

УДК 581.132 : 577.158.34

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ, ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РИБУЛОЗО-1,5-БИСФОСФАТКАРБОКСИЛАЗЫ КЛЕТОК *CHLORELLA*

Т. И. КАСАТКИНА, Н. А. ПРОНИНА, В. Е. СЕМЕНЕНКО

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Академии наук СССР, Москва

Показана возможность количественного выделения рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы из клеток хлореллы, используя метод дробного высаливания сульфатом аммония. Разработан метод выделения электрофоретического чистого препарата РБФК, основанный на применении ступенчатого градиентного геля полиакриламида. Определены молекулярно-весовые характеристики фермента и его субъединиц и их соотношение в нативной молекуле.

Хлорелла — фотосинтез — рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза — электрофорез.

Ключевой реакцией первичной ассимиляции углекислоты в процессе фотосинтеза является реакция карбоксилирования рибулозобисфосфата, катализируемая ферментом рибулозобисфосфаткарбоксилазой (РБФК). Этот фермент у большинства растительных организмов представляет собой высокомолекулярный белок с молекулярной массой порядка 560 000 дальтон. Многочисленными исследованиями показано, что фермент эукариот и многих из большинства исследованных прокариот состоит из двух типов субъединиц — больших и малых с молекулярной массой, соответствующей 55 000 и 15 000 дальтон. При этом у эукариотических организмов одна из субъединиц (большая) кодируется и синтезируется в хлоропласте, а другая (малая) закодирована в ядерном геноме и синтезируется в цитоплазме [1]. Это делает данный фермент удобной моделью для изучения механизмов регуляции экспрессии генома хлоропласта и хлоропластно-цитоплазматических регуляторных взаимоотношений, тем более что адаптивные изменения карбоксилирующей активности фотосинтезирующих клеток осуществляются главным образом на уровне синтеза рибулозобисфосфаткарбоксилазы [2—4].

Вместе с тем установлено, что молекулярная масса и субъединичное строение фермента, выделенного из филогенетически различных организмов, неодинаковы [5]. Поэтому необходимо изучение особенностей фермента у каждого конкретного организма.

Цель настоящего исследования — разработка методов количественного выделения РБФ-карбоксилазы, получение его в виде индивидуального белка и изучение свойств этого фермента из клеток *Chlorella sp. K*, которая широко используется для исследования механизмов эндогенной регуляции фотосинтеза [4, 6].

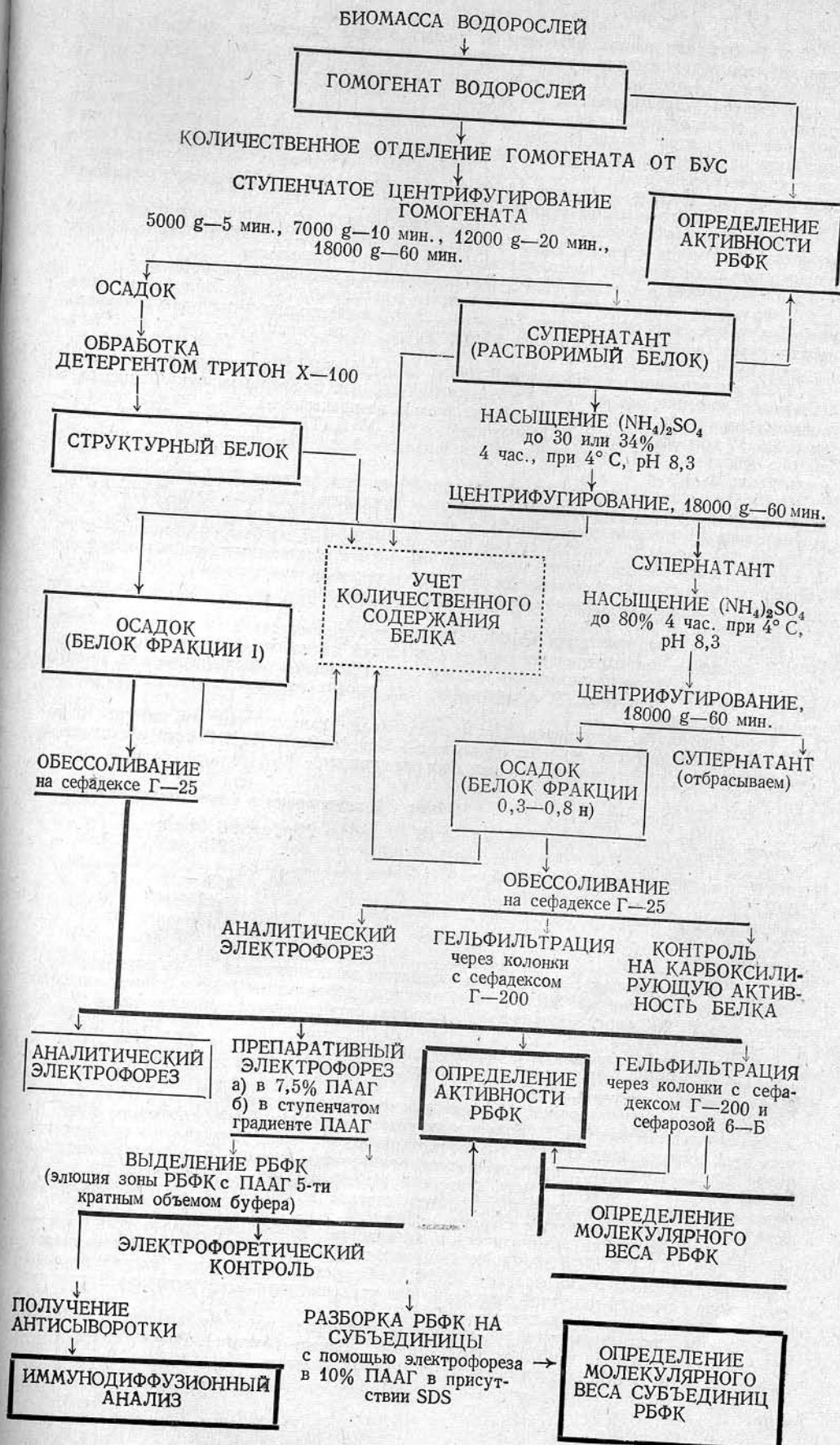
МЕТОДИКА

Объектом исследования служила одноклеточная зеленая водоросль *Chlorella sp. K* из коллекции культур водорослей ИФР им. К. А. Тимирязева АН СССР.

Культуру выращивали в стеклянных культуральных сосудах [7] в накопительном режиме в автотрофных условиях на среде Тамия с нитратным азотом при постоянном барботировании газовой смеси с 1,7% CO₂ на стационарной установке для интенсивного выращивания водорослей при двустороннем освещении люминесцентными лампами БС-80.

Схема выделения и очистки рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы представлена на рис. 1.

Рис. 1. Схема количественного выделения и фракционирования растворимого белка *Chlorella sp. K*



Для разрушения клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием на холоду, промывали дважды буфером и ресуспендировали в охлажденном 0,005 М трис-НСl-буфере рН 8,3, содержащем 0,005 М $MgCl_2$, 0,001 М ЕДТА, 0,001 М меркаптоэтанол. Дезинтеграцию клеток проводили на холоду в ротационном дезинтеграторе со стеклянными бусами по описанной ранее методике [8]. Метод обеспечивает 100%-ное разрушение клеток и полный выход растворимых белков, что позволяет рассчитывать их содержание на индивидуальную клетку. После разрушения клеток гомогенат количественно отделяли от бус и проводили ступенчатое центрифугирование: 5000 g — 5 мин, 7 000 g — 10 мин, 12 000 g — 20 мин, 18 000 g — 60 мин для отделения нерастворимых клеточных компонентов.

Количество белка определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм на спектрофотометре «Specord UV VIS», предварительно програвдуированном по белкам данного штамма хлореллы, определявшимся по Лоури и Кьельдалю.

Для выделения и очистки РБФК были использованы следующие методы.

1. Фракционирование тотального препарата растворимых белков сульфатом аммония. Полученные при высаливании белковые фракции обессоливали методом гель-фильтрации через сефадекс G-25 тонкий [9] или посредством диализа против трис-НСl-буфера рН 8,3 в течение 12—13 ч.

2. Хроматография на сефадексе G-200 и сефарозе 6-B. Для гель-фильтрации использовали колонки диаметром 10 мм и длиной 700 мм. Белок на колонку наносили в концентрации 7—10 мг/мл. Общий объем образца не превышал 4 мл. Элюцию проводили 0,005 М трис-НСl-буфером, содержащим 0,001 М ЕДТА, 0,005 М $MgCl_2$. Скорость выхода элюата — 4—5 капель/мин, объем фракции 2 мл. Температурный режим гель-фильтрации 2—4°.

3. Препаративный электрофорез. Электрофорез проводили в 7,5%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), а также в ступенчатом градиенте ПААГ по разработанной нами методике [10] в стеклянных трубках диаметром 12 мм при постоянном токе 16 мА на трубку в течение 90 мин. На трубку наносили от 5 до 15 мг белка в объеме 1—2 мл. После окончания электрофореза определяли положение разделенных белков при помощи окрашивания контрольной части геля. Затем участок геля, содержащий РБФК, вырезали, заливали 5-кратным объемом буфера, гомогенизировали и элюировали в течение нескольких часов.

Идентификация препарата РБФК. Для контроля процесса выделения и очистки РБФК использовали определение карбоксилирующей активности, аналитический электрофорез [11] и метод преципитации в агаре с применением моноспецифических антител против РБФК *Chlorella sp.* К и антисыворотки против гомогената клеток этого же штамма хлореллы [12].

Ферментативную активность РБФК определяли радиометрическим методом с использованием в качестве субстрата рибулозо-1,5-бисфосфата [13]. Состав реакционной смеси, объем которой составлял 0,25 мл, был следующим;

| Растворы | Объем | Концентрация в ферментативной смеси |
|------------------------------------|-------|-------------------------------------|
| Раствор белка | 0,05 | Не более 0,05 мг |
| NaH_2CO_3 | 0,05 | 12,5 мкМ |
| 0,05 М трис-НСl-буфер, содержащий: | 0,125 | |
| $MgCl_2$ | — | 2,5 мкМ |
| меркаптоэтанол | — | 0,125 мкМ |
| РБФ | 0,025 | 0,175 мкМ |

Перед началом реакции смесь всех компонентов, за исключением РБФ, прединкубировали в течение 15 мин при 30°. Реакцию начинали добавлением РБФ и ферментативную активность РБФК определяли при 30°. Реакцию останавливали добавлением 0,25 мл 6 н. НСl.

Аналитический электрофорез белковых фракций проводили в 7,5%-ном ПААГ в условиях щелочного рН при постоянном токе, равном 4 мА на трубку, в течение 40—45 мин при температуре 4—5° [11].

Получение антисывороток. Моноспецифическую сыворотку против РБФК хлореллы получали иммунизацией кроликов чистым препаратом РБФК по схеме [14]. За весь курс иммунизации кроликам было введено 10 мг белка. Для получения антисыворотки против гомогената иммунизировали гомогенатом клеток водорослей, который вводили животным вместе с адьювантом Фрейнда по схеме [14]. Общее количество белка, введенное за все циклы иммунизации, составляло 80—100 мг на животное. В работе использовали сыворотки с титрами 1 : 128.

Для ингибирования энзиматической активности РБФК антисывороткой против РБФК *Chlorella sp.* К к 0,1 мл (концентрация белка 5 мг/мл), очищенной путем высаливания растворимого белка фракции РБФК, добавляли возрастающее количество антисыворотки. После 10-минутной инкубации без удаления комплекса антиген-антитело определяли энзиматическую активность РБФК.

Регистрацию результатов электрофореза проводили после окрашивания и фотографирования гелей на микроденситометре «Хромоскан» (Англия). Результаты иммунодиффузионного анализа регистрировали фотографированием [15].

Молекулярную массу нативной молекулы РБФК определяли с помощью гель-фильтрации фермента через колонки с сефадексом Г-200 и рассчитывали по уравнению $\lg M = 6,698 - 0,987 V_e/V_0$, где V_e — объем выхода, соответствующий объему элюата, сошедшего с колонки с момента нанесения на нее препарата до момента выхода его с колонки, который соответствует на профиле элюции вершине пика; V_0 — холостой объем колонки, равный объему выхода буфера до появления вещества, не проникающего в гранулы геля.

Разборку РБФК на субъединицы и определение их молекулярной массы осуществляли методом электрофореза в 10%-ном ПААГ, содержащем 0,1% додецилсульфата натрия, с использованием маркерных белков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

РБФК относится к числу водорастворимых белков и при слабощелочных значениях рН переходит в супернатант при центрифугировании бесклеточного гомогената. Как видно из табл. 1, при используемых нами режимах дезинтеграции клеток и центрифугирования фермент полностью переходит в супернатант, а осаждаемые при 18 000 г нерастворимые в данном буфере клеточные фрагменты не обладают карбоксилирующей активностью.

Фракционирование растворимого белка хлореллы посредством дробного высаливания сульфатом аммония и электрофоретическая характеристика полученных фракций показали, что при 30% насыщения сульфатом аммония осаждается фракция, составляющая около 30% от растворимого белка, которая состоит в основном из электрофоретически малоподвижного компонента и незначительной примеси некоторых других белков. При этом, как видно из табл. 2, удельная карбоксилирующая активность этой фракции увеличивается в 9,8 раз по сравнению с активностью в суммарном растворимом белке.

Как видно из табл. 2, карбоксилирующая активность, обнаруживаемая во фракции 0,3—0,8, составляет менее 3%. Увеличение концентрации сульфата аммония на 4% (до 34% от насыщения) позволяет разделить растворимый белок на фракцию, содержащую РБФК (составляю-

Таблица 1

Распределение карбоксилирующей активности во фракциях, полученных при дифференциальном центрифугировании гомогената клеток хлореллы

| Фракция | Активность РБФК | | Образование преципитатов с антисывороткой против РБФК в реакции двойной диффузии в агаре |
|---|---------------------------|------|--|
| | мкМ CO_2 /мл·мин | % | |
| Гомогенат | 7,04 | 100 | +++ |
| Супернатант (растворимый белок) | 7,05 | 100 | +++ |
| Осадок (после ступенчатого центрифугирования) | 0,00 | 0,00 | — |

Таблица 2

Характеристика белковых фракций, получаемых при дробном высаливании растворимого белка хлореллы сульфатом аммония

| Относительная концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ * | Удельная активность РБФК | | Относительная концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ * | Удельная активность РБФК | |
|---|---------------------------------|-------|---|---------------------------------|-----|
| | мкМ CO_2 /мг белка·мин | % | | мкМ CO_2 /мг белка·мин | % |
| 1 н. | 0,37 | 100 | 0,3 н. | 3,62 | 100 |
| 0,3 н. | 3,62 | 980,4 | 0,3—0,8 н. | 0,1 | 2,6 |
| 0,34 н. | 1,04 | 276,4 | 0,34 н. | 1,02 | 100 |
| | | | 0,34—0,8 н. | 0,006 | 0,6 |

* За 1 н. взята насыщающая концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при 5° (80%).

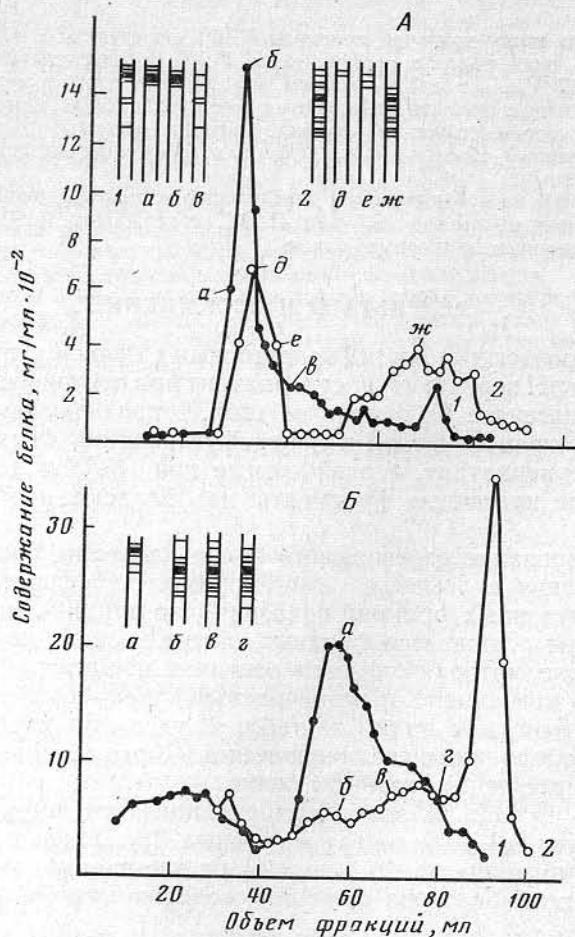


Рис. 2. Профиль элюции и электрофореграммы отдельных фракций, полученных при высаливании сульфатом аммония растворимого белка хлореллы

А — белковые фракции, разделенные на колонке с сефадексом Г-200; Б — с сефарозой 6-Б; α, β, γ, ζ — субфракции исходной фракции 0,34 н. (1); δ, ε, ζс — исходной фракции 0,34—0,8 н. (2)

шую около 60% от растворимого белка), и фракцию, практически полностью лишенную карбоксилирующей активности (0,34—0,8 н.). Однако в этом случае удельная активность фермента увеличивается лишь в 2,7 раза по сравнению с активностью в суммарном растворимом белке, что говорит о загрязнении этой фракции другими белковыми компонентами или о выпадении в эту фракцию белкового компонента, ингибирующего активность РБФК.

Гель-филтрация белковых фракций 0,3 н., состоящей на 85% из РБФК, и 0,34 н. через колонки с сефадексом Г-200 и сефарозой 6-Б (рис. 2, А, Б) показала, что активность РБФК после элюции с колонки практически не увеличивалась по сравнению с активностью во фракции, осаждающейся при 30% насыщения растворимого белка сульфатом аммония, и составила 2,3 и 2,2 мкМ $\text{CO}_2/\text{мг}$ белка соответственно. Это свидетельствует о достаточно высокой степени очистки, достигаемой уже при высаливании белка.

Фильтрация через колонку с сефадексом Г-200 фракции 0,3—0,8 н. (рис. 2, А) обнаружило в ее составе малоподвижные компоненты, элюирующиеся в том же объеме, что и РБФК. Однако определение карбокси-

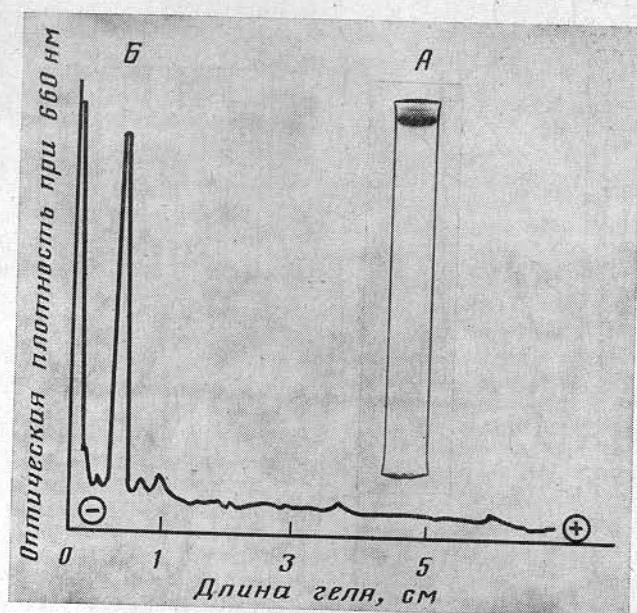


Рис. 3. Электрофореграмма (А) и денситограмма (Б) белка фракции 1, выделенной методом электрофореза в 7,5%-ном ПААГ

лирующей активности в этом пике не выявило фермента. Очевидно, именно эти малоподвижные компоненты загрязняют фракцию 0,34 н. по сравнению с фракцией 0,3 н., поскольку при фильтровании через колонку с сефарозой 6-Б фракции 0,34—0,8 н. этих компонентов не было обнаружено (рис. 2, б).

Таким образом, в силу наличия близких по подвижности к РБФК компонентов в составе суммарной фракции растворимых белков клеток хлореллы методы гель-фильтрации мало приемлемы для получения чистых препаратов РБФК из данного организма. В то же время при фракционировании растворимого белка клеток хлореллы посредством дробного высаливания удается выделить фракцию, максимально (на 85%) обогащенную РБФК с небольшими по количественному содержанию (не более 13—15%) примесями других белковых компонентов, и фракцию, лишенную РБФК-карбоксилазы (табл. 2). Такой достаточно простой метод позволяет количественно выделить из клеток хлореллы РБФК, что дает возможность изучать адаптивные перестройки карбоксилирующей активности клеток в физиологических экспериментах не только на уровне активности, но и на уровне количественного содержания этого фермента в хлоропласте.

Вместе с тем для более детального исследования свойств РБФК, в частности для выяснения ее субъединичного строения, а также для получения моноспецифических антисывороток такая степень очистки фермента недостаточна. Выделение РБФК с использованием метода препаративного электрофореза в 7,5%-ном ПААГ дает возможность получить препарат фермента с высокой карбоксилирующей активностью (1,280 мкМ CO_2 /мг белка). При этом удельная активность РБФК возрастает в 9,4 раза по сравнению с активностью в суммарном растворимом белке (0,136 мкМ CO_2 /мг белка), т. е. примерно во столько же раз, во сколько возрастает удельная активность фермента уже при высаливании растворимого белка сульфатом аммония (фракция 0,3 н.). Однако, как видно из электрофореграммы и денситограммы, при выделении РБФ-карбоксилазы даже методом препаративного электрофореза в 7,5%-ном ПААГ (рис. 3) этому ферменту из клеток хлореллы сопутству-

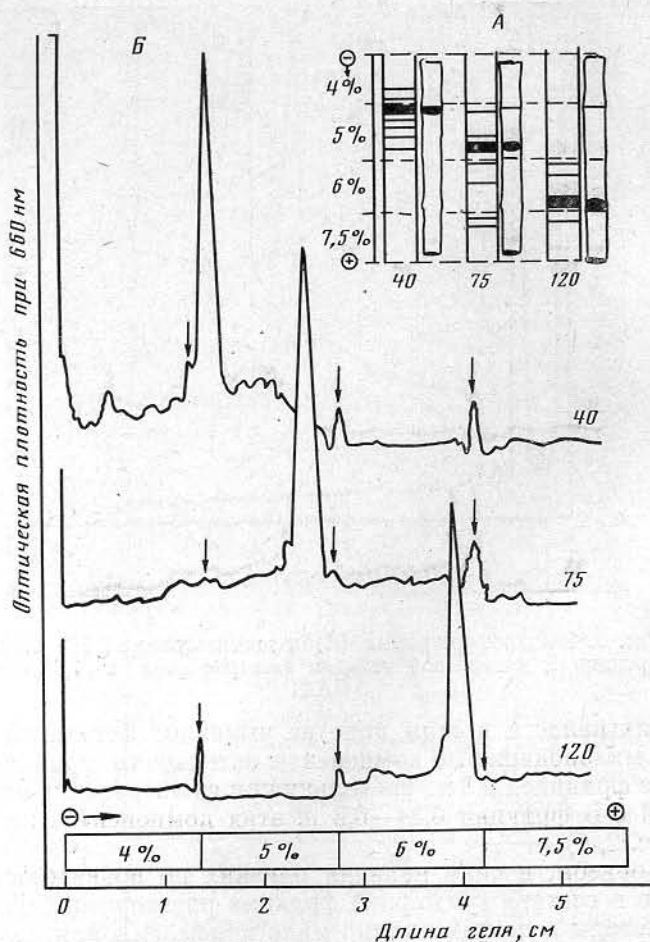


Рис. 4. Динамика движения белка фракции 1 в ступенчатом градиентном геле полиакриламида

А — электрофореграмма движения белка, Б — денситограммы гелей. Проценты — концентрация акриламида в градиентном геле. Цифры под схемами электрофореграмм и денситограмм — время электрофореза, мин

ет в минорных количествах четыре белковых компонента с близкой к РБФК электрофоретической подвижностью.

Таким образом, обычный препаративный электрофорез в 7,5%-ном ПААГ также не дает возможность выделить препарат фермента из клеток хлореллы в виде индивидуального белка. В связи с этим возникла необходимость разработки такого метода препаративного электрофореза, который позволил бы отделить сопутствующие (близкие по электрофоретической подвижности) белки и выделить электрофоретически чистый препарат РБФК.

Известно, что движение белка в полиакриламидном геле зависит при прочих константных условиях от размера пор геля, которые определяются концентрацией акриламида, образующего поперечные «сшивки». Изменение соотношения акриламида к фиксированному объему буфера дает возможность получать гели с различным размером пор. Изучение динамики движения белков хлореллы в таких гелях показало, что скорость и время движения РБФ-карбоксилазы и сопутствующих ей белков различны. Это послужило основанием использования ступенчатого градиентного геля для выделения РБФК в виде индивидуального белка. Гели разной концентрации (от мелкопористого — 7,5% до крупнопористого —

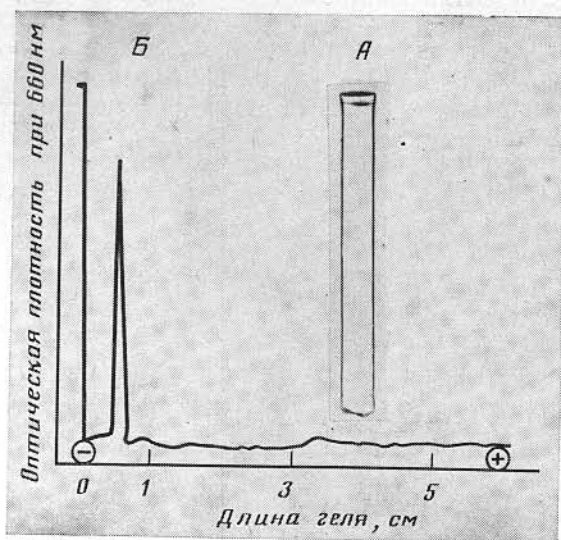


Рис. 5. Характеристика РБФ-карбоксилазы, выделенной методом препаративного электрофореза в ступенчатом градиенте ПААГ
 А — электрофореграмма, Б — денситограмма геля

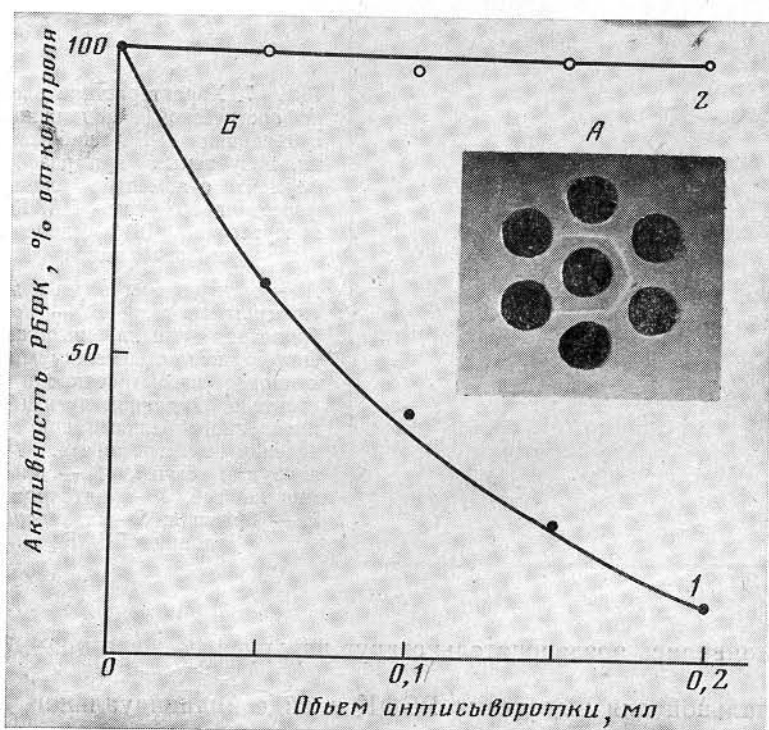


Рис. 6. Характеристика антисыворотки против РБФ-карбоксилазы хлореллы
 А — реакция преципитации в агаре; в центральной лунке — антитела против РБФ-карбоксилазы хлореллы, в периферических — последовательное разведение гомогената клеток хлореллы; Б — ингибирование активности РБФ-карбоксилазы антителами против РБФК

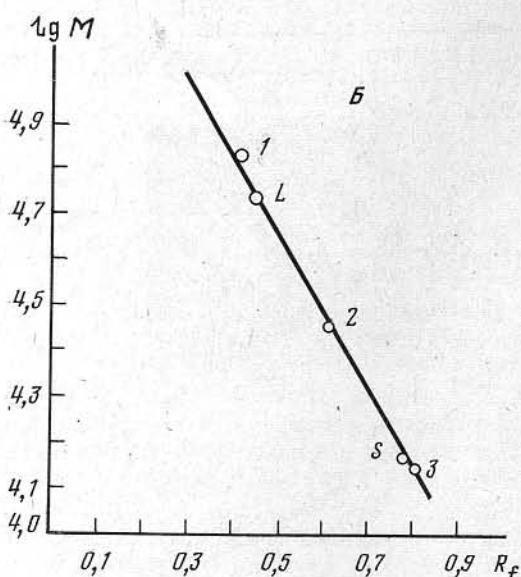
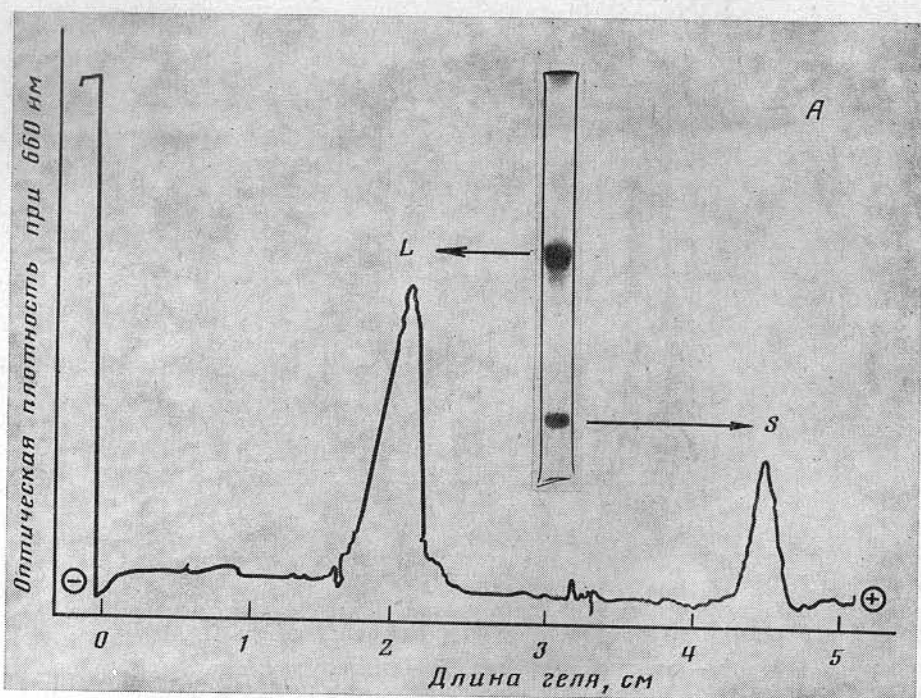


Рис. 7. Характеристика электрофоретической подвижности субъединиц РБФ-карбоксилазы, получаемых при разборке фермента с помощью электрофореза в 10%-ном ПААГ в присутствии 0,1% додецил-сульфата натрия

А — электрофореграмма и денситограмма геля, Б — калибровочная кривая, выражающая зависимость между молекулярным весом белков и относительной длиной пути (R_f), пройденного белками при проведении электрофореза: 1 — альбумин бычий, 2 — альбумин яичный, 3 — цитохром с; L — большая, S — малая субъединицы РБФК

4%) наслаивались последовательно друг на друга по мере полимеризации.

Оптимальной для выделения РБФК в виде индивидуального белка оказалась следующая ступенчатая структура геля: 7,5, 6,0, 5,0 и 4,0% ПАА при высоте каждой зоны 2 см.

Как видно из рис. 4, при движении РБФК в ступенчатом градиентном геле указанная картина расположения сопутствующих ей минорных компонентов меняется. Белки с большей электрофоретической подвижностью опережают РБФК, а с меньшей — отстают, что позволило освободиться от сопутствующих белков и получить электрофоретически чистый препарат фермента в виде индивидуального компонента (рис. 5).

Антисыворотка, полученная против электрофоретически чистого пре-

парата РБФК, образовывала в реакции против суммарного гомогената преципитат в виде одиночной полосы преципитации (рис. 6, А).

Специфичность антисыворотки к РБФК устанавливали кроме реакции иммунопреципитации против суммарных антигенов (гомогенат клеток) также по ингибированию энзиматической активности РБФК. В последнем случае к 0,1 мл (концентрация белка 5 мг/мл) очищенного путем высаливания растворимого белка фракции РБФК добавляли возрастающие количества антисыворотки. После 10-минутной инкубации без удаления комплекса антиген-антитело определяли энзиматическую активность РБФК. Как видно из рис. 6, Б, ингибирование активности РБФК происходило пропорционально количеству добавляемой антисыворотки и составляло 91,8%.

Представляло интерес изучить субъединичную структуру выделенной РБФК, поскольку строение молекулы этого фермента отличается у филогенетически различных организмов.

Молекулярная масса молекулы РБФК данного штамма хлореллы, определенная методом гель-фильтрации через колонки с сефадексом Г-200, оказалась равной 497 500—520 000 дальтон, а молекулярная масса большой и малой субъединиц этого фермента — 55 000 и 15 000 дальтон соответственно (рис. 7, а, б). Исходя из значений молекулярных масс субъединиц и нативной молекулы фермента, можно предположить, что РБФК *Chlorella sp* К состоит из 8 больших и 6 малых субъединиц. Это не согласуется с данными, полученными для молекулы ферментов большинства исследованных эукариот, для которых характерно соотношение субъединиц 8 : 8 и более высокое значение молекулярной массы для нативной молекулы фермента (560 000 дальтон). Это связано, возможно, с особенностями организации генома у данного штамма *Chlorella*.

Таким образом, показана возможность количественного выделения РБФ-карбоксилазы из клеток хлореллы, используя достаточно простые методы. Это открывает возможность для изучения регуляции синтеза РБФК, что представляет важный аспект исследований на пути выяснения механизмов, лежащих в основе эндогенной регуляции фотосинтеза [2]. Вероятно, клетке в определенных условиях не достаточно регуляция реакции карбоксилирования различными интермедиатами на уровне изменения каталитической активности фермента, возможность которой хорошо исследована в опытах *in vitro* [12], и тогда включаются механизмы, регулирующие карбоксилирующую активность хлоропласта за счет изменения количества (синтеза) РБФ-карбоксилазы. Учитывая, что регуляция карбоксилирующей активности хлоропласта находится под двойным ядерно-хлоропластным контролем, первостепенное значение приобретает выяснение механизмов координации ядерно-хлоропластных взаимодействий при синтезе РБФ-карбоксилазы [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Blair G. E., Ellis R. S. Protein synthesis in chloroplasts I. Light-driven synthesis of the large subunit of Fraction I protein by isolated pea chloroplasts.— *Biochim. et biophys. acta*, 1973, v. 319, p. 223.
2. Касаткина Т. И. Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза микроводорослей и регуляция ее синтеза: Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. М.: Ин-т физиол. растений, 1978. 24 с.
3. Семеновко В. Е. Механизмы регуляции фотосинтеза и адаптивные свойства хлоропластов.— В кн.: Физиология фотосинтеза. М.: Наука, 1982, с. 164.
4. Касаткина Т. И., Пронина Н. А., Семеновко В. Е. Рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза хлореллы и регуляция ее синтеза под действием света разной интенсивности.— В кн.: Матер. Всес. раб. совещ. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе. Киев: Наук. думка, 1979, с. 298.
5. McFadden B. A., Tabita F. R. D-Ribulose-1,5-diphosphate carboxylase and the evolution of autotrophy.— *Biosystem*, 1974, № 6, p. 93.
6. Семеновко В. Е. Молекулярно-биохимические аспекты эндогенной регуляции фотосинтеза.— *Физиол. растений*, 1978, т. 25, вып. 5, с. 903.

7. Владимирова М. Г., Семененко В. Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. М.: Изд-во АН СССР, 1968. 55 с.
8. Семененко В. Е., Касаткина Т. И. Изучение процесса разрушения клеток *Chlorella sp. K* в дезинтеграторе со стеклянными бусами для количественного извлечения нативных белков.— Физиол. растений, 1972, т. 19, вып. 1, с. 169.
9. Детерман Г. Гель-хроматография. М.: Мир, 1970. 249 с.
10. Касаткина Т. И., Пронина Н. А., Семененко В. Е. Выделение высокомолекулярных белков типа рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы *Chlorella sp. K* из сложной смеси растворимых белков.— В кн.: Матер. VIII Всес. раб. совещ. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе, Киев: Наук. думка, 1974, с. 69.
11. Сафонов В. И., Сафонова Н. П. Анализ белков растений методом вертикального микроэлектрофореза в полиакриламидном геле.— Физиол. растений, 1969, т. 16, вып. 2, с. 350.
12. Володарский А. Д., Оманн Э., Чаянова С. С., Тихоновская Н. Г. Иммуноидентификация и оценка чистоты ферментов на примере рибулозодифосфаткарбоксилазы.— Физиол. растений, 1979, т. 26, вып. 6, с. 1172.
13. Романова А. К. Важнейшие свойства и методы определения активности ферментов акцептирования и ассимиляции углекислоты.— В кн.: Биохимические методы изучения автотрофии у микроорганизмов. М.: Наука, 1980. 157 с.
14. Володарский А. Д. Иммунохимический анализ антигенной структуры тканей растений.— В кн.: Биофизические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971, с. 14.
15. Тихоновская Н. Г., Володарский А. Д. Установка для регистрации реакций иммунодиффузионного анализа.— Физиол. растений, 1977, т. 24, вып. 5, с. 1085.

Поступила в редакцию
18.I.1983

ISOLATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RIBULOSE 1.5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE FROM *CHLORELLA SP. K* CELLS

T. I. KASATRINA, N. A. PRONINA, V. E. SEMENENKO

*K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A method for isolating electrophoretically pure RuBPCase was developed using ammonium sulfate fractionation and polyacrylamide gradient gel electrophoresis. The molecular weights of the enzyme and its subunits, and the subunit ratio in the native enzyme were determined.