

В заключение отметим, что предлагаемые критерии количественной оценки активности штаммов-продуцентов биологически активных веществ и идентификации этих штаммов просты и могут быть применены как в исследовательской практике, так и в промышленности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агоя Н. С., Калуцкий Л. В. В кн.: Успехи микробиологии. 9, 59—107, М., 1972.
2. Загребя Е. Д., Эддус Я. А., Якобсон Ю. О. В кн.: Биохимические и физиологические свойства микроорганизмов 124—139. Рига, 1975.
3. Загребя Е. Д. и др. В кн.: Влияние условий культивирования на активность продуцентов. 174—180. Рига, 1980.
4. Капирян Л. С. Автореф. канд. дисс., 22. Пушкино, 1984.
5. Келешян С. К., Карапетян Ж. В., Арушанян А. В., Кочирян Ш. М. Тез. докл. III Всесоюз. совещ. по аминокислотам, 18. Ереван, 1984.

Поступило 12.VI 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 10, 807—811, 1987

УДК 577.323

РАСТВОРИМОСТЬ НУКЛЕОЗИДОВ В РАСТВОРАХ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

А. Г. ГАБРИЕЛЯН, А. Г. АРАКЕЛЯН, И. А. ГУКАСЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван

Аннотация.—Изучалась растворимость нуклеозидов при наличии и отсутствии в растворах ДНК-связывающих белков плазматической мембраны печени крысы. Особое внимание уделено белковой фракции, вызывающей значительное увеличение термостабильности и изменение формы дифференциальных кривых плавления ДНК. Величины свободной энергии переноса гуанозина, аденозина, тимидина в белковые растворы из безбелковых не превышают $\pm 200 \frac{\text{кал}}{\text{моль}}$. Перенос тимидина оказался термодинамически невыгодным. Как значения свободной энергии, так и большое различие в энтропийных и отрицательные величины энтропий переноса свидетельствуют о важной роли гидрофобных взаимодействий и о специфичности действия белка на нуклеозиды.

Անոտացիա — Առումնաբերված են նուկլեոզիդների հալմանը առանձին-անուկլեոզիդները ԳՆԲ-ի հետ կապվող սպիտակուցների ներկայությամբ և բացակայությամբ: Սպիտակուցները անուկլեոզիդները աճիկալի քրոմատոգրաֆիայի եղանակով առեկաների լյարդի պլազմատիկ մեմբրաններից: Նուկլեոզիդների անկա-
փոխման թերմոդինամիկական պարամետրերի մեմբրանների քննարկումը բերում է այն եզրակացության, որ սպիտակուցի և նուկլեոզիդների միջև գոյություն ունի հարմար յոն-ապահովում:

Տարբեր նուկլեոզիդների վրա ազդելիս սպիտակուցը հանգնում է բերում սպե-
սիֆիկության:

Abstract — The peculiarities of nucleosides hydration have been studied in the presence and absence of DNA-binding proteins from rat liver plasmatic membrane. The thermodynamic parameters of transfer of nucleosides from solutions, not containing proteins into protein — containing ones have been calculated. The results testify the important role of the hydrophobic interactions, as well as this protein specific action on the nucleosides.

Ключевые слова: нуклеозиды, мембранные белки.

Известно, что важным этапом в ряде биологических процессов является проникновение нуклеиновых кислот через мембраны прокариотических [19] и эукариотических [12, 17] клеток. Полученные к настоящему времени данные о механизме транслокации нуклеиновых кислот через мембрану касаются в основном общих характеристик этого процесса [7, 19]. Проникновение молекул ДНК в клетки и последующая экспрессия наиболее эффективны при предварительном заключении ДНК в липосомы, внутри которых ДНК защищена от нуклеаз и сохраняет свою биологическую активность [2]. Возможен и прямой путь проникновения ДНК через плазматическую мембрану в цитоплазму клетки. Участки связывания ДНК находятся на плазматической мембране клеток [17]. Природа взаимодействия с мембранами в процессе трансмембранного перехода нуклеиновых кислот не установлена. Было показано участие липидов мембран во взаимодействии ДНК — мембрана [10, 13]. При этом претерпевают изменения как ДНК [13], так и липиды [10]. Однако высокой специфичности контакта ДНК — мембрана липиды обеспечить не могут. На роль компонентов мембран, обеспечивающих стабильность, специфичность, функциональную активность контакта, предлагались мембранные РНК [9] и белки [8, 14, 19]. Изучение роли мембранных белков представляется нам важным, так как именно белки определяют специфичность каждого типа мембран. Малочисленность работ объясняется трудностями получения внутренних мембранных белков в достаточно большом количестве в чистом виде. Если и удавалось отделять их от липидов, то они теряли свою активность и нативную конформацию и агрегировали.

В последние годы пробел стал восполняться благодаря усовершенствованию методов получения «теплой» мембран, ДНК-аффинной хроматографии и гель-электрофорезу в присутствии детергентов, разрушающих агрегаты белка [14, 17, 19].

Нами выделены и расфракционированы ДНК-связывающие белки плазматической мембраны печени крысы, изучены некоторые физико-химические свойства комплексов белков с ДНК различного происхождения [3, 4]. Тотальный белок, так же как одна из его фракций, обладает дестабилизирующим действием на ДНК [4]. Другая фракция белка, вызывающая значительное увеличение термостабильности ДНК и сужение интервала плавления, была выделена с колонок нативная ДНК — целлюлоза. Изменение формы дифференциальных кривых плавления ДНК различного происхождения указывает на преимущественную стабилизацию этим белком-стабилизатором участков ДНК, богатых АТ-парами. С целью уточнения вопроса о специфичности взаимо-

действия мембранных ДНК-связывающих белков со структурными элементами нуклеиновых кислот. нами изучалась растворимость нуклеозидов при наличии и отсутствии белков плазматической мембраны печени крысы.

Материалы и методика. Плазматические мембраны из печени крыс получали согласно описанному методу [1]. ДНК-связывающие мембранные белки выделяли методом аффинной хроматографии [11] с колонок нативная ДНК гнмуса телянка—целлюлоза. Элюции связанных белков проводили буфером с 0,5 М NaCl, разрушающим образовавшиеся комплексы белка с ДНК-целлюлозой. Общую фракцию мембранных ДНК-связывающих белков фракционировали затем на колонке с сефадексом G-50 Fine и переводили в Na-фосфатный буфер (ионная сила 0,02) на микроколоночном жидкостном хроматографе «Обь». Спектры белков снимали на спектрофотометре «Spesol» M-40. Концентрацию белка-стабилизатора (0,33 мг/мл) определяли методом Лоури [16].

Растворимость нуклеозидов измеряли по описанной методике [5]. Относительную растворимость определяли как отношение растворимости нуклеозидов в растворе, содержащем белок (С), к растворимости в безбелковом растворе (C_0) при той же температуре. По температурной зависимости относительной растворимости оценивали величины свободной энергии, энтальпии и энтропии переноса нуклеозидов в белковый раствор из буфера, не содержащего белок [5].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены спектральные характеристики тотального белка (кр. 1) и белка-стабилизатора (кр. 2). Спектры сняты относительно буферного раствора. Спектр белка-стабилизатора обладает выраженным максимумом при 280 нм, свидетельствующим о большом количестве ароматических боковых групп в полипептидной цепи.

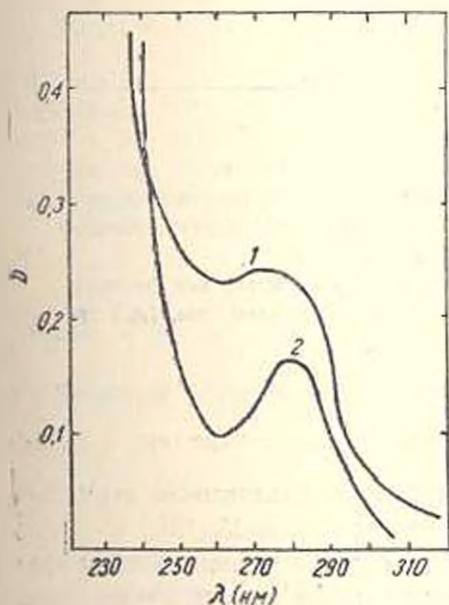


Рис. 1.

Рис. 1. Ультрафиолетовые спектры поглощения белков: 1) тотального; 2) фракции—стабилизатора.

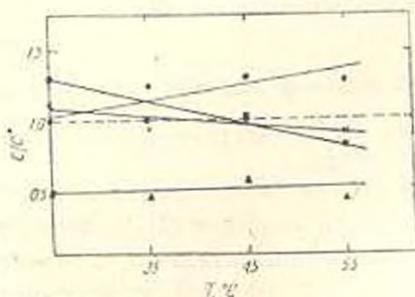


Рис. 2.

Рис. 2. Относительная растворимость нуклеозидов при наличии (С) и отсутствии (C_0) белка-стабилизатора как функция температуры для: (●) цитидина, (x) гуанозина, (■) аденозина, (▲) тимидина.

Измерялась растворимость гуанозина, аденозина, цитидина в присутствии белка и в безбелковом растворе. Как известно, такие исследования дают информацию о механизме воздействия растворителя и его составляющих на биополимеры [5, 18]. Качественно данные о растворимости нуклеозидов в присутствии тотального белка и белка-стабилизатора схожи. Поэтому мы приведем лишь данные, касающиеся интересующей нас фракции белка-стабилизатора.

Растворимость аденозина, гуанозина, цитидина в безбелковом растворе и в присутствии белка примерно одинакова (рис. 2). Точки, отвечающие величинам C/C_0 , располагаются вблизи прямой $C/C_0=1$. Исключение составляет лишь тимидин, растворимость которого в белковом растворе вдвое меньше растворимости его в буфере. С повышением температуры (от 25° до 55°) относительная растворимость аденозина и гуанозина несколько уменьшается, а цитидина и тимидина увеличивается. Но сильных температурных эффектов нет.

Вычисленные величины свободной энергии переноса (рис. 3) позволяют заключить, что перенос гуанозина, аденозина, цитидина в белко-

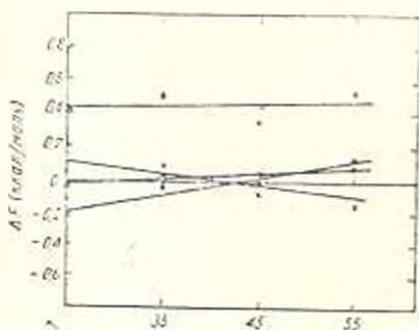


Рис. 3.

Рис. 3 Свободная энергия переноса нуклеозидов из буфера в белковый раствор в зависимости от температуры для: (●) цитидина, (x) гуанозина, (■) аденозина, (▲) тимидина.

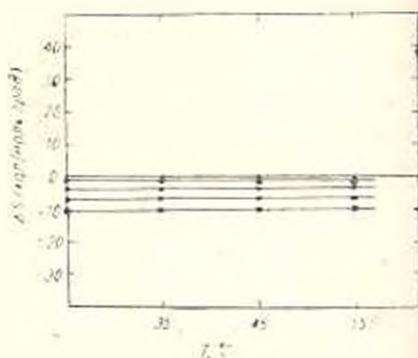


Рис. 4.

Рис. 4 Энтропия переноса нуклеозидов в белковый раствор как функция температуры для: (●) цитидина, (x) гуанозина, (■) аденозина, (▲) тимидина.

вый раствор приводит к изменению свободной энергии не более чем на $\pm 200 \frac{\text{кал}}{\text{моль}}$. Энергетическая невыгодность переноса тимидина в белко-

вый раствор коррелирует с преимущественным увеличением термостабильности участков ДНК, богатых АТ-парами [3, 6, 15, 18].

Величины энтальпии переноса, вычисленные с использованием кривых Вант-Гоффа [5], существенно различны для разных нуклеозидов. Энтропии переноса (рис. 4) имеют небольшие отрицательные значения для всех изученных соединений. Это говорит о структурировании воды, окружающей молекулы нуклеозидов, и о дегидратации растворенных веществ в присутствии белка.

Поведение термодинамических функций переноса указывает на наличие гидрофобных взаимодействий между нуклеозидами и белко-

выми молекулами. Результаты, полученные с тимидином, и значительные различия в тепловых эффектах свидетельствуют о специфичности действия белка. Это согласуется с результатами изучения плавления различных ДНК, продемонстрировавшими преимущественную стабилизацию белком областей ДНК, богатых АТ-парами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимические исследования мембран (под ред. Э. Мэдди). 49—50, М., 1979.
2. Будкер В. Г., Соколов А. В., Вайнер Л. М., Крийнев А. Г. Биол. мембраны, 4, 1, 55—66, 1987.
3. Габриелян А. Г., Аракелян А. Г., Захарян Р. А. В сб.: Конформационные изменения биополимеров в растворах. Мат-лы VI Всесоюз. симп., 145. Тбилиси, 1985.
4. Габриелян А. Г., Карагезян К. С., Захарян Р. А. В сб.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии. 10, Ереван, 1983.
5. Габриелян А. Г., Гукасян Н. А., Аракелян А. Г. Биолог. ж. Армении, 39, 4, 303—309, 1986.
6. Габриелян А. Г. Биофизика, 22, 5, 789—793, 1977.
7. Гринюс Л. Л. Транспорт макромолекул у бактерий. М., 1986.
8. Захарян Р. А., Карагезян К. С. Структура и функции белков и нуклеиновых кислот. Мат-лы VI симп. СССР—Франция, 132, Цхалтубо, 1982.
9. Сухоруков Б. И., Кувичкин В. В., Шабарчина Л. И. Биофизика, 25, 2, 270—275, 1980.
10. Шабарчина Л. И., Сухоруков Б. И., Шоинева Н. В., Коломийцева И. К. Биофизика, 20, 366, 1975.
11. Alberts B., Herrick G. Meth. Enzymol., 21D, 198—217, 1971.
12. Bhargava P. M., Shammugam G. In Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. (Davidson J. M., Cohn W. E. eds.), 11, 103—192, Acad. Press, N.—J.—London, 1971.
13. Brostus B., Riesner D., Hillen W. J. Biomol. Struct. Dynam., 1, 1535—1541, 1984.
14. Gabor G., Bennett R. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 1034—1034, 1984.
15. Hippel P. H. von., Schleich Th. In Structure and stability of biological macromolecules (ed. by Tymasheli S. N., Fasman G. D.), Marcel Dekker, N.—J., 1969.
16. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
17. Ohtbaum A., Csuzi S., Antoni F. Acta Biochem. et Biophys. Acad. Sci. Hung., 14, 3, 165—176, 1969.
18. Robinson D. K., Grant M. J. J. Biol. Chem., 241, 4030, 1966.
19. 6-th European meeting on bacterial transformation and transfection (abstracts), Lisbon, 1982.

Поступило 26.VI 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 10, № 10, 811—815, 1987

УДК 577.152.1

ВЛИЯНИЕ ИНДУКТОРА НА ФЕНОЛОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ *CORIOLUS VERSICOLOR*

З. Н. БАГДАСАРЯН, Г. С. ПЕНАЯН, А. М. МЕЖЛУМЯН, В. Г. ПАСОЯН

Армянский филиал ВНИИ ИРЕА «РЕАХРОМ», Ереван

Аннотация — Исследовано влияние ароматических аминов 2,5-ксилидина и сервокислого о-толуидина на выход индуцибельной формы медьсодержащей голубой оксидазы лакказы.

Максимальный выход фермента получается при добавлении в качестве индуктора 2,5-ксилидина с конечной концентрацией 2×10^{-4} М к 9—12-суточной культуре в стационарной фазе роста и индукции в течение трех суток при рН 5,0.

