

УДК 611.98 : 578.824.11—092.9—085.371

БИОХИМИЯ

А. С. Агабалян, А. Ф. Казанчян, А. С. Сафарян, Г. Г. Галустян,
К. А. Казарян, М. В. Татъян, Р. А. ЗахарянХарактеристика двуспиральных РНК, выделенных из препарата
нуклеината натрия

(Представлено академиком АН Армянской ССР Э. Г. Африкяном 3/V 1983)

В последнее десятилетие в терапии различных заболеваний с успехом используются препараты РНК, полученные из дрожжей в форме натриевой соли,—нуклеинат натрия (НН) (¹⁻³). Исследования по метаболизму вирусных РНК и стимулированию синтеза интерферона клетками животных привели к обнаружению в неинфицированных клетках двуспиральных (дс) РНК. Эти наблюдения показали, что у многих живых организмов выявлена устойчивая к панкреатической рибонуклеазе клеточная РНК, имеющая двуспиральную структуру (⁴⁻⁶). Эти дс РНК обладают выраженными биологическими свойствами, в частности они являются сильными индукторами интерферона (⁷).

Целью настоящей работы явилось изучение в составе официальных препаратов дрожжевых РНК и нуклеината натрия наличия дс РНК, а также исследование некоторых ее физико-химических и биологических свойств.

Дс РНК из препарата нуклеината натрия получали по методу Кроненберга и Хамфрейса (⁸), включающему обработку тотального препарата РНК-азой, фенольную депротенинизацию и фракционирование 4 М хлористым литием. О степени чистоты препаратов РНК судили по отношению E_{260}/E_{280} , которое во всех случаях было равно 2,0. Дальнейшее фракционирование дс РНК проводили на колонках с немодифицированной целлюлозой. Для обработки препаратов РНК нуклеазой SI РНК вносили в инкубационную среду следующего состава: 0,03 М Na-ацетатный буфер, рН 4,6, 0,05 М NaCl, 1 мМ ZnSO₄, 5%-ный глицерин, добавляли нуклеазу SI (2000 ед. активности) и инкубировали в течение 15 мин при 45°. Реакцию останавливали охлаждением. Электрофорез препаратов РНК в 1,5%-ном геле агарозы проводили по общепринятому способу (⁹).

Электронно-микроскопическую визуализацию препаратов РНК проводили на электронном микроскопе BS-613 с ускоряющим напряжением 80 кВ. Молекулярные веса определяли по Лангу (¹⁰).

Для изучения формирования первичного иммунного ответа к ксеногенному антигену последний вводили внутривенно в дозе 5×10^8 , а препарат дс РНК—в дозе 10 мкг на мышь в разные дни по отношению к тест-иммунизации. Количество антителообразующих клеток (АОК) определяли с помощью метода локального гемолиза в геле на 4 сутки после введения антигена (¹¹).

Тотальную РНК препарата НН фракционировали на колонке с немодифицированной целлюлозой, предварительно обработав ее РНК-азой (20 мкг/мл) и 4 М раствором хлористого лития. Элюцию РНК проводили буфером STE с 15% этанола и чистым буфером STE. При этом РНК вымывалась с колонки тремя пиками, из которых первый (фракции 13-27) соответствует односпиральным молекулам РНК и элюируется буфером STE с 15% этанола, в то время как дс РНК элюируется двумя небольшими пиками (фракции 37-43 и 46-58) только чистым STE буфером (рис. 1). Наши данные, полученные по хроматографическому поведению одно- и двуспиральных РНК на колонках с немодифицированной целлюлозой, полностью коррелируют с результатами других авторов (8). Проведенные расчеты показали, что описанный способ фракционирования позволяет получить около 100—200 мкг дс РНК при использовании 1 г тотального препарата НН.

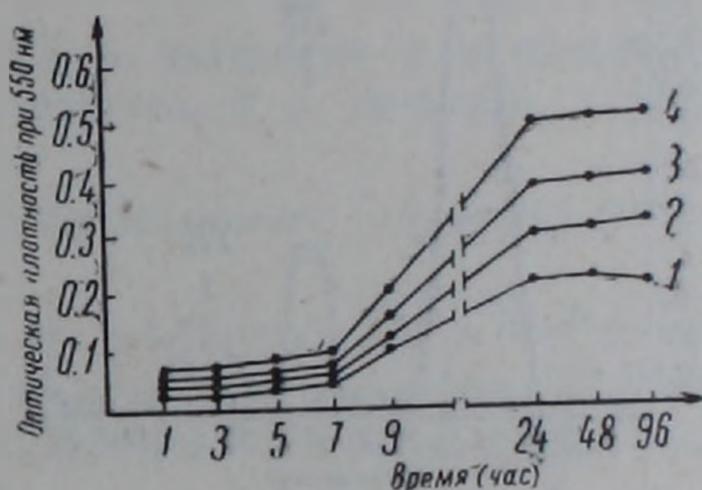


Рис. 1. Фракционирование РНК на немодифицированной целлюлозе

Выделенную описанным путем РНК идентифицировали как двуспиральную по нескольким тестам: по отношению к действию панкреатической рибонуклеазы в среде с высокой ионной силой, нуклеазы SI, а также электронно-микроскопически. Как показали результаты, полученные препараты РНК оказались резистентными к действию РНК-азы, в то время как односпиральные формы практически полностью перевариваются РНК-азой. Для дальнейшего подтверждения двуспиральности полученных РНК их подвергали воздействию SI нуклеазы, избирательно действующей только на односпиральные формы нуклеиновых кислот. Как и предполагалось, полученные препараты РНК оказались в отличие от тотального препарата резистентными к действию этого фермента.

Электронно-микроскопическая визуализация препаратов РНК выявила набор двуспиральных молекул РНК с молекулярным весом от $0,06 \times 10^6$ до $1,2 \times 10^6$ дальтон (Д). Наиболее часто встречающимися типами дс РНК, выделенными из тотального препарата НН, являются дс РНК с молекулярным весом $0,13 \times 10^6$ (21%), $0,26 \times 10^6$ (21%) и $0,4 \times 10^6$ Д (16%).

Специальная серия экспериментов была посвящена изучению биологической активности выделенных и физико-химически и электронно-микроскопически охарактеризованных дс РНК. Ранее было показано, что тотальные препараты РНК стимулируют рост медленно растущих штаммов бактерий (12). Нами изучено действие односпи-

ральных и двуспиральных РНК на рост бактерий *Salmonella derby*. Установлено, что оба препарата оказывают стимулирующее действие на рост бактерий, причем хотя концентрация препаратов дс РНК и была в 2000 раз меньше, однако стимулирующее действие обоих препаратов практически было одинаковым. Эти данные подтверждают наше предположение о том, что в ряде случаев стимулирующая активность дрожжевых РНК зависит от содержащихся в них двуспиральных форм РНК (рис. 2).

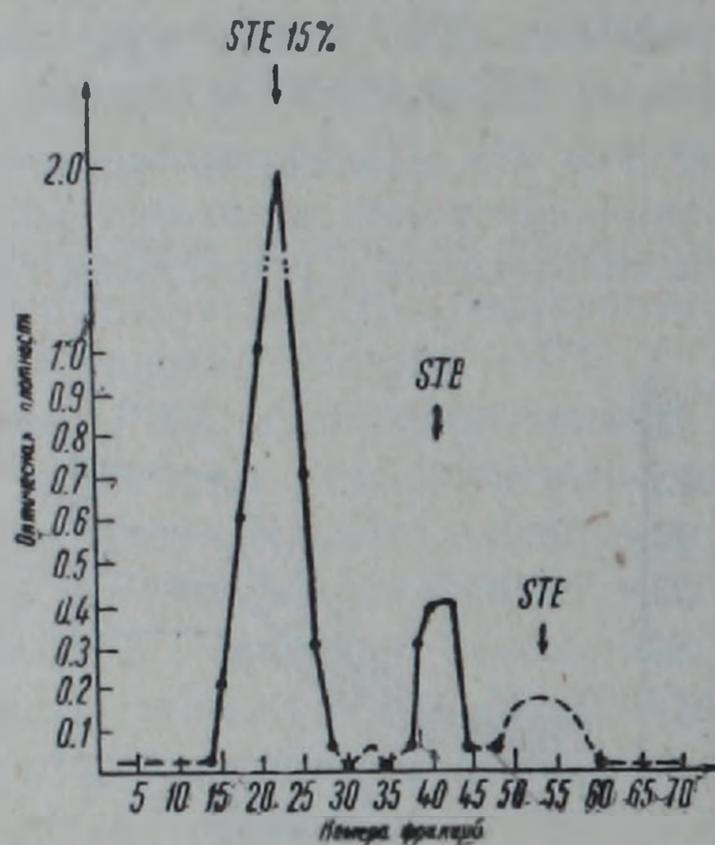


Рис. 2. Стимуляция роста бактерий *Salmonella derby* препаратами дс РНК: 1—контроль; 2—5 мкг дс РНК; 3—10 мкг дс РНК; 4—100 мкг дс РНК

В экспериментах по выявлению влияния дс РНК и НН на процесс формирования первичного иммунного ответа к ксеногенному антигену было показано, что количество антителообразующих клеток у подопытных животных, получавших препараты РНК, практически не отличалось от таковых у контрольных мышей (таблица). Это свидетельствует о том, что в условиях данного эксперимента изучаемые препараты не оказывают влияния на процессы образования гемолизинпродуцирующих клеток и гемагглютининов. В то же время сти-

Влияние дс РНК на первичный иммунный ответ

Материал	Концентрация	Время введения препарата	Количество клеток в селезенке	Количество антителообразующих клеток в селезенке
Эритроциты барана (контроль)	5×10^8	—	347	136773
дс РНК	10 мкг/мышь	За 24 ч до введения антигена	258	100925
НН	3,5 мг/мышь	—	321	92931
дс РНК	10 мкг/мышь	Одновременно с введением антигена	300	199067
НН	3,5 мг/мышь	—	290	142487

муляция первичного иммунного ответа препаратами НН, обнаруженная другими авторами (¹), зависит по-видимому от использования другого антигена.

Таким образом, наши эксперименты по выявлению биологической активности препаратов дс РНК и НН позволяют предположить, что по крайней мере некоторые эффекты, вызываемые официальным препаратом НН, по-видимому, зависят от присутствия в них дс РНК. Малые дозы этой формы РНК, ответственные за стимуляцию роста бактерий, в отличие от нуклеината натрия позволяют еще больше расширить спектр применения дс РНК, особенно в тех случаях, когда очень большие концентрации официального препарата могут оказаться токсичными.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Ա. Ս. ԱՂԱՐԱՅԱՆ, Ա. Յ. ՂԱԶԱՆՉՅԱՆ, Ա. Ս. ՍԱՅԱՐՅԱՆ, Հ. Գ. ԳՍԼՍՏՅԱՆ,
Կ. Ա. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Մ. Վ. ՏԱՏՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ

Na-նուկլեինատից անջատած երկթելանի ՌնԹ-ի բնութագիրը

Ուսումնասիրված են երկթելանի (ԵԹ) ՌնԹ-ի որոշ ֆիզիկաքիմիական և կենսաբանական առանձնահատկությունները: ԵԹ ՌնԹ-ի ստացվել է վաճառքում եղած խմորասնկերի ՌնԹ-ի Na-ական աղից Կրոնենբերգի և Հյումֆրեյսի եղանակով (⁸): Մաքրված ԵԹ ՌնԹ-ն նույնացվել է էլեկտրաֆորետիկ և էլեկտրոնային միկրոսկոպիկ եղանակներով, ինչպես նաև պանկրեատիկ ռիբոնուկլեազայի և S 1 նուկլեազայի ազդեցությամբ:

Ցույց է տրված, որ նշված եղանակով ստացված ՌնԹ-ն կայուն է այդ ֆերմենտների հանդեպ, մինչդեռ մեկթելանի ՌնԹ-ն՝ ոչ: Ըստ էլեկտրոնային միկրոսկոպիկ հետազոտության տվյալների ԵԹ ՌնԹ-ի մոլեկուլային կշիռը գտնվում է $0,06 \cdot 10^6 - 1,2 \cdot 10^6$ դալտոն սահմաններում:

Ցույց է տրված, որ ԵԹ ՌնԹ-ն խթանում է S. derby միկրոբների աճը: Մեր փորձերում քսենոգեն անտիգենի նկատմամբ իմուն պատասխանի փոփոխություն ինչպես Na-նուկլեինատի, այնպես էլ ԵԹ ՌնԹ-ի ազդեցության տակ ճազարների մոտ չի հայտնաբերվում:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ А. М. Земсков, В. М. Земсков, В. Г. Передерий, ЖМЭИ, т. 9, 13 (1982).
- ² А. М. Земсков, В. М. Земсков, В. Г. Передерий и др., Антибиотики, т. 9, 23 (1969).
- ³ Б. Б. Фукс, С. Ф. Шершевская, Л. М. Попова, Бюлл. эксп. биол. мед., т. 9, 23 (1969).
- ⁴ L. Montagnier, C. r. Acad. Sci. D. v. 287, 1417 (1968). ⁵ C. Colby, B. Stollar, M. Simon, Nature, New Biol., v. 229, 172 (1971). ⁶ А. П. Рысков, Успехи совр. биол. т. 86, 163 (1978). ⁷ W. Carter, E. De Clerq, Science, v. 186, 1172 (1974). ⁸ L. Kronenberg, Huphreys, Biochemistry, v. 11, 2020 (1972). ⁹ Р. А. Захарян, А. С. Агабалян, Л. А. Чил-Акопян и др. ДАН АрмССР, т. 53, 42 (1976). ¹⁰ D. Lang, J. Mol. Biol., v. 54, 557 (1970). ¹¹ N. Yerne, A. Pordin, Science, 140 (1963). ¹² А. М. Земсков, А. А. Харикова, Л. П. Иванова и др., Лабор. дело, т. 9, 565 (1978).