

УДК 577.322

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

А. Г. Габриелян, А. Г. Аракелян, Р. А. Захарян

Мембранный ДНК-связывающий белок—стабилизатор ДНК

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР Г. К. Карагесяном 23/VI 1987)

Ранее нами получены данные о том, что компетентность эукариотических клеток к акцепции и транспорту ДНК на первом этапе генетической трансформации обеспечивается специфическим связыванием трансформирующей ДНК с ДНК рецепторными белками плазматической мембраны клеток (1, 2). Эти результаты были подтверждены в работе (3). С целью выяснения молекулярного механизма процесса переноса экзогенной ДНК через плазматическую мембрану клеток нами начаты исследования ДНК-связывающих белков плазматической мембраны печени крысы.

Плазматические мембраны клеток печени крысы получали по методике (4). ДНК-связывающие белки выделяли по (5) методом аффинной хроматографии на ДНК, иммобилизованной на целлюлозе. Использовались трижды депротенинизированная ДНК тимуса теленка («Сигма») и целлюлоза Whatman CF—11. Препараты нативной и денатурированной ДНК-целлюлозы готовили модификацией метода (5). Элюцию белков производили буфером, содержащим 0,5 М NaCl.

Общую фракцию ДНК-связывающих мембранных белков фракционировали на колонке с сефадексом G—50 fine на микроколоночном жидкостном хроматографе «Обь», позволяющем одновременно регистрировать поглощение в проточной микрокювете при заданных длинах волн. Измерения вели при 230, 260, 280 и 330 нм. Спектры растворов ДНК и белков получали на спектрофотометре Spcogd M—40.

На рис. 1 показана хроматограмма белков с нативной ДНК-цел-

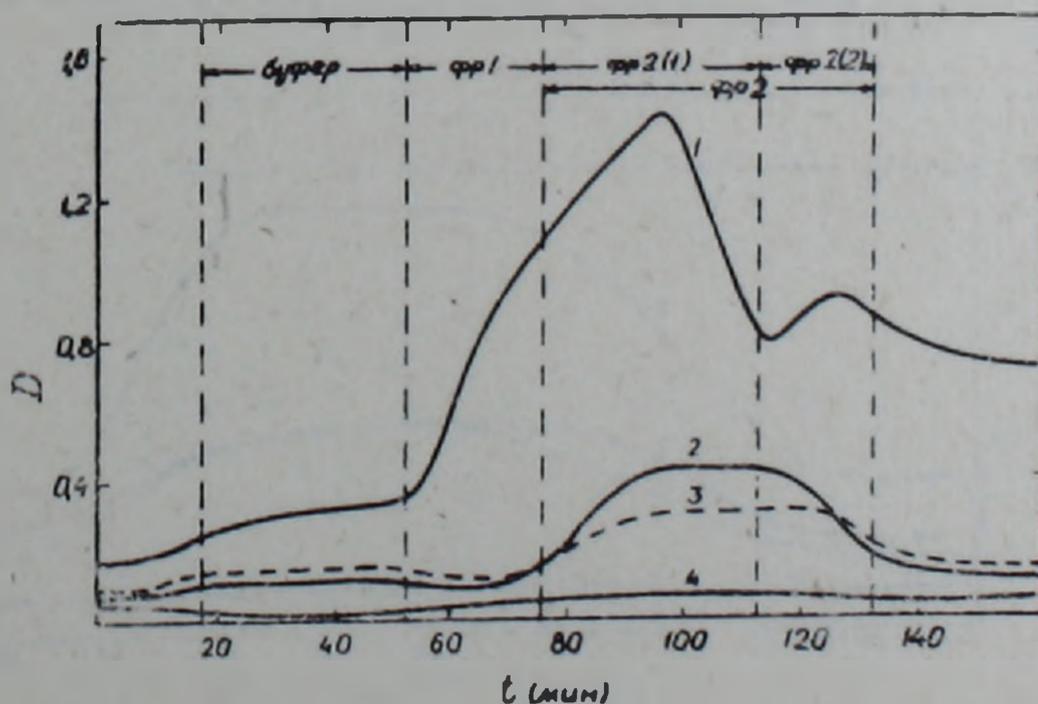


Рис. 1. Хроматограмма мембранных белков, полученных с нативной ДНК-целлюлозной колонки: поглощение при 230 (1), 280 (2), 260 (3) и 330 (4) нм

люлозной колонки. Выделены 2 основные фракции. Тотальный белок и фракция 1 действуют как дестабилизатор нативной структуры ДНК, а фракция 2 приводит к увеличению термостабильности ДНК и уменьшению интервала плавления (6).

На рис. 2 изображены спектральные характеристики тотального белка (кривая 1) и фракции 2 (кривая 2) белка-стабилизатора, обла-

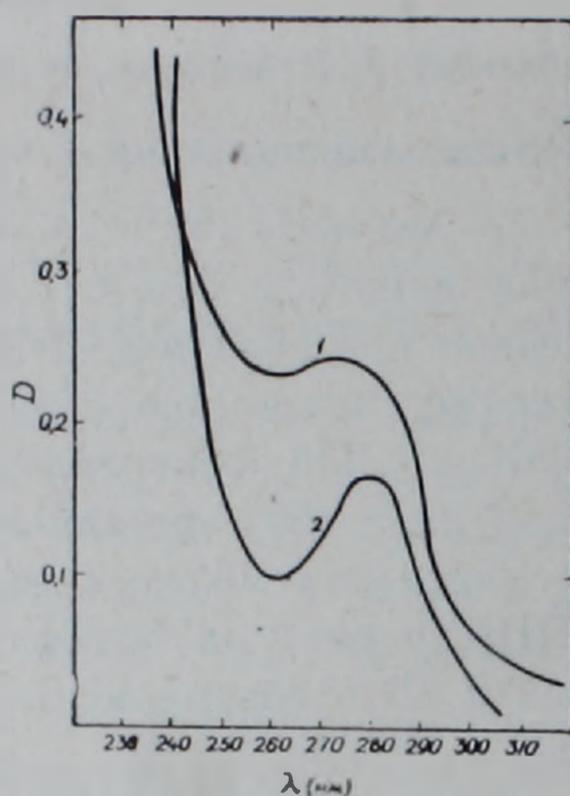


Рис. 2. Ультрафиолетовые спектры поглощения белков: 1 — тотального, 2 — фракции-стабилизатора

дающего максимумом поглощения при 280 нм. Такой спектр указывает на наличие большого числа ароматических аминокислот в белковой макромолекуле.

Известно, что параметры перехода спираль \rightleftharpoons клубок ДНК зависят от факторов, присутствующих в растворе. Если лиганд стабилизирует ДНК, смещая термодинамическое равновесие в переход в сторону нативной ДНК, то он преимущественно связывается с нативной формой ДНК. Поэтому белок-стабилизатор должен сильно связываться с нативной ДНК и не связываться (или слабо связываться) с денатурированной. Как можно видеть на рис. 3, белок, полученный с

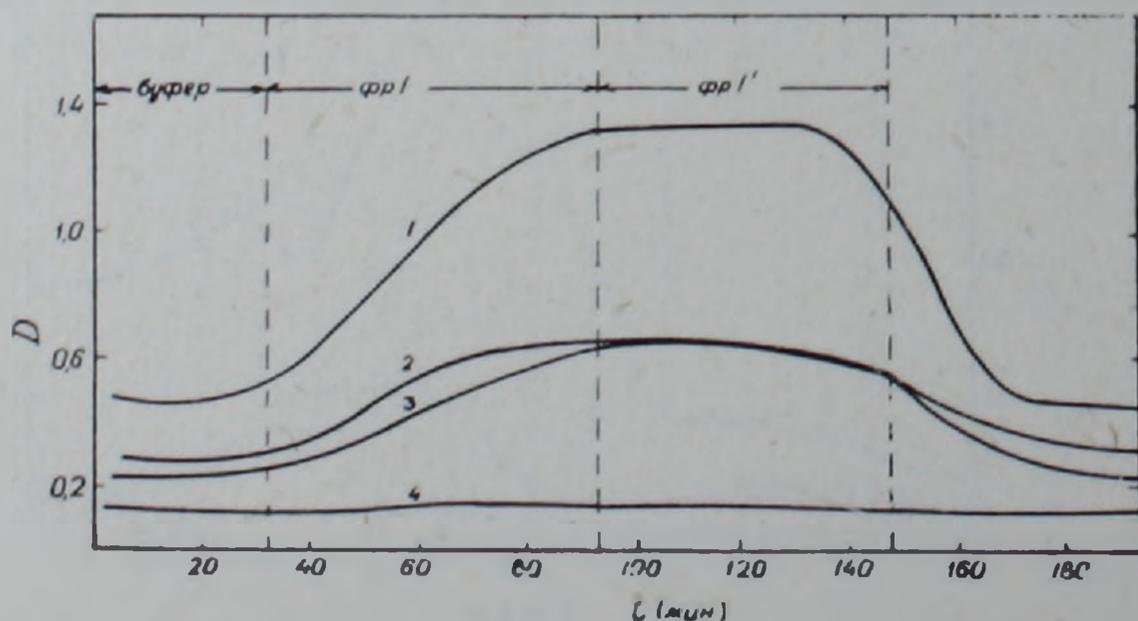


Рис. 3. Хроматограмма мембранных белков, полученных с денатурированной ДНК целлюлозной колонки; поглощение при 230 (1), 260 (2), 280 (3) и 330 (4) нм

колонки с денатурированной ДНК-целлюлозой, не содержит фракции-стабилизатора.

Итак, белок-стабилизатор получается лишь при элюции с колонок с нативной, но не денатурированной ДНК-целлюлозой.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Ա. Գ. ԳԱԲՐԻԵԼՅԱՆ, Հ. Հ. ԱՌԱՔԵԼՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱԲԱՐՅԱՆ

ԴՆԹ-ն կայունացնող ԴՆԹ-կապող մեմբրանային սպիտակուց

ԴՆԹ-ցելուլոզա աֆինային բրոմատոգրաֆիայի եղանակով առնետների լյարդի բջիջների պլազմատիկ մեմբրաններից անջատված են ԴՆԹ-կապող սպիտակուցներ: Սպիտակուցային ֆրակցիաներից մեկը, որի կլանման սպեկտրը մաքսիմում ունի 280 նմ-ի վրա, ուժեղ կայունացնող ադ-դեպոզիտն է գործում ԴՆԹ-ի հետ փոխադրելիս:

Այդ ֆրակցիան հնարավոր է անջատել միայն այն դեպքում, երբ ցելուլոզայի վրա իմմոբիլիզացված ԴՆԹ-ն նատիվ է, այլ ոչ թե դենատուրացված:

ЛИТЕРАТУРА—ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ P. A. Захарян, К. С. Карагезян, Структура и функция белков и нуклеиновых кислот 6-ой двусторонний симпозиум СССР—Франция, 1982. ² А. Г. Габриелян, К. С. Карагезян, P. A. Захарян, в кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии, Изд. АН АрмССР, Ереван, 1983. ³ G. Gabor, R. M. Bennett, Biochem. Biophys. Res. Commun, v. 123, p. 3 (1984). ⁴ Биохимические исследования мембран. Под ред. Э. Мэдди, Мир, М., 1979. ⁵ B. H. Alberts, G. Herrick, Meth. Enzymol., v. 21D, p. 198--217 (1971). ⁶ А. Г. Габриелян, А. Г. Аракелян, P. A. Захарян, в кн.: Конформационные изменения биополимеров в растворах, Материалы VI Всесоюз. симпозиума, Тбилиси, 1985.