

ЛИТЕРАТУРА

1. Афифи А., Эйзен С. Статистический анализ. Подход с использованием ЭВМ. М., 1982.
2. Ластед Л. Введение в проблему принятия решений в медицине. М., 1971.
3. Ордухьян А. А., Наабандян С. Г. I-я Всесоюз. конф. «Физиология, патофизиология и фармакология мозгового кровообращения». Тез. докл., 131, Ереван, 1984.
4. Ордухьян А. А., Джугарян К. М., Степанян К. Г. В сб.: Актуальные вопросы кардиологии, 34—35, Ереван, 1982.
5. Ордухьян А. А., Джугарян К. М., Оганесян Н. М., Бабаян А. С., Степанян К. Г. I-й Всесоюз. биофиз. съезд, 2, 175, М., 1982.
6. Розен Р. Принцип оптимальности в биологии. М., 1969.
7. Сокал Р. В сб.: Классификация и кластер. Под ред. Дж. Вэй Райзна, 7—18, М., 1980.
8. Соломон Г. В сб.: Классификация и кластер. Под ред. Дж. Вэй Райзна, 129—147, М., 1980.
9. Ту Дж., Гонсалес Р. Принципы распознавания образов, М., 1978.
10. Хант Э. Искусственный интеллект, М., 1978.
11. Вэуне С. et al. *Pat. Rec.*, 12, 2, 51—63, 1980.
12. Bourne L. Human conceptual behavior, Boston, 1966.
13. Cantigham K. *Computer J.*, 15, 3, 209—213, 1972.
14. Dubs R., Jain A. *Pat. Rec.*, 8, 4, 247—261, 1976.
15. Dubs R., Jain A. *Pat. Rec.*, 11, 4, 235—255, 1979.
16. Milligan G. *Psychometrika*, 46, 2, 187—199, 1981.
17. Smith S., Dubs R. *Pat. Rec.*, 12, 3, 177—189, 1980.

Биолот. ж. Армении, т. 39, № 9, с. 768—772, 1986

УДК 577.154.5

ОЧИСТКА ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ ПОЧЕК КРОЛИКА

А. В. АНАНЬЕВ, Х. О. БЕЗИРДЖЯН, Ж. И. АКОПЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР,
лаборатория молекулярной энзимологии, Ереван.

Аннотация — Выделена пуриинуклеозидфосфориллаза (КФ—2.4.2.1) из почек кролика. В результате шести стадий очистки с использованием фракционирования сульфатом аммония и колоночной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и гидроксилапатите получен электрофоретически гомогенный препарат. Фермент специфичен к нуклеозидам гипоксантина, гуанина, а также к ксантозину, но не расщепляет нуклеозиды аденина.

Անոտացիա — ճազարի երիկամներից անջատված է պուրիննուկլեոզիդ-ֆոսֆորիլազա (ԿՖ— 2. 4. 2. 1), Օգտագործելով մաքրման վեց փուլեր, որոնք ընդգրկում են բաժանումը ամոնիումի սուլֆատով և գրոմատոգրաֆիան Գեկե-ցելլուլոզի ու Հիդրօքսիլապատիտի սյուներում, ստացված է էլեկտրաֆորետիկ համոգեն պատրաստուկ: Ֆերմենտը սպեցիֆիկ է հիպոքսանտինի և գուանինի նուկլեոզիդների, ինչպես նաև քսանտոզինի նկատմամբ, բայց չի արժեզում ադենինի նուկլեոզիդները:

Abstract — Purine nucleoside phosphorylase (EC—2.4.2.1) from rabbit kidney has been isolated. The six-step purification procedure by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

fractionation and column chromatography on DEAE-cellulose and hydroxapatite has resulted in the receipt of an electrophoretically homogeneous preparation.

Enzyme is specific to nucleosides of hypoxanthine, guanine, and xanthosine, too, but is not specific to nucleosides of adenine.

Ключевые слова: пури nukлеозидфосфорилаза, гомогенность фермента, субстратная специфичность.

Пури nukлеозидфосфорилаза (КФ—2.4.2.1.) выполняет и анаболическую, и катаболическую функции в метаболизме пуриновых нуклеозидов. Возросший интерес к ней обусловлен еще и тем обстоятельством, что недостаточность клеточного иммунитета, по-видимому, связана также с понижением уровня активности этого фермента [10]. Пури nukлеозидфосфорилаза выделена из ряда биологических объектов [3, 5—8, 11—13, 15, 17]. Данные по очистке из почек кролика представляются впервые.

Материал и методика. Работа была выполнена в лаборатории молекулярной энзимологии ИЭБ АН АрмССР в 1985 г. Все операции по очистке фермента проводили при 4°. На всех стадиях очистки центрифугирование проводили при 15000 g в течение 20 мин. Колонки были предварительно уравновешены стартовыми буферами.

Кроликов забивали декапитацией. Почки быстро извлекали, кровь удаляли перфузией буфером А (0,1 М трис—HCl, pH 7,2, 2 мМ ЭДТА). Затем почки (47 г) измельчали ножницами, промывали буфером А, добавляли 180 мл того же буфера, гомогенизировали в гомогенизаторе MPW 302 (ПНР) в течение 7 минут. Гомогенат центрифугировали. Белки надосадочной жидкости фракционировали сульфатом аммония (35—80% насыщения). Осадок растворяли в буфере Б (20 мМ трис—HCl, pH 7,6, 2 мМ ЭДТА) и диализовывали в течение 14 ч против буфера Б. Диализованный препарат наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (1,6×34 см). Фермент элюировали линейным градиентом NaCl (0—0,4 М) на буфере Б. Скорость элюции—9 мл/ч. Активные фракции объединяли и наносили на колонку с гидроксипатитом (1,6×15 см). Колонку промывали 40 мМ Na-фосфатным буфером, pH 6,9. Пури nukлеозидфосфорилазу элюировали линейным градиентом Na-фосфатного буфера (40—160 мМ). Объединенные активные фракции вновь фракционировали сульфатом аммония (45—70% насыщения). Осадок растворяли в буфере Б и диализовывали против этого же буфера. Диализованный ферментный препарат наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (1,6×22 см). Колонку промывали 40 мМ NaCl на буфере Б, а затем фермент элюировали линейным градиентом NaCl (40—250 мМ) на буфере Б. Фракции, обладающие ферментативной активностью объединяли и наносили на колонку (1,6×7 см) с гидроксипатитом. Колонку промывали 40 мМ Na-фосфатным буфером, pH 6,9, а затем элюировали линейным градиентом Na-фосфатного буфера (40—100 мМ). Объединенные активные ферментативные фракции для концентрирования наносили на колонку (0,9×2,5 см) с гидроксипатитом и элюировали 200 мМ Na-фосфатным буфером. Активные фракции объединяли и хранили в 40%-ном глицерине при —18°.

Пури nukлеозидфосфорилазную активность определяли колориметрически.

I метод—по приросту основания [2].

II метод—по приросту рибозы—1-фосфат, по цветной реакции рибозы с орцином [1]. Реакционная смесь содержала 100 мМ Na-фосфата, pH 7,0, 1,5 мМ рибонуклеозид, 12 ME фермента в конечном объеме 0,3 мл. Реакцию останавливали 0,3 мл 0,4 М NaAc, pH 3,8, содержащим 10% активированного угля. Смесь кипятили 30 сек, фильтровали, в фильтрате определяли содержание рибозы [1]. Для стабилизации окрашенного объема раствора доводили до 2,8 мл 95%-ным этанолом.

III метод—по приросту дезоксирибозо-1-фосфата, по цветной реакции окисленной дезоксирибозы тиобарбитуровой кислотой [14]. Реакционная смесь содержала 50 мМ KH_2PO_4 —NaOH, pH 6,8, 1,5 мМ дезоксирибонуклеозид, 0,8—1,2 ME фермента; конеч-

ный объем—0,2 мл. Реакцию останавливали добавлением 80 мкл 15 мМ H_5IO_6 в 0,03 и H_2SO_4 , а не 0,125 и, во избежание неферментативного расщепления нуклеозидов, при этом pH снижался до 2,5. Далее, как в оригинальном методе [14]. Для стабилизации окраски объем раствора доводили до 2,8 мл изопропанолом. Во всех экспериментах по колориметрическому определению ферментативной активности длительность инкубации, проводимой при 37°, была равна 6 мин.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [16], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили при pH 8,9 в 6,2%-ном ПААГ. Белки окрашивали 0,2%-ным водным раствором кумасси R-250, содержащим 10% уксусной кислоты, 25% этанола. Для идентификации пуриннуклеозидфосфорилазной активности после электрофореза гели инкубировали в течение 1 ч при 37° в 80 мМ натрий-арсенитном буфере, pH 6,8, содержащем 1 мМ гуанозин, затем свободную рибозу окрашивали трифенилтетразолием [4].

Результаты и обсуждение. По описанной выше методике из почек кролика была выделена пуриннуклеозидфосфорилаза: двукратным фракционированием сульфатом аммония, двукратной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе и двукратной хроматографией на гидроксилпатите.

Схема очистки пуриннуклеозидфосфорилазы из почек кролика

Стадия очистки	Объем, мл	Концентрация, ед/мл	Общее число, ед	Общее количество белка, мг	Удельная активность	Выход, %	Степень очистки
Исходный экстракт	210	0,24	50,82	2316,3	0,022	100	0
4 осаждение $(NH_4)_2SO_4$, фракция 35–80%	130	0,35	45,11	983	0,046	89	2,1
I хроматография на ДЭАЭ — целлюлозе	93	0,48	44,64	231,1	0,188	88	8,5
I хроматография на гидроксилпатите	53	0,42	22,10	23,2	0,954	44	43,4
II осаждение $(NH_4)_2SO_4$, фракция 45–70% насыщения	21	0,92	19,26	13,7	1,41	3	61,1
II хроматография на ДЭАЭ — целлюлозе	255	0,07	18,18	10,2	1,78	3	80,7
II хроматография на гидроксилпатите	8	1,63	13,06	1,1	12,28	26	558,1

Активность определяли методом I; субстрат—1 мМ гуанозин в 50 мМ Na-фосфатного буфера.

Кривые элюирования белка и пуриннуклеозидфосфорилазы с колонок ДЭАЭ целлюлозы и гидроксилпатита приведены на рис. 1, 2. Схема очистки пуриннуклеозидфосфорилазы из почек кролика приведена в таблице.

В результате всех использованных этапов достигнута 558-кратная очистка фермента, с выходом общей активности 26%. При диск-электрофорезе очищенного препарата фермента обнаруживается одна белковая полоса, совпадающая с пуриннуклеозидфосфорилазной активностью (рис. 3).

Субстратная специфичность пуриннуклеозидфосфорилазы из почек кролика была изучена как по фосфоролизу, так и по синтезу нуклеозидов. Относительная скорость фосфоролиза (pH инкубационной смеси 7) для инозина—100, гуанозина—73, дезоксигуанозина—66, дезоксиинозина—55, ксантозина—4, дезоксиаденозина—4, аденозина—0%.

При отсутствии в реакционной смеси ионов фосфата не происходит расщепления нуклеозидов, что свидетельствует о фосфоролитическом характере реакции. Относительная скорость синтеза (рН инкубационной

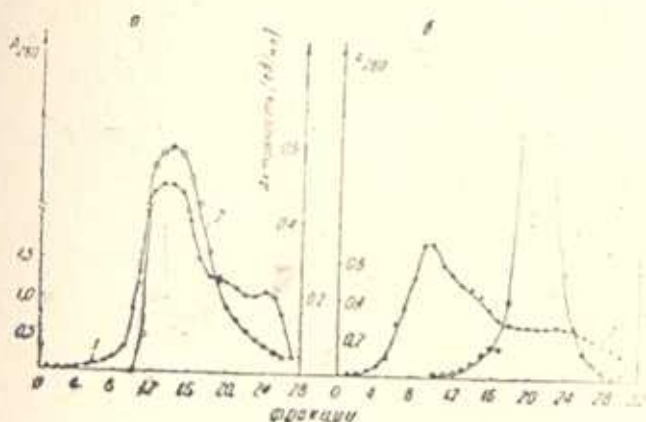


Рис. 1. а) Кривые элюирования белка и пуриинуклеозидфосфорилазы при последовательной хроматографии экстракта почек кролика на I ДЭАЭ-целлюлозе. 1—оптическая плотность при 280 нм, 2—пуриинуклеозидфосфорилазная активность (ед/мл), определявшаяся методом I. б) Кривые элюирования белка и пуриинуклеозидфосфорилазы при последовательной хроматографии на I гидроксилapatите. 1—оптическая плотность при 280 нм, 2—пуриинуклеозидфосфорилазная активность (ед/мл), определявшаяся I методом.

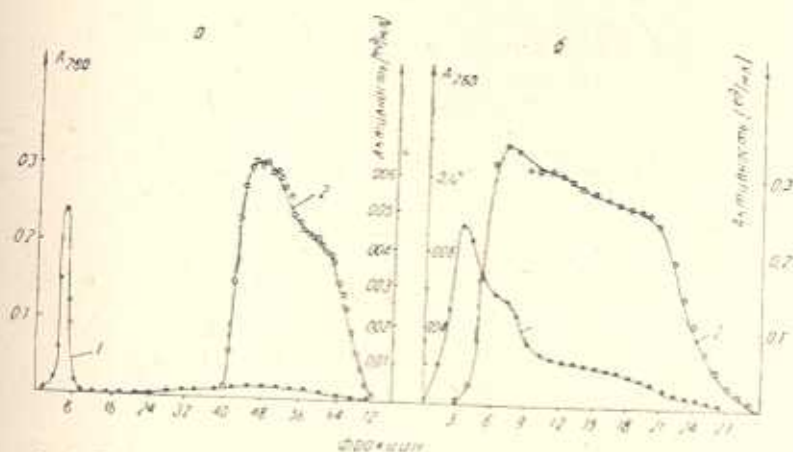


Рис. 2. а) Кривые элюирования белка и пуриинуклеозидфосфорилазы при последовательной хроматографии на II ДЭАЭ-целлюлозе. 1—оптическая плотность при 280 нм, 2—пуриинуклеозидфосфорилазная активность (ед/мл), определявшаяся методом I. б) Кривые элюирования белка и пуриинуклеозидфосфорилазы при последовательной хроматографии на II гидроксилapatите. 1—оптическая плотность при 280 нм, 2—пуриинуклеозидфосфорилазная активность (ед/мл), определявшаяся методом I.

смеси 7) инозина—100, гуанозина—26, ксантозина—10, аденозина—0 %.

Субстратную специфичность пуриинуклеозидфосфорилазы к нуклеозидам определяли II методом, а к дезоксирибонуклеозидам—III методом.

Настоящая работа является первым этапом исследований пурин-нуклеозидфосфорилазы из почек кролика. Так как были обнаружены различия в физико-химических свойствах пуриннуклеозидфосфорилазы

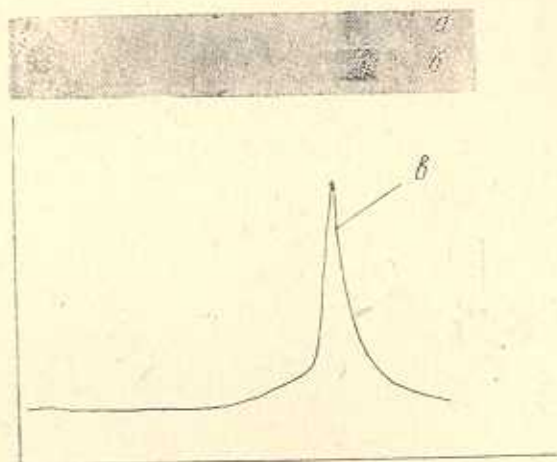


Рис. 3. Определение гомогенности пуриннуклеозидфосфорилазы методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле: а—окраска по белку, б—окраска по пуриннуклеозидфосфорилазной активности, в—денситограмма геля «а».

почек и других органов кролика, дальнейшее изучение этого фермента считаем целесообразным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. В кн.: Практикум по общей биохимии. 222, 1982.
2. Ahmad S. I., Pritchard R. H. Mol. and Gen. Genet., 104, 351—355, 1969.
3. Edwards Y. H., Edwards P. A. and Hopkinson D. A. FEBS letters, 23, 235—244 1973.
4. Gabriel O., Wang S.—F. Anal. Biochem., 27, 545—554, 1969.
5. Hoffes P. A., Jones H. E. In: Methods in Enzymol, New York e. a., Acad. Press. 51, 524—530, 1978.
6. Lewis A. S. Arc. of Biochem. and Biophys., 190, 2, 662—670, 1978.
7. Lewis A. S., Glantz M. D. Biochemistry, 15, 20, 4451—4457, 1976.
8. Lewis A. S. and Lowy B. A. Journal of Biol. Chem., 254, 19, 9927—9932, 1979.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Journal of Biol. Chem. 193, 1, 265—275, 1951.
10. Martin D. W., Jr. In: Ann. Rev. Biochem., 50, 351—356, 1981.
11. Milman G., Anton D. L. and Weber J. L. Biochemistry, 15, 23, 4967—4972, 1976.
12. Moyer T. P., Fisher A. G. Arc. of Biochem. and Biophys. 174, 2, 622—629, 1976.
13. Murakami K., Tsushima K. Biochim. Biophys., acta., 453, 205—211, 1976.
14. Saslow L. D., Waraudekar V. S. Methods Enzymol., 12, 108—113, 1976.
15. Savage B. and Spenser N. Biochemistry, 15, 20, 4451—4457, 1976.
16. Schimadle C. M., Tanigoshi L., Mole L., Sherman I. W. J. of Biol. Chem., 260-7, 4455—4460, 1985.
17. Umemura S., Nishino T., Murakami K., Tsushima K. J. of Biol. Chem., 257, 22, 13374—13378, 1982.

Поступило 26.11 1986 г.