



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 6 * № 6 * 1980

УДК 577.158.05

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК-ЛИГАЗЫ, РНК-ЛИГАЗЫ, ПОЛИНУКЛЕОТИДКИНАЗЫ И ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ИЗ КЛЕТОК *E. COLI*, ИНФИЦИРОВАННЫХ ФАГОМ Т4

Болезнин М. И., Смолянинов В. В.

Главное управление микробиологической промышленности
при Совете Министров СССР, Москва

Описан метод выделения ДНК- и РНК-лигаз, полинуклеотидкиназы и ДНК-полимераз из одной и той же клеточной массы *Escherichia coli*, инфицированной фагом Т4. Метод основан на использовании полизтиленимина для фракционирования грубого клеточного экстракта. Метод простой, легко воспроизводится и позволяет получать высокоактивные ферменты.

Полинуклеотидкиназа (ПН-киназа), ДНК-полимераза, РНК-лигаза и ДНК-полимераза *, индуцируемые фагом Т4, широко применяются при изучении химических и биологических свойств ДНК и РНК.

В методе Панета и др. [1], предложенном для совместного выделения ДНК-лигазы, ПН-киназы и ДНК-полимеразы из клеток *E. coli*, инфицированных фагом Т4, отделение фракции ДНК-лигазы от ПН-киназы и ДНК-полимеразы проводили осаждением ДНК-белкового комплекса, содержащего последние два фермента, сульфатом стрептомицина с последующим извлечением ПН-киназы и ДНК-полимеразы путем автолиза стрептомицнового осадка. Эта процедура относительно длительная, требует постоянного контроля за ходом автолиза.

В настоящей работе описан метод одновременной очистки указанных выше ферментов из одной и той же клеточной массы, основанный на фракционировании грубого клеточного экстракта полизтиленимином (полими-ном *P*). Применение полимина позволяет ускорить процедуру получения фракции, содержащей ПН-киназу и ДНК-полимеразу, путем избирательной экстракции из ДНК-белкового комплекса, не требует применения ультрацентрифугирования, фракционирования сульфатом стрептомицина, автолиза и дает хороший выход ферментов, свободных от нуклеазных примесей.

Возможность использования полимина для удаления нуклеиновых кислот из экстрактов бактериальных клеток была показана Аткинсоном и Джеком [2]. При низкой ионной силе некоторые ферменты, например ПН-киназа и ДНК-полимераза, связываются с ДНК и осаждаются в присутствии полимина в виде ДНК-белкового комплекса. Повышенная ионная

* Ферменты: полинуклеотидкиназа — полинуклеотид-5'-гидроксикиназа, КФ 2.7.1.78; ДНК-лигаза — полидезоксирибонуклеотидсинтетаза, КФ 6.5.1.1; РНК-лигаза — полиривонуклеотидсинтетаза, КФ 6.5.1.3; ДНК-полимераза — нуклеотидилтрансфераза, КФ 2.7.7.7.

слу, можно экстрагировать ферменты из ДНК-белкового комплекса. Фракционирование полимином было использовано рядом авторов при очистке специфических эндонуклеаз [3–6], РНК-полимеразы *E. coli* [7], ПН-киназы [8].

На схеме приведен метод одновременного выделения ПН-киназы, ДНК-полимеразы, ДНК-лигазы и РНК-лигазы с применением полимина *P*, использованный в настоящей работе.

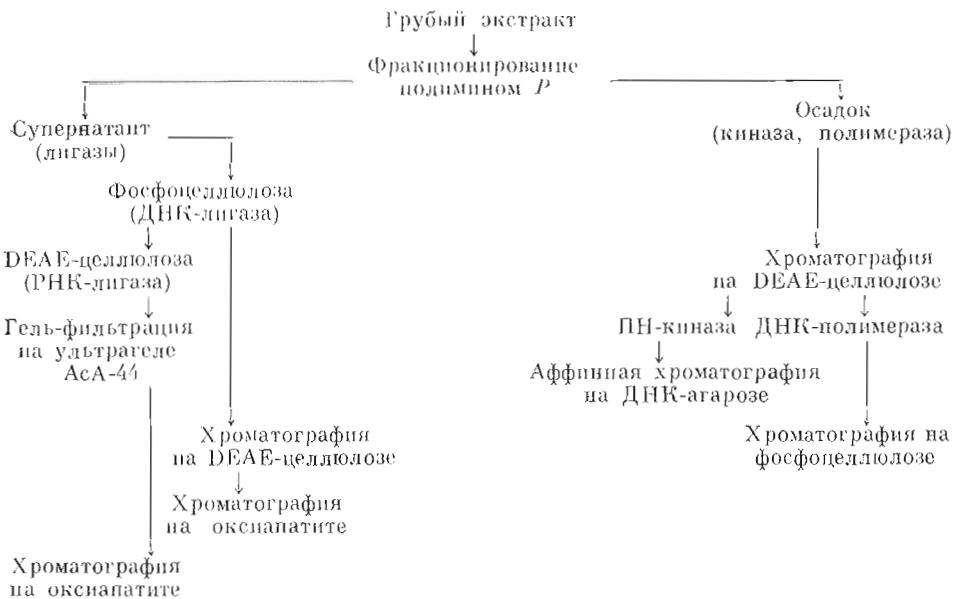


Схема выделения ДНК-лигазы, РНК-лигазы, ПН-киназы и ДНК-полимеразы из клеток *E. coli* B, инфицированных фагом *T4 ambN82*

Первая стадия — фракционирование клеточного экстракта осаждением полимиином. ДНК-лигаза и РНК-лигаза не осаждаются полимиином в составе ДНК-белкового комплекса и остаются в растворе. Использование при этом буфера с низкой ионной силой позволяет отделить от фракции лигаз значительную часть нуклеаз, осаждаемых полимиином с ДНК.

Результаты экстракции ПН-киназы и ДНК-полимеразы из полимиинового осадка в зависимости от концентрации KCl приведены на рис. 1. При 0,1 М KCl наблюдали сравнительно низкую экстракцию ферментов из ДНК-белкового комплекса, потери этих ферментов при промывании полимиинного осадка буфером с 0,1 М KCl незначительны. Экстрагирование ПН-киназы и ДНК-полимеразы 0,4 М KCl приводит к отделению основной их массы от осадка (рис. 1). Дальнейшее повышение ионной силы незначительно повышает содержание этих ферментов в растворе, но приводит к экстракции других белков, связанных с ДНК болееочно. Исходя из этого осадок предварительно промывали 0,1 М KCl и экстракцию ПН-киназы и ДНК-полимеразы проводили в 0,4 М KCl.

Лигазы разделяли в системе из последовательно соединенных колонок с фосфоцеллюлозой и DEAE-целлюлозой. ДНК-лигаза сорбируется на фосфоцеллюлозе. РНК-лигаза на фосфоцеллюлозе не сорбируется и связывается далее с DEAE-целлюлозой. Эта стадия обеспечивает полное разделение лигаз. Применение буферных растворов с 0,1 М KCl при панесении ферментов на сорбенты повышает эффективность разделения за счет того, что значительная часть белков в этих условиях не сорбируется.

Дальнейшая очистка РНК-лигазы на ультрагеле AcA-44 (рис. 2) значительно повышает удельную активность фермента по сравнению с применяемой обычно гель-фильтрацией на сепадексах. Последняя стадия вы-

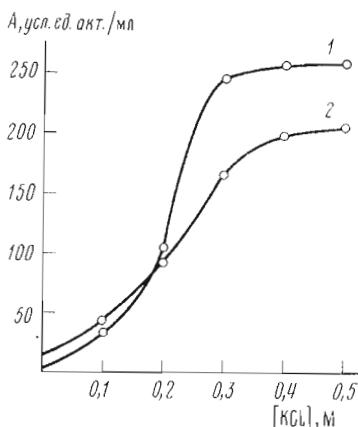


Рис. 1

Рис. 1. Влияние концентрации KCl на экстракцию ферментов из полиминного осадка:
1 – активность ДНК-полимеразы, 2 – активность ПН-киназы

Рис. 2. Гель-фильтрация РНК-лигазы на колонке ($2,5 \times 100$ см) с ультратрагелем Аса-44;
1 – поглощение, 2 – активность РНК-лигазы. Объем фракций 44 мл

деления РНК-лигазы включала хроматографию на оксиапатите [9] (табл. 1).

Фракцию ДНК-лигазы очищали хроматографией на DEAE-целлюлозе и оксиапатите [1] (табл. 2).

Полиминный экстракт, содержащий ПН-киназу и ДНК-полимеразу, разделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе с последующей очисткой ПН-киназы аффинной хроматографией на ДНК-агарозе [8] и ДНК-полимеразы на фосфоцеллюлозе [10] (табл. 3, 4).

Полученные ферменты имели хорошую чистоту при электрофорезе в полиакриламидном геле и сохраняли стабильность при -20°C в 50% глицерине в течение нескольких месяцев.

Таким образом, экспериментально показано, что предлагаемая методика дает возможность одновременного выделения из одной и той же клеточной массы *E. coli* ряда ферментов, индуцированных фагом T4, и является более простой и быстрой по сравнению с методиками, использующими сульфат стрептомицина.

Экспериментальная часть

Выделение ферментов проводили из 100 г клеточной массы *E. coli* B, инфицированной фагом T4 ambN82 с множественностью 5–8.

Для изучения влияния концентрации KCl на экстракцию ферментов из полиминного осадка в 10 мл клеточного экстракта добавляли 10% раствор полимина до конечной концентрации 0,2%. Аликвоты (1 мл) центрифугировали 30 мин при 27 000 g. Осадок суспендировали в 1 мл 10 mM трис-НCl-буфера, pH 7,5, содержащего 10 mM 2-меркаптоэтанол (буфер A) и в различных концентрациях KCl. После центрифugирования в супернатант определяли активность ферментов.

Для препаративного выделения 100 г клеточной массы суспендировали в 300 мл 10 mM трис-НCl-буфера, pH 7,5, содержащего 1 mM глутатион. Клетки разрушали на ультразвуковом осцилляторе MSE-150W при максимальной мощности 3 мин и осаждали 30 мин центрифугированием при 27 000 g. В супернатант добавляли 10% раствор полимина до конечной концентрации 0,2%. Через 10 мин суспензию центрифугировали 30 мин при 27 000 g. Супернатант использовали для выделения лигаз. Осадок суспендировали в 100 мл буфера A, содержащего 0,1 M KCl. После центрифу-

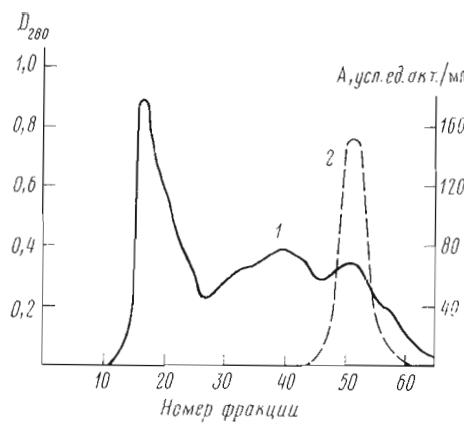


Рис. 2

Рис. 1. Влияние концентрации KCl на экстракцию ферментов из полиминного осадка:
1 – активность ДНК-полимеразы, 2 – активность ПН-киназы

Рис. 2. Гель-фильтрация РНК-лигазы на колонке ($2,5 \times 100$ см) с ультратрагелем Аса-44;
1 – поглощение, 2 – активность РНК-лигазы. Объем фракций 44 мл

деления РНК-лигазы включала хроматографию на оксиапатите [9] (табл. 1).

Фракцию ДНК-лигазы очищали хроматографией на DEAE-целлюлозе и оксиапатите [1] (табл. 2).

Полиминный экстракт, содержащий ПН-киназу и ДНК-полимеразу, разделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе с последующей очисткой ПН-киназы аффинной хроматографией на ДНК-агарозе [8] и ДНК-полимеразы на фосфоцеллюлозе [10] (табл. 3, 4).

Полученные ферменты имели хорошую чистоту при электрофорезе в полиакриламидном геле и сохраняли стабильность при -20°C в 50% глицерине в течение нескольких месяцев.

Таким образом, экспериментально показано, что предлагаемая методика дает возможность одновременного выделения из одной и той же клеточной массы *E. coli* ряда ферментов, индуцированных фагом T4, и является более простой и быстрой по сравнению с методиками, использующими сульфат стрептомицина.

Экспериментальная часть

Выделение ферментов проводили из 100 г клеточной массы *E. coli* B, инфицированной фагом T4 ambN82 с множественностью 5–8.

Для изучения влияния концентрации KCl на экстракцию ферментов из полиминного осадка в 10 мл клеточного экстракта добавляли 10% раствора полимина до конечной концентрации 0,2%. Аликвоты (1 мл) центрифугировали 30 мин при 27 000 g. Осадок суспендировали в 1 мл 10 mM трис-НCl-буфере, pH 7,5, содержащего 10 mM 2-меркаптоэтанол (буфер A) и в различных концентрациях KCl. После центрифугирования в супернатант определяли активность ферментов.

Для препаративного выделения 100 г клеточной массы суспендировали в 300 мл 10 mM трис-НCl-буфере, pH 7,5, содержащего 1 mM глутатион. Клетки разрушали на ультразвуковом осцилляторе MSE-150W при максимальной мощности 3 мин и осаждали 30 мин центрифугированием при 27 000 g. В супернатант добавляли 10% раствора полимина до конечной концентрации 0,2%. Через 10 мин суспензию центрифугировали 30 мин при 27 000 g. Супернатант использовали для выделения лигаз. Осадок суспендировали в 100 мл буфера A, содержащего 0,1 M KCl. После центрифу-

Таблица 1

Выделение РНК-лигазы из клеток *E. coli*, инфицированных фагом T4

Стадия выделения	Объем, мл	Белок, мг	Общая активность *, ед. акт.	Удельная активность, ед. акт./мг белка
Клеточный экстракт	340	6800	—	—
Фракционирование полимином	330	3900	160 000	41
Хроматография на DEAE-целлюлозе	210	310	98 000	290
Гель-фильтрация на ультрагеле Аса-44	44	63	93 000	1480
Хроматография на оксиапатите	20	34	53 000	1600

* Метод определения активности не позволяет определить общую активность РНК-лигазы в клеточном экстракте из-за значительной АТР-азной активности.

Таблица 2

Выделение ДНК-лигазы из клеток *E. coli*, инфицированных фагом T4

Стадия выделения	Объем, мл	Белок, мг	Общая активность, ед. акт.	Удельная активность, ед. акт./мг белка	Выход, %
Клеточный экстракт	340	5200	85 000	16,4	100
Фракционирование полимином	330	3900	68 000	17,4	80
Хроматография на фосфоцеллюлозе	95	160	19 000	118,8	22
Хроматография на DEAE-целлюлозе	60	7	12 000	1714	14
Хроматография на оксиапатите	15	1,1	5500	5000	5

тирования при 27 000 g в течении 30 мин осадок ресуспенсировали в 100 мл того же буфера, содержащего 0,4 M KCl. Супензию центрифугировали повторно. Первый супернатант выбрасывали, второй использовали для выделения РНК-лигазы и ДНК-полимеразы.

Супернатант после полиминового осаждения (содержащий лигазы) подвергали фракционирование сульфатом аммония (35–55% насыщения) и после диализа против буфера A, содержащего 0,1 mM EDTA и 0,1 M KCl, наносили на колонку (2,5×30 см) с фосфоцеллюлозой, последовательно соединенной с колонкой (2,5×25 см) с DEAE-целлюлозой (обе колонки уравновешены диализным буфером). ДНК-лигазу элюировали в линейном градиенте KCl (от 0,1 до 0,6 M) в уравновешивающем буфере (выходит при 0,35 M KCl); РНК-лигазу элюировали в линейном градиенте от 0,1 до 0,4 M KCl в уравновешивающем буфере (выходит при 0,26 M KCl).

Фракцию РНК-лигазы концентрировали осаждением сульфатом аммония (60% насыщения) и после растворения осадка в 15 мл 20 mM три-*N*-Cl-буфера, pH 7,5, содержащего 10 mM 2-меркаптоэтанол и 0,1 mM EDTA, подвергали гель-фильтрации на колонке (2,5×100 см) с ультрагелем Аса-44 со скоростью 20 мл/ч.

Активные фракции после гель-фильтрации объединяли и очищали хроматографией на оксиапатите, как описано Ластом и Андерсоном [9].

Таблица 3

Выделение ПН-киназы из клеток *E. coli*, инфицированных фагом T4

Стадия выделения	Объем, мл	Белок, мг	Общая активность *, ед. акт.	Удельная активность, ед. акт./мг белка
Клеточный экстракт	340	5200	—	—
Фракционирование полимином	100	220	123 000	560
Хроматография на DEAE-целлюлозе	25	33	75 000	2 270
Аффинная хроматография на ДНК-агарозе	10	3,9	42 000	10 770

* Метод определения активности ПН-киназы не позволяет определить общую активность фермента в клеточном экстракте из-за значительной АТР-азной активности.

Таблица 4

Выделение ДНК-полимеразы из клеток *E. coli*, инфицированных фагом T4

Стадия выделения	Объем, мл	Белок, мг	Общая активность, ед. акт.	Удельная активность, ед. акт./мг белка	Выход, %
Клеточный экстракт	340	5200	300 000	60	100
Фракционирование полимином	100	220	190 000	860	63
Хроматография на DEAE-целлюлозе	40	35	135 000	3850	45
Хроматография на фосфоцеллюлозе	10	5	80 000	16 000	26

Полимицкий экстракт (содержащий ПН-киназу и ДНК-полимеразу) концентрировали осаждением сульфатом аммония (до 55% насыщения). Осадок растворяли в 20 мл 10 mM калий-фосфатного буфера, pH 7,5, содержащего 10 mM 2-меркаптоэтанол; дialisировали против этого же буфера и наносили на колонку (2,5×20 см) с DEAE-целлюлозой. Колонку промывали диализным буфером. ПН-киназу элюировали 0,1 M KCl в диализном буфере; ДНК-полимеразу элюировали в линейном градиенте KCl (от 0,1 до 0,5 M) в диализном буфере.

Белок количественно определяли по методу Лоури [11].

Активность ДНК-лигазы определяли по методу Рейзера и др. [12]. За единицу ДНК-лигазной активности принимали количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкг кольцевых молекул ДНК фага λ.

Активность РНК-лигазы в процессе выделения определяли по реакции образования кислотонерастворимого фермент-аденилатного комплекса. Реакционная смесь (75 мкл) содержала 20 mM трип-НСl-буфер (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM дитиотреонит, 2,5 мкКи [³H]ATP и фермент. После 15 мин инкубации при 0°C реакцию останавливали добавлением 1 мл холодной 5% трихлоруксусной кислоты и смесь наносили на нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Радиоактивность фильтров считали на жидкостном спиритуляционном счетчике SL-30 (Intertechnique, Франция). За единицу РНК-лигазной активности принимали количество фер-

ментата, которое превращает 1 нмоль [³H]ATP в кислотонерастворимую форму за 15 мин при 0° С.

Активность ПН-киназы определяли по методу Сапо и др. [13], основанному на превращении пуклеозид-3'-монофосфата в нуклеозидифосфат.

Активность ДНК-полимеразы определяли по методу Гулиана и др. [10].

Диск-электрофорез проводили в 10% полиакриламидном геле по методу Вебера и Осборн [14].

Дезоксирибонуклеазные примеси определяли по методу Панета и др. [1], рибонуклеазные примеси — по методу Янга [15].

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Panet A., van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Raae A. J., Lillehang J. R., Kleppe K. (1973) Biochemistry, **12**, 5045–5050.
- 2 Atkinson A., Jack G. W. (1973) Biochim. et biophys. acta, **308**, 41–52.
- 3 Burgess R. R., Jendrisak J. J. (1975) Biochemistry, **14**, 4634–4638.
- 4 Bingham A. H. A., Sharman A. F., Atkinson T. (1977) FEBS Lett., **76**, 250–256.
- 5 Bickle T. A., Pirotta V., Imber R. (1977) Nucl. Acids Res., **4**, 2561–2572.
- 6 Sümegi J., Breedveld D., Hossenlopp P., Chambon P. (1977) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **76**, 78–85.
- 7 Zillig W., Zechel K., Halbwachs H. J. (1970) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **351**, 221–224.
- 8 Schaller H., Nüsslein C., Bonhoeffer F. J., Kurz C., Nietzschmann I. (1972) Eur. J. Biochem., **26**, 474–481.
- 9 Last J. A., Anderson W. F. (1976) Arch. Biochem. and Biophys., **174**, 167–176.
- 10 Goulian M., Lucas Z. J., Kornberg A. (1968) J. Biol. Chem., **243**, 627–638.
- 11 Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265–275.
- 12 Reiser J., Bentley C. M., Yuan R. (1976) Anal. Biochem., **75**, 555–562.
- 13 Sano H., Feix G. (1974) Biochemistry, **13**, 5110–5115.
- 14 Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., **244**, 4406–4412.
- 15 Wang E. C., Furth J. J. (1977) J. Biol. Chem., **252**, 116–123.

Поступила в редакцию

24.IX.1979

После доработки

29.XI.1979

ISOLATION OF DNA LIGASE, RNA LIGASE, POLYNUCLEOTIDE KINASE AND DNA POLYMERASE FROM *E. COLI* CELLS INFECTED WITH THE T4 PHAGE

BOLEZNIN M. I., SMOLYANINOV V. V.

Central Board of Microbiological Industry under the Council of Ministers of the USSR,
Moscow

A method of isolation of DNA and RNA ligases, polynucleotide kinase and DNA polymerase from the same *Escherichia coli* cell mass infected with the T4 phage is described. The method is based on the use of polyethylenimine for fractionation of the crude cell extract. The method is simple, well reproducible and yields highly active enzymes.