



УДК 577.15.082 : 543.544.6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ
В ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ ПЕЧЕНИ КРЫС
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕННЫХ ^3H и ^{14}C АДЕНОЗИН-5'-
ТРИФОСФАТОВ

Войков В. Л., Денисов В. М., Поздняков С. П.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Предложен метод определения активности аденилатциклазы с использованием в качестве субстрата ^3H - или ^{14}C АТР. Образующийся меченый циклический АМР отделяют от других меченых производных АТР последовательной хроматографией на колонках с ионообменниками дауэкс-50, Al_2O_3 и дауэкс-1. Чистота полученного после хроматографии циклического АМР не ниже 90%. Метод позволяет уверенно измерять активность аденилатциклазы, если радиоактивность образующегося в инкубационной пробе циклического АМР превышает 0,01% от радиоактивности внесенного в пробу АТР. Метод был использован для определения активности аденилатциклазы в плазматических мембранах печени крыс. Результаты определения активности в параллельных пробах отличаются не более чем на 5%.

При определении активности аденилатциклазы (АТР-широфосфонатлиаза, циклизующая, КФ 4.6.1.1) исследователи обычно встречаются с рядом серьезных трудностей. В большинстве систем, в которых производят измерение активности, уровень активности аденилатциклазы очень низок. Поэтому в качестве субстрата используют меченный различными радиоактивными изотопами АТР, а продукт реакции — циклический аденозин-3',5'-монофосфат (циклический АМР) — выделяют из реакционной смеси различными хроматографическими методами.

Чаще всего используют методы, в которых субстратом для аденилатциклазы может служить $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ [1—4]. Однако, хотя выделение циклического ^{32}P АМР в этом случае методически несложно, работа с ^{32}P АТР сопряжена с известными трудностями.

Гораздо удобнее использовать препараты АТР, меченного ^3H и ^{14}C , поскольку эти изотопы характеризуются длительным периодом полураспада, меньшими энергиями β -излучения. Кроме того, препараты ^3H АТР и ^{14}C АТР более стабильны, чем препараты $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$. Однако при определении активности аденилатциклазы в неочищенном препарате фермента, например в мембранах, в процессе реакции из ^3H АТР и ^{14}C АТР образуется значительно больше радиоактивных производных АТР, чем из $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$. В плазматических мембранах печени крыс содержатся ферменты, превращающие АТР в АДФ и АМФ, АДФ в АМФ, АМФ в аденозин, адепозин в аденин, инозин в гипоксантин [5]. Многие из этих производных образуются в значительно большем количестве, чем циклический АМР, поэтому очистка циклического ^3H АМР или ^{14}C АМР от этих побочных продуктов представляет довольно сложную задачу. При отделении цикли-

ческого [^{14}C]АМР от других радиоактивных соединений используют хроматографию реакционной пробы на бумаге в двух и трех направлениях, двумерную хроматографию в тонком слое ионообменных целлюлоз, электрофорез на бумаге или в тонком слое [5—8]. Основными недостатками указанных методов являются их трудоемкость и длительность процедур разделения. Если в качестве субстрата использовать [^3H]АТР, то работа еще более усложняется, поскольку для эффективного сцинтилляционного счета ^3H необходимо элюировать [^3H]циклический АМР с хроматограммы.

В настоящей работе исследованы оптимальные условия определения активности аденилатциклазы в плазматических мембранах печени крыс с использованием [^3H]АТР и [^{14}C]АТР. Особое внимание уделялось подавлению сопутствующих ферментативных реакций и оптимизации методов выделения циклического [^3H]- или [^{14}C]АМР.

Плазматические мембраны характеризуются высокой АТР-азной активностью [9]. Для поддержания высокого и стабильного уровня АТР при измерении активности аденилатциклазы в реакционную систему обычно вводят АТР-регенерирующую систему, например креатинфосфат и креатинфосфокиназу. Полученные нами данные (табл. 1) свидетельствуют о том, что в отсутствие АТР-регенерирующей системы мембраны превращают практически весь АТР в аденозин. Появление аденозина обусловлено тем, что мембраны кроме активной АТР-азы содержат также активную АДФ-азу и 5'-нуклеотидазу. В присутствии АТР-регенерирующей системы уровень АТР после инкубации снижается незначительно.

В плазматических мембранах печени содержится фосфодиэстераза циклического АМР, активность которой сравнима с активностью аденилатциклазы [10]. Чтобы предотвратить расщепление циклического АМР, в реакционную смесь вводят обычно ингибитор фосфодиэстеразы, теofilлин, в концентрации до 10 мМ. Однако теofilлин слабо растворим в воде и, кроме того, не полностью ингибирует фосфодиэстеразу [11]. Поэтому кроме теofilлина мы вводили в реакционную смесь циклический АМР, который разбавлял меченый циклический АМР, образуемый аденилатциклазой, и препятствовал его быстрому расщеплению фосфодиэстеразой. Нами было установлено, что в этих условиях циклический [^3H]АМР, введенный в пробу вместе с немеченым АТР, практически не расщепляется в процессе 15-минутной инкубации с плазматическими мембранами.

Низкая удельная активность аденилатциклазы предъявляет очень жесткие требования к качеству отделения образованного ею циклического АМР от других радиоактивных метаболитов. При разработке хроматографической системы мы исходили из того, что система должна последовательно отделять циклический АМР от АТР и его метаболитов, обеспечивать высокий выход циклического АМР после всех этапов хроматографии, а также не включать этапов градиентного элюирования, чтобы активность аденилатциклазы можно было определять одновременно во многих пробах.

Меченый ^3H или ^{14}C циклический АМР мы отделяли от других производных АТР последовательной хроматографией на колонках с катионитом дауэкс-50 и анионитами Al_2O_3 и дауэкс-1. Таким образом, на первом этапе хроматографии циклический АМР почти полностью отделялся от АТР, АДФ и АМР, которые выходили с колонки значительно раньше циклического АМР, и от аденина и аденозина, которые сильно отставали от циклического АМР. На Al_2O_3 циклический АМР не сорбировался, но полностью задерживались остатки АТР, АДФ и АМР. Циклический АМР задерживался на дауэкс-1, который не сорбировал аденин, аденозин, инозин, гипоксантин, ксантин и ксантозин. Выход циклического АМР с первой колонки составлял 80—90%, со второй — 90—95%, с третьей — 60—70%. Таким образом, выход циклического АМР после всех этапов хроматографии составлял 45—60%. Добавление в реакционную пробу известного количества циклического АМР, меченного ^{14}C , если субстратом слу-

Таблица 1

Влияние АТР-регенерирующей системы на содержание АТР в реакционной смеси при инкубации мембран

| АТР-регенерирующая система | Содержание после инкубации | | | |
|----------------------------|----------------------------|------|--------------------------|------|
| | АТР | | аденозин | |
| | имп/мин·10 ⁻⁶ | % | имп/мин·10 ⁻⁶ | % |
| + (опыт) | 2,49 | 90,4 | 0,12 | 4,3 |
| — (опыт) | 0,11 | 3,1 | 3,25 | 91,6 |
| — (контроль) | 3,06 | 94,0 | 0,11 | 3,6 |

Плазматические мембраны (0,65 мг мембранного белка на 1 мл) инкубировали в стандартной реакционной смеси в присутствии и в отсутствие креатинфосфокиназы 10 мин при 30°. АТР и его производные разделяли на колонке с DEAE-сефадексом с элюцией градиентом NaCl. В графе «%» приведено процентное отношение радиоактивности в данной фракции к общему количеству радиоактивности, нанесенной на колонку. Контроль: плазматические мембраны введены в реакционную смесь после добавления к ней останавливающего раствора (см. «Экспериментальную часть»).

Таблица 2

Проверка чистоты выделенного циклического АМР с помощью БХ

| Образец для БХ | Содержание в смеси, имп/мин | | | | | |
|---|-----------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | [¹⁴ C]АМР | [³ H]АМР | циклический | | [¹⁴ C]Аде | [³ H]Аде |
| | | | [¹⁴ C]АМР | [³ H]АМР | | |
| Элюат после колоночной хроматографии + свидетели | 0 | 0 | 635 | 1318 | 0 | 73 |
| Элюат пятна IV (рис. 1) с бумаги после обработки его фосфодиэстеразой | 472 | 1005 | 0 | 0 | 35 | 80 |

Таблица 3

Активности ферментов-маркеров в гомогенате и плазматических мембранах печени

| Фермент-маркер | Гомогенат | Плазматические мембраны | | |
|---------------------------------|----------------|-------------------------|---------|----------------|
| | уд. активность | уд. активность | выход | фактор очистки |
| Белок | | | 1,2—1,5 | |
| 5'-Нуклеотидаза | 1,4—2,1 | 30—45 | 18—27 | 22—40 |
| Глюкозо-6-фосфатаза | 2,8—6,6 | 1,0—2,5 | 0,3—0,5 | 0,3—0,9 |
| Кислая фосфатаза | 0,3—0,4 | <0,05 | 0 | 0 |
| Аденилатциклаза | | | | |
| базальный уровень | 0,05—0,08 | 0,5—0,8 | 20—30 | 8—13 |
| + глюкагон, 10 ⁻⁶ М | 0,09—0,11 | 1,5—2,0 | 40—50 | 18—22 |
| + адреналин, 10 ⁻⁴ М | | 0,8—1,1 | | |
| + NaF, 10 ⁻² М | 0,1—0,13 | 2,0—3,0 | 40—50 | 18—25 |

Выход белка приведен в мг/г сырого веса печени, выход ферментов — в % активности от содержания в гомогенате. Удельные активности фосфогидролаз приведены в мкмольх освобожденного фосфата на 1 мг белка в 1 ч, удельные активности аденилатциклазы — в имп/мин циклического АМР на 1 мг белка за 10 мин.

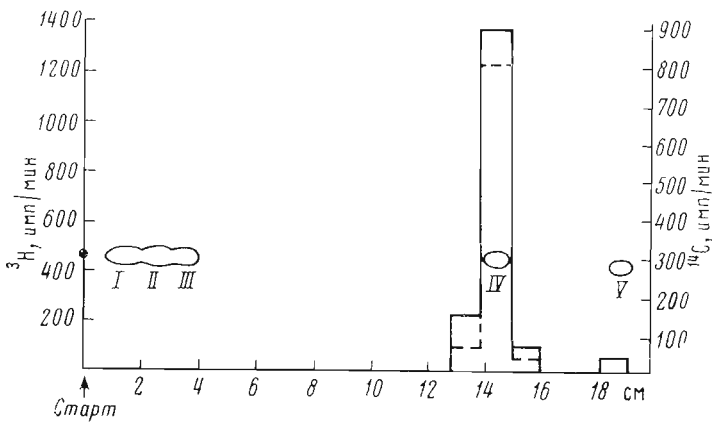


Рис. 1. Хроматография на бумаге (ватман 3ММ, нисходящая, 24 ч, система: 95% этанол — 1 М уксуснокислый аммоний, 7 : 3, рН 7,5) элюата после разделения реакционной пробы каскадной хроматографией. Мембраны (0,5 мг/мл инкубировали в стандартной реакционной смеси с ^3H АТР. После остановки реакции в пробу вносили циклический ^{14}C АМР. Радиоактивность определяли в диоксановом сцинтиляторе после элюции вещества с бумаги. Свидетели: меченые АТР (I), АДР (II), АМР (III), циклический АМР (IV), аденозин (V) и циклический ^{14}C АМР

жил ^3H АТР, позволяло фиксировать конкретный выход циклического ^3H АМР после хроматографии каждой пробы.

Чистоту циклического АМР, выделенного после инкубации мембран с ^3H АТР, проверяли хроматографированием элюата на бумаге ватман 3ММ (рис. 1, табл. 2). Из полученных данных следует, что более 90% радиоактивности ^3H сосредоточено в пятне, соответствующем заведомому образцу циклического ^{14}C АМР. Пятно, содержащее радиоактивность, элюировали с хроматограммы и инкубировали с фосфодиэстеразой циклического АМР (Sigma, США) в присутствии немеченого АМР. Продукты реакции разделяли на бумаге. Полученные данные (табл. 2) демонстрируют, что отношение $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ в пятнах, содержащих АМР, и аденозин после инкубации с фосфодиэстеразой одинаковы и равны отношению $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ в пятне циклического АМР до инкубации. Появление некоторого количества радиоактивности в аденозиновом пятне обусловлено следовой активностью 5'-нуклеотидазы в препарате фосфодиэстеразы. На основании этих данных можно сделать вывод, что вся радиоактивность ^3H в пятне, содержащем свидетель циклический АМР, обусловлена циклическим ^3H АМР.

Необходимо отметить, что основное загрязнение циклического АМР обусловлено аденозином или другим соединением, ведущим себя при хроматографии в этой системе как аденозин. В отсутствие АТР-регенерирующей системы, когда более 90% АТР в пробе превращается в процессе инкубации с мембранами в аденозин, уровень загрязнения в элюате резко повышается. В присутствии АТР-регенерирующей системы и при использовании очищенного АТР контроль обычно не превышает 30 имп/мин на 10^6 имп/мин внесенного в систему ^3H АТР.

В табл. 3 представлены данные об очистке аденилатциклазы в процессе выделения плазматических мембран печени крыс и об активации аденилатциклазы различными агентами. Глюкозой активирует аденилатциклазу в 3—4 раза, адреналин — в 1,5—2 раза, NaF — в 4—6 раз. Эти данные согласуются с литературными [12]. Линейная зависимость активности аденилатциклазы от концентрации белка соблюдается вплоть до концентрации белка 1 мг/мл, а в присутствии NaF — и до более высоких концентраций белка (рис. 2). На рис. 3 приведена зависимость активности аденилатциклазы от времени инкубации. Линейная зависимость активности фермента от времени инкубации сохраняется до 15 мин при 30°. Дан-

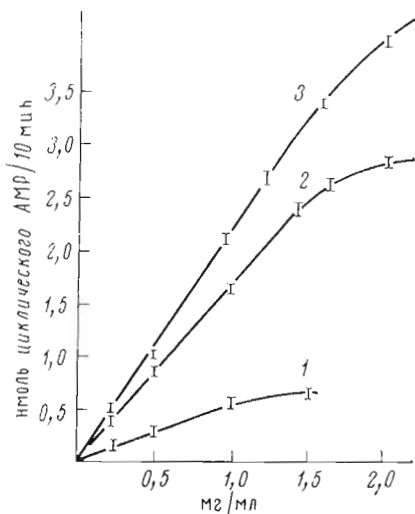


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость активности аденилатциклазы от концентрации белка в пробе: 1 — базальная активность, 2 — активность в присутствии 10^{-6} М глюкагона, 3 — активность в присутствии 10^{-2} М NaF. Вертикальные столбики указывают значения в двух параллельных пробах

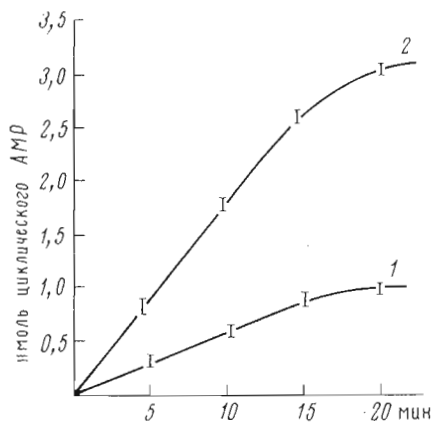


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость активности аденилатциклазы от времени инкубации: 1 — базальная активность, 2 — активность в присутствии 10^{-2} М NaF. Концентрация белка в пробах 1 мг/мл. Вертикальные столбики указывают значения в двух параллельных пробах

ные, представленные на рисунках, позволяют оценить также чувствительность метода. При удельной радиоактивности АТР 50—100 имп/мин/пмоль метод позволяет определить образование 3—5 пмоль циклического АМР в пробе с ошибкой не выше 20%. Если в пробе образуется более 10 пмоль циклического АМР, то ошибка становится меньше 5%.

В ряде опытов параллельно с $[^3\text{H}]\text{АТР}$ мы использовали в качестве субстрата $[^{14}\text{C}]\text{АТР}$ или $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$. Меченный ^{14}C или ^{32}P циклический АМР, образованный аденилатциклазой, выделяли по разработанной нами схеме. Результаты определения активности аденилатциклазы совпадали в пределах ошибки измерения независимо от того, какой субстрат был использован.

Предложенный метод позволяет измерить активность аденилатциклазы в 40—50 пробах в течение 2 ч и гораздо менее трудоемок, чем большинство описанных методов определения активности аденилатциклазы с использованием в качестве субстратов $[^3\text{H}]$ - или $[^{14}\text{C}]\text{АТР}$. Чувствительность метода и точность определения активности аденилатциклазы не уступает методам, в которых в качестве субстрата используют $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$.

Экспериментальная часть

Реагенты. Использовали дауэкс 50×8 (100—200 меш), дауэкс 1×8 (100—200 меш), β -глицерофосфат фирмы Serva (ФРГ), AG 1×8 (100—200 меш) и AG $50\text{W} \times 8$ (100—200 меш) фирмы Bio-Rad (США); трис, бычий сывороточный альбумин фирмы Sigma (США), DEAE-сефадекс фирмы Pharmacia (Швеция), теофиллин фирмы Calbiochem (США), нейтральный Al_2O_3 , Na-соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, глюкозо-6-фосфат, креатинфосфат, креатинфосфокиназу, нуклеиновые основания, нуклеозиды и нуклеотиды (кроме циклического АМР) фирмы Reanal (ВНР), ци-

клический АМР получен из СКТБ БАВ (Новосибирск). Использовали меченые соединения $[8\text{-}^3\text{H}]\text{АТР}$ (Amersham, Англия или «Изотоп», СССР), $[^{14}\text{C}]\text{АТР}$ (Amersham, Англия или СССР), $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$, циклический $[^3\text{H}]\text{АМР}$, циклический $[^{14}\text{C}]\text{АМР}$ (Amersham, Англия).

Выделение плазматических мембран. Плазматические мембраны выделяли из печени беспородных белых крыс по существенно модифицированному нами методу Рэя [13]. В опыт брали 20—30 самок весом от 150 до 180 г. Все процедуры осуществляли при 4°. После декапитации животного печень перфузировали от крови раствором 0,15 М NaCl, содержащим 0,5 мМ CaCl₂ (рН 7,6). Печени от трех животных гомогенизировали в 100 мл раствора, содержащего 1 мМ Na₂B₄O₇, 1 мМ CaCl₂ (рН 7,6, раствор А), в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком 10 ударами пестика. Гомогенат фильтровали через 1, а затем через 6 слоев марли. Фильтрат, полученный от 30 крыс, разводили до 12—13 л раствором А и центрифугировали 10 мин при 1000 g (1900 об/мин) в литровых стаканах в бакет-роторе центрифуги К-70 (Janetzki, ГДР). Надосадочную жидкость отсасывали с помощью водоструйного насоса, а осадки суспендировали пипеткой, объединяли и суспендировали в 3 л раствора А, а затем повторно центрифугировали в тех же условиях. Полученный осадок (ядерная фракция) доводили 70% раствором сахарозы (весовая концентрация) до концентрации сахарозы 44%. Все растворы сахарозы, использованные нами, содержали 3 мМ Na-соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (рН растворов 7,6), введение которой в сахарозный градиент способствует эффективной очистке мембран от митохондрий [14]. Действительно, полученные нами в присутствии этилендиаминтетрауксусной кислоты плазматические мембраны практически не содержали кардиолипина, фосфолипида, входящего в состав внутренних мембран митохондрий [15].

На дно пробирок ротора SW-27 центрифуги L-5-50 (Beckman, США) наслаивали 3 мл 50% сахарозы. На этот слой наносили приготовленную суспензию (не более 9 мл в каждую пробирку), а затем последовательно 8 мл 42,5%, 8 мл 41% и 8—9 мл 36% сахарозы. Такая форма градиента способствовала увеличению выхода плазматических мембран. Как было нами установлено в предварительных опытах, увеличение объема зоны, содержащей ядерный осадок, до более чем 10 мл приводило к резкому снижению выхода 5'-нуклеотидазы и аденилатциклазы, ферментов — маркеров плазматических мембран. «Подушка» 50% сахарозы на дне пробирки также способствовала увеличению выхода плазматических мембран, по-видимому препятствуя увлечению их ядрами и неразрушенными клетками на дно пробирки.

После центрифугирования в течение 2 ч при 25 000 об/мин при 4° плазматические мембраны выходили на границу 41—36% сахарозы. Плотный слой мембран отбирали с помощью шприца и суспендировали в растворе 1 мМ NaHCO₃, рН 7,6. Мембраны затем осаждали при 40 000 g в течение 40 мин, суспендировали в 1 мМ NaHCO₃, расфасовывали по 1—2 мл и хранили при —70°.

Предлагаемый метод выделения плазматических мембран из печени крыс позволяет за 7—8 ч с использованием двух роторов SW-27 выделить из 30 крыс до 200 мг мембранного белка с высокой степенью очистки. Полученные плазматические мембраны практически не загрязнены митохондриями, лизосомами и лишь в незначительной степени загрязнены эндоплазматическим ретикуломом.

На это указывает отсутствие в препарате плазматических мембран кислой фосфатазы (маркер лизосом), обеднение по глюкозо-6-фосфатазе (маркер эндоплазматического ретикулума), очень низкое содержание кардиолипина (маркер митохондрий) (табл. 3 и 4). Фосфолипидный состав выделенных нами плазматических мембран (табл. 4) близок к описанному в литературе для высокоочищенных мембран, полученных аналитическим методом [16].

Фосфолипидный состав плазматических мембран

Приведены результаты двух опытов

| Фосфолипиды | Содержание, % от общего количества фосфолипидов |
|----------------------|---|
| Фосфатидная кислота | 3,9; 2,8 |
| Кардиолипин | 0; 0,3 |
| Фосфатидилэтаноламин | 27,0; 24,0 |
| Фосфатидилхолин | 39,0; 39,1 |
| Сфингомиелин | 14,5; 18,6 |
| Фосфатидилсерин | 7,1; 16,6 |
| Фосфатидилинозит | 8,5; 8,6 |

Определение активности ферментов. Активность 5'-нуклеотидазы определяли в 1 мл 50 мМ глицил-глицинового буфера (рН 9,0), содержащего 10 мМ $MgCl_2$ и 5 мМ АМР. Мембраны инкубировали в этом растворе 5—20 мин при 37°. Активность глюкозо-6-фосфатазы определяли по методу Солинома и Трамса [17] с субстратом глюкозо-6-фосфатом, активность кислой фосфатазы — по методу Квирка и Робинсона [18] с субстратом β -глицерофосфатом, освобожденный неорганический фосфат — по методу Фиске и Субба-Роу [19], белок — по методу Лоури [20]. Стандартом служил бычий сывороточный альбумин. Фосфолипидный состав мембран устанавливали по методу Леминовской [21] *.

Определение активности аденилатциклазы. Активность аденилатциклазы определяли в 60 мкл раствора следующего состава: 25 мМ трис-НСI (рН 7,6), 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота, 2,5 мМ циклический АМР, 20 мМ креатинфосфат, 1 мг/мл креатинфосфокиназы, 3 мМ теофиллин и 0,5 мМ [8- 3H]АТР, или [^{14}C] АТР, или [α - ^{32}P]АТР (50—100 имп/мин/пмоль). В стеклянную центрифужную пробирку на 8 мл с коническим дном вводили 20 мкл раствора АТР, 20 мкл раствора, содержащего остальные компоненты реакционной смеси, и 20 мкл суспензии, содержащей 5—50 мкг мембранного белка. Пробы инкубировали 10 мин при 30° и реакцию останавливали добавлением 0,4 мл раствора следующего состава: 5 мМ трис-НСI (рН 7,2), 2,5 мг/мл АТР, 1 мг/мл циклического АМР и 1000 имп/мин циклического [^{14}C]АМР, если субстратом служил [3H]АТР, или 10 000 имп/мин циклического [3H]АМР, если субстратом служили [^{14}C]АТР или [α - ^{32}P]АТР. Пробирки опускали в кипящую баню на 3 мин и центрифугировали 10 мин при 5000 г.

Очистка меченого АТР. Некоторые партии АТР содержали радиоактивные примеси, ведущие себя при хроматографии подобно циклическому АМР. Поэтому, как правило, перед использованием меченого АТР его очищали с помощью модифицированного метода Юнта [22]. Колонку с DEAE-сефадексом А-25 (0,4 × 5 см) уравнивали 10 мМ триэтиламмонийбикарбонатным буфером, рН 7,5. Меченый АТР разводили немеченым до удельной радиоактивности 100—200 имп/мин/пмоль. На колонку напосили 2 моль АТР и 0,1 моль немеченого циклического АМР. Колонку элюировали градиентом триэтиламмонийбикарбонатного буфера от 10 мМ до 0,5 М. Фракцию, содержащую АТР, упаривали в роторном испарителе при 35°, промывали дистиллированной водой и этанолом и растворяли АТР в 10 мМ трис-НСI, рН 7,6. Этот раствор доводили затем раствором немеченого АТР до необходимой концентрации и удельной радиоактивности и хранили при -70°.

Выделение циклического АМР. Надосадочную жидкость после центрифугирования реакционной пробы напосили на колонку 10 × 0,4 см,

* Авторы глубоко признательны д-ру хим. наук Э. В. Дятловской за определение фосфолипидного состава мембран.

содержащую 1 мл дауэкса 50×8 или AG 50×8 в H^+ -форме. После нанесения пробы колошку промывали 2,5 (дауэкс 50) или 1,5 мл (AG 50) воды. Элюаты отбрасывали. Кончики колонок промывали водой и циклический АМР элюировали с колонок, содержащих дауэкс 50, 14 мл воды, а с колонок, содержащих AG 50, — 7 мл воды. В элюаты вносили 0,1—0,2 мл 1 М трис-НСl (рН 7,8) и наносили их на колонки ($10 \times 0,4$ см), содержащие 1 мл нейтральной Al_2O_3 , отмешиванной в дистиллированной воде. Элюат собирали непосредственно на колонки ($3 \times 0,4$ см), содержащие 0,3 мл дауэкса 1×8 или AG 1×8 в Cl^- -форме. Смолы были предварительно уравновешены 5 мМ трис-НСl, рН 7,6. После нанесения материала на эти колонки Al_2O_3 промывали 3 мл воды. Затем колонки с Al_2O_3 разъединяли с колонками дауэкса 1 (или AG 1). Последние промывали 3—5 мл воды и элюировали циклический АМР 1,2 мл 50 мМ НСl непосредственно во флаконы для сцинтилляционного счета. Хроматографию вели с использованием многоканальных перистальтических насосов DP-1 (MLW, ГДР). Флаконы содержали 15 мл сцинтиллятора (4 г РРО, 200 мг РОРОР и 100 мг нафталина в 900 мл сцинтиллятора на диоксановой основе). В зависимости от партии смолы объем промывающих и элюирующих растворов приходилось менять в пределах 20—30% от указанных. Радиоактивность просчитывали в жидкостном сцинтилляционном счетчике Mark-II (Nuclear-Chicago, США). Предварительно были построены калибровочные кривые, позволяющие учитывать истинное содержание данного изотопа в пробе независимо от степени загашенности образца.

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за ценные советы и обсуждение работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krishna G., Weiss B., Brodie B. B. (1968) *J. Pharmacol. and Experimental Therap.*, **163**, 379—388.
2. Ramachandran J. (1971) *Anal. Biochem.*, **43**, 227—239.
3. Salamon I., Londos C., Rodbell M. (1974) *Anal. Biochem.*, **58**, 541—548.
4. Wincek T. J., Sweat F. W. (1975) *Anal. Biochem.*, **64**, 631—635.
5. Bär H. P., Hechter O. (1969) *Anal. Biochem.*, **29**, 476—483.
6. Bitensky M. W., Gorman R. E., Newfield A. H., King R. (1971) *Endocrinology*, **89**, 1242—1250.
7. Emmelot P., Bos C. J. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **249**, 285—292.
8. Orengo A., Greenspan J., Love J. D. (1975) *Anal. Biochem.*, **63**, 559—565.
9. Emmelot P., Bos C. J., Benedetti E. L., Rümke P. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **90**, 126—145.
10. Hause P. R. D., Poullis P., Wiedemann M. J. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **24**, 429—437.
11. Maguire M. E., Gilman A. G. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **358**, 154—163.
12. Pohl S. H., Birnbaumer J., Rodbell M. (1974) *J. Biol. Chem.*, **246**, 1849—1860.
13. Ray T. K. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **196**, 1—9.
14. Wong M., Zull J. E. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **352**, 52—63.
15. Chapman D., Leslie R. B. (1970) in *Membranes of Mitochondria and Chloroplasts* (Racker E., ed.), Van Nostrand Reinhold Co., New York, p. 91.
16. Dorling P. R., LePage R. N. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **318**, 33—40.
17. Solyom A., Trams E. G. (1972) *Enzyme*, **13**, 329—372.
18. Qirk S. L., Robinson G. B. (1972) *Biochem. J.*, **128**, 1319—1328.
19. Fiske C. H., SubbaRow Y. (1925) *J. Biol. Chem.*, **66**, 371—378.
20. Lowry O. H., Rosenbrough N. G., Farr A. L., Randall R. J. (1954) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
21. Лемниовская А. Ф., Кози Я. М., Перевощникова К. А., Збарский И. Б., Дятловичкая Э. В., Бергельсон Л. Д. (1976) *Биохимия*, **41**, 1000—1003.
22. Yount R. G., Babcock D., Ballantyne W., Ojala D. (1971) *Biochemistry*, **10**, 2484—2489.

Поступила в редакцию
14.V.1976

ASSAY OF ADENYL CYCLASE ACTIVITY IN RAT LIVER PLASMA
MEMBRANES USING ^3H - AND ^{14}C -LABELED ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHATES

VOEIKOV V. L., DENISOV V. M., POSDNYAKOV S. P.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A procedure for adenylyl cyclase activity assay using [^3H]- and [^{14}C] ATP as substrates is described. The reaction product, [^3H]- or [^{14}C] cyclic AMP, is isolated from the reaction mixture by the sequential chromatography on Dowex 50, Al_2O_3 and Dowex 1 columns. The purity of cyclic AMP thus obtained is at least 90%. The method allows to estimate adenylyl cyclase activity provided the radioactivity of the nascent cyclic AMP exceeds 0,01% of the radioactivity of ATP taken into reaction. The method was used for the adenylyl cyclase activity determination in rat liver plasma membranes. The deviations for parallel runs were found not to exceed 5%.
