



УДК 577.152.314.01:577.112.083

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФОСФОЛИПАЗЫ А
ИЗ ГОРГОНАРИЙ *PLEXAURA HOMOMALLA* (ESPER)Леон Фернандес О.С., Ротанова Т.В.*, Антонов В.К.*,
Хенрикес Р.Д.

Институт химии и экспериментальной биологии Академии наук Кубы, Гавана;

* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

В горгонариях *Plexaura homomalla* (Esper) обнаружена мембраносвязанная фосфолипаза А. Разработана методика выделения фермента, включающая делипидизацию ткани коралла, солиобилизацию тритоном X-100, ионообменную и гидрофобную аффинную хроматографию. Молекулярная масса фосфолипазы 32000. Определены изоэлектрическая точка, температурный и pH-оптимумы активности фермента. Показано, что фосфолипаза *Pl. homomalla* катализирует гидролиз обеих сложноэфирных связей в молекуле фосфолипида со значительным преобладанием активности по типу A_2 . Тритон X-100 является, с одной стороны, активатором фосфолипазы А, а с другой — модификатором ее позиционной специфичности. Фермент инактивируется диазореагентами, что свидетельствует о функционировании карбоксильной группы в активном центре.

Горгоновые кораллы *Plexaura homomalla* (Esper) — это морской беспозвоночный организм, способный к биосинтезу простагландинов, причем по эффективности биосинтеза горгоналии значительно превосходят все известные в настоящее время природные источники этих важных биологических регуляторов [1]. Несмотря на имеющиеся сведения о наличии в *Pl. homomalla* простагландин- A_2 -синтетазы [2], информация о пути биосинтеза простагландинов в кораллах практически полностью отсутствует. Предполагается, что одним из важных ферментов, функционирующих на ключевых стадиях биосинтеза, является фермент с фосфолипазой (типа А) активностью [3—5].

Известно, что фосфолипазы А широко распространены в природе, при этом показано существование двух видов ферментов — растворимых и ассоциированных с мембранами [6]. В чистом виде получены преимущественно ферменты группы A_2 , и большинство исследований проведено с ферментами именно этого типа, выделенными из ядов змей, членистоногих, рептилий или поджелудочной железы некоторых животных [6]. Эти источники богаты растворимой формой фосфолипазы A_2 , для которой разработаны эффективные методы очистки [6]. Что касается мембраносвязанных фосфолипаз типа А, эти ферменты присутствуют в тканях в очень небольшом количестве и стандартные подходы к их выделению и очистке до настоящего времени не разработаны. Вместе с тем в литературе имеются сведения о выделении мембранных фосфолипаз из эритроцитов барана [7], тромбоцитов человека [8] и кролика [9], митохондрий печени крысы [10, 11], микросом мозга быка [12], асцитных клеток крысиной гепатомы 108А [13], из *E. coli* [14, 15] и *Mycobacterium phlei* [16].

В данном сообщении приводятся сведения об обнаружении в горгонариях *Pl. homomalla* (Esper) фосфолипазы А (КФ 3.1.1.), ассоциированной с мембранами, о выделении и очистке этого фермента, а также результаты исследования некоторых его физико-химических и каталитических свойств.

Образцы горгоналий были собраны сотрудниками Института океанологии Академии наук Кубы на северном побережье Кубы и хранились при -20°C . Мягкие ткани темно-бурого цвета были отделены от минеральной

структуры, измельчены и подвергнуты процедуре делипидизации. Для этого гомогенат ткани горгонарий экстрагировали смесями хлороформ — *n*-бутанол, а затем ацетоном и эфиром. При этом происходило отделение большого количества пигмента, и все экстракты были интенсивно окрашены. Полученный делипидизованный порошок коричневатого цвета использовали для выделения фосфолипазы.

Прежде всего было установлено, что фосфолипаза горгонарий является ферментом, прочно ассоциированным с мембранами, поскольку она не экстрагируется из делипидизованного порошка ни различными буферными, ни соевыми растворами. Однако при обработке делипидизованного порошка 0,15 М NaCl в растворе обнаруживается другой важный компонент системы метаболизма простагландинов — фермент, обладающий простагландин-гидролазной активностью. Таким образом, делипидизованный препарат горгоновых кораллов может служить источником и для выделения простагландин-гидролазы.

Методика очистки фосфолипазы из делипидизованного порошка *Pl. homomalla* включала следующие стадии: солиubilизацию фермента, ионообменную хроматографию на DEAE-сефарозе, аффинную хроматографию на фенил-сефарозе и повторную ионообменную хроматографию на DEAE-сефарозе.

Солюбилизация мембраносвязанных ферментов представляет весьма важный этап в процессе их очистки. На этой стадии могут применяться как ионные [7, 13—15], так и неионные [12, 16] детергенты, иногда используются такие жесткие условия, как обработка исходных препаратов серной кислотой [8, 17]. Обнаружено, что фосфолипаза горгонарий не солиubilизируется ионными детергентами (додецилсульфат натрия, дезоксихолат). С другой стороны, обработка делипидизованного порошка растворами, содержащими тритон X-100, приводит к солиubilизации фермента. Оптимальным солиubilизирующим раствором оказался 1% раствор тритона X-100 в трис-HCl-буфере, pH 8,0. Можно отметить, что при выделении фосфолипазы из *Mycobacterium phlei* [16] был использован солиubilизирующий раствор такого же состава.

Из полученного солиubilизата делипидизованного порошка добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ была осаждена белковая фракция, которую после растворения в минимальном объеме экстрагирующего буфера и диализа хроматографировали на DEAE-сефарозе в градиенте концентрации NaCl (рис. 1а). Фосфолипаза элюируется в составе широкого пика (II) при концентрации NaCl 0,30 М (рис. 1а). При этом фосфолипазная активность сосредоточивается примерно в 15 мл элюата. На этой стадии фермент освобождается от значительного количества сильно пигментированных примесей, не задерживающихся на колонке, кроме того, полностью отделяется детергент — тритон X-100 (пик I). Это оказалось весьма важным фактором для получения хороших результатов на следующей стадии очистки. В результате хроматографии на DEAE-сефарозе получено почти 100-кратное увеличение активности препарата фосфолипазы, отделено более 95% балластных белков (табл. 1). Надо отметить, что суммарная активность препарата на этой стадии повысилась более чем втрое, что может быть связано с удалением некоего эндогенного ингибитора фермента.

Вторым этапом очистки фосфолипазы из *Pl. homomalla* была выбрана гидрофобная хроматография, которая в применении к липолитическим ферментам может рассматриваться как аффинная хроматография. Препарат фермента, полученный на стадии ионообменной хроматографии, диализовали против трис-HCl-буфера, pH 7,5, содержащего 2 М NaCl, и паюсили на колонку с фенил-сефарозой (рис. 1б). Стандартными условиями элюции при гидрофобной хроматографии являются снижение ионной силы, уменьшение полярности элюента или введение в раствор детергентов. Оказалось, что фосфолипаза горгонарий настолько прочно связывается с фенил-сефарозой, что ни элюция бессолевым буфером (рис. 1б), ни добавление в элюент до 20% *изо*-пропилового спирта (на рис. 1 не показано) не приводит к разрушению связей фермента с носителем. И только

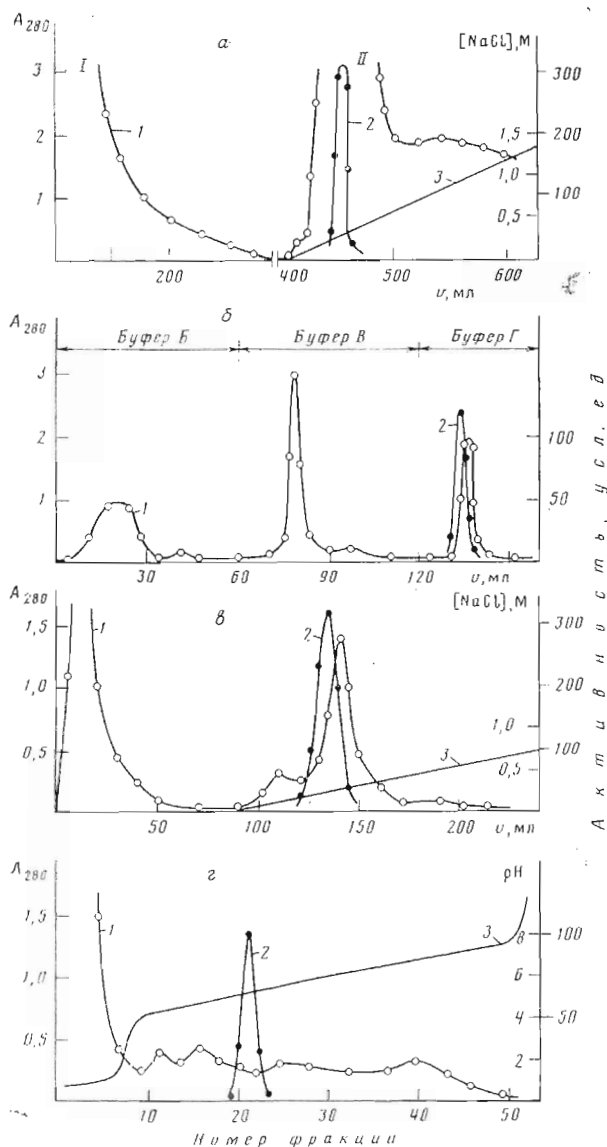


Рис. 1. Выделение мембранной фосфолипазы из ткани горгонарий *Plexaura homomalla*: а — хроматография на ДЕАЕ-сефарозе, б — хроматография на фенол-сефарозе, в — рехроматография на ДЕАЕ-сефарозе, з — изоэлектрофокусирование. 1 — A_{280} , 2 — активность (усл. ед.), 3 — [NaCl] (а, в), рН (з). Условия см. в «Экспер. части»

в присутствии 2% тригона X-100 удалось осуществить элюцию фосфолипазы (рис. 1б). Отсюда можно заключить, что фосфолипаза горгонарий является сильно гидрофобным белком, что подтверждается также невозможностью элюировать ее из комплекса с более гидрофобным, чем фенол-сефароза, носителем — октил-сефарозой. На стадии гидрофобной хроматографии активности препарата фермента возросла более чем в 5 раз, при этом отделилось ~85% неактивного белка (табл. 1).

Элюаты, обладающие фосфолипазной активностью, были диализованы и рехроматографированы на ДЕАЕ-сефарозе как описано выше (рис. 1в), при этом было отделено 90% белка, не имеющего активности. Удельная активность препарата фермента повысилась на этой стадии почти в 10 раз (табл. 1).

Таким образом, с использованием предложенной нами методики фосфолипаза из *Pl. homomalla* была очищена более чем в 5000 раз с выходом по активности 73%. Полученный препарат не был свободен от фосфоли-

Выделение фосфолипазы А из горгонарий *Plechuira homomalla*

Стадия	Белок, мг	Общая актив- ность, мкмоль/ мин	Удельная актив- ность, мкмоль/ мин·мг	Степень очистки	Выход, %
Солюбилизат делипидизованного порошка	200	0,920	0,0046	1	—
DEAE-сефароза CL-6B	6,8	3,060	0,45	97,8	100
Фенил-сефароза CL-4B	0,99	2,256	2,35	510	73
DEAE-сефароза CL-6B	0,09	2,250	23,1	5014	73

пидов, ассоциированных с ферментом. Их содержание (определяемое по содержанию фосфора) соответствовало соотношению белок — фосфолипид 1 : 1 (по весу). В литературе отмечены подобные случаи прочной ассоциации высокоочищенных препаратов фосфолипаз с фосфолипидами [7, 9, 14]. Кроме того, в полученном нами препарате фосфолипазы оставалось некоторое количество прочно связанной примеси пигмента, которую удалось отделить только при изоэлектрофокусировании (рис. 1з). При этом была установлена изоэлектрическая точка фермента, соответствующая рН 5,2. Однако значительные потери активности фермента при проведении процедуры изоэлектрофокусирования не позволили включить ее как одну из стадий в общую методику очистки фермента.

Попытки определения молекулярной массы фосфолипазы из *Pl. homomalla* хроматографией на био-геле Р-100 или сефадексе G-200 не привели к успеху: в обоих случаях фермент элюировался в свободном объеме, что формально соответствовало молекулярной массе белка, превышающей 100 000. Поскольку все известные в настоящее время мембранные фосфолипазы — относительно небольшие белки ($M_r = (12-45) \cdot 10^3$ [7-17]), разумно предположить, что фермент из *Pl. homomalla* либо склонен к ассоциации, либо образует прочные комплексы с тритоном X-100, что характерно для липофильных ферментов [18-20], и это является причиной получения высокого значения кажущейся M_r . Использование электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия для определения молекулярной массы фосфолипазы также оказалось безуспешным. Истинное значение молекулярной массы фермента, равное 32 000, удалось вычислить с помощью специфического мечения радиоактивным ингибитором (см. «Экспериментальную часть»).

Активность препаратов фосфолипазы в процессе выделения и очистки определяли методом рН-стагирования [21] по гидролизу лецитина яичного желтка в присутствии CaCl_2 и тритона X-100. Последнее следует подчеркнуть особо, поскольку для проявления фосфолипазной активности препаратами *Pl. homomalla* наличие в реакционной среде тритона X-100 абсолютно необходимо.

Влияние тритона X-100 на активность фосфолипазы проверяли в реакции фермента с синтетическим субстратом — дипальмитоилфосфатидилхолином. Известно, что тритон X-100 способен образовывать смешанные мицеллы с фосфолипидами и такого рода мицеллы являются хорошими субстратами фосфолипаз [22-24]. Оказалось, что зависимость активности фосфолипазы из *Pl. homomalla* от концентрации тритона X-100 в пределах концентраций от 0 до 32 мМ имеет сигмоидальный характер (рис. 2), причем активирующее действие детергента проявляется при концентрациях его, значительно превышающих величину критической концентрации мицеллообразования ($\text{ККМ} = 0,24$ мМ [9]); при концентрациях тритона X-100 выше 32 мМ наблюдается ингибиторный эффект. Для определения числа молекул детергента, участвующих в процессе активации фосфолипазы, полученные результаты были представлены в координатах Хилла (рис. 2). Коэффициент Хилла, определенный как тангенс угла наклона прямой, составляет 2,4, что указывает на функционирование более чем двух детергентсвязывающих центров на молекуле фермента.

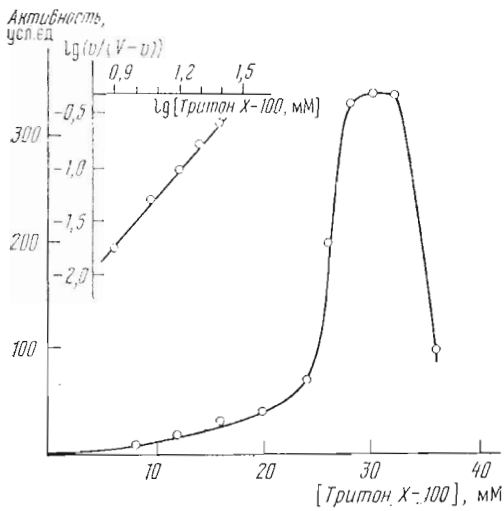


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость активности фосфолипазы А из *Pleuraea homomalla* от концентрации тритона X-100 (на вставке — график Хилла)

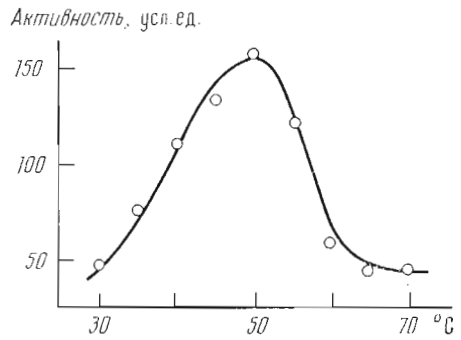


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость активности фосфолипазы А из *Pleuraea homomalla* от температуры

Влияние pH и температуры на активность фосфолипазы из Pl. homomalla. Установлено, что фермент имеет широкий pH-оптимум действия в зоне 7,5—9,5. В связи с этим кинетические характеристики фосфолипазы исследовали при pH 8,0—8,5.

На рис. 3 приведена зависимость активности фосфолипазы от температуры при pH 8,0. Видно, что фосфолипаза горгонарий — термостабильный фермент, проявляющий максимальную активность при 50°С. Интересно, что даже при 70°С фермент сохраняет более 25% активности.

По исследованным свойствам фосфолипаза *Pl. homomalla* не является уникальным ферментом: содержание фосфолипазы А в исходной ткани горгонарий соответствует 0,045%, что характерно для большинства известных мембранных фосфолипаз (об этом свидетельствуют высокие значения степени очистки ферментов — см. табл. 2); по удельной активности полученный нами препарат лишь незначительно превосходит ферменты из эритроцитов барана или *E. coli* (хотя надо иметь в виду, что измерения проводились с использованием различных субстратов); физико-химические характеристики выделенного нами препарата также хорошо согласуются с характеристиками, известными для других мембранных фосфолипаз (табл. 2). Действительно, молекулярная масса фосфолипазы из *Pl. homomalla* (32 000) хорошо укладывается в интервал значений молекулярных масс (12 000—45 000), полученный для ферментов из других источников; pH-оптимум действия многих мембранных фосфолипаз, как и для фермента горгонарий, находится в щелочной области; изоэлектрическая точка определена только для фермента из *E. coli*, и ее значение (pI 5,0) близко к значению, полученному для фосфолипазы *Pl. homomalla* (5,2); многие мембранные фосфолипазы термостабильны, при этом фермент из *E. coli*, так же как и фермент из кораллов, характеризуется температурным оптимумом при 50—60°С; и наконец, практически все известные мембранные фосфолипазы активируются в присутствии тритона X-100 (эта особенность распространяется и на некоторые растворимые фосфолипазы [25, 26]). Механизм активации фосфолипаз (и некоторых других ферментов) детергентом до настоящего времени не исследован, однако показано, что в присутствии тритона X-100 изменяются свойства как субстрата [22, 23], так и самого фермента [18]. В работе [7] отмечено также стабилизирующее действие тритона X-100 на фосфолипазу из *E. coli*.

Сравнительные данные по характеристике

Источник	Мол. масса, $M_r \cdot 10^{-3}$	pH-Оптимум	ρI
Горгонарий <i>Plexaura homomalla</i> Эритроциты барана	32 18,5	7,5–9,5	5,2
Тромбоциты человека Тромбоциты кролика	44 12	9,5	
Митохондрии печени крысы Микросомы мозга быка	18,5	8,0–9,0 7,4	
Асцитные клетки крысиной гепатомы 108A <i>E. coli</i> <i>Mycobacterium phlei</i>	29 45	7,0–9,0 8,0	5,0

Сравнительные данные по гидролизу стеароил- и арахидоилсодержащих

Субстрат	В отсутствие тритона X-100						
	Общий гидролиз, %	Относительное содержание, %			Гидролиз по типу A_1 , %	Гидролиз по типу A_2 , %	Соотношение активностей A_2/A_1
		фосфатидил- холлин	лизофосфа- тидилхоллин	жирная кислота			
1-Стеароил-2-[3H]стеароилфосфатидилхоллин	90,6	9,4	13,2	77,4	14,6	85,4	5,8
1-Стеароил-2-[^{14}C]арахидоилфосфатидилхоллин	61,3	38,7	10,7	50,6	17,5	82,5	4,7

Исследование позиционной специфичности фосфолипазы из *Pl. homomalla* проводили с помощью радиоактивно меченого субстрата, 1-стеароил-2-[3H]стеароилфосфатидилхолина. Оказалось, что фермент способен гидролизовать сложноэфирные связи как в первом, так и во втором положении молекулы субстрата, однако скорости этих процессов различны. Так, при 90%-ной глубине общего гидролиза субстрата соотношение меченых продуктов, [3H]стеариновой кислоты и 2-[3H]стеароил-лизофосфатидилхолина, составляло 5 : 1. При этом среди продуктов контрольных опытов с фосфолипазой A_2 из змеиного яда в тех же условиях 2-[3H]-меченого лизо-соединения не обнаруживается вовсе. В другом контрольном опыте было показано, что препарат фосфолипазы из *Pl. homomalla* неспособен гидролизовать специфический липазный субстрат трибутирин, что свидетельствует об отсутствии возможной примеси липазы в полученном нами препарате. Было также отмечено, что соотношение продуктов гидролиза и, соответственно, двух типов активности (A_2/A_1) остается неизменным в процессе очистки фосфолипазы. Это дает основание считать, что оба типа активности присущи одному и тому же белку.

Таким образом, можно полагать, что фосфолипаза *Pl. homomalla* — фермент, сочетающий активности типа A_1 и A_2 со значительным преобладанием последней.

Специфичность по отношению к жирным кислотам. Принимая во внимание возможное участие фосфолипазы *Pl. homomalla* на одной из стадий процесса биосинтеза простагландинов и тот факт, что ненасыщенные кислоты занимают обычно положение 2 в молекулах природных фосфолипидов, мы провели сравнение активности фермента в отношении фосфолипидов, содержащих во втором положении остатки насыщенной и ненасыщенной жирных кислот. Для этого были выбраны кислоты, которые входят составной частью в молекулы фосфолипидов горгонарий: арахидоновая

мембранных фосфолипаз

Температурный оптимум, °С	Активаторы	Степень очистки	Удельная активность, мкмоль/мин·мг	Литература
50	Тритон X-100	5014	23	Данная работа [7]
	Тритон X-100, дезоксихолат, холат	2835	4,7	
	Гексанол	1333	0,53	[8]
	Тритон X-100, дезоксихолат, холат	1016	0,83	[9]
	Тритон X-100, октилаглюкозид	1614	0,74	[11]
50—60	Тритон X-100	13 000	1,7	[12]
	»	2000	4,7	[13]
	»	»	»	[15]
	»	515	7,2	[16]

Таблица 3

фосфолипаз фосфолипазой из *Plexaura homomalla*

В присутствии 1% тритона X-100						
Общий гидролиз, %	Относительное содержание, %			Гидролиз по типу A ₁ , %	Гидролиз по типу A ₂ , %	Соотношение активностей A ₂ /A ₁
	фосфатидил-холин	лизофосфатидил-холин	жирная кислота			
96,2	3,8	15,8	80,4	16,4	83,6	5,1
89,9	10,1	3,6	86,3	4,1	95,9	23,4

(предшественник простагландинов) и старинная (относительное содержание кислот в ткани *Pl. homomalla* составляет 52 и 7,7% соответственно [27, 28]).

Из литературы известно, что по отношению к некоторым фосфолипазам детергенты, в частности тритон X-100, проявляют свойства не только активаторов и стабилизаторов, но в ряде случаев выступают как модификаторы позиционной специфичности [5, 13—15]. Учитывая, что и для фосфолипазы из *Pl. homomalla* тритон X-100 является активатором, мы решили изучить действие фермента на выбранные субстраты в присутствии и в отсутствие детергента (табл. 3). Время, в течение которого проводились опыты, было выбрано таким образом, чтобы субстраты претерпевали превращение на достаточную глубину (в присутствии тритона X-100 0,5—1 ч, а в отсутствие — 24—36 ч). Из табл. 3 видно, что в отсутствие тритона X-100 арахидоноил-производное расщепляется заметно медленнее, чем дистеароилсодержащий субстрат (для фосфолипазы змеиного яда арахидоноил-производное также оказалось худшим субстратом, чем дистеароилфосфатидилхолин). В присутствии тритона скорости расщепления обоих субстратов фосфолипазой *Pl. homomalla* становятся весьма близкими. Далее, при гидролизе обоих субстратов превалирует расщепление по второму положению молекулы. При этом отношение ферментативных активностей по типу A₂ и A₁ (A₂/A₁) при гидролизе дистеароил-производного остается примерно одинаковым независимо от присутствия детергента в реакционной смеси. Иная картина наблюдается при гидролизе 2-арахидоноил-производного: если в отсутствие тритона расщепление по типу A₂ происходит примерно в 5 раз более эффективно, чем расщепление по типу A₁ (и это совпадает с результатами, полученными для дистеароил-производного), то в присутствии тритона X-100 относительный вклад расщепления по типу A₂ резко возрастает, и величина соотношения A₂/A₁ приближается к 24. Этот

факт приобретает еще большую значимость в свете недавно полученных данных об обнаружении в ткани горгопарий эндогенного вещества с поверхностно-активными свойствами и структурными характеристиками, близкими к свойствам тритона X-100 (С. Sedeno — личное сообщение). Возможно, это соединение играет важную роль в функционировании фосфолипазы А *Pl. homomalla*.

Модификация карбоксильной группы. Известно, что одной из каталитически активных групп в активных центрах растворимых фосфолипаз типа А₂ является карбоксил аспарагиновой кислоты [29—33]. Данных о функциональных группах активных центров фосфолипаз, ассоциированных с мембранами, в литературе до настоящего времени не приводится. Однако можно было предположить наличие каталитически активной карбоксильной группы и в мембраносвязанных фосфолипазах. С целью проверки этого предположения была исследована возможность модификации фосфолипазы *Pl. homomalla* диазоагентами, N-диазоацетил-N'-(2,4-динитрофенил)этилендиамином и этиловым эфиром N-диазоацетил-L-фенилаланина.

В работе [29] было показано, что для реакции диазосоединений с карбоксильной группой фосфолипазы оптимальным является pH 6,6. Однако активность фосфолипазы *Pl. homomalla* при таком значении pH становится чрезвычайно низкой, поэтому модифицирование этого фермента проводили при pH 7,5. Было установлено, что N-диазоацетил-N'-(2,4-динитрофенил)этилендиамин ингибирует фосфолипазу, причем несмотря на неоптимальные условия для связи фермент — ингибитор [29], степень ингибирования достигала 74% (фосфолипаза змеиного яда в аналогичных условиях, но при pH 6,6 ингибируется на 96%). Эти результаты являются веским аргументом в пользу функционирования карбоксильной группы в активном центре фосфолипазы А из *Pl. homomalla*.

Экспериментальная часть

В работе использовали DEAE-сефарозу СL-6В и фенил-сефарозу (Pharmacia, Швеция), амфолиты 3,5—10 (LKB, Швеция), трис (Fluka, Швейцария), тритон X-100 (Calbiochem, США), биогель Р-100 (Bio-Rad, США), дипальмитоилфосфатидилхолин (Sigma, США), 1-стеароил-2-[³H]стеароилфосфатидилхолин и 1-стеароил-2-[¹⁴C]арахидоноилфосфатидилхолин — препараты, любезно предоставленные В. В. Безугловым (ИВХ им. М. М. Шемякина АН СССР), N-диазоацетил-N'-(2,4-динитрофенил)этилендиамин и этиловый эфир N-диазоацетил-[¹⁴C]фенилаланина — препараты, синтезированные в лаборатории химии протеолитических ферментов ИВХ им. М. М. Шемякина АН СССР. Остальные реактивы были отечественного производства квалификации не ниже х.ч.

В качестве источника змеиной фосфолипазы А₂ использовали лиофильно высушенный препарат яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* (характеристики препарата приведены в работе [34]).

Для тонкослойной хроматографии на силикагеле использовали пластинки DC-Alufolien Kieselgel 60 (Merck, ФРГ).

Буферные растворы: А — 10 мМ трис-НСl-буфер, pH 8,0, содержащий 1% тритона X-100; Б — 10 мМ трис-НСl-буфер, pH 8,0, содержащий 2 М NaCl; В — 10 мМ трис-НСl-буфер, pH 8,0; Г — 10 мМ трис-НСl-буфер, pH 8,0, содержащий 2% тритона X-100.

Выделение фосфолипазы А из *Pl. homomalla*. Все операции, кроме особо указанных, проводили при 4° С. 61 г ткани горгопарий гомогенизировали в 200 мл смеси хлороформ — бутанол (9 : 1) в гомогенизаторе РТ-1 с последующим центрифугированием (30 мин, 30 000g). Супернатант отбрасывали, осадок обрабатывали аналогичным образом 200 мл смеси хлороформ — бутанол (9 : 1) и 100 мл смеси хлороформ — бутанол (4 : 1). Полученный осадок растирали в ступке с ацетоном, супернатант декантировали, осадок промывали эфиром, сушили в вакууме. Выход делипидизованного порошка составлял 20—25 г (30—40% в расчете на влажный вес исходной ткани).

25 г делипидизованного порошка перемешивали 2 ч с 90 мл 0,15 М NaCl, центрифугировали, супернатант использовали для выделения простагландин-А₂-гидролазы. Осадок суспендировали в 250 мл буфера А, инкубировали 45 мин при 37° С и центрифугировали (1 ч, 80 000g), осадок отбрасывали. Соллоблизат фракционировали сульфатом аммония (0,4—0,7 па-

сыщения) и центрифугировали (20 мин, 35 000 g). Осадок в минимальном объеме буфера А диализовали против того же буфера и наносили на колонку (2,5×11 см) с DEAE-сефарозой, уравновешенной буфером А. Промывали 400 мл буфера А, белки элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0–1,5 М) в буфере А (2×125 мл) со скоростью 18 мл/ч (объем фракции 3 мл). Фракции с фосфолипазной активностью ([NaCl]=0,25–0,35 М) объединяли и диализовали 16 ч против буфера Б. Раствор наносили на колонку (2×4 см) с фенил-сефарозой, уравновешенной буфером Б, промывали 60 мл буфера Б, затем 60 мл буфера В и 30 мл буфера Г со скоростью 18 мл/ч (объем фракции 3 мл). Фракции с фосфолипазной активностью объединяли и диализовали 16 ч против буфера А. Раствор наносили на колонку (2,5×11 см) с DEAE-сефарозой и проводили хроматографию как описано выше. Фракции с фосфолипазной активностью ([NaCl]=0,18–0,25 М) объединяли и хранили при 4° С.

Изоэлектрофокусирование в градиенте плотности раствора сахарозы проводили на приборе фирмы LKB (Швеция) по методике, рекомендованной в проспекте фирмы. В колонку объемом 140 мл вносили 1–5 мг препарата фермента.

Определение активности фосфолипазы в процессе очистки проводили при 40° С. В ячейку pH-стата ТТТ-60 (Radiometer, Дания) помещали 1,5 мл эмульсии яичного желтка (1 желток в 1 мМ трис-НСl-буфере, содержащем 30 мМ тритон X-100 и 10 мМ CaCl₂), добавляли 100 мкл раствора фосфолипазы и регистрировали объем 0,01 н. щелочи, расходующийся на титрование выделяющейся жирной кислоты, во времени. За единицу активности принимали активность такого количества фермента, которое катализирует гидролиз 1 мкмоль субстрата за 1 мин.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [35], используя реагент фирмы Bio-Rad (США).

Исследование влияния концентрации тритона X-100, pH и температуры на гидролиз дипальмитоилфосфатидилхолина. Состав проб: концентрация фермента (1–50)·10⁻⁷ М, концентрация субстрата 2,5 мМ, 1 мМ трис-НСl-буфер (pH 6,5–9,5), 0–2,5% тритон X-100, объем пробы 1,5 мл, 30–70° С. Субстрат преинкубировали 5 мин в реакционной среде, затем вносили фермент и регистрировали во времени объем 0,01 н. щелочи, расходующийся на титрование выделяющейся жирной кислоты, на pH-стате ТТТ-60.

Исследование специфичности фосфолипазы. 1,2 мМ фосфолипид (50 мкг, 0,5 мкКи) инкубировали 1 ч (37° С) в 50 мкл 10 мМ трис-НСl-буфера, pH 8,5, содержащего (0,5–5)·10⁻⁶ М фермент, 30 мМ тритон X-100 и 10 мМ CaCl₂. Через определенные промежутки времени аликвоты реакционной смеси (по 10 мкл) хроматографировали на пластинках с силикагелем в системе хлороформ – метанол – NH₃OH (65 : 35 : 5) и определяли распределение радиоактивности по длине хроматограммы. Для этого использовали два метода: 1) полоски хроматограммы разрезали на фрагменты длиной 1 см и определяли радиоактивность каждого фрагмента, используя толуольный сцинтиллятор, на приборе Intertechnique SL-30 (Франция); 2) полоски хроматограмм анализировали с помощью сканирующего автоматического счетчика Thin-Linear Analyzer LB 2832 (Berthold, ФРГ). R_f перасищенного фосфолипида 0,65; жирной кислоты – 0,90; лизофосфолипида – 0,45.

Липолитическую активность фосфолипазы проверяли с использованием в качестве субстрата эмульсии трибутирина по методике [36].

Химическую модификацию фосфолипазы диазосоединениями осуществляли в присутствии ионов меди как катализатора при мольном соотношении фермент – ингибитор – ионы меди 1 : 30 : 60 [37]. Запасные растворы ингибитора готовили в ацетоне, CuSO₄ – в 0,3 М боратном буфере, pH 6,5. Белок инкубировали 15 мин (20° С) в присутствии ионов меди, добавляли ингибитор и инкубировали еще 1,5 ч. Затем определяли остаточную активность фосфолипазы титриметрическим методом.

Для определения молекулярной массы фермента 5 мг его инкубировали с 4,29 мкмоль этилового эфира N-диазоацетил-[¹⁴C]фенилаланина (82 810 имп/мин) в 3,5 мл 10 мМ трис-НСl-буфера, pH 7,5, в присутствии

2,6 мМ CuSO_4 . Избыток несвязавшегося модификатора отделяли на колонке (1,5×80 см) с биогелем Р-100 (0,3 М боратный буфер, рН 6,5, скорость элюции 10 мл/ч, объем фракции 2,5 мл) и определяли радиоактивность каждой фракции с жидким сцинтиллятором на приборе InterTechnique SL-30 (Франция). Оказалось, что во взаимодействие с ферментом вступило 0,157 мкмоль (3035 имп/мин) диазоингибитора. При условии, что связывание фермент — ингибитор осуществляется в соотношении моль/моль, расчетная молекулярная масса фермента составляет 32 000.

Авторы выражают признательность Л. М. Гинопдману за систематическую помощь и полезное обсуждение результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weinheimer A. J., Spraggins R. L. *Tetrahedron Lett.*, 1969, v. 59, p. 5185—5188.
2. Corey E. J., Washburn W. N., *Chem J. C. J. Amer. Chem. Soc.*, 1973, v. 95, № 6, p. 2054—2055.
3. Flower J. R., Blackwell J. C. *Biochem. Pharmacol.*, 1976, v. 25, p. 285—291.
4. Vogt W. *Advances in prostaglandin and thromboxane research*, 1978, v. 3, p. 89—95.
5. Van den Bosh H. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 604, № 2, p. 191—246.
6. Брокерзоф Х., Джеусен Р. В кн.: Липолитические ферменты. М.: Мир, 1978, с. 242—325.
7. Kramer R. M., Wülthrich C., Bollter C., Allergini P. R., Zahler P. *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 507, № 3, p. 381—394.
8. Apitz-Castro R. J., Mas M. A., Cruz M. R., Jain M. K. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1979, v. 91, № 1, p. 63—71.
9. Kannagi R., Koizumi K. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 556, № 3, p. 423—433.
10. Winter De J. M., Vianen G. M., Van den Bosh H. *Biochim. et biophys. acta*, 1982, v. 712, № 2, p. 332—341.
11. Waite M., Sisson P. *Biochemistry*, 1971, v. 10, № 12, p. 2377—2383.
12. Gray N. C. C., Strickland K. P. *Can. J. Biochem.*, 1982, v. 60, № 2, p. 108—117.
13. Natori Y., Nishijima M., Nojima Sh., Satoh H. J. *Biochem.*, 1980, v. 87, № 3, p. 959—967.
14. Scandella J., Kornberg A. *Biochemistry*, 1971, v. 10, № 24, p. 4447—4456.
15. Nishijima M., Nakaike Sh., Tamori Yu., Nojima Sh. *Eur. J. Biochem.*, 1977, v. 73, № 1, p. 115—124.
16. Nishijima M., Akamatsu Yu., Nojima Sh. *J. Biol. Chem.*, 1974, v. 249, № 17, p. 5658—5667.
17. Elsbach P., Weiss J., Franson R. C., Quagliata-Beckerdite S., Schneider A., Harris L. *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 21, p. 11000—11009.
18. Meunier J. C., Olsen R. W., Changeux J. P. *FEBS Lett.*, 1972, v. 24, № 1, p. 63—68.
19. Helenius A., Simons K. J. *Biol. Chem.*, 1972, v. 247, № 11, p. 3656—3661.
20. Rubin M. S., Tzagoloff A. J. *Biol. Chem.*, 1973, v. 248, № 12, p. 4269—4274.
21. De Haas G. H., Postema N. M., Nieuwenhuizen W., van Deenen L. L. M. *Biochim. et biophys. acta*, 1968, v. 159, № 1, p. 103—117.
22. Vedgar S., Barenholz Y., Cooper V. G., Gatt Sh. *Biochim. et biophys. acta*, 1974, v. 363, № 1, p. 98—111.
23. Lichtenberg D., Vedgar S., Cooper V. G., Gatt Sh. *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 12, p. 2574—2582.
24. Albertson Per-Ake. *Biochemistry*, 1973, v. 12, № 13, p. 2525—2530.
25. Teramoto T., Tojo H., Yamano T., Okamoto M. *J. Biol. Chem.*, 1983, v. 93, № 5, p. 1353—1360.
26. Raybin D. M., Bertsch L. Z., Kornberg A. *Biochemistry*, 1972, v. 11, № 10, p. 1754—1760.
27. Leon Fernandez O. S., Sanchez N., Bu M., Mustelier E., Henriques R. D. *Investigation Reports Chem. Exp. Biology Inst. Cuban Acad. Sci.*, 1985, № 5, p. 1—10.
28. Leon Fernandez O. S., Sanchez N., Mustelier E., Henriques R. D. *J. Biol. Sci. (Cuba)*, 1984, № 12, p. 3—9.
29. Желковский А. М., Ансалон У. Р., Дьяков В. Л., Гинопдман Л. М., Мирошников А. М., Антонов В. К. *Биоорган. химия*, 1977, т. 3, № 10, с. 1430—1432.
30. Dijkstra B. W., Kalk K. H., Hol W. G. J., Drenth J. *Mol. Biol.*, 1981, v. 147, № 1, p. 97—123.
31. Fleer E. A. N., Verheij H. M., de Haas G. H. *Eur. J. Biochem.*, 1981, v. 113, № 2, p. 283—288.
32. Scharrenburg van G. J. M., Puijk W. C., Seeger P. R., de Haas G. H., Slotboom A. J. *Biochemistry*, 1984, v. 23, № 6, p. 1256—1263.
33. Rosenberg P., Condrea E., Rapiano B. E., Soons K. R., Yang C. C. *Biochem. Pharmacol.*, 1983, v. 32, № 23, p. 3225—3230.
34. Ансалон У. Р., Шамбораир О. Г., Мирошников А. И. *Биоорган. химия*, 1977, т. 3, № 11, с. 1553—1559.
35. Bradford M. *Anal. Biochem.*, 1976, v. 72, № 1/2, p. 248—254.
36. Асагуани В. С. В кн.: Ферментные методы анализа. М.: Паука, 1969, с. 482—484.
37. Wilcox P. E. *Meth. Enzymol.*, 1972, v. 25B, p. 596—615.

Поступила в редакцию
10.VII.1986

ISOLATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PHOSPHOLIPASE
A FROM GORGONIAN *PLEXAURA HOMOMALLA* (ESPER)

LEON FERNANDEZ O. S., ROTANOVA T. V.*, ANTONOV V. K.*, HENRIQUES R. D.

*Institute of Chemistry and Experimental Biology, Academy
of Sciences of Cuba, Habana;*

**M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The membrane-bound phospholipase A is found for the first time in gorgonian *Plexaura homomalla* (Esper). The enzyme was solubilized from the delipidated coenenchyme of the gorgonian by Triton X-100 and purified 5000-fold through the ion exchange chromatography on DEAE-Sephacel CL-6B and hydrophobic affinity chromatography on Phenyl-Sepharose CL-4B. The purified enzyme contains phospholipids, has molecular mass ca. 32 000, pI 5.2, temperature optimum 50°C, wide pH-optimum 7.5–9.5. The enzyme cleaves distearoylphosphatidylcholine and 1-stearoyl-2-arachidonoylphosphatidylcholine predominantly at 2-position ($A_2/A_1=5$ and 23, resp.). Triton X-100 up to 30 mM concentration is a potent activator of the phospholipase. The enzyme does not hydrolyze tributyrin. N-Diazoacetyl-N'-(2,4-dinitrophenyl)ethylenediamine inactivates the enzyme by 74%, presumably by reaction with an essential carboxylic group of the protein molecule.