

А. А. СИМОНЯН, Р. Б. БАДАЛЯН

## ВЫДЕЛЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФРАКЦИЙ АТФазы ИЗ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ ПТИЦ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ И ИХ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

Из печени 19—20-дневных куриных эмбрионов выделены три фракции митохондриальной АТФазы, отличающиеся друг от друга общей активностью и стимуляцией  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  и ДНФ, а также своей термолабильностью и оптимумом рН.

В наших предыдущих исследованиях из печени взрослых кур были выделены четыре различные фракции митохондриальной АТФазы [1], отличающиеся друг от друга активностью как общей, так и  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  и ДНФ (2,4-динитрофенол)-стимулируемых АТФаз, а также своей термолабильностью и оптимумом рН. В настоящей работе ставилась цель выделить, очистить и изучить некоторые ферментативные свойства различных фракций митохондриальной АТФазы печени кур при их эмбриональном развитии.

*Материал и методика.* Объектом исследования служили 19—20-дневные куриные эмбрионы белой русской породы. Возраст цыплят определяли по срокам инкубации и корректировали по таблицам морфологического развития куриного эмбриона [2].

Описание методик изолирования субклеточных частиц ткани, выделения и очистки митохондриальной АТФазы печени и определение ее активности даны в нашей предыдущей работе [1].

Методом хроматографии на колонке ДЕАЕ-целлюлозы в линейном градиенте трис-НСI буфера полученный суммарный препарат АТФазы был распределен на 36 фракций.

*Результаты и обсуждение.* При анализе полученных данных обнаружилось, что АТФазной активностью обладают все фракции элюата, однако наивысшей удельной активностью отличаются три, условно обозначенные нами как I, II и III фракции.

Полученные результаты показывают, что в контрольных опытах (без добавления активаторов) наиболее высокой АТФазной активностью обладает II фракция, выделенная из митохондрий ткани печени 19—20-дневных куриных эмбрионов (табл. 1). При добавлении  $Mg^{2+}$  (10 ммоль) активность АТФазы в I фракции возрастает в 9, во II фракции — в 7,3, а в III — в 12 раз. Приведенные данные говорят о неравномерном распределении митохондриальной  $Mg^{2+}$ -стимулируемой АТФазы в отдельных фракциях.

Значительное активирование АТФазы в препаратах наблюдается в присутствии  $Ca^{2+}$  (20 ммоль). При этом активность фермента, по сравнению с контролем, в I фракции увеличивается в 4,2, во II — в 3,5 и в III фракции — в 5,5 раза. По сравнению с  $Ca^{2+}$ , и особенно  $Mg^{2+}$ ,

Таблица 1  
Влияние катионов и ДНФ на различные фракции митохондриальной АТФазы печени 19—20-дневных куриных эмбрионов. Р в мкатамах/мг белка,  $M \pm m$ .

Условия опыта	Ф р а к ц и и		
	I	II	III
Инкубированный контроль (без добавления активаторов)	$1,29 \pm 0,09$ (4)	$1,64 \pm 0,06$ (4)	$0,50 \pm 0,04$ (4)
$Mg^{2+}$	$10,50 \pm 0,43$ (4)	$12,00 \pm 0,30$ (4)	$6,14 \pm 0,40$ (4)
$Ca^{2+}$	$5,42 \pm 0,20$ (4)	$5,77 \pm 0,46$ (4)	$2,77 \pm 0,14$ (4)
ДНФ	$1,77 \pm 0,05$ (4)	$2,00 \pm 0,30$ (4)	$0,79 \pm 0,20$ (4)

Время инкубации I час при 37°.

активация АТФазы в различных фракциях при добавлении ДНФ ниже. Эти данные показывают, что выделенные из митохондрий печени куриного эмбриона белковые фракции обладают неодинаковой АТФазной активностью и в различной степени стимулируются катионами и ДНФ.

В следующих экспериментах мы исследовали влияние замораживания и оттаивания на активность различных фракций митохондриальной АТФазы (табл. 2). Полученные данные показывают, что после трехкратного замораживания (до  $-37^{\circ}C$ ) и оттаивания препаратов элюата ак-

Таблица 2  
Влияние замораживания и оттаивания на различные фракции митохондриальной АТФазы печени 19—20-дневных куриных эмбрионов, Р в мкатамах/мг белка,  $M \pm m$

Активаторы	Ф р а к ц и и		
	I	II	III
$Mg^{2+}$	$11,37 \pm 0,93$ (4)	$12,30 \pm 1,20$ (4)	$6,25 \pm 0,82$ (4)
$Ca^{2+}$	$5,27 \pm 0,72$ (4)	$4,76 \pm 0,58$ (4)	$3,23 \pm 0,14$ (4)

тивность как  $Mg^{2+}$ , так и  $Ca^{2+}$ -стимулируемой АТФазы несколько повышается во всех выделенных фракциях, за исключением АТФазы II фракции при ее стимулировании ионами Са.

В связи с полученными результатами и с целью выяснения степени термоустойчивости фермента представляло интерес изучение влияния температуры на активность АТФазы в полученных фракциях. В этих опытах соответствующие пробы элюата в течение 10 мин подвергались термообработке при 37, 45, 50, 60, 70 и 80°, а затем инкубировались в те-

чение часа при 37°. Результаты опытов, приведенные в табл. 3, показывают, что активность  $Mg^{2+}$ -стимулируемой АТФазы после термообработки при 70°, по сравнению с контролем (37°), во всех фракциях подавляется, однако не в одинаковой степени. При 80° фермент полностью инактивируется. Примерно таким же изменениям подвергается активность  $Ca^{2+}$ -зависимой АТФазы под влиянием температуры.

Таблица 3

Влияние температурного фактора на различные фракции митохондриальной АТФазы печени 19—20-дневных куриных эмбрионов. Р в мкатамах/мг белка

Температура при термообработке	Mg-зависимая АТФаза			Ca-зависимая АТФаза		
	фракции			фракции		
	I	II	III	I	II	III
37	10,49	12,58	6,42	5,73	6,02	2,85
45	10,32	12,33	6,07	5,47	5,86	2,73
50	9,65	11,50	6,08	5,39	5,32	2,73
60	8,99	10,63	5,39	4,53	4,70	2,68
70	5,49	5,30	2,63	3,29	2,68	2,22
80	0	0	0	0	0	0

Средние данные 4 опытов.

В последующей серии опытов было исследовано влияние рН среды на активность АТФазы. Результаты опытов, приведенные в табл. 4, показывают, что активность  $Mg^{2+}$ -зависимой АТФазы в I и III фракциях обнаруживается в довольно широком диапазоне рН среды (6,5—9,0). Однако во II фракции наивысшая активность фермента отмечается при рН 6,5—7,4. С дальнейшим повышением рН среды она постепенно снижается.  $Ca^{2+}$ -стимулируемая АТФазная активность во всех выделенных белковых фракциях при увеличении рН среды несколько увеличивается.

Таким образом, из печени 19—20-дневных куриных эмбрионов выделены три белковые фракции, обладающие различной АТФазной активностью. Как в контрольных опытах, так и в присутствии  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , а также ДНФ наивысшая активность фермента наблюдается во II, затем в I и III фракциях. Активность  $Mg^{2+}$ -зависимой АТФазы после трехкратного замораживания и оттаивания препаратов незначительно повышается. В этих условиях активность  $Ca^{2+}$ -стимулируемой АТФазы в III фракции незначительно возрастает, а в I и во II фракциях несколько понижается. Полученные данные свидетельствуют о том, что процессы замораживания и оттаивания неодинаково влияют на АТФазу, стимулируемую катионами, в различных белковых препаратах печени 19—20-дневных куриных эмбрионов. При термообработке препаратов различными температурами активность  $Mg^{2+}$ -стимулируемой АТФазы подавляется начиная с 60° и полностью исчезает при 80°. Аналогичная картина наблюдается при  $Ca^{2+}$ -стимулируемой АТФазе. Как  $Mg^{2+}$ , так и  $Ca^{2+}$ -

Таблица 4  
Влияние рН на различные фракции митохондриальной АТФазы печени 19—20-дневных куриных эмбрионов, Р в мкатамах/мг белка

рН	Mg-зависимая АТФаза			Ca-зависимая АТФаза		
	фракции			фракции		
	I	II	III	I	II	III
6,5	7,72	10,94	4,92	3,22	4,57	3,20
7,0	8,06	11,16	5,50	3,22	4,84	3,16
7,4	8,72	12,55	5,50	3,54	4,76	3,53
7,8	8,67	5,10	5,29	3,74	4,75	3,12
8,0	8,53	2,57	5,29	4,08	5,72	3,19
8,5	8,08	1,61	5,29	4,34	5,53	3,93
9,0	8,00	1,05	5,29	4,38	5,46	3,91

стимулируемые АТФазы в различных белковых фракциях имеют широкий диапазон действия рН (6,5—9,0), за исключением II фракции, где активность  $Mg^{2+}$ -стимулируемой АТФазы резко снижается начиная с рН 7,8.

Таким образом, на основании полученных данных можно прийти к заключению, что выделенные белки митохондриальной АТФазы печени 19—20-дневных куриных эмбрионов по своим свойствам не равноценны.

Институт биохимии  
АН АрмССР

Поступило 14.X 1974 г.

Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Ռ. Բ. ԲԱԳԱՅԱՆ

ԹԹՉՈՒՆՆԵՐԻ ԷՄԲՐԻՈՆԵՆԵԶՈՒՄ ԼՅԱՐԴԻ ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱՆԵՐԻՑ  
ԱՏՖազայի ՏԱՐԲԵՐ ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ  
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հավի 19—20 օրական սաղմերի լյարդից անջատվել են ԱՏՖազային հատկությամբ օժտված երեք սպիտակուցային ֆրակցիաներ, որոնք տարբերվում են իրենց ակտիվությամբ: Ինչպես Mg, Ca իոնների և 2,4-դինիտրոֆենոլի (ԴՆՖ) ներկայությամբ, այնպես էլ առանց դրանց, ֆերմենտի բարձր ակտիվություն դիտվում է անջատված երկրորդ, այնուհետև առաջին և երրորդ ֆրակցիաներում:

Ստացված արդյունքներից կարելի է եզրակացնել, որ հավի 19—20 օրական սաղմի լյարդից անջատվել են միտոքոնդրիալ ԱՏՖազայի երեք ֆրակցիաներ: Իրանք իրարից տարբերվում են ինչպես ընդհանուր, այնպես էլ  $Mg^{2+}$ ,

$Ca^{2+}$  և ԴՆՖ-խթանվող ԱՏՖազաների սկտիվություններ, ջերմակայունություններ և ազդեցության pH-ով: Բերված տվյալները հիմք են տալիս պնդելու, որ սաղմի միտոքոնդրիաներից անջատված ԱՏՖազային հատկություններ օժտված սպիտակուցները իրենց ֆերմենտային և ֆիզիկա-քիմիական հատկություններով միմյանցից տարբերվում են:

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Տիմոնյան Ա. Ա., Բադալյան Ք. Բ. Биологический журнал Армении, 10, 8, 1974.
2. Hamilton H. Lillies development of the chick. N. Y., 1952.