

И. Б. ЗБАРСКИЙ и К. А. ПЕРЕВОЩИКОВА

О НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ БЕЛКОВ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР

(Представлено академиком А. В. Палладиным 5 II 1948)

Согласно старым данным ((^{1,2}) и др.), клеточное ядро почти полностью состоит из нуклеопротеидов, которые могут быть разложены на кислый компонент (нуклеиновую кислоту) и сравнительно простой основной белок типа гистона или протамина. Хотя эти составные части ядра и были выделены лишь из немногих тканей, особенно богатых ядрами (сперматозоиды, зубная железа и др.), такое представление все же прочно укоренилось.

Можно а priori полагать, что ядро клетки, поскольку ему приписывают весьма разнообразные функции, должно обладать более сложной химической структурой белков и нуклеиновых кислот. С другой стороны, митотический цикл, связанный с саморепродукцией и периодическим изменением степени гидратации хромосом, позволяет предположить наличие в ядре богатых свободной энергией фосфорных соединений, а также возможность контрактильных свойств белкового субстрата.

Исходя из этих соображений, мы приступили к изучению состава клеточных ядер, а также некоторых свойств ядерных белков и их поведения в присутствии различных солей, аденозинтрифосфорной и нуклеиновой кислот.

Достаточно убедательные данные о химическом составе ядра могут быть получены только путем исследования изолированных ядер.

Наиболее удачным для выделения клеточных ядер оказалось применение лимонной кислоты, введенное Crossman (³). Однако к данным, полученным с различными модификациями этой методики ((⁴) и др.), следует относиться с большой осторожностью, поскольку выделение ядер производилось обычно в кислой среде, вследствие чего могла иметь место денатурация или экстракция белков.

Выделение ядер печени крысы в среде, близкой к нейтральной (рН = 6,1 — 6,2), было осуществлено Доупсе (⁵) путем применения лимонной кислоты в концентрации 1:475 M.

Выделение клеточных ядер из печени человека по оригинальному методу Доупсе (⁵) давало у нас материал, загрязненный обрывками цитоплазмы и неразрушенными клетками. По некоторым соображениям мы пришли к выводу, что ослабление связи ядра с цитоплазмой зависит не только от рН применяемого раствора, но и от концентрации аниона лимонной кислоты. Нам удалось установить, что применение определенной концентрации цитратного буфера (рН = 6,1 — 6,2) дает возможность выделить ядра печеночных клеток человека в нейтральной среде неповрежденными и свободными от неразрушенных клеток и частиц цитоплазмы.

Наша модификация метода с некоторыми изменениями в каждом случае позволяет выделять практически в нейтральной среде ядра и из других тканей, в том числе сарком.

Все нижеописанные данные получены на ядрах печени человека.

Экстракция ядер 1 *M* раствором NaCl вела к извлечению нуклеопротеида, который можно разделить на дезоксирибонуклеиновую кислоту и белок. Этот ядерный нуклеопротеид, вероятно, соответствует „хромозину“ Mirsky и Pollister (6), получивших результаты, в некоторых отношениях аналогичные нашим.

Существенно, что после многократной экстракции 1 *M* NaCl осталась значительная часть ядерного вещества, не растворимая в этом реактиве. Остаток этот содержит около 2% триптофана и не дает реакции на дезоксирибонуклеиновую кислоту. Содержание фосфора не превышает 0,1%. Повидимому, он состоит главным образом из белка с отличными от гистона свойствами.

При экстракции ядер разведенной соляной кислотой (около 0,24 *N*) переходил в раствор белок со свойствами гистона. Солянокислый экстракт насыщался NaCl. Выпавший осадок хлорида гистона не растворялся при диализе в течение 18—24 час. против водопроводной воды. Отдиализованный белок давал очень вязкий раствор в 0,05 *N* HCl. Полученный нами гепатогистон обладал свойствами, описанными Kossel (2) для гистонов, а именно: осаждался аммиаком, не растворяясь в избытке реактива, и не содержал триптофана. Содержание азота составляло около 17%, фосфора — не свыше 0,2%. Большой остаток, после извлечения гистона, содержал дезоксирибонуклеиновую кислоту и белок.

Вязкий раствор гепатогистона в 0,05 *N* HCl при выдувании капиллярной пипеткой в воду застывает в виде желеобразных нитей. Под микроскопом они представляются сравнительно прозрачными образованиями с мелкозернистой внутренней структурой.

Добавление к таким нитям аденозинтрифосфата в конечной концентрации 0,001 *M* вызывает резкое сжатие нити, составляющее более 50% линейного размера. Белок при этом уплотняется, делается непрозрачным, контуры нитевидного образования резко очерчиваются, мелкозернистая структура становится более выраженной.

Это явление, повидимому, во многом аналогично сокращению актомиозиновых нитей (7,8) и может трактоваться как осаждение, дегидратация или, точнее, синерезис. Миллимолярные концентрации NaCl, KCl, MgSO₄ и CaCl₂ вызывают лишь незначительное сокращение или только небольшое уменьшение прозрачности и более резкое обозначение контуров геля гистона. Однако более высокие концен-

Таблица 1
Сокращение нитей гепатогистона под действием различных солей и аденозинтрифосфата

Соли	Конечная концентрация (молей)				
	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001
NaCl	+++	++	+	—	—
KCl	+++	++	+	—	—
CaCl ₂	++++	+++	++	+	—
MgSO ₄	++++	+++	++	+	—
Na ₄ АТФ	Не исследовалось		++++	Не исследовалось	
Mg ₂ АТФ	»	»	++++	»	»

Обозначения: — отсутствие эффекта; + уменьшение прозрачности. более резкие контуры; ++ слабое сокращение (до 20% первоначальной длины); +++ сокращение на 20—50%; ++++ резкое сокращение (свыше 50%).

трации солей дают выраженный эффект. Этот эффект наблюдается при более низких концентрациях ионов щелочноземельных, чем щелочных металлов. Линейное сокращение вдвое и более наблюдается при 0,1 М концентрации одновалентных ионов и 0,01 М двухвалентных. Влияние разных концентраций солей и аденозинтрифосфата приведено в табл. 1.

Действие тимонукленовой кислоты, отдиализованной против дистиллированной воды, несколько отличается от вышеописанного. Сначала нить набухает, сохраняя при этом четкие очертания, затем постепенно уменьшается в объеме, теряя прозрачность.

Так как эффект сокращения был резче всего выражен при действии аденозинтрифосфата, важно было установить влияние различных концентраций фосфатного иона. Желая одновременно получить данные о влиянии рН на наблюдаемый эффект, мы исследовали поведение гистоновых нитей в фосфатном буфере при разных концентрациях последнего и разных рН (табл. 2).

Таблица 2

Сокращение нитей гепатогистона в зависимости от концентрации и рН фосфатного буфера (обозначения те же, что в табл. 1)

Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	рН	Конечная концентрация (молей)					
		0,1	0,025	0,01	0,005	0,001	0,0005
1/0	—	++++	+++	+++	++	+	} Через 7—10 мин. теряет прозрачность
16/1	8,0	+++	+++	+++	++	+ *	
8/1	7,7	+++	+++	+++	++	+ *	
4/1	7,3	+++	+++	+++	+	+ *	
2/1	7,0	+++	+++	+++	+	+ *	
1/1	6,7	++	++	++	+	+ *	} Нити распадаются на части
1/2	6,4	++	++	++	+	+ *	
1/4	6,1	++	++	+	+	+ *	
1/8	5,8	++	+	+	+	+ **	
1/16	5,5	++	+	+	+	+ **	
0/1	—	++	+	+	+	+ **	

* Через 3—5 мин.

** Свертывание неполное.

Сокращение резче выражено при более высоких рН. При рН ниже 5,5 сокращение невелико и замедлено даже при сравнительно высокой концентрации буфера. Миллимолярная концентрация фосфатного буфера дает лишь несколько большее сокращение, чем такие же концентрации NaCl или KCl. Таким образом, анион ортофосфата, по-видимому, не проявляет сколько-нибудь выраженного эффекта, в особенности если учесть, что опыты с аденозинтрифосфатом и неорганическими солями Na, K, Mg и Ca производились при рН около 6,5. При концентрации буфера 0,0005 М имело место очень слабое сокращение лишь при рН = 8,0—7,3. При рН = 7,0 и ниже гистоновый гель распадался на фрагменты и частично переходил в раствор.

Исключительная чувствительность нитевидных образований геля гепатогистона к небольшим изменениям концентрации солей заставила нас специально обратить внимание на растворимость этого белка в различных солевых растворах.

В то время как гистон осаждается при насыщении раствора NaCl, KCl, CaCl₂ или MgSO₄, те же соли в 1 М концентрации полностью переводят белок в раствор. Понижение ионной силы вновь вызывает осаждение, но гепатогистон снова растворяется в 0,0005 М и ниже растворе NaCl или KCl, или дистиллированной воде.

Свойства растворимости гистона, в особенности растворимость в 1 М NaCl и чистой воде, и чувствительность к малейшим концентрациям солей аналогичны свойствам многих ядерных нуклеопротеидов, из чего можно заключить, что растворимость последних определяется входящим в их состав гистоном. Эти свойства также близки к так называемым структурным белкам и, в частности, к миозину, который, как известно, также растворим в чистой воде, но осаждается при низких концентрациях солей.

Центральный онкологический институт
им. П. А. Герцена

Поступило
5 II 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Miescher, Histochemische und physiologische Arbeiten, 2, Leipzig, 1897 (цит. по ⁽²⁾). ² A. Kossel, Protamine und Histone, Leipzig, 1929. ³ G. Crossman, Science, 85, 250 (1937). ⁴ E. Stedman and E. Stedman, Mrs., Nature, 152, 267 (1943). ⁵ A. Dounce, J. Biol. Chem., 147, 685 (1943). ⁶ A. E. Mirsky and A. W. Polister, J. Gen. Physiol., 30, 117 (1946). ⁷ А. Сент-Джорджи, О мышечной деятельности, М., 1947. ⁸ И. И. Иванов, Б. С. Касавина и Л. Д. Фоменко, Биохимия, 12, 497 (1947).