

УДК 584.135.55+591.111.2

БИОХИМИЯ

Академик Я. В. ПЕЙВЕ, Б. П. АТАНАСОВ, Г. Я. ЖИЗНЕВСКАЯ,
Н. Н. КРАСНОБАЕВА

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИНДИВИДУАЛЬНОГО МАКРОКОМПОНЕНТА ЛЕГГЕМОГЛОБИНА ИЗ КЛУБЕНЬКОВ ЛЮПИНА *LUPINUS LUTEUS* L.

Леггемоглобин (Lb) — гемсодержащий белок из клубеньков бобовых растений — образуется в период активной фиксации молекулярного азота эффективными штаммами *Rhizobium* в симбиозе с бобовыми растениями. Несмотря на очевидную важность выяснения биохимических и физиологических функций этого белка, леггемоглобин остается гораздо менее изученным, чем гемоглобин животного происхождения.

В 1967 г. нами впервые был выделен кристаллический Lb из клубеньков желтого люпина *Lupinus luteus* L. ⁽¹⁾, содержащий 0,32% железа. Седиментационный анализ показал, что молекулярный вес белка около 16 000, а электрофорез в полиакриламидном геле обнаружил присутствие в кристаллах одного макрокомпонента и двух микрокомпонентов — примесей.

Целью настоящей работы являлось получение индивидуального макрокомпонента Lb, определение его молекулярного веса (м.в.), аминокислотного состава (АК), весовых и молярных коэффициентов поглощения и некоторых физико-химических характеристик.

Сбор и хранение клубеньков проводили, как описано ранее ⁽¹⁾. Lb экстрагировали из растертых замороженных клубеньков 0,05 *M* фосфатным буфером pH 7,4 равного веса; гомогенат отжимали через 4 слоя марли и центрифугировали при 6000 об/мин при 0—4°. Экстракт подвергали дробному высаливанию $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ высокой чистоты и отделяли сульфат гelfильтрацией на колонках сефадекса Г-25 (проверка отсутствия SO_4^{2-} ионами Ba^{2+}). Дальнейшую очистку осуществляли путем ионообменной хроматографии на ДЭАЕ-целлюлозе («Reanal»). Все остальные реактивы были марки х.ч. Концентрацию растворов $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ определяли на рефрактометре РДУ-66-23 по калибровочной кривой. Диск-электрофорез в полиакриламидном геле проводили методом Дэвиса ⁽²⁾ с видоизменениями, описанными нами ⁽³⁾. Электрофореграммы после проявления денситометрировали на микрофотометре МФ-4 с автоматической регистрацией. Железо определяли *o*-фенантролиновым методом ⁽⁴⁾, азот — по микро-Кьельдалю. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре СФ-4А и Hitachi ESR-3-T. Вязкость 0,1—1% растворов измерена при 20° на вискозиметре типа Эйгнера. Молекулярный вес определяли методом гelfильтрации в тонком слое ⁽⁵⁾. Определение АК проводили на глобине Lb (гем отщепляли при —18° кислым уксусом ⁽⁶⁾) при условии стандартного анализа на автоматических приборах «Bio-Cal» и «Micro AAA Beckman».

Очистку макрокомпонента леггемоглобина проводили методом фракционного высаливания $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. По профилю кривой осаждения были выделены четыре фракции (Ф). Обессоленные фракции были исследованы спектрофотометрически. Оказалось, что Ф₅₀ содержит в основном не гемоглобинподобные белки (очень низкое значение отношения коэффициентов поглощения при 405 и 275 мμ, равное 0,20). Для остальных фракций это

соотношение значительно выше (от 1,13 до 2,27), и спектры указывают на преимущественное содержание гемовых белков.

Для получения очищенного индивидуального леггемоглобина полученные гемсодержащие фракции подвергали ионообменной хроматографии. Описание фракционного высаливания и способов очистки макрокомпонента леггемоглобина будет подробно представлено в отдельной статье.

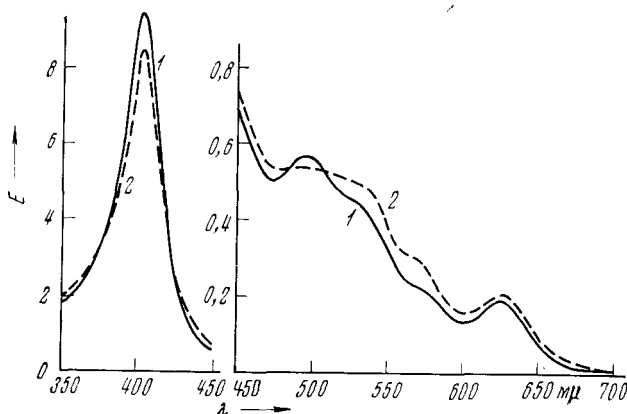


Рис. 1. Спектры поглощения очищенного леггемоглобина из клубеньков люпина. Высокоспиновый $\text{Lb(III)H}_2\text{O}$ — основная фракция (1) и низкоспиновый $\text{Lb(III)H}_2\text{O}$ (2)

Полученный основной компонент разделенной смеси представляет высокоочищенный леггемоглобин с предельным отношением $A_{404} / A_{275} = 4,2$, которое не изменяется при рехроматографии. При электрофорезе в полиакриламидном геле было показано наличие одного белкового компонента с относительной электрофоретической подвижностью (о.э.п.) $\sim 0,7$, аналогичного макрокомпоненту кристаллического леггемоглобина люпина (1) и дающего бензидиновую реакцию.

Для проверки гомогенности окрашенную в бурый цвет зону Lb вырезали из гелевой трубочки после окончания электрофореза, экстрагировали трис-буфером pH 8,9 и инкубировали в течение суток при 25° . После повторного электрофореза была получена одинаковая белковая зона с той же о.э.п. При электрофорезе в условиях обработки додецилсульфатом натрия

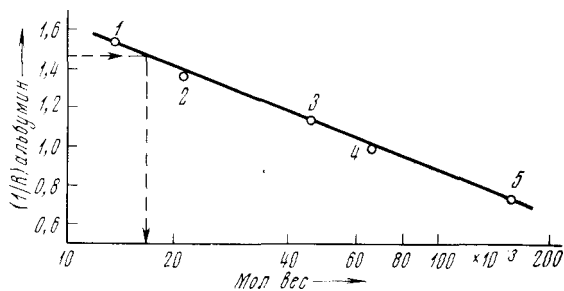


Рис. 2. Определение молекулярного веса леггемоглобина люпина методом гельфильтрации в тонком слое сефадекса Г-150 в 0,01 M фосфатном буфере, pH 7,0. Стандартные белки: 1 — рибонуклеаза; 2 — соевой ингибитор трипсина; 3 — овальбумин; 4 — альбумин бычьей сыворотки; 5 — γ -глобулин бычьей сыворотки; $R_{\text{альбумин}}$ — подвижность белков относительно 4

в присутствии β -меркаптоэтанола (7) было подтверждено, что в условиях опыта компонент не агрегирует и состоит из одной субъединицы. При кристаллизации очищенный Lb образовывал кристаллы, аналогичные описанным ранее (1). Абсорбционный спектр полученного белка (рис. 1, 1) соответствует высокоспиновой форме фиррилеглобина $\text{Lb(III)H}_2\text{O}$ из клубеньков сои (8). При хроматографии на ДЭАЕ-целлюлозе основной высокоспиновый $\text{Lb(III)H}_2\text{O}$ отделяются от низкоспинового (рис. 1, 2) микрокомпонента.

Таблица 1

Аминокислотный состав, число аминокислотных остатков и вычисленный молекулярный вес леггемоглобина (Lb) люпина в сравнении с другими гемсодержащими белками

№ п.п.	Аминокислоты	Lb люпина		Lb сои ⁽¹⁰⁾		Hb миноги ⁽¹¹⁾	β-цепь Hb человека ⁽¹²⁾	Mb кашалота ⁽¹³⁾
		определенные	округленные	«быстрый»	«медленный»			
1	Лизин	12,5	13	13	13	13	11	19*
2	Гистидин	3,0	3	2	2	2	9*	12*
3	Аргинин	0,7	1	1	2	5*	3*	4*
4	Аспарагиновая к-та	13,3	13	12	11	14	13	8*
5	Треонин	7,0	7	7	6	9	7	5
6	Серин	10,8	11	11	10	12	5*	6*
7	Глутаминовая к-та	13,8	14	14	12	10*	11*	19*
8	Пролин	5,0	5	5	5	6	7	4
9	Глицин	8,3	8	8	6	6	13*	11*
10	Аланин	18,6	19	21	24*	21	15*	17
11	Цистеин			0	0	1	2	0
12	Валин	9,5	10	13*	14*	12	18*	8
13	Метионин			0	0	4	1	2
14	Изолейцин	5,6	6	6	4	8	0	9*
15	Лейцин	11,5	12	12	12	9*	18	13*
16	Тирозин	1,8	2	3	3	4	3	3
17	Фенилаланин	6,7	7	8	7	8	8	6
18	Триптофан	4,3	3	3	3	2	2	2
	Общее число АК-остатков	—	135	139	134	146	146	153
	Вычисленный м.в. с гемом	—	15260	15590	15000	15990	16200	17826

Пр и м е ч а н и е: Звездочкой отмечены аминокислоты, число остатков которых больше, чем на ± 2 АК-остатка по сравнению с Lb люпина. Лейцин и изолейцин сосчитаны вместе.

Для определения молекулярного веса очищенного высокоспинового Lb(III)H₂O была использована стандартная методика ⁽⁵⁾ тонкослойной гельфильтрации на сефадексе. Полученное значение молекулярного веса составляет $15\,200 \pm 1000$ (рис. 2). Примерно такие же значения молекулярного веса получены на основе константы седиментации $S\,1,8$ и характеристической вязкости $[\eta] = 1,75 \cdot 10^{-2}$ дл/г. Рассчитанный из $[\eta]$ парциальный объем $\bar{V} = 0,73$ указывает на шарообразность молекул Lb. Содержание железа в очищенном леггемоглобине люпина составило 0,358%, что при допущении наличия одной гемогруппы на моль Lb дает значение молекулярного веса $15\,800 \pm 500$. Молекулярный вес, рассчитанный на основе аминокислотного состава (см. ниже), составил 15 260. Значение молекулярного веса макрокомпонента леггемоглобина люпина хорошо согласуется с данными о молекулярном весе Lb сои ⁽⁹⁾.

Аминокислотный состав глобина Lb люпина был определен параллельно в двух лабораториях* и представлен в табл. 1. Число амидов и окончательное определение серусодержащих аминокислот (АК) будут приведены по ходу исследования АК-последовательности Lb. Для сравнения в табл. 1 показан состав двух главных компонентов Lb сои ⁽¹⁰⁾, гемоглобина (Hb) миноги ⁽¹¹⁾, β-цепи Hb человека ⁽¹²⁾ и миоглобина (Mb) кашалота ⁽¹³⁾.

Аминокислотный состав Lb люпина весьма близок к АК быстрого компонента Lb сои ⁽¹⁰⁾ и Hb миноги ⁽¹¹⁾. В то же время он сильно отличается от АК-состава гемоглобина ⁽¹²⁾ и миоглобина позвоночных ⁽¹³⁾ (табл. 1).

* Авторы благодарят Ц. А. Егорова (Институт химии природных соединений АН СССР) и Е. Гусакову (Институт белка АН СССР) за определение состава аминокислот.

Сходство Lb люпина с Hb миноги по АК-составу распространяется и на другие физико-химические характеристики, что указывает на сходство структур молекул этих белков. Возможно, это сходство имеет глубокую эволюционную основу, так как Hb миноги является наиболее древним из всех ныне известных гемоглобинов животного происхождения.

Специальное внимание в работе было уделено определению весовых коэффициентов поглощения. Для этой цели высокоочищенный и обессоленный раствор Lb, полностью окисленный с помощью $K_3Fe(CN)_6$ перед нанесением на колонки сефадекса Г-25 (высокоспиновый $Lb(III)H_2O$), использовали для одновременной записи спектров поглощения и определения концентрации белка: а) высушиванием над P_2O_5 в вакуум-эксикаторе, б) по процентному содержанию азота, в) по процентному содержанию железа. Получены следующие средние значения весовых коэффициентов поглощения для 1% растворов pH 7,0 в 1-сантиметровой кювете — $A_{404m\mu} = 104$ и $A_{275m\mu} = 24,2$. На основе значения молекулярного веса 15 300 рассчитаны значения миллимолярных (E, mM) коэффициентов поглощения $E_{404} = 160$ ($cm^{-1} \cdot mM^{-1}$) и $E_{275} = 38$ ($cm^{-1} \cdot mM^{-1}$), которые близки значениям соответствующих коэффициентов для Lb сои⁽⁸⁾.

Дальнейшая физико-химическая характеристика леггемоглобина люпина явится предметом наших последующих сообщений.

Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР
Москва

Поступило
2 VIII 1971

Институт белка
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Я. В. Пейве, Г. Я. Жизневская, Г. И. Ливанова, ДАН, 177, 1229 (1967). ² B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404 (1964). ³ Я. В. Пейве, Г. Я. Жизневская и др., ДАН, 173, 965 (1967). ⁴ Е. Б. Сендел, Колориметрическое определение следов металлов, ИЛ, 1964. ⁵ H. Determann, W. Michel, J. Chromatogr., 25, 303 (1966). ⁶ H. Theorell, A. Åkeson, Ann. Sci. Fenn. Ser. A II, 60, 303 (1950). ⁷ K. Weber, M. Osborn, J. Biol. Chem., 244, 4406 (1969). ⁸ C. A. Appleby, Biochim. et biophys. acta, 189, 267 (1969). ⁹ N. Ellfolk, Acta chem. scand., 14, 1819 (1960). ¹⁰ N. Ellfolk, Acta chem. scand., 15, 545 (1961). ¹¹ S. L. Li, A. Riggs, J. Biol. Chem., 245, 6149 (1970). ¹² G. Braunitzer, R. Gehring-Müller et al., Zs. Physiol. Chem., 325, 283 (1961). ¹³ A. B. Edmondson, Nature, 205, 883 (1965).