

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

ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ИЗ ПЛАСТИД И ЕГО ХАРАКТЕРИСТИКА

(Представлено академиком А. И. Опариным 31 VII 1952)

При исследовании каталитических функций пластид было высказано предположение^(1, 2), что исключительное богатство этих структурных образований ферментами объясняется не только их способностью связывать ферменты, но и тем, что в пластидах происходит синтез каталитических белков. В связи с этим возникает необходимость изучения природы белков пластид. Это тем более существенно, что каталитическая функция пластид прежде всего определяется природой самих белков.

Многочисленные попытки исследователей выделить индивидуальные белки из пластид сталкивались с серьезными затруднениями и не увенчались успехом^(3, 4). Неудачи, повидимому, обуславливаются сложностью структуры протеидного комплекса пластид. Сильные воздействия, применявшиеся для разрушения этих комплексов, вряд ли могли привести к получению неизмененных белковых соединений⁽⁵⁾. Извлечение щелочью, применявшееся большинством исследователей, должно было неизбежно привести к получению неоднородной смеси белков⁽⁶⁻⁹⁾. Уже после окончания экспериментальной части настоящей работы было опубликовано сообщение о выделении из хлоропластов клевера кристаллического хлорофилл-липопротеидного комплекса⁽¹⁰⁾. Автор применил извлечение α -пиколином и последующее осаждение диоксаном, что позволило удалить из комплекса каротиноиды. Кристаллический препарат содержал лишь 8,48% азота на сухой вес, 38,8% липоидов и 3,39% золы.

Все перечисленные работы касаются выделения белков из хлоропластов. Попытки выделения однородных белковых веществ из лейкопластов не предпринимались.

Ранее нами были получены препараты белка из лейкопластов сахарной свеклы извлечением 0,3% спиртовой щелочью. Препараты содержали 16,67% азота и 20 аминокислот, характерных для белков⁽¹¹⁾. Как нами уже отмечалось, эти препараты белков не могли претендовать на однородность. Однако, в связи с исследованием самой каталитической функции пластид, возникает необходимость изучения свойств индивидуальных белковых соединений и, следовательно, их фракционированное выделение из пластид.

В настоящей работе из лейкопластов сахарной свеклы было выделено индивидуальное белковое соединение. Белки извлекались из лейкопластов этиловым спиртом после предварительной обработки суспензии пластид соляной кислотой. Возможность извлечения белка из пластид спиртом лишь после предварительной их обработки соляной кислотой позволяет высказать предположение, что воздействие кислоты направлено на нарушение связи белка с другими веществами пластид.

Как показало электрофоретическое исследование, проведенное методом подвижной границы Тизелиуса, в спиртовую вытяжку переходило по крайней мере три различных белка⁽¹²⁾. Изменяя pH раствора, нам

Таблица 1

Извлечение белка из пластид спиртом различной концентрации. (Содержание белка дано в % от первоначального его количества в лейкопластах).

Условия опытов	в лейкопластах	В спиртовой вытяжке						
		серия опытов						
		1		2		3		
Концентрация спирта в %	—	60	77	70	78	70	77	90
Количество белка в %: после предварительной обработки HCl без предварительной обработки HCl . . .	100	6,6	50,0	30,2	30,2	50,6	48,0	5,7
	—	—	—	—	—	8,5	7,8	—

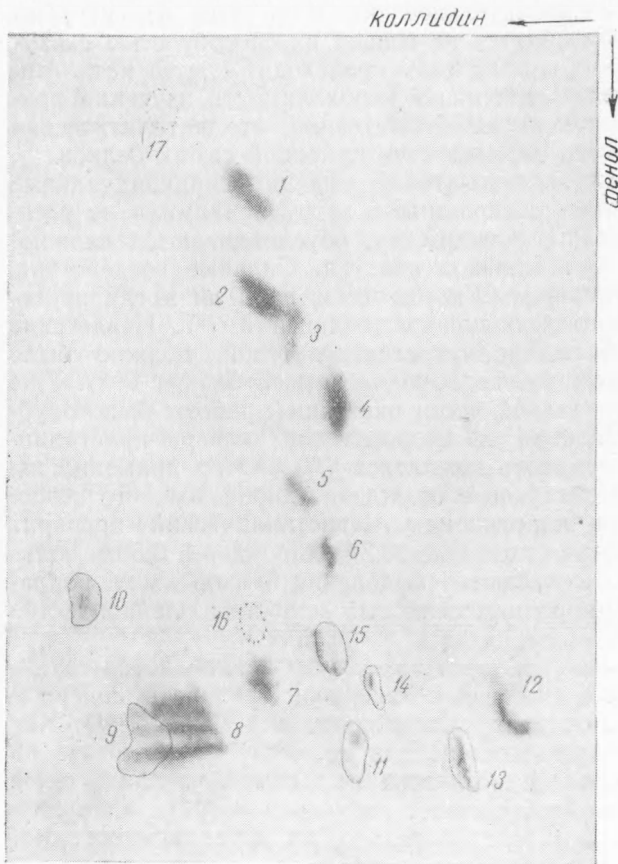


Рис. 1. Опыт — белок. 1 — аспарагиновая кислота, 2 — глютаминовая кислота, 3 — серин, 4 — гликоколл, 5 — треонин, 6 — аланин, 7 — валин, 8 — лейцины, 9 — фенилаланин, 10 — тирозин, 11 — пролин, 12 — лизин, 13 — аргинин, 14 — γ -аминомасляная кислота, 15 — гистидин, 16 — метионин сульфон, 17 — цистеиновая кислота

удалось выделить препарат, электрофоретическое исследование которого показало, что он представляет собой индивидуальный белок. Подвижность его в электрическом поле совпадала с подвижностью одного из трех белковых компонентов спиртовой вытяжки. Препарат содержал 12,7% азота и фосфор. Для белка характерна легкая растворимость в 70—80% спирте при pH 2,5—3 и в 0,2—0,3% водной щелочи. Белок выпадал из спиртовых растворов при изоэлектрической точке, которая, очевидно, лежит в пределах pH 5—6. Препарат не растворялся в воде и в растворах нейтральных солей и осаждался 3% раствором трихлоруксусной кислоты.

Осадок давал биуретовую реакцию.

В гидролизате препарата обнаружено 17 аминокислот (см. рис. 1): аспарагиновая, глютаминовая кислоты, гликоколл, аланин, валин, лейцины, серин, треонин, тирозин, фенилаланин, пролин, гистидин, лизин, аргинин, пятно на месте γ -аминомасляной кислоты, цистин и метионин.

лин, лейцины, серин, треонин, тирозин, фенилаланин, пролин, гистидин, лизин, аргинин, пятно на месте γ -аминомасляной кислоты, цистин и метионин.

Экспериментальная часть

Пластиды получались из корней сахарной свеклы сорта Верхнячка на суперцентрифуге Шарплесса при 30 000—31 000 об/мин. описанным ранее способом (13, 14). К мезге добавлялся 0,6 М раствор глюкозы, что соответствовало концентрации сахарозы в соке свеклы. Осажденные на роторе пластиды промывались для удаления следов цитоплазматических белков раствором глюкозы. Пластидный материал из различных образцов свеклы содержал 2,4—2,8% белкового азота, что составляет 15,0—17,3% белка на сухой вес. Определение производилось как по методу Войта (15), так и осаждением 2 и 4% трихлоруксусной кислоты и последующим сжиганием по микрокельдалю.

Для выделения белка пластидный материал тщательно растирался в небольшом количестве дистиллированной воды. рН водной суспензии доводилось соляной кислотой до 2,5—3. К растертой массе добавлялся спирт с таким расчетом, чтобы его концентрация достигала 75—78%. Без предварительной обработки соляной кислотой белок из пластид практически не извлекался (табл. 1).

Концентрация спирта была избрана на основании опытов, результаты которых представлены в табл. 1.

Белок извлекался при перемешивании и охлаждении в течение 3—4 час. и затем раствор отделялся от пластид центрифугированием. Извлечение повторялось 3—4 раза. Спирт отгонялся в вакууме при температуре бани 30—35°. Остаток многократно промывался водой до исчезновения реакции с α -нафтолом, растворялся в кислоту 75—78% спирту (рН 2,5—3) и осаждался добавлением спиртовой щелочи при рН 5—6. При этом перерастворении удалялось значительное количество веществ, очевидно, липоидного характера. Затем препарат сушился 96% и абсолютным спиртом, эфиром и в вакуум-эксикаторе.

Препараты представляли собой легкий, слегка пигментированный порошок. Они содержали 12,61 и 12,72% азота (определение азота производилось по микрокельдалю). В препаратах определялось также содержание белка по биуретовой реакции в осадке от трихлоруксусной кислоты в фотоэлектроколориметре (16). Количество белка составляло 84,8—86,3% от сухого веса. Препарат содержал фосфор. Он очень лег-



Рис. 2. Контроль. Обозначения те же, что на рис. 1

ко растворялся в кислом 75—78% спирту и в 0,2—0,3% водной щелочи. Не растворялся в воде и в растворах нейтральных солей.

Гидролиз препарата производился 6 *N* соляной кислотой. Гидролизат после соответствующей обработки (¹¹) исследовался методом распределительной хроматографии на бумаге на присутствие аминокислот. Первым растворителем был фенол, насыщенный водой, вторым — смесь коллидина и α -пиколина, также насыщенная водой. Для обнаружения пентен аминокислот применялся раствор нингидрина в *n*-бутиловом спирту.

В составе препарата было обнаружено 15 аминокислот. После обработки гидролизата перекисью водорода на холоду (¹¹) проявлялось еще два пятна, соответствующие производным цистина и метионина, а именно цистеиновой кислоте и метионинсульфону. Фотографии хроматограмм опыта и контроля, состоящего из смеси аминокислот, представлены на рис. 1 и 2. Аминокислоты, пятна которых были слабо выражены на хроматограмме из-за низкой концентрации, а также пятно пролина для большей четкости обведены контуром. Пятна цистеиновой кислоты и метионинсульфона, полученные в другом опыте, обозначены для удобства на общей хроматограмме в виде кружков, обведенных пунктиром.

Таким образом, из лейкопластов корней сахарной свеклы нами выделен белок.

Белковая природа веществ доказана его аминокислотным составом, значительным содержанием азота, растворимостью и реакциями на белки. При электрофорезе в спиртовогликоловом буфере (рН 3,3 и концентрации спирта 75%) белок оказался однокомпонентным. Присутствие фосфора в белковом соединении указывает на его протеидную природу.

Поступило
31 VII 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. М. Сисакян, В. И. Бирюзова, А. М. Кобякова, Биохимия, 16, 449 (1951). ² Н. М. Сисакян, А. М. Кобякова, Биохимия, 17, 368 (1952). ³ А. Фрей-Вислинг, Субмикроскопическое строение протоплазмы и ее производных, М., 1950, стр. 214, 216. ⁴ J. Bonner, Plant Biochemistry, N. Y., 1950, p. 257—259. ⁵ E. L. Smith, J. Gen. Physiol., 24, 565 (1941). ⁶ W. Menke, Zs. Botanik, 32, 273 (1938). ⁷ О. П. Осипова, И. В. Тимофеева, ДАН, 67, 105 (1949). ⁸ E. Timm, Zs. Botanik, 38, 1 (1942). ⁹ Н. М. Сисакян, Э. Н. Безингер, Е. Б. Куваева, ДАН, 74, 987 (1950). ¹⁰ S. Takashima, Nature, 169, 182 (1952). ¹¹ Н. М. Сисакян, Э. Н. Безингер, Е. Б. Куваева, Биохимия, 16, 358 (1951). ¹² Н. М. Сисакян, С. С. Мелик-Саркисян, Э. Н. Безингер, Биохимия, 17, в. 5 (1952). ¹³ Н. М. Сисакян, А. М. Кобякова, Биохимия, 13, 88 (1948). ¹⁴ А. С. Вечер, Изв. АН СССР, сер. биол., 3, 270 (1949). ¹⁵ E. Voit, Zs. Biol., 84, 153 (1926). ¹⁶ H. W. Robison, C. G. Hogden, J. Biol. Chem., 135, 727 (1940).