

RYBONUKLEAZY SUCHYCH NASION ŁUBINU ŻÓŁTEGO

Elżbieta Borzyszkowska, Henryk Cudny i Maciej Pietrzak

Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań

WSTĘP

Rybonukleazy należą do grupy enzymów hydrolitycznych i ich rola w suchych nasionach sprowadza się głównie do hydrolizy materiału zapasowego nasienia po rozpoczęciu kiełkowania w celu dostarczenia substratów potrzebnych do wzrostu zarodka. Aktywność RNazy, podobnie jak i innych enzymów hydrolitycznych, wzrasta stopniowo w czasie kiełkowania nasienia [1-3, 9, 10, 14]. Czynnikiem powodującym wzrost aktywności RNazy jest kwas giberelowy [4, 6, 11-13]. Suche nasiona, tak jak i inne części roślin, zawierają kilka typów RNazy /patrz prace przeglądowe: [8, 13, 18], które mogą pełnić różne funkcje fizjologiczne. Z tego względu badanie zmian aktywności poszczególnych pojedynczych enzymów nukleolitycznych może dostarczyć dodatkowych informacji, dotyczących fizjologicznej roli tych enzymów we wczesnych etapach kiełkowania nasienia. W pracy tej izolowano i częściowo charakteryzowano różne typy enzymów posiadających aktywność RNazy, zawartych w suchych nasionach łubinu.

MATERIAŁY I METODY

Materiały

Łubin żółty Lupinus luteus odmiana Jantar/ pochodził ze Stacji Hodowli Roślin Przebędowo. Drożdżowy RNA pochodził z firmy Fluka i był dodatkowo oczyszczany fenolem, chloroformem i wytrącany jako sól cetylotrójmetyloamonowa. Z tej samej firmy pochodził Tris. Z firmy Koch-Light otrzymano akrylamid i bis-akrylamid. Octan uranylu otrzymano z firmy Chemapol. DNA z grasicy cielęcej pochodził z firmy Sigma. Siarczan amonowy otrzymano z firmy Serva Biochemical. DEAE Sepharose CL-6B pochodziła z firmy Pharmacia Fine Chemicals, a Ultrogel AcA 54 z firmy LKB.

Metody

Izolacja rybonukleaz. Zmielono 1 kg nasion łubinu i zalano 5 l wody destylowanej, zawierającej 0,01% azydku sodowego. Ekstrakcję prowadzono przez 24 h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę poddano następnie wirowaniu przez 30 min przy 2000 rpm /Mistral 6L, MSE/ w 4°C. Zlano supernatant przez gazę i dodano NaCl do stężenia 0,1 M. Supernatant zakwaszono następnie kwasem octowym do pH 4,0 i pozostawiono na 1 h w 4°C. Wytrącony osad odwirowano przez 30 min przy 2000 rpm w 4°C i odrzucono. pH supernatantu doprowadzono następnie do 7,0 stężonym roztworem NaOH i pozostawiono przez noc w 4°C. Wytrącony osad odwirowano przez 30 min przy 2000 rpm w 4°C. Do supernatantu dodano stały siarczan amonowy do 80% nasycenia i pozostawiono na 1 h w 4°C. Wytrącony osad odwirowano przez 2 h przy 5000 rpm /K 70, Janetzky/ i rozpuszczono w 400 ml buforu: 0,01 Tris-HCl, pH 7,2, 0,01% NaN₃. Roztwór białka dializowano przez noc wobec 5 l tego samego buforu.

Chromatografia na kolumnie DEAE Sepharose CL-6B. Oddializowany roztwór białka naniesiono na kolumnę /5 cm x 40 cm/ DEAE Sepharose CL-6B i kolumnę przemyto buforem 0,05 M Tris-HCl, pH 7,2, 0,05 M NaCl, 0,01% NaN₃, w ilości równej trzem objętościom kolumny. Białko zaadsorbowane na kolumnie wymywano buforem: 0,05 M Tris-HCl, pH 7,2, zawierającym gradient stężenia NaCl od 0,05 M do 0,5 M /3 l/. Zbierano frakcje po około 10 ml. We frakcjach oznaczono aktywność rybonukleazy, stężenie białka oraz stężenie NaCl.

Sączenie żelowe na kolumnie Ultrogel AcA 54. Frakcje zawierające aktywność RNazy po chromatografii na DEAE Sepharose CL-6B zagęszczano na małej kolumnie tego samego wypełniacza i naniesiono na kolumnę /2,5 cm x 90 cm/ Ultrogel AcA 54, przemytą uprzednio buforem: 0,05 M Tris-HCl, pH 7,2, 0,1 M NaCl, 0,01% NaN₃. Elucję kolumny prowadzono tym samym buforem i zbierano frakcje po około 15 ml. We frakcjach oznaczano aktywność RNazy i stężenie białka.

Oznaczanie aktywności RNazy. Aktywność rybonukleazy oznaczano, stosując zmodyfikowaną metodę Tuve i Anfinsena [15]. Skład mieszaniny inkubacyjnej był następujący: 50 μl 0,5 M octan sodowy, pH 5,5; 50 μl 1,5% roztwór RNA; 150 μl odpowiednio rozcieńczonego enzymu. Próbki inkubowano przez 30 min w 37°C. Reakcję przerywano przez dodanie 50 μl 0,75% roztworu octanu uranylu w 25% kwasie nadchlorowym. Po 5 min od dodania odczynnika przerywającego próbki wirowano przez 6 min przy 16 000 rpm. Pobierano 100 μl supernatantu i dodawano do 2 ml wody. Mierzono ekstynkcję rozcieńczonego supernatantu przy 260 nm i na tej podstawie obliczano ilość jednostek RNazy w próbce. Za jedną jednostkę aktywności enzymu przyjęto taką jego aktywność, która w 37°C w ciągu 1 minuty uwalnia z RNA rozpuszczalne w kwasie nukleotydy, odpowiadające 1 jednostce optycznej przy 260 nm.

Oznaczanie aktywności DNazy. Aktywność DNazy oznaczano w ten sam sposób jak aktywność RNazy, stosując jako substrat natywny lub termicznie zdenaturowany DNA z grasy cielęcej.

Oznaczanie stężenia białka. Stężenie białka oznaczano wg Bradford [5], stosując jako wzorzec albuminę wołową.

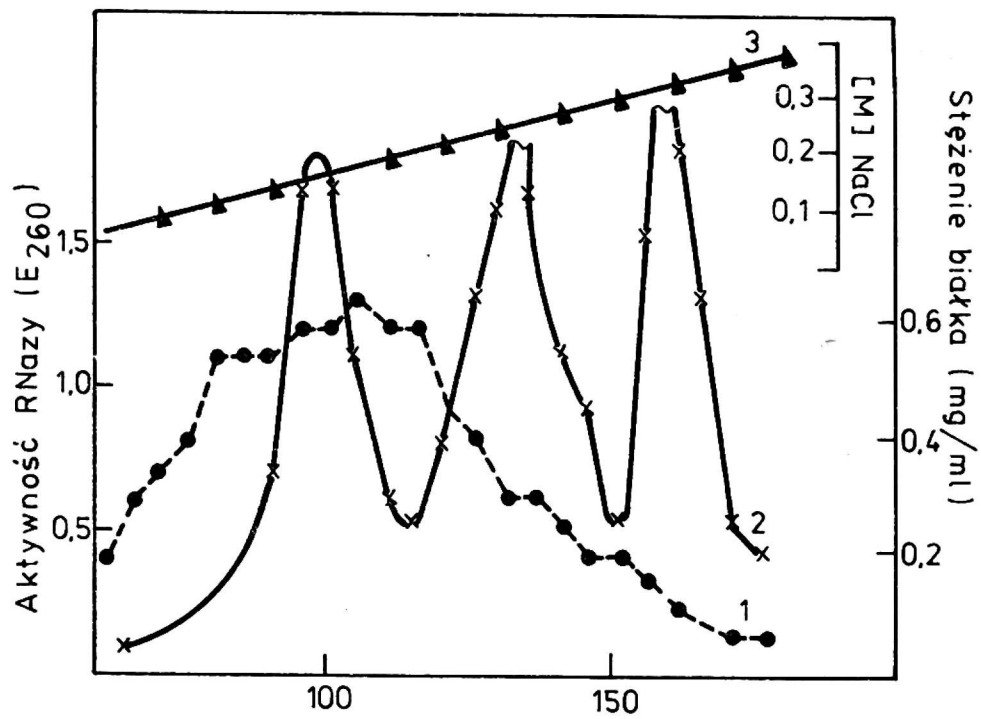
Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym. Elektroforezę w 10% żelu poliakryloamidowym prowadzono w układzie opisanym przez Davisa [7]. Po elektroforezie żele wybarwiano na aktywność RNazy wg Wilsona [17].

WYNIKI

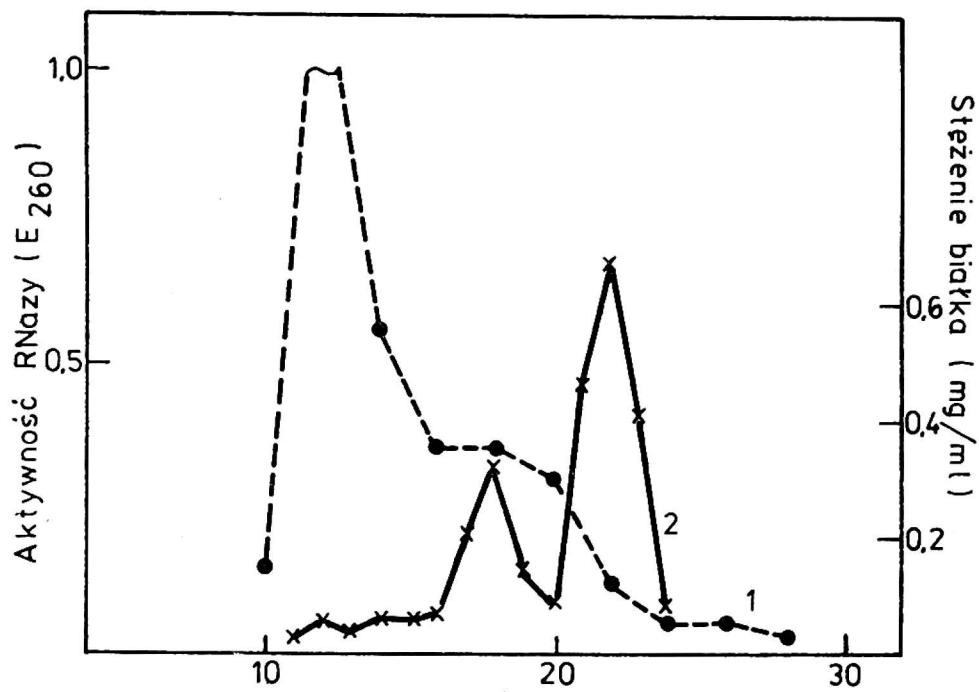
Izolacja i frakcjonowanie rybonukleaz

Do ekstrakcji rybonukleaz ze zmielonych nasion łubinu stosowano wodę destylowaną i ekstrakcję prowadzono przez noc, co powodowało, że wydajność ekstrakcji była około trzy razy wyższa w porównaniu z ekstrakcją prowadzoną przez dwie godziny. Po zakończeniu ekstrakcji pH ekstraktu wynosiło około 5,5. Zakwaszenie ekstraktu do pH 4, a następnie zmiana pH do 7 powodowały wytrącanie się dużej ilości osadu, który mógł być usunięty przez odwirowanie. Jednocześnie operacje te nie powodowały spadku aktywności RNazy. Następnie białko wytrącono przez dodanie siarczanu amonowego do 80% wysycenia, wydajność tego etapu wynosiła od 60 do 80%. Tak przygotowane białko rozdzielano na kolumnie DEAE Sepharose CL-6B. Około 20% aktywności RNazy w nanoszonym na kolumnę białku nie było adsorbowane w stosowanych warunkach. Aktywność rybonukleazy w białku zatrzymywanym na kolumnie była eluowana w gradientie stężenia NaCl w trzech frakcjach zawierających maksima aktywności RNazy. Frakcje te były eluowane przy około 0,16, 0,24 i 0,31 M NaCl i oznaczone w tej pracy jako 1, 2, i 3 /rys. 1/.

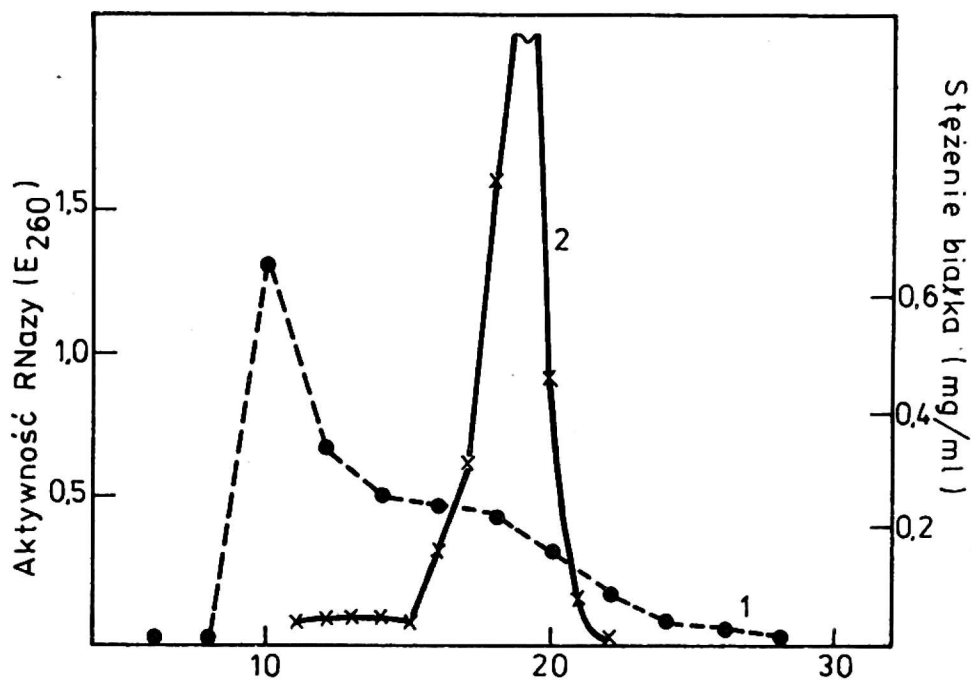
Frakcje białkowe zawierające aktywność RNazy były następnie poddane sączeniu żelowemu na kolumnie Ultrogel AcA 54. Rysunek 2 przedstawia chromatografię frakcji 1 na kolumnie Ultrogel AcA 54. Na profilu elucyjnym widoczne są dwa maksima aktywności rybonukleazy, które oznaczono jako frakcję 1a i frakcję 1b /w kolejności elucji/. Gdy sączeniu na kolumnie Ultrogel AcA 54 poddano frakcje 2 i 3 otrzymane po chromatografii na DEAE Sepharose, w obu przypadkach na profilu elucyjnym obserwowano tylko jedno maksimum aktywności RNazy /rys. 3, 4/.



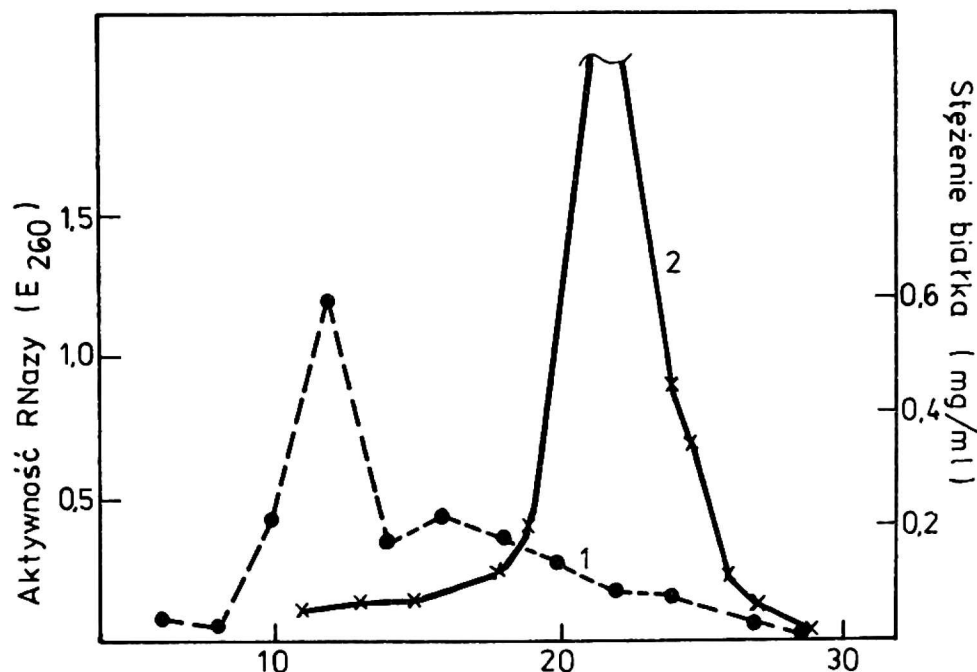
Rys. 1. Chromatografia białka na kolumnie DEAE Sepharose CL-6B: 1 - stężenie białka, 2 - aktywność RNazy, 3 - stężenie NaCl



Rys. 2. Chromatografia frakcji 1 na kolumnie Ultrogel AcA 54: 1 - stężenie białka, 2 - aktywność RNazy



Rys. 3. Chromatografia frakcji 2 na kolumnie Ultrogel AcA 54: 1 - stężenie białka, 2 - aktywność RNazy



Rys. 4. Chromatografia frakcji 3 na kolumnie Ultrogel AcA 54: 1 - stężenie białka, 2 - aktywność RNazy

Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym

Białko surowego ekstraktu poddano elektroforezie w 10% żelu poliakryloamidowym. Po elektroforezie kolumnienki wybarwiano na aktywność RNazy. Rozkład prążków aktywności RNazy przedstawiony jest na rysunku 5. Dwie następne kolumnienki na tym rysunku przedstawiają rozkład prążków aktywności po elektroforezie białka z etapu doprowadzenia pH ekstraktu do 7 oraz po dializie białka wytrąconego siarczanem amonowym.

Rozkład prążków aktywności RNazy na tych trzech kolumnienkach jest różny, z tym że we wszystkich kolumnienkach występuje szeroki i intensywny prążek w górnej części kolumnienki.

Dalsze kolumnienki na rysunku 5 przedstawiają rozkład prążków otrzymany po elektroforezie białka nie adsorbowanego na kolumnie DEAE Sepharose oraz w trzech frakcjach aktywności eluowanych z kolumny gradientem stężenia NaCl. Na kolumnienkach tych widoczne są prążki występujące zarówno w górnych jak i w dolnych częściach kolumnienek.



Rys. 5. Elektroforeza w 10% żelu poliakryloamidowym. Po elektroforezie żele wybarwiono na aktywność RNazy: a - surowy ekstrakt, b - białko z etapu pH 7, c - białko po wytrąceniu siarczanem amonowym i dializie, d - białko nie zaadsorbowane na kolumnie DEAE Sepharose, e - frakcja 1 z DEAE Sepharose, f - frakcja 2 z DEAE Sepharose, g - frakcja 3 z DEAE Sepharose, h - frakcja 1a po Ultrogel, i - frakcja 1b po Ultrogel, j - frakcja 2 po Ultrogel, k - frakcja 3 po Ultrogel

Elektroforezy białka odpowiadającego frakcjom aktywności RNazy na profilach elucyjnych po sączeniu na Ultrogel wykazują obecność tylko jednego prążka aktywności w przypadku frakcji 1b, 2 i 3 oraz dwóch prążków w przypadku frakcji 1a /rys. 5/. Po elektroforezie białka oczyszczonego na kolumnie Ultrogel AcA 54 nie obserwowano szerokich prążków aktywności w górnej części kolumnienki w żadnej z badanych frakcji.

Specyficzność substratowa enzymów

Oznaczenia aktywności DNazy we frakcjach 1, 2 i 3 po chromatografii na kolumnie DEAE Sepharose CL-6B /tab. 1/ wykazały, że frakcja 1 oprócz aktywności RNazy zawiera także aktywność DNazy. Gdy frakcja ta była dalej oczyszczana na kolumnie Ultrogel AcA 54, to frakcje zawierające aktywność RNazy /1a i 1b/ nie zawierały już aktywności DNazy /tab. 1/.

Tabela 1

Aktywność rybonukleaz łubinu wobec RNA i DNA

Frakcja	Aktywność /E ₂₆₀ /		
	RNA	DNA natywny	DNA zdenaturowany
Po DEAE Sepharose			
1	0,4	-	0,17
2	0,7	-	0,03
3	1,1	-	0,01
Po Ultrogel			
1a	0,25	0,01	0,02
1b	0,50	0,01	0,02

Reakcję prowadzono tak jak opisano w "Metodach", biorąc do oznaczenia takie same ilości odpowiedniego enzymu dla wszystkich substratów.

DYSKUSJA

Zastosowanie metod chromatograficznych pozwoliło na rozdzielenie enzymów suchych nasion łubinu, posiadających aktywność RNazy na kilka frakcji. Podczas chromatografii białka na kolumnie DEAE Sepharose CL-6B otrzymano cztery frakcje zawierające aktywność RNazy. Pierwsza z tych frakcji - białko nie zaadsorbowane na kolumnie - nie była dalej badana w tej pracy. Z kolumny wmywano następnie, stosując gradient stężenia NaCl, trzy dalsze frakcje białkowe zawierające aktywność RNazy, widoczne na profilu elucyjnym /rys. 1/. Stężenie NaCl potrzebne do wymycia tych enzymów wynosiło 0,16, 0,24 i 0,31 M dla frakcji oznaczonych kolejno jako 1, 2 i 3. Wyniki sączenia żelowego na Ultrogel AcA 54 /rys. 3 i 4/ sugeruje, że frakcje 2 i 3 zawierają pojedyncze enzymy. Potwierdza to elektroforeza w żelu poliakryloamidowym /rys. 5/. Obecność dwóch maksimum aktywności RNazy na profilu elucyjnym w przypadku sączenia żelowego białka frakcji 1 może świadczyć o obecności dwóch różnych enzymów. Nie można jednak wykluczyć możliwości, że pierwszemu z tych maksimum odpowiadają agregaty enzymu zawartego w drugim maksimum. Elektroforeza nie daje w tym przypadku jednoznacznej odpowiedzi, ponieważ na kolumnie /rys. 5/ widoczne są dwa prążki aktywności, jeden słabszy na wysokości odpowiadającej prążkowi we frakcji 1b oraz drugi na górze kolumny.

W miarę oczyszczania białka obserwowano zmianę rozkładu prążków aktywności RNazy po elektroforezie. Można przypuszczać, że szerokie prążki aktywności RNazy w górnych częściach kolumny, obserwowane w przypadku surowego ekstraktu oraz frakcji z początkowych etapów oczyszczania, stanowią agregaty enzymów ze sobą lub z innymi białkami.

W miarę oczyszczania enzymów obserwuje się zanik tych prążków i pojawianie się pojedynczych, bardziej ostrych, prążków aktywności w dolnej części kolumnienki. Frakcje otrzymane po chromatografii na DEAE Sepharose CL-6B wykazują pośredni obraz prążków.

Metodę elektroforezy w żelu poliakrylamidowym stosowano w celu analizy izoenzymów rybonukleaz [17]. Wyniki tej pracy sugerują małą przydatność surowych ekstraktów w badaniach nad rybonukleazami suchych ziarniaków metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Wszystkie cztery enzymy zawarte we frakcjach 1a, 1b, 2 i 3 wykazywały specyficzność substratową wobec RNA /tab. 1/. W oparciu o nomenklaturę Reddi'ego [13] i Wilsona [16] należy je sklasyfikować jako roślinne RNazy /E.C.3.1.4.23/.

LITERATURA

1. Barker G. R. and Bray C. M.: w ed. G. L. Farkas, "Nucleic Acids and Proteins in Higher Plants", Budapest, Akademiai Kiado, 1972, str. 61-68.
2. Barker G. R., Bray C. M. and Walter T. J.: Biochem. J. 1974, 142, 211-219.
3. Beevers L. and Splittstoesser W. E.: J. Exp. Bot. 1968, 19, 698-711.
4. Bennet P. A. and Chrispeels M. J.: Plant Physiol. 1972, 49, 445-447
5. Bradford M. M.: Anal. Biochem. 1976, 72, 248-254.
6. Chrispeels M. J. and Varner J. E.: Plant Physiol. 1967, 42, 398-406.
7. Davis B. J.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964, 121, 404-427.
8. Dove L. D.: Phytochemistry 1973, 12, 2561-70.
9. Ingle J.: Biochim. Biophys. Acta 1963, 73, 331-334.
10. Ingle J. and Hageman R. H.: Plant Physiol. 1965, 40, 48-53.
11. Jones R. L. and Price J. M.: Planta 1970, 94, 191-202.
12. Mierzwińska T.: Acta Soc. Bot. Pol. 1977, 46, 69-78.
13. Reddi K. K.: w ed. G. L. Cantoni and D. R. Davis, "Procedures in Nucleic Acid Research", New York, Harper and Row, 1966, str. 71-78.
14. Sutcliffe J. F. and Baset Q. A.: Plant Sci. Lett. 1973, 1, 15-20.
15. Tuve T. W. and Anfinsen C. B.: J. Biol. Chem. 1960, 235, 3437-41.
16. Wilson C. M.: Plant Physiol. 1968, 43, 1332-38.
17. Wilson C. M.: Plant Physiol. 1971, 48, 64-68.
18. Wilson C. M.: Ann. Rev. Plant. Physiol. 1975, 26, 187-208.

Э.Борышковска, Г.Цудны, М.Петшак

РИБОНУКЛЕАЗЫ СУХИХ СЕМЯН ЖЕЛТОГО ЛУПИНА

Р е з ю м е

Из сухих семян желтого люпина экстрагировано энзимы с активностью рибонуклеазы и разделяли их на пять фракции с использованием хроматографии DEAE Sepharose CL-6B и ультрагеля АсА 54. Три из полученных фракции содержали единичные энзимы специфические для рибонуклеазы. Результаты электрофореза в полиакрилоамидном геле указывают на образование агрегатов этих энзимов при применении неочищенных препаратов.

E. Borzyszkowska, H. Cudny, M. Pietrzak

RIBONUCLEASES IN DRY SEEDS OF YELLOW LUPINE

Summary

Enzymes of the RNase activity were extracted from dry seeds of yellow lupine and separated into five fractions using the chromatography of DEAE Sepharose CL-6B and Ultrigel AcA 54. Three of the fractions obtained contained single enzymes, specific towards RNA. Results of the electrophoresis in the polyacrilamide gel proved formation of aggregates of these enzymes at application of non-purified preparations.