

Ю. М. ТОРЧИНСКИЙ, М. Л. МЕХАНИК, Г. А. КОГАН

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 18 X 1971)

Активность глутаматдекарбоксилазы (L-глутамат: 4-карбоксилпазы, КФ 4.1.1.15) определяют обычно путем измерения количества освобождающегося CO_2 или γ -аминомасляной кислоты (γ -АМК), образующейся из глутамата. Количество CO_2 измеряют при помощи манометрической или изотопной техники (если в качестве субстрата используют 1- C^{14} -глутамат) ⁽¹⁾, а для определения γ -АМК предложены флуорометрический и хроматографический методы ⁽²⁻⁴⁾. Недавно Гоццани ⁽⁵⁾ описал спектрофотометрический метод определения γ -АМК, основанный на использовании ферментной системы, содержащей трансминазу γ -АМК, сопряженную с дегидрогеназой янтарного полуальдегида ⁽⁵⁾.

В настоящей работе предложен прямой спектрофотометрический метод определения активности глутаматдекарбоксилазы, основанный на различии в поглощении в далекой ультрафиолетовой области между субстратом (глутаматом) и продуктом реакции (γ -АМК).

Глутаматдекарбоксилазу выделяли из *Escherichia coli* 600 М по методу Шукуя и Шверта ⁽⁶⁾. Удельная активность очищенных препаратов фермента (выраженная в $\mu\text{л CO}_2$ за 10 мин. на 1 мг белка) при pH 4,6 и 37° составляла 19 000 при измерении в 0,1 М буфере пиридин — HCl и 9800 при измерении в 0,1 М ацетатном буфере. В работе использовали монопотassium-натриевую соль L-глутамата фирмы «VEB Berlin-Chemie», L-глутаминовую кислоту «A grade» фирмы «Calbiochem» и γ -АМК фирмы «Reanal» (Венгрия).

Спектральные измерения проводили на регистрирующем спектрофотометре Сагу-15 в кюветах толщиной 1 или 0,5 см. Для регистрации изменений в поглощении, вызванных реакцией декарбоксилирования, использовали растянутую шкалу от 0 до 0,1 единицы оптической плотности. В опытную кювету и кювету сравнения добавляли 2,8 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 4,55, и 0,2 мл 0,15 или 0,3 М раствора L-глутамата, доведенного до pH 4,55. Опытную кювету помещали в термостатированную приставку спектрофотометра при 37°. Перед началом измерений ручкой «баланс» смещали нулевую линию в область ΔE 0,08—0,09; затем добавляли в опытную кювету 5 $\mu\text{л}$ раствора фермента и регистрировали уменьшение оптической плотности, ΔE , при 220 м μ во времени в ходе реакции декарбоксилирования.

На рис. 1 представлены спектры поглощения глутаминовой кислоты и γ -АМК в области от 260 до 215 м μ ; видно, что разница в величине поглощения между ними резко возрастает с уменьшением длины волны, т. е. по мере приближения к полосам поглощения карбоксильной группы, расположенным при 210 м μ и вблизи 190 м μ ^(7, 8). Мы проводили измерения активности декарбоксилазы при 220 м μ , так как при этой длине волны разность в поглощении между субстратом и продуктом уже достаточно велика (рис. 1), а поглощение самого ацетатного буфера еще не затрудняет измерения. Коэффициент молярной экстинкции (ϵ_m) при 220 м μ растворов

глутаминовой кислоты и γ -АМК в 0,1 *M* ацетатном буфере, pH 4,6, составляет соответственно 33,5 и 16,5.

Начальную скорость реакции декарбоксилирования определяли графически как тангенс угла наклона начального прямолинейного отрезка кинетической кривой к оси абсцисс. Скорость выражали как изменение оптической плотности в единицу времени ($\Delta E/\text{мин}$). На рис. 2 показана зависимость начальной скорости реакции от концентрации добавленного фермента; из рис. 2 видно, что скорость прямо пропорциональна количеству фермента в широком интервале концентраций. Для определения активности декарбоксилазы описанным методом в кюветах толщиной 1 см

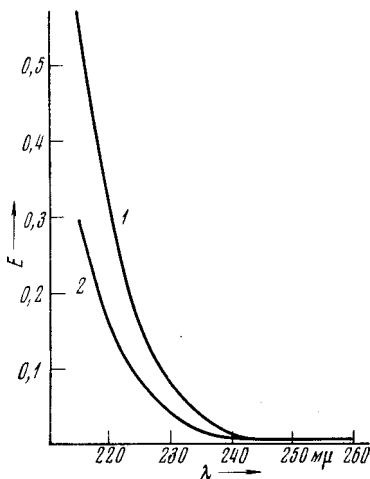


Рис. 1

Рис. 1. Спектры поглощения растворов глутаминовой и γ -аминомасляной кислот в 0,1 *M* Na-ацетатном буфере, pH 4,6. Спектры измеряли против того же буферного раствора в кюветах толщиной 1 см. 1 — $1 \cdot 10^{-2}$ *M* раствор *L*-глутаминовой кислоты («A grade», фирмы «Calbiochem»); 2 — $1 \cdot 10^{-2}$ *M* раствор γ -аминомасляной кислоты (фирмы «Reanal»)

Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции декарбоксилирования глутамата от концентрации фермента. v — начальная скорость реакции при 37°, выраженная как изменение экстинкции за 1 мин. ($\Delta E/\text{мин}$)

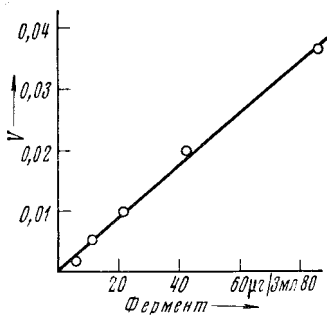


Рис. 2

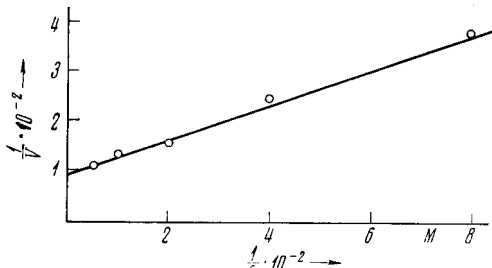


Рис. 3

достаточна концентрация фермента, равная 3—5 $\mu\text{г}$ белка в 1 мл. При проведении измерений в кюветах толщиной 0,5 см величина $\Delta E/\text{мин}$ уменьшалась ровно в 2 раза. Точность измерений активности составляла $\pm 3\%$.

Нам было также исследовано влияние концентрации глутамата (в интервале от $2 \cdot 10^{-2}$ *M* до $1,25 \cdot 10^{-3}$ *M*) на скорость реакции, и полученные данные отложены на графике по способу Лайнуивера и Бэрка (рис. 3). Рассчитанное из этого графика значение K_M для *L*-глутамата при 37° в 0,1 *M* ацетатном буфере, pH 4,6, равно $3,8 \cdot 10^{-3}$ мол/л. При измерении активности декарбоксилазы в 0,1 *M* буфере пиридин — HCl при pH 4,6 и 37° мы ранее нашли значение K_M , равное $9 \cdot 10^{-4}$ *M* (9). Расхождение между указанными величинами K_M объясняется, очевидно, влиянием ионов ацетата, конкурирующих с субстратом за соединение с ферментом, на что впервые обратили внимание Шукуя и Шверт (9). Эйджер и Фишер (10) нашли значение K_M для *L*-глутамата в 0,15 *M* ацетатном буфере при pH 5,0 равным $4,5 \cdot 10^{-3}$ мол/л, что близко к величине, найденной в настоящей работе.

В заключение отметим, что описанный выше прямой спектрофотометрический метод определения активности глутаматдекарбоксилазы лишь незначительно уступает в чувствительности манометрическому методу. В то же время спектрофотометрический метод намного проще и более пригоден для кинетических исследований. Он может найти применение для определения активности очищенных декарбоксилаз с различной субстратной специфичностью.

Авторы приносят искреннюю благодарность проф. А. Е. Браунштейну за интерес к работе и обсуждение результатов.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
18 X 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. J. Lupien, C. M. Hinse, L. Berlinguet, *Anal. Biochem.*, **24**, 1 (1968).
² I. P. Lowe, E. Robins, G. S. Eyerma, *J. Neurochem.*, **3**, 8 (1958). ³ N. Frontali, *Nature*, **191**, 178 (1961). ⁴ N. Seiler, M. Wiechmann, *Hoppe-Seyler's Zs. physiol. Chem.*, **349**, 588 (1968). ⁵ I. Gozzani, *Anal. Biochem.*, **33**, 125 (1970).
⁶ R. Shukuya, G. W. Schwert, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1649 (1960). ⁷ D. B. Wetlaufer, *Adv. in Protein Chem.*, **17**, 326 (1962). ⁸ J. P. Phillips, *Spectra-Structure Correlation*, N. Y.—London, 1964, p. 80. ⁹ M. L. Mechanik, Yu. M. Torchinsky et al., *FEBS Letters*, **13**, 177 (1971). ¹⁰ V. A. Najjar, J. Fisher, *J. Biol. Chem.*, **206**, 215 (1954).