

1. Барсегян Э. Х., Никогосян Ф. Ц., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 30, 6, 1977.
2. Барсегян Э. Х., Никогосян Ф. Ц., Месропян М. Б. Биолог. ж. Армении, 32, 12, 1979.
3. Давтян М. А. Вopr. биохимии мозга, 4, Ереван, 1968.
4. Терентьев П. В. Лягушка. М., 1950.
5. Roernke W. G. Comp. Biochem. & Physiol., 47, 1, 1974.
6. Carlisky N. Y. Comp. Biochem. & Physiol. 42, 1, 1972.
7. Hill D. L., Chambers P. Biochim. Biophys. Acta, 148, 2, 1967.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVII, № 1, 1984

УДК 547.963

АМИНО- И КАРБОКСИ-КОНЦЕВЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ БЕЛКА ПРОТЕОЛИПИДОВ ИЗ СЕРДЦА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Г. И. КАЗАРЯН, К. Л. ЛЕВОНЯН, К. Г. МАНУКЯН

Изучались амино- и карбокси-концевые аминокислоты белка протеолипидов, выделенных из сердца крупного рогатого скота. Показано, что N-концевой аминокислотой белка протеолипидов из сердца является глутаминовая кислота, а соответствующей C-концевой — лизин.

Ключевые слова: протеолипиды, амино- и карбокси-концевые аминокислоты, крупный рогатый скот.

Гидрофобные липидно-белковые комплексы — протолипиды (ПЛ) — являются важными компонентами ряда клеточных мембран нервной ткани и других органов [2, 5], где они, по-видимому, обладают различной функцией. В связи с этим представляет интерес исследование особенностей строения белкового и липидного компонентов ПЛ, выделенных из разных органов и их субклеточных образований, с целью выявления сходства и различий между ними. В нашем предыдущем сообщении приводились данные, касающиеся N-концевых аминокислот ПЛ, изолированных из серого и белого вещества мозга крупного рогатого скота [1]. В настоящей работе представлены результаты определения N- и C-концевых аминокислот ПЛ, выделенных из сердечной мышцы. Известно, что после мозга сердце является органом, наиболее богатым ПЛ, которые локализованы в основном в митохондриях [9]. Следует отметить, что изучение N- и C-концевых аминокислот белка ПЛ, как и других его свойств, представляет определенные трудности вследствие плохой растворимости и склонности к агрегации, обусловленных гидрофобностью, связанной с высоким содержанием неполярных аминокислот. Имеющиеся в литературе данные относительно амино- и карбокси-концевых аминокислот белка ПЛ из сердца малочисленны и несколько разноречивы.

Материал и методика. Сердце крупного рогатого скота экстрагировали на ночь в высококомбинате сразу после убоя. Предсердия удаляли. Мышцу желудочка очищали от

арови и оболочек и размельчали до однородной кашицы. Липидные экстракты, содержащие ПЛ, получали и отмывали по методу Фолча и др. [1]. ПЛ выделяли из промытых липидных экстрактов методом эмульгирования-центрифугирования [6]. Полученные этим методом препараты «очищенных» ПЛ (НПЛ), содержащих 20—40% белка, подвергали лиофилизации, но дальше не очищали. Предварительные исследования показали, что по мере очистки, ведущей к удалению липидов, количество выявляемых N- и C-концевых аминокислот резко снижается.

При определении N-концевых аминокислот белка ПЛ из сердца дансильировали, гидролиз и дальнейшую тонкослойную хроматографию производили по методике, описанной ранее [1]. Для количественного определения обозначенные пятна ДНС-аминокислот соскабливали с пластины и переносили в 4 мл смеси гептан—бутанол—уксусная кислота (3:3:1). Пробы энергично встряхивали, оставляли на ночь в темноте. На следующий день после непродолжительного центрифугирования флуоресценцию надосадочной жидкости измеряли на флуориметре фирмы «Aggand», США, при 255, 325 нм. Стандарты ДНС-аспарагиновой, ДНС-глутаминовой кислоты и ДНС-глицина (фирмы Sigma, США) подвергали тем же процедурам для получения стандартных кривых, компенсирующих потери, связанные с гидролизом и последующей тонкослойной хроматографией.

При определении C-концевых аминокислот лиофилизованные препараты ПЛ предварительно окисляли надхлоравиновой кислотой [8], затем подвергали ферментативному гидролизу карбоксипептидазой А (фирма Reanal, Венгрия) и В (фирма Sigma, США) в 0,3 мл 0,2 М N-этилморфолин-ацетатного буфера (pH 8,4) в соотношении фермент—субстрат 1:40 для карбоксипептидазы А и 1:20 для карбоксипептидазы В. Смесь инкубировали на водяной бане при 37° в течение 30 мин, а в некоторых случаях и 5 часов. Реакцию останавливали добавлением 0,3 мл 20%-ной ТХУ. Последнюю удаляли из комбинированных супертангов встряхиванием 2 раза с 2 мл диэтилового эфира. Пробы высушивали, подвергали дансильированию и дальнейшей тонкослойной хроматографии [1].

Результаты и обсуждение. При тонкослойной хроматографии ПЛ из сердца, подвергнутого дансильированию и 4-часовому кислотному гидролизу, было обнаружено в основном два пятна: большое, яркое пятно, соответствующее аспарагиновой кислоте, и менее яркое, меньших размеров, соответствующее серину (рис 1). Последний имеет, по-види-

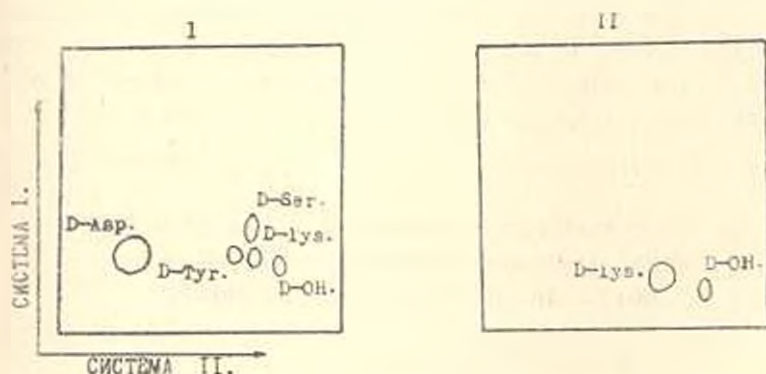


Рис. Двумерная тонкослойная хроматограмма ПЛ из желудочков сердца крупного рогатого скота после: I—дансильирования и кислотного гидролиза—N-концевые аминокислоты; II—ферментативного гидролиза карбоксипептидазой В с последующим дансильированием—C-концевые аминокислоты. Система I—диэтиловый эфир—метанол—ледяная уксусная кислота—100:5:1. Система II—метилацетат—изопропанол—аммиачный гидроксид—9:7:4

мому, липидное происхождение, так как отсутствует на хроматограммах свободного от липидов апопротенина ПЛ [10]. Наряду с этими аминокислотами, на всех пластинках выявлялись также пятна, соответствующие γ -ДНС-лизину и О-ДНС-тироzinу, которые образуются из внутренних аминокислотных остатков белка [7].

Приведенные данные позволяют заключить, что N-концевой аминокислотой белка ПЛ из желудочков сердца крупного рогатого скота является аспарагиновая кислота, количество которой согласно результатам проведенного нами количественного определения, составляет 10.67 ± 0.72 нмоль/мг белка, что значительно ниже величин, полученных Викартом и Лисе для водорастворимого апопротенина ПЛ, выделенного из сердца крупного рогатого скота [10].

C-концевые аминокислоты ПЛ, выделенных из сердечной мышцы, определяли после ферментативного гидролиза карбоксипептидазами А и В. Известно, что карбоксипептидаза А быстрее высвобождает аминокислоты с ароматической или большой алифатической боковой цепью, тогда как карбоксипептидаза В высвобождает в первую очередь щелочные аминокислоты. После инкубации с карбоксипептидазой А ПЛ, подвергнутых окислению надмуравьиной кислотой, высвобождения аминокислот из сердечной мышцы не наблюдалось. Инкубация с карбоксипептидазой В в течение 30 мин и 3 ч приводила к высвобождению только одной аминокислоты — лизина, причем визуальной разницы в количестве высвобожденной в эти сроки аминокислоты не отмечалось. Эти данные хорошо согласуются с результатами опытов других авторов, которые показали, что наиболее полное отщепление C-концевых аминокислот от белка ПЛ происходит в основном за первые 30 мин инкубации с ферментом [10].

Таким образом, C-концевой аминокислотой ПЛ, выделенных из желудочков сердца, является лизин.

Наши данные в отношении N и C-концевых аминокислот белка ПЛ из сердечной мышцы в основном совпадают с результатами исследований Викарта и Лисе [10] и не совсем согласуются с данными Эйхберга, обнаружившего в составе N-концевых аминокислот кроме преобладающей аспарагиновой также ряд других аминокислот [3].

Институт биохимии АН Армянской ССР

Получено 20.VII 1983 г.

ԽՈՇՈՐ ԵՎՋԵՐԱՎՈՐ ԱՆԱՍՏՈՆՆԵՐԻ ՍՐՏԻՅ ԱՆՋԱՏՎԱԾ
ՊՐՈՏԵՈՂԻՊԻՆԵՐԻ ՍՊԵՏԱԿՈՆԵՐ ԱՄՐԱՎԱՆ ԵՎ
ԿԱՐԲՈՔՍԻՊԵՊԻԴԱԶԻՆ ԱՄՐԱՎԱՐԹՈՒՆԵՐԸ

Տ. Բ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Կ. Լ. ՀԵՎՈՆՅԱՆ, Կ. Ջ. ՄԱՅԻՍԻՅԱՆ

Խստամասերով և խոշոր եղջերավոր անասունների սրտից տնջառված պրոտեոլիպիդների սպիտակուցի ամինա- և կարբոքսի- ծայրային ամինաթթուները N-ծայրային ամինաթթուները որոշվել են դանտիլացման մեթոդով, իսկ C-ծայրայինը՝ Ա և Բ կարբոքսիպեպտիդազաներով՝ ֆերմենտատիվ հիդրոլիզի ու դրան հաջորդող դանտիլացումից հետո՝ ջուց է տրվել, որ սրտից տնջառված պրոտեոլիպիդների սպիտակուցի N-ծայրային ամինաթթուն մասնաբաժանված է, իսկ C-ծայրայինը՝ համապատասխանորեն լիզինը:

AMINO- AND CARBOXY-TERMINAL AMINOACIDS OF PROTEOLIPIDS PROTEIN FROM THE BOVINE HEART

T. I. KAZARIAN, K. L. LEVONIAN, K. H. MANUKIAN

The amino- and carboxy-terminal aminoacids of proteolipids protein from bovine heart have been investigated. Amino-terminal aminoacids have been identified and quantitated by dansylation procedure. Carboxy-terminal aminoacids have been determined after the enzymatic hydrolysis with carboxypeptidases A and B with following dansylation. Aspartic acid has been identified as the N-terminal amino acid and lysine—as the corresponding C-terminal amino acid.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Казарян Т. И., Манукян К. Г. Биолог. ж. Армении, 34, 502—505, 1981.
2. Манукян К. Г. Нейрохимия, 1, 51—65, 1982.
3. Eichberg J. Biochim Biophys. Acta, 187, 533—545, 1969.
4. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. J. Biol. Chem., 226, 497—509, 1957.
5. Folch-Pi J., Stoffyn P. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 195, 86—107, 1972.
6. Folch J., Webster G. R., Lees M. Federat. proc., 18, 1, 228, 1959.
7. Gray W. R. In Methods in Enzymology, 11, 139—151. New-York, 1967.
8. Hirs C. H. W. In Methods in Enzymology, 11, 197—199. New-York, 1967.
9. Murakami M., Ozawa Y., Funahashi S. J. Biochemistry (Japan), 54, 166—172, 1963.
10. Whithart D. R., Lees M. B. J. Neurochem., 20, 1303—1315, 1973.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVII, № 4, 1984

УДК 577.1:636,5:612,393

ВЛИЯНИЕ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ НА РАЗВИТИЕ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

Н. Н. НАТИШВИЛИ, Л. Р. КАНАЯН, Л. С. АДАМЯН, Р. Г. КАМАЛЯН

Установлено, что предынкубационная обработка куриных яиц водным раствором янтарной кислоты оказывает положительное влияние на эмбриогенез: снижается эмбриональная смертность, увеличивается масса эмбриона, стимулируется энергия вылупления. Отмечается также повышение содержания белкового азота и нуклеиновых кислот в гомогенатах целого эмбриона.

Ключевые слова: куриный эмбрион, янтарная кислота

Значительный интерес к изучению превращений янтарной кислоты в организме, обусловленный ее ключевой позицией в обменных процессах, еще более возрос в последние годы благодаря исследованиям, показавшим благотворное влияние ее при ряде физиологических и патологических состояний [3, 9]. Уникальная роль янтарной кислоты в метаболизме явилась основанием для использования ее в качестве стимулятора прорастания семян сельскохозяйственных культур [1, 9], роста животных [3] и яйценоскости кур [4].