

© Л. Л. Сидорик, О. И. Гудзера, И. М. Золотухина, В. А. Драговоз,
М. А. Тукало, С. Ф. Берестень, Г. Х. Мацука, 1990

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕРИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ БЫКА ИММУНОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Получены поликлональные аффинно очищенные антитела на колонке с серил-тРНК синтетазой 95 %-ной чистоты, иммобилизованной в качестве лиганда на ВгСН-активированной агарозе. Исследована специфичность полученных антител, их влияние на ферментативную активность серил-тРНК синтетазы, а также межвидовой перекрест серил-тРНК синтетаз из различных организмов. Установлено, что межвидовой перекрест имеет место между серил-тРНК синтетазами различных представителей класса эукариот и отсутствует с прокариотическими ферментами, что свидетельствует в пользу предположения об отсутствии гомологии у антигенных детерминант серил-тРНК синтетаз эукариот и прокариот.

Введение. Аминоацил-тРНК синтетазы — ключевые ферменты в биосинтезе белка [1]. Несмотря на немалые успехи в исследовании их структуры и функции, ферменты эукариот изучены крайне недостаточно. Это связано, прежде всего, с низким содержанием их в тканях и органах эукариот (исключение составляет, пожалуй, триптофанил-тРНК синтетаза поджелудочной железы быка [2, 3, 5]), а также с трудоемкостью существующих методов очистки аминоацил-тРНК синтетаз эукариот до гомогенного состояния. Разработанный недавно экспресс-метод получения высокоочищенного препарата серил-тРНК синтетазы из печени животных [4] позволил существенно продвинуться как в изучении этого фермента классическими методами биохимии и молекулярной биологии, так и наработать достаточное количество белка для выделения поликлональных аффинно очищенных антител к серил-тРНК синтетазе печени быка.

Иммунохимические методы исследования значительно расширяют возможности изучения как традиционных, так и нетрадиционных функций клеточных компонентов. Как показал опыт последних лет, эти методы дают возможность изучать структурно-функциональные характеристики белков на молекулярном и клеточном уровнях. К сожалению, использование иммунохимических подходов к изучению аминоацил-тРНК синтетаз только начинается, и таких работ крайне мало. Одним из первых ферментов этой группы, достаточно хорошо исследованных с применением иммунохимических методов, включая использование как поликлональных моноспецифических, так и моноклональных антител, является триптофанил-тРНК синтетаза из поджелудочной железы крупного рогатого скота [2, 3, 5]. С помощью различных иммунохимических подходов было определено количество антигенных детерминант в молекуле белка, неравномерно распределенных вдоль полипептидной цепи, и влияние антител на ферментативную активность аминоацил-тРНК синтетазы [5]. Было также определено количество триптофанил-тРНК синтетазы в различных органах крупного рогатого скота, а также изучена внутриклеточная локализация фермента [6, 7]. С помощью моноклональных антител выявлено наличие общей эволюционно консервативной антигенной детерминанты в триптофанил-тРНК синтетазах эукариот, прокариот и архебактерий [8], а также локализация антигенных детерминант для этих антител в молекуле белка [9]. Иммунохимическое сравнение триптофанил-тРНК синтетаз и продуктов их ограниченного протеолиза [10] позволило получить определенные доказательства в пользу эволюционной стабильности определенных элементов структуры, а также более детально установить ход процесса эндогенного протеолиза. Детальное изучение триптофанил-тРНК синтетазы иммунохимическими методами с применением моноклональных антител дало возможность авторам разработать метод локализации антигенной детерминанты на полипептидной цепи молекулы антигена с не-

известной первичной структурой [11], что весьма актуально в случае аминоксил-тРНК синтетаз эукариот.

На основании вышеизложенных результатов мы применили ряд иммунохимических подходов к дальнейшему углубленному изучению отдельных структурно-функциональных особенностей серил-тРНК синтетаз эукариот. В данной работе представлено получение поликлональных аффинно очищенных антител к серил-тРНК синтетазе печени быка. Исследована их специфичность, влияние на ферментативную активность серил-тРНК синтетаз и проведено изучение общности антигенных детерминант серил-тРНК синтетаз из различных организмов.

Материалы и методы. Очистка серил-тРНК синтетазы. Серил-тРНК синтетазу (СерРС) выделяли из печени быка по описанному методу [4]. В процессе выделения фермента использовали фракционирование 50 %-ным раствором ПЭГ-6 000 («Fegлак», Западный Берлин), хроматографию полученного осадка (9—12 %) на сорбенте DEAE-Toyopearl 650 M («Toyo Soda», Япония) и дальнейшую хроматографию на системе FPLC на колонках MonoS и MonoQ. Серил-тРНК синтетазную активность определяли по начальной скорости образования аминоксил-тРНК. Инкубационная смесь в объеме 0,05 мл содержала 200 мМ трис-НСl, рН 8,0, 20 мМ MgCl₂, 10 мМ АТФ, 0,08 мМ ¹⁴C-серин (ЧСФР), 3 мг/мл суммарного препарата тРНК печени быка и от 10 до 0,1 мкг белка в зависимости от степени очистки фермента; время инкубации 3 мин при 37 °С. Молекулярную массу определяли электрофоретически в неденатурирующих условиях в градиенте концентрации полиакриламидного геля (ПААГ, 5—15 %) и методом гель-фильтрации по Эндриюсу [12]; молекулярную массу субъединиц — электрофоретически в градиенте концентрации ПААГ (7—22 %) по Лэммли [13]. Концентрацию белка определяли по Бредфорду [14]. За единицу активности СерРС принимали количество фермента, катализирующее аминокислирование 1 нмоль тРНК^{ser} за 1 мин при 37 °С.

Получение поликлональных аффинно очищенных антител к СерРС из печени быка. Кроликов массой 2—3 кг иммунизировали препаратом фермента 80 %-ной чистоты в полном адьюванте Фрейнда подкожно по методу [15] с некоторыми модификациями. На одного кролика вводили по 50 мкг белка. Через 8—10 недель повторяли иммунизацию с тем же количеством антигена в неполном адьюванте Фрейнда. Спустя 24 дня кроликов иммунизировали в третий раз 100 мкг белка в 0,05 М Na-фосфатном буфере с 0,15 М NaCl, рН 7,2 (ФСБ-буфер). На 7-й день после третьей иммунизации проверяли сыворотку крови кролика на содержание специфических антител к СерРС. Титр антител определяли методом ELISA. При достаточно высоком титре антисыворотки брали кровь и получали из нее сыворотку подопытных животных. Фракцию иммуноглобулинов выделяли по методу [16], высаливая антисыворотку насыщенным раствором сульфата аммония. Далее ее осаждали центрифугированием и диализовали против ФСБ-буфера.

Аффинную колонку готовили по методу [17] иммобилизацией СерРС 95 %-ной чистоты на ВгCN-активированной агарозе фирмы «Pharmacia» (Швеция). Агароза набухала в течение ночи при 4 °С в 0,1 М буфере NaHCO₃, рН 9,0. Белок, диализованный в течение ночи против того же буфера, смешивали с набухшей агарозой в соотношении 1 : 1 (по объему) и ставили на ночь на качалку для связывания белка с носителем. Затем конъюгат промывали на фильтре 2—3 объемами 2 М NaCl. Суспендировали конъюгат в 3—4 объемах 1 М глицина (рН 8,0) и ставили на качалку на 2 ч при 4 °С с двумя сменами глицинового буфера. Затем снова промывали конъюгат на фильтре 2 М NaCl. Аффинный сорбент набивали в небольшую колонку, промывали буфером ФСБ с 10 %-ной эмбриональной сывороткой, затем отмывали большим количеством ФСБ.

Колонки с иммобилизованным бычьим сывороточным альбумином (БСА) и иммуноглобулинами сыворотки неиммунизированных кроликов готовили аналогично.

Диализованную против ФСБ суммарную фракцию иммуноглобулинов сорбировали на аффинную колонку с иммобилизованной СерРС в течение ночи со скоростью 2 мл/ч при 4 °С. Затем колонку отмывали от несвязавшегося материала 3—4 объемами 0,5 М NaCl в ФСБ, 5—6 объемами ФСБ и элюировали антитела 0,2 М глицином, рН 2,5. Объем фракций 0,5 мл. Каждую собранную фракцию немедленно нейтрализовали доведением 50 мкл 2 М трис-НСl, рН 8,2. Фракции с концентрацией не менее 0,25 мг/мл

объединяли и диализовали против ББС-буфера (0,15 М NaCl, 0,2 М борная кислота, pH 8,2).

Чистоту полученных антител контролировали электрофоретически в градиенте концентрации (5—20 %) ПААГ по Лэммли в присутствии и без 2-меркаптоэтанола при обработке проб для электрофореза. Активность антител и их специфичность определяли методом ELISA [16], иммуноблотингом [16] и влиянием на ферментативную активность СерРС.

Определение специфичности поликлональных аффинно очищенных антител к СерРС печени быка и их влияние на ферментативную активность. Для доказательства специфичности полученные поликлональные аффинно очищенные антитела к СерРС (АТ) иммобилизовали на BrCN-активированной агарозе по описанному методу [15]. СерРС (1 мкг) диализовали против ФСБ-буфера, инкубировали с различными количествами аффинного сорбента с иммобилизованными АТ в течение 1 ч при 4°C. Затем сорбент удаляли центрифугированием. Супернатант исследовали на ферментативную активность СерРС в реакции аминокислотирования [2]. Для контроля препарат СерРС инкубировали с такими же количествами сорбента с иммобилизованными на BrCN-активированной агарозе БСА и иммуноглобулинами сыворотки неиммунизированных кроликов.

Для изучения влияния полученных АТ на ферментативную активность СерРС препарат фермента (1 мкг) инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре с варьирующими количествами АТ в объеме 20 мкл. Затем добавляли инкубационную смесь для аминокислотирования до конечного объема 0,1 мл и инкубировали 3 мин при 37°C — в условиях, оптимальных для работы СерРС в реакции аминокислотирования. Антитела предварительно диализовали против ФСБ, так как буфер ББС предназначен для хранения антител и немного подавляет активность СерРС. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл холодной 10 %-ной ТХУ. Пробы наносили на фильтры «Whatman» GF/C, промывали холодной 5 %-ной ТХУ, фильтры подсушивали и просчитывали включение метки в толуольном сцинтиллаторе на жидкостном счетчике «Rack Beta» (ЛКВ, Швеция).

В качестве положительного контроля служили пробы фермента, инкубированные со смесью для аминокислотирования в отсутствие АТ; в качестве отрицательно — фермент инкубировали с моноклональным антителом Ам2, подавляющим активность триптофанил-тРНК синтетазы [2, 3, 8].

Иммуноферментный метод (ELISA). Антиген адсорбировали на 96-луночную плашку («Flow Laboratories», Англия) при 4°C в течение ночи или 2 ч при 37°C в 0,1 мл ФСБ в концентрации 10 мкг/мл для очищенных антигенов и 100—200 мкг/мл для клеточных лизатов. Оставшиеся адсорбционные места блокировали 0,3 %-ным раствором БСА в ФСБ с 0,1 %-ным твин-20 (ФСБ-Т) в течение 1 ч при комнатной температуре. Все последующие процедуры данного метода проводили при комнатной температуре. После блокировки в лунки с антигеном добавляли различные количества АТ (от 100 до 0,01 мкг/мл) в ФСБ-Т, инкубация — 1 ч. После трехкратной отмывки лунок ФСБ-Т наносили биотинилированные антитела козы против цельной молекулы IgG кролика (кооператив «Диаген», Москва) в ФСБ-Т, инкубировали 1 ч, отмывали трижды ФСБ-Т и инкубировали 0,5 ч в тех же условиях с авидином, конъюгированным с пероксидазой («Диаген»). После пятикратной отмывки лунок ФСБ-Т и трехкратной — ФСБ результаты реакции визуализировали добавлением 0,1 мл раствора краски АВТС («Sigma», США) (0,5 мкг/мл) в 50 мМ цитратном буфере (pH 5,0) и H₂O₂ (0,05 %). Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 0,05 мл стоп-буфера (0,1 %-ный азид натрия в цитратном буфере), и количественно результат реакции обрабатывали на приборе «Multiscan» фирмы «Titertek» (Англия).

Иммуноблотинг. Иммунореактивность полученных АТ к СерРС из различных источников изучали также методом иммуноблотинга. СерРС печени кролика, как и печени быка, получали по описанному методу [4]. Тирозил-тРНК синтетаза из печени быка любезно предоставлена А. И. Корнелюком, СерРС из *Thermus thermophilus* — А. Д. Яремчук (Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР). Триптофанил-тРНК синтетаза поджелудочной железы быка получена от Г. К. Ковалевой (Ин-т молекуляр. биологии АН СССР). Клетки *E. coli*, дрожжей и культивируемые клетки человека К-562 лизировали в буфере RIPA (20 мМ трис-HCl (pH 7,5), 0,15 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 % NP-40, 1 % дезоксихолат натрия и 0,1 % DS-Na) с последующим центрифугированием. Непосредственно перед употреблением в лизирующий буфер добавляли ингибиторы протеаз фенилметилсульфонилфторид и диизопронилфторфосфат.

Белковые препараты разделяли электрофорезом в градиенте концентрации (7—22 %) ПААГ в присутствии DS-Na по методу Лэммли [13]: толщина геля 1 мм, затем переносили на нитроцеллюлозные фильтры BA-85 («Schleicher and Schull», ФРГ) пассивной диффузией. Фильтры отмывали в ФСБ, блокировали оставшиеся адсорбционные места инкубацией в ФСБ-Т в течение 1 ч при комнатной температуре и инкубировали при тех же условиях с АТ (20 мкг/мл) в ФСБ-Т. Затем фильтры отмывали в ФСБ-Т и инкубировали в течение 1 ч с биотинилированными антителами козы против

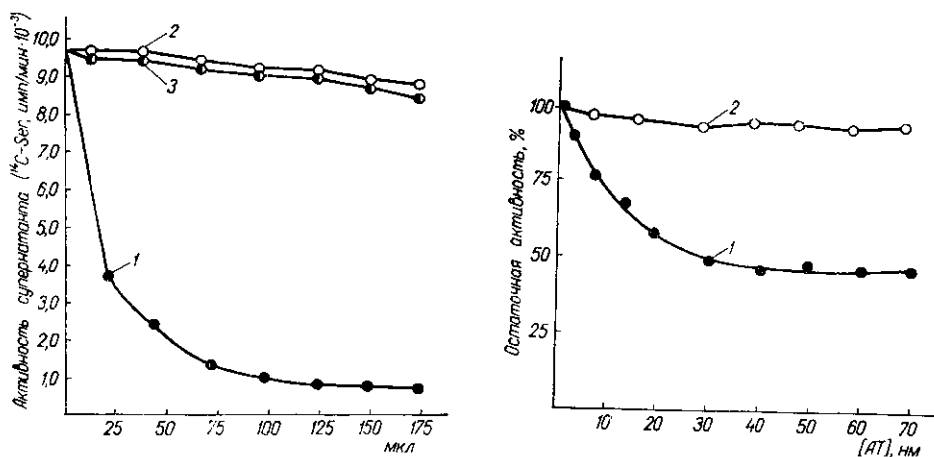


Рис. 1. Влияние преинкубации СерРС с иммобилизованными поликлональными аффинно очищенными антителами на активность супернатанта в реакции аминокислотирования: поликлональные аффинно очищенные антитела к СерРС (1), БСА (2) и IgG-фракция неиммунизированных кроликов (3), иммобилизованные на BrCN-активированной агарозе. Указанные количества 2 %-ной суспензии сорбента инкубировали в течение 1 ч с 1 мкг СерРС в ФСБ; сорбент удаляли центрифугированием. Для анализа ферментативной активности использовали 50 мкл супернатанта

Fig. 1. The effect of preincubation of bovine SerRS with immobilized antibodies on the supernatant aminoacylation activity. Polyclonal affined-purified antibodies against bovine SerRS (1), bovine serum albumin (2) and IgG-fractions and non-immunized rabbits (3) were immobilized on BrCN-activated agarose. The indicated amounts of 2 % matrix suspension were incubated at 4 °C for 1 h with 1 μg SerRS, dissolved in PBS; the matrices were removed by centrifugation. To assay the enzyme activity 0.05 μl of supernatant was used

Рис. 2. Зависимость серил-тРНК синтетазной активности от концентрации поликлональных аффинно очищенных АТ в реакции аминокислотирования. Реакционная смесь (0,1 мл) содержала АТ (1) или моноклональное антитело Am2 (2); реакцию запускали добавлением фермента. 2 нМ СерРС инкубировали 3 мин при 37 °C

Fig. 2. The dependence of bovine Ser-tRNA-synthetase activity on the antibodies concentration. Reaction mixture (0.1 ml) contained antibodies (1) or monoclonal antibody Am2 against bovine Trp-tRNA-synthetase (2). The reaction was started by adding the enzyme. 2 nM SerRS was incubated at 37 °C for 3 min

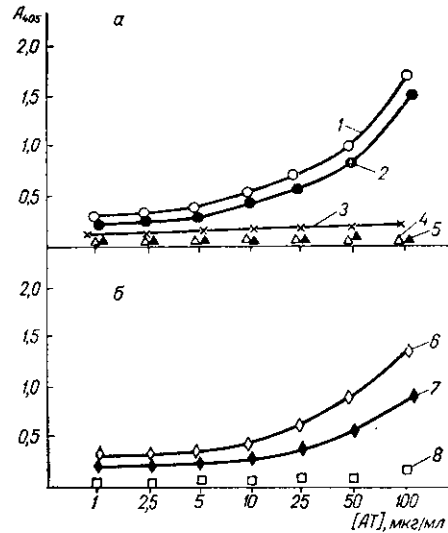
цельной молекулы IgG кролика, отмывали в ФСБ-Т и инкубировали в тех же условиях с авидин-пероксидазой. После пятикратной отмывки фильтров в ФСБ-Т их отмывали дважды ФСБ-буфером и обрабатывали фильтры 4-хлоро-1-нафтолом (0,5 мкг/мл) и H₂O₂ (0,05 %) в 50 мМ трис-HCl буфере, pH 7,5. Реакцию останавливали через 10—15 мин отмывкой фильтров в дистиллированной воде. Второй фильтр для проявления перенесенных белковых полос окрашивали 1 %-ным раствором амидочерного.

Результаты и обсуждение. Специфичность полученных антител и их влияние на ферментативную активность СерРС печени быка. Результаты, представленные рис. 1, показывают, что полученные поликлональные аффинно очищенные АТ специфичны к СерРС печени быка. После инкубации препарата СерРС печени быка (1 мкг) с различными количествами иммунного сорбента (АТ, иммобилизованными на BrCN-активированной агарозе, рис. 1, кривая 1) способность супернатанта катализировать аминокислотирование тРНК^{Ser} уменьшалась. Инкубация фермента с матриксом, конъюгированным с БСА либо IgG неиммунизированных кроликов, не ока-

зывает влияние на серил-тРНК синтетазную активность супернатанта (рис. 1, кривые 2 и 3 соответственно). Данные рис. 2 (кривая 1) иллюстрируют влияние АТ на аминоацелирующую активность СерРС печени быка; кривая 2 — влияние на активность синтетазы моноклонального антитела Ам2, подавляющего активность триптофанил-тРНК синтетазы поджелудочной железы быка. Из представленных результатов видно, что только препарат АТ ингибировал активность фермента. Это

Рис. 3. Межвидовой перекрест АТ к СерРС печени быка по данным ELISA: а — кривые титрования АТ с очищенными препаратами аминоксил-тРНК синтетаз из различных источников; б — с лизатами клеток различных организмов: СерРС печени быка (1), СерРС печени кролика (2), тирозил-тРНК синтетаза печени быка (3), триптофанил-тРНК синтетаза поджелудочной железы быка (4), СерРС *T. thermophilus* (5), лизат человеческих клеток К-562 (6), лизат клеток дрожжей (7) и лизат клеток *E. coli* (8). Каждый антиген вносили в концентрации 10 мкг/мл, лизаты клеток — по 100 мкг/мл суммарного белка

Fig. 3. Immunoreactivity of antibodies with aminoacyl-tRNA-synthetases from different organisms: а — interaction of antibodies with purified enzymes; б — interaction of antibodies with cell lysates: bovine SerRS (1), rabbit SerRS (2), bovine tyrosyl-tRNA-synthetase (3), bovine pancreas tryptophanyl-tRNA-synthetase (4), SerRS from *Thermus thermophilus* (5), lysates of human cells K-562 (6), yeast (7) and *E. coli* (8)



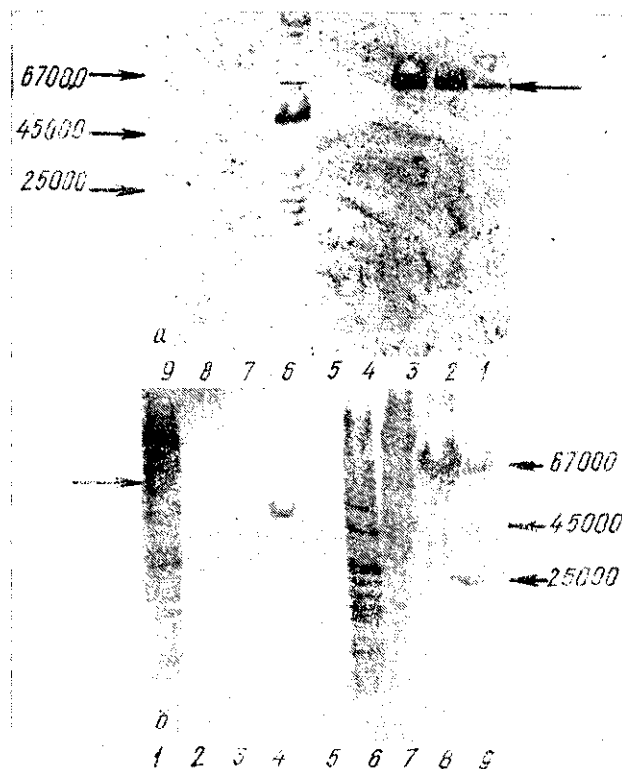
указывает на высокую специфичность полученных АТ: ни Ам2, ни иммуноглобулины неиммунизированных животных такого влияния на ферментативную активность СерРС не оказывали.

Полученные нами данные о неполном ингибировании ферментативной активности СерРС поликлональными аффинно очищенными антителами даже при 100-кратном молярном избытке антител не имеют пока однозначного объяснения. Для выяснения этого вопроса необходимы дальнейшие, более детальные исследования.

Эволюционная консервативность антигенной детерминанты СерРС. Результаты взаимодействия полученных АТ с СерРС из различных источников, а также с тирозил-тРНК синтетазой печени быка, триптофанил-тРНК синтетазой поджелудочной железы быка и лизатами клеток дрожжей, *E. coli* и культивируемых человеческих клеток К-562, по данным метода ELISA, представлены на рис. 3, а, б. Как видно из приведенных кривых титрования, полученные АТ к СерРС печени быка взаимодействуют с гомологичным антигеном, СерРС печени кролика, а также с лизатами культивируемых человеческих клеток К-562 и клеток дрожжей. Достоверное взаимодействие с вышеперечисленными антигенами эукариот наблюдалось для антител в конечном разведении 0,1 мкг/мл, что указывает на высокую аффинность используемых АТ.

Взаимодействие поликлональных аффинно очищенных антител с СерРС из различных организмов определяли методом иммуноблоттинга, результаты которого представлены на рис. 4, а, б. В связи с трудоемкостью и сложностью выделения СерРС в гомогенном состоянии для исследования межвидового перекреста в иммуноблоттинге использовали не только высокоочищенные препараты различных аминоксил-тРНК синтетаз, но и лизаты клеток из различных организмов. Из представленных данных видно, что АТ взаимодействует в блоттинге с СерРС печени быка и СерРС печени кролика, выявляя в обоих случаях одну полосу с подвижностью, соответствующую подвижности субъединиц вы-

сокоочищенных препаратов этих ферментов (с молекулярной массой (м. м.) около 60 000). В лизате человеческих клеток К-562 выявляется, главным образом, полипептид с м. м. около 60 000; у дрожжей преобладает полипептид с м. м. 47 000 наряду с полипептидом м. м. около 60 000. В литературе встречаются данные о наличии у СерРС дрожжей



lysate of yeast cells, 7 — lysate of *E. coli* cells and human K-562 cells; 8 — bovine serum albumin, 9 — markers. Positions and molecular weights of SerRS subunit are indicated by arrow.

Рис. 4. Иммунореактивность АТ с серил-тРНК синтетазы из различных источников (иммуноблоттинг проводили, как описано в «Материалах и методах»): а — иммуноблоттинг, б — нитроцеллюлозный фильтр, окрашенный амидочерным (1 — лизат культивируемых клеток человека К-562; 2 — СерРС печени быка; 3 — СерРС печени кролика; 4 — СерРС *T. thermophilus*; 5 — тирозил-тРНК синтетазы печени быка; 6 — лизат дрожжевых клеток; 7 — лизат клеток *E. coli*; 8 — БСА; 9 — маркеры). Положения и молекулярные массы субъединицы СерРС (60 000) указано стрелкой; маркеров — цифрами

Fig. 4. Immunoreactivity of antibodies with seryl-tRNA-synthetases from different eucaryotic and procaryotic species; a — enzyme-linked immunological staining; б — staining with amidoblack (1 — lysate of cultured human cells K-562, 2 — bovine SerRS, 3 — rabbit SerRS, 4 — SerRS from *Thermus thermophilus*, 5 — bovine tyrosyl-tRNA-synthetase, 6 —

субъединиц с м. м. 60 000 [18, 19] и 47 000 [20]. Поэтому можно предположить, что полоса с м. м. 47 000 представляет собой продукт эндогенного протеолиза 60 000-субъединицы СерРС дрожжей. В пользу предположения о высоком уровне эндогенного протеолиза свидетельствует выявление антителами в лизатах клеток дрожжей ряда полос с м. м. ниже 25 000. Аналогичные сложности выявления триптофанил-тРНК синтетазы в лизатах клеток дрожжей, *Neurospora crassa*, и клеток дрозофилы методом иммуноблоттинга отмечались в работе [6].

Поликлональные аффинно очищенные антитела к СерРС не выявляли ни единого полипептида в лизате клеток *E. coli*, а также в очищенных препаратах СерРС из *T. thermophilus*, тирозил-тРНК синтетазы из печени быка и БСА, что указывает на отсутствие межвидового перекреста, а следовательно, и отсутствие общих антигенных детерминант с СерРС этих организмов. Для окончательных выводов необходимы дальнейшие иммунохимические и структурные исследования СерРС.

Наличие иммунологического перекреста у СерРС печени быка, печени кролика, человеческих клеток К-562 и дрожжей однозначно указывает на существование общих антигенных детерминант у ферментов этих различных представителей класса эукариот. Полученные нами результаты, а также анализ литературных данных [8, 21, 22] позволяют предположить, что СерРС эукариот и прокариот эволюционировали, ве-

роятно, от низших форм к высшим от разных предковых прагенов. Для дальнейшего развития этой рабочей гипотезы необходимы глубокие и детальные исследования СерРС с привлечением как иммунохимических, так и генноинженерных подходов.

STUDIES OF SERYL-tRNA-SYNTHEASE FROM THE BOVINE LIVER BY THE IMMUNOCHEMICAL METHODS

L. L. Sidorik, O. I. Gudzera, I. M. Zolotukhina, V. A. Dragovoz, M. A. Tukalo, S. F. Beresten, G. Kh. Matsuka

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

Summary

Polyclonal affinity-purified antibodies against bovine seryl-tRNA-synthetase were prepared. Antibodies inhibit the Ser-tRNA synthetase activity and interact with the seryl-tRNA-synthetases from different organisms. Antibodies cross-react with seryl-tRNA-synthetases of eucaryotic rather than procaryotic species, as revealed by immunoblot analysis.

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. Molecular and cellular studies of tryptophanyl-tRNA synthetase using monoclonal antibodies / S. F. Beresten, T. A. Zargarova, O. O. Favorova et al. // Eur. J. Biochem.— 1989.— 184, N 1.— P. 575—581.
3. Моноклональные антитела к триптофанил-тРНК синтетазе / С. Ф. Берестень, Т. А. Заргарова, С. В. Костров, О. О. Фаворова // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 5.— С. 1407—1410.
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. Берестень С. Ф., Шейнкер В. Ш., О. В. Рохлин. Иммуно-химические свойства триптофанил-тРНК синтетазы и ее фрагментов // Молекуляр. биология.— 1978.— 12, № 6.— С. 1408—1419.
6. Межвидовые и межорганые вариации в содержании триптофанил-тРНК синтетазы у млекопитающих: аномально высокое содержание в поджелудочной железе крупного рогатого скота / О. О. Фаворова, Т. А. Заргарова, В. С. Рукосуев, С. Ф. Берестень // Биополимеры и клетка.— 1988.— 4, № 6.— С. 290—297.
7. Иммуно-электронно-микроскопическое определение локализации триптофанил-тРНК синтетазы в клетках бактерий и высших эукариот / В. И. Поленко, Н. Е. Черни, С. Ф. Берестень и др. // Молекуляр. биология.— 1983.— 23, № 6.— С. 1669—1681.
8. Триптофанил-тРНК синтетазы эукариот, прокариот и архебактерий имеют общую антигенную детерминанту / Т. А. Заргарова, С. Ф. Берестень, О. О. Фаворова, Л. Л. Киселев // Докл. АН СССР.— 1985.— 285, № 6.— С. 1484—1490.
9. Берестень С. Ф., Рубикайте Б. И., Казаков В. К. Локализация антигенных детерминант бычьей триптофанил-тРНК синтетазы, узнаваемых моноклональными антителами // Биополимеры и клетка.— 1987.— 3, № 2.— С. 59—65.
10. Immunochemical studies of beef pancreas tryptophanyl-tRNA synthetase and its fragments / V. Sh. Scheinker, S. F. Beresten, A. H. Mazo et al. // Eur. J. Biochem.— 1979.— 97, N 2.— P. 529—540.
11. Beresten S. F., Rubikaite B. I., Kisselev L. L. A general approach to the localization of antigenic determinants of a linear type of protein of unknown primary structure // J. Immunol. Meth.— 1988.— 113, N 2.— P. 247—254.
12. Andrews P. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration // Biochem. J.— 1970.— 119, N 1.— P. 691—697.
13. Laemmli U. K. Cleavage proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.— 1970.— 227.— P. 680—685.
14. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem.— 1976.— 86, N 1.— P. 193—200.
15. Baily B. S. The production of Antisera // Meth. Mol. Biol.— New York, 1984.— P. 295—300.
16. Фримель Г. Ф. Иммунологические методы.— М.: Медицина, 1987.— 472 с.
17. Goosen P. Isolation of subclasses of human IgG with affinity chromatography // J. Immunol. Meth.— 1980.— 37.— P. 89—93.

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 синтетазы 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-