

Ю. Е. ЕРОХИН, А. А. МОСКАЛЕНКО

ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ (ЧИСЛО ЦЕПЕЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕСА) ПИГМЕНТ-ЛИПОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ CHROMATIUM

(Представлено академиком А. И. Опариним 7 V 1973)

Ряду авторов (^{1, 3}) и нам (⁴) удалось выделить из хромофоров *Chromatium* два пигмент-липопротеиновых комплекса (Б 890 и Б 850), один из которых содержал длинноволновую форму бактериохлорофилла (БХЛ 890), реакционный центр (р.ц.) Р 890 и цитохромы, а другой — светособирающие формы БХЛ 850 и БХЛ 800. В данной работе представлены данные о белковом составе и молекулярных весах (м.в.) комплексов и входящих в них белковых цепей.

Комплексы выделяли из хромофоров *Chromatium minutissimum*, обработанных тритоном X-100 с помощью препаративного варианта элек-

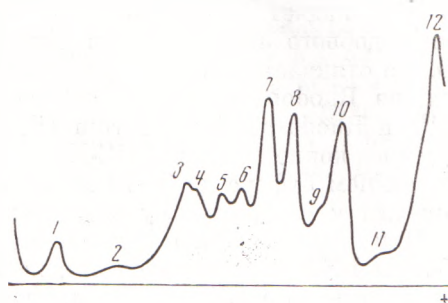


Рис. 1

Рис. 1. Разделение белков комплекса Б 890, согласно методике (⁶). 1—12 — номера полос

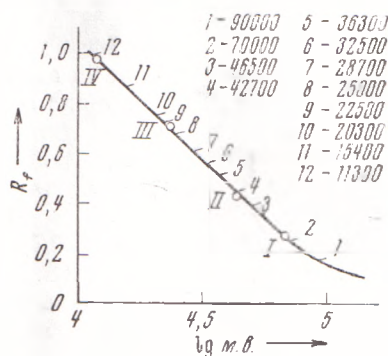


Рис. 2

Рис. 2. М.в. белковых цепей, входящих в комплекс Б 890 (1—12). Калибровочная кривая, построенная по стандартным белкам: I — сывороточный альбумин (м.в. 68 000), II — яичный альбумин (м.в. 44 000), III — димер цитохрома (м.в. 23 400), IV — цитохром (м.в. 11 700)

трофореза в полиакриламидном геле. М.в. комплексов был определен двумя методами: 1) гель-фильтрацией на колонке ($80 \times 2,1$ см) с сефадексом Г-200 в $0,01 M$ трис-НСl (рН 7,5) и $0,2 M$ NaCl. М.в. вычисляли по формуле Детермана $\lg \text{м.в.} = 6,698 - 0,987(V_e/V_0)$ (⁸), где V_e — объем элюции образца, а V_0 — холостой объем колонки, измеренный с помощью голубого декстрана; 2) электрофорезом в полиакриламидном геле с $0,1\%$ додецилсульфатом натрия (ДДС-Na) по методикам (^{5, 6}). В системе (⁵) концентрация акриламида была взята 10% , а в системе (⁶) 11% , соотношение акриламид/сшивка было $37,5$. В качестве стандартных белков-метчиков использовали цитохром с («Шутгарт», ФРГ), яичный альбумин (Олайнский завод химреактивов, СССР) и сывороточный альбумин («ЛТД», Англия). Наносили смесь этих белков, их общая концентрация составляла 2 мг/мл. Стандартные белки и комплексы (концентрация по

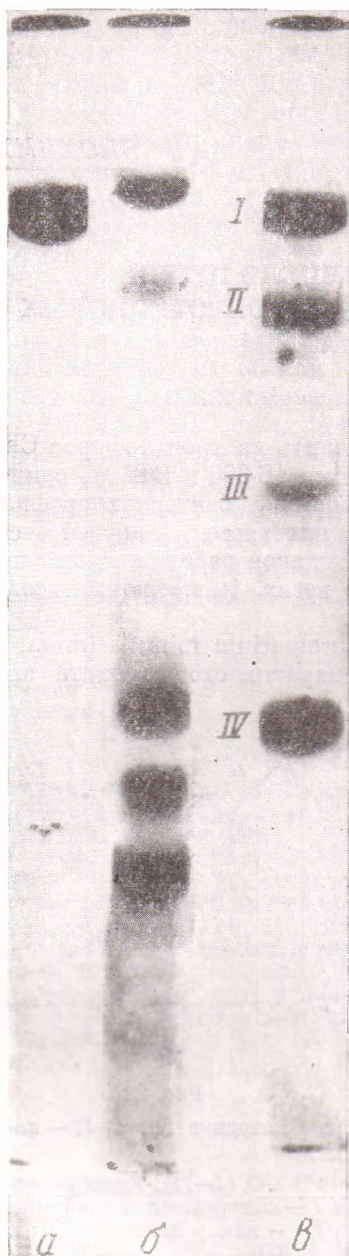


Рис. 3. Электрофореграммы белков комплекса Б 850 и стандартных белков. а — комплекс Б 850, обработанный ДДС-На при 40°; б — комплекс Б 850, обработанный ДДС-На при 100° и стандартные белки I—IV (обозначения см. в подписи к рис. 2); в — стандартные белки

белковых цепей приведены на рис. 2. Полоса 1 по спектру поглощения была идентична комплексу Б 850. Она наблюдалась только при указанных условиях обработки с ДДС-На, но отсутствовала, если комплекс Б 890 обработать тритоном X-100 и подвергнуть повторному электрофорезу. Поэтому ее трудно отнести за счет загрязнения Б 890 комплексом Б 850. Воз-

белку 2–10 мг/мл) предварительно обрабатывали из расчета 3 мг ДДС-На на 1 мг белка в присутствии 1% меркаптоэтанола в течение 1 часа при 40° или 2–3 мин. на кипящей водяной бане. Для определения м.в. нативного комплекса Б 890 последний обрабатывали 0,1% ДДС-На и электрофорез проводили по (6) с 1/2 сшивки. Стандартом в этом случае служили сывороточный альбумин и его олигомеры (димер, тример и т. д.). Диализ образцов перед электрофорезом не проводили. В каждую трубку вносили по 40–60 мкг метчиков или 100–200 мкг комплексов (по белку). Маркером фронта электрофореза служил бромфеноловый синий.

В кислых условиях (7) количество белковых цепей определялось с дополнительным введением в систему катализаторов дитионита и дегазацией раствора перед полимеризацией.

Денситограммы записывали на микрофотометре g-II («Карл Цейс», ГДР).

Двумя методами были получены сходные результаты для м.в. комплекса Б 890. Значение м.в., определенное нами в 475 500, совпадает с оценкой (500 000) (1) для подобного комплекса из *Chromatium D*, но отличается от м.в. р.д., выделенных из *Rhodopseudomonas spheroides* (2, 12, 13) и *Rhodospirillum rubrum* (14, 15). Увеличение концентрации ДДС-На в обрабатывающем буфере до 3–10 мг/мг белка приводит к необратимому разрушению Б 890. При этом исчезают длинноволновые формы БХЛ и появляется пик поглощения мономерного БХЛ, а затем феофитина или его агрегатов. Концентрации ДДС-На (10 мг на 1 мг белка), применяемые для определения м.в., согласно (5), вызвали агрегацию белков комплекса, и при электрофорезе нанесенный материал оставался на вершине геля. Поэтому концентрация ДДС-На была понижена до 3 мг на 1 мг белка. В этом случае все белки комплекса входили в гель, а пигменты отделялись от своих белковых носителей и шли вместе с фронтом электрофореза.

Электрофорез белков комплекса Б 890 в обеих системах (5, 6) дает одинаковые результаты (рис. 1), при этом для комплекса Б 890 видны 12 полос. Значения м.в.

можно, что полоса 1 является либо прочно связанным Б 850, либо идентична фракции С (¹).

В ряде работ (^{1, 3, 4}) было показано наличие в комплексе Б 890 двух цитохромов, которые отчетливее выявляются при восстановлении дитионитом. Поэтому можно было ожидать, что среди обнаруженных белковых цепей некоторые из полос могут принадлежать цитохромам. При увеличении количества нанесенного материала и диаметра трубок ясно видны желтоватые полосы, соответствующие зонам 3, 4, 5, 6 и 10. Если комплекс Б 890 был разрушен не полностью, то интенсивность окраски зоны 10 уменьшалась, а зоны 5 и 6, сливаясь, давали одну зону большей интенсивности. Белковые цепи, соответствующие этим зонам, имеют в спектре поглощения пик в области 415–425 мμ и, очевидно, принадлежат цитохромам. Полученные значения м.в. незначительно отличаются от данных (¹⁴) для связанных с мембранами цитохромов из *Chromatium D*: 45 000, 29 000 и 23 000, что может быть объяснено небольшим различием цитохромов у разных штаммов *Chromatium*.

М.в. полос 7, 8, 9 и 10 (полоса 9 является минорной и иногда отсутствует) близки к значениям м.в. белков из препаратов р.д. из *Rhodospseudomonas spheroides* — 28 000, 23 000 и 21 000 (^{9, 10}) и *Rhodospirillum rubrum* (¹⁵). По другим данным (^{13, 14}), в состав р.д. входит одна белковая цепь с м.в. 35 000–30 000. По-видимому, у *Chromatium minutissimum* к р.д. могут быть отнесены полосы 7 и 8 или одна из них. Определение м.в. комплекса Б 850 на колонках с сефадексом затруднено, так как он легко агрегирует при удалении детергента, давая агрегаты с большими м.в. порядка 10⁶. Однако комплекс стабилен и не диссоциирует на отдельные цепи даже при больших концентрациях ДДС-Na (до 10 мг на 1 мг белка). Поэтому его м.в. определяли согласно (^{5, 6}). При pH 7,0 получено значение м.в. в 70 000, а при pH 9,5 (⁶) — около 90 000 (рис. 3а), совпадающее с оценкой (¹) (100 000 ± 10 000) для аналогичного комплекса из *Chromatium D*.

Нагревание комплекса Б 850 до 100° в присутствии ДДС-Na вызывает его распад на две цепи с м.в. 9800 и 7600 (рис. 3б).

Анализ белков комплексов в кислых условиях был затруднен из-за их плохого растворения в таких системах. При этом основная масса материала осталась на старте, а небольшая часть входила в гель. Этим методом для комплекса Б 890 было обнаружено 6 зон (рис. 4). Такое же количество белков описано для *Rhodospseudomonas spheroides* (²).

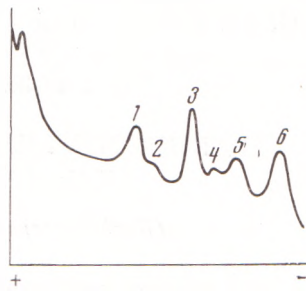


Рис. 4. Денситограмма белков (1–6) комплекса Б 890 при электрофорезе в кислых условиях (⁷)

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

Поступило
27 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. P. Tornber, *Biochemistry*, 9, 13, 2688 (1970). ² D. W. Reed, *J. Biol. Chem.*, 244, 18, 4931 (1969). ³ B. Ke, L. P. Vernon et al., *Biochemistry*, 7, 1, 341 (1968). ⁴ Ю. Е. Ерохин, А. А. Москаленко, II Всесоюз. биохим. съезд, Тез., 19 секция, Проблемы фотосинтеза, Ташкент, 1969, стр. 29. ⁵ K. Weber, M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, 244, 16, 4406 (1969). ⁶ B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 2, 404 (1964). ⁷ Д. Н. Островский, И. М. Цфасман, Н. С. Гельман, *Биохимия*, 34, 5, 993 (1969). ⁸ Г. Детерман, *Гельхроматография*, М., 1970. ⁹ R. K. Clayton, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 1, 44 (1972). ¹⁰ G. Feher, *Photochem. Photobiol.*, 14, 3, 373 (1971). ¹¹ S. J. Kennel, M. D. Kamen, *Biochim. et biophys. acta*, 253, 1, 153 (1971). ¹² L. Slooten, *Biochim. et biophys. acta*, 256, 2, 452 (1972). ¹³ F. Reis Husson, G. Jolchine, *Biochim. et biophys. acta*, 256, 2, 440 (1972). ¹⁴ W. R. Smith, C. Sybesma, K. Dus, *Biochim. et biophys. acta*, 267, 3, 609 (1972). ¹⁵ H. Noel, M. Rest, G. Gingras, *Biochim. et biophys. acta*, 275, 2, 219 (1972).