



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 579.843+579.222'112.083.3

### ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ $\alpha$ -ЦЕПЕЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ НА СТРУКТУРАХ НУКЛЕОИДА СВЕЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ

*Протопопов А. И., Могильная О. А., Киселева Е. В.\*,  
Медведева С. Е., Пузырь А. И.*

*Институт биофизики Сибирского отделения Академии наук СССР,  
Красноярск,*

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

Точка зрения на регуляцию биолюминесценции бактерий во многом определяется знанием естественного окружения *in vivo* главного фермента системы свечения — люциферазы [1, 2]. Установлено, что система свечения оперативно контролируется аутоиндуктором на уровне транскрипции [3]. Немало вопросов возникает по механизму адекватной транскрипции генов двух субъединиц фермента [4], метаболизму  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей люциферазы.

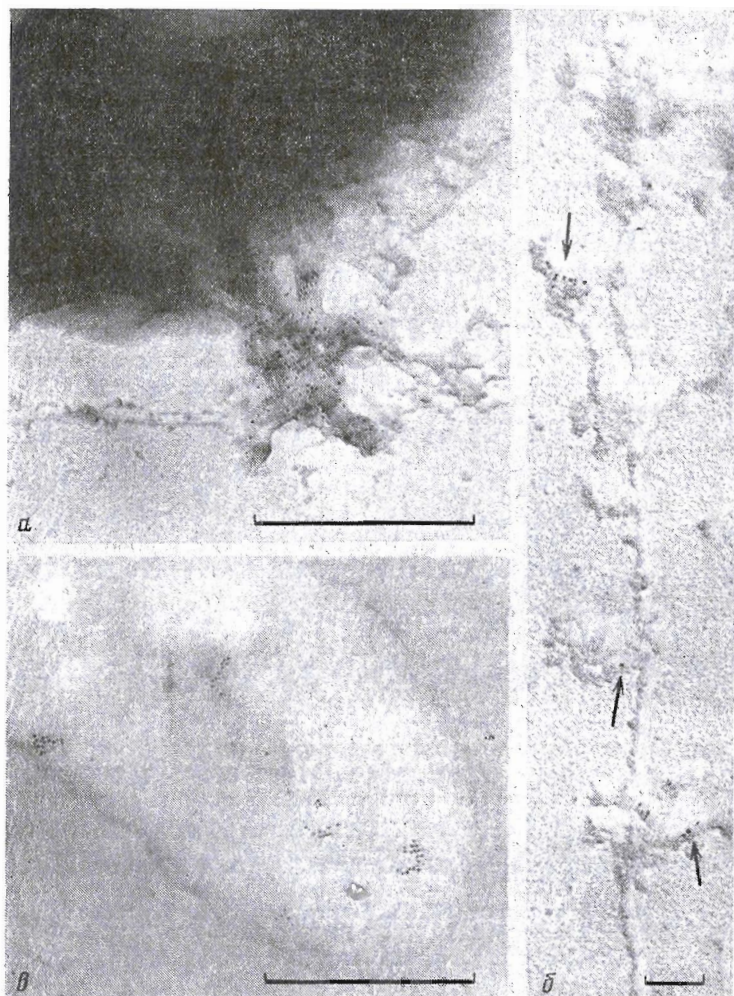
Для электронно-микроскопической локализации белка на внутриклеточных структурах бактерий в данной работе использованы моноклональные антитела, меченные коллоидным золотом.

Для получения антител мышей линии BALB/c иммунизировали люциферазой из *Photobacterium leiognathi*. Гибридизовали клетки миеломы РЗ-Х63/Ag 8.6.5.3 и спленциты по методу [5]. Антилюциферазные иммуноглобулины разной направленности секретировали гибриды 11% полученных популяций. Сведения о клонах LL1-LL9 приведены в таблице (титр антител в супернатанте определен с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA)) [6].

Антитела гибридомы LL1 с равной интенсивностью взаимодействуют также с люциферазой из *Vibrio harveyi*. Антитела LL2, конкурирующие с LL1 за место связывания антигена из *P. leiognathi*, таким свойством не обладают. С помощью иммуноблоттинга [7] показано, что антитела LL1, LL3 и LL6 узнают эпитопы агрегированных  $\alpha$ -цепей.

Наибольшее сродство к нативной  $\alpha$ -субъединице имеют антитела гибридомы LL2, что и определило их использование в цитохимических экспериментах. Иммуноглобулины сорбировали на частицы коллоидного золота по методу ДеМея [8]. Средний размер комплекса золото — белок составил 15 нм. Препараты изучали с помощью микроскопа JEM-100С (Япония).

LL	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Титр антител	1500	1500	1500	600	600	1000	300	300	300
Связывание с субъединицей $\alpha$	+	+	+	+	+	-	+	-	-
$\beta$	-	-	-	+	+	-	-	+	+



Визуализация антигенных детерминант  $\alpha$ -субъединицы люциферазы светящихся бактерий с помощью меченых золотом моноклональных антител: *a* — на нерасправленном нуклеоиде (масштаб 0,5 мкм); *б* — в составе транскрипционных комплексов (масштаб 0,1 мкм), отдельные метки указаны стрелками; *в* — на срезах (масштаб 0,5 мкм)

Реакцию связывания меченых моноклональных антител с антигеном проводили как со сферопластами бактерий после их мягкого осмотического шока [9], так и на ультратонких срезах клеток, фиксированных 2,5% раствором глutarового альдегида и заключенных в смесь эпон — аралдит [8]. Сферопласты *P. leiognathi* штамма 208 получали по методу Витольта [10]. Распластанные препараты отщепляли платиной — палладием. Неспецифическую сорбцию комплекса золота с антителами LL2 контролировали на клетках *E. coli* и с антителами LL4, инактивированными нагреванием, — на препаратах хроматина светящихся бактерий.

Антитела LL2 интенсивно взаимодействуют с одним-двумя участками нерасправленного компактизованного хроматина (один из них представлен на рисунке *a*). Очевидно, что выявляются зоны трансляции  $\alpha$ -цепей люциферазы. Наблюдаемая локализация белка обусловлена связью полипептидных цепей с транскриптами и, возможно, компактной упаковкой фибрилл ДНК — белок (ДНК-фибрилл). С некоторыми транскрипционными комплексами связывалось по 5 частиц золота (рисунок, *б*). Наличие нескольких меток говорит об активном последовательном синтезе ряда  $\alpha$ -цепей с одной мРНК.

Известно, что хромосома светящихся бактерий содержит единственный ген  $\alpha$ -цепи люциферазы [4, 11]. Следовательно, расположенные рядом

меченые транскрипты относятся к разным нитям ДНК в составе одной ДНП-фибриллы. На срезах светящихся бактерий метка выявляется в виде одиночных или сгруппированных по 5—15 частиц преимущественно в цитоплазме вблизи нуклеоида. Скорее всего, как и в опыте со сферопластами, это соответствует местам активного синтеза фермента (рисунок, в). Наличие нескольких источников синтеза люциферазы в одной клетке можно соотнести с известным явлением несовпадения цикла деления бактерии с циклом репликации [12]. В таком случае перед делением клетка содержит от двух до шести копий генома.

Мы не обнаружили посадку моноклональных антител LL2 вблизи мембранных структур или в периплазматическом пространстве бактерий. Возможно, в исследуемых фотобактериях  $\alpha$ -цепь фермента подвержена быстрой деградаци с изменением эпитопа LL2. Таким образом, впервые с помощью антител методом электронной микроскопии люцифераза локализована на нуклеоиде *P. leiognathi*. Полученные моноклональные антитела, высокоспецифичные к  $\alpha$ -субъединице фермента, позволили выявить транскрибируемые участки изолированной бактериальной хромосомы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сальников М. В., Высоцкий Е. С., Заворуев В. В., Межевский В. В. // Микробиология. 1984. Т. 53. № 5. С. 744—747.
2. Hastings J. W., Porticus C. J., Gupta S. C., Kurjurst M., Makemson J. C. // Adv. Microb. Physiol. 1985. V. 26. P. 235—291.
3. Kaplan H., Greenberg E. // J. Bacteriol. 1985. V. 163. № 3. P. 1210—1214.
4. Cohn D. H., Mileham A. J., Simon M. I., Neelson K. H., Rausch S. K., Bonam D., Baldwin T. O. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 10. P. 6139—6146.
5. Prige P. J. // Ricerca Clin. Lab. 1984. V. 14. P. 277—286.
6. Stähli C., Staehelin Th., Miggiano V. // Meth. Enzymol. 1983. V. 92. P. 26—36.
7. Douglas G. C., King B. F. // J. Immunol. Meth. 1984. V. 75. № 2. P. 333—338.
8. DeMey J., Moermans M. // Adv. techniques in biol. electron microscopy III/Ed. Koehler J. K. B. etc.: Springer, 1986. P. 229—271.
9. Fakan S., Leser G., Martin T. E. // J. Cell. Biol. 1986. V. 103. № 4. P. 1153—1157.
10. Witholt B., Boekhout M., Brock M., Kingma J., van Heerikhuzen H., de Leij L. // Anal. Biochem. 1976. V. 74. P. 160—170.
11. Илларионов Б. А., Протопопова М. В., Каргинов В. А., Мергяцов Н. П., Гигельзон И. И. // Биорган. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 412—415.
12. Брэдли С., Энквист Л. Молекулярная микробиология. М.: Мир, 1977. С. 54.

Поступило в редакцию  
24.VI.1988  
После доработки  
25.XI.1988

#### IMMUNOCYTOCHEMICAL VISUALIZATION OF LUCIFERASE $\alpha$ -CHAINS ON THE PHOROBACTERIUM CHROMOSOME

ПРОТОПОВ А. И., МОГЫЛНАЯ О. А., КЫСЕЛЕВА Е. В.\*,  
МЕДВЕДЕВА С. Е., ПУЗЫР А. Р.

*Institute of Biophysics, Siberian Division, Academy of Sciences  
of the USSR, Krasnoyarsk;*

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

Sites of synthesis of the *Photobacterium leiognathi* luciferase  $\alpha$ -chains were visualized by electron microscopy using gold-monoclonal antibody complexes. Antigen was revealed only near transcribing chromosome regions.