

Э. Г. САРУХАНЯН, М. И. МОЛЧАНОВ, Э. Н. БЕЗИНГЕР

ВЛИЯНИЕ СВЕТА НА БИОСИНТЕЗ ЛИПОПРОТЕИДОВ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПЛАСТИД КУКУРУЗЫ

В предыдущей работе, посвященной изучению влияния света на процесс дифференцировки пластид кукурузы и биосинтеза в них ламеллярного белка было показано, что, начиная с первого часа освещения проростков белым светом в пластидах происходил синтез липопротеидов, интенсивность биосинтеза которых значительно возрастала по мере формирования ламеллярной системы хлоропластов. К моменту появления в пластидах ламелл тилакоидного типа (24 часа освещения при интенсивности света 7500 люкс) интенсивность биосинтеза белка ламелл была большей, чем белков стромы [2].

В настоящей работе было продолжено исследование биосинтеза ламеллярного белка в пластидах *in vivo* и *in vitro*.

В опытах использовали 5—6-дневные проростки кукурузы сорта Букавицкий 3, сначала выращенные в темноте, затем подвергнутые освещению в различные промежутки времени лампами дневного света ЛДС-30 при интенсивности 5000—7500 люкс. Инкубацию проростков с $C^{14}O_2$ проводили при интенсивности света 17500 или 20000 люкс. Фракции пластид, необходимые для включения в них C^{14} -аминокислот, выделяли дифференциальным центрифугированием в интервале 300—3500×g в сахарозо-К-фосфатном буфере pH 7,1 по ранее описанной методике [4]. В опытах с $C^{14}O_2$ пластиды дополнительно очищали в ступенчатом градиенте сахарозы [2]. Препараты лейкопластов и хлоропластов контролировали на содержание хлорофилла определяемого по Ветштейну [5]. Характеристика по содержанию хлорофилла и общего белка на разных стадиях дифференцировки хлоропластов представлена в табл. 1.

Таблица 1
Влияние света на содержание хлорофилла в пластидах
из проростков кукурузы*

Продолжительность выращивания про- ростков на свету, час	Хлорофилл в пробе, мг	Общий бе- лок, мг	Хлорофилл белок
0	0,006	3,3	0,002
2	0,042	3,3	0,013
6	0,093	4,1	0,022
28	0,513	3,7	0,139
72	1,564	6,0	0,261

Интенсивность света—7500 люкс. Белок определяли по Лоури. Данные представлены для пластид, выделенных из 50 г проростков.

Липопротеиды (в хлоропластах—ламеллярные белки [3]) отделяли от белков стромы путем извлечения их из пластид 78% водным этанолом при pH 3 [4]. В опытах с

меткой препараты белков после удаления липидов (для липопротеидов—белков ламелл и белков стромы), полисахаридов и нуклеиновых кислот (для белков стромы) [4] растворяли в 1 М NaOH и осаждали 5% трихлоруксусной кислотой. Обработку белка щелочью повторяли дважды. В некоторых опытах (табл. 2 и 3, опыт 3) очищенные вышеуказанным способом препараты белков гидролизovali 6 N HCl при 105°C в течение 24 час и C^{14} -аминокислоты гидролизатов очищали на колонках Дауэкс 50 H+.

Таблица 2

Включение C^{14} из $C^{14}O_2$ в аминокислоты гидролизата липопротеидов из пластид кукурузы, имп/мин*

Аминокислоты	Включение C^{14}			
	1-ый опыт		2-ой опыт	
	2 часа освещения	24 часа освещения	2 часа освещения	24 часа освещения
Аргинин, лизин, гистидин	117	543	65	461
Серин, аспарагиновая кислота, глицин	225	720	210	2038
Глутаминовая к-та, треонин . .	73	255	76	670
Аланин	68	270	75	645
Пролин	36	39	83	634
Тирозин	32	84	31	197
Валин, метионин	32	96	57	454
Фенилаланин, лейцины	48	141	107	1122

* Интенсивность освещения проростков при инкубации с $C^{14}O_2$ составляла 20000 люкс.

Аминокислоты хроматографировали на бумаге Ватман 3 мм в системах растворителей бутанол—уксусная кислота—вода в соотношениях 5:2:3.

Таблица 3

Включение C^{14} из $C^{14}O_2$ в липопротеиды и белки стромы пластид кукурузы под влиянием света, имп/мин на 1 мг белка*

Продолжительность выращивания проростков на свету час.	№ опыта	Интенсивность света до инкубации проростков $C^{14}O_2$, люксы	Интенсивность света во время инкубации проростков с $C^{14}O_2$, люксы	Концентрация $C^{14}O_2$, %	Включение C^{14}		
					в белковую часть липопротеидов	в белки стромы	K**
4	1	7500	17500	0,08	19889	18175	1,0
24					21857	14459	1,5
4	2	7500	17500	0,12	16061	13743	1,2
24					234936	138122	1,7
2	3***	5000	20000	0,12	11235	14660	0,7
48					35152	36646	1,5

* Инкубация проростков с $C^{14}O_2$ 60 мин.

** K—отношение удельных активностей липопротеидов ламелл к удельным активностям белков стромы.

*** В опыте измеряли радиоактивность суммы аминокислот гидролизата 1 мг C^{14} -белка, очищенных на колонке Дауэкс 50 H+ (подробности см. в тексте).

Это было целесообразно по двум причинам: во-первых, методика позволяла еще раз убедиться в том, что метка в опытах с $C^{14}O_2$ включалась действительно в аминокислоты белка, тогда как возможные примеси других C^{14} продуктов были удалены; во-вторых, эти опыты показали, что в процессе инкубации проростков с $C^{14}O_2$ метка была обнаружена во всех исследованных аминокислотах белков (табл. 2). Это указывает на то, что синтез белка происходит *de novo*.

При этом не было обнаружено различий между этими опытами и теми, в которых белки очищали только пересаживанием их из щелочи (табл. 3).

В этом, как и в предыдущем исследовании [2], в пластидах растений, выставленных на свет на 24 или 48 часов происходило более интенсивное включение C^{14} в белковую часть липопротеидов, чем в белки стромы. Следует напомнить, что к этому времени в пластидах наблюдалось образование ламелл тилакоидного типа и увеличение числа дисков в гранах, а также количества самих гран, т. е. хлоропласт заполнялся высокоразвитой ламеллярной системой [2], в пользу чего свидетельствует и величина коэффициента (K), приведенного в табл. 3.

Таблица 4

Влияние pH на включение C^{14} глицина в белковую часть липопротеидов из пропластид кукурузы, имп/мин на 1 мг белка*

pH	pH	7,0	7,4	8,0	8,6
Включение C^{14}	C^{14}	238	231	351	308

* Время инкубации—45 мин.

Пластиды, выделенные из проростков кукурузы на стадии 24 час. освещения, при сравнении их с пропластидами характеризовались более высоким уровнем биосинтеза ламеллярных белков и в опытах *in vitro* (табл. 5). Предварительно было установлено, что максимальное вклю-

Таблица 5

Включение C^{14} лизина в белковую часть липопротеидов из пропластид и хлоропластов кукурузы, имп/мин на 1 мг белка

Условия освещения проростков	Включение C^{14}	
	время инкубации	
	15 мин	45 мин
Не освещались (этиолированные)	230	317
Освещались 24 часа*	331	799

* Интенсивность света—7500 люкс.

чение C^{14} аминокислоты в липопротеиды лейкопластов происходило при pH 8,0 (табл. 4), как это имеет место в опытах с изолированными хлоропластами фасоли [1].

В пропластидах по мере их инкубации с C^{14} лизином интенсивность биосинтеза липопротеидов увеличивалась в 1,3 раза, тогда как в пластидах из освещенных проростков—в 2,4 раза (табл. 5).

Таким образом, данные предыдущей работы [2] и настоящего исследования свидетельствуют о том, что дифференциация внутренних мембран пропластид в сформированную ламеллярную систему хлоропластов сопровождается преимущественным синтезом ламеллярных белков. К моменту заполнения хлоропластов развитой ламеллярной системой (48 час. освещения) интенсивность биосинтеза ламеллярных белков по отношению к биосинтезу белков стромы сохраняется на том же уровне, что и в проростках, освещавшихся в течение 24 час.

Институт агрохимических проблем и гидропоники

АН АрмССР,

Институт биохимии им. А. Н. Баха

АН СССР

Поступило 3.XII 1959 г.

Է. Գ. ՍԱՐԴԻԱՆՅԱՆ, Մ. Ի. ՄՈՂԶԱՆՈՎ, Է. Ն. ՔԵԶԻՆԳԵՐ

ԼՈՒՅՍԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԼԻՊՈՊՐՈՏԵԻԴՆԵՐԻ ԲԻՈՍԻՆԹԵԶԻ ՎՐԱ
ԵԳԻՊՏՍՈՐԵՆԻ ՊԼԱՍՏԻԴՆԵՐԻ ԴԻՖԵՐԵՆՏԻԱՅԻՆ ՄԻՋՈՑՈՎ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հետազոտվել է լամելյարային սպիտակուցի բիոսինթեզը պլաստիդների մեջ: Պրոպլաստիդների ներքին մեմբրանների փոխարկումը ձևավորված լամելյարային կառուցվածքի՝ տեղի է ունենում լամելյարային սպիտակուցների ինտենսիվ սինթեզին համընթաց:

Քլորոպլաստների լամելյարային սիստեմով զարգացման ընթացքում (48-ժամյա լուսավորվածությամբ) լամելյարային սպիտակուցների բիոսինթեզի ինտենսիվությունը, ստրոմների սպիտակուցների բիոսինթեզի համեմատությամբ, պահպանվում է նույն մակարդակի վրա, ինչպիսին է սածիլներում, որոնք կանաչում են 24 ժամվա ընթացքում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Марчукайтис А. С. Включение аминокислот в липоиды и белки изолированных хлоропластов. Автореф. диссерт. Вильнюс, 1966.
2. Молчанов М. И., Балаур Н. С., Безингер Э. Н. ДАН СССР, 187, 935, 1969.
3. Молчанов М. И., Безингер Э. Н. ДАН СССР, 178, 475, 1968.
4. Сисакян Н. М., Безингер и др. Биохимия, 28, 326, 1963.
5. Wettstein D. Exp. Cell. Res., 12, 427, 1957.