

Irena BORKOWSKA i Małgorzata SZCZERBO

Inkorporacja ^{32}P do różnych frakcji kwasu rybonukleinowego w mózgu embrionów kurzych

Инкorporация ^{32}P к разным фракциям рибонуклеиновой кислоты
в мозгу курных эмбрионов

Incorporation of ^{32}P into Different RNA Fractions of Embryo Chicken Brain

Synteza RNA przebiega odmiennie w mózgu organizmu młodego w porównaniu z mózgiem dojrzałym (1). Również i inkorporacja aminokwasów do białek rybosomalnych mózgu zmniejsza się z wiekiem zwierzęcia (10, 11). Przebadano kinetykę powstawania prekursorów rybosomalnego RNA (r-RNA) i informacyjnego RNA (m-RNA) w mózgu 2-tygodniowych szczurów (12).

W niniejszej pracy przeprowadzono badania na mózgu w stanie embrjonalnym w celu określenia szybkości inkorporacji ^{32}P do poszczególnych typów kwasu rybonukleinowego.

OPIS DOŚWIADCZEŃ

1. Preparatyka kwasów nukleinowych piętnowanych ^{32}P

Doświadczenia przeprowadzono na mózgach 10-dniowych embrionów kurzych. Fosfor radioaktywny wstrzykiwano pod kontrolą lampy do owodni jaja w pobliżu głowy w ilości 83—130 μc . Stosowano ^{32}P jako ortofosforan sodowy (nośnikowy 1 mg P/ml) o pH 7,0 lub jako ^{32}P beznosnikowy w roztworze soli fizjologicznej. Po różnych czasach inkubacji z ^{32}P (2—24 godzin) zabijano embriony przez dekapitację i wypreparowywano mózg. Do każdego doświadczenia przygotowywano homogenat z 20 mózgów w buforze Tris 0,01 M o pH 7,2 z dodatkiem 0,14 M roztworu NaCl. Całość preparatyki przeprowadzano w temp. 0°C. Kwasy nukleinowe otrzymywano metodą fenolową przez 3-krotną ekstrakcję w obecności 1% soli sodowej siarczanu dodecyłu w temp. 0°C, 18°C oraz w łaźni wodnej o temp. 60°C. Uzyskaną po wirowaniu fazę wodną oczyszczano od śladów fenolu oraz zanieczyszczeń białkiem przez wytrząsanie z równą objętością roztworu chloroformu i alkoholu izoamyloowego (15). Zawarte w fazie wodnej kwasy nukleinowe strącano podwójną objętością 96% etanolu.

2. Metody analityczne

Rozdział kwasów nukleinowych przeprowadzano metodą chromatografii kolumnowej z metylovaną albuminą (7), stosując elucję linearnym gradientem chlorku sodu (od 0,14 M do 0,9 M) w buforze Tris 0,01 M o pH 7,2, a następnie dodatkową elucję 1,5 M NaCl w 0,2 M NH_4OH . W próbkach uzyskanych z rozdziału chromatograficznego wykonano pomiar absorpcji w 260 m μ . Wyniki spektrofotometrycznych oznaczeń pozwoliły wyodrębnić cztery zasadnicze frakcje, które strącono 96% etanolem. Każdą frakcję poddano hydrolizie alkalicznej (13). Oznaczenia zawartości RNA oparto na reakcji orcynolowej (9), zaś stężenie DNA określano testem z dwufenyloaminą (5) po uprzedniej hydrolizie kwasem nadchlorowym (3).

Skład nukleotydowy poszczególnych frakcji RNA określano metodą rozdziału na kolumnach jonowymiennych z Dowex 50 i Dowex 1 (6). Skład zasad DNA analizowano przy pomocy elektroforezy na żelu agarowym (4).

Enzymatyczną hydrolizę RNA przeprowadzano w buforze cytrynianowym (8) stosując rybonukleazę trzuskową (EC 2.7.7.16, firmy BDH Anglia).

Pomiary radioaktywności analizowanych frakcji RNA po ich hydrolizie alkalicznej wykonywano w mokrej warstwie posługując się licznikiem Geigera-Millera z okienkiem mikowym 4 mg/cm².

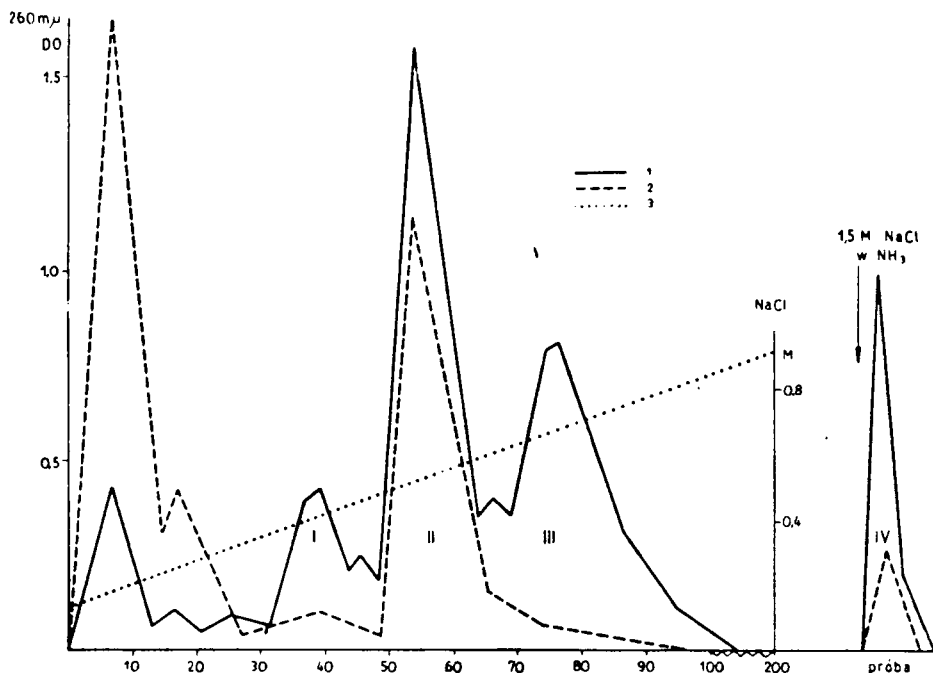
OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

W wyniku ekstrakcji kwasów nukleinowych z homogenatu 20 mózgowców embrionów otrzymywano preparat, którego gęstość optyczna w 260 m μ wynosiła średnio 200 jednostek. O czystości preparatu kwasu nukleinowego świadczy stosunek z pomiaru przy 280 m μ i 260 m μ równy 0,53.

Kwasy nukleinowe rozdzielano na kolumnie z metylovaną albuminą na cztery zasadnicze frakcje: pierwsza eluowała się 0,4 M NaCl, druga — 0,58 M NaCl, trzecia — 0,7 M NaCl, a czwarta wypływała przy 1,5 M NaCl w roztworze amoniaku. Nie analizowano natomiast produktów degradacji kwasów nukleinowych, które elują się niskim stężeniem NaCl i wypływają zawsze przed zasadniczymi frakcjami. Obraz chromatograficznego rozdziału kwasów nukleinowych przedstawia ryc. 1.

Analiza chemiczna wykazała, że kwas rybonukleinowy zawarty w preparacie rozdziela się na cztery frakcje, przy czym w I występuje w ilości około 26%, w II około 13%, w III do 51%, a IV zawiera średnio 10% całego RNA. Natomiast kwas dezoksyrybonukleinowy występuje przede wszystkim we frakcji II (91%), w III około 6%, w a IV zaledwie w ilości 3%.

Wydzielone frakcje kwasu rybonukleinowego różniły się między sobą swym składem nukleotydowym, który przedstawiono na tab. 1. Zgodnie z danymi naszych uprzednich prac (2), skład nukleotydowy RNA z frakcji I jest charakterystyczny dla s-RNA, a z frakcji II i III odpowiada r-RNA. Natomiast RNA znajdujący się we frakcji IV charakteryzuje się wysoką



Ryc. 1. Rozdział kwasów nukleinowych z tkanki mózgowej embrionów kurzych na kolumnie chromatograficznej z metylowaną albuminą
 Chromatography of nucleic acids from embryo chicken brain on the methylated albumin kieselguhr column

1 — preparat nietrawiony RN-azą (before RN-ase), 2 — preparat po inkubacji z RN-azą (after NR-ase), 3 — gradient chlorku sodu (gradient of sodium chloride)

zawartością kwasu gwanilowego, co wskazywałoby na podobieństwo do r-RNA. Przeprowadzono również oznaczenia składu zasad DNA z frakcji II, a wyniki umieszczono na tab. 1.

Tab. 1. Skład nukleotydowy różnych frakcji RNA izolowanych z mózgu embrionów kurzych

Nucleotide composition of various RNA fractions isolated from embryo chicken brain

Fracje RNA eluowane z kolumny chromat. roztworem NaCl	Skład zasad RNA w Mol %				$\frac{G+C}{A+U}$ (T)	$\frac{A+G}{U+C}$ (T)
	U (T)	G	C	A		
I 0,4 M	25,0	31,6	24,2	19,2	1,26	1,03
II 0,58 M	22,8	31,9	28,9	16,4	1,55	0,94
III 0,7 M	22,7	31,9	28,7	16,7	1,54	0,95
IV 1,5 M w NH_3	22,3	36,0	24,6	17,1	1,54	1,12
DNA z frakcji II	30,2	19,2	20,9	29,7	0,67	0,97

Szybkość inkorporacji ^{32}P do poszczególnych frakcji RNA określano na zasadzie obliczenia aktywności właściwej (imp/min/ μg P-RNA). Prześledzono zarówno wpływ czasu inkorporacji z ^{32}P na wzrost aktywności właściwej, jak i wpływ stężenia podanego izotopu. Wyniki ujęto w tab. 2.

Jak wynika z powyższych doświadczeń, aktywności właściwe poszczególnych frakcji RNA wzrastają w miarę przedłużania czasu inkubacji z ^{32}P , lecz nie ma różnicy pomiędzy aktywnością właściwą s-RNA i r-RNA. Wykazano natomiast, że RNA z frakcji IV posiada zawsze przynajmniej dwukrotnie wyższą aktywność właściwą od pozostałych frakcji RNA, niezależnie od czasu inkubacji oraz od stężenia podanego izotopu.

Tab. 2. Aktywność właściwa RNA w mózgu embrionów kurzych po różnym czasie inkubacji z ^{32}P

Specific activity of RNA from embryo chicken brain after different time of incubation with ^{32}P

Ilość ^{32}P w μc	Czas inkubacji w godz.	Aktywność właściwa (imp/min/ μg P-RNA)			
		I (s-RNA)	II-RNA towa- rzyszający DNA	III (r-RNA)	IV
131	2 ³⁰	18,8	17,1	18,9	45,0
88	2 ¹⁵	2,7	3,7	3,7	10,0
83	3 ¹⁵	4,4	4,4	5,4	11,8
88	12 ⁰⁰	59,0	62,0	62,0	115,0
98	24 ⁰⁰	101,0	110,0	100,0	270,0

Jak wynika z prac innych autorów, w rozdziale chromatograficznym kwasów nukleinowych elucja ponad 1 M chlorkiem sodu pozwala zarówno na oddzielenie szybko znakowanych frakcji RNA (16), jak i DNA (14). Yoshikawa i wsp. (16) wykazali istnienie dwóch rodzajów RNA z wysoką aktywnością właściwą, a mianowicie frakcję o składzie nukleotydowym odpowiadającym r-RNA, a drugą o typie DNA. Oba rodzaje RNA eluowały się z kolumny z metylowaną albuminą roztworem NaCl o stężeniu 1,05—1,15 M.

Aby się przekonać czy RNA z frakcji IV jest frakcją jednorodną, przeprowadzono następujące doświadczenie. Preparat kwasów nukleinowych przed rozdzielaniem chromatograficznym poddano hydrolizie enzymatycznej przez inkubację z rybonukleazą. Z kolei wytrącano przy pomocy alkoholu DNA oraz frakcje RNA odporne na działanie rybonukleazy. Użytkany w ten sposób preparat rozdzielano na kolumnie z metylowaną albuminą. Pomiar spektrofotometryczny wykazały trzy szczyty absorpcji. Pierwszy utworzony przez produkty degradacji RNA, drugi, który odpowiada DNA, oraz trzeci najmniejszy eluujący się 1,5 M chlorkiem sodu.

Ten ostatni był o wiele mniejszy w porównaniu do preparatu nietrawionego rybonukleazą. Zniknęły natomiast szczyty pochodzące od s-RNA i r-RNA (ryc. 1). W ten sposób wykazano, że mimo trawienia rybonukleazą, część frakcji, która eluuje się z kolumny wysokim stężeniem NaCl, jest niewrażliwa na działanie enzymu. W wyniku analizy chemicznej stwierdzono, że frakcja ta składa się zarówno z RNA, jak i DNA. Zbyt małe ilości RNA niewrażliwego na działanie rybonukleazy nie pozwoliły na określenie składu nukleotydowego. Obliczono natomiast jego aktywność właściwą, która okazała się 7-krotnie wyższa od aktywności właściwej s-RNA i r-RNA. Fakt ten wskazywałby na istnienie we frakcji IV dwóch rodzajów RNA, które w rozdziale chromatograficznym zachowują się wprawdzie jednakowo, lecz różnią się wrażliwością na działanie rybonukleazy oraz aktywnością właściwą.

Tab. 3. Charakterystyka frakcji RNA towarzyszących DNA
Characteristic of RNA fractions accompanying DNA

	Elucja z kolumny NaCl	przed RN-azą		po RN-azie	
		RNA/DNA	akt. właściwa RNA	RNA/DNA	akt. właściwa RNA
Frakcja II	0,58 M	~0,07	110	~0,01	128
Frakcja IV	1,5 M w NH_3	~1,5	270	1,0	780

Obecność RNA opornego na rybonukleazę wykazywaliśmy już wcześniej w doświadczeniach na mózгах dorosłych szczurów (2). Ten typ RNA eluował się z kolumny chromatograficznej wraz z DNA przy stężeniu 0,58 M NaCl. Również w obecnych badaniach stwierdziliśmy, że część RNA towarzyszącego DNA we frakcji II jest niewrażliwa na rybonukleazę. Istnieje jednak zasadnicza różnica między RNA rybonukleazo-opornym z frakcji II a IV. Charakterystykę obydwu rodzajów RNA podano w tab. 3.

Na specjalną uwagę zasługują trzy spostrzeżenia, a mianowicie wysoka aktywność właściwa RNA występującego we frakcji IV, jego rybonukleazo-oporność oraz równa ilość DNA, która mu zawsze towarzyszy. Powyższe wyniki mogłyby wskazywać na naturalne połączenie DNA z bardzo aktywną metabolicznie frakcją RNA.

PIŚMIENNICTWO

1. Adams D. H.: *Biochem. J.* **98**, 636—640, 1966.
2. Borkowski T., Borkowska I., Kulesza S., Paprocki A.: *Acta Biochim. Polon.*, **14**, 333—339, 1967.

3. Borkowski T., Sikorska K.: *Acta Biochim. Polon.*, **11**, 451—458, 1964.
4. Borkowski T., Wojcierowski J., Kulesza S.: *Anal. Biochem.* (w druku).
5. Burton K.: *Biochem. J.*, **62**, 315—323, 1956.
6. Katz S., Comb D. G.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 3065—3067, 1963.
7. Mandell J. D., Hershey A. D.: *Anal. Biochem.*, **1**, 66—67, 1960.
8. Marmur J.: *J. Mol. Biol.*, **3**, 208—214, 1961.
9. Mejbaum W.: *Z. Physiol. Chem.*, **258**, 117—120, 1939.
10. Murthy M. R. V., Rappoport D. A.: *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 121—131, 1965.
11. Murthy M. R. V.: *Biochim. Biophys. Acta*, **119**, 599—613, 1966.
12. Murthy M. R. V.: *Biochim. Biophys. Acta*, **166**, 115—123, 1968.
13. Schmidt G., Thannhäuser S. J.: *J. Biol. Chem.*, **161**, 83—89, 1945.
14. Smith G. M., Burton K.: *Biochem. J.*, **98**, 229—241, 1966.
15. Władyczeńska N. S., Tongur W. S.: *Biochimia*, **31**, 484—490, 1966.
16. Yoshikawa M., Fukada T., Kawada Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 22—26, 1964.

Otrzymano 10 X 1968.

РЕЗЮМЕ

Из мозгов десятидневных куриных эмбрионов изолировали клейменные ^{32}P нуклеиновые кислоты и разделили на колонки из метилированного альбумина (МАК).

Исследовали нуклеотидный состав и свойственные активности отдельных фракций RNA. Не констатировали разниц в удельных активностях s-RNA и r-RNA.

Фракция, полученная вымыванием 1,5 г · моль NaCl, содержит наряду с малыми количествами DNA два вида RNA, отличающихся чувствительностью к рибонуклеазе. Свойственная активность рибонуклеазо-резистентного RNA значительно выше свойственных активностей остальных фракций RNA.

S U M M A R Y

^{32}P -labelled nucleic acids prepared from 10-day-old embryo chicken brains were purified on a column of methylated albumin coated on kieselguhr (MAK).

The basic composition and the specific activity of various RNA-s were

investigated. No difference has been shown in the specific activity of s-RNA and r-RNA.

A fraction obtained by elution with 1.5 M NaCl consists of ribonuclease-sensitive RNA, ribonuclease-resistant RNA and a small quantity of DNA. The specific activity of ribonuclease-resistant RNA in this fraction was found to be considerably higher than that in other fractions.

