

ВИЛЬВЕ ЯАСКА, ВЕЛЛО ЯАСКА

ИЗОФЕРМЕНТЫ ФОСФОГИДРОЛАЗ И ПЕРОКСИДАЗЫ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ

Клеточные фракции и экстракты растительных тканей способны гидролизовать разнообразные фосфорные соединения, многие из которых представляют собой важные метаболиты энергетического и межклеточного обмена. Так, изученные нами ранее (Яаска, 1967а, 1967б) клеточные фракции из корней этиолированных проростков пшеницы и кукурузы расщепляли АТФ, АДФ, неорганический пирофосфат и в меньшей степени β -глицерофосфат и аденозин-5'-фосфат (АМФ). По Д. Робертсу (Roberts, 1957, 1958), сок из листьев пшеницы обладает выраженной фосфогидролазной активностью в отношении большинства из испытанных 16—19 субстратов. Фракция хлоропластов шпината, по данным Д. Весселса и Х. Бальтчевского (Wessels, Baltscheffsky, 1960), гидролизовала АТФ, АДФ и неорганический пирофосфат, но не действовала на АМФ. Фракция митохондрий, выделенная из проростков клевера *Trifolium alexandrinum* L., как и фракция хлоропластов шпината, обладала высокой АТФ-азной, АДФ-азной и пирофосфатазной, а также небольшой 5'-нуклеотидазной активностью, но не расщепляла β -глицерофосфат (Sikka и др., 1963).

Способность расщеплять большое количество фосфатных субстратов можно объяснить присутствием в растительных тканях ряда изоферментов фосфогидролаз с различными свойствами и различной степенью субстратной специфичности. Исследования многих авторов свидетельствуют о широком распространении в высших растениях неспецифических фосфогидролаз. Так, методом хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе из зародышей пшеницы были выделены четыре фракции, представляющие собой изоферменты неспецифической кислой фосфогидролазы и обладающие, кроме того, эстеразной активностью (Vrouillard, Ouellet, 1965). В колосьях риса методом фракционирования на ДЭАЭ-целлюлозе обнаружены три фракции кислой фосфатазы, несколько различающиеся по активности к различным субстратам, оптимуму рН и другим свойствам (Ikawa и др., 1964). Из кожуры апельсинов были получены восемь фракций кислых фосфатаз, которые оказались неспецифическими (Schogmüller и др., 1965).

Высокоочищенные препараты кислых фосфогидролаз, активные по отношению ко многим субстратам, были выделены из отрубей пшеницы (Nagai, Funahashi, 1962), проростков белого люпина (Newmark, Wenger, 1960), листьев фасоли (Williams, Staples, 1964), клубней батата (Ito и др., 1955) и других объектов. Попытки дальнейшей очистки полученных ферментных препаратов методом хроматографирования на колонке крахмала (Ito и др., 1955) или электрофореза в полиакриламидном геле (Williams, Staples, 1964) показали однородность препаратов и не

привели к разделению их на отдельные специфические ферменты. Это показывает, что способность гидролизовать многие фосфатные субстраты, по-видимому, может принадлежать одному и тому же индивидуальному белку.

Кроме неспецифических кислых фосфогидролаз, в растительных тканях присутствуют, вероятно, и более специфические фосфатазы, хотя о наличии их сообщается лишь в немногих работах. Из листьев шпината (Racker, Schroeder, 1958) обычными методами фракционирования белков была выделена высокоспецифическая фосфогидролаза, которая расщепляла в щелочной среде фруктозо-1,6-дифосфат, но не действовала на другие фосфаты сахаров. Некоторым авторам (Coti и др., 1965; Liebesq и др., 1962) путем фракционирования удалось увеличить субстратную специфичность препарата апиразы картофеля.

В последнее время поступает все больше данных о том, что ферменты, действующие на один и тот же субстрат, могут существовать во многих молекулярных формах, именуемых изоферментами (Markert, Møller, 1959; Wilkinson, 1965). В растительных тканях, кроме кислой фосфатазы, при помощи различных электрофоретических и хроматографических методов разделения обнаружены изоферменты пероксидазы (Evans, Alldridge, 1965; Jermyn, Thomas, 1954; Masko, Novacký, 1966a, 1966b; McCune, 1961; Shannon и др., 1966 и др.), эстераз (Schwartz и др., 1964), дегидрогеназ (Fottrell, 1966) и некоторых других ферментов.

В настоящей работе изучали состав и субстратную специфичность изоферментов фосфогидролаз и пероксидазы этилированных проростков пшеницы методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле в сочетании с гистохимической техникой.

Методика

В опытах использовали 5-дневные этилированные проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта 'Пиккер' (Йыгеваская селекционно-опытная станция), выращенные на $2,5 \cdot 10^{-4}$ М растворе CaSO_4 при постоянном аэрировании стерильным воздухом по методике Э. Эпштейна и К. Хагена (Epstein, Hagen, 1952).

Промытые дистиллированной водой корни и колеоптили с первичными листьями растирали отдельно на холоде с небольшим количеством промытого кварцевого песка и равным по весу ткани объемом гомогенизационной смеси следующего состава: трис-оксиметил-аминометан (трис) — 0,1М, аскорбиновая кислота — 0,07М, ЭДТА — 0,005М (рН смеси равен 7,0). Полученную массу отжимали через полотно из тонкого планктонового шелка. К экстракту добавляли 20%-ный раствор неионогенного детергента Тритон X-100 до 2%-ной конечной концентрации. После выдерживания на холоде в течение 30—40 мин экстракты центрифугировали в рефрижераторной центрифуге 30 мин при 18 000 г. Надосадочную жидкость разливали небольшими порциями (1—2 мл) по отдельным сосудикам, куда добавляли сахарозу до 30%-ной конечной концентрации и небольшое количество (около 20 мг) Сефадекса Г-100 в качестве инертного носителя. Сосудики с белковыми растворами хранили в замороженном виде при -15°C . Сохраняемые таким образом белковые растворы были пригодны к электрофоретическому изучению ферментов по крайней мере в течение одной—двух недель.

Электрофоретическое разделение белков на полиакриламидном геле проводили по методике Б. Дэвиса (Davis, 1964), с некоторыми изменениями, которые будут описаны ниже. Для получения полиакриламидного геля использовались следующие основные растворы: А. Акриламид — 20 г; N,N'-метиленабисакриламид — 0,4 г; дистиллированная вода — 80 мл. Б. Трис — 12,1 г; 1 н. HNO_3 — 20 мл; 20%-ный триэтанолламин — 2 мл; дистиллированная вода — до 100 мл. В. Рибофлавин — 2 мг на

100 мл воды. Основные растворы хранили на холоде в склянках из темного стекла. Растворы смешивали непосредственно перед полимеризацией в объемных соотношениях 2А + 1Б + 1В. Таким образом, в состав геля входили компоненты в следующих конечных концентрациях: акриламид — 10%, N,N'-метиленабисакриламид — 0,2%, трис — 0,25М, HNO₃ — 0,05 н., триэтаноламин — 0,1%, рибофлавин — 0,5 мг %.

Полученную смесь пипетировали в стеклянные трубки (длина 55 мм и внутренний диаметр 3 мм), закрепленные вертикально в специальном держателе, до высоты слоя около 45 мм. Сверху настилали дистиллированную воду и проводили фотополимеризацию в течение 30 мин под двумя лампами дневного света ДС-40, расположенными по обеим сторонам трубок на расстоянии около 2—3 см. После полимеризации слой воды заменяли катодным буферным раствором (0,01М трис, 0,08М глицин). Исследуемый раствор белка в 30%-ной сахарозе настилали непосредственно на полученный мелкопористый гель до высоты 1—2 мм. Сравнительные опыты показали, что исключение слоя крупнопористого геля, предлагаемого Б. Дэйвисом (Davis, 1964), практически не влияло на разрешающую способность метода, что согласуется с наблюдениями других авторов (Hjertén и др., 1965). Анодным буфером служил раствор 0,1М трис и 0,02М азотной кислоты с pH 8,9. Электрофорез проводили в охлаждаемом приборе типа Б. Дэйвиса (Davis, 1964), снабженном магнитной мешалкой, при силе тока 2,0—2,5 мА на трубку в течение 1—1,5 ч.

По окончании электрофореза гели высвобождали из трубок, споласкивали дистиллированной водой и выдерживали в реакционных смесях для выявления ферментативной активности. Для выявления активности фосфогидролаз использовали инкубационные смеси типа Гомори (Берстон, 1965) с солями свинца и кальция в несколько модифицированном виде. Чтобы избежать образования относительно труднорастворимого хлорида свинца, в составе всех применяемых растворов, в том числе и буфера при изготовлении полиакриламидного геля, хлориды заменяли нитратами.

При выявлении активности «кислых» фосфогидролаз гели промывали 15—20 мин в 0,1М ацетатном буфере с pH 5,2 и в течение 20—60 мин инкубировали на водяной бане при температуре 30—35° в реакционной смеси, содержащей компоненты в следующих конечных концентрациях: 0,1М ацетатный буфер с pH 5,2, 2,5 мМ нитрат свинца, 0,5 мМ нитрат магния и в качестве субстратов в параллельных опытах 1 мМ АТФ, 1 мМ тиаминпирофосфат или 2 мМ β-глицерофосфат натрия. После инкубирования гели промывали в течение 2—3 ч дистиллированной водой и окрашивали разбавленным раствором желтого сульфида аммония. Места в гелях, где локализована фосфатазная активность, окрашиваются в коричневый или черный цвет. Избыток сульфида аммония удаляли, промывая гели в разбавленном растворе метабисульфита натрия.

При выявлении активности «щелочных» фосфогидролаз гели промывали 10—15 мин в 5 мМ растворе нитрата кальция и затем в течение 2 ч инкубировали при комнатной температуре в реакционной смеси, содержащей 0,05М трис-нитратный буфер с pH 9,2, 5 мМ нитрат кальция и в качестве субстратов в отдельных опытах 2 мМ АТФ, 2 мМ тиаминпирофосфат или 5 мМ β-глицерофосфат. После инкубирования гели выдерживали в течение 2 ч в 5 мМ растворе нитрата кальция при pH 9,2 для удаления субстратов и затем обрабатывали 2,5 мМ раствором нитрата свинца в 0,1М ацетатном буфере с pH 5,2 для перевода отложенного фосфата кальция в осадки фосфата свинца. После 2-часового промывания в дистиллированной воде гели окрашивали разведенным раствором желтого сульфида аммония.

Для выявления фосфогидролаз, активных при нейтральной реакции среды, гели промывали 15—20 мин в нескольких сменах 0,05М трис-нитратного буфера с pH 7,2 и затем инкубировали на водяной бане при 30—35° в течение 20—60 мин в том же буферном растворе с добавлением 2 мМ нитрата свинца, 0,5 мМ нитрата магния и в качестве субстратов в параллельных опытах 1 мМ АТФ, 1 мМ тиаминпирофосфата или 2 мМ β-глицерофосфата. После промывания в течение одного часа дистиллированной водой для удаления субстратов гели выдерживали 5—10 мин в 0,1М ацетатном буфере с pH 5,2 для растворения нефосфатных отложений свинца. Затем гели промывали

в течение еще одного часа в дистиллированной воде и окрашивали разбавленным раствором желтого сульфида аммония.

Параллельно с основными ставились контрольные опыты, в которых гели выдерживали в тех же реакционных смесях, но без добавления субстратов. В контрольных гелях наблюдалось окрашивание лишь зоны, которая двигалась вместе с фронтом катодного буфера. В тех случаях, когда электрофорез проводили не до конца, т. е. когда фронт катодного буфера не доходил до 2—3 мм от нижнего края геля, перед фронтом наблюдалась еще одна очень интенсивно окрашенная зона.

Для выявления локализации пероксидазы гели после электрофореза 30 мин инкубировали при комнатной температуре в 2 мМ растворах субстратов (бензидин, дианизидин и гваякол) в 0,1М ацетатном буфере (рН 4,8) с последующим окрашиванием в 0,06%-ном растворе перекиси водорода.

Результаты и их обсуждение

Растительные фосфогидролазы в зависимости от того, при каком значении рН наблюдается максимум их ферментативной активности, условно подразделяются на две весьма обширные группы — кислые и щелочные фосфатазы. В предыдущей нашей работе было показано, что «цитоплазматическая фракция» из корней этиолированных проростков пшеницы обладала фосфогидролазной активностью в отношении ряда субстратов как в слабокислой, так и в щелочной среде (Яска, 1967а). В соответствии с этим для обнаружения фосфогидролаз после электрофореза гели выдерживали в инкубационных смесях Гомори при трех различных значениях рН, используя в качестве субстратов АТФ, тиаминпирофосфат и β -глицерофосфат. Полученные зимограммы фосфогидролаз корней и колеоптилей этиолированных проростков пшеницы приведены на рис. 1 и 2.

Как видно из рис. 1, в кислой среде рН 5,2 как АТФ-азная, так и тиаминпирофосфатазная активность суммарного белкового экстракта корней пшеницы обнаруживается на зимограммах в виде семи фракций с различными электрофоретическими подвижностями. На зимограмме β -глицерофосфатазы четко выделяется лишь одна фракция. Наиболее быстро движущаяся, т. е. самая нижняя окрашенная зона, на всех зимограммах не обусловлена ферментативной активностью, так как появляется и в контрольных опытах без добавления субстрата.

В нейтральной среде при рН 7,2 наблюдается такое же расположение полос изоферментов фосфогидролаз, как и в кислой среде. Это показывает, что носителями фосфогидролазной активности в нейтральной среде, возможно, являются те же белки, которые проявляют активность в кислой среде, где находится, как отмечено нами ранее (Яска, 1967а), рН оптимум АТФ-азной активности корней пшеницы.

В щелочной среде при рН 9,2 АТФ-азная активность корней обнаруживается на зимограмме в виде 3—4 полос. На зимограммах тиаминпирофосфатазы и β -глицерофосфатазы фракции, четко выявляющиеся на энзимограммах АТФ-азы, отсутствуют.

На зимограммах колеоптилей (рис. 2) наблюдаются в общем те же полосы изоферментов фосфогидролаз, что и в случае корней. Кроме того, однако, на зимограммах АТФ-азы и тиаминпирофосфатазы появляется дополнительно одна малоподвижная фракция, расположенная около места нанесения белкового экстракта. Основная АТФ-азная и тиаминпирофосфатазная активность колеоптилей в щелочной среде локализована именно в этой малоподвижной фракции. На зимограммах «щелочной» АТФ-азы и тиаминпирофосфатазы корней соответствующая

малоподвижная фракция отсутствует. Таким образом, в колеоптилях пшеницы присутствует неспецифическая «щелочная» АТФ-аза, которая в корнях не обнаруживается.

На основании полученных данных можно сделать заключение: фосфогидролазы в тканях пшеницы встречаются в виде нескольких электрофоретически разделяемых изоферментов. Из этого следует, что фосфогидролазная активность гомогенатов растительных тканей в отношении определенного субстрата складывается из активностей нескольких изоферментов. Наибольшее число фракций наблюдается в кислой и нейтральной средах, где общая активность АТФ-азы и тиаминпирофосфатазы белковых экстрактов проростков пшеницы состоит из суммы активностей 7—8 изоферментов. Число фракций с АТФ-азной активностью в щелочной среде значительно меньше и характер расположения их на зимограмме несколько отличен от локализации в кислой и нейтральной средах.

Следует отметить, что при выявлении фосфогидролаз для осаждения освобождающихся ионов фосфата в кислой и нейтральной средах применялись ионы свинца, а в щелочной среде — ионы кальция. Поэтому различия, наблюдаемые в картине изоферментов, отчасти могут быть обусловлены использованием неодинаковых катионов-осадителей. В предыдущей работе (Яска, 1967а) показано, что различные катионы в кислой и щелочной средах по-разному действуют на АТФ-азную активность корней пшеницы. Ионы кальция, как и ионы магния, в щелочной среде стимулировали АТФ-азную активность. В присутствии и кальция и магния активирующее действие этих катионов уменьшалось. По этой причине для выявления щелочных фосфатаз в инкубационные смеси вводили только ионы кальция. Однако согласно некоторым авторам (Naganna и др., 1955; Sikka, Das, 1961), в растительных тканях присутствуют магний-стимулируемые щелочные фосфатазы, в частности пирофосфатаза, активность которой подавляется ионами кальция. Ясно, что активность таких щелочных кальций-подавляемых фосфатаз на наших зимограммах не выявляется.

При рассмотрении полученных данных обращает на себя внимание одинаковое расположение зон ферментативной активности на зимограммах АТФ-азы и тиаминпирофосфатазы. Это позволяет говорить о наличии в проростках пшеницы неспецифической АТФ-азы, которая присутствует в виде нескольких изоферментов. Наряду с этим отмечается отсутствие на зимограммах β -глицерофосфатазы ряда фракций, обладающих как АТФ-азной, так и тиаминпирофосфатазной активностью. Из этого следует, что некоторые электрофоретически разделяемые фосфогидролазы проростков пшеницы способны гидролизовать фосфоангидридную связь, но не действуют на фосфомоноэфирную связь β -глицерофосфата. Таким образом, часть изоферментов фосфогидролаз обладает более узкой субстратной специфичностью. В нашем случае только одна-две фракции расщепляли как фосфоангидридную, так и фосфомоноэфирную связь.

Подобно фосфогидролазам пероксидаза пшеницы после электрофореза в полиакриламидном геле, как показано на рис. 3, обнаруживается в виде нескольких электрофоретически разделяемых изоферментов. Общее число выявляемых данным методом фракций изоферментов в белковых экстрактах корней и колеоптилей проростков пшеницы составляет 6—8. Картина расположения зон изоферментов на зимограммах при использовании трех различных субстратов очень сходна и в относительной интенсивности окрашивания отдельных зон существуют лишь количественные различия. Так, в случае применения гваякола на зимограмме пероксидазы среди малоподвижных изоферментов выделяется одна интенсивно окрашенная фракция, тогда как при использовании бензидина и дианизидина

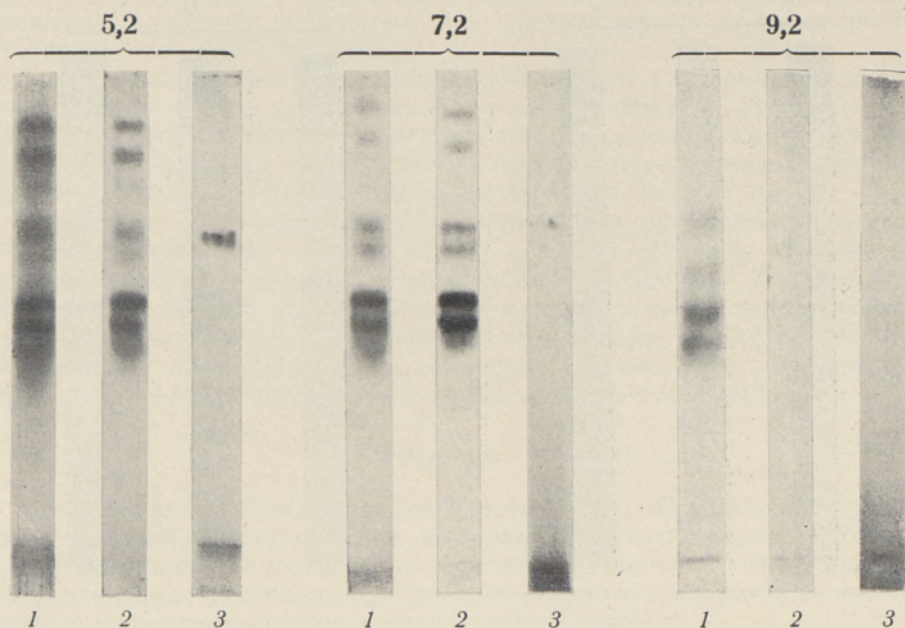


Рис. 1. Зимограммы фосфогидролаз корней этилированных проростков пшеницы. Субстраты: 1 — АТФ, 2 — тиаминпирофосфат, 3 — β -глицерофосфат.

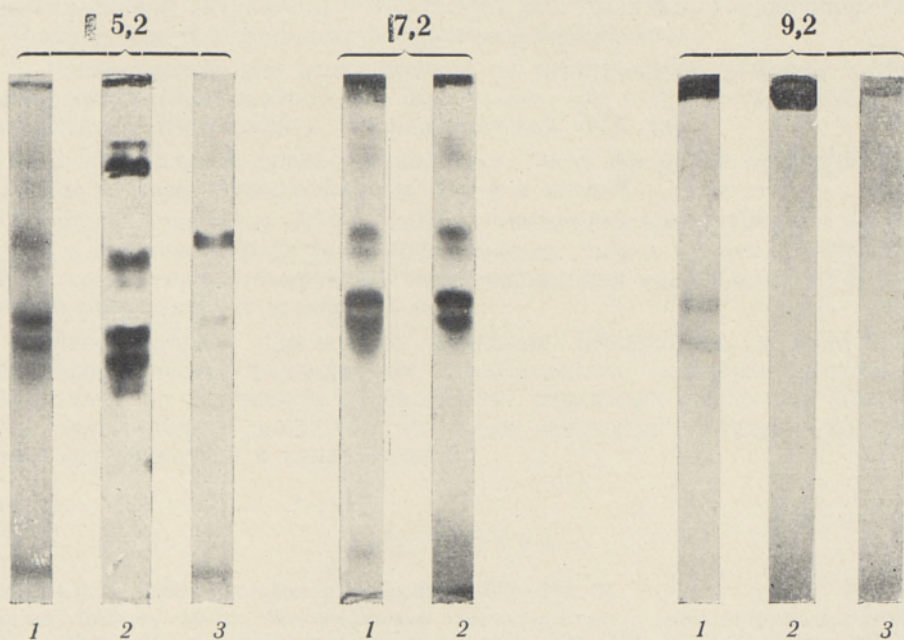


Рис. 2. Зимограммы фосфогидролаз coleoptилей этилированных проростков пшеницы. Обозначения см. рис. 1.

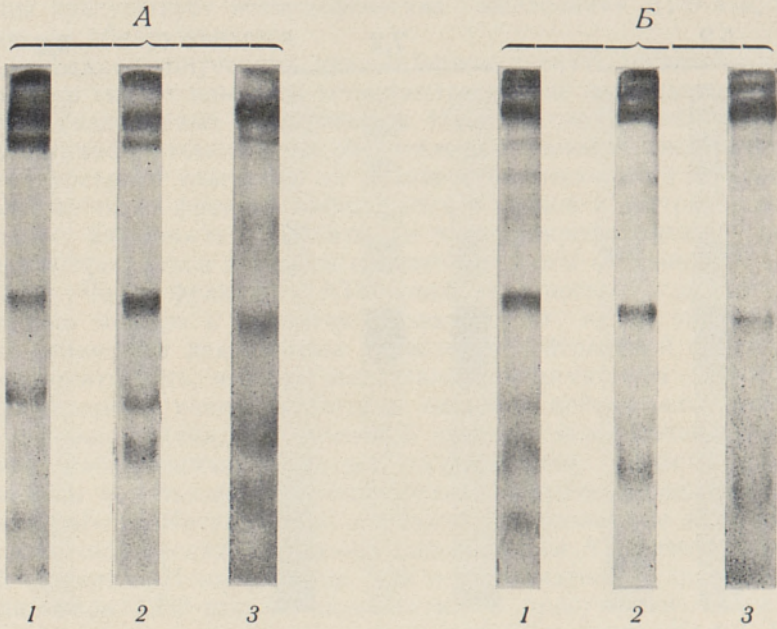


Рис. 3. Изоферменты пероксидазы корней (А) и coleoptилей (Б) эгиолированных проростков пшеницы после электрофоретического разделения в полиакриламидном геле.

Субстраты: 1 — бензидин, 2 — дианизидин, 3 — гваякол.

видны три интенсивно окрашенные малоподвижные зоны. Следовательно, отдельные изоферменты пероксидазы могут отличаться по активности в отношении различных субстратов, что согласуется с данными других авторов (Masko, Novacký, 1966).

При сравнении зимограмм пероксидазы корней и колеоптилей можно отметить наличие ряда общих для обоих органов фракций. Наряду с этим обнаруживаются некоторые различия в составе малоподвижных изоферментов. Неодинаковый состав изоферментов пероксидазы ранее был (Evans, Alldridge, 1965) обнаружен в различных органах томата.

Результаты настоящей работы показывают, что неспецифическая АТФ-аза и пероксидаза присутствуют в тканях пшеницы в форме нескольких электрофоретически разделяемых изоферментов. Физиологическая функция найденных изоферментов остается невыясненной. Обнаружение некоторых различий в изоферментном составе корней и колеоптилей позволяет предполагать, что некоторые из них могут выполнять в дифференцированных тканях более узко специфические функции.

Выводы

При помощи модифицированного метода вертикального электрофореза в полиакриламидном геле в сочетании с гистохимической техникой изучали фракционный состав и субстратную специфичность изоферментов фосфогидролаз и пероксидазы в суммарном белковом экстракте из корней и колеоптилей этиолированных проростков пшеницы.

1. Фосфогидролазы и пероксидаза в проростках пшеницы выявлены в виде нескольких электрофоретически разделяемых изоферментов.

2. В кислой среде АТФ-азная и тиаминпирофосфатазная активности обнаруживаются на зимограммах в виде 7—8 фракций изоферментов. На зимограммах β -глицерофосфатазы выявляется лишь 1—2 полосы ферментативной активности и отсутствует ряд фракций, обладающих как АТФ-азной, так и тиаминпирофосфатазной активностью.

3. Расположение зон изоферментов на зимограммах АТФ-азы и тиаминпирофосфатазы сходно. Это показывает, что в проростках пшеницы присутствуют изоферменты неспецифической АТФ-азы.

4. В нейтральной среде наблюдается такой же набор изоферментов АТФ-азы и тиаминпирофосфатазы, что и в кислой.

5. Число фракций с АТФ-азной и тиаминпирофосфатазной активностью в щелочной среде значительно меньше, чем в кислой и нейтральной. В колеоптилях обнаружена неспецифическая «щелочная» АТФ-аза, которая отсутствует в корнях.

6. Пероксидаза в проростках пшеницы обнаружена в виде 6—8 электрофоретически разделяемых изоферментов, которые несколько различаются по активности в отношении отдельных субстратов (бензидина, дианизида и гваякола). Отмечены некоторые различия в составе изоферментов корней и колеоптилей.

ЛИТЕРАТУРА

- Берстон М., 1962. Гистохимия ферментов: 206—212. М.
Яска Вильве, 1967а. Биохимическая характеристика аденозинтрифосфатазной активности в корнях проростков пшеницы. Изв. АН ЭССР. Биология **16** (2) : 175—188.
Яска Вильве, 1967б. Аденозинтрифосфатазная активность в корнях проростков кукурузы. Изв. АН ЭССР. Биология **16** (3) : 284—296.

- Brouillard J., Ouellet L., 1965. La phosphatase acide du germe de blé. Analyse chromatographique. *Canad. J. Biochem.* **43** (12) : 1899—1905.
- Cori O., Traverso-Cori A., Tetas M., Chaimovich H., 1965. Substrate specificity and inhibition studies on potato apyrase. *Biochem. Z.* **342** (3) : 345—358.
- Davis B. J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121** (2) : 404—427.
- Epstein E., Hagen C. E., 1952. A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant. Physiol.* **27** (3) : 457—474.
- Evans J. J., Alldridge N. A., 1965. The distribution of peroxidases in extreme dwarf and normal tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Phytochemistry* **4** (3) : 499—503.
- Fottrell P. F., 1966. Dehydrogenase isozymes from legume root nodules. *Nature [Engl.]* **210** (5032) : 198—199.
- Hjertén S., Jerstedt S., Tiselius A., 1965. Some aspects of the use of "continuous" and "discontinuous" buffer systems in polyacrylamide gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.* **11** (2) : 219—223.
- Ikawa T., Nisizawa K., Miwa T., 1964. Specificities of several acid phosphatases from plant sources. *Nature [Engl.]* **203** (4948) : 939—940.
- Ito E., Kondo S., Watanabe S., 1955. Studies on sweet potato phosphatase. I. Specificity. *J. Biochem. [Tokyo]* **42** (6) : 793—803.
- Jermyn M. A., Thomas R., 1954. Multiple components in horseradish peroxidase. *Biochem. J.* **56** (4) : 631—639.
- Liebecq C., Lallemand A., Degueldre-Guillaume M.-J., 1962. The apyrase activity of potato extract. *Arch. Biochem. Biophys.* **97** (3) : 609—610.
- Macko V., Nováček A., 1966a. Contribution to the study of plant peroxidase isozymes by means of disc electrophoresis on acrylamide gel. *Biología [CSSR]* **21** (2) : 128—132.
- Macko V., Nováček A., 1966b. Peroxidase isozymes in wheat infected with *Tilletia controversa* Kühn and rye infected with *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. *Biologia Plantarum* **8** (4) : 277—280.
- Markert C. L., Möller F., 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **45** (5) : 753—763.
- McCune D. C., 1961. Multiple peroxidases in corn. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **94** (3) : 723—730.
- Nagai Y., Funahashi S., 1962. Phytase (myoinositolhexaphosphate phosphohydrolase) from wheat bran. I. Purification and substrate specificity. *Agric. and Biol. Chem.* **26** (12) : 794—803.
- Naganna B., Raman A., Venugopal B., Sripathi C. E., 1955. Potato pyrophosphatases. *Biochem. J.* **60** (2) : 215—223.
- Newmark M. Z., Wenger B. S., 1960. Preparation and some properties of an acid phosphatase from white lupine seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* **89** (1) : 110—117.
- Racker E., Schroeder E. A. R., 1958. The reductive pentose phosphate cycle. II. Specific C-1-phosphatases for fructose 1,6-diphosphate and sedoheptulose 1,7-diphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **74** (2) : 326—344.
- Roberts D. W. A., 1957. The wheat leaf phosphatases. III. A survey of the heat stability of the enzymes active at pH 5.7. *J. Biol. Chem.* **226** (2) : 751—754.
- Roberts D. W. A., 1958. The wheat leaf phosphatases. IV. The effect of metal ions on the acid phosphatase activity of dialyzed juice. *J. Biol. Chem.* **230** (1) : 213—218.
- Schormüller J., Pfrogner N., Holz F., 1965. Über pflanzliche Phosphatasen. II. Mitt. Charakterisierung der Phosphatasen aus Apfelsinenrinde. *Z. Lebensmittel-Untersuch. und -Forsch.* **127** (6) : 325—341.
- Schwartz H. M., Biedron S. I., Holdt M. M. von, Rehm S., 1964. A study of some plant esterases. *Phytochemistry* **3** (2) : 189—200.
- Shannon L. M., Kay E., Lew J. Y., 1966. Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties. *J. Biol. Chem.* **241** (9) : 2166—2172.
- Sikka K. C., Gupta Y. P., Das N. B., 1963. Breakdown of ATP by plant mitochondria. *Indian J. Exptl Biol.* **1** (1) : 111—112.
- Sikka K. C., Das N. B., 1961. Studies on phosphatases in berseem. *Ann. Biochem. and Exptl Med.* **21** (6) : 163—168.
- Wessels J. S. C., Baltscheffsky H., 1960. Adenosine triphosphatase activity in chloroplasts. *Acta Chem. Scand.* **14** (2) : 233—246.
- Wilkinson J. H., 1965. Isoenzymes. London, Spon.
- Williams P. H., Staples R. C., 1964. Acid phosphatases from healthy and rust infected Pinto bean leaves. *Contrib. Boyce Thompson Institute* **22** (6) : 269—282.

VILVE JAASKA, VELLO JAASKA

FOSFOHÜDROLAASIDE JA PEROKSÜDAASI ISOENSÜUMID
NISUIDANDITES

Resümee

Uurit etioleeritud nisuidandite juurtest ja koleoptiilidest eraldatud valguekstrakti fosfohüdrolaaside ning peroksüdaasi isofermentide koostist ja substraatset spetsiifilisust, kasutades modifitseeritud vertikaalse elektroforeesi meetodit polüakrüülamiidgeelil.

Fosfohüdrolaasid ja peroksüdaas esinevad nisutõusmeis mitme elektroforeetilisel eraldatava isofermenti kujul, mida iseloomustab erinev aktiivsus üksikute substraatide suhtes. Täheledata mõningaid erinevusi juurte ja koleoptiilide isofermentide koostises.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Saabus toimetusse
6. IV 1967

VILVE JAASKA, VELLO JAASKA

PHOSPHOHYDROLASE AND PEROXIDASE ISOENZYMES IN
WHEAT SEEDLINGS

Summary

Multiple forms of phosphatases and peroxidase in the root and coleoptile tissues of etiolated 5-day-old wheat seedlings (*Triticum aestivum* L., variety 'Pikker') have been investigated, using disc electrophoresis in polyacrylamide gel combined with cytochemical methods for the localization of enzyme activities.

The protein extracts for electrophoretic studies were made by homogenizing the plant tissue in a prechilled mortar with 0.1M tris-ascorbate buffer of pH 7.0, containing 5 mM EDTA. Triton X-100 in a final concentration of two per cent was added to the homogenate to dissolve particle-bound proteins. The homogenate was centrifuged at 18,000 · g for 30 minutes. Sucrose, in a final concentration of up to 30 per cent, was added to the supernatant employed in electrophoretic studies, together with a small quantity of Sephadex G-100 as an inert carrier. Electrophoresis was carried out by a modified method of Davis (1964), using only a small-pore gel layer containing the following final concentrations of components: 10 per cent acrylamide, 0.2 per cent N,N'-methylenebisacrylamide, 0.25M tris (hydroxymethyl) aminomethane, 0.05M nitric acid, 0.1 per cent triethanolamine, 0.5 mg per cent riboflavin. Modified Gomori incubation mixtures containing lead and calcium salts together with ATP, thiamine pyrophosphate, and β -glycerophosphate as substrates were used for the visualization of phosphohydrolases in polyacrylamide gels.

It has been shown that wheat phosphohydrolases and peroxidase exist in the form of several electrophoretically separable isoenzymes.

In an acid medium at pH 5.2, seven or eight electrophoretically distinct bands exhibiting ATP-ase and thiamine pyrophosphatase activity were observed, whereas only one or two bands showed activity toward β -glycerophosphate as a substrate. Essentially the same ATP-ase and thiamine pyrophosphatase patterns were obtained in a neutral medium at pH 7.2, suggesting that the same isoenzymes were active in acid as well as in neutral media.

ATP-ase and thiamine pyrophosphatase zymograms revealed similar isoenzyme patterns indicating the presence, in wheat seedlings, of a non-specific ATP-ase in multiple molecular forms.

In an alkaline medium at pH 9.2, the zymograms revealed a reduced number of ATP-ase and thiamine pyrophosphatase fractions, compared with acid and neutral media. The coleoptile tissue proved to contain a nonspecific "alkaline" ATP-ase not present in the roots.

Peroxidase was found to be present in the wheat seedlings in the form of six to eight electrophoretically distinct isoenzymes, somewhat differing in their activity towards benzidine, dianisidine, and guajacol used as substrates. Some differences were observed in the electrophoretic patterns of peroxidase isoenzymes from roots and coleoptiles.

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

Received
April 6, 1967