

Г. Н. ЗАЙЦЕВА, Н. А. ШАНИНА, Е. Н. ЭЛИДИНА, М. В. ПАХОМОВА

НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ О РИБОСОМАХ ЗООФЛАГЕЛЛЯТА

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 14 VIII 1970)

Важный вклад в таксономию и филогению живого мира может дать изучение не только ДНК, но и белоксинтезирующего аппарата клетки — рибосом. Интерес представляют простейшие, и особенно жгутиковые, как наиболее древние представители типа простейших.

Однако о рибосомах жгутиковых простейших, и особенно зоофлагеллята, имеется относительно мало данных^(1, 2).

Перед нами стоял вопрос, существуют ли какие-либо особенности в составе ДНК и в строении рибосом у наиболее эволюционно древних флагеллята по сравнению с другими представителями простейших.

Изучали седиментационные свойства рибосом и рРНК, а также нуклеотидный состав ДНК и рРНК и качественный набор рибосомальных белков у *Trypanosoma lewisi*. Сравнивали их с уже известными свойствами рибосом *Strigomonas oncopelti*⁽³⁾. Эти два представителя зоофлагеллята относятся к разным родам: *Trypanosoma* и *Crithidia* одного семейства *Trypanosomida*. В работе использовали культуральную форму паразитического простейшего *Trypanosoma lewisi* в лептомонадной стадии (культуру любезно предоставил нам В. И. Хачоян). Клетки *T. lewisi* выращивали на модифицированной среде, рекомендованной Н. Н. Сухаревой для *S. oncopelti*⁽³⁾. Клетки разрушали стеклянными бусами (баллотини № 14) в гомогенизаторе MSE (среда А: трис-НCl, pH 8,0, 0,03 M; KCl 0,1 M; MgCl₂ 0,01 M; β-меркаптоэтанол 0,005 M). Гомогенат центрифугировали при 10 000 g 15 мин. Верхнюю часть жидкости осторожно сливали и добавляли тритон X-100 до конечной концентрации 0,5%. После часового перемешивания на холоду мембранный материал осаждали при 104 000 g 20 мин. (центрифуга Superspeed-50, MSE), а надосадочную жидкость снова центрифугировали при 104 000 g в течение 120 мин. Плотную часть осадка рибосом суспендировали в среде Б (та же, что среда А, но с сахарозой — 0,4 M и pH 7,6) и центрифугировали при 23 000 g в течение 20 мин. Эту процедуру очистки рибосом от мембранного материала проводили 3—4 раза. Осветленный супернатант, содержащий рибосомы, центрифугировали при 105 000 g в течение 80 мин. Плотный стекловидный осадок — чистые рибосомы (около 50 мг из 20 г сырых клеток).

Рибосомальные субчастицы получали диссоциацией мономеров при снижении концентрации ионов магния от 0,01 до 0,001 M (12 час. диализ в буфере: трис-НCl, pH 7,6, 0,015 M; KCl 0,1 M; Mg²⁺ 0,001 M).

Исследование седиментационных свойств рибосом и их субчастиц проводили в аналитической ультрацентрифуге Вискман с «шпирен»-оптикой. Коэффициенты седиментации рибосом определяли в 4 концентрациях (от 1 до 4,5 мг). Константу седиментации рибосом рассчитывали путем экстраполяции к бесконечному разделению значений $S_{20, W}$. Концентрацию рибосом определяли, считая $D_{260}^{0,10\%} = 23$ мг/мл РНК; количество РНК узнавали спектрофотометрически и с орцином⁽⁴⁾, а белка — по Лоури.

Седиментационные свойства рРНК исследовали при центрифугировании в линейном градиенте концентрации сахарозы в основном по методу⁽⁵⁾. При этом использовали способ непосредственного выделения рРНК обработкой препаратов рибосом додецилсульфатом натрия, который явля-

ется хорошим ингибитором рибонуклеаз. Для отделения рРНК от белков к 0,8 мл суспензии рибосом в буфере (трис-НСl, рН 7,6, 0,01 М; NaCl 0,1 М; $MgCl_2$ 0,015 М, поливинилсульфат 100 мкг/мл), добавляли 0,2 мл 25% раствора Na-додecilсульфата до конечной концентрации 5%. Смесь рибосом встряхивали 1 мин. и центрифугировали 5 мин. при 500g; супернатант содержал рРНК.

Для определения коэффициентов седиментации проводили одновременное осаждение в градиенте концентрации сахарозы исследуемой рРНК *T. lewisi* и меченной по H^3 -урацилу рРНК *E. coli*, которая служила маркером с известными коэффициентами седиментации 23S и 16S. Значения коэффициентов седиментации большого и малого компонентов рРНК *T. lewisi* рассчитывали по формуле (6).

ДНК выделяли из ядер, полученных из клеток *T. lewisi*, по методу (2). Состав ДНК и рРНК определяли после хроматографического разделения на бумаге оснований и нуклеотидов (7). Эти данные статистически обрабатывали. Получение рибосомальных белков и их разделение методом электрофореза в полиакриламидном геле проводили, как описано (2), с некоторой модификацией. Для лучшего разделения белков гели подвергали предварительному электрофорезу, который, как и основной процесс, вели при комнатной температуре.

Данные по нуклеотидному составу ядерной ДНК *T. lewisi* приводятся в табл. 1, в которой для сравнения дан также нуклеотидный состав ядерной ДНК *S. oncopelti* (8).

Из табл. 1 видно, что ДНК *T. lewisi* и *S. oncopelti* имеет довольно сходный состав оснований. ДНК этих зоофлагеллат относится к ГЦ-типу и имеет коэффициент специфичности $(Г + Ц) / (А + Т)$, равный 1,26 для *T. lewisi* и 1,18 для *S. oncopelti*. Полученные нами с помощью хроматографического метода данные по содержанию Г + Ц в ДНК *T. lewisi* и *S. oncopelti* (9) близки к литературным, рассчитанным по величине плавучей плотности (9).

Для изучения некоторых физико-химических свойств из клеток *T. lewisi* были выделены чистые рибосомы со спектральными данными (D_{260}/D_{235} 1,70 и D_{260}/D_{280} 1,93), свидетельствующими о том, что содержание РНК и белка в них близко к эквимоллярному. Сходные соотношения оптических плотностей были получены для цитоплазматических рибосом *S. oncopelti* (D_{260}/D_{235} 1,65 и D_{260}/D_{280} 1,80) (2). В рибосомах *T. lewisi* количество РНК составляло 51,1%, а белка 48,9%. Такое же содержание РНК и белка характерно для рибосом *S. oncopelti*.

Для химической характеристики рибосом *T. lewisi* был изучен нуклеотидный состав рРНК, который сравнивался с уже известным составом рРНК *S. oncopelti* (2).

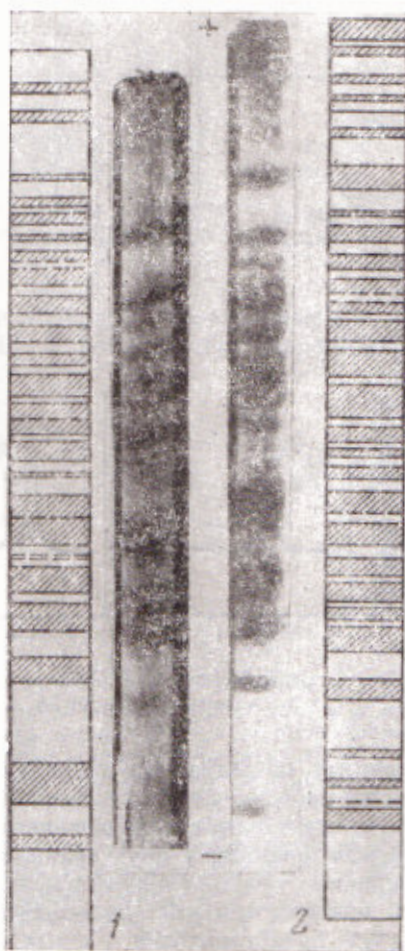


Рис. 1. Электрофоретическое распределение белков цитоплазматических рибосом *T. lewisi* (1) и *S. oncopelti* (2). 28 фракций белков

Нуклеотидный состав ДНК и рРНК зоофлагеллята (мол. %)

	Г	Ц	А	Т(У)	ПУ ПИ	Г+Ц А+Т(У)
ДНК						
<i>T. lewisi</i>	$28,07 \pm 0,58$	$27,73 \pm 0,75$	$21,97 \pm 0,65$	$22,23 \pm 0,61$	1,00	1,26
<i>S. oncopelti</i>	$27,13 \pm 0,45$	$27,12 \pm 0,61$	$22,84 \pm 0,51$	$22,81 \pm 0,58$	1,00	1,18
рРНК						
<i>T. lewisi</i>	$27,01 \pm 1,19$	$22,98 \pm 0,60$	$26,63 \pm 0,90$	$23,38 \pm 1,02$	1,16	1,00
<i>S. oncopelti</i>	$28,48 \pm 0,36$	$23,98 \pm 0,38$	$25,57 \pm 0,29$	$21,97 \pm 0,20$	1,18	1,13

Из данных табл. 1 следует, что рРНК *T. lewisi* имеет эквимоллярные соотношения нуклеотидов, а рРНК *S. oncopelti* принадлежит к слабо выраженному ГЦ-типу. Тем не менее, нуклеотидный состав рРНК этих зоофлагеллята имеет большое сходство.

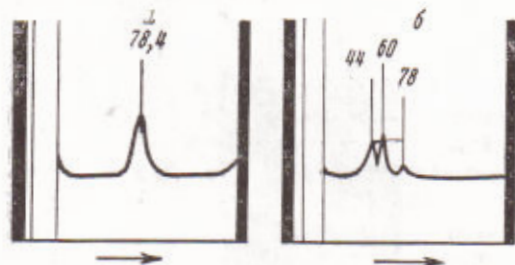


Рис. 2. Седиментограмма рибосом (а) и субчастиц (б) *T. lewisi*

Используя метод электрофореза в полиакриламидном геле, мы провели изучение качественного набора основных белков рибосом *T. lewisi*. Для сравнения приводятся данные по составу рибосомальных белков *S. oncopelti* (2). Из представленных электрофореграмм (рис. 1) видно, что сколько-нибудь существенных качественных отличий в распределении белков цитоплазматических рибосом у этих представителей трипанозомид не обнаружено. Можно отметить только количественную разницу в содержании некоторых белковых фракций у двух сравниваемых организмов. Так, например, рибосомальных белков с малой электрофоретической подвижностью у *S. oncopelti* больше, чем у *T. lewisi*. Итак, по ряду химических свойств рибосомы двух представителей разных родов семейства трипанозомид оказались весьма сходными.

Одной из основных характеристик рибосом является изучение их седиментационных свойств. При исследовании в аналитической ультрацентрифуге рибосомы *T. lewisi* (в буфере 0,01 *M* трис-НСl, pH 7,6; 0,01 *M* MgCl₂) имели один четкий пик мономера с константой седиментации 78,4S (рис. 2а). При снижении концентрации Mg²⁺ от 0,01 *M* до 0,001 *M* мономеры рибосом *T. lewisi* диссоциировали на субчастицы с коэффициентами седиментации 44S и 60S (рис. 2б). Значения коэффициентов седиментации рибосомальных субчастиц у *T. lewisi* совпадают с их значениями, полученными для *S. oncopelti* (2) и других флагеллята (10).

Одной из основных характеристик рибосом является изучение их седиментационных свойств.

При исследовании в аналитической ультрацентрифуге рибосомы *T. lewisi* (в буфере 0,01 *M* трис-НСl, pH 7,6; 0,01 *M* MgCl₂) имели один четкий пик мономера с константой седиментации 78,4S (рис. 2а). При снижении концентрации Mg²⁺ от 0,01 *M* до 0,001 *M* мономеры рибосом *T. lewisi* диссоциировали на субчастицы с коэффициентами седиментации 44S и 60S (рис. 2б). Значения коэффициентов седиментации рибосомальных субчастиц у *T. lewisi* совпадают с их значениями, полученными для *S. oncopelti* (2) и других флагеллята (10).

При изучении седиментационных свойств рРНК мы столкнулись с ее нестабильностью. Для предотвращения деградации рРНК под действием РНКазы при выделении ее из рибосом был использован додецилсульфат натрия. Исследуя препараты рРНК *T. lewisi* при оптимальных условиях центрифугирования в линейном градиенте концентрации сахарозы, мы обнаружили два компонента с коэффициентами седиментации (в разных опытах), равными 25–26S и 17–18S. Аналогичные результаты по седиментационным свойствам рРНК *S. oncopelti* были получены ранее (2).

Из наших и литературных данных (11, 12) следует, что почти у всех изученных представителей простейших (за исключением *Euglena gracilis*)

большой компонент рРНК по седиментационным свойствам ближе к животным, а малый — к растительным рРНК.

Интересной особенностью рибосом флагаеллы, обнаруженной нами ранее (³) у *S. oncorhynchi* и в настоящей работе у *T. lewisi*, является их почти полная диссоциация на субъединицы уже при 0,001 M концентрации ионов магния и ионной силе буфера 0,1—0,01 M, что сближает их в этом отношении с рибосомами прокариота. По характеру диссоциации в данных условиях рибосомы зоофлагаеллы и фитофлагаеллы (¹³) сходны, но отличаются от рибосом других простейших, например, ресничковых и саркодовых (^{5, 14, 12}).

Таким образом, сравнительное изучение рибосом подтверждает существующее предположение о том, что флагаеллы являются наиболее древней группой организмов среди простейших.

Другим свидетельством в пользу этой гипотезы является сравнительное изучение состава оснований ДНК у различных организмов типа простейших. Установлено, что ДНК всех изученных представителей флагаеллы принадлежит преимущественно к эволюционно древнему ГЦ-типу, широко распространенному среди прокариота (¹⁵) и некоторых низших форм эукариота (¹⁶).

Таким образом, сравнительное изучение ДНК и рибосом может дать важную информацию об эволюции живого мира.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
10 VIII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. A. Gross, J. Gen. Microbiol. (Proc.), 50, № 3, p. IX—X (1968); Biochim. et biophys. acta, 204, 470 (1970).
- ² Г. Н. Зайцева, А. В. Ильин и др., Биохимия, 35, 457 (1970).
- ³ А. В. Ильин, А. В. Шульга и др., Докл. высш. школы, биол. науки, 9, 118 (1968).
- ⁴ M. Kamili, H. Manhour, Clin. Chem., 15, 390 (1969).
- ⁵ D. L. Weller, A. Raina, D. B. Johnstone, Biochim. et biophys. acta, 157, 558 (1968).
- ⁶ R. G. Martin, B. N. Ames, J. Biol. Chem., 236, 1372 (1961).
- ⁷ Б. Ф. Ванюшин, В кн. Современные методы в биохимии, 1, М., 1964, стр. 236.
- ⁸ Г. Н. Зайцева, А. В. Ильин и др., ДАН, 180, 967 (1968).
- ⁹ C. L. Schildkraut, M. Mandel et al., Nature, 196, 795 (1962).
- ¹⁰ М. В. Пахомова, Г. Н. Зайцева, С. Ю. Степаненко, Биохимия, 33, 1074 (1968).
- ¹¹ R. E. Click, B. L. Tint, J. Mol. Biol., 25, 411 (1967).
- ¹² A. H. Reisner, J. Rowe, H. M. Macindoe, J. Mol. Biol., 32, 587 (1968).
- ¹³ R. Sager, M. G. Hamilton, Science, 157, 709 (1967).
- ¹⁴ M. Iwabuchi, H. Ochiai, Biochim. et biophys. acta, 190, 211 (1969).
- ¹⁵ M. Mandel, In: Chemical Zoology, 1, N. Y.—London, 1967, p. 541.
- ¹⁶ А. С. Антонов, Усп. совр. биол., 60, 161, 3 (1965).

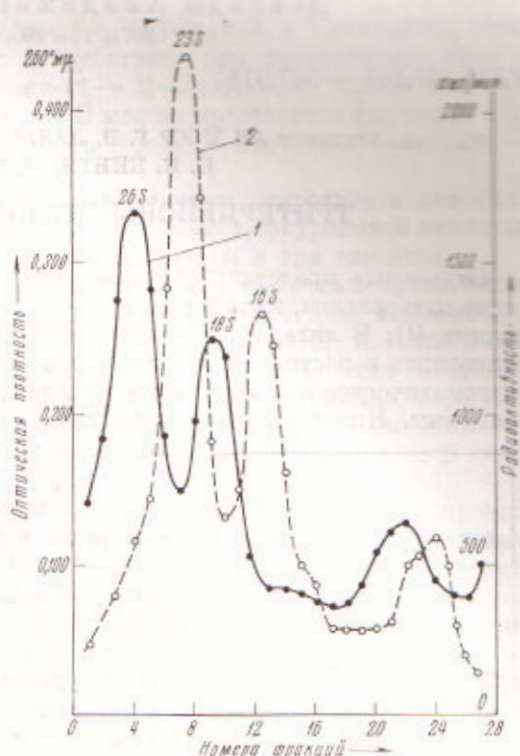


Рис. 3. Седиментация рРНК *T. lewisi* и *E. coli* в градиенте концентрации сахарозы. Линейный градиент концентрации сахарозы от 5 до 20%. Буфер: трис-НСl, pH 7,6, 0,01 M; NaCl 2,5 M; SDS 0,2%. Растворы сахарозы обрабатывали бентонитом (400 мкг/мл). Ротор SW-50, объем 5 мл, скорость осаждения 39 000 об/мин, время 4 часа, температура 18—20°. 1 — 3 оптических единицы рРНК *T. lewisi*; 2 — 0,15 оптических единиц H^+ -рРНК *E. coli*.