

О. П. ОСИПОВА и И. В. ТИМОФЕЕВА

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКА ХЛОРОПЛАСТОВ

(Представлено академиком Н. А. Максимовым 9 V 1949)

Изучение свойств компонентов, входящих в состав хлоропластов и особенно белка как основного вещества, представляет большой биологический интерес, так как хлоропласт является органом зеленого листа, где совершается превращение неорганических веществ в органические.

При изучении химического состава хлоропластов установлено, что белки в них составляют от 50 до 60%. Данные же относительно свойств белка хлоропластов в настоящее время очень скудны и противоречивы.

Белку хлоропластов посвящена работа Менке (1), который показал, что в хлоропластах, наряду с простым белком, имеется также белок нуклеопротеидного типа.

Штоль и Видеман (2), исследовав белки хлоропластов 30 видов растений из 14 различных семейств, нашли, что белки по аминокислотному составу очень близки между собой. В белках хлоропластов были обнаружены следующие аминокислоты: цистин, аргинин, лизин, тирозин, фенилаланин и глютаминовая кислота. В белках хлоропластов не был обнаружен гистидин, и в этом авторы видят его отличие от глобина крови.

При исследовании белков хлоропластов и цитоплазмы листьев шпината Тимм (3) было обнаружено, что эти белки по аминокислотному составу почти одинаковы, за исключением некоторой разницы в содержании лизина и глютаминовой кислоты (последних больше в белках цитоплазмы). В противоположность данным Штоля и Видемана, в белках хлоропластов Тимм был найден гистидин.

Нами (4) косвенным путем, по извлекаемости хлорофилла, было показано, что свойства хлорофилл-белкового комплекса молодых и старых листьев неодинаковы.

Продолжая работу по изучению свойств хлорофилл-белкового комплекса, мы поставили перед собой задачу — определить аминокислотный состав белков хлоропластов и проследить их возрастные изменения.

Хлоропласты молодых (сбор в июне) и старых (сбор в сентябре) листьев растений фасоли были получены следующим способом: снятые с растения листья тщательно промывались водопроводной водой, измельчались на мясорубке и отжимались через полотно. Жидкость профильтровывалась через вату для отделения кусочков неразрушенной ткани и затем центрифугировалась на суперцентрифуге при 30 000 оборотах в минуту. При такой скорости на роторе осаждались осколки разрушенных хлоропластов (гранулы и кусочки стромы хлоропласта). Густая зеленая масса отмывалась на стеклянном фильтре от пигментов и ли-

пойдов спиртом, затем смесью спирта и эфира (1:1) и, наконец, эфиром. Промывание производилось до тех пор, пока промывная жидкость не становилась совершенно бесцветной. Хлоропластные вещества затем высушивались над серной кислотой, тщательно растирались и использовались для извлечения белка.

Извлечение белка производилось спиртовой щелочью (0,3% NaOH в 60% спирте) при слабом подогревании на водяной бане и тщательном взбалтывании в течение 1 часа. После отцентрифугирования остаток снова несколько раз размешивался со спиртовой щелочью той же концентрации и отцентрифугировывался. Соединенные центрифугаты профильтровывались через бумажную массу.

Белок, осажденный прибавлением разбавленной HCl, отделялся центрифугированием, промывался водой и подвергался диализу в течение 2 суток. После этого белок высушивался, как обычно, последовательно спиртом различных концентраций, эфиром и, наконец, в вакуум-эксикаторе над серной кислотой. Полученные белковые препараты имели слабо желтый оттенок. Белки хлоропластов исследовались на содержание общего азота, общей зольности, фосфора, серы и некоторых аминокислот (табл. 1).

Таблица 1

	Белок хлоропластов в % к сухому белку			Белок хлоропластов в % к сухому белку	
	молодых	старых		молодых	старых
Общий азот	15,02	14,87	Гистидин	4,97	3,64
Зольность	1,44	2,00	Аргинин *	0,48	0,64
Фосфор	следы	следы	Тирозин	4,29	4,00
Серя	0,94	0,98	Пролин	8,38	7,63
Количество гуминов	4,93	9,9	Дикарбоновые кислоты	9,65	8,15
Азот гуминов	0,46	0,94	Лизин	следы	следы
Азот гистидиновой фракции	3,64	3,37	Триптофан	2,95	4,66
Азот моноаминокислотной фракции	8,11	8,09	Цистенин	1,55	2,99
Азот α-аминогрупп	6,63	6,68			

* Определялся по методу Сакагуши.

Кроме того, определялись некоторые физические константы, как то: изоэлектрические точки белков и относительная вязкость (табл. 2).

Таблица 2

	Белок хлоропластов	
	молодых	старых
Изоэлектрическая точка	5,3—5,4	5,7—5,8
Вязкость 1% раствора белка при 22°	1,70	2,01

Аминокислотный состав определялся после кислотного гидролиза с 30% H₂SO₄ в течение 24 час. После гидролиза гексоновые основания переводились в серебряные соли. Все аминокислоты, кроме цистина, были определены методами, описанными А. Р. Кизель⁽⁹⁾. Цистин определялся по методу Фолина и Маренза в модификации Томпсетт⁽¹⁰⁾.

Фосфор определялся по методу Фиске — Суббароу (¹¹), сера — осаждением серной кислоты, получаемой при озолении с водой и селитрой (⁹).

Изоэлектрические точки белков определялись осаждением белка из 1⁰/₀ раствора в 0,4% NaOH, разбавленной HCl. Определение вязкости проводилось в вискозиметре Оствальда.

На основании анализов белковых препаратов мы можем сделать некоторые заключения относительно их свойств.

Белок хлоропластов обладает кислыми свойствами. Изоэлектрическая точка белка лежит в кислой зоне. Незначительное содержание аминокислот с щелочными свойствами (аргинин и лизин) свидетельствует также о кислых свойствах белка.

Аминокислотный состав белков хлоропластов и некоторые физические свойства их изменяются в зависимости от возраста.

Повышение вязкости белков хлоропластов старых листьев по сравнению с белками хлоропластов молодых листьев, повидимому, можно объяснить укрупнением молекулы белка с возрастом.

Изоэлектрическая точка белка старых хлоропластов несколько смещена в щелочную сторону.

Значительные колебания с возрастом наблюдаются в содержании таких аминокислот, как гистидин, пролин, дикарбоновые кислоты, триптофан и цистин. Изменения аминокислотного состава белков с возрастом, наблюдаемые раньше и на белках животного происхождения, свидетельствуют о том, что изменению подвергаются аминокислоты, несущие в организме специальные функции (⁵). Большая лабильность триптофана и дикарбоновых кислот наблюдалась при исследовании аминокислотного состава белка пшеницы на разных стадиях ее созревания (⁶).

Различное содержание цистина в анализированных белках, при одинаковом содержании общего количества серы, свидетельствует, повидимому, о том, что в белках молодых хлоропластов, наряду с цистином и цистеином, имеются также иные серусодержащие аминокислоты.

Значительные колебания в содержании аминокислоты цистина, которая присутствует всегда в виде системы цистин \rightleftharpoons цистеин, заслуживает особого внимания благодаря большому значению этой системы в окислительно-восстановительных процессах.

Очень возможно, что сульфгидрильные группы белка хлоропластов служат одним из факторов, обуславливающих восстановительную способность хлоропластов. Не исключена возможность, что белок, именно его сульфгидрильные группы, может служить одним из промежуточных переносчиков водорода в окислительно-восстановительных реакциях, протекающих в хлоропласте.

Обнаруженный нами факт непостоянства состава и свойств белков хлоропластов в зависимости от возраста листа дополняет существующие данные относительно возрастных изменений хлоропластов как в морфологическом отношении, так и в отношении их фотохимической активности (^{7, 8}).

Химические и физические изменения белка хлоропластов с возрастом, очевидно, стоят в тесной зависимости от изменения их функций.

При оценке выводов, сделанных нами, надо иметь в виду отсутствие метода выделения белка, который мог бы гарантировать абсолютную неизменяемость его (белка) во время выделения. Таким образом, нельзя считать, что полученные нами результаты полностью и во всех деталях отражают действительное состояние и свойства белков хлоропластов.

Весь белок хлоропластов, очевидно, нельзя рассматривать как компонент белково-хлорофиллового комплекса, так как, согласно имеющимся данным, хлорофилл расположен только в гранулах, остальная же строма хлоропласта свободна от него. Белок гранул и будет, повидимо-

му, тем белком, который образует с хлорофиллом белково-хлорофилловый комплекс.

Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР

Поступило
9 V 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. Menke, Z. f. physiol. Chem., 257, 43 (1938). ² A. Stoll, E. Wideman u. A. Ruedger, Verh. Schweizer Naturf. Ges., 122, 125 (1941). ³ E. Timm, Z. f. Botanik, 38, I (1942). ⁴ О. П. Осипова, ДАН, 57, 799 (1947). ⁵ А. Р. Кизель, Химия протоплазмы, М.—Л., 1940. ⁶ И. И. Дубровская, Биохимия, 2, 182 (1944). ⁷ А. А. Табенцкий, Изв. АН СССР, сер. биол., 5, 609 (1947). ⁸ Т. Ф. Андреева и Л. Е. Зубкович, ДАН, 60, 681 (1948). ⁹ А. Р. Кизель, Практическое руководство по биохимии растений, 1934. ¹⁰ S. L. Tompsett, Bioch. Jour., 25, 2014 (1931). ¹¹ С. Д. Балаховский, Микрхимический анализ крови и его клиническое значение, 1932.