

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *The crystallization of ribosomal proteins from the 50S subunit of the Escherichia coli and Bacillus stearothermophilus ribosome* / K. Appelt, J. Dijk, R. Reinhardt et al. // J. Biol. Chem.—1981.—256, N 22.—P. 11787—11790.
2. Appelt K., White S. W., Wilson K. S. Proteins of the *Bacillus stearothermophilus* ribosome. Crystallization of proteins L30 and S5 // Ibid.—1983.—258, N 21.—P. 13328—13330.
3. Liljas A., Mewcower M. E. Purification and crystallization of a protein complex from *Bacillus stearothermophilus* ribosomes // J. Mol. Biol.—1981.—153, N 2.—P. 393—398.
4. Седелникова С. Э. Выделение индивидуальных белков из 50S субчастицы рибосом *Thermus thermophilus*. Кристаллизация белка TL7. // Биополимеры и клетка.—1987.—3, № 3.—С. 163—166.
5. Crystall structure of a prokaryotic ribosomal protein / K. S. Wilson, K. Appelt, S. Badger et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 19.—P. 7251—7255.
6. Кристаллизация 30S субчастиц рибосом *Thermus thermophilus* / М. М. Юсупов, С. Д. Траханов, В. В. Барынин и др. // Докл. АН СССР.—1987.—292, № 5.—С. 1271—1274.
7. Гогия З. В., Юсупов М. М., Спирина Т. Н. Структура рибосом *Thermus thermophilus*. 1. Метод выделения и очистки рибосом // Молекуляр. биология.—1986.—20, № 2.—С. 519—526.
8. Kenny G., Lambert G. M., Traut R. R. Cross-linking of ribosomes using 2-iminothiolane(methyl-4-mercaptobutyrimidate) and identification of cross-linked proteins by diagonal polyacrylamide sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis // Meth. Enzymol.—1979.—59.—P. 534—550.
9. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 5259.—P. 680—685.

Ин-т белка АН СССР, Пущино

Получено 09.06.88

ISOLATION AND CRYSTALLIZATION OF RIBOSOMAL PROTEIN TS9

S. Ch. Agalarov, I. A. Eliseikina

Institute of Protein Research,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region

Summary

A method is suggested to isolate ribosomal protein TS9 from 30S subparticles of ribosomes from extremal-thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. Rhomb-shaped crystals of this protein with maximal dimensions of 0.5 mm have been obtained. A method of vapour diffusion in a «hanging» drop with 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) as a precipitant has been used for crystallization.

УДК 577.323

Ю. С. Бабаян

СВЯЗЫВАНИЕ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С ПОЛИРИБОГУАНИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

Исследовано связывание бромистого этидия (БЭ) с полирибогуаниловой кислотой по характеру изменения спектров поглощения. Расчеты показали, что стехиометрия насыщения составляет одну молекулу БЭ на пять гуанинов с константой связывания $(5,2 \pm \pm 0,8) \cdot 10^4 M^{-1}$ при $0,1 M NaCl$ и комнатной температуре.

Введение. Взаимодействие бромистого этидия (БЭ) с нуклеиновыми кислотами исследовано довольно хорошо [1—6]. В частности, было показано, что в физиологических условиях взаимодействие носит интеркалирующий характер [1—3], причем стехиометрия насыщения составляет одну молекулу БЭ на две пары оснований [1, 2, 4, 6]. Характер связывания слабо зависит от GC-содержания для ДНК [1] и очень сильно — для двуспиральных РНК [6].

Структура поли(G) в растворе исследована недостаточно. Следует отметить, что в отличие от других гомополимеров поли(G) не находится в одноцепочечной форме [1, 7]. Точная структура поли(G) до конца не установлена. Известно, однако, что молекулы поли(G) могут образовывать как двуспиральные, так и четырехспиральные структуры [7].

В данной работе изучено взаимодействие БЭ с поли(G) и определены термодинамические параметры связывания.

Материалы и методы. В работе использован поли(G) («Pharmacia», Швеция), БЭ («Sigma», США), NaCl и трис («Serva», ФРГ). Поли(G) применяли без дополнительной очистки. Концентрацию использованных соединений определяли с помощью следующих коэффициентов экстинкции: поли(G) — $\epsilon_{260}(p) = 9900 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ и БЭ —

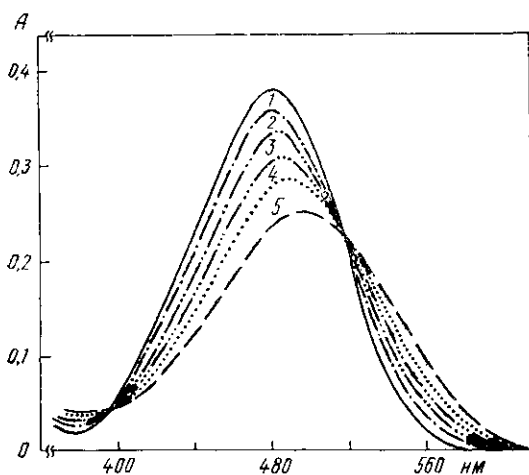


Рис. 1. Изменение спектров поглощения БЭ при связывании с поли(G) в буфере при комнатной температуре. Концентрация поли(G) в растворе составляла: $C_p = 8,65 \cdot 10^{-5}$ (1); $2,3 \cdot 10^{-4}$ (2); $4,1 \cdot 10^{-4}$ (3); $6,1 \cdot 10^{-4}$ (4) и $1,2 \cdot 10^{-3}$ М (5). В процессе титрования концентрация БЭ остается постоянной ($C_0 = 1,4 \cdot 10^{-4}$ М). Сплошная линия — спектр поглощения БЭ в отсутствие поли(G)

Fig. 1. The change in absorption spectra of ethidium bromide bound to poly(G) in the buffer at room temperature. The concentration of poly(G) in the solution equals: $8,65 \cdot 10^{-5}$ (1), $2,3 \cdot 10^{-4}$ (2), $4,1 \cdot 10^{-4}$ М/р (3). In the process of titration the ethidium bromide concentration remains constant ($C_0 = 1,4 \cdot 10^{-4}$ М). A continuous line — an absorption spectrum of ethidium bromide without poly(G)

$\epsilon_{480} = 5850$. Взаимодействие поли(G) с БЭ исследовали в буфере, содержащем 0,1 М NaCl, 0,01 М трис, pH 7,5, при комнатной температуре.

Спектры поглощения получены на спектрофотометре «Сагу-219» (США). Концентрация БЭ при титровании оставалась постоянной ($C_0 \approx 10^{-4}$ М). Молекулы БЭ в растворе могут образовывать димеры, тримеры и т. д. Исследуя связывание БЭ с поли(G), необходимо работать с такими его концентрациями, при которых можно пренебречь процессом димеризации. Учитывая максимальную концентрацию БЭ в данной работе ($C_0 = 1,5 \cdot 10^{-4}$ М), можно определить концентрацию мономеров в растворе, зная, что константа димеризации при 0,1 М NaCl и 25 °С равна $K_D = 70 \text{ M}^{-1}$ [2]. Процесс димеризации характеризуется уравнением $2C_M \rightleftharpoons C_D$ или $C_D = K_D C_M^2$, где C_M и C_D — концентрации мономеров и димеров соответственно. С другой стороны,

$$C_0 = C_M + 2C_D \quad \text{или} \quad C_0 = C_M + 2K_D C_M^2 \quad (1)$$

Подставляя в уравнение (1) значения C_0 и K_D , получаем, что $C_M = 1,47 \cdot 10^{-4}$ М. Следовательно, всего 0,2 % всех молекул БЭ образуют димеры и поэтому в условиях данного эксперимента процессом димеризации вполне можно пренебречь.

Результаты и обсуждение. Взаимодействие БЭ с поли(G) исследовали по характеру изменения спектров поглощения БЭ в видимой области спектра при связывании с поли(G). На рис. 1 показаны спектры поглощения свободного БЭ и в комплексе с поли(G). Как следует из рисунка, при постоянной концентрации БЭ с увеличением содержания поли(G) в растворе наблюдается гипохромизм и смещение максимума поглощения (при 480 нм) в длинноволновую область. При этом появляются две четко выраженные изобестические точки при 396 и 518 нм, расположение которых не меняется с увеличением концентрации по-

ли(G). Следовательно, в данных условиях образуется лишь одна спектрофотометрическая форма поли(G)-связанного БЭ. При некоторых значениях C_p/C_0 , где C_p — молярная концентрация фосфатов поли(G), C_0 — молярная концентрация БЭ в растворе, дальнейшее изменение спектров поглощения прекращается — все молекулы БЭ находятся в связанном состоянии. Из спектров поглощения (рис. 1) построена зависимость поглощения при 480 нм (A_{480}) от концентрации поли(G) (рис. 2). Для сравнения на рис. 2 приведена также указанная зависимость при связывании БЭ с двуспиральным синтетическим полирибонуклеотидом поли(G)·поли(C), который рассмотрен в работе [6]. Как следует из этого рисунка, связывание БЭ гораздо сильнее с поли(G), чем с поли(G)·поли(C), причем если для комплексов с относительной

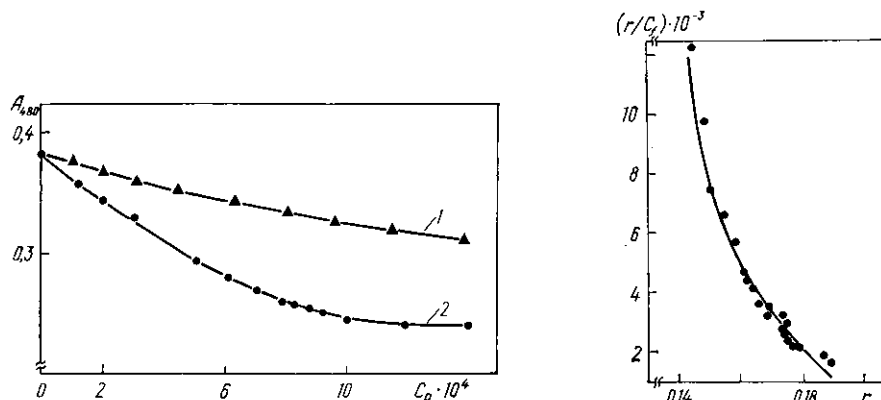


Рис. 2. Характер изменения поглощения БЭ при 480 нм при связывании с поли(G)·поли(C) (1) и поли(G) (2) в буфере при комнатной температуре

Fig. 2. The pattern of changes in ethidium bromide absorption at 480 nm, at binding to poly(G)·poly(C) (1) and poly(G) (2) in the buffer at room temperature

Рис. 3. Изотерма связывания, построенная с помощью спектрофотометрического титрования БЭ с поли(G) в буфере при комнатной температуре

Fig. 3. Binding isotherm plotted by spectrophotometric titration of ethidium bromide with poly(G) in the buffer at room temperature

концентрацией $C_p/C_0 \approx 10$ БЭ находится в практически полностью связанном состоянии для поли(G), то этого не наблюдается для поли(G) × поли(C).

Для расчета константы связывания и стехиометрии комплекса поли(G)·БЭ при насыщении из кривых спектрофотометрического титрования (рис. 1) определяли концентрации свободного (C_f) и связанного (C_b) БЭ по формуле (2) и анализировали изотермы адсорбции в координатах Скэтчарда (зависимость r/C_f от r)

$$C_f = \frac{A - A_\infty}{A_0 - A_\infty} \cdot C_0 \quad \text{и} \quad C_b = C_0 - C_f, \quad (2)$$

где A_0 и A_∞ — поглощение БЭ при 480 нм свободного и связанного с поли(G), A — поглощение при промежуточных концентрациях БЭ. A_∞ определяли линейной экстраполяцией зависимости A от $1/C_p$ при $1/C_p \rightarrow 0$.

Как следует из рис. 3, связывание БЭ с поли(G) характеризуется нелинейной изотермой адсорбции, которая хорошо описывается теоретической зависимостью (3) для некооперативного связывания лигандов на гомополимере [8, 9]:

$$r/C_f = K(1 - nr) \left[\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{n-1}, \quad (3)$$

где $r = C_b/C_p$, K — константа связывания БЭ с поли(G), n — параметр,

характеризующий стехиометрию комплекса поли(G)·БЭ при насыщении и равный числу оснований полимера, занимаемых одной связанной молекулой БЭ. Расчеты, проведенные согласно уравнению (3), показали, что при 25 °С $K = (5,2 \pm 0,8) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $n = 5$, т. е. одна молекула БЭ при насыщении связывается с пятью азотистыми основаниями. Для сравнения отметим, что стехиометрия насыщения комплекса БЭ с комплементарными двуспиральными нуклеиновыми кислотами составляет $n = 4$. Как было показано в работе [6], для связывания БЭ с поли(G)·поли(C) в аналогичных условиях получено значение $K = (0,8 \pm 0,2) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, что приблизительно на порядок меньше значения, полученного для комплексов поли(G)·БЭ. Зная константу связывания, можно определить изменение свободной энергии Гиббса (ΔG) при связывании по формуле (4):

$$\Delta G = -RT \ln K, \quad (4)$$

что составляет $\Delta G = -(6,5 \pm 0,2)$ ккал/моль. Отметим, что при связывании БЭ с двуспиральным поли(G)·поли(C) для изменения свободной энергии в работе [6] получено значение $-(4,0 \pm 0,3)$ ккал/моль.

Следовательно, параметры, характеризующие связывание БЭ с молекулами поли(G), отличаются от таковых для комплексов БЭ с двуспиральным полирибонуклеотидом поли(G)·поли(C). Эти отличия, должно быть, обусловлены особенностью организации вторичной структуры поли(G) в растворе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия.— М.: Мир, 1985.— Т. 3.— 534 с.
2. Nelson J. W., Tinoco I., Jr. Intercalation of ethidium ion into DNA and RNA oligonucleotides // *Biopolymers*.— 1984.— 23, N 2.— P. 213—233.
3. Aktipis S., Kindelis A. Optical properties of the deoxyribonucleic acid—ethidium bromide complex. Effect of salt // *Biochemistry*.— 1973.— 12, N 6.— P. 1213—1221.
4. Bresloff J. L., Crothers D. M. Equilibrium studies of ethidium—polynucleotide interactions // *Ibid.*— 1981.— 20, N 12.— P. 3547—3553.
5. Waring M. J. DNA modification and cancer // *Annu. Rev. Biochem.*— 1981.— 50.— P. 159—192.
6. Base specificity in the interaction of ethidium with synthetic polyribonucleotides / Yu. Babayan, G. Manzini, L. E. Xodo, F. Quadrifoglio // *Nucl. Acids Res.*— 1987.— 15, N 14.— P. 5803—5812.
7. Saenger W. Principles of nucleic acid structure.— New York: Springer, 1984.— 540 p.
8. Заседа́телев А. С., Гурский Г. В., Волькенштейн М. В. Теория одномерной адсорбции. 1. Адсорбция малых молекул на гомополимере // *Молекуляр. биология*.— 1971.— 5, № 2.— С. 245—252.
9. McGhee J. D., von Hippel P. H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: cooperative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice // *J. Mol. Biol.*— 1974.— 86, N 3.— P. 469—489.

Ереван. гос. ун-т

Получено 16.12.87

ETHIDIUM BROMIDE BINDING TO POLYRIBOGUANYLIC ACID

Yu. S. Babayan

State University, Department of Molecular Physics and Biophysics, Yerevan

Summary

The binding of ethidium bromide to polyriboguanylic acid has been investigated according to the character of changes in absorption spectra. The calculations have shown that the saturation stoichiometry at binding makes up one ethidium bromide molecule per 5 guanine bases with binding constant $(5.2 \pm 0.8) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ in the presence of 0.1 M NaCl and at room temperature.