

теннов осадков из сердечной мышцы крупного рогатого скота (рис. 3) также отличаются от печени и сыворотки крысы. Полученные результаты хорошо воспроизводимы. Применение конканавалина-А с последующей обработкой осажденных гликопротеинов моносахаридами (глюкоза, манноза), их фракционирование и окрашивание фореграмм можно использовать для выделения и анализа гликопротеинов при одновременном сопоставлении с суммарными белками и надосадочной фракцией. Метод дает возможность получить характеристики соотношений гликопротеинов с другими белками без дополнительной затраты времени.

#### CONCANAVALIN-A APPLICATION FOR THE ISOLATION OF GLYCOPROTEINS AND THEIR ELECTROPHORETIC SEPARATION PARALLEL WITH OTHER PROTEINS

*I. D. Golovatsky, B. A. Savchik*

A. V. Palladin Institute of Biochemistry,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Lvov Branch

#### Summary

A combination of the methods for precipitation of glycoproteins by concanavalin-A, for their release by monosaccharides (glucose, mannose) and for subsequent separation in the polyacrylamide gel has been used for simultaneous and parallel determination of certain glycoproteins and other tissue proteins. A good reproducibility of the results is established. 10-20 fractions of glycoproteins being, mainly, in bands corresponding to other proteins are shown to be present in different rat and bovine tissues.

1. *Lis H., Sharon N.* The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins) // *Ann. Rev. Biochem.*— 1973.—42.— P. 541—547.
2. *Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Луцик А. Д.* Лектины.— Львов: Вища школа, 1981.— 153 с.
3. *Методы исследования углеводов* / Под ред. Н. Я. Хорлина.— М.: Мир, 1975.—445 с.
4. *Хьюз Р.* Гликопротеины.— М.: Мир, 1985.—140 с.
5. *Гааль Э., Медвиши Г., Верецкей Л.* Электрофорез в разделении биологических макромолекул.— М.: Мир, 1982.—446 с.
6. *Faye L., Chrispeels M. J.* Characterization of N-linked oligosaccharides by affinoblotting with concanavalin-A — peroxidase and treatment of the blots with glycosidases // *Analyt. Biochem.*— 1985.—149, N 2.— P. 218—224.
7. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4 // *Nature.*— 1970.—227, N 5259.— P. 680—685.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Львов. отд-ние

Получено 28.03.86

УДК 575.24.577.352

#### РОЛЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ФОРМИРОВАНИИ КОМПЕТЕНТНОСТИ ДРОЖЖЕВЫХ ПРОТОПЛАСТОВ К ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

**Ю. И. Горлов, В. С. Кириллова, Л. Г. Жарова**

**Введение.** Известно, что клетки микроорганизмов способны взаимодействовать с экзогенной ДНК (генетически трансформироваться) только в определенном, компетентном, состоянии. В нашей предыдущей работе [1] сообщалось об индукции у дрожжевых клеток компетентности к трансформации плазмидной ДНК после их обработки хелаторами, которые вызывают интенсификацию эндогенного перекисного окисления (ПО) липидов у этих организмов. Ингибирование окисления липидов антиоксидантом ионолом приводило к значительному снижению частоты трансформации дрожжевых клеток в случае индукции их компетент-

ности хелатором. В связи с этим было предположено, что ПО липидов как фактор модификации структурно-функционального состояния мембран может играть важную роль при формировании компетентности у дрожжей [1]. В плане дальнейшей проверки этого предположения представлялось интересным выяснить, наблюдается ли подобная коррелятивная зависимость между уровнем ПО липидов и компетентностью к трансформации в случае иных способов получения компетентного состояния у дрожжей, в частности при использовании общепринятого метода трансформации дрожжей с использованием стадии протопластирования клеток [2].

В связи с этим задачей данной работы являлось исследование взаимосвязи между уровнем накопления продуктов ПО липидов и эффективностью трансформации дрожжевых протопластов плазмидной ДНК в том числе на фоне действия ингибиторов окислительных превращений липидов — антиоксидантов.

**Материалы и методы.** Штаммы дрожжей: *Saccharomyces cerevisiae* LL-20 (*leu* 2-3 *leu* 2-112 *his* 3-11 *his* 3-15). Выращивание дрожжей на среде YNP проводили, как описано в [1]. Протопласты получали по методике [3], позволяющей за 8 мин превращать клетки в протопласты. Эндогенный уровень ПО липидов в протопластах и клетках определяли по содержанию дисновых конъюгатов [4]. Для трансформации протопластов ауксотрофного по лейцину мутанта *S. cerevisiae* LL-20 использовали плазмиду, имеющую в своем составе дрожжевой ген *leu2* (плазида получена от д-ра Ботштейна (Англия)). Плазмидную ДНК получали щелочным методом [5]. Трансформацию протопластов проводили, как описано в работе [2]. Процедура трансформации протопластов включала следующие этапы: прединкубация протопластов в течение 1 ч (30 °С) в среде YPD (1,5 % пептона, 1 % дрожжевого экстракта, 2 % глюкозы, 1 М сорбитол); инкубация в той же среде, содержащей 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 10 мМ трие-НСI, pH 7,5, с плазмидной ДНК (10 мкг/мл) в течение 15 мин; обработка полиэтиленгликолем (ПЭГ, молекулярная масса 3000, конечная концентрация 40 %) в течение 30 мин. Ионол (4-метил-2,6-дитретбутилфенол) («Calbiochem», США) растворяли в этаноле.

**Результаты и обсуждение.** Если учесть, что удаление клеточной стенки является для дрожжей стрессовым воздействием и сопровождается существенным изменением метаболических процессов, частичной потерей жизнеспособности, нельзя исключить, что в протопластах интенсифицируются окислительные превращения липидов. С целью экспериментальной проверки этого предположения был определен уровень ПО липидов в протопластах дрожжей *S. cerevisiae* LL-20 до и после 2-часовой инкубации в питательной среде YPD, содержащей 2 % глюкозы и 1 М сорбитол в отсутствие и присутствии ингибитора этого процесса — антиоксиданта ионола. Для сравнения уровень ПО липидов определяли в исходных клетках, а также в клетках, подвергнутых инкубации в тех же условиях, что и протопласты. Результаты этих экспериментов представлены ниже:

| Условия эксперимента  | Продукты<br>двухдневной<br>конъюгации,<br>нМ/мг белка |
|---|---|
| Исходные клетки   | 0,26  |
| Свежеполученные протопласты                                       | 0,27  |
| Протопласты после инкубации в питательной среде, 2ч               | 0,56  |
| То же, но инкубация в присутствии антиоксиданта (ионол, 5 мкг/мл) | 0,32  |
| Клетки после инкубации в питательной среде, 2 ч                   | 0,28  |

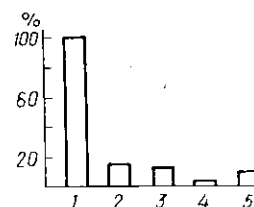
Видно, что в процессе инкубации протопластов в питательной среде уровень ПО липидов в них действительно повышается более чем в два раза по сравнению с исходными клетками и свежеполученными протопластами. Однако в интактных клетках, подвергнутых 2-часовой инкубации в тех же условиях, что и протопласты, уровень ПО липидов практически не повышается. Присутствие антиоксиданта ионола в питательной среде приводит к значительному снижению уровня ПО липидов в протопластах после 2-часовой инкубации. В экспериментах с ис-

пользованием дрожжей рода *Kluyveromyces* также установлено, что в процессе инкубации протопластов в питательной среде уровень ПО липидов повышается.

В связи с исходным предположением о роли окислительных превращений мембранных липидов в формировании компетентного состояния дрожжей были проведены эксперименты с целью выяснить, как влияет ингибирование ПО липидов антиоксидантом на эффективность трансформации протопластов *S. cerevisiae* плазмидной ДНК. Протопласты инкубировали в присутствии ионола во время их прединкубации в среде YPD (1 ч) или в период после инкубации с плазмидной ДНК и

Влияние антиоксиданта ионола на частоту трансформации протопластов дрожжей *S. cerevisiae* LL-20: 1 — контроль; 2 — обработка ионолом в концентрации 2 мкг/мл; 3 — то же, но 5 мкг/мл; 4 — 20 мкг/мл; 5 — 2 мкг/мл после инкубации с плазмидной ДНК и ПЭГ

Effect of antioxidant ionol on transformation frequency of yeast protoplasts *S. cerevisiae* LL-20: 1 — control; 2 — ionol treatment, 2 µg/ml; 3 — ionol treatment, 5 µg/ml; 4 — ionol treatment, 20 µg/ml; 5 — ionol treatment after incubation with plasmid DNA and PEG



ПЭГ (1 ч). Как следует из приведенных на рисунке результатов этих экспериментов, ионол, ингибируя окислительные превращения липидов в протопластах дрожжей, одновременно приводит к резкому снижению эффективности их трансформации плазмидной ДНК. Интересно отметить, что действие ионола на способность протопластов к трансформации проявляется и в том случае, когда этот агент добавляют после инкубации протопластов с плазмидной ДНК. Этот факт свидетельствует о том, что антиоксидант, по-видимому, не оказывает влияния на процесс адсорбции ДНК на поверхности протопласта, а затрагивает более поздние события трансформации (возможно, транспорт ДНК через клеточные мембраны).

Таким образом, для протопластов, так же как и для целых клеток дрожжей, обработанных хелаторами [1], наблюдается корреляция между уровнем ПО липидов и эффективностью трансформации плазмидной ДНК. Ингибирование окислительных превращений липидов в дрожжевых протопластах антиоксидантом приводит к резкому снижению частоты их трансформации. Можно допустить, что компетентность протопластов к генетической трансформации обусловлена не просто отсутствием клеточной стенки как барьера для проникновения ДНК, а изменениями в структуре мембран, вызванными интенсификацией ПО липидов. Перекиси липидов являются более полярными соединениями, чем исходные неокисленные липиды. Установлено [6], что НОО-содержащие гидроперекиси фосфолипидов способны объединяться в полярные кластеры, которые, пронизывая гидрофобный слой мембраны, приводят к увеличению ее проницаемости для ионов, а также для более крупных молекул [7]. Возможно, наличие таких структурных дефектов, нарушающих бислойную организацию мембран, и повышенная гидрофильность зоны дефектов, могут обеспечить проникновение и таких крупных молекул, как ДНК. Вероятность участия локальных нарушений липидного бислоя в транспорте экзогенной ДНК у бактерий уже обсуждается в литературе [8].

Таким образом, на основании данных [1], полученных с использованием целых клеток дрожжей (индукция компетентности хелаторами) и протопластов (естественное развитие компетентности), можно заключить, что процессы ПО липидов могут играть важную роль в формировании компетентности дрожжей к генетической трансформации. Это может способствовать поиску более целенаправленных подходов к изучению детального механизма взаимодействия экзогенной ДНК с клетками простейших эукариотических организмов.

## THE ROLE OF LIPID PEROXIDATION IN THE FORMATION OF YEAST PROTOPLAST COMPETENCE TO GENETIC TRANSFORMATION

Yu. I. Gorlov, V. S. Kirillova, L. G. Zharova

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

### Summary

The induction of protoplast competence is found to occur against a background of an increase in the level of lipid peroxidation. The inhibitor of peroxidation of lipids (ionol, a synthetic antioxidant) considerably decreases the frequency of their transformation.

1. Трансформация клеток дрожжей плазмидной ДНК с использованием хелатирующих агентов. О роли перекисного окисления липидов в индукции компетентности у дрожжей / Ю. И. Горлов, В. С. Кириллова, Л. Г. Жарова и др. // Биополимеры и клетка.— 1985.—1, № 3.— С. 147—153.
2. Hsiao C.-L., Carbon J. High-frequency transformation of yeast by plasmids containing the cloned yeast ARG 4 gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1979.—76, N 8.— P. 3829—3833.
3. Горлов Ю. И., Кириллова В. С. Методы получения протопластов дрожжей // Молекуляр. биология.— 1978.— Вып. 20.— С. 85—94.
4. Стальняя И. Д. Метод определения диеновой конъюгации высших жирных кислот // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М.: Медицина, 1977.— С. 63—64.
5. Birnboim N. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res.— 1979.—7, N 6.— P. 1513—1523.
6. Взаимосвязь структурных и функциональных перестроек в мембранах саркоплазматического ретикулума при перекисном окислении липидов / В. Е. Каган, О. А. Азизова, Ю. В. Архипенко и др. // Биофизика.— 1977.—22, № 4.— С. 625—630.
7. Сухарева-Немакова Н. И., Василевская В. Ю., Архипенко Ю. В. Активация перекисного окисления липидов в культуре *Crithidia oncopelti* как возможный путь повышения лекарственной чувствительности // Изв. АН СССР.— Сер. Б.— 1984.— № 3.— С. 375—381.
8. Механизмы  $Ca^{2+}$ -зависимой компетентности бактерий: образование небислоиных структур липидов в клетках *E. coli* / Л. Г. Сабельников, Б. Н. Ильяшиско, В. В. Чупин и др. // Докл. АН СССР.— 1985.—282, № 3.— С. 724—728.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 18.12.85

УДК 577.217.3:575.222.78

## НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ КОМПОНЕНТОВ АППАРАТА ТРАНСЛЯЦИИ ГЕТЕРОЗИСНЫХ ГИБРИДОВ КУКУРУЗЫ

С. С. Костышин, М. М. Марченко, Л. Т. Оплачко, Н. Ф. Григорьева

В результате комплексного исследования биохимических показателей на организменном, клеточном и субклеточном уровнях показано, что гетерозис полифункционален [1]. Важным подходом к изучению природы этого явления является исследование системы реализации генетической информации. В опыте с интактными растениями показано [2], что гетерозисные гибриды кукурузы интенсивнее включают меченые аминокислоты в белки по сравнению с исходными формами.

Для выяснения причин этого явления в данной работе изучали состав популяции рибосом, их функциональное состояние, а также акцепторную активность тРНК у высокогетерозисных гибридов кукурузы.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служили простые высокогетерозисные гибриды кукурузы Пионер (линия 346×линия 502) и Днепровский 415 (линия 153×линия 619). Семена стерилизовали в 1 %-ном водном растворе  $KMnO_4$ , промывали дистиллированной водой, замачивали на 14—16 ч (0 °С) и проращивали в темноте в течение 4 сут при 28 °С на влажной фильтровальной бумаге.

Препараты рибосом из четырехдневных проростков кукурузы выделяли по методу Дэвиса и др. [3]. Полисомы получали центрифугированием постмитохондриальной