

А. Р. Мовсесян

ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СОСТАВ И НЕКОТОРЫЕ ПАРАМЕТРЫ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПШЕНИЦЫ

Макромолекула малаатдегидрогеназы ($\mathcal{L}$ - малаат-НАД-оксидоредуктаза - 1.1.1.37) растений является тетрамером и составлена из двух типов субъединиц, синтез которых контролируется двумя генетическими участками /1/. Отсюда очевидно, что изменения типа и структуры субъединиц МДГ могут указать на активацию или торможение соответствующих генетических участков у мутантов растений.

Нами предпринято исследование изоферментного спектра, структурных и физико-химических особенностей МДГ у мутантов пшеницы, отличающихся по ряду физиологических параметров. В настоящем сообщении приводятся данные об активности, составе изоферментов и стабильности структуры МДГ мутантной формы пшеницы "Скверхед".

Препараты МДГ выделяли из обезжиренной муки пшеницы /2-4/. Белки высаливали из экстракта 95% насыщением аммоний-сульфатом /5/. Перед фракционированием на ДЭАЭ-целлюлозе раствор белка обессоливали гель-фильтрацией через сефадекс Г-75, уравновешенный с 0,01 М фосфатным буфером pH 7,6, содержащим 10^{-3} М β - меркаптоэтанол.

Активность МДГ определяли двумя способами: в случае оценки активности раствора белка по образованию НАД на спектрофотометре при длине волны 340 нм в течение 1 мин., при 25°C (за единицу активности принимали изменения шкалы экстинкции на величину 0,01). Субстратом служила щавелево-уксусная кислота (ШУК). В случае определения активности изоферментов, при их разделении на полиакриламидном геле методом электрофореза, в качестве субстрата использовали яблочную кислоту, а оценку активности производили по интенсивности окраски электрофоретических полос /6/.

Результаты проведенных исследований показали, что при очистке на ДЭАЭ-целлюлозе препарат МДГ пшеницы разделяется на пять фракций, которые элюируются ступенчатым градиентом концентраций NaCl 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 0,4 М соответственно (рис. 1). Колоночная фракция, элюированная 0,01 М NaCl не проявляет ферментативной активности. Наибольшей активностью, при использовании в качестве субстрата ШУК, характеризуются 4-5 фракции. В то же время при электрофорезе на полиакриламидном геле обнаруживаются две фермен-

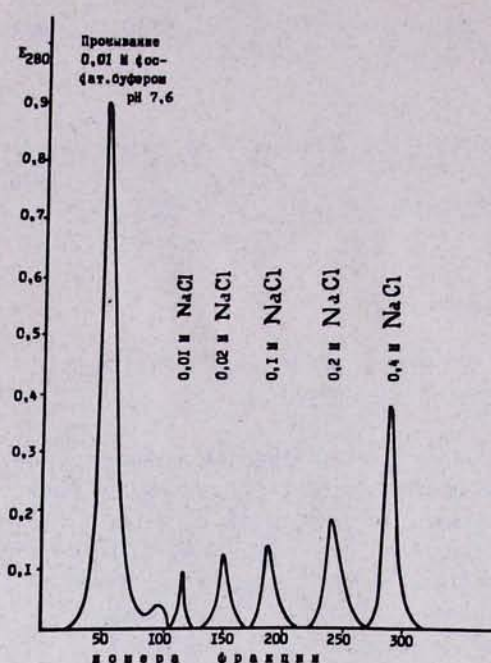


Рис. 1. Хроматография препарата малатдегидрогеназы из пшеницы на ДЭАЭ-целлюлозе. 0.01M фосфатный буфер pH 7.6; 10^{-3} M β -меркаптоэтанол.

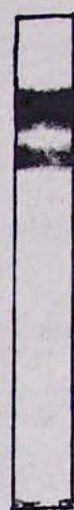


Рис. 2. Электрофорез малатдегидрогеназы пшеницы на полиакриламидном геле.

тативно активные полосы (рис. 2). Подобное различие в отношении к двум энзиматическим субстратам согласуется с тетрамерной структурой МДГ. Из рис. 3 видно, что кривая субстратной зависимости смеси всех фракций (изоферментов) МДГ имеет выраженную сигмоидную форму, что также указывает на кооперативность реакции, характерной для ферментов олигомеров.

Измерение оптической плотности раствора в максимуме светопоглощения (280 нм) показало, что изменение величины экстинкции в зависимости от концентрации мочевины (рис. 4) характеризуется двухступенчатой сигмоидной кривой, вторая часть кривой "Плавнение" наблюдается в области 4–6M мочевины, что, вероятно, объясняется разрушением тетрамера МДГ на мономеры и "плавлением" отдельных субъединиц. Так, в присутствии 4M мочевины или 1M NaCl происходит полная диссоциация МДГ на отдельные субъединицы с молекулярным весом 69000 /7/.

Двухфазный характер имеет кривая изменения оптической плотности раствора МДГ при нагревании (рис. 5). Первая фаза "Плавления" наблюдается до + 45°C, после чего начинается вторая фаза "плавле-

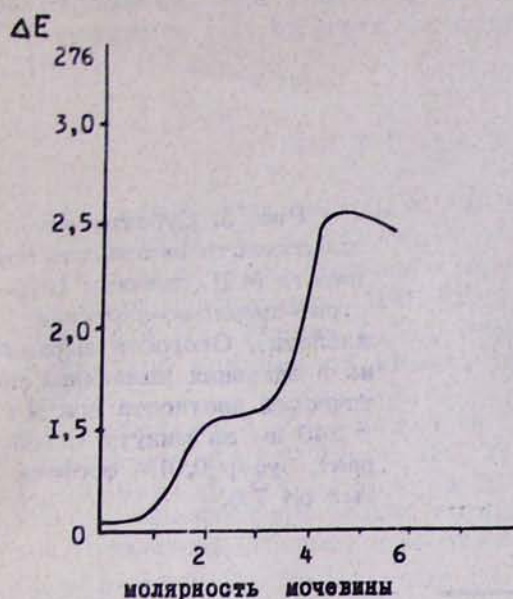


Рис. 3. Изменения относительной оптической плотности смеси изоферментов МДГ пшеницы в зависимости от концентрации мочевины. Буфер фосфатный 0.01M pH 7.6; $t = 20^{\circ}\text{C}$; $\lambda = 276 \text{ нм}$.

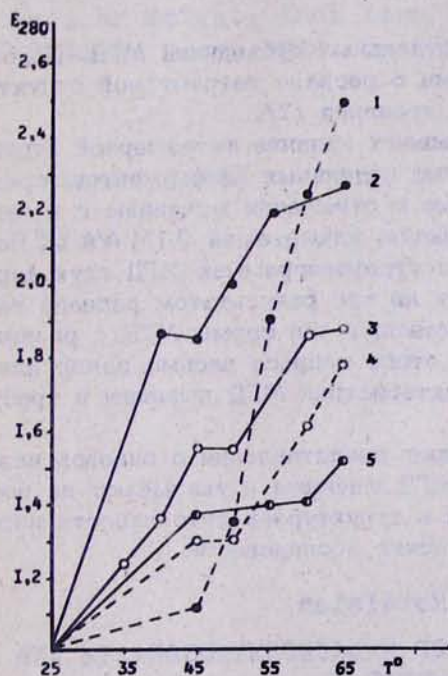


Рис. 4. Кривая "плавления" колоночных фракций препаратов МДГ: 1) элюирование 0.1M раствором NaCl ; 2) - 0.01M NaCl ; 3) - 0.02M NaCl ; 4) - 0.02M NaCl ; 5) - 0.4M NaCl .

ния", которая, вероятно, обусловлена расходом тетрамерной структуры с уменьшением α -спиральности в макромолекуле. Вторую часть кривой, как и в случае воздействия мочевиной, можно объяс-

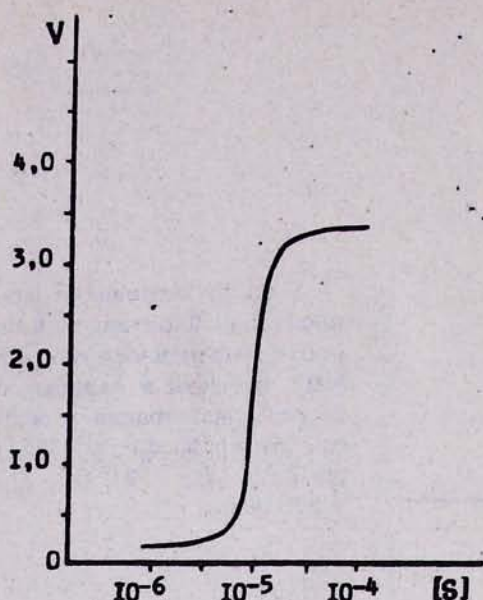


Рис. 5. Субстратная зависимость активности препарата МДГ пшеницы (субстрат-щавелево-уксусная кислота). Скорость выражена в единицах изменения оптической плотности при $\lambda = 340$ нм за минуту ($\times 100$ раз), буфер 0.01M фосфатный pH 7.6.

нить разрушением спиральности отдельных субъединиц МГД. Подобное заключение согласуется с данными о распаде тетрамерной структуры МГД растений в течение 14 дней хранения /7/.

Полученные результаты показывают наличие тетрамерной структуры МГД с различной стабильностью отдельных изоферментов, среди которых наибольшей устойчивостью в отношении мочевины и к тепловому воздействию отличается фракция, элюируемая 0.1M NaCl. Пока трудно объяснить появление на электрофореграммах МГД двух ферментативно активных полюсов. Является ли это результатом распада тетрамера на димер или же они представляют две формы МГД с разными молекулярными весами? Решение этого вопроса весьма важно для сравнительно-биохимической характеристики МГД пшеницы и требует специальных исследований.

Полученные данные подтверждают представления о видовой независимости тетрамерной структуры МГД пшеницы и указывают на возможность использования различий в структурной устойчивости изоферментов для сравнительно-генетических исследований.

A. R. Movsisian

THE ISOENZYMIC COMPOSITION OF MALATE DEHYDROGENASES AND SOME INDICES OF WHEAT

Summary

The results obtained support the conception of tetrameric structure and species independence of wheat malate-

dehydrogenases, and indicate that the structural differences of isoenzymes can be used in comparative genetic investigations.

ЛИТЕРАТУРА

1. Уилкинсон. Изоферменты, М., 1968.
2. Кретович В. Л., Карякина Т. И., Ткемаладзе Г. Ш., Сидельникова Л. И. Очистка и регуляция активности растительной малатдегидрогеназы. ДАН СССР, т. 189, № 6, 1389, 1969.
3. Honold G.R., Farkas C.L., Stahmann M.A. The oxidation-reduction enzymes of wheat. Cereal chemistry, 43, 517, 1966.
4. Броницкая З. С., Кретович В. Л. Малатдегидрогеназа семян сои. ДАН СССР, т. 180, № 6, 1488, 1968.
5. Броницкая З. С., Горетов В. П. Высаливание белков сернокислым аммонием при низких температурах. Таблица и номограмма. Прикладная биохимия и микробиология, № 3, 707, 1967.
6. Северная Т. А., Гильманов М. К., Яковлева В. И., Кретович В. Л. Малатдегидрогеназа корней, листьев и семян кукурузы. ДАН СССР, т. 181, № 5, 1284, 1968.
7. Habig W., Racusen D. A malat de hydrogenase of high molecular weight, from beau leaves. Canadian journal of Botany, v. 46, num. 5, 1968.