

В. Р. ШАТИЛОВ, В. Г. АМБАРЦУМЯН,
член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ

ИНДУЦИРУЕМАЯ В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ АММОНИЯ НАДФ-СПЕЦИФИЧНАЯ ГЛЮТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗА ХЛОРЕЛЛЫ

Нами было показано (¹), что в клетках термофильного штамма *Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim 82T под влиянием ионов аммония синтезируется *de novo* НАДФ-специфичная глютаматдегидрогеназа (НАДФ-ГДГ). В отличие от изученной ранее (²) конститутивной глютаматдегидрогеназы, работающей как с НАД, так и с НАДФ [НАД(Ф)-ГДГ], НАДФ-ГДГ имеет меньшую электрофоретическую подвижность. Для изучения свойств этой, индуцируемой, ГДГ и сравнения их со свойствами конститутивной НАД(Ф)-ГДГ необходимо было получить препараты НАДФ-ГДГ, свободные от НАД(Ф)-ГДГ. Кроме того, выделение НАДФ-ГДГ являлось бы окончательным доказательством ее синтеза. Это и входило в задачу настоящей работы. Для этой цели культуру выращивали в среде Таммийя, содержащей в качестве источника азота KNO_3 , в течение 3 суток до плотности 300–350 млн клеток мл. Выращивание проводили при непрерывном освещении (8 тыс. лк) люминесцентными лампами ЛД-40 и продувании воздухом, содержащим 0,5–0,8% CO_2 , при температуре 31–32°. После выращивания клетки собирали центрифугированием на суперцентрифуге С-44, промывали дистиллированной водой и переносили в свежую среду Таммийя, но содержащую в качестве источника азота $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в концентрации $4,92 \cdot 10^{-3}$ моль л (138 мг N на 1 л). Инкубацию в этой среде продолжали в течение 5 час. в ростовых условиях. Затем клетки собирали и промывали дистиллированной водой. Бесклеточные экстракты получали как описано ранее (³) с той разницей, что оттаивание проводили быстро при температуре 30°. Активность ГДГ определяли спектрофотометрическим методом по окислению НАДФ-Н при 340 мμ в стандартной реакционной смеси, содержащей в объеме 3 мл: 0,5 М трис-НСI-буфер pH 8,7 или 8,2; $0,94 \cdot 10^{-4}$ М НАД-Н или $1,2 \cdot 10^{-4}$ М НАДФ-Н; $8 \cdot 10^{-3}$ М α-кетоглутарат; $8 \cdot 10^{-2}$ М $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и фермент. Контролем служила аналогичная смесь без $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее окисление 1 μмоля НАД(Ф)-Н за 1 мин., а удельную активность рассчитывали как число единиц активности за 1 мин. на 1 мг белка. Белок определяли по методу Лоури и др. (⁴) после диализа против 0,005 М фосфатного буфера pH 7,4. Электрофорез проводили по методу Дэвиса и Орнштейна (^{5, 6}), а проявление активностей после электрофореза по методу Термена и др. (⁷).

Для выделения и очистки НАДФ-ГДГ использовали метод высаливания сухим $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и хроматографию на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой фирмы «Ватман». Количество $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, необходимое для достижения требуемой степени насыщения, рассчитывали по номограмме Бронвицкой и Горетова (⁸). НАДФ-ГДГ высаливалась вместе с НАД(Ф)-ГДГ при насыщении экстракта от 35 до 65%. После высаливания белок отделяли центрифугированием при 18 000 g в течение 10 мин., растворяли в 0,01 М фосфатном буфере pH 7,4, содержащем цистеин в концентрации 0,25 мг/мл, и обессоливали на колонке с сефадексом Г-25, уравновешенной тем же буфером. Активный элюат наносили на колонку с ДЭАЭ-32, уравновешенную указанным буфером с цистеином. Элюирова-

ние белков проводили ступенчато: сначала фосфатным буфером pH 7,4, возрастающей концентрации от 0,01 M до 0,1 M, а затем 0,1 M буфером, содержащим NaCl в возрастающей концентрации. Во всех элюатах всегда присутствовал цистеин в концентрации 0,25 мг/мл. На рис. 1 представлена типичная картина распределения ГДГ при используемом нами

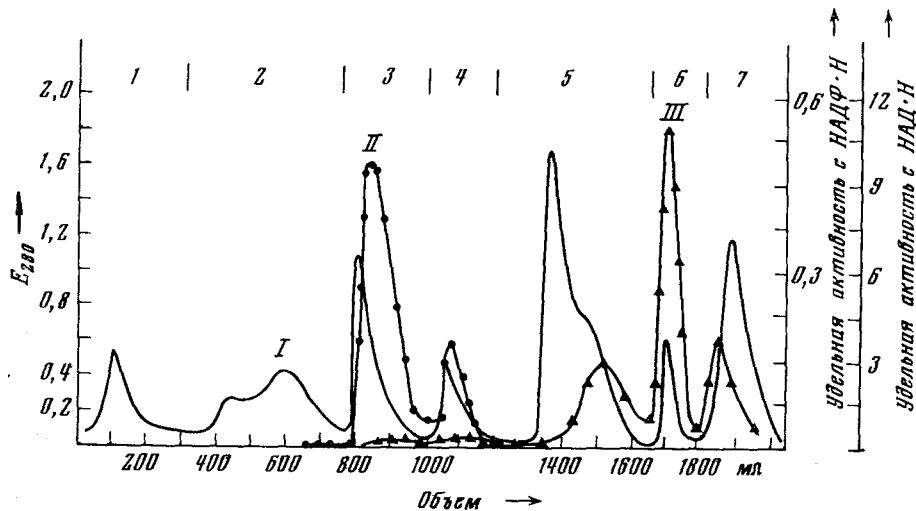


Рис. 1. Профиль элюции ГДГ при хроматографии фракции 35—65% насыщения (NH₄)₂SO₄ на колонке с ДЭАЭ-32. Элюенты: 1, 2, 3 и 4 — соответственно 0,03 M; 0,05 M; 0,08 M и 0,1 M фосфатный буфер pH 7,4, содержащий цистеин в концентрации 0,25 мг/мл; 5, 6 и 7 — соответственно 0,1 M; 0,2 M и 0,3 M NaCl в 0,1 M фосфатном буфере pH 7,4, содержащем цистеин в концентрации 0,25 мг/мл. I — поглощение при 280 мμ; II — ГДГ-активность с НАДФ-Н; III — ГДГ-активность с НАД-Н

ступенчато элюировании с ДЭАЭ-32. Такая же картина наблюдалась при использовании ДЭАЭ-11. Белковый пик, который элюировался фосфатным буфером pH 7,4 в области от 0,05 до 0,08 M, проявляет активность спектрофотометрически в условиях опыта только с НАДФ-Н и практически никакой активности с НАД-Н. Конститутивная НАДФ-ГДГ

Таблица 1

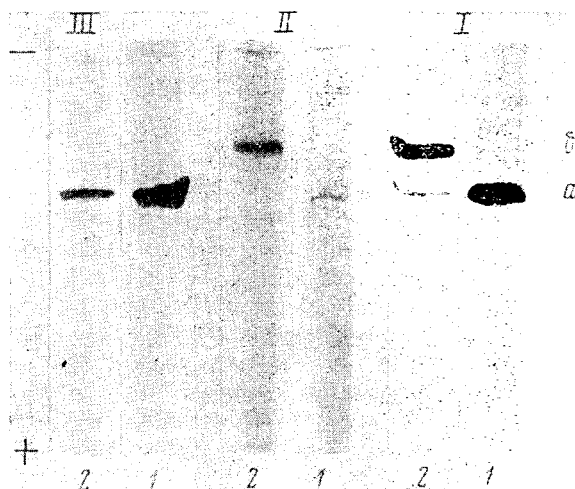
Разделение и очистка НАДФ- и НАД(Ф)-ГДГ хлореллы

Этап очистки	Белок, мг	Удельная активность		Общая активность		Степень очистки	Выход, %
		с НАДФ-Н	с НАД-Н	с НАДФ-Н	с НАД-Н		
Экстракт после центрифугирования при 110 000 g	1710	0,064	0,212	109,3	363,0	0,0	—
Высаливание (NH ₄) ₂ SO ₄ , фракция 35—65% насыщения	623	0,080	0,257	—	—	—	—
Хроматография на колонке с ДЭАЭ-32							
пик 3	30,4	0,413	Следы	12,6	Следы	14,3	24,3
пик 6	36,7	0,917	5,500	33,6	202,0	26,0	55,7
Высаливание (NH ₄) ₂ SO ₄ до 90% насыщения и обессоливание на колонке с сефадексом G-25							
пик 3	—	1,830	Следы	—	—	63,0	—
пик 6	—	1,200	6,900	—	—	37	—

в основном элюировалась в области от 0,1 до 0,2 М NaCl в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,4, как это было уже установлено ранее (2).

Результаты разделения и очистки ГДГ хлореллы представлены в табл. 1. Степень очистки НАДФ-ГДГ после хроматографии на колонке с ДЭАЭ-32 составляет 10–15 раз при выходе 25%. Высаливание $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 90% с последующим обессоливанием приводит к увеличению удельной активности НАДФ-ГДГ в 3–4,5 раза, и, следовательно, степень очистки увеличивается до 40–60 раз. Если считать исходным экстракт, полученный после разрушения и центрифугирования при

Рис. 2. Зимограммы ГДГ: I — в исходном экстракте; II — в элюате, который был элюирован с ДЭАЭ-32 0,08 М фосфатным буфером pH 7,4; III — в элюате, который был элюирован 0,2 М NaCl в 0,1 М фосфатном буфере. 1 — проявление с НАД⁺; 2 — проявление с НАДФ⁺. а — конститутивная НАД(Ф)-ГДГ; б — индуцируемая НАДФ-ГДГ



18 000 g, то степень очистки составит 120–180 раз, поскольку замораживание и оттаивание с последующим центрифугированием при 110 000 g приводит к увеличению удельных активностей в 3 раза (3).

Таким образом, индуцируемый и конститутивный ферменты легко разделяются на ДЭАЭ-целлюлозах в силу своих различных физико-химических свойств. Зимограммы ГДГ, представленные на рис. 2, подтверждают данные табл. 1. Видно, что пик 3 содержит НАДФ-ГДГ, а пик 6 — НАД(Ф)-ГДГ. Следует сказать, что хотя спектрофотометрически активность с НАД в пике 3 практически не обнаруживалась ни в прямом, ни в обратном направлениях реакции, все-таки при электрофорезе, в силу высокой чувствительности этого метода, проявлялась очень слабая полоса с НАД⁺ на уровне конститутивного фермента. Это указывало на незначительную примесь НАД(Ф)-ГДГ в пике 3, содержащем индуцированную НАДФ-ГДГ. Если пик 3 высолить $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 90% от полного насыщения, обессолить затем на колонке с сефадексом Г-25 и подвергнуть рехроматографии на ДЭАЭ-32, то можно получить НАДФ-ГДГ, абсолютно свободную от НАД(Ф)-ГДГ. Однако, такие препараты НАДФ-ГДГ были очень разбавленными и быстро инактивировались в процессе хранения при -15° . Поэтому для изучения свойств НАДФ-ГДГ мы использовали препараты после первой хроматографии, которые хранили при -15° после высаливания до 90%. По мере надобности порции этого препарата обессоливали на колонке с сефадексом Г-25 и использовали для анализа. Активность таких препаратов, как уже указывалось, была в 40–60 раз выше, по сравнению с активностью в исходном экстракте. Незначительная примесь конститутивного фермента не обнаруживалась спектрофотометрически в пределах используемых концентраций препарата НАДФ-ГДГ и, следовательно, не искажала истинную картину при изучении кинетических и других свойств НАДФ-ГДГ. Индуцируемая НАДФ-ГДГ резко отличается от конститутивной НАД(Ф)-ГДГ как по

своим физическим, так и кинетическим свойствам. НАДФ-ГДГ является во всех отношениях более чувствительным ко всем воздействиям, более лабильным ферментом. Например, при прогревании препарата НАДФ-ГДГ при 50° в течение 5 мин. активность терялась уже на 50%, а при 60° происходила полная инактивация. В то же время конститутивная НАД(Ф)-ГДГ сохраняла полностью активность при 70° и при 80° инактивировалась на 83,2% (табл. 2).

Таблица 2

Тепловая инактивация ГДГ хлореллы

Т-ра при прогревании 5 мин., °C	Оставшаяся активность, %		Т-ра при прогревании 5 мин., °C	Оставшаяся активность, %	
	индуцируемая НАДФ-ГДГ	конститутивная НАД(Ф)-ГДГ		индуцируемая НАДФ-ГДГ	конститутивная НАД(Ф)-ГДГ
20	100	100	60	0	100
40	78	—	70	0	100
50	50	107	80	0	17

Полученные нами данные, несомненно, свидетельствуют о том, что в клетках *Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim 82T в ответ на NH_4^+ синтезируется *de novo* ГДГ, специфичная к НАДФ. Этот фермент, по-видимому, обладает ярко выраженной синтетической функцией, поскольку, во-первых, образуется в ответ на NH_4^+ и, во-вторых, исчезает, когда потребность в нем отпадает, например при перенесении клеток после индукции в среду, содержащую KNO_3 (¹).

Эти данные, наряду с другими, полученными в нашей лаборатории (⁹⁻¹²), показывают, что NH_4^+ -ионы играют важнейшую регуляторную роль в клетках хлореллы и у высших растений.

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

Поступило
3 II 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Р. Шатилов, Г. С. Калошина, В. Л. Кретович, ДАН, 194, 964 (1970).
- ² В. Р. Шатилов, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович, Биохимия, 34, 409 (1969).
- ³ В. Р. Шатилов, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович, Прикл. биохим. и микробиол., 2, 667 (1966).
- ⁴ O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- ⁵ B. J. Davies, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, Part 2, 404 (1964).
- ⁶ L. Ornstein, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, Part 2, 321 (1964).
- ⁷ D. A. Thurman, C. Palin, M. V. Lauscock, Nature, 207, 193 (1965).
- ⁸ З. С. Броновицкая, В. Г. Горетов, В. Л. Кретович, Прикл. биохим. и микробиол., 3, 707 (1971).
- ⁹ В. Л. Кретович, Т. И. Карякина и др., ДАН, 202, 225 (1972).
- ¹⁰ В. Л. Кретович, Т. И. Карякина, Л. И. Сидельникова, ДАН, 202, № 1 (1972).
- ¹¹ Н. Г. Томова, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович, Биохимия, 34, 249 (1969).
- ¹² З. Г. Евстигнеева, К. Б. Асеева и др., Биохимия, 36, 389 (1971).