

УДК 584.19

Р. М. Налбандян

Очистка ферредоксина из водорослей *Kirchneriella obesa* и изучение его денатурации

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 27/XII 1971)

Негеминовые железопротенды составляют особую группу железосодержащих белков, в которых атомы железа непосредственно связаны с белковой частью, а не при помощи протетической группы, как в гемовых белках. Эти белки играют важную роль в животных и растительных тканях и в микроорганизмах, участвуя в процессах окисления, гидроксилирования, фотосинтеза и фиксации азота (¹).

В данной работе сообщается о получении высокоочищенного негеминового железопротенда, ферредоксина из зеленых протококковых водорослей *Kirchneriella obesa* (West.) Schmidle.

Была разработана следующая основная схема очистки ферредоксина. Экстракция лиофилизированной культуры разбавленным фосфатным буфером, рН 7,0 (стадия 1). На 1 кг лиофилизированных водорослей использовали 10 л буфера. Этот экстракт концентрировали на ДЭАЭ-целлюлозе (стадия 2). Затем собирали белковую фракцию, осаждающуюся между 0,3 и 0,9 степенями насыщения сульфатом аммония, и ее двукратно хроматографировали на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой, элюируя белок раствором 0,4 М фосфатного буфера, рН 7,0, содержащим 0,2 М KCl (стадии 3,4). Дальнейшая очистка достигалась при использовании гель-фильтрации на сефадексе G—75, используя колонку с размерами 1,2×30 (стадия 5). Белок окончательно концентрировали на небольшой колонке с ДЭАЭ-целлюлозой.

На всех стадиях очистки содержание белка во фракциях оценивали по оптической плотности при 280 nm. Оказалось, что весьма удобным критерием чистоты препарата является форма спектра фракций. По мере очистки резко уменьшались поглощения вблизи 400 nm, α,β—полос цитохрома и 280 nm (рис. 1). Большая часть цитохрома элюируется из колонок с ДЭАЭ-целлюлозой 0,2 М фосфатным буфером.

В результате очистки общее содержание белка уменьшалось более чем в 1000 раз. Спектр очищенного ферредоксина характеризуется отчетливыми максимумами при 277 nm, 325 nm, 422 nm и 465 nm (рис. 2).

Отношения оптических плотностей основных полос поглощения: $D_{422}/D_{465} = 0,4,8$, $D_{422}/D_{465} = 1,09$, $D_{422}/D_{425} = 0,68$. Эти величины характерны для высокоочищенных и кристаллических ферредоксинов, полученных из ряда высших растений и зеленых водорослей (2-4).



Рис. 1. Изменение спектров поглощения ферредоксинсодержащих фракций на различных стадиях очистки

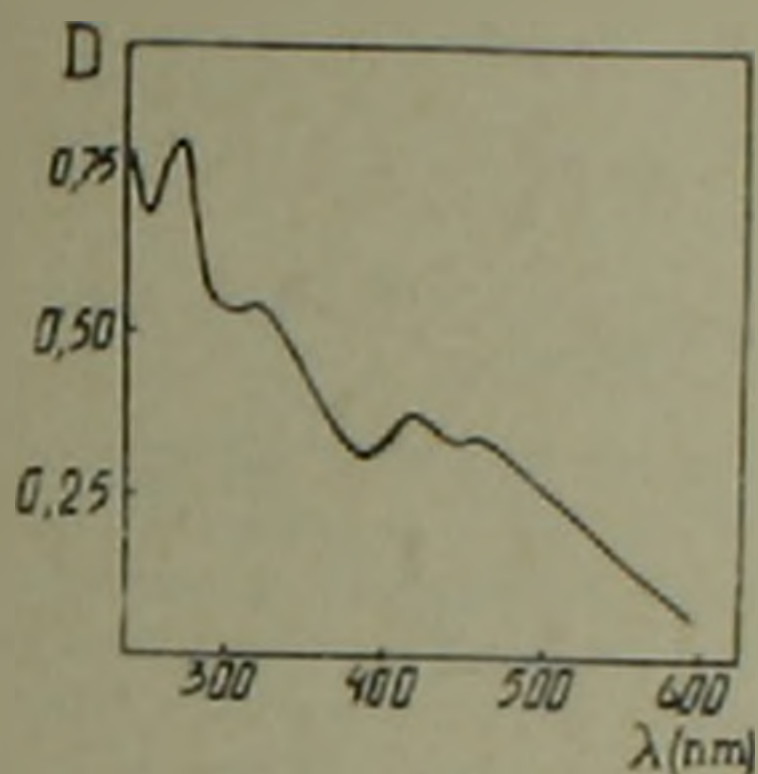


Рис. 2. Спектр очищенного ферредоксина в УФ — и видимой областях

Выход ферредоксина из 1 кг лиофилизированных водорослей составляет около 30 мг.

Оценка молекулярного веса белка проводилась на колонке с сефадексом G—75 (2,2×42). Колонку предварительно калибровали белками с известным молекулярным весом (цитохром с, яичный альбумин, бычий сывороточный альбумин). Рассчитанный этим методом молекулярный вес ферредоксина оказался равным примерно 14000.

На моль белка приходится два моля железа, а также два моля лабильного сульфида, т. е. сульфида, выделяемого при подкислении в виде сероводорода (5,6). Таким образом, ферредоксин из *Kirchneriella obesa* по своим свойствам напоминает ферредоксины высших растений.

Восстановление белка дитионитом, подкисление до pH 5,0, инкубация с реагентами на сульфгидрильные группы, удаление железа хелаторами, а также денатурация агентами, разрушающими водородные связи, приводят к резкому снижению интенсивности характерной красной окраски белка, за которую ответственны полосы поглощения в видимой области (422 и 465 nm) (рис. 3). Эти факты показывают, что хромофорные свойства ферредоксина определяются окисленной формой железа, сульфгидрильными группами и зависят от высших уровней структуры белка.

Хотя ферредоксин содержит два идентичных хромофорных центра, способных к окислению-восстановлению, в хлоропластах он функционирует как одноэлектронный переносчик, донируя в восстановленном со-

стоянии электроны к НАДФ (¹). Этот факт может быть связан с тем, что активные центры белка попеременно участвуют в реакции, или тем, что в ходе реакции один электрон акцептируется на два атома железа.

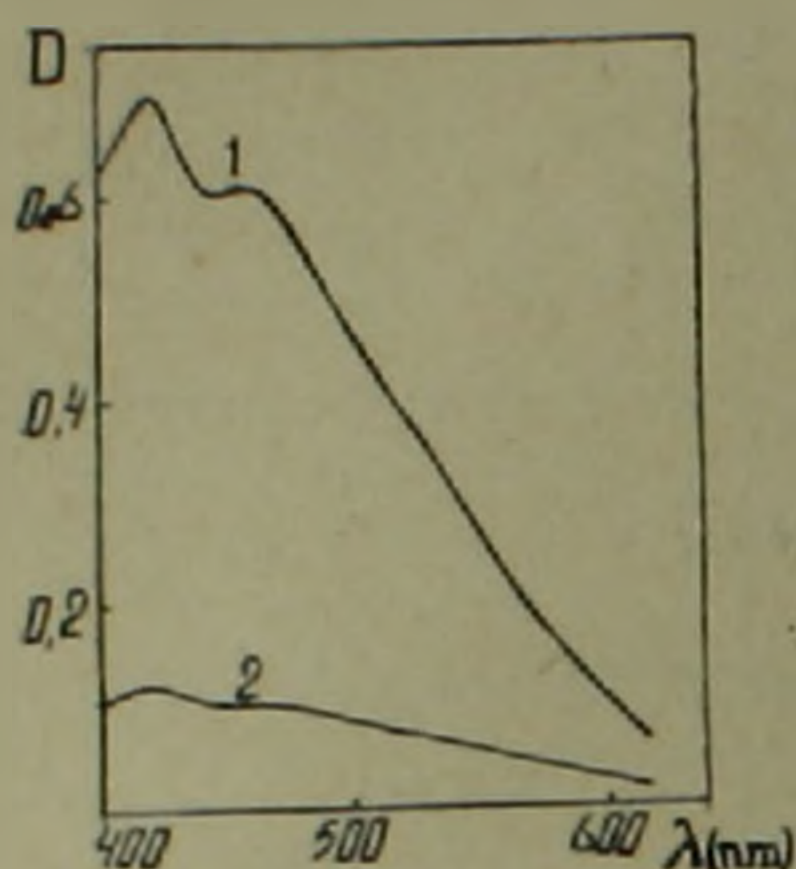


Рис. 3. Изменение спектра ферредоксина в видимой области под влиянием мочевины: 1 — спектр исходного белка непосредственно после добавления мочевины; 2 — спектр после инкубации с мочевиной в течение 7 суток при комнатной температуре

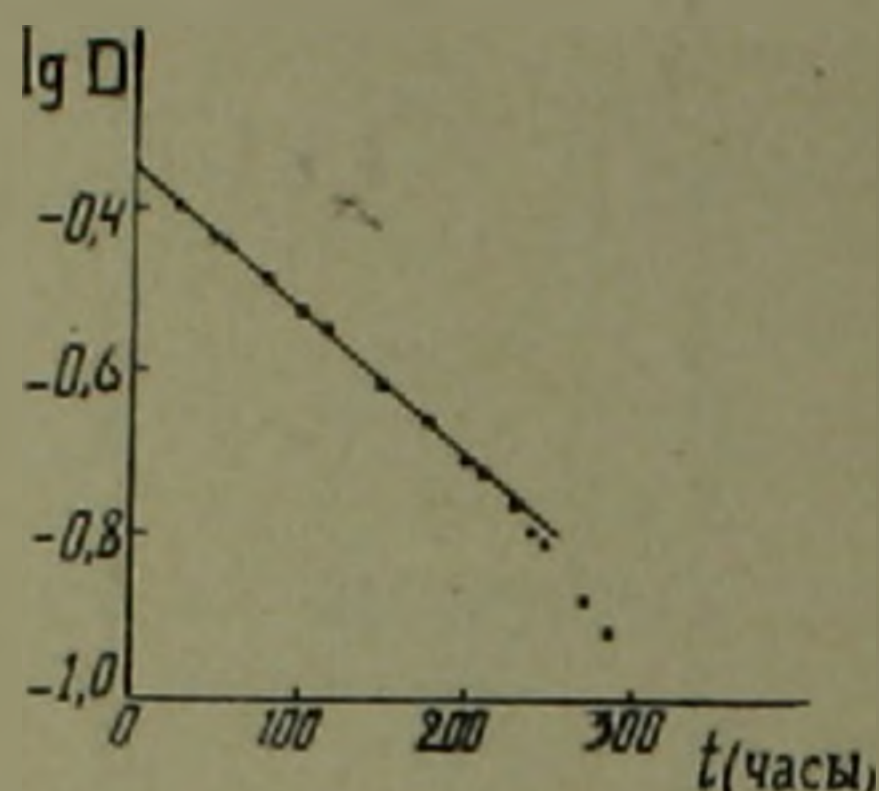


Рис. 4. Кинетика денатурации ферредоксина в 4 М мочевины при комнатной температуре

Для выяснения вопроса о том, сохраняется ли идентичность активных центров ферредоксина при различных воздействиях мы исследовали кинетику денатурации белка агентами, разрушающими водородные связи. Было обнаружено, что обесцвечивание ферредоксина под действием мочевины и гуанидина при комнатной и более низких температурах является весьма медленным процессом. Эта реакция подчиняется кинетике простой реакции первого порядка по концентрации белка только до глубины превращения около 50%. При больших глубинах превращения наблюдается отклонение от первого порядка (рис. 4).

В недавней работе (⁸) также было обнаружено, что денатурация негеминового железопротенда из митохондрий коркового вещества надпочечников, адренодоксина, также описывается одной реакцией первого порядка только при сравнительно небольших глубинах превращения.

Сложная кинетическая зависимость реакции денатурации негеминовых железопротендов может означать, что с изменением глубины превращения изменяется механизм реакции обесцвечивания, либо с тем, что по крайней мере на некоторых стадиях денатурации хроматофорные группы негеминовых железопротендов начинают обнаруживать различия. Это обстоятельство делает необходимым более подробное исследование механизма денатурации металлсодержащих белков-переносчиков электронов, функционирующих в электронно-транспортных системах органелл.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР
Институт химической физики
АН СССР

**Ֆերեդոսինի անջատումը *Kirchneriella obesa* շրիմուռից և նրա
դենատուրացման ուսումնասիրումը**

Մշակված է *Kirchneriella obesa* շրիմուռից ոչ հեմային երկաթ պարունակող սպիտակուցի (ֆերեդոսինի) անջատման մեթոդը: Սպիտակուցը ստացված է հոմոգեն վիճակում: 1 կգ շոր (5 կգ թաց) շրիմուռից ստացված է մոտ 30 մգ սպիտակուց: Որոշված է նրա մոլեկուլյար կշիռը, ինչպես նաև մեկ մոլեկուլում հրկաթի և լարիլ սուլֆիդի պարունակությունը:

Ստացված ֆերեդոսինն իր հատկություններով նման է բարձրակարգ բույսերից անջատված ֆերեդոսիններին:

Ուսումնասիրված է դենատուրացման կինետիկան 4 մոլյարանոց միզանյութի լուծույթում և ցույց է տրված, որ այս ոեակցիան որոշ խորությունից սկսած շեղվում է առաջին կարգի կինետիկայից: Ծնթադրվում է, որ ոեակցիայի զարգացման մի ինչ-որ փուլում ի հայտ է գալիս սպիտակուցի մոլեկուլում պարունակվող երկաթի երկու ատոմների շրջապատումների որոշ տարբերություն:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- ¹ D. O. Hall, M. C. Evans, Nature, 223, 1342 (1969). ² H. Matsubara, J. Biol. Chem., 243, 370 (1967). ³ S. Keresztes-Nagy, E. Margollash, J. Biol. Chem., 241, 5955 (1966). ⁴ D. Böger, A. San-Pietro, Z. Pflanzenphysiol., 58, 70 (1968). ⁵ T. Kimura, K. Suzuki, J. Biol. Chem., 242, 485 (1967). ⁶ J. K. Fogo, M. Popowsky, Anal. Chem. 21, 732 (1949). ⁷ N. K. Boardman, Adv. in Enzymol. v. 30, 1968. ⁸ P. Padmanabhan, T. Kimura, J. Biol. Chem., 245, 2469 (1970).