

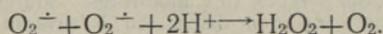
<https://doi.org/10.3176/biol.1984.1.07>

Вильве ЯАСКА

УДК 577.151.64

ИЗОФЕРМЕНТЫ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В ПРОРОСТКАХ ФАСОЛИЕВЫХ

Фермент супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1-супероксид: супероксидоредуктаза) катализирует реакцию дисмутации супероксидных радикалов:



Супероксидные радикалы образуются в процессах жизнедеятельности организмов во многих окислительно-восстановительных реакциях (Asada и др., 1973; Henry и др., 1976) и имеют потенциально высокую реакционную активность (см. обзор Malmström и др., 1975). По распространенному сейчас мнению, супероксидные радикалы оказывают на организмы в основном повреждающее или даже летальное действие (обзоры Fridovich, 1974, 1975; Турков, 1976; Мишин, Ляхович, 1976; Brown, Fridovich, 1980; Rabinowitch и др., 1982 и др.). Здесь очевидна уникальная роль СОД для аэробов (и для некоторых микротолерантных анаэробов) при защите их от токсичного действия радикалов $\text{O}_2^{\cdot -}$. Поэтому можно полагать, что СОД (или близкий к ней белок) должна была образоваться как неперемный ингредиент ферментной системы аэробных организмов уже на ранних этапах их эволюционного развития. СОД обнаруживается как в однодольных, так и в двудольных высших растениях (Giannopolitis, Ries, 1977; Jackson и др., 1978; Копо и др., 1979; Jaaska, Jaaska, 1982). Между тем, каталитические свойства и состав изоферментов СОД в растениях пока изучены слабо.

В данной работе методом электрофореза и электрофокусирования в полиакриламидном (ПАА) геле изучался состав изоферментов СОД и некоторые их свойства в фасоли видов *Phaseolus vulgaris* L., *Ph. coccineus* L., *Ph. mungo* L. и в вигне *Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *cylindrica* (L.) van Eseltine. Виды эти появились на различных географически отдаленных территориях: первые два — в Южной и Центральной Америке, а *V. unguiculata* s. l. и *Ph. mungo* возделываются в Индии и в тропической Африке (Evans, 1979). По внешней форме растений и бобов, размерам и окраске семян эти виды имеют как сходные, так и отличительные черты. Намечено проследить, каким образом отражает их сходство и различие спектр изоферментов СОД.

Материал и методика

Изучали виды следующих фасолиевых: 1) *Phaseolus vulgaris* L. — обыкновенную культурную фасоль, образец К-12169, полученный из Всесоюзного института растениеводства им. Н. И. Вавилова (ВИР); 2) *Ph. coccineus* — фасоль многоцветковую, образец из торговой сети, BR-196; 3) *Ph. mungo* L., syn. *Phaseolus radiatus* Roxb., syn. *Vigna mungo* (L.) Herper — индийскую фасоль (маи, урд), образец К-13314,

полученный из ВИРа; 4) *Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *cylindrica* (L.) van Eseltine, syn. *Vigna catjang* (Burm. f.) Walp. — коровий горох, образец BR-42/82, полученный из Ботанического сада г. Ахена (ФРГ).

Скарифицированные семена проращивали сначала в течение 2—3 дней в чашках Коха на смоченной дистиллированной водой фильтровальной бумаге. Наклюнувшиеся семена высаживали в ящики с торфяной крошкой, где они росли от 5 до 10 дней. Растения освещались в течение 12 ч в сутки тремя лампами дневного света.

Кусочки листьев или других органов молодого растения растирали в небольших тигельках с 0,2 мл холодного буфера гомогенизации. Последний состоял либо из 0,1 М *трис*-гидроксиметил-аминометана и 0,024 М HCl, либо включал 0,05 М *трис*- и 0,01 М ЭДТА. В буфер гомогенизации вводились в ходе опыта некоторые испытуемые добавки — цистеин (5 мМ конечной концентрации), диэтилдитиокарбамат натрия (ДИЭКА, 10 мМ) и другие компоненты. Волокна и клеточные стенки отделяли механически или путем центрифугирования, а к оставшемуся экстракту добавляли на каждый образец по 30—50 мг смеси Сефадекса G—200 с сахарозой (1:4). Полученный вязкий экстракт сразу же наслаивали на ПАА-гель под катодный буфер. Гелевые пластинки (60×45×3 мм) готовили непосредственно перед электрофорезом или электрофокусированием путем фотополимеризации свежеприготовленной полимеризационной смеси в кюветах из органического стекла между лампами дневного света в течение 1—1,5 ч.

Электрофорез и электрофокусирование в ПАА-гелях проводили по методике, описанной нами ранее (Яска, Яска, 1977). Градиент значений pH при изоэлектрическом фокусировании создавался 2%-ным амфолином (ЛКБ-Продуктер, Швеция) с диапазоном pH 4—6. Изоэлектрические точки *pI*-изоферментов определяли pH-метром после разрезания гелей и экстракции дистиллированной водой кусочков, соответствующих расположению изоферментов.

После завершения электрофореза или электрофокусирования гели окрашивали на активность СОД, тетразолий-оксидазы или пероксидазы. СОД выявляли, используя фотохимический метод Ч. Бошампа и И. Фридовича (Beauchamp, Fridovich, 1971) с некоторыми изменениями (Яска, Яска, 1982). Гели инкубировали при 25—30° С в темноте в 25 мл 0,1 М *трис*-HCl буфера, в который входили рибофлавин (0,04 мМ), нитротетразолиевый синий (НТС, 0,1 мМ) и N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин (ТЭМЭД, 0,08%). Через 25—30 мин реакционную смесь сливали, гели споласкивали дистиллированной водой и освещали лампами дневного света под водой или тиомочевинной (2 мМ). В местах локализации изоферментов СОД появляются светлые полосы на темно-синем фоне. Тиомочевина в некоторой степени препятствует со временем потускнению зон. Тетразолий-оксидазу выявляли аналогично СОД, добавляя в реакционную смесь вместо рибофлавина 0,5 мл феназинметосульфата (2,5 мг/мл) или азур-эозина (2 мг/мл). Анодные формы пероксидазы обнаруживали, используя раствор дигидрохлорида *o*-дианизидина (0,5 мМ) и пирокатехина (1 мМ) в Na-ацетатном буфере (0,2 М, pH 4,8) с последующим добавлением перекиси водорода (Яска, 1975).

Полученные гели с гистохимически выявленными фракциями, как и их фотографии, впоследствии названы электрофореграммами или энзимограммами в случае электрофореза и *pI*-энзимограммами при изоэлектрофокусировании.

Электрофоретический спектр СОД, тканевая специфичность. По рис. 1 видно, что в тканях корня, эпикотиля и листа десятидневных проростков всех четырех изученных видов выявляются три основных изофермента СОД, обозначенных нами СОД-А, СОД-Б и СОД-В в порядке уменьшения их электрофоретической подвижности. У *Ph. coccineus* между СОД-Б и СОД-В обнаруживается еще одна дополнительная зона — СОД-Д. Интенсивность ахроматических зон изоферментов СОД-Б и СОД-В мало зависит от типа ткани. Изофермент СОД-А имеет наибольшую интенсивность на электрофореграмме листа, тогда как на электрофореграммах эпикотиля и корня интенсивность этого изофермента намного ниже. Других различий в составе изоферментов СОД различных тканей не обнаруживалось. В последующем для изучения свойств изоферментов СОД мы использовали преимущественно экстракт из ткани листа, в котором все изоферменты СОД проявляют наисильнейшую активность. Кроме названных, на электрофореграммах близ места старта выявляются слабые зоны, которые, однако, в дальнейшем рассматриваться не будут. Изофермент СОД-А иногда выявляется в виде дублета полос, где к основному изоферменту добавляется вторая слабая полоса с несколько большей подвижностью. Возможно, что эта дополнительная зона обусловлена посттрансляционной модификацией основного изофермента, так как ее интенсивность увеличивается с возрастом проростка.

Сравнение изучаемых видов. Сравнивая между собой электрофореграммы СОД листовых экстрактов изучаемых видов (рис. 1, 10—13), можно отметить большое сходство спектров изоферментов *Ph. vulgaris* и *Ph. coccineus*. *Ph. mungo* имеет изофермент СОД-В, сходный по локализации на геле с верхним изоферментом *Ph. vulgaris*. Близки по подвижности и средние изоферменты — СОД-Б обоих видов. *Ph. mungo* отличается от *Ph. vulgaris* значительно меньшей подвижностью СОД-А.

Vigna unguiculata ssp. *cylindrica* выделяется среди других видов наименьшей подвижностью зоны СОД-В. Два других изофермента — СОД-Б и СОД-А — у *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* сходны по электрофоретической подвижности с соответствующими изоферментами *Ph. vulgaris*. Таким образом, *Ph. vulgaris*, *Ph. mungo* и *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* электрофоретически сходны по локализации на гелях изофермента СОД-Б и отличаются друг от друга подвижностью изоферментов СОД-А и СОД-В.

Действие комплексообразователя меди. Известно (Fridovich, 1975; Asada, Kanematsu, 1978), что в организмах встречаются три различных типа СОД: Cu-Zn-СОД, Fe-СОД и, наконец, Mn-СОД. Для установления Cu-Zn-СОД на электрофореграммах экстракты листьев готовили с применением 10 мМ ДИЭКА (купраля) — сильного комплексообразователя ионов меди (Jaaska, Jaaska, 1982). Как видно по рис. 1, 14—17, ДИЭКА оказывает сильное подавляющее действие на СОД-Б и СОД-А всех видов. Таким образом, эти изоферменты СОД представляют собой Cu-Zn-белки. В случае неполного подавления изоферментов СОД-А в результате недостаточно продолжительного выдерживания экстрактов с ДИЭКА (менее 30 мин) ахроматические полосы СОД-А ослаблены и сдвинуты ближе к аноду, что говорит о модификационном изменении фермента. ДИЭКА не оказывал никакого влияния на изофермент СОД-В всех видов. Активность этого изофермента не зависит от наличия меди, и его простетическая группа включает, по-видимому, Mn, как это характерно для СОД митохондрий эукариотов. Нечувствительным к ДИЭКА оказался также изофермент СОД-Д у вида *Ph. coccineus*.

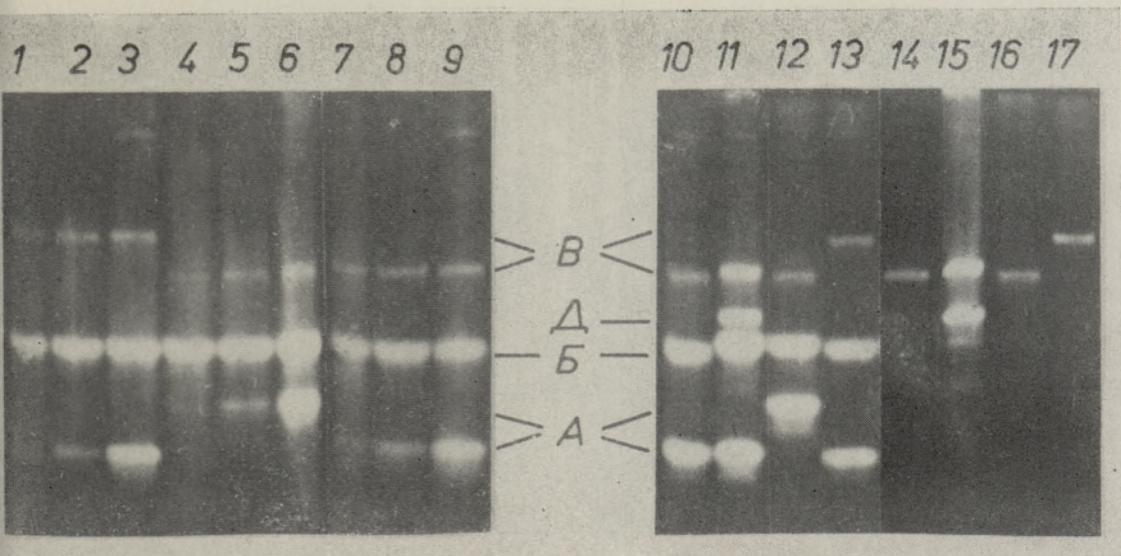


Рис. 1. Электрофореграммы СОД *Vigna unguiculata* (1—3, 13, 17); *Phaseolus mungo* (4—6, 12, 16); *Ph. vulgaris* (7—9, 10, 14); *Ph. coccineus* (11, 15); корень (1, 4, 7); эпикотиль (2, 5, 8); лист (3, 6, 9); экстракт с 10 мМ ДИЭКА (14—17).

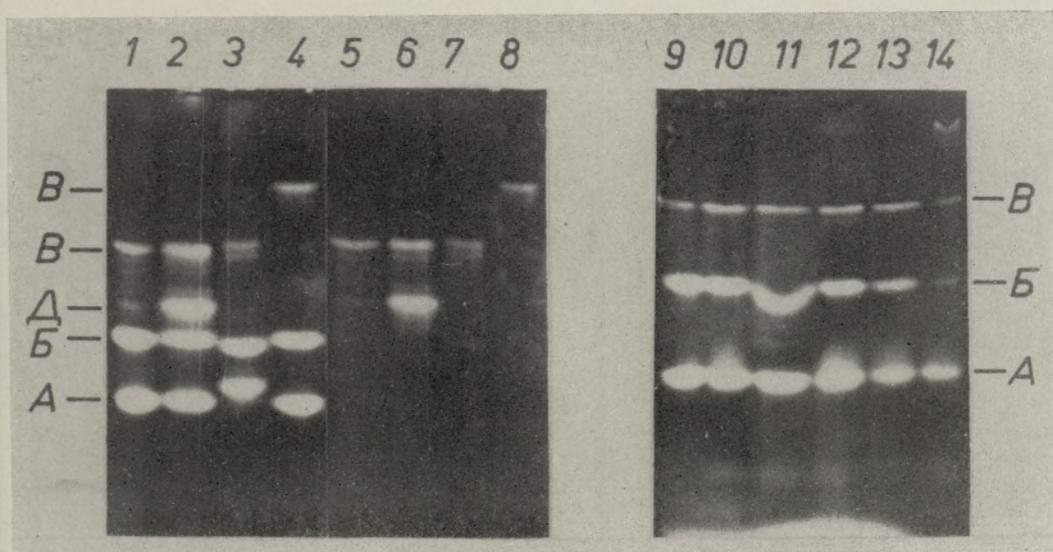


Рис. 2. *pI* электрофореграммы СОД листа *Phaseolus vulgaris* (1, 5, 9—14); *Ph. coccineus* (2, 6); *Ph. mungo* (3, 7); *Vigna unguiculata* (4, 8). Добавки в буфер гомогенизации: контроль без добавок (1—4, 9); 10 мМ ДИЭКА (5—8); 10 мМ 2-меркаптоэтил-амин — 10; 5 мМ *p*-хлормеркурибензоат — 11; 5 мМ нитропруссид натрия — 12; 5 мМ цистенин — 13; 5 мМ дитиотрейтол — 14.

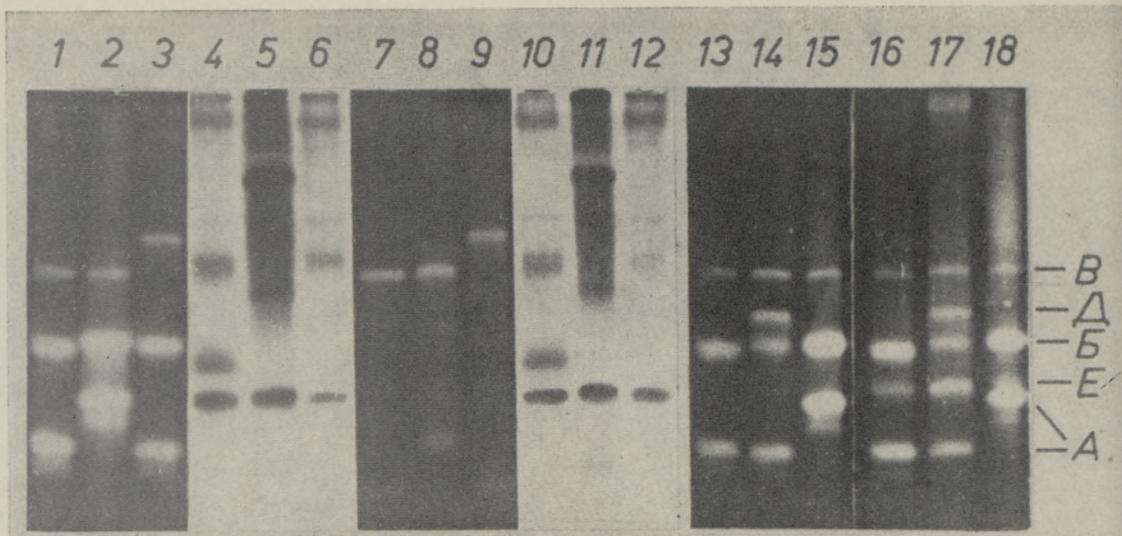


Рис. 3. Электрофореграммы СОД с рибофлавином (1—3, 7—9, 13—15) или феназинметосульфатом (16—18); электрофореграммы пероксидазы (4—6, 10—12). *Ph. vulgaris* (1, 4, 7, 10, 13, 16); *Ph. mungo* (2, 5, 8, 11, 15, 18); *Vigna unguiculata* (3, 6, 9, 12); *Ph. coccineus* (14, 17). Добавки в буфер гомогенизации: 10 мМ ДИЭКА (7—12).

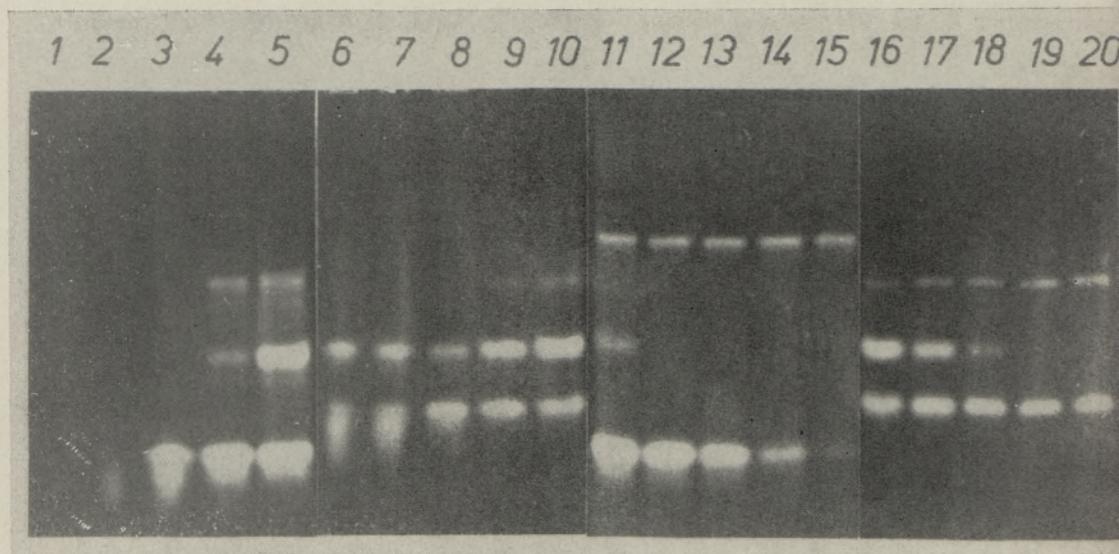


Рис. 4. Устойчивость изоферментов СОД листьев *Phaseolus vulgaris* (1—5); *Ph. mungo* (6—10, 16—20); *Vigna unguiculata* (11—15) к кислотности среды гомогенизации (1—10) и к нагреванию (11—20). Значения pH: 1, 6 — 3,8; 2, 7 — 4,2; 3, 8 — 4,8; 4, 9 — 5,2; 5, 10 — 5,8. Продолжительность нагревания при 70° С: 11, 16 — 10; 12, 17 — 20; 13, 18 — 30; 14, 19 — 45; 15, 20 — 60 мин.

Электрофокусирование. Разделение ферментов электрофорезом не всегда позволяет вскрыть небольшие различия в подвижности отдельных изоферментов (Jaaska, Jaaska, 1982). Поэтому параллельно электрофорезу проведено изоэлектрическое фокусирование экстрактов изучаемых видов. На рис. 2, 1—4, представлены *pI*-энзимограммы листьев изучаемых видов фасолиевых при использовании амфолина pH 4—6. Как и при электрофорезе, *pI*-спектр СОД листьев фасолиевых состоит из трех основных изоферментов (СОД-А, СОД-Б и СОД-В), расположенных на энзимограмме в порядке увеличения их изоэлектрических точек. На *pI*-энзимограмме *Ph. coccineus*, как и при электрофорезе, обнаруживается и четвертый изофермент — СОД-Д.

Ph. coccineus и *Ph. vulgaris* имеют одинаковые значения *pI* трех основных изоферментов: приблизительно 4,6, 5,1 и 5,6 для СОД-А, СОД-Б и СОД-В соответственно. У *Ph. mungo* СОД-В и СОД-Б имеют весьма близкие к предыдущим значения *pI*, однако СОД-А характеризуется четким сдвигом *pI* до значения 4,7. Вигна отличается малоподвижной СОД-В с *pI* около 6,1, тогда как СОД-А и СОД-Б этого вида по *pI* сходны с изоферментами фасоли. Итак, изоферменты изучаемых видов наиболее сходны по значениям *pI* СОД-Б и обнаруживают различия в изоэлектрических точках СОД-А и СОД-В.

Действие составных среды гомогенизации. По *pI*-энзимограммам 5—8 на рис. 2 видно, что ДИЭКА в растворе гомогенизации сильно подавляет выявленные электрофокусированием изоферменты СОД-А и СОД-Б, так же как это отмечалось и при электрофорезе. Не поддается ингибирующему действию ДИЭКА изофермент СОД-В, а также СОД-Д изученного образца *Ph. coccineus*.

Сульфгидрильные реагенты и восстановители: 2-меркаптоэтиламин (10 мМ), нитропруссид натрия (5 мМ) и цистеин (5 мМ), введенные в среду гомогенизации, не оказали влияния на *pI*-энзимограмму СОД молодых проростков *Ph. vulgaris* и *Ph. mungo* (рис. 2). *n*-Хлормеркурибензоат (5 мМ) вызывал небольшое искривление зоны СОД-Б, а свежеприготовленный дитиотрейтол (5 мМ) несколько подавлял СОД-Б и СОД-В. Качественных изменений в *pI*-спектре СОД под воздействием испытанных сульфгидрильных реагентов не отмечалось.

СОД, пероксидаза и тетразолий-оксидаза. В литературе есть высказывания о том, что некоторые из зон СОД могут быть вызваны пероксидазной активностью (Giannopolitis, Ries, 1977). Из приведенных на рис. 3 параллельно выполненных энзимограмм СОД и пероксидазы следует, что локализации отдельных изоферментов СОД и пероксидазы фасолиевых на геле действительно сходны. Однако подвижность обоих ферментов не всегда совпадает у изучаемых видов. Кроме того, как отмечалось выше и как видно по рис. 3, 7—12, ДИЭКА в среде гомогенизации инактивирует два основных изофермента СОД, однако совершенно не действует на изоферменты пероксидазы. Этого и можно ожидать, учитывая что пероксидаза является Fe-белком.

Тетразолий-оксидазу проявляли в реакционной смеси для СОД, где рибофлавин замещали феназинметосульфатом. На рис. 3 видно, что у *Ph. vulgaris*, *Ph. coccineus* и *Ph. mungo* сходны электрофорезграммы тетразолий-оксидазы и СОД, за исключением того, что у двух первых видов появляется добавочная ДИЭКА-резистентная зона СОД-Е, специфичная для феназинметосульфата. С азур-эозином появления добавочной зоны в составе спектра тетразолий-оксидазы не наблюдалось.

Зависимость активности от pH среды гомогенизации. Чтобы установить, как влияет кислотность среды гомогенизации на активность изоферментов СОД, белковые экстракты листьев готовили на ацетатном буфере (0,1 М) при интервале значений pH 3,4—5,8.

На рис. 4, 1—10, приведены спектры СОД листьев *Ph. vulgaris* и *Ph. mungo*. *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* имел рН-зависимость изоферментов СОД, аналогичную той же зависимости у *Ph. vulgaris*. Наиболее чувствительными к кислым значениям рН у *Ph. vulgaris* оказались СОД-Б и СОД-В, теряющие активность при рН 3,4—4,8. Активность их немного подавлена при рН 5,2, а далее (рН 5,8) значительно восстанавливается. Зона СОД-А несколько менее чувствительна к низким значениям рН среды гомогенизации и небольшая активность у нее наблюдается уже при рН 4,2. Интенсивность (активность) зон увеличивается по мере увеличения значений рН среды. У *Ph. mungo* СОД-В оказался по чувствительности к рН среды почти таким же, как и СОД-В у *Ph. vulgaris*. Между этими двумя видами выявились различия в кислоточувствительности изоферментов СОД-Б и СОД-А. В отличие от аналогичных изоферментов у *Ph. vulgaris*, СОД-Б и СОД-А у *Ph. mungo* частично сохраняют активность при рН 3,4—4,2. Интенсивность этих изоферментов повышается по мере повышения испытанных значений рН. Таким образом, *Ph. vulgaris* и *Ph. mungo* различаются по кислоточувствительности соответствующих изоферментов СОД-Б и СОД-А.

Инактивация нагреванием. Для выяснения чувствительности изоферментов СОД к повышенным температурам из листьев *V. unguiculata* и *Ph. mungo* готовили гомогенат в 0,05 М трис-0,01 М ЭДТА буфере с добавлением гидрохлорида цистеина (5 мМ). Гомогенат центрифугировали в течение 3 мин при 11 000 g, экстракт отделяли и нагревали в термостате при 70°. После 10, 20, 30, 45, 60 и 75 мин нагревания отбирали по 0,2 мл экстракта, быстро охлаждали на льду и подвергали электрофорезу. Как видно по рис. 4, наиболее чувствителен к повышенной температуре изофермент СОД-Б, тогда как два других — СОД-А и СОД-В — менее чувствительны к нагреванию. Инактивация СОД-Б наблюдается в экстракте вигны после 20 мин нагревания при 70°, а в экстракте *Ph. mungo* — после 30—45 мин. У вигны *V. unguiculata* после 60 мин нагревания подавляется и активность СОД-А, тогда как активность СОД-В полностью сохраняется.

Обсуждение результатов

В проростках *Ph. vulgaris*, *Ph. mungo*, *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* выявляются три основных изофермента СОД, обозначенных нами в порядке уменьшения электрофоретической подвижности и увеличения изoeлектрических точек СОД-А, СОД-Б и СОД-В. Другие авторы, изучающие изоферменты СОД бобовых, отмечали также три изофермента — в листьях гороха (Del Rio и др., 1978), в листьях обыкновенных бобов (Копо и др., 1979). Нами выявлены также и два новых изофермента СОД (СОД-Д и СОД-Е), не описанных ранее.

Поскольку изоферменты СОД-А и СОД-Б сильно подавляются комплексообразователем меди — ДИЭКА, их можно отнести к Cu-Zn-изоферментам. Учитывая данные Дж. Фостера и Д. Эдвардса (Foster, Edwards, 1980) о локализации изоферментов СОД в органеллах листьев гороха, можно предположить, что СОД-А представляет собой изофермент хлоропластов, а СОД-Б — растворимый цитоплазматический белок. В пользу этого говорят и наши данные о том, что полоса изофермента СОД-А наиболее интенсивна на энзимограммах зеленых листьев и значительно слабее на энзимограммах корня, тогда как полоса СОД-Б одинаково интенсивна в зеленых и этиолированных тканях. СОД-В, нечувствительный к ДИЭКА, является, видимо, Mn-изоферментом, который локализуется в митохондриях (Weisinger, Fridovich, 1973).

Изоферменты фасоли качественно не модифицировались под действием сульфгидрильных реагентов в среде гомогенизации, за исключением искривления зоны СОД-Б под действием *n*-хлормеркурибензоата при фокусировании. В этом отношении СОД-Б фасолевых отличается от СОД-Б ячменя и пшеницы, у которых были выявлены (Jaaska, Jaaska, 1982) зависящие от присутствия сульфгидрильных реагентов модификационные изоформы.

Некоторые авторы (Giannopolitis, Ries, 1977; Foster, Edwards, 1980) рассматривают иные ахроматические зоны на энзимограммах СОД как артефакты, обусловленные пероксидазой, т. е. ставят вопрос об идентичности СОД и пероксидазы. Но учитывая наши данные о различной чувствительности активности пероксидазы и СОД к ДИЭКА, а также отсутствие закономерности в совпадении локализации на геле пероксидаз и супероксидсмутаз у различных видов фасолевых, можно заключить, что ахроматические зоны на электрофореграммах обусловлены изоферментами СОД, а не пероксидазой.

Из полученных нами результатов следует, что все изоферменты СОД обнаруживаются и на электрофореграммах тетразолий-оксидазы, при гистохимическом выявлении которой вместо рибофлавина использовали феназинметосульфат или азур-эозин. Ч. Бошамп и И. Фридович (Beauchamp, Fridovich, 1971) показали экспериментально, что тетразолий-оксидаза, названная первоначально индофенолоксидазой (Brewer, 1967), на самом деле является СОД, что подтверждается и нашими данными. В литературе встречается мнение (Cleveland, Davis, 1974) о том, что слабой активностью СОД обладает и галактозооксидаза из гриба *Polyporus circunatus*.

Помимо общих с СОД ахроматических полос на электрофореграммах тетразолий-оксидазы *Ph. vulgaris*, *Ph. coccineus* и *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* обнаруживается еще одна дополнительная полоса изофермента СОД-Е, сущность которого остается пока не раскрытой. Можно полагать, что у этих видов имеется и специфическая оксидаза феназинметосульфата, выявляемая как тетразолий-оксидаза по способности ингибировать фотокаталитическое восстановление феназинметосульфата, но не рибофлавина и азур-эозина.

Совокупность данных об электрофоретической подвижности, термостойкости, ингибируемости ДИЭКА и межвидовой изменчивости дает возможность заключить, что все пять описанных изоферментов СОД фасолевых контролируются независимыми генами.

Изоферментный состав СОД изучаемых нами фасолевых, различающихся по внешней морфологии, характеризуется значительной стабильностью: почти одинаковой подвижностью изофермента СОД-Б у всех фасолевых, сходным расположением на электрофореграммах СОД-В у *Ph. vulgaris*, *Ph. coccineus* и *Ph. mungo*, а также СОД-А у *Ph. vulgaris* и *V. unguiculata*. Это указывает на значительную эволюционную консервативность изоферментов СОД, что ранее отмечалось нами (Jaaska, Jaaska, 1982) и относительно СОД ячменных.

Заключение

Электрофорезом и изоэлектрофокусированием в полиакриламидном геле показано, что в проростках *Ph. vulgaris*, *Ph. mungo*, *Vigna unguiculata* ssp. *cylindrica* выявляются три основных изофермента СОД, обозначенные в порядке уменьшения подвижности и увеличения изоэлектрических точек СОД-А, СОД-Б и СОД-В. У изучаемого образца *Ph. coccineus* обнаруживается еще один изофермент — СОД-Д. СОД-А и СОД-Б подавляются диэтилдитиокарбаматом (ДИЭКА) и представ-

ляют собой Cu-Zn-изоферменты хлоропластов и цитоплазмы соответственно. Изоферменты СОД-В и СОД-Д не ингибируются ДИЭКА. Когда в смеси гистохимического окрашивания вместо рибофлавина использовали феназинметосульфат, в спектре *Ph. vulgaris*, *Ph. coccineus* и *V. unguiculata* была обнаружена, кроме описанных изоферментов СОД, еще одна ахроматическая полоса изофермента — СОД-Е, специфическая для феназинметосульфата.

К кислой среде гомогенизации наиболее чувствительны СОД-В и СОД-Б. Активности СОД-Б и СОД-А у *Ph. mungo* более стабильны к низким рН, чем у *Ph. vulgaris*. Наиболее термолabileм изоферментом является СОД-Б, а наиболее термостабильным — СОД-В.

Три изофермента СОД у изученных видов фасолевых различаются по кислото- и теплоустойчивости, внутриклеточной локализации и электрофоретической изменчивости. Таким образом, это — генетически независимые изоферменты.

ЛИТЕРАТУРА

- Мишин В. М., Ляхович В. В. Дисмутаза O_2^- : физико-химические свойства, каталитический механизм и биологическое значение. — Успехи совр. биол., 1976, 82, 338—355.
- Турков М. И. Супероксиддисмутаза: свойства и функции. — Успехи совр. биол., 1976, 81, 341—354.
- Яска В., Яска В. Изоферменты эстеразы у дикорастущего и культурного ячменя. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1977, 26, 292—301.
- Яска В. Некоторые свойства и фракционирование пероксидаз проростков пшеницы. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1975, 24, 18—29.
- Asada, K., Kanematsu, S. Distribution of cuprozinc, manganic and ferric superoxide dismutases in plants and fungi: an evolutionary aspect. «Evol. Protein Mol., Proc. Symp., Osaka-Kobe 1977». Tokyo, 1978, 361—372.
- Asada, K., Urano, M., Takahashi, M. Subcellular localization of superoxide dismutase in spinach leaves and preparation and properties of crystalline spinach superoxide dismutase. — Eur. J. Biochem., 1973, 36, 257—266.
- Beauchamp, Ch., Fridovich, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. — Anal. Biochem., 1971, 44, 276—287.
- Brewer, G. J. Achromatic regions of tetrazolium stained starch gels: inherited electrophoretic variation. — Amer. J. Hum. Genet., 1967, 19, 674—680.
- Brown, K., Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defence. — Acta Physiol. Scand., 1980, 110, Suppl. N 492, 9—18.
- Cleveland, L., Davis, L. Superoxide dismutase activity of galactose oxidase. — Biochem. Biophys. Acta, 1974, 341, 517—523.
- Del Rio, L. A., Sevilla, F., Gómez, M., Jañez, J., López, J. Superoxide dismutase: an enzyme system for the study of micronutrient interactions in plants. — Planta, 1978, 140, 221—225.
- Evans, A. M. Beans. Phaseolus spp. (Leguminosae-Papilionatae). — In: Evolution of Crop Plants. London—New York, 1979, 171.
- Foster, J. G., Edwards, G. E. Localization of superoxide dismutase in leaves of C_3 and C_4 plant. — Plant and Cell Physiol., 1980, 21, 895—906.
- Fridovich, I. Superoxide dismutases. — Adv. Enzymol., 1974, 41, 35—97.
- Fridovich, I. Superoxide dismutases. — Ann. Rev. Biochem., 1975, 44, 147—159.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. — Plant Physiol., 1977, 59, 309—314.
- Henry, L. E. A., Halliwell, B., Hall, D. O. The superoxide dismutase activity of various photosynthetic organisms measured by a new and rapid assay technique. — FEBS Letters, 1976, 66, 303—306.
- Jaaska, V., Jaaska, V. Isoenzymes of superoxide dismutase in barley. — Biochem. Physiol. Pflanzen, 1982, 177, 375—386.
- Jackson, Chr., Dench, J., Moore, A. L., Halliwell, B., Foyer, Chr. H., Hall, D. O. Subcellular localization and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. — Eur. J. Biochem., 1978, 91, 339—344.
- Kono, Y., Takahashi, M., Asada, K. Superoxide dismutases from kidney bean leaves. — Plant and Cell Physiol., 1979, 20, 1229—1235.
- Malmström, B. G., Andreasson, L. E., Reinhammar, B. III. Superoxide dismutase. — In: Enzymes. New York, 1975, 533—557.

Rabinovitch, H. D., Sklan, D., Budowski, P. Photo-oxidative damage in the ripening tomato fruit: protective role of superoxide dismutase. — *Physiol. Plantarum*, 1982, **54**, 369—374.

Weisinger, R. A., Fridovich, I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. — *J. Biol. Chem.*, 1973, **248**, 4793—4796.

Институт зоологии и ботаники
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
21/II 1983

Vilve JAASKA

SUPEROKSUÜDI DISMUTAASI ISOENSÜÜMID OALISTEL

Oaliste *Phaseolus vulgaris* L., *Ph. coccineus* L., *Ph. mungo* L. ja *Vigna unguiculata* (L.) Walp. idandites eristati elektroforeesi ja elektrofokuseerimise teel polüakrüülamiidgeelis kolm põhilist superoksuüdi dismutaasi (SOD) isoensüümi — SOD-A, SOD-B ja SOD-C (tähistatud elektroforeetilise liikuvuse vähenemise suunas). Lilloa *Ph. coccineus* uuritud sordil avastati veel neljas isoensüüm — SOD-D.

Isoensüümid SOD-A ja SOD-B inaktiveeruvad, kui ekstraheerimispuhvrise lisada dietüülditiokarbamaati (DIEKA). Oma olemuselt on nad tsütoplasmale (SOD-B) ja kloroplastidele (SOD-A) iseloomulikud Cu-Zn-isoensüümid. SOD-C ja SOD-D on DIEKA-resistentid. Kui SOD histokeemilisel värvimisel riboflaviin asendada fenasiin-metosulfaadiga, ilmub geelis peale kirjeldatud isoensüümide veel üks DIEKA-resistentne isoensüüm — SOD-E. SOD-isoensüümide tundlikkus homogeniseerimiskeskkonna happelisuse ja kõrge temperatuuri suhtes on erinev.

Töös esitatud andmed oaliste SOD-isoensüümide biokeemiliste omaduste ja elektroforeetilise liikuvuse muutlikkuse kohta lubavad oletada, et kirjeldatud isoensüümid on geneetiliselt iseseisvad.

Vilve JAASKA

ISOENZYMES OF SUPEROXIDE DISMUTASE IN BEANS

Three major isoenzymes of superoxide dismutase, labelled SOD-A, SOD-B and SOD-C in the order of their decreasing electrophoretic mobility, could be distinguished in the seedlings of beans *Phaseolus vulgaris* L., *Ph. coccineus* L., *Ph. mungo* L. and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. A fourth isoenzyme SOD-D was found in the cultivar of the scarlet bean, *Ph. coccineus* studied.

SOD-A and SOD-B were inactivated in the presence of diethyldithiocarbamate (DIECA) in the homogenization buffer, as characteristic of chloroplastic (SOD-A) and cytoplasmic (SOD-B) Cu-Zn-isoenzymes. SOD-C and SOD-D are DIECA-resistant isoenzymes as characteristic of Mn- or Fe-SOD. An additional DIECA-resistant isoenzyme labelled SOD-E appeared in the gels stained in the histochemical reaction mixture with riboflavin replaced for phenazin methosulphate. The SOD isoenzymes differed significantly from each other in respect to their sensitivity to low pH and high temperature.

The data on the biochemical properties and on the variation of electrophoretic mobility among the bean species suggest that the SOD isoenzymes described are of independent genetic nature.