

А. А. ГАЛОЯН, Р. М. СРАПНОНЯН

ГЕЛЕВАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ КОРОНАРАСШНРЯЮЩЕГО БЕЛКА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ГИПОТАЛАМУСА

Синге и Тизелиус [7] впервые наблюдали эффект «молекулярного сита» в гелях при фракционировании продуктов гидролиза амилозы в агар-агаровом геле. Для детального исследования механизма молекулярного сита Лейт и Ратвен [3] использовали зерна крахмала. Они нашли, что белки не проникают в обычный гидратированный крахмал, но в нем хорошо разделяются вещества, молекулярные веса которых лежат в пределах от 100 до 1000. Однако крахмал, разбухший при нагревании в воде примерно в 3 раза по сравнению с первоначальным размером частиц, становится проницаемым для более крупных молекул, таких как инсулин, миоглобин и гемоглобин.

Порат и Флодин [5] в 1959 г. впервые показали возможность использования геле декстрана для обессоливания водного раствора белка.

В дальнейшем Порату [6] удалось достичь большого успеха в разделении белков, пептидов и аминокислот при использовании гелей декстранов, имеющих различное количество поперечных связей.

Декстраны с поперечными связями, известные под фирменным названием сефадексы (фирма «Pharmacia» Upsala Sweden), широко распространены и применяются с различной целью в биохимических исследованиях. Их используют для тех же целей, что и диализ: для обессоливания белков и смены буферного раствора; с помощью сефадексов можно осуществлять концентрирование растворов высокомолекулярных веществ, а также разделение белков, пептидов и аминокислот.

Сефадекс является модифицированным декстраном, т. е. приготавливается на его основе путем сшивания цепей полисахарида поперечными связями. Он представляет собой нерастворимую в воде неионизирующую сетку, обладающую однако высокой гидрофильностью, благодаря наличию весьма большого числа гидроксильных групп. Гидрофильность матрицы позволяет пропускать через колонки с сефадексом высоколабильные белки. Имеется целый ряд сефадексов, которые отделяют вещества с различными молекулярными весами.

Таким образом, гелевая фильтрация позволяет разделять вещества по молекулярному весу. При очистке белков целесообразно сначала смесь белков разделить по молекулярному весу на сефадексах, после чего можно перейти к ионообменникам до получения индивидуального белка.

Настоящая работа посвящена результатам применения гелевой

фильтрации для очистки и сравнительного изучения коронарорасширяющего белка, выделенного из гипоталамуса.

Методы исследования. Сефадексе G-100 в количестве 5 г суспендировали в 250 мл дистиллированной воды, перемешивали в течение 20 мин. и отстаивали 30 мин. Верхний слой сифонировали, вновь заливали водой, оставляя также в течение 30 мин. И так, эту процедуру повторяли до тех пор, пока верхний слой становился прозрачным после очередного 30-минутного отстаивания. Затем сефадексе несколько раз промывали рабочим раствором и переносили в колонку высотой 20 см, диаметром 2 см.

Наполненную колонку промывали 10—15 объемами рабочего раствора до уравнивания pH. Навеску белкового препарата растворяли в объеме борно-боратного буфера, pH=8, до концентрации 3%. Нерастворимую часть удаляли центрифугированием и супернатант вносили в колонку, предварительно уравниванную тем же буфером. После иштывания внесенного образца в гель вносили порцию борноборатного буфера так, чтобы образовался прозрачный слой над гелем высотой 1,5 см.

Затем подавали буфер микроасосом со скоростью 42 мл/час. Фракции собирали на коллекторе по 7 мл. Определяли плотность элюатов на спектрофотометре СФ-4 А, белок определяли по Лоури [4], биологическую активность — по методу Каверинной [2] на кошках под уретановым наркозом.

Результаты. Как видно из табл. 1, Лоури — положительные вещества появляются, начиная с 3-го элюата, т. е. после выхода 14-мл элюирующей жидкости. Отсюда и начинается первый Лоури — положительный пик, который заканчивается, включая 7-ой элюат; затем следует второй пик, начиная с № 8 и заканчивается 12-ым.

Таблица 1
Количество белка (по Лоури) в элюатах, вышедших из колонки, заполненной сефадексом G-100

№№	Показание ФЭК-а	Количество белка в 0,5 мл белкового раствора	Общее количество белка (в γ) (в 7 мл)
1—2	0	0	0
3	68	62	930
4	61	83	1245
5	70	57	855
6	90	18	270
7	94	10	150
8	93	12	180
9	96	7	105
10—12	97	3	45
13—30	0	0	0

Опыты показали, что коронароактивными являются 4—6 элюаты. Наибольшей активностью обладает 5-ый элюат. На рис. 1, 2 видны изменения количества крови, оттекающей из венозных сосудов сердца под

влиянием белковой фракции (рис. 1) и 5-го элюата (рис. 2), выделенного фильтрацией на G-100.

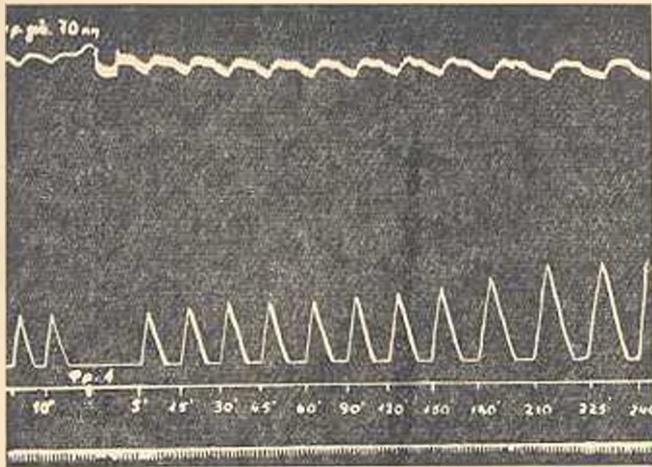


Рис. 1. Изменение количества крови, оттекающей из венозных сосудов сердца под влиянием коронарорасширяющего белка, выделенного из гипоталамуса (кошка, уретановый наркоз).

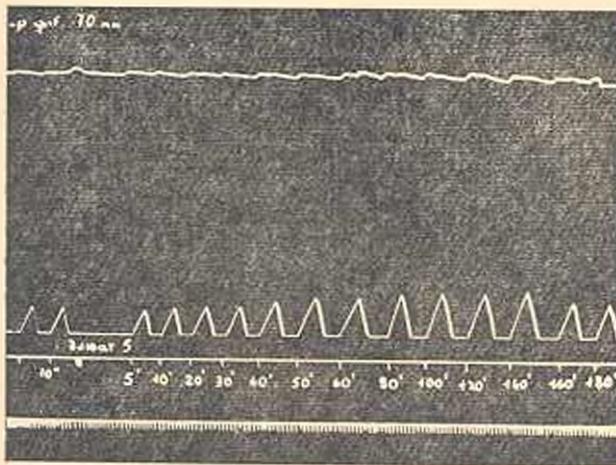


Рис. 2. Изменение количества крови, оттекающей из венозных сосудов сердца, под влиянием 5-го элюата (кошка, уретановый наркоз).

Как видно из рис. 1, по сравнению с нормой через 15 мин. после введения белкового раствора количество крови, оттекающей из венозного сосуда, начинает увеличиваться, этот эффект продолжается и достигает своего максимума на 240 мин., повышаясь более, чем на 100%. При этом кровяное давление почти не подвергается заметным изменениям. После внутривенного введения 5-го элюата (рис. 2) у кошек через 10 мин. отмечается увеличение количества крови, к 50 мин. это увеличение дости-

Биологический журнал Армении, XIX, № 9—2

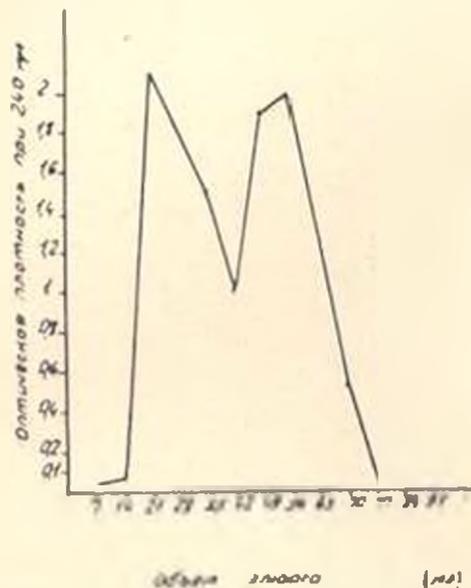


Рис. 3. Гелевая фильтрация коронарорасширяющего белка на сефалексе С-100, уравновешанном борно-боратным буфером, рН 8, на волне 240 мμ.

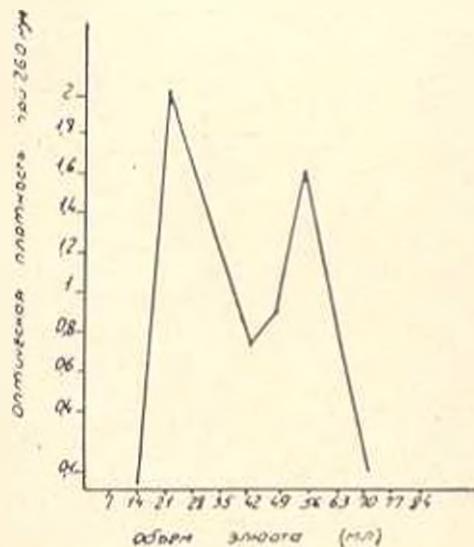


Рис. 4. Гелевая фильтрация коронарорасширяющего белка на сефалексе С-100, уравновешанном борно-боратным буфером, рН 8, на волне 260 мμ.

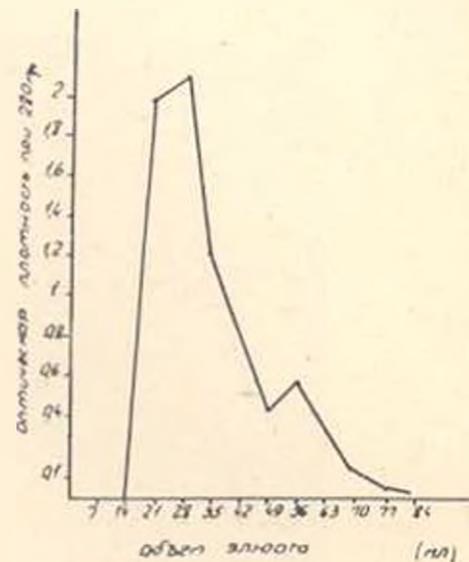


Рис. 5. Гелевая фильтрация коронарорасширяющего белка на сефалексе С-100, уравновешанном борно-боратным буфером, рН 8, на волне 280 мμ.

гает 60%, что продолжается до 100 мин., затем повышается до 80% и этот эффект сохраняется в течение 3 час. За весь период опыта кровяное давление не изменялось.

Оптическая плотность выделенных элюатов коронароактивного белка определялась на спектрофотометре на всех волнах с целью выявления природы элюируемых веществ. Наши опыты показали, что коронароактивный белок поглощается в основном в районе спектра от 220 м μ —300 м μ .

На рис. 3, 4, 5 приводятся данные спектрофотометрического определения элюатов исследуемого белка на волнах 240, 260, 280 м μ , потому что они показывают свое максимальное поглощение в этом районе. Как видно из этих рисунков, сефадексе G-100 разделяет искомый белок на два пика. Наиболее отчетливо это разделение выявляется на волнах 240 и 260 м μ (рис. 4 и 5). Однако на волне 280 м μ первый пик приобретает максимальное значение. Коронароактивный элюат обнаруживается во всех случаях в первом пике. Учитывая то обстоятельство, что при разделении белковых смесей на различных сефадексах сначала выходят высокомолекулярные вещества, а также то, что искомый белок, по нашим данным, не разделяется на сефадексе G-50 и G-75, можно полагать, что коронароактивная фракция, входящая в состав первого пика, имеет молекулярный вес приблизительно 100 000 и выше. Не исключена возможность, что коронароактивная фракция, которая, вероятно, находится в комплексе с другими белками, может иметь несколько иной молекулярный вес.

Во всех случаях ясно, что коронароактивная фракция находится в составе крупномолекулярных белков.

Имея в виду, что первый пик показывает на волне 280 м μ наибольшее поглощение, можно полагать, что эта группа соединений в основном является белковой, хотя, как показывают рис. 4 и 5, в составе этого пика могут быть и рибонуклеопротеиды, ибо и на других волнах обнаруживается заметное поглощение.

Хотя нам удалось разделить коронароактивный белок на два пика, однако мы не склонны считать, что отдельные пики являются гомогенными белками, тем более, что в нашей предыдущей работе [1] было показано как коронароактивный белок, выделенный методом высаливания сернистым аммонием, при электрофорезе на агар-агаре выявляет намного больше фракций, что свидетельствует о его гетерогенности.

Выводы

1. Коронароактивный белок, выделенный из гипоталамуса свиней, крупного рогатого скота на сефадексе G-100 в боратном буфере pH=8, разделяется на два пика.

2. Коронароактивная фракция, находящаяся в первом пике, увеличивает количество крови, оттекающей из венозных сосудов сердца, на 80%.

3. Она является гетерогенной и нуждается в дополнительной очистке на ионообменниках.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 13.VI 1966 г

Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ, Բ. Մ. ՍՐԱՊԻՈՆՅԱՆ

**ՇԻՊՈԹԱԼԱՄՈՒՍԻՑ ԱՆՋԱՏՎԱԾ ՊՍՍԿԱԶԻՎ ԱՆՈՒՅՆԵՐԸ ԼԱՅՆԱՑՆՈՂ
ՍՊԻՏԱԿԱՌԻՑԱՅԻՆ ՆՅՈՒԹԵՐԻ ԳԵԼԱՅԻՆ ՅԻՏՐԱՅԻԱՆ**

Ա. մ. փ. ո. փ. ո. մ.

Ինչպես ցույց են տվել հետազոտությունները [1] հիպոթալամուսից անջատված կորոնարոտակտիվ սպիտակուցը իրենից ներկայացնում է մի շարք նյութերի բարդ միացություն: Սույն աշխատության խնդիրն է մաքրել այդ սպիտակուցները:

Ինչպես հայտնի է, սպիտակուցների մաքրումը նպատակահարմար է սկսել սեֆազեբսիների միջոցով:

Կորոնարոտակտիվ սպիտակուցը հաջողվեց բաժանել սեֆազեբս G-100-ի միջոցով, բորային բուֆերի $pH=8$ ներկայությամբ 2 պիկի:

Կորոնարոտակտիվ ֆրակցիան, որը գտնվում էր 1 պիկում, 50% ավելացնում է այն արյան բանակը, որը գնում է սրտի պսակաձև անոթներից: Այդ ֆրակցիան հետերոգեն է և պահանջում է հետազոտ մաքրում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Срапионян Р. М. ДАН АрмССР, 42, 4, 1966.
2. Каверина Н. В. Фармакология и токсикология, 1, 39, 1958.
3. Lathé G. H., Ruthven C. R. Biochem. J., 62, 655, 1965.
4. Lowry O. H. et al., J. Biol. Chem., 193, 1, 265, 1951.
5. Porath J., Flodin P., Nature 183, 1657, 1959.
6. Porath J. Biochim. Biophys. Acta, 39, 193, 1960.
7. Syngé R. L. M., Tiselius A. Biochem. J. 46, xli., 1950.