

УДК 577.322

БИОХИМИЯ

А. Г. Габриелян, Н. А. Гукасян, Р. А. Захарян

### ДНК-связывающиеся белки плазматических мембран клеток Тимуса крупного рогатого скота

(Представлено чл.-корр. АН АрмССР К. Г. Карагезяном 7/VI 1989)

Известно, что важным этапом в ряде биологических процессов является проникновение нуклеиновых кислот через мембраны прокариотических (1) и эукариотических (2,3) клеток. Природа взаимодействия с мембранами в процессе трансмембранного перехода нуклеиновых кислот не установлена. Важную роль в этом процессе должны играть мембранные белки, способные обеспечить высокую специфичность, стабильность и функциональную активность контакта ДНК—мембрана. Однако до настоящего времени очень мало известно о структуре и свойствах этих белков, об особенностях их взаимодействия с ДНК (1,4,5). Малочисленность работ объясняется трудностями получения внутренних мембранных белков в достаточно большом количестве в чистом виде. Если и удавалось отделить их от липидов, то они теряли свою активность и нативную конформацию и агрегировали. В последние годы пробел стал восполняться благодаря усовершенствованию методов получения «теней» мембран, ДНК-аффинной хроматографии и гель-электрофорезу в присутствии детергентов, разрушающих агрегаты белка (1,4,6). Целью настоящей работы являлось выделение ДНК-связывающихся белков плазматической мембраны клеток тимуса крупного рогатого скота и изучение их свойств.

Плазматические мембраны из тимуса крупного рогатого скота были выделены по методике, описанной в (7). Белки плазматических мембран были получены методом солк-биллизации тритоном X—100 и последующей аффинной хроматографией на колонках АЭ-целлюлоза-нативная (или денатурированная) ДНК тимуса теленка (8). Элюирующий буфер (рН 7,5) содержал 0,5 или 1 М NaCl. Элюаты были диализованы и лиофилизированы, затем растворены в 200  $\mu$ l буфера 0,1XSSC и фракционированы на колонке с сефакрилом S-300 с помощью микроколоночного жидкостного хроматографа «Обь». Методом электрофореза в ПААГ с маркерными белками были оценены молекулярные массы полученных белков. На спектрофотометре Specord M—40 получены спектральные характеристики белков.

На рис. 1 показана хроматограмма ДНК-связывающихся белков плазматической мембраны, полученных с колонок АЭ-целлюлоза-нативная ДНК тимуса теленка при элюции буфером, содержащим 1 М NaCl. Элюция буфером высокой ионной силы позволила исключить белки, связывание которых с ДНК неспецифическое электростатическое. По

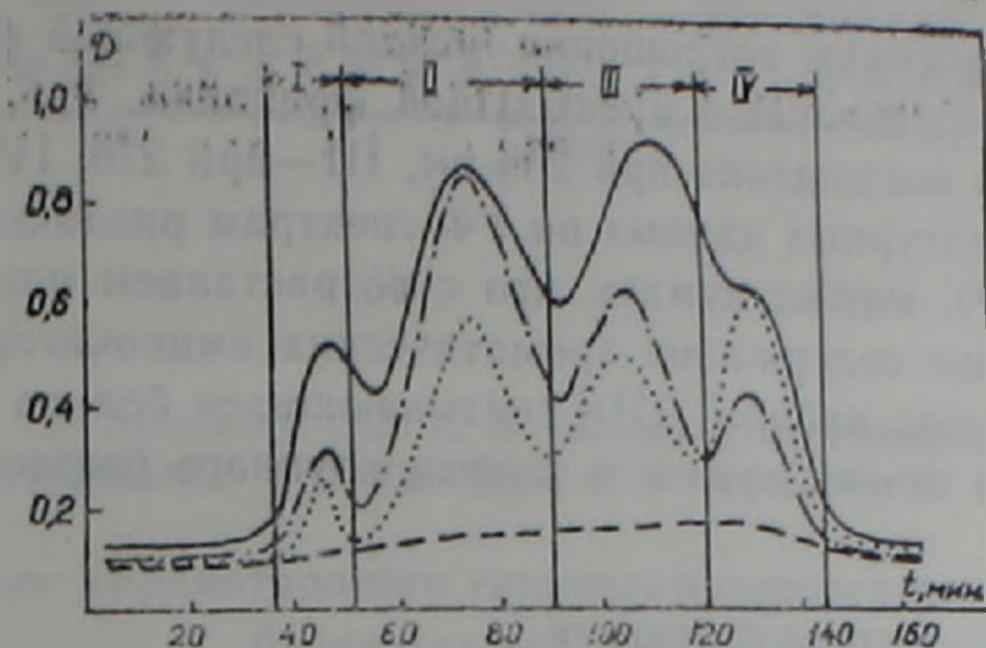


Рис. 1. Хроматограмма ДНК-связывающихся белков, элюированных с колонок нативная ДНК—АЭ-целлюлоза буфером с 1 M NaCl. По оси абсцисс—время хроматографии; по оси ординат—оптическая плотность на следующих длинах волн: 230 нм (—), 260 нм (---), 280 нм (.....), 330 нм (— — —). Римскими цифрами отмечены отобранные фракции

хроматограмме можно видеть, что при разделении белков по молекулярным массам и спектральным свойствам получают 4 фракции. Если среди ДНК-связывающихся белков плазматической мембраны клеток печени крысы был белок, исключительно (или преимущественно) связывающийся с нативной (но не денатурированной) ДНК (6), то в наборе белков крупного рогатого скота такого белка нет. Все 4 фракции получают при элюции как с нативной, так и с денатурированной АЭ-целлюлозной колонок. Различаются лишь относительные количества четырех белков.

По данным электрофореза в ПАА геле с маркерами молекулярные массы 4 белков оказались равны: I—51 000, II—42 000, III—38 000, IV—25 000 дальтон.

На рис. 2 приведены УФ-спектры этих четырех белков. Из рисун-

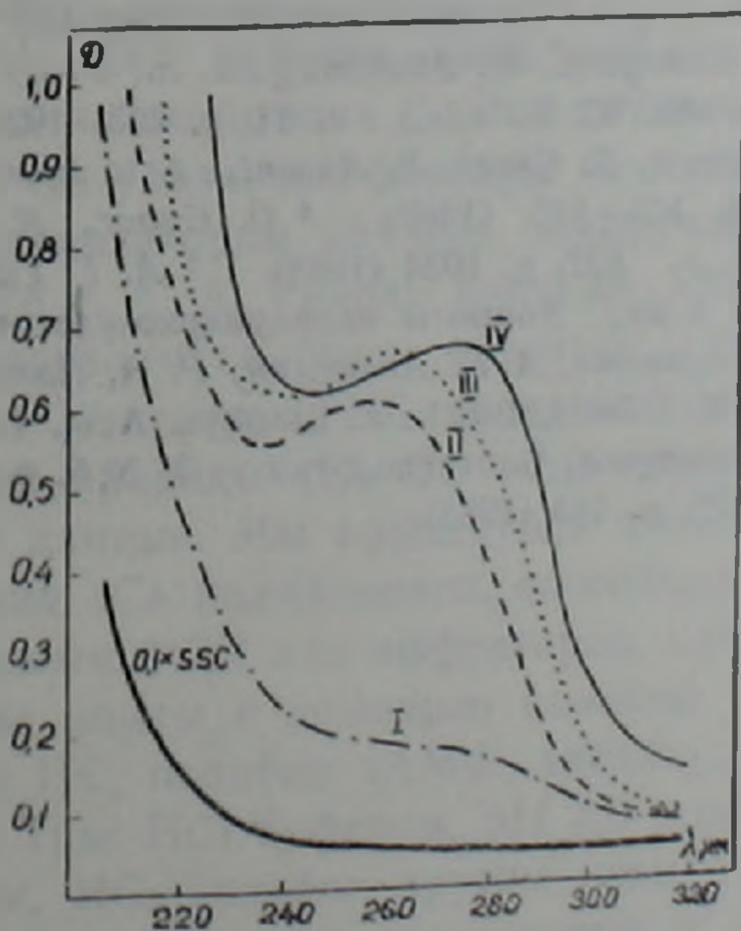


Рис. 2. Ультрафиолетовые спектры четырех ДНК-связывающихся белков. Обозначения те же, что на рис. 1.

ка видно, что максимум поглощения каждой следующей фракции сдвинут вправо по сравнению с предыдущей фракцией. Так, II фракция имеет максимум поглощения при 260 нм, III—при 270, IV—при 275 нм. Исходя из литературных данных по УФ-спектрам различных аминокислот и белков (<sup>9</sup>), можно думать, что с возрастанием номера фракции растет процентное содержание ароматических аминокислот в белках.

Таким образом, наборы ДНК-связывающихся белков из плазматических мембран печени крысы и тимуса крупного рогатого скота различны.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Армянской ССР

Ա. Գ. ԳԱՐՐԻՆՆԱՆ, Ն. Ա. ՂՈՒԿԱՍՅԱՆ, Ի. Ա. ԶԱՔԱՐԱՆ

Խոշոր եղջերավորների բիմուսի բջիջների պլազմատիկ թաղանթներից ստացված ԴՆԹ-կապող սպիտակուցներ

Աֆինային քրոմատոգրաֆիայի եղանակով խոշոր եղջերավորների բիմուսի բջիջների պլազմատիկ թաղանթներից անջատվել են ԴՆԹ-կապող սպիտակուցներ: Այնուհետև ստացված սպիտակուցները բաժանվել են 4 շափամասերի ըստ սպեկտրալ ընդհանրության և մոլեկուլյար զանգվածի: Նշված 4 սպիտակուցները, թեև տարբեր հարաբերությամբ, անջատվում են թե՛ նատիվ և թե՛ դենատուրացված ԴՆԹ-ով պատրաստված Աէ-ցելյուլոզա-ԴՆԹ սյունակից: Համեմատվում են տվյալ սպիտակուցների և մինչ այդ մեր կողմից ստանալոված առնետների լյարդից ստացված նույնատիպ սպիտակուցների սպեկտրալ և ԴՆԹ-կապող հատկությունները:

#### ЛИТЕРАТУРА—ԴՐԱՎԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

<sup>1</sup> 6-th European meeting on bacterial transformation and transfection (Abstracts), Lisbon, 1982. <sup>2</sup> P. M. Bhargava, G. Shammugam, in: Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. (Davidson J. M., Cohn W. E., eds.), v. 11, p. 103—192, Acad. Press, N.—J.—London, 1971. <sup>3</sup> A. Ohlbaum, S. Csuzi, F. Antoni, Acta Biochem. et Biophys. Acad. Sci. Hung., v. 14, № 3, p. 165—176 (1969). <sup>4</sup> G. Gabor, R. M. Bennett, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 122, p. 1034 (1984). <sup>5</sup> А. Г. Габриелян, К. С. Карагезян, Р. А. Захарян, в кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии, вып. 10, Ереван, 1983. <sup>6</sup> А. Г. Габриелян, А. Г. Аракелян, Р. А. Захарян, ДАН АрмССР, т. 85, № 4, p. 177 (1987). <sup>7</sup> H. Demus, Biochem. Biophys. Acta, v. 291, p. 93 (1973). <sup>8</sup> В. В. Романов, В. К. Старостина, Биотехнология v. 3, № 5, p. 618 (1980). <sup>9</sup> F. Wolf, Anal. Biochemistry, v. 129, p. 145 (1983).