

УДК 577.15.01.022.0.24

БИОХИМИЯ

Л. З. ГОГИЛАШВИЛИ, Г. Г. СОТНИКОВ

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ДРОЖЖЕВОЙ ГЕКСОКИНАЗЫ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

(Представлено академиком А. И. Опарным 18 II 1972)

В связи с проблемой рассмотрения коацерватных систем, как моделей образований, лежащих на пути происхождения жизни на Земле ⁽¹⁾, в модельных опытах проводилось изучение влияния структуры коацерватной системы белок — липид — вода на ферментативный процесс, катализируемый дрожжевой гексокиназой (КФ 2.7.1.1).

Ранее ⁽²⁾ нами было показано, что в гетерогенных условиях, создаваемых данной коацерватной системой, имеет место увеличение кислотно-лабильного фосфора в реакционной среде, характеризующее содержание АТФ в пробах, после 5 мин. инкубации с гексокиназой, по сравнению с исходным уровнем.

Дальнейшее изучение кинетики гексокиназной реакции дало картину немонотонного изменения концентрации лабильного фосфата в реакционной среде как в гетерогенных, так и в гомогенных условиях ⁽³⁾.

В связи с этим возникла необходимость прямого определения АТФ в реакционной смеси при исследовании кинетики гексокиназной реакции в гомогенных условиях. С этой целью был применен биолюминесцентный метод ⁽⁴⁾ с количественной регистрацией хемилюминесценции, возникающей в результате реакции люциферин — люцифераза. Количество АТФ измеряли на биохемилюминесцентной установке высокой чувствительности ⁽⁵⁾.

Метод позволяет выявлять характерные сигналы АТФ, отличающиеся по форме от сигналов АДФ (уровень АДФ на рисунках обозначен пунктирными линиями).

Концентрация гексокиназы (фирма «Schuchardt», удельная активность 5,5 Е/мг) составляла 0,24; 0,12; 0,06; 0,03 мг препарата фермента на 1 мл реакционной смеси и соответственно обозначена C_1 , C_2 , C_3 , C_4 .

Концентрация АТФ в опытах менялась в пределах $1,4 \cdot 10^{-3}$ — $11,2 \cdot 10^{-3}$ мол/л; концентрация глюкозы ($8 \cdot 10^{-1}$ мол/л) была постоянной и значительно превышала концентрацию АТФ.

В первой серии опытов, проведенных с концентрацией фермента C_2 (рис. 1), был использован препарат АТФ фирмы «Reanal» с содержанием минерального фосфата 2,2%. Хроматографический анализ этого препарата показал следующее содержание нуклеотидов: АТФ 96%; АДФ 4%.

Как видно из рис. 1 (кривые 1—8), при концентрации субстрата АТФ $1,4 \cdot 10^{-3}$ — $11,2 \cdot 10^{-3}$ мол/л (препарат АТФ приготовлен перед началом опыта) имеет место монотонное падение уровня АТФ во времени. При использовании того же раствора препарата АТФ, но гидролизованного при стоянии или долго хранившегося (г. Иваново), заведомо разложенного на АДФ и Φ_n , характер кинетических кривых резко менялся.

На рис. 2 представлена кинетика гексокиназной реакции с использованием растворов АТФ, взятых в предыдущей серии опытов, но с предварительным спонтанным гидролизом при комнатной температуре. Концентрация гексокиназы в реакционной смеси была равна C_4 . Точки кри-

вых 1 и 8 соответствуют кинетике гексокиназной реакции при использовании в качестве субстрата раствора АТФ, хранившегося при комнатной температуре в течение 12 час., а точки кривой 7 (концентрация АТФ $9,8 \cdot 10^{-3}$ мол/л) — при добавлении АТФ, хранившегося в течение 24 час. Точки кривой 8 измерены на том же растворе АТФ, что и точки кривой 8 рис. 1, но с предварительным гидролизом при 100° в течение 30 мин.

Как видно из рис. 2, кривые 7, 8 и 8', полученные для максимальных концентраций из взятого нами набора АТФ, имеют немонотонный вид, тогда как при минимальной концентрации АТФ характер кривых 1 и 1' совпадает с кривой 1 рис. 1 (точки кривой 1' измерены для раствора препарата АТФ после 4 суток выдержки с момента измерения точек кривой 1, представленных на рис. 1 с концентрацией фермента C_2).

Из анализа рис. 1 и 2 следует, что кривые 7, 8 и 8' рис. 2, по сравнению с кривыми 7 и 8 рис. 1, построенными для тех же концентраций АТФ, имеют немонотонный характер. Разница состоит в том, что точки кривых рис. 1 соответствуют активности гексокиназы в присутствии свежеприготовленного раствора препарата АТФ, тогда как точки кривых рис. 2 — в присутствии раствора АТФ, предварительно подвергнутого гидролизу как спонтанному, так и при нагревании и, соответственно, содержащего достаточное количество Φ_{II} в реакционной среде за счет разложения АТФ на АДФ и Φ_{II} при хранении.

В следующей серии опытов (рис. 3) был взят препарат АТФ (г. Иваново) с истекшим сроком годности, хранившийся при комнатной температуре. Хроматографический анализ этого препарата показал следующее содержание нуклеотидов: АТФ 62%, АДФ 38%.

Кривая *a* рис. 3, построенная для максимальной концентрации АТФ $11,2 \cdot 10^{-3}$ мол/л, показывает колебания уровня АТФ при использовании

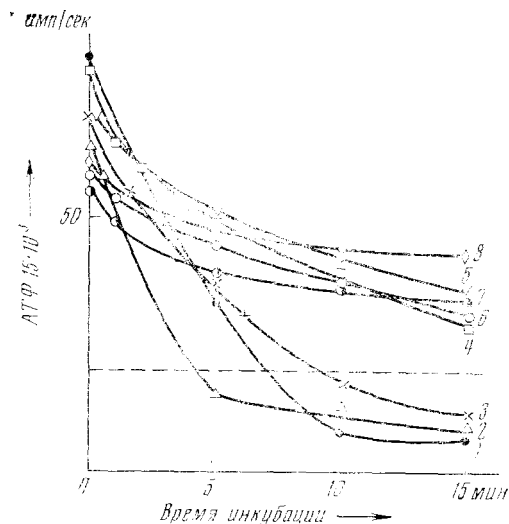


Рис. 1. Кинетика гексокиназной реакции в присутствии $1,4 \cdot 10^{-3}$ — $11,2 \cdot 10^{-3}$ М АТФ (1—8); концентрация фермента C_2 ; раствор препарата АТФ свежеприготовленный. Пунктирная линия — уровень АДФ (то же на рис. 2)

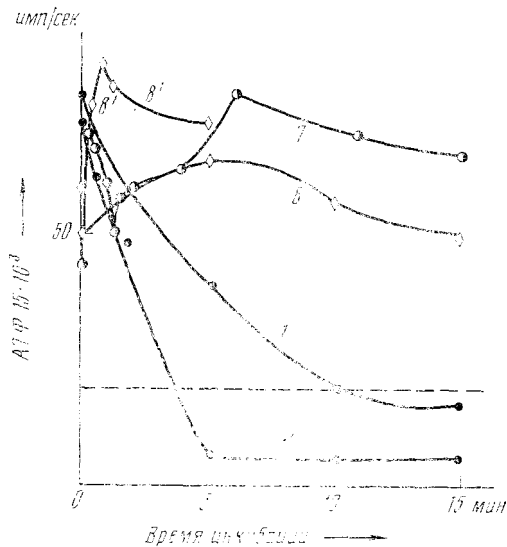


Рис. 2. Кинетика гексокиназной реакции с растворами АТФ, взятыми в серии опытов, представленных на рис. 1, но с предварительным гидролизом растворов при комнатной температуре. Концентрация фермента C_1 . Точки кривых 1 и 8 соответствуют раствору АТФ после 12 час. хранения, точки кривой 7 — после 24 час. хранения, точки кривой 8' получены для АТФ, подвергнутой гидролизу при 100° в течение 30 мин. Точки кривой 8' получены для АТФ после 4 суток хранения при комнатной температуре (концентрация фермента C_2)

разложившегося препарата (концентрация фермента C_1). Начальное нулевое значение кривой, определенное в отсутствие гексокиназы, характеризуется сигналом АДФ. Точка, соответствующая 30-секундному инкубированию с гексокиназой, много выше нулевого значения; 5-минутная точка характеризуется сигналом АДФ, совпадающим по уровню с 7-минутным сигналом, после максимального значения в точке, измеренной после 6-минутного инкубирования с ферментом. Очевидно, что изменение величины сигнала, характеризующего АДФ, сопровождается изменением направления реакции.

На том же рис. 3 кривые $b, в$ получены при использовании препарата АДФ (г. Иванова) с истекшим сроком годности, но хранившегося при температуре 2° . Как видно из рисунка, сохранение исходного уровня АДФ у этого препарата соответственно выше исходного уровня нулевой точки

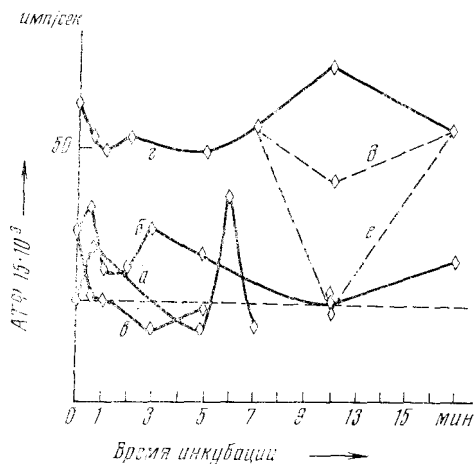


Рис. 3. Кинетика гексокиназной реакции при использовании различных препаратов АДФ с истекшим сроком годности. a — АДФ (г. Иванова) хранился при комнатной температуре, концентрация фермента C_1 ; b — то же при 2° , концентрация фермента C_1 ; $в$ — то же при 2° , концентрация фермента C_2 ; $г, д, е$ — АДФ фирмы «Reanal», гидролизованный при 100° с последующим хранением в течение 24 час., концентрация фермента C_2

ний, так и колебательный характер (вне зависимости от концентрации фермента во взятом нами наборе). Форма кривых меняется в зависимости от количественного соотношения АДФ и Φ_n в растворах препаратов АДФ; кроме того, при некотором соотношении АДФ и Φ_n имели место биолюминесцентные сигналы АДФ выше исходного уровня.

Эти результаты коррелируют с нашими данными по немонотонному изменению активности гексокиназы в гомогенных и гетерогенных условиях ⁽³⁾, а также с предварительными опытами по убыли неорганического фосфата в инкубационной среде в ходе исследования кинетики гексокиназной реакции.

Учитывая свойства дрожжевой гексокиназы проявлять как фосфотрансферазную, так и нуклеозидтрифосфатазную функции ^(6, 7), а также данные о включении в гексакиназную реакцию в качестве промежуточного соединения фосфорилированной формы фермента ^(8, 9), представляется возможным предположить, что в наших условиях Φ_n может играть роль

кривой a , измеренной при использовании того же препарата АДФ, но хранившегося при комнатной температуре. Точки кривой b построены при концентрации фермента C_1 , а кривой $в$ — при концентрации фермента C_2 . Кривые b и $в$, так же как и кривая a , характеризуются переходами значений биолюминесцентного сигнала АДФ к сигналу АДФ и наоборот, в результате чего вышеописанные кривые носят колебательный характер.

На рис. 3 точки кривой $г$ измерены при использовании свежего препарата АДФ фирмы «Reanal» после гидролиза при 100° с последующим хранением препарата в течение 24 час. при комнатной температуре. Обращают на себя внимание колебания ферментативной активности в параллельных опытах (10-минутной инкубации на кривой соответствуют три точки).

Таким образом, в наших опытах показано, что кинетические кривые могут иметь как монотон-

фактора, не только тормозящего ход прямой реакции гидролиза АТФ, но и обращающего реакцию в сторону увеличения концентрации АТФ в реакционной среде.

Институт микробиологии Академии наук СССР
Москва

Поступило
14 II 1972

Институт кибернетики Академии наук ГрузССР
Тбилиси

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. И. Опарин, Жизнь, ее природа, происхождение и развитие, М., 1968.
² А. И. Опарин, К. Б. Серебровская, А. З. Гогилашвили, ДАН, **185**, 952 (1969). ³ А. З. Гогилашвили, К. Б. Серебровская, Сборн. Колебательные процессы в биологических и химических системах, **2**, М., 1971. ⁴ W. D. McElroy, B. L. Strehler, Bacteriol. Rev., **18**, 177 (1954). ⁵ А. А. Имшенецкий, Т. Ф. Кондратьева, Г. С. Сотников, Микробиология, **39**, 1, 30 (1970). ⁶ F. B. Rudolph, H. J. Fromm, J. Biol. Chem., **245**, 16, 4047 (1970). ⁷ G. Dela Fuente, R. Lagunas, A. Sols, Europ. J. Biochem., **16**, 2, 226 (1970). ⁸ C. Walsh, L. B. Spector, Arch. Biochem. and Biophys., **145**, 1, 1 (1971). ⁹ Frank Solomon, Irwin A. Rose, Arch. Biochem. and Biophys., **147**, 1, 349 (1971).