

Выделение и свойства протеиназы пчелиного яда

А. Ф. Протас¹, О. С. Бондарева, Н. А. Мулявко

¹ Межотраслевая фирма «Берег»
Ул. Карантинная, 14, Одесса, 270014, Украина

Институт пчеловодства им. П. И. Прокоповича УААН
Ул. Академика Заболотного, 19, Киев, 03022, Украина

*В яде пчел (*Apis mellifera*) содержится протеиназа в количестве 0,8—1,5 % от белково-пептидной фракции. Хроматографией на бензамидин-сефарозе и обратнофазной хроматографией фермент очищен до гомогенного состояния с удельной активностью 110 ед/мг. Протеиназа обладает высокой гидрофобностью, имеет молекулярную массу 20 кДа (гель-фильтрация), рН-оптимум действия 4,5, проявляет высокую специфичность по отношению к белкам в составе мембран (тени эритроцитов). Протеиназа кооперативно связывается с наружной клеточной мембраной (эритроцитов), максимальное соотношение связывания (в расчете на белок мембраны) — 1:1,2. Делается вывод о роли протеиназы как одного из токсических компонентов яда, способного существенно влиять на качественный и количественный состав яда при его сертификации.*

Введение. Протеиназы достаточно часто встречаются как один из токсических компонентов яда насекомых и позвоночных [1—3]. Их присутствие наряду с другими составляющими обеспечивает деградацию всех классов биохимических компонентов клетки. Сведения о наличии протеиназ в яде пчел несколько противоречивы. Согласно данным одних авторов, протеиназная активность в пчелином яде не выявлена или присутствуют ее следы и, напротив, хорошо известно присутствие ингибитора протеаз [3, 4]. С другой стороны, реальный опыт проведения сертификации пчелиного яда свидетельствует о присутствии некоторого фактора, очевидно, протеиназы, обуславливающего некоторое видоизменение профиля элюции яда при хроматографическом анализе в том случае, если яд некоторое время (до 1 ч) находится в растворе при слабощелочных рН (об этом детальнее в разделе «Результаты и обсуждение»). Помимо этого, некоторые сертификаты, выполненные, в частности, в Грузии в перечне компонентов яда содержат пункт «Протеиназа», указанное содержание которой составляет около 1 %. В связи с этим целью данной работы было решить вопрос о присутствии протеиназы в составе яда пчел.

Материалы и методы. Работы выполняли на высушенном яде-сырце пчел (*Apis mellifera*), собранном методом электростимуляции в различных регионах Украины. Проанализированы 100 образцов яда. Протеиназную активность измеряли аналогично описанному методу [5], инкубационная смесь содержала 75 мкг/мл яда и 5 мг/мл субстрата (белка), пробу инкубировали при температуре 37 °С, буфер содержал 0,15 М NaCl. В качестве субстрата использовали сывороточный альбумин человека. За единицу активности принимали количество фермента, переводящее в кислоторастворимое состояние 1 мг белка за 1 ч в приведенных выше условиях. Измерения проводили на спектрофотометре DU-65 («Beckman», США).

Тени эритроцитов человека выделяли центрифугированием из гемолизата очищенных эритроцитов в 1 мМ трис-HCl, рН 7,4.

Хроматографию на бензамидин-сефарозе осуществляли аналогично описанному ранее методу [5] с учетом известных рекомендаций [6]. Обратную фазную хроматографию проводили на колонке RepRPC 5/5 HR («Pharmacia», Швеция) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила 0—100 % за 20 мин в присутствии 0,05 % H₃PO₄ или трифторуксусной кислоты, скорость элюции — 1 мл/мин. Гель-фильтрацию осуществляли на колонке K 9/60 с сефакрилом S200 HR («Phar-

мася»), объем нанесения — 0,5 мл, буфер — 0,15 М NaCl, 10 мМ Na-фосфат, pH 4,5, скорость элюции 1 мл/мин. Для определения молекулярной массы использовали коэффициент распределения K_{av} и соответствующий график фирмы — изготовителя геля. Хроматографию проводили в HPLC-системе фирмы «ISCO» (США).

Для исследования взаимодействия протеиназы с мембраной к телям эритроцитов в концентрации 100 мкг/мл (по белку) добавляли равный объем раствора очищенной протеиназы, инкубировали в течение 30 с и пропускали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм («Millipore», США), определяли концентрацию несвязавшегося белка по Лоури. Математический расчет кривой связывания выполняли с помощью компьютерной программы Enzfitter («Elsevier-Biosoft», Англия).

Результаты и обсуждение. Опыт проведения хроматографического контроля качества яда показывает, что даже сравнительно непродолжительное выдерживание яда в растворе перед разделением при комнатной температуре приводит к некоторому искажению профиля элюции (рис. 1). Уже через 1 ч наблюдается искажение пиков, а через 3 ч яд формально не соответствует стандарту. Такой результат не зависел от образца яда, что предполагает наличие протеиназы, а не является случайным загрязнением. Следует отметить, что аналогичные изменения, хотя и менее выраженные, наблюдаются в некоторых образцах яда через 10 и более месяцев его хранения. Эти обстоятельства и послужили основанием для проведения уже целенаправленных исследований.

При проведении реакции для выявления протеиназной активности в обычных условиях наблюдается линейная зависимость повышения содержания в инкубационной среде кислоторастворимых Лоури-положительных продуктов. Выбор pH был обусловлен тем, что в среднем водный раствор яда в концентрации 1 мг/мл имеет pH 4,3—4,7, а анализ специфической (гемолитической) активности пчелиного яда проводят при pH 4,5. В связи с полученным результатом дальнейшие исследования проводили, инкубируя пробы на протяжении 3 ч.

Корректный анализ любого фермента возможен только с учетом оптимальных условий его действия, в частности pH. Зависимость активности протеиназы от величины pH имеет довольно сложный характер (рис. 2). Максимальная активность наблюдается при pH 4,5, а после практически полного ее падения при pH около 7 выявляется второй пик активности, хотя и значительно меньший, чем в кислом диапазоне.

Протеиназа была идентифицирована обратно-

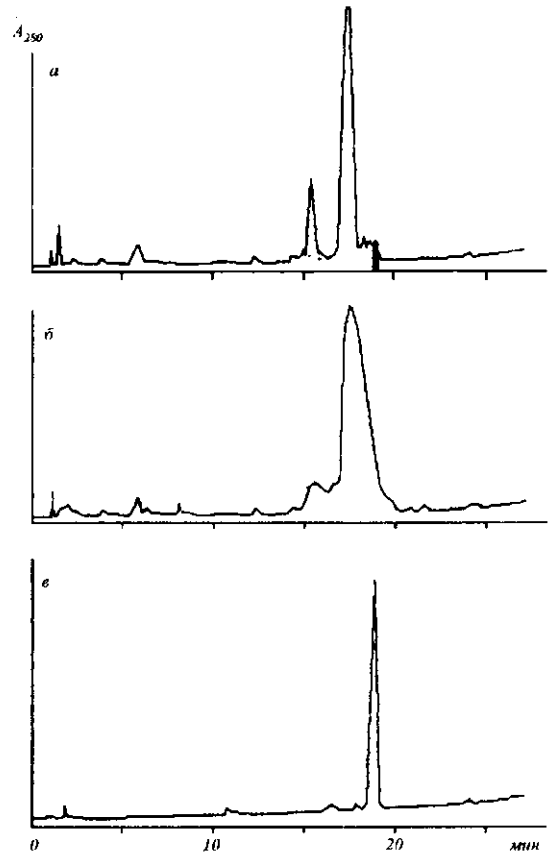


Рис. 1. Профили элюции яда на колонке РерRPC: а — исходный (выделенный пик содержит протеиназную активность); б — через 3 ч после растворения; в — препарат очищенной протеиназы

фазной хроматографией. Анализ всего профиля элюции протеиназной активности в приведенных выше условиях выявил ее только в одном пике (выделенный пик на рис. 1, а). Обращает на себя внимание очень высокий уровень гидрофобности фермента — элюция с колонки происходит при концентрации ацетонитрила около 80 %, то есть при концентрации, обычно используемой уже для

промывки колонки. Содержание протеиназы в яде колебалось от 0,6 до 1,4 %. Анализ достаточно большого числа образцов показал, что частотное распределение содержания протеиназы в яде имеет определенную закономерность (рис. 3, а). Представляло интерес сопоставить эти данные с содержанием протеиназы в единицах активности на единицу массы яда. Оказалось, что подобное, хотя и несколько менее выраженное распределение, наблюдается и при ферментативном анализе (рис. 3, б). Наиболее вероятно, что больший разброс по сравнению с хроматографическими данными обусловлен инактивацией протеиназы при сборе и хранении яда. Таким образом, можно выделить два популяционных типа ядов — с относительно низ-

ким и высоким содержанием протеиназы. Характерно, что яд с промежуточным содержанием протеиназы встречается крайне редко. Надо полагать, что относительный уровень ее содержания детерминирован генетически.

При гель-фильтрации яда на колонке с сефарилом S200 пик протеиназной активности симметричен и соответствует молекулярной массе 20 кДа (рис. 4). Для построения калибровочного графика помимо данных фирмы — изготовителя геля (см. «Материалы и методы») использовали голубой декстран (V_0), сывороточный альбумин человека (67 кДа), овальбумин (45 кДа) и РНКазу А (13,7 кДа)

Аффинной хроматографией на бензамидин-сефарозе (рис. 5) с последующей доочисткой обратной фазной хроматографией протеиназа может быть выделена в чистом виде (рис. 1, в) с удельной активностью около 110 ед/мг.

Протеиназа обладает высокой субстратной специфичностью, что следует из приведенных ниже данных:

Субстрат	Активность, %
Тени эритроцитов	100
САЧ	27
Гемоглобин	38
ДНКазы I	39
Миоглобин	3
Лизоцим	0
Гистоны	5
Протамина	5

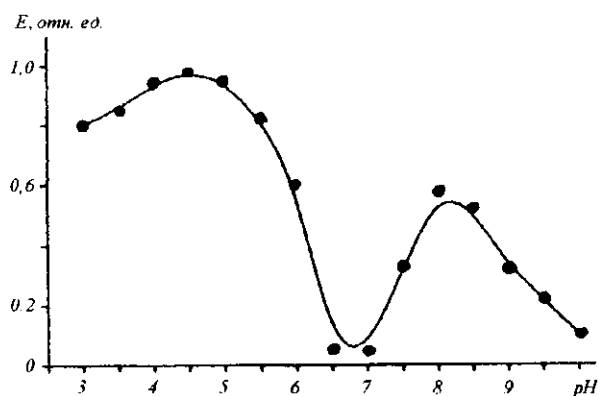


Рис. 2. Зависимость активности протеиназы (E) от pH. Буфер — 10 мМ NaH_2PO_4 -цитрат

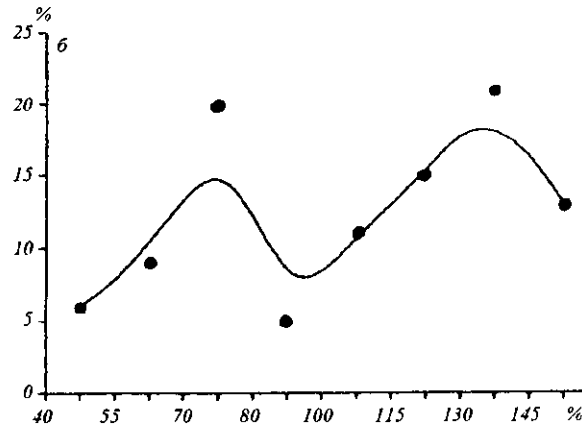
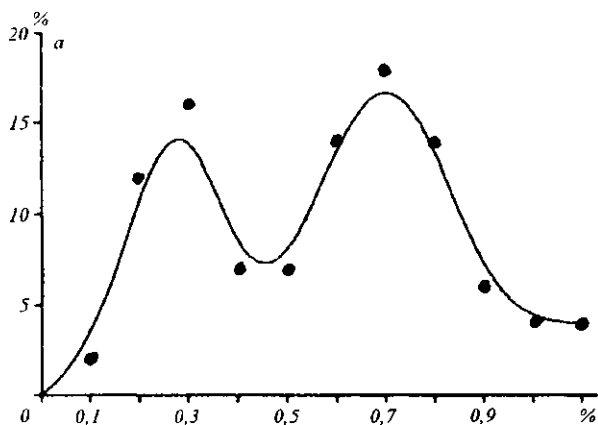


Рис. 3. Частотное распределение содержания протеиназы в образцах яда на основе: а — относительного содержания при хроматографическом разделении (%); б — протеолитической активности. Ось ординат — частота встречаемости (%)

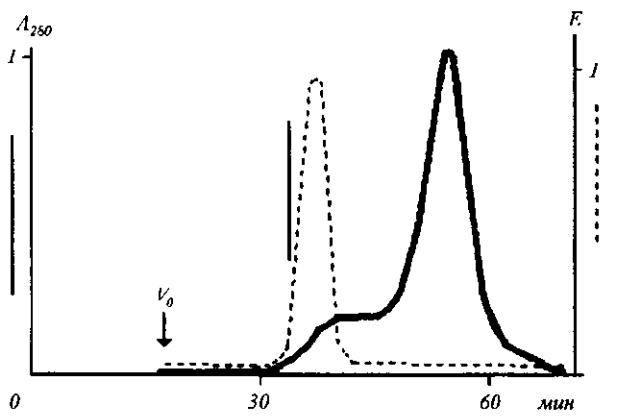


Рис. 4. Гель-фильтрация яда на колонке с сефакилом S200. E — активность фермента (отн. ед.)

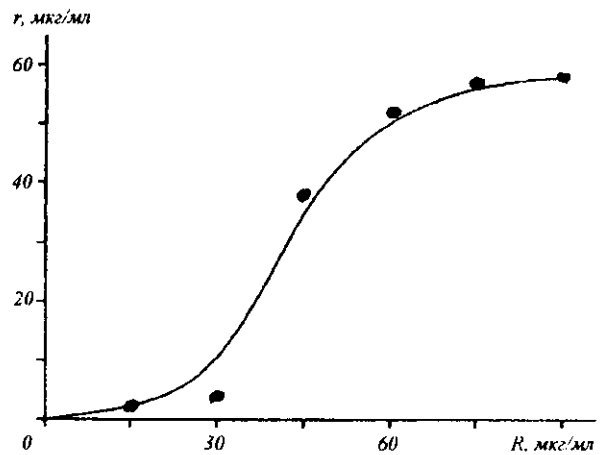


Рис. 6. Кривая связывания протеиназы с теньями эритроцитов. R — общая концентрация фермента, r — концентрация связанного фермента

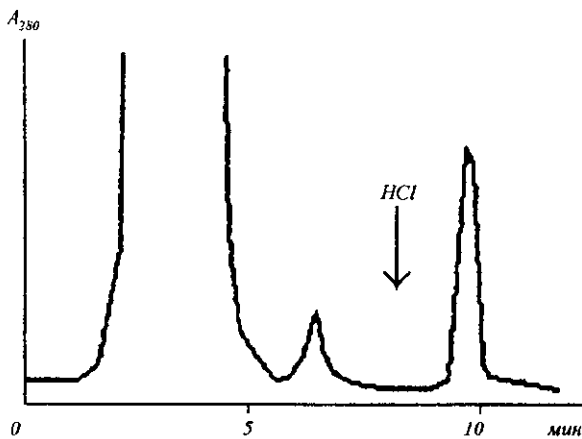


Рис. 5. Очистка протеиназы на бензамидин-сефарозе

Некоторые белки она вообще не гидролизует. В то же время активность по отношению к белкам в составе клеточной мембраны (тений эритроцитов) не менее чем в два раза выше любого другого субстрата. С учетом высокой гидрофобности протеиназы можно предположить, что такая специфичность обусловлена предварительной своеобразной иммобилизацией фермента на липидах или гидро-

фобных участках белков мембраны, что способствует созданию благоприятных условий для проявления ферментативной активности. Не исключено также, что фермент в принципе гидролизует преимущественно высокогидрофобные участки белков. В какой-то мере этот вопрос может быть решен при наличии количественной оценки взаимодействия протеиназы с клеточной мембраной. Оказалось, что протеиназа способна специфически связываться с теньями эритроцитов. При этом наблюдается типичная S-образная кривая связывания (рис. 6), а график Хилла был линейным. При этом коэффициент Хилла равен 5,8, равновесная константа ассоциации — 42 мкг/мл, а максимальный уровень связывания — 1,2 мг фермента на 1 мг белка эритроцитарной мембраны. Таким образом, связывание каждой молекулы фермента облегчает связывание следующей. Надо полагать, что именно эти процессы и обуславливают высокую активность и специфичность протеиназы. Связывание протеиназы с клеточной мембраной имеет еще один аспект, касающийся субстратной специфичности протеиназы. Из полученных по максимальному уровню связывания данных следует, что при достаточной концентрации фермента клеточная мембрана оказывается полностью покрыта протеиназой. В такой ситуации эффективность гидролиза будет чрезвычайно высокой, то есть субстратная специфичность может быть обусловлена и таким способом.

Таким образом, в пчелином яде содержится высокогидрофобная протеиназа, действие которой специфически направлено на гидролиз белков, ассоциированных с клеточной мембраной. Возможно, что у нее могут быть и другие функции, однако полученные результаты позволяют рассматривать ее как один из токсических факторов яда. Наличие протеиназы, несомненно, должно учитываться при контроле качества яда. Очевидно, что в тех случаях, когда влажность яда достаточно высока, создаются условия для эндогенной деградации компонентов яда. Это же обстоятельство, видимо, накладывает определенные ограничения на срок хранения яда.

О. Ф. Протас, О. С. Бондарева, Н. О. Мулявко

Виділення та властивості протеїнази бджолоїної отрути

Резюме

Встановлено, що в отруті бджіл (*Apis mellifera*) міститься протеїназа в кількості 0,8—1,5 % від білково-пептидної фракції. Хроматографією на бензамідин-сефарозі та зворотnofазною хроматографією фермент очищено до гомогенного стану з питомою активністю 110 од/мг. Протеїназа має молекулярну масу 20 кДа, рН-оптимум дії 4,5, її притаманна висока гідрофобність та специфічність по відношенню до білків у складі мембран (тіней еритроцитів). Протеїназа кооперативно зв'язується з клітинною мембраною (еритроцитів), при цьому вона практично повністю зв'язується з мембраною, максимальне співвідношення зв'язування (в розрахунку на білок мембрани) — 1:1,2. Робиться висновок стосовно функції протеїнази як одного з токсичних компонентів отрути.

A. F. Protas, O. S. Bondareva, N. O. Muliavko

Purification and properties of bee venom protease

Summary

Bee venom contains specific protease. It consists about 0.8—1.5 % of total protein-peptide fraction. The enzyme was purified with the help of benzamidine-sepharose and reverse-phase chromatography to the activity 110 U/mg. The protein is hydrophobic, its M_r is equal to 20 kDa (by gel-filtration), pH_{opt} 4.5. Protease specifically binds to cell membrane in cooperative manner; the maximal binding ratio is 1.2. Enzyme has high substrate specificity for membrane proteins. It is concluded that protease is a specific toxic component of bee venom.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ахунов А. Протеолитические ферменты ядов среднеазиатских змей // *Вопр. герпетологии*.—Л.: Наука, 1973.—С. 34—36.
2. Покровский А. А. Ферментный механизм некоторых интоксикаций (попытка ферментной классификации ядов) // *Успехи биол. химии*.—1962.—№ 4.—С. 61—80.
3. Орлов Б. Н. Зоотоксикология.—М.: Высш. шк., 1985.—228 с.
4. Иванов Ц., Шкендеров С. Пчелиные продукты.—София: Земиздат, 1985.—226 с.
5. Протас А. Ф., Чаяло П. П. Выделение гистон-специфической протеиназы из ядер клеток мозга крыс // *Укр. биохим. журн.*—1991.—63, № 6.—С. 99—102.
6. Benzamidine Sefarose 6B. Pharmacia. Data Sheet.

УДК 638.178.8

Поступила в редакцию 28.05.98