

ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ЯДЕРНЫХ МЕМБРАН
 КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС

Э. С. ГЕВОРКЯН, Ж. В. ЯВРОЯН, Г. А. ПАНОСЯН

Ключевые слова: ядерные мембраны, фосфолипиды.

Известно, что внутренняя мембрана ядерно-мембранной оболочки частично связана с хроматином, что предполагает возможное участие белков и фосфолипидов ядерной мембраны в изменении функциональной активности генома. Для рассмотрения этого вопроса необходимо выделение чистых препаратов основных компонентов ядерных мембран и их фракционирование. Данные об изучении фосфолипидов изолированных ядер и ядерных мембран клеток печени крыс приведены в ряде работ [1, 2, 8, 9, 10, 14], однако они довольно разноречивы, что, по-видимому, обусловлено различиями в методах их выделения и фракционирования. Качественный и количественный анализ фосфолипидного состава, наряду с другими характеристиками (химический анализ и процентное содержание основных компонентов, определение активности ряда маркерных ферментов и др.), может служить хорошим показателем чистоты выделенных препаратов ядерных мембран, степени их возможной загрязненности.

Настоящее сообщение посвящено изучению качественного и количественного состава фосфолипидов ядерных мембран печени крыс для оценки применяемого нами метода выделения с обработкой ДНК-азой, а также для четкого выявления всех основных и минорных фракций фосфолипидов с целью дальнейшего исследования их роли в регуляции генетической активности.

Материал и методика. Эксперименты проводили на беспородных крысах обоего пола. Ядра выделяли по методу Блобела и Потера [4], ядерные мембраны—по методу Березней и др. [3]. Белок определяли по методу Лоурри и др. [11], ДНК и РНК—спектрофотометрически по методу Шмидга и Танхаузера [12]. Фосфолипиды экстрагировали согласно методу Фолча и др. [6], их количественное определение проводили по методу Фиске и Суббароу [5], фракционирование фосфолипидов—методом тонкослойной хроматографии на пластинках с силикагелем КСК (толщина силикагеля—0,25 мм). На пластинку (12×20 см) наносили 15 мкг (по фосфору) фосфолипидов. В качестве разделяющей смеси брали хлороформ, метанол и концентрированную NH_4OH в соотношении 65:35:4 соответственно. Фракции фосфолипидов после разделения проявляли парами йода. Для количественного определения соскабливали пятна

фосфолипидов в пробирки, сжигали в присутствии 70%-ной HClO_4 и 1%-ного раствора молибдата аммония, определяли количество P_2O_5 по методу Фиске и Суббароу [5]. Для качественного анализа использовали стандартные фосфолипиды—фосфатидилхолин и кардиолипин (оба фирмы «Sigma», США). Холинсодержащие фосфолипиды выявляли реагентом Драгендорфа [15], а фосфатидилсерин и фосфатидилэтанолламин—нингидриновым реагентом [13].

Результаты и обсуждение. В табл. 1 суммированы результаты химического анализа препаратов ядерных мембран, выделенных нами с применением ДНК-азы. Соотношение основных компонентов ядерных мем-

Таблица 1
Процентное содержание и соотношение основных компонентов препаратов ядерных мембран клеток печени крыс

Процентное соотношение				Соотношение компонентов			
белок	ДНК	РНК	фосфолипиды	ДНК белок	РНК белок	фосфолипид белок	ДНК фосфолипид
64,7± 2,81	7,7± 0,73	6,21± 0,68	21,3± 2,54	0,12± 0,01	0,10± 0,01	0,35± 0,07	0,39± 0,04

бран свидетельствует о том, что выделенные препараты обладают достаточной чистотой. Полученные ощутимые количества нуклеиновых кислот в препаратах согласуются с литературными данными, в частности с работами Харриса [7], показавшего, что при обработке ДНК-азой и и гипотоническим шоком удается выделить ядерномембранные препараты с сохранившейся морфологией ядерной оболочки, и содержание ДНК в этих препаратах достигает 8%.

Качественный анализ фосфолипидов в препаратах ядерных мембран выявил девять фракций разной интенсивности и подвижности на силикагеле. С помощью применения стандартных фосфолипидов, а также обработки пластинок нипидриновым реагентом и реагентом Драгендорфа и сопоставляя полученные результаты с имеющимся в литературе, удалось идентифицировать все девять фосфолипидных фракций (табл. 2).

Таблица 2
Состав фосфолипидов ядерной мембраны печени крыс (средние значения от трех серий опытов)

Фракции	Фосфолипиды	Процентное содержание	Фракции	Фосфолипиды	Процентное содержание
1	Фосфатидилхолин	41,5	6	Сфингомиелин	4,7
2	Фосфатидилэтанолламин	21,7	7	Кардиолипин	4,5
3	Фосфатидилсерин	7,2	8	Фосфатидовая кислота	4,5
4	Фосфатидилинозит	6,9	9	Лизофосфатидовая кислота	4,3
5	Лизофосфатидилхолин	4,7			

Количественный анализ показал, что примерно 65% тотального количества фосфолипидов составляют основные два фосфолипида ядерных мембран—фосфатидилхолин и фосфатидилэтанолламин, что согласуется

с литературными данными [2, 8, 9]. Остальные семь фракций—минорные компоненты фосфолипидов—представлены примерно в равных количествах (табл. 2). Обращает на себя внимание наличие в составе фосфолипидов ядерных мембран небольших количеств кардиолипина (4,5%) и сфингомиелина (4,7%), известных как маркерные фосфолипиды митохондрий и плазматических мембран [2, 8, 9, 14]. На наличие этих фосфолипидов в препаратах ядерных мембран, выделенных разными методами, указывается также в ряде работ [2, 8—10, 14], согласно которым процентное содержание кардиолипина в препаратах колеблется в пределах 2,1—4,3, а сфингомиелина—2—9%.

Таким образом, фосфолипидный спектр ядерных мембран, выделенных с применением обработки ДНК-азой, свидетельствует о незначительной загрязненности препаратов и может служить четким контролем для дальнейшего исследования роли отдельных фосфолипидов в регуляции генетической активности.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 28.VIII 1980 г.

ՕՐՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԳԻ ԿՈՐԻՉԱՅԻՆ ՄԵՄԲՐԱՆԻ ՖՈՍՖՈԼԻՊԻԴԱՅԻՆ ԿԱԶՄԸ

Է. Ս. ԿԵՎՈՐԿՅԱՆ, Ժ. Վ. ՅԱՎՐՈՅԱՆ, Գ. Ն. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

Սիլիկազելային շերտում քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով հետազոտվել է առնետների լյարդի բջիջներից անշատված կորիզային մեմբրանի ֆոսֆոլիպիդային կազմը: Ցույց է տրվում, որ այն բաղկացած է ինը ֆոսֆոլիպիդներից, որոնցից երկուսը՝ ֆոսֆատիդիլսոլինը և ֆոսֆատիդիլէթանոլամինը կազմում են ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդների մոտ 2/3-ը:

Արդյունքները վկայում են կորիզային մեմբրանի բավարար մաքրության մասին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алесенко А. В., Бойков П. Я., Буракова Е. Б., Красильников В. А., Сидоренко Л. И., Тодоров И. Н. Биохимия, 43, 1966, 1978.
2. Леменовская А. Ф., Коен Я. М., Перевощикова К. А., Збарский И. Б., Дятловская Э. Я., Бергельсон Л. Д. Биохимия, 41, 1000, 1976.
3. Berezney R., Funk L. K., Crane F. L. Bioch. Bioph. Acta, 203, 531, 1970.
4. Blobel G., Potter V. R. Science, 154, 76, 1966.
5. Fiske C. H., Subbarow J. J. J. Biol. Chem., 63, 375, 1925.
6. Folch J., Lees M., Sloane S. G. H. J. Biol. Chem. 226, 497, 1957.
7. Harris J. R. Bioch. Bioph. Acta, 515, 55, 1978.
8. Keenan T. W., Berezney R., Funk L. K., Crane F. L. Bioch. Bioph. Acta, 203, 517, 1970.
9. Kleinig H. J. Cell Biol., 46, 396, 1970.
10. Kleinig H., Zentgraf H., Comes P., Stadler J. J. Biol. Chem., 246, 2996, 1971.
11. Lowry O. H., Rosenbraugh N. J., Farr A. K., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
12. Schmidt G., Tannhauser J. J. Biol. Chem., 161, 83, 1945.
13. Skipsi V. P., Peterson R. F. Barclay M. J. Lipid Res., 3, 467, 1967.
14. Virtanen J., Brotherus J., Renkonen O., Wartiovaara J. Bioch. Bioph. Res. Comm., 76, 142, 1977.
15. Wagner H., Hérhammer L., Wolff P. Biochem. Z., 334, 175, 1961.