

6. Галушка Ф. П., Азизбемян Р. Р. Докл. АН СССР, 236, 1233, 1977.
7. Григорьева Т. М., Азизбемян Р. Р. Генетика, 16, 1786, 1980.
8. Дебабов В. Г., Азизбемян Р. Р., Хлебалина О. И., Дьяченко В. В., Галушка Ф. П., Бельх Р. А. Генетика, 13, 3, 496, 1977.
9. Захарян Р. А., Израелян Ю. А., Агабальян А. С., Татевосян П. Е., Акопян С. М., Африкян Э. К. Микробиология, 48, 226, 1979.
10. Погосбекова М. Р., Азизбемян Р. Р. Генетика, 17, 609, 1981.
11. Рябченко И. Ф., Буканов Н. О., Саканян В. А., Алиханян С. И. Докл. АН СССР, 253, 729, 1980.
12. Azizbekyan R. R., Belych R. A., Stepinova T. V. Abstr. IV Genetics of Indust. Microorganisms, Kyoto, 55, 1982.
13. Azizbekyan R. R., Grigoreva T. M. Abstr. XII Internat. Congr. Microbiol., Boston, 81, 1982.
14. Barjac de H. C. Acad. Sci., 270D, 2227, 1970.
15. Gonzales J., Carlton B. Plasmid, 3, 92, 1980.
16. Gonzales J., Dulmage H., Carlton B. Plasmid, 5, 351, 1981.
17. Faust R., Spizizen J., Gage V., Travers R. J. Invertebr. Pathol., 33, 233, 1979.
18. Itzuka T., Faust R., Travers R. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ., 60, 143, 1981.
19. Klier A., Fargette F., Ribier J., Rapoport G. The EMBO Journal, 1, 791, 1982.
20. Landen R., Heirson A., Boman H. J. Gen. Microbiol., 123, 49, 1981.
21. Lecadet M.-M., Blondel M., Ribier J. J. Gen. Microbiol., 121, 203, 1980.
22. Lereclus D., Lecadet M.-M., Ribier J., Dondor R. Mol. Gen. Genetics, 186, 391, 1982.
23. Martin Ph., Lohr J., Dean D. J. Bacteriol., 145, 980, 1981.
24. Mileva V., Shivarova N., Grigorova R. FEMS Microbiol. Lett., 12, 253, 1981.
25. Perlak F., Mendelsohn C., Thorne C. J. Bacteriol., 140, 699, 1979.
26. Snepf E., Whiteley E. Proc. Natl. Acad. Sci., 48, 5, 2893, 1981.
27. Stahly E., Dingman D., Bulla L., Aronson A. Biochem. Biophys. Res. Comm., 84, 581, 1978.
28. Stahly D., Dingman D., Irgens R., Field C., Peiss M., Smith G. FEMS Microbiol. Lett., 3, 139, 1978.
29. Thorne C. Appl. Environm. Microbiol., 35, 1103, 1978.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 3, 1983,

УДК 577.159

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И ИОНОВ МЕДИ С АМФОЛИНАМИ

М. А. СИМОНЯН, А. Т. МИРЗОЯН, Р. М. НАЛБАНДЯН

Инкубация супероксиддисмутазы из эритроцитов с амфолинами приводит к заметной инактивации ее, в результате присоединения к меди, и к хелации. Показано образование комплексов меди с амфолинами, характеризующихся полосами поглощения при 280 и 680 нм, причем полоса в УФ области обладает высоким коэффициентом экстинкции, сопоставимым с таковым ароматических аминокислот в белках.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, ионы меди, амфолины.

В последнее десятилетие широкое распространение получил метод изоэлектрического фокусирования, используемый для препаративных

целей, изучения изоферментного состава, определения изоэлектрических точек белков [2, 9]. Высокая разрешающая способность метода дает возможность применять его также для изучения металлопротеинов. Метод изоэлектрического фокусирования был использован для определения изоферментного состава медьсодержащей оксидазы из грибов: лакказы [7] и медь-, цинксодержащей супероксиддисмутазы [6]. Полученные данные интерпретировались как доказательство наличия 7 изоферментов у лакказы и 3 изоферментов у супероксиддисмутазы.

Буферные системы, амфолины (полиаминополикарбоновые кислоты), используемые при применении метода изоэлектрического фокусирования, обладают выраженными хелирующими свойствами. Установлено, что обработка амфолинами негеминового железосерного белка из надпочечников, адренодоксина, приводит к удалению железа, причем полученный препарат апобелка обладает способностью к реконструкции [1]. В предварительных исследованиях было обнаружено также, что амфолины удаляют металл и из медьсодержащих белков церулоплазмينا, пластоцианина и супероксиддисмутазы. Изучение взаимодействия амфолинов с различными металлопротеинами методом изоэлектрического фокусирования позволит корректнее интерпретировать результаты.

В данной работе приводятся результаты исследования взаимодействия амфолинов с медь-, цинксодержащей супероксиддисмутазой.

Материал и методика. Электрофокусирование проводили на установке фирмы «ЛКВ», используя колонку объемом 110 мл. Спектры ЭПР замороженных растворов в 3-миллиметровых кварцевых ампулах регистрировали на приборе «Varion-E-4». Условия регистрации сигналов: температура—180°, частота—9,12 Гц, мощность—10 мвт, амплитуда модуляции—6,3 гаусс, скорость развертки поля—250 гаусс/мин, постоянная времени—0,3 сек. Значения магнитного поля, в которых наблюдается резонанс, указаны на соответствующих рисунках. Оптические спектры записаны на приборе фирмы «Beckman» в 10-миллиметровых кюветах при комнатной температуре.

Супероксиддисмутаза из эритроцитов быка была получена в электрофоретически гомогенном состоянии [3]. Активность фермента анализировали по его способности ингибировать реакцию автоокисления адреналина в адренохром в Na-карбонатном буфере при pH 10,2 [8].

В работе использованы ДЕ-52 целлюлоза фирмы «Whatman», сефадексы фирмы «Pharmacia» и амфолины фирмы «ЛКВ». Остальные реагенты—отечественного производства марки ч. д. а.

Результаты и обсуждение. При электрофокусировании электрофоретически гомогенного препарата супероксиддисмутазы в 1%-ном растворе амфолинов в элюиционном профиле его (построенном по поглощению в ультрафиолете) было обнаружено 3 максимума. Все эти фракции содержали медь. На основании этих фактов можно было прийти к выводу о наличии у супероксиддисмутазы 3 изоферментов. Более подробное исследование этих фракций показало, что их оптические и ЭПР-спектры и ферментативные активности существенно различаются. Поэтому можно было предположить также, что появление 3 фракций обусловлено модификацией части молекул фермента в ходе длительной инкубации с амфолинами. Для проверки этого предположения была



поставлена серия опытов, в которых фермент инкубировали в различном диапазоне рН с амфוליдами в течение различных периодов времени, от нескольких минут до нескольких суток. О модификации белка судили по изменению его оптических и ЭПР-спектров. Инкубация амфוליнов с супероксиддисмутазой без проведения электрофокусирования вызывает изменение спектров фермента, причем изменяются не только ЭПР-спектры, но и поглощение в видимой и УФ области, за которые ответственны атомы меди белка и белковая часть фермента соответственно (рис. 1).

Результаты этой серии исследований позволили сделать следующие заключения: изменения в спектрах белка вызывают амфоллины щелочного (рН 8—10) и кислого диапазона (рН 3—5). Существенных изменений в спектрах белка непосредственно после добавления амфוליнов не наблюдается. Они имеют место только после нескольких часов инкубации белка с амфוליдами. Изменения с щелочными амфоллидами обнаруживаются при более длительной инкубации, чем с кислотами, при одной и той же концентрации их. Обнаружено, что длительный диализ модифицированного инкубацией с амфоллидами белка не приводит к получению препарата, имеющего оптические и ЭПР-

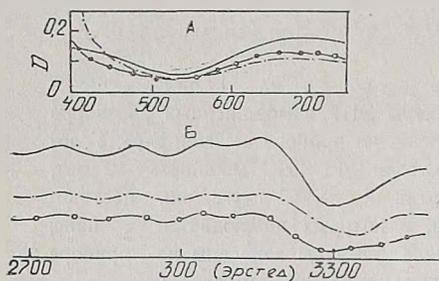


Рис. 1.

Рис. 1. Оптический (А) и ЭПР-спектры (Б) супероксиддисмутазы после четырехсуточной инкубации с амфоллидами (до конечной концентрации 5%). (—)—спектры нативной супероксиддисмутазы и после инкубации с амфоллидами, рН 3—5 (---) и рН 8—10 (-o-).

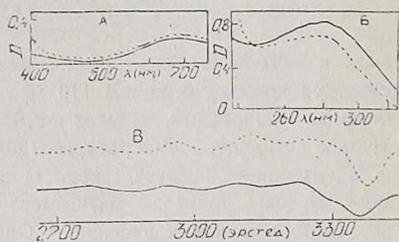


Рис. 2.

Рис. 2. Оптический (А, Б) и ЭПР-спектры (В) основных фракций, элюирующих из колонки с КМ-целлюлозой после предобработки амфоллидами с рН 3—5 (—) и рН 8—10 (---).

спектры исходного белка, что указывает на необратимость происходящих под воздействием амфоллинов изменений. Значительная часть амфоллинов не удаляется при длительном диализе смеси против воды, однако белок в основном может быть отделен от них гель-фильтрацией через сефадекс G-25 (сверхтонкий). После гель-фильтрации белок наносили на колонку с ДЕ-52 целлюлозой, уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером, рН 7,4. При этом наблюдалось образование на вершине колонки сине-зеленой полосы (если белок обработан амфоллидами с диапазонами рН 5—7 или 8—10) и желто-зеленой (рН 3—5). Сине-зеленая полоса имеет оптические и ЭПР-спектры, типичные для нативной супероксиддисмутазы, причем ее количество составляет пример-

но 30% от исходного белка. Желто-зеленая, элюируемая 0,4 М фосфатным буфером, обнаруживает модифицированный сигнал ЭПР, эта фракция имеет супероксиддисмутазную активность на два порядка ниже, чем нативный белок. Таким образом, амфолины кислого диапазона вызывают более сильные изменения, чем нейтральные и щелочные. Фракции, элюирующие из колонки с ДЕ-целлюлозой без задержки, адсорбировали на колонке с КМ-целлюлозой, на вершине которой при этом формируется синяя полоса, которая элюирует 0,4 М фосфатным буфером, рН 7,4. На рис. 2 приведены оптические и ЭПР-спектры этих синих фракций, полученных при обработке амфолинами различных типов. Как оказалось, синие фракции, полученные после инкубации с амфолинами нейтрального и щелочного диапазонов, обладают некоторой супероксиддисмутазной активностью, тогда как обработка кислыми амфолинами приводит к полной инактивации фермента. Более того, эта фракция ускоряет образование адrenoхрома из адrenalина (рис. 3).

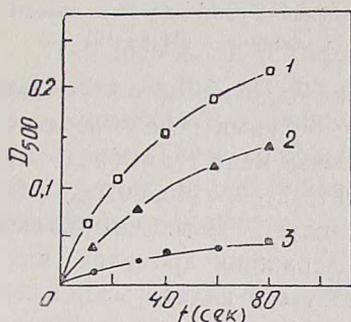


Рис. 3.

Рис. 3. Влияние основных синих фракций из колонки с КМ-целлюлозой на образование адrenoхрома из адrenalина. 1—добавлено $9,5 \times 10^{-6}$ М Cu^{+2} из фракций после предобработки кислыми амфолинами (рН 3—5), 2—без добавок, 3—добавлено 5×10^{-9} М Cu^{+2} из фракций после предобработки нейтральными амфолинами.

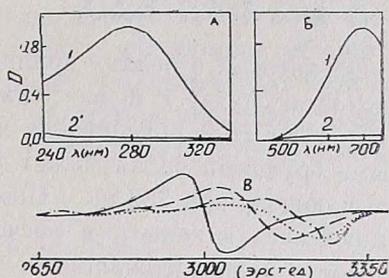


Рис. 4.

Рис. 4. Оптические (А, Б) и ЭПР-спектры (В) смеси амфолинов с рН 8—10 с медью. 1—Видимая, 1'—УФ-область спектра. Поглощение 10^{-3} М CuCl_2 в воде (видимая область 2) и поглощение 1%-ного раствора амфолина (УФ-область 2'). Спектры ЭПР записаны при разных соотношениях меди с амфолинами, (—)—только $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (---)— $\text{CuCl}_2/\text{амфолин}=3:7$, (...)—1:1, (-.-)-7:3. Напряженность магнитного поля показана в нижней части рисунка.

Как можно видеть на рис. 1 и 2, спектры поглощения белка в УФ области существенно модифицируются в присутствии амфолинов, хотя сами амфолины вносят незначительный вклад в поглощение в этой области. В связи с этим представлялось целесообразным изучение спектральных свойств амфолинов при добавлении к ним солей меди. Оказалось, что в присутствии ионов двухвалентной меди возникает интенсивная синяя окраска, за которую ответственно поглощение при 680 нм. Кроме того, добавление меди приводит к появлению интенсивного поглощения при 280 нм. Форма спектров ЭПР смесей амфолинов

с двухвалентной медью значительно отличается от формы спектров ЭПР гидратированных ионов меди. На рис. 4 приведены оптически разреженные ЭПР-спектры смеси амфолинов с медью. Эти факты свидетельствуют об образовании комплексов меди с амфолинами. Интересным свойством этих комплексов является их поглощение при 280 нм. Таким образом, хотя амфолины не содержат ароматических остатков, их комплексы с медью характеризуются интенсивным поглощением в УФ-области. Полученные результаты указывают, что полоса 280 нм, про-

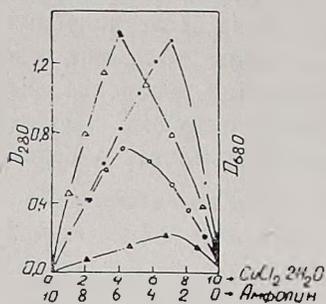


Рис. 5. Результаты опытов по определению стехиометрического состава комплексов меди с амфолином pH 3—5 (темные точки) и pH 8—10 (светлые точки). Образование комплексов прослеживали по полосам поглощения при 280—285 нм (●, ⊙) и 670—680 нм (△, ▲). Исходная концентрация меди для получения комплексов 10^{-4} М, в случае с амфолином с pH 3—5— 2×10^{-4} М (видимая область). Для записи спектров в видимой области использовали 2-сантиметровые кюветы (для амфолина с pH 8—10).

исхождение которой в белках приписывается наличию ароматических аминокислот, в случае с медьсодержащими белками не обязательно должна быть полностью обусловлена ими. Связь меди с амино- и карбоксильными группами белка может приводить к образованию комплекса, поглощающего при 280 нм. Поэтому следует с известной осторожностью относиться к попыткам расчетов содержания ароматических аминокислот в медьсодержащих белках без учета вклада меди в поглощение при 280 нм. Хорошо известно, что УФ спектр супероксиддисмутаза претерпевает значительные изменения при получении апобелка [5].

Используя метод изомолярных серий [4] и исходя из принятой молекулярной массы амфолинов (500), была определена стехиометрия комплекса меди с амфолинами. В этих опытах растворы Cu^{2+} и амфолинов одинаковой молярности смешивали друг с другом в различных объемных соотношениях, сохраняя суммарный объем постоянным, и регистрировали интенсивность характерных для комплексов полос поглощения при 280 и 680 нм. Полученные результаты приведены на рис. 5. Из этих данных следует сделать вывод, что в растворе ионы меди образуют с амфолинами комплексы следующего состава 1:3 (в случае с амфолинами с pH 8—10) и 1:2 (при pH 3—5). Коэффициенты экстинкции полос 680 и 285 нм для комплексов с амфолинами с pH 3—5 составляют соответственно 200 и $1000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$, а с pH 8—10 для полос 670 и 275 нм—соответственно 160 и $4500 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Большая величина молярного коэффициента экстинкции полос поглощения в УФ области позволяет предположить, что они принадлежат к типу полос с переносом заряда на лиганд или в обратном направлении. Связана ли медь в комплексах с амфолинами или кислородными лигандами, предстоит решить в дальнейших исследованиях.

ՍՈՒՊԵՐՕՔՍԻԴԻՄԱՆԵՍԱԶՄԱՆԻ ԵՎ ՎՂԱՂԻ ԻՈՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԱՄՖՈԼԻՆՆԵՐԻ ՀԵՏ

Մ. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Ա. Ք. ՄԻՐԶՈՅԱՆ, Ռ. Մ. ՆԱԼԲԱՆԴՅԱՆ

էրիթրոցիտներից անջատված սուպերօքսիդիզիմուտազան ղգալիորեն ակտիվազրկվում է ամֆոլինների հետ ինկուբացման հետևանքով (պղնձի պոկման պատճառով): Անմիջական փորձերով ցույց է տրված, որ ամֆոլիններն ընդունակ են կոմպլեքսներ կազմելու պղնձի հետ: Այդ կոմպլեքսներն ունեն կլանման մաքսիմումներ՝ 280 և 680 նմ երկարությամբ ալիքներում. ընդ որում, ուլտրամանուշակագույն մաքրում կլանման էքստինկցիան իր մեծությամբ մոտ է սպիտակուցներում ամինաթթուների կլանման էքստինկցիային:

INTERACTION OF SUPEROXIDDISMUTASE AND COPPER
IONS WITH AMPHOLINES

M. A. SYMONYAN, A. T. MIRZOIAN, R. M. NALBANDYAN

The incubation of superoxiddismutase with ampholines leads to the inactivation of the enzyme as the result of the binding of ampholines to the enzyme and the chelation of copper. Ampholines can form complexes with copper. These complexes have absorption maximums in 280 nm and 680 nm waves. In UV-band absorption extinction is close to that of aromatic aminoacids in proteins.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Марданян С. С., Демин Ю., Налбандян Р. М. Биохимия, 42, 1024, 1977.
2. Регли К. В. Новые методы анализа аминокислот пептидов и белков. М., 1974.
3. Симонян М. А., Налбандян Р. М. Биохимия, 40, 726—732, 1975.
4. Шлефер Г. Л. Комплексообразование в растворах. 1964.
5. Bannister J., Bannister W., Wood E. Eur. J. Biochem., 18, 178—186.
6. Beauchamp C. O., Fridovich I. Biochim. Biophys. Acta, 317, 50—64, 1973.
7. Jonsson M., Petterson E., Reinhammer B. Acta Chem. Scand., 22, 2135—2141, 1968.
8. Misra H. P., Fridovich I. J. Biol. Chem., 247, 3170—3175, 1972.
9. Svensson H. Acta Chem. Scand., 15, 325—335, 1971.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 5, 1983

УДК 502.72(47+57)

О ФЛОРЕ И РАСТИТЕЛЬНОСТИ ЭРЕБУНИЙСКОГО
ЗАПОВЕДНИКА

В. Е. ВОСКАНЯН, И. Г. АРЕВШАТЯН, А. С. АРУТЮНЯН

Изучались состав и структура флоры и растительности вновь организованного заповедника до введения заповедного режима. Проведена инвентаризация флоры высших цветковых растений, описаны некоторые основные коренные фитоценозы. На территории заповедника, кроме диких сородичей зерновых культур, произрастает также ряд редких исчезающих видов растений. Территория заповедника является как