

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

## ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ И ЕЕ ИЗОФЕРМЕНТНОГО СПЕКТРА В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ ЛЮПИНА

(Представлено академиком А. И. Опариным 27 VIII 1974)

Для установления биологической роли того или иного фермента, и в частности пероксидазы, большое значение имеет исследование его изменений в тканях и органах развивающегося организма.

В настоящее время широким признанием пользуется представление о том, что одним из регуляторов взаимоотношений между органами растения при прорастании являются соединения гормональной природы. Так, корреляция процессов в зародыше и эндосперме ячменя при синтезе  $\alpha$ -амилазы в процессе прорастания происходила при участии индолилуксусной кислоты (ИУК) и гиббереллинов, выделявшихся зародышем<sup>(1)</sup>. Что касается содержания в проростках свободной ИУК, то в сухих семенах бобов она не была найдена<sup>(2)</sup>. Только через 24 часа после замачивания ее обнаружили, причем в зародыше в большем количестве, чем в семядолях. С увеличением возраста проростков содержание свободной ИУК в зародыше возрастало, а в семядолях падало. Таким образом, в процессе прорастания происходило изменение количества свободной ИУК. Наряду с другими факторами, содержание свободной ИУК может в значительной степени зависеть от активности фермента, разрушающего ИУК,— пероксидазы.

В данной работе мы изучали изменение активности пероксидазы и ее изоферментного спектра на последовательных стадиях развития проростков люпина. Определяли как пероксидазную (по окислению гваякола), так и оксидазную (по окислению флороглюцина и ИУК) активности фермента в корнях, листьях и семядолях растений. Семена люпина Немчиновского № 846 замачивали, а затем проращивали в течение 4 дней на водопроводной воде при комнатной температуре. Через 3,5 часа, 1 день, 2 дня и 4 дня корни и семядоли растений использовали для приготовления экстрактов, а через 2 и 4 дня в опыт брали дополнительно и молодые листья (в более ранние сроки анализ листьев не проводился из-за отсутствия достаточного количества материала). Ткань быстро замораживали жидким азотом и растирали с 0,05 М трис-глицериновым буфером pH 8,3. Гомогенат настаивали на холоду в течение 1 часа, отжимали через капроновую сетку и центрифугировали при 21 000 g в течение 20 мин. Экстракт подвергали частичной очистке. Для этого в надосадочной жидкости проводили осаждение белковой фракции, содержавшей пероксидазу, сульфатом аммония, в диапазоне 80—20% насыщения. Осадок растворяли в 0,01 М трис-глицериновом буфере, центрифугировали при 21 000 g и пропускали через колонку с сефадексом G-50. Содержащую пероксидазу фракцию концентрировали сухим сефадексом. Всю очистку проводили на холоду.

Полученный таким образом экстракт использовали для определения содержания белка, пероксидазной и оксидазной активности фермента и подвергали последний электрофоретическому разделению. Белок определяли по методу Лоури<sup>(3)</sup>. Активность пероксидазы — по несколько измененному методу<sup>(4)</sup>. Проба содержала 0,066 М фосфатный буфер pH 6,0;  $7 \cdot 10^{-4}$  М гваякол;  $1,2 \cdot 10^{-3}$  М  $H_2O_2$  и экстракт ткани. Реакцию запускали добавлением 0,03 мл  $H_2O_2$  с одновременным перемешиванием. Регистрировали изменение оптической плотности при  $\Delta = 470$  нм на СФ-14

через каждые 0,5 мин. в течение 2 мин. Активность выражали в условных единицах на 1 мг белка. За единицу приняли такую активность, при которой изменение оптической плотности в 1 мин. составляло 0,1.

Оксидазную активность экстракта определяли по поглощению кислорода полярографически с использованием ячейки конструкции Шольда, Островского (5). При окислении флороглюцина проба объемом 2 мл содержала 0,066 *M* фосфатный буфер pH 7,8;  $1,4 \cdot 10^{-5}$  *M*  $MnCl_2$ ;  $2 \cdot 10^{-3}$  *M* флороглюцин и очищенный экстракт (6). Для учета скорости самоокисления флороглюцина ставили контрольные пробы, которые не содержали экстракта. Оксидазную активность рассчитывали по разности скоростей реакции в пробах с добавленным экстрактом и без него. Другие контрольные пробы, по составу одина-

Таблица 1

Активность пероксидазы (по гваяколу) в проростках люпина (данные двух опытов), в единицах на 1 мг белка

Возраст проростков, час.	Корни		Листья		Семядоли	
24	2,05	2,08	—		0,16	0,26
48	20,3	29,0	14,9	11,1	0,50	0,56
96	461	411	174	130	0,80	0,25

Примечание. При измерении активности через 3,5 часа в корнях и семядолях она была равна 0, в листьях активность не промерялась.

ковые с опытными, но не содержавшие флороглюцина, не поглощали кислорода. Следовательно, очищенный экстракт не содержал эндогенных субстратов, способных в данных условиях окисляться пероксидазой с поглощением  $O_2$ . Флороглюцин в присутствии экстракта ткани может окисляться, кроме пероксидазы, также аскорбиноксидазой, полифенолоксидазой. Специально поставленные контрольные пробы, содержавшие вместо флороглюцина аскорбиновую кислоту (1 мг) или пирокатехин (0,5 мг), не обнаруживали поглощения кислорода.

При окислении ИУК проба содержала 0,15 *M* фосфатный буфер pH 6,3;  $1 \cdot 10^{-3}$  *M*  $MnCl_2$ ;  $1 \cdot 10^{-3}$  *M* 2,4-дихлорфенол;  $1 \cdot 10^{-2}$  *M* ИУК (соль Na) и очищенный экстракт (7). Оксидазная активность фермента выражалась в микроатомах кислорода, поглощенного в 1 мин. на каждый миллиграмм белка в пробе.

Дисковый электрофорез проводили в 7,5% акриламидном геле со щелочным буфером (8, 9). Разделяли отрицательно заряженные изоферменты пероксидазы. В нефиксированных столбиках геля выявляли активность пероксидазы по цветной реакции с гваяколом (10), нитрогаллолом (11) и бензидином (12). Электрофореграммы фотографировали.

В табл. 1 представлено изменение активности пероксидазы (по гваяколу) в проростках люпина разного возраста. Через 3,5 часа после замачивания ни в корнях, ни в семядолях активность фермента не обнаруживалась. Она появлялась в корнях и семядолях 1-дневных проростков и резко возрастала в процессе развития растений. Наиболее высокая активность обнаруживалась в корнях, несколько меньшая — в листьях и очень низкая — в семядолях. Это различие увеличивалось с возрастом проростков.

Увеличение активности пероксидазы в процессе прорастания, которое отмечалось и для других растений (13, 14) и которое коррелирует с активацией дыхания и других процессов метаболизма у молодых проростков (15), может говорить о возрастании роли этого фермента на данных стадиях развития.

На рис. 1 представлены изозимные спектры пероксидазы в корнях, листьях и семядолях 4-дневных проростков люпина. Они состояли из медленно двигавшейся группы и I фракции средней подвижности. Для разных органов спектры отличались друг от друга по числу компонентов и соотношению их активностей в медленно двигавшейся группе фракций. Компонент средней подвижности обнаруживался во всех исследованных органах.

Через 3,5 часа после замачивания семян экстракты из корней и семядолей вообще не обнаруживали полос с пероксидазной активностью при электрофоретическом разделении, что коррелировало с отсутствием активности фермента в экстракте (табл. 1).

В корнях почти все изоцимы спектра появлялись уже на первый день после замачивания семян. В листьях мы обнаруживали их на второй день.

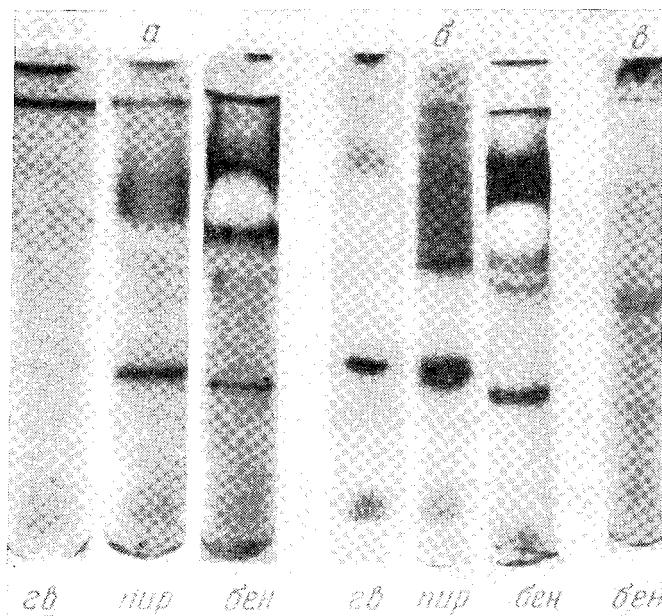


Рис. 1. Электрофореграммы изоцимов пероксидазы в корнях (а), листьях (б) и семядолях (в) люпина на 4-й день после замачивания семян. *гв* — гваякол, *пир* — пирогаллол, *бен* — бензидин

При этом изоцим средней подвижности проявлялся со всеми тремя субстратами, а в медленно двигавшейся группе часть компонентов проявлялась с тремя субстратами, другая часть обнаруживалась только с бензидином и пирогаллолом. В семядолях компонент средней подвижности появлялся только у 2-дневных проростков; следовательно, его появление запаздывало во времени по сравнению с корнями. Количество компонентов медленно двигавшейся группы, появлявшейся у 1-дневных проростков в семядолях, меньше, чем в корнях и листьях, и проявлялись они только с пирогаллолом. В процессе дальнейшего развития качественных изменений изоцимного спектра во всех изучавшихся органах растения не наблюдалось. Увеличивалась только активность отдельных компонентов и менялось их соотношение.

Запаздывание качественных изменений изоцимного спектра пероксидазы в семядолях по сравнению с корнями у люпина так же, как это наблюдалось и у бобов (<sup>10</sup>), согласуется с представлениями о ведущей роли зародыша в индуцировании биохимических процессов, происходящих в семядолях при развитии молодого растения.

Наряду с пероксидазной активностью, пероксидаза обладает также способностью окислять ряд соединений путем использования молекулярного кислорода. Так, в частности, окисляются флороглюцин (<sup>6</sup>) и ИУК (<sup>7</sup>).

В наших опытах через 3,5 часа после замачивания семян мы не обнаружили ни в одном из изучавшихся органов растения оксидазной активности пероксидазы (табл. 2).

В табл. 2 представлены данные по двум независимым опытам. Абсолютные величины активности в этих опытах отличались друг от друга, но в процессе развития в обоих случаях происходила резкая активация фермента и в корнях, и в листьях, которая значительно перекрывала эти индивидуальные колебания активности, связанные, по-видимому, с возможным различием условий развития проростков.

Таблица 2

Оксидазная активность пероксидазы в проростках люпина  
(данные двух опытов), в мкат.  $O_2$  в 1 мин. на 1 мг белка

Возраст проростков, час.	По флороглюцину				По ИУК			
	корни		листья		корни		листья	
24	57	136	—		78	316	—	
48	298	342	185	129	119	712	24	200
96	6460	4020	1350	416	2120	5440	335	910

Примечание. При измерении активности через 3,5 часа в корнях она была равна 0, в листьях активность не промерялась.

Способность окислять флороглюцин и ИУК была найдена в корнях 1-дневных проростков. В листьях мы смогли определить ее у 2-дневных растений. Оксидазная активность пероксидазы резко возрастала в процессе дальнейшего развития проростков. В семядолях применявшимся методом активность не была обнаружена совсем.

Таким образом, в процессе прорастания, наряду с изменением количества свободной ИУК<sup>(2)</sup>, происходит рост активности разрушающего ИУК фермента. Сообщалось, что низкая концентрация ИУК ( $10^{-13}$  M) стимулировала рост корневых волосков, а высокая ( $10^{-6}$  M) тормозила его<sup>(17)</sup>. По-видимому, пероксидаза, окисляя ИУК, участвует в регуляции уровня ее содержания в органах развивающегося проростка и тем самым может играть определенную роль в общем регулировании процессов прорастания семян и дальнейшего роста проростка. Пространственное разобщение метаболических компонентов в клетках и тканях может обеспечить нужное в данный момент направление процесса (в сторону разрушения ИУК или в сторону торможения его).

Наибольшей активностью в отношении окисления ИУК и флороглюцина в наших опытах обладали корни (табл. 2). Это согласуется с ведущей ролью корней в метаболизме гормонов.

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

Поступило  
13 VIII 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> A. M. MacLeod, G. H. Palmer, *New Physiol.*, v. 68, 295 (1969). <sup>2</sup> Н. Буневичюте, Матер. IV биохим. конфер. Прибалт. респ. и Белорусск. ССР, Вильнюс, 1970, стр. 328. <sup>3</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., *J. Biol. Chem.*, v. 193, 265 (1951). <sup>4</sup> В. Chance, A. C. Machly, *Methods Enzymol.*, v. 2, 764 (1955). <sup>5</sup> X. Ф. Шольц, Д. Н. Островский, Лаб. дело, т. 6, 375 (1965). <sup>6</sup> Т. М. Иванова, Б. А. Рубин, *Биохимия*, т. 27, 622 (1962). <sup>7</sup> R. E. Stutz, *Plant Physiol.*, v. 32, 31 (1957). <sup>8</sup> B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 121, 404 (1964). <sup>9</sup> В. И. Сафонов, М. П. Сафонова, *Физиол. раст.*, т. 16, 350 (1969). <sup>10</sup> V. Masco, G. R. Honold et al., *Phytochem.*, v. 6, 465 (1967). <sup>11</sup> М. Е. Ладыгина, Э. А. Таймла, Б. А. Рубин, *Физиол. раст.*, т. 17, 928 (1970). <sup>12</sup> Э. Пирс, *Гистохимия*, 1962. <sup>13</sup> L. M. Shannon, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v. 19, 187 (1968). <sup>14</sup> A. K. Mills, R. K. Crowden, *Austr. J. Biol. Sci.*, v. 21, 1131 (1968). <sup>15</sup> Э. Е. Хавкин, *Итоги науки и техн. Физ. раст.*, т. 1, 58 (1973). <sup>16</sup> Е. В. Будилова, Б. А. Рубин, Е. К. Антонова, *ДАН*, т. 198, 699 (1971). <sup>17</sup> Н. В. Обручева, *Итоги науки и техн. Физ. раст.*, т. 1, 107 (1973).