

УДК 581.19.7

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Н. Л. КЛЯЧКО, Л. А. ЯКОВЛЕВА, О. Н. КУЛАЕВА

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ ИЗОЛИРОВАННЫХ СЕМЯДОЛЕЙ ТЫКВЫ 6-БЕНЗИЛ-АМИНОПУРИНОМ НА АКТИВНОСТЬ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НИХ ПРЕПАРАТОВ РИБОСОМ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 12 IV 1973)

Цитокинины активируют включение меченых предшественников в белок как в целых органах и тканях (^{1, 2}), так и в изолированных органеллах (³⁻⁵). Однако их добавление непосредственно в рибосомальную бесклеточную систему не приводило к стимуляции синтеза белка (⁶). Вместе с тем, в литературе имеются указания на то, что предварительная обработка ткани цитокинином приводит к более активной работе белоксинтезирующего аппарата *in vitro* (^{6, 7}).

Нами в опытах *in vivo* было показано, что 6-бензил-аминопурин (БАП) увеличивает не только количество рибосом в клетке, но и их активность. Такой вывод был сделан косвенно, основываясь на предположении, что суммарное содержание РНК приблизительно отражает количество рибосом в клетке, а включение C^{14} -лейцина в белковую фракцию является показателем интенсивности синтеза белка. Расчет интенсивности

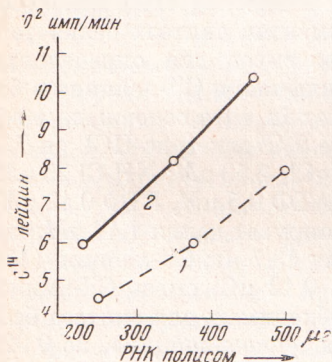


Рис. 1

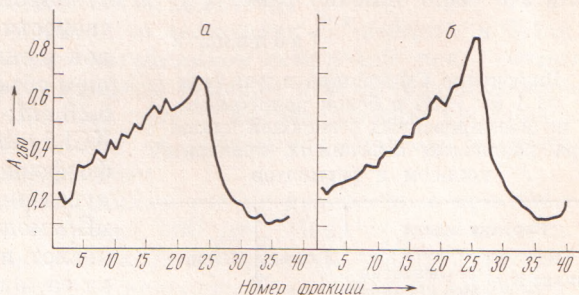


Рис. 2

Рис. 1. Включение C^{14} -лейцина в белок полисомами из изолированных семядолей тыквы, росших 96 час на воде (1) или растворе 10 мг/л БАП (2)

Рис. 2. Профиль полисом в градиенте плотности сахарозы (концентрация сахарозы увеличивается слева направо). Семядоли росли на воде (а) и на растворе 10 мг/л БАП (б)

включения метки в белок на единицу РНК позволяет получить некоторое представление об активности работы белоксинтезирующего аппарата. Подобный расчет и привел к выводу о том, что БАП повышал активность белоксинтезирующего аппарата в клетках семядолей. Однако этот вывод важно было проверить в дальнейшем в опытах с бесклеточной системой синтеза белка *in vivo*. В связи с этим задачей данной работы явилось непосредственное сравнение активности препаратов полисом, выделенных из изолированных семядолей тыквы, росших на растворе БАП или воде.

Семена тыквы сорта Столовая мозолеевская замачивали в воде в темноте в течение 4 час., а затем раскладывали на влажную фильтровальную бумагу для проращивания в темноте при 28° в течение 72 час. Затем семена очищали от оболочек и отрезали семядоли от остальных частей зародыша, изолированные семядоли помещали в чашки Петри с раствором БАП (10 мг/л) или водой, к которым добавляли пенициллин (100 тыс. ед. на 1 л). Чашки Петри находились в кондиционированной камере при 28°

Таблица 1

Содержание РНК в изолированных семядолях тыквы и включение C^{14} -лейцина высечками из семядолей

Возраст семядолей, часы после изоляции	Вариант опыта	РНК, мг на 1 семядолю	Включение C^{14} -лейцина, 10^3 имп/мин на 1 семядолю	Интенсивность включения C^{14} -лейцина в белок на единицу РНК	
				10^3 имп/мин на 1 мг РНК	%
72	Вода	0,85	39	45,8	100
	БАП	1,48	91	61,4	134
96	Вода	1,19	59	49,5	100
	БАП	1,49	114	76,5	155

и постоянном круглосуточном освещении (28 тыс. эрг/см²). Через 72—96 час. после изоляции в семядолях определяли содержание РНК методом Осборн (2), сократив время щелочного гидролиза до 1 часа, и содержание белка методом Лоури (8). Кроме того определяли интенсивность включения C^{14} -лейцина в белок высечками из семядолей в опытах *in vivo*. Остальные семядоли фиксировали в сухом льду и впоследствии использовали для получения препаратов полисом и ферментов синтеза белка так, как это было описано ранее (9). Инкубационная смесь для определения

Таблица 2

Включение C^{14} -лейцина в имп/мин на 1 мг РНК в белок полисомами из изолированных семядолей тыквы при различных сочетаниях препаратов полисом и ферментов

Вариант опыта		I опыт	II опыт
полисомы	ферментативный препарат		
Вода	Вода	2360	1820
Вода	БАП	2320	1920
БАП	Вода	2920	2960
БАП	БАП	3120	2810

скорости включения C^{14} -лейцина в белок в опытах *in vitro* содержала в общем объеме 0,43 мл: трис-HCl, рН 7,9, 6,23 μM ; $MgCl_2$ 2,53 μM ; NH_4Cl 25 μM ; KCl 5 μM ; АТФ 0,5 μM , ГТФ 0,12 μM ; фосфоэнолпируват калия 1,43 μM ; пируваткиназу 13,7 μg ; C^{14} -лейцин (124 мС/ммоль) 0,12 μC ; смесь C^{12} -аминокислот, необходимых для синтеза белка за исключением лейцина, по 0,029 μM каждой; полисом из расчета 100—400 μg РНК; ферментный препарат (100 μg белка); 2-меркаптоэтанол 1,44 μM . Инкубацию проводили 40 мин. при 30°. Реакцию останавливали добавлением равного объема ледяной 10% ТХУ. После гидролиза нуклеиновых кислот и промывки осадка 5% ТХУ на мембранных фильтрах № 4 (Мытищенская экспериментальная фабрика ультрафильтров) радиоактивность осадков определяли на газопоточном счетчике.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены результаты опыта по включению C^{14} -лейцина *in vivo* высечками из изолированных семядолей тыквы. Можно видеть, что семядоли, выросшие на растворе БАП, отличались более высоким содержанием РНК и большей интенсивностью синтеза белка в сравнении с семядолями, находившимися на воде. Интенсивность синтеза белка в расчете на единицу РНК в этих семядо-

лях также была выше, что позволяет предполагать увеличение под действием фитогормона активности белоксинтезирующего аппарата клеток. Особенно значительной разницей в интенсивности синтеза белка на единицу РНК была у семядолей, получавших и не получавших БАП, через 96 час. после их изоляции. Поэтому в дальнейшем семядоли такого возраста были выбраны для сравнения активности выделенных из них полисом.

Результаты одного из опытов по включению S^{14} -лейцина в белок полисомами, выделенными из семядолей, находившихся в течение 96 час. на растворе БАП или воде, представлены на рис. 1. Из полученных данных очевидно, что различие в активности включения S^{14} -лейцина, проявившееся в опытах *in vivo*, сохранилось и в опытах *in vitro*. Полисомы из семядолей, выросших на растворе БАП, включали S^{14} -лейцин в белок на 40—50% активнее, чем полисомы из семядолей, росших на воде.

В дальнейшем мы попытались выяснить, за счет чего происходит повышение активности синтеза белка в системе *in vitro* под действием цитокинина: за счет влияния фитогормона на ферменты, выделяемые из надосадочной жидкости, или за счет его воздействия на рибосомы. Для этого мы сравнили активность в синтезе белка рибосомальных препаратов из получавших цитокинин и контрольных семядолей тыквы, как в присутствии ферментов из контрольных семядолей, так и в присутствии ферментов из семядолей на цитокинине (табл. 2).

Проведенные опыты показали, что различие между семядолями, выросшими на воде или растворе БАП, заключалось в активности самого препарата полисом, а не ферментов белкового синтеза, поскольку результаты опытов не зависели от того, использовали ли мы препарат ферментов из семядолей, выросших на растворе БАП или на воде.

Фракционирование полисом в градиенте плотности сахарозы (10—30%) путем их центрифугирования в течение 3 час. при 25 тыс. об/мин в SW-25 роторе VAK-60 не позволило обнаружить какой-либо разницы в соотношении полисом и моносом в препаратах двух вариантов опыта (рис. 2). Доля полисом в препаратах из семядолей, выросших на растворе БАП, составляла 54%, а из семядолей на воде 57%.

Природа наблюдаемого различия во включении S^{14} -лейцина в белок у обеспеченных и необеспеченных цитокинином семядолей пока остается неясной. Отсутствие разницы в профиле полисом при их фракционировании в градиенте плотности сахарозы делает маловероятным предположение о том, что цитокинины влияют на активность системы, ингибируя РНКазы, связанные с фракцией полисом.

Различие между двумя вариантами опыта не проявлялось при низком содержании полисом в пробе (порядка 100 μ г). Пока трудно сказать, с какими внутренними свойствами полисом это связано, однако в литературе мы можем найти аналогии этому явлению. Так, Нолан и Хогланд⁽¹⁰⁾ показали, что различие в активности препаратов полисом из нормальной и регенерирующей печени крыс проявлялось только при недостатке ГТФ и ферментов синтеза белка. При их избытке активность препаратов была одинаковой.

В заключение важно подчеркнуть следующее.

Преимущества системы синтеза белка *in vitro* для изучения механизма регуляции этого процесса у растений очевидны. Она позволяет избежать ряда трудностей, связанных с измерением интенсивности синтеза белка *in vivo*, таких как вопросы проницаемости мембран клетки для меченых предшественников, различий в пулах свободных аминокислот и т. п., и глубже подойти к изучению механизма действия гормонов на аппарат белкового синтеза.

Вместе с тем использование бесклеточной системы синтеза белка для решения физиологических вопросов таит в себе много опасностей. Артефакты, связанные с выделением полисом и ферментов синтеза белка, могут легко привести к неправильным выводам. Поэтому особенно важно

сочетание опытов по исследованию синтеза белка *in vitro* и *in vivo*, что редко учитывается отдельными авторами.

Мы видим преимущества данного исследования именно в том, что действие БАП на синтез белка в изолированных семядолях тыквы изучалось параллельно в опытах *in vitro* и *in vivo* и при обеих постановках опытов были получены одинаковые выводы об активации под действием БАП аппарата белкового синтеза семядолей. Задачей дальнейшей работы является выяснение молекулярных механизмов этой активации.

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

Поступило
5 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ B. Parthier, *Flora*, **151**, 518 (1961). ² D. J. Osborne, *Plant Physiol.*, **37**, 595 (1962). ³ A. Datta, S. P. Sen, *Biochim. et biophys. acta*, **107**, 353 (1965). ⁴ О. Н. Кулаева, Е. Г. Романко, *ДАН*, **177**, 464 (1967). ⁵ J. Bhattachargye, S. C. Roy, *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **35**, 606 (1969). ⁶ A. H. G. Rijven, Ved Parkash, *Plant Physiol.*, **47**, 59 (1971). ⁷ О. Н. Кулаева, *Усп. совр. биол.*, **63**, 28 (1967). ⁸ O. H. Lowry, M. J. Rosebrough et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951). ⁹ Н. Л. Клячко, *Физиол. растений*, **20**, № 4 (1973). ¹⁰ R. D. Nolan, M. B. Hoagland, *Biochim. et biophys. acta*, **247**, 609 (1971).