



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.193*1.088.3

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
ПОЛИПЕПТИДОВ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫФилатов И. А., Нефедова И. В., Кулиш М. А.,
Мионов А. Ф.

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

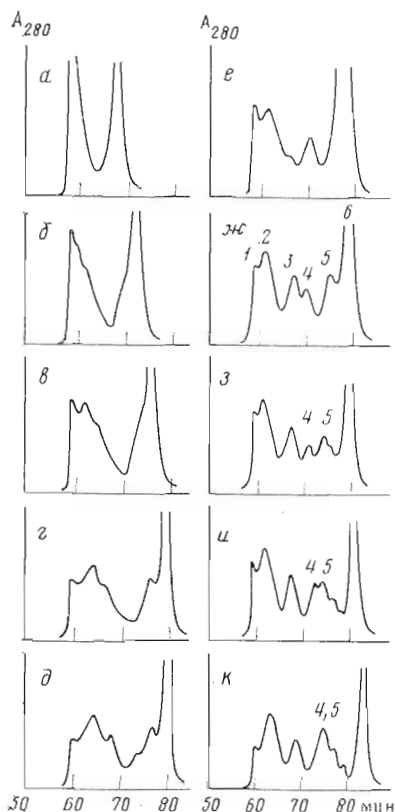
Цитохромоксидаза, фермент, катализирующий перенос электронов от цитохрома с к молекулярному кислороду, представляет собой сложный гидрофобный белок, расположенный во внутренней мембране митохондрий [1]. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле (18,5% акриламида) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) и мочевины было показано, что в препаратах фермента млекопитающих содержится до 13 различных полипептидов [2]. Наилучшие результаты в хроматографическом разделении субъединиц цитохромоксидазы были достигнуты при гель-фильтрации на биогеле P-30 и ультрагеле AcA-54 [3, 4]. В работе [4] подчеркивалось, что главными условиями успешного разделения полипептидов являются низкое содержание хлорида натрия и липидов в препарате, высокая концентрация SDS в буфере (2–3%) и очень низкая скорость элюирования (0,4–1 см/ч).

В данной работе для разделения полипептидов цитохромоксидазы была использована высокоэффективная жидкостная хроматография на колонке Ultragas TSK G2000SW (LKB, Швеция) размером 7,5×60 см. Цитохромоксидаза из сердечной мышцы быка была выделена как описано ранее [5]. Перед нанесением на колонку препарат фермента инкубировали в 50 мМ трис-HCl (pH 7,4) с 5% SDS не менее 16 ч при 20° С.

На рисунке (а–д) показано влияние концентрации трис-HCl-буфера на разделение субъединиц цитохромоксидазы. Некоторое изменение хроматографической картины наблюдается при добавлении LiCl (рисунок, д, ж). Дальнейшее улучшение разделения полипептидов происходит при повышении концентрации SDS (рисунок, е–к). При добавлении 6 М мочевины в элюирующий буфер разрешающая способность колонки падает. Электрофоретический анализ показал, что в состав фракции 1 (рисунок, ж) входят высокомолекулярные примесные белки и агрегаты, фракции 2 – субъединица I (M_r 56 993), фракции 3 – субъединицы II (26 049), III (29 918) и часть Va (12 436), фракции 4 – субъединицы VIc (8480) и VIIb (5441), фракции 5 – субъединицы IV (17 153), Va, Vb (10 670), VIa (9419), VIb (10 068), VIa (6244) и VIIc (4962) по номенклатуре [6] (значения молекулярных масс приведены по работе [7]). Фракция 6 содержит тритон X-100, присутствующий в образце, и гем а. Аномальное хроматографическое поведение субъединиц Va, VIc и VIIb указывает на существование сильного взаимодействия с тяжелыми полипептидами фермента. Повышение концентрации SDS приводит к ослаблению данного взаимодействия, о чем свидетельствует постепенное увеличение времени выхода фракции 4 вплоть до полного слияния с фракцией 5 (рисунок, ж–к).

Таким образом, при эксклюзионной ВЭЖХ гидрофобных белков необходимо обращать особое внимание на концентрацию SDS и буфера. Опти-

ВЭЖХ полипептидов цитохромоксидазы на колонке TSK G2000SW (7,5×60 см). Образец: 20 мкл раствора цитохромоксидазы (10 мг белка/мл) в растворе, содержащем 0,05 М трис-HCl (pH 7,4), 5% SDS. Скорость элюирования 0,2 мл/мин. Буферные системы содержат 0,5% SDS, трис-HCl (pH 7,2) концентрации 0,05 (а), 0,1 (б), 0,2 (в), 0,3 (г), 0,5 М (д) или 0,5 М трис-HCl (pH 7,2), 0,5 М LiCl и SDS концентрации 0,1 (е), 0,5 (ж), 1 (з), 2 (и), 3% (к)



мизация условий фракционирования позволяет не только разделять полипептиды, но и изучать взаимодействие отдельных субъединиц сложных мембранных белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Capaldi R. A., Malatesta F., Darley-Usmar V. M. *Biochim. et biophys. acta*, 1983, v. 726, № 2, p. 135-148.
2. Kadenbach B., Jarausch J., Hartmann R., Merle P. *Anal. Biochem.*, 1983, v. 129, № 2, p. 517-521.
3. Steffens G., Buse G. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1976, B. 357, № 8, S. 1125-1137.
4. Verheul F. E. A. M., Boonman J. C. P., Draijer J. W., Muijers A. O., Borden D., Tarr G. E., Margoliash E. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 548, № 2, p. 397-416.
5. Филатов Н. А., Кулиш М. А., Миронов А. Ф. *Биооргани. химия*, 1985, т. 11, № 2, с. 192-195.
6. Kadenbach B. *Angew. Chem.*, 1983, B. 95, № 4, S. 273-281.
7. Buse G., Steffens G. C. M., Meinecke L. *Dev. Bioenerg. Biomembr.*, 1983, № 6, p. 131-138.

Поступило в редакцию
- 17.VII.1985.

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF CYTOCHROME OXIDASE SUBUNITS

FILATOV I. A., NEFEDOVA I. V., KULISH M. A., MIRONOV A. F.

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

HPLC of the beef heart cytochrome oxidase subunits on TSKgel-column has been studied. It was found that the resolution of the subunits depends on the sodium dodecyl sulphate and buffer concentration. Strong interaction of subunits Va, VIc and VIIb with hydrophobic polypeptide chains was observed.