

nanoszono przy anodzie w buforze o $pH=5$. Czas rozdziału 4–5 godz., $U = 70$ V, $I = 1,5$ mA/rurkę.

II — kierunek: płyty o wymiarach $13 \times 10 \times 0,2$ cm, 18% akrylamid, 0,5% bis-akrylamid, 0,5% TEMED, 0,33% nadsiarczan amonu, bufor $CH_3COOH : KOH$, $pH=4,6$. Bufor elektrodowy 0,01 M CH_3COOH . Czas rozdziału 10 godz., $U = 70$ V, $I = 40$ mA/płytę.

Elektroforezę przeprowadzano w temperaturze pokojowej w aparacie własnej konstrukcji. Barwienie: 0,2% czerń amidowa, 7,5% CH_3COOH i 20% metanolu. Odbarwienie: 7,5% CH_3COOH , a następnie 7,5% $CH_3COOH + 20\%$ metanolu.

WYNIKI I DYSKUSJA

W badanych okresach rozwoju ilość białek rybosomalnych, ekstrahowanych 0,25 M HCl, obniża się w mózgu 5-krotnie, natomiast w wątrobie początkowo, do 15 dnia embriogenezy, wzrasta, po czym, podobnie jak w mózgu, obniża się (tab. 1). Różnice te są niewątpliwie odbiciem niejednakowego rytmu ontogenetycznego mózgu i wątroby.

Średni odzysk ekstrahowanych białek z rybosomów mózgu wynosił 39% (33–46), a dla wątroby 50% (42–57). Podane w nawiasach rozrzuty były przypadkowe i niezależne od wieku (dane nie prezentowane).

Oznaczenia zawartości białek i RNA w rybosomach mózgu i wątroby we wszystkich badanych okresach wykazywały stałe proporcje, a wyliczone odpowiednie stosunki — minimalne różnice (tab. 1).

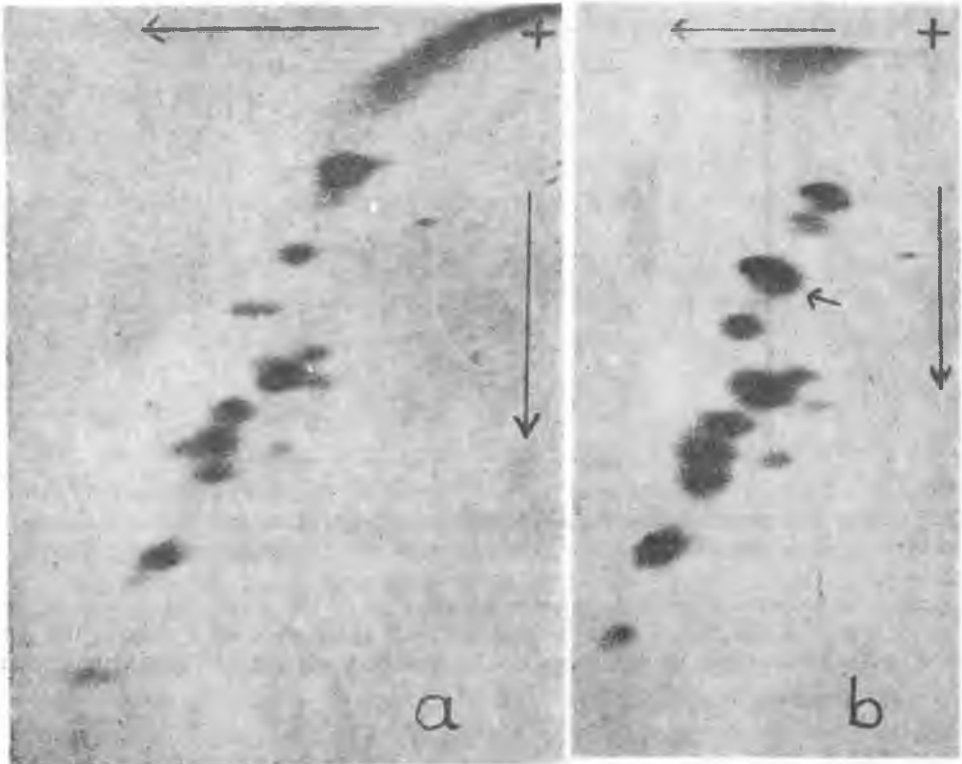
Tak więc obserwowany spadek wydajności ekstrakcji białek nie jest uwarunkowany obniżeniem się ich zawartości w rybosomie, a tylko

Tab. 1. Zawartość białek i RNA w rybosomach mózgu i wątroby w ontogenezie kurcząt*
Protein and RNA content of brain and liver ribosomes during ontogenesis of chicken*

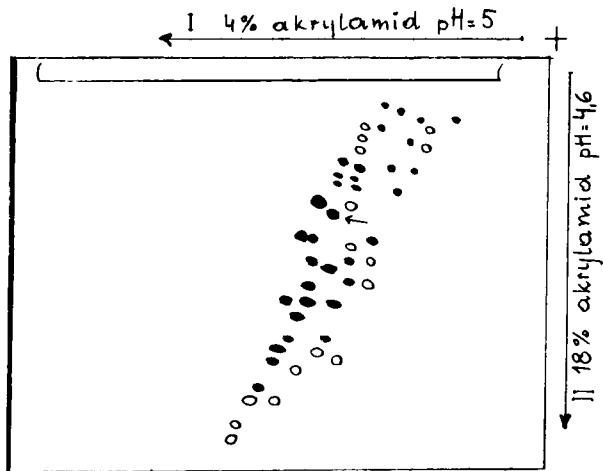
Wiek (dni)	Mózg				Wątroba			
	odzysk białka mg/g	RNA białko w/w	$\frac{E_{280}}{E_{240}}$	$\frac{E_{260}}{E_{280}}$	odzysk białka mg/g	RNA białko w/w	$\frac{E_{280}}{E_{240}}$	$\frac{E_{260}}{E_{280}}$
5	0,50	1,12	1,78	1,90	—	—	—	—
9	0,39	1,10	1,75	1,90	0,22	1,16	1,77	1,89
12	0,33	1,12	1,70	1,88	0,77	1,17	1,75	1,88
15	0,23	1,11	1,70	1,85	0,88	1,16	1,76	1,89
19	0,15	1,10	1,72	1,85	0,53	1,14	1,76	1,85
23	0,14	1,15	1,72	1,85	0,51	1,18	1,75	1,83
150	0,10	1,14	1,70	1,82	0,26	1,20	1,72	1,80

* Wyniki stanowią średnią z 4–6 eksperymentów.

* Results constitute the average from 4–6 experiments.



Ryc. 1. Dwukierunkowy elektroforetogram białek rybosomalnych mózgu (a) i wątroby (b), ekstrahowanych 0,25 M HCl; elektroforezę przeprowadzono w standardowych warunkach; kierunki rozdziálu zaznaczono strzałkami
Two-dimensional electrophoretogram of proteins extracted with 0.25 M HCl; from brain (a) and liver (b) ribosomes of 14-day old chick embryos; electrophoresis was in standard conditions; migration directions are marked with arrows



Ryc. 2. Schemat dwukierunkowego elektroforegramu białek rybosomalnych wątroby; plamy zaczernione widoczne są również na fotografiach; konturami zaznaczono plamy niewidoczne na fotografiach, ale obecne w żelu; kierunki rozdziału zaznaczono strzałkami

Schema of the two-dimensional electrophoretogram of the ribosomal proteins from liver; the solid spots were always seen, the open spots were only seen in the gel, but not visible in the photographs; migration directions are marked with arrows

zmniejszeniem się ilości rybosomów przypadających na 1 g mózgu. Jest to następstwem narastającej proliferacji włókien nerwowych i mielogenezy (6).

Analizę porównawczą białek rybosomalnych w ontogenezie przeprowadzono w oparciu o rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym techniką dwukierunkową. Opisane w literaturze metody elektroforezy dwukierunkowej (7, 10) ze względów technicznych lub odczynnikowych nie mogły być bezpośrednio zastosowane, stanowiły one jednak podstawę opracowania warunków dogodnych dla badań seryjnych przy minimalnej ilości materiału, a maksymalnej oszczędności czasu i odczynników.

W opracowanej metodzie w obu kierunkach zastosowano bufory kwaśne, przyjmując jako główne kryterium rozdziału w kierunku I — wielkość ładunku (niskoprocentowy żel, gradient pH i siły jonowej), a w kierunku II — masę cząsteczkową (żel 18%). Eksperymentalnie ustalone warunki prądowe zapewniły dobry i powtarzalny rozdział analizowanych białek. Oceny elektroforegramów dokonywano wizualnie, biorąc pod uwagę liczbę plam, ich wielkość, wysycenie i wzajemny układ.

Zazwyczaj wykrywano 50 plam dobrze rozgraniczonych, o różnej intensywności. Ilustruje to załączona ryc. 1, odpowiednio dla mózgu (a) i wątroby (b) oraz schemat (ryc. 2), na którym konturami zaznaczono plamy słabiej wybarwione, nie zarejestrowane na fotografiach, ale widoczne w mokrym żelu. Podkreślić należy, że wykrywana na elektroforegramach liczba plam odpowiada rzeczywistej liczbie białek ekstrahowanych z rybosomów 0,25 M HCl (18), a zatem każda plama reprezentuje pojedyncze białko. Wskazuje to na dużą zdolność rozdzielczą opracowanej metody.

Analiza porównawcza obrazu elektroforetycznego białek rybosomalnych w poszczególnych okresach rozwoju nie wykazała istotnych różnic. Natomiast we wszystkich badanych okresach obserwowano różnice między białkami rybosomalnymi mózgu i wątroby (ryc. 1a, b). Dodatkową plamę, wykrywaną tylko w rybosomach wątroby, zaznaczono strzałką. Obserwacja ta, będąca potwierdzeniem wcześniejszego doniesienia (16) i wskazująca na specyficzność tkankową białek rybosomalnych, jest zgodna z doniesieniami innych autorów (3, 9), chociaż M u t o l o (11) i S h e r t o n (19) nie potwierdzili występowania różnic tkankowych.

Podobnie kontrowersyjne wyniki otrzymywano w innych badaniach porównawczych. I tak podczas różnicowania i transformacji komórek D e l a u n a y (3) i B i e l k a (1) nie znajdowali różnic w białkach rybosomalnych, natomiast stwierdzali je S u b r a m a n i a n (20) i R o d g e r s (14). Różnice międzygatunkowe obserwował M u t o l o (11), a nie potwierdził ich D e l a u n a y (3). Wreszcie na różnice między rybosoma-

mi wolnymi a związanymi wskazują F e h l m a n n (4) i B u r k a (2), a wykluczają je H a n n a i wsp. (5).

W kontekście cytowanych prac i uzyskanych wyników wydaje się słuszne stwierdzenie, że obserwowane różnice między białkami rybosomalnymi mózgu i wątroby wskazują na specyficzność tkankową białek rybosomalnych, natomiast znaczne podobieństwo obrazów w poszczególnych okresach rozwoju pozwala wnioskować, że białka rybosomalne rozpuszczalne w 0,25 M HCl pozostają niezienne w procesie ontogenezy.

PISMIENICTWO

1. Bielka H. i wsp.: Studies on Proteins of Animal Ribosomes. IX. Proteins of Ribosomal Subunits of Some Tumors Characterized by Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Arch. Geschwulstforsch* **38**, 109, 1971.
2. Burka E. R., Bulova S. I.: Heterogeneity of Reticulocyte Ribosomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **42**, 801, 1971.
3. Delaunay J. i wsp.: Eucaryotic Ribosomal Proteins. Interspecific and Intra-specific Comparisons by Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Eur. J. Biochem.* **31**, 561, 1972.
4. F e h l m a n n M. i wsp.: Free and Membrane-bound Ribosomes. II. Two-dimensional Gel Electrophoresis of Proteins from Free and Membrane-bound Rabbit Reticulocyte Ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta* **378**, 119, 1975.
5. Hanna N. i wsp.: Free and Membrane-bound Ribosomes. I. Separation by Two-dimensional Gel Electrophoresis of Proteins from Rat Livers Monosomes. *Biochim. Biophys. Acta* **331**, 141, 1973.
6. Houthoff H. J., Drukker J.: The Normal Development of Neuronal and Satellite Cells in the Chicken Embryo. *Cell. Mol. Biol.* **26**, 49, 1980.
7. Kaltschmidt E., Wittmann H. G.: Ribosomal Proteins. VII Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Fingerprinting of Ribosomal Proteins. *Anal. Biochem.* **36**, 401, 1970.
8. Lowry O. H. i wsp.: Protein Measurement with Folin-reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265, 1951.
9. MacInnes J. W.: Differences between Ribosomal Subunits from Brain and Those from Other Tissues. *J. Mol. Biol.* **65**, 157, 1971.
10. Mets L. J., Bogard L.: Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. An Improved Method for Ribosomal Proteins. *Anal. Biochem.* **57**, 200, 1974.
11. Mutolo V. i wsp.: Species Specificity of Eucaryotic Ribosomal Proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **138**, 214, 1967.
12. Peterman M. L., Pavlovic A.: Ribonucleoprotein from a Rat Tumor, the Jensen Sarcoma. III. Ribosomes Purified without Deoxycholate but with Bentonite as Ribonuclease Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **238**, 318, 1963.
13. Ringer D. P. i wsp.: Differences in the Distribution of Phosphate Content in the Ribosomal Subunit. Protein of Free and Membrane-bound Ribosomes from Normal and Regenerating Rat Liver. *Biochim. Biophys. Acta* **656**, 62, 1981.
14. Rodgers A.: Ribosomal Proteins in Rapidly Growing and Nonproliferating Mouse Cells. *Biochim. Biophys. Acta* **294**, 292, 1973.
15. Sanecka-Obacz M.: Białka rybosomów mózgowych w embriogenezie. [w:] XIV Zjazd Pol. Tow. Bioch. Straszczania, Lublin 1976, s. 33.

16. Sanecka - Obacz M.: The Kinetics of ^{32}P Incorporation into Brain and Liver Ribosomal Proteins from 14-day Old Chick Embryos. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* 37, 19, 1982.
17. Sanecka - Obacz M.: Phosphorylation of Brain and Liver Ribosomal Proteins During Early Development of Chick Embryo. *Acta Physiol. Pol.* 35, 346, 1984.
18. Sherton C. C., Wool I. G.: The Extraction of Protein from Eucaryotic Ribosomes and Ribosomal Subunits. *Molec. Gen. Genet.* 135, 97, 1974.
19. Sherton C. C., Wool I. G.: A Comparison of the Proteins of Rat Skeletal Muscle and Liver Ribosomes by Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 249, 2258, 1974.
20. Subramanian A. R. i wsp.: Comparison of Ribosomal Proteins from Neoplastic and Non-neoplastic Cells. Resolution by Two-dimensional Gel Electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* 383, 93, 1975.

Otrzymano 1986.02.14.

РЕЗЮМЕ

Рибосомальные белки экстрагировали 0,25 М HCl из мозга и печени в онтогенезе цыплят, а затем анализировали методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле. В обеих тканях не обнаружено различий в рибосомальных белках в исследованных периодах развития, зато замечено незначительные различия между белками мозга и печени.

SUMMARY

Ribosomal proteins, extracted 0.25 M HCl, from brain and liver in the different stages of chicken development, were analyzed by means of the two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. No differences were observed between the ribosomal proteins from both tissues during ontogenesis. In contrast, a comparison of ribosomal protein patterns from brain with those of liver shows some differences.

