

М. Г. ТРУДОЛЮБОВА, Е. В. СИДОРОВА, М. И. ЛЕРМАН

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРЕДПОЛАГАЕМОЙ АЛЬБУМИНОВОЙ мРНК ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 11 III 1975)

Для изучения структуры мРНК, синтеза индивидуальных генов и анализа механизмов трансляции необходимо иметь индивидуальные полирибосомы и выделенную из них нативную мРНК. Наиболее общим методом выделения индивидуальных полирибосом является метод, основанный на взаимодействии полирибосом с антителами к синтезируемому белку. Частным вариантом этого метода является осаждение полирибосом антисывороткой, чистыми антителами или их фрагментами в присутствии носителя (копреципитация) ^(1, 2). Этот метод с успехом был применен для выделения полирибосом, богато представленных в клеточном пуле, например гемоглобиновых (~80% тотальных полирибосом), овальбуминовых (~60%) и для цепей γ -глобулина (~30%). Однако его применимость ко всем классам полирибосом, в особенности к полирибосомам, представленным в небольших количествах, остается неясной. Нами разработана высокоспецифическая процедура извлечения индивидуальных полирибосом, содержащих интактную мРНК, с помощью иммуносорбентов, содержащих ковалентно связанный комплекс антиген — антитело, роль антигена в котором играет белок, идентичный синтезируемому на полирибосомах.

Работу проводили на перививной плазмоцитоме МОРС 21 А, продуцирующей иммуноглобулин $\gamma^{1,h}$ -типа, и на печени крыс. Полирибосомы выделялись по модифицированной методике Блобеля ⁽³⁾. Получение антигенов, антисывороток и приготовление иммуносорбентов описано в предыдущей работе ⁽⁴⁾.

Процедура извлечения индивидуальных полирибосом сводилась к следующему. В стеклянные центрифужные пробирки вносили определенное количество ИГМ- или САК-сэндвич-сорбентов * ⁽¹⁾. Добавляли к ним соответствующие полирибосомы и инкубировали при 0° с постоянным перемешиванием в течение 30–40 мин. Сорбент отмывали 3–5 раз фосфатным буфером (0,01 М К-фосфатный буфер, 0,15 М КСl; 0,0015 М MgCl₂) от несорбированного материала. В аналитическом варианте (1 мг сорбента + (0,5–4 мг) полирибосом) изучали величину связывания, зависимость этой величины от рН и ионной силы среды, емкость сорбентов. Для препаративных целей — выделения и характеристики мРНК и растущих пептидов — применяли десятикратные количества сорбента и полирибосом (к 10 мг сорбента прибавляли 10–15 мг полирибосом). Для получения же количеств мРНК, достаточных для постановки реакций с обратной транскрипцией и в бесклеточной системе, необходимо иметь как минимум 100 мг сорбента и, соответственно, 100–200 мг полирибосом на опыт.

Для определения условий, в которых происходит специфическая сорбция данного класса полирибосом, измеряли связывание полирибосом специфическими и неспецифическими иммуносорбентами при избытке возможных мест связывания в зависимости от ионной силы среды и величины рН. Установлено (см. рис. 1), что при повышении ионной силы до физиологического уровня и несколько выше (от 0,01 до 0,5 М КСl) сорбция «чу-

* ИГМ — иммуноглобулин; САК — сывороточный альбумин крысы.

жих» полирибосом практически не происходит, а «собственных» снижается до теоретически ожидаемого уровня (10–12%). Таким образом, в растворах с низкой ионной силой сорбция полирибосом осуществляется за счет неспецифических ионных взаимодействий, а при физиологической и более высокой ионной силе (0,15–0,5 М КСl) сорбция происходит специфическим образом, т. е. с образованием связи антиген — антитело. Это специфическое связывание происходит в довольно узком интервале значений рН среды: при рН 8 оно резко уменьшается, а при рН 6 повышается, по-видимому, за счет агрегации полирибосом.

Для подтверждения того, что антигеном в исследуемых полирибосомах являются растущие полипептиды, полирибосомы обрабатывали пуромицином в условиях повышенной (0,5 М КСl) ионной силы при 0° (°). Полири-

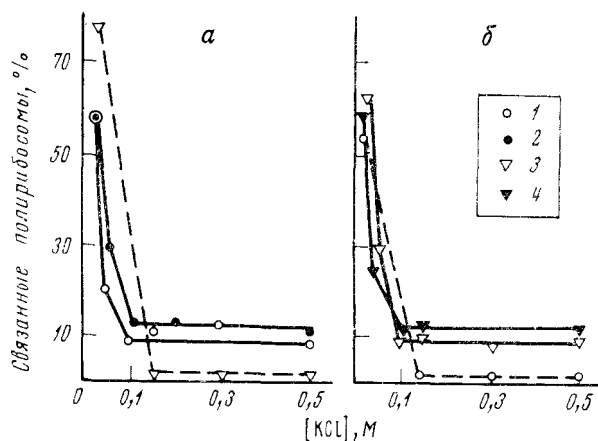


Рис. 1. Влияние концентрации КСl на связывание полирибосом специфическими и неспецифическими иммуносорбентами. Тотальные полирибосомы печени крысы, меченные по растущим пептидам (1) и рРНК (2); тотальные полирибосомы опухоли, меченные по растущим полипептидам (3) и рРНК (4). а — иммуносорбент, специфический для альбумина и б — специфический для γ -глобулина

босомы при этом не диссоциировали, но растущие полипептиды освобождались. После такой обработки количество связываемого специфическим иммуносорбентом рибосомного материала резко уменьшалось в соответствии с количеством удаляемых цепей.

Специфическая сорбция полирибосом на иммуносорбентах позволяет точно измерить количество данного вида полирибосом в общем пуле клеточных рибосом. Для клеток печени и плазмоцитомы количество связывающихся полирибосом, полученных из постмитохондриальной надосадочной жидкости, составляет 10–12%. Эти полирибосомы являются мембраносвязанными, так как свободные полирибосомы, как показано нами, практически не способны связываться с иммуносорбентами. Поскольку в постмитохондриальной надосадочной жидкости извлекается лишь около половины полирибосом, связанных с мембранами, то, следовательно, около 20–25% полирибосом синтезируют альбумин (в клетках печени крысы) и γ -глобулин (в клетках плазмоцитомы).

Специфичность связывания полирибосом иммуносорбентами наиболее отчетливо демонстрируется следующими экспериментами: электрофорезом в полиакриламидном геле растущих полипептидов, выделенных из тотальных и связанных с сорбентом полирибосом, и седиментационным анализом тотальной и выделенной из иммунохимического комплекса РНК. Для получения импульсно меченных растущих полипептидов крысам вводили внутривенно по 100 мкС 14 С-лейцина на 5 мин. Для избирательного

мечения мРНК крысам вводили на 1 час по 50 мкг актиномицина D, чтобы подавить синтез рРНК, а затем по 100 мкС ^{14}C -оротовой кислоты на 4—5 час.

Анализ растущих полипептидов проводили в 10% полиакриламидном геле (⁶). Рис. 2 показывает, что в сорбированных на специфическом сорбенте полирибосомах растущие полипептиды представлены альбумином и более легкими цепями и не содержат, в отличие от тотальных полирибосом, более тяжелых цепей.

Для выделения препарата РНК из полирибосом сорбент отмывали 5—6 раз буфером, содержащим 0,15 M KCl, и обрабатывали на холоду 0,02 M ЭДТА, затем инкубировали 5 мин. при 37° с 2% додецилсульфатом Na;

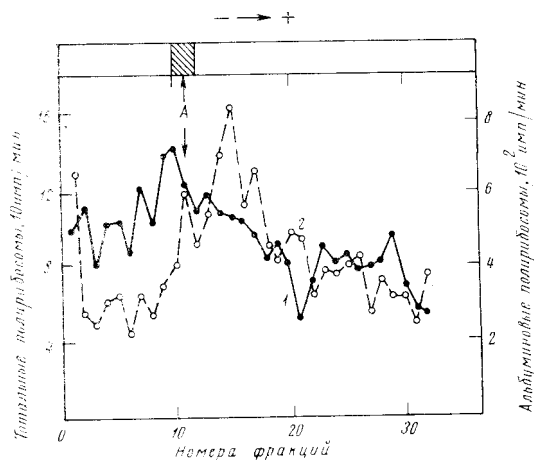


Рис. 3

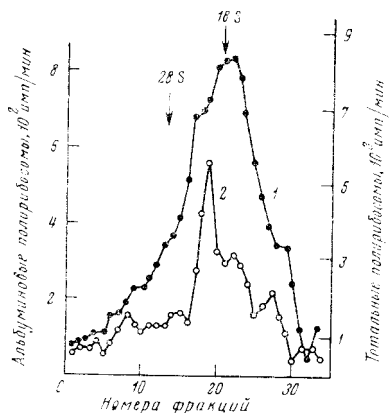


Рис. 2

Рис. 2. Электрофорез в полиакриламидном геле растущих полипептидов, меченных ^{14}C -лейцином, выделенных из тотальных (1) и альбуминовых (2) полирибосом. Полипептиды выделялись аналогично препарату РНК. А — расположение полосы чистого альбумина в контроле

Рис. 3. Седиментационный профиль мРНК из тотальных (1) и альбуминовых (2) полирибосом печени крысы

осветляли при 4—5000 об/мин в течение 5 мин. и обработку повторяли трижды, все надосадочные жидкости объединяли.

Полученный препарат РНК, избирательно меченный по мРНК, анализировали в градиенте плотности сахарозы 15—30% в присутствии 0,005 M ЭДТА и 0,5% додецилсульфата Na в роторе SW-27.1 на центрифуге «Spinco» L2-65B при 22° 17 час. при 25000 об/мин. Результаты анализа представлены на рис. 3. Из рисунка видно, что мРНК тотальных полирибосом печени, меченная до равновесия (⁶), седиментирует гетеродисперсно, занимая зону градиента от 8S до 35S с пиком между 15S и 20S. мРНК из сорбированных полирибосом (предполагаемая альбуминовая мРНК), напротив, содержит три гомогенных компонента: главный 20S (около 50—60% всего материала) и два дополнительных 16S (~20%) и 9S (~15%). Теоретически альбуминовая мРНК должна иметь коэффициент седиментации 16S, поэтому компонент 20S, по-видимому, является ее димером (что совпадает с недавно полученными данными для овальбуминовой мРНК (⁷)); 9S-компонент, вероятно, является продуктом нормальной деградации мРНК.

Для извлечения очищенной индивидуальной мРНК из полирибосом ее необходимо освободить от рРНК и тРНК, основываясь на содержании в мРНК фрагментов полиА (⁷). По предварительным данным, при очистке РНК, выделенной из сорбированных индивидуальных полирибосом мето-

дом сорбции на колонке целлюлозы с иммобилизованной полиУ, полиА-содержащая мРНК (предполагаемая альбуминовая мРНК), подобно тотальной (⁷), составляет 25% от всей мРНК.

Авторы выражают благодарность Е. В. Любимовой за фракционирование индивидуальной мРНК на колонке с полиУ.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
6 III 1975

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. L. Delovitch, Brian K. Davis, G. Holme, J. Mol. Biol., v. 69, 373 (1972). ² R. Palacios, D. Sullivan et al., J. Biol. Chem., v. 248, 540 (1973). ³ G. Blobel, D. Sabatini, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 68, 390 (1971). ⁴ С. В. Сидорова, О. Абакимова и др., Мол. биол., т. 7, 533 (1973). ⁵ G. Blobel, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 68, 4, 832 (1971). ⁶ E. V. Brykina (Lyubimova), O. V. Podobed et al., Mol. Biol. Reports, v. 1, № 7, 417 (1974). ⁷ О. В. Подобед, Е. В. Брыкина и др., Мол. биол., т. 8, 936 (1974). ⁸ R. D. Palmiter, T. Oka, R. T. Schimke, J. Biol. Chem., v. 246, 724 (1971). ⁹ M. E. Haines, N. H. Carey, R. D. Palmiter, Europ. J. Biochem., v. 43, 549 (1974).