

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- $\alpha$ -кетоглутарат-трансаминазы (КФ 2.6.1.1) из сердца кур.

Аспартат-трансаминазу выделяли из куриных сердец по модифицированной методике Бертланд и Каплана (<sup>1</sup>). Активность фермента определяли при pH 8,3 и 37° по приросту оптической плотности при 280 мμ за счет образования оксалацетата в реакции переаминирования между  $\alpha$ -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 (<sup>2</sup>). 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*  $\text{K}$ -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  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоту в концентрации 0,01 *M*. Концентрация белка в растворе варьировала от 4 до 15 мг в 1 мл. Легкую муть, возникшую при добавлении  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , удаляли путем центрифугирования. 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 вращающимся 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  $4_2$  и указывает на присутствие винтовой оси  $4_2$ . Наиболее вероятной пространственной группой является группа  $P4_22_12$ , 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:  $a = 124,1 \pm 0,5$  Å,  $c = 161,2 \pm 0,5$  Å. Таким образом, объем элементарной ячейки равен около  $2,5 \cdot 10^6$  Å<sup>3</sup>.

Принимая кратность общего положения равной 8 (в соответствии с пространственной группой  $P4_22_12$ ), получаем, что объем независимой части элементарной ячейки равен  $\sim 310\,000$  Å<sup>3</sup>. Согласно данным Мэтьюса<sup>(3)</sup>, 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 Å<sup>3</sup> на 1 дальтон. Учитывая, что молекулярный вес аспартат-трансаминазы из сердца кур равен 100 000<sup>(1)</sup>, предполагая, что в независимой части элементарной ячейки присутствует одна молекула фермента, получим значение  $v_m$ , равное 3,1 Å<sup>3</sup> 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 Å 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

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