

BIOCHEMICZNE I IMMUNOLOGICZNE WŁAŚCIWOŚCI 5'-NUKLEOTYDAZY PLAZMY NASIENIA TRYKA I BUHAJA

Jerzy Strzeżek, Aleksander Wołos

Instytut Fizjologii i Biochemii Zwierząt
Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie
Dyrektor: prof. dr Wacław Minakowski

Tempo biosyntezy i degradacji kwasów nukleinowych i nukleotydów w procesie spermatogenezy oraz procesach dojrzewania i reSORpcji plemników w najądrzu, jak i w przypadkach rozpadu uszkodzonych główek plemników po ejakulacji, wiąże się z obecnością w tkankach i płynach męskiego narządu płciowego enzymów nukleolitycznych typu DNA [14], RNA [2, 8] i nukleotydz [1, 7, 9]. Enzymy te chronią zapewne komórki płciowe przed dopływem obcego materiału genetycznego.

Aktywność 5'-nukleotyduzy w plazmie nasienia jest wyższa od aktywności pozostałych nukleaz. Pionierskie badania, dotyczące właściwości enzymu w nasieniu zwierząt, zapoczątkowali Heppel i Hilmoie [7], izolując 5'-nukleotyduzę z plazmy nasienia buhaja. Tym niemniej, do chwili obecnej brak jest badań w aspekcie gatunkowych różnic właściwości biochemicznych i immunologicznych tego enzymu.

Celem pracy było porównanie właściwości 5'-nukleotyduzy izolowanej z plazmy nasienia tryka i buhaja.

MATERIAŁ I METODY

Nasienie tryka i buhaja, otrzymane na sztuczną pochwę, o dobrej koncentracji i ruchliwości plemników odwirowywano w ciągu 15 min przy 13 000 obrotów/minutę. Plazmę nasienia zlewano znad osadu plemników i przechowywano do czasu izolacji w temp. 253°K. Izolacji 5'-nukleotyduzy dokonano według metody Heppela i Hilmoie [7], z pewnymi modyfikacjami własnymi.

Aktywność enzymu oznaczano wg przyrostu ilości nieorganicznego fosforu w inkubowanych próbach w temp. 310°K i wyrażano w μ molach

fosforu uwolnionego podczas 15-minutowej inkubacji na mg białka dla enzymu tryka, zaś dla 5'-nukleotydyazy plazmy buhaja podczas 15-minutowego i 5-minutowego okresu inkubacji. Fosfor nieorganiczny oznaczano według metody Fiske i Subbarowa [4], zaś białko ogólne metodą Wiechselbauma [15]. Do oznaczania aktywności 5'-nukleotydyazy użyto następujących substratów: 5'-AMP (Koch—Light), 5'-dAMP, 5'-dCMP, 5'-GMP, 5'-UMP, 5'-TMP (Calbiochem AG), ATP (Ośrodek Naukowo-Badawczy, Łódź), *beta*-glicerofosforan (Sigma).

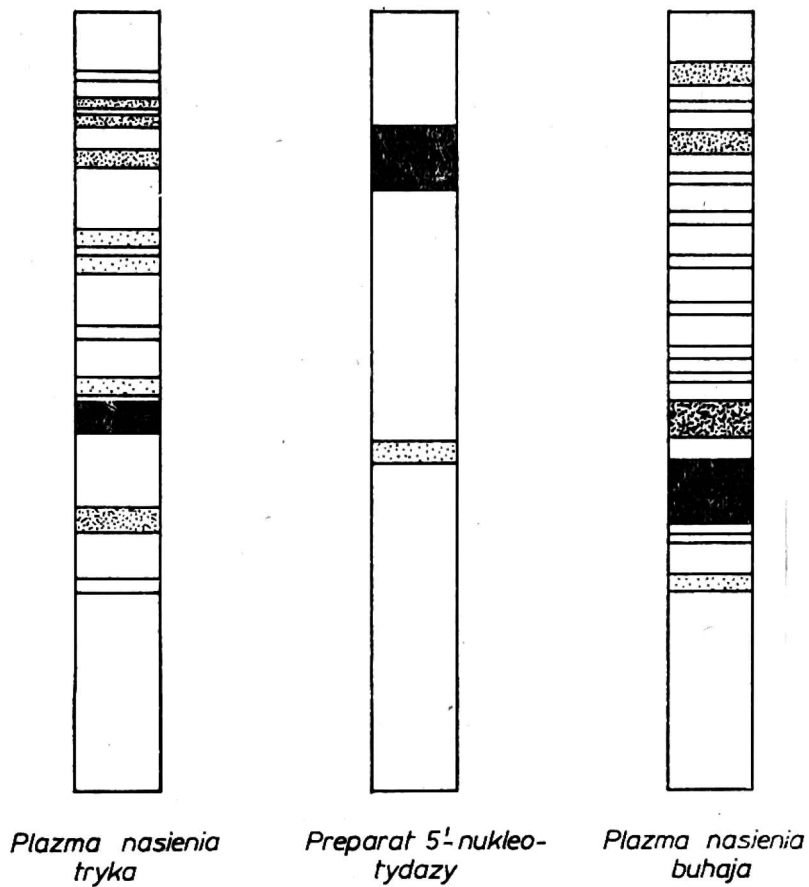
Rozdziałów elektroforetycznych izolowanych preparatów enzymu dokonano na żelu poliakrylamidowym wg metody Ornsteina [12] i Daviesa [3]. Ciężar molekularny określono metodą cienkowarstwowej chromatografii na żelu Sephadex G-200 Superfine wg instrukcji firmy Pharmacia, stosując następujące białka standardowe: cytochrom c (Fluka—Buchs), albuminę surowicy bydłowej (BDH, Anglia), kazeinę (BDH, Anglia), trypsynę (Bacto—Difco). Hydrolizaty izolowanych preparatów enzymu uzyskano wg ogólnie przyjętych zasad, zaś skład aminokwasowy określono metodą wysokonapięciowej elektrochromatografii [10].

Surowice odpornościowe wobec 5'-nukleotydyazy otrzymano, stosując schemat immunizacji podany przez Huntera i Hafsa [6]. Do badań immunologicznych zastosowano metodę podwójnej dyfuzji żelowej wg Ouchterlony oraz metodę immunoelektroforezy na żelu poliakrylamidowym [11]. Dokonano również obserwacji wpływu surowic odpornościowych na aktywność 5'-nukleotydyazy plazmy nasienia tryka i buhaja. Przeprowadzono wstępnie obserwacje sezonowych zmian aktywności enzymu w plazmie.

WYNIKI

Aktywności specyficzne uzyskanych preparatów 5'-nukleotydyazy, oznaczone przy pH = 8,5 i w obecności jonów magnezu, wskazują na różny stopień ich oczyszczenia. Mianowicie, aktywność enzymu plazmy buhaja była prawie 100-krotnie wyższa, zaś z plazmy tryka tylko 9-krotnie wyższa, w porównaniu do aktywności wyjściowej 5'-nukleotydyazy plazmy nasienia oznaczanej wobec 5'-AMP. Żaden z preparatów nie wykazywał istotnej aktywności fosfatazy zasadowej oznaczonej wobec *beta*-glicerofosforanu.

W rozdziałach na żelu poliakrylamidowym oba preparaty 5'-nukleotydyazy wykazywały obecność dużej frakcji w obrębie *gamma*-globulin oraz o mniejszym stężeniu w obrębie *alfa*-globulin (rys. 1). Frakcje te różniły się jednak ciężarem molekularnym. Ciężar molekularny głównej frakcji enzymu plazmy nasienia buhaja wynosił około 220 000, zaś tryka około 110 000. Frakcja druga posiadała ciężar molekularny odpowiednio: 110 000



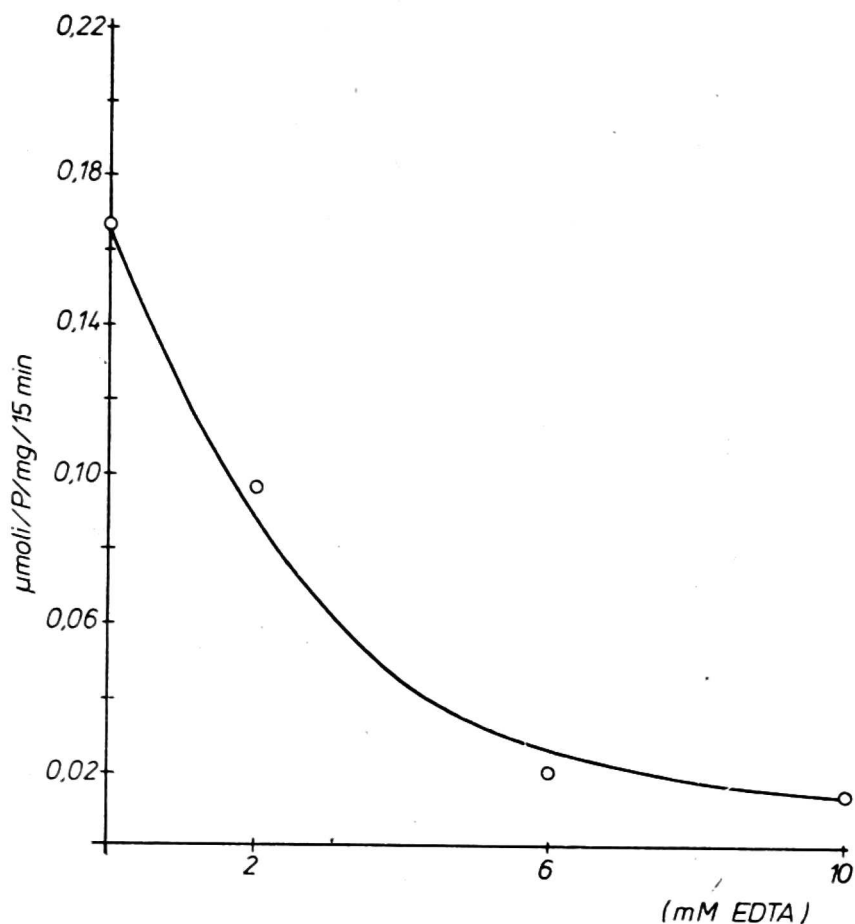
Rys. 1. Elektroforetyczny rozdział w żelu poliakrylamidowym białek plazmy nasienia tryka i buhaja oraz preparatu 5'-nukleotydyazy

i 50 000. Nie stwierdzono istotnych różnic w składzie aminokwasowym obu preparatów. Dominowały: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, lizyna, arginina, glicyna, alanina oraz leucyna i izoleucyna. Nieznaczące różnice dotyczyły alaniny (większa zawartość w preparacie tryka) oraz glicyny (dominuje w preparacie buhaja). Stwierdzono również obecność cystyny i metioniny.

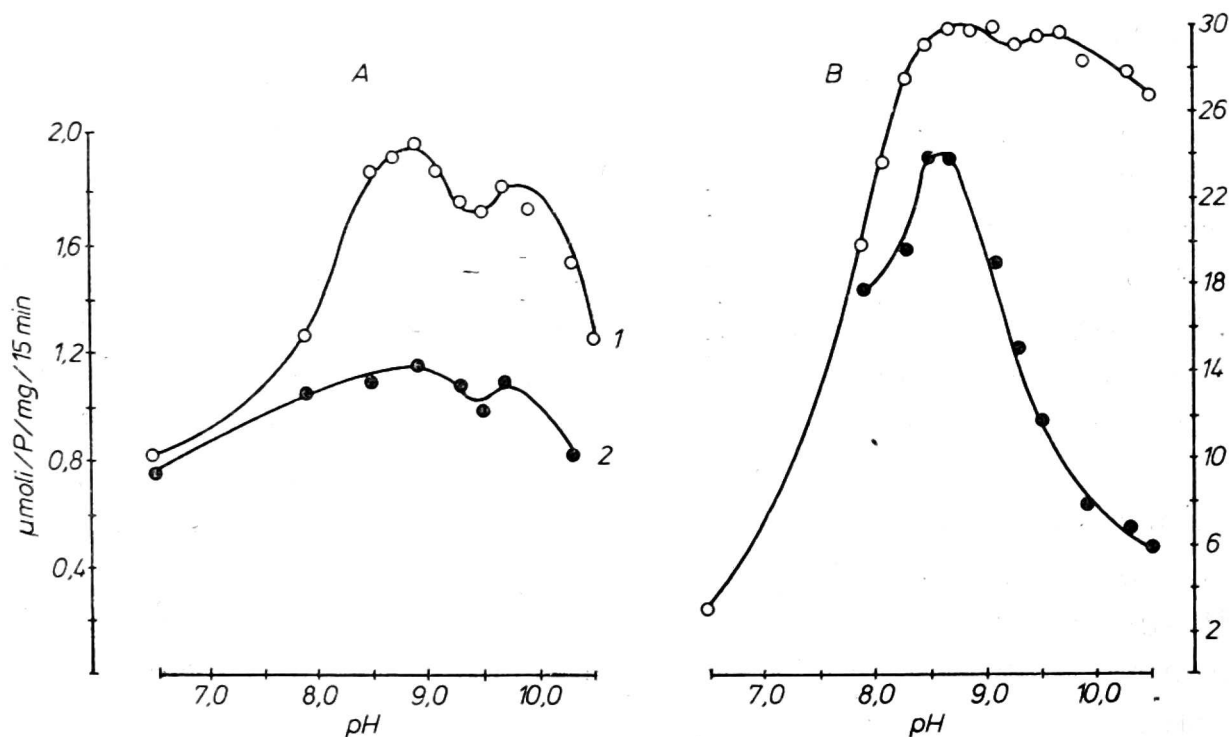
Tak jak prawie wszystkie fosfatazy, zarówno 5'-nukleotydaza plazmy nasienia tryka jak i buhaja jest aktywowana jonami Mg^{++} . Na rysunku 2 przedstawiono wpływ EDTA (czynnik chelatujący jony magnezowe) na aktywność 5'-nukleotydyazy w plazmie buhaja. Już 2 mM stężenie EDTA w inkubowanej próbce spowodowało obniżenie aktywności enzymu o 40%, zaś 6 mM stężenie obniżyło te aktywności o 89% (w porównaniu z próbkami bez EDTA).

Rysunek 3 przedstawia wpływ pH i jonów Mg^{++} na aktywność preparatów 5'-nukleotydyazy tryka i buhaja przy użyciu jako substratu 5'-AMP.

Enzym tryka (rys. 3A) posiada dwa optima pH ($pH = 8,5-9,1$ i $pH = 9,7$), występujące zarówno w obecności jonów magnezowych, jak i ich braku, mimo obniżonej aktywności 5'-nukleotydyazy w ostatnim przypadku.



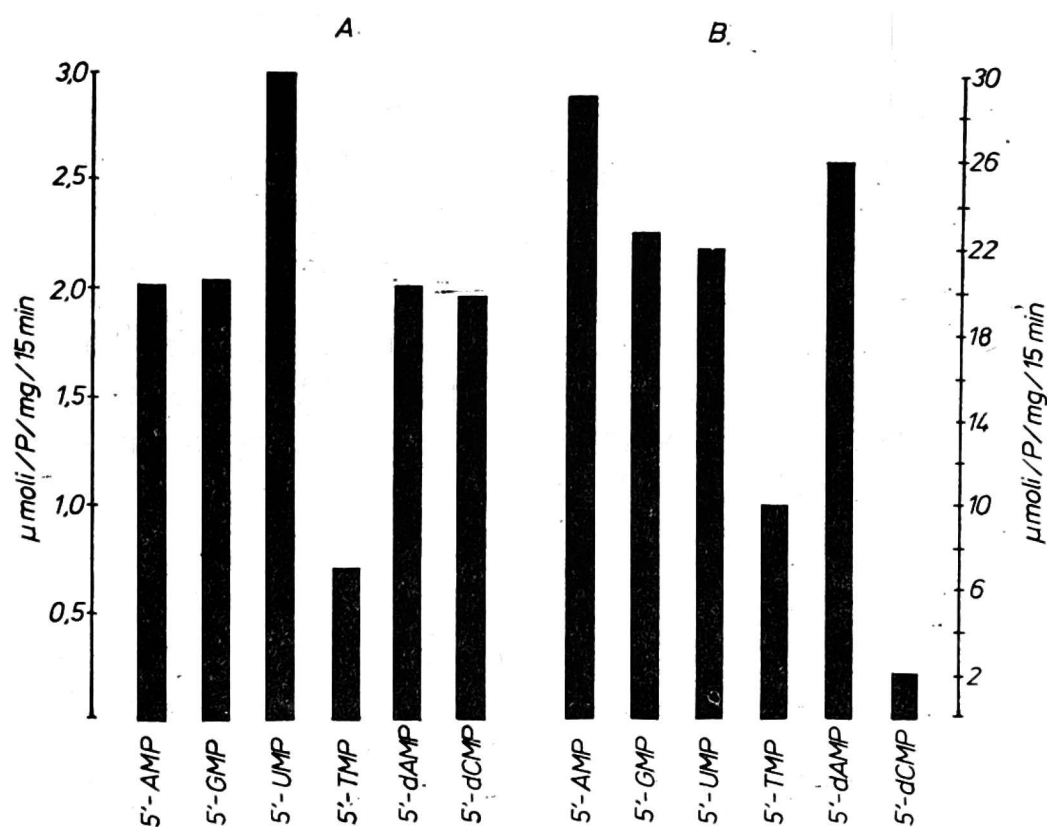
Rys. 2. Wpływ stężenia EDTA na aktywność 5'-nukleotydyzy w plazmie nasienia buhaja (0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 0,8 mM 5'-AMP, 4,85 mg białka/ml mieszaniny inkubacyjnej)



Rys. 3. Wpływ pH i jonów magnezowych na aktywność 5'-nukleotydyzy: A — 5'-nukleotydyza tryka (0,24 mg białka/ml mieszaniny inkubacyjnej), B — 5'-nukleotydyza buhaja (0,057 mg białka/ml mieszaniny inkubacyjnej); 0,1 M gli-NaOH, 2 mM 5'-AMP; 1 — z dodatkiem 10 mM MgCl₂, 2 — bez dodatku MgCl₂

5'-nukleotydaza buhaja posiada dwa optima pH w obecności jonów magnezowych (pH = 8,5 i pH = 9,5). Przy braku jonów Mg^{++} wystąpiło jedno optimum pH = 8,5, przy czym aktywność enzymu była niższa o 16,6 procent.

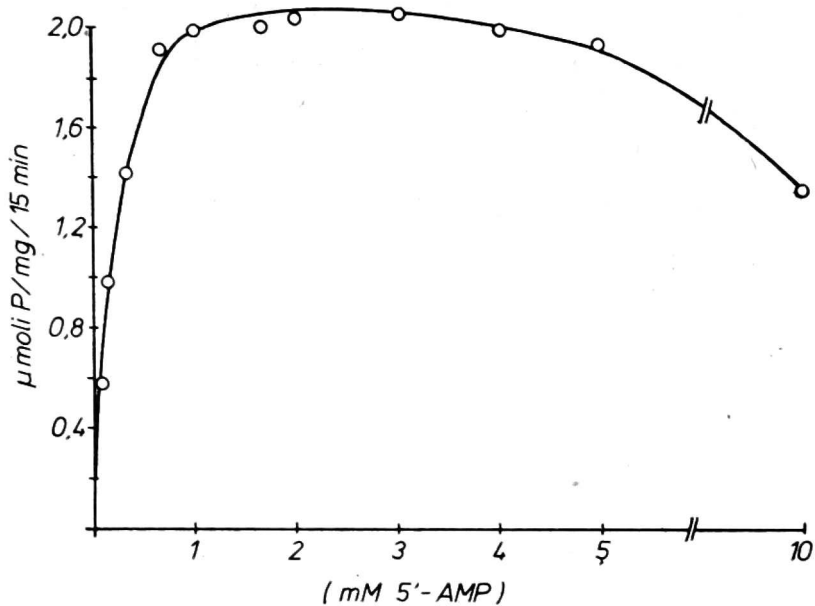
Badania dotyczące powinowactwa substratowego 5'-nukleotyduzy plazmy nasienia tryka i buhaja przedstawiono na rysunku 4. Enzym tryka hydrolizuje w jednakowym stopniu 5'-rybonukleotydy jak i 5'-dezoksyrybonukleotydy (rys. 4A). Najwyższą aktywność zanotowano w przypadku 5'-UMP, najniższą w stosunku do 5'-TMP, 3'-fosforany nukleozydów są hydrolizowane prawie 5-krotnie słabiej niż 5'-AMP.



Rys. 4. Powinowactwo substratowe preparatów 5'-nukleotyduzy z plazmy nasienia tryka i buhaja: A — 5'-nukleotydaza tryka (0,16 mg białka/ml mieszaniny inkubacyjnej), B — 5'-nukleotydaza buhaja (0,057 mg białka/ml mieszaniny inkubacyjnej); 0,1 M gli-NaOH, pH 8,5, 2 mM $MgCl_2$ i 2 mM substratu

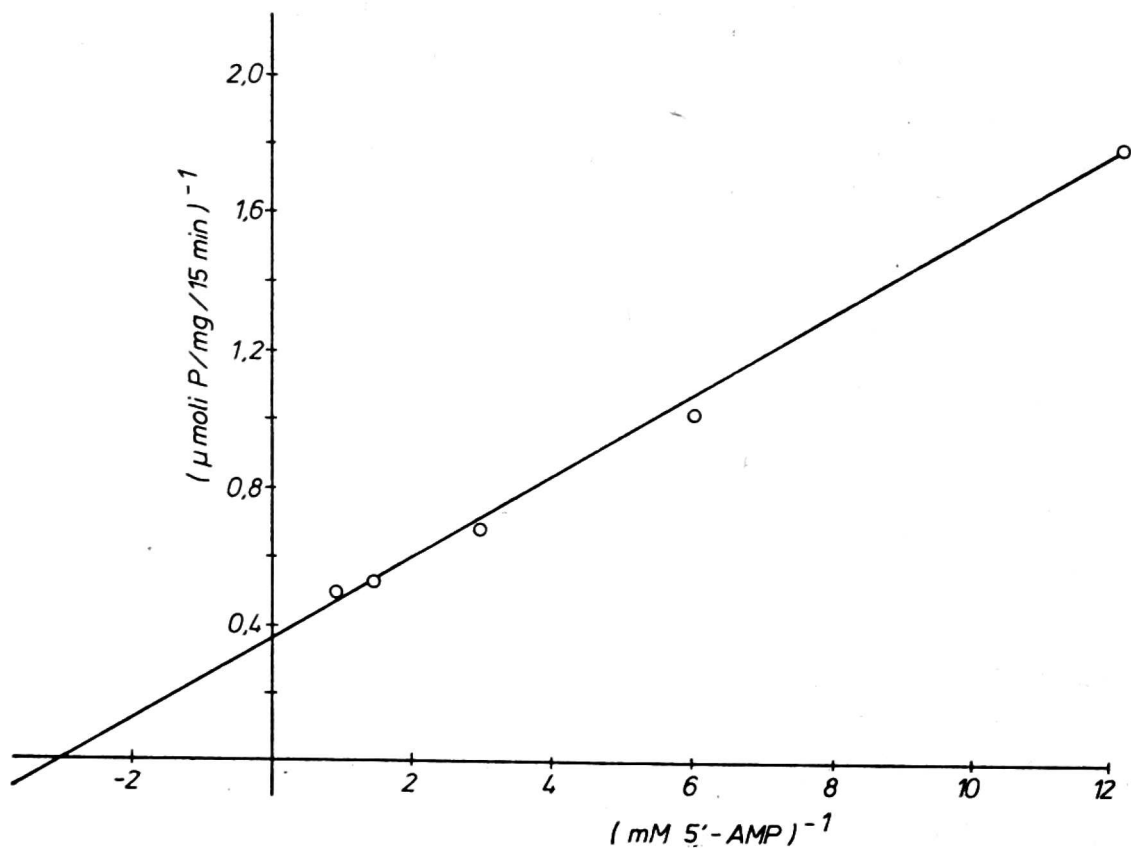
5'-nukleotydaza buhaja (rys. 4B) nie hydrolizuje 3'-nukleotyduzy ani w pH = 8,5, ani pH = 9,5. Najsilniej hydrolizowany jest 5'-AMP i prawie w jednakowym stopniu 5'-dAMP. Stwierdzono o około 23% słabszą aktywność enzymu w stosunku 5'-GMP i 5'-UMP, natomiast wobec 5'-TMP przy pH = 9,5 aktywność jest słabsza o około 46 procent. Wobec 5'-dCMP aktywność jest około 15-krotnie niższa aniżeli wobec 5'-AMP.

Interesujące dane uzyskano odnośnie do kinetyki obu preparatów enzymu, którą przedstawiono na rysunkach 5-9. Maksymalną szybkość hydrolizy 5'-AMP przez enzym tryka zaobserwowano przy 2 mM stężeniu 5'-AMP (rys. 5). Szybkość ta utrzymuje się praktycznie do 4 mM

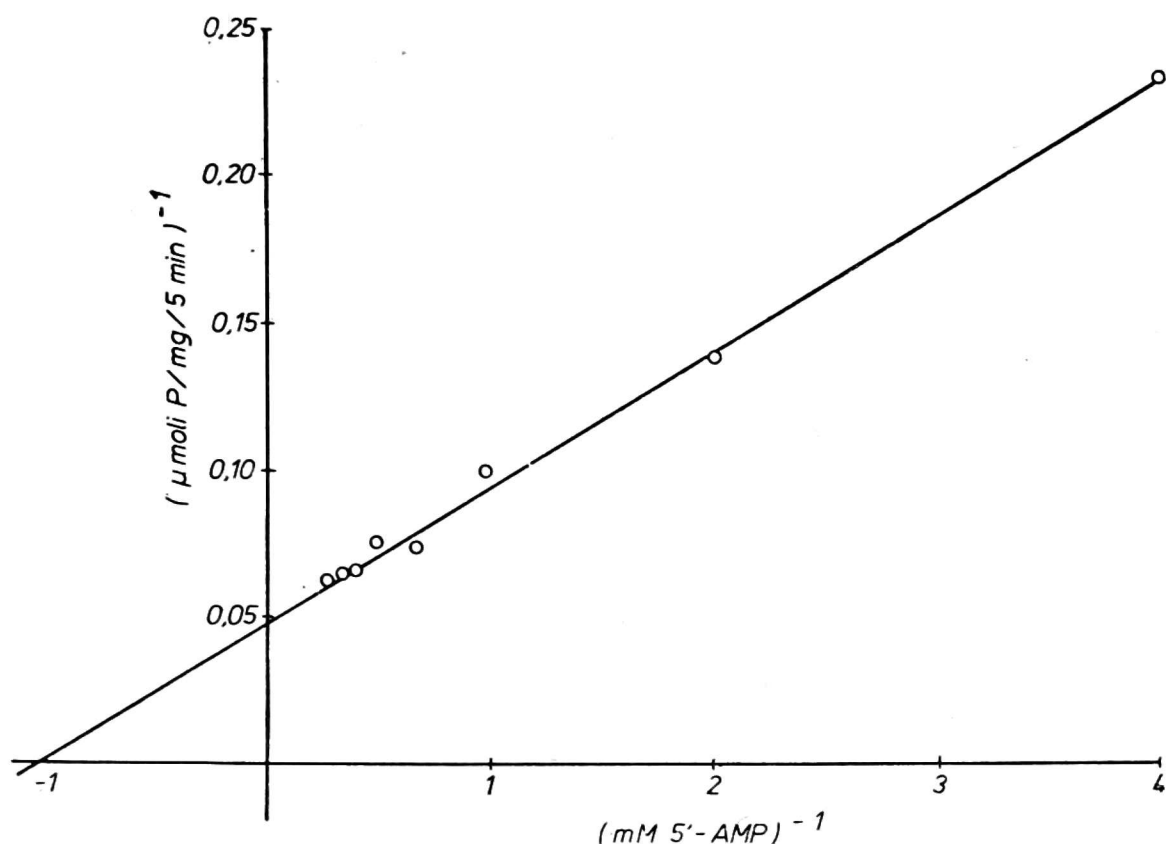


Rys. 5. Wpływ stężenia 5'-AMP na aktywność 5'-nukleotyduzy plazmy nasienia tryka: 0,1 M gli-NaOH, pH 8,5, 10 mM MgCl₂, 0,16 mg białka/ml mieszaniny inkubacyjnej

stężenia 5'-AMP. Przy stężeniu 5 mM pojawia się słabe hamowanie substratowe, które przy stężeniu substratu 10 mM dochodzi do 35 procent. Stała Michaelisa—Menten, wyznaczona za pomocą pochyłej Lineweave-ra—Burka, wynosi $3,25 \times 10^{-4}$ M (rys. 6).



Rys. 6. Graficzne wyznaczenie stałej Michaelisa-Menten dla 5'-nukleotyduzy plazmy nasienia tryka

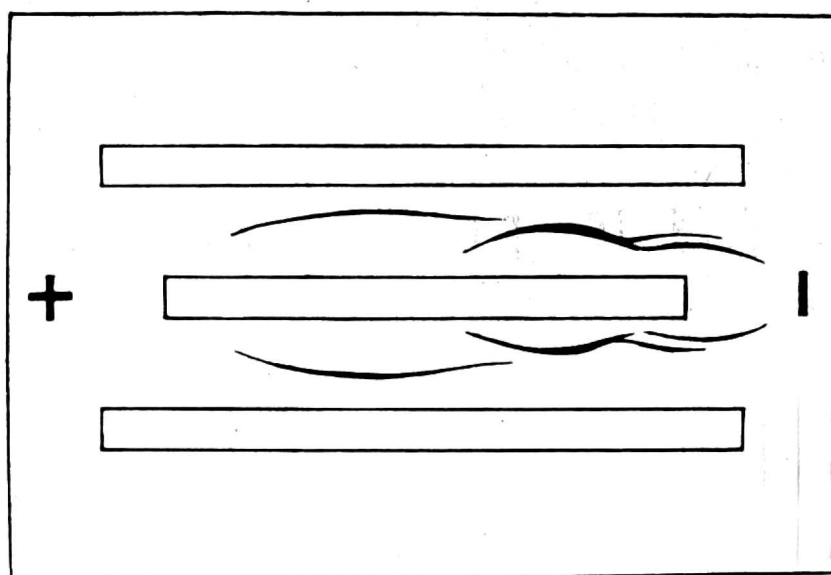


Rys. 9. Graficzne wyznaczenie stałej Michaelisa—Menten dla 5'-nukleotyduazy plazmy nasienia buhaja

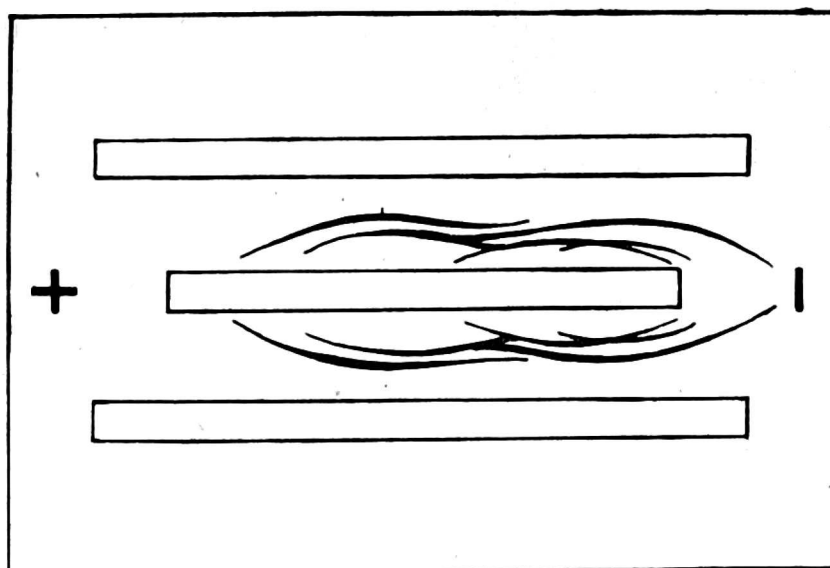
W przypadku 5'-nukleotyduazy buhaja (rys. 7) przy niekorzystnym stosunku enzym—substrat, a zwłaszcza nadmiernym stężeniu enzymu i przy czasie inkubacji 15 min, obserwuje się prostoliniową zależność szybkości reakcji do stężenia 4 mM 5'-AMP. Przy wyższych stężeniach substratu, a mianowicie przy 5 mM oraz 10 mM następuje hamowanie substratowe, wynoszące dla wyżej wymienionych stężeń odpowiednio 16% i 22 procent. Taka kinetyka enzymu uniemożliwia określenie powinowactwa 5'-nukleotyduazy do substratu i wyznaczenia stałej K_m . Na rysunku 8 przedstawiono przebieg reakcji enzymatycznej przy dwukrotnie niższym stężeniu enzymu i zmniejszonym do 5 min czasie inkubacji. W takich warunkach inkubacji maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej występuje przy 3-4 mM stężeniu 5'-AMP, natomiast przy 5 mM obserwuje się hamowanie substratowe, osiągające wartość 19% w porównaniu z szybkością maksymalną.

Stała Michaelisa—Menten wyznaczona za pomocą pochyłej Lineweavera—Burka wynosi $9,1 \times 10^{-4}$ (rys. 9).

Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym plazmy nasienia tryka i buhaja, a następnie immunodyfuzja w agarze wobec antysurowicy wskazała na obecność w plazmie antygenów o aktywności 5'-nukleotyduazy w obrębie *gamma*-globulin oraz *alfa*-globulin (rys. 10, 11). Również w przypadku ekstraktów plemników tryka i buhaja metodą dyfuzji żelowej stwierdzono występowanie jednej linii precypitacyjnej (rys. 12).



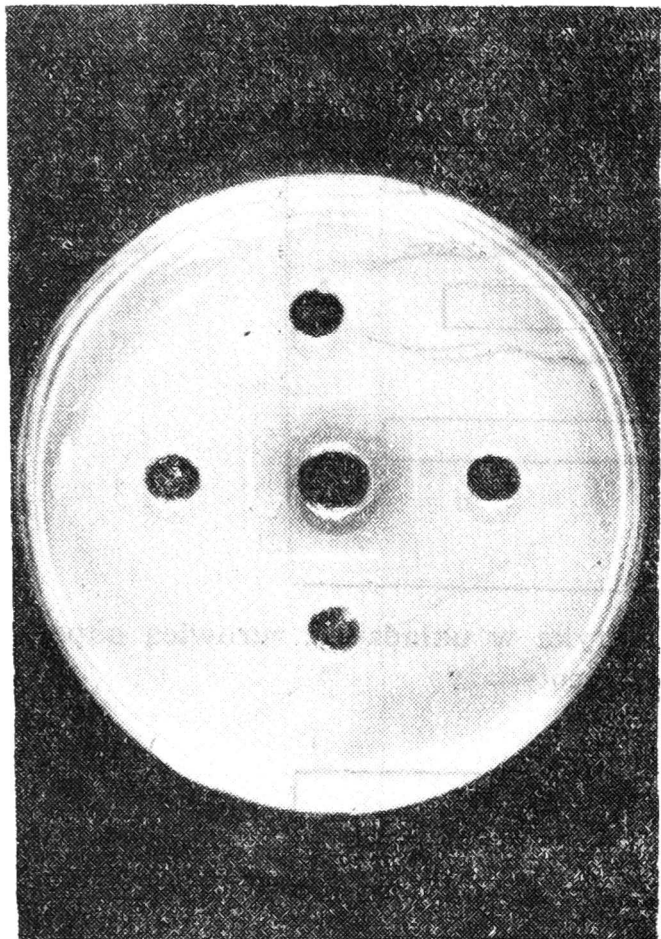
Rys. 10. Immunoelktroforeza plazmy nasienia tryka w układzie z surowicą odpornościową wobec 5'-nukleotyduzy



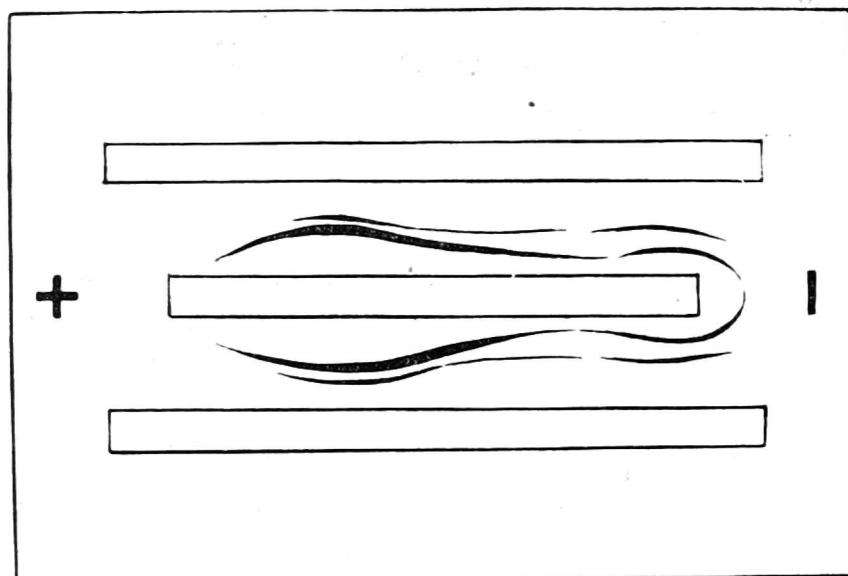
Rys. 11. Immunoelktroforeza plazmy nasienia buhaja w układzie z surowicą odpornościową wobec 5'-nukleotyduzy

Interesujące obserwacje uzyskano w badaniach identyczności antygenowych izolowanych preparatów 5'-nukleotyduzy. Na rysunku 13 przedstawiono przykładowo wynik immunoelktroforezy w układzie plazma nasienia tryka—surowica odpornościowa wobec 5'-nukleotyduzy plazmy buhaja. Występowanie linii precypitacyjnych w tym przypadku świadczyć może o niektórych wspólnych determinantach antygenowych 5'-nukleotyduzy w plazmie nasienia tryka i buhaja.

Antysurowice powodują zmiany aktywności 5'-nukleotyduzy (tab. 1, 2). W przypadku enzymu tryka (tab. 1) już przy 18-krotnym stosunku białka surowicy odpornościowej do białka enzymu obserwuje się prawie 40% hamowanie aktywności 5'-nukleotyduzy w porównaniu do aktywności wyjściowej. Natomiast dla antysurowicy wobec enzymu buhaja



Rys. 12. Immunodyfuzja żelowa w układzie: ekstrakt plemników buhaja — surowica odpornościowa wobec 5'-nukleotyduzy plazmy nasienia buhaja



Rys. 13. Immunoelktroforeza w układzie: plazma nasienia tryka — surowica odpornościowa wobec 5'-nukleotyduzy plazmy nasienia buhaja

(tab. 2) maksymalny stopień hamowania (około 75%) występuje przy ponad 100-krotnym stosunku białka antysurowicy do białka enzymu. Przy 10-krotnie mniejszym stosunku stopień hamowania osiąga także wysoką wartość (około 60%). Nie stwierdzono różnic w stopniu hamowania aktywności enzymu po preinkubacji antysurowic w 56°C.

Tabela 1

Wpływ surowicy odpornościowej wobec 5'-nukleotyduzy na aktywność enzymu plazmy nasienia tryka

(0,1 M bufor, glicyna — NaOH, pH 8,9; 2mM MgCl₂; 2 mM — 5'-AMP; 0,175 mg białka enzymu/ml próby)

Surowica	Stosunek białko sur. białko enz.	Aktywność	
		μmole P/mg/15 min	%
Bez surowicy	—	1,20	100
Normalna	18,8	0,94	78,3
Odpornościowa	17,7	0,74	61,7
Bez surowicy	—	1,16	100
Normalna	18,8	1,12	96,5
Inaktywowana	37,7	1,14	98,3
Odpornościowa	17,7	0,74	63,8
Inaktywowana	35,4	0,74	63,8

Tabela 2

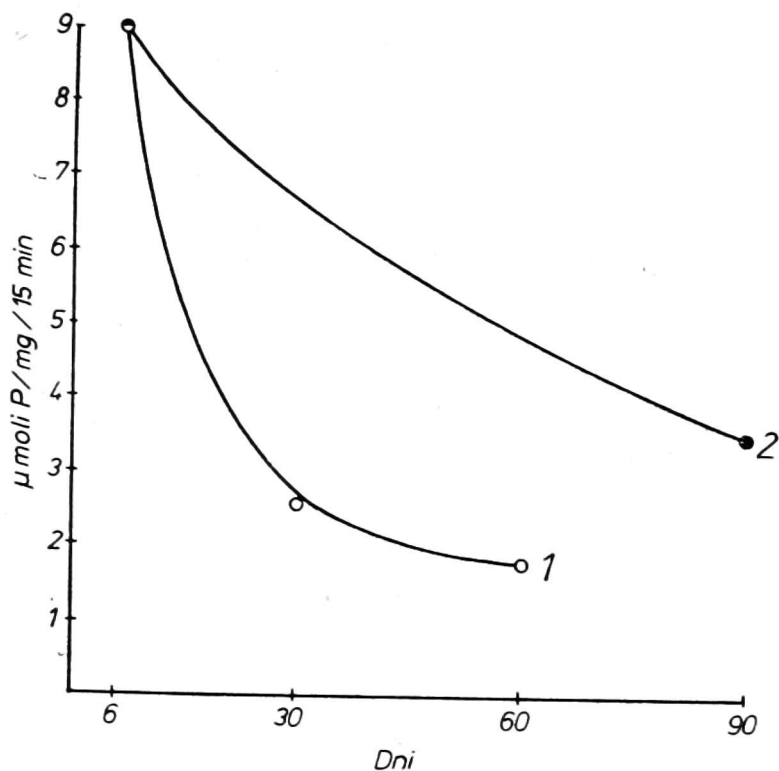
Wpływ surowicy odpornościowej wobec 5'-nukleotyduzy na aktywność enzymu plazmy nasienia buhaja

(0,1 M bufor, glicyna — NaOH, pH = 8,5; 2 mM MgCl₂; 2mM 5'-AMP; 0,057 mg białka enzymu/ml próby)

Surowica	Stosunek białko sur. białko enz.	Aktywność	
		μmole P/mg/15	%
Bez surowicy	—	18,84	100
Normalna	115,8	16,55	87,8
Odpornościowa	115,8	2,92	15,5
Normalna	115,8	17,63	93,5
Inaktywowana	11,6	18,84	100
Odpornościowa	115,8	2,93	15,5
Inaktywowana	11,6	7,34	38,9

Z uwagi na możliwość praktycznego zastosowania interesujące są nasze obserwacje, dotyczące sezonowych zmian aktywności 5'-nukleotyduzy w plazmie nasienia tryka i buhaja oraz zmiany aktywności izolowanych preparatów przechowywanych w temp. —20°C.

Najwyższą aktywność 5'-nukleotyduzy w plazmie tryka stwierdzono we wrześniu, najniższą zaś w miesiącach wiosenno-letnich (kwiecień—lipiec). W plazmie buhaja najwyższe aktywności występowały w miesiącach jesienno-zimowych (październik—marzec).



Rys. 14. Wpływ czasu i sposobu przechowywania na aktywność preparatu 5'-nukleotydu z plazmy nasienia buhaja: 0,1 M gli-NaOH, pH 8,9, 2 mM MgCl₂, 2 mM 5'-AMP; 1 — 5'-nukleotydu tryka przechowywana, zamrożona, 2 — nie zamrożona

Preparaty enzymu, przechowywane w stanie zamrożonym przez okres 3 miesięcy, wykazywały spadek aktywności, wynoszący w przypadku enzymu tryka 58%, zaś buhaja 36 procent. Rozmrażanie i ponowne zamrażanie powodowało istotne spadki aktywności enzymu.

DYSKUSJA

Uzyskane wyniki badań biochemicznych i immunologicznych 5'-nukleotydu plazmy nasienia tryka i buhaja wskazały na szereg nowych, dotychczas nie poznanych właściwości tego enzymu. Stwierdzono również szereg różnic gatunkowych, zwłaszcza jeśli chodzi o właściwości kinetyczne enzymu.

5'-nukleotydu plazmy nasienia tryka i buhaja jest aktywowana jonami magnezowymi. Levin i Bodansky [9] przypisują istotną rolę jonom Mg⁺⁺ w tworzeniu kompleksu enzym—substrat. Jony magnezu wiążą zapewne resztę fosforanową nukleotydu z odpowiednimi miejscami centrum aktywnego 5'-nukleotydu, przy czym wiązanie to wg autorów tworzyłoby się lub dysocjowało w zależności od pH środowiska.

Nasze wyniki potwierdzałyby tę hipotezę, bowiem najwyższą aktywność enzymu tryka i buhaja uzyskano przy ekwimolarnych stężeniach substratu i jonów magnezowych. Tym niemniej, fakt istnienia jednego optimum pH dla enzymu buhaja przy braku jonów magnezowych od-

różnia ten enzym od 5'-nukleotyduazy plazmy nasienia tryka. Bowiem dla tego ostatniego stwierdziliśmy dwa optima pH również przy braku jonów magnezowych w mieszaninie inkubacyjnej. Wyniki te sugerują inny model hydrolizy rybonukleotydów i dezoksyrybonukleotydów przez 5'-nukleotyduazę plazmy nasienia tryka.

5'-nukleotyduaza tryka, w odróżnieniu od enzymu buhaja, hydrolizuje, z nielicznymi wyjątkami, wszystkie 5'-nukleotydy. Ta właściwość różni ten enzym zdecydowanie, bowiem 5'-nukleotyduaza plazmy buhaja według Heppela i Hilmoie [7] oraz Levina i Bodansky'ego [9] posiada wysoką specyficzność substratową w stosunku do 5'-rybonukleotydów, natomiast 4-10 razy niższą w stosunku do 5'-dezoksyrybonukleotydów.

Wyniki badań aktywności izolowanego przez nas enzymu buhaja wobec sześciu różnych nukleotydów potwierdzają te dane, natomiast z dwu przebadanych dezoksyrybonukleotydów stwierdzenie to dotyczyłoby tylko 5'-dCMP, nie dotyczy zaś 5'-dAMP. Obserwowane niskie powinowactwo obu enzymów do 5'-TMP spowodowane jest zapewne obecnością grupy metylowej w pozycji 5'-pierścienia pirymidynowego. Oba enzymy posiadają jednak największe powinowactwo do 5'-AMP jako substratu, chociaż wartość stałej Michaelisa dla 5'-nukleotyduazy plazmy nasienia buhaja różni się od wartości podanych przez Levina i Bodansky'ego [9] oraz Buruiana i Dema [1].

Ci ostatni wykazali w plazmie nasienia buhaja obecność dwóch typów katalitycznych 5'-nukleotyduazy w zależności od jakości nasienia. Jeden z tych typów, charakterystyczny dla nasienia normalnego, posiadał właściwości kinetyczne podobne do uzyskanego przez nas preparatu 5'-nukleotyduazy. Buruiana i Dema nie podali jednak czasu inkubacji, przy którym wyznaczyli wartość stałej K_m enzymu. Nasze badania wykazały, że 5'-nukleotyduaza buhaja posiada wysoce specyficzne właściwości katalityczne, związane ze stosunkiem enzym—substrat oraz czasem inkubacji. Ta właściwość zdecydowanie różni ten enzym od preparatu z plazmy nasienia tryka.

Na podstawie naszych obserwacji należy stwierdzić, że 5'-nukleotyduaza tryka charakteryzuje się mniejszą specyficznością substratową, ponieważ posiada jednakowe powinowactwo zarówno do 5'-rybonukleotydów, jak i 5'-dezoksyrybonukleotydów. Wyniki naszych obserwacji elektroforetycznych wskazują wyraźnie na występowanie w izolowanych preparatach enzymów dwóch białek, różniących się ciężarem molekularnym. Analiza tych danych wskazywałaby na bardziej złożoną budowę przestrzenną 5'-nukleotyduazy buhaja. Można przypuszczać, że główna frakcja tego enzymu, o ruchliwości *gamma*-globulin, posiada budowę tetrameru, złożonego z podjednostek o ciężarach molekularnych około 55 000, lub dimeru złożonego z podjednostek o ciężarze po 110 000. Ta sama frakcja

enzymu tryka przypuszczalnie posiada budowę dimeru. Podobne różnice występują odnośnie do frakcji o ruchliwości *alfa*-globulin (monomer—tryk, dimer—buhaj). Obserwowany w trakcie długotrwałego przechowywania w niskiej temperaturze spadek aktywności enzymów spowodowany jest przypuszczalnie zmianą ich konformacji przestrzennej, związanej być może z obecnością grup SH. Nasze wstępne obserwacje wykazały bowiem w izolowanym preparacie 5'-nukleotydu tryka obecność 0,5 mola (11×10^{-4} g białka) grup SH. Potraktowanie preparatu mocznikiem zwiększało ich zawartość do 1 mola (11×10^{-4} g białka). Wskazywałoby to na dysocjację dimerów głównej frakcji enzymu. Dużą rolę odgrywają zapewne stwierdzone w hydrolizatach enzymów aminokwasy — cystyna i metionina.

Nie wyjaśnionym problemem jest obecność izoenzymów 5'-nukleotydu. Hipoteza Levina i Bodansky'ego [9] odrzucała istnienie izoenzymów 5'-nukleotydu plazmy buhaja. Autorzy ci sugerowali natomiast obecność 4 różnych miejsc aktywnych, zależnych od pH środowiska.

Natomiast Buruiana i Dema [1] drogą sączenia na żelach Sephadex stwierdzili kilka białek o aktywności 5'-nukleotydu w plazmie nasienia buhaja.

Nasze badania immunologiczne z zastosowaniem surowic odpornościowych wobec 5'-nukleotydu wskazują na heterogenność tego enzymu w plazmie nasienia tryka i buhaja. Badania identyczności antygenowych obu partnerów wykazały natomiast występowanie wspólnych determinant antygenowych w plazmie nasienia tryka i buhaja. Wynikać to może ze zbliżonej budowy fizyko-chemicznej obu enzymów.

Równocześnie występujące zróżnicowanie, jeśli chodzi o właściwości katalityczne enzymów, potwierdza obecność w plazmie nasienia tych gatunków różnych form molekularnych 5'-nukleotydu.

Brak danych piśmiennictwa nie pozwala porównać wyników naszych badań immunologicznych. Jedynie Hekmann i Rühmke [5] sygnalizowali obecność w gruczole krokowym człowieka dwóch antygenów tkankowych, z których jeden posiadał aktywność 5'-nukleotydu.

Tym niemniej, wyniki naszych badań immunoelektrycznych podwójnej dyfuzji żelowej oraz reakcji hamowania aktywności enzymu przez antysurowice wyraźnie podkreślały immunologiczną rolę 5'-nukleotydu w męskim narządzie rozrodczym. Zarówno u tryka, jak i u buhaja, 5'-nukleotyda pełni rolę antygeny plazmy nasienia oraz po ejakulacji plemników — antygeny okrywowego. Nasze wstępne badania z zastosowaniem antysurowic wobec 5'-nukleotydu plazmy nasienia w układzie z ekstraktami tkanek gruczołów oraz jąder tryka i buhaja wskazały na pęcherzyki nasienne jako główne źródło tego enzymu. Można przy-

puszczać, że 5'-nukleotydaza należy również do antygenów tkankowych narządu płciowego.

Podsumowując należy stwierdzić, że gatunkowe różnice we właściwościach katalitycznych 5'-nukleotydazy oraz zmiany sezonowe jej aktywności w plazmie nasienia wskazują nie tylko na istotną rolę w metabolizmie kwasów nukleinowych i nukleotydów, ale również sugerują genetycznie uwarunkowane powinowactwo substratowe tego enzymu do 5'-nukleotydów. Z drugiej strony 5'-nukleotydaza, będąc specyficznym antygenem tkankowym w plazmie nasienia oraz spełniając rolę antygeny okrywowego plemników, uczestniczyć może w procesie immunizacji samców w stanie patologicznym narządu rozrodczego. Badania wymagają dalszej kontynuacji.

PIŚMIENICTWO

1. Buruiana L. M., Dema A.: *Revue rom. Biochim.* 5, 91, 1968.
2. D'Alessio G., Parente A., Guida C., Leone E.: *FEBS Letters*, 27, 285, 1972.
3. Davis B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404, 1964.
4. Fiske G. H.: *Subbarow Y.: J. Biol. Chem.* 66, 375, 1925.
5. Hekman A., Rühmke P.: *Fert. Steril.*, 20, 312, 1969.
6. Hunter A. G., Hafs H. D.: *J.Reprod. Fert.* 7, 357, 1964.
7. Heppel I. A., Hilmo R. J.: 5'-Nucleotidase (1951) *Methods in Enzymology*, vol. II. S. Colowick, N. Kaplan, Acad. Press N. Y. 546, 1956.
8. Libonati M., Floridi A.: *Europ. J. Biochem.* 8, 81, 1969.
9. Levin S. J., Bodansky O.: *J. Biol. Chem.* 241, 51, 1966.
10. Minakowski W., Strzeżek J.: *Rocz. Nauk rol.* 88-B/3, 317, 1966.
11. Maurer R.: *Disk — elektroforese*, Berlin, 125, 1968.
12. Ornstein L.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 321 1964.
13. Ouchterlony Q.: *Diffusion in gel methods for immunological analys. II Progr. Allergy VI*, 1962.
14. Pinero G. J., Roussel J. D.: *Fert. Steril.*, 21, 145, 1973.
15. Wiechselbaum T. E.: *Amer. J. Clin. Techn. sect.* 10, 40, 1946.

Ежи Стшежек, Александр Волос

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ ПЛАЗМЫ СЕМЕНИ БАРАНА И БЫКА

Резюме

Энзим был изолирован из плазмы семени барана и быка по методу Хеппеля и Хильмoe. В сепарациях на полиакриламидном желе изолированные энзимы показали наличие двух фракций различающихся электрофоретической активностью по отношению к 5'-АМР. Четкие видовые различия установлены в активности 5'-нуклеотидазы в зависимости от рН среды и наличия магниевых ионов в инкубационной смеси.

5'-нуклеотидаза принадлежит у обоих исследуемых видов к антигенным белкам плазмы семени и входит в состав покровных антигенов сперматозоида. Иммунные сыворотки оказывают заметное задерживающее влияние на действие энзима.

Jerzy Strzeżek, Aleksander Wołos

BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES
OF 5'-NUCLEOTIDASE OF RAM AND BULL SEMINAL PLASMA

Summary

Isolation of the enzyme from bull and ram seminal plasma was carried out according to the method of Heppel and Hilmoe. Enzymes separated on polyacrylamide gel were characterized by two fractions of a different electrophoretic mobility and different specific weight. Both enzymes stimulated by Mg^{++} ions had different catalytic activity in respect to 5'-AMP.

Distinct species differences were observed as concerns the activity of 5'-nucleotidase in relation to pH and the presence of Mg^{++} ions in the incubated mixture.

5'-nucleotidase of both species belongs to antigen proteins of seminal plasma and is contained in the coating antigens of spermatozoon. Antiserum against the enzyme distinctly inhibits its activity.

Doc. dr hab. Jerzy Strzeżek
Wydział Zootechniczny AR-T w Olsztynie
Instytut Fizjologii i Biochemii Zwierząt
Olsztyn-Kortowo, blok 21