

И. П. АШМАРИН, А. А. МЮЛЬБЕРГ, А. А. ШАРЫГИН
**ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИДОВ
ХРОМАТИНА**

**ИССЛЕДОВАНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНП
ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ В ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ САХАРОЗЫ**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 13 III 1972)

К настоящему времени накоплен ряд фактов, говорящих о том, что гистоны, кислые белки и РНК неравномерно распределены вдоль ДНК хроматина и что препараты последнего состоят из гетерогенных молекул ДНП (¹⁻³). Однако разделение такого рода молекул и их фрагментов остается трудной задачей, поскольку различия их физико-химических свойств невелики. Кроме того, объективность картин разделения зависит не только от соотношения макромолекулярных компонентов в молекуле ДНП, но и от ряда других факторов (³⁻⁶). Различные подходы к решению задачи включают разделение хроматина на ДНП-нити, фрагментацию ультразвуком или ДНКазой с последующим делением на молекулярных ситах, по растворимости или по плавающей плотности предварительно фиксированных препаратов ДНП (¹⁻³).

Неодинаковое содержание белков и РНК в молекулах ДНП может привести к различиям в плотности заряда на единицу длины молекулы, что скажется на ее электрофоретической подвижности. Однако различия в подвижности незначительны для крупных молекул ДНП (^{7, 8}), что затрудняет их разделение. Поэтому в настоящей работе исследовалось электрофоретическое поведение частиц ДНП, получаемых при мягкой ультразвуковой обработке хроматина, растворенного в 4 М мочевины (ДНП_м).

Хроматин выделяли из ядер тимуса теленка по методу Хуанга и Хуанг (⁹). Полученный гелеобразный препарат (40% ДНК, 57% белка и 3% РНК) переводили в растворимое состояние обработкой 4 М мочевиной по методу Георгиева и сотрульников (¹⁰). Перед электрофорезом 10 мл ДНП_м подвергали действию ультразвука при частоте 22 кгп и интенсивности 14 Вт/см² в течение 3 мин. (генератор УЗДН-1) и центрифугировали 20 мин. при 20 000 g. Препарат ДНП_м (500—700 мкг ДНК на 1 мл) вносили в колонку электрофоретического аппарата (ЛКВ, 3340) в 0,001 М трис-буферном растворе, рН 7,5, содержащем 4 М мочевины, 0,01 М NaCl и 5% сахарозу. Разделение ДНП_м происходило в том же буферном растворе; в рабочей части колонки создавался градиент плотности сахарозы, равный 0,002 г·см⁻⁴, при изменении ее концентрации от 25 к 0%. При этом в верхней части колонки формировалась «ступенька» градиента плотности от 8 к 2% сахарозы для внесения препарата ДНП_м в 5% сахарозе. Электродные и промежуточные растворы готовили по методу Оливера и сотрульников (⁷). Электрофорез вели в течение 16—18 час. при плотности тока 1,5 ма/см² и напряжении 400 в. Элюированный материал диализовали против 0,001 М трис-буфера, рН 7,5, и концентрировали на гуммиарабике, лиофилизацией или обдуванием диализной трубки током холодного воздуха. Основные и кислые белки хроматина выделяли прямой экстракцией (¹¹) или фракционированием на гидроксилатите (¹²). Содержание нуклеиновых кислот оценивали по методу Цанева и Маркова (¹³), а содержание белка — по методу Лоури (¹⁴).

Как уже говорилось, электрофорез нативного ДНП не позволяет выявить его гетерогенность (^{7, 8}). Лишь частичное обеднение ДНП белками приводит к расширению движущейся зоны без какого-либо разделения ее на отдельные фракции (¹³). В наших опытах установлено, что мягкая ультразвуковая обработка хроматина в 4 М мочеvine приводит к появлению малого пика ДНП (ДНП I). Электрофоретическая подвижность этого пика на 35% превышает подвижность главного по массе пика — ДНП II (рис. 1). Такое разделение не происходит, если электрофорезу

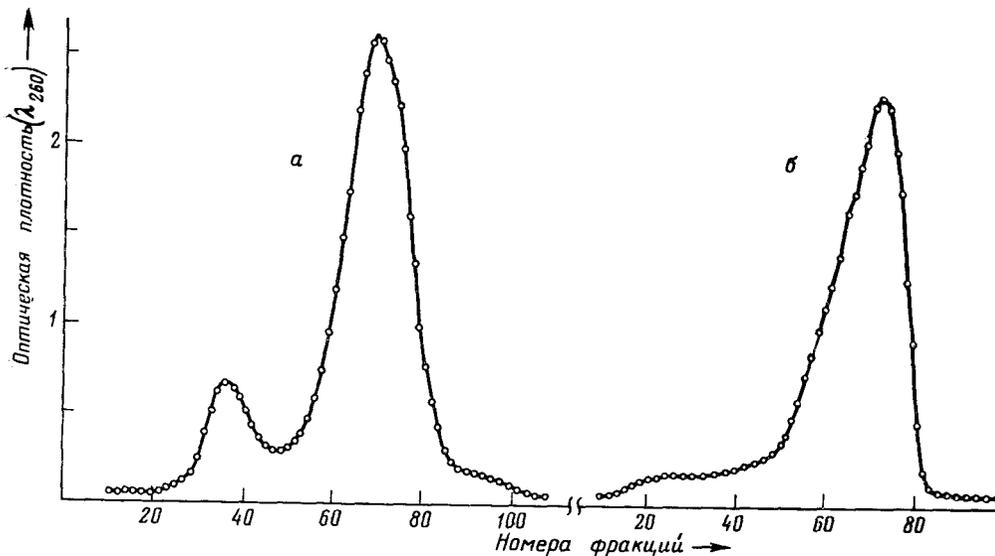


Рис. 1. Электрофоретическое разделение озвученных (а) и незвученных (б) препаратов ДНП_м в градиенте плотности сахаразы

подвергается незвученный препарат ДНП_м. По-видимому, в 4 М мочеvine поперечное дробление молекул ДНП ультразвуком (¹⁶) протекает более интенсивно, поскольку мочеvine переводит ДНП в растворимое состояние, расплетая хроматиновые фибриллы до элементарных 40 Å нитей (¹⁰). Существенное уменьшение длины фрагментов ДНП способствует выявлению предсуществующих различий в плотности заряда на единицу длины молекулы ДНП и появлению электрофоретических пиков ДНП I и ДНП II.

Данные химического анализа препаратов ДНП I и ДНП II представлены в табл. 1. Видно, что фракция ДНП I, содержащая около 8% всей ДНК хроматинового препарата, обогащена кислыми белками и РНК. Вероятно, это обогащение ДНП I полианионами обуславливает повышенную подвижность фракции в электрическом поле в направлении анода.

Наблюдаемые различия в плотности заряда фрагментов ДНП трудно объяснить частичной диссоциацией белков ДНП при электрофорезе или их перераспределением в 4 М мочеvine. Так, Оленбуш и сотрудники (¹⁵) показали, что увеличение концентрации NaCl до 0,2 М в используемых условиях электрофореза не сказывается заметно на подвижности ДНП. С другой стороны, перераспределение белков или каких-то комплексов белков с другими компонентами хроматина, наблюдаемое при обработке ДНП мочеvineй (¹⁷), по-видимому, сводится к миграции на гомологичные места других молекул ДНП. В пользу этого говорят данные о том, что присутствие 5 М мочеvine необходимо для реконструкции хроматина, эквивалентного нативному препарату по критерию конкурентной гибридизации (¹⁸). Вероятно, наблюдаемая гетерогенность ДНП не может быть обусловлена перераспределением белков. Напротив, последнее должно приводить к уменьшению степени гетерогенности, «смазыванию» ее.

Характеристика фракций ДНП, получаемых электрофорезом в градиенте плотности сахарозы (средние из 7 опытов)

Тип ДНП	Спектральные характеристики			РНК/ДНК	Белок/ДНК	Прямая экстракция (11)		Фракционирование на гидроксипапате (12)	
	λ_{\min} , м μ	λ_{\max} , м μ	ОП ₂₃₀ /ОП ₂₆₀			основные белки, %	кислые белки, %	основные белки, %	кислые белки, %
ДНП ₀	236	261	0,72	0,068 ± 0,014	1,38 ± 0,07	87 ± 4	13 ± 4	93 ± 3	7 ± 3
ДНП I	237	261	0,76	0,380 ± 0,090	1,84 ± 0,33	70 ± 9	30 ± 9	84 ± 6	16 ± 6
ДНП II	236	261	0,67	0,041 ± 0,010	1,09 ± 0,10	91 ± 3	9 ± 3	96 ± 2	4 ± 2

Таким образом, электрофорез озвученных препаратов ДНП₀ в градиенте плотности сахарозы представляется эффективным методом для выявления структурно неоднородных фрагментов хроматина и позволяет получить две фракции, четко различающиеся по целому ряду признаков. Анализ метаболической и матричной активности этих фракций, оценка степени гибридизации между их ДНК и естественной иРНК является предметом наших дальнейших исследований.

Ленинградский государственный университет
им. А. А. Жданова

Поступило
9 III 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ю. В. Ильин, А. Я. Варшавский, Г. П. Георгиев, Молек. биол., 4, 821 (1970). ² Н. А. Федорова, И. П. Ашмарин, В сборн. Клеточное ядро и его ультраструктуры, «Наука», 1970, стр. 33. ³ J. N. Frenster, V. G. Allfrey, A. E. Mirsky, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 50, 1026 (1963). ⁴ W. A. Atchley, N. V. C. Bhagawan, Arch. Biochem. and Biophys., 106, 505 (1964). ⁵ T. Sekiguchi, F. Sekiguchi, H. Matsudaria, Biochim. et biophys. acta, 145, 693 (1967). ⁶ J. D. Duerksen, B. J. McCarthy, Biochemistry, 10, 1471 (1971). ⁷ B. M. Olivera, P. Baine, N. Davidson, Biopolymers, 2, 245 (1964). ⁸ B. M. Olivera, R. C. Huang, N. Davidson, Ber. Bunsenges Phys. Chem., 68, 802 (1964). ⁹ R. C. Huang, P. C. Huang, J. Molec. Biol., 39, 365 (1969). ¹⁰ Г. П. Георгиев, Ю. В. Ильин и др. Молек. биол., 4, 246 (1970). ¹¹ C. W. Dingman, M. D. Sporn, J. Biol. Chem., 239, 3483 (1964). ¹² A. J. MacGillivray, D. Carroll, J. Paul, FEBS Letters, 13, 204 (1971). ¹³ Р. Г. Цанев, Г. Г. Марков, Биохимия, 25, 151 (1960). ¹⁴ O. H. Lowry, M. J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). ¹⁵ H. H. Ohlenbush, B. M. Olivera et al., J. Molec. Biol., 25, 299 (1967). ¹⁶ B. P. Sonnenberg, G. Zubay, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 54, 415 (1965). ¹⁷ Y. V. Ilyin, A. Ya. Varshavsky et al., Europ. J. Biochem., 22, 235 (1971). ¹⁸ J. Bekhor, G. M. Huang, J. Bonner, J. Molec. Biol., 33, 351 (1969).