

Для случаев $\kappa_1^{-1} = 10 \text{ \AA}^2$, $\kappa_2^{-1} = 100 \text{ \AA}^2$, $\gamma = 2 \text{ \AA}^2$, $\alpha = 50 \text{ \AA}^2$, $\epsilon_s = 2$, $\epsilon_w = 78.5$ несимметрия порядка $\approx 1.5\%$.

В заключение отметим, что при расчете энергии переноса иона из раствора в мембрану (18) следовало бы учесть вклад электростатической энергии взаимодействия центрального иона с ионной атмосферой, которая равна

$$W_d = - \frac{q_0^2 \kappa}{12 \pi \epsilon_s \epsilon_w} \quad (20)$$

Однако, как показывают оценки, этот вклад мал. Для случая $\kappa_1^{-1} = 10 \text{ \AA}^2$, $\epsilon_s = 78.5$ формула (20) дает для $W_d \approx 0.73 \text{ ккал/моль}$, что намного меньше W_m , которая при $\epsilon_s = 2$ и $\gamma = 2 \text{ \AA}^2$ равна $\approx 61 \text{ ккал/моль}$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айгян С. Х., Духин С. С., Чизмаджев Ю. А. Электрохимия, 13, 6, 779—783, 1977.
2. Neumcke B., Langer P. Biophys. J., 9, 9, 1160—1170, 1969.
3. Parsegian V. A. Ann. N. Y. Acad. Sci., 264, 161—174, 1975.

Поступило 6.XII 1989 г.

Биол. ж. Армении, № 1, (43), 1990

УДК 577.323

ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ МЕМБРАННЫХ РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ БЕЛКОВ С дсРНК

А. Г. ГАБРИЕЛЯН, К. А. БАКУНЦ, Р. А. ЗАХАРЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Методами КД-спектроскопии и термальной денатурации (тонкой структуры кривой плавления) показано образование комплекса между РНК-связывающимися белками мембранной фракции мозга крысы и дсРНК. Влияние двух главных фракций белков на ДКП дсРНК различно.

Մեթոդներով ԿԺ-սպեկտրոսկոպիայի և ջերմային բնախմբման (խոշոր կառուցվածքի) մեթոդներով ցույց է տրվել կոմպլեքսի առաջացումը առկա զլիտոդի բաղանջային ֆրակցիայի ՌՆԲ-կապող սպիտակուսների և ընթացիկ Սպիտակուսների երեւի զլիտոդ ֆրակցիաների ազդեցութունը ՌՆԲ-ի 2ԳԿ-ի վրա տարբեր է:

By CD-spectroscopy and thermal denaturation (fine structure of the melting curves) techniques it has been shown the complex formation between RNA-binding proteins of membrane fraction of the rat brain and dRNA. The influence of two main fractions of proteins on dRNA differential melting curves is different.

дсРНК—мембранные белки—кривые плавления высокого разрешения.

Двуцепочечные РНК известны как индукторы интерферона, стимуляторы первичного и вторичного иммунных ответов, модуляторы ряда био-

Сокращения дсРНК—двуцепочечные РНК; ДКП—дифференциальные кривые плавления.

химических реакции [1, 6, 7]. Взаимодействие дсРНК с плазматической мембраной клеток млекопитающих индуцирует комплекс биохимических изменений в мембране. Фактором связывания дсРНК на плазматической мембране клеток являются протенины. Однако до настоящего времени мало исследованы механизм активации мембранных фракций под воздействием дсРНК, структура и свойства дсРНК-связывающихся белков плазматической мембраны, особенности их взаимодействия с дсРНК. Целью данной работы являлось изучение взаимодействия дсРНК-связывающихся белков плазматической мембраны клеток коры больших полушарий мозга крысы с дсРНК методом тонкой структуры крины плавления.

Материал и методика. Двуспираальная РНК вирусоподобных частиц клллерных дрожжей *S. cerevisiae* (штамм М 437) с молекулярной массой $1,2-1,8 \times 10^6$ была любезно предоставлена проф. Ф. И. Еришовым (Институт эпидемиологии и иммунологии АМН СССР). Препарат дсРНК был разделен на фракции (L и M) на колонке с сефахрилом S1000 с помощью микроколоночного жидкостного хроматографа «Обь»; буфер 0,02 М трис, 0,001 М ЭДТА, 0,1 М NaCl. Непосредственно перед плавлением L дсРНК переносили в $0,1 \times \text{SSC}$ гельфильтрацией на колонке S300.

ДсРНК-связывающиеся белки из плазматических мембран клеток коры больших полушарий крысы получали салибиллизацией и присутствии тритона X-100 очищенной фракции плазматических мембран. Хроматографию белков, сорбированных на колонке дсРНК, иммобилизованной на АЭ-целлюлозе [5], проводили путем элюции в ступенчатом градиенте NaCl: 0,25; 0,5; 1 М. Затем следовали диализ, лиофилизация и хроматография на сефахриле S-300 с помощью хроматографа «Обь». Непосредственно перед плавлением растворы дсРНК и белка в $0,1 \times \text{SSC}$ смешивали в весовой пропорции 1:10.

Электрофорез в блочной модификации с маркерами был проведен в 10%-ный ПААГ.

Спектры КД получали на дихрографе Jobin III. ДКП дсРНК и комплексов с белками получали на спектрофотометре «Сар-219» с термодриставкой. Скорость нагрева $0,4^\circ/\text{мин}$. Кривые, записанные на перфоленгу, дифференцируются на ЭВМ «Искра-226» с использованием программы ДСР-К (Бейск).

Результаты и обсуждение. Электрофорез белков, элюированных с дсРНК-АЭ-целлюлозных колонок буферами с разными молярностями NaCl, показал, что с дсРНК связывается целый набор белков. Это связано, по-видимому, с тем, что дсРНК-связывающиеся белки выделены из плазматических мембран достаточно разнородной популяции клеток мозга [1]. По молекулярным массам белки располагаются в пределах от 25 до 67 тыс. дальтон. Различие в белках, элюированных солевыми растворами возрастающих ионных сил, — в их относительном количестве.

Хроматография белков на колонке S 300 с помощью хроматографа «Обь» позволила фракционировать белки не только по молекулярным массам, но и по различным спектральным свойствам. Были выделены две главные фракции белков.

Первая фракция идентифицирована электрофорезом и ПААГ как белок с молекулярной массой 56 тыс. дальтон, вторая фракция — 38 тыс. дальтон.

На рис. 1 (кр. 1) приведен спектр КД дсРНК (спектр А формы). Неаддитивное изменение спектра при смешивании с белком фракции

II (кр. 2) происходит вследствие изменения в структуре дсРНК при образовании комплекса с белком. При этом хромофорные группы белка не обладают оптической активностью при данных длинах волн (кр. 3).

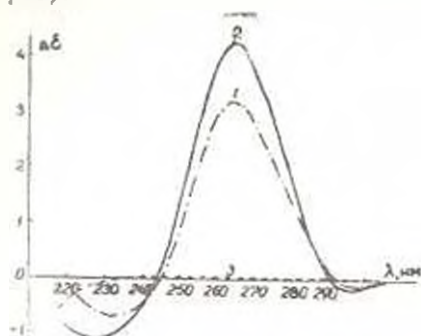


Рис. 1. Спектры КД в единицах молярного тирозина в Na-фосфатном буфере (ионная сила 0,021) суммарной дсРНК без белка (1), дсРНК в комплексе с белком II (2), белка 2 (3).

Суммарный препарат дсРНК содержит L и M формы дсРНК [2, 3] с молекулярными массами соответственно 4,5 тыс. пар и 1,8 тыс. пар нуклеотидов, причем соотношение L:M=9:1 [3]. Нами детально изучено влияние двух главных фракций белков на плавление L дсРНК, как превалирующей формы.

На рис. 2 даны ДКП L дсРНК без белка и в комплексе с белком фракции II. Как видно из рисунка, в присутствии белка происходит

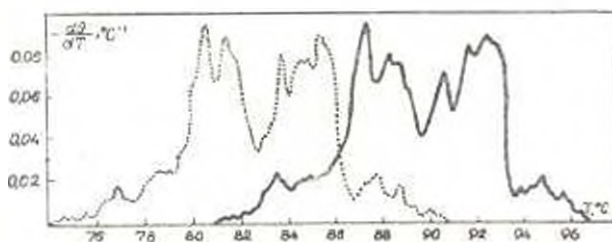


Рис. 2. Нормированная ДКП L дсРНК без белка в 0,1×SSC (пунктирная кривая) и в присутствии белка 2 (сплошная кривая).

смещение кривой плавления вправо на 7° без значительного изменения интервала плавления. Имеются и некоторые изменения формы кривой плавления, особенно пиков при 81÷81,5 и 83÷83,5°. Таким образом, белок II—фракции оказывает стабилизирующее действие на L дсРНК. В присутствии этого белка наблюдается также довольно большой гипохромный эффект, т. е. значительная степень реассоциации структуры дсРНК (и L дсРНК) при охлаждении от температур денатурации сразу начинается довольно резкое понижение поглощения.

Между тем при плавлении без белка и в присутствии белка I фракции восстановление структуры L дсРНК практически отсутствует. Результаты эти свидетельствуют о преимущественном связывании белка фракции II с двуспиральными участками L дсРНК по сравнению с одноцепочечными.

Добавление белка фракции I приводит к некоторому расширению кривой плавления и искажениям его формы. Однако сдвиг ДКП не наблюдается (рис. 3).

Таким образом, белки фракций I и II сильно различаются не только по своим спектральным характеристикам. Они образуют различные комплексы с молекулами дсРНК в растворах.

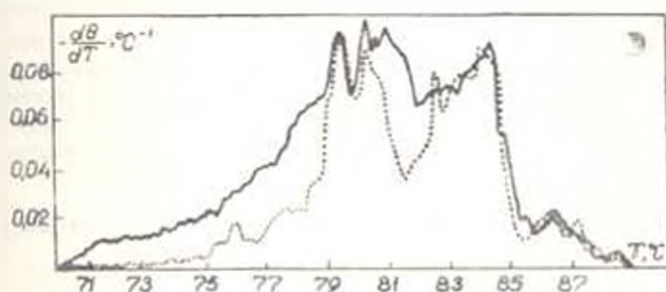


Рис. 3. Нормированная ДКП ДсРНК при добавлении белка I (сплошная кривая) и в отсутствие белка (штриховая кривая).

Авторы благодарят Ю. С. Лауркина, К. Л. Любченко за предоставление возможности для проведения работы, Кинтко Н. П. и Амосову О. А. за содействие в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакунц К. А., Захарян Р. А., Скобелева Н. А. Докл. АрмССР, 86, 4, 174, 1988.
2. Габриелян А. Г., Бакунц К. А., Захарян Р. А. Докл. АН АрмССР, 89, 3, 139—141, 1989.
3. Духан А. Б., Лохов С. Г., Закабуниан А. Н., Пообгарный Б. Ф. Мол. биология, 19, 6, 1579, 1985.
4. Иткес А. В., Туницкая В. Л., Северин Е. С. Успехи биол. химии, 26, 125, 1985.
5. Романов В. В., Старостина В. К. Биотехнология, 3, 5, 618, 1987.
6. Minks M. A., West D. K., Welch C. J. Biol. Chem., 254, 10180, 1979.
7. Rice A. B., Kerr I. M. J. Virol., 0, 229, 1984.

Поступило 9.VI 1989 г.

Биол. ж. Армении, № 1, 1990

УДК 578.088.547.963.4

СПЕКТРЫ ЭПР КОМПЛЕКСОВ МЕДЬ (II) АЛЬБУМИН С МОЧЕВИНОЙ

Р. А. АСАТУРЯН

Ереванский физический институт ГКАЗ СССР

Методом ЭПР исследованы комплексы медь (II) — альбумин с мочевиной при двух значениях pH. С ростом концентрации мочевины наблюдаются изменения константы ЭПР меди (II) при —190°C, что свидетельствует о двухстадийном процессе денатурации белка.

Сопоставлены EXAFS — Extended X-ray Absorption Fine Structure, XANES — X-ray Absorption Near Edge Structure, ТС — вторичная структура, Р — общий свороточный радиус, DSCN — денатурационная кривая.