

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

Cu/Zn-СОД (10^{-8} М)	Количество дисмутированных 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.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Григорян Н. А., Гюльхандян Г. В., Симонян М. А., Налбандян Р. М. Биохимия, 42, 8, 1499—1506, 1977.
2. Шаролян С. Г., Шалджян А. А., Налбандян Р. М., Бунятыян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 2, 105—115, Ереван, 1976.
3. Фридович И. В кн.: Свободные радикалы в биологии. 1, 273—311, 1979.
4. Benninger 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 գորտի լյարդից D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվ և անհրաժեշտ ստաբիլիզատորների մաքրման մեթոդ. Ֆերմենտի մաքրման աստիճանը հավասար է 1013,5:

Abstract — The method of purification of D-amino acid oxidase from frog liver without stabilizers has been developed. The degree of purification of the enzyme is 1013,5.

Ключевые слова: лягушка *Rana ridibunda*, оксидила D-аминокислот, КМ-целлюлоза.

Изучение оксидазы D-аминокислот приобретает в настоящее время прикладное значение в связи с возможностью использования этого фермента для разрушения D-стереоизомеров рацемических смесей и получения чистых L-аминокислот.

Данные Болангера и Дукоробла [4] указывают на высокую активность оксидазы D-аминокислот тканей лягушки по сравнению с таковой млекопитающих, птиц, рыб и на сравнимость фермента лягушек с оксидазой млекопитающих. Ранее нами исследовалась оксидазная активность тканей лягушек [1], причем установлено, что активность оксидазы D-аминокислот выше. Несмотря на большой экспериментальный материал [6, 10], касающийся очистки почечного фермента млекопитающих, в литературе отсутствуют аналогичные сведения об оксидазе D-аминокислот из печени, вообще и у земноводных, в частности.

В настоящей работе приводится разработанный нами способ очистки оксидазы D-аминокислот печени лягушек. На всех этапах очистки фермент остается связанным с ФАД, поэтому в добавлении кофермента к очищенному ферменту не было необходимости.

Материал и методика. Работа выполнена на кафедре биохимии ЕГУ в 1985—1986 гг. Объектом исследований служила лягушка *Rana ridibunda* (лягушка озерная).

Свежевырезанную печень гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе типа Поттер-Эльвехеда в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 8,3, в холодных условиях (0—5°), в течение 1 мин. Белок определяли на спектрофотометре СФ-16, по поглощению при 280 нм и методом Лоури [5]. Активность оксидазы D-аминокислот определяли по количеству выделившегося аммиака при инкубации фермента с субстратом, D-метионином, при температуре 37° в течение 2 часов. Инкубационная смесь содержала 1,5 мл калий-фосфатного буфера, pH 8,3, и 50 мкмоль субстрата, D-метионина. После инкубации реакцию останавливали 20%-ной ТХУ, а выделившийся аммиак определяли методом Зелинсона в модификации Силаковой [3]. Активность выражали в мкмоль выделившегося аммиака из мг белка.

Результаты и обсуждение. Предварительные данные показали, что оксидаза D-аминокислот печени лягушек при гомогенизации в относительно разбавленных буферных растворах или дистиллированной воде быстро переходит в раствор.

Ниже описывается разработанный способ очистки фермента.

На первой стадии очистки 10%-ный гомогенат подвергали 10-минутной экстракции на магнитной мешалке. Затем весь объем гомогената подвергали термообработке при 50° в течение 20 мин. Балластные белки удаляли центрифугированием при 18000 g в течение 30 мин, в результате чего удельная активность несколько повышалась.

На втором этапе очистки осуществляли фракционирование белков надосадка сульфатом аммония.

Оказалось, что активность осаждается при 35—55%-ном насыщении среды сульфатом аммония. Следы $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ удаляли гельфиль-

Таблица 1. Стадии очистки печеночной оксидазы D-аминокислот лягушки (субстрат D-метионин)

Стадии очистки	V, мл	Общий белок, мг	Общая активность, мкмоль	Удельная активность, мкмоль/мг/ч	Степень очистки
Гомогенат (12 г печени)	320	7980	1772.8	0.222	1
Надосадоk гомогената после термообработки и центрифугирования при 18000g, 30 мин	240	5983.2	1447.2	0.242	1.09
Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (35—55%) и обес-соливание на колонке с сефадексом (1—25)	280	179.2	890.4	4.97	22.39
Хроматография на КМ—целлюлозе					
19 фракция	32	3.52	62.1	17.73	79.86
22 фракция	32	4.0	94.4	23.6	106.3
Рехроматография на КМ—целлюлозе					
11 фракция	28	0.54	126	225	412.5
22 фракция	28	0.704	64.4	91.48	412.07

трацией на колонке с сефадексом G-25, для чего осадок растворяли в минимальном объеме (1—2) 0,05 М Na-ацетатного буфера, pH 5,5, и наносили на колонку с сефадексом G-25. Предварительное уравнивание и элюцию проводили тем же буфером. В итоге значительное количество балластных белков удалялось, что приводило к повышению удельной активности фермента до 4,97 мкмоль/мг/ч против 0,242 мкмоль/мг/ч на предыдущем этапе.

В дальнейшем проводили фракционирование методом ионообменной хроматографии на колонке (2,5×60 см) с КМ-целлюлозой, предварительно уравновешенной 0,05 М Na-ацетатным буфером, pH 5,5. Градиентную элюцию проводили NaCl (0,0—0,3 М) в 0,05 М Na-ацетатном буфере, pH 5,5, общий объем которого равнялся 300 мл. Скорость элюции—1,7 мл в мин; объем фракций—4 мл.

Все активные фракции были объединены для вторичной хроматографии на колонке (1,5×30 см) с КМ-целлюлозой, предварительно уравновешенной 0,025 М Na-ацетатным буфером, pH 5,5. Градиентную элюцию проводили NaCl (0,075—0,615 М) в 0,025 М Na-ацетатном буфере, общий объем которого составлял 180 мл. Скорость элюции—0,65 мл в мин; объем фракций—3,5 мл.

После первой хроматографии на КМ-целлюлозе, как видно из рис. 1, фермент выходит двумя пиками активностей (I и II), отстающими друг от друга незначительно. Первый пик активности (I) выходит при 0,095 М NaCl, тогда как второй (II)—при 0,11 М. При этом удельная активность первого пика достигает 17,73 мкмоль/мг/ч [степень очистки около 79,86], а второго—23,6 мкмоль/мг/ч [степень очистки около 106,3].

При рехроматографии активных фракций (рис. 2) они четко разграничиваются, хотя выходят при тех же ионных силах элюирующего раствора (0,095 и 0,11, соответственно). В результате удельная активность первого пика повышается до 225 мкмоль/мг/ч [степень очистки около 412,07]. Это происходит главным образом вследствие удаления

определенного количества балластных белков. Примечательно также то, что при рехроматографии значительно, почти в два раза, повышается активность первого пика. Она достигает 126 мкмоль против

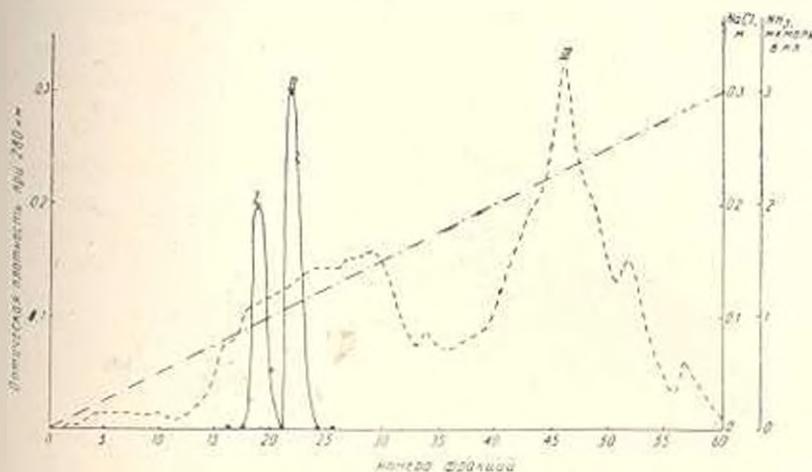


Рис. 1. Хроматография оксидазы D-аминокислот на КМ-целлюлозе. I и II—пики активностей, III—белок.

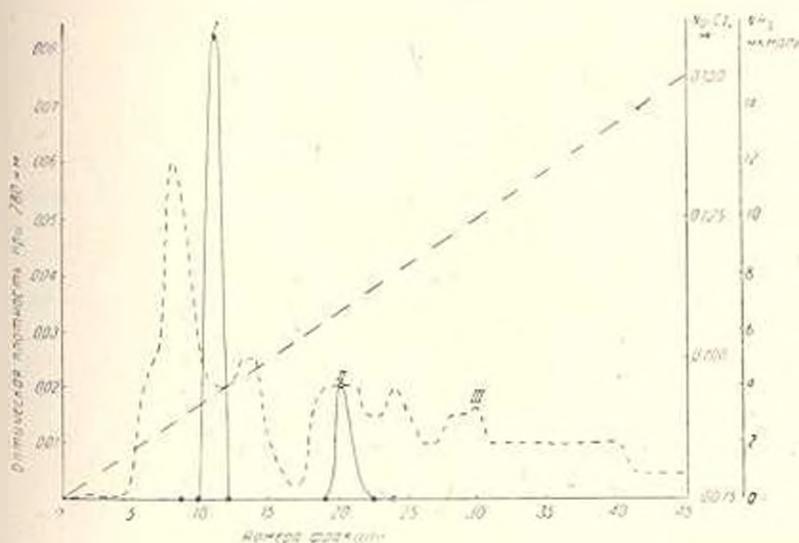


Рис. 2. Рехроматография оксидазы D-аминокислот на КМ-целлюлозе. I и II—пики активностей; III—белок.

62,4 мкмоль. В то же время активность второго пика, наоборот, значительно снижается, это можно объяснить обычной потерей активности при рехроматографии фермента. Трудно объяснить повышение активности первого пика, ибо при рехроматографии в среду разделения не вносились дополнительные компоненты. Можно лишь сделать предположение об удалении возможных ингибиторов белковой природы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в печени лягушки содержатся два изофермента оксидазы D-аминокислот, отличающиеся по заряду белка, хотя и имеющие одинаковую молекулярную массу [2].

Следует подчеркнуть, что, согласно литературным данным, существ-

вуют разновидности оксидазы D-аминокислот у млекопитающих [8, 9]. В частности, Шига и др. [8] при ионообменной хроматографии на ГАП экстрактов почек свиньи установили наличие второй активности оксидазы D-аминокислот, незначительно отстающей от первой. Показано, что при световом облучении часть оксидаз D-аминокислот почек свиньи переходит в новую молекулярную форму фермента, лишенную активности [9].

Таблица 2. Субстратная специфичность очищенной оксидазы D-аминокислот, NH₂, мкмоль/мл

Аминокислоты	Пики активности	
	I	II
DL-лизин	1.18	0.31
DL-лейцин	1.14	0.35
DL-тирозин	1.02	0.29
DL-серин	2.75	0.76
DL-изолейцин	0.96	0.31
DL-аспарагин	2.07	0.63
DL-треонин	1.07	0.33
DL-аргинин	1.68	0.45
DL-орнитин	1.81	0.26
DL-г-глютаминовая кислота	1.21	0.37
D-лизин	1.08	0.31
D-метионин	4.13	1.02
D-серин	2.76	0.73
D-аланин	1.85	0.52

В дальнейшем нами было установлено, что полученные высокоочищенные препараты оксидазы D-аминокислот также обладают строгой стереоспецифичностью в отношении D-изомеров аминокислот.

При изучении активностей двух изоэнзимов (I и II) полученной нами оксидазы D-аминокислот в отношении различных аминокислот (табл. 2) оказалось, что по этому показателю изоферменты весьма близки: проявляют максимальную активность в отношении D-метионина, далее D-серина, D-аланина, D-аргинина и слабую — в отношении D-орнитина и D-изолейцина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никогосян Ф. Ц., Петоян Р. Р., Давтян М. А. Биол. ж. Армении, 39, 3, 176, 1986.
2. Петоян Р. Р., Давтян М. А. (в печати).
3. Сулакова Я. Н., Тршн Г. П., Являкова А. Вопросы мед. хим., 8, 538, 1962.
4. Boullanger P. et Diezgrebe J. Societe de Biolog. de Lille, 1204, 1949.
5. Lowry O. M., Rosenbrough M. S., Farrar A., Ronda L. R. S. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
6. Mussey V., Paimier G. and Bennet J. Biochem. Biophys. Acta, 48, 1, 1961.
7. Meister A., Wellner D. and Scott J. J. Nation. Cancer Inst., 24, 31, 1960.
8. Shiga K., Nishina J., Horike K., Tojo H., Watari H. and Yamano T. Med. Journ. of Osaka Univ., 30, 71, 1980.
9. Tu, S. Ch. and McCormick D. B. J. Biol. Chem., 148, 6339, 1973.
10. Yagi K., Naoi M., Harada M. J. Biochem., 61, 580, 1967.

Поступило 26.III 1986 г.