

2. Murarian H. G. Тез. докл. на V Закарвак. конф. по паразитологии, Ереван, 1987.
3. Murarian H. G. Зоол. сб., Ереван, 1988.
4. Gupta N. K., Grewal S. S. Res. bull. Panjab., 22, 221—228, 1971.
5. Levay A., Fregida R. and Sandberg A. Hereditas, 62, 2, 1961.
6. Jones A. W. J. Trans. amer. micros. Society, 272—273, 1951.
7. Jones A. W. J. parasitol., 31, 1945.
8. Rausch V. and Rausch R. Can. J. Genet. Cytol., 23, 131—154, 1981.

Получено 26.X 1988 г.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ФОСФОЛИПАЗЫ А₂ ИЗ ЯДА ЗМЕЙ

А. Е. АПАНИН

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Тель-фильтрацией и ионообменной хроматографией из яда змеи *Vipera lebetina obtusa* и *Vipera raddei* выделен ряд индивидуальных фосфолипаз А₂. Степень чистоты выделенных фосфолипаз проверили с помощью электрофореза и полиакриламидном геле, изоэлектрофокусирования, ионно-специфического определения N-концевой аминокислоты и аминокислотным анализом. Алкилирование остатка гистидина p-бромфенилацилбромидом приводит к потере ферментативной активности.

Այս ֆիլտրացիան և իոնօւփոխանակչազանքի քրոմատոգրաֆիայով պարզարար էլեկտրաֆորեզի և ֆոսֆոլիպազների հատկությունները ստուգելու նպատակով: Մտադրված ֆոսֆոլիպազների մաքրմանը սուբստրատները առկազմում էլ պոլիակրիլամիդային ձեւի կոլոիդալ լուծույթներով: Ն-աւարջի ամինաթիւրի գտնելի որոշման և ամինաթիւրային անալիզի օգնութեամբ: Հիստիլինային մնացորդի պարզմանը պարզութեամբ արկիլացումը բերում է ֆերմենտի ակտիւնիւթիւրի պակասեցումն:

Using gel-filtration and ion-exchange chromatography a number of individual phospholipases have been isolated from *Vipera lebetina obtusa* and *Vipera raddei* snakes venoms. The purity of isolated phospholipases is controlled by polyacrylamide gel-electrophoresis, isoelectrofocusing, determination of the N-terminal amino acid analysis. Alkylation of histidine residue with p-bromophenacylbromide leads to diminished enzyme activity.

Фосфолипазы А₂ — змеиный яд — армянская гадюка — закавказская змея.

К настоящему времени фосфолипазы А₂ выделены из более чем 40 источников (ядов змей, насекомых, животной панкреазы и других тканей) и для более чем 30 из них установлена полная аминокислотная последовательность [9, 14]. Все выделенные фосфолипазы А₂ характеризуются высоким содержанием дисульфидных связей (4—7), термостабильностью, устойчивостью проявления ферментативной активности в широком диапазоне pH и способностью действовать в системах, богатых органическими растворителями [3].

Сравнение первичных структур фосфолипаз А₂ из ядов и панкреазы в эволюционном аспекте дает возможность их условно разделить на две

группы. В группу 1 входят фосфолипазы A_2 из ядов примитивных рептилий (залапидов, морских змей и панкреазы). Группу 2 составляют фосфолипазы A_2 из ядов змей семейства viperидов. Как правило, они отличаются удлиненной на 6 аминокислотных остатков С-концевой последовательностью, которая завершается полуцистином [3, 10]. Предполагается, что это структурное различие обуславливает физиологическое разнообразие действия молекул этих ферментов [10].

Ферменты группы 2, как и ферменты группы 1, могут содержать широкий спектр изоферментов, но в отличие от них—в очень широком интервале рН. Из фосфолипаз A_2 , входящих в группу 2, наиболее подробно изучены ферменты ядов кроталидов [9, 14]. Из семейства viperидов хорошо изучен яд американской змеи *Vipera russellii* [7]. В Ташкенте ведутся работы по осуществлению выделения изоферментов фосфолипазы A_2 из яда степной гадюки.

Для понимания молекулярных свойств фосфолипаз семейства viperидов необходимы данные о других видах змей этого семейства. С этой целью нами впервые осуществлены выделение и очистка фосфолипазы A_2 из ядов двух змей семейства viperидов—кавказской гюрзы (*Vipera lebetina obtusa*) и армянской гадюки (*Vipera raddei*), а также проведено сравнительное изучение некоторых физико-химических свойств их.

Материал и методики. Яды змей кавказской гюрзы (*Vipera lebetina obtusa*) и армянской гадюки (*Vipera raddei*) были получены из Целинограда, столицы МН Армянской ССР (Ереван) в виде желтых кристаллов.

Использовали сефадексы G-75, G-50 (сверхтонкие) (Pharmacia, Швеция), целлюлозы CM-32 и DE-52 (Whatman, Англия). Фосфатидилацетат был получен из яичных желтков. Степень чистоты липидов проверяли на тонкослойной хроматографии. Для электрофокусирования использовали амфолиты в диапазоне рН 3—10 (LKB, Швеция). Все стадии хроматографий проводили при 4°.

С целью выделения фосфолипазы A_2 50 мг сухого яда растворяли в 10 мл 0,05 М аммоний-ацетатном буфере, рН 7,2, нерастворимые частицы удаляли центрифугированием, после чего желтого цвета супернатант извлекали на колонку с сефадексом G-50 сверхтонкий (1,5×120 см), уравновешенную тем же буфером. Элюирование проводили со скоростью 6 мл/ч.

Отбирали фракции III и IV с фосфолипазной активностью и лиофилизовали.

Анализическую гель-фильтрацию веществ указанных фракций проводили на колонке с G-75 сверхтонкий (1×90 см) в 0,01 М Трис-НСl буфере (рН 7,4), содержащем 0,1 М KCl. Для определения молекулярного веса фракций в качестве стандартов использовали белки цитохром С (12.400 Да), симетрисиноген (25000 Да), овальбумин (43500 Да) и бычий сывороточный альбумин (66.000 Да).

Для разделения двух кислых изоферментов фосфолипазы A_2 яда кавказской гюрзы использовали целлюлозу CM-32 (1,5×20 см). Фракцию III после деления на G-50 яда гюрзы сорбировали на колонке с CM-целлюлозой, уравновешенной 0,05 М аммоний-ацетатным буфером (рН 3,8). Через колонку пропускали тот же буфер с градиенте рН 3,8—4,8, объемом 600 мл. Основные изоформы фосфолипазы A_2 яда гюрзы удается очистить при высоких значениях рН.

Разделение изоферментов A_2 яда армянской гадюки осуществляли на колонке с CM-целлюлозой (1,5×25 см), уравновешенной 0,01 М аммоний-ацетатным буфером (рН 6,7). В этом случае через колонку пропускали градиент концентрации (0,01—1,1 М) и рН (6,7—7,7) аммоний-ацетатного буфера. Элюирование проводили со скоростью 25—30 мл/час.

Все выделенные белковые фракции с фосфолипазной активностью многократно лиофилизировали до полного удаления ацетата аммония.

Фосфолипазную активность изоферментов определяли по предложенной ранее методике ацидометрического титрования [12]. Реакционная смесь содержала 0,5% детергента «Тригон X-100», 1 мМ Трис, 0,03 М NaCl, 0,02 М CaCl_2 и 0,07 мМ EDTA (pH 7,8—8).

К 2 мл среды добавляли 2 мг фосфатидилхолина в 50 мкл этанола, а затем вносили 0,1—1 мкг фермента в водном растворе (5—10 мкл). Измерения проводили на анализаторе ТТТ2 (Radiometer, Дания) при температуре 37°. При полуколичественном определении ферментативной активности в ходе очистки фосфолипаз A_2 в качестве субстратов использовали эмульсию яичного желтка в 0,01 М CaCl_2 и 0,15 М NaCl. В ряде опытов CaCl_2 был заменен в среде хлоридами двухвалентных ионов цинка, магния, меди, марганца, железа.

Индивидуальность белков проверяли с помощью стандартного диск-электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле по методу Орнштейна [11] и Дэвиса [4] с использованием буферов Трис/глицин (pH 8,9) или β -аланин/уксусная кислота (pH 4,3) соответственно. Изoeлектрические точки (pI) изоферментов определяли изоэлектрофокусированием на аппарате LKB Мультифаз (Модель 2117). N-концевые аминокислоты были определены в виде дивалентных производных [5].

Аминокислотный анализ белков проводили на автоматическом анализаторе Д-500 (Durrum США), после 24 и 48 ч гидролиза в 6,01 НСL. Количество остатков триптофана определяли спектрофотометрически с помощью их модификации N-бромсукцинимидом по методу Спанда [13]. Количество модифицированных остатков определяли на приборе *Specord UV VIS* (ГДР).

Термостабильность белков проверяли на 50 мкг фермента в 1 мл 0,05 М ацетатном, фосфатном или Трис-HCl буферах до температуры 90° с 10 мМ Ca^{2+} или без него.

Наличие свободных SH-групп в белковых молекулах фосфолипаз A_2 изучали с помощью реагента Эдмана.

Определение содержания карбогидратной части проводили по методике Кнаппа [8]. В качестве стандартов использовали глюкозу или декстрозу.

Фосфодиэстеразную и 5' нуклеотидазную активности определяли по количеству гидролизованного [8—11] цАМФ в процессе его инкубации с ферментом [2] в Трис-HCl буфере (pH 7,5) с CaCl_2 и без него. Эстеразную активность определяли по модифицированному методу Хабермана [6]. Проверка протеолитической активности изоферментов осуществляется согласно описанной методике [1].

Остаток гистидина модифицировали с помощью реагента п-бромфенилбромидом [15]. Реакционная среда содержала 7·10⁻⁵ М фермента в 0,05 М Трис-HCl буфере при 30°. Реакцию проводили в широком интервале pH (6—8) при 5-, 10-, 20-кратном избытке реагента при наличии до 7 мМ CaCl_2 или без него.

Результаты и обсуждение. Выделение ферментов проведено с помощью применения общего подхода—двухстадийного разделения на основе молекулярных масс и зарядов: гель-проникающей хроматографии целых ядов на сефадексах G-50 или G-75 сверхтонкий в нейтральных условиях с последующей очисткой с помощью ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе обладающих липолитической активностью фракций.

Используемая стратегия разделения дает возможность в значительной степени ускорить и упростить выделение фосфолипаз A_2 , одновременно обеспечив хорошую степень их очистки с высоким выходом изоферментов.

Гель-фильтрация на сефадексе G-50 сверхтонкий в ацетатном буфере (pH 7, 2) позволяет разделить высоко и низкомолекулярные ком-

пенты ядов. На хорошо разделенных семи фракциях способностью гидролизовать лецитин обладают III и IV фракции (рис. 1).

Определение молекулярного веса этих фракций на колонке с сефадексом G-75 сверхтонкий в Трис-HCl буфере (pH 7.4), содержащем 0,1 М KCl, дает основание полагать, что III и IV фракции содержат вещества с молекулярной массой 13—14000 и 27—28000. Да соответственно, из чего следует, что в один этап хроматографии удается достичь не только разделения высоко- и низкомолекулярных компонентов, но и димерных и мономерных форм фосфолипазы A_2 . Сравнительное изучение хроматограмм разделения двух ядов (рис. 1) показывает, что в

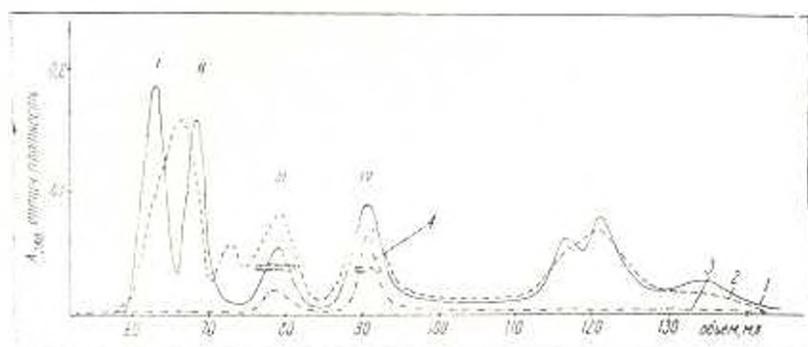


рис. 1. Разделение 50 мг яда армянской гадюки (1) и 15 мг — яда закавказской гюрзы (2) на колонке 1,5x120 см с сефадексом G-50 сверхтонкий. Условия опыта: 0,05 М аммоний-ацетатный буфер, pH 7,2, скорость элюции 6 мл/час. (3) и (4) — фосфолипазная активность в яде армянской гадюки и закавказской гюрзы соответственно.

яде закавказской гюрзы содержится больше димерной фосфолипазы по сравнению с мономерной ее формой, тогда как в яде армянской гадюки имеет место обратная картина.

На рис. 2 показано электрофоретическое фокусирование получившихся фракций яда обоих видов змей (высокомолекулярная фракция после фракционирования ядов на G-75) в диапазоне pH 3—10. Как видно из рисунка, в яде гюрзы на фоне гигантского содержания протеазных ферментов, различаются два довольно четких пика фосфолипазы A_2 с pI 3,95 и 4,15, а также ее множественные формы в диапазоне pH 7,7—9. Яд же армянской гадюки содержит 6—7 изоформ фермента, имеющих pI 6,7; 7,02; 7,2; 7,62; 7,92; 8,9 и 4,0, причем наибольшее количество фосфолипазы A_2 с наиболее выраженной ферментативной активностью содержат пики с pI 7,2 и 8,9.

Дальнейшая очистка фракций фосфолипаз A_2 после гельфильтрации G-50 сверхтонкий осуществлена при помощи ионообменной хроматографии. В градиенте pH аммоний-ацетатного буфера 3,8—4,8 на CM-целлюлозе удалось выделить кислые изоферменты яда гюрзы, а множественные формы фосфолипазы A_2 яда гадюки наилучшим образом разделяются на CM-целлюлозе в градиенте концентраций (0,01—0,1 М) и pH аммоний-ацетатного буфера (pH 6,7—7,7).

Гомогенность всех выделенных изоферментов проверена геле-электрофорезом в 15%-ном полнакриламидном геле в виде единственной полосы по методу Орштейна и Девиса [4, 11] в буферах Трис/глицин (рН 8,9) или β -аланин/уксусная кислота (рН 4,3).

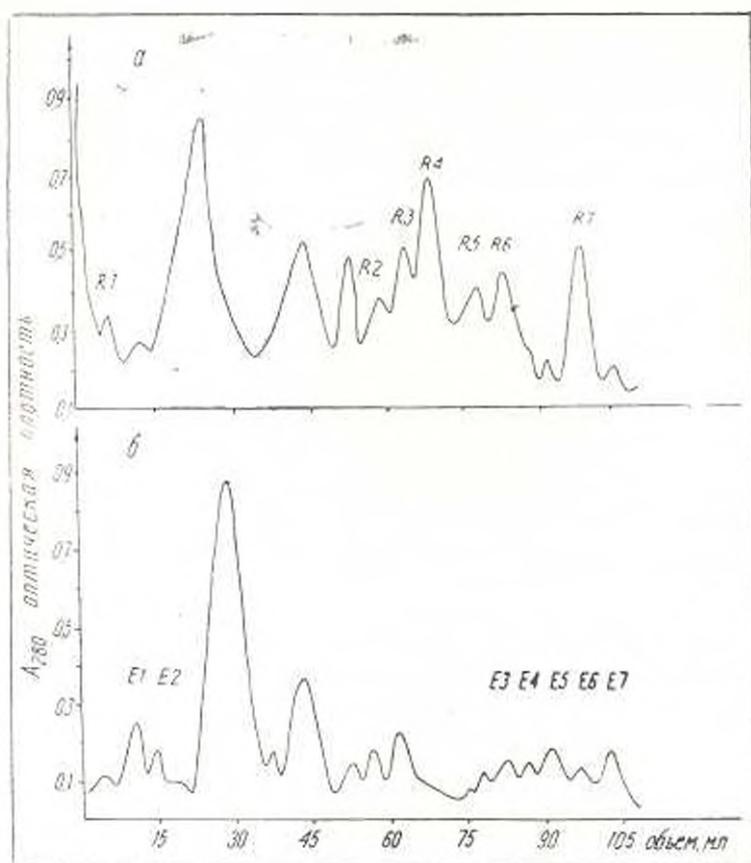


Рис. 2. Картина изоэлектрофокусирования высокомолекулярных фракций после деления на сефадексе G-75 ядов змей армянской гадюки (а) и закавказской гюрзы (б) в диапазоне рН 3—10.

Определение N-концевого аминокислотного остатка выделенных изоформ фосфолипазы A_2 из обоих источников явилось еще одним доказательством их гомогенности. В качестве N-конца дансильным методом выявлен Asx [5].

Определение молекулярной массы фосфолипаз A_2 с помощью геле-фильтрации образцов на сефадексе G-75 показало, что выделенные 2 кислые формы фосфолипазы A_2 из яда гюрзы элюируются после химотрипсиногена, и для них установлена М. м. 27.000 ± 500 Да, 2 щелочные формы фермента из яда гадюки с колонки выходят за цитохромом С, и для них графически установлена М. м. 13500 ± 500 Да.

Выход разных изоформ фосфолипазы A_2 в обоих источниках варьирует от 1 до 7% от веса исходных ядов.

Максимальную ферментативную активность все выделенные изоферменты проявляют в присутствии ионов Ca^{2+} . Замена ионов Ca^{2+} на

другие двухвалентные ионы (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+}) приводит к полному ингибированию фосфолипазной активности. В присутствии 0,5% детергента «Тритон X-100» оптимальная концентрация ионов Ca^{2+} достигает 10 мМ.

Все выделенные изоферменты проявляют высокую термостабильность, и при 75° выдерживают 3—5-минутное кипячение.

pH-зависимость действия изоформ выявляет сохранность ферментативных свойств в диапазоне pH 2—10. Изучение влияния pH на ферментативную активность фосфолипаз A_2 показывает, что оптимальная активность их действия проявляется при pH около 7,5—8,5.

С помощью реагента Элмана доказано отсутствие свободных SH-групп в белковой молекуле выделенных фосфолипаз A_2 . Это свидетельствует о том, что все остатки цистеина участвуют в образовании дисульфидных связей.

Выделенные формы фосфолипазы A_2 не проявляют фосфолиэстеразную, эстеразную [6], 5'-нуклеотидазную активности [2] и не обладают активностью цистеиновых и сериновых протеаз [1]. Обработка ферментных форм п-нитробензилхлоридом выявила, что изоферменты, выделенные из обоих ядов змей, не содержат карбогидратную часть и яде конъюгированных сахаров [8].

В целом в яде армянской гадюки фосфолипазная активность примерно в 1,5 раза выше, чем в яде закавказской гюрзы. Изоферментные составы этих ядов по фосфолипазе A_2 отличаются как качественно, так и количественно. Для двух кислых изоформ фосфолипазы A_2 яда закавказской гюрзы, а также двух основных форм фермента яда армянской гадюки установлены их белковые аминокислотные составы. Из представленной таблицы видно, что две фосфолипазы A_2 яда гюрзы содержат большое количество кислых аминокислотных остатков, тогда как ферменты яда армянской гадюки отличаются содержанием основных аминокислотных остатков. Для всех приведенных изоферментов характерно высокое содержание полуцистанов.

Аминокислотный состав изоферментов фосфолипазы A_2 из ядов змей закавказской гюрзы и армянской гадюки

Аминокислотный остаток	Яд гюрзы				Аминокислотный остаток	Яд гадюки			
	E1	E2	P4	P7		E1	E2	P4	P7
Asx	20	18	16	15	Val	5	5	4	4
Glx	8	10	8	11	Met	1	1	2	2
Ser	7	7	8	8	Cys	14	14	14	14
Gly	10	12	13	11	He	1	1	4	3
His	1	1	3	2	Leu	6	7	5	7
Arg	4	4	4	6	Phe	6	6	5	5
Thr	5	6	6	7	Lys	6	7	10	8
Ala	7	6	6	6	Trp	2	2	2	2
Pro	5	5	5	5	Итого	118	122	125	126
Tyr	7	7	6	8	N-конец	Asx	Asx	Asx	Asx

Расчеты велась исходя из молярной массы 13500 Да.

Количество остатков триптофана определено с помощью их реакции с N-бромсукцинимидом [13].

Обработка одной кислой и одной основной форм фосфолипазы A_2 *n*-бромфенилбромидом в стандартных условиях приводит к инактивации фермента. Установлено, что в результате 6-часовой инкубации в отсутствие и в среде ионов Ca^{2+} модифицируется один остаток гистидина на молекулу белка, при этом остаточная липолитическая активность составляет не более 1%. Это свидетельствует о наличии в каталитическом центре этих ферментов функционально важного остатка гистидина, как и у хорошо изученных фосфолипаз A_2 [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Акопян Т. Н., Карабахян А. А., Арутюнян А. А., Гилоян А. А. Биолог. ж. Армении. 31, 6, 612—615, 1978.
2. Галоян А. А., Гирвиц Б. Я., Поджян М. А. Вопросы биохимии мозга, 11, 89—96, 1976.
3. Brockdorff H., Jensen R. G. Lipolytic Enzymes. Acad. Press., New-York—San-Francisco—London, 194—241, 1974.
4. Davis B. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 414—427, 1964.
5. Gray W. R. In: Methods in enzymol., 11, 139—151, Acad. Press., New-York—London, 1967.
6. Haberman E. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 338, 3, 452—502, 1959.
7. Huang C. H., Lee C. Y. Toxicol., 22, 2, 207—219, 1981.
8. Knapp D. P. In: Handbook of Analytical Derivatization Reactions, 559—566, N. Y. Edit. Ley J. W. & Sons, 1979.
9. Maraganore J. M., Henrikson R. L. J. Biol. Chem., 261, 11, 1797—1800, 1986.
10. Maraganore J. M., Henrikson R. L. J. Biol. Chem., 259, 25, 13839—13842, 1984.
11. Ornstein L. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 321—349, 1961.
12. Salach J. J., Turini P., Seng R., Humber L., Singer T. P. J. Biol. Chem., 246, 2, 331—339, 1971.
13. Spande T. F., Witkop B., Degani Y., Patchornik A. Advan. Protein. Chem., 24, 97, 1970.
14. Tanaka S., Mohri Y., Kitano H., Ohno M. J. Biochem., 99, 1, 281—289, 1986.
15. Volwerk J. J., Pieterse W. A., de Haas G. H. Biochemistry, 13, 7, 1446—1456, 1974.

Получено 20 VII 1988 г.

Биолог. ж. Армении, № 8, (42), 1989

УДК 612.825

ЭКСТРАСТРИАРНАЯ ЗРИТЕЛЬНАЯ ОБЛАСТЬ КОРЫ КОШКИ ВДОЛЬ ЗАДНЕЙ СУПРАСИЛЬВИЕВОЙ БОРОЗДЫ: РЕТИНОТОПИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

М. Б. АФРИКЯН, Р. А. ДЖАВАДЯН, С. А. ХАЧАТРЯН, Л. А. АВЕГИСЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Показано, что площадь РП нейронов (82,6%) ЗСО коры кошки в основном составляет от 4 град² до 250 град², РП расположены главным образом в верхнем контрлатеральном квадранте поля зрения. На основе размеров РП и по их расположению в поле зрения сделано заключение, что зоны 21а, 21б, и 20а, 20б, очевидно, составляют одно целое. Предполагается, что ЗСО целостная зрительно-чувствительная зона коры, которая выполняет обработку зрительной сенсорной информации.