

Т. Н. ИВАНОВА и Н. И. ПРАВДИНА

К ВОПРОСУ О МЕТОДАХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СКОРОСТИ ОБНОВЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ТКАНИ МОЗГА

(Представлено академиком К. М. Быковым 28 I 1954)

Основные литературные данные по скорости обновления нуклеиновых кислот в тканях получены при использовании искусственного радиоактивного фосфора (P^{32}). Почти всеми исследователями фракционирование нуклеиновых кислот проводилось при этом по методу Шмидта и Тангаузера, в основу которого положено определение фосфорного компонента.

Однако в последние годы появились указания на то, что при определении нуклеиновых кислот по методу Шмидта и Тангаузера для ряда тканей, и в частности, для мозговой ткани (¹) получаются величины, значительно превышающие таковые, получаемые при определении нуклеиновых кислот методами, основанными как на определении углеводного компонента, так и на определении азотистых оснований.

Применяя радиоактивный фосфор для исследования скорости обновления того или иного соединения, обычно пользуются величиной так называемой удельной активности, определяемой как количество импульсов в 1 минуту, приходящееся на 1 мг фосфора исследуемой фракции. Для правильного вычисления этих величин необходимо выделение соответствующих веществ в чистом виде.

При определении нуклеиновых кислот по методу Шмидта и Тангаузера мы имеем дело не с чистыми фракциями, а со смесью различных фосфорсодержащих соединений, особенно в случае фракции рибонуклеиновой кислоты (РНК). Убедительные данные в этом отношении для ткани печени приводятся в работах Дэвидсона и сотр. (²). Они показали, что во фракции РНК, получаемой по методу Шмидта и Тангаузера из ткани печени, помимо РНК имеется еще 6 фосфорсодержащих примесей, удельные активности которых оказались значительно выше таковых, вычисленных для нуклеотидов, образующихся из РНК.

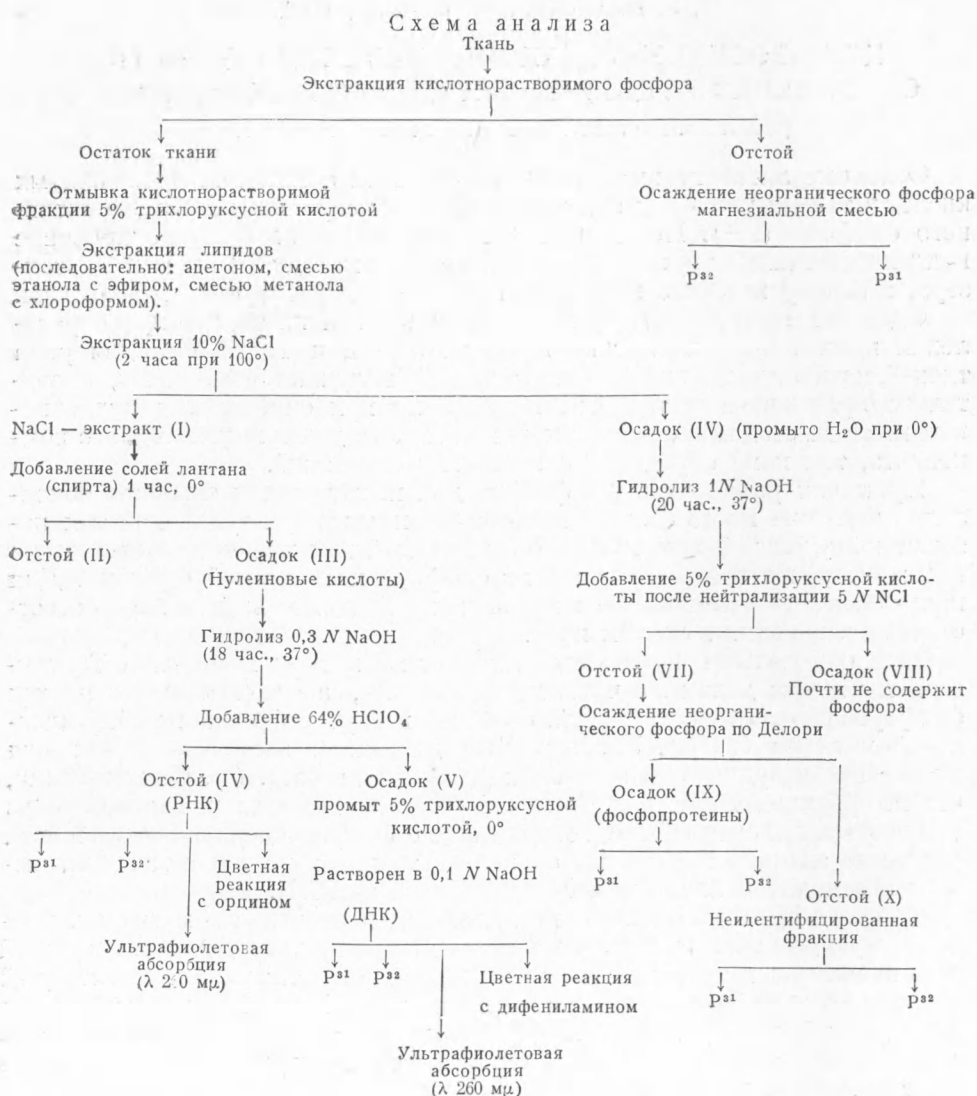
В связи с этим оказалось необходимым пересмотреть методику, применяемую для экстракции нуклеиновых кислот при определении скоростей их обновления в тканях с целью выяснения относительно простых путей выделения нуклеиновых кислот в чистом виде. При этом мы не ставили перед собой задачу количественного выделения нуклеиновых кислот из ткани мозга, так как для вычисления величин их удельных активностей этот момент не имеет существенного значения.

Экспериментальная часть

Пользуясь указаниями, имеющимися в работах (^{2, 3}), мы разработали новый вариант анализа мозговой ткани, позволяющий определять истинные удельные активности фосфора, входящего в состав нуклеиновых кислот (см. схему).

Остаток гомогената ткани мозга, отмытый от следов кислотнорастворимого и липоидного фосфора, экстрагировался в течение 2 час. двумя порциями (по 5 мл) 10% раствора хлористого натрия при 100°.

Остаток ткани после экстракции хлористым натрием (VI) фракционировался далее по методу Шмидта и Тангаузера с целью выяснения величин удельных активностей фосфопротеинов (IX) и неидентифицированных фосфорсодержащих соединений мозговой ткани (X), остающихся в белковом осадке после удаления основной массы нуклеиновых кислот. Из солевого экстракта (I) нуклеиновые кислоты могли быть высажены либо двойным объемом спирта ⁽²⁾, либо при помощи солей лантана ⁽³⁾. Как нами было показано, оба эти способа в отношении количеств нуклеиновых кислот дают однозначные результаты.



Однако для целей работы с радиоактивным фосфором более удобным оказался второй способ, так как он давал возможность отмывать лантановый осадок нуклеиновых кислот водным растворителем (0,01 M раствор нитрата лантана), удаляющим различные фосфорные загрязнения, увлеченные осадком.

Нуклеиновые кислоты, выделенные в форме солей лантана, гидролизировались затем с 3 мл 0,3 N NaOH в течение 18 час., после чего производилось осаждение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) подкислением гидролизата до pH 1 соответствующим количеством 64% перхлорной кис-

лоты (HClO_4) — осадок V. Рибонуклеиновая кислота при этом оставалась в растворе (отстой IV).

С целью установления чистоты получаемых данным методом фракций РНК и ДНК (фракции IV и V) количество нуклеиновых кислот определялось в них тремя различными методами: по фосфору, по цветной реакции (с орцином в случае РНК и с дифениламином в случае ДНК) и по поглощению в ультрафиолетовой части спектра (при $\lambda = 260 \text{ м}\mu$) при помощи спектрофотометра типа СФ-4. Результаты таких сравнительных анализов, приведенные

Таблица 1

Сравнительные данные определения нуклеиновых кислот, осаждаемых солью лантана из солевого экстракта ткани мозга (в $\mu\text{г}$ фосфора на 1 г сырого веса)

РНК (фракция IV)				ДНК (фракция V)			
№№ п/п.	рассчит. по фосфору	рассчит. по цветной реакции	рассчит. по поглощению света при λ 260 мμ	№№ п/п.	рассчит. по фосфору	рассчит. по цветной реакции	рассчит. по поглощению света при λ 260 мμ
1	121	115	130	1	49	—	55
2	125	126	137	1	46	—	51
3	120	115	125	3	44	—	45
4	120	112	132	4	42	—	44
5	90	85	93	5	41	37	45
6	95	95	100	6	41	37	45
7	83	77	88	7	30	32	35
8	88	88	93	8	35	34	37
9	100	88	109				
10	110	93	119				
11	120	105	131				
Средн.	107	100	114		41	—	44

составляет примерно одну и ту же величину. Это дает нам основание считать, что выделяемые по описанному выше методу фракции РНК (IV) и ДНК (V) не содержат в значительных количествах иного фосфора, кроме фосфора, принадлежащего нуклеиновым кислотам. Последнее имеет особое значение при определении истинных величин удельных активностей.

Несколько завышенные цифры количеств фосфора нуклеиновых кислот, рассчитанные по данным поглощения при длине волны 260 мμ, следует, очевидно, объяснить присутствием в пробах незначительных количеств HClO_4 , так как согласно литературным указаниям (4) в присутствии HClO_4 поглощение света рибонуклеиновой кислотой в ультрафиолетовой части спектра может повышаться.

Изложенный метод фракционирования был использован нами в дальнейшем для определения удельных активностей отдельных фосфорных фракций белкового остатка мозговой ткани. В качестве примера в табл. 2 приведены данные опытов, в которых две равные навески мозговой ткани от одних и тех же животных (по одному полушарию от двух крыс в каждом определении) подвергались для сравнения параллельному фракционированию по общепринятому методу Шмидта и Тангаузера и по вновь разработанной схеме.

Как видно из табл. 2, удельная активность фосфора фракции IV в 3—4 раза ниже удельной активности фосфора рибонуклеиновой кислоты, определяемой при фракционировании ткани по методу Шмидта и Тангаузера.

Подобное же соотношение величин удельных активностей для РНК неоднократно наблюдалось и в дальнейшем при сравнении результатов, полученных на отдельных животных. Так, в 4-часовых опытах величины

относительной удельной активности для РНК, определяемой по методу Шмидта и Тангаузера, составляли 12,7 (среднее из 5 опытов, колебания 10—14%), а для РНК, определяемой по модифицированному методу, всего 4,1% (среднее из 7 опытов, колебания 2,8—5,4%). В то же время относительная удельная активность фракции X определялась величиной 17,9% (среднее из 7 опытов, колебания 15—20%).

Таблица 2

Сравнение удельных активностей фосфорсодержащих фракций белкового остатка ткани мозга при обработке его по методу Шмидта и Тангаузера и по модифицированному методу (радиоактивный фосфор вводился в количестве 1 μ на 1 г веса животного)

Фракция	Время после введения Р ³² в час.	Уд. активность	Относит. уд. активность
Щелочной гидролизат по методу Ш. и Т.	2	6000	14
	24	8000	25
Фракция VI (гидролизат осадка)	2	9000	22
	24	13000	33
РНК по методу Ш. и Т. .	2	4000	10,4
	24	7400	22
Фракция IV (истинная РНК)	2	900	2,1
	24	3740	9,6
Фракция X (неидентифицированная фракция) . .	2	6500	16
	24	9880	25
ДНК по методу Ш. и Т. .	2	0	0
	24	800	2,5
Фракция V (истинная ДНК)	2	0	0
	24	300	0,78

Таким образом, на основании рассмотрения приведенных данных можно сделать основной вывод, что истинная величина относительной удельной активности РНК мозга, характеризующая собой скорость обновления данного соединения, значительно ниже соответствующих величин, получаемых при обработке ткани по методу Шмидта и Тангаузера. За 2 часа она составляет 2—3% вместо наблюдавшихся ранее 9—10%.

Несомненно, что определяемые в последнем случае высокие цифры относительной удельной активности РНК обусловлены значительным количеством высокоактивных примесей органически связанного фосфора. Основная масса этого быстро обменивающегося фосфора при анализе ткани по опи-

санной выше схеме переходит во фракцию X, фосфор которой составляет примерно 40—50% от всего фосфора, связанного с белковым остатком мозговой ткани. Основную массу его составляют неидентифицированные фосфорсодержащие органические соединения и лишь некоторая часть должна быть отнесена за счет фосфора остатков нуклеиновых кислот, так как двухкратная экстракция 10% раствором хлористого натрия не обеспечивает полного их удаления из белкового остатка ткани. Фракция V — истинная ДНК — показывает некоторую величину активности лишь в опытах, длящихся 24 часа с момента инъекции животному радиоактивного фосфора. Однако и в данном случае величина относительной удельной активности оказалась более низкой (0,78%), чем в случае обработки ткани по методу Шмидта и Тангаузера (2,5%).

Институт физиологии им. И. П. Павлова
Академии Наук СССР

Поступило
15 X 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. Л. Брик, Автореферат диссертации, Лен. гос. унив. им. А. А. Жданова, 1953.
² J. M. Davidson, R. M. S. Smellie, Biochem. J., **52**, 594, 599 (1952).
³ E. Hammarsten, Acta med. scandinav., Supplem **196**, 634 (1947). ⁴ M. Oguri, G. Rosen, Arch. Biochem., **250**, 262 (1950).

$$* \text{Относит. уд. активность} = \frac{\text{уд. активность фосфора исследуемой фракции}}{\text{уд. активность неорганич. фосфора мозга}} \cdot 100.$$