

Н. М. СИСАКЯН, Э. Н. БЕЗИНГЕР и Е. Б. КУВАЕВА

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ ПЛАСТИД

(Представлено академиком А. И. Опариным 18 VIII 1950)

При изучении ферментативной активности пластид одним из нас ⁽¹⁾ была показана прочная связь некоторых ферментов со структурными образованиями клетки. Во многих случаях автолиз пластид сопровождался повышением ферментативной активности. Предположение о связи ферментов с липопротеидным комплексом пластид подтвердилось наблюдениями под электронным микроскопом над изменением структуры лейкопластов при автолизе ⁽²⁾. Таким образом, изучение химической природы белков пластид представляет несомненный интерес для выяснения характера связей ферментов со структурными образованиями организма.

Настоящее исследование посвящено аминокислотному составу белков лейкопластов сахарной свеклы. Немногочисленные работы по этому вопросу касаются, главным образом, белков, выделенных из хлоропластов. Так, Штоль и Видеман ⁽³⁾ обнаружили аргинин, лизин, тирозин, фенилаланин, глутаминовую кислоту и цистин в белках хлоропластов листьев различных семейств растений. Авторы подчеркивали отсутствие гистидина, тогда как Тимм ⁽⁴⁾ указала на наличие гистидина в белках хлоропластов из листьев шпината. О. П. Осипова и И. В. Тимофеева ⁽⁵⁾ подтвердили присутствие гистидина в белках хлоропластов листьев фасоли разного возраста. Кроме гистидина, авторы определяли аргинин, тирозин, дикарбоновые кислоты, триптофан, цистеин, следы лизина и, косвенно, пролин.

Однако перечисленные работы не касались лейкопластов. Кроме того, состав белков структурных элементов растительной клетки, очевидно, не исчерпывается обнаруженными аминокислотами.

В наших исследованиях был применен метод хроматографии распределения на бумаге. Этот способ завоевал всеобщее признание в последние годы как охватывающий большое количество отдельных аминокислот и вместе с тем очень точный и быстрый.

Пластидное вещество (лейкопласты) получалось нами после отделения на прессе сока из измельченных корней сахарной свеклы. Сок пропускался через суперцентрифугу Шарплесса при 30 000 — 31 000 об/мин. Гранулы и кусочки стромы, оседавшие на роторе, переносились в 96% спирт. Обработка спиртом повторялась 3 раза. Затем пластыды обезжиривались смесью спирта и эфира (1:1), эфиром и сушились в вакуум-эксикаторе над серной кислотой. Сухая масса делилась на две части. Одна предназначалась для получения препарата белка, другая — для препарата „пластид“. Белок выделялся трехкратным извлечением 0,3% едким натрием в 60% спирту, осаждался разбавленной соляной кислотой при pH 4,4 и подвергался диализу в при-

сутствии толуола при температуре 4° в микродиализаторе (6). Реакция на углеводы с α -нафтолом после диализа отрицательная. Затем белок, отделенный центрифугированием, сушился спиртом, эфиром и в вакуум-эксикаторе над серной кислотой.

Содержание азота в препарате было 9,13 на абсолютно сухой вес. В остатке после извлечения белка оставалось значительное количество азота. Таким образом, можно было предположить, что выделенный препарат представлял собою или часть белка или лишь некоторые фракции белков пластид. Поэтому, кроме препарата белка, исследовались аминокислоты и всего белкового комплекса пластид суммарно. Для этого обезжиренное пластидное вещество подвергалось диализу при 4° до исчезновения реакции на углеводы с α -нафтолом, сушилось спиртом, эфиром и в вакуум-эксикаторе. В полученных препаратах пластид (п) содержание азота составляло 5,52% на абсолютно сухой вес. Зольность до диализа 16,84% и после диализа 16,62%.

Гидролиз препаратов пластид и белка производился 24 часа 6 N HCl. Соляная кислота удалялась в вакууме. Сухой остаток растворялся в слегка подкисленной воде. Гумины и нерастворимые неорганические соли отделялись центрифугированием. Полученный прозрачный раствор аминокислот анализировался методом хроматографического распределения на бумаге (7,8).

Таблица 1

Значения R_F для гидролизата „пластид“ (п₃)
(Двумерная хроматограмма)

№ пятна на диаграмме	Аминокислота	Контроль		„Пластиды“ п ₃		Окраска пятен	Примечания
		фенол	„коллиндин“	фенол	„коллиндин“		
	Неизвестная . . .	—	—	0,02	0,31	Синевато-лилов.	
1	Аспарагиновая . .	0,09	0,28	0,13	0,27	Лилов.	Пятно в опыте раздвоенное
2	Глутаминовая . .	0,19	0,28	0,13 0,20	0,23 0,30	Синеват. Лилов.	Пятно раздвояно и в опыте и в контроле
3	Гликоколл . . .	0,30	0,26	0,31	0,27	Красновато-лилов.	
4	Серин	0,29	0,29	0,27	0,31	Синеват.	
5	Треонин	0,37	0,33	0,37	0,32	Лилов.	Слабо окрашен.
6	Аланин	0,47	0,33	0,49	0,31	Лилов.	Пятно яркое
7	Гистидин	0,59	0,33	0,69	0,33	Серовато-син.	Изменен. в феноле и несовпадение с контролем объясн. недостаточн. нейтрализ.
8	Оксипролин . . .	0,53	0,31	0,59	0,32	Оранжев.	
9	Валины	0,63	0,38	0,65	0,38	Лилов.	Яркое пятно
10	Пролин	0,75	0,31	0,80	0,30	Лимонно-желт.	
11	Лейцины	0,69	0,47	0,69	0,45	Лилов.	Яркое пятно
12	Тирозин	0,53	0,48	0,53	0,52	Серовато-син.	
13	Фенилаланин . .	0,65	0,51	0,72	0,52	Зелен.	
14	Лизин	0,51	0,15	0,59	0,14	Лилов.	Смещение R_F в феноле и расхожд. с контролем объясн. неточн. при нейтрализации
15	Аргинин	0,57	0,19	0,65	0,20	Лилов.	

Получение двумерной хроматограммы. Первым растворителем служил фенол, насыщенный водой, вторым — смесь из „сырого“ коллидина и α -пиколина, насыщенная водой. Одновременно с опытом ставился контроль из смеси 15 аминокислот, которые были обнаружены в гидролизатах при предварительных исследованиях.

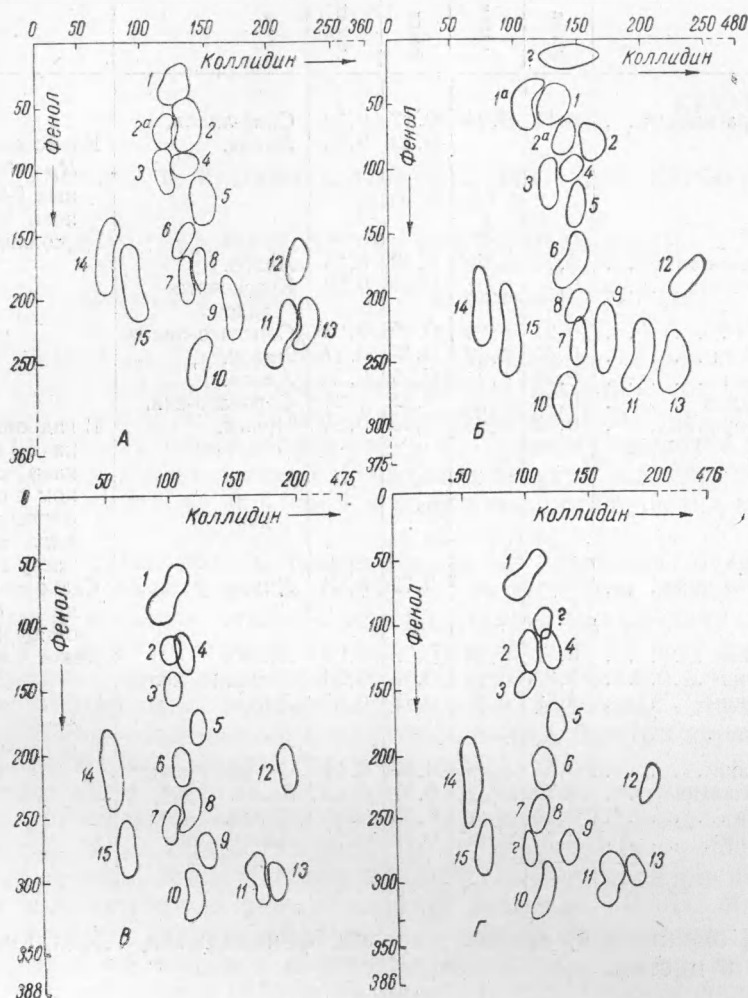


Рис. 1. А — контроль, Б — пластиды, В — контроль, Г — белок

Полученные значения R_F для контроля и препарата пластид приведены в табл. 1, а расположение пятен показано, соответственно, на рис. 1, А и Б.

Для гидролизата белка и соответствующего контроля значения R_F даны в табл. 2, а расположение пятен представлено на рис. 1, В и Г.

На двумерной хроматограмме гидролизата белка было обнаружено пятно с R_F 0,72 в феноле и 0,23 в „коллидине“ (см. табл. 2).

На хроматограмме гидролизата „пластид“ всегда появлялось синевато-лиловое пятно с R_F 0,02 — 0,06 в феноле и 0,31 в „коллидине“. Вещества эти не были нами ближе идентифицированы.

Таким образом, в результате наших исследований в белках лейкопластов корней сахарной свеклы методом хроматографии распределения на бумаге было обнаружено 16 известных аминокислот: аспарагиновая, глутаминовая, гликоколл, аланин, валин, лейцин, серин,

Значения R_F для гидролизата белка (Двумерная хроматограмма)

№ пятна на диаграмме	Аминокислота	Контроль		Белок б ₃		Окраска пятна	Примечания
		фенол	"коллина"	фенол	"коллина"		
1	Аспарагиновая . .	0,14	0,23	0,12 0,23	0,22 0,25	Сине-лилов. Лилов.	Возможно, цистин R_F на одномерных 0,23 для фенола и 0,24 для "коллина"
2	Глутаминовая . .	0,27	0,22	0,29	0,23	Лилов.	
3	Гликоколл	0,36	0,22	0,36	0,22	Красновато-лилов.	
4	Серин	0,27	0,25	0,29	0,26	Синевато-лилов.	В гидролизате белка (б ₃) пятно совпало с гистидином и оранжевая окраска выступила сквозь окраску гистидина. Слабо окрашен, но отчетливо очерченное яркое пятно
5	Треонин	0,44	0,27	0,45	0,27	Лилов.	
6	Аланин	0,54	0,24	0,55	0,26	Лилов.	
7	Гистидин	0,65	0,21	0,65	0,24	Серовато-син.	
8	Оксипролин . . .	0,62	0,25	0,65	0,24	Оранжев.	
	Неизвестная . . .	—	—	0,72	0,23	Лилов.	
9	Валины	0,72	0,28	0,72	0,30	Лилов.	
10	Пролин	0,80	0,25	0,80	0,26	Лимонно-желт.	
11	Лейцины	0,79	0,37	0,78	0,38	Лилов.	Пятна яркие. В опыте пятно с перетяжкой
12	Тирозин	0,55	0,43	0,57	0,44	Серовато-син.	
13	Фенилаланин . .	0,79	0,41	0,77	0,42	Зелен.	
14	Лизин	0,53	0,11	0,58	0,12	Лилов.	
15	Аргинин	0,70	0,13	0,72	0,14	Лилов.	

треонин, оксипролин, пролин, тирозин, фенилаланин, гистидин, лизин, аргинин и цистин.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
7 VII 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. М. Сисакян и А. М. Кобякова, Биохимия, 14, 86 (1949). ² Н. М. Сисакян, А. М. Золковер и В. И. Бирюзова, ДАН, 60, № 7 (1948). ³ A. Stoll, E. Wideman u. A. Ruegger, Verh. Schweizer Naturf. Ges., 122, 125 (1941). ⁴ E. Timm, Zs. f. Bot., 38, 1 (1942). ⁵ О. П. Осипова и И. В. Тимофеева, ДАН, 67, 105 (1949). ⁶ Г. А. Критский, Биохимия, 15, 334 (1950). ⁷ R. Consden, A. H. Gordon and A. J. P. Martin, Biochem. Journ., 38, 224 (1944). ⁸ C. E. Dent, Biochem. Journ., 43, 169 (1948).