

ОБ N-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТАХ БЕЛКА
ПРОТЕОЛИПИДОВ ИЗ СЕРОГО И БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА
МОЗГА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Т. И. КАЗАРЯН, К. Г. МАНУКЯН

Ключевые слова: аминокислоты, протеолипиды.

Исследование протеолипидов (ПЛ), характерных для нервной ткани гидрофобных липидно-белковых комплексов, являющихся важными компонентами ряда клеточных мембран, таких как миелин, митохондриальные, синапсомальные мембраны и т. д. [1], представляет определенные трудности вследствие необычных свойств их белковой части. В силу своей гидрофобности, обусловленной высоким процентом неполярных аминокислот, белок ПЛ имеет тенденцию к агрегации и потере растворимости, особенно по мере удаления липидов. В связи с этим, хотя уже начато исследование аминокислотной последовательности белка ПЛ, выделенных из белого вещества мозга и миелина [2, 6], вопрос о присутствии одной или нескольких полипептидных цепей и истинном молекулярном весе этого белка остается до сих пор нерешенным. Разноречивые данные получены также относительно амино-, и карбоксиконцевых аминокислот белка ПЛ [7, 9, 10]. Полагают, что в силу своих особых свойств он может адсорбировать на себе некоторые аминокислоты, которые в дальнейшем составляют примесь к N- и C-концевым аминокислотам при их определении [10].

Нами была поставлена цель проследить еще раз за N-концевыми аминокислотами ПЛ, выделенных из серого и белого вещества мозга крупного рогатого скота. В настоящем сообщении приводятся данные только качественного определения.

Материал и методика. Мозг крупного рогатого скота доставляли на льду с мясокомбината сразу после убоя. Серое вещество снимали со всей поверхности больших полушарий, белое—из области centrum semiovale. Липидные экстракты, содержащие ПЛ, получали и отмывали по методу Фолча и др. [3]. ПЛ выделяли методом эмульгирования—центрифугирования [4]. Полученные этим методом препараты очищенных ПЛ (НПЛ), содержащих 50—55% белка, подвергали лиофилизации и для очистки промывали 3—4 раза 600-кратным объемом смеси спирт—эфир 1:1. Очищенные таким образом ПЛ (ОПЛ) содержали 85—90% белка и 10—15% липидов.

НПЛ и ОПЛ, выделенные из серого и белого вещества мозга, подвергали дансильрованию модифицированным методом Грос и Лабусси [5, 11], приспособленным для работы с нерастворимыми белками [9]. Использовали дансил-хлорид фирмы Fluka, Швейцария. Высушенный осадок белка после дансильрования гидролизовали в вакууме с 2 мл 6 N HCl при 110° в течение 4 или 16 ч. Высвобожденные в ходе гидролиза ϵ -ДНС-лизин и ДНС-сульфовую кислоту, которые могли помешать идентификации некоторых аминокислот на тонкослойных пластинах, отделяли от ДНС-аминокислот вторичным распределением между равными объемами 0,02 M ацетатного буфера (pH 3,8) и этилацетата. Комбинированные верхние этилацетатные фазы досуха выпаривали, растворяли в смеси гептан—бутанол—уксусная кислота (3:3:1, объем/объем) и соответствующие количества наносили на пластины, покрытые силикагелем G (фирма Sigma, США), размером 6×6 см. Хроматографирование проводили в двух направлениях: первое—в системе диэтиловый эфир—метанол—ледяная уксусная кислота (100:5:1); второе—метилацетат—изопропанол—аммоний гидроксид (9:7:4). Пластины просматривали в ультрафиолете. В качестве свидетелей использовали ДНС-аминокислоты фирмы Sigma (США).

Результаты и обсуждение. При тонкослойной хроматографии ОПЛ из белого вещества мозга, подвергнутых дансильрованию и 4-часовому гидролизу, выявлялось в основном два пятна, соответствующих глицину и серину (рис., I), причем серин происходит, по-видимому, из липидного компонента ПЛ. На хроматограммах НПЛ, кроме этих пятен, присутствовало также пятно ДНС-этанолamina, тоже липидного происхождения, так как на хроматограммах ОПЛ этого пятна не было. После 16-часового гидролиза дансильрованных НПЛ и ОПЛ из белого вещества мозга на тонкослойных пластинах, наряду с вышеуказанными аминокислотами, выявлялись следы глутаминовой и аспарагиновой кислот (рис., II).

Таким образом, по нашим данным, N-концевой аминокислотой ПЛ из белого вещества мозга является глицин, что совпадает с результатами работ по определению N-концевой аминокислотой последовательности ПЛ [2, 6, 8]. Викарт и Лис при исследовании N-концевых аминокислот белка ПЛ из белого вещества мозга крупного рогатого скота нашли, наряду с глицином, также заметные количества глутаминовой кислоты [9]. Виггинс и др. обнаружили, наряду с глицином, присутствие определенных количеств глутаминовой, аспарагиновой кислот и аланина в составе N-концевых аминокислот ПЛ, выделенных из миелина [10].

Как видно из рис. (III), на тонкослойных хроматограммах ОПЛ из серого вещества мозга крупного рогатого скота, подвергнутых дансильрованию и 4-часовому гидролизу, выявляется три пятна, соответствующих аспарагиновой кислоте, глицину и серину. На хроматограммах НПЛ, как и в белом веществе, присутствовало также пятно ДНС—этанолamina. 16-часовой гидролиз ОПЛ из серого вещества приводит, как и в белом, к высвобождению, кроме указанных аминокислот, также незначительных количеств глутаминовой кислоты, которая выявляется на хроматограммах в виде очень бледного пятна (рис., VI).

Согласно приведенным данным, N-концевыми аминокислотами ПЛ из серого вещества мозга являются глицин и аспарагиновая кислота,

что совпадает с данными Викеарт и Лис [9]. Однако у этих авторов в составе N-концевых аминокислот ПЛ из серого вещества мозга присутствует также определенное количество глутаминовой кислоты, которая в наших опытах выявляется в следовых количествах только после 16-часового гидролиза.

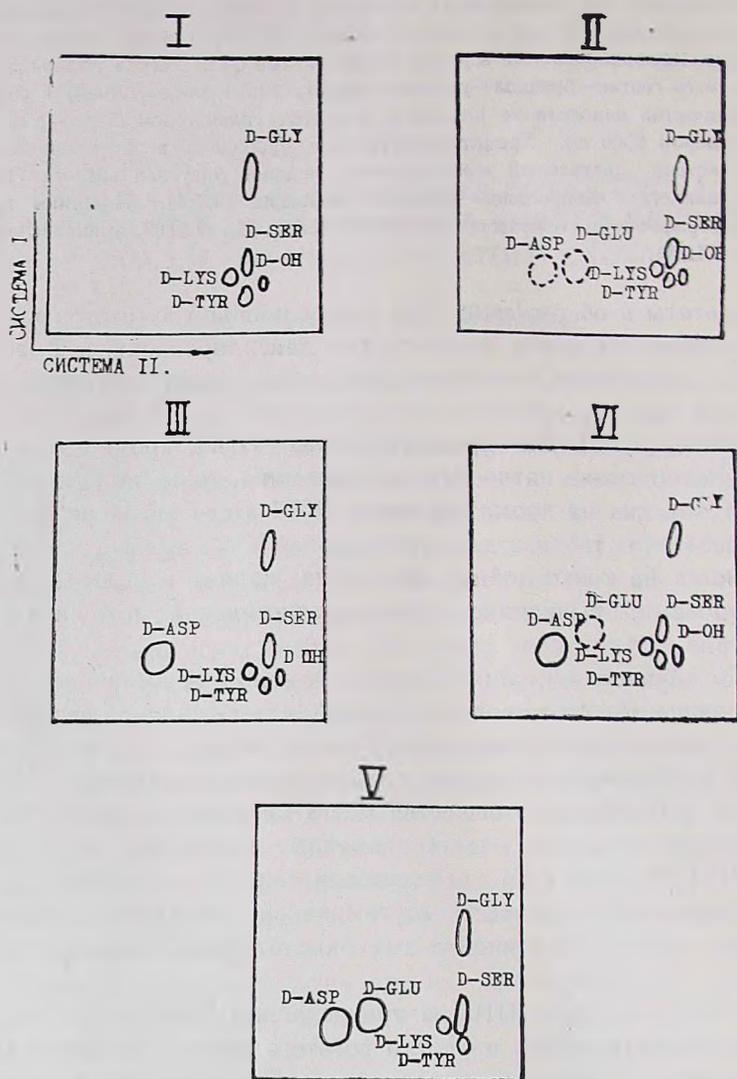


Рис. Двухмерная тонкослойная хроматография ОПЛ мозга крупного рогатого скота после дансирования и кислотного гидролиза. I—белое вещество, 4-часовой гидролиз; II—белое вещество, 16-часовой гидролиз; III—серое вещество, 4-часовой гидролиз; VI—серое вещество, 16-часовой гидролиз; V—стандартная смесь аминокислот (контроль).

Следует отметить, что на хроматограммах ПЛ как из белого, так и серого вещества мозга, наряду с вышеуказанными аминокислотами, выявлялись также пятна, соответствующие ϵ -ДНС-лизину и o -ДНС-ти-

розину, которые образуются из внутренних аминокислотных остатков белка.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 18.VII 1980 г.

ԽՈՇՈՐ ԵՂՋԵՐԱՎՈՐ ԿԵՆՌԱՆԻՆԵՐԻ ՍՊԻՏԱԿ ԵՎ ԳՈՐՇ
ՆՅՈՒԹԻ ՊՐՈՏԵՈԼԻՊԻՆԵՐԻ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԻ Ն-ՄԱՅՐԱՅԻՆ
ԱՄԻՆԱԹՔՈՒՆԵՐԸ

Տ. Ի. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Կ. Հ. ՄԱՆՈՒԿՅԱՆ

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ խոշոր եղջերավոր կենդանիների գլխուղեղի սպիտակ նյութից անջատված պրոտեոլիպիդների սպիտակուցի N-ծայրային ամինաթթուն գլիցինն է, իսկ գորշ նյութի պրոտեոլիպիդներինը՝ գլիցինը և ասպարագինաթթուն:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Манукян К. Г. Вопросы биохимии мозга, 13, 86, Ереван, 1979.
2. Chan D. S., Lees M. B. J. Neurochem., 30, 983, 1978.
3. Folch J., Lees M. B., Sloane-Stanley G. H. J. Biol. Chem., 226, 497, 1957.
4. Folch J., Webster G. R., Lees M. B. Feder. Proc., 18, 228, 1959.
5. Gros C., Labouesse B. Eur. J. Biochem., 7, 463, 1969.
6. Jollès J., Nussbaum J.-L., Schoentgen F., Mandel P., Jollès P. Febs Letters, 74, 190, 1977.
7. Vacher-Lepêtre M., Nicol C., Alfsen A., Jollès J., Jollès P. Biochim. Biophys. Acta, 420, 323, 1976.
8. Nussbaum J. L., Rouayrenc J. F., Mandel P., Jollès J., Jollès P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 57, 1240, 1974.
9. Whitehart D. R., Lees M. B. J. Neurochem., 20, 1303, 1973.
10. Wiggins R. C., Del Valle U., Joffe S. J. Neurochem., 22, 337, 1974.
11. Zanetta J. P., Vincendon G., Mandel P., Gombos G. J. Chromatog., 51, 441, 1970.