



УДК 577.153.211 : 547.953.04

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ А₂ С ФОСФОЛИПИДАМИ, ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ НА ОРГАНОКРЕМНЕЗЕМНЫХ СОРБЕНТАХ

Евстратова Н. Г., Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П.

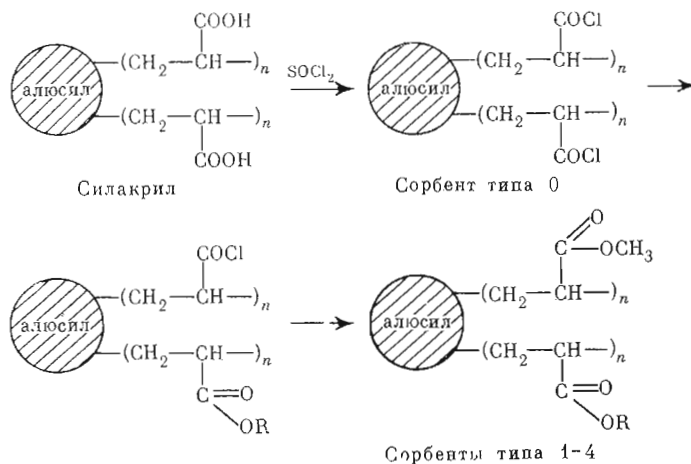
*Московский институт тонкой химической технологии
им. М. В. Ломоносова*

Описано получение биоспецифических сорбентов на основе силохрома с включением различных фосфолипидных лигандов. Изучено взаимодействие иммобилизованных липидов с фосфолипазой А₂ на всех сорбентах; при этом максимальное мольное отношение фосфолипид: фермент составляло 15–17 и не зависело от типа иммобилизованного фосфолипида.

Иммобилизация различных биологически активных соединений на сорбентах приобретает все большее развитие благодаря многосторонности вопросов, решаемых с помощью данного метода исследования. Она широко используется для аффинной хроматографии биополимеров, производства оптически активных аминокислот [1], исследования различных мембранных процессов [2]. Иммобилизация может быть использована как инструмент для получения количественных характеристик субстрат-ферментного взаимодействия.

В данной работе изучалось взаимодействие фосфолипазы А₂ (КФ 3.1.1.4) с фосфолипидами (I–IV) [3], ковалентно присоединенными к матрице. Матрицей служил силохром, обработанный солями алюминия и различными органическими полимерами, в частности полнакриловой кислотой. Характеристика сорбентов с иммобилизованными липидами приведена в табл. 1.

Иммобилизация липидов (I)–(IV), содержащих свободную гидроксильную группу, осуществлялась по типу сложпоэфирной связи после предварительного перевода сорбента в его хлорангидридную форму (схема). Неотреагировавшие карбоксильные группы метилировались, и сорбент после многократных промывок органическими растворителями, а затем дистиллированной водой нацелился на колонку с целью дальнейшего изучения процесса связывания фосфолипазы А₂ с фосфолипидами, иммобилизованными на сорбенте.



R – остаток фосфолипида (I)–(IV).

Характеристика биоспецифических сорбентов с иммобилизованными фосфолипидами

Тип сорбента	Содержание СООН-групп в сил-кроводе, г-экв/г	Лиганд	Структура лиганда	Степень посадки лиганда, мкмоль/г
1	0,58	<i>rac</i> -1-О-(2-оксигексадецил)-2-пальмитонил-глицеро-3-фосфохолин (I)	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3 \\ \\ \text{CHOCOC}_{15}\text{H}_{31} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_2\text{OPOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{O}^- \end{array} $	8,0
2	0,78	3-О-(2-оксигексадецил)-2-стеаронил- <i>sn</i> -глицеро-1-фосфохолин (II)	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3 \\ \\ \text{CHOCOC}_{17}\text{H}_{33} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_2\text{OPOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{O}^- \end{array} $	12,3
3	0,69	3-О-(2-оксигексадецил)-2-тридецил- <i>sn</i> -глицеро-1-фосфохолин (III)	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3 \\ \\ \text{CHOCN}_2(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_2\text{OPOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{O}^- \end{array} $	7,3
4	0,69	<i>rac</i> -2-каприноил-глицеро-1-(β-хлорэтил)фосфат (IV)	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOCOC}_8\text{H}_{17} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_2\text{OPOCH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \\ \\ \text{O}^- \end{array} $	7,5

Таблица 2

Связывание фосфолипазы A₂ с липидами на биоспецифических сорбентах

Тип сорбента	Количество сорбента, г	Общее количество фосфолипида, мкмоль	Количество связанной фосфолипазы A ₂ , мг	Мольное отношение фосфолипид — фермент *
1	0,2	1,6	2,0	17
2	1,38	17,0	14,2	16
3	0,48	3,5	3,1	15
4	0,40	3,0	2,8	15

* Рассчитано, исходя из молекулярного веса фосфолипазы A₂, равного 13 500.

Источниками фосфолипазы A₂ служил яд дальневосточного щитомордника *Agkistrodon halys blomhoffii*. Предварительное выделение фермента было проведено на сорбенте типа 1 и описано ранее [4].

Фосфолипазу A₂ наносили на колонку с данными сорбентами в трис-НСI-буфере, содержащем ионы Ca²⁺. В указанных условиях комплекс фермент — субстрат образовывался за 12–14 ч при 4° С. Промывание биоспецифических сорбентов исходным буфером приводило к элюированию фермента, не связанного с иммобилизованным фосфолипидом. Исключение из буфера ионов Ca²⁺ способствует разрушению комплекса фермент — субстрат и элюированию оставшейся на колонке фосфолипазы A₂.

Активность фосфолипазы A_2 , определяемая ацидометрическим методом [5], после нанесения фермента на сорбент не изменялась и составляла $80 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$. Количество фосфолипазы A_2 , связываемой с фосфолипидным лигандом, зависело от общего количества липида на сорбенте (табл. 2). Расчеты показали, что 1 моль фермента связывается с 15–17 моль фосфолипида.

Поскольку в процессе выделения фосфолипазы A_2 на сорбентах типа 1 и 4 с рацемическими фосфолипидами происходит частичное отщепление жирной кислоты из второго положения липидной молекулы, а количество связываемой фосфолипазы A_2 , определяемое в результате проведения 5–6 опытов, остается неизменным, комплекс фосфолипаза — фосфолипид образуется не только с исходным лигандом, но и с его лизопроизводным.

Как видно из табл. 2, исследованные фосфолипиды имеют одинаковую степень связывания с ферментом и эта величина не зависит существенно от структуры фосфолипида. Полученные данные подтверждают известный из ряда сообщений факт, что в образовании комплекса фосфолипаза — фосфолипид главную роль играет фосфатная группировка, которая осуществляет связь с катионным центром фермента [6]. Для данного процесса образования комплекса фосфолипаза — липид, по-видимому, не существенна роль катионной головки лецитина, имеющей, однако, определенное значение в связывании субстрата активным центром фермента в иных условиях [6–8].

Экспериментальная часть

В качестве исходного сорбента был использован силихром отечественного производства с диаметром пор 1130 \AA и $S_{\text{уд}} 34 \text{ м}^2/\text{г}$. Обработку силихрома солями алюминия проводили по методу [9]. Концентрацию фосфолипида на сорбенте определяли по методу Аллена — Бартлега [10]. Минерализацию фосфора осуществляли обработкой 70%-ной HClO_4 при $200\text{--}300^\circ \text{C}$ в течение 20–30 мин. Содержание белка при хроматографировании определяли, измеряя поглощение растворов при 280 нм на приборе *Spectord UV VIS*.

Получение биоспецифических сорбентов. Сорбент типа 1 был получен ранее [11]. Сорбент типа 0. К 1,0 г силакрида с различным содержанием карбоксильных групп в 20 мл сухого хлороформа добавляли 0,4 мл SOCl_2 и 0,1 мл диметилформамида. Реакционную массу перемешивали 2 ч при 60°C . Сорбент отфильтровывали и промывали 150 мл сухого хлороформа. Сорбент типа 2. К 1,0 г сорбента типа 0 в 20 мл сухого хлороформа добавляли 10 мг фосфолипида (II) и 0,1 мл триэтиламина, перемешивали 24 ч при $18\text{--}20^\circ \text{C}$. Сорбент отфильтровывали и промывали 200 мл сухого хлороформа, 100 мл метанола, выдерживали 30 мин в растворе метанола, промывали далее 150 мл ацетона, сушили в вакууме при 40°C . Концентрация фосфатидилхолина (II) $12,3 \text{ мкмоль/г}$. Сорбент типа 3 получали аналогично сорбенту типа 2 из 1,0 г сорбента типа 0 и 20 мг фосфолипида (III) в 20 мл сухого хлороформа. Концентрация фосфатидилхолина (III) $7,3 \text{ мкмоль/г}$. Сорбент типа 4 получали в условиях синтеза сорбента типа 2 из 1,0 г сорбента типа 0 и 50 мг фосфолипида (IV) в присутствии 0,4 мл триэтиламина. Концентрация фосфолипида (IV) $7,5 \text{ мкмоль/г}$.

Взаимодействие фосфолипазы A_2 с иммобилизованными липидами. На колонку с указанным в табл. 2 количеством сорбента наносили 10–20 мг фосфолипазы A_2 в буфере 50 мМ трис-HCl (pH 8,0), 25 мМ CaCl_2 , 0,2 М NaCl, 1 мМ EDTA. Колонки оставляли на 12–14 ч при 4°C и затем промывали исходным буфером (100 мл). Связанную фосфолипазу A_2 элюировали буфером 50 мМ трис-HCl (pH 8,0), 50 мМ EDTA. Фракции, содержащие фосфолипазу A_2 , обессоливали на колонке с сефадексом G-25 и лиофилизовали.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tosa T., Mori T., Fuse T., Chibata I. *Agric. and Biol. Chem.*, 1969, v. 33, № 6, p. 1047-1052.
2. Барсуков Л. И., Кисель М. А., Иванова В. И., Бергельсон Л. Д. *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 6, с. 923-926.
3. Евстратова Н. Г., Позмогова Г. Е., Серпухова Е. М., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. *Биоорган. химия*, 1982, т. 8, № 7, с. 998-1003.
4. Евстратова Н. Г., Мирошников А. И., Айалян А. Е., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. *Биохимия*, 1982, т. 47, № 9, с. 1547-1551.
5. Апсалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. *Биоорган. химия*, 1977, т. 3, № 11, с. 1553-1559.
6. Брокерхофф Х., Дженсен Р. *Липолитические ферменты*. М.: Мир, 1978, с. 270-276.
7. Суханов В. А., Сидоров О. Ю., Оганов В. В., Башарули В. А., Швец В. И., Мирошников А. И. *Биохимия*, 1981, т. 15, № 1, с. 139-144.
8. Литвинко Н. М., Хурган Ю. И., Каверзнева Е. Д. *Биохимия*, 1977, т. 42, № 1, с. 85-91.
9. А.с. 688431 (СССР). Способ получения модифицированного кремнеземного носителя. Артемова А. А., Варламов В. П., Киселев А. В., Кустова Г. А., Линкин Б. А., Никитин Ю. С., Рогожин С. В., Фалина А. С. Заявл. 29.XII.1977, № 2560649. Опубл. в Б.И., 1979, № 36.
10. Кейтс М. *Техника липидологии*. М.: Мир, 1975.
11. Евстратова Н. Г., Василенко И. А., Кондрагьева Н. Ю., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П., Варламов В. П., Семенова Н. Н., Рогожин С. В. *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 8, с. 1355-1360.

Поступила в редакцию
24.V.1982

PHOSPHOLIPASE A₂ INTERACTION WITH PHOSPHOLIPIDS IMMOBILIZED ON ORGANO-SILICA SUPPORTS

EVSTRATOVA N. G., SEREBRENNIKOVA G. A., EVSTIGNEEVA R. P.

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

The synthesis of biospecific sorbents of an organo-silica type involving different phospholipid ligands is described. The interaction of immobilized lipid with phospholipase A₂ was studied. Maximal molar ratio phospholipid: enzyme 15-17 independently of the type of immobilized phospholipids.