

М. А. АЙТХОЖИН, А. Б. БЕКЛЕМИШЕВ, Л. М. НАЗАРОВА, Н. Г. ФИЛИМОНОВ  
**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ РИБОСОМ**

(Представлено академиком А. С. Спириным 18 VI 1971)

Классическим способом диссоциации рибосом, разработанным для бактериальных объектов, является понижение в среде концентрации ионов магния. Рибосомы эукариотов в этих условиях либо диссоциируют слабо, либо вообще не диссоциируют. Хелирующие агенты, такие как ипророфосфат и ЭДТА, хотя и диссоциируют рибосомы эукариотов, но полученные при этом субъединицы в бесклеточной системе белкового синтеза функциональной активностью не обладают. Лишь в последнее время разработаны условия диссоциации рибосом эукариотов<sup>(1-3)</sup>. Разработка удовлетворительных условий диссоциации рибосом эукариотов открыла возможность исследования свойств гетерологичных рибосом, построенных из субъединиц различных объектов.

Получены структурные гибриды<sup>(4)</sup> рибосом из субъединиц ряда животных и растительных объектов. Рибосомы, построенные из субъединиц различных животных объектов, оказались функционально активными<sup>(5)</sup>.

Нами предпринята попытка получения гибридных рибосом, построенных из субъединиц печени крыс и проростков гороха, и проведено испытание их на активность в бесклеточной системе синтеза белка.

Рибосомы из печени крыс были получены по методике Мартин и др.<sup>(1)</sup> из проростков гороха по обычной методике дифференциального центрифугирования<sup>(6)</sup>. Рибосомы проростков гороха и печени крыс диссоциировали по методике Блобел и Сабатино<sup>(3)</sup>. Разделение субъединиц проводили в липейном градиенте сахарозы (15—30%) в роторе SW-25.2 ультрацентрифуги Spinco L-2-65K. Фракции, соответствующие большой и малой субъединицам, собирали в узком интервале для избежания перекрестного загрязнения субъединицами с последующим осаждением 95% этанолом. Для получения гетерологичных рибосом большую и малую субъединицы суспендировали и смешивали в соотношении 2:1 с последующим центрифугированием в градиенте сахарозы. На рис. 1 (а, б, в) приведены типичные седиментационные диаграммы рибосом проростков гороха и гетерологичных рибосом, построенных из рибосомных субъединиц печени крыс и проростков гороха. Как видно из рис. 1б и в, смешивание рибосомных субъединиц животных и растительных клеток приводит к формированию структурных гибридов с нормальным седиментационным распределением, характерным для монорибосом.

Наиболее интересным представлялось испытание функциональной активности полученных структурных гибридов. В связи с этим были поставлены эксперименты по включению фенилаланина  $^3\text{C}^{14}$  в полипептид в присутствии поли-У. Среда для анализа активности рибосомных компонентов в полипептидном синтезе содержала в 1 мл: АТФ («Boeringer») 1 ммоль; ГТФ («Reanal») 0,4 ммоль; фосфоэнолпируват 10 ммоль, пируваткиназа 10 мкг, поли-У 300 мкг («Calbiochem»); фенилаланин  $^3\text{C}^{14}$  («Amersham») 0,5 мкС; фермент рН 5 0,2 мл, построносомная надосадочная жидкость 0,2 мл (получены из печени крыс); рибосомные компоненты 6—12 о.е.<sub>260</sub>. Результаты, следующие (в имп/мин на 1 мг рибосомной РНК): для Мп\* 850, Мг 50; Бп 2110; Бг 920; Мп + Бп 6900; Мп + + Бг 13120; Мг + Бг 9580; Мг + Бп 5370; для недиссоциированных ри-

\* Мп — малая субъединица рибосом печени и Мг — гороха; Бп — большая субъединица рибосом печени и Бг — гороха.

босом: гороха 7300; печени 10440; гороха без поли-У 610; печени без поли-У 1800.

Видно, что 40S- и 60S-субъединицы печени и гороха обладают низкой, но заметной активностью по включению фенилаланина, что связано, по-

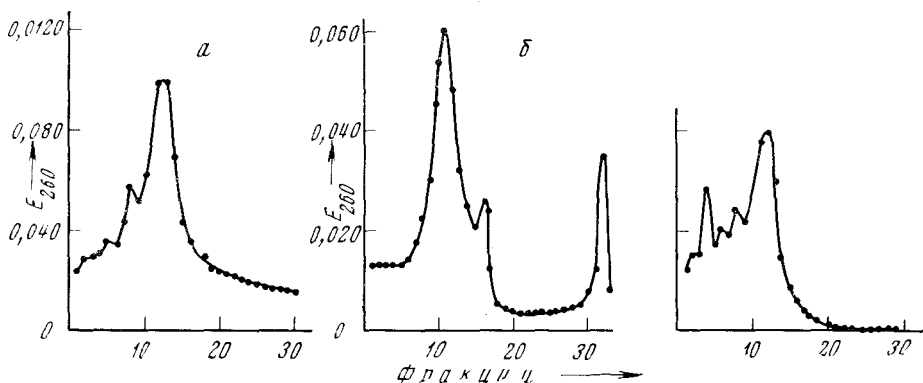


Рис. 1. Фракционирование рибосом гороха (а) и гибридных рибосом, построенных из большой рибосомной субъединицы гороха и малой рибосомной субъединицы печени (б) и большой рибосомной субъединицы печени и малой рибосомной субъединицы гороха (в). Центрифугирование в градиенте сахарады (15—30%) на основе буфера (трис-НСl 0,02 М, рН 7,5; MgCl<sub>2</sub> 0,005 М; KCl 0,04 М, β-меркаптоэтанол 0,001 М) в роторе SW-50, скорость 38000 об/мин, время 2 часа,  $t = 20^\circ$  (а, в), или 3 часа,  $t = 3^\circ$  (б)

видимому, с некоторым перекрестным загрязнением субъединиц; высокое включение фенилаланина 60S-субъединицами рибосом печени связано, очевидно, с попаданием в 60S-фракцию некоторого количества димеров малой субъединицы, что было отмечено ранее в работах ряда авторов (1, 7). Наиболее существенным в этих экспериментах является то, что обе комбинации гибридных рибосом показывают высокое включение экзогенного фенилаланина  $^3\text{C}^{14}$  в полипептидную цепь, сравнимое с включением недиссоциированных монорибосом и реассоциированных гомологичных рибосом. Несколько более низкое включение фенилаланина реассоциированными гомологичными рибосомами печени крмы и гибридными рибосомами, построенными из малой рибосомной субъединицы гороха и большой рибосомной субъединицы печени, обусловлено, вероятно, частичной димеризацией при низкой ионной силе (1, 2) большой рибосомной субъединицы печени крмы. На основании полученных данных можно прийти к заключению, что гетерологичные рибосомы, построенные из субъединиц рибосом филогенетически отдаленных видов, обладают функциональной активностью в синтезе полипептидной цепи. Это свидетельствует о том, что структура рибосом или по крайней мере активные центры их у эукариотов строго консервированы и мало изменялись в ходе эволюции.

В заключение следует отметить, что исследование гетерологичных рибосом из различных объектов представляет большой интерес как в эволюционном плане, — при этом представляется интересной количественная оценка функциональной активности гетерологичных рибосом, так и в исследовании активных центров рибосом вообще.

Институт ботаники  
Академии наук КазССР  
Алма-Ата

Поступило  
16 XI 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> T. E. Martin, F. S. Rolleston et al., *J. Mol. Biol.*, **43**, 135 (1969). <sup>2</sup> A. K. Falvey, T. Staehelin, *J. Mol. Biol.*, **53**, 1 (1970). <sup>3</sup> G. Blobel, D. Sabatini, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **68**, 390 (1971). <sup>4</sup> T. E. Martin, J. N. Bicknell, A. Kumar, *Biochem. Genet.*, **4**, 603 (1970). <sup>5</sup> T. E. Martin, I. G. Wool, *J. Mol. Biol.*, **43**, 151 (1969). <sup>6</sup> A. Marcus, J. Feeley, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **51**, 1075 (1964). <sup>7</sup> Y. Tashiro, T. Morimoto, *Biochim. et biophys. acta*, **123**, 523 (1966).