

КРАТКИЕ НАУЧНЫЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.15.152

Ж. И. АКОПЯН, А. З. КИРКЕЛЬ

АМФ-АМИНОГИДРОЛАЗА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРЫСЫ,
ОЧИСТКА

В настоящем сообщении описывается простой метод одноэтапной очистки фермента из скелетных мышц крысы.

Аденилатдезаминаза (АМФ-аминогидролаза, КФ 3, 5, 4, 6) катализирует реакцию гидролитического дезаминирования адениловой кислоты с образованием инозиновой кислоты и аммиака по уравнению:



Физиологическая функция аденилатдезаминаз плохо изучена. По-видимому, дезаминазный путь катаболизма аденозин—5'—монофосфата играет определенную роль при болезнях сердечно-сосудистой, нервной систем и других болезнях [1, 4].

Для изучения молекулярных механизмов регуляции активности, физико-химических и каталитических свойств фермента необходимо получить его в высокоочищенном виде.

Материал и методика. В наших опытах были использованы следующие реагенты: 5'—АМФ-динатриевая соль (Реанал, ВНР); экстрагирующий буфер, состоящий из 0,18 М КСl; 0,054 М KH_2PO_4 ; 0,035 М K_2HPO_4 , (рН 6,5); 0,45 М и 1,0 М растворы КСl, рН 7,0, целлюлоза фосфат, тип Р-11 (Ватман, Англия). Перед использованием фосфат целлюлозы дополнительно обрабатывался, что в значительной степени увеличивало его адсорбционные свойства [5]. К 50 г целлюлозы добавлялся с перемешиванием раствор, состоящий из 75 г NaOH и 185 мл воды. Вязкая масса выдерживалась в ледяной бане в течение 30 мин, затем медленно добавлялось 330 мл H_2O с перемешиванием и охлаждением. Спустя 15 мин по каплям (примерно в течение 50 мин) добавлялось 80 мл эфирного раствора хлорангидрида фосфора — POCl_3 , при температуре суспензии 25—30°. Конечное значение рН равно приблизительно 6,0. Через несколько минут суспензия разводилась водой до 2 л в большом кристаллизаторе и оставлялась на ночь. Осадок промывался повторными декантациями до получения чистой суспензии, фильтровался, промывался спиртом, высушивался. Продукт представлял собой белый порошок, весом около 30 г и содержал 1,9% фосфата (0,6 ммоль фосфата на г).

Активность фермента в процессе очистки определялась спектрофотометрическим методом [2], с измерением увеличения оптической плотности при 285 нм. Коэффициент молярной экстинкции при этой длине волны для АМФ равен 480, для ИМФ—730. $\Delta D = 0,73 - 0,48 = 0,25$. Следовательно, при увеличении оптической плотности на величину 0,25 из 1 ммоль АМФ образуется 1 моль ИМФ в 1 литре. Реакция проводилась в пробе, объемом 3 мл (в 10 мм кювете). Следовательно, $\Delta C = 3$ мкмоль на кювету.

Если в пробе образуется 1 ммоль ИМФ, то увеличение оптической плотности при 285 нм составляет $0,083 \left(E = \frac{\Delta D}{\Delta C} \right)$.

За единицу активности (ед.) фермента принималось его количество, катализирующее образование 1 мкмоль ИМФ за минуту при комнатной температуре, в 0.05 М имидазол·НС буфере, рН 6,5.

Содержание белка в пробах определялось по методу Лоури [3].

Использовались свежие скелетные мышцы крыс-самцов, весом 120—150 г, содержащихся на стандартной диете.

Очистка фермента.

Т а б л и ц а
Пример очистки аденилатдезаминазы скелетных мышц крысы

Этапы очистки	Объем, мл	Актив-ность, ед/мл	Общая актив-ность, ед	Содержа-ние белка, мг/мл	Уд. актив-ность, ед/мг	Выход, %	Степень очистки
Надосадочная фракция	270	14,2	3827	13,5	1,05	1	100
Адсорбция на фосфоцеллюлозе	2,75	432	1188	1,5	288	274	31

В основе принципа данного метода лежит феномен избирательной (возможно аффинной) адсорбции аденилатдезаминазы на фосфате целлюлозы.

Гомогенат. 100 г свежей ткани гомогенизировался в 3,3-кратном объеме экстрагирующего буфера в гомогенизаторе типа Вейринга сначала при 8000 об/мин (5 мин), а затем 25 мин при малых оборотах (4000 об/мин) при комнатной температуре. Центрифугировалось при 14000 g в течение 30 мин при охлаждении. Осадки отбрасывались, надосадочная фракция фильтровалась через 3 слоя марли.

Обработка надосадочной фракции. Ко всей надосадочной фракции прибавлялось 1,25 г фосфоцеллюлозы (сухой вес) и при медленном перемешивании магнитной мешалкой выдерживалось 30 мин. При этом на фосфоцеллюлозе адсорбировалось около 90% общей аденилатдезаминазной активности. После отстаивания надосадочная жидкость сливалась, фосфоцеллюлоза переносилась на воронку со стеклянным фильтром (№ 2—3) для удаления части балластного белка и промывалась 330 мл (порции по 80—100 мл) экстрагирующего буфера с легким подсосыванием водоструйным насосом. Затем на той же воронке фосфоцеллюлоза промывалась 330 мл (порции 80—100 мл) 0,45 М раствором KCl (рН 7,0), содержащим 1 mM меркаптоэтанола. Фосфоцеллюлоза суспендировалась в последней порции 0,45 М раствора KCl (рН 7,0) и переносилась в колонку (2,5×25 см). Адсорбированная на фосфоцеллюлозе аденилатдезаминаза элюировалась 1 М раствором KCl, содержащим 1 mM меркаптоэтанола. Фермент элюируется одним острым, симметричным пиком, в котором сосредоточено около 30% общей актив-

ности фермента, очищенного в 250—300 раз по сравнению с исходной надосадочной фракцией. Элюцию фермента 1 М раствором KCl можно проводить и на воронке, но в этом случае значительно уменьшается выход общей активности фермента (до 3—5%).

Некоторые свойства фермента.

Фермент стабилен в течение 20—25 дней в 1 М растворе KCl, содержащем 1 мМ меркаптоэтанол.

Величина K_m (константа Михаэлиса), определенная графически методом двойных обратных величин, составляла 1 мМ (субстрат—АМФ).

Оптимальные величины реакции дезаминирования адениловой кислоты наблюдались при pH 6,5.

Институт экспериментальной биологии

АН АрмССР,

Институт биологической и медицинской
химии АМН СССР

Поступило 18.IX 1974 г.

Ժ. Ի. ՀԱԿՈՅԱՆ, Ա. Ջ. ԿԻՐԿԵԼ

ԱՌՆԵՏԻ ԿՄԱՆՔԱՅԻՆ ՄԿԱՆՆԵՐԻ ԱՄՖ-ը— ԱՄԻՆՈՒԴՐՈՒԱԶԱՆ, ՄԱՔՐՈՒՄԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ներկայացված են տվյալներ առնետի կմախքային մկանների ադենիլատ-դեզամինազայի մաքրման վերաբերյալ:

Մաքրման սկզբունքի հիմքում ընկած է ցելուլոզայի ֆոսֆատի կողմից ֆերմենտի ընտրողական (հնարավոր է աֆֆինային) ադսորբցիայի երևույթը:

Նկարագրված է ֆոսֆոցելուլոզայի ադսորբցիոն տարողության զգալի ավելացման մեթոդը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Engel A. G., Patter G. S., Rosevear Z. M. Nature, 202, 670, 1964.
2. Kalckar H. M. J. Biol. Chem., 167, 429, 1947.
3. Lowry O. H., Rosenbrough M. J. et. al. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
4. Penington R. J. Nature, 192, 884, 1961.
5. Peterson E. A. Laboratore techniques in biochemistry and molecular biology. Ed. Work T. S., Work E. A., 2, 228—396, Holland Publication Company, Amsterdam, 1970.