

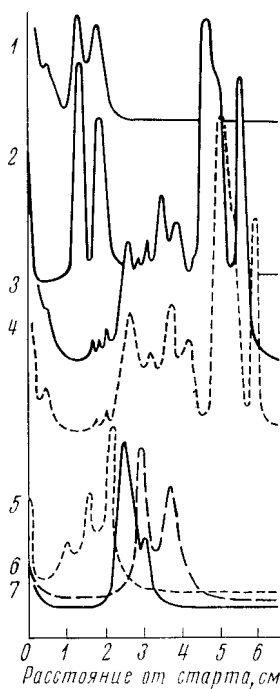
М. И. МОЛЧАНОВ, В. М. ТРУСОВА, А. П. КОТОВСКАЯ,
академик А. И. ОПАРИН

О ВЫДЕЛЕНИИ ПРОТЕОЛИПИДОВ ИЗ МЕМБРАН ПЛАСТИД И СИНЕЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Протеолипиды — наиболее гидрофобные белки мембран — были получены впервые из тканей мозга Фолчем и Лиисом (¹). Аналогичную по свойствам фракцию белков выделяли из хлоропластов шпината Цилл и Хармон (²). В последнее время стимулом к выделению протеолипидов и их изучению послужили гипотезы об участии протеолипидов в механизмах открывания и закрывания пор в биологических мембранах (³⁻⁶). В некоторых работах для выделения протеолипидов использовалась подкисленная смесь хлороформа и метанола, что могло привести к загрязнению фракции протеолипидов остальными белками мембран (⁶). Примером могут служить белки мембран из митохондрий печени крысы, которые практически полностью растворяются в подкисленном хлороформе — метаноле (⁷). В настоящей работе изучали биосинтез протеолипидов мембранной системы пластид кукурузы *in vivo*, а также их аминокислотный состав. Кроме того, проведено сравнительное изучение электрофоретических свойств протеолипидов из мембран пластид кукурузы, фасоли и синезеленых водорослей *Anacystis nidulans* и *Aphanizomenon flos-aquae* в полиакриламидном геле.

Препараты проламеллярной и ламеллярной систем пластид выделяли из 5-дневных проростков кукурузы сорта Буковинская-3 и фасоли сорта Северная звезда 690 по методу (⁸). Фракции мембран из сине-зеленых водорослей получали по методу (⁹). Мембраны экстрагировали на холоду дважды смесью хлороформ — метанол (2:1), экстракт центрифугировали, добавляли равный объем воды и вновь центрифугировали. Материал интерфазы перерастворяли в хлороформе — метаноле (2:1), раствор фильтровали через стеклянный фильтр № 4, встряхивали с равным объемом воды и центрифугировали. Материал интерфазы оставляли в течение ночи в acetone при 0°. Нерастворимый осадок, содержащий протеолипиды, собирали центрифугированием. Для включения ¹⁴C в протеолипиды проростки выращивали на минеральной среде Кроне, содержащей в 200 мл раствора 200 мг KNO₃, 50 мг Ca₃(PO₄)₂, 100 мг MgSO₄, 100 мг CaSO₄, 1 мг H₃BO₃, 1 мг MnSO₄, 50 мг Fe₂(SO₄)₃ и 1,95 мг NaH¹⁴CO₃ (5 мС, уд. акт. 260 мС/г). Гидролиз протеолипидов проводили в 6N HCl при 104° в течение 24 час., анализ аминокислот — в анализаторе KLA-3 фирмы «Хитачи» (Япония). Методы разделения ¹⁴C-аминокислот описаны ранее (¹⁰). Радиоактивность проб измеряли в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Интертехник СЛ-30». При электрофореze протеолипидов и суммарных белков мембран в полиакриламидном геле рабочий раствор геля готовили, смешивая последовательно 3,6 мл воды, 2,4 г акриламида, 35 мг бис-акриламида, 7,2 г мочевины, 8,4 мл 85% муравьиной кислоты и 2,4 мл 10% раствора персульфата аммония. После удаления из раствора воздуха в раствор вносили 0,3 мл ТЕМЕД. Колонки заполняли 2 мл гелевого раствора, наслаивали 0,5 мл воды и полимеризовали в течение 90 мин. при 40°. Белки мембран, освобожденные от липидов, растворяли в течение 3 час. при комнатной температуре в сильно диссоциирующей системе фенол — муравьиная кислота — вода (2:1:1 по объему), содержащей 10% мочевины. В колонки вносили 0,05—0,07 мл раствора белка. Электрофореz проводили в 10% му-

Рис. 1. Распределение протеолипидов и остальных белков мембран из пластид высших растений и протеолипидов из мембран синезеленых водорослей в полиакриламидном геле. Протеолипиды из мембран синезеленых водорослей *Anacystis nidulans* (1) и *Aphanizomenon flos-aquae* (2); протеолипиды из мембран пропластид (5) и хлоропластов (6) кукурузы и хлоропластов фасоли (7) и остальные белки из пропластид (4) и мембран хлоропластов (3) кукурузы



равьиной кислоте при 0° в течение 20 час. при силе тока на трубку 15 ма. Направление движения белков — от анода к катоду. Гели фиксировали 15 мин. в 10% ТХУ и окрашивали в течение часа 1% раствором амидового черного в 7% уксусной кислоте. Избыток краски отмывали 7% уксусной кислотой. Гелевые столбики депситометрировали на приборе МФ-4.

В препаратах ламеллярной системы пластид на долю белков, переходящих в хлороформ — метанол, приходится не более 0,13% мембранного белка или 0,07% сухого веса мембраны. При выращивании проростков на минеральной среде, содержащей изотоп ^{14}C , в аминокислотах протеолипидов из ламеллярной системы хлоропластов было сосредоточено от 2,9% до 15,0% радиоактивности ^{14}C от ее содержания в суммарных белках мембран. Сравнение данных о количественном содержании протеолипидов в мембранах пластид и величин включения ^{14}C в протеолипиды *in vivo* говорит о том, что речь идет об очень активных в метаболизме фракциях мембранных белков проламеллярной и ламеллярной систем пластид. В составе ^{14}C -протеолипидов и остальных ^{14}C -белков мембран были обнаружены существенные различия в относительном содержании полярных и неполярных ^{14}C -аминокислот. Об этом свидетельствуют данные, представленные в табл. 1, 2. В табл. 1 радиоактивность протеолипидов в пропластидах и хлоропластах составляла 992 и 2152 имп/мин, радиоактивность остальных белков мембран 6548 и 12 182 имп/мин соответственно.

Результаты включения ^{14}C в аминокислоты протеолипидов и остальные белки мембранной системы пластид *in vivo* находятся в соответствии с данными об аминокислотном составе этих белков. Обращает на себя внимание, что протеолипиды хлоропластов в сравнении с суммарными белками мембран из пропластид и хлоропластов обеднены заряженными аминокислотами и значительно обогащены гидрофобными аминокислотами.

При электрофорезе в полиакриламидном геле фракции протеолипидов из мембран пластид и мембран синезеленых водорослей обнаруживали близкие свойства. В их составе было выявлено по два главных белковых компонента. Препараты проламеллярной и ламеллярной систем пластид в отличие от фракций протеолипидов были представлены значительным набором белковых компонентов (рис. 1).

Таким образом, протеолипиды мембранной системы пластид представляют собой группу наиболее гидрофобных белков пластид, имеющих высокую метаболическую активность *in vivo* как в сформированных хлоропластах, так и на самых ранних этапах их дифференциации — в пропластидах. Кроме того, полученные результаты подтверждают высказанное ранее (⁹)

Таблица 1

Включение ^{14}C в полярные и неполярные аминокислоты протеолипидов и остальные белки проламеллярной и ламеллярной систем пластид (% от суммарной радиоактивности ^{14}C -аминокислот в белках)

Аминокислоты	Пропластиды		Хлоропласты	
	протео-липиды	остальные белки мембран	протео-липиды	остальные белки мембран
Полярные				
Кислые	26,1	39,0	23,3	31,0
Основные	8,8	10,7	6,1	21,7
Гидроксилсодержащие	21,1	19,0	26,9	13,2
Сумма	56,0	68,7	56,3	65,9
Неполярные, сумма	44,0	34,3	43,7	34,1
Полярные/неполярные	1,27	2,19	1,51	1,94

Таблица 2

Количественное содержание аминокислотных остатков мембран пластид и синезеленых водорослей и включение ^{14}C в аминокислоты протеолипидов и остальные белки ламеллярной системы хлоропластов (% от суммарной радиоактивности ^{14}C -аминокислот в белках)

Аминокислоты	Протеолипиды мембран хлоропластов, мол. %	Суммарный белок мембран, мол. %				Включение ^{14}C , %	
		пропла-стиды	хлоро-пласты	Anacy- tis nidu- lans	Aphan- izomenon flos-aquae	протео-липиды	осталь- ные бел- ки мем- бран
Полярные							
Аспарагиновая кис- лота	6,9	12,7	13,3	10,3	14,6	12,7	25,0
Глутаминовая кисло- та	4,4	11,2	10,7	12,2	13,7	2,1	11,6
Лизин	1,5	6,4	2,8	3,7	3,7	0,5	1,8
Аргинин	1,5	3,8	3,6	4,1	3,1	Не опр.	Не опр.
Гистидин	0	3,1	2,6	3,8	0,9	1,1	0,9
Серин	5,8	6,9	7,6	5,3	7,9	19,2	13,4
Треонин	4,6	5,5	5,4	5,4	7,0	8,6	12,8
Сумма	24,7	49,6	46,0	44,8	50,9	44,2	65,5
Неполярные							
Глицин	8,4	8,9	10,0	7,9	8,7	30,1	25,9
Аланин	12,0	10,2	10,5	11,1	7,2	4,6	2,5
Валин	17,3	4,5	3,6	6,4	6,5	1,0	0,3
Лейцин	10,5	10,4	11,1	11,2	9,9	} 3,0	} 0,5
Изолейцин	7,9	4,7	4,5	5,5	6,4		
Пролин	8,1	5,3	6,4	6,8	4,7	5,1	3,1
Метионин	1,3	1,4	1,2	1,4	1,1	0,4	0,1
Тирозин	4,3	1,3	1,7	0,8	0,8	11,2	0,4
Фенилаланин	5,5	3,6	5,0	4,1	3,8	0,4	1,7
Сумма	75,3	50,3	54,0	55,2	49,1	55,8	34,5
Заряженные	14,3	34,1	30,4	30,3	35,1	15,3	38,4
Полярные/неполярные	0,33	0,99	0,85	0,81	1,04	0,79	1,90

Примечание: Радиоактивность ^{14}C -аминокислот в протеолипидах составляла 8430, в остальных белках мембран 489045 имп/мин.

предположение о том, что липопротеидные комплексы мембран синезеленых водорослей по целому ряду свойств подобны липопротеидным комплексам мембранной системы пластид высших растений.

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

Поступило
9 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. Folch, M. Lees, J. Biol. Chem., v., 191, 807 (1951). ² L. C. Zill, E. A. Harmon, Biochim. et biophys. acta, v. 53, 579 (1961). ³ J. L. La Torre, G. S. Lunt, E. De Robertis, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v., 65, 716 (1970). ⁴ E. De Robertis, Science, v., 1971, 963 (1971). ⁵ G. G. Lunt, O. M. Canessa, E. De Robertis, Nature, v., 230, 187 (1971). ⁶ C. M. Redman, Biochim. et biophys. acta, v. 282, 123 (1972). ⁷ P. J. Curtis, ibid., v., 194, 513 (1969). ⁸ М. И. Молчанов, В. М. Трусова, А. И. Опарин, ДАН, т. 220, 975 (1975). ⁹ А. И. Опарин, Э. Н. Безингер и др., ДАН, т. 193, 223 (1970). ¹⁰ М. И. Молчанов, В. С. Чигирев, ДАН, т. 204, 1485 (1972).