

В. П. КАЛИНОВСКИЙ, И. Ф. СЕЙЦ

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИНФОРМАЦИОННОЙ РНК ПЕПСИНОГЕНА И ЕЕ ТРАНСЛЯЦИЯ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ КРЕБС-II

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 14 II 1975)

Вопрос о механизме биосинтеза ферментов желудочного сока имеет как теоретическое, так и большое практическое значение. Возможность регулирования и направленного изменения этого процесса зависит от расшифровки основных его этапов и, в первую очередь, транскрипции соответствующих генов в мРНК и трансляции последней в белок. В ряде случаев уже удалось выделить и охарактеризовать мРНК отдельных белков: глобина (¹, ²), легких цепей иммуноглобулина (³), кристаллина (⁴), миозина (⁵), овальбумина (⁶), фиброина (⁷), коллагена (⁸) и других, однако подобная работа не была произведена в отношении пепсина — важнейшего протеолитического фермента желудочного сока, хотя доля пепсиногена в общей массе синтезируемой слизистой оболочкой желудка белка составляет около 20%.

Целью данной работы было идентифицировать и изолировать мРНК пепсиногена и осуществить синтез этого профермента *in vitro* в бесклеточной системе с выделенной мРНК как матрицей. Как будет видно из дальнейшего, в принципе эта задача была решена, хотя в настоящее время мРНК пепсиногена еще не получена в чистом гомогенном состоянии. Тем не менее, выделение из слизистой желудка небольшой группы РНК с охарактеризованным молекулярным весом и способностью индуцировать в бесклеточной системе синтез белка с биологической и физико-химическими характеристиками пепсиногена создает предпосылки получения соответствующей мРНК в гомогенном состоянии.

В опытах использовали слизистую оболочку желудка свиней, полученную из Ленинградского мясокомбината. Тотальные препараты цитоплазматической РНК (цРНК) выделяли по Георгиеву (⁹). Концентрацию РНК устанавливали по поглощению света при 260 нм (¹⁰). О чистоте полученных препаратов судили по отношению E_{260}/E_{280} и E_{260}/E_{230} . мРНК выделяли из цРНК методом электрофореза в 2,5% полиакриламидном геле (ПАГ) на большой препаративной колонке, разработанной в нашей лаборатории (¹¹, ¹²), на которую наносили до 30 мг цРНК. Аналитический электрофорез РНК проводили в 2,5% ПАГ по Ленину (¹³), синтез пепсиногена осуществляли в бесклеточной системе, приготовленной из асцитных мышинных клеток Кребс-II, полученных на 7-й день после перевивки. Очистку и приготовление среды из клеток Кребс-II проводили по методу Жакоб — Лорена (¹⁴). Для истощения матричной эндогенной активности бесклеточную систему инкубировали 60 мин. при 37° в присутствии 4 мкмол/мл креатинфосфата, 200 мкг/мл креатинкиназы, 0,2 мкмол/мл ГТФ, 1 мкмол АТФ и использовали после соответствующей повторной очистки (¹⁴).

1 мл инкубационной среды содержал: 35 мкмол трис-HCl pH 7,6, 96 мкмол KCl, 3 мкмол ацетата магния, 3,2 мкмол меркаптоэтанол, 0,01 мкмол дитиотреитола, 1 мкмол АТФ, 0,2 мкмол ГТФ, 4 мкмол креатинфосфата, 200 мкг креатинкиназы, 3,5 мг белка бесклеточной системы из клеток Кребс-II. В инкубационную среду добавляли гидролизат белка (производство ЧССР), содержащий меченые по углероду аминокислоты из

расчета 0,1 мкС/мл (удельная активность 1 мС/мг) и смесь недостающих в гидролизате немеченных L-аминокислот (L-треонин, L-цистеин, L-цистин, L-аспарагин, L-глутамин) до конечной концентрации 0,1 мкмол/мл каждой аминокислоты. В последнюю очередь в систему бесклеточного синтеза вносили 1–10 мкг фракции РНК. Реакцию останавливали добавлением равного объема 10% трихлоруксусной кислоты (ТХУК). Осадки 3–4 раза промывали 5% ТХУК, прогревали на водяной бане в течение 15 мин. при 90° с 5% ТХУК, снова промывали холодной 5% ТХУК, затем смесью спирт — эфир — хлороформ ⁽¹⁵⁾ и переносили на миллипоровые фильтры. Радиоактивность проб определяли на счетчике МАРК-2 (Нуклеар Чикаго) в толуоловом сцинтилляторе. В параллельных опытах определяли протеолитическую активность пепсиногена после его активации HCl при pH 1,8 по Ансону и Мирскому ⁽¹⁶⁾. Содержание белка устанавливали по Лоури ⁽¹⁷⁾.

На рис. 1 приводятся данные по preparativному фракционированию цРНК слизистой оболочки желудка свиньи. Как видно из рисунка, выделены и изолированы три основных (4S, 18S, 28S) и ряд промежуточных мелких фракций различного молекулярного веса и функционального назначения. Всего собирали на колонке и исследовали до 80 фракций. Каждая фракция РНК, выделенная preparativно,

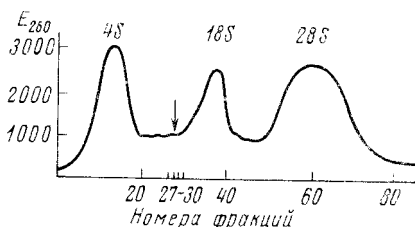


Рис. 1. Preparativное разделение цитоплазматической РНК слизистой оболочки желудка свиньи электрофорезом в 2,5% ПАГ

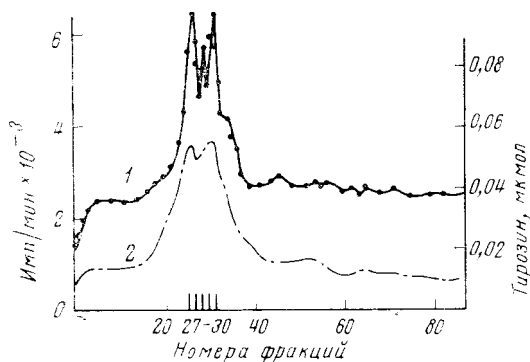


Рис. 2

Рис. 2. Интенсивность включения меченых аминокислот гидролизата белка и протеолитическая активность при pH 1,8 белкового продукта бесклеточного синтеза в системе Krebs-II при добавлении различных фракций РНК слизистой оболочки желудка свиньи. 1 — включение метки, 2 — протеолитическая активность белкового продукта

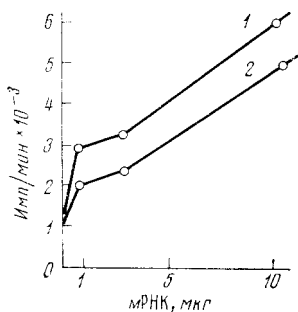


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость включения метки в продукт белкового синтеза от количества добавленной мРНК пепсиногена слизистой оболочки желудка свиньи. 1 — фракция № 27, 2 — фракция № 29

вносилась в количестве 1–10 мкг в белоксинтезирующую систему. Наиболее высокий эффект стимуляции включения меченых аминокислот был после добавления фракций № 27, 29 и 30 (рис. 2, 3). Параллельное определение в продукте синтеза протеолитической активности пепсиногена после добавления фракций № 27, 29 и 30 (рис. 2, 3). Параллельное определение для пепсина только в пробах, где в белоксинтезирующую систему вводились те же фракции РНК, а именно № 27, 29 и 30 (рис. 2). Белковый продукт, синтезированный в бесклеточной системе в присутствии этих фракций РНК, при электрофорезе в 7% ПАГ располагался в тех

же быстродвигающихся анодных зонах, что и хроматографически очищенный пепсиноген свиньи. Аналогичные исследования всех других выделенных препаративно фракций цРНК, включая главные 4S, 18S и 28S, не показали в тех же условиях прироста протеолиза, свойственного для пепсиногена-пепсина.

Последующий аналитический электрофорез в 2,5% ПАГ фракций РНК, стимулирующих *in vitro* включение меченых аминокислот, позволил установить, что по своим коэффициентам седиментации они соответствуют 16—17S.

Таким образом, фракции цитоплазматической РНК слизистой оболочки желудка свиньи с константой седиментации 16—17S обладают способностью стимулировать в бесклеточной системе включение меченых аминокислот в белковый продукт, имеющий биологические (протеолитическая активность при pH 1,8) и физико-химические (электрофоретическая подвижность в ПАГ) свойства пепсиногена. Это позволяет приписать данным фракциям РНК информационную фракцию и матричную роль в биосинтезе пепсиногена.

Научно-исследовательский институт онкологии
им. Н. Н. Петрова
Ленинград

Поступило
9 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Williamson, M. Morrison et al., *Biochemistry*, v. 10, № 16, 3014 (1971).
² J. Sampson, M. B. Mathews et al., *Biochemistry*, v. 11, № 19, 3636 (1972). ³ J. Schechter, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 70, № 8, 2256 (1973). ⁴ T. J. M. Berns, V. A. M. Scheurs et al., *Europ. J. Biochem.*, v. 33, 551 (1973). ⁵ S. M. Heywood, M. Nwagwu, *Biochemistry*, v. 8, № 9, 3839 (1969). ⁶ R. Palacion, R. D. Palmiter, R. T. Schimke, *J. Biol. Chem.*, v. 247, № 8, 2316 (1972). ⁷ Y. Suzuki, D. D. Brown, *J. Mol. Biol.*, v. 63, 409 (1972). ⁸ S. Bloom, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 19, 317 (1965). ⁹ Г. П. Георгиев, В кн.: Химия и биохимия нуклеиновых кислот, Л., 1968, стр. 74. ¹⁰ A. C. Peacock, C. W. Dingman, *Biochemistry*, v. 6, № 6, 1818 (1967). ¹¹ И. Ф. Сейц, В. П. Калиновский, Т. А. Горюхина, Фракционирование РНК на препаративной колонке методом электрофореза в полиакриламидном геле, Л., 1973. ¹² В. П. Калиновский, Т. А. Горюхина и др., *Лаб. дело*, № 5, 280 (1974). ¹³ U. E. Loening, I. Ingle, *Nature*, v. 215, № 5099, 363 (1967). ¹⁴ M. Jacobs-Lorena, C. Baglioni, *Biochemistry*, v. 11, № 26, 4970 (1972). ¹⁵ М. И. Лерман, *Мол. биол.*, т. 2, 209 (1968). ¹⁶ M. L. Anson, A. E. Mirsky, *J. Gen. Physiol.*, v. 16, 59 (1932). ¹⁷ O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al., *J. Biol. Chem.*, v. 193, 265 (1951).