

УДК 577.152.3

ОТНОШЕНИЕ МЕМБРАННО-СВЯЗАННОЙ ТИАМИНМОНОФОСФАТНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕЧЕНИ КУРИЦЫ К ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЕ

Колос И.К., Макарчикова А.Ф.

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь

Тиаминмонофосфат (ТМФ) является одним из продуктов обмена тиаминина в клетках всех видов организмов. У животных ТМФ, образующийся при гидролизе тиаминдифосфата – коферментной формы витамина В₁, подвергается дальнейшему дефосфорилированию для выведения из клетки в процессе оборота пула кофермента. В настоящее время ферменты, участвующие в метаболизме ТМФ в клетках животных, не идентифицированы. Цель данной работы состояла в изучении свойств мембранно-связанной фосфатазы, катализирующей гидролиз ТМФ в гомогенатах печени курицы.

Объектом исследования служила печень кур породы белый леггорн. Гомогенаты готовили на 20 мМ трис-НСl буфере, рН 7,3, содержащем 0,15 М КСl и 0,2 мМ ЭДТА, растирая образцы ткани в стеклянном гомогенизаторе. Ферментативную активность определяли при 37 °С по скорости высвобождения неорганического фосфата (P_i). Стандартная реакционная смесь включала 50 мМ трис-НСl буфер, рН 9,0, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ субстрат и аликвоту фермента в общем объеме 0,2 мл. При кинетических исследованиях состав реакционной среды изменялся в зависимости от цели эксперимента. Реакцию проводили 10-30 мин. и останавливали, добавляя равный объем 10%-й трихлоруксусной кислоты. После центрифугирования смеси (10 мин, 2500 об./мин.) количество образовавшегося P_i определяли методом LanZetta с соавт. [1].

Проведенные исследования показали, что в гомогенате печени курицы присутствуют два белка с ТМФазной активностью – растворимый, проявляющий рН-оптимум при рН 6,0, и связанный с мембранами, активность которого максимальна при рН 9,0. Мембранно-связанная фос-

фатаза активировалась в 1.7 раза в присутствии 5 мМ Mg^{2+} ; кажущаяся K_m этого фермента для ТМФ, рассчитанная в координатах Хейнса, составила 0,6 мМ.

Известно, что ТМФ может служить субстратом локализованной в плазматической мембране клетки щелочной фосфатазы (ЩФ) [2]. Для того чтобы выяснить отношение ЩФ к гидролизу ТМФ в гомогенатах печени кур мы провели ряд экспериментов с ее специфическим бесконкурентным ингибитором – левамизолом. Как оказалось, при pH 9,0 в присутствии 1 мМ ингибитора р-нитрофенилфосфатазная и ТМФазная активности гомогената снижаются в одинаковой степени на 69%. Кинетический анализ свидетельствует о бесконкурентном типе ингибирования мембранной ТМФазы левамизолом, при этом значение K_i составляет 53 мкМ.

Таким образом, результаты настоящей работы позволяют идентифицировать мембранно-связанный фермент печени курицы, обладающий ТМФазной активностью, как ЩФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S., Candia, O. A. An improved assay for nanjmjle amounts of inorganic phosphate // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 100. – P. 95–97.
2. Вовк, А.И., Бабий, Л.В., Муравьева, И.В. Относительная реакционная способность тиаминмонофосфата и тиамидифосфата при взаимодействии со щелочной фосфатазой // *Укр. біохім. журн.* – 2002. – Т. 74, № 1. – С. 93–96.