

И. М. СИМАКОВА, Е. Ф. ХАРАТЬЯН, Н. С. ГЕЛЬМАН

ВЫДЕЛЕНИЕ МЕЗОСОМ ИЗ БАКТЕРИЙ *MICROCOCCLUS* *LYSODEIKTICUS*

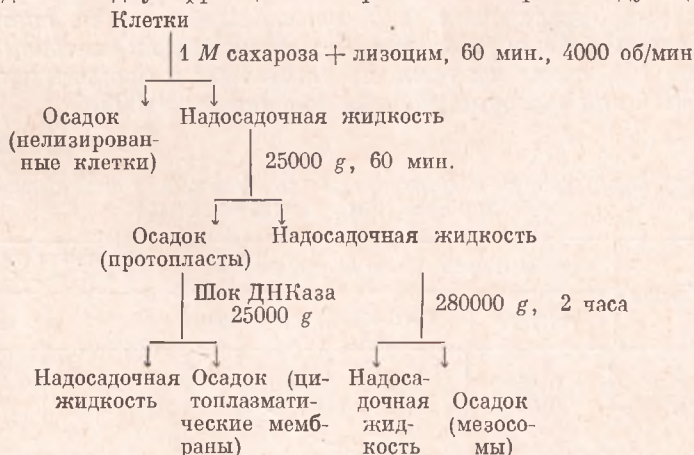
(Представлено академиком А. И. Опариным 12 II 1973)

Мембранный аппарат протопласта бактерий представлен цитоплазматической мембраной (ц.м.) и внутренними мембранами, которые называют мезосомами. Несмотря на то, что мезосомы были обнаружены сравнительно давно, их роль в клетке, а также химический и ферментативный состав остаются неясными. Объясняется это трудностями, связанными с выделением и очисткой мезосом. Тем не менее из некоторых бактериальных клеток мезосомы выделены, хотя загрязнены ц.м. и рибосомами (¹⁻⁴).

В своей работе мы предприняли попытку выделить и по возможности охарактеризовать фракции мезосом и ц.м. из бактерий *M. lysodeikticus*. Бактерии выращивали на мясопептонном бульоне в колбах на качалке при 37°. Биомассу собирали в конце логарифмической фазы роста центрифугированием при 4000 об/мин, промывали 0,04 М трис-буфером pH 7,4 и хранили при 4° не свыше 5 дней.

Попытка изолировать мезосомы из общего лизата клеток в соответствии с предложенными ранее методами (^{1, 2}) не дала результатов. В дальнейших опытах фракции мезосом и ц.м. мы получали через стадию выделения протопластов, как это было проведено на клетках бацилл (^{3, 4}). Мы также наблюдали, что обработка клеток 1 М сахарозой вызывала плазмолиз и выход мезосом в пространство между клеточной стенкой и ц.м. (рис. 1а, см. вкл. к стр. 1457).

Схема выделения двух фракций мембран из бактерий следующая:



Клетки суспендировали в 1 М сахарозе на трис-буфере, pH 7,4 с $MgSO_4$ 10^{-3} М. Лизис (1 мг лизоцима на 250 мг сухого веса бактерий) вели 1 час при 37°. После лизиса суспензию центрифугировали 10 мин. при 4000 об/мин для удаления нелизированных клеток, затем осаждали при 25 000 g 1 час, после чего надосадочную жидкость центрифугировали при 25 000 g 1 час для отброса крупных фрагментов, а затем 2 часа при 280 000 g.

В результате в осадке получали фракцию мезосом, имеющих вид мелких замкнутых пузырьков.

Для получения ц.м. протопласты разрушали замораживанием и оттаиванием в присутствии ДНКазы (0,5 мг на 250 мг сухого веса бактерий). Суспензию центрифугировали при 25 000 *g* 30 мин. и дважды промывали буфером (рис. 1 в).

О степени загрязнения получаемых фракций рибосомами судили по электронно-микроскопическим фотографиям (рис. 1 б, в), а также по содержанию РНК. РНК определяли по отношению E_{260}/E_{280} после гидролиза препаратов в 6% HClO_4 при 90°, 30 мин.

Во фракциях ц.м. и мезосомах были обнаружены примеси РНК (табл. 1), вероятно, рибосомального происхождения.

Таблица 1

Содержание белка, РНК и липидов во фракциях цитоплазматических мембран (ц.м.) и мезосомах (м.)

Фракция	Белок во фракции, мг	РНК, мг на 1 мг белка	Фосфолипиды, мг на 1 мг белка	Лютеин, ΔD на 1 мг белка
ц.м.	78,0	0,07	0,55	38,3
м.	11,6	0,05	0,28	15,0

Белок во фракциях определяли методом Лоури ⁽⁵⁾. Фосфолипиды определяли по фосфору в хлороформ-метанольных экстрактах. Лютеин находили спектрофотометрически при 455 мμ и выражали в величине оптической плотности. Малат- и НАД-Н-дегидрогеназы измеряли по скорости восстановления 2,6-дихлорфенолиндифенола (2,6-ДФИ) с регистрирующей приставкой. Среда содержала 2,6-ДФИ (0,4 мМ), 2,0 μмол малата или 0,5 μмол НАД-Н в 4 мл трис-буфера с MgSO_4 10^{-3} М и 0,005–0,03 мг белка. Активность дегидрогеназ выражали в μмол субстрата, окисленного в 1 мин. на 1 мг белка. Малат-аскорбат- и НАД-Н-оксидазы определяли полярографически ⁽⁸⁾. Среда содержала 10 μмол малата, 2,0 μмол НАД-Н или 10 μмол аскорбата в присутствии ТМРД, белка 0,6–2,0 мг в 2 мл буфера.

Препараты фиксировали 0,1% глутаральдегидом на ацетоново-оранжевом буфере pH 6,4 с дофиксацией ⁽⁹⁾, обезвоживали ацетоном и заключали в аралдит ⁽¹⁰⁾, срезы получали на ультратоме и просматривали в микроскопе JEM-6 при инструментальном увеличении 30 000X.

Таблица 2

Содержание оксидаз и дегидрогеназ во фракциях цитоплазматических мембран (ц.м.) и мезосомах (м.)

Фракция	Оксидазы, μмол O_2 /мин на 1 мг белка			Дегидрогеназы, μмол O_2 /мин на 1 мг белка	
	малата	НАД-Н	аскорбата	малата	НАД-Н
ц.м.	0,45	1,27	0,25	0,36	1,12
м.	0,05	0,25	0,06	0,16	0,09

Из данных по распределению белка между фракциями (табл. 1) можно заключить, что мезосомы составляют около 15% от цитоплазматических мембран. Мезосомы по сравнению с ц.м. содержат почти на 50% меньше фосфолипидов и лютеина, что противоречит данным ⁽¹¹⁾, у которых аналогичные фракции мембран бактерий *M. lysodeikticus* не отличались по соотношению белка и фосфолипидов. Наш метод выделения мезосом отличается от метода, применяемого Оуэном и Фриером, только тем, что мы вели плазмоллиз в 1 М сахарозе вместо 2 М и фракцию мезосом не промывали. Сни-

жение концентрации сахарозы при плазмолизе может отразиться только на полноте выхода мезосом, а не на их химическом составе. Причиной же изменения отношения белок/липид в мезосомах, вероятно, является их загрязнение белками цитоплазмы, удаление которых достигалось в опытах Оуэна и Фриера ⁽¹¹⁾ многократными промывками.

Вопрос о функции мезосом, в том числе и о локализации в них ферментов цепи переноса электронов, является спорным ^(2, 12). Мы провели определение оксидаз малата, НАД-Н и аскорбата, а также дегидрогеназ малата и НАД-Н в мезосомах и ц.м. (табл. 2).

Активность указанных ферментов мезосом существенно меньше по сравнению с ц.м., что согласуется с данными ⁽¹¹⁾. Незначительная оставшаяся активность может быть отнесена за счет загрязнений фрагментами ц.м.

Таким образом, можно сделать вывод, что система ферментов переноса электронов локализована не в мезосомах, а скорее в цитоплазматических мембранах.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
9 II 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ B. Ghosh, R. Murray, J. Bacteriol., **97**, 426 (1969). ² C. Patch, O. Landman, J. Bacteriol., **107**, 345 (1971). ³ D. Reaveley, H. Rogers, Biochem. J., **113**, 67 (1969). ⁴ B. Ferrandes, P. Chaix, Biochim. et biophys. acta, **256**, 548 (1972). ⁵ O. Lowry, N. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951). ⁶ J. Folch, M. Lees, G. Sloane-Stanley, J. Biol. Chem., **226**, 497 (1957). ⁷ E. Gerlach, B. Deuticke, Biochem. Zs., **337**, 477 (1963). ⁸ X. Ф. Шольц, Д. Н. Островский, Лаб. дело, **6**, 375 (1965). ⁹ A. Ryter, E. Kellenberger et al., Zs. Naturforsch., **13b**, 597 (1958). ¹⁰ J. Luft, J. Biophys. Biochem. Cytol., **9**, 409 (1961). ¹¹ P. Owen, J. Freer, Biochem. J., **129**, 907 (1972). ¹² A. Ryter, Bacteriol. Rev., **32**, 39 (1968).