

Г. А. БУЗУН, К. М. ДЖЕМУХАДЗЕ, Л. Ф. МИЛЕШКО

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕСА ИЗОФЕРМЕНТОВ
ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ ПОБЕГОВ ЧАЙНОГО РАСТЕНИЯ,
ОПРЕДЕЛЕННЫЕ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА
В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 27 V 1974)

Полифенолоксидаза (О-дифенол-О₂-оксидоредуктаза, ЕС. 1. 10. 3. 1) является гетерогенным и лабильным ферментом, поэтому в литературе мало данных по молекулярным весам изоферментов. В настоящей работе для определения молекулярных весов изоферментов полифенолоксидазы чайного растения был использован метод Хедрика и Смита (¹), который исключает применение денатурирующих агентов.

Молодые побеги чайного растения (дву- и трехлистные флешы), собирали в Адлерском районе и хранили до начала опыта при температуре 78,5°. Навески, равные 3–10 г, растирали 20 мин. в ступке с десятикратным объемом 0,1 М лимонно-фосфатного буфера (рН 7), содержащим 0,3% аскорбината Na, и порошком капрона (²), составлявшим 3/4 веса навески. Экстракт отжимали через ткань и пропускали через колонку из порошка капрона, составлявшего 1/4 веса навески (*d : h = 1 : 3*). Получали бесцветный прозрачный раствор, не требовавший центрифугирования («экстракт без очистки»). Электрофорезу подвергали: а) экстракты без очистки; б) экстракты, пропущенные через колонку сефадекса G-50, уравновешенную 0,005 М фосфатным буфером, рН 7; в) ферменты, осажденные из экстракта сульфатом аммония в области 30–90% насыщения и обессоленные, как в п. б); г) ферменты, прошедшие стадию в) и разделенные на ДЭАЭ-целлюлозе (³); д) ферменты экстрактов п. а), разделенные на колонках сефадекса G-200 (⁴). Электрофорез проводили при рН 8,3 по методу Дэвиса (⁵), но без крупнопористого геля. Образцы смешивали с бромфеноловым синим и вносили их под электродный буфер на верх разделяющего геля. Полифенолоксидазу брали в количестве 0,010–0,015 единиц (³). Электрофорез проводили в аппарате «Реанал», модель 69. Сила тока сначала была 2 ма на трубку в течение 30 мин., а затем 4 ма на трубку в течение 60 мин. По окончании электрофореза отмечали положение бромфенолового синего (¹). Белки окрашивали 30 мин. 1% амидочерным в 7% уксусной кислоте, после чего краситель отмывали 7% уксусной кислотой. Для обнаружения полифенолоксидазной активности гели инкубиро-

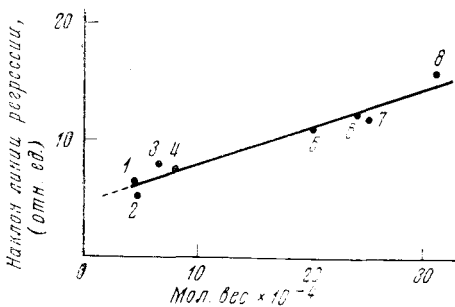


Рис. 1. Зависимость наклонов линий регрессий от молекулярных весов стандартных белков. 1 — α-амилаза; 2 — яичный альбумин; 3 — бычий сывороточный альбумин, мономер, 4 — креатинкиназа; 5 — фосфоорилаза В; 6 — каталаза; 7 — пируваткиназа; 8 — эдестин

осажденные из экстракта сульфатом аммония в области 30–90% насыщения и обессоленные, как в п. б); г) ферменты, прошедшие стадию в) и разделенные на ДЭАЭ-целлюлозе (³); д) ферменты экстрактов п. а), разделенные на колонках сефадекса G-200 (⁴). Электрофорез проводили при рН 8,3 по методу Дэвиса (⁵), но без крупнопористого геля. Образцы смешивали с бромфеноловым синим и вносили их под электродный буфер на верх разделяющего геля. Полифенолоксидазу брали в количестве 0,010–0,015 единиц (³). Электрофорез проводили в аппарате «Реанал», модель 69. Сила тока сначала была 2 ма на трубку в течение 30 мин., а затем 4 ма на трубку в течение 60 мин. По окончании электрофореза отмечали положение бромфенолового синего (¹). Белки окрашивали 30 мин. 1% амидочерным в 7% уксусной кислоте, после чего краситель отмывали 7% уксусной кислотой. Для обнаружения полифенолоксидазной активности гели инкубиро-

вали 1 час в смеси равных объемов 1% водного раствора пирокатехина, 0,05 M фосфатного буфера pH 6,8 и 0,06% раствора парафенилендиамина в 0,01 M растворе щавелевой кислоты. Гели промывали смесью этанола, воды и уксусной кислоты (10 : 15 : 1,5)

Определяли относительную подвижность (Rm) стандартных белков и изоферментов полифенолоксидазы в гелях разной концентрации. Графически зависимость $\log Rm$ от концентрации геля представлена линейной функцией регрессии. Чем выше молекулярный вес белка, тем больше тангенс угла наклона линии регрессии. Белки одинакового размера, но с разным зарядом, дают параллельные линии. Линейные функции регрессии

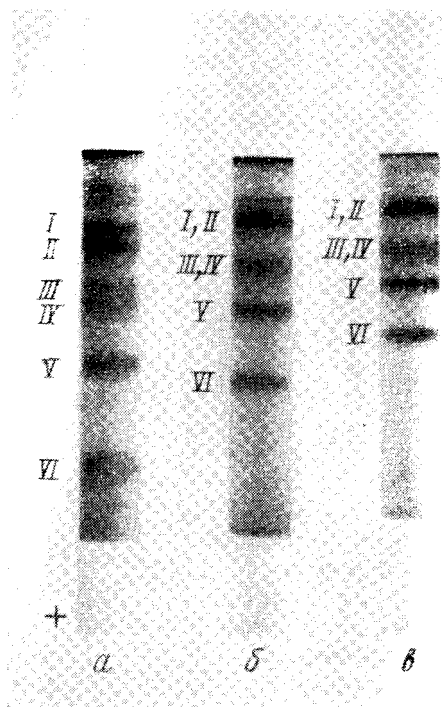


Рис. 2

Рис. 2. Энзимограммы полифенолоксидазы в гелях разной концентрации. а — 4,8%; б — 7,2%; в — 9,6%. I—VI — изоферменты полифенолоксидазы

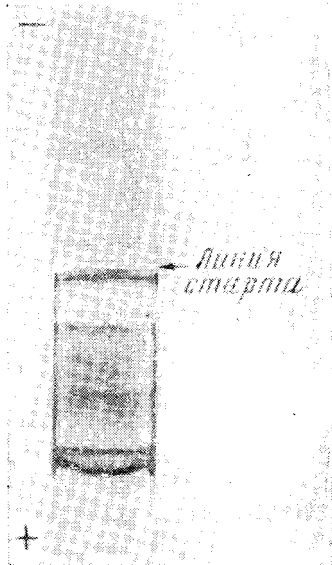


Рис. 3

Рис. 3. Энзимограмма полифенолоксидазы при горизонтальном электрофорезе в 7,2% геле

были получены на основании определения Rm в 5 разных концентрациях геля.

Наряду со средней линией регрессии находили для нее доверительный интервал, учитывающий ограниченность экспериментальных данных (не менее 5 определений для каждой концентрации геля). Далее для стандартных белков строилась зависимость тангенс угла наклона — молекулярный вес (рис. 1). Находили среднее значение тангенсов и доверительный интервал при доверительной вероятности $\gamma=0,95$. В результате проведенных расчетов установлена достаточность числа стандартных белков для построения такой зависимости, а также была найдена ее линейная аппроксимация. Этот график (рис. 1) служил для определения молекулярных весов изоферментов полифенолоксидазы по их тангенсам угла наклона, полученным так же, как и для стандартных белков. Расчеты были проведены на ЭВМ «Наири» К.

Как показал диск-электрофорез (рис. 2), полифенолоксидаза экстрактов без очистки и после очистки (пп. б) и в) делится в щелочном геле низкой концентрации по крайней мере на 8 полос. В гелях, более концентрированных, — на 4 полосы. Кроме того, имеются 2 катионных изофермента, которые обнаруживаются при горизонтальном электрофорезе (рис. 3), когда препарат фермента наносится в середину блока. Ввиду сложности изоферментного состава полифенолоксидазы производили разделение суммарного препарата на ДЭА-целлюлозе и сефадексе G-200. Для установления идентичности изоферментов, полученных при разных способах очистки и разделения (пп. а) — д), проводили электрофорез каждой фракции на гелях пяти концентраций и все данные подвергали статистической обработке.

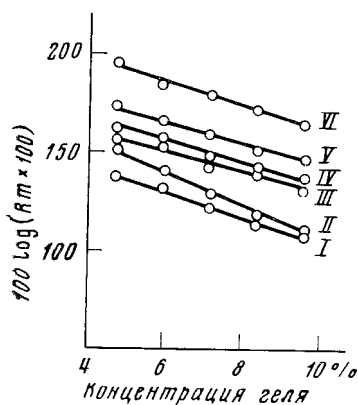


Рис. 4. Линии регрессий (I-VI) тех же изоферментов полифенолоксидазы, что и на рис. 2

На рис. 4 показаны линии регрессий 6 анионных изоферментов полифенолоксидазы. Линии I и VI, IV и V параллельны, что свидетельствует о близких или одинаковых молекулярных весах соответствующих изоферментов, а также об их разных зарядах. На основании тангенсов наклонов молекулярные веса изоферментов имеют следующие величины: I. 51500 ± 2500 , II. 117000 ± 200 , III. 35300 ± 200 , IV. 40500 ± 2500 , V. 41500 ± 1500 , VI. 56000 ± 2000 .

Из данных этих видно, что молекулярные веса некоторых изоферментов (II, III, VI) близки к величинам, полученным ранее (4) методом гель-фильтрации. Часть полифенолоксидазной активности задерживается при электрофорезе на верху гелевой колонки (рис. 2). Это могут быть высокомолекулярные агрегаты фермента с какими-то белками, также обнаруженные ранее (4). Как видно из рис. 2а, две полоски пронумерованы. Относительная подвижность верхней полосы в гелях разной концентрации не изменялась, что свидетельствует о низком молекулярном весе соответствующего соединения (ниже 30 000). Размер молекулы второго пронумерованного изофермента лежит в зоне 190—240 000 и в настоящее время уточняется.

Полученные данные по значениям молекулярных весов для отдельных изоферментов полифенолоксидазы могут указывать на то, что наблюдающаяся гетерогенность этого фермента в ряде случаев обусловлена процессом ассоциации — диссоциации субъединиц с молекулярным весом около 30 000. Существование форм полифенолоксидазы с молекулярным весом, не кратным 30 000, может объясняться присоединением пептидов или веществ небелковой природы, например углеводов (6), что приводит к менее резким различиям в величине молекулы.

Авторы выражают благодарность С. Я. Карпухиной, Н. Б. Ливановой, В. В. Мосолову, Н. А. Розановой, В. Я. Черняку за предоставление препаратов белков.

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

Поступило
15 V 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. L. Hedrick, A. J. Smith, Arch. Biochem. and Biophys., v. 126, 155 (1968).
² Г. А. Бузун, К. М. Джемухадзе, Л. Ф. Милешко, Прикл. биохим. и микробиол., т. 6, 345 (1970).
³ Г. А. Бузун, К. М. Джемухадзе, Л. Ф. Милешко, Биохимия, т. 35, 1002 (1970).
⁴ Г. А. Бузун, К. М. Джемухадзе, Л. Ф. Милешко, ДАН, т. 209, № 6 (1973).
⁵ B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, 404 (1964).
⁶ E. Harel, A. M. Mayer, E. Lehman, Phytochem., v. 12, 2649 (1973).