

Вильве ЯАСКА

## НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

К настоящему времени накопилась обширная литература о высокой пероксидазной активности в растениях или в отдельных их органах. Согласно определению, пероксидаза в них окисляет с участием перекиси водорода различные растительные полифенолы и ароматические амины. Помимо участия непосредственно в пероксидазной реакции этот фермент обладает оксидазными функциями и способен катализировать и без перекиси, но при наличии определенных кофакторов окислительное декарбоксилирование некоторых аминокислот (Mazelis, 1962; Klämbt, 1964; Riddle, Mazelis, 1965) и органических кислот (Kenten, Mann, 1953; Shannon и др., 1963, 1966), а также окисление фенолов (Иванова, Рубин, 1962; Klapper, Hackett, 1963; La Du, Zannoni, 1963). Кроме того, выяснилось, что в митохондриях растений пероксидаза может переносить водород, связанный в НАД·Н<sub>2</sub> или НАДФ·Н<sub>2</sub>, на молекулярный кислород и тем самым быть одним из звеньев электронной транспортной цепи дыхания (Петроченко, Колесников, 1966; Иванова и др., 1967; Yokota, Yamazaki, 1965).

Несмотря, однако, на множественность реакций, катализируемых этим ферментом *in vitro*, истинная физиологическая сущность его *in vivo* все еще остается не раскрытой. Некоторые авторы считают (Манская, 1948; Lipetz, Garro, 1965; Harkin, Obst, 1973), что пероксидаза благодаря способности катализировать окисление и гидроксילирование фенольных соединений может участвовать в биосинтезе лигнина. Имеются данные (Yang, 1967) о роли пероксидазы в биосинтезе этилена в растениях. Обнаружение пероксидазной активности у ферментной системы, расщепляющей фитогормон 3-индолилуксусную кислоту (ИУК), привело многих авторов к предположению о тождественности пероксидазы и оксидазы 3-индолилуксусной кислоты (Galston и др., 1953; Bastin, 1964; Hoyle, 1972). Это указывает на возможную регулирующую роль пероксидазы в росте и развитии растений.

Известно, что в различных органах растений пероксидаза присутствует во множественных молекулярных формах — изоформах, подвергающихся в течение онтогенеза значительным изменениям. Возникает вопрос, являются ли множественные формы пероксидазы носителями различной физиологической функции и различаются ли они между собой по каким-либо каталитическим свойствам.

В настоящей статье рассматривается субстратная специфичность анодных изоформ пероксидазы корней и coleoptилей пшеницы *T. dicocum* (Schrank) Schuebl. в отношении различных фенольных соединений и ароматических аминов. Изучается реакция различных изоформ

пероксидазы на действие некоторых ингибиторов и их способность окислять различные фенольные субстраты без наличия  $H_2O_2$ , т. е. проявлять оксидазную активность. При помощи фракционирования на колонке диэтиламиноэтил (ДЭАЭ)-целлюлозы предпринята попытка разделить фракции с активностью оксидазы 3-индолилуксусной кислоты и пероксидазной активностью.

### Материал и методика

Изолированные и промытые дистиллированной водой 5-дневные корни или колеоптили (с первым листом) гомогенизировались (для электрофореза) на холоде буферной смесью, состоящей из 0,05 *M* трис-оксиметил-аминометана (трис), 0,04 *M* аскорбиновой кислоты, 0,001 *M* ЭДТА- $Na_2Mg$  и 0,005 *M* цистеина в соотношении 500 мг тканей на 2,0 мл смеси. Дальнейшее изготовление гомогената, полимеризация гелей и электрофорез белков в анионной и катионной системе проводились согласно методике, описанной ранее (Яска, Яска, 1973). Для выявления пероксидазной активности гель после электрофореза выдерживался в течение 15 мин в 20 мл буферного раствора соответствующего рН, который затем заменялся 20 мл того же буфера с добавлением окисляемых субстратов в следующих комбинациях и конечных концентрациях: 1) *m*-фенилендиамин 5 мМ+пирокатехин 2 мМ; 2) *m*-фенилендиамин 5 мМ+кофейная кислота 2 мМ; 3) гваякол 1 мМ; 4) *o*-дианизидин дигидрохлорид 0,5 мМ; 5) *o*-дианизидин дигидрохлорид 0,5 мМ+пирокатехин 2 мМ; 6) 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид 2 мМ. Концентрированные растворы *m*-фенилендиамина (0,05 *M*) и гваякола (0,01 *M*) изготовляли на 0,05 *M* растворе щавелевой кислоты. Пероксидазную активность в гелях обнаруживали после внесения через 15 мин в смесь 0,1 мл 1,5%-ной  $H_2O_2$ .

Применяемые ингибиторы, которые добавлялись в реакционную смесь одновременно с окисляемыми субстратами, имели конечную концентрацию: гидроксилламин сульфат — 0,07 *M*, фенилгидразин гидрохлорид — 0,25—2 мМ, *o*-оксихинолин — 1—2 мМ.

Гистохимическое выявление ауксиноксидазной активности проводили в основном по методу Эндо (Endo, 1968). После электрофореза гель оставляли на 15—20 мин в 0,2 *M* калий-фосфатном буфере (рН 6,1), а затем переводили в 10 мл инкубационную смесь, состоящую из 2 мМ ИУК, 1 мМ  $Mn^{++}$  и 1 мМ дихлорфенола в 0,2 *M* калий-фосфатном буфере (рН 6,1). После выдерживания 35 мин в темноте смесь заменяли раствором диазотированного *o*-дианизидина, полученного путем диазосочетания 2,0 мл 0,01 *M* *o*-дианизидин дигидрохлорида в 0,6 *M*  $HCl$  с 0,2 мл холодного 7%-ного  $NaNO_2$  и нейтрализации 10 мл 0,1 *M* натрий-маленатным буфером до рН 6. Гели оставляли в темноте на ночь. Между диазониевой солью и промежуточными продуктами распада ИУК образуется труднорастворимое соединение.

Гомогенат для хроматографии белков на ДЭАЭ-целлюлозе готовили растиранием 16÷20 г промытых дистиллированной водой 7-дневных листьев со стеблями или корней *T. discolor* с 30 или 40 мл холодного трис-аскорбинового буфера вышеприведенного состава. Полученную смесь отжимали через планктоновое полотно и экстракт центрифугировали в рефрижераторной центрифуге при 18 000 *g* в течение 20 мин. Из надосадочной жидкости осаждали белок 30%-ным  $(NH_4)_2SO_4$  и отстаивали в течение 2—3 ч. После центрифугирования в течение 15 мин при 18 000 *g* образовавшийся осадок выбрасывали, а из надосадочной жидкости осаждали белок  $(NH_4)_2SO_4$  70%-ного насыщения и оставляли на холоде примерно 12 ч. Полученный после центрифугирования (18 000 *g*, 15 мин) белковый осадок растворяли в 4,0 мл 0,02 *M* трис- $HCl$  буфера с рН 7,2, куда для большей вязкости добавляли сахарозу до 30%-ной конечной концентрации и замораживали для хранения. Колонку ДЭАЭ-целлюлозы (фирма «Reanal», фактор набухаемости 9,0 мл/г сухого вещества, номинальная емкость 0,6—0,8 мг-экв/г) готовили общепринятым способом, обрабатывая 20 г анионита последовательно дистиллированной водой, 300 мл 0,5 н.  $HCl$  и

300 мл 0,5 н. NaOH. Отмытый дистиллированной водой до pH 7 анионит суспендировали в 0,02 М трис-HCl и еще дважды путем декантации обрабатывали тем же буфером. Суспензию ДЭАЭ-целлюлозы загружали в колонку с пористым стеклянным фильтром на дне, отстаивали, а затем многократно промывали 0,02 М трис-HCl буфером до pH вытекающего раствора 7,2. Сверху колонку ДЭАЭ-целлюлозы покрывали 0,5 см слоем сефадекса G-25, предварительно обработанного тем же буфером.

Для хроматографирования на колонку осторожно насливали 2,0 мл белкового экстракта листьев и стеблей (10 г сырого веса ткани) или 2,0 мл белкового экстракта корней (8 г сырого веса ткани). Величина колонки 2,0×20 см. Скорость протекания элюирующего раствора 50 мл/ч. Вымывание фракций с колонки проводили градиентным способом, повышая сначала главным образом pH, а в последующем и молярность элюирующего раствора. Элюирование начинали 55 мл исходного трис-HCl буфера (0,02 М трис+0,018 М HCl), а затем пропускали раствор, образующийся в смесилах из 100 мл 0,02 М трис-HCl и 100 мл 0,02 М трис. Дальнейшее повышение pH и молярности происходило при смешивании 50 мл буфера, содержащего 0,02 М трис и 0,01 н. HCl, с 50 мл раствора 0,02 М трис, 0,005 М HCl и 1 М NaCl. Элюирование завершали 200 мл раствора 0,02 М трис и 1 М NaCl. Вытекаемый из колонки элюат нагнетали при помощи перистальтического насоса «Вариоперлекс 12000» (LKB, Швеция) через проточный УФ-анализатор «Увикорд II-8300» (LKB) и регистрировали фракции белка по поглощению при 280 нм самопишущим регистратором постоянного тока LKB 6500. Фракции по 6,9 мл на пробирку собирали при 2°C в коллектор фракций «Ультрорак LKB 7000», помещенный в холодильную камеру LKB 5202-1.

Пероксидазную активность (донор: перекись водорода — оксидоредуктаза; КФ 1.11.1.7) во фракциях определяли колориметрически по окислению 1 мМ *o*-дианизидин дигидрохлорида 0,8 мМ перекись водорода в 0,12 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ —NaOH буфере (pH 6,0) с добавлением свежеприготовленного раствора детергента твин-80 до 0,1%-ной конечной концентрации. По нашим предварительным опытам применение *o*-дианизидина вместо обычно используемого гваякола для определения пероксидазной активности позволяет значительно повысить чувствительность реакции. Реакцию начинали введением 0,2 или 0,5 мл соответствующе разбавленного элюата. Общий объем реакционной смеси 5,0 мл. Изменение оптической плотности измерялось на ФЭК-56 с светофильтром № 5 с интервалами 60 сек в течение первых 3 мин. За единицу пероксидазной активности принимали величину изменения оптической плотности ( $D$ ) за 60 сек. Результаты пересчитывали на 0,5 мл исходного элюата.

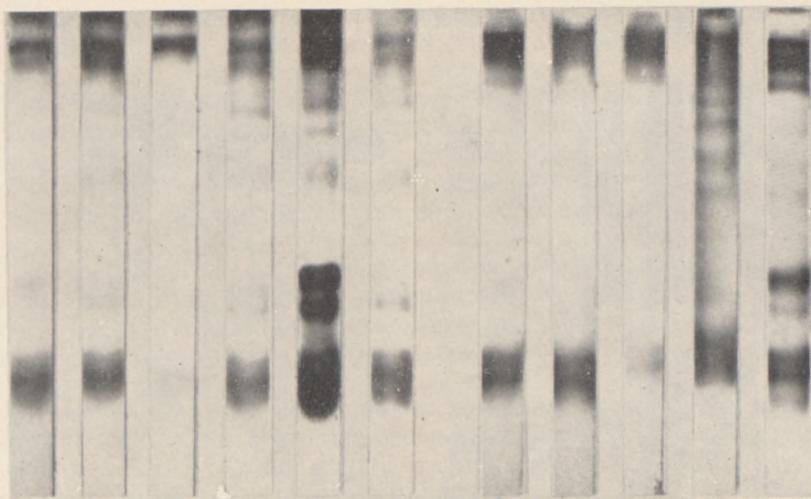
Активность ауксиноксидазы определяли спектрофотометрически по модифицированному методу Гордона и Вебера (Gordon, Weber, 1951) по скорости разрушения ИУК при комнатной температуре. К 0,9 мл реакционной смеси, изготовленной на 0,1 М натрий-фосфатном буфере с pH 6,0 и содержащей  $2 \cdot 10^{-4}$  М ИУК,  $1 \cdot 10^{-4}$  М 2,4-дихлорфенола и  $1 \cdot 10^{-4}$  М  $\text{MnCl}_2$ , добавляли 0,1 мл подходяще разбавленного ферментного экстракта. После 30-минутного инкубирования добавляли 2,0 мл реактива Сальковского (0,01 М  $\text{FeCl}_3$  в 42%-ной  $\text{HClO}_4$ ). После перемешивания и выдерживания в темноте в течение 30 мин измеряли оптическую плотность ( $D$ ) на спектрофотометре СФ-4А при 525 нм. Об ауксиноксидазной активности судили по разности оптических плотностей холостого опыта и испытуемого раствора.

## Результаты и обсуждение

Пероксидазная активность в колеоптилях и корнях *T. dicocum*, как видно из электрофореграмм 1—6 на рис. 1 А (для колеоптилей) и 1—5 на рис. 1 Б (для корней), складывается из активностей ряда изоформ фермента, способных в слабокислой среде при pH 4,8 окислять *o*-дифенолы — пирокатехин и кофейную кислоту, монофенол — гваякол, а также ароматические амины — *o*-дианизидин и 3,3'-диаминобензидин. Распределение изоформ фермента на электрофореграммах при применении

А

Б



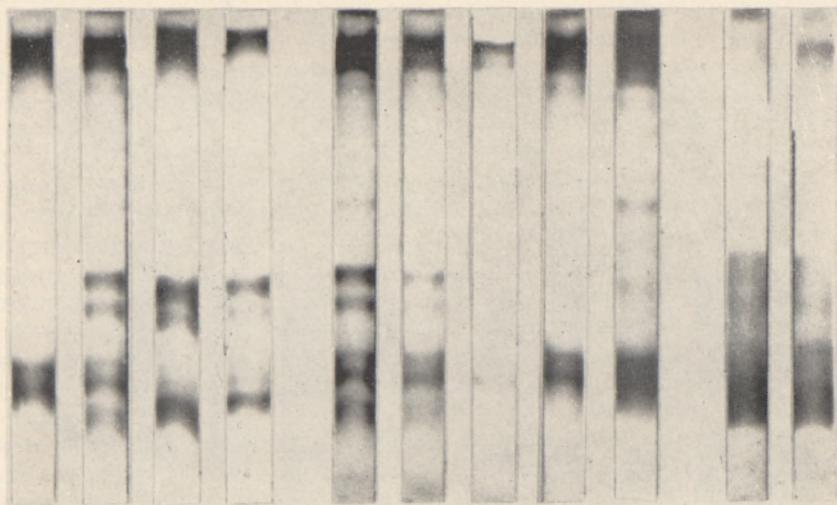
1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5

Рис. 1. Субстратная специфичность изопероксидаз колеоптилей (вместе с первым листом) (А) и корней (Б) *T. discolor*. 1 — 5 мМ м-фенилендиамин+2 мМ пирокатехин, 2 — 5 мМ м-фенилендиамин+2 мМ кофейная кислота, 3 — 1 мМ гваякол, 4 — 0,5 мМ о-дианизидин, 5 — 0,5 мМ о-дианизидин+2 мМ пирокатехин, 6 — 2 мМ 3,3'-диаминобензидин.

А

Б

В



1 2 3 4 1 2 3 4 5 1 2

Рис. 2. А — зависимость активности изопероксидаз корней от рН (субстрат о-дианизидин+пирокатехин), 1 — рН 3,6; 2 — рН 4,8; 3 — рН 7,4; 4 — рН 8,9.

Б — действие некоторых ингибиторов на активность изопероксидаз корней. 1 — контроль, 2 — 0,07 М гидроксилламин, 3 — 1 мМ фенилгидразин, 4 — 0,25 мМ фенилгидразин, 5 — 2 мМ о-оксихинолин.

В — о-дифенолоксидазная активность изопероксидаз. 1 — колеоптиль, 2 — корни.

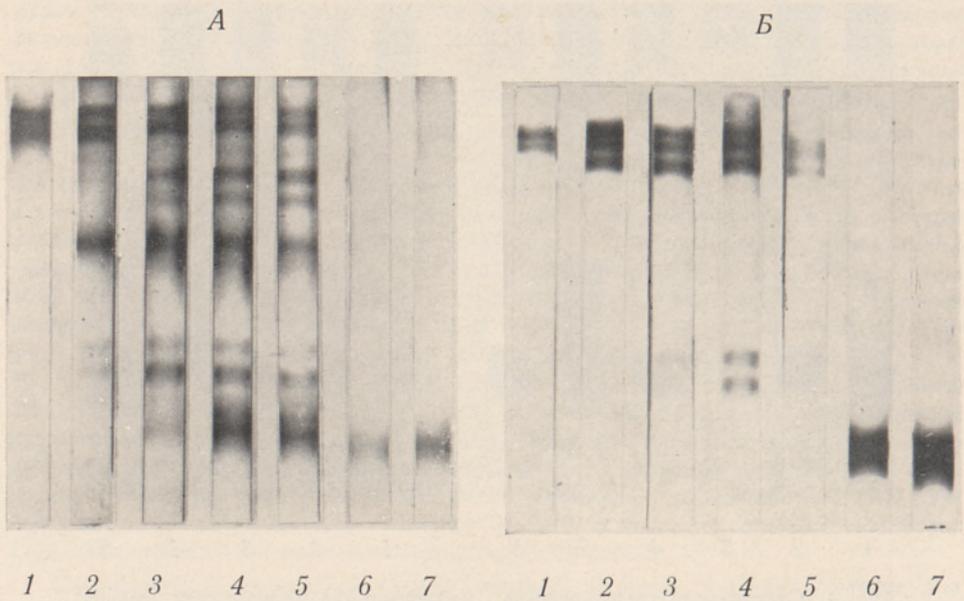


Рис. 4. Состав анодных изопероксидаз двух фракций листьев и стеблей (А) и корней (Б) *T. discosum*, выделенных на ДЭАЭ-целлюлозе. 1—5 электрофореграммы первой фракции, 6—7 электрофореграммы второй фракции.

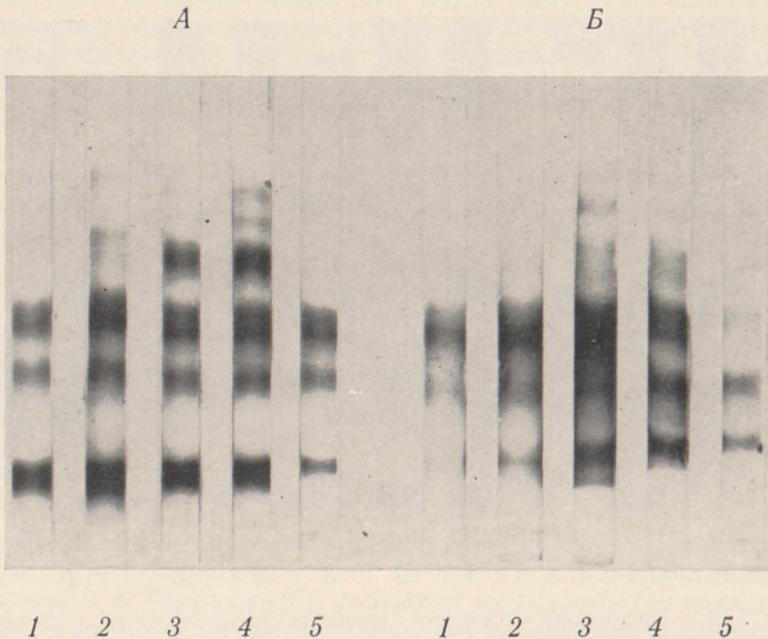


Рис. 5. Состав катодных изопероксидаз листьев и стеблей (А) и корней (Б) *T. discosum*, входящих в состав первой фракции.

различных субстратов весьма сходно: во всех случаях наиболее интенсивно окрашиваются две-три малоподвижные зоны изопероксидаз, расположенные в верхней части электрофореграммы, и наиболее быстро движущаяся широкая зона, состоящая из трех-четырех близкорасположенных и легко сливающихся при окрашивании зон изопероксидаз. Интенсивность окрашивания двух последовательно расположенных изопероксидаз со средней электрофоретической подвижностью существенно зависит от применяемого субстрата. Относительно большинства испытанных субстратов они обнаруживают низкую активность и часто, особенно при электрофорезе экстрактов корней, не выявляются на электрофореграммах.

Наиболее быстро и интенсивно окрашиваются изопероксидазы при окислении смеси *o*-дианизидина и пирокатехина (электрофореграмма 5 на рис. 1 А и Б). Продолжительное выдерживание гелей в реакционной смеси, необходимое для четкого выявления изопероксидаз при окислении других субстратов, приводит в случае смеси *o*-дианизидина и пирокатехина к образованию широких темно-фиолетовых зон на слабоокрашенном фоне. Окисление одного *o*-дианизидина (электрофореграмма 4 на рис. 1 А и Б) дает также весьма интенсивные сначала зеленые, а затем бурые зоны, однако продукты реакции здесь менее стабильны и быстро образуется фон.

Из испытанных субстратов гваякол окисляется наименьшим количеством изоформ пероксидазы (электрофореграмма 3 на рис. 1 А и Б). В этом случае на электрофореграмме отсутствует ряд изоформ со средней электрофоретической подвижностью, выявляющихся при использовании других доноров электронов, и некоторые изопероксидазы с наибольшей электрофоретической подвижностью.

Когда в качестве пероксидазных субстратов применялись пирокатехин, кофейная или хлорогеновая кислота в отдельности без добавления *o*-дианизидина, обнаруживались диффузные зоны изопероксидаз с низкой интенсивностью окрашивания и часто на значительно окрашенном фоне. Для повышения интенсивности и стабильности зон окрашивание проводили в сочетании с ароматическими аминами — *o*-фенилендиамином, *m*-фенилендиамином или *o*-дианизидином. Наиболее подходящими для этой цели оказались *m*-фенилендиамин и *o*-дианизидин. *m*-Фенилендиамин сам практически не окислялся пероксидазой и не давал фона. *o*-Фенилендиамин менее пригоден — при его окислении в гелях обнаруживались желтые зоны изопероксидазы на сильноокрашенном фоне.

Из сказанного следует, что изопероксидазы корней и колеоптилей пшеницы не обнаруживают строгой специфичности относительно химического строения использованных субстратов. Различия в окисляемости тех или иных субстратов определенными молекулярными формами носят в большинстве случаев скорее количественный, чем качественный характер. Отдельные изоформы пероксидазы в общей мультимолекулярной системе фермента выявляют различную активность относительно определенного субстрата. Способность изопероксидаз разного происхождения окислять моно- и полифенолы, ароматические амины и многие красители подтверждается и в других работах (Сулейманов и др., 1972; Маско, Novacky, 1966 и др.).

Активность отдельных молекулярных форм пероксидазы зависит от pH среды. Как показано в случае окисления смеси *o*-дианизидина и пирокатехина пероксидазой корней (рис. 2 А, электрофореграммы 1—4), наибольшее количество активных изоформ выявляется при pH 4,8 (рис. 2 А, 2). Высокую ферментативную активность можно было отметить также при pH 6,0. Изоферменты с промежуточной подвижностью и неко-

торые наиболее быстрые лишены активности при рН 3,6 (рис. 2 А, 1). В нейтральной среде при рН 7,4 и в щелочной — при рН 8,9 подавлена активность изопероксидаз верхней части электрофореграммы и некоторых из комплекса наиболее подвижных зон. В то же время дублет со средней электрофоретической подвижностью выявляет особенно при рН 7,4 значительную активность (рис. 2 А, 3—4). Примерно такую же зависимость от рН можно было отметить в случае других доноров электронов — пирокатехина в сочетании с *m*-фенилендиамином и гваяколом: наибольшая активность изопероксидаз обнаруживалась при рН 4,8—6,0. В более кислой, а особенно в щелочной среде (рН 8,9) интенсивность окрашивания быстрых зон была значительно меньше.

Таким образом, изопероксидазы корней пшеницы можно по оптимуму рН окисления *o*-дианизидина и пирокатехина условно разделить на 4 группы: 1) изоформы, активные в широком диапазоне рН 3,6—8,9; 2) изоформы, обнаруживающие активность при рН 4,8—8,9, но лишены ее в сильнокислой среде (рН 3,6); 3) изоформы, активные в диапазоне рН 3,6—6,0 и теряющие активность в щелочной среде при рН > 7; 4) изоформы с максимальной активностью при рН 4,8—6,0, не функционирующие как в сильнокислой (рН 3,6), так и в щелочной средах. Большое разнообразие в интервалах значений рН, при которых наблюдается каталитическое действие тех или иных изопероксидаз, наводит на мысль о различной физиологической роли последних в жизнедеятельности растений и о возможном контроле над их активностью путем урегулирования кислотности внутриклеточной среды.

В дальнейшем изучали действие некоторых потенциальных ингибиторов на активность изоформ пероксидазы колеоптилей и корней пшеницы. Соединения эти вводились в инкубационную среду одновременно с донором электронов при рН 6,0. Действие этих веществ на активность изопероксидаз корней и колеоптилей в большой мере сходно, поэтому на рис. 2 Б приведены только электрофореграммы корней. Как видно по электрофореграммам 1 и 2, присутствие в среде одновременно с *o*-дианизидином и пирокатехином 0,07 *M* гидроксилamina, способного образовывать координативные связи с атомом железа в простетической группе, не вызвало существенных изменений ферментативной активности изопероксидаз по сравнению с контролем, хотя у зон со средней электрофоретической подвижностью, а также у наиболее быстрых, наблюдалось некоторое снижение активности. Фенилгидразин имел на пероксидазную активность сильное ингибирующее действие. В наивысшей использованной концентрации фенилгидразина (2 *mM*) практически полностью подавлялась активность всех изопероксидаз, за исключением наименее подвижных, которые выявлялись в виде очень слабоокрашенных зон (на рисунке не приводится). При более низких концентрациях (0,25—1 *mM*) фенилгидразина в большей или меньшей мере также сохранялась активность наименее подвижных изоформ, однако, кроме того, обнаруживались и верхние зоны из наиболее быстро движущегося комплекса (электрофореграммы 3—4). *o*-Оксихинолин (1—2 *mM*) снижал активность среднерасположенных и нижних зон из наиболее подвижного комплекса изопероксидаз (электрофореграмма 5).

Следовательно, отдельные изопероксидазы выявляют относительно испытанных ингибиторов различную чувствительность.

6 *M* мочевины, добавленная к неочищенному гомогенату, сильно ингибировала изопероксидазы колеоптилей и корней, причем подавляющее действие ее возрастало с продолжительностью контакта с белком. Наиболее легко инактивировались мочевиной изопероксидазы в средней части электрофореграммы. После 24-часового выдерживания ферментных экст-

рактос с 6 М мочевиной небольшую активность сохраняли только некоторые зоны в начале и конце электрофореграммы!

Присутствие 0,2 М 2-меркаптоэтанола в среде гомогенизирования не оказывало существенного влияния на изопероксидазы корней и колеоптилей пшеницы. Судя по интенсивности окрашивания зон, можно отметить даже некоторое повышение активности верхних зон наиболее быстро движущегося комплекса.

Изоформы пероксидазы колеоптилей и корней пшеницы обнаруживали, помимо пероксидазной также и *o*-дифенолоксидазную активность (КФ 1.10.3.1). Окисление молекулярным кислородом с образованием окрашенных продуктов происходило, когда субстратами служили смеси *o*-дианизидина и пирокатехина или *m*-фенилендиамина и пирокатехина. Гваякол не окислялся. Как видно из рис. 2 В (электрофореграммы 1, 2), *o*-дифенолоксидазную активность в основном имеют те же зоны, что и пероксидазную, за исключением изоформ в верхней части электрофореграммы, *o*-дифенолоксидазная активность которых мала, и они не всегда выявляются; поэтому строгое соответствие пероксидазных и оксидазных зон здесь установить трудно. Оксидазная активность изопероксидаз начинала обнаруживаться при рН около 6 и повышалась с повышением рН до 8,9. Следует отметить, что не исключена возможность образования перекиси водорода в виде побочного продукта в ходе окисления. В этом случае выявившиеся на электрофореграммах зоны представляют собой все те же изоформы пероксидазы.

Идентичность зон *o*-дифенолоксидазы и пероксидазы наблюдалась и другими исследователями (Sheen, Calvert, 1969 и др.), хотя имеются высказывания и в пользу их различной природы (Loop, 1971). Наличие у одних и тех же изоформ пероксидазной и *o*-дифенолоксидазной активности может объясняться по-разному. Растворимая *o*-дифенолоксидаза может ассоциироваться с пероксидазой во время изготовления белковых экстрактов (Sheen, Calvert, 1969). Многие авторы (Рамазанова и др., 1971; Siegel, Galston, 1967) склонны связывать пероксидазную и ауксиноксидазную активность с двумя различными или даже с одним и тем же каталитическим центром (Иванова, Рубин, 1962; Bastin, 1964) одного белка. Недавно (Siegel, Galston, 1967) из пероксидазы хрена был выделен апофермент, который после удаления геминовой группы не имел пероксидазной активности, но сохранял оксидазную функцию по отношению к ауксину — ИУК.

Наши белковые экстракты из колеоптилей и корней *T. dicoccum* также имели ауксиноксидазную активность. Основные изоформы, выявляющиеся при гистохимическом окрашивании оксидазы ИУК, по своему расположению на электрофореграмме оказались сходными с соответствующими изопероксидазами колеоптиля или корня, однако по сравнению с последними бурые зоны оксидазы ИУК на желтоватом фоне значительно менее четкие и точное соответствие всех изоформ пероксидазы и ауксиноксидазы установить трудно.

В литературе появились данные (Sequeira, Mineo, 1966), по которым из корней табака удалось выделить фракцию белков, обнаруживающую ИУК-оксидазную активность, но лишенную пероксидазной активности. С другой стороны, как уже отмечалось, накапливаются указания на то, что пероксидазная и ауксиноксидазная активности связаны с одним ферментом (Galston и др., 1953; Bastin, 1964; Hoyle, 1972; и др.).

Мы пытались сравнить распределение пероксидазной и ауксиноксидазной активностей по фракциям после хроматографирования белков на колонке ДЭАЭ-целлюлозы. Результаты фракционирования белкового экстракта из листьев и стеблей *T. dicoccum* приведены на рис. 3 А (то же

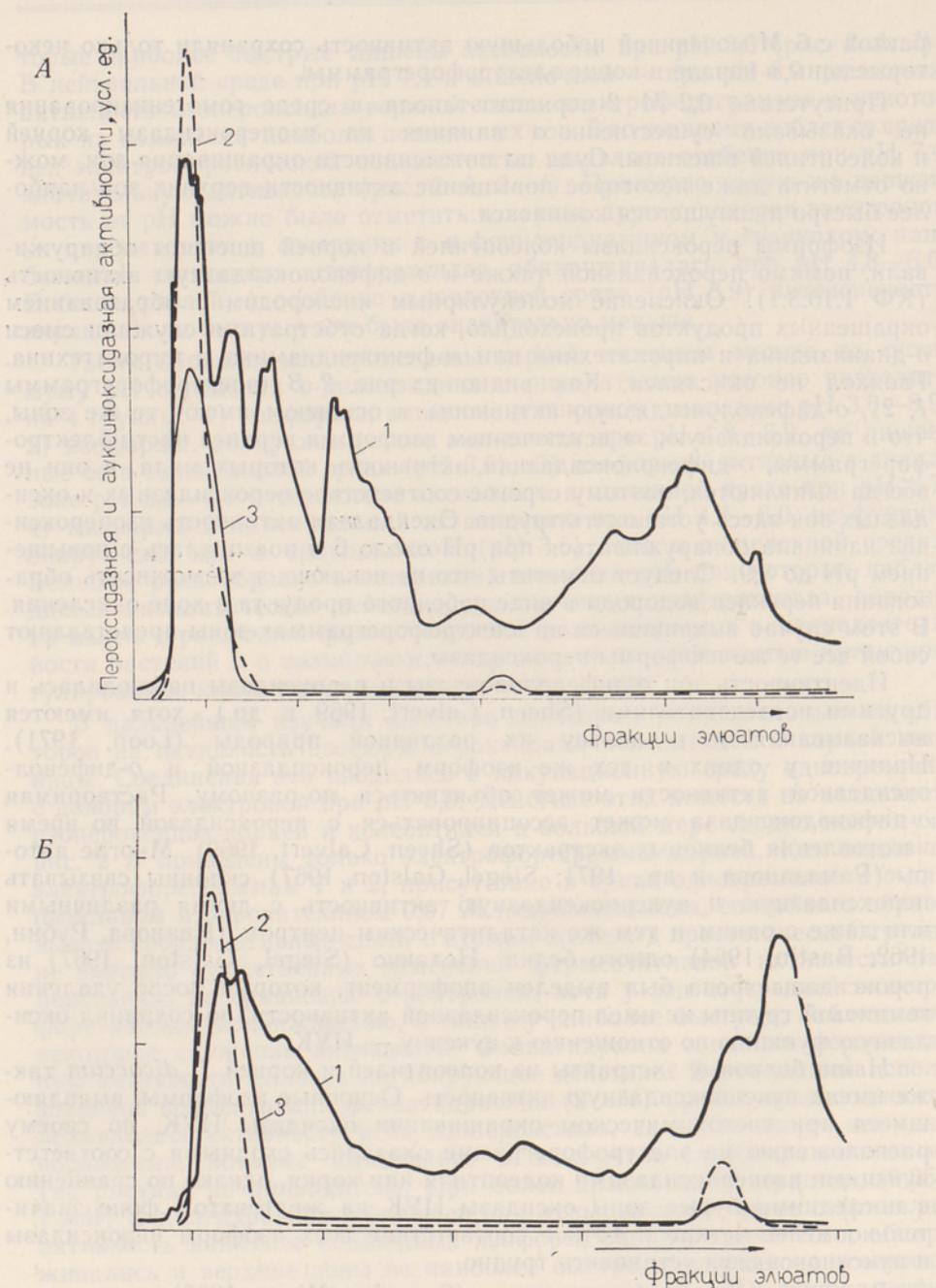


Рис. 3. Фракционирование белковых экстрактов листьев и стеблей (А) и корней (Б) *T. discolor* на ДЭАЭ-целлюлозе. 1 — содержание белка, 2 — пероксидазная активность, 3 — аусиноксидазная активность.

для экстракта из корней — на рис. 3 Б). В обоих случаях пероксидазу удалось разделить на две основные фракции, которые в последующем будут называться в порядке их вымывания первой и второй фракцией. Наибольшая пероксидазная активность приходится на долю первой

фракции, которая связывалась с активными группами анионита слабее, чем большинство остальных белков и вымывалась поэтому одной из первых. Это создает хорошие предпосылки для дальнейшей очистки этой фракции от сопутствующих белков. Активность фермента во второй, более сильно связанной с ионитом фракции, значительно меньше, чем в первой. Пробы элюата, отобранные между двумя фракциями, практически лишены пероксидазной активности. Те элюаты, в которых обнаруживалась пероксидазная активность, подвергались электрофорезу в полиакриламидном геле. Соответствующие электрофореграммы пероксидазы приведены на рис. 4 А и Б в порядке вымывания проб. Как видно по электрофореграммам белковых элюатов из листьев и стеблей (рис. 4 А, электрофореграммы 1—5), пероксидазная активность первой хроматографической фракции пероксидазы складывается из активностей ряда электрофоретически разделяемых изоформ. Быстрее других с колонки ионита вымывается наименее подвижный дублет изопероксидаз (электрофореграмма 1), затем начинают выделяться изоформы средней электрофоретической подвижности (электрофореграмма 2), а за ними или вместе с ними следуют изоформы большей электрофоретической подвижности (электрофореграммы 3—5). Электрофоретически наиболее быстрые изоформы (электрофореграммы 6—7) входят в состав второй хроматографической фракции пероксидазы. Она адсорбирована на ионите значительно сильнее первой и элюируется лишь при  $pH > 8,2$ .

Сходная с предыдущей картина фракционирования пероксидазы наблюдается при хроматографии белковых экстрактов корней на ДЭАЭ-целлюлозе (рис. 4 Б, 1—7). Как видно, и здесь слабее других связан с анионитом дублет изопероксидаз с наименьшей электрофоретической подвижностью, который вымывается в значительном количестве практически отдельно от других изопероксидаз (электрофореграммы 1, 2). В первую хроматографическую фракцию пероксидазы корней кроме того входят изоформы фермента со средней электрофоретической подвижностью (электрофореграммы 3—5). Пероксидазная активность второй хроматографической фракции корней складывается главным образом из активностей наиболее быстрых изоформ, а также активностей некоторых менее подвижных минорных изоформ (электрофореграммы 6, 7).

Кроме того выяснилось, что высокая пероксидазная активность первой хроматографической фракции как листьев, так и корней, состоит не только из активностей анодных изоферментов, но обусловлена и катодными изопероксидазами, которые вымываются с ионита теми же фракциями элюата, что и основные анодные изоформы. Катодные изопероксидазы листьев и стеблей, входящие в первую фракцию, представлены на рис. 5 А (электрофореграммы 1—5) в порядке их вымывания (для корней — рис. 5 Б, 1—5). Таким образом, в первой хроматографической фракции сосредоточена пероксидазная активность всех катодных пероксидаз листьев или корней. Вторая хроматографическая фракция катодных изопероксидаз не включает.

В итоге можно отметить, что обработка белковых экстрактов *T. discosit* на колонке ДЭАЭ-целлюлозы позволяет добиться лишь частичного фракционирования пероксидаз. Белковые экстракты из листьев и корней *T. discosit* удалось разделить при помощи анионита на две фракции пероксидаз, различающихся по уровню пероксидазной активности и по составу изоформ фермента. Применимым способом изоформы катионной системы не отделимы от ряда анионных изопероксидаз: все они выделяются в составе первой хроматографической фракции.

Во всех пробах элюатов, как у листьев (со стеблями), так и у корней определяли активность оксидазы индолилуксусной кислоты. Как видно

по рис. 3А (для листьев со стеблями) и Б (для корней), оксидаза индолилуксусной кислоты при хроматографировании на ДЭАЭ-целлюлозе разделяется на две основные фракции. В обоих случаях сравнительно легко элюируемая первая фракция характеризуется высокой активностью оксидазы индолилуксусной кислоты. Во второй сильнее связанной фракции по сравнению с первой ауксиноксидазная активность значительно меньше. Активность оксидазы индолилуксусной кислоты обнаруживается в основном в тех же пробах элюата, где и активность пероксидазы. Некоторое смещение кривой, отображающей распределение ауксиноксидазной активности в пробах элюата первых фракций, по сравнению с ходом кривой распределения пероксидазной активности, видимо, обусловлено изменением соотношения двух ферментативных активностей в пробах элюата.

Соотношение пероксидазной и ауксиноксидазной активностей в двух хроматографических фракциях различно. Так, у листьев (со стеблями) в первой фракции пероксидазная активность (в условных единицах) превышает активность оксидазы индолилуксусной кислоты. Во второй фракции оксидазы индолилуксусной кислоты листьев активность условно выше пероксидазной активности соответствующей второй фракции. У корней пероксидазная и ауксиноксидазная активности в первой фракции близки по условным значениям. В соответствующих вторых фракциях у корней пероксидазная активность превышает активность оксидазы индолилуксусной кислоты.

Итак, гистохимически была установлена идентичность локализации в полиакриламидных гелях основных зон активности ауксиноксидазы, *o*-дифенолоксидазы и пероксидазы. При фракционировании белковых экстрактов на ДЭАЭ-целлюлозе активность оксидазы индолилуксусной кислоты обнаруживалась в основном в тех же пробах элюата, где и пероксидазная активность. Кроме того, пробы элюата, имеющие наибольшую пероксидазную активность, отличались одновременно и максимумом активности оксидазы индолилуксусной кислоты. Все это свидетельствует в пользу того, что пероксидазная и ауксиноксидазная активности присутствуют одному белку. С другой стороны, при хроматографии экстракта из одной и той же ткани соотношение пероксидазной и ауксиноксидазной активности в двух выделенных хроматографических фракциях оказались различным. Подобное же несоответствие в скорости пероксидазного окисления гваякола и разрушения ИУК двумя молекулярными формами пероксидазы было выявлено (Masnicol, 1966) и для проростка гороха.

### Выводы

Изопероксидазы корней и колеоптилей (вместе с первым листом) тетраплоидной пшеницы *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl., выявленные при электрофорезе в полиакриламидном геле, не обнаруживают строгой специфичности относительно химического строения окисляемых субстратов: они окисляют монофенол — гваякол, *o*-дифенолы — пирокатехин и кофейную кислоту, диамины — *o*-дианизидин и 3,3'-диаминобензидин. Наиболее интенсивные зоны выявляются при пероксидажном окислении смеси *o*-дианизидина и пирокатехина при рН 4,8—6,0. Из испытанных ингибиторов наиболее сильным оказался фенилгидразин; *o*-оксихинолин и гидроксилламин имели менее подавляющее действие. Обнаружены различия между отдельными изопероксидазами по субстратной специфичности, по интервалу рН, при котором может наблюдаться каталитическая активность, и по чувствительности к ингибиторам.

Установлена идентичность локализации в полиакриламидных гелях основных зон активности пероксидазы, *o*-дифенолоксидазы и ауксиноксидазы. *o*-Дифенолоксидазная активность начинала обнаруживаться при рН около 6 и повышалась с повышением рН до 8,9. Фракционирование белковых экстрактов листьев (вместе со стеблями) и корней на ДЭАЭ-целлюлозе позволило разделить пероксидазную активность на две хроматографические фракции. Ауксиноксидазная активность обнаруживалась в основном в тех же пробах элюата, где и пероксидазная активность. Максимум пероксидазной активности совпадал с максимумом активности оксидазы индолилуксусной кислоты. Соотношение пероксидазной и ауксиноксидазной активностей в выделенных хроматографических фракциях, однако, оказалось различным.

## ЛИТЕРАТУРА

- Иванова Т. М., Давыдова М. А., Рубин Б. А., 1967. О каталитических функциях пероксидазы. Биохимия **32** (3) : 607—611.
- Иванова Т. М., Рубин Б. А., 1962. О природе фенолоксидазного действия пероксидазы. Биохимия **27** (4) : 622—630.
- Манская С. М., 1948. Участие оксидаз в образовании лигнина. Докл. АН СССР **62** (3) : 369—371.
- Петроченко Е. И., Колесников П. А., 1966. Окисление НАД-Н<sub>2</sub> субклеточными фракциями пероксидазы и молекулярного кислорода. Биохимия **31** (6) : 1117—1120.
- Рамазанова Л. Х., Муфтахутдинова Ф. Г., Алексеева В. Я., 1971. К вопросу об активном центре оксидазной функции пероксидазы. Биохимия **36** (1) : 67—71.
- Сулейманов И. Г., Рамазанова Л. Х., Алексеева В. А., 1972. Об изоферментах пероксидазы листьев озимой ржи. Докл. АН СССР **202** (3) : 718—720.
- Яска Вильве, Яска Велло, 1973. Регуляция мультимолекулярных систем ферментов при прорастании тетраплоидных пшениц. Изв. АН ЭССР. Биол. **22** (3) : 233—243.
- Bastin M., 1964. The active enzymatic center of indoleacetic acid peroxidation. Bull. Soc. roy. sci. Liège. **33** (11) : 678—683.
- Endo T., 1968. Indoleacetate oxidase activity of horseradish and other plant peroxidase isozymes. Plant and Cell Physiol. **9** (2) : 333—341.
- Galston A. W., Bonner J., Baker R. S., 1953. Flavoprotein and peroxidase as components of the indoleacetic acid oxidase system of peas. Arch. Biochem. Biophys. **42** (2) : 456—470.
- Gordon S. A., Weber R. P., 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiol. **26** : 192—195.
- Harkin J. M., Obst J. R., 1973. Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. Science **180** (4083) : 296—298.
- Hoyle M. C., 1972. Indoleacetic acid oxidase. A dual catalytic enzyme? Plant Physiol. **50** (1) : 15—18.
- Kenten R. H., Mann P. J. G., 1953. The oxidation of certain dicarboxylic acids by peroxidase systems in presence of manganese. Biochem. J. **53** (3) : 498—505.
- Klapper M. H., Hackett D. P., 1963. The oxidatic activity of horseradish peroxidase. I. Oxidation of hydro- and naphthohydroquinones. J. Biol. Chem. **238** (11) : 3736—3742.
- Klämbt H. D., 1964. Pyridoxalphosphat-abhängige oxydative Decarboxylierung von L-Tryptophan durch Meerrettich Peroxydase. Z. Naturforsch. **19B** (5) : 449—450.
- La Du B. N., Zannoni V. G., 1963. Oxidation of homogentisic acid catalyzed by horse-radish peroxidase. Biochim. Biophys. Acta **67** (2) : 281—287.
- Lipetz J., Garro J., 1965. Ionic effects on lignification and peroxidase in tissue cultures. J. Cell Biol. **25** (1) : 109—116.
- Loon L. C. van, 1971. Tobacco polyphenoloxidases: A specific staining method indicating non-identity with peroxidases. Phytochem. **10** (3) : 503—507.
- Macnicol P. K., 1966. Peroxidases of the Alaska pea (*Pisum sativum* L.). Arch. Biochem. Biophys. **117** (2) : 347—356.
- Macko V., Novacky A., 1966. Contribution to the study of plant peroxidase isozymes by means of disc electrophoresis on acrylamide gel. Biologia (CSSR) **21** (2) : 128—132.

- Mazelis M., 1962. The pyridoxal phosphate-dependent oxidative decarboxylation of methionine by peroxidase. I. Characteristics and properties of the reaction. *J. Biol. Chem.* **237** (1) : 104—108.
- Riddle V. M., Mazelis M., 1965. Conversion of tryptophane to indoleacetamide and further conversion to indoleacetic acid by plant preparations. *Plant Physiol.* **40** (3) : 481—484.
- Sequeira L., Mineo L., 1966. Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from tobacco roots. *Plant Physiol.* **41** (7) : 1200—1208.
- Shannon L. M., Kay E., Lew J., 1966. Oxidation of oxaloacetate to malonate by peroxidase isozymes from horseradish. *Plant Physiol.* **41** (6) : xl.
- Shannon L. M., de Vellis J., Lew J. Y., 1963. Malonic acid biosynthesis in bush bean roots. II. Purification and properties of enzyme catalyzing oxidative decarboxylation of oxaloacetate. *Plant Physiol.* **38** (6) : 691—697.
- Sheen S. J., Calvert J., 1969. Studies on polyphenol content, activities and isozymes of polyphenol oxidase and peroxidase during air-curing in three tobacco types. *Plant Physiol.* **44** (2) : 199—204.
- Siegel B. Z., Galston A. W., 1967. Indoleacetic acid oxidase activity of apoperoxidase. *Science* **157** (3796) : 55—57.
- Yang S. F., 1967. Biosynthesis of ethylene: ethylene formation from methional by horseradish peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **122** (2) : 481—487.
- Yokota H., Yamazaki I., 1965. Reaction of peroxidase with reduced nicotinamide-adenine dinucleotide and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* **105** (2) : 301—312.

Институт зоологии и ботаники  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
17/X 1973

Vilve JAASKA

## NISUTÕUSMETE PEROKSÜDAASIDE MÕNED OMADUSED JA FRAKTSIONEERIMINE

Resümees

Nisu *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl. etioleeritud koleoptülide ja juurte isoperoksüdaasid, mis eraldati polüakrüülamiidgeelelektroforeesi teel, oksüdeerisid  $H_2O_2$  juuresolekul monofenool guajakooli, *o*-difenoole pürokatehhooli ja kohvhapet ning aromaatsid aminiine *o*-dianisidiini ja 3,3'-diaminobensidiini. Kõige intensiivsemad peroksüdaasi tsoonid ilmusid *o*-dianisidiini ja pürokatehhooli segu oksüdeerimisel, kui pH oli 4,8—6,0. Inhibiitoritest osutus kõige efektiivsemaks fenüülhüdrasiin, nõrgalt inhibeerisid hüdroksüülamiin ja *o*-oksüküinoliin. Mõned peroksüdaasi isovormid erinesid üksteisest aktiivsusest teatud substraatide suhtes, samuti pH väärtuste poolest, mille puhul esineb katalüütiline aktiivsus, ning inhibiitoritele reageerimise tundlikkuse poolest.

Peroksüdaasi, *o*-difenoooloksüdaasi ja auksiinoksüdaasi aktiivsuse põhitsoonid ühtisid elektroforeetilise liikuvuse poolest. *o*-difenoooloksüdaasne aktiivsus hakkas ilmema pH 6 juures ning suurenes, kuni pH tõusis 8,9-ni. Tehti kindlaks, et *T. dicoccum*'i etioleeritud lehe (koos varrega) ning juure valgukstraktide fraktsioneerimisel DEAE-tselluloosil jaguneb peroksüdaasne aktiivsus kahte fraktsiooni. Esimesse fraktsiooni koondub enamik koe peroksüdaasest aktiivsusest. Elektroforeetiliselt koosneb see fraktsioon reast katoodsetest ja anoodsetest isoperoksüdaasidest. Kõige liikuvad anoodsed isovormid moodustavad teise fraktsiooni. Auksiinoksüdaasne aktiivsusega valgud elueerusid põhiliselt samade eluadi fraktsioonidega nagu peroksüdaasestki. Peroksüdaasne ja auksiinoksüdaasne aktiivsuse maksimumid langesid kokku. Erinevad kromatograafilised fraktsioonid erinesid aga peroksüdaasne ja auksiinoksüdaasne aktiivsuse suhte poolest.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Toimetusele saabunud  
17. X 1973

Vilve JAASKA

## SOME CATALYTIC PROPERTIES AND FRACTIONATION OF PEROXIDASES FROM WHEAT SEEDLINGS

## Summary

Isoperoxidases from etiolated coleoptiles and roots of *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl., as histochemically revealed after polyacrylamide gel electrophoresis, were capable of catalyzing the oxidation of several donor substances: a monophenol — guaiacol, *o*-diphenols — catechol and caffeic acid, aromatic amines — *o*-dianizidine and 3,3'-diaminobenzidine. The highest staining intensity of isoperoxidases was obtained at pH 4.8—6.0 with a mixture of substrates — catechol and *o*-dianizidine. Among the inhibitors tested phenylhydrazine was the most inhibitory one. *o*-Oxychinoline and hydroxylamine had only a slight inhibitory effect. Certain differences between the individual molecular forms of peroxidase were revealed in their hydrogen donor specificity, in the pH range of catalytic activity and in the sensitivity to inhibitors. Localization of major peroxidase, *o*-Diphenoloxidase and IAA-oxidase bands in polyacrylamide gels was found to be similar. *o*-Diphenoloxidase activity was detectable from pH of about 6 and increased up to pH 8.9.

By means of column chromatography on DEAE-cellulose, the peroxidase activity extracted from etiolated leaves and roots of *T. dicoccum* was separated into two fractions. The first fraction accounted for a considerable amount of the total peroxidase activity of the tissue and contained most anodal and all cathodal isoperoxidases. The fast-migrating anodal isoperoxidases constituted the second fraction strongly retained with the ionite. IAA-oxidase and peroxidase activities were eluted from the ionite in the same volumes with coinciding activity maxima. The two separated fractions, however, differed considerably in the relative rates of IAA oxidation and *o*-dianizidine peroxidation.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Zoology and Botany

Received  
Oct. 17, 1973