

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА Cu-, Zn-СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ ИЗ СЕЛЕЗЕНКИ

М. А. СИМОНЯН

Институт биохимии АН Армянской ССР, лаборатория  
физической химии белков, Ереван

**Аннотация** — Из селезенки крупного рогатого скота была выделена и очищена до электрофоретически гомогенного состояния Cu-, Zn-супероксиддисмутаза, оптические, ЭПР спектры, молекулярный вес и активность которой соответствовали таковым Cu-, Zn-супероксиддисмутаза, выделенной из других объектов. Однако фермент из селезенки более чувствителен к инактивирующему действию перекиси водорода, чем фермент из крови или печени. Количество Cu-, Zn-супероксиддисмутаза в селезенке составляет 30—35 мг/кг ткани

**Անոտացիա** — հեղուր եղջերավոր անասունի փայծաղից անջատվել է միևնույն էլեկտրաֆորետիկորեն հոմոգեն վիճակի մարրվել է Cu-, Zn-սուպերօքսիդդիսմուտազան, որն օժտված է այլ օրգաններից անջատված Cu-, Zn-սուպերօքսիդդիսմուտազաների բնորոշ օպտիկական, էՊՐ սպեկտրներով, մոլեկուլային կշռով և ակտիվությամբ: Անկայն փայծաղից անջատված ֆերմենտը արյունից և լյարդից անջատված նույն ֆերմենտի համեմատությամբ ավելի զգայուն է  $H_2O_2$ -ի ակտիվացրկող ազդեցության նկատմամբ: Cu-, Zn-սուպերօքսիդդիսմուտազայի քանակությունը 1 կգ փայծաղում կազմում է 30—35 մգ:

**Abstract** — Cu/Zn-superoxide dismutase has been isolated and purified from bovine spleen to electrophoretically homogeneous state. This preparation has optical, EPR spectra, molecular weight and enzymatic activity, which are characteristic of the superoxide dismutases, isolated from other sources. However, hydrogen peroxide more easily inactivates this enzyme, than superoxide dismutase from blood or liver. The quantity of Cu/Zn-superoxide dismutase in the spleen is 30—35 mg/kg of the tissue.

**Ключевые слова:** селезенка, Cu-, Zn-супероксиддисмутаза.

Почти во всех органах животного, в том числе и в селезенке, обнаружена супероксиддисмутазная активность [1, 5]. Медь-, цинк-содержащая супероксиддисмутаза (Cu-, Zn-СОД) выделена и очищена из различных тканей: печени и почек [1, 6], мозга [2], сердца [8], глаза [4], крови [9] и других объектов [3]. По своим ферментативным свойствам эти Cu-, Zn-СОД в основном не отличаются друг от друга. Однако до настоящего времени в литературе не описан метод препаративного выделения и очистки Cu-, Zn-СОД из селезенки.

Цель настоящей работы состояла в разработке методики препаративного выделения, очистки и идентификации Cu-, Zn-СОД из селезенки крупного рогатого скота. Это позволит изучить характерные изменения свойства фермента в указанном органе при различных патологических состояниях.

**Материал и методика.** Для выделения Cu-, Zn-СОД из селезенки были использованы ацетон, хлороформ, этанол и сульфат аммония. Очистку фермента проводили на целлюлозах ДЭ-52 и КМ-52 (Whatman, Англия) и сефадексах G-75 и ДЭАЭ А-50

(Pharmacia, Швеция). Содержание белка во фракциях оценивали по поглощению при 260 нм. Содержание меди в полученном ферменте определяли при помощи тетраэтилтиурамидсульфата [11], а также методом двойного интегрирования ЭПР спектров замороженных растворов, используя в качестве стандарта комплекс меди с ЭДТА. Молекулярный вес белка определяли электрофоретически после его предварительной инкубации в смеси S-меркаптоэтанола, мочевины и додецилсульфата по методу Вебера-Осборна [15]. Аналитический электрофорез в 7%-ном полиакриламидном геле проводили по методу Дэвиса [6].

В целях изучения влияния перекиси водорода на активность супероксиддисмутазы последнюю инкубировали (30 сек при 20°) в растворе 0.1 М  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 0.05 мл фермент добавляли к 2 мл раствора супероксидных радикалов ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), генерированных при расщеплении 0.1 М  $\text{H}_2\text{O}_2$  при pH 11. Концентрацию  $\text{O}_2^{\cdot-}$  определяли путем сравнения интегральных интенсивностей ЭПР спектров  $\text{O}_2^{\cdot-}$  и низкоэнергетических радикалов определяемой концентрации.

ЭПР спектры регистрировали при  $-190^\circ$  на приборе «Varian E-4» (США) в кварцевых ампулах с внутренним диаметром 3 мм при следующих условиях: микроволновая частота—9.08 Гц, микроволновая мощность—10 мВт, амплитуда модуляции—10 гаусс, постоянная времени—0.3 сек.

Оптические спектры поглощения записывали на приборе «Beckman-26» (США) в сантиметровых кюветках при комнатной температуре.

При выделении фермента из селезенки использовали центрифугу К-70 м (ГДР).

**Результаты и их обсуждение.** 5 кг селезенки гомогенизировали в 10 л холодного ацетона. Гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин, 10 мин. Полученный осадок в аналогичных условиях повторно гомогенизировали в ацетоне. Гомогенат центрифугировали, и осадок высушивали проветриванием до получения сухого порошка. После добавления к последнему 10 л 0.05 М калий фосфатного буфера (pH 7.4) и перемешивания смеси в течение 3-х ч (при 10°) ее центрифугировали при 6000 об/мин в течение 40 мин. К полученным 6 л супернатанта добавляли 1.5 л спирта и 0.9 л хлороформа. После интенсивного перемешивания смеси в течение 20 мин ее центрифугировали при 6000 об/мин 20 мин. Далее к полученному супернатанту добавляли сульфат аммония (при 20°) до насыщения. Через 30—40 мин, центрифугированием в течение 30 мин при 6000 об/мин, собирали осадок. Последний смешивали с водой и ставили на диализ против воды в течение 22—24 ч с трехкратной сменой ее.

После диализа смесь центрифугировали в аналогичных условиях и полученный супернатант (1,2 л) пропускали через колонку с КМ-52 целлюлозой (4×6 см), уравновешенную 0.01 М калий фосфатным буфером, pH 7.4 (в дальнейшем использовали этот буфер разной молярности). Не задерживающуюся на КМ-52 фракцию наносили на колонку с ДЭ-52 целлюлозой (5×12 см), уравновешенную 0.01 М буфером. Фракцию с супероксиддисмутазной активностью элюировали 0.01 М буфером (0.7 л) и после разбавления ее водой в 4 раза пропускали через ДЭ-52 целлюлозу (4×6 см). Cu-, Zn-СОД элюировали 0.2 М буфером.

Таким образом получали 6 мл раствора супероксиддисмутазы с поглощением при 680 нм ( $A_{680}$ ), равным 0.208. Далее белок очищали гель-фильтрацией на колонке с G-75 (3×90 см), уравновешенной 0.01 М буфером. СОД-активные фракции собирали и наносили на колонку с ДЭАЭ А-50 сефадексом (4×6 см), уравновешенную 0.01 М буфером. Затем эту колонку промывали 0.005 М (200 мл), далее 0.008 М буфером,

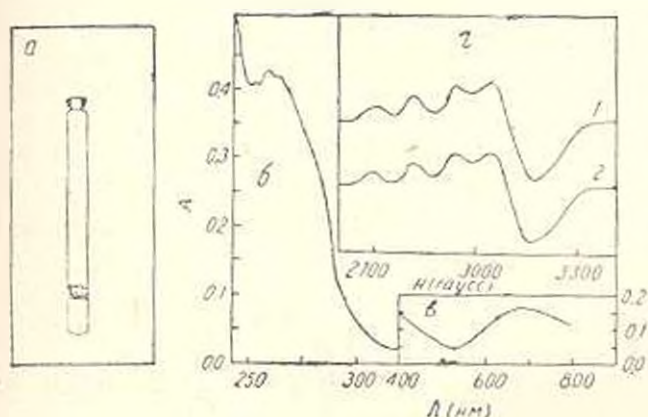
и  $\text{Cu}$ -,  $\text{Zn}$ -СОД (15 мл) элюировали 0,2 М буфером. После разбавления этой фракции СОД в 100 раз ее дополнительно очищали и концентрировали на ДЭ-52. На этой стадии получали 6,2 мл СОД с  $A_{680} = 0,163$ , а отношение  $A_{260}/A_{680} = 35$ .

Ход очистки фермента поэтапно приведен в табл. 1. В результате такой очистки был получен электрофоретический гомогенный препарат супероксиддисмутазы (рис., а).

Таблица 1. Ход выделения и очистки  $\text{Cu}$ -,  $\text{Zn}$ -супероксиддисмутазы из селезенки крупного рогатого скота

| Этапы очистки                                                                             | Объем, мл | Поглощение при 680 нм | Выход, % |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------------------|----------|
| Супернатант после смешивания ацетонового порошка с буфером                                | 10 000    | —                     | —        |
| Супернатант после обработки спирт-хлороформом                                             | 11 000    | —                     | —        |
| Супернатант после осаждения белков сульфатом аммония, растворения осадка в воде и диализа | 1200      | 0,0013                | 100      |
| Белковая фракция после хроматографирования на КМ-52 и ДЕ-52                               | 700       | 0,0012                | 92       |
| Белковая фракция после гель-фильтрации на О-75                                            | 6         | 0,208                 | 84       |
| $\text{Cu}$ -, $\text{Zn}$ -СОД после хроматографирования на ДЕАЕ А-50                    | 15        | 0,08                  | 73       |
| Фермент после хроматографирования и концентрирования на ДЕ-52                             | 6,2       | 0,163                 | 67       |

Количество атомов меди на молекулу белка, оцененное по методу [11] и по ЭПР спектрам, равно двум. Оптические и ЭПР спектры СОД из селезенки (рис., б, в и г) полностью совпадают с таковыми СОД из других источников. Молекулярный вес  $\text{Cu}$ -,  $\text{Zn}$ -СОД из селезенки равен 32600 дальтон.



Электрофореграмма из 7%-ном полиакриламидном геле (а), оптические (б, в) и ЭПР (1—2) спектры  $\text{Cu}$ -,  $\text{Zn}$ -СОД из селезенки (в) печени или крови—г—1). При записи спектра 1-6 раствор фермента разбавляли в 14 раз.

$\text{Cu}$ -,  $\text{Zn}$ -СОД, полученные из селезенки, крови и печени, имеют одинаковую ферментативную активность. Однако СОД, выделенная из селезенки, более чувствительна к инактивирующему действию перекиси водорода [12, 14], чем СОД из печени и эритроцитов крупного рогатого скота (табл. 2).

Таблица 2. Влияние перекиси водорода на активность Cu-, Zn-СОД

| Cu/Zn—СОД ( $10^{-8}$ М)  | Количество дисмугнированных $O_2^-$ (М) |                                                  |
|---------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------|
|                           | без инкубации фермента с $H_2O_2$       | при инкубации фермента (30 сек) с 0,1 М $H_2O_2$ |
| Из селезенки              | $4,2 \times 10^{-4} \pm 0,2$            | $2,5 \times 10^{-4} \pm 0,5$                     |
| Из печени или эритроцитов | $3,6 \times 10^{-4} \pm 0,4$            | $4,1 \times 10^{-4} \pm 0,2$                     |

Таким образом, в одном кг селезенки крупного рогатого скота содержится 30—35 мг Cu-, Zn-СОД, и по предлагаемому методу из 5 кг селезенки можно выделить и очистить 100—120 мг гомогенного препарата СОД.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Григорян Н. А., Гюльхандянк Г. В., Симонян М. А., Налбандян Р. М. Биохимия, 42, 8, 1499—1506, 1977.
2. Шаролян С. Г., Шалджян А. А., Налбандян Р. М., Бумягян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 2, 105—115, Ереван, 1976.
3. Фридоович И. В кн.: Свободные радикалы в биологии. 1, 273—311, 1979.
4. Bensinger R. E., Crabb J. W. Exp. Eye. Res., 34, 4, 623—627, 1982.
5. Davis B. Y. N.-Y., Acad. Sci., 121, 424—427, 1964.
6. Gershon D. Eur. J. Biochem., 63, 2, 617—623, 1976.
7. Hartz J. W., Funakoshi S., Deutsch H. F. Clin. Chim. Acta, 46, 2, 125—132, 1973.
8. Keele B. B., McCord J. M., Fridovich I. J. Biol. Chem., 246, 2875—2880, 1971.
9. McCord J. M., Fridovich I. J. Biol. Chem., 244, 22, 6045—6055, 1969.
10. Marklund S. L. Biochem. J., 222, 3, 649—655, 1984.
11. Matsuba J., Takahashi J. Anal. Biochem., 36, 1, 182—191, 1970.
12. Stet P. M., Garber P. Arch. Biochem. Biophys., 212, 2, 68—72, 1981.
13. Symonjan M. A., Nalbandyan R. M. Biochim. Biophys. Acta, 583, 3, 279—286, 1979.
14. Symonjan M. A., Nalbandyan R. M. FEBS Letters, 28, 1, 22—24, 1972.
15. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 244, 16, 4406—4412, 1969.

Поступило 13.III 1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 9, с. 776—780, 1986

УДК 577.1:577.151

## ОЧИСТКА ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ПЕЧЕНИ ЛЯГУШКИ

Р. Р. ПЕТОЯН, М. А. ДАВТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии

Аннотация — Разработан способ очистки оксидазы D-аминокислот печени лягушки без использования стабилизаторов. Степень очистки фермента равна 1013,5.

Անոտացիա — Մշակվել է զորտի լյարդից D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվ չափանշանների մաքրման մեթոդը, Ֆերմենտի մաքրման աստիճանը հավասար է 1013,5: