

К ВОПРОСУ О ГЕТЕРОГЕННОСТИ КОРОНАРОАКТИВНОГО БЕЛКА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ГИПОТАЛАМУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Р. М. СРАПИОНЯН, Ф. М. СААКЯН, С. А. СААКЯН,
 М. Т. БХЕЯН, А. А. ГАЛОЯН

Из гипоталамической ткани мозга крупного рогатого скота с помощью фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации на сефадексе G-100, последующей хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе и изоэлектрофокусированием в градиенте амфолинов были получены высокоочищенные препараты новых коронароактивных белков. Изучен ряд физико-химических свойств этих белков. Обсуждается вопрос о возможной гетерогенности коронароактивного белка, обнаруженного ранее.

Ранее мы сообщали о наличии в гипоталамусе крупного рогатого скота двух коронарорасширяющих белковых носителей нейрогормонов К и С (условно обозначенных нами БНК и БНС по признаку связывания с соответствующими нейрогормонами), различающихся по биологическим свойствам, электрофоретической подвижности и аминокислотному составу [1, 2]. В процессе дальнейшего, более детального изучения этих белков нам удалось выявить наличие третьей активной фракции, элюируемой объемом буфера, равным свободному сбъему, и подтвердить двухфракционность БНК при ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе.

В настоящей работе мы описываем процедуру очистки этих белков, сравнивая некоторые их физико-химические свойства.

Материал и методика. В работе использовали сефадексы фирмы «Pharmacia», целлюлозные ионообменники—«Whatman», стандартные белки—«Sigma», додецилсульфат—«Fegak», остальные реактивы фирмы «Reanal» и отечественного производства.

Коронароактивные белки выделяли из гипоталамусов крупного рогатого скота методом, описанным ранее [3]. Изоэлектрические точки определяли электрофокусированием, которое проводили на приборе фирмы ЛКВ в колонке объемом 110 мл при 4°. Испытуемые образцы переводили в 3%-ный раствор амфолинов с интервалами рН 5—7 при ступенчатом изменении напряжения. Продолжительность фокусирования составляла 48 час., конечное напряжение 500 в, сила тока 0,8 ма. Оптическую плотность в элюатах измеряли при 280 нм на проточном спектрофотометре Увикорд 11.

Гомогенность белков контролировали методом диск-электрофореза в 7,5%-ном полиакриламидном геле (Пааг-е) по методу Орнштейна и Дэвиса [4]. Продолжительность фореза—около трех часов при силе тока в 4 ма на трубку. Окрашивание гелей проводили 0,25%-ным раствором амидошварца 10В.

Для определения молекулярного веса использовали электрофорез в 10%-ном Пааг-е по методу Вебера и Осборна [5]. Продолжительность фореза—около 6 час. при

силе тока в 8 ма на трубку. Окрашивание гелей проводили 0,1%-ным раствором ку-масси R 250 в смеси метанола с уксусной кислотой при комнатной температуре.

Сканирование окрашенных гелей осуществлялось в видимой области при длине волны 560 нм, на приставке новой конструкции, приспособленной к спекорду типа UVvis [6].

Аминокислотный анализ белков проводили на автоматическом анализаторе типа Д-500 (фирмы «Dittip»). Гидролиз белков вели в 5,7 N HCl, в запаянных ампулах при 110° в течение 22 час. Используемая ионообменная смола—ДС-4. Продолжительность анализа с регенерацией—106 мин. Чувствительность прибора—2/1.

Биологическая активность изучалась в опытах с регистрированием объемной скорости оттока крови из коронарного синуса на кошках по известной методике [7].

Экстракция водорастворимых белков из свежей ткани. Исходным материалом для экспериментов служили гипоталамусы крупного рогатого скота, которые сразу после убоя животных подвергали соответствующей обработке: освобождали от мозговых оболочек, кровеносных сосудов и гомогенизировали в холодной дистиллированной воде (вес/объем, 1:2) механическим гомогенизатором (тип 324) со скоростью 3000 об/мин на протяжении трех минут. Гомогенат центрифугировали в течение 40 мин при 10 000 g, супернатант фракционировали при помощи сернистого аммония. В качестве источника коронароактивных белков использовали белковую фракцию, высаливающуюся в пределах насыщения 75—100%.

Приготовление ацетоновых порошков. Привезенные с бойни свежие гипоталамусы, обработанные указанным способом, замораживали, измельчали и гомогенизировали в течение 90 сек в холодном ацетоне. Отношение ткань/ацетон равнялось 1:10 (вес/объем). Гомогенат отсасывали на воронке Бюхнера; осадок, собранный с фильтровальной бумаги, вновь подвергали аналогичной обработке, высушивали при комнатной температуре в течение нескольких часов. Ацетоновый порошок суспендировали в натрий-фосфатном буфере, рН 7,38, из расчета 20 мл на 1 г порошка. Суспензию гомогенизировали и экстрагировали на магнитной мешалке в течение 18 час. Гомогенат центрифугировали в течение 40 мин при 10 000 g. Полученная таким образом надосадочная жидкость служила исходным экстрактом для фракционирования сернистым аммонием. Белковую фракцию, высаливающуюся в пределах насыщения 75—100%, как и при первом способе получения коронароактивных белков, подвергали диализу против воды и лиофилизировали.

Очистка коронароактивных белков. Гель-фильтрацию проводили на колонке с сефадексом G-100, размерами 2,0×50 см. На колонку, предварительно уравновешенную 0,02 M борно-боратным буфером, рН 7,8, нанесли 3%-ный раствор белкового образца. Фракции собирали со скоростью 60 мл/час. В элюатах измеряли оптическую плотность при 280 нм на регистрирующем спектрофотометре Unicam SP-800 и определяли содержание белка по методу Лоури и сотр. [8].

Коронароактивные белковые элюаты, вышедшие из колонки, заполненной сефадексом, предварительно отдиализованные и лиофилизированные, вводили в колонку, заполненную ДЕАЕ-целлюлозой, уравновешенную 0,005 M натрий-фосфатным буфером, рН 6,5. Применяли градиентную элюцию со скоростью 20 мл/час, по линейной схеме, с использованием значительного градиента концентрации NaCl (0,002—0,5 M) в сочетании с небольшим понижением рН натрий-фосфатного буфера (6,5—5,0).

Результаты и обсуждение. Данные предыдущих исследований свидетельствовали о том, что при гель-фильтрации через сефадекс G-100 белки, высаливаемые в пределах насыщения 75—100%, разделяются на три пика, условно обозначенные как пики I, II, III [рис. 1]. При исследовании биологической активности белковых элюатов оказалось, что коронароактивные белки сосредоточены в основном в составе I пика. Результаты последних наблюдений убедительно показали в составе белков этого пика, кроме БНК и БНС, наличие третьей активности, кото-

рая, судя по времени выхода и объему элюируемого буфера, примерно равному свободному объему, отлична от указанных двух белковых носителей. Фракцию условно обозначали как БНХ.

Возможность отчетливой дифференциации этих белков была осуществлена путем ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе

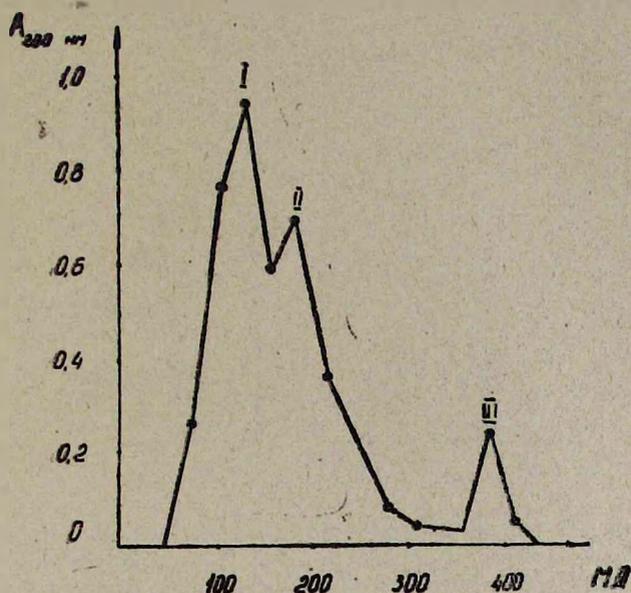


Рис. 1. Кривая спектрофотометрического анализа элюатов белковых фракций после гелевой флльтрации на сефадексе G-100, колонка уравновешена борно-боратным буфером, рН 7,8.

[рис. 2]. Как видно из рисунка, белки I пика, элюируемого из сефадекса G-100, разделяются более чем на 12—13 фракций, из которых 4 являются коронарорасширяющими. Фракция, элюируемая в III пике, содержит преимущественно компонент БНХ. Одновременно при хроматографии была обнаружена двухфракционность БНХ. Между выходом обеих фракций отмечался значительный интервал, исчисляемый как во времени, так и объемом элюируемого буфера (пика V и VIII). Сохраняя условия эксперимента, мы произвели рехроматографию, однако положение белковых пиков не изменилось. Дальнейшее изучение биологической активности показало, что одна из этих фракций сохраняет свойство нативного белка и является носителем нейрогормона К, в то время как вторая активная фракция—носитель нейрогормона Г (фракция условно обозначена как БНГ).

Выход коронароактивных белков. Нами отработано два варианта выделения указанных белков из гипоталамуса крупного рогатого скота. Второй вариант (экстракция из ацетоновых порошков) позволяет в значительной степени увеличить выход активных белков почти в 5 раз. Содержание БНГ составляет около 30% от общей суммы всех коронароактивных белков, в то время как содержание БНХ—лишь 10%, при

этом оно варьирует в различных экспериментах. Наблюдаемая в наших экспериментах невоспроизводимость количественного выхода БНХ, по-видимому, объясняется его плохой экстракцией из гипоталамической ткани, где он, вероятно, находится в прочносвязанной форме.

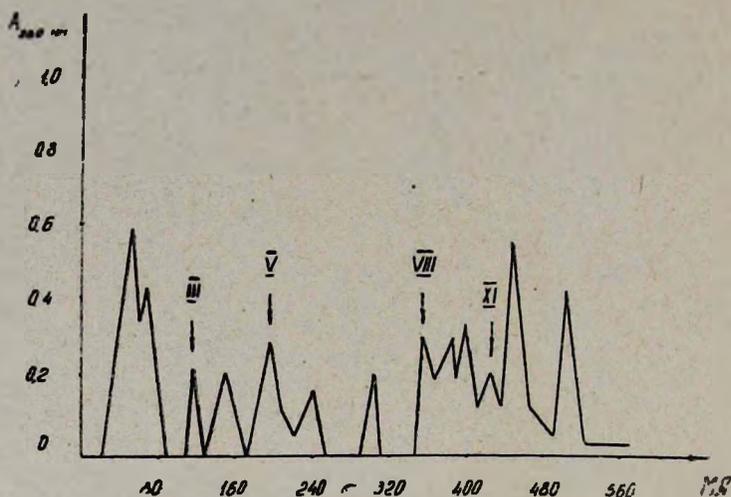


Рис. 2. Кривая спектрофотометрического анализа элюатов белков I пика, хроматографированного на ДЕЛЕ-целлюлозе: стрелками обозначены места выхода коронароактивных белков, в III пике содержится БНХ, в V—БНГ.

Некоторые физико-химические свойства БНГ и БНХ. Определенные методом изоэлектрофокусировки изоточки БНГ и БНХ находятся вблизи рН 5,9 и 5,7 соответственно, т. е. они являются слабокислыми белками. Гомогенность их была доказана диск-электрофорезом в 7,5%-ном Пааг-е, результаты которого количественно оценивались общепринятым способом [9]. Выявлена существенная разница в количественном отношении: условная активность равнялась 0,17 и 0,29 соответственно [рис. 3 и 4]. Одновременно выяснилось, что фракция БНХ по сравнению с БНГ электрофоретически более подвижна.

Молекулярный вес БНГ, определяемый диск-электрофорезом в 10%-ном Пааг-е с использованием белков-стандартов, оказался равным 24 000. Молекулярный вес БНХ в настоящее время не уточнен.

Различия в аминокислотном составе этих двух белков сводятся к количественному преобладанию почти всех аминокислотных остатков во фракции БНГ, в частности фенилаланина, содержание которого почти в 10 раз выше, чем в БНХ [таблица].

Сопоставляя полученные данные, свидетельствующие о различии в аминокислотном составе, электрофоретической подвижности, параметрах гель-фильтрации и хроматографии указанных белков, мы не исключаем возможности, что они могут быть молекулярными формами, так называемыми «изопротеинами», коронарорасширяющего белкового компонента. Отсутствие значительной протеолитической активно-

сти в надосадочной жидкости очищенных мозговых экстрактов делает неправомерным мнение, согласно которому гетерогенность—следствие протеолиза. С другой стороны, используемые методы являются доста-

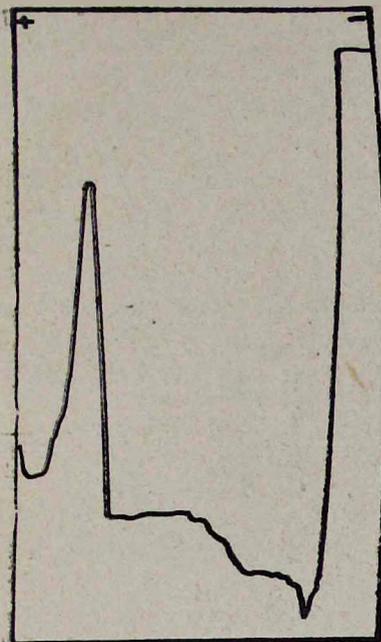


Рис. 3.

Рис. 3. Денситометрический профиль диск-электрофореграмм коронароактивного белка (БНГ), разделенного в 7,5%-ном Пааг-е, измерение при 560 нм.

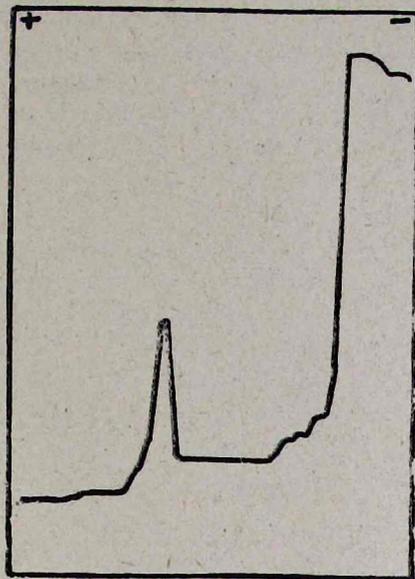


Рис. 4.

Рис. 4. Денситометрический профиль диск-электрофореграммы коронароактивного белка (БНХ), разделенного в 7,5%-ном Пааг-е, измерение при 560 нм.

Таблица
Аминокислотный состав коронароактивных белков (БНГ и БНХ)

Аминокислоты	Остатки аминокислот, наномоли		Аминокислоты	Остатки аминокислот, наномоли	
	БНГ	БНХ		БНГ	БНХ
Аспарагиновая кислота	8,031	2,988	Метинин	1,221	0,030
Треонин	5,434	1,762	Изолейцин	2,417	0,664
Серин	13,262	5,651	Лейцин	5,664	1,575
Глутаминовая кислота	8,942	2,109	Тирозин	2,417	0,630
Пролин	4,240	1,383	Фенилаланин	3,737	0,840
Глицин	12,195	6,868	Гистидин	8,289	0,840
Аланин	9,683	5,552	Лизин	7,563	1,560
Валин	3,350	1,228	Аргинин	2,201	0,822

Цистеин и триптофан не определяли. Количество нанесенного образца—30 мкг.

точно мягкими способами фракционирования белковых веществ. Следовательно, обнаруженная гетерогенность коронароактивного белка, по-видимому, объясняется наличием в гипоталамусе нескольких моле-

кулярных форм его. В настоящее время отсутствию иммунохимического контроля не дает возможности рассматривать эти данные в качестве окончательных.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 10.VII 1978 г.

**ՑՈՒԼԻ ՀԻՊՈԹԱԼԱՄՈՒՍԻՑ ԱՆՋԱՏՎԱՍ ՍՐՏԻ ՊՍԱԿԱԶԵՎ
ԱՆՈՐՆԵՐԸ ԼԱՅՆԱՑՆՈՂ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԻ ՀԵՏԵՐՈԳԵՆՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ**

Ռ. Մ. ՍՐԱՊԻՈՆՅԱՆ, Ֆ. Մ. ՍԱՀԱԿՅԱՆ, Ս. Ա. ՍԱՀԱԿՅԱՆ.

Մ. Տ. ԲԵՆՅԱՆ, Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ

Ցուլի հիպոթալամուսից ստացվել են սրտի պսակաձև անոթները լայնացնող գերմաքրված սպիտակուցներ՝ օգտագործելով ամոնիում սուլֆատով աղայնացման, սեֆադեկս G-100 հել-ֆիլտրացիայի, DEAE-ցելյուլոզայով հետագա քրոմատոգրաֆիայի և ամֆոլինների գրադիենտում իզոէլեկտրաֆոկուսացման մեթոդները:

Ուսումնասիրված է այդ սպիտակուցների մոլեկուլյար կշիռը, ամինաթթվային կազմը, իզոէլեկտրիկ կետը:

Քննվում է նախկինում հայտնաբերված սրտի պսակաձև անոթները լայնացնող սպիտակուցային կոմպոնենտի հետերոգենության հարցը:

**ON THE HETEROGENITY OF CORONAROACTIONIVE PROTEIN
ISOLATED FROM BOVINE HYPOTHALAMUS**

R. M. SRAPIONIAN, F. M. SAHAKIAN, S. A. SAHAKIAN,
M. T. BCHEIAN, A. A. GALOYAN

Highly purified preparations of new coronarocationive proteins have been received from hypothalamic tissue of bovine brain with ammonium sulfate fractionation, gel-filtration on sephadex G—100, following by chromatography on DEAE—cellulose and Isoelectrofocusing in gradient of ampholines. Some physico-chemical properties of these proteins have been studied: molecular weight, aminoacids composition, isoelectric points. The probable heterogeneity of coronarocationive protein component, revealed before has been discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А. и Срапионян Р. М. Биологический журнал Армении, 20, 4, 1967.
2. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Вопросы биохимии мозга, 11, 97, Ереван, 1976.
3. Галоян А. А., Срапионян Р. М. ДАН АрмССР, 32, 210, 1966.
4. Davis B. J. and Ornstein L. Disk Electrophoretic reprints by Distillation Product Ind., I., 1962.
5. Weber K. and Osborn M. J. Biol. Chem., 244, 4406, 1969.
6. Мовсесян Н. О., Хумарян М. А., Мовсесян С. Г. Уч. зап. Егрю. 3, 1975.
7. Morawitz P. Z. und Zahn A. Deutsch. Arch. Klin. Med., 116, 364, 1914.
8. Lowry O. H. et al. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
9. Волгин В. Л., Блинова Т. В., Шевлак П. Ф. Лаб. дело, 1, 76, 1971.