

УДК 541.144.7 + 581(132 + 174)

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК, Н. И. АХРАМОВИЧ

# СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПИГМЕНТНЫХ ФОНДОВ ПРИ ФРАКЦИОНИРОВАНИИ ГОМОГЕНАТА И ХЛОРОПЛАСТОВ ЛИСТЬЕВ ЯЧМЕНЯ С ПОМОЩЬЮ ДЕЗОКСИХОЛАТА

Успешное фракционирование фотосинтетического аппарата пшпината на два типа частиц (<sup>1</sup>) положило начало работам по разделению систем I и II фотосинтеза с помощью детергентов. Установлено, что легкие фрагменты хлоропластов оптически и функционально соответствуют пигментной системе I. Проведенное в нашей лаборатории изучение пигментных фондов фракций, полученных после растирания зеленых листьев ячменя, показало, что и в этом случае легкие частицы характеризуются более высоким соотношением количеств хлорофиллов а : b (<sup>2</sup>) и преобладанием длинноволновой полосы флуоресценции (<sup>3</sup>). Кроме того, они содержат в своем пигментном фонде больше свежееобразованных молекул хлорофиллов а и b (<sup>4</sup>), обогащены протохлорофиллидом (<sup>5</sup>), хлорофиллидом (<sup>6</sup>), а также ферментами, осуществляющими терминальные стадии биосинтеза хлорофилла (<sup>4</sup>, <sup>6</sup>). Аналогичные характеристики легких частиц были получены и при фракционировании дигитонином (<sup>3</sup>). Однако в этом случае обогащение легкой фракции молодыми молекулами хлорофилла а регистрировалось лишь при малой концентрации дигитонина (<sup>8</sup>), возможно, ввиду лабильности пигментных фондов детергентом (<sup>7</sup>).

Совокупность этих данных, наряду с наблюдениями над зеленением этиолированных проростков и действием ряда агентов (<sup>3</sup>), позволила выдвинуть гипотезу о существовании и частичном выделении особых

Таблица 1  
Распределение хлорофиллов а и b по фракциям

Фракция	Количество хлорофиллов а + b, %		Отношение содержания хлорофиллов а : b	
	гомогенат	хлоропласты	гомогенат	хлоропласты
Исходный материал	100	100	3,04±0,08	2,81±0,06
Осадок 1000 g	18,4±2,5	35,9±5,6	2,75±0,04	2,71±0,03
Осадок 10 000 g	36,5±2,5	42,7±1,1	2,58±0,10	2,51±0,03
Осадок 48 000 g	30,4±2,2	13,5±4,0	3,06±0,10	2,87±0,07
Супернатант 48 000 g	14,5±1,6	8,00±2,3	5,01±0,20	3,90±0,21

частиц хлоропластов, являющихся центрами биосинтеза хлорофилла (<sup>2-6</sup>, <sup>8-10</sup>). Характеристики фракций, обогащенных центрами биосинтеза хлорофилла, коррелируют со свойствами, обычно приписываемыми частицам фотосистемы I. На основании этого было сделано предположение об участии этих центров в формировании прежде всего единиц системы I (<sup>3</sup>, <sup>4</sup>, <sup>6</sup>, <sup>8-10</sup>). Результаты настоящей работы делают это представление еще более обоснованным благодаря использованию для фракционирования хлоропластов дезоксихолата, который, по имеющимся данным (<sup>11</sup>), позволяет хорошо разделить две фотосистемы.

Опыты проводили с 7—8-дневными проростками ячменя, ассимилировавшими C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> в течение 10—60 мин. Гомогенат из этих проростков получали по (<sup>12</sup>). В варианте с выделением хлоропластов проростки растирали



5—10 мин. при 0—2° в трис-буфере, pH 8,0, с 0,55 M сахарозой и 0,01 M KCl. Массу пропускали через 2 слоя капрона и центрифугировали 15 мин. при 1000 g. Осадок хлоропластов промывали трис-буфером и повторно центрифугировали 15 мин. при 6000 g. Содержание хлорофиллов а + b в суспензии хлоропластов доводили до 200 мкг/мл и продолжали работу по методике <sup>(12)</sup>, описанной выше для гомогената. Процесс выделения хлоропластов был более длительным, чем получение гомогената, и занимал 90 мин. после ассимиляции C<sup>14</sup>O<sub>2</sub>. В обоих вариантах осадки и последний супернатант фиксировали ацетоном. Пигменты гомогената, суспензии хлоропластов и фракций переводили из ацетона в диэтиловый эфир и регист-

Таблица 2

Удельная радиоактивность пигментов во фракциях, полученных из гомогената зеленых листьев ячменя и из хлоропластов

Фракция	У хлорофилла а		У хлорофилла b	
	гомогенат	хлоропласты	гомогенат	хлоропласты
Исходный материал	1,0	1,0	1,0	1,0
Осадок 1000 g	0,78±0,07	0,97±0,02	0,85±0,06	1,00±0,01
Осадок 10 000 g	0,93±0,04	0,95±0,04	1,02±0,06	0,97±0,03
Осадок 48 000 g	0,98±0,03	0,92±0,03	1,03±0,06	1,10±0,11
Супернатант 48 000 g	1,08±0,03	0,89±0,04	2,47±0,47	1,84±0,58

рировали их спектры поглощения на СФ-5. Количества хлорофиллов а и b рассчитывали по <sup>(12)</sup>. Удельную радиоактивность (у.а.) хлорофиллов а и b определяли по <sup>(14)</sup>. Содержание протохлорофиллида во фракциях находили по <sup>(15)</sup>.

При фракционировании гомогената основное количество хлорофиллов а + b было связано с частицами, осаждаемыми при 10 000 и 48 000 g (табл. 1). В варианте с фракционированием хлоропластов 80% хлорофиллов было сосредоточено в осадках 1000 и 10 000 g. Осадок 10 000 g, типичный для системы II, в обоих вариантах содержал около 40% суммы хлорофиллов и обладал самым низким отношением а : b. Количество хлорофиллов в супернатанте 48 000 g в варианте с гомогенатами было в 2 раза, а в варианте с хлоропластами в 5 раз меньше, чем в осадке 10 000 g. Супернатанты 48 000 g характеризовались самым высоким отношением количества хлорофиллов а : b. В случае фракционирования гомогенатов это отношение в супернатанте 48 000 g превышало отношение в супернатанте 48 000 g превышало отношение в осадке 10 000 g в 2,0 ± 0,1 раза. В варианте с хлоропластами это превышение было ниже и составляло 1,6 ± 0,1.

О распределении возникших после ассимиляции C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> молекул хлорофиллов свидетельствуют отношения у.а. пигментов каждой фракции к их у.а. до фракционирования (табл. 2). Величины, меньшие единицы, соответствуют пигментным фондам с повышенной по сравнению с исходной пробой долей ранее существовавших молекул, а превышение над единицей означает обогащение новыми молекулами. При фракционировании и гомогената, и хлоропластов наблюдалось обогащение супернатанта 48 000 g свежееобразованными молекулами хлорофилла b. Отношение у.а. крайних фракций составляет 2,9 для гомогената и 1,8 для хлоропластов. При сопоставлении разных опытов наблюдалась зависимость этой величины от содержания хлорофиллов в супернатанте 48 000 g. С увеличением количества пигментов, поступивших в супернатант, отношение у.а. хлорофилла b крайних фракций падало.

В опытах с гомогенатами фракция самых легких частиц характеризовалась и более высокой у.а. хлорофилла а (табл. 2) по сравнению с другими фракциями. Превышение у.а. этого пигмента в супернатанте 48 000 g над осадком 1000 g составляло 1,4 раза. Несколько иная закономерность наблюдалась для хлорофилла а в варианте с фракционированием хлоро-



пластов. В этом случае статистически надежные различия у.а. отсутствовали, но преобладала скорей тенденция к снижению у.а. хлорофилла а с уменьшением размеров частиц. В супернатанте 48 000 g у.а. хлорофилла а была в среднем в 1,1 меньше, чем в осадке 1000 g (табл. 2).

Кроме суспензии хлоропластов фракционированию подвергали и надосадочную жидкость, оставшуюся после 15-минутного осаждения хлоропластов при 1000 g. Ее обрабатывали 0,4% дезоксихолатом и 0,15 M KCl и центрифугировали 50 мин. при 48 000 g. Осадок содержал  $72 \pm 4\%$  общего количества хлорофиллов надосадочной жидкости и обладал низким отношением а : b (табл. 3), типичным для фракции хлоропластов, осаждае-

Таблица 3

Распределение хлорофиллов а и b по фракциям и изменение у.а. пигментов при фракционировании надосадочной жидкости

Фракция	Отношение содержания хлорофиллов а : b	У.а. после разделения по отношению к исходной	
		хлорофилл а	хлорофилл b
Исходная суспензия хлоропластов	$2,81 \pm 0,06$	1,0	1,0
Надосадочная жидкость	$2,90 \pm 0,10$	$1,03 \pm 0,04$	$1,05 \pm 0,04$
Осадок 48 000 g	$2,51 \pm 0,04$	$1,00 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,04$
Супернатант 48 000 g	$4,14 \pm 0,26$	$1,03 \pm 0,05$	$1,21 \pm 0,10$

мой при 10 000 g. В супернатанте величина этого отношения в отдельных опытах достигала 4,6, а в среднем составила 4,1. У.а. хлорофилла а в полученных фракциях, как и в не обработанной детергентом надосадочной жидкости, была близка к у.а. хлорофилла а в исходной суспензии хлоропластов (табл. 3). Для хлорофилла b были получены различия, подобные наблюдавшимся при фракционировании суспензии хлоропластов.

Определение относительного содержания протохлорофиллида во фракциях гомогената и хлоропластов обнаружило обогащение супернатанта 48 000 g этим предшественником хлорофилла. Растения одного варианта перед взятием пробы находились при естественном освещении, другого — помещались на 22—24 часа в темноту. Разность между этими вариантами характеризовала накопление протохлорофиллида в темноте в каждом опыте. Полученные для гомогената результаты показывают, что в обоих вариантах относительное содержание протохлорофиллида в супернатанте 48 000 g выше, чем в осадке 10 000 g (табл. 4). Особенно большая избирательность наблюдалась в распределении по фракциям протохлорофиллида, накопившегося в темноте (<sup>5</sup>). При фракционировании хлоропластов обогащение мелких частиц протохлорофиллидом, обнаруживаемым после затемнения, было в 1,3 раза большим, чем для гомогената.

Итак, результаты фракционирования гомогената и суспензии хлоропластов показывают, что легкие частицы (супернатант 48 000 g) в обоих вариантах обладают повышенным соотношением количества хлорофиллов а : b по сравнению с другими фракциями и особенно с осадком 10 000 g. Как показано ранее, частицы, полученные после фрагментирования гомогенатов дезоксихолатом, обнаруживают обогащение либо  $\beta$ -каротином, либо лютеином, описанное в литературе соответственно для систем I и II при действии иных агентов.

Высокие у.а. хлорофиллов а и b в супернатанте 48 000 g свидетельствуют о преимущественной локализации новых молекул обоих пигментов в легких частицах, что наблюдалось и у фракций, полученных после механического фрагментирования хлоропластов (<sup>4</sup>). Снижение у.а. хлорофилла по мере перехода от фракций тяжелых к фракциям более легких частиц в варианте с хлоропластами, очевидно, является отражением высокой лабильности молодых молекул хлорофилла а (<sup>3, 7, 14</sup>), которые в этом случае разрушаются (у.а. всех фракций меньше исходной) в большей степени, поскольку для выделения хлоропластов требовался втрое более длитель-



Таблица 4

Относительное содержание протохлорофиллида (в расчете на единицу хлорофилла а) в супернатанте 48 000 g и осадке 10 000g, полученных при фракционировании гомогената и хлоропластов (в скобках указано число повторных опытов)

Вариант	Гомогенат			Хлоропласты		
	осад. 10 000 g	суперн. 48 000 g	суперн. 48000 g осад. 10 000 g	осад. 10 000 g	суперн. 48 000 g	суперн. 48000 g осад. 10 000 g
Освещаемые листья	4,91±0,71 (7)	8,91±0,51 (7)	1,88±0,16 (7)	4,70 (1)	6,26 (1)	1,34 (1)
Листья после 22—24 час. темноты	5,41±0,71 (7)	14,73±1,45 (7)	2,65±0,39 (7)	4,66 ±0,24 (4)	15,50±1,73 (4)	3,40±0,51 (4)
Увеличение содержания протохлорофиллида в темноте	0,74±0,09 (5)	3,70±0,79 (5)	4,99±0,76 (5)	0,67 (1)	4,34 (1)	6,48 (1)

ный промежуток времени, чем для приготовления гомогената. А так как за время пребывания растений в камере и выделения хлоропластов могло обновиться лишь до 1% молекул хлорофилла (<sup>14</sup>), то разрушение даже очень малой, не поддающейся регистрации, доли этих молекул может привести к падению у.а. хлорофилла а в супернатанте 48 000 g. Предположение о вымывании материала, несущего молодые молекулы хлорофилла, в процессе выделения хлоропластов отвергается данными по фракционированию надосадочной жидкости, оставшейся после 15-минутного осаждения хлоропластов при 1000 g. У.а. хлорофилла а в ней, как во фракциях, полученных после ее фрагментирования дезоксихолом, очень близка к у.а. хлорофилла а в исходной суспензии хлоропластов. Существование единого в своей основе типа фрагментирования хлоропластов и гомогената подтверждается данными об обогащении супернатанта 48 000 g протохлорофиллидом, являющимся предшественником возникающих молекул хлорофилла а. Результаты, опубликованные нами ранее (<sup>12</sup>), свидетельствуют о преимущественной локализации в супернатанте 48 000 g и еще более непосредственного предшественника хлорофилла — хлорофиллида, а также фермента, катализирующего процесс его фитолизаии в хлорофилл а.

Все приведенные данные означают, что легкие частицы содержат материал, наиболее активно осуществляющий метаболизм хлорофилла в зеленом растении. Это далее развивает выдвинутое в нашей лаборатории представление об обогащении этой фракции центрами, в которых происходит формирование новых молекул хлорофиллов а и б.

Лаборатория биофизики и изотопов  
Академии наук БССР  
Минск

Поступило  
12 V 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 N. K. Bardman, I. M. Anderson, Nature, 203, 166 (1964); Adv. in Enzymol., 30, 1 (1968).
- 2 А. А. Шлык, Л. И. Фрадкин и др., ДАН, 167, 3 (1966).
- 3 А. А. Shlyk, I. V. Prudnikova et al., In: Progress in Photosynthesis Research Tübingen, 1969, p. 572.
- 4 А. А. Шлык, И. В. Прудникова, ДАН, 160, 720 (1965); Photosynthetica, 1, 157 (1967).
- 5 А. А. Шлык, Г. Е. Савченко, ДАН, 176, 1437 (1967).
- 6 А. А. Shlyk, L. I. Vlasenok et al., Studia biophysica, 5, 17 (1967).
- 7 А. А. Шлык, В. И. Гапоненко и др., ДАН, 188, 1189 (1969).
- 8 Р. А. Чканикова, Кандидатская диссертация, Минск, 1971.
- 9 А. А. Шлык, Л. К. Суховер, ДАН, 181, 1274 (1968).
- 10 А. А. Шлык, Л. И. Фрадкин и др., III конфер. физiol. и биохим. раст. Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, 1968, стр. 233.
- 11 C. Brill, D. I. Van der Host et al., Biochim. et biophys. acta, 172, 345 (1969).
- 12 А. А. Шлык, Н. И. Ахрамович, ДАН, 194, № 2 (1970).
- 13 C. L. Somar, F. P. Zscheile, Plant Physiol., 17, 198 (1942).
- 14 А. А. Шлык, Метаболизм хлорофилла в зеленом растении, Минск, 1965.
- 15 А. А. Шлык, Г. Е. Савченко, Н. Г. Аверина, Биофизика, 14, 119 (1969).