

Е. В. БУДИЛОВА, Б. А. РУБИН, Е. К. АНТОНОВА

ОБ ИЗОЗИМАХ ПЕРОКСИДАЗЫ В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ БОБОВ

(Представлено академиком А. И. Опариным 5 VIII 1970)

Многочисленные данные указывают на функциональную связь пероксидазы со многими сторонами клеточного метаболизма.

Возможно, это объясняется существованием большого числа различных молекулярных форм этого фермента. Изозимы пероксидазы могут отличаться не только по электрофоретическим свойствам, но и биохимически^(1,2). Их физиологическая роль еще не ясна. Наиболее вероятно, что молекулярная гетерогенность обеспечивает тончайшую самонастройку метаболизма в ходе онтогенеза, что особенно имеет значение для растений в обеспечивании быстрой приспособляемости к постоянно меняющимся условиям внешней среды.

Активность этого фермента и его изозимный состав могут отражать изменения метаболизма растения в онтогенезе, начиная с очень ранних его стадий⁽²⁻⁴⁾. Поэтому интересно было изучить динамику активности этого фермента и его изозимного спектра в процессе развития семени в проросток.

Объектом служили черные русские бобы. Семена замачивались в проточной воде в течение суток, а затем проращивались в кювете при 21°. На шестой день после замачивания проростки высаживались на водопроводную воду и выращивались в термостате при круглосуточном освещении. Определения проводились в сухих семенах и с 1 по 11 день после замачивания.

Исследовали неочищенные экстракты пероксидазы из семян бобов (проростка), расчленение которого в данной работе не проводили. Ткань, замороженную жидким азотом, растирали в ступке с 0,05 М триглицидным буфером (рН 8,3), содержащим 1 мл тритона на 100 мл буфера. Гомогенат настаивали на холоде 15 мин., отжимали через капроновую сетку и центрифугировали при 8 тыс. об/мин в течение 30 мин.

Содержание белка в экстракте определяли по методу⁽⁵⁾, активность пероксидазы — по методу⁽⁶⁾. Вычисляли активность в условных единицах на 100 мг белка.

Изоферментный состав пероксидазы изучали методом дискового электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле со щелочным буфером⁽⁷⁾. В каждую трубочку наносили по 0,1 мл экстракта с общим содержанием

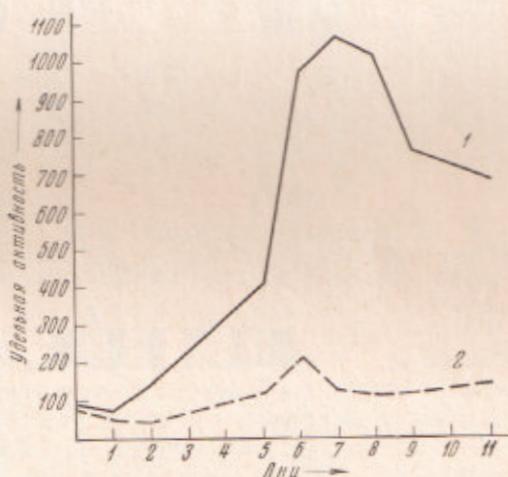


Рис. 1. Динамика удельной активности пероксидазы при прорастании. Расчет сделан в условных единицах на 100 мг белка. 1 — в зародыше, 2 — в семядолях

белка от 60 до 1800 γ в зависимости от объекта. В качестве стабилизатора использовали 40% раствор сахарозы, индикатором служил краситель «солнечный желтый». Отрицательно заряженные изоферменты пероксидазы разделяли при силе тока 5 ма на трубочку и напряжении 600—800 в. По окончании электрофореза столбики окрашивали бензидином (8). Электрофореграммы фотометрировали на МФ-4 и фотографировали.

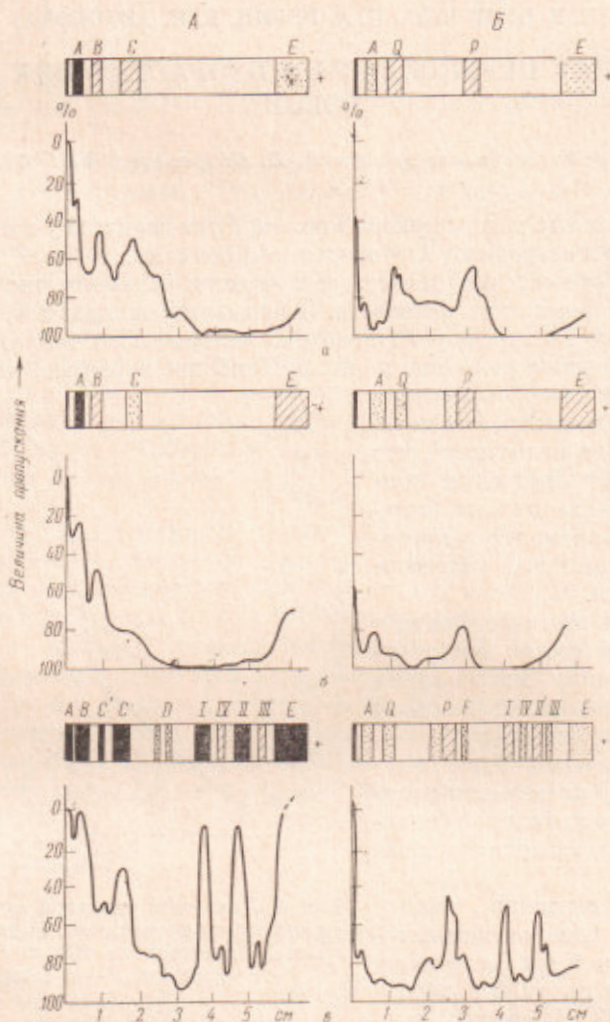


Рис. 2. Денситограммы и схемы электрофореграмм зародыша (А) и семядолей (В). а — сухих семян, б — 1 день после замачивания, в — 8 день после замачивания

Сухие семена бобов обладали достаточно высокой пероксидазной активностью, которая резко возрастала в процессе прорастания (рис. 1). На всех стадиях активность фермента в зародыше (проростке) была выше, чем в семядолях. В ходе онтогенеза это различие значительно увеличивалось в результате более резкой активации пероксидазы в зародыше.

Установлено, что в основе наблюдавшихся количественных изменений в пероксидазном комплексе лежат качественные сдвиги, выражающиеся в изменении числа и активности отдельных изозимов.

При сопоставлении изозимных спектров пероксидазы зародыша (проростка) и семядолей (рис. 2) обнаружены как специфические компоненты,

так и изоцимы-аналоги. Основная часть пероксидазных белков в семядолях представлена медленно движущейся положительно заряженной фракцией, а в зародыше (проростке) — отрицательно заряженными белками. Анодные компоненты, динамика которых изучалась, по своей электрофоретической подвижности делятся на 3 группы: малоподвижные, среднеподвижные и быстро движущиеся. Изоцимы-аналоги (I, II, III, IV, E) относятся к последним двум группам.

Обнаруженные в сухих семенах изоферменты пероксидазы присутствуют и на более поздних стадиях. Через 24 часа после замачивания в изоцимном спектре пероксидазы наблюдались изменения лишь относительных активностей отдельных компонентов. Качественные изменения в изоцимном составе пероксидазы зародыша наступали на 2 день после замачивания. На этой фазе (прободение корешком об-

олочки семени) появляется среднеподвижный компонент I, активность которого быстро растет в течение последующих дней. Фаза выхода надземной части проростка (4—5 день) сопровождается появлением изоцима II. В процессе дальнейшего роста и дифференцировки проростка меняется соотношение между активностями этих компонентов, растет активность быстро- и медленно движущихся фракций, появляются минорные изоцимы (III, IV, D). Максимальное число изоферментов пероксидазы в зародыше наблюдается на 7 и 8 день (рис. 3), после чего исчезают минорные изоферменты и несколько уменьшается активность основных компонентов. Такая динамика изоцимного спектра пероксидазы зародыша (проростка) коррелирует с динамикой активности фермента в экстракте (рис. 1).

В семядолях качественные изменения в изоцимном составе пероксидазы наступают значительно позднее, на 4—5 день. Это объясняется, по-видимому, тем, что из состояния покоя первым при прорастании выходит зародыш (корешок). Наблюдаемое усложнение изоцимного состава пероксидазы в семядолях свидетельствует о процессах вторичной дифференцировки клеток этих органов в процессе развития семени в проросток. Исчезновение минорных изоцимов-аналогов происходит в семядолях и в проростке одновременно. Полученные данные находятся в соответствии с гипотезой о регулирующей роли зародыша в сложных процессах, происходящих в семядолях при прорастании.

Резкая активация дыхательных ферментов в прорастающих семенах может объясняться несколькими причинами: высвобождением латентных форм их, удалением низкомолекулярных ингибиторов, увеличением доступных субстратов. Однако в основном этот эффект объясняется синтезом ферментов *de novo*. В отношении пероксидазы это было показано в опытах

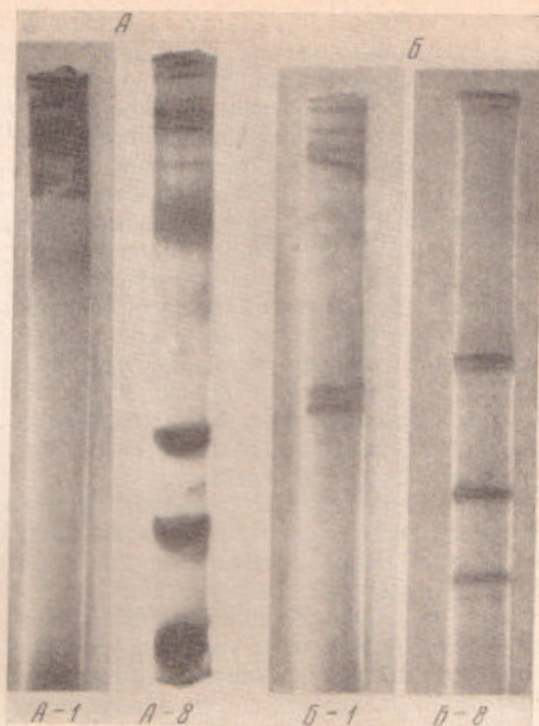


Рис. 3. Электрофоретические диаграммы зародыша (А) и семядолей (В). А-1 и В-1 — 1 день после замачивания, А-8 и В-8 — 8 день после замачивания

Вернера и Черри⁽⁹⁾. Одним из наиболее вероятных механизмов генетической регуляции синтеза различных молекулярных форм пероксидазы считается взаимодействие гормон — ген, поскольку существует множество экспериментальных данных о влиянии ростовых веществ на активность этого фермента и его изозимный состав^(2, 10).

Проведенные в нашей лаборатории предварительные опыты показали, что изменение условий выращивания (естественное освещение, колебания температуры) влечет за собой изменения в пероксидазном комплексе, сопровождающие замедление темпов развития. Установлено, что проростки при выращивании без дополнительного освещения во все сроки наблюдения обладали заметно более низкой пероксидазной активностью, чем при круглосуточном освещении. Так, удельная активность фермента 8-дневных проростков в первом опыте 793,0 ед., во втором 1015,0 ед. В семядолях же на 8 день активность пероксидазы была в первом варианте выше, чем во втором (соответственно 132,0 и 115,6 ед.). На 11—13 день активность фермента в опыте без дополнительного освещения становится меньше, чем при круглосуточном освещении.

Изменение внешних условий повлияло не только на величину активности пероксидазы, но и на ее изозимный спектр. Хотя 8-дневные проростки обоих вариантов внешне по развитию еще не отличались, компоненты III и IV обнаруживались в изозимном составе проростков, выращивавшихся при дневном освещении лишь на 10 день. В изозимном спектре пероксидазы семядолей этих растений изозим III появился на 10 день, а минорный компонент IV, в отличие от варианта с круглосуточным освещением, отсутствовал.

Полученные данные согласуются с представлением о большой лабильности ферментативного аппарата растения. Они подтверждают предположение о том, что система адаптации его в ходе онтогенеза включает образование различных молекулярных форм ферментов.

Институт биохимии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
10 VII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. А. Рубин, Л. Н. Логинова, Усп. совр. биол., 65, 3 (422) (1968). ² L. M. Shannon, Ann. Rev. Plant Physiol., 19, 187 (1968). ³ A. K. Mills, R. K. Crowden, Austral. J. Biol. Sci., 21, 6, 1131 (1968). ⁴ B. Z. Siegel, A. W. Galston, Plant Physiol., 42, 1, 221 (1967). ⁵ O. H. Lowry, J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). ⁶ А. Н. Бояркин, Биохимия, 16, 352 (1951). ⁷ B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404 (1964). ⁸ Э. Пирс, Гистохимия, 1962. ⁹ Э. Е. Хавкин, Индуцированный синтез ферментов в процессах роста и морфогенеза растений, «Наука», 1969. ¹⁰ A. W. Galston, P. J. Davis, Sci., 163, 3873, 1288 (1969).