

Ж. Г. САРУХАНЯН, М. А. ДАВТЯН

## ИЗОФЕРМЕНТЫ АРГИНАЗЫ И $\gamma$ -ГУАНИДИНОБУТИРАТ-УРЕОГИДРОЛАЗЫ В ПЕЧЕНИ КУР

Производилось фракционирование экстракта печени кур сульфатом аммония, гель-фильтрация, ионообменная хроматография (КМ-целлюлоза). Выявлено наличие индивидуального фермента  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы в печени кур, а также наличие четырех изоферментов аргиназы и  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы, различающихся между собой как по молекулярному весу, так и по заряду.

В предыдущей нашей работе, исходя из совпадения внутриклеточной локализации аргиназы и  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы, а также наблюдаемого активирования обеих активностей после фракционирования путем дифференциального центрифугирования гомогената, было поставлено под сомнение существование индивидуального фермента  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы, не обладающего аргиназной активностью.

Мора и сотр. [4] при попытке выделить очищенный препарат  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы из печени цыплят удалось получить препарат с высокой активностью  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы, но не лишенный аргиназной активности.

С целью окончательного выяснения вопроса о наличии индивидуального фермента  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы печени кур нами проводились исследования по фракционированию экстракта печени кур аммоний-сульфатом с определением активности аргиназы и  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы в полученных фракциях.

*Материал и методика.* Опыты проводились на курах (7—9 месяцев) породы Леггорн. Активность ферментов аргиназы и  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы определяли микродиффузионным методом Зелигсона [5]. Ферментный препарат инкубировали при 37°C в течение 60 мин при pH 9,5 (0,04 М глициновый буфер) в присутствии L-аргинина или соответственно  $\gamma$ -гуанидинобутирата (50 мМ) и  $MnCl_2$  (5 мМ) с последующим определением мочевины. Затем в пробы добавляли уреазу и образовавшийся аммиак определяли колориметрически с помощью реактива Винклера. Интенсивность окраски определяли на ФЭК-56 при длине волны 460 мкм.

Активность фермента выражали в мкмольх образовавшейся мочевины на 1 г свежей ткани.

В случае необходимости быстрого определения активности ферментов пользовались менее продолжительным методом Арчибальда в модификации Мора и Кауфмана [3]. Ферментный препарат прединкубировали 15 мин в атмосфере воздуха при 37°C, затем инкубировали 20 мин при 37°C в 0,04 М глициновом буфере (pH 9,5) в присутствии L-аргинина или  $\gamma$ -гуанидинобутирата (0,7 М),  $MnCl_2$  (0,5 М). Образующаяся мочевина с диацетилмоноксимом дает желтое окрашивание, по интенсивности которого судят

с количестве ее. Пробы колориметрировали на СФ-4 при длине волны 478 м. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое в течение 1 мин в условиях эксперимента расщепляет 1 мкмоль субстрата. Белок определяли по методу Лоури. [2].

В I серии опытов гомогенат подвергали двукратному замораживанию и оттаиванию с последующим нагреванием при 60°C 5 мин. После этого центрифугировали при 18000 об/мин 30 мин и в полученном супернатанте определяли активность обоих ферментов.

При подобной обработке гомогенатов активность обоих ферментов переходит в супернатант. В дальнейшем этот экстракт подвергали дробному осаждению аммоний-сульфатом.

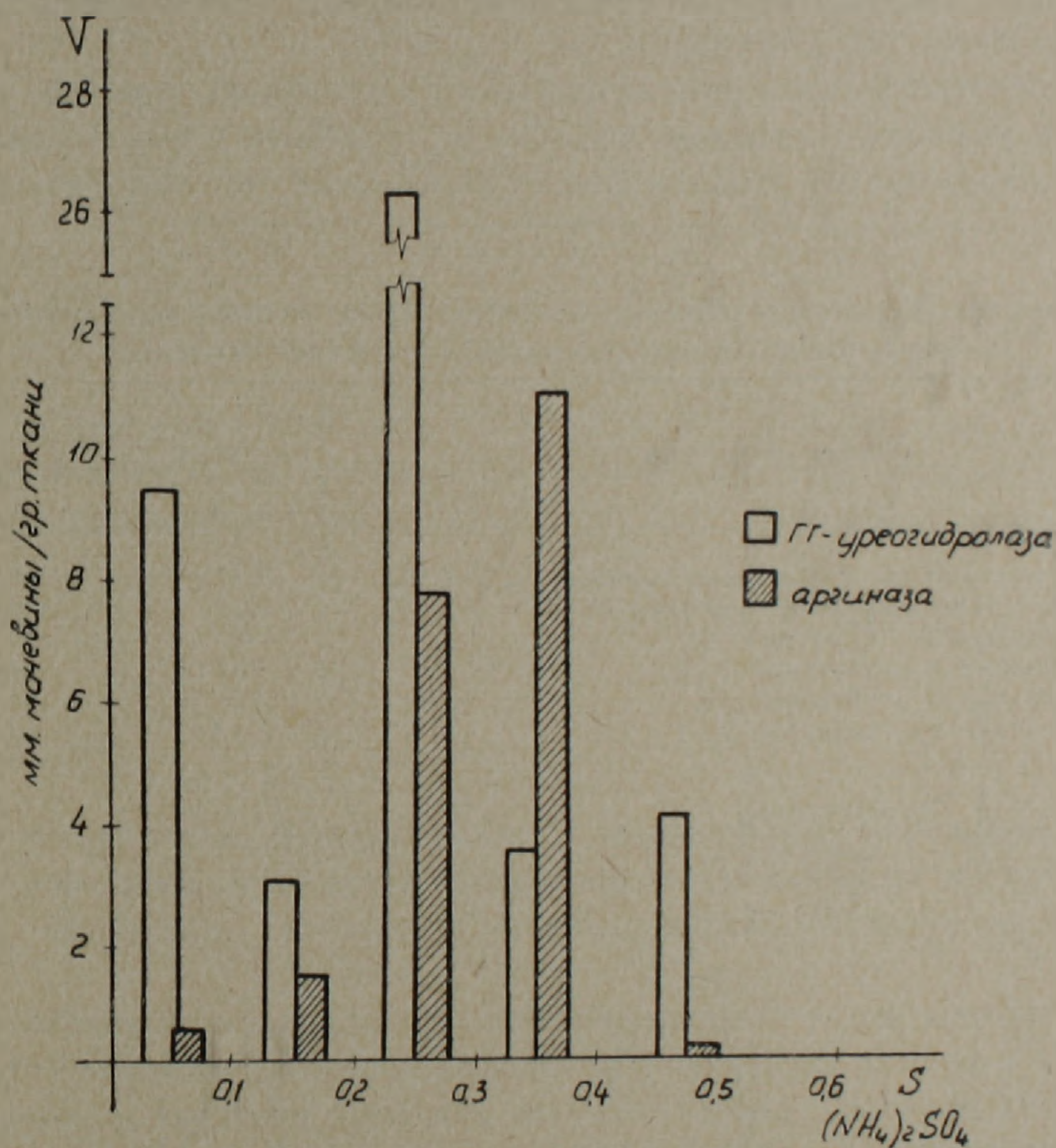


Рис. 1. Аргиназная и  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазная активности фракций, полученных при дробном осаждении экстракта печени кур сульфатом аммония (прирост мочевины в мкмоль/г свежей ткани).

Как видно из рис. 1, при осаждении аммоний-сульфатом при 0,1 насыщении [1], а также при насыщении 0,4—0,5 получается препарат, обладающий  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазной активностью и почти лишенный аргиназой. В этом препарате соотношение  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазной активности к аргиназной равняется 19:1 (при 0,1 насыщении), 2:1 (при насыщении 0,2) и 20:1 (при насыщении 0,4—0,5), тогда как в гомогенате — 4:1 и во фракциях, осаждаемых сульфатом аммония при насыщении 0,2—0,4, — 3:1. Это свидетельствует о том, что з

печени кур, по-видимому, имеются индивидуальные ферменты как  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы, так и аргиназы, ибо в противном случае соотношение двух активностей не должно меняться. Хотя во фракциях, полученных в двух крайних насыщениях сульфатом аммония (ниже 0,1 и выше 0,4), содержится преимущественно  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазная активность, однако для окончательного решения индивидуальности фермента  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы нами были продолжены опыты по фракционированию белкового препарата, осажденного из экстракта печени при 0,2—0,4 насыщении сульфатом аммония и содержащего основную активность как  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы, так и аргиназы.

В следующей серии опытов фракцию, полученную при 0,2—0,4 насыщении аммоний-сульфатом, подвергали тепловой и холодовой обработке. Приведенные в таблице данные показывают, что после двукратно-

Т а б л и ц а

Аргиназная и  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазная активность экстрактов печени кур, фракционированных сульфатом аммония

| Стадии обработки                                | Аргиназа | $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролаза |
|-------------------------------------------------|----------|------------------------------------------|
| Фракция (насыщение аммоний сульфатом 0,25—0,35) | 68       | 340                                      |
| Двукратное замораживание и оттаивание           | 65       | 410                                      |
| Нагревание при 60° С 10 мин                     | 0        | 44                                       |
| Замораживание и оттаивание I                    | 0        | 44                                       |
| Замораживание и оттаивание II                   | 0        | 44                                       |
| Замораживание и оттаивание III                  | 0        | 44                                       |

го замораживания этой фракции с последующим нагреванием ее при 60°С в течение 10 мин исчезает аргиназная активность, тогда как  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазная активность, правда понижаясь, сохраняется.

Интересно, что  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазная активность не меняется в течение последующего трехкратного замораживания и оттаивания. Таким образом, удалось получить активный препарат  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы, лишенный активности аргиназы. Но так как при подобной обработке, хотя и исчезает аргиназная активность, одновременно теряется и значительная часть  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы, возникает сомнение о возможной инактивации предполагаемого изофермента, обладающего обеими активностями, который в течение тепловой и холодовой обработки, описанной выше, теряет свою аргиназную активность. С целью внесения ясности в этот вопрос проводилась гель-фильтрация этой фракции (насыщение аммоний-сульфатом 0,2—0,4) на сефадексе G-200. На рис. 2 видно, что при этом получается один пик, обладающий активностью как аргиназы, так и  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы.

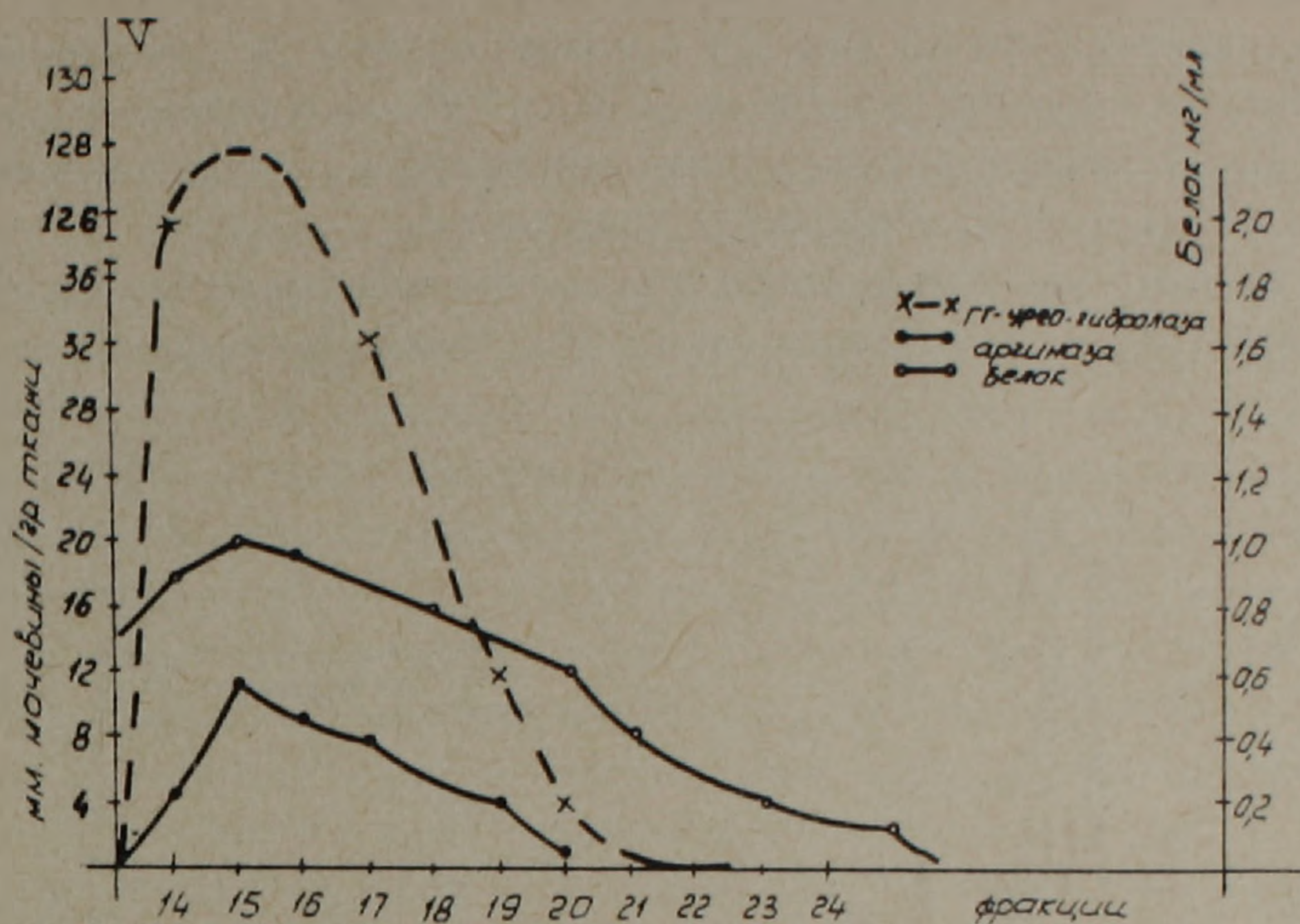


Рис. 2. Гель-фильтрация на сефадексе G-200 фракции экстракта печени кур, полученной при 0,2—0,4 насыщении сульфатом аммония.

При нанесении экстракта гомогената на колонку с сефадексом (без предварительного высаливания аммоний-сульфатом) проявляются два пика, обладающие обеими активностями (рис. 3), причем в пике, соот-

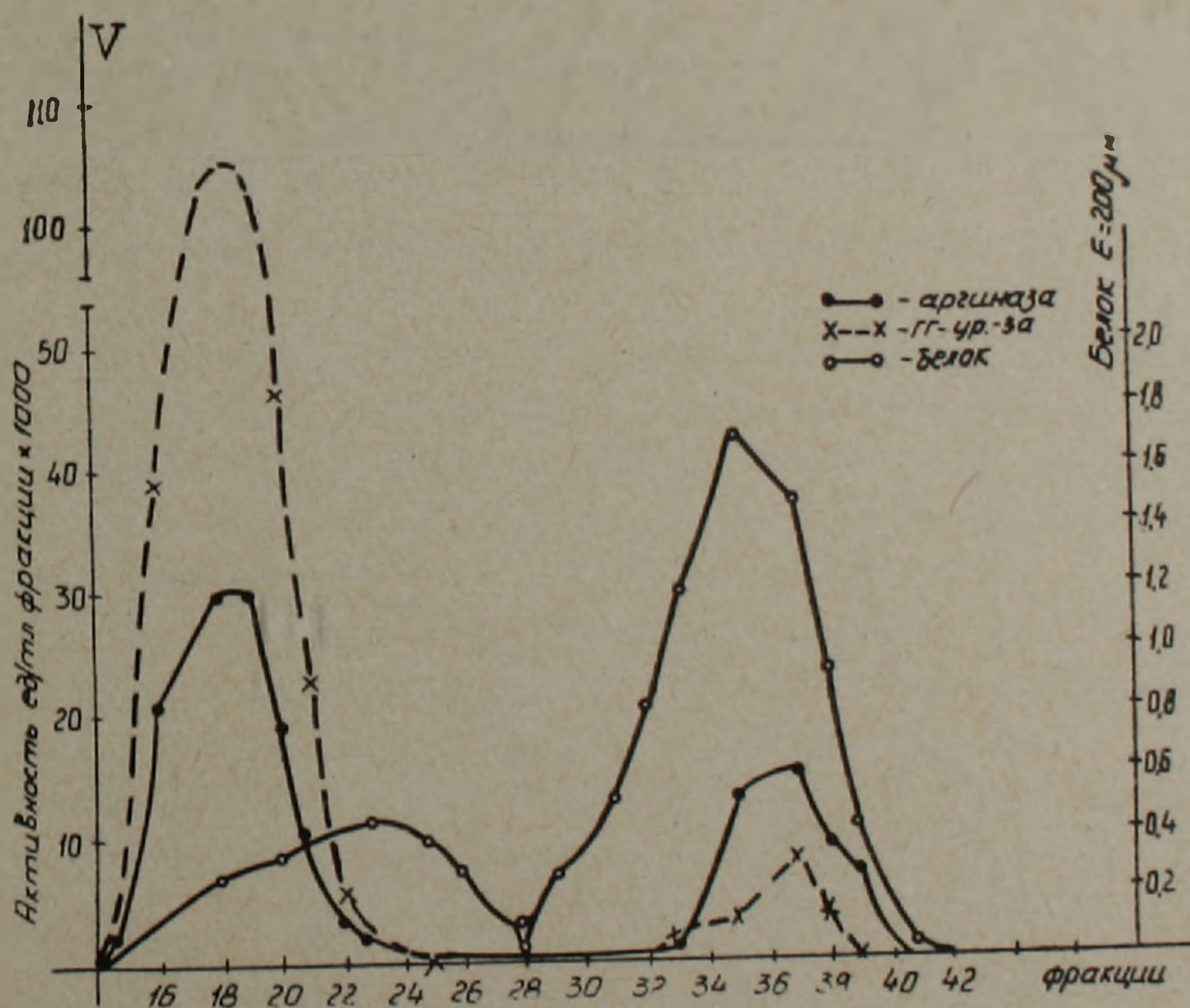


Рис. 3. Гель-фильтрация на сефадексе G-200 экстракта гомогената печени кур.

ветствующем высокомолекулярным белкам,  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазная активность выражена значительно больше, чем аргиназная, тогда как в пике низкомолекулярных белков отмечается обратное соотношение активностей.

При сравнении кривых рис. 2 и 3 можно прийти к заключению, что при насыщении аммоний-сульфатом от 0 до 0,25 осаждались ферментные фракции (обладающие активностями аргиназы и  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазы) с низким молекулярным весом.

При хроматографировании экстракта гомогената на колонке с КМ-целлюлозой (рис. 4) получается также два пика со смешанными актив-

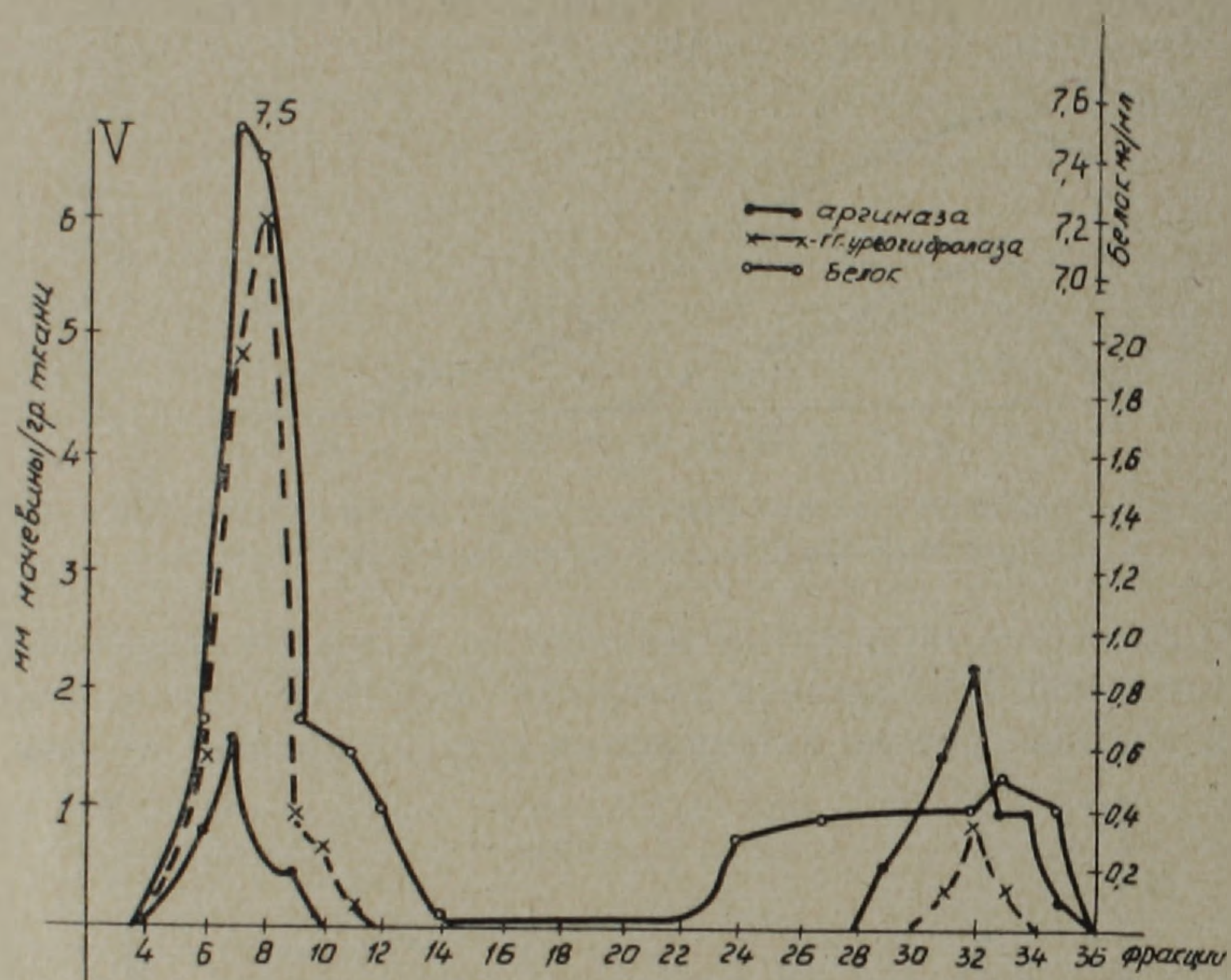


Рис. 4. Хроматография экстракта печени кур на колонке с КМ-целлюлозой.

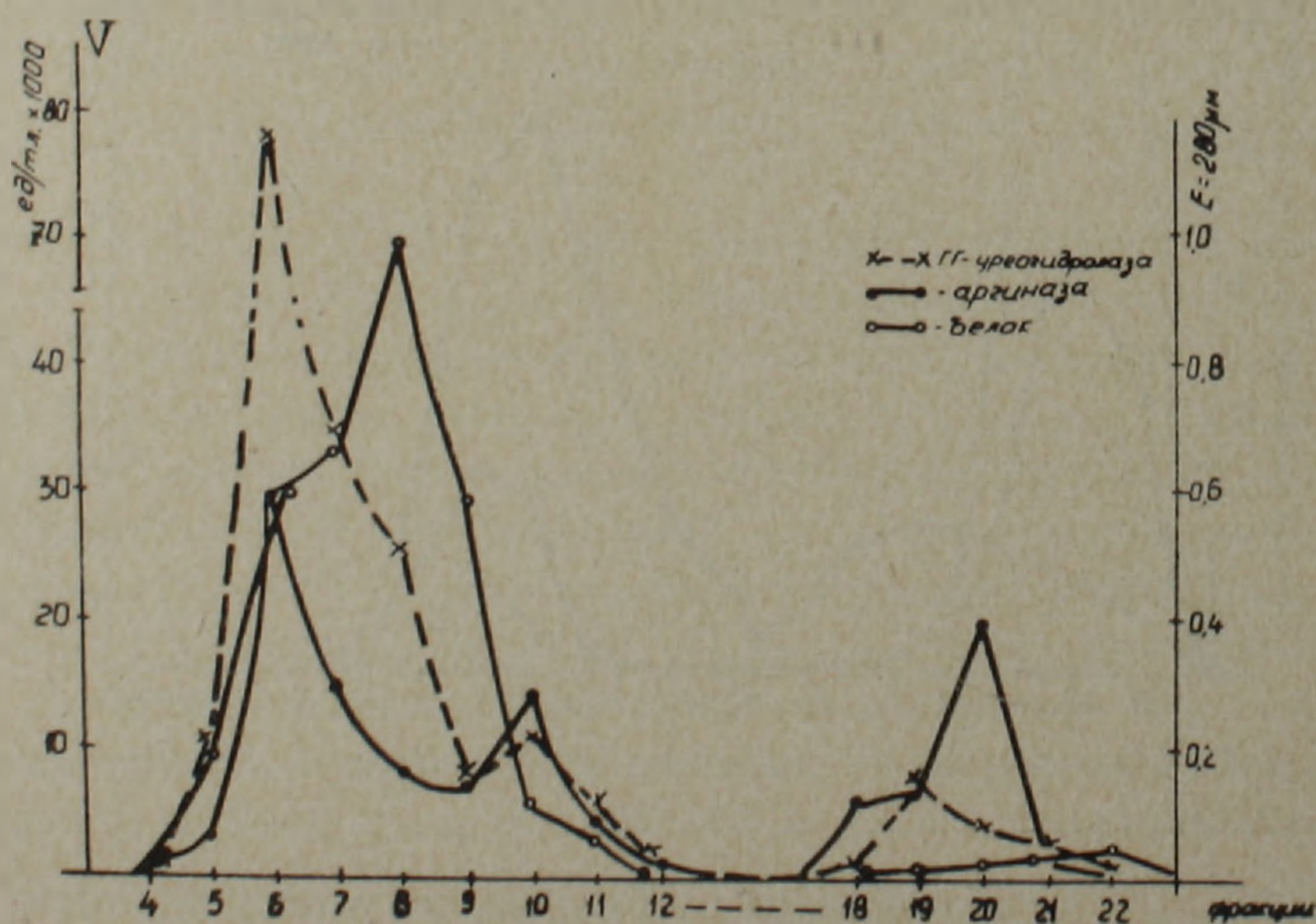


Рис. 5. Хроматография на КМ-целлюлозе большого пика, полученного при гель-фильтрации экстракта печени кур на сефадексе G-200.

ностями, причем в первом из них преобладает  $\gamma$ -гуанидинобутират-уреогидролазная активность, а во втором — аргиназная. Интересно, что при хроматографии на КМ-целлюлозе пика активностей, соответствующего белкам с высоким молекулярным весом (полученный при гель-фильтрации экстракта печени), получаются также два четко выраженных пика, обладающих обеими активностями, причем они по заряду идентичны пикам, полученным при хроматографии экстракта печени кур. Эти данные свидетельствуют о том, что пик с большим молекулярным весом состоит из изоферментов с различным зарядом белка. При сравнении кривых рис. 4 и 5 можно также заключить, что, по-видимому, и пик с низким молекулярным весом состоит из изоферментов с различными зарядами, так как соотношение изучаемых активностей в пиках, полученных при хроматографии экстракта печени кур, отличается от соотношения активностей в пиках, полученных при хроматографии белков с высоким молекулярным весом (большой пик, полученный при гель-фильтрации экстракта).

Институт биохимии  
АН АрмССР

Поступило 12.XII 1972 г.

Փ. Գ. ՍԱՐԳՍՅԱՆՆ, Մ. Ա. ԳԱԳԺՅԱՆ

# ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ԵՎ $\gamma$ -ԳՈՒԱՆԻԴԻՆՈՐՈՒՏԻՐԱՏՈՒՐԵՆՈՂԻԴՐՈՒԱԶԱՅԻ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԸ ՀԱՎԻ ԼՅԱՐԴՈՒՄ

Ա. մ. փ. ո. փ. ո. լ. մ.

Հավերի լյարդում առանձին  $\gamma$ -գուանիդինորուտիրատուրեոհիդրոլազայի գոյության պարզաբանման նպատակով կատարվել են հավերի լյարդի էքստրակտի ֆրակցիոնացում ամոնիում սուլֆատով, ժելֆիլտրացիայով (սեֆադեքս G-200), ինչպես նաև իոնփոխանակային քրոմատոգրաֆիայով (CM-ցելյուլոզա)։

Փորձերը ապացուցում են, որ հավերի լյարդում գոյություն ունի առանձին  $\gamma$ -գուանիդինորուտիրատուրեոհիդրոլազա։ Միաժամանակ եզրակացվում է, որ հավերի լյարդի էքստրակտում գոյություն ունեն արգինազայի և  $\gamma$ -գուանիդինորուտիրատուրեոհիդրոլազայի 4 իզոֆերմենտներ, որոնք միմյանցից տարբերվում են մոլեկուլյար կշռով և լիցքերի մեծությամբ։

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bevilacqua, Белки, I, М., 1956.
2. Lowry et al. J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.
3. Moore R. B. a. Kauffman N. J. Anal. Biochem. 33, 2, 1970.
4. Mora J. et al. Biochem. J. 96, 588, 1965.
5. Seligson a. Seligson. J. Lab. and clin. Med. 38, 324, 1951.