

С. Д. БЕЛЯЕВ, Н. Б. СТРАЖЕВСКАЯ, И. К. КОЛОМИЙЦЕВА, В. А. СТРУЧКОВ,  
член-корреспондент АН СССР А. М. КУЗИН

## ЛИПИДЫ В НАДМОЛЕКУЛЯРНОМ КОМПЛЕКСЕ ДНК ТИМУСА И ПЕЧЕНИ КРЫС

В наших работах было показано, что с помощью мягкого фенольного метода из клеток животных можно извлекать надмолекулярную ДНК (н.м. ДНК) с аномально высокой вязкостью в прочном комплексе с небольшим количеством остаточного кислого белка (<sup>1-3</sup>). На уровне н.м. ДНК была обнаружена гормональная, тканевая и возрастная специфичность (<sup>2, 4-6</sup>). Н.м. ДНК оказалась очень чувствительной к ионизирующей радиации *in vivo* и *in vitro* (<sup>4, 6, 7</sup>).

Определено, что основная масса ДНК в ядре клеток бактерий (<sup>8</sup>) и животных (<sup>9, 10</sup>) не свободна, а находится в комплексе с белками и липидами мембран в виде ДНК-мембранного комплекса. По своим физико-химическим свойствам (аномально высокой вязкости, высокой чувствительности к радиации и гидродинамическому сдвигу) ДНК-мембранный комплекс (<sup>8-10</sup>) имеет много общего с исследуемой нами н.м. ДНК (<sup>1-7</sup>). Это обстоятельство дает основание предполагать, что в структуру н.м. ДНК, помимо остаточного белка (<sup>3</sup>), могут входить и липиды. Исследованию липидной компоненты н.м. ДНК и посвящена настоящая работа.

Объектом служили самцы белых крыс «Вистар» весом 120—140 г. Н.м. ДНК выделяли мягким фенольным методом (трехкратная депротеинизация) из тимуса и печени крыс по методу (<sup>1, 2</sup>). От фенола освобождались диализом против 0,14 М NaCl при 2—4° (10 смен, каждая по 4 л). Затем н.м. ДНК «осветляли» центрифугированием в течение 1 часа при 15 000 г на К-24. Содержание ДНК определяли по дифениламину. Для выделения липидов свежеполученный раствор н.м. ДНК (общее содержание ДНК ~10 мг) осаждали перегнанным 96% этанолом (1 : 2 по объему) и оставляли на ночь в холодильнике. Осажденную ДНК переносили в пробирку на 20 мл с притертой пробкой, высушивали от спирта под вакуумом и экстрагировали липиды смесью хлороформ — метанол 2 раза по 15 мин. по Фолчу (<sup>11</sup>). Оставшийся после осаждения ДНК спирт выпаривали и из сухого остатка также экстрагировали липиды по Фолчу. Затем оба экстракта объединяли (фракция I — слабосвязанные липиды). Осадок ДНК вновь высушивали под вакуумом, растворяли при тщательном размешивании в 10—15 мл 1% раствора додецилсульфата натрия, осаждали 96% этанолом (1 : 2). Затем этанольный раствор выпаривали и осадок экстрагировали по Фолчу. Осадок ДНК высушивали и также экстрагировали липиды по Фолчу. Эти экстракты объединяли (фракция II — прочносвязанные липиды). Все процедуры выпаривания проводили под вакуумом при 40°.

Хроматографический анализ липидов проводили в тонком слое силикагеля КСК с 5% гипсом или в силикагеле Н в системе растворителей для нейтральных липидов: *n*-гексан — эфир — муравьиная кислота (80 : 20 : 1 по объему (<sup>12</sup>)). После разделения хроматограммы проявляли в парах иода (<sup>13</sup>). Идентификацию липидов проводили на одной и той же пластинке с известными стандартами и суммарными липидами печени крыс. Количественное определение нейтральных липидов осуществляли по методу (<sup>14</sup>). Силикагель из областей пятен переносили на стеклянные фильтры № 3, промывали хлороформом, переносили в маленькие фарфоровые тигли, вы-

Содержание нейтральных липидов в н.м. ДНК органов крыс

Источник н.м. ДНК	№ опыта	Липиды, %			Отношение прочносвязанных к слабосвязанным
		общие	слабосвязанные	прочносвязанные	
Тимус	1	1,74	0,67	1,07	1,60
	2	1,05	0,38	0,67	1,76
	3	—	0,50	—	—
	4	—	0,55	—	—
Печень	среднее	1,40±0,35	0,53±0,08	0,87±0,20	1,64
	1	2,51	0,66	1,85	2,80
	2	2,61	0,65	1,96	3,20
	среднее	2,56±0,05	0,65±0,01	1,90±0,05	2,92

Таблица 2

Состав липидов в н.м. ДНК органов крыс (µг на 10 мг ДНК)

Фракция липидов	Тимус			Печень		
	слабосвязанные	прочносвязанные	отношение прочносвязанных к слабосвязанным	слабосвязанные	прочносвязанные	отношение прочносвязанных к слабосвязанным
Нейтральные липиды:						
холестерин	12,5	60,0	5,0	29,0	87,0	3,0
триглицериды	12,5	31,3	2,5	11,6	35,0	3,0
эфиры холесте- р. холестерина	42,3	16,0	0,4	26,0	67,7	2,5
свободные жирные кис- лоты		следы			следы	
Фосфолипиды		следы			следы	

паривали хлороформ при 80—100° и высушивали в вакуум-эксикаторе. Затем во все пробы добавляли по 2 мл конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и ставили на 15 мин. в расплавленный сплав Вуда при 200°. После быстрого охлаждения в ледяной бане в тигли добавляли по 3 мл H<sub>2</sub>O, тщательно перемешивали и спустя 10 мин. (для удаления пузырьков воздуха) измеряли на СФ-4А при 375 мк. Концентрацию нейтральных липидов определяли по кривым в работе (14), которые при проверке показали хорошее совпадение. Проведен анализ содержания свободного холестерина, триглицеридов, эфиров холестерина. Кроме того, на хроматограммах найдены люминесцирующие в у.-ф. неидентифицированные вещества, углеводы, а также следы фосфолипидов и свободных жирных кислот.

Результаты исследований показали, что н.м. ДНК действительно содержит несколько процентов липидов. В табл. 1 представлены данные по содержанию общих липидов в н.м. ДНК тимуса и печени крыс. Показано, что н.м. ДНК тимуса содержит меньше общих липидов (1,4%), чем н.м. ДНК печени (2,56%), причем в первом случае количество слабосвязанных липидов выше (38%) по сравнению со вторым (25%). Хроматографический анализ выделенных из н.м. ДНК липидов обнаружил в их составе нейтральные липиды: свободный холестерин, эфиры холестерина и триглицериды (табл. 2). Фосфолипиды на хроматограммах практически не найдены. Интересно отметить, что в слабосвязанных липидах преобладают эфиры холестерина, а в прочносвязанных — холестерин. Таким образом,

## Включение меченых соединений в н.м. ДНК органов крыс

Органы крыс	$C^{14}$ -ацетат (липиды)	$C^{14}$ -тимидин (ДНК)	$C^{14}$ -уридин (мРНК)	Нейтральные липиды, %	Остаточный белок, % <sup>(3)</sup>
	имп/мин на 1 мг ДНК				
Тимус	920±50	20130±350	110±12	1,40±0,35	1,40±0,3
Печень	7200±310	2160±140	202±15	2,56±0,15	3,4±0,3

Примечание. Вводили по 200 мкС каждого изотопа на 1 крысу внутривенно в 1 мл 0,14 М NaCl, животные забиты через 1 час. В опытах с уридином препараты ДНК обрабатывали панкреатической РНКазой (2 часа при 37°). Радиоактивность образцов измеряли на счетчике «Протока».

впервые установлено количественное и качественное различие состава липидов в н.м. ДНК тимуса и печени крыс.

В табл. 3 представлены сравнительные данные по включению  $C^{14}$ -ацетата натрия,  $C^{14}$ -тимидина и  $C^{14}$ -уридина в н.м. ДНК тимуса и печени крыс. Видно, что н.м. ДНК включает меченый ацетат, причем н.м. ДНК печени включает метку в 8 раз активнее, чем н.м. ДНК тимуса. На основании того, что н.м. ДНК содержит природные тканеспецифичные гетерокомпоненты в виде нейтральных липидов (табл. 1, 3) кислых остаточных белков <sup>(3)</sup> и мРНК (табл. 3), можно предположить, что н.м. ДНК является существенной частью ДНК-мембранного комплекса, описанного в работах <sup>(8-10)</sup>. Согласно данным этих работ, показано, что липидная компонента ДНК-мембранного комплекса в основном представлена фосфолипидами, нейтральные же липиды эти авторы не изучали, и не исключено их присутствие. В наших экспериментах были обнаружены только нейтральные липиды, так как фосфолипиды при нашем методе выделения н.м. ДНК экстрагируются фенолом <sup>(15)</sup>. Мы считаем, что нейтральные липиды — не артефакт, а структурный элемент н.м. ДНК животных, ибо многократная мягкая депротенинизация фенолом не снижала их содержания в препаратах.

Роль нейтральных липидов в организации структуры надмолекулярных комплексов ДНК животных и в радиобиологическом эффекте является предметом наших дальнейших исследований.

Институт биологической физики  
Академии наук СССР  
Пушкино-на-Оке

Поступило  
5 XI 1971

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Н. Б. Стражевская, В. А. Стручков, Радиобиология, 2, 1, 9, (1962).  
<sup>2</sup> В. А. Стручков, Биофизика, 7, 5, 538 (1962). <sup>3</sup> Н. Б. Стражевская, Г. Г. Кривцов и др., Радиобиология, 12, 1, 19 (1972). <sup>4</sup> Н. Б. Стражевская, В. А. Стручков, Г. С. Календо, Радиобиология, 6, 6, 783 (1966). <sup>5</sup> Н. Б. Стражевская, В. А. Стручков, Радиобиология, 12, 5, 644 (1972).  
<sup>6</sup> Y. Shekhtman, N. B. Strazhevskaya et al., Studia biophysica, Berlin, 15/16, 9 (1969). <sup>7</sup> В. А. Стручков, В сборн. Нуклеиновые кислоты и биологическое действие ионизирующей радиации, «Наука», 1967, стр. 56. <sup>8</sup> A. D. Burrell, P. Feldschreiber, J. Dean, Biochim. et biophys. acta, 247, 1, 38 (1971). <sup>9</sup> M. G. Ormerod, A. R. Lehman, Biochim. et biophys. acta, 228, 2, 331 (1971). <sup>10</sup> M. M. Elkind, Chin-Mei, Chang-Liu, Int. J. Rad. Biol., 22, 1, 75 (1972). <sup>11</sup> J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane-Stanley, J. Biol. Chem., 226, 1, 497 (1957). <sup>12</sup> J. H. Moore, R. C. Noble, P. N. O'Donoghue, Canad. J. Biochem., 45, 1335 (1967). <sup>13</sup> G. C. Barret, Nature, 194, 1171 (1962). <sup>14</sup> J. B. March, D. B. Weinstein, J. Lipid. Res., 77, 574 (1966). <sup>15</sup> J. M. R. Hatfield, Exp. Cell Res., 72, 2, 591 (1972).