NASA TT F-10, 368

GPO PRICE $ _____

CFSTI PRICE(S) $ _____

Hard copy (HC) 3.00

Microfiche (MF) .65

ff 653 July 65

NASA TT F-10, 368

ISOLATION AND PROPERTIES OF A RNA-DNA COMPLEX FROM ESCHERICHIA COLI CELLS

N. S. Vladychenskaya and V. S. Tongur

Translation of "Vydeleniye i svoystva kompleksa RNK-DNK iz kletok Escherichia coli".
Biokhimiya, Vol. 31, No. 3, pp. 484-490, 1966.

FACILITY FORM 602

N67 15560
(ACCESSION NUMBER)

19
(PAGES)

(NASA CR OR TMX OR AD NUMBER)

(THRU)

1
(CODE)

04
(CATEGORY)

NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION
WASHINGTON OCTOBER 1966

ISOLATION AND PROPERTIES OF A RNA-DNA COMPLEX FROM ESCHERICHIA COLI CELLS

N. S. Vladychenskaya and V. S. Tongur

RNA, not split by ribonuclease, was found in logarithmically growing E. coli cells. A preparation containing this RNA and DNA behaves as homogeneous material in an ultracentrifuge and gives a one-step fusion curve. It is concluded that this material is a RNA-DNA complex. The complex can be detected by either the phenol or detergent methods of isolating nucleic acids. During denaturation the complex breaks down into two components, one of which is destroyed by ribonuclease. In cells taken in the ninth hour of growth the complex to all intents and purposes is absent.

Natural RNA-DNA complexes are of interest because they can be formed in /484* the synthesis of RNA by DNA. Such RNA complexes and fractions, associated with DNA, now have been discovered in animal [1-14], plant [15-19] and bacterial [20,21] cells when using different methods for isolating and investigating nucleic acids (processing with phenol or detergent, differential ultracentrifuging, and chromatographic fractionation). Data on the properties of these complexes (resistance to nucleases, nucleotide composition and metabolic activity of RNA, and its participation in the synthesis of protein) are rather varied and sometimes contradictory. This probably can be attributed to the fact that as a result of the difference in the objects and methods used in the mentioned cases, not entirely identical formations have been discovered.

In logarithmically-growing E. coli cells, we have discovered RNA fractions which were isolated during phenol processing together with DNA and which were not split by RNAase under conditions of splitting of ordinary RNA [22]. On the basis of a preliminary investigation of some properties of an unrefined preparation containing this RNA and DNA, we postulated that this RNA is bound with DNA. This hypothesis is in agreement with available data on the unsplittability of RNA of natural RNA-DNA complexes by RNAase [9,10,12,14,15,17,18].

This paper presents evidence in support of the hypothesis that there is a bond between unsplittable RNA and DNA and describes some properties of their complex. Study of such a complex is of all the more interest in that there are very few data on the existence of RNA in association with DNA in bacterial cells.

*Numbers in the margin indicate pagination of the original foreign text.

Method

Preparation of the bacterial mass. In this work we used E. coli bacteria, strain B12. The bacteria were cultivated in a D agar culture for 18 hours at 37°; then the culture was washed with a physiologic solution and subcultured in a liquid glucose-mineral medium [22]. The bacterial mass was collected by centrifuging, in most experiments at the end of the fifth hour (logarithmic phase); in some experiments it was collected in the ninth hour of growth (late stationary phase). The bacteria were stored in a frozen state.

Isolation of nucleic acids. The principal method for isolation was the /485 Georgiyev phenol method [23], modified for bacterial cells, in combination with deproteinization with chloroform by the Marmur method [24]. The bacterial mass was unfrozen in a solution of 0.14 M NaCl containing 0.05 M sodium nitrate. A 25% solution of sodium dodecylsulfate was added to the resulting suspension to a concentration of 1%, and the mixture was incubated for 10-15 minutes at 37° for lysis of the cells. Then, the volume of the solution, 0.14 M NaCl - 0.05 M Na citrate, in the mixture was reduced to 5-10 times in relation to the weight of the taken mass, an equal volume of phenol, pH 8.5, was added, and the cold mixture was shaken for 40 minutes. (We omitted the earlier employed [22] preliminary processing of the lysates with phenol, pH 6, for removing the free RNA because in the subsequent processing with RNAase this RNA is destroyed). The material was centrifuged for 45 minutes, cold, at 2,500 rpm; the water layer was collected and washed with an equal volume of a chloroform-isoamyl alcohol mixture (24:1) with subsequent centrifuging. Washing with chloroform and isoamyl alcohol was repeated until the intermediate layer disappeared during centrifuging. The preparation, containing RNA and DNA, deproteinized in this way, was precipitated with a standard and dissolved in 0.14 M NaCl - 0.05 M Na citrate.

The modified detergent method for isolating nucleic acids [25] was used in a number of experiments. The bacterial mass was suspended in 5x its volume of 0.14 M NaCl - 0.05 M Na citrate, a 1% concentration of a 5% alcohol solution of sodium dodecylsulfate was added and the mixture was incubated for 10-15 minutes at 37°. The forming gel was mixed for two hours, dry NaCl was added to a 1 M concentration, the mixture was mixed for 15 minutes and centrifuged at 2,500 rpm, cold, for two hours. The water layer was collected, the nucleic acids were precipitated by a standard and dissolved in 0.14 M NaCl - 0.05 M Na citrate. In some cases the isolated extracts also were deproteinized with chloroform and isoamyl alcohol.

The RNA and DNA for the control experiments were obtained by the phenol method [23].

Purification and processing of the isolated preparations with RNAase. The extracts of nucleic acids after solution in 0.14 M NaCl - 0.05 M Na citrate were deproteinized once or twice again with chloroform and isoamyl alcohol and processed with RNAase. RNAase (Worthington), first heated in a hydrous solution for 10 minutes at 75-85°, was added to the preparations in a quantity of 20-50 μg/ml. Incubation was for 45 minutes at 37° in 0.02 M phosphate buffer, pH 7. The preparations were purified of RNA fermentative hydrolysis products

in G-50 Cephadex. The concentration of nucleic acids was determined spectrophotometrically after hydrolysis of a 0.5 N solution of $HClO_4$ [26].

Acidic hydrolysis of the preparations and chromatography of hydrolyzing agents. The method used is a modification of the method described by Spirin and Belozerskiy [27]. Aliquots of purified preparations, isolated from free RNA, containing 500-1000 μg of nucleic acids, were precipitated with an equal volume of a 0.5 N solution of $HClO_4$, washed with a 0.2 N solution of $HClO_4$, alcohol and ether and air-dried. The dried precipitates were hydrolyzed with a 70% solution of $HClO_4$ in sealed ampules in a boiling water bath for one hour. The hydrolysates were applied to 3MM Wattmann paper or Wattmann paper 1 and a chromatographic study was made in the system isopropanol-HCl-water (34:8:8) or N-butanol-water (43:7) [28]. Spots were discovered in the ultrachemiscope, eluted with a 0.1 N solution of HCl (18 hours, 37°) and the optical density of the eluates was measured using a SF-4 spectrophotometer. The content of the bases was computed by multiplying the difference of absorptions at λ_{max} and 290 mμ by scaling factors, computed on the basis of data given by Vischer and Chargaff in [29].

Alkali hydrolysis was by the Schmidt-Tannhauser method [30] for 18 hours at 37° with a 0.5 N solution of KOH. After hydrolysis, the samples were neutralized with concentrated $HClO_4$, ~~its~~ their concentration was reduced in the mixture to 2.5% and the mixture was centrifuged. The precipitate was washed, dried, and subjected to acid hydrolysis and chromatographic study, as was described above.

Denaturation and fusion curves. For denaturation, we used solutions of nucleic acids in a concentration of 0.01 - 0.1 and 0.005% (for ultracentrifuging, using schlieren and ultraviolet optical methods respectively) in 0.014 M NaCl - 0.005 M Na citrate. The solutions were heated for 15 minutes at 100° and cooled rapidly. For checking the completeness of denaturation, we constructed fusion curves of the heated and rapidly cooled preparations. The fusion curves of the native preparations were obtained for a 0.003% concentration in a 0.014 M NaCl - 0.005 M Na citrate solution. The processing of denatured preparations with RNAase, and also their acidic hydrolysis and chromatographic study were carried out under the same conditions as for the native preparations.

Ultracentrifuging. Analytical ultracentrifuging was carried out using a Spinko Ye ultracentrifuge at 45,000, 50,000 and 56,000 rpm, using schlieren and ultraviolet optical methods. In the first case we used solutions of nucleic acids in a concentration of 0.01 - 0.1%, in the second case -- in a concentration of 0.005%. The films obtained during ultracentrifuging with use of an ultraviolet optical method were subjected to photometric study using an automatic MF-4 microphotometer. Centrifuging in a 4 - 20% saccharose gradient was with a Spinko L centrifuge in a SW-30 rotor at 37,000 rpm for 2.5 hours. We used solutions of nucleic acids in a concentration of 0.02 - 0.06%. Fractions of 3-5 drops were diluted by water to 3 ml and their optical absorption was measured.

Results and Their Discussion /486

With processing lysed cells of E. coli, obtained in the logarithmic phase, with phenol, pH 8.5, we obtained extracts containing all the RNA and DNA cells. The extracts were treated with RNAase and isolated from the RNA hydrolysis products in Cephadex. The preparation processed and purified in this way, in which the RNA and DNA remained unsplit, in our opinion is a RNA-DNA complex.

For the purpose of confirming and refining the data on the content of unsplit RNA in the investigated material, obtained earlier when determining it in an alkaline hydrolysate of the unrefined preparation [22], we carried out a chromatographic investigation of the postulated complex. In the chromatographic study of the acidic hydrolysates of the purified preparations and preparations processed with RNAase, we discovered a spot which on the basis of its localization and absorption spectrum was identified as uracil. The presence of this spot was caused by the presence of unsplittable RNA in the investigated material because on the chromatograms of the acid-insoluble part of the preparations, treated with a 0.5 N solution of KOH, only four spots were detected, corresponding to DNA bases, and no spot of uracil was discovered (Table 1). According to spectrophotometric data on the eluates of the spots, the uracil content is 10-17% in conversion to thymine (Table 2). Thus, the content of unsplittable RNA, that is, the quantity of RNA in the complex, averages about 15% of the DNA. The existing scatter of data apparently can be attributed to the nonhomogeneity of the material.

TABLE 1. URACIL/THYMINE RATIO IN PREPARATIONS OF NUCLEIC ACIDS TREATED WITH RNAase OBTAINED IN DIFFERENT WAYS (ANALYTICAL DATA FOR THREE-FIVE PREPARATIONS).

	U/T, %
Phenol isolation method	14.7
Same, after alkaline hydrolysis	0
Same, after denaturation and repeated treatment with RNAase	0
Control mixture of RNA and DNA, treated with phenol	0
Phenol isolation method, 8-hour culture	2 (0-5)
Detergent isolation method, 5-hour culture	11.6 (11.0-12.3)

In order to demonstrate that the formation of a bond between RNA and DNA with the formation of a complex is not the result of treatment with phenol, we formulated control experiments for clarifying the influence of phenol on the mixture of free RNA and DNA. The solutions of DNA and RNA were mixed in

TABLE 2. CONTENT OF URACIL (U) AND THYMINE (T) IN PREPARATIONS OF NUCLEIC ACIDS (IN μMOLE$\cdot 10^2$) TREATED WITH RNAase.

Bases	Data from analysis of independent preparations							
U	11.2	5.0	6.4	6.7	1.1	2.7	4.8	2.0
T	75.5	48.0	39.5	12.3	9.0	16.8	22.6	12.8
U/T, %	14.8	10.4	16.2	13.8	13.3	16.0	17.5	15.7
U/T_{mean} = 14.7%								

concentrations and ratios approximately corresponding to their concentrations and ratios in the experimental mixture and subjected to the same treatment as the investigated bacterial lysates (shaking with phenol, chloroform and trea-/487 tment with RNAase). The control mixtures were hydrolyzed to the bases and a chromatographic study was made in an acidic isopropanol or N-butanol. The following combinations were used: T2-DNA and total RNA from E. coli, DNA of thymus and total RNA from E. coli, DNA of thymus and RNA from rat liver*. (We could not use DNA from E. coli for these experiments, because according to our data it contained RNA). In all cases neither uracil nor specific absorption in the corresponding region could be detected on the chromatograms (Table 1).

If the detected complex is not a product of phenol treatment, it obviously should be detected also during the extraction of nucleic acids by a different method. For demonstration of this assumption, DNA was isolated from E. coli cells (in the "logarithmic" growth phase) by the detergent method**. The resulting preparations were analyzed the same as those isolated by the phenol method. It was found that the DNA obtained in this way also contains RNA, unsplittable by RNAase, in a quantity of 11.6% (Table 1).

The formation of the RNA-DNA complex is dependent on the material used: with use of this same phenol method no complex was discovered in the cells which were in the late stationary phase (Table 1).

Thus, the results of the control experiments preclude the possibility that the detected complex is an artifact.

---

*The DNA of the T2 bacteriophage was provided for us through the kindness of F. L. Kiselev.

**Analysis of the preparations obtained by the detergent method and isolated from the cells after nine hours growth, was done by V. M. Kochkina, graduate of the Department of Plant Biochemistry, Biology-Soils Faculty, Moscow State University.

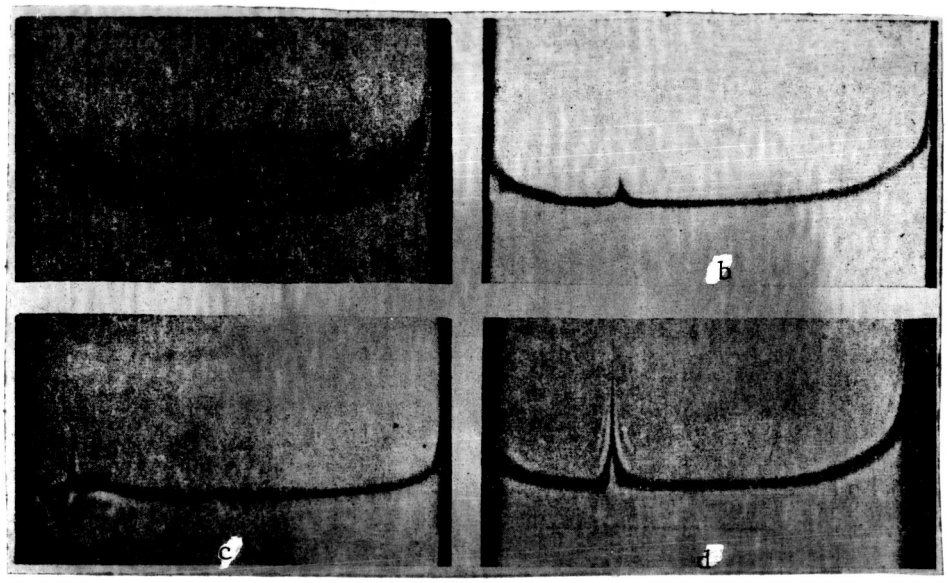

Figure 1. Sedimentation Diagrams of the RNA-DNA Complex. The Rate of Rotor Rotation was 50,740 rpm.
Legend: a = Native Preparation, Concentration 0.1%, Time After Attaining Full Rate of Rotation was 19 Minutes; b = Same, Concentration 0.01%, 25 Minutes; c = Denatured Preparation, Concentration 0.19%, 5 Minutes; d = Denatured Preparation, Treated with RNAase, Concentration 0.1%, 30 Minutes.

In order to clarify the problem of the degree of homogeneity of the postulated complex we investigated it in an ultracentrifuge. The ultracentrifuging was done in an analytical ultracentrifuge, employing the schlieren and /488 ultraviolet optical methods, and in a preparation ultracentrifuge in a saccharose gradient. In all cases the native complex was sedimented in one peak, in the experiment with a 0.005% concentration of nucleic acids s = 28S (Figures 1a and 1b; 2a; 3a). Independent sedimentation of RNA was not observed, supporting the belief that the RNA is bonded to the DNA. In addition to centrifuging, we obtained a fusion curve for the investigated preparation (Figure 4a). The one-step shape of the curve also indicates bonding of RNA with DNA: the curve has no rise in the region of fusion of free RNA, that is, unsplittable RNA does not appear independently of DNA. The results indicate that the material containing unsplittable RNA and DNA in actuality is their complex. However, it is impossible to preclude the hypothesis that not all the DNA in the investigated preparation is bonded to RNA. In the latter case it is possible to assume the presence of a mixture of DNA molecules and a DNA-RNA complex, and the apparent homogeneity of the material can be attributed to their structural similarity.

The possibility of separating the RNA and DNA of the complex was investigated by heating it at 100° with subsequent rapid cooling. We proceeded here

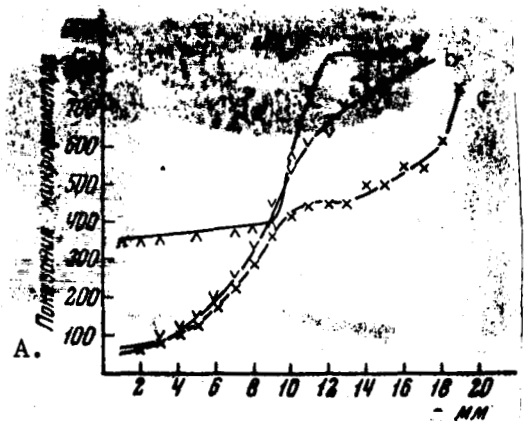

Figure 2. Curves of Optical Density of Photo Plates Obtained at the Time of Ultracentrifuging of the RNA-DNA Complex, Using the Ultraviolet Optical Method, Concentration 0.005%.
Legend: a = Native Preparation, Rate of Rotation of Rotor 45,000 rpm, Time after Reaching Full Velocity -- 20 Minutes; b = Denatured Preparation Treated with RNAase, at 46,000 rpm, 14 Minutes; c = Denatured; A = Microphotometer Readings.

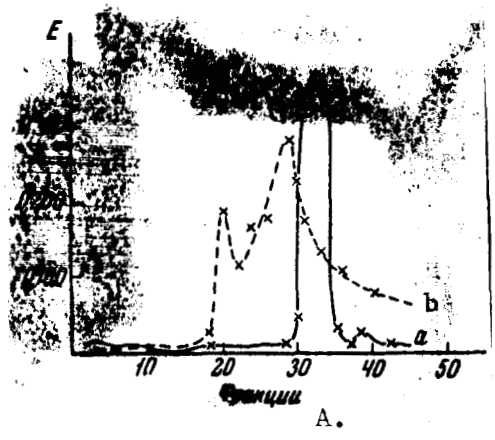

Figure 3. Optical Absorption curves Obtained During Ultracentrifuging of RNA-DNA Complex in a Saccharose Gradient. Concentration 0.012%, Rate of Rotation of Rotor 37,000 rpm, 2.5 Hours.
Legend: a = Native; b = Denatured; A = Fractions.

on the assumption that under such conditions there is a denaturation of the complex with the releasing of RNA. For checking the completeness of the denaturation we obtained a fusion curve of the heated preparation. The curve had a shape typical for denatured polynucleotides (Figure 4b). The denatured /489

complex also was investigated in an ultracentrifuge.

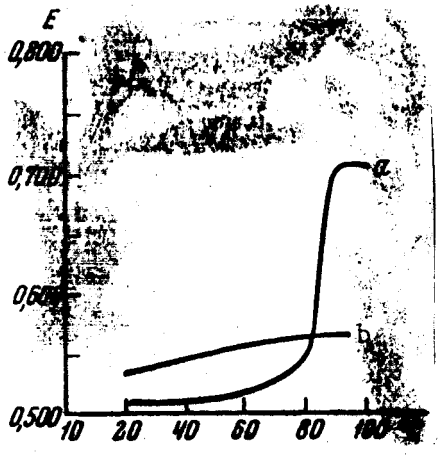

Figure 4. Fusion Curves of RNA-DNA Complex.
Legend: a = Native; b = Denatured Preparation, Concentration 0.1% during Denaturation and 0.003% during Fusion.

In the first series of experiments, we investigated the denatured preparation directly. We found two peaks on the sedimentation diagrams and on the optical absorption curves obtained during centrifuging in a saccharose gradient (Figures 1c and 3b). On the curves obtained after photometric study of the films obtained during centrifuging with the use of the ultraviolet optical method, there is an additional rise which indicates the presence of a second component in the investigated mixture (Figure 2c). The ratio of the areas of the peaks obtained on the saccharose fractionation curve corresponds approximately to the established RNA-DNA ratio in the complex.

In the second series of experiments, the denatured complex was centrifuged after treatment with RNAase. In this case, one of the peaks on the sedimentation diagrams and the additional rise on the curves obtained during the photometric study of the films obtained in the ultraviolet both disappeared (Figures 1d and 2b).

The experiments in ultracentrifuging denatured preparations were carried out with chromatographic controls. The chromatograms of preparations first denaturated and then treated with RNAase revealed no spots of uracil.

Thus, the results of experiments with a denaturated preparation obviously indicate that during denaturation there is a ~~decay~~ breakdown of the complex into RNA and DNA. The RNA released is destroyed by ribonuclease.

In order to obtain some information on the nature of RNA entering into a complex with DNA, we determined the presence of this RNA in a bacterial cell in dependence on its physiological state. For this purpose, the quantity of

unsplittable RNA was determined in the cells of E. coli obtained in the ninth hour of growth, that is, in the late stationary phase. It was found that in this case the mean quantity of RNA bound with DNA is 2%, while in seven determinations of the twelve made for three preparations, this RNA was not detected at all (Table 1). Obviously, the existence of a complex is associated with the state of cell growth. The absence of RNA in complex with DNA in cells in the stationary phase of growth, when the rate of synthesis processes is lowered, makes it possible to surmise that this RNA is in the process of synthesis, which possibly is caused by existence of the complex itself.

The totality of these data apparently indicates the existence of a RNA-DNA complex in cells of E. coli in the logarithmic growth stage. The conclusion drawn is in agreement with the data given by Smith in [21], who discovered a DNA-RNA complex during centrifuging of the DNA of E. coli in a cesium chloride medium.

Conclusions

RNA, not split by ribonuclease, was found in logarithmically growing E. coli cells. A preparation containing this RNA and DNA behaves as homogeneous material in an ultracentrifuge and gives a one-step fusion curve. It is concluded that this material is a RNA-DNA complex. The complex can be detected by either the phenol or detergent methods of isolating nucleic acids. During denaturation the complex breaks down into two components, one of which is destroyed by ribonuclease. In cells taken in the ninth hour of growth, the complex to all intents and purposes is absent.

In conclusion, we express appreciation to Doctor of Biological Sciences V. O. Shikiter for assistance in carrying out the ultracentrifuge experiments.

REFERENCES

1. Sibatani, A., K. Yamana, K. Kimura and H. Okagaki: Biochim. et Biophys. /490 Acta 33: 590, 1959.

2. Sibatani, A., K. Yamana, K. Kimura and T. Takahashi: Nature 186: 215, 1960.

3. Kimura, K.: Biochim. et Biophys. Acta 55: 22, 1962.

4. Ramenskaya, G. P., G. P. Georgiyev, L. S. Mil'man, V. L. Mant'yeva and I. B. Zbarskiy: Dokl. AN SSSR 131: 680, 1960.

5. Mant'yeva, V. L.: Vopr. Med. Khimii 9: 93, 1963.

6. Sarkar, N.: Federat. Proc. 20: 147, 1961.

7. Finamore, F. and E. Volkin: 140th Nat. Meet. Amer. Chem. Soc., Chicago, 1963.

8. Harel, J., L. Harel, F. Lacour et al.: J. Mol. Biol. 7: 645, 1963.

9. Kidson, C., K. Kirby and R. Ralph: J. Mol. Biol. 7: 312, 1963.

10. Kidson, C. and K. Kirby: J. Mol. Biol. 10: 187, 1964.

11. Mead, C.: J. Biol. Chem. 239: 550, 1964.

12. Mandel, P. and O. Bokrowska: Biochim. Biophys. Acta 91: 683, 1964.

13. Kay, E.: Nature 202: 390, 1964.

14. Nass, S., M. Nass and U. Henmix: Biochim. et Biophys. Acta 95: 426, 1965.

15. Bonner, J., R. Huang and N. Maheshwari: Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 47: 1954, 1961.

16. Schulmann, H. and D. Bonner: Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 48: 53, 1962.

17. Cherry, J.: Science 146: 1066, 1964.

18. Richter, G. and N. Senger: Biochim. et Biophys. Acta 95: 362, 1965.

19. Sebesta, K., I. Bauerova and Z. Sormova: Biochim. and Biophys. Res. Communs. 19: 55, 1965.

20. Otaka, E., S. Osawa, G. Oota et al.: Biochim. et Biophys. Acta 55: 310, 1962.

21. Smith, K.: Federat. Proc. 24: 293, 1965.

22. Tongur, V. S., N. S. Vladychenskaya, V. V. Romanov and Ye. D. Vyshepan: Byull. Eksperim. Biol. i Med. 57: 65, 1964.

23. Georgiyev, G. P.: Biokhimiya 24: 472, 1959.

24. Marmur, J.: J. Mol. Biol. 3: 208, 1961.

25. Kay, E., N. Simmons and A. Dounce: J. Amer. Chem. Soc. 74: 1724, 1952.

26. Spirin, A. S.: Biokhimiya 23: 656, 1958.

27. Spirin, A. S. and A. N. Belozerskiy: Biokhimiya 21: 786, 1956.

28. Wyatt, G.: In: Nukleinovyye Kisloty. (Nucleic Acids.) IL, 1958, p. 441.

29. Vischer, A. and E. Chargaff: J. Biol. Chem. 176: 503, 1958.

30. Schmidt, G. and S. Tannhauser: J. Biol. Chem. 161: 83, 1945.

Article submitted 5 July 1965

FRANK C. FARNHAM COMPANY
133 South 36th Street
Philadelphia, Pa. 19104

(78890)

TTF 10, 368
1497-3

УДК 547.963.3

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА КОМПЛЕКСА РНК—ДНК ИЗ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*

Н. С. ВЛАДЫЧЕНСКАЯ и В. С. ТОНГУР

Институт биологической и медицинской химии Академии медицинских наук СССР, Москва

Естественные комплексы РНК—ДНК представляют интерес в связи с тем, что они могут образовываться при синтезе РНК на ДНК. Такие комплексы и фракции РНК, связанные с ДНК, обнаружены в настоящее время в животных [1—14], растительных [15—19] и бактериальных [20; 21] клетках при использовании различных методов выделения и исследования нуклеиновых кислот (обработка фенолом или детергентами, дифференциальное ультрацентрифугирование, хроматографическое фракционирование). Данные относительно свойств этих комплексов (устойчивость к нуклеазам, нуклеотидный состав и метаболическая активность РНК, ее участие в синтезе белка) довольно разнообразны и иногда противоречивы. Это, вероятно, объясняется тем, что, вследствие различия использованных объектов и примененных методов, в указанных случаях обнаруживались не вполне идентичные образования.

Нами была обнаружена в логарифмически растущих клетках *E. coli* фракция РНК, выделяющаяся при фенольной обработке вместе с ДНК и не расщепляющаяся РНКазой в условиях расщепления обычной РНК [22]. На основании предварительного исследования некоторых свойств неочищенного препарата, содержащего эту РНК и ДНК, мы предположили, что эта РНК связана с ДНК. Высказанное предположение находится в соответствии с имеющимися данными о нерасщепляемости РНКазой РНК естественных комплексов РНК—ДНК [9; 10; 12; 14; 15; 17; 18].

В настоящей работе приведены доказательства в пользу предположения о связи нерасщепляемой РНК с ДНК и описаны некоторые свойства их комплекса. Изучение такого комплекса представляет тем больший интерес, что данных о существовании в бактериальных клетках РНК, связанной с ДНК, очень мало.

МЕТОДИКА

Приготовление бактериальной массы. Для работы использовали бактерии *E. coli* штамма B12. Бактерии выращивали на питательном агаре Д в течение 18 час. при 37°, затем культуру смывали физиологическим раствором и пересевали на жидкую глюкозно-минеральную среду [22]. Бактериальную массу собирали центрифугированием, в большинстве опытов в конце пятого часа (логарифмическая фаза); в некоторых опытах — на девятом часу роста (поздняя стационарная фаза). Бактерии хранили в замороженном состоянии.

1497-3

Выделение нуклеиновых кислот. Основным методом выделения служил модифицированный для бактериальных клеток фенольный метод Георгиева [23] в сочетании с депротеинизацией хлороформом по Мармуру [24]. Бактериальную массу размораживали в растворе 0,14 *М* NaCl, содержащем 0,05 *М* цитрат натрия. К получившейся суспензии добавляли 25%-ный раствор додецилсульфата натрия до концентрации 1% и смесь инкубировали 10—15 мин. при 37° для лизиса клеток. После этого объем раствора 0,14 *М* NaCl — 0,05 *М* Na-цитрата в смеси доводили до 5—10-кратного по отношению к весу взятой массы, добавляли равный объем фенола, pH 8,5, и смесь встряхивали 40 мин. на холоду. (Применявшуюся ранее [22] предварительную обработку лизатов фенолом, pH 6, для удаления свободной РНК мы опустили, так как при последующей обработке РНКазой эта РНК разрушается). Материал центрифугировали 45 мин. на холоду при 2500 *об/мин*, водный слой собирали и промывали равным объемом смеси хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1) с последующим центрифугированием. Промывку хлороформом с изоамиловым спиртом повторяли до тех пор, пока не исчезал промежуточный слой при центрифугировании. Депротеинизированный таким образом препарат, содержащий РНК и ДНК, осаждали этанолом и растворяли в 0,14 *М* NaCl— 0,05 *М* Na-цитрате.

В ряде опытов применяли модифицированный детергентный метод выделения нуклеиновых кислот [25]. Бактериальную массу суспендировали в 5-кратном объеме 0,14 *М* NaCl — 0,05 *М* Na-цитрата, добавляли 5%-ный спиртовой раствор додецилсульфата натрия до концентрации 1% и смесь инкубировали 10—15 мин. при 37°. Образовавшийся гель перемешивали в течение 2 час., затем добавляли сухой NaCl до концентрации 1 *М*, смесь перемешивали 15 мин. и центрифугировали при 2500 *об/мин.* на холоду 2 часа. Водный слой собирали, нуклеиновые кислоты осаждали этанолом и растворяли в 0,14 *М* NaCl — 0,05 *М* Na-цитрате. В некоторых случаях выделенные экстракты дополнительно депротеинизировали хлороформом с изоамиловым спиртом.

РНК и ДНК для контрольных опытов получали фенольным методом [23].

Очистка и обработка РНКазой выделенных препаратов. Экстракты нуклеиновых кислот после растворения в 0,14 *М* NaCl — 0,05 *М* Na-цитрате 1—2 раза повторно депротеинизировали хлороформом с изоамиловым спиртом и обрабатывали РНКазой. РНКазу (Worthington), предварительно прогретую в водном растворе 10 мин. при 75—85°, добавляли в препараты в количестве 20—50 *мкг/мл.* Инкубацию проводили 45 мин. при 37° в 0,02 *М* фосфатном буфере, pH 7. Препараты очищали от продуктов ферментативного гидролиза РНК на Сефадексе G-50. Концентрацию нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически после гидролиза 0,5 н. $HClO_4$ [26].

Кислотный гидролиз препаратов и хроматография гидролизатов. Примененная методика является модификацией метода, описанного Спириным и Белозерским [27]. Аликвоты из очищенных и отделенных от свободной РНК препаратов, содержащие 500—1000 *мкг* нуклеиновых кислот, осаждали равным объемом 0,5 н. $HClO_4$, промывали 0,2 н. $HClO_4$, спиртом и эфиром и высушивали на воздухе. Высушенные осадки гидролизовали 70%-ной $HClO_4$ в запаянных ампулах на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Гидролизаты наносили на бумагу Ваттман 3ММ или Ваттман 1 и хроматографировали в системе изопропанол — HCl — вода (34 : 8 : 8) или *н*-бутанол — вода (43 : 7) [28]. Пятна обнаруживали на ультрахемископе, элюировали 0,1 н. HCl (18 час., 37°) и измеряли оптическую плотность элюатов на спектрофотометре СФ-4. Содержание оснований рассчитывали, умножая разность поглощений при $\lambda_{макс}$ и 290 *мкк* на пересчетные коэффициенты, вычисленные на основании данных Вишера и Чаргаффа [29].

Щелочной гидролиз проводили по методу Шмидта и Таннгаузера [30] в течение 18 час. при 37° с 0,5 н. KOH. После гидролиза пробы нейтрализовали концентрированной $HClO_4$, доводили ее концентрацию в смеси до 2,5% и смесь центрифугировали. Осадок промывали, высушивали, подвергали кислотному гидролизу и хроматографировали, как описано выше.

Денатурация и кривые плавления. Для денатурации использовали растворы нуклеиновых кислот в концентрации 0,01—0,1 и 0,005% (для ультрацентрифугирования с использованием «шлирен» и ультрафиолетовой оптики, соответственно) в 0,014 *М* NaCl — 0,005 *М* Na-цитрате. Растворы прогревали 15 мин. при 100° и быстро охлаждали. Для проверки полноты денатурации снимали кривые плавления прогретых и быстро охлажденных препаратов. Кривые плавления нативных препаратов снимали в концентрации 0,003% в растворе 0,014 *М* NaCl — 0,005 *М* Na-цитрат. Обработку денатурированных препаратов РНКазой, а также их кислотный гидролиз и хроматографию проводили в тех же условиях, что и нативных.

Ультрацентрифугирование. Аналитическое ультрацентрифугирование выполняли на ультрацентрифуге Спинко Е при 45 000, 50 000 и 56 000 *об/мин.* с применением «шлирен» и ультрафиолетовой оптики. В первом случае использовали растворы нуклеиновых кислот в концентрации 0,01—0,1%, во втором — в концентрации 0,005%. Пленки, полученные при ультрацентрифугировании с использованием ультрафиолетовой оптики, фотометрировали на регистрационном микрофотометре МФ-4. Центрифугирование в градиенте сахарозы 4—20% проводили на центрифуге Спинко Л в роторе SW-39 при 37 000 *об/мин* в течение 2,5 час. Использовали растворы нуклеиновых кислот в концентрации 0,02—0,06%. Фракции по 3—5 капель разводили водой до 3 *мл* и измеряли их оптическое поглощение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При помощи обработки фенолом pH 8,5 лизированных клеток *E. coli*, взятых в логарифмической фазе, мы получали экстракты, содержащие всю РНК и ДНК клетки. Экстракты обрабатывали РНКазой и отделяли от продуктов гидролиза РНК на Сефадексе. Обработанный и очищенный таким образом препарат, в котором остались нерасщепившаяся РНК и ДНК, являлся, согласно нашему предположению, комплексом РНК—ДНК.

С целью подтверждения и уточнения данных о содержании нерасщепляемой РНК в исследуемом материале, полученных ранее при ее определении в щелочном гидролизате неочищенного препарата [22], мы провели хроматографическое исследование предполагаемого комплекса. При хроматографии кислотных гидролизатов очищенных и обработанных РНКазой препаратов было обнаружено пятно, которое на основании локализации и спектра поглощения было идентифицировано как урацил. Наличие этого пятна обусловлено присутствием нерасщепляемой РНК в исследуемом материале, так как на хроматограммах кислотонерастворимой части препаратов, обработанных 0,5 н. КОН, было обнаружено только четыре пятна, соответствующих основаниям ДНК, и не было обнаружено пятно урацила (табл. 1). По данным

Таблица 1

Отношение У/Т в обработанных РНКазой препаратах нуклеиновых кислот, полученных различным образом (данные анализа трех—пяти препаратов)

	У/Т, %
Фенольный метод выделения	14,7
То же, после щелочного гидролиза	0
То же, после денатурации и повторной обработки РНКазой	0
Контрольная смесь РНК и ДНК, обработка фенолом	0
Фенольный метод выделения, 8-часовая культура	2 (0—5)
Детергентный метод выделения, 5-часовая культура	11,6 (11,0—12,3)

спектрофотометрии элюатов пятен, содержание урацила составляет 10—17% в пересчете на тимин (табл. 2). Таким образом, содержание

Таблица 2

Содержание урацила (У) и тимина (Т) в обработанных РНКазой препаратах нуклеиновых кислот (в *мкмоль*×10²)

Основания	Данные анализа независимых препаратов							
У	11,2	5,0	6,4	6,7	1,1	2,7	4,8	2,0
Т	75,5	48,0	39,5	12,3	9,0	16,8	22,6	12,8
У/Т, %	14,8	10,4	16,2	13,8	13,3	16,0	17,5	15,7

$У/Т_{средн.}$ 14,7%

нерасщепляемой РНК, т. е. количество РНК в комплексе, составляет в среднем около 15% ДНК. Существующий разброс данных, очевидно, объясняется биологической неоднородностью материала.

Чтобы показать, что образование связи между РНК и ДНК с образованием комплекса не является следствием фенольной обработки, были поставлены контрольные опыты по выяснению влияния фенола на смесь свободных РНК и ДНК. Растворы ДНК и РНК смешивали в концентрациях и соотношении, приблизительно соответствующих их концентрациям и соотношению в опытной смеси, и подвергали такой же обработке,

что и исследуемые бактериальные лизаты (встряхивание с фенолом, хлороформом и обработка РНКазой). Контрольные смеси гидролизовали до оснований и хроматографировали в кислом изопропаноле или *н*-бутаноле. Были взяты следующие комбинации: Т2-ДНК и суммарная РНК *E. coli*, ДНК тимуса и суммарная РНК *E. coli*, ДНК тимуса и

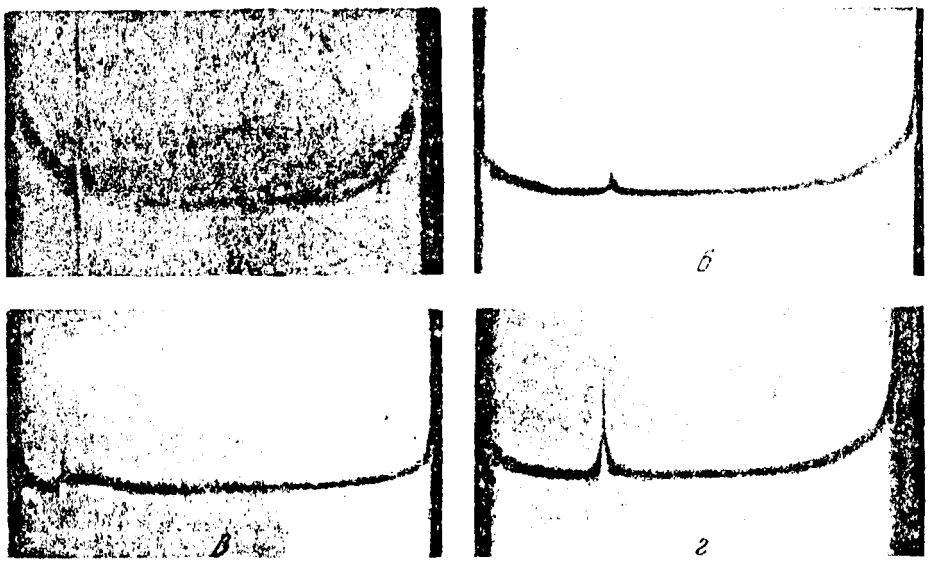

Рис. 1. [illegible] ДНК

[illegible] РНКазой [illegible] центрация [illegible]

РНК печени крысы*. (Исп[illegible] ДНК *E. coli* для этих опытов мы не могли, так как она, по нашим данным, содержала РНК). Во всех случаях на хроматограммах не было обнаружено ни урацила, ни специфического поглощения в соответствующей области (табл. 1).

Если обнаруженный комплекс не является продуктом фенольной обработки, то, очевидно, он должен быть обнаружен и при экстракции нуклеиновых кислот иным способом. Для доказательства этого предположения ДНК выделяли из клеток *E. coli* (в фазе «логарифмического» роста) детергентным методом**. Полученные препараты анализировали так же, как и выделенные фенольным методом. Оказалось, что полученная таким образом ДНК также содержит РНК, не расщепляемую РНКазой, в количестве 11,6 [illegible] (табл. 1).

Образование комплекса РНК – ДНК зависит от использованного материала: при применении того же фенольного метода, комплекс не был обнаружен в клетках, находящихся в поздней стационарной фазе (табл. 1).

Таким образом, результаты контрольных опытов исключают возможность того, что обнаруженный комплекс является артефактом.

Для выяснения вопроса о том, насколько однороден предполагаемый комплекс, мы исследовали его в ультрацентрифуге. Ультрацентрифугирование проводили в аналитической ультрацентрифуге с использо-

---

* ДНК фаза Т2 была любезно предоставлена нам Ф. Л. Киселевым.

** [illegible] ...ного факультета МГУ В. М. [illegible]

вачием «шлирен» и ультрафиолетовой оптики и в препаративной ультрацентрифуге в градиенте сахарозы. Во всех случаях нативный комплекс седиментировал одним пиком, в опыте с 0,005%-ной концентрацией нуклеиновых кислот $s=28S$ (рис. 1, *а* и *б*; 2*а*; 3*а*). Независимой седиментации РНК не наблюдалось, что говорит в пользу того, что РНК связана с ДНК. В дополнение к ультрацентрифугированию, снимали кривую плавления исследуемого препарата (рис. 4, *а*). Одноступенчатая форма кривой также свидетельствует о связи РНК с ДНК: на кривой отсутствует подъем в области плавления свободной РНК, т. е. нерасщепляемая РНК не проявляет себя независимо от ДНК. Полученные результаты указывают на то, что материал, содержащий нерасщепляемую РНК и ДНК, действительно представляет собой их комплекс. Нельзя, однако, исключить предположение о том, что не вся ДНК в исследуемом препарате связана с РНК. В последнем случае можно предположить о наличии смеси молекул ДНК и комплекса ДНК — РНК, а кажущаяся однородность материала объясняется их структурным подобием.

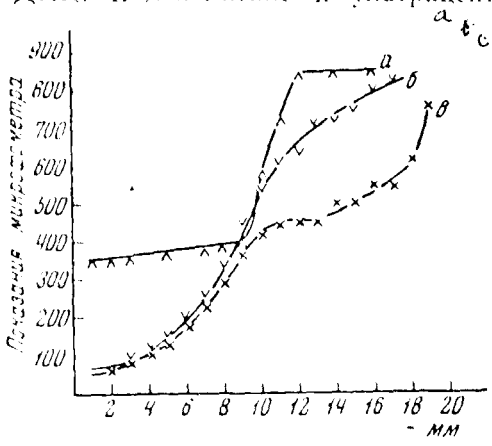

Рис. 2. Кривые оптической плотности фотопластинки, полученной при ультрацентрифугировании комплекса РНК — ДНК с использованием ультрафиолетовой оптики, концентрация 0,005%

а — нативный препарат, скорость вращения ротора 45 000 *об/мин*, время после достижения полной скорости 20 мин; *б* — денатурированный и обработанный РНКазой препарат при 35 000 *об/мин*, 14 мин; *в* — денатурированный

Возможность разделения РНК и ДНК комплекса исследовали, прогревая его при 100° с последующим быстрым охлаждением. При этом мы исходили из предположения о том, что в таких условиях произойдет денатурация комплекса с освобождением РНК. Для контроля за полнотой денатурации снимали кривую плавления прогретого препарата. Кривая имела вид, типичный для денатурированных полинуклеотидов

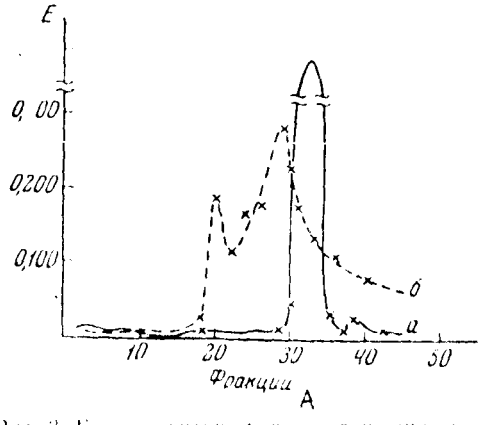

Рис. 3. Кривые оптического поглощения, полученные при ультрацентрифугировании комплекса РНК — ДНК в градиенте сахарозы

Концентрация 0,012%, скорость вращения ротора 37 000 *об/мин*, 2,5 часа, *а* — нативный, *б* — денатурированный препарат

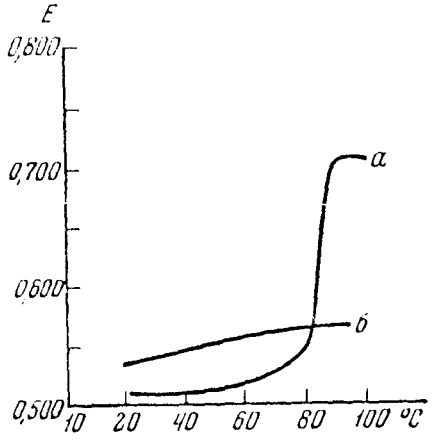

Рис. 4. Кривые плавления комплекса РНК — ДНК

а — нативный препарат, концентрация 0,003%, *б* — денатурированный препарат, концентрация 0,1% при денатурации и 0,003% при плавлении

(рис. 4, *б*). Денатурированный комплекс также исследовали в ультрацентрифуге.

В первой серии опытов исследованию подвергали непосредственно денатурированный препарат. При этом обнаруживалось два пика на седиментационных диаграммах и на кривых оптического поглощения, полученных при центрифугировании в градиенте сахарозы (рис. 1, *в*, 3, *б*). На кривых фотометрирования пленок, полученных при центрифугировании с использованием ультрафиолетовой оптики, появляется дополнительный подъем, говорящий о наличии второго компонента в исследуемой смеси (рис. 2, *в*). Соотношение площадей пиков, полученных на кривых сахарозного фракционирования, приблизительно соответствует установленному отношению РНК — ДНК в комплексе.

Во второй серии опытов денатурированный комплекс ультрацентрифугировали после обработки РНКазой. В этом случае исчезал как один из пиков на седиментационных диаграммах, так и дополнительный подъем на кривых, полученных при фотометрировании снятых в ультрафиолете пленок (рис. 1, *г*, 2, *б*).

Опыты по ультрацентрифугированию денатурированного препарата проводили под контролем хроматографии. На хроматограммах денатурированного и затем обработанного РНКазой препарата не было пятна урацила.

Таким образом, результаты опытов с денатурированным препаратом, очевидно, говорят о том, что при денатурации происходит распад комплекса на РНК и ДНК. Освобожденная РНК разрушается рибонуклеазой.

Для получения некоторых сведений относительно природы РНК, входящей в комплекс с ДНК, определяли наличие этой РНК в бактериальной клетке в зависимости от ее физиологического состояния. С этой целью количество нерасщепляемой РНК определяли в клетках *E. coli*, взятых на девятом часу роста, т. е. в поздней стационарной фазе. Оказалось, что в этом случае среднее количество связанной с ДНК РНК составляет 2%, а в семи определениях, из 12 сделанных для трех препаратов, эта РНК не была обнаружена совсем (табл. 1). Очевидно, существование комплекса связано со стадией роста клеток. Отсутствие РНК в комплексе с ДНК в клетках, находящихся в стационарной фазе роста, когда интенсивность синтетических процессов снижена, позволяет думать, что эта РНК находится в процессе синтеза, чем, может быть, и обусловлено само существование комплекса.

Совокупность представленных данных свидетельствует, по-видимому, о существовании комплекса РНК — ДНК в клетках *E. coli*, находящихся в логарифмической стадии роста. Сделанный вывод находится в соответствии с данными Смита [21], который обнаружил комплекс ДНК — РНК при центрифугировании ДНК *E. coli* в градиенте хлористого цезия.

ВЫВОДЫ

В логарифмически растущих клетках *E. coli* найдена РНК, не расщепляемая рибонуклеазой. Препарат, содержащий эту РНК и ДНК, ведет себя как однородный материал в ультрацентрифуге и дает одноступенчатую кривую плавления. Делается вывод о том, что этот материал является комплексом РНК и ДНК. Комплекс обнаруживается как при фенольном, так и при детергентном методах выделения нуклеиновых кислот. При денатурации комплекс распадается на два компонента, один из которых разрушается рибонуклеазой. В клетках, взятых на девятом часу роста, комплекс практически не обнаруживается.

В заключение приносим благодарность докт. биол. наук В. О. Шпикитеру за помощь в проведении опытов по ультрацентрифугированию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sibatani A., Yamana K., Kimura K., Okagaki H., Biochim. et biophys. acta, **33**, 590, 1959
2. Sibatani A., Yamana K., Kimura K., Takahashi T., Nature **186**, 215, 1960.
3. Kimura K., Biochim. et biophys. acta **55**, 22, 1962
4. Раменская Г. П., Георгиев Г. П., Мильман Л. С., Мантьева В. Л., Збарский И. Б., Докл. АН СССР, **131**, 680, 1960
5. Мантьева В. Л., Вопр. мед. химии **9**, 93, 1963
6. Sarkar N., Federat. Proc. **20**, 147, 1961
7. Finamore F., Volkin E., 140th Nat. Meet. Amer. Chem. Soc. Chicago, 1963
8. Harel J., Harel L., Lacour F. *et al.*; J. Mol. Biol. **7**, 645, 1963
9. Kidson C., Kirby K., Ralph R., J. Mol. Biol. **7**, 312, 1963
10. Kidson C., Kirby K., J. Mol. Biol., **10**, 187, 1964
11. Mead C., J. Biol. Chem. **239**, 550, 1964
12. Mandel P., Bokrowska O., Biochim. Biophys. Acta **91**, 683, 1964
13. Kay E., Nature **202**, 390, 1964
14. Nass S., Nass M., Henmix U., Biochim. et Biophys. Acta **95**, 426, 1965
15. Bonner J., Huang R., Maheshwari N., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) **47**, 1954, 1961
16. Schulmann H., Bonner D., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **48**, 53, 1962
17. Cherry J., Science **146**, 1066, 1964
18. Richter G., Senger N., Biochim. et Biophys. Acta, **95**, 362, 1965
19. Sebesta K., Bauerova I., Sormova Z., Biochim. and Biophys. Res. Communs **19**, 55, 1965
20. Otaka E., Osawa S., Oota G. *et al.*, Biochim. et biophys. acta **55**, 310, 1962
21. Smith K., Feredat. Proc. **24**, 293, 1965
22. Тонгур В. С., Владыченская Н. С., Романов В. В., Вышепан Е. Д., Бюлл. эксперим. биол. и мед. **57**, 65, 1964
23. Георгиев Г. П., Биохимия **24**, 472, 1959
24. Marmur J.; J. Mol. Biol. **3**, 208, 1961
25. Kay E., Simmons N., Dounce A.; J. Amer. Chem. Soc. **74**, 1724, 1952
26. Спирин А. С., Биохимия, **23**, 656, 1958
27. Спирин А. С., Белозерский А. Н., Биохимия **21**, 786, 1956
28. Уайатт Г., сб.: Нуклеиновые кислоты, стр. 441, ИЛ, 1958
29. Vischer A., Chargaff E., J. Biol. Chem. **176**, 503, 1958
30. Schmidt G., Tannhauser S., J. Biol. Chem. **161**, 83, 1945

Поступила в редакцию
5.VII 1965

ISOLATION AND PROPERTIES OF RNA — DNA COMPLEX FROM *ESCHERICHIA COLI*

N. S. WLADYTCHENSKAYA and V. S. TONGUR

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

The RNA fraction, resistant to RNAse, is found in logarithmically growing *E. coli* cells. A preparation, containing this RNA and DNA, behaves as homogeneous material in ultracentrifuge and has one-step-shaped melting curve. A conclusion is made that this material is RNA — DNA complex. This complex can be observed when nucleic acids are extracted either with phenol or detergent. After denaturation the RNA — DNA complex gives two components, one of them digested with ribonuclease. In 9-hour old culture this complex is no longer observed.