

В. С. ШАПОТ, Г. Д. КРЕЧЕТОВА, М. Г. ЛУНЦ, И. П. ПУШКИНА,
Т. И. СУХОВА

О НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ СВОБОДНЫХ РИБОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

(Представлено академиком А. А. Баевым 8 IV 1974)

Цитоплазматические рибосомы в клетках эукариотов, как известно, существуют в двух состояниях — свободном и прикрепленном к эндоплазматическому ретикулуму, образуя его гранулированную форму (¹, ²). До настоящего времени не ясно, объясняется ли различное топографическое положение рибосом отличиями в структуре частиц (³), их разными физико-химическими свойствами или оно зависит от функционального состояния (⁴⁻¹³). Для решения этого вопроса необходимо накопление новых экспериментальных данных.

Целью настоящей работы было исследование некоторых свойств свободных рибосом и сравнение их с мембранносвязанными (мб-) рибосомами из клеток печени крыс.

Свободные рибосомы выделяли из постмикросомальной надосадочной жидкости (¹⁴) после центрифугирования последней в ступенчатом градиенте са-

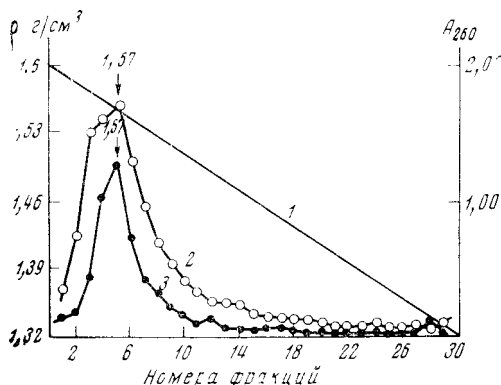


Рис. 1

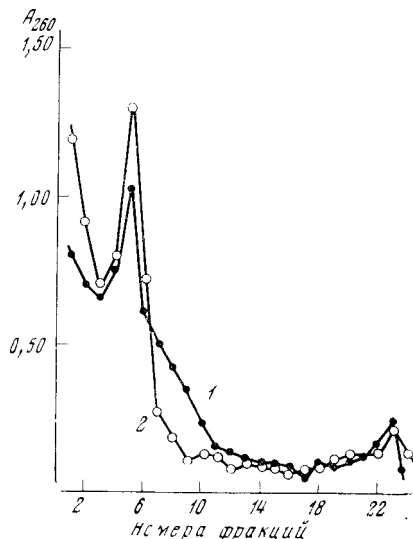


Рис. 2

Рис. 1. Равновесное центрифугирование в градиенте плотности (ρ 1,6, ρ 1,32 г/см³). Центрифугирование в течение 18 час. при 37 000 об/мин, ротор «Спинко» SW-50. 1 — распределение плотности CsCl при центрифугировании (ρ), 2 — мб-рибосомы, 3 — свободные рибосомы

Рис. 2. Распределение мб- и свободных рибосом при центрифугировании в 5–20% градиенте плотности сахарозы. Центрифугирование при 38 000 об/мин в роторе «Спинко» SW-50 в течение 180 мин. 1 — свободные рибосомы, 2 — мб-рибосомы

харозы (2:1, 35:0,25 (мол.)), приготовленной на ТКМ-буфере (0,05 M трис-HCl, 0,025 M KCl, 0,005 M MgCl₂) pH 7,6 в течение 16 час. при 125 000 g в Ti-50 роторе «Спинко». Мб-рибосомы получали в аналогичных условиях

центрифугирования суспензии микросом в ТКМ-буфере, содержащем 0,9% дезоксихолата натрия (ДОХ). В некоторых опытах при получении свободных рибосом мы использовали ДОХ в конечной концентрации 0,6%.

В указанных условиях относительное содержание свободных и мб-рибосом составляло в печени соответственно 2:3. Это соотношение рассчитано без учета потерь микросомальной фракции (15—20%) за счет соосаждения с митохондриями при центрифугировании.

Свободные рибосомы под электронным микроскопом представляли собой в основном мономеры с некоторой примесью полисом и единичных скоплений. Исследование в ультрацентрифуге при 38 000 об/мин выявляет основной пик 80 S и минорные пики 120 и 60 S. Кривые распределения частиц в градиенте плотности CsCl и сахарозы (рис. 1, 2) также свидетельствуют об относительной гомогенности. Очень близкими оказались и другие характеристики этих двух классов рибосом (табл. 1).

Таблица 1
Сравнительная характеристика свободных и мб-рибосом

Рибосомы	D_{260}/D_{280}	D_{260}/D_{235}	Химический состав *, %	
			белок	РНК
Свободные	1,69	1,48	39	61
Мембранно-связанные	1,7	1,53	37	63 (15)

* Белок определяли методом Лоури (16), содержание РНК по методу Спирина (17).

ула (18) при соотношениях KCl к MgCl₂ в среде, равных 100, 250, 500. Из ранее полученных данных было известно, что диссоциация мб-рибосом происходит более полно в среде с превышением K⁺ над Mg²⁺ в 250—500 раз. В своих опытах мы подтвердили эти результаты, что же касается

Способность свободных рибосом диссоциировать на субъединицы была исследована путем модификации процедуры Мартина и Ву-

ланда (18) при соотношениях KCl к MgCl₂ в среде, равных 100, 250, 500. Из ранее полученных данных было известно, что диссоциация мб-рибосом происходит более полно в среде с превышением K⁺ над Mg²⁺ в 250—500 раз. В своих опытах мы подтвердили эти результаты, что же касается

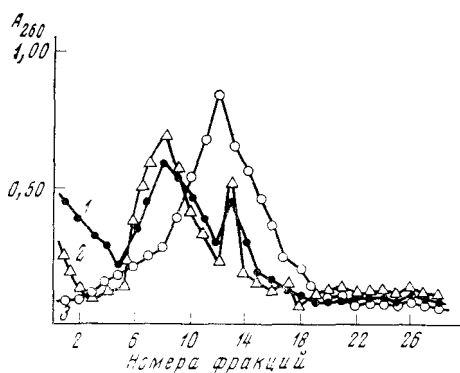


Рис. 3

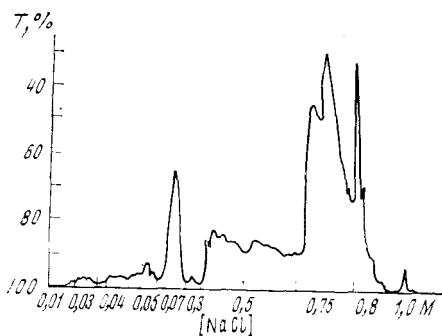


Рис. 4

Рис. 3. Выделение из свободных рибосом субъединиц, полученных в условиях различного содержания ионов K⁺ в буфере, содержащем 1 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-НСl pH 7,6 и 20 мМ β-меркаптоэтанол. Непрерывный градиент плотности сахарозы, приготовленный на том же буфере. Центрифугирование 90 мин. при 44 000 об/мин в роторе «Спинко» SW-50. 1 — 100 мМ KCl, 2 — 250 мМ KCl, 3 — 500 мМ KCl

Рис. 4. Хроматография гидролизата РНК на ДЭАЭ-сефадексе А-25. Гидролиз проводили в течение 48 час. при 37°. Инкубационная смесь содержала в 3 мл 150 мкмол. NaCl, 3 мг РНК, 0,03 мкмоля мертиолат, 80 мкг ферментативного белка, 150 мкмол. трис-НСl-буфера pH 8,1. T — пропускание светового потока

свободных рибосом, то они лучше диссоциировали при меньшем содержании KCl в среде, а именно 100—250 мм (рис. 3). Более высокие концентрации KCl вызвали образование гетерогенных частиц (рис. 3). Содержание MgCl₂ во всех случаях не превышало 2 мМ.

Инкубация свободных рибосом при 37° сопровождается деградацией эндогенной РНК, легко обнаруживаемой по приросту поглощения при 260 нм кислоторастворимой фракции ($\Delta D_{260}=0,160$ за 30 мин. на 0,5 мг рибосом).

Белки с нуклеазной активностью были выделены из свободных рибосом по методу, описанному ранее для мб-рибосом (19). Они обладали как РНКазной, так и ДНКазной активностями с оптимумом действия при pH 8,1 и ионной силе 0,1. Активность ДНКазы определялась в присутствии ионов Mg^{2+} . Удельная активность тотальных препаратов нуклеаз из рибосом пивсока; для РНКазы она составляла 15—25 единиц и для ДНКазы 2—13 ед. Ферментные препараты не обнаруживали ни фосфатазной, ни фосфодиэстеразной активности. При высоких фермент-субстратных отношениях, например 1:20, 1:50, гидролизует 89—96% добавленной РНК. Фракционирование гидролизата высокополимерной РНК, после исчерпывающего гидролиза, на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-25 свидетельствует об эндогенном характере действия РНКазы на субстрат, ибо обнаруживается при элюции лишь незначительное количество (1—3%) мононуклеотидов (рис. 4).

Ферментативно активные белки не находятся на поверхности рибосом и, по-видимому, прочно связаны с ними, так как обработка 0,5 М КСl за 15 мин. снимает 1%, а за 6 час. — всего лишь 15% активности, причем теряется 19% белка. Обработка растворами одновалентных катионов относительно высокой ионной силы применялась нами ранее к мб-рибосомам (20), что приводило в этом случае к снятию значительно большего количества белка (до 30%) с потерей 50% РНКазной активности. В дальнейшем был проделан анализ тотальных белков рибосом посредством диск-электрофореза в полиакриламидном геле, с целью выяснения подвижности белков, обладающих нуклеазной активностью, а также для ориентировочного сопоставления белковых фракций в тех и других классах рибосом.

Из препаратов рибосом белки извлекали 66% уксусной кислотой по методу (21). После 24-часового диализа против 1% уксусной кислоты (соотношение объемов 1:1000) и внесения сахарозы (до 2 М) или мочевины (до 4 М) для «утяжеления» белковый экстракт был готов к анализу. Извлечение белков таким способом сопровождается потерями белка, не отщепленного от РНК, которые составляют около 5—8% от тотального; при этом исходная активность РНКазы уменьшается в растворимой фракции белков на 20%. Белковые экстракты наносили на столбики с подготовленным полиакриламидным гелем (система 7 (20)) и проводили электрофорез в течение 2,5 час. при силе тока 4 ма на трубочку. Электродный буфер pH 4,3 содержал 70 ммол. β -аланина и 27,5 ммолья уксусной кислоты. В качестве свидетеля использовали пиронин G. При окрашивании амидо-черным на диск-электрофореграмме проявлялось 21—23 белковых фракции. Два быстро перемещающихся белка в препаратах свободных рибосом, как правило, отсутствовали.

При определении нуклеазной активности гели предварительно отмывали от персульфата до нанесения пробы путем одно-двухчасового электрофореза в тех же буферных растворах, а затем проводили электрофорез образца, проявляли один столбик-«свидетель», а два других разрезали на диски по аналогии (две параллельных пробы), гели измельчали, элюировали в 0,05 М трис-НСl-буфере, содержащем 0,1 М NaCl, pH 8,1, при встряхивании в течение 4 час. Элюаты центрифугировали 15 мин. при 3000 g, а затем использовали в качестве РНКазы. Субстратом служила высокополимерная C^{14} -РНК (380 000 имп/мин·мг), полученная из печени крыс после введения C^{14} -оротовой кислоты. Пробы содержали 100 мкг РНК, 0,2 мл элюата (1—10 мкг белка), 50 мкмол. трис-НСl-буфера pH 8,1 в 1 мл. Инкубация продолжалась 2 часа, после чего пробы осаждали хлорной кислотой (0,5 М конечная концентрация). Кислоторастворимую надосадочную жидкость (0,2 мл) вносили в сцинтилляционный раствор —

Гидролиз РНК элюатами белковых фракций с полиакриламидного геля (% к исходной активности тотальных белков, составляющей 1000—1500 имп/мин на пробу)

Рибосомы	Порядковый номер элюата (согласно схеме)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Свободные	0	0	0	26—30	65—70	0	0	0	0	0	0	0	0
Мембранно-связанные	0	30—35	0	0	50—45	0	0	0	0	0	15—20	0	0
Контроль *	0,2	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

* В качестве контроля были взяты элюаты с геля, на который не наносили белок. Контрольные элюаты подвергали инкубации в тех же условиях, что и опытные пробы. Значение каждого опыта в табл. 2 рассчитано за вычетом контроля и является средним из трех определений.

смесь 4 мл толуола с добавлением ППО и ПОПОП и 4 мл метилцеллюлозольва. Результаты подсчитывали в сцинтилляционном счетчике «Нуклеар-Чикаго-Марк 2».

Как видно из табл. 2, свободные рибосомы не содержат 2 белковых компонентов, обладающих нуклеиновой активностью. Обнаруженные различия могут быть обусловлены присутствием в мб-рибосомах белков из мембран эндоплазматического ретикулума, хотя нельзя исключить и альтернативного объяснения, т. е. исходных структурных особенностей определенного типа рибосом, способствующих их связыванию с мембранами.

Институт экспериментальной
и клинической онкологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
28 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. E. Palade, J. Biophys. Biochem. Cytol., v. 1, 99 (1955). ² G. E. Palade, P. Siekevitz, *ibid.*, v. 2, 171 (1956). ³ A. S. Spirin, FEBS Letters, v. 14, 349 (1971). ⁴ M. Rosbash, S. Penman, J. Mol. Biol., v. 59, 227 (1971). ⁵ J. Vournakis, A. Rich, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 68, 12, 3021 (1971). ⁶ P. N. Campbell, FEBS Letters, v. 7, 1 (1970). ⁷ D. A. Shafritz, K. J. Isselbacher, Biochim. Biophys. Res. Commun., v. 46, 4 (1972). ⁸ N. Venkatesan, W. J. Steele, Biochim. et biophys. acta, v. 287, 526 (1972). ⁹ E. G. Henshaw, T. B. Bojarski, H. Hiatt, J. Mol. Biol., v. 7, 122 (1963). ¹⁰ Hallinam, N. M. Munro, Biochim. et biophys. acta, v. 108, 285 (1965). ¹¹ P. N. Campbell, P. P. Cooper, S. I. Hicks, Biochem. J., v. 92, 225 (1964). ¹² K. Uenoyama, T. Ono, Biochim. et biophys. acta, v. 281, 124 (1972). ¹³ S. J. Hicks, J. W. Drisdale, H. N. Munro, Science, v. 164, 584 (1969). ¹⁴ Г. Д. Кречетова, И. А. Чудинова, В. С. Шанор, Биохимия, т. 28, 682 (1963). ¹⁵ G. D. Krechetova, I. A. Chudinova, W. S. Shapor, Biochim. et biophys. acta, v. 277, 161 (1972). ¹⁶ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). ¹⁷ А. С. Спирин, Биохимия, т. 23, 656 (1958). ¹⁸ F. E. Martin, J. G. Wool, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 60, 569 (1968). ¹⁹ И. А. Чудинова, Г. Д. Кречетова, В. С. Шанор, Биохимия, т. 30, 4, 750 (1965). ²⁰ И. А. Чудинова, Г. Д. Кречетова, В. С. Шанор, Биохимия, т. 34, в. 5, 1021 (1969). ²¹ S. I. S. Hardy, C. G. Kurland et al., Biochem. J., v. 7, 2897 (1968).