



УДК 577.352.4

**Mg<sup>2+</sup>-ЗАВИСИМАЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗА ИЗ МЕМБРАН  
БАКТЕРИЙ *STREPTOCOCCUS FAECALIS*****II. ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ ЧАСТИ Н<sup>+</sup>-АТФ-АЗЫ****Бабаков А. В., Гаврилова Е. Г., Гевондян Н. М.,  
Полищук Г. И., Терехов О. П., Усманова Р. Г.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Разработан препаративный метод выделения каталитической части Н<sup>+</sup>-АТФ-азы — фактора SfF<sub>1</sub> из мембран бактерий *Streptococcus faecalis*. Показано, что фактор SfF<sub>1</sub> (M 360 000) состоит из 4 видов субъединиц: α — M 55 000, β — M 51 000, γ — M 35 000, ε — M 13 500 со стехиометрией 3α3β1γ (1–2)ε. Определены аминокислотный состав и N-концевые аминокислотные остатки субъединиц: α- и β-субъединицы имеют существенные различия в аминокислотной последовательности. Получены антитела на индивидуальные субъединицы каталитической части Н<sup>+</sup>-АТФ-азы и исследовано их взаимодействие с солюбилизованным фактором SfF<sub>1</sub>. Предложена модель локализации каталитической части Н<sup>+</sup>-транспортирующей АТФ-азы в мембране, а также пространственного расположения ее субъединиц.

В предыдущей статье [1] описан метод выделения и субъединичный состав Mg<sup>2+</sup>-зависимой Н<sup>+</sup>-АТФ-азы из мембран бактерий *Streptococcus faecalis*. Целью настоящей работы является выделение каталитической части фермента — фактора SfF<sub>1</sub>, установление его субъединичной структуры, химическая характеристика субъединиц и определение их взаимного пространственного расположения в молекуле фактора SfF<sub>1</sub>.

На первом этапе исследования нами разработаны методы препаративного получения мембранных фрагментов и солюбилизации мембраносвязанного фактора SfF<sub>1</sub>. Наилучшие результаты были получены при использовании метода [2] с модификациями, а именно получение мембранных фрагментов непосредственно в процессе лизиса клеток и применение на стадии солюбилизации проточного центрифугирования. Данные модификации позволили в сравнении с методом [2] существенно сократить время получения солюбилизованного фактора SfF<sub>1</sub> и значительно увеличить суммарную и удельную активности АТФ-азы данного препарата.

Солюбилизованный препарат подвергали очистке, используя методы фракционирования метанолом, ионообменной хроматографии в растворе на полимине II, гель-фильтрации на биогеле А-1,5 М (рис. 1, табл. 1). Для получения гомогенного препарата фактора SfF<sub>1</sub> в препаративных количествах на последней стадии очистки белка нами были разработаны специальные условия фракционирования на сефадексе А-25, использующие одновременно гель-фильтрационные и анионообменные свойства этой смолы (рис. 2).

По данным аналитического электрофореза в полиакриламидном геле, выделенная нами каталитическая часть Н<sup>+</sup>-АТФ-азы (уд. акт. 60 ед./мг·мин) гомогенна и состоит из 4 субъединиц (рис. 3а и б). Измерения зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата показали, что данная фермент-субстратная система подчиняется кинетике

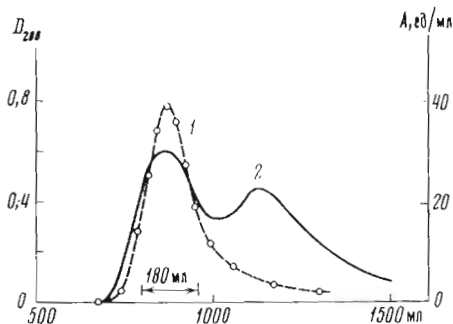


Рис. 1. Гель-фильтрация фактора  $SfF_1$  на биогеле А-1,5 М ( $5 \times 100$  см) с элюцией 10 мМ  $MgCl_2$  в 20 мМ трис-НСI-буфере, рН 7,5. 1 — АТФ-азная активность; 2 — поглощение на 280 нм

Михаэлиса — Ментен ( $K_m^{ATP} = 1,8$  мМ и  $V = 100$  мкмоль/мг·мин), причем АДФ является конкурентным ингибитором АТФ-азной реакции с  $K_i^{ADP} = 2,4$  мМ (рис. 4а). Максимальная ферментативная активность фактора  $SfF_1$  наблюдается при соотношении  $[ATP]:[Mg^{2+}]$  2 : 1 в диапазоне рН 7–8 (рис. 4б, в).

На основании данных опыта по седиментационному равновесию определен молекулярный вес фактора  $SfF_1$ , равный 360 000.

Удельный парциальный объем  $v = 0,74$  рассчитан [4] по определенному нами аминокислотному составу белка, приведенному в табл. 2. Расчет изоэлектрической точки фактора  $SfF_1$  на основе его аминокислотного состава показал, что она находится в диапазоне рН 4–5. На это также указывает тот факт, что в данной области рН фактор  $SfF_1$  не связывается ни катионообменной, ни анионообменной смолами. Как видно из этой же таблицы, фактор  $SfF_1$  сходен по своему аминокислотному составу с ранее выделенными факторами  $F_1$  из других объектов. Заметим, что ни один из этих белков не содержит в своем составе триптофана. Вместе с тем наблюдается одно характерное различие: фактор  $F_1$  митохондрий и хлоропластов содержит в среднем в 2–3 раза больше остатков цистеина по сравнению с фактором  $F_1$  из анаэробных бактерий.

Данные аналитического электрофореза в полиакриламидном геле показывают, что при действии на фактор  $SfF_1$  8 М мочевины или 6 М хлоргидрата гуанидина не происходит полной диссоциации белка на субъединицы (рис. 3в, г). Поэтому выделение субъединиц фактора  $SfF_1$  проводили в растворах додецилсульфата натрия, используя методы ионообменной хроматографии на гидроксиланатите (рис. 5) и препаративный электрофорез в полиакриламидном геле (рис. 6).

Все субъединицы, как и сам фактор  $SfF_1$ , относятся к кислым белкам и содержат примерно равное количество (в % к сумме) неполярных аминокислот (см. табл. 3). Из этих же данных видно, что остатки цистеина имеются только в  $\alpha$ - и  $\gamma$ -субъединицах. Косвенным подтверждением присутствия цистеина только в  $\alpha$ - и  $\gamma$ -субъединицах в нашем случае является тот факт (данные будут опубликованы особо), что  $\alpha$ - и  $\gamma$ -субъединицы связываются тиол-сефарозой 4В, тогда как субъединицы  $\beta$  и  $\epsilon$  не связываются.

Таблица 1

#### Очистка фактора $SfF_1$

Стадии очистки	Объем, мл	Белок, мг	Активность, ед. акт.	Уд. акт., ед. акт./мг белка
Солюбилизация 1 мМ трис	3500	8000	20 000	2,5
Фракционирование метанолом	4500	3400	19 000	5,6
Хроматография на полимине II	500	790	15 000	19,0
Гель-фильтрация на А-1,5 М	180	380	11 000	42,0
Хроматография на А-25	30	120	7400	62,0

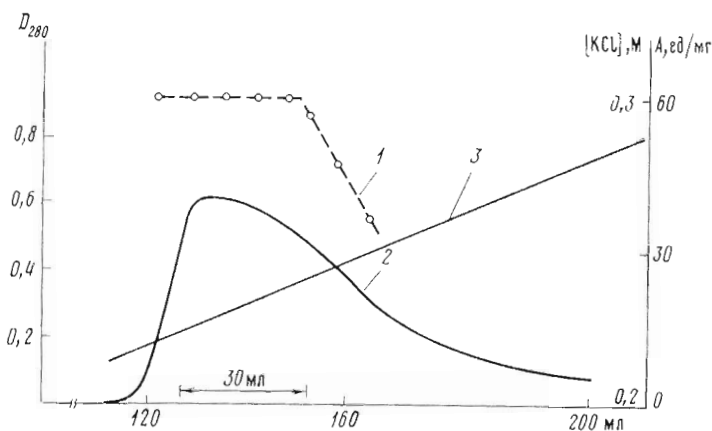


Рис. 2. Ионнообменная хроматография фактора SfF<sub>1</sub> на сефадексе А-25 (2,5×100 см) с элюцией линейным градиентом KCl. 1 — удельная активность, 2 — поглощение на 280 нм, 3 — линейный градиент 0,1–0,3 М KCl в 20 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,2), содержащем 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>

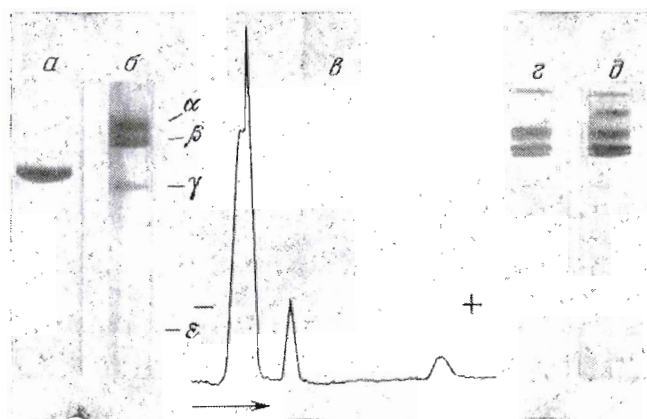


Рис. 3. Аналитический электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле препарата после хроматографии на А-25 SfF<sub>1</sub> (50 мкг) без диссоциирующих агентов (а), в присутствии додецилсульфата натрия (б) или 8 М мочевины (г, д). В случае 8 М мочевины диссоциацию белка на субъединицы вели 8 М мочевиной или 6 М хлоридом гуанидина в присутствии (г) или в отсутствие (д) 10 мМ дитиотреита. На рисунке в приведена сканограмма геля б

Интересно, что для фактора F<sub>1</sub> из митохондрий цистеин найден в α-, γ- и ε-субъединицах, а в случае фактора F<sub>1</sub> из хлоропластов — во всех субъединицах [5, 6].

N-Концевой анализ субъединиц фактора SfF<sub>1</sub> показал, что в неденатурированном белке все N-концевые аминокислоты недоступны для их определения. N-концевая аминокислота β-субъединицы не определялась и в присутствии додецилсульфата натрия. Следует отметить, что из двух остатков метионина ε-субъединицы один является N-концевой аминокислотой. К сожалению, нельзя провести сравнение каталитических частей H<sup>+</sup>-АТФ-аз по N-концевым аминокислотам, поскольку эти данные отсутствуют для H<sup>+</sup>-АТФ-аз, выделенных из других источников.

Пептидные карты α- и β-субъединиц дали дополнительную информацию о структурных различиях между этими субъединицами. Проведенный анализ пептидных карт α- и β-субъединиц путем сравнения относительных подвижностей пептидов при горизонтальном электрофорезе и восходящей хроматографии показывает, что взаимное расположение большинства пеп-

Таблица 2

Аминокислотный состав фактора F<sub>1</sub>  
различных H<sup>+</sup>-АТФ-аз \*

Аминокислота	SfF <sub>1</sub>	TF <sub>1</sub> **	F <sub>1</sub> ***	CF <sub>1</sub> ****
Lys	5,6	4,1	6,1	4,2
His	1,5	1,7	1,4	0,8
Arg	4,8	6,0	5,5	6,1
Cys	0,14	0,08	0,35	0,38
Asp	9,5	8,4	7,9	7,3
Thr	6,3	5,0	5,4	6,9
Ser	5,6	4,8	5,2	5,7
Glu	12,5	13,3	12,5	13,4
Pro	3,8	5,6	4,1	3,8
Gly	9,0	8,6	9,7	7,7
Ala	8,8	10,2	10,0	8,8
Val	8,5	8,8	8,3	6,9
Met	2,2	0,3	1,8	2,7
Ile	6,8	6,9	7,3	6,5
Leu	9,2	9,3	9,3	9,2
Tyr	2,7	2,8	2,5	2,7
Phe	3,2	3,5	3,3	2,7
Основные аминокислоты	11,9	11,8	13,8	11,1
Неполярные аминокислоты	42	46	43	41

\* Количество каждой аминокислоты выражено в процентном отношении ко всем аминокислотам фактора F<sub>1</sub>.\*\* TF<sub>1</sub> — фактор F<sub>1</sub> термофильных бактерий [23].\*\*\* F<sub>1</sub> — фактор F<sub>1</sub> митохондрий [15].\*\*\*\* CF<sub>1</sub> — фактор F<sub>1</sub> хлоропластов [22].

Таблица 3

Аминокислотный состав субъединиц фактора SfF<sub>1</sub> \*

Аминокислота	α	β	γ	ε
Lys	28	26	18	7
His	7	6	5	4
Arg	25	21	13	9
Cys	1	Нет	2	Нет
Asp	49	41	34	14
Thr	29	30	26	8
Ser	26	27	23	7
Glu	60	63	39	14
Pro	19	19	10	4
Gly	46	45	23	10
Ala	47	36	34	13
Val	38	45	19	14
Met	12	9	9	2
Ile	36	29	25	9
Leu	50	44	25	7
Tyr	15	11	11	2
Phe	15	18	9	1
Всего	503	468	325	125
Мол. вес **	54600	51100	35400	13500
Кислые аминокислоты, %	66	66	67	58
Неполярные аминокислоты, %	41	43	40	40
N-Концевая аминокислота	Ala	He обна- руж.	Gly	Met

\* Данные выражены относительно аминокислоты, представленной в каждой субъединице в наименьшем количестве.

\*\* Молекулярные веса субъединиц были рассчитаны в предположении, что α-субъединица содержит 1 остаток цистеина, β — 6 остатков гистидина, γ — 2 остатка цистеина, ε — 1 остаток фенилаланина.

тидных пятен на хроматограммах α- и β-субъединиц различно. Однако на пептидных картах этих субъединиц имеются сходные семейства пептидов, поэтому не исключено, что в аминокислотных последовательностях α- и β-субъединиц имеются участки с одинаковой последовательностью аминокислот, причем вероятно, что именно они участвуют в формировании центра связывания адениновых нуклеотидов. Исследования места связывания различных ингибиторов H<sup>+</sup>-АТФ-аз, фотоаффинных аналогов АТФ и АДФ, реконструкции фактора F<sub>1</sub> из отдельных субъединиц и кинетические измерения приводят к выводу, что активный центр фермента локализован в β-субъединице, а в α-субъединице находится центр связывания адениновых нуклеотидов с высоким средством к АДФ [7, 8].

Молекулярные веса отдельных субъединиц (α — 55 000, β — 51 000, γ — 35 000 и ε — 13 500) определены двумя методами: путем сравнения относительных подвижностей субъединиц с подвижностью маркерных белков при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и из найденного нами аминокислотного состава индивидуальных субъединиц (табл. 3). Знание молекулярного веса каталитической части H<sup>+</sup>-АТФ-азы *S. faecalis* и молекулярных весов ее отдельных субъединиц позволило установить по результатам сканирования гелей в присутствии додецилсульфата натрия при 280 и 500 нм стехиометрию субъединиц в молекуле фактора SfF<sub>1</sub>—3α3β1γ(1—2)ε (рис. 3б).

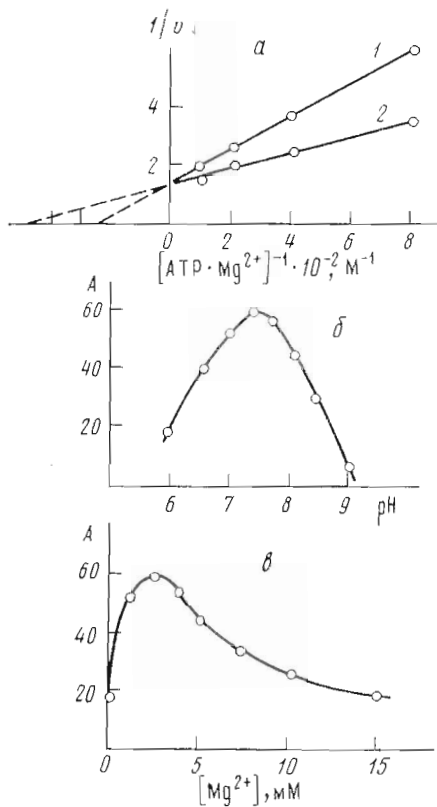


Рис. 4

Рис. 4. Характеристики фактора SfF<sub>1</sub>. Зависимость скорости ферментативной реакции от [АТР] (а), рН (б) и [Mg<sup>2+</sup>] (в). Для а и б [АТР]/[Mg<sup>2+</sup>] 2 : 1; в [АТР] 5 мМ

Рис. 5. Ионообменная хроматография субъединиц фактора SfF<sub>1</sub> на гидроксилалюминате (2,5×7,0 см). Стрелками указаны концентрации (М) фосфатного буфера, рН 6,5

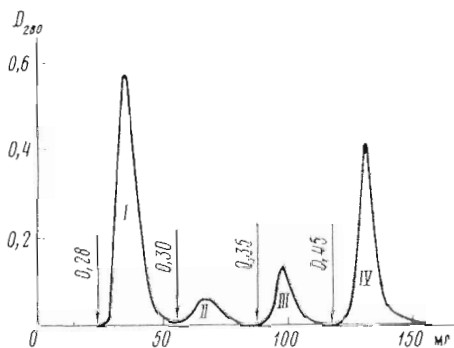


Рис. 5

Полученные данные по аминокислотному составу, N-концевым аминокислотам совместно с результатами о различии в пептидных картах α- и β-субъединиц позволяют однозначно идентифицировать все субъединицы каталитической части H<sup>+</sup>-АТР-азы *S. faecalis*.

Для получения данных о локализации субъединиц каталитической части фермента в естественной мембране нами проведено исследование взаимодействия фактора SfF<sub>1</sub> с антителами, образованными против индивидуальных субъединиц фактора SfF<sub>1</sub> и каталитической части H<sup>+</sup>-АТР-азы. Взаимодействие антител с солюбилизованным и мембраносвязанным фактором SfF<sub>1</sub> оценивали путем измерения способности антител ингибировать АТР-азную активность и вызывать преципитацию белка.

Как следует из этих данных (табл. 4), ингибирующей способностью обладают антитела к целому фактору SfF<sub>1</sub>, к β- и ε-субъединицам. Полное ингибирование β-антителами АТР-азной активности каталитической части фермента подтверждает другие данные о том, что именно в этой субъединице находится активный центр фермента [7, 8].

ε-Антитела ингибируют АТР-азный комплекс SfF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> на 50%. Вероятно, часть молекул солюбилизованной и очищенной каталитической части H<sup>+</sup>-АТР-азы *S. faecalis* не имеют ε-субъединицы, так как только ~80% фактора SfF<sub>1</sub> удается осадить ε-антителами. Если принять это во внимание, то ингибирование ε-антителами солюбилизованной каталитической части H<sup>+</sup>-АТР-азы также составляет 50%.

Обращает на себя внимание тот факт, что преципитация ε-антителами мембраносвязанного фактора SfF<sub>1</sub> не превышает 25%. При преципитации мембранного комплекса SfF<sub>0</sub>·F<sub>1</sub> не существенно, имеют ли все ферменты в своем составе ε-субъединицу, так как в этом случае мы имеем дело с мембранной фракцией и маловероятно существование гетерогенности субъеди-

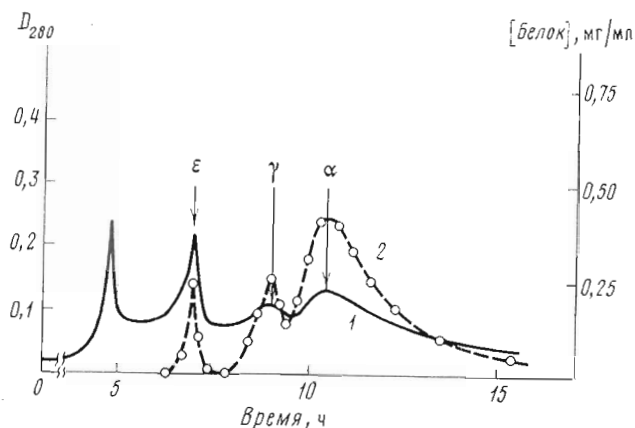


Рис. 6. Профиль элюции белка фракции I (рис. 5) при сравнительном электрофорезе в полиакриламидном геле. 1 — поглощение при 280 мμ, 2 — белок по Лоури

ничного состава  $H^+$ -АТФ-азы по фрагментам мембран, поэтому неполная преципитация в этом случае обусловлена недостатком времени (24 ч) для образования преципитата, что в свою очередь, вероятно, связано со стерическими затруднениями образования преципитата между мембраносвязанной каталитической частью  $H^+$ -АТФ-азы с  $\epsilon$ -антителами. Стерические затруднения образования преципитата и частичное ингибирование ферментативной активности  $H^+$ -АТФ-азы  $\epsilon$ -антителами указывают на то, что  $\epsilon$ -субъединица локализована, по-видимому, в той части молекулы фактора  $SfF_1$ , которая обращена к мембране и, вероятно, близко расположена к протонпроводящему пути внутри фактора  $SfF_1$  между активным центром фермента и его гидрофобной частью — фактором  $SfF_0$ .

Из данных, представленных в табл. 4, можно видеть, что  $\gamma$ -антитела не взаимодействуют ни с солюбилизированным, ни с мембраносвязанным фактором  $SfF_1$ . Отсюда следует, что  $\gamma$ -субъединица, по-видимому, находится внутри молекулы каталитической части  $H^+$ -АТФ-азы и экранирована другими субъединицами от раствора таким образом, что они препятствуют одновременному взаимодействию  $\gamma$ -антител с разными молекулами фактора  $SfF_1$ .

Ранее [9] при изучении поверхностно-активных свойств каталитической части  $H^+$ -АТФ-азы *S. faecalis* нами была сделана оценка размеров молекулы фактора  $SfF_1$ , находящегося на границе раздела фаз вода — воздух, и было показано, что фактор  $SfF_1$  не вступает в заметное взаимодействие с фосфолипидами. Полученные размеры белка (площадь  $1,8 \cdot 10^4 \text{ \AA}^2$  и высота 30  $\text{\AA}$ ) и найденное нами соотношение субъединиц в молекуле фактора  $SfF_1$  дают основание утверждать, что  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы лежат в одной плоскости.

Таблица 4

Взаимодействие антител против индивидуальных субъединиц с каталитической частью  $H^+$ -АТФ-азы *S. faecalis*

1 — преципитация, %; 2 — ингибирование \*, %

Антитела против	$SfF_1$		$\alpha$		$\beta$		$\gamma$		$\epsilon$	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Фактор $SfF_1$	100	100	100	0	100	100	0	0	77	38
$H^+$ -АТФ-аза	100	100	100	0	100	100	0	0	25	50

\* Измерения ингибирования АТФ-азной активности препарата проводили в зоне максимальной преципитации.

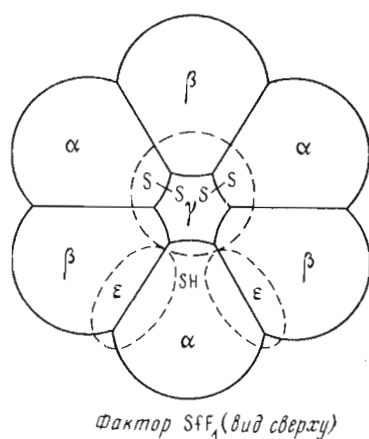
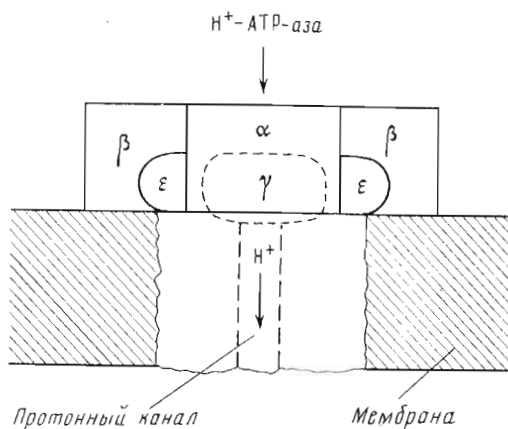


Рис. 7. Модель локализации каталитической части  $H^+$ -АТР-азы *S. faecalis* в мембране и взаимное расположение ее субъединиц в молекуле фермента

Суммируя полученные данные о доступности  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\epsilon$ -субъединиц каталитической части  $H^+$ -АТР-азы с результатами по поверхностной и ферментативной активности фактора  $SfF_1$  в монослое, можно сделать вывод о том, что фактор  $SfF_1$  расположен в биологической мембране в зоне перехода из неполярной области в полярную, причем место взаимодействия фактора  $SfF_1$  с мембраной определяется, по-видимому, специальными интегральными белками, которые, как показано для термофильных бактерий [10], образуют протонпроводящий путь.

На рис. 7 представлена модель локализации каталитической части  $H^+$ -АТР-азы *S. faecalis* в мембране и взаимного расположения ее субъединиц. В данной модели SH-группы двух  $\alpha$ -субъединиц соединены S—S-связью с двумя SH-группами  $\gamma$ -субъединицы. Возможность для этого следует как из определенного нами аминокислотного состава субъединиц и их стехиометрии в молекуле фактора  $SfF_1$  (всего 5 SH-групп на одну молекулу белка), так и из данных о наличии двух дисульфидных связей в  $H^+$ -АТР-азах [5, 6]. Располагая таким образом S—S-связи, мы тем самым делаем молекулу  $H^+$ -АТР-азы асимметричной по  $\alpha$ -субъединицам.

Такая структурная асимметрия молекулы каталитической части  $H^+$ -АТР-азы, по-видимому, имеет существенное значение для функционирования фермента и может оказаться полезной для понимания молекулярных механизмов синтеза и гидролиза АТФ и связанного с ними активного транспорта протонов через мембрану.

## Экспериментальная часть

В работе использовали АТФ (Reanal, Венгрия), ДНКазу (Sigma, США), лизоцим (Олайне), полимин II (полиэтиленимин) (Fluka, Швейцария), биогель А-1,5 М (Bio-Rad, США), сефадексы А-25, G-25 (Pharmacia, Швеция), трипсин (Worthington, США), метансульфоновую кислоту (Pierce, США).

Бактериальную массу выращивали по методу [1]. Седиментационный анализ фактора SfF<sub>1</sub> проводили на аналитической центрифуге Spinco E (Beckman, США), оснащенной сканирующей системой. Молекулярный вес рассчитывали по формуле [3].

Концентрацию белка определяли методом Лоури [11]. АТФ-азную активность (А) измеряли путем определения количества неорганического фосфата [12]. За единицу активности принимали 1 мкмоль АТФ, гидролизованной в 1 мин. Среда для определения активности содержала 0,1 М трис-НСl, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ АТФ (рН 7,5; 38°). Определение белка в элюате осуществляли с помощью Uvicord II (ЛКВ, Швеция) по поглощению при 280 нм.

Аналитический электрофорез вели в 7,5% полиакриламидном геле в трис-глициновом буфере по методу Дэвиса [13], а электрофорез в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия и 8 М мочевины — по методам [14] и [15] соответственно.

Иммунизацию кроликов субъединицами Н<sup>+</sup>-АТФ-азы проводили по методу [16].

Аминокислотный состав определяли после кислотного гидролиза при 110° в течение 24 и 96 ч на автоматическом анализаторе D-500 (Durrum, США). Содержание цистеина определяли как количество цистеиновой кислоты, образовавшейся после окисления надмуравьиной кислотой [17]. Триптофан определяли после гидролиза белка 4 н. метансульфоновой кислотой, содержащей 0,2% 3-(2-аминоэтил)индола [18].

Идентификацию N-концевых аминокислот проводили в присутствии додецилсульфата натрия [19] по методу Грея [20].

Гидроксилпатит готовили по методу [21].

Бактериальную массу (0,8–1,0 кг), хранящуюся в холодильнике при –70°, размораживали и проводили лизис клеток при 37° в течение 1,5 ч в 5-кратном объеме буфера (2 мкг/мл ДНКазы, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ трис-НСl, рН 7,2) по отношению к объему уплотненных клеток. Лизоцим (4 г) добавляли двумя порциями по 2 г с интервалом 30 мин. Образовавшиеся в результате лизиса и осмотического шока суббактериальные частицы осаждали центрифугированием при 19 000 об/мин (L5-50, Beckman, Австрия, Ti-19 ротор) в течение 40 мин. Полученный осадок промывали по методу Абрамса [2]. К приготовленному таким образом мембранным частицам добавляли 3,5 л 1 мМ трис-НСl, рН 7,5, гомогенизировали и центрифугировали при 30 000 об/мин на зональной проточной центрифуге РК (Electro Nucleonics, США, РК-3 ротор) при скорости потока 60 мл/мин.

Солюбилизированный препарат подвергали фракционированию 20% метанолом в 20 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,5), содержащем 50 мМ MgCl<sub>2</sub>. Полученный супернатант (4500 мл), обладающий АТФ-азной активностью, подвергали ионообменной хроматографии в растворе на полимине II (из расчета 0,1 г полимина II на 1 г белка) со ступенчатой элюцией 0,45 М (1000 мл) и 0,85 М (500 мл) KCl при рН 7,5 в буфере, содержащем 20 мМ трис-НСl и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>. Перевод комплекса смола — белок из одного раствора в другой проводили с помощью центрифугирования при 7000 об/мин. Для более полного удаления полимина II супернатант (500 мл), содержащий АТФ-азную активность, последовательно двукратно высаливали твердым сульфатом аммония при 80% насыщении. Осадок собирали центрифугированием при 19 000 об/мин (J-21B, JA-20 ротор) в течение 40 мин.



Полученный осадок растворяли в 5 мл буфера, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7,5) и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, и диализовали против этого же буфера в течение 4 ч.

Раствор белка (10 мл) подвергали гель-фильтрации на биогеле А-1,5 М (5×100 см) в 20 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,5), содержащем 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, со скоростью элюции 50 мл/ч (рис. 1). Фракцию, содержащую АТР-азную активность (180 мл), высаливали 80% сульфатом аммония и центрифугировали при 19 000 об/мин (J-21В, JA-20 ротор) в течение 40 мин. Полученный осадок растворяли в 3 мл буфера, содержащего 0,3 М KCl, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ трис-НСl (рН 7,2), и диализовали против этого же буфера в течение 4 ч.

Раствор белка (10 мл) наносили на колонку с сефадексом А-25 (2,5××100 см, скорость элюции 20 мл/ч), нижняя половина которой уравновешена буфером 0,1 М KCl с 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ трис-НСl, рН 7,2, а верхняя половина колонки — линейным градиентом KCl от 0,1 до 0,3 М KCl в том же буфере. Фактор SfF<sub>1</sub> выходил с колонки при концентрации KCl 0,22—0,24 М в объеме 30 мл (рис. 2). Выделенный белок хранили в холодильнике при —20°.

Для выделения субъединиц использовали хроматографию на гидроксилпатите. Лиофилизированный фактор SfF<sub>1</sub> (50 мг) растворяли в 50 мл 10 мМ фосфата натрия (рН 6,5) с 0,3% додецилсульфата натрия и 1% β-меркаптоэтанола, нагревали до 100° и после охлаждения наносили на колонку (2,5×7,0 см) с гидроксилпатитом. Вначале колонку промывали 50 мл 10 мМ фосфатного буфера, а затем ступенчатым градиентом фосфатного буфера (скорость элюции 50 мл/ч) (рис. 5). Фракция IV содержала чистую β-субъединицу. Разделение смеси α-, γ- и ε-субъединиц (фракция I) проводили далее с помощью препаративного электрофореза на установке Uniphog (ЛКВ, Швеция) в градиентном полиакриламидном геле в трис-глицериновом буфере (рис. 6). Колонку с диаметром основания 2,1 см заполняли до высоты 7 см полиакриламидным гелем с экспоненциальным убыванием концентрации геля от 13 до 7%. Концентрация додецилсульфата натрия в геле и электродных буферах 0,05%. 15 мг смеси α-, γ- и ε-субъединиц, полученной после хроматографии на гидроксилпатите, растворяли в 1 мл электродного буфера, разведенного в 10 раз, в присутствии 1% додецилсульфата натрия и 5% β-меркаптоэтанола, инкубировали 3 мин при 100° и наносили на поверхность геля. Электрофорез вели при 1500 В в течение 20 ч. Выделенные субъединицы осаждали 10% трихлоруксусной кислотой, промывали 2 раза этанолом и хранили в холодильнике при —20°.

Образцы субъединиц для пептидных карт и для иммунизации кроликов растворяли при комнатной температуре в 0,1 М NH<sub>4</sub>НСО<sub>3</sub> в присутствии 6 М хлоргидрата гуанидина, а затем переводили их в 0,1 М NH<sub>4</sub>НСО<sub>3</sub> на колонке с сефадексом G-25. Собранную белковую фракцию лиофилизировали. Лиофилизированный белок растворяли в 0,1 М NH<sub>4</sub>НСО<sub>3</sub> до конечной его концентрации 1%, после чего добавляли трипсин из расчета 3% по отношению к гидролизуемому белку. Трипсин вводили в два приема равными порциями с интервалом в 1 ч. Гидролиз вели 4 ч при 37°, после чего гидролизат центрифугировали при 6000 об/мин (J-21В, JS-7,5 ротор) в течение 15 мин и полученный супернатант лиофилизировали. 5 нмоль гидролизата в 5—10 мкл H<sub>2</sub>O наносили на хроматографическую пластину с целлюлозой размером 200×200 мм (Schleicher and Schüll, ФРГ) и проводили горизонтальный электрофорез в ацетат-пиридиновом буфере (рН 5,4) при 500 В в течение 3 ч при 8°. Восходящую хроматографию вели при 4° в смеси бутанол — пиридин — уксусная кислота — H<sub>2</sub>O, 15 : 20 : 3 : 12. Пептиды обнаруживали нингидрином.

Взаимодействие антител с солюбилизированной и мембраносвязанной каталитической частью H<sup>+</sup>-АТР-азы исследовали путем измерения АТР-азной активности фактора SfF<sub>1</sub> непосредственно сразу после добавления

антител или после преципитации комплекса антиген — антитело, причем для контроля использовали сыворотку тех же животных, взятую до иммунизации.

Авторы признательны акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к работе и ценные советы при обсуждении ее результатов. Выражаем благодарность старшим научным сотрудникам Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР М. Ю. Фейгиной за проведение анализа N-концевых аминокислот, Ц. А. Егорову за помощь в выполнении аминокислотного анализа, Г. М. Смирновой за налаживание метода получения больших количеств бактериальной массы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаков А. В., Васильев Р. Г. (1979) Биоорг. химия, 5, 119—125.
2. Abrams A. (1965) J. Biol. Chem., 240, 3675—3681.
3. Chervenka C. H. (1969) A manual of methods for the analytical ultracentrifuge, Spinco Division of Beckman Instruments, Palo Alto, Calif.
4. Cohn E. J., Edsall J. T. (1943) Proteins, Amino Acids and Peptides, Reinhold Publishing Corporation, N. Y.
5. Senior A. E. (1975) Biochemistry, 14, 660—664.
6. Farron F., Racker E. (1970) Biochemistry, 9, 3829—3836.
7. Koslov I. A., Skulachev V. P. (1977) Biochim. et biophys. acta, 463, 29—89.
8. Harris D. A. (1978) Biochim. et biophys. acta, 463, 245—273.
9. Terekhov O. P. (1976) Stadia biophys., 56, 55—56.
10. Okamoto H., Sone N., Hirata H., Yoshida M., Kagawa Y. (1977) J. Biol. Chem., 252, 6118—6124.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
12. Fiske C. H., Subbarow Y. J. (1925) J. Biol. Chem., 66, 375—378.
13. Davis B. J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404—427.
14. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406—4412.
15. Knowles A. F., Penefsky H. S. (1972) J. Biol. Chem., 247, 6624—6630.
16. Сидорова Е. В., Трудовой М. Г. (1977) в кн.: Современные методы в биохимии, под ред. Ореховича В. Н., с. 293—300, «Медицина», М.
17. Moore S. J. (1963) J. Biol. Chem., 238, 235—239.
18. Moore S. J. (1972) in: Chemistry and Biology of Peptides (Meienhofer J., ed.), pp. 629—653, Ann Arbor Publishers, Michigan.
19. Weiner A. M., Platt T., Weber K. (1972) J. Biol. Chem., 247, 3242—3251.
20. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А., Липкин В. М., Смирнов Ю. А., Потапенко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. (1973) Биохимия, 38, 3—21.
21. Levin O. (1962) in: Methods in Enzymology (Colowick S. P., Kaplan N. O., eds.), vol. 5, pp. 27—32, Acad. Press, N. Y.—London.
22. Farron F. (1970) Biochemistry, 9, 3823—3928.
23. Yoshida M., Sone N., Hirata H., Kagawa Y. (1975) J. Biol. Chem., 250, 7910—7916.

Поступила в редакцию 16.VIII.1978

#### Mg<sup>2+</sup> DEPENDENT ADENOSINETRIPHOSPHATASE FROM *STREPTOCOCCUS FAECALIS* MEMBRANES. II. A STUDY OF ATPase CATALYTIC MOIETY

БАБАКОВ А. В., ГАВРИЛОВА Е. Г., ГЕВОНДЯН Н. М.,  
ПОЛИШЧУК Г. И., ТЕРЕХОВ О. П., УСМАНОВА Р. Г.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

A large-scale method for purifying the *Streptococcus faecalis* H<sup>+</sup>-ATPase catalytic moiety — factor SIF<sub>1</sub> has been developed. Factor SIF<sub>1</sub> has been shown to consist of 4 types of subunits of the following molecular weight:  $\alpha$  — 55000,  $\beta$  — 51000,  $\gamma$  — 35000,  $\epsilon$  — 13500. The determined molecular weight of factor SIF<sub>1</sub> is 360000. All the SIF<sub>1</sub> subunits have been isolated, their amino acid composition determined, the N-terminal amino acid identified and stoichiometry of  $3\alpha\beta\beta\gamma(1-2)\epsilon$  elucidated. The antibodies against the SIF<sub>1</sub> individual subunits have been raised and their interaction with soluble and membrane bound SIF<sub>1</sub> has been studied. The following inferences have been made: factor SIF<sub>1</sub> is located in the transition region between the polar and nonpolar areas in the membrane; its major subunits  $\alpha$  and  $\beta$  lie in the same plane; the  $\gamma$  subunit is located inside factor SIF<sub>1</sub>, while the  $\epsilon$  subunit is closer to the SIF<sub>1</sub> moiety which interacts with the proteins of the hydrophobic complex SIF<sub>0</sub>.