

ВКЛЮЧЕНИЕ C^{14} -АМИНОКИСЛОТ РАЗЛИЧНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ ХЛОРОПЛАСТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭТАНОЛАМИНА

Л. В. ДАВТЯН

Исследовалось включение C^{14} -меченых аминокислот в белки различных фракций хлоропластов кукурузы и гороха.

Установлено максимальное повышение интенсивности включения аминокислот во фракциях хлоропластов, богатых ламеллами, при действии этаноламина.

Возможность синтеза белка хлоропластами доказана давно. Установлены факторы и системы, ответственные за синтез белков и способствующие протеканию различных этапов этого процесса.

В работах ряда авторов [1—3] показано непосредственное участие липопротеидов, липоаминокислот в биосинтезе белка. Путем ступенчатой «разборки» структур хлоропластов и солюбилизации липидов и белков выявлено наличие в мембранах хлоропластов специального транскрипционно-трансляционного аппарата; выделены ферменты, активизирующие аминокислоты-аминоацил-тРНК-синтазы, т-РНК-азы и другие с различной степенью активности в различных фракциях хлоропластов.

Хлоропласты отличаются обилием мембранных систем, создающих самостоятельные фрагменты, ответственные за пространственную организацию последовательных процессов метаболизма, в связи с чем разрушение мембранной структуры их приводит к потере как фотохимической, так и белоксинтезирующей функции. Исследованиями структуры белоксинтезирующего аппарата хлоропластов установлено, что эти системы находятся в теснейшем контакте с ламеллярной структурой хлоропластов. В работах Чэна и Уилдмана [4], Опарина, Филиппович и др. [5] показано, что полирибосомы тилакоидов гран, синтезируя белки, связывают их со структурным компонентом гран. Этими же авторами установлено, что 30—40% включающихся в блок аминокислот удерживаются фракцией мембранносвязанных рибосом в хлоропластах.

Нами ставилась цель изучить интенсивность включения C^{14} -аминокислот различными фракциями хлоропластов при действии этаноламина. В предыдущих [6] работах показано, что этаноламин, обладающий стимулирующим рост свойством, усиливает синтез белка в целых

хлоропластах, повышает содержание фосфолипидов, вызывает определенные сдвиги в фосфолипидном составе мембран хлоропластов.

Материал и методика. Влияние этаноламина на процесс синтеза белка нами изучалось посредством определения включения меченых (C^{14}) аминокислот в белки хлоропластов.

Объектом исследования служили проростки кукурузы (Краснодарская-5) и гороха (Мозговой-5). Опыты проводились в 3-х сериях. В первой серии семена до проращивания обрабатывались водой (контроль), во второй—водным раствором этаноламина в стимулирующих концентрациях 1%—4% (вариант—*in vivo*), в третьей—этаноломином в количестве 1 мкг непосредственно включался в инкубационную смесь (вариант—*in vitro*).

Фракции хлоропластов выделяли по методике, описанной в работе Опарина, Филиппович и др. [5]. Суспензия хлоропластов, разрушенных осмотическим шоком (в условиях бессахарозного буфера), центрифугировалась при 16000 об/мин в течение 1 час. в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (1,0, 1,5 и 2,0 М) в среде с трис-НСl буфером (рН 7,6, 0,01 М $MgCl_2$ и 0,01 М KCl).

Субструктуры по плотности расслаивались на три слоя: 1) фракция а—мономеры рибосом, обычно покрытые пленкой белка; 2) фракция в—в основном ламеллы стромы и отдельные или связанные друг с другом тилакоиды, $P=1,113$; 3) фракция с—ламеллы, с которыми связаны граны, отдельные граны и крупные фрагменты хлоропластов, а также полирибосомы, $P=1,156$. Фракции различаются не только по структурному составу, но и содержанию белка, РНК, ДНК.

Разделение субструктур при центрифугировании зависит от плотности рибосом, ламелл и гран. Ламеллы стромы, с которыми связаны граны, опускаются в нижний слой, а свободные от гран—остаются в верхнем слое.

После расслоения фракции отбирались шприцем и вносились в инкубационную среду, содержащую C^{14} -аминокислоты (0,1 мл гидролизата белков хлореллы—200 тыс. имп в пробе), трис-буфер 0,1 мл, рН 7,4, конечный объем—0,5 мл. Ставился контроль на адсорбцию, инкубация при 20—25°, 1 час. Дальнейшее осаждение белка и обработка осадка согласно методике. Радиоактивность измерялась на радиометре «Волна» с газопроточным счетчиком СOT-25ВФЛ. Содержание белка определяли по Лоурн.

Результаты и обсуждение. Фракция а, содержащая очень низкие концентрации белка порядка 0,015—0,008 мг, показала слабое включение меченых аминокислот, поэтому приводятся данные только по фракциям в и с. Фракция с кукурузы содержала белка почти в 3, а гороха в 1,5 раза больше, чем фракция в.

Хотя при однократном центрифугировании происходит четкое разделение фракций, однако они могут оказаться гетерогенными и содержать примесь нехарактерных структур. Поэтому после разделения фракций бралась проба на электронномикроскопические исследования.

Приводим электронномикроскопические снимки типичных для полученных фракций структур: во фракции в преобладают ламеллы и их части в виде обводов (рис. 1, 1, 2), а во фракции с—крупные фрагменты хлоропластов и ламеллы, связанные с гранами (рис. 1, 3, 4).

В таблице приводятся данные об удельной радиоактивности фракций хлоропластов, рассчитанной на мг белков (в имп/мин/мг), и о влиянии на нее этаноламина.

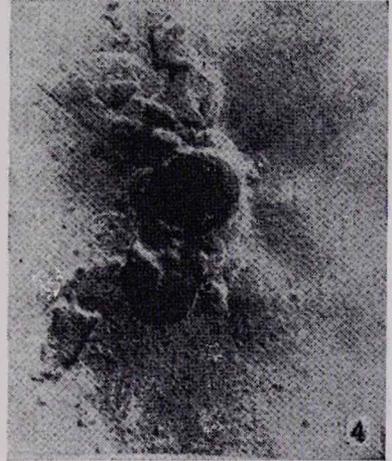
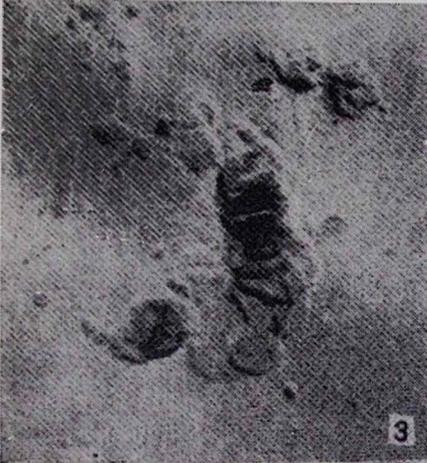
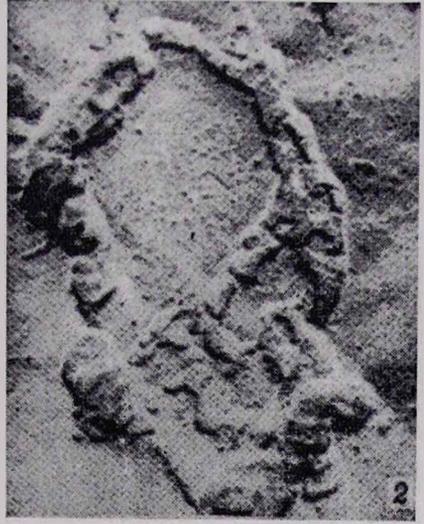


Рис. 1. Типичные структуры, обнаруженные в слоях в и с ступенчатого градиента хлоропластов кукурузы, $\times 2500$, слой в—1. 2—ламеллы стром и их части в виде обводов; слой с—3, 4 фрагменты, нагруженные гранами; ламеллы, связанные с гранами.

Таблица

Удельная радиоактивность фракций в и с хлоропластов кукурузы и гороха при действии этаполамина, нмп/мин/мг

Контроль	Статистические критерии	К у к у р у з а				Г о р о х			
		in vitro		in vivo		in vitro		in vivo	
		в	с	в	с	в	с	в	с
Контроль ЭА, 1 мкг	$M \pm m$	104,2±10,4	40,0±1,5	61±6,5	61,3±10,7	1121,3±26,6	950,3±36,7	181,2±17	80,7±7,6
	$M_1 \pm m_1$	146,2±12,3	62,7±3,5	—	—	1800 ± 48,7	1767±130	—	—
	t	3,58	2,086			11,74	5,18		
	P	0,02	0,05			0,01	0,01		
ЭА, 10 ⁻⁴	$M_2 \pm m_2$	—	—	108,2±12,3	83,0±10,8	—	—	217,9±4,9	123,5±17
	t			3,27	1,56			3,2	2,8
	P			0,05	0,2			0,01	0,1
Белок, мг	$M \pm m$	0,24±0,01	—	—	0,81±0,03	0,57±0,03	—	—	0,89±0,06
	t	6,5			9,02	9,5			28,4
	P	0,01			0,01	0,01			0,01

При включении метки удельная радиоактивность во фракции в кукурузы заметно превышает таковую фракции с в условиях *in vitro* (более чем вдвое), в условиях *in vivo* фракции не различаются. У гороха удельная радиоактивность фракций почти одинакова в условиях *in vitro*, а *in vivo* фракция в во много раз превышает фракцию с.

При обработке этаноламином *in vitro* радиоактивность фракции у кукурузы повышалась на 43,5, *in vivo*—на 17%, а во фракции с соответственно на 58 и 36%.

Во фракциях хлоропластов гороха при действии этаноламином наблюдается усиление включения C^{14} -аминокислот в белки как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Удельная радиоактивность во фракции в в условиях *in vitro* повысилась на 60, а *in vivo*—на 20%, во фракции с—соответственно 35 и 58%. Эта закономерность сохраняется и при определении радиоактивности фракций, подсчитанной за 3 мин (включение метки C^{14} -аминокислот в имп) (рис. 2).

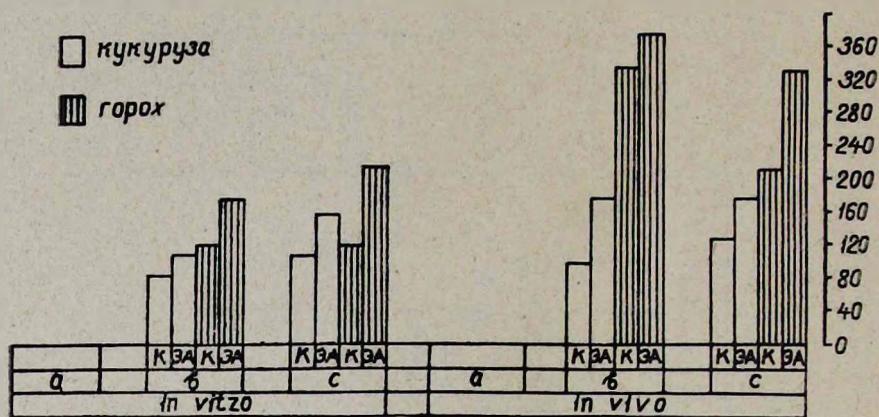


Рис. 2. Действие этаноламина на включение C^{14} -аминокислот в белки фракций в и с хлоропластов кукурузы и гороха в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, фракция в хлоропластов кукурузы наиболее активно включает метку при действии этаноламина в условиях *in vivo*, а фракция с—*in vitro*. Фракции в и с гороха наиболее активны при обработке этаноламином в условиях *in vivo*.

По результатам экспериментов можно заключить, что фракции хлоропластов в и с обладают высокой включаемостью меченых C^{14} -аминокислот в белки. Обработка этаноламином в условиях *in vitro* и *in vivo* усиливает включение аминокислот, однако наилучший эффект у кукурузы наблюдается в условиях *in vivo* во фракции в и *in vitro*—во фракции с. У гороха наибольшую интенсивность включения показали фракции в и с при действии этаноламином *in vitro*, что, очевидно, связано с действием амина не только на белоксинтезирующий аппарат, но и на мембранные системы. Фракции с наибольшей интенсивностью включения обогащены ламеллами—мембранами. Можно сделать вы-

вод, что в инициации включения метки немаловажную роль играют сдвиги в фосфолипидном составе и в ориентации липидов мембран, имеющие место при действии этаноламина.

Ереванский зооветеринарный институт,
кафедра биохимии и органической химии

Поступило 23.I 1978 г.

ԷՔԱՆՈՎԱՄԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ C^{14} -ԱՄԻՆԱԹՔՈՒՆԵՐԻ
ՆԵՐԱՌՄԱՆ ՎՐԱ ՔՆՐԱՊԼԱՍՏՆԵՐԻ ՏԱՐԲԵՐ ՖՐԱԳՄԵՆՏՆԵՐԻ
ԿՈՂՄԻՑ

Լ. Վ. ԴԱՎԹՅԱՆ

Քլորապլաստները ֆոտոթիմիական ֆունկցիայի հետ մեկտեղ օժտված
են սպիտակուց սինթեզելու հատկությամբ: Այդ հատկությունն ունեն նաև քլո-
րապլաստներից ստացված տարբեր ֆրագմենտները:

Հետազոտված է C^{14} -նշված ամինաթթուների ներառումը եգիպտացո-
րենի և սիսեոի քլորապլաստներից անջատված որոշակի ֆրագմենտների սպի-
տակուցների մեջ:

Դիտվել է սպիտակուցի սինթեզման տարբեր ինտենսիվություն և քլո-
րապլաստների որոշ ֆրակցիաների կողմից C^{14} -ամինաթթուների ներառման
ուժեղացում էթանոլամինի ազդեցության դեպքում ինչպես in vitro, այնպես
էլ in vivo պայմաններում: Էթանոլամինի ազդեցությունը պայմանավորված
է նրա ներգործությամբ քլորապլաստների սպիտակուց սինթեզող ապարատի
ֆերմենտների ակտիվության և մեմբրանային սիստեմների (լամելների) վրա:

INCLUSION OF C^{14} AMINOACIDS BY DIFFERENT CHLOROPLAST
FRAGMENTS AND THE INFLUENCE OF ETHANOLAMINE

L. V. DAVTIAN

The inclusion of C^{14} labelled aminoacids in proteins of maize and
pea chloroplast different fractions has been investigated.]

The maximum intensity rise of the inclusion of aminoacids in the
fractions of chloroplasts rich in lamellae has been ascertained under the
effect of ethanolamine.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Sissaklan N. M., Phillpovitch J. J., Svetajlo E. N., Altyev K. Biochim. Biophys. Acta, 95, 474, 1965.
2. Jagendorf A. T., Wildman S. C. Plant Physiol., 29, 270, 1974.
3. Jagendorf A. T., Eisenstadt et al. Acad. Press 181, New York, 1962.
4. Chen S. A., Wildman S. C. Biochim et Biophys acta, 209, 207, 1970.
5. Опарин А. И., Филиппович И. И., Безсмертная И. Н. Физиология растений, 19, 5, 1972.
6. Давтян Л. В., Гаспарян М. Г. Биологический журнал Армении, 28, 11, 1975.