



УДК 577.152.114*991.02

ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗА: СТАБИЛЬНОСТЬ И АКТИВНОСТЬ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА СИЛИКАГЕЛЕ

© 1999 г. Р. У. Бейсембаева, Т. А. Зацерковная, Ю. А. Кузнецова*, А. Т. Мевх**

*Научно-экспериментальный Центр по биотехнологии и воспроизводству животных
Министерства науки АН Республики Казахстан, Алма-Ата;*** НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ,
119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ*

Поступила в редакцию 08.04.98 г. Принята к печати 26.05.98 г.

Простагландин-Н-синтазу получали в виде микросом везикулярных желез барана и иммобилизовали на силикагеле. Ионы кальция активировали, а адреналин стабилизировал простагландинсинтазную систему. Иммобилизованные в присутствии адреналина и ионов кальция микросомы были стабильны при хранении при 4°C. Через два месяца их активность составляла 80% от исходной. Иммобилизованный препарат способен быть многократно использованным для катализа ферментативной реакции синтеза простагландина E₂ без существенной потери активности: после 8 циклов эксплуатации он сохранял 66% исходной ферментативной активности.

Ключевые слова: простагландин-Н-синтаза; иммобилизация; стабильность; адреналин, ионы кальция.

Простагландины – производные полиненасыщенных жирных кислот представляют собой внутриклеточные молекулярные регуляторы многих физиологических процессов [1]. Синтез этих соединений осуществляется в клетках практически всех органов млекопитающих.

Бисинтез всех известных простаноидов из полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) осуществляется биферментной системой, в которой первым ферментом является одинаковая по механизму действия для всех типов клеток простагландин-Н-синтаза (PGH-синтаза, КФ 1.14.99.1), а второй фермент биферментной системы, PGH-конвертаза, органоспецифичен [2]. PGH-синтазная реакция многосубстратна и двухстадийна. При этом фермент проявляет последовательно циклооксигеназную и пероксидазную активности [2], которые могут быть измерены независимо.

Наиболее часто для характеристики фермента используют суммарную PGH-синтазную активность, определяемую: 1) как скорость накопления окисленной формы одного из субстратов (донора электронов) в реакции фермента с полиненасыщенной жирной кислотой (ПНЖК) (арахидоновой кислотой) [3]; 2) как скорость поглощения кислорода в PGH-синтазной реакции с помощью кислородного электрода Кларка [4]; 3) по выходу простагландина E₂ (PGE₂), образующегося в ходе реакции спонтанного разложения PGH₂ [5].

Пероксидазная активность PGH-синтазы может быть определена независимо спектрофотометрически как скорость накопления окисленной формы донора электронов при использовании в качестве субстрата вместо ПНЖК пероксида водорода [6].

Несмотря на значительные достижения генной инженерии в получении ферментов синтеза простагландинов [7, 8], биосинтез простагландинов с помощью природных ферментов остается основным способом получения этих веществ.

Ферменты биосинтеза простагландинов легко инактивируются как в ходе ферментативной реакции [9], так и при хранении [10]. Есть данные о некоторой стабилизации ферментной системы синтеза простагландинов, выделенной из везикулярных желез козлов, путем ее иммобилизации на силикагеле [11]. Стабилизация ферментных препаратов достигается также при их адсорбции на DEAE-сефадексе [12]. Так микросомный препарат PGH-синтазы, иммобилизованный на DEAE-сефадексе, после одних суток хранения сохранял 40% исходной простагландинсинтазной активности, а после четырех циклов эксплуатации – 15% активности. Также было обнаружено, что эффект инактивации PGH-синтазы, выделенной из тромбоцитов человека, кислородом в присутствии гемина может быть полностью устранен добавлением в среду антиоксидантов, например адреналина [13] или аскорбиновой кислоты [14], способных выступать в роли субстратов PGH-синтазной реакции. Введение антиоксиданта в различные промежутки

* Автор для переписки (e-mail: mevk@libro.genebee.msu.su; факс: (095) 939-3181).

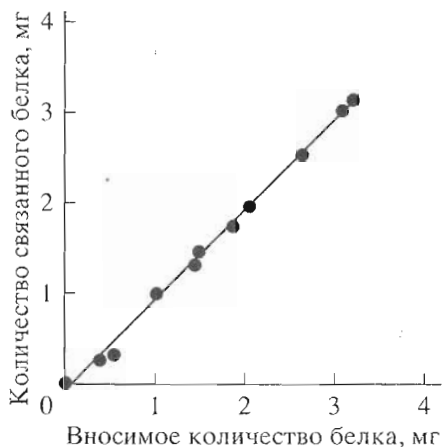


Рис. 1. Сорбция микросом на силикагеле. Условия: 3 мл 0.1 М Трис-НСI-буфера, рН 8.4; 0.5 г силикагеля; 200 мкл суспензии микросом с разным содержанием белка, 25 мин.

времени от начала предынкубации РGH-синтазы с геминном в присутствии кислорода полностью предотвращало дальнейшую инактивацию фермента.

Ранее нами был разработан метод иммобилизации простагландинсинтазного ферментного комплекса везикулярных желез барана на силикагеле [15]. Получаемый ферментный препарат сохранял 55% первоначальной простагландинсинтазной активности после 6 сут хранения [15]. Цель данной работы – исследование факторов стабилизации этой иммобилизованной простагландинсинтазной системы.

Работа по исследованию факторов, влияющих на стабильность простагландинсинтазной фер-

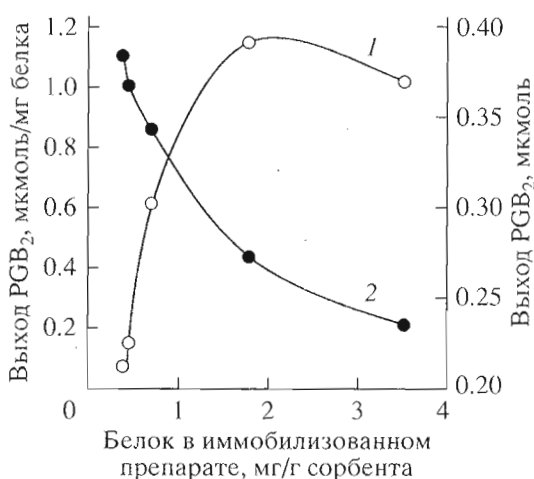


Рис. 2. Синтез простагландина иммобилизованными на силикагеле микросомами. Кривая 1 – правая ось, кривая 2 – левая ось. Условия: 3 мл 0.1 М Трис-НСI-буфера, рН 8.4; иммобилизованные на 0.5 г силикагеля микросомы; 0.5 мМ адреналин; 3.4 мкМ гемин; 71 мкМ арахидоновая кислота; 37°C; 45 мин.

ментной системы, проводилась с микросомами, полученными из везикулярных желез барана. Ферментные препараты иммобилизовали на силикагеле адсорбционным способом. Разработанные ранее условия иммобилизации [15] позволяют получать сорбированный ферментный препарат, обладающий 80–90% первоначальной простагландинсинтазной активности.

Результаты исследования кинетики сорбции микросом на силикагеле показали, что в интервале концентраций микросом от 0.8 до 6.4 мг белка/г сорбента в 3.2 мл раствора практически полная их сорбция (90–97% по белку) достигалась через 20–25 мин (рис. 1). Для иммобилизованных препаратов с разным содержанием микросом была исследована их способность катализировать синтез простагландинов. Оказалось, что по мере насыщения сорбента микросомами при увеличении общего выхода PGB_2 (рис. 2, кривая 1) его удельный выход снижался (рис. 2, кривая 2). Вероятно, с повышением концентрации белка на носителе образуются участки, где микросомы сорбируются в несколько слоев, в результате чего активный центр фермента становится недоступным. Частичная инактивация фермента в результате образования би-, трислоев на носителе отмечалась также и для других ферментов, например, для гексокиназы при иммобилизации на силикагеле [16].

В опытах по влиянию адреналина на стабильность свободных микросом была исследована пероксидазная активность содержащейся в них РGH-синтазы при использовании в качестве субстрата вместо арахидоновой кислоты пероксида водорода. Из полученных результатов (рис. 3)

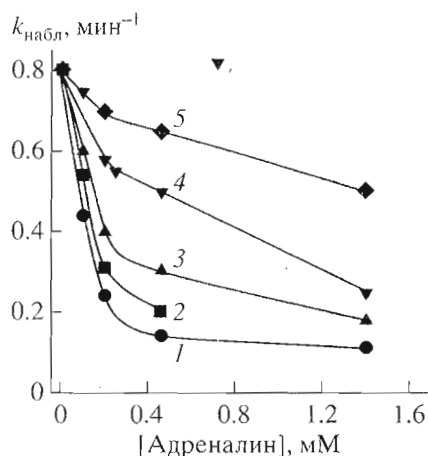


Рис. 3. Зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации пероксидазной реакции РGH-синтазы от концентрации адреналина при концентрации H_2O_2 (10^{-4} М): 0.635 (1); 0.89 (2); 1.27 (3); 2.54 (4); 5.08 (5). Условия: Трис-НСI-буфер, рН 8.0; Твин-20 – 1%; гемин – 1.3 мкМ; белок – 47 мкг/мл; 32°C.

видно, что увеличение концентрации донора электронов при различных концентрациях пероксида водорода замедляло скорость инактивации PGH-синтазы.

Нами исследована простагландинсинтазная активность свободных микросом везикулярных желез барана в процессе хранения при 4°C при добавлении к ним адреналина (0.5 мМ). Из результатов, представленных на рис. 4, видно, что в присутствии адреналина исходная простагландинсинтазная активность ферментного препарата была в 1.5 раза выше, а после семи суток хранения микросомы проявляли 13% исходной активности, тогда как препарат, не содержащий адреналина, полностью инактивировался уже на четвертые сутки.

Известно, что ионы двухвалентных металлов (кальций, магний, стронций) выступают в качестве стимуляторов синтеза простагландинов [17]. Кроме того, ионы кальция могут оказывать стабилизирующее влияние на иммобилизованную простагландинсинтазную полиферментную систему везикулярных желез козла [11]. Нами исследовано влияние ионов кальция на ферментативную активность микросом везикулярных желез барана. Показано, что исходная простагландинсинтазная активность микросом в присутствии ионов кальция, вносимых в раствор в виде CaCl_2 в количестве, соответствующем их содержанию в силикагеле (см. "Эксперимент. часть"), повышается в 1.7 раза по сравнению с контролем, не содержащим добавок, однако стабилизирующий эффект Ca^{2+} значительно ниже, чем адреналина (рис. 4). Поэтому было исследовано влияние совместного добавления адреналина и ионов кальция на простагландинсинтазную активность микросом. Действительно, при одновременном использовании этих добавок можно значительно стабилизировать и активировать ферментную систему в процессе хранения (рис. 4).

Аналогичные исследования проведены для иммобилизованных микросом. Влияние адреналина оценивали, добавляя его в инкубационную смесь перед иммобилизацией в концентрации 0.5 мМ и выдерживая 5 мин при 20°C. Для исследования влияния ионов кальция на активность иммобилизованного препарата проводили сорбцию на силикагеле без предварительной отмывки, т.е. содержащем 13% CaSO_4 . В качестве контроля использовали микросомы, иммобилизованные согласно описанной выше методике на силикагеле, предварительно отмывом от примеси CaSO_4 . Образцы хранили до 180 сут при 4°C. Полученные данные показывают, что ионы кальция оказывают активирующее влияние на иммобилизованные микросомы – выход продукта (PGB_2) повышается в 1.8 раза (рис. 5). Однако значительного влияния ионов кальция на стабильность препарата по сравнению с контролем не обнаружено. При использовании в качестве добавки адреналина также на-

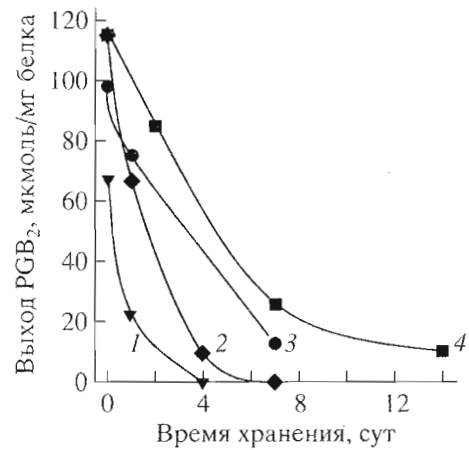


Рис. 4. Активность микросом (0.1 мг белка/мл) в процессе хранения при 4°C: без добавок (1), в присутствии ионов кальция (2), в присутствии адреналина (3), в присутствии адреналина и ионов кальция (4). Условия синтеза PGB_2 приведены в "Эксперимент. части".

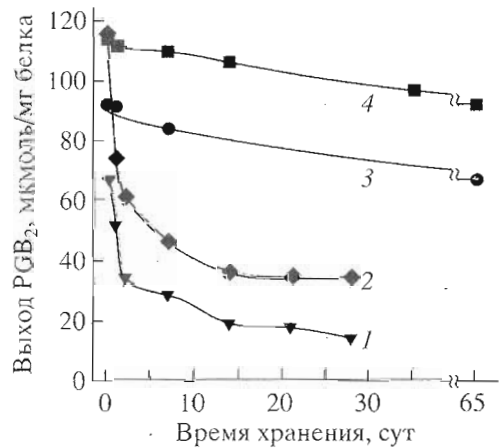


Рис. 5. Активность иммобилизованных микросом (0.1 мг белка/мл) в процессе хранения при 4°C: без добавок (1), в присутствии ионов кальция (2), в присутствии адреналина (3), в присутствии адреналина и ионов кальция (4). Условия синтеза PGB_2 приведены в "Эксперимент. части".

блюдалась некоторая активация ферментного препарата – в 1.3 раза по сравнению с контролем. Видно, что адреналин значительно стабилизировал простагландинсинтазную активность – инактивация иммобилизованного препарата через 65 сут хранения при 4°C составила всего около 20% (рис. 5). Присутствие в среде иммобилизации адреналина и ионов кальция одновременно оказывало значительный стабилизирующий эффект на активность иммобилизованного препарата. Так, сразу после иммобилизации выход PGB_2 был на 20% выше, чем при использовании микросом, сорбированных в присутствии только адреналина. Через 65 сут хранения при 4°C эта разница составила 10–15% (рис. 5).

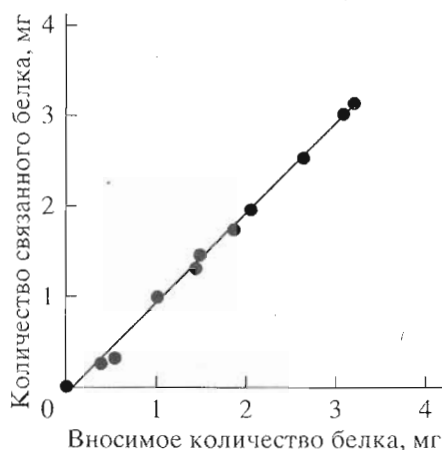


Рис. 1. Сорбция микросом на силикагеле. Условия: 3 мл 0.1 М Трис-НСI-буфера, рН 8.4; 0.5 г силикагеля; 200 мкл суспензии микросом с разным содержанием белка, 25 мин.

времени от начала прединкубации PGH-синтазы с гемином в присутствии кислорода полностью предотвращало дальнейшую инактивацию фермента.

Ранее нами был разработан метод иммобилизации простагландинсинтазного ферментного комплекса везикулярных желез барана на силикагеле [15]. Получаемый ферментный препарат сохранял 55% первоначальной простагландинсинтазной активности после 6 сут хранения [15]. Цель данной работы – исследование факторов стабилизации этой иммобилизованной простагландинсинтазной системы.

Работа по исследованию факторов, влияющих на стабильность простагландинсинтазной фер-

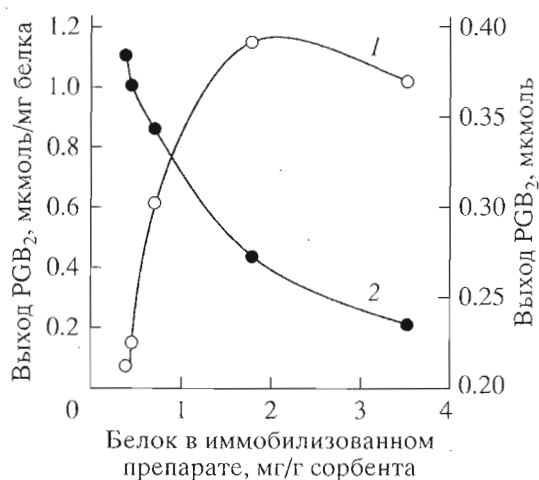


Рис. 2. Синтез простагландина иммобилизованными на силикагеле микросомами. Кривая 1 – правая ось, кривая 2 – левая ось. Условия: 3 мл 0.1 М Трис-НСI-буфера, рН 8.4; иммобилизованные на 0.5 г силикагеля микросомы; 0.5 мМ адреналин; 3.4 мкМ гемин; 71 мкМ арахидоновая кислота; 37°C; 45 мин.

ментной системы, проводилась с микросомами, полученными из везикулярных желез барана. Ферментные препараты иммобилизовали на силикагеле адсорбционным способом. Разработанные ранее условия иммобилизации [15] позволяют получать сорбированный ферментный препарат, обладающий 80–90% первоначальной простагландинсинтазной активности.

Результаты исследования кинетики сорбции микросом на силикагеле показали, что в интервале концентраций микросом от 0.8 до 6.4 мг белка/г сорбента в 3.2 мл раствора практически полная их сорбция (90–97% по белку) достигалась через 20–25 мин (рис. 1). Для иммобилизованных препаратов с разным содержанием микросом была исследована их способность катализировать синтез простагландинов. Оказалось, что по мере насыщения сорбента микросомами при увеличении общего выхода PGB_2 (рис. 2, кривая 1) его удельный выход снижался (рис. 2, кривая 2). Вероятно, с повышением концентрации белка на носителе образуются участки, где микросомы сорбируются в несколько слоев, в результате чего активный центр фермента становится недоступным. Частичная инактивация фермента в результате образования би-, трислоев на носителе отмечалась также и для других ферментов, например, для гексокиназы при иммобилизации на силикагеле [16].

В опытах по влиянию адреналина на стабильность свободных микросом была исследована пероксидазная активность содержащейся в них PGH-синтазы при использовании в качестве субстрата вместо арахидоновой кислоты пероксида водорода. Из полученных результатов (рис. 3)

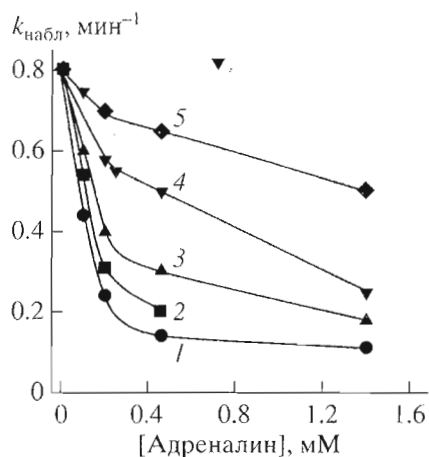


Рис. 3. Зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации пероксидазной реакции PGH-синтазы от концентрации адреналина при концентрации H_2O_2 (10^{-4} М): 0.635 (1); 0.89 (2); 1.27 (3); 2.54 (4); 5.08 (5). Условия: Трис-НСI-буфер, рН 8.0; Твин-20 – 1%; гемин – 1.3 мкМ; белок – 47 мкг/мл; 32°C.

видно, что увеличение концентрации донора электронов при различных концентрациях пероксида водорода замедляло скорость инактивации PGN-синтазы.

Нами исследована простагландинсинтазная активность свободных микросом везикулярных желез барана в процессе хранения при 4°C при добавлении к ним адреналина (0.5 мМ). Из результатов, представленных на рис. 4, видно, что в присутствии адреналина исходная простагландинсинтазная активность ферментного препарата была в 1.5 раза выше, а после семи суток хранения микросомы проявляли 13% исходной активности, тогда как препарат, не содержащий адреналина, полностью инактивировался уже на четвертые сутки.

Известно, что ионы двухвалентных металлов (кальций, магний, стронций) выступают в качестве стимуляторов синтеза простагландинов [17]. Кроме того, ионы кальция могут оказывать стабилизирующее влияние на иммобилизованную простагландинсинтазную полиферментную систему везикулярных желез козла [11]. Нами исследовано влияние ионов кальция на ферментативную активность микросом везикулярных желез барана. Показано, что исходная простагландинсинтазная активность микросом в присутствии ионов кальция, вносимых в раствор в виде CaCl_2 в количестве, соответствующем их содержанию в силикагеле (см. "Эксперимент. часть"), повышается в 1.7 раза по сравнению с контролем, не содержащим добавок, однако стабилизирующий эффект Ca^{2+} значительно ниже, чем адреналина (рис. 4). Поэтому было исследовано влияние совместного добавления адреналина и ионов кальция на простагландинсинтазную активность микросом. Действительно, при одновременном использовании этих добавок можно значительно стабилизировать и активировать ферментную систему в процессе хранения (рис. 4).

Аналогичные исследования проведены для иммобилизованных микросом. Влияние адреналина оценивали, добавляя его в инкубационную смесь перед иммобилизацией в концентрации 0.5 мМ и выдерживая 5 мин при 20°C. Для исследования влияния ионов кальция на активность иммобилизованного препарата проводили сорбцию на силикагеле без предварительной отмывки, т.е. содержащем 13% CaSO_4 . В качестве контроля использовали микросомы, иммобилизованные согласно описанной выше методике на силикагеле, предварительно отмытом от примеси CaSO_4 . Образцы хранили до 180 сут при 4°C. Полученные данные показывают, что ионы кальция оказывают активирующее влияние на иммобилизованные микросомы – выход продукта (PGB_2) повышается в 1.8 раза (рис. 5). Однако значительного влияния ионов кальция на стабильность препарата по сравнению с контролем не обнаружено. При использовании в качестве добавки адреналина также на-

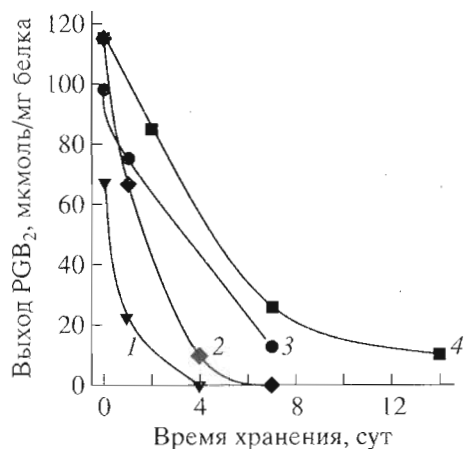


Рис. 4. Активность микросом (0.1 мг белка/мл) в процессе хранения при 4°C: без добавок (1), в присутствии ионов кальция (2), в присутствии адреналина (3), в присутствии адреналина и ионов кальция (4). Условия синтеза PGB_2 приведены в "Эксперимент. части".

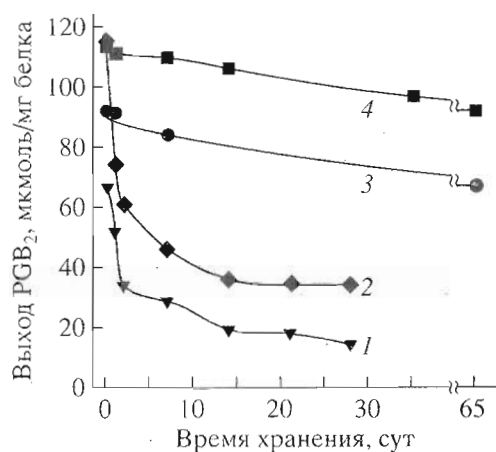


Рис. 5. Активность иммобилизованных микросом (0.1 мг белка/мл) в процессе хранения при 4°C: без добавок (1), в присутствии ионов кальция (2), в присутствии адреналина (3), в присутствии адреналина и ионов кальция (4). Условия синтеза PGB_2 приведены в "Эксперимент. части".

блюдалась некоторая активация ферментного препарата – в 1.3 раза по сравнению с контролем. Видно, что адреналин значительно стабилизировал простагландинсинтазную активность – инактивация иммобилизованного препарата через 65 сут хранения при 4°C составила всего около 20% (рис. 5). Присутствие в среде иммобилизации адреналина и ионов кальция одновременно оказывало значительный стабилизирующий эффект на активность иммобилизованного препарата. Так, сразу после иммобилизации выход PGB_2 был на 20% выше, чем при использовании микросом, сорбированных в присутствии только адреналина. Через 65 сут хранения при 4°C эта разница составила 10–15% (рис. 5).

Таким образом, ионы кальция оказывали в основном активирующее влияние на иммобилизованный простагландинсинтазный ферментный комплекс, а адреналин стабилизировал его, причем максимальный эффект достигался при одновременном использовании обеих добавок.

Основным препаративным способом получения природных простагландинов является их биосинтез. Существенный недостаток этого процесса – крайняя нестабильность ферментов синтеза простагландинов, поэтому невозможно их повторное использование. Полученные нами результаты по стабилизации и активации простагландинсинтазного ферментного комплекса открывают возможности для многократного использования иммобилизованных препаратов. Нами обнаружено, что микросомы, иммобилизованные в присутствии ионов кальция после трех циклов эксплуатации сохраняли около 50% активности. Введение в эту систему адреналина позволяло сохранить 96% исходной активности после трех циклов эксплуатации. После проведения трех циклов ферментативной реакции препарат, содержащий адреналин и ионы кальция, хранили при 4°C 28 сут и затем использовали еще в 5 циклах проведения реакции. Оказалось, что простагландинсинтазная активность после 8 циклов составила 66% от исходной. Таким образом, найденные условия иммобилизации позволяют эффективно использовать ферментный препарат многократно.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали арахидоновую кислоту – препарат Института биологии моря ДВО РАН, адреналин (Serva), гемин (Реахим), силикагель LS 5/40 · 13% CaSO₄ (Chemapol). Остальные реактивы квалификации “х. ч.”, “ч”, “ч. д. а.”. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-240 (Япония).

Получение ферментного препарата. Источником выделения микросомального ферментного препарата были везикулярные железы барана, полученные на Алма-Атинском мясокомбинате, которые хранили при температуре –20°C. Микросомальный ферментный препарат получали описанным методом [18]. Простагландинсинтазную активность ферментного комплекса определяли по его способности синтезировать простагландин E₂ (PGE₂) из арахидоновой кислоты. PGE₂ детектировали спектрофотометрически [5] после щелочной изомеризации в виде простагландина B₂ (PGB₂).

Подготовка силикагеля к работе. Для удаления ионов кальция коммерческий препарат силикагеля (25 г), содержащий 13% CaSO₄, промывали Трис-НСI-буфером рН 8.4 (20 раз по 100 мл) при

температуре 60°C. Отсутствие ионов кальция подтверждали качественной реакцией [19].

Иммобилизация микросомальной PG-синтазы адсорбционным методом. К 3 мл суспензии, содержащей 0.5 г сухого силикагеля, уравновешенного 0.1 М Трис-НСI-буфером (рН 8.4), добавляли 200 мкл суспензии микросом, содержавшей 0.55–0.56 мг белка. После перемешивания (30 мин при 4°C) носитель отделяли от супернатанта центрифугированием (3 мин, 4000 об/мин) и промывали 0.1 М Трис-НСI-буфером рН 8.4 (2 × 3 мл).

Количество сорбированного на силикагеле белка определяли по разности концентраций белка в исходной суспензии микросом и в супернатанте после центрифугирования. В некоторых случаях количество сорбированного белка определяли десорбцией белка с силикагеля [11]. Для этого силикагель с иммобилизованными микросомами кипятили в течение 30 мин с 2 н. КОН. Щелочной раствор отфильтровывали, нейтрализовали и определяли в растворе количество белка методом Лоури. Результаты, полученные обоими методами, совпадали.

Ферментативная активность микросом. а) *Простагландинсинтазная активность.* Инкубационная смесь (3 мл) содержала иммобилизованные микросомы (0.3 мг белка на 0.5 г сорбента), 0.5 мМ адреналин, 3.4 мкМ гемин и 71 мкМ арахидоновую кислоту. Реакцию проводили 45 мин при 37°C при перемешивании. Иммобилизованный фермент отделяли центрифугированием (3 мин при 4000 об/мин), промывали буфером и вновь использовали в опыте. Супернатант подкисляли, экстрагировали этилацетатом. Экстракты сушили Na₂SO₄ и упаривали досуха. Остаток растворяли в 3 мл этилового спирта, к раствору добавляли 200 мкл 2 М КОН в этиловом спирте для изомеризации PGE₂, образующегося при спонтанном разложении PGN₂, в PGB₂ [5]. Полученную смесь термостатировали при 37°C 30 мин. Концентрацию PGB₂ определяли по поглощению при 278 нм (ϵ_{278} 23000 М⁻¹ см⁻¹).

б) *Пероксидазная активность.* Пероксидазную активность определяли, непрерывно регистрируя на спектрофотометре изменение оптического поглощения окисленной формы адреналина (ϵ_{480} 4200 М⁻¹ см⁻¹), используя в качестве субстрата H₂O₂. Состав реакционной смеси приведен в подписи к рис. 3. Начальную скорость реакции определяли как тангенс угла наклона начального участка кинетической кривой. Наблюдаемую константу скорости инактивации фермента при малых степенях конверсии субстрата рассчитывали в полулогарифмических координатах как константу скорости реакции первого порядка [13]. Значения наблюдаемых констант скорости инактивации представляют собой результаты

расчетов с использованием метода наименьших квадратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамченко В.В., Новиков Е.И. // Акушерство и гинекология. 1982. № 9. С. 16–18.
2. Варфоломеев С.Д., Мевх А.Т. Простагландины – молекулярные биорегуляторы. М.: МГУ, 1985. С. 31–33.
3. Мевх А.Т., Игумнова Н.Д., Муратов В.К., Фрейманис Я.Ф., Кориц В.Ф., Варфоломеев С.Д. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 1334–1340.
4. Achmedov R.M., Mevkh A.T., Kulys J.J. // Anal. Chim. Acta. 1984. V. 166. P. 301.
5. Wallach D.P., Daniels E.G. // Biochim. Biophys. Acta. 1971. V. 231. P. 445–457.
6. Бейсембаева Р.У., Мурзагалиева А.Т., Джумалиева Л.М., Шайкенов Т.Е., Мевх А.Т. // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 2261–2267.
7. Yokoyama Ch., Takai T., Tanabe T. // FEBS Lett. 1988. V. 231. P. 347–351.
8. DeWitt D.L., El-Harith E.A., Kraemer S.A., Andrews M.J., Yao E.F., Armstrong R.L., Smith W.L. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 5192–5198.
9. Varfolomeyev S.D., Mevkh A.T. // Biotechnol. Appl. Biochem. 1993. V. 17. P. 291–304.
10. Yamamoto S. // Methods Enzymol. 1982. V. 86. P. 55–59.
11. Chosh D., Mukherjee E., Dutta J. // Indian J. Biochem. Biophys. 1990. V. 27. P. 76–80.
12. Мевх А.Т., Судьина Г.Ф., Якушева Л.А., Мягкова Г.И., Евстигнеева Р.П. // Биохимия. 1985. Т. 50. С. 974–979.
13. Мевх А.Т., Басевич В.В., Ярвинг И., Варфоломеев С.Д. // Биохимия. 1982. Т. 47. С. 1852–1858.
14. Муратов В.К., Мевх А.Т., Игумнова Н.Д., Чурюканов В.В. // Хим.-фарм. журн. 1990. Т. 24. С. 15–17.
15. Зацерковная Т.А., Бейсембаева Р.У. // Изв. МН-АН. Сер. биол. 1996. № 2. С. 58–61.
16. Березин И.В. Иммуобилизованные ферменты. М.: МГУ, 1976. Т. 1. С. 38.
17. Schrey M.P., Rubin R.P. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 11234–11241.
18. Van der Ouderaa F.J., Buytenhek M., Nugteren D.H., van Dorp D.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1977. V. 487. P. 315–331.
19. Алексеев В.Н. Качественный анализ. М.: Госхимиздат, 1954. С. 143–145, 372.

Prostaglandin H Synthase Immobilized on Silica Gel: Stability and Activity

R. U. Beisembaeva*, T. A. Zatserkovnaya*, Yu. A. Kuznetsova**, and A. T. Mevkh***

*Research Experimental Center of Biotechnology and Reproduction of Animals,
Ministry of Science and Academy of Sciences of Kazakhstan, Almaty

**Belozerskii Research Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University,
Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

Prostaglandin H synthase was isolated in the form of microsomes from sheep vesicular glands and immobilized on silica gel. This system of prostaglandin synthesis was activated by calcium ions and stabilized by adrenaline. Microsomes immobilized in the presence of adrenaline and calcium ions were stable upon storage at 4°C. After two months, their activity was 80% of the initial activity. Immobilized microsomes were able to catalyze several cycles of prostaglandin E₂ synthesis with no substantial loss of activity: after eight utilization cycles, they retained 66% of their initial enzymic activity.

Key words: prostaglandin H synthase, immobilization, stability, adrenaline, calcium ions

‡ To whom correspondence should be addressed; e-mail: mevkh@libro.genebee.msu.su; fax: +7 (095) 939-3181.