

УДК 577.158.45

БИОФИЗИКА

В. М. КОЧКИНА, Ю. М. ТОРЧИНСКИЙ, Н. Е. ЩУЦКЕВЕР,
В. В. БОРИСОВ

**ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ РЕНТГЕНОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
КРИСТАЛЛОВ АСПАРТАТ-ТРАНСАМИНАЗЫ ИЗ СЕРДЦА КУР**

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 2 I 1973)

Предварительное рентгенографическое исследование кристаллов белка имеет целью определение параметров элементарной ячейки кристаллов и выяснение их пригодности для проведения анализа трехмерной структуры белка. Такое исследование было проведено нами с кристаллами цитоплазматической аспартат- α -кетоглутарат-трансаминазы (КФ 2.6.1.1) из сердца кур.

Аспартат-трансаминазу выделяли из куриных сердец по модифицированной методике Бертланд и Каплана (1). Активность фермента определяли при pH 8,3 и 37° по приросту оптической плотности при 280 м μ за счет образования оксалоацетата в реакции переаминирования между α -кетоглутаратом и L-аспартатом. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое вызывает увеличение оптической плотности на 0,001 в 1 мин. Препараты трансаминазы, использованные для кристаллизации, имели удельную активность от 40 000 до 50 000 ед. на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, принимая E_{280} 1% раствора равной 14,2 (2). Исследование седиментации наиболее активных препаратов фермента в аналитической ультрацентрифуге «Спинко» показало их гомогенность.

Кристаллизацию аспартат-трансаминазы проводили следующим образом. К раствору фермента в 0,05 M К-фосфатном буфере (pH 7,0 или 7,5) медленно добавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ примерно до 40% насыщения; при этом величина pH раствора снижалась до 6,5–7,0. В ряде опытов раствор фермента содержал α -кетоглутаровую кислоту в концентрации 0,01 M. Концентрация белка в растворе варьировала от 4 до 15 мг в 1 мл. Легкую муть, возникавшую при добавлении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, удаляли путем центрифugирования. После центрифугирования пробирки с раствором фермента плотно закрывали и помещали в холодную комнату при 4°. Кристаллы выращивали в течение нескольких недель; в зависимости от условий инкубации (pH, ионной силы и т. п.) они имели форму палочек, прямоугольных и шестиугольных пластинок или кубиков (рис. 1, см. вкл. к стр. 1206).

Для рентгенографических исследований были использованы кристаллы, имевшие форму квадратных пластинок со стороной квадрата 0,2 мм и толщиной 0,05 мм. Для съемки кристаллы запаивали в тонкостенные стеклянные капилляры вместе с каплей маточного раствора. Съемку проводили в прецессионных камерах на японской установке с врачающимся анодом, при силе тока 80 ма и напряжении 50 кв.

Были получены развертки двух базисных плоскостей обратной решетки $hk0$ и $0kl$. Симметрия развертки $hk0$ позволяет утверждать о принадлежности кристаллов к тетрагональной сингонии и кристаллографическому классу 422. На плоскости $hk0$ присутствуют только рефлексы, индексы которых удовлетворяют условию $h+k=2n$. На плоскости $0kl$ вдоль линии $00l$ отсутствуют рефлексы с нечетным l , однако имеется очень сильный рефлекс (0010) . Это исключает возможность наличия винтовых

осей 4_1 или 4_3 и указывает на присутствие винтовой оси 4_2 . Наиболее вероятной пространственной группой является группа $P4_22_2$, однако дополнительные погасания на плоскости $hk0$ указывают на возможное наличие псевдосимметрии. Малые размеры кристаллов не позволяли регистрировать слабые ненулевые дифракционные отражения, поэтому окончательных выводов о картине погасаний пока сделать нельзя.

Параметры элементарной ячейки составляют: $a = 124,1 \pm 0,5 \text{ \AA}$, $c = 161,2 \pm 0,5 \text{ \AA}$. Таким образом, объем элементарной ячейки равен около $2,5 \cdot 10^6 \text{ \AA}^3$.

Принимая кратность общего положения равной 8 (в соответствии с пространственной группой $P4_22_2$), получаем, что объем независимой части элементарной ячейки равен $\sim 310\,000 \text{ \AA}^3$. Согласно данным Мэтьюса (³), для всех исследованных кристаллов глобулярных белков объем v_m , приходящийся в кристалле на единицу молекулярного веса, укладывается в пределах от 1,68 до 3,53 \AA^3 на 1 дальтон. Учитывая, что молекулярный вес аспартат-трансаминазы из сердца кур равен 100 000 (¹), предполагая, что в независимой части элементарной ячейки присутствует одна молекула фермента, получим значение v_m , равное 3,1 \AA^3 на 1 дальтон. Присутствие двух молекул в независимой части элементарной ячейки дает значение v_m , равное 1,55, что выходит за указанные выше пределы и соответствует предельно плотной упаковке молекул в ячейки. На этом основании можно заключить, что в независимой части ячейки находится одна молекула фермента.

Поскольку известно, что молекула фермента состоит из двух идентичных или сходных субъединиц, можно сделать вывод о присутствии в кристаллах некристаллографической симметрии.

Наличие на рентгенограммах заметных дифракционных отражений в зоне разрешения до 3 \AA служит хорошей предпосылкой для проведения полного рентгеноструктурного анализа при условии получения более крупных кристаллов.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
11 XII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ L. H. Bertland, N. O. Kaplan, Biochemistry, 7, № 1, 134 (1968). ² L. H. Bertland, N. O. Kaplan, Biochemistry, 9, № 13, 2653 (1970). ³ B. W. Matthews, J. Mol. Biol., 33, № 2, 491 (1968).