

Очистка и свойства лектинов из надземной части растений трех видов рода ястребинка (*Hieracium*)

В. А. АНТОНЮК

Институт биологии клетки НАН Украины
Ул. Драгоманова, 14/16, Львов, 79005, Украина

E. mail: Antonyuk@meduniv.lviv.ua

Из надземной части растений трех видов рода ястребинка — *Hieracium aurantiacum*, *H. pilosella*, *H. sylvularum*, принадлежащих семейству Asteraceae, очищены лектины с выходом 61, 126 и 92 мг на 1 кг сырой массы сырья соответственно. Молекулярная масса всех трех лектинов, определенная гель-хроматографией на Toyopearl HW-55, составляет 36 кДа. При электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии ДС-Na обнаружена одна зона с молекулярной массой примерно 18 кДа. Очевидно, что лектины ястребинок состоят из двух идентичных субъединиц. При диск-электрофорезе в щелочной (pH 8,9) и кислой (pH 4,3) средах обнаружено по одной зоне. В составе молекул лектинов обнаружено 2,1–2,2 % углеводов. Лектины растений трех видов рода ястребинка лучше всего агглютинируют эритроциты кролика и слабее — эритроциты курицы, барана и человека. Лучшим ингибитором активности всех трех лектинов является *N,N',N'',N'''*-тетраацетилхитотетраоза, которая в 8 раз сильнее, чем *N,N'*-диацетилхитобиоза и в 625 раз — чем *N*-ацетил-*D*-глюкозамин. Для гистохимических целей получены конъюгаты лектинов с пероксидазой хрена и лектины, меченные ФИТЦ.

Введение. Термин лектины используют для обозначения группы белков неиммунного происхождения, обладающих общим свойством избирательно и обратимо связывать углеводы и углеводные детерминанты биополимеров без изменений их ковалентной структуры [1]. Лектины нашли применение в разделении и очистке гликоконъюгатов [2], диагностике ряда заболеваний человека и животных [3, 4], судебно-медицинской экспертизе [5] и в многочисленных гистохимических исследованиях (см. монографию [6]). Для этих целей нужны лектины, обладающие различными свойствами и, прежде всего, разной углеводной специфичностью. В плане получения сырья наибольший интерес представляют лектины растений — фитолектины. Однако на наличие лектина семейства растений исследованы неравномерно: детальнее всего проанализировано семейство *Fabaceae*, а семейство *Asteraceae*, насчитывающее более чем 1000 родов 20000 видов растений [7], изучено слабо. Лектины выделены и охарактеризованы лишь у некоторых представителей этого семейства, например, у *Helianthus tu-*

berosus [8], *Echinacea purpurea* (L.), Moench. и *Rudbeckia laciniata* L. [9], *Artemisia vulgaris* L., *A. absinthium* L., *A. arbotanum* L. [10].

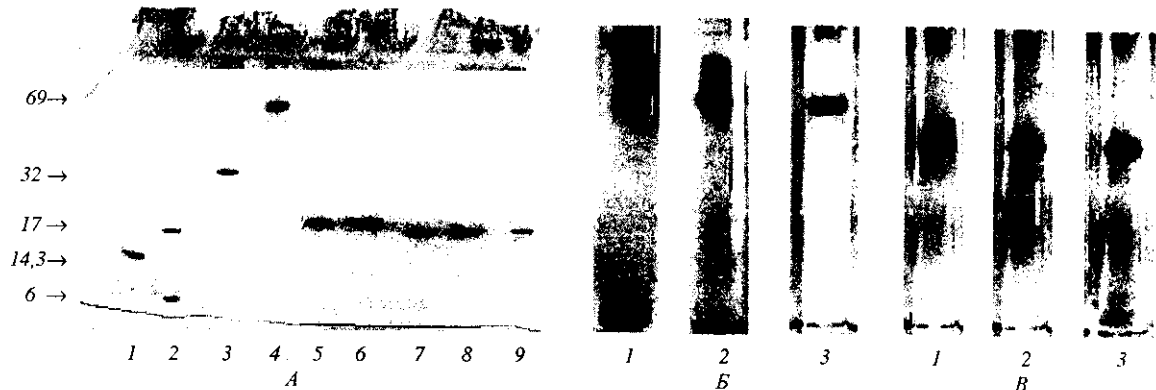
Нами обнаружены новые лектины в трех видах растений *Hieracium* — обширного рода, представители которого встречаются почти во всех Европейских странах].

Цель настоящей работы состояла в очистке этих лектинов, изучении их свойств и в получении производных, меченных пероксидазой и ФИТЦ, для гистохимических исследований.

Материалы и методы Надземную часть ястребинки оранжево-красной (*H. aurantiacum* L.), ястребинки волосистой (*H. pilosella* L.) и ястребинки лесной (*H. sylvularum* Jord ex Boreau) собирали на опушке лесов в Карпатах (Сколековский район Львовской области) в начале цветения растений (июнь).

Аффинный сорбент для очистки лектинов получали по методу, описанному ранее [11].

Концентрацию белка при очистке лектина определяли по методу Бредфорд в модификации Рида и соавт. [12], а также по поглощению при 280 нм.



Электрофореграмма очищенных препаратов лектинов ястребинок и белков-маркеров: А — электрофорез в 10—15 %-м ПААГ, pH 8,9, с 0,1 %-м ДС-Na (1 — яичный лизоцим, $M_r = 14,3$ кДа; 2 — лектин семян чечевицы, $M_r = 5,7 + 17,5$ кДа; 3 — эритроагглютинин семян фасоли обыкновенной, $M_r = 32$ кДа; 4 — бычий сывороточный альбумин, $M_r = 69$ кДа; 5 — лектин зародышей пшеницы, $M_r = 21,6$ кДа; 6 — лектин зародышей пшеницы с 2 % β -меркаптоэтанола; 7 — лектин ястребинки волосистой; 8 — лектин ястребинки оранжево-красной; 9 — лектин ястребинки лесной); Б — диск-электрофорез в 12,5 %-м ПААГ, pH 8,9 (1 — лектин ястребинки волосистой; 2 — лектин ястребинки оранжево-красной; 3 — лектин ястребинки лесной); В — диск-электрофорез в 12,5 %-м ПААГ, pH 4,3 (1 — лектин ястребинки волосистой; 2 — лектин ястребинки оранжево-красной; 3 — лектин ястребинки лесной)

Активность лектина в растворе выявляли с помощью реакции гемагглютинации в микропробирках по методике, описанной ранее [13]. В реакции использовали человеческие и кроличьи эритроциты, а также эритроциты других животных, полученные из вивария Львовского медуниверситета и Львовского мясокомбината.

Для определения углеводной специфичности лектинов использовали реакцию угнетения гемагглютинации углеводами и гликопротеинами. С помощью ступенчатого разведения углевода определяли его минимальную концентрацию, полностью угнетающую активность раствора лектина с титром 1:4. Реакцию проводили по методике [13].

Чистоту полученного препарата лектина оценивали после электрофореза в 12,5 %-м ПААГ в кислой (pH 4,3) и щелочной (pH 8,9) буферных системах [14].

Молекулярную массу (M_r) лектина регистрировали методом гель-хроматографии на калиброванной колонке с Toyopearl HW-55 («Тоуо-Сода», Япония) [15]. В качестве стандартов использовали яичный лизоцим ($M_r = 14,3$ кДа), соевый ингибитор трипсина ($M_r = 21$ кДа), овальбумин ($M_r = 40$ кДа), лектин семян гороха ($M_r = 48$ кДа), альбумин сыворотки крови ($M_r = 69$ кДа), лектин семян сои ($M_r = 120$ кДа) (рисунок).

Минимальную молекулярную массу полипептидных цепей лектина находили с помощью электрофореза в градиенте концентрации 10—15 % ПААГ с 0,1 % ДС-Na [14].

Содержание углеводов в препарате лектина определяли по методу [16].

Очистка лектинов. Свежесобранную траву перемалывали на мясорубке и затем экстрагировали 0,1 %-м раствором HCl в соотношении сырье:экстрагент 1:3 при комнатной температуре на протяжении 1 ч при непрерывном перемешивании смеси. После этого полученный экстракт отжимали через плотную ткань, жмых отбрасывали, а жидкость центрифугировали (10 мин, 6000 g). Величину pH надосадочной жидкости доводили до 7,5 и образовавшийся осадок удаляли центрифугированием (10 мин, 6000 g).

Супернатант наносили на колонку, заполненную аффинным сорбентом, который предварительно уравнивали 0,1 М фосфатным буферным раствором с 0,3 М NaCl, pH 6,5. Для очистки лектина из 1 кг свежесобранной травы достаточно 200 см³ аффинного сорбента. После прохождения экстракта через колонку с аффинным гелем ее промывали тем же буферным раствором до снижения поглощения при 280 нм в вытекающей жидкости ниже 0,1. Затем лектин снимали с колонки с помощью 1 %-го раствора CH₃COOH. Фракции, содержащие белок, объединяли и лектин высаливали при 85 %-м насыщении сульфатом аммония. После центрифугирования осадок растворяли в минимальном объеме дистиллированной воды и диализировали против 0,1 М ацетатного буфера, pH 7,0, с добавлением 0,25 М NaCl.

Небольшой осадок, формирующийся после диализа, удаляли центрифугированием. Надосадочную жидкость (объем 2 мл) наносили на колонку с Toyopearl HW-55 высотой 40 см и диаметром 1,6 см. Собирали фракции, обладающие гемагглютиниру-

Таблица 1
Выход лектинов из сырья

Растение	Масса сырья, г	Выход лектина, мг	Выход свежего сырья, мг/кг
Ястребинка оранжево-красная	540	33	61
Ястребинка волосистая	300	38	126
Ястребинка лесная	380	35	92

Таблица 2
Некоторые физико-химические характеристики лектинов ястребинок

Растение	Молекулярная масса лектина*, кДа	Молекулярная масса полипептидных цепей*, кДа	Содержание углеводов в молекуле, %
Ястребинка оранжево-красная	36	~18	2,2
Ястребинка волосистая	36	~18	2,1
Ястребинка лесная	36	~18	2,1

*По данным гель-хроматографии; **по данным электрофореза в присутствии ДС-На.

ющей активностью по отношению к эритроцитам кролика. Лектин после диализа против дистиллированной воды лиофильно высушивали.

Получение производных, меченных пероксидазой. Для получения пероксидазных конъюгатов использовали метод периодатного окисления пероксидазы в щелочных условиях [17]. Так как лектины ястребинок во многом напоминают лектин зародышей пшеницы, время конъюгирования с пероксидазой для них по данной методике может иметь существенное значение [18]. Пероксидазу корней хрена (15 мг) с RZ 3,0—3,3 и активностью не ниже 1000 фенол-антипириновых единиц (производство НПК «Лектинотест», Львов) растворяли в 3 мл 1 %-го раствора гидрокарбоната натрия, pH 8,2, и добавляли 0,12 мл 1 %-го спиртового раствора динитрофторбензола. Смесь оставляли на 60 мин в темном месте, после чего добавляли 51 мг NaJO₄, растворенного в 0,6 мл дистиллированной воды, и оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Затем окисление пероксидазы останавливали добавлением к смеси 0,5 мл этиленгликоля. Через 1 ч окисленную пероксидазу очищали от динитрофторбензола гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-50, предварительно уравновешенным 0,01 М карбонатным буферным раствором, pH 9,5.

Окисленную пероксидазу разделяли на три порции по 5 мг и к каждой добавляли по 3,5 мг лектина ястребинки, растворенного в 0,5 мл 0,01 М карбонатного буфера, pH 9,5. Через 1, 2 и 3 ч к смеси добавляли борогидрид натрия до конечной концентрации 0,5 мг/мл.

Еще через 1 ч смесь диализировали против забуференного физиологического раствора (ЗФР), pH 7,4, к которому добавляли борогидрид натрия до концентрации 0,5 мг/мл.

Очистку конъюгата от непрореагировавших компонентов проводили на следующий день на колонке с сефадексом G-200 (высота 50 см и диаметр 1,5 см), уравновешенным ЗФР. Конъюгаты хранили в жидком виде в присутствии консерванта — азида натрия (0,02 %).

Получение производных, меченных ФИТЦ. Мечение лектина, выделенного из надземной части ястребинки волосистой, ФИТЦ проводили по методике, усовершенствованной Луциком [6] с небольшими изменениями, не затрагивающими сути метода. К 1 мл 1 %-го раствора лектина в 20 мМ карбонатном буферном растворе с pH 9,0 добавляли 0,1 мл 2 %-го раствора флуоресцеина изотиоцианата в диметилсульфоксиде. Смесь инкубировали в темноте в течение 3 ч, после чего меченый лектин отделяли от непрореагировавшего флуорохрома гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в 20 мМ карбонатном буферном растворе. Лектин, меченый ФИТЦ, передвигался со свободным объемом колонки, а непрореагировавший ФИТЦ медленно перемещался сзади.

После диализа против дистиллированной воды препарат меченного ФИТЦ лектина лиофильно высушивали. Последняя процедура не обязательна, так как лектин, меченный ФИТЦ, хорошо хранится в виде жидкого раствора (ФИТЦ является хорошим антисептиком).

Результаты и обсуждение. Свежий сок из травы трех видов ястребинок, собранных до начала цветения, агглютинировал кроличьи трипсинизированные эритроциты в титре 1:8—1:16 (2⁻³—2⁻⁴). Однако после высаливания белков из сока растения или экстракта сульфатом аммония, полученного экстракцией 0,9 %-м раствором NaCl, агглютинации не наблюдалось. Подобно лектину из зародышей пшеницы выход лектина из сырья значительно возрос при экстрагировании 0,1 М раствором HCl и очистке на аффинном сорбенте без предварительного концентрирования. В результате получены количества очищенных лектинов, представленные

Таблица 3
Взаимодействие лектинов трех видов ястребинок с эритроцитами человека и животных

Лектин	Минимальная концентрация лектина, агглютинирующая эритроциты, мкг/мл							
	Эритроциты человека			Баран	Курица	Кролик	Свинья	Карп
	О	А	В					
Ястребинка лесная	19	39	5	1,25	5	0,6	156	1250
Ястребинка волосистая	5	10	10	19	2,5	0,008	19	1250
Ястребинка оранжево-красная	5	10	10	10	5	5	156	1250

Таблица 4
Взаимодействие лектинов ястребинок с углеводами.

Углевод или гликопротеин	Минимальная концентрация гаптена, угнетающая активность 4 ед. лектина, мМ			
	Лектин травы ястребинки волосистой	Лектин травы ястребинки оранжево-красной	Лектин травы ястребинки лесной	Агглютинин зародышей пшеницы
N-ацетил-D-глюкозамин	25	25	25	50
N,N'-диацетилхитобиоза	0,32	0,32	0,32	2
N,N''',N''''-тетраацетилхитотетраоза	0,04	0,04	0,04	0,05
Овомукоид	0,03 %	0,06 %	0,06 %	0,125 %
Асиалоовомукоид	0,03 %	0,125 %	0,06 %	0,125 %
4-нитрофенил-β-D-глюкозаминопиранозид	1,25	2,5	1,25	2,5
4-нитрофенил-β-D-глюкопиранозид	20	> 40	20	> 40

Примечание. Все лектины не взаимодействовали со следующими углеводами: α-метил-D-маннопиранозидом, α-метил-D-глюкозаминопиранозидом, D-глюкозой, D-маннозой, L-фукозой, L-рамнозой, D-галактозой, N-ацетил-D-галактозаминном, D-глюкозамингидрохлоридом, целлобиозой, мальтозой, лактозой, α-β-метил-D-галактопиранозидами, 4-нитрофенил-β-D-галактопиранозидом в концентрации 0—100 мМ, а также с гликопротеинами: телячьим фетуином, трансферрином из сыворотки крови человека, иммуноглобулином G крови человека, бычьим и человеческим тиреоглобулином.

в табл. 1. Учитывая, что свежая трава содержит 85—90 % воды, можно считать выход лектинов достаточно высоким.

Содержание углеводов, определенное по методу Дюбуа, у всех трех лектинов оказалось на уровне 2,1—2,2 % (табл. 2).

Очищенные аффинной хроматографией лектины обладали высокой гемагглютинирующей активностью по отношению к эритроцитам человека и животных (табл. 3).

Обращает также на себя внимание более высокое сродство к эритроцитам кролика.

Однако, несмотря на аффинную очистку лектинов, все они агглютинировали эритроциты человека с так называемой «зоной задержки». Это может свидетельствовать о присутствии в очищенных лектинах очень сильного ингибитора агглютинации, который не удаляется даже после аффинной хроматографии. Подобное явление мы наблюдали при очистке лектина зародышей пшеницы (WGA).

Только трехкратная перекристаллизация WGA позволяет избавиться от этого ингибитора. Интересно, что эритроциты кролика, барана и курицы агглютинировались без «зоны задержки».

Изучение углеводной специфичности лектинов ястребинок и параллельно агглютинина зародышей пшеницы (WGA) обнаружило их большое сходство (табл. 4).

Подобно WGA для конъюгации лектинов ястребинок с пероксидазой хрена необходимо более короткое время, чем для большинства лектинов. Лучший результат получен при 1-ч экспозиции; более продолжительное время приводило к образованию нерастворимых агрегатов. Это косвенно свидетельствует о сходстве аминокислотного состава лектинов ястребинок и WGA.

Таким образом, отработанная нами схема очистки новых лектинов из представителей трех видов растений рода ястребинка (*Hieracium*) позволяет получить электрофоретически чистые препараты с

высоким выходом целевого продукта. Их производные, меченные пероксидазой и ФИТЦ, могут быть рекомендованы в качестве гистохимических маркеров. По углеводной специфичности лектины ястребинок обнаружили большое сходство с лектином зародышей пшеницы.

V. A. Antonyuk

Purification and properties of the lectins from aerial part of three species of plants genus hawkweed (*Hieracium*)

Summary

From aerial part of three species of the plants of genus hawkweed (*Hieracium aurantiacum*, *H. pilosella*, *H. sylvularum*), family Asteraceae, the lectins have been purified with the yield of 61, 126 and 92 mg per kg of crude drugs, accordingly. The molecular mass of the three lectins as determined by gel filtration on Toyopearl HW-55 is 36 kDa. According to the SDS-PAGE data, the lectins contain one component of molecular mass approximately 18 kDa. The PAGE disc electrophoresis in an alkaline (pH 8.9) and acidic systems (pH 4.3) detected one protein band, that presumes the lectins investigated to consist of one isoform. The sugar component (2.1–2.2 %) was revealed in the lectins. The lectins of three species studied agglutinate rabbit erythrocytes best of all and agglutinate weaker hen, sheep and human erythrocytes. The best inhibitor of lectin activity for three species of genus hawkweed is N,N',N''',N'''' -tetraacetylchitotetraose. This sugar is 8 time stronger inhibitor than N,N' -diacetylchitobiose and 625 time stronger than N -acetyl-D-glucosamine. Peroxidase-lectin conjugates and FITC-labelled lectins for histochemicals applications have been prepared.

B. O. Антонюк

Очищення та властивості лектинів з надземної частини рослин трьох видів роду нечуй-вітер (*Hieracium*)

Резюме

З надземної частини рослин трьох видів роду нечуй-вітер (*Hieracium aurantiacum*, *H. pilosella*, *H. sylvularum*), які належать до родини Asteraceae, очищено лектини з виходом 61, 126 і 92 мг на 1 кг сирової маси сировини відповідно. Молекулярна маса усіх трьох лектинів, визначена гел'єхромотографією на Toyopearl HW-55, складає 36 кДа. При електрофорезі в ПААГ у присутності ДС-На виявлено одну зону з молекулярною масою приблизно 18 кДа. Очевидно, лектини нечуй-вітрів складаються з двох ідентичних субодиниць. При диск-електрофорезі в лужному (pH 8,9) і кислому (pH 4,3) середовищах виявлено по одній зоні. У складі молекул лектинів знайдено 2,1–2,2 % вуглеводів. Лектини рослин трьох видів роду нечуй-вітер найкраще аглютинують еритроцити кроля, слабше — еритроцити курки, барана і людини. Кращим інгібітором активності усіх трьох лектинів є N,N',N''',N'''' -тетраацетилхітотетраоза, яка у 8 разів є сильніший інгібітор, ніж N,N' -діацетилхітобіоза, та в 625 разів — ніж N -ацетил-D-глюкозамін. Для гистохімічних досліджень отримано кон'югати лектинів з пероксидазою хрому і лектини, мічені ФІТЦ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peumans W. J., Van Damme E. J. M. Lectins as plant defense proteins // *Plant Physiol.*—1995.—109.—P. 347—352.
2. Лахтин В. М., Ямсков И. А. Лектины в исследовании рецепторов // *Успехи химии.*—1991.—60, № 8.—С. 1777—1816.
3. Roth J., Zuber C., Komminoth P., Sata T., Li W., P., Heitz P. U. Applications of immunogold and lectin-gold labeling in tumor research and diagnosis // *Histochem. and Cell Biol.*—1996.—106, N 1.—P. 131—148.
4. Gornik I., Maravic G., Dumic J., Fogel M., Lauc G. Fucosylation of IgG heavy chains is increased in rheumatoid arthritis // *Clin. Biochem.*—1999.—32, N 8.—P. 605—608
5. Луцки М. Д., Антонюк В. А. Приготовление реагента анти-А из лектина горошка мохнатого для выявления антигена А в эритроцитах и слюне человека // *Суд.-мед. экспертиза.*—1995.—№ 1.—С. 17—19.
6. Луцки А. Д., Детюк Е. С., Луцки М. Д. Лектины в гистохимии.—Львов: Изд. Львов. ун-та, 1989.—144 с.
7. *Определитель высших растений Украины* / Под ред. Ю. Н. Прокудина.—Киев: Наук. думка, 1987.—389 с.
8. Bourne Y., Zamboni V., Barre A., Peumans W. J., Van Damme E. J., Rouge P. *Helianthus tuberosus* lectin reveals a widespread scaffold for mannose-binding lectins // *Struct. Fold Des.*—1999.—7, N 12.—P. 1473—1482.
9. Антонюк В. О., Рибак О. В. Вивчення вуглеводної специфічності лектинів підземних органів ехінацеї пурпурової та рудбекії роздільнолистої // *Фармаком.*—2002.—№ 3.—С. 153—158
10. Антонюк В. О., Дубицький О. Л. Вивчення вуглеводної специфічності лектинів рослин роду *Artemisia* // *Укр. біохім. журн.*—2002.—74, № 46 (додат. 2).—С. 114.
11. А. с. СССР № 1554961. Способ получения аффинного сорбента для очистки лектинов / В. А. Антонюк // *Бюл. изобретений.*—1990.—№ 13.
12. Read S. M., Norcote D. H. Minimization of variation in the response of different proteins of the coomassie blue G dye-binding assay for protein // *Anal. Biochem.*—1981.—116, N 1.—P. 53—64.
13. Луцки М. Д., Панасюк Е. Н., Антонюк В. А., Луцки А. Д., Ладная Л. Я. Методы исследования углеводной специфичности лектинов (Метод. рекомендации).—Львов, 1983.—22 с.
14. Маурер Г. Диск-электрофорез.—М.: Мир, 1971.—С. 58—67.
15. Kato Y., Komiya K., Iwaeada T., Sasaki H., Hashimoto T. Packing of toyopearl columns for gel filtration. I. Influence of packing velocity on column performance // *J. Chromatogr.*—1981.—205.—P. 185—191.
16. Dubois M., Gilles K., Hamilton I., Rebers P., Smith F. Colorimetric method for demonstration of sugars and related substances // *Anal. Chem.*—1956.—28, N 3.—P. 350—356.
17. Nakane P., Kawaoi A. Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation // *J. Histochem. and Cytochem.*—1974.—22, N 12.—P. 1084—1091.
18. Антонюк В. А., Яценко А. М. Конъюгирование лектинов с пероксидазой хрена: усовершенствование методики // *Клин. лаб. диагностика.*—1996.—№ 3.—С. 51—52.

УДК 577.152.1

Надійшла до редакції 03.10.03