

ՀՈՂԱԾՄՆԵՐ • СТАТЬИ

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 5, 351—358, 1987

ՈՒՏԳ 577. 112

Ա₂ ՖՈՍՖՈԼԻՊԱԶԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԹՈՒՅՆԵՐԻՑ

Ա. Ե. ԱՅԱՆՅԱՆ

Հայկական ՍՍՀ ԳԱ կենսաբանության ինստիտուտ, Սրբան

Անոտացիա — Նկարագրված է Ա₂ ֆոսֆոլիպազի անջատումը *Naja naja oxiana*, *Agkistrodon halis blomhoffii* օձերի և *Apis mellifera* մեղրատու մեղվի թույներից: Որպես կենսայուրահատուկ կրի: օգտագործված է իմմոբիլիզացված ֆոսֆոլիպիդով ամինային ապակի: Անջատված ֆոսֆոլիպազների մաքրության աստիճանը առուգված է պոլիակրիլամիդային զել-էլեկտրաֆորմացիո, իզոէլեկտրաֆոկուսացման, N-ծայրի ամինաթթվի դանսիլ-օրոշման, ինչպես նաև ամինաթթվային անալիզի օգնությամբ:

Аннотация — Описано выделение фосфолипаз А₂ из ядов змей *Naja naja oxiana*, *Agkistrodon halis blomhoffii* и яда медоносной пчелы *Apis mellifera*. В качестве биоспецифического носителя использовано амминокстекло с иммобилизованным фосфолипидом. Степень чистоты выделенных фосфолипаз проверяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, изоэлектрофокусирования, дансильного определения N-концевой аминокислоты и аминокислотным анализом.

Abstract — The procedure of isolation of phospholipase A₂ from *Naja naja oxiana*, *Agkistrodon halis blomhoffii* snakes venoms and *Apis mellifera* bee venom is described. Aminoglass with immobilized phospholipid is applied as biospecific support. The purity of isolated phospholipases is controlled by polyacrylamide gel-electrophoresis, isoelectrofocusing, determination of the N-terminal amino acid and amino acid analysis.

Բանալի բառեր. Ա₂ ֆոսֆոլիպազ, ֆոսֆոլիպիդ, մեղվի և օձի թույներ, կենսայուրահատուկ հիմնատրոֆիլ:

Ա₂ ֆոսֆոլիպազը (ԿՖ 3.1.1.4) իրրև կատալիզատոր ապահովում է բարձր կարգի թթուների բարդ ԼՔերային կապերի յուրահատուկ հիդրոլիզը 1.2 դիացիլ-3-ՏՈ-ֆոսֆոլիպիդների Լրկրորդ դիրքում: Այն լայնորեն տարածված է բնության մեջ և բավարար բանակով պարունակվում է օձերի ու միջատների թույներում: Ա₂ ֆոսֆոլիպազն այսօր հիմնավորապես օգտագործվում է իրրև գործիք՝ ներվային զրգիոների փոխանցման պրոցեսների,

թաղանթային սիստեմների կառուցվածքային-ֆունկցիոնալ կազմակերպության, շերտերի բաժանման սահմանագծում կենսակատալիզի յուրահատկությունների հետազոտության մեջ: Թվարկված խնդիրների բարենաչող լուծումը պահանջում է սպիտակուցի բարձր մաքրության աստիճանով և՛ ֆոսֆոլիպազի անհրաժեշտ քանակների կիրառություն:

Ներկայումս բարդ խառնուրդներից սպիտակուցների անջատման և մաքրման համար ավելի ու ավելի մեծ տեղ է տրվում աֆինային բրոմատոգրաֆիային, քանի որ վերջինս ննարավորություն է տալիս նյութերը արագ և արդյունավետ կերպով իրարից բաժանել բրոմատոգրաֆիայի մեկ աստիճանում, մինչդեռ բազմաստիճան և ոչ յուրահատուկ մեթոդների օդազործումը մեծ աշխատանք և ծախսակ է պահանջում:

Խինչ այժմ հայտնի են տարբեր ազդյուններից անջատված ավելի քան 30 և՛ ֆոսֆոլիպազի ամինաթթվային հաջորդականություններ, որոնցից բլերի համար է. սակայն, կիրառվել մաքրման կենսալուրահատուկ բրոմատոգրաֆիայի մեթոդը:

Այսպես, հայտնի է դիալիլ-ֆոսֆատիդիլ սեֆարոզի վրա զեաներգենտի առկայությամբ էրիտրոցիտների թաղանթներից Աձ ֆոսֆոլիպազի անջատումը [11]: *Crotalus adamantensis* օձի թույնից Աձ ֆոսֆոլիպազ հաջողվել է անջատել սեֆարոզի վրա, որը կարգաբաշխային խմբով կովալենտորեն կապակցված է Ca^{2+} -(9-կարբոքսի) նոնիլ-2-հեքսադեցիլդիցերո-3-ֆոսֆոլիտինի հետ [15]: Հակամարմինների հիման վրա ստացված իմունոլուրահատուկ սորբենտի օգնությամբ Աձ ֆոսֆոլիպազի իզոֆերմենտների խառնուրդը հաջողությամբ անջատվել է *Naja naja oxiana* կորրայի հում թույնից [1]: Կոնկանավալին-Ա սեֆարոզը հաջող կրիչ է հանդիսացել աֆինային բրոմատոգրաֆիայի միջոցով *Apis mellifera* մեղվի թույնից Աձ ֆոսֆոլիպազ անջատելու համար [2]: Մեղ հաջողվել է նաև իմունիլիզացված ֆոսֆոլիպիդով օրգանա-սինթետիզացված տիպի կենսալուրահատուկ կրիչների հիման վրա Աձ ֆոսֆոլիպազ անջատել խողի ենթաստամոքսային գեղձից [3]:

Վերջին ժամանակներս նոտկապես ուշադրություն է դարձվում ներբրջային Աձ ֆոսֆոլիպազների ուսումնասիրությանը [7, 16, 17]: Այս խմբատույն տարբեր ազդյուններից Աձ ֆոսֆոլիպազի անջատման համար անխվերապ կենսալուրահատուկ սորբենտների մշակումը խիստ արդիական խնդիր է:

Նյութ և մեթոդ: Աշխատանքում օգտագործված են Մոսկվայի Լոմոնոսովի անվան նուրբ քիմիական սինթետիկայի ինստիտուտում վաղորտը ստացված կենսալուրահատուկ սորբենտներ: Որպես Աձ ֆոսֆոլիպազի ստացման աղբյուր օգտագործված են հեռավոր արևելյան *Agkistrodon halis blomhoffi* վահանամուկ օձի, միջինասիական *Naja naja oxiana* կորրայի և մեղրատու *Apis mellifera* մեղվի թույները [4,5]: Սպիտակուցի բրոմատոգրաֆիայի համար օգտագործված են սեֆադեքսներ G-15 և G-25 (Pharmacia, Շվեդիա), ցելյուլոզներ CM-32 և DE-52 (Whatman, Անգլիա): Սպիտակուցների հոմոգենությունը ստուգված է 15% պոլիակրիլամիդային գել պարունակող ստանդարտ դիսկ էլեկտրաֆորեզի օգնությամբ pI 4,5 և 7,3 միջավայրերում [12]: **DS-Na**-ի առկայությամբ էլեկտրաֆորեզը ես իրականացվել է ըստ հայտնի մեթոդիկայի [18], pI 7,0 ղեկորում, **Reanal** (Հունգարիա) ֆերմայի սարքի կիրառությամբ: Այս ղեկորում օգտագործված գելը պարունակում է 10% ակրիլամիդ:

Իզոէլեկտրաֆոկուսացումը իրականացվել է ամֆոլին պարունակող ստանդարտ պոլիակրիլամիդային շերտիկի վրա pI 3,5-9,5 դիսպոզիցիոն, 2 ժամ-

վա տեղությամբ, 10 վտ չարվածության կայունացված ռեժիմում (LKB, Շվեդիա), սեման աղբյուրը՝ «Multiphor 2103» (LKB, Շվեդիա):

N-ծալրի ամինաթթուները որոշված են դանսիլային ածանցյալների ձևով, սխիկացելի հիման վրա, նրբախափային քրոմատոգրաֆիայից հետո [8]:

Ա₂ ֆոսֆոլիպազի ֆերմենտային ակտիվությունը որոշված է նախկինում առաջարկված աջիդուլարիկ մեթոդով [14], համաձայն որի սեակցիոն միջավայրը պարունակում է 0,5 % դետերգենտ «Trition X-100», 1 mM Tris, 0,03 M NaCl, 0,02 M CaCl₂ և 0,7 mM EDTA (pH 7,8—8,0): Միջավայրի 2 մլ քանակին ավելացնում ենք 3 մզ լիպիդ՝ լուծված 75 մկլ էթանոլի մեջ, հետո ներմուծում ենք 0,1—1,0 մկգ ֆերմենտ 5—10 մկլ ջրային լուծույթի ձևով: Ակտիվության չափումը իրագործվել է ինքնատիտրոլ TIT-2 սարքի (Radiometer, Դանիա) վրա, սենյակային ջերմաստիճանում՝ իրրե սուբստրատ օգտագործելով դիպալմիտոիլֆոսֆատիդիլսոլին կամ ձվի դեղնուցի ֆոսֆատիդիլսոլին [19]:

Սպիտակուցների ամինաթթվային բաղադրությունը որոշված է D-500 (Durrum, ԱՄՆ) ավտոմատ անալիզատորի վրա 5,7 N HCl-ի մեջ 24 ժ և 72 ժ հիդրոլիզից հետո: Տրիպտոֆանի մնացորդների քանակը որոշված է Biocal (LKB, Շվեդիա) անալիզատորի վրա 4 N մեթանոլիֆոնային թթվով ամինաէթիլիզոլի (Pierce, ԱՄՆ) ավելցուկի առկայությամբ 24 ժ հիդրոլիզից հետո:

Քրոմատոգրաֆիայի ընթացքում Ա₂ ֆոսֆոլիպազի պարունակությունը սպիտակուցային թորամասերի լուծույթներում որոշված է «Gilford-250» (ԱՄՆ) սարքի օգնությամբ 280 նմ համար չափելով լուծույթների օպտիկական լիանումը: Սպիտակուցների աֆինային քրոմատոգրաֆիան իրականացվել է 4,0×15 սմ աշտարակներում՝ լցված 6 մզ կայունացված սուբստրատ պարունակող 300 մզ կենսալուրահատուկ սորբենտով:

Հանգստի վիճակում աշտարակը հավասարակշռվել է բուֆեր 1-ով (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0,2 M, pH 7,5—8,1): Ֆոսֆոլիպազային թորամասերի լվացման համար կիրառվել է բուֆեր 2 (Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0) կամ 1 % քաղախաթթվի լուծույթ:

Ա₂ ֆոսֆոլիպազի անջատումը կորեայի բույնից: Կորեայի թույնի 300 մզ լուծում ենք 0,3 մլ բուֆեր 1-ում (pH 7,5) և ներմուծում նույն բուֆերով հավասարակշռված սորբենտով ի աշտարակ: 4°C տակ 20—24 ժ պահելուց հետո աշտարակը լվանում ենք բուֆեր 1-ով, 3 մլ՝ Ժ արագությամբ՝ թույնի չկապվող բաղադրամասերը հեռացնելու համար: Ա₂ ֆոսֆոլիպազի անջատման համար աշտարակը լվանում ենք 1 % քաղախաթթվի լուծույթով: Ստացված թորամասը 1 % քաղախաթթվի լուծույթի միջավայրում սեֆադեքս G-15-ով ի աշտարակում (1,0×30 սմ) ադապտիկուց հետո լիսֆիլիզացնում ենք: Նյութ կազմում է ~ 10 մզ:

Իզոֆերմենտների տարբադադրման համար ստացված 10 մզ պրեպարատը ներմուծում ենք CM-ցելյուլոզով լցված աշտարակ (1,0×10 սմ), որը հավասարակշռված է 0,05 M (pH 4,5) ամոնիում-ացետատային բուֆերով: Բաժանումը իրականացվում է 15 մլ՝ Ժ արագությամբ, pH 4,5—7,5 դրադիենտի պայմաններում (400 մլ): Ստացված սպիտակուցային թորամասերը լիսֆիլիզացվում են:

Վահանամուր օձի բույնից Ա₂ ֆոսֆոլիպազի անջատման նպատակով սորբենտով ի աշտարակ է ներմուծվել 100 մզ թույնի կոնցենտրիկ լուծույթ

(բութեր 1, рН 8,0): Քրոմատոգրաֆիան իրականացվել է վերը նշված ձևով: Ա₂ ֆոսֆորիլազի լվացման համար կիրառվել է բութեր 2-ի լուծույթը: Աղադրկումն իրականացվել է սեֆադեքս G-25-ի օգնությամբ՝ 1 % քաղցախաթթվի լուծույթի միջավայրում: Նշքը կազմել է 5,2 մգ:

Իզոֆերմենտների բաժանումը իրականացվել է DEAE-ցելյուլոզի վրա բրոմատոգրաֆիայի միջոցով (1,0×5,0 սմ), կիրառելով ամոնիում-ացետատային բութերի 0,005-0,05 M գրադիենտի (200 մլ), այնուհետև հաջորդաբար 100-ական մլ 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M լուծույթներ (рН 7,0): Ստացված թորամասերը կրկնակի լիոֆիլիզացվել են:

Արդյունաբերական մեթոդով բույսից Ա₂ ֆոսֆորիլազի անջատման համար պահանջվում է թույնի բարձր մածուցիկությամբ լուծույթը նախապես ֆիլտրել պղտոր խառնուրդներից: Այսպիսի նախնական մաքրումից հետո թույնի 200 մլ ներմուծվել է աֆինային բրոմատոգրաֆիայի աշտարակ՝ հավասարակշռված բութեր 1-ով (рН 7,9): 1°C-ի տակ 20 ժ թողնելուց հետո աշտարակը լվացվել է 1 % քաղցախաթթվի լուծույթով: Աղադրկված ֆոսֆորիլազային թորամասի էլքը լիոֆիլիզացիայից հետո կազմել է ~ 5 մգ:

Իզոֆերմենտների այս խառնուրդն այնուհետև 10 մլ/ժ արագությամբ բաժանվել է СМ-սեֆադեքսի վրա (1,0×5,0 սմ)՝ հավասարակշռված 0,05 M Tris-HCl բութերով, рН 9,0, NaCl-ի 0-0,2 M գրադիենտի կիրառությամբ (100 մլ):

Թույլներից Ա₂ ֆոսֆորիլազի անջատման և անալիզի արդյունքները բերված են աղյուսակ 1-ում:

Այլ սպիտակուցային ֆրակցիաները ստացված են աննշան բանականությով:

Արդյունքներ և Լճնաբերում: Ներկա աշխատության մեջ նկարագրված է ամինային ապակու հիման վրա ստացված կենսալուրահատուկ սորբենտի սպառազործումը տարբեր աղբյուրներից Ա₂ ֆոսֆորիլազ անջատելու համար: Իբրև կենսալուրահատուկ էրի՝ ոգտագործված է ամինային սուպակին, որն ամինախմբերի միջոցով կովալենտորեն կապակցված է ֆոսֆորիլազների մոլեկուլների հետ: Աֆինային սորբենտի ստացման ժամանակ հաշվի են առնված ինչպես լիզանդ հանդիսացող լիպիդի, այնպես էլ անջատման ենթակա ֆերմենտի, իբրև սպիտակուցի հատկություններն ու ֆունկցիաները:

Այսպես, բանի որ Ա₂ ֆոսֆորիլազը օժտված է սուբստրատային և դիրքային յուրահատկությամբ, այսինքն՝ դիրքային է ենթարկում 1,2 դիացիլ-3-օն-ֆոսֆորիլազների երկրորդ դիրքի բարդ եթերային կապը, ապա, իբրև լիզանդ ընտրել են՝ գլիցերինային հիմքի երկրորդ դիրքում պարզ եթերային կապ պարունակող ֆոսֆատիդիլսուլին: Լիզանդի կովալենտ կապակցումը մատրիցայի հետ իրականացված է գլիցերինային հիմքի C-1 ատոմին հարող ալկիլ մնացորդի կարգօքսիդային խմբի միջոցով: Սպառազործված լիզանդը 1-Օ-դոդեկադիկարբոնային-2-օկտադեցիլդեկան-3-ֆոսֆոսուլին է՝ նախկինում սինթեզված Մոսկովայի նուրբ քիմիական տեխնոլոգիայի ինստիտուտում [4,5], (տես սխեման):

Ոչ յուրահատուկ սորբցիայի կանխման նպատակով ամինային ապակու ազատ մնացած ամինախմբերը մեկուսացված են քաղցախային անհիդրիդի միջոցով ապոտիլացնելով:

Փորձը ցույց է տալիս, որ այսպիսի սորբենտը հնարավոր է բազմիցս օգտագործել երկար ժամանակահատվածի (1—2 տարվա) ընթացքում: Այս իմաստով, յուրաքանչյուր մաքրման պրոցեսից հետո սորբենտով լի աշտա-

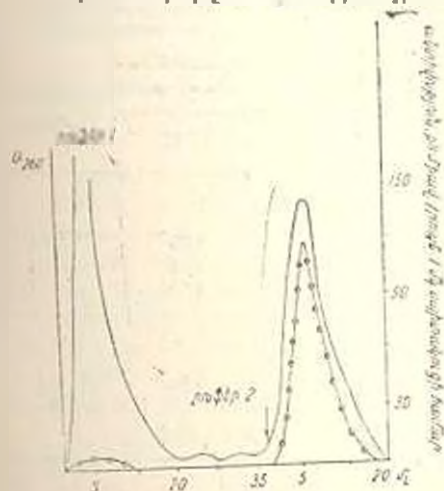
րակը նպատակահարմար է կրկին համասարակշռել ստարտային բուֆեր 1-ով և այս վիճակում պահել 4°C -ի պայմանում:

Ստացված աֆինային սորբենտը օգտագործել ենք միջինասիական *Naja naja oxiana* կոբրայի, հեռավոր արևելյան *Agkistrodon halis blomhoffii* վահանամուխ օձի և մեղրատու *Apis mellifera* մեղմի թույներից Ա₂ ֆոսֆոլիպազի անջատման համար:

Խուֆերային լուծույթների ընտրությունն ու բուն աֆինային քրոմատոգրաֆիայի ընթացքը երեք աղբյուրների համար էլ հիմնականում նույնն է: Սակայն պետք է նկատի ունենալ, որ Ա₂ ֆոսֆոլիպազն օձերի թույներից անջատելու դեպքում սորբենտով լցված աշտարակ է ներմուծվում պարզապես թույնի գոնցնետրիկ լուծույթ, մինչդեռ մեղմի թույնից անջատելու դեպքում սահմանցվում է թույնի մածուցիկ լուծույթի նախնական մշակում՝ ֆիլտրացիայի միջոցով մեխանիկական խառնուրդներից անջատում, հետագայում սորբենտը աղափոխելուց և խցանվելուց ապահովելու նպատակով:

Ծխնյութի լուծման և լիպիդ-լիզանզի հետ թույնի չկապվող բաղադրամասերի լվացման համար օգտագործված է բուֆեր 1-ը: Ֆոսֆոլիպազային ակտիվությամբ թորամասերի լվացումը իրականացվել է բուֆեր 2-ով կամ 1% քաղախաթթվի լուծույթով:

Լիզանզի հետ ֆերմենտի կապակցումն ընթանում է 20—24 ժամվա ընթացքում 4°C ջերմաստիճանի պայմաններում: Ա₂ ֆոսֆոլիպազի բոլոր իզոֆերմենտների լիակատար սորբցիայի մասին է վկայում այն փաստը, որ 24-ժամյա դադարից հետո աշտարակի կրկին լվացման դեպքում (բուֆեր 1), լվացված ճեղուկում ֆոսֆոլիպազային ակտիվություն չի հայտնաբերվում: Աշտարակի մաքրումը ֆերմենտային ակտիվություն ունեցող թորամասերից իրականացվել է կալցիումի իոններ չպարունակող բուֆեր 1-ով (այսինքն՝ բուֆեր 2-ով) կամ էլ քաղախաթթվի 1% լուծույթով լվացում կատարելով: Հետաքրքիր է նշել, որ աշտարակից ֆոսֆոլիպազային թորամասերը լվանալու նպատակով աղերի (օրինակ՝ 1,0—5,0M NaCl) կամ դետերգենտի տարրեր կոնցենտրացիաների (մինչև 10%) լուծույթների կիրառումը հաջող արդյունք չտվեց: Նկատվում բերված է աֆինային քրոմատոգրաֆիայի ընթացքը կորբայի



Ա₂ ֆոսֆոլիպազի աֆինային քրոմատոգրաֆիայի ընթացքը: Այսպիսով յուրյց է տրբված բուֆերի փոփոխումը 1-սպիտակուցային խառնուրդ, ֆոսֆոլիպազային ակտիվությամբ թորամաս:

Թույնից Ա₂ ֆոսֆոլիպազի անջատման համար: Վահանամուխ օձի և մեղմի թույներից Ա₂ ֆոսֆոլիպազի աֆինային մաքրման դեպքում քրոմատոգրաֆիայի կորը նմանօրինակ տեսք ունի:

Կենսալուրահատուկ բրոմատոգրաֆիայի միջոցով կարելի է դտարկել այս կամ այն աղբյուրի մեջ պարունակվող Ա₂ ֆոսֆոլիպազի իզոֆերմենտների ողջ գումարը: Ֆերմենտի դտարկված գումարային խառնուրդը կարելի է տաքադադրել՝ օգտագործելով ցելյուլոզի կամ սեֆադեքսի հիման վրա տարրեր տխար խոնափոխանակիչ սորբենտներ:

Կորրայի թույնի մեջ պարունակվում են Ա₂ ֆոսֆոլիպազի մինչև 7 իզոֆերմենտներ, մեղվի և վահանամուրթ օձի թույներում եւս կան այդ ֆերմենտի մի բանի իզոմերներ [10, 15]: Սակայն հարկ է նշել, որ մինչ վերջերս վահանամուրթ օձի թույնի մեջ պարունակվող իզոֆերմենտների թվի վերաբերյալ հայտնի տվյալները հակասական են եղել: Որոշ հեղինակներ [15] գտել են, որ այդ թույնը պարունակում է երկու իզոֆերմենտ՝ Բ1 4,0 և Բ0 իզոէլեկտրական կետերով, մինչդեռ մյուսներն ի հայտ են բերել երեք իզոֆերմենտ՝ Բ1 4,9, Բ2 6,9 և Բ3 8,7 իզոէլեկտրական կետերով [9]: Ընդ որում, երկու դեպքում էլ կիրառված է տրոպիցին բազմաստիճան բրոմատոգրաֆիայի եղանակը:

Մեր կողմից վահանամուրթ օձի թույնի աֆինային բրոմատոգրաֆիայից ստացված Ա₂ ֆոսֆոլիպազի իզոֆերմենտների խառնուրդի բաժանման համար օգտագործված է բրոմատոգրաֆիան DEAE-ցելյուլոզի վրա՝ կիրառելով ամոնիում-ացետատային բուֆերի գրադիենտը [3]: Այս ձևով անջատված են երեք իզոֆերմենտներ՝ Բ1 5,0±0,2, Բ2 7,0±0,2, Բ3 8,7±0,2 իզոէլեկտրական կետերով: Սպիտակուցային այլ ֆրակցիաներ ստացվել են զրեթե սեննչան բանակով և ֆոսֆոլիպազային ակտիվություն չեն պարունակել:

Անջատված իզոֆերմենտները իներատիպությունը հաստատված է 15 պոլիակրիլամիդային զել-էլեկտրաֆորեզի և իզոէլեկտրաֆոկուսացման մեթոդներով [12, 18]: Մոլեկուլյար կշիռները որոշված են Ds-Na ներկայությամբ էլեկտրաֆորեզի և գել-ֆիլտրացիայի միջոցով: Ստացված իներատիպ սպիտակուցների ամինաթթվային անալիզի տվյալները լավագույն ձևով համադրվում են զրականության մեջ հայտնի տվյալների հետ [1, 2, 9]:

Աղյուսակ 1-ում ամփոփված են Ա₂ ֆոսֆոլիպազի աֆինային մաքրման և անալիզի որոշ արդյունքներ:

Տարբեր աղբյուրներից Ա₂ ֆոսֆոլիպազի բրոմատոգրաֆիկ մաքրման և անալիզի արդյունքները

Թույնի աղանակ	Ֆերմենտի պարունակությունը, %	Ֆերմենտի անսակարար թյունը, միավորային մաքրման համար	Ամրանաթթվային մնացորդների բնականությունը, թիվը	N-ձայրի ամինաթթվային	
Միջինատիական կորրայի թույն իզոֆերմենտ	I 1.0 II 2.0-3.0 III 2.5-3.0	75 130 150	5.4±0.1 5.5±0.1 5.1±0.1	126 128 119	Act
Մեղրատու մեղվի թույն (հիմնային իզոֆերմենտ)	1.0-1.5	1.0	10.5±0.1	129	Ile
Արևելյան վահանամուրթի թույն իզոֆերմենտ	I 1.0-1.5 II 3.0 III 1.0-1.5	40 160 80	8.7±0.2 7.0±0.2 5.0±0.2	109 123 105	Ser

Հարկ է նշել, որ նկարագրված ադսորբենտի միջոցով ստացվում են Ա₂ ֆոսֆոլիպազի անջատման լավագույն տվյալները օձերի և մեղրատու մեղվի թույ՝ Ներից՝ ի տարբերություն այն տվյալների, որոնք ստացվում են Ա₂ ֆոսֆոլիպազի անջատման դեպքում սրգանա-սիլիկատոլային տիպի կայունացված լիպիդով կենսալուրահատուկ կրիչի վրա, հավանաբար այն բանի հաշվին, որ տվյալ դեպքում սղտագործված սուրստրատ-լիպանդը ապահովում է կապը ֆերմենտի հետ ոչ միայն բևեռացված մասով, այլև բոտ գլխից երկնային հիմքի C-1 և C-2 ատոմներին կից հիդրոֆոր ալիֆատիկ կողմնային շղթաների, որն էլ բերում է թույնի ալիպիտի թաղանթաակտիվ բաղադրամասերի սուրստրատի հետ փոխազդեցության և կապի թուլացմանը, ինչպիսիք են ցիտո-և կարդիոտոքսինները՝ կորբալի և մելլիտինը մեղվի թույների մեջ (հայտնի է, որ վերջիններս առաջացնում են կայուն կոմպլեքսներ սուրստրատի բևեռացված մասի հետ)։

Այսպիսով, տարրեր թույներից Ա₂ ֆոսֆոլիպազ անջատելու համար կարելի է հաջողությամբ էկրանել վերը նշված ձևի՝ ամինային ապակու հիման վրա ստացված, անշարժացված լիպիդ-լիպանդով կենսալուրահատուկ ազսորբենտ։

Իր մեջ լավագույն հատկությունների համադրման շնորհիվ (կայունություն, իներտություն, լիպիդ-լիպանդի հետ կոմպլեքս կապի ամրություն, լիպիդի հանդեպ ֆերմենտի բարձր խնամակցություն և էլանյութի մեջ այլ թաղանթաակտիվ բաղադրիչների՝ լիպանդի հանդեպ խնամակցության թուլացում), նման աֆինային սորբենտը կարելի է Լրաշխավորել տարրեր ներթափանցիվ և արտաթափանցիվ ադրյուրներից Ա₂ ֆոսֆոլիպազի անջատման համար կիրառության։

ЛИТЕРАТУРА

1. Алсалам У. Р., Шамбарант О. Г., Мирошников А. И., Биоорган. химия, 11, 1553—1559, 1977.
2. Гричук В. И., Мецержкова Е. А., Оханов В. В., Ефремова Е. С., Мирошников А. И., Биоорган. химия, 5, 8, 1222—1233, 1979.
3. Евстратова Н. Г., Айанян А. Е., Мирошников А. И., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П., Биохимия, 47, 9, 1547—1551, 1982.
4. Евстратова Н. Г., Василенко И. А., Попова Т. П., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П., Биоорган. химия, 5, 8, 1140—1145, 1979.
5. Купаун А. И., Башарули В. А., Швец В. И., Биоорган. химия, 4, 11, 1567—1568, 1978.
6. Borgmann B. J., Huntz C. K., Mackin W. M., Becker E. L., Proc. Nat. Acad. Sci., 81, 3, 761—771, 1984.
7. Francon R. C., Weir D. L., Thakkar J. J., molec & cell cardiology, 15, 3, 189—197, 1983.
8. Gray W. R. in Methods in enzymol., 11, 139—151, Acad. Press, New York—London, 1967.
9. Hanahan P., Joseph M., Morales R., Biochem. et biophys. acta, 629, 3, 649—649, 1980.
10. Kawasch S., Iwanaga S., Samama J., Suzuki T., Biochem. et biophys. acta, 236, 1, 142—160, 1970.
11. Little C., Aurebeck B., Othman A., Febs Lett., 52, 2, 175—179, 1975.
12. Reisfeld R. A., Lewis U., Williams D., Nature, 195, 281—283, 1962.
13. Rock C. O., Snyder F. J., Biol. Chem., 250, 16, 6554—6556, 1975.
14. Salach J. I., Turini P., Seng R., Hauser J., Singer T. P. J., Biol. Chem., 246, 331—339, 1971.

15. Shipolini R. A., Callawaert G. L., Cottrell R. C., Deenan S., Vernon C. A., Banks B. E. G. J. Biochem. 20, 459, 1971.
16. Tanaka Y., Eriomin V. A., Kawamura Y., Inoue K., Nafima S. J. Biochem., 24, 3, 841—846, 1983.
17. Teramoto T., Taji H., Yamano T., Okamoto M. J. Biochemistry, 93, 5, 1353—1361, 1983.
18. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 244, 16, 4401—4412, 1969.
19. Wells M. A., Hanahan D. L. Methods in Enzymol., 14, 179—181, Acad. Press., New York—London, 1969.

Ստացված է 25. XI 1985 թ.

Бiolог. ж. Арм. — 40, № 6, 358—360, 1987

УДК 577.15:579.22+579.6

ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF A NEW HYDROLASE FROM MICROBIAL ORIGIN

BOHOS KEVORK MESROB AND STANKA PETKOVA STOEVA

Dept. of Organic Chemistry, Inst. of Chemical Technology Sofia, Bulgaria

Abstract — The enzymatic properties of proteolytic enzyme isolated from *Bac. mesentericus* strain 76, selected by bulgarian microbiologists were investigated. The proteinase named as "MCP 76" (milk-clotting proteinase) is a metalloenzyme of 33000 mol. weight.

On the basis of the enzyme properties and structure the new enzyme is considered a metal-chelation-sensitive alkaline proteinase, which is too strange to find its place in the Morihara classification, but can be defined after Dixon and Webb as 3.4.21.1. *Bac. mesentericus* alkaline proteinase.

Аннотация — Изучены ферментативные свойства протеолитического фермента, изолированного из *Bac. mesentericus* (штамм 76) — болгарскими микробиологами. Молокосвёртывающая протеиназа, названная «МСП 76» является металлоэнзимом с м. в. = 33 000.

На основе изучения свойств и структуры нового фермента он определен как чувствительный к хелатам металлов щелочной протеиназа, которая слишком необычна, чтобы классифицироваться по системе Морихары, но может быть определена по Диксону и Уэббу как 3.4.21.1. *Bac. mesentericus* alkaline proteinase.

Անոտացիա — Ուսումնասիրվել են *Bac. mesentericus* (շտամ 76)-ից, ընտրված բուլղարական միկրոբիոլոգների կողմից, առանձին պրոտեոլիտիկ ֆերմենտի ֆերմենտատիվ հատկությունները: Կաթ թափաղակող պրոտեոլիտազը, որն անվանված է «МСП 76», 3300 մոլ. կշռով մետաղազնախնայող է:

Ֆերմենտի հատկությունների և կառուցվածքի ուսումնասիրման հիման վրա նոր ֆերմենտը համարվել է մետաղների խելատների նկատմամբ զգայուն ալկալային պրոտեոլիտազ, որը չափից դուրս արտասովոր է, որպեսզի դասակարգվի ըստ Մորիհարայի սխեմի, բայց կարող է ընդգրկվել ըստ Դիքսոնի և Ուեբերի որպես 3. 1. 24. 1. *Bac. mesentericus* alkaline proteinase.

Key words: milk-clotting enzyme, alkaline proteinase, *Bacillus mesentericus*.

The hydrolase, subject of our report is a proteolytic enzyme isolated from *Bac. mesentericus* strain 76, selected from bulgarian microbiologists [1]. Once established as an industrially interesting enzyme, they were elaborated new growth conditions of this strain, getting higher en-