

ИНАКТИВАЦИЯ ПРЕПАРАТОВ АРГИНАЗЫ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ОЧИСТКИ

Н.А. АРЦУНИ, Э.Х. БАРСЕГЯН, М.А. ДАВТЯН

*Ереванский государственный университет, кафедра биохимии и проблемная лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии, 375049**Аргиназа - инактивация фермента*

Исследованиями, проведенными на кафедре биохимии ЕГУ, было установлено, что при pH 3,6 (22ч), а также при действии ЭПГА (2ч) происходит инактивирование аргиназы печени лягушки *Rana ridibunda* на 85 и 92,5% соответственно. Показано также, что при этих двух способах инактивации аргиназы процесс обратим в разной степени в зависимости от pH среды и наличия определенных двухвалентных ионов. Сделано предположение о различных механизмах инактивирования фермента [1].

Данное исследование предпринято с целью изучения процесса инактивации аргиназы в зависимости от степени очистки фермента при pH 3,6 и действии ЭПГА.

Материал и методика. Объектом исследования служили лягушки *Rana ridibunda* (лягушка степная) массой 100-120 г.

Активность аргиназы определяли по описанному методу [2]. Активность фермента выражали в мкмоль образующейся мочевины на 1 г свежей ткани, на 1 г белка и в 1000 мл в случае высокоочищенного препарата из печени крупного рогатого скота (КРС) фирмы Reanal, Венгрия.

Инактивацию аргиназы проводили в 0,05 М глицин - HCl буфере, pH 9,6, а также при действии ЭПГА в конечной концентрации $2,7 \times 10^{-2}$ М. Инактивации подвергали экстракты, полученные неуприфугированием гомогенатов печени лягушек *Rana ridibunda* при 25000 г, частично очищенные препараты аргиназы печени *Rana ridibunda*, полученные путем пропускания экстрактов печени через колонку только с сефадексом G-75, а также G-150 с последующим разделением на ДЭАЭ-целлюлозе. Гель использован и высокоочищенный препарат аргиназы из печени крупного рогатого скота (активность не менее 20 ФЕ/мг).

Результаты и обсуждение. Как показали результаты исследований, при кислотной инактивации как высокоочищенный, так и частично очищенный препарат аргиназы полностью инактивируются через 3 ч инкубации. Все 3 субфракции аргиназы, полученные на ДЭАЭ-целлюлозе, инактивировались уже через 2 ч инкубации на 84,5, 89,7 и 80% соответственно (табл. 1).

Таблица 1. Инактивация препаратов аргиназы различной степени очистки при pH 3,6 (средние данные 4 опытов)

Образец	Экстракт, мкмоль/г ткани	% инактивирования	Частично очищенный препарат, G-75, мкмоль/г ткани	Частично очищенный препарат, G-150, ДЭАЭ-целлюлоза, мкмоль/г белка			Высокоочищенный препарат из печени КРС, мкмоль/1000 мл
				1	2	3	
Исх. активность	30993		30000	149	393	261	7200
30 мин				89,5	162,2	137	
1 ч				48,2	95	101	
2 ч				13	40,25	51,7	
3 ч	23400	24,5	260				60
22 ч	4734	85					
% инактивирования	85		100	84,5	89,7	80	100

Что касается аргиназы экстракта печени лягушки, то через 3 ч проходило инактивирование фермента лишь на 24%, и только к 22 часу активность фермента подавлялась на 85%. По всей видимости, в гомогенате печени имеется какой-то фактор, стабилизирующий фермент против кислотной инактивации. Очевидно, при очистке этот фактор исчезает и фермент становится уязвимым в отношении воздействия низких значений pH. Природа его пока неизвестна, либо он связан непосредственно с ферментом, либо находится в среде. Можно предположить, что этот фактор по крайней мере прикрывает дисульфидные связи от влияния низких pH среды.

Таблица 2. Инактивация препаратов аргиназы различной степени очистки при действии ЭДГА (средние данные 4 опытов)

Образец	Экстракт, мкмоль/г ткани	Частично очищенный препарат, G-75, мкмоль/г тк.	Частично очищенный препарат, G-150, ДЭАЭ-целлюлоза, мкмоль/г белка			Высокоочищенный препарат из печени КРС, мкмоль/1000мл
			1	2	3	
Исх. акт.	28416	30910	133	423	269	7960
0'			18	18,3	29,7	
20'	2918	1770				4580
30'			17,8	17,7	27,2	
40'	1728	800				4152
60'	109	268	17,4	17,6	26,7	1760
80'	58,4	132				1206
100'	41,6	68				1128
120'	33,6	30	15,6	16,3	26,5	33,6
% инакт.	100	100	88,2	96	90,1	100

Результаты исследований с ЭДГА показали, что аргиназа печени лягушек как в экстрактах, так и частично очищенная инактивируется через 20 минут (табл. 2). Действие указанного реагента на ферментный препарат, прошедший двухэтапную очистку, обнаруживается уже в первые минуты эксперимента во всех трех субфракциях в равной мере.

Что касается процесса инактивации аргиназы из печени крупного рогатого скота, то фермент полностью инактивируется через 2 часа. Быстрая инактивация фермента в присутствии ЭДГА в наших экспериментах свидетельствует, вероятно, об относительно прочной связи Mn с субъединицами аргиназы и о легкой диссоциации этих ионов при их поверхностном расположении на ферменте, поскольку, как показано при исследовании ЭПР-спектров аргиназы, в печени лягушек *Rana ridibunda* присутствуют 2 типа двухвалентного Mn, которые ассоциируются на поверхности, но отличаются по белковому окружению в молекуле фермента [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Барсегян Э.Х. Биолог. журн. Армении, 42, 2, 1989.
2. Барсегян Э.Х., Никогосян Ф.Ц., Давтян М.А. Там же, 30, 6, 1977.
3. Барсегян Э.Х., Никогосян Ф.Ц., Месропян М.Б. Там же, 32, 12, 1979

Поступила 30.IX.1995