

6. *Synthesis of modified nucleoside 3',5'-biphosphates and their incorporation into oligoribonucleotides with T4 RNA ligase* / J. R. Barrio, M. C. G. Barrio, N. J. Leonard et al. // *Biochemistry*.— 1978.— 17, N 11.— P. 2077—2081.
7. *Фенилаланил-тРНК синтетазы из Escherichia coli: модификация фермента флюоресцентными химически активными аналогами нуклеотидов* / Г. А. Невинский, В. Н. Подуст, В. Н. Анкилова, О. И. Лаврик // *Биоорг. химия*.— 1983.— 9, № 7.— С. 936—946.
8. *Горшкова И. И., Даций И. И., Лаврик О. И.* Роль остатков аргинина во взаимодействии фенилаланил-тРНК синтетазы с субстратами // *Молекуляр. биология*.— 1980.— 14, № 1.— С. 118—124.
9. *Shugart L.* Effect of selective chemical modification of 4-thiouridine of phenylalanine transfer ribonucleic acid on enzyme recognition // *Arch. Biochem. and Biophys.*— 1972.— 148, N 2.— P. 488—495.
10. *Bartmann P., Hanke T., Holler E.* Active site stoichiometry of L-phenylalanine: tRNA ligase from *Escherichia coli K-10* // *J. Biol. Chem.*— 1975.— 250, N 19.— P. 7668—7674.
11. *Аденозин- и этеноаденозин-5'-триметафосфаты: влияние образования ковалентной связи на состояние аффинной метки в комплексе с фенилаланил-тРНК синтетазой* / Г. А. Невинский, В. Н. Подуст, С. Н. Ходырева и др. // *Молекуляр. биология*.— 1984.— 18, № 5.— С. 1311—1315.
12. *Lavrik O. I., Nevinsky G. A.* Phenylalanyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli MRE-600*. Activation by nucleotides and affinity modification of the effector binding sites // *FEBS Lett.*— 1980.— 109, N 1.— P. 13—17.
13. *Tal J., Deutscher M. P., Littauer U. Z.* Biological activity of *Escherichia coli* tRNA<sup>Phe</sup> modified in its C-C-A terminus // *Eur. J. Biochem.*— 1972.— 28, N 2.— P. 478—491.
14. *Holler E., Baltzinger M., Favre A.* Catalytic mechanism of phenylalanyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli K-10*. Different properties of native and photochemically cross-linked tRNA<sup>Phe</sup> can be explained in the light of tRNA conformer equilibria // *Biochemistry*.— 1981.— 20, N 5.— P. 1139—1147.

Ин-т биоорг. химии  
Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск

Получено 15.12.86

УДК 576.315.42:577.23

## КАПИЛЛЯРНАЯ ЭЛАСТОВИСКОЗИМЕТРИЯ НУКЛЕОИДОВ ЭУКАРИОТ

Д. Ю. Блохин, В. А. Стручков

**Введение.** Структурная организация ДНК в интерфазном ядре эукариот является одной из центральных проблем молекулярной биологии, которой посвящен ряд обзоров последних лет [1, 2]. Одним из надмолекулярных уровней организации ДНК является ее складчато-петлевая структура с участием ядерного скелета, сохраняющаяся в составе нуклеоидов [3—5].

Ряд основных выводов о структуре и свойствах нуклеоидов получен на основании анализа их седиментационной подвижности в градиентах концентраций нейтральной сахарозы [3, 6—8], хотя некоторыми авторами использованы вязкози- [9] и эластовискозиметрические [10, 11] методы исследования. Изучены некоторые свойства нуклеоидов, выделенных из разных клеток [3, 5, 12].

Однако отсутствие стандартной процедуры выделения и анализа нуклеоидов в ряде случаев затрудняет сопоставление результатов разных авторов. Одновременно с этим достаточно трудоемкие методы седиментационного анализа ограничивают возможности исследований.

В этой связи актуальной задачей является поиск простого и информативного аналитического приема и стандартизация условий выделения нуклеоидов по ряду параметров. Решение этой задачи даст возможность существенно расширить круг объектов исследования для сравнительного изучения нуклеоидов и может открыть новые подходы к исследованию структурной организации этих комплексов.

Для изучения реологических свойств препаратов «надмолекулярной ДНК» нами был предложен капиллярный эластовискозиметр [13,

14], позднее конструктивно модифицированный [15] и использованный для решения ряда радиобиологических и онкологических задач [16, 17]. Простая конструкция прибора и нетрудоемкая процедура анализа выгодно отличают предложенный метод от ротационной эласто-вискозиметрии и седиментации. Представлялось интересным оценить возможности капиллярной эласто-вискозиметрии для изучения структуры и свойств нуклеонидов и других надмолекулярных комплексов ДНК эукариот.

В настоящей работе предлагаемым методом воспроизведены основные закономерности реологического поведения нуклеонидов, выделенных из разных клеток, ранее установленные седиментационными методами, а также оценены структурные изменения комплексов при модификации некоторых параметров процедуры выделения.

**Материалы и методы.** Объектами исследования служили спермии пресноводного вьюна *Misgurnus fossilis* L. и клетки персвиваемых опухолевых штаммов: лейкозы L1210 и P388, асцитная саркома C37 мышей.

Спермии выделяли мягкой гомогенизацией семенников половозрелых особей, содержащихся при 4 °С [16]. Клетки опухолей выделяли из асцитной жидкости мышей через 6—8 сут после внутрибрюшинной инокуляции 10<sup>6</sup> опухолевых клеток на каждое животное.

Препараты нуклеонидов получали мягким лизисом (в основном подобным методу [3]) клеток в растворе, состоящем из минимального буфера ТЕТ (трис-ЭДТА-три-топовый: 10 мМ трис-основание, 0,1 М динатриевая соль ЭДТА, 0,5 %-ный тритон X-100, рН 7,6) с различным содержанием хлорида натрия. В ряде экспериментов применяли лизирующий раствор иного состава: 1) на основе буфера ТКМ (трис-калий-магниевый: 25 мМ трис-НСl, 25 мМ КCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, рН 7,6) с добавлением до 1 или 2 М NaCl и нуклеаз (ДНКазы I или бактериальная эндонуклеаза); 2) на основе щелочного раствора (1 М NaCl, 0,1 М динатриевая соль ЭДТА, 0,1 М NaOH, рН 12,5). В зависимости от цели эксперимента в состав лизирующего раствора дополнительно вносили фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ) до 1 мМ; диэтилпирикарбонат (ДЭПК) до 0,1 % по объему; бромистый этидий (БЭ) до 40 мкг/мл.

Приготовление лизатов и измерение эластовязкости (ЭВ). Клеточную суспензию в растворе Хенкса фильтровали через капроновую (70 мкм) и титановую (40 мкм) сетки и разводили раствором Хенкса из расчета, чтобы рабочая суспензия клеток содержала 100 мкг/мл ДНК.

В конические пробирки помещали по 200 мкл суспензии клеток и немедленно интенсивной струей косо по стенке пробирки приливали 4,8 мл лизирующего раствора (20 °С). Эта процедура обеспечивает быстрое перемешивание образцов во всем объеме, что важно для образования гомогенной суспензии и одновременно исключает гидродинамическую деградацию материала. Лизис проводили в термостате (20 °С) в течение различного периода времени (от 5 мин до 7 сут). Лизаты осторожно по стенке переносили в камеру капиллярного эласто-вискозиметра и через 1 мин открывали выходное отверстие капилляра (диаметр капилляра 0,9 мм). Измеряли время истечения 4,0 мл лизатов, что контролировали по накоплению соответствующего количества образцов в чашке-накопителе предложенного нами контрольного устройства — инерционных весов с ртутным противовесом (подвижный центр масс).

Численное значение ЭВ выражали в единицах обратной процентной концентрации ДНК в образцах (дл/г).

Выделение и анализ белков нуклеонидов. К aliquотам клеточных лизатов добавляли два объема холодного этанола (95 %), препараты перемешивали и охлаждали до —10 °С, через 30 мин осадки отделяли центрифугированием (1000 г, 15 мин, 4 °С; центрифуга К-23, «Janetzki», ГДР), суспендировали в 2,0 мл буфера ТКМ, содержащего 10 ед. Кунитца в 1 мл ДНКазы I («Serva», ФРГ) и 0,1 ммоль/л ФМСФ («Serva», ФРГ), инкубировали 30 мин при 20 °С. К образцам добавляли 4,0 мл буфера ТКМ, содержащего дополнительно 3,0 ммоль/л NaCl, инкубировали 10 мин (20 °С) и осаждали белки центрифугированием (1500 г, 15 мин, 20 °С). Осадки промывали 2,0 М NaCl (на ТКМ) и дважды — дистиллированной водой с 1 % глицерина; сохраняли в 10 %-ном водном растворе глицерина при —20 °С.

Электрофорез в полиакриламидном геле (Т=12,5 %; С=2,6 %) в присутствии DS-Na вели по Леммли [18].

Статистическую обработку результатов производили на микрокалькуляторе «Электроника БЗ-21» по программе расчета среднего арифметического и стандартного отклонения.

**Результаты и обсуждение.** Прежде всего было установлено, что значения ЭВ лизатов не зависят от концентрации ДНК в диапазоне от 1,5 до 30,0 мкг/мл, что свидетельствует об отсутствии агрегации макромолекул в образцах. Поэтому в дальнейшей работе использовали лизаты с концентрацией ДНК 4,0 мкг/мл (0,0004 %).

ЭВ образцов определяется почти исключительно свойствами надмолекулярного комплекса ДНК, так как лизаты, полученные в условиях разрушения этого комплекса, обладают незначительной (3—5 % от контроля) ЭВ (табл. 1).

У образцов, полученных при «щадящих» условиях лизиса (буфер ТЕТ, содержащий 2,0 М NaCl), ЭВ обладает характерной бифазной реакцией на повышение концентраций БЭ (рис. 1), что может быть связано с присутствием в них суперспиральной ДНК, обнаруженной ранее разными методами в аналогичных препаратах надмолекулярных комплексов [3, 5, 6, 12, 16]. Если это предположение верно, то индукция односторонних разрывов ДНК (например,  $\gamma$ -облучением) должна приводить к прогрессирующему снижению реакции нуклеоидов на присутствие интеркалятора [8], так как наличие в доменах ДНК хотя бы одного одностороннего разрыва делает невозможным существование напряженной суперспиральной конформации [5, 19].

На рис. 1 представлены изменения кривой титрования нуклеоидов БЭ, возникающие при облучении исходных клеток непосредственно перед лизисом. Обнаруженная закономерность полностью согласуется с предположением о детерминирующей роли конформационных переходов суперспиральной ДНК в бифазном характере реакции нуклеоида на интеркалятор. Поэтому в дальнейшей работе бифазность кривой титрования служила свидетельством суперспиральности ДНК в составе надмолекулярного комплекса, а концентрация БЭ, вызывающая максимальную релаксацию ДНК («эквивалентная» концентрация), — мерой плотности суперспирализации [5, 8, 12, 20].

Таким образом, обнаруженные нами данные полностью согласуются с аналогичными результатами седиментационных исследований

Таблица 1

*ЭВ лизатов клеток лейкоза L1210, полученных в различных условиях лизиса*  
*The viscoelasticity of L1210 mouse leukemic cells lysates obtained by different lysis conditions*

Объект	Состав лизирующего раствора	Режим лизиса	ЭВ, дл/г
Интактная клеточная суспензия	2 М NaCl (в буфере ТЕТ)	60 мин, 20 °С	540±44
То же	1 М NaCl (в буфере ТЕТ)	»	1350±120
»	1 М NaCl (в буфере ТКМ+10 ед/мл ДНКазы I)	»	20±8
»	2 М NaCl (в буфере ТЕТ)	40 мин, 20 °С+ +20 мин, 100 °С	32±10
Разрушенные 5 %-ной ТХУ клетки	»	60 мин, 20 °С	18±5
То же	0,9 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,1 М NaOH, pH 12,5	»	20±6
Интактная клеточная суспензия	То же	»	2600±230
То же	»	48 ч, 20 °С	27±5
ДНК из эритроцитов цыплят («Reanal», ВНР)	2 М NaCl (в буфере ТЕТ)	»	5±1

[3, 6, 8, 20], что свидетельствует об адекватности выбранного метода анализа.

Из табл. 1 видно, что условия выделения надмолекулярных комплексов существенно влияют на значения ЭВ образцов, поэтому даже незначительные модификации основных процедур выделения могут приводить к получению плохо воспроизводимых или вовсе несравнимых результатов. В рамках задачи стандартизации метода получения препаратов пяс в первую очередь интересовало значение длительности лизи-

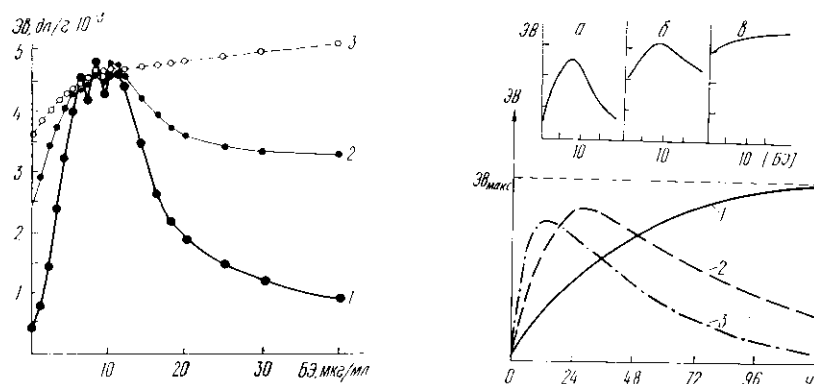


Рис. 1. Зависимость ЭВ нуклеонидов клеток лейкемии *L1210* от концентрации БЭ: 1 — контрольные клетки; 2—3 —  $\gamma$ -облученные клетки, 10 и 50 Гр соответственно

Fig. 1. Dependence of viscoelasticity of *L1210* leukemic cell nucleoids on ethidium bromide (Eth Br) concentration: 1 — control cells; 2, 3 —  $\gamma$ -irradiated cells, 10 and 50 Gy, respectively

Рис. 2. Зависимость ЭВ нуклеонидов клеток лейкемии *L1210* от времени лизиса: 1 — контроль; 2, 3 — клеточные лизаты после одно- и двукратного пропусканий через капилляр ( $d=1$  мм,  $G=600$  с $^{-1}$ ) соответственно. Вверху — форма кривых титрования нуклеоида БЭ в зависимости от времени лизиса: а — 60 мин, б — 24 ч, в — 48 ч и более

Fig. 2. Dependence of viscoelasticity of *L1210* leukemic cell nucleoids on time of lysis: 1 — control; 2, 3 — cell lysates after single and double forcing through capillary ( $d=1$  mm,  $G=600$  s $^{-1}$ ), respectively. Above — the shape of nucleoid titration curves with Eth Br dependent on time of lysis: a — 60 min, б — 24 h, в — 48 h and more

са клеток и влияние ионной силы лизирующего раствора на конечные результаты эластовискозиметрического анализа образцов.

На рис. 2 показана зависимость ЭВ нуклеонидов от времени «нейтрального» лизиса клеток (буфер ТЕТ, содержащий 2,0 М NaCl). Наблюдаемая кинетика изменений ЭВ имеет характер процесса «насыщения» и описывается (по аналогии с кинетикой химической реакции первого порядка) уравнением

$$\text{ЭВ}_t = \text{ЭВ}_{\text{макс}} (1 - e^{-Kt})$$

или:

$$\ln \left( 1 - \frac{\text{ЭВ}_t}{\text{ЭВ}_{\text{макс}}} \right) = -Kt,$$

где  $\text{ЭВ}_t$  — текущее значение ЭВ в момент  $t$ .

Таким образом, кинетика лизиса характеризуется двумя параметрами: максимальным значением ЭВ (при предельной, исчерпывающей обработке в использованных условиях) и константой скорости процесса  $K$ . Оба параметра оказались специфичными в отношении объекта исследования (табл. 2).

Процесс щелочного лизиса (аналогично [10]) характеризуется другой кинетикой (рис. 3): положение и величина максимума ЭВ образцов зависят от объекта и отражают, видимо, структурно-функциональные особенности складчато-петлевой организации ДНК в различных клетках (размер петлевых доменов, частота щелочелабильных сайтов ДНК и др.).

Получаемые препараты являются чрезвычайно чувствительными к гидродинамическому сдвигу: не только пипетирование, но и резкое пе-

рсмешивание образцов вызывает изменение ЭВ, причем как величина, так и характер этого изменения зависят от времени (длительности) лизиса и интенсивности воздействия (рис. 2).

Титрование нуклеоидов БЭ выявило уменьшение количества суперспиральной ДНК, пропорциональное времени лизиса, а при длительных инкубациях (более 48 ч) суперспиральная ДНК отсутствовала в нуклеоидах из всех видов исследованных клеток (рис. 2). При использовании щелочных условий лизиса мы не обнаружили суперспиральной

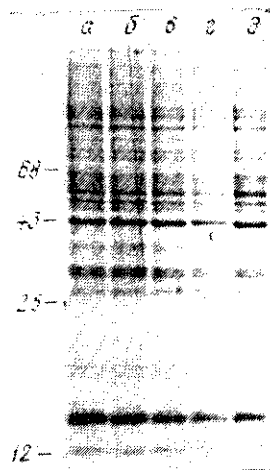
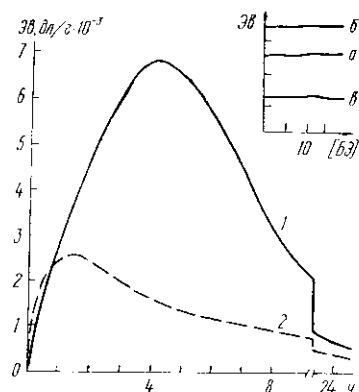


Рис. 3. Зависимость ЭВ щелочных лизатов клеток от времени лизиса: 1 — сперма вьюна; 2 — клетки лейкемии *L1210*. Вверху — форма кривых титрования БЭ в зависимости от времени лизиса: а — 60 мин, б — 4, в — 24 ч и более

Fig. 3. Dependence of viscoelasticity of alkaline cell lysates on time lysis: 1 — mud loach sperm; 2 — *L1210* leukemic cell. Above the shape of titration curves with Eth Br dependent on time of lysis: а — 60 min, б — 4 h, в — 24 h and more

Рис. 4. Электрофореграммы белков нуклеоида клеток лейкемии *L1210* в зависимости от времени лизиса: а — 30 мин; б — 4, в — 24, г — 72, д — 120 ч. Цифры обозначают положение маркерных белков

Fig. 4. Electrophoregrammes of proteins of *L1210* leukemic cell nucleoid on time lysis: а — 30 min, б — 4 h, в — 24 h, г — 72 h, д — 120 h. The position of protein markers 12—68 kD

ДНК надмолекулярного комплекса из всех клеток во все исследованные сроки (рис. 3).

Представленные данные позволяют рассматривать структуру нуклеоида в процессе лизиса как динамичную, непрерывно изменяющуюся в течение инкубации до некоторого «предельного» состояния, при котором нативная организация комплекса в значительной мере утрачивается.

Анализируя процесс щелочного лизиса, можно связать наблюдаемые изменения реологических характеристик образцов с прогрессирующей деградацией комплекса до составляющих компонентов, денатурацией белков и ДНК, гидролизом химических связей и т. д. Ранее нами показан неслучайный характер фрагментации ДНК в щелочных условиях [21], что интерпретируется в рамках представления о субъединичной (или «квазисубъединичной») организации ДНК в составе хроматина [22].

Кинетика нейтрального лизиса, однако, требует более тщательной оценки в отношении возможной роли остаточной ферментативной активности лизосомальных гидролаз, присутствующих в клеточных лизатах.

В качестве объекта для контрольных экспериментов мы выбрали клетки *P388*, имеющие наибольшую из всех исследованных клеток константу скорости лизиса (табл. 2). Электрофоретический анализ белков нуклеоида не выявил никакого изменения белкового состава образцов

при инкубации в буфере ТЕТ, содержащем 2,0 М NaCl, от 30 мин до 120 ч (рис. 4). Кроме того, введение в состав лизирующего раствора нуклеаз (ДНКаза I — до 5 ед. Купитца в 1 мл, бактериальная эндонуклеаза — до 130 ед/мл, РНКаза А — до 1,0 мг/мл) не изменяло значений ЭВ образцов при 60-минутной инкубации и, с другой стороны, применение ингибиторов нуклеаз — диэтилпирокарбоната — не влияло на значения ЭВ и кинетику процесса (данные не представлены). Из этих результатов следует, что наблюдаемая в процессе длительных инкубаций спонтанная релаксация суперспиральной ДНК не связана с ферментативной деградацией надмолекулярного комплекса. Такой вывод согласуется с фактом равенства значений  $K$  для клеток асцитной саркомы *C37* и спермиев вьюна, ферментативная активность которых существенно различается, а также позволяет трактовать аналогичные результаты других авторов, использовавших для лизиса очищенные препараты ядер гепатоцитов [10]. Заслуживают внимания данные [23] о неферментативной фрагментации ДНК в концентрированных растворах ЭДТА.

Таблица 2

Кинетические параметры лизиса разных клеток в ТЕТ-буфере, содержащем 2,0 М NaCl, при 20 °С

The kinetic values of different cells lysis in TET-buffer with 2.0 M NaCl

Объект	Значения ЭВ, дл/г		$K, \text{ч}^{-1}$
	ЭВ <sub>1</sub> *	ЭВ <sub>макс</sub>	
Спермии вьюна	710 ± 56	17900 ± 2340	0,040
Лейкоз <i>L1210</i>	540 ± 44	8400 ± 1270	0,066
Лейкоз <i>P388</i>	475 ± 48	6950 ± 720	0,071
Саркома <i>C37</i>	260 ± 37	6600 ± 830	0,040

\* Значение ЭВ при лизисе в течение 1 ч (20 °С).

Таким образом, в процессе длительных инкубаций в нейтральном лизирующем растворе происходит постепенное ослабление или разрушение межмолекулярных взаимодействий, обеспечивающих конформационные ограничения суперспиральных доменов ДНК, что приводит к существенному изменению структуры и свойств нуклеоида; это объясняет неравнозначность экспериментальных оценок при использовании различных по длительности инкубаций даже в растворах одинакового состава, в условиях подавления активности эндогенных гидролаз.

Вопрос о влиянии ионной силы растворителя на конформацию ДНК неоднократно обсуждался в литературе [5, 10, 24]. Установлено, что повышение ионной силы вызывает увеличение суперспиральной плотности ДНК двумя путями: собственно конформационными переходами двухцепочечной молекулы и диссоциацией коровых частиц нуклеосом. В наших экспериментах «эквивалентная» концентрация БЭ [8, 20] при титровании нуклеоидов из клеток *P388* и спермиев вьюна при переходе от 1,0 к 2,0 М NaCl увеличивалась на 20 %, что сопоставимо с данными литературы [5]. Однако феномен зависимости гидродинамических характеристик препаратов надмолекулярных комплексов ДНК от ионной силы, наблюдавшийся и другими авторами [10], по-видимому, не исчерпывается только изменением числа супервитков доменов ДНК. Действительно, суперспиральная плотность ДНК нуклеоидов *P388* и спермиев вьюна изменяется при повышении ионной силы в равной степени, в то время как значения ЭВ зависят от молярности хлорида натрия различно (рис. 5). Максимальные значения ЭВ наблюдаются при лизисе обоих видов клеток в 0,6 М NaCl (в буфере ТЕТ); повышение концентрации соли снижает ЭВ в случае нуклеоидов *P388* в пять раз, а в случае нуклеоидов из спермиев вьюна — лишь на 25—30 %.

Можно предположить, что первая фаза (повышение ЭВ) связана с диссоциацией гистона H1 из состава комплекса и утратой хромомерного уровня организации ДНК, а вторая фаза (снижение ЭВ) — с потерей коровых гистонов и разворачиванием нуклеосом.

В данных экспериментах измерялась ЭВ лизатов, полученных при лизисе в растворах с различной ионной силой (без ее изменения в процессе инкубации). Однако если провести предварительный лизис клеток в 1,0 М NaCl, а затем повысить концентрацию соли до 2,0 М

Таблица 3  
ЭВ лизатов клеток лейкоза P388 при «ступенчатом лизисе» с изменением ионной силы раствора  
*The viscoelasticity of P388 mouse leukemic cells lysates under the «step-lysis» conditions with solutions ionic strength variations*

Содержание NaCl в составе лизирующего раствора на основе нейтрального буфера ТЕТ, М			ЭВ, дл/г
Предварительный лизис, 30 мин	Добавленный раствор	Окончательный лизис, 30 мин	
1	1	1	2200 ± 130
1	3	2	2900 ± 240
2	2	2	880 ± 35
2	0	1	880 ± 60

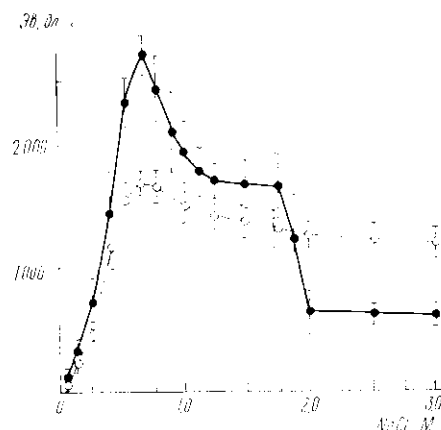


Рис. 5. Зависимость ЭВ нуклеоида от ионной силы лизирующего раствора: 1 — сперма вьюна; 2 — клетки лейкомии L1210

Fig. 5. Dependence of nucleoid viscoelasticity on ionic strength of lysis solution: 1 — mud loach sperm; 2 — L1210 leukemic cells

и дополнительно инкубировать образцы, то ЭВ полученных препаратов почти соответствует лизису в 1,0 М NaCl в течение суммарного времени. И наоборот, предварительный лизис в 2,0 М NaCl с последующим разбавлением образца и дополнительной инкубацией дает лизаты с ЭВ, характерной для 2,0 М NaCl (табл. 3).

Эти результаты предполагают, что рассматриваемый феномен не является прямым следствием конформационных переходов ДНК и только частично связан с дегистонизацией материала. Имеются данные о зависимости контурной длины каркасных фибрилл метафазных хромосом от ионной силы [25, 26], и, хотя нельзя проводить полной аналогии между «скаффолдом» метафазных хромосом и матриксом интерфазных ядер [27], можно предположить, что в данном случае происходит сокращение белковых фибрилл нуклеоида при высоких ионных силах. Различия между объектами могут быть связаны с различным белковым составом их нуклеондов, а «необратимость» параметров при изменении ионной силы — с известной необратимой перестройкой структуры ядерного матрикса при различной последовательности отдельных процедур его выделения [28]. Это наблюдение существенно ограничивает возможность выделения «интактных» нуклеондов из препаратов очищенных клеточных ядер.

Таким образом, на основании полученных данных следует заключить, что: 1) капиллярная эластовискозиметрия клеточных лизатов является перспективным методом исследования структуры надмолекулярных комплексов ДНК; 2) структура нуклеондов является динамичной и подвержена значительным изменениям при модификации условий выделения, что необходимо учитывать при анализе результатов исследования и экстраполяции параметров нуклеондов на структуру нативного хроматина.

Стандартизация условий выделения нуклеондов позволяет прово-

дить сравнительные исследования этих комплексов, выделенных из разных клеток, а также изучать структурно-функциональные аспекты физиологических и повреждающих воздействий на клетки. Этим вопросом будут посвящены следующие сообщения.

#### CAPILLARY VISCOELASTOMETRY OF EUKARYOTIC NUCLEOIDS

*D. Yu. Blokhin, V. A. Struchkov*

All-Union Cancer Research Centre, Academy of Medical Sciences, USSR, Moscow

#### Summary

The method of capillary viscoelastometry was used to study structural peculiarities of supramolecular complexes (SC DNA) at different levels of their organization (nucleoids and alkaline lysates) in eukaryotic cells mud loach sperm, *P388*, *L1210*, *S37*. The dependence of SC DNA viscoelasticity on time of lysis and ionic strength was studied. Velocity constants of nucleoid relaxation of various eukaryotic cells are shown to be significantly different. The curves of viscoelastometric titration of nucleoid of this eukaryotic cells with the ethidium bromide has a biphasic shape typical of supercoiled DNA, obtained by sedimentation. It is detected that the change in viscoelastic characteristics of *L1210* nucleoids is not due to the action of endogenic proteases, since the electrophoretic composition of nucleoid proteins remained constant. Under these experimental conditions the nucleases were not active too. The method of capillary viscoelastometry appears to be enough informative and sensitive in studies of SC DNA properties.

1. Igo-Kemenes T., Hörz W., Zachau H. G. Chromatin // Ann. Rev. Biochem.—1982.—51.— P. 89—121.
2. Nicolini C. Chromatin structure: from nuclei to genes // Anticancer Res.—1983.—3, N 1.— P. 63—86.
3. Cook P. R., Brazell I. A. Conformational constraints in nuclear DNA // J. Cell Sci.—1976.—22, N 2.— P. 287—302.
4. McCready S. J., Akrigg A., Cook P. R. Electron-microscopy of intact nuclear DNA from human cells // Ibid.—1979.—39, N 1.— P. 53—62.
5. Филиппович И. В., Сорокина Н. И. Суперспиральная ДНК клеточного ядра // Успехи соврем. биологии.—1983.—95, № 2.— С. 163—180.
6. Benyajati S., Worcel A. Isolation, characterization and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster* // Cell.—1976.—9, N 2.— P. 393—407.
7. Supercoiled DNA folded by non-histone proteins in cultured mammalian cells / T. Ide, M. Nakane, K. Anzai, T. Andoh // Nature.—1975.—258.— P. 445—447.
8. Hartwig M. Organization of mammalian chromosomal DNA: supercoiled and folded circular DNA subunits from interphase cell nuclei // Acta biol. et med. ger.—1978.—37, N 2.— P. 421—432.
9. Ващенко В. И., Рециков А. М. Определение радиочувствительности субпопуляций тимоцитов методом вискозиметрии нуклеоида // Радиобиология.—1982.—22, № 5.— С. 690—693.
10. A circular channel crucible oscillating viscometer. Detection of DNA damage induced *in vivo* by exceedingly small doses of dimethylnitrosoamine / S. Parodi, P. Carlo, A. Martelli et al. // J. Mol. Biol.—1981.—147, N 1.— P. 501—521.
11. Shafer R. H., Chase E. S., Eisenach J. Slow repair of X-ray-induced DNA damage in rat 9L cells *in vitro* analyzed by viscoelastometry // Radiat. Res.—1981.—85, N 1.— P. 47—56.
12. Глазер В. М., Лучник А. Н. Различия в плотности топологических витков ДНК злокачественно трансформированных и нормальных клеток сирийского хомячка // Докл. АН СССР.—1981.—258, № 5.— С. 1227—1231.
13. Стручков В. А. О природе «сверхполимерной» дезоксирибонуклеиновой кислоты // Биофизика.—1962.—7, № 5.— С. 538—550.
14. Стражевская Н. Б., Стручков В. А. Организация надмолекулярных комплексов ДНК хроматина эукариот и их роль в радиационном эффекте // Радиобиология.—1977.—17, № 2.— С. 163—177.
15. А. с. 1267216 СССР, (51)4 G 01 N 11/08. Капиллярный эластовискозиметр / В. А. Стручков, Н. Б. Стражевская // Открытия. Изобретения.—1986.— № 40.— С. 152.
16. Нечаевский Ю. В., Стражевская Н. Б.  $\gamma$ -индуцированное повреждение суперспиральной ДНК спермы вьюна // Повреждение и репарация ДНК / Под ред. А. И. Газиева.— Пушкино, 1980.— С. 107—114.
17. Блохин Д. Ю. Повреждение надмолекулярного комплекса ДНК в механизме действия противоопухолевых препаратов // Вопр. онкологии.—1985.—31, № 11.— С. 60—66.



18. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*.—1970.—227.—P. 680—685.
19. *Wang J. C.* Superhelical DNA // *Trends Biochem. Sci.*—1980.—5, N 1.—P. 219—221.
20. *Cook P. R., Brazell I. A.* The superhelical density of nuclear DNA from human cells // *Eur. J. Biochem.*—1977.—74, N 2.—P. 527—531.
21. *Struchkov V. A.* On the subunit organization of DNA in eukaryotic chromatin // *Stud. biophys.*—1982.—87, N 2/3.—P. 153—154.
22. *Стручков В. А., Стражевская Н. Б.* Организация хромомероподобных структур надмолекулярных комплексов ДНК эукариот // *Материалы V Всесоюз. биохим. съезда*.—М.: Наука, 1986.—Т. 2.—С. 369—370.
23. *Welsh R. S., Vyska K.* Organization of highly purified calf thymus DNA // *Biochim. et biophys. acta.*—1981.—655, N 3.—P. 291—306.
24. *Wang J. C.* Variation of the average rotation angle of the DNA helix and the superhelical turns of covalently closed cyclic DNA // *J. Mol. Biol.*—1969.—43, N 1.—P. 25—39.
25. *Isolation of the protein scaffold from mitotic HeLa cells chromosomes* /K. W. Adolph, S. M. Cheng, J. R. Paulson, U. K. Laemmli // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74, N 11.—P. 4937—4941.
26. *Наседкина Т. В., Слезингер С. И.* Изменения в структуре нуклеогистоновых фибрилл хромосомы при удалении бивалентных катионов и гистона H1 // *Цитология*.—1983.—25, № 9.—С. 1054—1058.
27. *Збарский И. Б.* Белковый состав и организация ядерного матрикса // *Биополимеры и клетка*.—1985.—1, № 1.—С. 26—32.
28. *Чернохвостов В. В.* Ядерный матрикс эукариотической клетки: некоторые вопросы выделения, структуры и функционирования // *Успехи соврем. биологии*.—1985.—99, № 3.—С. 371—384.

Всесоюз. онкол. науч. центр АМН СССР, Москва

Получено 25.11.86

УДК 578.08:543.4

## ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КРАЕВОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ ИНДОЛА И ТРИПТОФАНА

А. П. Демченко, А. С. Ладохин

**Введение.** В последнее время большое значение приобрели флюоресцентные методы изучения структуры и динамики белков. Поскольку триптофановые остатки вносят основной вклад в собственную флюоресценцию белков, повышенный интерес вызывают флюоресцентные свойства индола и триптофана. Однако связь между свойствами окружения этих хромофоров и их спектрами флюоресценции неоднозначна. Как известно, триптофановая флюоресценция чувствительна к полярности среды, образованию комплексов в возбужденном состоянии (эксиплексов) и к скорости дипольно-ориентационной релаксации молекул растворителя и белковых групп, окружающих хромофор [1—3]. Действие этих факторов приводит к значительным (до 40 нм) вариациям спектров триптофановой флюоресценции. Это определяет высокую чувствительность спектров флюоресценции к структурным изменениям в белках и объясняет большую популярность этого подхода. Но интерпретация результатов может быть очень сложной. Например, только при достижении дипольно-ориентационного равновесия может быть проанализирована полярность окружения хромофора путем сравнения результатов, полученных на белках, с результатами исследований в модельных жидких растворителях. В связи с этим возникает необходимость в методе, который способен выявлять неотрелаксировавшие электронно-возбужденные состояния в белках.

Недавно было предложено проводить анализ дипольно-релаксационной подвижности в белках, применяя флюоресцентную спектроскопию красного краевого возбуждения [4]. Эффекты красного края в спектрах флюоресценции возникают вследствие распределения хромофоров по набору микросостояний, отличающихся по энергии взаимодействия с окружением [5, 6]. Несмотря на широкое изучение этого эффекта