



УДК 547.963.4.02

**ВЫДЕЛЕНИЕ ЛЕГГЕМОГЛОБИНОВ I И II ИЗ КЛУБЕНЬКОВ
ЖЕЛТОГО ЛЮПИНА. ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА****Егоров Ц. А., Казаков В. К., Шахпаронов М. И.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва***Краснобаева Н. Н., Гудрявцева Н. Н., Жизневская Г. Я.***Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Академии наук СССР, Москва*

Описана методика выделения двух компонентов леггемоглобина из клубеньков желтого люпина (*Lupinus luteus* L.) — леггемоглобинов I и II. Определены их аминокислотный состав и N-концевая аминокислотная последовательность.

Примечательной особенностью растительного гемопротеида леггемоглобина является его сходство с миоглобином, а также наличие полиморфизма, свойственного гемоглобинам животного происхождения. В клубеньках большинства до сих пор изученных бобовых растений найдено несколько хроматографически различных леггемоглобинов [1], имеющих сходный аминокислотный состав.

Ранее в кратких сообщениях нами была описана полная аминокислотная последовательность леггемоглобинов I [2] и II [3] из клубеньков желтого люпина. Настоящая статья посвящена подробному описанию выделения леггемоглобина люпина, разделению его на компоненты, определению их аминокислотного состава и N-концевой последовательности.

Наиболее распространенная методика выделения различных леггемоглобинов заключается в дробном высаливании белка и последующей хроматографии на DEAE-целлюлозе или DEAE-сефадексе [4–6]. В некоторых работах рекомендуется также предварительное удаление полифенолов [7] и никотиновой кислоты [8].

При воспроизведении данных методик для выделения леггемоглобина из клубеньков желтого люпина нами была получена фракция белка, содержащая смесь двух компонентов. Поэтому для получения индивидуальных компонентов леггемоглобина нами предложена двухстадийная методика разделения с помощью ионообменной хроматографии на колонках образца, полученного после дробного высаливания и последующего удаления сульфата аммония гель-хроматографией. Вначале леггемоглобин очищали хроматографией на DEAE-целлюлозе. На этом этапе освободились от значительной части примесей. Затем для окончательной очистки и разделения компонентов использовали хроматографию на DEAE-сефадексе в тонком градиенте pH трис-HCl-буферов (рис. 1). Таким путем удалось выделить два компонента леггемоглобина с выходом в среднем 100 мг леггемоглобина I и 70 мг леггемоглобина II исходя из 1 кг клубеньков.

Анализ N-концевых аминокислот показал, что оба компонента гомогенны и имеют на N-конце белковой цепи глицин. Однако при электрофорезе в полиакриламидном геле (7,5 и 15%) было найдено, что леггемоглобин II в отличие от леггемоглобина I имеет незначительные примеси, которые обнаруживаются при перегрузке и окрашивании геля амидошварцем. Этих примесей в леггемоглобине II нельзя избежать, даже если объединять только часть фракций после хроматографии на DEAE-сефадексе, отбрасывая фракции, соответствующие нисходящей половине пика белка (рис. 1). О наличии примесей также можно судить по результатам аминокислотного анализа обоих компонентов. В то время как аминокислотный анализ леггемоглобина I находится в хорошем согласии с аминокислотным составом, выведенным на основании его первичной структуры, в случае леггемоглобина II имеется разница в нескольких аминокислотах (треонин,

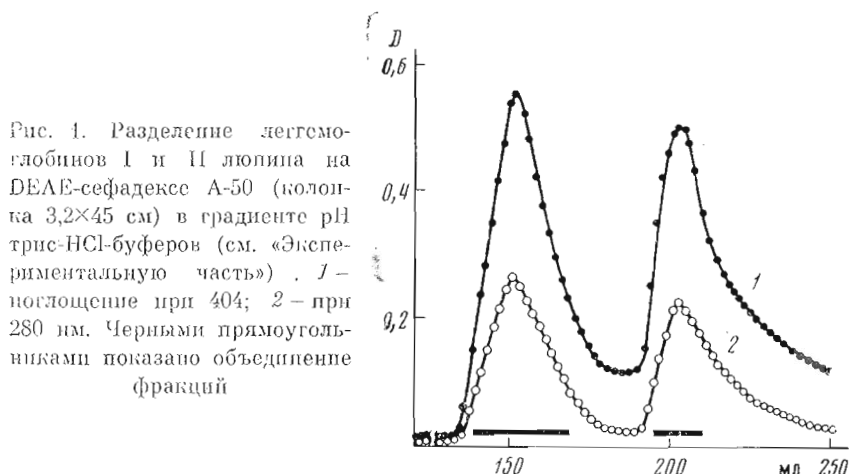


Рис. 1. Разделение леггемоглобинов I и II люпина на DEAE-сефадексе А-50 (колонка 3,2×45 см) в градиенте рН трис-НСl-буферов (см. «Экспериментальную часть»). 1 — поглощение при 404; 2 — при 280 нм. Черными прямоугольниками показано объединение фракций

серин, глутаминовая кислота, аланин и валин). Обусловлена ли эта незначительная примесь каким-либо минорным компонентом леггемоглобина люпина или посторонним белком, нами не выяснено. Во всяком случае эта примесь не обнаруживается как при анализе N-концевой последовательности леггемоглобина II с помощью секвенатора, так и при дальнейшем исследовании его первичной структуры. Уровень белковой примеси в препаратах леггемоглобина II, вероятно, настолько низок, что не мешает определению его аминокислотной последовательности, хотя сказывается на результатах аминокислотного анализа.

Из таблицы видно, что оба компонента довольно близки по аминокислотному составу. Однако сравнение их пептидных карт (рис. 2) и анализ N-концевой последовательности показал, что в аминокислотной последовательности исследуемых белков имеются определенные различия. В случае леггемоглобина I было проанализировано 24, а в случае леггемоглобина II — 36 аминокислотных остатков. Оба белка в пределах проанализированной последовательности отличаются заменой шести аминокислотных остатков (подчеркнуты):

LbI	Gly-Val-Leu-Thr- <u>Asp</u> -Val-Gln-Val-Ala-Leu-Val-Lys-Ser-Ser-Phe-
LbII	Gly- <u>Ala</u> -Leu-Thr- <u>Glu</u> - <u>Ser</u> -Gln- <u>Ala</u> -Ala-Leu-Val-Lys-Ser-Ser-Trp-
LbI	Glu-Glu-Phe-Asn-Ala-Asn-Ile-Pro-Lys- ²⁴
LbII	Glu-Glu-Phe-Asn-Ala-Asn-Ile-Pro-Lys-His-Thr-His-Arg-Phe-
LbII	Phe-Ile-Leu-Val-Leu-Glu-Ile- ³⁶

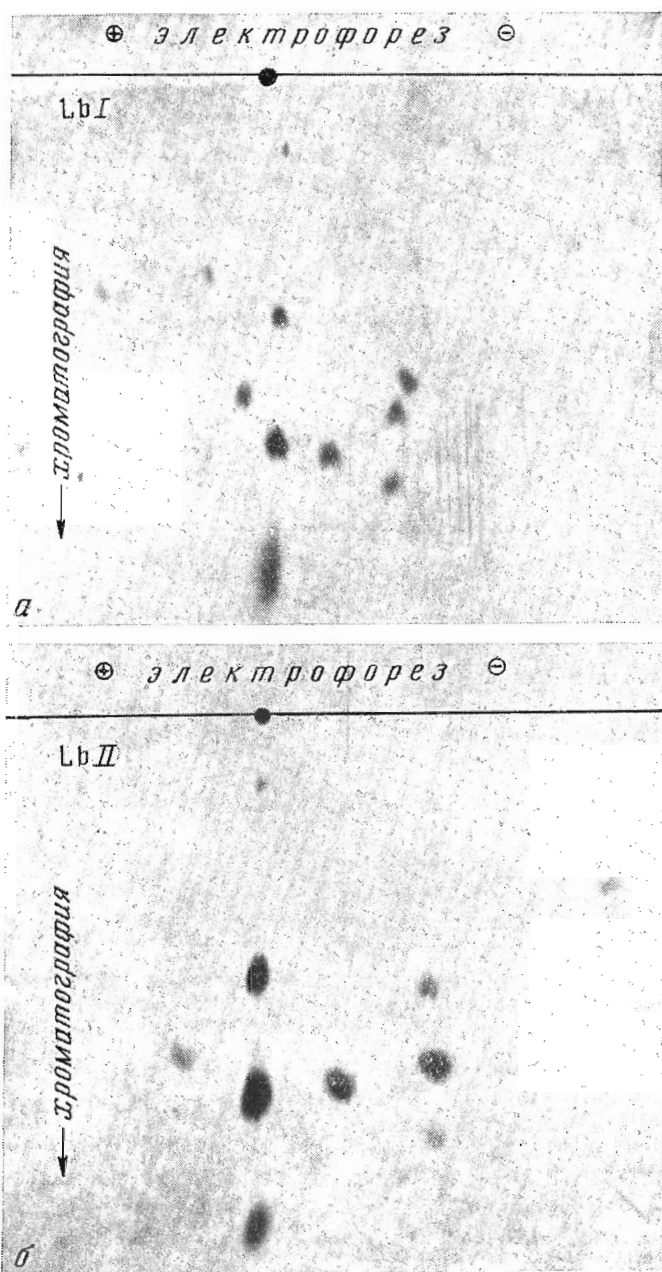


Рис. 2. Пептидные карты леггемоглобина (Lb) I (а) и леггемоглобина II (б)

При хроматографии на DEAE-сефадексе помимо двух компонентов леггемоглобина обнаруживаются еще по меньшей мере две окрашенные зоны, которые мигрируют по колонке чрезвычайно медленно (на рис. 1 они не показаны). Поэтому их выделяли путем выдавливания сефадекса из колонки и вырезания окрашенных зон с последующим элюированием белков. Анализ этих фракций на секвенаторе показал, что каждая из них является смесью обоих компонентов леггемоглобина люпина, т. е. леггемоглобинов I и II в разной пропорции. Такое разделение компонентов леггемоглобина могло, по-видимому, произойти по ряду причин: благода-

Аминокислотный состав леггемоглобинов I и II люпина

Аминокислота	Число остатков *		Аминокислота	Число остатков *	
	Леггемоглобин I	Леггемоглобин II		Леггемоглобин I	Леггемоглобин II
Asp	14,73(15)	12,15(12)	Ile **	8,35(9)	8,21(9)
Thr	8,00(8)	7,50(8)	Leu **	14,07(14)	13,99(14)
Ser	9,52(10)	8,73(10)	Tyr	2,00(2)	1,88(2)
Glu	15,81(16)	16,93(18)	Phe	7,74(8)	6,63(7)
Pro	5,38(5)	5,21(5)	His	4,17(4)	4,95(5)
Gly	8,42(8)	7,63(7)	Lys	15,08(15)	14,37(14)
Ala	18,67(18)	20,02(21)	Arg	1,10(1)	1,13(1)
Val	17,10(17)	17,38(17)	Trp ***	1,81(2)	2,79(3)
Met	0,90(1)	0,58(1)	Всего	153	153

* В скобках указано число аминокислотных остатков исходя из установленной первичной структуры [1, 2].

** Определены по результатам 96-часового гидролиза.

*** Определен по результатам гидролиза 4 н. метансульфоновой кислотой.

ря различному состоянию железа гем-группы, несмотря на перевод этих белков в цианмет-форму до хроматографии, образованию различных комплексов, модификации простетической группы и т. п.

Экспериментальная часть

В работе использовались сульфат аммония, одно- и двузамещенный фосфат калия марки х.ч., хлористый натрий марки ос.ч., сефадекс и DEAE-сефадекс (Pharmacia Fine Chemical, Швеция), трис·HCl (Koch-Light, Англия), мембраны для ультрафильтрации (Amicon, США), 4 н. метансульфоновая кислота, содержащая 0,2% 3(2-аминоэтил)индола (Pierce Chemical Co., США). 5,7 н. HCl для гидролиза очищали трехкратной перегонкой над двухлористым оловом. Растворители перед использованием перегоняли.

Получение клубеньков. Клубеньки желтого кормового люпина (*Lupinus luteus* L.) сорта «Быстрорастущий-4» выращивали в полевых условиях на песчаных почвах Московской области из семян, инокулированных эффективным штаммом клубеньковых бактерий *Rhizobium lupini* 359^a. Клубеньки собирали в фазу бутонизации-цветения растений непосредственно в поле, замораживали в сосудах Дьюара с сухим льдом и хранили при -40° С до использования.

Выделение леггемоглобина. 1 кг замороженных клубеньков растирали и гемоглобин экстрагировали 0,05 М калий-фосфатным буфером, pH 7,5. Полученный гомогенат отжимали через четыре слоя марли и центрифугировали при 23 000g в течение 10 мин при 4° С. Осадок отбрасывали, а супернатант подвергали дробному высаливанию сульфатом аммония, подерживая pH раствора около 6,9—7,0 с помощью водного аммиака. Первый осадок до 50% насыщения отбрасывали. Второй осадок, получающийся от 50 до 100% насыщения, отделяли центрифугированием при 23 000g, растворяли в минимальном объеме 0,01 М аммоний-ацетатного буфера (pH 7,0) и диализовали против этого же буфера в течение 5—6 ч при 4° С.

Раствор белка после диализа центрифугировали и подвергали гelfiltrации на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным 0,05 М аммоний-ацетатным буфером, pH 7,0. Затем фракцию, содержащую белок, наносили на колонку с DEAE-целлюлозой DE-23 (1,5×10 см), уравновешенной 0,05 М аммоний-ацетатным буфером, pH 7,0. Элюирование вели этим же буфером. Отбрасывали первую бесцветную фракцию, а затем собирали суммарную фракцию леггемоглобина. На этом этапе освобождались от значительной части примесей.

Далее раствор белка концентрировали ультрафильтрацией на мембране РМ 10 (Amicon, США). Разделение легтемоглобина на компоненты осуществляли хроматографией на колонке с DEAE-сефадексом А-50 (3,2×50 см) в топком градиенте трис-НСl-буферов, содержащих цианистый натрий (100 мг/л) (для этого вначале раствор белка переводили в 0,05 М трис-НСl-буфер, рН 8,3, гель-хроматографией на сефадексе G-25). Для создания градиента использовали девятикамерное градиентное устройство (Technicon, США). Первую камеру заполняли 0,05 М трис-НСl-буфером, рН 7,9, последующие камеры — буферами того же состава и молярности, но с понижением величины рН на 0,1 единиц для каждой последующей камеры. Колонку предварительно уравнивали 0,05 М трис-НСl-буфером, рН 8,3, и после нанесения пробы элюирование вели со скоростью 45 мл/ч при 8—10° С. Собирали фракции объемом 18 мл. Белок определяли спектрофотометрически при 280 и 404 нм. Соответствующие фракции объединяли и лиофилизировали.

Получение глобина. Гем отделяли по работе [9] в кислом ацетоне (0,1 мл конц. НСl на 100 мл ацетона). К 20 объемам кислого ацетона, охлажденного до -10° С, добавляли по каплям при перемешивании и охлаждении 1 объем белка, предварительно освобожденного от солей гели-фильтрацией на сефадексе G-25. После выпадения осадка последний отделяли центрифугированием на холоде, дважды промывали чистым ацетоном и окончательно высушивали в вакуум-эксихаторе при комнатной температуре.

Электрофорез в полиакриламидном геле. Для анализа готовили трубочки, которые содержали одну секцию — мелкопористый разделяющий гель [10] с пористостью 7,5 и 15%. Пробы белка наносили в 1 М растворе сахарозы. Электрофорез проводили в трис-глицериновом буфере, рН 8,3, в течение 40—60 мин при силе тока 3—4 мА на трубочку. Гели сканировали на спектрофотометре модели 2400 (Gifford, Франция) до окрашивания при 280 и 404 нм и после окрашивания (амидошварц) при 560 нм.

Пептидные карты. Вначале белок гидролизovali трипсином при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, рН 8, при 37° С в течение 16 ч. Для получения пептидных карт проводили электрофорез, затем во втором направлении — хроматографию (Ватман 3ММ). Высоковольтный электрофорез на бумаге выполняли в пиридин-ацетатном буфере, рН 5,6, при 1500 В в течение 2,5 ч. Нисходящую хроматографию на бумаге выполняли в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин, 15 : 3 : 12 : 10, при 20° С в течение 16—18 ч. Вещества на хроматограммах после высушивания обнаруживали 0,2% раствором нингидрина в ацетоне.

Аминокислотный анализ выполняли по работе [11]. Для определения аминокислотного состава образцы белка гидролизovali 5,7 н. НСl. Гидролиз вели в вакууме в течение 24 и 96 ч при 110° С. По окончании гидролиза кислоту упаривали на ротационном испарителе, остаток растворяли в 0,2 н. натрий-ацетатном буфере, рН 2,2, и центрифугировали. Триптофан определяли в отдельной пробе после гидролиза белка 4 н. метансульфоновой кислотой, содержащей 0,2% 3(2-аминоэтил)индола при 115° С в течение 20 ч. Поскольку метансульфоновая кислота не упаривается, пробу после гидролиза разбавляли 0,2 н. натрий-цитратным буфером, рН 4,25. Тем не менее первые аминокислоты сильно задерживаются на колонке и плохо разделяются (аспарагиновая кислота, треонин, серин, глутаминовая кислота, пролин, глицин, аланин, валин). Для определения серосодержащих аминокислот белок предварительно окисляли надмуравьиной кислотой [12]. В каждом случае выполняли пять параллельных анализов, из которых находили среднее значение. Расчет состава белка осуществляли по соотношению аминокислот, предполагая, что в молекуле белка содержится следующее число остатков: аргинина 1, тирозина 2, гистидина 4, фенил-

аланина 8 и лизина 15. Аминокислотный анализ выполняли на аминокислотном анализаторе модели Д-500 (Durrum, США).

Определение N-концевой последовательности аминокислот леггемоглобинов I и II осуществляли по методу Эдмана и Бегга [14] на автоматическом секвенсере модели 890С (Beckman, США) с идентификацией фенилтиогидантоинов аминокислот газожидкостной хроматографией, тонкослойной хроматографией и в виде свободных аминокислот на аминокислотном анализаторе после гидролиза [15].

Авторы выражают признательность акад. Ю. А. Овчинникову за постановку и поддержку этой работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Appleby C. A. (1974) The biology of nitrogen fixation, pp. 521–554, Nopth Holland Publishing Co.
2. Егоров Ц. А., Фейгина М. Ю., Казаков В. К., Шахпаронов М. И., Миталева С. И., Овчинников Ю. А. (1976) Биоорг. химия, 2, 125–128.
3. Егоров Ц. А., Казаков В. К., Шахпаронов М. И., Фейгина М. Ю., Костецкий П. В. (1978) Биоорг. химия, 4, 476–480.
4. Brogthon W. J., Dilworth M. J. (1971) Biochem. J., 125, 1075–1081.
5. Appleby C. A. (1969) Biochem. et biophys. acta, 188, 222–229.
6. Пейве Я. В., Атанасов Б. П., Жизневская Г. Я., Краснобаева Н. Н. (1972) Докл. АН СССР, 177, 482–485.
7. Мелик-Саркисян С. С., Ярвенко В. В., Крстович В. Л. (1969) Докл. АН СССР, 188, 1390–1393.
8. Appleby C. A., Nicola N. A., Hurrell J. G. R., Leach S. J. (1975) Biochem. J., 14, 4444–4450.
9. Anson M. Z., Mirsky A. E. (1930) J. Gen. Physiol., 13, 469–476.
10. Маурер Г. (1971) Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле, с. 58, «Мир», М.
11. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S. (1958) Anal. Chem., 30, 1190–1206.
12. Moore S. (1973) Chemistry and biology of peptides, pp. 629–653, Ann Arbor Science Publishes.
13. Moore S. (1963) J. Biol. Chem., 238, 235–237.
14. Edman P., Begg G. (1967) Eur. J. Biochem., 1, 80–91.
15. Inglis A. S., Nicholls P. W., Roxburch C. M. (1971) Aust. J. biol. Sci., 24, 1247–1250.

Поступила в редакцию
6.VI.1979

После доработки
27.VIII.1979

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LEGHEMOGLOBINS I AND II FROM THE YELLOW LUPIN NODULES

EGOROV Ts. A., KAZAKOV V. K., SHAKHPARONOV M. I.,
KRASNOBAEVA N. N., KUDRYAVTSEVA N. N., ZHIZNEVSKAYA G. Ya.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry and K. A. Timiryazev
Institute of Plant Physiology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A method is described for separating leghemoglobins I and II – the two components of the yellow lupin (*Lupinus luteus* L.).