



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.191.3'13+546.11*3

ВЫДЕЛЕНИЕ МЕЧЕННОЙ ТРИТИЕМ СУБЪЕДИНИЦЫ II
ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ*Котлова Н. Г., Кулиш М. А., Миронов А. Ф.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

В последнее время предложено несколько моделей структурной организации цитохромоксидазы (ферродитохром-с: кислород-оксидоредуктазы, КФ 1.9.3.1) — терминального фермента дыхательной цепи живой клетки [1]. Для определения взаимного расположения субъединиц в ферменте использовались разнообразные методы: мечение химическими реагентами, реакции с бифункциональными сшивающими реагентами, взаимодействие с антителами.

С целью выяснения локализации отдельных субъединиц в молекуле фермента цитохромоксидазы и их взаимодействия друг с другом нами используется метод тритиевой планиграфии. Он включает в себя: обработку активированным тритием молекулы цитохромоксидазы, диссоциацию фермента, выделение меченых субъединиц в чистом виде, их последующее расщепление протеолитическими ферментами и выделение индивидуальных пептидов. Это позволяет установить фрагменты, содержащие тритий, и, следовательно, расположенные на поверхности молекулы. Этот метод оправдал себя при изучении пространственной организации лизоцима [2] и бактериородопсина [3]. Исследования этих белков показали хорошее соответствие данных о пространственной структуре, полученных с помощью тритиевой планиграфии и рентгеноструктурного анализа.

В качестве начального этапа исследования цитохромоксидазы была выбрана субъединица II. Эта субъединица участвует в образовании окислительно-восстановительных центров (содержит ион меди и гем *a*), для нее известна аминокислотная последовательность [4] и имеются предварительные данные о ее пространственной организации в мембране [5]. Настоящее сообщение является первым из серии, посвященной детальному изложению отдельных этапов этой работы.

Цитохромоксидазу получали из субмитохондриальных частиц с использованием солиubilизации холатом натрия, фракционирования сульфатом аммония с последующей хроматографической очисткой на октил-сефарозе CL-4B в присутствии тритона X-100 [6]. Удаление тритона X-100 проводили ионообменной хроматографией с помощью амберлита XAD-2 [7]. Образцы цитохромоксидазы, приготовленные в виде двумерных кристаллов, облучали тритием по методике [8]. Лабильный тритий удаляли из меченых препаратов многократным промыванием водой. При этом радиоактивность образца снижалась в 40 раз. Общая молярная активность препарата [^3H]цитохромоксидазы составила 0,84 Ки/ммоль.

Меченый препарат цитохромоксидазы после обработки додецилсульфатом натрия (SDS) и β -меркаптоэтанолом разделяли на ультрагеле АсА-54, в результате чего было получено 7 фракций (рис. 1). Субъединичный состав этих фракций исследовали электрофоретически в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии SDS (рис. 2).

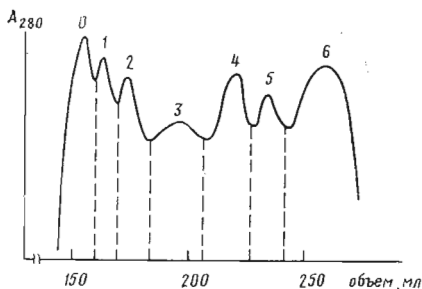


Рис. 1

Рис. 1. Разделение меченой тритием цитохромоксидазы на ультрогеле АсА54 (колонка 2,5×90 см), уравновешенном 0,05 М трис-Н₂SO₄-буфером (рН 8,2), содержащим 3% SDS, 0,01% азиды натрия, 1 мМ EDTA. Скорость элюции 6 мл/ч. Образец предварительно инкубировали в течение 16 ч при 20° С в присутствии SDS (5 мг/мг белка) и 4% β-меркаптоэтанола

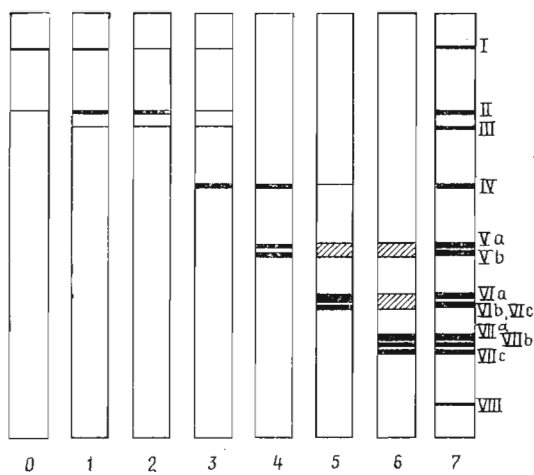


Рис. 2

Рис. 2. Электрофоретический анализ фракций, полученных при хроматографии цитохромоксидазы на ультрогеле АсА54 (см. рис. 1). Предварительно образцы инкубировали в 0,05 м трис-НСl-буфере (рН 7,0), содержащем 4% SDS и 8 М мочевины, в течение 14 ч при 20° С. Электрофорез вели в 18,5% ПААГ в трубках размером 0,5×6 см. Субъединицы в исходном комплексе цитохромоксидазы (7) обозначены согласно Каденбаху [9]

Для выделения и очистки субъединицы II цитохромоксидазы фракции 1–3 подвергали дальнейшему хроматографическому разделению. Для этого использовали колонку TSKG-2000SW (LKB, Швеция) и жидкостный хроматограф (Knauer, ФРГ). Разделение проводили в 0,5 М трис-НСl-буфере (рН 7,2), содержащем 0,5 М LiCl и 2% SDS, при скорости потока 0,2 мл/мин. Гомогенность субъединицы II доказывали с помощью диск-электрофореза и анализом N-концевой аминокислоты. Для этого субъединицу дансильировали, гидролизовали, подвергали тонкослойной хроматографии на пластине кизельгель Р-254. В качестве N-концевой аминокислоты был определен метионин, что соответствует литературным данным [4].

Таким образом, в результате проведенной работы удалось выделить из 20 мг меченого препарата цитохромоксидазы 3 мг субъединицы II с радиоактивностью 0,13 Ки/ммоль, что позволило начать исследования по определению участков полипептидной цепи субъединицы II, меченных тритием, т. е. не участвующих во взаимодействии с другими субъединицами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Филатов И. А., Кулиш М. А., Миронов А. Ф. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 6. С. 725–745.
2. Вольнская А. В., Шишков А. В., Скрипкина А. Ю., Джафаров Э. С., Румянцев Ю. М., Гольдманский В. И. // Молек. биология. 1985. Т. 19. С. 1294–1300.
3. Аленьчева Т. Н., Куратов А. Б., Антропова Л. П., Шемякин В. В., Нейман Л. А. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 7. С. 898–907.
4. Steffens G. J., Buse G. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1979. В. 360. S. 613–619.
5. Bisson R., Steffens G. J., Buse G. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 12. P. 6716–6720.
6. Филатов И. А., Кулиш М. А., Миронов А. Ф. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 2. С. 192–195.

7. Филатов И. А., Кулиш М. А., Миронов А. Ф., Пожевникова Е. В., Нейман Л. А. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 623–627.
8. Шишков А. В., Нейман Л. А., Смоляков В. С. // Успехи химии. 1984. Т. 53. № 5. С. 1125–1151.
9. Merle P., Kadenbach B. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 105. № 3. P. 499–507.

Поступило в редакцию
27.V.1988

ISOLATION OF THE TRITIUM LABELLED SUBUNIT II OF CYTOCHROME OXIDASE

KOTLOVA N. G., KULISH M. A., MIRONOV A. F.

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

Radioactively labelled subunit II of cytochrome oxidase is isolated after irradiation of molecular crystals of the enzyme with thermally activated tritium.