ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA
VOL. XXXVII, 21 SECTIO D 1982

Zakład Chemii Fizjologicznej. Instytut Chemii Podstawowych. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Tomasz Borkowski

Halina ŻARNOWSKA, Włodzimierz BARANOWSKI

Nowa metoda przechowywania biologicznie aktywnych preparatów tRNA

Новый метод хранения биологически активных препаратов тРНК

A New Method for Storage of Biological Active tRNA

Wewnątrzmitochondrialna i cytozolowa biosynteza białka w tkance mózgowej różni się między innymi aktywnością aminoacylo-tRNA syntetaz oraz niejednakową ilością izoakceptorowych tRNA (1, 2, 3). Do badań wymagana jest znaczna ilość czystych prepartów tRNA. Uzyskanie dostatecznych ilości tRNA w trakcie jednorazowej preparacji jest zbyt trudne, dlatego też otrzymane każdorazowo preparaty tRNA muszą być konserwowane. Można je przechowywać w postaci suchego proszku, w postaci zliofilizowanej, w roztworze alkoholu etylowego bądź w roztworze wodnym w formie zamrożonej (−20°C).

Celem niniejszej pracy było przebadanie wpływu różnych warunków konserwacji na aktywność akceptorową preparatów tRNA.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzano na świeżych mózgach cielęcych. Do badań używano głównie kory mózgowej, którą oddzielano od pozostałych elementów anatomicznych mózgu i umieszczano natychmiast w łaźni lodowej.

Preparatyka tRNA

100 g tkanki mózgowej homogenizowano w 150 ml 0,1 M buforu Tris-HCl, *pH* 7,5, z 1,0 M NaCl, 0,05 M EDTA oraz 150 ml 80% fenolu nasyconego wodą z 0,1% 8-hydroksychinoliną w homogenizatorze typu Waring-Blendor.

Homogenat wirowano przy 15000×g w ciągu 15 min. Górną fazę poddawano ponownej ekstrakcji z równą objętością fenolu w ciągu 60 min. i wirowano. Kwasy nukleinowe zawarte w fazie wodnej wytrącano 3 obj. alkoholu etylowego i pozostawiano w temp. −20°C przez 24 godz.

Odwirowany osad rozpuszczano w 0,3 M octanie sodu i do roztworu dodawano powoli kroplami 0,54 obj. izopropanolu. Otrzymany osad wirowano przy 8000×g w ciągu 5 min. i odrzucano, a do supernatantu dodawano 0,44 obj. izopropanolu. Odwirowany osad stanowił totalny preparat tRNA mózgowego (7).

Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym

Elektroforezę preparatów tRNA wykonywano w szklanych rurkach o wymiarach: 10 cm długości i 5 mm średnicy wewnętrznej, wypełnionych 5% żelem o składzie: akrylamid, nadsiarczan amonu, DMNAP, 0,12 M bufor Tris-HCl, *pH* 7,2 (5). Czas polimeryzacji żelu wynosił 3 godz. Wstępna elektroforeza bez naniesionego preparatu trwała 40 min., przy natężeniu 5 mA na rurkę i 7 V/cm w buforze 0,04 M Tris, 0,02 M CH_3COONa, 2 mM EDTA o *pH* 7,2.

Preparaty tRNA nanoszono w 10% roztworze sacharozy w 0,1 M CH_3COONa w ilości ok. 30 µg (ok. 1 OD) kwasów nukleinowych na rurkę. Właściwy rozdział kwasów nukleinowych trwał ok. 90 min. Rozdzielone preparaty wybarwiano 0,005% roztworem Stains-allu w formamidzie w ciągu 12 godz., nie związany barwnik wymywano wodą. Intensywność barwy odczytywano w densytometrze firmy Kipp-Zonen.

Preparatyka aminoacyl-tRNA syntetazy

Tkankę mózgową homogenizowano w 0,25 M sacharozie, 10 mM Tris-HCl, *pH* 7,4, 10 mM octanie magnezu i 5 mM merkaptoetanolu. Homogenat wirowano przy 105 000×g w ciągu 90 min. Osad odrzucano, a z supernatantu wysalano białko enzymatyczne przez precypitację siarczanem amonu do 60% nasycenia. Osad rozpuszczano w 5 ml 0,05 M buforu fosforanowego, *pH* 7,2, i dializowano przez 24 godz. wobec tego samego buforu (8). Stężenie białka oznaczano metodą Lowry (4).

Oznaczanie aktywności akceptorowej

Aktywność akceptorową oznaczano na podstawie pomiaru radioaktywności ^{14}C-glutamyl-tRNA.

Skład mieszaniny inkubacyjnej: 50 µmoli Tris-HCl, pH 7,2, 10 µmoli $MgCl_2$, 2 µmole ATP, 1 µmol ditiotreitolu, 5—10 µC ^{14}C-kwasu glutaminowego, 0,5—1 mg enzymu, 2 jedn. opt. tRNA. Próba kontrolna zawierała wszystkie składniki, z wyjątkiem tRNA, czas inkubacji 30 min. w temp. 37°C. Mieszaninę inkubacyjną nanoszono na sączki miliporowe „Sartorius" i płukano na zimno 5% kwasem trójchlorooctowym (6).

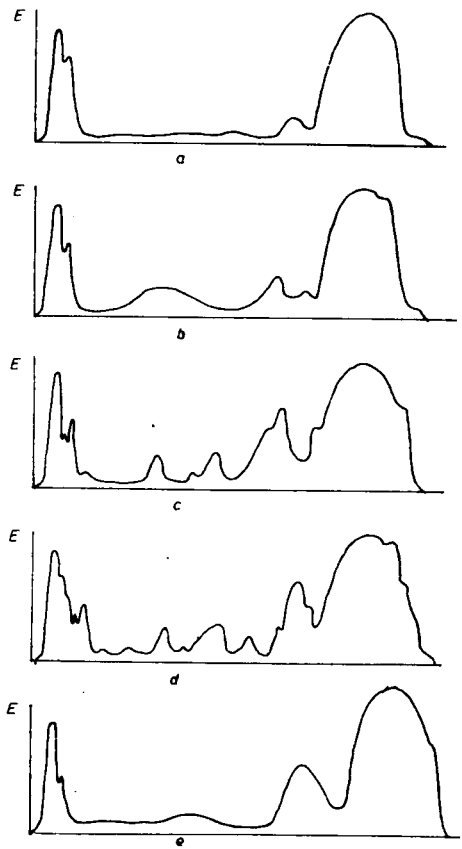
Aktywność mierzono w 5 ml scyntylatorze (4 g PPO, 0,1 g POPOP w 1 l toluenu) w liczniku scyntylacyjnym firmy Intertechnique (France).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Świeżo uzykane preparaty tRNA z tkanki mózgowej wykazywały w rozdziale elektroforetycznym na żelu poliakrylamidowym znaczną heterogenność. Obok frakcji 4S i 5S stwierdzono obecność 2 pasm migrują-

cych bardzo powoli; prawdopodobnie było to DNA i białko, oraz obecność frakcji pośrednich (ryc. 1).

Mimo pewnej heterogenności nie oczyszczone dodatkowo preparaty tRNA charakteryzowały się wysoką aktywnością akceptorową, która w trakcie przechowywania stopniowo malała. Wartość spadku aktywności akceptorowej uzależniona była od sposobu konserwacji (tab. 1).



Ryc. 1. Elektroforetyczny rozdział tRNA na 5% żelu poliakrylamidowym; a — densytogram tRNA po preparacji, b — densytogram tRNA po 30 dniach konserwacji w roztworze wodnym, c — densytogram tRNA po 30 dniach konserwacji w roztworze alkoholowym, d — densytogram tRNA po liofilizacji, e — densytogram tRNA po liofilizacji na żelu Sephadex G-25
Electrophoretic profiles of tRNA on 5% polyacrylamide gel; a — densitometric tracings of tRNA after preparation, b — densitometric tracings of tRNA after 30 days of storage in water solution, c — densitometric tracings of tRNA after 30 days of storage in alcohol solution, d — densitometric tracings of tRNA after liophilisation, e — densitometric tracings of tRNA after liophilisation with Sephadex G-25

Jak wynika z przedstawionych danych, po 30 dniach konserwacji totalny preparat tRNA przechowywany w roztworze wodnym (−20°C) tracił ok. 30% aktywności wyjściowej, konserwowany w alkoholu etylowym — ok. 29%, a przechowywany w postaci suchego proszku w temp. pokojowej — ok. 20%.

Zastosowanie liofilizacji wprawdzie przeciwdziałało utracie aktywności w czasie, ale sam proces okazał się zbyt drastyczny, gdyż aktywność akceptorowa preparatu tRNA zmniejszała się o ok. 30% (tab. 2).

Równolegle z oznaczaniem aktywności akceptorowej preparatów, kon-

Tab. 1. Wpływ warunków konserwacji na aktywność akceptorową tRNA
Acceptor activity of tRNA under different storage conditions

Sposób konserwacji	Aktywność akceptorowa tRNA w pM *						
	czas 0	po 6 dniach	% strat	po 12 dniach	% strat	po 30 dniach	% strat
tRNA w roztworze wodnym	234	197	16	189	19	160	31
tRNA w roztworze alkoholowym	234	192	18	181	23	165	29
tRNA w postaci suchego proszku	234	190	19	191	20	181	22

* Średnia z 6 eksperymentów.
* Average of 6 experiments.

Tab. 2. Wpływ liofilizacji na aktywność akceptorową tRNA
Effect of lyophilization on the acceptor tRNA activity

Rodzaj próby	Aktywność akceptorowa w pM *		
	przed liofilizacją	po liofilizacji	% strat
tRNA liofilizowane	234	156	33
tRNA liofilizowane Sephadexem	234	210	10

* Średnia z 6 eksperymentów.
* Average of 6 experiments.

serwowanych metodami podanymi wyżej, przeprowadzano ich rozdział elektroforetyczny na żelu poliakrylamidowym.

Stwierdzono, że istnieje ścisła korelacja zmian między aktywnością akceptorową a spektrum rozdziału elektroforetycznego (ryc. 1). Zmiany w obrazie elektroforetycznym dotyczą przede wszystkim frakcji 5S i frakcji pośrednich, w nieco mniejszym stopniu pozostałych frakcji. Szczególne nasilenie zmian obserwuje się dla preparatu tRNA konserwowanego w alkoholu etylowym i dla preparatu poddanego liofilizacji. Wydaje się, że w czasie przechowywania preparatu tRNA następują powiązane ze sobą procesy degradacji i agregacji cząsteczek pochodzących z poszczególnych frakcji, co w rozdziale elektroforetycznym daje obraz znacznej heterogenności w stosunku do preparatu wyjściowego. Destrukcyjnego wpływu można uniknąć, stosując liofilizowanie preparatów tRNA związanych

przez Sephadex G-25. W tym celu na kolumnach o wymiarach 0,6×6 cm, wypełnionych przez Sephadex G-25 (po 24 godz. pęcznienia), wiązano tRNA w proporcji 20 jedn. optycznych tRNA na 300 mg żelu. Po liofilizacji preparat tRNA z Sephadexu G-25 ekstrahowano dwukrotnie 0,01 M buforem fosforanowym, *pH* 7,0. W tych warunkach utrata aktywności akceptorowej preparatu tRNA wynosiła ok. 10%.

Potwierdzono elektroforetycznie, że niewielkiemu spadkowi aktywności akceptorowej preparatu tRNA, tym sposobem konserwowanego, towarzyszą nieznaczne zmiany w obrazie rozdziału elektroforetycznego.

Użyty do liofilizacji Sephadex G-25 okazał się wysoce użyteczny w konserwacji preparatów tRNA. Nawet po upływie 50 dni preparat tRNA, eluowany z żelu Sephadex G-25, wykazywał nie zmienioną aktywność akceptorową w stosunku do preparatu wyjściowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Borkowski T., Brzuszkiewicz-Żarnowska H.: Fractionation of Specific Mitochondrial and Cytoplasmic tRNAs Obtained from Calf Brain. J. Neurochem. **25**, 641, 1975.
2. Brzuszkiewicz-Żarnowska H., Borkowski T.: Aktywność akceptorowa tRNA mitochondrialnego i cytozolowego mózgu cieląt. Folia Soc. Sci. Lublinensis, **16**, Biol. **1**, 47, 1974.
3. Charęziński M., Borkowski T.: Studies on Binding of Amino Acids by Mitochondrial and Cytoplasmic tRNA from Calf Brain. Acta Biochim. Polon. **20**, 153, 1973.
4. Lowry O. H. i wsp.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265, 1951.
5. Peacock A. C., Dingman C. W.: Resolution of Multiple Ribonucleic Acid Species by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Biochemistry **6**, 1818, 1967.
6. Rubin J. B. i wsp.: The Determination of Transfer Ribonucleic Acid by Aminoacylation. I. Leucine and Phenyloalanine Transfer Ribonucleic Acid from *E. coli*. Anal. Biochem. **20**, 533, 1967.
7. Sein K. T. i wsp.: A Simple Modified Method for the Extraction of Rat Liver tRNA. Anal. Biochem. **28**, 65, 1969.
8. Yang W. K., Novelli G. D.: Analysis of Isoaccepting tRNAs in Mammalian Tissues and Cells. Methods in Enzymol. Moldave K. Grasman K. eds., Academic Press, Vol. **20**, New York 1971.

РЕЗЮМЕ

Препараты тРНК были хранены в водной и алкогольной среде, в виде сухого порошка, в лиофилизованном виде с Сефадексом Г-25 и в лиофилизованном виде без Сефадекса. После разных периодов консервации, определено акцепторную активность, а также проведено электрофорез. В течение 30-дневного хранения в водной и алкогольной среде, в виде сухого порошка и в лиофилизованном виде, препараты тРНК проявляли довольно большие электрофориче-

ские изменения и теряли акцепторную активность на 30%. Препараты тРНК, сохраняемые в виде лиофилизации вместе с Сефадоксом Г-25, не изменяли своей акцепторной активности и оставались электрофорически неизмененными. Этот метод хранения оказывается полезным в исследованиях изолирования изоакцепторных тРНК.

SUMMARY

Total samples of tRNA were stored in aqueous and alcohol solutions, as a dry powder and as liophilizated with and without Sephadex G-25. After different times of storage the samples of tRNA were electrophoretically analyzed on polyacrylamide gel and the acceptor activity for glutamic acid was measured. Electrophoretic changes were also observed. Samples of tRNA liophilizated with Sephadex G-25 may be stored for a long time. No electrophoretic changes were observed and their acceptor activity diminished by 10 per cent. The above storage method is highly effective with the experiments dealing with the isolation of tRNA isoacceptors.