

В. М. ЗАЙДЕС, М. Я. ВОЛКОВА, А. Г. БУКРИНСКАЯ,
действительный член АМН СССР В. М. ЖДАНОВ

**СЕДИМЕНТАЦИОННЫЕ И ПЛОТНОСТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
НЕКОТОРЫХ КЛЕТОЧНЫХ И ВИРУСПЕЦИФИЧЕСКИХ
РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДОВ В ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ
ЭКСТРАКТАХ КЛЕТОК КУРИНОГО ЭМБРИОНА, ЗАРАЖЕННЫХ
ВИРУСОМ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА**

Ранее было установлено, что в цитоплазматических экстрактах из клеток куриного эмбриона (к.к.э.), зараженных вирусом болезни Ньюкасла (в.б.н.), существенное количество вирусиндуцированной РНК входит в состав структур, седиментирующих со скоростью около 45 S⁽¹⁾. В данной работе обосновывается предположение о том, что эта РНК образует комплекс с меньшей субчастицей рибосомы.

На рис. 1 представлены результаты седиментационного фракционирования цитоплазматического экстракта из клеток, содержащих меченые стабильную клеточную РНК (H³-радиоактивность) и вирусиндуцированную РНК (C¹⁴-радиоактивность). Условия эксперимента следующие.

Через 18 час. после посева трипсинизированных к.к.э. в матрасы в питательную среду вносили H³-уридин (293 мС/ммоль, 2 мС/мл), через 23 часа метку удаляли, через 64 часа после посева клетки заражали в.б.н. (20—40 БОЕ на 1 клетку), через 69 час. вносили актиномицин D (2 мкг/мл), через 71 час — C¹⁴-уридин (7,3 мС/ммоль, 1 мС/мл), через 74 часа после посева клетки снимали с поверхности стекла механически, разрушали и готовили цитоплазматический экстракт в буферном растворе: KCl 0,01 M, MgCl₂ 0,003 M, триэтаноламин 0,003 M, pH 8,1⁽⁴⁾. Экстракт наносили на вершину градиента концентрации сахарозы (16 мл, 15—30% по весу, на том же буферном растворе) и центрифугировали в роторе 3-20 центрифуги Superspeed, MSE, Англия (18 000 об/мин, 12 час., 4°). Фракции собирали со дна пробирки по 32 капли, кислотонерастворимую радиоактивность определяли в аликвотах по 0,1 мл в сцинтилляционном счетчике Паккард. Условия счета подбирали таким образом, что в канал, в котором определялась радиоактивность трития, попадало ~ 10% C¹⁴-радиоактивности, а в «углеродный» канал — менее 0,3% тритиевой радиоактивности.

Распределение трития в кислотонерастворимом материале градиента в основном отражает распределение рибосом⁽²⁾. Вероятно, что та часть H³-радиоактивности, которая седиментирует со скоростью ~ 45 S (фракция № 10), представлена меньшей рибосомной субчастицей. Как видно, из рис. 1, в этой же фракции определяется существенное количество материала, содержащего вирусиндуцированную РНК.

Удобным способом для разделения физически не связанных структур с одинаковой скоростью осаждения (каковыми в наших опытах могли быть вирусный и клеточный материалы во фракции № 10 сахарозного градиента) является плотностное фракционирование⁽³⁾.

При таком способе анализа разделение произвести не удалось. Материал фракции № 10 сахарозного градиента (рис. 1) диализовали против буферного раствора с 4% формальдегидом и анализировали в предобработанном градиенте концентрации хлористого цезия (ротор 3-5,

35 000 об/мин, 16 час., 4°). Фракции собирали со дна пробирок по 15 капель. Часть материала некоторых фракций использовали для определения показателя преломления, из которого высчитывали плотность раствора (12) с поправкой на преломление формальдегида. Из рис. 2 видно, что оба материала в основном определяются в зоне с плавучей плотностью ~ 1,46 г/мл. Некоторое увеличение плавучей плотности вирусного компонента (~ 1,44 г/мл в прежних определениях (1)), возможно, связано с отсутствием формальдегида в течение относительно длительного седимен-

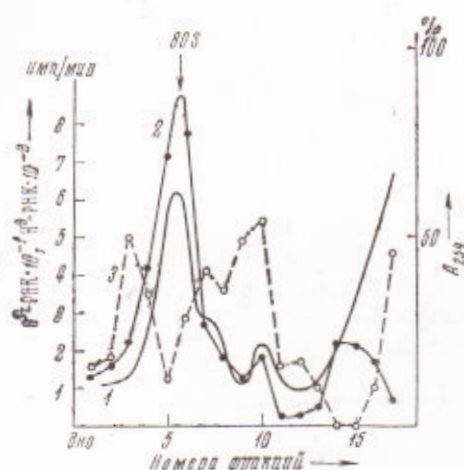


Рис. 1. Седиментационное фракционирование цитоплазматического экстракта из зараженных клеток. 1 — распределение у-ф.-поглощающего материала (A_{234} , регистрации в проточной кювете), 2 — распределение H^3 -радиоактивности, 3 — распределение C^{14} -радиоактивности

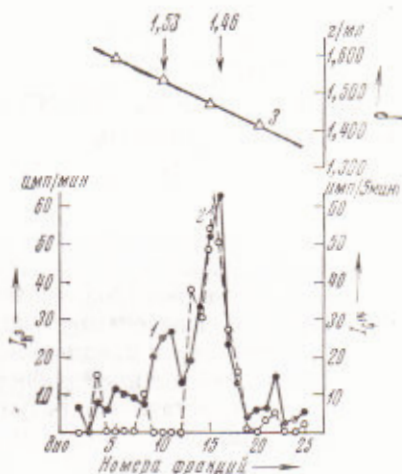


Рис. 2. Плотностное фракционирование клеточного и вирусспецифического материала, седиментирующего в районе меньшей субчастицы рибосомы. 1 — распределение H^3 -кислотонерастворимой радиоактивности, 2 — распределение C^{14} -радиоактивности, 3 — распределение плотности

тационного фракционирования экстракта. Плотностное распределение клеточного материала сходно с недавно описанным распределением меньшей субчастицы рибосомы из клеток печени крысы (4).

Итак, результаты опытов свидетельствуют о сходстве (или тождестве) двух свойств клеточных и вирусспецифических рибонуклеопротеидов скорости седиментации (~ 45 S) и плавучей плотности. На этом основании мы делаем предположение о физической связи структур. С ним согласуются результаты функционального анализа вирусного компонента предполагаемого комплекса, которые указывают на возможность транспорта вирусиндуцированной РНК из структур 45 S в полирибосомы (5). Таким образом, имеются определенные основания, чтобы рассматривать данный комплекс как инициаторный в синтезе вирусных белков. Подобные комплексы (информационная РНК плюс меньшая субчастица рибосомы) были описаны в бактериальных системах (6-8). Не так давно появились сообщения, что такие же комплексы могут существовать и в животных клетках (9, 10).

Если принять, что идея о существовании комплекса меньшей рибосомной субчастицы и РНК, индуцированной в.б.н., верна, важно отметить следующее: 1) данный комплекс должен содержать существенное количество дополнительного (нерибосомного) белка (при этом мы исходим из того, что плавучая плотность «свободной» меньшей субчастицы определяется цифрой не ниже 1,49—1,50 г/мл, а молекулярный вес вирусиндуцированной РНК комплекса колеблется в районе $0,6-0,7 \cdot 10^6$ (5)); 2) если этот дополнительный белок связывается с вирусиндуцированной

РНК до ее прикрепления к рибосомной субчастице, в клетках должен существовать комплекс вирусиндуцированная РНК — белок с относительно низкой плавучей плотностью, т. е. частицы типа информсом (¹¹); 3) молекулярный вес комплекса должен быть относительно высоким и во всяком случае должен значительно превышать молекулярный вес меньшей субчастицы рибосомы как таковой.

Следует заметить, что в рамках высказанного предположения в настоящее время трудно объяснить некоторые факты. Наиболее существенные из них — относительно низкая скорость седimentации комплекса, а также его чувствительность к дезоксихолату натрия (¹²). Кроме того, в настоящее время отсутствуют строгие доказательства рибосомной природы клеточного компонента комплекса. Мы надеемся, что дальнейший анализ позволит дать более определенное суждение о справедливости высказанного предположения.

Выражаем благодарность О. Н. Березиной за помощь в отработке оптимальных условий измерения радиоактивности в пробах с двойной меткой.

Институт вирусологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
28 I 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. М. Зайдес, В. Г. Заславский и др., Мол. биол., 4, 607 (1970).
² В. М. Зайдес, А. Г. Букринская, В. М. Жданов, Мол. биол., № 5 (1971).
³ Н. В. Белицина, Л. П. Овчинников и др., Мол. биол., 2, 727 (1968).
⁴ E. C. Henshaw, J. Loebenstein, Biochim. et biophys. acta, 199, 405 (1970).
⁵ Н. В. Каверин, В. Г. Заславский и др., Мол. биол., 4, 612 (1970).
⁶ M. Nomura, C. V. Lowry, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 58, 946 (1967).
⁷ M. Nomura, C. V. Lowry, C. Guthrie, ibid., 58, 1487 (1967).
⁸ C. Guthrie, M. Nomura, Nature, 219, 232 (1968).
⁹ S. M. Heywood, Nature, 225, 696 (1970).
¹⁰ A. S. Huang, D. Baltimore, J. Mol. Biol., 47, 275 (1970).
¹¹ А. С. Спириин, Н. В. Белицина, М. А. Айтхожин, Журн. общ. биол., 25, 321 (1964).
¹² J. B. Ifft, D. H. Voet, J. J. Vinograd, J. Phys. Chem., 65, 1138 (1961).
¹³ Н. В. Каверин, Н. В. Сюрин, В. Г. Заславский, Мол. биол., (в печати).