

УДК 576.314:582.736.3

ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТІВ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ З КОРЕНІВ ГОРОХУ МЕТОДОМ ДВОФАЗОВОЇ ВОДНО-ПОЛІМЕРНОЇ СИСТЕМИ

Д. О. Климчук, І. М. Куриленко, Т. В. Воробйова, В. Д. Дубовой

Отримання препаратів цитоплазматичної мембрани з коренів гороху методом двофазової водно-полімерної системи. — Д. О. Климчук¹, І. М. Куриленко¹, Т. В. Воробйова¹, В. Д. Дубовой². — З клітин коренів проростків гороху методом розділення мікросомальної фракції у двофазовій водно-полімерній системі отримано фракцію цитоплазматичної мембрани з незначними домішками. Чистота отриманих препаратів оцінювалася за активністю маркерних ферментів та електронно-мікроскопічним аналізом специфічної реакції з кремній вольфрамовою кислотою. Виділені препарати представляють собою везикули цитоплазматичної мембрани, вивернуті цитоплазматичною стороною назовні, які зберігають АТФ-гідролітичну активність. Досліджені фактори, які сприяють підвищенню виходу препаратів цитоплазматичної мембрани.

Ключові слова: Цитоплазматична мембрана, двофазова водно-полімерна система, мікросомальна фракція, АТФ-гідролітична активність, маркерні ферменти.

Адреса: ¹Інститут ботаніки НАН України, 2, Терещенківська, Київ, 01601, Україна, ²Інститут біохімії НАН України, e-mail: microscopy@botany.kiev.ua

Isolation of plasma membranes from roots of pea seedlings by aqueous two-phase partition. — D. O. Klymchuk¹, I. N. Kurylenko¹, T. V. Vorobyova¹, V. D. Dubovoy². — The preparations of plasma membrane with high purity were obtained from roots of pea seedlings by aqueous two-phase partition. These preparations contained sealed plasma membrane vesicles with an insignificant contamination of other membranes. Obtained plasma membrane preparations were right-side-out vesicles that maintained the ATP-hydrolyzing activity. To obtain the membrane pellets with most volumes the separation procedures were optimized.

Key words: plasma membrane, aqueous polymer two-phase system, microsomal fraction, ATP-hydrolyzing activity, membrane markers

Address: ¹Institute of Botany of NASU, 2, Tereschenkivska St., Kyiv, 01601, Ukraine, ²Institute of Biochemistry of NASU, e-mail: microscopy@botany.kiev.ua.

Вступ

Цитоплазматична мембрана (ЦМ) найбільш диференційована в порівнянні з іншими клітинними мембранами. У вищих рослин вона відрізняється в межах клітин різних органів [2, 15], організація її внутрішньої поверхні відрізняється від зовнішньої. ЦМ виконує різноманітні функції в клітинному метаболізмі: бере участь в обміні речовин між клітиною та оточуючим середовищем, координує синтез та зборку целюлозних мікрофібрил клітинної оболонки, передає гормональні та зовнішні сигнали, які контролюють ріст та диференціювання клітин. Ці функції значною мірою визначаються специфічними молекулами, такими як рецептори, ферментні білки тощо. Важливим її ферментом, зокрема, є H^+ -АТФаза [17], яка представляє систему первинного активного транспорту рослинних клітин, забезпечує гідроліз АТФ та трансмембранний перенос протонів з цитозолу в апопласт. Вона також створює на мембрані електрохімічний градієнт, який функціонує як вторинний активний транспорт для проникнення іонів та розчинів проти градієнту концентрації. На активність ферментів ЦМ, впливають властивості ліпідного оточення [8, 18], яке виступає для них струк-

турною основою, бар'єром для іонів та гідрофільних молекул.

Зручною моделлю для дослідження ЦМ є везикулярні препарати, завдяки яким значно розширені уявлення щодо її структури та функцій. Вимоги до везикулярних препаратів полягають у відсутності домішок інших мембран, однорідності орієнтації, збереженні бар'єрних властивостей тощо. Препарати з відносно високим рівнем очищення від інших мембран дозволяє отримувати методом двофазової водно-полімерної системи, який ґрунтується на вибіркового концентруванні мембранних везикул в одній із фаз і відбувається завдяки незначним відмінностям в енергіях взаємодії їх поверхні з полімерними компонентами. Розподіл між фазами зумовлений як природою та властивостями полімерів, що утворюють фази, так і властивостями мембранних везикул: площею поверхні, її структурою, електричним зарядом, поверхневими реакційними центрами.

Мета даної роботи полягала в адаптації методу двофазової водно-полімерної системи для одержання препаратів ЦМ з коренів проростків гороху, відомості по яким в науковій літературі нам не відомі.

Матеріали і методи

Препарати ЦМ отримували з коренів 6 добових проростків гороху (*Pisum sativum* L., сорт Інтенсивний). Насіння гороху стерилізували 0,03 % розчином перманганату калію (20 хв) та 5 % розчином гіпохлориту (10 хв), залишали на 36 годин на вологому фільтрувальному папері. Проростки загортали у фільтрувальний папір у вигляді трубочок, поміщали у стакани, в які додавали 80 мл дистильованої води, інкубували в темряві при температурі 23 ± 1 °С. Для одержання мембранних препаратів брали наважки 45,0 г коренів приблизно з 350 проростків.

Отримання мікросомальної фракції з гомогенату. Для запобігання від підсихання, корені відокремлювали та подрібнювали на сегменти (~10 мм завдовжки) на паперових рушниках, розташовуваних на льоду. Корені швидко зважували, переносили в охолоджений буфер гомогенізації, який містив 50 мМ MOPS-KOH (pH 7,6), 0,25 М сахарозу, 5 мМ EDTA, 1,5 % (м/об) полівінілпіролідон, 1 мМ PMSF, 4 мМ саліцилгідроксамову кислоту, 10 мг/мл бутильованого гідрокситолуолу, 2,5 мМ $K_2S_2O_5$ та 0,5 % бичачого сироваткового альбуміну (Sigma), гомогенізували блендером Multiquick /Minipimer MR 404 (Type 4185). Після фільтрації гомогенат центрифугували (ЦВР-1, СССР) при 10 000 г впродовж 20 хв для осадження великих часток. Відокремлений супернатант центрифугували при 105 000 г впродовж 60 хв для одержання мікросомальної фракції.

Виділення цитоплазматичної мембрани з мікросомальної фракції. Препарати ЦМ одержували з мікросомальної фракції методом двофазової водно-полімерної системи, запропонованої Kjellbom та Larsson [9] з деякими модифікаціями згідно схеми, зображеної на рис. 1. Осад мембран мікросомальної фракції ресуспендували у 5 мМ фосфатному буфері (pH 7,8), що містив 0,25 М цукрозу, 2 мМ KCl, 1 мМ дітіотрейтол (ДТТ) та 0,1 мМ EDTA. 6 мл суспензії мікросомальних везикул змішували з 18 г фазової суміші декстрану Т 500 та поліетиленгліколю (ПЕГ) 3350 з кінцевою концентрацією 6,5 % (м/м). Отриману суміш перемішували, розділяли при 1500 г впродовж 5 хв на центрифuzі (РС-6, Росія) з плаваючим ротором для полегшення розділення фаз. 90% утвореної верхньої фази обережно відбирали і додавали до другої пробірки, що містила чисту нижню фазу (декстран Т 500). До залишку першої пробірки додавали чисту верхню фазу (пробірка №1', рис. 1). Перемішування і центрифугування повторювали. 90% верхньої фази з пробірки №2 переносили у пробірку №3, що містила чисту нижню фазу, а до її залишку додавали верхню фазу з пробірки №1', яка на рис. 1 відображена як №2'. Перемішування і центрифугування повторювали знову. Наостанку, 90% верхньої фази із пробірки №3 відбирали і позначали як V_3 згідно термінології [9], а до її залишку додавали верхню фазу з пробірки №2' і процеду-

ру перемішування і центрифугування повторювали учетверте. Утворену верхню фазу з пробірки №3, позначену на рис. 1 як V'_3 , об'єднували з V_3 , розбавляли 5мМ Tris-MES буфером (pH 7,0), що містив 0,25 М цукрозу, 2 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ та 5 мМ EDTA, центрифугували при 105000 г впродовж 60 хв. Отриманий осад ресуспендували у 5мМ Tris-MES буфері зазначеного вище складу, використовували для визначення АТФ-гідролітичної активності, або зберігали при -80 °С. Всі процедури виділення проводили при 3 ± 1 °С.

Оцінка чистоти фракції цитоплазматичної мембрани та орієнтації везикул. Для ідентифікації ЦМ, оцінки її забруднення іншими мембранами використовували специфічні маркери та електронну мікроскопію.

АТФ-гідролітичну активність визначали по простоту неорганічного фосфату впродовж 15 хв при 30 °С. Середовище інкубації містило 30 мкг білка, 5 мМ азиду натрію, 0,2 мМ молібдату амонію в 50 мМ Tris-MES буфері (pH 6,5). Реакцію запускали внесенням Mg-АТФ до кінцевої концентрації 3 мМ; зупиняли додаванням 1 мл 0,2 М ацетатного буферу (pH 4,2), що містив 0,15 % молібдату амонію та 0,5 % SDS. Кількість неорганічного фосфату визначали [12] за розвитком забарвлення з 0,2 мл $SnCl_2$ впродовж 10 хв. Після додавання 0,3 мл 2,2 % лимонної кислоти для попередження додаткового забарвлення внаслідок не ферментного гідролізу АТФ, вимірювали абсорбцію при 750 нм. Залежність АТФ-гідролітичної активності від pH середовища проводилася [1] при pH реакційної суміші 9,0.

Забруднення препаратів ЦМ іншими мембранами оцінювали по активності маркерних ферментів тонопласту (нітрат-чутлива АТФаза), ендоплазматичного ретикулуму (НАДФ-цитохром-с редуктаза, нечутлива до ціаніду), мітохондрій (цитохром-с оксидаза), везикул Гольджі (латентна ІДФаза) [5].

Орієнтацію везикул цитоплазматичної мембрани оцінювали по АТФ-гідролітичній активності в присутності 0,1 % детергенту Тритон Х-100 [11]. Загальний вміст білка в мембранних препаратах визначали за стандартним методом Бредфорда [4].

Для електронномікроскопічного дослідження мембранний осад змішували з 1,6 % розплавленого агару (pH 7,2, 40 °С) в приблизно однаковому співвідношенні (об/об) на предметному скельці. Після охолодження, затверділу краплину мембранної суспензії та зразки кореневого апексу фіксували та обробляли згідно загальноприйнятих в електронній мікроскопії процедур [10]. Ультратонкі зрізи (60 ± 10 нм) поміщали на золоті сітки, фарбували кремній-вольфрамовою кислотою [16], специфічною для ЦМ, або цитратом свинцю [14]. Морфометричний аналіз проводили згідно [20].

Отримані дані є середні величини п'яти незалежних експериментів, опрацьовані статистично.

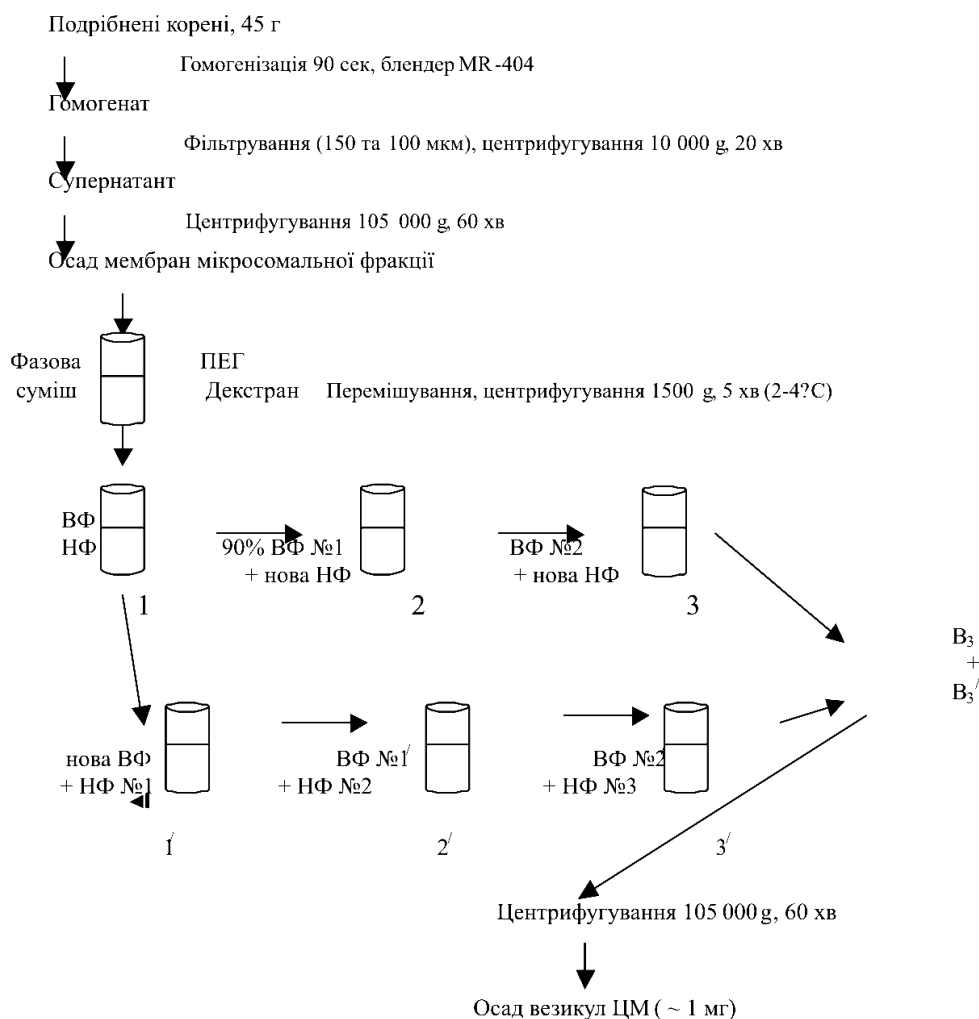


Рис. 1. Схема виділення ЦМ з коренів проростків гороху методом двофазової водно-полімерної системи. ВФ – верхня фаза (В₃, В₃'); НФ – нижня фаза

Таблиця 1. АТФ-гідролітична активність мембранних фракцій клітин коренів гороху в присутності різних субстратів, мкмоль $\Phi_{\text{неорг}}$ мг білка⁻¹ год⁻¹

Субстрат	Фракція ЦМ	Мікросомальна фракція
Повна інкубаційна суміш, рН 6,5	20,96±1,71	9,93±0,59
Інкубаційна суміш без КСl	17,91±1,00	9,28±0,91
Повна інкубаційна суміш „+” лізофосфатиділхолін	23,48±1,07	10,72±1,18
Повна інкубаційна суміш, рН 9,0	1,48±0,05	1,0±0,01
Повна інкубаційна суміш „+” ортованадат натрію	10,3±1,74	4,97±0,48
Повна інкубаційна суміш „+” Тритон X-100	21,61±1,00	—

Примітка. Повна інкубаційна суміш: 50 мМ КСl; 30 мкг мембранного білку, 5 мМ азиду натрію, 0,2 мМ молібдату амонію та 50 мМ Трис-MES, рН 6,5; 3мМ Mg-АТФ.

Таблиця 2. Активність маркерних ферментів не цитоплазматичних мембран у фракціях ЦМ та мікросомальних мембран, отриманих з клітин коренів гороху

Фермент	Фракція ЦМ	Мікросомальна фракція
NO ₃ ⁻ -чутлива, Mg-залежна АТФаза, мкмоль $\Phi_{\text{неорг}}$ мг білка ⁻¹ год ⁻¹	1,37±0,11	4,93±0,08
НАДФН-цитохром-с редуктаза, нечутлива до цианіду, нмоль цит с мг білка ⁻¹ хв ⁻¹	52,0±3,94	46,2±3,25
Цитохром с оксидаза, нмоль цит с мг білка ⁻¹ хв ⁻¹	0,00	0,202±0,02
Латентна ІДФаза, мкмоль $\Phi_{\text{неорг}}$ мг білка ⁻¹ год ⁻¹	0,79±0,09	1,58±0,13

Результати досліджень

Кожен етап процедури виділення ЦМ методом двофазової водно-полімерної системи, представленої на рис. 1 має значення для якості і кількості одержуваного препарату. В зв'язку з цим нами досліджувався вплив деяких етапів процедури виділення на ефективність виходу мембранних препаратів. Зокрема, оцінювалася ефективність різних термінів гомогенізації коренів блендером Multiquick/Minipimer MR 404 (Type 4185, Іспанія) при 14000 об/хв. Більший об'єм мембранних осадів одержували при гомогенізації тривалістю 90 с в порівнянні з 60- та 30 с. Досліджувалася також ефективність різних типів фільтрації гомогенату, завдяки якій видаляються обривки зруйнованих тканин, великі уламки клітинних стінок тощо. Було випробувано три типи фільтрів: чотири шари марлі, два шари бязі та нейлонова тканина з розмірами пор 150 та 100 μm . Мембранні осадки більшого об'єму також одержували після подвійної фільтрації гомогенату через нейлонову тканину з фіксованим розміром пор 150 та 100 μm . Фільтрування гомогенату через чотири шари марлі або два шари бязі давало осадки меншого приблизно однакового об'єму.

Для підвищення ефективності виходу мембран з супернатанту досліджували два типи центрифугування: 105 000 г впродовж 60 хв (УЦП2-85, Україна) з кутовим ротором та 80 000 г впродовж 60 хв (УЦП-35, Україна) з плаваючим бакет-ротором. Обидва типи центрифугування давали компактні осадки, які, за даними електронномікроскопічних досліджень, характеризувалися типовою гетерогенністю везикул по розмірам без домішок незамкнутих ламелярних мембранних фрагментів чи клітинних органел таких як мітохондрії. Проте мембранні препарати, отримані при центрифугуванні 105 000 г відзначалися відносно більшим об'ємом осадків.

АТФ-гідролітична активність препаратів мікросомальної фракції та, після розділення її методом двофазової водно-полімерної системи, - препаратів ЦМ представлена табл. 1. Видно, що АТФ-гідролітична активність препаратів ЦМ в більшій мірі ніж мембран мікросомальної фракції залежала від присутності в інкубаційному середовищі хлориду калію. Підвищення швидкості гідролізу АТФ в присутності лізофосфатидилхоліну була більш суттєва у препаратах ЦМ в порівнянні з мікросомальними. Ці дані вказують, що гідроліз АТФ в препаратах ЦМ міг бути зумовлений роботою Mg^{2+} -залежної, K^+ -активованої H^+ -АТФази, маркера ЦМ рослинних клітин [13]. Оскільки подібні АТФ-ази виявляються в інших мембранах – тонопласті, мітохондріях, ендоплазматичному ретикулуму, для ідентифікації останньої необхідна додаткова характеристика. Однією з властивостей H^+ -АТФази є залежність її функціонування від рН середовища. Проведені нами дослідження підтвердили, що максимум АТФ-гідролітичної активності припадав на рН 6,5, характерний для даного ферменту. Активність гідролізу АТФ при рН 9,0 зни-

жувалася в 20 разів в препаратах ЦМ і в 10 разів в препаратах мікросомальних мембран. Зниження активності гідролізу АТФ спостерігалось також в присутності в інкубаційному середовищі ортованадату натрію – специфічного інгібітору H^+ -АТФази (табл.1).

Вміст не цитоплазматичних мембран у досліджуваних препаратах оцінювали по активності маркерних ферментів мітохондрій, тонопласту, ендоплазматичного ретикулуму та апарату Гольджі. Розділення мембран у двофазовій водно-полімерній системі супроводжувалось зниженням у фракції ЦМ в порівнянні з мікросомальною активностей NO_3^- -чутливої, Mg -залежної АТФази та латентної інозин-дифосфатази - маркерних ферментів тонопласту та апарату Гольджі, відповідно (табл. 2). Активність цитохром с-оксидази, маркерного ферменту внутрішньої мембрани мітохондрій у фракції ЦМ не виявлялась зовсім.

АТФ-гідролітична активність препаратів ЦМ в присутності детергенту Тритон Х-100 підвищувалася лише на 3 %, вказуючи на те, що переважна більшість (97 %) везикул орієнтована цитоплазматичною поверхнею назовні (табл. 1).

Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що препарати ЦМ, отримані методом фазового розділення, характеризувалися гетерогенністю по розмірам везикул з середнім діаметром 0,1–0,4 μm (рис. 2, А, Б). Не менше 95% везикул, контрастованих кремній-вольфрамовою кислотою набували специфічного забарвлення (рис. 2, Б). Водночас, зрізи кореневого апексу, контрастовані кремній-вольфрамовою кислотою (рис. 2, Г), показують, що серед клітинних мембран забарвлення набуває лише цитоплазматична мембрана, специфічна до кремній-вольфрамової та фосфорно-вольфрамової кислоти [16], підтверджуючи цитоплазматичне походження везикул у препаратах ЦМ.

Обговорення результатів досліджень

Значна частина досліджень ЦМ була виконана на препаратах, отриманих за допомогою методу розділення мембран в концентраційному градієнті цукрози, запропонованого Ходжесом з співавторами [6]. Незважаючи на відносну простоту, цей метод дозволяє отримувати препарати, збагачених ЦМ, як правило, не більше, ніж на 75 %. Тому для вивчення структури та функцій ЦМ, першочерговим завданням є отримання відносно чистих препаратів. Метод виділення ЦМ за допомогою розділення у двофазовій водно-полімерній системі ґрунтується на відмінностях в енергії взаємодії мембранних поверхонь з полімерними компонентами фаз, дозволив Ходжесу та Мілсу [7] підвищити вихід ЦМ до 95 %.

За даними цих же авторів, препарати ЦМ, отримані методом двофазової водно-полімерної системи, містили везикули переважно однієї орієнтації, тоді як препарати, отримані в градієнті цукрози, містили везикули обох орієнтацій.

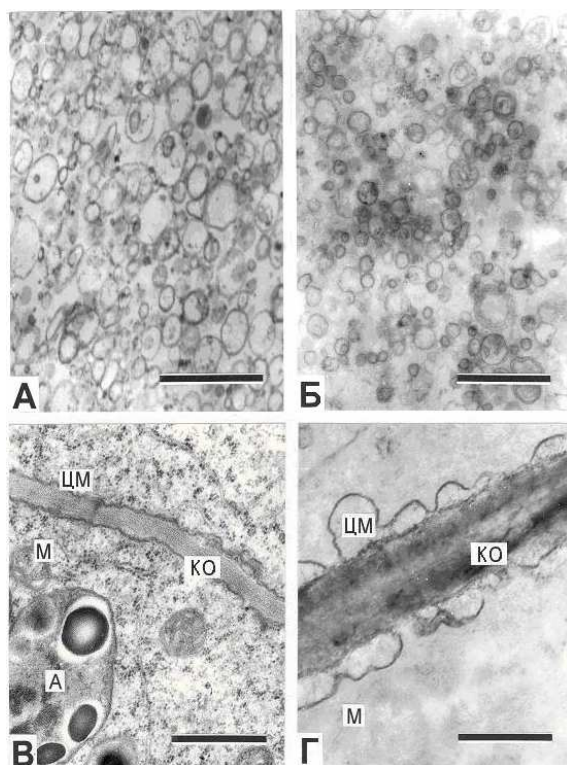


Рис. 2. Електронограми везикул ЦМ (А, Б) та фрагментів клітин кореневого апексу (В, Г) 6-добових проростків гороху. Зрізи везикул ЦМ та кореневі апекси контрастували цитратом свинцю (А, В) та кремній вольфрамовою кислотою (Б, Г) специфічною для ЦМ. Цитоплазматична мембрана (ЦМ), клітинна оболонка (КО); амілопласт (А); мітохондрія (М). Лінійка тожотожна 1 мкм

Порівняльний аналіз різних методів виділення наведений в дослідженні [1] ЦМ, отриманої з клітин суспензійної культури цукрового буряка. Крім того, припускається, що високий осмотичний тиск середовища виділення в градієнті цукрози пошкоджує мембрани [3].

Зважаючи на те, що властивості цитоплазматичних мембран мають видові та органні особливості та багато речовин, які входять до складу середовищ виділення, можуть впливати на їх властивості, необхідний підбір умов виділення, який носить емпіричний характер. Відпрацьованні нами умови процедури виділення, включаючи тривалість гомогенізації матеріалу, фільтрації та швидкісного

центрифугування дозволили підвищити вихід ЦМ до 10 мкг мембранного білка на грам біомаси коренів.

Отриманні в нашому дослідженні мембранні препарати були здатні гідролізувати АТФ. В порівнянні з мембранами мікосомальної фракції препарати ЦМ виявляли вищий рівень АТФ-гідролітичної активності, в більшій мірі реагували на наявність в інкубаційному середовищі іонів K^+ , ортованадату натрію, лізофосфатиділхоліну, який підвищує активність H^+ -АТФази ЦМ [17, 19]. Найвища швидкість гідролізу АТФ припадала на рН 6,5, що відповідає оптимуму, характерному для Mg^{2+} -залежної, K^+ -активованої H^+ -АТФази, маркера ЦМ рослинних клітин [13]. Активність маркерних ферментів мітохондрій, тонопласту, ендоплазматичного ретикулуму та апарату Гольджі у препаратах ЦМ в порівнянні з мікосомальними була пригнічена або зовсім не виявлялася, засвідчуючи тим самим її цитоплазматичне походження.

Відома локалізація активного центру того чи іншого мембранного ферменту дає можливість визначати орієнтацію везикул по ступеню його активації детергентом, який впливає на проникність мембран, забезпечуючи доступ до нього субстрату. Відомо, що активний центр H^+ -АТФази ЦМ знаходиться на внутрішній, цитоплазматичній поверхні [19]. Щодо нашого дослідження, АТФ-гідролітична активність препаратів ЦМ в присутності детергенту Тритон Х-100 складала 97 % від загальної. Це свідчить про те, що 97 % везикул препаратів цитоплазматичної мембрани були повернутими, орієнтованими цитоплазматичною поверхнею назовні. Не менше 95 % везикул ЦМ за даними електронномікроскопічних досліджень набували специфічного забарвлення з кремній-вольфрамовою кислотою [16], підтверджуючи їх цитоплазматичне походження.

Висновки

На основі методу двофазової водно-полімерної системи, опрацьовані процедури отримання високо очищених (95 %) препаратів цитоплазматичної мембрани, переважно (97 %) орієнтованих цитоплазматичною поверхнею назовні.

1. Гайворонская Л. М., Тимонина В. Н., Трофимова М.С., Дзюбенко В.С. Получение и характеристика везикул плазматической мембраны с низкой протонной проницаемостью из клеток суспензионной культуры сахарной свеклы. // Физиол. Раст. – 1987. – 34, № 1. – С.13–27.
 2. Auderset G., Sandelius A. S., Penel C., Brightman A., Greppin H., Morre D. J. Isolation of plasma membrane and tonoplast fractions from spinach leaves by preparative free-flow electrophoresis and effect of photoinduction // *Physiol. Plant.* – 1986. – Bd. 68, P. 1–12.
 10. Bennet A.B., O'Neill S.D., Eilman M., Spanswick R.M. H^+ – ATPase from storage tissue of *Beta vulgaris*. III Modulation of

ATPase activity by reaction substrates and products // *Plant Physiol.* – 1985. – Bd. 78. – P. 495–499.
 11. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Bd. 72, № 1. – P. 248.
 3. Briskin D. P., Leonard R. T., Hodges T. K. Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles // *Methods Enzymology.* – 1987. – Bd. 148. – P. 542–558.
 4. Hodges T. K., Leonard R. T. Purification of a plasma membrane bound adenosine triphosphatase from plant roots. // *Methods Enzymol.* – 1974. – Bd. 32. – P. 392–406.

5. *Hodges T. K., Mills D.* Isolation of the plasma membrane vesicles // *Methods Enzymol.* – 1986. – Bd. 118. – P. 41–54.
6. *Kasamo K., Nouchi I.* The role of phospholipids in plasma membrane ATPase in *Vigna radiata* L. (mung bean) roots and hypocotyls // *Plant Physiol.* – 1987. – Bd. 83. – P. 323–328.
7. *Kjellbom P., Larsson Ch.* Preparation and polypeptide composition of chlorophyll-free plasma membranes from leaves of light-grown spinach and barley // *Physiol. Plantarum.* – 1984. – Bd. 62, № 4. – P. 501.
8. *Klymchuk D. O., Brown C. S., Chapman D. K., Vorobyova T. V., Martyn G. M.* Cytochemical localization of calcium in soybean root cap cells in microgravity // *Adv. Space Res.* – 2001. – Bd. 27, № 5. – P. 967–972.
9. *Larsson C., Sommarin M., Widell S.* Isolation of highly purified plant plasma membranes and separation of inside-out and right-side-out vesicles // *Methods Enzymology*, – 1994. – Bd. 228. – P. 451–469.
12. *Rathbun W. B., Betlach M. V.* Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate // *Anal. Biochem.* – 1969. – Bd. 28, № 1–3. – P. 436.
13. *Quail P. H.* Plant cell fractionation // *Annu. Rev. Plant Physiol.* – 1979. – Bd. 30. – P. 425–484.
14. *Reynolds E. S.* The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J Cell Biol.* – 1963. – Bd. 17. – P. 208–212.
15. *Robinson D. G., Depta H.* Coated vesicles // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1988. – Bd. 39. – P. 53–99.
16. *Roland J. C.* General preparation and staining of thin sections. / In: Hall J.L. (ed) *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells.* Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York., 1978. – pp. 1–62.
17. *Serrano R.* Plasma membrane ATPase of plants and fungi CRC Press, Boca Raton, FL., – 1985. – pp. 1–174.
18. *Serrano R., Montesinos C., Sanchez J.* Lipid requirements of the plasma membrane ATPase from oat roots and yeast // *Plant Sci.* – 1988. – Bd. 56. – P. 117–122.
19. *Sze H.* H⁺-translocating ATPases: advances using membrane vesicles // *Annu. Rev. Plant Physiol.* – 1985. – Bd. 36. – P. 175–208.
20. *Wiebel E. R., Kistler G. S., Scherle W. F.* Practical stereological methods for morphometric cytology // *J. Cell Biol.* – 1966. – Bd. 30. – P. 23–38.

Отримано: 1 червня 2006 р.

Прийнято до друку: 17 червня 2006 р.