

УДК 591.1.05

А.Х. АГАДЖАНЯН, М.С. МАРТИРОСЯН, А.А. АГАДЖАНЯН

БИОСИНТЕЗ ПРОЛИНА, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ ОРНИТИНЦИКЛАЗОЙ,
НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ МЕТАМОРФОЗА ФАСОЛЕВОЙ ЗЕРНОВКИ
ACANTHOSCELIDES OBTECTUS SAY

Осуществлена очистка орнитинциклазы с помощью диализа с последующим фракционированием на сефадексе G-100. Обнаружено, что фермент жуков фасоловой зерновки при диализе теряет свою активность, а фермент личинок довольно устойчив и значительно активнее. При фракционировании бесклеточного экстракта жуков и личинок на сефадексе G-100 орнитинциклаза жуков элюируется одним пиком, а фермент личинок – двумя, обладающими довольно высокими активностями.

Новый путь биосинтеза пролина из орнитина, катализируемый орнитинциклазой, впервые обнаружен у анаэробных бактерий *Clostridium sporogenes*. При этом орнитин превращается в пролин одним ферментом – орнитинциклазой [1].

Молекулярная масса фермента равна 80кДа. Гель-электрофорезом на полиакриламиде установлено, что фермент состоит из двух субъединиц с молекулярной массой по 41.5кДа [2].

Обнаружена орнитинциклазная активность также на различных стадиях метаморфоза фасоловой зерновки [3], которая является фактически вторым после анаэробных бактерий *Clostridium sporogenes* объектом с этим редко встречающимся в природе ферментом. Установлено, что орнитинциклаза не проявляет строгой специфичности относительно орнитина. Роль последнего может выполнять как ряд аминокислот, так и мочевины и гуанидинуксусная кислота [4].

Материалы и методы. Объектом исследования служили личинки и жуки фасоловой зерновки *Acanthoscelides obtectus Say*. Продолжительность развития яиц при 28°C – 7 дней. При указанной температуре и 75%-ой влажности воздуха личиночная стадия длится 30 дней. Личинки для опытов были отобраны на 28-ой день развития. Гомогенизацию проводили в стеклянном гомогенизаторе типа Поттера–Эльведжема. Готовили 10%-ый гомогенат в 0,05М буфере трис-НСl (рН 7,4). Очистку орнитинциклазы осуществляли с помощью диализа в холодных условиях в течение двух часов против буфера трис-НСl (рН 7,4) в соотношении 1:20

и фракционированием на сефадексе G-100, уравновешенном буфером трис-НСI, на колонке длиной 48 и диаметром 1,9см, объем наносимого раствора – 3мл, скорость элюции – 5мл за 10 мин. Активность фермента определяли в инкубационной среде, содержащей следующие компоненты: калийфосфатный буфер (рН 7,4) – 1мл, кофакторы (НАД⁺, НАДФ⁺) – 2мкмоль, L-орн – 50мкмоль. Реакцию останавливали добавлением 1мл 20%-го холодного раствора ТХУ. Пролин определялся химическим методом по Блюменкрантцу [5], белок – по интенсивности поглощения света при длине волны 280нм на СФ-4А. Статистическая обработка данных проведена по Вознесенскому [6].

Результаты и обсуждение. Наши исследования были посвящены выделению частично очищенной орнитинциклазы, об активности которой судили по количеству синтезированного пролина, поэтому применялись различные системы для удаления пролина путем диализа (табл. 1).

Таблица 1*

Удаление свободного пролина из гомогената личинок и жуков фасолевой зерновки, мкмоль про на 1г ткани

Система для диализа	Личинки	Жуки
исходное количество пролина в гомогенате	2,51±0,7	2,54±0,8
содержание пролина после диализа против трис-НСI	0,72±0,1	0,68±0,1
содержание пролина после диализа против 30%-го сульфата аммония	0,71±0,1	0,73±0,1
содержание пролина после диализа против воды	1,71±0,4	0,98±0,3

* В таблицах 1,2 приведены средние значения пяти серий экспериментов.

Данные таблицы свидетельствуют, что пролин хорошо диализуется против трис-НСI (рН 7,4) и 30%-го сульфата аммония.

В следующих сериях экспериментов для выявления орнитинциклазной активности были использованы диализаты, полученные различными способами. Данные приведены в табл. 2.

Таблица 2

Использование диализатов для выявления активности орнитинциклазы, мкмоль про на 1г ткани.

Варианты	Кофакторы фермента	Личинки	Жуки
диализат, полученный против трис-НСI	НАД ⁺	0,53±0,05	0
	НАДФ ⁺	0,30±0,03	0
диализат, полученный против 30%-го сульфата аммония	НАД ⁺	0,14±0,01	0
	НАДФ ⁺	0,07±0,005	0
диализат, полученный против воды	НАД ⁺	0,43±0,04	0
	НАДФ ⁺	0,21±0,02	0

Из таблицы видно, что орнитинциклаза жуков при диализе полностью теряет свою активность, а фермент личинок, напротив, довольно устойчив и после двухчасового диализа проявляет значительную активность.

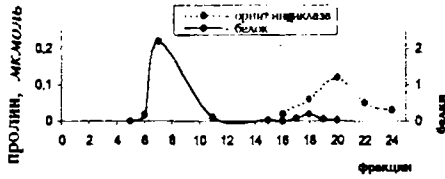


Рис. 1. Орнитинциклаза жуков фасоловой зерновки.

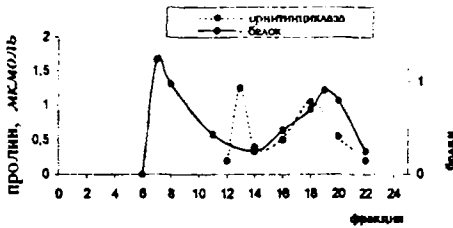


Рис. 2. Изоэнзимы орнитинциклазы личинок фасоловой зерновки.

изоформы фермента. Дальнейшие исследования будут посвящены изучению регуляторных свойств этого фермента и его изоэнзимов.

Активность орнитинциклазы проявляется как с окисленным НАД, так и с НАДФ, однако с последним кофактором – наполовину. Лучшие результаты показывают диализаты, полученные против буфера трис-НСl. При гельфильтрации гомогената жуков фасоловой зерновки на сефадексе G-100 орнитинциклаза элюируется одним пиком при наличии двух пиков белка (рис. 1), а в случае с диализатом гомогената личинок – двумя четко выраженными активностями (рис. 2).

Таким образом, нам впервые удалось фракционировать орнитинциклазу, как и выявить

Кафедра биохимии

Поступила 22.05.2002

ЛИТЕРАТУРА

1. Costilow R.N., Laycock L. – J. Biol. Chem., 1971, v. 246, p. 6655–6668.
2. Muth W.L., Costilow R.N. – J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 23, p. 7457–7462.
3. Агаджанян А.Х. Аргиназа, ферменты биосинтеза и катаболизма пролина в сравнительном аспекте: Автореф. дис. на соискание уч. ст. докт. биол. наук. Ер., 1990.
4. Агаджанян А.Х., Мартиросян М.С., Агаджанян А.А. – Ежекварт. рефер. сборник. Депонир. работы РА, 2001, с. 346.
5. Blumencrantz N. – Clin. Biochem., 1980, v. 13, p. 177–183.
6. Вознесенский В.Л. Первичная обработка экспериментальных данных. Л., 1969.

Ա.Խ. ԱՂԱԶԱՆՅԱՆ, Մ.Ս. ՄԱՐՏԻՐՈՍՅԱՆ, Ա.Ա. ԱՂԱԶԱՆՅԱՆ

ՕՐՆԻԹԻՆՑԻԿԼԱԶՈՎ ԿԱՏԱԼԻԶՎՈՂ ՊՐՈԼԻՆԻ ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԸ
 ԼՈՐՈՒ ԸՆԴԱԿԵՐԻ (ACANTHOSCELIDES OBTECTUS SAY)
 ԿԵՐՊԱՐԱՆԱՓՈՒՈՒԹՅԱՆ ՏԱՐԲԵՐ ՓՈՒԼԵՐՈՒՄ

Ամփոփում

Իրականացվել է օրնիթինցիկլազի մաքրումն դիալիզով և G-100 սեֆադեքսով չափազատման ճանապարհով: Հայտնաբերվել է, որ լոբու

ընդակերի բզեզների ֆերմենտը դիալիզի ենթարկելիս կորցնում է իր ակտիվությունը, իսկ թրթուրների ֆերմենտը չափազանց կայուն է և ավելի ակտիվ է բզեզների ֆերմենտի համեմատությամբ: Բզեզների և թրթուրների անբջիջ մզվածքը G-100 սեֆադեքսով չափազատելիս բզեզների օրնիթինցիկլազը էլյուցվում է մեկ, իսկ թրթուրների ֆերմենտը բավականաչափ բարձր ակտիվությամբ օժտված երկու մաքսիմումով:

A.Kh. AGHADJANIAN, M.S. MARTIROSIAN, A.A. AGHADJANIAN

BIOSYNTHESIS OF PROLINE CATALISED BY ORNITHINE CYCLASE AT DIFFERENT STAGES OF METHAMORPHOSIS OF HARICOT BEETLEFLY
ACANTHOSCELIDES OBTECTUS SAY

Summary

Purifying of ornithine cyclase has been realized by dialysis with following fractionation on sefadex G-100. It has been discovered that enzyme of haricot beetlefly loses its activity during dialysis, but larvas enzyme is rather stabile and considerably active than the enzyme of beetles. During fractionation of cell-free extracts of larvas and beetles on sefadex G-100 ornithine cyclase of beetles is elutioned with one peak, but larvas enzyme - with two peaks possessing, rather high activity.