

УДК 577.152.19 СОД.087.5

Н. Н. Вольский, В. М. Мишин

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ

Институт клинической и экспериментальной медицины СФ АМН СССР, Новосибирск

(Поступила в редакцию 29/VI 1976 г. Представлена акад. АМН СССР В. П. Казначеевым)

Описан количественный метод определения активности множественных форм супероксиддисмутазы (СОД), основанный на разделении форм фермента гель-электрофорезом, элюции с геля и определения ингибирования восстановления нитросинего тетразолия в системе НАД·Н₂ — феназинметасульфат. Показано, что частично очищенная СОД эритроцитов быка разделяется на три формы, причем активность формы 2 гораздо ниже, чем степень ее окраски на белок (Бюлл. экспер. биол., 1977, № 6, с. 762).

К л ю ч е в ы е с л о в а: супероксиддисмутаза; множественные формы; метод определения активности.

Многими авторами показано существование множественных форм фермента супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1), разделяющихся при колоночной хроматографии и при электрофорезе в полиакриламидном геле (ПААГ). В частности, изоферменты СОД обнаружены в тканях человека [2], печени быка [5], растениях [8] и микроорганизмах [11]. По современным представлениям, функцией СОД является естественная защита организма от анион-радикалов кислорода [6], поэтому количественное определение относительной активности различных форм этого фермента весьма интересно.

Bohnenkamp и Weser [3] оценивали активность СОД денситометрией ахроматичных зон на столбиках геля после прокрашивания их в системе свет — рибофлавин — нитросиний тетразолий (НСТ). Векман и соавт. [2] использовали визуальный метод оценки после электрофоретического разделения форм СОД и окрашивания на активность. Недостатки денситометрического способа, а тем более визуального, хорошо известны и подробно разбираются в специальной литературе [1].

В настоящем сообщении предлагается метод определения относительной активности форм СОД, основанный на разделении фермента при электрофорезе в ПААГ,

последующей элюции отдельных фракций и спектрофотометрическом определении активности элюатов.

Методика исследования. Электрофорез в ПААГ проводили по методу Davis [4] в приборе фирмы «Reanal» при напряжении 400 В и токе 4 мА на трубку в течение 7 ч.

Окраску гелей для обнаружения активности СОД и спектрофотометрическое определение активности фермента производили по методу Nishikimi и соавт. [10] с небольшими изменениями. После электрофореза гели инкубировали 20 мин в 0,017 М пирофосфатном буфере рН 8,3, содержащем 1,2 мМ НСТ и 28 мМ феназинметасульфата (ФМС), затем отмывали водой и выдерживали в 150 мМ НАД·Н₂, растворенном в том же буфере, до четкого проявления светлых полос активности СОД (1—1½ ч).

Из неокрашенных гелей вырезали участки, соответствующие светлым полосам на окрашенном геле. Кусочки вырезанного геля гомогенизировали в 1,90 мл 0,017 М пирофосфатного буфера рН 8,3 (общий объем вместе с гелем 2,25 мл). Гомогенаты выдерживали в течение 12 ч

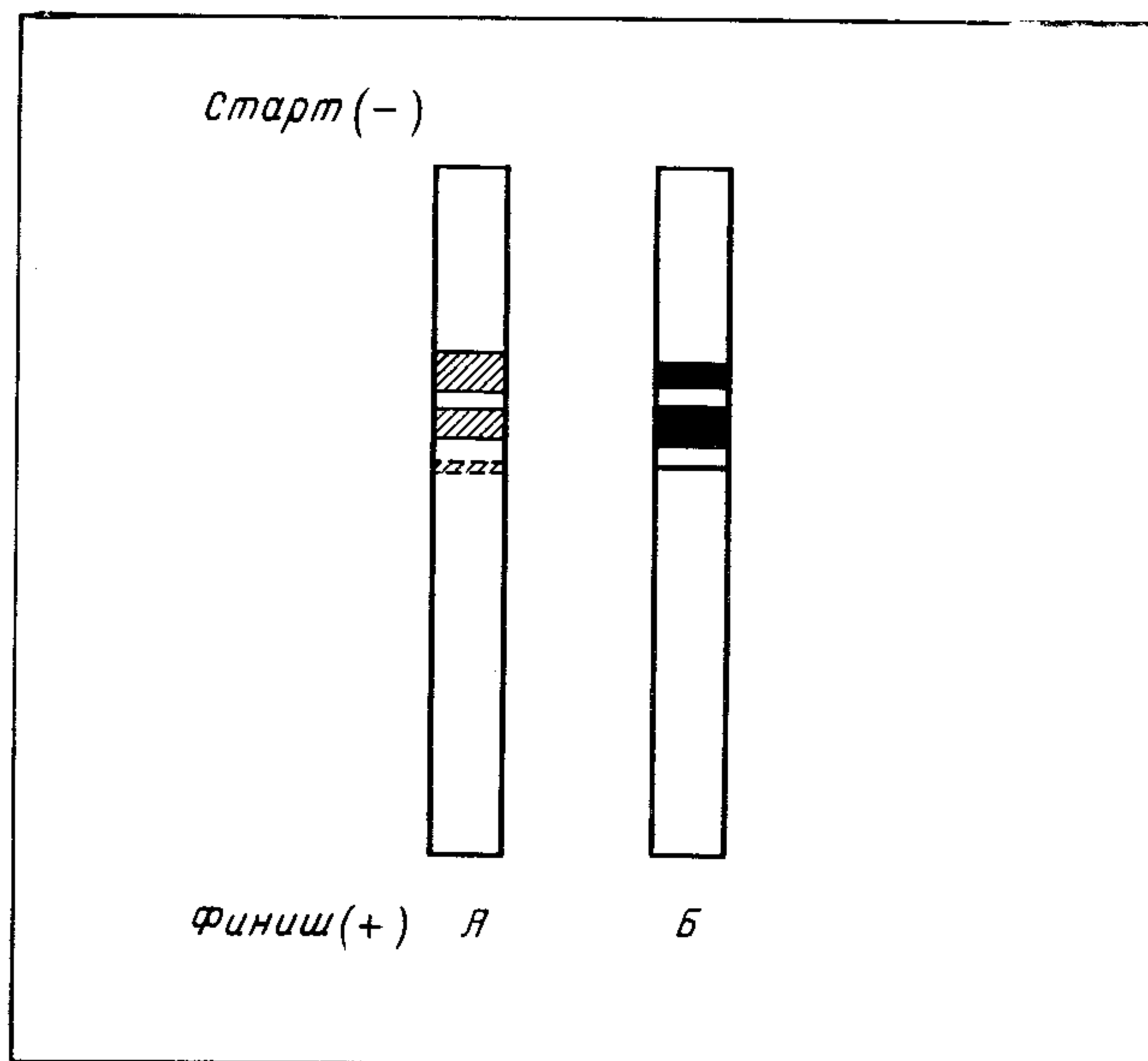


Рис. 1. Электрофорез дисмутазы в полиакриламидном геле (схема).

А — окраска на активность СОД; Б — окраска на белок.

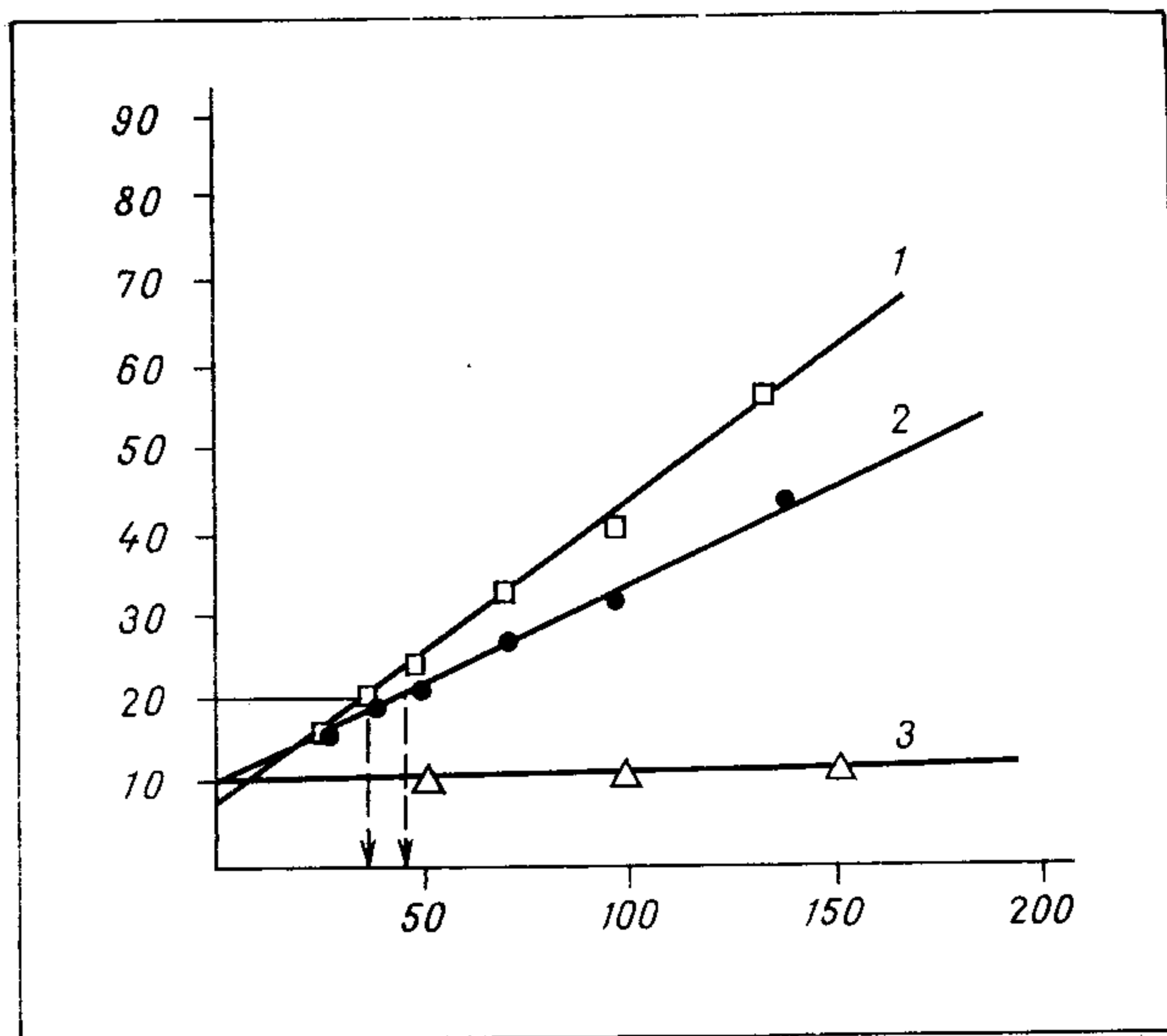


Рис. 2. Сравнение ингибирующей активности дисмутазы до и после электрофореза в ПААГ.

1 — активность дисмутазы после элюции с геля; 2 — активность дисмутазы без электрофореза; 3 — «ингибирующая» активность элюатов контрольного геля. По оси абсцисс — количество СОД (в мкл); по оси ординат — скорость реакции (в $\%^{-1} \times 1000$).

при 40°C , затем центрифугировали 30 мин при 800 g. Полученный прозрачный элюат использовали для определения активности СОД.

Активность как исходного раствора СОД, так и полученных после электрофореза элюатов определяли на регистрирующем спектрофотометре «Hitachi-356» по степени торможения СОД скорости восстановления НСТ супероксидным радикалом, который генерировался в системе $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ — ФМС. Реакционная смесь (3 мл) содержала 150 нмоль НСТ, 234 нмоль $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$, 0,7 нмоль ФМС и 0,017 М пирофосфатный буфер рН 8,3. При таких концентрациях компонентов изменение оптической плотности при 560 нм было равно 0,030 ед/мин в отсутствие ингибитора. После небольшого латентного периода реакция линейна в течение 4—5 мин. Торможение реакции СОД определяли при добавлении 20, 30, 50, 75, 100 и 150 мкл исследуемого раствора, а затем по построенному на основании этих величин графику вычисляли количество раствора, необходимое для 50% торможения. Для каждого образца из одного столбика геля определения проводили дважды. Разведение образца подбирали таким образом, чтобы 50% торможение происходило при добавлении 30—60 мкл раствора, так как при такой активности графические построения наиболее точны и удобны. Измерения производили при 20°C . За единицу активности СОД принимали количество фермента, требующееся для 50% торможения скорости восстановления НСТ при описанных выше условиях. Эта единица СОД, как показало сравнение, равна 0,142 ед. активности фермента, определенной по методу McCord и Fridovich [9] с ксантинооксидазой и цитохромом *c*. Количество белка определялось по Lowry [7].

В качестве материала для исследования использовали частично очищенный препарат СОД, выделенный из эритроцитов крупного рогатого скота по методу McCord и Fridovich [9] до стадии ацетоновой преципитации. Полученный осадок растворяли в воде и использовали как исходный раствор фермента.

Результаты исследования. После электрофореза в ПААГ и окраски на столбиках геля проявились три полосы просветления, которые были обозначены

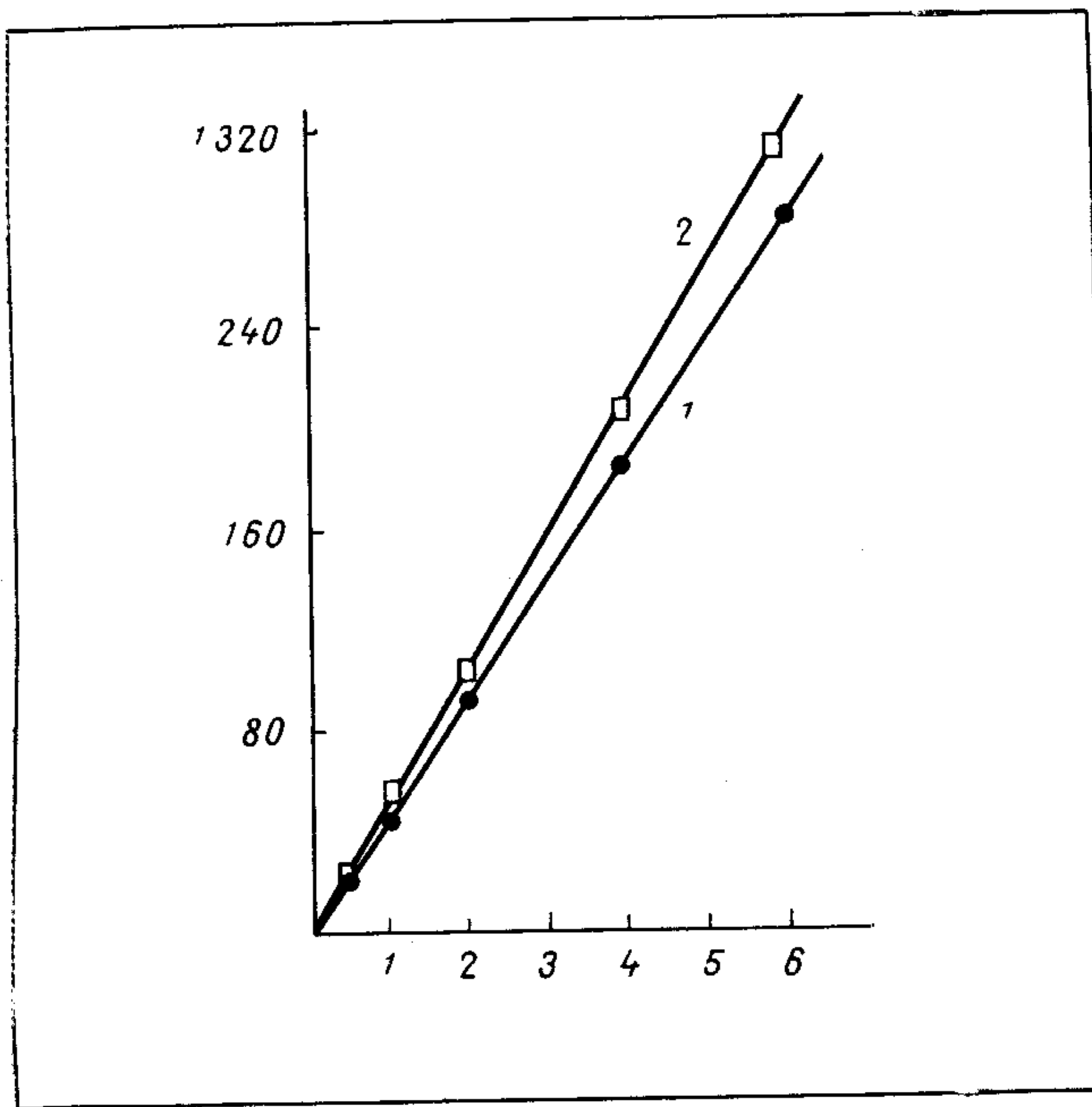


Рис. 3. Соотношение активности дисмутазы до и после электрофореза в ПААГ в зависимости от количества нанесенного фермента.

1 — до электрофореза; 2 — после электрофореза. По оси абсцисс — количество СОД (в мкл); по оси ординат — активность СОД (в ед).

нами как СОД_1 , СОД_2 и СОД_3 при отсчете с анодного конца геля. Соответствующие темные полосы были получены при окраске геля на белок амидочерным 10Б (рис. 1).

При разгонке на геле 44,6 ед. СОД и последующей элюции участка геля, содержащего все три полосы дисмутазной активности, обнаружилось, что практически вся СОД снимается с геля и даже общая активность элюата несколько превышала активность СОД, нанесенной на гель. Частично это зависит от того, что элюаты контрольного геля (т. е. геля, подвергнутого электрофорезу без нанесения СОД) оказывают несильное ингибирующее действие на реакцию восстановления НСТ (рис. 2). Поскольку мы нашли, что используемый при полимеризации геля персульфат аммония в концентрации 2,5 мг/мл полностью тормозит восстановление НСТ, ингибирующий эффект геля может зависеть от следовых количеств персульфата, остающегося в геле после электрофореза и попадающего в элюаты. Все же активность элюатов, содержащих все формы СОД, превышала, хотя и незначительно ($\leq 15\%$), сумму активности элюатов контрольного геля и активности того же количества СОД перед нанесением на гель. Механизм этого явления остается непонятным. Поскольку отношение активностей нанесенной СОД и элюата не изменяется при изменении количества фермента, наносимого на гель (рис. 3), мы считаем, что это не существенно при определении соотношения активности форм СОД. Из рис. 3 также видно, что активность элюата (за вычетом активности контрольного геля) прямо пропорциональна количеству нанесенного на гель фермента и что, следовательно, полнота элюции не изменяется в зависимости от концентрации СОД в геле.

Основываясь на этом, мы определили активность каждой из фракций СОД, по отдельности вырезая и гомогенизируя участки геля, соответствующие полосам активности. Результаты для двух различных концентраций СОД представлены в таблице.

Активность электрофоретических фракций СОД эритроцитов быка ($M \pm m$)

Фракция СОД	Нанесено на гель 96 ед.		Нанесено на гель 288 ед.	
	активность, снятая с геля, ед.	% от суммарной активности	активность, снятая с геля, ед.	% от суммарной активности
СОД ₁ + СОД ₂ + СОД ₃	133,1 ± 19,7	100	327,8 ± 25,0	100
СОД ₁	7,2 ± 1,4	5,0 ± 1	9,3 ± 0,1	3 ± 0
СОД ₂	29,6 ± 3,1	23,0 ± 5	54,5 ± 8,8	17 ± 3
СОД ₃	96,3 ± 15,2	72,0 ± 5	264,0 ± 22,5	80 ± 7

Необходимо отметить, что полученные результаты отражают соотношение активностей СОД₁, СОД₂ и СОД₃ только в определенном образце фермента, поскольку это соотношение варьирует для каждого выделенного препарата фермента.

В процессе разработки метода обнаружено, что величина активности форм СОД эритроцитов быка не совпадает с интенсивностью окраски полос на белок (см. рис. 1). По визуальной оценке фракция СОД₂ содержит больше белка, чем более активная в отношении дисмутации анион-радикалов кислорода фракция СОД₃. Это явление можно объяснить несколькими причинами: 1) часть окраски на белок в месте нахождения СОД₂ зависит от постороннего белка, обладающего весьма сходными с СОД₂ электрофоретическими свойствами; 2) СОД₂ частично инактивируется при выделении; 3) специфическая активность СОД₂ меньше СОД₃.

ЛИТЕРАТУРА. 1. Маурер Г. (Maurer H.) Диск-электрофорез. М., 1971. — 2. Beckman G., Lundgren E., Tarnvik A. — «Hum. Hered.», 1973, v. 23, p. 338. — 3. Bohnenkamp W., Wesser U. — «Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.», 1975, Bd 356, S. 747. — 4. Frants R. — «Acta Acad. Aboensis», 1973, v. 33, p. 1. — 5. Davis B. G. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1964, v. 121, p. 404. — 6. Fridovich I. — «Account. Chem. Res.», 1972, v. 5, p. 321. — 7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L.

et al. — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265. — 8. Marmocchi F., Venardi G., Caulini G. et al. — «FEBS Letters.», 1974, v. 44, p. 337. — 9. McCord J. M., Fridovich I. — «J. biol. Chem.», 1969, v. 244, p. 6049. — 10. Nishikimi M., Rao N. A., Yagi K. — «Biochem. biophys. Res. Commun.», 1972, v. 46, p. 849. — 11. Puget K., Michelson A. M. — Ibid., 1974, v. 58, p. 830.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE ACTIVITY OF MULTIPLE SUPEROXIDE DISMUTASE FORMS

N. N. Volsky, V. M. Mishin

Institute of Clinical and Experimental Medicine, Novosibirsk

A quantitative method for determination of the activity of multiple superoxide dismutase (SOD) forms is presented. The method is based on SOD electrophoretic separation on polyacrylamide gels, elution from gels and determination of inhibition of nitro blue tetrazolium reduction in the NADH₂ + phenazinemetasulphate system. As shown, partially purified SOD from bovine erythrocytes separated into three fractions. The activity of form 2 proved to be much lower than the degree of its staining for protein.