



УДК 577.112

ВЫДЕЛЕНИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ А₂ ИЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЫКА
АНАНЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР им. Г. Х. Бунятина, Ереван

Значение внутриклеточных фосфолипаз А₂, очевидно, не менее интересно, чем их роль в змеином яде, в яде насекомых и в пищеварительной железе как факторов, играющих важную гидролитическую и транспортную роль в метаболизме клеточных мембран.

Интерес к исследованиям внутриклеточных фосфолипаз А₂ для многих типов клеток к настоящему времени значительно возрос [1—7]. Установлено, что в клетках их местонахождение часто не ограничено одной органеллой или одной субклеточной фракцией [8, 9], однако малая специфическая активность и низкая концентрация в клетках затрудняют их интенсивное изучение. До сих пор известны лишь несколько внутриклеточных фосфолипаз А₂, оцененных до гомогенного состояния [1—3, 6].

В данной работе описаны результаты выделения и очистки фосфолипазы А₂ из головного мозга быка с учетом имеющейся в литературе информации относительно фосфолипаз А₂ ядов и пищеварительных желез.

100 г свежего бычьего мозга гомогенизировали в 300 мл 0,05 M ацетатного буфера, pH 5,2, содержащего 0,15 M NaCl. После озвучивания смеси ультразвуком 22 кГц в течение 1—2 мин, гомогенат оставляли на 18 ч при температуре 4°. При этом наблюдалось повышение pH среды до 5,9. После подкисления концентрированной HCl до pH 4,0 раствор гомогената подвергали нагреванию при 70° в течение 5 мин, что сопровождалось изменением цвета гомогената от кремового до темно-серого. Затем гомогенат быстро охлаждали до 4°, нейтрализовали с помощью 5 н. NaOH и центрифугировали при 5000 g 20 мин. Отделили супернатант желтого цвета, проводили его через бумажный фильтр и диализовали против дистиллированной воды (3 раза по 10 л, 28 ч). Образовавшийся осадок удаляли центрифугированием при 10000 g, 40 мин. Прозрачно-желтого цвета супернатант лиофилизовали и хранили в сухом виде.

Для дальнейшего фракционирования лиофилизованной белковой фракции применяли упрощенный двухстадийный подход разделения на основе молекулярных масс и зарядов—гель-фильтрацию на сепадексе G-50 и ИОХ на КМ-целлюлозе, обладающих липолитической активностью фракций.

С этой целью 1/2 часть лиофилизированного материала наносили на колонку с сепадексом G-50 сверхтонкий (1,2×120 см), уравновешенную 0,01 M ацетатным буфером, pH 7,2. Элюировали тем же буфером со скоростью 6 мл/ч. Вся фосфолипазная активность была обнаружена во втором из двух белковых пиков (рис. 1). Определение

величины M_r этой фракции на колонке с сефадексом G-75 сверхтонкий в трис-HCl буфере, pH 7,2, содержащем 0,1 M KCl приводит к значениям величины M_r полученной активной фракции 13—14 кД, что соответствует мономерной форме фосфолипазы A₂.

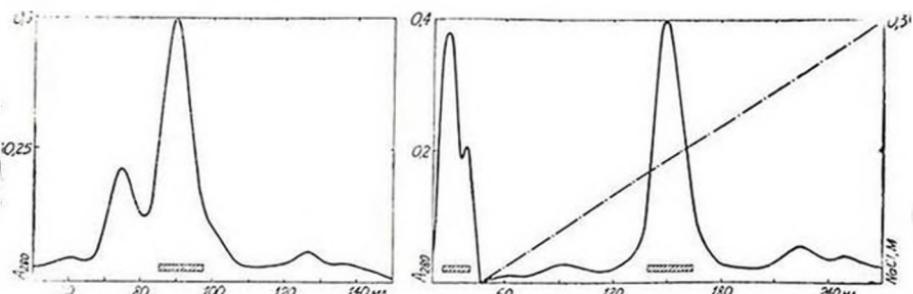


Рис. 1. Разделение белковой смеси гомогената мозга быка после лиофилизации на колонке с сефадексом G-50 сверхтонкий. Использован 0,01 M аммоний-ацетатный буфер, pH 7,2, скорость элюирования 6 мл/ч. Отмечен пик с фосфолипазной активностью

Рис. 2. Разделение фракции с фосфолипазной активностью после гель-фильтрации на G-50 на колонке с КМ-целлюлозой. Условия опыта: 0,01 M аммоний-ацетатный буфер, градиент NaCl от 0 до 0,3 M, скорость элюирования 30 мл/ч, объем градиента 2×200 мл

Фракции с фосфолипазной активностью были объединены и насыщены на колонку с КМ-целлюлозой (1,2×22 см), уравновешенной 0,01 M аммоний-ацетатным буфером, pH 7,2. Элюировали белок в градиенте ионной силы, используя NaCl в градиенте концентраций 0—0,3 в исходном буфере, объем растворов 2×200 мл (рис. 2), скорость элюирования была равна 30 мл/ч.

Ферментативную активность на всех стадиях очистки и разделения определяли ацидометрическим методом, используя смешанные мицеллы субстрата с детергентом тритон X-100, как указано в работе [10], однако вносили 1—10 мкг фермента в водном растворе (5 мкл), что в 10—100 раз больше, чем при измерении фосфолипазной активности ядов змей. В качестве субстрата использовали яичный лецитин, или дигидральмитоцеллентин, гидролиз проводили при 37°, pH около 8,0 в присутствии 0,01—0,02 M Ca²⁺ без которого фосфолипазная активность не проявлялась. Гомогенность фракций на всех стадиях разделения и индивидуальность выделенного белка контролировали методом диск-электрофореза в 15%-ном растворе ПААГ в стандартных условиях [11]. Индивидуальность белка была определена электрофоретически в 10%-ном растворе ПААГ в присутствии 0,1%-ного ДДС-Na [12] и оценена ее величина M_r , равная 13,5±0,5 кД.

Предварительные измерения позволили выявить оптимум фосфолипазной активности при pH 8,0±0,5 ед. в присутствии Ca²⁺. Замена последнего на другие двухвалентные ионы приводит к ингибированию ферментативной активности. pH-зависимость действия фермента выявляет сохранность ферментативных свойств в диапазоне pH 2—10. Фермент обладает высокой термостабильностью при 70°, устойчив к 5-минутному кипячению. Отсутствие свободных SH-групп

в белковой молекуле фосфолипазы A₂ доказано с помощью реагента Эллмана [13].

Таким образом, выделенная нами фосфолипаза A₂ из мозга быка является Ca²⁺-зависимой, устойчивой к нагреванию и проявляющей оптимальную ферментативную активность при pH 8,0. Ферментный белок не содержит свободных SH-групп и имеет M_r около 13,5 кД, напоминая собой набор щелочных изоферментов из яда армянской гадюки.

Мы полагаем, что фосфолипаза A₂ из мозга быка будет также иметь нейтральную или щелочную pI, хотя по данным ацидометрического титрования она примерно на два порядка уступает ферменту секреторных фосфолипаз A₂ ядов змей по своей специфической активности.

Представляет интерес в дальнейшем изучить, какие имеются различия в механизме молекулярного действия и физиологической активности фосфолипазы A₂ из мозга быка по сравнению с другими внутриклеточными и секреторными фосфолипазами этого типа.

ISOLATION OF PHOSPHOLIPASE A₂ FROM BRAIN

AYANIAN A. Y.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Experimental procedure of isolation of phospholipase A₂ from animal brain has been developed. Phospholipase A₂ was purified by heat treatment of the homogenate, followed by chromatography on Sephadex G-50 and CM-cellulose. The isolated enzyme was homogeneous according to SDS-PAGE analysis, its molecular weight being 13 500±500 Da. The optimal activity of the enzyme was observed at pH 8±0,5 in the presence of Ca²⁺ (up to 20 mM).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ono T., Tojo H., Inoue K., Kugamiyama H., Yamano T., Okamoto M. J. Biochem., v. 96, № 3, p. 785–792, 1984.
2. Stefanski E., Pruzanski W., Sternby B., Vadas P. J. Biochem., v. 100, № 5, p. 1297–1303, 1986.
3. Hara S., Kudo I., Matsuta K., Miyamoto T., Inoue K. J. Biochem., v. 104, № 3, p. 326–328, 1988.
4. Lat Ch. Y., Wada K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 157, № 2, p. 488–494, 1988.
5. De Geus P., Riegman N. H., Horrevoets A. J. G., Verhelt H. M., De Lucas G. H. Eur. J. Biochem., v. 161, № 1, p. 163–169, 1986.
6. Chang H. W., Kudo I., Tomita M., Inoue K. J. Biochem., v. 102, № 1, p. 147–154, 1987.
7. Hara S., Kudo I., Matsuta K., Miyamoto T., Inoue K. J. Biochem., v. 104, № 3, p. 326–328, 1988.
8. De Jong J. G. N., Amesz H., Darsman A. J., Lenting H. B. B. M., Van Den Bosch H. Eur. J. Biochem., v. 164, № 129–135, 1985.
9. Bar-Sagi D., Syhan J. P., Cormick F. M., Feramisco J. R. J. Cell Biol., v. 106, № 5, p. 1649–1659, 1988.
10. Salach J. I., Turini P., Song R., Lignuber J., Singer T. P. J. Biol. Chem., v. 246, № 2, p. 331–339, 1971.
11. Reisfeld R. A., Lewis U. J., Williams D. Nature, v. 195, № 4838, p. 281–283, 1962.
12. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., v. 244, № 16, p. 4406–4412, 1969.
13. Ellman G. L. Arch. Biochem. Biophys., v. 82, № 1, p. 70–77, 1969.

Поступила 13.XII.1989