

УДК 577.23

М. А. Симонян, академик НАН Армении А. А. Галоян,
Г. М. Симонян, Р. В. Мелконян

Оптические спектральные характеристики фракций новых типов цитохрома *b* из мембран эритроцитов

(Представлено 15/VII 1997)

При выделении из мембран эритроцитов цитохромов b_{558}^{III} и b_{558}^{IV} путем хроматографирования фракции солюбилизованных белков на целлюлозах ДЭ-52 и КМ-52 (1,2) имеют место потери (25-30%) белковых фракций в результате их задерживания на этих целлюлозах. Изменение рН, ионной силы элюационного буфера, а также присутствие в нем органического растворителя не приводит к элюированию этих белковых фракций.

Целью настоящей работы являлось выявление подходящих условий элюирования, наряду с цитохромами b_{558}^{III} и b_{558}^{IV} , "неэлюированных" фракций сильноокислых и сильноосновных гемопротейнов и идентификация их по оптическим спектральным характеристикам.

Белковые фракции мембран эритроцитов крови (15-20 мл или больше) человека (крыс, быка) получили путем их солюбилизации 1%-ным неионным детергентом Нонидетом Р-40 (Швеция). Хроматографирование белковых фракций проводили на колонках с целлюлозами ДЭ-52 и КМ-52 (фирма "Whatman" Англия). Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Beckman-26" (США), с длиной оптического пути 1 см при 20°C. В процедуре выделения белковых фракций использовали центрифуги К-24 и К-70 (MLW Zentrifugenbaum Engelsdorf, Германия).

Белковую фракцию, полученную из мембран эритроцитов после солюбилизации белков мембран 1%-ным детергентом, подвергли диализу против воды (1:200 об/об) в течение ночи при 10°C. Процедура диализа повторялась дважды, для лучшего удаления сопутствующего детергента. После центрифугирования диализата (600×g,

20 мин) его пропускали через колонку с КМ-52 (2×5 см) целлюлозой, уравновешенную 0,01 М калий фосфатным буфером, рН 7,4. Содержимое колонки промывали 0,01 М калий фосфатным буфером, рН 7,4 (до получения бесцветного элюата) и фракцию цитохрома b_{558}^{IV} элюировали 0,02 М этим же буфером. Далее колонку промывали 1 М натрий ацетатным буфером (также до получения бесцветного элюата). Красно-коричневую фракцию, осевшую на верхней части колонки, элюировали 1 М натрий ацетатным буфером, содержащим 1%-ный Нонидет Р-40 (фракция сильнощелочной формы цитохрома b_{558}^{IV}). Не задержавшуюся на этой колонке КМ-52 белковую фракцию пропускали через колонку с целлюлозой ДЭ-52 (3×10 см), уравновешенную 0,01 М калий фосфатным буфером, рН 7,4. Содержимое колонки промывали 0,02 М калий фосфатным буфером, рН 7,4, а фракцию цитохрома b_{558}^{III} элюировали 0,4 М буфером. Далее колонку промывали 1 М ацетатным буфером, рН 5,6. Белковую фракцию сильноокислого цитохрома b_{558}^{III} элюировали натрий ацетатным буфером (1 М, рН 5,6), содержащим 0,5%-ный детергент. После этого содержимое колонки промывали этим же буфером для удаления следов сильноокислого цитохрома b_{558}^{III} . Фракцию сильноокислого гемопротейна (как покажут спектральные параметры, это фракция цитохрома b_{600}) элюировали 1%-ным детергент содержащим натрий ацетатным буфером (1 М, рН 5,6). Последовательность выделения и количественные показатели приведены в таблице.

По описанной методике из мембран эритроцитов 15-20 мл крови одновременно получают фракции цитохрома b_{558} четырех типов и цитохрома b_{600} . Метод, позволяющий одновременно получать и четыре антиоксидантных металлопротеина, широко используется в экспериментальной медицине и клинике для выявления характерных количественных (качественных) изменений металлопротеинов прооксидантного характера при различных проявлениях оксидативного стресса (8).

Оптические спектры поглощения фракций сильноосновного b_{558}^{II} , сильноокислого цитохрома b_{558}^{III} (рисунок) по форме не отличаются от такового у цитохрома b_{558}^{III} . Приведенные цитохромы резко отличаются друг от друга по кислотно-основным характеристикам, что выражается в данном случае разностями молярностей элюционных буферов. Оптический спектр поглощения цитохрома b_{600} характеризуется отклонением максимальных поглощений α и β полос на 42 нм в длинноволновую область спектра. Максимумы

поглощения цитохрома b_{600} таковы: в окисленном состоянии 600 (α -полоса), 570 (β) и 395 нм (γ), в восстановленном состоянии 570, 550 и 421 нм (рисунок). Хотя максимумы поглощения цитохрома b_{600} и цитохромов b_{558} сильно отличаются, однако по форме они схожи (в окисленном состоянии), отсюда и название цитохрома b_{600} . В восстановленном же состоянии спектр цитохрома b_{600} резко отличается от таковых у цитохромов b_{558} .

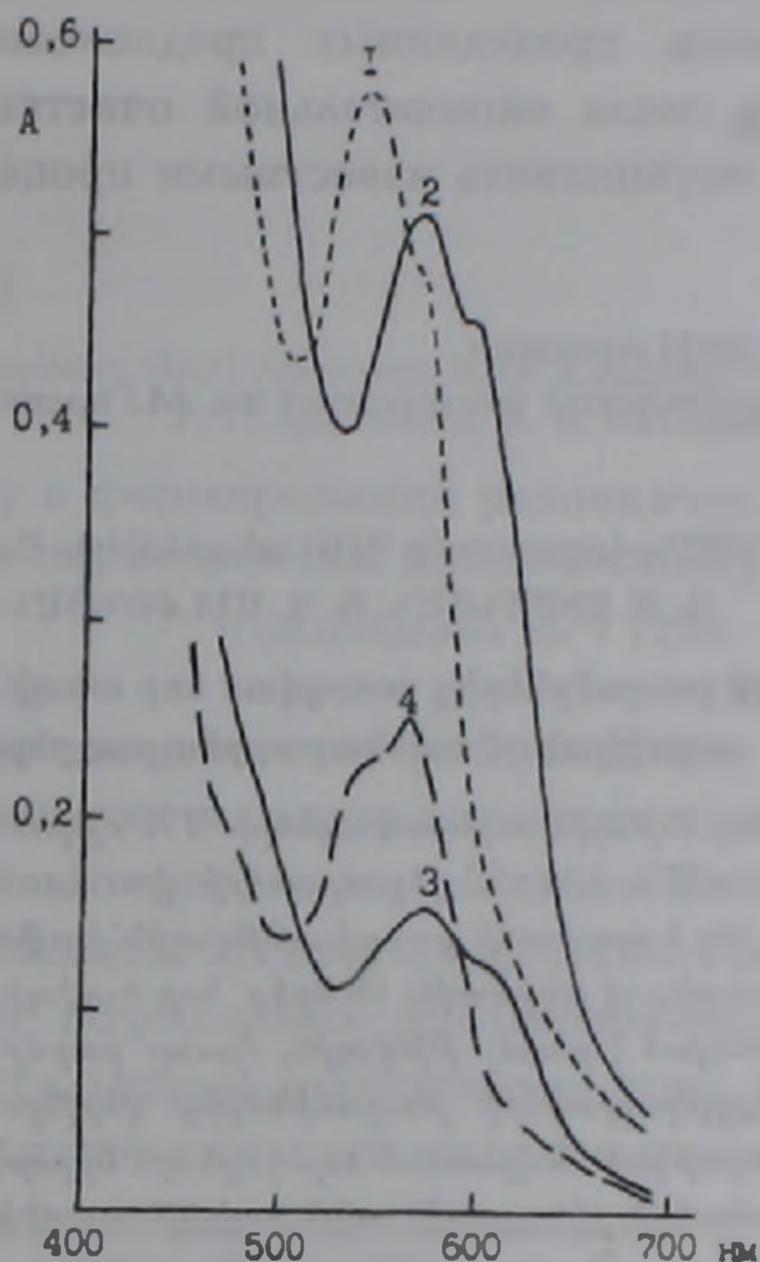
Ход выделения мембран эритроцитов фракций цитохромов b_{558}^{III} , b_{558}^{II} , сильноокислого цитохрома b_{558}^{III} , сильноосновного цитохрома b_{558}^{IV} , сильноокислого цитохрома b_{600} и количественные показатели

Этапы выделения	Молярность элюационного буфера	Объем, мл	A_{530}	Содержание фракций, %
Очистка мембран эритроцитов	—	5	—	—
Солюбилизация белков, диализ, удаление нерастворимых остатков	—	22	0,8	100
Разделение фракции цитохрома b_{558}^{II}	0,02	5	0,4	
Разделение фракции цитохрома b_{558}^{III}	0,4	14	0,7	67
Разделение фракции сильноосновного цитохрома b_{558}^{III}	1M + 1% детергант	3	0,2	
Разделение фракции сильноокислого цитохрома b_{558}^{III}	1M + 0,5% детергант	10	0,3	25
Разделение сильноокислого цитохрома b_{600}	1M + 1% детергант	5	0,2	

Примечание. Содержание фракций цитохромов b_{558} определяли по величине плотности оптического поглощения при 530 нм, а цитохрома b_{600} — при 600 нм.

К настоящему времени цитохромы b различных типов, выделенные из различных биосистем, имеют также различные максимумы поглощения α -полосы: 558 (3), 559 (4), 560 (5), 561 (6), 562 (7) и т.д. Приведенные максимумы поглощения у этих цитохромов b отличаются друг от друга всего на 1-4 нм. Такое отклонение у цитохрома

b_{600} составляет 42 нм! В литературе отсутствуют какие-либо сведения о таком гемопротеине. Возможно, цитохром является новым типом цитохрома b из биосистем.



Оптические спектры поглощения фракций цитохромов b из мембран эритроцитов: 1 — часть спектра фракции цитохромов b_{558}^{III} , b_{558}^{IV} , сильноокислой фракции цитохрома b_{558}^{III} и фракции сильноосновного цитохрома b_{558}^{IV} ; 2 — часть спектра фракции цитохрома b_{600} ; 3 — как у 2, после разбавления; 4 — 3, после восстановления цитохрома b_{600} дитионитом натрия. Спектры фракций цитохромов также не отличаются друг от друга после их восстановления (α -полоса — 558 нм, β — 530 нм, γ — 412 нм) (2), они имеют характерные для белков максимумы поглощения при 275-280 нм (спектры не приводятся).

Большое сродство этих цитохромов с остатками целлюлозных групп ДЭ-52 и КМ-52 говорит о возможном сходстве связей этих гемопротеинов с целлюлозными остатками мембран эритроцитов. Только детергент-содержащий высокомолекулярный буфер способен расщеплять гидрофобные связи и элюировать указанные цитохромы из целлюлозы ДЭ-52 и КМ-52. Не исключается, что различие кислотно-основных свойств этих цитохромов обусловлено содержанием и составом липидных остатков, с помощью которых цитохро-

мы связываются с целлюлозами или с соответствующими участками мембран эритроцитов. Легкость расщепления и восстановления гидрофобных связей даст возможность "пересадения" цитохромов b_{558} и b_{600} в мембранах эритроцитов или других биообразований. Объективность приведенных предположений может быть проверена только после окончательной очистки этих цитохромов (это пока трудно осуществить известными процедурами) и глубокого исследования.

Институт биохимии НАН Армении

Государственный медицинский университет им. М.Гераци

Մ. Մ. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Հայաստանի ԳԱԱ ակադեմիկոս **Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ**,

Գ. Մ. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, **Ռ. Վ. ՄԵԼԻՔՈՆՅԱՆ**

**Էրիթրոցիտների թաղանթներից ստացված նոր տիպի b ցիտոքրոմների
օպտիկական սպեկտրալ բնութագրերը**

Էրիթրոցիտների թաղանթային սպիտակուցների 1% ոչ իոնական դետերգենտով լուծելիացման, դրանց DE-52 և KM-52 ցելյուլոզների վրա նստեցման և 0,5-1% դետերգենտ պարունակող, 1 մոլ նատրիումի քացախաթթվային բուֆերով (pH 5.6) արտահոսման (էլյուացման) հետևանքով անջատվել են երեք՝ նոր b տիպի ցիտոքրոմների ֆրակցիաներ. որոնցից մեկը օժտված է բարձր թթվային, մյուսը՝ բարձր հիմնային հատկանիշներով: Սրանք ունեն էրիթրոցիտների թաղանթներից վերջերս անջատված ցիտոքրոմ b-558 - երին բնորոշ օպտիկական կլանման սպեկտրներ: Երրորդ՝ դարձյալ ուժեղ թթվային հատկանիշներով օժտված ցիտոքրոմն ունի նախկինում չնկարագրված օպտիկական կլանման սպեկտր, 600 նմ (α -չերտ), 570 նմ (β) և 395 նմ (γ) մաքսիմումներով սպիտակուցի օքսիդացված վիճակում:

ЛИТЕРАТУРА - ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ *Մ.Ա.Симомян, Г.М.Симомян, Р.В.Мелкоян*, Изобретение №000610, Патентное управление РА, Ереван, 1996. ² *Մ.Ա.Симомян, Г.М.Симомян, Մ.Ա.Բաբայան*, Биохимия, т.60, с.1977-1987 (1995). ³ *М.Т.Quinn*, Methods Enzymol., v.255, p.476-487 (1995). ⁴ *V.Koshkin*, Biochim.Biophys.Acta, v.1232, p.225-229 (1995). ⁵ *B.R.Crous*, FEBS Lett., v.367, p.1-4 (1995). ⁶ *М.Сrivastava*, J.Biol.Chem., v.270, p.22714-22720 (1995). ⁷ *Y.Feng*, Nat.Struct.Biol., v.1, p.30-35 (1994). ⁸ *Մ.Ա.Симомян*, Автореф.док.дис., Ереван, НАН Армении, 1996.