

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 C<sub>1</sub> УЧАСТКАМИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА**

*Проведено сравнение аминокислотных последовательностей и рассчитаны показатели гомологичности для цитохромов C<sub>1</sub>-типа и белков НДб, кодируемых участками митохондриального генома. Последние обладают наибольшей гомологичностью по отношению к цитохрому C<sub>1</sub>. В геноме митохондрий ген, кодирующий белок НДб, расположен рядом с геном, кодирующим цитохром b — компоненту II комплекса дыхательной цепи, в который входит и цитохром C<sub>1</sub>.*

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

	10	20	30	40
1. <i>EM. O. CUB.</i>				
2. <i>EM. O. PER.</i>				
3. <i>EM. O. MEX.</i>				
4. <i>EM. O. IND.</i>				
5. <i>EM. O. JPA.</i>				
6. <i>EM. O. CH.</i>				
7. <i>EM. O. BRA.</i>				
8. <i>EM. O. ARG.</i>				
9. <i>EM. O. COL.</i>				
10. <i>EM. O. PER.</i>				
11. <i>EM. O. ECU.</i>				
12. <i>EM. O. VEN.</i>				
13. <i>EM. O. GUA.</i>				
14. <i>EM. O. PAN.</i>				
15. <i>EM. O. CUB.</i>				
16. <i>EM. O. PER.</i>				
17. <i>EM. O. ARG.</i>				
18. <i>EM. O. COL.</i>				
19. <i>EM. O. VEN.</i>				
20. <i>EM. O. GUA.</i>				
21. <i>EM. O. PAN.</i>				
22. <i>EM. O. CUB.</i>				
23. <i>EM. O. PER.</i>				
24. <i>EM. O. ARG.</i>				
25. <i>EM. O. COL.</i>				
26. <i>EM. O. VEN.</i>				
27. <i>EM. O. GUA.</i>				
28. <i>EM. O. PAN.</i>				
29. <i>EM. O. CUB.</i>				

- 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
- 110 120 130 140 150 160
1. S-VLVEVCSGWAFFY-E-ETAMATTYGFVVMGG-L-YILFVMEG--MYSQQFVLI-IVC
  2. FACLVAKNSLWIEFY-Q-ETAMATTYGFVVMGG-L-YILFVMEG--MYSQQFVLI-IGU
  3. FG-LILWNSCHTEFY-E-ETAMATTYGFVVMGG-L-YILFVMEG--MYSQQFGLV-MEC
  4. F-VVS-W-EGWAEPYF--KARAASYAFVVMGG-L-YILFVMEG--MYSQQFVLI-VLC
  5. F-LTL-KISNFKK-----NSALSTVYIFVVMGG-L-FILFL-IYSYWFESK-TMCSLLC
  6. -GKLSDY--FFKPYNPFAARAANNAL---PFDESYVFAHRCCEQIV--PSLEIGYC
  7. Y-LL-NPKK ----YIPG-TKIV--FPGKKEKQDRADLIAY-LKKATSS
  8. Y-LT-NPKK -----YIPG-TKMA--FCGLKKEKDEDNLITY-LKKA-CP
  9. Y-LE-NPKK -----YIPG-TKMA--FCGLKKADEDNIVTY-MLEAS-K
  10. Y-LE-NPKK -----YIPG-TKMA--FCGLKKADEDNIVTY-MLEAT-A
  11. Y-LE-NPKK -----YIPG-TKIV--FACLKKAERADLIAY-LKE-SUK
  12. Y-LE-NPKK -----YIPG-TKIV--FTCLSKKERTQLIAY-LKKATNE
  13. Y-LE-NPKK -----YIPG-TKMI--FVGIKKKEBERADLIAY-LKKATNE
  14. Y-LP-DPNAJGQADKATGSKMT--FKLAND-QQKEDVAAY-L--ATLK ; J-YLKKFETDK
  15. Y-LE-NPKA-VV ---PG-TKIV--FVGLKNPQDRADVIAY-LKQLSGK
  16. Y-VK-DPKAFVLEKSDPKAKSKMTFKLTKD-DEIENVIAAY-LK--TLK
  17. -----AMPG-FNGRLSPLQIEDVAAYVVDQAEKGV
  18. -----AMPA-FGRLVDEIEDAANYVLSQSEKGV
  19. -----PMPA-WCVLSEDEIVAVTDYVYTTQAGGAWNV
  20. -----AMPA-FGSRLAETIEDVANFVLTBZBRGWE; B-D KAV N.
  21. -----MPAKCGNFDL-TD-KQVCDVAAYMVNEVL
  22. -----MPAKCGNFDL-TDA-QVGNVAAYMVCGSK
  23. -----MFFKCTCADC-SD-DEIREATQVMSG-L
  24. -----PMPP---NA-V SD-DFACTLAENWLSQK
  25. -----PMPP---N-QV-TDAE-ALTEAQWVLSK
  26. -----PMPP---NF-V-TE-EAKTLEENWLSQK
  27. -----PMPP---NF-V-TE-EAKTLEENWLSQK
  28. -----PMPP---NA-V-S-PEAKTLEENWLSQK
  29. -----PMPP---NF-V-TE-EAKTLEENWLSQK

	1234567890123456789012345678901234567890123456	
	170 180 190 200	
1.	- GVFCSVI-IVLGGYIPSPKSSFGVFGVGV--S-LLFLAY-MM	(174-1)
2.	--GVFCSVL-IVLGGYIPSPKSSFGVFGV-FIV-S-LIFLIYLM	(175-1)
3.	--GVFCSVI-IVLGGYIPSPKALGL-CGVFL--SSLVFI-YNNM	(174-1)
4.	--GAGAAIV-LGLAAVFPSPNSAVAVVLGEVIVMMSVSV--MY-IM	(172-1)
5.	-VFITQILITLCLA----LPHI-MNFF-IISTTIIIL-S-YMLQII	(175-1)
6.	EF-PTCVSLREGL--YFN-PYFPCQAICMAPPIYNEVLEF---NNG	(1-173)

Здесь

Рис. 1. Сопоставление структуры митохондриального генома дрозофилы и позвоночных (по данным работы [1])

Определение структуры митохондриального генома дрозофилы [1] показало, что состав его тот же, что и у генома митохондрий позвоночных, но порядок расположения несколько иной. Эти различия продемонстрированы на рис. 1, где геном дрозофилы разбит на четыре участка, различающихся направлением считывания информации с мРНК. По сравнению с геномом дрозофилы в митохондриальном геноме позвоночных (человек, бык, мышь, амфибия) участки 2 и 4 поменялись

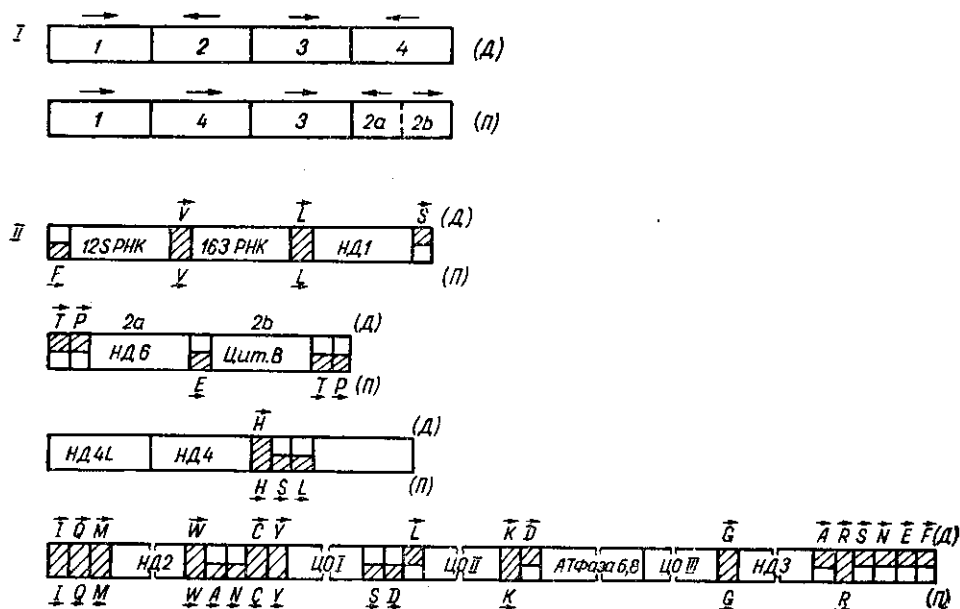


Рис. 2. Сопоставление аминокислотных последовательностей белков НД6 (по данным работ [1, 4]) и цитохромов С-типа (по данным работ [5—8])

местами. Кроме того, как видно из этого рисунка, поменялось положение участков, кодирующих 10 тРНК. Последовательность генов в геноме дрозофилы отражает постепенное усложнение в процессе эволюции дыхательной цепи. На участке 1 кодируется элемент НАДН-дегидрогеназного комплекса НД1. На участке 2 — еще один белок НАДН-дегидрогеназного комплекса НД6 и цитохром b, входящий в комплекс II дыхательной цепи. На участке 3 кодируются три белка НАДН-дегидрогеназного комплекса НД4L, НД4 и НД5. На 4-м участке — еще два белка НАДН-дегидрогеназного комплекса НД2 и НД3, три белка из последнего III комплекса дыхательной цепи — компоненты цитохромоксидазы и две АТФазы.

В комплексе II дыхательной цепи, помимо цитохрома b, имеется и цитохром С<sub>1</sub>. В нашей работе [2] показано, что белок НД6, кодируемый на том же участке митохондриального генома, при считывании в обратном направлении в высокой степени гомологичен цитохрому С<sub>1</sub>. Далее мы приведем дополнительные аргументы в пользу того, что белок НД6 при считывании в обратном направлении гомологичен цитохрому С<sub>1</sub>.

На рис. 2 сопоставлены аминокислотные последовательности белков НД6 и различных цитохромов С. Это сопоставление несколько отличается от предложенного в работе [2]. Расчет показателей гомологичности  $C_{отн}$  между двумя последовательностями проводили по способу, предложенному в работе [3]:

$$C_{отн} = \frac{A + A_1}{N},$$

где  $A$  — число совпадений одинаковых аминокислотных остатков;  $A_1$  — число совпадений различных аминокислотных остатков, но принадле-

Средние показатели гомологичности  $\bar{C}_{отн}$  между аминокислотными последовательностями белков НД6 и цитохромов С-типа

Белок	Белок							
	НД6	C <sub>1</sub>	C	C <sub>2</sub>	F	C <sub>555</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>551</sub>
	Число белков в группе							
	5	1	7	3	4	2	1	6
НД6	0,58; 0,54	0,37	0,25	0,20	0,27	0,20	0,21	0,25
C <sub>1</sub>	0,34	X	0,32	0,25	0,28	0,23	0,21	0,33
C	0,29	0,54	0,77; 0,69	0,57	0,40	0,30	0,27	0,35
C <sub>2</sub>	0,24	0,40	0,54	0,58; 0,61	0,40	0,29	0,29	0,36
F	0,33	0,42	0,49	0,55	0,68; 0,68	0,38	0,36	0,37
C <sub>555</sub>	0,24	0,35	0,44	0,55	0,46	0,65; 0,63	0,50	0,38
C <sub>5</sub>	0,27	0,30	0,34	0,43	0,41	0,42	X	0,44
C <sub>551</sub>	0,35	0,53	0,66	0,62	0,56	0,41	0,51	0,76; 0,77

жащих к одной и той же группе из следующих семи: 1) G, A, P; 2) V, L, I; 3) S, T; 4) C, M; 5) K, R, H; 6) D, E, Q, N; 7) F, Y, W. Величина  $N$  означает число сравниваемых пар аминокислотных остатков, исключая те участки, где хотя бы в одной из сравниваемых последовательностей имеются пробелы (делеции). Расчеты на ЭВМ ЭКЛИПС проведены для полных последовательностей и для участков, примыкающих в цитохромах С к гену и изображенных на рис. 2 (33 позиции от 26 до 58). Для семи групп белков с разным количеством белков в каждой группе вычисляли средние арифметические значения  $\bar{C}_{отн}$ , которые представлены в таблице. Из таблицы видно, что белок НД6 ближе всего по показателю к цитохрому С<sub>1</sub>. При сравнении участков, примыкающих к гену, наблюдается качественно та же картина, но показатели гомологичности для них, как правило, выше, чем для полных последовательностей. У всех цитохромов типа С имеется участок из пяти аминокислотных остатков, непосредственно примыкающих к гену: С—СН. В последовательности белка НД6 эта группа не сохраняется. Первый остаток цистеина С сохраняется в двух случаях из пяти, а в остальных он заменен на тирозин Y или на фенилаланин F. Следует отметить, что у этих аминокислот имеются близкие кодирующие триплеты: TCT (С, цистеин), TAT (Y, тирозин), TTT (F, фенилаланин). Вторым остатком цистеина (С) в двух случаях замещен на остаток иной серусодержащей аминокислоты — метионина (M) или на лейцин (L), близкий по структуре к метионину.

Таким образом, на участке НД6 при считывании в обратном направлении кодируется белок, у которого достаточно близкий предок с цитохромом С<sub>1</sub>. В геноме митохондрий как дрозофилы, так и позвоночных участок НД6 соседствует с таковым, кодирующим другую компоненту комплекса II дыхательной цепи — цитохром b.

**Summary.** The amino acid sequences are compared and the homology indexes are calculated for cytochromes of C-type and for ND6 proteins coded on the mitochondrial genome. The ND6 proteins have greatest homology index with the cytochrome C<sub>1</sub>. In mitochondrial genome the gene coding the ND6 protein is arranged next to the gene coding the cytochrome b, a component of the 2nd complexes of respiratory chain, in which is contain also the cytochrome C<sub>1</sub>.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clary D. O., Wolstenholme D. R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization and genetic code//J. Mol. Evol.— 1985.— 22, N 2.— P. 252—271.
2. Савиц А. В., Береговская Н. Н. Эволюция и изменчивость белков энергетической системы клеток// Биол. журн. Армении.— 1989.— 42, № 9—10.— С. 822—829.

3. Береговская Н. Н., Савич А. В. Возможное кодирование железосерных белков в митохондриальном геноме млекопитающих // Биополимеры и клетка.— 1988.— 4, № 5.— С. 238—245.
4. *The complete* nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome/ B. A. Roe, D.-P. Ma, R. K. Wilson, J. F. N. Wong//J. Biol. Chem.— 1985.— 260, N 17.— P. 9759—9777.
5. *The complete* amino acid sequence of bovine cytochrome C<sub>1</sub>/S. Wakabayashi, H. Matzubara, H. Kim Chong et al.//Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1980.— 97, N 4.— P. 1548—1554.
6. Dayhof V. O., Hunt T. L. Protein sequence database.— Washington: O. C., 1981.— 265 p.
7. Narita K., Titani K. Comparison of the primary structures of cytochromes C from two species of yeast // Proc. Jap. Acad.— 1985.— N 9.— P. 831—836.
8. Dikerson R. E., Timkovich R., Amassy R. Y. The cytochrome C fold and the evolution of bacterial energy metabolism // J. Mol. Biol.— 1976.— 100, N 3.— P. 473—491.

Науч.-инж. центр автомат. биотехн. систем «Сонар»  
Ин-та кибернетики АН Украины им. В. М. Глушкова, Киев

Получено 02.12.91