



УДК 577.153

ЭКСТРАКЦИЯ БЕЛКОВ И ФОСФОЛИПИДОВ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ИЗ ПРЕПАРАТОВ НЕЙРОМЕМБРАН

КРАВЦОВА В. В., КРАВЦОВ А. В., ЯРОШЕНКО Н. А., АРЯМОВА Ж. М.

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР,
Институт коллоидной химии и химии воды им. А. В. Думанского АН УССР, Киев

Исследована экстракция поверхностно-активными веществами (ПАВ)—алкил-сульфатами с длиной цепи углеводородного радикала C_8-C_{15} , ДОХ-Na, твинном-80, тритоном X-100 и дигитонином—белков и фосфолипидов из нейромембран, обогащенных Na^+ , K^+ -АТразой. Показано, что эффективность солюбилизирующего действия ПАВ на мембранные структуры мозга модифицируется в присутствии NaCl: экстракция белков и фосфолипидов неионными ПАВ уменьшается, а ДОХ-Na—резко увеличивается. Изменение экстрагирующего действия алкилсульфатов имеет более сложный характер (наблюдается зависимость от длины цепи углеводородного радикала).

Изучена мицеллярная структура и определено поверхностное натяжение в сложной системе вода—дезоксихолат—мембраны—NaCl.

Сделано заключение о том, что эффективность экстракции белков и фосфолипидов ПАВ зависит как от упорядоченности, целостности мембраны, так и от состояния ПАВ в системе вода—ПАВ—мембраны—электролит.

Многие достижения современной мембранологии связаны с использованием «детергентной техники» [1, 2]. Имея амфифильную природу, эти ПАВ могут взаимодействовать с основными компонентами биомембран—белками и липидами, а в достаточно высоких концентрациях—солюбилизовать мембраны [3].

Так, неионные ПАВ и соли желчных кислот дают возможность солюбилизовать клеточную мембрану, выделить ряд биологически активных макромолекул и частично их охарактеризовать [4]. Другие ПАВ (цетилтриметиламмонийбромид, частично ДДС-Na и др.) оказывают на мембранные ферменты «жесткое» действие: происходит их инактивация и денатурация.

Активность многих мембраносвязанных ферментов, в том числе Na^+ , K^+ -АТразы (К.Ф.3.6.1.3), зависит от их белково-липидного окружения [5], нарушение которого при действии ПАВ может повлиять на их конформацию, сродство к субстрату, потребность в лигандах и т. д.

Однако несмотря на многочисленные работы по изучению влияния ПАВ на белковые структуры [2] и их широкое применение для солюбилизации бномембран [3], имеются лишь отдельные сведения, касающиеся сравнительного изучения экстрагирующего действия этих соединений на белки и фосфолипиды мембран [6, 7].

В предыдущей нашей работе [8] показано наличие корреляции между стабилизирующим (или, наоборот, угнетающим) эффектом ПАВ на интегральный мембранный комплекс— Na^+ , K^+ -АТРазу—и их способностью солюбилизовать белки и фосфолипиды в препарате нейромембран, обогащенных транспортной АТРазой. Отмечено существенное модифицирующее действие предобработки ферментного препарата NaCl на экстракцию из него белков и фосфолипидов ДДС- Na и ДОХ- Na .

В связи с этим представляло интерес более детально изучить процесс «ограниченной» солюбилизации [1, 4] нейромембран, обогащенных Na^+ , K^+ -АТРазой (NaI -микросомы), ПАВ в концентрациях, максимально активирующих эту ферментную систему [9]. Такой подход позволяет количественно оценить деструкцию мембран, при которой АТФ-фосфогидролазные центры транспортной АТРазы максимально доступны для субстрата— Mg-ATP , а также сравнить эффективность солюбилизирующего действия ПАВ, отличающихся по химической структуре, заряду и степени гидрофобности молекул. Кроме того, детального рассмотрения заслуживает эффект совместного действия дезоксихолата и NaCl на нейромембраны—резкое увеличение экстракции фосфолипидов и белков, сопровождающееся снижением активности Na^+ , K^+ -АТРазы в частично делипидированном препарате. Отмеченные особенности «поведения» ПАВ следует учитывать при использовании «детергентной техники» для изучения бномембран.

Материалы и методы

В качестве препарата нейромембран, обогащенных Na^+ , K^+ -АТРазой, использовали фракцию микросом, полученную из серого вещества мозга быка и обработанную NaI [10].

Солюбилизованные препараты получали, обрабатывая эту фракцию ПАВ (или NaCl , а затем ПАВ) при 4° в течение 30 мин. Концентрация белка в момент взаимодействия с ПАВ была постоянна—0,5 мг/мл. Суспензию, обработанную как указано выше, центрифугировали в течение 1 ч при $105000 \times g$. Солюбилизованный препарат представлял собой оптически прозрачную надосадочную жидкость.

При определении АТРазной активности использовали следующую реакционную смесь: 30 мМ трис- HCl буфер pH 7,4, 3 мМ трис- ATP , 3 мМ MgCl_2 , 150 мМ NaCl и 15 мМ KCl . В нее вносили 50 мкг белка ферментного препарата. Объем пробы составлял 1 мл, время инкубации—15 мин при 37° . Реакцию прекращали, добавляя ДДС- Na до конечной концентрации 0,3%. Na^+ , K^+ -АТРазную активность определяли по разности между Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТРазной и Mg^{2+} -АТРазной активностями. Последнюю измеряли при полном катионном составе среды, но в присутствии 10^{-4} М строфантина К. Величину У. А. выражали в мкмоль P_i , отщепленного от субстрата/мг белка/ч. P_i определяли по методу Fiske, Subbarow [11], содержание белка—по модифицированному методу Lowry и соавт. [12].

Фосфолипиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола (2:1) по методу Folch и соавт. [13]. Для этого препараты, солюбилизованные ПАВ, лиофилизировали. Препараты, содержащие NaCl, предварительно диализовали. Общее содержание фосфолипидов выражали в мкмоль P_i /мг белка. P_i определяли по методу Chen и соавт. [14].

Для определения критической концентрации мицеллообразования (ККМ) применяли метод измерения поверхностного натяжения—наибольшего давления пузырьков [15]. ККМ определяли при температуре 25°.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены данные экстракции белков и фосфолипидов анионоактивными и неионными ПАВ из микросомной фракции мозга, обработанной и необработанной NaCl. Из них следует, что октил- и особенно децилсульфат и ДОХ-Na экстрагируют из мембранного препарата Na^+ , K^+ -АТФазы, предварительно обработанного NaCl, значительно больше белков, чем из непредобработанного.

В этом случае ДОХ-Na также экстрагирует больше фосфолипидов (почти в 4,5 раза), а октил- и децилсульфат—несколько меньше (в 3,5 и 2,5 раза соответственно).

Длинноцепочечные гомологи ряда алкилсульфатов—додecil-, тетрадецил- и пентадецилсульфат, в отличие от октил- и децилсульфата, экстрагируют из предобработанного NaCl ферментного препарата в 2—2,5 раза меньше белков. Но вместе с тем, они, подобно C_8 и C_{10} -гомологам, экстрагируют в 1,5—2,5 раза больше фосфолипидов, чем из непредобработанного препарата. Это, очевидно, связано с тем, что содержание фосфолипидов дается из расчета на 1 мг белка.

Неионные ПАВ—твин-80, дигитонин и особенно тритон X-100—в случае с предобработкой NaCl экстрагируют меньше белков (в 1,2—2,5 раза) и фосфолипидов.

Таким образом, предобработка мембранной фракции NaCl эффективным стабилизирующим лигандом транспортной АТФазы [16] приводит к сходным изменениям в экстрагирующем действии неионных ПАВ на белки и фосфолипиды: экстракция уменьшается, причем в случае с каждым из детергентов индивидуально, что может быть связано с различиями в величине липофильно-гидрофильного баланса их молекул [17].

Для гомологов алкилсульфатов эта закономерность не соблюдается (рис. 1). Короткоцепочечные гомологи октил- и децилсульфат экстрагируют из нейромембран, предобработанных NaCl, почти в 2 и 3 раза соответственно больше белков, чем из непредобработанной фракции, в то время как экстракция белков додецил-, тетрадецил- и пентадецилсульфатом в присутствии NaCl уменьшается в 2,5—3 раза. Что касается экстракции фосфолипидов, то в случае предобработки мембран NaCl наблюдается в целом обратное ее увеличение (из расчета на мг белка), причем для короткоцепочечных гомологов оно выражено в большей степени.

Различия в экстрагирующем действии алкилсульфатов на мембранные белки и фосфолипиды могут быть обусловлены тем, что в случае предобработки NaCl углеводородные радикалы короткоцепочечных гомологов легче проникают в липидный матрикс мембраны, образуя «складчатые слои» [17], которые нарушают белок-липидные взаимо-

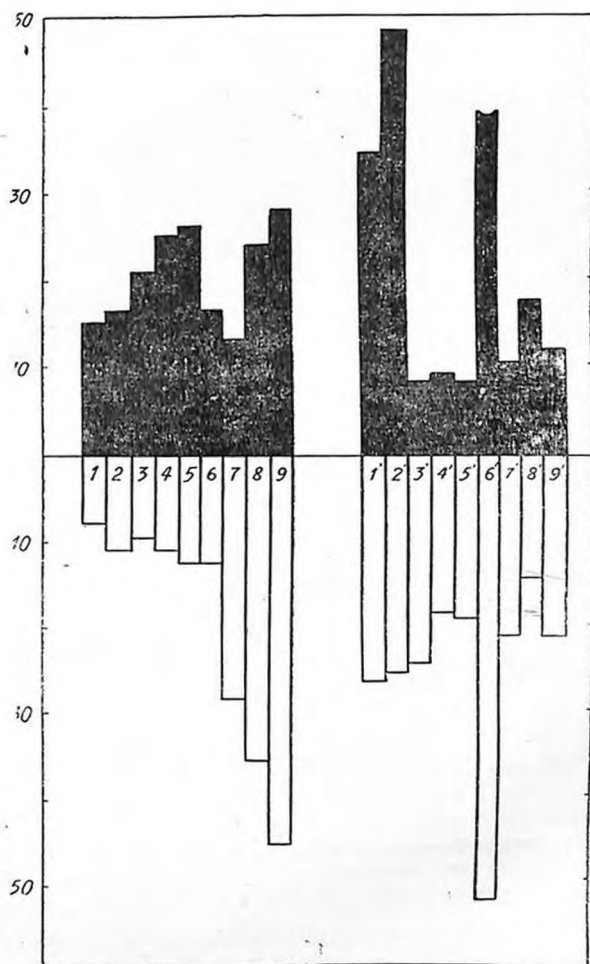


Рис. 1. Экстракция белков [■] в % и фосфолипидов [□] в мкг P₁/мг белка поверхностно-активными веществами из необработанных (1—9) и обработанных 0,6 М NaCl (1'—9') нейромембран. 1, 1'-етилсульфат (0,5%), 2, 2'-децилсульфат (0,15%), 3, 3'-додецилсульфат (0,02%), 4, 4'-тетрадецилсульфат (0,009%), 5, 5'-пентадецилсульфат (0,012%), 6, 6'-ДОХ-Na (0,1%), 7, 7'-твин 80 (0,5), 8, 8'-дигитонин (0,1%), 9, 9'-тритон X-100 (0,02%).

действия и вызывают частичную солюбилизацию мембраны [1, 2].

Наибольший интерес представляет феномен резкого увеличения экстрагирующего действия ДОХ-На в присутствии NaCl (рис. 1): экстракция белков возрастает в 2,3 раза, а фосфолипидов—в 4,3 раза по сравнению с контролем (мембранная фракция, испредобработанная NaCl).

Применение относительно «мягкодействующего» ПАВ—ДОХ-На в сочетании с NaCl перспективно в плане выделения интегральных мембранных белков, ферментных комплексов, в том числе Na^+ , K^+ -АТразы [18], с сохранением их биологической активности. Кроме того, этот метод позволяет эффективно делипидировать мембраны с тем, чтобы, используя методы реконструкции биомембран [1], выяснить роль отдельных липидных компонентов в функционировании мембранных структур.

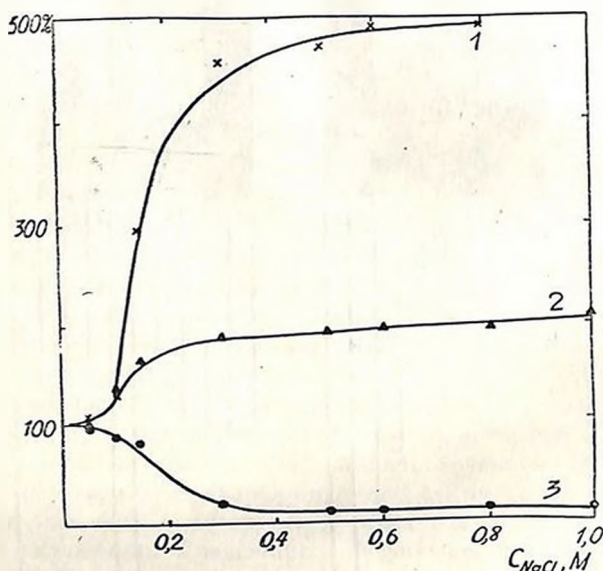


Рис. 2. Экстракция белков и фосфолипидов из нейромембран 0,1%-ным ДОХ-На в присутствии различных концентраций NaCl. 1—фосфолипиды, 2—белки, 3— Na^+ , K^+ -АТразная активность.

В связи с этим проведено более детальное исследование солюбилизации ДОХ-На нейромембран, обогащенных Na^+ , K^+ -АТразой, после их предобработки различными концентрациями NaCl (рис. 2). Как видно из рисунка, при возрастании концентрации NaCl от 0,05 до 0,3 М экстракция белков и фосфолипидов увеличивается в 1,9 и 4,5 раза соответственно. Дальнейшее возрастание концентрации NaCl вплоть до 1 М существенно не влияет на эффективность экстракции белков и фосфолипидов этим ПАВ.

Na^+ , K^+ -АТРазная активность NaI -микросом, обработанных NaCl в сочетании с 0,1%-ным DOX-Na , изменялась следующим образом: в интервале концентраций NaCl от 0,05 до 0,3 М она постепенно снижалась до 20—25% от исходной и при дальнейшем увеличении концентрации до 1 М оставалась на низком уровне (около 15% от исходной активности).

Таким образом, эффективность солибилизирующего действия ПАВ на мембранные структуры мозга, в том числе Na^+ , K^+ -АТРаза—интегральный ферментный комплекс возбудимых мембран [19], зависит от NaCl : в его присутствии экстракция белков и особенно фосфолипидов ионными ПАВ уменьшается (количественно это выражается для каждого из исследованных ПАВ по-разному), DOX-Na резко повышается, а алкилсульфатами—увеличивается, за исключением экстракции белков гомологами C_{12} , C_{14} и C_{15} (уменьшается в 2—2,5 раза).

Эффект увеличения экстракции белков и фосфолипидов анионо-активными ПАВ, в особенности DOX-Na , в присутствии сильного электролита NaCl , очевидно, связан с их «разрыхляющим» действием на структуру мембран, обусловленным увеличением сил электростатического отталкивания отрицательно заряженных групп молекул фосфолипидов в бимолекулярных слоях, что, в свою очередь, связано с частичной нейтрализацией компенсирующих положительных зарядов [20].

Кроме того, в случае с DOX-Na или другим сходным с ним по действию ПАВ присутствие электролита NaCl в системе вода—ПАВ—мембраны могло привести к изменениям во взаимодействии заряженных молекул ПАВ между собой (например, к изменению ККМ), а также между ПАВ и мембранами.

В связи с этим представляло интерес определить влияние различных концентраций NaCl на ККМ дезоксихолата в суспензии NaI -микросом. Как видно из рис. 3, увеличение концентрации электролита приводит к снижению поверхностного натяжения в системе вода— DOX-Na —мембраны и уменьшению ККМ этого ПАВ (рис. 4). При увеличении концентрации NaCl до 0,3 М и выше ККМ практически не изменяется, хотя поверхностное натяжение в системе заметно уменьшается (рис. 3, кривые 3 и 4).

Приведенные результаты, очевидно, свидетельствуют о том, что при увеличении концентрации NaCl от 0,3 до 0,5 М мицеллярная структура сложной системы вода—ПАВ—мембраны— NaCl фактически не изменяется, но само увеличение концентрации электролита действует дегидратирующе на поверхностные адсорбционные слои на границе раздела водный раствор—воздух.

Таким образом, увеличение экстрагирующего действия DOX-Na на белки и фосфолипиды нейромембран в присутствии NaCl , по-видимому, связано как с ослаблением межмолекулярных связей в мембранах, их «разрыхлением» [20], так и с уменьшением ККМ этого ПАВ,

а, следовательно, более эффективным проникновением в липидный бислой мембраны [3].

Анализ приведенных данных о специфике солюбилизирующего действия анниопоактивных и неионных ПАВ на нейромембраны, обогащенные интегральным Na^+ , K^+ -АТФазным комплексом, в присутствии NaCl показывает, что эффективность экстракции белков и фосфолипидов этими детергентами зависит как от степени упорядочен-

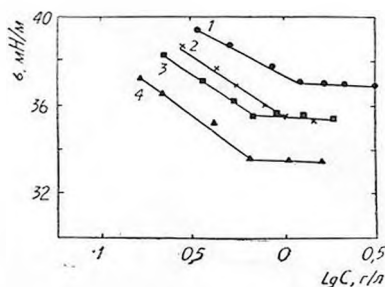


Рис. 3. Изотермы поверхностного натяжения водных растворов ДОХ-На в области критической концентрации мицеллообразования при постоянной концентрации белка (0,5 мг/мл) и различных концентрациях NaCl . 1—без NaCl , 2—0,1 М NaCl , 3—0,3 М NaCl , 4—0,5 М NaCl .

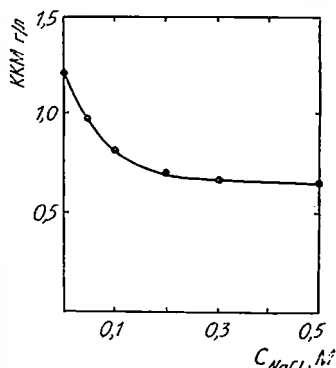


Рис. 4. Влияние различных концентраций NaCl на критическую концентрацию мицеллообразования водных растворов ДОХ-На при постоянной концентрации белка (0,5 мг/мл).

ности, целостности мембраны, так и от состояния ПАВ в системе вода—ПАВ—мембраны—электролит.

Полученные результаты дают реальное представление о том, что в условиях отсутствия общей теории биологического, в том числе мембранотропного, действия ПАВ, необходим детальный анализ их поведения в конкретных экспериментальных условиях. Накопление такого экспериментального материала позволит в конечном итоге разработать модель, адекватно описывающую поведение ПАВ в системе вода—ПАВ—мембраны с учетом целого ряда факторов внешней среды (рН, температура, ионы и др.) и принадлежности детергента к тому или иному классу ПАВ.

PROTEIN AND PHOSPHOLIPID EXTRACTION FROM NEUROMEMBRANES BY SURFACTANTS

KRAVTSOVA V. V., KRAVTSOV A. V., YAROSHENKO N. A.,
ARYAMOVA ZH. M.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, A. V. Dumansky Institute of
Colloid Chemistry and Water Chemistry, Ukrainian SSR Academy
of Sciences, Kiev

The extraction of proteins and phospholipids from neuromembranes enriched in Na^+ , K^+ -ATPase (EC 3. 6. 1. 3.), by surfactants—alkylsulfates with the length of hydrocarbon chain C_8 — C_{15} , deoxycholate, Tween-80, Triton X-100 and digitonin—has been estimated. It has been demonstrated that the effectiveness of solubilization of neuronal membranes by surfactants is modified in the presence of NaCl: the extraction of proteins and phospholipids by nonionic surfactants is diminished, and by deoxycholate is essentially enhanced.

The micellar structure has been estimated and the surface tension has been determined in the system: water-deoxycholate-membranes-NaCl.

It is concluded that the effectiveness of extraction of proteins and phospholipids by surfactants depends on both the order and integrity of membrane, and the state of surfactant in the system water-surfactant-membrane-electrolyte.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Razin S. Biochim. et biophys. acta, v. 265, p. 241—296, 1972.
2. Tanford C., Reynolds J. A. Biochim. et biophys. acta, v. 457, p. 133—170, 1976.
3. Helentius A., Simons K. Biochim. et biophys. acta, v. 415, p. 29—79, 1975.
4. Maddy A. H. Sub-Cellular. Biochem., v. 1, p. 293—201, 1972.
5. Tanaka R. Reviews of Neurosci., v. 1, p. 181—230, 1974.
6. Dunlick J. K., Marinetti G. V., Greenland P. Biochim. et biophys. acta, v. 266, p. 684—694, 1972.
7. Guillon G., Roy C., Jard S. Eur. J. Biochem., v. 92, p. 341—348, 1978.
8. Кравцова В. В., Кравцов А. В., Ярошенко Н. А. Укр. біохім. журн., т. 55, с. 392—397, 1983.
9. Кирсенко О. В., Демченко Г. О., Вавилова Г. Л., Ярошенко Н. А., Кравцов О. В. Укр. біохім. журн., т. 46, с. 300—305, 1974.
10. Nakao T., Tashima Y., Nagano K., Nakao M. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 19, p. 755—758, 1965.
11. Fiske C. H., Subbarow Y. J. Biol. Chem., v. 66, p. 375—400, 1925.
12. Cadman E., Bostwick J. R., Eichberg J. Anal. Biochem., v. 96, p. 21—23, 1979.
13. Folch J., Ascoli J., Lees M., Meath J. A., Le Barron F. N. J. Biol. Chem., v. 191, p. 833—841, 1951.
14. Chen P. S., Toribara T. Y., Warner H. Anal. Chem., v. 28, p. 1756—1758, 1966.
15. Методы испытаний водных растворов поверхностно-активных веществ, с. 39, М., Наука, 1965.

16. Swann A. C., Albers R. W. *Biochim. et biophys. acta*, v. 523, p. 215—227, 1978. ,
17. Schwuger M. J., Bartnik F. G.—In: *Anionic Surfactants*, v. 10, p. 1—50, New York and Basel, 1982.
18. Lane L. K., Copenhaver J. H., Lindenmayer G. E., Schwartz A. J. *Biol. Chem.* v. 248, p. 7197—7200, 1973.
19. Hokin L. E. *Trends in biochem. Sci.*, v. 1, p. 233—236, 1976.
20. Шагинян А. А., Закарян В. А., Квачко Т. В., Миносянц М. Х., Пасоян В. Г., Матевосян Р. О. *Биофизика*, т. 28, с. 761—765, 1983.

Поступила 26. III. 1984