

Е. Б. ЛИШНЕВСКАЯ, академик А. С. СПИРИН

ДИССОЦИИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ САХАРОЗЫ НА РИБОСОМЫ

Седimentация рибосом в сахарозном градиенте является стандартным и широко принятым методом исследования в современной молекулярной биологии. В то же время некритическое отношение к методу приводит в ряде случаев к различным артефактам. Недавно было указано на то, что увеличивающееся гидростатическое давление вдоль центрифужной пробирки может индуцировать диссоциацию рибосом на субчастицы в ходе седimentации (^{1, 2}). Сразу после появления указанных сообщений стало очень модным объяснять все ненормальные картины седimentации рибосом в сахарозном градиенте именно этой причиной — переменным (увеличивающимся) гидростатическим давлением вдоль центрифужной пробирки. Очевидно, однако, что к аналогичным артефактам может приводить любой переменный фактор, обладающий диссоциирующим действием. В частности, при центрифугировании в сахарозном градиенте еще одним переменным фактором, действию которого подвергаются рибосомы в ходе седimentации, является концентрация сахарозы (обычно от 5% у верха пробирки до 20% у дна). Удивительно, что, несмотря на широкое использование метода центрифугирования рибосом в сахарозном градиенте, никто не проверял действия самой сахарозы на диссоциацию — ассоциацию рибосомных частиц.

В настоящей работе показано, что сахароза обладает четко выраженным диссоциирующим действием на рибосомы *Escherichia coli*. Таким образом, при центрифугировании рибосом в сахарозном градиенте они подвергаются все возрастающему диссоциирующему действию сахарозы, что должно приводить к артефактам, аналогичным тем, которые описаны и объяснены увеличивающимся гидростатическим давлением (^{1, 2}).

Рибосомы и рибосомные субчастицы получали из бактерий *E. coli*, штамм MRE-600, как описано ранее (^{3, 4}). В работе было испытано действие 5, 10 и 20% сахарозы на рибосомы при различных концентрациях Mg^{2+} . Приготовление образцов с этими концентрациями сахарозы при разных концентрациях Mg^{2+} проводили аналогично тому, что описано ранее для других диссоциирующих или стабилизирующих агентов (^{3, 4}). Образцы анализировали на аналитической ультрацентрифуге «Спинко Е», снабженной ультрафиолетовой оптикой, в 12 мм ячейках при 42 040 об/мин. Относительные количества недиссоциировавших рибосом и отдельных 50S и 30S субчастицы при различных условиях среды рассчитывали из седimentационных диаграмм. Количество недиссоциировавших рибосом (70S) при 20 мМ Mg^{2+} без сахарозы принимали за 100%. Долю недиссоциировав-

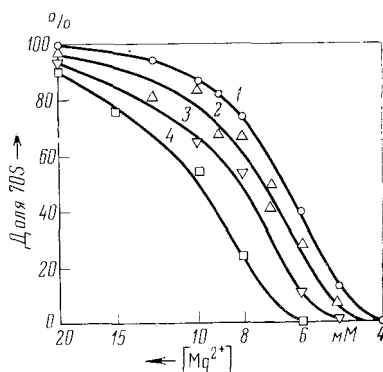


Рис. 1. Относительное содержание ассоциатов 50—30S (70S-частиц) в зависимости от концентрации Mg^{2+} в присутствии различных концентраций сахарозы по данным аналитического ультрацентрифугирования. 1 — контроль (без сахарозы), 2 — 5% сахароза, 3 — 10% сахароза, 4 — 20% сахароза. Во всех пробах присутствует 0,1 M NH_4Cl и 0,01 M трис-HCl-буфер, pH 7,3

ших рибосом, остающуюся от этого количества в присутствии сахарозы, откладывали против понижающейся концентрации Mg^{2+} .

На рис. 1 представлены полученные результаты. Видно, что в контрольной серии, без сахарозы (кривая 1), полудиссоциация исходных рибосом наблюдается в районе $6 мМ Mg^{2+}$ или между 7 и 6 $мМ Mg^{2+}$; основная масса рибосом диссоциирует в интервале между 10 и 5 $мМ Mg^{2+}$, в соответствии с прежними данными (^{3, 4}). Присутствие 5% сахарозы (кривая 2) сдвигает точку полудиссоциации в район 7 $мМ Mg^{2+}$, 10% сахарозы (кривая 3) — в район 8 $мМ Mg^{2+}$, а 20% сахарозы (кривая 4) — в район 9—10 $мМ Mg^{2+}$. При 20% сахарозы основная масса рибосом диссоциирует в интервале между 15 и 7 $мМ Mg^{2+}$. Таким образом, присутствие сахарозы дестабилизирует ассоциацию рибосомных субчастиц. Чем выше концентрация сахарозы, тем больше диссоциация рибосом при каждой данной концентрации Mg^{2+} (во всяком случае, начиная с 15 $мМ$ и ниже). Из рис. 1 видно, что увеличение концентрации сахарозы в растворе на 5% эквивалентно понижению концентрации Mg^{2+} приблизительно на 1 $мМ$.

Обнаруженное диссоциирующее действие сахарозы на рибосомы может быть результатом вовсе не прямого взаимодействия ее с рибосомными частицами. Очень вероятным объяснением кажется то, что сахароза просто понижает эффективную концентрацию свободных ионов Mg^{2+} в растворе вследствие образования сахаратов. Тогда введение сахарозы в раствор аналогично уменьшению концентрации Mg^{2+} , который, как хорошо известно (⁵), необходим для поддержания ассоциированного состояния рибосомы.

Как бы то ни было, диссоциирующее действие сахарозы на рибосомы нельзя не принимать во внимание при анализе рибосомных препаратов путем центрифугирования в сахарозных градиентах. Во всяком случае, когда рибосомы находятся на грани стабильности, увеличение концентрации сахарозы по мере их седиментации должно приводить к их диссоциации в ходе центрифугирования, со всеми вытекающими отсюда артефактами.

Приносим глубокую благодарность Н. Г. Коровянскому за квалифицированное техническое обеспечение опытов на аналитической ультрацентрифуге.

Институт белка
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
18 II 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. A. Infante, M. Krauss, *Biochim. et biophys. acta*, **246**, 81 (1971). ² A. A. Infante, R. Baierlein, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1780 (1971). ³ Е. Б. Лишневская, В. И. Гельфанд, А. С. Спирин, *ДАН*, **199**, 712 (1971). ⁴ A. S. Spirin, E. B. Lishnevskaya, *FEBS Letters*, **14**, 114 (1971). ⁵ А. С. Спирин, Л. П. Гаврилова, Рибосома, «Наука», 1971.