

պահման բոլոր ժամկետներում մուտացիաների հաճախականությունը դումարայինից ցածր է:

ՖՈՒԿՔ-ի մոդիֆիկացման պայմաններում կառուցվածքային մուտացիաների քանակը  $G_1$  և  $G_2$  փուլերում զերազանցում է ռենտգենյան ճառագայթման և  $HN_2$ -ի համատեղ ազդեցության մակարդակը:

## CREPIS CAPILLARIS CHROMOSOMES INDUCED MUTABILITY UNDER SEEDS STORAGE AND DNA SYNTHESIS MODIFICATION CONDITIONS

G. I. MIRZOYAN

The mutability level fluctuates during the storage not only in case of the combined action of X-rays and  $NH_2$ , but also in case of their independent action. In  $G_1$  and  $G_2$  phases the structural mutations quantity excels in the level X-rays and  $NH_2$  combined action under FUDR modification conditions.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аветисов В. А., Налева С. А. Генетика, 4, 5, 31, 1968.
2. Гарина К. П. Молекулярные механизмы генетических процессов. Мутагенез и репарация М., 1976
3. Дубинина Л. Г. Генетика, 6, 8, 35, 1970
4. Каробко Е. И., Гарина К. П., Лышков В. И. Биофизические исследования при селекции растений из гетерозиса. Кишинев, 1973
5. Қорытова А. Н., Михайлов О. Ф., Дубинина Н. П. Генетика, 7, 8, 10, 1970
6. Мірзоян Г. И. Биолог. ж. Армения, 36, 9, 1983.
7. Мірзоян Г. И. Биолог. ж. Армения, 37, 2, 1984.
8. Оран Н. Изв. АН ЭССР. Сер. биол., 18, 1, 108, 1969
9. Brendel M., Khan N. A., Haynes R. H. Mol. and Gen. Genet., 106, 4, 289, 1979

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

УДК 591.05

## ОБМЕН ГЛУТАМАТА У ЛИЧИНОК И ЖУКОВ ФАСОЛОВОЙ ЗЕРНОВКИ ACANTHOSCELIDES OBTECTUS SAY.

М. А. ДАВТЯН, А. Х. АГАДЖАНЯН, Д. Г. ГУКАСЯН

Изучалась пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназная активность у личинок и жуков фасолевой зерновки. У жуков, по сравнению с личинками, активность фермента высока. Лучшим кофактором фермента служит НАДН. Реакция эффективно протекает в 0,25 М калий-фосфатном буфере. После дивализа активировается лишь пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназа у жуков.

*Ключевые слова:* глутамат, пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназа, пирролин-5-карбоксилат, фасолевая зерновка

Глутамат превращается в полуальдегид глутаминновой кислоты глутамилкиназой или пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназой [1, 6]. Опытами *in vivo* доказано, что при введении крысам  $C^{14}$ -глу обнаруживается

радиоактивность в протине плазмы крови печени [2, 8]. По данным этих авторов, глутамат превращается в полуальдегид пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназой при участии кофактора НАДН. Активность пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназы повышается у цыплят при диете с недостаточным содержанием пролина [3]. У *Escherichia coli* [4] глутамат превращается в полуальдегид глутамилкиназой в присутствии АТФ и ингибируется пролином. Причем предполагается, что возможным промежуточным соединением является либо глутамил фосфат, либо глутамил эфир, находящийся, вероятно, в агрегированном состоянии [5]. Рангачер и Гомас очистили глутамилкиназу из *Pseudomonas aeruginosa* в 85 раз [7]. Пролин, двухвалентные ионы магния и марганца ингибируют активность фермента наполовину, а ПХМБ—полностью. Превращение глутамата в пролин доказано в митохондриях, выделенных из падающей мухи *Aldrichina grahami*. Процесс зависит полностью от наличия АТФ,  $Mg^{2+}$  и НАДФН [9]. Целью настоящей работы было изучение активности пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназы и некоторых ее регуляторных свойств у личинок и жуков фасолевой зерновки.

**Материал и методы.** Объектом исследования служили личинки и жуки фасолевой зерновки *Acanthoscelides obtectus* Say. Личиночная стадия длится 30 дней при 28° и 70%-ной влажности воздуха. Длительность жизни жуков 12—15 дней при тех же условиях.

Активность пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназы определяли в среде следующего состава: L-глу-100 мкМ, НАДН-1 мкМ, 0,25 М калий-фосфатного буфера (рН 7,1). Конечный объем реакционной смеси—3,2 мл.

Пирролин-5-карбоксилат (ПБК) определяли методом Чипарта (в модификации Херцфельда) по разнице между нитрированным и нейтральным пробками. К 0,25 мл депротеинизированного тканевого экстракта (содержащего 0,02—0,15 мкМ пролин) добавляли 0,5 мл концентрированной HCl и 0,25 мл 2,5 М  $K_2CrO_7$ . Содержимое оставляли при комнатной температуре на 10 мин, после чего добавляли 0,15 мл 7,8 М  $NiCl_2$ . Пробирки закрывали притертыми пробками и кипятили в течение 20 мин в кипящей водной бане. Пробы охлаждали и нейтрализовали добавлением 0,1 мл 10 М NaOH. К нейтральным пробкам добавляли 2,5 мл смеси, содержащей 0,1 М пиридина, 2,14 М  $NaH_2PO_4$  и 1,22 мл  $H_2PO_4$ . Пробы закрывали и снова кипятили в течение 60 мин. Образовавшуюся красную окраску экстрагировали 5 мл бензола при встряхивании. Интенсивность окраски измеряли спектрофотометром при длине волны 520 мкм.

**Результаты и обсуждение.** Пами изучалась внутриклеточная локализация пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназы путем дифференциального центрифугирования гомогенатов.

Обнаружено, что фермент локализован в надосадочной фракции (табл. 1). Изучена динамика активности пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназы при развитии жуков фасолевой зерновки (табл. 2).

Максимальная активность фермента обнаруживается на 4-й день развития жуков.

Для выявления максимальной активности фермента мы испытывали разные концентрации буфера и кофакторов (табл. 3).

Согласно полученным данным, максимальная активность фермента проявляется в 0,25 М калий-фосфатном буфере при использовании в качестве кофактора НАДН, несколько слабее—с НАДФН. В присутствии АТФ и двухвалентных ионов магния пирролин-5-карбоксилат не

Таблица 1

Внутриклеточная локализация пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназы у жуков фасоловой зерновки, мкМ П5К на 1 г ткани

Фракция	Активность
Целый гомогенат	3,75
Надосадок (центрифугирование при 1800 об/мин)	3,56
Осадок	0

Таблица 2

Динамика пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназы жуков фасоловой зерновки, мкМ П5К на 1 г ткани

Дни развития	Активность	Дни развития	Активность
2	2,84	6	2,24
4	5,10	8	2,20

образуется. Фруктозо-6-фосфат не влияет на активность фермента. Однако первый фермент превращения глутамата — глутамилкиназа из *Escherichia coli*, по данным Бейч, ингибируется почти полностью при концентрации 0,1 М фруктозо-6-фосфата [4].

Таблица 3

Влияние различных концентраций калий-фосфатного буфера и различных кофакторов на активность пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназы гомогената личинок и жуков фасоловой зерновки, мкМ П5К из 1 г ткани

Объект исследования	Концентрация буфера, М	Эффекторы	Активность
Личинки	0,1	НАДН	не обнаруживается
	0,25	НАДН	5,39
	0,25	НАДФН	1,0
	0,25	АТФ, Mg <sup>2+</sup>	не обнаруживается
	0,4	НАДН	2,24
Жуки	0,1	НАДН	не обнаруживается
	0,25	НАДН	13,9
	0,25	НАДФН	2,0
	0,25	АТФ, Mg <sup>2+</sup>	не обнаруживается
	0,25	НАДН + ФР-6-фосфат	13,9
	0,4	НАДН	4,1

Для удаления из гомогената факторов, мешающих проявлению максимальной активности пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназы, мы провели анализ надосадка гомогената в анализовых мешочках против 0,05 М калий-фосфатного буфера при pH 7,0, содержащего 10<sup>-3</sup> М меркаптоэтанол (табл. 4).

Согласно данным таблицы, при 2-часовом анализе у жуков значительно увеличивается активность фермента. По-видимому, это объясняется тем, что при этом удаляются факторы, оказывающие ингибирующее действие на фермент, а у личинок анализ не влияет на активность

Таблица 4

Влияние анализа на активность пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназы у личинок и жуков фасолевой зерновок, мкМ П5К на 1 г ткани

Объект исследования	Время анализа	Количество образовавшегося пирролин-5-карбоксилата
Личинки	до анализа	1,90
	через 1 ч	1,81
	через 2 ч	1,90
Жуки	до анализа	2,90
	через 1 ч	2,60
	через 2 ч	3,52

фермента. При продолжительном (20 ч) анализе активность фермента как у жуков, так и у личинок не обнаруживается. Добавление меркаптоэтанола не предотвращает инактивирование. С целью выявления изоэнзимов пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназы, мы подвергли экстракт целого тела жуков гельфильтрации на сефадексе G 150.

Обнаружено 2 пика белка и один пик пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназной активности, элюирующиеся в 20-й фракции (рис.)

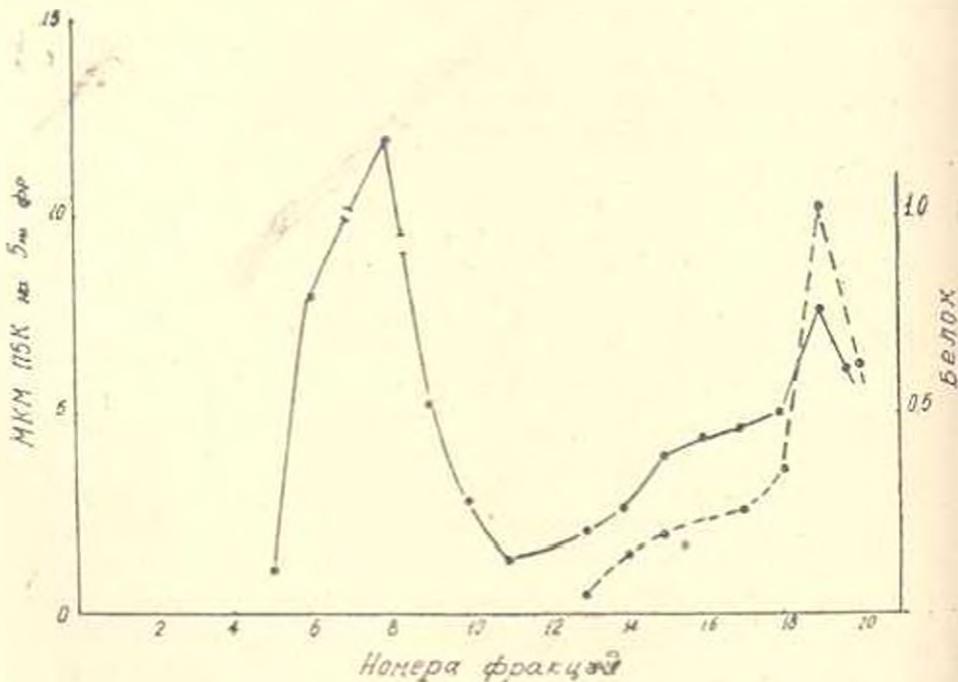


Рис. Фракционирование экстракта пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназы жуков фасолевой зерновки *Acanthoscelides obtectus* Say. ● — белок  
○ — пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназа.

При исследовании влияния некоторых факторов на частично очищенный при гельфильтрации фермент — пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназу (табл. 5) обнаружено, что реакция хорошо протекает в присут-

Влияние некоторых факторов на пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназную активность у жуков, мкМ П5К на 1 г ткани

Фракция	Факторы					
	без фактора (контроль)	НАДН	НАДФН	АТФ	Mg <sup>2+</sup>	ПХМБ
20-ли	0	0,67	0,41	0	0	0,08

ствии кофактора НАДН и не протекает (как и на уровне гомогената) в присутствии АТФ и Mg<sup>2+</sup>. ПХМБ на 88% ингибирует активность частично очищенного путем гельфильтрации фермента.

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

Поступило 12.VII 1983 г.

ՎԼՈՒՆԱՄԱՐՈՒՄ ՓՈՆԵԱՆԱԿՈՒՅՈՒՆԸ ԼՈՐՈՒ ԸՆԿԱԿԵՐԻ  
ACANTHOSCELIDES OBTECTUS SAY  
ԹԹՈՒՐՆԵՐՈՒՄ ԵՎ ԲՁԵՋՆԵՐՈՒՄ

Թ. Ա. ՎԱՆԻՅԱՆ, Ա. Կ. ԱԳՋԱՆԻԱՆ, Լ. Գ. ԳՈՒԿԱՅԱՆ

Ստուժնաարվել է պիրոլին-5-կարբոքսիլատ դեհիդրոգենազայի ակտիվութիւնը լորու ընդակերի թրթուրների և բզկանների մոտ: Յերմենտի ակտիվութիւնը բզկանների մոտ ավելի բարձր է, քան թրթուրների մոտ: Յերմենտի համար լավ կոֆակտոր է նեՒՊԻ-ը: Ռեակցիան արդյունալետ է ընթանում 0,25M կալիում-ֆոսֆատային բուֆերում: Դիալիզից հետո ակտիվանում է միայն բզկանների պիրոլին-5-կարբոքսիլատ դեհիդրոգենազան:

METABOLISM OF GLUTAMATE IN ACANTHOSCELIDES  
OBTECTUS SAY HARICOT LARVAE AND BEETLES

M. A. DAVTIAN, A. Kh. AGHAJANIAN, L. G. GHUKASIAN

Pirrolin-5-carboxylate dehydrogenase activity of haricot larvae and beetles has been studied. Enzymatic activity in beetles is higher than in larvae. The best cofactor of the enzyme is NADH. The reaction effectively proceeds in 0,25M K-phosphate buffer. After dialysis the pirrolin-5-carboxylate dehydrogenase of beetles is activated.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Дзель С., Никольсон Д. Метаболические пути. М., 1973.
2. Austic R. E. J. Nutr., 103, 999, 1973.
3. Austic R. E. Poultry sci., 52, 30, 1973.
4. Batch A. Biochim. Biophys. Acta., 192, 462, 1969.
5. Camper H., Moses V. Biochim. Biophys. Acta., 354, 75, 1974.
6. Melster A. Biochemistry of amino acid, 2, 714, 1965.
7. Rungacher K. Z., Thomas V. L. Biochem. J., 161, 275, 1979.
8. Shen T. E., Bird H. R., Sunde M. Z. Poultry sci., 52, 676, 1973.
9. Wadano A. Experimentia, 36, 1028, 1980.