Kuzevanov V.Ya., Katkov B.B., Salyaev R.K. General principles of isolation of vacuoles and vacuolar membranes. In: Structure and function of biological membranes of plants. – Novosibirsk : Nauka, 1985. - p.93-107. http://bogard.isu.ru/articles/1985/vacuoles_general_principles_1985.pdf

Кузеванов В.Я., Катков Б.Б., Саляев Р.К. Общие принципы выделения вакуолей и вакуолярных мембран. В сб.: Структура и функции биологических мембран растений. – Новосибирск : Наука, 1985. - С.93-107. http://bogard.isu.ru/articles/1985/vacuoles_general_principles_1985.pdf

В. Я. Кузеванов, Б. Б. Катков, Р. К. Саляев

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ВАКУОЛЕЙ И ВАКУОЛЯРНЫХ МЕМБРАН

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО АН СССР, Иркутск

В настоящее время накоплен большой практический опыт получения изолированных вакуолей и вакуолярных мембран из многочисленных растительных организмов. Повышенный интерес к тонопласту и центральным вакуолям растений обусловлен двумя главными причинами: первая — это выяснение роли тонопласта и вакуолей в структурной н функциональной организации клетки и целого растения, вторая обусловлена возможностью их использования в области мембранной биологии для изучения фундаментальных проблем структуры, состава и функции биомембран [1].

Изолированная вакуоль является одной из простейших мембранных систем, не содержащей, в отличие от других объектов, цитоплазмы и состоящей из концентрированного раствора солей, углеводов, аминокислот, органических кислот и т. д., окруженного тонопластом, в котором локализуются основные системы трансмембранного транспорта этих веществ. Вакуолярная мембрана в этом случае выступает в качестве важного конечного барьера, контролирующего процесс переноса веществ в вакуоль, а главное, — удерживающего их там при хранении в запасающих органах [2]. Следовательно, изучение структуры, функции и свойств тонопласта и вакуолей может помочь понять цитологические механизмы формирования и функционирования запасающих органов, накапливающих большое количество веществ, которые составляют основную питательную ценность растений, возделываемых как источник пищевых продуктов и технического сырья.

Однако фактором, сдерживающим широкие исследования тонопласта и вакуолей, остается сложность их извлечения из клеток, во-первых, в чистом виде, а во-вторых, в большом количестве, достаточном для биохимических анализов. Известные методы извлечения вакуолей из растительных клеток, разработанные в основном для определения химического состава вакуолярного сока, из-за сложностей процедур выделения и очистки применимы к ограничен

ному кругу объектов. Поэтому в работе с тонопластом и вакуолями на первом плане задача достаточно надежного получения с помощью простых и быстрых способов как небольших, так и препаративных количеств вакуолей и вакуолярных мембран из разных растений.

Существуют два подхода для выделения тонопласта: 1) традиционный для выделения изолированных мембран, который включает гомогенизацию клеток и получение мембранных везикул в линейном или ступенчатом градиенте плотности, но он осложнен сопутствующими задачами идентификации; 2) специфичный и наиболее перспективный, состоящий в выделении и очистке вакуолей с последующим получением из них очищенного препарата везикул тонопласта.

Изолированные вакуоли можно получать из протопластов [3— 15] или непосредственно из клеток путем их механического разрезания [16—19]. Способы выделения центральных вакуолей из растительных клеток, использующиеся в настоящее время, схематично изображены на рис. 1. Однако при массовых выделениях во фракциях часто присутствуют заметные количества протопластов. Во всех случаях наиболее критическим моментом, от которого зависит успех выделения вакуолей, является, во-первых, использование условий, обеспечивающих разрушение плазмалеммы при сохранении целостности тонопласта, и, во-вторых, выбор режимов эффективной очистки вакуолей.

Следует отметить, что в литературе отсутствуют четко сформулированные общие принципы выделения вакуолей и вакуолярных мембран, применимые для большинства растений. Выделение и фракционирование вакуолей в каждом конкретном случае — это, скорее, перебор известных приемов. Поэтому наша задача заключалась в выработке общих принципов выделения и алгоритма работы с вакуолями и их мембранами.

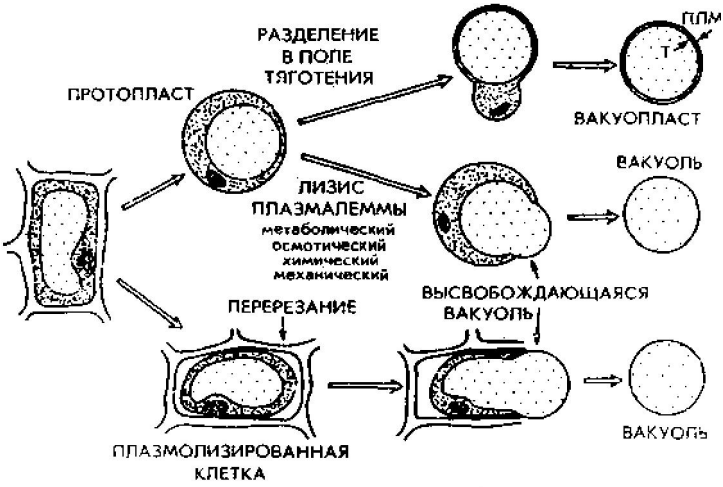

Рис. 1. Способы выделения вакуолей из клеток растений.
Т — тонопласт; ПЛМ—плазмалемма.

Получение вакуолей определяется в большинстве своем способностью плазмалеммы и тонопласта противостоять разрушению при заданных условиях среды, что обусловлено различием свойств этих пограничных мембран (табл. 1). Как показывают опыты по плазмолизу клеток столовой свеклы *(Beta vulgaris L.)* и огурца *(Cucumis sativus L.),* плазмалемма в отличие от вакуолярной мембраны неустойчива в сильнощелочных средах и в присутствии хелатирующих агентов. К тому же при быстром плазмолизе клеток в среде с высокой концентрацией KCl плазмалемма разрушается, тогда как центральная вакуоль остается целой.

При разрезании плазмолизированных клеток многие вакуоли сохраняют целостность и выходят в окружающий раствор, причем число чистых вакуолей (без протопластов и налипшей цитоплазмы) зависит от времени инкубации ткани в гипертонической среде. Например, выход чистых вакуолей из мезокарпа огурца максимален при обработке ткани раствором KG1 (0,8—1 М) не более 60 с и составляет 200—400 вакуолей с 1 $см^2$ площади среза, а из корнеплода столовой свеклы — в 2—3 раза выше [18]. Выход вакуолей существенно зависит от концентрации KCl, достигая максимума при 0,8—
1,5 М. При 5—10° выход вакуолей примерно в 1,5 раза выше, а при 0—1° в 2—3 раза ниже по сравнению с выделением при комнатной температуре [18]. При pH от 8 до 10 выход вакуолей максимален, причем в более щелочных условиях (pH 8—9) вакуоли получаются чище и не несут каких-либо органоидов или цитоплазмы на поверхности тонопласта, тогда как при кислотности ниже pH 7 во фракциях больше протопластов и практически все вакуоли несут на себе прикрепленные остатки цитоплазмы [18].

Наиболее чистые фракции изолированных вакуолей удается получать при разрезании клеток в концентрированных растворах KCl с pH 8, содержащих ЭДТА. Использование более кислых растворов, удаление из них хелата и уменьшение ионной силы, а также про-

Таблица 1

Сравнение устойчивости тонопласта и плазмалеммы при быстром плазмолизе клеток паренхимы корня столовой свеклы в различных средах

Условия плазмолиза	Плазмалемма	Тонопласт
0,8-1 М KCl, pH 6,8—7,0	Не изменяется	Не изменяется
1М KCl, pH 5,0—6,0	Стабилизируется	Разрушается
1М KCl, pH 7,4	Не изменяется	Стабилизируется
1М KCl, pH 8,0-9,0	Разрушается	Не изменяется
1М KCl, pH 7,4, 5—10 мМ $CaCl_2$	Стабилизируется	Разрушается
1М KCl, pH 7,4, 20 мМ ЭДТА	Разрушается	Не изменяется
1М KCl, pH 8,0, 50 мМ K_2HPO_4	Разрушается	Стабилизируется

должительный плазмолиз ведут к увеличению доли протопластов и субпротопластов и к усилению агрегации цитоплазмы на поверхности выделяющихся вакуолей.

Таким образом, наиболее оптимальными для большего выхода чистых вакуолей являются условия, способствующие разрушению плазмалеммы, но не дестабилизирующие вакуолярную мембрану, а именно:
1) использование высоких осмотических концентраций KCl (0,8— 1 М); 2) сокращение времени плазмолиза клеток (менее 60 с); 3) введение хелатирующих агентов в среду выделения; 4) использование щелочных буферных растворов (pH $\geqslant$ 8,0); 5) выделение при пониженной температуре (5—10°).

При этих условиях, с одной стороны, обеспечивается достаточно высокий выход чистых вакуолей, а с другой — они оказываются стабильными и почти не разрушаются в течение 10—15 мин, достаточных для подготовки вакуолей к дальнейшей работе или фракционированию.

Например, при макрообъемном нарезании свежей растительной ткани с помощью специального аппарата [18] в среде выделения, состоящей из 0,8 М KCl, 20 мМ ЭДТА, 50 мМ Трис-HC1, pH 8, выход вакуолей из жестких тканей (корнеплоды свеклы, турнепса и др.) достигает 10^7 — 10^8 вакуолей/кг ткани, из более мягких (огурец, арбуз, тыква и др.) — до 10^6 вакуолей/кг.

СТАБИЛИЗАЦИЯ МЕМБРАН ИЗОЛИРОВАННЫХ ВАКУОЛЕЙ

Изолированные вакуоли представляют собой весьма хрупкие образования, разрушающиеся на всех этапах работы с ними. Поэтому основная трудность, отмечаемая многими исследователями, заключается в выборе наиболее подходящего компромиссного режима очистки вакуолей от примесей, так как увеличение тщательности очистки и количества ее этапов могут свести на нет выход конечного продукта — чистой фракции вакуолей. Стабильность изолированных вакуолей, таким образом, является фактором, определяющим как успешность выделения больших количеств вакуолей и вакуолярных мембран, так и возможность проведения с ними различных цитологических и биофизических исследований.

Очевидно, что стабильность вакуолярной мембраны нужно различать в двух аспектах. С одной стороны, стабильность в смысле сохранения структурной целостности, т. е. как морфологического образования, а с другой — как способность сохранять барьерную функцию (полупроницаемость), т. е. одну из важнейших функций, выполняемых вакуолью в клетке. Самопроизвольное разрушение изолированных вакуолей (по уменьшению их числа и утечке компонентов вакуолярного сока) имеет экспоненциальный характер и может быть до некоторой степени уменьшено добавлением в раствор различного рода веществ, а также изменением условий среды. Нужно отметить, что изолированные вакуоли очень чувствительны к из-

менению осмотического давления среды и разрушаются при гипотонии, поэтому важным моментом работы с ними должно быть использование гипертонических сред.

Эксперименты показали, что стабилизирующее действие на мембраны изолированных вакуолей оказывают некоторые белки, восстановители и углеводы [20]. Максимальный эффект среди белков дают гемоглобин, альбумины (яичный, сывороточный человеческий и бычий), а также казеин и желатина, являющиеся преобладающими в плазме крови (сывороточные альбумины) или цитозоле эритроцитов (гемоглобин), а также в молоке (казеин), т. е. белками, определяющими свойства микроокружения пограничных мембран. Эти белки увеличивают период полураспада вакуолей до 3,2—6,4 ч по сравнению с 2 ч в контроле.

Из числа восстановителей наибольшее стабилизирующее действие оказывают 2-меркаптоэтанол, аскорбиновая кислота и дитиотреитол (период полураспада 3,2—3,8 ч), а среди углеводов— *агар-Бакто* и *Фиколл 400,* тогда как низкомолекулярные углеводы в основном малоэффективны [20].

Стабильность вакуолей при комнатной температуре сильно зависит от кислотности среды в физиологическом интервале pH 6—9. Они в значительной степени повреждаются при механическом перемешивании, и наибольший период полураспада при pH 7,3—7,7 составляет около 2,8 ч (рис. 2, *б),* тогда как без перемешивания – 4,6 ч (рис. 2, *а*). В присутствии стабилизирующих добавок (казеина, альбумина и аскорбиновой кислоты) существенно повышается как период полураспада изолированных вакуолей при оптимальном

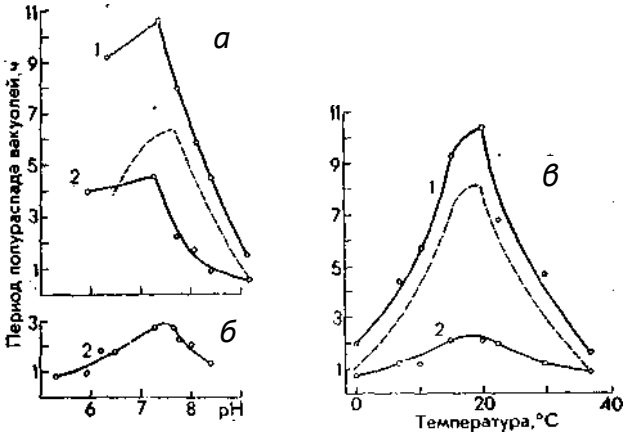

Рис. 2. Зависимость стабильности изолированных вакуолей красной столовой свеклы от pH среды (*а, б)* и температуры *(и)* в присутствии *(1)* и отсутствии (*2)* стабилизирующих добавок в условиях механического перемешивания (*б*) и без перемешивания (а, б).

Штриховой линией указан «чистый» аффект стабилизирующих добавок. Стабилизирующие добавки: казеин (0,1%), человеческий сывороточный альбумин (0,1%), аскорбиновая кислота (5 мМ). Состав среды: 1 М KCl, 50 мМ Трис-МЭС. pH-зависимость стабильности вакуолей определена при температуре 20—23° (*а, б*), а температурная — при pH 7,4 (*в*).

pH 7,4 (10,7 ч), так и заметно расширяются пределы pH, при которых вакуоли достаточно стабильны (рис. 2, *а).* Интересно, что «чистый эффект» стабилизирующих добавок (рис. 2, *а,* штриховая линия) наиболее сильно проявлялся при pH 7,3—7,8, т. е. при условиях большей адсорбции на поверхности тонопласта периферических белков [19]. Это увеличивает стабильность вакуолей и способность тонопласта к удерживанию компонентов вакуолярного сока (в том числе бетацианинов) внутри вакуолей, т. е. обеспечивает сохранение тонопластом барьерной функции — полупроницаем ости.

При варьировании температуры растворов от 0 до 37° (рис. 2, *в)* оказывается, что вакуоли нестабильны как при пониженной (период полураспада при 0—10° составляет 0,8—1,2 ч), так и при повышенной температуре (период полураспада при 30—37° составляет 0.8— 1,1 ч), а наибольшая стабильность наблюдается при 15—22° [21]. Стабилизирующие добавки в этом случае также повышают стабильность изолированных вакуолей при 15—22° (6,7—10,2 ч) и расширяют пределы температурной устойчивости вакуолей (рис. 2, *в*). Следует отметить, что перегиб кривой температурной стабильности вакуолей (15—22°) лежит в области температуры, оптимальной для роста корнеплодов свеклы и накопления сахаров в вакуолях [2] и, вероятно, связан с оптимальной работой тонопласта.

Комментируя эти результаты, заманчиво представить стабилизирующие добавки, но только в качестве веществ, упрочняющих мембрану, но и в роли регуляторов барьерной функции (полупроницаемости) вакуолярной мембраны, которую они выполняют аналогично натуральным цитоплазматическим белкам и восстановителям в живой клетке.

Использование условий, способствующих сохранению наибольшей стабильности изолированного тонопласта, позволяет повысить конечный выход очищенных вакуолярных мембран за счет уменьшения разрушения вакуолей на всех предшествующих этапах фракционирования и очистки.

Таким образом, следует подчеркнуть, что различие условий, оптимальных для выделения вакуолей и для их стабилизации, необходимо учитывать при работе с изолированными вакуолями и вакуолярными мембранами.

ОБЩИН ПОДХОД К ОЧИСТКЕ ВАКУОЛЕЙ. ПОЛУЧЕНИЕ ВАКУОЛЯРНЫХ МЕМБРАН

Среди существующих методов фракционирования компонентов клетки широко распространен метод центрифугирования в градиенте, при котором органеллы разделяются в зависимости от их удельной плавучей плотности в соответствующих средах [22]. Причем наиболее важным этаном в такой работе считается определение плавучей плотности изолированных органелл.

К общим принципам работы с вакуолями следует отнести и возможность теоретического прогнозирования состава растворов,

пенчатого или линейного градиента для получения максимального количества вакуолей или их субпопуляций с заданной плавучей плотностью. В основу этого может быть положено свойство вакуолей как осмотических ячеек [23], поведение которых удовлетворительно описывается уравнением Вант-Гоффа

$$P_0 V_0 = P_t V_t = \text{const}, \tag{1}$$

где V_0 и V_t — объемы вакуоли при осмотических давлениях P_0 и P_t соответственно. Полагая, что при извлечении вакуоли из клетки и при ее сжатии в гипертонической среде не происходит значительной утечки веществ вакуолярного сока наружу, а изменение объема вакуоли (AF) обусловлено только осмотическим выходом воды, запишем уравнение и преобразуем его в соответствии с формулой (1)

$$\Delta V = V_0 - V_0 = V_0 - V_0 \frac{P_0}{P_t} = V_0 \left(1 - \frac{P_0}{P_t}\right). \tag{2}$$

При осмотическом сжатии вакуоли в гипертонической среде вакуолярных сок концентрируется, поэтому соответственно возрастает его удельная плотность. Так как вакуолярная мембрана составляет крайне малую величину от общего объема вакуоли, ее вкладом в плавучую плотность вакуоли можно пренебречь и считать плавучую плотность целой вакуоли равной удельной плотности вакуолярного сока. Отсюда можно записать закон сохранения масс при осмотическом сжатии вакуоли

$$\rho_0 V_0 = \rho_t V_t + \rho_{H_2O} \Delta V \tag{3}$$

где ρ_0 — удельная плотность вакуолярного сока в интактной клетке; ρ_t — плотность вакуолярного сока в осмотически сжатой вакуоли; ρ_{H_2O} — удельная плотность воды. Подставляя уравнения (1) и (2) в (3), получим:

$$\rho_0 V_0 = \rho_t V_t \frac{P_0}{P_t} + \rho_{H_2O} V_0 \left(1 - \frac{P_0}{P_t}\right)$$

откуда путем преобразований получаем

$$\rho_t = \frac{P_t}{P_0}\left(\rho_0 - \rho_{H_2O}\right) + \rho_{H_2O} \tag{4}$$

где ρ_t — удельная плотность вакуоли при осмотическом давлении P_t; ρ_0 — удельная плотность вакуолярного сока в интактной клетке, имеющей собственное осмотическое давление P_0; ρ_{H_2O} — удельная плотность воды.

Представив осмотическое давление P_t через осмотическую концентрацию C_i, а также принимая плотность воды за 1 г/см^3, приведем уравнение (4) к виду, наиболее удобному для практического использования:

$$\rho_t = \frac{C_t}{C_0}(\rho_0 - 1) + 1 \tag{5}$$

где C_0 — осмотическая концентрация (осмоляльность) вакуолярного сока в клетке; C_t — осмотическая концентрация среды для вакуолей.

Таким образом, из уравнения (5) следует, что, зная средние величины удельной плотности и осмотической концентрации вакуолярного сока в клетках, можно оценить среднюю величину плавучей плотности изолированных вакуолей в среде с известной осмоляльностью. Так как центральная вакуоль, находящаяся в осмотическом равновесии с цитоплазмой, обычно занимает до 90% и более от объема зрелой растительной клетки, для практического определения величин ρ_0 и C_0 можно использовать сок, выжатый из растительной ткани известными способами [24].

Этот способ расчета плавучей плотности для фракционирования и очистки вакуолей, изолированных из различных растений, позволяет *a priori* без длительного и трудоемкого перебора вариантов градиентов составлять прописи ступенчатых градиентов плотности, обеспечивающие достаточно надежное получение препаративных количеств очищенных вакуолей из корнеплодов турнепса, столовой и сахарной свеклы, а также из плодов огурца (табл. 2).

Наиболее подходящим для фракционирования вакуолей и отделения примесей других органелл является способ флотационного центрифугирования в градиенте, составленном из трех слоев с разной удельной плотностью, когда в качестве нижнего слоя используется исходная загрязненная суспензия вакуолей (рис. 3, *а*). При центрифугировании такого градиента крупные вакуоли всплывают вверх быстрее, чем примеси, и, следовательно, быстрее достигают седимен-

Таблица 2

Использование теоретических расчетов для определения плавучей плотности изолированных вакуолей и составления градиентов при фракционировании вакуолей из различных растений

Растение	Выжатый сок		Расчетные параметры изолированных вакуолей		Плотность слоев градиента, г/см³			Выход вакуолей после очистки флотацией, вакуолей/кг ткани
	ρ_0 г/см³	C_0 осМ	ρ_t г/см³	C_t ОСМ	верхний	средний	нижний	
Свекла столовая — растущий корнеплод	1,025	0,435	1,105	1,820	1,050	1,150	1,175	5-8 x 10^7
Свекла столовая — хранящийся корнеплод	1,051	0,593	1,157	1,820	1,050	1,150	1,200	4-6 x 10^7
Спекла сахарная — хранящийся корнеплод	1,080	0,910	1,160	1,820	1,050	1,150	1,200	1-2-10^7
Турнепс — хранящийся корнеплод	1,028	0,470	1,108	1,820	1,050	1,150	1,200	До 1,5 • 10^7
Огурец — растущий плод	1,016	0,240	1,097	1,450	1,050	1,130	1,150	До 3-105

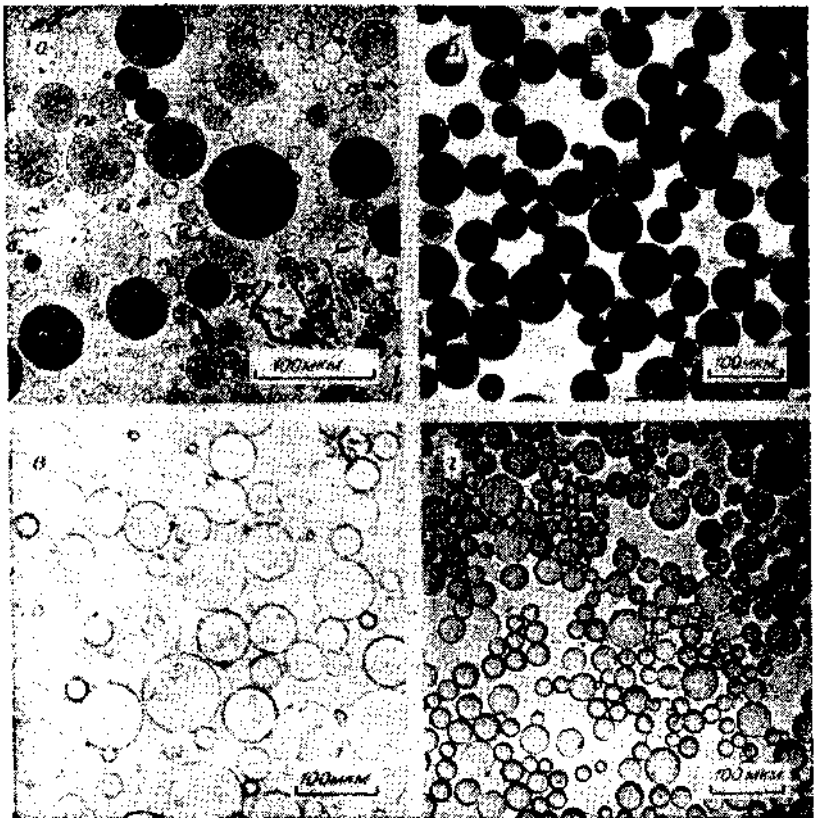

Рис. 3. Фракции вакуолей, изолированных из корнеплодов.

а — исходная фракция вакуолей столовой свеклы; б, в, г — вакуоли столовой свеклы, турнепса и сахарной свеклы, очищенные флотацией в ступенчатом градиенте плотности соответственно.

тационного равновесия на границе верхнего и среднего слоев (рис. 4, а). Эффективность получения очищенных вакуолей достигает 10^8 — 10^7 вакуолей из 1 кг ткани разных растений; этого количества достаточно для проведения экспериментов и анализов. При этом чистота фракций, оцениваемая под микроскопом, оказывается не ниже 95—98% (по объему), а в случае вакуолей из корнеплодов столовой и сахарной свеклы, а также турнепса (рис. 3, *б-г)* содержание примесей не превышает 1 %.

Дальнейшее получение фракции вакуолярных мембран из очищенных препаратов вакуолей не представляет сложности, поскольку изолированные вакуоли очень нежны и легко фрагментируются при осмотическом или механическом воздействии, в результате чего получается взвесь мелких везикул тонопласта в вакуолярном соке. Например, для получения везикул тонопласта применяют ультразвуковую обработку фракции вакуолей [8, 27], осмотический лизис

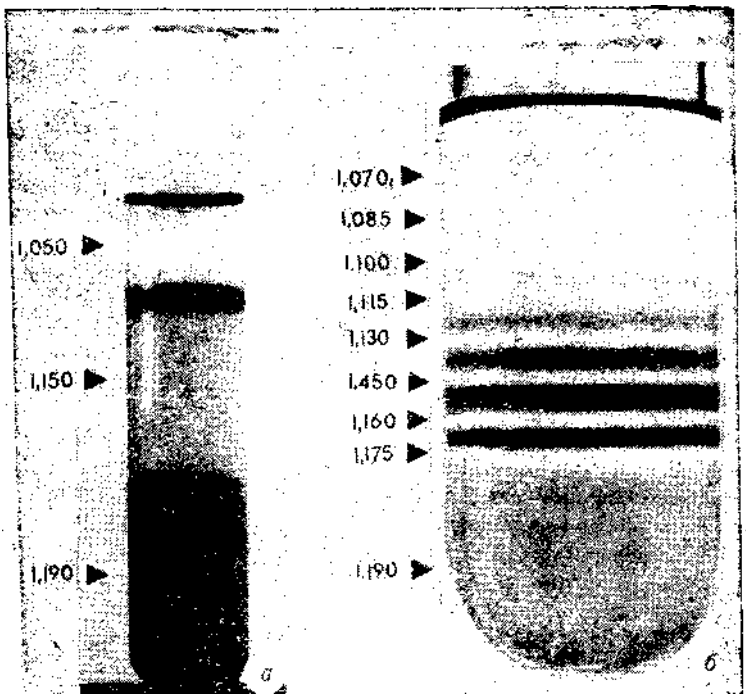

Рис. 4. Распределение изолированных вакуолей красной столовой свеклы после центрифугирования (10 мин, 125 g) в ступенчатом градиенте плотности при их очистке в трехслойном градиенте *(а)* или при разделении на субфракции в многослойном градиенте плотности в изотонических условиях *(б)* после флотации вакуолей из нижнего слоя. Цифры обозначают удельную плотность слоев градиента из смесей KCl и сахарозы.

[6, 18, 19, 28, 29], а также фрагментирование мембран вакуолей, «пермеабилизированных» гипотонией в процессе ультрацентрифугирования [5, 16, 17, 25]. Для отделения от вакуолярного сока и концентрирования везикул тонопласта суспензию мембран обычно ультрацентрифугируют при 60000—100000 g в течение 1—2,5 ч [6, 18, 19, 27, 28], а небольшие объемы суспензий — при 39 000 g в течение 30 мин. Однако получаемые препараты мембран содержат значительные количества вакуолярного сока, захваченного в полости везикул тонопласта, и примесные белки сока могут искажать картину биохимического состава вакуолярной мембраны [19, 25, 26].

Осадок вакуолярных мембран слизистой консистенции представляет собой достаточно гомогенную фракцию везикул тонопласта с чистотой не ниже 91% [18, 30]. Для более полного удаления компонентов вакуолярного сока основную фракцию тонопласта можно замораживать — оттаивать в большом объеме гипотонического раствора и промывать двойным центрифугированием [19]. В полученной фракции вакуолярных мембран присутствуют следовые количества компонентов вакуолярного сока (менее 10^{-5}% от их содержания в

Рис. 5. Ампула с лиофильно высушенным препаратом очищенных вакуолярных мембран (210 мг), выделенных из 480 кг запасающей паренхимы корнеплода столовой свеклы по методике [18, 19].

исходной фракции вакуолей). Такая методика получения вакуолярных мембран позволяет более полно освободиться от примесей и слабоудерживаемых компонентов и сохранить главные, которые, собственно, и формируют строму тонопласта.

Для проведения комплексных биохимических и цитологических исследований тонопласта требуются десятки и даже сотни-миллиграммов мембранного материала. Решить эту проблему можно, используя механический метод выделения вакуолей [16, 18] путем нарезания сотен килограммов растительного материала, в результате чего удается получить большое количество очищенных вакуолярных мембран (рис. 5).

О ГЕТЕРОГЕННОСТИ ВАКУОЛЕЙ

Рассмотренные принципы работы с вакуолями и теоретический расчет градиентов растворов вполне применимы, если используемая растительная ткань состоит из однородных клеток. В этом случае рассчитанная плавучая Плотность соответствует удельной плотности большинства вакуолей ткани. Однако дело обстоит иначе, если имеются различные популяции клеток. Такая гетерогенность вакуолей может сильно затруднить, во-первых, разработку методов выделения чистых фракций вакуолей, а во-вторых, осложнить применение уже имеющихся методик при переходе к новым растительным объектам.

Из литературы известно, что вакуоли, изолированные из разных растений, сильно различаются по плотности. Согласно опубликованным материалам, удельная плавучая плотность вакуолей может варьировать от 1,013—1,017 г/см^3 у вакуолей из лепестков петунии [15] до более 1,160 г/см^3 у вакуолей из эндосперма клещевины [8]. Кроме того, в большинстве работ упоминается, что даже популяции вакуолей, выделенные из одного органа или ткани растения, сильно различаются по размерам, содержанию пигментов и по плавучей плотности [3, 9, 12]. Даже у одних и тех же растений удельные плавучие плотности изолированных вакуолей неодинаковы. Например, вакуоли из листьев бриофнллума имели плавучую плотность более 1,105 г/см^3 [141 или в пределах 1,044—1,076 г/см^8 [7]; вакуоли из листьев ячменя — 1,016—1,023 г/см^3 [13] или 1,028—

Рис. 6. Денситограмма распределения изолированных вакуолей красной столовой свеклы (по бетацианину) в линейном изотоническом градиенте плотности из смеси растворов 1 М КС! и 1,377 М сахарозы.
а — из паренхимы зоны проводящей ткани! *б* — из межкольцевой паренхимы; *в* — вакуоли, выделенные из целого корнеплода. Видны два пика, относящиеся к популяциям «легких» («солевых») вакуолей (1,055 — 1,100 г/см“) и «тяжелых» («сахарных») вакуолей (1,120—1,170 г/см¹).

1,036 г/см³ [4]; вакуоли из листьев табака — 1,015—1,022 г/см³ [10] или 1,037—1,053 г/см³ [11].

Аналогично этому вакуоли, выделенные из запасающей паренхимы корнеплода красной столовой свеклы, также неоднородны и при центрифугировании в ступенчатом градиенте разделяются на ряд субфракций (рис. 4, б). Согласно теоретическим расчетам по формуле (5), можно ожидать максимального скопления вакуолей при плотности 1,157 г/см³ (см. табл. 2), следовательно экспериментальное определение плавучей плотности вакуолей *in vitro* показывает удовлетворительное соответствие с теоретическими расчетами. В этом случае рассчитанная плотность отражает среднее между удельной плотностью различных популяций вакуолей.

Нам удалось обнаружить, что при центрифугировании в изотоническом линейном градиенте вакуоли корнеплода разделяются поменьшей мере на две популяции — «легкую» (плотность 1,055—1,100 г/см³) и «тяжелую» (1,120—1,170 г/см³) (рис. 6, *а).* Очевидно, эти две популяции соответствуют морфологически различным зонам корнеплода. Опыты показали, что для межкольцевой паренхимы характерно большее содержание доли «легких» вакуолей (рис. 6, б),;а для паренхимы зоны проводящей ткани — «тяжелых» (рис. 6, *а).* Несомненно, такое различие связано с особенностями состава вакуолярного сока [31, 32], а именно, с преобладанием сахарозы в «тящелых» вакуолях («сахарные» вакуоли) и солей — в «легких» («солевые» вакуоли).

Таким образом, при выделении вакуолей из различных растительных тканей необходимо учитывать их гетерогенность, и в том числе «солевой» и «сахарный» статус.

* *
*

Итак, рассмотрены моменты, которые необходимо учитывать при работе с вакуолями, и сформулированы принципы, позволяющие достаточно надежно выделять вакуоли и их мембраны из различных растений.

Выделение вакуолей и работа с ними может строиться по определенной системе, учитывающей особенности используемого растительного объекта: 1) предварительный анализ ткани и ее зон (опреде-

ление удельной плотности и осмотического давления выжатого сока); 2) выбор условий, обеспечивающих максимальный выход и чистоту получаемых фракций вакуолей; 3) использование условий и сред, обеспечивающих стабильность мембран изолированных вакуолей и сохранение их свойств в течение длительного времени; 4) фракцио нироваиие вакуолей в изотоническом линейном градиенте плотности с целыо выявления их гетерогенности; 5) теоретический расчет удельной плотности изолированных вакуолей, учет данных фракционирования в линейном градиенте и в итоге составление подходящих прописей для их очистки.

По нашему мнению, предлагаемый алгоритм получения вакуолей из сочных растений с некоторыми модификациями может быть использован и для работы с другими органеллами, т. е. может иметь более общее применение.

Использование принципов, изложенных в статье, позволяет выделять достаточно стабильные и долгоживущие вакуоли, подходящие для цитологических исследований [30], биофизических экспериментов [33, 34], биохимических анализов состава вакуолярного сока [35, 36], а также для получения очищенных вакуолярных мембран в количествах, достаточных для рентгеноструктурного анализа [37], инфракрасной спектроскопии [38] и биохимических исследований [39].

Анализ публикаций, посвященных изучению изолированных вакуолей и вакуолярных мембран, показывает, что в последние годы наблюдается фаза экспоненциального увеличения их количества. Это можно расценивать как формирование нового, перспективного направления на стыке цитофизиологии с биохимией и биофизикой. Поэтому в ближайшие годы следует ожидать расширение спектра работ с использованием изолированных вакуолей и дальнейшее развитие приемов их выделения из растений. Особенно перспективным, с нашей точки зрения, является исследование структуры и функции вакуолярных мембран в связи с гетерогенностью вакуолей, играющих роль гомеостатических компартментов [40] в системе целого растения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Саляев Р. К. Изолированные вакуолярные мембраны — новый объект биофизических исследовании.— В кн.: Тез. докл. I Всесоюзного биофизического съезда 3—8 августа 1982, М.: Пущино, ОНТИ НЦБИ, 1982, с. 46—47.
2. Курсанов А. Л. Транспорт ассимилятов в растениях.— М.: Наука, 1976.— 646 с.
3. Wagner G. J., Siegelman H.W. Large-scale isolation of intact vacuoles and isolation of chloroplasts from protoplasts of mature plant tissues.— Science, 1975, v.190, N 4221, p. 1298—1299.
4. Lörz H., Harms C. T., Potrykus I. Isolation of «vacuoplasts» from protoplasts of higher plants.— Biochem. Physiol. Pflanzen, 1976, **v.** 169, N 4, p. 617 — 620.
5. Lin W., Wagner G. J., Siegelman H., Hind G**.** Membrane bound ATPase of intact vacuoles and tonoplasts isolated from mature plant tissue.— Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 465, N 1, p. 110—117.

6. Butcher H. C., Wagner L. J., Siegelman H. W. Localization of acid hydrolases in protoplasts. Estimation of the proposed lysosomal function of the mature vacuoles.— Plant Physiol., 1977, v. 59, N 6, p. 1098—1103.
7. Buser Ch., Matile Ph. Malic acid in vacuoles isolated from *Bryophyllum* leaf cells.— Z. Pflanzenphysiol., 1977, v. 82, N 5, p. 462—466.
8. Nishimura M., Beevers H. Hydrolases in vacuoles from castor bean endosperm.— Plant Physiol., 1978, v. 62, N 1, p. 44—48.'
9. Saunders J. A., Conn E. E. Presence of cyanogenic glucoside dhurrin in isolated vacuoles from *Sorghum*.— Plant Physiol., 1978, v. 61, N 1, p. 154— 157.
10. Boiler T., Kende H. Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells.— Plant Physiol., 1979, v. 63, N 6, p. 1123—1132.
11. Saunders J. A. Investigation of vacuoles isolated from tobacco. I. Quantitation of nicotine. — Plant Physiol., 1979, v. 64, N 1, p. 74—78.
12. Kringstad Ft., Kenyon W. H., Black C. C. The rapid isolation of vacuoles from leaves of *Crassulacean* acid metabolism.— Plant Physiol., 1980, v. 66, N 2, p. 379-382.
13. Ohlrogge J. B., Garcia-Martinez J. L., Adams D., Rappaport L. Uptake and subcellular compartmentation of Gibberellin A_t applied to leaves of barley and cowpea.— Plant Physiol., 1980, v. 66, N 3, p. 422—427.
14. Buser-Suter Ch., Wiemken A., Matile Ph. A malic acid permease in isolated vacuoles of *Crassulacean* acid metabolism plant.— Plant Physiol., 1982, v. 69, N 2, p. 456-459.
15. Jonsson L. N. V., Donker-Koopman W. E., Nitslager P., Schram A. W. Subcellular localization of anthocyanin methyltransferase in flowers of *Petunia hybrida*.— Plant Physiol., 1983, v. 72, N,2, p. 287—290.
16. Leigh R. A., Branton D., Marty **F.** Methods for the isolation of intact vacuoles and fragments of tonoplast.— In: Plant organelles: Methodological surveys (B), 1979, p. 69—80.
17. Marty F., Branton D., Leigh R. Plant vacuoles.— In: The biochemistry of plants. V. 1. New York: Acad. Press, 1980, p. 625—658.
18. Саляев Р. К., Кузеванов В. Я., Хаптагаев С. Б., Копытчук В. II. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений,— Физиология растений, 1981, т. 28, вып. 6, с. 1295—1305.
19. Саляев Р. К., Кузеванов В. Я., Озолина Н. В. и др. Содержание липидов, белков и углеводов в мембране изолированных вакуолей красной свеклы,— Физиология растений, 1982, т. 29, вып. 5, с. 933—940.
20. Кузеванов В. Я., Катков Б. Б., Кошкина С. В., Саляев Р. К. Влияние различных веществ на стабильность изолированных вакуолей растительных клеток,— В кн.: Оперативные информационные материалы СИФиБР СО АН СССР. Иркутск, 1983, с. 12—15.
21. Кузеванов В. Я., Катков Б. Б., Кошкина С. В., Саляев Р. К. Влияние температуры и pH среды на стабильность изолированных вакуолей растительных клеток,— В кн.: Оперативные информационные материалы СИФиБР СО АН СССР. Иркутск, 1983, с. 22—25.
22. Quail P. H. Plant cell fractionation.— Ann. Rev. Plant Physiol., 1979, v. 30, p-425—484.
23. Niedermeyer W., Parish **G.** R., Moor H. The elasticity of the yeast cell tonoplast related to its ultrastructure and chemical composition. I. Induced swelling and shrinking; a freeze-etch membrane study.— Cytobiologie, 1976, v. 13, N 3, p. 364—379.
24. Гусев Н. А. Некоторые методы исследования водного режима растений,— Л., I960.— 61 с.
25. Marty F, Branton D. Analytical characterization of beetroot vacuole membrane.- *J.* Cell. Biol., 1980, v. 87, No 1, p. 72-83.
26. Briskin D. P., Leonard R. T. Isolation of tonoplast vesicles isolated from tobacco protoplasts.— Plant Physiol., 1980, v. 66, N 4, p. 684—687.
27. Wagner G. J. Enzymic and protein character of tonoplast from *Hippeastrum* vacuoles.— Plant Physiol., 1981, v. 68, N 2, p. 499—503.
28. Leigh R**.** A., Walker P. P. ATPase and acid phosphatase activities associated with vacuoles isolated from storage root of red beet *(Beta vulgaris* L.).— Planta, 1980, v. 150, N 3, p. 222-230.

29. Walker R. R., Leigh R. A. Characterization of a salt-stimulated ATPase activity associated with vacuoles from storage roots of red beet *(Beta vulgaris* L.).- Planta, 1981, v. 153, N 2, p. 140-149.
30. Саляев Р. К., Хаптагаев С. Б., Кузеванов В. Я., Копытчук В. Н. Об ультраструктуре изолированных вакуолярных мембран, — Цитология, 1983, т. 25, № 6, с. 643-648.
31. Хаптагаева Е. А., Корзун А. М., Саляев Р. К. Радиальное распределение ионов и бетанина в ткани корнеплода красной столовой свеклы.— В кн.: Оперативные информационные материалы СИФиБР СО АН СССР. Ч. 2: Иркутск, 1982, с. 13—16.
32. Саляев Р. К., Пузанова Н. А., Лобохо С. В. Неравномерное распределение метаболитов в корнеплоде красной столовой свеклы,— В кн.: Оперативные информационные материалы СИФиБР СО АН СССР. Иркутск, 1983, с. 15—18.
33. Корзун А. М., Саляев Р. К., Кузеванов В. Я. Особенности электрофизиологических исследований вакуолярной мембраны клеток высших растений,— Физиология растений, 1984, т. 31, вып. 2, с. 213—221.
34. Корзун А. М., Кузеванов В. Я. Техника крепления изолированных вакуолей на микропипетке для исследования физических свойств тонопласта. Наст. сб.
35. Пузанова Н. А., Пузанов В. И., Саляев Р. К. Буферная емкость вакуолярного сока корнеплодов красной столовой свеклы *(Beta vulgaris* L.).— В кн.: Оперативные информационные материалы СИФиБР СО All СССР. Иркутск, 1982, с. 25—28.
36. Пузанова Н. А., Лобохо С. В., Козаренко Т. Д., Саляев Р. К. Изучение химического состава вакуолярного сока корнеплодов красной столовой свеклы.— В кн.: Оперативные информационные материалы СИФиБР СО АН СССР. Иркутск, 1982, с. 16—19.
37. Львов Ю. М., Фейгин Л. А. Изучение структуры некоторых биологических мембран с помощью рентгеновского малоуглового анализа.— 'В кн.: Тезисы III Советско-швейцарского симпозиума по биомембранам. Ташкент, 1983, с. . 99.
38. Макаренко С. П. О структуре тонопласта по данным ИК-спектроскопин,— Наст. сб.
39. Озолина И. В., Кузеванов В. Я., Каменкова Л. Д. и др. Особенности химического состава изолированной вакуолярной мембраны.— Наст. сб.
40. Саляев Р. К. Проблемы и перспективы изучения биологических мембран у растений.—Наст. сб.

Kuzevanov V.Ya., Katkov B.B., Salyaev R.K. General principles of isolation of vacuoles and vacuolar membranes. In: Structure and function of biological membranes of plants. – Novosibirsk : Nauka, 1985. - p.93-107. http://bogard.isu.ru/articles/1985/vacuoles_general_principles_1985.pdf

Кузеванов В.Я., Катков Б.Б., Саляев Р.К. Общие принципы выделения вакуолей и вакуолярных мембран. В сб.: Структура и функции биологических мембран растений. – Новосибирск : Наука, 1985. - С.93-107. http://bogard.isu.ru/articles/1985/vacuoles_general_principles_1985.pdf