

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

**ФИЗИОЛОГИЯ
РАСТЕНИЙ**

Том 28

№ 6

(ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК)

Саляев Р.К., Кузеванов В.Я., Хаптагаев С.Б., Копытчук В.Н.

Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений.

// Физиология растений. - 1981. - Т. 28, № 6. - С. 1295-1305.

Salyaev R.K., Kuzevanov V.Ya., Khaptaev S.B., Kopytchuk V.N. 1981.

Isolation and purification of vacuoles and vacuolar membranes from plant cells.

Soviet Plant Physiology, vol. 28, No. 6, p. 1295-1305.

МОСКВА - 1981

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Т о м 28, вып. 6

1981г.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ВАКУОЛЕЙ И ВАКУОЛЯРНЫХ МЕМБРАН ИЗ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

**Р. К. САЛЯЕВ, В. Я. КУЗЕВАНОВ, С. Б. ХАПТАГАЕВ,
В. Н. КОПЫТЧУК**

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Академии наук СССР, Иркутск*

Описан метод механического выделения вакуолей путем разрезания растительной ткани в растворах, содержащих КС1 в качестве главного компонента. Предложены два способа выделения — микрообъемный (ручной) и макрообъемный (с помощью специального аппарата). Изучено влияние состава растворов выделения, рН и температуры на выход вакуолей и их стабильность в изолированном состоянии. Для очистки вакуолей использовали центрифугирование в градиенте плотности, составленном из 1,0 М КС1 и 1,8 М сахарозы. Подобраны условия для получения очищенной фракции вакуолярных мембран (тонопласта). Выход вакуолей при микрообъемном методе выделения составлял 800-1200 вакуолей с 1 см² площади среза, а при макрообъемном методе — 4-6 x 10⁸ вакуолей на 1 кг ткани красной столовой свеклы, что соответствовало 0,8-1,2% пигмента, выделявшегося из разрезанной ткани. Электронно-микроскопические исследования методами тонких срезов и криофрактографии показали, что фракция вакуолярных мембран однородна и состоит из везикул около 200 нм в диаметре с толщиной мембраны 95-105 Å. Чистота фракции, оцененная с помощью количественной электронной микроскопии, не ниже 91%. Микрообъемный метод опробован на различных органах более 40 видов культурных и дикорастущих растений.

Механический метод выделения — изолированные вакуоли — вакуолярная мембрана.

В исследовании биологических мембран успех работы во многом зависит от методики выделения необходимого количества достаточно чистой фракции. В последние годы исследователи все чаще обращаются к попыткам выделения вакуолярной мембраны — тонопласта. Помимо общего интереса к вакуолярным мембранам это обуславливается еще и возможностью получать мембраны не из гомогената, что затрудняет их очистку, а из предварительно очищенной фракции изолированных вакуолей.

Таким образом, общая задача складывается из двух этапов: выделения и очистки вакуолярной фракции, и выделения и очистки из этой фракции мембран вакуолей.

После первых попыток изолировать отдельные вакуоли путем разрезания плазмолизированной ткани, предпринятых еще Де Фризом [1], наблюдался длительный перерыв в разработке и усовершенствовании методов выделения вакуолей.

В получении больших количеств изолированных вакуолей наибольшие успехи достигнуты применительно к дрожжевым клеткам [2]. Эти методы включают предварительное получение протопластов (сферопластов) с последующим выделением вакуолей при осмотическом лизисе [3, 4], метаболическом лизисе [5, 6], механической дезинтеграции [7, 8], а также путем обработки веществами, разрушающими плазмалемму [9, 10].

Возможность выделения больших количеств интактных вакуолей появилась после разработки метода получения изолированных протопластов путем ферментативного лизиса клеточной стенки. Перенос изолированных протопластов корней томата в гипотоничный (0,1 М) раствор сахарозы, рН 6,0, приводил к их осмотическому набуханию и высвобождению интактных вакуолей. При этом часть протоплазматического материала оставалась прикрепленной к тонопласту [11]. Позднее Грегори и Кокинг [12] применили ряд прогрессивных модификаций этого метода для получения вакуолей из плаценты плодов томатов.

В этих работах была показана принципиальная возможность прямого выделения вакуолей из протопластов или плазмолизированной ткани. Однако фракция вакуолей была сильно загрязнена протоплазматическим материалом. Тем не менее, в разных модификациях этот метод использовался для получения изолированных вакуолей из листьев, стеблей, лепестков, тычиночных нитей, плодов [13—20]. Из различных тканей высших растений можно было получать достаточно большие количества изолированных вакуолей (до $1,4 \times 10^6$ — $2,5 \times 10^6$ вакуолей), что составляет 10—20% от исходного количества в протопластах. Однако практически во всех работах отмечалось, что полученные фракции содержали примесь различных органелл, а вакуоли несли на поверхности остатки цитоплазматических структур.

Следует отметить еще один способ изолирования вакуолей путем получения так называемых «вакуопластов» [21, 22]. При центрифугировании в ступенчатом градиенте плотности, протопласты, полученные ферментативным лизисом, разделялись на «вакуопласты» (вакуоли, покрытые плазмалеммой) и «субпротопласты» (остаток протоплазмы).

Однако наиболее предпочтительными, на наш взгляд, способами извлечения вакуолей являются прямые методы получения чистых вакуолей, не требующие дорогостоящих реактивов (пектиназ, целлюлаз, многокомпонентных буферных смесей и сред выделения) и сложного оборудования.

В настоящее время этим условиям в значительной мере удовлетворяет метод Лея и Брэнтона [23], который был взят нами за основу для дальнейшей работы.

Оригинальный метод Лея и Брэнтона заключается в следующем: ткань корня столовой свеклы нарезается при комнатной температуре при помощи специального устройства в растворе 1,0 М сорбита, 5 мМ ЭДТА, 0,1 мг/мл Na-2-меркаптобензотиазола, 50 мМ трис-НСl-буфера, рН 7,6. После отделения раствора ткань вторично пропускается через нарезающий аппарат. Суспензии выделившихся вакуолей объединяются и центрифугируются 10 мин при 2000 g. Осадок, содержащий вакуоли, ресуспендируется в 15%-ном растворе метризида (2-[3-ацетиламино-до-5-N-метилацетиламино-2, 4, 6-триидбензамидо]2-дезоксиглюкоза) в 1,5 М сорбите, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-НСl-буфере, рН 7,6. Затем на суспензию наслаиваются растворы 10%- и 2,5%-ного метризида в 1,5 М сорбите и чистый 1,5 М сорбит. Градиент центрифугируется 10 мин при 650 g и вакуоли собираются с границы 2,5%- и 10%-ного метризида. Для концентрирования вакуолей собранная фракция разбавлялась двумя объемами 1,5 М сорбита и повторно центрифугируется 10 мин при 650 g. Световая и электронная микроскопия, а также биохимические тесты показали, что фракция, кроме вакуолей, содержала ядра и некоторые другие органоиды, но, тем не менее, по чистоте не уступала фракциям, полученным осмотическим лизисом протопластов [13, 18]. Несмотря на низкую эффективность извлечения вакуолей из ткани (около 0,2% пигмента бетанина, вышедшего из ткани при разрезании, присутствовало в вакуолях), метод дает возможность получать значительное количество вакуолей (до 107—108) за счет быстрой переработки большого количества исходного растительного материала [24].

Однако применение сорбита и метризида при переработке больших количеств материала значительно удорожает и усложняет выделение вакуолей. Поэтому мы сочли полезным разработать такую модификацию метода выделения вакуолей и вакуолярных мембран, которая позволяла бы обходиться более дешевыми и доступными реактивами. Необходимо также было оптимизировать целый ряд параметров выделения, таких, как время действия растворов выделения, их концентрация, кислотность, температура. Все эти вопросы рассматриваются в предлагаемой вниманию статье.

МЕТОДЫ И АППАРАТУРА

В опытах использовали в основном корнеплоды красной столовой свеклы (*Beta vulgaris* L., сорт Бордо), плоды огурца (*Cucumis sativus* L., сорт ТСХА-2), а также ряд других растений.

При отработке методики и оптимизации некоторых параметров выделения не обязательно проводить выделение вакуолей в больших объемах. Поэтому мы применили два метода изолирования вакуолей — ручной и механический, которые в дальнейшем для удобства будут называться микрообъемным и макрообъемным методами.

При микрообъемном методе высеку ткани (длина 20 мм, диаметр 8 мм) нарезали лезвием безопасной бритвы на 15 пластинок в чашке Петри с 10 мл раствора выделения. Кусочки ткани удаляли, суспензию вакуолей переносили в 12-мл стеклянные конические пробирки и центрифугировали 3 мин при 50 g. Вакуоли, осевшие на дно, осторожно ресуспендировали в 0,5 мл надосадочной жидкости, затем часть суспензии вносили в камеру Фукса-Розенталя и подсчитывали количество вакуолей. Этот метод использовали для изучения влияния концентрации раствора выделения, рН и температуры на выход вакуолей, а также для определения стабильности вакуолей во времени в различных условиях.

Макрообъемный метод выделения заключался в механической нарезке около 400 г ткани с помощью специального аппарата (конструкция нарезающего аппарата и работа с ним описаны ниже) в 800 мл среды выделения. Раствор с нарезанной массой ткани пропускали через сито с капроновой планктонной сеткой (130 меш) для отделения суспензии выделившихся вакуолей от кусочков ткани. Суспензию разливали в две пластмассовые 500-мл центрифужные пробирки. Все последующие операции проводили при 4—5°. Вакуоли осаждали центрифугированием 10 мин при 250 g и осадки использовали для дальнейшей очистки от примесей клеточных органелл. Этот метод применялся уже после подбора оптимальных условий выделения при помощи микрообъемного метода и служил для отработки окончательной методики изолирования вакуолей и тонопласта, пригодной для препаративных целей.

Оценку эффективности макрообъемного выделения вакуолей из ткани красной свеклы проводили по содержанию красного пигмента (бетацианина) во фракциях вакуолей и надосадочной жидкости, определяя оптическую плотность образцов при длине волны 540 нм.

Фракцию вакуолей наблюдали и фотографировали с помощью светового микроскопа NU-2 («Carl Zeiss», DDR).

Для изучения стабильности изолированные вакуоли помещали в герметичную микрокамеру и следили под микроскопом за их изменениями во времени.

Для изучения ультраструктуры методом тонких срезов изолированные вакуолярные мембраны заключали в агар-агаровые микрокапсулы [25] и фиксировали при 15 мин 2%-ным глутаровым альдегидом, 1%-ной четырехокисью осмия с дофиксацией 2%-ной танниновой кислотой [26]. Все фиксаторы готовили на 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,4. После обезвоживания в этаноле объекты заливали в аралдит по стандартной

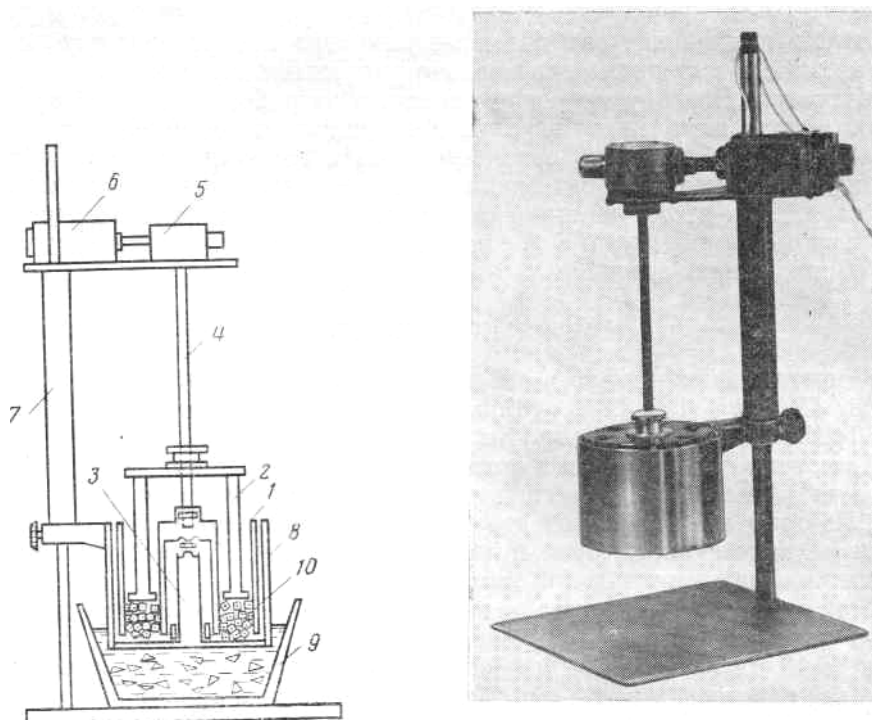


Рис. 1. Схема (А) и внешний вид (Б) нарезающего аппарата

1 — барабан с ячейками, в который загружается растительная ткань, 2 — пресс, 3 — основание с бритвенными лезвиями, 4 — шток, 5 — редуктор, 6 — электромотор, 7 — штатив, 8 — защитный цилиндр, 9 — чашка со средой выделения для сбора нарезанной ткани, 10 — растительная ткань

методике. Срезы контрастировали 2%-ным уранил-ацетатом на 70%-ном спирте и цитратом свинца по Рейнольдсу [27].

Криофрактографию фракций проводили с помощью аппарата ВАФ-300 («Balzers»). Электронно-микроскопические исследования тонких срезов и реплик проводили на микроскопах ЭМВ-100Л и JEM-100СХ. Чистоту фракции изолированного тонопласта оценивали с помощью многоцелевой тестовой системы коротких отрезков по методике [28].

Конструкция нарезающего аппарата и работа с ним. Для выделения препаративных количеств вакуолей лучше всего использовать аппарат, в основу конструкции которого положена схема, опубликованная Леем и Брэнтоном [23].

Не изменяя принципа конструкции узла для нарезания ткани, мы применили следующую компоновку (рис. 1). Аппарат выполнен из нержавеющей стали, питается от сети переменного тока 220 В через регулирующий автотрансформатор.

Кусочки растительной ткани (400—450 г) загружаются в ячейки барабана 1. При вращении барабана (80—120 об/мин) кусочки ткани постепенно подаются с помощью пресса 2 к лезвиям безопасных бритв, закрепленных под углом 15° в прорезях основания 3, и тонкие пластинки разрезанной ткани (0,1—2 мм толщиной) падают в чашку со средой выделения 9. Скорость нарезания ткани можно регулировать, изменяя скорость вращения до 250 об/мин, лабораторным автотрансформатором, питающим электромотор (ДШС-2, 220 В, 40 Вт, 5000 об/мин) с редуктором (передаточное число 20). Производительность одного аппарата при разрезании ткани корнеплода свеклы составляет 8—10 кг/ч.

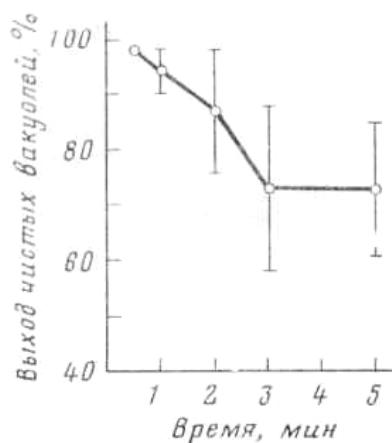
Условия выделения, выход и стабильность вакуолей. Из сред различного состава наиболее перспективными для выделения вакуолей из

мезокарпа огурца и корнеплодов свеклы оказались 1,0—1,5 М КС1 и КN0₃. Растворы на основе NaCl, K₂CO₃, мочевины, сахарозы, маннита и сорбита давали при выделении из предварительно плазмолизированной ткани от 20 до 70% примеси протопластов с различной степенью целостности. Добавление 10 мМ цитрата натрия или трилона Б уменьшало примесь протопластов до 10—20% (особенно в растворах КС1 и КN0₃). Поэтому растворы КС1 были взяты за основу для дальнейшей работы.

Доля чистых вакуолей (т. е. вакуолей без прикрепленной цитоплазмы) зависела от времени пребывания ткани в растворе выделения (рис. 2). Выход чистых вакуолей из мезокарпа огурца был максимален при обработке раствором не более 60 с и составлял 200—400 вакуолей с 1 см² площади среза. Выход вакуолей из корнеплода красной столовой свеклы при тех же условиях был в 2—3 раза выше.

Рис. 2. Зависимость выхода чистых вакуолей от времени пребывания ткани в растворе 1,25 М КС1, рН 7,0 (мезокарпа огурца)

% от общего количества выделившихся вакуолей и протопластов



Как видно на рис. 3 и 4, получение вакуолей существенно зависело от концентрации КС1 и температуры. При 5° выход вакуолей был примерно в 3 раза выше, а при 0—1° в 2—3 раза ниже по сравнению с выделением при комнатной температуре.

При исследовании влияния кислотности среды выяснилось, что при выделении микрообъемным методом выход вакуолей был максимален при рН от 8,0 до 9,0 (рис. 5). Таким образом, при микрообъемном методе удавалось получать 10³—10⁴ вакуолей в течение 10 мин.

Фракция изолированных вакуолей огурца и свеклы представляет собой множество бесцветных и окрашенных (свекла) пузырьков, сильно преломляющих свет (рис. 6). Размеры изолированных вакуолей варьировали от 3 до 80 мк. Вакуоли из мезокарпа огурца были крупнее и иногда достигали более 120 мк в диаметре.

Вакуоли были способны накапливать нейтральный красный. В гипотонических растворах они набухали и лопались, а в гипертонических сжимались, сохраняя правильную сферическую форму, т. е. вели себя как типичные осмотические ячейки.

Изолированные вакуоли — нежные образования и разрушаются на всех этапах выделения и очистки. В специальных опытах было установлено, что вакуоли наиболее стабильны при пониженной температуре и при значениях рН, близких к нейтральным. Они быстро разрушались в кислых и сильнощелочных средах, а также при температуре выше 30°.

Вакуоли красной столовой свеклы при комнатной температуре (18—22°) были наиболее стабильны при рН 7,3—7,8. При рН 7,4 половина общего количества вакуолей разрушалась за 7—9 ч, при рН 6,0 (кислотность вакуолярного сока) период полураспада составлял около 1 ч, а при рН 8,2 был равен 2—3 ч. Интересно, что хранение при рН

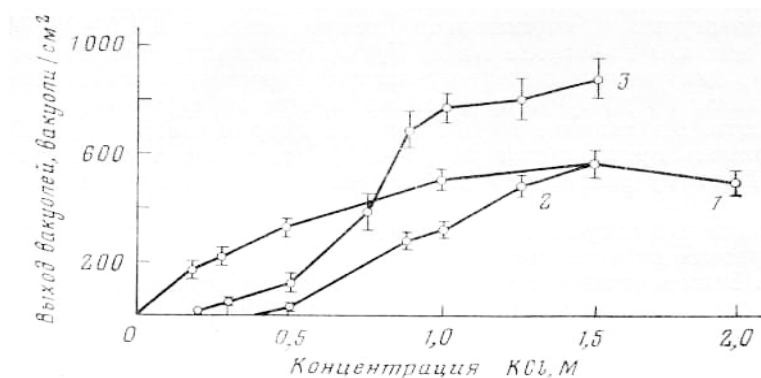


Рис. 3. Влияние концентрации КС1 на выход вакуолей с 1 см² площади среза ткани

1 — мезокарп огурца при 23°, рН 7,0; —запасяющая ткань корнеплода красной столовой свеклы при 0° (2) и 23° (3), рН 8,0

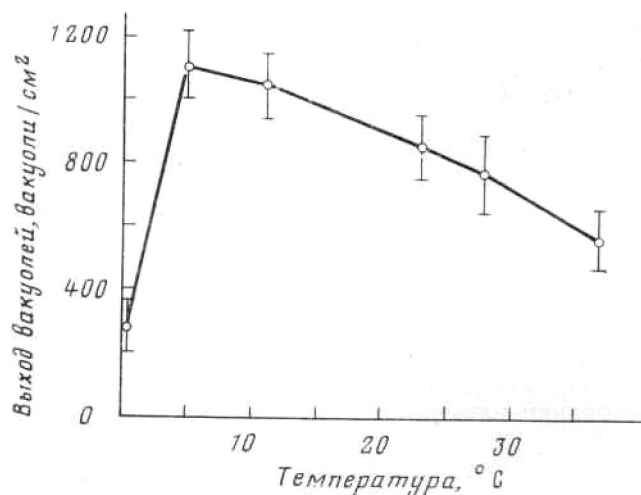


Рис. 4. Влияние температуры на выход вакуолей из запасяющей ткани корнеплода красной столовой свеклы

Состав раствора выделения: 0,88 М КС1, 20 мМ ЭДТА, 50 мМ трис-НС1, рН 8,0

7,4 в растворе 1,0 М КС1 сохраняло окраску вакуолей и их размеры практически не изменялись в течение суток, что свидетельствует о сохранении полупроницаемости у вакуолярной мембраны.

В заключение можно сказать, что результаты макрообъемного метода хорошо коррелировали с результатами выделения микрообъемным методом. Однако следует отметить, что после повторного нарезания ткани свеклы в растворе КС1 во фракции возрастала доля протопластов и субпротопластов (до 15%), а многие вакуоли несли на себе остатки цитоплазмы, поэтому во избежание дополнительного загрязнения вакуолей мы не стали дважды нарезать растительную ткань, как рекомендуют Лей и Брэнтон [23].

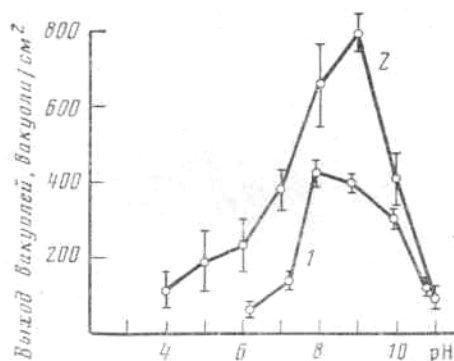
На основе всех рассмотренных материалов была выбрана среда выделения вакуолей, состоящая из 0,8 М КС1, 20 мМ ЭДТА — Na₂, 50 мМ трис-НС1, рН 8,0. Замена буфера на 50 мМ Na₂HP0₄—NaH₂P0₄ или 50 мМ NaH₂P0₄—KOH существенно не влияла на конечный результат.

Описанная методика давала возможность получать вакуолярную фракцию, содержащую примесь клеточных стенок, ядер и субпротопластов менее 1 % (по объему) для свежего растительного материала.

Дальнейшую очистку вакуолей осуществляли центрифугированием в ступенчатом градиенте плотности (1,050—1,200 г/см³, шаг градиента — 0,010 г/см³), составленном из смесей растворов 1,0 М КС1 и 1,8 М сахарозы, содержащих 5 мМ ЭДТА — 2Na, 20 мМ трис-НС1, рН 7,4. Для этого осадок вакуолей свеклы ресуспендировали в 1,0 М КС1 и градиент центрифугировали 20 мин при 1000 г. О локализации вакуолей судили по распределению окраски в градиенте с последующим контролем под микроскопом. Нашли, что плотность вакуолей составляла от 1,060 до 1,170 г/см³, однако вместе с вакуолями во фракцию переходила часть примесей.

Рис. 5. Выход вакуолей из мезокарпа огурца (1) и запасующей ткани корнеплода красной столовой свеклы (2) в зависимости от рН среды

Состав раствора выделения:
0,88 М КС1, 20 мМ ЭДТА, 50 мМ
NaH₂PO₄—КОН, рН 8,0



Наилучшим способом очистки оказался флотационный метод, при котором вакуоли ресуспендировали в 5—10 мл смеси растворов 1,0 М КС1 и 1,8 М сахарозы, имеющей плотность 1,175 г/см³, и сверху наслаивали такие же смеси с плотностями 1,150 и 1,050 г/см³ (5 мл). При центрифугировании такого градиента 10 мин при 125 г крупные вакуоли двигались вверх быстрее, чем примеси, и, следовательно, быстрее достигали седиментационного равновесия. Вакуоли собирались на границе плотностей 1,050—1,150 г/см³ в виде ярко-красной зоны, в то время как примеси не успевали подняться, из нижнего слоя. Согласно нашим данным, извлекаемость вакуолей очень сильно зависела от объема среды ресуспендирования. Наилучшие результаты давало ресуспендирование каждого исходного осадка в 10 мл среды, при этом извлекаемость по пигменту составляла около 50%.

Для концентрирования очищенных вакуолей достаточно было разбавить суспензию в 3 раза раствором 1,0 М КС1 и осадить центрифугированием при 125 г в течение 10 мин. Таким способом удавалось получать фракцию изолированных вакуолей с минимальным загрязнением (рис. 7).

Выход вакуолей из свежих корнеплодов красной столовой свеклы составлял до 4—6 × 10⁸ вакуолей/кг ткани. Они содержали 0,8—1,2% бетацианина выделявшегося из разрезанной ткани, против 0,2% по методу Лея и Брэнтона [24], что говорит о почти в 5 раз большем выходе вакуолей. После флотационной очистки выход вакуолей составлял 5—8 × 10⁷ вакуолей/кг ткани.

Качество, количество и размеры вакуолей сильно зависели от качества и условий хранения исходного материала и тщательного соблюдения всех деталей методики при выделении и очистке.

Вышеописанная методика оказалась пригодной для изоляции вакуолей из запасующей ткани корнеплодов сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. (рис. 8), а также из тканей других растений.

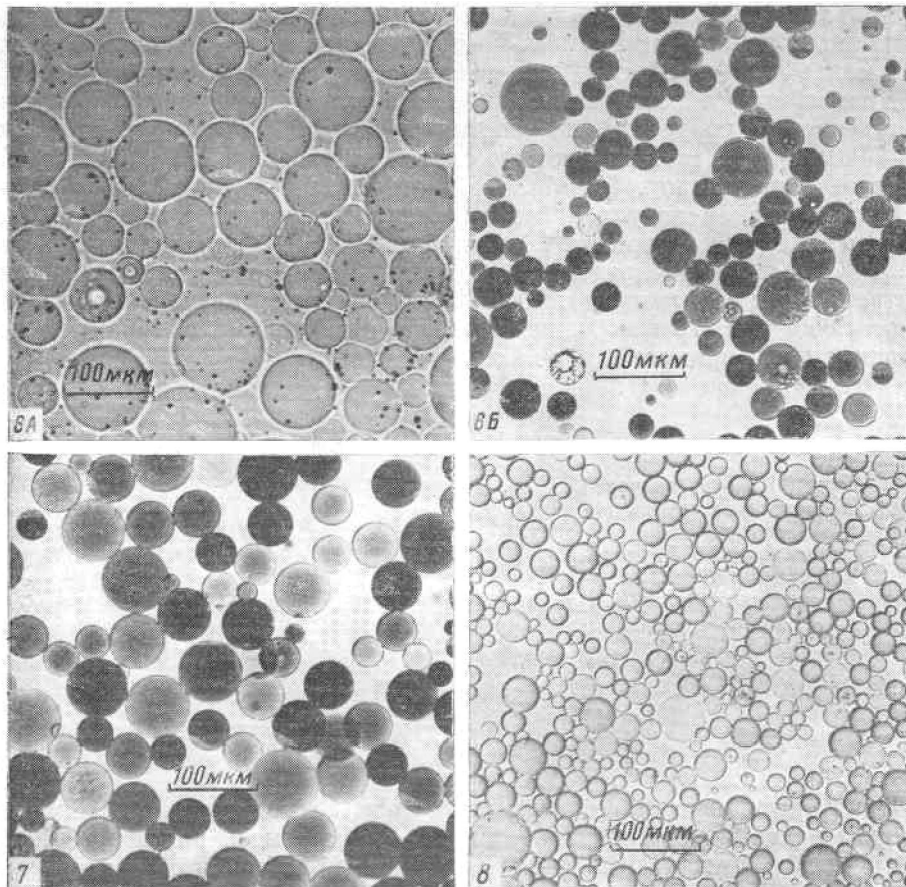


Рис. 6. Вакуоли, изолированные микрообъемным методом, из мезокарпа огурца (А) и запасующей ткани корнеплода красной столовой свеклы (Б)

Состав раствора выделения: 0,8 М КС1, 20 мМ ЭДТА, 50 мМ Na_2HPO_4 — КОН, pH 8,0. Темные точки — примесь других органелл, которые легко могут быть удалены дальнейшей очисткой

Рис. 7. Вакуоли запасующей ткани корнеплода красной столовой свеклы, изолированные макрообъемным методом и очищенные флотацией в ступенчатом градиенте плотности

Рис. 8. Вакуоли запасующей ткани корнеплода сахарной свеклы, выделенные микрообъемным методом в растворе Состав среды выделения: 0,8 М КС1, 20 мМ ЭДТА, 50 мМ Na_2HPO_4 — КОН, pH 8,0

Нами было испытано более 40 видов культурных и дикорастущих растений (картофель *Solanum tuberosum* L., редис *Raphanus sativus* L., морковь *Daucus sativus* (Hoffm.), томаты *Lycopersicon esculentum* Mill., дыня *Melo sativus* Sager, тыква *Cucurbita pepo* L., арбуз *Citrullus vulgaris* Schrad., кукуруза *Zea mays* L., пшеница *Triticum vulgare* L., одуванчик *Taraxacum officinale* L. s. l., элодея *Elodea densa* Casp. и др.) и практически из всех органов (корней, корневищ, колеоптилей, стеблей, плодов, листьев, лепестков) микрообъемным методом удавалось получать изолированные вакуоли. Однако эффективность выделения зависела от консистенции тканей. Например, выход вакуолей из тонких листьев был крайне низким, однако его можно было несколько повысить, свернув листовую пластинку в плотный рулон. Точно также удавалось получать вакуоли из нежных лепестков розы, плотно уложенных в бутоне. Из плотных листьев суккулентов выделялись крупные, но нежные вакуоли, которые быстро разрушались при переливании суспензии.

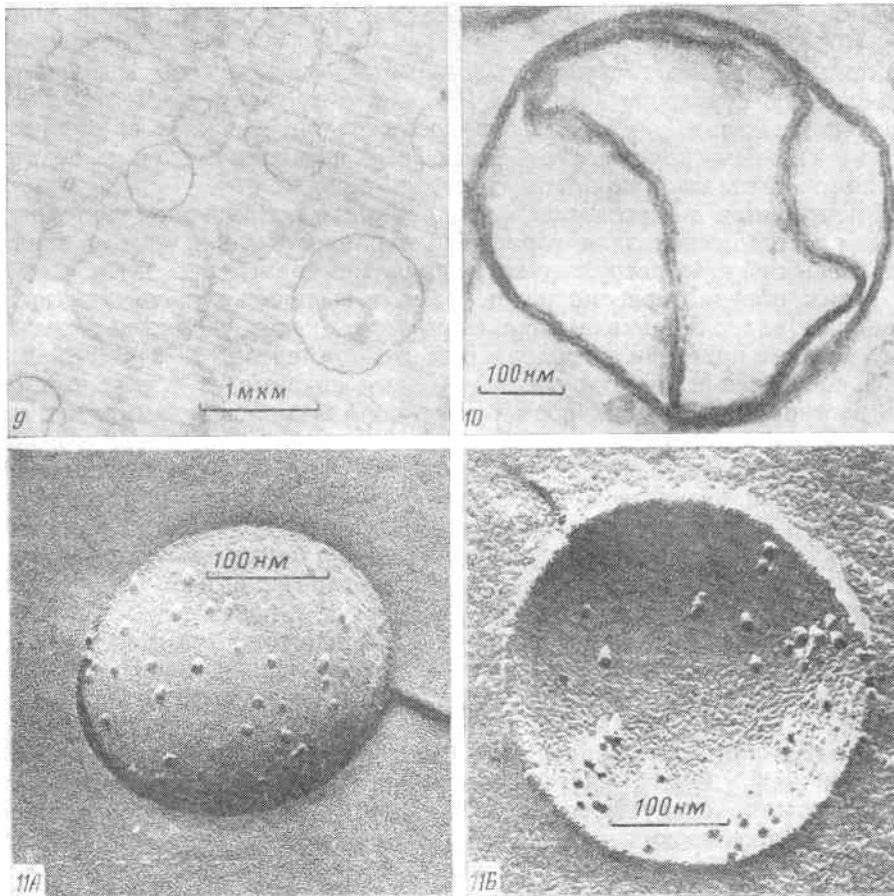


Рис. 9. Ультратонкий срез очищенной фракции вакуолярных мембран клеток корнеплода красной столовой свеклы

Рис. 10. Ультратонкое строение концентрической везикулы, изолированного тонопласта клетки корнеплода красной столовой свеклы

Рис. 11. Криофрактография везикул изолированного тонопласта клетки корнеплода красной столовой свеклы

А — выпуклый скол, Б — вогнутый скол

Получение изолированных вакуолярных мембран. Для получения тонопластов вакуолярную фракцию подвергали осмотическому шоку разбавлением в 10 раз осадка очищенной фракции вакуолей гипотоническим раствором (1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ трис- HCl , 1 мМ 2-меркаптоэтанол, рН 7,4), после чего проводили ультрацентрифугирование 60 мин при 60 000 g. Осадки тонопластов тщательно ресуспендировали гомогенизатором Поттера в свежем растворе при 0° и повторно центрифугировали в тех же условиях. В результате получали осадок вакуолярных мембран слизистой консистенции слабой желтовато-розовой окраски. При ресуспендировании осадка тонопластов получалась однородная сильно опалесцирующая суспензия молочно-белого цвета.

Осадок вакуолярных мембран в световой микроскоп представлял собой достаточно гомогенную фракцию без видимых в световой микроскоп примесей. Электронно-микроскопическое исследование фракции вакуолярных мембран выявило, что при данном способе выделения фракция состоит, преимущественно, из мембранных везикул (рис. 9), диаметры которых на тонких срезах имеют средние размеры около 200 нм, но встречаются везикулы до 1,5 мкм диаметром. Некоторые

везикулы образуют концентрические фигуры (пузырек в пузырьке, рис. 10).

Мембраны имеют толщину 95—105 Å и отчетливо выявляемую трехслойную структуру (см. рис. 10). Фракция не содержит значительного количества примесей. Специальные определения с помощью тестовой системы коротких отрезков [28] позволили оценить чистоту фракции тонопластов по объему мембран не ниже 91%.

Электронная микроскопия фракции тонопластов криофрактографическим методом показала хорошую сохранность липидного матрикса и белковых глобул, погруженных в толщу мембраны (рис. 11).

Таким образом, рассмотренный метод выделения и очистки изолированных вакуолей и вакуолярных мембран дает удовлетворительные результаты и пригоден для различных экспериментов.

Сопоставление его с другими методами показывает, что использование растворов КС1 и сахарозы вместо сорбита и метризиамида, помимо большей доступности и меньшей стоимости реактивов, имеет и некоторые другие преимущества. Использование КС1 в среде выделения за счет меньшей вязкости и плотности дает возможность проводить операции при более низких параметрах центрифугирования. Кроме того, как показали расчеты на основе табличных данных плотности и вязкости растворов метризиамида, сорбита, сахарозы и КС1, можно легко приготовить смеси растворов КС1 и сахарозы с почти такими же плотностью и вязкостью, как растворы метризиамида с сорбитом.

Вместе с тем, по нашим данным, выход вакуолей при выделении в растворах КС1 выше, чем при выделении в растворах на основе сорбита.

Однако при использовании КС1 следует иметь в виду, что этот агент может удалять часть периферических белков мембран и это обстоятельство следует, очевидно, учитывать при интерпретации результатов, так же как и при любых других методах изучения изолированных биомембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. *De Vries H.* Plasmolitische studien fiber die wand der vakuolen.— *Jahrb. Wiss. Bot.*, 1885, v. 16, S. 464.
2. *Wiemken A.* Isolation of vacuoles from yeast.— In: *Methods in cell biology*. New York: Acad. Press, 1975, v. 12, p. 99.
3. *Nakamura K. D.* The isolation of vacuoles from *Candida utilis*.— *Preparat. Biochem.*, 1973, v. 3, p. 553.
4. *Белов А. П., Давидова Е. Г., Рачинский В. В.* Выделение вакуолей из дрожжей *Candida tropicalis*.— *Микробиология*, 1976, т. 45, с. 852.
5. *Indge K. J.* The isolation and properties of the yeast cell vacuole.— *J. Gen. Microbiol.*, 1968, v. 51, p. 441.
6. *Schwencke J., De Robichon-Szulmajster H.* The transport of S-Adenosyl-L-methionine in isolated vacuoles and spheroplasts.— *Europ. J. Biochem.*, 1976, v. 65, p. 49.
7. *Wiemken A., Durr M.* Characterization of amino acids pools in vacuolar compartment of *S. cerevisiae*.— *Arch. Microbial.*, 1974, v. 101, p. 45.
8. *Boiler T., Durr M., Wiemken A.* Characterization of a specific transport system for arginine in isolated yeast vacuoles.— *Europ. J. Biochem.*, 1975, v. 54, p. 81.
9. *Schlenk F., Dainko J. L., Svihla G.* The accumulation and intracellular distribution of biological sulfonium compounds in yeast.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1970, v. 140, p. 228.
10. *Nagy M.* Studies on purine transport and on purine content in vacuoles isolated from *S. cerevisiae*.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 558, p. 221.
11. *Cocking E. C.* A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles.— *Nature*, 1960, v. 187, p. 962.
12. *Gregory D. W., Cocking E. C.* Studies on isolated protoplasts and vacuoles. I. General properties.— *J. Exptl Bot.*, 1966, v. 17, p. 57.
13. *Wagner G., Siegelman H. W.* Large-scale isolation of intact and fragile materials in agar microcapsules.— In: *Proc. IV Europ. Conf. Electron Microscopy*. Roma, 1968, v. 11, S. 37.
14. *Lin W., Wagner G., Siegelman H. W., Hind G.* Membrane-bound ATPase of intact vacuoles and tonoplasts isolated from mature plant tissue.— *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 465, p. 110.

15. *Butcher H. C., Wagner G. J., Siegelman H. W.* Localization of acid hydrolases in protoplasts.— *Plant Physiol.*, 1977, v. 59, p. 1098.
16. *Walker-Simmons M., Ryan C. A.* Immunological identification of proteinase inhibitors I and II in isolated tomato leaf vacuoles.— *Plant Physiol.*, 1977, v. 60, p. 61.
17. *Baser Ch., Matile Ph.* Malic acid in vacuoles isolated from *Bryophyllum* leaf cells.— *Z. Pflanzenphysiol.* 1977, B. 82, S. 462.
18. *Saunders J. A., Conn E. E.* Presence of the cyanogenic glucoside dhurrin in isolated vacuoles from Sorghum.— *Plant Physiol.*, 1978, v. 61, p. 154.
19. *Nishimura M., Beevers H.* Hydrolases in vacuoles from castor bean endosperm.— *Plant Physiol.*, 1978, v. 62, p. 44.
20. *Boiler T., Kende H.* Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells.— *Plant Physiol.*, 1979, v. 63, p. 1123.
21. *Zorz H., Harms C. T., Polrykus I.* Isolation of «vacuoplasts» from protoplasts of higher plants.— *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 1976, B. 169, S. 617.
22. *Guy M., Reinhold L., Michaeli D.* Direct evidence for a sugar transport mechanism in isolated vacuoles.— *Plant Physiol.*, 1979, v. 64, p. 61.
23. *Leigh R. A., Branton D.* Isolation of vacuoles from root storage tissue of *Beta vulgaris* L. - *Plant Physiol.*, 1976, v. 58, p. 656.
24. *Leigh R. A., Branton D., Marty F.* Methods for the isolation of intact vacuoles and fragments of tonoplast.— In: *Plant organelles*, Chichester, Ellis Horwood Ltd., 1979, v. 9, p. 69.
25. *Salyaev R. K.* A method of fixation and embedding of liquid and fragile materials in agar microcapsules.— In: *Proc. IV Europ. Conf. Electron Microscopy. Roma, 1968*, v. 11, p. 37.
26. *Wagner R. C.* The effect of tannic acid on electron images of capillary endothelial cell membranes.— *J. Ultrastruct. Res.*, 1976, v. 51, p. 132.
27. *Reynolds E. S.* The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy.— *J. Cell Biol.*, 1963, v. 17, p. 208.
28. *Шилов А. Г.* Общие принципы стереологии срезов.— В кн.: *Применение стереологических методов в цитологии*. Новосибирск: Наука, 1974, с. 11.

Поступила в редакцию
20.IV.1981

ISOLATION AND PURIFICATION OF VACUOLES AND VACUOLAR MEMBRANES FROM PLANT CELLS

*R. K. SALYAEV, V. Ya. KUZEVANOV, S. B. KHAPTAGAEV,
V. N. KOPYTCHUK*

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Siberian Branch*

Two methods are described for the isolation of vacuoles by cutting the plant tissue in solutions containing KCl as a main component. The effects of isolation medium composition, pH and temperature on the yield and stability of isolated vacuoles were studied. The step-density gradient centrifugation in 1.0 M KCl and 1.8 M. sucrose was employed for purifying vacuolar membranes (the tonoplast). By using the micromethod, the vacuole yield was 800—1200 vacuoles per 1 cm² of the cutting area, but with the macromethod it was 4—6 x 10⁸ vacuoles per 1 kg of beetroot tissue, which corresponded to 0.8—1.2% of the pigment released from the tissue cut. The thin-section and freeze-fracture electron microscope study showed that the fraction of vacuolar membranes was homogenous and composed of membrane vesicles of about 200 nm in diameter, the membrane thickness being 95—105 Å. The tonoplast fraction purity estimated by the quantitative electron microscopy was not lower than 91%. The micromethod was tested on various plant organs of over 40 species of cultured and wild plants.

Салыев Р.К., Кузеванов В.Я., Хаптагаев С.Б., Копытчук В.Н. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений // *Физиология растений*. - 1981. - Т. 28, № 6. - С. 1295-1305.

Salyaev R.K., Kuzevanov V.Ya., Khaptaev S.B., Kopytchuk V.N. 1981. Isolation and purification of vacuoles and vacuolar membranes from plant cells. *Soviet Plant Physiology*, vol. 28, No. 6, p. 1295-1305.