

УДК 547.962:612.8.015

ОЧИСТКА НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКА 14-3-2

НАЗАРЯН К. Б., КАРАПЕТЯН Н. Г., КАЗАРЯН Б. А.

Методами проявительной хроматографии, гель-фильтрации и препаративного электрофореза из мозга быка выделен нейроспецифический белок 14-3-2.

При электрофорезе в 10%-ном ПААГ белок мигрирует в виде гомогенной зоны, идентичной основной фракции белка 14-3-2, полученного от Б. Мура. Показана полная иммунологическая идентичность этих белковых препаратов, а также наличие у них кросс-реакции при двойной иммунодиффузии с антисывороткой к антигену Д.

Нейроспецифический белок 14-3-2 был обнаружен при сравнении «белковых карт» экстрактов мозга и печени быка [1]. Рядом авторов было описано несколько белков со сходными характеристиками. Это α -антиген [2], белок SPR [3], антиген Д [4] и нейроспецифическая енолаза — NSE [5].

Сравнение их иммунологических и физико-химических свойств было затруднено из-за методических сложностей при воспроизведении оригинальных методик и отсутствия надежных тестов определения этих белков в процессе очистки. После энзим-электрофоретического обнаружения енолазной активности в белковой фракции с подвижностью белка 14-3-2 [6] и открытия нейроспецифической формы енолазы [7] многие авторы стали их отождествлять [8, 9], хотя, на наш взгляд, окончательно утверждать это несколько преждевременно, так как не во всех подобных исследованиях белок 14-3-2 отделялся от белка 14-2-3, имеющего очень близкие физико-химические характеристики [10]. С этой точки зрения приводимые доказательства идентичности 14-3-2 и NSE нельзя считать окончательными.

Задачей настоящей работы было выделение и очистка гомогенного препарата белка 14-3-2, сравнение с препаратами, полученными в других лабораториях, для изучения в дальнейшем их ферментативных свойств.

Материалы и методы

Для выделения белка использовали свежий бычий мозг (1—1,5 кг) который гомогенизировали в 10 мМ трис-фосфатном буфере, pH 7,5 (буфер А). Гомогенат центрифугировали 60 мин при 8000 g, и к супернатанту добавляли сухой сульфат аммония до 10% насыщения, отдел

ли осадок центрифугированием (30 мин, 8000 g) и к супернатанту добавляли сульфат аммония до 60% насыщения. После центрифугирования при тех же условиях осадок (фракция Р60) растворяли в минимальном объеме буфера А, диализовали против этого буфера и сгущали ультрафильтрацией на фильтре Diaflo UM-10 («Amicon», США) [11]. 35—40 мл сконцентрированного белкового раствора (30 мг/мл) подавали на колонку 3,3×60 см с ДЕАЕ-целлюлозой ДЕ-52 («Serva», ФРГ). Белок с колонки элюировали 0—0,35 моль линейным градиентом NaCl со скоростью 40 мл/ч. Фракции, содержащие белок 14-3-2, диализовали против буфера А, сгущали до 3 мл (конечная концентрация белка 20 мг/мл) и подавали на колонку (1,5×90 см) с сефадексом G-150, уравновешенную буфером А. Элюирование осуществляли тем же буфером со скоростью 3 мл/ч. После гель-фильтрации фракции, содержащие 14-3-2, диализовали против воды и лиофилизировали. Дальнейшую очистку проводили препаративным электрофорезом в ПААГ при pH 8. Белок определяли по Lowry и соавт. [12], аналитический электрофорез проводили по Davis [13], а реакцию двойной иммунодиффузии по Гусеву [14] в геле 1%-го агара.

Результаты исследований

Выход белка после высаливания в 60%-ном сульфате аммония экстракта 1 кг мозга составлял около 1 г, а выход очищенного продукта— 1—3 мг, что несколько ниже результата, полученного Marangos и соавт. [11]. Это объясняется тем, что в настоящей работе использовали более низкие ускорения при центрифугировании и не применяли в ходе очистки каких-либо детергентов.

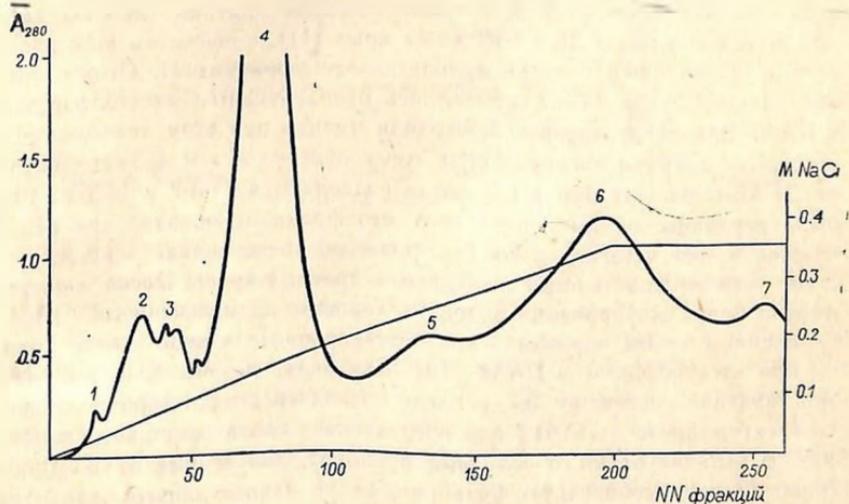


Рис. 1. Белковый профиль фракции Р60 после разделения на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой. По оси абсцисс—поглощение при 280 нм; по оси ординат—номера фракций объемом по 5 мл; I—VII—белковые пики, разделяемые в ПААГ

Характерная картина, получаемая после фракционирования на ДЕАЕ-целлюлозе, приведена на рис. 1. Цифрами на нем обозначены 7 основных пиков. Полученные после электрофореза в ПААГ белковые спектры этих пиков показаны на рис. 2. По данным ряда исследователей [11, 15], белок 14-3-2 при электрофорезе в ПААГ по Davis равен 0,7. Такой подвижностью обладает основной компонент полученной нами фракции VI, исходя из чего она и была использована для дальнейшей очистки. Типичный белковый профиль этой фракции после гель-фильтрации на сефадексе G-150 показан на рис. 3. Видно, что при

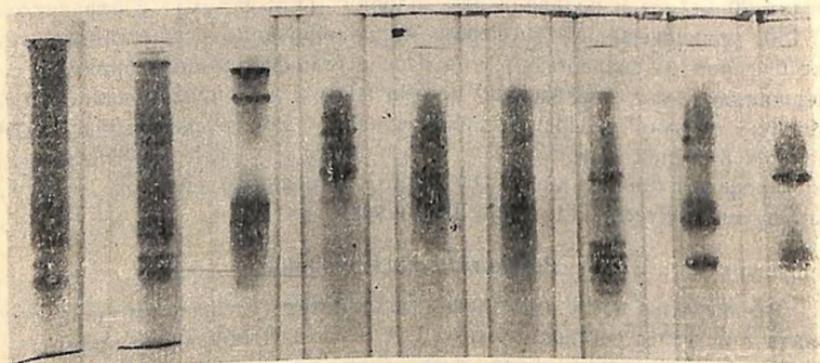


Рис. 2. Электрофорез белковых фракций. Слева направо: гомогенат, P60 и пики, полученные после разделения на ДЕАЕ-целлюлозе (I—VII)

этом она разделяется на 3 фракции. Сходная картина наблюдалась при выделении белка 14-3-2 из мозга крыс [11], причем и в этой работе для дальнейшей очистки использовалась фракция II. Окончательная очистка белка 14-3-2 достигалась препаративным электрофорезом в ПААГ при pH 8, который проводили именно при этом значении pH, поскольку попытки воспроизвести схему очистки путем хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе при pH 5, когда разделяются 14-3-2 и 14-3-3 [10], были неудачны, видимо, из-за того, что фракционирование при pH 5 ведется в зоне, близкой к изоэлектрической точке белка 14-3-2, вследствие чего он практически необратимо преципитирует. После электрофореза белок элюировали водой из хорошо размельченного ПААГ. Очищенный таким образом белок детектировался в виде четкой полосы при электрофорезе в ПААГ [13]. Как видно из рис. 4, Rf выделяемой фракции составляет 0,7, и после последней стадии (препаративного электрофореза в ПААГ) она представляет собой гомогенный препарат. В отличие от этого белковый препарат, полученный от Б. Мура, образует одну добавочную фракцию как по нашим данным, так и по данным Grasso и соавт. [10]. Одна из двух основных фракций этого препарата и очищенный нами белок полностью идентичны при электрофорезе в ПААГ (рис. 5). Важным дополнительным критерием иден-

тичности этих белков являются результаты иммунологического анализа. Белок 14-3-2, очищенный нами, и белковый препарат, полученный от Б. Мура, дает реакцию полной иммунологической идентичности в кросс-реакции с антисывороткой к антигену Д (рис. 6).

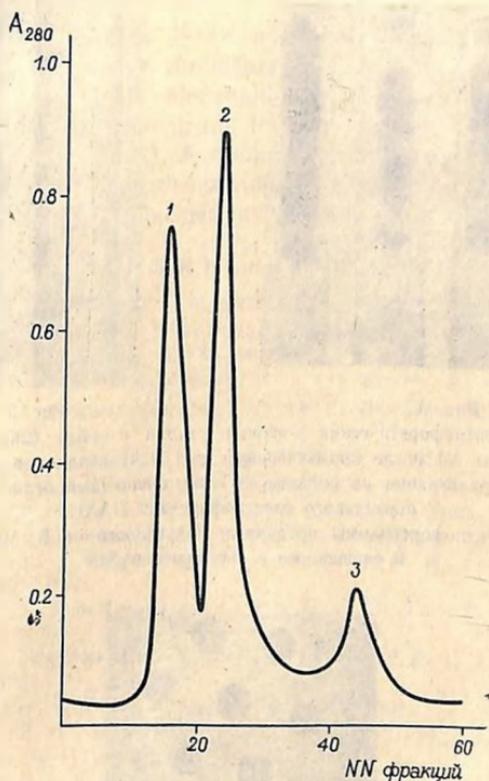


Рис. 3. Белковый профиль фракции VI после гель-фильтрации на сефадексе G-150. Объем фракций—2 мл

Вопрос о природе енолазной активности белка 14-3-2 требует дополнительных исследований. Необходимо очень точно разделять 14-3-2 и 14-3-3, что нечетко показано в предыдущих работах [16]. Отсюда и не совсем убедительные, на наш взгляд, доказательства идентичности 14-3-2 и NSE некоторыми исследователями [17]. В связи с этим нет единого мнения о минимальной величине M нативной молекулы. Так, по данным ряда авторов, она варьирует от 25 до 73 кД [2, 3, 10]. Не следует, однако, исключать возможности, что при иммунологическом контроле этапов очистки белка реагировать с антителами к 14-3-2 могут несколько фракций, и он может оказаться гетерогенным *in vivo*, как это показано для S-100 [18]. Это вполне объяснило бы разноречивость результатов в определении величины M и некоторых других физико-химических свойств белка. Возможно, что гетерогенность вызвана существ-

вованнем олигомерных форм 14-3-2, сохраняющих иммунореактивность. Неоднократные указания на тенденцию к агрегации 14-3-2 *in vitro* [5, 10] делают более вероятным это предположение.

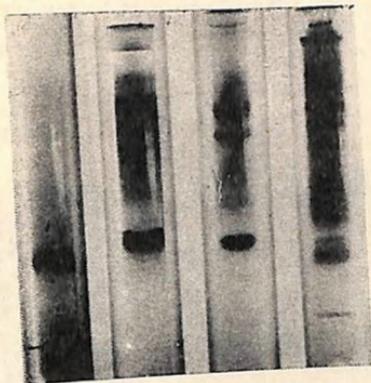


Рис. 4

Рис. 4. Электрофоретический контроль стадий очистки. Слева направо: Р60, фракция VI после хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе, фракция II после гель-фильтрации на сефадексе G-150, очищенный белок после препаративного электрофореза в ПААГ

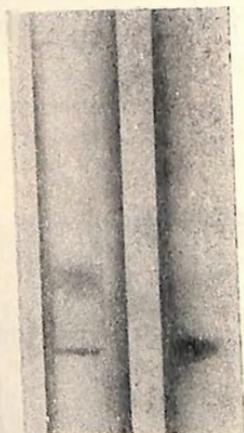


Рис. 5

Рис. 5. Электрофореграммы препарата, полученного от Б. Мура (слева) и очищенного в настоящей работе

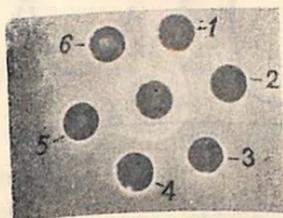


Рис. 6. Реакция двойной иммунодиффузии в агаровом геле. В центре—антисыворотка к антигену Д: 1—экстракт мышц; 2—белок 14-3-2, полученный от Б. Мура; 3—препарат, очищенный в настоящей работе; 4—экстракт мозга; 5—экстракт печени; 6—экстракт сердца

Отсюда вытекает необходимость уточнения ряда данных о содержании 14-3-2 в различных органах и тканях, что может существенно влиять на точку зрения о ценности его определения в биологических жидкостях с диагностической целью в клинической практике.

Авторы выражают глубокую признательность Б. Муру (Вашингтонский университет, Сент-Луис, США) и А. Грассо (Институт биологии клетки, Рим, Италия), Я. В. Белику и Г. А. Бережному (Институт биохимии им. А. В. Палладина, Киев) за предоставление препарата белка 14-3-2, антигена Д и антисыворотки к антигену Д.

PURIFICATION OF NEUROSPECIFIC PROTEIN 14-3-2

NAZARYAN K. B., KARAPETYAN N. H., KAZARYAN B. A.

Institute of Experimental Biology, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

Neurospecific protein 14-3-2 has been purified from bovine brain by means of ion-exchange chromatography, gel-filtration and preparative electrophoresis. On PAG electrophoresis (10%) it produced a single band comigrating with the main fraction of protein 14-3-2, received from prof. B. Moore (USA). A complete immunological identity of these two preparations has been demonstrated. Both of them crossreacted with antiserum to antigen D (Ouchterlony immunodiffusion technique).

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Moore B. W., McGregor D. J. *Biol. Chem.*, 240, 1647—1653, 1965.
2. Bennett S. G., Edelman G. M. *J. Biol. Chem.*, 243, 6234—6241, 1968.
3. Kawakita H. *J. Neurochem.*, 19, 87—90, 1972.
4. Бережной Г. А., Белик Я. В., Горбань В. А. *Укр. биохим. ж.*, 47, 411—416, 1975.
5. Marangos P. J., Zomzely-Neurath C., York C. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 68, 1309—1316, 1976.
6. Bock E., Dissing J. *Scand. J. Immunol.*, 4, 31—36, 2, 1975.
7. Rider C. C., Taylor C. B. *Biochem. Biophys. Acta*, 405, 175—187, 1975.
8. Marangos P. J., Parma A. M., Goodwin F. K. *J. Neurochem.*, 31, 727—732, 1979.
9. Thompson R. J. *Biochem. Soc. Trans.*, 8, 489—491, 1980.
10. Grasso A., Roda G., Hogue-Angeletti R. A., Moore B. W., Perez V. *J. Brain Res.*, 124, 497—507, 1977.
11. Marangos P. J., Zomzely-Neurath C., Luk D. C. M., York C. *J. Biol. Chem.*, 250, 1884—1891, 1975.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275, 1951.
13. Davis B. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404—427, 1964.
14. Гусев А. И.—В кн.: Иммунохимический анализ (под ред. Л. А. Зильбера), М., Медицина, с. 99—119, 1968.
15. Boston P., Jackson P. *Biochem. Soc. Trans.*, 8, 617—618, 1980.
16. Saktmura K., Yoshida Y., Nabeshima Y., Takahashi Y. *Proc. Jap. Acad.* B55, 323—328, 1979.
17. Bock E., Lynne F., Rider C., Taylor C. *J. Neurochem.*, 30, 181—186, 1978.
18. Полежаев А. Б., Куприяненко Т. И. *Биохимия*, 45, 2153—2157, 1980.

Институт экспериментальной
биологии АН АрмССР, Ереван

Поступила 1. IX 1982