



УДК 577.354.3.088

РАЗДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОГО И СВЯЗАННОГО
С СОЛЮБИЛИЗИРОВАННЫМИ β -АДРЕНЕРГИЧЕСКИМИ
РЕЦЕПТОРАМИ [^3H]ДИГИДРОАЛЬПРЕНОЛОЛА
НА КАТИОНООБМЕННОЙ СМОЛЕ

Войтков В. Л., Гуревич В. В.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
биологический факультет*

Для разделения свободного и связанного с солюбилизованными β -адренергическими рецепторами [^3H]дигидроальпренолола разработан простой, быстрый и надежный метод, основанный на микроколоночной катионообменной хроматографии.

Определение содержания и констант связывания рецепторов гормонов и нейромедиаторов в различных препаратах с использованием меченных радиоактивными изотопами лигандов (радиолигандный метод) требует разделения комплекса рецептор — лиганд и свободного лиганда. Для радиолигандного анализа рецепторов в интактных клетках или в выделенных из них мембранах большинство авторов использует простой метод разделения на фильтрах из модифицированной целлюлозы [1] или стекловолокна [2, 3]. Для анализа солюбилизованных рецепторов такого общепринятого метода пока нет. Различные авторы используют равновесный диализ [4, 5], гель-фильтрацию [4—8], а также осаждение комплекса рецептор — лиганд сульфатом аммония [7] или полиэтиленгликолем (ПЭГ 6000) в присутствии γ -глобулина [9] или без него [8] с последующей фильтрацией или центрифугированием [10, 11]. Все эти методы требуют длительного времени, включают в себя относительно большое число операций и в ряде случаев характеризуются трудноустраняемым высоким уровнем «неспецифического» связывания, что снижает их чувствительность и не всегда дает достоверные оценки параметров связывания.

В настоящей работе предложен метод разделения свободного и связанного с β -адренергическими рецепторами [^3H]дигидроальпренолола (^3H]DHA) посредством хроматографии на колонках с катионитом AG 50W. Он основан на том, что молекулы белка в отличие от низкомолекулярных аминов практически не связываются с катионитами этого типа [12].

В таблице сопоставлены основные параметры различных методов разделения свободного [^3H]DHA и лиганда, связанного с солюбилизованными β -адренергическими рецепторами мембран ретикулоцитов. Значения специфического связывания, определенные с использованием осаждения ПЭГ, сульфатом аммония и хроматографии на катионите с зернением 50—100 меш, совпадают. Данные, полученные с использованием более мелкого катионита (100—200 меш), занижены, по-видимому, из-за увеличения продолжительности хроматографии, в процессе которой происходит частичная диссоциация комплекса лиганд — рецептор. Уровень «неспецифического связывания» при использовании методов осаждения в первоначальных опытах был в 2—5 раз ниже, чем при использовании ионообменной хроматографии, но увеличивался с возрастанием количества белка в пробе. Уровень «неспецифического связывания» при разделении на катионите зависел только от количества внесенной в пробу радиоактивности, но не от концентрации белка. Это, по-видимому, указывало на то, что обнаруживаемый уровень «неспецифического связывания» определялся не количеством лиганда, неспецифически связываемого бел-

Сравнение различных методов определения свободного и связанного с рецепторами $[^3\text{H}]\text{DNA}$

Метод	Относительное специфическое связывание, % *	«Неспецифическое связывание», % от радиоактивности в пробе	Время, необходимое для обработки, мин	
			10 проб	30 проб
1. Осаждение ПЭГ и фильтрация	100	0,4–0,6	55	75
2. Осаждение сульфатом аммония и фильтрация	100	2,0–2,4	50	70
3. Хроматография на AG 50W×8 (100–200 меш)	83	1,4–1,6	7–8	27–28
4. Хроматография на AG 50W×8 (50–100 меш, неочищенный $[^3\text{H}]\text{DNA}$)	100	2,4–2,6	3–4	15–16
5. Хроматография на AG 50W×8 (50–100 меш, очищенный $[^3\text{H}]\text{DNA}$)	100	1,1–1,3	3–4	15–16

* 100% специфического связывания составляло 0,39 МБк при концентрации $[^3\text{H}]\text{DNA}$ 0,55 нМ и количестве белка в пробе 117 мкг.

Сокращения: DNA – дигидроальprenолол, ПЭГ – полиэтиленгликоль.

ком, а наличием радиоактивных примесей в препаратах $[^3\text{H}]\text{DNA}$, которые не удерживались смолой. Действительно, после очистки $[^3\text{H}]\text{DNA}$ от этих соединений с помощью ТСХ уровень «неспецифического связывания» снизился до уровня, характерного для методов осаждения. Таким образом, при использовании предлагаемого метода необходима предварительная очистка препарата радиоактивного лиганда, что в общем естественно, так как корректный радиолигандный анализ требует применения радиоактивного лиганда с максимальной радиохимической чистотой [13]. При повторном использовании колонок с катионообменной смолой без регенерации уровень «неспецифического связывания» возрастал на 30%, а при третьем использовании – еще на 20%, но в целом не превышал 3% нанесенного меченого соединения, что вполне удовлетворительно для до-

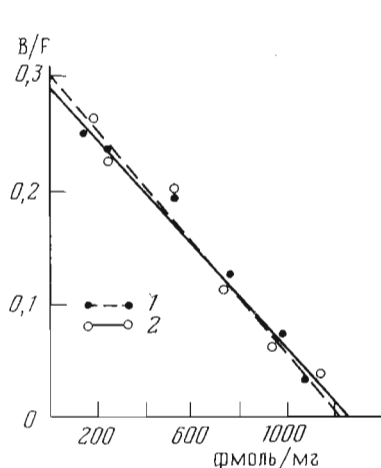


Рис. 1

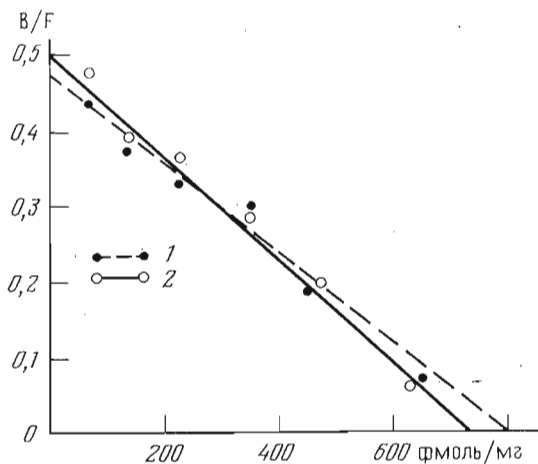


Рис. 2

Рис. 1. Графики Скетчарда для связывания $[^3\text{H}]\text{DNA}$ с солубилизованными рецепторами мозжечка: 1 – данные получены методом осаждения ПЭГ; 2 – данные получены методом хроматографии на AG 50W×8, 50–100 меш; содержание белка в пробе 67 мкг, диапазон концентраций $[^3\text{H}]\text{DNA}$ от 0,1 до 5 нМ. Абсцисса – количество связанного рецепторами $[^3\text{H}]\text{DNA}$, фмоль/мг белка; ордината – отношение количества связанного рецепторами $[^3\text{H}]\text{DNA}$ (В) к количеству свободного (F).

Рис. 2. Графики Скетчарда для связывания $[^3\text{H}]\text{DNA}$ с солубилизованными рецепторами ретикулоцитов крыс: 1 – данные получены методом осаждения ПЭГ; 2 – данные получены методом хроматографии на AG 50W×8, 50–100 меш. Содержание белка в пробе 127 мкг, диапазон концентраций $[^3\text{H}]\text{DNA}$ от 0,05 до 3 нМ. Обозначения осей – см. рис. 1

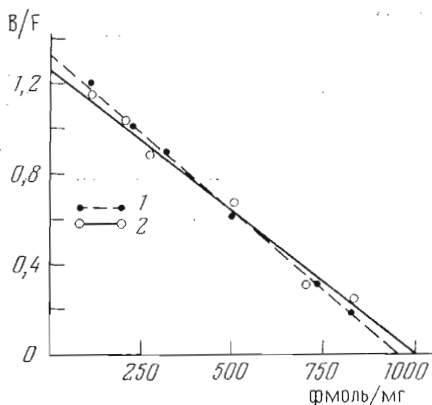


Рис. 3. Графики Скотчарда для связывания $[^3\text{H}]\text{DNA}$ с мембранами ретикулоцитов крыс: 1 — данные получены методом фильтрации на фильтрах GF/C; 2 — данные получены методом хроматографии на AG 50W \times 8, 50–100 меш. Содержание белка в пробе 303 мкг, диапазон концентраций $[^3\text{H}]\text{DNA}$ от 0,03 до 2 нМ. Обозначения осей — см. рис. 1

статочию точного определения специфического связывания при обычном содержании рецептора и радиоактивного лиганда в пробе. Как следует из таблицы, метод с использованием хроматографии значительно быстрее методов осаждения, поскольку требует лишь двух операций: нанесения пробы на катионит и его промывки.

Для выяснения корректности результатов, полученных различными методами, были построены графики Скотчарда [14] для солиubilизированных рецепторов мозжечка (рис. 1), солиubilизированных и связанных с мембранами рецепторов ретикулоцитов (рис. 2 и 3). Из графиков следует, что K_d для связывания $[^3\text{H}]\text{DNA}$ солиubilизированными рецепторами, вычисленные по данным, полученным методом хроматографии и методом осаждения ПЭГ, совпадают (0,55 и 0,52 нМ соответственно) и совпадают с K_d рецепторов на мембранах. Концентрации рецепторов, определенные различными методами, также не различаются.

В отдельной серии экспериментов была оценена возможность использования метода хроматографии сульфокатионита для анализа рецепторов в мембранных препаратах. Графики Скотчарда, построенные для связанных с мембранами рецепторов по данным, полученным методами хроматографии и фильтрации на мембранах GF/C (рис. 3), были практически идентичны (K_d 0,50 и 0,42 нМ соответственно). Таким образом, метод хроматографии на катионите позволяет сравнивать свойства солиubilизированных и связанных с мембранами рецепторов в одинаковых условиях. Присутствие в инкубационных пробах одновалентных катионов Na^+ , K^+ и NH_4^+ в концентрациях до 1 М, трис- HCl — до 0,1 М, двухвалентных катионов Mg^{2+} , Mn^{2+} и Ca^{2+} — до 50 мМ увеличивает неспецифическое связывание не более чем на 40%, что при обычно используемых концентрациях солиubilизированного белка и $[^3\text{H}]\text{DNA}$ повышает «неспецифическое связывание» с 7 до 10% от общего. Это практически не сказывается на чувствительности метода.

Таким образом, предлагаемый метод разделения свободного и связанного с рецепторами лиганда хроматографией на сульфокатионитах быстрее, проще, надежнее и дешевле широко применяемых сейчас методов. Он не уступает им в чувствительности и позволяет анализировать как солиubilизированные, так и связанные с мембранами рецепторы. Этот метод в отличие от прочих позволяет работать с пробами большого объема (2–4 мл) (объем ограничивается только эффективностью счета радиоактивности в водных образцах). Увеличение объема пробы может быть необходимо для анализа рецепторов в сильно разбавленных препаратах. В принципе этот метод приложим к анализу не только β -адренергических, но и других рецепторов, связывающих низкомолекулярные лиганды, которые несут аминогруппу и в целом положительно заряжены при физиологических значениях pH, например α -адренергических, допаминовых, гистаминовых, серотониновых, опиатных (лиганды — морфин и налоксон) и холинергических.

Экспериментальная часть

Выделение мембран ретикулоцитов крыс и мозжечка быка. Методы индукции ретикулоцитоза у крыс и получения мембран ретикулоцитов описаны ранее [15]. Свежезамороженные мозжечки, которые хранились при температуре от -60 до -70°C , размораживали при 4°C и дальнейшие операции проводили при той же температуре. Серое вещество мозжечков измельчали, суспендировали в 10-кратном (объем/вес) количестве буфера, содержащего 1 мМ NaHCO_3 , 0,25 М сахарозу, 2 мМ EDTA, 0,1 мМ дитиотреит и 40 мкМ фенилметилсульфонилфторид (рН 7,4), и гомогенизировали в ножевом гомогенизаторе MPW-300 (ПНР) при 13 000 об/мин 3 раза по 15 с с интервалами по 15 с. Гомогенат фильтровали через шесть слоев марли и центрифугировали 30 мин при 30 000 g в роторе JA-14 центрифуги J-21В (Beckman, Австрия). Осадок гомогенизировали в аналогичном буфере, содержащем в 10 раз меньшее количество сахарозы, и повторно центрифугировали в тех же условиях. Полученный осадок суспендировали в аналогичном буфере, содержащем 0,8 М сахарозу, и центрифугировали 90 мин при 30 000 g. Плавающий на поверхности слой миелина и надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок суспендировали в буфере исходного состава (2 мл буфера на 1 г исходной ткани, концентрация белка 4–5 мг/мл) и хранили при температуре от -60 до -70°C . Свойства β -адренергических рецепторов в полученных препаратах не изменялись в течение 3 месяцев хранения.

Солюбилизация β -адренергических рецепторов. Мембраны ретикулоцитов крыс осаждали центрифугированием при 45 000 g в роторе JA-21 центрифуги J-21В при 4°C в течение 30 мин. Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок суспендировали в буфере, содержащем 1,5% дигитонина (Merck, ФРГ), 45 мМ трис-HCl и 150 мМ NaCl (рН 7,4 при 20°C), применяя 1 мл буфера на 4–5 мг мембранного белка, и инкубировали 15 мин при 4°C . Суспензию в процессе солюбилизации время от времени встряхивали (Microshaker, ПНР). После инкубации суспензию центрифугировали 90 мин со скоростью 100 000 g при 4°C в роторе SW-27 центрифуги 15-50 (Beckman, Австрия). Выход β -адренергического рецептора в надосадочную жидкость составлял $70 \pm 5\%$. Мембраны мозжечка солюбилизировали так же, за исключением того, что буфер, добавляемый к осадку мембран, содержал 0,8% дигитонина. Выход солюбилизованного рецептора составлял 70–80%.

Содержание рецепторов в мембранных препаратах определяли с использованием фильтров из стекловолокна GF/C (Whatman, Англия) по методу [2]. Конкретные условия инкубации мембранных препаратов с [^3H]ДНА (Amersham, Англия, удельная радиоактивность 32 Ки/ммоль) и разделения свободного лиганда описаны в работе [15]. Специфическое связывание во всех случаях определяли как разницу между связыванием [^3H]дигидроалprenолола в отсутствие и в присутствии 10^{-5} М пропранолола или 10^{-4} М изопротеренола.

Определение содержания рецепторов в солюбилизованных препаратах. а) *Модифицированные методы осаждения.* Солюбилизованный белок (25–100 мкг) инкубировали 30 мин при 25°C в 0,5 мл раствора, содержащего 100 мМ NaCl, 0,5–5,0 нМ [^3H]ДНА и 10 мМ трис-HCl, рН 7,4. При использовании ПЭГ для разделения свободного и связанного лигандов пробы после инкубации охлаждали до 4°C , добавляли в них 1 мл холодного 0,1% раствора γ -глобулина (Koch-Light, Англия), а затем при перемешивании 1 мл раствора 30% ПЭГ-6000 (Serva, ФРГ) (ср. [9]). Пробы инкубировали 40 мин при 4°C и фильтровали в вакууме через двойные фильтры GF/C или одинарные фильтры GF/F (Whatman, Англия). Фильтры промывали 4 раза по 4 мл холодного 10% раствора ПЭГ. При использовании сульфата аммония для осаждения комплекса рецептор–лиганд в пробы после инкубации и добавления 0,1% γ -глобулина вносили 2,25 мл насыщенного при 4°C раствора сульфата аммония. Растворы ПЭГ, сульфата аммония и γ -глобулина готовили в буфере, содержащем 5 мМ MgCl_2 и 10 мМ трис-HCl, рН 7,4. Фильтры помещали

во флаконы для сцинтилляционного счета, заливали по 7 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-7А (Союзреактив) и через 30–40 мин радиоактивность измеряли в режиме счета распадов в минуту на сцинтилляционном счетчике Mark-III (Tracor Eurora, Нидерланды).

б) Метод с использованием сульфокатионитов. Для разделения свободного и связанного лигандов пробы после охлаждения до 4°С наносили на колонки, содержащие 0,5 мл смолы AG 50W×8, 100–200 меш, AG 50W×4, 50–100 меш, или AG 50W×8, 50–100 меш (Bio-Rad, ФРГ) в Na⁺-форме. Колонки делали из стандартных полиэтиленовых наконечников на 1 мл к автоматическим пипеткам типа Pipetman (Gilson, Франция). Колонки помещали в блоки из органического стекла по 10 штук. Блоки и колонки до опыта хранили в холодильнике. После полного впитывания пробы в смолу (20–30 с для смолы зернением 50–100 меш и 1,0–1,5 мин для смолы 100–200 меш) колонки промывали 0,6 мл холодного буфера, содержащего 100 мМ NaCl и 10 мМ трис-HCl, pH 7,4. Блоки с колонками помещали над флаконами для сцинтилляционного счета, в которые собирали весь элюат. Во флаконы заливали по 10 мл сцинтилляционной жидкости и радиоактивность измеряли в режиме счета распадов в минуту. Использованные колонки регенерировали согласно рекомендациям фирмы Bio-Rad [16]. Регенерация 30 колонок со смолой занимала 10–15 мин. Чистоту препарата [³H]ДНА проверяли путем ТСХ на силикагеле 6060 (Eastman, ФРГ) в системе ацетон – бензол – уксусная кислота, 70 : 25 : 5 [17]; R_f для [³H]ДНА составлял 0,3, для неидентифицированных продуктов его распада – 0,9. Пятно, содержащее [³H]ДНА, вырезали и элюировали спиртом. Очищенный таким образом препарат хранили при –60°С. Белок определяли по методу [18] с использованием красителя кумасси ярко-синего С-250 (Bio-Rad, США) и бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США) в качестве стандарта.

Авторы выражают глубокую благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за ценные советы и помощь при выполнении этой работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cuatrecasas P., Tell G. P. E., Sica V., Parikh I., Chang K.-J. Nature, 1974, v. 247, № 5436, p. 92–97.
2. Suter P., Rosenbuch J. P. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 19, p. 5986–5991.
3. Lefkowitz R. J., Williams L. T. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 515–519.
4. Williams L. T., Mullikin D., Lefkowitz R. J. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 22, p. 6915–6923.
5. Caron M. G., Lefkowitz R. J. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 8, p. 2374–2384.
6. Sano K., Nishikori K., Noshiro O., Maeno H. Arch. Biochem. and Biophys., 1979, v. 197, № 1, p. 285–293.
7. Gorisson H., Ilich B., Aerts G., Laduron P. FEBS Lett., 1980, v. 121, № 1, p. 133–138.
8. Vauquelin G., Geynet P., Hanoune J., Strosberg A. D. Eur. J. Biochem., 1979, v. 98, № 2, p. 543–547.
9. Cuatrecasas P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 2, p. 318–322.
10. Fleming G. N., Ross E. M. J. Cycl. Nucl. Res., 1980, v. 6, № 6, p. 407–419.
11. Li E. L.-F., Perdue J. F. J. Biochem. and Biophys. Methods, 1980, v. 3, № 4, p. 207–217.
12. Baumann G., Chrambach A. Anal. Biochem., 1975, v. 69, № 2, p. 649–651.
13. Lefkowitz R. J., Limbird L. E., Mukherjee C., Caron M. G. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 457, № 1, p. 1–39.
14. Scatchard G. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1949, v. 51, № 2, p. 660–664.
15. Воейков В. Л., Вуленинская Н. Д., Лукашев М. Е., Гуревич В. В. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 524–532.
16. Materials, Equipment and Systems for Chromatography, Electrophoresis, Immunochemistry and HPLC. Bio-Rad Laboratories, Catalog E, 1979, p. 14.
17. Lefkowitz R. J., Mukherjee C., Coverstone M., Caron M. G. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 60, № 2, p. 703–708.
18. Bradford M. Anal. Biochem., 1976, v. 72, № 1, p. 248–254.

Поступила в редакцию:
9.X.1982

SEPARATION OF FREE AND BOUND WITH THE SOLUBILIZED β -ADRENERGIC RECEPTORS [³H]DIHYDROALPRENOLOL USING CATION-EXCHANGE RESIN

VOEIKOV V. L., GUREVICH V. V.

Biology Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

A new rapid, facile and reliable method based on microcolumn cation-exchange chromatography has been developed for separating free antagonist [³H]dihydroalprenolol from that bound to solubilized β -adrenergic receptors.