



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 F<sub>1</sub>.*

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), цитротритол (ДТТ) — фирмы «Reanal» (ВНР); <sup>14</sup>С-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 Г<sub>1</sub> (линия 101×Г<sub>0</sub>), а также гибриды с низким проявлением эффекта гетерозиса по продуктивности: гибрид Г<sub>2</sub> (линия 105×Г<sub>0</sub>), гибрид Г<sub>7</sub> (линия 107×Г<sub>0</sub>).

Семена кукурузы обрабатывали раствором 0,5 %-ного КМпО<sub>4</sub> 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 <sup>14</sup>С-фенилаланина, 1 о. е. А<sub>260</sub> 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 Mg<sup>2+</sup> увеличивали до 8 мМ. Пробы инкубировали 40 мин при 30 °С. Инкубационную смесь наносили на диск-фильтры Ватман 3 ММ,

фиксировали 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)

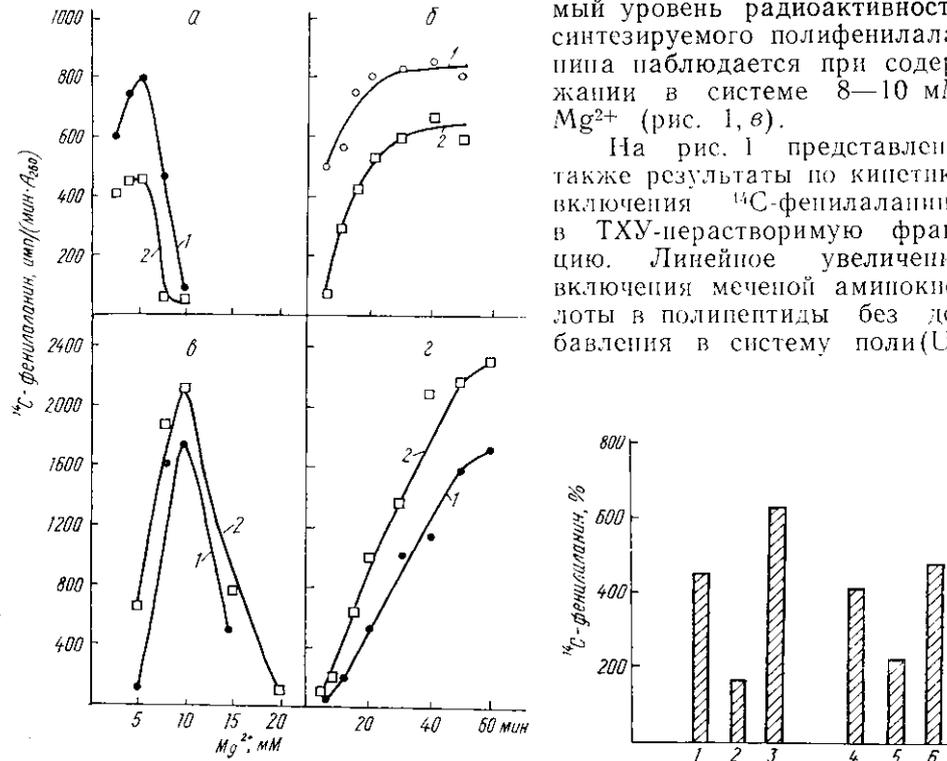


Рис. 1. Зависимость включения  $^{14}C$ -фенилаланина в ТХУ-нерастворимый продукт в бесклеточной системе, выделенной из зародышей кукурузы, от концентрации  $Mg^{2+}$  и времени инкубации: а, б — полипептидный синтез на эндогенных матрицах; в, г — синтез полифенилаланина на матрице поли(U) в системе S23 (1 — гибрид Г<sub>1</sub>, 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 S<sub>23</sub>; (1 — hybrid Г<sub>1</sub>, 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 Г<sub>1</sub>; 6 — гибрид Г<sub>0</sub>. 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 Г<sub>1</sub>, 6 — hybrid Г<sub>0</sub>

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  $^{14}\text{C}$ -аминокислотами наблюдается увеличение удельной радиоактив-

*Включение  $^{14}\text{C}$ -фенилаланина в ТХУ-нерастворимую фракцию в бесклеточной системе синтеза белка из зародышей различных селекционных форм кукурузы, имп/(мин·А<sub>260</sub>) (M±m, n=6)*

*Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -phenylalanine into TCA-insoluble fraction in cell-free systems of polypeptide synthesis from different selection forms of maize germs, cpm/A<sub>260</sub> (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* <sup>***</sup>	2481±92	1635±80
502	282±12 <sup>***</sup>	2124±101	1842±87
101	452±24	2426±78	1973±51
Г <sub>1</sub>	730±31* <sup>***</sup>	2352±54	1622±39
Г <sub>0</sub>	446±47	2581±31	2136±22
107	327±59	2300±232	1973±170
Г <sub>7</sub>	453±31	2274±151	1821±98
Г <sub>0</sub>	445±47	2581±30	2137±24
105	229±34	1924±46	1625±32
Г <sub>5</sub>	492±34*	3441±95* <sup>**</sup>	2949±53
Г <sub>0</sub>	445±47 <sup>***</sup>	2581±30 <sup>***</sup>	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 F<sub>1</sub> (рис. 2). Особенно выражена такая закономерность у простого межлинейного гибрида Пионер 3978. Наблюдаемое увеличение включения  $^{14}\text{C}$ -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 F<sub>1</sub>.

#### 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 F<sub>1</sub>.

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<sup>+</sup>-фенотип, обеспечиваемый экспрессией гена *lacZ*, является одним из маркеров, наиболее часто используемых в практике конструирования