



УДК 577.153.211 : 547.953.04

ПОЛУЧЕНИЕ АФФИННЫХ СОРБЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ
ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 Остапенко О. В., Евстратова Н. Г., Серебrenникова Г. А.,
Евстигнеева Р. П.Московский институт тонкой химической технологии
им. М. В. Ломоносова

Описано получение биоспецифических сорбентов для выделения фосфолипазы A_2 на основе органокремнеземной матрицы и ковалентно присоединенного *sn*-глицеро-3-фосфохолина. Сорбенты различались концентрацией лиганда. С целью изучения роли гидрофобного взаимодействия фермента с матрицей исследована сорбция фосфолипазы A_2 на гидрофобных аналогах биоспецифических сорбентов. Приведена сравнительная характеристика полученных сорбентов.

Эффективным методом выделения фосфолипазы A_2 из ядов змей, пчел, поджелудочных желез животных [1—3] является аффинная хроматография, которая позволяет достигать высокой степени очистки фермента. Особенно перспективен этот способ для выделения фосфолипазы A_2 , присутствующей в животных тканях и клетках в мембранно-связанном состоянии. Традиционные методы очистки такого фермента не позволяют получать его с достаточно высокой степенью чистоты вследствие высокой лабильности внутриклеточных фосфолипаз A_2 [4, 5]. Во всех случаях эффективность аффинной хроматографии существенно зависит от выбора липидного лиганда, который должен быть достаточно доступным и отвечать ряду требований. Ранее в качестве лигандов были использованы окисленный яичный фосфатидилхолин [6], синтетические диалкилглицерофосфохолины [1, 7, 8], гидроксилсодержащие фосфолипиды различной структуры [8], алкилфосфохолины [9]. Однако не все перечисленные лиганды достаточно эффективны при выделении фосфолипазы A_2 . Авторы отмечают значительное влияние гидрофобного взаимодействия на образование фермент-субстратных комплексов, которые разрушались лишь в присутствии детергентов [6, 9].

В развитие ранее проведенных исследований по получению биоспецифических сорбентов для выделения фосфолипазы A_2 на органокремнеземной матрице [8] нами получен ряд аффинных носителей, включающих в себя в качестве липидного лиганда доступный *sn*-глицеро-3-фосфохолин. Эффективность биоспецифического сорбента в значительной мере определяется не только типом лиганда, но и степенью посадки его на данный носитель. Поэтому нами были получены сорбенты, различающиеся концентрацией *sn*-глицеро-3-фосфохолина на носителе.

sn-Глицеро-3-фосфохолин (ГФХ), отвечая всем требованиям, предъявляемым к иммобилизуемым субстратам фосфолипазы A_2 (высокое сродство к ферменту, обратимость взаимодействия с ним, наличие функциональной группы, с помощью которой его можно присоединить к матрице), отличается более простой схемой получения в сравнении с ранее синтезированными нами лигандами [8], при этом использование ГФХ позволяет исключить неблагоприятное гидрофобное взаимодействие из-за отсутствия жирнокислотных остатков. Как известно, ГФХ, получаемый омылением яичного или соевого фосфатидилхолина [10], характеризуется плохой растворимостью в органических растворителях. Поэтому посадка лиганда на органо-кремнеземную матрицу осуществлялась путем предварительного перевода ГФХ в такие его растворимые формы, как триметилсилильное производное [11] (схема 1) или кадмиевый комплекс ГФХ [12] (схема 2).

Схема 1

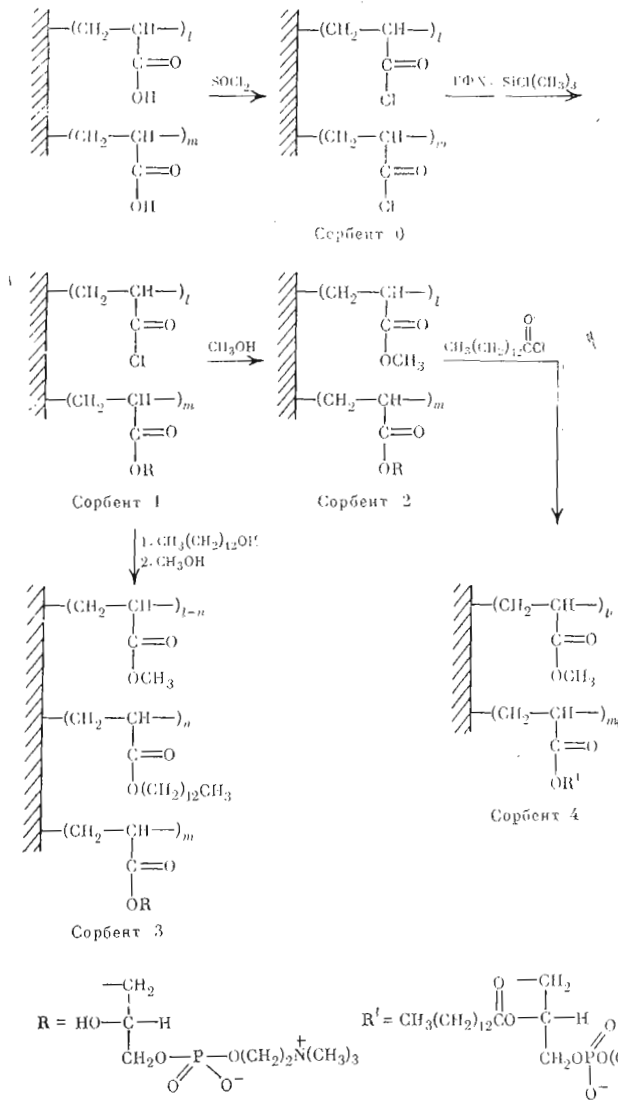
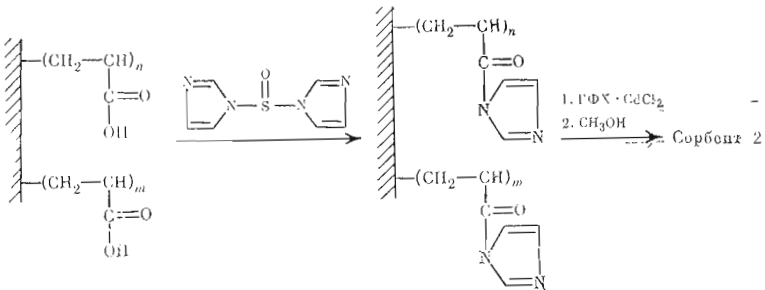


Схема 2



Ковалентное связывание с носителем, имеющим свободную карбоксильную группу, происходило с образованием сложноэфирной связи. При этом получение сорбента 1 осуществлялось путем взаимодействия триметилсилильного производного ГФХ с хлорангидридной формой матрицы. В случае кадмиевого комплекса проводилась активация карбоксильных групп органокремнеземного носителя с помощью тионилдиимдазола в отличие от применяемого ранее карбонилдиимдазола [13]. Непрореагировавшие карбоксильные группы после посадки лиганда блокировались метанолом.

Очистка фосфолипазы A₂ из яда кобры *Naja naja oxiana**

Сорбент	Концентрация лиганда, мкмоль/г	Стадия очистки	Общая активность, мкмоль/мин	Удельная активность, мкмоль/мин·мг	Количество белка, мг	Степень очистки **
2	37,6	Исходный яд	3,3	0,11	30,0	4,4
		Аффинная хроматография:				
		буфер А	0,825	0,03	25,0	
		» Б	2,104	0,44	4,6	
3	17,4	Исходный яд	9,6	0,12	80,0	4,5
		Аффинная хроматография:				
		буфер А	—	—	57,8	
		» Б	0,880	0,11	8,0	
4	29,3	Исходный яд	9,6	0,12	80,0	4,2
		Аффинная хроматография:				
		буфер А	—	—	69,0	
		» Б	3,2	0,36	8,8	
5	11,0	Исходный яд	3,3	0,11	30,0	9,3
		Аффинная хроматография:				
		буфер А	—	—	27,0	
		» Б	3,0	1,02	3,0	

* Для фермента из яда щитомордника *Aghistrodon halys blomhoffii* получены аналогичные результаты.

** Степень очистки определялась как отношение общей активности белка, вымываемого суммарно буфером Б и В, к исходной общей активности.

Сравнение двух методов посадки ГФХ на носитель позволило отдать предпочтение силильному способу вследствие его лучшей воспроизводимости и экспериментальной простоты.

С целью изучения влияния гидрофобного взаимодействия на специфическое связывание фосфолипазы A₂ с биоспецифическим сорбентом было проведено получение аффинных носителей 3 и 4, включающих в себя остатки высших жирных кислот и спиртов. Для этого сорбент 1 был обработан тридециловым спиртом, а затем метанолом. Сорбент типа 4 был получен ацилированием сорбента 2 хлорангидридом миристиновой кислоты, взаимодействующей со свободной гидроксильной группой иммобилизованного ГФХ. Сорбент 5 отличался от сорбента 2 пониженной концентрацией лиганда на матрице. Характеристики биоспецифических сорбентов приведены в таблице.

Полученные сорбенты были опробованы при выделении фосфолипазы A₂ из поджелудочной железы свиньи и змеиных ядов *Aghistrodon halys blomhoffii* и *Naja naja oxiana*. Для этого на колонку с биоспецифическим сорбентом, предварительно промытым и уравновешенным буфером А (50 мМ трис-НСl, рН 8,0; 0,01 мМ EDTA, 20 мМ CaCl₂), наносили определенное количество исходного яда или суммарной белковой фракции, выделенной по известной методике из поджелудочной железы [14]. Колонку оставляли на 18—20 ч при 4° С. Несвязанный белок элюировали буфером А, после чего колонку промывали 1% CH₃COOH и окончательно 1% CH₃COOH, содержащей 0,5% тритона X-100 или SDS. Однако SDS, будучи ингибитором фосфолипазы A₂, препятствует определению ее активности, поэтому в дальнейшем мы использовали тритон X-100. Введение детергента в буфер способствовало вымыванию неспецифически (гидрофобно) связанного белка.

Полученные сорбенты оказались неэффективными при выделении фосфолипазы A₂ из поджелудочной железы свиньи, поскольку не наблюдалось специфического связывания фермента. Эти данные соответствуют результатам, приведенным в работе [9], по разделению панкреатической фосфолипазы A₂ и бычьего сывороточного альбумина на аффинном сорбенте с алкилфосфохолином.

Использование биоспецифических сорбентов типа 2, 3, 4, 5 для выделения фосфолипаз A_2 из змеиных ядов оказалось более успешным (таблица). При этом отмечено, что результаты аффинной хроматографии фермента существенно зависят от степени посадки фосфолипида на матрице. Поскольку наибольшая степень очистки фосфолипазы A_2 , равная 9,3, была достигнута на сорбенте 5 с концентрацией лиганда 11,03 мкмоль/г, наиболее удовлетворительной степенью посадки фосфолипида можно считать значение, не превышающее 12–15 мкмоль на 1 г сорбента. При более высоком содержании лиганда биоспецифический сорбент приобретает свойства ионообменника, при этом увеличивается количество неспецифически связанного белка. Так, на сорбентах типа 2, 3, 4, содержащих 17,4–37,6 мкмоль липида на 1 г сорбента, степень очистки фосфолипазы A_2 не превышала 4,5, а удельная активность фермента была в 2,5 раза меньше, чем на сорбенте 5.

Как уже указывалось, другим важным фактором, влияющим на результаты биоспецифического выделения фосфолипазы A_2 , является наличие гидрофобных участков в составе аффинного сорбента. Повышение гидрофобности носителя, с одной стороны, может способствовать дополнительно связыванию выделяемого фермента, с другой — усиливать неспецифическую сорбцию ряда других белков. Исследование влияния гидрофобного взаимодействия на адсорбцию фосфолипазы A_2 было проведено на сорбентах 3 и 4, содержащих остатки высшей жирной кислоты или спирта. Проведенные эксперименты показали, что увеличение гидрофобности биоспецифического носителя вызывало лишь увеличение количества неспецифически связанного белка, вымываемого буфером, содержащим детергент. При этом ни степень очистки, ни удельная активность фермента существенно не отличались от результатов, полученных при выделении фосфолипазы A_2 на сорбенте типа 2.

В результате проведенных исследований показано, что биоспецифические сорбенты с иммобилизованным *sn*-глицеро-3-фосфохолином пригодны для выделения фосфолипазы A_2 из змеиных ядов. В дальнейшем предполагается опробовать данные аффинные носители для выделения фосфолипазы A_2 и из других источников.

Экспериментальная часть

В работе был использован органокремнеземный сорбент силакрил [15], предоставленный В. П. Варламовым (ИНЭОС АН СССР). Содержание COOH-групп 0,22 ммоль/г.

Содержание белка определяли по методу Лоури [16]. Измерение поглощения белковых растворов проводилось при 750 нм на спектрофотометре Hitachi EP-3T (Япония).

Концентрация фосфолипида на сорбенте определялась по методу Барлета [17].

Наличие белка в элюате при хроматографировании ядов и белков поджелудочной железы свиньи определяли, измеряя поглощение растворов при 280 нм на приборе Specord UV VIS (ГДР).

Активность фосфолипазы A_2 определяли спектрофотометрически при 412 нм на приборе Hitachi EP-3T (Япония) с использованием 1-тиомиристоил-этан-2-фосфохолина [18, 19] в буфере, содержащем трис-HCl (200 мМ), pH 7,5, ДТНБ (1 мМ), EDTA (0,6 мМ).

При аффинной хроматографии были использованы буферы А (50 мМ трис-HCl, pH 8,0; 10 мМ EDTA, 20 мМ CaCl₂), Б (1% CH₃COOH), В (1% CH₃COOH, 0,5% детергента — SDS или тритона X-100).

Получение биоспецифических сорбентов. Сорбент 0. К 1,1 г силакрила в 10 мл сухого хлороформа добавляли 5 мл SOCl₂ и 0,15 мл DMFA, перемешивали 2 ч при 60° С, сорбент отфильтровывали и промывали 200 мл сухого хлороформа, затем 200 мл сухого дихлорэтана.

Сорбент 1. К суспензии 74 мг *sn*-глицеро-3-фосфохолина в 10 мл сухого дихлорэтана добавляли 0,2 мл пиридина и 0,2 мл триметилхлорсилана.

перемешивали 30 мин при 20° С, затем добавляли сорбент 0 и кипятили 5 ч, сорбент отфильтровывали, промывали 200 мл дихлорэтана.

Сорбент 2. 720 мг сорбента 1 промывали 100 мл сухого метанола, выдерживали 30 мин в метаноле, затем промывали 500 мл дистиллированной воды, 100 мл ацетона, сушили в вакууме.

Сорбент 3. К 380 мг сорбента 1 в 10 мл сухого дихлорэтана добавляли 0,8 мл сухого пиридина и 98 мг тридецилового спирта, перемешивали 24 ч при 20° С. Сорбент отфильтровывали, промывали 200 мл сухого дихлорэтана, выдерживали 30 мин в 20 мл сухого метанола, промывали 500 мл дистиллированной воды, 100 мл ацетона, сушили в вакууме.

Сорбент 4. К 300 мг сорбента 2 в 10 мл сухого хлороформа и 0,2 мл пиридина добавляли по каплям 0,2 мл хлорангида миристиновой кислоты в 3 мл сухого хлороформа, кипятили 8 ч, сорбент отфильтровывали, промывали 100 мл дихлорэтана, 100 мл ацетона, сушили в вакууме.

Сорбент 5 получали аналогично сорбенту 2 из 340 мг сорбента 0 и 11,2 мг ГФХ.

Сорбент 2 (схема 2). К 930 мг силакрила в 10 мл сухого тетрагидрофурана добавляли при перемешивании 0,15 г тионилдимидазола в токе азота, через 30 мин добавляли 71 мг кадмиевого комплекса ГФХ в 4 мл DMSO при 40° С, затем приливали 1,15 мл раствора металлического натрия в DMSO (323 мг натрия в 20 мл DMSO), перемешивали 3 ч при 20° С. Сорбент отфильтровывали, промывали 200 мл тетрагидрофурана, выдерживали 30 мин в 50 мл сухого метанола, промывали 500 мл дистиллированной воды, 100 мл ацетона, сушили в вакууме. Концентрация ГФХ 29,3 мкмоль/г.

Выделение фосфолипазы A₂ на биоспецифических сорбентах. На колонку с 300–370 мг биоспецифического сорбента наносили указанное в таблице количество исходного яда в 1 мл буфера А. Колонки оставляли на 12–14 ч при 4° С и затем промывали этим же буфером. Связанные белки элюировали буфером Б, а затем буфером В. Во всех фракциях измеряли содержание белка и фосфолипазную активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rock C. O., Snyder F. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 16, p. 6564–6566.
2. Апсалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. Биоорганическая химия, 1977, т. 3, № 11, с. 1553–1559.
3. Евстратова Н. Г., Айялян А. Е., Мирошников А. И., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биохимия, 1982, т. 47, № 9, с. 1547–1551.
4. Tamori Y., Nishijima M., Nojima S. J. Biochem., 1979, v. 86, № 5, p. 1129–1138.
5. De Winter J. M., Vianen G. M., Van den Bosch H. Biochim et biophys. acta, 1982, v. 712, № 2, p. 332–341.
6. Natori J., Nishijima M., Nojima S., Saton H. J. Biochem., 1983, v. 93, № 2, p. 631–637.
7. Kramer R. M., Wuthrich C., Bollier C., Allegrini P. R., Zahler P. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 507, № 3, p. 381–394.
8. Евстратова Н. Г., Позмогова Г. Е., Серпухова Е. М., Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 7, с. 998–1003.
9. Aarsman A. J., Weyts F., Van den Bosch H. Biochim. et biophys. acta, 1984, v. 792, № 3, p. 363–366.
10. Brockerhoff H., Jurkowski M. Can. J. Biochem., 1965, v. 43, № 10, p. 1777–1780.
11. Lekim D., Biedermann J., Ghyezy M. Патент ФРГ, № 2647395, заявл. 20.10.76, опублик. 27.04.78.
12. Chadha J. S. Chem. Phys. Lipids, 1970, v. 4, № 1, p. 104–108.
13. Hermetter A., Paltauf F. Chem. Phys. Lipids, 1981, v. 28, № 1, p. 111–115.
14. De Haas G. H., Postema M. M., Nieuwenhuizen W., Van Deenen L. L. M. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 159, № 1, p. 103–117.
15. А. с. 682900 (СССР). Способ получения водонерастворимых биологических активных соединений/Варламов В. П., Власов А. В., Банникова Г. Е., Цетлин Б. Л., Рогожин С. В. Заявл. 28.07.77, № 2513065/2304. Опублик. в Б. И., 1980, № 44.
16. Lowry O. H., Rosebrough W. J., Zarr A. L., Randall R. J. Biol. Chem., 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.
17. Bartlett G. R. J. Biol. Chem., 1959, v. 234, № 3, p. 466–468.
18. Aarsman A. J., Van den Bosch H. FEBS Lett., 1977, v. 79, № 2, p. 317–320.
19. Aarsman A. J., Van Deenen L. L. M., Van den Bosch H. Bioorgan. Chem., 1976, v. 5, № 3, p. 241–253.

Поступила в редакцию
26.VI.1984

PREPARATION OF AFFINITY SUPPORTS FOR PHOSPHOLIPASE A₂ ISOLATION

OSTAPENKO O. V., EVSTRATOVA N. G., SEREBRENNIKOVA G. A.,
EVSTIGNEEVA R. P.

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

The preparation of biospecific organo-silica supports with different concentrations of covalently attached *sn*-glycero-3-phosphocholine was described. Sorbtion of phospholipase A₂ on the hydrophobic analogues of biospecific supports was studied with the aim of elucidating the role of the enzyme-matrix hydrophobic interactions. A comparative characterization of the prepared sorbents was carried out.