

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том 30, вып. 2

1983 г.

УДК 581.17

ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВОГО И ПОЛИПЕПТИДНОГО СОСТАВА ИЗОЛИРОВАННОГО ТОНОПЛАСТА КРАСНОЙ СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ

Р. К. САЛЯЕВ, Н. В. ОЗОЛИНА, В. Я. КУЗЕВАНОВ

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Академии наук СССР, Иркутск*

Методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия исследовали полипептидный состав мембран вакуолей, изолированных из корнеплодов красной столовой свеклы. Обработывая вакуолярные мембраны растворами с различной солюбилизирующей силой, извлекали белки, с разной степенью прочности связанные с мембраной: периферические белки, суммарную фракцию интегральных белков и фракцию прочносвязанных интегральных белков. Показано, что общий полипептидный спектр белков изолированного тонопласта состоял из 20—22 полос, 7 из которых являются гликопептидами. В суммарной фракции интегральных белков присутствовали полипептиды с мол. весом до 70 кД, тогда как среди периферических преобладали низкомолекулярные (до 14 кД). В электрофоретическом спектре прочносвязанных интегральных белков обнаружена полоса с мол. весом 100—130 кД, которая соответствует полипептидам, глубоко погруженным в липидный матрикс мембраны и недоступным для действия протеолитического фермента проназы. Полученные данные обсуждаются в связи с транспортной функцией интегральных белков, а также в связи с участием поверхностных белков в процессах, мембранного «узнавания».

Изолированная вакуолярная мембрана — электрофорез — периферические и интегральные белки

В предыдущей работе [1] охарактеризован общий состав изолированной вакуолярной мембраны корнеплодов красной столовой свеклы. Установлено, что в исследуемой мембране содержится значительное количество интегральных белков, которые глубоко проникают в мембрану и, по всей вероятности, могут принимать участие в транспортных процессах.

Задачей настоящей работы было более детальное исследование белков тонопласта, а именно количественная и качественная оценка белково-полипептидного состава с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, а также изучение топографии белков в мембране методом протеолиза.

МЕТОДИКА

Вакуолярные мембраны выделяли по описанной ранее методике [1, 2] из корнеплодов красной столовой свеклы *Beta vulgaris* L. (сорт Бордо), хранящихся при 0—1° в условиях фитотрона. Препараты тщательно промытых вакуолярных мембран лиофилизировали и хранили в ампулах, запаянных под вакуумом. По данным количественной электронной микроскопии, чистота фракции тонопласта была не ниже 90% (по объему мембран).

Для извлечения белков, с разной степенью прочности связанных с мембраной (периферических и интегральных), фракцию тонопласта последовательно обрабатывали растворами различной солюбилизирующей силы, содержащими хелатирующий агент (ЭДТА), неионный (третон X-100) и ионный (додецилсульфат натрия, ДС-Na) детергенты, как описано ранее [1].

Суммарную фракцию интегральных белков получали путем 3-кратного замораживания-оттаивания препарата вакуолярных мембран в свежих порциях раствора, содержащего 5 мМ ЭДТА, 1% 2-меркаптоэтанола, 50 мМ трис-глицинового буфера pH 8,3, каждый раз осаждая мембраны ультрацентрифугированием при 80 000 g в течение 60 мин для тщательного удаления периферических белков. Осадок, содержащий суммарную фракцию интегральных белков, а супернатант — периферические белки.

Фракцию прочносвязанных интегральных белков получали, обрабатывая мембранный препарат в течение 17 ч при 4° раствором, содержащим 2% тритона X-100, 1 мМ ЭДТА, 1% 2-меркаптоэтанола, 50 мМ трис-HCl, и осаждая мембраны при 120 000 г в течение 60 мин. Затем мембраны снова ресуспендировали в свежей порции этого же раствора, инкубировали 1 ч при тех же условиях и осаждали ультрацентрифугированием для более полного удаления периферических и слабосвязанных интегральных белков. Осадок содержал прочносвязанные интегральные белки, а супернатант — сумму периферических и слабосвязанных интегральных белков.

Содержание белка в образцах в присутствии детергентов определяли методами Шафнера и Флореса [3, 4], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Электрофорез мембранных белков проводили по методу Лаэмли [5] в приборе для диск-электрофореза (Реанал, ВНР), используя столбики 7,5%-ного полиакриламидного, геля, содержащие, в зависимости от задачи, 0,1% тритона X-100 или 0,1% ДС-Na. Для улучшения разделения белки, солюбилизованные из мембран, алкилировали по методу [6]. Перед нанесением на гель белковые фракции солюбилизовали раствором, содержащим 2% ДС-Na, 1 мМ ЭДТА, 5% 2-меркаптоэтанола, 50 мМ трис-HCl pH 8,3 при температуре 96° для разрушения белков до полипептидов. При электрофорезе в присутствии детергента тритон X-100 вместо 0,1% ДС-Na в электродном буфере использовали 0,1 %-ный тритон X-100.

Полипептиды и белки в гелях выявляли при помощи красителя Кумасси Р-250 по методу [7], гликопротеины — с помощью йодной кислоты и реактива Шиффа [8], а липопротеины — красителем Судан черный Б [7].

Электрофоретическую подвижность (R_f) полипептидов и белков определяли, относительно длины пробега красителя бромфенолового синего. Для более точного определения R_f полипептидов и белков гели фотографировали через желтый светофильтр и денситометрировали на сканирующем денситометре ИФО-45П. Оценку молекулярных весов полипептидов при ДС-Na-электрофорезе проводили по калибровочной кривой для стандартных белков (цитохром с, трипсин, яичный альбумин, сывороточный альбумин). Протеолиз проводили, добавляя к мембранному препарату, подвергнутому замораживанию—оттаиванию в растворе 1 мМ ЭДТА, 1 мМ 2-меркаптоэтанола, 100 мМ трис-HCl pH 8,3, протеолитический фермент широкого спектра действия — проназу (Pronase, Calbiochem USA) в соотношении фермент — белок 1:25 и инкубируя при pH 7,4 в течение 1 ч при комнатной температуре. После остановки протеолиза добавлением ТХУ и осаждения мембран ультрацентрифугированием белки, оставшиеся в мембране, солюбилизовали на водяной бане в растворе, содержащем 2% ДС-Na.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как установлено в работе [1], отношение белок/липид в используемой фракции тонопласта было около 0,26, а содержание белка составляло около 21% от сухого веса. В результате последовательной солюбилизации с помощью растворов ЭДТА, тритона X-100 и ДС-Na мембранные белки удалось разделить на периферические (около 7-8% от общего белка) и интегральные белки (около 92%), которые, в свою очередь, можно подразделить на относительно слабосвязанные интегральные белки (около 50%) и прочносвязанные интегральные белки, солюбилизирующиеся только в растворе ДС-Na (около 42%).

На рис. 1 представлены в сравнении электрофоретические спектры в результате ДС-Na-электрофореза полипептидов фракций периферических белков, суммарной фракции интегральных белков, фракции прочносвязанных интегральных белков, а также общий полипептидный спектр тонопласта. Видно, что общий полипептидный спектр изолированного тонопласта свеклы состоял из 10 основных и 10—12 минорных полос (рис. 1, А), расположенных, главным образом, в низкомолекулярной части спектра и имеющих молекулярные веса менее 70 кД. В общем спектре выявилось, по меньшей мере, 7 полос, дающих положительную реакцию на гликопептиды (указаны стрелками).

В спектре периферических полипептидов обнаружили две основные низкомолекулярные зоны (до 14 кД) и ряд минорных полос (рис. 1, Б). Спектр интегральных полипептидов (рис. 1, В) по основным параметрам совпадал с общим полипептидным спектром, но в спектре прочносвязанных интегральных полипептидов, не извлекаемых тритоном X-100, но растворяющихся в присутствии ДС-Na, обнаружены некоторые отличия (рис. 1, Г). В спектре прочносвязанных интегральных полипептидов выявлялись пять основных и семь минорных полос, причем в высоко-

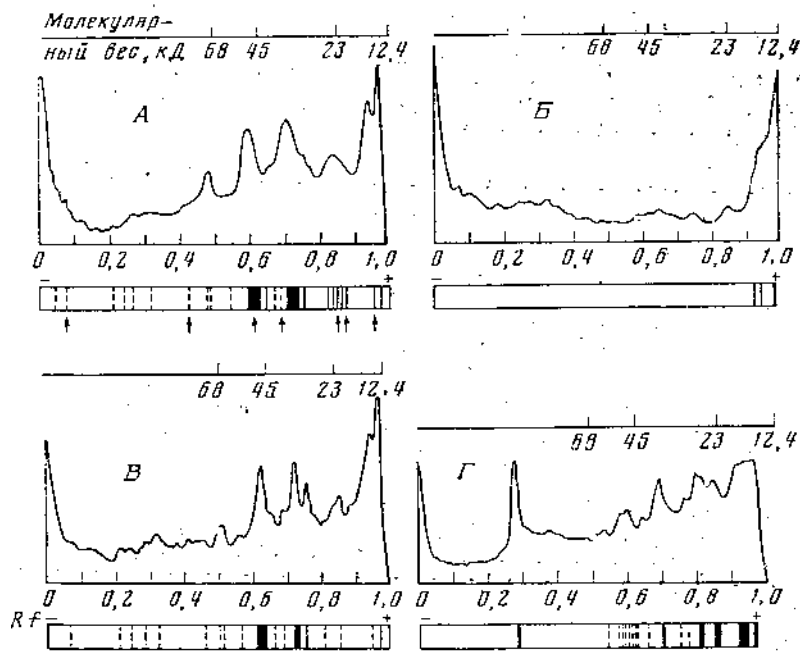


Рис. 1. Полипептидные спектры белков тонопласта красной столовой свеклы после электрофореза в 7,5%-ном ПААГ с 0,1% ДС-Na

A — общая фракция белков, солюбилизованных раствором 2% ДС-Na, 5% 2-меркаптоэтанола, 1 мМ ЭДТА, 100 мМ трис-НСl pH 8,3 при 96°; *B* — фракция периферических белков, экстрагированных 3-кратным замораживанием — оттаиванием в растворе 5мМ ЭДТА, 1% 2-меркаптоэтанола, 50 мМ трис-глицина pH 8,3; *V* — суммарная фракция интегральных белков, оставшихся в мембране после удаления периферических; *Г* — фракция прочносвязанных интегральных белков, оставшихся в мембране после обработки раствором 2% тритона X-100, 1% 2-меркаптоэтанола, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ трис-НСl pH 8,3. На гели нанесено по 100—150 мкг белка (*B*, *V*, *Г*) и около 300 мкг (*A*). Стрелками указаны зоны гликопептидов

молекулярной части спектра особенно четко, была видна интенсивно окрашенная узкая полоса с R_f 0,29, которая в виде минорного компонента также присутствовала в общем полипептидном спектре и в спектре периферических полипептидов. По величине электрофоретической подвижности мы попытались оценить молекулярный вес, соответствующий этой полосе, и он оказался в пределах 100—130 кД. Специальные расчеты по величине оптической плотности на денситограммах показали, что в этой зоне находится менее 1% от содержания белка в исходной фракции тонопласта или около 1—4% от белка фракции прочносвязанных интегральных полипептидов.

После обработки мембранного препарата протеолитическим ферментом проназой в полипептидном спектре выявлялось только две основные полосы с R_f 0,29 и 0,96 (рис. 2), представляющие полипептиды, недоступные для действия протеолитического фермента. Поэтому мы считаем, что зона с R_f 0,29 соответствует одному или нескольким полипептидам близкого молекулярного веса (100—130 кД), погруженным глубоко в липидный матрикс мембраны. Учитывая большой молекулярный вес этих полипептидов, можно полагать, что они являются крупными субъединицами белковых комплексов, пронизывающих строю мембраны и представляющих собой элементы системы транспорта веществ через тонопласт (каналы, насосы или переносчики).

Как известно, солюбилизация в растворах с высокой концентрацией ДС-Na (выше 1%) служит удобным методом для характеристики полипептидного состава белков, но не позволяет разделять при электрофорезе белки, обладающие четвертичной структурой. Поэтому для получения белкового спектра и выявления глико- и липопротеинов мы солюбилизовали вакуолярные мембраны более мягким детергентом — тритоном

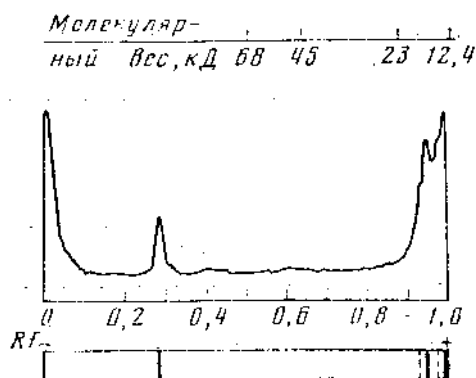


Рис. 2

Рис. 2. Полипептидный спектр белков тонопласта красной столовой свеклы, оставшихся в мембране после 60-мин обработки протеолитическим ферментом проназой

На гель нанесено около 100 мкг белка

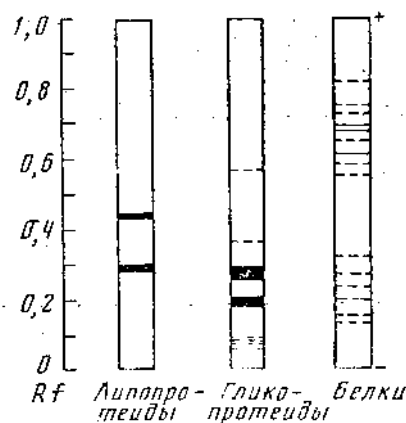


Рис. 3

Рис. 3. Электрофоретические спектры белков тонопласта красной столовой свеклы в ПААГ с 0,1%-ным тритоном X-100

На гели нанесено по 100—200 мкг белка. Зоны белков окрашивали Кумасси Р-250, гликопротеиды — йодной кислотой и реактивом Шиффа, а липопротеиды — красителем Судан черный Б

X-100, не разрушающим белки до полипептидов. При этом из мембраны извлекались лишь периферические и слабосвязанные интегральные белки, которые в сумме составляют около 60% всего белка изолированного тонопласта [1]. Как видно из рис. 3, при разделении в геле, содержащем 0,1% тритона X-100, обнаружено 15 полос, окрашивающихся красителем Кумасси и идентифицированных как зоны белков, а также три полосы липопротеинов и восемь полос гликопротеинов. Полоса с R_f 0,27 представляет собой глико-липипропротеидный комплекс. Эти белки, солюбилизирующиеся тритоном X-100, видимо, имеют преимущественно поверхностную локализацию в мембране и могут являться мембранными рецепторами, участвующими в процессах мембранного «узнавания».

Присутствие ряда гликопротеинов среди поверхностных белков представляет особый интерес, так как на протоплазматической поверхности изолированных вакуолей свеклы нами ранее были выявлены рецепторы лектинов, содержащие остатки галактозы, глюкозы и/или маннозы и обуславливающие агглютинацию вакуолей и образование плотных контактов вакуолярных мембран под действием лектинов [9]. Мы полагаем, что «узнающие» белки, видимо, могут обеспечивать образование избирательных контактов с мембранами «стареющих» органелл и способствовать их захвату внутрь вакуоли, что особенно характерно для зрелых центральных вакуолей, выполняющих функции лизосом [10]. Кроме того, биогенез самих, вакуолей неразрывно связан с образованием контактов и слиянием мембран.

Большая доля интегральных белков в составе изолированного тонопласта свеклы, а также выявленные особенности состава прочносвязанных интегральных белков позволяют полагать, что они формируют транспортные системы (электронейтральные и ионные), регулирующие перенос веществ через тонопласт. В пользу этого предположения свидетельствуют наши опыты по взаимодействию вакуолярных мембран свеклы с плоской фосфолипидной мембраной, во время которых наблюдали включение значительных количеств проводящих элементов в искусственную мембрану, а также удалось зафиксировать флуктуации электропроводности отдельных ионных каналов [11]. Это говорит о присутствии в тонопласте свеклы трансмембранных каналов.

Обнаруженные особенности белково-полипептидного состава изолированной вакуолярной мембраны красной столовой свеклы показывают перспективность изучения разнообразия состава и функций белков, поэтому наши дальнейшие исследования будут направлены на детальное изучение ферментных и транспортных систем мембран вакуолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Саляев Р. К., Кузеванов В. Я., Озолина Н. В., Каменкова Л. Д., Пузанова Н. А. Содержание липидов, белков и углеводов в изолированном тонопласте красной столовой свеклы *Beta vulgaris* L — Физиол. растений, 1982, т. 29, вып. 5, с. 933.
2. Саляев Р. К., Кузеванов В. Я., Хаптагаев С. Б., Копытчук В. Н. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток-растений — Физиол. растений, 1981, т. 28, выи. 6, с. 29.
3. Schafener W., Weissmann C. A rapid sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. — Anal. Biochem., 1973, V; 56, № 2, p. 502.
4. Flores R. A rapid and reproducible assay for quantitative estimation of proteins using bromophenol blue. — Anal. Biochem., 1978, v. 88, No 2, p. 605.
5. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. — Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 630.
6. Lane L. C. A simple method for stabilizing protein sulfhydryl groups during SDS-gel electrophoresis. — Anal. Biochem., 1978, v. 86, № 2, p. 655.
7. Сафоново В. И., Сафонова М. П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле. — В кн.: Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971, с. 113.
8. Zacharius R. M., Zell T. E. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. — Anal. Biochem., 1969, v. 30, No 1, p. 148.
9. Саляев Р. К., Кузеванов В. Я. Выявление рецепторов лектинов на поверхности изолированных вакуолей. — Оператив. информ. матер. Сиб. ин-та физиол. и биохим. растений СО АН СССР, Иркутск, 1981, с. 8.
10. Wittenbach V. A., Lin W., Hebert R.R. Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. - Plant Physiol., 1982, v. 69, No 1, p. 98.
11. Саляев Р. К., Кузеванов В. Я., Корзун А. М., Ненашев В. А., Берестовский Г. Н. Взаимодействие изолированных растительных вакуолей и везикул-тонопласта с БЛМ. — Тез. докл. I Всесоюзн. биофиз. съезда, Т. 1, М., 1982, с.245.

Поступила в редакцию
2.VIII.1982

PROTEIN AND POLYPEPTIDE COMPOSITION OF THE TONOPLAST ISOLATED FROM RED BEET

R. K. SALYAEV, N. V. OZOLINA, V. Ya. KUZEVANOV

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Siberian Branch, Irkutsk*

The polypeptide composition of vacuolar membranes isolated from red beet roots was studied by SDS-electrophoresis in polyacrylamide gel. The proteins differing in the degree of binding to the membranes (peripheral proteins, the total fraction of integral proteins and the fraction of firmly-bound integral proteins) were extracted from the vacuolar membranes with the solutions of varied solubilizing activity. The overall polypeptide pattern of tonoplast proteins consisted of 20-22 bands, seven of which being glycopeptides. In the total fraction of integral proteins the polypeptides with the molecular weight of 70 kD were present, whereas among the peripheral proteins the polypeptides of low mol. wt. (under 14 kD) predominated. In the electrophoretic pattern of firmly-bound integral proteins a band was revealed of mol. wt. 100-130 kD related to the polypeptides deeply immersed into the lipid matrix of the membrane, thus being inaccessible to the proteolytic enzyme pronase action. The data obtained are examined in relation to the transport function of integral proteins and to the involvement of surface proteins in recognition processes in the membrane.

Саляев Р. К., Озолина Н. В., Кузеванов В. Я. Особенности белкового и полипептидного состава изолированного тонопласта красной столовой свеклы. Физиология растений, 1983, т. 30, № 2, с.241-245.

Salyaev R.K., Ozolina N.V., Kuzevanov V.Ya. Peculiarities of protein and polypeptide composition of the tonoplast isolated from red beet roots. Russian J. Plant Physiology, 1983, vol. 30, No 2, p.241-245.