

УДК 584.19

БИОХИМИЯ

Э. Г. Саруханян, Н. П. Кирпичникова, Р. М. Налбандян

Пластоцианин и ферредоксин из люцерны

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. С. Давтяном 6/Х 1976)

Медьсодержащий белок,—пластоцианин, и железосодержащий белок,—ферредоксин, играют важную роль в фотосинтетических процессах растений. Первый из них принимает участие во взаимодействии двух фотосистем, т. е. обеспечивает связь системы, ответственной за разложение воды (с образованием кислорода), с системой фиксации CO_2 . Второй из этих белков принимает непосредственное участие в фиксации CO_2 (^{1,2}). Таким образом, нормальное протекание фотосинтеза в растениях невозможно без участия этих белков.

Хорошо известно, что растения, выросшие в условиях гидропонии, характеризуются высоким уровнем фотосинтетических процессов (^{3,4}). В связи с этим представляло определенный интерес выделение и сравнительное изучение свойств указанных двух металлсодержащих белков из растений, выросших в естественных и гидропонических условиях.

В данной работе сообщаются результаты, полученные при изучении люцерны (*Medicago L.*) Для получения пластоцианина и ферредоксина из люцерны была разработана следующая методика очистки. 3—5 кг материала гомогенизировали с равным количеством 0,01М фосфатного буфера, рН 7,4. Гомогенат отжимали через полотно, и к раствору добавляли 100 г целлюлозы DE—32 для адсорбции на ней кислых белков. После перемешивания в течение 1—2 ч целлюлозу собирали фильтрованием через воронку Бюхнера или центрифугированием при 3000 g в течение 5 мин. Целлюлозу тщательно промывали 0,02М фосфатным буфером, а затем белки элюировали последовательным промыванием более концентрированными растворами. Было обнаружено, что промывание примерно 300 мл 0,2М буфера приводит к практически полной элюции пластоцианина (фракция 0,2М). Последующее промывание 0,2М буфером, содержащим 0,3М KCl (фракция 0,5М), элюирует основную часть адсорбированного на целлюлозе ферредоксина. Дальнейшее промывание раствором, 0,2М буфера, содержащим насыщенный KCl, приводит к элюции лишь незначительных количеств ферредоксина. В полученной коричневой фракции главным образом содержится желе-

зосодержащий белок, свойства которого существенно отличаются от свойств ферредоксина. Таким образом, использованная процедура разделения пластоцианина и ферредоксина может быть выполнена без применения осаждения органическими растворителями или сульфатом аммония и практически может быть осуществлена без использования центрифуг. Дальнейшая очистка фракций пластоцианина и ферредоксина из люцерны была проведена по известным схемам с применением гель-фильтрации через сефадексы G-50 и G-75 и анион-обменной колоночной хроматографии (5). Благодаря применению этих процедур удается получить электрофоретически гомогенные препараты пластоцианина и ферредоксина (рис. 1).

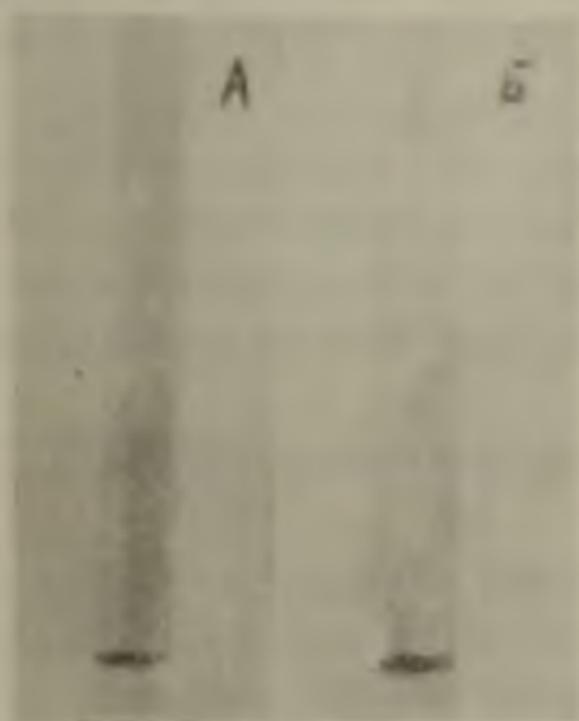


Рис. 1. Электрофореграммы белков из люцерны в полиакриламидном геле. А—пластоцианин; Б—ferredоксин. Катод сверху

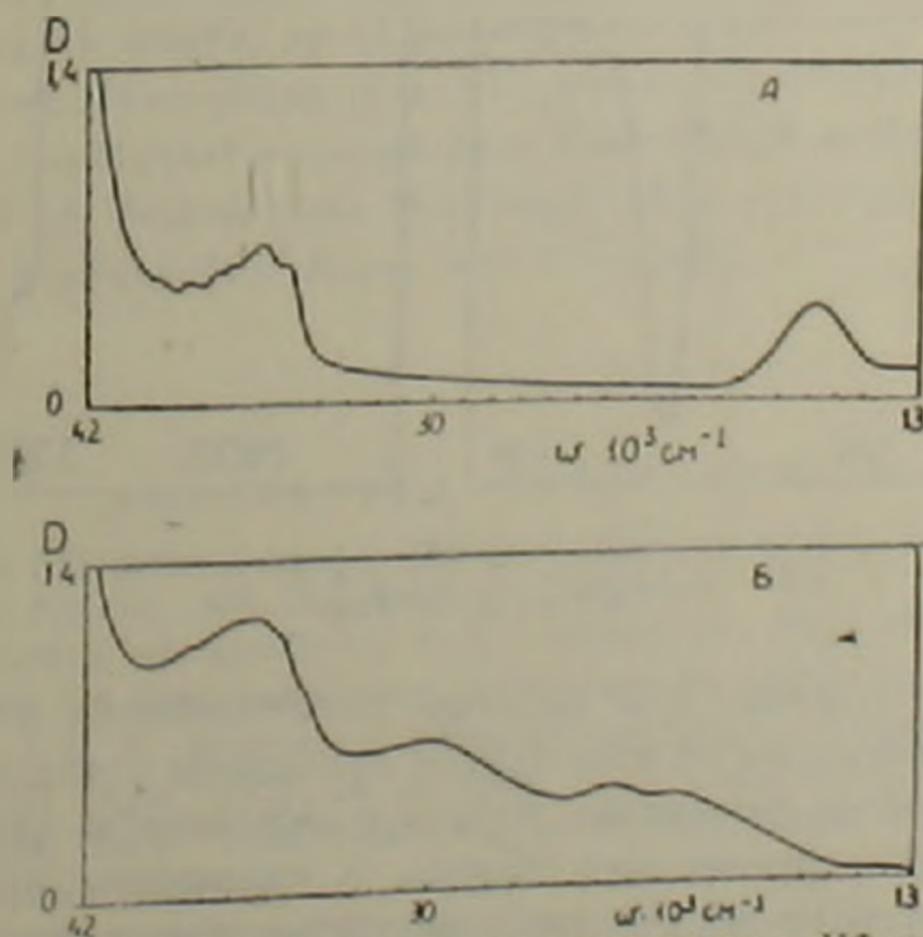


Рис. 2. Оптические спектры поглощения в УФ и видимой области пластоцианина (А) и ферредоксина (Б)

Люцерна оказалась очень удобным источником получения как пластоцианина, так и ферредоксина. Выход этих белков из 1 кг исходного материала составлял примерно 20 и 30 мг соответственно для пластоцианина и ферредоксина, причем эти величины характерны для растений, выросших как в естественных, так и в гидропонических условиях.

Дальнейшее изучение свойств этих металлсодержащих белков привело также к выводу, что белки из материала, выросшего в гидропонических условиях, практически аналогичны полученным из растений, выращенных в естественных условиях. На рис. 2 приведены оптические спектры в ультрафиолетовой и видимой области окисленных пластоцианина и ферредоксина. Тонкая структура в ультрафиолетовой области спектра, за которую ответственны фенилаланиновые остатки, наблюдается у пластоцианина и практически отсутствует в ферредоксине. Это свидетельствует о значительно меньшем содержании фенилаланина в ферредоксине по сравнению с пластоцианином. Отношение поглощений в видимой и УФ-области как для пластоцианина, так и для ферредоксина указывает на высокую чистоту полученных препаратов.

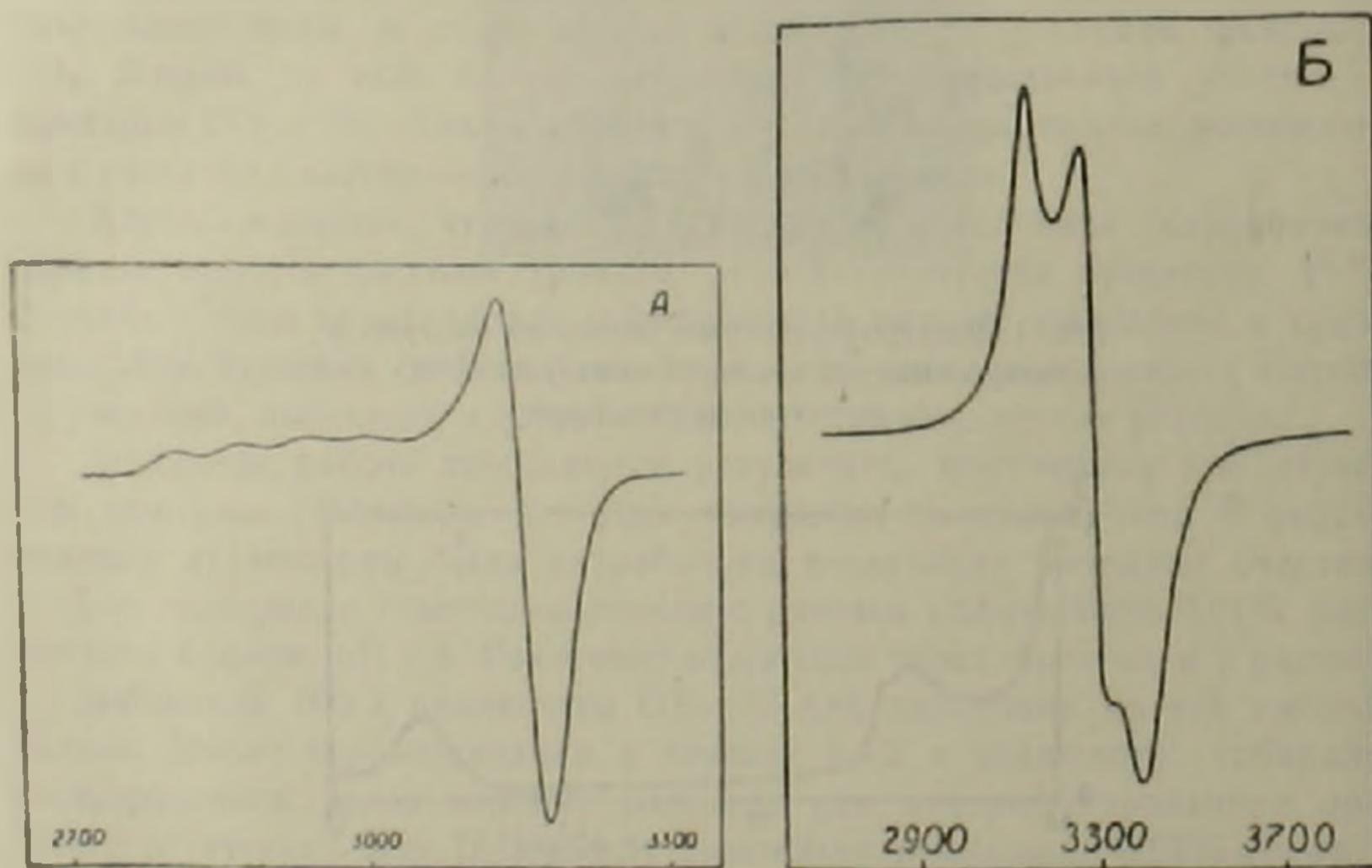


Рис. 3 Спектры ЭПР пластоцианина (А) и ферредоксина (Б) при 77 К.
Частота 9, 12 Гц

На рис. 3 показаны ЭПР-спектры пластоцианина и ферредоксина из люцерны. Параметры сигналов ЭПР приведены в подписи к рисунку. Сигналы ЭПР обнаруживаются только в окисленном пластоцианине и восстановленном ферредоксине. Форма и параметры наблюдающихся сигналов ЭПР практически полностью соответствуют форме и параметрам сигналов для пластоцианинов и ферредоксинов, выделенных из других высших растений^(6,7). Молекулярные веса пластоцианина и фер-

редоксина, оцененные методом гель-фильтрации, оказались соответственно равными 11000 и 13000, что также находится в соответствии с имеющимися данными для этих белков из других источников.

Сходство оптических спектров в видимой области, а также спектров ЭПР различных пластоцианинов и ферредоксинов свидетельствует об аналогичном окружении металла в белках, выполняющих одну и ту же функцию в растениях. Как установлено, это окружение не изменяется при изменении условий выращивания и, в частности, при переходе от естественных к гидропоническим условиям. Содержание металлов в белках также не изменяется при изменении условий выращивания. Пластоцианин содержит на молекулу один атом меди, а ферредоксин — два атома железа.

Институт агрохимических проблем и
гидропонии Академии наук Армянской ССР
Институт биохимии Академии наук Армянской ССР

Է. Վ. ՍԱՐԴԻԱՆՅԱՆ, Ն. Գ. ԿԵՐԳԵՉԵԿՈՎԱ, Ռ. Մ. ՆԱԼԲԱՆՅԱՆ

Կորեզանից ստացված պլաստոցիանին և ֆերեդոքսին

Ներկայացված հոդվածում հաղորդվում է այն մասին, որ բաց հիդրոպոնիկայի և հողային պայմաններում աճեցված կորեզան (*Medicago L.*) բույսից անջատվել են մետաղ պարունակող սպիտակուցներ, պլաստոցիանին և ֆերեդոքսին: Համեմատական ուսումնասիրվել են այդ երկու մետաղ պարունակող սպիտակուցների էՊՏ-ը, տեսանելի շրջանի ուլտրամանիշակագույն օպտիկական սպեկտրները, մոլեկուլյար կշիռը, մարրոթյան աստիճանը:

Միանման օպտիկական սպեկտրը տեսանելի շրջանում, ինչպես նաև էՊՏ սպեկտրը ցույց են տալիս, որ հիդրոպոնիկայի պայմաններում աճեցված բույսերից ստացված մետաղների (Cu, Fe) շրջապատը նույնն է, ինչ որ հողային պայմաններում աճեցված բույսերի մոտ: Մետաղների պարունակությունը սպիտակուցներում չի փոփոխվում: Պլաստոցիանինը պարունակում է մեկ ատոմ պղինձ, իսկ ֆերեդոքսինը երկու ատոմ երկաթ:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ S. Katoh, *Nature*, 186, 533, 1960. ² Non-heme Iron Proteins: their Role in Energy Conservation, ed. San-Pietro A. G. Antloch Pr., Ohio, 1965. ³ Գ. Շ. Ծառյան, Тезисы докладов XII Международного конгресса по ботанике в Ленинграде, ч. П, стр. 495, 1975. ⁴ Ե. Վ. Մեջունց, Сообщения института агрохимических проблем и гидропонии АН Арм. ССР, № 15, 1976. ⁵ H. Determann, *Gelchromatographie*, Berlin-Heidelberg, New York, 1967. ⁶ J. A. M. Ramshaw, R. H. Brown, M. D. Scawen, D. Boulter, *Biochem. et biophys. acta*, 203, 269 (1973). ⁷ D. O. Hall, R. Cammack, K. K. Rao, *Pure and Applied Chem.*, 34, 553 (1973).