



УДК 577.150.7+547.963.3

**ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ.  
ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛЯ***Шиян А. Н.**Институт общей генетики Академии наук СССР, Москва*

Из клеток асцитной гепатомы Зайделя выделены ДНК-полимеразы А, В и С с молекулярным весом соответственно 190 000, 100 000 и 45 000. Ферменты очищены фракционированием сульфатом аммония, хроматографией на DEAE-целлюлозе, фосфоцеллюлозе, сефадексе G-100 и ДНК-целлюлозе. Максимальная активность всех трех ферментов проявлялась в присутствии двухцепочечной ДНК, активированной панкреатической ДНК-азой, четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и двухвалентных ионов металлов. Ферменты различались по оптимуму действия рН, влиянию ионной силы и требованиям к концентрациям дивалентных катионов и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. ДНК-полимеразы А и С в отличие от ДНК-полимеразы В активны и на синтетических полирибонуклеотидных матрицах.

В клетках эукариот обнаружено несколько типов ДНК-полимераз (КФ 2.7.7.7). Помимо ДНК-полимераз, выявленных в некоторых специализированных тканях (терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза из тимуса телят [1]) или в субклеточных фракциях (митохондриальная [2, 3]), выделяются два основных типа ферментов: ДНК-полимеразы типа I, имеющие высокий молекулярный вес (100 000—150 000), и ДНК-полимеразы типа II с низким молекулярным весом (40 000—50 000) [4—8]. Особое внимание в последнее время уделяется изучению РНК-зависимой ДНК-полимеразы (ревертазы), выделенной из ряда РНК-содержащих онкогенных вирусов [9]. В некоторых нормальных и опухолевых клетках обнаружен фермент (названный ДНК-полимеразой III или Р-ДНК-полимеразой), сходный с «ревертазой» по активности на синтетических полирибонуклеотидах [10—11], но неактивный на природных РНК [12]. Указанные выше три типа клеточных ДНК-полимераз сейчас рекомендовано обозначать как ДНК-полимеразы  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  [13]. Эти ферменты различаются по локализации, матричным и физико-химическим свойствам и уровню активности в покоящихся и пролиферирующих клетках.

В последнее время появились сообщения о выделении трех ДНК-полимераз из асцитной гепатомы крыс: одной из цитоплазмы и двух из ядер, обозначенных авторами как ДНК-полимеразы С,  $P_1$  и  $P_2$  [8]. ДНК-поли-

Сокращения: АГЗ — асцитная гепатома Зайделя; акт. ДНК — ДНК из тимуса телят, активированная панкреатической ДНК-азой; ДНК-целлюлоза — целлюлоза с иммобилизованной на ней денатурированной ДНК; dNTP — дезоксирибонуклеозидтрифосфат; EDTA — динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты; КФ-буфер — 0,05 М  $K_2PO_4$ -буфер (рН 6,5), содержащий 5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол и 1 мМ EDTA; ТЭМ-буфер — 0,05 М трис-НСl-буфер (рН 7,9), содержащий 5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 1 мМ EDTA и 10% (об/об) глицерина; ТХУ — трихлоруксусная кислота.

меразы С и  $P_1$  по ряду свойств и молекулярному весу аналогичны ДНК-зависимым ДНК-полимеразам высокого молекулярного веса, а ДНК-полимераза  $P_2$  аналогична ДНК-полимеразам низкого молекулярного веса, описанным другими авторами [4—7]. Обнаружение в цитоплазме лишь одной ДНК-полимеразы, по-видимому, объясняется условиями экстракции ферментов (ср. [5]).

Особое внимание, которое уделяется полимеразам опухолевых клеток, связано с решением вопросов злокачественного роста и механизмов пролиферации. Поэтому мы изучили спектр ДНК-полимераз в быстро растущих клетках асцитной гепатомы Зайделя, для которых был показан интенсивный синтез ДНК *de novo* [14].

В клетках АГЗ нами были обнаружены три типа ДНК-полимераз: высокомолекулярные ДНК-полимеразы А и В и низкомолекулярная ДНК-полимераза С. В настоящей работе описана очистка этих ферментов и изучен ряд их свойств. ДНК-полимеразы А и С оказались способными использовать синтетический гибрид  $(A)_n \cdot (dT)_{10}$  [15].

Для определения ДНК-зависимой ДНК-полимеразной активности в качестве матрицы использовали акт. ДНК [16] (системы с этой матрицей обозначены далее как системы А), для определения РНК-зависимой ДНК-полимеразной активности — синтетическую матрицу  $poly(A)$  в комплексе с  $oligo(dT)$  [17] (системы В). При тестировании ионная сила раствора и концентрация дивалентного катиона выбирались для каждого фермента так, чтобы вклад сопутствующих ДНК-полимераз был сведен к минимуму.

Концентрация  $dNTP$  при определении активности ДНК-полимераз В и С составляла  $10^{-1}$  М, а в случае ДНК-полимеразы А —  $5 \cdot 10^{-6}$  М.

Данные по очистке ферментов, состоящей из следующих стадий: экстракции, фракционирования сульфатом аммония, хроматографии на DEAE-целлюлозе, фракционирования на фосфоцеллюлозе и сефадексе G-100 и аффинной хроматографии на ДНК-целлюлозе, приведены в табл. 1.

Было отмечено, что на первых этапах очистки происходило увеличение не только удельной, но и суммарной активности фермента, что особенно было заметно при определении активности в системах В. По-видимому, это связано с удалением некоторых нуклеаз или ингибиторов матричного синтеза ДНК.

Как видно из табл. 1, основное количество ферментативной активности экстрагировалось из клеток АГЗ 0,2 М КСl.

Почти 90% ДНК-зависимой полимеразной активности осаждалось при концентрации сульфата аммония от 18 до 40% от насыщения; фракция II-1 (табл. 1) содержала преимущественно ДНК-полимеразы А и В. При более высоких концентрациях (40—80%) происходило осаждение ДНК-полимеразы С (фракция II-2), что подтверждалось тестированием в системе  $B_2$  (см. «Экспериментальную часть»). В результате на этой стадии происходило грубое отделение ДНК-полимеразы С от остальных ДНК-полимераз и некоторое повышение ее удельной активности.

Для удаления сопутствующих нуклеиновых кислот фракции II-1 и II-2 пропускали через колонки с DEAE-целлюлозой [17]. При этом основное количество белка элюировалось 0,2 М КСl (соотношение  $E_{280} : E_{260}$  в элюате больше 1,1). При последующем фракционировании на фосфоцеллюлозе основное количество активного белка из фракции II-1 элюировалось 0,4 М КСl (фракция III-1), а из фракции II-2 — 0,6 М КСl (фракция III-2).

Полученные фракции III-1 и III-2 концентрировали и хроматографировали на сефадексе G-100.

Как видно из рис. 1, фракция III-1 при этом разделялась на две активности: на ДНК-полимеразу А, активную в системе  $B_1$  (которая обладала наибольшим молекулярным весом из всех описанных нами полимераз), и ДНК-зависимую ДНК-полимеразу В. Наименьший молекулярный вес имела ДНК-полимераза С из фракции III-2.

Таблица 1

## Очистка ДНК-полимераз из асцитной гепатомы Зайделя

Фракция	Стадия	Кол-во белка, мг	ДНК-полимераза В		ДНК-полимераза А		Выход, %
			Фермент, активность (ед.)	Удельная активность	Фермент, активность (ед.)	Удельная активность	
I	Экстракт 0,2 М КСl Экстракт 1,0 М КСl	12 600	63 800	84	23 600	1,8	100
		2 000	42 200	16	2 000		
II	Обесдиленный экстракт Осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1) 48—40% 2) 40—80%	14 600	76 000	5,2	25 600	48	100
		2 750	53 000	19	132 000		
III-1	Хроматография на DEAE-целлюлозе	2 470	8 400	3,4	73 000	44	55
		1 780	66 000	37	54 000		
IV-1	Фракционирование на фосфоцеллюлозе	210	48 000	220	68 000	2 500	52
		27	8 600	320	52 500		
V-1	Гель-фильтрация	1,2	6 400	820	44 000	40	40
		7,7					
VI	Хроматография на ДНК-целлюлозе	12 600	25 800	85	1 350	83	40
		2 000	4 500	15	83		
I	Экстракт 0,2 М КСl Экстракт 1,0 М КСl	14 600	30 300	2,1	1 440	0,2	100
		2 750	26 600	9,7	540		
II	Обесдиленный экстракт Осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1) 48—40% 2) 40—80%	2 470	8 600	3,7	15 300	13	160
		1 890	42 000	6,3	23 800		
III-2	Хроматография на DEAE-целлюлозе	75	40 700	140	38 400	510	250
		33	6 500	2 000	21 100		
IV-2	Фракционирование на фосфоцеллюлозе	0,17	3 000	17 500	8 700	51 000	57
		33	6 500	2 000	21 100		
V-2	Гель-фильтрация					6 300	140
VI	Хроматография на ДНК-целлюлозе					8 700	51 000
ДНК-полимераза А	ДНК-полимераза В					8 700	51 000
I	Экстракт 0,2 М КСl Экстракт 1,0 М КСl	12 600	25 800	85	1 350	83	40
		2 000	4 500	15	83		
II	Обесдиленный экстракт Осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1) 48—40% 2) 40—80%	14 600	30 300	2,1	1 440	0,2	100
		2 750	26 600	9,7	540		
III-2	Хроматография на DEAE-целлюлозе	2 470	8 600	3,7	15 300	13	160
		1 890	42 000	6,3	23 800		
IV-2	Фракционирование на фосфоцеллюлозе	75	40 700	140	38 400	510	250
		33	6 500	2 000	21 100		
V-2	Гель-фильтрация	0,17	3 000	17 500	8 700	51 000	57
		33	6 500	2 000	21 100		
VI	Хроматография на ДНК-целлюлозе					8 700	51 000

Примечание. В системах А<sub>1</sub> и А<sub>2</sub> использована матрица акт. ДНК, а в системах В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub> — (А)<sub>1р</sub>, (дТ)<sub>1р</sub>. Условия тестирования для каждого фермента близки к оптимальным (см. методику).

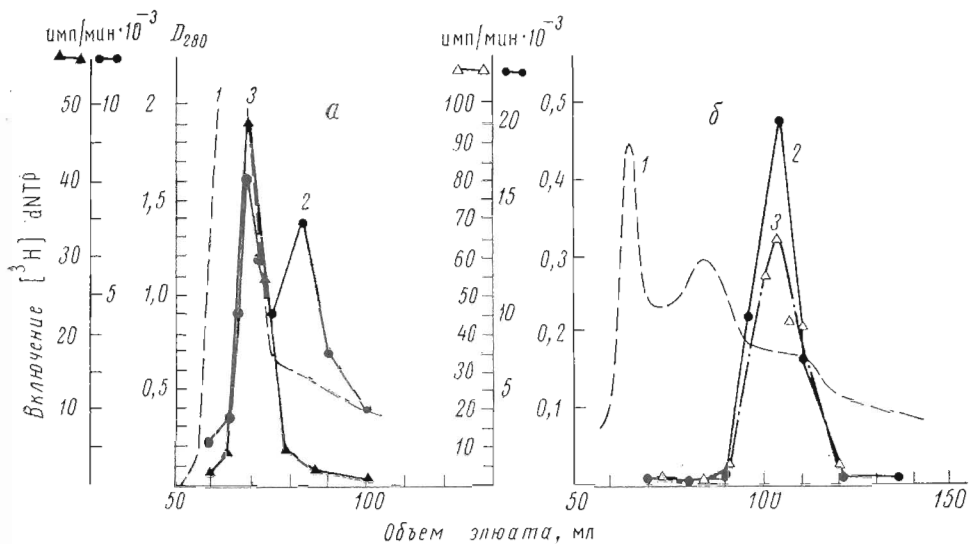


Рис. 1. Гель-фильтрация через колонку (99 × 1,5 см) с сефадексом G-100. *a* — разделение фракции IV-1: 1 — оптическая плотность при 280 нм, 2 — ДНК-полимеразная активность в системе А<sub>1</sub>, 3 — ДНК-полимеразная активность в системе Б<sub>1</sub>; *б* — разделение фракции IV-2: 1 — оптическая плотность, 2 — ДНК-полимеразная активность в системе А<sub>2</sub>, 3 — ДНК-полимеразная активность в системе Б<sub>2</sub>

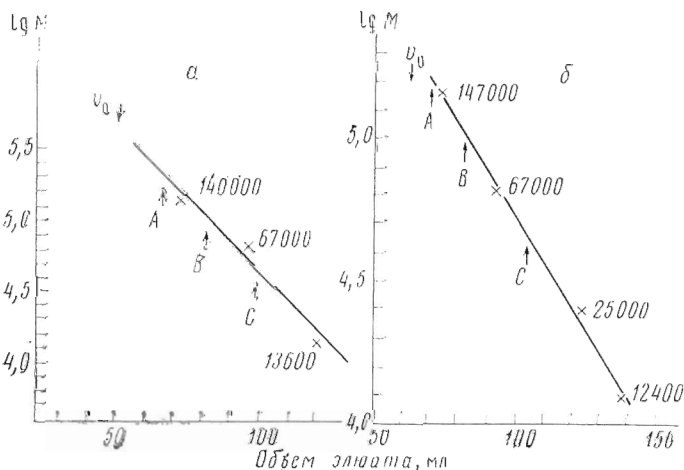


Рис. 2. Определение молекулярного веса ДНК-полимераз на сефадексах G-200 и G-100. Колонки откалиброваны следующими белковыми маркерами: *a* — колонка с G-200 (49 × 2 см) — у-глобулин (*M* 140 000), бычий сывороточный альбумин (*M* 67 000), панкреатическая рибонуклеаза (*M* 13 600); *б* — колонка с G-100 (99 × 1,5 см) — альдолаза (*M* 147 000), бычий сывороточный альбумин (*M* 67 000), химотрипсиноген А (*M* 25 000), цитохром С (*M* 12 400). Стрелками указано положение соответствующих ДНК-полимераз А, В и С

Молекулярный вес ДНК-полимераз А, В и С, определенный с помощью гель-хроматографии на сефадексах G-100 и G-200 (см. рис. 2), составлял соответственно 180 000—190 000, 100 000 и 45 000—48 000.

Окончательно разделить ДНК- и РНК-зависимые ДНК-полимеразные активности удалось с помощью аффинной хроматографии на ДНК-целлюлозе (см. рис. 3).

В результате проведенной очистки удельная активность ферментов по сравнению с исходным экстрактом увеличилась для ДНК-полимеразы В

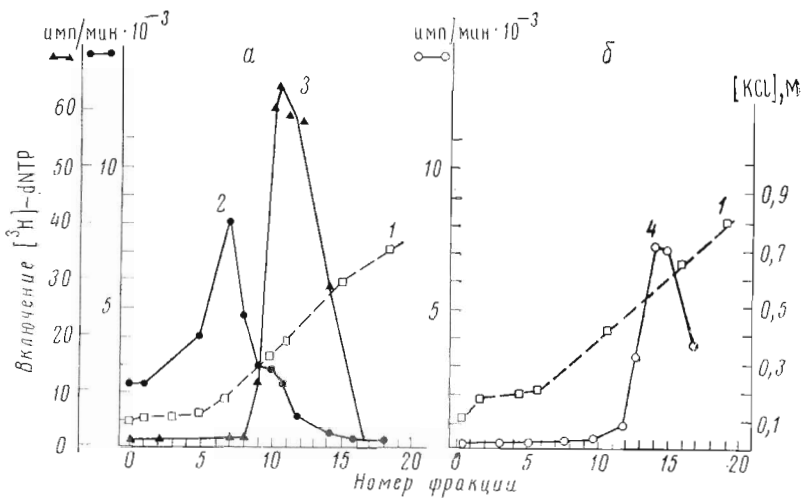


Рис. 3. Аффинная хроматография ДНК-полимераз на ДНК-целлюлозе. *a* — разделение фракции V-1 (ДНК-полимеразы В и А), *б* — хроматография фракции V-2 (ДНК-полимераза С, в некоторых случаях она элюируется при более высокой ионной силе — порядка 0,7 М КСl). 1 — градиент концентрации КСl; 2 — ДНК-полимеразная активность в системе А<sub>1</sub>; 3 — ДНК-полимеразная активность в системе В<sub>1</sub>; 4 — ДНК-полимеразная активность в системе В<sub>2</sub>.

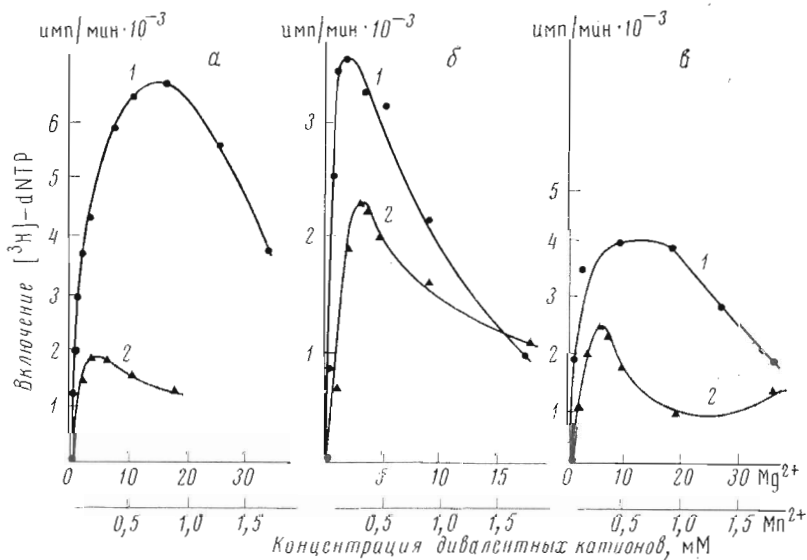


Рис. 4. Зависимость скорости ДНК-полимеразной реакции от концентрации дивалентных катионов: 1 — от концентрации  $Mg^{2+}$ , 2 — от концентрации  $Mn^{2+}$ . *a* — активность ДНК-полимеразы А (реакцию проводили при рН 8,5 и концентрации КСl 0,12 М, используя 10—11 мкг акт. ДНК); *б* — активность ДНК-полимеразы В при концентрации КСl 0,06 М; *в* — активность ДНК-полимеразы С при концентрации КСl 0,12 М.

в 150 раз, для ДНК-полимеразы С — в 8000 раз, а для ДНК-полимеразы А — в 1000 раз по отношению к активности сульфатаммонийной фракции. У выделенных ДНК-полимераз были изучены требования к условиям реакции, катализируемой этими ферментами (оптимум рН, концентрация дивалентных катионов и ионная сила) с использованием в качестве матрицы акт. ДНК.

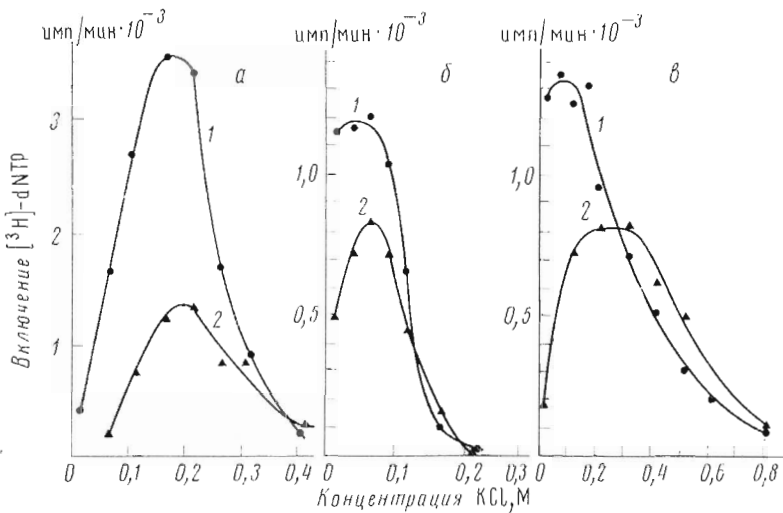


Рис. 5. Зависимость скорости ДНК-полимеразной реакции от ионной силы. *а* — активность ДНК-полимеразы А: 1 — при концентрации  $Mg^{2+}$  5 мМ; 2 — при концентрации  $Mn^{2+}$  0,5 мМ; *б* — активность ДНК-полимеразы Б: 1 — при концентрации  $Mg^{2+}$  2 мМ; 2 — при концентрации  $Mn^{2+}$  0,5 мМ; *в* — активность ДНК-полимеразы С: 1 — при концентрации  $Mg^{2+}$  8 мМ; 2 — при концентрации  $Mn^{2+}$  0,5 мМ

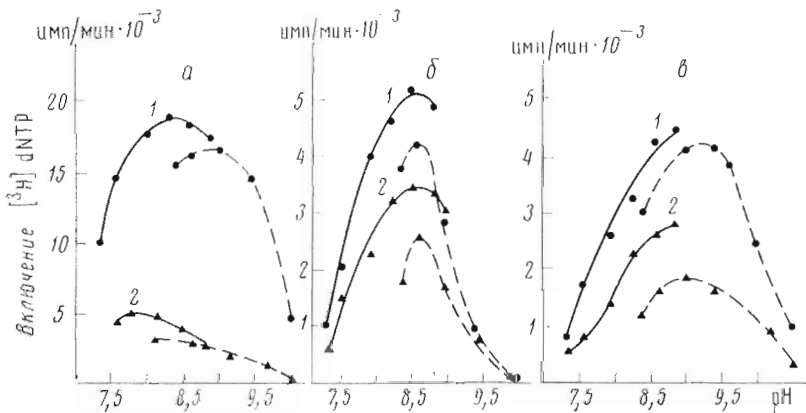


Рис. 6. Влияние pH реакционной смеси на скорость ДНК-полимеразной реакции. В реакции были использованы 0,05 М трис-НСl-буфер (сплошная линия) и 0,05 М глицин-NaOH-буфер (пунктирная линия) и различные концентрации  $Mg^{2+}$  (кружки),  $Mn^{2+}$  (треугольники) и KCl. *а* — активность ДНК-полимеразы А в 0,12 М KCl: 1 — в присутствии 8 мМ  $Mg^{2+}$ ; 2 — в присутствии 0,5 мМ  $Mn^{2+}$ . *б* — активность ДНК-полимеразы В в 0,06 М KCl: 1 — в присутствии 2 мМ  $Mg^{2+}$ ; 2 — в присутствии 0,5 мМ  $Mn^{2+}$ . *в* — активность ДНК-полимеразы С в 0,12 М KCl: 1 — в присутствии 8 мМ  $Mg^{2+}$ ; 2 — в присутствии 0,5 мМ  $Mn^{2+}$

Для протекания ферментативной реакции необходимо присутствие дивалентных катионов:  $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$ . Максимальная активность ДНК-полимераз в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  в 1,5—3 раза выше, чем при использовании  $Mn^{2+}$  (рис. 4). Оптимальные концентрации ионов  $Mn^{2+}$  были равны примерно 0,25 мМ, а ионов  $Mg^{2+}$  — 10—20 мМ для ДНК-полимераз А и С и 1—3 мМ для ДНК-полимеразы В. На рис. 5 представлены данные по влиянию ионной силы раствора на активность исследуемых ДНК полимераз. Видно, что независимо от использованных дивалентных катионов максимальная активность ДНК-полимеразы В проявлялась при более низкой ионной силе (70 мМ KCl), чем для ДНК-полимераз С и А. Максимум активности для

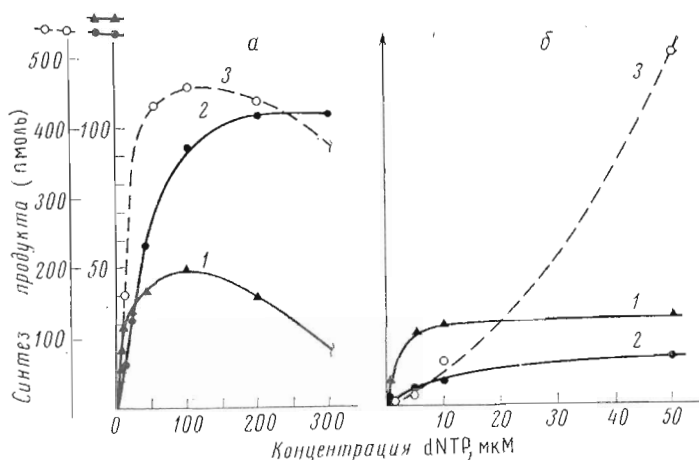


Рис. 7. Зависимость ДНК-полимеразной активности от концентрации dNTP. *a* — ДНК-зависимый синтез проводили с использованием 10 мкг акт. ДНК, 5 мМ Mg<sup>2+</sup> и различной концентрации смеси четырех dNTP при pH 8,5 (концентрация KCl для каждого фермента близка к оптимальной). *б* — poly(A)-зависимый синтез проводили на матрице (A)<sub>n</sub>(dT)<sub>10</sub> при соотношении A/dT 1 : 1. Реакционная смесь содержала 0,12 М KCl, 1 мМ Mn<sup>2+</sup> и различные концентрации dTTP. 1 — ДНК-полимераза А; 2 — ДНК-полимераза В; 3 — ДНК-полимераза С

ДНК-полимераза А наблюдался при концентрации KCl 170—200 мМ, для полимеразы С с участием ионов Mg<sup>2+</sup> — при 120 мМ, а с Mn<sup>2+</sup> — при 150—300 мМ. В последнем случае реакция не ингибировалась полностью при концентрации KCl, равной 0,5 М.

В реакции с участием ионов Mg<sup>2+</sup> для всех трех ферментов оптимум pH выше 8,0 и составлял для полимеразы А 8,2, для полимеразы В — 8,5 и для полимеразы С — 9,2 (см. рис. 6). Оптимум pH для ДНК-полимераз В и С не зависел от используемого буфера и дивалентного катиона, а для ДНК-полимеразы А в присутствии Mg<sup>2+</sup> оптимум активности был несколько сдвинут в щелочную область (pH 8,2) по сравнению с оптимумом в присутствии Mn<sup>2+</sup> (pH 7,9).

Изменение концентрации dNTP по-разному влияло на скорость реакции синтеза ДНК данными ферментами.

На рис. 7 представлена зависимость матричного синтеза продукта от концентрации предшественников в системах А и Б. Для матричного синтеза в обеих системах для ДНК-полимеразы А характерно в отличие от других ДНК-полимераз более быстрое увеличение скорости синтеза при низких концентрациях dNTP; при концентрации 5 мкМ (в системе А) уровень синтеза для ДНК-полимераз А, В и С составлял 50, 5 и 10% максимума.

В системе Б для ДНК-полимеразы А наблюдалась сходная зависимость, однако для ДНК-полимеразы С характерен другой вид кривой. При низких концентрациях dTTP (до 10 мкМ) включение было менее 5% от максимума, после чего шло резкое возрастание скорости синтеза, которое достигало плато при концентрациях 200—400 мкМ.

При изучении влияния природы матрицы на синтез ДНК реакцию проводили в течение 30 мин в зоне линейной зависимости синтеза от времени. Уровень включения на нативной двуцепочечной ДНК был выше, чем на одноцепочечной (табл. 2). Частичный гидролиз ДНК панкреатической ДНК-азой I более чем на порядок повышал ее матричную активность. Щелочная денатурация матрицы и в этом случае приводила к значительному снижению включения dNTP. Весьма активной матрицей для ДНК-полимераз А и С являлся синтетический рибополимер poly(A) в комплексе с

## ДНК-полимеразная активность ферментов на различных природных и синтетических матрицах

Матрица	Предшественник	Относительная активность ДНК-полимераз *		
		А	В	С
ДНК	4 dNTP	12	4	4
ДНК денатурированная	4 dNTP	6	<1	2
акт. ДНК	4 dNTP	100	100	100
	dTTP	<1	2	6
	dATP	3	4	6
акт. ДНК денатурированная	4 dNTP	75	20	63
poly(A)	dTTP	<1	<1	<1
poly(dT)	dATP	<1	0	<1
poly(A)·oligo(dT)	dTTP	86	2	850
	dATP	<1	0	<1
poly(dA)·oligo(dT)	dTTP	16	15	940
	dATP	<1	0	<1
poly(A)·poly(dT)	dTTP	<1	1	80
	dATP	2	0	23
poly(dA)·poly(dT)	dTTP	5	8	140
	dATP	<1	<1	8
poly[d(A-T)·d(A-T)]	dTTP + dATP	1	2	6
	dTTP	<1	1	1

\* Синтез на акт. ДНК принят за 100% активности.

oligo(dT), poly(A) без oligo(dT) почти неактивен, а замена низкомолекулярных цепей праймера oligo(dT) на высокомолекулярную poly(dT) снижала матричную активность более чем в 10 раз. ДНК-полимераза А в системе с poly(A) функционировала почти так же, как на акт. ДНК (86%), а ДНК-полимераза С poly(A) в 8—9 раз активнее, чем на акт. ДНК. Интересно, что замена poly(A) на poly(dA) несколько увеличивала синтез с участием ДНК-полимеразы С, но снижает его в 5 раз для ДНК-полимеразы А, что позволяет отнести последнюю к  $\gamma$ -полимеразам.

Для проявления максимальной ферментативной активности требовалось присутствие всех комплементарных dNTP. При использовании только одного из четырех dNTP в случае акт. ДНК синтез составлял не более 6%. Poly(dT) являлась менее эффективной матрицей, чем poly(A) и poly(dA); замена dTTP на dATP в случае синтетических матриц poly(A)·poly(dT) и poly(dA)·poly(dT) приводила к значительному снижению включения радиоактивного предшественника в кислотонерастворимый продукт (см. табл. 2). Обращает на себя внимание тот факт, что в наших условиях для ДНК-полимеразы С poly(A) является более активной затравкой, чем poly(dA). Poly[d(A-T)·d(A-T)] в системах В имела незначительную матричную активность.

Эти данные говорят в пользу того, что все три выделенных нами фермента — истинные ДНК-полимеразы, поскольку для синтеза продукта они требуют наличия комплементарных матрицам dNTP и затравки. По ряду свойств — фракционированию на фосфоцеллюлозе [5, 7], зависимости активности от ионной силы и рН реакционной среды [7, 18], молекулярному весу и требованиям к матрице [7—10, 18] — ферменты отнесены нами к следующим типам ДНК-полимераз: ДНК-полимераза А — к Р-ДНК-полимеразам (ДНК-полимеразы  $\gamma$ ), ДНК-полимераза В — к ДНК-зависимым ДНК-полимеразам высокого молекулярного веса (ДНК-полимеразы  $\alpha$ ) и ДНК-полимераза С — к ДНК-полимеразам низкого молекулярного веса (ДНК-полимеразы  $\beta$ ).



## Экспериментальная часть

*Выделение ферментов.* Беспородным крысам-самцам весом 150—200 г интубируя интубационно вводили по 0,5 мл зрелого асцита и на 5-й день после инокуляции собирали асцитную жидкость \*. Клетки АГЗ осаждали центрифугированием при 100g в течение 1 мин, отмывали от эритроцитов 0,15M KCl с 1 mM EDTA и хранили в замороженном состоянии при  $-30^{\circ}$ .

Размораживали 160 г клеток и гомогенизировали при 2860 об/мин в трехкратном объеме 0,01 M трис-HCl-буфера (pH 7,5), содержащего 1 mM EDTA и 5 mM  $\beta$ -меркаптоэтанол, в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Все операции проводили при 0—5°. Гомогенат центрифугировали 15 мин при 1000g, собирали супернатант, а осадок разрушали ультразвуком (35 кГц; 0,5 А;  $3 \times 60$  с) в ультразвуковом диспергаторе (УЗДН-1У 4.2) в буфере для гомогенизации (порциями по 40 мл.) Эту суспензию объединяли с супернатантом от первого центрифугирования и к 850 мл разрушенных клеток добавляли 47 мл 4 M KCl и 47 мл 1 M  $K_2CrO_4$ -буфера (pH 6,5). Гомогенат перемешивали 2 ч, затем центрифугировали 1,5 ч при 90 000g на центрифуге VAC-601. Получали экстракт 0,2 M KCl. Осадок дополнительно экстрагировали в 150 мл 1 M KCl в KФ-буфере в течение 10 ч, затем смесь центрифугировали 2 ч при 120 000g. Полученную надосадочную жидкость диализовали против KФ-буфера, содержащего 0,3 M KCl (экстракт 1 M KCl), и повторно центрифугировали 30 мин при 10 000g.

Объединенный экстракт (фракция I, см. табл. 1) насыщали последовательно сульфатом аммония до 18, 40 и 80% от насыщения, добавляя в течение 20—30 мин (в последнем случае в течение 60 мин) навески из расчета 114, 133 и 285 г/л, и через 30—40 мин отделяли осадки центрифугированием. Первый осадок отбрасывали, а осадки, полученные при насыщении до 40 и 80%, растворяли в 130 мл KФ-буфера, содержащего 0,3 M KCl, и диализовали 12 ч против 10 объемов того же раствора. Полученные фракции (II-1 или II-2, см. табл. 1) дробно, порциями по 40 мл, разбавляли буфером до концентрации 0,2 M KCl, пропускали через колонку с 400 мл DEAE-целлюлозы, уравновешенной KФ-буфером с 0,2 M KCl, и элюат стабилизировали, добавляя глицерин до 10% (об/об).

Каждую из полученных фракций (II-1 и II-2) разбавляли 1 : 1 KФ-буфером с 10%-ным глицерином и наносили на колонки с фосфоцеллюлозой, предварительно уравновешенной тем же буфером с глицерином, из расчета 10—15 мг белка на 1 мл ионообменника. Колонки промывали 0,1 M KCl и ферменты элюировали ступенчатым градиентом концентрации KCl (0,15; 0,4; 0,6 M), по два объема колонки на каждую ступень. Для дальнейшего фракционирования использовали элюаты 0,4 (фракция IV-1) и 0,6 M KCl (фракция IV-2). Ферментные растворы дополнительно концентрировали, для чего фракцию IV-1 разбавляли 1 : 2 исходным буфером и наносили на фосфоцеллюлозную колонку объемом 14 мл, а фракцию IV-2, разбавленную 1 : 1, сорбировали на колонке объемом 9 мл. Белок смывали минимальным объемом 0,6 M KCl и фракции диализовали против раствора  $(NH_4)_2SO_4$  (630 г/л) в KФ-буфере.

Выпавший осадок растворяли в 4 мл 0,2 M раствора KCl в ТЭМ-буфере и фракционировали в том же растворе на колонке с сефадексом G-100 ( $1,5 \times 100$  см, см. рис. 1). Белковые фракции, обладавшие максимальной ферментативной активностью, разбавляли ТЭМ-буфером 1 : 2 и хроматографировали на колошках с ДНК-целлюлозой (объем колонки 3 мл), уравновешенной ТЭМ-буфером. После нанесения белка колонки промывали

\* К 6-му дню зараженные животные, как правило, погибали. В некоторых опытах, когда использовались более крупные крысы, созревание асцита шло медленнее, и его собирали на 6-й и даже 7-й день. При этом уровень активности ДНК-полимеразы В заметно снижался, а ДНК-полимераза А практически не обнаруживалась.

5 мл 0,1 М КСl и элюировали линейным градиентом 0,1—0,8 М КСl в ТЭМ-буфере (30 мл).

Фракции, содержащие активный белок, концентрировали диализом против 50% глицерина в 0,05 М трис-НСl (рН 7,5) с 0,2 М КСl, 1 мМ ЕДТА и 2 мМ дитиотреитола и хранили при  $-15^{\circ}$ . Заметного изменения ферментативной активности белка не наблюдалось при этом в течение 6 месяцев.

*Определение активности ДНК-полимераз.* Определение ДНК-зависимой ДНК-полимеразной активности проводили в системах  $A_1$  и  $A_2$ , а poly(A)-зависимой ДНК-полимеразной активности — в системах  $B_1$  и  $B_2$  в пробах объемом 0,1 мл.

*Система  $A_1$*  содержит следующие компоненты: 3 мМ  $MgCl_2$ , 0,07 М КСl, 0,05 М трис-НСl-буфер (рН 8,5), 2 мМ дитиотреитол, 40 мкг бычьего сывороточного альбумина, 10 мкг акт. ДНК по 100 мкМ каждого из четырех dNTP и дополнительно 0,5 мкКи  $^3H$ -dTTP.

*Система  $A_2$* : 8 мМ  $MgCl_2$ , 0,12 М КСl, а все другие компоненты в тех же концентрациях, что и система  $A_1$ .

Акт. ДНК получали путем обработки нативной ДНК тимуса теленка (2 мг/мл) панкреатической ДНК-азой I (0,2—0,4 мкг/мл) в 0,1 М трис-НСl-буфере (рН 7,5) с 2 мМ  $MgCl_2$  при  $37^{\circ}$  до перехода 5—10% нуклеотидов ДНК в кислоторастворимую форму. Реакцию останавливали добавлением раствора ЕДТА до 5 мМ, инактивировали ДНК-азу при  $60^{\circ}$  в течение 30 мин и диализовали против дистиллированной воды.

*Система  $B_1$* : 0,5 мМ  $MnCl_2$ , 0,12 М КСl, 0,05 М трис-НСl-буфер (рН 8,5), 2 мМ дитиотреитол, 40 мкг бычьего сывороточного альбумина, 0,0125  $OE_{260}$  (A) $_n$  · [(dT) $_{10}$ ] $_n$ / $_{10}$ , 5 мкМ dTTP и 0,5 мкКи [ $^3H$ ]dTTP.

*Система  $B_2$*  отличается от системы  $B_1$  только содержанием dTTP — 100 мкМ.

В пробы добавляли по 0,1—0,3 ед. фермента и инкубировали 30 мин при  $37^{\circ}$  (системы А) или 30 мин при  $30^{\circ}$  (системы В). Реакцию останавливали, добавляя 40 мкл смеси 0,2 М ЕДТА: насыщ. раствор  $Na_4P_2O_7$  (1 : 1), пробы количественно переносили на бумажные диски («Whatman» № 3) диаметром 24 мм и погружали в 10%-ную ТХУ, содержащую  $1/_{10}$  объема конц. раствора  $Na_4P_2O_7$ . Затем диски последовательно погружали на 15—20 мин в 10%-ную, 5%-ную ТХУ, 70%-ный спирт и смесь спирт — эфир (1 : 1) и сушили 10 мин при  $120^{\circ}$ .

Радиоактивность измеряли в толуольном сцинтилляторе на сцинтилляционном счетчике «Mark-I» (Nuclear — Chicago). За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее переход за 30 мин в кислотонерастворимую форму 10 пмоль предшественников под действием ДНК-полимеразы А и 1 пмоль — под действием ДНК-полимераз В и С.

Количество белка во фракциях определяли по методу Лоури [19] и спектрофотометрически, по поглощению при 280 нм.

В работе использовали следующие реактивы: dNTP («Merck», ФРГ), [ $^3H$ ]dNTP («Amersham», Англия), синтетические матрицы: poly(A), poly(dA), poly(dT), poly[d(A-T) · (A-T)] и др. и дитиотреитол («Calbiochem», США), бычий сывороточный альбумин («Armour», США), трис («Reanal», Венгрия), ДЕАЕ-целлюлоза ДЕ-32 («Whatman», Англия) и фосфоцеллюлоза («Serva», ФРГ).

ДНК-целлюлозу, содержащую 6 мг денатурированной ДНК на 1 г целлюлозы, готовили по Альбертсу — Литману [20, 21] и хранили в ТЭМ-буфере в замороженном состоянии.

Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду и дважды перегнанный под вакуумом глицерин.

Автор приносит благодарность С. И. Городецкому за помощь при выполнении этой работы и Ю. П. Винецкому и Г. А. Дворкину за ценные замечания при подготовке ее к публикации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Chang L. M. S., Bollum F. J. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 909—916.
2. Meyer R. R., Simpson M. V. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 130—137.
3. Fry M., Weissbach A. (1973) *Biochemistry*, **12**, 3602—3608.
4. Spadari S., Muller R., Weissbach A. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 2991—2992.
5. Baril E. F., Brown O. E., Jenkins M. D., Laszlo J. (1971) *Biochemistry*, **10**, 1981—1992.
6. Weissbach A., Schlabach A., Fridlender B., Bolden A. (1971) *Nature New Biol.*, **231**, 167—170.
7. Smith R. G., Gallo R. C. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 2879—2884.
8. Tsuruo T., Hirayama K., Ukita T. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **383**, 274—281.
9. Gallo R. C. (1972) *Blood*, **39**, 117—137.
10. Ward D. C., Humphryes K. C., Weinstein I. B. (1972) *Nature*, **237**, 499—503.
11. Fridlender B., Fry M., Bolden A., Weissbach A. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 452—455.
12. Lewis B. J., Abrell J. W., Smith R. G., Gallo R. C. (1974) *Science*, **183**, 867—869.
13. Weissbach A., Baltimore D., Bollum F., Gallo R., Korn D. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **59**, 1—2.
14. Комар В. Е., Никитина З. С., Шутко А. Н., Ильин Л. А. (1974) *Биохимия*, **39**, 327—332.
15. Шнян А. Н. (1975) V Всесоюзный симпозиум «Структура и функции клеточного ядра», Новосибирск, Тезисы сообщений.
16. Loeb L. A. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 1672—1681.
17. Stavrianopoulos J. G., Karkas J. D., Chargaff E. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 1781—1785.
18. Chang L. M. S. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 7441—7446.
19. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
20. Alberts B. M., Amodio F. J., Jenkins M., Gutmann E. D., Derris F. L. (1968) *Cold Spring Harbor. Sympos. Quant. Biol.*, **33**, 289—305.
21. Litman R. M. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 6222—6233.

Поступила в редакцию  
17.XII.1975

После доработки  
12.II.1976

### EUCARYOTIC DNA POLYMERASES. ISOLATION FROM ZAIDEL ASCITE HEPATOMA

SHYAN A. N.

*Institute of General Genetics, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

Three DNA polymerases with molecular weight of 190 000, 100 000 and 45 000 designated as DNA polymerases A, B and C, respectively, have been isolated from Zaidel ascite hepatoma cells by ammonium sulphate fractionation and successive DEAE-cellulose, phosphocellulose, Sephadex G-100 and DNA-cellulose chromatography. All the DNA polymerases are more active towards double-stranded DNA. DNAase I treatment of the template increases its activity by one order of magnitude. DNA polymerases A and C showed activity with poly(A)·(dT)<sub>10</sub> by contrast to DNA polymerase B. DNA polymerase C is equally active towards poly(dA)·(dT)<sub>10</sub> and poly(A)·(dT)<sub>10</sub>, whereas DNA polymerase A is five times less active towards poly(dA)·(dT)<sub>10</sub>. The effects of pH as well as of MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, KCl and deoxynucleoside triphosphate concentrations on the enzymatic activity of the preparations obtained have been studied.