

Н. В. САМОСУДОВА, М. М. ОГИВЕЦКАЯ, М. Б. КАЛАМКАРОВА,  
академик Г. М. ФРАНК

### ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВ ТОНКИХ НИТЕЙ МЫШЦЫ МЕТОДОМ ФЕРРИТИНОВЫХ АНТИТЕЛ

Известно, что актин не является единственным белком, составляющим тонкие протофибриллы (<sup>1</sup>). Согласно модели тонкой нити (<sup>2, 3</sup>), Ф-актин образует двухтяжевую спираль с шагом  $2 \times 375 \text{ \AA}$ ; в канавках идущих вдоль спирали, располагается тропомиозин, к которому присоединяются молекулы тропонина с интервалом  $400 \text{ \AA}$ . Этот период постоянно наблюдается в мышце, как в электронном микроскопе, так и методом рентгеноструктурного анализа (<sup>4, 5</sup>). Присутствие тропонина в тонких нитях, расположенного через каждые  $400 \text{ \AA}$  по длинной оси, подтверждается связыванием антител к тропонину, меченых ферритином (<sup>6</sup>). Как показано методом флуоресцентных антител (<sup>7, 8</sup>), местом локализации актина в саркомере является, главным образом I-диск, за исключением Z-линии. Однако недавно Вильсон и Финк (<sup>9</sup>) на основании иммунохимического и иммунофлуоресцентного изучения актина высказали предположение, что антитела против актина *per se* не вырабатываются.

В настоящей работе сравнивается распределение в саркомере антител, полученных против актина Штрауба («грубого») и актина, дополнительно очищенного по методу Спудича и Уотта (<sup>10</sup>) — «очищенного».

Ф-актин был приготовлен из грудных мышц 3-х месячных цыплят по методу Штрауба с использованием холодной экстракции. Кролики весом  $\sim 4 \text{ кг}$  иммунизировались актином Штрауба («грубым») по схеме: количество белка  $250\text{--}200 \text{ мг}$ ; курс 3 недели; 9 инъекций; интервал 2—3 дня; доза 20—25 мг; введение внутривенное; получение антител — через месяц после последней инъекции.

Кроме того, был получен актин, дополнительно очищенный по методу Спудича и Уотта (<sup>10</sup>), и использован для иммунизации по схеме с малыми дозами белка: в первый день кроликам вводили внутривенно раствор, содержащий  $0,5 \text{ мг}$  актина и  $10 \text{ мкг}$  эндотоксина (*S. abortus ovis*) на 3 и 5-й день — по  $0,25 \text{ мг}$  актина. Общее количество белка составляло  $1 \text{ мг}$ . Антисыворотку получали на 8—10-й день. Наличие антител устанавливали кольцепреципитацией. Получение  $\gamma$ -глобулина и его конъюгация с ферритином производилась по способу, описанному ранее (<sup>11</sup>), с помощью 2,4-диизотианат толуена. В некоторых сериях экспериментов, главным образом, с «очищенным» актином,  $\gamma$ -глобулин соединялся с ферритином через глутаральдегид (<sup>12</sup>). Обработка конъюгатом суспензии миофибрилл, полученных при гомогенизации глицеринизированной мышцы цыпленка, проводилась при комнатной температуре в течение 1 часа при соотношении 1:1, с последующей отмывкой в фосфатном буфере, pH 7,2, с фиксацией в 2,5% глутаральдегиде, pH 7,2 (15 мин.) и в 1%  $\text{OsO}_4$ , pH 7,2 (1 час). Материал заливался в смесь эпон-аральдита (<sup>13</sup>).

Антисыворотка, полученная против «грубого» актина (общая доза при иммунизации  $200\text{--}250 \text{ мг}$ ) проверялась на гетерогенность методом двойной гелевой диффузии. Картина иммунодиффузии (актин-антиактин) демонстрирует три полосы преципитации (рис. 1, вставка) в отличие от результатов Вильсона и Финка (<sup>10</sup>), наблюдавших от 4 до 7 полос преци-

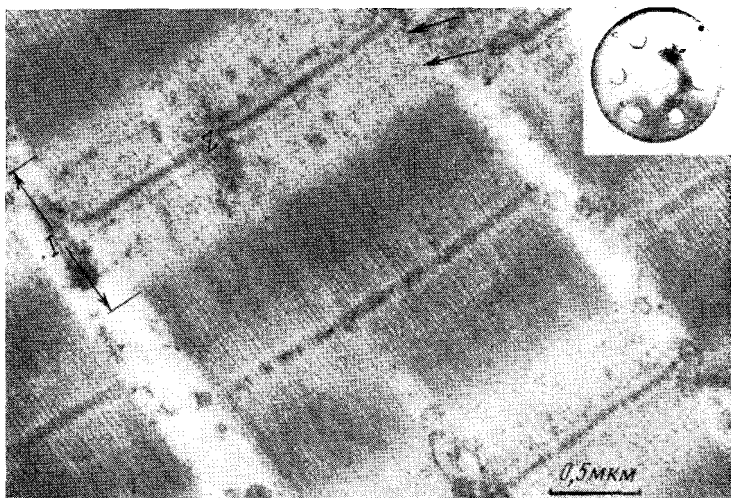


Рис. 1

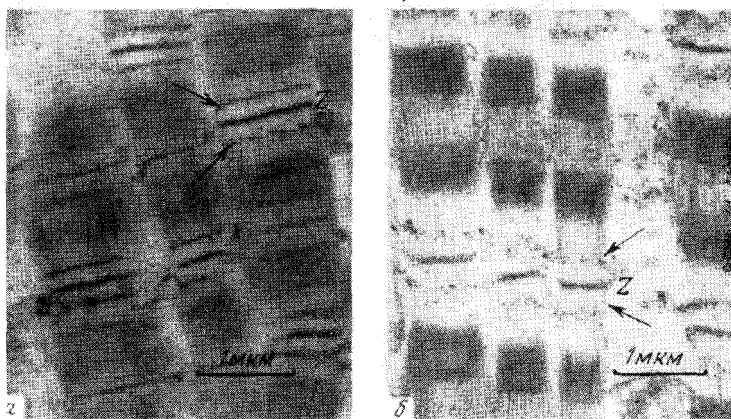


Рис. 2

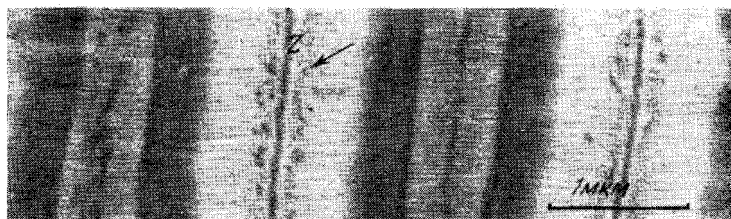


Рис. 3

Рис. 1. Распределение антител к «грубому» актину в соответствии с периодом 400 Å. Стрелки указывают на окрашенную полосу на месте соединения Z- и I-нитей и на полосу, расположенную на расстоянии около 0,3 мк от Z-линии. Вставка: реакция двойной диффузии в агаровом геле (0,75%; 0,5 мМ АТФ; 0,2 мМ CaCl<sub>2</sub>; 0,5 мМ β-меркаптоэтанол; 2 мМ трис-буфер, pH 8,0), в центральной лунке – антиактин, в периферических – «грубый» актин в концентрации 4 мг/мл – 0,06 мг/мл

Рис. 2. Картина распределения антител к «грубому» актину после фиксации (а) и экстракции (б). Видны окрашенные полосы на расстоянии около 0,3 мк от Z-линии

Рис. 3. Локализация антител к «очищенному» актину на месте соединений Z и I-нитей.

питации (при общей дозе 60 мг). При взаимодействии (общая доза 1 мг) в агаровом геле «очищенного» актина с его антисывороткой четких полос преципитации получить не удалось. Однако после отмывки агарового препарата и окраски амидошварцем, наблюдалось диффузное распределение белкового материала.

«Грубый» антиактин. Миофибриллы, взятые для окрашивания ферритиновым конъюгатом, подвергались предварительной обработке: глицеринизации, экстракции и фиксации 1% формалином, рН 7,2 в течение 5—7 мин. На рис. 1 показано распределение меченых ферритином антител в глицеринизированных миофибриллах. Локализация зерен ферритина соответствует периодичности 400 Å. Z-линия свободна от зерен ферритина. В H-зоне также можно видеть небольшое количество ферритина.

При окрашивании миофибрилл, фиксированных формалином, в изотропном диске выявляется только две окрашенные полосы, симметрично расположенные от Z-линии, примерно на расстоянии 0,3 мкм (рис. 2а). Эти линии можно выделить и в глицеринизированных миофибриллах, когда наблюдается реакция во всем изотропном диске (рис. 1).

Экстракция раствором низкой ионной силы (трис-буфер 2 мМ рН 7,6) глицеринизированных миофибрилл проводилась около 3 час., после чего отмывые миофибриллы окрашивались «грубым» антиактином (рис. 2б). После 3 час. экстракции M-линия исчезает, а структура I-диска и Z-линии еще сохраняется. Однако окрашивание периодов I-диска тоже исчезает за исключением окрашенных полос, расположенных с каждой стороны от Z-линии на расстоянии ~0,3 мкм.

«Очищенный» антиактин в глицеринизированных миофибриллах локализуется рядом с Z-линией в месте соединения Z и I-нитей. (рис. 3). Эти окрашенные зоны изотропного диска также включаются в общую картину окрашивания «грубым» антиактином (рис. 1).

Сравнение картин распределения антител к «грубому» и «очищенному» актину показало наличие, по крайней мере, трех антигенов в пределах изотропного диска, которые, по-видимому, соответствуют трем полосам преципитации при диффузии в агаровом геле. Локализация одного из них соответствует периодичности 400 Å и совпадает с локализацией антител к тропонину<sup>(6)</sup>. Такая «тропониновая» картина наблюдалась при обработке глицеринизированных миофибрилл антителами к «грубому» актину. «Тропониновая» картина исчезает, если миофибриллы предварительно фиксированы или подвергнуты частичной экстракции. В этих условиях сохраняется окрашивание «грубым» антиактином в виде полос (2-й антиген) в каждой половине I-диска на расстоянии около 0,3 мкм от Z-линии. По своему местоположению окрашенные полосы соответствуют N-полосам<sup>(4, 14)</sup> или, так называемым, муфтам или сгущениям материала, появляющимся при восстановлении структуры экстрагированных миофибрилл с помощью некоторых белков: α-актина и тропомиозина<sup>(15)</sup>.

Локализация третьего антигена была получена при обработке миофибрилл «очищенным» антиактином в месте соединения материала Z-линии с тонкими нитями. В этом случае мы были вправе рассчитывать на получение антител против актина *per se*, так как очистка актина по использованному методу<sup>(10)</sup> дает одну полосу при электрофорезе на полиакриламидном геле. Правда, довольно узкая зона локализации «чистого» антиактина не дает представления о полной картине его распределения. Однако совершенно ясно, что в подобных случаях помимо специфических свойств реакции «антиген — антитело» несомненную роль играет участие антигена (в данном случае актина *per se*) в сложных взаимосвязях с другими белковыми компонентами. Эта взаимосвязь мешает выявлению специфического антигена, так как, очевидно, некоторые химические потенции «заняты» другими контактами при комплексообразовании.

Полученные результаты показывают, что антитела, вырабатываемые на введение актина Штрауба, направлены не только против белков, сопут-

ствующих актину, как считают Вильсон и Финк (<sup>9</sup>), но и также против актина *per se*.

Авторы выражают благодарность доктору биологических наук Б. Ф. Поглазову за помощь в получении очищенного актина и доктору Г. Финку за предложенную схему иммунизации с малой дозой белка.

Институт биологической физики  
Академии наук СССР  
Пушчино-на-Оке

Поступило  
18 VII 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> J. Hanson, J. Lowy, J. Mol. Biol., v. 6, 46 (1963). <sup>2</sup> S. Ebashi, M. Endo, I. Othzuki, Quart. Rev. Biophys., v. 2, 4, 351 (1969). <sup>3</sup> D. A. Parry, J. M. Squire, J. Mol. Biol., v. 75, 1, 33 (1973). <sup>4</sup> M. H. Draper, A. J. Hodge, Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., v. 27, 5, 465 (1949). <sup>5</sup> H. E. Huxley, W. Brown, J. Mol. Biol., v. 30, 383 (1967). <sup>6</sup> I. Othzuki, T. Masaki et al., J. Biochem., v. 61, 817 (1967). <sup>7</sup> J. M. Marshall, H. Holtzer et al., Exp. Cell Res., Suppl. 7, 219 (1959). <sup>8</sup> Г. М. Франк, Н. В. Самосудова и др., Биофизика, т. 8, 569 (1963). <sup>9</sup> J. Wilson, H. Finck, J. Biochem., v. 70, 1, 143 (1971). <sup>10</sup> J. A. Spudich, S. Watt, J. Biol. Chem., v. 246, 4866 (1971). <sup>11</sup> М. М. Огиевецкая, Н. В. Самосудова и др., Биофизика, т. 13, 5, 873 (1968). <sup>12</sup> S. Avrameas, Immunochem., v. 6, 43 (1969). <sup>13</sup> M. Mollenhauer, Stain Techn., v. 39, 2, 45 (1964). <sup>14</sup> D. Pease, R. F. Baker, Am. J. Anat., v. 84, 2, 175 (1949). <sup>15</sup> M. H. Stromer, D. E. Goll, J. Mol. Biol., v. 67, 3, 489 (1972).