



УДК 577.112.7:577.352.332:581.132

ДИССОЦИАЦИЯ БЕЛКА 50 кДа В ПИГМЕНТ-БЕЛКОВОМ
КОМПЛЕКСЕ ФОТОСИСТЕМЫ II ХЛОРОПЛАСТОВ ШПИНАТА*Стадничук И. Н., Элиидина Е. Н., Ганаго И. Б. *,
Климов В. В. ***Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва;*** Институт почвоведения и фотосинтеза Академии наук СССР,
г. Пушкино Московской обл.*

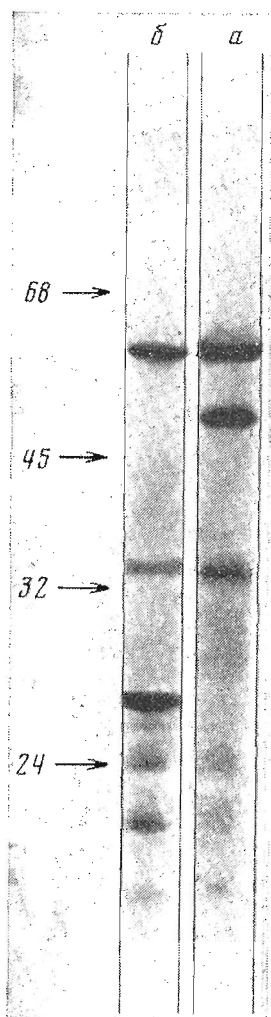
Методом электрофореза в полиакриламидном геле исследован полипептидный состав пигмент-белкового комплекса фотосистемы II хлоропластов шпината. Обработка препарата β -меркаптоэтанолом ведет к исчезновению белка 50 кДа, считающегося характеристическим для фотосистемы II, и появлению полипептида 27 кДа. Предполагается, что белок 50 кДа — димер субъединиц 27 кДа. Тем самым установлено, что основой всех трех пигмент-белковых комплексов хлоропластов, комплекса фотосистемы II и исследованных ранее в тех же условиях комплекса фотосистемы I и хлорофилл-*a/b*-содержащего комплекса являются полипептиды с близкой молекулярной массой (23–27 кДа).

Как известно, мембраны хлоропластов высших растений содержат три пигмент-белковых комплекса: вспомогательный светособирающий хлорофилл-*a/b*-содержащий комплекс и два фотоактивных комплекса фотосистем I и II (см. обзоры [1, 2]). Исследование комплекса фотосистемы II (ФС II) особенно затруднительно, так как ФС II содержит не более 10% всего хлорофилла хлоропластов, легко теряемого при электрофорезе. В приведенных в обзоре [2] относительно немногочисленных работах препараты ФС II получают хроматографическими методами. Во всех случаях анализ полипептидного состава ФС II выявляет в качестве главного компонента белок 43–50 кДа и ряд дополнительных полипептидов. Содержание последних зависит от степени очистки препаратов [2].

Ранее [3] обработкой 2% β -меркаптоэтанолом двух других комплексов хлоропластов, светособирающего и комплекса фотосистемы I, было показано, что белки 70 и 28–30 кДа, считающиеся соответственно характеристическими для каждого из них, являются ассоциатами полипептидов с молекулярной массой 23–25 кДа и ряда минорных полипептидных компонентов. Это позволило допустить, что белок 43–50 кДа, принадлежащий ФС II, также может быть ассоциатом более низкомолекулярных полипептидов. Для выяснения этого вопроса мы предприняли изучение полипептидного состава комплекса ФС II.

Электрофоретический анализ препарата ФС II в контрольном варианте показывает, что препарат содержит интенсивную белковую зону 50 кДа, характерную для ФС II. Присутствует также полипептид 60 кДа, являющийся α -субъединицей сопрягающего фактора хлоропластов [4], белок 33 кДа, типичный для получаемых препаратов ФС II [5], и ряд минорных полипептидных компонентов в области менее 25 кДа (рисунок).

После обработки препарата β -меркаптоэтанолом белковая зона 50 кДа полностью исчезает и вместо нее появляется зона 27 кДа. Полипептиды 60 и 33 кДа при этом сохраняют свое положение (рисунок). Следует подчеркнуть, что полное исчезновение зоны 50 кДа достигается только при интенсивной обработке препарата β -меркаптоэтанолом (кипячение 5 мин), при кипячении в течение 1,5 мин лишь часть полипептида 43–50 кДа распадается до 27 кДа [7]. Наблюдаемый эффект не связан



Электрофорез комплекса фотосистемы II в полиакриламидном геле [6] в присутствии додецилсульфата натрия без (а) и с добавкой 2% β-меркаптоэтанола (б). Стрелками указаны положение белков-маркеров и их молекулярная масса (кДа)

Электрофорез проводили в блоках полиакриламидного геля в системе Леммля [6]. На гель наносили по 20 мкг суммарного белка, белок в пробах определяли по Лоури. Метчиками молекулярной массы служили ингибитор трипсина (24 кДа), α-цепь гемоглобина (32 кДа), овальбумин (45 кДа) и бычий сывороточный альбумин (68 кДа). Белок в гелях после фиксации 12% трихлоруксусной кислотой окрашивали кумасси R-250 (в растворе из метанола, ледяной уксусной кислоты и воды в соотношении 5:1:5). Перед электрофорезом препарат инкубировали 5 мин при ~100°С в присутствии 2% додецилсульфата натрия и 2% β-меркаптоэтанола. В контрольном варианте инкубацию вели при 18°С только в присутствии 2% додецилсульфата натрия.

Авторы благодарны Я. Е. Дунаевскому за советы и помощь в работе.

с присутствием других пигмент-белковых комплексов хлоропластов, так как соответствующие им белковые зоны 70 кДа (фотосистема I) и 28–30 кДа (хлорофилл-*a/b*-содержащий комплекс) не обнаружены в исходном препарате. Минорные полипептиды препарата ФС II также не обуславливают наблюдаемый эффект, поскольку их молекулярные массы не превышают 25 кДа.

Из наших опытов следует, что белок 50 кДа, считающийся характеристическим для ФС II, вероятнее всего, является димером из полипептидных субъединиц 27 кДа, в формировании которого принимают участие S–S-связи. Полученный результат отличен от всех ранее известных литературных данных (см. [1, 2]). Наши настоящие и предыдущие [3] эксперименты позволяют считать: 1) в основе молекулярной организации всех трех пигмент-белковых комплексов хлоропластов лежат близкие по молекулярной массе полипептиды 23–27 кДа; 2) белки пигмент-белковых комплексов, обнаруживаемые в стандартных условиях электрофореза, обязаны своим происхождением ассоциации более низкомолекулярных полипептидов; 3) для выявления полипептидных субъединиц пигмент-белковых комплексов необходимо использование денатурирующих условий с применением β-меркаптоэтанола.

Экспериментальная часть

Хлоропласты и мембраны хлоропластов выделяли из 8-дневных растений шпината методом дифференциального центрифугирования, как описано в работе [8]. Комплекс ФС II получали солиubilизацией мембран хлоропластов детергентом тритоном X-100 с последующим дифференциальным центрифугированием и очисткой препарата на биогеле в соответствии с методом [9]. Нативность препарата контролировали измерением фотоиндуцированных изменений поглощения феофитина — промежуточного акцептора электронов в ФС II. В соответствии с этой оценкой полученный препарат содержал ~60 молекул хлорофилла *a* на один реакционный центр ФС II [10].

1. *Thorner J. P., Markwell J. P., Reinman S.* Photochem. and Photobiol., 1979, v. 29, № 6, p. 1205-1216.
2. *Hiller R. C., Goodchild D. G.* In: The biochemistry of plants/Eds Hatch M. D., Boardman N. K. N. Y.: Blackwell sci., publ., 1981, v. 8, p. 2-50.
3. *Stadnichuk I. N., Zakharova N. I.* Photosynthetica, 1984, v. 18, № 1, p. 150-152.
4. *Machold O.* Biochem. und Physiol. Pflanzen, 1981, B. 176, H. 9, S. 805-827.
5. *Kuwabara T., Murata N.* Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 680, № 2, p. 210-215.
6. *Laemmli U. K.* Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680-685.
7. *Sato K.* Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 546, № 1, p. 84-92.
8. *Шыгулова Н. И., Кюрипун В. М.* Физиол. растений, 1976, т. 23, № 1, с. 42-49.
9. *Ke B., Saku S., Show E. R., Beinert H.* Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 347, № 1, p. 36-48.
10. *Klimov V. V., Klevanik V. A., Shuvalov V. A., Krasnovsky A. A.* FEBS Lett., 1977, v. 82, № 2, p. 183-186.

Поступила в редакцию
22.V.1984

После доработки
22.III.1985

DISSOCIATION OF 50 kD PROTEIN IN PIGMENT-PROTEIN COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II FROM SPINACH CHLOROPLASTS

STADNICHUK I. N., ELPIDINA E. N., GANAGO I. B. *, KLIMOV V. V. *

Biology Department, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow;
**Institute of Soil Science and Photosynthesis, Academy of Sciences*
of the USSR, Pushchino

Polyacrylamide gel electrophoretic analysis was used to characterize the polypeptide composition of the pigment-protein complex of photosystem II from spinach chloroplasts. Following treatment with β -mercaptoethanol, the 50 kD protein, which is characteristic of photosystem II, disappeared and simultaneously the 27 kD polypeptide could be detected. This finding indicates that the 50 kD protein is a dimer of the 27 kD subunits, and thus and earlier data provide evidence that polypeptides with molecular weights of 23-27 kD are universal for all three pigment-protein complexes of higher plant chloroplasts, complex of photosystem II, as well as for earlier studied complex of photosystem I and chlorophyll *a/b* containing complex.