

О. М. ГУЛИКОВА, Л. Н. БАХТАДЗЕ, М. В. ПАХОМОВА,  
Г. Н. ЗАЙЦЕВА

## СЕДИМЕНТАЦИОННАЯ И ПЛОТНОСТНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РИБОСОМ ХЛОРОПЛАСТОВ *EUGLENA GRACILIS*

(Представлено академиком А. С. Спириным 19 VII 1974)

К настоящему времени накопилось много данных по седиментационным свойствам рибосом хлоропластов водорослей (<sup>1-7</sup>). Полученные результаты позволяют отнести эти частицы к типу 70S и указывают на их сходство с рибосомами прокариотов: бактерий и синезеленых водорослей. Это сходство поддерживает гипотезу о том, что хлоропласты возникли путем эндосимбиоза клеток-гетеротрофов и синезеленых водорослей. Однако относительно плотностной характеристики в CsCl рибосом хлоропластов сведений в литературе мало.

В данной работе изучены седиментационные свойства мономеров и субчастиц и определена величина плавучей плотности в хлористом цезии рибосом хлоропластов одноклеточной водоросли *Euglena gracilis*, относящейся к типу *Euglenophita*.

Клетки выращивали на синтетической среде Крамера и Мейера, как описано ранее (<sup>8</sup>). Выделение и очистку рибосом из хлоропластов проводили методом дифференциального центрифугирования. Отмытые от среды клетки разрушали растиранием в ступке со стеклянными бусами и затем суспендировали в среде, содержащей 10 мМ триэтанолamina (ТЭА) pH 7,6, 10 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ β-меркаптоэтанола (β-МЭ), 0,3 М сахарозу и 10 мкг/мл поливинилсульфата (ПВС). Неразрушенные клетки, обломки и ядра удаляли центрифугированием при 700 g. Хлоропласты осаждали при 3000g с последующим двукратным пересаживанием. С целью очистки от возможного загрязнения цитоплазматическими рибосомами хлоропласты, суспендированные в среде выделения, наслаивали на среду того же состава, но содержащую 0,5 М сахарозу, и центрифугировали при 4500g в течение 40 мин. Осадок хлоропластов помещали в гипотоническую среду (10 мМ ТЭА pH 7,6, 100 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ β-МЭ, 10 мкг/мл ПВС) и лизировали их 5% раствором тритона X-100. После центрифугирования при 25 000g в течение 20 мин. суспензии разрушенных хлоропластов рибосомы осаждали при 110 000g 120 мин. Полученный препарат рибосом пересаживали при 160 000g в течение 60 мин. с предварительным удалением агрегатов низкоскоростным центрифугированием. Формалинизацию проводили путем добавления к суспензии рибосом на холоду равного объема 8% формальдегида (<sup>9</sup>).

Выделенные препараты рибосом обладали типичным спектром поглощения в у.-ф. свете отношения  $E_{260}/E_{280}$  и  $E_{260}/E_{235}$  равнялись соответственно 1,8 и 1,7. Содержание белка в препарате рибосом, определенное по методу Лоури (<sup>10</sup>), составляло 45%.

Коэффициенты седиментации рибосом и субъединиц определяли на аналитической ультрацентрифуге «Spinco E» (Beckman), оснащенной сканирующим устройством с адсорбционной оптикой, мультиплексором и монохроматором. Седиментацию проводили в ТЭА-буфере 10мМ pH 7,6, содержащем 100 мМ KCl и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, при концентрации частиц около 100 мкг/мл. Суспензию рибосом предварительно диализовали против того же буфера для удаления тритона X-100. На рис. 1 приведены полученные в одном из опытов седиментационные диаграммы. Как видно, выделенные

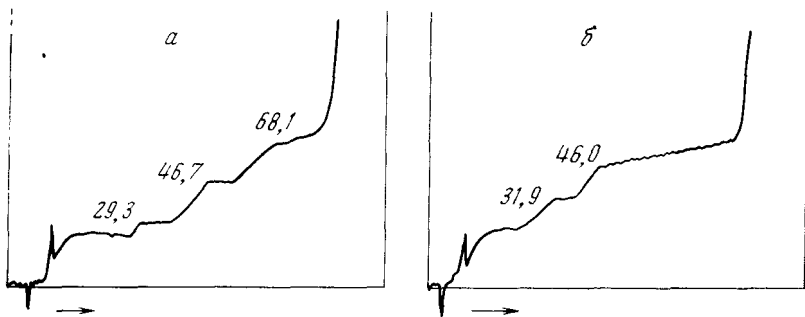


Рис. 1. Седиментационные диаграммы препарата рибосом (а) и большой и малой субъединиц рибосом (б) хлоропластов *E. gracilis*. Анализ на ультрацентрифуге «Spinco E», оснащенной сканирующим устройством с абсорбционной оптикой. Центрифугирование при 30 000 об/мин, 20°. Снимки сделаны на 33-й мин. (а) и на 31-й мин. (б)

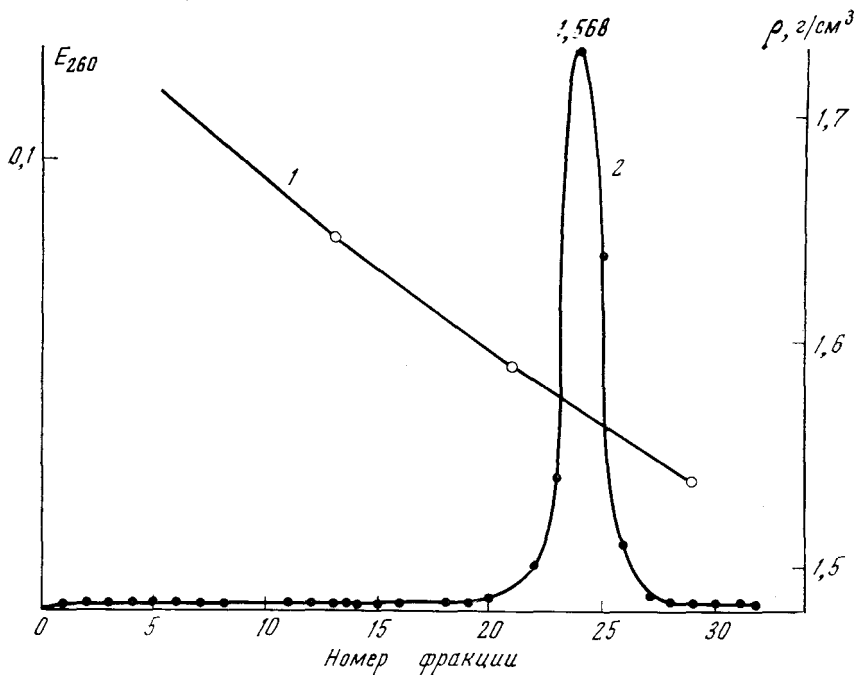


Рис. 2. Плотностное распределение рибосом хлоропластов *E. gracilis* в градиенте CsCl. 1 — плотность CsCl; 2 — поглощение; центрифугирование при 36 000 об/мин., 36 час. в роторе «SW-45» центрифуги К-28 Горьковского автозавода

препараты рибосом представляли собой смесь мономеров и субчастиц. Для полной диссоциации рибосом их диализовали против буфера следующего состава: 10 мМ ТЭА рН 7,6, 100 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>. Расчет коэффициентов седиментации ( $s_{20, w}$ ) дал величины  $68,7 \pm 0,4$  S для мономера и  $46,7 \pm 0,3$  и  $31,2 \pm 1,1$  S для большой и малой субъединиц соответственно. В опытах по определению седиментационных свойств рибосом использовали очень низкие концентрации частиц, и поэтому вычисленные величины  $s_{20, w}$  могут быть без поправки приняты в качестве значений  $s_{20, w}^0$ .

Центрифугирование фиксированных формальдегидом рибосом в градиенте плотности хлористого цезия до равновесия проводили по описанному ранее методу (9). Плотности растворов рассчитывали по уравнению Иффта (11) и вносили поправку на показатель преломления формальдегида. Относительное содержание белка в рибосомах вычисляли на основании найденных величин плавучей плотности CsCl (12).

Распределение рибосом хлоропластов в градиенте плотности CsCl в водном из типичных опытов представлено на рис. 2. Исследованные препараты распределялись в градиенте CsCl в виде одного гомогенного пика. Плавающая плотность 70S рибосом хлоропластов *E. gracilis* оказалась равной  $1,574 \pm 0,005$  г/см<sup>3</sup> (по данным трех независимых опытов). На основании этого расчет относительного содержания белка в них дает величину 46% (соотношение РНК/белок  $\approx 1,2$ ), что совпадает с данными химического определения.

Для сравнения мы исследовали плавающую плотность в градиенте CsCl рибосом синезеленой водоросли *Anabaena variabilis*. Рибосомы *A. variabilis* обладали плавающей плотностью  $1,641$  г/см<sup>3</sup> и напоминали в этом отношении рибосомы бактерий (для *E. coli*  $\rho = 1,638$  г/см<sup>3</sup>). Подобные результаты были получены ранее для данного и других видов синезеленых водорослей<sup>(13)</sup>.

Таким образом, по величине плавающей плотности в CsCl рибосомы хлоропластов *E. gracilis* значительно отличаются от рибосом бактерий и синезеленых водорослей, хотя и имеют одинаковые коэффициенты седиментации.

В литературе отсутствовали данные по плотностной характеристике рибосом хлоропластов *E. gracilis*. В работе Раусона и Штутца<sup>(4)</sup>, выделивших из хлоропластов этого вида водорослей 70S рибосомы, приведены результаты химического анализа рибосом. Авторы обнаружили, что рибосомы хлоропластов по химическому составу сходны с рибосомами бактерий и содержат 33% белка. Однако определенные нами величины относительного содержания белка химическим методом (45%) и методом плотностного анализа в CsCl (46%) не совпадают с данными Раусона и Штутца, но хорошо согласуются с имеющимися в литературе немногочисленными сведениями о плотностной характеристике рибосом хлоропластов других объектов. Так, плавающая плотность рибосом хлоропластов проростков гороха *Pisum sativum* составляет, по одним данным,  $1,555 \pm 0,003$  г/см<sup>3</sup><sup>(14)</sup>, а по другим,  $1,576$  г/см<sup>3</sup><sup>(15)</sup>. Это позволило авторам предположить, что по химическому составу рибосомы хлоропластов высших растений больше напоминают рибосомы 80S-типа, чем рибосомы бактерий и синезеленых водорослей. Имеется лишь единичное сообщение, касающееся плотностей характеристики рибосом хлоропластов водорослей. Было найдено<sup>(13)</sup>, что у зеленой водоросли *Chlorella pyrenoidosa* рибосомы хлоропластов характеризуются плавающей плотностью, равной  $1,570$  г/см<sup>3</sup> и содержат белка 47%, что совпадает с результатами анализа химическим методом. Полученные нами данные о химическом составе рибосом хлоропластов *E. gracilis* соответствуют опубликованным в литературе результатам по плотностной характеристике рибосом хлоропластов других объектов.

В заключение следует подчеркнуть, что отмеченное ранее многими исследователями сходство седиментационных свойств мономеров и субъединиц рибосом хлоропластов с рибосомами 70S-типа бактерий и синезеленых водорослей хорошо подтверждается нашими результатами. Однако рибосомы хлоропластов *Euglena gracilis* характеризуются более низкой величиной плавающей плотности, чем рибосомы прокариотического типа, и похожи на рибосомы хлоропластов высших растений и водорослей. Не исключено, что рибосомы хлоропластов уникальны и отличаются от рибосом прокариотов.

Авторы выражают искреннюю благодарность акад. А. С. Спирину за постоянное внимание к работе и ценные советы, В. В. Щербухину за проведение опытов по седиментационному анализу и Л. П. Овчинникову за помощь при освоении метода плотностного анализа.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> R. Sager, M. G. Hamilton, *Science*, v. 157, 709 (1967). <sup>2</sup> М. В. Пахомова, Г. П. Зайцева, С. Ю. Степаненко, *Биохимия*, т. 33, 1074 (1968). <sup>3</sup> J. R. Hooper, G. Blobel, *J. Mol. Biol.*, v. 41, 121 (1968). <sup>4</sup> J. B. Rawson, E. Stutz, *Biochim. et biophys. acta*, v. 190, 368 (1969). <sup>5</sup> L. R. Mendiola, A. Kovacs, C. A. Price, *Plant Cell Physiol.*, v. 11, 335 (1970). <sup>6</sup> N. G. Avadhani, D. E. Buetow, *Biochem. J.*, v. 128, 353 (1972). <sup>7</sup> Н. П. Юрина, Канд. дисс., М., 1972. <sup>8</sup> Н. А. Шанина, Г. Н. Зайцева, А. М. Непомнящая, *Биол. науки*, т. 6, 75 (1972). <sup>9</sup> A. S. Spirin, N. V. Belitzina, M. J. Lerman, *J. Mol. Biol.*, v. 14, 611 (1965). <sup>10</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., *J. Biol. Chem.*, v. 193, 265 (1951). <sup>11</sup> J. B. Ifft, D. M. Voet, J. Vinograd, *J. Phys. Chem.*, v. 65, 1138 (1961). <sup>12</sup> Л. П. Овчинников, Т. Ф. Быстрова, А. С. Спири, ДАН, т. 185, 210 (1969). <sup>13</sup> Н. П. Юрина, М. С. Одинцова, А. И. Опарин, ДАН, т. 205, 997 (1972). <sup>14</sup> Э. Н. Светайло, И. И. Филиппович, ДАН, т. 174, 714 (1967). <sup>15</sup> М. С. Одинцова, Н. П. Юрина, *Биохимия*, т. 34, 667 (1969).