

9. Palmer R. D., Brinster R. L., *Cell*, 41, 343-435, 1985.
 10. Palmer R. D., Brinster R. L. *Annu. Rev. Genet.* 21, 465-499, 1985.
 11. Ross S. R., Sotter D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5880-5884, 1985.
 12. Southern E. L. *Mol. Biol.* 9, 593, 1974.

Получено 1.11.1991

Бюллетень журн. Архивна. № 1 (45), 1992

Т. 8, № 386-612, 1977

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕТОИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ХЛОРОПЛАСТОВ

Г. Б. ГУКАСЯН, С. А. ГОНИН, А. Е. ЗАКЛЯН, Г. А. ПАНОСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии

Показаны светоиндуцированные изменения электрокинетического потенциала хлоропластов высших растений. Величина электрокинетического потенциала -40 ± -60 мВ, а при значениях pH 4,3 и выше его значение переходит на положительный. Освещение вызывает значительное увеличение электрокинетического потенциала на 60-90% в отсутствие электронного акцептора электронов и на 80-140%, в присутствии $K_2Fe(CN)_6$. Ингибитор электронного транспорта антрацин подавляет светоиндуцированный рост потенциала.

Ուսումնասիրված բարձրակարգ բույսերի քլորոպլաստների էլեկտրակինետիկական պոտենցիալի լուսաինդուցիվ փոփոխությունները էլեկտրոակտիվական պոտենցիալի մեծությունը -40 ± -60 մՎ է. իսկ pH 4,3-ում և ավելի բարձր ցածրում նրա նշանը փոխվում է դրականի (ուստի որովհետև առաջացնում է էլեկտրակինետիկական պոտենցիալի դրական մեծացում, 60-90 % էլեկտրոնների կիրառման անցնելու արդյունքում և 80-140 % $K_2Fe(CN)_6$ ներկայության դեպքում:

Light-induced alterations of electrokinetic potentials of high-plants' chloroplasts are shown. Illumination causes considerable increase of electrokinetic potential: 60-90% in the absence of electron acceptor of electrons and 80-140% in the presence of $K_2Fe(CN)_6$.

Хлоропласты—электронный транспорт—электрокинетический потенциал

Исследование поверхностных свойств тилакоидных мембран расширяет возможности изучения и контролирования ряда фотосинтетических процессов, которые в определенной мере обуславливают эти свойства. Ряд исследователей показали, что поверхностный заряд тилакоидов обусловлен в основном интегральными белками мембран [4, 7]. Эти данные подтверждались нами на искусственных системах. При изучении процесса слияния фосфолипидных липосом со встроенным пигмент-белковым комплексом фотосистемы I с плоской фосфолипидной мембраной было обнаружено, что этот процесс во многом обусловлен зарядом встроенного и мембрану липосом белка [1].

Целью настоящей работы явилось изучение изменений поверхностного потенциала хлоропластных мембран при смене темновых и све-

товых условий, поскольку имеющиеся в литературе данные, касающиеся этого вопроса, весьма противоречивы [7, 9, 10].

Материал и методика. Хлоропласты выделяли из 20—30-дневных проростков гороха, выращенного в оранжевом, либо из рыночного шпината по методу [11] с некоторыми модификациями. При использовании 0,02 М трис-HCl буфера (рН 7,8) центрифугирование проводили при 1000 об/мин в течение 5 мин, а при использовании 0,05 М K_2HPO_4 -KOH (рН 6,9) образцы центрифугировали 5 мин при 800 об/мин и 15 мин при 2500 об/мин.

Для определения зависимости величины ζ -потенциала от рН среды и качества среды суспендирования хлоропластов использовали буферные растворы $\text{Na}_2\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ -HCl и KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 . Концентрацию хлорофилла определяли по Арнону [3].

Суспензию хлоропластов освещали через водный фильтр направленным светом лампы накаливания КГМ (24 В, 50 Вт) в течение 10 мин. Источником света служил на расстоянии 20 см от объекта. Для облучения монохроматическим светом использовали He-Ne лазер 208 (λ —630 нм, мощность—20 мВт). Во время облучения температура образцов поддерживалась на уровне 17—20°.

Миквоэлектрофорез проводили в плоскопараллельной камере по методу [2]. При измерении скорости движения хлоропластов делали 11 замеров на хлоропластах одного образца. Затем среднее значение скорости подставляли в формулу Эйнштейна-Смолуховского, по которой рассчитывали величину ζ -потенциала.

Результаты и обсуждение. В экспериментах использовали только хлоропласты типа «с», поскольку ранее было показано, что на таких хлоропластах светондущиваемый рост величины электрокинетического потенциала обычно больше, чем на интактных [10]. Величина регистрируемого нами электрокинетического потенциала варьировала в широких пределах и зависела от условий выделения и физиологического состояния хлоропластов. Когда хлоропласты не подвергались действию света, величина ζ -потенциала составляла 16—40 мВ, что согласуется с литературными данными [7, 9, 10].

При физиологических значениях рН измеряемый нами электрокинетический потенциал был отрицательным. Исследование зависимости величины ζ -потенциала от рН среды суспендирования показало, что знак его меняется на положительный при значении рН 4,3. Согласно данным ряда авторов, это значение рН соответствует изоэлектрической точке [6, 7], которая, как известно, не зависит от природы катионов, содержащихся в среде [8]. Согласно нашим данным, изоэлектрическая точка действительно близка к рН 4,3, однако нам не удалось ее зарегистрировать, мы зафиксировали только реверсию потенциала. По-видимому, это можно объяснить возможными конформационными изменениями мембранных белков, требующими дополнительных исследований.

Исследование электрофоретических свойств хлоропластов после десятиминутного освещения выявило резкий рост величины ζ -потенциала (табл. 1, говоря о росте, знак потенциала, естественно, не учитываем). Эти данные противоречат результатам Накатани и соавт. [7], которым не удалось зарегистрировать светондущиваемых изменений электрофоретической подвижности хлоропластов, и свидетельствуют о несостоятельности их теории о том, что освещение дол-

Таблица 1. Светоиндуцированные изменения ζ -потенциала хлоропластов (концентрация хлорофилла 0.1—0.2 мг/мл).

Среда	Хлоропласты — контроль (свет-контроль), мВ	Хлор. пласты — свет, 5 мВ	Хлоропласты — облучение He-Ne лазером, мВ	Свет-индуция, %	Хлор-контроль, %
-------	--	---------------------------	---	-----------------	------------------

0,05М KH_2PO_4 —KOH pH 6,9	-20,4	-32,5	—	59,3	—
0,02М трис-HCl pH 7,8	-18,6	-36	-50,7	93,5	172,5
0,02М трис-HCl,					
0,5М NaCl pH 7,5	-11,8	-16,5	—	31,8	—

жно вызывать изменение электрофоретической подвижности всего на 1%.

Как видно из табл. 1, наибольший рост потенциала (на 93,5%) наблюдался в случае, когда хлоропласты находились в среде, содержащей 0,02М трис-HCl (pH 7,8). Такого порядка увеличение ζ -потенциала при действии света (на 90—120%) наблюдали и Шапендонк с соавт. [10], но при условии наличия в среде 5 мМ MgCl_2 . В среде без MgCl_2 этим авторам удавалось зарегистрировать светоиндуцированное изменение ζ -потенциала всего на 40—50%. В наших экспериментах, как видно из табл. 1, такой рост потенциала наблюдался в условиях наличия в среде выделения 0,5 М NaCl.

Наличие в среде одно- и двухвалентных катионов (Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) приводит к снижению величины ζ -потенциала, что согласуется с литературными данными [4]. Очевидно, катионы экранируют отрицательные заряды на краевых, маргинальных и стромальных мембранах. Необходимо отметить, что при концентрации катионов от 1 до 5 мМ величина электрокинетического потенциала резко уменьшается. В свете этих данных трудно объяснить результаты исследований Шапендонка и соавт. [10], свидетельствующие о стимуляции светоиндуцированного роста ζ -потенциала в условиях наличия 5 мМ MgCl_2 .

В табл. 1 приведены также данные об изменении величины ζ -потенциала при облучении хлоропластов монохроматическим светом (He-Ne лазер $\lambda = 630$ нм). Резкое увеличение ζ -потенциала (на 172,5%) свидетельствует о связи процессов, происходящих в реакционных центрах, с возникновением поверхностного потенциала и о вкладе пигмент-белковых комплексов фотосистем в формирование поверхностного потенциала фотосинтетических мембран.

Светоиндуцированные изменения электрокинетического потенциала мы исследовали также в присутствии экзогенного акцептора электронов феррицианида калия (табл. 2).

Как видно из табл. 2, феррицианид калия стимулирует светоиндуцированный рост величины ζ -потенциала. И в данном случае наибольший рост потенциала (на 143%) наблюдался в бессолевой среде. По всей вероятности, в таких хлоропластах процессы электронного транспорта и фотофосфорилирования разобщены, поэтому скорость

Таблица 2. Световындуцированные изменения электрохимического потенциала в присутствии 2 мкМ феррицианида калия.

Среда	Концентрация хлоропластов, мг/мл	Хлоропласты в темноте (контр.), мВ	Хлоропласты - $K_3Fe(CN)_6$ ингибитор, мВ	Хлоропласты + $K_3Fe(CN)_6$ ингибитор в темноте, мВ	Световый эффект
0,05 М KH_2PO_4 - КСМ рН 6,9	0,09	-27	50,9	28	81,8
0,05 М KH_2PO_4 - КСМ рН 6,9	0,14	-20	38,1	-16,2	134,9
0,15 М KH_2PO_4 - КСМ рН 6,9	0,15	-15	-39,6	-19,1	107,3
0,15 М KH_2PO_4 - КСМ рН 6,9	0,24	-36	-59	-21,9	129,4
0,02 М трие-НСl рН 6,9	0,22	-43,6	-57,2	-23,5	143

электронного транспорта высока, что и отражается на величине электрохимического потенциала. Подтверждением тому, что процесс электронного транспорта оказывает непосредственное влияние на электрофоретическую подвижность хлоропластов, явилась данная о дебетации ингибитора электронного транспорта диурона. Последний в концентрации 10^{-6} М подавляет световындуцированный рост потенциала.

Для проведения реакции фотофосфорилирования использовали хлоропласты, выделенные в среде с 0,5 М NaCl, 0,02 М трие-НСl (рН 7,8). Перед освещением к суспензии хлоропластов добавляли следующие кофакторы: 0,03 М $MgCl_2$, 0,02 М АДФ, 0,06 М Na_2CO_3 , 0,2 М KH_2PO_4 , 0,014 М феназаметосульфат. Это приводило к понижению величины ζ -потенциала относительно потенциала контрольных хлоропластов (т. е. хлоропластов, находящихся в условиях комнатного освещения без кофакторов) как в темновых (на 60—65%), так и в световых условиях (на 20—35%). Очевидно, что уменьшение абсолютной величины ζ -потенциала на свету связано не с процессом фотофосфорилирования, а с присутствием кофакторов, поскольку в темновых условиях величина потенциала резко уменьшалась. Действие света, однако, приводило к росту потенциала на 70—125%, несмотря на то, что в среде присутствовал NaCl.

Согласно данным [7], связывающий фактор хлоропластов и светособирающий пигмент-белковый комплекс не включаются в процесс увеличения поверхностного заряда тилакоидов. Однако есть сведения [5], что фосфорилирование светособирающего комплекса II увеличивает плотность поверхностного заряда тилакоидов. С этой точки зрения интересно продолжить исследования по влиянию процесса фотофосфорилирования на создание поверхностного заряда хлоропластов. На основании же полученных данных можно утверждать, что величина поверхностного заряда тилакоидов прямо связана с работой электронтранспортной цепи и что огромный вклад в процесс воз-

нирования поверхностного заряда тилакоидных мембран вносят пигмент-белковые комплексы фотосистемы I и фотосистемы II. Причина же того, что некоторым авторам не удалось зарегистрировать светоминдуцированных изменений ζ -потенциала, кроется, по-видимому, в методе выделения хлоропластов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лукаш Г. Б., Чажоровский С. К., Шукленко А. Я., Куларский Г. И., Кренделев Т. Е., Пащенко В. Э., Рубин А. Б. ДАН СССР 280, 6, 1452-1455, 1985.
2. Карамольнико С. С., Рикилянская Л. А. Электрофорез клеток и норм. и патол. тии Минск, 1974.
3. Arnon O. I. Plant Physiol., 24, 1-15, 1949.
4. Barber J. Biochim. Biophys. Acta, 594, 293-308, 1980.
5. Barber J. Ann. Rev. Plant Physiol., 33, 241-295, 1982.
6. Mercer F. V., Hodge A. J., Hope A. B., McLean J. D., Aust I. Biol. Sci. 4 1-18, 1965.
7. Nakatani N. Y., Barber J., Forrester J. A. Biochim. Biophys. Acta 504, 215-225, 1978.
8. Nakatani N. Y., Barber J. Biochim. Biophys. Acta 711, 82-91, 1980.
9. Nobel P. S., Mel H. C. Arch. Biochem. Biophys., 113 697-702, 1966.
10. Schapendonk Ad. H. C. M., Hemrika-Wagner A. M., Theuvsent A. P. R., Wong Fong Sang H. W., Vredenberg W. J., Kraughenbog K. Biochemistry, 19, 1922-1927, 1980.
11. Winget J. D., Izawa S., Good N. E. Biochemistry, 8, 2067-2077, 1969.

Получила 6 VIII 1990 г.