

15. *Лакович Дж.* Основы флюоресцентной спектроскопии.— М.: Мир, 1986.— 496 с.
16. *Струкова С. М., Семенова О. А., Киреева Е. Ф.* Регуляция активности α - β / γ форм тромбина гепарином и индолом /! Биохимия.— 1980.— 45, № 4.— С. 738—748.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии АН Украины,
Киев

Получено 10.12.91

УДК 581.198

И. Ф. Карпилова, И. М. Соколова, С. М. Газиянц

**ВЫДЕЛЕНИЕ АКТИВНОЙ
РИБУЛОЗО-1, 5-БИСФОСФАТКАРБОКСИЛАЗЫ
ИЗ ЛИСТЬЕВ ХЛОПЧАТНИКА ВИДОВ
GOSSYPIUM HIRSUTUM L. И G. BARBADENSE L.**

Предложен быстрый метод выделения и очистки рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы из листьев хлопчатника. Определенный комплекс добавок полностью связывает полифенолы и позволяет получить высокую общую и удельную активность фермента, выделенного из листьев зрелых растений со значительным содержанием фенольных соединений. Метод пригоден для сравнительного анализа серии образцов, что позволяет использовать его для генетических и эволюционных исследований.

Введение. Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (Рубиско, КФ 1.1.39) является одним из ключевых ферментов фотосинтеза и фотодыхания. В настоящее время Рубиско представляет интерес для генноинженерных работ и генетических исследований, ориентированных на повышение фотосинтетической активности разных видов растений [1].

Выделение и очистка активной Рубиско из листьев хлопчатника затруднены из-за высокого содержания полифенольных соединений, в частности госсипола, что приводит к денатурации белка при гомогенизации ткани. Для предохранения Рубиско от действия полифенолов при работе с проростками хлопчатника использовали боратный буфер, прочно связывающий полифенолы и способствующий сохранению активности фермента в процессе его выделения [2]. В наших опытах выявлено, что этот метод пригоден для исследования растений лишь на ранних стадиях онтогенеза либо для безгоссипольных сортов, промышленно возделываемых в США. При получении частично очищенных препаратов Рубиско из листьев растений, достигших репродуктивной фазы, видов *G. hirsutum L.* и *G. barbadense L.* применение метода [3] не дало положительных результатов. В экстрактах из листьев сортов вида *G. hirsutum L.* отмечено низкое содержание белка, а вида *G. barbadense L.*— используемым методом белок не выявлен совсем. Очевидно, это обусловлено различной видовой специфичностью накопления госсипола и динамики его содержания в тканях в ходе онтогенеза. Известно, что содержание полифенолов в листьях хлопчатника вида *G. barbadense L.* значительно выше, чем у других видов.

Целью настоящей работы была модификация метода [3] выделения и частичной очистки Рубиско из листьев взрослых растений различных видов и сортов хлопчатника и определение активности фермента.

Материалы и методы. Материалами опыта служили контрастные сорта 108-Ф, ВНИИССХ-1, Короткостебельный вида *G. hirsutum L.* и сорта ТСХИ-21 и Карши-2 вида *G. barbadense L.* Растения выращивали в климатической камере в течение 1,5—2 месяцев до наступления массовой бутонизации. Для анализа использовали семядольные листья,

© И. Ф. КАРПИЛОВА, И. М. СОКОЛОВА, С. М. ГАЗИЯНЦ, 1992

а также листья 3—5-го яруса по главному стеблю в период цветения растений.

Рубиско из листьев различных культур обычно выделяют в среде, содержащей трис-НСI буфер, рН 7,8 [4]. Однако в опытах с хлопчатником при использовании этого буфера белок в экстрактах отсутствовал (табл. 1). Поэтому в дальнейших исследованиях применяли боратный буфер, рН 7,6 [3], с добавлением 10 мМ MgCl₂, 10 мМ NaHCO₃, 1 мМ ЭДТА, 20 мМ дитиотреитола (ДТТ) (среда I).

Таблица 1

Действие добавок к среде выделения [3] на содержание белка и удельную активность Рубиско у вида *G. hirsutum* L.

Параметр	Среда I		Среда II			
	0,1 М трис-НСI-буфер	Без добавок	0,2 М боратный буфер			
			+ДТТ, мМ		+Polyclar, мг/г	
			20	40	50	100
Содержание белка, мг/г сырой массы	0	10,5	10,0	9,65	9,60	7,70
Удельная активность Рубиско, мкмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка	0	0,38	0,42	0,41	0,38	0,51

Активность Рубиско определяли радиометрическим методом по включению ¹⁴C в кислотоустойчивый продукт [4]. Реакцию карбоксилирования проводили в течение 1 мин при 30 °С и останавливали добавлением 6 н. НСI в реакционную смесь. Радиоактивность образцов просчитывали на сцинтилляционном счетчике фирмы «Векстап» (США). Количественное содержание белка в образцах регистрировали по Брэдфорду [5]. Успешное выделение активной Рубиско в боратном буфере отмечалось только при строгом соблюдении величины рН 7,6. Использование этого буфера с рН 7,8 и 8,0 приводило к резкому снижению содержания белка в экстракте.

Длительное хранение боратного буфера при температуре 2—4 °С вызывает обильное выпадение буры в осадок, что смещает значение рН раствора.

Таким образом, выделение Рубиско в натрий-боратном буфере должно осуществляться при тщательном соблюдении температурного режима и величины рН в процессе гомогенизации и центрифугирования.

Результаты и обсуждение. Для достижения максимальной активности фермента, полученного из разных видов хлопчатника, были проверены дополнительные компоненты, вносимые в среду выделения и стабилизирующие фермент при высоком содержании фенольных соединений в листьях. Увеличение концентрации ДТТ не привело к заметным изменениям активности фермента. Добавление низкомолекулярного поливинилпирролидона (PVP) Polyclar AT при гомогенизации тканей из расчета 100 мг на 1 г сырой массы листьев способствовало получению формы фермента с наиболее высокой активностью, хотя и сопровождалось количественной потерей белка, пропорциональной количеству добавленного препарата (см. табл. 1). У вида *G. barbadense* L. увеличение концентрации Polyclar до 200 мг/г листовой ткани при ее гомогенизации привело не только к количественной потере белка, но и к снижению его активности, что, возможно, объясняется способностью Polyclar связывать не только полифенолы, но частично и белок. При работе с исследуемыми образцами в репродуктивной фазе использование 0,2 М боратного буфера, содержащего добавки среды I и 10 % Polyclar AT, вызвало низкий выход белка и даже невозможность его тестирования у некоторых образцов (см. табл. 1). Повышение концентрации боратного буфера с 0,2 до 0,3 М не привело к каким-либо изме-

Таблица 2

Влияние добавления PVP в среду выделения на содержание белка в ферментных препаратах различных видов и сортов

Вариант опыта	Содержание белка, мг/г сырой массы				
	<i>G. hirsutum</i> L.			<i>G. barbadense</i> L.	
	108-Ф	ВНИИССХ	Коротко-стебельный	Карши-2	ТСХИ-21
Контроль (без PVP)	1,45	7,70	0	1,30	0,25
Опыт (с добавлением PVP)	11,80	7,20	10,70	10,30	13,90

нениям активности. Однако добавление в среду выделения 0,5 % растворимого PVP (м. м. 25 000—30 000) значительно увеличило выход белка в ферментных препаратах обоих видов хлопчатника. Исключение составил сорт ВНИИССХ, у которого содержание белка не зависело от наличия в среде выделения PVP и других добавок, что, возможно, обусловлено меньшим содержанием полифенолов в листьях этого сорта. Использование растворимого PVP позволило уменьшить дозу Polyclar до 5 % и снизить потери белка при гомогенизации ткани (табл. 2).

На основании полученных результатов отработан следующий метод выделения и очистки Рубиско из листьев зрелых растений хлопчатника видов *G. hirsutum* L. и *G. barbadense* L.

1 г листовой ткани растирали в ступке на холоду с максимальной скоростью в 0,2 М боратном буфере, содержащем 10 мМ MgCl₂, 10 мМ NaHCO₃, 1 мМ ЭДТА, 5 % Polyclar, 0,5 % PVP и 20 мМ ДТТ. Гомогенат отжимали через два слоя нейлона с добавлением 5 % Polyclar и центрифугировали 20 мин при 16 000 об/мин. Белок из супернатанта осаждали сульфатом аммония при 60 %-м насыщении и повторно центрифугировали в указанном режиме. Полученный осадок растворяли в 0,05 М трис-HCl буфере (рН 7,8), содержащем 10 мМ MgCl₂, 10 мМ NaHCO₃, 0,1 мМ ЭДТА, 10 мМ ДТТ. Раствор белка пропускали через колонку с сефадексом G-75, уравновешенным тем же буфером, но с 2 мМ ДТТ. Все операции проводили при 4 °С.

Использование метода [3] для выделения Рубиско из листьев хлопчатника не дало положительного результата. В ходе гомогенизации листовой ткани белок подвергается активному воздействию со стороны полифенольных соединений, концентрация которых в листьях хлопчатника, достигших репродуктивной фазы, очень высока. Госсипол и родственные ему соединения при окислении образуют ковалентные связи с белком и денатурируют его. Качественный и количественный состав полифенолов имеет видовую и сортовую специфику, что может искажать результаты сравнительных анализов в случае неполного блокирования полифенолов. Это подтвердилось различной отзывчивостью изученных генотипов сортов на состав буферной смеси, использованной при выделении фермента. В связи с этим потребовалось отработать комплекс связывающих соединений, максимально предохраняющих белок от денатурации.

Определенное сочетание добавок в среде выделения (0,5 % PVP, 5 % Polyclar, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ NaHCO₃) и использование 0,2 М боратного буфера позволяли поддерживать белок в высокоактивном состоянии в ходе выделения и очистки. Дальнейшее повышение содержания PVP в среде выделения до 1 % вызывало сильное увеличение плотности среды и требовало применения высокоскоростной вакуумной центрифуги VAC-60 для осаждения белка, что увеличивало продолжительность анализа. Между тем, скорость очистки белка влияет на его активность, и одной из наших основных задач была отработка быстрого метода получения активной Рубиско.

На первых этапах выделения боратный буфер предохраняет белок, образуя обратимый комплекс полифенол—борат, который разруша-

ется при температуре выше 4 °С. Нерастворимый Polyclar и растворимый PVP также связывают полифенольные соединения. Осадок с Polyclar удаляли, а от комплекса полифенолы — PVP освобождались при очистке белкового экстракта методом хроматографии с сефадексом G-75.

Модифицированные среды выделения пригодны для гомогенизации материала в ступке или низкоскоростном измельчителе в отличие от использования специального гомогенизатора Polytron, выбранного авторами [3] после проверки нескольких видов скоростных гомогенизаторов.

Предложенный метод обеспечивает выделение активной Рубиско из листьев зрелых растений хлопчатника видов *G. hirsutum L.* и *G. barbadense L.* и возможность сравнительного анализа ее активности у разных генотипов. Вид *G. barbadense L.* характеризуется высоким содержанием полифенолов, сравнимым с дикорастущими видами. Это позволяет использовать данный метод в эволюционных исследованиях хлопчатника. Получение стабильных результатов по содержанию белка и удельной активности Рубиско свидетельствует о надежности метода, а сокращенное время опыта даст возможность одновременного анализа 5—6 образцов, что делает метод пригодным для любых генетических исследований и выявления генотипических различий.

Summary. A rapid method of isolation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from cotton leaves is offered. Definite complex of additional substances completely blocks the polyphenols and allows to obtain high level of common and specific activities of Rubisco isolated from adult cotton leaves with high content of phenolic substances. Method is useful for the comparative analysis of the examples seria and may be used for the genetic and evolutional investigations.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ellis B. J. The most abundant protein in the world//Trends Biochem. Sci.— 1979.—4.— P. 241.
2. Quayle T. J., Katterman F. R., Jensen R. J. Isolation of active ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from glanded cotton//Physiol. Plant.— 1980.— 50.— P. 233—236.
3. Действие температуры на рибулосбисфосфаткарбоксилазу листьев клевера в раннем онтогенезе / И. Ф. Карпилова, Н. З. Рагимова, А. К. Романова, А. Б. Пачепская // Физиология растений.— 1988.— 35, № 1.— С. 41.
4. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-due binding//Anal. Biochem.— 1979.— 72, N 2.— P. 248—257.
5. King E. E. Extraction of cotton leaf enzymes with borate//Phytochemistry.— 1971.— 10, N 10.— P. 2337—2341.

Ин-т почвоведения и фотосинтеза РАН, Москва
Ин-т эксперим. биологии растений АН Узбекистана, Ташкент

Получено 11.09.91

УДК 517.150.6

Н. Н. Береговская, А. В. Савич

ВОЗМОЖНОЕ КОДИРОВАНИЕ ЦИТОХРОМА C₁ УЧАСТКАМИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА

Проведено сравнение аминокислотных последовательностей и рассчитаны показатели гомологичности для цитохромов C₁-типа и белков НДб, кодируемых участками митохондриального генома. Последние обладают наибольшей гомологичностью по отношению к цитохрому C₁. В геноме митохондрий ген, кодирующий белок НДб, расположен рядом с геном, кодирующим цитохром b — компоненту II комплекса дыхательной цепи, в который входит и цитохром C₁.

© Н. Н. БЕРЕГОВСКАЯ, А. В. САВИЧ, 1992