

УДК 582.288.621.039.85:576.341

## МЕТОД ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОДНОГО И ТОГО ЖЕ ИЗОТОПА УГЛЕРОДА ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ МЕТАБОЛИЗМА У ДРОЖЖЕЙ ДВУХ СУБСТРАТОВ

Е. Р. ДАВИДОВ, В. В. РАЧИНСКИЙ, А. Д. ГОЛОЛОБОВ, Н. Ф. ДЕМАНОВА

(Кафедра прикладной атомной физики и радиохимии)

Ранее [1] нами исследовался процесс адаптации дрожжей при смене углеводного источника питания углеводородным, в результате предложен метод определения продолжительности периода адаптации по появлению  $^{14}\text{CO}_2$  при использовании  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -октадекана. Поскольку глюкоза, являясь предшествующим октадекану источником углерода, полностью репрессировала окисление *n*-алкана, появилась возможность достаточно удовлетворительно фиксировать окончание синтеза ферментов первичного окисления *n*-алкана и начало его окисления.

При исследовании метаболизма двух субстратов, которые могут одновременно окисляться клетками микроорганизмов, используются субстраты, меченные изотопами разных элементов ( $^3\text{H}$  и  $^{14}\text{C}$  или  $^{14}\text{C}$  и  $^{32}\text{P}$ ) либо, крайне редко, различными изотопами одного элемента ( $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{14}\text{C}$  или  $^{31}\text{P}$  и  $^{32}\text{P}$ ) [4]. При изучении метаболизма углерода применим только последний — одновременное использование соединений, меченных радиоактивным и стабильным изотопами углерода, поскольку период полураспада  $^{14}\text{C}$  крайне мал. Однако в этом случае необходимо применение в ком-

плексе радиометрии и масс-спектрометрии.

Цель данной работы определить скорость окисления различных эндогенных углеводных субстратов, синтезированных ранее при использовании клеток одной культуры, и экзогенных субстратов, каждый из которых помечен только одним изотопом  $^{14}\text{C}$ . Была предпринята попытка использовать для этой цели общую теорию метода изотопных индикаторов [5, 6], основанного на явлении изотопного разбавления. В эту теорию введены следующие основные понятия. Немеченый элемент — химический элемент с естественным (природным) изотопным составом; меченый — химический элемент с искусственно измененным изотопным составом. При смешении указанных элементов получается смешанный элемент. Изотопный состав каждого химического элемента (немеченого, меченого и смешанного) характеризуется соответствующими рядами атомных концентраций изотопов данного элемента:

$$A_{a, 1}, A_{a, 2}, \dots, A_{a, n}; A_{b, 1}, A_{b, 2}, \dots, A_{b, n}, A_1, A_2, \dots, A_n,$$

где индекс *b* относится к немеченому эле-

менту, индекс  $a$  — к меченому. Атомные концентрации смешанного элемента  $A_1, A_2, \dots, A_n$  устанавливаются при смешении немеченого и меченого элементов и служат количественным выражением явления изотопного разбавления.

Для определения массы меченого элемента в том случае, когда элемент состоит из двух изотопов, используется формула

$$m_b = m \frac{\delta_2}{\delta_{b,2}}, \quad (1)$$

где  $m_b$  — масса меченого элемента;  $m$  — масса смешанного (общего) элемента;  $\delta_2 = A_2 - A_{a,2}$  и  $\delta_{b,2} = A_{b,2} - A_{a,2}$  так называемые избытки атомных концентраций над атомной концентрацией немеченого элемента; индекс 2 относится к изотопу-индикатору.

В природном углероде, например, содержание  $^{14}\text{C}$  крайне мало, поэтому в немеченом элементе атомная концентрация  $^{14}\text{C}$   $A_{a,2} \ll 0$ , и ею можно пренебречь. Тогда с достаточной точностью запишем

$$m_b = m \frac{A_2}{A_{b,2}} = m \frac{a}{a_0}, \quad (2)$$

где  $a_0$  и  $a$  — удельная активность соответственно меченого и смешанного (общего) элементов.

Таким образом, возможно проводить наблюдение за меченым элементом, обогащенным радиоактивным изотопом  $^{14}\text{C}$ .

Но из общей теории метода изотопных индикаторов [5, 6] вытекает и другое важное следствие: можно приготавливать (например, два меченых углерода, характеризующихся разной удельной активностью) и проследить в принципе бесконечное разнообразие меченых форм одного и того же элемента. Принимая во внимание, что в методе радиоактивных индикаторов мерой атомной концентрации служит значение удельной активности, можно использовать ту же формулу (1) и записать для двух форм меченого элемента

$$m_2 = m \frac{a - a_1}{a_2 - a_1}, \quad (3)$$

где  $m$  — масса смешанного общего элемента;  $m_2$  — масса 2-й формы меченого элемента;  $a_1$  и  $a_2$  — удельная активность соответственно первой и второй форм меченого элемента;  $a$  — удельная активность смешанного элемента.

Для изучения метаболизма углерода в опытах с дрожжами использовали две формы одного и того же углеродного субстрата, в разной степени обогащенные  $^{14}\text{C}$ .

Дрожжи *Candida guilliermondii* выращивали на жидкой минеральной среде в колбах на качалке, как описано ранее [1]. Источником углерода был либо  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -октадекан, либо  $1,2\text{-}^{14}\text{C}$ -уксусная кислота с удельной активностью 5 мк Ки/мл, или немеченый  $n$ -октадекан и уксусная кислота.

В середине логарифмической фазы роста дрожжи отделяли центрифугированием от культуральной жидкости, суспендировали в 0,05 М буфере MES (рН 4,9) и вносили 0,5 мл суспензии, содержащей 12—13 мг

сухих дрожжей, в сосуды Варбурга с 3,5 мл буфера, содержащего 0,6 об. %  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -октадекана, или 0,5 мас. %  $1,2\text{-}^{14}\text{C}$ -уксуснокислого калия, или  $1\text{-}6\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозу различной удельной активности, или 3,5 мл буфера для определения эндогенного дыхания. Все варианты опытов приведены в табл. 1.

Скорость окисления субстратов определяли по выделению покоящимися клетками дрожжей  $\text{C}^*\text{O}_2$  при инкубации в модифицированных сосудах Варбурга по методу, описанному в работе [7]. Эксперименты проводили в 2-кратной биологической и 4-кратной аналитической повторностях. Относительная ошибка аналитических повторностей составляла 8 %. Для расчета массы меченого углерода в  $\text{C}^*\text{O}_2$  в вариантах 1, 2, 4 и 5 использовали формулу

$$m_b = \frac{m_a}{a_0} = \frac{A}{a_0}, \quad (4)$$

где  $A$  — активность образца, расп/мин;  $a_0$  — удельная активность углерода используемого образца, расп·мин $^{-1}$ ·мкг $^{-1}$ С.

Для расчета удельной активности в варианте 3 радиометрическим методом [2] после экстракции липидов по методу [3] было определено содержание  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -октадекана, вносимого в сосуд с дрожжевыми клетками, — эндогенного  $n$ -алкана.

Масса  $n$ -октадекана  $m = 225$  мкг, углерода эндогенного  $n$ -октадекана  $m_a = 195,3$  мкг  $\text{C}^*$ , количество экзогенного  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -октадекана, внесенного в сосуд в качестве субстрата, — 18,9 мкг, или масса меченого углерода экзогенного  $n$ -октадекана  $m_2 = 16,1$  мкг  $\text{C}^*$ .

Для меченого углерода эндогенного  $n$ -октадекана  $a_1 = 22,1$  расп·мин $^{-1}$ ·мкг $^{-1}$ С\*,  $a_2$  экзогенного — 748 расп·мин $^{-1}$ ·мкг $^{-1}$ С\*,  $m = 211,4$  мкг С. В таком случае согласно формуле (3) для углерода смеси

$$a = a_1 + \frac{m_2(a_2 - a_1)}{m} = 22,1 + \frac{16,1(748 - 22,1)}{211,4} + 77,4 \text{ расп·мин}^{-1} \times \times \text{мкг}^{-1}\text{C}. \quad (5)$$

В вариантах 2, 4 и 5 совпадение значений хорошее (табл. 2). В то же время значение массы углерода  $\text{C}^*\text{O}_2$ , полученное с использованием удельной активности, которая вычислена на основании формулы (5), сильно отличается (приблизительно на порядок).

Метод изотопного разбавления предполагает равномерное перемешивание изотопов, входящих в состав различных фондов элемента, или в случае исследования метаболизма существование «фондов равных возможностей». Это означает, что при попытке использовать для расчета удельной активности формулу (5) мы исходили из следующих условий: углерод экзогенного  $n$ -алкана, поступающего из окружающей среды, и углерод эндогенного  $n$ -алкана, находящегося в сорбируемом виде в клетках, могут перемешиваться в клетке или

## Условия опытов

№ варианта	Субстрат выращивания	Удельная активность, мкКи/мл	Субстрат инкубирования	Количество субстрата*	Удельная активность	
					мкКи/мл	расп/мин · мкгС
1	1- <sup>14</sup> С-октадекан	5	Без субстрата	—		22,1
2	То же	5	1- <sup>14</sup> С-октадекан	0,6	5	22,1
3	» »	5	»	0,6	250	77,4 (расч.) 748
4	Октадекан	—	»	0,6	5	22,1
5	»	—	»	0,6	250	748
6	1,2- <sup>14</sup> С-уксуснокислый калий	15	Без субстрата	—		177
7	То же	15	1,2- <sup>14</sup> С-уксуснокислый калий	0,5	15	177
8	» »	15	То же	0,5	200	1084
9	» »	15	1-6- <sup>14</sup> С-глюкоза	0,47	125	2222
10	Уксуснокислый калий	—	»	0,47	125	2222
11	То же	—	1,2- <sup>14</sup> С-уксуснокислый калий	0,5		177
12	» »	—	То же	0,5	200	1084

\* Количество первых пяти субстратов дано в мас. %, остальных — об. %.

использоваться в равной степени, т. е. эндогенный и экзогенный н-алканы окисляются с одинаковой интенсивностью. Несоответствие расчетных и реальных масс углерода CO<sub>2</sub> (табл. 2) свидетельствует о том, что фонды углерода эндогенного и экзогенного н-алканов метаболически неравноценны. Это позволило использовать для расчета массы меченого углерода С\*О<sub>2</sub> в варианте 3 исходную удельную активность экзогенного н-алкана. Такой расчет возможен, поскольку удельная активность углерода эндогенного н-алкана и углерода самих дрожжевых клеток, выращенных на 1-<sup>14</sup>С-октадекане, с удельной активностью 5 мкКи/мл была значительно меньше удельной активности экзогенного 1-<sup>14</sup>С-октадекана (250 мкКи/мл).

Таблица 2

Выделение меченого углерода в форме С\*О<sub>2</sub> при инкубации дрожжей, выращенных на н-алкане, в сосудах Варбурга

№ варианта	С*О <sub>2</sub> , расп/мин · мг · ч	С*О <sub>2</sub> , мкг С*/мг · ч
1	43,8 ÷ 50,6	1,98 ÷ 2,29
2	174 ÷ 175	7,87 ÷ 7,92
3	4819 ÷ 5086	62,2 ÷ 65,7*
		6,44 — 6,80
4	170 ÷ 193	7,69 ÷ 8,73
5	5614 ÷ 6822	7,50 ÷ 9,12

\* Расчетная.

Как видно из данных табл. 2, активность <sup>14</sup>С в выделившемся С\*О<sub>2</sub> за счет эндогенного дыхания (вариант 1) на два порядка меньше активности <sup>14</sup>С в С\*О<sub>2</sub>, выделившемся при инкубации дрожжей, тотально меченных <sup>14</sup>С, по сравнению с 1-<sup>14</sup>С-октадеканом с удельной активностью 250 мкКи/мл (вариант 3).

Следует отметить, что выделение CO<sub>2</sub> в варианте 1 может быть результатом как окисления некоторой части эндогенного н-октадекана, так и деградации биополимеров клетки. Разграничение этих процессов в данном случае при большом содержании эндогенного субстрата не представляется возможным.

Произведенный расчет с использованием исходной удельной активности экзогенного

Таблица 3

Выделение меченого углерода в виде С\*О<sub>2</sub> при инкубировании дрожжей, выращенных на ацетате, в сосудах Варбурга

№ варианта	С*О <sub>2</sub> , расп/мин · мг · ч	С*О <sub>2</sub> , мкг С*/мг · ч
6	286 ÷ 287	1,60 ÷ 1,62
7	1 522 ÷ 1 575	8,6 ÷ 8,9
8	8 455 ÷ 8 780	7,8 ÷ 8,7
9	53 772 ÷ 5 466	24,2 ÷ 24,6
10	47 550 ÷ 47 773	21,4 ÷ 21,5
11	1 380 ÷ 1 469	7,8 ÷ 8,3
12	8 563 ÷ 8 780	7,9 ÷ 8,1

$1\text{-}^{14}\text{C}$ -октадекана ( $a_0 = 748$  расп·мин $^{-1}$  ×  $\times$ мкг $^{-1}$ О\* дал удовлетворительный результат. Разность между полученными таким образом массой меченого углерода в  $\text{C}^*\text{O}_2$  и массой  $\text{C}^*$  в  $\text{C}^*\text{O}_2$  в вариантах 2, 4, 5 находится в пределах погрешности определения.

При использовании в качестве субстрата для выращивания дрожжей калия уксуснокислого, аккумуляция которого в клетках значительно ниже, чем  $n$ -алкана, полученные значения были более близкими (табл. 3).

Проведенное исследование показало, что имеется возможность следить за окислени-

ем эндогенного и экзогенного  $n$ -алканов, проводя исследования по следующей схеме:

1) инкубация дрожжей с меченым субстратом с низкой удельной активностью  $a_1$ ;

2) последующее перенесение клеток в среды, не содержащие углеродный субстрат и содержащие меченый углерод-субстрат с высокой удельной активностью  $a_2$  ( $a_2 \gg a_1$ ); в случае необходимости на среду, содержащую меченый субстрат с удельной активностью  $a_3$ , равной удельной активности исходного субстрата  $a_3 = a_1$  (состояние агрегатное нового субстрата отличается от первоначального).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гололобов А. Д., Давидов Е. Р., Разумов О. Б., Рачинский В. В. Влияние жирных кислот на адаптацию дрожжей к углеводородному типу питания. — Прикл. биохимия и микробиол., 1969, т. 5, № 3, с. 245—250. — 2. Деманова Н. Ф., Давидов Е. Р., Гололобов А. Д. Окисление  $n$ -алканов различной длины углеродной цепи (в диапазоне  $\text{C}_{11}$ — $\text{C}_{25}$ ) дрожжами. — Прикл. биохим. и микробиол., 1980, т. 16, № 1, с. 5—10. — 3. Кейтс М. Техника липидологии.

М.: Мир, 1975, с. 75. — 4. Камен М. Д. Радиоиндикаторные методы в биологии. М.: ИЛ, 1948. — 5. Рачинский В. В. Курс основ атомной техники в сельском хозяйстве. М.: Атомиздат, 1974. — 6. Рачинский В. В., Ленский Л. А. Явление изотопного разбавления и общая теория метода изотопных индикаторов. — Изв. ТСХА, 1977, № 2, с. 199—205. — 7. Dawson P. S. S., Steinhues L. P. — Canad. J. Microbiol., 1977, vol. 23, p. 1689—1693.

*Статья поступила 12 февраля 1981 г.*

## SUMMARY

To develop the general theory of isotopic indicators technique, a modification of the technique with the use of two forms of the labelled element is suggested.

The technique has been verified in studying the oxidation of different organic substrata in the experiment on yeast growing.