

УДК 577.158.4

БИОХИМИЯ

Н. Д. АЛЕХИНА, С. А. СОКОЛОВА

**ИЗМЕНЕНИЕ ИЗОЗИМНОГО СОСТАВА
ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СВЯЗИ С ТЕМПЕРАТУРОЙ
ВЫРАЩИВАНИЯ РАСТЕНИЙ**

(Представлено академиком А. С. Спириным 21 XI 1973)

В последние годы при исследовании ферментов широко используется метод гель-электрофореза ⁽¹⁾. Он позволяет выявить гетерогенность ферментных белков и охарактеризовать изменения, происходящие в изоферментном составе в зависимости от внешних воздействий. Работы, в которых была показана гетерогенность растительной НАД-зависимой глутаматдегидрогеназы, проводились в основном на препаратах фермента из зеленых тканей растений. В листьях проростков гороха обнаружено 3 изоферментных формы ГДГ ⁽²⁾; в препаратах из листьев пшеницы обнаружено 2 формы ⁽³⁾. В хлоропластах и митохондриях из колеоптилей бобов найдено 7 изозимных полос, идентичных в обеих структурах ⁽⁹⁾. Большое число изозимов ГДГ обнаружено в семенах бобовых растений ⁽¹⁰⁻¹²⁾. Сведения об изозимном составе ГДГ из корней растений более противоречивы. По данным некоторых авторов фермент из корней представлен одной изозимной формой ⁽²⁻⁵⁾, по данным других — двумя ⁽¹³⁾ или даже семью изозимами ⁽¹²⁾. Изозимный спектр ГДГ различается в зависимости от вида растений ⁽¹⁴⁾, их возраста ^(4, 6, 7) и условий азотного питания ⁽¹³⁾.

В настоящей работе приведены данные исследования изозимного состава ГДГ из корней кукурузы. Проростки выращивали в водной культуре на питательной смеси Прянишникова при температуре в зоне корней 25° (контроль) и 12° (опыт). Источником фермента служил белковый препарат, полученный из корней 15-дневных растений по методу, описанному ранее ⁽⁶⁾. Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Дэвиса ⁽¹⁵⁾. Удовлетворительное разделение было получено при силе тока на трубку 5 ма в течение первых 15 мин. и 2,5 ма в течение последующих 30 мин. Гели инкубировали в реакционной смеси при 37° в течение 15–30 мин. ⁽¹⁰⁾. Контролем служила та же смесь, не содержащая глутамата натрия. Гели фотометрировали в проходящем свете (Е) на экстинкционном регистраторе с интегратором Eri-65 m. Величину R_f рассчитывали как отношение расстояния от старта (С) (границы крупнопористого и мелкопористого геля) до середины ферментной полосы к расстоянию, пройденному метчиком (Ф).

Как уже упоминалось, по данным ряда авторов НАД-ГДГ из корней бобовых и злаковых растений представлена одной широкой полосой с низкой величиной R_f ⁽²⁻⁵⁾. Мы также наблюдали проявление фермента в виде одной интенсивно окрашенной полосы с R_f 0,24 в случае, если концентрация белка, внесенного в трубку, была велика и, особенно, если время инкубации гелей в реакционной среде было длительным (30 мин. и более) (рис. 1). При более низкой концентрации белка и при инкубации гелей в реакционной смеси в течение 15 мин. в контрольном варианте обнаруживается шесть близко расположенных изозимов НАД-ГДГ (рис. 2а). R_f первой полосы равен 0,20, шестой 0,30. Таким образом,

расположение полос точно соответствует расположению одной широкой полосы, представленной на рис. 1а. Наиболее интенсивной является вторая изозимная полоса с R_f 0,22. В отсутствие в реакционной смеси проростков кукурузы было найдено 7 изоферментов НАД-ГДГ с величинами R_f 0,21–0,30⁽¹⁴⁾. Автором отмечалось, что при некоторых условиях эксперимента полосы проявляются в виде одной широкой зоны, что наблюдалось и в наших опытах.

Значительное число изозимов ГДГ присутствует в корнях люцерны и гороха^(11, 12). Набор этих изозимов рассматривается как система ГДГ, характерная для корней. Ей присущи метаболические, главным образом катаболические, функции. В отличие от этого система изозимов из надземных органов этих растений выполняет анаболические функции. Множественные молекулярные формы ГДГ, проявляющиеся в виде ряда полос на геле, имеют одинаковый молекулярный вес^(11, 16). В связи с этим предполагается, что изозимы являются конформационными формами одного фермента⁽¹⁶⁾.

С НАДФ, в качестве кофактора реакции, ГДГ из корней кукурузы проявляется как две одинаковой интенсивности полосы с R_f , соответствующими 2-му и 5-му изоферменту НАД-ГДГ (рис. 3а). Активность НАДФ-зависимой реакции была очень низкой. Для получения фотометрируемых полос потребовалось вдвое увеличить концентрацию белка, наносимого на гель, и удлинить время инкубации (30–45 мин.). Кроме того, фотометрическая регистрация плотности гелей была выполнена при максимальной чувствительности прибора. Наличие НАДФ-зависимых изозимов ГДГ было установлено при исследовании фермента из семян вики⁽¹⁰⁾, листьев кукурузы⁽⁴⁾, хлоропластов гороха⁽⁷⁾. При электрофоретическом исследовании препаратов ГДГ из корней было найдено, что НАДФ-зависимые изозимы либо отсутствуют⁽²⁾, либо проявляются очень слабыми полосами⁽¹³⁾. В последнем случае, как это было показано на корнях проростков риса, образование изоферментов НАДФ-ГДГ индуцируется аммонием⁽¹³⁾. В наших опытах наличие значительного числа НАД-зависимых изоферментов и наличие двух НАДФ-зависимых изозимов может быть связано с условиями выращивания растений. С 3-дневного возраста (после проращивания на фильтровальной бумаге) в течение 12 дней растения находились на питательной смеси с азотом в форме нитрата аммония (концентрация соли 0,24 г/л). Аммоний, являясь субстратом обратной реакции, катализируемой ГДГ, по некоторым данным, может одновременно быть индуктором синтеза фермента^(2, 13).

Ранее сообщалось, что активность фермента в корнях растений опытного варианта ниже, чем в контроле⁽⁶⁾. Высказывалось предположение, что изменение активности фермента может быть обусловлено как относительным уменьшением количества ферментного белка, так и качественными изменениями, связанными с числом и соотношением различных изозимных форм ГДГ. Последнее подтверждается данными настоящего исследования. НАДФ-зависимая ГДГ из корней проростков, выращенных при 12°, проявляется в виде 3 полос с R_f 0,15; 0,22 и 0,28 (рис. 2б). Вторая и третья полосы совпадают соответственно со второй и пятой полосой фермента контрольного варианта. Изозим с R_f 0,15 отсутствует в контроле. Наиболее активным является изофермент с R_f 0,22. При равной концентрации белка, нанесенного на гель, и прочих равных условиях проведения эксперимента этот изозим более активен в опытном варианте, чем в контрольном. Полосы 1 и 3 окрашены значительно слабее. С НАДФ фермент из корней опытных растений, так же как и в контроле, проявляется двумя слабыми полосами с R_f 0,22 и 0,28.

Таким образом, в корнях проростков кукурузы существует несколько изозимов ГДГ. Два изозима с R_f 0,22 и 0,28 проявляют как НАД, так и НАДФ-зависимую активность и сохраняют ее при изменении температуры

выращивания. Изозимы 1, 3, 4 и 6 являются лабильными формами фермента, которые исчезают при неблагоприятных температурных условиях выращивания. Вместо этого появляется новая НАД-зависимая форма фермента с низкой электрофоретической подвижностью. Изменения в изозимном спектре фермента могут рассматриваться как один из механизмов приспособительной реакции растений к низким температурам (¹⁷). В качестве одной из причин замены одних изоферментных форм на другие может

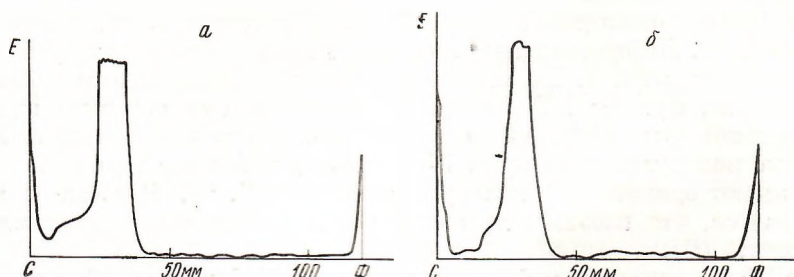


Рис. 1. Фореграммы зоны НАД-ГДГ при 30-минутной инкубации гелей в реакционной смеси. Концентрация нанесенного белка: контроль (а) 204 $\mu\text{г}$; опыт (б) 238 $\mu\text{г}$. Обозначения здесь и на рис. 2, 3: С — старт, Ф — финиш; E — экстинкция

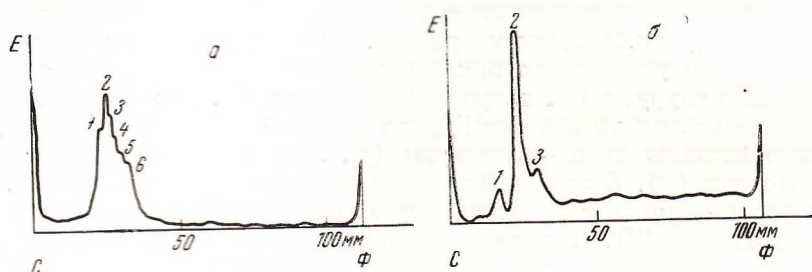


Рис. 2. Изозимы НАД-ГДГ из корней кукурузы, выращенной при разной температуре. Время инкубации 15 мин, концентрация нанесенного белка: контроль (а) 142 $\mu\text{г}$; опыт (б) 142 $\mu\text{г}$. 1–6 — изозимы

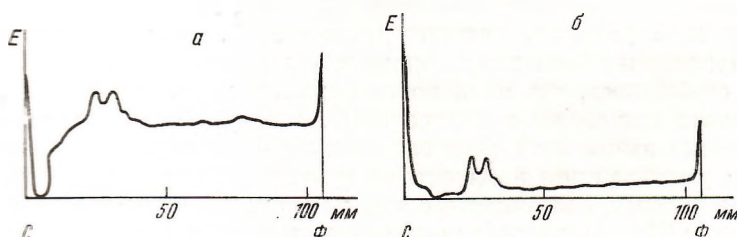


Рис. 3. Изозимы НАДФ-ГДГ из корней кукурузы, выращенной при разной температуре. Время инкубации 40 мин. Концентрация нанесенного белка: контроль (а) 213 $\mu\text{г}$; опыт (б) 299 $\mu\text{г}$

быть изменение в концентрации веществ, регулирующих деятельность данного фермента. В корнях растений, выращенных при пониженной температуре, содержание аммонийного азота в тканях ниже, а глутаминовой кислоты — в два раза выше, чем в корнях проростков контрольного варианта (⁶, ⁸). Если учесть, что аммоний может быть индуктором, а глутаминовая кислота репрессором синтеза ГДГ, то следствием подобных изменений в их содержании может быть подавление синтеза фермента в корнях проростков при пониженной температуре. Это проявляется как в

снижении удельной активности ГДГ (⁶), так и в уменьшении числа изо-
зимов в корнях растений, выращенных при неблагоприятной температуре
питательного раствора.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
16 XI 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. Маурек, Диск-электрофорез, М., 1971. ² В. Л. Крегович, Т. И. Карякина и др., ДАН, т. 202, № 1 (1972). ³ В. Л. Крегович, Т. И. Карякина, Л. И. Сидельникова, ДАН, 208, № 2, 1973. ⁴ М. К. Гильманов, В. И. Яковлева, В. Л. Крегович, ДАН, т. 175, № 4 (1967). ⁵ Э. Е. Хавкин, Р. Т. Поликарпочкина, Рост, развитие и устойчивость растений, Иркутск, 1969. ⁶ Н. Д. Алексина, С. С. Андреевко, ДАН, т. 206, № 1 (1972). ⁷ В. Л. Крегович, Т. И. Карякина и др., ДАН, т. 201, № 5 (1971). ⁸ С. С. Андреевко, Н. Д. Алексина, Е. Д. Ширшова, Научн. докл. высш. школы, Биол. науки, № 10 (1969). ⁹ P. J. Lea, D. A. Thurman, J. Exp. Bot., v. 29, № 75 (1972). ¹⁰ D. A. Thurman, C. Palin, M. V. Laycock, Nature, v. 207, № 4993 (1965). ¹¹ T. Hartmann, M. Nagel, H. L. Hert, Planta, v. 3, № 2 (1973). ¹² T. Hartmann, Planta, v. 3, № 2 (1973). ¹³ T. Kanamory, S. Konishi, E. Takahashi, Physiol. Plant., v. 26, № 1 (1972). ¹⁴ S. B. Yue, Plant Physiol., v. 44, № 3 (1969). ¹⁵ B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121 (1964). ¹⁶ E. Pahlich, Planta, v. 104, № 1 (1972). ¹⁷ D. W. A. Roberts, Intern. Rev. of Cytol., v. 26 (1969).