

3. Юсупов М. М., Спиринов А. С. Исследование поверхности рибосом и рибосомных субчастиц *E. coli* методом тритиевой бомбардировки // Биохимия. — 1986. — 51, № 11. — С. 1858—1867.
4. Гогия З. В., Юсупов М. М., Спирина Т. Н. Структура рибосом *Thermus thermophilus*. Метод выделения и очистки рибосом // Молекуляр. биология. — 1986. — 20, № 2. — С. 519—526.
5. Purification of the 30S ribosomal proteins // S. J. S. Hardy, G. G. Kurland, P. Voynow et al. // Biochemistry. — 1969. — 8, N 7. — P. 2897—2905.
6. Kanny J. W., Lambert J. M., Traut R. R. Cross-linking of ribosomes using 2-iminothiolane and identification of cross-linked proteins by diagonal polyacrylamide/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis // Meth. Enzymol. — 1979. — 59. — P. 539—650.
7. Crystallization of 70S ribosomes and 30S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus* / C. D. Trakhanov, M. M. Yusupov, S. Ch. Agalarov et al. // FEBS Lett. — 1987. — 220, N 2 — P. 319—322.
8. Yusupov M. M., Spirin A. S. Are there proteins between ribosomal subunits? // Ibid. — 1986. — 197, N 2. — P. 229—233.

Ин-т белка АН СССР, Пущино
Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 21.08.89

УДК 577.112.4:577.113.4

© Т. И. Головина, В. М. Солошенко, М. Г. Безруков, 1990

РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КОМПОНЕНТОВ БИОМАССЫ ДРОЖЖЕЙ. 1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛУТЕЛИНОВОЙ ФРАКЦИИ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КОМПОНЕНТОВ

В работе рассмотрены основные способы денуклеинизации биомассы дрожжей: гидролиз эндонуклеазами, взаимодействие с хаотропными солями, кислотная обработка. Показано, что при взаимодействии белков и нуклеиновых кислот определяющую роль играют гидрофобные взаимодействия. Для предотвращения соосаждения в изоэлектрической точке белков и нуклеиновых кислот последние должны быть гидролизованы до олигонуклеотидов с молекулярной массой около 800 и переведены в гидрофильное состояние, возможно, за счет отщепления гидрофобных оснований. Показано, что оптимальным способом достижения этого результата является кислотная обработка.

Введение. Биомасса микроорганизмов обычно содержит от 6 до 15 % нуклеиновых кислот. Белковые продукты пищевого назначения, полученные из микробной биомассы, согласно требованиям ФАО-ВОЗ, должны содержать не более 2 % нуклеиновых кислот [1]. Поэтому стадия разделения белков и нуклеиновых кислот имеет определяющее значение.

Принципиально возможным способом разделения таких компонентов является их фазовое распределение. Так, белки типа глобулинов и глютелинов могут быть переведены в твердую фазу путем изоэлектрического осаждения, а нуклеиновые кислоты оставлены в растворе, если они предварительно подвергнуты ферментативному или химическому гидролизу [2, 3], а также при наличии в системе хаотропных солей [4].

Настоящая работа посвящена исследованию механизмов взаимодействия глютелиновой фракции белков и нуклеиновых кислот в процессе выделения из биомассы микроорганизмов.

Материалы и методы. Работу проводили с пассивной биомассой пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, имеющей состав (%): белок — 48, нуклеиновые кислоты — 8, липиды — 10, углеводы — 20.

Для выделения внутриклеточных компонентов 10 %-ную суспензию биомассы дрожжей дезинтегрировали на баллистическом дезинтеграторе МЛ-1 (СКБ БП АН СССР, Пущино), рН дезинтегрированной биомассы доводили до нужного значения 1 н. HCl или NaOH, суспензию выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин и отделяли осадок центрифугированием. Экстракты являлись объектом дальнейшего исследования.

В качестве модельных веществ использовали казеин по Гаммерстену производства НПО «Биолар» (СССР) и препарат РНК из дрожжей рода *Torula* производства фирмы «Sigma» (США), содержащий 90 % нуклеиновых кислот, 4 % белка и 6 % солей.

Модельные системы получали следующим образом: навеску белка (10 г) или препарат РНК (1 г) суспендировали в 100 г воды, доводили рН до нужного значения, выдерживали при комнатной температуре в течение 60 мин, отделяли нерастворимую часть последовательным центрифугированием и фильтрацией на микрофильтре с диаметром пор 0,45 мкм фирмы «Sartorius» (ФРГ).

Изоэлектрическую точку полученных систем определяли методом нефелометрии [9].

Молекулярную массу (м. м.) определяли методом гель-фильтрации на калиброванных колонках с сефадексами G-50 (размером 12×810 мм при скорости элюции 1,3 мл/мин) и G-200 (размером 12×780 мм при скорости элюции 0,25 мл/мин). В качестве элюэнта использовали 0,09 М раствор NaCl, рН 8,0. Эфлюэнт анализировали при 280 нм на анализаторе типа «Fracto-scan» (США).

Разделение компонентов по гидрофобности проводили методом ВЭЖХ на хроматографе типа «Laboratorne pristroj» (СССР) с колонками, наполненными гидрофобным носителем «Сепарон С-18». Скорость элюции 0,2 мл/мин. В качестве элюэнта использовали 25 %-ный водный раствор изопропилового спирта.

Белок определяли микрометодом Кьельдаля [6]; нуклеиновые кислоты — по методу Спирина [7].

Результаты и обсуждение. Исследована степень экстрагируемости белка и нуклеиновых кислот из биомассы дрожжей, подвергнутой меха-

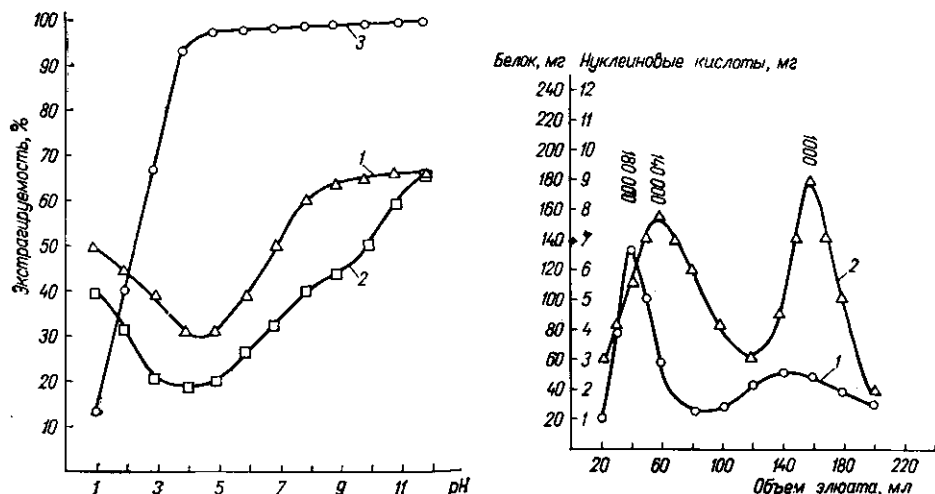


Рис. 1. Профили экстрагируемости белка (1), нуклеиновых кислот (2) из дезинтеграта дрожжевой биомассы и профиль растворимости препарата РНК (3)

Fig. 1. Profiles of extraction of protein (1), nucleic acids (2) from yeast biomass and profile of solvability of RNA preparation (3)

Рис. 2. Хроматограмма белков (1) и нуклеиновых кислот (2), содержащихся в экстракте внутриклеточных компонентов, полученном при рН 8,0 из дезинтеграта биомассы

Fig. 2. Chromatogram of proteins (1) and nucleic acids (2) contained in the extract of intracellular components and produced at рН 8.0 from yeast biomass

нической дезинтеграции. Данные рис. 1 показывают, что как белок, так и нуклеиновые кислоты имеют минимальную степень экстракции в интервале рН 3—5.

На рис. 2 представлены хроматограммы белка и нуклеиновых кислот в дрожжевом экстракте, из которых следует, что оба типа компонентов содержат фракции с м. м. 140 000—180 000 и 1 000.

При доведении рН экстракта от величины 8,0 до 4,5 из него выпадает осадок глутелиновой фракции белка и все высокомолекулярные

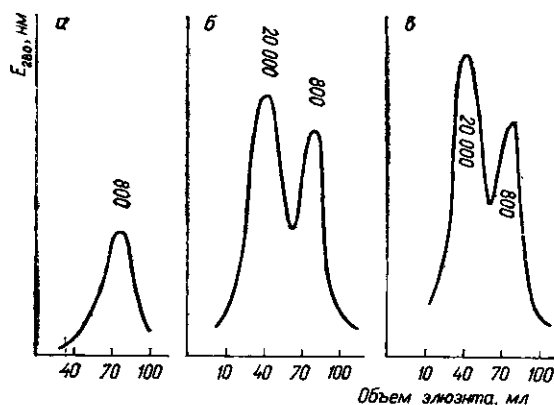
нуклеиновые кислоты. В растворе остаются только компоненты нуклеиновой природы с м. м. 1 000.

Из рис. 1 видно, что профиль экстрагируемости нуклеиновых кислот из дрожжевой биомассы принципиально отличается от профиля растворимости препарата РНК («Sigma»). Последний плохо растворим в сильнокислых условиях при pH 1—3, а в интервале pH 4—12 его растворимость возрастает до 100 %.

На рис. 3 представлены хроматограммы растворов препарата РНК («Sigma»), полученных при различных pH, свидетельствующие о том, что при pH 1,0 в раствор переходят только олигонуклеотиды с м. м. около 800. Это соответствует ди- и/или тринуклеотидам. При pH 3,7 и 8,0 в раствор переходят как олигонуклеотиды, так и нуклеиновые кислоты с м. м. 20 000.

Рис. 3. Хроматограммы водных растворов препарата РНК («Sigma») при pH: а—1,0; б—3,7; в—8,0 (колодки с сефадексами G-50 размером 12×810 мм)

Fig. 3. Chromatograms of aqueous solutions of RNA preparation («Sigma») at pH: а—1,0; б—3,7; в—8,0 (columns with Sephadex G-50 with size of 12×810 mm)



Различия в растворимости высокоочищенного препарата РНК и экстрагируемости нуклеиновых кислот из дрожжей могут быть связаны с тем, что в последнем случае нуклеиновые кислоты переходят в раствор в виде комплекса с белком, а при pH, соответствующем изоэлектрической точке глутелиновой фракции белка, сосаждаются с ней.

Для выяснения механизма образования комплекса мы исследовали модельную систему, включающую казеин (типичный глутелин) и РНК («Sigma»). Раствор казеина с pH 8,0 смешивали с растворами препарата РНК, полученными при pH 1,0 и 8,0. По методу [9] определили изоэлектрическую точку системы. После установления pH изоэлектрической точки отделяли осадок и оценивали количественное содержание нуклеиновых кислот в жидкой фазе и их молекулярно-массовое распределение.

Из данных таблицы видно, что нуклеиновые кислоты, растворимые при pH 1,0, с казеином не сосаждаются, тогда как из раствора, полученного при pH 8,0, с белком сосаждается около 80 % РНК. При этом белково-нуклеотидный копреципитат выпадает в осадок при pH 3,7, что значительно ниже изоэлектрической точки казеина (pH 4,5).

Влияние солей и мочевины на сосаждение казеина и РНК («Sigma») при pH 3,7

The influence of the salts on the coprecipitation of the proteins and nucleic components with pH 3.7

Исследуемая система	Количество РНК, остающееся в надосадочной жидкости, после осаждения комплекса, мг		
	Общее	Фракции м. м. 20 000	Фракции м. м. 800
Раствор РНК без казеина	850	510	340
Раствор РНК с казеином	170	—	170
Раствор РНК с казеином в присутствии 0,5 М NaCl	178,5	—	178,5
Раствор РНК с казеином в присутствии 0,5 М Na ₂ HPO ₄	275,4	91,8	183,6
Раствор РНК с казеином в присутствии 8 М мочевины	459	255	204

Аналогичное снижение рН изоэлектрической точки было отмечено нами ранее в работе [10] для концентратов дрожжевого белка с различным содержанием нуклеиновых кислот. Полученный результат можно объяснить увеличением суммарного отрицательного заряда при комплексообразовании белковой молекулы с рибонуклеиновой кислотой.

В настоящее время большинство исследователей считают, что гидролиз нуклеиновых кислот до низкомолекулярных олигомеров является достаточным для предотвращения их соосаждения с глутелиновой фракцией белка [2—4]. Исходя из полученных данных можно было бы

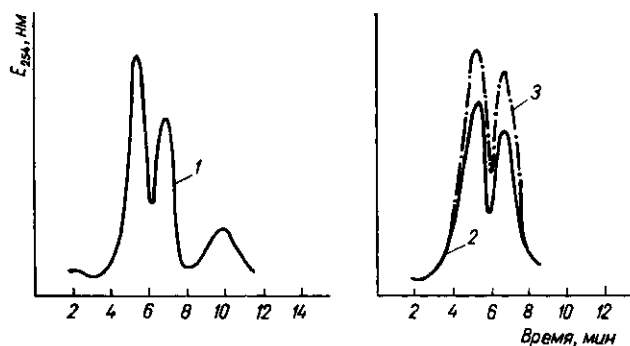


Рис. 4. Хроматограмма олигонуклеотидов с м.м. 800, выделенных из препарата РНК («Sigma»), полученная на хроматографе типа «Laboratorne pristroj» (ЧССР) с колонками, наполненными гидрофобным носителем «Сепарон С-18»: 1, 2 — растворимые при рН 8,0 и 1,0 соответственно; 3 — после обработки при рН 1,0 (70 °С) в течение 1 ч

Fig. 4. Chromatogram of oligonucleotides with m.w. 800 extracted from RNA preparation («Sigma») obtained on «Laboratorne pristroj» chromatograph (CzSR) with columns filled with hydrophobic carrier «Сепарон С-18»: 1, 2 — soluble at рН 8.0 and 1.0, respectively; 3 — after treatment with рН 1.0 (70 °С) for 1 h

предположить, что величина, м. м. 800—1 000 (ди- и/или тринуклеотиды) является тем критическим значением, ниже которого нуклеиновые компоненты перестают соосаждаться с белком.

Однако мы установили, что из щелочного раствора с рН 8,0 препарата РНК («Sigma») с казеином соосаждается не только высокомолекулярная РНК, но и часть олигонуклеотидов с м. м. 800 (таблица).

Эти результаты позволяют предположить, что степень гидролиза не является единственным фактором, обуславливающим способность нуклеиновых компонентов соосаждаться с белком.

Многие авторы полагают, что образование нуклеопротеидных комплексов обусловлено электростатическими взаимодействиями аминокислотных групп белков и фосфатных групп нуклеиновых кислот [11].

С другой стороны, существует ряд работ, показывающих преобладающее значение гидрофобных связей при белково-нуклеотидном взаимодействии [8, 12]. Это подтверждается возможностью разрушения образующихся комплексов с помощью органических и неорганических агентов, изменяющих структуру воды, в частности хаотропных солей [4].

Мы исследовали процессы соосаждения казеина и РНК («Sigma») в присутствии NaCl (нейтральная соль), Na₂HPO₄ (хаотропная соль) и мочевины (модификатор гидрофобных взаимодействий).

Эксперимент осуществляли следующим образом. Растворы казеина и РНК, имеющие рН 8,0 и содержащие один из указанных компонентов, смешивали и доводили рН до изоэлектрической точки. Осадок отделяли и в надосадочной жидкости определяли содержание нуклеиновых кислот. Далее надосадочную жидкость подвергали гелевой фильтрации на колонке с сефадексом G-50 и определяли содержание фракций РНК с м. м. 20 000 и 800.

Из таблицы видно, что наименьшее количество РНК соосаждается с казеином в присутствии мочевины. Фосфат натрия обладает более слабым диссоциирующим воздействием, а NaCl практически не влияет на соосаждение белка и нуклеиновых кислот.

Полученные данные подтверждают предположение о существенном вкладе гидрофобных связей в образование нуклеопротеидных комплексов.

Интересно отметить, что в присутствии NaCl с казеином полностью соосаждается фракция РНК с м. м. 20 000 и 50 % фракции с м. м. 800.

В присутствии фосфатов или мочевины с казеином соосаждается только 80 % высокомолекулярной фракции РНК и около 40 % низкомолекулярной.

Мы предположили, что осаждающаяся и неосаждающаяся с казеином низкомолекулярные фракции РНК различаются по гидрофобности. Для подтверждения этого был использован метод ВЭЖХ. Растворы РНК («Sigma») с рН 1,0 и 8,0 были пропущены через колонку с сефадексом G-50, отобраны фракции олигонуклеотидов с м. м. 800 и подвергнуты хроматографии на носителе «Сепарон С-18».

Олигонуклеотиды, растворимые при рН 8,0, по гидрофобности делятся на три фракции по времени удерживания: 324, 408 и 588 с (рис. 4). Олигонуклеотиды, растворимые при рН 1,0, а также остающиеся в растворе после осаждения казеина, содержат только две фракции с временем удерживания 324 и 408 с. Наиболее гидрофобная фракция с временем удерживания 588 с в этих условиях в раствор не переходит. Таким образом, в случае взаимодействия продуктов гидролиза нуклеиновых кислот с белком именно гидрофобность определяет их способность соосаждаться с белком.

Структурные особенности, обуславливающие различия в гидрофобности олигонуклеотидов, мы выяснили при кислотной обработке препарата РНК («Sigma»). После инкубации в течение 60 мин при рН 1,0 и температуре 70 °С происходит 100 %-ное растворение препарата. При этом хроматограмма раствора, полученная на сефадексе G-50, показывает наличие только олигонуклеотидов с м. м. 800 и компонентов с м. м. около 150. На «Сепароне С-18» олигонуклеотиды с м. м. 800 делятся по гидрофобности на две фракции с временем удерживания 324 и 408 с (рис. 4).

Полученные данные можно объяснить тем, что при кислотной обработке происходит не только гидролиз каркаса РНК, но и расщепление N-гликозидных связей. По литературным данным [8], в первую очередь отщепляются наиболее гидрофобные пуриновые основания, тогда как связи с более гидрофильными пиримидиновыми основаниями практически не гидролизуются.

Таким образом, можно предположить, что гидрофобные олигонуклеотиды содержат как пуриновые, так и пиримидиновые основания. Гидрофильные продукты расщепления нуклеиновых кислот, очевидно, содержат в основном пиримидиновые основания.

Это предположение согласуется с литературными данными о том, что наибольший вклад в гидрофобные взаимодействия белков и нуклеиновых кислот вносят гетероциклы пуриновых азотистых оснований.

Обобщая полученные результаты, можно сделать заключение о том, что для предотвращения соосаждения нуклеиновых кислот с глутелиновой фракцией белка необходим гидролиз их до олигонуклеотидов с м. м. 800—1 000 и перевод в гидрофильное состояние за счет отщепления пуриновых азотистых оснований.

С практической стороны мы исследовали процессы соосаждения глутелиновой фракции белка и нуклеиновых кислот из экстракта внутриклеточных компонентов дрожжей после кислотного, ферментативного гидролизом и в присутствии фосфатов.

Ферментативный гидролиз проводили за счет активации эндонуклеаз, путем инкубации дезинтеграта дрожжевой биомассы при рН 6,0 и температуре 55 °С [4]. После инкубации экстрагировали внутриклеточные компоненты при рН 8,0 и осаждали глутелиновую фракцию белка. Остаточное содержание нуклеиновых компонентов в осадке белка составило 3 %.

Для кислотного гидролиза рН экстракта внутриклеточных компонентов, полученного из дезинтеграта биомассы при рН 8,0, доводили до 1,0, экстракт инкубировали при 70 °С, после чего осаждали глутели-

новую фракцию белка в изоэлектрической точке. Остаточное содержание нуклеиновых кислот в осадке составляло 1 %.

Для диссоциации нуклеопротеидного комплекса без гидролиза нуклеиновых кислот в экстракт внутриклеточных компонентов дрожжей, полученный при pH 8,0, вносили NaH_2PO_4 до концентрации 0,5 М, выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин и осаждали глутелиновую фракцию белка. Остаточное содержание нуклеиновых кислот в осадке составляло 2,6 %.

Из полученных данных видно, что наилучшие результаты по снижению содержания нуклеиновых компонентов в препарате глобулиновой фракции белка дрожжей достигаются после кислотной обработки. Ферментативный гидролиз менее эффективен. Это, по-видимому, связано с тем, что эндонуклеазы не гидролизуют N-гликозидных связей, а химический гидролиз в слабощелочных условиях практически не происходит.

С точки зрения остаточного содержания нуклеиновых компонентов осаждение глутелиновой фракции белка в присутствии фосфатов также менее эффективно по сравнению с кислотной обработкой. Однако этот метод позволяет параллельно с глутелиновой фракцией получать высокомолекулярные нуклеиновые кислоты.

Основываясь на полученных данных, можно сделать следующие выводы:

— существенное значение при взаимодействии белков типа глутелинов и нуклеиновых кислот имеют гидрофобные связи. Взаимодействию белков и нуклеиновых кислот как высокомолекулярных, так и низкомолекулярных препятствуют хаотропные соли и мочевины;

— для предотвращения соосаждения белков и нуклеиновых кислот наиболее удобным методом является кислотная обработка, приводящая к гидролитической модификации нуклеиновых кислот с уменьшением их молекулярной массы и гидрофобности, но практически не затрагивающая белковые вещества.

SEPARATION OF PROTEINS AND NUCLEIC COMPONENTS OF THE YEAST BIOMASS. I. AN INTERACTION OF THE GLUTELIN FRACTION OF PROTEINS AND NUCLEIC COMPONENTS

T. I. Golovina, V. M. Soloshenko, M. G. Bezrukov

All-Union Research Institute Sintezbelok

Summary

Extracts of the yeast components and the model mixtures of the glutelins and nucleic acids have been investigated in the paper.

It is shown that hydrophobic bonds play a main role in the interaction between the nucleic acids and proteins. The chaotropic salts should be in the system to avoid the coprecipitation of the proteins and nucleic acids at the isoelectric point. Another way is to hydrolyze the nucleic acids to the oligonucleotides with the molecular mass of 800—1000 dalton and to transform them to the «hydrophilic» state due to separation of purine bases. The most convenient method for it is an acid treatment.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Высоцкий В. Г.* Медико-биологические проблемы пищевого белка микробиологического синтеза // Использование биомассы микроорганизмов для пищевых целей. — Пушкино: ОНТИ НЦБИ, 1985. — С. 89.
2. *А. с. 161299 ЧССР.* Способ получения нативного микробного белка с низким содержанием нуклеиновых кислот / З. Фенцл, Ф. Махек, В. Шиллингер // *Kvasny Průmysl.* — 1986. — 32, N 11. — С. 278—279.
3. *Pat. 4.133.904 США.* Способ обработки белка одноклеточных / Д. С. Стиир, Х. Л. Вильямс. — 09.01.1979.
4. *Pamodaran S., Kinsella Y. E.* The use of chaotropic salt for separation of ribonucleic acids and proteins from yeasts nucleoproteins // *Biotechnol. and Bioeng.* — 1983. — 25, N 3. — P. 761—770.

5. Альбертсон П. О. Разделение клеточных частиц и макромолекул. — М.: Мир, 1974. — 381 с.
6. Бабаян Т. Л., Безруков М. Г. Метаболиты-индукторы автолиза дрожжей // Acta biotechnol. — 1985. — 5, № 3. — С. 279—284.
7. Спириг А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. — 1958. — 23, № 5. — С. 656—662.
8. Schwenke K. D., Prahl L. Functional properties of plant proteins // Die Nahrung. — 1981. — 25, N 1. — P. 59—69.
9. Krumphanz V., Rehacek Z. Modern biotechnology. — Paris: UNESCO, 1984. — 527 p.
10. Sergeev V. A., Solosenko V. M., Bezrucov M. G. Vergleichscharakteristik von Isolaten der Gesamteiweibe der Hefe in Abhängigkeit von den Bedingungen ihrer Abscheidung // Acta Biotechnol. — 1984. — 4, N 2. — S. 105—115.
11. Шабарова З. А., Богданов А. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. — М.: Химия, 1978. — 584 с.
12. McCormick D. B. Interactions of flavins with aminoacid residues // Photochem. and Photobiol. — 1974. — 261, N 15. — P. 169—182.

ВНИИСинтезбелок, Москва

Получено 25.08.89

УДК 577.113.4

© И. А. Назаренко, Л. В. Мацкова, 1990

ВЛИЯНИЕ НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДОВ НА ОКРАШИВАНИЕ СЕРЕБРОМ В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЯХ

Описан простой и хорошо воспроизводимый метод окрашивания тРНК и гомополирибонуклеотидов серебром в денатурирующих ПААГ, чувствительность которого на три порядка превышает таковую при окрашивании этих полинуклеотидов метиленовым синим. Предложенный способ позволяет избирательно окрашивать серебром нуклеиновые кислоты в присутствии примесей белков. Исследована зависимость эффективности окрашивания полинуклеотидов и цвета образовавшихся комплексов от нуклеотидного состава. Так, поли(G) и поли(I) окрашиваются наиболее ярко, тогда как поли(U) демонстрирует негативное окрашивание.

Введение. Постоянно растущий интерес исследователей к выявлению и характеристике бесконечно малых количеств белков и полинуклеотидов определил развитие целого ряда высокочувствительных методов окрашивания этих молекул. Одним из таких методов является окрашивание белков и нуклеиновых кислот в гелях серебром. По чувствительности данный метод сравним с радиоактивным мечением биомолекул. Окрашивание белков в ПААГ серебром, изначально предложенное Мериллом и др. [1], позволяет обнаружить в DS-Na-ПААГ в 100 раз меньшее количество белка, чем обычно используемый метод окрашивания белков кумасси бриллиантовым голубым R-250. Позднее были опубликованы различные модификации метода, различающиеся по сложности выполнения, воспроизводимости и числу стадий [2—7].

Одна из модификаций метода окрашивания белков в ПААГ серебром [3] была использована рядом исследователей для окрашивания ДНК в полиакриламидных [8, 9] и агарозных [10] гелях, а также для обнаружения двуспиральной РНК [11]. Оказалось, что серебро является в 10—100 раз более эффективным реагентом для окрашивания двуспиральных нуклеиновых кислот, чем бромистый этидий.

Несмотря на многочисленные исследования в области окрашивания биополимеров серебром, механизм этой реакции до сих пор остается невыясненным. В частности, не объяснена зависимость эффективности окрашивания и цвета получаемого комплекса от аминокислотного состава белков [12—14]. Влияние нуклеотидного состава ДНК и РНК на окрашивание серебром не описано. В данной работе предложена простая, хорошо воспроизводимая и высокочувствительная процедура окрашивания серебром тРНК и полирибонуклеотидов различного состава в ПААГ, содержащих 7 М мочевины. Исследовано влия-