

К. Б. НАЗАРЯН

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКА GP-350

Изучены физико-химические свойства нейроспецифического белка GP-350, гомогенного при электрофорезе в 7,5 и 15% полиакриламидном геле, скоростной седиментации и изофокусировании. Показано, что он хорошо окрашивается резорциновым реактивом и реактивом Шиффа. Методом равновесной седиментации определен молекулярный вес белка (16.500 дальтон), а методом аналитического изофокусирования — его изоэлектрическая точка ($\leq 2,5$).

В настоящее время выделена и интенсивно изучается группа белков, уникальных для нервной системы. Это кислые белки с небольшим молекулярным весом и высокой электрофоретической подвижностью, локализованные как в нейронах, так и в нейроглии. Роль их в функционировании нервной системы неизвестна, однако имеется ряд работ, свидетельствующих о накоплении некоторых из них при выработке и фиксации временных связей; содержание других изменяется при опухолеобразовании и иных патологиях мозга (болезнь Тей-Сакса, старческое слабоумие и т. д.) [1—3].

Нейроспецифический белок GP-350 впервые выделен и описан Ван Амеронгеном и соавт. [4] из мозга быка и крысы. Он обнаружен ими в цитоплазме нейронов и синапсах во всех областях мозга. По данным этих авторов, белок GP-350 имеет молекулярный вес 11.600 дальтон и изоэлектрическую точку 2,0.

Задачей настоящего исследования было уточнение этих и изучение некоторых других физико-химических характеристик белка GP-350, выделенного из мозга крысы.

Материал и методика. В работе использовали белок GP-350, выделенный из мозга беспородных крыс по методике Ван Амеронгена [5] в нашей модификации. Молекулярный вес определяли равновесным ультрацентрифугированием в аналитической центрифуге фирмы «Вектап» (модель E) и диск—электрофорезом в 15% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия по Веберу и Осборну [6]; изоэлектрическую точку определяли по Клоусу [7] в 4,5% полиакриламидном геле с амфолинаминосителями. При электрофорезе гели окрашивали на белок по Фербенксу [8], а при изофокусировании — по Ауде [9]. Для определения углеводов в препарате белка после электрофореза гели окрашивали на гликопротеиды по Захариусу [10] и на сиаловые кислоты резорциновым реактивом по Сваннерхольму [11].

Результаты и обсуждение. Белок, выделенный и очищенный по указанной методике, оказался гомогенным при электрофорезе в 7,5% и 15% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, изофокусировании в 4,5% полиакриламидном геле с амфолинами и скоростной

седиментации. Белковая зона, соответствующая GP-350, при электрофорезе дает положительную реакцию при окраске на гликопротеиды и сиаловые кислоты. В обоих случаях наблюдается одна хорошо окрашенная полоса (рис. 1).

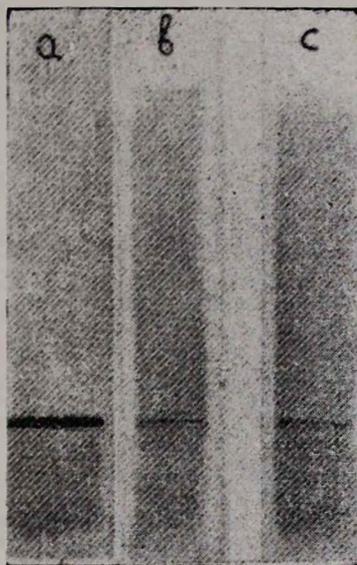


Рис. 1. Электрофорез очищенного белка GP-350 в 7,5% полиакриламидном геле. Окраска на белок (а), сиаловые кислоты (в), гликопротеиды (с).

Молекулярный вес при седиментационном равновесии можно определить исходя из уравнения Сведберга [12]:

$$M = \frac{2RT \, d \ln c}{(1 - \bar{v}\rho) \omega^2 dx^2},$$

где R —универсальная газовая постоянная;

T —температура ротора в K° ;

ρ —плотность растворителя; x —расстояние от оси вращения; \bar{v} —парциальный удельный объем белка; c —концентрация вещества; M —молекулярный вес; ω —скорость вращения ротора.

Величину $\frac{d \ln c}{dx^2}$ определяли из графика зависимости изменения кон-

центрации от расстояния до оси вращения (рис. 2), где $\frac{d \ln c}{dx^2} = \operatorname{tg} \alpha$.

Очищенный белок растворяли в 0,01 М трис-буфере с рН 7,2 в концентрации, имеющей начальную плотность 0,8Д. Для предотвращения бактериального заражения в раствор добавляли азид натрия в концентрации 0,01%. Равновесие с точностью до 2% было достигнуто за 24 час. при скорости вращения ротора 10.200 об/мин.

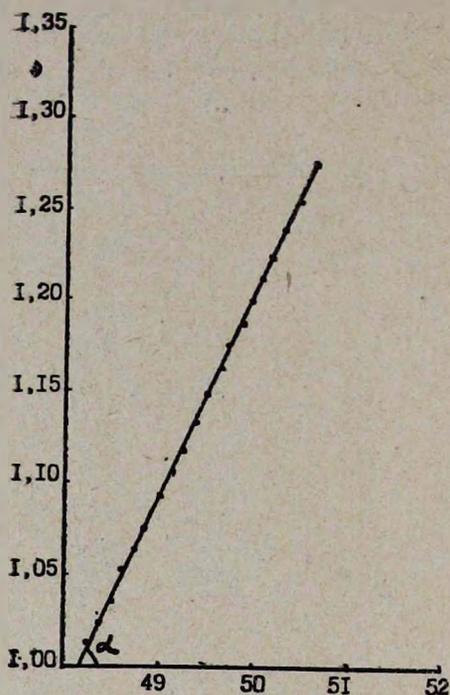


Рис. 2. График зависимости логарифма концентрации от расстояния до оси вращения ротора при равновесии. По оси абсцисс— r^2 (квадрат расстояния до оси вращения), по оси ординат— lgc (логарифм концентрации).

Парциальный удельный объем белка GP-350 рассчитывали по данным его аминокислотного и углеводного состава. При вычислении этой величины мы исходили из предпосылки, что парциальный удельный объем белка представляет собой сумму парциальных удельных объемов аминокислот и углеводов, входящих в состав его. Тогда

$$\bar{v} = \frac{\sum \bar{v}_i c_i}{\sum c_i},$$

где \bar{v}_i — парциальный удельный объем данного аминокислотного или углеводного остатка; c_i — его содержание в весовых процентах. Вычисленный на основании данных Гиббонса и Шахмана [13, 14] по вышеуказанной формуле парциальный удельный объем белка GP-350 равен 0,71 г/мл. Предположение, на основании которого определялся этот показатель, подтверждается сравнением расчетных и определенных экспериментально значений парциального удельного объема для ряда хорошо исследованных гликопротеидов (табл.). Из этой таблицы видно также, что значения парциального удельного объема ряда гликопротеидов связаны с отношением содержания углеводов к содержанию аминокислот и увеличиваются с уменьшением последнего. Однако, несмотря на большую разницу в содержании углеводного компонента, как

Таблица

Сравнение экспериментальных и вычисленных на основе аминокислотного и углеводного анализа парциальных удельных объемов гликопротеидов с различными молекулярными весами и содержанием углеводов

Группа гликопротеидов	Молекулярный вес	Общее содержание сахаров, %	Нейтральные сахара, %	Аминосахара, %	Сиаловые кислоты, %	Парциальный удельный объем		Источники
						найденный экспериментально	вычисленный по аминокислотному составу	
α -казеин	17000	0,3	0,06	0,11	0,2	0,74	0,74	[17, 18]
β -казеин	24000	0,8	0,3	0,25	0,2	0,72	0,72	[17, 18]
Трансферрин	86000	1,4				0,725		[19, 20]
Гонадотропный гормон	30000	7,4	2,6	4,8		0,73		[21]
Рибонуклеаза В	14700	8	5,7	2,1		0,7	0,7	[22]
Овальбумин	45000	3	2	1		0,7	0,72	[23—25]
Гликопр теид мочи	6400000	13	2,7	1,1	9,1	0,705		[21]
Фетунин	45000	23	8,3	6,0	8,7	0,7	0,71	[27, 28]
Огомукоид	27000	25	9	15	1	0,69		[29, 30]
Кислый α -гликопротеид сыворотки крови	40—44000	24—31	14—16		10—14	0,71		[31—34]
Гликопротеид подчелюстных желез овцы	85000	40	0,45	15	23	0,685	0,66	[35—37]

качественную, так и количественную, значение парциального удельного объема различных гликопротеидов изменяется мало, но среднее значение их значительно отличается от такового протеннов. Согласно этим данным, молекулярный вес белка GP-350 при центрифугировании равен 16.500 дальтон.

При определении молекулярного веса электрофорезом в 15% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, с использованием белков-стандартов мы получили значение молекулярного веса, равное 12.000 дальтон (рис. 3), что практически совпадает с данными Ван

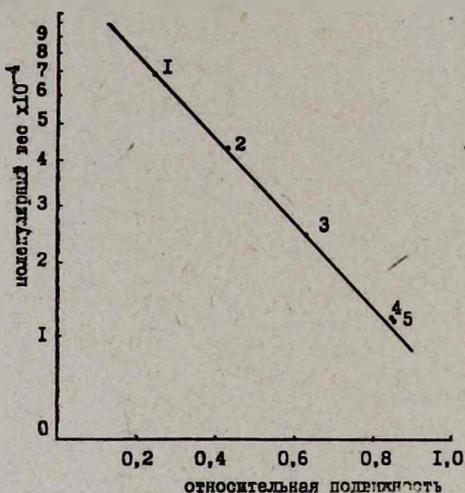


Рис. 3. Зависимость электрофоретической подвижности от молекулярного веса при электрофорезе в 15% полиакриламидном геле. 1. Альбумин сыворотки крысы (МВ=67000). 2. Овальбумин (МВ=45000). 3. Химотрипсиноген А (МВ=25000). 4. Цитохром С (МВ=13500). 5. GP-350 крысы

Амеронгена [5]. Однако, учитывая неточность этого метода для белков с небольшим молекулярным весом [5] и, с другой стороны, аномально низкое связывание додецилсульфата с олигосахаридной цепью молекулы гликопротеидов [16], нужно отдать предпочтение данным, полученным с помощью ультрацентрифугирования.

Изоэлектрическую точку белка определяли аналитическим изоэлектрофокусированием в 4,8% полиакриламидном геле с амфолинами, имеющими интервал рН 3,5—10 и 2,5—4. Гели окрашивали бромфеноловым синим, который не окрашивает амфолины-носители, дающие интенсивный и трудноудаляемый фон с амидошварцем 10В, кумаси R 250 и кумаси GL [7, 9]. В случае с амфолинами при интервале рН 3,5—10 окрашенная полоса белка находится на самом конце геля у положительного электрода. Учитывая это и данные Ван Амеронгена, получившего сходные данные с амфолинами того же интервала рН, но определившего по ним изоэлектрическую точку белка, равную 2,0, мы провели изоэлектрическое фокусирование с амфолинами, имеющими

интервал pH 2,5—4, однако и в этом случае белок GP-350 концентрируется в самом конце геля у положительного электрода. Исходя из этих данных, можно утверждать, что изоэлектрическая точка белка $\leq 2,5$ (рис. 4 и 5).

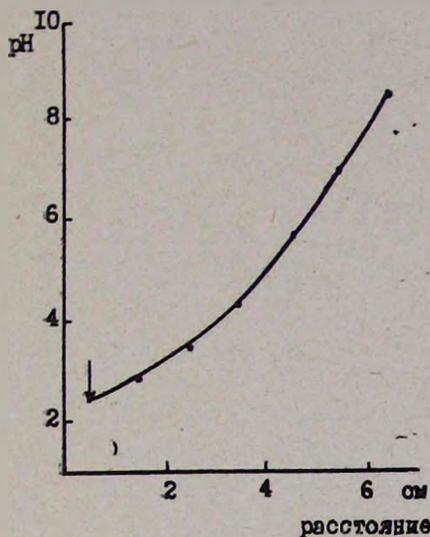


Рис. 4.

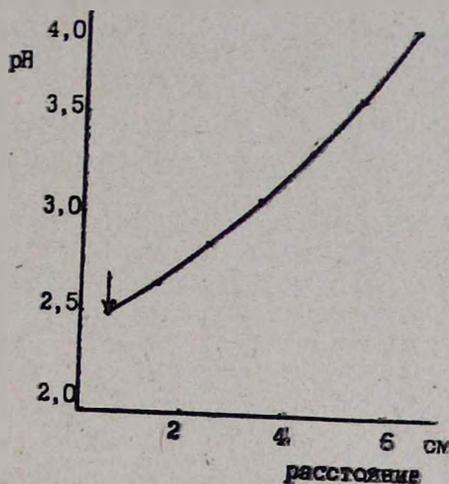


Рис. 5.

Рис. 4. Изофокусирование белка GP-350 с амфоллинами интервала pH 3,5—10 в 4,8% полиакриламидном геле. По оси абсцисс—расстояние до верхнего конца геля, по оси ординат—градиент pH. Стрелка показывает положение зоны белка после фокусирования.

Рис. 5. Изофокусирование белка GP-350 с амфоллинами интервала pH 2,5—4. По оси абсцисс—расстояние до верхнего конца геля, по оси ординат—градиент pH. Стрелка показывает положение зоны белка после фокусирования.

Обобщая сказанное, можно сделать вывод, что белок GP-350 имеет все признаки, характерные для группы органоспецифических водорастворимых белков мозга. Он имеет небольшой молекулярный вес, низкую изоэлектрическую точку, обусловленную наличием концевой сиаловой кислоты и, следовательно, высокую электрофоретическую подвижность. По предварительным данным, молекула GP-350, по всей вероятности, не содержит атомов металлов с неспаренными электронами.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,
Институт психиатрии АМН СССР

Поступило 29.IV 1977 г

Կ. Բ. ՆԱԶԱՐՅԱՆ

GP-350 ՆԵՅՐՈՍՊԵՏԻՅԻԿ ՍՊԻՏԱԿՈՒՅԻ ՖԻԶԻԿԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա. Վ. Փ. Ն. Փ. Ն. Վ.

Ուսումնասիրվել են 7,5% և 15% պոլիակրիլամիդային գել-էլեկտրաֆորեզի, իզոֆոկուսացման և արագընթաց սեդիմենտացիայի ժամանակ համո-

դեն GP-350 ներյոսպեցիֆիկ սիալոգլյուկոպրոտեինի որոշ ֆիզիկա-քիմիական հատկությունները: Այդ սիալոգլյուկոպրոտեինը լավ է ներկվում ռեզորցինային և Շիֆֆի ռեակտիվներով, որը ապացուցում է GP-350 սպիտակուցի մոլեկուլի կազմում շաքարների և N-ացեթիլնեյրամինաթթվի առկայությունը: Հավասարակշռային սեդիմենտացիայի մեթոդով որոշված մոլեկուլյար կշիռը հավասար է 16.500 դալտոն, իզոֆոկոլուսացման եղանակով որոշված իզոէլեկտրիկ կետը $\leq 2,5$:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Клементьев Б. И., Гринкевич Л. И., Глуценко Т. С., Репин В. С., Левзнер Л. З. ДАН СССР, 221, 243, 1975.
2. Bogoch S. H. Biol. Psych, 9, 73, 1974.
3. Bowen D. M., Smith C. B., Davison A. N. 7th Int. Congr. Neuropathol., proc., 1. Budapest, 1975.
4. Van Nieuw Amerongen A., Van Den Htjnden D. H., Htjzman J., Roukema P. A. J. Neurochem, 19, 2195, 1972.
5. Van Nieuw Amerongen A., Roukema P. A. J. Neurochem., 21, 125, 1973.
6. Weber K., Osborn N. J. Biol. Chem., 244, 4406, 1969.
7. Klose J. Humangenetik, 26, 231, 1975.
8. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach E. E. Biochem., 10, 2606, 1971.
9. Awdeh Z. L. Sci. Tools, 16, 42, 1969.
10. Zacharius R. M., Zell T. E. Anal. Biochem., 30, 148, 1969.
11. Heuser E., Lipp K., Wiegandt H. Anal. Biochem., 60, 382, 1974.
12. Бозян Т. Введение в ультрацентрифугирование. М., 1973.
13. Гиббокс Р. А. Гликопротеины. М., 1, 37, 1969.
14. Schachman H. K. Methods in Enzymol., Acad. Pr., 4, 108, 1957.
15. Koenne M., Jacob L. Anal. Biochem., 64, 414, 1975.
16. Kobulka D., Khettry A., Shin B. S., Carraway K. L. Arch. Biochem. Biophys 148, 475, 1972.
17. Hill R. D. J. Dairy Res., 30, 101, 1963.
18. McMeekin T. L., Groves M. L. J. Am. Chem. Soc., 69, 1747, 1947.
19. Koehlin B. A. J. Am. Chem. Soc., 74, 2649, 1952.
20. Laurell C. B. Acta Chem. Scand., 7, 1407, 1953.
21. Готшалк А. Гликопротеины. М., 2, 139, 1969.
22. McMeekin T. L., Marshall K. Science, 116, 142, 1952.
23. Каверзнева Е. Д., Богданов В. П. Биохимия, 26, 105, 1961.
24. Adair G. S., Adair M. E. Proc. Roy. Soc., B, 120, 422, 1936.
25. Johansen P. G., Marshall R. D., Neuberger A. Biochem. J., 78, 518, 1961.
26. Tristram G. R. Adv. Prot. Chem. Acad. Pr., 5, 83, 1949.
27. Spiro R. G. J. Biol. Chem., 235, 2860, 2960.
28. Spiro M. G., Spiro R. G. J. Biol. Chem., 237, 1507, 1962.
29. Chatterjee A. K., Montgomery R. Arch. Biochem. Biophys., 99, 426, 1962.
30. Rhodes M. B., Bennett N., Faney R. E. J. Biol. Chem., 235, 1686, 1960.
31. Bezkorovainy A., Winzler R. J. Biochim. Biophys. Acta, 49, 559, 1961.
32. Eylar E. H., Jeanloz R. W. J. Biol. Chem., 237, 622, 1962.
33. Schultze H. E., Schmidberger R. Biochim. Z., 529, 490, 1958.
34. Smith E. L., Brown D. M., Winzler J. J. Biol. Chem., 185, 569, 1950.
35. Gottschalk A., Simmons D. H. Biochim. Biophys. Acta, 42, 141, 1960.
36. Gottschalk A., Thomas M. Biochim. Biophys. Acta, 46, 91, 1961.
37. Graham E. R. B., Gottschalk A. Biochim. Biophys. Acta, 33, 513, 1960.