

П. КУЛЫЕВ

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РИБОСОМ ШЕЛКООТДЕЛИТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА КАК МОДЕЛИ ДЛЯ ИСПЫТАНИЯ
ЭКЗОГЕННЫХ МАТРИЦ В БИОСИНТЕЗЕ БЕЛКА**

(Представлено академиком А. С. Спириным 13 XII 1975)

В фиброинном отделе шелкоотделительной железы тутового шелкопряда в течение V возраста гусениц синтез внутриклеточных белков и фиброина разобщены во времени: в первой половине V возраста синтезируются внутриклеточные белки ⁽¹⁾, во второй половине синтезируется фиброин в мембранно-связанных полирибосомах ⁽²⁻⁶⁾. Кроме того, во второй половине V возраста в фиброинном отделе обнаруживаются свободные рибосомы, не принимающие участия в синтезе белка ⁽⁵⁾. Оставалось не ясным, почему свободные рибосомы не могут участвовать в синтезе белка в клетке фиброинового отдела шелкоотделительной железы во второй половине V возраста — вследствие потери биологической активности рибосом или же из-за отсутствия в их составе мРНК.

В настоящей работе показано, что свободные рибосомы, выделенные из фиброинового отдела шелкоотделительной железы тутового шелкопряда в конце V возраста, обладают биологической активностью и могут быть использованы для исследования экзогенных матриц и аминоксил-тРНК-синтетаз (АРСаз) в бесклеточной системе.

Для получения свободных рибосом гусениц тутового шелкопряда перед завивкой кокона препарировали, извлекали фиброиновый отдел шелкоотделительной железы, замораживали и хранили при -70° . Для получения рибосом изолированный фиброиновый отдел дважды промывали холодным буфером ТКМ (трис-НСI 0,050 M pH 7,6, ацетат магния 0,005 M, KCl 0,025 M), содержащим 0,5 M сахарозу, и размельчали ножницами. Ткань гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в течение 45—60 сек. в том же буфере. Полученный гомогенат пропускали через два слоя марли и центрифугировали при 1000 g в течение 20 мин для осаждения неразрушенных клеток и ядер. Надосадочную жидкость центрифугировали при 105 000 g в течение 1 часа. Осадок, полученный при ультрацентрифугировании, суспендировали в буфере и наслаивали в центрифужной пробирке поверх непрерывного градиента сахарозы (15—60%) в буфере ТКМ. Центрифугирование в сахарозном градиенте проводили в горизонтальном роторе SW-25,2 на препаративной центрифуге «Spinco» L2-65B при 24 000 об/мин в течение 2 час. Зоны свободных рибосом в градиенте концентрации сахарозы, составляющие $\frac{1}{3}$ содержания каждой пробирки в верхней ее части, отбирали, разбавляли 3 объемами буфера ТКМ и центрифугировали при 105 000 g в течение 1 часа для осаждения рибосом. Полученный осадок суспендировали в малом объеме буфера ТКМ до концентрации 6—8 мг в 1 мл и хранили препарат при -70° .

Аминоксил-тРНК-синтетазы (АРСазаы) из печени крыс получали по ранее описанным методам ⁽⁷⁾. тРНК из печени крыс получали по Янгу и Новелли ⁽⁸⁾ и очищали примеси от других видов РНК на сефадексе G-100 (размер колонки 1,7×180 см). Деацилирование тРНК проводили в 0,3 M трис-НСI-буфере pH 8,5 при 35° в течение 30 мин.

Синтез белка определяли по включению равномерно меченого ^{14}C -фенилаланина (удельная активность 52 мС/ммоль, ЧССР) в кислотонерастворимый осадок. Инкубацию проводили в среде, содержащей 35 мМ трис-НСI pH 7,6, 6 мМ ацетат магния, 40 мМ KCl, 8 мМ дитиотреитол, 8 мМ фосфоэнолпируват и 0,06 мМ смесь немеченых аминокислот кроме фенилаланина. В каждую пробу объемом 0,1 мл добавляли 0,6 м.е. пируваткиназы и 0,2 мкС ^{14}C -фенилаланина. Концентрация свободных рибосом 10 опт. ед. при 260 нм на 1 мл, АРСаз — 2 мг/мл, тРНК — 40 мкг на пробу,

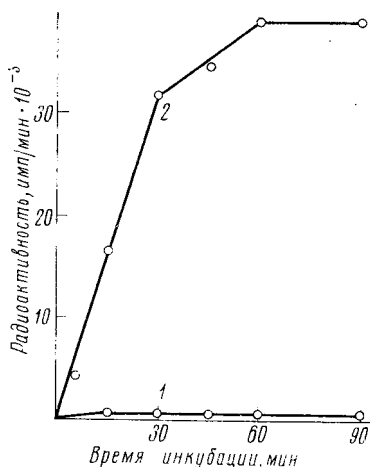


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика включения в бесклеточной системе ^{14}C -фенилаланина в кислотонерастворимую фракцию свободных рибосом, выделенных из фибринозного отдела шелкоотделительной железы перед завивкой кокона гусениц. 1 — полная система; 2 — полная система + 20 мкг полиУ на пробу

Рис. 2. Зависимость включения ^{14}C -фенилаланина в кислотонерастворимую фракцию свободных рибосом от количества полиУ (а) и от количества АРСаз (б) в реакционной смеси. Для б количество полиУ составляло 10 мкг на пробу

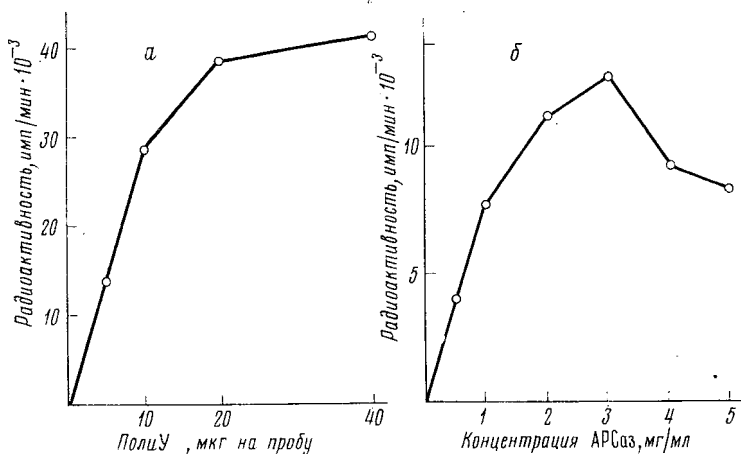


Рис. 2

полиУ — от 5 до 40 мкг, обычно 10 мкг на пробу. Синтез белка проводили при 30° в течение 30 мин. После окончания инкубационного времени к пробам добавляли по 3 мл 5% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) для осаждения белков. РНК гидролизovali 5% ТХУ при 80° в течение 20 мин. Полученные осадки белков переносили на ультрафильтры «Синпор-6» (ЧССР), промывали 5—6 раз 5% ТХУ и спиртом. Радиоактивность определяли в толуоловом растворе в сцинтилляционном счетчике «Intertech-nique SL-30». Белок определяли по методу Лоури (9).

Кинетика включения ^{14}C -фенилаланина в кислотонерастворимую фракцию и зависимость его от присутствия полиУ в реакционной смеси представлены на рис. 1. При добавлении полиУ (20 мкг на пробу) к бесклеточ-

ной системе синтез полифенилаланина в течение первых 30 мин. возрастает линейно. Затем, в интервале времени 30—60 мин. следует спад прироста величины радиоактивности в кислотонерастворимый осадок и в дальнейшем остается на одном уровне. В контрольном варианте опыта, в отсутствие полиУ в бесклеточной системе, включение ^{14}C -фенилаланина в кислотонерастворимую фракцию очень низкое в интервале всего инкубационного времени (рис. 1). При добавлении полиУ к бесклеточной системе скорость полиУ-направляемого синтеза полифенилаланина прибли-

Т а б л и ц а 1

Характеристика синтеза белка в бесклеточной системе

Условия инкубации	Включение ^{14}C -фенилаланина, % от полной системы
Полная система	100
Без АТФ и без АТФ регенерирующей системы	4
Без рибосом	~1
Без АРСаз	~1
Без тРНК	31
Без полиУ	3
С РНКазой, 5 мкг	4

П р и м е ч а н и е. Количество полиУ 10 мкг на пробу. В полной системе включение ^{14}C -фенилаланина составляло 16340 имп/мин.

зительно в 80 раз выше, чем без матрицы. Как показывает рис. 2, синтез белка в бесклеточной системе со свободными рибосомами полностью зависит от количества матрицы в реакционной смеси. При добавлении полиУ к бесклеточной системе со свободными рибосомами в пределах от 5 до 10 мкг на пробу полиУ-зависимый синтез полифенилаланина линейно возрастает. В присутствии полиУ в количестве 20 мкг в реакционной смеси свободные рибосомы насыщаются матрицей и при дальнейшем увеличении полиУ в среде наблюдается очень низкий уровень прироста радиоактивности в кислотонерастворимый осадок.

Результаты исследования свободных рибосом в бесклеточной системе в присутствии различных количеств синтетической матрицы показывают, что свободные рибосомы не содержат в своем составе мРНК и при добавлении экзогенных матриц, вероятно, способны синтезировать полипептиды в бесклеточной системе.

Влияние различных концентраций АРСаз на скорость полиУ-зависимого синтеза полифенилаланина приведено на рис. 2. Как видно из рисунка, в пределах концентраций АРСаз 0,5—3 мг/мл в реакционной среде синтез полифенилаланина зависит от количества АРСаз в среде. Максимум эффекта наблюдается при концентрации АРСаз 3 мг/мл. При дальнейшем увеличении концентрации АРСаз в бесклеточной системе (4—5 мг/мл) происходит подавление полиУ-зависимого синтеза полифенилаланина. Как показывают результаты опытов, препараты свободных рибосом, выделенные из фибринового отдела шелкоотделительной железы в конце V возраста свободны также и от АРСаз.

Некоторые свойства белоксинтезирующей системы в присутствии полиУ со свободными рибосомами, выделенными из фибринового отдела показаны в табл. 1. Синтез полифенилаланина в бесклеточной системе полностью зависит от присутствия в среде рибосом и АРСаз. При исключении из реакционной среды полиУ и АТФ регенерирующей системы наблюдается всего 3—4% синтеза белка от полной системы. В отсутствие тРНК в бесклеточной системе синтез белка уменьшается в 3 раза. При

добавлении РНКазы в количестве 5 мкг на пробу включение ^{14}C -фенилаланина в кислотонерастворимый осадок подавляется на 96%.

Результаты исследования свободных рибосом в бесклеточной системе, выделенных из фиброинового отдела шелкоотделительной железы тутового шелкопряда в конце V возраста гусениц, таким образом, показывают следующее. 1. Свободные рибосомы, выделенные из фиброинового отдела шелкоотделительной железы в конце V возраста, обладают биологической активностью. В присутствии полиУ, а также АРСаз и тРНК из печени крыс в реакционной среде свободные рибосомы способны осуществлять полиУ-направляемый синтез полифенилаланина. 2. В фиброиновом отделе железы в конце V возраста около половины рибосом находится в свободном состоянии. Эти рибосомы можно изолировать без примеси мРНК и АРСаз, что позволяет использовать их как удобную модель для испытания экзогенных матриц и АРСаз в бесклеточной системе.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
12 XII 1975

Институт зоологии
Академии наук ТуркмССР
Ашхабад

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. В. Бирюкова, П. Куллыев, О. Н. Мамедниязов, Изв. АН ТуркмССР, сер. биол., № 1, 58 (1966). ² В. Н. Смирнов, П. Куллыев и др., ДАН, т. 156, 1221 (1964). ³ Н. А. Гумилевская, Е. Б. Куваева, Л. В. Чумкина, Биохимия, т. 33, 694 (1968). ⁴ Г. П. Раменская, Журн. общ. биол., т. 23, 391 (1962). ⁵ П. Куллыев, К. Караев, И. Б. Збарский, Журн. общ. биол., т. 35, 114 (1974). ⁶ Y. Tashira, T. Morimoto et al., J. Cell Biol., v. 38, 574 (1968). ⁷ П. Куллыев, К. Караев, Г. Г. Гаузе, ДАН, т. 223, 494 (1975). ⁸ W. K. Yang, G. D. Novelli, Methods in Enzymology, v. 20, 46 (1971). ⁹ O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951).