



УДК 616.895.8

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ИЗОФЕРМЕНТОВ ЕНОЛАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЫКА

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

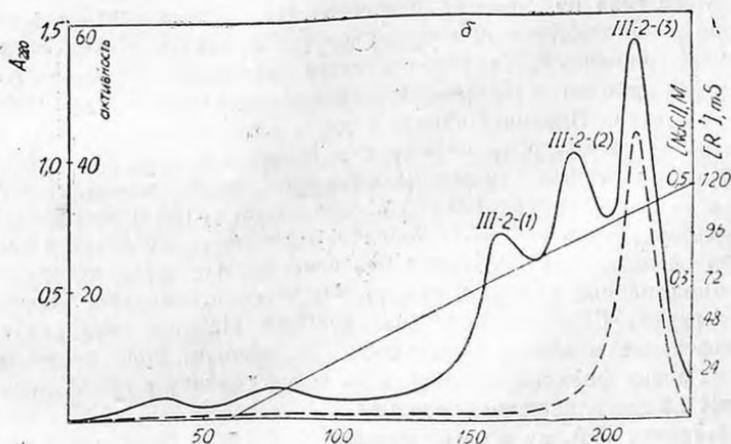
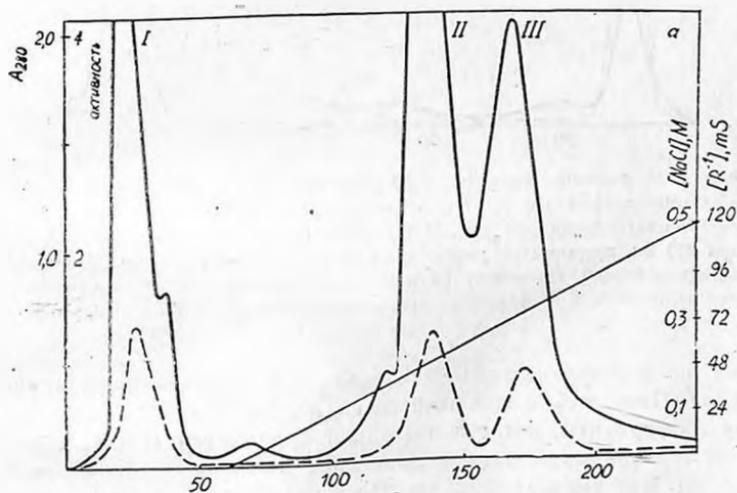
Институт экспериментальной биологии АН Арм ССР, Ереван

Енолаза (КФ. 4.2.1.11) у млекопитающих представлена, в основном, тремя изоферментами. Изофермент с субъединичным составом $\alpha\alpha$ характерен для печеночной ткани, $\beta\beta$ —для мышечной и $\gamma\gamma$ —для нервной [1]. Существование *in vivo* гетеродимеров типа $\alpha\gamma$ или других олигомеров пока нельзя считать окончательно доказанным. Установление тождественности белка 14-3-2 мономеру нейроспецифической енолазы [2] значительно повысило интерес исследователей к этому белку. Это объясняется тем, что белок 14-3-2 теперь изучается не только как специфический маркер нейронов, но и в энзимологическом аспекте при сравнительном анализе механизма функционирования изоферментов енолазы. В связи с этим выделение и очистка препаративных количеств изоферментов енолазы приобретают первостепенное значение.

Целью настоящей работы было получение в высокоочищенном виде $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ гомодимеров енолазы головного мозга. Препаративные количества мозговых енолаз получали из ткани головного мозга быка. Их иммунологическая идентичность с енолазами человека [2] позволяет использовать препараты бычьего мозга и антисыворотки к ним для определения сдвигов в содержании мозговых енолаз в биологических жидкостях человека, диагностическая ценность которых может считаться установленной [3, 4].

Гомогенизацию, экстракцию и высаливание сульфатом аммония проводили, как описано ранее [5], в 0,01 М трис-фосфатном буфере pH 7,4 с 5 мМ $MgSO_4$ (буфер А). Фракцию белков (~ 5 г), высаливающих при 60%-ном насыщении сульфатом аммония (фракция Р-60), наносили на колонку размером 4,5×30 см с ДЕАЕ-целлюлозой (ДЕ-32, Англия), уравновешенной буфером А. После промывания колонки двумя объемами буфера А связавшиеся белки элюировали 0—0,5 М линейным градиентом NaCl. Оптическую плотность элюата при 280 нм измеряли в непрерывном режиме, енолазную активность во фракциях определяли по методу Bara jowski, Wolna [6], креатинкиназную—по Ennog, Rosenberg [7].

При фракционировании на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой идентифицируется 3 пика ензимной активности (рис. 1, а), которые, по литературным данным, соответствуют $\alpha\alpha$, $\alpha\gamma$ и $\gamma\gamma$ изоферментам [1]. Дальнейшую очистку $\gamma\gamma$ изофермента проводили рехроматографией на колонке $4,5 \times 30$ см с ДЕАЕ-целлюлозой в ацетатном буфере при pH 5,3 с 0—0,5 М линейным градиентом NaCl. Третий белковый пик при этом соответствовал $\gamma\gamma$ ензиме (рис. 1, б). Электрофорез в 7,5%-ном ПААГ с ДДС-На выявил в этом пике единственную белковую фракцию с высокой ензимной активностью (рис. 2). Для возможно более полного использования полученных с первой целлюлозной колонки фракций были подвергнуты рехроматографии на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой



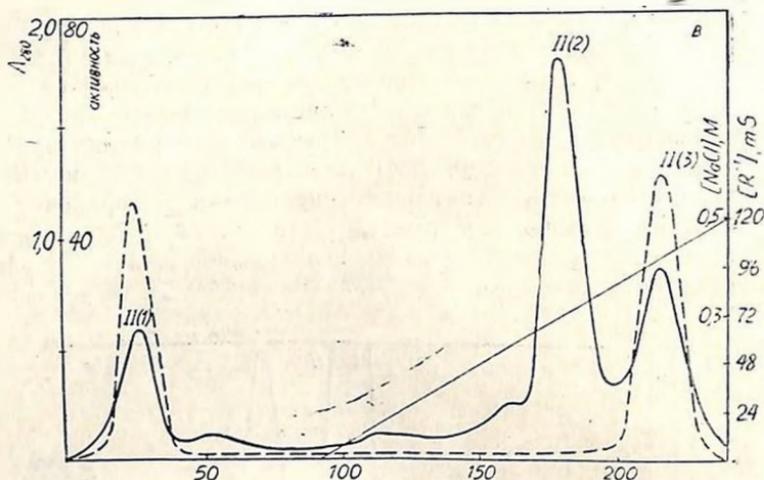


Рис. 1. Разделение фракции Р-60 на колонках с ДЕАЕ-целлюлозой. а—хроматография при рН 7,4; б—рехроматография при рН 5,3 II пика; в—рехроматография при рН 5,3 III пика. Сплошная линия—поглощение при 280 нм, прерывистая линия—енолазная активность. По оси абсцисс—номера фракций. По оси ординат слева—поглощение при 280 нм и енолазная активность в мкМ/мин/мг, справа—концентрация NaCl и электропроводимость

при рН 5,3 и белки второго пика енолазной активности (фракция II, рис. 1, а). При этом с колонкой не связывались балластные белки $\alpha\alpha$, $\alpha\gamma$ изоферменты, которые выходили с фракцией II (1), а $\gamma\gamma$ изофермент в гомогенном виде элюировался линейным градиентом NaCl (рис. 1, в). Это указывает на то, что в растворе, видимо, существует равновесие типа $\alpha\gamma \rightleftharpoons \alpha\alpha + \gamma\gamma$, что позволяет использовать в качестве источника гомодимеров и гетеродимерную фракцию. Имеет ли место подобное равновесие *in vivo*—остается неясным. Недавно Kato и соавт. [8] высокочувствительным иммуноферментным методом обнаружили в клетках Пуркиньи наряду с γ и α субъединицу енолазы, следовательно, гетеродимер $\alpha\gamma$, видимо, существует и *in vivo*.

Для дальнейшей очистки $\alpha\alpha$ енолазы использовалась гель-фильтрация на колонке (2,5×100 см) с сефадексом G-150 и препаративный электрофорез в блоке ПААГ. Разрабатывая эту схему очистки изоферментов енолазы, для получения большего выхода были использованы как гомодимерные фракции $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$, так и гетеродимерная, элюированные с первой ДЕАЕ-целлюлозной колонки. Причем, как оказалось, $\gamma\gamma$ -изофермент в электрофоретически гомогенном виде можно получать из обеих фракций, пропуская их через колонку с ДЕАЕ-целлюлозой, рН 5,3 при одинаковых условиях.

Величина У. А. $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферментов енолазы быка после очистки



Рис. 2. Электрофорез в ПААГ с ДДС-Na препаратов α (а) и γ (б) мономеров изоферментов енолазы

составляла 50 и 45 мкМ/мин/мг белка соответственно. При сравнении этого параметра с результатами других авторов, выделивших изоферменты енoлазы из мозга мыши [9], крысы [10] и человека [11], было выявлено наличие определенных видовых различий. Обращает на себя внимание большой разброс значений активности изоферментов енoлазы человека, обусловленный, видимо, трупными изменениями (20—60 мкМ/мин/мг для $\gamma\gamma$ изофермента) [2]. Исходя из этого, можно сделать вывод, что наиболее удачным объектом для выделения значительных количеств изоферментов енoлазы является мозг быка, так как в этом случае подобного разброса данных не обнаружено.

Гомогенность препаратов $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферментов енoлазы сохраняется как при электрофорезе в ПААГ с ДДС-Na, так и при аналитическом изофокусировании с амфолинами—процедурах, при которых разделяются $\gamma\gamma$ енoлаза и креатинкиназа ВВ, имеющие очень близкие физико-химические свойства [11]. С другой стороны, полученные препараты не обладают креатинкиназной активностью. Величина M_r $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферментов енoлазы мозга быка приблизительно одинакова и равна 44 кД при электрофорезе с ДДС-Na (мономер) и 85 кД при гель-фильтрации через сефадекс G-150 в буфере А (димер). Изоэлектрическая точка, определенная при аналитическом изофокусировании в ПААГ с амфолинами pH 3—10, равна 7,05 для $\alpha\alpha$ и 5,2— $\gamma\gamma$ изофермента. Здесь также имеются небольшие межвидовые различия.

PURIFICATION AND SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF BOVINE BRAIN ENOLASE ISOZYMES

NAZARYAN K. B., KAZARYAN B. A., KARAPETIAN N. G.

Institute of Experimental Biology, Armenian Academy of Sciences, Yerevan

Bovine brain enolase $\alpha\alpha$ - and $\gamma\gamma$ -isozymes have been purified by a procedure involving extraction and salting out of water-soluble proteins, chromatography on DEAE-cellulose (pH 7,4 and 5,3), Sephadex G-150 and preparative electrophoresis in PAAG.

Preparations of $\alpha\alpha$ - and $\gamma\gamma$ -enolase isozymes obtained are homogeneous on SDS PAAG electrophoresis. M_r of monomer is 40000, isoelectric points are 7,05 and 5,2, specific activity is 50 and 45 μm of product $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Райдер К., Тейлор К.-В. кн.: Изоферменты, с. 49—52, М., Мир, 1983.
2. Zomzely-Neurath C. E. Scand. J. Immunol., Suppl., v. 9, № 1, p. 1—40, 1982.
3. Carney D. N., Ihde D. C., Cohen M. N., Marangos P. J., Bunn P. A., Mirna J. D., Gazdar A. F. Lancet, № 8272, p. 583—585, 1982.
4. Ishiguro Y., Kato K., Shimizu A., Ito T., Nagaya M.—Clin. Chem. Acta, v. 121, № 2, p. 173—180, 1982.

5. Назарян К. Б., Карапетян Н. Г., Казарян Б. А.—Нейрохимия, т. 1, № 2, с. 174—179, 1982.
6. Baranowski T., Wolna E.—In: Methods Enzymology, v. 42, p. 335—338, N. Y., Acad. Press., 1975.
7. Ennor A. H., Rosenberg H. Biochem. J., v. 51, № 2, p. 606—609, 1952.
8. Kato K., Suzuki F., Umeda J. J. Neurochem., v. 37, № 4, p. 998—1005, 1981.
9. Keller A., Scarna H., Mermet A., Pujot J.—F. J. Neurochem., v. 36, № 4, p. 1389—1397, 1981.
10. Suzuki F., Umeda J., Kato K.—J. Biochem., v. 87, № 6, p. 1587—1594, 1980.
11. Gerbitz K.—D., Deufel T., Summer I., Thallmer I., Wietand O. H. Clin. Chem. Acta, v. 133, № 2, p. 233—239, 1983.

Поступила 1. VI 1985

НОВЫЕ КНИГИ

Gene Expression in brain (ed. by C. Zomzely-Neurath and W. A. Wabker), John Wiley & Sons Ltd, England, 1985.

В книге рассматриваются вопросы использования молекулярно-биологической методологии в решении нейробиологических проблем. Приведен ряд технических приемов очистки мРНК и применения синтетических олигонуклеотидов для получения комплементарной ДНК, включающейся в плазмиды, а также её клонирования и амплификации в бактериальные векторы.

В книге представлены следующие главы:

Рекомбинантные ДНК в изучении генной экспрессии в нервной ткани; Генная экспрессия пептидных гормонов в мозгу; Молекулярная биология мозга млекопитающих; Нейроспецифические фосфопротенины как модель нейрональной генной экспрессии; Экспрессия белков микротубул в мозгу; Модификация генной экспрессии в мозгу млекопитающих после гипотермии; Молекулярная биология миелинизации и генная экспрессия основного белка миелина; Вазоактивный интестинальный полипептид; от гена до пептида и др.