



УДК 577.153.241.02

**МИКРОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ
И РАВНОВЕСИЯ АССОЦИИ ФОСФОЛИПАЗЫ A₂ ИЗ ЯДА
СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ****Мальцев В. Г., Зилина Т. М., Куренбин О. И.,
Беленький В. Г.***Институт высокомолекулярных соединений
Академии наук СССР, Ленинград***Александров С. Л., Павлова Н. П., Дьяков В. Л.,
Антонов В. К.***Институт биорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

С помощью микроколоночной фронтальной гель-хроматографии определены кинетические константы (k_1 и k_2) и константа равновесия (K) димеризации фосфолипазы A₂ из яда среднеазиатской кобры (*Naja naja oxiana*). Гидродинамический радиус димера одинаков при ассоциации фермента как в отсутствие, так и в присутствии ионов Ca²⁺. Показано, что при нейтральном значении pH ионы Ca²⁺ не влияют на константу равновесия мономер-димер, но заметно снижают как скорость ассоциации, так и скорость диссоциации фермента. Полученные данные обсуждаются в рамках модели функционирования каталитически активного димера фосфолипазы A₂.

Фосфолипаза A₂ гидролизует в положении 2 эфирную связь жирных кислот в составе 1,2-диацил-*sn*-фосфоглицеридов, причем скорость гидролиза сильно зависит от агрегатного состояния субстрата и резко увеличивается, когда субстрат находится в мицеллярной фазе [1]. Для активности фосфолипазы A₂ абсолютно необходимо присутствие ионов Ca²⁺. В оптимуме pH-действия фермента константа связывания Ca²⁺ составляет 0,21±0,04 мМ [2]. Имеются основания предполагать, что активной формой фермента является ассоциат, по-видимому димер [3-5]. Наиболее убедительно в пользу этого предположения свидетельствует необычная стехиометрия дезактивации фермента из яда среднеазиатской кобры диазосоединениями [3], соответствующая модификации 0,5 остатка аспарагиновой кислоты при полной инактивации фермента. Аналогичные данные были получены при модификации остатка гистидина *n*-бромфенацилбромидом как на том же ферменте [4], так и на фосфолипазе из яда пакистанской кобры (*Naja naja naja*) [5]. Обнаружено также [5, 6], что гидрофобные молекулы, обладающие сродством к фосфолипазе A₂, стимулируют агрегацию фермента.

Представлялось интересным количественно охарактеризовать равновесие и кинетику ассоциации фосфолипазы A₂ из яда среднеазиатской кобры (*Naja naja oxiana*) как в присутствии, так и в отсутствие ионов Ca²⁺.

Для изучения ассоциации использовали микроколоночный вариант фронтальной эксклюзионной хроматографии — метода, который успешно апробирован при исследовании ряда взаимодействий в разных белковых системах [7, 8] и хорошо теоретически обоснован [9—12].

При хроматографии ассоциирующих белков зоны мономера и димера (полимера) не могут отделяться друг от друга полностью, так как в зоне мономера всегда образуется димер (полимер), а в зоне ассоциата происходит его диссоциация на мономерные частицы. В зависимости от соотношения времени жизни ассоциата и времени хроматографического эксперимента будут наблюдаться различные хроматографические профили: когда это соотношение велико — почти полное разделение хроматографических зон, мало — зоны мономера и ассоциата сливаются в одну общую зону. Если же время жизни ассоциата сопоставимо с временем хроматографирования, то на хроматограмме будут присутствовать не полностью разделенные зоны мономера и ассоциата. С другой стороны, в статистической картине движения молекул по колонке при ассоциации появится новая степень свободы, соответствующая различию во временах жизни ассоциатов разных белковых молекул, а это приведет к дополнительному размыванию хроматографических зон. Таким образом, положение пиков на хроматограмме и степень их размывания позволяют судить о процессах ассоциации белков, движущихся по колонке. Созданная для этих целей количественная теория [13—15] даст возможность на основе хроматограмм определить термодинамические и кинетические константы ассоциации, а также ее стехиометрию.

Поскольку равновесие ассоциации смещается при изменении концентрации белка, изучение концентрационной зависимости хроматографического профиля создает дополнительные возможности для исследования ассоциации. Чтобы фиксировать исходную концентрацию белка и, следовательно, состав системы мономер — ассоциат во время его движения по всей колонке, белок вводится в виде широкой зоны. При гель-хроматографии, когда с увеличением размера частицы уменьшается ее объем удерживания, изотерма сорбции ассоциирующего белка является выпуклой. Следовательно, передний фронт широкой хроматографической зоны обостряется, и его центростид будет характеризовать средневесовой объем удерживания (коэффициент распределения) при заданной концентрации. Задний же фронт ступенчатой зоны определяется кинетикой ассоциации и зависит от числа взаимодействующих компонентов и их содержания. Наиболее сложный вопрос при изучении ассоциации белков методом гель-хроматографии — определение стехиометрии реакции. Однако для двухкомпонентной системы, т. е. реакции типа мономер — n -мер без промежуточных ассоциатов, существует удобный критерий, о котором будет сказано ниже.

Микроколонока (25×0,4 см) с сефадексом G-75 калибровалась реперными белками по молекулярной массе [16] (рис. 1) и стоксову радиусу [16] (рис. 2). Объем элюции фосфолипазы A_2 , экстраполированный на бесконечное разбавление, значительно выше той величины, которую можно определить из калибровки (рис. 1) для молекулярной массы 13447, вычисленной по аминокислотному составу мономера [17]. Это несоответствие объясняется весьма малой степенью гидратации фосфолипазы A_2 , что было установлено в опытах по ультрацентрифугированию белка.

Определение молекулярной массы фосфолипазы A_2 ультрацентрифугированием в режиме седиментационного равновесия дало значение 6000—7000 дальтон при минимальных из использованных нами концентрациях белка (рис. 3). При увеличении концентрации белка значение молекулярной массы увеличивается до 12 000—13 000.

Таким образом, наблюдаемая на рис. 1 аномалия объема элюции фосфолипазы A_2 связана с ее повышенным по сравнению с другими белками той же молекулярной массы гидродинамическим объемом. Сказанное подтверждается нормированной на сольватацию фосфолипазы A_2 зависи-

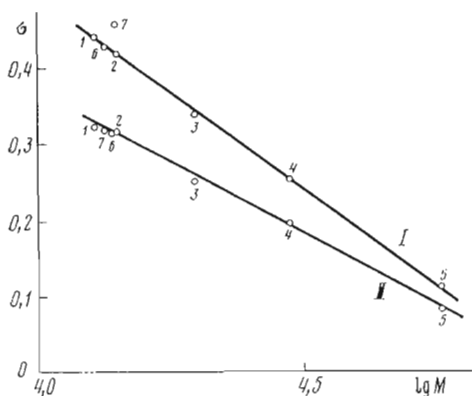


Рис. 1. Калибровочная зависимость коэффициента распределения (σ) от молекулярной массы для глобулярных белков: 1 — цитохром *c*, 2 — рибонуклеаза, 3 — миоглобин, 4 — химотрипсиноген А, 5 — овальбумин, 6 — фосфолипаза A_2 (мономер), 7 — фосфолипаза A_2 (димер); II — экспериментальная зависимость, I — зависимость коэффициента распределения, нормированного на величину сольватации фосфолипазы A_2 (δ 0,15 г/моль)

мостью σ от $\lg M$ (прямая I на рис. 1), которой удовлетворяют коэффициенты распределения [18] для всех белков, включая фосфолипазу A_2 .

Калибровочная зависимость I на рис. 1 получена с помощью формулы Тенфорда [19] для эффективной сольватации:

$$\delta = \left(\frac{4}{3} \pi R^3 \frac{N_a}{M} - \bar{V}_2 \right) \rho_0, \quad (1)$$

где N_a — число Авогадро, \bar{V}_2 — парциальный удельный объем белка, M — молекулярная масса несольватированной молекулы, R — стоксов радиус сольватированной молекулы, ρ_0 — плотность растворителя.

В табл. 1 приведены рассчитанные значения δ для калибровочных белков и фосфолипазы A_2 .

Если с помощью формулы 1, приравняв значение индекса сольватации для реперных белков к соответствующей величине для фосфолипазы A_2 , пересчитать стоксовы радиусы реперных белков и с помощью калибровочной зависимости (рис. 2) вычислить значения коэффициентов распределения, то полученная зависимость σ от $\lg M$ (I на рис. 1) устранил указанную выше аномалию для фосфолипазы A_2 . Это значит, что можно с достаточным основанием пользоваться полученной таким образом калибровкой по молекулярной массе и стоксову радиусу (рис. 2) для определения степени ассоциации фосфолипазы A_2 .

Самопроизвольную и индуцированную Ca^{2+} ассоциацию фосфолипазы A_2 исследовали при концентрации белка от 0,01 до 5 мг/мл. На рис. 4 показаны соответствующие концентрационные зависимости объема элюции центроида переднего фронта, который, согласно работе [12], представ-

Таблица 1

Белок	M	$R \cdot 10^8$, см [16]	\bar{V}_2 , см ³ /г [19]	δ , г/моль
Бычий сывороточный альбумин	67000	35,5	0,734	1,038
Овальбумин	45000	23,7	0,734	0,430
Химотрипсиноген А	25000	22,4	0,721	0,428
Миоглобин	17800	20,7	0,73	0,226
Рибонуклеаза	13630	18,0	0,728	0,347
Цитохром <i>c</i>	12400	16,4	0,73	0,341
Фосфолипаза A_2 * (мономер) ($c_0 \rightarrow 0$)	13447	16,6	0,718	0,15

* Для мономера фосфолипазы A_2 стоксов радиус R найден из калибровочной зависимости (рис. 2); парциальный удельный объем \bar{V}_2 рассчитан по аминокислотному составу, M — молекулярная масса, δ — степень сольватации.

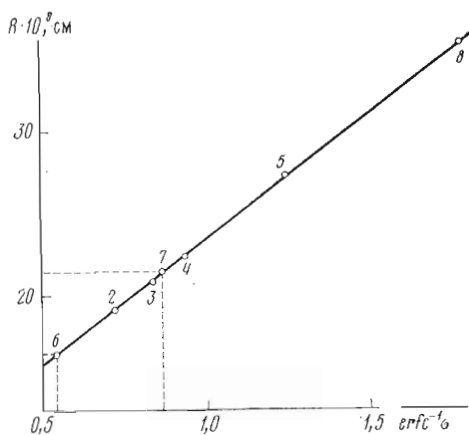


Рис. 2

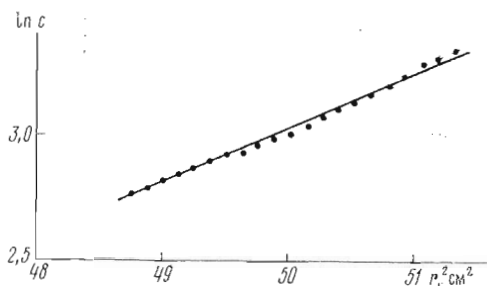


Рис. 3

Рис. 2. Калибровочная зависимость коэффициента распределения от стоксова радиуса белков; $erfc \sigma = \frac{\sqrt{\pi}}{2} - \int_0^{\sigma} e^{-t^2} dt$ [12, 13]; $erfc^{-1} \sigma$ — обратная функция. Точки 2-7 — как на рис. 1, 8 — бычий сывороточный альбумин

Рис. 3. Молекулярно-весовое распределение фосфолипазы A_2 , полученное методом седиментационного равновесия для c_0 6,9 мгМ

ляет собой средневесовой элюционный объем мономера и ассоциатов

$$\bar{V}_w = \frac{\int_0^c V dc}{c}$$

Определялся также V_z — средний элюционный объем:

$$V_z = \frac{\int_0^c V^2 dc}{\int_0^c V dc}$$

Линейный характер зависимости V_z от \bar{V}_w^{-1} (рис. 5), согласно Софиано-полусу — Ван Хольде [20], свидетельствует о протекании реакции ассоциации по схеме $nM_1 \rightleftharpoons M_n$ без промежуточных олигомеров, причем эта схема, как видно из графика, одинакова для апофермента и для его комплекса с Ca^{2+} .

Наличие только двух компонентов (мономер — n -мер) существенно облегчает последующие расчеты.

Из уравнения

$$V_z = V_1^0 + V_n^0 - \frac{V_1 V_n^0}{\bar{V}_w} \quad (2)$$

можно определить [20] объем элюции мономера (V_1^0) и ассоциата (V_n^0) при $c \rightarrow 0$. Соответствующие значения приведены в табл. 2.

Полученный таким образом объем элюции мономера совпадает с величиной $V_1^0 = 142 \pm 2$ мкл, определенной путем экстраполяции на нулевую концентрацию экспериментальной зависимости $\bar{V}_w(c)$ (рис. 4). Независимость (в пределах ошибки) значения V_n^0 от содержания Ca^{2+} заставляет усомниться в том, что ассоциат, содержащий Ca^{2+} , имеет конформацию,

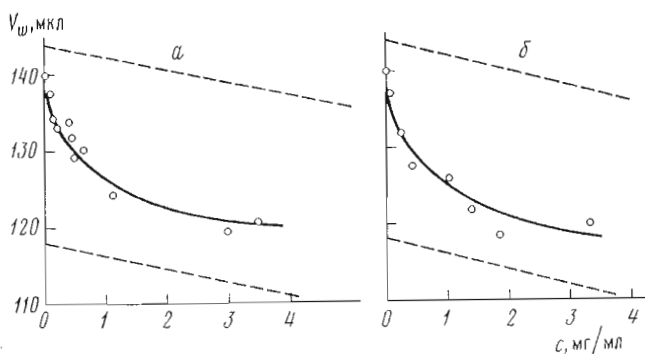


Рис. 4. Зависимость средневесового объема элюции для фосфолипазы A_2 от общей концентрации белка в отсутствие (а) и в присутствии (б) Ca^{2+} (0,02 М). Непрерывной линией представлена зависимость, рассчитанная на основе значений K и g , приведенных в табл. 2 (см. ниже)

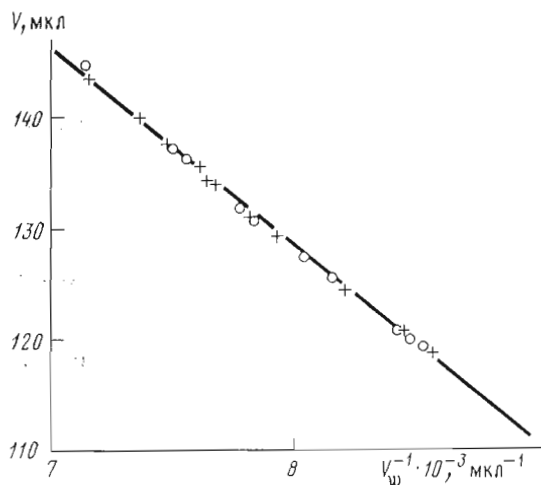


Рис. 5. Зависимость среднего объема элюции фосфолипазы A_2 от обратной величины средневесового удерживаемого объема. Точки, обозначенные кружком и крестиком, соответствуют случаям а и б на рис. 4. Для наглядности прямая проведена только через точки, обозначенные кружком

отличную от конформации ассоциата апофермента, как это предполагалось в работе [2].

Степень ассоциации (n) можно определить на основе модели слияния реагирующих молекул мономера в одну сферу с помощью калибровки (рис. 2).

Таблица 2

Концентрация Ca^{2+}	$V_1^0 \cdot 10^6$, л *	$V_n^0 \cdot 10^6$, л	$K \cdot 10^{-4}$, М ⁻¹	$g \cdot 10^{-4}$, мкл · М ⁻¹	$k_1 \cdot 10^{-4}$, М ⁻¹ с ⁻¹	k_2 , с ⁻¹	$\tau = k_2^{-1}$, с
0	148,9 ± 2	117,7 ± 2	6,0 ± 0,5	2,7 ± 0,16	4,2 ± 0,5	0,7 ± 0,1	1,5
0,02 М	143,9 ± 2	117,7 ± 2	6,3 ± 0,5	3,0 ± 0,16	4,27 ± 0,32	0,2 ± 0,05	5

* V_1^0 и V_n^0 — объемы элюции мономера и n -мера соответственно (колонка $25 \times 0,1$ см). K — константа равновесия, k_1 и k_2 — константы скорости ассоциации и диссоциации фосфолипазы A_2 , g — коэффициент из уравнения 5.

Приведенные в табл. 2 значения V_1^0 и V_n^0 соответствуют стоксовым радиусам $R_1 = (16,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-8}$ и $R_n = (21,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-8}$ см, что дает $n = (R_n/R_1)^3 = 1,95 \pm 0,08$.

Таким образом, вне зависимости от содержания Ca^{2+} реакция ассоциации фосфолипазы A_2 протекает по схеме мономер — димер и гидродинамические объемы компонентов реакции также не зависят от присутствия Ca^{2+} .

При равновесии

$$k_1 c_1^2 = k_2 c_2, \quad K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{c_2}{c_1^2}, \quad (3)$$

где k_1 , k_2 — константы скорости прямой и обратной реакции, K — термодинамическая константа равновесия, c_1 и c_2 — концентрации мономера и димера соответственно.

Поскольку элюиционный объем центрида фронта является средневесовым объемом элюции компонентов реакции (если пренебречь поправками, вводимыми при сопоставимых скоростях реакции и хроматографического разделения [21]), то из концентрационной зависимости \bar{V}_w может быть найдена константа равновесия

$$\bar{V}_w = \frac{c_1 V_1 + (c_0 - c_1) V_2}{c_0} = \frac{V_1 + K c_1 V_2}{1 + K c_1}, \quad (4)$$

где $c_1 = (\sqrt{1 + 4Kc_0} - 1) / 2K$, c_0 — общая концентрация белка.

Варьируя величину константы равновесия (K), можно добиться наилучшего совпадения кривой, задаваемой соотношением 4, с экспериментальной зависимостью $\bar{V}_w(c)$. При этом следует учесть, что для индивидуальных компонентов реакции, если бы они могли существовать, не находясь в подвижном равновесии, изотерма включения в поры, как правило, нелинейна, а концентрационная зависимость удерживаемого объема имеет вид [22]:

$$V_1 = V_1^0 - gc. \quad (5)$$

Согласно [22], коэффициент g можно считать одинаковым для мономера и ассоциатов. Таким образом, приходится варьировать помимо константы равновесия и величину параметра g . Полученные с помощью ЭВМ значения K и g приведены в табл. 2.

На рис. 4 сплошными линиями изображены рассчитанные на основе приведенных в табл. 2 величин K и g концентрационные зависимости \bar{V}_w . Видно, что экспериментальные точки удовлетворительно укладываются на расчетные кривые.

Для определения кинетических констант k_1 и k_2 необходимо проанализировать форму фронтов на хроматограммах. Для этого целесообразно использовать задние фронты хроматографической зоны [23].

Размывание фронта можно описать с помощью безразмерного коэффициента дисперсии:

$$L_v = \frac{\sigma_v^2}{\bar{V}^2} = \frac{1}{N}, \quad (6)$$

где σ_v^2 — дисперсия объема элюции, N — число теоретических тарелок.

При ассоциации размывание связано не только с чисто хроматографическими факторами (продольной и вихревой диффузией и неравновесностью массообмена между фазами), но и с тем обстоятельством, что мигрирующий по колонке белок разное время существует в состоянии мономера или ассоциата. Поэтому измеряемый коэффициент дисперсии ($L_{v(\text{изм})}$) складывается из средневесового коэффициента дисперсии для компонентов реакции и некоторой кинетической добавки L_k [24]:

$$L_{v(\text{изм})} = \frac{V_1 L_{v_1} + K V_2 L_{v_2}}{V_1 + K V_2} + L_k, \quad (7)$$

где $L_k = F(V_1 - V_2)^2 K L A / (1 + K)^3 \bar{V}_w^3 k_2$, F — объемная скорость элюции, L — длина колонки, A — площадь сечения колонки. Выражение 7 написано при тех же допущениях, что и выражение 4.

Если не учитывать различия в коэффициентах диффузии в подвижной фазе и в геле для компонентов реакции, то в соответствии с представлением о постоянстве N [25] можно считать, что $L_{v_1} = L_{v_2}$. В пользу этого допущения свидетельствует постоянное (в пределах 30%) число теоретических тарелок ($N = V^2 / \sigma^2$), полученное для переднего и заднего фронта на хроматограммах калибровочных белков и фосфолипазы A_2 при $c \rightarrow 0$

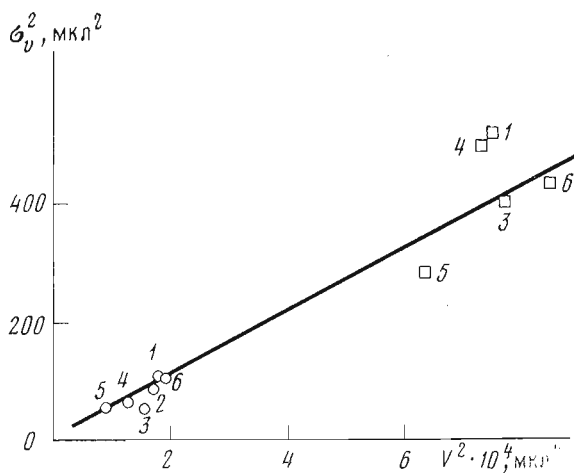


Рис. 6. Зависимость дисперсии объема элюции калибровочных белков и фосфолипазы A_2 от удерживаемого объема (V); квадратом обозначен передний фронт, кружком — задний фронт. Число теоретических тарелок 195. Обозначения см. рис. 1

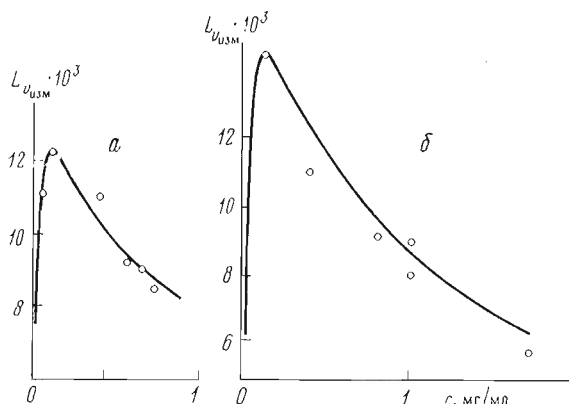


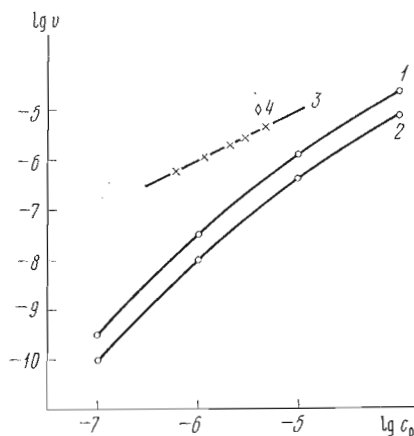
Рис. 7. Концентрационная зависимость безразмерного коэффициента дисперсии $L_{v(изм)} = \sigma_v^2/V^2$ для фосфолипазы A_2 ; а и б — как на рис. 4. Непрерывные линии — зависимости, рассчитанные на основе данных табл. 2, для N 195

(рис. 6). В этом случае $L_{v(изм)} = 1/N + L_k$ и кинетические константы k_2 и k_1 можно оценить из соотношения 7. При этом варьированием k_2 добивались наилучшего совпадения экспериментальных значений $L_{v(изм)}$ с рассчитанными для приведенных выше значений K зависимостями коэффициента дисперсии от концентраций белка. Результат показан на рис. 7. Полученные таким способом кинетические константы и полупериоды диссоциации приведены в табл. 2.

Наличие максимумов на кривых зависимости L от c связано с тем, что при $c \rightarrow 0$ (полная диссоциация) и $c \rightarrow \infty$ (полная ассоциация) $L_{v(изм)} \rightarrow 1/N$, а промежуточная область концентраций характеризуется смешанной кинетикой, когда реакция в такой же степени лимитирует скорость процесса, как и массообмен между подвижной и неподвижной фазой.

Полученные данные показывают, что в оптимуме рН-функционирования фосфолипазы ионы Ca^{2+} не изменяют положения равновесия мономер — димер и лишь несколько (в 4 раза) замедляют скорости диссоциа-

Рис. 8. Теоретические кривые зависимости скорости ассоциации и диссоциации от концентрации фосфолипазы A_2 в отсутствие (1) и в присутствии (2) ионов Ca^{2+} (0,02 М). Крестики на прямой 3 — максимальные скорости гидролиза 1,2-дibuтироил-*sn*-фосфорилхолина по данным работы [3]. Точка 4 — скорость гидролиза того же субстрата при $[S_0]$ 0,15 М



ции и ассоциации. Таким образом, одни ионы Ca^{2+} не могут служить агентами, стабилизирующими активную димерную форму фосфолипазы A_2 .

Интересно сравнить наблюдаемые скорости ассоциации и диссоциации со скоростями гидролиза субстратов, катализируемого фосфолипазой A_2 . На рис. 8 приведены зависимости скорости диссоциации и ассоциации фермента от его концентрации, рассчитанные с использованием констант, приведенных в табл. 2. На этот график нанесены данные по максимальной скорости гидролиза истинных растворов дибuтироил-*sn*-фосфатидилхолина в зависимости от концентрации фермента (в эксперименте эти условия недостижимы, так как критическая концентрация мицеллообразования много меньше, чем K_m). Видно, что значения максимальных скоростей гидролиза лежат существенно выше значений скоростей диссоциации — ассоциации.

Реальные скорости гидролиза этого субстрата в условиях $[S]_0 > K_m$ намного превышают наблюдаемые для свободного фермента скорости ассоциации — диссоциации из-за эффекта ускорения каталитической реакции поверхностью мицелл. Таким образом, очевидно, что даже в области концентраций субстрата, соответствующей истинным растворам, субстрат должен заметно увеличивать скорость ассоциации мономеров или же увеличивать константу равновесия, т. е. повышать равновесную концентрацию активной димерной формы. Эти эффекты должны быть еще больше в том случае, когда субстрат находится в мицеллярной форме.

Полученные в настоящей работе данные хорошо согласуются с предложенной нами схемой функционирования фосфолипазы A_2 [3].

Авторы выражают благодарность А. И. Мирошникову за предоставление препаратов фосфолипазы A_2 .

Экспериментальная часть

Фосфолипаза A_2 (изофермент ЕЗ) предоставлена А. И. Мирошниковым. Критерии ее чистоты приведены в работе [17].

Для калибровки колонки использовали хроматографически чистые реперные белки (Serva, ФРГ). Микроколонку (25×0,1 см) с фильтром из пористого поликапроамида заполняли сефадексом G-75 (fine) при гидростатическом давлении, обеспечивающем протекание элюента со скоростью 300 мкл/ч. В дальнейшем, во избежание сжатия геля, элюент подавали шприцевым микронасосом со скоростью 250 мкл/ч. Поток элюента не прекращали в течение всего эксперимента. Перед экспериментом с элюентом, не содержащим Ca^{2+} , колонку с сефадексом промывали 0,02 М раствором EDTA. Микроколонку термостатировали при $22 \pm 0,5^\circ C$.

Коэффициенты распределения σ вычислялись по формуле $\sigma_i = (V_i - V_0) / (V_{acc} - V_0)$, V_{acc} определяли как объем элюции триптофана (237 мкл), а V_0 — как объем элюции ферритина (68,5 мкл).

Использовали микроколоночный хроматограф ХЖ-1305, оснащенный спектрофотометрическим детектором с измерительной ячейкой объемом 1 мкл. Объем дозируемого образца 100 мкл. Концентрацию белка определяли исходя из молекулярного веса фосфолипазы 13 447 и $E_{1\text{ мс}}^{0,1\%}$ 1,71 при 280 нм.

Применение микроколонки диаметром 1 мм позволило сократить необходимое для эксперимента количество вещества до 5 мг.

Для элюции использовали буферный раствор, рН 7,5 (0,01 М трис, 0,09 М HCl). Регистрацию элюата при низкой концентрации белка проводили на длине волны 220–280 нм в области 0–0,05 ОЕ, а при высокой концентрации — на длине волны 280–310 нм в области 0–0,3 ОЕ.

Опыты по седиментационному равновесию проводили на ультрацентрифуге (Beckman), модель E, в течение суток при скорости вращения ротора 20 000 об/мин, температуре 5° С и рН 7,5, используя оптическую систему сканирования. Кажущиеся значения средневесовой молекулярной массы (M_w) определяли по формуле

$$M_w = \frac{2RT}{(1 - \bar{V}\rho)W} \frac{d \ln c}{dr^2},$$

где R — газовая постоянная, ρ — плотность растворителя (г/мл), T — температура, °К, \bar{V} — удельный парциальный объем фосфолипазы A_2 , равный 0,718 мл/г (вычислен по аминокислотному составу мономера), W — скорость вращения ротора.

Значение $d \ln c/dr^2$, пропорциональное средневесовой молекулярной массе, определяли из графика в координатах $\ln c$, r^2 (c — концентрация белка в ячейке в М, r — расстояние от оси вращения ротора до соответствующей точки на радиусе, где концентрация белка равна c [27] (см. рис. 3)).

ЛИТЕРАТУРА

1. Verger R., de Haas G. H. (1976) *Annu. Rev. Biophys. and Bioeng.*, **5**, 77–117.
2. Roberts M. F., Deems R. A., Dennis E. A. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 6011–6017.
3. Желковский А. М., Дьяков В. Л., Гинодман Л. М., Антопов В. К. (1978) *Биоорганическая химия*, **4**, 1665–1672.
4. Antonov V. K., Apsalon U. R., Dyakov V. L., Zhelkovskii A. M., Miroshnikov A. I. (1978) *Abstracts USSR–Sweden symposium on Physico-chemical biology*, pp. 54–55.
5. Roberts M. F., Deems R. A., Mincey T. C., Dennis E. A. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 2405–2411.
6. Roberts M. F., Deems R. A., Dennis E. A. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 1950–1954.
7. Chun R. W., Kim S. G., Stanley C. A., Ackers G. K. (1969) *Biochemistry*, **8**, 1625–1632.
8. Chiancone E., Gilbert L. M., Gilbert G. A., Kellett G. L. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 1212–1219.
9. Halvorson H. R., Ackers G. K. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 967–973.
10. Ackers G. K. (1964) *Biochemistry*, **3**, 723–730.
11. Ackers G. K. (1970) *Adv. Prot. Chem.*, **24**, 343–446.
12. Ackers G. K. (1973) *Methods in Enzymology*, **27**, 441–455.
13. Куренбин О. И., Виленчик Л. З., Готлиб Ю. Я., Бельский Б. Г. (1977) *Биофизика*, **22**, 589–593.
14. Виленчик Л. З., Куренбин О. И., Готлиб Ю. Я., Бельский Б. Г. (1977) *Биофизика*, **22**, 582–588.
15. Cann J. R., Goad W. B. (1970) *Interacting Molecules. The theory and Practice of their Electrophoresis, Ultracentrifugation and Chromatography*, p. 249, Acad. Press, New York – London.
16. Andrews P. (1970) *Methods in Biochemical Analysis*, **18**, 1–53.
17. Апсалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. (1977) *Биоорганическая химия*, **3**, 1553–1559.
18. Ackers G. K. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 3237–3238.
19. Тенфорд И. (1965) *Физическая химия полимеров*, с. 391–394, «Химия», М.
20. Sophianopolous A. G., Van Holde K. E. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2516–2524.
21. Бельский Б. Г., Виленчик Л. З. (1973) *Хроматография полимеров*, с. 169–183, «Химия», М.
22. Gilbert G. A. (1959) *Proc. Roy. Soc.*, **A250**, 377–388.

23. Ackers G. K. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 3026–3034.
24. Мальцев В. Г., Куренбин О. И., Зими́на Т. М., Виленчик Л. З., Беле́нский Б. Г., Готлиб Ю. Я. (1977) Тезисы IV Всесоюзного симпозиума по химии белков и пептидов, с. 21.
25. Современное состояние жидкостной хроматографии, под ред. Киркленда Дж. (1974) «Мир», М.
26. Желяковский А. М., Дьяков В. Л., Антонов В. К. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 404–409.
27. Боуэн Т. (1973) Введение в ультрацентрифугирование, «Мир», М.

Поступила в редакцию
11.IV.1979

**MICROCHROMATOGRAPHIC STUDIES OF THE KINETICS
AND EQUILIBRIUM OF ASSOCIATION OF THE PHOSPHOLIPASE A₂
FROM THE VENOM OF MIDDLE ASIAN COBRA**

MAL'TSEV V. G., ZIMINA T. M., KURENBIN O. I., BELENKII B. G.,
ALEXANDROV S. L., PAVLOVA N. P., DYAKOV V. L., ANTONOV V. K.

*Institute of High Molecular Weight Compounds,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad;
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The equilibrium constant (K) and the rate constants (k_1 and k_2) of the dimerization of phospholipase A₂ from the *Naja naja oxiana* venom have been studied by the method of frontal gel-chromatography. It was found that the hydrodynamic radii of the dimer do not depend on the presence of Ca²⁺ ions. At neutral pH values Ca²⁺ ions exert no influence on the equilibrium but lower the association and dissociation rates of the enzyme. The data obtained are discussed in the framework of the model implying the functioning of the enzyme as a catalytically active dimer.