

<https://doi.org/10.3176/biol.1982.4.06>

УДК 547.962 : 591/862

Рахиль ПАССОВА

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ДИСК-ДСН-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ХЛОРОПЛАСТОВ

Метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия (ДСН), предложенный А. Л. Шапиро с соавторами (Sharigo и др., 1967) и развитый К. Вебером и М. Осборном (Weber, Osborn, 1969), в настоящее время широко используется для характеристики белкового состава различных биологических структур. Небезынтересно отметить, что одновременно и независимо Дж. П. Торнбер (Thornber и др., 1967) применил метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии анионного детергента додецилбензенсульфоната натрия для разделения и характеристики мембранных белков хлоропластов. Ему и его соавторам удалось растворить 96% хлорофилла и белка хлоропластов и получить на полиакриламидном (ПАА) геле три окрашенных компонента, два из которых были идентифицированы как хлорофилл—белковые комплексы 1 и 2, соответствующие фотосистемам 1 и 2. В последующих работах, проведенных с помощью ДСН-электрофореза (Anderson, Levine, 1974a, б; Eaglesham, Ellis, 1974; Genge и др., 1974; Hooper, 1970; Machold, 1971; Machold, Anrich, 1972), было показано, что мембраны хлоропластов включают в себя более 20 различных белков. Все эти исследования были проведены с помощью обычных однородных буферных систем электрофореза. Известно, однако, что электрофорез, основанный на неоднородных буферных системах, или диск-электрофорез, введенный Л. Орнштейн (Ornstein, 1964) и Б. Дж. Дэвисом (Davis, 1964), имеет значительно большую разрешающую способность благодаря предварительному концентрированию материала. Диск-электрофорез в сочетании с электрофорезом в присутствии ДСН (диск-ДСН-электрофорез) успешно применен для исследования белкового состава головок бактериофага (Laemmly, 1970), разделения мембранных белков клеток и органелл животных (Neville, 1971), сократительных белков (Шелудько, 1975) и стал в настоящее время хрестоматийным.

В данной работе сделана попытка применить метод диск-ДСН-электрофореза для исследования мембранных белков хлоропластов ячменя.

### Методика

Хлоропласты выделяли из двухнедельных проростков ячменя сорта 'Мийна', выращенных в теплице. Для выделения использовался раствор, содержащий 0,05 М фосфатный буфер (рН 7,2), 0,3 М сахарозу и 0,01 М КСl. На каждые 15 г ткани приходилось 90 мл раствора. После гомогенизации и фильтрования через шестислойную марлю суспензию центрифугировали при 300 г в течение 5 мин для удаления неразрушенных клеток, крупных фрагментов и ядер. Хлоропласты осаждались из супернатанта при 1000 г в течение 10 мин. Промытые и переосажденные хлоропласты подвергали трехкратной обработке H<sub>2</sub>O (10 мл на

каждые 15 г ткани) для лизиса и удаления растворимых белков, причем каждый раз осадок мембран тщательно гомогенизировали. Мембраны осаждались при 16 000 *g* в течение 30 мин. Наконец, для достижения более полной диссоциации мембран и удаления СФ-фактора мембраны обрабатывали 1 *мМ* ЭДТА. Все процедуры проводили при температуре 4°C. Диссоциацию мембран проводили непосредственно перед электрофорезом. Для солиubilизации использовали 1%-ный раствор ДСН, содержащий 4 *М* мочевины, 2%-ный меркаптоэтанол и 0,05 *М* трис-НСI (рН 6,8—7,2). После часовой инкубации при комнатной температуре нерастворенный материал удаляли центрифугированием при 18 000 *g* в течение 30 мин. Концентрацию белка в солиubilизированном препарате определяли по методу О. Х. Лоури (Lowry и др., 1951), концентрацию хлорофилла — по методу Д. Дж. Арнона (Arnon, 1949).

В основу электрофореза положена методика диск-электрофореза У. К. Лэммли (Laemmly, 1970). Состав разделяющего геля: 15%-ный акриламид (АА), 0,145%-ный N, N-метиленбисакриламид (МБА), 0,4 *М* трис-НСI (рН 8,8), 0,1%-ный ДСН, 0,28%-ный ТЕМЕД и 0,26%-ный персульфат аммония (ПСА). Состав концентрирующего геля: 3%-ный АА, 0,6%-ный МБА, 0,05 *М* трис-НСI (рН 6,8—7,2), 0,2%-ный ДСН, 0,2%-ный ТЕМЕД и 0,05%-ный ПСА. Состав электродного буфера: 50 *мМ* трис-глицин рН 8,3 с 0,1%-ным ДСН. Растворенные мембранные белки утяжеляли глицерином и наносили под электродный буфер с помощью микрошприца.

Электрофорез проводили в пластинах в камере системы А. Полокайнена (Полокайнен, Евдокимова, 1982). На каждую пластину наносили 12 проб. Концентрация белка в пробе составляла 122—555 *мкг*. Удовлетворительное разделение получали при нанесении 200—300 *мкг* белка. Концентрирование препарата проводили при силе тока 20 *мА*, напряжении 100 *В*; в дальнейшем силу тока увеличивали до 40 *мА*, напряжение до 160 *В*. Электрофорез проводили при комнатной температуре до тех пор, пока окрашенная зона не достигала конца геля. Время пробега составляло, как правило, 2—2,5 ч. Гель фиксировали в смеси метанол—вода—уксусная кислота (4,5:4,5:1) и затем окрашивали 0,03%-ным кумасси ярко-голубым R—250, приготовленным на этой же смеси. Избыток красителя удаляли электрофоретически смесью метанол—вода—уксусная кислота (2,5:42,5:5). Для электрофореза использовали реактивы фирмы «Реанал», (Венгрия).

## Результаты и обсуждение

В ходе работы мы опробовали различные однородные электрофоретические системы, используемые ранее (Machold, 1971; Eaglesham, Ellis, 1974) для анализа и разделения мембранных белков хлоропластов. Однако ни в одном случае нам не удалось получить удовлетворительных, повторяющихся результатов. Стабильные электрофоретические профили мембранных белков удалось получить, применив для разделения неоднородную трис-глициновую систему ДСН-электрофореза, разработанную У. К. Лэммли (Laemmly, 1970) и широко используемую для характеристики гистонов и сократительных белков.

Результаты разделения мембранных белков хлоропластов, предварительно очищенных от водорастворимых белков и СФ-фактора (фактора сопряжения — белка, обладающего АТФ-азной активностью), полученные с помощью диск-ДСН-электрофореза представлены на рис. 1—3 в виде денситограмм. Видно, что наиболее четкое разделение происходит тогда, когда мембраны для диссоциации обрабатывают раствором 1%-ного ДСН в присутствии мочевины (4 *М*) и 2-меркаптоэта-

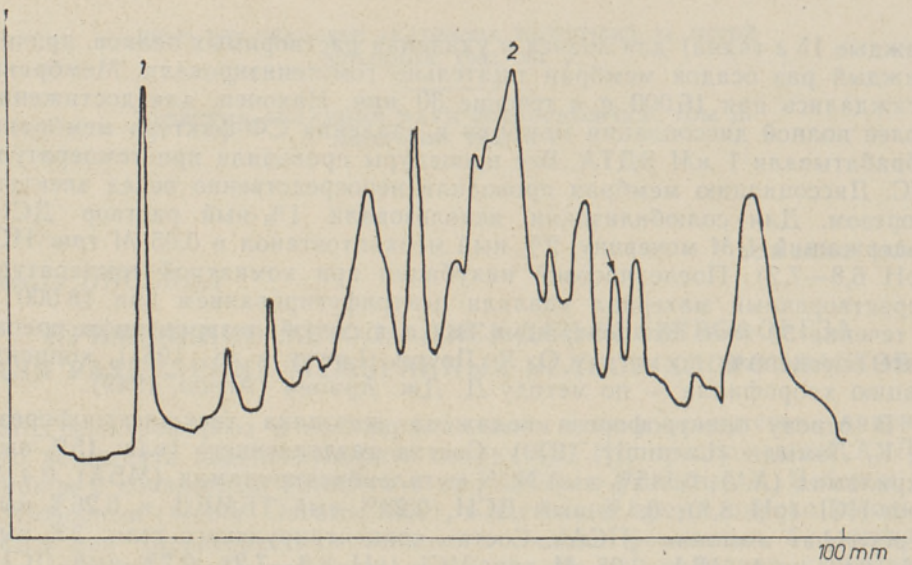


Рис. 1. Электрофоретическое разделение мембранных белков хлоропластов ячменя. Мембраны растворены и подвержены электрофорезу в растворе, содержащем 1%-ный ДСН, 0,05 М трис-НСI (рН 7,2), 4 М мочевины и 2%-ный 2-меркаптоэтанол.

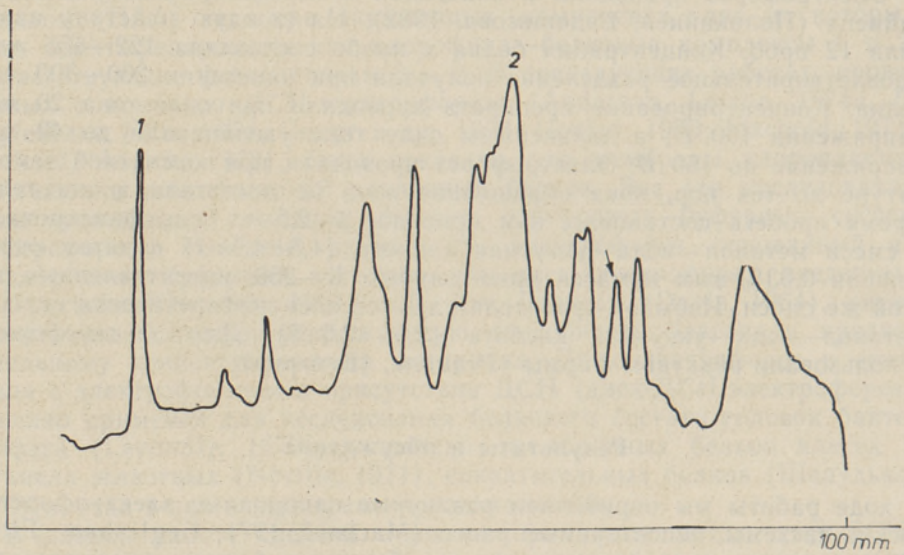


Рис. 2. Электрофоретическое разделение мембранных белков хлоропластов ячменя. Мембраны растворены и подвержены электрофорезу в растворе, содержащем 1%-ный ДСН, 0,05 М трис-НСI (рН 7,2), 2%-ный 2-меркаптоэтанол.

нола (2%). Отсутствие мочевины в диссоциирующем растворе и, следовательно, в подверженном электрофорезу образце, как видно из рис. 2, не отражается на результатах разделения. Растворение мембран 1%-ным раствором ДСН, не содержащим ни мочевины, ни меркаптоэтанол (рис. 3), приводит к почти полному исчезновению белковой зоны в низкомолекулярной области (на рис. 1—3 обозначена стрелкой). Следует отметить также, что вариация рН в диссоциирующем растворе (и следовательно, в разделяемом препарате) и в концентрирующем

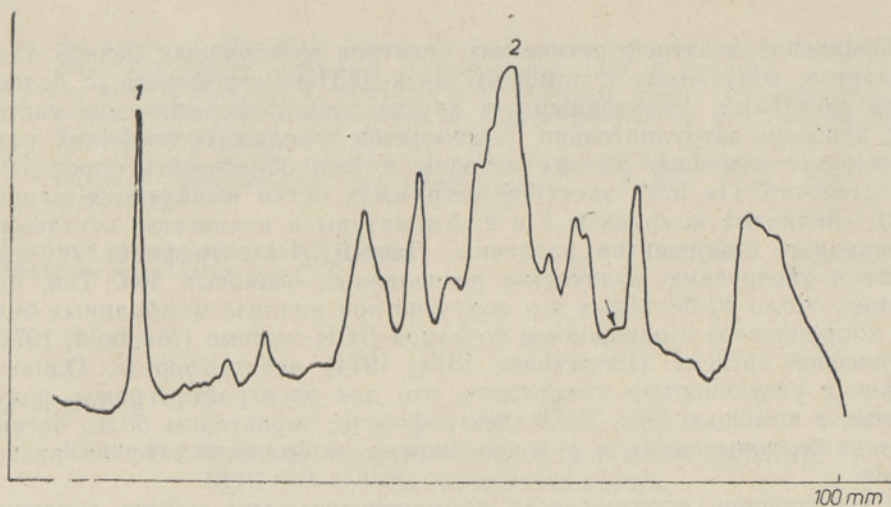


Рис. 3. Электрофоретическое разделение мембранных белков хлоропластов ячменя. Мембраны растворены и подвержены электрофорезу в растворе, содержащем 1%-ный ДСН, 0,05 М трис-НСl (рН 7,2).

геле от 6,8 до 7,2 не влияла на результаты разделения. Несущественной в случае диск-ДСН-электрофореза в отличие от электрофореза в однородной буферной системе оказывается и ионная сила буфера в образце; изменение ионной силы от 5 до 50 мМ не влияет на разделение. Стабильности результатов электрофореза способствует также предварительная обработка мембран хлоропластов ЭДТА, которая приводит не только к удалению СФ-фактора с мембран, но способствует и более полной их диссоциации.

Еще до окрашивания, практически сразу после вхождения исследуемых образцов в разделяющий гель, отчетливо выявляются три зеленые полосы, которые соответствуют хлорофилл—белковому комплексу 1, светопоглощающему хлорофилл—белковому комплексу 2 и свободному хлорофиллу. После окрашивания на электрофореграммах обнаруживается до 20—21 окрашенной полосы различной интенсивности (на денситограммах выявляемые в виде пиков различной амплитуды). Хлорофилл—белковый комплекс 1 на денситограммах соответствует пику 1, хлорофилл—белковый комплекс 2, соответствующий, очевидно, группе белков 2, — пику 2. Ранее на хлоропластах шпината и *Chlamydomonas reinhardi* показано, что белки группы 1 в мембранах ассоциированы с фракцией, обладающей активностью фотосистемы 1, белки группы 2 преобладают во фракции, имеющей активность фотосистемы 2 (Thornberg и др., 1967). Эти две основные группы содержат соответственно 25 и 50% ламеллярного белка хлоропластов. Хлорофилл—белковый комплекс 1 связан в основном с хлорофиллом *a*, отношение хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* составляет 12 : 1, для светопоглощающего хлорофилл—белкового комплекса 2 это отношение равно 1,2 : 1 (Thornberg и др., 1967). Исследования, проведенные на мутантных линиях ячменя, гороха, *C. reinhardi* (Anderson, Levine, 1974a, б; Genge и др., 1974), показали, что хлорофилл—белковые комплексы 1 и 2 играют существенную роль не только в обеспечении функциональной активности хлоропластов, но необходимы и для поддержания целостной структурной организации мембран в хлоропластах. Попытки различных исследователей идентифицировать остальные разделенные мембранные белки хлоропластов положительных результатов пока не дали.

Сравнение электрофоретических спектров мембранных белков хлоропластов, полученных с помощью диск-ДСН-электрофореза, с белковыми спектрами, полученными в других электрофоретических системах, довольно затруднительно. Тем не менее в белковых профилях, разделенных с помощью разных методов, можно обнаружить определенное сходство. На всех электрофореграммах четко выявляются хлорофилл—белковые комплексы 1 и 2. Амплитуды и количество остальных выявленных компонентов различны. Диск-ДСН-электрофорез не приводит к увеличению количества разделенных белковых зон. Так, например, около 20 белковых зон получено при анализе мембранных белков хлоропластов в однородной боратной ДСН-системе (Machold, 1971) и трисовой системе (Eaglesham, Ellis, 1974) электрофореза. Однако, можно с уверенностью утверждать, что для электрофореграмм, полученных с помощью диск-ДСН-электрофореза, характерны более четкие и узкие белковые зоны, т. е. в конечном счете большая четкость разделения.

Существенное преимущество примененного нами метода заключается, на наш взгляд, не только в некотором увеличении разрешающей способности, благодаря концентрированию образца, но главным образом в том, что он позволяет получать стабильные, повторяющиеся картины разделения, что довольно затруднительно при использовании однородных буферных систем электрофореза.

В заключение мне хочется выразить глубокую признательность А. Полокайнену за многочисленные ценные советы и моим ближайшим коллегам за постоянное участие и помощь в работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Полокайнен А., Евдокимова Е. А. Аппарат для электрофореза в пластинчатом геле между стеклянными пластинками. — *Лаборат. дело*, 1982, 5, 294—296.
- Шелудько Н. С. Белковый состав миофибрилл кролика, определенный методом диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия. — *Цитология*, 1975, 17, 1148—1154.
- Anderson, J. M., Levine, R. P. Membrane polypeptide of some higher plant chloroplasts. — *BBA*, 1974a, 333, 378—387.
- Anderson, J. M., Levine, R. P. The relationship between chlorophyll-protein complexes and chloroplast membrane polypeptides. — *BBA*, 1974b, 357, 118—126.
- Arnon, D. J. Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. — *Plant Physiol.*, 1949, 24, 1—15.
- Davis, B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, 121, 404—427.
- Eaglesham, A., Ellis, R. J. Protein synthesis in chloroplasts. II. Light-driven synthesis of membrane proteins by isolated pea chloroplasts. — *BBA*, 1974, 335, 396—407.
- Genge, S., Pilger, D., Hiller, R. G. The relationship between chlorophyll *b* and pigment-protein complex II. — *BBA*, 1974, 347, 22—30.
- Hooper, J. K. Sites of synthesis of chloroplast membrane polypeptides in *Chlamydomonas reinhardtii* y-1. — *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 4327—4334.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. — *Nature*, 1970, 227, 680—685.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. — *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265—275.
- Machold, O. Lamellar proteins of green and chlorotic chloroplasts as affected by iron deficiency and antibiotics. — *BBA*, 1971, 238, 324—331.
- Machold, O., Anrich, O. Sites of synthesis of chloroplast lamellar proteins in *Vicia faba*. — *BBA*, 1972, 281, 103—112.
- Neville, D. M. Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. — *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 6328—6334.
- Ornstein, L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, 121, 321—349.
- Thornber, J. P., Gregory, R. P. F., Smith, C. A., Bailey, J. L. Studies of

- the nature of chloroplast lamella. I. Preparation and some properties of two chlorophyll-protein complexes. — *Biochemistry*, 1967, **6**, 391—396.
- Shapiro, A. L., Vinuela, E., Maizel, I. V. Molecular weight estimation of polypeptide chain by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1967, **28**, 815—820.
- Weber, K., Osborn, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate — polyacrylamide gel electrophoresis. — *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 4406—4412.

*Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Эстонской ССР*

Поступила в редакцию  
26/II 1982

*Rahil PASSOVA*

#### **KLOROPLASTIDE MEMBRAANIVALKUDE FRAKTSIONEERIMINE DISK-NDS-ELEKTROFOREESIMEETODIL**

Nimetatud meetodil eraldati üle 20 valgukomponendi. Selgus, et meetodil pole mitte ainult suurem lahutusvõime, vaid ta võimaldab saada ka stabiilseid, korratavaid elektroforegramme, mis teiste meetoditega on raskesti kättesaadavad.

*Rahil PASSOVA*

#### **FRACTIONATION OF CHLOROPLAST MEMBRANE PROTEINS BY DISC ELECTROPHORESIS IN SODIUM DODECYL SULPHATE**

The protein composition of washed membranes from barley chloroplasts is studied by polyacrylamide gel disc electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS). Washed membranes can be resolved into at least 20 protein bands. The electrophoretic patterns of SDS-solubilized membranes obtained by disc-SDS-electrophoresis result in a markedly improved resolution and are more stable and repeatable than those obtained by SDS-electrophoresis in continuous buffer systems.