



УДК 577.153.211 : 598.126.2

ВЫДЕЛЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ФОСФОЛИПАЗ A_2
ИЗ ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ *NAJA NAJA OXIANA*

Ансалон У. Р., Шамборит О. Г., Мирошников А. И.

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

Гель-фильтрацией и ионообменной хроматографией на СМ-целлюлозе из яда кобры *Naja naja oxiana* выделены три индивидуальные фосфолипазы A_2 , а также ряд белковых фракций, обладающих фосфолипазной активностью. С помощью иммобилизованной фосфолипазы (изофермент 3) выделены специфические антитела из сыворотки кролика, иммунизированного этой же фосфолипазой. На основе антител получен иммуноспецифический сорбент, позволивший выделить из сырого яда кобры смесь фосфолипаз A_2 . Хроматографией на СМ-целлюлозе смесь разделена на семь индивидуальных изоферментов, различающихся аминокислотным составом и биологической активностью.

Фосфолипаза A_2 (КФ 3.1.1.4), катализирующая гидролиз сложноэфирной связи во втором положении 1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфатидов, широко используется при исследовании структуры биологических мембран [1], при солиubilизации мембранных белков [2], а также в химии липидов [3]. К настоящему времени фосфолипазы A_2 выделены из различных источников, причем для ряда из них установлена первичная структура [4—10]. Фосфолипазы A_2 яда кобр являются, пожалуй, наиболее удобными объектами для исследования механизма молекулярного действия этого типа ферментов. Они обладают сравнительно небольшими (до 14 000) молекулярными весами, а их жесткая пространственная структура с 6—7 дисульфидными связями обеспечивает молекуле высокую конформационную устойчивость к изменениям условий среды (рН, температуры, полярности растворителей и т. п.). Для яда кобр характерно наличие в одном и том же образце нескольких изоферментов фосфолипазы A_2 [9—14], отличающихся друг от друга не только аминокислотным составом и физико-химическими свойствами, но и биологической активностью [13, 15]. Естественно, что сравнение структуры и свойств этих соединений может существенно облегчить выяснение функциональной роли участков молекулы и отдельных аминокислотных остатков в проявлении тех или иных биологических свойств. Необходимое условие для такого исследования — выделение всех изоферментов в индивидуальном состоянии, что, как правило, представляет собой достаточно сложную и трудоемкую задачу.

В настоящей работе описано выделение фосфолипаз A_2 из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*. Первая стадия фракционирования яда заключалась в гель-фильтрации на сефадексе G-50 (рис. 1). Фракцию, содержащую фосфолипазы A_2 , разделяли далее на СМ-целлюлозе (рис. 2). Из 15 фракций 12 обладали фосфолипазной активностью. Первые три из

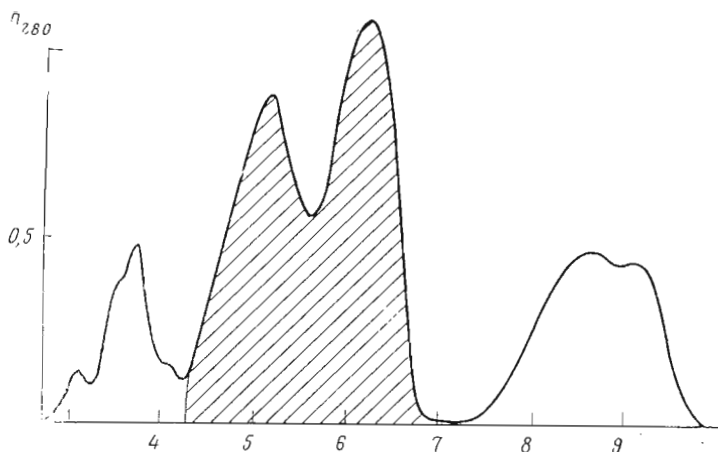


Рис. 1. Гель-фильтрация яда кобры на сефадексе G-50 (10 × 88 см) в аммоний-ацетатном буфере (рН 4,5). Заштрихована фракция, обладающая фосфолипазной активностью

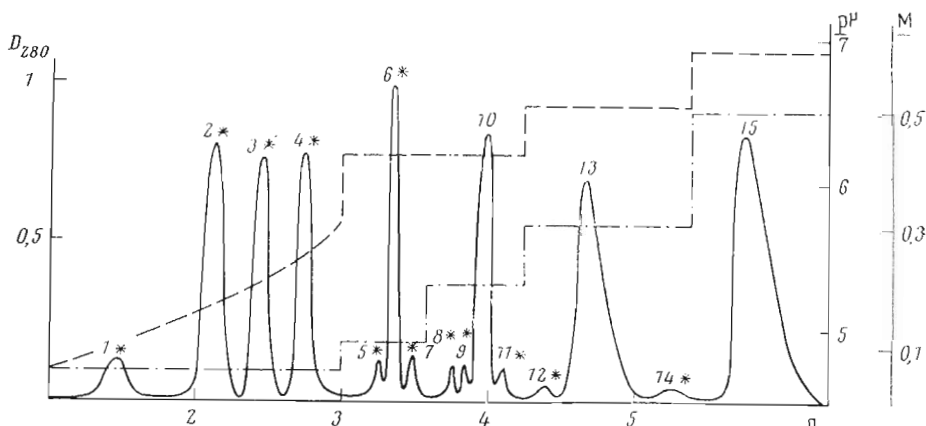


Рис. 2. Разделение средней фракции яда (см. рис. 1) на CM-целлюлозе (2,5 × 35 см) в аммоний-ацетатном буфере. Звездочками отмечены фракции, обладающие фосфолипазной активностью

них, проявившие высокую удельную ферментативную активность, были очищены рехроматографией на CM-целлюлозе. Выделенные изоферменты оказались индивидуальными по данным диск-электрофореза в полиакриламидном геле и изоэлектрофокусирования. Попытки выделить другие гомогенные фосфолипазы из фракций 5—14 с помощью одноступенчатой хроматографии (на сефадексе G-50, CM- или DEAE-целлюлозе) оказались неудачными, возможно, по причине образования прочных комплексов с другими компонентами яда.

Принципиально иным подходом к выделению фосфолипаз A_2 из сложной смеси белков является аффинная хроматография. Нами было проведено отделение фосфолипаз от других белков на основе использования сродства ферментов к специфическим антителам. В качестве антигена для иммунизации животных, а также для получения сорбента при выделении из сыворотки необходимых антител была использована одна из индивидуальных фосфолипаз A_2 , полученная нами методами обычной хроматографии (рис. 2, фр. 3). Фермент, иммобилизованный на сефарозе 4В, сохранял ~10% удельной ферментативной активности по отношению к яичному лецитину и синтетическому дипальмитоиллецитину и был устойчив при хранении в течение нескольких месяцев при -5° .

Антитела, выделенные из сыворотки иммунизированных животных с помощью иммобилизованной фосфолипазы, в свою очередь, были ковалентно связаны с сефарозой, предварительно активированной бромцианом. Полученный таким образом иммуноспецифический сорбент был использован далее для выделения ферментов из сырого яда кобры (рис. 3). Раствор яда в Трис-HCl-буфере (рН 7,6) пропускали через аффинный сорбент (на основе иммобилизованных антител) и промывали далее тем же самым буфером для удаления несвязавшихся белков. Фосфолипазная активность в элюате (рис. 3, фр. 1) обнаружена не была. Это свидетельствовало о том, что все ферменты сорбировались на колонке. Фосфолипазная фракция (фр. 2) была выделена промыванием раствором аммиака (рН 11).

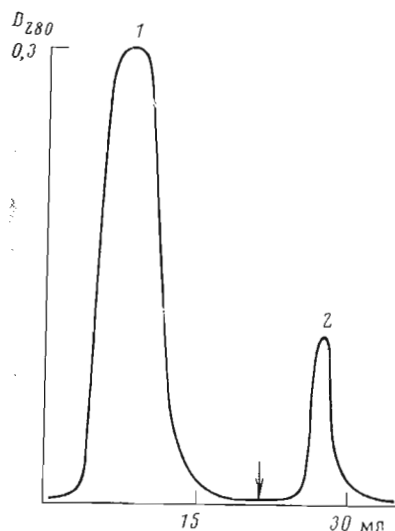


Рис. 3. Выделение фосфолипаз A_2 из яда кобры на иммуноспецифическом сорбенте. Стрелкой указана смена элюента

Полученный препарат представлял собой смесь фосфолипаз. Для их разделения была использована хроматография на СМ-целлюлозе. При промывании колонки градиентом 0,05 М аммоний-ацетатного буфера рН от 4,5 до 7,5 последовательно вымывается пять белков, а при последующем повышении молярности — еще два (рис. 4). Все выделенные белки обладают фосфолипазной активностью (табл. 1); индивидуальность их подтверждена диск-электрофорезом (при рН 4,5) и изоэлектрическим фокусированием на пластинках. Значительные различия между изоферментами обнаруживаются при сопоставлении аминокислотного состава (в расчете на 120—130 остатков (табл. 2)). Белки Е1 — Е3 и Е5 по аминокислотному составу близки между собой, но существенно отличаются от остальных количеством остатков пролина, лизина и дикарбоновых кислот (или их амидов). С другой стороны, все изоферменты имеют одинаковую N-концевую аминокислоту (аспарагин) и одинаковое число дисульфидных связей.

Согласно данным аминокислотного анализа, фосфолипазы Е1 — Е3 имеют по два остатка триптофана в молекуле. Для подтверждения этих

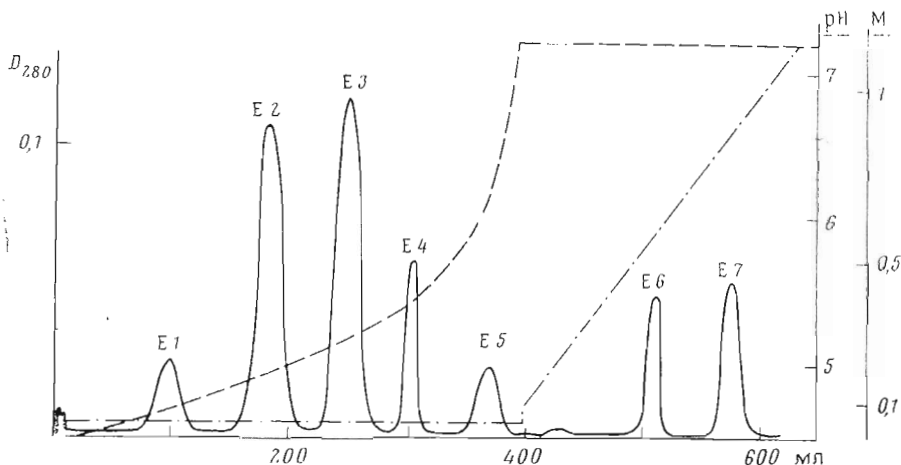


Рис. 4. Разделение смеси изоферментов фосфолипаз A_2 (фр. 2 на рис. 3) на СМ-целлюлозе (1×10 см) в аммоний-ацетатном буфере

Таблица 1

Свойства изоферментов фосфолипаз A₂ из яда среднеазиатской кобры

Изофермент	Общая активность Фракции, усл. ед.	Удельная актив- ность, ед/мг	Изоэлектрическая точка (pI)
E1	10 500	26 250	5,4
E2	53 000	37 200	5,5
E3	84 000	44 400	5,1
E4	750	1080	6,8
E5	1400	3600	6,9
E6	75	120	8,0
E7	45	60	8,3

Таблица 2

Аминокислотный состав изоферментов фосфолипазы A₂

Амино- кислота	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Asx	21	20	20	12	21	17	12
Thr	6	6	5	13	7	7	6
Ser	8	8	7	9	9	6	9
Glx	7	8	7	9	7	6	2
Pro	5	5	5	12	5	9	11
Gly	11	12	9	9	11	6	6
Ala	10	11	11	8	10	6	6
Cys	14	14	14	14	14	14	14
Val	4	4	4	4	5	6	14
Met	1	1	1	1	1	2	2
Ile	4	4	4	8	6	5	3
Leu	8	8	6	5	8	11	14
Tyr	9	8	8	6	8	5	4
Phe	3	3	4	1	3	3	4
His	1	1	1	2	2	2	3
Lys	7	8	6	11	8	16	15
Arg	5	5	4	4	5	6	3
Trp	2	2	2	3	2	0	0
Итого	126	128	118	131	132	127	128

данных была проведена модификация этих белков по остаткам триптофана *o*-нитрофенилсульфенилхлоридом [16]. Спектрофотометрический анализ подтвердил, что полученные производные имеют по две нитрофенилсульфенильные группы на молекулу белка.

При сопоставлении данных аминокислотного анализа, изоэлектрических точек и условий десорбции с СМ-целлюлозы становится очевидным, что выделенные с помощью аффинной хроматографии изоферменты E1 — E3 (рис. 4) идентичны гомогенным белкам соответственно из фракций 1—3 (рис. 2). Выделенные нами ферменты E2 и E3 полностью соответствуют фосфолипазам A1 и A2, выделенным из кобры *Naja naja oxiana* ранее [14]. Кислые фосфолипазы E1 — E3 по всем свойствам близки кислым фосфолипазам, полученным из яда других кобр [13, 17, 18].

Кислые фосфолипазы из яда кобр в индивидуальном состоянии практически нетоксичны [14, 17, 18]. В отличие от этого щелочная фосфолипаза A₂ из яда *Naja nigricollis* обладает ярко выраженным цитотоксическим действием и имеет LD₅₀ 0,2 мг/кг (для белых мышей) [19]. Биологический эффект щелочной фосфолипазы из фракции E7 аналогичен. При внутривенном введении мышам этой фракции в дозе 2 мг/кг (LD₅₀ для цитотоксина из этого яда [20]) у животных появились явные признаки цитотоксического воздействия (подкожные кровоизлияния, затруднение дыхания и т. п.), но без летального исхода. Увеличение доз приводит к гибели животных.

При иммунизации кроликов антигеном служил только один изофермент (ЕЗ). Тем не менее все шесть других фосфолипаз также давали реакцию иммунопреципитации с полученными антителами. Это показывает, что кислые и щелочные фосфолипазы из исследованного источника имеют антигенную детерминанту одинаковой или близкой структуры.

Таким образом, с помощью иммуноспецифической хроматографии из яда кобры *Naja naja oxiana* выделен ряд фосфолипаз A_2 , отличающихся друг от друга по аминокислотному составу, физико-химическим свойствам, а также биологической активностью.

Экспериментальная часть

Яд кобры *Naja naja oxiana* был получен из Института зоологии и паразитологии АН УзССР (Ташкент). Отфильтрованный 10% раствор яда лиофилизовали и хранили при -20° . В работе были использованы сефадексы и ВrCN-сефароза 4В (Pharmacia, Швеция). CM-целлюлоза CM-32 (Whatman, Англия), димиристоил-*sn*-лецитин (Koch Light Lab., Англия). Яичный лецитин получен из куриных желтков по обычной методике [21], *o*-нитрофенилсульфенилхлорид синтезирован по ранее описанному методу [22].

Ферментативную активность фосфолипаз A_2 определяли ацидиметрическим методом, предложенным ранее [12]. Реакционная среда содержала 0,5% детергента «Triton X-100», 1 мМ Трис, 0,03 М NaCl, 0,02 М CaCl₂ и 0,7 мМ EDTA (рН 7,8—8). К 2 мл среды добавляли 3 мг димиристоиллецитина в 75 мкл этанола, а затем вносили 0,1—1 мкг фермента в водном растворе (5—10 мкл). В начальный период реакции скорость падения рН пропорциональна активности фермента. За единицу активности было принято количество фермента, которое вызывает в системе падение рН на 0,033 единицы в 1 мин. Измерения проводили на автотитраторе ТТТ2 (Radiometer, Дания) при комнатной температуре в атмосфере азота. При полуколичественном определении ферментативной активности (рис. 1, 2) в качестве субстратов использовали яичный лецитин в той же реакционной среде или суспензию яичного желтка в 0,01 М CaCl₂ и 0,15 М NaCl.

Индивидуальность белков проверяли с помощью стандартного диск-электрофореза в 15% полиакриламидном геле при рН 4,5 [23], а также изоэлектрофокусированием на полиакриламидной пластинке с амфолинами в диапазоне рI 3,5—9,5 (ЛКВ, Швеция). N-Концевые аминокислоты были определены в виде дансильных производных [24]. Аминокислотный состав белков устанавливали на автоматическом анализаторе D-500 (Durrum, США) после 24 и 72 ч гидролиза в 5,7 н. HCl. Количество остатков триптофана было определено на анализаторе Bio Cal 3201 (ЛКВ, Швеция) после 24 ч гидролиза 4 н. метансульфоновой кислотой с добавкой аминоэтилindoла (Pierce, США).

Иммунизацию кроликов весом 2—2,5 кг фосфолипазой A_2 (рис. 2, фр. 3) проводили путем еженедельного введения под кожу раствора белка (в возрастающей дозе от 0,5 до 5 мг/кг веса) в течение 6 недель.

Выделение фосфолипаз A_2 методами хроматографии. 5 г яда кобры растворяли в 250 мл 0,05 М аммоний-ацетатного буфера (рН 4,5) и вносили на колонку с сефадексом G-50 (10 × 88 см), уравновешенную тем же буфером. Элюирование проводили со скоростью 270 мл/ч (рис. 1). Фракцию, содержащую фосфолипазы A_2 , сорбировали на CM-целлюлозе, уравновешенной тем же буфером. Через колонку (2,5 × 35 см) пропускали (со скоростью 100 мл/ч) 0,05 М аммоний-ацетатный буфер (градиент рН от 4,5 до 5,7 объемом 3 л), затем последовательно 0,5 л 0,1 М (рН 6,2), 0,7 л 0,2 М (рН 6,2), 1,3 л 0,3 М (рН 6,5) и 1 л 0,5 М (рН 6,9) аммоний-ацетатные буферы (рис. 2). Белковые фракции были трижды лиофилизованы до полного удаления ацетата аммония. Окончательная очистка фракций 1—3 проводилась также на CM-целлюлозе (колонка 1,5 × 15 см) в градиенте

аммоний-ацетатного буфера от 0,02 М (рН 5) до 0,03 М (рН 6,2) (объем 1 л).

Иммобилизация фосфолипазы. 3,5 мл BrCN-сефарозы 4В промывали на фильтре 200 мл 1 мМ HCl, затем буфером А (рН 8,2; 0,1 М NaHCO₃ + 0,5 М NaCl). Суспензию геля смешивали с раствором 20 мг фосфолипазы A₂ (рис. 2, фр. 3) в буфере А, выдерживали 2 ч при комнатной температуре, затем отмывали от несвязанного белка буфером А. Суспензию выдерживали 2 ч с 0,05 М раствором Трис (рН 10,1), затем промывали буфером А, ацетатным буфером (0,1 М, рН 4 + 0,5 М NaCl) и снова буфером А. Полученный таким образом сорбент был уравновешен буфером Б (0,05 М Трис-HCl, рН 7,6 + 0,15 М NaCl) и использован для выделения антител из сыворотки кроликов.

Получение иммуноспецифического сорбента на основе антител. Предварительно прогретую (1 ч при 60°) сыворотку кроликов, иммунизированных фосфолипазой A₂, наносили на колонку (1 × 4 см) с иммобилизованной фосфолипазой и промывали буфером Б. Сорбированные антитела смывали аммиачным раствором (рН 11), содержащим 0,15 М NaCl. За выходом белка следили по поглощению элюата при 280 нм. Элюат антител диализовали против физиологического раствора в течение 24 ч. Выход чистых антител 4 мг. По вышеуказанной методике, используя 12 мг антител, была осуществлена их иммобилизация на BrCN-сефарозе. Полученный иммуноспецифический сорбент был использован для выделения фосфолипаз.

Выделение фосфолипаз. 5 мг яда кобры растворяли в 5 мл буфера Б и наносили на колонку (1 × 4 см) с иммуносорбентом на основе антител. Колонку промывали тем же буфером со скоростью 18 мл/ч до удаления несвязанных компонентов яда (рис. 3, фр. 1), а фосфолипазы A₂ элюировали аммиачным раствором (рН 11; 0,15 М NaCl) (фр. 2). Колонку уравновешивали буфером Б и снова использовали для следующего опыта. Фракцию 2, обладающую удельной фосфолипазной активностью 24 ед./мкг, обессоливали на сефадексе G-15 в 1% уксусной кислоте и лиофилизировали. Выход ~0,4 мг.

8 мг полученного препарата наносили на колонку (1 × 10 см) с СМ-целлюлозой, уравновешенной 0,05 М (рН 4,5) аммоний-ацетатным буфером. Через колонку со скоростью 20 мл/ч пропускали 0,05 М аммоний-ацетатный буфер (градиент рН от 4,5 до 7,2 объемом 400 мл), затем хроматографировали в аммоний-ацетатном буфере (рН 7,2) при градиенте концентрации от 0,1 до 1,5 М (объем 300 мл) (рис. 4). Полученные белковые фракции лиофилизировали.

Модификацию остатков триптофана проводили по методу Фонтана и Скоффоне [16]. Количество модифицированных остатков определяли на приборе Sprecord UV-VIS (ГДР) по поглощению при 365 нм (ϵ 4000) в 10% уксусной кислоте.

Авторы выражают благодарность руководителю настоящей работы акад. Ю. А. Овчинникову за участие в обсуждении результатов и критические замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zwaal R. F. A., Roelofsen B., Colley C. M. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **300**, 159—182.
2. Cremona T., Kearney E. B. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2328—2334.
3. Кейтс М. (1975) *Техника липидологии*, «Мир», М.
4. DeHaas G. H., Slotboom A. J., Bonsel P. P. M., van Deenen L. L. M., Maroux S., Puigserver A., Desnuelle P. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **221**, 31—53.
5. Shipolini R. A., Callwaert G. L., Cottrell R. C., Vernon C. A. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **48**, 465—476.
6. Botes D. P., Viljoen C. C. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 3827—3835.
7. Iwanaga S., Suzuki T. (1974) *FEBS Lett.*, **47**, 348—351.

8. Halpert J., Eaker D. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 6990—6997.
9. Joubert F. J. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **52**, 539—554.
10. Joubert F. J. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **379**, 329—359.
11. Braganca B. M., Sambray Y. M. (1967) *Nature*, **216**, 1210—1211.
12. Salach J. I., Turini P., Seng R., Hauber J., Singer T. P. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 331—339.
13. Shiloah J., Clibansky C., de Vries A. (1973) *Toxicon*, **11**, 481—490.
14. Салыхов Р. С. (1975) Канд. дис. «Фосфолипазы А яда среднеазиатской кобры *Naja oxiana*», Ташкент.
15. Salach J. I., Seng R., Tisdale H., Singer T. P. (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 340—347.
16. Fontana A., Scoffone E. (1972) in *Methods in Enzymol.*, **25**, pp. 482—494, Acad. Press, N. Y.
17. Braganca B. M., Sambray Y. M., Ghadially R. C. (1975) *Toxicon*, **7**, 151—157.
18. Wahlström A. (1971) *Toxicon*, **9**, 45—56.
19. Dumarey C., Sket D., Joseph D., Voquet P. (1975) *Comptes rendus, ser. D*, **280**, 1633—1635.
20. Гришин Е. В., Сухих А. П., Адамович Т. Б., Овчинников Ю. А. (1976) *Биоорганич. химия*, **2**, 1018—1034.
21. Wells M. A., Hanahan D. J. (1969) in *Methods in Enzymol.*, **14**, pp. 179—181, Acad. Press, N. Y.— London.
22. В сб. Синтезы орг. преп. (1949) т. 2, с. 560—561, Изд-во иностр. лит., М.
23. Reisfeld R. A., Lewis U., Williams D. (1962) *Nature*, **195**, 281—283.
24. Gray W. R. (1967) in *Methods in Enzymol.*, **11**, pp. 139—151, Acad. Press, N. Y.— London.

Поступила в редакцию
10.V.1977

ISOLATION AND SOME PROPERTIES OF PHOSPHOLIPASE A₂ FROM THE VENOM OF MIDDLE-ASIAN COBRA *NAJA NAJA OXIANA*

APSALON U. R., SHAMBORANT O. G., MIROSHNIKOV A. I.

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

Using gel-filtration and ion-exchange chromatography on CM-cellulose, three individual phospholipases A₂ and a number of fractions manifesting phospholipase activity have been isolated from the venom of cobra *Naja naja oxiana*. Utilization of the immobilized phospholipase (isoenzyme 3) allowed to isolate the antibodies from the rabbit serum after immunization with the same phospholipase. Basing on the antibodies, a specific immunosorbent was prepared which facilitated isolating a mixture of phospholipases A₂ from the crude venom. The mixture was further resolved by CM-cellulose chromatography into 7 individual components differing in amino acid composition and biological activity.