

ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ КРЫС С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Р. Р. КАЗАРЯН, Ю. М. ДЕМНИ, С. Г. ПИРАЦУЯН, А. Г. МАНВЕЛЯН

Проведен флуоресцентный анализ хроматина, выделенного из печени белых крыс. Установлены максимумы спектров возбуждения и эмиссии. Диссоциация хроматина усиливает интенсивность возбуждения и эмиссии, незначительно сдвигая их максимумы в ультрафиолетовую область. При гормональной индукции аргиназы изменений в указанных флуоресцентных характеристиках хроматина не происходит.

При изучении структуры белков, их физико-химических свойств все чаще применяется флуоресцентный анализ. При этом исследуется как собственная флуоресценция белков, так и свечение в комплексе с флуоресцентными красителями.

Исследование хроматина с применением метода флуоресцентного анализа, насколько нам известно, не проводилось, хотя не исключается возможность изменения флуоресцентных характеристик его при определенных структурных перестройках дезоксирибонуклеопротеидного (ДНП) комплекса, лежащего в основе различных функциональных состояний хромосом.

В связи с этим мы поставили задачу изучить флуоресцентные характеристики хроматина, выделенного как из печени интактных белых крыс, так и животных, которым вводили гидрокортизон, вызывающий индукцию аргиназы и ряда других катаболических ферментов [1, 2].

Материал и методика. Использовались белые крысы весом 120—150 г. Хроматин печени получали после предварительного выделения ядер, осуществленного с помощью модифицированного сотрудниками кафедры биофизики ЕГУ метода Видмала и Тата [3], с очисткой ядерной фракции центрифугированием при 16.000 g в течение 50 мин в растворе 2,2 М сахарозы в присутствии 1 мМ $MgCl_2$. Все растворы были приготовлены из 0,01 М трис-НСl буфере (pH 7,5).

Для получения хроматина ядра 3—4 раза промывали 0,021 М ЭДТА + 0,075 М NaCl буфером (pH 8), а затем по два раза 0,05, 0,01 и 0,002 М трис-НСl буфером (pH 8). Каждый этап промывки проводили центрифугированием при 7000 g в течение 15 мин. Во все использованные растворы добавляли 0,5 мМ метабисульфит калия для предотвращения действия протезаз.

В экспериментах использовали также хроматин, выделенный из печени крыс после кортикостероидной индукции гидрокортизоном. Суспензию гормона вводили внутримышечно (с расчетом 5 мг на 100 г веса тела) в течение четырех дней. На четвертый день через 4—5 час после введения гормона, в период высшей активации синтеза РНК [4, 5], а также аргиназы (КФ 3.5.3.1) [1, 2], тирозин- α -кетоглутарат

трансаминазы (КФ 2.6.1.5), триптофанпирролизы (КФ 1.11.1.4) и некоторых других катаболических ферментов [1, 5] животных забивали и выделяли хроматин.

Диссоциацию хроматина проводили с помощью раствора 2 М NaCl, приготовленного на 0,01 М трис-HCl буфере (рН 8). Выделенный хроматин имел следующие спектральные характеристики $A_{290/260}=0,75$, $A_{280/260}=0,57$, $A_{330/260}=0,0157$. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [6], ДНК—по Динсу [7], РНК—спектрофотометрически после гидролиза 1 N HClO₄.

Соотношение белок/ДНК во всех исследованных препаратах составляло 2:1, соотношение РНК/ДНК—0,04:1. Спектральные характеристики получали из спектрофотометра СФ-16. Спектры экстинкции и эмиссии хроматина регистрировали на флуоресцентном спектрофотометре МРФ-2А фирмы «Hitachi» (Япония), в кварцевых прямоугольных кюветах при комнатной температуре (при чувствительности прибора SS-1, SS-5), в многократных разбавлениях в 2×10^{-3} М трис-HCl буфере (рН 8).

Для изменения рН среды использовали 0,1 N HCl и 2,5 N NH₄ OH.

Результаты и обсуждение. Поглощение и возбуждение белков в ультрафиолетовой области объясняется исключительно наличием в составе их ароматических аминокислот: фенилаланина, тирозина и триптофана. В свободном состоянии эти аминокислоты имеют максимумы спектров возбуждения при 260, 275 и 287 нм и максимумы спектров эмиссии—при 282, 303 и 348 нм соответственно, обуславливая идентичную флуоресценцию белков, в состав которых входят [8—12].

Изучение флуоресценции хроматина, выделенного из печени белых крыс, показало, что при возбуждении 260 и 275 нм характерные для фенилаланина и тирозина спектры эмиссии отсутствуют, четко выявляется один пик эмиссии, при 340 нм, с максимумом спектра возбуждения при 295 нм (рис. 1), т. е. обнаруживается триптофановая флуоресценция, сдвинутая в коротковолновую область по сравнению с максимумом спектра эмиссии свободного триптофана (348 нм).

В связи с этим следует учесть, что в некоторых белках в зависимости от условий окружения ароматических аминокислот может происходить миграция энергии, благодаря чему максимумы спектров эмиссии тирозинового и триптофанового остатков могут смешаться как в ультрафиолетовую, так и в длинноволновую область [13, 14]. Так, работами Конева [10] показано, что сывороточный альбумин, яичный альбумин, α -глобулин, сыворотки казенная, стурини и ряд других белков имеют спектры флуоресценции с максимумами эмиссии при 313 и 350 нм, т. е. эмиссии, характерные для тирозина и триптофана, но несколько сдвинутые в длинноволновую область. Кимура и Тинга [15], изучая флуоресценцию ферридоксина из коры надпочечников, обнаружили значительное смещение спектра флуоресценции тирозинового комплекса в длинноволновую область, со спектром эмиссии при 330 нм, т. е. в область, характерную для триптофанилов. Такой же сдвиг эмиссии (340—350 нм) тирозинового комплекса показали в своих экспериментах Марданиян и др. [16], исследуя различные ферредоксинны типа «b» животного и растительного происхождения. С другой стороны, работами Велика [11], Тила и Вебера [9] показано, что у некоторых белков смещены максимумы эмиссии спектра флуоресценции триптофана в коротковолновую область (340 нм).

Учитывая эти литературные данные, можно предположить, что отмеченная в наших экспериментах эмиссия при 340 нм. вероятно, обусловлена триптофанильными остатками, флуоресценция которых несколько сдвинута в коротковолновую область. Для подтверждения это-

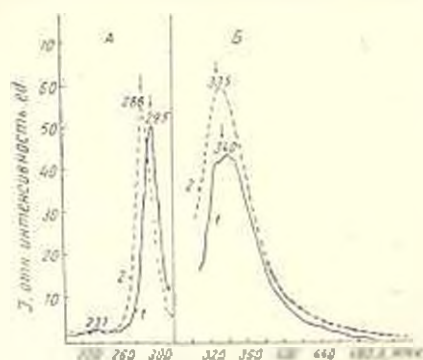


Рис. 1. Спектры экзитации (А) и эмиссии (Б) хроматина, выделенного из печени белых крыс. Ширина щелей монохроматоров экзитации и эмиссии—4 нм. 1. Нативный хроматин, разбавленный $\times 20$ в 2×10^{-3} М трис-НСI буфере, pH 8. 2. Диссоциированный хроматин, разбавленный $\times 10$ в 2×10^{-3} М трис-НСI буфере, pH 8.

го предположения нами изучалась эмиссия основного флуоресцирующего комплекса хроматина при различных значениях pH среды. При этом мы исходили из того положения, что при изменении pH среды максимум эмиссии спектра флуоресценции белков сохраняется на постоянном уровне (340 нм), если она обусловлена остатками только триптофанов [12, 17]. Постепенное изменение исходного pH в кислую сторону (рис. 2) у нативного хроматина приводит к резкому снижению квантового выхода флуоресценции, однако положение максимума спектра флуоресценции при этом не меняется, что может свидетельствовать об обуславливании спектра эмиссии хроматина при 340 нм триптофанильными остатками.

Нами изучалась также флуоресценция хроматина при его диссоциации, когда при определенных ионных условиях среды появляются свободные участки ДНК, что, как известно, обусловлено перераспределением связанных с ДНК гистонов [18, 19]. Полученные данные показали, что при диссоциации хроматина (рис. 1) повышается квантовый выход флуоресценции, а максимумы спектров возбуждения и эмиссии несколько сдвигаются в коротковолновую область (288 против 295 нм и 335 против 340 нм), не выходя за пределы, характерные для триптофанильных остатков.

Наши исследования показали, кроме того, что закисление pH среды у диссоциированного хроматина (рис. 3), как и в случае с нативным, приводит к снижению квантового выхода флуоресценции без существенных изменений положения максимума спектра флуоресценции; структура диссоциированного хроматина не претерпевает необратимой

денатурации, в то время как в случае с нативным дальнейшее закисление, начиная с pH 4 (рис. 2), приводит к необратимой кислотной де-

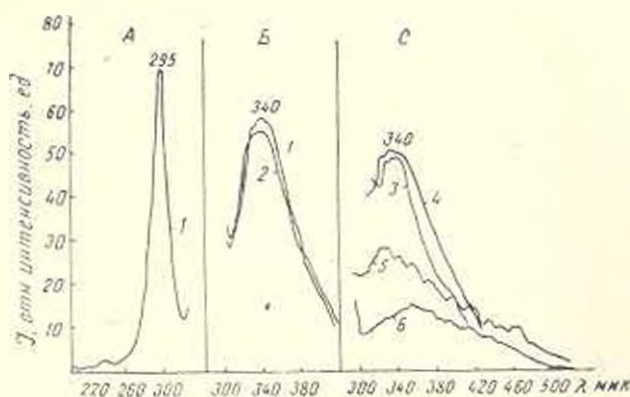


Рис. 2. Спектры экстинкции (А), эмиссии (Б), (С) нативного хроматина, разбавленного $\times 20$ в 2×10^{-3} М трис-НСI буфере. Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссии—5 нм. 1. pH 8. 2. pH 7. 3. pH 6. 4. pH 5. 5. pH 4. 6. pH 3.

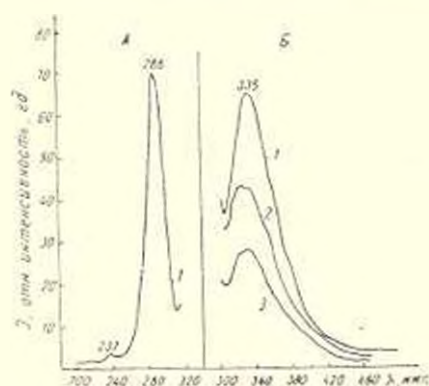


Рис. 3. Спектры экстинкции (А) и эмиссии (Б) диссоциированного хроматина, разбавленного $\times 10$ в 2×10^{-3} М трис-НСI буфере. Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссии—4 нм. 1. pH 8. 2. pH 1. 3. pH 8.

натурации его структуры. Отсутствие этого эффекта у диссоциированного хроматина представляет определенный интерес. Однако для объяснения этого явления необходимы дополнительные исследования, что не входит в задачу данной работы.

Таким образом, как при изменении pH среды, так и диссоциации хроматина основной флуоресцирующий комплекс хроматина остается характерным для триптофанов.

Нами изучалась также и флуоресценция хроматина, выделенного из печени крыс после введения гидрокортизона (гормональной индукции). При индукции аргиназы и других катаболических ферментов в вышеуказанных флуоресцентных характеристиках хроматина изменений не наблюдалось.

Авторы признательны М. А. Давтяну за помощь при обсуждении данной работы.

Ереванский государственный университет,
филиал: ВНИИ клинической и экспериментальной
хирургии МЗ СССР, Ереван

Поступило 15.V 1978 г.

ԱՌՆՆՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԻԻ ՔՐՈՄԱՏԻՆԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ ՅԼՈՒՈՐԵՍԵՆՏԱՅԻՆ ԱՆԱԼԻԶԻ ՄԻՋՈՑՈՎ

Ռ. Ռ. ԿԱԶԱՐԻԱՆ, Ի. Մ. ԴՅՈՄԻՆ, Ս. Գ. ԿՐԱՏՍՅԱՆ, Ա. Գ. ՄԱՆՎԵԼԻԱՆ

Կատարվել է սպիտակ սունկտների լյարդից ստացված բրոմատինի ֆլու-
րեսցենտային անալիզ: Որոշվել են էքստինցիայի և էմիսիայի սպեկտրների
մաքսիմումները, որոնք համապատասխանաբար հավասար են 295 և 340 մմկ:
Բրոմատինի միայն մի էմիսիայի սպեկտրի առկայությունը 340 մմկ-ի դեա-
րում պայմանավորված է տրիպտոֆանի ֆլուորեսցենցիայով, որը ապաս-
տրիպտոֆանի էմիսիայի սպեկտրի մաքսիմումի համեմատությամբ մի փո-
քրր շարժված է դեպի կարճալիք շրջանը: Բրոմատինի դիսոցիացիան սաստ-
կացնում է էքստինցիայի և էմիսիայի ինտենսիվությունը, չնչին չափով տե-
ղաշարժելով նրանց մաքսիմումները դեպի ուլտրամանուշակագույն շրջանը
(288 և 335 մմկ համապատասխանաբար): Արգինազայի հորմոնայ (հիդրո-
կորտիզոն) ինդուկցիայի դեպքում բրոմատինի նշված ֆլուորեսցենտային
ցուցանիշներում փոփոխություններ տեղի չեն ունենում:

STUDIES OF THE RAT LIVER CHROMATIN BY FLUORESCENT ANALYSIS

R. R. KAZARIAN, Yu. M. DYOMIN, S. G. TIRATSUYAN, A. G. MANVELIAN

The fluorescent analysis of chromatin isolated from liver of white rats has been carried out. Maximums of excitement and emission spectra have been set. Dissociation of chromatin increases the intensity of excitement and emission, slightly removing their maximums to ultra-violet range.

In the case of hormonal (hydrocortison) induction of arginase, changes in the indicated fluorescent characteristics of chromatin do not take place.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Давтян М. А. Петросян Т. А. Биологический журнал Армении. 23. 5. 1970.
2. Kuchakin C. D. In Mechanisms of hormone action, 256. Edit. by P. Karlson. Academic Press, N. Y. and London, 1965.
3. Widnell C. C., Tata J. R. Biochem. J., 92, 313, 1964.
4. Knox W. E. In Synthesis of Molecular and Cellular structure. 13, P. Rudnick, Ed. The Ronald Press Co., N. Y., 1960.
5. Kenney F. T. J. Cell Compar. Physiol., 66, supp. 1, 125, 1965.

6. Lowry O. H., Rosenbrough N. J. et al. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
7. Diske Z. Microchemie, 8, 9, 1930.
8. Shore V. G., Pardee A. B. Arch. Biochem. Biophys., 40, 100, 1956.
9. Teale F. W. Y., Weber G. J. Biochem., 65, 467, 1957.
10. Конец С. В. ДАН СССР, 116, 594, 1957.
11. Wallick S. F. J. Biol. Chem., 233, 1455, 1958.
12. Юденфрнд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине, 192 М., 1965.
13. Владимирон Ю. А. ДАН СССР, 4, 960, 1961.
14. Владимирон Ю. А., Конец С. В. Биофизика, 5, 537, 1959.
15. Kimura I., Ting J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 45, 1227, 1971.
16. Марджян С. С., Демин Ю. М., Налбандян Р. М. Биодинам., 6, 1024, 1977.
17. Воденкини Н. С., Бурштейн Э. А., Готберг М. И. Механизмы мышечного сокращения, 4, М., 1972.
18. Parakhovsky A. J., Hgln Yu. V., Georgiev G. P. Nature, 250, 603, 1974.
19. Parakhovsky A. J., Hgln Yu. V., Georgiev G. P. Molecular Biol. Reports, 1, 201, 1973.