

А. И. ВОСКОБОВЕВ, А. Н. ПЕТРОВА

МНОЖЕСТВЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ ДЕКСТРИН-4-ГЛИКОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ ПЕЧЕНИ

(Представлено академиком А. И. Опариным 28 IX 1970)

Нами был найден в печени кроликов фермент, названный декстрин-4-гликозилтрансферазой (ДГТ) ⁽¹⁾. В настоящей работе показано, что этот фермент существует в множественной молекулярной форме.

Методика. Препарат ДГТ получали из гомогената печени путем «посадки» фермента на кристаллы фосфорнокислой аммонийно-магниево-

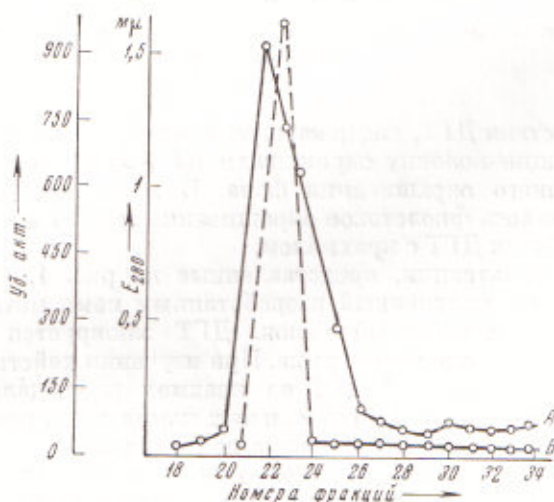


Рис. 1. Профиль элюции ДГТ с G-200. А — кривая содержания белка во фракциях, В — кривая гликозил трансферазной активности фракций

соли ($MgNH_4PO_4$), а белок фермента извлекали растворением кристаллов в 0,2 М ацетатном буфере pH 4,5 ⁽²⁾. Действие ДГТ определяли по понижению экстинкции (E_{500}) иодокрахмальных комплексов, при инкубации фермента в смеси (в мг/мл): крахмала 1, глюкозы 20, мальтозы 50. Исследование фермента проводили методами гельфильтрации, электрофореза в полиакриламидном геле и седиментационного анализа. Для гельфильтрации использовали G-200. На колонку размером $1,2 \times 55$ см наносили 10 мг белка в 2 мл буфера. Элюцию проводили 0,01 М трис-HCl буфером pH 8,0; элюат собирали по 1,2 мл. Седиментационный анализ проводили на аналитической ультрацентрифуге Спинко Е с 0,8% раствором белка в 0,05 М трис-HCl буфере. Скорость вращения ротора 51 000 об/мин. Фотографирование проводили через 20 мин. после достижения ротором заданной скорости с интервалом 8 мин. Электрофорез ставили по модифицированному методу Дэвиса ^(3, 4). Разгонку вели в 8% геле на боратном буфере pH 8,5—8,7. Продолжительность электрофореза 1 час.

Сила тока на каждую трубку размером $0,5 \times 8$ см 2—4 ма, напряжение 200—400 в. На столбик геля наносили 0,2 мл раствора фермента, содержащего 100 мкг белка. После проведения электрофореза гелевую колонку фиксировали 0,5% раствором трихлоруксусной кислоты и окрашивали 0,1% раствором кумаси бриллиантового. Для получения зимограмм использовали метод Ботчера⁽⁵⁾, применяемый для L-амилаз, который был нами видоизменен и приспособлен для определения ДГТ. После проведения электрофореза гелевую колонку помещали в инкубационную смесь, специ-

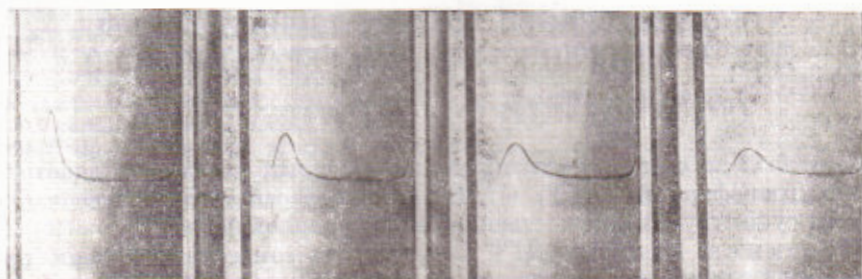


Рис. 2. Седиментационная диаграмма ДГТ. Температура 20° , интервал между снимками 8 мин.

фичную для действия ДГТ, содержащую крахмал и смесь сахаров. После суточной инкубации колонку окрашивали $KJ + J_2$ и промывали водой до исчезновения синего окрашивания фона. В месте расположения белка фермента развивалось фиолетовое окрашивание за счет специфичной ферментативной реакции ДГТ с крахмалом.

Данные гельфильтрации, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что фермент, полученный разработанным нами методом, представляет собой высокоочищенный белок. ДГТ элюируется с колонки в виде одного пика. При изучении действия полученных фракций ДГТ на крахмал наблюдалось понижение E_{500} подокрахмальных комплексов, пропорциональное содержанию белка во фракциях.



При исследовании фермента в аналитической ультрацентрифуге на седиментограмме обнаруживается один белковый пик (рис. 2), постепенно распадающийся после достижения ротором установленной скорости. Это приводит к выводу, что препарат имеет гетерогенную структуру и состоит из ряда белков очень близких по своему молекулярному весу. Достоверность этого положения подтверждают данные, полученные при электрофорезе ДГТ на полиакриламидном геле. Как видно из рис. 3А, на электрофореграмме видна одна широкая полоса, состоящая из очень близко расположенных друг к другу пяти полос. Расстояние между полосами незначительно, что указывает на их близкий молекулярный вес. Все полоски обладают специфичной активностью. Об этом

Рис. 3. Электрофорез ДГТ в полиакриламидном геле. А — гелевая колонка после электрофореза, окрашенная кумаси, В — гелевая колонка, проинкубированная в крахмале с глюкозой и мальтозой, и окрашенная $KJ + J_2$.

свидетельствует приведенная на рис. 3 *В* зимограмма. В данном случае ширина белковой полосы, полученной на электрофореграмме соответствует таковой, полученной на зимограмме. Наличие меньшей выраженности полос на зимограмме — результат диффузии крахмала в порах геля. Таким образом, на основании полученных результатов может быть сделан вывод о том, что ДГТ печени существует в виде множественных молекулярных форм.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
22 IX 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Н. Петрова, Биохимия, 23, 30 (1958). ² А. Н. Петрова, Биохимия, 24, 228 (1959). ³ B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404 (1964). ⁴ S. W. Raymond, L. S. Weintraub, Science, 130, 711 (1959). ⁵ B. Boet-cher, A. Feanaces, Anal. Biochem., 28, 510 (1969).