



УДК 577.112.856:616.153/078.3

Л. Е. Панин, Л. М. Поляков, И. Ф. Усынин,  
А. П. Кузьменко, О. Н. Потеряева

## ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ АПОПРОТЕИНА А-1 В ХРОМАТИНЕ ЯДЕР ГЕПТОЦИТОВ КРЫС

*С помощью методов иммунохимии показано наличие иммунореактивности апопротеина А-1 (апо А-1) во фракции суммарного, репрессированного, транскрипционно активного хроматина и ядерного матрикса. Используя иммуноблоттинг, удалось выявить два белка, по антигенным свойствам идентичных апо А-1. Один с молекулярной массой 28 000 присутствовал во фракции транскрипционно активного хроматина и в ядерном матриксе; второй белок (около 14 000) — только в репрессированном хроматине. Молекулярная масса, электрофоретическая подвижность и иммунохимическая идентичность позволяют считать, что один белок является апо А-1, другой — продуктом его лимитированного протеолиза.*

**Введение.** Имеется достаточно оснований предполагать, что липопротеиновые комплексы играют определенную роль в структурной и функциональной организации хроматина эукариот. Вместе с тем, механизмы транспорта липидов в ядра, их физико-химическое состояние в составе хроматина, а также природа белков, ассоциированных с хроматином, до сих пор остаются невыясненными. Ранее нами были проведены исследования по поглощению и внутриклеточному распределению меченных по белковому компоненту липопротеинов (ЛП) в печени и в клетках коры надпочечников крыс. Отмечалось наличие радиоактивности в ядерной фракции. Распределение радиоактивности менялось в зависимости от функционального состояния организма. В частности, оно изменялось при интенсивной физической нагрузке, а также в опытах *in vitro* при добавлении некоторых гормонов: адреналина, гидрокортизона или АКТГ [1, 2]. Учитывая, что основным белковым компонентом липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) является апопротеин А-1 (апо А-1), мы предприняли попытку обнаружения его в составе ядерных структур гепатоцитов крыс с помощью иммунохимических методов.

**Материалы и методы.** Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар массой 180—200 г. Препаративное выделение ЛП из сыворотки крови крыс осуществляли ультрацентрифугированием в растворах КВ [3] на центрифуге «Beckman L-75» (США), ротор 75 Ti.

Делипидирование ЛП осуществляли охлажденной до  $-16^{\circ}\text{C}$  смесью этанол—диэтиловый эфир. Апо А-1 выделяли методом гель-фильтрации на сефарозе 4В («Pharmacia», Швеция) в 0,01 М трис-НСl-буфере, рН 8,6, содержащем 6 М мочевины. Пик II, соответствующий апо А-1, повторно очищали путем ионообменной хроматографии на DEAE-Toyorearl 650M («Toyo Soda», Япония), уравновешенном 0,01 М трис-НСl, рН 8,6, с 6 М мочевиной. Элюирование проводили исходным буфером с линейным градиентом от 0,01 до 0,5 М. Чистоту апо А-1 проверяли с помощью электрофореза в ПААГ по Лэмбли [4]. В качестве маркеров использовали наборы фирмы «Pharmacia». Концентрацию белка определяли по Лоури [5].

© Л. Е. ПАНИН, Л. М. ПОЛЯКОВ, И. Ф. УСЫНИН, А. П. КУЗЬМЕНКО, О. Н. ПОТЕРЯЕВА, 1992

Для получения поликлональных антител кроликам подкожно вводили раствор апо А-II в разные точки верхней части спины. Первую иммунизацию осуществляли с полным адъювантом Фрейнда. Каждому кролику вводили смесь 0,5 мл антигена (100 мкг белка) с 0,5 мл полного адъюванта Фрейнда. Последующие две иммунизации проводили через 10 дней по 100 мкг антигена с неполным адъювантом Фрейнда. Последнюю иммунизацию выполняли внутривенным введением раствора апо А-I без адъюванта. Гамма-глобулиновую фракцию получали из сыворотки крови кроликов трехкратным осаждением 50 %-ным раствором сульфата аммония с последующим диализом против 0,01 М фосфатного буфера, рН 7,4, содержащего 0,15 М NaCl и 0,1 % азид натрия. Конечный этап очистки антител включал ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-сефарозе («Pharmacia»). Полученные антитела хранили в замороженном виде при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Для идентификации антител использовали реакцию двойной радиальной иммунодиффузии [6]. В процессе работы специфичность антител проверяли с помощью непрямого метода иммуноферментного анализа (тИФА) или иммуноблоттинга [7].

Количественное определение апо А-I иммунореактивности во фракциях хроматина и ядерного матрикса выполнялось методом непрямого тИФА [8]. Пробы по 100 мкл наносили на полистироловые планшеты «Nunc» (Дания) и инкубировали в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$ . В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали раствор апо А-I, содержащий 1, 2, 5, 10, 20, 50 и 100 нг белка в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ). После инкубации планшеты трижды отмывали ФСБ, содержащим 0,05 % твин-20 (ФСБТ). Незанятые места сорбции блокировали смесью 1 % бычьего альбумина и 0,5 % яичного альбумина. В обработанные таким образом планшеты добавляли по 100 мкл специфических антиапо А-I антител в разведении 1:2500 в 0,01 М ФСБТ. Связавшиеся с апо А-I первые антитела на следующем этапе насыщались вторыми антителами. Для этого использовали козьи антитела против иммуноглобулинов кролика, меченные пероксидазой («Sigma», США), которые добавляли в количестве 100 мкл в каждую ячейку (разведение 1:1000 в ФСБТ). Планшеты инкубировали в течение 1 ч при  $23^{\circ}\text{C}$ . После 5-кратного отмывания ФСБТ проводили ферментативную реакцию. В ячейки вносили по 200 мкл свежеприготовленного субстрата — орто-фенилендиамина («Merck», ФРГ) в концентрации 20 мг/100 мл в фосфатно-цитратном буфере, рН 5,0, содержащем 0,006 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Через 15 мин ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и измеряли экстинкцию при длине волны 492 нм на многоканальном фотометре «Multiscan-Flow» (Англия). В качестве отрицательного контроля принимали значения оптической плотности в ячейках, в которые вместо антигена добавляли по 100 мкл ФСБ.

Гепатоциты из печени крыс выделяли с помощью коллагеназы описанным ранее методом [9]. Хроматин и ядерный матрикс получали из клеток после гомогенизации их в гипотоническом растворе, содержащем 1 mM трис-HCl, рН 7,6, 3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM дитиотреитол (ДТГ), 1 mM фенилметансульфонилфторид (ФМСФ) и 0,1 % тритон X-100. Гомогенат помещали в лед на 5 мин, добавляли сахарозу до концентрации 0,25 M и центрифугировали 10 мин при 800 g. Осадок после дополнительной промывки в буфере для гомогенизации ресуспендировали в 50 объемах 2,1 M сахарозы, содержащей 1 mM трис-HCl, рН 7,6, 3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ДТГ, 0,5 mM ФМСФ, и центрифугировали в течение 1 ч при 50 000 g на центрифуге L-80 («Beckman», США), ротор SW-27. Полученную ядерную фракцию дважды промывали раствором 0,25 M сахарозы, 3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ДТГ, 1 mM ФМСФ, 1 mM трис-HCl, рН 7,6.

Затем ядра ресуспендировали в растворе, содержащем 0,28 M NaCl, 1 mM трис-HCl, рН 7,9, 22 mM ЭДТА- $\text{Na}_2$ , 1 % тритон X-100, и

центрифугировали 30 мин при 25 000 g. Гелеобразный осадок хроматина трижды промывали раствором, содержащим 10 мМ трис-HCl, pH 7,6, 2 мМ ЭДТА-Na<sub>2</sub> и 1 мМ ФМСФ. Фракции транскрипционно активного и неактивного (репрессированного) хроматина выделяли по методу Готтесфилда [10], используя ДНКазу II фирмы «Serva» (ФРГ).

Для получения ядерного матрикса ядра ресуспендировали в растворе, содержащем 0,25 М сахарозу, 5 мМ трис-HCl, pH 7,6, 3 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ, 30 ед. на мл ДНКазы I («Serva») так, чтобы конечная концентрация ДНК составляла 2,0—

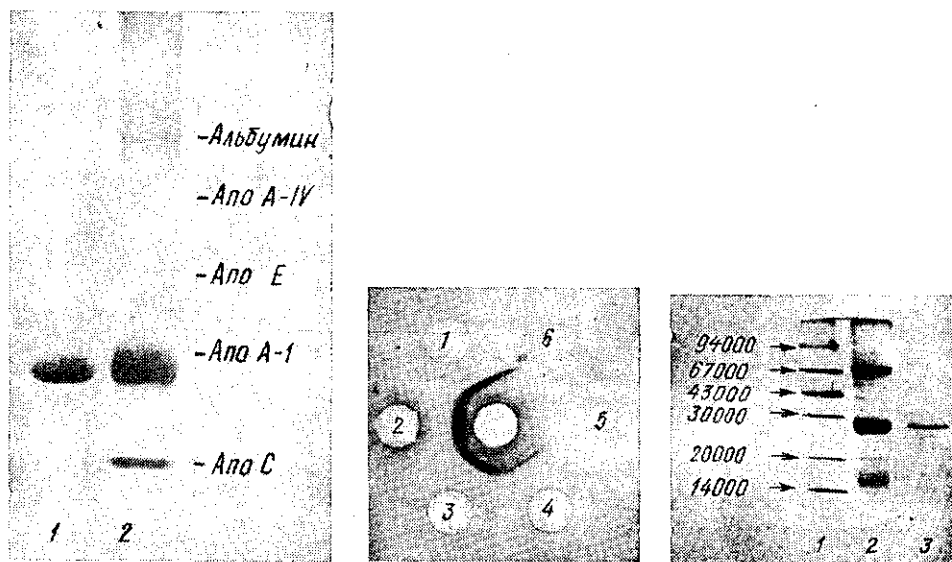


Рис. 1. Электрофорез в 12,5 %-ном ПААГ по Лэммли: 1 — апо А-I после хроматографической очистки; 2 — суммарные апо-ЛПВП

Рис. 2. Двойная радиальная иммунодиффузия по Оухтерлони (в центре — антитела к апо А-I крыс): 1 — апо А-I крыс; 2 — цельная сыворотка крыс; 3 — сыворотка крыс после удаления ЛП; 4 — ЛПВП крыс; 5 — ЛПВП человека; 6 — апо А-I человека

Рис. 3. Определение специфичности антител с помощью иммуноблоттинга: 1 — низкомолекулярные белки-стандарты («Pharmacia») фосфоорилаза, альбумин, овальбумин, карбоангидраза, ингибитор трипсина, лактальбумин; 2 — суммарные апо-ЛПВП; 3 — электрофоретический перенос апо-ЛПВП на нитроцеллюлозную мембрану с последующей обработкой антиапо А-I антителами

2,5 мг/мл. Смесь инкубировали при 4 °С в течение 16—18 ч и добавляли 20 объемов 2,12 М NaCl, 1,1 % тритона X-100. Ядерный матрикс осаждали центрифугированием в течение 30 мин при 40 000 g [10].

**Результаты и обсуждение.** Хроматографически очищенный апо А-I крыс мигрировал в ПААГ одной полосой как гомогенный белок с молекулярной массой около 28 000 (рис. 1). Полученные кроличьи антитела к апо А-I крыс были охарактеризованы с помощью двойной иммунодиффузии по Оухтерлони (рис. 2). Антитела давали одну полосу преципитации с апо А-I, изолированными ЛПВП крыс, сывороткой крыс и сывороткой крыс, не содержащей после ультрацентрифугирования липопротеины. Отсутствовала преципитация с ЛПВП человека, а также с апо А-I человека, что свидетельствует об иммунохимической гетерогенности апо А-I человека и крысы. Обращает на себя внимание четкая полоса преципитации с сывороткой крыс, не содержащей липопротеины. Это подтверждает наличие «свободного» пула апо А-I, недавно показанного методом перекрестного иммуноэлектрофореза [11].

Моноспецифичность полученных антител была доказана с помощью иммуноблоттинга, по чувствительности значительно превосходящего метод Оухтерлони (рис. 3). Для этого апо-ЛПВП крыс были разделены электрофоретически в 12,5 %-ном ПААГ в присутствии DS-Na

Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Schleicher und Schull», ФРГ) полусухим методом (semi-dry) с использованием плоских угольных электродов [7]. На нижнее графитовое плато, служащее анодом, укладывался «сэндвич» — фильтровальная бумага, нитроцеллюлозная мембрана, гель, фильтровальная бумага. Сверху «сэндвич» закрывали катодом из графита. Перенос белков осуществляли в течение 1 ч при силе тока 0,8 мА/см<sup>2</sup>. После блокировки нитроцеллюлозную мембрану обрабатывали первыми антителами, а затем и вторыми, мечеными пероксидазой. Антитела выявляли 4-хлор-1-нафто-

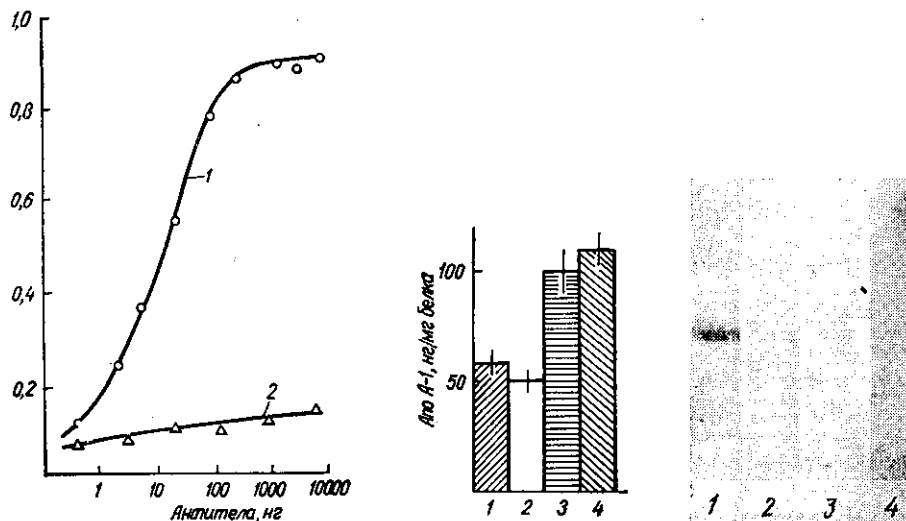


Рис. 4. Тестирование антител с помощью тИФА. По оси ординат — поглощение при 492 нм; по оси абсцисс — количество антител в одной ячейке. Связывание антител с апо А-1 крыс (1) и человека (2)

Рис. 5. Твердофазный ИФА апо А-1-иммунореактивности во фракциях хроматина ядер гепатоцитов крыс: 1 — суммарный хроматин; 2 — репрессированный; 3 — транскрипционно активный; 4 — ядерный матрикс

Рис. 6. Выявление апо А-1 во фракциях хроматина ядер гепатоцитов крыс с помощью иммуноблоттинга: 1 — апо А-1 крыс (стандарт); 2 — ядерный матрикс; 3 — транскрипционно активный хроматин; 4 — репрессированный хроматин

лом. Полученные антитела взаимодействовали только с апо А-1 и не связывались с другими апопротеинами (апо А-IV, апо Е, апо С).

Антитела к апо А-1 тестировали с помощью непрямого метода тИФА. Для этого антиген сорбировали на планшет в избыточной концентрации. Образцы антител разбавляли при последовательном двукратном разведении буфером, содержащим 0,05 % твин-20 и 0,5 % бычьего сывороточного альбумина. Конечный титр антител был достаточно высок — 1 : 600 000 — 1 : 800 000. В данных условиях оптимальная концентрация антител составила 5 мкг/мл, что соответствовало разведению 1 : 2000 — 1 : 3000 (рис. 4).

Дальнейшие исследования в этом направлении были связаны с иммунохимической идентификацией апо А-1 в хроматине ядер гепатоцитов крыс. Материалом для исследования служили суммарный хроматин, фракция репрессированного или транскрипционно неактивного хроматина, транскрипционно активный хроматин, а также ядерный матрикс. Выбор объекта исследования продиктован двумя причинами: во-первых, апо А-1 является основным белком ЛПВП и составляет у разных видов животных от 50 до 80—90 %; во-вторых, как было показано нами ранее, ЛПВП могут принимать участие в регуляции экспрессии генов [12].

По отношению к суммарному содержанию количество ДНК в репрессированном хроматине было не менее 80 %, в транскрипционно активном хроматине — 11—15 %, а в ядерном матриксе — 3—5 %. Ко-

личественную оценку апо А-I-иммунореактивности во фракциях хроматина осуществляли с помощью тИФА (рис. 5). Оказалось, что содержание апо А-I (апо А-I-иммунореактивности) в суммарном хроматине составляло 60 нг на 1 мг белка фракции. Аналогичный показатель во фракции репрессированного хроматина был равен 52 нг на 1 мг белка. Апо А-I-иммунореактивность в транскрипционно активном хроматине была почти вдвое выше. Самой высокой она была в ядерном матриксе и составляла 110 нг на 1 мг белка.

Дополнительная информация получена с помощью иммуноблоттинга (рис. 6). Оказалось, что в хроматине ядер гепатоцитов крыс присутствуют два белка, иммунологически идентичных апопротеину А-I: один из них с молекулярной массой 28 000, другой — с молекулярной массой около 14 000. Первый белок по электрофоретической подвижности соответствует апо А-I. Он присутствует во фракции транскрипционно активного хроматина и в ядерном матриксе. Второй, низкомолекулярный белок, имеющий антигенные детерминанты апо А-I, присутствует только во фракции репрессированного хроматина. По-видимому, это продукт лимитированного протеолиза апо А-I. Где происходит протеолиз, сказать трудно. Возможно, в макрофагах. Однако в настоящее время в ядре обнаружены как нейтральные, так и кислые протеазы, в том числе катепсины D, В, Н и др. [13]. Это делает вполне реальной частичную деградацию апо А-I с молекулярной массой 28 000 и образование белка с молекулярной массой около 14 000 непосредственно в ядре. Судьба последнего белка пока остается неясной.

Полученные результаты чрезвычайно интересны с точки зрения анализа условий, создающих или поддерживающих транскрипционно активную конформацию хроматина независимо от того, обусловлено это собственно апопротеинами или липидами, которые они переносят в ядро. Обнаружение высокой апо А-I-иммунореактивности в ядерном матриксе чрезвычайно важно, ибо сегодня последний рассматривается как место РНК-транскрипции или репликации ДНК. Решение данного вопроса требует дальнейших исследований.

*Summary.* Two proteins of 28 000 and 14 000 immunologically identical to apoprotein A-I were found in the chromatin of rat hepatocyte nuclei of using immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay. The 28 000 protein was present in the transcriptionally active chromatin and in the nuclear matrix. The 14 000 protein was present in the repressed chromatin. The molecular weights of these protein determined by SDS-PAGE, and immunochemical identity allow us to propose, that one of this proteins is apoprotein A-I, and the other one is probably a product of limited proteolysis of apoprotein A-I.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние кортизола, адреналина и АКГГ на поглощение и внутриклеточное распределение меченных по белку липопротеидов тканями печени и надпочечников крыс / Л. Е. Панин, Л. М. Поляков, Е. Э. Войцеховская, М. М. Биккина // Цитология.— 1980.— 23, № 11.— С. 1257—1262.
2. Поляков Л. М., Панин Л. Е., Войцеховская Е. Э. Поглощение и внутриклеточное распределение липопротеидов в надпочечниках крыс при физической нагрузке // Пробл. эндокринологии.— 1984.— 30, № 4.— С. 60—63.
3. Hatch F. T., Lees R. S. Practical methods for plasma lipoprotein analysis // Adv. Lipid Res.— 1968.— 6, N 1.— P. 2—68.
4. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.— 1970.— 227, N 5259.— P. 680—685.
5. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem.— 1951.— 193, N 1.— P. 265—275.
6. Ouchterlony O. Diffusion in the gel methods for immunological analysis // Progr. Allergy.— 1958.— 5, N 1.— P. 1—77.
7. Tovey E., Baldo A. Comparison of semi-dry and conventional tank-buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels / Electrophoresis.— 1987.— 8, N 2.— P. 384—387.
8. Поляков Л. М., Потеряева О. Н., Панин Л. Е. Определение апопротеина А-I методом иммуноферментного анализа // Вопр. мед. химии.— 1991.— № 1.— С. 89—92.

9. Усынин И. Ф. Новые методы научных исследований в клинической и экспериментальной медицине.— Новосибирск, 1980.— С. 96—98.
10. Sequence composition of the template active fraction of rat liver chromatin / J. M. Gottesfeld, G. Bagi, P. Berg, J. Bonner // Biochemistry.— 1976.— 15, N 11.— P. 2472—2483.
11. Neary R. H., Golland E. The effect of renal failure and haemodialysis on the concentration of free apolipoprotein A-I in serum and the implications for the catabolism of high-density lipoproteins // Clin. chim. acta.— 1988.— 171, N 2—3.— P. 239—246.
12. Панин Л. Е., Свечникова И. Г., Маянская Н. Н. Роль плазменных липопротеидов высокой плотности как модуляторов специфического гормонального эффекта гидрокортизона // Вопр. мед. химии.— 1990.— 3, № 3.— С. 600—622.
13. Панин Л. Е., Маянская Н. Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении.— Новосибирск: Наука, 1987.— 198 с.

Ин-т биохимии Сиб. отд-ния АМН СССР,  
Новосибирск

Получено 29.05.91

УДК 591

М. Р. Столина, Л. М. Морозова, А. П. Соломко

## ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ГЕНЕТИКО-ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЯХ МЫШЕЙ.

### 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СЕЗОННОЙ ПЛОДОВИТОСТИ САМОК МЫШЕЙ ЛИНИЙ BALB/cLac C57BL6/j и ICR

*Изучено влияние сезонного фактора на фертильность и плодовитость самок мышей инбредных линий BALB/cLac, C57BL/6j и ICR. Данные экспериментов указывают на то, что планирование работ в биологической системе, связанных с естественной репродуктивной функцией животных, необходимо проводить с учетом сезона года и линейной принадлежности мышей. Самки контрастных по окраске линий C57BL и ICR характеризуются стабильно высокой фертильностью и плодовитостью. Мыши C57BL предложены в качестве доноров гамет и зигот в исследованиях, связанных с оплодотворением и культивированием зародышей в системе *in vitro*, а самки ICR — как реципиенты для трансплантаций эмбрионов.*

**Введение.** Оптимизация условий проведения экспериментов в биологических системах определяется большим числом вне- и внутриорганизменных факторов, оказывающих существенное влияние на физиологический, гормональный, биохимический и т. п. статус объекта изучения. Для эффективности исследований и получения корректных результатов необходимо вычлениить и учесть из множества факторы, имеющие в определенной системе ключевое значение.

Современные генетические и молекулярно-биологические исследования на гаметах и эмбрионах млекопитающих (клонирование зародышей, консервация уникальных геномов, изучение ядерно-цитоплазменных взаимоотношений, процессов метилирования, регуляции экспрессии генов и т. д.), включающие этапы оплодотворения и культивирования эмбрионов *in vitro*, требуют выполнения ряда условий.

1. В эксперименте должны участвовать лабораторные животные инбредных линий, характеризующихся высокой плодовитостью и сезонной стабильностью.

2. Необходимо отсутствие стрессовых воздействий на организм донора гамет, в том числе гормональной суперовуляции, увеличивающей частоту резорбированных и отстающих в развитии плодов [1, 2], а также вызывающей активацию определенных генов гамет и зигот в ответ на действие стероидных гормонов [3].

3. Получение оплодотворенных яйцеклеток и обеспечение достаточного количества эмбрионов, синхронно развивающихся в культуре.

© М. Р. СТОЛИНА, Л. М. МОРОЗОВА, А. П. СОЛОМКО, 1992