

УДК 541.144.7+577.150.6

БИОХИМИЯ

М. С. ХРИСТИН, Е. А. АКУЛОВА

**ОБНАРУЖЕНИЕ ФЕРРЕДОКСИНОВ И ПЛАСТОЦИАНИНА
В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ И ПРИ ЗЕЛЕНЕНИИ
ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА**

(Представлено академиком А. И. Опариным 10 IV 1975)

О формировании структуры хлоропластов в онтогенезе и в процессе зеленения фотосинтезирующих организмов имеются многочисленные литературные данные (^{1, 2}). Однако формирование и динамика биосинтеза отдельных компонентов хлоропластов, особенно переносчиков электронов, пока что изучены слабо, ввиду трудностей количественной экстракции и анализа таких веществ (³).

В немногих работах, где изучен биосинтез ферредоксина (Фд) в зеленющих растениях, было установлено, что Фд есть в этиолированных листьях и что на ранних стадиях зеленения отсутствует корреляция между накоплением Фд и хлорофилла (³⁻⁵). В качестве методов определения Фд применяют спектрофотометрический метод регистрации, зависящего от Фд фотовосстановления НАДФ⁺ или в сходной системе полирографически измеряют выделение О₂. Хэслетт с сотр. (³) кроме того применяли метод, основанный на измерении величины сигнала э.п.р. восстановленного Фд. По данным этих авторов (³), накопление Фд в зеленющих листьях фасоли продолжалось до 120 час. непрерывного освещения.

Есть очень мало отрывочных сведений о Фд в онтогенезе растений (⁵⁻⁸). Интересным моментом в работе (⁸) является обнаружение одной формы Фд в 1—2-недельных растениях кукурузы и двух форм в 2,5—4-недельных. Нами (⁹) было сообщено о двух формах Фд в листьях гороха.

Еще меньше с указанных позиций изучен другой важный переносчик электронов в хлоропластах — пластоцианин (Пц). В работе (¹⁰) показано, что в этиолированных листьях ячменя уже есть Пц и его количество в расчете на свежий вес не менялось в течение 24 час. непрерывного освещения.

Целью данной работы было изучение динамики появления форм ферредоксина и пластоцианина на ранних стадиях онтогенеза и в зеленющих этиолированных проростках гороха методом электрофореза в полиакриламидном геле.

Горох *Pisum sativum* L. сорта Неистощимый находился в камере при освещении 20 000 лк лампами типа ЛБ-80-4. Этиолированные проростки гороха выращивали до двухнедельного возраста в темной камере при температуре 20—22°. Затем их освещали в тех же условиях, что и зеленые проростки. Через каждые два часа отбирали пробы зеленющих листьев для анализа на наличие в них Фд и Пц. Листья гороха, выращиваемого с самого начала на свету, брали на анализ каждый день, начиная со дня прорастания. Развивающиеся листья третьего яруса анализировали со дня начала их развития. Пробы немедленно замораживали жидким азотом, растирали в ступке, добавляли трис-глициновый буфер pH 8,3 (1 мл на 1 г свежего веса), фильтровали через два слоя полотна, фильтрат центрифугировали при 18 000 г. Надосадочную жидкость пропускали через колонку сефадекса G-25, чтобы отделить от белков низкомолекулярные веществ-

ва, особенно фенольной природы. Диск-электрофорез проводили в аппарате фирмы «Реанал» по методу ⁽¹¹⁾ с небольшими модификациями. Гель 15%-й концентрации оказался оптимальным для поставленной цели. Концентрацию белков определяли по Лоури или при 280 нм. До нанесения белков проводили предварительный электрофорез при силе тока 3 ма на трубку и общем напряжении 380 в. Продолжительность электрофореза проб белка 35–40 мин., условия те же, что и для предварительного электрофореза. Во время разделения белков аппарат охлаждали. В качестве свидетелей использовали бромфеноловый синий и предварительно очищенные Фд и Пц из гороха ⁽¹²⁾. Разделение смеси белков-метчиков в одной трубке даст такие же результаты, как и по отдельности: их относительные электрофоретические подвижности не меняются. Белки в геле фиксировали в 5% растворе ТХУ. Окраску на негеминное железо проводили в 5% ТХУ спиртовым 1% раствором *o*-фенантролина или α -дипиридила. Однако нестабильность образуемых комплексов сильно мешала работе. Поэтому для выявления негеминного железа Фд мы использовали феррицианид калия в кислой среде. Новый комплекс имел синюю окраску, удобную для документирования, и не вымывался из геля. В щелочной среде феррицианидом проявляли медь Пц, зона Пц окрашивалась в синий цвет. С помощью феррицианида оказалось возможным локализовать оба белка в одном геле: в кислой среде Фд синел, а пластоцианин приобретал оранжевый цвет. Предложенный нами метод окраски Пц более прост и надежен, чем в работе ⁽¹³⁾, авторы которой предлагают окрашивать пластоцианин в гелях ализариновым красителем.

На рис. 1 представлены фореграммы объединенной пробы Фд и Пц, использованных в качестве метчиков, а также проб белков из листьев одно- и четырехдневных проростков гороха. В контроле четко видна полоса Пц (рис. 1, *a*) и две полосы Фд (рис. 1, *б*, *в*). При изучении динамики биосинтеза Фд и Пц в онтогенезе зеленых проростков гороха было установлено, что Пц имеется в них уже в первый день прорастания (рис. 1*A*, *a*, рис. 2*A*, 1). Оказалось, что это был апобелок Пц, так как он не давал окраски на медь. Но уже на второй день роста растений окраска на медь была положительной, т. е. произошло включение иона меди в молекулу апобелка. В однодневных проростках гороха Фд не был обнаружен (рис. 1*A*, рис. 2*A*, 1). На второй день появилась одна полоса Фд, наиболее подвижная; вторая полоса Фд была обнаружена только на четвертый день прорастания гороха (рис. 1*B*, рис. 2*A*). Параллельное проявление гелей на содержание негеминного железа показало одновременность биосинтеза апобелка обеих форм Фд и включение в них железа. В первом, более подвижном, ФдI железо было обнаружено на третий день, т. е. на один день позже, чем апобелок. Наличие железа во втором апобелке ФдII было

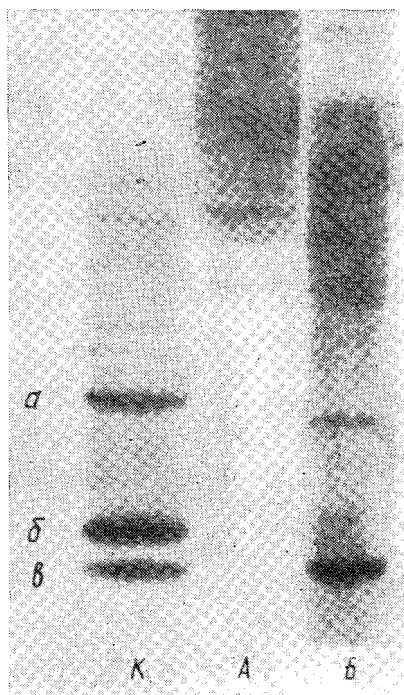


Рис. 1. Электрофореграммы водорастворимых белков гороха. *K* — контроль, *a* — Пц, *б* — ФдII, *в* — ФдI. *A* — 1-дневные проростки, *B* — 4-дневные проростки

зарегистрировано лишь на десятый день роста гороха, т. е. на шестой день после появления апобелка ФдII.

Так как пробы листьев для вышеописанных опытов составлялись из листьев разных ярусов и это могло отразиться на результатах опытов, то далее мы проверили динамику биосинтеза Фд и Пц в листьях одного и того же яруса. Двухнедельные растения с развивающимися листьями

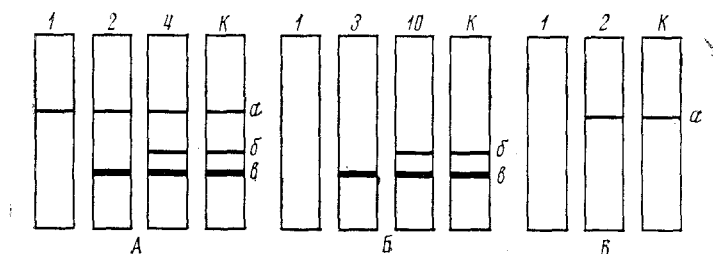


Рис. 2. Электрофореграммы ферредоксинов и пластоцианина в раннем онтогенезе гороха. А — окраска на белок (цифры — дни от начала прорастания, К — контроль, а — Пц, б — ФдII, в — ФдI); Б — окраска на железо; В — окраска на медь

третьего яруса брали для анализа с первого дня их появления. У однодневных листьев присутствуют обе формы Фд и Пц, но в форме апобелков (рис. 3А). Включение меди в апоПц, как и в случае смешанной пробы листьев разных ярусов, происходит на втором дне жизни листа третьего яруса. Время появления железа в апоферредоксинах несколько отличается

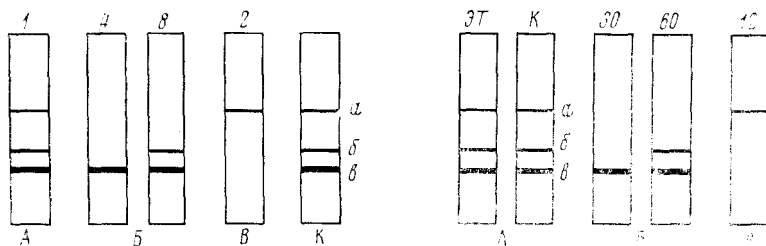


Рис. 3

Рис. 4

Рис. 3. Электрофореграммы ферредоксинов и пластоцианина развивающегося листа третьего яруса. Обозначения те же, что на рис. 2

Рис. 4. Электрофореграммы ферредоксинов и пластоцианина при зеленении этиолянтов гороха. ЭТ — этиолированные проростки. Цифры — световая экспозиция в часах, остальные обозначения те же, что на рис. 2

по сравнению со смешанной пробой: в апоФдI железо обнаружено на четвертый день, а в апоФдII — на восьмой день развития листа.

Интересно, что в этиолированных проростках гороха уже есть обе формы Фд и Пц, но тоже в форме апобелков (рис. 4А). Можно полагать, что в синтезе апобелков этих перепосчиков свет не является необходимым участником, однако окончательное формирование их молекул, требующее включения ионов металлов, идет только на свету. Включение меди в Пц происходит через 12 час. непрерывного освещения этиолированного гороха. Хотя оба апоферредоксина имеются в этиолянтах гороха, однако включение железа в них происходит через разные промежутки времени, но в том же порядке, как и в зеленых проростках: через 30 час. освещения железо обнаружено в ФдI и только через 60 час. — в ФдII.

Итак, показано, что в раннем онтогенезе и при зеленении этиолянтов гороха переносчики Фд и Пц существуют некоторое время в форме анббббков, причем молекула Пц дотраивается за более короткий срок, чем Фд. Обнаружены две формы Фд в этиолянтах и горохе в стадии раннего онтогенеза, причем сначала синтезируется более электрофоретически подвижная форма ФдI, а потом — ФдII. Оказалось, что включение ионов металлов в Пц и Фд гороха происходит на свету. Этот факт не согласуется с результатами работ (³, ¹⁰), авторы которых установили, что Пц из этиолированного ячменя и Фд из этиолированной фасоли уже содержат ионы металлов.

Выяснение физиологической роли двух ферредоксинов в горохе и изучение их физико-химических свойств будет предметом дальнейшего исследования.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

Поступило
8 IV 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Y. T. Kirk, R. A. E. Tilney-Bassett, The Plastids, Ch. 13, London — San Francisco, 1967.
- ² Хлоропласты и митохондрии, ред. А. А. Шахов, М., «Наука», 1969.
- ³ B. G. Haslett, R. Cammack, F. R. Whatley, Biochem. J., v. 136, 697 (1973).
- ⁴ B. A. Melandri, A. Bacerini, G. Forti, Physiol. Veg., v. 5, 337 (1967).
- ⁵ Phung Nhu Hung, S. A. Hoaran, A. Moysse, Zs. Pflanzenphysiol., B. 62, 245 (1970).
- ⁶ А. Б. Мурускин, Биохимия, v. 31, в. 5, 924 (1966).
- ⁷ R. M. Smillie, Plant Physiol., v. 37, 716 (1962).
- ⁸ А. И. Есюнина, Л. Н. Савельева, Докл. ВАСХНИЛ, т. 8, 11 (1974).
- ⁹ М. С. Хрустин, Е. А. Акулова, Сб. Итоги исследования механизма фотосинтеза, Пушино, 1974, стр. 141.
- ¹⁰ M. Plesnicar, D. S. Bendall, Biochem. J., v. 136, 803 (1973).
- ¹¹ Г. Маурер, Диск-электрофорез, М., «Мир», 1971.
- ¹² Е. Н. Мухин, Е. А. Акулова, В. К. Гинс, Сб. Методы выделения и исследования белков — компонентов фотосинтетического аппарата, Пушино, 1973.
- ¹³ Y. Armstrong, S. I. Surzycki, R. P. Lerein, Biochem. J., v. 10, 692 (1971).