

## ОЧИСТКА И СВОЙСТВА КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНОГО ФРАГМЕНТА РАСТВОРИМОЙ НУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТАЗЫ ИЗ ПОЧЕК БЫКА

А. Ф. МАКАРЧИКОВ

*Гродненский государственный аграрный университет, Беларусь;  
e-mail: a\_makarchikov@yahoo.com*

*Из почек быка выделен каталитически активный фрагмент растворимой нуклеозидтрифосфатазы (НТРазы). Процесс очистки состоял из экстракции и 4 стадий колоночной хроматографии. Удельная активность НТРазы – 37,7 Е/мг протеина, степень очистки ~ 236 раз. Каталитический фрагмент НТРазы имеет рН-оптимум 7, проявляет абсолютную зависимость от катионов двухвалентных металлов и специфичность по отношению к ИТР, ГТР, УТР и ХТР; нуклеозиддифосфаты, АТР, СТР и ИМР не являются субстратами. Значения кажущихся  $K_m$  для Mg–ИТР, Mg–ГТР и Mg–УТР-комплексов рассчитаны графическим методом в координатах Хейнса и соответственно равны 1,70 мМ, 0,93 мМ и 0,48 мМ. По данным гель-фильтрации и электрофореза в ПААГ в присутствии DSNa каталитически активный фрагмент НТРазы состоит из двух одинаковых полипептидных цепей и имеет  $M_m$  54,7 кДа. Полученные результаты свидетельствуют о том, что растворимая НТРаза из почек быка состоит из каталитических и регуляторных структурных единиц.*

*Ключевые слова: нуклеозидтрифосфатаза, каталитический фрагмент, молекулярная масса, кинетические свойства.*

**Н**уклеозидтрифосфатаза (3.6.1.15) объединяет гетерогенную группу энзимов прокариотного, эукариотного и вирусного происхождения, способных катализировать гидролиз нуклеозидтри(ди)фосфатов. В настоящее время в базе данных BRENDA [1] содержится информация о свойствах более двух десятков НТРаз. Протеины с НТРазной активностью вовлечены в различные процессы жизнедеятельности, включая клеточную подвижность, экспрессию генов, репликацию, рекомбинацию и репарацию ДНК, деградацию протеинов, элиминацию токсичных эндогенных метаболитов нуклеотидов, обеспечивают осуществление репликационных циклов вирусов и др. Функции многих НТРаз остаются неизвестными.

Ранее в почках быка (*Bos taurus*) нами была обнаружена растворимая НТРаза с  $M_m$  146 кДа [2], представляющая собой аллостерический энзим, активность которого существенно изменяется под действием фи-

зиологических концентраций фруктозо-1,6-дифосфата, пирофосфата и АТР. Такие характеристики, как субстратная специфичность, тканевое распределение и субклеточная локализация, наряду с регуляторными свойствами этой НТРазы, дают основания полагать, что ее метаболическая роль может заключаться в регуляции скорости глюконеогенеза у жвачных животных [3, 4]. Предварительные эксперименты показали, что при экстракции из ткани буферным раствором, содержащим ДТТ, энзим распадается с высвобождением компонента, сохраняющего активность. Цель настоящей работы заключалась в выделении, очистке и исследовании субстратной специфичности и кинетических свойств каталитически активного фрагмента растворимой НТРазы из почек быка.

### Материалы и методы

В работе использованы ДЭАЭ-тойоперл 650 М, тойоперл HW-60 (Toyo Soda Co., Япо-

---

**Сокращения:** БСА – бычий сывороточный альбумин, ЧСА – человеческий сывороточный альбумин, DSNa – додецилсульфат натрия, ДТТ – дитиотреитол, ИМР – инозин-5'-монофосфат, ИДФ – инозин-5'-дифосфат, ИТР – инозин-5'-трифосфат,  $K_d$  – константа диссоциации,  $K_m$  – константа Михаэлиса, НТР – нуклеозид-5'-трифосфат, НТРаза – нуклеозидтрифосфатаза, ПААГ – полиакриламидный гель,  $P_i$  – неорганический фосфат, ХТР – ксантозин-5'-трифосфат, ЭДТА – этилендиаминтетраацетат, ДЭАЭ-тойоперл – диэтиламиноэтил-тойоперл.

ния); гидроксиапатит (Fluka, Швейцария); сефакрил S-200, сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция); нуклеозид-5'-фосфаты, БСА, реагенты для электрофореза (Sigma, США), протеины-стандарты (Serva, Германия). Все остальные реагенты производства «Реахим» (Россия) квалификации чда и хч.

НТРазную активность определяли по скорости образования  $P_i$ . Стандартная реакционная смесь включала 25 мМ трис-25 мМ малеатный буфер, pH 7,0, 0,5 мМ ИТР, 5 мМ  $MgCl_2$ , 50 мкг БСА и образец энзима в конечном объеме 0,5 мл. Реакцию проводили 10–60 мин при 37 °С, останавливали, добавляя 3 мл реагента для определения  $P_i$  [5], и измеряли светопоглощение при 318 нм. Количество образующегося в реакции  $P_i$  рассчитывали по калибровочному графику. За единицу активности (Е) принимали количество энзима, катализирующее образование 1 мкмоль  $P_i$  за 1 мин.

Электрофорез денатурированного протеина осуществляли в вертикальной пластинке (115×55×1 мм) 10%-го ПААГ в присутствии DSNa в фосфатной буферной системе [6]. Значения молекулярной массы рассчитывали по калибровочному графику, построенному в координатах: длина пути – lg Мм. В качестве протеинов-стандартов использовали гемоглобин (Мм субъединицы 15,5 кДа),  $\alpha$ -химотрипсиноген (25,7 кДа), лактатдегидрогеназа (Мм субъединицы 35 кДа), овальбумин (45 кДа), пируваткиназа (Мм субъединицы 57 кДа), ЧСА (67,5 кДа). Нативный электрофорез проводили в трубочках ( $\varnothing$  6×100 мм) с 7%-ым ПААГ [7]. Для визуализации протеиновых полос гели окрашивали раствором кумасси бриллиантового голубого R-250.

Молекулярную массу нативного протеина определяли на колонке с сефакрилом S-200 ( $\varnothing$  2,2×46 см). Хроматографию проводили в 20 мМ трис-НСІ буфере (pH 7,4), содержащем 0,1 М NaCl при скорости потока 5 см/ч. Для построения калибровочного графика использовали протеины-маркеры: цитохром с (12,4 кДа), миоглобин (17,8 кДа),  $\alpha$ -химотрипсиноген (25,7 кДа), овальбумин (45 кДа), ЧСА (67,5 кДа), лактатдегидрогеназу (135 кДа), пируваткиназу (228 кДа). Локализацию каталитически активного фрагмента НТРазы в элюируемых фракциях устанавливали, измеряя энзиматическую активность. Значения молекулярной массы рассчитывали в координатах  $lgMm - lgV_e/V_0$ .

Концентрацию протеина в пробах находили по поглощению при 280 нм или методом Брэдфорд [8] с БСА в качестве стандарта.

Эксперименты проводили в 2–3 повторностях. При графическом анализе данных, требующем построения прямых, рассчитывали уравнения линейной регрессии по методу наименьших квадратов с использованием программы Microsoft Excel.

## Результаты и обсуждение

Для выделения субъединицы НТРазы 500 г почек быка гомогенизировали в 1,25 л 20 мМ трис-НСІ-буфера (pH 7,5), содержащего 0,15 М KCl, 1 мМ ЭДТА и 5 мМ DTT, в размельчителе тканей РТ-1 в течение 2 мин при 4000 об./мин. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 5000 g, полученный экстракт фильтровали через 16 слоев марли. Разработанная нами схема очистки включает 4 стадии.

*Стадия 1. Гидрофобная хроматография.* К экстракту добавляли кристаллический сульфат аммония до 35%-го насыщения раствора (208,4 г/л), через 30 мин осадок отделяли центрифугированием (60 мин, 5000 g) и отбрасывали, надосадочную жидкость пропускали через колонку ( $\varnothing$  4,8×18 см) с тойоперлом НW-60, уравновешенную 20 мМ трис-НСІ-буфером (pH 7,5), содержащим 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА 5 мМ DTT и 35%-й сульфат аммония. После промывки колонки, адсорбированные протеины элюировали понижающимся линейным градиентом сульфата аммония (35–0% насыщения, по 300 мл в каждой камере) со скоростью 60 мл/ч, собирая фракции по 5,7 мл; при этом на хроматограмме были выявлены два пика НТРазной активности. Фракции второго пика объединяли и высаливали сульфатом аммония при насыщении 60% (162,5 г/л).

*Стадия 2. Гель-фильтрация.* Полученный осадок растворяли в 20 мМ трис-НСІ буфере (pH 7,5), содержащем 50 мМ NaCl, 0,2 мМ ЭДТА, 5 мМ DTT, и хроматографировали на колонке ( $\varnothing$  4,5×44 см) с сефакрилом S-200 в том же буфере со скоростью 90 мл/ч, собирая фракции по 5,5 мл. Фракции, в которых удельная активность возрастала в 1,6–2 раза, объединяли и использовали для дальнейшей очистки.

*Стадия 3. Анионообменная хроматография.* Раствор энзима наносили на колонку ( $\varnothing$  1,6×15 см) с ДЭАЭ-тойоперлом 650М, уравновешенную вышеупомянутым буферным раствором. Колонку отмывали от несвязавшихся протеинов и осуществляли элюцию НТРазы линейным градиентом KCl от 50 до 400 мМ (по 150 мл в каждой камере) со скоростью потока 20 мл/ч. Объем фракций – 3 мл. Фракции с удельной НТРазной активностью 9–17 Е/мг объединяли.

*Стадия 4. Адсорбционная хроматография.* На заключительном этапе очистки объединенные фракции пропускали через колонку (Ø 1,6×15 см) с гидроксипатитом, уравновешенную 20 мМ К-фосфатным буфером (рН 7,2), содержащим 5 мМ ДТТ. После промывки колонки десорбцию протеина проводили линейным градиентом К-фосфатного буфера от 20 мМ до 250 мМ (по 50 мл в каждой камере) со скоростью 12 мл/ч, собирая фракции объемом 1 мл. Как показано на рис. 1, в элюате присутствовал один пик НТРазной активности, совпадающий с основным протеиновым пиком; при этом удельная активность во всех исследованных фракциях находилась приблизительно на одинаковом уровне.

Результаты очистки приведены в табл. 1. Удельная активность полученного препарата составила 37,7 Е/мг протеина, что в ~236 раз выше по сравнению с экстрактом.

При анализе результатов очистки, обращает на себя внимание большая потеря активности в процессе гидрофобной хроматографии (стадия 1, тойоперл HW-60). Основная причина этого – недостаточная эффективность центрифугирования. Экстракт, полученный в заданном режиме седиментации (5000 g, 60 мин), содержит большое количество мелких частиц разрушенной ткани, в которых локализованы мембраносвязанные ферменты с активностью НТРазы. Приблизительно 80% НТРазной активности удаляется при высаливании экстракта сульфатом аммония (35% насыщения) и еще ~ 14% – в процессе элюции адсорбированных на носителе протеинов. В связи с этим следует отметить, что при дифференциальном центрифугировании гомогената почек быка в цитозольной фракции обнаруживается лишь 20% общей НТРазной активности [3], т. е. на долю растворимой НТРазы приходится 1/5 часть активности фермента, содержащегося в ткани почек. Из табл. 1 видно, что самым эффективным этапом в предложенной нами схеме

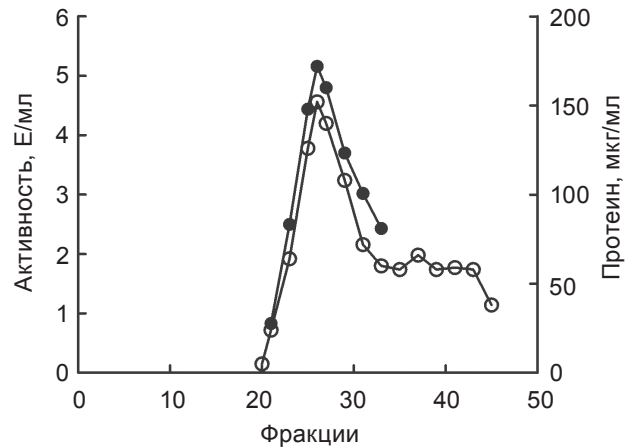


Рис. 1. Хроматография каталитически активного фрагмента растворимой НТРазы из почек быка на колонке с гидроксипатитом: ● – энзиматическая активность, ○ – концентрация протеина

очистки является ионообменная хроматография, после которой удельная НТРазная активность препарата возрастает по сравнению с предыдущей стадией в 20 раз. Выход очищенного каталитического фрагмента НТРазы по активности составляет 0,83%. Для удаления фосфат-ионов протеин хроматографировали на колонке (Ø 1,2×14 см) с сефадексом G-25 в 20 мМ трис-НСl буфере (рН 7,5), содержащем 50 мМ NaCl и 0,2 мМ ЭДТА.

При диск-электрофорезе нативного фермента выявлены 3 протеиновые полосы: интенсивная полоса с относительной подвижностью 0,83, слабоокрашенная – с относительной подвижностью 0,77 и диффузная зона с низкой интенсивностью окраски, подвижность которой составляет 0,64–0,68. Таким образом, результаты хроматографии на гидроксипатите (рис. 1) и диск-электрофореза позволяют говорить о высокой степени чистоты полученного препарата.

Таблица 1. Очистка каталитически активного фрагмента растворимой НТРазы из почек быка

Фракция	Объем, мл	Общий протеин, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки, раз
Экстракт	1300	17160	2779,9	0,16	-
Тойоперл HW-60	62,5	440	162,8	0,37	2,3
Сефакрил S-200	40,0	95,2	62,1	0,65	4,1
ДЭАЭ-тойоперл 650М	15,5	3,4	45,9	13,5	84,4
Гидроксипатит	6	0,61	23,0	37,7	235,6

Обычный методический подход, применяемый в исследованиях стехиометрического состава олигомерных энзимов, заключается в анализе молекулярных масс интактного протеина и полипептидных цепей, высвобождающихся в результате его денатурации [9]. С целью определения молекулярной массы интактного каталитически активного фрагмента НТРазы нами использовался метод гель-фильтрации. Как показали результаты хроматографии на колонке ( $\varnothing$  2,2×46 см) с сефакрилом S-200, молекулярная масса очищенного протеина равняется  $54,7 \pm 0,6$  кДа. Определение молекулярных масс полипептидных цепей протеина, содержащихся в препарате, осуществляли методом электрофореза денатурированного протеина в пластинке ПААГ в присутствии DSNa [6]. После окрашивания геля обнаружены 4 полосы, соответствующие Мм 28, 37, 41 и 45 кДа. Эти данные указывают на то, что растворимая НТРаза из почек быка содержит в своем составе каталитически активный фрагмент, построенный из двух одинаковых полипептидных цепей с Мм  $\approx 28$  кДа.

Влияние ионов водорода на активность каталитического фрагмента НТРазы исследовали в интервале рН 5,0–9,5 с ИТР в качестве субстрата, используя ацетатный (20 мМ, рН 5,0–5,5), малеатный (25 мМ, рН 6,0–6,5), трис-малеатный (50 мМ, рН 7,0), трис-НСl (50 мМ, рН 7,5–9,0) и глициновый (50 мМ, рН 9,5) буфер (рис. 2). На графике видно, что каталитический фрагмент НТРазы максимально активен при рН 7,0, т. е. в области физиологических значений водородного показателя. Следует отметить, что аутентичный энзим, выделенный из почек быка, имеет такой же оптимум рН, но несколько иную форму рН-зависимости [3].

Общий классификационный признак НТРаз состоит в их групповой субстратной специфичности к нуклеозидтри(ди)фосфатам. В исследованиях различных НТРаз из тканей животных, растений и бактерий было показано, что предпочтительным субстратом для большинства энзимов этой группы является АТР [10–17]. В то же время, растворимая НТРаза из почек быка проявляет специфичность к ГТР, УТР и ИТР, но неспособна к эффективному гидролизу АТР; СТР, нуклеозидди- и монофосфаты также не являются субстратами этого энзима [3]. Аналогичная специфичность характерна и для каталитического фрагмента НТРазы (табл. 2). Из данных, представленных в табл. 2, следует, что каталитический фрагмент НТРазы способен осуществлять гидролиз как пуриновых (ГТР, ХТР, ИТР), так и пири-

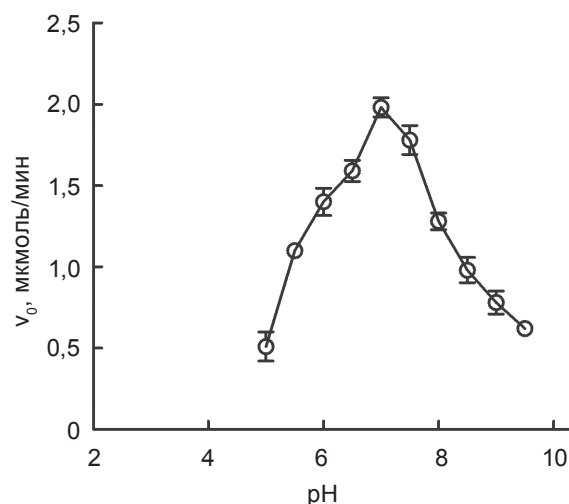


Рис. 2. Влияние рН на активность каталитического фрагмента НТРазы

мидиновых (УТР) нуклеозид-5'-трифосфатов. При этом главным условием, определяющим специфичность энзима, по-видимому, является наличие С-6 и С-4 карбонильной группы соответственно в пуриновом и пиримидиновом основании молекулы субстрата.

Каталитический фрагмент НТРазы не проявляет активность (с 1 мМ ИТР в качестве субстрата) в отсутствие ионов двухвалентных металлов. Как показано в табл. 3, среди исследованных катионов максимальным активирующим действием обладает  $Mn^{2+}$ , менее эффективны  $Mg^{2+}$  (на 18%) и  $Ca^{2+}$  (на 25%); с небольшой скоростью гидролиз ИТР также осуществляется при добавлении в реакционную смесь  $Co^{2+}$  (35% от активности) и  $Mn^{2+}$ . Такие катионы, как  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  и  $Ba^{2+}$ , неспособны к активации энзима.

Хотя  $Mn^{2+}$  наиболее эффективен в качестве активатора каталитического фрагмента НТРазы, в условиях клетки он, как и  $Ca^{2+}$ , и  $Co^{2+}$ , по-видимому, не оказывает действия на энзим. Известно, что фосфатсодержащие соединения формируют стабильные комплексы с

Таблица 2. Субстратная специфичность каталитического фрагмента НТРазы из почек быка

Субстрат, 1 мМ	$v$ , мкмоль/мин
ИТР	$3,38 \pm 0,17$
ГТР	$2,48 \pm 0,40$
УТР	$2,37 \pm 0,08$
ХТР	$0,77 \pm 0,02$

Таблица 3. Влияние ионов металлов на активность каталитического фрагмента НТРазаы из почек быка

Катион металла, 5 мМ	v, мкмоль/мин
Без металла	0
Mn <sup>2+</sup>	4,49 ± 0,32
Mg <sup>2+</sup>	3,68 ± 0,31
Ca <sup>2+</sup>	3,36 ± 0,06
Co <sup>2+</sup>	1,55 ± 0,09

ионами двухзарядных металлов в нейтральной и щелочной среде, когда фосфатные группы частично или полностью ионизированы. В количественном отношении внутриклеточная концентрация Mg<sup>2+</sup> намного превосходит концентрации других двухвалентных металлов. Так, в большинстве клеток млекопитающих общая концентрация Mg<sup>2+</sup> составляет 14–20 мМ; концентрация свободных Mg<sup>2+</sup>, присутствующих в цитозоле, при этом поддерживается на уровне 0,5–1 мМ [18]. В то же время, например, в клетках печени крысы общие концентрации Ca<sup>2+</sup> и Mn<sup>2+</sup> ниже в 10 и 500 раз (1,6 мМ и 0,034 мМ) соответственно, а концентрация свободных ионов этих металлов – величина порядка 0,2–0,8 мкМ [19, 20]. Поэтому АТР и другие НТР находятся в клетке преимущественно в виде комплексов с Mg<sup>2+</sup>, и именно такие комплексы служат субстратами многих ферментов [21]. Исходя из сказанного, мы про-

вели оценку влияния концентраций ИТР, ГТР и УТР на активность каталитического фрагмента НТРазаы в присутствии катионов Mg<sup>2+</sup> (5 мМ), учитывая возможность комплексообразования. При расчете концентраций Mg–НТР-комплексов использовали значения K<sub>d</sub> из работы [22]: 36,3 мкМ, 32,4 мкМ и 37,2 мкМ соответственно для ИТР, ГТР и УТР. Концентрации рассчитывали, решая квадратное уравнение

$$C^2 - (M_t + S_t + K_d)C + M_t S_t = 0,$$

где C – концентрация комплекса Mg–НТР, M<sub>t</sub> – общая концентрация металла, S<sub>t</sub> – общая концентрация субстрата. На рис. 3 (А) изображен график зависимости скорости реакции от концентрации Mg–ИТР комплекса, представляющий собой гиперболическую кривую в диапазоне 0–1,5 мМ; при более высоких концентрациях Mg–ИТР наблюдается частичное ингибирование фермента. Кажущаяся K<sub>m</sub> для Mg–ИТР, рассчитанная в координатах Хейнса, составляет 1,7 ± 0,1 мМ (рис. 3, Б). Это значение в 2,3 раза выше величины кажущейся K<sub>m</sub> аутентичной НТРазаы [3].

В экспериментах с УТР наблюдается сходная зависимость V<sub>0</sub> от [S]: гиперболическая форма кривой насыщения в области концентраций 0–1 мМ и частичное ингибирование при более высоких концентрациях субстрата. Кажущаяся K<sub>m</sub> для Mg–УТР-комплекса, рассчитанная по линейному участку графика Хейнса, составляет 0,48 ± 0,02 мМ. Вместе с тем, в случае ГТР реакция подчиняется кинетике

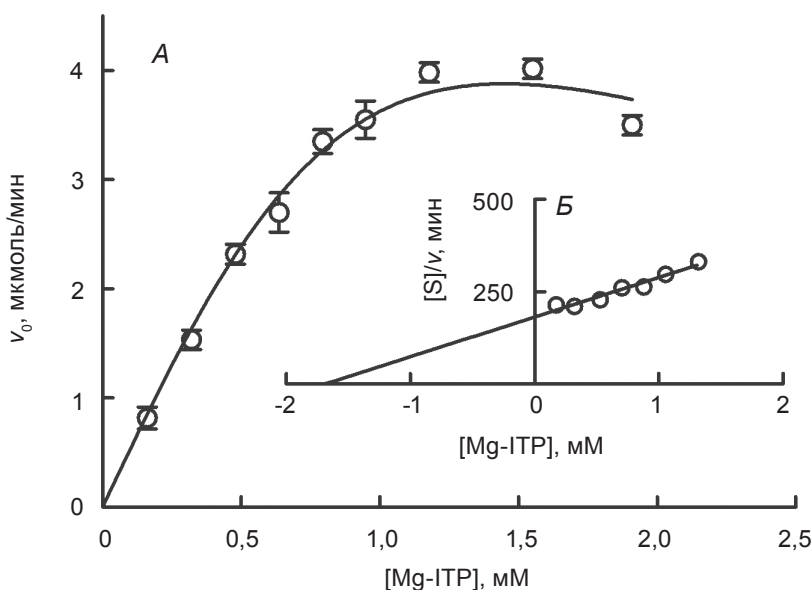


Рис. 3. А. Зависимость активности каталитического фрагмента НТРазаы от концентрации Mg–ИТР-комплекса. Б – то же в координатах Хейнса

тике Михаэлиса–Ментен во всем исследованном диапазоне концентраций субстрата, при этом значение кажущейся  $K_m$  для Mg–GTP-комплекса равна  $0,93 \pm 0,06$  мМ (графики не представлены). Очевидно, что истинным субстратом каталитического фрагмента НТРазы из почек быка служит комплекс Me–NTP, так как в заданных условиях определения активности (при фиксированной 5 мМ концентрации  $Mg^{2+}$ ) концентрации свободных NTP в реакционной системе составляют всего лишь 0,002–0,030 мМ.

Таким образом, результаты настоящего исследования показывают, что при обработке ДТТ в неденатурирующих условиях растворимая НТРаза из почек быка распадается, высвобождая каталитически активный фрагмент с Мм 54,7 кДа, построенный из двух полипептидных цепей с одинаковой Мм ( $\approx 28$  кДа). В общих чертах этот фрагмент проявляет свойства, присущие аутентичной НТРаза: максимум активности при pH 7,0, специфичность к ИТР, ГТР и УТР, абсолютную зависимость от ионов двухвалентных металлов. Вместе с тем, для каталитического фрагмента характерен видоизмененный pH-профиль, а также более низкое кажущееся сродство к субстрату. С учетом того, что НТРаза из почек быка является регуляторным энзимом [3, 4], полученные результаты позволяют предположить, что этот протеин построен из двух типов структурных единиц – каталитических и регуляторных.

### ОЧИСТКА І ВЛАСТИВОСТІ КАТАЛІТИЧНО АКТИВНОГО ФРАГМЕНТА РОЗЧИННОЇ НУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТАЗИ З НИРОК БИКА

*О. Ф. Макаричюков*

Гродненський державний аграрний університет, Білорусь;  
e-mail: a\_makarchikov@yahoo.com

Із нирок бика одержано каталітично активний фрагмент розчинної нуклеозидтрифосфатази (НТРази). Очистка складалася з екстракції та 4 стадій колоночної хроматографії. Питома активність НТРази дорівнювала 37,7 Е/мг протеїну, ступінь очистки  $\sim 236$  разів. Каталітичний фрагмент НТРази (pH-оптимум – 7,0) виявляє абсолютну залежність від катіонів дво валентних металів і специфічність відносно ИТР, ГТР, УТР та ХТР; нуклеозиддифосфати, АТР, СТР і ІМР не є субстратами. Значення уявних  $K_m$  для

Mg–ИТР-, Mg–ГТР- та Mg–ИТР-комплексів розраховані графічним методом у координатах Хейнса і дорівнюють 1,70; 0,93 та 0,48 мМ відповідно.

За даними гель-фільтрації та електрофорузу в ПААГ у присутності DSNa каталітично активний фрагмент НТРази складається з двох однакових поліпептидних ланцюгів з Мм 54,7 кДа. Одержані результати свідчать про те, що розчинна НТРаза з нирок бика складається з каталітичних і регуляторних структурних одиниць.

**Ключові слова:** нуклеотидтрифосфатаза, каталітичний фрагмент, молекулярна маса, кінетичні властивості.

### PURIFICATION AND PROPERTIES OF A CATALYTICALLY ACTIVE FRAGMENT OF SOLUBLE NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATASE FROM BOVINE KIDNEY

*A. F. Makarchikov*

Grodno State Agricultural University, Belarus;  
e-mail: a\_makarchikov@yahoo.com

A catalytic fragment of soluble NTPase has been isolated from bovine kidneys. The 236-fold purification was carried out to obtain the preparation with a specific activity of 37.7 U/mg of protein. The purification scheme included the enzyme extraction followed by four column chromatography steps. The catalytic fragment was activated with divalent metal ions, had a pH optimum of 7.0, and possessed specificity for ИТР, ГТР, УТР and ХТР. The apparent  $K_m$  for Mg–ИТР, Mg–ГТР and Mg–УТР complexes were calculated from Hanes plots to be 1.70 mM, 0.93 mM and 0.48 mM, respectively. As estimated by gel filtration and SDS-PAAGE, the catalytic fragment has Mw 54.7 kDa being composed of two identical polypeptide chains. Our results suppose soluble NTPase from bovine kidney to consist of regulatory and catalytic structural units.

**Key words:** nucleoside triphosphatase, catalytic fragment, molecular weight, kinetic properties.

1. *BRENDA*. The Comprehensive Enzyme Information System [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.brenda-enzymes.info>.
2. *Makarchikov A. F., Chernikevich I. P.* // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1998. – **46**. – P. 115–123.

3. Makarchikov A. F. // J. Biochem. Mol. Biol. Biophys. – 2001. – 5. – P. 525–531.
4. Русина И. М., Макарович А. Ф., Лукашенко Ю. А. // Вестник ГрГУ. – 2011. – Сер. 5, № 1. – С. 128–133.
5. Sapru M. K., Geetha H., Taranath S. K. // Ind. J. Biochem. Biophys. – 1987. – 24. – P. 340–343.
6. Weber K., Osborn M. // J. Biol. Chem. – 1969. – 244. – P. 4406–4412.
7. Davis B. J. // Ann. NY Acad. Sci. – 1964. – 121. – P. 404–427.
8. Bradford M. M. // Anal. Biochem. – 1976. – 72. – P. 248–254.
9. Практическая химия белка: Пер. с англ. / Под ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989. – 623 с.
10. Agutter P. S., Cockrill J. B., Lavine J. E. et al. // Biochem. J. – 1979. – 181. – P. 647–658.
11. Lewis M., Weissman S. // Arch. Biochem. Biophys. – 1965. – 109. – P. 490–498.
12. Нарыжный С. Н., Крутяков В. М. // Биохимия. – 1982. – 47. – С. 569–574.
13. Dalhmann N., Kirchgesser M. // Biochem. Int. – 1990. – 20. – P. 317–327.
14. Williams M. V. // Enzyme. – 1984. – 32. – P. 201–207.
15. McCarty D. R., Selman B. R. // Arch. Biochem. Biophys. – 1986. – 248. – P. 523–531.
16. Mukherjee J., Biswas S. // Indian J. Biochem. Biophys. – 1980. – 17. – P. 452–456.
17. Nishimune T., Ito S., Abe M. et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – 923. – P. 74–82.
18. Romani A. // Arch. Biochem. Biophys. – 2011. – 512. – P. 1–23.
19. Ash D. E., Schramm V. L. // J. Biol. Chem. – 1982. – 257. – P. 9261–9264.
20. Metzler D. E. Biochemistry. The chemical reactions of living cells. Harcourt/Academic Press. – 2001. – V. 1. – 937 p.
21. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир. – 1982. – 2. – 515 с.
22. Smith R. M., Martell A. E., Chen Y. // Pure Appl. Chem. – 1991. – 63. – P. 1015–1080.

Получено 26.12.2012