



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.113 : 577.21 : 577.15

ИММУНО-ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ  
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ НА ХРОМОСОМЕ *ESCHERICHIA COLI*  
ПРИ ПОМОЩИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ  
 $\beta$ -СУБЪЕДИНИЦЫ

Грячев М. А., Зайчиков Е. Ф., Лактионов П. П.,  
Рошке В. В., Лиховицкая Е. В.\*, Байбородин С. И.\*,  
Керкис А. Ю.\*.

Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР;

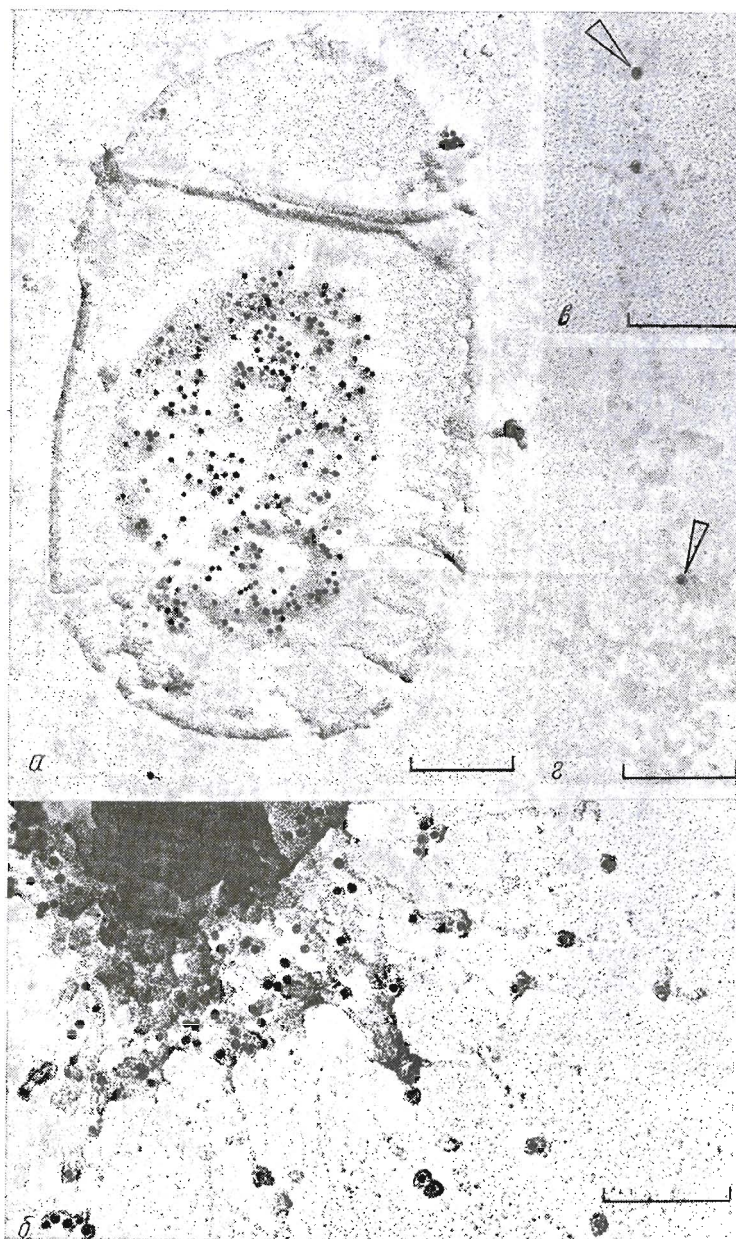
\*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск

При изучении структуры хроматина несомненный интерес представляет выявление транскрипционно активных участков, содержащих РНК-полимеразу. Электронно-микроскопическая визуализация РНК-полимеразы *in vitro* в виде ее комплекса со сравнительно мелкими молекулами ДНК плазмид или фагов не вызывает затруднений [1]. Однако традиционные электронно-микроскопические методы идентификации этого фермента в составе более сложных структур, например в бактериальном нуклеоиде (хромосоме), неэффективны, так как в составе хромосомы прокариот является множество гранул различного размера, часть из которых сходна с РНК-полимеразой. Это могут быть нуклеосомоподобные частицы [2], дезокси-нуклеопротеидные гранулы более крупного порядка [3] либо молекулы ассоциированных с ДНК белков. В связи с этим более перспективным представляется подход, использующий специфические реагенты для РНК-полимеразы, с последующей электронно-микроскопической визуализацией комплекса.

В настоящей работе мы предлагаем метод выявления РНК-полимеразы в составе прокариотической хромосомы, основанный на использовании моноклональных антител против  $\beta$ -субъединицы и электронно-микроскопической визуализации специфичного комплекса после его обработки белком А, меченным коллоидным золотом.

Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела против РНК-полимеразы, получали гибридизацией спленоцитов гипериммунных мышей линии BALB/c с клетками миеломы P3.X63.Ag8.653. Гибридизацию выполняли по методу [4]. Специфичность моноклональных антител оценивали по их способности реагировать с электрофоретически разделенными субъединицами РНК-полимеразы, перенесенными на нитроцеллюлозу, аналогично описанному ранее [5]. Для последующей работы использовали культуральную среду одного из клонов гибридом (клон 2A5B1), продуцирующего антитела подкласса  $\gamma$  2b, специфичные к  $\beta$ -субъединице. Выбор клона 2A5B1 был обусловлен тем, что его антитела относятся к подклассу  $\gamma$  2b, обладающему наиболее высоким сродством к белку А.

Сферопласты, полученные из клеток *E. coli* штамма MRE600 по методу Витольда [6], в отношении 1 : 9 разводили 0,1 М трис-боратным буфером или 0,02 М трис-HCl, содержащим 2 мМ EDTA, pH 8,0. Немедленно (в этих условиях лизировалась только часть сферопластов) к 20 мкл полу-



Локализация антигенов РНК-полимеразы ( $\beta$ -субъединицы) с помощью моноклональных антител и меченного золотом белка А на нуклеоиде сферопласта (А), частично освобожденной от оболочки хромосоме (Б) и транскрибируемых участках хромосомы (В, Г). Препараты А и Б получены методом [9], В, Г — методом [10]. Стрелка — молекулы РНК-полимеразы. Масштаб — 0,25 мкм

ченной суспензии добавляли равный объем раствора моноклональных антител (моноклональные антитела из культуральной жидкости осаждали равным объемом насыщенного раствора сульфата аммония, осадок после центрифугирования растворяли в буфере, содержащем 0,01 М трис-НСl, рН 8,0; 0,15 М NaCl, 0,05% твин 20,  $\frac{1}{10}$  от начального объема) и инкубировали 3) мин при 20° С, осторожно помешивая. Затем добавляли 4 мкл раствора комплекса А-белок — золото в концентрации 11,1 мкг/мл (диаметр частиц золота 15 нм), полученного по методу [7], и инкубировали еще 30 мин при 20° С, как описано ранее [8]. По истечении времени инкубации пробы распластывали по методу Миллера или Джунханса [9, 10], фиксировали 96% этанолом, оттеняли круговым напылением сплавом платины

с палладием (4 : 1) под углом 7° и наблюдали в электронный микроскоп JEM 100С.

Проведенные эксперименты позволили локализовать молекулы РНК-полимеразы ( $\beta$ -субъединицы) как в нуклеоиде внутри бактериальной клетки (рисунок, А), так и на хромосоме, частично освобожденной от оболочки (рисунок, В). Глобулы диаметром  $\sim 20$  нм с частицей золота в середине представляют собой комплекс, состоящий из РНК-полимеразы, молекулы моноклонального антитела, молекул А-белка и частицы коллоидного золота. При использовании белково-монослойной техники [10] удастся добиться большего расправления хромосомы с сохранением транскрипционных комплексов. На рисунке (В и Г) представлены транскрибируемые участки бактериальной хромосомы. Видны нити ДНК, отходящие от них транскрипты и выявленные среди них молекулы РНК-полимеразы (стрелка).

Таким образом, в настоящей работе впервые показана возможность специфической локализации РНК-полимеразы на нуклеоиде внутри сферопластов и на освободившихся от оболочки бактериальных хромосомах с помощью моноклональных антител и комплекса [А-белок — золото]. Кроме того, предложенный метод иммуно-электронно-микроскопического выявления РНК-полимеразы позволяет производить сравнительную оценку содержания фермента в клетке и на различных участках хромосомы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Richardson J. // J. Mol. Biol. 1966. V. 21. № 1. P. 83—114.
2. Griffith J. D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 2. P. 563—567.
3. Киселева Е. В., Лихошвай Е. В., Христолюбова Н. Б. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 289. № 5. С. 1235—1237.
4. Gejter M. L., Margulies D. M., Seharf M. D. // Somat. Cell Genet. 1977. V. 3. P. 231—236.
5. Грачев М. А., Зеленин С. М., Лактионов П. П., Рошке В. В. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 81—88.
6. Withold B. // Anal. Biochem. 1976. V. 74. № 1. P. 160—170.
7. Roth J. // Techniques in Immunocytochemistry. V. 1. N. Y.: Acad. Press, 1982. P. 107—133.
8. Fakan S., Leser G., Martin T. E. // J. Cell Biol. 1986. V. 103. P. 1153—1157.
9. Miller O. L., Bakken A. H. // Acta endocrinol. 1972. V. 168. Suppl. P. 155—177.
10. Junhans P. P. // J. Virol. 1982. V. 43. P. 544—554.

Поступило в редакцию  
1.IX.1987

#### IMMUNOELECTRON MICROSCOPIC LOCALIZATION OF RNA POLYMERASE ON THE *ESCHERICHIA COLI* CHROMOSOME WITH MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST THE $\beta$ -SUBUNIT

GRACHEV M. A., ZAYCHIKOV E. P., LAKTIONOV P. P., ROSCHKE V. V.,  
LIKHOHWAY Ye. V.\*, BAYBORODIN S. I.\*, KERKIS A. Yu.\*

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry;*  
\* *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division,*  
*Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Possibility of the immunoelectron microscopic visualization of RNA polymerase on the *Escherichia coli* chromosome with monoclonal antibodies against the  $\beta$ -subunit labelled by [protein A-gold] complex was demonstrated. Using this method RNA polymerase molecules were revealed within nucleoid as well as on the membrane-free chromosome.