

УДК 612.173.1.015.1:577.15.013

БИОХИМИЯ

Г. М. БОРИСКИНА

## МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВЕС НАД-ГЛЮКОГИДРОЛАЗЫ МЫШЦЫ СЕРДЦА КРОЛИКА

(Представлено академиком С. Е. Севериным 8 I 1974)

НАД-глюкогидролаза или НАДаза (КФ 3.2.2.5) — фермент, участвующий в деградации никотинамидных коферментов с освобождением свободного никотинамида, обнаружен в различных животных и растительных тканях, а также у микроорганизмов (<sup>1-3</sup>). Фермент прочно связан со структурой микросом и может быть солюбилизирован протеолитической или липолитической обработкой (<sup>4</sup>). Имеющиеся в литературе данные по определению молекулярного веса НАД-глюкогидролаз, выделенных из различных источников, дают основание предположить, что фермент может существовать в формах, различающихся по четвертичной структуре. Так, для НАДазы из селезенки лошади установлен молекулярный вес порядка 100 000 (<sup>4</sup>), а для фермента мозга свиньи всего 26 000 (<sup>5</sup>). НАДаза из печени кролика представлена двумя формами: с молекулярным весом 89 000 и 160 000 (<sup>6</sup>).

В отличие от НАД-глюкогидролаз, выделенных из различных животных тканей, НАДаза сердца кролика характеризуется рядом особенностей: она не переходит в растворимое состояние при обработке микросомом трипсином или липазой, обладает сравнительно низкой трансглюкозидазной активностью (<sup>7</sup>), легко инактивируется при фотоокислении (<sup>8</sup>) и не тормозится производными аденина в концентрации порядка  $10^{-3}$  М. В продолжение изучения особенностей свойств НАД-глюкогидролазы мышцы сердца в настоящей работе было проведено определение молекулярного веса фермента.

Фракцию микросом сердца кролика выделяли по модифицированному методу Цатмана (<sup>9</sup>). Фермент солюбилизировали фосфолипазой А\* из яда кобры Наја паја в 0,05 М фосфатном буфере рН 7,2 при 37° в течение 3 час., соотношение белка фосфолипазы к белку микросом составляло 1:40. Солюбилизацию микросомальной фракции 0,2% тритоном Х-100 проводили в 0,05 М фосфатном буфере рН 7,2 при 0° в течение 40 мин. Затем пробы центрифугировали при 105 000 g в течение 1 часа и полученную надосадочную жидкость использовали в качестве источника фермента. Молекулярный вес солюбилизированного фермента определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на сефадексе G-200 (<sup>10</sup>) и методом диск-электрофореза в линейном градиенте (от 3 до 20%) полиакриламида (<sup>11</sup>). ТСХ проводили в присутствии белков с известным молекулярным весом: химотрипсиногена, яичного альбумина, креатинкиназы, дегидрогеназы фосфоглицеринового альдегида и пируваткиназы (<sup>12</sup>). Отношение длины продвижения белков к пути продвижения химотрипсиногена ( $R_{хтр}$ ) является линейной функцией от логарифма молекулярного веса. Препараты НАДазы хроматографировали на одной пластинке с перечисленными стандартными белками (рис. 1). Для диск-электрофореза использовали трис-глициновый электродный буфер рН 8,3. Электрофорез

\* Препарат фосфолипазы А был предоставлен А. И. Арчаковым, за что автор выражает ему благодарность.

проводили в течение 3 час. при силе тока 2—3 ма на трубочку. Для построения калибровочной кривой при определении молекулярного веса НАДазы методом диск-электрофореза в качестве стандартов использовали бычий сывороточный альбумин (мономер, димер, тример, тетрамер) и каталазу (рис. 2). Ферментативная активность определялась в элюатах цианидным и энзиматическим (с алкогольдегидрогеназой) методами (<sup>13</sup>).

При хроматографировании препаратов НАДазы, солюбилизированных фосфолипазой и тритоном X-100, обнаруживалось несколько белковых пятен. Однако ферментативная активность всегда была сосредоточена

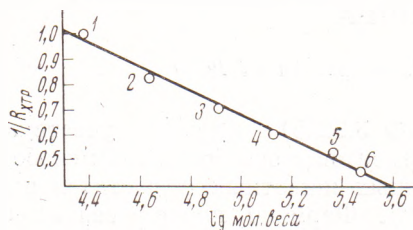


Рис. 1

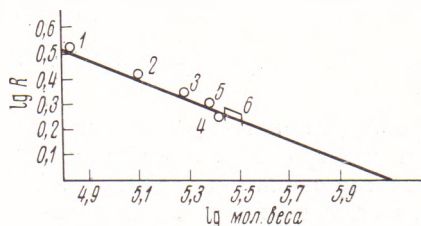


Рис. 2

Рис. 1. Стандартная кривая для определения молекулярного веса методом тонкослойной хроматографии на сефадексе С-200. 1 — химотрипсиноген, 2 — яичный альбумин, 3 — креатинкиназа, 4 — дегидрогеназа фосфоглицеринового альдегида, 5 — пируваткиназа, 6 — НАДАЗа

Рис. 2. Стандартная кривая для определения молекулярного веса методом диск-электрофореза в линейном градиенте. 1 — альбумин (мономер), 2 — альбумин (димер), 3 — альбумин (тример), 4 — альбумин (тетрамер), 5 — каталаза. R — расстояние, пройденное белком. 6 — зона НАДАЗы

лишь в одном пятне, обладающем наибольшей подвижностью. Молекулярный вес НАД-глюкогидролазы по данным ТСХ на сефадексе G-200 равен 300 000.

Электрофореграммы препаратов НАДазы, солюбилизированных фосфолипазой и тритоном X-100, обнаруживали ряд белковых полос. Электрофоретическая подвижность обоих ферментных препаратов оказалась одинаковой. Активность НАДазы обнаруживалась в зоне, длина которой составляла 0,3 см. Молекулярный вес НАДазы по данным диск-электрофореза может колебаться в пределах 280 000—320 000. Полученные разными методами данные по определению молекулярного веса НАДазы мышцы сердца близки и заставляют признать, что такие различные по своей природе солюбилизирующие агенты, как фосфолипаза и тритон X-100, переводят НАДАЗу в растворимое состояние в одинаковой форме.

Приведенные в настоящей работе данные указывают на то, что по молекулярному весу НАД-глюкогидролаза мышцы сердца отличается от аналогичного фермента других органов и тканей. Высокий молекулярный вес НАДазы, вероятно, указывает либо на наличие олигомерных форм фермента в мышце сердца, либо на ассоциацию НАДазы с какими-то другими белками. Последнее предположение не лишено оснований, так как для некоторых бактериальных НАДаз показано наличие слабодиссоциирующих комплексов с термолабильными белками (<sup>3</sup>). Явление диссоциации — ассоциации, возможно, имеет место и для НАД-глюкогидролазы из селезенки крысы, представленной формами с молекулярными весами 78 000 и более 200 000 (<sup>14</sup>).

Автор приносит глубокую благодарность С. Е. Северину и Л. А. Цейтлину за постоянное внимание и ценные советы при выполнении данной работы.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
19 XII 1973

# ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> N. J. Swislocki, N. O. Kaplan, J. Biol. Chem., v. 242, 1089 (1967).
- <sup>2</sup> D. Stathakos, J. Isaakidon, H. Thomou, Biochim. et biophys. acta, v. 302, 80 (1973).
- <sup>3</sup> J. H. Mather, M. A. Knight, Biochem. J., v. 129, 141 (1972).
- <sup>4</sup> L. Bovalini, P. Mortelli et al., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., v. 48, 762, 1972 (1973).
- <sup>5</sup> N. J. Swislocki, N. O. Kaplan, J. Biol. Chem., v. 242, 1083 (1967).
- <sup>6</sup> S. Green, A. Dobrjansky, Biochemistry, v. 10, 4533 (1971).
- <sup>7</sup> Г. М. Борискина, Л. А. Цейтлин, ДАН, т. 207, 464 (1972).
- <sup>8</sup> А. З. Приходько, Бюлл. эксп. биол. и мед. т. 76, № 12 (1973).
- <sup>9</sup> А. З. Приходько, Л. А. Цейтлин, С. Е. Северин, Биохимия, т. 39, 1 (1974).
- <sup>10</sup> B. J. Radola, J. Chromat., v. 38, 61 (1968).
- <sup>11</sup> G. Kopperschlager, M. Diezel, B. Bierwagen, FEBS Letters, v. 5, 221 (1969).
- <sup>12</sup> D. W. Darnall, J. M. Klotz, Arch. Biochem. and Biophys., v. 149, 1 (1972).
- <sup>13</sup> С. Е. Северин, Л. А. Цейтлин, Т. Н. Дружинина, Биохимия, т. 28, 145 (1963).
- <sup>14</sup> V. Pallini, P. Neri, C. Ricci, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., v. 44, 1355 (1968).