

HELGI ÄKKE

ERÜTROTSÜÜTIDE ADENIINNUKLEOTIIDIDE ERALDAMINE PABERELEKTROFOREESI- JA PABERKROMATOGRAAFIA- MEETODIL

ХЕЛЬГИ ЭККЕ. РАЗДЕЛЕНИЕ АДЕНИННУКЛЕОТИДОВ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДАМИ
ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

HELGI ÄKKE. SEPARATION OF ADENINE NUCLEOTIDES OF RED BLOOD CELLS BY
PAPER ELECTROPHORESIS AND PAPER CHROMATOGRAPHY

Bioloogiliste ekstraktide nukleotiidse koostise selgitamiseks rakenda-
takse tänapäeval laialdaselt paber- jaioonvahetuskromatograafiat. Nende
meetoditega võrreldes on paberelektroforeesi eeliseks kiirus, mis analüüsi
kestel piirab labiilsete ühendite hüdrolyüsi.

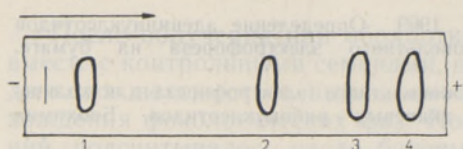
Käesolevas töös uuriti võimalusi erütrotsüütide vabade ribonukleotiidide
madalpingeliseks paberelektroforeetiliseks eraldamiseks horisontaalsel
elektroforeesiseadmel. Saadud tulemusi võrreldi paberkromatograafilise
analüüsi vastavate andmetega.

Esmakordselt kasutasid paberelektroforeesi nukleotiidide eraldamiseks
ribonukleiinhapete hüdrolyüsaadist Markham ja Smith (1951). Stránský
(1963) järgi eralduvad madalpingelisel paberelektroforeesil erütrotsüütide
adeniinnukleotiidid kõige paremini tsitraatpuhvriga, kui pH on vahemikus
4,0—5,0. Selles pH piirkonnas paraneb adeniinnukleotiidide eraldamine
puhvri ioonjõu vähenemisel.

Metoodika. Veri koguti kanadelt dekapitatsioonil või tiivaveenist süst-
laga, küülikutelt kõrvaveenist. Antikoagulandina kasutati hepariini. Erüt-
rotsüütide eraldamine verest, nukleotiidide ekstraheerimine, paberkromato-
graafiline eraldamine, identifitseerimine ja kvantitatiivne määramine toi-
musid varem kirjeldatud (Äkke, 1972) meetodikat kasutades. Paberelektro-
forees teostati elektroforeesiseadmel УЭА МРТУ-42-2350-64. Tuginedes
Stránský (1963) ning Verhovskaja ja Tšumakova (Верховская, Чумакова,
1969) andmetele, tehti seadme optimaalsete eraldamistingimuste väljasel-
gitamiseks rida puhaste adeniinnukleotiidide segu analüüsi. Nukleotiidide
parim eraldumine toimus, kui kasutati 0,025M tsitraatpuhvrit pH 4,8 juures
ja pinget 800 V (potentsiaali gradient 25 V/cm). Eraldumine kestis kolm
tundi. Elektroforeesiks kasutati 1,5%-se HCl-ga pestud kromatografeeri-
mispaberit «Schleicher & Schüll» nr. 2043b mõõtmetega 4×40 cm. Uuritav
segu kanti kalibreeritud mikropipetiga (0,02 ml) seadmes olevaile puhvri-
ga niisutatud paberiribadele 1,5 cm pikkuse joonena 10,5 cm kaugusele
katoodipoolsest otsast. Kontsentratsioonist olenevalt kanti ekstrakti pabe-
rile 0,04—0,1 ml.

Tulemused. pH vahemikus 5,0—6,0 toimub nukleotiidide jaotumine
elektriväljas fosforhappejääkide hüdroksüülrühmade dissotsiatsiooni arvel
(Рогозкин, Комкова, 1961). Järelikult sõltub nende ühendite elektroforee-
tiline liikuvus fosforileerituse astmest.

Adenosiinfosfaatide segust eraldumist eespool kirjeldatud elektroforeesi
tingimustes iseloomustab joonis. Anorgaaniline fosfaat liigub sel juhul kiire-



Adeniinnukleotiidide asetus elektroforegrammil. 0,025M tsitraatpuhver, pH 4,8, 800 V (25 V/cm), 3 tundi. 1 — adeniin, 2 — AMP, 3 — ADP, 4 — ATP.

mini kui ATP* (Stránský, 1963) ega sega seetõttu adeniinnukleotiidide kvantitatiivset määramist.

Tabelis 1 on esitatud kana erütrotsüütide elektroforeetilisel eraldatud adeniinnukleotiidide kogused vastavalt kolmele erinevale ekstraheerimismeetodile (Äkke, 1972). Gerlachi jt. (1957) ning Venksterni ja Bajevi (Венкстерн, Баев, 1957) andmeil sisaldavad tuvi erütrotsüüdid peale adeniinnukleotiidide ka guanosiiinfosfaate GTP ja GDP. Viimaste kindlaks tegemiseks kana erütrotsüütides kasutati paberkromatograafiat, sest paberelektroforeesil toimub nukleotiidide jaotumine nukleosiidmono-, nukleosiid- ja neukleosiidtrifosfaate sisaldavateks fraktsioonideks. Tulemustest selgub (tab. 1), et ka kana erütrotsüüdid sisaldavad vabade nukleotiidide hulgas guaniini derivaate. Seetõttu on elektroforeetilisel saadud ATP ja ADP väärtused tegelikest suuremad GTP ja GDP koguste võrra. Sama nähtub ka tabelist 2, kus on võrdlevalt esitatud paberelektroforeesi- ja paberkromatograafia-meetodil määratud puriinnukleotiididesisaldus küüliku erütrotsüütides.

Kuna ATP moodustab trifosfaatide fraktsioonist 92—94%, GDP lisandus difosfaatide fraktsioonis aga ei ületa 1—2% ning ka monofosfaatide hulgas domineerib AMP (Воскобойников, 1966), siis kasutavad paljud autorid paberelektroforeesi vabade adeniinnukleotiidide kvantitatiivseks määramiseks mitmesugustes loomsetes kudedes (Рогозкин, Комкова, 1961; Stránský, 1963; Воскобойников, 1966; Верховская, Чумакова, 1963).

Kokku võttes võib öelda, et nukleosiidfosfaatide segu lahutamisel komponentideks on paberelektroforeesil teiste meetoditega võrreldes vaieldamatu eelis: adeniinnukleotiidide täielik eraldumine potentsiaali gradiendi madalate väärtuste korral saavutatakse 3—4 tunniga. Pinge tõstmine võimaldab analüüsi kestust veelgi lühendada. Paberkromatograafia kasutamisel saadakse nukleotiidide rahuldav eraldumine alles pikaajaliste korduvate voolutamiste tulemusena. Samal ajal jääb aga viimati mainitud meetodi positiivseks küljeks sama fosforileerituse astmega ühendite lahutamine, mida ei taga elektroforees. Seega tuleb neid meetodeid erütrotsüütide nukleotiidse koostise määramisel rakendada valikuliselt, vastavalt püstitatud ülesandele.

KIRJANDUS

- Gerlach E., Fleckenstein A., Freundt K. J., 1957. Konzentration und Turnover der Adenosin- und Guaninphosphate sowie anderer säurelöslicher Phosphorverbindungen in Taubenerythrocyten. Pflügers Arch. Ges. Physiol. **263** : 682—703.
- Markham R., Smith J. D., 1951. Structure of ribonucleic acid. Nature **168** : 406—408.
- Stránský Z., 1963. Determination of adenine nucleotides by paper electrophoresis. J. Chromatog. **10** : 456—462.
- Äkke H., 1972. Küüliku erütrotsüütide adeniinnukleotiidide ekstraheerimismeetodite võrdlus. ENSV TA Toimet., Biol. **21** (2) : 151—160.
- Венкстерн Т. В., Баев А. А., 1957. Нуклеотидный состав ядерных эритроцитов. Биохимия **22** : 1043—1055.

* ATP — adenosiin-5-trifosforhape; ADP — adenosiin-5-difosforhape; AMP — adenosiin-5-monofosforhape; GTP — guanosiin-5-trifosforhape; GDP — guanosiin-5-difosforhape; ТКА — triklooraädikhape.

- Верховская П. Б., Чумакова Н. И., 1969. Определение адениннуклеотидов в эритроцитах крови методом низковольтного электрофореза на бумаге. Лаб. дело **12** : 729—732.
- Воскобойников Г. В., 1966. Метод высоковольтного электрофореза для количественного определения свободных тканевых рибонуклеотидов. Биохимия **31** : 1041—1045.
- Рогозкин В. А., Комкова А. И., 1961. Электрофоретическое разделение на бумаге аденозинфосфорных кислот. Укр. біохім. журнал **33** : 709—712.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalioloogia Instituut

Toimetusse saabunud
15. IX 1971

EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA TOIMETISED. 21. KÕIDE
BIOLOGIA. 1972, NR. 2

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР. ТОМ 21
БИОЛОГИЯ. 1972, № 2

УДК 633.853.494:576.353:581.154

ТАМАРА ШНАЙДЕР, ЮТА ПЯРДИ

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У РАПСА, ВЫЗВАННЫЕ ДЕЙСТВИЕМ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ И ЭТИЛЕНИМИНА

TAMARA SNAIDER, JUTA PÄRDI. GAMMA-KIIRGUSE JA ETÜLEENIMIINI TOIMELTEKINUD TSÜTOGENEETILISED MUUTUSED RAPSIL

TAMARA SHNAIDER, JUTA PÄRDI. CYTOGENETICAL EFFECTS OF GAMMA-IRRADIATION AND ETHYLENE IMINE TREATMENT ON SEEDS OF OIL-RAPE

Рапс масличный относится к числу растений, высоко устойчивых к мутагенам — как гамма-лучи, так и химические алкилирующие соединения вызывают в потомстве обработанных мутагенами растений появление чрезвычайно малого числа наследственных изменений, преимущественно затрагивающих длину вегетационного периода (Орав, Шнайдер, 1968; Шнайдер, 1969, 1971).

Для установления возможной связи между цитогенетическими нарушениями и мутабельностью у рапса в 1970—71 гг. были проведены цитологические анализы и полевые опыты, в которых определялось действие гамма-лучей и этиленимина (ЭИ) на митотическую активность и количество хромосомных нарушений в корневой меристеме проростков рапса и на наследственную изменчивость растений.

Воздушно-сухие семена (влажность 11%) ярового рапса 'Регина II' облучались на установке Луч-1 Института экспериментальной биологии АН Эстонской ССР гамма-лучами ^{60}Co в дозах 0, 50, 100, 150, 200, 250 и 300 кр. Другая партия семян этого же сорта обрабатывалась в течение 4 ч 0,01%-ным раствором ЭИ при pH 6. Обработке ЭИ подвергались семена, находящиеся в состоянии различной метаболической активности — воздушно-сухие, предварительно замоченные в воде в течение 12 ч и предварительно замоченные в воде в течение 24 ч.