



УДК 577.217.3:575.222.78:633.15

М. М. Марченко, Л. Т. Оплачко, С. С. Костышин, Л. С. Язловицкая

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА БЕЛКА НА ЭНДОГЕННЫХ мРНК В БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ ИЗ ЗАРОДЫШЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ КУКУРУЗЫ

Исследовали активность синтеза полипептидов на эндогенных матрицах в бесклеточной системе из зародышей различных форм кукурузы. Установлено повышение активности трансляции в системе, выделенной из зародышей гибридных растений. При добавлении экзогенной матрицы поли(U) процент стимуляции включения фенилаланина в продукт трансляции у родительских форм высокогетерозисных гибридов значительно выше, чем в поколении F₁.

Изучение степени жизнеспособности организмов при гибридизации кукурузы показало, что в период активного роста она обеспечивается повышенной интенсивностью синтеза белка и РНК [1—3]. Развивая гипотезу об опережающем росте и развитии гибридного эмбриона [4, 5], авторы ставили перед собой задачу изучить особенности синтеза полипептидов в бесклеточной системе из зародышей различных форм кукурузы.

Материалы и методы. Реактивы: трис, ГТФ, креатинфосфат, креатинкиназа, спермидин — фирмы «Serva» (ФРГ); поли(U), цитротритон (ДТТ) — фирмы «Reanal» (ВНР); ¹⁴С-фенилаланин (ВО «Изотоп» СССР, Моск. отд-ние, удельная радиоактивность 2019 ГБк/моль). Остальные реактивы марки «осч» СССР.

Эксперименты выполнены на зародышах, выделенных из семян различных селекционных форм кукурузы. Объектом исследования служили высокогетерозисные гибриды кукурузы Пионер 3978 (линия 346×линия 502) и гибрид Г₁ (линия 101×Г₀), а также гибриды с низким проявлением эффекта гетерозиса по продуктивности: гибрид Г₂ (линия 105×Г₀), гибрид Г₇ (линия 107×Г₀).

Семена кукурузы обрабатывали раствором 0,5 %-ного КМпО₄ в течение 5 мин. Промывали дистиллированной водой и проращивали в термостате 1 сут при температуре 28 °С.

Выделение бесклеточной системы синтеза белка из зародышей кукурузы. S23-фракцию выделяли по методу Робертса и др. [6]. Навеску зародышей (2 г) растирали в охлажденной ступке с 1 г кварцевого песка до однородной массы, гомогенизировали в четырех объемах среды, содержащей 20 мМ Mg-ацетат, 60 мМ K-ацетат, 2 мМ ДТТ. Суспензию центрифугировали дважды при 23000 g 20 мин (VAC-601). Супернатант подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25 (med). Фракции, выходящие в свободном объеме (S23-фракция), использовали в реакции бесклеточного синтеза белка.

Синтез белка *in vitro*. Уровень полипептидного синтеза определяли по методу Маркуса [7]. Инкубационная смесь объемом 0,1 мл содержала 20 мМ трис-ацетат, рН 7,6, 4 мМ Mg-ацетат, 1 мМ АТФ, 0,05 мМ ГТФ, 10 мМ креатинфосфат, 50 мкг креатинкиназы, 0,4 мМ спермидин, 3 мМ ДТТ, 30 мкМ каждую из 19 немеченых аминокислот (за исключением фенилаланина), 0,1 МБк ¹⁴С-фенилаланина, 1 о. е. А₂₆₀ S23 после гель-фильтрации на G-25. В опытах по изучению поли(U)-зависимого синтеза полипептида в систему, содержащую вышеуказанные компоненты, добавляли 50 мкг поли(U) и концентрацию Mg²⁺ увеличивали до 8 мМ. Пробы инкубировали 40 мин при 30 °С. Инкубационную смесь наносили на диск-фильтры Ватман 3 ММ,

фиксируют в 10 %-ной ТХУ 10 мин и обрабатывали по методу [8]. Радиоактивность ТХУ-нерастворимого материала определяли в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Бета-1» в стандартной толуольной смеси ЖС-107.

Результаты и обсуждение. Предварительно нами была изучена зависимость эндогенного и поли(U)-стимулируемого синтеза полипептидов от концентрации Mg^{2+} в среде и времени инкубации. При трансляции эндогенных матриц максимум включения меченого предшественника соответствует 4–5 мМ Mg^{2+} в инкубационной смеси (рис. 1, а). Самый высокий поли(U)-зависимый уровень радиоактивности синтезируемого полифенилаланина наблюдается при содержании в системе 8–10 мМ Mg^{2+} (рис. 1, б).

На рис. 1 представлены также результаты по кинетике включения ^{14}C -фенилаланина в ТХУ-нерастворимую фракцию. Линейное увеличение включения меченой аминокислоты в полипептиды без добавления в систему поли(U)

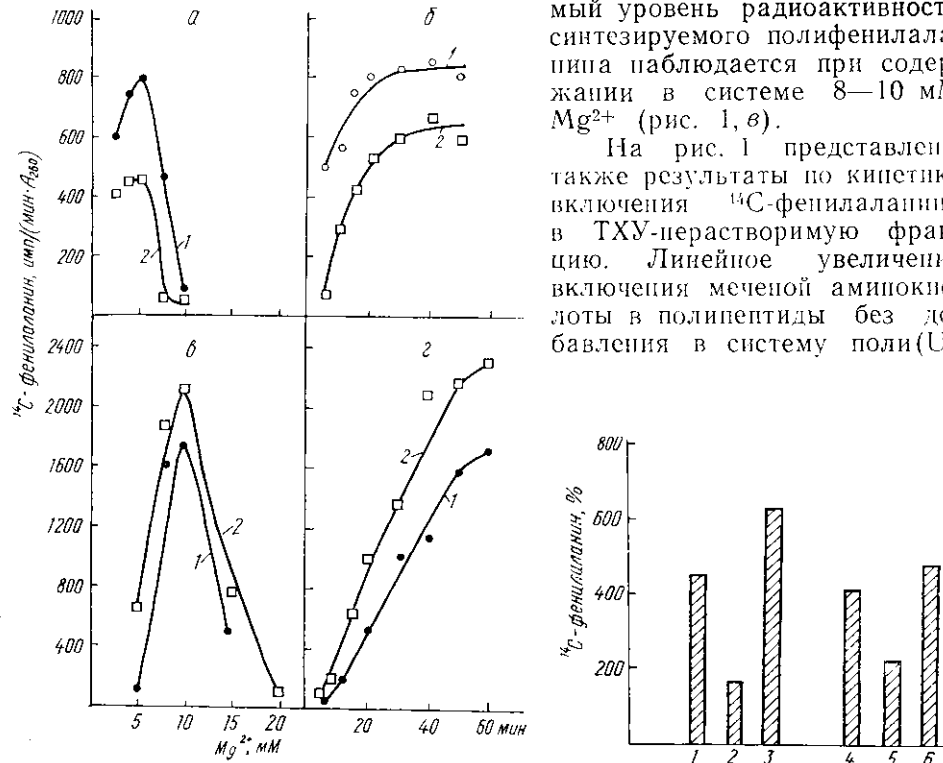


Рис. 1. Зависимость включения ^{14}C -фенилаланина в ТХУ-нерастворимый продукт в бесклеточной системе, выделенной из зародышей кукурузы, от концентрации Mg^{2+} и времени инкубации: а, б — полипептидный синтез на эндогенных матрицах; в, г — синтез полифенилаланина на матрице поли(U) в системе S23 (1 — гибрид Г₁, 2 — линия 101).
Fig. 1. The dependence of ^{14}C -phenylalanine incorporation into TCA-insoluble product in the cell-free system isolated from maize germs on Mg^{2+} concentration and time incubation: а, б — polypeptide synthesis on the endogenous mRNAs; в, г — polyphenylalanine synthesis on the poly(U) matrix in system S₂₃; (1 — hybrid Г₁, 2 — line 101)

Рис. 2. Влияние поли(U) на включение ^{14}C -фенилаланина в ТХУ-нерастворимый продукт трансляции в бесклеточной системе из зародышей гетерозисных гибридов кукурузы и их родительских форм: 1 — линия 346; 2 — гибрид Пионер 3978; 3 — линия 502; 4 — линия 101; 5 — гибрид Г₁; 6 — гибрид Г₀. За 100 % принято включение в отсутствие поли(U)

Fig. 2. The effect of poly(U) on ^{14}C -phenylalanine incorporation into TCA-insoluble translation product in cell-free system from the maize germs of the heterosis hybrids and their parental forms: 1 — line 346, 2 — hybrid «Pioneer» 3978, 3 — line 502, 4 — line 101, 5 — hybrid Г₁, 6 — hybrid Г₀

наблюдается в интервале 0–15 мин (рис. 1, б), в присутствии экзогенной матрицы — 0–40 мин инкубации (рис. 1, г). Такие результаты согласуются с данными, полученными в других системах трансляции [6, 8].

В дальнейшем был изучен синтез белка на эндогенных матрицах в бесклеточной системе из зародышей разных селекционных форм кукурузы. Результаты исследований свидетельствуют о том, что этот пока-

затель у высокогетерозисных гибридов находится на более высоком уровне по сравнению с исходными компонентами и гибридами с низким проявлением эффекта гетерозиса по продуктивности (таблица). Активность бесклеточных систем из зародышей низкогетерозисных гибридов находится на уровне исходных форм.

Ранее нами было показано, что при инкубации зародышей кукурузы с ^{14}C -аминокислотами наблюдается увеличение удельной радиоактив-

Включение ^{14}C -фенилаланина в ТХУ-нерастворимую фракцию в бесклеточной системе синтеза белка из зародышей различных селекционных форм кукурузы, имп/(мин·А₂₆₀) (M±m, n=6)

Incorporation of ^{14}C -phenylalanine into TCA-insoluble fraction in cell-free systems of polypeptide synthesis from different selection forms of maize germs, cpm/A₂₆₀ (M±m, n=6)

Линия, гибриды	Эндогенное	Стимулируемое поли(U)+ -эндогенное	Стимулируемое поли(U)- -эндогенное
346	397±16	2345±85	1948±74
Пионер 3978	846±21* ^{***}	2481±92	1635±80
502	282±12 ^{***}	2124±101	1842±87
101	452±24	2426±78	1973±51
Г ₁	730±31* ^{***}	2352±54	1622±39
Г ₀	446±47	2581±31	2136±22
107	327±59	2300±232	1973±170
Г ₇	453±31	2274±151	1821±98
Г ₀	445±47	2581±30	2137±24
105	229±34	1924±46	1625±32
Г ₅	492±34*	3441±95* ^{**}	2949±53
Г ₀	445±47 ^{***}	2581±30 ^{***}	2136±27

Примечание. Разницы между гибридной и материнской (*), гибридной и отцовской (**), формами и исходными компонентами (***) достоверны.

ности белков в зародышах гибридных форм по сравнению с инбредными линиями [9]. Как следует из полученных данных, аналогичные изменения наблюдаются и при изучении активности трансляции в бесклеточных системах из зародышей различных селекционных форм кукурузы (таблица).

Возникает вопрос, за счет чего происходит увеличение синтеза белка на эндогенных матрицах у высокогетерозисных по продуктивности гибридов кукурузы? Одним из возможных объяснений этого явления может быть предположение о том, что активация биосинтеза белка у гибридных зародышей обусловлена увеличением полисом в клетках.

Для доказательства выдвинутых предположений мы в дальнейшем использовали поли(U) в качестве экзогенной матрицы в бесклеточной системе белка из зародышей гибридных и линейных форм кукурузы.

Как видно из представленных данных, наблюдается значительный стимулирующий эффект при добавлении экзогенной матрицы у всех изученных форм (таблица). При этом процент стимуляции у исходных компонентов высокогетерозисных гибридов значительно выше, чем в поколении F₁ (рис. 2). Особенно выражена такая закономерность у простого межлинейного гибрида Пионер 3978. Наблюдаемое увеличение включения ^{14}C -фенилаланина в кислоторастворимую фракцию в бесклеточной системе с поли(U), вероятно, обусловлено наличием в ней вакантных рибосом. При этом большее количество их имеется в системе, выделенной из зародышей инбредных линий кукурузы, по сравнению с гибридными формами. Менее выраженный поли(U)-стимулирующий эффект трансляции в бесклеточной системе, выделенной из зародышей гибридных форм кукурузы, по сравнению с системами, выделенными из зародышей родительских форм, в сочетании с увеличением активности синтеза белка на эндогенных матрицах свидетельствует о том, что у гетерозисных гибридов в начальный период прорастания увеличивается доля активных полисом в клетке. Происходят ли эти изменения в связи

с увеличением новосинтезированных мРНК или это обусловлено активацией процесса инициации биосинтеза белка на предшествующих матрицах, пока еще не выяснено.

Таким образом, экспериментально установлено повышение полипептидного синтеза на эндогенных матрицах в бесклеточной системе, выделенной из зародышей высокогетерозисных гибридных растений. При добавлении экзогенной матрицы процент стимуляции синтеза у родительских форм таких гибридов значительно выше, чем в поколении F₁.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Активность рибосом проростков гибридных и инбредных форм кукурузы в бесклеточной системе синтеза белка* / Л. Т. Оплачко, С. С. Костышин, Л. А. Яковлева, М. М. Марченко // Физиология растений.— 1985.—32, № 4.— С. 710—714.
2. *Ерксев М. И., Кудоярова Г. Р.* Изучение активности белоксинтезирующей системы у гетерозисных гибридов кукурузы // Там же.— 1981.—28, № 4.— С. 880—883.
3. *Конярев В. Г.* Биохимия и молекулярная генетика гетерозиса // Гетерозис.— Минск: Наука и техника, 1982.— С. 163—178.
4. *Yamada M., Ishige T., Ohkawa Y.* Reappraisal of Ashby's hypothesis on heterosis of physiological traits in maize, *Zea mays* L. // Euphytica.— 1985.—34, N 3.— P. 593—598.
5. *Yamada M.* Heterosis in embryo of maize, *Zea mays* L. // Bull. Nat. Inst. Agrobiol. Res.— 1985.— N 1.— P. 85—98.
6. *Roberts B. E., Patterson B. M.* Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1973.—70, N 5.— P. 2330—2334.
7. *Marcus A., Efron D., Weeks D. P.* The wheat embryo cell-free system // Meth. Enzymol.— 1974.—30.— P. 749—761.
8. *Mans R. J., Novelli G. D.* Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disk method // Arch. Biochem. and Biophys.— 1961.—94.— P. 48—53.
9. *Синтез РНК и белка в ранний период прорастания зародышей кукурузы в связи с гетерозисом* / С. С. Костышин, Л. Н. Хлус, Л. Т. Оплачко, М. М. Марченко // С.-х. биология.— 1988.— № 1.— С. 35—38.

Черновин. гос. ун-т

Получено 15.03.88

PECULIARITIES OF PROTEIN SYNTHESIS ON ENDOGENOUS mRNAs IN CELL-FREE SYSTEMS FROM GERMS OF THE DIFFERENT MAIZE FORMS

M. M. Marchenko, L. T. Oplachko, S. S. Kostyshin, L. S. Yazlovitskaya
University, Chernovtsy

Summary

The activity of polypeptide synthesis on the endogenous mRNAs and poly(U) in the cell-free system from germs of the different maize forms is studied. Translational activity on the endogenous mRNAs in the cell-free system isolated from the hybrid maize germs is established to increase. The polypeptide synthesis stimulation by poly(U) in parental forms of super heterosis hybrids is higher than in generation F₁.

УДК 577.2.08

Е. Б. Патон, А. Г. Терентьев

ПРЕИМУЩЕСТВА Z-gal ПРИ СЕЛЕКЦИИ РЕКОМБИНАНТОВ ПО Lac-ФЕНОТИПУ

Рассмотрены преимущества использования Z-gal в качестве хромогенного субстрата β-галактозидазы при селекции рекомбинантов по Lac-фенотипу.

Lac⁺-фенотип, обеспечиваемый экспрессией гена *lacZ*, является одним из маркеров, наиболее часто используемых в практике конструирования