

Член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ, Т. И. КАРЯКИНА,
Л. И. СИДЕЛЬНИКОВА, Г. С. КАЛОШИНА

ВЛИЯНИЕ СВЕТА НА ИЗОЭНЗИМЫ ГЛЮТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

Известно, что свет индуцирует в растениях синтез некоторых ферментов (1). Поскольку глютаматдегидрогеназа (ГДГ) — ключевой фермент в процессе ассимиляции растениями неорганического азота, большой ин-

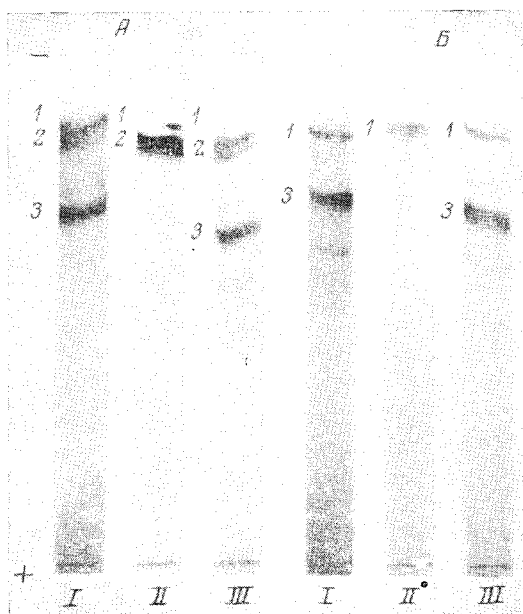


Рис. 1. Зимограммы ГДГ из листочков проростков гороха, выращенных на свету (I), в темноте (этиолированные) (II), этиолированных и затем выдержанных 24 часа на свету (III). А — активность ГДГ с НАД, Б — активность ГДГ с НАДФ; 1 — красноватая полоса, 2 и 3 — синие полосы

терес представляет вопрос о влиянии света на ее изоэнзимный спектр. Это и являлось задачей данной работы.

Опыты проводили с проростками гороха сорта Победитель. Для получения ферментных экстрактов брали: 1) листочки проростков, выращенные на воде: а) при освещении, б) в темноте (этиолированные проростки), в) этиолированные проростки, выставленные на одни сутки на свет и 2) хлоропласты из зеленых листочков.

Ферментные экстракты получали следующим образом:

1. Суммарный ферментный экстракт выделяли из свежих или замороженных сухим льдом листьев. Листья растирали в ступке, и затем экстрагировали водой в отношении 1:1,5 в течение 1,5 часов. Экстракт отжимали через четыре слоя марли, центрифугировали при 10 000 g в течение 30 мин. и после диализа брали в опыт.

2. Хлоропласты получали из свежих зеленых листочков, которые помещали в 0,5 M раствор сахарозы в отношении 1:2 и измельчали в течение 20 сек. в гомогенизаторе при 8000 об/сек. Полученный гомогенат отжимали через два слоя полотна и центрифугировали 8 мин. при 700 g. Осадок хлоропластов дважды промывали 0,5 M раствором сахарозы. Затем суспендировали в воде и оставляли на 1,5 часа при 0°. После центрифугирования надосадочную жидкость использовали в качестве ферментного экстракта. Все выделение ферментных экстрактов вели при 4°.

Электрофорез проводили при 3° С с использованием полиакриламидного геля по методу Дэвиса (2) и Орнштейна (3). Пробы ферментных экстрактов, наносимые на электрофоретические колонки, содержали 100—150 мкг белка. Электрофорез продолжался 1 час 10 мин. при силе тока 3 ма на колонку геля. За это время фронт краски достигал расстояния приблизительно равного 1 см от конца колонки. Расположение полос, соответствующих активности глутаматдегидрогеназы на колонке определяли по образованию формазанов в присутствии глутамата, НАД или НАДФ, ФМС и нитротетразолиевого синего (4). Интенсивность полос замеряли на саморегистрирующем микрофотометре МФ-4 специального изготовления. Контролем служили прокипяченные ферментные экстракты и реакционная смесь без субстрата. Белок в экстрактах определяли по методу Лоури (5).

Изоэнзимный спектр глутаматдегидрогеназы представлен на рис. 1 и 2. НАД-специфичная глутаматдегидрогеназа из листьев растений, выращенных на свету, образует три полосы: одну красноватую полосу и две синих. Экстракт из этиолированных листочков дает только две полосы активности: одну красноватую и одну синюю. После выставления проростков на свет на одни сутки изоэнзимный спектр получается такой же как у выросших на свету растений (рис. 1А, 2А).

Изоэнзимный спектр НАДФ-специфичной глутаматдегидрогеназы (рис. 1Б, 2Б) из листочков проростков, выращенных на свету, состоит из двух полос — одной красноватой и одной синей, которая по R_f совпадает с синей полосой 3 НАД-специфичной глутаматдегидрогеназы (рис. 1А). Экстракт из этиолированных листочков дает только одну красноватую полосу. После выставления этиолированных проростков на свет, изоэнзимный спектр НАДФ-специфичной глутаматдегидрогеназы также восстанавливается.

На основании полученных данных можно было предположить, что один из изоферментов глутаматдегидрогеназы (полоса 3) специфичен как к НАД, так и к НАДФ и индуцируется светом. Для подтверждения этого предположения нами были получены ферментные экстракты из хлоропластов проростков, выращенных при нормальном освещении. Результаты, представленные на рис. 3, показывают, что глутаматдегидрогеназа из хлоропластов специфична как к НАД, так и к НАДФ и образует лишь

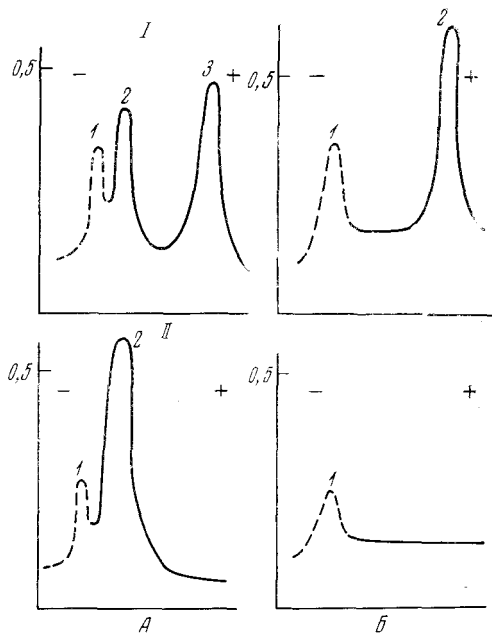


Рис. 2. Денситограмма полос, характеризующих активность НАД и НАДФ — глутаматдегидрогеназ. Все обозначения как на рис. 1

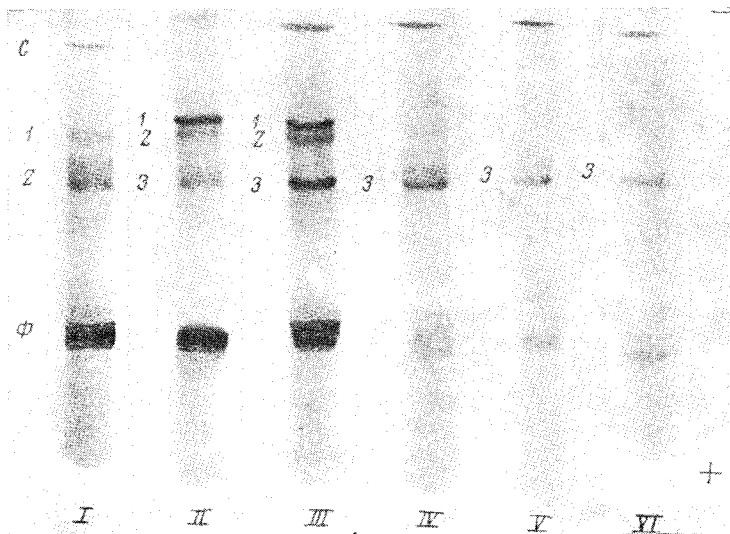


Рис. 3. Зимограммы ГДГ из зеленых листочков и хлоропластов. I — Активность ГДГ с НАДФ суммарного ферментного экстракта из зеленых листочков. II — то же, что I, но с НАД. III — то же, что II + ферментный экстракт из хлоропластов. IV — активность ГДГ с НАД ферментного экстракта из хлоропластов. V — то же, что IV, но с НАДФ. VI — то же, что V + НАД. 1, 3 — синие полосы, 2 — красноватая полоса, C — старт, Φ — фронт

одну полосу. Эта полоса совпадает по Rf с синей полосой активности 3 для ГДГ — НАД и для ГДГ-НАДФ из суммарного ферментного экстракта зеленых листочков (рис. 3).

Таким образом нам удалось показать, что локализованный в хлоропластах растворимый изофермент глутаматдегидрогеназы растений, специфичный как к НАД, так и к НАДФ, индуцируется светом. На изофермент глутаматдегидрогеназы, специфичной только к НАД (верхняя синяя полоса), свет не оказывает влияния.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
21 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ph. Filner, J. L. Wray, J. E. Varner, Science, 165, 358 (1969). ² B. J. Davies, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, Part 2, 404 (1964). ³ L. Ornstein, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, Part 2, 321 (1964). ⁴ D. A. Thurman, C. Palin, M. V. Lausock, Nature, 207, 493 (1965). ⁵ O. Lowry, N. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).