



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 12 * № 11 * 1986

ОВЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.153.211:547.953.04:547.95

БИОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ЛИПОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ АКТИВНОСТИ

Остапенко О. В., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П.

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

В обзоре описано использование аффинной хроматографии для выделения фосфолипаз и липаз, а также рассмотрены методы определения их активности. Основное внимание уделено вопросам получения биоспецифических сорбентов с липидными лигандами, развитию новых методов анализа липолитической активности.

Содержание обзора

- I. Биоспецифическая хроматография фосфолипаз и липаз
 - I.1. Носители, используемые в аффинной хроматографии липолитических ферментов
 - I.2. Биоспецифические сорбенты с липидными лигандами
 - I.3. Методологические проблемы аффинной хроматографии липолитических ферментов
 - I.4. Иммуноспецифическая хроматография
 - I.5. Методы определения активности липолитических ферментов

I. БИОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ФОСФОЛИПАЗ И ЛИПАЗ

Липолитические ферменты играют важную роль в жизнедеятельности организмов, осуществляя регуляцию катаболизма липидов различных типов. Отдельные представители липолитических ферментов широко используются в различных биохимических исследованиях. Так, фосфолипазы являются важным инструментом для изучения строения и функций мембран. Широкое развитие получило применение ферментов данной группы для структурного анализа липидов, а также для их получения с помощью полусинтетических методов.

В связи с этим все более актуальной становится проблема разработки эффективных методов выделения липолитических ферментов в гомогенном состоянии.

Описанные в литературе методики очистки липолитических ферментов позволяют в ряде случаев получить фермент в индивидуальном состоянии, однако процесс очистки, как правило, многостадиен, и выход фермента обычно невысок. Кроме ионообменной хроматографии и гель-фильтрации при выделении липолитических ферментов в настоящее время все чаще применяются методы гидрофобной хроматографии [1–3] и высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой [4]. Однако все эти методы неспецифичны относительно природы активного центра фермента, и в последние годы все большее распространение находит более избирательный, и, следовательно, более эффективный метод очистки — биоспецифическая (аффинная) хроматография, применение которой позволяет извлекать фермент из сложных смесей часто в одну стадию с высокой степенью очистки и с выходом, близким к количественному.

Метод аффинной хроматографии ферментов основан на специфических взаимодействиях фермента и сорбента. При этом сорбенты представляют

Носители на основе сефарозы, используемые в аффинной хроматографии
липолитических ферментов
Здесь и далее P — носитель

Производные сефарозы	Активная группа носителя	Функциональная группа лиганды	Литература
Бромцианактивированная сефароза 6В		-NH ₂	[6-8]
CH-сефароза 4В	$P-\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	-NH ₂	[9, 10]
AH-сефароза 4В	$P-\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$	-COOH	[11-13]
Аффигель 10		-NH ₂	[14]
Эпоксиактивированная сефароза 4В	$P-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_n\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{OCH}_2\text{CH}-\text{CH}_2$ $n=1,2$	-NH ₂	[10, 15]

собой различные носители с ковалентно присоединенными лигандами — субстратами, ингибиторами или их аналогами. В ходе аффинной хроматографии на таких сорбентах избирательно удерживаются лишь те ферменты, которые проявляют сродство к иммобилизованным лигандам. После удаления несвязанных компонентов и при изменении условий элюции происходит разрушение специфичных взаимодействий фермента с сорбентом, и фермент выделяется в чистом виде. Этот метод оказался эффективным и при выделении ферментов, обладающих сродством к липидам. Его применение позволило значительно облегчить и ускорить процесс выделения липолитических ферментов, исключить ряд трудоемких и малоэффективных стадий очистки. При этом лигандами являются, как правило, соединения липидной природы — субстраты или их аналоги. В ряде случаев в качестве лигандов использовались антитела к липолитическим ферментам.

I. 1. Носители, используемые в аффинной хроматографии липолитических ферментов

Носитель — нерастворимая матрица, к которой ковалентно присоединяют биоспецифический лиганд, получая при этом сорбент для аффинной хроматографии. Успешное применение метода требует, чтобы носитель обладал следующими свойствами [5]:

- 1) минимальной адсорбционной способностью по отношению к белластным белкам;
- 2) механической и химической стабильностью как в условиях сорбции и десорбции биополимера, так и в условиях присоединения лиганды и регенерации сорбента;
- 3) достаточной проницаемостью для молекул выделяемого биополимера и большой удельной поверхностью;
- 4) способностью удобно иочно присоединять специфический лиганд в относительно мягких условиях;
- 5) микробиологической устойчивостью.

Наиболее распространеными носителями для биоспецифических сорбентов являются органические матрицы на основе гелей агарозы (сефароза и биогель А). Агарозные гели устойчивы в диапазоне рН от 4 до 9,

могут использоваться при температурах от 0 до 40° С, обладают низкой неспецифической сорбцией. К недостаткам агарозы следует отнести невысокую механическую прочность и возможность микробного заражения. Наиболее широко используемые в аффинной хроматографии липолитических ферментов носители приведены в табл. 1.

Кроме указанных используются также и другие органические носители, например полиамидные, полученные при специальной обработке капроновой ткани [16]. Такие носители, модифицированные глутаровым альдегидом, использовались при ковалентной посадке лигандов, содержащих NH₂-группу [17, 18].

В последнее время в аффинной хроматографии липолитических ферментов начали применяться носители на неорганической основе — модифицированные макропористые кремнеземы (силохромы). Силохромы характеризуются высокой степенью химической чистоты, узким распределением по размерам пор. Сорбенты на неорганической основе механически прочны, не подвержены действию микроорганизмов, жесткая структура носителя не изменяется при переходе от одного растворителя к другому. Однако неорганическим носителям присущи и свои недостатки: невысокая стабильность в водных растворах при pH>7 и способность к неспецифической сорбции. Повышению гидролитической стабильности силохромов способствует их обработка солями алюминия [19]. Для уменьшения неспецифической сорбции белков силохром модифицировали гидрофильтальными полимерами, например полиакриловой кислотой. Такие модифицированные карбоксилсодержащие силохромы (силаакрилы) после их перевода в форму хлорангидрида были использованы для иммобилизации гидроксилсодержащих лигандов [20, 21].

1. 2. Биоспецифические сорбенты с липидными лигандами

В аффинной хроматографии липолитических ферментов наиболее широко в качестве лигандов используются соединения липидной природы, являющиеся субстратами данных ферментов или их аналогами. При выборе лиганда для получения эффективного биоспецифического сорбента необходимо руководствоваться следующими требованиями:

1) лиганд должен обладать высоким сродством к выделяемому ферменту;

2) взаимодействие лиганда и фермента должно быть обратимым;

3) в ходе аффинной хроматографии лиганд должен быть устойчивым по отношению к выделяемым биополимерам (не расцепляться ими со значительной скоростью);

4) лиганд должен обладать функциональной группировкой, с помощью которой его можно присоединить к матрице, причем процесс иммобилизации не должен существенно влиять на сродство фермента к лиганду.

Липидные лиганды в зависимости от способа присоединения к носителю можно разделить на три группы:

1) лиганды, присоединенные через аминогруппы;

2) лиганды, присоединенные через карбоксильные группы;

3) лиганды, присоединенные через гидроксильные группы.

1. 2.1. Сорбенты с липидными лигандами, присоединенными через NH₂-группу

Первые работы, связанные с применением аффинной хроматографии для выделения липолитических ферментов, относятся к середине 70-х годов. Впервые на биоспецифическом сорбенте была очищена фосфолипаза С из *Clostridium perfringens* [7]. Сорбент был получен присоединением липопротеина яичного желтка к сефарозе 4B, активированной бромцианием по методу [22]. Иммобилизация лиганда на носителе происходила, вероятно, в основном за счет свободных аминогрупп апопротеинов, входящих в состав яичных липопротеинов. Была достигнута 200-кратная очистка фермента с выходом по белку 60%. Сорбент был устойчив в течение месяца при хранении в буфере при 4° С и выдерживал 4–5 цик-

лов работы. Этот аффинный сорбент был также успешно использован при выделении фосфолипазы С из *Bacillus cereus* [8] и при очистке фосфолипазы D из *B. subtilis* [6]. В случае фосфолипазы D на стадии аффинной хроматографии активность возрастала в 40 раз, выход по белку составил 90%, но выделенный фермент не был полностью гомогенным.

Липопротеины доступны и довольно легко выделяются из яичных желтков, но их использование в качестве лигандов имеет ряд серьезных ограничений. Во-первых, такие сорбенты недостаточно устойчивы и не могут многократно использоваться, а во-вторых, помимо специфических взаимодействий между выделяемым ферментом и сорбентом могут наблюдаться неспецифические гидрофобные взаимодействия, обусловленные наличием гидрофобных участков в лиганде. Такие взаимодействия отмечались в случае очистки фосфолипаз обоих типов, они снижали эффективность очистки и чистоту выделяемых препаратов [6, 7].

Фосфатидилэтаноламин является субстратом для фосфолипаз и обладает высоким сродством к этим ферментам, а наличие у него реакционно-способной NH₂-группы в полярной части молекулы позволяет ковалентно присоединять его к матрице, получая аффинные сорбенты. Так, яичный фосфатидилэтаноламин был присоединен к модифицированному глутаровым альдегидом полiamидному носителю, и полученный сорбент (1) (табл. 2) был успешно применен при очистке фосфолипазы D из корнеплода среднесизиатской редьки [18]. При этом были выделены три изофермента, степень их очистки составила соответственно 182, 155 и 198. Такой же сорбент был использован при выделении фосфолипазы A₂ из митохондрий печени крысы [23]. Применение различных условий элюции привело к выделению двух белковых фракций, обладающих фосфолипазной активностью. Степень очистки этих двух ферментных фракций составила соответственно 347 и 416.

Однако сорбенты с иммобилизованным фосфатидилэтаноламином оказались неэффективными при выделении ряда ферментов, специфически взаимодействующих с полярной частью молекулы субстрата. Так, в работе [24] диалкильный аналог 1,2-дигексадецил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина был ковалентно за счет амидной связи присоединен к СН-сепарозе 4B, но на получившем сорбенте (2) (табл. 2) не происходило специфического удерживания фосфолипазы A₂ из яда *Crotalus adamanteus*.

Неудачными также оказались попытки выделить фосфолипазу В из *Penicillium notatum* на сорбентах (3) и (4) на основе СН-сепарозы 4B или эпоксисепарозы с яичным фосфатидилэтаноламином в качестве лиганда [10] (табл. 2).

Другим лигандом, ковалентное присоединение которого к матрице осуществлялось за счет NH₂-групп, явился фосфатидилсерин бычьего мозга – субстрат ряда фосфолипаз. Этот лиганд был иммобилизован на СН-сепарозе 4B в присутствии карбодиимида. Однако на полученном сорбенте (5) наблюдалось лишь слабое удерживание фосфолипазы В из *P. notatum* из-за низкой концентрации лиганда (0,5 мкмоль/мл геля) [10].

В настоящее время все шире используются в качестве лигандов синтетические фосфолипиды с функциональными группами в гидрофобной части молекулы. К таким лигандам относится, например, 1-(12-амино-эйказаноил)-2-гексадецил-sn-глицеро-3-фосфохолип [14]. (Известно, что наличие NH₂-группы в гидрофобном остатке при C1-атоме глицерина не оказывает существенного влияния на образование фермент-субстратного комплекса.) На основе этого фосфолипида, не гидролизуемого фосфолипазой A₂, получали биоспецифический сорбент (6) (табл. 2) путем присоединения лиганда к аффигелю-10. Сорбент (6) был применен при выделении фосфолипазы A₂ из поджелудочной железы свиньи и гладких мышц быка [14]. Для фосфолипазы A₂ из гладких мышц быка была достигнута 32-кратная очистка с выходом 70% от исходной активности, содержащейся в мембранный фракции гомогената. Сорбент был использован 6 раз без потери способности к связыванию.

могут использоваться при температурах от 0 до 40° С, обладают низкой неспецифической сорбцией. К недостаткам агарозы следует отнести невысокую механическую прочность и возможность микробного заражения. Наиболее широко используемые в аффинной хроматографии липолитических ферментов носители приведены в табл. 1.

Кроме указанных используются также и другие органические носители, например полиамидные, полученные при специальной обработке капроновой ткани [16]. Такие носители, модифицированные глутаровым альдегидом, использовались при ковалентной посадке лигандов, содержащих NH₂-группу [17, 18].

В последнее время в аффинной хроматографии липолитических ферментов начали применяться носители на неорганической основе — модифицированные макропористые кремнеземы (силохромы). Силохромы характеризуются высокой степенью химической чистоты, узким распределением по размерам пор. Сорбенты на неорганической основе механически прочны, не подвержены действию микроорганизмов, жесткая структура носителя не изменяется при переходе от одного растворителя к другому. Однако неорганическим носителям присущи и свои недостатки: невысокая стабильность в водных растворах при pH > 7 и способность к неспецифической сорбции. Повышению гидролитической стабильности силохромов способствует их обработка солями алюминия [19]. Для уменьшения неспецифической сорбции белков силохром модифицировали гидрофильными полимерами, например полиакриловой кислотой. Такие модифицированные карбоксилсодержащие силохромы (силакрилы) после их перевода в форму хлорангидрида были использованы для иммобилизации гидроксилсодержащих лигандов [20, 21].

I. 2. Биоспецифические сорбенты с липидными лигандами

В аффинной хроматографии липолитических ферментов наиболее широко в качестве лигандов используются соединения липидной природы, являющиеся субстратами данных ферментов или их аналогами. При выборе лиганда для получения эффективного биоспецифического сорбента необходимо руководствоваться следующими требованиями:

- 1) лиганд должен обладать высоким сродством к выделяемому ферменту;
- 2) взаимодействие лиганда и фермента должно быть обратимым;
- 3) в ходе аффинной хроматографии лиганд должен быть устойчивым по отношению к выделяемым биополимерам (не расцепляться ими со значительной скоростью);
- 4) лиганд должен обладать функциональной группировкой, с помощью которой его можно присоединить к матрице, причем процесс иммобилизации не должен существенно влиять на сродство фермента к лиганду.

Липидные лиганды в зависимости от способа присоединения к носителю можно разделить на три группы:

- 1) лиганды, присоединенные через аминогруппы;
- 2) лиганды, присоединенные через карбоксильные группы;
- 3) лиганды, присоединенные через гидроксильные группы.

I. 2.1. Сорбенты с липидными лигандами, присоединенными через NH₂-группу

Первые работы, связанные с применением аффинной хроматографии для выделения липолитических ферментов, относятся к середине 70-х годов. Впервые на биоспецифическом сорбенте была очищена фосфолипаза С из *Clostridium perfringens* [7]. Сорбент был получен присоединением липопротеина яичного желтка к сефарозе 4B, активированной бромцианином по методу [22]. Иммобилизация лиганда на носителе происходила, вероятно, в основном за счет свободных аминогрупп апопротеинов, входящих в состав яичных липопротеинов. Была достигнута 200-кратная очистка фермента с выходом по белку 60%. Сорбент был устойчив в течение месяца при хранении в буфере при 4° С и выдерживал 4–5 цик-

лов работы. Этот аффинный сорбент был также успешно использован при выделении фосфолипазы С из *Bacillus cereus* [8] и при очистке фосфолипазы D из *B. subtilis* [6]. В случае фосфолипазы D на стадии аффинной хроматографии активность возрастила в 40 раз, выход по белку составил 90%, но выделенный фермент не был полностью гомогенным.

Липопротеины доступны и довольно легко выделяются из яичных желтков, но их использование в качестве лигандов имеет ряд серьезных ограничений. Во-первых, такие сорбенты недостаточно устойчивы и не могут многократно использоваться, а во-вторых, помимо специфических взаимодействий между выделяемым ферментом и сорбентом могут наблюдаться неспецифические гидрофобные взаимодействия, обусловленные наличием гидрофобных участков в лиганде. Такие взаимодействия отмечались в случае очистки фосфолипаз обоих типов, они снижали эффективность очистки и чистоту выделяемых препаратов [6, 7].

Фосфатидилэтаноламин является субстратом для фосфолипаз и обладает высоким сродством к этим ферментам, а наличие у него реакционно-способной NH₂-группы в полярной части молекулы позволяет ковалентно присоединять его к матрице, получая аффинные сорбенты. Так, яичный фосфатидилэтаноламин был присоединен к модифицированному глутаровым альдегидом полiamидному носителю, и полученный сорбент (1) (табл. 2) был успешно применен при очистке фосфолипазы D из корне-плода среднеазиатской редьки [18]. При этом были выделены три изофермента, степень их очистки составила соответственно 182, 155 и 198. Такой же сорбент был использован при выделении фосфолипазы A₂ из митохондрий печени крысы [23]. Применение различных условий элюции привело к выделению двух белковых фракций, обладающих фосфолипазной активностью. Степень очистки этих двух ферментных фракций составила соответственно 347 и 416.

Однако сорбенты с иммобилизованным фосфатидилэтаноламином оказались неэффективными при выделении ряда ферментов, специфически взаимодействующих с полярной частью молекулы субстрата. Так, в работе [24] дигалкильный аналог 1,2-дигексадецил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина был ковалентно за счет амидной связи присоединен к СН-сесфарозе 4B, но на полученном сорбенте (2) (табл. 2) не происходило специфического удерживания фосфолипазы A₂ из яда *Crotalus adamanteus*.

Неудачными также оказались попытки выделить фосфолипазу В из *Penicillium notatum* на сорбентах (3) и (4) на основе СН-сесфарозы 4B или эпоксицефарозы с яичным фосфатидилэтаноламином в качестве лиганда [10] (табл. 2).

Другим лигандом, ковалентное присоединение которого к матрице осуществлялось за счет NH₂-групп, явился фосфатидилсерин бычьего мозга — субстрат ряда фосфолипаз. Этот лиганд был иммобилизован на СН-сесфарозе 4B в присутствии карбодимида. Однако на полученному сорбенте (5) наблюдалось лишь слабое удерживание фосфолипазы В из *P. notatum* из-за низкой концентрации лиганда (0,5 мкмоль/мл геля) [10].

В настоящее время все шире используются в качестве лигандов синтетические фосфолипиды с функциональными группами в гидрофобной части молекулы. К таким лигандам относится, например, 1-(12-амино-эйкозаноил)-2-гексадецил-sn-глицеро-3-фосфохолив [14]. (Известно, что наличие NH₂-группы в гидрофобном остатке при C1-атоме глицерина не оказывает существенного влияния на образование фермент-субстратного комплекса.) На основе этого фосфолипида, не гидролизуемого фосфолипазой A₂, получали биоспецифический сорбент (6) (табл. 2) путем присоединения лиганда к аффигелю-10. Сорбент (6) был применен при выделении фосфолипазы A₂ из поджелудочной железы свиньи и гладких мышц быка [14]. Для фосфолипазы A₂ из гладких мышц быка была достигнута 32-кратная очистка с выходом 70% от исходной активности, содержащейся в мембранный фракции гомогената. Сорбент был использован 6 раз без потери способности к связыванию.

**Биоспецифические сорбенты с липидными лигандами, присоединенными через
NH₂-группы (схематическое изображение)**
Жирным шрифтом выделена активная группа носителя

Номер сорбента	Структура сорбента
1	$ \begin{array}{c} P-N=C \\ \\ (\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{OPO}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} \begin{array}{c} \text{R''OCO}-\overset{\text{CH}_2\text{OCOR'}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{H} \\ \\ \text{O} \end{array} $
2	$ \begin{array}{c} P-\text{NH}(\text{CH}_2)_5 \\ \\ \text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OPO}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} \begin{array}{c} \text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}-\overset{\text{CH}_2\text{OC}_{16}\text{H}_{33}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{H} \\ \\ \text{O} \end{array} $
3	$ \begin{array}{c} P-\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OPOCH}_2 \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} \begin{array}{c} \text{R''OCO}-\overset{\text{CH}_2\text{OCOR'}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{H} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $
4	$ \begin{array}{c} P-\text{OCH}_2\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{OCH}_2\overset{\text{OH}}{\text{CH}}\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{OPOCH}_2 \\ \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} \begin{array}{c} \text{R''OCO}-\overset{\text{CH}_2\text{OCOR'}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{H} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $
5	$ \begin{array}{c} P-\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CONHCHCH}_2\overset{\text{COOH}}{\underset{\text{OH}}{\text{OPOCH}_2}} \\ \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} \begin{array}{c} \text{R''OCO}-\overset{\text{CH}_2\text{OCOR'}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{H} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $
6	$ \begin{array}{c} P-\overset{\text{(CH}_2)_7\text{CH}_3}{\text{O}}(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}(\text{CH}_2)_{10}\text{OCOCH}_2 \\ \\ \\ \text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}-\overset{\text{CH}_2\text{OC}_{16}\text{H}_{33}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{H} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_2\text{OP}_2(\text{CH}_2)_2\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{O}^- \end{array} $

I.2.2. Сорбенты с липидными лигандами, присоединенными через COOH-группу

Карбоксилсодержащие липидные лиганды, широко используемые при аффинной хроматографии фосфолипаз, можно разделить на две группы:

1) лиганды, содержащие COOH-группу в полярной части молекулы фосфолипида;

2) лиганды, содержащие COOH-группу в гидрофобной части молекулы фосфолипида.

К первой группе лигандов можно отнести фосфатидилсерин, ковалентное присоединение которого к матрице, содержащей аминогруппу, осуществляется по типу амидной связи за счет COOH-группы в полярной части молекулы. Так, при иммобилизации фосфатидилсерина на АН-сепарозе 4В был получен аффинный сорбент (7) (табл. 3), который был успешно применен при очистке фосфолипазы В из *P. notatum* [10, 25]. Использование аффинной хроматографии позволило упростить процесс очистки фермента, исключить стадии электрофореза и изоэлектрофокусировки [10].

Ко второй группе лигандов относится окисленный яичный фосфатидилхолин, содержащий COOH-группу при C2-атоме глицеринового скелета фосфолипида. Окислению подвергались двойные связи ненасыщенных жирных кислот, которые в яичном фосфатидилхолине в основном сосредоточены при C2-атоме. Впервые такой тип лиганда — 1-ацил-2-(8-карбокси)октаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин был присоединен к АН-сепарозе 4В в присутствии карбодимида. Полученный сорбент (8) (табл. 3) был успешно применен при аффинной хроматографии липид-переносящего белка из печени быка [26].

Сорбент (8) оказался эффективным и при очистке фосфолипазы С из *C. perfrigens* [13], на нем была частично очищена также митохондриальная фосфолипаза А₂ из печени крысы [27]. Однако авторы не сообщают, насколько сорбент устойчив в условиях выделения фосфолипазы А₂.

Таблица 3

Биоспецифические сорбенты с липидными лигандами, присоединенными через COOH-группы (схематическое изображение)

Жирным шрифтом выделена активная группа носителя

Номер сорбента	Структура сорбента
7	$P-\overset{+}{\text{NH}}(\text{CH}_2)_6\text{NHCOCH}_2\overset{\text{OPOCH}_2}{\underset{\text{O}}{\text{ }}} \text{C}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{R''OCO}}{\text{ }}} \text{N}^+$
8	$P-\overset{+}{\text{NH}}(\text{CH}_2)_6\text{NHCO}(\text{CH}_2)_7\overset{\text{OPO(CH}_2)_2\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3}{\underset{\text{O}}{\text{ }}} \text{C}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{CH}_2\text{OCOR}}{\text{ }}}$
9	$P-\overset{+}{\text{NH}}(\text{CH}_2)_6\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n\overset{\text{OCH}_2}{\underset{\text{CHOC}_{16}\text{H}_{33}}{\text{ }}} \text{C}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{CH}_2\text{OPO}(\text{CH}_2)_2\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3}{\text{ }}}$

а) $n = 8$; б) $n = 11$

способной гидролизовать сложноэфирную связь при С2-атоме углерода в молекуле лиганда, что может привести к отщеплению лиганда от матрицы.

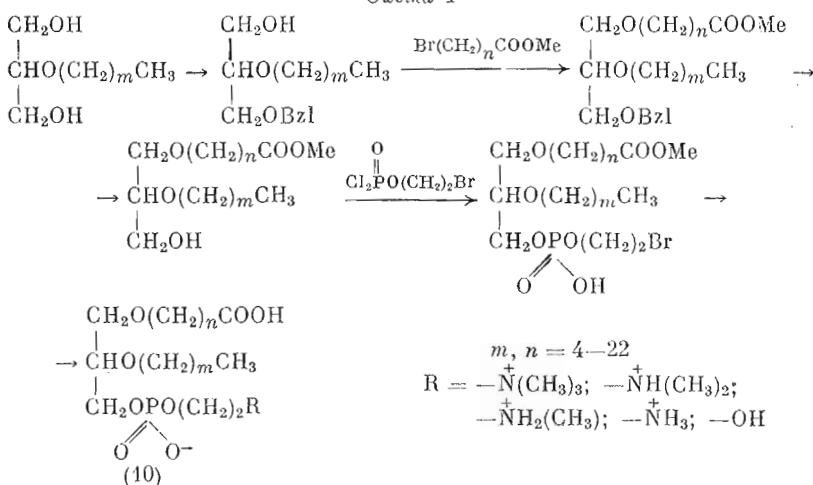
Более подходящими лигандами для выделения фосфолипазы А₂ из различных источников являются аналоги субстратов С2-алкильного типа со свободной COOH-группой при С1-атоме глицеринового скелета, не гидролизуемые данным ферментом. Так, в качестве лигандов были использованы *rac*-1-(8-карбокси)октил- и *rac*-1-(11-карбокси)ундекил-2-гексадецилглицеро-3-фосфохолины, полученные окислением *rac*-1-октадец-9 (или 12)-енил-2-гексадецилглицеро-3-фосфохолинов смесью KMnO₄+KIO₃ [28]. Эти лиганды были присоединены ковалентно к АН-сепарозе 4В в присутствии карбодиимида с образованием сорбентов (9а) и (9б) соответственно (табл. 3).

Аффинный сорбент (9а) был успешно применен при выделении в гомогенном состоянии фосфолипазы А₂ из тромбоцитов крови человека [11] и из яда *Cr. adamanteus* [24].

Биоспецифический сорбент (9б) оказался эффективным при выделении фосфолипазы А₂ из мембран эритроцитов овцы [12], а также фосфолипаз, обладающих активностью А₁ и В, из ядов различных видов ос [29].

Недавно была предложена общая схема синтеза различных алкильных аналогов субстратов фосфолипаз типа (10), имеющих свободную COOH-группу при С1-атоме глицерина (схема 1). Полученные фосфолипидные

Схема 1



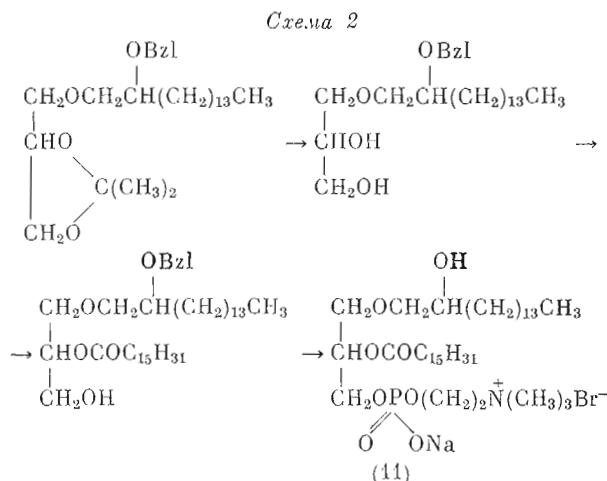
лиганды в дальнейшем предполагается иммобилизовать на аминосодержащих смолах и использовать полученные биоспецифические сорбенты при выделении фосфолипазы А₂ [30].

I.2.3. Сорбенты с липидными лигандами, присоединенными через OH-группу

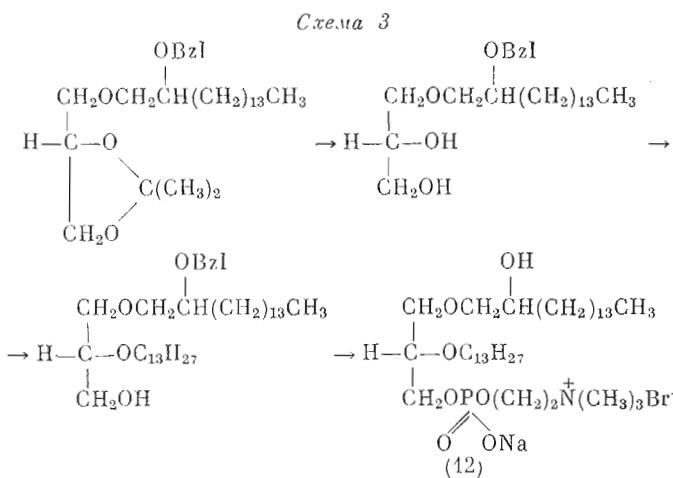
В последнее время в качестве носителей для биоспецифической хроматографии все шире используются органокремнеземные сорбенты, покрытые поликарболовой кислотой. В этом случае фосфолипидные лиганды целесообразно присоединять по типу сложноэфирной связи. Был синтезирован ряд фосфолипидов, содержащих свободную OH-группу при С1-атоме глицерина или в гидрофобном остатке, связанном с данным атомом. Для получения биоспецифических сорбентов, используемых для аффинной хроматографии фосфолипазы А₂ из различных источников, был синтезирован *rac*-1-(2-оксигексадецил)-2-нальмитоилглицеро-3-фосфохолин (11) [31] (схема 2).

Однако этот фосфолипид расщепляется фосфолипазой А₂, что уменьшает стабильность биоспецифического сорбента и способствует частично-

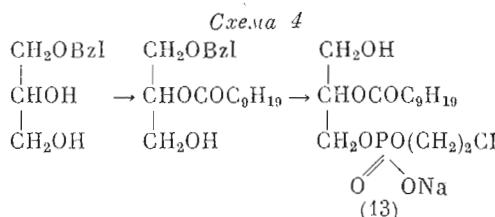
му загрязнению препарата фермента примесями жирной кислоты. Эти недостатки могут быть преодолены использованием не расщепляющихся фосфолипазой A₂ лигандов — энантиомерных фосфатидилхолинов *sn*-1-конфигурации или диалкильных фосфатидилхолинов. С этой целью по описанному методу (схема 2) был синтезирован 3-O-(2-оксигексадецил)-2-стеа-



роил-*sn*-глицеро-1-фосфохолин [32]. Диалкильный аналог — 3-O-(2-оксигексадецил)-2-тридецил-*sn*-глицеро-1-фосфохолин (12) получен по схеме 3 [32].

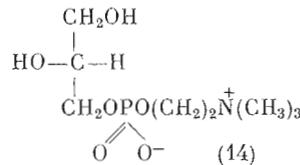


В поисках лигандов более простой структуры был получен *rac*-2-ка-
приноилглицеро-3-(β-хлорэтил)fosфат (13) [32] (схема 4), синтез кото-

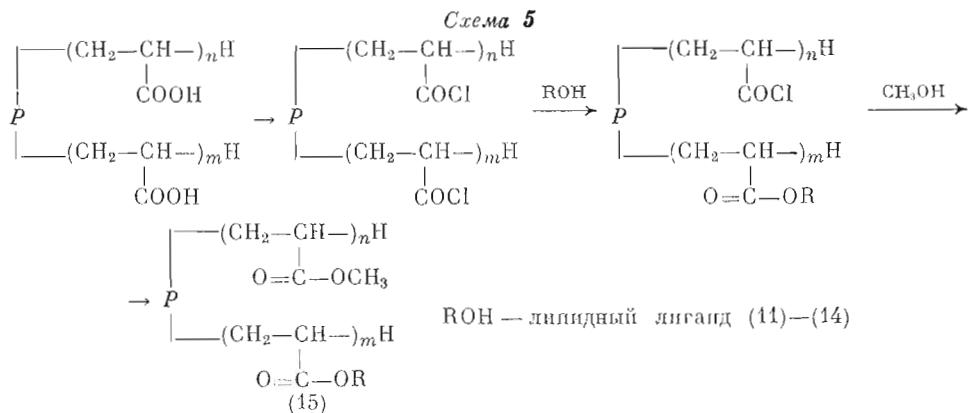


рого включает меньшее количество стадий в сравнении с вышеприведенными схемами. Основанием для синтеза такого лиганда послужил известный факт о том, что фосфолипаза A₂ расщепляет фосфолипиды, не содержащие алкиламмониевой или аминогруппы в полярной части молекулы. В качестве другого доступного лиганда было предложено ис-

пользовать *sn*-глицеро-3-фосфохолин (14), получаемый щелочным омылением фосфатидилхолина [33].

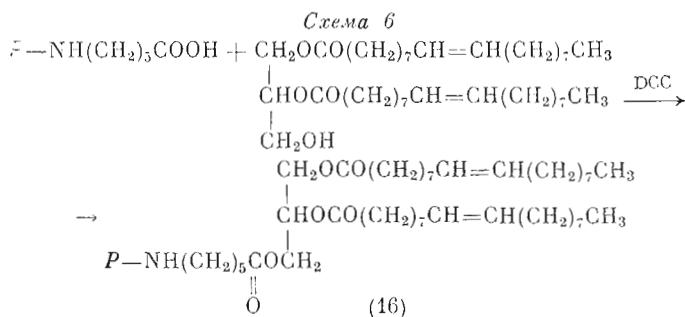


Иммобилизацию полученных фосфолипидов (11)–(14), содержащих свободную гидроксильную группу, проводили на силикагеле путем образования сложноэфирной связи [21] (схема 5). Непрореагировавшие кар-



боксильные группы сорбента метоксилировали с целью предотвращения неспецифической сорбции. Биоспецифические сорбенты типа (15) успешно использовались для выделения фосфолипазы A₂ из ядов *Agkistrodon halys blomhoffii* [33, 34], *Naja naja oxiana* [33] и из поджелудочной железы свиньи [34]. Сорбенты обладали достаточной устойчивостью и допускали 12–15-кратное использование их в течение года. Эффективность биоспецифических сорбентов с иммобилизованным *sn*-глицеро-3-фосфохолином существенно зависела от емкости сорбента по лиганду [35].

Кроме модифицированных фосфолипидов, содержащих OH-группу в гидрофобной части молекулы, к гидроксилсодержащим лигандам относятся также диацилглицерины, проявляющие средство к ряду липаз. Они могут быть также использованы для получения биоспецифических сорбентов. Так, 1,2-диолеоглицерин был ковалентно присоединен к CH-сегменту 4В по типу сложноэфирной связи в присутствии карбодиимида (схема 6), и полученный сорбент (16) был применен при выделении



липазы из жировой ткани человека. На стадии аффинной хроматографии была достигнута 10-кратная очистка фермента с выходом по белку 70% [9].

I.3. Методологические проблемы аффинной хроматографии липолитических ферментов

Выбор метода иммобилизации лиганда на матрице определяется характером функциональных групп лиганда и носителя. Как отмечалось выше, в аффинной хроматографии липолитических ферментов широко применяются такие матрицы, как АН-сепароза 4В, СН-сепароза 4В и лиганды, содержащие в качестве функциональных групп карбоксильные или аминогруппы. В связи с этим основным методом иммобилизации карбоксил- и аминосодержащих липидных лигандов на агарозные гели является конденсация с образованием амидной связи при активации карбоксильных групп носителя или лиганда с помощью различных карбодиимидов, таких, как N,N'-дициклогексилкарбодиимид, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид, N-циклогексил-N'[2-(4-метилморфолино)-этил]карбодиимид и n-толуолсульфонат.

Обычно реакцию амидной конденсации проводят в 40–50% водных растворах тетрагидрофурана [10, 12, 24] или диоксана [27]. С целью повышения содержания фосфолипидных лигандов на сорбенте и улучшения его адсорбционных свойств было предложено использовать в качестве растворителя диметилсульфоксид [35]. При этом содержание иммобилизованных фосфолипидов на сорбентах возрастает в 5–6 раз по сравнению с содержанием лигандов на сорбентах, полученных при проведении конденсации в среде других растворителей, например в тетрагидрофуране [36]. В среде диметилсульфоксида проводили, например, иммобилизацию аминосодержащего фосфолипидного лиганда на аффигель 10 [14]. При выборе оптимальных условий посадки лиганда были опробованы и другие растворители (диметилформамид, этанол, изопропанол, метанол), однако наибольшая емкость сорбента по лиганду (2–3 мкмоль/мл геля) была достигнута именно в среде диметилсульфоксида.

Емкость биоспецифического сорбента по фосфолипидному лиганду определяют по содержанию неорганического фосфора после кислотного гидролиза сорбента [37, 38]. Повышение концентрации лиганда на носителе увеличивает адсорбционную емкость гелей, повышает их селективность и уменьшает неспецифическую адсорбцию примесных белков.

Однако в работе [27] указывалось, что при относительно высокой концентрации липидного лиганда (40 мкмоль/мл геля) удерживание выделяемого фермента в основном происходило за счет гидрофобных сил. Так, при содержании фосфолипидного лиганда типа окисленного яично-го фосфатидилхолина ~40 мкмоль/мл геля фосфолипаза A₂ из митохондрий печени крысы была элюирована буфером, содержащим 0,1–0,5% тритон X-100. При понижении содержания липидного лиганда (3,3 мкмоль/мл геля) фосфолипаза A₂ адсорбировалась на колонке в присутствии ионов Ca²⁺, а элюировалась буфером, содержащим EDTA, т. е. наблюдалось специфическое взаимодействие фермента с сорбентом. Следовательно, при получении аффинных сорбентов необходимо выбирать в качестве оптимальной такую концентрацию лиганда, при которой обеспечивалось бы строго специфическое взаимодействие очищаемого фермента и сорбента.

Кроме гидрофобных взаимодействий причиной неспецифической сорбции примесных белков при аффинной хроматографии липолитических ферментов могут служить ионные взаимодействия, обусловленные зарядом лиганда. Для предотвращения таких взаимодействий при биоспецифической хроматографии используют буферы, содержащие NaCl для увеличения их ионной силы. Так, если при выделении фосфолипазы A₂ из *Cr. adamanteus* на аффинном сорбенте с иммобилизованным фосфолипидным лигандом [24] белковую смесь наносили и элюировали в отсутствие NaCl (50 mM трис-HCl-буфер, pH 7,5; 25 mM CaCl₂; 1 mM EDTA), то фосфолипаза A₂ удерживалась на сорбенте вместе с другими балластными белками, а при добавлении NaCl (0,2 M) на сорбенте удерживалась исключительно фосфолипаза A₂. В каждом конкретном случае выбор концентрации NaCl зависит от типа выделяемого фермента, его сродства к

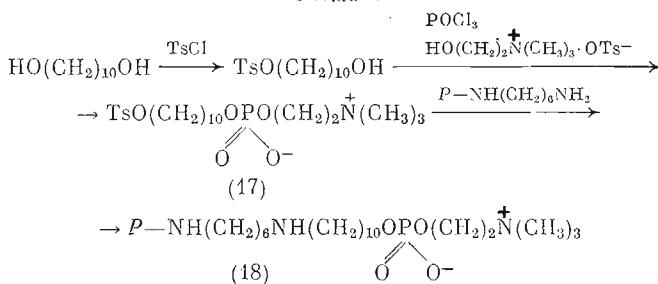
лиганду, от концентрации лиганда на носителе и природы инертных белков.

Важную роль в уменьшении неспецифических взаимодействий играет блокировка избытка активных групп носителя. Для блокировки активированных карбоксильных групп сорбента (СН-сепароза 4В, активированная карбодиимидаами, аффигель 10), а также непрореагировавших альдегидных групп полиамида носителя, модифицированного глутаровым альдегидом, используется этаноламин [10, 14, 18]. Карбоксильные группы силакрила, переведенные в процессе активации в форму хлорангидрида, метоксилировались для уменьшения неспецифической сорбции (схема 5). Для АН-сепарозы 4В, используемой в качестве матрицы для присоединения карбоксилсодержащих липидных лигандов в присутствии карбодиимида, в качестве блокирующего реагента используют уксусную кислоту [10]. Избыток активных групп бромцианактивированной сепарозы 4В удаляется мягкой щелочной обработкой геля в трис-HCl-буфере (рН 8; 2 ч) после реакции присоединения лиганда.

Кроме гелей агарозы в качестве носителей используются и другие органические матрицы, например полиамидные носители, полученные специальной обработкой капроновой ткани [17]. Такие носители модифицировались 12,5% глутаровым альдегидом, затем к ним присоединили аминосодержащие липидные лиганды [18, 23] с образованием основания Шиффа.

Присоединение липидных лигандов к матрицам со свободными NH₂-группами проводят также по типу аминной связи. Так, для очистки фосфолипазы A₂ предложено использовать новый сорбент, полученный путем присоединения по типу аминной связи 10-O-n-толуолсульфонилоксидекан-1-ил-фосфохолина (17) к АН-сепарозе АВ (схема 7) [39].

Схема 7



Синтезированный лиганд имеет довольно простую структуру и не является субстратом фосфолипазы A₂, однако известно, что фермент обнаруживает высокое сродство к n-алкилфосфохолинам [40]. Предложенный сорбент (18) позволял проводить одностадийное выделение фосфолипазы A₂ из яда *Cr. adamanteus* и был эффективным также для очистки солюбилизированных препаратов мембранных фосфолипаз из митохондрий печени и из тромбоцитов. Авторы указывали на то, что использование биоспецифического сорбента (18) исключает нежелательное гидрофобное взаимодействие фермента с сорбентом, которое отрицательно сказывается на процессе аффинной хроматографии [26, 27].

В случае иммобилизации гидроксилсодержащих фосфолипидных лигандов на силакриле [20, 21] присоединение лиганда к матрице осуществлялось по типу сложноэфирной связи после перевода карбоксильных групп носителя в форму хлорангидрида.

I.4. Иммуноспецифическая хроматография

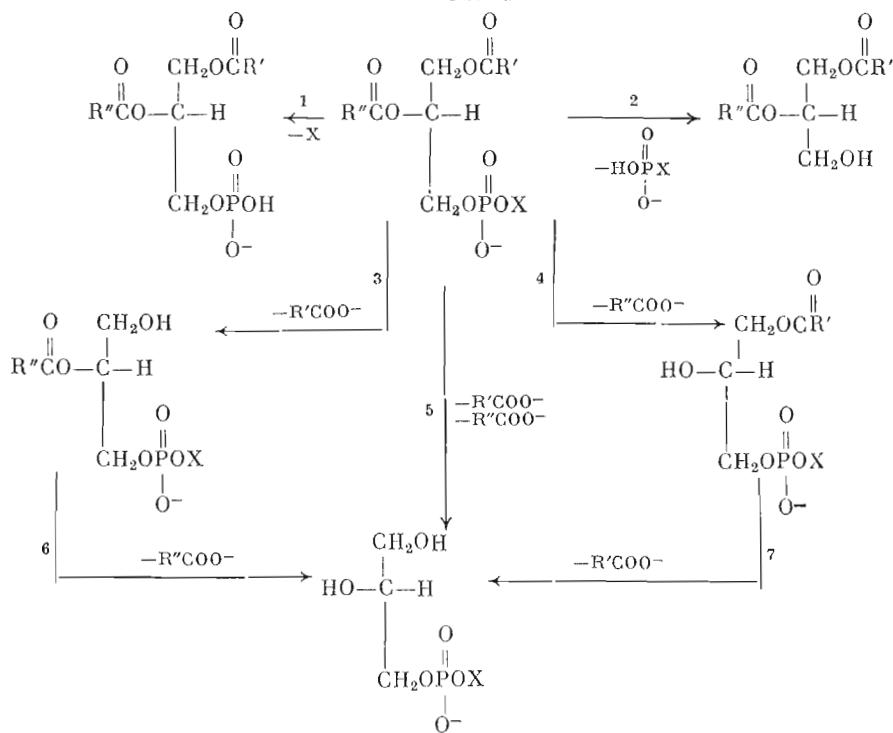
Кроме соединений липидной природы в качестве лигандов для получения биоспецифических сорбентов в аффинной хроматографии липолитических ферментов используются также антитела к ним. Разновидность биоспецифической хроматографии — иммуноспецифическая хроматография — явилась удобным приемом при выделении фосфолипазы A₂ из яда кобры *N. n. oxiana* [41] и яда *Vipera ammodytes* [42]. Для получения

высокоспецифичных антител коммерческую антисыворотку, содержащую антитела ко всем белкам, присутствующим в яде, наносили на колонку с очищенной иммобилизованной фосфолипазой. На колонке происходило специфическое взаимодействие фермента с антителом, затем выделенные антитела присоединялись к носителям, и полученные биоспецифические сорбенты использовались для выделения фосфолипазы А₂ из яда *N. n. oxiana* с последующим разделением изоферментов ионнообменной хроматографией.

II. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЛИПОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Для успешного исследования различных типов липолитических ферментов, в частности фосфолипаз, необходимо располагать надежными методами определения их активности. Фосфолипазы — ферменты, относящиеся к классу гидролаз, расщепляют сложноэфирные или фосфоэфирные связи в молекулах природных фосфолипидов (схема 8). Методы

Схема 8



Цифрами обозначены фосфолипазы D (1), C (2), A₁ (3), A₂ (4), B (5) и лизофосфолипазы (6, 7). X — основание, аминокислота, глицерин и т. д.

определения фосфолипазной активности основаны на количественном определении выделяющихся продуктов гидролиза. Активность фосфолипаз пропорциональна количеству образующихся в единицу времени продуктов реакции или количеству гидролизуемого в единицу времени субстрата и выражается в микромолях в минуту, а удельная ферментативная активность — в микромолях в минуту на 1 мг белка. Для каждого вида фосфолипаз существуют специфичные методы анализа, использующие различные возможности определения образующихся в ходе ферментативного гидролиза продуктов (жирные кислоты, лизофосфолипиды, диглицериды, фосфатидная кислота, холин, фосфохолин и др.). Помимо таких специфичных методов есть и общие способы анализа ферментативной активности фосфолипаз. К числу таких методов относятся титрометрические, радиометрические и спектрофотометрические методы.

II.1. Титриметрический метод

В настоящее время наиболее распространенным методом определения активности фосфолипаз, в особенности карбоксиэстераз (фосфолипазы A_1 и A_2 , лизофосфолипазы) является потенциометрическое титрование. Автоматическое титрование выделяющихся жирных кислот проводится при постоянном значении рН (рН-стабилизация), а фосфолипазная активность измеряется количеством добавляемого щелочного реагента (0,01–0,1 М NaOH). Основное достоинство данного способа определения активности – возможность непрерывного контроля, однако измерения можно проводить лишь при нейтральных или щелочных значениях рН, где жирные кислоты остаются в ионизированном состоянии. Этот метод относительно малочувствителен (нижний предел определения – 50–100 нмоль/мин) и поэтому непригоден для анализа активности внутриклеточных фосфолипаз, исходная активность которых, как правило, очень невелика. Метод рН-стабилизации был первоначально применен для анализа активности фосфолипазы A_2 [43, 44], для которой в качестве субстратов обычно используются липопротеины яичного желтка или очищенный яичный лецитин. При титриметрическом анализе фосфолипаз, гидролизующих фосфоэфирные связи (фосфолипаза С, фосфолипаза D), титруются выделяющиеся кислотные компоненты (фосфохолин или фосфатидная кислота). Методика рН-стабилизации была успешно применена при определении активности фосфолипазы D из савойской капусты [45] и фосфолипазы С из *B. cereus* [46].

II.2. Радиометрический метод

Фосфолипидные субстраты с радиоактивными метками широко используются для определения активности различных типов фосфолипаз. Одним из основных преимуществ данного метода анализа является его высокая чувствительность. Меченные субстраты инкубируют с ферментом в течение определенного времени, затем реакцию останавливают и проводят разделение продуктов гидролиза и определение их радиоактивности.

Синтетические фосфолипиды, содержащие метку в жирнокислотной цепи молекулы фосфолипидного субстрата, нашли широкое применение при анализе активности различных фосфолипаз (табл. 4). При этом использование липидного субстрата, содержащего различные метки в жирнокислотных цепях при первом и втором атомах углерода [49], дает возможность специфично измерять активность фосфолипазы A_1 из поджелудочной железы свиньи в присутствии других липолитических ферментов, имеющихся в данном источнике (лизофосфолипаза, фосфолипаза A_2).

Введение метки в фосфолипид может осуществляться химическим синтезом или биохимически. При биохимическом синтезе меченные фосфолипиды лизофосфолипид инкубируются с радиоактивными жирными кислотами в присутствии ацилирующей системы, такой, как микросомы печени крысы [54].

В качестве радиоактивномеческого субстрата, применяемого при измерении активности фосфолипаз A_2 тромбоцитов, полиморфоядерных лейкоцитов и альвеолярных макрофагов [47], а также фосфолипазы A_2 в гомогенатах или экстрактах клеток из гладких мышц аорты и брыжеечной артерии крысы [55], были использованы [1-C^{14}]олеатмеченные клетки *E. coli*. ^{14}C -Метку вводили в фосфолипиды *E. coli* в процессе роста клеток. С помощью фосфолипазы A_2 из яда *Cr. adamanteus* было показано, что метка на 95% попадает во второе положение фосфолипида, т. е. полученный субстрат обладает достаточной специфичностью по отношению к фосфолипазам A_2 .

При определении активности фосфолипаз D и С используются фосфолипиды, содержащие радиоактивную метку в полярной части молекулы (табл. 5).

Таблица 4

Использование фосфолипидов с радиоактивномерченными жирными кислотами для определения активности фосфолипаз А₁, А₂ и лизофосфолипаз

Меченный субстрат	Анализируемый фермент	Литература
1-Ацил-2-[1- ¹⁴ C]линовеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин	Фосфолипазы А ₂ полиморфоядерных лейкоцитов, тромбоцитов, альвеолярных макрофагов	[47]
1-Пальмитоил-2-[1- ¹⁴ C]пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин	Фосфолипаза А ₂ плазмы крови человека	[48]
1-[9,10- ³ H ₂]Пальмитоил-2-[1- ¹⁴ C]линовеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин	Фосфолипаза А ₁ из поджелудочной железы свиньи	[49]
1-[9,10- ³ H ₂]Стеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин	Лизофосфолипазы из печени крысы и быка	[50]
1-[1- ¹⁴ C]Пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолипид		
2-[9,10- ³ H ₂]Стеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин		
2-[1- ¹⁴ C]Олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин		
2-[9,10- ³ H ₂]Стеароил-1-фосфохолинэтиленгликоль		
2-[1- ¹⁴ C]Гексадеканоил-1-фосфохолин-этиленгликоль	Фосфолипаза А ₂ поджелудочной железы свиньи, лизофосфолипазы I и II из печени быка	[51-53]
3-[1- ¹⁴ C]Гексадеканоил-1-фосфохолин-пропан-1,3-диол	Лизофосфолипазы I и II из печени быка	[51-53]

Таблица 5

Использование фосфолипидов с радиоактивными метками в полярной части молекулы при определении активности фосфолипаз С, D

Меченный субстрат	Анализируемый фермент	Литература
Фосфатидил-[³ H]холин	Фосфолипаза D <i>Peanut seeds</i>	[56, 57]
1,2-Дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфо-[метил- ¹⁴ C]холин	Фосфолипаза D из мозга крысы	[58]
1-Пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфо-[метил- ¹⁴ C]холин		
Фосфатидил-[¹⁴ C]этаноламин		
[³² P]Фосфатидилинозитол	Фосфолипаза С	[59]

Одной из важнейших проблем, возникающих при радиометрическом измерении фосфолипазной активности, является проблема разделения радиоактивных продуктов гидролиза. Наиболее часто для этих целей используют экстракцию [49-52], хроматографию в тонком слое [50, 58, 60], колоночную хроматографию [49, 60]. Для отделения радиоактивных жирных кислот, образовавшихся при ферментативном гидролизе, как правило, используют экстракцию трехфазной системой гептан — изопропанол — серная кислота [61], при этом меченные кислоты в основном оказываются в гептановой фазе. Для предотвращения проникновения нерасщепившихся фосфолипидов и лизопродуктов в гептановую фазу процесс экстракции ведут в присутствии кремневой кислоты [48, 49].

Помимо очевидного достоинства радиометрического метода — высокой чувствительности (использование радиоактивномерченых фосфолипидных субстратов позволяет измерять удельные фосфолипазные активности

~5–10 нмоль/(мин·мг)), данному методу присущи и свои недостатки: 1) отсутствие возможности непрерывного контроля; 2) трудоемкость и недостаточная эффективность процессов селективного разделения продуктов гидролиза.

II.3. Колориметрические методы

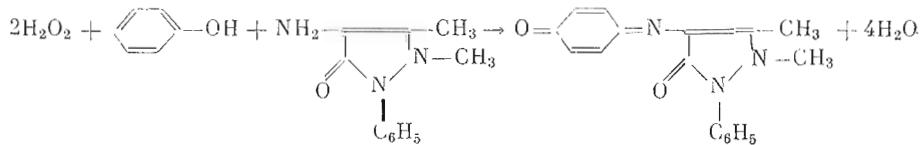
В молекулах природных фосфолипидов нет хромогенных участков, поэтому накопление продуктов ферментативного гидролиза нельзя непосредственно фиксировать спектрофотометрически. Однако при использовании аналогов субстратов, в состав которых входят хромогенные группировки, становится возможным измерение фосфолипазной активности колориметрически.

Примером такого аналога является *n*-нитрофенилфосфохолин, который был успешно использован для колориметрического анализа фосфолипазы С [62]. В ходе его расщепления образуются фосфохолин и *n*-нитрофенол, количество последнего измерялось спектрофотометрически при 403 нм. Скорость ферментативного гидролиза существенно повышается в присутствии сorbita и глицерина [63]. Было показано, что фосфодиэстеразы змеиного яда и селезенки не гидролизуют данный субстрат.

Другая возможность использования колориметрических методов для анализа фосфолипазной активности основана на способности продуктов гидролиза образовывать комплексы с такими соединениями, концентрацию которых можно измерять спектрофотометрически. Так, для анализа фосфолипазы А₂ была использована способность высших жирных кислот образовывать растворимые в хлороформе комплексы с Cu²⁺ или Co²⁺. При экстракции инкубационной смеси хлороформом фосфолипиды и жирные кислоты переходят в органический слой, который промывают водными растворами комплексообразующих металлов, а затем колориметрически измеряют концентрацию в хлороформе комплексов жирных кислот с металлами в присутствии хромогенных реагентов — диэтилтиокарбамата или дифенилкарбазида (комpleксы с ионами Cu²⁺ [64, 65]), и α-нитрозоб-нафтола (комpleксы с ионами Co²⁺ [66]).

Спектрофотометрический анализ фосфолипазы D основан на колориметрическом определении выделяющегося в ходе гидролиза водорастворимого холина, который можно количественно осадить и определить в виде [HO(CH₂)₂N(CH₃)₃]⁺·[Cr(NH₃)₂(SCN)₄]⁻ (рейнекат-холин) [67] или его энноидида [67, 68]. При анализе активности фосфолипазы D из *Streptomyces chromofuscus* [3] и из листьев капусты [69] холин определяли иначе: холин окисляли холиноксидазой с образованием H₂O₂, добавляли фенол и 4-аминоантитиридин и в присутствии пероксидазы получали краситель, содержащий хинониминовую группировку, который определяли спектрофотометрически (схема 9).

Схема 9

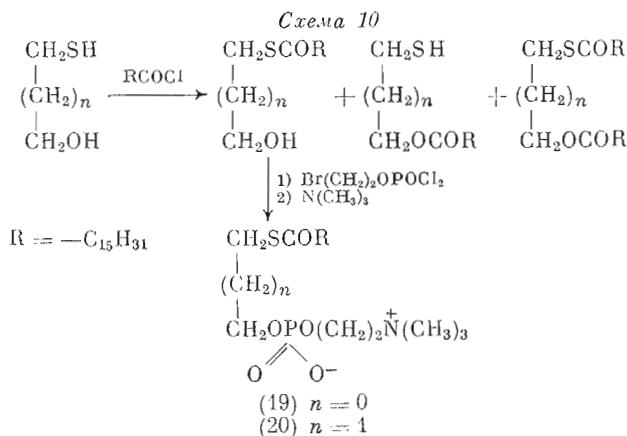


II.4. Спектрофотометрический анализ активности фосфолипаз и липаз с использованием тиоаналогов липидных субстратов

В последние годы получил широкое развитие спектрофотометрический метод измерения липолитической активности с использованием тиоэфирных аналогов субстратов, сочетающий в себе все преимущества непрерывного и высокочувствительного метода ферментативного анализа.

Впервые такой метод определения активности фосфолипаз был предложен в 1976 г. [70]. В качестве субстратов были использованы тиоэфирные аналоги лизофосфатидилхолина, в которых ацилоксигифирные связи были заменены ацилтиоэфирными. Были синтезированы 1-S-гекса-

деканоил-2-О-фосфохолинмеркартоэтанол (19) и 1-S-гексадеканоил-3-О-фосфохолинмеркартопропанол (20) (схема 10), гидролизуемые лизофос-



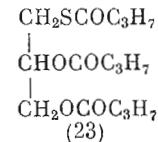
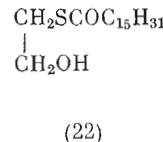
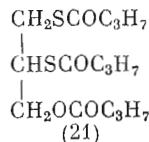
фолипазой из печени быка. В ходе ферментативного гидролиза соединений (19) и (20) открывается SH-группа, реагирующая с хромогенным тиольным реагентом — 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой) (DTNB), концентрация освобождающегося хромогенного аниона, 5-тио(2-нитробензоата), измеряется спектрофотометрически (412 нм). Эти же соединения были опробованы в качестве субстратов для панкреатической фосфолипазы A₂. Соединение (19), гидролизуемое фосфолипазой A₂ из поджелудочной железы свиньи, было использовано для спектрофотометрического анализа данного фермента. Зависимость между начальными скоростями гидролиза, пропорциональными количеству выделяющихся в единицу времени свободных SH-групп, и количеством фермента (лизофосфолипазы или фосфолипазы A₂) была линейной. Для сравнения скоростей гидролиза тиоэфирыных субстратов и их оксиэфирыных аналогов были получены соответствующие радиоактивномеченные оксиэфирыные субстраты. Оказалось, что тиоэфирыные субстраты гидролизуются в 2–3 раза быстрее, чем их оксиэфирыные аналоги [52]. Благодаря высокой чувствительности спектрофотометрического метода (нижний порог ~1 нмоль/мин) тиоэфириный аналог лизолецитина (20) оказался полезным при измерении активности лизофосфолипазы в процессе ее выделения из гомогената печени быка [53]. На каждой стадии очистки параллельно проводилось определение активности с помощью соответствующих радиоактивномеченных оксиэфирыных субстратов. Соотношение удельных активностей, измеренных с помощью тио- и оксиэфирыных субстратов, оставалось постоянным (~2–3). Это свидетельствует об отсутствии неспецифического разрушения тиосубстрата и подтверждает возможность использования тиоаналогов лизофосфатидилхолина для измерения ферментативной активности лизофосфолипазы в неочищенных препаратах других тканей.

Синтетические тиоаналоги липидных субстратов (19, 20) были успешно применены и при измерении активности мембранных связанных лизофосфолипаз из *Acholeplasma laidlawii* и из микросомной фракции печени крысы, а также в клеточных фракциях гомогената печени быка [71].

Для анализа активности липаз различных типов также был предложен спектрофотометрический метод с использованием тиоаналогов триглицеридов. Впервые в качестве субстрата был использован 1,2-ди-S-бутироил-3-О-бутироилдимеркартопропанол (21), анализ проводился в присутствии DTNB [72]. Время анализа не превышало 30 мин, метод оказался воспроизводимым и достаточно чувствительным, что позволяло измерять низкие уровни активности липазы в сыворотке человека при нормальном и патологическом состояниях.

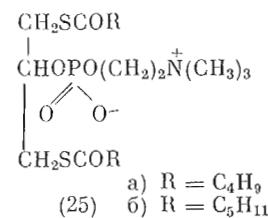
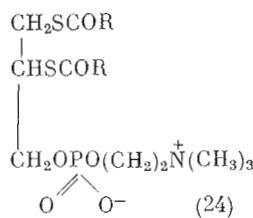
Было также показано, что липаза из поджелудочной железы свиньи гидролизует ацилтиоэфирыные связи в 1-S-гексадеканоилмеркартоэтаноле (22) и 1-S-бутироил-2,3-ди-O-бутироилмеркартопропандиоле (23). Эти со-

единения были использованы в качестве тиосубстратов для спектрофотометрического анализа указанного фермента [70].



При гидролизе соединения (23) непрерывным титрованием измерялось количество выделяющихся жирных кислот, а через определенные промежутки времени в отобранных аликвотах определялось количество SH-групп с помощью DTNB. Соотношение общего количества жирных кислот и количества свободных SH-групп составило 2:1, скорости гидролиза тиоэфирных и оксиэфирных связей были примерно одинаковыми. Хотя соединения (21) и (23) нельзя было использовать для непрерывного спектрофотометрического анализа липазы из-за значительной мутности субстратных эмульсий, проведенные эксперименты показали принципиальную возможность использования тиосубстратов для спектрофотометрического анализа липаз.

В ходе дальнейшего развития метода спектрофотометрического анализа фосфолипаз были синтезированы такие тиоэфирные аналоги субстратов, структура которых в большей степени напоминает структуру природных субстратов по сравнению с ранее синтезированными соединениями (19) и (20). Так, для анализа активности фосфолипазы A₂ и ее зимогена из поджелудочной железы свиньи при концентрациях субстрата выше критической константы мицеллообразования были применены рацемические короткоцепочечные тиоаналоги фосфатидилхолина — 1,2-ди-S-ацил-3-O-фосфохолиндимеркаптолпропанол (24) и 1,3-ди-S-ацил-2-O-фосфохолиндимеркаптолпропанол (25) [73].

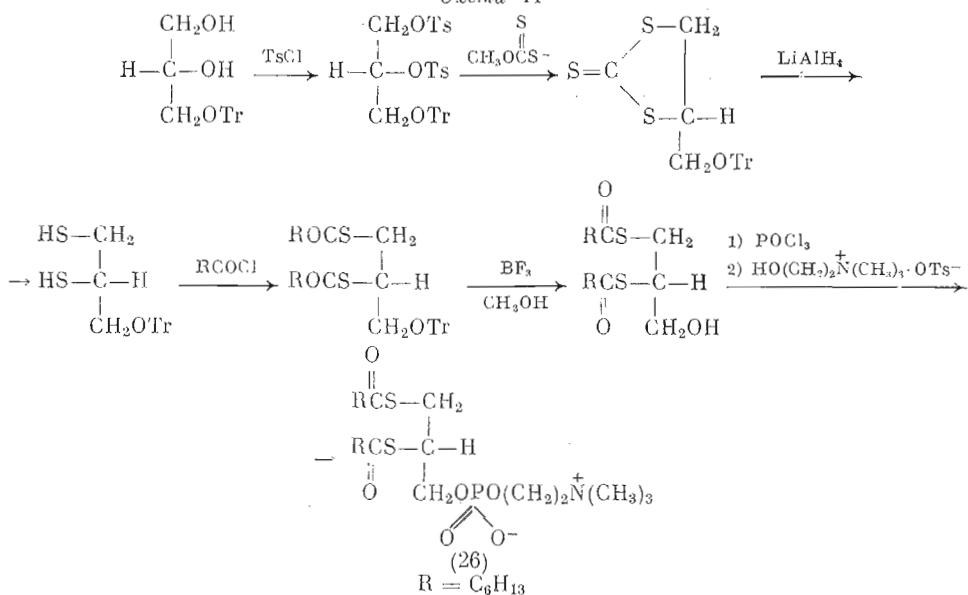


Такие диацильные соединения являются более предпочтительными субстратами для фосфолипазы A₂, чемmonoацильные соединения типа (19). Измерение активности проводилось в присутствии DTNB, а также другого тиольного реагента — 4,4'-дитиобиспиридина, применение которого позволяет проводить измерения в широком диапазоне pH (3–8).

Использование рацемических субстратов затрудняет изучение кинетики ферментативного гидролиза. В связи с этим был осуществлен направленный синтез оптически активного субстрата — (R)-1,2-ди-S-гептаноил-3-O-фосфохолиндимеркаптолпропанола (26) (схема 11) [74]. Тиоаналог природного фосфатидилхолина (26) был использован в спектрофотометрическом анализе фосфолипазы A₂ из яда *N. n. oxiana*. Были применены 0,3 мМ липидные дисперсии субстрата, полученные ультразвуковой обработкой, в качестве хромогенного реагента использовали DTNB. Чувствительность метода составила ~0,2 нмоль/мин и была примерно на два порядка выше чувствительности титрометрического метода [75].

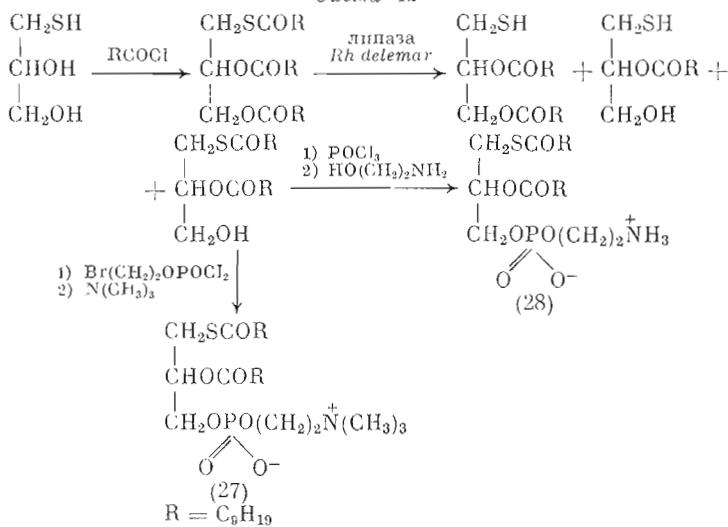
В настоящее время все большее внимание уделяется изучению внутриклеточных фосфолипаз A₁ [76, 77], а существующие методы определения их активности, как правило, недостаточно удобны, чувствительны и специфичны. Использование тиоаналогов природных субстратов позволило провести непрерывный спектрофотометрический анализ фосфолипазы A₁. В качестве субстратов были использованы тиоэфирные аналоги фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина — 1,2-ди-S,O-деканоил-3-O-фосфохолин.

Схема 11



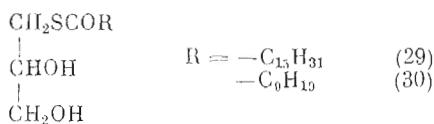
линимеркаптоинпропандиол (27) и 1,2-ди-S,O-деканоил-3-O-фосфоэтаноламин-меркаптопропандиол (28), полученные по схеме 12 [78]. Эти соединения

Схема 12



были успешно применены при спектрофотометрическом анализе фосфолипазы A₁, содержащейся в препарате липазы *Rhizopus delema*. Анализ проводили в присутствии 4,4'-дитиобиспиридина, дисперсии фосфолипидов получали озвучиванием. Для получения более устойчивых дисперсий субстрата (28) к нему перед озвучиванием добавляли небольшое количество хлороформа.

Моноацильные производные 1-меркаптопропан-2,3-диола — соединения (29) и (30) — были использованы при спектрофотометрическом анализе активности моноацилглицеридлипазы, содержащейся в препарате липазы *Rh. delema* [78].

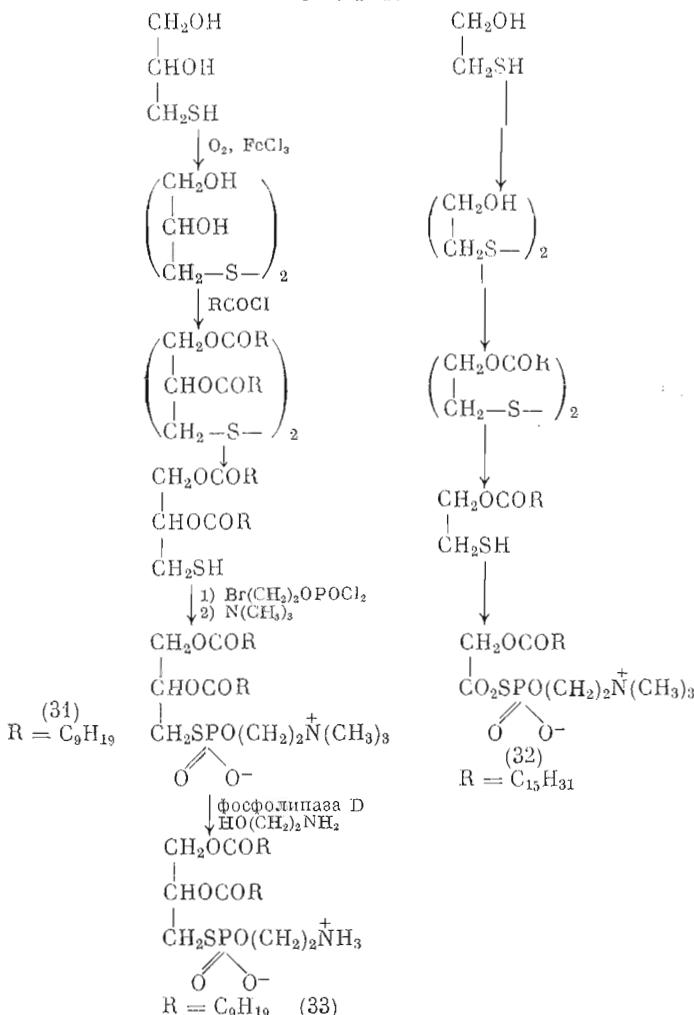


Устойчивые в течение 1 ч дисперсии субстратов были получены озвучиванием смесей 1,2-дидеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолина и моно-

глицеридов (29) или (30). Спектрофотометрические анализы активности фосфолипазы А₁ и моноацилглицеридлипазы показали, что приведенный способ измерения с применением в качестве хромогенного реагента 4,4'-дитиобисспирдицина очень удобен, чувствителен и специфичен.

Фосфолипиды с фосфотиоэфирными связями нашли применение при спектрофотометрическом анализе фосфолипазы С из *Cl. perfringens* [79]. В качестве субстратов были использованы 1-S-фосфохолин-2,3-ди-O-деканоилмеркартопропандиол (31), 1-S-фосфохолин-2-O-гексадеканоилмеркартоэтанол (32) и 1-S-фосфоэтаполамин-2,3-ди-O-деканоилмеркартоэтанол (33), полученные по схеме 13. Дисперсии соединений (31) и

Схема 13



(33) получали озвучиванием, анализ проводили в присутствии 4,4'-дитиобисспирдицила.

Для успешного проведения спектрофотометрического анализа активности фосфолипаз и липаз необходимо учитывать ряд факторов. Важное значение имеет выбор хромогенного тиольного реагента. DTNB, часто используемая при спектрофотометрическом анализе, может оказывать ингибирующее действие на липолитические ферменты, понижая чувствительность метода. Было показано, что DTNB в некоторой степени ингибирует лизофосфолипазы из клеточных фракций гомогената печени крысы [71], однако это не приводило к снижению чувствительности анализа по сравнению с методом, использующим радиоактивноремеченные оксиэфиры субстраты. Спектрофотометрические измерения липолитической активности в присутствии DTNB проводятся в диапазоне pH 7–9,

Использование тиоэфирных аналогов липидных субстратов при спектрофотометрическом анализе активности фосфолипаз и липаз

Тиоэфирный липидный субстрат	Анализируемый фермент	Литература
1-S-Гексадекапоил-2-O-фосфохолинмеркаптоэтанол (19)	Лизофосфолипаза печени быка, фосфолипаза A ₂ поджелудочной железы свиньи	[70]
1-S-Гексадекапоил-3-O-фосфохолинмеркаптопропанол (20)	Лизофосфолипаза печени быка, мембранные связанные лизофосфолипазы	[53, 70, 71]
1,2-Ди-S-бутироил-3-O-бутирилдимеркаптопропанол (21)	Липаза из сыворотки человека	[72]
1-S-Гексадекапоилмеркаптоэтанол (22) 1-S-Бутироил-2,3-ди-O-бутирилмеркаптопропандиол (23)	Липаза поджелудочной железы свиньи	[70]
1,2-Ди-S-ацил-3-O-фосфохолиндимеркаптопропанол (24) 1,3-Ди-S-ацил-2-O-фосфолиндимеркаптопропанол (25)	Фосфолипаза A ₂ из поджелудочной железы свиньи	[73]
(R)-1,2-Ди-S-гептапоил-3-O-фосфохолиндимеркаптопропанол (26)	Фосфолипаза A ₂ из яда <i>N. n. oxiana</i>	[74]
1,2-Ди-S,O-деканоил-3-O-фосфохолиндимеркаптопропандиол (27)	Фосфолипаза A ₁ <i>Rh. delemar</i>	[78]
1,2-Ди-S,O-деканоил-3-O-фосфоэтаноламинмеркаптопропандиол (28)	Моноглицеридлипаза <i>R. delemar</i>	[78]
(29), (30)	Фосфолипаза C <i>Cl. perfringens</i>	[79]
1-S-Фосфохолин-2,3-ди-O-деканоилмеркаптопропандиол (31)		
1-S-Фосфохолин-2-O-гексадекапоилмеркаптоэтанол (32)		
1-S-Фосфоэтаноламин-2,3-ди-O-деканоилмеркаптопропандиол (33)		

где коэффициент мольной экстинкции 5-тио-2-нитробензоата максимальен, а процессы окисления минимальны. Следовательно, наилучшие результаты могут быть получены при определении активности тех ферментов, оптимальное значение pH которых находится в данном интервале. Использование другого тиольного реагента — 4,4'-дитиобиспиридинина — позволяет определять активности в более широком диапазоне pH.

Измерение специфической липолитической активности ферментов в неочищенных белковых препаратах с использованием тиоэфирных субстратных аналогов может оказаться недостоверным из-за наличия в исходном источнике неспецифичных тиоэстераз. Поэтому при очистке того или иного фермента необходимо данные спектрофотометрического анализа с использованием тиосубстратов сравнивать с результатами, полученными при использовании аналогичных оксиэфирных субстратов, чтобы убедиться в том, что возрастает активность одного и того же фермента.

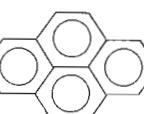
Подобные соединения также успешно использовались при изучении кинетики гидролиза смешанных фосфолипидных мицелл под действием фосфолипазы A₂ (*N. n. oxiana*) [80, 81], было проведено сравнительное исследование действия лизофосфолипазы из печени быка [51, 52] и липопротеидлипазы молока коровы [82] на тиоэфирные и соответствующие оксиэфирные субстраты. Оптически активные триглицериды с тиоэфирными связями оказались полезными при изучении стереоспецифичности различных липаз [83].

Общая сводка по применению тиоэфирных аналогов субстратов в спектрофотометрическом анализе активности фосфолипаз и липаз приведена в табл. 6.

Таблица 7

Использование флуоресцентномеченых фосфолипидов для анализа фосфолипазы А₂

Меченный субстрат	Источник фосфолипазы А ₂	Литература
<p>1-Триаконтиоил-2-[6-(пирен-1-ил)гексаноил]-sn-глицеро-3-фосфохолин</p> $\begin{array}{c} \text{O} & \text{CH}_2\text{OCOR}' \\ & \\ \text{R''}(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{C}-\text{H} & \text{CH}_2\text{OPO}(\text{CH}_2)_2\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3 \\ & \diagup \quad \diagdown \\ & \text{O} \quad \text{O}^- \end{array}$	Поджелудочная железа человека, яд <i>Vipera berus</i>	[84]
<p>1-Триаконтиоил-2-[4-(пирен-1-ил)бутаноил]-sn-глицеро-3-фосфохолин</p> $\begin{array}{c} \text{O} & \text{CH}_2\text{OCOR}' \\ & \\ \text{R''CO}-\text{C}-\text{H} & \text{CH}_2\text{OPO}(\text{CH}_2)_2\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3 \\ & \diagup \quad \diagdown \\ & \text{O} \quad \text{O}^- \end{array}$	Поджелудочная железа свиньи	[85]
<p>1,2-Бис-[4-(пирен-1-ил)бутаноил]-sn-глицеро-3-фосфохолин</p> $\begin{array}{c} \text{O} & \text{CH}_2\text{OCOR}'' \\ & \\ \text{R''CO}-\text{C}-\text{H} & \text{CH}_2\text{OPO}(\text{CH}_2)_2\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3 \\ & \diagup \quad \diagdown \\ & \text{O} \quad \text{O}^- \end{array}$	Яд <i>Cr. adamanteus</i>	[86]
(34)	То же	[87]
$\begin{array}{c} \text{O} & \text{CH}_2\text{OCOR} \\ & \\ \text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH})_4(\text{CH}_2)_7\text{CO}-\text{C}-\text{H} & \text{O} \\ & \\ & \text{CH}_2\text{OPO}(\text{CH}_2)_2 \\ & \\ & \text{O}^- \text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \end{array}$		
<p>1-Ацил-2-(6-[7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил]амино)капроилглицеро-3-фосфохолин</p> $\begin{array}{c} \text{NO}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{OCOR} \quad \text{CH}_2\text{OPO}(\text{CH}_2)_2\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3 \\ \quad \\ \text{CHOOC}(\text{CH}_2)_5\text{NH} \\ \\ \text{O}^- \end{array}$	Поджелудочная железа свиньи	[88]

Примечание. R' = C₂₃H₄₅; R'' = -(CH₂)₃

II.5. Флуориметрический метод определения активности фосфолипазы А₂

В последнее время все большее применение для анализа активности фосфолипаз из различных источников находят фосфолипидные субстраты с флуоресцентными метками в жирнокислотных цепях (табл. 7). Этот

метод определения фосфолипазной активности весьма удобен, так как он позволяет проводить измерения непрерывно, не требует разделения продуктов гидролиза, а также обладает очень высокой чувствительностью. Так, при использовании 1-ацил-2-*all-trans*-паринойл-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (34) для анализа активности фосфолипазы A₂ из яда *Cr. adamanteus* можно измерять уровень активности ~1 нмоль/мин [87], а соединения с иреновой меткой (табл. 7) обладают еще большей чувствительностью и позволяют определять фосфолипазные активности порядка нмоль/мин [84].

Заключение

Как видно из вышеизложенного, за последние 10 лет достигнут значительный прогресс в развитии аффинной хроматографии липополитических ферментов. Использование данного метода позволяет в большинстве случаев ускорить и облегчить процесс очистки фосфолипаз и липаз и выделить ферментные препараты в высокоочищенном состоянии. В настоящее время получен целый ряд биоспецифических сорбентов с лигандами липидной природы, разработаны методы ковалентного присоединения лигандов к матрицам, подобраны оптимальные условия для проведения процесса биоспецифической хроматографии. Развитие эффективных методов очистки ферментов сопровождается появлением новых перспективных методов определения липополитической активности. Создание эффективных и доступных биоспецифических сорбентов для выделения липополитических ферментов, а также совершенствование методов определения их активности позволит получать высокоочищенные фосфолипазы и липазы, а следовательно, расширить область использования данных ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лестровая Н. Н., Лебедева Ж. Д., Волкова И. М., Арен А. К., Букбарбе В. У., Грудин И. В., Рубан Е. Л. Прикл. биохимия и микробиология, 1983, т. 19, вып. 1, с. 130–135.
2. Louw A. I., Carlsson F. H. H. Toxicon, 1979, v. 17, № 2, p. 193–197.
3. Immura S., Horiuti Y. J. Biochem., 1979, v. 85, № 1, p. 79–95.
4. Ono T., Tojo H., Inoue K., Kagamiyama H., Yamano T., Okamoto M. J. J. Biochem., 1984, v. 96, № 3, p. 785–792.
5. Туркова Я. Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980.
6. Гаруцкас Р. С., Глемжа А. А., Кулене В. В. Биохимия, 1977, т. 42, вып. 10, с. 1910–1918.
7. Takahashi T., Sugahara T., Ohsaka A. Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 351, № 1, p. 155–171.
8. Little C., Aurebeck B., Otnaess A.-B. FEBS Lett., 1975, v. 52, № 2, p. 175–179.
9. Verine A., Giudicelli H., Boyer J. Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 369, № 1, p. 125–128.
10. Okumura T., Kimura S., Saito K. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 617, № 2, p. 264–273.
11. Apitz-Castro R. J., Mas M. A., Cruz M. R., Jain M. K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 91, № 1, p. 63–74.
12. Kramer R. M., Wüthrich C., Bollier C., Allegri P. R., Zahler P. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 507, № 3, p. 381–394.
13. Krug E. L., Kent C. Arch. Biochem. and Biophys., 1984, v. 231, № 2, p. 400–410.
14. Tahir S., Hider R. C. Anal. Biochem., 1983, v. 135, № 2, p. 332–334.
15. Sundberg L., Porath J. J. Chromatogr., 1974, v. 90, № 1, p. 87–98.
16. Рахимов М. М., Джанбаева Н. Р., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1976, т. 229, № 6, с. 1481–1484.
17. Ахмеджанов Р. А., Рахимов М. М., Ташмухамедов Б. А. Узб. биол. журн., 1979, № 2, с. 3–6.
18. Рахимов М. М., Ахмеджанов Р. А., Бабаев М. У., Мадъяров Ш. Р., Муратова У. З., Ташмухамедов Б. А. Узб. биол. журн., 1980, № 5, с. 7–11.
19. А. с. 689200 (СССР). Способ получения водонерастворимых биологических активных соединений/ Варламов В. Й., Власов А. В., Баникова Г. Е., Цеглин Б. Л., Рогожин С. В. Заявл. 28.07.77, № 2513065/2304. Опубл. в Б. И., 1980, № 44.
20. Евстратова Н. Г., Василенко И. А., Кондратюева Н. Ю., Серебренникова Г. А., Евстигнеев Р. П. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1355–1360.
21. Евстратова Н. Г., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1497–1500.
22. Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, v. 61, № 2, p. 636–643.

23. Муратова У. З., Мадъяров Ш. Р., Рахимов М. М., Ташмухамедов Б. А. Узб. биол. журн., 1982, № 3, с. 5–7.
24. Rock C. O., Snyder F. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 16, p. 6564–6566.
25. Sugatani J., Okumura T., Saito K., Ikeda K., Hamaguchi K. J. Biochem., 1984, v. 95, № 5, p. 1407–1415.
26. Barsukov L. I., Dam C. W., Bergelson L. D., Muzja G. I., Wirtz K. W. A. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 513, № 2, p. 198–204.
27. Natori Y., Karasawa K., Arai H., Tamori-Natori Y., Nojima S. J. Biochem., 1983, v. 93, № 2, p. 631–637.
28. Shimojo T., Abe M., Ohta M. J. Lipid Res., 1974, v. 15, № 5, p. 525–527.
29. King T. P., Kochoumian L., Joslyn A. Arch. Biochem. and Biophys., 1984, v. 230, № 1, p. 1–12.
30. Berchtold R. Патент 642665 (Швейцария). Заявл. 8.02.79, № 1177/79. Опубл. 30.04.84. МКИ С07F9/10.
31. Евстратова Н. Г., Василенко И. А., Попова Т. П., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 8, с. 1140–1145.
32. Евстратова Н. Г., Серпухова Е. М., Позмогова Г. Е., Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 7, с. 998–1003.
33. Остапенко О. В., Евстратова Н. Г., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 12, с. 1639–1644.
34. Евстратова Н. Г., Айанян А. Е., Мирошников А. И., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биохимия, 1982, т. 47, вып. 9, с. 1547–1551.
35. А. с. 1057095 (СССР). Способ получения биоспецифических фосфолипидсодержащих сорбентов/Барсуков Л. И., Музя Г. И., Бергельсон Л. Д. Заявл. 30.08.82, № 3486692/23–26. Опубл. в Б. И., 1983, № 44.
36. Dyatlovitskaya E. V., Timofeeva N. G., Yakimenko E. F., Barsukov L. I., Muzya G. I., Bergelson L. D. Eur. J. Biochem., 1982, v. 123, № 2, p. 311–315.
37. Rouser G., Fleischer S., Yamamoto A. Lipids, 1970, v. 5, № 5, p. 494–496.
38. Bartlett G. R. J. Biol. Chem., 1959, v. 234, № 3, p. 466–468.
39. Aarsman A. J., Neys F., Van den Bosch H. Biochim. et biophys. acta, 1984, v. 792, № 3, p. 363–366.
40. Van Dam-Mieras M. C. E., Slotboom A. J., Pietersen W. A., de Haas G. H. Biochemistry, 1975, v. 14, № 25, p. 5387–5394.
41. Ансалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 11, с. 1553–1559.
42. Gubensek F., Zunić D. Toxicicon, 1978, v. 16, № 5, p. 419.
43. De Haas G. H., Postema N. M., Neiwenhuizen W.; van Deenen L. L. M. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 159, № 1, p. 103–117.
44. Wells M. A. Biochemistry, 1972, v. 11, № 6, p. 1030–1041.
45. Altgyer T. T., Wells M. A. Biochemistry, 1979, v. 18, № 24, p. 5348–5353.
46. Zwaal R. F. A., Roelofsen B., Conjurius P., van Deenen L. L. M. Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 233, № 2, p. 474–479.
47. Franson R. C. In: Liposomes: from physical structure to therapeutic application/Ed. Knight C. G. Amsterdam: North Holland biomed. press, 1981, p. 349–380.
48. Shakir K. M. M. Anal. Biochem., 1981, v. 114, № 1, p. 64–70.
49. Van den Bosch H., Aarsman A. J., van Deenen L. L. M. Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 348, № 2, p. 197–209.
50. Van den Bosch H., Aarsman A. J., Slotboom A. J., van Deenen L. L. M. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 164, № 2, p. 215–225.
51. Aarsman A. J., van den Bosch H. Chem. Phys. Lipids, 1984, v. 29, № 3, p. 267–275.
52. Aarsman A. J., van den Bosch H. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 572, № 3, p. 519–530.
53. Aarsman A. J., Hille J. D. R., van den Bosch H. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 489, № 2, p. 242–246.
54. Lands W. E. M. J. Biol. Chem., 1960, v. 235, № 8, p. 2233–2237.
55. Thakkar J. K., Sperelakis N., Pang D., Franson R. C. Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 750, № 1, p. 134–140.
56. Tzur R., Shapiro B. Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 280, № 2, p. 290–296.
57. Strauss H., Leibovitz-ben Gershon Z., Heller M. Lipids, 1976, v. 11, № 6, p. 442–448.
58. Taki T., Kanfer J. N. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 19, p. 9761–9765.
59. Irvine R. F., Hemington N., Dawson R. M. C. Biochem. J., 1977, v. 164, № 1, p. 277–280.
60. Feyen J. H. M., van Erp P. E. J., Mier P. D. J. Chromatogr., 1983, v. 259, № 2, p. 338–340.
61. Dole V. P., Meinertz H. J. Biol. Chem., 1960, v. 235, № 9, p. 2595–2599.
62. Kurioka S. J. Biochem., 1968, v. 63, № 5, p. 678–680.
63. Kurioka S., Matsuda M. Anal. Biochem., 1976, v. 75, № 1, p. 281–289.
64. Duncombe W. G. Biochem. J., 1963, v. 88, № 1, p. 7–10.
65. Itaya K. J. Lipid Res., 1977, v. 18, № 5, p. 663–665.
66. Novak M. J. Lipid Res., 1965, v. 6, № 3, p. 431–433.
67. Kates M., Sastry P. S. Methods Enzymol., 1969, v. 14, p. 197–203.
68. Kater L. A., Goetzl E. F., Austin K. F. J. Clin. Invest., 1976, v. 57, № 5, p. 1173–1180.
69. Imamova S., Horiuti Y. J. Biochem., 1978, v. 83, № 3, p. 677–680.
70. Aarsman A. J., van Deenen L. L. M., van den Bosch H. Bioorgan. Chem., 1976, v. 5, № 3, p. 241–253.
71. Aarsman A. J., van den Bosch H. FEBS Lett., 1977, v. 79, № 2, p. 317–320.

72. Kukooka S., Okamoto S., Hashimoto M. J. Biochem., 1977, v. 81, № 2, p. 361–369.
73. Volwerk J. J., Dedieu A. G. R., Verheij H. M., Dijkman R., de Haas G. H. Rec. trav. chim., 1979, v. 98, № 4, p. 214–220.
74. Hendrickson H. S., Hendrickson E. K., Dybvig R. H. J. Lipid Res., 1983, v. 24, № 11, p. 1532–1537.
75. Deems R. A., Dennis E. A. Methods Enzymol., 1981, v. 71, p. 703–710.
76. Van den Bosch H. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 604, № 2, p. 191–246.
77. Hawthorne J. N., Ansell G. B. In: Phospholipids. Amsterdam – New York – Oxford: Elsevier biomedical press, 1982, p. 314–320.
78. Cox J. W., Horrocks L. A. J. Lipid Res., 1981, v. 22, № 3, p. 496–505.
79. Cox J. W., Snyder W. R., Horrocks L. A. Chem. Phys. Lipids, 1979, v. 25, № 4, p. 369–380.
80. Hendrickson H. S., Dennis E. A. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 9, p. 5734–5739.
81. Hendrickson H. S., Dennis E. A. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 9, p. 5740–5744.
82. Shinomiya M., Epps D. E., Jackson R. L. Biochim. et biophys. acta, 1984, v. 795, № 2, p. 212–220.
83. Gronowitz S., Herslöt B., Michelsen P., Åkesson B. Chem. Phys. Lipids, 1978, v. 22, № 4, p. 307–321.
84. Thuren T., Virtanen J. A., Vainio P., Kinnunen P. K. J. Chem. Phys. Lipids, 1983, v. 33, № 3, p. 283–292.
85. Thurén T., Virtanen J. A., Kinnunen P. K. J. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1982, B. 363, № 9, S. 996–997.
86. Hendrickson H. S., Rauk P. N. Anal. Biochem., 1981, v. 116, № 2, p. 553–558.
87. Wolf C., Sagaert L., Bereziat G. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1981, v. 99, № 1, p. 275–283.
88. Wittenauer L. A., Shirai K., Jackson R. L., Johnson J. D. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1984, v. 118, № 3, p. 894–901.

Поступила в редакцию
8.VIII.1985

BIOSPECIFIC CHROMATOGRAPHY OF LIPOLYTIC ENZYMES AND METHODS FOR DETERMINING THEIR ACTIVITY

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

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

The review concerns application of affinity chromatography for isolation of phospholipases and lipases, as well as the methods for determining their activities. Main emphasis is laid on the preparation of biospecific supports with lipid ligands as well as on development of new methods for assaying lipolytic activity.