

Л. И. ФРАДКИН, В. М. КОЛЯГО,
член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ОБРАБОТАННЫХ ДИГИТОНИНОМ ХЛОРОПЛАСТОВ ЯЧМЕНЯ МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

В предыдущих работах развита концепция, согласно которой образование хлорофиллов в растениях протекает в особых центрах биосинтеза, содержащих полиферментный комплекс хлорофилл-синтазы (¹, ²). При дифференциальном центрифугировании хлоропластов, разрушенных только растиранием или с помощью ультразвука, дигитонина (¹, ²) или дезокси-холата (³) обнаруживалось преобладание в некоторых фракциях (у высших растений — фракциях легких частиц) показателей, которые характеризуют хлорофиллсинтезирующий аппарат. Распределение этих показателей по фракциям коррелировало с типичным распределением частиц фотохимической системы I при дифференциальном центрифугировании фрагментов хлоропластов после обработки дигитонином (⁴). В связи с тем, что дифференциальное центрифугирование разделяет фрагменты мембран главным образом на основании их массы и внешних характеристик и частицы различной природы могут оказаться в одной и той же фракции, казалось полезным использовать для изучения распределения центров биосинтеза хлорофилла другой более избирательный по отношению к природе частиц метод разделения. Для этого было применено фракционирование хлоропластов электрофорезом в полиакриламидном геле после обработки 4% дигитонином.

Хлоропласты выделяли из 7—9-дневных листьев ячменя по методу (⁴) и суспензировали в 0,005 M трис-HCl буфере, pH 7,6. К суспензии добавляли раствор дигитонина до конечной концентрации 4% так, чтобы соотношение дигитонин/хлорофилл было не меньше 130. Суспензию встряхивали и наслаивали на поверхность геля. Между добавлением к хлоропластам дигитонина и подачей напряжения проходило 10 мин. Использовали 5% раздельный и 2,5% концентрирующий гель без добавления детергента и 0,005 M трис-глициновый буфер, pH 8,3 в качестве электродного. Помимо электрофореза фрагментов хлоропластов проводили электрофорез осадков 10 000 g (D10) и 144 000 g (D144), полученных после предварительной обработки хлоропластов 0,5% дигитонином по (⁴). В этом случае перед электрофорезом дигитонин не добавляли. Спектры флуоресценции при —196° регистрировали на установке, описанной ранее (⁵), при возбуждении ртутно-кварцевой лампой СВД-120А со светофильтром СЗС-22. Регистрацию осуществляли с фотомножителем ФЭУ-38 при спектральной ширине щелей монохроматора 2 мк. Спектры не исправлены на спектральную чувствительность установки.

Пигменты извлекали из геля поочередной экстракцией ацетоном и петролейным эфиром и разделяли на фитопизированные и бесфитольные по (⁶). Содержание хлорофиллов определяли по Смиту и Бенитезу (⁷). Содержание протохлорофиллида определяли на спектрофлуорометре ЦКБ АМН СССР, прокалиброванном по растворам очищенного протохлорофиллида.

При электрофорезе фрагментов хлоропластов более половины хлорофилла оставалось на поверхности геля. Остальной материал двигался к аноду,

разделяясь на пять зон (рис. 1). Зона 2 состояла из трех полос, которые имели одинаковые спектральные характеристики и отдельно не анализировались. Ниже приведены средние данные о распределении хлорофиллов в электрофоретических зонах. Зоны 2, 3, 4, содержащие в сумме около 14% хлорофилла, обладали повышенным отношением количеств хлорофиллов a/b . В зоне 5 это соотношение было наименьшим.

Зона	0	1	2	3	4	5
Количество хлорофиллов $a + b$, %	64,8	14,6	6,5	3,9	3,1	6,9
Отношение a/b	3,0	3,2	3,6	5,5	6,1	1,6

На рис. 2 представлены спектры флуоресценции электрофоретических зон. Спектр частиц, оставшихся на поверхности геля, повторял спектр зоны 1 и отдельно не приводится. Спектр флуоресценции зоны 1 содержал полосы близкой интенсивности при 683 и 737 м μ и слабую полосу около

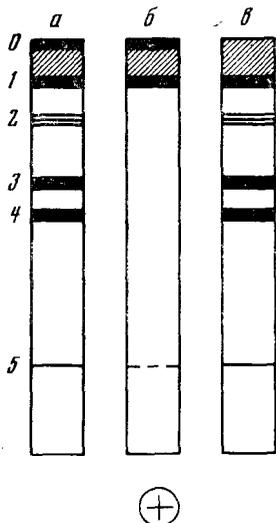


Рис. 1. Электрофоретическое разделение фрагментов хлоропластов ячменя, обработанных 4% дигитонином (*a*), и осадков после дифференциального центрифугирования фрагментов хлоропластов, обработанных 0,5% дигитонином по (*б*) (6 — 10 000 г, *в* — 144 000 г). Заштрихованный участок соответствует положению концентрирующего геля

698 м μ . Спектр зоны 2 отличался положением максимума длинноволновой полосы при 734 м μ , меньшей выраженностью полосы 698 м μ и увеличением вклада коротковолновой полосы со сдвигом ее максимума к 680 м μ . Это положение коротковолновой полосы флуоресценции характерно и для более подвижных электрофоретических зон, однако в зонах 3 и 4 (с очень близкими спектрами) длинноволновая полоса при 734 м μ сильно преобладает, превышая полосу при 680 м μ в 2 и более раз. Спектр флуоресценции зоны 5 имел основную полосу при 680 м μ и структуру в длинноволновой области спектра с максимумами и «плечами» около 698, 717, 735, 755 м μ .

Обработка хлоропластов дигитонином вызывала нарушение нативного состояния пигмент-липопротеидных комплексов, выражающееся в увеличении относительной величины и в небольшом «сигнем» сдвиге коротковолновой полосы флуоресценции. Возможно, изменение соотношения полос связано с частичным нарушением переноса энергии от коротковолновой формы к длинноволновым. Можно полагать, что именно комплексы с нарушенной структурой определяют коротковолновую флуоресценцию зон 2, 3, 4. В пользу этого говорит тот факт, что при промывании буфером геля каждой из этих зон, продавленного через капрон, комплексы с флуоресценцией при 680 м μ извлекаются в первую очередь. В зонах 3, 4 остается длинноволновая полоса при 730 м μ с небольшой примесью свечения при 680—690 м μ . В зоне 2, кроме длинноволновой полосы, остается уменьшенная промыванием полоса при 683 м μ и четче проявляется полоса при 697 м μ .

В спектрах поглощения всех зон преобладала полоса с максимумом при 676—678 м μ . Таким образом, комплексы зон 3, 4 с длинноволновой флуо-

ресценцией после промывания буфером имеют набор форм хлорофилла с почти полным стоком энергии от коротковолновых форм на длинноволновые.

Для уточнения природы зон провели электрофорез осадков Д10 и Д144 (рис. 1). У осадка Д10 только материал, содержащий приблизительно 10% хлорофиллов, входил в гель и образовывал зону 1 и крайне слабую зону, аналогичную пятой. Основная масса веществ оставалась на поверхности концентрирующего геля. Осадок Д144, наоборот, не содержал частиц, не входящих в гель, или содержал их очень мало. Электрофорез этого осадка дал те же пять зон, что и электрофорез фрагментов хлоропластов. Исследования последних лет показывают, что при 10 000 g происходит частичное осаждение мембран гран, в то время как межгранные ламеллы осаждаются при 144 000 g⁽⁸⁾. Если это так, то при электрофорезе фрагментов хлоропластов в зону 1 попадал материал различного рода, происходящий как из мем-

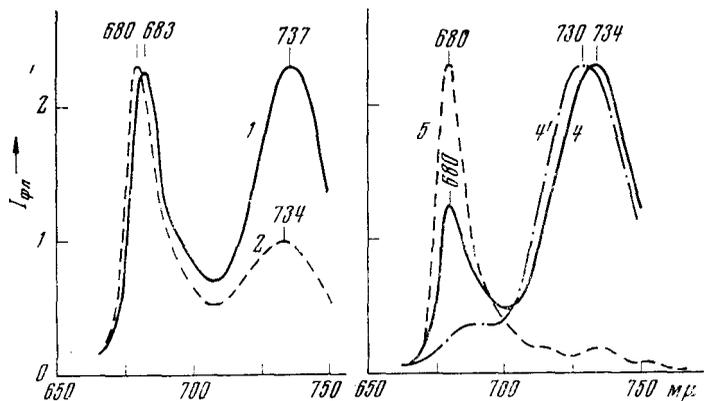


Рис. 2. Спектры флуоресценции при -196° зон, полученных при электрофорезе обработанных 4% дигитонином хлоропластов ячменя. Номера спектров соответствуют номерам зон на рис. 1. Зоны 0 и 3 имели спектры, близкие соответственно спектрам зон 1 и 4. 4' — спектр зоны 4 после промывания буфером

бран гран, так и из межгранных ламелл. Зоны 2—5 при использованной методике происходили главным образом из межгранных ламелл, хотя при более жесткой обработке дигитонином из мембран гран выделяются зоны с такой же подвижностью. Основная часть материала гран оставалась на поверхности геля.

При исследовании фотохимической активности фрагментов в осадке Д10 обычно обнаруживают активность обеих фотохимических систем, в то время как в осадке Д144 — в основном активность фотосистемы I^(4, 5, 9). В ряде работ отмечается, что помимо частиц с активностью фотосистемы I, во фракции Д144 имеются частицы, потерявшие активность в результате нарушения мембраны⁽¹⁰⁻¹²⁾. В легких частицах, полученных после продавливания хлоропластов через френч-пресс (источником легких частиц в этом случае, так же как и при фрагментировании дигитонином, являются межгранные ламеллы), обнаружена и активность системы II⁽⁸⁾. Высказано предположение, что фракция легких частиц может содержать участки мембраны с незавершенной структурой^(8, 13). Наши данные о разделении материала Д144 подтверждают, что эта фракция неоднородна по составу частиц. Можно предположить в соответствии с цитированными работами, что комплексы 2—4 с длинноволновой флуоресценцией и повышенным соотношением хлорофиллов а/в являются очищенными пигмент-липопротеидными комплексами пигментной системы I фотосинтеза.

Зона 5, по-видимому, содержит комплексы с почти полностью нарушенным переносом энергии к длинноволновым формам. Поэтому полосы

флуоресценции с характерными для нативных спектров положениями длинноволновых максимумов очень слабо выражены в спектрах этой зоны. Можно полагать, что эти комплексы образуются из иных, чем длинноволновые, более лабильных участков мембран. Имея в виду высокое содержание хлорофилла *b* в этой зоне, трудно исключить наличие в ней элементов пигментной системы II.

Ниже приведены данные о распределении в электрофоретических зонах предшественника хлорофилла — протохлорофиллида. Имевшийся на свету протохлорофиллид был распределен таким образом, что его относительное содержание в зонах 2—4 было большим, чем в зонах 0 и 1. В зонах, полученных из затемнявшихся растений, количество протохлорофиллида было на порядок величины выше, свидетельствуя о наличии хлорофиллсинтезирующего аппарата в комплексах каждого типа. Наибольшее увеличение содержания протохлорофиллида отмечено в зоне 5, а наименьшее в мембранах гран, оседающих на поверхности геля.

Зона	0	1	2	3	4	5
Отношение протохлорофиллид/хлорофилл в зонах из освещавшихся растений	0,5	0,5	1,0	1,5	0,8	0,9 ($\times 10^{-4}$)
То же после темновой экспозиции растений в течение суток	5	8	14	8	9	21 ($\times 10^{-4}$)

Можно предположить, что повышенная лабильность части комплексов, попадающих в зону 5, связана с тем, что они являются компонентами молодых, развивающихся участков мембран. Эти комплексы обладают высокой (по отношению к уже накопленному количеству хлорофилла) активностью хлорофиллообразования, с которой сопряжено формирование и иных компонентов фотосинтетического аппарата (¹⁴). По мере развития этих структурных элементов мембран комплексы приобретают спектральные характеристики, свойственные полностью сформировавшейся мембране, и становятся более устойчивыми к действию дигитонина и электрофоретической обработке. Больше накопление протохлорофиллида в комплексах 2—4, выделенных из межгранных мембран, чем в мембранах гран, соответствует прежним данным нашей лаборатории (¹⁻³) и недавнему предположению других авторов (^{8, 13}) об образовании тилакоидов гран на основе межгранных мембран.

Лаборатория биофизики и изотопов
Академии наук БССР
Минск

Поступило
26 VI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. A. Shlyk, I. V. Prudnikova et al., In: Progress in Photosynthesis Research, 2, Tübingen, 1969, p. 572. ² А. А. Шлык, Л. И. Фрадкин и др., В сборн. Минеральное питание и фотосинтез, Иркутск, 1969, стр. 173. ³ А. А. Шлык, Н. И. Ахрамович, ДАН, 194, № 2, 448 (1970); 200, № 2, 473 (1971). ⁴ N. K. Boardman, J. M. Anderson, Nature, 203, № 4941, 166 (1964); Biochim. et biophys. acta, 112, 3, 403 (1966). ⁵ Л. И. Фрадкин, А. Фалуды-Даниэль, А. А. Шлык, ДАН, 182, № 6, 1420 (1968). ⁶ А. А. Шлык, Метаболизм хлорофилла в зеленом растении, Минск, 1965, стр. 207; В. Л. Калер, Г. М. Подчуфарова, В сборн. Физиолого-биохимические исследования растений, Минск, 1965, стр. 20. ⁷ J. H. C. Smith, A. Benitez, In: Modern Methods of Plant Analysis, 4, Berlin, 1955, p. 142. ⁸ R. V. Park, P. V. Sane, Ann. Rev. Plant Physiol., 22, 395 (1971). ⁹ N. K. Boardman, *ibid.*, 21, 115 (1970). ¹⁰ W. J. Vredenberg, L. Slooten, Biochim. et biophys. acta, 143, 583 (1967). ¹¹ А. Ю. Борисов, М. Д. Ильина, Молек. биол., 3, 3, 391 (1969). ¹² В. И. Григорович, Н. И. Захарова и др., Биофизика, 16, 2, 260 (1971). ¹³ C. J. Arntzen, R. A. Dilley, J. Neumann, Biochim. et biophys. acta, 245, 2, 409 (1971). ¹⁴ А. А. Шлык, Л. И. Фрадкин и др., В сборн. Биохимия и биофизика фотосинтеза, Иркутск, 1971, стр. 8.