

УДК 577.158

БИОХИМИЯ

И. Г. БОРИСОВА, Н. В. ЧЕПУРЕНКО, Е. В. БУДНИЦКАЯ

ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СОСТАВ ЛИПОКСИГЕНАЗЫ СЕМЯН ГОРОХА

(Представлено академиком А. И. Опариным 30 I 1975)

Широкое распространение липоксигеназы в тканях растений, присутствие ее во всех структурах клетки (¹, ²), участие в процессах перекисного окисления ненасыщенных высших жирных кислот, определяющих стабильность структуры и функций мембраны внутриклеточных органелл (³), — все это делает актуальным исследование изоферментного состава липоксигеназы.

В настоящее время наиболее подробно изучена липоксигеназа соевых бобов, откуда этот фермент был впервые выделен в 1949 г. Показано, что липоксигеназа бобов сои является многокомпонентным ферментом, состоящим из 2—3 изоформ, различающихся по кинетическим параметрам, таким как субстратная специфичность, устойчивость к нагреванию, влиянию ионов кальция, а также по электрофоретической подвижности, величине изоточки и рН-оптимуму (⁴⁻⁷).

Почти не исследован изоферментный состав липоксигеназы других бобовых, в частности гороха, а имеющиеся в литературе данные по этому вопросу разноречивы. Число изоферментов, описанных для липоксигеназы семян гороха различных сортов, колеблется от одного до трех (⁸⁻¹⁰). Поэтому целью настоящей работы явилось изучение изоферментного состава липоксигеназы гороха — культуры, исследованной нами ранее (¹, ¹¹).

Липоксигеназу выделяли из семян гороха сорта Победитель путем экстракции обезжиренной муки фосфатным буфером 0,05 М, рН 7,0. Дальнейшей очистке и разделению методами гель-хроматографии и ионообменной хроматографии подвергали как свежевыделенный экстракт, так и препараты белков, полученные из экстракта высаливанием сернокислым аммонием при 60% насыщении.

Активность липоксигеназы на всех стадиях выделения и очистки определяли по специфической реакции окисления экзогенной линолевой кислоты, взятой в качестве субстрата, манометрическим методом в аппарате Варбурга. Общую активность липоксигеназы выражали в микролитрах поглощенного кислорода на 1 мг белка фракции, удельную активность — в микролитрах поглощенного кислорода на 1 мг белка в 1 мин., при экспозициях 3 и 6 мин. Содержание белка фракций определяли по Лоури или спектрофотометрически, по поглощению исследуемых растворов в области 280 нм.

Разделение белков свежевыделенного экстракта или препаратов белка после высаливания проводили методом гель-хроматографии при 4°. На колонку (3,0×75 см), заполненную сефадексом G-150 и уравновешенную 0,05 М фосфатным буфером при рН 7,0, наносили до 800 мг белка исходных растворов и элюировали тем же буфером. Картина деления белков в этих условиях одинакова для обоих препаратов. Обнаруживаются три четких белковых пика, липоксигеназа активна лишь во втором пике (рис. 1).

Тот факт, что кривая активности липоксигеназы имеет два максимума (рис. 1, 2), указывает на неоднородность фермента. Это было подтверждено при повторном хроматографировании белков, обладающих липоксигеназной активностью, на анионообменнике ДЭАЭ-сефадексе А-50.

Ионообменную хроматографию проводили в следующих условиях: колонка размером 2,5×70 см, элюция 0,05 М фосфатным буфером, pH 7,0 в ступенчатом градиенте хлористого натрия (0,1 М; 0,2 М; 0,3 М; 0,4 М и 0,5 М). Количество нанесенного белка 200–250 мг, выход белка 90–95%.

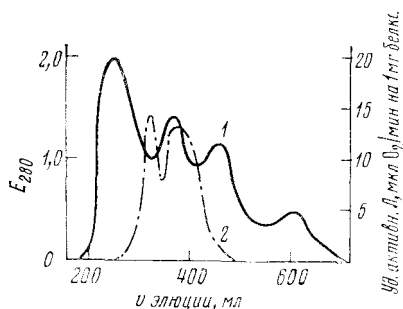


Рис. 1

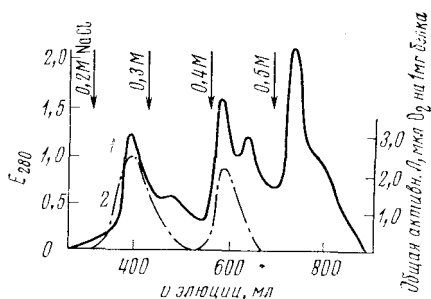


Рис. 2

Рис. 1. Разделение исходных белков методом колоночной хроматографии на сефадексе G-150. 1 — распределение белка исходных препаратов, 2 — удельная активность липоксигеназы (Л)

Рис. 2. Разделение белков, обладающих активностью липоксигеназы, на ДЭАЭ-сефадексе А-50. 1 — распределение белка в элюатах, 2 — активность липоксигеназы (Л)

Как видно из рис. 2, белок второго пика, полученный при гель-хроматографии, является смесью 3–4 белков близкого молекулярного веса. Однако активность липоксигеназы обнаружена лишь в белках, сошедших с колонки в первых двух пиках (рис. 2, 2). Липоксигеназа, содержащаяся в первом белковом пике, условно обозначена как липоксигеназа-1 (Л-1), во втором — как липоксигеназа-2 (Л-2).

Изучение некоторых кинетических параметров полученных ферментов подтвердило наши предположения об их различии. Так, Л-1 и Л-2 показали разную зависимость удельной активности от pH реакционной среды.

Л-1 наиболее активна в условиях слабощелочной среды, при pH 7,8; pH-оптимум для Л-2 обнаружен в кислой среде (рис. 3).

Выявлена различная зависимость удельной активности Л-1 и Л-2 от концентрации субстрата. Константы Михаэлиса, определенные при 25° в условиях оптимальных величин pH реакционной среды, оказались следующими: для Л-1 $K_m = 2,5 \cdot 10^{-3}$, для Л-2 $K_m = 3,8 \cdot 10^{-3}$ М (для линолевой кислоты).

Л-2 с оптимумом активности при pH 6,0, по-видимому, соответствует изоферменту, описанному в (10). Что же касается Л-1, то эта изоформа, проявляющая максимальную активность в щелочной среде, ранее описана не была.

Следует предположить, что исследованные изоферменты липоксигеназы семян гороха будут отличаться и по субстратной специфичности, по аналогии с «кислотной» и «эфирной» формами липоксигеназы соевых бобов.

Следует предположить, что исследованные изоферменты липоксигеназы семян гороха будут отличаться и по субстратной специфичности, по аналогии с «кислотной» и «эфирной» формами липоксигеназы соевых бобов.

Сочетанием методов ионообменной и гель-хроматографии достигнута 37—40-кратная очистка препаратов Л-1 и Л-2, по сравнению удельной активности этих препаратов с исходной формой липоксигеназы. Молекулярный вес изоферментов липоксигеназы, определенный методом гель-хроматографии на сефадексе G-150, равен 70 000, что полностью соответствует имеющимся в литературе данным (⁹, ¹⁰).

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
28 I 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. V. Boudnitskaya, I. G. Borisova, FEBS Letters, v. 24, 359 (1972). ² S. Grossman et al., Phytochem., v. 11, 509 (1972). ³ A. L. Tappel, Federat. Proc. v. 32, 1870 (1973). ⁴ R. Koch, B. Stern, C. Ferrari, Arch. Biochem. and Biophys., v. 78, 165 (1958). ⁵ I. Christopher, E. Pistorius, B. Axelrod, Biochim. et biophys. acta, v. 284, 54 (1972). ⁶ W. Verhoe, A. Francke, Biochim. et biophys. acta, v. 285, 43 (1972). ⁷ A. Yamamoto, K. Yasumoto, H. Mitsuda, Agricultural Biol. Chem., v. 34, 1169 (1970). ⁸ S. Hale et al., Lipids, v. 4, 209 (1969). ⁹ C. E. Eriksson, S. I. Svensson, Biochim. et biophys. acta, v. 198, 449 (1970). ¹⁰ D. Arens et al., Biochim. et biophys. acta, v. 327, 295 (1973). ¹¹ И. Г. Борисова, Е. В. Будницкая, Сб.: Действие ионизирующего излучения на клеточные мембраны, М., 1973, стр. 57.