

З. В. ГОРБАЧ

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ РНК ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

(Представлено академиком А. С. Спириным 22 V 1975)

Многими авторами отмечалось, что в препаратах РНК, выделенных из печени крысы или других объектов животного происхождения с помощью фенола ⁽¹⁾ при пониженной температуре (0–4°), кроме основных фракций 28S, 18S, 5S рибосомальных и 4S транспортных можно выделить и другие фракции РНК ^(2, 3). Так как общее их содержание во всей массе получаемых РНК не превышает 5–10%, то такие методы как гель-фильтрация на сефадексе G-100 ⁽⁴⁾, сефарозе 4В ⁽⁵⁾, или наиболее распространенный метод фракционирования макромолекул в градиенте концентрации сахарозы ⁽⁶⁾ уже не обладают достаточной чувствительностью для обнаружения этих фракций. Помочь может метод диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).

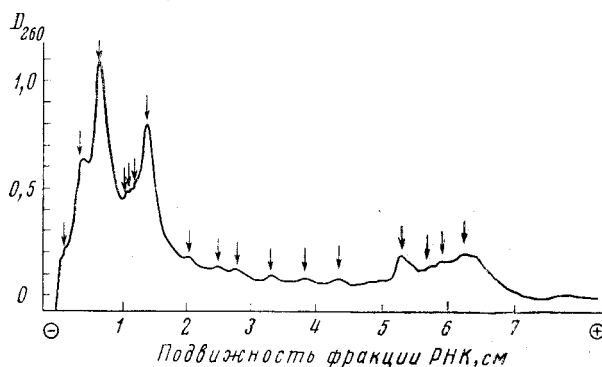


Рис. 1

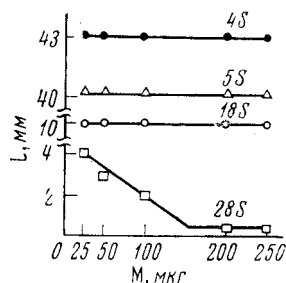


Рис. 2

Рис. 1. Денситограмма цитоплазматических РНК, выделенных из печени крысы. Стрелки указывают на отдельные фракции РНК

Рис. 2. Зависимость электрофоретической подвижности РНК (L) в 2,5% полиакриламидном геле от количества нанесенного препарата (M)

Авторами ^(2, 3), проанализировавшими фракционный состав цитоплазматических РНК печени крысы, было найдено, что имеются две фракции РНК, константы седиментации которых превышают величину 28S. Арионом ⁽⁷⁾ показано, что одна из этих высокомолекулярных фракций — это 32S, предшественник 28S рибосомальной РНК. Большое число минорных фракций, не укладывающихся в общую схему процессинга РНК ⁽⁸⁾, по-видимому, нельзя отнести к продуктам деградации высокомолекулярных РНК в процессе выделения, так как картина фракционного состава хорошо воспроизводится на электрофореграммах. Кроме того в экспериментах, ставящих своей целью расшифровку фракционного состава цитоплазматических и других типов РНК, как правило, используются инактиваторы или ингибиторы РНКаз. Здесь, однако, остаются некоторые сомнения по поводу полноты остановки деградирующей активности РНКаз с помощью фенола, поливинилсульфата, бентонита и других агентов.

В наших экспериментах мы воспользовались методом фракционирования нуклеиновых кислот в ПААГ, приготовленном на 6М мочеvine (*). При этом для приготовления геля использовали акриламид, конечная концентрация которого составляла 2,5%, бисакриламид 0,1%, мочеvinу 6М, додецилсульфат натрия 0,1% *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) 0,1%, персульфат аммония 0,1%. Для электрофореза РНК использовали 0,04 М трис CH_3COOH -буфер (рН 7,8), содержащий 0,02 М ацетат натрия и 0,002 М ЭДТА. Полимеризация геля заканчивалась в течение 30–40 мин. при комнатной температуре для вертикального электрофореза. Инициаторы полимеризации удаляли предварительным электрофорезом в течение 30 мин. при градиенте напряжения 10 в/см. Выделяли цитоплазматическую РНК (¹) в присутствии бентонита (2–5 мг на 1 мл экстрагента), очищали от полисахаридов (¹¹) и фенола (пересаживаниями в спирт). 25–250 мкг препарата очищенной РНК ($D_{260}/D_{230}=2,2$, $D_{260}/D_{280}=2,0$) наносили на слой геля. Электрофорез проводили в течение 120 мин. при токе в 5 ма на трубку. По окончании фореза гели из трубок извлекали и фиксировали 30 мин. в 1 М уксусной кислоте. Отмывку гелей от додецилсульфата натрия и мочевины проводили в течение 24 час. в дистиллированной воде. Положение зон РНК определяли денситометрированием на спектрофотометре «Specord UV Vis» при 260 нм (рис. 1). После спектрофотометрирования гели окрашивали метиленовым синим (10); избыток красителя удаляли водой.

На рис. 2 представлена зависимость электрофоретической подвижности 28S, 18S, 5S рибосомальных и 4S транспортных РНК от количества нанесенного препарата на гель. Оказалось, что подвижность 18S, 5S и 4S РНК остается постоянной, т. е. не зависит от количества нанесенного материала на гель. Отсюда следует, что эти виды молекул находятся в условиях свободного электрофореза (¹², ¹³). Их подвижность при данных условиях электрофореза есть величина постоянная. Исходя из таких предпосылок 18S, 5S и 4S РНК взяты в качестве «реперных» точек. Молекулярные веса имеющихся промежуточных фракций рассчитаны интерполированием. Константы седиментации определены по уравнению А. С. Спирина (¹⁴). Как видно из рис. 1, подвижность 28S РНК не остается постоянной с изменением количества наносимого материала на гель. Это укладывается в гипотезу Томбаса о том, что подвижность макромолекул в ПААГ пропорциональна доле пор, размер которых превышает предельную величину (¹²). Предельной величиной в данном случае является размер 28S РНК. Очевидно, что проникновение этих макромолекул в гель затруднено, но, возможно, в связи с тем, что поры геля неоднородны и имеется небольшой процент их размером больше, чем 28S РНК.

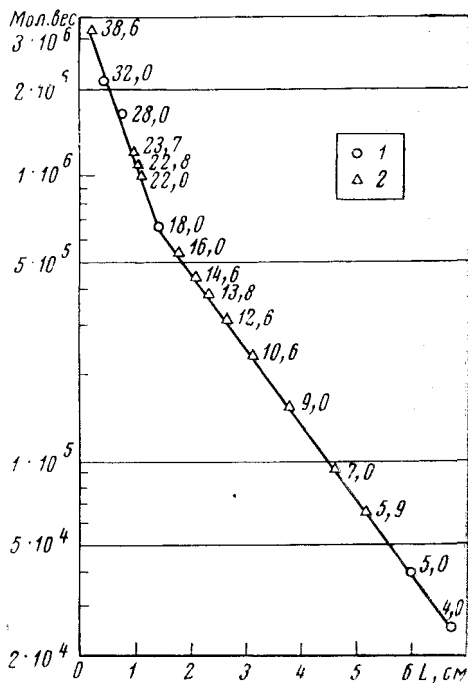


Рис. 3. Константы седиментации РНК, выделенных из цитоплазмы печени фенольным методом. 1 — фракции РНК с известными константами седиментации — «реперные точки»; 2 — фракция РНК, для которых определены константы седиментации

Из рис. 3 видно, что в полулогарифмических координатах наблюдается линейная зависимость между логарифмом молекулярного веса 18S, 5S и 4S РНК и их относительной электрофоретической подвижностью. В зоне между 5S и 18S РНК имеется 8 дополнительных фракций. Их константы седиментации составили величины: 16; 14,6; 13,8; 12,6; 10,6; 9,0; 7,0; 5,9S.

Если прямую, соединяющую 4S, 5S и 18S РНК, продолжить до пересечения с осью ординат, то найдем, что макромолекулы с константами седиментации 28S и выше должны иметь нулевую подвижность в 2,5% ПААГ. Однако гель проницаем для 28S и 32S РНК. При этом точки 18S, 28S и 32S РНК лежат на одной прямой в полулогарифмической системе координат. Между 18S и 28S РНК обнаружены три фракции, константы седиментации для которых ориентировочно посчитаны интерполяцией, и они составили величины: 22; 22,8; 23,7S.

Обнаружена одна фракция с небольшой подвижностью. Константа седиментации, полученная экстраполированием составила величину в 38,6S.

На большое число фракций цитоплазматических РНК имеются указания в литературе (², ³). В этой связи можно полагать, что обнаруживающиеся методом диск-электрофореза в ПААГ фракции РНК — нормальные продукты метаболизма клеток.

Отдел регуляции обмена веществ
Академии наук БССР
Гродно

Поступило
15 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. П. Георгиев, В кн.: Химия и биохимия нуклеиновых кислот, Л., 1968, стр. 74.
² В. П. Калиновский, Т. А. Горюхина, И. Ф. Сейц, Вопросы мед. химии, т. 20, № 5, 540 (1974). ³ В. П. Калиновский, Т. А. Горюхина, И. Ф. Сейц, Вопросы онкологии, т. 20, № 12, 39 (1974). ⁴ R. Stern, R. M. Friedman, Biochemistry, v. 10, № 20, 3635 (1971). ⁵ S. Petrovic, M. Novakolic, J. Petrovic, Biochim. et biophys. acta, v. 254, № 3, 493 (1971). ⁶ Э. Мак-Конки, В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот, М., 1970, стр. 127. ⁷ V. J. Arion, Europ. J. Biochem., v. 35, № 1, 186 (1973). ⁸ Fujisawa Takao, Abe Scachiko et al., Biochim. et biophys. acta, v. 324, № 2, 226 (1973). ⁹ K. W. Floyd, M. P. Stone, W. K. Joklik, Anal. Biochem., v. 59, № 2, 599 (1974). ¹⁰ Г. Майпер, В кн.: Диск-электрофорез, М., 1971, стр. 98. ¹¹ W. Dingman, M. B. Sporn, Biochim. et biophys. acta, v. 61, 164 (1962). ¹² M. P. Tombas, Anal. Biochem., v. 13, 121 (1965). ¹³ L. Ingram, M. P. Tombas, A. Harst, Anal. Biochem., v. 20, 24 (1967). ¹⁴ А. С. Спириг, Биохимия, т. 26, 511 (1961).