

УДК 615.32

Э. Г. САРКИСЯН, Э. С. ГЕВОРКЯН, Г. А. ПАНОСЯН

## МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ И НЕКОТОРЫЕ ПАРАМЕТРЫ ХРОМАТИНА МАТКИ КРОЛИКА

Предложен метод выделения хроматина из матки кролика. Определены параметры хроматина, указывающие на чистоту полученного препарата. Даны некоторые характеристики хроматина в контроле и при введении в организм животных 17 β-эстрадиола.

Выделение хроматина из матки связано с определенными трудностями, обусловленными жесткостью ткани. Трудная гомогенизируемость мышечной ткани вынудила многих исследователей варьировать условия и среды гомогенизации, применяя при этом ультразвук или другие сильные физические воздействия [2, 6, 9, 12, 16, 25, 26, 27]. Хроматин из матки можно получить непосредственно из ткани [2, 6, 21] или же из чистых ядер [7, 10, 13, 19]. Большое разнообразие методических приемов преследует общую цель—выбор условий для максимальной гомогенизации с оптимальным выходом.

В настоящей работе описывается разработанный нами метод выделения хроматина непосредственно из матки кролика. Метод обеспечивает быстрое и качественное выделение хроматина, включающее гомогенизацию в среде с высокой концентрацией сахарозы и последующими промывками в растворах с низкой ионной силой. Отсутствие детергентов при выделении позволяет получить нативный препарат хроматина. Метод обеспечивает получение 0,5 мг хроматина (в пересчете на ДНК) на 1 г ткани.

### Материал и методы исследования

Эксперименты проводились на половозрелых (8—10-месячных) самках новозеландских кроликов. 17 β-эстрадиол («Sigma», США), растворенный в 1 мл пропиленгликоля, в концентрации 100 мкг на 1 кг веса животного вводили внутривентрально. Активным контролем служили животные, обработанные пропиленгликолем. Животных забивали через 40 минут после введения гормона. Все последующие процедуры проводили в холодных условиях. Матку изолировали, очищали от жира, брыжейки и соединительной ткани, промывали холодным

раствором 0,9 N NaCl. В качестве среды гомогенизации была использована среда, предложенная Talwar и др. [22] и содержащая 50 mM Трис-HCl (pH 8,0), 0,88 M сахарозы, 10 mM KCl и 1,5 mM  $MgCl_2$ . Гомогенизацию проводили в 10-кратном объеме в стеклянном гомогенизаторе с плотно притертым стеклянным пестиком в течение 5 минут при 5 000 об/мин. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали 15 минут при 4 000 x g. Осадок суспензировали в 50 мл вышеуказанной среды и центрифугировали при тех же условиях. Неоцентрифугированный препарат хроматина вновь ресуспензировался в 50 мл раствора, содержащего 24 mM ЭДТА, 75 mM NaCl, 50 mM Трис-HCl (pH 8,0), и осаждался в аналогичных условиях. Дальнейшая очистка грубого препарата хроматина проводилась двукратным ресуспензированием в 25 мл 50 mM Трис-HCl буфера (pH 8,0) с чередующимся центрифугированием в течение 10 минут при 15 000 x g. Процедура очистки завершалась осаждением желатинообразного вязкого препарата хроматина из суспензии 10 mM Трис-HCl при 15 000 x g в течение 15 минут. Полученный желатинообразный осадок хроматина суспензировали в буфере и проводили анализ его компонентов. Часть суспензии использовалась на диссоциацию в 1 mM NaCl. УФ-спектр хроматина измерялся на спектрофотометрах СФ-16 и „Specord UV VIS“.

Тотальные нуклеиновые кислоты и белки разделяли щелочным гидролизом в соответствующих условиях, описанных в методе Schmidt, Thannhauser [20] в модификации Munro, Fleck [18]. Концентрация РНК определялась спектрофотометрически по поглощению при 260 нм. ДНК определялась дифениламиновым методом по Burton [5]. В качестве стандарта использовался препарат ДНК («Sigma», США) из тимуса телят. Концентрацию тотального белка, гистонов и негистоновых белков определяли по методам Itzhaki и др. [11] и Lowry и др. [14], используя бычий сывороточный альбумин («Reanal», ВНР) в качестве стандарта.

### Результаты и обсуждение

Химический анализ и отношения оптических параметров хроматина из мозга, матки и печени кроликов, приведенные в табл. 1, показывают, что полученные значения характеристик хроматина согласуются с данными других авторов [2, 6, 21]. Отношение компонентов хроматина свидетельствует, что полученный вышеописанным методом хроматин обладает достаточной чистотой. Об этом свидетельствует также ультрафиолетовый спектр диссоциированного и недиссоциированного хроматина (рис. 1). Амплитуда спектра диссоциированного хроматина указывает на возрастающую степень гомогенности хроматина. Такое же увеличение амплитуды наблюдается в присутствии высокой ионной силы, диссоциирующей ДНК-белковый комплекс [23].

Известно, что введение в организм животных физиологических концентраций ряда стероидных гормонов приводит к повышению матрич-

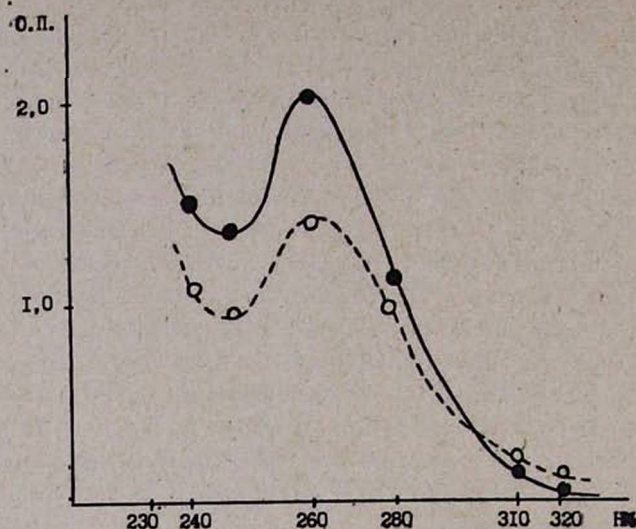


Рис. 1. УФ-спектр хроматина матки кролика. Измерения проводились на спектрофотометре СФ-16. На оси абсцисс—длина волны, ординат—оптическая плотность. Сплошная кривая—диссоциированный, пунктирная—недиссоциированный хроматин.

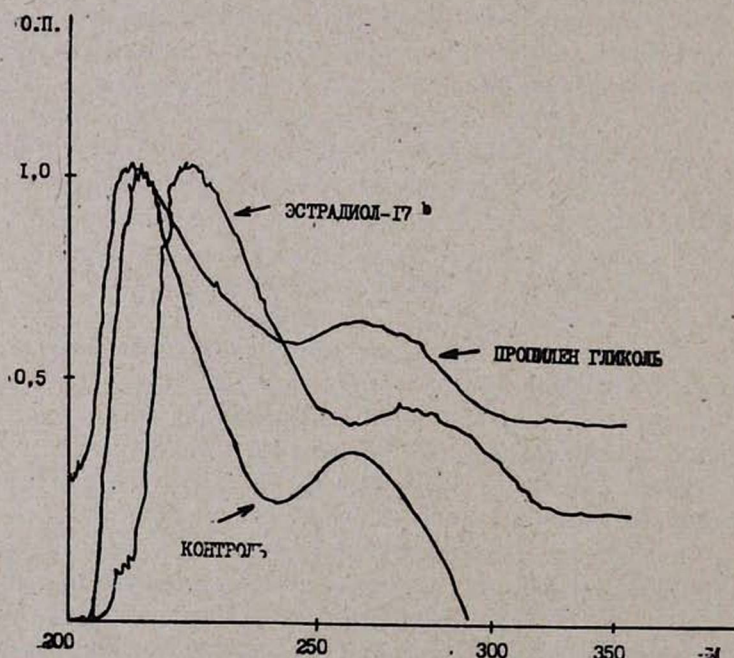


Рис. 2. УФ-спектр хроматина матки кроликов контрольных и обработанных пропиленгликолем и пропиленгликоль+эстрадиолом-17 β. Измерения проводились на спектрофотометре «Specord UV VIS».

ной активности хроматина, к усилению синтеза РНК [3, 4, 15, 17, 24]. При этом возможны конформационные изменения нуклеопротеидного комплекса, приводящие к раскрытию и выставлению акцепторных участков хроматина, которые становятся способными специфически связывать гормонрецепторные комплексы [1]. Такая возможность предполагает изменение в ультрафиолетовом спектре хроматина при введении стероидов в организм животных.

Таблица 1  
Химический состав хроматина

| Компоненты                           | Матка          | Мозг | Печень |
|--------------------------------------|----------------|------|--------|
|                                      | отношение масс |      |        |
| ДНК                                  | 1              | 1    | 1      |
| РНК                                  | 0,13           | 0,20 | 0,09   |
| Тотальный белок                      | 2,00           | 1,12 | 1,30   |
| Гистон                               | 1,08           | 1,00 | 1,02   |
| Негистоновый белок                   | 0,46           | 0,50 | 0,32   |
| ОП <sub>160</sub> /ОП <sub>240</sub> | 1,10           | 1,10 | 1,20   |
| ОП <sub>260</sub> /ОП <sub>280</sub> | 1,40           | 1,40 | 1,50   |
| ОП <sub>260</sub> /ОП <sub>320</sub> | 3,40           | 5,00 | 7,00   |

Примечание. Приведены средние значения десяти серий экспериментов.

Таблица 2  
Химический состав хроматина матки

| Компоненты                           | Контроль       | Пропилен-гликоль | 17 $\beta$ -эстрадиол |
|--------------------------------------|----------------|------------------|-----------------------|
|                                      | отношение масс |                  |                       |
| ДНК                                  | 1              | 1                | 1                     |
| РНК                                  | 0,13           | 0,07             | 0,06                  |
| Тотальный белок                      | 2,00           | 2,10             | 2,00                  |
| ОП <sub>260</sub> /ОП <sub>240</sub> | 1,14           | 1,14             | 1,00                  |
| ОП <sub>260</sub> /ОП <sub>280</sub> | 1,40           | 1,45             | 1,46                  |
| ОП <sub>260</sub> /ОП <sub>320</sub> | 3,40           | 3,35             | 3,10                  |

Примечание. Приведены средние значения пяти серий экспериментов.

Химический анализ хроматина из матки кроликов не выявил существенных изменений в параметрах при введении в организм животных пропиленгликоля и эстрадиола (табл. 2), что согласуется с литературными данными [2, 8]. Ультрафиолетовый спектр хроматина из матки обработанных 17  $\beta$ -эстрадиолом кроликов несколько смещен по сравнению с контролем (рис. 2). Смещение пиков на 10—20 нм в сторону длинных волн наблюдается при 215 и 260 нм, которое, вероятно, отражает перестройки в структуре нуклеопротеидного комплекса, обусловленные воздействием гормона. Эти изменения, возможно, связаны со специфическим активированием генетического аппарата и, несомненно, требуют более детального исследования.

Предлагаемая методика выделения хроматина из матки кроликов обеспечивает быстрое и простое получение нативных препаратов без применения детергентов.

Кафедра биофизики  
Ереванского государственного университета

Поступила 20/VII 1979 г.

Է. Գ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Է. Ս. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

ՀԱԳԱՐԻ ԱՐԳԱՆԻՒՄԻ ՔՐՈՄԱՏԻՆԻ ԱՆՋԱՏՄԱՆ ՄԵԹՈԴԻ  
ՈՒ ՄԻ ՔԱՆԻ ՊԱՐԱՄԵՏՐԵՐԸ

Առաջարկված է ճագարի արգանդից բրոմատինի անջատման մեթոդ: Որոշված են բրոմատինի մի քանի պարամետրեր, որոնք վկայում են ստացված դեղամիջոցի մաքրության մասին: Բերված են բրոմատինի որոշ բնութագրերը ստուգիչ և 17- $\beta$ -էստրադիոլ սրսկված կենդանիների մոտ:

E. G. SARKISSIAN, E. S. GEVORKIAN, G. H. PANOSYAN

A METHOD OF ISOLATION AND SOME PARAMETERS OF  
RABBIT UTERINE CHROMATIN

A method of chromatin isolation from rabbit uterus is suggested. Uterine chromatin parameters have shown, that the preparation is satisfactory. Some characteristics of chromatin are given for control group of rabbits, and rabbits treated by Estradiol-17- $\beta$ .

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Смирнов В. Г., Кирьянова Г. И., Ванюшин Б. Ф. Биохимия, 1978, т. 43, в. 10, стр. 1845.
2. Barker K. L., Warren J. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 56, 1298.
3. Bieri-Bonnoit F., Joss U. Dierks-Ventling Ch., FEBS Lett., 1977, 81, 91.
4. Büchl K. A., Veneziale C. M. Andrologia, 1977, 9, 237.
5. Burton K. Bloch. Journ., 1956, 62, 315.
6. Cohen M. E., Hamilton T. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 4346.
7. Cohen M. E., Kleinsmith L. J. Bloch. et Bioph. Acta, 1976, 435, 159.
8. Dahmus M. E., Bonner J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, 54, 1370.
9. DeSombre E. R., Puca G. A., Jensen E. V. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, 64, 148.
10. Hardin J. W., Clark J. H., Glasser S. R., Peck E. J. Jr. Biochemistry, 1976, 15, 1370.
11. Itzhaki, Gill Analyt. Bloch., 1964, 9, 410.
12. Jensen E. V., Suzuki T., Kawashima T., Stumpf W. E., Jungblut P. W., DeSombre E. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, 59, 632.
13. Kokko E., Isomaa V., Janne O. Bloch. et Bioph. Acta, 1976, 479, 354.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. Z., Randall R. J. Journ. Biol. Chem. 1951, 193, 265.

15. *Lukacs J., Sekeris C. E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, 54, 1370.
16. *Luck D. N., Hamilton T. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 157.
17. *Means A. R., Hamilton T. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 56, 1594.
18. *Munro H. N., Fleck A.* Meth. Bioch. Anal., 1967, 14, 113.
19. *Reeder R. H.* Journ. Mol. Biol., 1973, 80, 229.
20. *Schmidt G., Thannhauser S. J.* Journ. Biol. Chem., 1945, 161, 83.
21. *Steggles A. W., Spelsberg T. C., Glasser S. R., O'Malley B. W.* Proc., Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 1479.
22. *Talwar G. P., Segal S. J., Evans S. J., Davidson O. M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1964, 52, 1059.
23. *Wagner T., Spelsberg T. C.* Biochemistry, 1971, 10, 2599.
24. *Walker M. D., Kaye A. M., Fridlender B. R.* FEBS, Lett., 1978, 92, 25.
25. *Yamamoto K. R., Alberts B. M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 2105.
26. *Yamamoto K. R., Alberts B.* Journ. Biol. Chem., 1974, 249, 7076.
27. *Zava D. T., Harrington N. J., McGuire W. Z.* Biochemistry, 1976, 15, 4292.