

М. В. ОСТРОВСКАЯ, Г. А. ЮРЗИНА, С. А. БУРНАШЕВА, М. Н. ЛЮБИМОВА

**ИССЛЕДОВАНИЕ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТНЫХ СВОЙСТВ  
ЖГУТОВ *STRIGOMONAS ONCORPELTI* И ВЫДЕЛЕННЫХ  
ИЗ НИХ БЕЛКОВ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 23 IV 1971)

Сравнительные исследования биохимических процессов, лежащих в основе сокращения мышц (1), движения жгутиков сперматозоидов животных (2-4), ресничек и жгутиков простейших (5, 6), а также движения листа *Mimosa pudica* (7) имеют большое значение для выяснения молекулярно-химических основ двигательной функции живых существ.

Задачей настоящей работы было изучение аденозинтрифосфатных свойств жгутов *S. oncorpelti* и выделенных из них белков. Жгутиконосец *S. oncorpelti* — представитель семейства Трупаносомиде, в отличие от типичных представителей трипанозом, лишен ундулирующей мембраны и совершает волнообразные изгибательные движения таким образом, что волны изгибания идут от вершины жгута к его основанию, в результате чего происходит движение всего тела жгутом вперед (8).

Выращивание и концентрирование культуры *S. oncorpelti* проводили в стерильной питательной среде по ранее описанному методу (9). Отделения жгутов от тел жгутиконосцев достигали путем механического встряхивания водной суспензии жгутиконосцев в шутель-аппарате в течение одного часа. Очистку оторванных жгутов от тел проводили путем центрифугирования водной суспензии при 1000 г. Очищенные от тел жгуты концентрировали центрифугированием при 20 000 г. О чистоте полученных фракций жгутов судили на основании электронномикроскопического контроля. Для извлечения белков из жгутов *S. oncorpelti* были использованы растворы следующего состава: 1) 0,03 моля трис-НСI-буфера рН 8+0,005 моля АТФ + 0,05 моля MgCl<sub>2</sub> + 0,25% дигитонина; 2) 0,03 моля трис-НСI-буфера рН 8,5+0,04 моля цистеина + 0,25% дигитонина; 3) 0,005 моля трис-НСI-буфера рН 8+0,03 моля KCl + 0,0004 моля ЭДТА + 0,01% меркаптоэтанола и + 0,25% дигитонина; 4) 0,03 моля трис-НСI-буфера рН 8,5 + 0,004 моля цистеина + 0,5% дигитонина. Экстрагирование проводили при постоянном перемешивании в течение 20—24 час., а в некоторых случаях 48 час. на холоду. Белки, экстрагированные в указанные растворы, отделяли от остатка жгутов центрифугированием при 20 000 г. Для отде-

Таблица 1

Специфичность ферментативного действия суспензии жгутов *S. oncorpelti*

Субстраты	Концентрация субстрата, ммол/л	Удельная АТФазная активность, $\mu\text{g P}$ на 1 мг белка в 10 мин.			
		без активаторов	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	%
АТФ	1	9,3	8,8	16	100
АДФ	2	0	0	12	80
АМФ	4	0,5	1,0	1,5	10
Пирофосфат	4	0	0	0	0
$\beta$ -Глицерофосфат	4	0	0	0	0

ления солей центрифугат подвергали диализу или гельфильтрации через сефадекс Г-25. В исходной суспензии жгутов и полученных белковых фракциях определяли содержание белка по методу Лоури. Исследовали

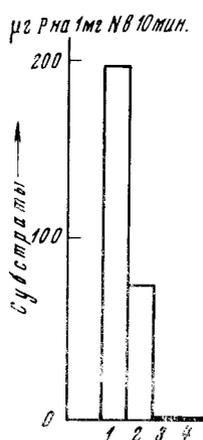


Рис. 1. Специфичность ферментативного действия белков жгутов к субстратам: 1 — АТФ ( $1 \cdot 10^{-3} M$ ); 2 — АДФ ( $2 \cdot 10^{-3} M$ ); 3 — АМФ ( $4 \cdot 10^{-3} M$ ); 4 — глицерофосфат ( $4 \cdot 10^{-3} M$ )

однородность белков методом гельфильтрации через сефадексы Г-100 и Г-200 по Эндрюсу (<sup>10</sup>). Методом гельфильтрации через сефадекс Г-200 определяли приблизительные молекулярные веса выделенных белков. В работе были использованы препараты АТФ и цитохром С (фирмы «Reanal»), дигитонин и сывроточный альбумин быка (фирмы «Light»), голубой декстран («Pharmacia», Швеция), химотрипсиноген (фирмы «Спофа»).

Изолированные жгуты обнаруживают АТФазную активность, стимулируемую ионами магния (табл. 1). Исследования ферментативной активности жгутов с АДФ, АМФ, пирофосфатом и β-глицерофосфатом показали, что жгуты проявляют не только АТФ-гидролизующие свойства, но способны гидролизовать также АДФ и АМФ, но в меньшей степени, чем АТФ. По отношению к АТФ-гидролизующей способности жгутов в присутствии  $Mg^{2+}$ , принятой за 100%, способность расщеплять АДФ составляет 80%, а АМФ лишь 10%.

С целью более полного выявления АТФазы жгутов последние были подвергнуты воздействию детергента дигитонина, твина-80 и ультразвука (ультразвуковой дезинтегратор MSE, при силе тока 8 а и 20 кг/сек, в течение 1—2 мин.). Как видно из

табл. 2, удельная активность жгутов, подвергнутых воздействию ультразвука или детергентов — дигитонина и твина, значительно выше, по сравнению с активностью целых неразрушенных жгутов. Электронномикроскопические исследования показали, что после воздействия дигитонина происходит изменение поверхности целостности оболочек жгутов и выявляются составляющие жгут фибриллы в виде отдельных пучков. Очевидно, после указанных воздействий на жгут удается более полно выявить суммарную АТФазную активность, обусловленную как белками поверхностно локализованными, так и ассоциированными с фибриллярными структурами жгута.

Для экстрагирования белков в одной серии опытов жгуты без механического разрушения подвергали действию растворов 1 и 2 в присутствии дигитонина; в другой серии опытов жгуты сначала подвергали воздействию ультразвука в трис-НСI-буфере, а затем экстрагировали раствором дигитонина. В результате такого экстрагирования удалось извлечь до 50%

Таблица 2

Выявление АТФазной активности жгутов *S. oncopelti* после воздействий дигитонина и ультразвука

№ № опытов	Состав растворов	Удельная АТФазная активность, μг Р на 1 мг белка в 10 мин.		
		без активаторов	активаторы $5 \cdot 10^{-3} M$	
			Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
1	Жгуты в воде	21	20	26
	Жгуты, озвученные в 0,03 M трис-НСI-буфере рН 7,5	41	41	56
2	Жгуты в воде	0,28	8,8	16
	Жгуты в 0,03 M трис-НСI-буфере рН 8+0,25% дигитонина	5,4	27,3	38

АТФазно-активных белков. Выделенные белки обнаруживали высокую АТФазную активность, стимулируемую в значительной степени  $\text{Ca}^{2+}$  (табл. 3). Ферментативная активность этих белков, в отличие от ферментативной активности целых жгутов, специфична лишь по отношению к АТФ и АДФ (рис. 1). Способность расщеплять АДФ, по-видимому, об-

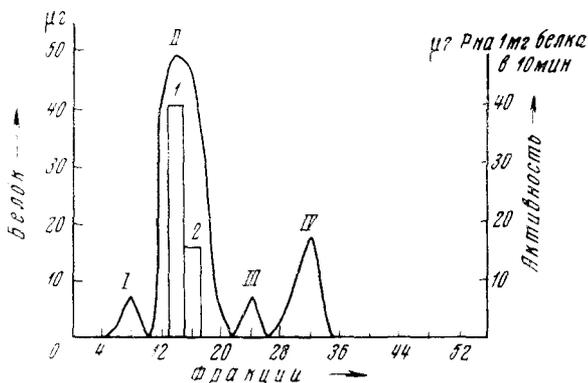


Рис. 2. Гельфильтрация белков жгутов через колонку сефадекса Г-100. Колонку уравнивали 0,005 М трис-НСI-буфером рН 7,5, гельфильтрацию проводили тем же буфером. Размер колонки  $1,7 \times 70$ , скорость 10 мл/час, объем фракций по 2 мл. I, II, III, IV — белковые фракции. I — АТФаза, стимулируемая  $\text{Ca}^{2+}$ ; 2 — АТФаза, стимулируемая  $\text{Mg}^{2+}$

условливается примесью АДФазы или аденилаткиназы. О наличии последней в жгутах спермиев и в ресничках *T. rugiformis* имеются данные в литературе (2, 11).

Белки, полученные экстрагированием жгутов раствором 4, подвергли дальнейшей очистке и фракционированию на колонке сефадекса Г-100. На колонку было нанесено 4,6 мг белка. В результате гельфильтрации (рис. 2) выявляется основной белковый пик, составляющий 70% от общего количества взятого белка и три минорных пика (I, III, IV), составляющих 7 и 16% соответственно. АТФазная активность, стимулируемая  $\text{Ca}^{2+}$  и в меньшей степени  $\text{Mg}^{2+}$ , сосредоточена в основном белковом пике

Таблица 3

АТФазная активность белков *S. oncopelti*  
(белки извлечены раствором 1, отдиализованы)

Активаторы $1 \cdot 10^{-3}$ М	Удельная активность, $\mu\text{г Р на } 1 \text{ мг N в } 10 \text{ мин.}$	Активация, %	Ингибирование, %
Без активаторов	342	100	—
С активаторами:			
$\text{Ca}^{2+}$	970	283	—
$\text{Mg}^{2+}$	431	120	—
Na	251	73	27
K <sup>+</sup>	342	100	—
$\text{K}^+ + \text{Mg}^{2+} + \text{Na}^+$	467	137	—

(рис. 2, II); происходит отделение ферментативно-активного белка (пик II) от сопутствующих неактивных белков и вследствие этого очистка и повышение АТФазной активности примерно в 3 раза.

Гельфильтрация выделенных аналогичным образом белков (раствором 2) через сефадекс Г-200 дала сходные результаты (рис. 3), а именно: белки, обладающие АТФазной активностью, стимулируемой  $\text{Ca}^{2+}$ , выявил-

лись в основном белковом пике и при гельфильтрации не разделяются. Был определен приблизительный молекулярный вес основной белковой фракции, в которой сосредоточена АТФазная активность. Колонка, на которой проводилось определение молекулярного веса, предварительно бы-

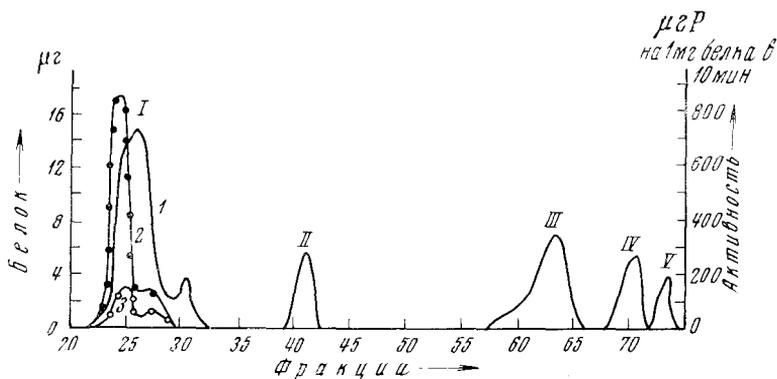


Рис. 3. Гельфильтрация белков жгутов через колонку сефадекса Г-200. Размер колонки  $1.7 \times 70$ , объем фракций по 2 мл., скорость 6 мл/час. Молекулярный вес белка в пике I 400 000; II 150 000, III 50 000, IV — 20 000. I — белок; 2 — АТФазная активность, стимулируемая  $\text{Ca}^{2+}$ ; 3 — АТФазная активность, стимулируемая  $\text{Mg}^{2+}$

ла откалибрована с помощью белков известного молекулярного веса: фикоэритрина, сывороточного альбумина быка, химотрипсिनогена, цитохрома С. Основной белковый пик, где сосредоточена АТФазная активность, выходит за пиком фикоэритрина, что соответствует молекулярному весу порядка 400 000.

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

Поступило  
22 IV 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. А. Энгельгардт, Вестн. АН СССР, **11**, 58 (1957). <sup>2</sup> С. А. Бурнашева, В. А. Энгельгардт, Биохимия, **22**, 554 (1957). <sup>3</sup> С. А. Бурнашева, Биохимия, **23**, 558 (1958). <sup>4</sup> L. Nelson, In: Spermatozoan Motility, Washington, 1962, p. 171. <sup>5</sup> С. А. Бурнашева, М. В. Ефременко и др., Биохимия, **30**, 765 (1965). <sup>6</sup> J. A. Gibbons, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **50**, 1002 (1963). <sup>7</sup> М. Н. Любимова, В кн. Молекулярная биология. Проблемы и перспективы, Изд. АН СССР, 1964, стр. 25. <sup>8</sup> P. Satir, Protoplasmatologia, **3**, 1965, S. 1. <sup>9</sup> С. А. Бурнашева, М. В. Островская, Г. А. Юрзина, ДАН, **181**, № 1 (1968). <sup>10</sup> P. Andrews, Biochem. J., **91**, 2 (1964). <sup>11</sup> J. R. Gibbons, Ann. Rev. Biochem., **37**, 521 (1968).