

УДК 581.133

## ВЫДЕЛЕНИЕ, ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА рРНК КЛЕТОК CHLORELLA SP. K.

М. Г. ЗВЕРЕВА, Л. А. КЛИМОВА, В. Е. СЕМЕНЕНКО \*

*Институт фотосинтеза Академии наук СССР, Пущино-на-Оке  
\* Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева  
Академии наук СССР, Москва*

Описаны условия, обеспечивающие выделение нативной рРНК из клеток *Chlorella* sp. K. Проведено фракционирование тотального препарата РНК с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Идентифицированы большие и малые рРНК хлоропластного и цитоплазматического происхождения и определены их молекулярно-весовые характеристики с использованием в качестве внутреннего метчика РНК из безРНКазного штамма *E. coli* и дрожжевой РНК. Показана специфическая нестабильность в комплексе рибосомальных РНК из клеток *Chlorella* компонента с мол. весом  $1,1 \cdot 10^6$  дальтон по сравнению с другими формами рРНК.

Клетки *Chlorella* давно стали классическим объектом для изучения физиологии, биохимии и энергетики фотосинтеза, так же как клетки *Chlamydomonas* для изучения генетики этого процесса. В настоящее время одноклеточные водоросли в силу пластичности их метаболизма все более широко используются для изучения регуляторных механизмов фотосинтезирующих клеток, в частности для изучения молекулярных механизмов эндогенной регуляции фотосинтеза на уровне генетического контроля и синтеза нуклеиновых кислот и белков хлоропласта [1—3]. Такие исследования связаны с необходимостью выделения различных форм нуклеиновых кислот в нативном состоянии, индивидуальных белков и других макромолекул.

Выделение из эукариотических фотосинтезирующих клеток нативных нуклеиновых кислот, их фракционирование и идентификация остаются достаточно трудной задачей [4]. Задача эта осложняется не только специфическими свойствами конкретных организмов, но и свойствами различных РНК, локализованных в разных органеллах растительной клетки [5—8].

Ниже приводятся результаты выделения, фракционирования, определения молекулярно-весовых характеристик и некоторых других свойств нуклеиновых кислот *Chlorella* sp. K., на клетках которой ранее была показана возможность направленной индукции и репрессии активности фотосинтетического аппарата, сопровождающейся специфическими перестройками в комплексе растворимых белков [9—11], содержании РНК [10, 12], ультраструктурной организации хлоропласта [13—15].

### МЕТОДИКА

Объектом исследования служил штамм *Chlorella* sp. K. Культуру выращивали в накопительном режиме в автотрофных условиях на среде Тамия с нитратным азотом при 36—38°, непрерывном барботиро-

вании газозвоздушной смесью с 1,7%  $\text{CO}_2$  и круглосуточном освещении светом интенсивностью 50 тыс. эрг/см<sup>2</sup>·с от люминесцентных ламп [16].

Дезинтеграция клеток является фактором, существенно влияющим на выход и нативность выделяемой РНК. Это обусловлено высокой прочностью клеточной стенки хлореллы, для разрушения которой приходится применять достаточно жесткие методы [17, 18], что приводит часто к нарушению нативности РНК и потребовало специального изучения влияния разных методов дезинтеграции на сохранение нативности выделяемых нуклеиновых кислот. Изучены: дезинтеграция в ротационном дезинтеграторе со стеклянными бусами [18] при разных режимах разрушения; продавливание клеток из замороженного состояния через диафрагму с узкими щелями при давлении 100—150 кг/см<sup>2</sup> (модифицированный метод Хьюза) [17]; растирание с окисью алюминия; дезинтеграция с помощью ультразвука [17]. Разрушение клеток во всех случаях проводилось при 0—4°.

Выделение РНК проводили фенольно-детергентным методом, разработанным в различных модификациях для выделения РНК у высших растений [4] и хлореллы [18]. После центрифугирования суспензии клетки однократно промывали буфером, использовавшимся в дальнейшем для выделения РНК, ресуспендировали и разрушали в экстракционной смеси, состоящей из буфера с 1% додецилсульфата натрия (SDS) и водонасыщенного фенола с 0,1% 8-оксихинолина. В качестве буферов для среды выделения были изучены: 0,01 М *трис*-HCl pH 7,8, цитратный (0,15 М NaCl — 0,015 М цитрат натрия) pH 7,4, ацетатный pH 5,6. Для повышения ионной силы в буфер вносили 0,01 М  $\text{MgCl}_2$ . В качестве ингибитора нуклеаз использовали поливинилсульфат натрия (20 мкг/мл буфера).

После дезинтеграции гомогенат переносили в колбу и проводили депротенинизацию (3—4 основных по 45 мин и 3—4 дополнительных по 30 мин) при 4° и непрерывном встряхивании на качалке. В середине каждой депротенинизации добавляли хлороформ в количестве 1/3 от объема буфера. После каждой депротенинизации водную фазу отделяли от фенольной центрифугированием на холоду при 2—3 тыс. *g* в течение 5 мин. Нуклеиновые кислоты из водной фазы осаждали двумя—тремя объемами 96%-ного этанола с 2 М ацетатным буфером (1 мл буфера на 100 мл водно-спиртовой смеси) при —20° не менее 2 ч. От фенола нуклеиновые кислоты отмывали 3—4 раза 70%-ным и 1 раз 96%-ным этанолом и хранили на холоду в 96%-ном этаноле. Для освобождения от ДНК препарат нуклеиновых кислот обрабатывали ДНКазой (фирмы «Реанал») в концентрации 1/50 часть ДНКазы от количества нуклеиновых кислот при 4° в течение 20 мин [20].

Фракционирование РНК проводили с помощью методов ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы и электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).

Градиент сахарозы (2—20%) готовили на 0,05 М *трис*-буфере, pH 7,8 с 0,05 М NaCl. В пробирку с градиентом наслаивали РНК по 0,4—0,6 мг/мл (около 15 опт. ед.). Центрифугировали на центрифуге типа VAC-601 в бакетном роторе при 28 тыс. об/мин 18 ч. Распределение РНК по фракциям определяли по поглощению растворов при 260 нм.

Электрофорез в ПААГ проводили по методу Ленинга [21] с использованием буфера, содержащего 36 мМ *трис*, 30 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ  $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ , pH 7,8, при 5°. Применяли гели с 2,8% и с линейным градиентом концентраций полиакриламида (2,5—10%). Электрофорез проводили при силе тока 5 ма на трубку в течение 1,5—2,5 ч в зависимости от длины геля. РНК растворяли в электродном буфере с 15% сахарозы. После электрофореза гели окрашивали 1%-ным раствором пиронина G с 2% хромовых квасцов в 15%-ной уксусной кислоте. Избыток краски отмывали 7%-ной уксусной кислотой.

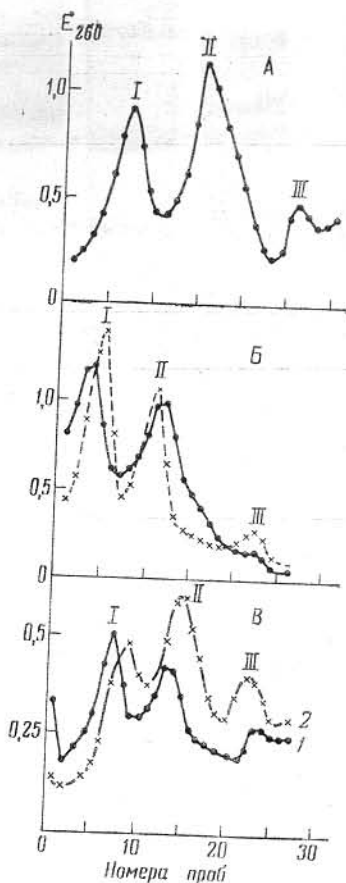


Рис. 1. Седиментационное распределение в градиенте плотности сахарозы РНК, выделенной из клеток *Chlorella sp. K.*

А — с использованием *трис*-буфера; Б — с использованием цитратного буфера (центрифугирование 20 ч, пунктиром проведена кривая для *E. coli*); В — без дополнительной депротенинизации: 1 — сразу после выделения, 2 — после 24 ч хранения препарата. I — большие рРНК, II — малые рРНК, III — низкополимерные РНК

Сканирование окрашенных гелей проводили на микроденситометрах «Хромоскан» (Англия) или G-11 (ГДР) при 465 нм.

Идентификацию рибосомальных РНК хлоропластного и цитоплазматического происхождения проводили с помощью электрофореза в ПААГ с использованием в качестве внутреннего метчика РНК из безРНКазного штамма *E. coli* MRE-600 (молекулярные веса и коэффициенты седиментации большой и малой рРНК  $1,1 \cdot 10^6$  и  $0,56 \cdot 10^6$  дальтон и 23S и 16S соответственно) и РНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (молекулярные веса  $1,3 \cdot 10^6$  и  $0,70 \cdot 10^6$  и коэффициенты седиментации 25S и 18S) [22, 23].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При использовании фенольно-детергентного метода выделения РНК из клеток *Chlorella sp. K.* с применением *трис*-буфера и при разделении получаемых препаратов в сахарозном градиенте обычно получается профиль седиментации, представленный на рис. 1, А. Как видно, молекулы больших рРНК частично деградированы, о чем можно судить по сдвигу соотношения пиков больших (пик I) и малых (пик II) рибосомальных РНК. При этом деградирует, очевидно, именно большая рРНК на фрагменты, близкие по молекулярному весу к малой, а не общая рРНК, так как пик низкополимерных РНК (пик III) остается небольшим, близким к теоретическому значению.

Исследование зависимости седиментационных характеристик выделяемых из клеток *Chlorella sp. K.* препаратов РНК от условий дезинтеграции клеток, состава и ионной силы буфера, pH фенола, условий депротенинизации, применения ингибиторов РНКаз показало возможность получения нативных рРНК, что видно из рис. 1, Б: соотношение большой и малой рРНК клеток хлореллы равно примерно 2:1 и подобно соотношению рибосомальных РНК безРНКазного штамма *E. coli*, что характерно для нативных рРНК. Такие соотношения большой и малой рРНК клеток *Chlorella sp. K.* были получены при использовании в качестве среды для выделения следующей системы: цитратный буфер pH 7,4 с 0,01 М  $MgCl_2$ , 1% SDS, 20 мкг/мл буфера поливинилсульфата; водонасыщенный фенол pH 7,0 с 0,1% 8-оксихинолина при соотношении буфер: фенол 1:1 с добавлением в середине каждой депротенинизации 1/2 объема (по отношению к буферу) хлороформа.

Деградикация большой рРНК обусловлена, очевидно, высокой активностью РНКаз в клетках хлореллы, о чем свидетельствует влияние дополнительной депротенинизации на сохранение большой рРНК. Как видно из рис. 1, В, при хранении препаратов РНК, выделенных без дополнительной депротенинизации (хотя и при 6 основных), деградикация боль-

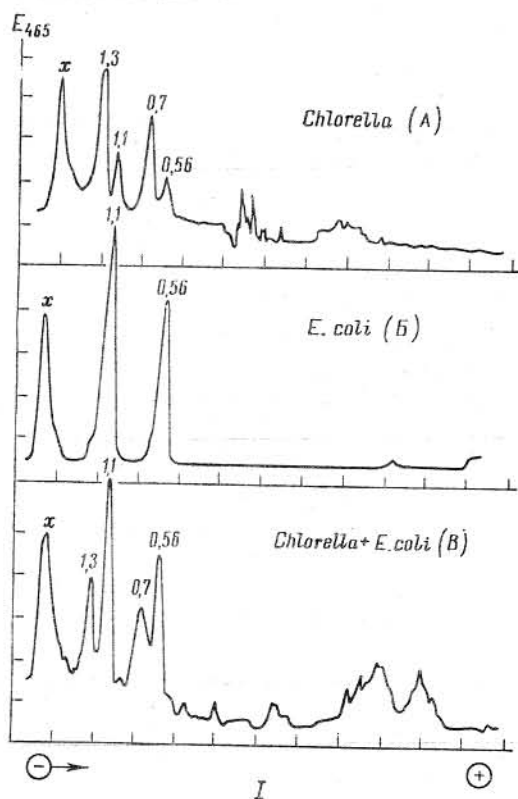
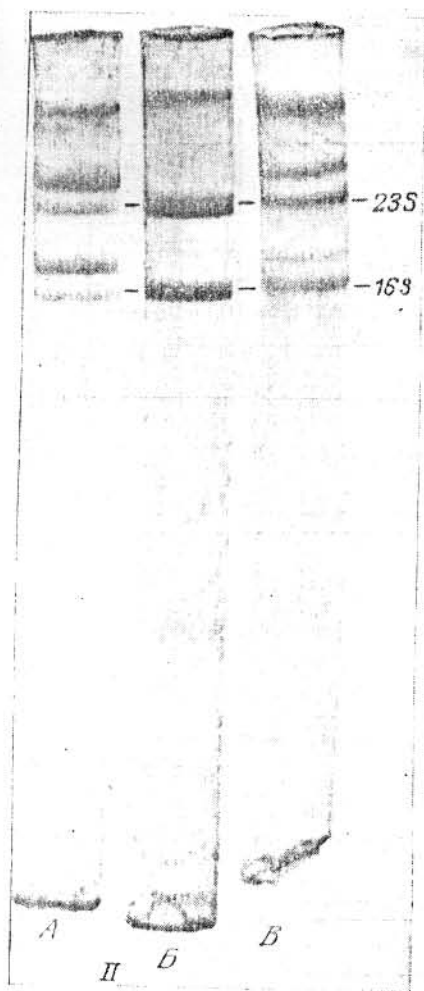


Рис. 2. Идентификация рРНК 70S рибосом клеток *Chlorella* sp. К.  
 I — Фракционирование тотального препарата РНК клеток *Chlorella* sp. К., *E. coli* и смеси нуклеиновых кислот *Chlorella*+*E. coli* с помощью электрофореза в ПААГ. I — денситограмма гелей; II — электрофореграммы

шой РНК происходит уже в течение суток. В то же время при применении трех—четырёх основных и трех дополнительных депротенизаций препараты РНК могут храниться, как показал опыт, до 6 мес. без деградации.

Поскольку метод фракционирования в градиенте сахарозы не позволяет разделить хлоропластные и цитоплазматические большие (23S и 25S) и малые (16S и 18S) рРНК, то остается неясным, происходит ли деградация больших рРНК 70S и 80S рибосом или это является специфическим свойством одной из них. В литературе имеются указания на нестабильность 23S. рРНК хлоропластов высших растений, хламидомонады, клеток сине-зеленых водорослей [5—8]. Это позволяет предположить, что в наших условиях нарушение картины седиментационного профиля РНК хлореллы обусловлено деградацией большой хлоропластной рРНК.

В связи с этим существенный интерес представляло более тонкое фракционирование тотального препарата РНК клеток хлореллы с разделением всех индивидуальных компонентов рРНК хлоропластного и цитоплазматического происхождения. Такое фракционирование препа-

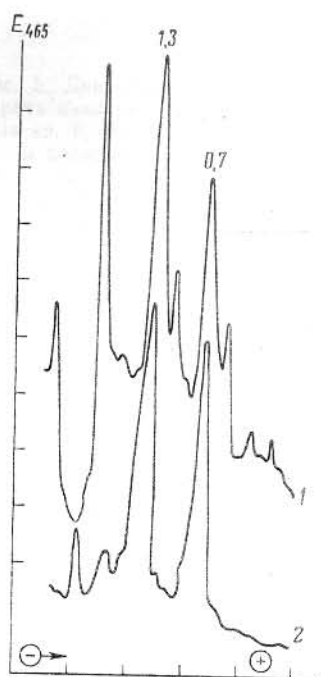


Рис. 3

Рис. 3. Идентификация рРНК 80S рибосом клеток *Chlorella* sp. К. Фракционирование тотального препарата клеток *Chlorella* sp. (1) и *Saccharomyces cerevisiae* (2) с помощью электрофореза в ПААГ. Денситограмма гелей



Рис. 4

Рис. 4. Характеристика молекулярного веса отдельных фракций нуклеиновых кислот клеток *Chlorella* sp. К по данным их электрофоретической подвижности. Кружок — различные фракции нуклеиновых кислот из клеток *Chlorella* sp. К, незаширированной треугольник — 16S и 23S рРНК *E. coli*, черный треугольник — 18S и 25S рРНК дрожжей, x — ДНК

рата нуклеиновых кислот, выделенного из клеток *Chlorella* sp. К. в указанных выше условиях, удалось осуществить с помощью электрофореза в ПААГ. Это позволило разделить тотальный препарат на пять высокополимерных компонентов (рис. 2), определить их молекулярно-весовые характеристики и принадлежность к 70S и 80S рибосомам. Сравнение денситограмм электрофоретического разделения тотального препарата нуклеиновых кислот *Chlorella* sp. К. с электрофореграммой РНК *E. coli* и результаты электрофореза смешанного препарата РНК хлореллы и *E. coli* позволяют идентифицировать два компонента — как 23S и 16S рРНК рибосом хлоропластов с молекулярным весом  $1,1 \cdot 10^6$  и  $0,56 \cdot 10^6$  дальтон. Применение в качестве внутреннего метчика РНК дрожжей (рис. 3) позволяет идентифицировать другие два компонента — как 26S и 18S рРНК рибосом цитоплазмы с молекулярным весом соответственно  $1,3 \cdot 10^6$  и  $0,7 \cdot 10^6$  дальтон.

Используя зависимость между молекулярным весом нуклеиновых кислот и их электрофоретической подвижностью [22], был определен молекулярный вес пятого компонента высокополимерной нуклеиновой кислоты (на рис. 2 обозначен как x), который оказался равным  $1,73 \cdot 10^6$  дальтон (рис. 4). Данный компонент представлен в основном ДНК, о чем можно судить по тому, что этот компонент не проявляется на электрофореграммах после обработки препарата нуклеиновых кислот ДНКазой (рис. 5).

Следует отметить, что при использовании приведенной выше буферной системы выделения нуклеиновых кислот нативность всех форм рРНК достаточно хорошо сохраняется при использовании таких методов дез-

рис. 5. Денситограммы тотального препарата нуклеиновых кислот клеток *Chlorella sp. K* без обработки ДНКазой (А) и после обработки ДНКазой (Б)

рис. 6. Влияние различных методов дезинтеграции клеток *Chlorella sp. K* на активность выделяемых нуклеиновых кислот

денситограммы гелей. А — пресс Хьюза, Б — ротационный дезинтегратор со стеклянными бусами (7 тыс. об/мин, 3 мин), В — растирание с оксидом алюминия

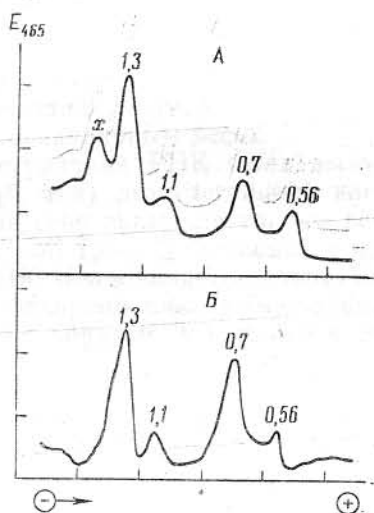


Рис. 5

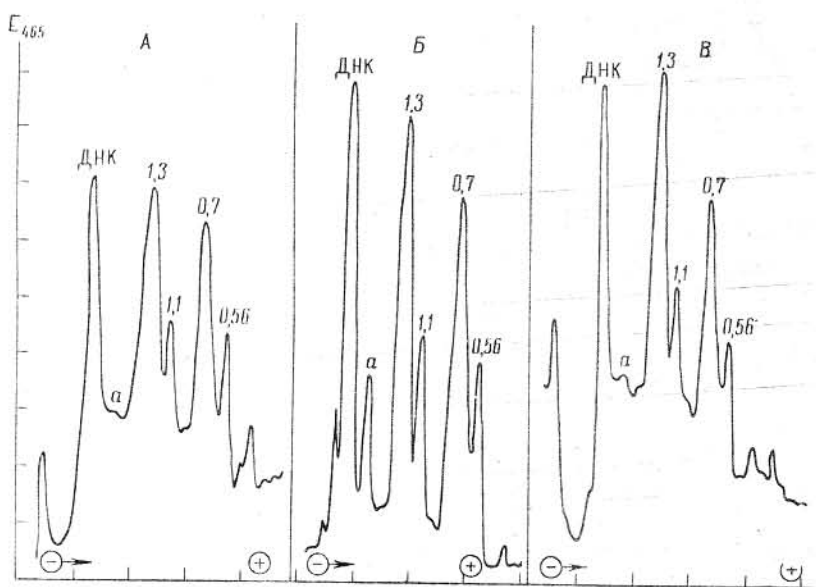


Рис. 6

рации клеток хлореллы, как пресс Хьюза, дезинтеграция со стеклянными бусами и растирание с оксидом алюминия (рис. 6). Дезинтеграция с помощью ультразвука приводила к полной деградации нуклеиновых кислот даже в тех случаях, когда процент разрушенных клеток хлореллы не превышал 30—40%. Как видно из рис. 6, во всех случаях наряду с рибосомальными РНК выделяется ДНК. Вместе с тем в случае растирания клеток в ротационном дезинтеграторе со стеклянными бусами (7 тыс. об/мин) отчетливо выделяется также компонент *a*, локализованный на электрофореграммах между пиками ДНК и большой рРНК (молекулярный вес  $1,3 \cdot 10^6$  дальтон).

Использование электрофореза в ПААГ для выяснения относительной активности больших рРНК хлоропластного и цитоплазматического происхождения показывает, что наблюдавшиеся нарушения в соотношении пиков больших и малых рРНК в профиле седиментации (см.

рис. 1, А) обусловлены специфической деградацией компонента с мол. весом  $1,1 \cdot 10^6$  дальтон (рис. 7), т. е. большой рРНК хлоропластов. При этом большая рРНК 80S рибосом с молекулярным весом  $1,3 \cdot 10^6$  дальтон в этих условиях сохраняется. Деградация рНК была вызвана в представленных опытах длительной (5 мин) дезинтеграцией клеток в дезинтеграторе с бусами. Обращает на себя внимание то, что дезинтеграция в таких же условиях клеток *E. coli* (рис. 7) приводит к пропорциональной деградации 23S и 16S рРНК, о чем свидетельствует соотношение пиков этих рНК и появление большого пика низкополимерных фрагментов нуклеиновых кислот. Таким образом, в комплексе рибосо-

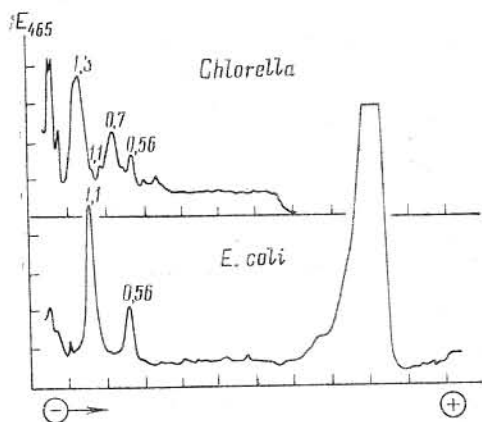


Рис. 7

Рис. 7. Сравнительная характеристика стабильности различных форм рНК клеток *Chlorella* sp. К и *E. coli*  
Денситограмма гелей

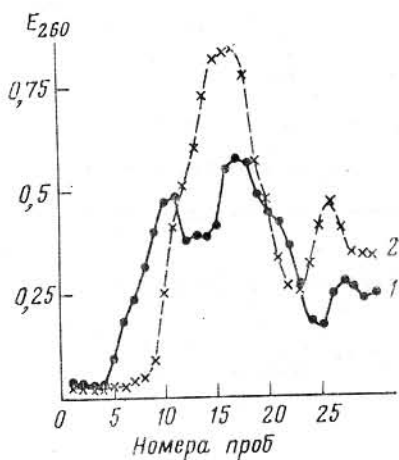


Рис. 8

Рис. 8. Зависимость стабильности рНК клеток *Chlorella* sp. К от физиологического состояния культуры  
1 — культура выращена при  $36^\circ$ , 2 — при  $43^\circ$

мальных рНК клеток хлореллы компонент с молекулярным весом  $1,1 \cdot 10^6$  дальтон отличается специфической нестабильностью по сравнению с другими формами рНК. При этом степень и выраженность такой деградации зависит от физиологического состояния культуры, что видно из рис. 8, на котором представлены профили седиментации нуклеиновых кислот клеток *Chlorella* sp. К., выращенных при оптимальной ( $36^\circ$ ) температуре (кривая 1) и при разобщении клеточных функций экстремальной ( $43^\circ$ ) температурой (кривая 2), когда деление клеток подавлено, но сохраняется функциональная активность хлоропласта и синтез хлоропластных белков [10, 12, 13]. Обращает на себя внимание также то, что в случае деградации нестабильности больших рНК хлоропластов проявляется в уменьшении пика этой рНК и в соответствующем увеличении пика малых рНК, без образования низкополимерных фрагментов. Очевидно, разрыв большой рНК хлоропластов происходит в середине молекулы на два примерно равных фрагмента с молекулярным весом порядка  $0,56 \cdot 10^6$  дальтон. Возможно, это определяется особенностями укладки рибонуклеопротеидного тяжа в хлоропластных 70S рибосомах, когда незащищенный белком участок в средней части молекулы оказывается экспонированным и легко доступным для действия нуклеаз, что, может быть, имеет определенный, но пока неясный, физиологический смысл.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Сэджер Р. Цитоплазматические гены и органеллы. «Мир», 1975.
2. Smillie R. M., Scott N. S. In: Progr. in molecular and subcellular biology, 1, 136. Berlin — Heidelberg — N. Y., 1969.
3. Семеновко В. Е. В сб.: Фоторегуляция метаболизма и морфогенеза растений, 135. «Наука», 1975.
4. Кулаева О. Н., Селиванкина С. Ю., Романко Е. Г. В сб.: Биохимические методы в физиологии растений, 171. «Наука», 1971.
5. Cattolico R. A., Jones R. F. Biochim. et Biophys. acta, 269, 259, 1972.
6. Munsche D., Wollgichn R. Biochim. et Biophys. acta, 340, 437, 1974.
7. Wollgichn R., Munsche D. Biochem. und Physiol. Pflanzen, 165, 407, 1974.
8. Szalay A., Munsche D., Wollgichn R., Parthier V. Biochem. J., 129, 135, 1972.
9. Семеновко В. Е., Касаткина Т. И., Зверева М. Г. В сб.: Матер. VII Всес. рабочего совещания по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе, 120. Киев, «Наукова думка», 1972.
10. Семеновко В. Е., Зверева М. Г., Касаткина Т. И., Цоглин Л. Н. В сб.: Итоги исследования механизма фотосинтеза, 179. Пушино-на-Оке, 1974.
11. Семеновко В. Е., Касаткина Т. И., Рудова Т. С. Физиол. растений, 23, 1225, 1976.
12. Семеновко В. Е., Зверева М. Г. В сб.: Матер. VII Всес. рабочего совещания по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе, 116. Киев, «Наукова думка», 1972.
13. Семеновко В. Е., Владимирова М. Г., Орлеанская О. Б., Райков Н. И., Кованова Е. С. Физиол. растений, 16, 210, 1969.
14. Владимирова М. Г., Семеновко В. Е. Матер. X Всес. конф. по электронной микроскопии, 357. Ташкент, 1976.
15. Владимирова М. Г., Семеновко В. Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. Изд-во АН СССР, 1962.
16. Владимирова М. Г. Физиол. растений, 23, 1180, 1976.
17. Зверева М. Г., Ушаков В. М., Семеновко В. Е. В сб.: Дезинтеграция микроорганизмов, 281. Пушино-на-Оке, 1972.
18. Семеновко В. Е., Касаткина Т. И. Физиол. растений, 19, 169, 1972.
19. Кордюм В. А., Черных С. И., Кириллова В. С., Сакода В. С., Жарова Л. Г. В сб.: Матер. VI рабочего совещания по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе, 109. Киев, «Наукова думка», 1969.
20. Mihara S. K., Kimura K., Hase E. Plant Cell Physiol., 9, 87, 1968.
21. Loening U. E. J. Mol. Biol., 38, 355, 1968.
22. Loening U. E. Biochem. J., 113, 131, 1969.
23. Спирин А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. «Наука», 1971.

Поступила в редакцию  
16.IV.1976

### ISOLATION, FRACTIONATION, IDENTIFICATION, AND SOME CHARACTERISTICS OF rRNAs FROM THE CELLS OF CHLORELLA SP. K.

M. G. ZVEREVA, L. A. KLIMOVA, V. E. SEMENENKO

*Institute of Photosynthesis, USSR Academy of Sciences, Pushchino-on-Oka*  
*K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology, USSR Academy of Sciences, Moscow*

Conditions required for isolating native rRNA from the cells of *Chlorella* sp. K. are described. Total cell RNA was fractionated by electrophoresis in polyacrylamide gel. Large and small rRNAs from the chloroplasts and the cytoplasm were identified, and their molecular weights were determined using as an internal standard RNA from an RNA-less strain of *E. coli* and RNA of yeast origin.

A component having molecular weight of  $1.1 \cdot 10^6$  daltons was found to be unstable as compared to other forms of rRNA in the complex of ribosomal RNAs isolated from the cells of *Chlorella*.