

УДК 577.153

ВЫДЕЛЕНИЕ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ Na^+, K^+ -АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ ИЗ ПОЧЕК СВИНЬИ И ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ

А. Б. ЧЕТВЕРИН, Е. В. БРАЖНИКОВ и Ю. Н. ЧИРГАДЗЕ

Институт белка АН СССР, Пущино

Разработана методика выделения больших количеств гомогенного препарата липид-белкового комплекса Na^+, K^+ -АТФазы из почек свиньи. Чистота препарата по белковому компоненту составляет 96—98%, соотношение масс большой и малой субъединиц равно 4 : 1. Белковая и липидная части препарата приблизительно одинаковы по массе. Активность препарата составляет 1600—1900 мкмоль освобожденного неорганического фосфата на 1 мг белка в 1 ч. Изучена вторичная структура белка в растворе тяжелой воды методом инфракрасной спектроскопии в области основных амидных полос. Показано, что ~20% пептидных групп образуют высокоупорядоченные α -спиральные участки и ~25% находится в структуре складчатого слоя с антипараллельной упаковкой цепей. Участки с регулярной структурой расположены преимущественно в недоступных для воды областях белкового компонента, и, по-видимому, принимают участие в образовании гидрофобного ядра молекулы. Основная часть белковой структуры (~55%) является малопорядоченной и легко доступна для молекул воды.

Na^+, K^+ -АТФаза является белковой системой, встроенной в плазматическую мембрану эукариотических клеток. Ее основная функция заключается в генерации электрохимического трансмембранного потенциала одновалентных катионов, транспортируемых с использованием энергии гидролиза АТФ до АДФ и P_i . При этом, как правило, процесс идет с соблюдением строгого стехиометрического соотношения: выход трех ионов натрия и вход двух ионов калия сопровождается гидролизом одной молекулы АТФ [1, 2]. В этом смысле Na^+, K^+ -АТФаза может рассматриваться как представитель широкого класса биохимических молекулярных машин. Успех в изучении таких систем зависит прежде всего от решения проблемы механохимического сопряжения, т. е. вопроса о структурных перестройках белков на разных стадиях энзиматического цикла. Na^+, K^+ -АТФаза обладает тем привлекательным свойством, что она может быть зафиксирована в разных точках ее рабочего цикла путем образования специфических комплексов с лигандами. Однако при обсуждении данных о структуре Na^+, K^+ -АТФазы необходимо помнить о специфике этого объекта. Для этой АТФазы, как и для многих других мембранных белков, естественным состоянием является ее локализация в липидном бислое с одновременным экспонированием части молекул в водный раствор. Поэтому следует уделять внимание не только активности фермента, но и сохранению нативной природы его окружения. Отсюда следует, что изучение структуры Na^+, K^+ -АТФазы предпочтительнее проводить для мембраносвязанной формы, а не солюбилизированной. Такие препараты представляют собой суспензию из довольно крупных белок-липидных частиц [3], что сильно затрудняет применение многих физических методов. В настоящее время, по-видимому, только метод инфракрасной спектроскопии может быть пригод-

ным для оценки вторичной структуры белковой части Na^+ , K^+ -АТРазного комплекса и ее превращений в процессе функционирования в растворе. Данная работа открывает цикл структурно-функциональных исследований Na^+ , K^+ -АТРаза из почек свиньи.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение препарата Na^+ , K^+ -АТРаза. Данный метод основан на методике разработанной Йоргенсенем для очистки Na^+ , K^+ -АТРаза из мозгового слоя почек «Ролика» [4]. Исходный материал — почки свиньи — извлекали из животных, обработанных на мясокомбинате по технологии «дранка», немедленно помещали в сосуд Дьюара и перекладывали полиэтиленовыми пакетами со льдом. В таком виде почки транспортировали в лабораторию. Все процедуры выделения микросомной фракции проводили при температуре 4° . Требуемую ткань — мозговой слой почек (область петель Генле) — вырезали с помощью глазных ножниц и помещали в буфер А, содержащий 30 мМ трис-НСl, рН 7,2 (20°), 300 мМ сахарозу и 1 мМ ЭДТА. Затем ткань дважды продавливали через сито из нержавеющей стали с отверстиями диаметром 2 мм и гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса — Поттера с тefлоновым пестиком, вращающимся со скоростью около 1000 об/мин (5 тракций пестика). При этом на 100 г ткани добавляли 400 мл буфера А, гомогенизатор охлаждали снегом или ледяной крошкой. Гомогенат центрифугировали при 6000 г 20 мин, осадок повторно гомогенизировали во вдвое меньшем объеме буфера и вторичный гомогенат центрифугировали в тех же условиях. Объединенную надосадочную жидкость центрифугировали при 10 000 г 20 мин для освобождения от митохондрий и из полученной надосадочной жидкости осаждали микросомы центрифугированием при 50 000 г 30 мин. Осадок суспендировали в буфере А с тем расчетом, чтобы концентрация белка в суспензии была около 10 мг/мл. Суспензию разливали в пробирки по 4—5 мл, замораживали в смеси ацетона с сухим льдом и хранили при -60° . В таком виде микросомы можно хранить без потери их активности по крайней мере в течение года и использовать по мере необходимости. Из 100 г ткани получали обычно 0,4—0,6 г микросомального белка.

Дальнейшую очистку Na^+ , K^+ -АТРаза осуществляли следующим образом. Необходимое количество микросом быстро размораживали и добавляли буфер, содержащий 50 мМ трис-НСl, рН 7,5 (20°), 3 мМ АТР и 2 мМ ЭДТА и (по каплям, при постоянном перемешивании) 0,2%-ный раствор додецилсульфата натрия, приготовленный на том же буфере, так, чтобы конечная концентрация белка составляла 1,4 мг/мл, а детергента — 0,58 мг/мл. Инкубацию проводили в течение 30 мин при 20° и образец немедленно загружали в зональный ротор с заранее приготовленным сахарозным градиентом. Центрифугирование проводили на отечественной центрифуге УЦПЗ-47 в роторе РЗ-35Т (объем ротора 1670 мл). Загружали и разгружали ротор при скорости его вращения 2000 об/мин, собственно центрифугирование проводили при 33 000 об/мин в течение 3,5 ч и температуре 2° . Градиент сахарозы (линейный по объему) формировали с помощью перистальтического трехканального насоса: в смеситель с 800 мл раствора 15%-ной сахарозы в буфере Б, содержащем 25 мМ трис-НСl, рН 7,5 (20°) и 1 мМ ЭДТА, по одному каналу подавали раствор 45%-ной сахарозы в том же буфере, а по двум другим каналам смесь закачивали в ротор, на его периферию, заполнение ротора завершали подачей раствора 45%-ной сахарозы в буфере Б. Образец (200 мл) загружали в центр ротора, вытесняя из него «тяжелую» часть градиента, а затем подавали 300 мл буфера Б. По окончании центрифугирования содержимое ротора вытесняли через центр, подавая на периферию раствор с 45%-ной сахарозой и собирали во фракции по 16 мл, одновременно регистрируя оптическую плотность образца при 280 нм. Коллектор с пробирками и оптическую ячейку прибора «Увикорд» охлаждали в холодильном шкафу (2°). Скорость подачи градиента сахарозы — 40 мл/мин, скорость подачи образца и буфера, а также скорость разгрузки ротора — 20 мл/мин.

Из фракций, соответствующих второму, малому, пику оптической плотности, отбирали пробы по 10 мкл для определения активности Na^+ , K^+ -АТРаза. Фракции, содержащие не менее 600 единиц активности, объединяли, разбавляли в 2 раза буфером Б с 1 мМ АТР и центрифугировали в течение ночи при 100 000 г (4°). Осадок суспендировали в буфере Б с тем расчетом, чтобы конечная концентрация белка была 3—4 мг/мл, и полученный препарат хранили при 4° . Активность АТРаза оставалась практически неизменной в течение по крайней мере двух месяцев, после хранения в течение шести месяцев сохранялось около 70% исходной активности.

Определение АТРазной активности. АТРазную реакцию проводили в условиях, близких к используемым Йоргенсенем и Скоу [5]. К 450 мкл образца в буфере, содержащем 30 мМ трис-НСl, рН 7,5 (37°), 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 4 мМ MgCl_2 и 1 мМ ЭДТА (с 0,5 мМ строфантинидом или без него), предварительно прогретого при 37° в течение 5 мин, добавляли 50 мкл 10 мМ раствора АТР в том же буфере. Реакцию проводили в течение 10 мин при 37° . Количество белка в пробе подбирали с таким расчетом, чтобы в результате реакции было выделено 50—100 нмоль P_i . Для очищенного препарата Na^+ , K^+ -АТРаза брали обычно 0,2 мкг белка на пробу. Реакцию останавливали добавлением 0,7 мл 3%-ной хлорной кислоты. Количество P_i определяли по «холодному» методу Дельсаля и Манури в модификации Пануша и др. [6]. В качестве стан-

дарт использовали оптическую плотность пробы со 100 нмоль K_2HPO_4 . Для учета уровня спонтанного гидролиза АТР в условиях эксперимента ставили пробу с 500 нмоль АТР. По разности в количестве P_i , освобожденного в пробах без ингибитора и с ингибитором (строфантин), рассчитывали величину Na^+, K^+ -АТРазной активности, по разности в количестве P_i в пробах с ингибитором и с 500 нмоль АТР — величину неспецифической Mg^{2+} -АТРазной активности, используя в качестве единицы активности 1 мкмоль P_i , освобожденного за 1 ч.

Определение концентрации белка осуществляли по методу Лоури и др. [7] после осаждения белка в 5%-ной трихлоруксусной кислоте. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин, аминокислотный состав которого очень близок к таковому для Na^+, K^+ -АТРазы. Концентрацию альбумина определяли из экстинкции $E_{1\text{см}}^{1\%} = 6,68$ при 279 нм [8]. Помимо предварительной калибровки каждый раз при определении концентрации белка ставили контрольные пробы с 25, 50, 75 и 100 мкг альбумина. Среднее квадратичное случайное отклонение при определении концентрации белка не превышало 3%. Мы полагаем, что максимально возможная систематическая ошибка в определении концентрации белка по методу Лоури в нашем случае не превышает 10%.

Электрофорез белков в градиенте полиакриламидного геля с додецилсульфатом натрия. Метод основан на классической методике [9]. Образец (15—200 мкг белка) разбавляли до 70 мкл буфером, содержащим 5 мМ фосфат натрия, рН 7,2 (20°), добавляли 30 мкл 10%-ного раствора DS-Na, 2 мкл 2-меркаптоэтанола и нагревали 4 мин при 100°. Затем добавляли 80 мкл 60%-ной сахарозы, 20 мкл 0,05%-ного бромфенолового синего и 100 мкл 1 мМ фосфата натрия, рН 7,2. 50 мкл такого образца наносили на поверхность геля, приготовленного следующим образом. В смеситель, содержащий 40 мл «легкого» раствора (5% акриламида, 0,135% N,N'-метиленбисакриламида, 2,5% сахарозы, 0,1% DS-Na, 0,025% персульфата аммония и 0,05% N,N,N',N'-тетраэтилметилendiамина в 50 мМ фосфата натрия, рН 7,2), с помощью трехканального перистальтического насоса подавали по одному каналу «тяжелый» раствор (15% акриламида, 0,405% N,N'-метиленбисакриламида, 5% сахарозы, остальные компоненты те же, что и в «легком» растворе), по двум другим каналам смесь подавали снизу в цилиндрический сосуд, заполненный силиконизированными электрофоретическими трубками (5 × 130 мм). После подачи 80 мл смеси (через 30 мин после добавления последнего компонента) трубки оказывались заполненными на высоту 105 мм раствором с линейно увеличивающейся сверху вниз концентрацией акриламида и бисакриламида. Для предотвращения контакта с воздухом в сосуд с трубками предварительно подавали 10 мл воды с 0,025% персульфата аммония. Гель оставляли полимеризоваться на ночь. Перед электрофорезом трубки извлекали из сосуда, очищали от наружного геля и помещали в прибор для электрофореза, верхний и нижний резервуары которого заполняли буфером, содержащим 50 мМ фосфат натрия, рН 7,2 и 0,1% DS-Na. Электрофорез проводили в следующем режиме: 1 мА на 1 трубку геля в течение первых 30 мин и 5 мА на 1 трубку в течение последующих 4—5 ч, пока полоса бромфенолового синего не достигала 1 см от нижнего конца трубки. Гель окрашивали кумасси бриллиантовым голубым R-250 и после отмывки в диффузионном обесцвечивателе с активированным углем в качестве поглотителя краски сканировали на приборе фирмы ISCO (США) при 580 нм. Применение градиента полиакриламида давало высокое разрешение при электрофорезе мембранных препаратов, а также возможность следить за наличием примесных полипептидов в широком диапазоне молекулярных весов. Относительное содержание каждого полипептида определяли по площади под соответствующим ему пиком на денситограмме. Такой метод определения массового соотношения субъединиц в препаратах Na^+, K^+ -АТРазы является общепринятым, хотя известно, что гликопротеины (каковым является малая субъединица) часто окрашиваются менее интенсивно, чем обычные белки. Однако, как показано в лаборатории Хокина [10, 11], при определении количества белка по Лоури получается такое же соотношение субъединиц, как и при окрашивании белков исползуемым в нашей лаборатории красителем.

Получение инфракрасных спектров мембраносвязанной Na^+, K^+ -АТРазы в растворе тяжелой воды. Инфр красные спектры ферментного комплекса регистрировали на спектрофотометре Перкин.—Эльмер 180. В настоящее время количественный анализ вторичной структуры белков по инфракрасным спектрам возможен только в растворах тяжелой воды D_2O . Методика получения количественных инфракрасных спектров полипептидов в тяжелой воде описана в работах [12, 13]: Для получения свободного от легкой воды пептидного поглощения в области полосы валентных колебаний NH-пептидной группы из экспериментального спектра вычитали полосу примесной изотопной воды H_2O таким образом, чтобы в области 3500—3700 см^{-1} ее поглощение стало равным нулю. Перед опытом исходную суспензию препарата Na^+, K^+ -АТРазы (6 мг белка) осаждали в центрифуге при 100 000 г в течение 1 ч, осадок суспендировали в 0,3 мл буфера, содержащего 25 мМ трис-HCl, рН 7,5, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl_2 , 2 мМ АТР и 1 мМ уабаин. Полученную суспензию с концентрацией белка 2% инкубировали 30 мин при 37°, в этих условиях образуется комплекс Na^+, K^+ -АТРазы с уабаином. Перевод образца из раствора в легкой воде в тяжелую воду осуществляли на колонке (4 × 10 мм) с сефадексом G-25 (fine), уравновешенной в буфере того же состава на основе тяжелой воды. Элюцию проводили при 5° под давлением около 1 атм, создаваемым перистальтическим насосом. Концентрация белка после выхода из колонки со-

ставляла 1,6%. Измерения были проведены также при концентрации 0,6%. Использовали термостатированные кюветы толщиной 120 мкм. Процедура от начала контакта белка с тяжелой водой до начала измерения занимала около 10 мин.

Материалы. В работе использованы следующие реактивы: АТР (динатриевая соль) и реактив Фолина — фирмы «Merck» (ФРГ), додецилсульфат натрия, 2-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий и кумаси бриллиантовый голубой R-250 — «Serva» (ФРГ), бычий сывороточный альбумин — «Koch-Light Laboratories» (Англия), убаин — «British Drug Houses» (Англия), акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, N,N,N',N'-тетраэтилметиленадмин, персульфат аммония и ЭДТА (динатриевая соль) — «Reanal» (Венгрия), трихлоруксусная кислота — «Хепоп» (Польша). В экспериментах по инфракрасной спектроскопии использовали тяжелую воду отечественного производства с содержанием D₂O не менее 99,8%. Додецилсульфат натрия, используемый для очистки Na⁺,K⁺-АТРазы, был дважды перекристаллизован из этанола до исчезновения поглощения в ближней ультрафиолетовой области спектра, трис(гидроксиметил)аминометан, отечественного производства, перекристаллизован дважды — из воды и этанола. Препарат строфантидина был любезно предоставлен нам проф. Н. К. Абубакировым (Институт химии растительных веществ АН УзССР, Ташкент). Остальные реактивы были отечественного производства, квалификации ос. ч. или х. ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Активность Na⁺,K⁺-АТРазы в микросомной фракции, получаемой на первой стадии очистки фермента, составляла приблизительно 30 ед. на 1 мг белка, а неспецифической Mg²⁺-АТРазы — около 20 ед. После обработки додецилсульфатом натрия активность Na⁺,K⁺-АТРазы увеличивалась до 170—190 ед. на 1 мг белка, в то время как величина Mg²⁺-АТРазы оставалась практически без изменений. Отсюда, учитывая активность конечного препарата, можно заключить, что содержание Na⁺,K⁺-АТРазы в препарате микросом из почек свиньи составляет около 10% от всего микросомного белка. Конечный препарат имел следующие характеристики: активность Na⁺,K⁺-АТРазы составляла 1600—1900 мкмоль освобожденного P_i на 1 мг белка в 1 ч, неспецифическая Mg²⁺-АТРаза практически отсутствовала, содержание белка Na⁺,K⁺-АТРазы от общего белка препарата составляло 96—98% (в расчете на две субъединицы — 50 000 и 100 000 дальтон), массовое отношение больших субъединиц к малым — приблизительно 4:1* (рис. 1). Выход такого препарата на одно центрифугирование в зональном роторе составлял 12—15 мг белка, или около 50% от теоретически ожидаемого. Как видно из электронно-микроскопической фотографии, любезно изготовленной Б. Л. Аллахвердовым и В. И. Поповым в Институте биофизики АН СССР, препарат представляет собой смесь везикул и фрагментов мембран размером в среднем около 0,3 мкм, с включенными в них белковыми частицами диаметром около 100 Å (рис. 2). Активность конечного препарата Na⁺,K⁺-АТРазы можно поднять на 10—15%, если перед определением активности образец обработать детергентом — додецилсульфатом натрия или тритоном X-100. По-видимому, это связано с разрушением везикул (см. [3]).

Инфракрасный спектр липидного комплекса Na⁺,K⁺-АТРазы в тяжелой воде был получен при 5° через 15 мин после контакта с буфером на основе тяжелой воды (рис. 3). Дейтерообмен с высокими скоростями проходит практически во всех боковых группах, а также в некоторой части пептидных групп белка в областях легкой доступности для молекул D₂O. В спектре видны сильные полосы белка: полоса амид А около 3290 см⁻¹, полоса амид I с максимумом около 1651 см⁻¹ и амид II с максимумом около 1551 см⁻¹. Хорошо видны также полосы липидов: карбонильная полоса с максимумом около 1733 см⁻¹ и сильные полосы СН₂-групп около 2854 и 2922 см⁻¹ (вклад белковых групп в этой области составляет не более 10% от общей интенсивности). По отношению

* Возможная ошибка в определении относительного содержания субъединиц в препарате Na⁺,K⁺-АТРазы не может существенно повлиять на результат анализа вторичной структуры белка вследствие сходства аминокислотного состава обеих субъединиц [17].

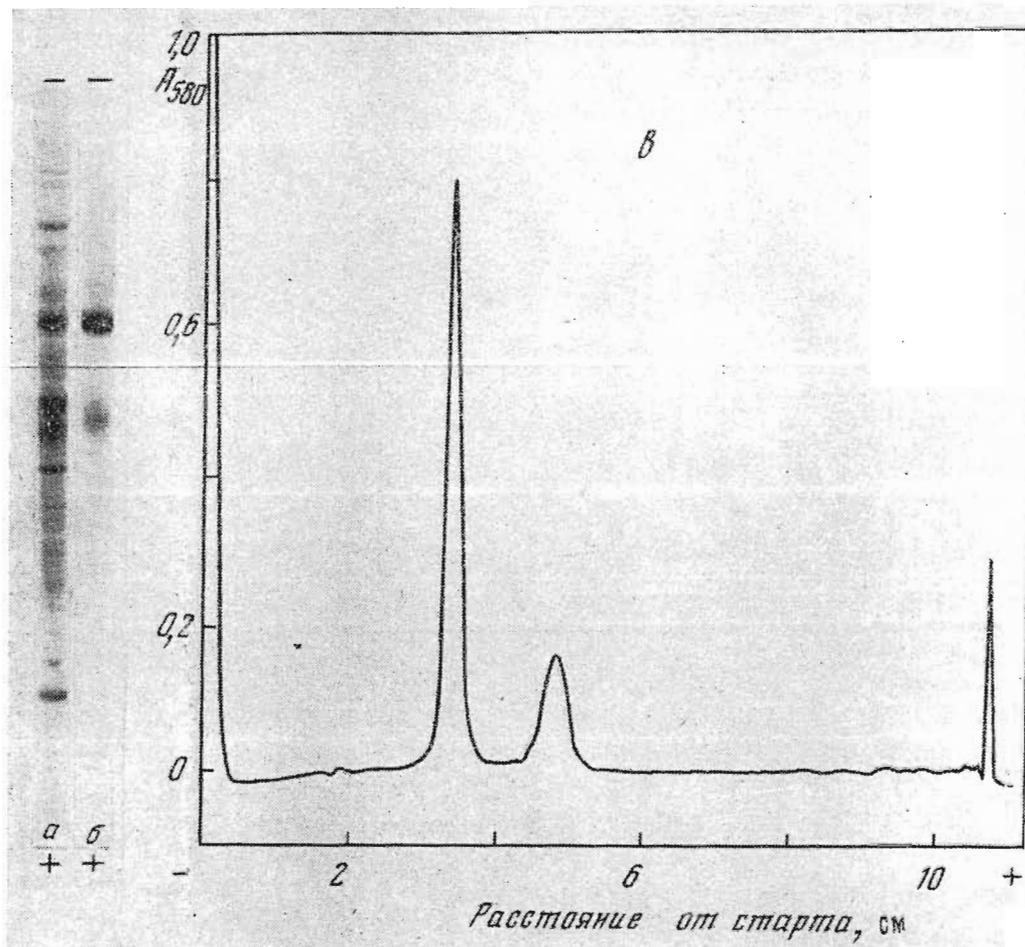


Рис. 1. Электрофоретический контроль чистоты препарата Na^+, K^+ -АТФазы из почек свиньи

a — электрофорез микросомной фракции, нагрузка — 40 мкг образца на столбик геля, *б* — электрофорез конечного препарата Na^+, K^+ -АТФазы, нагрузка — 8 мкг образца на столбик геля, *в* — сканирование геля (*б*) при 580 нм

интегральных интенсивностей белковой и липидных полос около 1651 и 1733 см^{-1} была сделана оценка отношения белка и липидов. Доли этих компонентов в комплексе по весу приблизительно одинаковы.

Полоса амид А (NH-валентное колебание) так же, как и полоса амид II (NH-деформационное колебание), относятся к колебаниям недеутерированных пептидных групп. Полоса амид А проявляется в виде узкой полосы с полушириной около 88 см^{-1} , что характерно только для регулярных полипептидных структур [14]. На этом основании мы будем полагать, что спектр в области полос амид А и амид II в основном относится к регулярной части белка. Интегральная интенсивность полосы амид А будет характеризовать долю регулярной части структуры. Пользуясь значением этой интенсивности для 100% регулярной формы, равной $4,5 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ [15], мы оцениваем количество регулярной формы в белке равным 45%. Спектр, полученный при 5° через 15 мин после контакта образца с тяжелой водой, практически не меняется в течение 1 ч. Последующая выдержка при 20° в течение 2 ч приводит к дополнительному дейтерозамещению около 8% пептидных групп. При этом полуширина полосы уменьшается до 78 см^{-1} .

Наиболее чувствительной к вторичной структуре является полоса амид I, расположенная в области 1650 см^{-1} . Ее мы и использовали для оценки вторичной структуры. Мы провели вычитание поглощения боковых групп аминокислотных остатков согласно работе [16]. Аминокислотный состав для Na^+, K^+ -АТФазы из почек свиньи неизвестен, поэтому мы использовали данные для этого белка из почек собаки [17], ос-

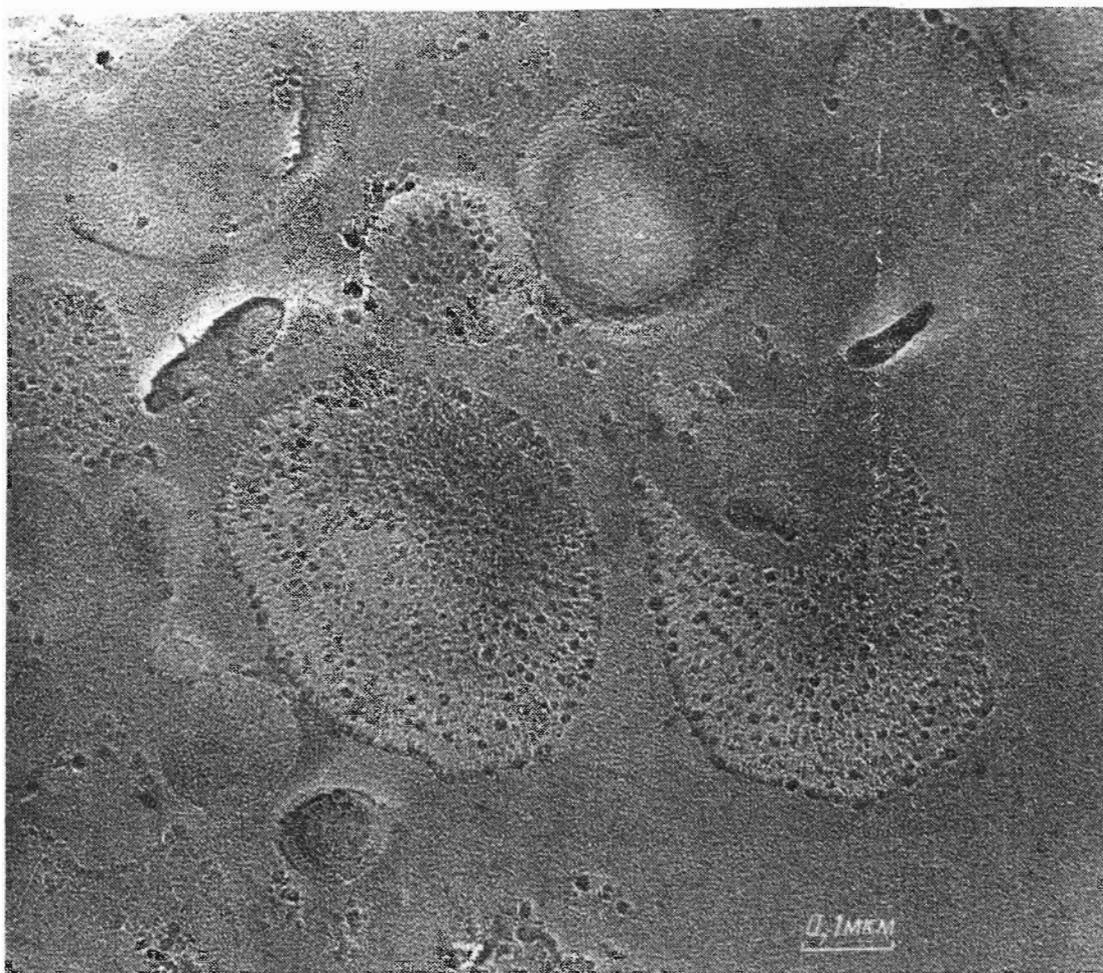


Рис. 2. Электронная микрофотография препарата Na^+, K^+ -АТФазы из почек свиньи
Круговое отнение скола образца, замороженного в 30%-ном глицерине

новываясь на том, что различия в аминокислотном составе в этом случае незначительны даже для эволюционно отдаленных видов [18]. Точные данные по содержанию амидных остатков также отсутствуют, поэтому мы приняли число остатков глутамина и аспарагина равным числу остатков соответствующих дикарбоновых кислот.

Контур полосы амид I включает в себя незамещенную регулярную часть и дейтерированную часть неупорядоченной формы. Параметры последней были взяты нами близкими к таковым для денатурированного теплом лизоцима из куриных яиц [19], гистонов в растворах с низкой ионной силой [20], а также специально измеренного нами α_{s1} -казеина из коровьего молока. Во всех случаях эти белки в растворе тяжелой воды имели контур полосы амид I в виде широкой полосы с близкими параметрами. Средний контур неупорядоченной формы имел частоту максимума 1647 см^{-1} , полуширину 50 см^{-1} и интегральную интенсивность $3,8 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$.

В результате вычитания неупорядоченной части из амидного поглощения в области полосы амид I мы получили незамещенную часть этой полосы, относящейся к регулярным участкам белка (рис. 4). Этот спектр является весьма характерным. Из суммарного контура довольно легко можно выделить компонент с частотой 1656 см^{-1} и полушириной 21 см^{-1} , относящейся к α -спиральной структуре. Содержание α -спиралей, определенное по интегральной интенсивности этой полосы [13], составляет 20%. Узкая полуширина α -спирального компонента свидетельствует о высокой степени упорядоченности этой структуры. Два компонента при 1632 и 1675 см^{-1} можно отнести к антипараллельной β -форме [20]. Ее содержание, оцененное по интегральной интенсивности

[12], составляет около 25%. Эта структура более деформирована, чем α -спираль, поскольку ее компоненты имеют большие полуширины. Расщепление компонент, равное 43 см^{-1} , соответствует числу цепей в складчатом слое, равному трем или четырем [21].

Наибольшая погрешность анализа может возникнуть из-за неточности в определении концентрации белка по методу Лоури, которую мы принимаем равной 10%. В этом случае количество регулярных структур оценивается с такой же погрешностью, и оно станет равным $45 \pm \pm 4,5\%$. К этому, конечно, следует добавить погрешность самого метода измерения интегральных интенсивностей и выделения соответствующих контуров, которую мы оцениваем равной 5—7%. В результате общее количество регулярных структур можно оценить как $45 \pm 8\%$.

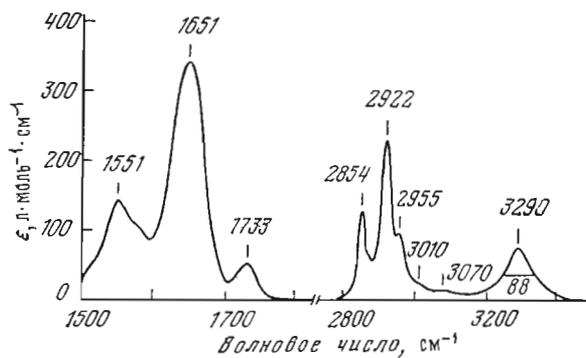


Рис. 3

Рис. 3. Инфракрасный спектр частично дейтерированного препарата Na^+ , K^+ -АТФазы из почек свиньи в виде суспензии в тяжелой воде 25 мМ трис-DCI, рD 7,5, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl_2 , 2 мМ АТФ и 1 мМ уабаина. Спектр получен через 15 мин после перевода препарата в тяжелую воду при 5°

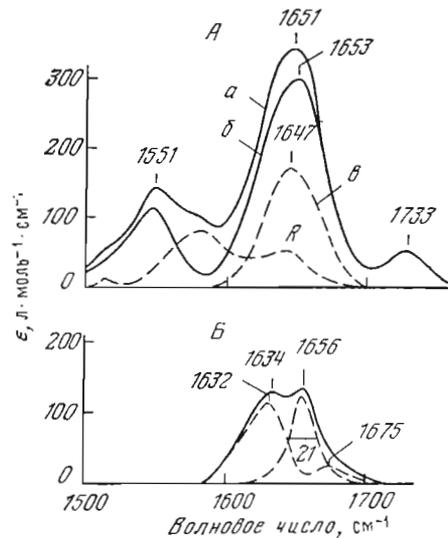


Рис. 4

Рис. 4. Анализ инфракрасного спектра частично дейтерированного препарата Na^+ , K^+ -АТФазы из почек свиньи (А) и графический анализ контура полосы амид I, относящийся к незамещенной регулярной части белкового компонента (Б)

a — экспериментальный контур, *b* — пептидное поглощение, *v* — неупорядоченная форма (55%), *R* — вычисленный вклад в поглощение боковых групп аминокислотных остатков

Необходимо отметить, что в этой работе представлены данные о структуре Na^+ , K^+ -АТФазы, находящейся в комплексе с сердечным гликозидом. Однако нами было установлено, что как форма основных амидных полос, так и кинетика дейтерообмена остаются почти неизменными, независимо от того, находится ли фермент в комплексе с каким-либо лигандом или нет. Исследование вторичной структуры белок — липидного комплекса АТФазы показало, что около 55% всех пептидных атомов водорода обмениваются при рD 7,5 и 5° в течение 15 мин, что свидетельствует о больших скоростях обмена и фактически отражает большую степень доступности значительной части белковой структуры для молекул воды. Водородный обмен в остальной (регулярной) части молекулы затруднен. По-видимому, регулярные структуры локализованы в гидрофобном ядре белок-липидного комплекса.

Авторы выражают благодарность академику А. С. Спирину за обсуждение результатов и ценные замечания, а также С. Ч. Агаларову за помощь в биохимической части работы и О. В. Федорову за обсуждение оценки погрешности результатов спектральных измерений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Skou J. C. (1975) *Quart. Rev. Biophys.* 7, 401—434.
2. Glynn I. M., Karlisch S. J. D. (1975) in *Energy Trans. in Biol. Systems* (Ciba Foundation Sympos 31), pp. 205—223, Ass. Sci. Publ., Amsterdam—Oxford—N. Y.
3. Jorgensen P. L. (1974) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 242, 36—52.
4. Jorgensen P. L. (1974) *Biochim. et biophys. acta* 356, 36—52.
5. Jorgensen P. L., Skou J. C. (1969) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 37, 39—46.
6. Panusz H. T., Graczyk G., Wilmańska D., Skarżyński J. (1970) *Analyt. Biochem.* 35, 494—504.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265—275.
8. Ryan M. T., Chopra R. K. (1976) *Biochim. et biophys. acta* 427, 337—349.
9. Weber K., Osborn M. (1975) in *The Proteins* (Neurath H., Hill K. L., eds), v. 1, pp. 179—223, Acad. Press, N. Y.—San Francisco—London.
10. Hokin L. E., Dahl J. L., Deupree J. D., Dixon J. F., Hackney J. F., Perdue J. F. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 2593—2605
11. Perrone J. R., Hackney J. F., Dixon J. F., Hokin L. E. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4178—4184.
12. Chirgadze Yu. N., Shestopalov B. V., Venyaminov S. Yu. (1973) *Biopolymers* 12, 1337—1351.
13. Chirgadze Yu. N., Brazhnikov E. V. (1974) *Biopolymers* 13, 1701—1712.
14. Chirgadze Yu. N., Brazhnikov E. V., Nevskaya N. A. (1976) *J. Mol. Biol.* 102, 781—792.
15. Brazhnikov E. V., Chirgadze Yu. N. (1978) *J. Mol. Biol.* 122, 127—135.
16. Chirgadze Yu. N., Fedorov O. V., Trushina N. P. (1975) *Biopolymers* 14, 679—694.
17. Kyte J. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 7642—7649.
18. Hopkins H., Wagner H., Jr., Smith T. S. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4365—4371.
19. Федоров О. В., Хечинашвили Н. Н. (1976) *Докл. АН СССР* 226, 1207—1209.
20. Shestopalov B. V., Chirgadze Yu. N. (1976) *Europ. J. Biochem.* 67, 123—128.
21. Chirgadze Yu. N., Nevskaya N. A. (1976) *Biopolymers* 15, 607—626.

Поступила в редакцию
9.XI.1978

ISOLATION AND STRUCTURAL PROPERTIES OF MEMBRANE-BOUND Na⁺,K⁺-ADENOSINE TRIPHOSPHATASE FROM PIG KIDNEY

A. B. CHETVERIN, E. V. BRAZHNIKOV and Yu. N. CHIRGADZE

Institute of Protein Research, USSR Academy of Sciences, Pushchino

A technique for isolation of large amounts of homogeneous Na⁺, K⁺-ATPase lipid-protein complex from pig kidney has been developed. The purity of the preparation as determined by the protein component is 96—98%, the large to small subparticle ratio being 4:1. The protein and lipid parts of the preparation have approximately the same mass. The enzyme activity is 1600—1900 μ moles of inorganic phosphate released per mg of protein per hour. The protein secondary structure in a heavy water solution has been studied by infrared spectroscopy in the region of the main amide bands. It has been shown that about 20% of the peptide groups form highly ordered α -helical regions and about 25% are found in the pleated sheet structure with an antiparallel packing of the chains. The regions with a regular structure are mainly located in the protein component regions, inaccessible for water and are presumably involved in the formation of the hydrophobic core of the molecule. The major part of the protein structure (~55%) is non-ordered and is easily accessible for water molecules.
