

Е. В. БУДИЛОВА, Б. А. РУБИН, М. А. ИВАНОВА, М. А. СЕМЕНОВА

ИЗОФЕРМЕНТЫ ПЕРОКСИДАЗЫ В ЛИСТЬЯХ КУБЫШКИ  
(*NUPHAR LUTEUM*)

(Представлено академиком А. И. Опариным 16 XII 1970)

Для большинства ферментов найдено существование множественных молекулярных белковых форм (<sup>1,2</sup>). Белок пероксидазы также состоит из набора изоферментов. Отдельные работы, в которых проводилось выделение, очистка некоторых индивидуальных изоферментов пероксидазы, показали, что эти фракции могут отличаться друг от друга не только электрофоретически, но и по отношению к ингибиторам, субстратам, по оптимуму pH, по локализации внутри клетки и другим биохимическим свойствам (<sup>3,4</sup>). Изучение особенностей изоферментных спектров различных органов и тканей растения, обладающих разными физиологическими функциями или отличающихся биохимически, а также изменения этих спектров в различные периоды жизни растения, в различных условиях может служить одним из путей к выяснению биологической роли существования гетерогенности ферментных белков.

В данной работе сравнивался изоферментный состав и общая активность пероксидазы в плавающих и погруженных листьях разного возраста у полупогруженного растения — кубышки (*Nuphar luteum*). Плавающие и погруженные листья этого водного растения находятся в разных условиях снабжения кислородом и, по-видимому, в связи с этим отличаются друг от друга некоторыми особенностями окислительного обмена (<sup>5</sup>). В работе использовались растения, выросшие в открытом водоеме филиала Ботанического сада МГУ \*.

Для получения экстракта листья без средней жилки замораживали сухим льдом, а затем растирали с песком в ступке с 20 объемами 0,05 М трис-глицинового буфера pH 8,2, содержавшего цистеин (0,01 М), капрон (1 г на 1 г ткани) и тритон X-100 (1 мл на 1 г ткани). После экстрагирования гомогенат отжимали через капроновую сетку, а фильтрат центрифугировали 15 мин. при 18 000 g. Полученный экстракт подвергали частичной очистке. Из прозрачного центрифугата белковую фракцию, содержащую активную пероксидазу осаждали (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 85% насыщения. Осадок растворяли в 0,05 М трис-глициновом буфере pH 8,2 и очищали на колонке с сефадексом Г-50. Все операции проводили на холоду.

В полученном экстракте изоферменты пероксидазы разделяли путем электрофореза в 7,5% акриламидном геле со щелочным буфером (<sup>6,7</sup>). Параллельно проводили электрофорез неочищенных экстрактов. Электрофореграммы частично очищенных по описанному методу и неочищенных экстрактов были во всех случаях одинаковыми. Все закономерности, установленные для очищенных экстрактов, наблюдались и на неочищенных. Следовательно, очистка не внесла вторичных нежелательных изменений. Как правило, на трубочку наносили 0,05 мл экстракта, содержавшего 10—20 мкг белка. Разделение проводили к аноду при 5 ма на трубочку в течение 45—50 мин. В нефиксированных столбиках геля определяли активность пероксидазы по цветной реакции с бензидином (<sup>8</sup>). Окрашенные столбики фотографировали и фотометрировали на микрофотометре МФ-4.

\* Пользуемся случаем выразить глубокую благодарность сотруднику ботанического сада А. А. Некрасову за предоставленную возможность работать с кубышкой.

В экстрактах, полученных после пропускания через сефадекс Г-50, определяли белок по Лоури<sup>(9)</sup> и активность пероксидазы тремя методами: по окислению бензидина<sup>(10)</sup>, пирогаллола<sup>(11)</sup> и НАДН<sub>2</sub><sup>(12,13)</sup>. Активность по методу Бояркина определяли также в неочищенных экстрактах. Активность по окислению бензидина выражали в условных единицах на 1 мг белка, а в случае неочищенных экстрактов — на 1 г ткани. При окислении пирогаллола проба объемом 4,5 мл содержала: 0,022 М фосфатный буфер pH 7,4; 45  $\mu$ мол. пирогаллола; 0,75 мл 0,08% раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0,1 мл экстракта листа (0,002—0,004 мг белка). Определяли изменение оптической плотности на ФЭК в течение 2 мин. Активность фермента в этом случае рассчитывали по формуле:  $\Delta A\alpha\beta/\text{мин.}$  на 1 г белка, где  $\Delta A$  — изменение оптической плотности,  $\alpha$  — разведение в пробе,  $\beta$  — степень предварительного разведения экстракта. При окислении НАДН<sub>2</sub> проба объемом 3 мл содержала: 0,3  $\mu$ моля НАДН<sub>2</sub>; 0,03  $\mu$ моля MnCl<sub>2</sub>; 0,05  $\mu$ моля флороглucinина; 0,066 М фосфатный буфер pH 7,4; 0,5 мл экстракта листа (0,1—0,2 мг белка). Определяли изменение оптической плотности при 340 м $\mu$  в течение 10 мин. на СФ-4А. Активность фермента рассчитывали по формуле  $\Delta A\alpha/\text{час}$  на 1 мг белка, где  $\Delta A$  — изменение оптической плотности,  $\alpha$  — разведение в пробе. Необходимо подчеркнуть, что в исследовавшихся нами экстрактах не были обнаружены положительно заряженные изоферменты пероксидазы, несмотря на то что разделение продолжалось 5 час. В этих же условиях фронт соответствующих изоферментов кристаллической пероксидазы из хрена доходил до нижнего конца мелкопористого геля.

Отрицательно заряженные изоферменты пероксидазы в листьях кубышки в наших опытах делились путем электрофореза в основном на 2 группы: быстро и медленно двигавшиеся компоненты. Электрофореграммы из плавающего и погруженных листьев резко отличались друг от друга (рис. 1). Число быстро двигавшихся компонентов в экстракте из плавающего листа было значительно больше, чем в экстрактах из погруженных. Кроме того, в экстрактах из погруженных листьев между быстро и медленно двигавшимися фракциями обнаруживалась дополнительная полоса, которая не наблюдалась на электрофореграммах, полученных для плавающих листьев. Отличие в изоферментном составе пероксидазы из этих листьев коррелировало с различием в общей активности фермента. В соответствии с данными Логиновой<sup>(9)</sup>, активность пероксидазы в экстрактах из погруженных листьев в наших опытах всегда была выше, чем в экстрактах из плавающих (табл. 1). Эта закономерность наблюдалась во всех случаях, несмотря на колебания активности фермента в листьях, взятых с разных растений. Такая особенность погруженных листьев кубышки может быть связана с повышенной ролью в них пероксидазы из-за низкой интенсивности дыхания (поглощения кислорода) и низкой величины дыхательного контроля<sup>(14)</sup>.

Электрофореграммы для погруженных листьев разного возраста также отличались друг от друга (рис. 1). В экстрактах из стареющих погруженных листьев общее количество изоферментов было таким же, как в экстрактах из молодых, но разделение на отдельные фракции в области мед-

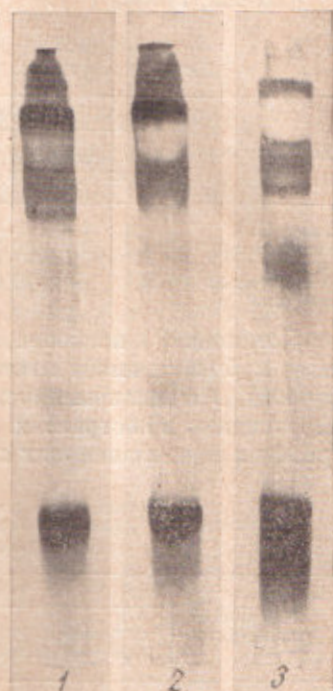


Рис. 1. Электрофореграммы изоферментов пероксидазы в листьях кубышки. Лист погруженный старый (1), погруженный молодой (2), плавающий (3)

ленно двигавшихся компонентов наблюдалось более четко. Листья разного возраста в наших опытах отличались и по величине общей активности пероксидазы. Старые погруженные листья обладали более высокой активностью чем молодые (табл. 1). Эти результаты согласуются с данными по увеличению активности пероксидазы при старении листьев яблони <sup>(14)</sup>, гороха, бобов, табака <sup>(15)</sup>.

Таблица 1

Активность пероксидазы в листьях кубышки (*Nuphar luteum*)

| Характер листа | После очистки                     |      |                                     |       |                                              |       |     | Без очистки                       |     |     |     |
|----------------|-----------------------------------|------|-------------------------------------|-------|----------------------------------------------|-------|-----|-----------------------------------|-----|-----|-----|
|                | по бензидину<br>ед. на 1 мг белка |      | по пирогаллолу<br>ед. на 1 мг белка |       | по НАДН <sub>2</sub><br>ед. на 1 мг<br>белка |       |     | по бензидину,<br>ед. на 1 г ткани |     |     |     |
| Плавающий      | 14,3                              | 30,6 | —                                   | 0,157 | 0,198                                        | —     | 5,8 | —                                 | 166 | 210 | —   |
| Погруженный    | 77,7                              | 37,7 | 123,7                               | 0,454 | 0,257                                        | 0,533 | 7,1 | 13,4                              | 236 | 334 | 470 |
| старый         |                                   |      |                                     |       |                                              |       |     |                                   |     |     | 348 |
| Погруженный    | 36,8                              | —    | 59,4                                | 0,390 | —                                            | 0,331 | —   | 8,8                               | 216 | 286 | 364 |
| молодой        |                                   |      |                                     |       |                                              |       |     |                                   |     |     | 178 |

Логинава <sup>(5)</sup> показала, что при полном удалении всех плавающих листьев кубышки имеет место увеличение активности пероксидазы в погруженных. Эта закономерность подтвердилась и в наших опытах. Активность пероксидазы в экстрактах из погруженных листьев через 6 дней после срезания всех плавающих сильно возрастала (табл. 2).

Таблица 2

Влияние удаления плавающих листьев кубышки (*Nuphar luteum*) на активность пероксидазы в погруженных

| Условия<br>определения | После очистки                      |                                      |                                                | Без очистки                       |     |       |       |
|------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------|-----|-------|-------|
|                        | по бензидину,<br>ед. на 1 мг белка | по пирогаллолу,<br>ед. на 1 мг белка | по НАДН <sub>2</sub> ,<br>ед. на 1 мг<br>белка | по бензидину, ед. на 1 г<br>ткани |     |       |       |
| До удаления            | 37,7                               | —                                    | 7,1                                            | 236                               | 334 | 216 * | 286 * |
| После удаления         | 55,5                               | 0,257                                | 14,0                                           | 348                               | 400 | 290 * | 332 * |

\* Молодые листья.

Количество изоферментов пероксидазы в экстрактах из этих оставшихся после срезания листьев не изменилось, но неоднократно наблюдалось снижение экстрафторетический подвижности отдельных компонентов спектра, характеризующего молодой погруженный лист.

Наличие особенностей изоферментного состава пероксидазы в погруженных и плавающих листьях, отличающихся между собой по окислительному обмену, а также по уровню общей активности пероксидазы, подчеркивает физиологическое значение молекулярной гетерогенности этого фермента. Увеличение активности пероксидазы в погруженных листьях после срезания плавающих подтверждает гипотезу о приспособительной роли изучавшегося фермента.

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

Поступило  
1 XII 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup>В. И. Яковлева, Усп. биол. хим., 9, 53 (1968). <sup>2</sup>L. M. Shannon, Ann. Rev. Plant Physiol., 19, 187 (1968). <sup>3</sup>E. Kay, L. M. Shannon, J. Y. Lew, J. Biol. Chem., 242, 2470 (1967). <sup>4</sup>P. Renon et al., Phytochem., 9, 73 (1970). <sup>5</sup>Б. А. Рубин, Л. Н. Логинава, Биохимия, 30, 681 (1965). <sup>6</sup>B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 2, 404 (1964). <sup>7</sup>В. И. Сафонов, М. П. Сафонова, Физиол. раст., 16, 2, 350 (1969). <sup>8</sup>Э. Пирс, Гистохимия, 1962. <sup>9</sup>O. H. Lowry, A. L. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). <sup>10</sup>А. Н. Бояркин, Биохимия, 16, 352 (1951). <sup>11</sup>D. C. McCune, A. W. Galston, Plant Physiol., 34, 416 (1959). <sup>12</sup>T. Akazawa, E. E. Conn, J. Biol. Chem., 232, 1 (1958). <sup>13</sup>Т. М. Иванова, Б. А. Рубин, Биохимия, 27, 622 (1962). <sup>14</sup>Н. М. Сисакян, Б. А. Рубин, Биохимия, 9, 307 (1944). <sup>15</sup>A. Novacky, R. E. Hampton, Phytopathol., 58, 301 (1968).