

Н. П. ЮРИНА, М. С. ОДИНЦОВА

**БЕЛКИ РИБОСОМ РАСТЕНИЙ. ДВУМЕРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ
В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ БЕЛКОВ РИБОСОМ
ХЛОРОПЛАСТОВ И ЦИТОПЛАЗМЫ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА**

(Представлено академиком А. И. Опариным 9 VII 1974)

Методом одномерного электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) показано, что белки рибосом клеточных органелл значительно отличаются от белков рибосом цитоплазмы тех же видов растений (¹). Одномерный электрофорез в ПААГ, обладая высокой чувствительностью, не позволяет, однако, делить белки рибосом на отдельные индивидуальные белки. Комбинируя две электрофоретические системы, в одной из которых белки делятся преимущественно по заряду, а в другой в основном по молекулярному весу (двумерное разделение), можно достигнуть большего разрешения и получить разделение до индивидуальных белков. Двумерный электрофорез в ПААГ был впервые применен для фракционирования белков рибосом *Escherichia coli* (²). В последнее время аналогичным методом начато изучение рибосомальных белков растений (^{3, 4}).

Большой интерес представляет вопрос о числе белков в рибосомах клеток про- и эукариотов. Как известно, в клетках высших растений и зеленых водорослей содержится два типа рибосом: 80S рибосомы в цитоплазме и 70S рибосомы в хлоропластах. Рибосомы пластид и клеток прокариотов близки по ряду физико-химических и функциональных свойств, но отличаются по величине плавучей плотности в CsCl (⁵). Относительное содержание белка в рибосомах хлоропластов выше, чем в рибосомах прокариотов (47,0–45,7 и 40,0–35,0% белка соответственно), что может быть связано как с различиями в молекулярном весе рибосомальных белков хлоропластов и прокариотов, так и с различиями в числе индивидуальных белков.

Настоящая работа посвящена изучению белков рибосом хлоропластов и цитоплазмы проростков гороха методом двумерного электрофореза в ПААГ.

Рибосомы выделяли из двухнедельных и зеленых проростков гороха, как было описано ранее (⁴). Белки рибосом отделяли 3 М раствором LiCl в присутствии 5 М мочевины (⁴) или 67% уксусной кислотой в присутствии 0,2 М Mg²⁺. Оба метода давали идентичные картины распределения белков при электрофорезе. Высушенные препараты белков растворяли в буфере ЭДТА — борная кислота — трис (⁶), содержащем 8 М мочевины, 10-процентную сахарозу и 5 мМ 2-меркаптоэтанол (рН 8,6). Растворы электродных буферов и компонентов геля для первого и второго направлений готовили по (⁶). Электрофорез во втором направлении проводили в приборе, описанном Велфлом (⁷), несколько модифицированном нами.

При электрофорезе в 1-м направлении образец белка (2–4 мг) наносили на две колонки размером 100×6 мм, одну из которых подвергали электрофоретическому разделению от анода к катоду, а другую — от катода к аноду. Электрофорез проводили в течение 19–30 час. при 50 в. Колонки геля, полученные после электрофореза в первом направлении, укладывали на гелевые пластины размером 200×180 мм и толщиной 5 мм. Разделение во втором направлении проводили в течение 24–36 час. при постоянном напряжении 100 в. В обоих направлениях электрофорез вели при 4°.

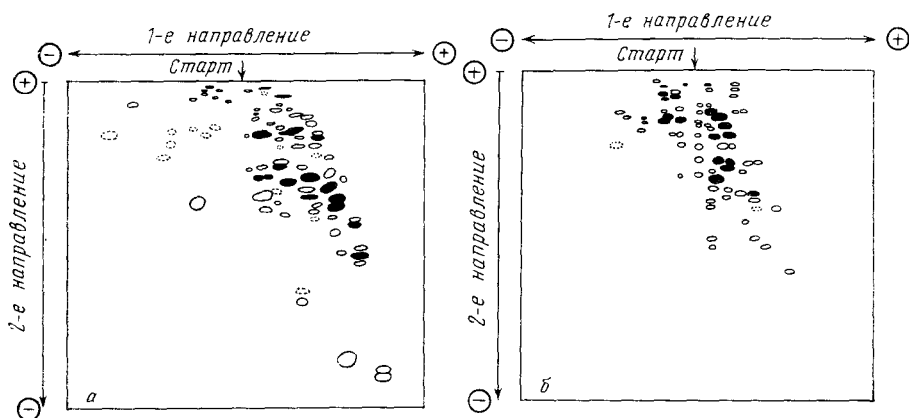
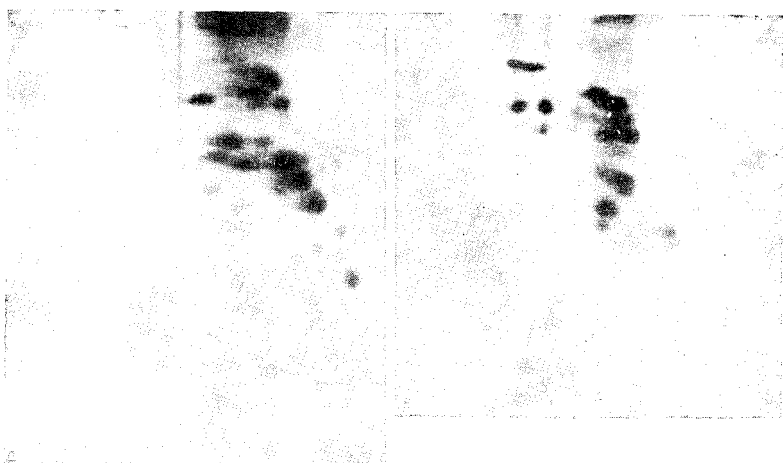


Рис. 1. Электрофореграммы белков рибосом цитоплазмы (а) и хлоропластов (б) проростков гороха, полученные при двумерном электрофорезе в ПААГ. 1-е направление: 8-процентный по акриlamиду гель, рН 8,6, 19 час.; 2-е направление: 18-процентный по акриlamиду гель, рН 4,6, 36 час. Фотографии пластин и схемы разделения белков рибосом при электрофорезе, составленные из нескольких опытов. Электрофореграммы получены в одном и том же опыте

Методом двумерного электрофореза в ПААГ в цитоплазматических рибосомах проростков гороха было обнаружено в среднем 80 белков. Из них в первом направлении 64 белка двигались к катоду и 16 к аноду (рис. 1а). Минорные белковые компоненты были отчетливо видны только при нанесении на колонку большого количества белка (4 мг по сравнению с обычно используемыми 2 мг). Ряд белков удалось разделить при увеличении продолжительности электрофореза до 30 час. в первом направлении и до 36 час. во втором. На основании нескольких опытов с различными препаратами рибосом составлена суммарная схема распределения белков цитоплазматических рибосом проростков гороха при двумерном электрофорезе в ПААГ (рис. 1а).

Общее число белков, обнаруженное нами в рибосомах цитоплазмы проростков гороха, согласуется с данными, полученными в работе (3) для цитоплазматических рибосом проростков пшеницы, и превышает число белков, обнаруженных в рибосомах животных клеток (табл. 1).

Следует отметить, что в отличие от рибосом млекопитающих, содержащих 2—3 белка, двигающихся к аноду (43), в 80 S рибосомах растений обнаружено 16 белков, отрицательно заряженных при рН 8,6.

Исследования растительных рибосом эукариотического типа показывают, что они содержат 80–85 белков, т. е. на 10–15 белков больше, чем соответствующие рибосомы животных клеток. Предположение Шертона и Вула (13) о том, что число белков в рибосомах клеток эукариотов близко к 70, по-видимому, справедливо только для рибосом животного происхождения. Возможны также вариации в числе рибосомальных белков у разных видов.

В рибосомах хлоропластов гороха при электрофорезе в аналогичных условиях обнаружен 71 белок (рис. 1б). При электрофорезе в первом направлении около 49 белков движется к катоду и около 22 к аноду. 70 S рибосомы хлоропластов и 80 S рибосомы цитоплазмы проростков гороха различаются как по числу, так и по электрофоретической подвижности входящих в их состав белков. Не исключено, однако, что они имеют наряду с этим несколько белков с близким молекулярным весом и одинаковым зарядом. Так, пять белков, три из которых при делении в первом направлении движутся к аноду, и два — к катоду, записывают на электрофо-граммах белков рибосом хлоропластов и цитоплазмы одинаковое положение.

До сих пор белки рибосом пластид остаются мало изученными (3). По числу белков рибосомы хлоропластов гороха сходны с рибосомами хлоропластов пшеницы (табл. 1). Соотношение между белками, противоположно заряженными при pH 8,6, одинаково в рибосомах пластид этих видов растений, около трети белков движется к аноду.

Данные, полученные при двумерном электрофорезе в ПААГ белков рибосом пластид, свидетельствуют о том, что рибосомы хлоропластов содержат значительно больше белков, чем рибосомы клеток прокариотов (71 и 75 белков в рибосомах хлоропластов гороха и пшеницы (3) соответственно, 55 белков в рибосомах *E. coli* (2)). Различно соотношение положительно и отрицательно заряженных белков при pH 8,6 у этих типов рибосом. В рибосомах пластид относительно больше белков,двигающихся к аноду (33 и 20% соответ-

Таблица 1
Число белков, обнаруженных в рибосомах разного происхождения, при двумерном электрофорезе в ПААГ

Источник рибосом	Найденное экспериментально	Расчитанное теоретически	Литературные источники
Бактерии <i>Escherichia coli</i>	55		(2)
В цитоплазме			
Животные			
Дрозофила	67*		(8)
»	68–69		(9)
Кролик, ретикулоциты	62–63*	67	(10)
Кролик, печень	75		(11)
Крыса, печень	72		(12)
»	68–72		(13)
Мышь, культуры клеток и тканей	60–67		(14)
Мышь, культура клеток плазмцитомы	—	60–79	(15)
Растения			
Эвглена	—	66–78	(15)
Пшеница	85		(3)
Горох	80		
В хлоропластах			
Пшеница	75		(3)
Горох	71		

* Двумерный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия.

венно).

Как было показано ранее (5), рибосомы хлоропластов высших и низших растений содержат примерно на 1/2 млн дальтон белка больше, чем рибосомы бактерий и сине-зеленых водорослей (плавучая плотность в CsCl 1,568–1,576 и 1,61–1,64 г/см³; относительное содержание белка 47,0–45,7 и 40,0–35,0% соответственно). Средний молекулярный вес белков рибосом пластид не известен. Если принять, что он равен 21 000 (средневесовой молекулярный вес рибосомальных белков *E. coli* (15)), то разница в 1/2 млн дальтон будет соответствовать примерно 24 белкам. Это хо-

рошо согласуется с экспериментально найденными различиями в числе белков между рибосомами хлоропластов и рибосомами исследованных видов прокариотов.

Гомология между рибосомами пластид и рибосомами клеток прокариотов, по-видимому, носит более ограниченный характер, чем это предполагалось ранее. Рибосомы пластид не имеют всех черт сходства с рибосомами прокариотического типа и отличаются от них по крайней мере по относительному содержанию и числу входящих в их состав белков. Показаны также различия в иммунологических свойствах этих рибосом (¹⁶).

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

Поступило
5 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ М. С. Одинова, Н. П. Юрина, Биохимия, т. 34, 667 (1969). ² R. A. Garrett, H. G. Wittmann, Adv. in Protein Chem., v. 27, 278 (1973). ³ B. L. Jones, N. Nagabushan et al., FEBS Letters, v. 23, 167 (1972). ⁴ J. Delaunay, F. Creusot, G. Schapira, Europ. J. Biochem., v. 39, 305 (1973). ⁵ Н. П. Юрина, М. С. Одинова, А. И. Опарин, ДАН, т. 205, 997 (1972). ⁶ E. Kaltschmidt, H. G. Wittmann, Anal. Biochem., v. 36, 401 (1970). ⁷ H. Welfle, Acta biol. med. germ., v. 27, 547 (1971). ⁸ E. Berger, Molec. Gen. Genet., v. 128, 1 (1974). ⁹ A. G. Lambertsson, Molec. Gen. Genet., v. 128, 241 (1974). ¹⁰ O. H. W. Martini, H. J. Gould, J. Mol. Biol., v. 62, 403 (1971). ¹¹ Huynh-Van-Tan, J. Delaunay, G. Schapira, FEBS Letters, v. 17, 163 (1971). ¹² H. Welfle, J. Stahl, H. Bielka, FEBS Letters, v. 26, 228 (1972). ¹³ C. C. Sherton, I. G. Wool, J. Biol. Chem., v. 247, 4460 (1972). ¹⁴ A. Rodgers, Biochim. et biophys. acta, v. 294, 292 (1973). ¹⁵ T. A. Bickle, R. R. Traut, J. Biol. Chem., v. 246, 6828 (1971). ¹⁶ G. Hallermayer, W. Neupert, FEBS Letters, v. 41, 264 (1974).