

А. А. КРИЧЕВСКАЯ, А. И. ЛУКАШ, К. Б. ШЕРСТНЕВ

**РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МОЗГА СОЧЕТАНИЕМ МЕТОДОВ  
ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ФОКУСИРОВАНИЯ И ЭЛЕКТРОФОРЕЗА  
В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 26 X 1972)

Исследованиями последних лет установлена чрезвычайная гетерогенность белков головного мозга по аминокислотному составу, молекулярному весу, способности к образованию комплексов с высоко- и низкомолекулярными соединениями (1-3). Способность к межмолекулярной ассоциации, которая, по-видимому, играет важную роль в специфических функциях белков мозга, в большой степени зависит от состояния заряженных функциональных групп белковых молекул. При различных функциональных и патологических состояниях мозга обнаруживаются модификации амидированности белков мозга (4), влекущие за собой изменение заряда. Однако заряд разных фракций белков, равно как и электростати-

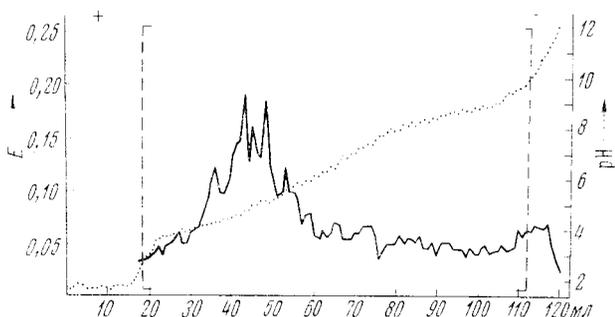


Рис. 1. Профиль изоэлектрических точек белков фракции Б. Скобками указан интервал градиента pH

ческие свойства зависят от многих условий и могут быть использованы для характеристики белков только при тщательном их соблюдении.

Для характеристики белков мозга мы использовали метод изоэлектрического фокусирования с помощью оборудования фирмы LKB (Швеция).

К настоящему времени нам известна только одна работа (5), в которой данный метод применен для анализа белков мозга. Использование метода для разделения белков мозга осложняется большой нестабильностью растворимых белков мозга в изоэлектрических точках. Авторы использовали для предотвращения преципитации белков денатурирующие (6 M) концентрации мочевины (5).

Целью настоящей работы явилась характеристика водорастворимых белков мозга сочетанием методов изоэлектрического фокусирования без применения мочевины и диск-электрофореза в полиакриламидном геле. Предварительными экспериментами было установлено, что прямое изоэлектрическое фокусирование водорастворимых белков мозга в амфолнах

невозможно вследствие образования мощного преципитата в области рН 5. Освобождение от преципитирующих белков достигалось предварительной обработкой водорастворимой фракции ацетатным буфером рН 5.

Из головного мозга белых крыс весом 150—200 г при  $-14^{\circ}$  готовили ацетоновые порошки. 600 мг порошка экстрагировали 12 мл дистиллированной воды 18 час. при  $4^{\circ}$  на вибраторе (50 гц). После центрифугирования (5000 г, 15 мин.) супернатант обрабатывали равным объемом ацетатного буфера рН 5. Выпавший осадок (фракция А) отделяли центрифугированием (5000 г, 5 мин.), раствор помещали в термостат при  $37^{\circ}$  на 30 мин. и вновь центрифугировали 15 мин. Фракцию А отмывали разведенным вдвое ацетатным буфером и растворяли в трис-глицериновом буфере рН 8,3.

Растворимые при рН 5 белки освобождали от ацетатного буфера на колонке ( $4,5 \times 22$  см) с сефадексом Г-25 крупнозернистым и переводили в 1% водный раствор глицина. Раствор центрифугировали 30 мин. при 20 000 г. Супернатант (фракция Б) вносили в колонку для изоэлектрического фокусирования (LKB 8100—1,110 ml). Заполнение колонки проводили по методике LKB 8100 Ampholine\*. Для уменьшения преципитации белков в колонке растворы содержали глицин в 1% концентрации. Изоэлектрическое фокусирование проводили в 1% растворах амфолинов в интервале рН 3—10 при ступенчатом изменении режима: 100 в — первые 24 часа, 200 в 16 час., 300 в 5 час при температуре  $0^{\circ}$ .

Оптическую плотность при 280 м $\mu$  измеряли с помощью проточного спектрофотометра Увикорд II, запись на самопишущем потенциометре LKB 6500. Параллельно собирали фракции по 1 мл на автоматическом коллекторе фракций Ультрарак 7000. Во фракциях проводили измерение рН ( $t = 4^{\circ}$ ) и оптической плотности на спектрофотометре СФ 4А.

Кроме того, во фракциях А и В определяли концентрацию белка по методу Лоури ( $^{\circ}$ ), снимали их у.-ф. абсорбционные спектры и подвергали диск-электрофорезу в системе гелей № 1 по Мауреру ( $^{\circ}$ ).

Фракция А составляла 52—55% от суммы водорастворимых белков. В среднем при экстракции водой в раствор переходило 20 мг белка на 100 мг ацетонового порошка. Таким образом, содержание белков, нерастворимых при рН 5, составило около 10 мг на 100 мг ацетонового порошка.

Изоэлектрические точки белков фракции Б (рис. 1) преимущественно распределены в довольно узком интервале (4,2—5,6) значений рН. В этой области расположены 5 наиболее крупных фракций. Три значительно меньших фракции, возможно, соответствуют формам гемоглобина, находятся в изоточках при рН 6,7; 6,9; 7,3. На профилях изофокусирования обнаруживается минимум при рН 7,7. Следует отметить хорошую воспроизводимость результатов, полученных в 6 экспериментах.

Ультрафиолетовый спектр фракции Б (рис. 2) имел максимум при 280 м $\mu$  и не обнаруживал нуклеотидной составляющей. Анализ электрофореграмм белков фракции Б показывает, что она преимущественно содержит белки, характеризующиеся средней электрофоретической подвижностью (рис. 3) сывороточных  $\gamma, \alpha_1, \alpha_2$ -глобулинов и альбумина.

Полученные нами профили изоэлектрических точек (рис. 1) свидетельствуют, что подавляющее число водорастворимых белков мозга имеет изоточки в кислой области рН (4—6). Это согласуется с данными, полу-

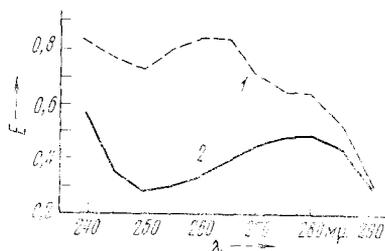


Рис. 2. У.-ф. абсорбционные спектры фракций. 1 — фракция А, 2 — фракция Б

\* LKB 8100 Ampholine, Instruction Manual, LKB Producter AB, Bromma 4, Sweden.

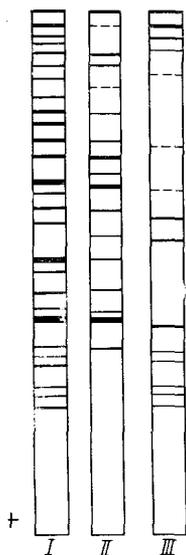


Рис. 3. Схемы диск-электрофореграмм. I — сумма водорастворимых белков, II — фракция Б, III — фракция А

ченными при изоэлектрическом фокусировании растворимых белков мозга хомячка<sup>(5)</sup>. Вероятно, одной из причин малого содержания фракций белков с изоэлектрическими точками при физиологических значениях рН является их нестабильность в изоэлектрическом состоянии, связанная с уменьшением растворимости. Преимущественная локализация изоточек при кислых значениях рН свидетельствует о преобладании дикарбоновых аминокислот в белках мозга, что согласуется с литературными данными<sup>(8)</sup>.

Таким образом, при физиологических значениях рН основная масса белков мозга характеризуется преобладанием свободного отрицательного заряда, что, возможно, является необходимым условием, контролирующим растворимость и функциональную активность за счет действия электростатических сил.

У.-ф. абсорбционный спектр фракции А, растворенной в триглицериновом буфере рН 8,3 (рис. 2), свидетельствует о присутствии в ней нуклеопротеидов. При электрофоретическом разделении в полиакриламидном геле фракции А на электрофореграммах обнаруживаются белковые фракции, которые соответствуют по своей электрофоретической подвижности сывороточным  $\gamma$ -глобулинам и преальбуминам (рис. 3). Исследованиями<sup>(9)</sup> установлено, что фракция с максимальной электрофоретической подвижностью является нуклеопротеидом, что соответствует полученным нами данным.

Фракция А растворима также при высокой ионной силе в 2 М NaCl. Можно предположить, что преципитация при рН 5 обусловлена межмолекулярным взаимодействием наиболее кислых белков, сохраняющих отрицательный заряд при этих условиях, и фракциями с минимальной электрофоретической подвижностью при рН 8,3, перешедшими в изоэлектрическое состояние или изменившими знак заряда при рН 5.

Ростовский-на-Дону государственный университет

Поступило  
14 X 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> S. Bogoch et al., *Nature*, **204**, 4953, 73 (1964). <sup>2</sup> B. W. Moore, D. McGregor, *J. Biol. Chem.*, **240**, 1647 (1965). <sup>3</sup> E. G. Brunngraber, W. G. Оссому, *Biochem. J.*, **97**, 3, 689 (1957). <sup>4</sup> З. С. Гершеневич, А. А. Кричевская, *Биохимия*, **25**, 2, 310 (1960). <sup>5</sup> A. L. Griffith, A. La Velle, N. Catsimproolas, *Brain. Res.*, **24**, 3, 537 (1970). <sup>6</sup> O. H. Lowery et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951). <sup>7</sup> Г. Маурер, *Дискэлектрофорез*, М., 1971. <sup>8</sup> A. Lajtha, *Intern. Rev. Neurobiol.*, **6**, 1 (1964). <sup>9</sup> Л. С. Смерчинская, Я. В. Белик, Г. А. Бережной, *Укр. биохим. журн.*, **41**, 1, 3 (1972).