

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Т. Ф. АНДРЕЕВА и Е. Г. ПЛЫШЕВСКАЯ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ БЕЛКА В ПРОЦЕССЕ
ФОТОСИНТЕЗА С ПРИМЕНЕНИЕМ N¹⁵**

(Представлено академиком А. И. Опариным 6 IX 1952)

В настоящее время представление об образовании белка в процессе фотосинтеза (¹⁻¹) подтверждается рядом работ (⁵⁻⁹). Однако вопрос этот окончательно не решен и требует дальнейшего изучения.

Исследование этого сложного вопроса требует применения меченых атомов, так как только работа с ними позволит проследить (на фоне большого содержания в растении уже сформированных белков и углеводов) пути превращения азота и углерода при фотосинтезе. В настоящей работе для изучения синтеза белка в зеленом листе мы применили тяжелый изотоп азота N¹⁵.

Мы считали, что использование изотопа N¹⁵ позволит нам показать новообразование белка в процессе фотосинтеза и изучить процесс синтеза белка в хлоропластах и плазме листа отдельно. Исследование проводилось следующим образом. Опытные растения махорки и кукурузы выращивались в песчаных культурах на смеси Гельригеля с 1/3 азота, благодаря чему мы получали листья, испытывающие некоторое голодание по азоту и вследствие этого имеющие сниженное количество белка. Синтез белка у таких листьев при введении минерального азота должен был быть более интенсивный, чем у листьев, выращенных на обычной питательной среде.

В качестве источника тяжелого азота употреблялся раствор сернокислого аммония, содержащий 1,5 избытка атомных процентов тяжелого азота N¹⁵. Опыты проводились с целыми листьями или с высечками из листьев. При работе с целыми листьями N¹⁵ поступал в лист через черешок, который погружался в раствор на 18—20 час. в темноте. В высечки листьев раствор вводился путем вакуум-инfiltrации.

Употреблялась концентрация сернокислого аммония от 0,1 до 0,025 мол. для листьев махорки и 0,01 мол. для листьев кукурузы. Листья, получившие таким образом меченый минеральный азот, экспонировались в течение 4—6 час. в 3 камерах. 2 камеры освещались зеркальными лампами (500 вт), дававшими на поверхности листьев освещенность в 30—40 тыс. люксов. Через одну камеру просасывался со скоростью 20 л/час воздух с 1% углекислоты, через другую — воздух, лишенный углекислоты; третья камера находилась в темноте, и через нее просасывался обычный воздух.

После экспозиции в указанных условиях листья растирались в ступке с дестиллированной водой, и полученная масса отжималась через полотно. При этом мы получали зеленую суспензию, которая при помощи центрифугирования разделялась на хлоропласты и плазму. Выделенные хлоропласты промывались водой. Во фракциях хлоропластов и плазмы

осаждался белок по методу Барнштейна — Штутцера. Определялось количество белкового азота по Кьельдалю и содержанию в нем N^{15} .

Количество N^{15} определялось на масс-спектрометре. Для этого азот белка, полученный после сжигания и отгонки по Кьельдалю в виде аммиачной соли, переводился в специальной вакуумной * установке в газообразный азот под действием щелочного гипобромита (¹⁰). Полученная таким образом проба азота, лишенная посторонних примесей, запаивалась в стеклянной ампулке и поступала на определение количества N^{15} на масс-спектрометре.

Полученные результаты приведены в табл. 1, в которой дается увеличение содержания N^{15} в белке хлоропластов и плазмы за время опыта. Количество N^{15} выражено в избытке атомных процентов N^{15} . Эта величина представляет собой превышение концентрации тяжелого азота над обычным его содержанием в природе, равным 0,37%.

Таблица 1

Увеличение содержания N^{15} в белках хлоропластов и плазмы за время опыта (избыток атомн. % N^{15})

№№ опытов	Растение	Хлоропласты			Плазма		
		свет+CO ₂	свет-CO ₂	темнота	свет+CO ₂	свет-CO ₂	темнота
3	Махорка	0,0697	0,0367	0	—	0,0698	0,0184
4	"	0,1340	0,0624	0	0,2200	0,1688	0,1615
5	"	0,0367	0,0257	0,0073	0,1477	0,3597	0,2312
7	"	0,2312	0,0587	0,0441	0,1211	-0,0073	0,1542
9	Кукуруза	0,0881	0,0330	0,0367	0,0881	0,0220	0,0771
11	"	0,0532	0,0128	0,0055	0,1652	0,2129	0,2789

В опытах 3, 4 и 5 тяжелый азот вводился путем инфильтрации высе-чек из листьев. В опытах 7, 9 и 11 раствор с N^{15} поступал в листья через черешки.

Данные по содержанию N^{15} в белках хлоропластов и плазмы даются без пересчета на общее исходное содержание белкового азота в этих фракциях листа, поэтому количественные сравнения содержания N^{15} можно проводить только в пределах данных для хлоропластов или для плазмы.

Рассматривая полученные данные, мы видим, что в результате экспозиции листьев, предварительно получивших N^{15} , в различных условиях свечения и концентрации углекислоты происходит обогащение белка хлоропластов и плазмы этим изотопом азота, что указывает на новообразование белка во время опыта.

Однако, как видно из табл. 1, обогащение белков хлоропластов и плазмы N^{15} обнаруживает различную зависимость от условий опыта. Обогащение белка хлоропластов зависит от освещения и наличия углекислоты, в плазме же этой зависимости накопления изотопа N^{15} не наблюдается. Мы видим, что наибольшее обогащение белка хлоропластов изотопом N^{15} происходит на свету в присутствии CO₂, т. е. в условиях фотосинтеза. На свету без CO₂ обогащение белка хлоропластов этим изотопом наблюдается, но оно всегда значительно меньше, чем на свету в присутствии углекислоты. Величины обогащения, однако, больше, чем в темноте; вероятно, за счет использования углекислоты, выделяющейся при дыхании.

* Выражаем глубокую благодарность Л. Н. Беллу за помощь при монтировании и проверке вакуумной установки.

В темноте азот N^{15} в белке хлоропластов либо совсем не обнаруживается, либо обнаруживается в очень небольшом количестве, что указывает на отсутствие образования белка в этих условиях. Небольшое накопление азота N^{15} в темноте (оп. 7 и 9) может быть объяснено либо частичной способностью хлоропластов синтезировать белок в темноте, либо поступлением белка, содержащего N^{15} , из плазмы.

В плазме N^{15} обнаруживается в белке при всех условиях опыта — и на свету и в темноте — примерно в одинаковом количестве. Некоторое преимущество света и углекислоты (оп. 4 и 5) объясняется, вероятно, оттоком белковых веществ из хлоропластов в плазму, но это преимущество не всегда наблюдается (оп. 7, 9 и 11). Обогащение белка плазмы листа N^{15} независимо от освещения указывает на темновой путь образования белка плазмы.

На основании данных табл. 1 можно рассчитать процент азота в белке, который подвергся обмену во время опыта*. Эти величины приведены в табл. 2.

Таблица 2

Количество неорганического азота, поступившего в белок за время опыта (в % от общего содержания азота в белке)

№№ опытов	Хлоропласты			Плазма		
	свет+CO ₂	свет-CO ₂	темнота	свет+CO ₂	свет-CO ₂	темнота
3	4,64	2,45	0	—	4,65	1,22
4	8,93	4,16	0	14,66	11,25	10,76
5	2,45	1,71	0,48	29,84	23,98	15,41
7	15,41	3,91	2,94	8,07	-0,48	10,20
9	5,87	2,20	2,25	5,87	1,46	5,14
11	3,54	0,85	0,36	1,11	1,42	1,85

Данные, полученные с азотом N^{15} , подтверждают наш вывод⁽⁹⁾ о том, что синтез белка в листе за счет минерального азота может осуществляться разными путями: с одной стороны, на свету при непосредственном участии процесса фотосинтеза, с другой, в темноте, вероятно, при использовании углеводов, являющихся источником энергии и углерода. Темновой процесс локализован в плазме. Для хлоропластов же свойственно образование белка на свету в присутствии углекислоты, т. е. этот процесс уже непосредственно связан с процессом фотосинтеза. Таким образом, наши данные указывают на образование белка в процессе фотосинтеза. Мы вправе считать белок продуктом фотосинтеза: он образуется в органах листа, осуществляющих фотосинтез, — в хлоропластах — и только тогда, когда в хлоропласте идет процесс фотосинтеза.

Применение изотопа N^{15} позволило таким образом:

1) Обнаружить образование белка в хлоропластах в процессе фотосинтеза.

2) Показать, что образование белка в процессе фотосинтеза не является результатом перестройки и использования органического азота листа, а является процессом новообразования белка за счет минерального азота.

3) Подтвердить наличие двух путей синтеза белка в листе.

* Эта величина совпадает с избытком атомных процентов при 100% обогащении.

В заключение выражаем глубокую благодарность проф. А. А. Ничипоровичу за руководство и ценные указания при проведении настоящей работы.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева
и Биофизический институт
Академии наук СССР

Поступило
23 VI 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. В. Сапожников, Белки и углеводы зеленых листьев, как продукты ассимиляции, 1894. ² В. Н. Любименко, Фотосинтез и хемосинтез в растительном мире, 1935. ³ В. О. Таусон, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3 (1947). ⁴ А. А. Ничипорович, Вестн. АН СССР, № 9 (1950). ⁵ А. А. Ничипорович, Тр. ИФР АН СССР, 8, в. 1 (1952). ⁶ Н. П. Воскресенская, ДАН, 72, № 1 (1950). ⁷ Л. А. Незговорова, ДАН, 79, № 3 (1951). ⁸ О. П. Осипова, И. В. Тимофеева, ДАН, 80, № 3 (1951). ⁹ Т. Ф. Андреева, ДАН, 78, № 5 (1951). ¹⁰ Получение и определение меченых атомов, Сборн. статей под ред. проф. В. А. Плесскова, 1948.