

Член-корреспондент АН СССР В. Л. РЫЖКОВ и Г. И. ЛОЙДИНА

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛЬБУМИНА И ВИРУСА МОЗАИЧНОЙ БОЛЕЗНИ ТАБАКА (ВТМ) С АДЕНИЛОВОЙ И НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Несмотря на значительное число работ, посвященных взаимодействию нуклеиновых кислот с белками, многие вопросы природы этого взаимодействия остаются до настоящего времени невыясненными. О взаимодействии вируса мозаичной болезни табака (ВТМ) с нуклеиновыми кислотами вовсе ничего неизвестно, кроме данных, приводимых в нашей предыдущей работе (1). В этой работе было показано, что крепкие растворы нуклеиновых кислот могут осаждать ВТМ, не вступая с ним в соединение. В данной работе изучалось взаимодействие ВТМ с более слабыми растворами нуклеиновых кислот при различных рН. Известно, что белки образуют осадок с нуклеиновыми кислотами только при рН, лежащем между изоэлектрическими точками взаимодействующих компонентов. Большая часть работ, посвященных комплексам нуклеиновых кислот с белками, ограничивается изучением этих комплексов в условиях их осаждения, а между тем для понимания природы взаимодействия было бы очень важно изучать его при различных рН, что чисто химическим методом мало доступно. Недавно сделанная в этом направлении попытка О. П. Чепиноги и Р. Ш. Гросблата (2) едва ли может считаться вполне убедительной, так как, хотя авторы соединяли белок и тимонуклеиновую кислоту при разных рН, однако затем они осаждали комплекс раствором уксусной и пикриновой кислот, причем, само собой разумеется, рН резко сдвигалось в кислую сторону. Взаимодействие ВТМ с нуклеиновыми кислотами при рН, при которых не образуется нерастворимого соединения, можно изучать вирусологическим методом, т. е. судить о взаимодействии по уменьшению биологической активности вируса.

В первой части работы изучалось взаимодействие альбумина и ВТМ с рибонуклеинатом натрия при рН, при которых образуется осадок. Смеси притотавливались в пробирках для центрифугирования. В опытную пробирку наливали раствор ВТМ или яичного альбумина, раствор рибонуклеината натрия, а также цитратный буфер определенного рН. В контрольную пробирку, кроме нуклеиновой кислоты и буферного раствора, вместо белкового раствора добавлялось соответствующее количество воды. В отдельных опытах вместо буферного раствора добавлялся раствор HCl. Опыты с ВТМ велись при рН 2,0—2,1. Опыты с альбумином велись при рН 3,5. В этих условиях в обоих случаях выпадает осадок. Осадок центрифугировался, и определялся фосфор как в контрольных пробирках, так и в надосадочной жидкости опытных пробирок. По разности мы могли судить о количестве нуклеиновой кислоты, увлеченной белком в осадок. Концентрация ВТМ и, соответственно, альбумина в растворе определялась по количеству общего азота.

В табл. 1 приводятся результаты этих опытов. Так как концентрация нуклеиновой кислоты во всех опытах была одна и та же, то незначительные вариации в количестве общего фосфора в контрольном растворе дают понятие о степени точности определения фосфора. Из табл. 1 видно, что вариации в количестве фосфора, остающегося в надосадочной жидкости, сильно превосходят ошибку опыта, из чего можно сделать вывод, что количество нуклеиновой кислоты, осаждаемой от опыта к опыту, подвержено известным колебаниям, которые не удается контролировать даже при относительном единообразии условий опытов. Далее из таблицы видно, что уменьшение содержания альбумина или ВТМ в смеси сравнительно мало отражается на количестве осаждающейся нуклеиновой кислоты. Вследствие этого уменьшение концентрации белкового компонента в смеси приводит к увеличению количества нуклеиновой кислоты в осадке на единицу осажденного белка.

Таблица 1

Взаимодействие альбумина (Альб.) и вируса мозаичной болезни табака (ВТМ) с дрожжевой нуклеиновой кислотой (ДНК)  
(1 — фосфор в исходном растворе, 2 — фосфор в надосадочной жидкости)

Смесь	Р нуклеин. кислоты в мг/мл			Белок в мг/мл	Р на 1000 г белка	Примечание	
	1	2	1-2				
Альб.+ ДНК	0,352	0,130	0,222	7,00	314,3	В цитратном буфере рН 3,5	
	0,340	0,187	0,153	7,00	218,6		
	0,357	0,230	0,127	7,00	181,4		
	0,347	0,200	0,147	7,50	196,0		
	0,375	0,245	0,130	3,50	400,0		
ВТМ+ДНК	0,370	0,260	0,110	7,00	171,8		В цитратном буфере рН 2,1
	0,375	0,285	0,090	7,00	140,6		
	0,365	0,275	0,090	7,00	140,0		
	0,370*	0,285	0,085	3,50	265,6		
	0,375*	0,255	0,075	3,50	234,3		
	0,365*	0,285	0,080	3,50	250,0	В растворе HCl рН 2,0	
	0,373	0,230	0,143	7,00	223,4		
	0,370	0,235	0,135	7,00	210,0		
	0,355*	0,195	0,160	7,00	250,0		
	0,373*	0,245	0,128	4,75	266,0		
	0,370*	0,255	0,115	4,75	243,0		
	0,373*	0,230	0,143	3,50	415,6		
	0,370*	0,275	0,095	3,50	296,8		
	0,355*	0,210	0,145	3,50	421,8		

\* Звездочкой отмечены цифры контрольных определений, общих для ряда опытов, которые приводятся повторно для удобства чтения таблицы.

Имеющиеся в литературе данные не противоречат полученным нами результатам. В опытах по искусственному получению соединений белка с дрожжевой нуклеиновой кислотой при различных вариациях в количестве разных компонентов мы нередко получаем самые разнообразные отношения (3, 4). Хотя А. Н. Белозерскому (5) удавалось получать нуклеинаты белков, дающие известное право говорить о простой солевой связи, однако в наших опытах взаимодействие белков и нуклеината не может быть сведено к этой связи уже по одному тому, что в части опытов белок связывает значительно больше грамм-атомов фосфора, чем он имеет основных групп, как это видно из табл. 2.

Минимальное количество фосфора в комплексе мы находим при достаточно большом количестве белка в смеси и максимальное — при уменьшении количества белка. Из литературы известно, что белки,

Таблица 2

Количество основных аминокислот, основных групп и грамм-атомов связанного фосфора на 10 000 г альбумина и ВТМ

Белок	Колич. основн. аминокислот в г	Группы		Связывание Р в г-ат
		NH	NH <sub>2</sub>	
Альбумин .	1200	1,8	6,21	5,8—12,6
ВТМ . . .	1127	0	6,63	4,5—13,6

взаимодействуя с детергентами и образуя с ними при определенных рН нерастворимые соли, увлекают за собой значительные количества несвязанного с ними солевой связью детергента (6). Для понимания изучаемых здесь взаимодействий очень важно учесть, что, как

Таблица 3

Процент сохранения активности ВТМ под влиянием нуклеиновых кислот при разных рН

№ опыта	рН	% сохранения активности
---------	----	-------------------------

## ВТМ + 0,5% ДНК

1	2,16	2,7
1а	7,06	9,56
2	2,16	0
2а	7,06	21,0
3	2,16	9,0
3а	7,06	35,0

## ВТМ + 0,5% ТНК

5,11	4	80,0
6,06	4а	79,0
7,14	4b	71,0
7,93	4с	40,0
4,73	5	52,0
5,95	5а	72,0
7,05	5b	92,0
7,93	5с	26,0

Из табл. 3 видно, что, хотя цифры от опыта к опыту варьируют, что зависит от различия чувствительности листьев *N. glutinosa* и сравнительно небольшого количества их в отдельном опыте, определенные соотношения закономерно сохраняются. ДНК сильнее подавляет активность ВТМ, чем ТНК. Подавляющий эффект нуклеиновых кислот сохраняется при рН, при которых ВТМ не переходит в осадок. ТНК в двух опытах при щелочных рН оказалась более активной, чем при кислых.

В опытах, подобных описываемым, следует учитывать возможность действия вещества не на самый вирус, а на чувствительность *N. glutinosa*. В последнем случае уменьшение концентрации вируса при сохранении той же концентрации вещества не увеличивает подавляющего эффекта, как это было более подробно описано ранее (9). Специальный

опыт с ДНК, как видно из рис. 1, показал, что эффект ее не может быть сведен к действию на растение.

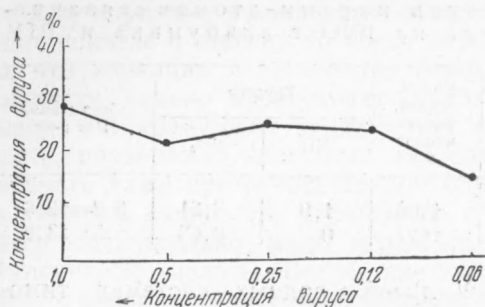


Рис. 1. Влияние 0,5% ДНК на различные концентрации ВТМ (за единицу принята максимальная концентрация вируса)

ятно для активности вируса, и при сильно кислом рН, очевидно, основные группы адениловой кислоты играют защитную роль по отношению к ВТМ. При рН выше изоэлектрической точки адениловая кислота довольно значительно подавляет активность ВТМ.

Приведенные опыты показывают, что ВТМ, содержащий в своем составе около 5% дрожжевой нуклеиновой кислоты, может взаимодействовать, вступая в связь как с нуклеиновыми кислотами, так и с нуклеотидом — адениловой кислотой. Остающиеся свободными основные группы должны играть существенную роль во взаимодействии ВТМ с анионами, в том числе с теми, которые мы рассматриваем в данной работе. Нами было обращено уже ранее внимание на подавление активности вируса не только катионами, но и анионами (9). Данная работа подтверждает значение катионных центров в биологической активности частицы ВТМ.

Действие адениловой кислоты изучалось таким же образом, как и действие нуклеиновых кислот. Результаты трех опытов приведены на рис. 2.

Из этих опытов видно, что при рН 2,0 адениловая кислота не только не подавляет активности вируса, но даже в ряде случаев усиливает ее. Изоэлектрическая точка адениловой кислоты лежит при рН 2,5, при рН 2  $\text{NH}_2$ -группа адениловой кислоты достигает полной диссоциации, и она уже не функционирует как кислота. Кислое рН само по себе неблагопри-

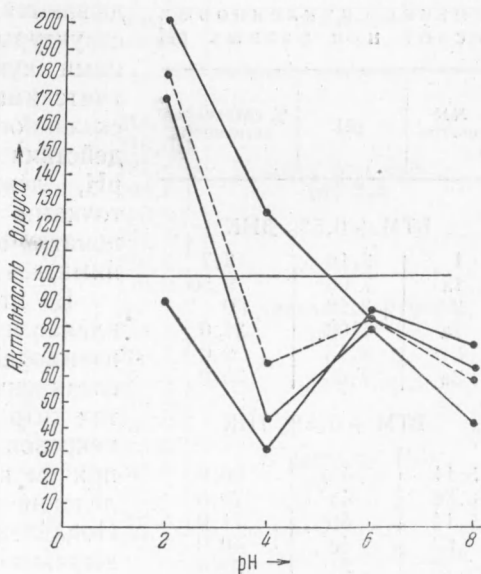


Рис. 2. Влияние 0,5% адениловой кислоты на активность ВТМ при различных рН. Приводятся данные 3 опытов. Пунктиром обозначено среднее из 3 опытов

Институт микробиологии  
Академии наук СССР

Поступило  
14 V 1952

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 В. Л. Рыжков, Л. М. Тарасевич, Г. И. Лойдина, ДАН, 74, № 5 (1950).
- 2 О. П. Чепинога и Р. Ш. Гросблат, Укр. биохим. журн., 21, № 2 (1949).
- 3 E. Hammersten, G. Hammersten, Acta medica scandinavica, 68 (1928).
- 4 S. J. Przybylowski, M. Z. Grynberg, Biochim. Z., 251, No. 4/6 (1932).
- 5 А. Н. Белозерский, Уч. зап. МГУ, Ботаника, 36 (1940).
- 6 H. Bergstermann, Naturwiss., 38, No. 6 (1951).
- 7 D. P. Riley, G. Oster, Biochem. et Biophys. Acta, 7, No. 4 (1951).
- 8 G. Oster, Recueil des trav. chim. de Pays-Bas, 68, No. 12 (1949).
- 9 В. Л. Рыжков, В. А. Смирнова, О. С. Городская, Биохимия, 15, № 3 (1950).