

М. И. МОЛЧАНОВ, И. Г. ЖУКОВА, М. Ю. СОФРОНОВА,
Е. П. СЕНЧЕНКОВ, Д. Н. ОСТРОВСКИЙ

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН

(Представлено академиком А. И. Опариным 29 XII 1971)

Белки, составляя в бактериальных мембранах от 50 до 80% (¹), являются структурной и функциональной основой мембран. В этой связи изучение первичной структуры мембранных белков и, в частности, изучение аминокислотного состава представляется очень интересным. До сих пор анализ аминокислотного состава проводили главным образом на целых мембранах или их фрагментах (^{2, 3}) и, реже, на отдельных слабо связанных с мембранами ферментативных белках (^{4, 5}). Такая ситуация обусловлена трудностями препаративного разделения чрезвычайно гидрофобных мембранных белков, число которых достигает 30. Для правильной оценки сил взаимодействия компонентов мембраны и расшифровки ее молекулярной организации, однако, требуется знание аминокислотного состава всех ее белков.

В настоящей работе мы попытались решить эту задачу, комбинируя эффективные способы аналитического разделения белков при электрофо-

Таблица 1

Радиоактивность аминокислот 12 образцов белков из мембран
M. lysodeikticus, имп/мин

Аминокислоты	№ белка											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Аргинин	667	178	358	354	253	2701	104	52	63	65	370	819
Лизин	583	379	916	734	230	3700	139	94	75	65	418	976
Гистидин	1174	998	909	1233	736	5400	182	102	104	112	450	1124
Аспарагиновая кислота	172	112	141	130	223	144	81	41	119	72	363	1216
Серин	343	121	175	140	524	726	393	187	367	228	814	3118
Глицин	1523	262	358	555	661	378	267	194	201	190	1596	3852
Глутаминовая кислота	381	72	63	99	123	535	157	116	86	127	495	1590
Треонин	338	133	303	291	297	1826	326	224	264	318	1033	6958
Аланин	244	341	692	514	572	595	641	566	1018	914	2782	20230
Пролин	117	521	263	262	378	237	310	275	191	301	1128	7574
Тирозин	54	170	113	106	82	209	234	122	141	183	562	3590
Валин	338	264	231	261	433	842	448	149	318	253	1122	9862
Метионин	148	126	134	254	172	1230	177	50	50	69	374	1641
Фенилаланин	143	469	321	285	568	360	958	482	842	682	2470	21866
Лейцины	630	1240	1470	974	1094	2148	1022	1067	1380	1634	5777	39678
Сумма одного бел- ка	6855	5386	6447	6192	6346	21034	5439	3721	5219	5213	19754	124094
Сумма одного бел- ка от суммы 11 белков, %	7,5	5,9	7,0	6,7	7,0	23,0	6,0	4,0	5,7	5,7	21,6	

резе в полиакриламидном геле с прижизненным включением радиоактивных аминокислот и с последующим пересчетом радиоактивности в молярные отношения аминокислот для каждого белка.

Использовали культуру *Miccosocus lysodeikticus* штамм Флеминга 2265 в логарифмической фазе роста ⁽⁶⁾. 500 мг клеток промывали 1 раз раствором К, Na-фосфатного буфера 0,001 M pH 7,4 с 0,001 M MgSO₄, содержащего 0,7% глюкозы и 0,5% NaCl.

Для получения мембранных белков, меченных по углероду, клетки инкубировали при 30° на качалке 3,5 часа в 200 мл промывного раствора с добавкой 0,5 мл биотина (100 мкг/мл) и 0,5 мл нейтрализованного гидролизата радиоактивного белка (0,5 мкС, равномерная метка по С¹⁴). Затем клетки собирали центрифугированием, мембраны выделяли по ранее описанной методике ⁽⁷⁾ с 4-кратной промывкой буфером, обезжиривали в 25 мл смеси хлороформ — метанол (2:1), 20 мин. при комнатной температуре. При этом около 10% белка переходит в смесь хлороформа и метанола ⁽⁸⁾. Остальной белок осаждали центрифугированием при 6000 об/мин. 10 мин. (ЦУМ-1) и растворяли в 0,3 мл смеси: фенол — мочевины — уксусная кислота — вода — сахароза (2:1,6:1:0,8:0,8 вес:моль:объем:объем:вес) для геля-электрофореза. Концентрация белка составляла 7,9 мг/мл.

Гель-электрофорез проводили на 7,5% полиакриламидном геле по методу Такаэма ⁽⁹⁾. На гелевый столбик наносили 0,025 мл раствора белка в фенольной смеси и проводили электрофорез при токе 1 ма на трубку в течение 30 мин. и затем еще 2,5 часа при токе 2,5 ма на трубку. Гели вынимали из трубок, помещали в 12% ТХУ на 20 мин. и затем окрашивали 0,2% раствором Кумасси в 7% уксусной кислоте 30 мин. После удаления фона 7% уксусной кислотой гелевые столбики разрезали бритвой на части по схеме, представленной на рис. 1.

Гелевые диски переносили в ампулы для гидролиза, в которые добавляли по 0,01 мл раствора смеси аминокислот (10 мкг каждой аминокислоты) и 1—3 мл 6 N HCl. Гидролиз вели в запаянных под вакуумом ампулах при 105° 24 часа ⁽¹⁰⁾. После гидролиза остатки геля отделяли центрифугированием при 4000 об/мин 3 мин. (ЦУМ-1). К гидролизату добавляли хлороформ (1:1), отбирали водную фазу, а тяжелую фазу промывали водой 2 раза так, что конечный объем водного раствора составлял 6 мл, этот раствор упаривали над щелочью до нейтрального pH.

Каждый образец подвергали хроматографическому анализу. Растворитель: бутанол — уксусная кислота — вода (5:2:3), бумага «Ватман» 3 ММ. Метчиком служила смесь стандартных аминокислот. Проявитель 1% раствор нингидрина в ацетоне. Пятна с хроматограмм элюировали водой.

Бумажный электрофорез проводили в 2N уксусной кислоте 1,5 часа при напряжении 700 в, бумага «Ватман» 3 ММ. Щелочные аминокислоты, элюированные водой, подвергали повторному электрофорезу на бумаге для очистки от примесей углеводного характера. Буфером служил ~1,3 N раствор NH₄OH. Электрофорез вели 1,5 часа при 700 в, бумага «Ватман» 3 ММ.

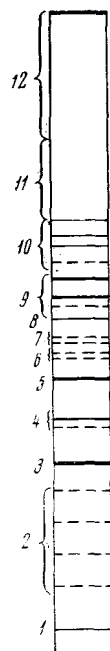


Рис. 1. Распределение белковых полос после электрофореза в полиакриламидном геле и порядок их отделения от гелевого столбика для последующего гидролиза. Цифры — номер белка

Измерение радиоактивности проводили один раз на сцинтилляционном счетчике «Mark-1» (U.S.A.) в толуюльном сцинтилляторе. Для этих измерений вырезанные из бумажных полос после электрофореза пятна аминокислот помещали непосредственно во флаконы с толуюлом. Два раза измерение радиоактивности проводили на газопропускном счетчике СОР-30 БФЛ. Для этих измерений аминокислоты элюировали водой. Растворы аминокислот каждого образца помещали непосредственно на латунный диск для подсчета радиоактивности.

Результаты одного из опытов приведены в табл. 1, из которой видно, что в условиях опыта происходило значительное включение в мембранные

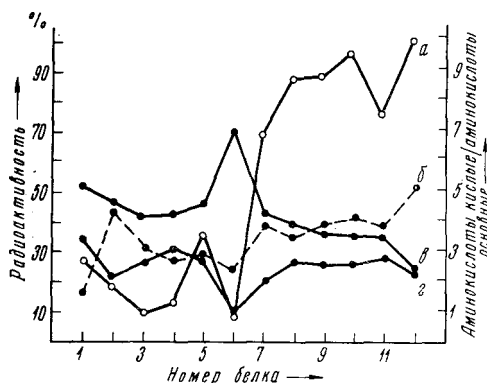


Рис. 2. Доля аминокислот разных типов по молярным отношениям. а — отношение кислых аминокислот к основным; б — неполярные аминокислоты; в — полярные аминокислоты; г — малые аминокислоты

белки меченых аминокислот. При этом радиоактивность большинства белков, в соответствии с данными ⁽⁸⁾, составляет 5—7%, и только многокомпонентные белки №№ 6 и 11 содержат значительное количество метки. Стартовая зона (№ 12) в этих расчетах не учитывалась, так как известно ⁽⁸⁾, что в этой зоне, кроме высокомолекулярных компонентов, имеются агрегаты, содержащие все остальные белки мембран в том же соотношении, что и исходный препарат.

Удельная радиоактивность аминокислот нам неизвестна и, чтобы рассчитать ее, мы провели препаративное выделение немеченого белка № 3 и определили

соотношение аминокислот в нем по результатам ионообменной хроматографии. Эти данные позволили найти связь между радиоактивностью образцов и молекулярными отношениями аминокислот в каждом белке.

Мы исходили из допущения, что биосинтез всех мембранных белков в бактериальной клетке происходит одновременно и со скоростью, пропорциональной количеству каждого белка, и поэтому включение меченых аминокислот отражает количественные соотношения белков в мембране и аминокислот в белке. Это допущение основано на известном факте почти полного отсутствия обмена в структурных элементах бактериальной клетки ⁽¹¹⁾.

Таким образом, если в белке № 3 радиоактивность аланина 692 имп/мин, а в белке № 2 341 имп/мин, то значит и в молярном выражении аланина в белке № 2 содержится в 2 с лишним раза меньше, чем в белке № 3. Такие рассуждения, очевидно, справедливы и для других аминокислот.

После расчета молярных аминокислотных отношений для всех белков была проведена оценка физико-химических свойств белков путем группировки аминокислот в три класса (рис. 2): неполярные — фенилаланин, лейцины, валин, метионин; полярные — аргинин, лизин, гистидин, аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, треонин, серин и маленькие — аланин, глицин, пролин* ⁽¹²⁾. Относительное содержание гидрофобных аминокислот колеблется от 15 до 50% с общей тенденцией к возрастанию по мере увеличения молекулярного веса белка ⁽¹³⁾. Группа белков под № 6 обладает сильно выраженными полярными свойствами; значительные колебания претерпевает отношение кислых аминокислот к основ-

* В работе ⁽¹²⁾ в маленькие аминокислоты пролин не входит.

ным, и, хотя у части белков кислые аминокислоты преобладают, имеются белки с почти равным содержанием этих аминокислот.

Проведенный анализ никак нельзя считать полным и окончательным. В нем совершенно отсутствуют данные по содержанию триптофана, серусодержащих аминокислот и амидов. Однако имеющиеся данные уже позволяют сделать один существенный вывод, а именно тот, что в мембранах *M. lysodeikticus* имеются в измеримом количестве белки, очень непохожие друг на друга по свойствам. Отсюда можно допустить, что бактериальная мембрана не монотонна по соотношению сил взаимодействия ее компонентов и что в ней имеются участки с преобладанием как неполярных, так и различных полярных взаимодействий. Окончательное суждение по этому вопросу можно будет сделать после тщательного анализа мембранных белков и, в частности, белков, растворяющихся в органических растворителях при обезжиривании мембран.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
30 XII 1971

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. С. Гельман, М. А. Лукоянова, Д. Н. Островский, Дыхательный аппарат бактерий, «Наука», 1966. ² K. McQuillen, *Bacteria*, 1, 250 (1960). ³ И. Г. Жукова, Д. Н. Островский и др., *Биохимия*, 31, 1209 (1966). ⁴ H. Drucker, L. Campbell, R. Woody, *Biochemistry*, 9, 1519 (1970). ⁵ K. Miki, K. Okunuki, *J. Biochem.*, 66, 831 (1969). ⁶ Д. Н. Островский, Н. С. Гельман, *Биохимия*, 30, 772 (1965). ⁷ Н. С. Гельман, И. Г. Жукова, А. И. Опарин, *Биохимия*, 28, 122 (1963). ⁸ М. Ю. Софронова, Д. Н. Островский, Н. С. Гельман, *Биохимия*, 36, 997 (1971). ⁹ K. Takayama, D. MacLennan et al., *Arch. Biophys.*, 144, 223 (1966). ¹⁰ R. Yong, H. Fulhorst, *Anal. Biochem.*, 11, 389 (1965). ¹¹ A. Mandelstam, *Bact. Rev.*, 24, 289 (1960). ¹² F. Hatch, A. Bruce, *Nature*, 218, 1166 (1968). ¹³ Д. Н. Островский, И. М. Цфасман, Н. С. Гельман, *Биохимия*, 34, 993 (1969).