

УДК 612.8.015

Академик АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыан, М. А. Давтян, Д. М. Геворкян

Получение высокоочищенного препарата мозговой аргиназы крыс и его некоторые физико-химические свойства

(Представлено 19/XII 1969)

В мозгу многих животных (крысы, куры, лягушки, водяные и наземные черепахи) нами обнаружена выраженная аргиназная активность. Изучены некоторые кинетические свойства аргиназы мозга на уровне гомогената (¹⁻³). Печеночная аргиназа некоторых урсотелических животных получена в высокоочищенном виде и охарактеризована довольно подробно (⁴⁻⁶).

Мы задались целью выделить аргиназу из головного мозга крыс в очищенном виде, разносторонне изучить ее и сопоставить с печеночным ферментом.

Вследствие ряда особенностей мозгового фермента и мозговой ткани ни один из предложенных методов очистки печеночной аргиназы не оказался пригодным в отношении мозгового фермента. Затруднения, в первую очередь, связаны с преимущественной локализацией аргиназы в ядерной фракции мозга (⁷), откуда необходимо было предварительно перевести ее в растворимое состояние. Другое существенное затруднение обуславливалось наличием большого содержания липидов в мозгу, которых необходимо удалить органическими растворителями, последние неизбежно вызывают большие потери фермента. Следует учесть, что и без того исходная аргиназная активность мозговой ткани несравненно ниже активности фермента печени.

Для определения аргиназной активности брали 0,5 мл ферментного препарата, 0,2 мл 0,02 М $MnCl_2$ и 0,8 мл 0,04 М глицинового буфера (рН 9,5), прединкубировали 15 минут при 37° в атмосфере воздуха, после чего добавляли 1 мл 0,7 М раствора L-аргинина (рН 9,5) и инкубировали еще 5 минут. Реакцию приостанавливали добавлением 0,5 мл 0,5 М раствора $HClO_4$, центрифугировали и в супернатанте определяли мочевины диацетилмоноксимом по методу Арчибальда (⁸). Данная методика, хотя и предложена для определения цитруллина, пригодна и для мочевины в ферментных препаратах мозга, содержащих цитруллин

в незначительных количествах. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует расщепление 1 мкмоль L-аргинина в течение 1 минуты.

Определение содержания белка проводили по Лоури. В некоторых случаях определяли ориентировочное количество белка проб путем измерения поглощения при 280 м.мк (СФ-4).

Из 2000 крысиных мозгов был приготовлен 20% гомогенат на Na-маленнатном буфере (pH 7,0), содержащем 0,03 М MnCl₂. С целью перевода аргиназы из ядерной фракции в растворимое состояние, гомогенат подвергали трехкратному замораживанию и оттаиванию, после чего подогревали при 60° 10 минут, охлаждали и центрифугировали при 50000 g 30 минут. Из полученного супернатанта экстрагировали липиды эфиром (1 : 1). Осаждение активного белка осуществляли метанолом (при 30—70% насыщении среды), после чего осадок быстро суспендировали в Na-маленнатном буфере (pH 7,0) и диализовали против 0,05 М трис-глицинового буфера (pH 8,0). Фракционирование белков осуществляли гельфильтрацией на колонке (2,5×120 см) с сефадексом G-200 (уравновешивание колонки и элюцию проводили 0,05 М трис-глициновым буфером, pH 8,0).

Дальнейшую очистку проводили с помощью ионообменной хроматографии (карбоксиметил-сефадекс С-50 и ДЭАЭ-сефадекс А-50), в основном, методом Коссмана и сотр. (6), предложенным для очистки печеночной аргиназы крыс.

В результате очистки удалось получить высокоочищенный препарат мозговой аргиназы крыс (степень очистки—1470, удельная активность—26,47, выход—38%), который совершенно гомогенен как при электрофорезе на бумаге, так и при ультрацентрифугировании.

Изучен ряд физико-химических и кинетических свойств очищенного фермента. Соответствующие данные приведены в табл. 1.

Таблица 1

Кинетические и физико-химические свойства очищенной аргиназы мозга крыс

1	pH-оптимум	9,8
2	Константа Михаэлиса (K _m)	16 × 10 ⁻³ М
3	Оптимальная концентрация Mn ⁺⁺	2,5 × 10 ⁻⁴ М
4	Специфичность	L-аргинин
5	Константа седиментации (S _{20 w} ⁰)	1,56 × 10 ⁻¹³ сек
6	Константа диффузии (D _{20 w} ⁰)	7,16 × 10 ⁻⁷ см ² /сек
7	Молекулярный вес (M _{SD})	62000
8	Спектральные свойства (максимум поглощения)	278 м.мк
9	Содержание азота	11,57 %
10	Содержание углеводов	0,5—1,5 %
11	Содержание липидов	0

Константу Михаэлиса определяли методом Лайнуивера и Бэрка (⁹). Константы седиментации ($S_{20,w}^0$) и диффузии ($D_{20,w}^0$) определяли на аналитической центрифуге («Хитачи»). По классической формуле Сведберга рассчитали молекулярный вес фермента (M_{SD}) используя величины $S_{20,w}^0$ и $D_{20,w}^0$. Содержание азота в препарате определяли газометрическим микрометодом Дюма (¹⁰), а содержание углеводов—феколсерным методом. Для определения липидов электрофореграммы (электрофорез на бумаге) окрашивали суданом черным.

При помощи аминокислотного анализатора («Бекман») произведен также полный аминокислотный анализ фермента, после предварительного гидролиза его 6N соляной кислоты при 110° в запаянных под вакуумом ампулах. Оказалось, что в состав мозговой аргиназы крыс входят 17 аминокислот (табл. 2) и, вероятно, еще триптофан, который, как известно, полностью разрушается при кислотном гидролизе.

Таблица 2

Аминокислотный состав аргиназы мозга крыс

Аминокислоты	мг/100 мг белка	М/100 М аминокислот	% азота
Лизин	7,87	8,07	13,08
Гистидин	2,79	2,61	6,52
Аргинин	5,11	4,27	14,52
Цистеиновая кислота	следы	—	—
Аспарагиновая кислота	8,25	9,02	7,34
Треонин	4,47	5,46	4,83
Серин	4,11	5,68	4,74
Глутаминовая кислота	10,80	11,16	8,89
Пролин	5,63	7,12	5,93
Глицин	9,46	18,29	15,27
Цистин	3,07	1,89	1,58
Валин	8,38	7,12	5,93
Метионин	1,21	1,18	0,99
Изолейцин	3,21	3,56	2,99
Лейцин	7,92	8,78	7,31
Тирозин	3,25	2,61	2,18
Фенилаланин	4,31		
	89,84	3,80	3,16

Таким образом, из головного мозга крыс выделен высокоочищенный препарат аргиназы, который существенно отличается от аргиназы печени крыс, очищенной другими авторами (⁷). Отличия этих аргиназ особенно наглядны в отношении констант Михаэлиса, седиментации, диффузии и молекулярного веса, а также аминокислотного состава.

Полученные данные являются подтверждением выдвинутого ранее нами положения (1-3, 12) о том, что мозговая аргиназа является неуреотелическим ферментом, играющим определенную, но пока невыясненную роль в клеточном метаболизме, вне зависимости от механизмов нейтрализации аммиака и типа экскреции азота животного.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Հայկական ՍՍՀ ԳԱ ակադեմիկոս Է. Խ. ՌՈՒՆՅԱՔՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Դ. Մ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ

Բարձր մախուրյան արգինազային պրեպարատի անջատումը առնետների գլխուղեղից և նրա ուղի ֆիզիկա-քիմիական հատկությունները

Ուղիտակ առնետների գլխուղեղից անջատված է բարձր մաքրությամբ ու ակտիվությամբ ունեցող արգինազային պրեպարատ (մաքրման առաժեռեր-1470, տեսակարար ակտիվությունը-28.47, էլը-38%)։ Պրեպարատը հոմոգեն է ուլտրաքննորոշության և էլեկտրոֆորեզի պայմաններում։ Հետազոտվել են այդ արգինազային հիմնական կինոտիկ և ֆիզիկա-քիմիական հատկությունները։ Ուղեղային արգինազան մի շարք հատկություններով (Միխայիսի, սեզիմենտացիոն և դիֆուզիայի կոնստանտները, մոլեկուլային կշիռը, ամինաթթվային կազմը և այլն) խիստ տարբերվում է լյարդի արգինազայինց։ Այդ երկու ֆերմենտները համեմատաբար տարբերվում են իրենց մոլեկուլային կշիռներով (ուղեղային արգինազային մոլեկուլային կշիռը ավելի քան երկու անգամ փոքր է)։ Ստացված տվյալները հաստատում են նախկինում մեր կողմից առաջ քաջված այն տեսակետը, որ ուղեղային արգինազան, ի տարբերություն լյարդի արգինազային, ուրեոտիկ ֆերմենտ չէ, չի մասնակցում ամոնիակի շեղացման մեխանիզմում և ունի այլ, ցածր լրացահատված գեր ընթացիկ փոխանակությունում։

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ H. Ch. Bunatian, Davtian M. A. J. Neurochem., 13, 743, 1966. ² М. А. Давтян, Вопросы биохимии мозга. Изд. АН Арм. ССР, 3, 273, 1967. ³ М. А. Давтян, Г. Х. Бунятян, Д. М. Геворкян, Р. С. Бабоян, Л. А. Петросян, Тезисы Второго биохим. съезда, секция 7, Ташкент, стр. 4, 1969. ⁴ D. M. Greenberg, A. E. Bagol, O. A. Boholt, Arch. Biochem. Biophys., 62, 446, 1956. ⁵ W. Grassman, H. Hormann, O. Japowsky, Z. physiol. Chem., 312, 273 (1958). ⁶ H. Hirsch-Kolb, D. M. Greenberg, J. Biol. Chem., 243, 6123 (1968). ⁷ K. Th. Koßmann, R. Hintze, K. Lange, Z. physiol. Chem., 341, 255 (1965). ⁸ R. M. Archibald, J. Biol. Chem. 156, 121 (1944). ⁹ H. Lineweaver, D. Burk, J. Am. Chem. Soc., 56, 658 (1934). ¹⁰ М. Н. Чумаченко, Н. Е. Пахомова, Изв. АН СССР, Сер. хим., № 9, 1561 (1964). ¹¹ M. Dubous, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, R. A. Rebers, F. Smith, Anal. Chem., 28, 350 (1956). ¹² М. А. Давтян, Вопросы биохимии мозга. Изд. АН Арм. ССР, 4, 237 (1968).