

5. Shimada Y. Int. J. Radiat. Biol., 48, 3, 423, 1985.
6. Shimada Y., Shima A., Egami N. Radiat. Res., 104, 1, 78, 1985.
7. Shimada Y., Shima A., Egami N. Radiat. Res., 26, 111, 1985.

Поступило 14.X 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 11, № 3, 1988

УДК 591.1.06

ЗНАЧЕНИЕ SH-ГРУПП В ПРОЯВЛЕНИИ АКТИВНОСТИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

Т. Г. АРУТЮНЯН, М. А. ХАЧАТРИИ, А. Ж. АБРАМЯН

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

Методом химической модификации специфическими реагентами показано значение SH-групп в проявлении активности очищенной аргиназы печени 18-дневного куриного эмбриона. Очищенный препарат фермента содержал 9,93 мкмоль мочевины на мг белка.

Ցուրառեակ ազդակների ազդեցությամբ բիմիական մոդիֆիկացիայի մեխանիզմը ցույց է տրվում SH-խմբերի նշանակությունը 18-օրական ճագի արգիմի լյարդի արգինազային ակտիվության զրուհորման մեջ: Ֆերմենտի մաքրված պրեպարատը պարունակում է 9,93 մկմոլ միզանյութ 1 մգ սպիտակուցի վրա տեսակարար ակտիվությամբ:

The importance of SH-groups for the expression of arginase activity of 18-days hen embryo liver has been shown by the method of chemical modification with specific reagents. The purified enzyme contains 9,93 μ mole urea per 1 protein mg.

Эмбрион кур—аргиназа—парахлормеркурибензоат—парабензохином—1-ацетат.

Ранее нами было установлено, что изоферменты аргиназы урикоотельческих организмов в зависимости от их метаболической направленности обладают характерными физико-химическими и кинетическими особенностями [1—3, 5]. Очевидно, эти изоферменты различаются содержанием химически активных групп, играющих роль в проявлении активности и поддержании нативной конформации ферментов. В настоящее время с целью изучения указанных групп широко применяются методы химической модификации при помощи реагентов, избирательно взаимодействующих при определенных условиях с отдельными остатками в белках [9—11]. Указанными методами исследована роль SH-группы в проявлении активности аргиназы различных организмов [6, 12—15].

В настоящей работе представлены результаты очистки аргиназы печени 18-дневного куриного эмбриона и изучения роли SH-группы в проявлении активности фермента.

Материал и методика. Исследовали печень эмбрионов кур породы леггорн 18-дневия развития. Аргиназную активность и белок определяли ранее описанными методами [4].

Сокращения: ПХМБ—парахлормеркурибензоат.

Реагенты на тиоловые группы—ПХМБ, парабензохинон, J-ацетат—добавляли и концентратях, указанных в соответствующих таблицах, перед внесением аргинина.

Результаты и обсуждение. Аргиназа печени 18-дневного куриного эмбриона, имеющая один пик активности, по физико-химическим и кинетическим свойствам близка к неуреотелическим формам [2]. Уреогелическая аргиназа печени 18-дневного куриного эмбриона была очищена нами по следующей схеме.

I—этап—гомогенизация. Печень выделяли при 20° и подвергали гомогенизации в среде 0,15 М КСl + 5 мМ МпСl₂ в течение 3 мин в стеклянном гомогенизаторе типа Пёттер-Эльведжема. Гомогенат центрифугировали при 9000 об/мин в течение 1 часа.

II этап—получение ацетонового порошка. После отделения супернатанта осадок подвергали гомогенизации с охлажденным ацетоном (–20°). Полученную суспензию фильтровали при помощи бюкхеровской воронки, после чего осадок вновь гомогенизировали с ацетоном при указанных выше условиях. Полученный ацетоновый порошок элюировали в течение 24 ч в среде трис-НСl буфера (рН 7,4) + 5 мМ МпСl₂. Суспензию центрифугировали 15 мин при 12000.

III этап—хроматография на ДЕАЕ целлюлозе. Элюат наносили на колонку (1,3X24 см), уравновешенную трис-НСl буфером (рН 7,4), содержащим 2 мМ МпСl₂. Затем колонку промывали растворами NaCl (от 60 мМ до 0,35 М), содержащими 5 мМ МпСl₂.

IV этап—тепловая обработка. Активные фракции подвергали тепловой обработке. Раствор элюата согрели в течение 10 мин при 45° в среде с 5 мМ МпСl₂.

V этап—высаливание сульфатом аммония и гельфильтрация на сефадексе G-100. После тепловой обработки образец высаливали сульфатом аммония 23%-ного насыщения. Затем супернатант подвергали гельфильтрации на сефадексе G-100 (трис-НСl буфер, рН 7,4) (табл. 1).

Таблица 1. Очистка аргиназы печени 18-дневных эмбрионов кур

Этапы	Объем	Количество белка, мг	Аргиназа активнос. в, мкмоль моч.	Удельная активность, мкм.мг моч. белка	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	130.0	7920.6	457.60	0.057		100
Ацетоновый порошок	90.0	1250.2	264.40	0.062	1.08	57.7
Хроматография на ДЕАЕ целлюлозе	33.0	654.0	236.6	0.362	6.33	51.7
Термообработка	30.0	158.0	204.2	1.292	22.70	44.6
Гельфильтрация на сефадексе g—100	45.0	17.6	171.8	9.93	174.2	38.0

Из 100 эмбрионов было выделено 45,5 г печени. Очищенный препарат фермента содержал 17,6 мг белка с удельной активностью $9,93 \frac{\text{мкм.мг}}{\text{моч.белка}}$. Степень очистки определяли электрофорезом на полиакриламидном геле [4].

Наиболее специфическим реагентом на тиоловые группы является ПХМБ, который, согласно данным литературы, в концентрации 1 мМ полностью ингибирует аргиназу печени шпыленка [15], речного рака, жирового тела таракана, дрожжей [12], люпина, тогда как не действует на аргиназу печени крыс [15], человека, шелкоичной моли, печени быка [6]. Неодинаковое действие ПХМБ на аргиназную активность люпина и печени крыс Бер и Мужинска объясняют отсутствием SH-групп в аргиназе печени крыс.

Исследованные нами реагенты на тиоловые группы—ПХМБ, J-ацетат и парабензохинон—ингибируют очищенную аргиназу печени 18-дневного куриного эмбриона, что указывает на значение SH-группы в проявлении активности фермента.

Таблица 2. Влияние реагентов на тиоловые группы очищенной аргиназы 18-дневного куриного эмбриона

Концентрация	ПХМБ		ПХМБ + МЭ		ПХМБ + глутатион	
	мкМ моч.	%	мкМ моч.	%	мкМ моч.	%
Контроль	1.603	100	1.744	100	1.704	100
$1.25 \cdot 10^{-2}$	1.632	101.49	1.704	98.7	1.678	98.57
$1.25 \cdot 10^{-4}$	1.704	105.97	1.576	90.37	1.704	100
$2.5 \cdot 10^{-4}$	1.520	94.53	1.624	93.12	1.776	104.22
$1.25 \cdot 10^{-3}$	1.280	79.83	1.728	101.30	1.960	115.83
$2.5 \cdot 10^{-3}$	0.760	47.26				
	Глутатион				меркаптоэтанол	
Контроль	0.830	100			0.840	100
5.0	1.360	154.53			1.280	152.38
$1.25 \cdot 10^{-4}$	1.394	157.26			1.344	160.00
$1.25 \cdot 10^{-3}$	1.360	154.53			1.350	161.91
$3.75 \cdot 10^{-3}$	0.888	100.0			1.296	154.20
$5.0 \cdot 10^{-3}$	0.840	95.45			1.208	143.81
	J-ацетат		J-ацетат + МЭ		J-ацетат + глутатион	
Контроль	1.701	100	1.714	100	1.712	100
$1.25 \cdot 10^{-4}$	1.528	88.66	1.680	98.58	1.608	83.92
$5.0 \cdot 10^{-4}$	0.920	53.99	1.744	102.34	1.704	99.53
$1.0 \cdot 10^{-3}$	0.672	39.43	1.800	107.84	1.784	104.20
$1.25 \cdot 10^{-2}$	0.640	37.56	1.960	115.83	1.810	106.80
	Бензохинон		бензохинон + МЭ		бензохинон + глутатион	
Контроль	1.640	100	1.704	100	1.704	100
$2.5 \cdot 10^{-4}$	1.520	92.67	1.704	100	1.704	100
$1.25 \cdot 10^{-3}$	1.448	88.28	1.720	100.92	1.704	100
$3.75 \cdot 10^{-3}$	1.280	78.04	1.728	101.39	1.730	100.92
$1.25 \cdot 10^{-2}$	1.176	71.70	1.744	102.34	1.736	101.87

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что ингибирующее влияние ПХМБ начинается с концентрации $2.5 \cdot 10^{-4}$ М и выше. При концентрации $2.5 \cdot 10^{-3}$ М активность фермента подавляется на 50%. Интересно, что низкие концентрации реагента, согласно полученным нами данным, оказывают стимулирующее действие на активность фермента, что, по-видимому, можно объяснить взаимодействием ПХМБ с более доступны-

ми группами, при котором конформационные изменения молекулы фермента облегчают его реакцию с субстратом. Используемые в эквимольных концентрациях восстанавливающие агенты—глутатион (восстановленный) и меркаптоэтанол, оказывающие защитное действие на тиоловые группы, одинаково предохраняют фермент от воздействия ПХМБ, а в высоких концентрациях даже стимулируют активность аргиназы. При отсутствии в среде ингибитора эти реагенты являются активаторами фермента печени куриного эмбриона.

Влияние J-ацетата ($1,25 \cdot 10^{-5}$ — $1,25 \cdot 10^{-2}$ М) и парабензохинона ($2,5 \cdot 10^{-6}$ — $1,25 \cdot 10^{-4}$ М) аналогично действию ПХМБ. В условиях нашего эксперимента J-ацетат ингибировал активность фермента на 60% при концентрации $1,25 \cdot 10^{-4}$ М (высокие концентрации реактива окрашивают среду и делают невозможным колориметрирование).

Глутатион и меркаптоэтанол полностью защищают фермент от ингибирующего влияния J-ацетата и парабензохинона.

Хотя не исключается комбинирование этих реагентов, особенно J-ацетата с другими реакционноспособными группами гистидина, лизина, метионина, факт реактивирования глутатионом и меркаптоэтанолом заблокированного ингибитором фермента свидетельствует о наличии SH-группы в урикоглицерической аргиназе печени куриного эмбриона и значительной их роли в проявлении ее активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян Т. Г., Карапетян С. А., Джакуджян Н. Дж. Биолог. ж. Армении, 34, 1, 1981.
2. Арутюнян Т. Г., Карапетян С. А., Абрамян А. Ж., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 39, 6, 1986.
3. Давтян М. А., Георгян М. Л. Биолог. ж. Армении, 39, 9, 1980.
4. Давтян М. А., Арутюнян Т. Г., Хачатрян М. А. Вопросы биологии, 2, Ереван, 1981.
5. Давтян М. А., Арутюнян Т. Г., Хачатрян М. А., Петросян А. Р. Биолог. ж. Армении, 34, 9, 1981.
6. Джакуджян Н. Дж., Арутюнян Т. Г., Хачатрян М. А., Давтян М. А. Биология. Межвуз. сб. научн. тр., 1, Ереван, 1979.
7. Северин Е. С., Курочкин С. И., Кочетков С. Н. Успехи биол. химии, 15, 1974.
8. Торчинский Ю. М. Успехи совр. биологии, 66, 1968.
9. Гуманян Л. Р., Чубарян С. В., Торчян Р. О., Мовсисян А. С. Биолог. ж. Армении, 36, 6, 1983.
10. Ber E., Muszynska G., Cichova D. Bull. Acad. Polon. sci. ser. sci. biol., 26, 10, 1978.
11. Mora J., Tarran R. Ra. Analiz, Biochim. Biophys. Acta, 118, 206, 1966.
12. Muhirad H., Heggi J., Foth J. Acta Biochim. Biophys., 2, 19, 1967.
13. Muszynski G., Szwirina L., Lobereva L. Acta Biochem. Polon., 19, 2, 1972.
14. Muszynska G., Ber. E. J. Biochem., 9, 10, 1978.
15. Wright L. C., Brady C. J., Hide R. W. Phytochemistry, 20, 2641, 1981.

Поступило 18 IX 1987 г.