

При инокуляции ткани гороха шт. 5502 во внешнем слое оболочки отсутствовали Ca^{2+} , Mn^{2+} , а при заражении шт. 649 (В. жароустойчив) отсутствовали Mg^{2+} и Ca^{2+} , у люцерны Ca^{2+} и Mn^{2+} не найдены в ассоциации со шт. 5609, 649 и 5891.

Результаты проведенных исследований подтверждают литературные данные о значительной роли лектина в процессе «узнавания» специфических клубеньковых бактерий. Кроме того, была выявлена специфичность реакции компонентов оболочки изолированных растительных клеток на инфицирование специфическими и неспецифическими штаммами клубеньковых бактерий. При инфицировании специфическими штаммами во внешнем слое клеточной оболочки обнаружены гликопротеиды, гесперидины и нонизированные формы кальция, магния и марганца, которые, очевидно, входят в состав лектина и реагируют с клубеньковыми бактериями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Большой практикум по физиологии растений. Под ред. Б. А. Рубина. Л., 1978.
2. Методические указания по использованию ацетиленового метода при селекции бобовых культур на повышение симбиотической азотфиксации. Л., 1982.
3. Пирс Э. Гистология. М., 1962.
4. Прокина М. И. Ботаническая микротехника. Л., 1960.
5. Связывание молекулярного азота клубеньковыми бактериями в симбиотических и культуральных условиях. Под ред. Е. П. Старченкова. Киев, 1984.
6. Шандия М. Г., Авакхужова Е. Н., Чабыхян М. А. Докл. АН СССР, 222, 3, 710—743, 1975.
7. Dazzo F. B., Hrabar E. M., Urbano M. R., Sherman Y. E., Truchet G. In: Current perspectives in nitrogen fixation, 292—295, Canberra, 1981.
8. Hubbel D. H. Bioscienc., 37, 11, 832—837, 1981.
9. Kamberger W. Arch. Microbiol., 121, 1, 63—90, 1979.
10. Lis H., Sharon N. Biochem., 42, 541—574, 1973.
11. Novakova N., Kozurek Y. Biochem. Biophys. Acta, 359, 323—333, 1974.
12. Pavlova M., Ticha M., Enfinger G., Kozurek Y., Kozurek Y. Biochem. Biophys., 252, 388—395, 1971.
13. Roth Y. The lectins, 1973.

Получено 9.1.1986 г.

Восток. м. Армения, т. 40, № 4, 283—291, 1987

УДК 591.1.05

ИЗОЭНЗИМЫ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА ПРОЛИНА И РЕГУЛЯЦИЯ ИХ АКТИВНОСТИ У ФАСОЛЕВОЙ ЗЕРНОВКИ *AGANTHOSCELIDES OBTECTUS* SAY.

А. А. АГАДЖАНИН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии и проблемной лаборатории сравнительной и эволюционной биологии

Аминотация — 5-лицинол фасолевого зерновки орнитин-5-трансминала и пирролидин-5-карбоксилат редуктаза представлены двумя изоэнзимами, у кукурузы — одним с более высокой активностью. ПХМБ, гидроксиметил, АДФ.

АТФ, глут, арг, вал и двухвалентные ионы Co и Cd ингибируют, а хлористый калий и пироват, наоборот, стимулируют процесс биосинтеза пролина.

Անձամարդ — (որտ ընդակերի թրթուրներով հարձակմանը են OSH -ի և HSC -ի կողմից իզոլուկինների մոտ մեկական իզոլուկինների մոտակիությունը դառնի ցածր է թրթուրների համեմատությամբ: PCMB , HSC , HSC և HSC կողմից իզոլուկինները ընկճում են պրոլինի բիոսինթեզի ֆերմենտների ակտիվությունը, իսկ պիրուատը և կալիումի քլորիդը, ընդհանրապես, խթանում են այն:

Abstract — In larvae of haricot beetle ornithin— δ —transaminase and proline- γ -carboxylate reductase have been presented by two isoenzymes, in pupae—by one enzyme, with a lower activity. PCMB, hydroxylamin, ADP, ATP, glu., arg., val and bivalent ions of Co and Cd inhibit, whereas chlorine potassium and piruvate stimulate the process of proline biosynthesis.

Ключевые слова: пролин, орнитин- δ -трансаминаза, пирролин- γ -карбоксилат редуктаза, физиология зерновки.

В гемолимфе многих видов насекомых уровень пролина очень высок, поскольку последние используют пролин как энергетический субстрат [14, 17]. Источниками синтеза пролина у различных насекомых могут служить разные аминокислоты. Так, личинки сипей мухи [19] и гусеницы тутового шелкопряда [1] лучше используют орнитин, чем глутамат, а личинки дрозофилы, наоборот, используют глутамат вместо орнитина.

В жировом теле *Hyalophora gloveri*, очевидно, образовавшийся из аргинина под действием неуротелической аргиназы орнитин превращается в пролин [15]. Установлено коррелятивное изменение активности аргиназы и орнитин-аминотрансферазы (ОТА) в процессе онтогенеза у *P. cisipi* [14], тутового шелкопряда [1], у жуков фасолевой зерновки [3]. Биосинтез пролина из аргинина и орнитина подробно изучен у инфузорий *Tetrahymena pyriformis* [18]. Из последних в очищенном виде выделены ОТА и пирролин- γ -карбоксилат редуктаза (П5КР). Получены также очищенные препараты П5КР из печени крыс [18] и птиц [19]. Выделена высокоактивная кристаллическая ОТА из *Bacillus spaciatus*, предварительно индуцированная орнитином и аргинином [12]. Показано, что ПХМБ ингибирует ОТА печени птиц на 66% [19].

В настоящей работе представлены результаты изучения изоэнзимного спектра ферментов биосинтеза пролина и их регуляторных свойств у личинок и куколок фасолевой зерновки *A. oblectus* Say.

Материал и методика. Объектами исследования служили личинки и куколки фасолевой зерновки *A. oblectus* Say. Личиночная стадия при 28° и 75%-ной влажности воздуха длится 28–30 дней. Гомогенат целого тела личинок и куколок готовили в смеси 20 мМ хлористого калия и 80 мМ глицинового буфера (pH 9.5). Гельфильтрацию белков проводили на сефадексе G-150. Активность ОТА и П5КР определяли по методу Редди и Кемблза [15] и выражали количеством образовавшегося пролина. Проллин определяли как химическим, так и хроматическим методами, описанными ранее нами [1].

Результаты и обсуждение. Изучение изоэнзимного спектра ферментов биосинтеза пролина у личинок и куколок фасолевой зерновки

(рис. 1, 2), показало, что у личинок ОТА и П5КР представлены двумя изоэнзимами: I изоэнзим ОТА фильтруется в 12—13-й фракции, а II — в 19—20-й, I изоэнзим П5КР фильтруется в 8—9 фракций, II — в 13-й. У куколок эти ферменты имеют по одному энзиму, активность которых почти в 16 и 8 раз соответственно ниже, чем у личинок. Следует отметить, что довольно слабый синтез пролина у куколок на уровне целого гомогената обнаружен нами ранее [2].

В следующей серии экспериментов с целью большей наглядности нами была воспроизведена система биосинтеза пролина из орнитина с использованием различных комбинаций изоэнзимов ОТА и П5КР.

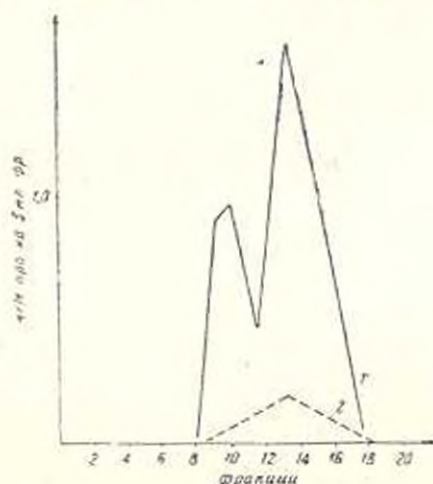
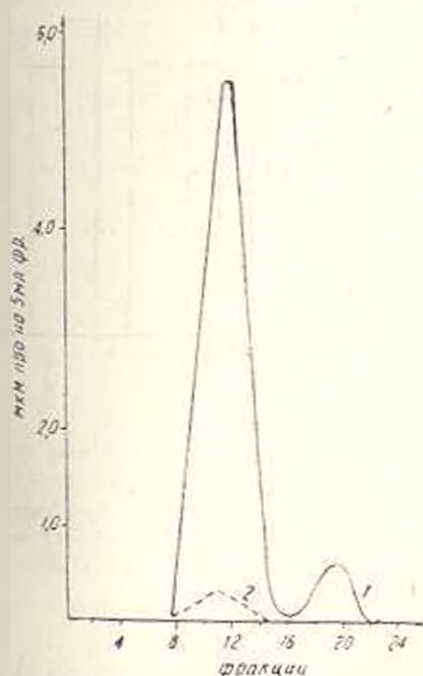


Рис. 1. Изоэнзимный спектр ОТА у личинок и куколок фасольной зерновки *A. obtus Say*. 1—личинки, 2—куколки. Рис. 2. Изоэнзимный спектр П5КР у личинок и куколок фасольной зерновки *A. obtus Say*. 1—личинки, 2—куколки.

Данные табл. 1 наглядно показывают, что в модельных опытах отдельные изоэнзимы проявляют достаточную для биосинтеза пролина активность. Наиболее интенсивный синтез пролина наблюдался при использовании I изоэнзима ОТА с I изоэнзимом П5КР.

Таблица 1. Использование различных фракций для биосинтеза пролина (мкМ на 5 мл фракций)

Изоэнзимы			Изоэнзимы		
ОТА	П5КР	Активность	ОТА	П5КР	Активность
I	I	6.29 ± 0.10	II	I	2.17 ± 0.02
I	II	0.42 ± 0.01	II	II	1.64 ± 0.02

На отдельных пиках нами изучено влияние различных факторов на ферменты биосинтеза пролина, в частности, нуклеотидов, тиоловых реагентов, ионов металлов, кетокислот и δ -аминовалериановой кислоты.

и также гидроксиламина в качестве ингибитора трансаминирования (рис. 3, 4). Показано, что использованные эффекторы, за исключением пирувата, ингибируют активность ферментов, участвующих в биосинтезе пролина. При применении I изоэнзима ОТА и I изоэнзима П5КР (рис. 3) пируват в некоторой степени повышает активность ферментов

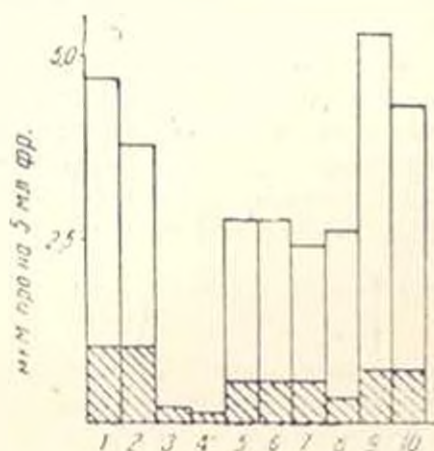


Рис. 3. Влияние эффекторов на ферменты биосинтеза пролина и личинок фасолевой зерновки *A. oblectus* Say. 1—без эффектора, 2—НАД⁺, 3—ПХМБ, 4—NH₄OH, 5—АДФ, 6—АТФ, 7—CoCl₂, 8—CdCl₂, 9—пируват, 10—MgCl₂. □ — I изоэнзим ОТА с I изоэнзимом П5КР, ▨ — I изоэнзим ОТА с II изоэнзимом П5КР.

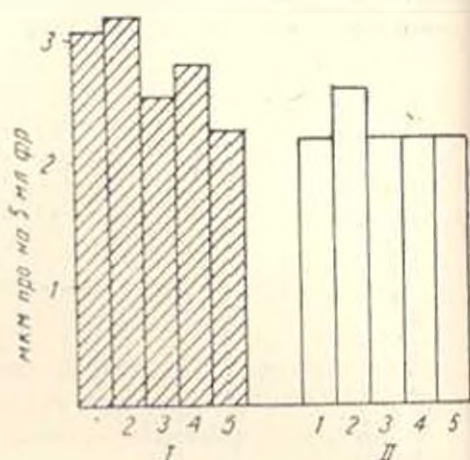


Рис. 4. Влияние аминокислот на I и II изоэнзимы ОТА личинок фасолевой зерновки *A. oblectus* Say. 1—НАДН, 2—НАДФ⁺, 3—глу, 4—сукт, 5—арг. ▨ — I изоэнзим ОТА с I изоэнзимом П5КР; □ — II изоэнзим ОТА с I изоэнзимом П5КР.

биосинтеза пролина, а при применении I изоэнзима ОТА с II изоэнзимом П5КР, он не только не стимулирует, но и в некоторой степени ингибирует процесс биосинтеза пролина. Очевидно, этот эффект пирувата связан с его действием на II изоэнзим П5КР. Стимулирование биосинтеза пролина пируватом обнаружено также у дождевого червя [5]. Гидроксиламин полностью ингибирует этот процесс при комбинации I изоэнзима ОТА с I изоэнзимом П5КР, очевидно, в результате подавления орнитинтрансаминазы. Ингибирование гидроксиламином различных ферментативных реакций, в частности, реакций переаминирования, установлено у животных и растений [4, 6]. Полностью ингибируется процесс биосинтеза пролина также ПХМБ начиная с концентрации 10^{-3} М. Данные других авторов показывают, что ПХМБ в концентрации 10^{-4} ингибирует активность П5КР в гомогенатах печени и у табака [11, 13], а в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М—у синей мухи [20].

Интересно также ингибирование активности П5КР окисленным НАД⁺. Из литературы известно, что окисленный НАДФ⁺ является строгим ингибитором П5КР, между тем как окисленный НАД⁺ таким свойством не обладает [11].

Полученные нами данные свидетельствуют, что окисленный НАД⁺ обладает ингибирующим действием на активность биосинтеза пролина в модельной системе, состоящей из I изоэнзима ОТА и I изоэнзима П5КР. Подобные результаты получены в отношении фермента из ки-

шечника дождевого червя в нашей лаборатории [5]. Данные рис. 3 показывают, что примененные кофакторы, за исключением НАД⁺ и пирувата, оказывают почти такое же влияние на процесс биосинтеза пролина и при комбинации изоферментов I ОТА и II П5КР. Очевидно, НАД⁺ избирательно влияет на изоферменты П5КР.

Нами изучено влияние НАДН, НАДФН, глутамата, цитруллина и аргинина на биосинтез пролина у личинок фасолевой зерновки (рис. 4). Данные показывают, что НАДФН действует эффективнее НАДН при всех комбинациях изоэнзимов ОТА и П5КР. Глутамат, аргинин и несколько слабее цитруллин оказывают ингибирующее влияние на биосинтез пролина при комбинации I изоэнзим ОТА с I изоэнзимом П5КР. Указанные аминокислоты, однако, не оказывают влияния на активность биосинтеза пролина при комбинациях со II изоэнзимом ОТА. Эти данные дают основание предполагать, что, по-видимому, I изоэнзим ОТА обеспечивает процесс биосинтеза глутамата, а последний по принципу обратной связи ингибирует активность фермента. Разумеется, для окончательного ответа необходимы дальнейшие исследования. Трудно, например, объяснить ингибирующее влияние аргинина.

В следующей серии экспериментов исследовали влияние валина на процесс биосинтеза пролина у личинок фасолевой зерновки на уровне гомогената (табл. 2).

Таблица 2. Влияние валина на процесс биосинтеза пролина у личинок фасолевой зерновки, мкМ на 1 г ткани

Варианты	Активность	% ингибирования
Инкубационная среда	5 ± 0.51	
Инкубационная среда + валин ($2.7 \cdot 10^{-3}$) М	0	100

Данные показывают, что валин полностью ингибирует биосинтез пролина личинок, по-видимому, действуя на активность ОТА. Ингибирование активности ОТА установлено также у жуков фасолевой зерновки ранее [3], а также у инфузорий *T. pyriformis* [8].

В литературе имеются сведения, что активность П5КР сетчатки глаза быка стимулируется в присутствии 70 мМ КСl и фосфатных ионов [9]. Нас интересовало, имеет ли место подобное явление у личинок фасолевой зерновки (табл. 3).

Таблица 3. Влияние КСl на активность биосинтеза пролина у личинок фасолевой зерновки, мкМ на 1 г ткани

Варианты	Активность	Варианты	Активность
Среда	0.28 ± 0.012	Среда + 50 мкМ КСl	0.15 ± 0.010
Среда + 10 мкМ КСl	0.36 ± 0.021	Среда + 70 мкМ КСl	0
Среда + 30 мкМ КСl	0.18 ± 0.010		

Полученные данные показывают, что биосинтез пролина у личинок активируется в присутствии 10 мкМ хлористого калия примерно на 35%

по сравнению с контролем. При возрастании концентрации хлористого калия в инкубационной среде интенсивность этого процесса постепенно снижается и при 70 мкМ полностью ингибируется. Очевидно, KCl в низких концентрациях стимулирует активность ПСКР. По данным литературы [7], ионы хлора, по-видимому, присоединяются к положительно заряженной группе молекулы фермента вблизи от активного центра, понижая, таким образом, значение рК группы, играющей важную роль в катализе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биол. ж. Армении, 27, 5, 1974.
2. Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биол. ж. Армении, 28, 10, 1975.
3. Агаджанян А. Х., Арутюнян Т. М., Гукасян Дж. Г. Биол. ж. Армении, 33, 6, 1980.
4. Браунштейн А. Е., Азарс Р. М., Могилевская З. Г. Укр. биохим. ж., 27, 259, 1955.
5. Гаспарян Х. Г. Канд. дисс., Ереван, 1983.
6. Кротович В. Л., Бундель А. А., Фрошери М. Р., Борошкова Н. В. Журн. общ. биол., 19, 414, 1958.
7. Moss D. B., Batterworth P. Дж. Эпидемиологии и медицины, М., 1976.
8. Hill D. Z., Chambers P. Biochem. Biophys. Acta, 148, 415, 1967.
9. Matsusawa T., Biochem. Biophys. Acta, 717, 215, 1982.
10. Matsusawa T., Katsunuma T., Katsunuma N. Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 2, 1968.
11. Miller P. M., Stewart C. P. Phytochemistry, 15, 1455, 1976.
12. Misano H., Toyama S., Sada K. J. Bacter., 148, 43, 1981.
13. Naguchi M., Kikuzo A., Tanaka E. Ag. Biol. chem., 40, 453, 1966.
14. Pant R., Kumar S. Biochem. J., 174, 341, 1978.
15. Reddy S. R. R., Campbell J. W. Comp. Biochem. Physiol., 29, 515, 1969.
16. Price G. M. Biochem. J., 89, 420, 1951.
17. Sactor B., Childress C. Arch. Biochem. Biophys., 124, 583, 1967.
18. Smith M. E., Greenberg D. M. J. Biol. chem., 236, 317, 1967.
19. Vecchlo D. A., Kalman S. M. Arch. Biochem. Biophys., 127, 376, 1968.
20. Yoshinaga F., Wadano A., Miura K. Insect Biochem., 7, 51, 1977.

Поступило 5.I 1986 г.

Биол. ж. Армении т. 40, № 4, 294–298, 1987

УДК 616.973+616.993+616.43-002/616.697+618.177

РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ МОЧЕПОЛОВОМ ТРИХОМОНИАЗЕ У БЕСПЛОДНЫХ СУПРУЖЕСКИХ ПАР

М. Г. ОГАНЕСЯН, Л. Т. МИАНСАРЯН, В. И. БЕДНОВА,
Т. Е. ВАХИНИА, И. С. ОГАНЕСЯН

Республиканский центр семьи, брака и сексопатологии
МЗ Армянской ССР

Аннотация. Показана высокая чувствительность РИФ-40 абс при выявлении больных мочеполовым трихомониазом, превышающая чувствительность бактериоскопического и бактериологического методов, что позволяет реско-