

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 Н. 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 ($0^\circ C$) и проращивали в темноте в течение 4 сут при $28^\circ C$ на влажной фильтровальной бумаге.

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

фракции, обработанной тритоном X-100 (1 %), через 1,75 М раствор сахарозы (90 мин) при 195 000 g. Полученную суспензию осадка полисом использовали для седиментационного анализа и исследования активности в бесклеточной системе.

Фракционирование рибосомных препаратов проводили в линейном (15—35 %) градиенте концентрации сахарозы, и процент полисом определяли по площади соответствующих пиков на седиментограмме.

Фракцию S23 гомогената получали из неочищенных коммерческих зародышей пшеницы («General Mills», США) по методу [4]. Стандартная инкубационная смесь содержала: 0,5 опт. ед. A_{280} фракции S23; 1,2 опт. ед. A_{260} полисом, 20 мМ Hepes-KOH, рН 7,6, 60 мМ KAc, 2 мМ $MgAc_2$, 1 мМ АТФ, 0,05 мМ ГТФ, 3 мМ дитиотреитол, 0,35 мМ спермидин, 8 мМ креатинфосфат, 50 мкг креатинфосфокиназы; 30 мкМ немецкие аминокислоты (кроме лейцина) и 1 мкМ ^{14}C -лейцин (7,8 ГБк/ммоль). Инкубацию проводили при 30 °С 20 мин. Конечный объем инкубационной смеси 60 мкл.

Радиоактивность ТХУ-нерастворимой фракции определяли на фильтрах Ватман 3 ММ, обработанных по методу Манса и Новелли [5], в сцинтилляционном счетчике Mark II.

Суммарные препараты тРНК и аминоксил-тРНК-синтаз (АРСаз) получали, как в [6, 7]. Реакцию аминокислирования тРНК проводили в 100 мкл инкубационной смеси, содержащей: 100 мМ трис-НСI, рН 7,8, 20 мМ $MgCl_2$, 30 мМ KCl, 12 мМ АТФ, 0,3 мМ ^{14}C -аминокислоту; 20 мкг суммарного препарата тРНК и 150 мкг суммарного препарата АРСаз, выделенного из этиолированных проростков пшеницы. Время инкубации 20 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением равного объема ТХУ (10 %-ного раствора) и осадок наносили на миллиметровые фильтры.

Активность АРСаз определяли по начальной скорости реакции аминокислирования при насыщающих концентрациях субстратов в условиях прямолинейной зависимости выхода продукта от концентрации белка и времени инкубации. Реакционная смесь в 250 мкл содержала: 100 мМ трис-НСI, рН 7,8, 20 мМ $MgCl_2$, 30 мМ KCl, 12 мМ АТФ, 0,3 мМ аминокислоту, 150 мкг тРНК, выделенной из этиолированных проростков пшеницы, 20 мкг белка. Время инкубации 5 мин при 37 °С. За единицу активности условно принимали количество фермента, в присутствии которого тРНК присоединяет 1 пмоль аминокислоты за 1 мин.

Для изучения активности тРНК и АРСаз использовали ^{14}C -лейцин и ^{14}C -лизин ВО «Изотоп» (СССР, Московское отделение) с удельной радиоактивностью 1961 МБк/ммоль и 1221 МБк/ммоль соответственно.

Результаты исследований обработаны статистически [8].

Результаты и обсуждение. Анализ полученных профилей седиментации рибосомных препаратов в градиенте концентрации сахарозы свидетельствует о том, что относительное содержание полисом в проростках простого гетерозисного гибрида выше, чем у исходных линий (табл. 1).

Исследование активности полисом, выделенных из проростков кукурузы, в бесклеточной системе синтеза белка из зародышей пшеницы свидетельствует о том, что включение метки в продукт трансляции выше в системе с полисомами из проростков высокогетерозисных гибридов по

Таблица 1

Характеристика рибосом проростков гибридных и инбредных форм кукурузы в бесклеточной системе синтеза белка из зародышей пшеницы

Properties of ribosomes of hybrid and inbred maize seedlings in wheat germ cell-free protein synthesis system

Форма	Доля полисом в препарате рибосом, %	Активность препарата рибосом, имп/мин· A_{280}	Удельная активность полисом, имп/мин·содержание полисом	Активность полисом по отношению к гибридной форме, %
Линия 346	64±3	20210±297	1053	90
Пионер	80±2	27930±520	1163	100
Линия 502	62±2	15323±109	851	73
Линия 153	60±1	14343±116	795	90
Днепроvский 415	76±2	20131±214	875	100
Линия 619	59±1	12114±96	673	77

Таблица 2

Аминоацилирование тРНК и активность аминоацил-тРНК-синтетаз проростков гибрида Пионер и его исходных форм *in vitro*

Aminoacylation of tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase activity from seedlings of hybrid Pioneer and its parental forms *in vitro*

Форма	Акцепторная активность тРНК, нмоль аминокислоты на 1 мг тРНК		Активность аминоацил-тРНК-синтетаз, пмоль аминоацил-тРНК на 100 мкг белка за 1 мин	
	Лизин	Лейцин	Лизин	Лейцин
Линия 346	1,07±0,08	2,17±0,07	53,78±4,51	91,9±3,9
Пионер	1,63±0,04 ^{*,**}	2,67±0,12 ^{*,**}	48,2±3,2	64,69±6,5 ^{*,**}
Линия 502	1,16±0,06	2,05±0,09	41,86±7,6	87,29±4,0

* Различия между гибридом и материнской формой достоверны; ** различия между гибридом и отцовской формой достоверны.

сравнению с таковыми линейных форм (табл. 1). Удельная активность полисом проростков простых гетерозисных гибридов в среднем на 10 % превышает этот показатель у материнской формы и на 25 % — у отцовской. Это позволяет предположить, что установленное ранее [2] повышение активности синтеза белка при гетерозисе может быть связано не только с соотношением полисомы/моносомы в препарате рибосом, но и с эффективностью функционирования полисом. Последнее косвенно подтверждается литературными данными об уменьшении времени синтеза «среднего» полипептида у гетерозисных гибридов кукурузы по сравнению с исходными формами [9].

Поскольку процесс трансляции зависит не только от эффективности функционирования рибосом, но и от доставки аминокислот к месту синтеза белка, изучали биологическую активность тРНК и АРСаз у гибридных и инбредных форм кукурузы.

Показано увеличение акцепторной активности тРНК по лизину и лейцину высокогетерозисного гибрида по сравнению с родительскими компонентами на 30—40 % (табл. 2). Экспериментально установлено, что эти изменения не связаны с различием в сохранности акцепторного конца молекул тРНК гибридных и инбредных форм кукурузы. Можно предположить, что повышение *in vivo* уровня аминоацилирования тРНК у гибрида связано с изменением количественного набора тРНК в суммарном пуле в результате гибридизации.

Так как участие тРНК в биосинтезе белка определяется функционированием АРСаз, изучали каталитическую активность ферментов, специфичных к лейцину и лизину. Превосходства гибрида над исходными формами по данному показателю не обнаружено (табл. 2).

Таким образом, в гибридном поколении растений установлена положительная корреляция между уровнем проявления гетерозиса и количеством полисом в общем рибосомном препарате, функциональной активностью полисом и аминоацилированием тРНК *in vitro*. Это согласуется с ранее обнаруженным [2] повышением активности синтеза белка *in vivo* гетерозисных гибридов кукурузы.

CERTAIN PECULIARITIES OF THE TRANSLATION APPARATUS COMPONENTS OF THE HETEROSIS MAIZE HYBRIDS

S. S. Kostyshin, M. M. Marchenko, L. T. Oplachko, N. F. Grigorieva
State University, Chernovtsy

Summary

The aminoacylation of tRNA and activity of ribosomes from hybrid and inbred maize seedlings in the cell-free system of protein synthesis from wheat germs and ribosome sedimentation profiles in the sucrose density gradient have been investigated. A positive

correlation between the level of heterosis manifestation and the quantity of polysomes in the total ribosomal preparation, the functional activity of polysomes and aminoacylation of tRNA *in vitro* is established in the hybrid generation of plants.

1. Костышин С. С. Полифункциональность гетерозиса у кукурузы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— Киев, 1985.—51 с.
2. Костышин С. С., Баран М. М., Оплачко Л. Т. Различная интенсивность биосинтеза белка у гетерозисных гибридов кукурузы // Физиология и биохимия культурных растений.— 1982.—14, № 2.— С. 123—126.
3. Davies E., Larkins S. A., Knight R. H. Polysomes from peas. An improved method for their isolation in the absence of ribonuclease inhibitors // Plant Physiol.— 1972.—50, N 4.— P. 581—584.
4. Roberts B. E., Patterson B. M. Efficient translation to tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA on a cell-free system from commercial wheat germ // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1973.—70, N 5.— P. 2330—2334.
5. Mans R. J., Novelli G. D. Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by filter paper disk method // Arch. Biochem. and Biophys.— 1961.—94, N 1.— P. 48—53.
6. Некоторые данные об изменении способности транспортных РНК печени кроликов акцептировать аминокислоты при голодании / Г. Х. Мадука, Т. П. Бабий, Э. Б. Сквирская и др. // Укр. биохим. журн.— 1969.—41, № 6.— С. 655—659.
7. Демидов С. В., Ельская А. В. Сравнение акцепторной активности тРНК печени кроликов в онтогенезе // Там же.— 1979.—51, № 5.— С. 503—507.
8. Маслов Ю. Т. Статистическая обработка данных биохимических исследований // Методы биохимического анализа растений.— Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1978.— С. 163—187.
9. Кудоярова Г. Р., Еркеев М. И. Сравнительное изучение активности трансляционного аппарата в листьях гибридов кукурузы и их исходных форм // Физиология растений.— 1983.—36, № 4.— С. 703—708.

Черновиц. гос. ун-т

Получено 21.04.86

УДК 57.085.23:577.216.9

РЕПЛИКАЦИЯ В ПРОТОПЛАСТАХ ТАБАКА РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК

В. А. Кордюм, В. А. Труханов, Е. К. Топорова, В. Н. Шульженко,
Т. Н. Чеченева

Введение. На фоне впечатляющих достижений генной инженерии микроорганизмов исследования по переносу генетической информации у растений находятся еще на начальных этапах. Одним из важнейших и наиболее сложных моментов этой работы является создание векторов для высших растений.

По механизму действия векторы для растений, как и векторы для всех других биологических объектов, могут быть либо интегративными, либо репликативными. К интегративным векторам принадлежат *Ti*- и *Ri*-плазмиды и их искусственно полученные производные [1—5]. Прообразом репликативных векторов могут служить ДНК вируса мозаики цветной капусты [6—8] и ДНК-копии некоторых РНК-содержащих вирусов растений [8—10]. Как и любой другой вектор, вектор для растений может быть успешно использован, если удастся просто и быстро осуществить его наработку в препаративных количествах и стабильно поддерживать в хорошо изученных и просто культивируемых клетках, чаще всего бактериальных. Этот вектор должен иметь также удобные маркеры, содержать уникальные сайты рестрикции и т. п. Но возможны и иные варианты. Например, *Ti*-плазида несет природно существующий репликон, обеспечивающий ее стабильное функционирование в клетках *Agrobacterium tumefaciens*, однако она не многокопийна и не обладает хорошо изученными маркерами. Работать с ней общепринятыми методами невозможно. Поэтому наработка, амплификация, селекция и введение в нее заданных фрагментов ДНК обеспечиваются особыми промежуточными векторами. У репликативных векторов для высших эукариот обычно вводятся дополнительные последовательности, например репликона *ColE1*, маркерные гены и т. д.

В статье приводятся результаты изучения репликации в протопластах табака созданного авторами репликативного вектора, являющегося комбинацией известных ранее векторов и элементов генома высших растений (молекулярная масса $4,6 \cdot 10^6$).