

ON THE INFLUENCE OF VERTICAL THERMOGRADIENTS OF SURROUNDINGS OF THE DYNAMICS OF PLANT BIOMASS FORMATION

N. P. KHURSHUDIAN

The positive thermogradient of surrounding in the primary period of ontogenesis quickens the biomass formation rate and inhibits during following stages of development, which is the result of the breach of correlative interrelation of plant roots and leaves. A great inhibition of root and underground organs growth is observed in *rudbekia* under the positive gradient.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Дадькин В. П., Григорьева В. Г. Докл. АН СССР, 80, 2, 1951.
2. Дадькин В. П. Особенность поведения растений на холодных почвах. М., 1952.
3. Закиров А. З., Умаров Х. У., Гафурова Б., Кутаева Ф., Сибханкулова В., Ходжиханова А. Физиология и биохимия хлопчатника. Ташкент, 1972.
4. Крамер П. И., Козловский Т. Т. Физиология древесных растений, М., 1963.
5. Незговорова Л. А. Физиология растений. Вып. 6, 3, 1956.
6. Радченко С. И. Советская ботаника, 6, 1934.
7. Радченко С. И. Тр. Ботан. ин-та им. В. Л. Комарова АН СССР, 4, 4, 1940.
8. Радченко С. И. Температурные градиенты среды и растения. М.—Л., 1966.
9. Флеров К. В., Якубцев С. И. Бюлл. отд. земледелия, 37, Государственный институт опытной агрономии, 1829.
10. Хуршудян Н. П. Биолог. ж. Армении, 30, 5, 1977.
11. Хуршудян Н. П. Канд. дисс., Ереван, 1979
12. Шахов А. А., Шищенко С. В. Сб.: Роль минеральных элементов в обмене веществ и продуктивности растений. М., 1964.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 3, 1982

УДК 577.1:577.15

ОЧИСТКА АРГИНАЗЫ СЕМЯДОЛЕЙ ГОРОХА

М. А. ДАВТЯН, Дж. А. ВАРДАНЯН

Изучалось поведение аргиназы семян гороха при гельфильтрации на сефадексе G-200 и попообменной хроматографии на ДЭАЭ целлюлозе. Разработан метод и произведена частичная очистка аргиназы семян гороха. Получен ферментный препарат со степенью очистки 44,4 с выходом 57%.

Ключевые слова: горох, семена, аргиназа.

В настоящее время обосновано существование уреотелического и неуреотелического изоферментов аргиназы, один из которых (уреотелический) встречается лишь у уреотелических организмов, участвуя в механизме нейтрализации аммиака путем биосинтеза мочевины, а второй (неуреотелический) имеет широкое биологическое распространение и обладает специфическими функциями [1—4, 10].

Растительная аргиназа — катаболический фермент, расщепляющий аргинин для обеспечения потребностей организма в азоте. Следует подчеркнуть, что во многих растениях обнаруживаются все ферменты орнитинового цикла, и, следовательно, в них аргиназа имеет уреотелический характер [12, 13]. Возникает вопрос о существовании в растениях неуреотелической аргиназы, т. е. аргиназы, не связанной с орнитиновым циклом.

В отличие от аргиназ животного происхождения и микроорганизмов исследования по изоэнзимному спектру аргиназы из растительных организмов в известной нам литературе отсутствуют.

Имеются немногочисленные исследования по очистке аргиназы из растительных организмов в отличие от аргиназ животного происхождения и микроорганизмов. Между тем получение высокоочищенных препаратов ферментов является необходимой предпосылкой для успешного развития дальнейших исследований по изучению структуры и возможностей разработки способов регулирования активности фермента. Особенно это необходимо для применения высокоочищенных препаратов аргиназы различного происхождения в качестве противоопухолевого средства.

Целью настоящей работы было изучение некоторых физико-химических свойств аргиназы семян гороха, поведения ее при гельфильтрации и ионообменной хроматографии, а также разработка метода очистки указанного фермента.

Материал и методика. Объектом исследования служили семена гороха Рамонский 77. Для опытов использовались семена гороха на второй день прорастания. Гомогенизация проводилась в стеклянном гомогенизаторе типа Поттер-Элведжема при 0—4° с кварцевым песком в дистиллированной воде. Аргиназная активность определялась методом Ратнера [9] с последующим определением мочевины по Арчибальду [6]. Константа Михаэлиса (Км) определялась методом Лайнуивера-Берка [5].

Результаты и обсуждение. Первая серия экспериментов посвящена выявлению внутриклеточной локализации аргиназы семян гороха. Для этого гомогенат семян гороха подвергался дифференциальному центрифугированию в дистиллированной воде при 2—4°. Активность фермента определялась как в надосадочных, так и в осадочных фракциях, получаемых при различных скоростях центрифугирования. Данные показали, что аргиназа локализована в растворимой (цитоплазматической) фракции и почти отсутствует в осадках.

Далее исследовалось влияние двухвалентных (Mn, Co, Ni, Fe, Mg, Zn) и трехвалентных (Fe) ионов металлов на аргиназу семян гороха. Оказалось, что ионы Mn повышают активность фермента на 451%. Сравнительно высоко также активирующее влияние ионов Fe (218%), Co (144%) и Fe⁺³ (137%); ионы Ni, Mg и Zn оказывают ингибирующее влияние на исследуемую активность.

Согласно литературным данным, аргиназа семян тыквы активируется ионами Mn на 167%; сравнительно слабо активируют ее ионы Fe и Co (10%), а Cu, K, Na, Ca, Mg не влияют на активность фермента [11]. В то же время выделенная из чины аргиназа не активирована

лась ионами Mn^{2+} ; максимальная активность ее наблюдалась в присутствии Fe^{3+} [7].

Исследования показали, что оптимальной для проявления аргиназной активности семядолей гороха является концентрация ионов Mn^{2+} от 1 до 2,5 мкМ. При более высоких концентрациях активность фермента падает и при 100 мкМ она составляет 1,2.

Для сравнения отметим, что оптимальная активность для аргиназы семядолей тыквы наблюдалась при концентрации ионов Mn^{2+} 40—100 мкМ, а в их отсутствие активность фермента неочищенных экстрактов вообще не обнаруживалась [11].

Большая серия экспериментов была посвящена изучению поведения активности аргиназы семядолей гороха при гельфильтрации на сефадексе G-200 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ целлюлозе.

На первом этапе бесклеточный экстракт семядолей гороха после обработки ионами Mn^{2+} центрифугировался при 25000 g в течение 30 мин. Полученный экстракт пропускался через колонку (2×40) с сефадексом G-200, предварительно уравновешенным 0,02 M трис-ацетатным буфером (pH 8,0). Элюция из колонки проводилась тем же буфером со скоростью 20 мл/ч при температуре 2—4°. Фракции собирались в объеме 5 мл каждая; содержание белка определялось измерением оптической плотности при 280 нм на спектрофотометре (СФ-4).

Все белоксодержащие фракции испытывались на наличие в них аргиназной активности. Кривые гельфильтрации, представленные на рис. 1, показывают, что основная часть активности аргиназы фильтруется в виде одного пика во фракциях 5—10.

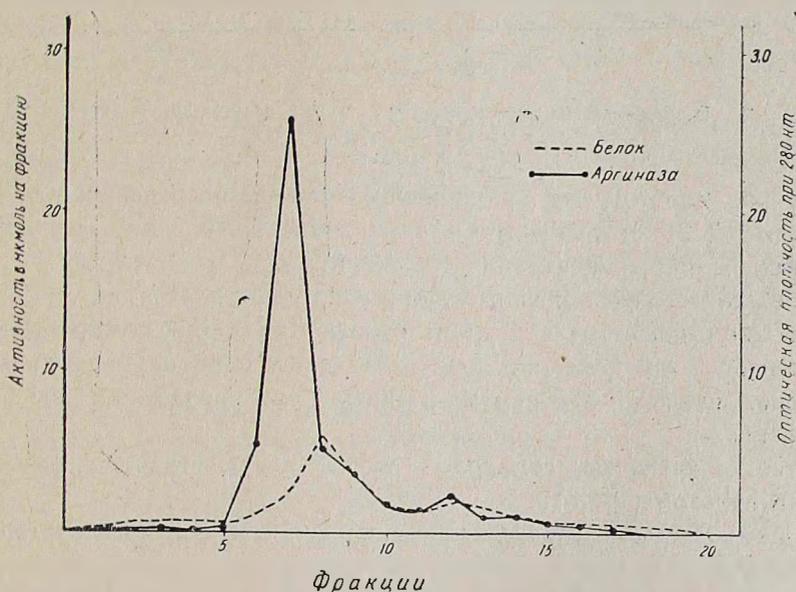


Рис. 1. Гельфильтрация аргиназы семядолей гороха на сефадексе G-200.

Таким образом, в результате гельфильтрации на сефадексе G-200 получен один пик активности фермента. Следует отметить, что он не совпадает с белковым пиком, вследствие чего удельная активность фермента довольно высокая.

На следующем этапе исследовалось поведение полученного гель-фильтрацией пика при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ целлюлозе. С этой целью активные фракции после гельфильтрации [6—9] объединялись и пропускались через колонку (1,5×25) с ДЭАЭ целлюлозой, предварительно уравновешенной 0,02 М трис-ацетатным буфером рН 8,0 со скоростью 1 мл/мин. Элюция осуществлялась различными концентрациями КСl (0,1—0,3 М). Полученные данные представлены в виде графика на рис. 2.

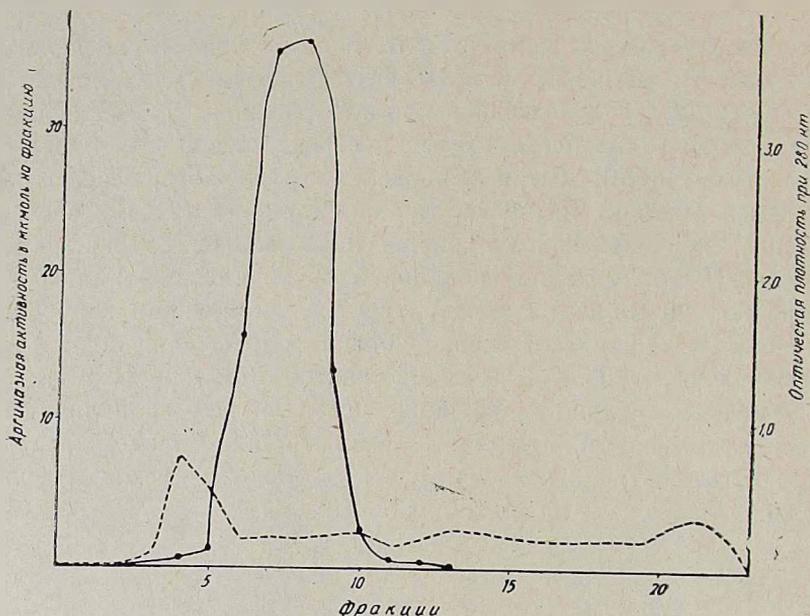


Рис. 2. Ионообменная хроматография аргиназы семян гороха на ДЭАЭ целлюлозе.

Из рис. следует, что при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ целлюлозе был также получен один пик аргиназной активности, элюируемый при концентрации КСl 0,2 М.

Обобщая вышеизложенные данные по гельфильтрации на сефадексе G-200 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ целлюлозе, можно заключить, что семена гороха содержат один пик аргиназы.

Основываясь на полученных данных, нами разработан способ очистки аргиназы.

Очистка аргиназы семян гороха осуществлялась нами следующим образом (табл.):

I этап: семена гороха гомогенизировались в гомогенизаторе типа Поттер-Элведжема в присутствии кварцевого песка в дистиллированной воде при 0°, после чего полученный гомогенат центрифугировался при 25000 g в течение 30 мин (0—2°).

II этап: к бесклеточному экстракту (10 мл) добавлялось 0,86 мл 5 мкМ раствора хлористого марганца, и экстракт оставлялся при —15° в течение 10—12 ч. Образовавшийся неактивный осадок удалялся цен-

трифугированием при 25000 г в течение 30 мин (0—2°). При этом в два раза повышалась общая и в 5 раз — удельная активность фермента.

Таблица
Этапы очистки аргиназы семядолей гороха, активность фермента в мкМ мочевины

Этапы очистки	Общий белок, мг	Общая активность	Удельная активность	Выход, %	Степень очистки
1. Бесклеточный экстракт	95,4	74,4	0,8	100	—
2. Обработка марганцем	36,9	144,4	3,9	194	4,9
3. Гельфильтрация (сефадекс G-200), фракции 6—9	3,2	73,3	22,9	99	28,8
4. Ионобменная хроматография (ДЭАЭц), фракции 6—8	1,2	42,3	35,3	57	44,4

III этап: полученный надосадок подвергался гельфильтрации на сефадексе G-200, уравновешенном 0,02 М трис-ацетатным буфером (рН 8,0), содержащим 5 мМ треонина и 1 мМ хлористого марганца; объем фракций 5 мл.

IV этап: активные фракции (6—9), полученные при гельфильтрации, объединялись и подвергались ионобменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ целлюлозой, предварительно уравновешенной 0,02 М трис-ацетатным буфером (рН 8,0); объем фракций 5 мл. Активность аргиназы фильтровалась во фракциях 6—8 0,2 М КСl.

Таким образом, мы получили аргиназу семядолей гороха со степенью очистки 44,4 с выходом 57% и удельной активностью 35,3. Следует подчеркнуть, что нами достигнута определенная степень очистки аргиназы, значительно превышающая очистку фермента из семядолей тыквы [11].

Была определена константа Михаэлиса (Км) фермента для L-аргинина графическим методом Лайнуивера-Берка. Для аргиназы семядолей гороха она равна $3,1 \times 10^{-3}$ М.

Определенная нами величина Км близка значениям Км из *Lathyrus sativus* ($5,5 \times 10^{-3}$ М) [7]. Однако, по сравнению с семядолями гороха, у аргиназы семядолей тыквы сродство субстрата значительно выше ($0,026 \times 10^{-3}$ М) [11], а у сои и люпина — ниже (50×10^{-3} М и 55×10^{-3} М) [8, 14].

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии
и проблемная лаборатория сравнительной и
эволюционной биохимии

Поступило 29.V 1981 г.

ՈՒՈՒԻ ՇԱՔԻՆՆԵՐԻ ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ՄԱՔՐՈՒՄԸ

Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Զ. Հ. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ

Մշակվել է ոլոռի շաքիլների արգինազայի մաքրման մեթոդ: Ֆերմենտի մաքրումն իրականացվել է հետևյալ փուլերով՝ անբջիջ էքստրակտի մշակում՝ MnCl₂-ի լուծույթով, հելֆիլտրացիա սեֆադեքս G-200-ով և իոնափոխանա-

Կլիին քրոմատոգրաֆիա ԴէԱէ ցելուլոզայի վրա: Ստացված ֆերմենտային պրեպարատը մաքրվել է 44,4 անգամ 57% ելքով:

PURIFICATION OF ARGINASE OF PEA COTYLEDONS

M. A. DAVTIAN, J. A. VARDANIAN

The arginase behavior of pea cotyledons under gel-filtration on G—200 sephadex and ion-exchange chromatography on cellulose has been studied. A method has been worked out and partial purification of pea cotyledons arginase carried out.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Барсегян Э. Х., Никогосян Ф. Ц., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 30, 6, 12, 1977.
2. Давтян М. А. Докт. дисс., Ереван, 1970.
3. Давтян М. А., Бунятыан Г. Х. Биохимия, 35, 412, 1970.
4. Давтян М. А., Агаджанян А. Х., Заробян Т. Я. Биолог. ж. Армении, 29, 6, 1976.
5. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты, М., 1966.
6. Archibald R. M. J. Biol. Chem., 156, 121, 1944.
7. Cheema P. S., Padmanaban G., Sarma P. S. Phytochemistry, 8, 409, 1969.
8. Dumitru J. F. Acta vitamin. enzymol., 27, 267, 1973.
9. Ratner S., Pappas A. Biochem. J., 179, 1183, 1949.
10. Reddy S. R., Campbell J. W. Biochem. J., 115, 3, 495, 1969.
11. Splittstoesser W. E. Phytochemistry, 8, 4, 1969.
12. Shargool P. D., Cossins E. A. Can. J. Biochem., 47, 467, 1969.
13. Shargool P. D. Phytochemistry, 10, 2029, 1971.
14. Muszynska G., Severina L. O. Lobyreva L. W. Acta biochim. pol., 19, 109, 1972.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 3, 1982

УДК 595.754(479.25):578.081

ТЕКСТОВОЙ ПОЛИТОМИЧЕСКИЙ ОДНОВХОДОВЫЙ ОПРЕДЕЛИТЕЛЬ СЕМ. COREIDAE (HETEROPTERA) АРМЕНИИ

Э. Г. АКРАМОВСКАЯ

Приводится текстовой одноходовый политомический определитель сем. Coreidae Армении, созданный ЭВМ. Сравняется определение по количеству ступеней и признаков, использованных на определение по дихотомическому и одноходовому текстовому политомическому определителю.

Ключевые слова: полужесткокрылые насекомые сем. Coreidae, определитель текстовой, электронно-вычислительная машина.

Электронно-вычислительная машина «Наири-2» по введенному в нее алгоритму «Эребуни» и цифровой таблице сем. Coreidae Армении [1] с помощью программ Лобанова [3] составила оптимизированный одноходовый политомический текстовой определитель. Для определения