



УДК 577.152.191.3*1.01

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИПЕПТИДНОГО СОСТАВА ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ
ИЗ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ БЫКА

Филатов И. А., Кулиш М. А., Миронов А. Ф.

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

Из сердечной мышцы быка выделена и очищена с использованием гидрофобной хроматографии цитохромоксидаза (ферроцитохром *c*: кислород оксидоредуктаза, КФ 1.9.3.1). Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и мочевины позволил разделить препарат фермента на 11 различных полипептидов.

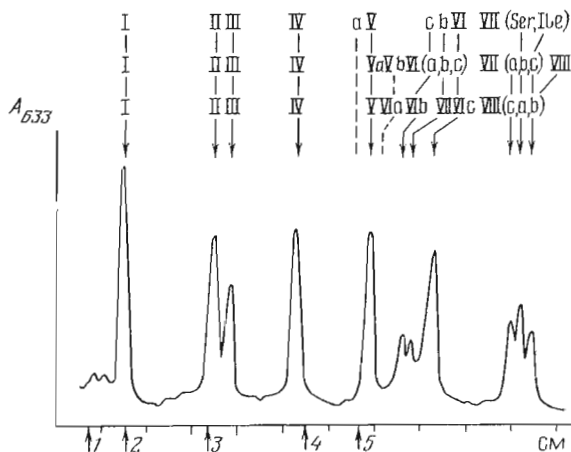
Цитохром *c*-оксидаза (далее — цитохромоксидаза), терминальный фермент в цепи окислительного фосфорилирования, состоит из нескольких полипептидных субъединиц, двух гемов *a* и двух атомов меди [1]. Несмотря на интенсивное исследование этого фермента, его строение окончательно не установлено — в частности, остается невыясненным количество субъединиц, входящих в состав цитохромоксидазы млекопитающих [2]. Это объясняется как трудностью разделения и идентификации субъединиц цитохромоксидазы, так и неопределенностью в вопросе, какие полипептиды, содержащиеся в препарате фермента, действительно входят в его состав, а какие являются примесными белками. С одной стороны, субъединицами цитохромоксидазы следует называть все полипептиды, остающиеся в стехиометрическом отношении к простетическим группам в процессе выделения и очистки фермента, т. е. речь может идти о 12 или 13 субъединицах [2—4], с другой — минимальный комплекс полипептидов, способный переносить электроны от цитохрома *c* к кислороду и создавать градиент протонов через мембрану, сопряженный с переносом электронов. Фермент, определенный таким образом, состоит из 8 или 9 полипептидов [2].

Классический метод очистки цитохромоксидазы, заключающийся в многократном фракционировании сульфатом аммония, позволяет получить препарат, содержащий до 13 полипептидов [5]. Сравнительно недавно для очистки цитохромоксидазы была предложена гидрофобная хроматография на октил- и фенил-сефарозе [6, 7]. Однако сведения о полипептидном составе полученного таким образом фермента противоречивы. В одних работах сообщалось, что препарат содержит 6 [6, 8], а в других — 7 [7, 9] субъединиц.

В настоящей работе для получения активного фермента из сердечной мышцы быка использовалась гидрофобная хроматография на октил-сефарозе CL-4B. Первоначальную стадию отделения цитохромредуктазного комплекса и экстракцию цитохромоксидазы проводили из частиц Кейлина-Хартри [10]. После осаждения примесных белков сульфатом аммония надосадочную жидкость, содержащую цитохромоксидазу (5,5—6,5 нмоль гема *a*/мг белка), наносили на колонку с октил-сефарозой, промывали 1,5% холатом натрия в 0,05 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,4), затем элюировали 1% тритоном X-100 в том же буфере. Процесс получения очищенного фермента из частиц Кейлина-Хартри занимал не более 15 ч.

Выделенный препарат цитохромоксидазы содержал 9,0—9,3 нмоль гема *a*/мг белка, 2—3% фосфолипидов и имел активность 120 моль цит. *c*/моль цитохромоксидазы · с⁻¹ в присутствии 0,5% твина 80. При добавлении смеси кардиолипина и лецитина (1:4) активность фермента возрастала более чем в 2 раза.

Результаты электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и мочевины изображены на рисунке. По срав-



Денситометрический профиль полипептидов цитохромоксидазы после электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Вверху приведено обозначение субъединиц по трем различным номенклатурам (строки сверху вниз: [11], [12], [13]). Внизу стрелками указано положение стандартных белков (M_r): 1 — бычий альбумин (67 000), 2 — яичный альбумин (45 000), 3 — химотрипсин (25 000), 4 — миоглобин (17 800), 5 — цитохром *c* (12 300)

нению с препаратами цитохромоксидазы, выделенными классическим методом, наш препарат имеет более низкое содержание полипептидов *b* и *c* [11] и не содержит полипептиды *a* [11] и VI*a* [13], которые по функциональному определению фермента считаются примесными белками. Аналогичные результаты были получены при использовании фенил-сефарозы, однако необходимо отметить, что для выделения цитохромоксидазы в препаративных количествах этот сорбент менее удобен, чем октил-сефароза. Для элюирования фермента с фенил-сефарозы приходится применять буферный раствор, содержащий в 3 раза больше тритона X-100; время элюирования также возрастает. Применение условий хроматографии, указанных в работе [6] (10% холат натрия и 1,5% твин 80), практически не сказывалось на чистоте выделяемого препарата и не приводило к потере наименьших полипептидов.

Таким образом, сообщения о 6- и 7-субъединичных препаратах цитохромоксидазы, полученных с применением гидрофобной хроматографии, нами не подтверждаются и, по-видимому, могут быть объяснены неполной диссоциацией фермента при обработке его додецилсульфатом натрия или применением электрофоретических систем недостаточно высокого разрешения.

Экспериментальная часть

В работе использовали тритон X-100, твин 80, додецилсульфат натрия, акриламид, бисакриламид, аскорбат натрия (Serva, ФРГ), октил- и фенил-сефарозу CL-4B (Pharmacia, Швеция). Остальные реактивы — отечественного производства.

Выделение цитохромоксидазы. Все операции по выделению фермента проводили при температуре не выше 4° С. В работе использовали центрифуги K70D, Beckman L5-50 (ротор Ti-19), Beckman J-21B (ротор J-20).

Частицы Кейлина-Хартри (25 г белка), полученные из свежих бычьих сердец по методу [14], гомогенизировали в 0,1 М борат-фосфатном буфере (рН 7,6) до общего объема 1 л. К суспензии при постоянном помешивании добавляли 10% холат натрия до концентрации 1%, мелко размельченный сульфат аммония до 25% насыщения и 1 н. NaOH до рН 8,0. Смесь оставляли перемешиваться в течение 1 ч, после чего добавляли размельченный сульфат аммония до 35% насыщения и центрифугировали 40 мин при 30 000g. Осадок гомогенизировали в 0,1 М натрий-фосфатном буфере

(рН 7,4) до объема 800 мл. К полученной суспензии добавляли 10% холат натрия до концентрации 2%, размельченный сульфат аммония до 25% насыщения и 1 н. NaOH до рН 7,6. Смесь перемешивали 1,5–2 ч, после чего центрифугировали 40 мин при 30 000g. К прозрачной зеленовато-коричневой надосадочной жидкости добавляли размельченный сульфат аммония до 40% насыщения и центрифугировали 20 мин при 30 000g. Осадок растворяли в 150 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 1,5% холат натрия. К прозрачному раствору при помешивании приливали насыщенный, нейтрализованный (рН 7,0) раствор сульфата аммония до 25% насыщения. После центрифугирования при 30 000g в течение 30 мин надосадочную жидкость наносили на колонку (1,6×40 см) с октил-сефарозой CL-4В, уравновешенной 0,05 М натрий-фосфатным буфером, содержащим 1,5% холат натрия, со скоростью 3 мл/мин. Колонку промывали тем же буфером (80 мл, 4 мл/мин), после чего цитохромоксидазу элюировали 0,05 М натрий-фосфатным буфером, содержащим 1% тритон X-100, со скоростью 1 мл/мин. В результате выделения получали не менее 4,5 мкмоль фермента.

Для определения концентрации белка использовали биуретовый метод [15] и модифицированный метод Лоури [16]. Содержание фосфолипидов в препарате определяли согласно Бартлетту [17]. Содержание гема *a* измеряли по разнице поглощения восстановленной и окисленной форм фермента при 605 нм, используя коэффициент молярного поглощения $12,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [18].

Определение ферментативной активности. Активность препарата цитохромоксидазы определяли полярографически [19] в 0,05 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 0,5% твин 80, 20 мМ аскорбат натрия, 60 мкМ цитохром *c* и 20–100 нМ цитохромоксидазу, при 20° С.

Электрофорез проводили в присутствии додецилсульфата натрия и 8 М мочевины в 18,5% полиакриламидном геле на пластинках размером $0,2 \times 15 \times 15 \text{ см}$ [5]. Образец инкубировали в 0,05 М трис-HCl (рН 7,0), содержащем 4% додецилсульфат натрия и 8 М мочевины, в течение 14 ч при 20° С. Гели фиксировали 6 ч в смеси метанол — вода — уксусная кислота (5 : 4 : 1), окрашивали 0,2% кумассы голубым G-250 в течение 4–12 ч и отмывали 10% уксусной кислотой. Сканирование гелей проводили на лазерном денситометре Ultro Scan 2202 (ЛКВ, Швеция).

Мы приносим глубокую благодарность чл.-корр. АН СССР Р. П. Евстигнеевой за постоянную поддержку и внимание к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулиш М. А., Миронов А. Ф. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 7, с. 965–986.
2. Capaldi R. A., Malatesta F., Darley-Usmar V. M. Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 726, № 2, p. 135–148.
3. Kadenbach B., Merle P. FEBS Lett., 1981, v. 135, № 1, p. 1–11.
4. Verheul F. E. A. M., Draijer J. W., Dentener I. K., Muijsers A. O. Eur. J. Biochem., 1981, v. 119, № 2, p. 401–408.
5. Kadenbach B., Jarausch J., Hartmann R., Merle P. Anal. Biochem., 1983, v. 129, № 2, p. 517–521.
6. Rosen S. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 523, № 2, p. 314–320.
7. Nagasawa T., Nagasawa-Fujimori H., Heinrich P. C. Eur. J. Biochem., 1979, v. 94, № 1, p. 31–39.
8. Ozawa T., Tada M., Suzuki H. In: Cytochrome oxidase/Eds King T. E., Oril Y., Chance B., Okunuki K. Amsterdam: Elsevier, 1979, p. 39–52.
9. Ozawa T., Tanaka M., Wakabayashi T. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 23, p. 7175–7179.
10. Kuboyama M., Yong F. C., King T. E. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 20, p. 6375–6383.
11. Capaldi R. A. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 694, № 3, p. 291–306.
12. Kadenbach B. Angew. Chem., 1983, B. 95, № 4, S. 273–281.
13. Meinecke L., Steffens G. J., Buse G. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1984, B. 365, № 3, S. 313–320.
14. Yonetani T. J. Biol. Chem., 1960, v. 235, № 3, p. 845–852.
15. Gornall A., Bardawill C. J., David M. M. J. Biol. Chem., 1949, v. 177, № 2, p. 610–617.
16. Smith R. L., Wang C. S. Anal. Biochem., 1975, v. 63, № 2, p. 414–417.
17. Bartlett G. R. J. Biol. Chem., 1959, v. 234, № 3, p. 466–468.

18. *Van Gelder B. F.* Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 118, № 1, p. 36-46.
19. *Yonetani T.* J. Biol. Chem., 1962, v. 237, № 2, p. 550-559.

Поступила в редакцию
9.VII.1984

STUDIES ON THE POLYPEPTIDE COMPOSITION ON BEEF HEART
CYTOCHROME OXIDASE

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

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

The beef heart cytochrome oxidase (EC 1.9.3.1) has been purified by hydrophobic chromatography. The enzyme has been resolved into 11 different polypeptides by SDS/urea gel-electrophoresis.