

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТИРОЗИНАЗЫ ИЗ ГРИБОВ *AGARICUS BISPORUS*

А. С. Куркач

Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск, Беларусь, www.apanasik.by@gmail.com
Научный руководитель — М. В. Шолух, кандидат биологических наук

Актуальной является проблема стандартизации процессов микроанализа и создания меток для таргетной химиотерапии конъюгатами антитело-лекарство. В тяжёлых цепях иммуноглобулинов находится тирозин, через который с помощью грибной тирозиназы осуществляется циклоприесоединение, что позволяет сконструировать гомогенные конъюгаты со специализированными метками. В связи с этим целью данной работы стало получение высокоочищенного препарата тирозиназы с высокой удельной активностью.

Ключевые слова: грибная тирозиназа; очистка; *Agaricus bisporus*; меланины.

В Fc-фрагменте иммуноглобулинов находится тирозин, через который с помощью тирозиназы *Agaricus bisporus* осуществляется циклоприесоединение, что позволяет сконструировать гомогенные конъюгаты со специализированными метками [1].

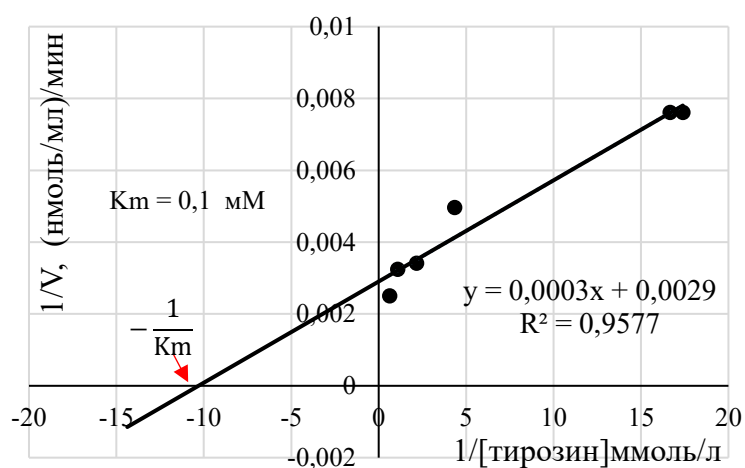
Экстракцию проводили в соответствии с указаниями Haghbeen K. H. et al. [2] с использованием калий-фосфатного буфера (pH=7,0, 0,1 мМ). В присутствии аскорбиновой кислоты (5 мМ). Активность тирозиназы определяли по методике [3]. В результате реакции образуется окрашенный продукт карбоксиазамонадина, имеющий коэффициент молярной экстинкции $\varepsilon = 44680 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при данных условиях [4]. В среду для анализа до инкубации вводились катионы меди до конечной концентрации 15 мМ [5]. Определение концентрации белка проводили по методу Брэдфорда [6]. Проводили SDS-электрофорез отобранных фракций [7], гель окрашивали красителем Кумасси R-250 [8] с дополнительным окрашиванием серебром [9].

В ходе работы был проведен эксперимент, состоящий из нескольких этапов: получение экстракта, ионообменная хроматография на DEAE-целлюлозе и аффинная хроматография на TOYOPEARL HW-65 [10]. После каждого этапа определялась концентрация белка, проводился электрофорез в полиакриламидном геле и измерялась активность тирозиназы. Для следующей стадии очистки выбиралась фракция с наибольшей удельной активностью (таблица).

Определение выхода и фактора очистки тирозиназы

Стадия	Объём (мл)	Белок (мг/мл)	Об-щий белок (мг)	Актив-ность общая (Е)	Актив-ность удельная (Е/мг белка)	Выход (%)	Фактор очистки
1. Тканевой экстракт	752	0,243	182,7	2820	15,4	100	1
2. Хроматография на DEAE-целлюлозе (фракция 3)	10	0,012	0,123	13,5	109,76	—	—
3. Хроматография на Сп-ТОУОРЕАРЛ HW-65 (фракция 2)	2	0,018	0,036	53,8	1494,4	2	97,04

Были получены данные активности очищенного фермента при различных концентрациях тирозина. Построив график по Лайнуиверу-Берку, определили константу Михаэлиса (K_m) для тирозина (рисунок).



Определение K_m тирозиназы для тирозина

Методом флуоресцентной спектроскопии было подтверждено образование продукта тирозиназной реакции карбоксиазамонардина, обладающего максимумом эмиссии на длине волны 464 – 465 нм при длине волны возбуждения 420 нм [4].

1) Установлено, что выход целевого продукта составляет 2 %, фактор очистки 97,04 раза.

2) SDS-электрофорезом в 12,5% полиакриламидном геле подтверждено наличие у тирозиназы двух полипептидных цепей с молекулярными массами около 34 – 43 кДа и двух полипептидных цепей с молекулярными массами около 17 кДа [11].

3) Константа Михаэлиса фермента для тирозина равна 0,10 мМ, удельная активность 1494,4 нмоль тирозина/мг белка/мин.

4) Согласно данным флуоресцентной спектроскопии и кинетического анализа можно полагать, что выделенный фермент сохранил третичную структуру в процессе выделения и очистки.

Библиографические ссылки

1. Non-genetic generation of antibody conjugates based on Chemoenzymatic tyrosine click chemistry / Bruins J. J. [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. 2021. Vol. 32, iss. 10. P. 2167-2172.

2. Purification of tyrosinase from edible mushroom / Haghbeen K. [et al.] // *Iranian J. Biotechnology*. 2004. Vol. 21. P. 189-194.

3. In situ fluorogenic and chromogenic reactions for the sensitive dual-readout assay of tyrosinase activity / Zhao J. [et al.] // *Analytical chemistry*. 2017. Vol. 89, iss. 19. P. 10529-10536.

4. Synthesis and photophysics of novel biocompatible fluorescent oxocines and azocines in aqueous solution / Acuña A. U. [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2013. Vol. 15, iss. 39. P. 16704-16712.

5. Partial purification and characterization of a novel extracellular tyrosinase from *Auricularia auricula* / Zou Y. [et al.] // *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014. Vol. 172. P. 1460–1469.

6. Kruger N. J. The Bradford method for protein quantitation // *The protein protocols handbook*. 2009. P. 17–24.

7. Hoefer Inc. HOEFER SE250. Mini-vertical gel electrophoresis unit // *User manual*. 2012. P. 8-14.

8. SERVA Brilliant Blue Staining Procedures [Electronic resource]. URL: https://www.serva.de/en/DE/612_Information_Center_Electrophoresis_SDS_PAGE_Coomassie_reg_staining.html (date of access: 15.05.2024).

9. A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins / Damerval C. [et al.] // *Electrophoresis*. 1987. Vol. 8, iss. 3. P. 158–159.

10. TOSOH BIOSCIENCE THE CUSTOMER MAGAZINE [Electronic resource]. URL: <https://www.separations.eu.tosohbioscience.com/products/process-media/size-exclusion/toyoparl-hw-65> (date of access: 15.05.2024).

11. Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone / Ismaya W. T. [et al.] // *Biochemistry*. 2011. Vol. 50, iss. 24. P. 5477 – 5486.