

Ж. Г. ШМЕРЛИНГ и Х. М. РАВИКОВИЧ

О СОДЕРЖАНИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ЖЕЛТКЕ КУРИНЫХ ЯИЦ

(Представлено академиком А. И. Опариным 24 X 1953)

Вопрос о наличии нуклеиновых кислот в неоплодотворенных яйцах неоднократно являлся предметом исследований (подробную сводку литературы см. (1, 2)). Результаты исследований показали, что в яйцах различных видов животных содержание нуклеиновых кислот может колебаться в очень значительных пределах — от ничтожных следов (яйца насекомых, рептилий птиц) до очень значительных количеств (яйца морского ежа, некоторых ракообразных и др.).

Надо отметить, однако, что многие работы по этому вопросу, в особенности относящиеся к раннему периоду исследований, проведены при помощи неспецифических методов. В связи с этим в отдельных случаях нет уверенности не только в количественных данных, но и в том, имеются ли вообще нуклеиновые кислоты в яйцах. Так например, Коссель (3), определяя содержание нуклеопротеидов в курином яйце на разных стадиях развития по содержанию в нем пурриновых оснований не мог установить их присутствия в неоплодотворенных яйцах. Согласно же работе Плиммера и Скотта (4), в которой нуклеиновые кислоты определялись по содержанию фосфора в соответствующей фракции, их количество в курином неоплодотворенном яйце достигает значительной величины. Позже Масаи и Фукотами (5) при исследовании распределения фосфора в курином яйце не обнаружили в нем фосфора нуклеиновых кислот.

Значительным шагом вперед явилось применение для определения содержания нуклеиновых кислот в тканях гистохимических методов, основанных на реакциях Фейлгена для дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и на исчезновении способности окрашиваться пиронином в тканевых срезах, обработанных рибонуклеазой, для рибонуклеиновой кислоты (РНК).

Применяя окраску по Фейлгену, В. Марца и Е. Марца (6) нашли ДНК в желтке неоплодотворенного яйца. Однако необычайный характер описанной ими реакции вызывает сомнение в ее специфичности для ДНК. Возможно, что положительная фэйлгеновская реакция в желтке объясняется, как это предполагает ряд авторов (2), наличием в желтке больших количеств плазмалогена или каких-либо других веществ с альдегидной группой. Присутствие ДНК в желточных шарах и изменение ее количества в связи с развитием желточных шаров при помощи той же реакции Фейлгена показано М. Я. Тепляковой (7).

Гистохимические методы не всегда удобны для точных количественных определений. В связи с этим в последние годы уделялось много внимания разработке новых методов выделения и количественного определения нуклеиновых кислот, которые обладали бы достаточной чувстви-

тельностью и специфичностью. Такими методами в настоящее время являются спектрофотометрия, хроматографическое разделение продуктов гидролиза нуклеиновых кислот, колориметрические реакции на отдельные их компоненты и микробиологическое определение нуклеозидов.

Используя последний метод, Хофф-Иргенсон (8) показал, что в цитоплазме одного неоплодотворенного яйца лягушки содержится 0,065 γ ДНК. ДНК была обнаружена также в белке куриных яиц в комплексе с авидином (9). Вопрос о содержании нуклеиновых кислот в желтке

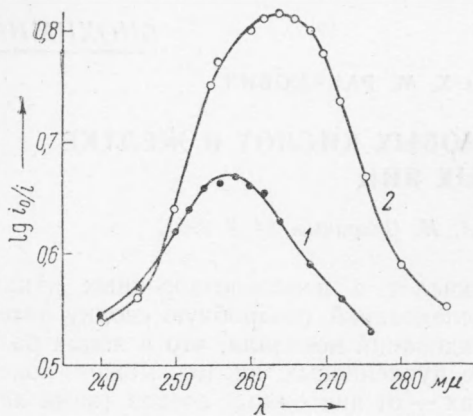


Рис. 1. Кривые поглощения нуклеиновых кислот. 1 — РНК, $c = 20 \gamma/\text{мл}$; 2 — нуклеиновые кислоты, выделенные из желтка неоплодотворенных яиц. Спектрофотометр Бекмана

куриных яиц в настоящее время приобрел особое значение в связи с работами О. Б. Лепшинской (10) о развитии клеток из желточных шаров.

Как видно из приведенной литературы, наличие нуклеиновых кислот в желтке куриного яйца во многих работах либо установлено фейлгеновской реакцией, либо эти работы относятся к тому периоду, когда количественные методы определения нуклеиновых кислот были еще недостаточно разработаны и применяемые в этих работах методы не специфичны.

В настоящее время в литературе приводятся данные, показывающие, что реакция

Фейлгена сама по себе не является еще достаточным критерием для суждения о наличии или отсутствии ДНК, так как ее результаты могут расходиться с данными прямых химических определений (11). В связи с этим представлялось необходимым исследовать содержание нуклеиновых кислот в желтке. Исследования проводились на неоплодотворенных и развивающихся яйцах белых леггорнов. Из желтков этих яиц выделялись фракции нуклеиновых кислот, после чего в них определялся фосфор по методу Фиске и Суббароу и одновременно спектрофотометрически содержание нуклеиновых кислот.

При исследовании содержания нуклеиновых кислот в желтке куриного яйца обычно применяющимися для этой цели методами разделения фосфорных фракций ткани мы получили во всех фракциях, соответствующих обоим типам нуклеиновых кислот, определенное количество фосфора; этот факт позволяет сделать вывод о наличии значительных количеств нуклеиновых кислот в исследуемом материале. Однако исследование содержания нуклеиновых кислот спектрофотометрическим путем показало, что в соответствующих фосфорных фракциях нельзя обнаружить характерного для нуклеиновых кислот поглощения; на этом основании мы сделали вывод о том, что обычная схема разделения фосфорных фракций неприменима для куриного желтка, очень богатого фосфорсодержащими белками. Можно предполагать, что фосфор в этих белках находится в различных формах связи и это обстоятельство не позволяет отделить фосфор нуклеиновых кислот обычными путями.

В результате испытания различных схем выделения нуклеиновых кислот мы остановились на несколько измененной методике Дэвидсона (12). Желтки от 20—30 яиц со снятым зародышевым диском разбивались в измельчителе. В опытах с развивающимися яйцами желток тщательно освобождался от зародышевых тканей. Для избежания возможной примеси кровяных клеток гомогенизированные желтки центрифугировались при небольшом числе оборотов. Затем гомогенная эмуль-

сия желтка обрабатывалась ацетоном, трижды спиртом на холоду и 2-кратной эфирно-спиртовой смесью при нагревании. Вес полученного обезжиренного белка по отношению к исходному весу изменялся в зависимости от стадии развития исследуемых яиц.

Из обезжиренного остатка нуклеиновые кислоты выделялись последовательной экстракцией 10% NaCl (3 раза 10-кратным объемом). Экстракты осаждались двойным объемом спирта. Полученные осадки растворялись в слабой щелочи и вновь осаждались подкислением. Все процедуры, связанные с экстракцией, проводились при механическом перемешивании. Вес полученного после указанной обработки осадка составляет 1,5—2% от веса сухого белка. Он содержит еще большое количество фосфора других соединений, кроме нуклеиновых кислот. Эти осадки экстрагировались 5% трихлоруксусной кислотой в течение 15 мин. при 90°. Трихлоруксусная кислота из полученных экстрактов извлекалась эфиром. После удаления эфира в экстрактах исследовалось спектрофотометрически содержание нуклеиновых кислот. В части опытов осадки подвергались гидролизу с серной кислотой

и из гидролизата осаждались серебряные соли пуринов, которые также исследовались спектрофотометрически.

Хорошо известно, что поглощение нуклеиновых кислот имеет явно выраженный максимум около 2600 Å. Это поглощение обусловлено пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, входящими в нуклеиновые кислоты. Все эти основания имеют характеристические кривые поглощения, и поглощение нуклеиновых кислот представляет сумму отдельных поглощений пуриновых и пиримидиновых оснований. РНК и ДНК имеют полосы поглощения, одинаковые по форме и положению максимумов, и не могут быть спектрофотометрически дифференцированы.

Таблица 1
Содержание нуклеиновых кислот в желтке куриных яиц

Стадия	в % к весу исходн. желтка	в % к сух. обезжир. белку, выдел. из желтков
Неоплодотворенное яйцо . . .	0,0014	0,0074
Оплодотворенное яйцо до закладки в инкубатор	0,0015	0,0087
	0,0016	0,0091
2-дневное яйцо	0,0014	0,0085
4 " "	0,0012	0,00824
8 " "	0,0009	0,0070

Поглощение нуклеиновых кислот, выделенных из желтка куриного яйца, как это видно из рис. 1, немного сдвинуто в длинноволновую часть спектра по сравнению с чистой нуклеиновой кислотой, взятой для сравнения. Очевидно, это связано с присутствием в наших препаратах каких-то примесей. Кривые поглощения для изолированных пуринов представлены на рис. 2. В последнем случае максимум поглощения точно совпадает с максимумом для пуринов, выделенных из чистой РНК. Результаты определений суммарного содержания нуклеиновых кислот приводятся в табл. 1.

Полученных данных, конечно, недостаточно для заключения о закономерностях в количественных изменениях содержания нуклеиновых кислот во время развития. Очевидно только, что нуклеиновые кислоты находятся уже в желтках неоплодотворенных яиц.

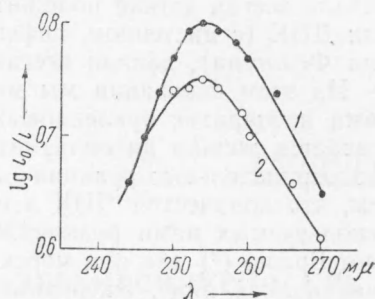


Рис. 2. Кривые поглощения пуринов, выделенных из нуклеиновых кислот. 1 — пурины, выделенные из РНК; 2 — пурины, выделенные из нуклеиновых кислот желтков неразвивающихся яиц. Спектрофотометр Бекмана

В связи с тем, что РНК и ДНК не различаются по спектру поглощения, в тех препаратах, где нуклеиновые кислоты определялись спектрофотометрически, мы проводили колориметрические реакции на оба их типа. Реакции на пентозу РНК (с орцином и анилином на фурфурол) давали всегда четкие положительные результаты. Реакции, специфичные для ДНК (с цистеином, дифениламином, химическая модификация реакции Фейлгена), давали всегда отрицательный эффект.

На этом основании мы можем сделать вывод, что в выделенных нами препаратах нуклеиновых кислот из желтков куриных яиц обнаруживается только цитоплазматическая нуклеиновая кислота. Возможно, что отрицательные реакции на ДНК в наших препаратах объясняются тем, что количество ДНК в них лежит за пределами чувствительности используемых нами реакций. Можно также предположить, как это делает Браше (2) для яиц морского ежа, что РНК переходит в ДНК в развивающемся яйце. Экспериментально такой переход и участие в нем аскорбиновой кислоты в опытах *in vitro* показан Б. И. Гольдштейном с сотр. (13) на животных тканях. Возможно, что в желтке куриных яиц образующаяся ДНК с такой скоростью используется для построения клеток зародыша, что не может быть обнаружена в желтке.

Институт биологической
и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
19 VII 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. Needham, Chem. Embryology, 1931. ² J. Brachet, Embryologie chimique, 1947. ³ A. Kossel, Zs. phys. Chem., 10, 248 (1886). ⁴ R. H. Plimmer, F. H. Scott, J. Physiol., 38, 247 (1909). ⁵ V. D. Masai, T. Fukutami, Jap. J. Biochem., 2, 271 (1923). ⁶ V. D. Marza, E. Marza, Quart. J. Microsc. Soc., 78, 134 (1935) (цит. по J. Brachet, Embryol. chim., 1947). ⁷ М. Я. Теплякова, Ст. в кн. О. Б. Лепешинской, Происхождение клеток из живого вещества и роль живого вещества в организме, 1950. ⁸ E. Hoff-Jørgensen, E. Zeuthen, Nature, 169, 245 (1952). ⁹ H. Fraenkel-Conrat, E. Ducau, N. Snell, R. Ward, J. Am. Chem. Soc., 72, 3826 (1950). ¹⁰ О. Б. Лепешинская, Происхождение клеток из живого вещества и роль живого вещества в организме, 1951. ¹¹ A. Marshak, H. Vogel, J. Biol. Chem., 189, 2, 597 (1951). ¹² J. Davidson, Biochem. J., 49, 311 (1951). ¹³ Б. И. Гольдштейн, Л. Г. Кондратьева, В. В. Герасимова, Биохимия, 17, 354 (1952).