



УДК 577.23+577.153+615.779.94

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И СВОЙСТВА РАСТВОРИМОЙ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ H^+ -АТРАЗЫ МОЗГА БЫКА

ХВАТОВА Е. М., НОВИКОВА Н. А., КОРЯГИН А. С.

Медицинский институт, Горький

Растворимая митохондриальная H^+ -АТРаза мозга быка выделена методом ультразвуковой дезинтеграции субмитохондриальных частиц, предварительно обработанных хлороформом. Очистка фермента проводилась последовательно кислотной precipitation, высаливанием $(NH_4)_2 SO_4$, термообработкой и вновь высаливанием. Электрофорез в ПААГ выявил гомогенность полученного белка. У.А. фермента составила 16—24 мкмоль P_i /мин/мг белка. K_m для Mg АТР равна 0,69 мМ. В растворе $(NH_4)_2 SO_4$ (50% насыщения) при температуре $+4^\circ$ активность фермента сохраняется в течение нескольких месяцев. Растворимая АТРаза не чувствительна к олигомицину и ингибируется водорастворимым карбонимидом.

Для нервной ткани характерен высокий уровень энергетического обмена со значительной скоростью образования АТР (0,6—2,4 мкмоль АТР/г ткани/мин), поскольку ее основные функции связаны с большой затратой энергии [1]. Наименьшей структурной единицей, способной осуществлять катализ всех связанных с превращением АТР процессов, является H^+ -АТРАЗный комплекс, чувствительный к олигомицину, в состав которого входят несколько индивидуальных белков с величиной M_r от 11 до 380 кД и фосфолипиды. Самым высокомолекулярным компонентом в составе АТРАЗного комплекса является растворимая митохондриальная H^+ -АТРаза (сопрягающий фактор F_1). С этим ферментом связывают осуществление АТР-гидролазной и АТР-синтетазной реакций [2].

Растворимая АТРаза получена из различных тканей, дрожжей, хлоропластов, бактерий [3—7].

Описан ряд методов выделения этого фермента: экстракция АТРАЗы из ацетонового порошка [8], выделение фермента при ультразвуковой обработке субмитохондриальных частиц (СМЧ) [9] или митохондрий [10], экстрагирование фактора F_1 из СМЧ хлороформом [11] и др.

Однако получить достаточно активный препарат H^+ -АТРАЗы из митохондрий мозга при использовании методов, предложенных в литературе для фермента из других источников, нам не удалось. Выделен-

ный фермент обладал незначительной У.А. (~ 1 мкмоль P_i /мин/мг белка).

Разработанная нами методика получения растворимой митохондриальной H^+ -АТразы мозга быка учитывает особенности химического состава нервной ткани, обогащенной липидами [12].

Материалы и методы

Выделение митохондриальной фракции из головного мозга проводили методом дифференциального центрифугирования [13]. Для получения фракции, обогащенной митохондриями и одновременно лишенной миелина и синапсом, применяли центрифугирование в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (0,7—1,2—1,45 М, pH 7,5) при 60000g в течение 120 мин. Полученную фракцию хранили при -20° . Освобождение митохондрий от наружных мембран проводили на основе метода, предложенного Шиппакимым и соавт. [9]. Использовали гипотоническую среду, содержащую 0,02 М трис-HCl (pH 7,5). Суспензию митохондрий в данной среде выдерживали при 0° в течение 30 мин, затем центрифугировали 30 мин при 10000g. Полученный осадок ресуспендировали в среде, содержащей 0,9 М NaCl, 0,02 М трис-HCl (pH 7,5) и центрифугировали при 6000g в течение 10 мин. Отсутствие в митохондриях примеси наружных мембран контролировали методом электронной микроскопии.

Полученные СМЧ обрабатывали хлороформом при температуре 0° , к суспензии СМЧ в 0,25 М сахарозе добавляли 0,5 объема хлороформа при постоянном перемешивании. Осаждение частиц проводили центрифугированием при 10000g в течение 10 мин. Осадок СМЧ, обработанных хлороформом, суспендировали в среде, содержащей 0,1 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl (pH 7,5) и озвучивали в течение 5 мин на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т при частоте 22 кГц. После этого раствор центрифугировали при 140000g в течение 30 мин, осадок вновь суспендировали, дезинтегрировали и центрифугировали при тех же условиях. Полученные СМЧ хранили при -20° .

Для выделения АТразы СМЧ суспендировали в среде приведенного выше состава и озвучивали непрерывно в течение 25 мин без охлаждения с последующим центрифугированием при 200000g в течение 30 мин. Первичный супернатант, обладающий АТразной активностью, использовали для очистки фермента.

Очистку АТразы начинали кислотной преципитацией [10]: pH исследуемого раствора доводили до 5,4 1 N CH_3COOH , затем его центрифугировали при 18000g, pH полученного супернатанта быстро доводили до 7,2—7,4. Высаливание проводили добавлением к раствору фермента кристаллического $(NH_4)_2SO_4$ до конечной концентрации 50% насыщения. Раствор выдерживали при температуре 4° в течение 30—40 мин и центрифугировали 10 мин при 10000g. Термообработку осадка проводили по Racker [10], его растворяли в среде, содержащей 0,25 М сахарозы, 30 мМ АТР, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl (pH 7,5) и выдерживали на водяной бане при 64° в течение 4 мин. Раствор охлаждали при комнатной температуре до 37° и центрифугировали при 18000g в течение 10 мин. К супернатанту добавляли порошок сульфата аммония до конечной концентрации 50% насыщения. Полученный препарат хранили при 4° .

Гомогенность растворимой H^+ -АТразы контролировали методом электрофореза в 5%-ном ПААГ. Гель готовили на трис-HCl буфере (pH 7,5). Электродным буфером служил раствор трис-диэтилбарбитуровой кислоты [14]. Гели фиксировали 10%-ной ТХУ и окрашивали 0,25%-ным Кумасси R-250. Идентификацию белка, обладающего АТразной активностью, проводили непосредственно в геле [9].

АТразную активность регистрировали pH-метрическим методом [15]. Скорость реакции выражали в мкмоль P_i /мин, У.А. в мкмоль P_i /мин/мг белка. Для определения активности использовали инкубационную среду, содержащую 2 мМ АТР,

2 мМ $MgSO_4$, 3 мМ трис- HCl (рН 8,3). В пробу конечным объемом 5 мл вносили 10—15 мкг белка, реакцию регистрировали в течение 1—2 мин. Величину K_m определяли в координатах Лайнуивера-Бэрка. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [16].

Результаты и обсуждение

Для выделения АТРа́зы митохондриальную фракцию освобождали от миеллина и синапсом, что обеспечивало уменьшение количества белковых примесей в первичном супернатанте, упрощало очистку и повышало выход ферментного препарата. Для частичного разрушения белок-липидных связей в мембранах митохондрий СМЧ обрабатывали хлороформом.

Для выделения фактора F_1 применяли 3-кратное воздействие ультразвуком: дважды с короткой экспозицией озвучивания—для получения инвертированных мембранных пузырьков [9], которые затем подвергали продолжительному непрерывному воздействию ультразвуком. Применение указанных в работе Щипакина и соавт. [9] параметров ультразвуковой обработки не приводило к выделению АТРа́зы, что, по-видимому, связано с физико-химическими особенностями мембран митохондрий мозга.

Очистка выделенной растворимой АТРа́зы включала следующие операции: кислотную преципитацию, высаливание и термообработку. Данные по эффективности очистки приведены в таблице.

Таблица

Этапы очистки растворимой митохондриальной Н-АТРа́зы

Этапы очистки	Общий белок, мг	АТРа́зная активность		Выход, %	Степень очистки
		общая, мкмоль P_i /мин	У.А. мкмоль P_i /мин/мг белка		
Первичный супернатант (после осаждения СМЧ при 200000g)	13,80	21,81	1,58	100	1,00
Кислотная преципитация	9,30	16,28	1,75	74,64	1,1
Высаливание (50% насыщения $(NH_4)_2SO_4$)	1,97	9,61	4,88	44,06	3,1
Тепловая обработка	1,47	18,75	12,76	85,97	8,1
Конечный препарат	1,10	18,41	16,74	84,41	10,6

После кислотной преципитации и высаливания удалялась значительная часть белковых примесей. Применение тепловой обработки вызывало увеличение У.А. фермента в несколько раз, потери белка при этом были незначительны. Увеличение АТРа́зной активности после термообработки связывают с удалением белкового ингибитора АТРа́зы [8, 9].

Общая АТРа́зная активность, определяемая в конечном препарате АТРа́зы после всех этапов очистки, составила 84% от общей активности в первичном супернатанте. У.А. фермента при этом возрастала ~ в 11 раз. Достигнутая степень очистки белка была сравнима с таковой для препаратов АТРа́зы из других тканей [9, 10].

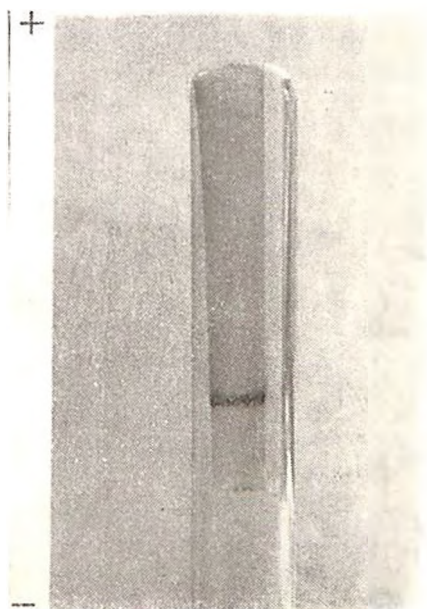


Рис. 1. Электрофореграмма растворимой H^+ -АТРазы. На гель наносили ~ 100 мкг белка, окрашивали Кумасси R-250.

Анализ чистоты полученного препарата показал, что очищенный фермент гомогенен: в геле обнаруживается единственная полоса (рис. 1). Одновременно проведенная энзиматическая идентификация выявила, что в этом же участке геля локализована АТРазная активность.

Проведенные исследования показали, что митохондриальная растворимая АТРаза мозга быка не чувствительна к олигомицину и ингибируется водорастворимым карбонимидом. У. А. фермента в разных опытах составляла 16—24 мкмоль P_i /мин/мг белка.

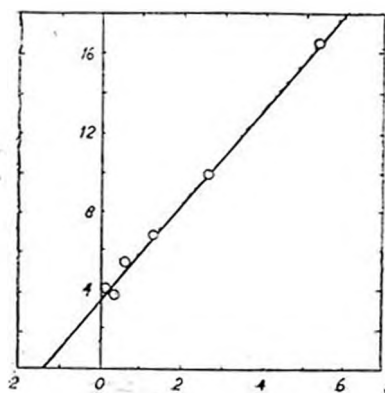


Рис. 2. Определение графическим способом величины K_m в координатах двойных обратных величин.

По оси абсцисс— $1/[S]$, мМ^{-1} , по оси ординат— $1/V$, $\mu\text{моль } P_i/\text{мин}$.

Активность фермента в водной среде при комнатной температуре сохранялась в течение трех суток. В растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50% насыщения) активность фермента при температуре 4° сохранялась в течение нескольких месяцев.

Зависимость гидролиза АТФ от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Бэрка приведена на рис. 2. Величина K_m , определенная для MgATP в этих условиях, равна 0,69 мМ, что сопоставимо с данными, приведенными для фермента из других тканей [8, 17].

Предложенный способ выделения и очистки растворимой митохондриальной H^+ -АТРаза мозга быка относительно несложен, стабилен и позволяет с высокой степенью надежности получать фермент из ткани мозга.

PURIFICATION AND CHARACTERISTICS OF THE SOLUBLE BOVINE BRAIN MITOCHONDRIAL H^+ -ATPase

KHIVATOVA E. M., NOVIKOVA N. A., KORYAGIN A. S.

Biochemical Department, Medical School, Gorky

The soluble bovine brain mitochondrial H^+ -ATPase has been extracted by ultrasonic desintegration of submitochondrial particles, pretreated with chloroform. The purification of enzyme was performed by acid precipitation, ammonium sulphate precipitation, thermal treatment and again ammonium sulphate precipitation. Electrophoresis in polyacrylamide gel proved homogeneity of the protein purified. Enzyme specific ac-

tivity is 16—24 $\mu\text{mole P}_i/\text{mg protein per minute}$. K_m for Mg-ATP is 0,69 mM. In the ammonium sulphate solution (50% saturation) protein activity is stable for several months at $+4^\circ$. The soluble ATPase is not sensitive to oligomycin and is inhibited by water-soluble carbodiimide.

ЛИТЕРАТУРА

1. Прохорова М. И.—В кн.: Нейрохимия (под ред. М. И. Прохоровой), с. 30, Л., Изд-во ЛГУ, 1979.
2. Скулачев В. П., Козлов И. А. Протонные аденозинтрифосфатазы. Молекулярные биологические генераторы тока, М., Наука, 1977.
3. Knowles A. F., Penefsky H. S. J. Biol. Chem., v. 247, p. 6524—6630, 1972.
4. Catterall W. A., Pedersen P. L. J. Biol. Chem., v. 246, p. 4987—4991, 1971.
5. Ryrie I. Arch. Biochem. and Biophys., v. 184, p. 464—475, 1977.
6. Farron F. Biochemistry, v. 9, p. 3823—3828, 1970.
7. Muller H., Neufang H., Knobloch K. Eur. J. Biochem., v. 127, p. 559—566, 1982.
8. Акименко В. К., Минков И. Б., Бакеева Л. Е., Виноградов А. Д. Биохимия, т. 37, с. 348—359, 1972.
9. Шипакин В. Н., Азарашвили Т. С., Фролова Е. П., Евтодченко Ю. В.—В кн.: Биофизика живой клетки. Мембраны (под ред. Г. М. Франка), с. 12—24, Пушкино, 1974.
10. Horstman L. L., Racker E. J. Biol. Chem., v. 245, p. 1336—1341, 1970.
11. Beechly R. B., Hubbard S. A., Linnet P. E., Mitchell A. D., Mann E. A. Biochem., v. 148, p. 533—537, 1975.
12. Хватова Е. М., Новикова Н. А., Корягин А. С. Авт. свид. на изобр., № 1070479, кл. G 01 N 38/50, 1984.
13. Samogy G., Fonio A. Acta physiol. Acad. Sci. Hung., v. 21, № 4, p. 295—308, 1962.
14. Маурер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле, М., Мир, 1971.
15. Болдырев А. А., Лебедев А. В., Ритов В. Б. Вопр. мед. химии, т. 15, с.622—626, 1969.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. K., Randall R. L. J. Biol. Chem. v. 193, p. 265—275, 1951.
17. Houstek J., Drahota Z. Biochim. et biophys. acta, v. 484, p. 127—139, 1977.

Поступила 28. IX 1984