

А. Д. СКРИДОНЕНКО

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ИНГИБИТОРА РИБОНУКЛЕАЗЫ ИЗ ЯДЕРНОГО СОКА ПЕЧЕНИ КРЫС

(Представлено академиком А. А. Баевым 27 XII 1972)

Шакраворт и Буш (1) впервые указали на присутствие ингибитора РНКазы в ядрах клеток печени и некоторых опухолей, обладающего способностью блокировать свободную РНКазу и этим регулировать ее активность. В дальнейшем было выделено (2) термостабильное белковое вещество из ядерного сока печени и гепатомы Зайделя у крыс, подавляющее активность как РНКазы, так и ДНКазы.

В настоящем сообщении представлены данные о получении специфического ингибитора РНКазы в высокоочищенном виде из ядерного сока печени крыс и приведены некоторые его свойства.

Для выделения ингибитора использовали ядра печени крыс, изолированные модифицированным сахарозным методом Шово и др. (3). Препараты ядер, по данным фазово-контрастной и электронной микроскопии, не содержали примесей в виде митохондрий и эндоплазматического ретикулула.

Активность цитоплазматических маркер-энзимов (глюкозо-6-фосфатаза и 5'-нуклеотидаза) в изолированных ядрах не превышала 0,3% общей активности ферментов в гомогенате; отношение РНК к ДНК равно 0,19.

Активность ингибитора определяли по методу Грибно и др. (4). Единица активности соответствовала 50% угнетению 0,05 мкг кристаллической РНКазы из поджелудочной железы быка («Реанал», Венгрия). Удельную активность выражали в единицах активности на 1 мг белка. Белок определяли микробиуретовым методом, а также по поглощению при 280 и 210 мк, принимая, что $E_{210}^{1\%} = 10$ и $E_{280}^{1\%} = 205$.

Операции по очистке ингибитора проводили на холоду при 1–4°. Все растворы содержали 1 мМ ЭДТА и 1 мМ 2-меркаптоэтанол (МЭ).

Осадок ядер, полученный из 400 г печени крыс, гомогенизировали в 400 мл 0,14 М раствора NaCl и центрифугировали 15 мин. при 10 000 об/мин. Процедуру повторяли трижды.

Объединенный экстракт (ядерный сок) подкисляли 1 N уксусной кислотой до pH 5,0 и центрифугировали. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость разводили в 3 раза 0,015 М фосфатным буфером pH 7,5 и добавляли дважды при перемешивании гель фосфата кальция (5), соответственно 200 и 100 мл, с последующим центрифугированием. При этом большая часть ингибитора РНКазы адсорбировалась гелем, а РНКаза оставалась в растворе. Ингибитор экстрагировали из геля дважды (100 и 50 мл) 0,075 М фосфатным буфером pH 7,5.

Объединенные экстракты (175 мг белка) наносили на колонку с ДЭАЭ-сефадексом А-50 (2,5 × 25 см), уравновешенную 0,075 М фосфатным буфером pH 7,5 и элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0–0,45 М) в том же буферном растворе со скоростью 35–40 мл/час. Объем фракций 10 мл. При этом было установлено (рис. 1), что ингибитор выходит в виде трех пиков, соответствующих 0,06 М, 0,17 М и 0,35 М NaCl (фракции X, А и В). Фракция X составляла 1,4%, А 10,5% и В 44,2% нанесенного на колонку ингибитора. Дальнейшей очистке подвергали фракцию В.

Для этого фракцию В (150 мл) насыщали сульфатом аммония до 80% насыщения и сформировавшийся осадок собирали центрифугированием в течение 10 мин. при 30 000 g. Осадок растворяли в минимальном объеме 1 M ЭДТА, содержащего 1 M МЭ, и диализовали против этого раствора для удаления ионов SO_4^{2-} . Диализат разводили фосфатным буфером pH 6,5 до конечной концентрации 0,01 M (3 мл, 20 мг белка) и наносили на колонку с КМ-целлюлозой (1×30 см), уравновешенную 0,01 M фосфатным буфером pH 6,5. Белки элюировали с помощью градиента NaCl (0—0,56 M) в том же буферном растворе со скоростью 8 мл/час. Фракции собирали по 5 мл. Результаты хроматографии показали, что основное количество ингибитора выходит в зоне 0,16—0,32 M NaCl (фракции 8—12).

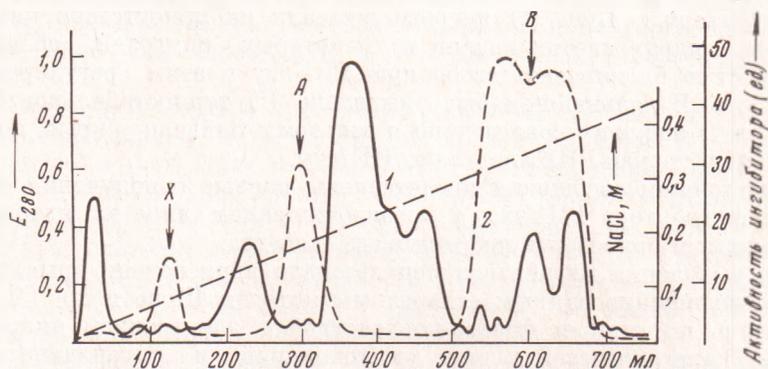


Рис. 1. Хроматография ингибитора РНКазы из ядерного сока печени крыс на ДЭАЭ-сефадексе А-50, Колонка 2,5 × 25 см, 1 — оптическая плотность при 280 м μ ; 2 — активность ингибитора

Активные фракции концентрировали добавлением сульфата аммония (80% насыщение) как описано выше. Осадок растворяли в 1 мл 0,01 M фосфатного буфера pH 7,5, содержащего 0,1 M NaCl, и диализовали три часа против этого же раствора. Диализат (0,7 мг белка) наносили на колонку с сефадексом Г-100 (1×61 см), уравновешенную 0,01 M фосфатным буфером pH 7,5 с 0,1 M NaCl и элюировали этим же раствором со скоростью 15 мл/час. Собирали фракции по 1 мл. При гель-фильтрации фракции В на сефадексе Г-100 ингибиторная активность была выявлена в зоне между двумя белковыми пиками. Активные фракции (15—18) объединяли, насыщали сульфатом аммония до 80% и использовали для дальнейших исследований. Удельная активность очищенного ингибитора в объединенных фракциях составляла 3346 ед/мг белка при выходе 9,8%. Препарат был очищен в 3042 раза. Результаты очистки суммированы в табл. 1.

Ингибитор ядерного сока печени крыс представляет собой вещество белковой природы с максимумом поглощения при 280 м μ и минимумом при 251 м μ ($E_{280} / E_{250} = 1,84$; $E_{280}^{0,1\%} = 0,96$). Молекулярный вес ингибитора, определенный методом гель-фильтрации на калиброванных колонках с сефадексом Г-100 ($^{\circ}$), равен 60 000.

Нагревание при 60° в течение 5 мин., обработка РХМБ (10^{-8} M) и мочевиной (5 M) полностью инактивируют его. Присутствие 1 M МЭ было совершенно необходимо для сохранения активности препарата на всех стадиях очистки и хранения. В сульфате аммония 80% насыщения при -20° препарат сохранял 50% активности в течение 1 мес.

Оптимальная активность ингибитора наблюдается в интервале pH 7,0—7,8. Линейная зависимость между концентрацией ингибитора (0—1,6 ед.) и степенью угнетения РНКазы сохраняется до 80% ингибиро-

ния. Фермент-ингибиторный комплекс образуется мгновенно и сохраняется на протяжении всего периода реакции. В отличие от препарата, полученного Шапотом и др. (2), ядерный ингибитор подавляет активность только РНКазы и не оказывает влияния на активность панкреатической ДНКазы. По предварительным данным, для полного угнетения ядерной эндорибонуклеазы достаточны меньшие концентрации препарата, чем для панкреатической РНКазы.

При повторной гель-фильтрации на сефадексе Г-100 ингибитор выходит в виде симметричного пика с хорошей корреляцией между активностью и поглощением при 210 мμ, что можно рассматривать как свидетельство высокой степени его чистоты.

Таблица 1

Очистка ингибитора рибонуклеазы из ядерного сока печени крыс

Стадия очистки	Общее содержание белка, мг	Всего единиц активности	Удельная активность, ед/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Ядерный сок	8030	8830	1,1	1,0	100
Надосаочная жидкость рН 5,0	4860	7760	1,6	1,5	88
Обработка гелем фосфата Са	174	4680	27	24	53
Хроматография на ДЭАЭ-сефадексе А-50					
фракция А	2	490	245	223	5,5
фракция В	20	2070	103	94	23,4
Хроматография фракции В на КМ-целлюлозе	0,7	1430	2043	1857	16,2
Гель-фильтрация фракции В на сефадексе Г-100	0,26	870	3346	3042	9,8

При сопоставлении свойств ядерного ингибитора с цитоплазматическим ингибитором Рота (7), полученным из надосаочной жидкости печени крыс (4), оказалось, что оба ингибитора имеют одинаковую электрофоретическую подвижность в 7,5% полиакриламидном геле, ведут себя идентично при гель-фильтрации на сефадексе Г-100 и при хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе А-50, чувствительны к температуре и РХМБ (10^{-6} M), угнетают только РНКазу и не действуют на ДНКазу, имеют одинаковый молекулярный вес (~60 000). Это позволяет предположить, что ядерный ингибитор РНКазы идентичен цитоплазматическому ингибитору Рота.

Полученный ингибитор, по-видимому, играет важную роль в регуляции активности внутриядерных рибонуклеаз. Препарат может быть использован для изучения ядерных деполимераз РНК и для выделения полирибосом, ядерных мембран и высокополимерных РНК в условиях, препятствующих их деградации.

Автор выражает благодарность Р. И. Татарской за консультативную помощь и обсуждение полученных результатов.

Одесский научно-исследовательский институт курортологии

Поступило
2 XII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. K. Chakravoty, H. Bush, *Cancer Res.*, **27**, 4, 789 (1967). ² V. S. Shapot, I. A. Chudinova et al., *FEBS Letters*, **13**, 1, 13 (1971). ³ J. Chauveau, J. Moule, C. Roniller, *Exp. Cell Res.*, **11**, 2, 317 (1956). ⁴ A. A. Gribnau, J. G. G. Schoenmakers et al., *Biochem. biophys. acta*, **224**, 1, 55 (1970). ⁵ A. Tiselius, *Arkiv. Kemi*, **7**, 3, 443 (1954). ⁶ P. Andrews, *Biochem. J.*, **91**, 2, 222 (1964). ⁷ I. S. Roth, *Biochem et biophys. acta*, **21**, 1, 34 (1956).