

(Д. Бородин). Ранее известен из южного Казахстана [1]. (эдеагус — см. рисунок, 8).

*Longitarsus karlheinzii* Warch. Новый для Европы и СССР вид. Обнаружен в Крыму: Керченский полуостров, 06—07.04.83 (С. А. Мосякин). Описан из Турции [4] (эдеагус — см. рисунок, 9).

*Longitarsus obliteratoides* Gruev. Новый для фауны СССР вид. Найден в Грузии: Хашури, 16—22.07.83 (А. С. Константинов). Арсал вида охватывает Италию, Францию, Португалию [5] (эдеагус — см. рисунок, 10).

*Longitarsus salarius* Lop. et Kul. Новый для Европы вид. В коллекции ЗИН АН СССР обнаружен экземпляр с этикеткой «Астрахань, 12.07.24. Д. Оглоблин». Описан из Казахстана [6] (эдеагус — см. рисунок, 11).

*Altica brevicollis* Foud. В результате изучения изменчивости эдеагуса *A. brevicollis* (см. рисунок, 12, 13) установлено, что *A. chamaenerii* Lindb. является синонимом этого вида. Главные особенности, которыми отличается экземпляр *A. chamaenerii* с этикеткой «Helsingfors, 01.08.29, Lind., det. K. Lindberg» (резко выраженные продольные борозды, лежащие по бокам эдеагуса), целиком укладываются в границы изменчивости этой структуры у *A. brevicollis* (*A. chamaenerii* Lindb., 1926 = *A. brevicollis* Foudras, 1860, syn. nov.).

*Psylliodes brisouti* Bed. Новый для фауны СССР вид. В коллекции ЗИН АН СССР обнаружен экземпляр из Алушты, 18.06.27. (Ф. Лукьянович) (эдеагус — см. рисунок, 14).

### Список литературы

1. Лопатин И. К. Жуки-листоеды (Coleoptera, Chrysomelidae) Средней Азии и Казахстана. Л., 1977.
2. Heikertinger F. // Kol. Rundschau. 1941. В. 27. S. 75.
3. Heikertinger F. Ibid. 1944. В. 30. S. 37.
4. Warchalowski A. // Pol. Pismo Entomol. 1972. Т. 1/2. № 2. S. 313.
5. Gruev B. // Науч. тр. Пловдивски ун-т. 1973. С. 103.
6. Лопатин И. К., Куленова К. З. // Изв. АН Каз. ССР. Сер. биол. 1985. № 1. С. 47.

УДК 577.113.083

В. И. ЦЕЛИНИНА, Н. Н. КУЗУБ, М. В. ШОЛУХ

### МИКРОМЕТОД РАЗДЕЛЕНИЯ АДЕНИЛОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ КОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА ПЭИ-ЦЕЛЛЮЛОЗЕ

Для разделения и очистки адениловых нуклеотидов применяются различные ионообменные материалы [1]. Эффективное фракционирование моно-, ди- и трифосфатов аденозина достигается при тонкослойной и колоночной хроматографии на ПЭИ-целлюлозе при использовании в качестве элюирующего раствора хлорида лития [2]. Этот метод отличается простотой, высоким выходом (до 99 %) и успешно применяется для качественного и количественного анализа радиоактивных препаратов адениловых нуклеотидов. Однако полученные таким способом препараты АТР содержат достаточно высокие (до 1,5 М) концентрации хлорида лития, что делает их практически непригодными без дополнительной очистки для определения активности ферментов, использующих в качестве субстрата АТР.

В связи с этим задачей данной работы явилась модификация условий хроматографии адениловых нуклеотидов с целью исключения ионов лития из элюирующего раствора.

### Материал и методика

Хроматографию на ПЭИ-целлюлозе (емк. 0,1—0,15 мэкв/г, «Реанал», Венгрия) проводили в колонке диаметром 0,5 см. Ионообменник готови-

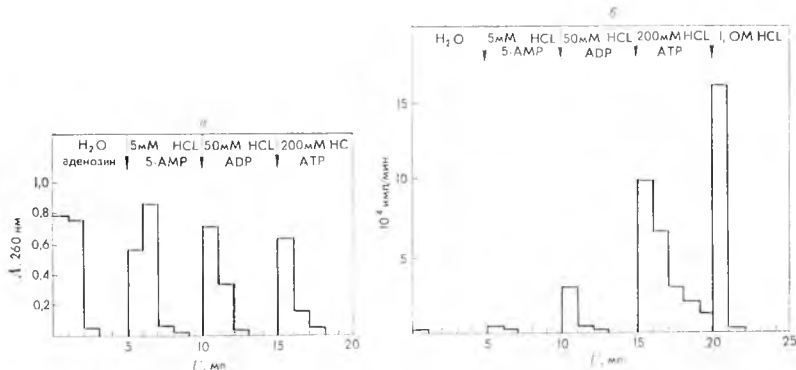
ли к работе согласно методу [2]: 1 г ПЭИ-целлюлозы суспендировали в 50 мл дистиллированной воды, мелкие гранулы сорбента удаляли декантированием. ПЭИ-целлюлозу, ресуспендированную в  $H_2O$ , вносили в колонку до высоты столбика сорбента 1 см.

По 0,1 мкМ аденозина, 5'-AMP, ADP и ATP растворяли в 0,5 мл  $H_2O$ . Смесь нуклеотидов в указанном объеме наносили на колонку и давали раствору впитаться в гель. Аденозин элюировали 5 мл дистиллированной воды. Разделение моно-, ди- и трифосфатов аденозина проводили с использованием ступенчатого градиента концентраций HCl (по 5 мл 5, 50 и 200 мМ растворов). HCl наносили на колонку порциями по 1 мл. Собирали по 1 мл элюата и измеряли оптическую плотность при 260 нм.

Хроматографию [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]ATP (В/О «Изотоп», СССР) проводили аналогично процедуре, описанной выше: 0,5 мл водного раствора, содержавшего [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]ATP ( $6 \cdot 10^5$  имп/мин) и 0,1 мкМ нерадиоактивного ATP, наносили на колонку. Аликвоты по 1 мл собирали в сцинтилляционные флаконы, добавляли по 10 мл сцинтиллятора (0,2 г 1,4-ди-(5-фенил-2-оксазолл) бензола и 4 г 2,5-дифенилоксазола в 1 л диуксана) и измеряли радиоактивность на счетчике Бета-2 (СССР).

### Результаты и их обсуждение

В работе [2] показано, что 5'-AMP, ADP и ATP успешно разделяются при ступенчатом элюировании 0,3, 1,0 и 1,5 М хлоридом лития. Однако наличие в среде высоких концентраций лития делает препараты ATP непригодными для определения активности ATP-зависимых ферментов. Так, например, установлено [3], что литий в микромолярных концентрациях является стимулятором аденилатциклазы, а в высоких концентрациях — ее ингибитором. В связи с этим нами была предпринята попытка исключения ионов лития из элюента, использовавшегося для разделения адениловых нуклеотидов.



Хроматография смеси адениловых нуклеотидов на колонке (0,5×1 см) с ПЭИ-целлюлозой (а). Анализируемая проба содержала по 1 мкМ аденозина, 5'-AMP, ADP и ATP. Хроматография [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]ATP (0,1 мкМ,  $6 \cdot 10^5$  имп/мин) на колонке с ПЭИ-целлюлозой (б)

Для фракционирования моно-, ди- и трифосфатов аденозина на анионообменниках типа Дауэкс в качестве элюирующего агента используется соляная кислота [4]. Применение ее позволило нам успешно разделить адениловые нуклеотиды на ПЭИ-целлюлозе. Выбор концентраций HCl, обеспечивающих максимальный выход нуклеотидов в минимальном объеме элюента, проводили при хроматографии индивидуальных нуклеотидов (см. рисунок, а). Аденозин не удерживался на колонке и сходил при промывке ее 5 мл  $H_2O$ . До 90 % 5'-AMP элюировали в 2 мл 5 мМ HCl. Оставшуюся часть аденозинмонофосфата практически полностью снимали дополнительными 3 мл HCl той же молярности. ADP и ATP элюировали 50 и 200 мМ HCl соответственно. Как и в случае с 5'-AMP, до

90 % ди- и трифосфата аденозина элюировалось первыми двумя миллилитрами HCl. Увеличение количества нуклеотидов в пробе в два-три раза не влияло на качество разделения. Выход нуклеотидов в среднем составил 99 %.

На рисунке, б представлены результаты хроматографии коммерческого препарата [ $\alpha$ - $^{32}$ P]АТР. После нанесения последнего на колонку сорбент промывали 5 мл H<sub>2</sub>O. В этой фракции обнаружено 0,4 % радиоактивности. На долю 5'-AMP и ADP приходилось соответственно 2,5 и 7,3 % радиоактивности исходного препарата, нанесенного на колонку. Содержание [ $\alpha$ - $^{32}$ P]АТР составило 40 %. Нендентифицированные радиоактивные примеси удерживались на сорбенте при концентрации HCl, достаточной для элюции АТР. Для их удаления требовалось увеличение концентрации HCl до 1 М. Содержание этих примесей в составе препарата [ $\alpha$ - $^{32}$ P]АТР доходило до 30 % (в зависимости от партии препарата и срока его хранения).

Описанные условия хроматографии применены для разделения гуаниловых нуклеотидов. Гуанозин, 5'-GMP, GDP элюировали H<sub>2</sub>O, 5 и 50 мМ HCl соответственно. Для снятия с колонки ГТР требовалась более высокая концентрация HCl (500 мМ), чем для элюции АТР (200 мМ).

Таким образом, описанный метод может быть использован для качественного и количественного анализа смеси адениловых или гуаниловых нуклеотидов, а также для очистки радиоактивного препарата [ $\alpha$ - $^{32}$ P]АТР.

### Список литературы

1. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М., 1985. С. 319.
2. Magnusson R. P., Portis A. R. Jr., McCarty R. F. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 653.
3. Roy C., Le Bars, Noelle C., Jard S. // Eur. Journ. Biochem., 1977. V. 78. P. 325.
4. Практикум по биохимии. М., 1979. С. 174.

УДК 577.3.05

А. В. ТИМОШЕНКО, И. В. ГОРУДКО,  
С. С. КАМАНО, С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ

### ТЕРМОИНДУЦИРОВАННЫЙ ШЕДДИНГ МЕМБРАННЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ

Процесс схождения фрагментов плазматической мембраны клеток в среду при действии факторов различной природы носит название «шеддинг» [1]. Он играет важную роль в функционировании клеток, особенно при взаимодействии опухолевых клеток с лимфоцитами [2]. Одно из основных следствий шеддинга, по-видимому, — изменение рецепторных свойств клеток. Показано, например, что при инкубировании лимфоидных клеток в условиях гипертермии в супернатантах обнаруживаются белки, которые могут быть отнесены к клеточным рецепторам [3]. Поскольку клеточные рецепторы являются, как правило, гликопротеинами [4], представляет интерес анализ изменения их содержания в клетках при действии температуры как фактора, вызывающего шеддинг мембранных компонентов. Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния различных температур на структурно-функциональные свойства клеток, связанные с шеддингом мембранных гликопротеинов.

### Материал и методика

Клетки линий L-41 и Vero получали из Института микробиологии и эпидемиологии МЗ БССР, где они культивировались стандартным образом на стеклянных подложках (37 °С, 5 %-ный гемгидролизат с 10 %-