

А. А. Ахрем, В. П. Егорова, А. С. Егоров,  
В. И. Крот, Д. Ю. Ландо, З. А. Лука

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК С ПРИМЕСНЫМИ БЕЛКАМИ \*

*Исследовано взаимодействие ДНК, выделенной из селезенки коровы, с загрязняющими ее примесными белками. Показано, что последние не являются гистонами и их связи с ДНК разрушаются в присутствии мочевины, но сохраняются при высоких концентрациях  $\text{Na}^+$ . Примесные белки не изменяют термостабильности ДНК и распределены между макромолекулами неравномерно: менее 10 % ДНК содержат более 70 % всех белков.*

**Введение.** Для разработки эффективных промышленных методов выделения и очистки нуклеиновых кислот необходимы данные о характере их взаимодействия с загрязняющими примесными белками, присутствующими в образцах. Это позволит найти оптимальные условия разрушения комплекса. Целесообразно также исследовать влияние примесных белков на стабильность двойной спирали ДНК, поскольку ряд методов очистки включает нагревание растворов, содержащих ДНК, до 60—70 °С. В связи с этим в данной работе проведено физико-химическое исследование комплексообразования ДНК с остаточными примесными белками, выделена фракция ДНК, ими обогащенная, и исследована термостабильность ДНК в составе этой фракции.

**Материалы и методы.** В работе использовали додецилсульфат натрия (DS-Na), бычий сывороточный альбумин (БСА), цитохром С, яичный альбумин, хмотрипсиноген фирмы «Serva» (ФРГ). Отечественные реактивы имели квалификацию «хч» или «осч» и не требовали дополнительной очистки. Концентрированные растворы ДНК очищали от белковых примесей и РНК с помощью гидроксиапатита (Ленинград).

Спектральные характеристики ДНК получали на спектрофотометре СФ-26 («ЛОМО», СССР) и UV-VIS («Carl Zeiss», ГДР). Мутность образцов особо чистой ДНК определяли при помощи спектрофотометра Shimadzu-3000 («Shimadzu», Япония). В работе применяли образцы ДНК, выделенные из селезенки коровы различными способами и содержащие от 0,26 до 10 % белковых примесей.

Ультрацентрифугирование растворов ДНК проводили в 0,005 М или 0,15 М NaCl (90 000 г, 30 мин) на центрифуге VAC-601 («Janetzki», ГДР) при концентрации ДНК 1 мг/мл.

Для электронно-микроскопических исследований использовали метод белковой пленки [1] (JEM-1000, «JEOL», Япония), ускоряющее напряжение 80 кВ.

Плавление ДНК осуществляли в термостатированной ячейке собственной конструкции на спектрофотометре СФ-26. Все образцы содержали  $2 \cdot 10^{-4}$  М натриевой соли этилендиамина тетрауксусной кислоты. Точность измерения температуры 0,05 °С. Скорость нагрева 0,5 град/мин.

Качественный состав белков осадка определяли электрофорезом в 18 %-ном полиакриламидном геле в присутствии DS-Na [2]. В качестве маркеров использовали хмотрипсиноген (27 000), яичный альбумин (45 000), БСА (67 000). Окрашивание проводилось кумасси G-250.

Светорассеяние в области поглощения ДНК оценивали с помощью известной линейной зависимости логарифма оптической плотности ( $D$ ) от логарифма длины волны ( $\lambda$ ):  $\lg D = A - n \cdot \lg \lambda$ , где величина  $n$  определяется размером частиц. По значению  $n$  вычисляли также размеры агрегатов, образующих комплекс ДНК с примесными белками [3, 4].

Для повышения точности определения содержания белковых примесей в ДНК модифицировали метод Лоури и др. [5]. Использовали следующие растворы: 1 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3 + 0,54$  М NaOH (А); 0,02 М  $\text{CuSO}_4 + 0,04$  М цитрат натрия (Б); 46 мл раствора А + 5 мл раствора Б (В).

Измерение проводили, добавляя к 2,9 мл раствора белка 0,1 мл 17 %-ного DS-Na, 0,6 мл раствора В и через 10 мин — 0,3 мл реактива Фолина. Как и в [5], спектральные изменения определяли при  $\lambda = 750$  нм. При низком содержании белка в образцах ДНК (менее 0,7 %) DS-Na не вводили, поскольку светорассеяние в этом случае искажений не вызывает. Концентрация ДНК при измерении 1—2 мг/мл. Способ позволяет регистрировать до 0,05 % белковых примесей.

**Результаты и обсуждение.** Наличие примесных белков в составе образцов ДНК вызывает достаточно сильное помутнение растворов, которое удобно регистрировать при  $\lambda \geq 320$  нм, т. е. в области длин волн,

\* Представлена членом редколлегии В. И. Ивановым.

где поглощение ДНК отсутствует. Если для высокоочищенных образцов (содержание белка менее 0,4 %)  $D_{320}$  не превышает 0,02 опт. ед. при концентрации ДНК 1 мг/мл (толщина кюветы 1 см), то после выделения по стандартным методикам, используемым различными фирмами,  $D_{320}$  может превышать 0,4 опт. ед. (рис. 1, а). Из рис. 1 (б) видно, что имеет место корреляция между содержанием примесных белков и помутнением растворов. Кроме суммарного содержания бел-

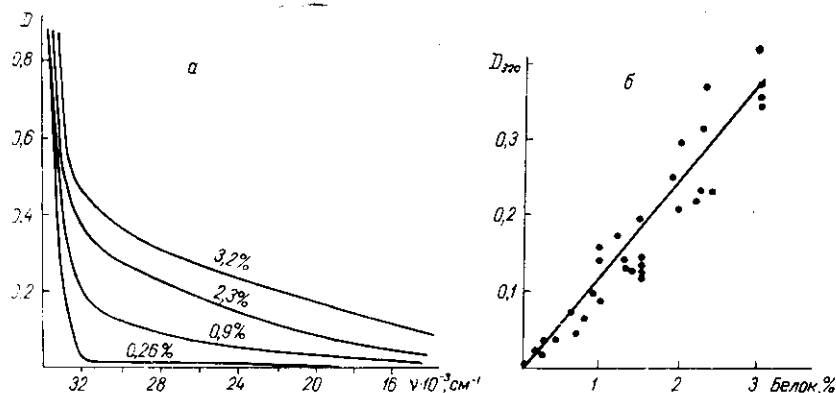


Рис. 1. Спектры образцов ДНК с различным содержанием белка (а) и зависимость оптической плотности ( $D_{320}$ ) от содержания белка (б). Концентрация ДНК 1 мг/мл  
Fig. 1. Spectra of DNA samples characterized by different protein content (а) and optical density dependence ( $D_{320}$ ) on the protein content (б). DNA concentration — 1 mg/ml

ков, помутнение определяется их составом, что обуславливает существенный разброс данных для различных образцов (рис. 1, б).

Ультрацентрифугирование растворов, проводимое при низкой (0,005 M NaCl) и средней (0,15 M NaCl) ионной силе, дает одинаковые результаты: образуется плотный осадок, а мутность снижается от 0,2—0,4 до 0,07—0,1 опт. ед. ( $\lambda=320$  нм). При этом относительное содержание белка в осадке, в который включено менее 10 % всей ДНК, составляет 45—60 % при содержании белка в исходном образце 2—3 %. Это показывает, что белки распределены между молекулами ДНК неравномерно. Меньшая часть молекул практически полностью заполнена белками, а остальные почти не содержат их.

Выделенный в результате ультрацентрифугирования осадок удается полностью растворить в 0,005 M NaCl. Однако даже при разбавлении этого раствора до концентрации ДНК 30 мкг/мл наблюдается сильная мутность, которая полностью не исчезает в присутствии 0,5 %-ного DS-Na.

Помутнение раствора ДНК дает возможность оценить размеры агрегатов, образующих комплекс ДНК—белок. Однако стандартная процедура [6] в данном случае неприменяема, поскольку, как указано в [3, 4], коэффициент преломления для подобных (содержащих много воды) систем близок к единице. Поэтому, как и в [4], мы использовали зависимость  $n$  от величины частиц, полученную в [3] для бактерий различных размеров.

Зависимость  $\lg D$  от  $\lg \lambda$  хорошо аппроксимируется линейной функцией, угловой коэффициент которой ( $n$ ) практически не зависит от концентрации ДНК и близок к единице, что соответствует размерам частиц  $\sim 150$  нм. Этот результат подтверждают и данные электронной микроскопии. На фотографиях четко видны агрегаты примерно таких же размеров, из которых торчат «хвосты» ДНК. Для образцов ДНК, содержащих менее 0,5 % примесных белков, подобные агрегаты не обнаруживаются (данные не приведены).

Как правило, методы выделения ДНК из ядер ориентированы на удаление гистонов, которые в ядре составляют подавляющую часть белков. Можно было предположить, что основную массу примесных

белков также составляют гистоны. Тогда в присутствии 2 М NaCl комплекс должен полностью разрушаться, поскольку в этих условиях гистоны с ДНК не взаимодействуют. Однако при увеличении содержания в растворе  $\text{Na}^+$  от 0,005 до 2 М мутность практически не изменяется (рис. 2). Это доказывает, что примесные белки не являются гистонами и образование агрегатов обусловлено не солеобразными взаимодействиями, а гидрофобными контактами и водородными связями.

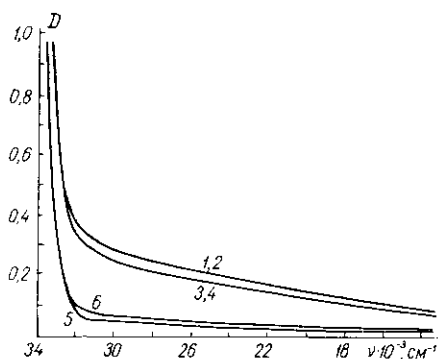


Рис. 2. Спектры образца ДНК с содержанием белка 2,8 % в различных растворах (концентрация ДНК 1 мг/мл): 1—0,005 М NaCl; 2—0,15 М NaCl; 3—1 М  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 4—2 М NaCl; 5—0,005 М NaCl+2 М мочевины; 6—0,15 М NaCl+0,1 %-ный DS-Na

Fig. 2. Spectra of DNA samples with protein content 2.8 % in different solutions (DNA concentration—1 mg/ml): 1—0.005 M NaCl; 2—0.15 M NaCl; 3—1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 4—2 M NaCl; 5—0.005 M NaCl+2 M urea; 6—0.15 M NaCl+0.1 % sodium dodecyl sulfate

Последнее подтверждается и резким уменьшением помутнения раствора в присутствии 2 М мочевины даже при низкой ионной силе (рис. 2). Агрегаты также эффективно разрушает DS-Na, в присутствии которого  $D_{260}$  уменьшается до 0,04—0,07 опт. ед. (рис. 2).

Для прямого доказательства негистоновой природы белковых загрязнений был проведен электрофорез в присутствии DS-Na (рис. 3). В результате выявлено пять полос, соответствующих молекулярным массам  $(45—55) \cdot 10^3$  и три полосы—более  $75 \cdot 10^3$ . Выявлено также небольшое количество гистонов, но их содержание в суммарном белке не превышает 5 %.

Нами обнаружен еще один эффективный способ удаления агрегатов. Если в раствор ДНК в 0,2 М NaCl (концентрация ДНК 1 мг/мл) ввести 0,02—0,05 объема суспензии сорбента гидроксиапатита, перемешать (15—30 мин), а затем провести низкоскоростное центрифугирование ( $\sim 2500$  g) или грубую фильтрацию, то мутность снижается примерно в три раза. При этом содержание РНК уменьшается в 2,5—4 раза, белка—в 3 раза, а ДНК—менее чем на 10 %.

Проведенные исследования показали, что данный эффект объясняется тем, что насыщенный ДНК гидроксиапатит сохраняет достаточно высокую адсорбционную емкость по отношению к РНК. Поскольку ДНК в растворе в 30—200 раз больше, чем РНК, то описанная обработка гидроксиапатитом резко уменьшает относительное содержание последней. По-видимому, аналогичный эффект имеет место и для примесных белков.

На рис. 4 представлены кривые плавления ДНК и осадка, полученного в результате ультрацентрифугирования. Плавление показывает, что белковые загрязнения не влияют на термостабильность ДНК. Однако гиперхромный эффект для осадка почти в 2 раза ниже, чем для исходного образца, и составляет 18—20 %. После вычитания светорассеяния из суммарного значения  $D_{260}$  для нативной и денатурированной ДНК получаем величину гиперхромного эффекта, равную 33 %. Это значение соответствует исходному образцу (35 %, если не учитывать теплового расширения раствора). Гиперхромизм растворенного осадка составляет 32 % в случае использования вместо 0,005 М NaCl 0,005 М DS-Na, что свидетельствует о разрушении агрегатов.

Примерно для 40 % образцов наличие остаточных белков проявляется в уменьшении оптической плотности раствора на 10÷40 % при изменении температуры от 67 до 90 °С (рис. 4). Обычно подобные эффекты обусловлены выпадением комплекса в осадок при денатура-

ции ДНК. Однако в нашем случае образования осадка не наблюдается, мутность раствора при нагревании не изменяется. Кроме этого, при денатурации комплекса с уменьшением температуры от 90 до 70 °С происходит некоторое увеличение оптической плотности раствора ( $\lambda = 260$  нм). Для исходного образца ДНК подобные эффекты отсутствуют. Все это указывает на то, что снижение величины  $D_{260}$  после плавления связано не с выпадением ДНК в осадок, а с изменением

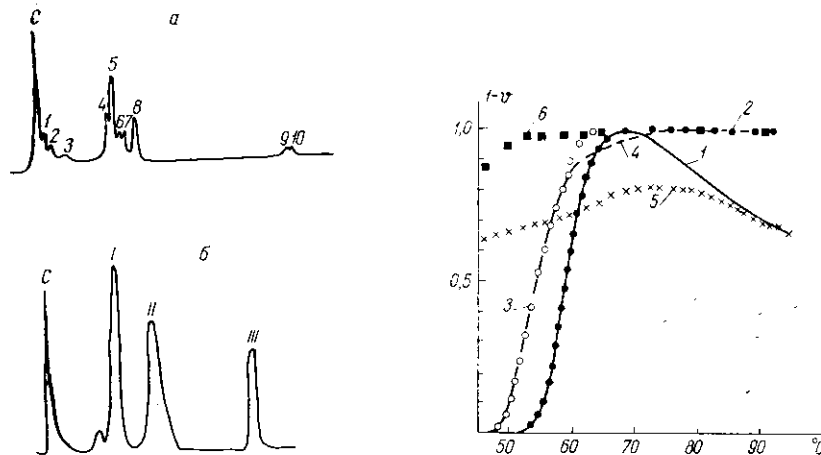


Рис. 3. Разделение белков осадка (а) и смеси (б) БСА (I—67 000); яичного альбумина (II—45 000) и химотрипсиногена (III—27 000)

Fig. 3. Gel-electrophoresis of pellet proteins (a) and mixture (b) of chymotrypsinogen (27 kD) chicken egg albumin (45 kD) and bovine albumin (67 kD)

Рис. 4. Кривые денатурации (1—4) и ренатурации (5, 6) исходного образца ДНК (2, 3, 6) и растворенного осадка (1, 4, 5): 1—осадок в 0,005 М NaCl; 2—ДНК в 0,005 М NaCl; 3—ДНК в 0,005 М Ds-Na; 4—осадок в 0,005 М DS-Na; 5—ренатурация системы 1; 6—ренатурация систем 2—4

Fig. 4. Denaturation (1—4) and renaturation (5, 6) curves of DNA sample (2, 3, 6) and dissolved pellet (1, 4, 5): 1—pellet in 0.005 M NaCl; 2—DNA in 0.005 M NaCl; 3—DNA in 0.005 M DS-Na; 4—pellet in 0.005 M DS-Na; 5—renaturation of the 1 system; 6—renaturation of the 2—4 systems

характера взаимодействия с примесными белками. Наличие или отсутствие эффекта определяется составом примесных белков и их количеством.

При замене NaCl на DS-Na значение  $D_{260}$  при температуре, большей 70 °С, не уменьшается, что свидетельствует о разрушении комплекса.

**Заключение.** В результате проведенного исследования можно сделать следующие выводы. Белки, загрязняющие образцы ДНК, являются, в основном, негистоновыми белками. Гистоны составляют ~5% примесей. Главную роль в связывании примесных белков с ДНК выполняют водородные связи и гидрофобные контакты. Ресуспендирование в растворе ДНК гидроксиапатита и последующее низкоскоростное центрифугирование или фильтрация в 2,5—3 раза уменьшают мутность раствора ДНК.

Примесные белки не изменяют термостабильности ДНК, поэтому не препятствуют использованию при выделении и очистке ДНК примесей, связанных с нагреванием.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Devis R. M., Simon M., Davidson N.* Electron microscope heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids // *Meth. Enzymol.*—1971.— **D21**.— P. 413—428.
2. *Thomas J. O., Kornberg R. D.* An octamer of histones in chromatin and in free solution // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1975.— **72**, N 6.— P. 2626—2633.

3. Фиксман Б. А. Светорассеяние взвесей бактерий в видимой области спектра // Биофизика.— 1963.—8, № 3.— С. 380—384.
4. Евдокимов Ю. М., Скуридин С. Г., Акименко Н. М. Жидкокристаллические микрофазы низкомолекулярных двухцепочечных нуклеиновых кислот и синтетических полинуклеотидов // Высокомолекуляр. соединения.— 1984.— А26, № 11.— С. 2403—2410.
5. Protein measurements with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrouh, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem.— 1951.—193, N 1.— P. 265—275.
6. Слоנים И. Я. Определение размера частиц по светорассеянию // Оптика и спектроскопия.— 1970.—8, № 1.— С. 98—108.

Ин-т биоорг. химии АН БССР, Минск  
 Ин-т физиологии АН БССР, Минск  
 Белорус. гос. ун-т им. В. И. Ленина, Минск  
 Ин-т фотобиологии АН БССР, Минск

Получено 10.03.89

## STUDIES OF DNA INTERACTION WITH PROTEIN CONTAMINANTS

A. A. Akhrem, V. P. Egorova, A. S. Egorov, V. I. Krot, D. Yu. Lando, Z. A. Luka  
 Institute of Bioorganic Chemistry,  
 Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk  
 Institute of Physiology,  
 Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk  
 Lenin Byelorussian State University, Minsk  
 Institute of Photobiology,  
 Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

### Summary

DNA isolated from the bovine spleen has been investigated for its interaction with protein contaminants. It is shown that the contaminants are not histones and their binding is determined by the nonionic contacts which are destroyed in the presence of urea and retain with high concentrations of NaCl. The protein contaminants do not change thermostability of DNA and they are distributed irregularly among the macromolecules: less than 10 % of DNA contains more than 70 % of all the proteins.

УДК 577.323.425

В. А. Сорокин, В. Л. Галкин, В. А. Валеев,  
 Е. С. Архипова, Г. О. Гладченко, Ю. П. Благой

## ИЗУЧЕНИЕ ЭНЕРГЕТИКИ ГИДРАТАЦИИ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ УФ-СПЕКТРОСКОПИИ \*

Для определения термодинамических параметров гидратации оснований нуклеотидов измерены температурные зависимости дифференциальных УФ-спектров поглощения водных растворов СМР, GMP, UMP, IMP, AMP и Guo. С помощью двухуровневой термодинамической модели вычислены энтальпия ( $\Delta H$ ) и энтропия ( $\Delta S$ ) гидратации молекул воды, образующих внутренний моногидратный слой вблизи оснований. Для UMP, IMP, GMP и Guo гидратация приводит к возрастанию энтропии, которое вносит основной вклад в изменение свободной энергии Гиббса ( $\Delta G$ ). Для СМР энтальпийный и энтропийный члены сравнимы по величине, чем объясняется аномально низкое значение  $|\Delta G|$ . Обнаружена корреляция между величиной  $\Delta H$  и значениями дипольного момента основного состояния. Гидратация приводит к возрастанию энергии электронных переходов оснований.

**Введение.** Для выяснения энергетики специфических взаимодействий ДНК с низкомолекулярными лигандами в водных растворах необходима информация о термодинамических параметрах, характеризующих гидратацию гетероатомов оснований нуклеотидов.

Хотя калориметрия является прямым и наиболее точным методом определения теплот гидратации, она не позволяет разделить вклады,

\* Представлена членом редколлегии Н. В. Желтовским.