



УДК 547.962

## НОВЫЙ ПРЕПАРАТИВНЫЙ МЕТОД РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ ИЗ 70S-РИБОСОМ *E. COLI* MRE-600

*Алахов Ю. Б., Медникова Т. А., Мотуз Л. П.,  
Маркова Л. Ф., Довгас Н. В., Кашипаров И. А.,  
Обчинников Ю. А.*

*Институт белка Академии наук СССР, Пушкино*

Предложен препаративный метод разделения рибосомальных белков непосредственно из 70S-рибосом. Метод основан на использовании исключительно хроматографической техники, включая хроматографию суммарного белка из 70S-рибосом на СМ-целлюлозе с последующей рехроматографией на СМ- и DEAE-целлюлозах и гель-фильтрацией на сефадексе G-100. Преимуществом метода является то, что при такой схеме отпадает необходимость обычно используемого предварительного разделения рибосом на субъединицы с помощью зонального центрифугирования, являющегося лимитирующей стадией ранее предложенных методов. Метод в принципе позволяет получить любой из рибосомальных белков. На первом этапе из 10 г суммарного белка было выделено 37 индивидуальных белков с выходом до 150 мг.

В настоящее время используется несколько методов разделения рибосомальных белков. Большинство из них предполагает предварительное разделение 70S-рибосом на субъединицы, отделение белка от РНК и последующее разделение субъединичного белка с использованием хроматографических и электрофоретических методов [1—3].

Значительно сложнее разделить суммарный белок из 70S-рибосом. Многие белки имеют близкие молекулярные веса и близкие изоэлектрические точки, что значительно усложняет их разделение. Эта задача может быть решена только комбинированием различных методов, учитывающих даже небольшие различия в свойствах белков. В данном случае авторы работ [4, 5] используют постепенное «раздевание» рибосомы и получение нескольких белковых фракций различного состава, которые далее подвергаются разделению хроматографическими методами. Однако все эти методы являются многостадийными, сложными и весьма трудоемкими.

В данной работе предлагается схема препаративного разделения рибосомальных белков, исходя из суммарного белка 70S-рибосом, которая предусматривает использование только хроматографических методов. Предложенным методом из 10 г суммарного белка выделено 37 индивидуальных белков с выходом до 150 мг.

Первоначальный этап разделения рибосомальных белков — выделение суммарного белка из 70S-рибосом обработкой последних 67%-ной уксусной кислотой. Лиофильно высушенный суммарный белок далее разделяется хроматографией на СМ-целлюлозе в градиенте концентрации ацетата натрия в присутствии 6 М мочевины и β-меркаптоэтанола. На рис. 1 приведен профиль элюирования, при анализе которого была

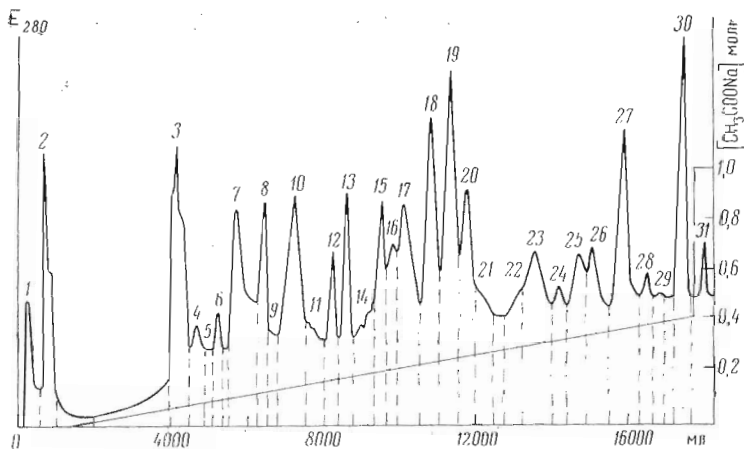


Рис. 1. Хроматографический профиль разделения суммарного белка из 70S-рибосом на СМ-целлюлозе при pH 5,6. Размеры колонки 3,2 × 85 см, скорость элюирования 50 мл/ч, градиент концентрации 0,005—0,4 М ацетат натрия (17 000 мл). Объем фракций 15 мл

получена 31 объединенная фракция. После обессоливания на сефадексе G-25 или биогеле Р-10 и лиофилизации все фракции были подвергнуты анализу с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле. В табл. 1 представлен белковый состав фракций. Оказалось, что ряд фракций содержит практически чистые белки: в частности, фракция 1 — белок L7/12, фракция 12 — белок L25, фракция 22 — белок S9, фракция 31 — белок L34. Однако большая часть фракций, полученных в результате хроматографии суммарного белка на СМ-целлюлозе, представляет собой смесь двух, трех и более белков и поэтому требует дальнейшего разделения.

С этой целью была проведена рехроматография ряда сложных фракций. В зависимости от характера и свойств белков, входящих в состав какой-либо фракции, рехроматографию проводили либо на СМ-целлюлозе, либо на DEAE-целлюлозе, либо гель-фильтрацией на сефадексе G-100 с последующим обессоливанием на сефадексе G-25 или биогеле Р-10. На рис. 2 представлена общая схема выделения индивидуальных белков. В результате первой рехроматографии удалось выделить 27 индивидуальных белков (см. табл. 1).

Многие рибосомальные белки имеют очень близкие молекулярные веса и мало отличаются по изоэлектрическим точкам. Поэтому смеси белков с близкими свойствами не удалось разделить за один прием и потребовалась еще одна рехроматография. В результате третьего этапа разделения выделен еще ряд белков (см. табл. 1). Таким образом, в результате работы удалось выделить 37 индивидуальных белков, представленных в табл. 2.

Чистота выделенных белков оценивалась по двумерному электрофорезу в полиакриламидном геле, электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, сравнением данных аминокислотного анализа, полученных нами и другими авторами, определением N-концевых аминокислот (табл. 2); кроме того, для ряда белков были получены пептидные карты триптического гидролиза для доказательства тождественности белков, выделенных в различных опытах.

В ряде случаев окончательная очистка белков была проведена гель-фильтрацией на сефадексе G-50 или биогеле Р-10 в 10%-ной уксусной кислоте. В результате чистота белков, оцененная по двумерному электрофорезу в полиакриламидном геле и электрофорезу в присутствии додецил-

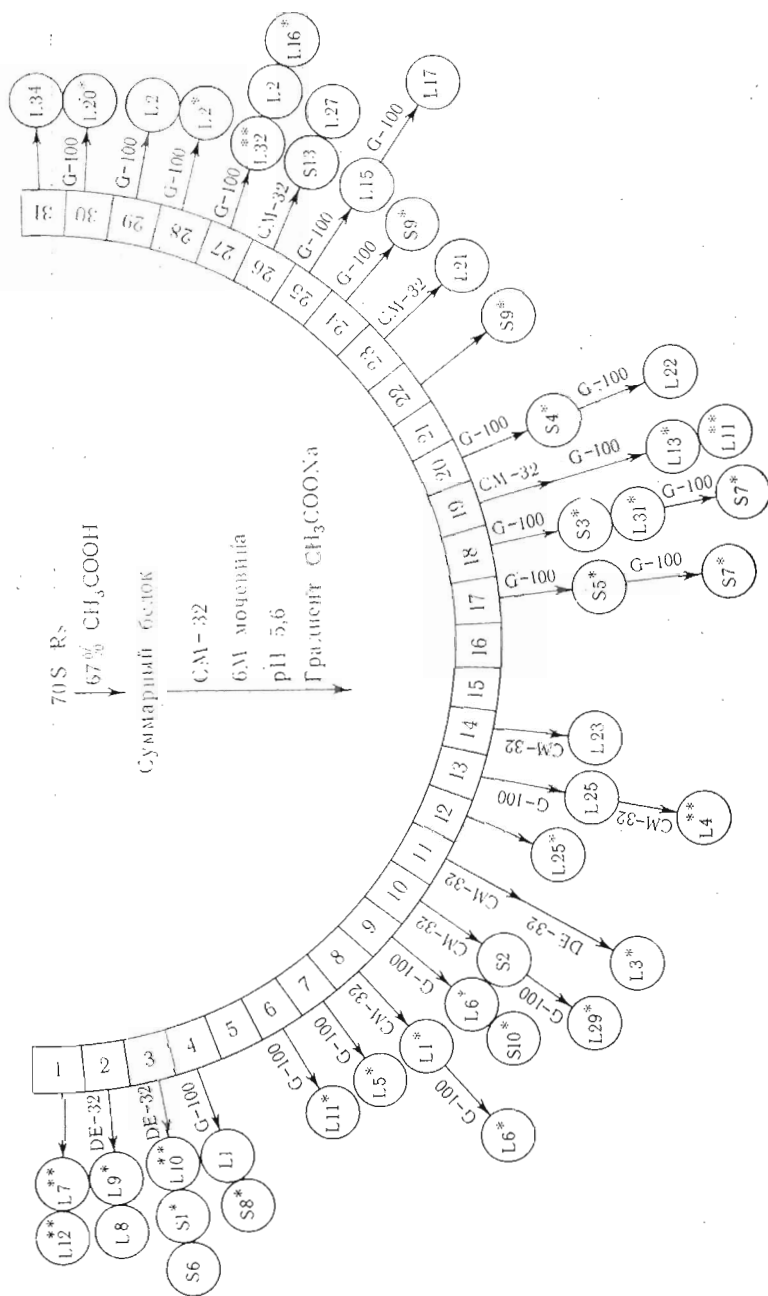


Рис. 2. Схема выделения индивидуальных белков из суммарного белка 70S-рибосом: \*белок был подвергнут гель-фильтрации на сефадексе G-50; \*\*на бюбеле P-10

Таблица 1

Номер фракции	Состав	1-я рехроматографии	Выделенные белки	Состав фракции для 2-й рехроматографии	2-я рехроматография	Выделенные белки
1	L7, L12 *	—	L7, L12			
2	S1, S2, L9, L10, L12, L8	DE-32	L9, L8			
3	S1, S6, L9, L10	DE-32	S1, S6, L10			
4	S8, L1, L7, L9, L10, L12	G-100	S8, L1			
5	S8, L7, L9, L12	—				
6	L1, L11	G-100	L11			
7	S2, S4, L1, L5, L7, L9, L11, L12	G-100	L5			
8	S3, S4, S10, L1, L3, L5, L6, L9	CM-32	L1	S10, L1, L3, L6	G-100	L6
9	S10, S16, S17, L3, L6, L11, L14	G-100	S10, L6			
10	S2, S4, L3, L6, L11, L29	CM-32	S2	S4, L6, L11, L29	G-100	L29
11	S2, S16, S17, L3, L11, L13, L21	CM-32	—	S2, L3, L21	DE-32	L3
12	L25	—	L25			
13	S2, L2, L3, L4, L5, L25	G-100	L25	L4, L25, L5	CM-32	L4
14	S10, L5, L11, L15, L16, L23	CM-32	L23			
15	S7, L4					
16	S16, S17					
17	S5, S7, L19, L23, L24	G-100	S5	S7, L23, L24	G-100	S7
18	S3, S7, L11, L13, L14, L24, L30, L31	G-100	S3, L31	S3, S7, L13, L24	G-100	S7
19	S3, S4, L11, L13, L18	CM-32		S3, S4, L13, L11	G-100	L13, L11
20	S4, L13, L19, L22	G-100	S4	L13, L22	G-100	L22
21	S7, L13, L14, L15, L18					
22	S9	—	S9			
23	S9, S11, S15, L13, L15, L17, L18, L21	CM-32	L21			
24	S9, S10, S11, L15	G-100	S9			
25	S3, S18, L3, L16, L17, L18, L19, L27	G-100	L15	L17, L19, L27	G-100	L17
26	S13, S19, L27, L24	CM-32	L27, S13			
27	L2, L16, L32	G-100	L2, L16, L32			
28	S9, L2	G-100	L2			
29	S3, S12, L2, L17, L20, L21	G-100	L2			
30	S3, S21, L20, L32	G-100	L20			
31	L34	—	L34			

\* Жирным выделены белки, содержащиеся в преобладающем количестве.

сульфата натрия, составляет 95—100%. Для ряда белков были определены С-концевые аминокислоты с помощью карбоксипептидаз А и В (см. табл. 2).

Таким образом, предложенный нами метод представляет собой комбинирование хроматографии на CM-DEAE-целлюлозах и гель-фильтрации на сефадексе G-100 и может быть применен для выделения всех 70S-рибосомальных белков без применения предварительного разделения рибосом на субъединицы или отделения белковых фракций от 70S-рибосом с помощью ступенчатой экстракции.

### Экспериментальная часть

*Получение рибосом.* Культуру *E. coli* MRE-600 выращивали в 100-литровом ферментере на богатой среде, содержащей пептон, дрожжевой экстракт и глюкозу, и собирали на  $2/3$  логарифмической фазы роста.

Таблица 2

Белок	Молекулярный вес		N-концевая аминокислота	C-концевая аминокислота	Белок	Молекулярный вес		N-концевая аминокислота	C-концевая аминокислота
	по данным работы [16]	экспериментальный *				по данным работы [16]	экспериментальный *		
S1	65 000	51 500	Ala		L9	17 300	16 800	Met	
S2	28 300	28 800	Ala		L10	19 000	19 000	Ala	
S3	28 200	29 000	Gly	Lys	L11	19 600	17 200	Закрыт	
S4	26 700	26 800	Ala	Lys	L12	13 200		Ser	
S5	19 600	19 400	Закрыт	Arg	L13	17 800	17 500	Met	
S6	15 600		Met		L15	17 500	15 900	Met	
S7	22 700	21 800	Pro	Arg	L16	17 900	17 700		
S8	15 500	15 400	Ser		L17	16 700	16 800	Met	
S9	16 200	16 600	Ala	Arg	L20	17 200	21 200	Ala	
S10	12 400		Met		L21	13 900	13 300	Met	
S13	14 900	14 400	Ala	Lys	L22	14 800	14 700	Met	
L1	26 700	31 500	Ala		L23	12 700	12 400	Met	
L2	31 500	35 000	Ala	Lys	L25	12 000	11 500	Met	
L3	27 000	27 600	Met		L27	12 700	12 500	Ala	
L4	25 800	26 500	Met		L29	12 000	10 500	Met	
L5	22 000	23 000	Ala	Lys	L31	10 000	7 100	Met	Lys
L6	22 200	22 800	Ser	Lys	L32	10 500	10 000	Ala	Lys
L7	13 400		Закрыт		L34	9 600	12 700	Met	Lys
L8	17 300	18 100	Ala						

\* Молекулярные веса определены по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата Na.

После центрифугирования и промывки клетки замораживали и хранили при  $-30^{\circ}$  до использования. Порции по 100 г клеток разрушали в замороженном состоянии с использованием френч-пресса под давлением 300 атм. После разрушения клеток массу суспендировали в 250 мл буферного раствора (pH 7,1), содержащего 0,01 М трис-HCl, 0,02 М  $MgCl_2$ , 0,05 М  $NH_4Cl$  и 0,001 М  $\beta$ -меркаптоэтанол, добавляли 1 мг ДНКазы в 1 мл воды, и клеточные осколки отделяли центрифугированием (30 мин, 30 000 g). Затем рибосомы осаждали центрифугированием в роторе «Spinco Ti60», США (2 ч, 60 000 об/мин). Осадки суспендировали в 250 мл буферного раствора (pH 7,1), содержащего 0,01 М трис-HCl, 0,01 М  $MgCl_2$ , 1 М  $NH_4Cl$ , 0,001 М  $\beta$ -меркаптоэтанол, и оставляли для перемешивания на магнитной мешалке на ночь при  $4^{\circ}$ . Полученный раствор осветляли центрифугированием (30 мин, 30 000 g), и рибосомы осаждали центрифугированием (3 ч, 60 000 об/мин, Ti60). Осадки суспендировали в 250 мл буферного раствора, оставляли на ночь при  $4^{\circ}$ . Рибосомы осаждали центрифугированием (3 ч, 60 000 об/мин, Ti60). Осадки суспендировали в 150 мл буферного раствора (pH 7,1), содержащего 0,01 М трис-HCl, 0,1 М KCl, 0,013 М  $MgCl_2$ , 0,001 М  $\beta$ -меркаптоэтанол. Раствор осветляли центрифугированием (20 мин., 30 000g), концентрацию рибосом доводили до 10 мг/мл, и рибосомы осаждали прибавлением 0,65 объема этанола. Осажденные рибосомы хранили при  $4^{\circ}$  до использования.

*Экстракция белка из 70S-рибосом.* Экстракцию рибосомального белка проводили 67%-ной уксусной кислотой [6]. Раствор белка в 67%-ной уксусной кислоте подвергали ступенчатому диализу против 50, 40, 30, 20 и 10%-ной уксусной кислоты и затем лиофилизовали.

*Приготовление СМ-целлюлозы.* 200 г СМ-целлюлозы (СМ-32, «Whatman», Англия) готовили в условиях, предложенных С. Осава и соавт. [7]. Затем целлюлозу дважды промывали буферным раствором (pH 5,6), содержащим 0,75 М ацетат натрия и 6 М мочевины и далее многократно промывали буферным раствором (pH 5,6), содержащим 0,005 М ацетат натрия, 6 М мочевины и 50 мкл/л  $\beta$ -меркаптоэтанол до достижения

pH и электропроводности промывающего раствора, близких к значению исходного буферного раствора.

*Приготовление DEAE-целлюлозы.* DEAE-целлюлозу (DE-32, «Whatman», Англия) обрабатывали в соответствии с проспектом фирмы «Whatman», затем промывали 3 М раствором NaCl и уравнивали буферным раствором (pH 7,8), содержащим 0,01 М трис-HCl, 6 М мочевины и 50 мкл/л β-меркаптоэтанола.

*Хроматография суммарного рибосомального белка.* Ионообменную хроматографию суммарного рибосомального белка проводили на CM-целлюлозе в натрий-ацетатном буферном растворе в условиях, предложенных Осава и соавт. [8], адаптированных к крупному препаративному разделению. Колонку (3,2 × 100 см) наполняли целлюлозой под давлением азота (1,8 атм) так, чтобы получить высоту носителя 85 см, и уравнивали буферным раствором (pH 5,6), содержащим 0,005 М CH<sub>3</sub>COONa, 6 М мочевины, 50 мкл/л β-меркаптоэтанола. Образец белка (10 г) растворяли в 500 мл того же буферного раствора, доводили уксусной кислотой до pH 5,0 и наносили на колонку со скоростью 50 мл/ч. Колонку промывали 1 л стартового буферного раствора и проводили элюирование со скоростью 50 мл/ч в градиенте концентрации ацетата натрия (8,5 л стартового буферного раствора — 8,5 л буферного раствора (pH 5,6), содержащего 0,4 М CH<sub>3</sub>COONa, 6 М мочевины, 50 мкл/л β-меркаптоэтанола). Объем фракций 15 мл.

*Рехроматография белковых фракций.* Рехроматографию белковых фракций проводили либо на колонке (1,6 × 30 см) с DEAE-целлюлозой в градиенте концентрации NaCl в трис-HCl буферном растворе (pH 7,8) в присутствии 6 М мочевины и β-меркаптоэтанола, либо на CM-целлюлозе на колонке (1,6 × 30 см) в условиях, аналогичных первоначальному разделению, либо гель-фильтрацией на сефадексе G-100 в растворе 10%-ной уксусной кислоты в присутствии 6 М мочевины и β-меркаптоэтанола. Для гель-фильтрации на сефадексе G-100 использовали колонки диаметром 1,5—2,5 см и длиной 100—150 см.

*Обессоливание белков.* Обессоливание белков проводили на сефадексе G-25 (колонки 10,0 × 100 и 5,0 × 100 см) или на биогеле P-10 (колонки 2,5 × 100 и 5,0 × 100 см).

*Электрофорез.* Двумерный электрофорез в полиакриламидном геле проводили по Кальтшмидту и Витману [9] и в модифицированном микроварианте, разработанном в лаборатории биосинтеза белка Института белка АН СССР. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия проводили по методу, предложенному Вебером и Осборн [10].

*Аминокислотный анализ.* Белки гидролизovali 5,7 н. HCl в течение 24 и 72 ч при 110°. Аминокислотный анализ проводили на аминокислотном анализаторе BC-201.

*Определение N- и C-концевых аминокислот.* N-концевые аминокислоты индивидуальных рибосомальных белков определяли дансильным методом в присутствии додецилсульфата натрия [11] с идентификацией ДНС-аминокислот с помощью ТСХ на силикагеле [12, 13]. C-концевые аминокислоты определяли с помощью карбоксипептидаз А и В [14].

*Пептидные карты триптического гидролиза.* Гидролиз белка трипсином, обработанным тозилфенилаланилхлоркетеном («Serva», ФРГ), проводили (pH 8,4, 37°, 12 ч) при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 на автоматическом титраторе («Radiomet», Дания) с поддержанием заданного pH насыщенным водным раствором триэтиламина. По окончании гидролиза смесь подкисляли уксусной кислотой до pH 3,0 и лиофилизировали. Пептидные карты получили на пластинках 20 × 20 см с тонким слоем целлюлозы «Whatman». На пластинку наносили 0,01—0,005 мкмоль гидролизата исходного белка. В первом направлении использовали восходящую хроматографию в системе бутанол — пиридинацетат —

вода (1 : 1 : 1 по объему) рН 5,4, 4—5 ч [15]. Разделения во втором направлении достигали электрофорезом в 1%-ном пиридинацетатном буферном растворе рН 3,5 (800В, 50 мА, 1 ч, 4°).

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР Г. М. Смирновой и Т. И. Муравьевой за препаративную наработку биомассы *E. coli* и суммарного белка из 70S-рибосом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hindennach I., Stoffler G., Wittmann H. G. (1971) Eur. J. Biochem., 23, 7—11
2. Hindennach I., Kaltschmidt E., Wittmann H. G. (1971) Eur. J. Biochem., 23, 12—16.
3. Hardy S. J. S., Kurland C. G., Voynow P., Mora G. (1969) Biochemistry, 8, 2897—2905.
4. Kaltschmidt E., Rudloff V., Ianda H. G., Cech M., Nierhaus K., Wittmann H. G. (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 1545—1552.
5. Schwabe E. (1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 1899—1906.
6. Kaltschmidt E., Wittmann H. G. (1972) Biochemie, 54, 167—175.
7. Otaka E., Itoh T., Osawa S. (1968), J. Mol. Biol., 33, 93—107.
8. Osawa S., Otaka E., Itoh T., Fukui F. (1969) J. Mol. Biol., 40, 321—351.
9. Kaltschmidt E., Wittmann H. G. (1969) Anal. Biochem., 30, 132—141.
10. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406—4412.
11. Weiner A. M., Platt T., Weber K. (1972) J. Biol. Chem., 247, 3242—3251.
12. Бельский Б. Г., Ганкина Э. С., Пришвинова С. П., Эрастов Д. П. (1967) Молекулярн. биология, 1, 184—189.
13. Бельский Б. Г., Ганкина Э. С., Несеров В. В. (1967) Докл. АН СССР, 172, 91—93.
14. Ambler R. (1967) in Methods in Enzymology, vol. XI, pp. 155—166.
15. Schacher M., Zillig W. (1971) Eur. J. Biochem., 22, 513—519.
16. Dzionara M., Kaltschmidt E., Wittmann H. G. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67, 1909—1913.

Поступила в редакцию  
15.XI.1974

#### A NEW PREPARATIVE METHOD FOR ISOLATING PROTEINS FROM *E. COLI* MRE-600 70S RIBOSOMES

ALAKHOV Yu. B., MEDNIKOVA T. A., MOTUZ L. P., MARKOVA L. F.,  
DOVGAS N. V., KASHPAROV I. A., OVCHINNIKOV Yu. A.

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences  
of the USSR, Pushchino*

A preparative method is developed for isolating ribosomal proteins directly from the 70S ribosomes. The method is based exclusively on the use of chromatographic techniques, i. e. separation of the total ribosomal proteins on CM-cellulose, rechromatography on CM- and DE-cellulose, and gel-filtration on Sephadex G-100. The advantage of the method is that it obviates the necessity of normal preliminary preparation of subunits from ribosomes by zonal centrifugation, which is a limiting stage of the earlier methods. In principle, the method allows to obtain any of the ribosomal proteins. At the first stage, 37 individual proteins were isolated from 10 g of the total protein with up to 150 mg yield.