

И. И. ФИЛИПОВИЧ, С. Н. СКОПИНСКАЯ, академик А. И. ОПАРИН

### ВЫДЕЛЕНИЕ тРНК И АМИНОАЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗ ИЗ МЕМБРАН ХЛОРОПЛАСТОВ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

В последние годы было показано, что рибосомы могут быть связаны не только с мембранами эндоплазматического ретикулула, но и с внутренними мембранами таких цитоплазматических структур, как хлоропласты (<sup>1-4</sup>) и митохондрии (<sup>5-6</sup>). В зависимости от состояния растений, из которых получены хлоропласты, и метода выделения последних, связанные с мембранами рибосомы составляют от 10 до 50% от общего количества рибосом хлоропластов (<sup>3</sup>). Именно эти связанные с мембранами рибосомы ответственны за протекающий в изолированных хлоропластах синтез белка (<sup>1</sup>), а находящиеся в матриксе хлоропластов свободные рибосомы, по-видимому, являются непрограммированными (<sup>4</sup>). Мембраносвязанные рибосомы входят в состав полисомных комплексов, которые в зрелых хлоропластах локализованы в тилакоидах гран (<sup>7-8</sup>).

Если полирибосомы хлоропластов связаны с внутренними мембранами данных органоидов, то следует предположить, что некоторая часть тРНК и аминоксил-тРНК синтетаз (АРСаз, КФ 6.1.1) тоже должна присутствовать в мембранах. Вместе с тем считается, что эти компоненты белоксинтезирующей системы находятся в основном в мобильной фазе хлоропластов. Поэтому их обычно выделяют из центрифугата суспензии разрушенных хлоропластов.

В настоящей работе сообщаются результаты попытки выделения тРНК и АРСаз из мембран хлоропластов проростков гороха.

Хлоропласты изолировали из 2-недельных проростков гороха сорта «Победитель» (<sup>9</sup>). Средой для выделения служила смесь: 0,5 М сахараза, 0,01 М трис-НСl, рН 7,6, 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 0,01 М KCl. Отмытые в той же буферной смеси с сахарозой хлоропласты разрушали осмотическим «шоком» в буфере без сахарозы. Мембраны хлоропластов осаждали при 60 000 g. Осадок мембран промывали 2 раза в буферной смеси с 5% сахарозой и обрабатывали тритоном X-100 в течение 5 мин. или дезоксихолатом натрия (ДОХ-Na) 20 мин. Надосадочную жидкость, полученную при осаждении мембран, и суспензию после обработки мембран детергентами центрифугировали при 105 000 g 1,5 часа. Осадок, оставшийся после действия на мембраны тритона X-100, обрабатывали 1% додецилсульфатом натрия (ДДС-Na) и снова центрифугировали при тех же условиях. Каждый из полученных центрифугатов использовали для выделения тРНК. Все процедуры вели при 0-2°.

Препарат тРНК выделяли по методу (<sup>10</sup>). Очищали его на колонке эктола-целлюлозы (1,6 × 15 см), уравновешенной против 0,01 М Na-фосфатного буфера рН 7,6. Элюцию вели в линейном градиенте концентраций NaCl от 0,2 до 1,5 мол/л. Активность АРСаз определяли по реакции аминокислотирования тРНК. Центрифугат, в котором определяли активность, и все растворы перед опытом диализовали в течение ночи против 0,01 М Na-фосфатного буфера рН 7,6, содержащего 10% глицерин и 0,01 М β-меркаптоэтанол. Инкубационная смесь содержала: трис-НСl 20 мкмол., рН 8,0 MgCl<sub>2</sub> 10 мкмол., АТФ 10 мкмол., β-меркаптоэтанол 2 мкмоль, бычий сывороточный альбумин 0,1 мг, препарат фермента (0,5 мг белка), тРНК из хлоропластов 0,1 мг, <sup>14</sup>C-аминокислоты гидролизата белка хло-

реллы с удельной активностью 0,25 мкм/г, 500 000 имп/мин. Инкубацию вели 20 мин. при 30°, после чего добавляли ТХУ до конечной концентрации 5%. Осадки отделяли центрифугированием при 2500 g 20 мин. и обрабатывали на фильтрах 4 раза по 5 мл 5% ТХУ, по 5 мл 80% этанола и эфиром. Активность просчитывали на автоматическом счетчике «Интертекстик» СЛ-30 в толуольном сцинтиллаторе. Белок в препаратах ферментов и РНК определяли как и в ранних работах (<sup>7-9</sup>). Коэффициент седиментации тРНК определяли в аналитической ультрацентрифуге «Spinco» Е. Кювета содержала 2 мг РНК в 0,1 M NaCl (<sup>9</sup>).

тРНК, выделенная как из соответствующей матриксу мобильной фазы, так и из осадка мембран хлоропластов, элюировалась с колонки эктеола-целлюлозы в виде четкого, характерного для тРНК, пика при концентрации NaCl 0,5 мол/л. Соотношение  $E_{258}/E_{286}$  и  $E_{258}/E_{230}$  для того и другого препарата составляло 2,03—2,22 и 2,12—2,34 соответственно. Коэффициент седиментации тРНК, выделенной из мобильной фазы и из осадка мембран, обработанных 1% тритоном X-100, равен 4,2 S.

Оба препарата тРНК в присутствии АРСазы из хлоропластов способны к реакции аминокислотирования: тРНК из мобильной фазы (уд. активность  $13\,647 \pm 587$  имп/мин на 1 мг РНК) и тРНК из мембран (уд. активность  $8\,403 \pm 109$  имп/мин на 1 мг РНК). Таким образом, препараты тРНК из матрикса и из мобильной фазы практически не отличаются по исследованным свойствам.

Выход тРНК из хлоропластов в расчете на 1 г сырого веса хлоропластов составляет 193 мкг, причем 46,6% этого количества тРНК выделяется из мобильной фазы хлоропластов. Обработка осадка отмытых мембран хлоропластов 1% ДОХ-На не приводит к извлечению тРНК, в то время как обработка тритоном X-100 в той же концентрации позволяет выделить 30,6% тРНК. Последующая обработка осадка ДДС-На ведет к дополнительному выходу 22,8% тРНК.

Ранее было установлено, что ДОХ-На и тритон X-100 по-разному действуют на мембранные компоненты зрелых хлоропластов. ДОХ-На солюбилизирует материал ламелл стромы, но в значительно меньшей степени действует на тилакоиды гран. Отмечено, что под действием 0,5% ДОХ-На солюбилизируются липиды и белки преимущественно из центральной части тилакоидов, в результате чего от них остаются кольца, в которых заключены циклические полирибосомы. Тритон X-100 солюбилизирует материал этих колец и способствует выходу из них полирибосом (<sup>7-8</sup>). В связи с этим тот факт, что тРНК удается выделить из мембран только после их обработки тритоном X-100 и невозможно освободить с помощью 1% ДОХ-На, может рассматриваться как свидетельство в пользу связи тРНК с тилакоидными мембранами. Скорее всего мембраносвязанные тРНК входят в состав локализованного в периферической области тилакоидов полисомного комплекса. Очевидно, поэтому они более полно извлекаются 1% ДДС-На. Вместе с тем не исключено, что часть их находится и во внутренней полости тилакоидов, заполненной энхилемой.

В результате обработки осадка мембран хлоропластов 0,1% тритоном X-100 в центрифугат переходит также существенная часть АРСаз. Как видно из приведенных цифр (табл. 1), во фракции мобильной фазы хлоропластов, объединенной с первыми промывными водами, обнаруживается около 60% общей активности АРСаз. При повторном промывании осадка мембран буфером с 5% сахарозой освобождается 4,3% от общей активности, а после обработки 0,1% тритоном X-100 вторично отмытого осадка мембран в надосадочную жидкость переходит до 35,7% активности. В отличие от тРНК, АРСазы мембран хлоропластов освобождаются не только в результате обработки мембран тритоном X-100, но и при действии ДОХ-На.

Изучение влияния ДОХ-На и тритона X-100 на активность синтетаз, выделенных из мобильной фазы хлоропластов, показало, что тритон X-100

Активность препаратов АРСаз и субфракций хлоропластов

Фракции	Удельная активность, имп/мин на 1 мг белка		Общая активность фракции, имп/мин	
	I опыт	II опыт	I опыт	II опыт
Центрифугат 105 000 g + первые промывные воды	468 ± 14,6	392 ± 25,2	26208	31360
Вторые промывные воды	347 ± 24,2	—	1878	—
Центрифугат 105 000 g после обработки отмытого осадка мембран хлоропластов	784 ± 24,2	—	15620	—
обработка тритоном X-100	—	674 ± 16,0	—	18198
обработка 0,5% ДОХ-Na	—	—	—	—

в концентрации 0,1% не влияет на активность АРСаз, в то время как ДОХ-Na (0,5%) ингибирует активность ферментов; удельная активность препарата АРСаз из мобильной фазы хлоропластов равна  $468 \pm 14,6$  имп/мин на 1 мг белка; после обработки препарата 0,5% ДОХ-Na она равна  $339 \pm 17,2$  имп/мин на 1 мг белка, а после обработки 0,1% тритоном X-100  $454 \pm 15,1$  имп/мин на 1 мг белка.

Подобное ингибирующее действие наблюдалось и при изучении влияния ДОХ-Na на активность АРСаз вируса птичьего миеобластоза (<sup>11</sup>). Другими исследователями активность некоторых АРСаз была обнаружена в микросомах из эмбриональной ткани гороха (<sup>12</sup>), из эмбрионов цыплят (<sup>13</sup>), из культуры клеток яичников китайского хомячка (<sup>14</sup>), а также в мембранах *Streptococcus faecalis* (<sup>15</sup>). Теперь мы убеждаемся в том, что АРСазы связаны и с внутренними мембранами хлоропластов. Возможно, что с хлоропластными мембранами связаны только некоторые из этих ферментов, как было недавно показано при исследовании мембранно-связанных АРСаз животной клетки (<sup>14</sup>).

Итак, из осадка мембран хлоропластов удается выделить до 50% тРНК и 35% АРСаз хлоропластов. Однако следует сказать, что поскольку при изолировании хлоропластов в водной среде часть исследуемых компонентов теряется, приведенные соотношения локализованных в матриксе и мембранах хлоропластов тРНК и АРСаз, очевидно, не могут быть признаны истинными. В то же время они практически совпадают с соотношением свободных и мембранно-связанных рибосом, также установленным в опытах с хлоропластами, изолированными в водной среде (<sup>3</sup>). Присутствие в мембранах хлоропластов ощутимых количеств АРСаз и тРНК служит еще одним доказательством связи аппарата трансляции с мембранами пластид.

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

Поступило  
22 V 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> И. И. Филлипович, О. А. Спандарьян и др., ДАН, т. 172, 1214 (1967). <sup>2</sup> J. L. Chen, S. G. Wildman, Biochim. et biophys. acta, v. 209, 207 (1970). <sup>3</sup> K. L. J. Tao, A. F. Jagendorf, Biochim. et biophys. acta, v. 324, 518 (1973). <sup>4</sup> N. H. Chua, G. Blobel et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 1554 (1973). <sup>5</sup> K. Watson, J. Cell. Biol., v. 55, 724 (1972). <sup>6</sup> I. Kuriyama, D. J. L. Luck, J. Cell. Biol., v. 59, 776 (1973). <sup>7</sup> И. И. Филлипович, А. М. Тонгур и др., Биохимия, т. 35, 244 (1970). <sup>8</sup> I. I. Philippovich, I. N. Bezsmertnaja, A. I. Oparin, Exp. Cell. Res., v. 79, 159 (1973). <sup>9</sup> N. M. Sissakian, I. I. Philippovich et al., Biochim. et biophys. acta, v. 95, 474 (1965). <sup>10</sup> A. Legocki, K. Wosciechowska, Bull. Acad. Polon. Sci., v. 18, 7 (1970). <sup>11</sup> M. Travnicek, I. Riman, Nature New-Biol., v. 241, 60 (1973). <sup>12</sup> I. D. Henshall, T. W. Goodwin, Phytochemistry, v. 3, 677 (1964). <sup>13</sup> S. L. Norton, D. D. Key, S. W. Scholes, Arch. Biochem. and Biophys., v. 109, 7 (1965). <sup>14</sup> A. Hampel, M. D. Enger, J. Mol. Biol., v. 79, 285 (1973). <sup>15</sup> W. Standenbauer, E. Willoughby, J. L. Strominger, J. Biol. Chem., v. 247, 5289 (1972).