



УДК 577.112.856.088.2

© 1991 г.

О. Е. Трубецкая, Г. Р. Титеева, Г. В. Афанасьева,
К. Ю. Резников, В. Б. Садовников, О. А. Селюченко,
В. М. Липкин

ИССЛЕДОВАНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИНОВОЙ ФРАКЦИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ МЫШЕЙ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина
АН СССР, г. Пушкино Московской обл.

При анализе сыворотки здоровых и зараженных малярийным плазмодием (*Plasmodium berghei*) мышей обнаружено резкое увеличение содержания линейной двухцепочечной ДНК с 0,2—0,5 в норме до 2—15 мкг/мл сыворотки при патологии. Определены некоторые физико-химические свойства сывороточной ДНК, а также ассоциированного с ней гликопротеина с $M \sim 40$ кДа.

Механизм развития заболевания и ответной реакции организма представляет собой весьма важную проблему, исследованию которой посвящено множество работ. С середины 60-х годов известен класс белков сыворотки крови, называемых белками острой фазы, содержание которых в крови существенно изменяется в ответ на развитие патологических процессов [1, 2]. Наиболее хорошо изучены сывороточный альбумин, а также α_1 -кислый гликопротеин [3]. Причина изменения концентрации белков острой фазы в процессе развития заболевания пока неясна.

Примерно в это же время было показано, что при ряде патологий, таких, как некоторые типы рака, красная волчанка, инфекционный гепатит [4—10], в сыворотке крови резко повышается концентрация свободно циркулирующей ДНК, причем при превышении определенного предела концентрации в некоторых случаях наблюдался летальный исход. При использовании эффективной терапии параллельно с улучшением состояния пациента снижалась концентрация ДНК в сыворотке крови [11]. Рядом авторов было высказано предположение об иммуносупрессорной роли ДНК или ДНК-белкового комплекса, содержащегося в сыворотке крови [12], однако имеющиеся в литературе данные немногочисленны и противоречивы.

В настоящей работе было проведено выделение нуклеопротеиновой фракции сыворотки крови здоровых и зараженных малярийным плазмодием (*Plasmodium berghei*) мышей с целью получения достоверной информации о размере, концентрации сывороточной ДНК и связанных с ней белковых компонентов в норме и при развитии заболевания.

Нуклеотидный (НК) материал получали путем депротеинизации разбавленной сыворотки экстракцией фенолом и хлороформом с последующим осаждением этанолом (см. «Экспериментальную часть»).

В серии экспериментов было показано, что концентрация НК-содержащего материала в норме составляет 0,2—0,5 мкг/мл сыворотки, а при патологии увеличивается до 2—15 мкг/мл. Анализ нуклеотидного материала электрофорезом в 1% агарозном геле выявил наличие в исследуемых образцах, выделенных из сыворотки здоровых и больных мышей, НК-фрагментов размером 200—300 п. о. (рис. 1).

С целью установления природы выделенного материала препараты обрабатывали ДНКазой, РНКазой и протеиназой К (рис. 1). Низкомо-

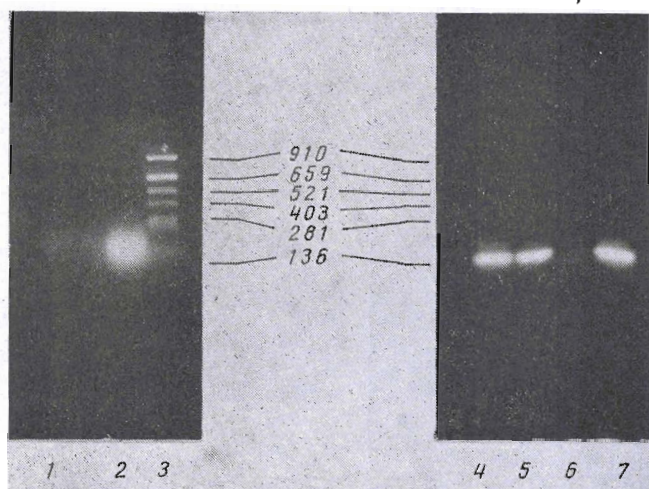


Рис. 1

Рис. 1. Электрофорез в 1% агарозном геле нуклеотидного материала, выделенного из 150 мкл сыворотки крови здоровых (1) и больных малярией (2, 7) мышей, нуклеотидного материала, выделенного из сыворотки больных мышей, после его обработки протеиназой К (4), РНКазой (5), ДНКазой (6). Приведены размеры фрагментов ДНК (п. о.) *AluI*-рестрикта pBR322 (3). Окрашивание геля бромистым этидием

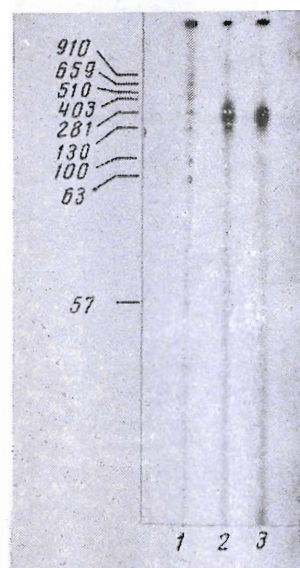


Рис. 2

Рис. 2. Электрофорез в 10% ПААГ радиоактивно меченных препаратов ДНК из сыворотки крови здоровых (2) и больных (3) мышей. Приведены размеры фрагментов ДНК (п. о.) *AluI*-рестрикта pBR322 (1)

лекулярный нуклеотидный материал здоровых и больных мышей устойчив к действию РНКазы, протеиназы К, расщепляется при добавлении ДНКазы и, следовательно, представляет собой ДНК. Включение радиоактивной метки по 5'-концу свидетельствует о линейной природе исследуемой сывороточной ДНК (рис. 2). Окрашивание низкомолекулярной ДНК сыворотки красителем акридиноый оранжевый в зеленый цвет указывает на ее двухцепочечность.

В препаративном электрофорезе в 1% агарозном геле было обнаружено, что помимо низкомолекулярных фрагментов препараты ДНК, выделенные из сыворотки здоровых и больных мышей, содержат незначительное количество высокомолекулярной фракции размером ~ 40 т. п. о., а также материал на старте (рис. 3а).

Спектральные характеристики препаратов сывороточной ДНК ($A_{\max} = 275$ нм, $A_{260}/A_{280} = 1-1,2$) отличались от общепринятых ($A_{\max} = 258$ нм, $A_{260}/A_{280} = 2$) и позволяли предположить наличие в них белка. Поэтому агарозный гель, после окраски бромистым этидием и обнаружения нуклеотидного материала, окрашивали разбавленным раствором кумасси. При этом была идентифицирована белковая полоса с отличной от фрагментов ДНК электрофоретической подвижностью. Электрофорез в 15% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) выявил наличие в препаратах сывороточной ДНК здоровых и больных мышей практически гомогенного белка с $M \sim 40$ кДа (рис. 3б, 4, 2, 3), содержание белковых примесей не превышало 2%.

По данным аминокислотного анализа (см. таблицу), 40-кДа белок содержит $\sim 30\%$ кислых аминокислот, N-концевая аминокислота блокирована. Обработка 40-кДа белка нейраминидазой приводила к снижению кажущейся молекулярной массы до $\sim 37-38$ кДа, что указывает на гликопротеиновую природу белка (рис. 4).

Обращает на себя внимание параллельное увеличение содержания выделенных сывороточной ДНК и 40-кДа белка в сыворотке крови боль-

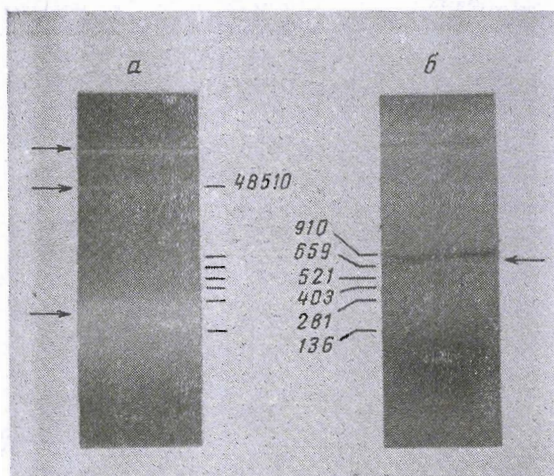


Рис. 3

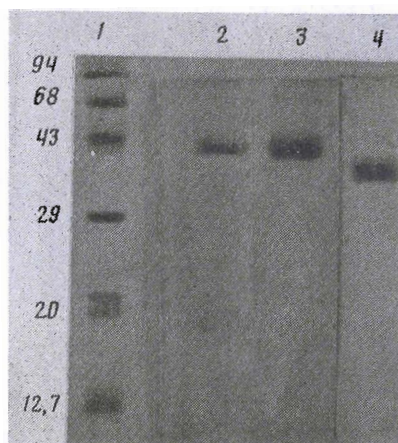


Рис. 4

Рис. 3. Препаративный электрофорез в 1% агарозном геле нуклеотидного материала, выделенного из сыворотки больных мышей. *а* — окрашивание геля бромистым этидием, стрелками указаны ДНК-фрагменты размером 0,2 и ~40 т.п.о., а также материал на старте; *б* — окрашивание кумасси R-250, стрелкой указана белковая полоса. Приведены размеры ДНК фага λ clt857 и фрагментов *Alu*I-рестрикта pBR322 (п. о.). Аналогичные результаты получены при анализе препаратов, выделенных из сыворотки здоровых мышей

Рис. 4. Электрофорез в 15% ПААГ с SDS (с окраской кумасси R-250) ДНК-содержащего препарата, полученного из 600 мкл сыворотки крови здоровых мышей (2), из 600 мкл сыворотки мышей, зараженных малярийным плазмодием (3), после обработки препарата (3) нейраминидазой (4). Указаны молекулярные массы (кДа) белковых стандартов (1)

ных животных. Так, концентрация белка в норме составляет 0,5—10 мкг/мл сыворотки, а у зараженных малярийным плазмодием животных варьирует в пределах 10—200 мкг/мл (рис. 4).

Как отмечалось ранее, белок и сывороточная ДНК имеют различную электрофоретическую подвижность в 1% агарозном геле (рис. 3а, б). Это позволило методом электроэлюции из агарозного геля получить препарат 40-кДа белка, свободный от ДНК. Обработка фенолом 40-кДа белка, свободного от ДНК, приводила к его практически полному переходу в фенольную фракцию в отличие от 40-кДа белка в составе нуклеопротеиновой фракции. Следует отметить, что после электроэлюции не изменились основные физико-химические свойства белка (молекулярная масса, изоэлектрическая точка, аминокислотный состав). Возможно, первоначальный переход 40-кДа белка в водную фазу обусловлен образованием комплекса между ним и сывороточной ДНК.

Существование четкой корреляции между увеличением концентрации нуклеопротеиновой фракции сыворотки крови и развитием патологического процесса наводит на мысль о возможном участии этого фактора в формировании иммунологического статуса организма. Получение детальной информации о структуре и функции компонентов нуклеопротеиновой фракции сыворотки крови может помочь в понимании механизма развития реакций иммунитета.

Экспериментальная часть

В работе использовали трис, акриламид, бисакриламид, N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин и персульфат аммония (Reanal, Венгрия), агарозу (Pharmacia, Швеция), SDS, протеиназу K (Serva, ФРГ), щелочную фосфатазу *E. coli*, [γ - 32 P]ATP (Amersham, Англия), T4-полинуклеотидкиназу, ДНКазу I, РНКазу А, бромистый этидий и акридиновый оранже-

**Аминокислотный состав 40-кДа — белка, выделенного
в составе нуклеопротеиновой фракции сыворотки
крови мышей**

Аминокислота	Мольные %	Аминокислота	Мольные %
Asx	11,3	Met	3,02
Thr	8,03	Ile	5,35
Ser	4,72	Leu	7,47
Glx	18,23	Tyr	4,9
Pro	3,42	Phe	4,72
Gly	4,24	His	1,37
Ala	5,14	Lys	6,79
Cys	—	Arg	5,23
Val	4,59	Trp	—

вый (Sigma, США), остальные реактивы отечественного производства марки ос. ч., фенол и этанол дважды перегнанные.

В работе использовали кровь лабораторных нелинейных мышей дикого типа обоего пола в возрасте 2—3 мес.

Заражали мышей малярийным плазмодием (*Plasmodium berghei*) введением внутрибрюшинно свежей крови больных животных, разбавленной в 10—20 раз физиологическим раствором. На 6-й день у мышей проверяли уровень паразитемии. Для опытов брали особей с уровнем паразитемии 10—70%.

Центрифугирование при 2000—3500 об/мин проводили на центрифуге Midispin R (LKB, Швеция), при 10 000 об/мин — на центрифуге J2-21 (Beckman, США).

Выделение нуклеопротеиновой фракции. Свернувшуюся кровь лабораторных мышей центрифугировали 10 мин 2 раза при 2000 об/мин. Сыворотку разводили в 3 раза физиологическим раствором, добавляли равный объем фенола, встряхивали 5 мин при 20° С, центрифугировали 15 мин при 3500 об/мин для расслоения фаз, водную фазу собирали, еще дважды обрабатывали фенолом, затем смесью фенол — хлороформ (1 : 1) и хлороформом. Остатки фенола и хлороформа удаляли эфиром. К водной фазе добавляли $\frac{1}{10}$ часть 3 М ацетата натрия, pH 5,2, и 2,5 объема 96% этанола. Раствор оставляли на 1 сут при —20° С, осадок собирали на дне пробирки центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 30 мин, промывали 70% этанолом, сушили и растворяли в буфере, содержащем 10 мМ трис-HCl (pH 7,5), 1 мМ EDTA (TE-буфер).

Электрофорез в 15% ПААГ с SDS осуществляли по методу [13].

Мечение, электрофорез радиоактивно меченной сывороточной ДНК в 10% ПААГ и автордиографию проводили согласно [14].

Электрофорез в 1% агарозном геле проводили по методу [14], гель окрашивали бромистым этидием или акридиновым оранжевым.

Белок из 1% агарозного геля элюировали в аппарате для электроэлюции (ISCO, США) по методу [15], используя систему буферов, содержащих SDS, после предварительного окрашивания геля 0,01% раствором кумасси R-250. К полученному раствору белка добавляли равный объем фенола, из водной фракции белок осаждали этанолом, как описано ранее для осаждения НК-содержащей фракции сыворотки крови. К фенольной фракции добавляли $\frac{1}{10}$ объема 5 М HCl и 6 объемов ацетона, выдерживали ночь при —20° С, центрифугировали 30 мин при 10 000 об/мин, осадок промывали смесью 0,1 М HCl — ацетон (1 : 6) и чистым ацетоном, сушили и растворяли в TE-буфере.

Концентрацию белка определяли по данным аминокислотного анализа, а также по окраске кумасси R-250 после электрофореза в ПААГ с SDS. В качестве стандарта использовали известное количество бычьего сывороточного альбумина.

Концентрацию ДНК в растворе определяли спектрофотометрически по поглощению при 260 нм, а при электрофорезе в агарозном геле — по

интенсивности окраски бромистым этидием с использованием в качестве стандарта известного количества ДНК фага λ .

НК-содержащую фракцию сыворотки крови обратывали ДНКазой, РНКазой, протеиназой К согласно [14].

Обработку 40-кДа белка нейраминидазой (Millipore, США) проводили в 0,1 М CH_3COONa , pH 5,5, в течение 1 ч при 37° С с последующим анализом аликвот электрофорезом в 15% ПААГ в присутствии SDS. К 1 мг белка добавляли 0,5 ед. акт. фермента.

N-Концевой аминокислотный остаток белка определяли дансильным методом Эдмана [16], аминокислотный состав белка — на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alper C. A.* // *N. Engl. J. Med.* 1974. V. 291. № 2. P. 287—290.
2. *Kushner I.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1982. V. 389. P. 39—48.
3. *Kremer J. M. H., Wilting J., Janssen L. H. M.* // *Pharm. Rev.* 1988. V. 40. № 1. P. 1—47.
4. *Козак В. В., Негрей Г. З., Шляховенко В. А., Михайленко В. М., Куреева С. С., Бебешко В. Р.* // *Гематология и трансфузиология.* 1987. Т. XXXII. № 11. С. 31—34.
5. *Cohn E. M., Shapiro B., Leon S. A., Desai M., Ghandi R.* // *Digestion.* 1977. V. 16. № 3. P. 235—236.
6. *Паньков В. Н., Скотникова О. И., Рыбакова М. Е., Федоров Н. А.* // *Гематология и трансфузиология.* 1988. Т. XXXIII. № 2. С. 19—20.
7. *Паньков В. Н., Ворончихина Л. Д., Демьянова В. Т., Безносикова Т. П., Колупаева Н. В.* // *Гематология и трансфузиология.* 1988. Т. XXXIII. № 8. С. 45—48.
8. *Leon S. A., Shapiro B., Cohn E., Desai M.* // *J. Nuclear. Med.* 1977. V. 18. № 6. P. 632.
9. *Stroun M., Anker P., Lyantey J., Lederrey C., Maurise P.* // *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1987. V. 23. № 6. P. 707—712.
10. *Steinman C. R.* // *J. Clin. Invest.* 1984. V. 73. № 3. P. 832—841.
11. *Leon S. A., Shapiro B., Sklaroff D. M., Yaros M. J.* // *Cancer Res.* 1977. V. 37. № 3. P. 647—650.
12. *Белохвостов А. С.* // *Вопр. онкологии.* 1978. Т. XXIV. № 3. С. 99—106.
13. *Laemli V.* // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680—684.
14. *Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж.* // *Молекулярное клонирование.* М.: Мир, 1984.
15. *Zassenhaus H. P., Butow R. A., Hannon Yo.* // *Anal. Biochem.* 1982. V. 125. № 1. P. 125—130.
16. *Ambler R. P.* // *Meth. Enzymol.* 1967. V. 11. P. 155—156.

Поступила в редакцию
16.I.1990

После доработки
7.VI.1990

O. Ye. TRUBETSKAYA, G. R. TITEYEVA, G. V. AFANASIEVA, K. Yu. REZNIKOV,
V. B. SADOVNIKOV, O. A. SELUCHENKO, V. M. LIPKIN

INVESTIGATION OF THE BLOOD SERUM [NUCLEOPROTEIN FRACTION OF MICE IN NORMAL CONDITIONS AND AT PATHOLOGIC PROCESSES

*Branch of M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region*

Analysis of the blood serum of healthy and infected with malaria plasmodium mice showed a steep rise in content of linear double-stranded DNA (0,2—0,5 and 2—15 $\mu\text{g/ml}$, respectively). Some physico-chemical properties of serum DNA and a DNA-associated glycoprotein ($M \sim 40$ kDa) are determined.