



УДК 577.152.277*7'1

ДНК-ПОЛИМЕРАЗА β ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ.
ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ
ГОМОГЕННОГО ПРЕПАРАТА

Атражесв А. М., Кухалова М. К.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Разработана простая и воспроизводимая методика очистки до гомогенного состояния ДНК-полимеразы β из печени крысы, включающая стадии выделения и солевой экстракции хроматина, хроматографии белков на ДЕАЕ- и фосфоцеллюлозе, голубом геле А и ДНК-сфарозе. Конечный препарат представляет собой белок с молекулярной массой 38–40 кДа, удельной активностью 31 ед. акт./мкг и рI 8,6–8,9. Общий выход активного фермента составил 8,4% в расчете на экстракт хроматина. Реакция включения ферментом радиоактивных dNTP в активированную ДНК эффективно ингибируется dNTP(3'NH₂), ddTTP и dNTP(3'F) и значительно слабее aCTP и aNTP(3'NH₂).

Исследование репликативного и репаративного синтеза ДНК в клетке значительно облегчается, если известны свойства очищенных ферментов, участвующих в этих процессах. Изучение индивидуального фермента на современном уровне обязательно требует получения гомогенного или по крайней мере высокоочищенного препарата. В клетках эукариот ДНК-полимераза β (КФ 2.7.7.7) осуществляет репаративный синтез ДНК [1] и, по-видимому, участвует в репликации, обеспечивая вместе с ДНК-лигазой соединение фрагментов Оказаки. Поэтому разработка несложной и воспроизводимой методики очистки ДНК-полимеразы β является важным этапом в изучении репаративного и, возможно, репликативного синтеза ДНК в эукариотических клетках.

К настоящему времени описано получение ряда ДНК-полимераз типа β : из тимуса теленка [1], культуры клеток человека KB [2], миеломы мыши [3], печени морской свинки [4], гепатомы Новикова [5], эмбрионов ксенопуса [6], морского ежа [7] и цыпленка [8]. Как правило, методики очистки состоят из 4–7 последовательных стадий и приводят к получению гомогенного препарата фермента. В качестве источника ДНК-полимеразы β мы используем печень взрослых крыс, потому что она легко доступна и практически не содержит других ферментов, синтезирующих ДНК. Кроме того, хроматин и клеточные ядра из печени крысы представляют собой один из традиционных объектов при изучении механизмов репарации ДНК.

Разработанная нами методика очистки ДНК-полимеразы β из печени крысы до гомогенного состояния состоит из четырех последовательных этапов (таблица). В качестве начальной стадии очистки хроматин из полученного гомогената ткани осаждали центрифугированием, промывали тритоном X-100, а затем подвергали экстракции калий-фосфатным буфером, содержащим 4 М NaCl, Na₂EDTA и фенолметансульфонилфторид. Полученный таким образом первичный экстракт обладал удельной активностью 27 ед. акт./мг белка. Следует отметить, что первичные экстракты, полученные из тканевой или клеточной массы без осаждения хроматина [4, 5, 7, 8], имеют в 10–15 раз более низкую удельную активность из-за присутствия цитоплазматических белков. Эти белки были отделены нами

Сокращения: dNTP, ddTTP, dNTP(3'NH₂), aCTP, dNTP(3'F), aNTP(3'NH₂) – 5'-трифосфаты соответственно 2'-дезоксирибонуклеозидов, 2',3'-дидезокситимидана, 3'-амино-2',3'-дидезоксирибонуклеозидов, арабиноцитидина, 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибонуклеозидов и 3'-амино-3'-дезоксиарабинонуклеозидов.

Процедура очистки ДНК-полимеразы β из печени крысы

Стадия очистки	Белок, мг	Уд. акт., ед./мг белка	Суммарная активность, ед.	Выход по активности, %
Экстракция из хроматина	3300	27	89 000	100
DEAE-целлюлоза и фосфоцеллюлоза	25,8	1 000	25 800	29
Голубой гель А	2,0	9 500	19 000	21,2
ДНК-сефароза	0,24	31 000	7 400	8,4

при осаждении хроматина, поэтому в нашем случае конечная степень очистки фермента в пересчете на первичный экстракт оказывается заниженной по сравнению с указанными литературными данными, несмотря на то что препарат фермента гомогенен по данным электрофореза. Это говорит о том, что степень обогащения препарата активным ферментом по отношению к первичному экстракту является весьма относительным критерием чистоты этого фермента по сравнению с данными электрофореза в денатурирующих условиях.

Для отделения ДНК-полимеразы β от примесей 3'-экзонуклеазы фермент, полученный после хроматографии первичного экстракта на анионо- и катионообменной целлюлозе, пропускали через колонку с голубым гелем А. Окончательная очистка ДНК-полимеразы β достигалась хроматографией на колонке с ДНК-сефарозой. Полученный таким образом фермент практически не содержит примесей экзо- и эндонуклеаз и является гомогенным по данным электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 1). Его молекулярная масса равна 38–40 кДа, а удельная активность составляет 31 ед. акт./мкг белка. По опубликованным данным, удельная активность ДНК-полимеразы β в системе с активированной ДНК, используемой в качестве праймер-матрицы, составляет в зависимости от метода выделения и источника фермента 21 [4], 65 [3,5] или 38 ед. акт./мкг белка [8], а молекулярная масса ДНК-полимераз β млекопитающих варьирует в пределах 32–70 кДа [1, 5, 8]. Методом изоэлектрического фокусирования фермента в градиенте концентрации сахарозы мы показали, что *pI* ДНК-полимеразы β из печени крысы находится между 8,6 и 8,9 (рис. 2). По литературным данным, измеренные значения *pI* фермента колеблются от 8,4 до 9,2 [2]. Анализ продуктов триптического гидролиза [9], а также результатов перекрестных иммунологических реакций [10] различных ДНК-полимераз β из млекопитающих указывает на то, что они структурно близки друг к другу. Это позволяет предполагать, что свойства, проявляемые ферментом из одного источника, будут в достаточной мере характеризовать весь класс ДНК-полимераз β . При очистке ДНК-полимеразы β выход активного фермента, как правило, невелик и лежит в пределах от 3,5 [2] до 9% [5], что объясняется многостадийностью методик выделения и довольно низкой стабильностью ДНК-полимеразы β . Этот фермент является основным белком; при очистке ему сопутствуют клеточные протеиназы, которые попадают в следовых количествах в конечный препарат фермента и могут оказаться причиной его нестабильности при хранении, отмечаемой в сообщениях [4, 5, 8].

Разрабатывая нашу методику, мы пробовали очищать фермент дробным осаждением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, изоэлектрическим фокусированием, хроматографией на гидроксинатите и сефадексе G-100. Однако в окончательный вариант методики эти этапы очистки не вошли, поскольку отбирались только те методы, которые позволяли получать максимальное количество фермента с наивысшей удельной активностью на данной стадии выделения, а также давали возможность в конечном итоге наиболее полно избавиться от экзо- и эндонуклеазных примесей. Результаты очистки ДНК-полимеразы β от 3'-экзонуклеаз и эндонуклеаз показаны на рис. 3.

С целью дальнейшего изучения ДНК-полимеразы β мы выяснили действие на нее различных ингибиторов и блокирующих реагентов (рис. 4). Так, N-этилмалеимид, реагирующий с SH-группами, мало влияет на активность фермента, тогда как диэтилпирокарбонат, блокирующий остат-

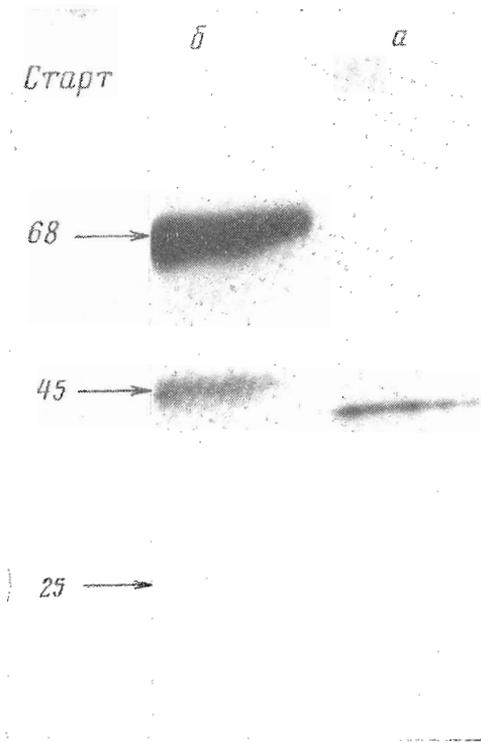


Рис. 1

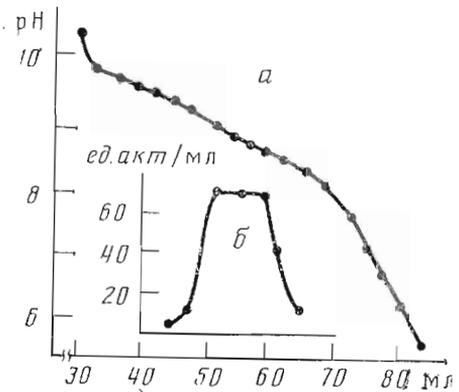


Рис. 2

Рис. 1. Электрофорез в денатурирующих условиях: *a* — конечного препарата ДНК-полимеразы β ; *б* — маркерных белков: бычьего сывороточного альбумина (68 кДа), овальбумина (45 кДа) и химотрипсина (25 кДа)

Рис. 2. Изоэлектрическое фокусирование препарата ДНК-полимеразы β . Контроль pH фракций (*a*) и активности фермента (*б*). Условия эксперимента указаны в «Экспер. части»

ки гистидина, полностью ее подавляет в субмиллимолярных концентрациях (рис. 4а). Синтетические аналоги dNTP, модифицированные по 3'-положению сахарного остатка, обрывают синтез ДНК, встраиваясь в растущий конец праймера. Чем лучше подобное соединение «узнается» ДНК-полимеразой и включается в цепь ДНК, тем сильнее оно ингибирует синтез ДНК. ДНК-полимераза β эффективно встраивает аналоги dNTP, в которых 3'-гидроксильная группа остатка рибозы замещена на фтор, аминогруппу или остаток водорода (рис. 4б и в). При pH 7,4 аминокпроизводные ингибируют фермент заметно слабее, чем при pH 9 (рис. 4в, г). Возможно, это связано с тем, что аминокпроизводные при нейтральных значениях pH переходят в протонированную форму с изменением конформации нуклеозидного остатка. Таким образом, существует определенный класс аналогов dNTP, встраиваемых ДНК-полимеразой β в цепь ДНК, хотя производные с замещенным остатком арабинозы включаются ею значительно хуже (рис. 4б).

Ингибиторный анализ репаративного синтеза ДНК в облученном хроматине печени крысы [11] показывает ту же картину влияния dNTP (3'NH₂), аСТР и ddTTP на ход синтеза ДНК, как и в бесклеточной системе с ДНК-полимеразой β . ddTTP и dNTP (3'NH₂) подавляют включение меченых нуклеотидов в ДНК на 50% в концентрациях, сравнимых с концентрациями одноименного dNTP; аСТР практически не влияет на этот процесс, даже будучи взятым в 10-кратном избытке. Это позволяет предположить, что репаративный синтез ДНК в хроматине печени взрослых крыс осуществляется ДНК-полимеразой β .

Ингибиторный анализ *in vitro* был ранее проведен с ДНК-полимераза-

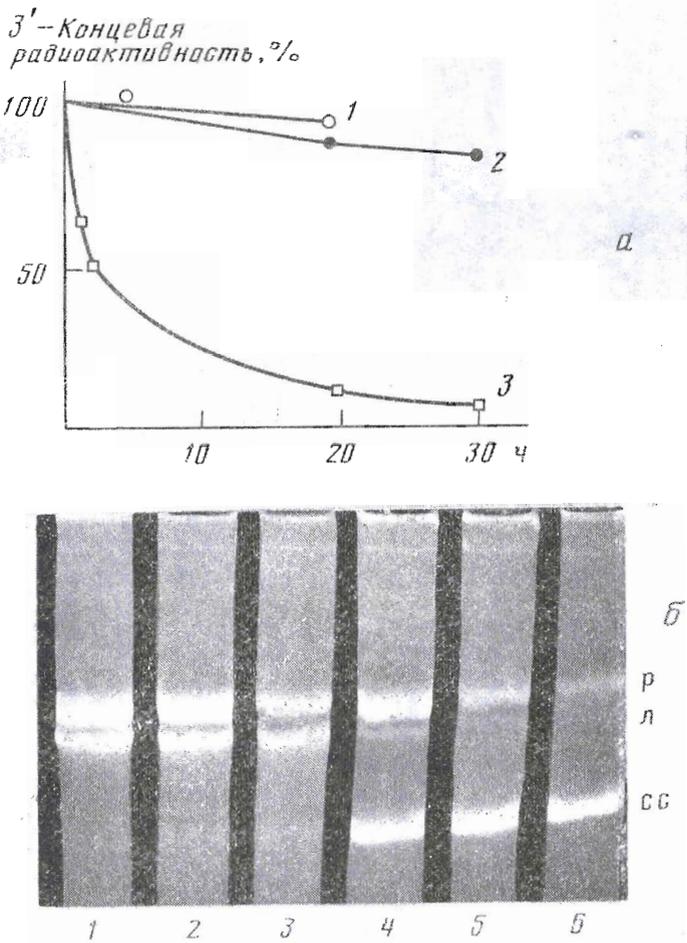


Рис. 3. Результаты экспериментов по определению 3'-экзо- (а) и эндонуклеазной (б) активностей в препарате ДНК-полимеразы β . а - бычий сывороточный альбумин, 0,1 мг/мл (1); ДНК-полимераза β , 4 ед. акт. (2); ДНК-полимераза I, 4 ед. акт. (3); б - инкубация 0,5 мкг ДНК плазмиды pBR 322 с 2 ед. ДНК-полимеразы β , содержащей примесь эндонуклеазы (1-3); аналогичный опыт с 2 ед. акт. ДНК-полимеразы β , очищенной на ДНК-сефарозе (4-6). Время инкубации - 60, 20 и 10 мин; сс - суперскрученная, р - релаксированная, л - линейная формы плазмиды. Условия эксперимента указаны в «Экспер. части»

ми 1 и α [12]. Показано, что dATP(3'NH₂) и dGTP(3'NH₂) являются мощными ингибиторами синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой 1, который весьма слабо подавляется ddTTP и практически не изменяется в присутствии аСТР и аНТР(3'NH₂). Для этого фермента ранее не было найдено эффективных субстратоподобных ингибиторов [12]. Активность ДНК-полимеразы α из тимуса теленка заметно подавляется dNTP(3'NH₂), хотя и в меньшей степени, чем аСТР. Таким образом, действие различных субстратоподобных ингибиторов на биосинтез ДНК характерно для ДНК-полимеразы каждого типа и позволяет идентифицировать ее в изучаемой системе.

Восстановление ферментативной активности ДНК-полимеразы β в геле после электрофореза в денатурирующих условиях позволяет однозначно идентифицировать этот фермент и определять его относительное содержание в сложных смесях [13-15]. На рис. 5 показаны результаты опыта с очищенной ДНК-полимеразой β и бактериальными ДНК-полимеразами. Следует отметить тот факт, что активность бактериальных ферментов восстанавливается полнее.

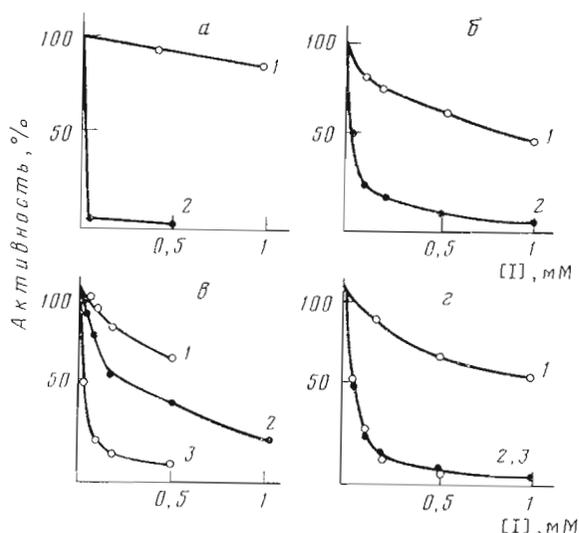


Рис. 4. Ингибирование ДНК-полимеразы β в условиях определения активности фермента (см. «Экспер. часть») в присутствии N-этилмалеимида (а, 1), диэтилпирокарбоната (а, 2), аТТР(3-NH₂) (б, 1), ТТР(3-F) (б, 2), ТТР(3-NH₂) при pH 7,4 (в, 2) и 9,0 (г, 2). Аналогичные результаты получены с производными dGTP, dATP и dCTP. На графиках в и г для сравнения показано действие аСТР (1) и ddTTP (2,3) при этих же значениях pH

Экспериментальная часть

В работе использованы dNTP отечественного производства: [³H]TTP с удельной радиоактивностью 19 Ки/ммоль синтезирован объединением «Изотоп»; dNTP(3'-NH₂), dNTP(3'-F) и aNTP(3NH₂) любезно предоставлены А. А. Краевским (ИМБ АН СССР, Москва), И. А. Михайлоуло (ИБХ, Минск) и А. В. Папчихиным (КГУ, Куйбышев). Использовались также следующие реактивы: тритон X-100 и трис-HCl (Ferah, ФРГ), бромциан и β -меркаптоэтанол (Merck, ФРГ), Na₂-EDTA, DEAE-целлюлоза (Serva, ФРГ), лаурилсульфат натрия (BDH, Англия), фосфоцеллюлоза P-11 и DEAE-бумага DE-81 (Whatman, Англия), сефароза 4В и амфолины (LKB, Швеция), агароза (Bio-Rad, США), фенол-метансульфонилфторид (Sigma, ФРГ), аффинный сорбент голубой гель А (Gel Blue A, Amicon, США), акриламид, N,N'-метиленисакриламид (Reanal, ВНР), бычий сывороточный альбумин, ДНК-полимераза 1 и маркерные белки (Boehringer-Mannheim, ФРГ). Остальные реактивы поставлялись объединением Союзреактив, квалификация ос. ч. и х. ч. Глицерин перед употреблением перегоняли в вакууме.

Активированную ДНКазой I ДНК получали по стандартной методике [1] из препарата тимусной ДНК теленка (НИКТИ БАВ, Бердск; M 2-6 МДа), предварительно очистив ее от примесных белков по [16]. При осаждении активированной ДНК на холоду 0,3 н. HCl в растворе остается от 5 до 8% материала, поглощающего при 260 нм. Концентрация 3'-гидроксильных групп в растворе, содержащем 1 мг/мл активированной ДНК, составила 5-10 мкМ. Концентрацию белка определяли согласно [17].

Получение ДНК-сефарозы. Сефарозу 4В активировали бромцианом по методике [18] с небольшими модификациями. Реакцию активирования проводили при 0°С, добавляя триэтиламин двумя равными порциями с интервалом в 1 мин. Конечное отношение триэтиламина к бромциану (моль/моль) составило 1,5:1. Прекращение закисления реакционной массы свидетельствовало об окончании активации сефарозы. К 20 г активированной сефарозы добавляли 5 мл раствора денатурированной нагреванием тимусной ДНК (5 мг/мл) в 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,6). Смесь встряхивали в течение 48 ч при 20°С и затем добавляли

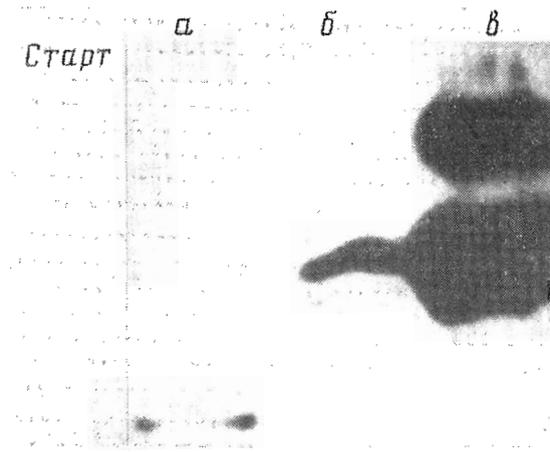


Рис. 5. Ренатурация ДНК-полимераз после электрофореза в денатурирующих условиях (см. «Экспер. часть»): ДНК-полимеразы β , 10 ед. акт., 38–40 кДа (а), фрагмента Кленова, 2 ед. акт., 69 кДа (б) и ДНК-полимеразы 1, 10 ед. акт., 104 кДа (в)

0,1 мл этаноламина. Через 1 ч ДНК-сефарозу промыли водой и хранили в 40% водном этаноле при 4° С.

Выделение хроматина. Из 100 взрослых целинейных крыс, убитых декапитацией, извлекали печень и сразу же помещали ее в ледяную баню. Затем ее гомогенизировали в 2 л 10 мМ калий-фосфатного буфера (рН 6,5), содержащего 2 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ β -меркаптоэтанол (буфер А). Гомогенизацию проводили в приборе Уоринга двумя импульсами по 45 с в режиме работы 6000 об/мин. Гомогенат фильтровали через четыре слоя марли и центрифугировали 30 мин при 1200g. Осадок ресуспендировали в 2 л буфера А, содержащего 0,25% тритона X-100, перемешивали 10 мин, после чего центрифугировали (1200g, 40 мин). Супернатант отбрасывали. Процедуру промывания тритоном X-100 повторяли, после чего для удаления тритона X-100 осадок ресуспендировали в 1 л буфера А, содержащего 0,25 М сахарозу и центрифугировали (1200g, 40 мин). Получили 80 мл частично очищенного хроматина, который можно хранить год и более при -70° С.

Экстракцию ДНК-полимеразы β из хроматина проводили по работе [2] с некоторыми модификациями. Плотный осадок, полученный на предыдущей стадии, тщательно суспендировали несколькими порциями в приборе Даунса в 450 мл калий-фосфатного буфера (рН 6,5), содержащего 0,5 мМ Na_2-EDTA , 4 М $NaCl$ и 0,1 мМ фенилметансульфонилфторид. Суспензию хроматина интенсивно перемешивали верхней мешалкой в течение 3 ч, затем центрифугировали (1 ч, 15 000g) и диализовали вязкий супернатант против 10 мМ калий-фосфатного буфера (рН 6,5); меняя внешний буфер через 10 ч (3 смены по 10 л). Затем центрифугированием удалили образовавшийся осадок и получили 995 мл розового первичного экстракта. Повторная экстракция осадка дает не более 5% активности первичного экстракта.

Ионообменная хроматография. К первичному экстракту (995 мл) тремя порциями в течение 30 мин при 0° С добавили 300 мл суспензии DEAE-целлюлозы в 10 мМ калий-фосфатном буфере (рН 6,5) при интенсивном перемешивании. На дно колонки (5×30 см) поместили 200 мл суспензии DEAE-целлюлозы в 10 мМ калий-фосфатном буфере (рН 6,5) и на нее осторожно наслаивали суспензию DEAE-целлюлозы в первичном экстракте. Колонку промыли 1 л 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,6). Фермент элюировали 0,75 л 0,2 М и 0,5 л 0,35 М калий-фосфатного буфера (рН 7,6). Активные фракции диализовали против 10 объемов дистиллированной воды до тех пор, пока концентрация буфера не снижалась до 50 мМ, после чего их сразу наносили на колонку (2×30 см),

заполненную фосфоцеллюлозой, уравновешенной 50 мМ калий-фосфатным^{*} буфером (рН 7,6); скорость нанесения составила 40 мл/ч. Затем колонку промыли 100 мл того же буфера. Фермент элюировали градиентом концентрации калий-фосфатного буфера (0,1—0,5 М, общий объем 500 мл), содержащего 10% глицерина, 0,5 мМ Na₂-EDTA и 0,5 мМ β-меркаптоэтанол. Элюат собирали фракциями объемом 15 мл; активные фракции объединяли и диализовали 12 ч против 6 объемов 10% глицерина. Получили 95 мл фракции I.

Хроматография на голубом геле А. Колонку (0,75×20 см) с голубым гелем А уравновесили 20 мМ трис-НСI-буфером (рН 7,4), содержащим 0,5 мМ Na₂-EDTA, 0,5 мМ β-меркаптоэтанол и 10% глицерина (буфер Б). Фракцию I наносили на нее со скоростью 15 мл/ч. Затем колонку промыли 20 мл буфера Б. Фермент элюировали рН-солевым градиентом (буфер Б (рН 7,4) → 1 М КСI в буфере Б (рН 9,0), общий объем 150 мл). Собирали фракции по 4,5 мл и в каждой из них измеряли активность ДНК-полимеразы β. Активные фракции объединяли и диализовали против 200 мл буфера Б, содержащего 50% глицерина. Получили 7 мл фракции II. В такой форме ДНК-полимеразу β можно хранить более 6 мес при -10° С без заметной потери активности.

Хроматография на ДНК-сефарозе. Для получения ДНК-полимеразы β, не содержащей примесей эндонуклеазы, фракцию II нанесли со скоростью 5 мл/ч на колонку (1×10 см) с ДНК-сефарозой. Колонку промыли с такой же скоростью 20 мл буфера Б и затем фермент элюировали градиентом концентрации КСI в буфере Б (0—1 М, общий объем 150 мл), собирая фракции по 5 мл. ДНК-полимераза β элюируется 0,45 М КСI; объем активных фракций составляет 15 мл. Активность полученного препарата фермента составляет 0,15 ед. акт./мкл, а содержание белка — 7—9 мкг/мл. Для концентрирования раствора фермента его обессоливали и наносили на микроколонку с голубым гелем А из расчета 1 мл сорбента на 5000 ед. акт. и смывали 0,7 М КСI в 30 мМ трис-НСI-буфере (рН 9,0). В объеме, равном $\frac{2}{3}$ объема колонки, элюируется 90% фермента. Последующий диализ против 50% глицерина уменьшает объем раствора еще более чем вдвое, при этом активность препарата фермента возрастает до 1,5 ед. акт./мкл.

Измерение активности ДНК-полимеразы β проводили аналогично [1], добавляя 5 мкл исследуемой фракции к 30 мкл 30 мМ трис-НСI-буфера (рН 9,0), содержащего 0,1 М NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ β-меркаптоэтанол, по 0,1 мМ dATP, dCTP, dGTP и TTP, 0,3—0,5 мкКи [³H]TTP, 0,15 мг/мл активированной ДНК и 10 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина. При необходимости в реакционную смесь добавляли ингибитор или блокирующий реагент в нужной концентрации. Реакцию вели 0,5—1 ч при 37° С и останавливали, перенося реакционную смесь на полоску DEAE-бумаги (1×1,5 см), предварительно смоченную 10 мкл 0,2 М раствора Na₂-EDTA. Радиоактивность, не включенную в ДНК, отмывали, помещая полоски в стакан с 5% раствором Na₂HPO₄·12H₂O из расчета по 10 мл раствора на полоску. Отмывку повторяли 4 раза по 5 мин, затем промывали по одному разу водой и этанолом. После этого полоски высушивали и просчитывали радиоактивность в стандартном толуольном сцинтилляторе. За единицу активности принимали такое количество ДНК-полимеразы, которое катализирует включение 1 нмоль нуклеотида в ДНК за 1 ч [2].

Изоэлектрическое фокусирование ДНК-полимеразы β осуществляли в стеклянной колонке объемом 85 мл, аналогичной прибору № 8100-1 (LKB, Швеция). Колонку последовательно заполняли следующими растворами: 35 мл 1% NaOH в 60% водном глицерине; 60 мл 2,6% раствора амфолинов, рН 8—9,5, и 0,6% раствора амфолинов, рН 3,5—10, в линейном градиенте концентрации глицерина (5—55%), содержащем 200 ед. акт. ДНК-полимеразы β; 15 мл 1% H₃PO₄ в воде. Во время электрофокусирования колонку охлаждали водой с температурой 5° С. Режим установления градиента рН и электрофокусирования белков подбирали таким образом, чтобы тепловыделение в рабочей зоне колонки не превышало 5 Вт.

Максимальная напряженность электрического поля при этом составляла 57 В/см (1200 В на колонку). Электрофокусирование длилось 18 ч, в качестве маркерного белка был использован цитохром *c*. По окончании формирования белковых зон градиент фракционировали по 2 мл и определяли рН и ДНК-полимеразную активность в каждой фракции.

Для обнаружения 3'-эксонуклеазной активности к 3'концам активированной ДНК присоединяли остатки [³H]тимидина согласно методике [19]. Меченую ДНК очищали от низкомолекулярных примесей гель-хроматографией. 3'-Эксонуклеазную активность выявляли по степени отщепления радиоактивности из ДНК при длительной инкубации с исследуемым препаратом в отсутствие dNTP.

Для определения эндонуклеазной активности в исследуемых препаратах изучали кинетику появления одноцепочечных разрывов в замкнутых суперскрученных молекулах ДНК плазмиды pBR 322 [20]. Разрыв одной из цепей суперскрученной ДНК ведет к ее разворачиванию и изменению электрофоретической подвижности. Количественную оценку эндонуклеазной активности проводили, оценивая при 37°С в присутствии 20 мМ трис-НСl-буфера (рН 7,4) и 5 мМ MgCl₂ минимальное время инкубации, ведущее к разрыву 0,5 мкг плазмиды; один разрыв за 30 мин соответствует 1 ед. акт.

Электрофорез в денатурирующих условиях препаратов ДНК-полимеразы β проводили в системе Лэммли [21]. В качестве разделяющего использовали градиентный полиакриламидный гель с размерами 15×12××0,06 см и градиентом концентрации акриламида 5–20%. Электрофорез осуществляли при постоянном значении силы тока 14 мА/см² до того момента, пока зона лидирующего красителя бромфенолового синего не доходила до края геля. Белковые зоны прокрашивали кумасси R-250.

Определение ДНК-полимеразной активности в полиакриламидном геле после денатурирующего электрофореза проводили по методике, аналогичной описанному ранее [13–15]. К 10 мкл препарата ДНК-полимеразы добавляли 5 мкл денатурирующего раствора, содержащего 4% β -меркаптоэтанол, 2% лаурилсульфат натрия, 0,375 М трис-НСl (рН 6,8), 0,01% бромфеноловый синий и 30% глицерина. Смесь инкубировали 3 мин при 37°С, после чего вносили в карман электрофорезного геля. В состав геля вводили ДНК (0,1 мг/мл геля), гидролизованную ДНКазой I при 20°С, по методике [1] до тех пор, пока ее 0,3% раствор не перестал быть вязким. Электрофорез проводили при 4°С и силе тока 5 мА/см². После этого гель отмывали 2 раза по 30 мин в 300 мл 50 мМ трис-НСl-буфера (рН 7,4), содержащего 1 мМ β -меркаптоэтанол, и оставляли на 16 ч при 4°С в свежей смене того же буфера для ренатурации фермента. Затем гель инкубировали 10 ч при 37°С в 30 мл реакционной смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,4), 6 мМ Mg(OAc)₂, 40 мМ KCl, 0,4 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 16% глицерина, 12,5 мкМ dATP, dGTP, dCTP и 130 мкКи [α -³²P]TTP (1000 Ки/ммоль). После этого не включенную в ДНК радиоактивность отмывали 5% СCl₃COOH, содержащей 1% Na₄P₂O₇ (3×300 мл через каждые 4 ч), и автордиографировали без высушивания геля при 20°С на пленку РТ-6М в течение 6 ч.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chang L. M. S. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 11, p. 3789–3795.
2. Wang T. S.-F., Korn D. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 3, p. 841–847.
3. Tanabe K., Bohn E. W., Wilson S. H. Biochemistry, 1979, v. 18, № 15, p. 3401–3406.
4. Kunkel T. A., Tchong J. E., Meyer R. R. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 520, № 2, p. 302–316.
5. Stalker D. M., Mosbaugh D. W., Meyer R. R. Biochemistry, 1978, v. 15, № 15, p. 3114–3121.
6. Fansler B. S., Loeb L. A. Meth. Enzymol., 1974, v. 29, p. 53–70.
7. Joenje H., Benbow R. M. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 8, p. 2640–2649.
8. Yamaguchi M., Hanabe K., Taguchi Y. N., Nishizawa M., Takahashi T., Matsukage A. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 20, p. 2640–2649.
9. Tanabe K., Yamaguchi M., Matsukage A., Takahashi T. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 6, p. 3098–3102.

10. Chang L. M. S., Plevani P., Bollum F. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 3, p. 758—762.
11. Krayevsky A., Kukhanova M., Alexandrova L., Belyakova N., Krutyakov V. Biochim. et biophys. acta, 1984, v. 783, № 2, p. 216—220.
12. Chidgeavodze Z. G., Beabzalashvili R. Sh., Atrazhev A. M., Kukhanova M. K., Azharyev A. V., Krayevsky A. A. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 3, p. 1671—1686.
13. Spanos A., Sedwick S. G., Yarranton G. T., Hubscher U., Banks G. R. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 6, p. 1825—1839.
14. Blanck A., Silber J. R., Thelen M. P., Dekker C. A. Analyt. Biochem., 1983, v. 135, № 3, p. 423—430.
15. Karawya E., Swach J. A., Wilson S. H. Analyt. Biochem., 1983, v. 135, № 2, p. 318—325.
16. Hotchkiss R. D. Meth. Enzymol., 1957, v. 3, p. 692—696.
17. Bradford M. M. Analyt. Biochem., 1976, v. 72, p. 248—254.
18. Kohn J., Wilchek M. Biophys. and Biochem. Res. Commun., 1982, v. 107, № 3, p. 878—884.
19. Brutlag D., Kornberg A. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 11, p. 241—248.
20. Вингер В. Г., Беляева М. И., Шляпневич М. А., Хамидулина Н. Г., Полоцкая А. В., Зоркина Н. Л. Биохимия, 1977, т. 426, № 5, с. 823—827.
21. Laemmli U. K. Nature, 1970, v. 227, p. 680—685.

Поступила в редакцию
27.III.1985
После доработки
15.VII.1985

DNA POLYMERASE β FROM RAT LIVER. PURIFICATION, PROPERTIES AND INHIBITORY ANALYSIS OF THE HOMOGENEOUS ENZYME

ATRAZHEV A. M., KUKHANOVA M. K.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A simple and reproducible purification procedure of homogeneous DNA polymerase β from rat liver is developed, including sedimentation and saline extraction of rat liver chromatin, chromatography of the extract on DEAE-cellulose, phosphocellulose, Gel Blue A, and DNA sepharose. The purified enzyme isolated with the 8.4% yield proved to be a homogeneous protein with m.w. 38—40 kDa, specific activity 31 units/g, pI 8.6—8.9. Incorporation of [3 H]TTP into activated DNA catalysed by DNA polymerase β was strongly inhibited by dNTP(3'NH₂), ddTTP, dNTP(3'F) and slightly inhibited by aCTP and aNTP(3'NH₂).