



УДК 577.152.07+547.963.04

**Na⁺-K⁺-АКТИВИРУЕМАЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗА
ИЗ ПОЧЕК СВИНЬИ****I. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТА
И ЕГО СУБЪЕДИНИЦ***Джанджугазян К. Н., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Из мозгового слоя почек свиньи модифицированным методом Йоргенсена с центрифугированием в ступенчатом градиенте плотности глицерина выделен иммунохимически гомогенный препарат Na⁺-K⁺-АТФ-азы. Фермент состоит из двух типов субъединиц: α (M 96000) и β (молекулярный вес белковой части 40000, углеводной — 7000). Субъединицы фермента разделены хроматографией на гидроксипанатите и гель-фильтрацией на биогеле А-1,5 m в присутствии додецилсульфата натрия. Определен аминокислотный и углеводный состав субъединиц и их N-концевая аминокислотная последовательность: H-Gly-Arg-Asx-Lys-Tyr- для α, H-Ala-Asn(OCH)-Gly-Thr-Ala- для β.

Неравновесное распределение одновалентных катионов между клеткой и средой у высших животных является результатом функционирования универсальной системы «Na⁺-насоса», или Na⁺-K⁺-АТФ-азы. Этот фермент, локализованный в плазматической мембране, осуществляет трансмембранный перепос ионов Na⁺ и K⁺ против градиента их электрохимических потенциалов в ходе катализируемой им многостадийной реакции гидролиза АТФ [1].

С целью выяснения структурных основ активного транспорта одновалентных катионов нами начаты исследования строения и пространственной организации Na⁺-K⁺-АТФ-азы из мозгового слоя почек свиньи. В данном сообщении описано выделение гомогенного препарата фермента и его субъединиц, определение их аминокислотного и углеводного состава и N-концевых аминокислотных последовательностей.

Для выделения фермента был использован метод Йоргенсена [2], заключающийся в избирательном удалении всех белковых компонентов мембраны, за исключением Na⁺-K⁺-АТФ-азы, остающейся в мембранном матриксе. В исходную методику был внесен ряд изменений (использование ступенчатого градиента глицерина вместо линейного градиента сахаразы, внесение образца в среднюю область градиента), что позволило упростить процедуру выделения и увеличить количество выделяемого фермента высокой удельной активности.

Смесь белок-липид-детергентных мицелл и фрагментов мембран, полученную в результате обработки фракции плазматических мембран доде-

ОСН — условное обозначение углеводной цепи, связанной гликозидной связью с аминокислотным остатком; SDS — додецилсульфат Na, ПААГ — полиакриламидный гель.

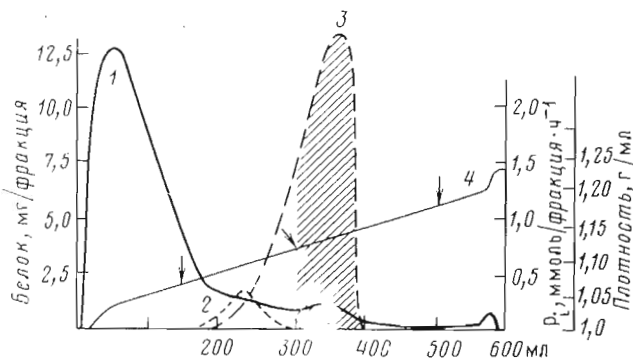


Рис. 1. Выделение $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы центрифугированием в линейном градиенте плотности глицерина. Объем фракций 16 мл. 1 — белок, 2 — оубаин-нечувствительная ATP -азная активность, 3 — $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -аза, 4 — градиент плотности. Заштрихованная область содержит только $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азу. Стрелки указывают выбранные величины плотностей для ступенчатого градиента глицерина

цилсульфатом натрия (SDS) в присутствии ATP , разделяли центрифугированием в ступенчатом градиенте плотности глицерина. В предварительных опытах, осуществляемых в линейном градиенте плотности глицерина (рис. 1), было установлено, что при центрифугировании большая часть балластного белкового материала остается в зоне низкой плотности, а $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -аза локализуется между пиком оубаин-нечувствительной ATP -азной активности и мембранными фрагментами, практически не обладающими ATP -азной активностью. Фракции заштрихованной области ATP -азного пика (рис. 1), по данным гель-электрофореза в присутствии SDS, не содержат белковых примесей, но, по-видимому, вследствие меньшей степени инактивации фермента, находящегося в зоне большей плотности градиента, последние фракции ATP -азного пика обладают наивысшей удельной активностью. На основании этих результатов и были выбраны характеристики ступенчатого градиента плотности глицерина, формируемого как описано в «Экспериментальной части». В результате центрифугирования в ступенчатом градиенте (табл. 1) очищенный препарат $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы, содержащий 70% исходной ферментативной активности, концентрируется на границе 1—2 (фракция I), отделяясь от неактивного белка, седиментирующего на дно пробирки, и от белкового материала, обладающего оубаин-нечувствительной ATP -азной активностью и концентрирующегося на последующей границе 2—3 (фракция II).

Использование глицерина, а не сахарозы для создания градиента плотности при выделении $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы, по нашему мнению, имеет ряд преимуществ. Во-первых, глицерин препятствует инактивации $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы детергентами [3], возможно, из-за большей диссоциации в глицериновых растворах связанных с белком молекул детергента [4]. Во-вторых, меньший коэффициент диффузии в глицериновых растворах обуславливает меньшее размывание и перекрытие белковых пиков. Внесение образца в среднюю область градиента, во-первых, уменьшает время неконтролируемого взаимодействия белка с детергентом и связанный с этим процесс инактивации фермента и, во-вторых, обуславливает миграцию фермента и солиubilизированных белковых примесей в противоположных направлениях, что предотвращает неспецифическую адсорбцию примесей на мембраносвязанном ферментном препарате. Предложенные модификации метода Йоргенсена позволили проводить в том же объеме градиента разделение в три раза больших количеств исходного белкового материала и использовать угловой, а не зональный ротор. Полученный ферментный препарат можно осадить скоростным центрифугированием после умень-

Очистка $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы в ступенчатом градиенте плотности глицерина

Фракция	Объем, мл	Количество белка, мг	Общая активность, P_i , мкмоль \cdot ч $^{-1}$		Удельная активность, P_i мкмоль \cdot мг белка $^{-1}$ \cdot ч $^{-1}$	
			Оубаин-нечувствительная	$\text{Na}^+\text{-K}^+$ -активируемая	Оубаин-нечувствительная	$\text{Na}^+\text{-K}^+$ -активируемая
Мембранная фракция	180	250	3750	5000	15	20
Мембранная фракция после обработки SDS	180	250	1400	44 600	5,6	178
Фракция I	90	17	12	32 800	0,7	1930
Тяжелая подфракция I	30	5,3	0	13 200	0	2490
Фракция II	120	18,4	1108	11 200	59	610
Фракция III	330	212	214	418	1,02	1,97
Осадок	—	2,4	0	38	0	15,8

шения плотности раствора, как и в исходном методе. Препарат обладает удельной активностью 1700—2400 P_i мкмоль \cdot мг белка $^{-1}$ \cdot ч $^{-1}$, и его хранение при -20° в буфере (рН 7,5), содержащем 0,25 М сахарозу, 30 мМ гистидин, не ведет к заметному снижению его активности в течение нескольких месяцев. При лиофилизации в этой среде активность уменьшается на 30% и сохраняется на этом уровне не менее года.

Препараты $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы независимо от способа их выделения являются полидисперсными липопротеидными комплексами, для анализа гомогенности белкового состава которых практически невозможно использовать такие традиционные методы, как, например, электрофорез в ПААГ и гель-фильтрация, поэтому в данном случае был применен метод иммунодиффузии по Ухтерлони. Иммунизацию кроликов проводили суспензией полученного мембраносвязанного препарата фермента. Поскольку необходимым условием применимости данного метода является независимая диффузия молекул антигена, требовалось подобрать условия солиubilизации исходного препарата $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы, не приводящие к искажению антигенной структуры белка и не мешающие взаимодействию антиген — антитело. Были испытаны следующие анионные и неионные детергенты: холат и дезоксихолат натрия, нонидет Р40, луброл РХ и тритон X-100. Используемые концентрации этих детергентов не превышали их критических концентраций для взаимодействия антиген — антитело [5]. Влияние детергентов контролировали, определяя количество преципитата, образуемого антителами с двумя формами $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы — мембранной и солиubilизированной, а также путем сравнения этих форм белка по иммунодиффузии в агаровом геле. На основании полученных результатов для солиubilизации $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы был выбран 1% раствор тритона X-100. Как видно из рис. 2, реакция преципитации с мембранной и солиubilизированной формами белка приводит к образованию одинакового количества преципитата в зоне эквивалентности, т. е. число взаимодействующих с ферментом антител не меняется. Иммунодиффузионное сравнение обеих форм $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы (рис. 3а) показывает, что широкая преципитационная полоса медленно диффундирующей мембранной формы полностью переходит в четкую полосу преципитации для солиubilизированного белка, что доказывает иммунохимическую идентичность обеих форм. В широком интервале концентраций солиubilизированного белка (6—100 мкг) при иммунодиффузии образуется единственная полоса преципитации, что свидетельствует об иммунохимической гомогенности выделенного фермента (рис. 3б).

Как и большинство ранее описанных препаратов фермента, полученный препарат $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы состоит из двух типов субъединиц с электрофоретическими подвижностями в присутствии SDS, соответствующими

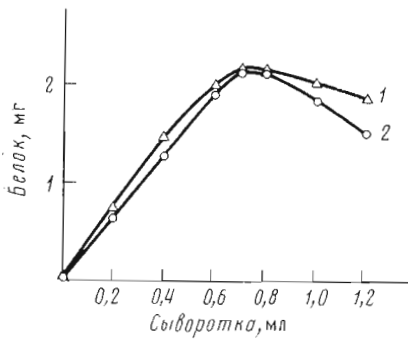


Рис. 2. Иммунопреципитация выделенного препарата фермента (0,5 мг) антителами против $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы в отсутствие детергента (1) и в присутствии 1% тритона X-100 (2)

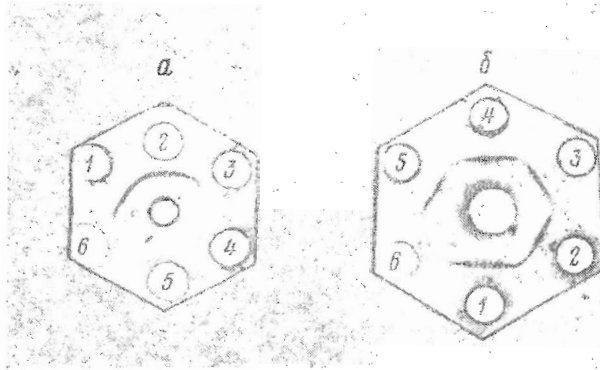


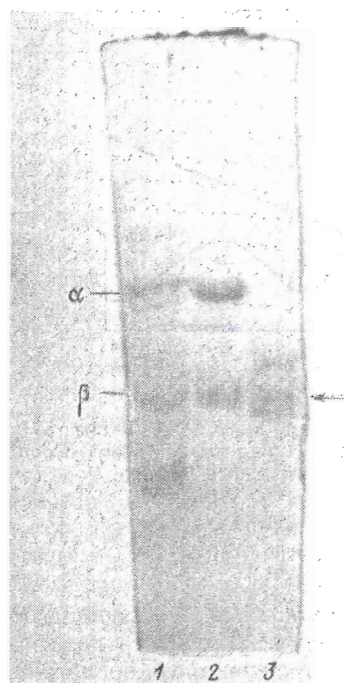
Рис. 3. Иммунодиффузия в агаре мембранного и солиобилизованного препаратов $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы. а) Лунки содержат: 1 — 50 мг белка, солиобилизованного в 1% тритоне X-100; 2—5 — последовательные пятикратные разведения мембранного препарата, начиная с 50 мкг. б) Лунки 5—1 содержат солиобилизованную в 1% тритоне X-100 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азу в последовательно двукратно возрастающих количествах (6—100 мкг). Гель содержит 0,5% тритон X-100. В центральных лунках — иммунная сыворотка, лунки б — контроль

M 96 000 (α) и 58 000 (β) (рис. 4). Из анализа полученных результатов следует, что в образце нет ни одного минорного компонента в количестве, превышающем 1% общего количества белка.

На рис. 4 для сравнения приведен электрофорез ближайших к $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азе фракций в легкой и тяжелой областях градиента. Видно, что в первой из них, обладающей $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - и оуабаллин-нечувствительной АТФ-азной активностями, кроме субъединиц $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы содержатся и другие белковые компоненты, в том числе меньшего молекулярного веса. Основным компонентом тяжелой области градиента является белок, близкий по электрофоретической подвижности к β -субъединице фермента. Сравнение этого белка с β -субъединицей показывает, что оба они содержат углеводный компонент, поскольку обе полосы окрашиваются реактивом Шиффа. Кроме того, оба белка элюируются с гидроксипатита буфером одинаковой ионной силы и имеют совпадающую N-концевую аминокислотную последовательность (см. ниже). На основании изложенных данных можно предположить, что мембранные фрагменты высокой плотности содержат преимущественно β -субъединицу фермента. Этот факт может отражать равновероятно как различия во взаимодействии субъединиц с мембранным матриксом в процессе выделения фермента, так и особенности биогенеза субъединиц.

Для препаративного разделения субъединиц $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы была разработана следующая методика [7]. Фермент диссоциировали на субъ-

Рис. 4. Электрофоретический анализ в ПААГ в присутствии SDS [6] фракций, полученных при выделении $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы центрифугированием в ступенчатом градиенте плотности глицерина. 1 — фракция II, проявляющая $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - и оубаин-нечувствительную ATP-азные активности; 2 — фракция I, проявляющая $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азную активность; 3 — осадок, не обладающий ATP-азной активностью. Стрелкой указана полоса, окрашиваемая реактивом Шиффа



единицы с помощью SDS. Полученную смесь хроматографировали на гидроксипатите с помощью линейного градиента концентраций натрий-фосфатного буфера (рис. 5). Фракции, содержащие преимущественно β^- (0,32 M) и α -субъединицы (0,5 M), концентрировали мембранной ультрафильтрацией в присутствии SDS, 1 mM EDTA и 1 mM дитиотреита таким образом, чтобы в конечном объеме был не менее чем 5-кратный весовой избыток детергента относительно количества белка (в противном случае наблюдалась сильная агрегация белкового материала). Полученные фракции очищали на биогеле A-1,5m (рис. 6). Таким образом удается разделить на индивидуальные субъединицы примерно половину исходного количества белка. Фракции, содержащие обе субъединицы, можно использовать для повторного разделения, однако разделить более 80% белка не удастся из-за агрегации субъединиц, происходящей несмотря на присутствие SDS, EDTA и дитиотреита. Подобные результаты получены при разделении субъединиц и для препарата $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы из почечной овцы [8].

Полученные препараты субъединиц были охарактеризованы с помощью электрофореза в ПААГ и определением N-концевых аминокислотных остатков (α — Gly, β — Ala). При определении N-концевых аминокислотных остатков фермента — как в мембраносвязанной форме, так и после диссоциации на субъединицы с помощью SDS — были обнаружены дансилы производные глицина и аланина. В то же время N-концевой остаток выделенной α -субъединицы в отличие от α -субъединицы в составе мембраносвязанного фермента становится доступным для дансирования только в присутствии не менее чем 1% SDS.

Сопоставление аминокислотного состава обеих субъединиц (табл. 2) показывает, что они различаются в наибольшей степени по содержанию метионина, тирозина и триптофана, и большее содержание последних двух аминокислот в β -субъединице следует иметь в виду при оценке относительных количеств субъединиц по их поглощению в ультрафиолетовой области. Поскольку β -субъединица фермента является гликопротеидом, то для определения молекулярного веса ее белковой части проводили флуориметрические измерения количества производного N-концевого ами-

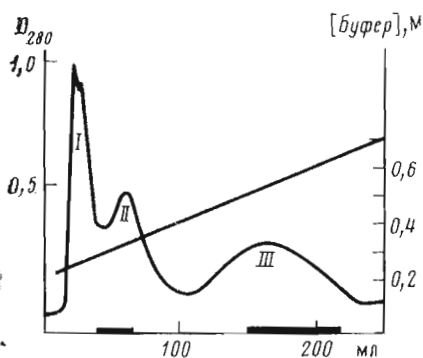


Рис. 5

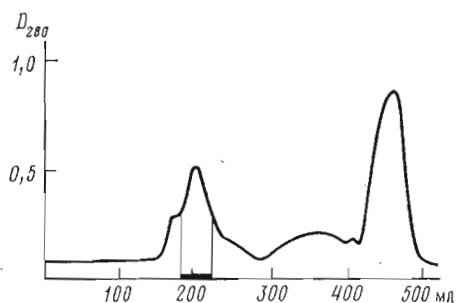


Рис. 6

Рис. 5. Разделение $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-азы}$ (50 мг) на субъединицы хроматографией на гидроксипатите (колонка $2,5 \times 5$ см) с использованием линейного градиента концентраций натрий-фосфатного буфера. Черные прямоугольники — объединенные фракции. Пик I не содержит белкового материала

Рис. 6. Очистка α -субъединицы $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-азы}$ (фракция III, рис. 5) на биогеле А-1,5 м в присутствии 0,1% SDS. Отмечена область выхода гомогенной α -субъединицы

нокислотного остатка, образующегося при дансильровании известного количества белка. Для этого измеряли флуоресценцию соответствующего дансильного производного после элюирования из слоя силикагеля [9]. Контрольные количества N-дансилалаина, как и дансильрованный образец белка, подвергали кислотному гидролизу, хроматографии и элюированию для коррекции потерь дансильного производного в образце. Молекулярный вес белковой части β -субъединицы, определенный этим методом, равен 40 000. Углеводная часть β -субъединицы, углеводный состав которой приведен в табл. 2, имеет M 7000. Следовательно, молекулярный вес β -субъединицы равен 47 000. Как известно, определение молекулярного веса гликопротеидов по электрофоретической подвижности в присутствии SDS часто приводит к завышенным значениям [10]. В данном случае величина M 58 000, определенная в ПААГ в присутствии SDS, также оказалась завышенной.

Определены N-концевые аминокислотные последовательности субъединиц. Попытки определения N-концевой последовательности α -субъединицы на секвенаторе не увенчались успехом, поэтому приведенные результаты получены методом Эдмана в дансильном варианте в присутствии SDS [11]. Определенная нами последовательность (H-Gly-Arg-Asx-Lys-Tyr-) полностью совпадает с N-концевой последовательностью α -субъединицы $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-азы}$ из солевой железы утки [12].

N-Концевая последовательность β -субъединицы (H-Ala-Asn(OCH)-Gly-Thr-Ala-) была определена на секвенаторе по стандартной методике, причем на втором цикле отщепления не удалось обнаружить Pth-производное какой-либо аминокислоты. При определении последовательности методом Эдмана в дансильном варианте в присутствии SDS на этой стадии был обнаружен Asx. Наличие в составе углеводной части β -субъединицы N-ацетилглюкозамина, а не N-ацетилгалактозамина, по-видимому, свидетельствует о том, что углеводные цепи присоединены N-гликозидными связями к остаткам аспарагина полипептидной цепи. Последовательность Asn-X-Thr характерна для места присоединения углеводов N-гликозидной связью [13]. Действительно, углеводный анализ экстрагированного водой тиазолинона, полученного во втором цикле отщепления, показал присутствие в нем сахаров, а аминокислотный анализ после кислотного гидролиза — наличие аспарагиновой кислоты. Следовательно, одна из углеводных цепей β -субъединицы присоединена к остатку аспарагина во втором положении полипептидной цепи.

Таблица 2

**Аминокислотный и углеводный состав субъединиц
Na⁺-K⁺-АТФ-азы**

Аминокислота, сахар	α (M 96 000)		β (M 47 000)	
	мольные %	число остатков	мольные %	число остатков
Asx	9,1	80,1	8,5	30,9
Thr	5,9	51,9	6,3	22,9
Ser	6,8	59,8	6,9	25,1
Glx	10,3	90,6	11,4	41,5
Pro	4,6	40,5	6,7	24,4
Gly	8,8	77,4	9,5	34,6
Ala	8,2	72,1	6,6	24,0
Val	6,7	58,9	6,5	23,7
Met	2,4	21,1	1,6	5,8
Ile	6,2	54,5	4,5	16,4
Leu	9,6	84,4	8,1	29,5
Tyr	2,6	22,9	4,4	16,0
Phe	4,6	40,5	4,3	15,7
His	2,0	17,6	1,7	6,2
Lys	5,2	45,7	6,0	21,8
Arg	4,6	40,5	4,0	14,6
Cys	2,1	18,5	2,4	8,7
Trp	0,3	2,6	0,6	2,2
Всего		878		364
Gal				6,8
Man				6,3
Fuc				1,1
GlcNAc				10,3
NeuNAc				3,9

Наличие в N-концевой области β-субъединицы углеводного компонента свидетельствует о том, что этот район полипептидной цепи экспонирован на наружной поверхности плазматической мембраны.

Разработка методов выделения гомогенных препаратов фермента и его субъединиц позволила начать исследования пространственной организации молекулы Na⁺-K⁺-АТФ-азы в мембране.

Экспериментальная часть

В работе использовали АТФ, имидазол, гистидин, EDTA (Reanal, Венгрия), холат, дезоксихолат, SDS, луброл РХ, тритон X-100 (Serva, ФРГ), понидет Р40 (BDH, Chemicals, Англия), оуабайн (Calbiochem, США), биогель А-1,5m (Bio-Rad, США), метансульфоновую кислоту (Pierce, США). Сахарозу (х.ч.), используемую для хранения препарата фермента, перекристаллизовывали из этанола; SDS, используемый для очистки фермента, — из 50 и 96% этанола.

Количество белка во фракциях определяли методом Лоури [14] с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта. В некоторых случаях, например при определении молекулярного веса β-субъединицы и ее углеводного состава, количество белка измеряли по аминокислотному составу.

АТФ-азную активность измеряли путем определения неорганического фосфата [15], Na⁺-K⁺-АТФ-азную активность определяли как разность между общей АТФ-азной активностью в среде, содержащей 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 2,5 мМ АТФ, 30 мМ гистидин (37° С, рН, 7,5), и оуабайн-нечувствительной АТФ-азной активностью, измеряемой в той же среде в присутствии 10⁻⁴ М оуабайна. АТФ-азную реакцию проводили 15 мин при 37° С.

Электрофорез в градиентном (4–30%) ПААГ в присутствии SDS проводили по методу Вебера и Осборн [6], гели окрашивали коллоидным раствором кумасси G-250 в 12,5% трихлоруксусной кислоте [16] или реактивом Шиффа [17]. Калибровочную кривую для определения молекулярного веса строили по следующим белковым стандартам: миоглобин, химо-трипсиноген А, яичный и бычий сывороточный альбумин, альдолаза из мышц кролика. Гидроксипатит готовили по методу [18], скорость сливания реагентов была уменьшена в 2 раза.

Аминокислотный состав определяли после кислотного гидролиза в течение 24 и 96 ч на автоматическом анализаторе D-500 (Dugum, США) [19], содержание цистеина — путем измерения количества цистеиновой кислоты, образовавшейся после окисления надмуравьиной кислотой [20], триптофан — после гидролиза белка 4 н. метансульфононой кислотой, содержащей 0,2% 3-(2-аминоэтил)индола [21]. Для аминокислотного и углеводного анализов тиазолинон, экстрагированный водой после циклизации и отщепления, гидролизovali в 57% HCl при 110° С в течение 24 ч. N-Концевые аминокислотные остатки определяли в виде Dns-производных [11].

Углеводный состав определяли после метанолиза образца 0,5 н. HCl в абсолютном метаноле (24 ч, 100° С, в атмосфере азота) и ре-N-ацетилирования [22]. Сахара идентифицировали в виде триметилсилильных производных с помощью ГЖХ [23] на газовом хроматографе «Hewlett Packard-57-10А» (США). Аминосакхара определяли после гидролиза образца 4 н. HCl при 100° С в течение 4–8 ч [24] на аминокислотном анализаторе D-500 (Dugum, США), спаловые кислоты — с 2-тиобарбитуровой кислотой по методу Уоррена [25].

Выделение фермента. Препарирование мозгового слоя почек свиньи, получение фракции цитоплазматических мембран и ее инкубацию с SDS проводили по методу Йоргенсена [2]. Дальнейшую очистку осуществляли центрифугированием в градиенте плотности глицерина. Все растворы для создания линейного и ступенчатого градиентов плотности глицерина или сахарозы, использованных в работе, содержали 25 мМ имидазол и 1 мМ EDTA (20° С, pH 7,5) — буфер А. При центрифугировании в линейном градиенте в зональном роторе создавали градиент плотности сахарозы или глицерина 1,059–1,181 г/мл объемом 450 мл, который завершался ступенью 50% сахарозы (50 мл). Образец (50 мл) также вносили в линейном градиенте плотности 1,025–1,059 г/мл, создаваемом добавлением сахарозы. После окончания центрифугирования (L5-50, Beckman, Австралия, ротор Ti-14; 4,5 ч, 34 000 об/мин, 4° С) содержимое ротора разливали на фракции по 16 мл, распределение компонентов смеси контролировали ультрафиолетовым детектором «Uvicord II» (LKB, Швеция) при 280 нм. Результаты центрифугирования показаны на рис. 1.

Ступенчатый градиент глицерина формировали в шести центрифужных стаканах объемом 90 мл каждый последовательным наслоением 10 мл 64% глицерина (ступень 1), 25 мл 44% глицерина (ступень 2), 25 мл образца, к которому после обработки SDS была добавлена сухая сахароза до концентрации 14% (ступень 3), 30 мл буфера (ступень 4). После окончания центрифугирования (L5-50, Beckman, ротор тип 35; 34 000 об/мин, 4,5 ч) со дна отбирали фракции: I — 15 мл (или эту же фракцию отбирали в два приема: 5 и 10 мл; первые 5 мл, содержащие Na⁺-K⁺-АТФ-азу наивысшей удельной активности, обозначены в табл. 1 как тяжелая подфракция фракции I), II — 20 мл, III — оставшиеся 55 мл. Осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 30 мМ гистидин-HCl (20° С, pH 7,2). Плотность фракций I и II, обладающих Na⁺-K⁺- и оубанин-чувствительной АТФ-азной активностями, уменьшали добавлением 1,5 объемов буфера А и мембранные фрагменты осаждали центрифугированием (L5-50, ротор тип 35, Beckman, 34 000 об/мин, 4 ч, 4° С). Полученные осадки ресуспендировали в том же буфере, что и осадок после

градиентного центрифугирования. Выделенные препараты характеризовали по удельной активности и с помощью электрофореза в ПААГ и хранили при -20°C .

Разделение субъединиц. $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATP-азу}$ (50 мг фракции I) растворяли в 25 мл раствора, содержащего 1% SDS, 1% β -меркаптоэтанол, 1 мМ EDTA, 10^{-4} М фенилметилсульфонилфторид, и инкубировали 3 мин при 100°C . Концентрацию SDS в смеси понижали до 0,2% добавлением 4 объемов буфера, содержащего 10 мМ натрий-фосфат, 1 мМ дитиотреит (20°C , pH 6,4), и со скоростью 50 мл/ч наносили на колонку с гидроксипатитом ($2,5 \times 5$ см), предварительно уравновешенным буфером, содержащим 10 мМ натрий-фосфат, 1 мМ дитиотреит, 0,1% SDS. После напеснения образца колонку промывали сначала буфером для уравновешивания, а затем натрий-фосфатным буфером с линейным градиентом концентраций 0,2–0,7 М (pH 6,4), содержащим 0,1% SDS, 1 мМ дитиотреит. Объем градиента 250 мл, скорость 20 мл/ч. Фракции, содержащие по данным электрофореза преимущественно одну из субъединиц, объединяли и концентрировали ультрафильтрацией (Amicon, модель 52, фильтр PM-30) следующим образом: к 50 мл объединенной фракции добавляли 500 мг SDS и 0,5 мл 100 мМ EDTA, концентрировали до 10 мл и после повторного добавления 500 мг SDS концентрировали до 2 мл. К образцу добавляли β -меркаптоэтанол до 1%, EDTA до 1 мМ, фенилметилсульфонилфторид до 10^{-4} М, полученную смесь инкубировали 3 мин при 100°C и наносили на колонку ($2,5 \times 90$ см) с биогелем A-1,5m (Bio-Rad, США, 100–200 меш). Фракции элюировали со скоростью 25 мл/ч буфером, содержащим 0,1 М трис- H_2SO_4 , 0,1% SDS, 0,02% азид натрия (20°C , pH 7,5). Полученные фракции анализировали электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS и определением N-концевых аминокислотных остатков.

N-Концевую аминокислотную последовательность субъединиц определяли в присутствии не менее чем 10-кратного весового избытка SDS (1–5%) по методу [11] со следующими модификациями: перед каждой стадией деградации белок прогревали 3 мин при 100°C в присутствии SDS, время реакции отщепления увеличивали до 10 мин, реакцию циклизации и отщепления проводили в атмосфере аргона после 3-кратного вакуумирования смеси.

Иммунохимический анализ. Для получения иммунной сыворотки группу из трех кроликов иммунизировали препаратом $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATP-азы}$ в подколенные лимфоузлы [26]. Сыворотку хранили при -20°C и использовали после инактивации системы комплемента (30 мин при 56°C) и центрифугирования (J-21B, ротор JS-7,5, 6000 об/мин, 30 мин, 4°C).

Для иммунопреципитации фермент и сыворотку инкубировали 30 мин при 37°C и затем сутки при 4°C . Иммунопреципитат осаждали и дважды отмывали в 0,14 М NaCl центрифугированием (6000 об/мин, 30 мин). В контрольных пробах инкубировали фермент с сывороткой тех же животных до иммунизации.

Иммунодиффузию по Ухтерлоу [27] в присутствии 0,5% тритона X-100 или без детергента проводили в 1% агаровом геле, содержащем 140 мМ NaCl, 0,02% азид натрия, 50 мМ имидазол (20°C , pH 8,0). Через 2 сут при 20°C проявлялись все полосы иммунопреципитации, дальнейшая инкубация в течение недели новых полос не выявляла.

Авторы глубоко признательны Н. А. Алдановой и М. Ю. Фейгиной, В. А. Маркину и И. Е. Федуловой за ценные советы и помощь при выполнении отдельных этапов данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shou J. C.* The (Na⁺+K⁺)-activated enzyme and its relationship to transport of sodium and potassium.— *Quart. Rev. Biophys.*, 1974, v. 7, № 3, p. 401–434.
2. *Jorgensen P. L.* Purification and characterization of (Na⁺+K⁺)-ATPase. III. Purification from the outer medulla of mammalian kidney after selective removal of membrane components by dodecylsulfate.— *Biochim. et biophys. acta*, 1974, v. 356, № 1, p. 36–52.
3. *Towle D. W., Copenhagen J. H., Jr.* Partial purification of a soluble (Na⁺+K⁺)-dependent ATPase from rabbit kidney.— *Biochim. et biophys. acta*, 1970, v. 203, № 1, p. 124–132.
4. *Кусов Ю. Ю., Калинин Н. А., Гоголашвили Л. М.* Удаление неионных детергентов ультрафильтрацией.— *Биоорг. химия*, 1978, т. 4, № 4, с. 832–835.
5. *Qualliere L. F., Anderson A. G., Meyers P.* Effect of ionic and nonionic detergents on antigen-antibody reactions.— *J. Immunology*, 1977, v. 119, № 5, p. 1645–1651.
6. *Weber K., Osborn M.* The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.— *J. Biol. Chem.*, 1969, v. 244, № 16, p. 4406–4412.
7. *Джаиджугазян К. Н.* Na⁺-K⁺-АТФ-аза почек свиньи: субъединичный состав и химическая характеристика субъединиц.— *Тезисы научных сообщений IV Всесоюзного биохимического съезда*. М.: Наука, 1979, т. 2, с. 33.
8. *Lane L. K., Potter J. D., Collins J. H.* Large scale purification of Na⁺, K-ATPase and its protein subunits from lamb kidney medulla.— *Preparative Biochem.*, 1979, v. 9, № 2, p. 157–170.
9. *Seiler N.* Use of dansyl reaction in biochemical analysis.— In: *Methods of biochemical analysis* (Glick D., ed.). N. Y.— London — Sydney — Toronto: Interscience publishers a division of J. Wiley, v. 18, p. 296–311.
10. *Nielsen T. B., Reynolds J. A.* Measurement of molecular weights by gel electrophoresis.— *Methods in Enzymology* (Hirs C. H. W., Timasheff S. N., eds). N. Y.— San Francisco — London: Acad. Press, 1978, v. 48, p. 3–10.
11. *Weiner A. M., Platt T., Weber K.* Amino terminal sequence analysis of proteins purified on a nanomole scale by gel electrophoresis.— *J. Biol. Chem.*, 1972, v. 247, № 10, p. 3242–3251.
12. *Hopkins B. E., Wagner H., Jr., Smith T. W.* Sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase of the nasal salt gland of the duck (*Anas platyrhynchos*).— *J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251, № 14, p. 4365–4371.
13. *Glick M. C.* Isolation and characterization of surface membrane glycoproteins from mammalian cells.— In: *Methods in Membrane Biology* (Korn E. D., ed.). N. Y.— London: Plenum Press, 1974, v. 2, p. 189–190.
14. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent.— *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.
15. *Fiske C. H., SubbaRow Y.* The colorimetric determination of phosphorus.— *J. Biol. Chem.*, 1925, v. 66, № 2, p. 375–400.
16. *Diezel W., Kopperschlager G., Hofmann E.* An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie brilliant blue.— *Anal. Biochem.*, 1972, v. 48, № 2, p. 617–620.
17. *Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H.* Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane.— *Biochemistry*, 1971, v. 10, № 13, p. 2606–2617.
18. *Levin O.* Column chromatography of proteins: calcium phosphate.— In: *Methods in Enzymology* (Colowick S. P., Kaplan N. O., eds). N. Y.— London: Acad. Press, 1962, v. 5, p. 27–32.
19. *Модянов Н. Н., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Потапенко Н. А., Шувалова Т. М.* Первичная структура α -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*.— *Биоорг. химия*, 1978, т. 4, № 2, с. 158–178.
20. *Moore S.* On the determination of cystine as cystic acid.— *J. Biol. Chem.*, 1963, v. 238, № 1, p. 235–237.
21. *Simpson R. J., Neuberger M. R., Liu T.-Y.* Complete amino acid analysis of protein from a single hydrolysate.— *J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251, № 7, p. 1936–1940.
22. *Pritchard D. G., Todd C. W.* Gas chromatography of methyl glycosides as their trimethylsilyl ethers. The methanolysis and re-N-acetylation steps.— *J. Chromatogr.*, 1977, v. 133, № 1, p. 133–140.
23. *Sweeley C. C., Bentley R., Makita M., Wells W. W.* Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1963, v. 85, № 16, p. 2497–2505.
24. *Spiro R. G.* Study of the carbohydrates of glycoproteins.— In: *Methods in Enzymology* (Ginsburg V., ed.). N. Y.— London: Acad. Press, 1972, v. 28, p. 3–4.
25. *Warren L.* Theobarbituric acid assay of sialic acids.— *J. Biol. Chem.*, 1959, v. 234, № 8, p. 1971–1975.
26. *Сидорова Е. В., Трудолюбова М. Г.* Иммунохимический метод выделения индивидуальных полирибосом.— В кн.: *Современные методы в биохимии*. М.: Медицина, 1977, с. 293–299.

27. *Ouchterlony O.* Immunodiffusion and immunoelectrophoresis.— In: Handbook of Experimental Immunology (Weir D. M., ed.). Oxford — Edinburg: Blackwell Scientific Publications, 1967, p. 655—660.

Поступила в редакцию
25.I.1981

**Na⁺-K⁺-ACTIVATED ADENOSINE TRIPHOSPHATASE FROM PIG KIDNEY.
I. ISOLATION AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF ENZYME AND ITS
SUBUNITS**

DZHANDZHUGAZYAN K. N., MODYANOV N. N., OVCHINNIKOV Yu. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

The immunochemically homogeneous preparation of Na⁺-K⁺-ATPase has been isolated from the outer medulla of pig kidney according to Jorgensen's procedure. The enzyme consists of two types of subunits, α (M.W. 96 000) and β (M.W. of protein and carbohydrate moieties 40 000 and 7000, respectively). The separation of subunits was achieved by chromatography on hydroxyapatite followed by gel filtration on Bio-Gel A-1,5 m in the presence of SDS. The amino acid and carbohydrate composition of the subunits were determined and their N-terminal sequences were established as II-Gly-Arg-Asx-Lys-Tyr- for α and II-Ala-Asn(OCH)-Gly-Thr-Ala- for β subunit.
