

- турация ДНК в кислой среде // Молекуляр. биология.— 1981.— 15, № 5.— С. 1093—1101.
7. Фридман А. С., Ландо Д. Ю. Кооперативное контактное взаимодействие между лигандами, адсорбированными на ДНК, вызывает уменьшение ширины температурного интервала плавления // Тез. докл. V Всесоюз. конф. по спектроскопии биополимеров.— Харьков, 1984.— С. 251.
 8. Tachibana H., Wada A. Ligand induced melting reaction of specific-sequence DNA molecules // Biopolymers.— 1982.— 21, N 9.— P. 1873—1886.
 9. Fine structure of DNA melting curves / Yu. L. Lyubchenko, M. D. Frank-Kamenetskii, A. V. Vologodskii et al. // Ibid.— 1976.— 15, N 6.— P. 1019—1036.
 10. Kaukas E., Raim T. Thermal denaturation of distamycin A—DNA complexes as followed hyperchromic spectra // Biophys. Chem.— 1980.— 11, N 2.— P. 233—237.
 11. Об особенностях перехода спираль—клубок ДНК в области инверсии относительной стабильности GC- и AT-пар, обусловленной ионами Cu^{2+} и Mn^{2+} / Ю. П. Благой, В. А. Сорокин, В. А. Валсев, Г. О. Гладченко // Докл. АН СССР.— 1978.— 240, № 2.— С. 459—462.
 12. Melchior W. B., von Hippel P. H. Alteration of the relative stability of dA·dT and dG·dC base pairs in DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1973.— 70, N 2.— P. 298—302.
 13. Record M. T., Woodbury C. P., Ross B. I. Characterization of rod-like DNA fragments // Biopolymers.— 1975.— 14, N 2.— P. 393—408.
 14. Woodbury C. P., Record M. T. A range of GC-independent denaturation solvents for DNA // Ibid.— N 11.— P. 2417—2420.
 15. Монаселдзе Д. Р., Мгеладзе Г. Н. Тепловые свойства ДНК и полидезоксирибонуклеотидов в широкой области концентраций ионов солей и полимера // Биофизика.— 1977.— 22, № 5.— С. 950—958.
 16. Shapiro J. T., Stannard B. S., Felsenfeld G. The binding of small cations to deoxyribonucleic acid. Nucleotide specificity // Biochemistry.— 1969.— 8, N 8.— P. 3233—3241.
 17. Габриелян А. Г. Конформационные переходы ДНК в концентрированных растворах нейтральных солей // Биофизика.— 1979.— 24, № 4.— С. 620—632.

Ин-т биоорг. химии АН БССР, Минск

Получено 04.06.86.

УДК 543.544.42.08:577.214.625

ИЗМЕРЕНИЕ КОНСТАНТ ДНК-БЕЛКОВОГО СВЯЗЫВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ КОМПЛЕКСА ХРОМАТОГРАФ «МИЛИХРОМ» — ЭВМ

Ю. А. Каламбет, Е. И. Бурова, А. А. Жучков, В. Л. Кнорре,
А. А. Александров

Введение. В литературе описано большое число способов определения констант ДНК-белкового связывания с помощью гель-хроматографии [1—4]. Во всех вариантах постановки хроматографического эксперимента исходными данными для подсчета констант являются зависимости концентраций ДНК и белка от времени. Для облегчения расчетов желательно иметь обе зависимости. Однако при детектировании хроматограммы на одной длине волны обе зависимости получить невозможно.

Использование многоволнового детектора хроматографа «Милихром» [5] делает задачу одновременного определения концентраций разрешимой. В работах [3, 4] регистрировали хроматограммы с помощью самописца, и для определения соотношения количеств ДНК и белка применяли спектральное отношение на двух длинах волн. При таком способе регистрации невозможно адекватно оценить ошибку определения количеств веществ и затруднено использование большого числа длин волн.

Регистрация хроматограммы с использованием ЭВМ и последующий анализ полученных данных позволяют решить задачу определения количеств ДНК и белка в смеси с максимальной точностью и с учетом измерений, сделанных на любых выбранных длинах волн.

В данной работе представлены результаты проведенных нами с помощью комплекса хроматограф «Милихром» — ЭВМ «Искра-226» экспериментов по изучению взаимодействия РНК-полимеразы *Esche-*

richia coli с ДНК плазмид *pAO3*, *pUC19*, *pBR322* со вставкой гена гормона роста, а также с одностранными олигодезоксирибонуклеотидными последовательностями — фрагментами промоторов *Spc* и *trpR* генов *E. coli*.

Материалы и методы. ДНК. Плазмиды *pAO3* [6] (штамм С600), *pUC19* [7] (JM83), *pBR322* со вставкой гена гормона роста человека (НВ101) выделяли из клеток *E. coli* щелочным методом с последующим равновесным центрифугированием в градиенте плотности CsCl в присутствии бромистого этидия.

Олигонуклеотиды. Для анализа связывания с РНК-полимеразой *E. coli* использовали следующие одностранные синтетические олигодезоксирибонуклеотиды: 1) 5'-TATAATGCC из «—11—3» области *Spc*-промотора; 2) 5'-TATAATGCCGCG из «—11+1» области *Spc*-промотора; 3) 5'-TATCGTACTCTT из «—13—2» области промотора гена *trpR*; 4) 3'-ATAGCATGAGAA из «—2—13» области промотора гена *trpR*.

Синтетические олигонуклеотиды 1 и 2 соответствуют участку транскрибируемой нити ДНК в «—10» области *Spc*-промотора рибосомных генов *E. coli*; 3 и 4 представляют собой комплементарные участки ДНК из промотора гена *trpR* репрессора *E. coli*. Олигонуклеотиды 1 и 2 синтезированы и любезно предоставлены Н. В. Амерхановым, а 3 и 4 — Л. В. Барановой (Ин-т цитологии и генетики Сиб. отделения АН СССР).

РНК-полимераза. Очистку холофермента РНК-полимеразы проводили по методу [8]. Гомогенность фермента составляла >95 % по данным электрофореза в 7 %-ном полиакриламидном геле в присутствии DS-Na. Содержание σ -субъединицы определяли спектрофотометрически в процессе отделения ее от минимального фермента на ионообменной смоле «Bio-Rex 70» («Bio-Rad», США). Определение концентрации активного фермента в препарате проводили по методу [9].

Связывание и кинетика диссоциации. Связывание РНК-полимеразы с ДНК осуществляли в следующих условиях. Инкубационная смесь объемом 50 мкл содержала 20 мМ ТЭА-HCl, рН 7,9, 100 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,2 мМ ДТТ, 20 мкг/мл ДНК и РНК-полимеразу (молярное отношение концентраций фермента и ДНК варьировало от 5 до 60). Смесь инкубировали при 37 °С в течение 30 мин, затем проводили ступенчатую фиксацию специфических комплексов ДНК с РНК-полимеразой формальдегидом [10], добавляя его до концентрации 0,2 %, через 2 мин — до 2 % и выдерживали еще 10 мин.

Связывание РНК-полимеразы с олигонуклеотидом проходило в процессе хроматографии фермента на колонке, заполненной олигонуклеотидом, в том же буфере, что и при связывании с ДНК, при комнатной температуре.

В экспериментах по кинетике диссоциации комплексов РНК-полимеразы с ДНК для инактивирования свободной полимеразы в растворе использовали гепарин («Sprofa», СССР) в концентрациях от 5 до 100 мкг/мл. Через определенные промежутки времени после добавления гепарина отбирали аликвоту инкубационной смеси, проводили ступенчатую фиксацию комплексов формальдегидом и гелевую хроматографический анализ.

Хроматография. Гель-хроматографию комплексов ДНК с РНК-полимеразой, зафиксированных формальдегидом, проводили в стеклянных колонках объемом 200—600 мкл, заполненных TSK-гелем HW65F («Toyo Soda», Япония). Раствор, содержащий 0,5 мкг ДНК и РНК-полимеразу, наносили на колонку с помощью насоса хроматографа «Минихром». Скорость подачи растворителя насосом хроматографа составляла 10—20 мкл/мин. Состав элюента — буфер для связывания ДНК с РНК-полимеразой. Типичная хроматограмма изображена на рис. 1. ДНК и комплекс выходили в исключенном объеме (пик А), несвязанная РНК-полимераза — примерно в середине диапазона фракционирования колонки (пик Б). Во избежание ошибки, связанной с перекрытием пиков, соотношение ДНК — белок в пике исключенного объема определяли по спектру первой половины этого пика.

Хроматографическое определение изотермы связывания РНК-полимеразы с олигодезоксирибонуклеотидами проводили импульсным методом [1]. Стеклообразную колонку объемом 300—600 мкл, заполненную смолой «Sephadex-50S», уравнивали буфером для связывания, в который добавлен олигонуклеотид в различных концентрациях (от 1 до 20 мкг/мл). На колонку наносили «импульс» РНК-полимеразы (3—5 мкг). Для хроматографии использовали раствор, содержащий олиго-ДНК в различных концентрациях (от 1 до 20 мкг/мл). В ходе хроматографии РНК-полимераза «обгоняет» олигонуклеотид, увлекая за собой ту его часть, которая связана с ферментом. За «импульсом» РНК-полимеразы остается провал, связанный с тем, что полимеразы забрала

часть олигонуклеотида из раствора. Таким образом, создаются условия, при которых комплекс РНК-полимеразы с олигонуклеотидом находится в равновесии с растворенным олигонуклеотидом. Хроматограмма представлена на рис. 2. Определение соотношения концентраций РНК-полимеразы и олигонуклеотида в комплексе проводится по спектру первой половины пика А на рис. 2.

Метод расчета констант связывания РНК-полимеразы с ДНК. При расчете констант связывания предполагается, что имеются два типа мест связыва-

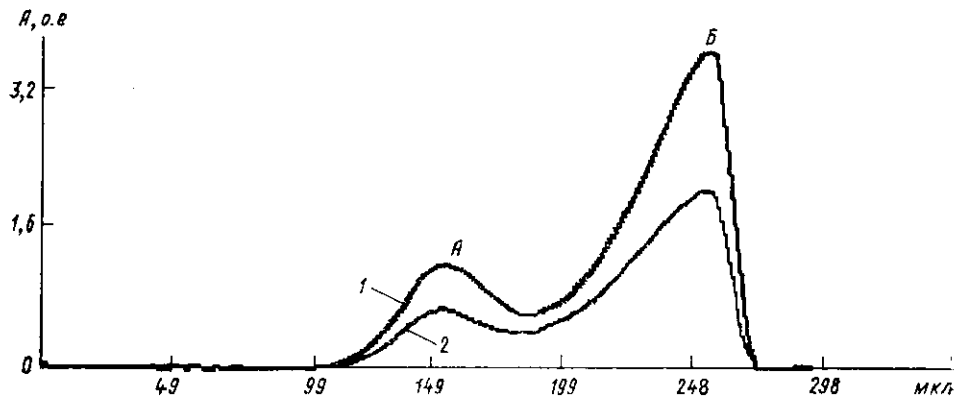


Рис. 1. Хроматографический профиль элюции комплексов РНК-полимеразы *E. coli* с ДНК на геле TSK HW65. Оптическое поглощение *A* на длине волны 280 (1) и 260 нм (2). Пик *A* соответствует ДНК и комплексу, пик *B* — свободному ферменту

Fig. 1. Chromatographic profile of elution of RNA-polymerase — DNA complexes on TSK HW65 gel. The optical absorption *A* is shown for two wavelengths: 280 nm (1) and 260 nm (2). Peak *A* corresponds to DNA and the complex, peak *B* — to unbound enzyme

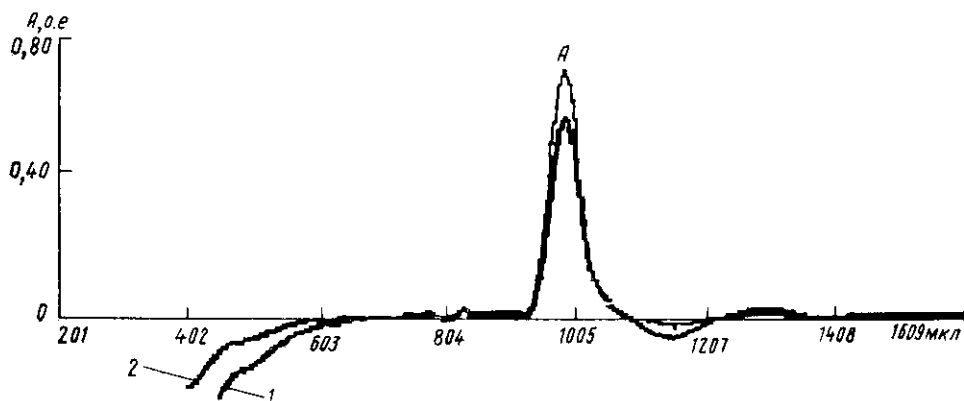


Рис. 2. Хроматографический профиль элюции комплексов РНК-полимеразы *E. coli* с олигодесоксирибонуклеотидами на смоле «Sephadex-50S». Оптическое поглощение на длине волны 260 (1) и 280 нм (2). Пик *A* соответствует комплексу

Fig. 2. Chromatographic profile of elution of RNA-polymerase — oligodesoxyribonucleotide complexes on «Sephadex G-50S» gel. The optical absorption is shown for two wavelengths: 260 nm (1) and 280 nm (2). Peak *A* corresponds to the complex

ния— сильного и слабого, или неспецифического. Взаимодействие с местами сильного связывания описывается уравнением



где *D* — место сильного связывания (все места сильного связывания считаются одинаковыми); *P* — РНК-полимераза; *DP* — комплекс; *K* — константа специфического связывания.

$$K = \frac{[DP]}{[D][P]} = \frac{r}{(r_0 - r)C_{\text{ДНК}}R}, \quad (2)$$

где $C_{\text{ДНК}}$ — молярная концентрация ДНК в растворе; *r* — молярное отношение концентраций РНК-полимеразы и ДНК в комплексе, т. е. $r = \frac{[DP]}{C_{\text{ДНК}}}$; r_0 — число мест сильно-

го связывания на ДНК; R — молярное отношение концентраций свободной РНК-полимеразы и ДНК в растворе:

$$R = R_0 - R_{\text{НС}} - r; \quad (3)$$

R_0 — молярное отношение исходных концентраций РНК-полимеразы и ДНК в растворе; $R_{\text{НС}}$ — молярное отношение концентраций РНК-полимеразы, идущей на неспецифическое связывание, и ДНК.

Места слабого связывания в нашей модели описываются уравнениями Мак-Ги и фон Хиппеля [11]. Количество свободной РНК-полимеразы в растворе, необходимое для подсчета константы сильного связывания, определяли по уравнению [11] в предположении, что константа неспецифического связывания РНК-полимеразы с ДНК рав-

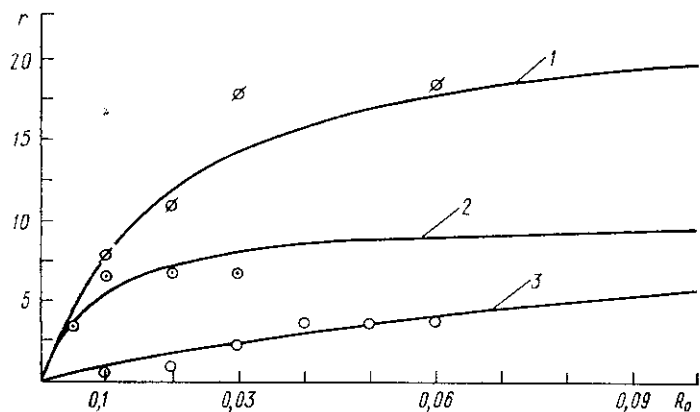


Рис. 3. Изотермы связывания РНК-полимеразы *E. coli* с ДНК плазмиды *pBR322* со вставкой (1); с ДНК плазмиды *pUC19* (2) и ДНК плазмиды *pAO3* (3); r — число молекул РНК-полимеразы, связанных с ДНК; R_0 — число молекул РНК-полимеразы в растворе, приходящихся на одну пару нуклеотидных оснований

Fig. 3. Isotherms of RNA-polymerase binding to DNA of plasmids: *pBR322* with an insertion (1); *pUC19* (2), and *pAO3* (3); r is a number of RNA-polymerase molecules bound with DNA; R_0 is the number of RNA-polymerase molecules per one pair of nucleotide bases in solution

на $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (концентрация ДНК измеряется в молях пар оснований на литр), в присутствии $0,05 \text{ M NaCl}$ и $0,01 \text{ M MgCl}_2$ [12]. Размер места связывания составляет 42 нуклеотида [13].

В формуле (2) известной величиной является $C_{\text{ДНК}}$; R — рассчитывается из (3) списанным выше способом из начальной концентрации РНК-полимеразы в растворе; r определяется в ходе хроматографического эксперимента с помощью разработанного комплекса программного обеспечения.

Построение зависимости r от R позволяет определить параметры связывания K и r_0 .

В случае связывания РНК-полимеразы с олигонуклеотидом имеется лишь один тип мест связывания, и может связаться только одна молекула РНК-полимеразы, поэтому $r_0=1$.

Результаты и обсуждение. На рис. 3 представлена зависимость среднего числа молекул РНК-полимеразы, специфически связанных с ДНК (r), от исходного числа молекул РНК-полимеразы в растворе, приходящихся на моль пар оснований ДНК (R_0). Изотермы связывания построены для ДНК плазмид *pBR322* (~ 4362 н. п.) со вставкой размером 800 нуклеотидов (ген гормона роста человека), *pUC19* (2686 н. п.) и *pAO3* (1683 н. п.). Начальный наклон этих кривых определяется константой связывания, значения кривых в насыщении определяют число мест специфического связывания на данной ДНК. Для ДНК *pBR322* со вставкой число мест связывания равно 20 ± 1 , для *pUC19* — 7 ± 1 , для *pAO3* — 4 ± 1 . Точность получаемых значений обусловлена ошибкой в определении отношения концентраций белка и ДНК и в основном связана со значительным перекрыванием двух хроматографических пиков (А и Б на рис. 1) при насыщающих концентрациях РНК-полимеразы. Таким образом, для данных ДНК одно

место связывания фермента приходится на 250, 380 и 420 пар оснований соответственно. Эти данные согласуются с последующим анализом отфильтрованных комплексов с помощью электронной микроскопии. При значениях $R_0 > 0,05$ все изотермы связывания выходят на насыщение вследствие того, что константы связывания K для данных ДНК близки. Предполагается, что все места связывания на ДНК идентичны. Зависимости r от R_0 перестраивали в координаты r от R и из полученной зависимости определяли значения равновесных констант специфического связывания согласно формуле (2). Для данных трех ДНК в

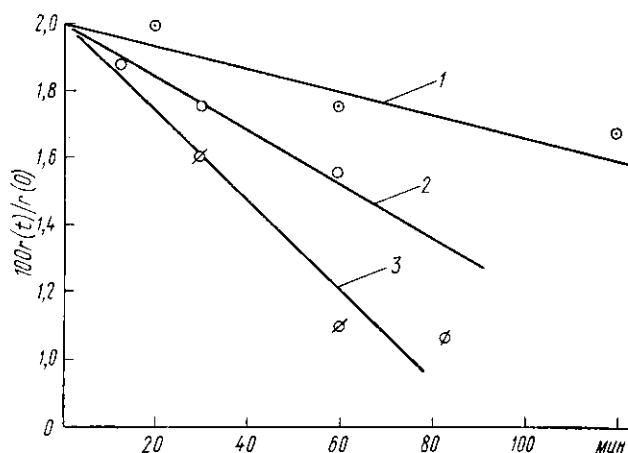


Рис. 4. Кинетика диссоциации специфических комплексов РНК-полимеразы *E. coli* с ДНК плазмиды *pBR322* со вставкой при различных концентрациях гепарина: 1—5; 2—50; 3—100 мкг/мл; $r(t)$ — среднее число молекул фермента, специфически связанных с ДНК в момент времени t

Fig. 4. Kinetics of release of the polymerase from DNA of *pBR322* plasmid with an insertion at various heparin concentrations. 1—5 $\mu\text{g/ml}$; 2—50 $\mu\text{g/ml}$; 3—100 $\mu\text{g/ml}$. Value $100 r(t)/r(0)$ is plotted against time on logarithmic scale. $r(t)$ is the mean value of enzyme molecules bound with DNA at time t

пределах ошибки эксперимента получили одинаковые значения $K = 3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ (рассчитано на моль пар оснований ДНК). Это значение согласуется с данными, полученными в работе [14], где с помощью метода электронной микроскопии определена константа взаимодействия РНК-полимеразы *E. coli* с ДНК репликативной формы фага *fd*. Полученное нами значение согласуется также с результатами Сибурга и др. [16], которые рассчитали равновесную константу взаимодействия с пятью промоторами репликативной формы *fd*, исходя из отношения кинетических констант, определенных методом связывания на фильтрах. При 0,01 М MgCl_2 , 0,12 М KCl величины K варьировали в диапазоне $2 \cdot 10^8$ — $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$.

Для олигонуклеотидов константа связывания в принципе может быть рассчитана из одной точки на изотерме связывания, так как $r_0 = 1$, и число неизвестных параметров в уравнении (2) уменьшается до одного. Для препарата 1 была получена изотерма равновесного связывания, и мы определяли одновременно K и r_0 . В данном эксперименте полученное максимальное отношение, равное 1,28, может быть обусловлено следующими обстоятельствами: а) отсутствием точного значения коэффициента экстинкции для олигонуклеотидов, который в данных экспериментах принимался равным 35 о. е. · мл/мг на 260 нм; б) возможным частичным изменением спектра олигонуклеотида при связывании с РНК-полимеразой; менее вероятно значительное изменение спектра РНК-полимеразы при связывании с олигонуклеотидом.

Из постановки эксперимента вытекает ограничение для максимально измеряемой константы: концентрация фрагмента должна быть достаточной для насыщения РНК-полимеразы в процессе хроматографии.

Поэтому в данных условиях постановки эксперимента получена нижняя оценка константы связывания с препаратом 1: $K > 0,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Показано, что с олигонуклеотидами из промотора *trpR*-гена (препараты 3 и 4) связывания с РНК-полимеразой при концентрациях олигонуклеотидов до $1,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ не наблюдается. В экспериментах с препаратом 2 связывание обнаруживается, однако его параметры не определялись.

Наличие связывания РНК-полимеразы *E. coli* с препаратами из участка «-10» *Spc*-промотора *E. coli* продемонстрировано также в [17], где измерена эффективность связывания с РНК-полимеразой (10 % для препарата 1 и 41 % для препарата 2) по задержке меченых олигонуклеотидов на фильтрах.

Хроматографическим методом изучали также кинетику диссоциации специфических комплексов РНК-полимеразы *E. coli* с ДНК плазмиды *pBR322* со вставкой. Время фиксации комплексов формальдегидом должно быть значительно меньше среднего времени жизни комплекса, чтобы использование метода фиксации формальдегидом было адекватно решению данной задачи. Получено, что обработки формальдегидом в течение 2 мин достаточно для фиксации всех специфически связанных комплексов. Это время гораздо меньше времени диссоциации специфических комплексов по литературным данным [15].

В качестве агента для инактивации свободной РНК-полимеразы в растворе использовали гепарин, который является мощным ингибитором связывания РНК-полимеразы с ДНК [18]. В хроматографических экспериментах его применение при исследовании кинетики диссоциации более предпочтительно, чем, например, тРНК, poly d(A-T) или ДНК, которые также связывают РНК-полимеразу, но в отличие от гепарина дают большой вклад в оптическое поглощение, а также при хроматографии могут не отделяться от пика комплекса.

Кинетика диссоциации для данной концентрации гепарина подчиняется экспоненциальному закону

$$r(t) = r(0) \exp(-t/\tau), \quad (4)$$

где t — время; τ — среднее время жизни комплекса, которое зависит от концентрации гепарина. Предполагается, что все места связывания с РНК-полимеразой для данного типа ДНК идентичны.

Из рис. 4 следует, что при различных концентрациях гепарина величина $r(0)$ варьирует, на графике представлено отношение $r(t)/r(0)$ в логарифмическом масштабе. Видно, что скорость диссоциации специфических комплексов ДНК с РНК-полимеразой зависит от концентрации гепарина в растворе. Например, при $C = 50 \text{ мкг/мл}$ константа диссоциации $K = 8 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$, что соответствует среднему времени жизни комплексов $\tau = 120 \text{ мин}$.

На рис. 5 построена зависимость $1/\tau$ от C , которая в данном диапазоне концентраций гепарина может быть описана линейным уравнением

$$1/\tau = K_d + K_t C, \quad (5)$$

полученным в работе [15]. Здесь K_d — истинная константа скорости диссоциации комплексов; K_t — константа скорости реакции взаимодействия гепарина со специфическим комплексом. K_d можно получить экстраполяцией значений $1/\tau$ к нулевой концентрации гепарина. В нашем случае $K_d = 2 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$, что соответствует среднему времени жизни 500 мин при 0,05 М NaCl. Показано, что скорость реакции взаимодействия гепарина со специфическим комплексом $K_t = 23 \cdot 10^{-4} \text{ л} \times \text{г}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Значение K_d сравнимо по величине с K_d для специфических комплексов РНК-полимеразы с ДНК репликативной формы *fd*, полученными в [15] при 0,01 М NaCl. Значение K_t из [15] меньше значения, полученного нами, в четыре раза. Причиной может быть использование различных коммерческих препаратов гепарина, который состо-

ит из смеси полимеров с разной молекулярной массой, при этом неизвестно, какая минимальная длина полимера необходима для того, чтобы связаться с РНК-полимеразой.

Известно, что обработка комплексов в течение 10 с гепарином в концентрации 5 мкг/мл приводит к быстрой и полной диссоциации неспецифического связывания [19]. Нами показано, что такая обработка комплексов гепарином перед фиксацией не приводит к уменьшению

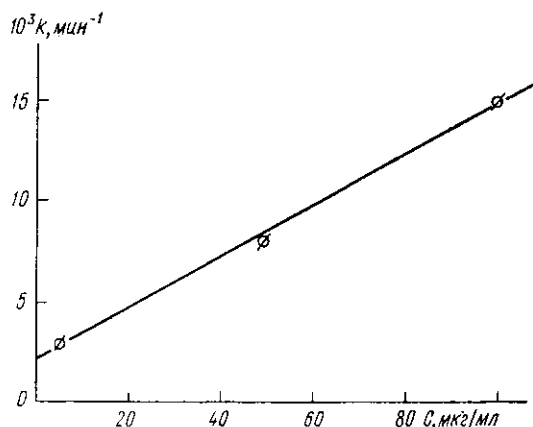


Рис. 5. Зависимость константы скорости диссоциации комплексов (K) от концентрации (C) гепарина в растворе

Fig. 5. Plot of the rate constant of complexes dissociation (K) against heparin concentration (C) in the solution

числа молекул РНК-полимеразы, фиксируемых на ДНК формальдегидом. Этот факт еще раз свидетельствует в пользу того, что формальдегид не фиксирует неспецифических комплексов.

В заключение хотелось бы обсудить преимущества использования хроматографического метода. Описанные выше усредненные характеристики связывания, полученные хроматографическим методом, могут быть детализированы с помощью электронной микроскопии. Зафиксированные комплексы, исследуемые хроматографическим методом, можно в дальнейшем без дополнительной очистки использовать для анализа в электронном микроскопе.

Сравним данный метод с другими. Наиболее широко используется для изучения взаимодействия белков с ДНК метод связывания на нитроцеллюлозных фильтрах. Считается, что для удержания ДНК на фильтре достаточно, чтобы с молекулой ДНК была прочно связана хотя бы одна молекула белка. По этой причине связывание на фильтрах не может дать полной изотермы связывания при наличии более чем одного места связывания ДНК с белком или кооперативного характера связывания. Некоторые белки могут не связываться с нитроцеллюлозой.

Хроматографический метод имеет много общего с методом центрифугирования, но используемые в хроматографии детекторы гораздо более чувствительны.

При использовании метода электронной микроскопии для измерения связывания без предварительной фиксации комплексов не учитывается влияние пленки-подложки, что может сильно сдвигать равновесие.

Следствием использования комплекса микроколоночный хроматограф «Миличром» — ЭВМ «Искра-226» является наиболее полное извлечение информации из хроматографических кривых, что способствует увеличению чувствительности метода и уменьшению его трудоемкости.

MEASUREMENT OF DNA-PROTEIN BINDING CONSTANTS
BY MEANS OF CHROMATOGRAPH «MILICHROM» — COMPUTER COMPLEX

Yu. A. Kalambet, E. I. Burova, A. A. Juchkov, V. L. Knorre, A. A. Alexandrov

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

The method of gel-chromatography is used to determine the constants of DNA-protein binding. The complex consisting of multiwave scanning chromatograph «Milichrom» and computer «Iskra-226» is used as a registering device. The software for this complex allows determining DNA and protein concentrations at any moment. Information on time dependence of DNA and protein concentrations is used to determine the constants of DNA-protein binding. The method is applied to investigate the interaction of RNA-polymerase of *E. coli* by a number of plasmids and four one-stranded oligodesoxyribonucleotides — the fragments of *E. coli* promoters.

1. Raju E. V., Davidson N. Binding of RNase to denatured and native deoxyribonucleic acids // *Biopolymers*.— 1969.— 8, N 6.— P. 743—755.
2. Frankel A. D., Ackers G. K., Smith H. O. Measurement of DNA-protein equilibria using gel chromatography: application to the *HinfI* restriction endonuclease // *Biochemistry*.— 1985.— 24, N 12.— P. 3049—3054.
3. Volodin A. A., Shepelev V. A., Kosaganov Yu. N. Stoichiometry and kinetics of complex formation by the *recA* protein and a double-stranded DNA // *FEBS Lett.*— 1982.— 145, N 1.— P. 53—56.
4. Shepelev V. A., Kosaganov Yu. N., Lazurkin Yu. S. Interaction of the HMG1 protein with nucleic acids // *Ibid.*— 1984.— 172, N 2.— P. 172—176.
5. Microcolumn liquid chromatography with multiwavelength photometric detection. OB-4 microcolumn liquid chromatograph / G. I. Baram, M. A. Grachev, N. I. Komarova et al. // *J. Chromatogr.*— 1983.— 264, N 1.— P. 69—90.
6. Nucleotide sequence of small *ColE1* derivatives: structure of the regions essential for autonomous replication and colicin E1 immunity / A. Oka, N. Nomura, M. Morita et al. // *Mol. and Gen. Genet.*— 1979.— 172, N 2.— P. 151—159.
7. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved *M13* phage cloning and host strains: nucleotide sequences of the *M13mp18* and *pUC19* vectors // *Gene*.— 1985.— 33, N 1.— P. 103—119.
8. Burgess R. R., Jendrisak J. J. A procedure for the rapid, large scale purification of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA-polymerase involving polymin P precipitation and DNA-cellulose chromatography // *Biochemistry*.— 1975.— 14, N 21.— P. 4634—4638.
9. A quantitative assay for bacterial RNA-polymerases / M. J. Chamberlin, W. C. Nierman, J. Wiggs, N. Neff // *J. Biol. Chem.*— 1979.— 254, N 20.— P. 10061—10069.
10. Investigation of the binding of *Escherichia coli* RNA polymerase to DNA from bacteriophages T2 and T7 by kinetic formaldehyde method and electron microscopy / D. I. Cherny, A. A. Alexandrov, M. I. Zarudnaya et al. // *Eur. J. Biochem.*— 1977.— 79, N 2.— P. 309—317.
11. McGhee J. D., von Hippel P. H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice // *J. Mol. Biol.*— 1974.— 86, N 2.— P. 469—489.
12. Nonspecific interactions of *Escherichia coli* RNA polymerase with native and denatured DNA: differences in the binding behaviour of core and holoenzyme / P. H. de Haesele, T. M. Lohman, R. R. Burgess, M. T. Record, Jr. // *Biochemistry*.— 1978.— 17, N 9.— P. 1612—1622.
13. Revzin A., Woychik R. P. Quantitation of the interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme with double-helical DNA using a thermodynamically rigorous centrifugation method // *Ibid.*— 1981.— 20, N 2.— P. 250—256.
14. Giacomoni P. U., Delain E., Le Pecq J. B. Electron microscopy analysis of the interaction between *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase and the replicative form of phage ϕ d DNA. 1. Mapping of the binding sites // *Eur. J. Biochem.*— 1977.— 78, N 2.— P. 205—213.
15. Giacomoni P. U., Delain E., Le Pecq J. B. Electron microscopy analysis of the interaction between *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase and the replicative form of phage ϕ d DNA. 2. Analysis of the dissociation kinetics // *Ibid.*— P. 215—220.
16. Seeburg P. H., Nusslein C., Schaller H. Interaction of RNA polymerase with promoters from bacteriophage ϕ d // *Ibid.*— 74, N 1.— P. 107—113.
17. Кнорре В. Л., Савинкова Л. К., Салганик П. И. Олигонуклеотидные последовательности, избирательно связываемые РНК-полимеразой *E. coli* // *Биополимеры и клетка*.— 1985.— 1, № 6.— С. 283—292.
18. Chamberlin M. J. The selectivity of transcription // *Annu. Rev. Biochem.*— 1974.— 43.— P. 721—775.
19. Melancon P., Burgess R. R., Record M. T., Jr. Direct evidence for the preferential binding of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme to the ends of deoxyribonucleic and restriction fragments // *Biochemistry*.— 1983.— 22, N 22.— P. 5169—5176.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 30.06.86