

18. *Fluorescence studies of substrate binding to seryl-tRNA synthetase from yeast* / E. Engel, H. Heider, A. Macklike et al. // *Eur. J. Biochem.*— 1972.— 29, N 2.— P. 257—262.
19. *Heider H., Gottschalk E., Cramer E. Isolation and characterization of seryl-tRNA synthetase from yeast* // *Ibid.*— 1971.— 20, N 1.— P. 144—152.
20. *Kinetic studies on the interaction of seryl-tRNA synthetase with tRNA^{Ser} and Ser-tRNA^{Ser} from yeast* / A. Pingoud, D. Riesner, D. Boehme, G. Mass // *FEBS Lett.*— 1973.— 30, N 1.— P. 1—5.
21. *Bruton C. J. Probing the sub-structure, evolution and interactions of aminoacyl-tRNA synthetases* // *Nonsense mutations and tRNA suppressors* / Eds J. E. Selis, J. D. Smith.— New York: Acad. press, 1979.— P. 47—68.
22. *Eigen M. Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules* // *Naturwissenschaften.*— 1971.— 58, N 10.— P. 465—523.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
Ин-т молекуляр. биологии им. Энгельгардта АН СССР, Москва

Получено 27.04.90

УДК 577.152.6:576.31

© Л. Л. Сидорик, В. И. Попенко, Н. Е. Черни, М. А. Тукало,
С. Ф. Берестень, Г. Х. Мацука, 1990

ИММУНОЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ СЕРИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗЫ В КЛЕТКАХ ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ

Локализацию серил-ТРНК синтетазы (СерРС) изучали на ультратонких срезах ткани надпочечника быка, фиксированных глутаровым альдегидом и заключенных в смолу «Lowusril K4 M» при —35°С. Ультратонкие срезы обрабатывали поликлональными аффинно очищенными антителами к СерРС и комплексами белок А—коллоидное золото. Наиболее интенсивно метилась цитоплазма: определенное количество метки обнаруживалось и в ядре клеток, преимущественно в зоне расположения диффузного хроматина, хотя некоторое количество частиц золота отмечалось и в зоне расположения компактного хроматина. Присутствие СерРС в ядре клеток эукариот может быть связано с возможными дополнительными функциями СерРС в ядре, кроме участия в синтезе серил-ТРНК.

Введение. Биохимическими методами аминоксил-ТРНК синтетазы (КФ 6.1.1) обнаружены как в цитоплазме, так и в различных органеллах клетки, в рибосомах, полисомах, а также в составе мультиферментных комплексов [1], что все же не позволяет однозначно судить о внутриклеточной локализации этих ферментов. Существенный прогресс в изучении данной проблемы достигнут с помощью определенных иммунохимических подходов благодаря применению для исследования внутриклеточной локализации аминоксил-ТРНК синтетаз как поликлональных, так и моноклональных антител. Наиболее изученным в этом отношении ферментом является триптофанил-ТРНК синтетаза из поджелудочной железы крупного рогатого скота, что описано в работах [2, 3]. Используя комплексы коллоидного золота с моноклональными и поликлональными моноспецифическими антителами к триптофанил-ТРНК синтетазе, было изучено распределение этого фермента в цитоплазме и органеллах клеток эукариот и прокариот, а также подтверждены полученные ранее данные по иммунофлюоресцентной микроскопии и результаты иммуноцитохимического исследования культуры клеток почки быка после обработки их детергентом тритон X-100 [2]. В работе [3] было также показано важное отличие в распределении аминоксил-ТРНК синтетазы в бактериальных и эукариотических клетках — присутствие значительного количества фермента в ядрах клеток эукариот, что, возможно, связано с дополнительными функциями триптофанил-ТРНК синтетазы в ядре, кроме синтеза триптофанил-ТРНК.

Разработанный нами новый методический подход [4] к выделению серил-ТРНК синтетазы (СерРС) из печени быка позволяет быстро на-

работать значительные количества фермента в гомогенном состоянии, что дает возможность получить достаточное количество поликлональных аффинно очищенных антител к СерРС. Настоящая работа посвящена изучению распределения СерРС в клетках высших эукариот с помощью поликлональных аффинно очищенных антител к этому ферменту, применяя непрямой метод маркирования (с использованием комплексов белка А с коллоидным золотом) ультратонких срезов.

Материалы и методы. Выделение СерРС из печени быка [4], схема иммунизации животных [5] и получение поликлональных аффинно очищенных антител к СерРС детально описаны в предыдущей работе (см. статью Сидорик Л. Л., Гудзеры О. И., Золотухиной И. М. и др. в этом же номере).

Фиксация клеток и приготовление ультратонких срезов. Кусочки ткани подпочечника быка фиксировали в течение 3 ч в 2,5 %-ном глutarовом альдегиде в 0,1 М фосфатном буфере с дальнейшим обезвоживанием образцов в ряду спиртов возрастающей концентрации и заключением в смолу «Lowycril K4 M» («Bio-Science», США), а также полимеризацией при ультрафиолетовом облучении при -35°C , как описано ранее [7].

Срезы толщиной 50–70 нм получали на ультратоме «ЛКВ-III» (Швеция) и помещали на медные сетки, покрытые угольно-формваровой свеженонизированной пленкой-подложкой.

Приготовление комплексов коллоидного золота с белками. Коллоидное золото со средним размером частиц 20 нм (Au 20) получали по методу Френса [8]. Комплексы СерРС с коллоидным золотом готовили, добавляя к 5 мл раствора коллоидного золота 15 мкл 0,1 М раствора углекислого калия и 250 мкл СерРС в дистиллированной воде (0,3 мг/мл). Комплексы коллоидного золота с белком А («Seriva», ФРГ) готовили по методике [9]. Через 5 мин для дополнительной стабилизации полученных комплексов прибавляли 1 %-ный раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ) 20 000 («Fergak», Западный Берлин) до конечной концентрации 0,02 %. Для удаления несвязавшегося белка комплексы коллоидного золота с белком А (pA—Au) центрифугировали 30 мин при 4°C и 11 000 об/мин на центрифуге К-24 («Janetski», ГДР). Осадок ресуспендировали в 0,5 мл ФСБ-буфера (рН 7,5) с добавлением 0,02 % ПЭГ-20 000 и 0,02 % азида натрия. Полученные комплексы хранили при 4°C .

Маркирование ультратонких срезов. Свежеприготовленные ультратонкие срезы обрабатывали 10 мин в растворе 0,2 М глицина в ФСБ (рН 7,5), промывали в трех сменах ФСБ и инкубировали 20 мин при комнатной температуре на каплях раствора, содержащего 0,5 %-ный БСА в ФСБ, рН 7,5. Затем препараты обрабатывали поликлональными аффинно очищенными антителами к СерРС (5 мкг/мл) в ФСБ (рН 7,5), содержащем 0,05 %-ный твин-20 и 0,2 %-ный БСА, в течение 1 ч при комнатной температуре, промывали в ФСБ и инкубировали с комплексами pA—Au, разведенными в 15–20 раз в ФСБ (рН 7,5), содержащем 0,2 %-ный БСА и 0,05 % твин-20. Концентрацию комплексов определяли спектрофотометрически по поглощению $\text{OD}_{525} = 0,45$. Описанные условия, как указано в работе [10], препятствуют неспецифическому связыванию комплексов pA—Au на срезах.

Для определения мест связывания СерРС ультратонкие срезы после обработки 0,2 % БСА в ФСБ (рН 7,5) инкубировали с комплексами СерРС—Au, приготовленными, как описано выше, в присутствии 0,1 % БСА, 0,05 % твин-20 в ФСБ (рН 7,5) в течение 1,5 ч.

Дальнейшие процедуры описаны в работе [3].

Для проверки специфичности маркирования были поставлены следующие контрольные эксперименты:

а) срезы обрабатывали комплексами pA—Au без предварительной инкубации с антителами к СерРС;

б) срезы инкубировали с раствором коллоидного золота, не конъюгированного с макромолекулами;

в) срезы предварительно обрабатывали СерРС (180 мкг/мл) и затем комплексами СерРС—Au.

Препараты просматривали в электронном микроскопе «JEM-100CX» при ускоряющем напряжении 80 кВ. Измерения проводили на микрофотографиях с конечным увеличением 25 000.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлен ультратонкий срез ткани надпочечника быка после обработки антителами к СерРС и комплексами рА—Аи. Частицы коллоидного золота присутствуют как в цитоплазме, так и в ядре клеток. В цитоплазме основная часть метки локализуется над скоплениями полисом, хотя в отдельных случаях час-

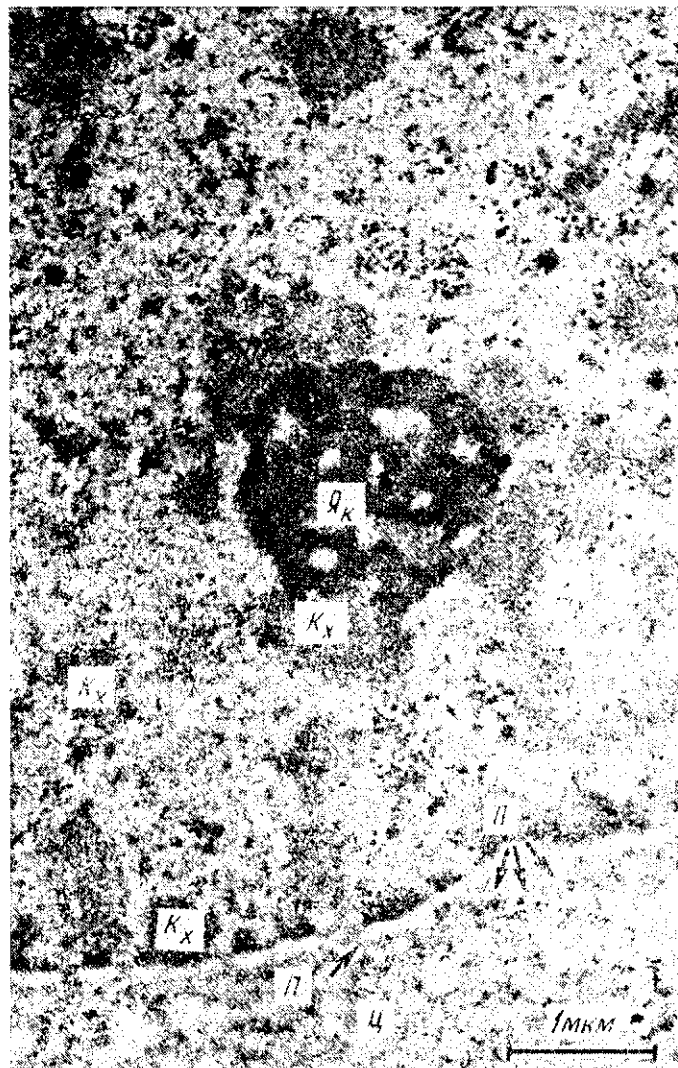


Рис. 1. Локализация СерРС в клетках надпочечника быка. Срезы ткани надпочечника быка, заключенные в смолу «Lowycril K4 M», обрабатывали поликлональными аффинно очищенными антителами к СерРС и комплексами белок А — коллоидное золото. Здесь и далее обозначения на срезах: Ц — цитоплазма; Я — ядро; П — поры ядерной оболочки; Ях — ядрышко; Кх — компактный хроматин, Дх — диффузный хроматин

Fig. 1. Localization of SerRS in bovine kidney cells. Ultrathin section of bovine kidney cells in «Lowycril K4M» resin were treated with the polyclonal affined-purified antibodies against SerRS and with the complexes: protein A-colloidal gold. Marks on the sections: Ц — cytoplasm, Я — nucleus, П — nucleus membrane pores, Кх — compact chromatin, Дх — diffuse chromatin

тицы золота присутствуют в участках, где рибосомы не обнаружены. Над митохондриями клеток просматриваются только одиночные гранулы.

В ядре комплексы коллоидного золота обнаруживаются над зонами расположения диффузного хроматина. Некоторое количество метки связывается с компактным хроматином, хотя в последнем случае час-

тицы золота расположены чаще всего на границе компактного и диффузного хроматина.

Ядрышки в надпочечнике быка имеют в основном нуклеолонемную структуру. Частицы золота над ядрышками встречаются достаточно редко и связаны, в основном, с периферией нуклеолонемы.



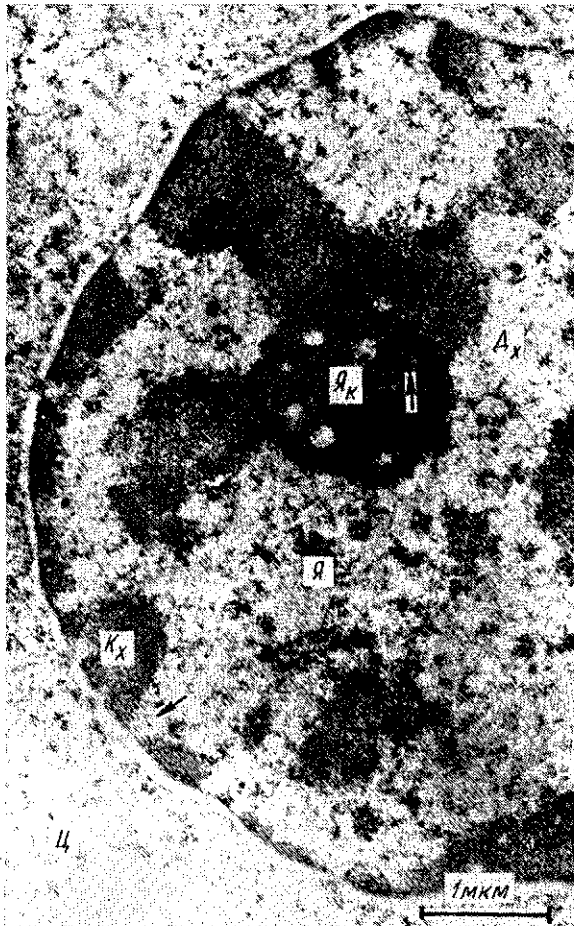
Рис. 2. Локализация мест связывания СерРС в клетке. Срезы ткани надпочечника быка, заключенной в смолу «Lowycril K4 М», обрабатывали комплексами СерРС—Au: *a* — фрагмент периферической части ядра; *б* — фрагмент клетки. Хорошо видно, что частицы золота локализируются по периферии ядра, преимущественно в районе ядерных пор (толстые стрелки)

Fig. 2. Localization of binding sites of SerRS in the cell. UT sections of bovine kidney cell in «Lowycril K4M» resin were treated with the SerRS-Au complexes: *a* — fragment of periferic part of the nuclei, *б* — fragment of the cell. Gold granules are localized on the periferic part of the nuclei, mainly in the region of nucleus pores (thick arrows).

Иногда видно, что частицы золота располагаются в районе ядерных пор.

В целом полученные данные хорошо согласуются с результатами определения локализации триптофанил-тРНК синтетазы в эукариотических клетках [3]. Триптофанил-тРНК синтетаза и СерРС обнаруживаются как в цитоплазме, так и в ядре клеток эукариот, причем в ядре — преимущественно в зонах расположения диффузного хроматина.

В то же время при использовании поликлональных аффинно очищенных антител к СерРС мы наблюдали некоторое увеличение (по сравнению с локализацией триптофанил-тРНК синтетазы с помощью поликлональных и моноклональных антител [3]) метки над структурами компактного хроматина. Присутствие СерРС в ядре клеток надпочечника быка хорошо согласуется с иммунофлуоресцентными данными,



показавшими наличие некоторых аминокислот-тРНК синтетаз в ядрах клеток эукариот, а также с результатами иммуноцитохимических исследований культуры клеток почки быка после обработки их детергентом тритон X-100 [2]. Аналогичные результаты получены и Миранде с соавт. [11]. Авторы этой работы выявили фенилаланил-тРНК синтетазу в ядрах клеток некоторых эукариот и высказали

Рис. 3. Контроль. Ультратонкий срез ткани надпочечника быка, заключенной в смолу «Lowycril K4 M», обработанный комплексом белок А — коллоидное золото без предварительной инкубации с антителами. На срезе видны только единичные частицы золота (стрелки)

Fig. 3. Control. UT sections of bovine kidney cells in the «Lowycril K4M» resin were treated with the complexes protein A — colloidal gold without incubation with antibodies. On the section only separate gold granules are seen. Scale — 1 μm.

предположение о том, что содержание данного фермента в ядре может меняться на разных стадиях клеточного цикла. Полученные нами результаты могут являться косвенным доводом в пользу высказанного выше предположения.

В контрольных экспериментах, когда ультратонкие срезы без предварительной инкубации с антителами обрабатывали комплексами рА—Au, частицы золота на срезах практически отсутствовали (рис. 3). На высокую специфичность метода указывает и тот факт, что в прослойке соединительной ткани надпочечника, содержащей большое количество коллагеновых волокон, метка также отсутствует (данные не приведены).

Интересные результаты были получены, когда срезы ткани надпочечника обрабатывали комплексами СерРС—Au (рис. 2). Хорошо видно, что СерРС не связывается со структурами цитоплазмы. Основная часть метки локализуется в районе поровых комплексов по периферии всей ядерной оболочки. Небольшое количество частиц золота присутствует в участках локализации диффузного хроматина.

Со структурами ядрышка СерРС также не связываются.

В контрольных экспериментах, где срезы предварительно обрабатывали СерРС, а затем комплексами СерРС—Au или исходным коллоидным золотом, частицы золота на срезах практически отсутствовали.

Полученные данные о локализации мест связывания SerPC со структурами на срезах хорошо согласуются с результатами биохимических исследований триптофанил-тРНК синтетазы, в которых было продемонстрировано, что триптофанил-тРНК синтетаза избирательно связывается с клеточными белками [12]. Таким образом, наличие метки по периферии ядра и в районе ядерных пор (рис. 2) может свидетельствовать о локализации специфических белков, связывающихся с SerPC, в периферических участках ядра и в районе ядерных пор.

Возможно, что присутствие SerPC в ядрах эукариотических клеток (по аналогии с триптофанил-тРНК синтетазой [3]) связано с дополнительными функциями, которые она может выполнять в эукариотических клетках, кроме участия в синтезе серил-тРНК, на что указывает и неравномерное распределение SerPC внутри ядра.

IMMUNOELECTRON-MICROSCOPIC STUDY OF SERYL-tRNA-SYNTHEASE LOCALIZATION IN CELLS OF HIGHER EUKARYOTES

L. I. Sidorik, V. I. Popenko, N. E. Cherny, M. A. Tukalo, S. F. Beresten, G. Kh. Matsuka

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev
V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

Localization of seryl-tRNA-synthetase (SerRS) was studied on ultrathin (UT) section of bovine kidney cells fixed with glutaraldehyde and embedded in «Lowycriol K4M» resin at -35°C . The UT sections were treated with the polyclonal affined-purified antibodies against SerRS and the complexes of protein A with colloidal gold 20 nm in size. In the cells the cytoplasm was the most intensely labelled. A great amount of SerRS was found in the cell nuclei: the label was concentrated over the diffuse chromatin localization regions, a minimal binding being observed over compact chromatin. The presence of SerRS in the eucaryotic cell nucleus may evidence for the possible regulatory role of SerRS in eucaryotes.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислоты до аминоацил-тРНК.— М.: Наука, 1984.— 408 с.
2. Иммуноморфологическое и биохимическое изучение внутриклеточной локализации триптофанил-тРНК-синтетазы высших организмов / Е. Л. Палей, В. Н. Баранов, Н. Е. Зиновьев, Л. Л. Киселев // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 2.— С. 70—79.
3. Иммуно-электронно-микроскопическое определение локализации триптофанил-тРНК синтетазы в клетках бактерий и высших эукариот / В. И. Попенко, Н. Е. Черни, С. Ф. Берестень и др. // Молекуляр. биология.— 1989.— 23, № 6.— С. 1669—1681.
4. Выделение серил-тРНК синтетазы из печени животных экспресс-методом / О. И. Гудзера, Л. Л. Сидорик, И. В. Золотухина и др. // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 2.— С. 105—107.
5. Bailey G. S. The production of antisera // Meth. Mol. Biol.— New York: Clifton, 1984.— V. 1.— P. 295—300.
6. Фримель Г. Ф. Иммунологические методы.— М.: Медицина, 1987.— 472 с.
7. Carlmalm E., Gavarito R. M., Villinge W. Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature // J. Microscopy.— 1982.— 126.— N 1.— P. 123—143.
8. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // Nature Phys. Sci.— 1973.— 241.— N 1.— P. 20—22.
9. Roth J. The protein A-gold technique, qualitative and quantitative approach for the antigen localization on thin sections // Techniques in Immunocytochemistry / Eds G. R. Bullock, P. Petrusz.— London: Acad. press, 1982.— V. 1.— P. 104—133.
10. Roth J., Taotes D. J., Warhol M. J. Prevention of non-specific interactions of gold-labelled reagents on tissue sections // Histochemistry.— 1989.— 92.— N 1.— P. 47—56.
11. Association of an aminoacyl-tRNA synthetase complex and phenylalanyl-tRNA synthetase with the cytoskeletal framework fraction from mammalian cells / L. Mirande, D. LeCorre, D. Lonvard et al. // Exp. Cell Res.— 1985.— 156, N 1.— P. 91—102.
12. Берестень С. Ф., Рубикайте Б. И., Киселев Л. Л. Метод выявления белок-белковых взаимодействий. Обнаружение белка с М. м. 37 кДа, связывающегося с триптофанил-тРНК синтетазой // Биоорг. химия.— 1987.— 13, № 10.— С. 1325—1330.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 27.04.90

Ин-т молекуляр. биологии им. Энгельгардта АН СССР, Москва