



УДК. 547.962.04

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФОСФОЛИПАЗЫ  $A_2$  ИЗ ЯДА  
ШЕРШНЯ *VESPA ORIENTALIS**Мирошников А. И., Грицук В. П., Мецзяркова Е. А.,  
Оханов В. В.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва**Туйчибаев М. У., Ташмухамедов Б. А.**Институт биохимии Академии наук УзССР, Ташкент*

Из яда шершня *Vespa orientalis* методами гель-фильтрации и ионообменной хроматографии выделена фосфолипаза  $A_2$  ( $M$  16 000), обладающая также высокой лизофосфолипазой активностью. Исследован аминокислотный состав, определена N-концевая аминокислотная последовательность и изучены физико-химические характеристики выделенного фермента. При исследовании конформационных состояний фосфолипазы  $A_2$  методом дифференциальной УФ-спектроскопии, КД и флуоресценции обнаружен конформационный переход вблизи pH 2,3. При pH 9,5 наблюдается необратимая денатурация фермента.

Успехи, достигнутые в исследовании механизма передачи нервного возбуждения посредством химических медиаторов, связаны прежде всего с использованием нейротоксинов из различных животных ядов, позволяющих исключительно специфично воздействовать на каждую стадию этого сложного физиологического процесса. С помощью нейротоксинов постсинаптического действия удалось выделить и охарактеризовать ацетилхолиновый рецептор никотинового типа из тканей различных животных и вплотную подойти к выяснению молекулярной организации этой важной биологической мишени [1]. В то же время процессы секреции медиаторов охарактеризованы недостаточно, хотя существует ряд белковых нейротоксинов, действующих на пресинаптическую мембрану. К такого рода токсинам относятся столбчатый и бутулинический токсины, токсины яда кара-курта, а также ряд нейротоксинов из ядов змей ( $\beta$ -бунгаротоксин, нотексин, тайпоксин и кротоксин), обладающих способностью гидролизовать фосфолипиды, т. е. являющихся фосфолипазами  $A_2$  (КФ 3.1.1.4) [2]. Недавно было показано [3, 4], что пресинаптическим действием обладают и фосфолипазы  $A_2$  из яда кобры *Naja naja oxiana* и пчелы *Apis mellifera*, хотя токсическое действие этих ферментов существенно ниже, чем, например,  $\beta$ -бунгаротоксина. Сейчас твердо установлено, что ферментативная активность играет существенную роль в процессе блокирования выброса нейромедиатора из пресинаптического нервного окончания.

Известно, что цельный яд восточного шершня *Vespa orientalis* обладает высокой фосфолипазой активностью, намного большей (примерно на 2 порядка), чем у фосфолипаз из других источников [5]. С целью получения нового инструмента исследования пресинаптических процессов секре-

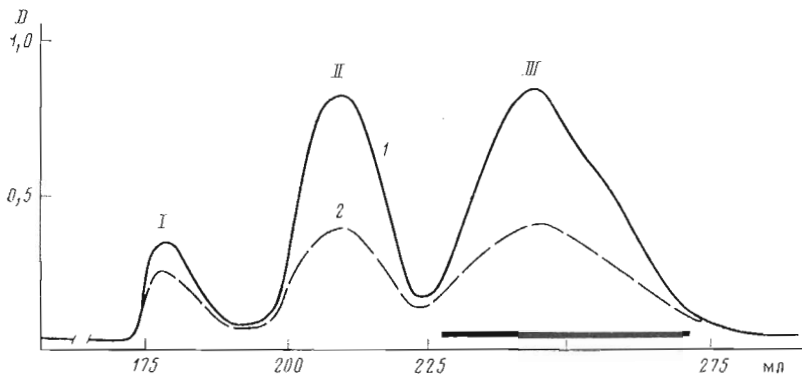


Рис. 1. Гель-фильтрация цельного яда большого шершня на сефадексе G-50 (1,3×300 см) в аммоний-форматном буфере (рН 4,5). Контроль по активности (1) и белку (2). Отмечена выделенная фракция

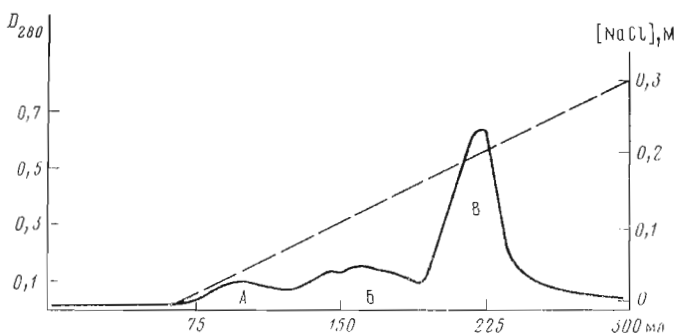


Рис. 2. Хроматографическое разделение фракции III (рис. 1) на СМ-целлюлозе СМ-52 (колонка 1×20 см)

ции нейромедиаторов мы выделили и охарактеризовали фосфолипазу  $A_2$  из яда большого шершня *Vespa orientalis*.

Первой стадией фракционирования цельного яда шершня явилась гель-фильтрация на сефадексе G-50 в аммоний-форматном буфере (рис. 1). Фосфолипазная активность по отношению к яичному лецитину проявлялась только во фракции III. После лиофилизации белковая смесь из этой фракции была подвергнута хроматографии на СМ-целлюлозе в трис-НСl-буфере с использованием линейного градиента NaCl (рис. 2). Из фракции В после обессоливания была выделена фосфолипаза, индивидуальная по данным диск-электрофореза в полиакриламидном геле и N-концевой аминокислотного анализа дансылым методом (таблица). N-Концевой аминокислотой является фенилаланин. Молекулярный вес фосфолипазы, определенный с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-75 и диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, составил  $\sim 30\,000$ . Такие значения молекулярного веса фосфолипаз  $A_2$  характерны для ферментов, выделенных из яда змей семейств элапидов и вipersидов [2], что, по-видимому, объясняется способностью этих белков образовывать комплексы с другими компонентами ядов или же склонностью индивидуальных ферментов к агрегации. Истинные молекулярные веса указанных ферментов лежат в интервалах 12 000—18 000. Аналогичное явление наблюдается и в случае фосфолипазы из яда шершня. Молекулярный вес карбоксиметилированного белка равен примерно 16 000. Из сравнения аминокислотного состава фосфолипаз  $A_2$  из яда пчелы и шершня (таблица) следует, что последняя содержит большое количество гидрофобных аминокислот, чем и можно объяснить склонность

**Аминокислотный состав фосфолипаз A<sub>2</sub> из разных источников**

| Аминокислоты | Фосфолипаза A <sub>2</sub> из яда |           |                                  |
|--------------|-----------------------------------|-----------|----------------------------------|
|              | шершня                            | пчелы [6] | змеи <i>Naja naja oxiana</i> [7] |
| Asx          | 15,95 (16)                        | 15        | 20                               |
| Thr          | 9,58 (10)                         | 11        | 6                                |
| Ser          | 6,80 (7)                          | 10        | 8                                |
| Glx          | 10,93 (11)                        | 6         | 8                                |
| Pro          | 6,50 (7)                          | 5         | 5                                |
| Gly          | 10,93 (11)                        | 11        | 9                                |
| Ala          | 9,50 (10)                         | 4         | 11                               |
| Val          | 9,01 (9)                          | 5         | 4                                |
| Cys(Cm)      | 5,91 (6)                          | 8         | 14                               |
| Met          | 2,17 (2)                          | 3         | 1                                |
| Ile          | 8,55 (9)                          | 4         | 4                                |
| Leu          | 9,10 (9)                          | 7         | 6                                |
| Tyr          | 5,80 (6)                          | 8         | 8                                |
| Phe          | 4,98 (5)                          | 5         | 4                                |
| His          | 3,50 (4)                          | 6         | 1                                |
| Lys          | 9,71 (10)                         | 10        | 6                                |
| Trp          | 1,94 * (2)                        | 2         | 2                                |
| Arg          | 5 (5)                             | 6         | 4                                |
| Всего        | 139                               | 128       | 119                              |

\* Гидролиз метансульфоновой кислотой.

этого белка к агрегации. N-Концевая последовательность фосфолипазы шершня, определенная автоматической деградацией по Эдману карбоксиметилированного образца, существенно отличается от соответствующей последовательности фосфолипазы из яда пчелы [6] и фосфолипазы из яда среднеазиатской кобры [7].

*V. orientalis* H-Pro-Asn-Pro-Cys-Pro-Tyr-Asp-Asp-Thr-Val-X-Lys-Met-Ile-Ile-  
*A. mellifera* H-Ile-Ile-Tyr-Pro-Gly-Thr-Leu-Trp-Cys-Gly-His-Gly-Asn-Lys-Ser-  
*N. n. oxiana* H-Asn-Leu-Tyr-Gln-Phe-Lys-Asn-Met-Ile-Lys-Cys-Thr-Val-Pro-Ser-

Если для фосфолипаз A<sub>2</sub> из яда змей и поджелудочной железы млекопитающих существует гомология в первичной структуре [2], то, как видно из N-концевой последовательности, ферменты из яда пчелы и яда шершня существенно различаются как между собой, так и в сравнении с фосфолипазами яда змей. Для фосфолипаз перепончатокрылых характерно низкое содержание остатков цистеина в молекуле; можно предположить, что в исследуемом ферменте присутствуют 3 дисульфидные связи. Свободных сульфгидрильных групп в фосфолипазе из яда шершня не обнаружено.

Определение ферментативной активности фосфолипазы по методике [8] проводилось с использованием в качестве субстратов синтетического дипальмитониллецитина и яичного лецитина. Максимальная активность фермента проявляется при pH 7–8, что характерно практически для всех фосфолипаз A<sub>2</sub> как панкреатических, так и из ядов различных животных. Удельная активность исследованного фермента равна 45 мкмоль/мин на 1 мкг фосфолипазы. Для проявления ферментативной активности необходимо присутствие ионов Ca<sup>2+</sup>, которые могут быть заменены на ионы Mg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>. Аналогичное явление было отмечено для фосфолипазы A<sub>2</sub> из яда пчелы [9], но не для ферментов из яда кобр, для которых показана незаменимость ионов кальция [10].

При изучении субстратной специфичности фосфолипазы на яичном лецитине [11] показано, что отщепление жирных кислот от молекулы фосфолипида происходит преимущественно во 2-м положении и что фос-

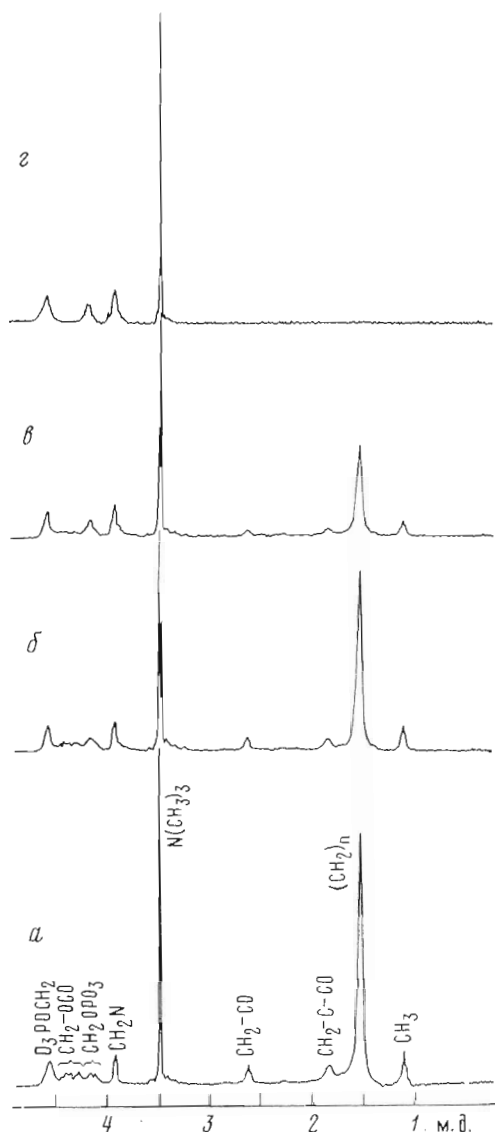


Рис. 3. Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР лизолецитина в 0,25 М натрий-боратном буфере (3,6 мг/мл, рН 6,7;  $35^\circ\text{C}$ ) до добавления фосфолипазы из яда шершня (а) и после добавления фосфолипазы (0,1 мкг/мл через 1 ч 40 мин (б), через 3 ч (в), после окончания гидролиза (г))

фолипаза таким образом относится к типу  $A_2$ . В то же время по сравнению с фосфолипазами  $A_2$  из яда медоносной пчелы и яда среднеазиатской кобры исследуемый фермент имеет достаточно высокую лизофосфолипазную активность, которая также была измерена титрованием освобожденной жирной кислоты из лизолецитина [8]. Как и фосфолипазная, лизофосфолипазная активность исследованной белковой молекулы имеет оптимальное значение при рН 7,5 (лизофосфолипаза из *Penicillium notatum* имеет рН-оптимум 4 [12]). Наличие лизофосфолипазной активности было подтверждено с помощью ЯМР-спектроскопии при исследовании фермент-субстратного взаимодействия с использованием в качестве аналога субстрата лизолецитина (рис. 3). Отнесение сигналов проведено на основании ранее приведенных данных [13]. После добавления фермента наблюдается быстрое уменьшение интенсивностей сигналов жирных кис-

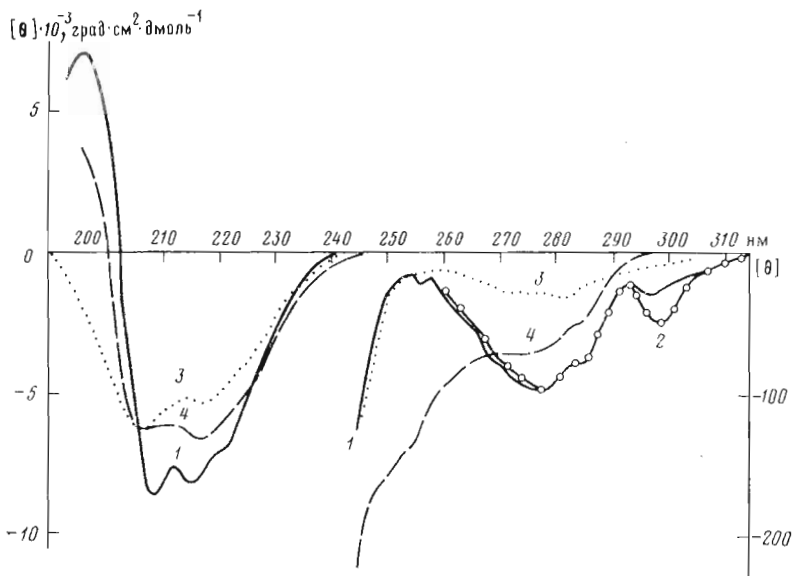


Рис. 4. Кривые КД фосфолипазы  $A_2$  при pH 3,0–9,0 (1); 8,0 (+CaCl<sub>2</sub>) (2); 2,1 (3); 11,5 (+CaCl<sub>2</sub>) (4). [Белок]/[CaCl<sub>2</sub>]=200

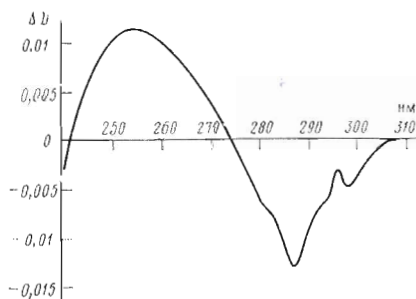
лот, а также дифференциация сигнала метильных протонов холина на два, соответствующих глицерофосфохолину и лизолецитину. По окончании гидролиза раствор в ампуле представляет собой суспензию пальмитиновой кислоты, плохо растворимой в воде, в водном растворе глицерофосфохолина (рис. 3г). Аналогичные изменения в спектрах ЯМР мы наблюдали также при исследовании фосфолипаз  $A_2$  из яда кобры *N. n. oxiana* и яда пчелы *Apis mellifera*, однако скорость гидролиза лизолецитина в присутствии этих ферментов на четыре порядка ниже, чем в присутствии фермента из яда шершня.

Таким образом, выделенная фосфолипаза  $A_2$  яда шершня *V. orientalis* обладает как фосфолипазной  $A_2$ , так и фосфолипазной В (лизофосфолипазной) активностями. Конечно, эти данные не исключают присутствия в яде шершня специфического фермента, расщепляющего исключительно лизолецитин. Проявление высокой лизофосфолипазной активности фосфолипазой  $A_2$  яда шершня может быть следствием большей конформационной подвижности белковой молекулы исследуемого фермента по сравнению с фосфолипазами из ядов змей и панкреатическими, имеющими 7–8 дисульфидных связей на полипептидную цепь из 120–140 аминокислотных остатков. Для оценки конформационной подвижности мы исследовали некоторые спектральные характеристики изучаемой молекулы.

Методом кругового дихроизма исследовано влияние pH среды на конформационную подвижность белковой молекулы в растворе. Из рис. 4 (кривая 1) видно, что нативная структура фермента в интервале pH 3,0–9,0 достаточно устойчива; в данных условиях кривые КД не изменились по форме и интенсивности. Разложение спектра КД в области 190–240 нм на составляющие и расчет методом Чена — Янга [14] дает для  $\alpha$ -спиральной,  $\beta$ -структурированной и R-неупорядоченной конформации белка значения 18,50 и 32%. В кислой среде (pH 3,0) наблюдались изменения спектров КД (рис. 4, 3), вызванные уменьшением содержания  $\alpha$ -спирали до 14,5%,  $\beta$ -структуры до 38% и возрастанием доли неупорядоченной формы до 47,5%.

Конформационный переход молекулы фосфолипазы  $A_2$  с pK 2,3 является необратимым, поскольку последующее подщелачивание раствора белка до pH 8,0 не приводит к восстановлению формы и интенсивности спектров КД, соответствующих нативному ферменту. Как отмечалось выше,

Рис. 5. Разностный спектр поглощения фермента. В кювете сравнения и в кювете с образцом раствор фосфолипазы  $A_2$  при pH 7,5 и 2,3 соответственно



в нейтральной среде фосфолипаза  $A_2$  из яда шершня существует в димерной форме с  $M$  30 000. Можно полагать, что конформационный переход в кислой области pH сопровождается диссоциацией димеров, как это было обнаружено для фосфолипазы  $A_2$  из других источников [15].

Переход фермента в кислой среде к менее упорядоченной конформации исследовался также с помощью разностной УФ-спектроскопии (рис. 5). Как видно, в кислой среде полосы ароматических остатков подвергаются голубому сдвигу, что соответствует переходу этих остатков в полярное (водное) окружение. Положение максимумов полос характерно для пертурбации остатков тирозина (287 нм) и триптофана (плечо 292 и 298 нм). Из этих данных также следует, что конформационный переход с  $pK_{\text{кон}}$  2,3 сопровождается разупорядочиванием нативной структуры и, вероятно, диссоциацией димерной формы молекулы фермента. В щелочной среде фермент устойчив до pH 9,5, дальнейшее увеличение pH приводит к необратимой денатурации белка, сопровождающейся его осаждением.

Как было показано выше, присутствие кальция — необходимое условие проявления ферментативной активности фосфолипазы  $A_2$  из яда шершня. Однако добавление  $CaCl_2$  к раствору фермента не приводит к появлению разностного УФ-спектра. В спектрах КД в области дихроичного поглощения пептидных хромофоров (190—240 нм) также не было обнаружено изменений кривых при добавлении к раствору белка  $CaCl_2$ . Наблюдается лишь небольшое увеличение отрицательной интенсивности полосы при 297 нм (рис. 4, 2), относящейся к остатку триптофана. Необходимо отметить, что добавление ионов кальция к ферменту значительно повышает его конформационную устойчивость в щелочной среде. В присутствии  $Ca^{2+}$  лишь при pH 11,5 кривые КД отличались по виду от кривых, соответствующих нативному состоянию белка (рис. 4, 4). Было определено, что в этих условиях молекула фосфолипазы  $A_2$  построена из 18%  $\alpha$ -спирали, 42,5%  $\beta$ -структуры и 39% R-формы, т.е. упорядоченность структуры уменьшается по сравнению с нативной молекулой.

С помощью спектров флуоресценции было изучено окружение остатков триптофана в фосфолипазе  $A_2$  (два остатка на мономер). В диапазоне pH 8,0—3,0 эмиссионный спектр фермента имеет максимум при 320 нм, (квантовый выход 0,03  $\lambda_{\text{возб}}$  295 нм), который смещается до 325 при pH 2,4. Коротковолновое положение максимума флуоресценции однозначно свидетельствует о сильном гидрофобном окружении остатка (остатков) триптофана, а низкое значение квантового выхода — о наличии вблизи тушащих групп белка. В кислой среде (pH 2,4) в результате конформационного перехода молекулы фермента окружение остатков триптофана становится более полярным, что приводит к смещению максимума флуоресценции в красную область. В спектрах КД полоса остатка триптофана находится при 297 нм (рис. 4), причем именно эта полоса оказалась наиболее «чувствительной» к конформационному переходу фермента с  $pK_{\text{кон}}$  2,3 и к добавлению ионов кальция. Близкое значение максимума поглощения остатка триптофана (298 нм) обнаружено также в разностном УФ-спектре (рис. 5). Аномальное положение полос

остатка триптофана в разностном УФ-спектре и в спектрах КД по сравнению с обычным (292–294 нм) также подтверждает вывод, сделанный по спектрам флуоресценции, о сильногидрофобном окружении этого остатка. Полученные данные позволяют предположить, что остатки триптофана локализованы в неполярном кластере молекулы, а также вблизи области связывания ионов кальция.

Остается добавить, что фосфолипаза  $A_2$  из яда шершня гораздо токсичнее фосфолипаз  $A_2$  из яда пчелы и яда кобры *N. n. oxiana* (токсичность ( $LD_{50}$ ) на белых мышах равна соответственно 0,58; 4 и 80 мг/кг).

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за интерес к работе и ценные замечания, а также И. В. Назимову за анализ аминокислотной последовательности N-концевого фрагмента фермента.

### Экспериментальная часть

Яд восточного шершня *Vespa orientalis* получен в Институте биохимии Академии наук УзССР по ранее описанной методике [16]. Раствор 200 мг яда в 0,1 М аммоний-форматном буфере (pH 4,5) наносили на колонку (1,3×300 см) с сефадексом G-50 (Pharmacia, Швеция), уравновешенным тем же буфером (рис. 1). После контроля на фосфолипазную активность (см. ниже) белковую смесь из фракции III лиофилизовали, остаток растворяли в 0,05 М трис-HCl-буфере (pH 7,6) и хроматографировали на колонке (1,0×20 см) с CM-целлюлозой (CM-52) (Whatman, Англия), уравновешенной стартовым буфером, с использованием градиента NaCl до 0,3 М (объем 300 мл). После обессоливания фракции В, содержащей фосфолипазу, был выделен белок, индивидуальный по данным N-концевого аминокислотного анализа, диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Фосфолипазную активность определяли ацидометрическим методом по отношению к яичному лецитину и синтезированному нами дипальмитоил-лецитину, как описано ранее [8]. Субстратную специфичность определяли анализом жирных кислот, получаемых после гидролиза яичного лецитина по известной методике [11].

Для определения лизофосфолипазной активности по методике [8] использовали монопальмитоиллизолецитин, полученный после гидролиза фосфолипазой  $A_2$  из яда кобры *N. n. oxiana* 1,2-дипальмитоил-*sn*-фосфатидилхолина (Merck, ФРГ). Аминокислотный анализ гидролизатов (6 н. HCl, 100° С, 6 ч) белка проводили на анализаторе D-500 (Durrum, США), автоматический анализ последовательности аминокислот — на секвенаторе 890 С (Beckman, США).

Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР получены на спектрометре SC-300 «Varian» в импульсивном режиме с фурье-преобразованием на ЭВМ типа 620/L-100 (Varian 16 К) в 0,25 М натрий-боратном буфере (pH 6,7) при концентрации фермента 0,1 мкг/мл и концентрации лизолецитина 3,6 мг/мл. Температуру образца в датчике (35° С) контролировали с помощью стандартной температурной приставки с точностью ±1° С. Химические сдвиги протонных сигналов измерены относительно внешнего стандарта гексаметилдисилоксана.

Спектры КД снимали на дихрографе «Jobin-Ivon» (Jobin-Ivon, Франция) при толщине слоя 1 см для области 320–250 нм и 0,01 см — для области 250–190 нм и концентрации белка 10 мкМ. [Θ] — эллиптичность среднего аминокислотного остатка ( $M$  120).

Разностные спектры поглощения получены на спектрофотометре «Acta M-VI» (США) при толщине слоя 1 см и концентрации белка 10 мкМ. Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре «Aminco SPF-1000 CS» (США). Толщина слоя 1 см,  $\lambda_{возб}$  295 нм, ширина щели возбуждения и эмиссии 5 и 10 нм соответственно, чувствительность 1,0,

концентрация белка не более 1 мкМ. При спектрофотометрических измерениях использовали 0,05 М буферный раствор трис-HCl, pH контролировали с помощью pH-метра «Beckman pH ASAR-1» (США) с комбинированным микроэлектродом «Beckman 39090».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Albuquerque E. X., Eldefrawi A. T., Eldefrawi M. E.* The use of snake toxins for the study of the acetylcholine receptor.—In: Snake venom (Lee C.-Y., ed.), Berlin—Heidelberg—New York: Springer Verlag, 1979, p. 377–402.
2. *Karlsson E.* Chemistry of protein toxins in snake venoms.—In: Snake venom (Lee C.-Y., ed.), Berlin—Heidelberg—New York: Springer Verlag, 1979, p. 159–212.
3. *Magazanik L. G., Gotgilf I. M., Slavnova T. I., Miroshnikov A. I., Apsalon U. R.* Effects of phospholipase A<sub>2</sub> from cobra and bee venom on the presynaptic membrane.—Toxicon, 1978, v. 17, № 5, p. 477–488.
4. *Каменская М. А., Магазаник Л. Г., Котова Е. Р., Сагъбабдина Н. К., Мирошников А. И., Ансалон У. Р.* Влияние пресинаптических нейротоксинов из ядов пчелы и кобры на спонтанную секрецию медиатора из двигательных окончаний мышцы.—Бюл. exper. биол. и мед., 1979, т. 87, с. 396–399.
5. *Fletcher J. E., Elliot W. B., Ishay J., Rosenberg P.* Phospholipase A and B activities of reptile and Hymenoptera venoms.—Toxicon, 1979, v. 17, № 6, p. 591–599.
6. *Shipolini R. A., Callewaert G. L., Cottrell R. C., Vernon Ch. A.* The amino-acid sequence and carbohydrate content of phospholipase A<sub>2</sub> from bee venom.—Eur. J. Biochem., 1974, v. 48, № 2, p. 465–476.
7. *Овчинников Ю. А., Мирошников А. И., Назимов И. В., Ансалон У. Р., Солдатов Л. Н.* Полная аминокислотная последовательность фосфолипазы A<sub>2</sub> (изофермент E3) из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*.—Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 805–813.
8. *Ансалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И.* Выделение и некоторые свойства фосфолипазы A<sub>2</sub> из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*.—Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 3, с. 1553–1559.
9. *Shipolini R. A., Callewaert G. L., Cottrell R. C., Doonan S., Vernon Ch. A., Banks B. E. C.* Phospholipase A from bee venom.—Eur. J. Biochem., 1971, v. 20, № 4, p. 459–468.
10. *Salach J. I., Turini P., Seng R., Hauber J., Singer T. P.* Phospholipase A of snake venoms. 1. Isolation and molecular properties of isoenzymes from *Naja naja* and *Vipera russelli* venoms.—J. Biol. Chem., 1971, v. 246, № 2, p. 331–339.
11. *Sugatani I., Kawasaki N., Saito K.* Studies on a phospholipase B from *Penicillium notatum*. Substrate specificity.—Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 296, № 2, p. 29–37.
12. *Kawasaki N., Saito K.* Purification and some properties of lysophospholipase from *Penicillium notatum*.—Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 296, № 2, p. 426–430.
13. *Hauser H., Phillips M. C., Levine B. A., Williams R. J. P.* Ion-binding to phospholipids. Interaction of calcium and lanthanide ions with phosphatidylcholine (lecithin).—Eur. J. Biochem., 1975, v. 58, № 1, p. 133–144.
14. *Chen J. H., Jang J. T., Martinez H. M.* Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion.—Biochemistry, 1972, v. 11, № 22, p. 4120–4131.
15. *Wells M. A.* Evidence that the phospholipase A<sub>2</sub> of crotalus adamanteus venom are dimers.—Biochemistry, 1971, v. 10, № 22, p. 4074–4078.
16. *Гуйчибаев М. У., Мухимов Ф. А., Ахмедова Н., Шкинев А. В., Мирходжаев У. З., Мурагова У. З., Алмагов К. Т., Рахимов М. М., Ташмукхамедов Б. А.* Характеристика некоторых мембраноактивных компонентов яда *Vespa orientalis*.—Биохимия, 1977, т. 42, № 12, с. 2160–2168.

Поступила в редакцию  
15.X.1980

#### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub> FROM THE *VESPA ORIENTALIS* HORNET VENOM

MIROSHNIKOV A. I., GRITSUK V. I., MESHCHERYAKOVA E. A.,  
OKHANOV V. V., TUCHIBAEV M. U., TASHMUKHAMEDOV B. A.

M. M. Shemyakin Institute of Biorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow; Institute of Biochemistry, Academy of Sciences  
of the Uzbek SSR, Tashkent

Phospholipase A<sub>2</sub> has been isolated from the venom of hornet *Vespa orientalis* using gel filtration and ion-exchange chromatography. The enzyme has a molecular weight of 16000 and shows a high lysophospholipase activity. Amino acid composition and the N-terminal sequence were determined. The conformational states of phospholipase A<sub>2</sub> were investigated by difference UV spectroscopy, CD and fluorescence, revealing a conformational transition around pH 2.3. Irreversible denaturation of the enzyme took place at pH higher than 9.5.