазанов Магомед Валединович, ассистент кафедры биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121, тел. (8512) 52-41-43, e-mail: agma@astranet.ru