

18. Hiratsuka T. Nucleotide-induced change of the interaction between the 20- and 26-kilodalton heavy-chain segments of myosin adenosine triphosphatase revealed by chemical cross // *Biochemistry*.— 1987.— 26, N 11.— P. 3168—3173.
19. Alexis M. N., Gratzner W. B. Interaction of skeletal myosin light chains with calcium ions // *Ibid.*— 1978.— 17, N 12.— P. 2319—2325.
20. Trayer J. P., Trayer H. R., Levine B. A. Evidence that the amino terminal region of A1-light chain of myosin interacts directly with the carboxyl-terminal region of actin: A PMR study // *Eur. J. Biochem.*— 1987.— 161, N 1.— P. 259—266.
21. Position of the amino-acide terminus of myosin light chain 1 and light chain 2 determined by electron microscopy with monoclonal antibody / M. Tokunaga, M. Suzuki, K. Sasaki et al. // *J. Mol. Biol.*— 1987.— 194, N 2.— P. 245—256.
22. Minou O., Matsuda S., Yagi K. Calcium-induced conformational change of 20 000 dalton light chain of vertebrate striated muscle myosin // *J. Biochem.*— 1983.— 94, N 1.— P. 25—36.
23. Waller G., Lowey S. Myosin subunit interaction: localization of the alkali light chains // *J. Biol. Chem.*— 1985.— 260, N 26.— P. 14368—14373.
24. Lu R. Ch., Moo L., Wong A. G. Both the 25-kilodalton and 50-kilodalton domains in myosin subfragment-1 are close to the reactive thiols // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1986.— 83, N 17.— P. 6392—6396.

НИИ физиологии Киев. гос. ун-та им. Т. Г. Шевченко

Получено 05.05.89

МДК 176.315.42

© В. А. Сигава, А. В. Гаврюшкин, Ю. А. Ершов, 1990

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЧНО СВЯЗАННЫХ ДНК-МЕМБРАННЫХ КОМПЛЕКСОВ В СОСТАВЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО НУКЛЕОИДА

С помощью электрофореза в свободном потоке (ЭФСП) впервые выделены из бактериальных клеток Escherichia coli комплексы ДНК с мембранными белками. Изучены изменения ДНК и белков этих комплексов после УФ-облучения клеток. Показана возможность с помощью метода ЭФСП выявлять повреждения биомолекул в составе ненарушенного нуклеопротеидного комплекса.

Введение. Комплексы ДНК с белками обеспечивают высокую степень компактности ДНК и осуществление ее важнейших функций [1]. При воздействии на клетки УФ-радиации компоненты ДНК-белкового комплекса претерпевают различные изменения. Имеются данные об увеличении количества белка, прочно связанного с ДНК в УФ-облученных клетках (УФ-сшивание ДНК с белком) [2]. Определение ДНК-белковых сшивок в настоящее время затруднено, длительные процедуры их выделения и очистки сопровождаются повреждением биомолекул и потерей их функциональной активности. При этом исследования ведутся с нуклеопротеидами (нуклеотидопептидами), далекими от своего нативного состояния в клетке, что осложняет интерпретацию этих данных в биологических экспериментах. Поиск методов определения ДНК-белковых сшивок в целой клетке или в макромолекулярном комплексе важен для изучения их биологической роли. Быстро выделить ненарушенный макромолекулярный комплекс из бактериальных клеток позволяет метод ЭФСП [3].

В данной работе впервые с помощью этого метода исследованы ДНК-белковые комплексы *E. coli*, а также изменения состава ДНК и белков этих комплексов после УФ-облучения клеток.

Материалы и методы. В работе использован бактериальный штамм *E. coli* K12 (дикий тип), полученный из коллекции микроорганизмов Ин-та биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР. Клетки выращивали в жидкой питательной среде М9 в колбах по 250 мл на качалке при 37 °С. Для того чтобы поместить ДНК в культуру через 1 ч после посева вносили ³H-тимидин (18,5 МБк) (удельная радиоактивность 0,66 ТБк/мМ). Клетки в стационарной фазе роста осаждали центрифугированием, промывали 0,02 М триэтанолламинным буфером с удельной электропроводностью

0,1 Ом⁻¹ м⁻¹ и pH 7,0 (А), ресуспендировали в том же буфере до концентрации 10⁷ клеток в 1 мл. Облучали 1 мл суспензии под лампой ДБ 30 (254 нм) при 0—2 °С в чашках Петри диаметром 11 см. Дозиметрию проводили ферриноксалитным методом [4]. Доза облучения составляла 20 Дж/м². Получение и лизис протопластов выполняли по методу [5]. Нуклеонид, связанный с мембраной, осторожно ресуспендировали в 2 М растворе NaCl и центрифугировали для удаления белков. Осадок ресуспендировали в буфере (А), 1 мл раствора вводили в камеру ЭФС. Разделение белков с помощью ЭФС осуществляли в камере прибора «Desaga FF48». Режим разделения: ток в камере 150 мА, напряжение на электродах 650 В, время нахождения образца в

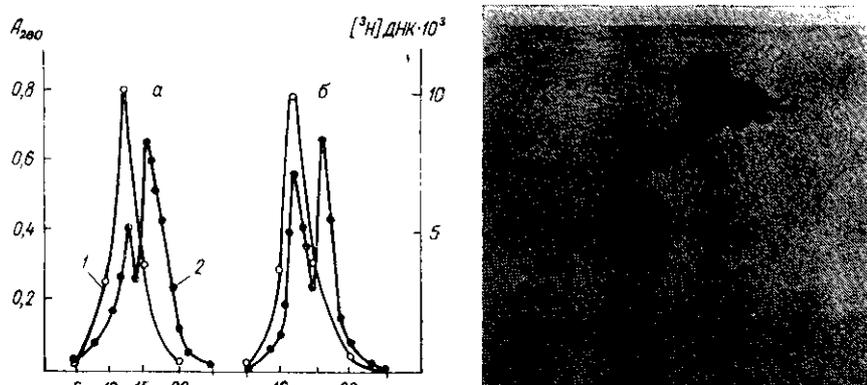


Рис. 1. Электрофоретические профили разделения ДНК и белков: а — контрольные клетки; б — УФ-облученные в дозе 20 Дж/м² (1 — ДНК, 2 — белок)

Fig. 1. Electrophoretic traces of DNA and protein separation by free flow-electrophoresis: а — control; б — after UV irradiation in dose of 20 Dg/m² (1 — DNA; 2 — protein)

Рис. 2. Электронная фотография ДНК-мембранного комплекса, выделенного с помощью ЭФС

Fig. 2. Electron microscopy of DNA-membrane complex isolated by free flow-electrophoresis

электрическом поле 170 с, температура в камере 7 °С. После электрофореза получали 48 фракций по 5—10 мл. В каждой из них определяли оптическую плотность и ³H-радиоактивность. Электронно-микроскопическое исследование проводили на приборе «Hitachi», пробы готовили по методу [6]. Точно связанный ДНК-белковый комплекс выделяли, как описано [5], и обрабатывали проназой и ДНКазой I. Проназу добавляли к препаратам, содержащим ДНК (100 мкг/мл в количестве 50 мкг/мл), инкубировали при 37 °С 20 мин, а ДНКазу I — в концентрации 0,003 мг/мл, инкубировали смесь при 37 °С 30 мин, 1, 7 и 10 ч. Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили по методу Леммли [7], электрофорез ДНК — в 0,8 %-ном агарозном геле, содержащем 0,09 М трис-боратный буфер, pH 8,3, и 2 мМ ЭДТА. ДНК выявляли, окрашивая гель бромистым этидием в концентрации 1 мкг/мл. Относительную радиоактивность ДНК регистрировали с помощью сцинтилляционного спектрометра SL-4000 («Intertechnique», Франция).

Результаты и обсуждение. Выделение и депротенизация нуклеоида. На первом этапе выделения нуклеоида клетки обрабатывали лизоцимом в концентрации 10 мкг/мл. Концентрация фермента была снижена для предотвращения адсорбции экзогенного белка на нуклеоиде [1]. Последующий мягкий лизис протопластов в присутствии неионных детергентов приводил к вскрытию протопластов и освобождению нуклеоида, который собирали на подушке 80 %-ного раствора сахарозы. После центрифугирования в средней части пробирки образовывалась опалесцирующая полоса нуклеоида, а свободные белки рибонуклеопротеида оставались в супернатанте.

К полученному нуклеоиду добавляли 2 М раствор NaCl, затем разделяли ДНК и белки с помощью ЭФС.

На электрофоретических профилях разделения белков и ДНК в камере ЭФС (рис. 1) видно, что связанные с ДНК белки обнаружива-

ются во фракциях 10—14, а диссоциированные — находятся во фракциях 15—21.

Ранее установлено, что полученные с помощью метода ЭФСР ДНК-белковые комплексы содержат белки наружной и цитоплазматической мембран [3]. Электронные фотографии ДНК-комплекса после очистки его в камере ЭФСР (рис. 2) показывают, что такой способ депротеинизации не приводит к полному разрушению нуклеоида, петли ДНК остаются ненарушенными. Кроме того, бактериальная ДНК имеет точки прикрепления к мембране. Специальные исследования природы ассоциации ДНК с мембранными белками позволяют предположить

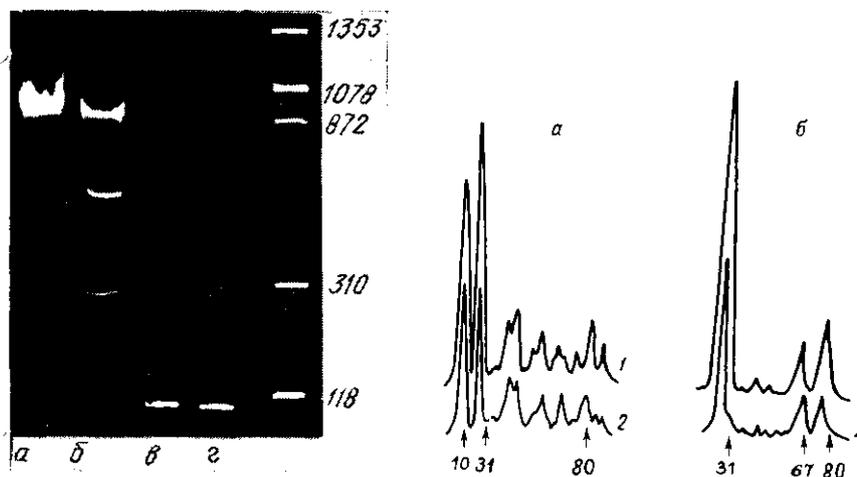


Рис. 3. Электрофоретические профили ДНК в агарозном геле: *a* — ДНК-мембранный комплекс, обработанный ДНКазой I в течение 30 мин; *б* — в течение 1 ч; *в*, *г* — 7 ч; *a* — *в* — необлученные клетки; *г* — УФ-облученные. Справа указано число пар нуклеотидов в стандартных фрагментах

Fig. 3. DNA Electrophoretic traces in agarose gel: *a* — DNA-membrane complex treated with deoxyribonuclease I for 30 min; *б* — for 60 minutes, *в*, *г* — for 7 hours, *a* — *в* — control, *г* — UV-irradiation. Right-number of nucleotide pairs in markers

Рис. 4. Денситограммы электрофоретических профилей белков нуклеопротсида, не обработанного солями с высокой ионной силой (*a*), и прочно связанных с ДНК (*б*); *1* — необлученные клетки; *2* — УФ-облученные

Fig. 4. Densitograms of protein electrophoretic profiles: *1* — proteins of DNA-membrane complex not treated with salts of high ionic strength; *2* — protein closely bounded with DNA; (*a* — cells are not treated with UV-irradiation, *б* — UV-irradiation)

существование связи ковалентного типа [8]. Для проверки данного предположения проводили дальнейшую депротеинизацию ДНК-белкового комплекса различными растворами солей с высокой ионной силой (4 М гуанидингидрохлорид, 6 М мочевины), разделение комплекса на колонке ГАП. Обработка прочно связанного ДНК-белкового комплекса проназой освобождала ДНК. Нуклеазная обработка комплекса позволила выделить белки и так называемую «якорную» ДНК, т. е. фрагменты ДНК, которые находятся в ассоциации с мембранными белками.

Электрофорез ДНК в агарозном геле проводили после дозированной и исчерпывающей обработки ДНК-мембранных комплексов ДНКазой I. В суммарном препарате ДНК, выделенной из очищенных в камере ЭФСР препаратов ДНК-мембранного комплекса, после нуклеазной обработки в течение 30 мин, 1, 7 и 10 ч обнаружен ряд фрагментов различной длины — 1000, 700, ~100 п. н. (рис. 3).

Электрофорез белков в ПААГ показал (рис. 4, *a*), что белки, не диссоциирующие в 2 М NaCl, имеют хорошо воспроизводимый профиль, гетерогенны по составу. После дополнительной депротеинизации комплекса общее количество белков значительно уменьшается, главным образом за счет высокомолекулярных белков. В прочно

связанном ДНК-белковом комплексе остаются белки с низкой молекулярной массой (рис. 4, б), преобладающим среди них является белок 31 000, обнаруженный в составе препаратов внешней мембраны. Показано, что он может связываться с ДНК, и этот комплекс не диссоциирует в присутствии DS-Na [9]. Ряд минорных компонентов с молекулярной массой 67 000, 80 000 также обнаружен ранее в составе внутренней мембраны [10]. Возможно, что эти белки образуют скелетную структуру бактериальной хромосомы, необходимую для специфической укладки и сегрегации хромосомы. На ней локализованы ферменты, обеспечивающие синтез, репликацию, транскрипцию ДНК [5].

УФ-облучение приводит к изменениям в структуре нуклеопротеида. На электрофоретических профилях разделения белков и ДНК, выделенных из УФ-облученных клеток (рис. 1), наблюдается изменение спектра распределения белков в электрофоретической камере, увеличение количества белков, находящихся в комплексе с ДНК. Дополнительная депротенизация ДНК-белкового комплекса на колонке с ГАПом приводила к диссоциации значительной части белков, однако 1—2 % их оставались связанными с ДНК. В УФ-облученных клетках количество таких белков было в 1,5—2 раза больше по сравнению с контролем. Это согласуется с полученными ранее данными об УФ-индуцированном сшивании ДНК с белком [2]. В электрофоретических профилях белков в ПААГ (рис. 4, б) заметно увеличение количества белков с молекулярной массой 31 000, 80 000. Молекулярная масса «якорной» ДНК, выделенной из УФ-облученных клеток, как и в контрольных клетках, соответствует фрагментам, имеющим длину ~100 п. н. (рис. 3, д). Увеличение количества прочно связанного с ДНК белка, возникающее в результате УФ-облучения, может привести к нарушению ДНК-белковых взаимодействий и важнейших функций ДНК.

Таким образом, применение различных методов позволило исследовать прочно связанные комплексы ДНК с мембранными белками. После УФ-облучения клеток не отмечено изменений длины фрагментов ДНК, прилегающих к мембране, не обнаружено появления качественно новых белков, однако количество этих белков увеличивается, главным образом за счет низкомолекулярных полипептидов, играющих важную роль в стабилизации и функционировании ДНК. УФ-индуцированное сшивание ДНК с этими белками может быть обнаружено в ненарушенном нуклеопротеиде с помощью метода ЭФСП по увеличению электропотенциала мембранных белков, связанных с ДНК.

INVESTIGATION OF CLOSELY BOUNDED DNA-MEMBRANE COMPLEXES IN THE BACTERIAL NUCLEOID COMPOSITION

V. A. Sigaeva, A. V. Gavryushkin, Yu. A. Ershov

All-Union Research Institute of Applied Microbiology,
Obolensk, Moscow Region

Summary

DNA-membrane complexes from *E. coli* were isolated by free-flow electrophoresis. The changes in their structure after UV-irradiation were investigated. It was shown that free-flow electrophoresis can detect biomolecule damages in DNA-protein complex.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакаев В. В. Структура хромосомных ДНП. XI. Об организации ДНП комплекса в бактериальной клетке // Молекуляр. биология.— 1981.— 15, № 6.— С. 1350—1363.
2. Smith V. C., Hamlin C. DNA synthesis kinetics, cell division delay and post-replication repair after uv irradiation of frozen cells of *E. coli* B/r // Photochem. and Photobiol.— 1977.— 25, N 1.— P. 27—29.
3. Heidrich H. G., Olsen W. L. Desoxyribonucleic acid-envelope complexes from *E. coli* // J. Cell Biol.— 1975.— 65, N 2.— P. 444—460.
4. Parker C. A., Hatchard C. G. A new sensitive chemical actinometer // Proc. Roy. Soc. A.— 1956 — 235, N 6.— P. 518—536.

5. Прочно связанные с ДНК белки в составе нуклеоида *E. coli* / А. И. Газиев, Л. А. Фоменко, Д. Г. Закржевская, В. А. Сигаева // Биохимия.— 1985.— 50, № 5.— С. 814—816.
6. Kleinschmidt A. K. Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules // Meth. Enzymol.— 1968.— 12.— P. 361—379.
7. Laemmli H. K. Cleavage of structure DNA *E. coli* // Nature.— 1970.— 227, N 5259.— P. 680—682.
8. Berezny R. Dynamic properties of the nuclear matrix // The cell nucleus / Ed. H. Busch — New York: Acad. press, 1979.— V. 7.— P. 413—456.
9. Wolf-Wotz H., Norquist A. H. Deoxyribonucleic acid and outer membrane; binding to outer membrane involves a specific protein // J. Bacteriol.— 1979.— 140, N 1.— P. 43—49.
10. Nicolaidas A. A., Rolland I. B. Evidens for specific of chromosomal origin with outer membrane fraction isolated from *E. coli* // J. Bacteriol.— 1978.— 135, N 1.— P. 178—189.

ВНИИ прикл. микробиологии, Серпухов Моск. обл.

Получено 30.08.88

УДК 577.214.3

© Л. Я. Денисова, С. Н. Загребельный, Н. М. Пустошилова,
А. Г. Веняминова, В. В. Горн, В. Ф. Зарытова, М. Н. Репкова, 1990

ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ РИБООЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ЗАДАННОГО СТРОЕНИЯ ПУТЕМ ТРАНСКРИПЦИИ ДЕЗОКСИРИБООЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Транскрипция дезоксирибоолигонуклеотидных матриц в системе РНК-полимеразы *Escherichia coli* является одним из перспективных методов получения рибоолигонуклеотидов заданного строения. Для получения препаративных количеств AGGGGAUUGAA-LAUC-фрагмента антикодонной петли фенилаланиновой тРНК и AUGAGGAAUACCC-AUG-фрагмента РНК фага MS2 проведена транскрипция комплементарных дезоксирибоолигонуклеотидов. Уровень включения нуклеотидов в продукт транскрипции при этом составил не менее 70 % нуклеотидного материала матрицы.

Разработана процедура извлечения транскрипта из реакционной смеси, включающая хроматографию на гепарин-агарозе, хроматографию на гидрофобном сорбенте Lichroprep RP18 и электрофорез в 20 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей электроэлюцией целевого продукта из геля. При использовании в РНК-полимеразной реакции 5 о. е. A₂₆₀ дезоксирибоматрицы конечный выход точной РНК-копии составил 1,0—1,5 о. е. A₂₆₀.

Введение. В настоящее время олигорибонуклеотиды приобретают огромное значение как инструменты в молекулярно-биологических исследованиях при изучении структуры и функции РНК. Однако эти исследования развиваются недостаточно эффективно, и одна из основных причин сложившейся ситуации — сложность методов синтеза достаточно протяженных олигорибонуклеотидов. Несмотря на значительный прогресс в области автоматизации синтеза олигорибонуклеотидов в последние годы, химический синтез олигорибонуклеотидов все еще остается трудоемким процессом. При использовании РНК-лигазы удалось синтезировать полирибонуклеотиды длиной до 20—70 звеньев, однако эффективность этого метода крайне низка.

Ранее при изучении функциональных свойств ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* мы обнаружили, что этот фермент достаточно эффективно транскрибирует однонитчатые дезоксирибоолигонуклеотиды как выделенные из природных источников, так и полученные синтетическим путем [1—4]. Это послужило основанием считать транскрипцию дезоксирибоматриц одним из эффективных методов синтеза рибоолигонуклеотидов заданного строения. Последнему способствует и то обстоятельство, что синтез дезоксирибоолиго- и полинуклеотидов в настоящее время является практически решенной задачей.

В предлагаемой работе представлены данные по препаративному синтезу рибоолигонуклеотида длиной 15 звеньев —