

Ж. И. АКОПЯН, Л. Н. СТЕСИНА

## НОВЫЙ СПОСОБ СОЛЮБИЛИЗАЦИИ И ОЧИСТКИ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ БЫКА

Использован феномен усиления солюбилизирующего эффекта неионных детергентов в щелочной среде. Добавлением к водной суспензии митохондрий бензиламина-основания достигается увеличение рН до 8,2—8,3. Бензиламин-основание обнаруживает высокое сродство к митохондриальным моноаминоксидазам и предотвращает инактивацию этих ферментов в щелочной среде. Белки надосадочной жидкости, полученной после отделения нерастворимых остатков митохондриальных мембран путем ультрацентрифугирования, фракционируют обычными способами до получения высокоочищенных препаратов фермента.

Митохондриальная моноаминоксидаза (моноамин:  $O_2$ —оксидоредуктаза (дезаминирующая); КФ 1.4.3.4) играет важную роль в организме, катализируя реакцию окислительного дезаминирования аминов согласно уравнению [4]:



Будучи структурно связанным с мембранами митохондрий [1], фермент трудно вводится в растворимую фракцию.

В настоящем сообщении описывается способ солюбилизации митохондриальной моноаминоксидазы, отличный от описанных в литературе, принцип которого, очевидно, может быть использован и при солюбилизации других нерастворимых ферментов [2, 3].

*Материал и методика.* Использовались бензиламин-основание (Шосткинский завод химреактив), *n*-нитрофенилэтиламин, HCl (химзавод им. Войкова). Готовили 50 мМ водный раствор (101 мг препарата на 10 мл воды), 0,2 М калий фосфатный буфер (рН 7,4), 25-процентный водный раствор неионного детергента Тритон X-100 (фирма «Т. Шухардт», ФРГ), 0,25 М раствор сахарозы. Использовались также перекристаллизованный сернокислый аммоний и 5-процентный раствор аммиака.

Гель гидрооксид алюминия Сβ получали по рецепту: 22 г сернокислого аммония растворяли в 500 мл воды при 63° и к раствору добавляли 100 мл 10-процентного аммиака. Смесь быстро подогревали до 50° и к ней прибавляли в один прием при сильном перемешивании турбинной мешалкой 150 мл воды, содержащей 76,7 г аллюмоаммиачных квасцов и нагретой предварительно также до 58°. Температура при этом повышалась до 61°. Через 10 мин осадок отделяли от раствора центрифугированием, промывали 5 раз, взбалтывая каждый раз с 1,5 л воды и удаляя промывную жидкость центрифугированием. При центрифугировании шестой раз отстаившаяся жидкость остается мутной. Получающийся белый, пластический, хлопьевидный осадок после двухнедельного хранения при комнатной температуре есть гель гидроокиси алюминия Сβ.

Зональный электрофорез в полиакриламидном геле [5] проводили при напряжении 420v, силе тока 5а, концентрации геля 7,5%. Продолжительность электрофореза—5 мин.

Для суждения о концентрации детергента Тритон X-100 в пробах было использовано известное свойство неионных детергентов изменять окраску водных растворов индикаторов [9]. При pH 7,5 положение максимума поглощения водного раствора бромтимолового синего в присутствии детергента Тритон X-100 изменяется от 623 до 425 нм. В известных пределах снижение оптической плотности при длине волны 623 нм пропорционально концентрации детергента.

Активность моноаминоксидазы в процессе очистки определяли калориметрическим методом, основанном на измерении скорости окислительного дезаминирования п-нитрофенилэтиламина. Находили зависимость между величиной оптической плотности при длине волны 450 нм пигмента, образующегося при дезаминировании п-нитрофенилэтиламина, и количеством освобождаемого при этом аммиака. Пользуясь построенным на основании этих данных калибровочным графиком, вычисляли количество освобождаемого аммиака по результатам фотометрических измерений.

За единицу активности (ед) фермента принимали его количество, катализирующее освобождение 1 н моля аммиака за минуту при 37° в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,4).

Свежую ткань печени быка сохраняли в замороженном состоянии при -20° в течение трех-четырех недель перед выделением митохондрий.

**Очистка фермента.** Замороженную печень быка оставляли на 3—4 часа до полного оттаивания и гомогенизировали с 10-кратным объемом 0,25 М раствора сахарозы в гомогенизаторе типа Вейринга. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования с последующим промыванием осадка бидистиллированной водой.

Пример очистки

Этапы очистки	Объем, мл	Актив-ность, ед/мл	Общая актив-ность, ед	Содержа-ние белка, мг/мл	Удельная актив-ность, ед/мл	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	800	33,8	27040	26	1,3	100	1
Выделение митохондрий	75	130,2	9765	21	6,2	36	5,0
Солюбилизация	68	116,8	7932	16	7,3	29	5,8
Фракционирование серно-кислым аммонием	45	89,7	4036	6,5	13,8	15	11,0
Обработка гелем гидрокси-алюминия	48	54,7	2625	11,1	49,8	9,5	39,5
Осаждение сернокислым аммонием	8	39,8	318	0,4	99,6	1,2	79,0
Повторная обработка гелем гидрокси-алюминия	6	38,3	229	0,12	319	0,9	253,5

Молекулярный вес, определенный при помощи хроматографии на пластине с сефадексом G-200 в тонком слое, равен 264000.

Величина  $K_m$ , определенная графическим методом двойных обратных величин составляла  $3,2 \cdot 10^{-3}$  М (субстрат-тирамин).

Оптимальные величины реакции дезаминирования тирамина наблюдались при pH 9.

К водной суспензии митохондрий (pH 6,0—6,2, содержание белка около 20 мг/мл) добавляли при постоянном перемешивании магнитной мешалкой (и одновременном определении величины pH при помощи потенциометра) бензиламин-основание до конечной концентрации 5 мМ (pH суспензии возрастает до 8,2—8,3) и 25-процентный водный раствор Тритона X-100 до конечной концентрации 75%. Суспензию центрифугировали 40 мин при 100000 g. Осадок отбрасывали. Надосадочная фракция содержала от 75 до 95% моноаминоксидазной активности суспензии митохондрий.

*Фракционирование сернокислым аммонием.* К полученной надосадочной фракции добавляли при постоянном перемешивании и контроле величины рН кристаллический сернокислый аммоний до насыщения на 20%. Величину рН поддерживали постоянной путем добавления 5-процентного аммиака. Материал оставляли на 30 мин при  $-20^{\circ}$  и на 30 мин при  $4^{\circ}$ . Центрифугировали (20000 g, 10 мин), осадок отбрасывали. К надосадочной фракции добавляли сернокислый аммоний до насыщения на 40%; материал оставляли на 30 мин при  $-20^{\circ}$ , на 30 мин при  $4^{\circ}$ . Центрифугировали (20000 g, 10 мин), флотирующий осадок суспензировали в небольшом объеме 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4), диализовали против 1 мМ фосфатного буфера (рН 7,4) до полного освобождения от ионов аммония. Добавляли Тритон X-100 до конечной концентрации 0,75%, центрифугировали (25000 g, 30 мин), осадок отбрасывали.

*Обработка гелем гидроокиси алюминия.* К надосадочной фракции прибавляли суспензию геля гидроокиси алюминия таким образом, чтобы отношение веса белка к сухому весу геля было равным 3:1. После 40-минутного перемешивания центрифугировали (10000 g, 5 мин), осадки отбрасывали.

*Осаждение сернокислым аммонием.* К надосадочной фракции добавляли сернокислый аммоний до насыщения на 40%, поддерживая величину рН в пределах 7,2—7,4. Материал оставляли на 30 мин при  $-20^{\circ}$  и на 90 мин при  $4^{\circ}$ , центрифугировали (20000 g, 10 мин), флотирующий осадок растворяли в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7,4). Раствор (1—1,5 мг белка/мл) диализовали против 1 мМ фосфатного буфера (рН 7,4) до полного удаления ионов аммония, центрифугировали (25000 g, 30 мин), осадки отбрасывали.

*Повторная обработка гелем гидроокиси алюминия.* К надосадочной фракции прибавляли гель гидроокиси алюминия С<sub>В</sub> (соотношение белок:гель—1:1), перемешивали 40 мин, центрифугировали (10000 g, 5 мин), осадки отбрасывали. Надосадочная фракция содержала около 1% моноаминоксидазной активности исходного гомогената, концентрация детергента Тритон X-100 в растворах очищенных ферментных препаратов составляла 0,5—1%.

Полученный фермент стабилен в течение 72—96 час. при  $4^{\circ}$ , теряет 50% активности при нагревании до  $50^{\circ}$  в течение 5 мин. Данные зонального электрофореза в полиакриламидном геле свидетельствуют о том, что ферментный препарат является высокоочищенным. Высокоочищенные препараты митохондриальной моноаминоксидазы из печени быка, полученные в лаборатории Ясунобу [10], также растворимы в присутствии детергента (холата натрия). Эти препараты практически не отличаются от полученных нами по степени очистки (в 58 раз по сравнению с суспензией митохондрий (субстрат-бензиламин), против 73 или 51 раз при сопоставимом способе расчета (субстраты—*p*-нитро-фенилэтиламин или тирамин, соответственно в наших опытах).

Институт экспериментальной биологии  
АН АрмССР

Поступило 28.VIII 1975 г.

Ժ. Ի. ՀԱՎՈՐՅԱՆ, Լ. Ն. ՍՏԵՍԻՆԱ

ՄԻՏՈՔՈՆՆԵՐԻՄԱԼ ՄՈՆՈԱՄԻՆՈՔՍԻԴԱԶԻ ՍՈԼՅՈՒԲԻԼԻԶԱՑԻԱՅԻ  
ԵՎ ՄԱՔՐՄԱՆ ՆՈՐ ՄԵԹՈԴ ՑՈՒԼԻ ԼՅԱՐԴԻՑ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հողվածում առաջարկվում է ցուլի լյարդից միաոքոնդրիալ մոնոամինո-  
օքսիդազի մաքրման և սոլյուբիլիզացիայի նոր եղանակ:

Այդ նպատակով օգտագործվել է ոչ իոնային դետերգենտների հիմնային ճիջավայրում յուլյուբիլիզացիոն էֆեկտի ուժեղացման ֆենոմենը:

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Веревкина И. В., Горкин В. З., Митюшин В. М. и Эльпинер И. Е. Биофизика, 9, 999, 1964.
2. Akopyan Z. I., Stesina L. N. and Gorkin V. Z. J. Biol. Chem., 246, 4610, 1971.
3. Akopyan Z. I., Veryoukina I. V., Levyant M. I., Moskvitina I. A., Gorkin V. Z. and Orekhoviz V. N. Inter. J. Prot. Res., 3, 111, 1971.
4. Davison A. N. Physiol. Rev., 21, 729, 1958.
5. Davis B. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404, 1964.
6. Ervin V. G. and Hellerman L. J. Biol. Chem., 242, 4230, 1967.
7. Gabay S. and Valcourt A. J. Biochem. Biophys. Acta, 159, 440, 1968.
8. Gomes B., Kloepter H. G. and Yasunobu K. J. Activ Biochem. Biophys., 132, 16, 1969.
9. Schwartz A. M., Perry Z. and Berch Z. Surface active agents and detergents. Interscience Publ., I n. e. N. Y., 11, 576, 1958.
10. Yasunobu K. T., Igaue I., Gomes B. Adv. Pharmac., 6, 43, 1968.