

УДК 581.174.1

**ВЫЯВЛЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ
РИБУЛОЗОБИСФОФАТКАРБОКСИЛАЗЫ В ПИРЕНОИДАХ
ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ
ЦИТОИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ**

М. Г. ВЛАДИМИРОВА, А. Г. МАРКЕЛОВА, В. Е. СЕМЕНЕНКО

*Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР, Москва*

Для выяснения природы пиреноида применен метод непрямой иммунофлуоресценции с использованием антисыворотки кролика к рибулозобисфосфаткарбоксилазе (РБФК) хлореллы и люминесцирующей антикродичей сыворотки, меченой флуоресцином изотиоцианата натрия. На двух культурах зеленых одноклеточных водорослей *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 и *Dunaliella salina* с помощью специфичной к РБФК иммунофлуоресцентной метки показано локальное свечение пиреноида, характеризующее наличие в нем значительного количества рибулозобисфосфаткарбоксилазы. Обсуждается роль пиреноида как своеобразной «гигантской карбоксисомы».

Иммунофлуоресценция — пиреноид — рибулозобисфосфаткарбоксилаза — Chlamydomonas reinhardtii CW-15 — Dunaliella salina.

Одной из характерных особенностей структурной организации хлоропластов низших эукариотических организмов (водорослей) является наличие в них хорошо видимого в световой микроскоп плотного образования белковой природы — пиреноида. Тело пиреноида тесно связано с ламеллярной системой хлоропласта и окружено, как правило, продуктами фотосинтетической ассимиляции углерода (чаще всего в виде крахмальной обкладки), что давно привело к представлению о связи пиреноида с процессом фотосинтеза. Однако функциональная роль пиреноида до сих пор остается неизвестной; чаще всего высказывается предположение о его участии в образовании запасных продуктов фотосинтеза (крахмал, липиды) [1, 2].

Существенным обстоятельством является то, что в ряде работ, в том числе и наших [3—5], показана функциональная зависимость морфологической выраженности пиреноида от физиологического состояния культуры и активности фотосинтетического аппарата. Так, на культуре *Chlorella* sp. К электронно-микроскопическими исследованиями было показано изменение степени выраженности пиреноида в зависимости от интенсивности света и при действии экстремальных факторов [4—6], а также под влиянием 2-дезокси-Д-глюкозы, которая вызывает специфическую репрессию синтеза нуклеиновых кислот и белков хлоропласта [6—8]. Сопоставление полученных при этом данных с результатами проведенных в этих же условиях физиолого-биохимических исследований [8—12] позволило установить четкую корреляцию между морфологической выраженностью пиреноида и содержанием рибулозобисфосфаткарбоксилазы (РБФК) и послужило основанием для предположения о том, что пиреноид является депо фотосинтетических ферментов, в частности РБФК [6]. Это подтверждалось данными по отсутствию пиреноида у мутанта *Chlamydomonas reinhardtii* ac-20 с нарушенным биосинтезом РБФК [13], а также работой Холсфорса [14], который показал, что белок изолированных пиреноидов зеленой водоросли *Eremosphaera viridis* содержит до 70% РБФК. Близкие результаты в 1978 г. получили

Кэрби и Эванс [15], которые выделили фракцию пиреноидов бурой водоросли *Pilayella littoralis* и нашли, что два основных полипептида экстракта пиреноидов подобны большой и малой субъединицам РБФК.

Интересно отметить в связи с этим, что в клетках эволюционно более древних прокариотических автотрофов, таких, как синезеленые водоросли (цианобактерии), тионовые бактерии, нитробактер, имеются полиэдральные тела, которые, как убедительно показано серией работ [16, 17], содержат РБФК и потому названы «карбокисомами».

Таким образом, накапливаются данные, указывающие на то, что пиреноид хлоропласта эукариотических водорослей содержит один из ключевых ферментов цикла Кальвина — рибулезобисфосфаткарбоксил-азу.

В настоящей работе для изучения природы пиреноида водорослей был впервые применен метод цитоиммуофлуоресцентной микроскопии с использованием моноспецифической антисыворотки против РБФК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Культуры. В качестве объекта исследования использовали одноклеточные зеленые водоросли, не имеющие оболочки: лишенный клеточной стенки мутант *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 и галофильную водоросль *Dunaliella salina* (соответственно D-9 и D-21 по списку коллекции одноклеточных водорослей ИФР АН СССР). В основном исследовании были проведены на *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15. Выращивание вели в условиях, обеспечивающих интенсивный рост каждой из этих форм [18, 19]. В опытах использовали культуры на стадии линейного роста, когда клетки имели хорошо выраженный пиреноид. После центрифугирования клетки дважды промывали 0,4 М сахарозой и ресуспендировали в физиологический раствор на фосфатном буфере с pH 7,2 (БФР).

Способ фиксации клеток имеет при цитоиммуофлуоресцентных исследованиях первостепенное значение, поскольку должен облегчить проникновение крупных молекул иммуноглобулина к исследуемым антигенам, не нарушая вместе с тем структурную организацию клетки. Кроме того, чтобы полностью исключить влияние собственной флуоресценции хлорофилла, мы стремились подобрать фиксатор, который бы обесцвечивал клетки. Козлов с сотр. [20] для фиксации одноклеточных водорослей при иммунофлуоресцентном исследовании гистонов использовали 50%-ный этанол. Однако в нашем случае при работе с легко деформирующимися клетками — протопластами хламидомонады этот способ оказался неэффективным. Удовлетворительные результаты были получены при фиксации клеток непосредственно на предметном стекле 96%-ным этиловым спиртом. Для этого на предметное стекло наносили каплю суспензии клеток в БФР и после подсыхания препарата на него наносили 2—3 капли 96%-ного спирта. Фиксацию вели в течение 30—40 мин, добавляя периодически капли спирта. После фиксации препарат промывали в БФР и подсушивали на воздухе. Приготовленные таким образом препараты, как показала проверка, хорошо сохраняются и могут быть использованы для иммуноцитохимических исследований спустя длительное время после приготовления.

Иммунофлуоресцентный анализ проводили с помощью метода непрямого иммунофлуоресценции (НИФ), который, как известно, заключается в выявлении антигена путем последовательного наслаивания («сандвич»-метод) на исследуемый образец сначала иммунной сыворотки к искомому антигену (в нашем случае к РБФК) с образованием комплекса антиген — антитело, а затем люминесцирующей сыворотки, содержащей антииммуноглобулины к глобулинам иммунной сыворотки (в нашем случае к иммуноглобулинам кролика).

В настоящей работе для выявления РБФК в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 и *Dunaliella salina* в качестве иммунной сыворотки использовали моноспецифическую сыворотку, содержащую антитела против РБФК *Chlorella* sp. K, полученную в результате иммунизации кроликов электрофоретически и иммунохимически чистым препаратом РБФК. Схема выделения, очистки, проверки чистоты РБФК для иммунизации, получение моноспецифической антисыворотки против РБФК хлореллы описаны в работах [8, 12, 21].

В качестве люминесцирующей сыворотки использовали лиофильно высушенную ослиную сыворотку против глобулинов кролика, меченную изотиоцианатом флуоресценна (ФИТЦ) (производство Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалея Минздрава СССР).

Идентификация антигена (РБФК) в клетках водорослей методом НИФ осуществлялась следующим образом: на предметное стекло с фиксированным и подсушенным препаратом клеток водорослей наносили 2—3 капли иммунной сыворотки, разведенной забуференным физиологическим раствором (БФР) с pH 7,2. Образцы инкубировали во влажной камере при температуре 37° в течение 30 мин, затем промывали 5—10 мин в проточной воде, 2—3 раза — в дистиллированной и 2—3 раза по 5 мин — в БФР. После подсушивания на препарат наносили люминесцирующую сыворотку, препараты снова

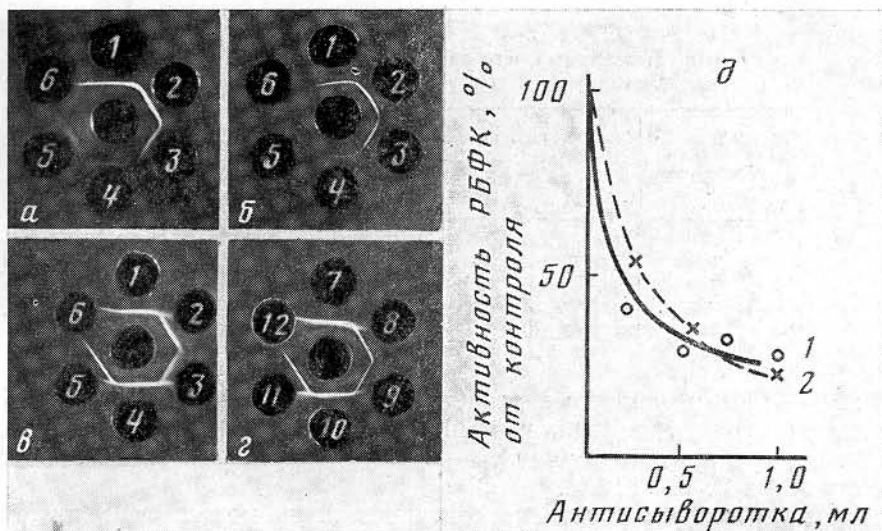


Рис. 1. Характеристика серологического сродства РБФК *Chlorella* sp. K, *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 и *Dunaliella salina* [26]

а — иммунная реакция между РБФК *Chlamydomonas reinhardtii* и антителами против РБФК хлореллы. В центральной лунке — антисыворотка против РБФК *Chlorella* sp. K. В периферических лунках — растворимый белок *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15: 1 — без разведения, 2–6 — соответственно в 2, 4, 8, 16 и 32 раза; б — иммунная реакция между РБФК *Dunaliella salina* и антисывороткой против РБФК *Chlorella* sp. K. В центральной лунке — растворимый белок *Dunaliella salina*. В периферических лунках — антисыворотка против РБФК хлореллы в разведениях: 1 — без разведения, 2–6 — соответственно в 2, 4, 8, 16 и 32 раза; в и г — выявление антигенной общности РБФК клеток *Chlorella* sp. K, *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 и *Dunaliella salina* в реакциях иммунопреципитации с антителами против РБФК *Chlorella* sp. K. В центральной лунке — антисыворотка против РБФК *Chlorella* sp. K. В периферических лунках — растворимый белок: 1, 4, 7, 10 — *Chlorella* sp. K; 2, 9, 11 — *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15; 3, 5, 8 — *Dunaliella salina*; 6, 12 — физиологический раствор; д — подавление каталитической активности РБФК *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 (1) и *Dunaliella salina* (2) антисывороткой против РБФК *Chlorella* sp. K

помещали на 30–40 мин в термостат (37°), затем промывали последовательно, как и в первый раз, в проточной воде, дистиллированной и в БФР и снова подсушивали на воздухе при комнатной температуре.

Люминесцентный анализ и микрофотосъемку препаратов проводили на микроскопе Ergaval (Zeiss, Jena) с флуоресцентной насадкой, использовали объективы $\times 40$ и $\times 100$. Зеленую флуоресценцию возбуждали с помощью фильтров В 233+U 204 при запирающих фильтрах G 249 или G-247. Фотографировали на пленку РФ-3. Контрольные снимки в видимой области спектра получали при использовании запирающего фильтра G 245 и фотопленки Микрат-200.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во многих работах, в том числе и наших [22, 23], показано наличие общих антигенных детерминант в молекуле рибулозобисфосфаткарбоксилазы различных водорослей, что позволяет использовать антисыворотку против РБФК какой-либо одной водоросли для иммунохимического выявления фермента у других водорослей.

В предварительных опытах было показано, что РБФ-карбоксилаза *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 и *Dunaliella salina* обладает серологическим сродством к антисыворотке против РБФК хлореллы, что видно (рис. 1) как по наличию реакции преципитации, так и по подавлению каталитической активности РБФК этих водорослей антисывороткой против РБФК хлореллы [24].

Поскольку в конечном счете рабочее разведение иммунной и люминесцирующей сыворотки при проведении реакций непрямой иммунофлуоресценции определяется антигеном, то для серии опытов устанавливали рабочее разведение сывороток непосредственно на препаратах с оценкой интенсивности люминесценции по четырехкрестной системе. Типичный результат такого определения представлен в табл. 1, из которой видно, что оптимальная зона для выявления иммунофлуоресценции находилась в наших опытах в пределах разведения иммунной сыворот-

Определение рабочего разведения антисыворотки и люминесцирующей сыворотки по яркости свечения

Разведение рабочей иммунной сыворотки (кроличьей)	Разведение люминесцирующей антикроличьей сыворотки			
	1/1	1/2	1/4	1/8
1/16	—	±	+	±
1/32	±	+	++	±
1/64	++	++	+++	+
1/128	+++	+++	++++	++
1/256	+	++	++	+

ки 1:64—1:128 и рабочего разведения сыворотки ФИТЦ 1:2—1:4. На практике всегда использовали люминесцирующую сыворотку в разведении 1:4, а препараты готовили с 2—3 разведениями иммунной сыворотки в пределах 1:32—1:128.

При оптимальном сочетании соотношения промежуточной и люминесцирующей сывороток получали характерную яркую зеленоватую люминесценцию у 100% клеток, как это видно на рис. 2. Из фото, представленного на рис. 2, отчетливо видно, что свечение имеет локальный характер в виде яркого пятна на фоне общей слабой флуоресценции всей клетки. Это видно также на других фото, имеющих большее увеличение (см. рис. 4, в; 5, в; 6, б; 7, б).

Локализация свечения в одном месте уже сама по себе свидетельствует о том, что иммуноглобулины проникли в клетку и в клетке прошла иммунохимическая реакция. Однако известно, что методы иммунофлуоресценции требуют системы контролей для доказательства иммуноспецифичности взаимодействия антисывороток с клеточными компонентами. Для доказательства специфичности протекания первой реакции по методу НИФ (антиген+антитело), т. е. реакции РБФК имеющейся в клетке водоросли с антителами против РБФК, проводились следующие контрольные опыты: в системе реакций антиген—промежуточная иммунная сыворотка—люминесцирующая антисыворотка исключали промежуточную сыворотку или использовали в качестве промежуточной нейтральную, гомологичную иммунной сыворотку, а также гетерологичную по антигену иммунную сыворотку. Во всех случаях не выявлялась специфическая флуоресценция, а наблюдалось слабое, неспецифическое свечение, равномерное по всей клетке (рис. 3 и табл. 2). Аналогично при использовании в качестве «антигена» препарата дрожжевых клеток и мазка альбумина, не содержащих РБФК, также не возникало иммуноспецифической реакции с антителами против РБФК и проявлялось лишь слабое неспецифическое свечение (табл. 2).

Проверка специфичности выявленной иммунофлуоресценции в реакциях второго этапа НИФ по конечному компоненту (люминесцирующая сыворотка) также подтвердила полученный результат. Так, не наблюдалось специфической люминесценции при использовании ослиной люминесцирующей антисыворотки против глобулинов человека, т. е. гетерологичной по отношению к глобулинам промежуточной кроличьей сыворотки, а также и при нанесении нелюминесцирующей антикроличьей ослиной сыворотки. При этом существенно, что в последнем случае происходит полное связывание антикроличьей сывороткой тех глобулинов кролика, которые специфически связаны с РБФК клетки в результате первой реакции. Об этом свидетельствует тот факт, что нанесение антикроличьей люминесцирующей сыворотки поверх антикроличьей нелюминесцирующей давало лишь слабое неспецифическое свечение. Следует отметить, что неспецифическое свечение, как это известно и видно из анализа табл. 2, определяется неспецифической адсорбцией ФИТЦ на

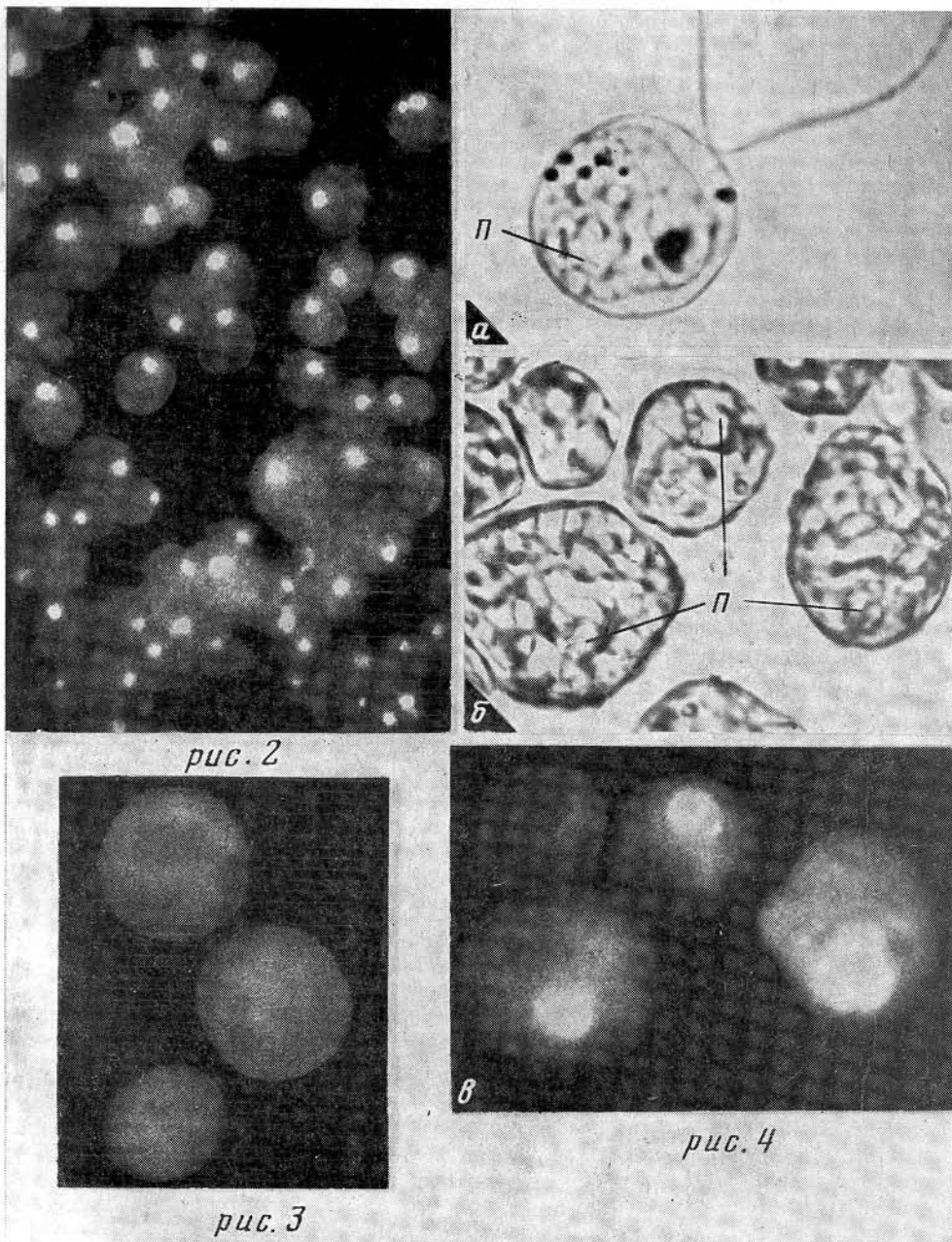


рис. 2

рис. 3

рис. 4

Рис. 2. Локализация РБФ-карбоксилазы в клетках *Chlamydomonas reinhardtii*, выявляемая методом непрямой цитоиммунофлуоресценции (общий вид препарата, ув. 1200)

Рис. 3. Неспецифическая флуоресценция клеток *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 при обработке по методу НИФ с использованием нейтральной антисыворотки вместо иммунной к РБФК

Рис. 4. Локализация РБФК в пиреноиде клеток *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15
 а — клетка до фиксации препарата; б и в — клетки после обработки по методу НИФ: б — фото в видимой области спектра, в — те же клетки в свете, возбуждающем люминесценцию ФИТЦ. П — пиреноид. Ув. 3000

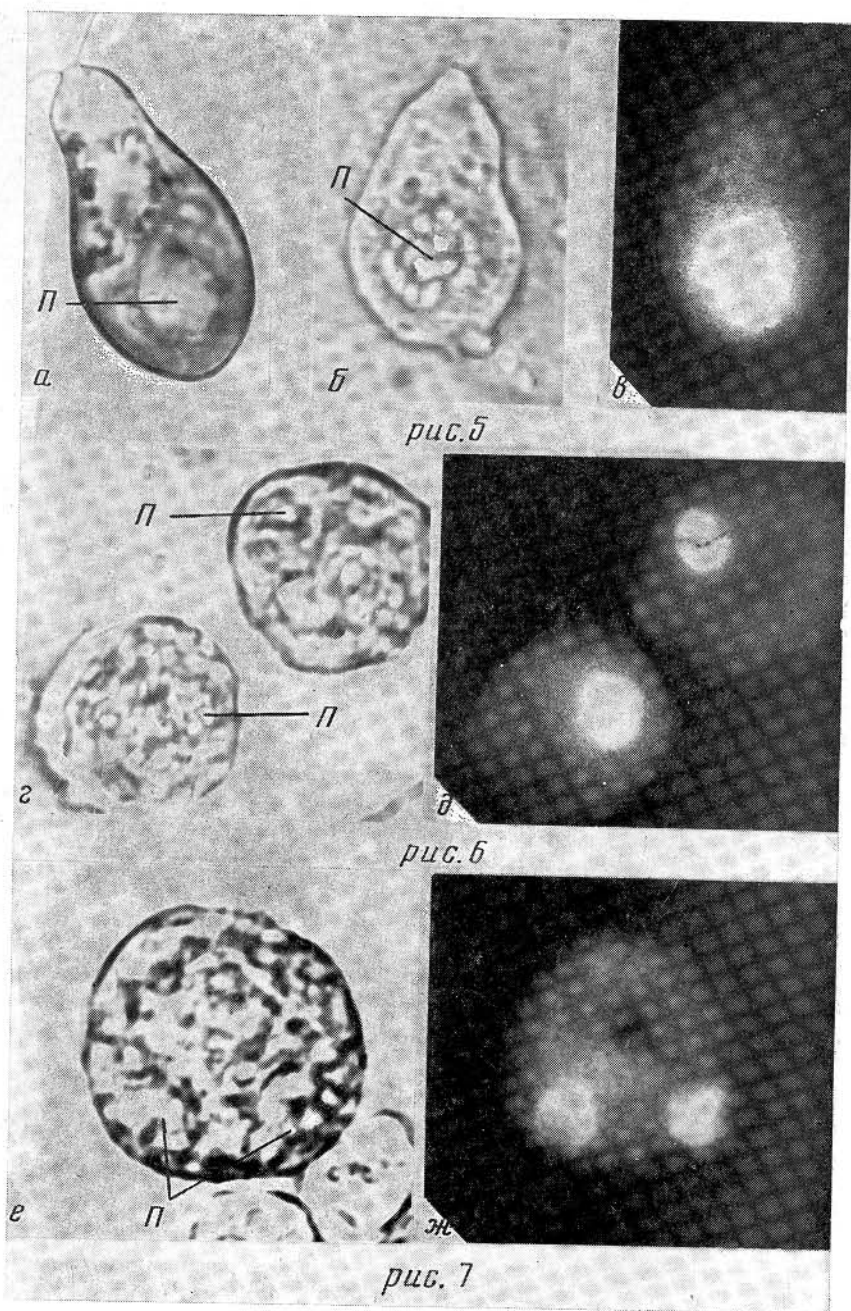


Рис. 5. Локализация РБФК в пиреноиде клеток *Dunaliella salina*
a, б, в — те же варианты, что и на рис. 4. Ув. 1600
 Рис. 6 и 7. Клетки *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 после обработки препарата по методу НИФ
 На фото 6 — клетка с делящимся пиреноидом (клетка сверху). Фото 7 — два пиреноида в делящемся хлоропласте у клетки перед делением
г, е — в видимой области спектра; *д, ж* — при возбуждении флуоресценции ФИТЦ. На фото 6 и 7 ув. 3000

Характеристика иммунологической специфичности взаимодействия антисыворотки против РБФ-карбоксилазы с РБФК (антиген) в клетках

№	Объект	Этапы реакции НИФ		Наличие специфической флуоресценции
		1-й этап (промежуточная сыворотка)	2-й этап (антисыворотка)	
1	Препарат, содержащий антиген	Без сыворотки	Без сыворотки	—
2	То же	Иммунная против РБФК сыворотка, кроличья	Люминесцирующая анти-кроличья сыворотка	+
3	»	Неиммунная (нейтральная) сыворотка	То же	—
4	»	Без сыворотки	»	—
5	Препарат, не содержащий антиген (дрожжи)	Иммунная против РБФК сыворотка, кроличья	»	—
6	Препарат не содержащий антиген (альбумин)	То же	»	—
7	Препарат, содержащий антиген	Иммунная против глобулинов мыши сыворотка, кроличья	»	—
8	То же	Иммунная против РБФК сыворотка, кроличья	Люминесцирующая анти-человеческая сыворотка	—
9	»	То же	Нелюминесцирующая анти-кроличья сыворотка	—
10	»	»	Нелюминесцирующая анти-кроличья сыворотка, затем люминесцирующая анти-кроличья сыворотка	—

всей поверхности клетки. Этот фон удается несколько снизить благодаря предварительной обработке люминесцирующей сыворотки фиксированными клетками исследуемой культуры.

Как видно из полученных результатов, специфическое локальное свечение в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 выявляется только в случае использования антисыворотки против рибулозобисфосфаткарбоксилазы и, следовательно, в результате серологической реакции между РБФК водоросли и антиглобулинами сыворотки, иммунной к РБФ-карбоксилазе.

Таким образом, с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции в настоящей работе доказано, что рибулозобисфосфаткарбоксилаза выявляется в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 в виде, как правило, одного локального участка. Аналогичные результаты были получены и для *Dunaliella salina*, хотя в этом случае использовали минимальную систему необходимых контролей (варианты 2—4 по табл. 2).

Для того чтобы выяснить, приурочено ли локальное специфическое свечение комплекса РБФК — иммуноглобулины — ФИТЦ к области пиреноида, проводили микроскопическое изучение и фотографирование одних и тех же участков препарата или отдельных клеток последовательно в свете, возбуждающем флуоресценцию, и в видимом свете. На рис. 4, а и 5, а представлен общий вид клеток *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 и *Dunaliella salina* перед фиксацией препарата. В клетках хорошо выражен пиреноид. На рис. 4, б и 5, б представлены клетки после фиксации и проведения иммунохимической реакции. Как видно из рис. 4, б, у всех клеток хламидомонады выделяется область хлоропласта, содержащая пиреноид. У клеток дуналиеллы (рис. 5, б) крупный пиреноид занимает значительную область в базальной части клетки. При сопоставлении снимков в видимом свете и в свете, возбуждающем флуо-

ресценцию изотиоцианата флуоресцеина, четко видно, что зона специфической флуоресценции в клетке локализована точно в месте расположения пиреноида (рис. 4, б, в; 5, б, в).

Таким образом, на двух культурах зеленых одноклеточных водорослей с помощью специфического к РБФК иммунофлуоресцентного зонда показано локальное свечение пиреноида, характеризующего наличие в пиреноиде значительного количества РБФК. Пиреноид, очевидно, следует рассматривать как своеобразную «гигантскую карбоксисому».

Пиреноид не является органеллой, однако представляет собой полуавтономную систему и в процессе деления клетки в зависимости от организма наблюдается или деление пиреноида (пополам или на неравные части), или его возникновение *de novo* [2]. Изучение и документация этого процесса могут быть облегчены применением метода НИФ, особенно в случае мелкоклеточных форм. Так, на рис. 6 представлены две клетки *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 с четко выраженным пиреноидом. При этом в одной клетке (на фото вверху) пиреноид находится в стадии деления, как это видно на препарате, сфотографированном в видимом свете (рис. 6, а), и что очень четко выявляется при люминесцентном анализе (рис. 6, б). На рис. 7, а, б представлена клетка хламидомонады, готовящаяся к делению. Клетка еще не имеет поперечной перегородки, но уже содержит два хлоропласта, в каждом из которых четко выявляется пиреноид.

Исследования пиреноида и РБФК в интактных клетках водорослей с помощью метода цитоиммунофлуоресценции могут, таким образом, представить большой интерес для изучения явлений биохимической и морфологической дифференцировки хлоропласта и адаптивных свойств фотосинтетического аппарата.

Остается неясным функциональный смысл пиреноида как массового скопления РБФК. В свое время [6] мы уже высказывали мнение, что пиреноид является депо фотосинтетических ферментов, в том числе РБФК. Если проводить известную аналогию между полиэдральными телами прокариотов и пиреноидом эукариотических водорослей и рассматривать пиреноид как гигантскую карбоксисому, то в пользу того, что РБФК депонируется в запас, можно привести данные о том, что у *Thiobacillus neapolitanus* появление и исчезновение полиэдральных тел (эквивалентно РБФК) находится в обратной зависимости от активности РБФК во фракции растворимых белков [15].

В своем эволюционном развитии природа пошла по пути рассредоточения фермента. У высших растений РБФК считается типичным стромальным белком. Наши наблюдения показали, что в клетках помимо ярко светящегося пиреноида дополнительно несколько выделяется свечение хлоропласта, а более темные места отличают цитоплазму, как это видно из сопоставления флуоресцентной и световой микроскопии (рис. 4, 7). Можно полагать, что РБФК содержится не только в пиреноиде, но и в других компартментах хлоропласта, хотя, видимо, в значительно меньших количествах, чем в пиреноиде. В какой мере, какая доля фермента рассредоточена по строме или приурочена к мембранной системе хлоропласта и является активной (если принимать, что пиреноид — форма запаса РБФК) — очень важный вопрос, который требует специального исследования как на биохимическом, так и на иммуноэлектронно-микроскопическом уровнях.

С другой стороны, нельзя не учитывать и представления, складывающегося, например, на основании работ по генезису крахмальных зерен [25]. Передвижение крахмального зерна от обкладки к периферии хлоропласта по мере возникновения новых зерен вокруг пиреноида указывает на возможность альтернативного предположения о том, что пиреноид является пулом активно работающего фермента, а возможно, и центром его биосинтеза. В пользу этого предположения могут свидетель-

ствовать также наши наблюдения за исчезновением пиреноида и снижением количества РБФК в период репрессии белоксинтезирующей системы хлоропласта [5—8].

Наконец, локализация РБФК в виде пиреноида может отражать эволюционную попытку преодолеть низкое сродство к субстрату через увеличение концентрации самого фермента.

Таким образом, в данной работе благодаря использованию цитоиммунофлуоресцентного метода впервые удалось визуализировать локализацию рибулозобисфосфаткарбоксилазы в пиреноиде водорослей. Это открывает новые возможности в изучении функциональной роли пиреноида и регуляторных механизмов синтеза белков хлоропласта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Griffith D. J. The pyrenoid.— Bot. Rev., 1970, v. 36, № 1, p. 29.
2. Седова Т. В. Цитология водорослей. Л.: Наука, 1977, 172 с.
3. Седова Т. В. Пиреноид, его строение и функции.— Бот. ж., 1966, т. 51, № 9, с. 1345.
4. Владимирова М. Г. Субмикроскопическая организация и функциональная активность клетки хлореллы.— В кн.: Матер. VIII Всес. рабочего совещ. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе на основе жизнедеятельности низших организмов. Киев: Наукова думка, 1974, с. 80.
5. Владимирова М. Г. Изменения структурной организации при функциональных перестройках клетки *Chlorella* sp. K.— Физiol. растений, 1976, т. 23, вып. 6, с. 1180.
6. Владимирова М. Г. К изучению функциональной роли пиреноида в клетках хлореллы.— В кн.: Электронная микроскопия в ботанических исследованиях. Петрозаводск, 1974, с. 134.
7. Владимирова М. Г., Семенов В. Е. Функциональные изменения структуры хлоропласта и пиреноида *Chlorella* sp. K. при действии 2-дезоксид-Д-глюкозы.— В кн.: Proc. of the XV Czechoslovak conference on electron microscopy with international participation. Prague, 1977, p. 237.
8. Семенов В. Е., Кулцова Е. С., Касаткина Т. И., Пронина Н. А., Владимирова М. Г., Зверева М. Г., Кузнецова Л. Г. Кинетические характеристики обратимой репрессии синтеза белков и функциональной активности хлоропласта стереохимическими аналогами глюкозы.— В кн.: Роль низших организмов в круговороте веществ в замкнутых экологических системах. Киев: Наукова думка, 1979, с. 313.
9. Семенов В. Е., Касаткина Т. И., Гевондян А., Лапина Е. С. Эндогенная регуляция фотосинтеза и сопряженных процессов. VI. Изменение состава растворимых белков под влиянием NaCl, сопровождающееся активацией фотосинтетического аппарата клеток хлореллы.— В кн.: Матер. XII Всес. рабочего совещ. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе. Киев: Наукова думка, 1972, с. 134.
10. Семенов В. Е., Касаткина Т. И., Зверева М. Г. Эндогенная регуляция фотосинтеза и сопряженных процессов. II. Перестройка в комплексе индивидуальных белков и направлений синтез белка фракции I при действии экстремальной температуры на клетку хлореллы.— В кн.: Матер. VII Всес. рабочего совещ. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе. Киев: Наукова думка, 1972, с. 120.
11. Семенов В. Е., Касаткина Т. И., Рудова Т. С. Обратимое подавление синтеза белка фракции I под влиянием 2-деокси-Д-глюкозы. Физiol. растений, 1976, т. 23, вып. 6, с. 1225.
12. Касаткина Т. И., Пронина Н. А., Семенов В. Е. Рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза хлореллы и регуляция ее синтеза под действием света разной интенсивности.— В кн.: Роль низших организмов в круговороте веществ в замкнутых экологических системах. Киев: Наукова думка, 1979, с. 298.
13. Goodenough U. W., Levin R. P. Chloroplast structure and function in ac—20, a mutant strain of *Chlamydomonas reinhardi*. III. Chloroplast ribosomes and membrane organization.— J. Cell Biol., 1970, v. 44, № 3, p. 547.
14. Holdsworth R. H. Isolation and partial characterisation pyrenoid's protein from *Eremosphaera viridis*.— J. Cell Biol., 1971, v. 51, № 2, p. 499.
15. Kerby N. W., Evans L. V. Isolation and partial characterisation of pyrenoids from the broun alga *Pylayella littoralis* (L) Kjellm.— Planta, 1978, v. 142, № 1, p. 91.
16. Beudeker R. F., Cannon G. C., Kuenen J. G., Shively J. M. Relation between D-Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, carboxysomes and CO₂ fixing capacity in the obligate chemolithotroph *Thiobacillus neapolitanus* grown under different limitations in the chemostat.— Arch. Microbiol., 1980, v. 124, № 2, p. 185.
17. Codd G. A., Stewart W. D. P. Polyhedral bodies and Ribulose-1, 5-diphosphate carboxylase of the blue-green alga *Anabaena cylindrica*.— Planta, 1976, v. 130, № 3, p. 323.
18. Владимирова М. Г., Маркелова А. Г. Автотрофный рост лишеного клеточной стенки мутанта *Chlamydomonas reinhardii* CW-15 в условиях интенсивной культуры.— Физiol. растений, 1980, т. 27, вып. 6, с. 1180.

19. Абдуллаев А. А., Семенов В. Е. Интенсивная культура *Dunaliella salina* Teod. и некоторые ее физиологические характеристики.— Физиол. растений, 1974, т. 21, вып. 6, с. 1145.
20. Козлов А. В., Иванова С. Б., Липская А. А., Берс Э. П., Водопьянова Л. Л. Иммунофлуоресцентное исследование набора основных хромосомных белков некоторых зеленых водорослей и эвглены.— Цитология, 1979, т. 21, № 4, с. 459.
21. Касаткина Т. И., Пронина Н. А., Семенов В. Е. Выделение высокомолекулярных белков типа рибулез-1,5-дифосфаткарбоксилазы из сложной смеси растворимых белков методом диск-электрофореза и в градиентном геле полиакриламида.— В кн.: Матер. VIII Всес. рабочего совещ. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе.— Киев: Наукова думка, 1974, с. 69.
22. Lord J. M., Codd G. A., Stewart W. D. P. Serological comparison of ribulose-15-diphosphate carboxylase from *Euglena gracilis*, *Chlorella fusca* and blue-green algae.— Plant Sci. Lett., 1975, v. 4, № 6, p. 377.
23. Касаткина Т. И., Владимирова М. Г., Пронина Н. А., Семенов В. Е. A comparative immunochemical study of RDP-carboxylases in some procaryotic phototrophs.— In: Microbial growth on C₁-compounds. Pushchino, 1977, p. 133.
24. Владимирова М. Г., Маркелова А. Г., Касаткина Т. И. Свойства фотосинтетического аппарата лишеного клеточной стенки мутанта *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15. Физиол. растений, 1982, т. 29, вып. 1, с. 80.
25. Bisalputra T., Weier T. E. The pyrenoid of *Scenedesmus quadricauda*.— Amer. J. Bot., 1964, v. 51, № 8, p. 881.

Поступила в редакцию
27.I.1982

**IDENTIFICATION OF RIBULOSE BISPHTHOSPHATE CARBOXYLASE
LOCATION IN THE PYRENOIDS OF UNICELLULAR ALGAE
BY CYTOIMMUNOFLUORESCENT METHOD**

M. G. VLADIMIROVA, A. G. MARKELOVA, V. E. SEMENENKO

*K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

To study the pyrenoid nature, a method of indirect immunofluorescence was applied using a rabbit antiserum against *Chlorella* ribulose bisphosphate carboxylase (RuBPC) and a luminescent anti-rabbit serum labeled with fluorescein-sodium isothiocyanate. In two green unicellular algae (*Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 and *Dunaliella salina*), with the aid of the immunofluorescent label specific to RuBPC, local luminosity in the pyrenoid was demonstrated to be the evidence for the presence of a substantial amount of RuBPC. The role of the pyrenoid as being a peculiar «giant carboxysome» is being discussed.