

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ ДРОЖЖЕЙ

С. Г. КАСПАРОВА, Е. Г. ДАВИДОВА, В. В. РАЧИНСКИЙ, А. В. ЕРМОЛАЕВ

(Кафедра применения изотопов и радиации в сельском хозяйстве)

Из дрожжей *S. utilis* и *T. famata* выделена фракция водорастворимых низкомолекулярных белков, специфически связывающих кобальт. Она состоит из трех белков с молекулярной массой 4500, 1800 и 1000. Удельное содержание кобальта в белках, выделенных из *T. famata*, на порядок ниже, чем в белках, выделенных из *S. utilis*.

Дрожжи *S. utilis* и *T. famata* обладают способностью расти на средах со значительными концентрациями кобальта и накапливать его в биомассе [4, 5]. При этом *T. famata* отличаются более высокой по сравнению с *S. utilis* устойчивостью к металлу. Возможно, это обусловлено повышенной сорбционной способностью их клеточной стенки и менее эффективным транспортом кобальта, что обеспечивает низкий уровень его накопления внутри дрожжевой клетки [5]. И у дрожжей *S. maltosa* [2], и у исследуемых видов [5] основная часть поступившего в клетку кобальта (около 75 %) локализована во фракции растворимых белков, среди которых находятся специфические белки, структурно связывающие значительные количества металлов [1, 7, 9]. Такие белки получили название металлотионеинов. Предполагается, что они выполняют защитную функцию, поскольку являются антиоксидантами [8]. Цель настоящей работы состояла в сравнительном исследовании кобальтсвязывающих белков дрожжей *S. utilis* и *T. famata*, различающихся по резистентности к высоким концентрациям металла в среде.

Методика

В работе использовали дрожжи *S. utilis* ВСБ-651 и *T. famata* 0-3К, полученные

из коллекции ВНИИсинтезбелок. Дрожжи выращивали в условиях, описанных ранее [5], на средах с концентрацией Co^{2+} соответственно 2, 10 и 10, 100 мкг/мл, который вносили в форме Co SO_4 (радиоиндикатор ^{57}Co), и 1 % глюкозы. В конце фазы активного роста дрожжевые клетки центрифугировали, промывали дважды водой и разрушали при помощи гомогенизатора со стеклянными бусами. Из полученного гомогената методом дифференциального центрифугирования выделяли фракцию растворимых белков (105000 г, 90 мин), пропускали ее через колонку (длина колонки — 90 см, диаметр — 0,9 см) с сефадексом G-10 для удаления ионов кобальта. Однако свободного иона кобальта в этой фракции не оказалось. Весь исходный меченый кобальт растворимой фракции белков был обнаружен в элюате. Затем фракцию растворимых белков пропускали через колонку (длина — 80 см, диаметр — 0,8 см) с сефадексом G-50, позволяющим разделять белки по молекулярной массе (хроматографический метод гельфильтрации). На колонку наносили 2—5 мл фракции растворимых белков. Элюирование проводили водой или трис-фосфатным буфером (pH 7,6) со скоростью 1 мл за 10 мин. Элюат отбирали порциями по 2 мл. Радиоактивность проб определяли радиометром Компью-Гамма (ЛКБ, Швеция — Финляндия), а содержание белка — спектрофотометрическим методом [3] при двух длинах волн — 235 и 280 нм — на спектрофотометре «Ultrospec-4050». Концентрацию белка рассчитывали по [3]. Дальнейшую очистку белка проводили на колонке с сефадексом G-10. Скорость элюирования — 1 мл

за 10 мин. Содержание белка и кобальта устанавливали указанным выше способом.

Молекулярную массу (ММ) очищенной белковой фракции определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке «Ultragras TSK G 3000 SW» фирмы ЛКБ при давлении 30 атм и скорости потока 0,57 мл/мин. Спектрофотометрический анализ элюатов проводили при длине волны 254 нм. Элюирование осуществляли раствором 0,1 М буфера Na/KH₂PO₄ с добавлением 0,15 М NaCl и 0,2 % NaN₃, величина pH которого составляла 6,8.

Результаты

Радиометрический анализ показал, что содержание меченого кобальта во фракции растворимых белков у дрожжей *S. utilis* составило 75 % его содержания в гомогенате, а у дрожжей *T. famata* — 77 и 23 % при росте на среде соответственно с 10 и со 100 мкг ⁵⁷Со на 1 мл. Белки, связывающие меченый кобальт, обнаруживаются как в высокомолекулярной (ММ 158000—670000), так и в низкомолекулярной (ММ 17000) фрак-

Рис. 1. Хроматограмма белков растворимой фракции дрожжей *S. utilis* при гельфильтрации на колонке с сефадексом G-50. 1 — радиометрический анализ ⁵⁷Со; 2 — спектрофотометрический анализ ($\lambda = 230$ нм).

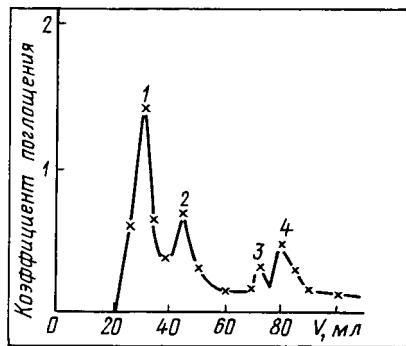
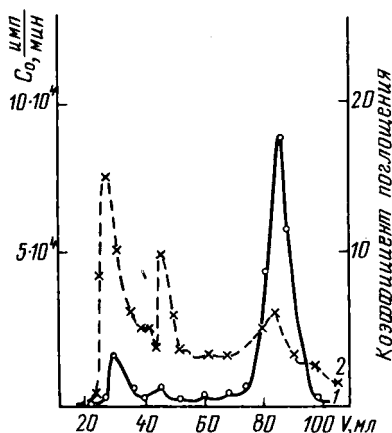


Рис. 2. Калибровочная хроматограмма стандартной смеси белков для колонки с сефадексом G-50.

1 — тиглобулин (ММ 670 000); 2 — человеческий глобулин (ММ 158 000); 3 — овалбумин (ММ 44 000); 4 — миоглобин (ММ 17 000).

циях, что следует из сравнения представленных на рис. 1 и 2 хроматограмм. При этом основное количество меченого кобальта, как видно на рис. 1, отмечается во фракциях белков с ММ ниже 17000, хотя их относительное количество значительно меньше количества высокомолекулярных белков, о чем свидетельствует хроматограмма, полученная путем спектрометрического анализа проб при длине волны 230 нм. Все пробы элюата были разделены на 2 фракции, одна из которых включала белки с ММ выше 17000, а другая — белки с ММ ниже 17000. В каждой из двух смешанных фракций было определено общее содержание белка и общее содержание меченого кобальта. В результате проведенных расчетов установлено, что кобальт во фракции растворимых белков связан в основном с низкомолекулярными белками (88—92 % у *S. utilis* и 62—75 % у *T. famata*) (таблица).

При концентрации кобальта в питательной среде 2 и 10 мкг/мл его удельное содержание в этих белках у *S. utilis* выше, чем в высокомолекулярных, соответственно в 10 и 5 раз. В то же время у дрожжей *T. famata* удельное содержа-

Распределение кобальта между фракциями растворимых белков

Фракция	C. utilis		T. fatata	
	%	мкг ^{57}Co на 1 мг	%	мкг ^{57}Co на 1 мг
Высокомолекулярная	8,5	0,242	25	0,445
	12	2,35	38	2,30
Низкомолекулярная	91,5	2,61	75	1,65
	88	12,3	62	6,67

Пр и м е ч а н и е. Числитель и знаменатель — данные для дрожжей, выращенных на среде с концентрацией $^{57}\text{Co}^{2+}$ соответственно 2 и 10 мкг/мл (для C. utilis) и 10 и 100 мкг/мл (для T. fatata).

ние кобальта во фракции низкомолекулярных белков на порядок ниже, чем у C. utilis при той же исходной концентрации кобальта. При высокой концентрации кобальта (100 мкг/мл) оно увеличивается, но все же остается меньше, чем у белков C. utilis. Кроме того, у T. fatata удельное содержание кобальта в низкомолекулярной фракции всего в три раза выше, чем в высокомолекулярной.

Таким образом, низкомолекулярные белки дрожжей C. utilis содержат на порядок больше кобальта, чем низкомолекулярные белки дрожжей T. utilis.

После дальнейшей очистки фракций низкомолекулярных белков на колонке с сефадексом G-10 удельное содержание кобальта в них увеличилось в 1,5—2 раза. Проведенный радиохроматографический анализ на сефадексе G-10 показал, что полученная после элюирования на колонке с сефадексом G-50 фракция низкомолекулярных белков неоднородна. Она включает одну фракцию с наибольшим количеством меченого кобальта и примеси двух, а может быть и больше белков, содержащих значительно меньше кобальта (рис. 3).

Последняя фракция также неоднородна и состоит у C. utilis из трех белков с ММ 4500, 1800 и 1000 (рис. 4). Ранее [1] нами

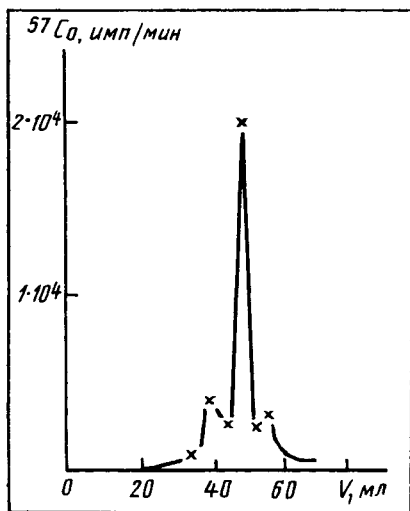


Рис. 3. Хроматограмма низкомолекулярной фракции белков C. utilis при гельфильтрации на колонке с сефадексом G-10 (радиометрический анализ ^{57}Co).

было установлено, что ММ металлотионеинов дрожжей C. maltosa, выращенных на глюкозе, составляет 5000. Близкие величины получены и для других видов дрожжей [7]. Можно предположить, что во время фракционирования имела место деструкция белка, и белки с ММ 1800 и 1000 являются фрагментами белка с ММ 4500. Не исключена, однако, и возможность истинного су-

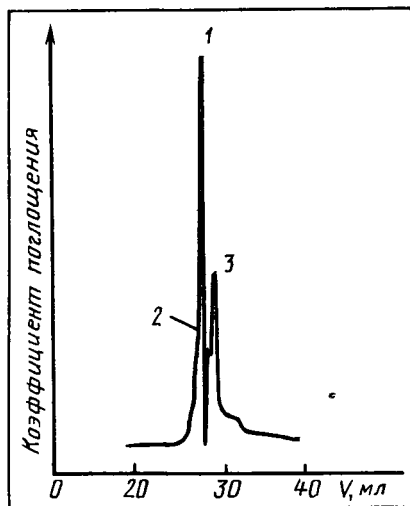


Рис. 4. Хроматограммы, полученные при помощи ВЭЖХ ($\lambda=254$).

1, 2, 3 — фракции с ММ соответственно 4500, 1800 и 1000.

существования в дрожжах таких низкомолекулярных белков, связывающих кобальт. В литературе описаны металлотioniны с ММ 2000 [6].

Интерес к низкомолекулярным белкам, связывающим металлы, в настоящее время велик, так как они могут найти применение в медицине и сельском хозяйстве в качестве антиоксидантов. Поэтому необходимо проведение дальнейших исследований для выяснения вопро-

са, действительно ли существуют белки с ММ порядка 1000—2000 и каково их относительное содержание во фракции низкомолекулярных белков дрожжей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белов А. П., Давидова Е. Г. Выделение и свойства Co^{2+} -связывающего белка из дрожжей.— Биохимия, 1984, т. 49, с. 1494—1496.— 2. Белов А. П., Давидова Е. Г., Рачинский В. В. Унутриклеточное распределение кобальта в дрожжах *S. maltosa*.— Микробиол., 1985, т. LIV, вып. 6, с. 970—973.— 3. Дарбрей А.— В кн.: Практическая химия белка. М.: Мир, 1989, с. 302—303.— 4. Диканская Э. М. О вариантах дрожжей, образующих рибофлавин и устойчивых к кобальту.— Микробиол., 1971, т. XL, вып. 6, с. 1077—1083.— 5. Каспарова С. Г., Давидова Е. Г. Накопление и унутриклеточное распределение кобальта в клетках дрожжей.— Изв. ТСХА, 1990, № 1, с. 119—122.— 6. Hayashi Y., Nakagama S., Murasugi A.— Environmental Health Perspectives, 1986, vol. 65, p. 13—19.— 7. Murasugi A., Wada S., Hayashi Y.— J. Biochemistry, 1981, vol. 90, N 5, p. 1561—1564.— 8. Thornalley P. J., Vasa K. M.— Biochemistry Biophysic Acta. 1985, vol. 827, p. 36—44.— 9. Winge D. R., Wielson K. B., Grayl W. R., Hamer D. H.— J. Biol. Chemistry, 1986, vol. 280, N 27, p. 14464—14470.

Статья поступила 1 марта 1990 г.

SUMMARY

From yeasts *C. utilis* and *T. famata* a fraction of water-soluble low-molecular proteins which specifically bind cobalt has been separated. It consists of three proteins with molecular weight 4500, 1800 and 1000. Specific content of cobalt in proteins separated from *T. famata* is by an order lower than that in proteins from *C. utilis*.