

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Афифи А., Эйзен С. Статистический анализ. Подход с использованием ЭВМ. М., 1982.
2. Ластей Л. Введение в проблему принятия решений и медицине. М., 1971.
3. Ордукхян А. А., Налбандян С. Г. 1-я Всесоюз. конф. «Физиология, патофизиология и фармакология мозгового кровообращения». Тез. докл., 131. Ереван, 1984.
4. Ордукхян А. А., Джугарян К. М., Степанян К. Г. В сб.: Актуальные вопросы кардиологии, 34—35, Ереван, 1982.
5. Ордукхян А. А., Джугарян К. М., Оганесян Н. М., Бабалян А. С., Степанян К. Г. 1-й Всесоюз. биофиз. съезд, 2, 175. М., 1982.
6. Розен Р. Принцип оптимальности в биологии. М., 1969.
7. Сокал Р. В сб.: Классификация и кластер. Под ред. Дж. Вэн Райзинга, 7—18. М., 1980.
8. Соломон Г. В сб.: Классификация и кластер. Под ред. Дж. Вэн Райзинга, 129—117, М., 1980.
9. Ту Дж., Гонсалес Р. Принципы распознавания образов, М., 1978.
10. Хант Э. Искусственный интеллект, М., 1978.
11. Bayne C. et al. *Phil. Rec.*, 12, 2, 51—63, 1980.
12. Bourne L. *Human conceptual behavior*, Boston, 1966.
13. Conlgham K. *Computer J.*, 15, 3, 209—213, 1972.
14. Dubes R., Jain A. *Phil. Rec.*, 8, 4, 247—261, 1976.
15. Dubes R., Jain A. *Phil. Rec.*, 11, 4, 235—255, 1979.
16. Milligan G. *Psychometrika*, 46, 2, 187—199, 1981.
17. Smith S., Dubes R. *Phil. Rec.*, 12, 3, 177—189, 1980.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 9, с. 768—772, 1986

УДК 577.154.5

ОЧИСТКА ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ ПОЧЕК КРОЛИКА

А. В. АНАНЬЕВ, Х. О. БЕЗИРДЖЯН, Ж. И. АКОПЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР,
лаборатория молекулярной энзимологии, Ереван.

Аннотация — Выделена пуриинуклеозидфосфорилаза (КФ—2.4.2.1) из почек кролика. В результате шести стадий очистки с использованием фракционирования сульфатом аммония и колоночной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и гидроксилапатите получен электрофоретически гомогенный препарат. Фермент специфичен к нуклеозидам гипоксантина, гуанина, а также к ксантозину, но не расщепляет нуклеозиды аденина.

Անոտացիա — Կատարվել էրիկամներից անջատված է պուրինուկլեոզիդֆոսֆորիլազա (ԷԿ— 2. 4. 2. 1)։ Օգտագործելով մաքրման վեց փուլեր, որոնք ընդգրկում էև բաժանումը ամոնիումի սուլֆատով և զրոմատոգրաֆիան ԴԵԱԷ-ցելլուլոզի ու հիդրոքսիլապատիտի սյուներում, ստացված է էլեկտրաֆորետիկ հոմոգեն պատրաստով։ Ֆերմենտը սպեցիֆիկ է հիպոքսանտինի և գուանինի նուկլեոզիդներին, ինչպես նաև քսանտոզինի նկատմամբ, բայց չի տրոհում ադենինի նուկլեոզիդները։

Abstract — Purine nucleoside phosphorylase (EC—2.4.2.1) from rabbit kidney has been isolated. The six-step purification procedure by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

fractionation and column chromatography on DEAE-cellulose and hydroxylapatite has resulted in the receipt of an electrophoretically homogeneous preparation.

Enzyme is specific to nucleosides of hypoxanthine, guanine, and xanthosine, too, but is not specific to nucleosides of adenine.

Ключевые слова: пури nukлеозидфосфорилаза, гомогенность фермента, субстратная специфичность.

Пури nukлеозидфосфорилаза (КФ—2.4.2.1) выполняет и анаболическую, и катаболическую функции в метаболизме пуриновых nukлеозидов. Возросший интерес к ней обусловлен еще и тем обстоятельством, что недостаточность клеточного иммунитета, по-видимому, связана также с понижением уровня активности этого фермента [10]. Пури nukлеозидфосфорилаза выделена из ряда биологических объектов [3, 5—9, 11—13, 15, 17]. Данные по очистке из почек кролика представляются впервые.

Материал и методика. Работа была выполнена в лаборатории молекулярной энзимологии ИЭВ АН АрмССР в 1985 г. Все операции по очистке фермента проводили при 1°. На всех стадиях очистки центрифугирование проводили при 15000 г в течение 20 мин. Колонки были предварительно уравновешены стартовыми буферами.

Кроликов забивали деканитацией. Почки быстро извлекали, кровь удаляли перфузией буфером А (0.1 М трис—HCl, pH 7.2, 2 mM ЭДТА). Затем почки (47 г) измельчали ножницами, промывали буфером А, добавляли 180 мл того же буфера, гомогенизировали в гомогенизаторе MPW 302 (ГНР) в течение 7 минут. Гомогениат центрифугировали. Белки на осадочной жидкости фракционировали сульфатом аммония (35—80% насыщения). Осадок растворяли в буфере Б (20 mM трис—HCl, pH 7.6, 2 mM ЭДТА) и диализовывали в течение 14 ч против буфера Б. Диализованный препарат наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (1.6×34 см). Фермент элюировали линейным градиентом NaCl (40—0.1 М) на буфере Б. Скорость элюции—9 мл/ч. Активные фракции объединяли и наносили на колонку с гидроксиллапатитом (1.6×15 см). Колонку промывали 40 mM Na-фосфатным буфером, pH 6.9. Пури nukлеозидфосфорилазу элюировали линейным градиентом Na-фосфатного буфера (40—160 mM). Объединенные активные фракции вновь фракционировали сульфатом аммония (45—70% насыщения). Осадок растворяли в буфере Б и диализовывали против этого же буфера. Диализованный ферментный препарат наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (1.6×22 см). Колонку промывали 40 mM NaCl на буфере Б, а затем фермент элюировали линейным градиентом NaCl (40—250 mM) на буфере Б. Фракции, обладающие ферментативной активностью объединяли и наносили на колонку (1.6×7 см) с гидроксиллапатитом. Колонку промывали 40 mM Na-фосфатным буфером, pH 6.9, а затем элюировали линейным градиентом Na-фосфатного буфера (40—100 mM). Объединенные активные ферментативные фракции для концентрирования наносили на колонку (0.9×2.5 см) с гидроксиллапатитом и элюировали 200 mM Na-фосфатным буфером. Активные фракции объединяли и хранили в 40%-ном глицерине при —18°.

Пури nukлеозидфосфорилазную активность определяли колориметрически.

1 метод—по приросту окисления [2].

II метод—по приросту рибозы-1-фосфата, по цветной реакции рибозы с орпинном [1]. Реакционная смесь содержала 100 mM Na-фосфата, pH 7.0, 1.5 mM рибонуклеотид, 12 ME фермента в конечном объеме 0.3 мл. Реакцию останавливали 0.3 мл 0.1 М NaAc, pH 3.8, содержащим 10% активированного угля. Смесь кипятили 30 сек, фильтровали, в фильтрате определяли содержание рибозы [1]. Для стабилизации окраски объем раствора доводили до 2.8 мл 95%-ным этанолом.

III метод—по приросту дезоксирибозо-1-фосфата, по цветной реакции окисленной дезоксирибозы тиобарбитуровой кислотой [14]. Реакционная смесь содержала 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{--NaOH}$, pH 6.8, 1.5 mM дезоксирибонуклеозид, 0.8–1.2 ME фермента; концен-

ный объем—0,2 мл. Реакцию останавливали добавлением 80 мкл 15 М H_2IO_6 в 0,03 н. H_2SO_4 , а не 0,125 н. во избежание неферментативного расщепления нуклеозидов, при этом pH снижался до 2,5. Далее, как в оригинальном методе [14]. Для стабилизации окраски объем раствора доводили до 2,8 мл изопропанолом. Во всех экспериментах по колориметрическому определению ферментативной активности длительности инкубации, проводимой при 37°, была равна 6 мин.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [16], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили при pH 8,9 в 6,2%-ном ПЛАГ. Белки окрашивали 0,2%-ным водным раствором кумасси R-250, содержащим 10% уксусной кислоты, 25% этанола. Для идентификации пуриннуклеозидфосфорилазной активности после электрофореза гели инкубировали в течение 1 ч при 37° в 80 мМ натрий-арсенитном буфере, pH 6,8, содержащем 1 мМ гуанозин, затем свободную рибозу окрашивали трифенилтетразолием [4].

Результаты и обсуждение. По описанной выше методике из почек кролика была выделена пуриннуклеозидфосфорилаза: двукратным фракционированием сульфатом аммония, двукратной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе и двукратной хроматографией на гидроксилапатите.

Схема очистки пуриннуклеозидфосфорилазы из почек кролика

Стадия очистки	Объем, мл	Концентрация, ед/мл	Общее число, ед.	Общее количество белка, мг	Удельная активность	Выход, %	Степень очистки
Исходный экстракт	210	0,24	50,82	2316,3	0,022	100	0
I осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, фракция 35–80%	130	0,35	45,11	983	0,016	89	2,1
I хроматография на ДЭАЭ — целлюлозе	93	0,48	44,64	231,1	0,188	85	8,5
I хроматография на гидроксилапатите	53	0,42	22,10	23,2	0,954	44	43,4
II осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, фракция 45–70% насыщенный	21	0,92	19,26	13,7	1,41	31	61,1
II хроматография на ДЭАЭ — целлюлозе	255	0,07	18,18	10,2	1,75	31	80,7
II хроматография на гидроксилапатите	—	1,63	13,06	1,1	12,28	26	558,1

Активность определяли методом 1; субстрат—1 мМ гуанозин и 50 мМ Δ -п-фосфатного буфера.

литс. Кривые элюирования белка и пуриннуклеозидфосфорилазы с колонок ДЭАЭ целлюлозы и гидроксилапатита припедены на рис. 1, 2. Схема очистки пуриннуклеозидфосфорилазы из почек кролика приведена в таблице.

В результате всех использованных этапов достигнута 558-кратная очистка фермента, с выходом общей активности 26%. При диск-электрофорезе очищенного препарата фермента обнаруживается одна белковая полоса, совпадающая с пуриннуклеозидфосфорилазной активностью (рис. 3).

Субстратная специфичность пуриннуклеозидфосфорилазы из почек кролика была изучена как по фосфоролizu, так и по синтезу нуклеозидов. Относительная скорость фосфоролиза (pH инкубационной смеси 7) для инозина—100, гуанозина—73, дезоксигуанозина—66, дезоксиинозина—55, ксантина—4, дезоксиаденозина—4, аденозина—0%.

При отсутствии в реакционной смеси ионов фосфата не происходит расщепления нуклеозидов, что свидетельствует о фосфоролитическом характере реакции. Относительная скорость синтеза (рН инкубационной

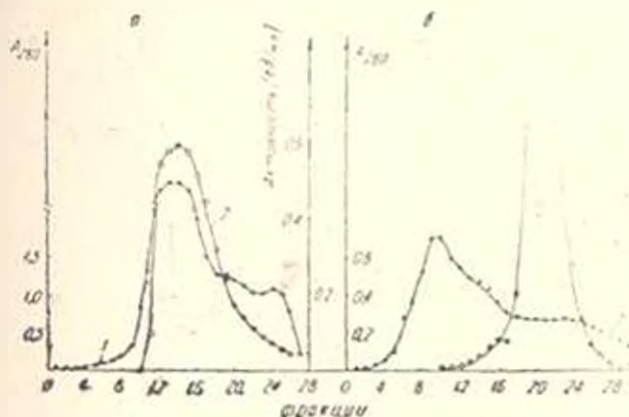


Рис. 1 а) Кривые элюирования белка и пурииннуклеозидфосфорилазы при последовательной хроматографии экстракта почек кролика на I ДЭАЭ-целлюлозе. 1—оптическая плотность при 280 нм, 2—пурииннуклеозидфосфорилазная активность (ед/мл), определявшаяся методом I. б) Кривые элюирования белка и пурииннуклеозидфосфорилазы при последовательной хроматографии на I гидроксипатите. 1—оптическая плотность при 280 нм, 2—пурииннуклеозидфосфорилазная активность (ед/мл), определявшаяся I методом.

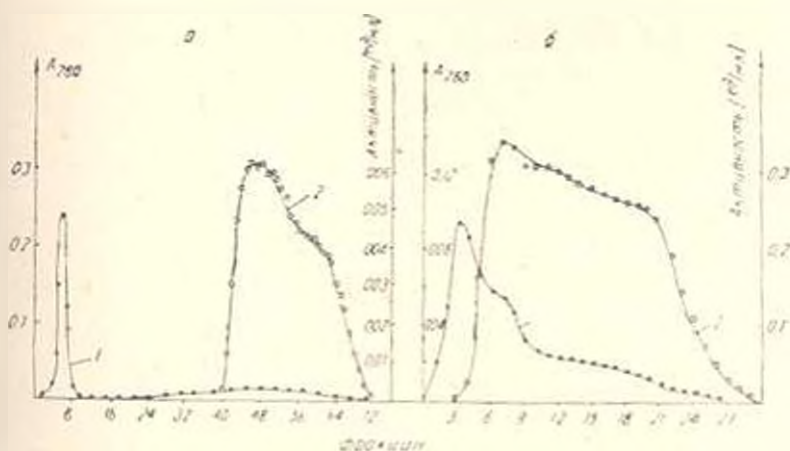


Рис. 2 а) Кривые элюирования белка и пурииннуклеозидфосфорилазы при последовательной хроматографии на II ДЭАЭ-целлюлозе. 1—оптическая плотность при 280 нм, 2—пурииннуклеозидфосфорилазная активность (ед/мл), определявшаяся методом I. б) Кривые элюирования белка и пурииннуклеозидфосфорилазы при последовательной хроматографии на II гидроксипатите. 1—оптическая плотность при 280 нм, 2—пурииннуклеозидфосфорилазная активность (ед/мл), определявшаяся методом I.

смеси 7) инозина—100, гуанозина—26, ксантозина—10, аденозина—0. Субстратную специфичность пурииннуклеозидфосфорилазы к нуклеозидам определяли II методом, а к дезоксирибонуклеозидам—III методом.

Настоящая работа является первым этапом исследований пури-
нуклеозидфосфорилазы из почек кролика. Так как были обнаружены
различия в физико-химических свойствах пури-нуклеозидфосфорилазы

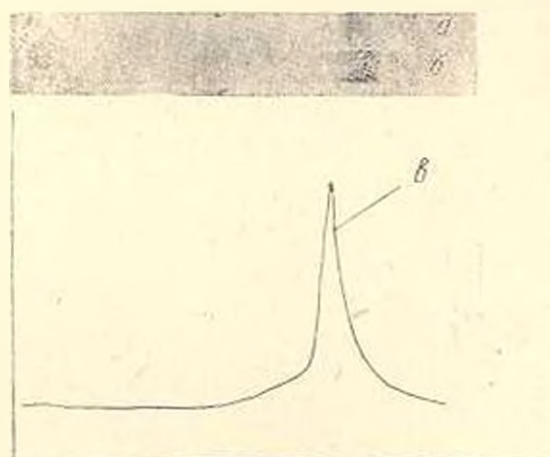


Рис. 3. Определение гомогенности пури-нуклеозидфосфорилазы методом
диск-электрофореза и полиакриламидном геле: а—окраска по белку, б—
окраска по пури-нуклеозидфосфорилазной активности, в—денситограм-
ма гели «а».

почек и других органов кролика, дальнейшее изучение этого фермента
считаем целесообразным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Филиппович Ю. Б., Есорова Т. А., Севастьянова Г. А. В кн.: Практикум по об-
щей биохимии. 222, 1982.
2. Ahmad S. I., Pritchard R. H. Mol. and Gen. Genet., 104, 351—356, 1969.
3. Edwards P. H., Edwards P. A. and Hopkinson D. A. FEBS letters, 23, 235—244
1973.
4. Gabriel O., Wang S.-F. Anal. Biochem., 27, 545—554, 1969.
5. Hoffes P. A., Jones H. E. In: Methods in Enzymol., New York e. a., Acad. Press
51, 524—530, 1978.
6. Lewis A. S. Arc. of Biochem. and Biophys., 190, 2, 662—670, 1978.
7. Lewis A. S., Glantz M. D. Biochemistry, 15, 20, 4451—4457, 1976.
8. Lewis A. S. and Lowy B. A. Journal of Biol. Chem., 254, 19, 9927—9932, 1979.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Journal of Biol. Chem.
193, 1, 265—275, 1951.
10. Martin D. W., Jr. In: Ann. Rev. Biochem., 50, 351—356, 1981.
11. Milman G., Anton D. L. and Weber J. L. Biochemistry, 15, 23, 4967—4972, 1976.
12. Moyer T. P., Fisher A. G. Arc. of Biochem. and Biophys., 174, 2, 622—629, 1976.
13. Murakami K., Tsushima K. Biochim. Biophys., acta., 453, 205—211, 1976.
14. Saslow L. D., Waravdekar V. S. Methods Enzymol., 12, 108—113, 1976.
15. Savage D. and Sprhiser N. Biochemistry, 15, 20, 4451—4457, 1976.
16. Schimadte C. M., Tanigoshi L., Mole L., Sherman I. W. J. of Biol. Chem., 260,
7, 4455—4460, 1985.
17. Unemura S., Nishino T., Murakami K., Tsushima K. J. of Biol. Chem., 257, 22,
13374—13378, 1982.

Поступило 26.11 1986 г