

*ВИЛЬВЕ ЯАСКА*

## БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АДЕНОЗИНТРИФОСФАТНОЙ АКТИВНОСТИ В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

Обнаружение В. Энгельгардтом и М. Любимовой (Engelhardt, Ljubimova, 1939) аденозинтрифосфатазной (АТФ-азной) активности у сократительного белка мышц — миозина — послужило основой для обширных исследований механизмов использования энергии в клетках и тканях. Выяснилось, что для всех живых организмов аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) — то универсальное соединение, в макроэргические связи которого связывается освобождающаяся при окислении субстратов энергия. Ферменты, высвобождающие эту энергию или осуществляющие за счет макроэргических фосфатных связей разнообразные биосинтетические процессы, следует поэтому считать важными биохимическими катализаторами живого организма.

Ферментные системы, гидролизующие АТФ в животных тканях, изучены достаточно хорошо. У растительных организмов свойства и физиологическая роль белков, обладающих АТФ-азной активностью, изучены меньше. Тем не менее, АТФ-азная активность обнаружена почти во всех клеточных органеллах растений: в митохондриях (Андреева, Куркова, 1965; Aloni и др., 1962; Forti, 1957; Reid и др., 1964 и др.), в ядрах (Васильева, Гофштейн, 1964), в хлоропластах (Одинцова и др., 1963; Avron, 1962; Baltscheffsky, 1959; Wessels, Baltscheffsky, 1960 и др.), в клеточных стенках (Kivilaan и др., 1961), в цитоплазме (Сисакян и др., 1963; Молотковский, 1961).

Большой интерес представляют работы, в которых сообщается о наличии в растительных клетках сократительных белков, подобных актомиозину (Воробьева, Поглазов, 1963; Loewy, 1952; Nakajima, 1960; Ts'o и др., 1956; Yen, Shih, 1965). Присутствие в растительных тканях сократительных белков с высокой АТФ-азной активностью свидетельствует о их возможной роли в различных двигательных функциях (Любимова и др., 1964; Поглазов, 1956; Туркова, Бернер, 1960). В последнее время все больше внимания уделяется исследованию АТФ-азной активности хлоропластов в связи с процессами фотосинтетического фосфорилирования (Avron, 1962; Bennun, Avron, 1964; Petrack и др., 1965) и контрактивными свойствами хлоропластов (Ohnishi, 1964; Packer и др., 1963; Packer, Marchant, 1964).

Все эти данные указывают на широкое распространение АТФ-азной активности в растительных тканях и клетках. Однако во многих случаях конкретная физиологическая роль ферментной системы, ответственной за расщепление АТФ в растениях, остается невыясненной. В последние годы во многих мембранах животного происхождения обнаружена специфическая  $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{++}$ -активируемая АТФ-аза, участвующая в активном транспорте катионов через мембраны (Post и др., 1960; Skou, 1957 и др.).

Гистохимическими методами выявлена высокая фосфатазная, и в частности АТФ-азная, активность в проводящих тканях растений (Braun, Sauter, 1964; Frey, 1954; Yin, 1954), что дает основание некоторым авторам (Braun, Sauter, 1964; Sauter, Marouardt, 1965; Yin, 1954) предполагать участие этой ферментной системы в активном транспорте веществ.



В связи с этим значительный интерес представляет изучение АТФ-азы в корнях как органах, непосредственно участвующих в поглощении и активном транспорте веществ. При этом подробное изучение свойств и распределения фермента в тканях и клеточных структурах корней — необходимая предпосылка для выяснения его физиологической роли.

В настоящей работе приведены результаты исследования активности и некоторых свойств ферментной системы, гидролизующей АТФ в двух фракциях, выделенных из корней проростков пшеницы.

### Методика

В опытах использовались корни этиолированных 10-дневных проростков яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта 'Пиккер' (Иыгеваская селекционная станция).

#### 1. Выращивание проростков.

Семена прополаскивали 95%-ным спиртом, 10 мин стерилизовали 10%-ным раствором перекиси водорода, промывали и проращивали 24 ч в аэрируемой дистиллированной воде в темноте при 22°C. Промытые дистиллированной водой семена наносили на сетку из нержавеющей стали, покрытую тонким слоем стерилизованной ваты. Проростки выращивали по методике Э. Эпштейна и К. Харена (Epstein, Hagen, 1952) в темноте при  $22 \pm 2^\circ$  на растворе  $2,5 \times 10^{-4}M$   $CaSO_4$  при постоянном продувании стерильным воздухом.

На пятый день корни промывали дистиллированной водой и переносили на свежий раствор  $CaSO_4$ . Корни десятидневных проростков опять промывали, отрезали 5—10 мм ниже основания и помещали в сосуд с ледяной дистиллированной водой.

#### 2. Выделение фракций.

Навеску корней (5—7 г) растирали в охлажденной фарфоровой ступке в присутствии очищенного кварцевого песка с 4—5-кратным объемом среды, содержащей сахарозу (0,25M) и трис-НCl буфер (0,1M) при pH 7,2.

Полученный гомогенат отжимали через ткань из тонкого планктонового шелка и 20 мин центрифугировали при 900 g. Надосадочную жидкость разливали небольшими порциями по пробиркам. Осадки структур дважды промывали средой, которую применяли при гомогенизации, и центрифугировали при 900 g по 15 мин. Затем эти осадки суспендировали в 5—6 мл среды для гомогенизации и разливали по пробиркам. Все описанные операции проводили в холодном помещении (0 — +5°).

Пробирки с фракциями хранили в замороженном виде при  $-15^\circ$ . В работе с однократно оттаявшими гомогенатами активность сохранялась практически неизменной в течение 5—7 дней. Таким образом были получены две фракции. Первая (I) состоит преимущественно из клеточных стенок с примесью ядер и, вероятно, тяжелых пластид. Микроскопическое изучение показало отсутствие в ней цельных клеток. Вторая — цитоплазматическая фракция (II) — содержит остальные клеточные компоненты: митохондрии, лейкопласты, микросомы, сферосомы, цитоплазматическую жидкость.

#### 3. Определение АТФ-азной активности.

Субстратом служил препарат динатриевой соли АТФ, выпускаемый фирмой «Reanal» (Венгрия), с 95%-ным содержанием АТФ. Компоненты стандартной инкубационной среды имели следующие концентрации: 0,002M АТФ; 0,003M  $MgCl_2$ ; 0,2M ацетатный или 0,2M трис-НCl буфера соответствующего pH. Реакция начиналась введением в термостатированную среду 0,1 мл (или более) гомогената. Общий объем инкубационной среды — 2 мл. Параллельно с основным опытом ставились холостые для определения неорганического фосфора ( $P_n$ ) в добавленном препарате АТФ и гомогенате. Инкубацию проводили при  $30 \pm 0,2^\circ$  в течение 20 мин или — как указано в тексте. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл холодной 55%-ной ТХУ и быстро охлаждали. В надосадочной жидкости определяли неорганический фосфор ( $P_n$ ) по методике Лаури—Лопеса (Lowry, Lopez, 1946) в модификации В. Скулачева (1962). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-4А при 850 м.мк.



Специальными опытами было установлено, что для первой фракции прямолинейная зависимость между количеством отщепленного фосфата и временем сохраняется по крайней мере 50 мин с начала реакции. Для второй фракции строго прямолинейная зависимость наблюдается только в первые 30—35 мин. Количество  $P_n$  отщепленного за 20 мин инкубации соответствовало гидролизу от 15 до 40% терминального фосфата АТФ в зависимости от количества и концентрации добавленного гомогената.

Содержание белка в гомогенатах определяли после осаждения горячим спиртом (или 5%-ным ТХУ на холоде) фотометрически реактивом Фолин-Чикольте по несколько модифицированной методике О. Лаури (Lowry и др., 1951).

Предварительные опыты установили прямолинейную зависимость между количеством отщепленного фосфата и количеством введенного с гомогенатом белка. АТФ-азная активность выражена в микроатомах ( $\mu A$ ) отщепленного неорганического фосфора ( $P_n$ ) за единицу времени на 1 мг белка или на объем гомогената.

Необходимо отметить, что значения удельных активностей гомогенатов, полученных из различных выращиваний проростков, по неизвестным нам причинам не всегда совпадали. Относительная ошибка определения АТФ-азной активности на одном и том же гомогенате в большинстве случаев не превышала 5%. В таблицах приведены средние данные по двум параллельным инкубациям. Результаты, полученные на отдельных гомогенатах, несмотря на различия абсолютных значений активности привели в принципе к одинаковым результатам.

## Результаты исследований

**1. Зависимость АТФ-азной активности от рН.** В целях выявления оптимальных условий для ферментативных реакций в обеих фракциях изучалась зависимость скорости реакции от концентрации водородных ионов в среде. Кривые зависимости АТФ-азной активности от рН при использовании натрий-ацетатного, трис-ацетатного, трис-малеатного и трис-НСl буферов приведены на рис. 1. Как видно, обе фракции обладают максимумом активности при значениях рН 5,4—5,7. Активность падает в более кислых и более щелочных средах. В обоих случаях кривые зависимости АТФ-азной активности от рН имеют один оптимум. Значения активности фермента, полученные при использовании натрий-ацетатного, трис-ацетатного, трис-малеатного и трис-НСl буферов укладываются на одной кривой. Это указывает на возможность применения всех этих буферов. Несмотря на отсутствие максимума, достаточно высокая АТФ-азная активность наблюдалась и в щелочной среде при рН 8—9. Изменение концентрации буферов от 0,1 до 0,2 М на активность не влияло.

Дальнейшие опыты проводились при рН 5,7 с натрий-ацетатным буфером. В щелочной среде использовался трис-НСl буфер.

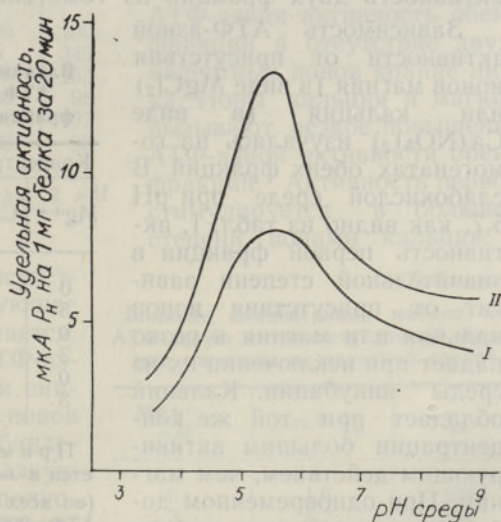
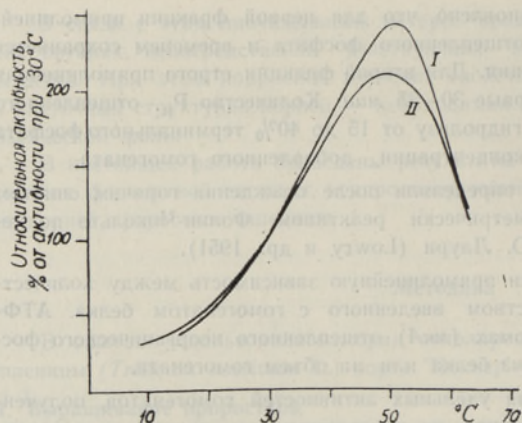


Рис. 1. Зависимость АТФ-азной активности от рН. I — первая фракция, II — вторая фракция.





## 2. Влияние температуры.

На рис. 2 приведены кривые зависимости АТФ-азной активности от температуры в пределах 11—63°. Скорость реакции резко повышается с возрастанием температуры от 30 до 42°, достигает оптимума при 52—55° и затем падает к 63°.

Рис. 2. Зависимость АТФ-азной активности от температуры. Обозначения см. рис. 1.

**3. Влияние цистеина и аскорбиновой кислоты.** Действие аскорбиновой кислоты и цистеина изучалось на гомогенате второй фракции. Введение в стандартную инкубационную смесь цистеина в концентрации  $5 \times 10^{-4}$  М или 0,01%-ной аскорбиновой кислоты на АТФ-азную активность значительного влияния не оказывало. Существенных изменений активности не наблюдалось также при добавлении цистеина в концентрации  $5 \times 10^{-3}$  М или цистеина и 0,1%-ной аскорбиновой кислоты в среду гомогенизации. Однако необходимо отметить, что в наших условиях присутствие цистеина в среде гомогенизации задерживало осаждение белка трихлоруксусной кислотой.

**4. Влияние некоторых катионов и анионов.** Хорошо известна многосторонняя роль металлов в различных ферментативных реакциях. Действие тех или иных катионов и анионов на ферменты нередко служит важной характеристикой этих ферментов. Целью последующих опытов было испытать влияние некоторых катионов и анионов на АТФ-азную активность двух фракций из гомогенатов пшеницы.

Зависимость АТФ-азной активности от присутствия ионов магния (в виде  $MgCl_2$ ) или кальция (в виде  $Ca(NO_3)_2$ ) изучалась на гомогенатах обеих фракций. В слабокислой среде при рН 5,7, как видно из табл. 1, активность первой фракции в значительной степени зависит от присутствия ионов кальция или магния и резко падает при исключении их из среды инкубации. Кальций обладает при той же концентрации большим активирующим действием, чем магний. При одновременном добавлении кальция и магния АТФ-азная активность меньше, чем в присутствии одного из катионов, и приблизительно такая же, как в присутствии магния.

Таблица 1

Влияние ионов кальция, магния и ЭДТА на АТФ-азную активность первой и второй фракций из корней пшеницы в кислой среде

Концентрация, мМ			1-я фракция		2-я фракция	
Mg <sup>++</sup>	Ca <sup>++</sup>	ЭДТА	мкА Р <sub>n</sub>	%	мкА Р <sub>n</sub>	%
0	0	0	5,3	100	10,9	100
3	0	0	11,5	217	11,9	109
0	3	0	14,1	266	14,1	129
3	3	0	11,7	221	12,0	110
0	0	5	1,7	32	8,1	74
3	0	5	7,5	142	11,4	104

Примечание. Удельная активность выражается в мкА Р<sub>n</sub> на 1 мг белка за 20 мин при 30°С (во всех таблицах); инкубационная среда: 2 мМ АТФ, 200 мМ ацетатного буфера рН 5,7.

кальция, и приблизительно такая же, как



Таблица 2

Влияние концентрации ионов магния и кальция на АТФ-азную активность двух фракций из корней пшеницы в кислой среде\*

Ион	Концентрация, мМ	1-я фракция		2-я фракция	
		мкА Р <sub>n</sub>	%	мкА Р <sub>n</sub>	%
Mg <sup>++</sup>	0	7,1	100	16,0	100
	3	14,9	210	16,8	105
	6	14,6	206	16,6	104
	9	14,7	207	16,6	104
Ca <sup>++</sup>	0	7,1	100	16,0	100
	3	17,7	250	20,3	127
	6	17,7	250	21,9	137
	9	19,6	276	21,5	134

\* См. примечание к табл. 1.

Комплексообразователь ЭДТА вызывает значительное понижение активности первой фракции без добавленных ионов двухвалентных катионов. Это указывает на возможное наличие в первой фракции связанных катионов, необходимых для выявления высокой АТФ-азной активности. ЭДТА уменьшает и активирующее действие ионов магния.

В отличие от первой фракции АТФ-азная активность второй при рН 5,7 не зависит существенно от присутствия ионов магния и несколько активируется кальцием. В присутствии и кальция и магния наблюдается уменьшение активирующего действия кальция. ЭДТА подавляет АТФ-азную активность второй фракции на 22—29% и не влияет на нее в присутствии ионов магния.

Таблица 3

Действие ионов магния, кальция и ЭДТА на АТФ-азную активность двух фракций из корней пшеницы в щелочной среде

Концентрация, мМ			1-я фракция		2-я фракция	
Mg <sup>++</sup>	Ca <sup>++</sup>	ЭДТА	мкА Р <sub>n</sub>	%	мкА Р <sub>n</sub>	%
0	0	0	1,34	100	1,86	100
3	0	0	4,74	353	6,5	349
0	3	0	6,49	484	4,75	255
0	0	5	0	0	1,83	98
3	3	0	2,84	212	3,67	197
3	0	5	0	0	1,83	98

Примечание. Инкубационная среда: 2 мМ АТФ, 200 мМ трис-НСl буфера рН 8,8.

второй — ионами магния. В присутствии и кальция и магния активирующее действие этих катионов уменьшается. ЭДТА полностью подавляет АТФ-азную активность первой фракции и снимает активирующее действие ионов магния. Во второй фракции добавление ЭДТА не влияло на АТФ-азную активность, но в то же время полностью снимало активирующее действие ионов магния. Увеличение концентрации ионов магния от 3 мМ до 6 мМ вызывало дальнейший рост АТФ-азной ак-

Как видно из табл. 2, дальнейшее повышение концентраций ионов магния и кальция от 3 мМ до 9 мМ при рН 5,7 существенного влияния на активность обеих фракций не оказывало.

В щелочной среде при рН 8,8, как показано в табл. 3, АТФ-азная активность обеих фракций в отсутствие двухвалентных ионов крайне низка. Ионы кальция и магния вызывают резкое повышение АТФ-азной активности обеих фракций. Активность первой стимулируется в большей степени ионами кальция, а

Таблица 4

Влияние концентрации магния на АТФ-азную активность второй фракции пшеницы в щелочной среде\*

Mg <sup>++</sup> , мМ	мкА Р <sub>n</sub>	%
0	1,6	100
3	5,7	356
6	7,1	444
9	7,2	450

\* См. примечание к табл. 3.



тивности второй фракции (табл. 4), а от 6 до 9 мМ уже не оказывало существенного влияния на активность.

Результаты влияния одновалентных катионов натрия и калия приведены в табл. 5. Из данных видно, что добавление в инкубационную среду (рН 8,8) ионов калия и натрия как в отдельности, так и совместно не вызывало повышения активности Mg-стимулируемой АТФ-азы обеих фракций. Наблюдалось даже некоторое подавление АТФ-азной активности под влиянием одновалентных катионов.

Таблица 5

Действие ионов калия и натрия на АТФ-азную активность первой и второй фракций из корней пшеницы

Концентрация, мМ		1-я фракция		2-я фракция	
Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%
0	0	4,1	100	6,25	100
100	0	3,7	90	6,05	97
0	10	3,4	83	5,8	93
100	10	3,3	81	5,7	91

Примечание. Инкубационная среда: 2 мМ АТФ, 3 мМ Mg<sup>++</sup>, 200 мМ трис-НСI буфера рН 8,8. Применялась АТФ, очищенная на катионите Дауке 50 × 4.

второй фракции несколько стимулировалась только ионами магния. Остальные изученные катионы подавляли активность в различной степени. В тех же условиях (табл. 6) при наличии в инкубационной среде 3 мМ магния ионы марганца и кобальта существенного влияния на АТФ-азную активность обеих фракций не оказывали. Ионы меди подавляли АТФ-азную активность на 25—27%.

Таблица 6

Влияние различных катионов на АТФ-азную активность двух фракций из корней пшеницы в кислой среде

Добавляемая соль	Концентрация, мМ	1-я фракция				2-я фракция			
		+Mg <sup>++</sup>		-Mg <sup>++</sup>		+Mg <sup>++</sup>		-Mg <sup>++</sup>	
		мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%
—	0	—	—	5,1	100	—	—	10,5	100
MgCl <sub>2</sub>	3	14,7	100	10,7	210	16,3	100	11,0	105
MnCl <sub>2</sub>	5	14,5	99	10,0	196	15,8	97	9,5	90
CoCl <sub>2</sub>	5	14,3	97	10,1	198	15,2	93	9,4	89
CuSO <sub>4</sub>	2	10,7	73	8,2	161	12,3	75	6,4	61
ZnSO <sub>4</sub>	5	—	—	8,9	175	—	—	9,0	86

Примечание. Относительная активность выражена в % от активности без исследуемого иона. Опыты проводились в присутствии (+) и отсутствии (—) 3 мМ Mg<sup>++</sup>, 2 мМ АТФ, 200 мМ ацетатного буфера рН 5,7.

В щелочной среде, как видно из табл. 7, АТФ-азная активность обеих фракций в наибольшей степени (более, чем в 3 раза) стимулировалась ионами магния. Значительно меньший стимулирующий эффект имели марганец и кобальт. Ионы меди на АТФ-азную активность не влияли.



Таблица 7

Влияние различных катионов на АТФ-азную активность двух фракций из корней пшеницы в щелочной среде

Добавляемая соль	Концентрация, мМ	1-я фракция				2-я фракция			
		+Mg <sup>++</sup>		-Mg <sup>++</sup>		+Mg <sup>++</sup>		-Mg <sup>++</sup>	
		мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%
—	0	—	—	1,37	100	—	—	1,48	100
MgCl <sub>2</sub>	3	5,4	100	4,65	340	7,5	100	5,24	354
MnCl <sub>2</sub>	5	2,9	54	1,73	126	3,2	43	2,68	181
CoCl <sub>2</sub>	5	2,1	39	1,73	126	3,9	52	1,94	131
CuSO <sub>4</sub>	2	5,6	104	1,37	100	8,0	107	1,42	96
ZnSO <sub>4</sub>	5	—	—	0	0	—	—	0	0

Примечание. Вместо ацетатного буфера использовался трис-НСI буфер рН 8,8 — 200 мМ. Остальные условия см. в примечании к табл. 6.

Активность обеих фракций полностью подавлялась ионами цинка. В тех же условиях (табл. 7) при наличии в среде магния ионы марганца и кобальта в значительной мере подавляли АТФ-азную активность обеих фракций. Ионы меди такого влияния не оказывали или даже немного ее стимулировали.

Таблица 8

Действие некоторых анионов на АТФ-азную активность двух фракций из корней пшеницы

Добавляемая соль	Концентрация, мМ	рН 5,7				рН 8,8			
		1-я фракция		2-я фракция		1-я фракция		2-я фракция	
		мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%
—	0	14,7	100	16,3	100	5,4	100	7,5	100
NaF	5	6,2	42	6,7	41	—	—	4,1	55
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	5	9,5	65	6,9	42	5,2	96	7,4	99
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	5	13,5	92	16,1	99	4,8	89	7,5	100

Примечание. Относительная активность выражена в % от активности без исследуемых анионов; инкубационная среда: 3 мМ Mg<sup>++</sup>, 2 мМ АТФ, 200 мМ ацетатного или трис-НСI буфера.

В табл. 8 приведены результаты влияния молибдата, фторида и тетрабората. Как видно, в обеих фракциях при рН 5,7 фторид и молибдат — сильные ингибиторы. В щелочной среде при рН 8,8 подавляющее действие молибдата не наблюдалось.

**5. Влияние 2,4-динитрофенола и флоридзина.** Как показано в табл. 9, 2,4-динитрофенол (ДНФ) в наиболее высокой концентрации (7,5 × 10<sup>-4</sup> М) немного понижал АТФ-азную активность обеих фракций в кислой и щелочной средах. При более низких концентрациях (7,5 × 10<sup>-5</sup> и 7,5 × 10<sup>-6</sup> М) подавляющее действие ДНФ понижалось. Повышения АТФ-азной активности под влиянием ДНФ ни в одном из проведенных опытов отмечено не было.

Флоридзин, как видно из табл. 10, при рН 5,7 обладает приблизительно таким же действием, как и ДНФ, а именно — вызывает небольшое подавление АТФ-азной активности, которое уменьшается с понижением концентрации флоридзина.



Таблица 9

Влияние ДНФ на АТФ-азную активность двух фракций из корней пшеницы

рН	Концентрация ДНФ, М	1-я фракция		2-я фракция	
		мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%
5,7	0	13,0	100	16,7	100
	$7,5 \cdot 10^{-6}$	12,9	99	16,0	96
	$7,5 \cdot 10^{-5}$	11,0	85	16,4	98
	$7,5 \cdot 10^{-4}$	9,8	75	15,0	90
9,0	0	4,7	100	7,2	100
	$7,5 \cdot 10^{-6}$	4,7	100	7,2	100
	$7,5 \cdot 10^{-5}$	4,6	98	7,3	101
	$7,5 \cdot 10^{-4}$	4,0	85	6,8	95

Примечание. Инкубационная среда: 3 мМ Mg<sup>++</sup>, 2 мМ АТФ, 200 мМ ацетатного или трис-НСI буфера.

Таблица 10

Действие флоридина на АТФ-азную активность двух фракций из корней пшеницы\*

рН	Концентрация флоридина, М	1-я фракция		2-я фракция	
		мкА Р <sub>н</sub>	%	мкА Р <sub>н</sub>	%
5,7	0	8,4	100	16,9	100
	$7,5 \cdot 10^{-6}$	8,3	99	16,9	100
	$7,5 \cdot 10^{-5}$	8,1	96	14,7	87
	$7,5 \cdot 10^{-4}$	7,5	89	15,4	91
9,0	0	3,6	100	6,0	100
	$7,5 \cdot 10^{-6}$	3,5	97	5,9	98
	$7,5 \cdot 10^{-5}$	3,4	94	5,4	90
	$7,5 \cdot 10^{-4}$	3,7	103	5,2	87

\* См. примечание к табл. 9.

чии фосфомоноэстеразной активности. Обе фракции не гидролизovali глюкозо-1-фосфат (Г-1-Ф).

### Обсуждение

Полученные результаты указывают на присутствие в корнях проростков пшеницы ферментной системы, способной гидролизовать АТФ. В наших условиях высокая АТФ-азная активность была обнаружена в обеих выделенных фракциях: как во фракции клеточных стенок и ядер (первая фракция), так и в цитоплазматической фракции (вторая фракция).

Одно из характерных свойств АТФ-азной системы обеих фракций — наличие единственного максимума при рН 5,4—5,7. О широком распространении в тканях высших растений АТФ-аз с максимальной ак-

6. Субстратная специфичность. В табл. 11 приведены данные о способности двух фракций из корней пшеницы расщеплять различные фосфоангидриды и фосфомоноэфир. Как видно, наиболее высокая гидролазная активность наблюдается в отношении АТФ, как в кислой, так и в щелочной среде. Аденозиндифосфат (АДФ) и в особенности аденозинмонофосфат (АМФ) гидролизировались в значительно меньшей степени. В щелочной среде первая фракция практически не расщепляла АМФ.

Изученные фракции существенно различались по способности гидролизовать неорганический пирофосфат. В то время как первая фракция практически не обладала способностью расщеплять пирофосфат, вторая обнаруживала значительную пирофосфатазную активность. При этом следует учитывать, что при расщеплении одной молекулы пирофосфата образуется два фосфатных иона, вследствие чего действительная удельная пирофосфатазная активность вдвое меньше величин, приведенных в таблице. Вторая фракция гидролизовала β-глицерофосфат (β-ГФ) и аденозин-5'-монофосфат (АМФ), что свидетельствует о нали-



Таблица 11

## Субстратная специфичность двух фракций из корней проростков пшеницы\*

рН	Субстрат	1-я фракция		2-я фракция	
		мкА Р <sub>n</sub>	%	мкА Р <sub>n</sub>	%
5,7	АТФ	16,4	100	10,5	100
	АДФ	12,1	74	8,1	77
	АМФ	4,1	25	3,0	29
	Na <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0	0	11,4	108
	Г-1-Ф	0	0	0	0
	β-ГФ	—	—	2,7	26
8,8	АТФ	4,0	100	4,6	100
	АДФ	2,0	50	2,6	56
	АМФ	0	0	1,5	33
	Na <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	следы	—	2,7	59
	Г-1-Ф	0	0	0	0
	β-ГФ	—	—	1,0	22

\* См. примечание к табл. 9.

тивностью при значениях рН 5—6,7 сообщают и другие авторы (Сисакян и др., 1963; Меркис, Приалгаускайте, 1963; Wessels, Baltscheffsky, 1960). Наряду с этим имеются данные о наличии в хлоропластах и митохондриях растений АТФ-азной активности с оптимумом в нейтральной или щелочной среде (Aloni, Poljakoff-Mayber, 1962; Avron, 1962; Reid и др., 1964). В наших опытах высокая АТФ-азная активность в щелочной среде обнаруживалась в обеих фракциях лишь в присутствии ионов магния или кальция. Аналогичный ход кривой зависимости активности от рН и стимулирующее действие ионов магния в щелочной среде по-

казаны в работе Дж. Весселса и Х. Балтчевского (Wessels, Baltscheffsky, 1960) на хлоропластах шпината. Дж. Форти (Forti, 1957) сообщает о сильном активирующем действии ионов кальция на АТФ-азную активность митохондрий гороха при рН 7,3. На АТФ-азную активность митохондрий кукурузы (Hanson и др., 1965) ионы кальция не влияли, тогда как АТФ-азная активность митохондрий цветной капусты (Reid и др., 1964) подавлялась на 30%. В наших опытах АТФ-азная активность цитоплазматической фракции в щелочной среде стимулировалась в большей степени ионами магния, а активность фракции клеточных стенок и ядер — ионами кальция.

Существенные качественные различия двух исследованных фракций по влиянию ионов магния и кальция на АТФ-азную активность были выявлены в слабокислой среде. Добавление в инкубационную смесь магния ( $3 \times 10^{-3}$  М или выше) увеличивало АТФ-азную активность фракции клеточных стенок и ядер приблизительно в два раза, тогда как активность цитоплазматической фракции стимулировалась лишь незначительно. Аналогичная картина наблюдалась и в отношении влияния кальция. В обеих фракциях при рН 5,7 отмечалось более выраженное активирующее влияние ионов кальция по сравнению с магнием. Активирующее действие ионов кальция и некоторых других двухвалентных катионов на АТФ-азную активность корней пшеницы отмечалось и в работе Р. Джонсона (Johnson, 1962). Из других растительных объектов хорошо известно сильное активирующее действие ионов кальция на апиразу клубней картофеля (Cohn, Meek, 1957; Krishnan, 1949; Molnar, Lorand, 1961).

Многими авторами (Post и др., 1960; Skou, 1957 и др.) отмечено присутствие в ряде животных тканей специфической  $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{++}$ -активируемой АТФ-азы, участвующей в активном транспорте одновалентных катионов и в поддержании концентрационного градиента. В связи с этим представляло интерес изучить действие одновалентных катионов на  $\text{Mg}^{++}$ -активируемую АТФ-азу корней. В наших опытах не удалось выявить стимулирующего эффекта ионов натрия и калия на



Mg<sup>++</sup>-активируемую АТФ-азу обеих фракций (табл. 5), что согласуется с данными Р. Джонсона (Johnson, 1962). Из других растительных объектов показано отсутствие Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>-активируемой АТФ-азы у морской водоросли *Ulva lactuca* (Bonting, Caravaggio, 1966).

Поглощение одновалентных катионов корнями растений, как показано многими авторами (Epstein, 1961; Jacobson и др., 1961; Viets, 1944 и др.), регулируется и стимулируется ионами кальция. В работе Р. Джонсона (Johnson, 1962) высказывается предположение о том, что регулирующее действие кальция на поглощение одновалентных катионов осуществляется стимулированием синтеза АТФ-азы. Не исключено, однако, что свойства ферментной системы, обеспечивающей энергией активный транспорт ионов, у растительных и животных тканей могут различаться.

При рассмотрении полученных данных следует учитывать, что в наших гомогенатах наряду с АТФ-азной активностью обнаруживалась способность гидролизовать и некоторые другие фосфатные субстраты. Фракция клеточных стенок и ядер обладает значительной активностью только в отношении двух изученных субстратов — АТФ и АДФ, т. е. имеет выраженную апиразную активность. Во фракции клеточных стенок и ядер практически отсутствует пирофосфатазная активность. Цитоплазматическая фракция, однако, расщепляет пирофосфат со значительной скоростью. Таким образом, практически вся пирофосфатазная активность в клетках корней пшеницы локализована в цитоплазме. Интересно отметить, что у бактерий *Bacillus megaterium* также показана преобладающая локализация пирофосфатазы в растворимой фракции и ее отсутствие в препарате «тенивых» мембран (Weibull и др., 1962).

Полученные данные не позволяют сделать определенного вывода о том, присутствует ли в цитоплазматической фракции несколько специфических ферментов или функционирует неспецифическая фосфогидролаза. В литературе (Jouce, Grisolia, 1960; Nagai, Funahashi, 1962 и др.) имеются данные о присутствии в растительных тканях неспецифической фосфогидролазы с оптимумом активности в кислой среде. Так, из отрубей пшеницы был выделен (Nagai, Funahashi, 1962) 1500-кратно очищенный препарат кислой фосфогидролазы, обладающий наибольшей активностью в отношении АТФ, но расщепляющий со значительной скоростью также пирофосфат и АДФ. Этот препарат гидролизовал, кроме того, АМФ и глюкозо-6-фосфат, но не расщеплял Г-1-Ф. Таким образом, высокоочищенный препарат фосфогидролазы из пшеницы обладал в общих чертах такой же субстратной специфичностью, как в наших опытах цитоплазматическая фракция. С другой стороны, из растений выделены препараты фосфогидролаз с более узкой субстратной специфичностью (Krishnan, 1949).

По всей вероятности, в растительных клетках присутствуют фосфогидролазы с различной степенью субстратной специфичности. В пользу такого предположения свидетельствуют также данные о различной субстратной специфичности двух изученных нами фракций из корней пшеницы.

### Выводы

Изучали некоторые свойства ферментной системы, гидролизующей АТФ, во фракции клеточных стенок и ядер и в цитоплазматической фракции из корней этиолированных проростков пшеницы.

1. В обеих фракциях присутствует высокоактивная ферментная система, расщепляющая АТФ. Максимальная скорость гидролиза наблюдается при рН 5,4—5,7 и температуре около 52°.



2. В слабокислой среде при рН 5,7 АТФ-азная активность фракции клеточных стенок и ядер стимулируется ионами кальция, магния и некоторыми другими двухвалентными катионами. АТФ-азная активность цитоплазматической фракции практически не зависит от присутствия ионов магния и немного стимулируется ионами кальция.

3. В щелочной среде при рН 8,8 в отсутствие двухвалентных катионов наблюдается лишь незначительная АТФ-азная активность, которая сильно повышается под действием ионов магния или кальция. При этом активность фракции клеточных стенок и ядер стимулируется больше ионами кальция, а активность цитоплазматической фракции — ионами магния.

4. Ионы натрия и калия как в отдельности, так и вместе не повышают активности  $Mg^{++}$ -стимулируемой АТФ-азы обеих фракций.

5. Фторид и молибдат при рН 5,7 — сильные ингибиторы АТФ-азной активности обеих фракций. В щелочной среде подавляющее действие молибдата практически отсутствует.

6. Цистенин ( $5 \times 10^{-4} M$ ) и аскорбиновая кислота (0,1 г/л) на АТФ-азную активность цитоплазматической фракции не влияют.

7. 2,4-Динитрофенол и флоридзин в повышенных концентрациях ( $7,5 \times 10^{-4} M$ ), как правило, несколько подавляют АТФ-азную активность.

8. Обе фракции способны расщеплять наряду с АТФ также некоторые другие фосфатные субстраты. Фракция клеточных стенок и ядер гидролизует АТФ и АДФ; активность относительно АМФ, пиродифосфата и Г-1-Ф низка или отсутствует. Цитоплазматическая фракция гидролизует со значительной скоростью фосфоангидриды — АТФ, АДФ и пиродифосфат. Скорость гидролиза двух фосфомоноэфиров — АМФ и β-ГФ — значительно ниже, а Г-1-Ф не расщепляется.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Андреева И. Н., Куркова Е. Б., 1965. Окислительное фосфорилирование митохондрий корней кукурузы. Физиол. раст. 12 (4) : 584—589.
- Васильева Н. А., Гофштейн Л. В., 1964. Метод выделения клеточных ядер из зародышей и проростков пшеницы в растворах глицерина. Докл. АН СССР 157 (3) : 696—698.
- Воробьева И. А., Поглазов Б. Ф., 1963. Выделение сократительного белка из водоросли *Nitella flexilis*. Биофизика 8 (4) : 427—489.
- Любимова М. Н., Демяновская Н. С., Файн Ф. С., 1964. Связь нуклеотидаз (ди- и трифосфатаз) высших растений с движением и ростом. АТФ-аза и АДФ-аза. Тез. докл. на Первом всесоюзном биохимическом съезде 1 : 46.
- Меркис А. И., Приалгаускайте Л. Л., 1963. Динамика активности фосфатаз в течение вегетации. Тр. АН ЛитССР В1 (30) : 11—26.
- Молотковский Ю. Г., 1961. Изменение аденозинтрифосфатазной активности субклеточных структур растений при прогреве. Физиол. раст. 8 (6) : 669—672.
- Одинцова М. С., Раковская М. В., Сисакян Н. М., 1963. Активность некоторых ферментов фосфорного обмена в хлоропластах, выделенных в неводной среде. Биохимия 28 (4) : 616—621.
- Поглазов Б. Ф., 1956. Аденозинтрифосфатная активность и двигательная реакция у растений. Докл. АН СССР 109 (3) : 597—599.
- Сисакян Н. М., Кобякова А. М., Филиппович И. И., 1963. Аденозинтрифосфатаза протоплазматических структур растений. Биохимия 28 (6) : 1011—1017.
- Скулачев В. П., 1962. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М. (АН СССР).
- Туркова Н. С., Бернер Р., 1960. Изменение активности АТФ-азы при полегании стеблей овса под действием гетероауксина. Науч. докл. высшей школы, сер. биол. 2 : 140—143.
- Aloni R., Poljakoff-Mayber A., 1962. Adenosinetriphosphatase activity in germinating lettuce seeds. Plant and Cell. Physiol. 3 (1) : 105—110.



- Avron M., 1962. Light-dependent adenosine triphosphatase in chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **237** (6) : 2011—2017.
- Baltscheffsky H., 1959. Adenosine triphosphatase in chloroplasts. *Acta Chem. Scand.* **13** (2) : 393—394.
- Bennun A., Avron M., 1964. Light-dependent and light-triggered adenosine triphosphatases in chloroplasts. *Biochim. et Biophys. Acta* **79** (3) : 646—648.
- Bonting S. L., Caravaggio L. L., 1966. Studies on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-activated adenosine triphosphatase. XVI. Its absence from the cation transport system of *Ulva lactuca*. *Biochim. et Biophys. Acta* **112** (3) : 519—523.
- Braun H. J., Sauter J. J., 1964. Phosphatase-Aktivität in den Siebzellen der Koniferennadeln. *Naturwissenschaften* **51** (7) : 170.
- Cohn M., Meek G. A., 1957. The mechanism of hydrolysis of adenosine di- and triphosphate catalysed by potato apyrase. *Biochem. J.* **66** (1) : 128—130.
- Engelhardt W. A., Ljubimova M. N., 1939. Myosine and adenosinetriphosphatase. *Nature* **144** (3650) : 668—669.
- Epstein E., 1961. The essential role of calcium in selective cation transport by plant cells. *Plant Physiol.* **36** (4) : 437—444.
- Epstein E., Hagen C. E., 1952. A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiol.* **27** (3) : 457—474.
- Forti G., 1957. Adenosinetriphosphatase activity of pea mitochondria. *Physiol. Plantarum* **10** (5) : 898—909.
- Frey G., 1954. Aktivität und Lokalisation von saurer Phosphatase in den vegetativen Teilen einiger Angiospermen und in einigen Samen. *Ber. Schweiz. bot. Ges.* **64** : 390—452.
- Hanson J. B., Malhotra S. S., Stoner C. D., 1965. Action of calcium on corn mitochondria. *Plant Physiol.* **40** (6) : 1033—1040.
- Jacobson L., Hannapel R. J., Moore D. P., Schaedle M., 1961. Influence of calcium on selectivity of ion absorption process. *Plant Physiol.* **36** (1) : 58—61.
- Johnson R. E., 1962. Investigations of calcium uptake and transport and some properties of a calcium-activated adenosine triphosphatase in wheat roots. *Dissertation Abstr.* **23** (3) : 781—782.
- Joyce B. K., Grisolia S., 1960. Purification and properties of a nonspecific acid phosphatase from wheat germ. *J. Biol. Chem.* **235** (8) : 2278—2281.
- Kivilaan A., Beaman R. C., Bandurski R. S., 1961. Enzymatic activities associated with cell wall preparations from corn coleoptiles. *Plant Physiol.* **36** (5) : 605—610.
- Krishnan P. S., 1949. Studies on apyrases. II. Some properties of potato apyrase. *Arch. Biochem. Biophys.* **20** (2) : 272—283.
- Loewy A. G., 1952. An actomyosin-like substance from the plasmodium of a Myxomycete. *J. Cell. Compar. Physiol.* **40** (1) : 127—156.
- Lowry O. H., Lopez J. A., 1946. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.* **162** : 421—428.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1) : 265—275.
- Molnar J., Lorand L., 1961. Studies on apyrases. *Arch. Biochem. Biophys.* **93** (2) : 353—363.
- Nagai Y., Funahashi S., 1962. Phytase (myoinositolhexaphosphate phosphohydrolase) from wheat bran. I. Purification and substrate specificity. *Agric. and Biol. Chem.* **26** (12) : 794—803.
- Nakajima H., 1960. Some properties of a contractile protein in a myxomycete plasmodium. *Protoplasma* **52** (3) : 413—436.
- Ohnishi T., 1964. Le changement de volume du chloroplaste accompagné de phosphorylation, et les protéines ressemblantes à l'actine et à la myosine extraites du chloroplaste. *J. Biochem.* **55** (5) : 494—503.
- Packer L., Marchant R. H., 1964. Action of adenosine triphosphate on chloroplast structure. *J. Biol. Chem.* **239** (6) : 2061—2070.
- Packer L., Marchant R. H., Mukohata Y., 1963. Observations on the control of chloroplast structure by adenosine triphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11** (6) : 429—434.
- Petrack B., Craston A., Sheppy F., Farron Fr., 1965. Studies on the hydrolysis of adenosine triphosphate by spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **240** (2) : 906—914.
- Post R. L., Merritt C. R., Kinsolving C. R., Albright C. D., 1960. Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* **235** (6) : 1796—1802.
- Reid H. B., Gentile A. C., Klein R. M., 1964. Adenosine triphosphatase activity of cauliflower mitochondria. *Plant Physiol.* **39** (6) : 1020—1023.
- Sauter J. J., Marouardt H., 1965. Phosphatase-Aktivität und Stofftransport im Holzstrahlparenchym von *Populus*. *Naturwissenschaften* **52** (3) : 67—68.



- Skou J. C., 1957. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochem. Biophys. Acta* **23** : 394—401.
- Ts'o P. O. P. Jr., Bonner J., Eggman L., Vinograd J., 1956. Observations on an ATP-sensitive protein system from the plasmodia of a Myxomycete. *J. Gen. Physiol.* **39** (3) : 325—347.
- Viets F. G., 1944. Calcium and other polyvalent cations as accelerators of ion accumulation by excised barley roots. *Plant Physiol.* **19** : 466—480.
- Weibull C., Greenawalt J. W., Low H., 1962. The hydrolysis of adenosine triphosphate by cell fractions of *Bacillus megaterium*. I. Localization and general characteristics of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **237** (3) : 847—852.
- Wessels J. S. C., Baltscheffsky H., 1960. Adenosine triphosphatase activity in chloroplasts. *Acta Chem. Scand.* **14** (2) : 233—246.
- Yen L., Shih T., 1965. The presence of a contractile protein in higher plants. *Scientia sinica* **14** (4) : 601—608.
- Yin H. C., 1945. A histochemical study of the distribution of phosphatase in plant tissues. *New Phytology* **44** (2) : 191—195.

Институт зоологии и ботаники  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
21/XI 1966

V. JAASKA

## NISUIDANDITE JUURTE ADENOSIINTRIFOSFATAASSE AKTIIVSUSE BIOKEEMILINE ISELOOMUSTUS

### Resümee

Uuriti adenosiiintrifosfatasset (ATF-aasset) aktiivsust kümnepäevaste etioleeritud nisu-idandite juurtest diferentsiaaltsentrifuugimise teel eraldatud kahes fraktsioonis. Esitatakse andmed keskkonna pH, temperatuuri ja mitmesuguste katioonide ning anioonide mõju kohta ATF-aassele aktiivsusele. Mõlemas fraktsioonis määrati fosfohüdrolaasne aktiivsus mõningate fosfoanhüdriidide ja fosfomonoestrite suhtes.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Saabus toimetusse  
21. XI 1966

V. JAASKA

## BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ADENOSINE TRIPHOSPHATASE ACTIVITY IN WHEAT SEEDLING ROOTS

### Summary

Adenosine triphosphatase (ATP-ase) activity of roots from etiolated 10-day-old wheat seedlings has been studied. The seedlings had been grown in the dark in continuously aerated  $2.5 \cdot 10^{-4}M$   $CaSO_4$ , essentially according to Epstein and Hagen (1952). The enzyme extract was prepared by grinding the small pieces of roots with 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.2), 0.25M sucrose and pure white sand in a previously chilled mortar. The mash was strained through a piece of thin planktonic silk. The resulting suspension was centrifuged for 20 minutes at 900 g. The sediment from this centrifugation was called the first fraction; the supernatant obtained constituted the second fraction.

The main components of the first fraction were cell walls and probably nuclei; the second — "cytoplasmic fraction" contained ground plasma and other granular cell constituents.

The ATP-ase activity was assayed by measuring the  $P_i$  liberated upon enzymic hydrolysis of ATP for 20 minutes at 30°C. The standard reaction mixture consisted of 2mM ATP, 3mM  $Mg^{++}$ , 200mM Na-acetate (pH 5.7) or Tris-HCl buffer (pH 8.8 or 9.0).

Both the first and the second fractions showed a high ATP-ase activity with maximum in the pH range 5.4—5.7 and at 52—55°C (fig. 1 and fig. 2, respectively).



The ATP-ase activities of the two fractions differed in respect to their response to magnesium and calcium. At pH 5.7 (Na-acetate buffer) the ATP-ase activity of the first fraction was strongly stimulated by 3mM  $Mg^{++}$  or 3mM  $Ca^{++}$  (table 1). The activation was about 2.1-fold in the case of  $Mg^{++}$  and about 2.5–2.7-fold in the case of  $Ca^{++}$ . The enzymatic activity was not markedly enhanced by the higher calcium and magnesium concentrations (table 2).

On the other hand, the ATP-ase activity of the "cytoplasmic fraction" was only slightly stimulated by magnesium. The addition of calcium ( $3 \cdot 10^{-3}M$ ) increased the ATP-ase activity of cytoplasmic fraction about 30% (table 1).

At pH 8.8 in the absence of magnesium or calcium the ATP-ase activity of two fractions was negligible (table 3). The addition of magnesium or calcium raised the activity several-fold.

No stimulation of  $Mg^{++}$ -activated ATP-ase activity at pH 8.8 was observed by 10mM  $K^+$  and 100mM  $Na^+$  when added separately or instantaneously (table 5).

In the acid range the ATP-ase activity of the two fractions was significantly inhibited by fluoride and molybdate (table 8). At pH 8.8, molybdate had practically no influence on the activity, whereas manganese and cobalt ( $5 \cdot 10^{-3}M$ ) inhibited the  $Mg^{++}$ -activated hydrolysis of ATP in both fractions (table 7).

Sodium tetraborate ( $5 \cdot 10^{-3}M$ ) had little or no effect (table 8).

L-cysteine ( $5 \cdot 10^{-4}M$ ) and ascorbic acid (0.1 g/l) had no influence on the ATP-ase activity of "cytoplasmic fraction".

2,4-Dinitrophenol (DNP) and florigidin ( $7.5 \cdot 10^{-4}$ — $7.5 \cdot 10^{-5}M$ ) were slightly inhibitory. DNP did not exert any stimulating effect on the ATP-ase activity (tables 9 and 10).

It has been found that both the fractions studied were able to hydrolyze not only ATP, but also some other substrates (table 11). The first fraction showed high activity on ATP and ADP; the activity towards adenosine-5'-monophosphate (AMP) and pyrophosphate ( $PP_i$ ) was little or negligible. The cytoplasmic fraction had high activity on ATP, ADP and  $PP_i$ , and was relatively less active on AMP and  $\beta$ -glycerophosphate. Both the fractions showed the highest degree of activity towards ATP, and exhibited no activity on glucose-1-phosphate.

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

Received  
Nov. 21, 1966