

Б. Р. АРАКЕЛЯН

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РИБОСОМ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

В настоящее время внимание многих исследователей привлекает исследование химических, физико-химических и биологических свойств рибосом, являющихся центрами белкового синтеза в клетке. Несмотря на то, что место и роль рибосом в белковом синтезе вполне понятны, в отношении структуры и механизма функционирования их существует еще целый ряд неясностей. Рибосомы растений с этой точки зрения изучены очень мало [4, 6, 11].

Целью данной работы являлось выделение и характеристика рибосом зародышей пшеницы. Был использован коммерческий препарат зародышей пшеницы производства Польской Народной республики.

Выделение рибосом. Все операции по выделению и очистке рибосом проводили при температуре 4°C. Сухие зародыши размалывали в электрической кофейной мельнице в течение 30 сек; муку тщательно растирали в фарфоровой ступке с пестиком в среде: 0,5 М сахароза—0,05 М фосфатный буфер, 0,01 М Mg^{2+} рН 7,6 (соотношение муки и среды—1:8). Суспензию размешивали 40 мин на магнитной мешалке и затем центрифугировали при 40 000 g на центрифуге MSE—25—30 мин. Для солюбилизации неразрушенных частиц к надосадочной фракции добавляли неионный детергент тритон X 100 до конечной концентрации 0,5%. Рибосомы осаждали из надосадочной фракции при 144 000 g в течение 150 мин в препаративной ультрацентрифуге Spinco (модель L, ротор № 40); осадок суспендировали пестиком в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,1, содержащем 0,01 М Mg^{2+} . Для удаления механических примесей и агрегатов рибосом суспензию их центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. С целью получения более очищенных препаратов суспензию наслаивали на 5 мл 1 М раствора сахарозы, приготовленного на 0,05 М фосфатном буфере—0,01 М Mg^{2+} , рН 7,5, и осаждали при 165 000 g в ультрацентрифуге VAC-60 в течение 120 мин.

Химическая и физико-химическая характеристика рибосом. Чистоту препаратов рибосом контролировали спектрофотометрически (E_{260}/E_{280} ; E_{max}/E_{min}) и по соотношению РНК/белок. Концентрацию рибосом в растворе определяли спектрофотометрически при 260 мкм, принимая, что 1 мг рибосом/мл дает поглощение, равное 16 опт. ед.; содержание РНК—по Спирину [1]; белок—по Лоури [5]. Определение коэффициентов седиментации проводили на аналитической ультрацентрифуге Spinco, модель E с регистрацией подвижной границы—при помощи оптической системы «шлирен» (скорость осаждения 37 020 об/мин или 42040 об/мин, температура 20°C, угол наклона струны 65°, интервал съемки 4 мин). Для расчета $S_{20,w}^0$ значения $S_{20,w}$, полученные при концентрациях РНК 1,8; 2,7; 3,6; 4,5; 5,4; 7,2 мг/мл, экстраполировали к бесконечному разведению.

Выделение белка из рибосом. Для отделения тотального белка рибосом использовали метод обработки 3 М LiCl в 5 М мочеvine [6]. К суспензии рибосом прибавляли равный объем 6 М LiCl в 10 М мочеvine и оставляли на 16—20 час. при температуре 4°C. Выпавшую в осадок рибосомальную РНК удаляли центрифугированием при

20 000 g в течение 20 мин (центрифуга MSE=25). LiCl и мочевины из раствора белка удаляли путем диализа против воды—продолжительность диализа 24 часа при температуре 4°C. Раствор белка лиофильно высушивали, концентрацию его в высушенных образцах определяли по содержанию азота.

Аминокислотный анализ. При определении аминокислотного состава тотального белка рибосом образцы лиофильно высушенных белков подвергали кислотному гидролизу. К 1 мг белка добавляли 0,5 мл 6 н. HCl. Гидролиз проводили в атмосфере азота в запаянных ампулах из стекла пирекс при температуре 110°C в течение 24 час. После гидролиза HCl удаляли многократным высушиванием гидролизатов в вакуум-эксикаторе над NaOH. Сухой остаток растворяли в 0,2 н. растворе цитратного буфера, pH 2,2—концентрация гидролизованного белка в нем составляла 1 мг/мл. Раствор фильтровали через стеклянный фильтр № 5 и непосредственно использовали для аминокислотного анализа; определение проводили по методу Мура и др. [7] в автоматическом анализаторе фирмы Hitachi KLA-3; содержание отдельных аминокислот выражали в молях на 100 молей аминокислот.

Триптофан в негидролизированных образцах не определяли.

Электрофорез в полиакриламидном геле. Электрофорез основных белков рибосом проводили в полиакриламидном геле по методу Гестеланда и Стехелина [3], являющемуся модификацией метода Рейсфилда.

Гель состоял из 10% акриламида, 0,15% N',N'-метиленбисакриламида, 0,5% TEMED, 1,2% персульфата аммония. Все ингредиенты его содержали 6 М мочевины. Электродным буфером служил 0,07 М раствор β-аланина, pH 4,5 (в некоторых случаях в качестве электродного буфера применяли 0,1 н. раствор глицина, pH 2,2).

Электрофорез проводили в стеклянных трубочках с внутренним диаметром 6 мм, длиной 70 или 100 мм. Полимеризацию геля—в термостате при температуре 26°C в течение 120 мин. На гелевую колонку наносили 100—150 мкг белка в объеме 0,05—0,08 мл. Трубки устанавливали в прибор для электрофореза, состоящий из двух камер: нижней, стеклянной, в которую наливали электродный буфер, и верхней, полиэтиленовой, с крышкой, в которую помещали трубки с гелем. В верхней камере была укреплена стеклянная трубка, несущая платиновые электроды. Прибор для электрофореза помещали в сосуд со льдом и устанавливали на магнитную мешалку для перемешивания буферного раствора. Температура при электрофорезе была в нижней камере (−2°)—(−4°)C, а в верхней 6°—8°C; сила тока на трубку составляла 2,5 ма или 4,0 ма; продолжительность—4—7 часов. После окончания электрофореза белки окрашивали 0,5% раствором амидного черного в 7% уксусной кислоте в течение 15 мин; избыток красителя удаляли смесью метанол—вода—уксусная кислота (5:5:1, по объему). Пробирки с колонками геля фотографировали на фотопленку ФТ-11, колонки геля денситометрировали на микрофотометре МФ-4.

В работе использовались следующие реактивы: акриламид—Koch a. Light, Англия; N',N'-метиленбисакриламид—Schuchardt, München, ФРГ; β-аланин—Koch a. Light, Англия; глицин—ГДР; амидовый черный—Serva, Heidelberg, ФРГ; мочевина (XЧ)—Черкасский завод химреактивов.

Результаты исследований. Препараты рибосом зародышей пшеницы имели характерный спектр поглощения в УФ свете с максимумом при 260 мкм и минимумом при 235 мкм.

Величины отношений E_{260}/E_{280} , E_{\max}/E_{\min} составляли в среднем 1,85 и 1,63. Препараты рибосом содержали 56% РНК и 44% белка (среднее из 6 определений). Выход рибосом в пересчете на 1 г воздушно-сухого веса зародышей пшеницы составлял 4—5 мг.

При аналитическом ультрацентрифугировании (рис. 1) в препаратах рибосом обнаруживался один основной пик мономера рибосом—83 S и 2 пика более тяжелых частиц—114 S и 121 S. Слева от основного компо-

нента виден небольшой пик с коэффициентом седиментации 30,7 S, который, видимо, представляет собой малую субъединицу рибосом.

Ниже приводятся седиментационные диаграммы рибосом при различных концентрациях (рис. 2). При экстраполяции полученных значений коэффициентов седиментации рибосом зародышей пшеницы к нулевой концентрации была получена величина $S_{0,w}^0 = 83,3$.

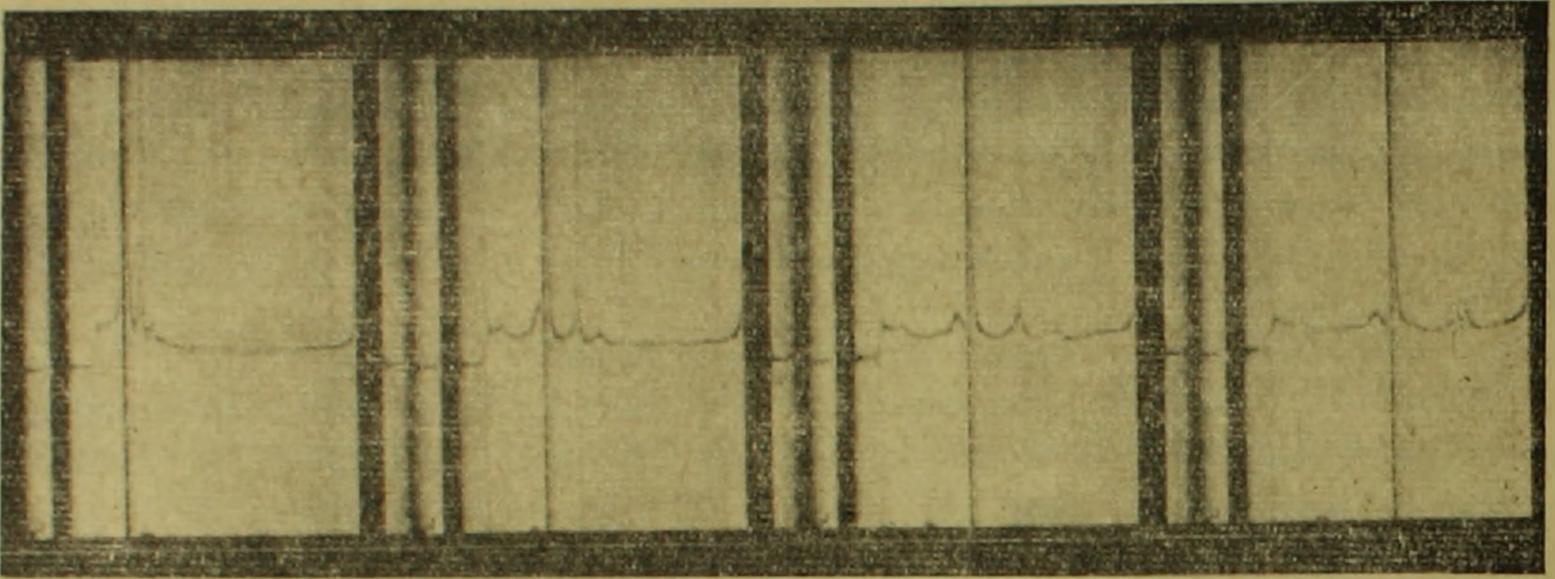


Рис. 1. Седиментационная диаграмма рибосом. 0,01 н. фосфатный буфер, pH 7,5; 37020 об/мин; температура 20°C; угол наклона струны 65°; интервал съемки 4 мин (движение пиков слева направо).

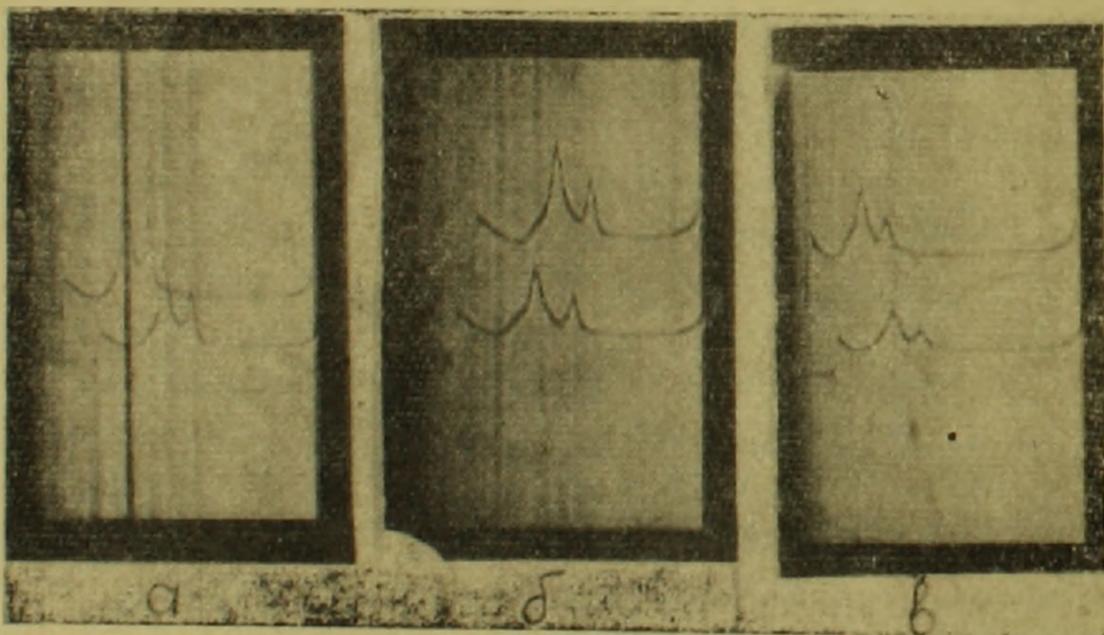


Рис. 2. Седиментационные диаграммы рибосом при разных концентрациях. 0,01 н. фосфатный буфер, pH 7,5; температура 20°C; 42 040 об/мин; угол наклона струны 65°; интервал съемки 4 мин. (Движение пиков слева направо: а—7,2 и 5,4 мг РНК/мл, б—4,5 и 3,6 мг РНК/мл, в—2,7 и 1,8 мг РНК/мл).

В таблице приведен аминокислотный состав белков рибосом зародышей пшеницы. Для сравнения приводятся наши данные по аминокислотному составу цитоплазматических рибосом проростков гороха и литературные данные по аминокислотному составу белков рибосом гороха, ретикулоцитов кролика и ядер зубной железы теленка.

Как видно из таблицы, для белков рибосом характерно наличие большого количества основных аминокислот—лизина и аргинина, а также высокое содержание дикарбоновых кислот. Общее содержание основ-

Таблица

Аминокислотный состав белков рибосом

Аминокислоты	Зародыши пшеницы	Проростки гороха	Проростки гороха [2]	Ретикулоциты кролика [9]	Ядра зобной железы теленка [10]
Лизин	10,6	10,8	9,1	10,5	9,9
Гистидин	1,1	2,4	1,4	2,2	2,5
Аргинин	6,0	10,2	6,3	8,2	7,8
Аспарагиновая кислота	8,4	9,8	9,5	8,0	9,0
Глутаминовая кислота	12,7	11,6	10,2	9,4	10,0
Треонин	4,1	4,7	5,6	4,6	4,7
Серин	5,0	5,0	5,9	5,0	4,5
Пролин	3,5	2,7	5,0	4,9	4,7
Глицин	9,8	6,9	8,1	8,5	9,2
Аланин	10,1	8,9	8,4	7,3	7,3
Валин	8,5	8,5	7,4	7,4	6,6
Метионин	1,5	—	1,6	1,6	2,0
Изолейцин	4,4	5,3	5,7	5,2	5,8
Лейцин	8,2	7,5	8,7	8,0	8,7
Тирозин	2,6	2,3	3,0	4,3	3,0
Фенилаланин	3,5	3,4	4,1	3,2	3,7

ных аминокислот в белках рибосом зародышей пшеницы составляет 17,7, а дикарбоновых—21,1 мол. %. В проростках гороха эти величины составляют соответственно 23,4 и 21,4 мол. %. Обращает на себя внимание низкое содержание гистидина в белках рибосом растительного

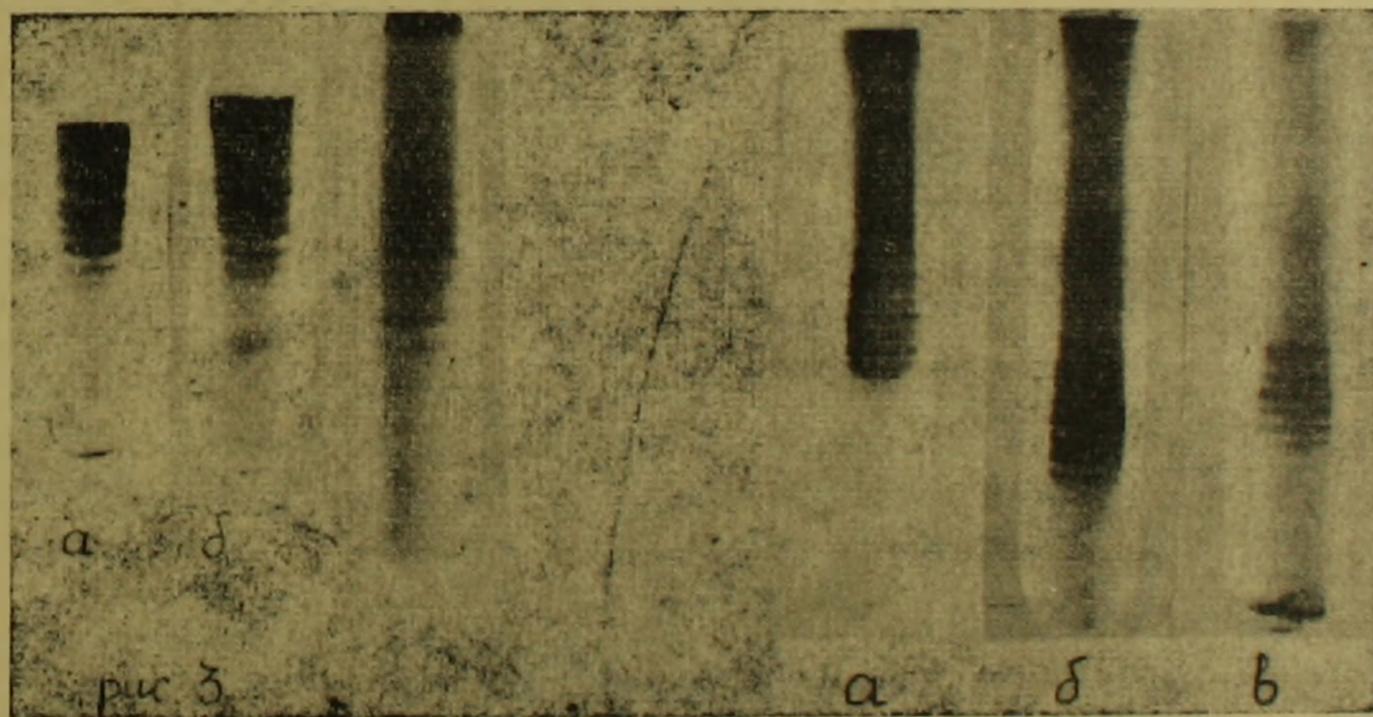


Рис. 4

Рис. 3. Электрофоретическое разделение основных белков рибосом зародышей пшеницы в β -аланиновом буфере, pH 4,5: а, б—при нанесении 100 и 120 мкг образца, сила тока 2,5 ма, продолжительность электрофореза 4 часа 30 мин; в—при нанесении 120 мкг образца, сила тока 4,0 ма, продолжительность электрофореза 6 часов 30 мин

Рис. 4. Электрофоретическое разделение основных белков рибосом зародышей пшеницы в глициновом буфере, pH 2,2: а—при нанесении 150 мкг образца, сила тока 4,0 ма, продолжительность электрофореза 5 час. 30 мин; б—при нанесении 150 мкг образца, сила тока 4,0 ма, продолжительность электрофореза 6 час. 30 мин; в—при нанесении 120 мкг образца, сила тока 4,0 ма, продолжительность электрофореза 6 час. 30 мин.

происхождения. У пшеницы и проростков гороха обнаружено довольно высокое содержание глицина, аланина, валина и лейцина. Содержание ароматических кислот невелико. На долю метионина в белках рибосом зародышей пшеницы приходится 1,5 мол. %; у гороха метионин обнаружить не удалось. По данным Бёрнстила и др. [2], содержание метионина в этих рибосомах составляет 1,6 мол. %.

Следует отметить большое сходство аминокислотного состава белков рибосом разного происхождения.

Ниже приводятся данные по электрофоретическому разделению основных белков рибосом в полиакриламидном геле. При электрофорезе в β -аланиновом буфере, рН 4,5, в течение 4—6 час. нам удалось разделить белок рибосом зародышей пшеницы на 16—18 фракций (рис. 3). Такое число фракций было обнаружено также при проведении электрофореза в глициновом буфере, рН 2,2 (рис. 4), хотя характер распределения белковых полос в этом буфере значительно отличался от распределения их в β -аланиновом буфере. При микроденситометрировании электрофореграмм (рис. 6) в белках рибосом зародышей пшеницы удалось обнаружить 19—26 фракций.

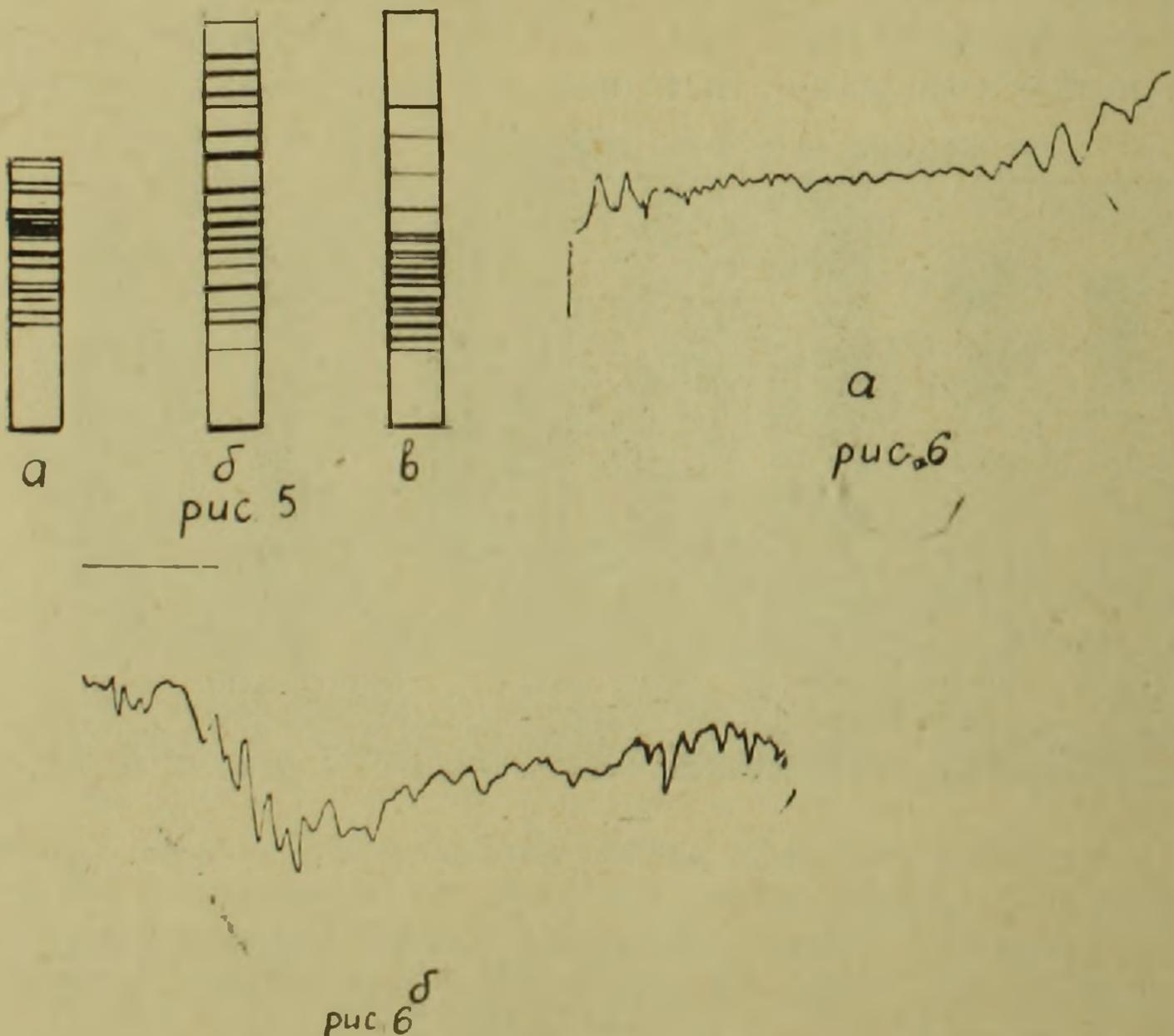


Рис. 5. Схематическое изображение электрофореграмм: а—то же, что на рис. 3а; б—то же, что на рис. 3в; в—то же, что на рис. 4в.

Рис. 6. Денситограммы электрофореграмм белков рибосом зародышей пшеницы: а—в β -аланиновом буфере; рис. 3в. б—в глициновом буфере; рис. 4в.

Таким образом, по гетерогенности белкового состава белки рибосом зародышей пшеницы близки к таковым других видов растений [6], а также к белкам рибосом животного и бактериального происхождения.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР,
Ордена Ленина институт биохимии
им. А. Н. Баха АН СССР

Поступило 16.IX 1970 г.

Բ. Ռ. ԱՌԱՔԵԼՅԱՆ

ՑՈՐԵՆԻ ՍԱՂՄԻՑ ՌԻԲՈՍՈՄՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԵՎ ԲՆՈՒԹԱԴՐՈՒՄԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրված է ցորենի սաղմից անջատված ռիբոսոմների քիմիական և ֆիզիկա-քիմիական հատկությունները: Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ցորենի սաղմից անջատված ռիբոսոմները ունեն S_{20}^0 , $w = 83$, պարունակում են 56% ՌՆԹ և 44% սպիտակուց: Ռիբոսոմներին բնորոշ E_{280}/E_{290} , E_{\max}/E_{\min} հարաբերությունները կազմել են համապատասխանաբար 1,85 և 1,63:

Կատարված է ռիբոսոմների ընդհանուր սպիտակուցային և ամինաթթվային կազմի ուսումնասիրություն:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Спирин А. С. Биохимия, 23, 656, 1958.
2. Birnstiel M., Chipchase M., Flamm W. Blochim. Biophys. Acta, 87, 111, 1964.
3. Gesteland R., Staechelin T. J. Mol. Biol., 24, 149, 1967.
4. Hsiao T. C. Biochim. Biophys. Acta, 91, 598, 1964.
5. Loury O. H., Rosebrouch N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
6. Lyttleton J. M. Blochim. Biophys. Acta, 154, 145, 1968.
7. Moore S., Spackman D. H., Stein W. H. Anal. Chem., 39, 1185, 1958.
8. Spitnik-Elson F. Bloch. Bioph. Res. Comm., 18, 557, 1965.
9. Ts'o P., Bonner J., Dintzis H. Arch. Biochem. Biophys., 76, 225, 1959.
10. Wang T. Arch. Biochem. Biophys., 97, 987, 1962.
11. Wolfe F., Kay C. Biochemistry 6, 2583, 1967.