

А. И. СИЛАКОВА, С. Н. ПОЛИЩУК, К. Л. КОНОПЛИЦКАЯ

ВЫДЕЛЕНИЕ ЯДЕР ИЗ СЕРДЕЧНОЙ И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ И ИХ ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

(Представлено академиком А. В. Палладиным 18 VIII 1970)

К настоящему времени обмен веществ в ядрах изучен в разной степени для клеток разных тканей. Что касается мышечных волокон, то отсутствие простых и достаточно эффективных методов выделения их ядер привело к тому, что и до последнего времени в литературе имеются лишь отдельные сообщения, характеризующие химический состав их и ферментативную активность (¹⁻⁶). Метод Шово и сотрудников, дающий хорошие результаты при выделении ядер из клеток таких органов, как печень, почки, тимус и др., согласно их данным, давал неудовлетворительные результаты при попытке использовать этот метод для выделения ядер из мышечных волокон (⁷⁻⁸). При этом следует отметить, что выделяемые рядом исследователей из мышечных волокон ядра часто были охарактеризованы лишь микроскопически (^{1, 5}), что совершенно недостаточно для оценки их чистоты и биологической активности. В связи с этим достоверность полученных биохимических данных при использовании в качестве объекта исследования таких препаратов ядер невелика.

В настоящей работе описываются приемы, обеспечивающие выделение и очистку ядер из скелетных и сердечной мышц с воспроизводимыми параметрами, характеризующими их, а также дана характеристика некоторых сосредоточенных в них ферментативных активностей.

Ниже приводится схема основных этапов приемов, разработанных нами для выделения ядер.

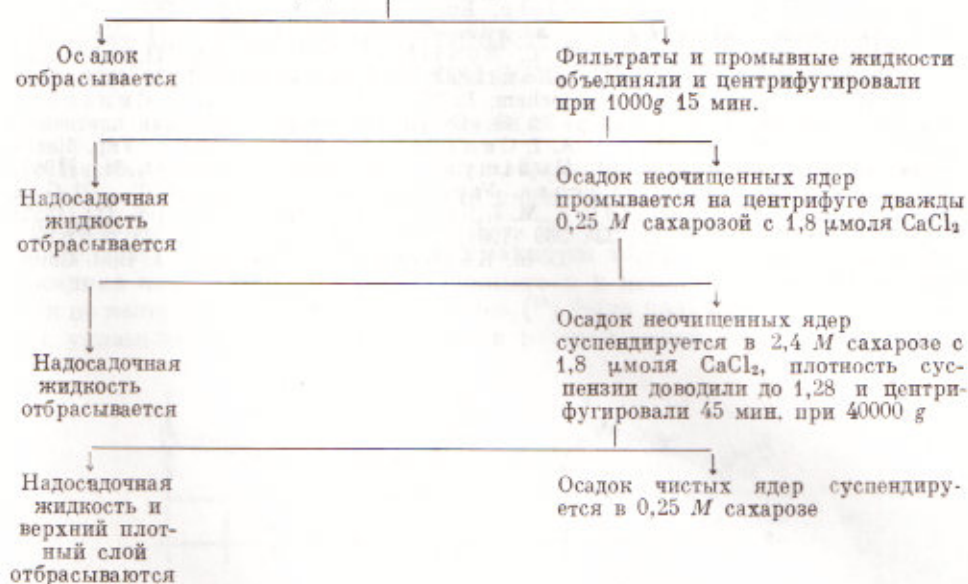
Особое внимание было уделено условиям гомогенизации: величина зазора в используемом стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком составляла 0,45 мм., что обеспечивало достаточное освобождение из мышечных волокон неповрежденных ядер. В качестве гомогенизационной среды использовали 0,25 М раствор сахарозы, а не 2,2 М, как это имело место в исследованиях (^{7, 8}). Известно, что гомогенизация ткани в концентрированных растворах сахарозы сопровождается значительным разогреванием, приводящим к повреждению структуры ядер (⁹). В условиях использования плотной сахарозы снижается и эффективность предварительного отделения миофибрилл и обрывков волокон фильтрованием гомогената.

Для очистки «сырого» препарата ядер, полученного при 1000 g, использовали 2,4 М раствор сахарозы с удельным весом 1,365. Конечную плотность суспензии ядер тщательно контролировали, доводя до величины не ниже 1,270—1,275 для сердечной и 1,280 для скелетных мышц. Это условие в наибольшей мере влияет на степень очистки ядер цитоплазматических загрязнений. Последующее центрифугирование при 40 000 g в течение 45 мин. позволяло получить чистый препарат ядер.

Полученные по этой схеме ядра сохраняли свою целостность по данным световой и электронной микроскопии. Величины отношения РНК/ДНК, используемые для количественной оценки саркоплазматических примесей, составляли от 0,3 до 0,7 (¹⁰⁻¹³), что, согласно литературным данным, правда, для клеточных ядер иных тканей, свидетельствовало о высокой степени их чистоты (^{2, 9, 14-16}).

Схема выделения ядер из волокон скелетных и сердечной мышц
(гомогенизация: 0,25 М сахара с 1,8 μ моля CaCl_2 ; ткань : среда 1:9)

Фильтрование: сита 100 и 200 меш
и двухразовое промывание осадка
средой гомогенизации



Активности глюкозо-6-фосфатазы (КФ 3.1.3.9) и кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2) в ядрах мышц оказались низкими, составляя менее 3% общей активности этих ферментов в гомогенате в расчете на 1 г влажной ткани (табл. 1).

Однако удельная активность этих ферментов в чистых ядрах достоверно выше, чем в исходном гомогенате (табл. 1). Это дает основание считать, что глюкозо-6-фосфатаза и кислая фосфатаза, по-видимому, являются ядерными ферментами. Полученные нами данные хорошо согласуются с недавно опубликованными ⁽¹⁷⁾ о вероятной локализации глюкозо-6-фосфатазы в мембране ядер.

Таблица 1

Активность глюкозо-6-фосфатазы и кислой фосфатазы (на 100 % выхода ядер), $M \pm m$

	Скелетные мышцы			Сердечная мышца	
	гомогенат	ядра	надосаочная жидкость	гомогенат	ядра
Глюкозо-6-фосфатаза	$141 \pm 24(5)$	$4,2 \pm 1,4(5)$	—	$212 \pm 14(4)$	$7,0 \pm 0,7(4)$
	$1,1 \pm 0,3(6)$	$2,0 \pm 0,6(6)$		$1,5 \pm 0,2(5)$	$2,1 \pm 0,3(5)$
Кислая фосфатаза	$167 \pm 36(6)$	$3,4 \pm 0,7(6)$	$58,5 \pm 9,0(6)$	—	—
	$15,3 \pm 3,9(6)$	$30,8 \pm 8,1(6)$	$22,4 \pm 3,3(6)$		

Примечание. Над чертой: для глюкозо-6-фосфатазы — μ г Р на 1 г влажной ткани, для кислой фосфатазы — μ г₁Р на 100 г свежей ткани; под чертой: μ г Р на 1 мг белка.

Высокая активность в ядрах сердечной и скелетных мышц НАД — пироглутаматсинтетазы и АТФазы ⁽¹³⁾ подтверждает регуляторную роль ядра в процессах транспорта, обеспечивающих определенный уровень ядерно-цитоплазматических отношений.

Институт биохимии
Академии наук УССР
Киев

Поступило
10 VIII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Rogozkin, Г. П. Федорова, В. Ф. Машанский, *Вопр. мед. хим.*, **10**, 546 (1964).
- ² J. C. Edelman, P. M. Edelman et al., *J. Cell. Biol.*, **27**, 365 (1965).
- ³ С. Е. Северин, А. А. Цейтлин, В. И. Телепнева, *ДАН*, **160**, 953 (1965).
- ⁴ R. L. Klein, *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 669 (1966).
- ⁵ R. L. Klein, C. R. Horton, A. Thureson-Klein, *Europ. J. Biol.*, **6**, 4, 514 (1968).
- ⁶ М. М. Заалишвили, Н. А. Гачечилдзе, *Сообщ. АН ГрузССР*, **41**, 341 (1966).
- ⁷ L. Chauveau, J. Moulé, A. C. Rouiller, *Exp. Cell Res.*, **11**, 317 (1956).
- ⁸ L. Chauveau, J. Moulé, A. C. Rouiller, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, 1521 (1957).
- ⁹ C. C. Widnell, J. K. Tata, *Biochem. J.*, **92**, 313 (1964).
- ¹⁰ А. И. Силакова, С. Н. Полишук, Г. М. Бекир-Заде, *Сборн. Структура и функции клеточного ядра*, «Наука», 1967, стр. 131.
- ¹¹ А. И. Силакова, С. М. Полишук, *Укр. біохім. журн.*, **41**, 371 (1969).
- ¹² С. М. Полишук, *Укр. біохім. журн.*, **41**, 611 (1969).
- ¹³ С. М. Полишук, А. И. Силакова, *Укр. біохім. журн.*, **42**, 345 (1970).
- ¹⁴ G. H. Hogeboom, W. C. Schneidler, M. J. Stribich, *J. Biol. Chem.*, **196**, 111 (1952).
- ¹⁵ G. Siebert, *Biochem. Zs.*, **334**, 369 (1961).
- ¹⁶ G. Siebert, G. B. Humphrey, *Adv. Enzymol.*, **27**, 239 (1965).
- ¹⁷ D. M. Kashing, C. B. Kasper, *J. Biol. Chem.*, **244**, 3786 (1969).