

Е. Ш. ЛУГОВАЯ, Н. И. ЗАХАРОВА, В. М. КУТЮРИН

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕСА БЕЛКОВЫХ СУБЪЕДИНИЦ ЛАМЕЛЛ ХЛОРОПЛАСТОВ ГОРОХА

(Представлено академиком А. П. Виноградовым 11 IV 1973)

Белковые компоненты тилакоидов почти совершенно не изучены по сравнению с липидными и пигментными компонентами. До сих пор нет единого мнения о числе белков в ламеллах хлоропластов. Обнаружены и достаточно хорошо изучены два пигмент-белковых комплекса, однако сведения об их молекулярных весах, полученные методом седиментационного анализа, противоречивы (¹, ²).

Большие затруднения в изучении белков ламелл связаны с их ограниченной растворимостью. Эти белки, подобно другим структурным белкам, растворимы при крайних значениях pH (³) или в присутствии детергентов. Наиболее эффективен в растворении белков ламелл анионный детергент додецилсульфат натрия (SDS) (³).

В настоящей работе ставилась цель уточнить число белковых компонентов ламелл хлоропластов и определить их молекулярный вес, используя метод электрофореза в полиакриламидном геле в системе додецилсульфат натрия (SDS) — 2-меркаптоэтанол (⁴). Обладая высокой разрешающей способностью, метод Шапиро позволяет определить молекулярные веса отдельных субъединиц сложной многокомпонентной белковой системы. Этот метод получил широкое распространение за рубежом, однако в отечественных исследованиях еще мало используется. Разрушение белковой молекулы на отдельные субъединицы обеспечивается SDS и 2-меркаптоэтанолом. Кроме того, SDS образует с субъединицами белка детергент-белковый комплекс, длина которого пропорциональна белковой части комплекса и нейтрализует собственный заряд белковой молекулы, в результате чего все белки мигрируют как анионы. Это дает возможность из трех факторов, определяющих подвижность белковой молекулы в поле электрического тока, а именно: заряда, формы и размера, устранить влияние двух параметров и оценить подвижность только по размерам молекулы. В диапазоне молекулярных весов от 10 000 до 100 000 наблюдается прямая зависимость относительной подвижности белков от логарифма их молекулярного веса.

Исходным материалом служили хлоропласты гороха возраста 10–12 дней, выращенные на среде Кнопа. Хлоропласты выделяли измельчением листьев в 0,5 *M* растворе сахарозы в фосфатном буфере (0,026 *M*), содержащем 10^{-3} *M* ЭДТА, и отмывали от водорастворимых белков ламелл 0,026 *M* фосфатным буфером. Далее хлоропласты разрушали действием ультразвука (20 кгц, 10 мин., 0,6 а) при охлаждении. Дифференциальным центрифугированием выделяли фракции крупных (10 000 *g*, 30 мин.) и мелких частиц ламелл хлоропластов (50 000 *g*, 1 час и 144 000 *g*, 1 час.). Эти фракции обрабатывали в течение часа SDS, соотношение SDS : белок было равно 10 : 1 (мг : мг). При таком соотношении достигалось полное растворение белков указанных частиц. Для обнаружения отдельных белков ламелл использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле.

Электрофорез проводили в трис-глицериновом буфере (0,01 *M* по трису, 0,8 *M* по глицерину), pH 8,6, с 0,1% SDS и 0,1% 2-меркаптоэтанолом. Сила

тока 8 ма на трубку, время электрофореза 1,5 часа. Размер столбика геля: диаметр 5 мм, высота 65 мм. Наилучшее разделение получалось при использовании 12% геля акриламида. После электрофореза электрофореграммы фиксировали 20% сульфосалициловой кислотой (1 час.), прокрашивали 0,2% раствором амидошварца (15 мин.) в смеси метанол : уксусная кислота : вода (4 : 10 : 1) и отмывали в той же смеси. Опыты по электрофорезу показали, что белки ламелл хлоропластов изменяют свою структуру только под действием SDS и не требуют обработки 2-мер-

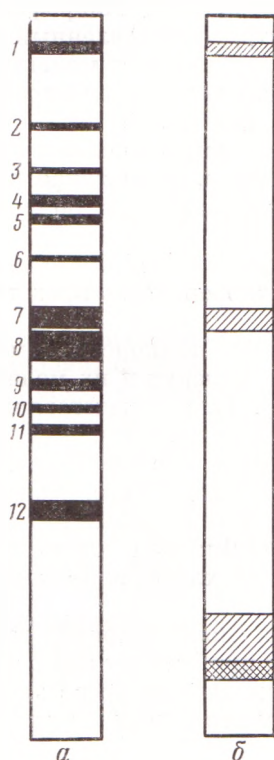


Рис. 1

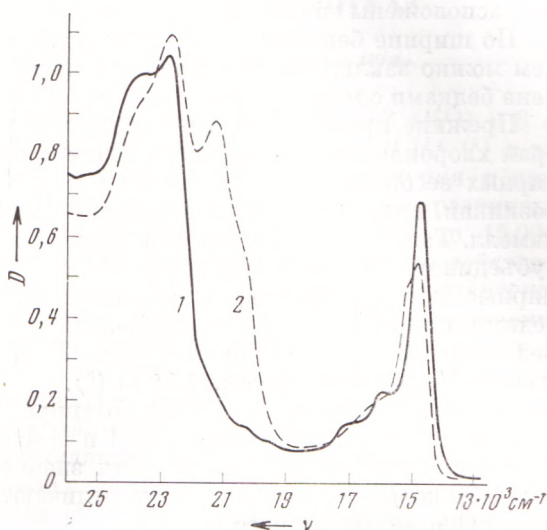


Рис. 2

Рис. 1. Распределение белковых субъединиц (1–12) фракции 10 000 г при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии 0,1% SDS. а – после окрашивания 0,2% амидошварцем, б – до окрашивания. Молекулярные веса субъединиц: 1 – 95 000, 2 – 69 000, 3 – 60 000, 4 – 56 000, 5 – 54 000, 6 – 47 000, 7 – 34 000, 8 – 32 000, 9 – 29 000, 10 – 27 000, 11 – 25 000, 12 – 18 000

Рис. 2. Электронные спектры поглощения хлорофилл-белковых комплексов в трис-глициновом буфере (0,01 M по трису, 0,8 M по глицину), pH 8,6, содержащем 0,1% SDS. 1 – комплекс I фотосистемы, 2 – II фотосистемы

каптоэтанолом, однако для белков-стандартов подобная обработка необходима для полного разрушения молекул на субъединицы.

В качестве стандартов для построения калибровочной кривой были взяты белки с известными молекулярными весами субъединиц⁽⁵⁾. В выбранным диапазоне молекулярных весов была получена прямая зависимость подвижности белковых субъединиц от логарифма их молекулярных весов. Наиболее четкая картина разделения белков наблюдается при нанесении 150 мкг белка на трубку.

До окрашивания амидошварцем на электрофореграмме обнаруживали три зоны, окрашенные пигментами (рис. 1). Окрашенная зона, идущая по фронту, содержала только свободные пигменты. Две другие прокрашивались на белки. Эти зоны были проэлюированы 0,02 M трис-HCl-буфером pH 8,0. Полученные спектры поглощения зон оказались близкими к спектрам пигмент-белковых комплексов, принадлежащих к I и II фотосистемам (рис. 2)⁽⁶⁾.

Электрофореграммы белков мелких и крупных частиц очень сходны по распределению основных белковых субъединиц. Помимо двух пигмент-белковых комплексов, на электрофореграмме постоянно проявляются при прокраске еще восемь полос. Общее число проявляющихся белковых зон колеблется от опыта к опыту и составляет 10—13 зон. Постоянно присутствующие зоны обозначены на рис. 1 номерами 1, 4—6, 8—12. Хлорофилл-белковый комплекс, который, как показывает спектр, представленный на рис. 2, принадлежит к I фотосистеме, находится в верхней части электрофореграммы. Ниже идут 5—6 белковых полос. Среднюю часть электрофореграммы занимает хлорофилл-белковый комплекс, принадлежащий, судя по спектру, ко II фотосистеме (рис. 2). Вплотную к этому комплексу прижимается широкая и интенсивно прокрашивающаяся зона, не несущая пигментов. Между этой зоной и зоной свободных пигментов, идущих по фронту, расположены еще четыре белковые зоны.

По ширине белковых зон и интенсивности прокрашивания амидошварцем можно заключить, что основная масса ламелл хлоропластов представлена белками с молекулярным весом 25000—55000.

Прежние представления об однородности белковых компонентов мембран хлоропластов в отношении размера отдельных молекул и их молекулярных весов, видимо, нуждаются в пересмотре (³). Такие представления возникли, в частности, из определения коэффициента седиментации белков ламелл. Так, было получено, что белки ламелл представлены однородными субъединицами с молекулярным весом 20 000 (^{7,8}). Кроме того, молекулярные веса двух хлорофилл-белковых комплексов, определенные методом седиментационного анализа, оказались очень близкими: для хлорофилл-белкового комплекса II фотосистемы 23 000 (²), а для хлорофилл-белкового комплекса I фотосистемы 35 000 (²).

Полученные нами по методу Шапиро значения молекулярных весов субъединиц белковых комплексов I и II фотосистем приблизительно равны 95 000 и 34 000 соответственно. Эти значения молекулярных весов хлорофилл-белковых комплексов резко отличаются от величин, полученных методом седиментационного анализа.

По-видимому, метод седиментационного анализа не может быть использован при изучении столь сложной смеси белковых субъединиц в присутствии детергента без учета агрегационной способности субъединиц структурного белка.

В процессе подготовки этой работы к печати появилась работа (⁶), в которой приведены данные по молекулярным весам пигмент-белковых комплексов, определенные с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по методу Шапиро. Эти данные оказались очень близкими нашим.

Полученные данные о множественности белковых компонентов, различных по размеру и молекулярному весу, отвечают сложившимся представлениям о сложной структуре ламелл тилакоидов (⁹).

Институт геохимии и аналитической химии
им. В. И. Вернадского
Москва

Поступило
29 III 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. Ogawa, F. Obata, K. Shibata, *Biochim. et biophys. acta*, **112**, 223 (1966).
- ² J. P. Thornber, J. C. Stewart et al., *Biochemistry*, **6**, 2006 (1967). ³ H. C. Гельман, *Усп. совр. биол.*, **68**, 3 (1969). ⁴ A. L. Shapiro, E. Venuela, J. V. Maizel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **8**, 815 (1967). ⁵ K. Weber, M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969). ⁶ S. D. Kung, J. P. Thornber, *Biochim. et biophys. acta*, **253**, 285 (1971). ⁷ A. Lockshin, R. H. Burris, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 1564 (1966). ⁸ J. Biggins, R. B. Park, *Plant Physiol.*, **40**, 1109 (1965). ⁹ L. P. Vernon, E. R. Shaw, T. Ogawa, *Photochem. Photobiol.*, **14**, 343 (1971).