

УДК 577.1:577.95:576.807.7

БИОХИМИЯ

А. Ю. БОРОВКОВ, Е. Н. КАРАКИН, Б. А. КУЗЬИН, С. М. СВИРИДОВ

## СИНТЕЗ КРЫСИНОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В ОВОЦИТАХ *RANA RIDIBUNDA*

(Представлено академиком Д. К. Беляевым 11 III 1975)

Для решения ряда онтогенетических задач, связанных с детерминацией и дифференцировкой клеток, необходим метод, позволяющий определить время появления в клетке мРНК-матриц для синтеза того или иного белка. Существует ряд прямых методов тестирования этих матриц. Сюда можно отнести бесклеточные белоксинтезирующие системы<sup>(1)</sup> и метод гибридизации РНК—ДНК<sup>(2)</sup>. Мы попытались использовать в качестве тест-системы белоксинтезирующую систему овоцитов *Rana ridibunda*. Впервые такая система была предложена Гердоном, использовавшим овоциты *Xenopus laevis*<sup>(3)</sup>, который установил, что инъецированные в них чужеродные матрицы мРНК способны синтезировать соответствующие белки. Наличие этих чужеродных белков определяется сравнением спектров радиоактивности электрофореграмм или хроматограмм белков овоцита при инъекции мРНК и без нее. Главным затруднением при работе с белоксинтезирующей системой является метод тестирования чужеродных белков. Упомянутые выше методы позволяют исследовать синтез белков, резко отличающихся от собственных белков овоцита по физико-химическим характеристикам, но требуют высокой концентрации и гомогенности введенной мРНК. При решении онтогенетических задач работа ведется с относительно низкими концентрациями мРНК и высокой гетерогенностью матричного материала, поэтому к методам детекции наведенного белкового синтеза предъявляются повышенные требования в отношении их специфичности, разрешающей способности и уровня фона. В нашей работе для этой цели использованы радиоиммунохимические методы. В настоящей, модельной, серии экспериментов источником матриц служили полирибосомы печени крысы, выделенные по методу Олснеса<sup>(4)</sup>. Полученные препараты полирибосом анализировали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы и электронно-микроскопически. Антисыворотка к крысиному сывороточному альбумину (аКСА) была получена от иммунизированных кроликов. Антисыворотка не давала перекрестной реакции с экстрактом из овоцитов *Rana ridibunda*. Овоциты выделяли из яичников половозрелых предварительно стимулированных самок, которые стимулировались за два дня до опыта однократной инъекцией гомогената гипофизов самок *Rana ridibunda*. Для инъекций отбирались овоциты диаметром более 1,5 мм с ярко выраженным разделением на анимальный и вегетативный полюсы. Все процедуры инъекций проводили по методу, описанному Гердоном<sup>(3)</sup>. В овоциты инъецировали раствор полирибосом в концентрации от 0 до 10 мг/мл, содержащий <sup>14</sup>C-меченные аминокислоты (*L*-лейцин, *L*-серин, *L*-изолейцин, *L*-лизин) с суммарной активностью от 3 до 10 мкС/мл. Инъецируемый раствор был приготовлен на ТМК-буфере (0,15 *M* KCl, 0,0005 *M* MgCl<sub>2</sub>, 0,01 *M* трис-HCl, pH 7,5). В качестве контроля использовали овоциты, инъецированные тем же раствором, но не содержащим полирибосомы. Каждая серия экспериментов, состоящая для реакции преципитации из 30 овоцитов, а для иммуноэлектродиффузии из 6, была выполнена не менее чем в 10 повторностях. После инъекции ово-

циты культивировались в течение 4 час. в физиологическом растворе, содержащем  $^{14}\text{C}$ -меченные аминокислоты по методу, описанному Гердоном (<sup>6</sup>). Овоциты гомогенизировали в 1% тритоне X-100 и 0,125% водном растворе КСА. Затем гомогенат центрифугировали при 16 000  $g$  при 0° 1 час. Надосадочную жидкость собирали и анализировали на присутствие  $^{14}\text{C}$ -меченного

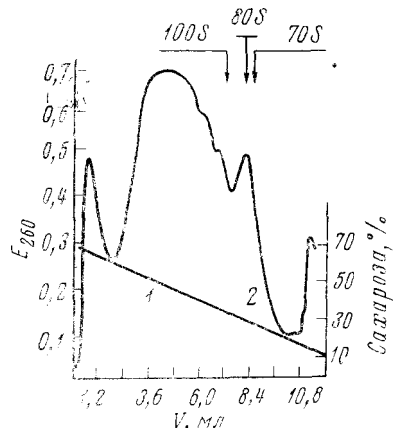


Рис. 1. Седиментограмма полирибосом печени крысы. Центрифуга MSE Superspeed-40, ротор SW-25, 25 000 мин<sup>-1</sup>, 1,4 часа. 1 — градиент концентрации сахаразы, 2 —  $E_{260}$

КСА несколькими способами: 1) реакцией преципитации с последующей отмывкой преципитата в буфере (0,14  $M$  NaCl, 0,01  $M$  трис-HCl, pH 7,2) и счетом радиоактивности на сцинтилляционном счетчике; реакцию проводили в избытке аКСА, доза которой была установлена в предварительном калибровочном эксперименте; 2) иммуноэлектродиффузией против аКСА в 1% агарозе на 0,14  $M$  трис-NaCl, 5 мМ ЭДТА, 0,18  $M$   $\text{P}_2\text{O}_5$ -буфере pH 8,6, содержащем 1% тритон X-100, 1% твин-60 и 1% таурохолат натрия с последующей автораддиографией (<sup>7</sup>).

Выделенные полирибосомы оказались нативными, в пользу этого свидетельствуют характерный профиль их распределения при центрифугировании в градиенте плотности сахаразы (рис. 1) и полученные электронограммы (рис. 2\*). Нами была изучена зависимость между уровнем наведенного белкового синтеза и количеством введенных полирибосом. Полученные

данные согласуются с результатами, опубликованными в (<sup>8</sup>). Оптимальная концентрация инъецируемого в овоцит раствора полирибосом объемом в 20 нл оказалась равной 1 мг/мл. Были подобраны оптимальные разведения  $^{14}\text{C}$ -меченных аминокислот как для инъекции в овоцит, так и для постинъекционного культивирования. Наиболее удачной концентрацией  $^{14}\text{C}$ -меченных предшественников белка, вводимых в инкубационную среду и в инъецируемый раствор полирибосом, оказалась 5–7 мкС/мл. Ниже представлены результаты преципитации радиоактивного белка из экстрактов овоцитов аКСА антисывороткой (имп/мин):

| № эксперимента | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | Средн. |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|
| Опыт           | 5086 | 4790 | 4367 | 4826 | 4993 | 4009 | 4245 | 4243 | 4059 | 4024 | 4463   |
| Контроль       | 3743 | 3553 | 4165 | 3628 | 4147 | 3830 | 3878 | 3719 | 3819 | 3462 | 3794   |

Во всех случаях радиоактивность преципитатов, полученных от овоцитов, инъецированных полирибосомами печени крыс, выше относительно контроля. Однако это превышение слишком мало, чтобы с уверенностью можно было судить о синтезе КСА в овоците. Вероятно, это обстоятельство объясняется неспецифической сорбцией  $^{14}\text{C}$ -меченных аминокислот на немеченый носитель, а также процессом вовлечения радиоактивных белков овоцита в специфический иммунный преципитат. Попытка снизить неспецифическую сорбцию  $^{14}\text{C}$ -меченных аминокислот обработкой КСА-носителя немечеными аминокислотами оказалась безуспешной. Отмывание иммунного преципитата в буферных растворах высокой ионной силы и содержащих безионные детергенты также не привело к уменьшению уровня радиоактивного фона.

Автораддиограммы, полученные с препаратов иммуноэлектродиффузии, показаны на рис. 4. При использовании этого метода тестирования неспе-

\* Рис. 2, 3, 4 см. на вкл. к стр. 743.

пффическая сорбция также велика, но она может быть существенно снижена использованием детергентов, поэтому на рис. 4 хорошо видна разница в интенсивности включения метки в опытные и контрольные овоциты. При использовании иммуноэлектродиффузии очень трудно проводить точную количественную оценку радиоактивного включения. Для грубой количественной оценки была использована денситометрия, которая показала пятикратное превышение ( $7,0 \pm 1,0$  усл. ед. в опыте и  $1,3 \pm 0,25$  в контроле) радиоактивного включения в овоциты, инъецированные полирибосомами, по сравнению с контрольными. Анализируя полученные результаты, можно заключить, что овоциты *Rana ridibunda* способны синтезировать белки с чужеродных матриц, которые можно тестировать методом радиоиммуноэлектродиффузии.

Работа проведена при постоянном внимании и содействии проф. Л. И. Корочкина, которому авторы искренне благодарны. Мы благодарим за оказанную помощь Н. М. Денегу, В. Г. Будкера, Г. М. Дымшица, В. А. Мельникова, Л. С. Сапдахчиева. Авторы выражают особую благодарность акад. Д. К. Беляеву, активно поддержавшему работу и предоставившему возможность ее осуществления.

Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Академии наук СССР  
Новосибирск

Поступило  
11 III 1975

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> R. E. Locard et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 37, № 2, 204 (1966).  
<sup>2</sup> S. E. Harris et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, № 12, Part 2, 3776 (1973).  
<sup>3</sup> J. B. Gurdon et al., Nature, v. 233, 177 (1971). <sup>4</sup> S. Olsnes, Biochim. et biophys. acta, v. 213, № 1, 149 (1970). <sup>5</sup> J. B. Gurdon, J. Embryol. Exp. Morphol., v. 24, Part 2, 249 (1970). <sup>6</sup> J. B. Gurdon, J. Embryol. Exp. Morphol., v. 20, Part 3, 401 (1968). <sup>7</sup> Г. И. Абелев, Р. Д. Бакиров, Иммуноауторадиография, в кн. Иммуно-химический анализ, М., 1968, стр. 271. <sup>8</sup> J. B. Gurdon, Nature, v. 248, 772 (1974).