

УДК 576.314:577.111:621.039.85

## **ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМАЛЕММЫ ДРОЖЖЕЙ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЕЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА**

**Г. А. ЗИНЧЕНКО, А. П. БЕЛОВ, Е. Г. ДАВИДОВА**

**(Кафедра применения изотопов и радиации в сельском хозяйстве)**

Была отработана методика выделения плазмалеммы высокой степени чистоты из протопластов дрожжей *Candida utilis*. Стабилизация препарата плазматической мембраны осуществлялась с помощью конканавалина А. В препарате плазмалеммы определены содержание липидов и их состав.

Существующие методы выделения плазматической мембраны дрожжей включают или механическое разрушение целых клеток с последующим фракционированием гомогената [5, 7, 12], или дезинтеграцию целых клеток, выделение клеточной оболочки и обработку литическими ферментами, растворяющими клеточную оболочку [6, 13], а затем полу-

чение протопластов и различные способы их лизиса с последующим фракционированием лизата [8, 10, 14]. Все перечисленные методические приемы имеют свои достоинства и недостатки, поэтому выбор метода определяется задачами исследования.

Нашей целью была отработка метода, позволяющего получать препарат плазмалеммы дрожжей высокой степени чистоты при сохранении нативного состояния мембранных липидов.

## Методика

В работе использовали дрожжи *Candida maltosa* и *Candida utilis*, которые выращивали в периодической культуре при условиях, описанных ранее [1, 3], на глюкозе (1 % масс.) в качестве источника углерода. В середине экспоненциальной фазы роста клетки дрожжей отделяли центрифугированием.

Отмытые клетки дрожжей разрушали при помощи дезинтегратора MSK со стеклянными бусами диаметром 0,5 мм в течение 3 мин при температуре 4°C. Среда разрушения — 0,6 М маннит + трис-НСl буфер с pH 7,6. После разрушения бусы дважды промывали в аналогичной среде. Затем суспензию центрифугировали 3 раза при 3000 г в течение 10 мин для удаления клеточных стенок и неразрушенных клеток. Полученный бесклеточный экстракт центрифугировали при 8000 г в течение 20 мин для осаждения везикул плазмалеммы (грубая фракция мембран). Для фракционирования грубого препарата мембран использовали градиент перколлы. Непрерывный градиент плотности получали смешиванием 25 мл перколлы с 12 мл 50 % сахарозы и буфером доводили объем смеси до 50 мл. К полученной смеси добавляли 2 мл грубой фракции мембран и центрифугировали в роторе Ti-50 в течение 30 мин при 30 000 г. Полученные фракции мембран отбирали с помощью пастеровской пипетки.

Изоэлектрическое осаждение грубого препарата мембран проводили в 50 мМ ацетатном буфере с pH 4,2 и 4,7. После 10 мин инкубации при комнатной температуре агрегированные мембраны отделяли центрифугированием при 500 г в течение 5 мин. Протопласты дрожжей получали обработкой клеток улиточным ферментом по методике [1, 2]. Для выделения плазмалеммы протопласты суспендировали в среде, содержащей сорбит (0,7 М), CaCl<sub>2</sub> (2 мМ) и МЕС-трис буфер с pH 6,8 (50 мМ). К суспензии добавляли раствор конканавалина А из расчета 1 мг на 200 мг клеток и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. После агрегации протопласты охлаждали и центрифугировали в течение 5 мин при 500 г. Осадок протопластов суспендировали в 10 мл воды и вливали в 400 мл охлажденного раствора фенолметилсульфонилфторида концентрацией 0,5 мМ. Грубый препарат плазмалеммы, стабилизированной

конканавалином А, осаждали при 4000 г. Осадок суспендировали в поттеровском гомогенизаторе, смешивали с перколлом до конечной концентрации 18 % и центрифугировали при 38 000 г в течение 30 мин. Слой градиента, содержащий плазмалемму, отбирали, разбавляли фосфатным буфером с pH 7,2 и центрифугировали при 20 000 г в течение 5 мин. Осадок, содержащий препарат плазмалеммы, лиофилизировали.

Активность маннансинтетазы измеряли с использованием эндогенных акцепторов и ГДФ-1-<sup>14</sup>C-маннозы в системе общим объемом 0,1 мл. В пробу вносили 0,3 М MgCl<sub>2</sub> — 3 мкл, 0,2 М MnSO<sub>4</sub> — 5 мкл, трис-НСl буфер с pH 7,2 — 20 мкл, суспензию мембран — 50 мкл, ГДФ-1-<sup>14</sup>C-маннозу — 57 мкл. Реакцию останавливали в различные промежутки времени добавлением 1 мл абсолютного этанола. Осадок несколько раз промывали этанолом и растворяли в солибилизаторе NCS.

Активность сукцинатдегидрогеназы измеряли в следующей системе: суспензия мембран — 0,5 мл, трис-НСl буфер с pH 7,2 — 2,0 мл, 0,1 KCN — 0,1 мл, 2,6-дихлорфенолиндофенол — 60 мкг, сукцинат натрия — 8 мг. Измерение поглощения 2,6-дихлорфенолиндофенола проводили на спектрофотометре «Ультроспек» при длине волны 600 нм. Активность Mg-зависимой АТФ-азы измеряли в следующей системе: MgCl<sub>2</sub> — 10 мкмоль, АТФ (динатриевая соль) — 5 ммоль, фракция мембран — 100—200 мкг, буфер трис-НСl с pH 7,4. Для ингибирования митохондриальной АТФ-азы в пробу вносили олигомицин до конечной концентрации 35 мкг/мл.

Липиды из лиофилизированных образцов экстрагировали согласно методу [4]. Фракционирование липидов на классы проводили методом сравнительной тонкослойной хроматографии на пластинках «Мерк» в системе растворителей гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота (80 : 20 : 1). Фосфолипиды разделяли на бумаге «Ватман SG-81», пропитанной кремниевой кислотой, в системе диизобутилкетон — уксусная кислота — вода (40 : 25 : 5).

Активность <sup>14</sup>C измеряли на жидкостно-сцинтилляционном радиометре «Ракбета-1219» фирмы «Фармация ЛКБ Валлак» (Швеция — Финляндия) с использованием сцинтиллятора на основе толуола.

## Результаты

После механического разрушения целых клеток дрожжей *Candida maltosa* был получен грубый препарат плазматических мембран. Для его очистки использовали центрифугирование в градиенте перколлы, полученного *in situ*. В результате препарат мембран удалось разделить на две фракции. В табл. 1 представлены результаты измерения актив-

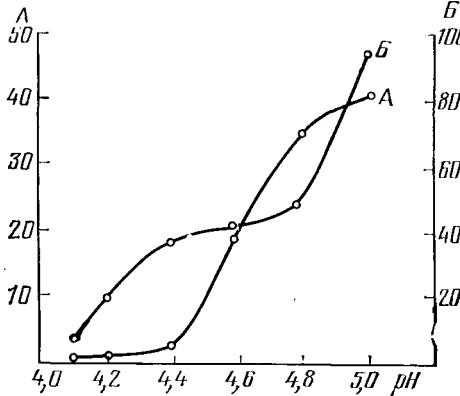
Таблица 1

Распределение суммарных активностей ферментов (%) при фракционировании препарата мембран в градиенте перколла

Фракция	Без олигомицина	С олигомицином	Сукцинатдегидрогеназа
Слой 1	43±2	28±4	74±9
Слой 2	56±4	71±6	31±5

нений и не может считаться препаратом плазмалеммы удовлетворительной чистоты.

В дальнейшем для более эффективного фракционирования грубого препарата мембран была сделана попытка использовать метод изоэлектрического осаждения. Согласно



Осаждение митохондрий при различных pH среды.

A — активность сукцинатдегидрогеназы,  $\Delta E_{500} \times \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1} \cdot 10^3$ ; B — содержание белка в супернатанте, % к внесенному.

литературным данным [7, 15], изоэлектрические (интегральные) точки мембран митохондрий и плазмалеммы значительно различаются, что позволяет использовать градиент pH для разделения этих двух фракций. На рисунке представлены результаты осаждения митохондрий (по изменению активности сукцинатдегидрогеназы) из смеси в зависимости от pH среды. При pH среды 4,4 осадок содержит около 95 % сукцинатдегидрогеназы — маркерного фермента митохондрий, тогда как около 20 % белка мембран остается в супернатанте.

Результаты распределения ферментативных активностей, характерных для плазматической

мембраны, — Mg-зависимой олигомицин нечувствительной АТФ-азы и маннансинтетазы [8, 9, 16] — в процессе выделения плазмалеммы методом изоэлектрического осаждения приведены в табл. 2. Актив-

Таблица 2

Распределение ферментативных активностей Mg-зависимой АТФ-азы и маннансинтетазы при фракционировании дрожжей

Фракция	Mg <sup>2+</sup> -зависимая АТФ-аза				Маннансинтетаза	
	без олигомицина		с олигомицином		расп. мин · 10 <sup>3</sup> · мг белка <sup>-1</sup>	% к сумме
	нмоль · мин <sup>-1</sup> · мг белка <sup>-1</sup>	% к сумме	нмоль · мин <sup>-1</sup> · мг белка <sup>-1</sup>	% к удельной активности		
Гомогенат (без клеток)	25,4±3,0	100	9,5±0,8	37,5	2,33±0,45	100
Осадок мембран 1	86±10	71±11	42,5±3,5	49,2	2,58±0,32	103
Супернатант 2	78±11	6±2	61,1±5,1	78,3	2,92±0,34	12
Осадок 2	80,1±9,4	36±8	22,3±2,9	27,9	2,08±0,18	54
Фракция плазмалеммы	88,9±7,6	6±1	79,7±7,9	89,5	3,56±0,37	5
Гомогенат протопластов	42,3±3,1	—	24,1±2,8		Не опр.	
Препарат плазмалеммы из протопластов	196,8±4,1		193,1±4,3		« «	

Относительное содержание и состав липидов в субклеточных структурах дрожжей

Класс липидов	Гомогенат протопластов	Фракция микросом	Фракция плазмалеммы	Плазмалемма, полученная осаждением при pH 4,2
% к меченому углероду липидов				
Фосфолипиды	64,8±5,4	67,3±5,1	58,2±2,4	32,3±3,1
Моноглицериды	1,2±0,5	2,5±0,8	0,3±0,1	3,1±0,3
Диглицериды	3,3±0,7	2,8±0,6	1,9±0,2	1,8±0,3
Стерины	9,6±0,9	12,3±1,8	34,9±1,7	36,7±1,7
Жирные кислоты	1,2±0,9	1,7±0,8	0,9±0,2	19,1±1,2
Триацилглицерины	17,8±3,9	9,8±2,1	1,1±0,2	2,2±0,2
Воска + эфиры стериннов	3,2±3,1	2,6±0,4	1,8±0,2	2,8±0,3
% к углероду структуры				
Содержание меченого углерода липидов	21,7±3,7	40,1±2,4	31,3±2,9	34,9±3,1

ность АТФ-азы, измеренная при отсутствии олигомицина, включает в себя и активности митохондриальных АТФ-аз. На первом этапе фракционирования — центрифугирование митохондрий и плазмалеммы — во фракции осадка мембран (табл. 2) сосредоточивается около 70 % суммарной АТФ-азной активности, причем около половины ее приходится на фермент плазматической мембраны. Осадок митохондрий, агрегированных при pH 4,4 (осадок 2), содержит около 30 % АТФ-азной активности плазмалеммы. При этом в супернатанте остается около 6 % суммарной АТФ-азной активности.

Таким образом, фракция плазмалеммы, выделенная методом изоэлектрического осаждения, содержит около 10 % митохондриальных загрязнений, и чистоту полученного препарата можно считать удовлетворительной. Однако определение липидного состава фракции показало присутствие большого количества свободных жирных кислот (табл. 3), что может быть обусловлено активацией фосфолипаз в процессе выделения плазмалеммы указанным способом.

В дальнейшем мы попытались получить фракцию плазмалеммы в более мягких условиях — из дрожжевых протопластов. Для стабилизации плазмалеммы использовали конканавалин А — лектин, связывающийся с маннанными остатками гликопротеинов на поверхности плазматической мембраны [13]. Лизис стабилизированных конканавалином протопластов в большом объеме жидкости приводит к снижению концентрации загрязняющих структур. Условия центрифугирования в градиенте перколла были подобраны таким образом, чтобы фракция плазмалеммы (белого цвета) собиралась в 1,5 см от дна пробирки.

Данные о ферментативной активности плазматической мембраны, полученной из протопластов, представлены в табл. 2. Поскольку добав-

Таблица 4

Состав фосфолипидов субклеточных структур дрожжей (% к меченому углероду фосфолипидов)

Фосфолипид	Гомогенат протопластов	Фракция микросом	Фракция плазмалеммы
Фосфатидилинозит	5,8±0,2	5,2±0,3	8,7±1,1
Фосфатидилхолин	45,7±2,4	49,2±5,1	46,4±2,4
Фосфатидилсерин	5,3±0,4	5,4±0,3	5,4±0,4
Фосфатидилэтаноламин	24,8±1,4	19,2±0,8	29,2±1,2
Фосфатидная кислота	7,6±0,8	13,9±1,1	0,8±1,1
Лизофосфатидная кислота + кардиолипин	9,7±0,9	5,4±0,4	3,8±0,6

ка олигомицина не приводит к снижению АТФ-азной активности, препарат плазмалеммы можно считать свободным от митохондриальных загрязнений. Результаты радиондикаторного анализа липидного состава плазмалеммы, полученной из протопластов (табл. 3), показали, что препарат плазматических мембран содержит значительные количества стерина (35 %). Это хорошо согласуется с данными [8, 10]. Состав фосфолипидов плазмалеммы приведен в табл. 4. Липиды плазматической мембраны представлены в основном фосфатидилхолином и фосфатидилэтанололамином. Количество фосфатидилэтанололамина плазмалеммы значительно выше, чем у микросом. Аналогичные данные получены в опытах [10].

Таким образом, нами был получен препарат плазмалеммы удовлетворительной чистоты, содержащий 31 % липидов. Основными фракциями липидов были фосфолипиды (58 %) и стерина (35 %). Фосфолипидный состав плазмалеммы характеризовался значительным содержанием фосфатидилэтанололамина (29 %) и фосфатидилхолина (46 %).

Обнаруженные различия в составе липидов плазмалеммы и микросом, вероятно, обусловлены функциональными особенностями данных структур.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Белов А. П., Давидова Е. Г. Липидные гранулы — один из компартментов синтеза липидов в дрожжевой клетке. — *Микробиология*, 1982, т. 51, № 2, с. 302—307. — 2. Белов А. П., Давидова Е. Г., Рачинский В. В. Определение компонентного состава аминокислотного пула митохондрий. — *Изв. ТСХА*, 1980, вып. 4, с. 15—19. — 3. Давидова Е. Г., Белов А. П., Рачинский В. В. Электрофоретическая характеристика белка липидных гранул дрожжей. — *Микробиология*, 1979, т. 48, № 5, с. 803—807. — 4. Кейтс М. Техника липидологии. — М.: Мир, 1975. — 5. Christiansen M. S., Cirillo V. P. — *J. Bacteriol.*, 1972, vol. 110, p. 1190—1205. — 6. Dube J., Setterfield G., Kiss G. a. o. — *Canad. J. Microbiol.*, 1973, vol. 19, N 2, p. 285—290. — 7. Fuhrmann G. F., Wehli E., Boehm C. — *Bioch. Biophys. Acta*, 1974, vol. 363, N 3, p. 295—310. — 8. Hubbard M. J., Surarit R., Sullivan P. A. a. o. — *Eur. J. Bioch.*, 1986, vol. 154, N 2, p. 375—381. — 9. Kosinova A., Farkas V., Machala S. a. o. — *Arch. Microbiol.*, 1974, vol. 99, N 3, p. 255—263. — 10. Marrioff M. S. — *J. Gen. Microbiol.*, 1975, vol. 86, N 2, p. 115—132. — 11. Marrioff M. S. — *J. Gen. Microbiol.*, 1975, vol. 89, N 2, p. 345—352. — 12. Matile P., Moor H., Muhlethaler K. — *Arch. Microbiol.*, 1967, vol. 58, N 2, p. 201—211. — 13. Nurminen T., Oura E., Suomalainen H. — *Biochemical J.*, 1970, vol. 116, N 1, p. 61—69. — 14. Schibeci A., Rattray J. B. M., Kidby D. K. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, vol. 311, N 1, p. 15—25. — 15. Schneider H., Fiechter A., Fuhrmann G. F. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, vol. 512, N 3, p. 495—507. — 16. Vermeulen G. A., Raeven M. B., Wessels J. G. H. — *J. General Microbiol.*, 1979, vol. 114, N 1, p. 87—97.

*Статья поступила 31 марта 1988 г.*

#### SUMMARY

From *Candida utilis* yeast protoplasts a plasmalemma fraction of high purity degree has been isolated after special treatment. In the plasmalemma preparation the amount of lipids and their composition have been determined.