



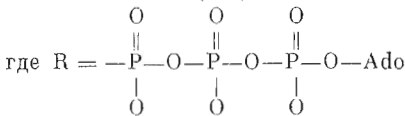
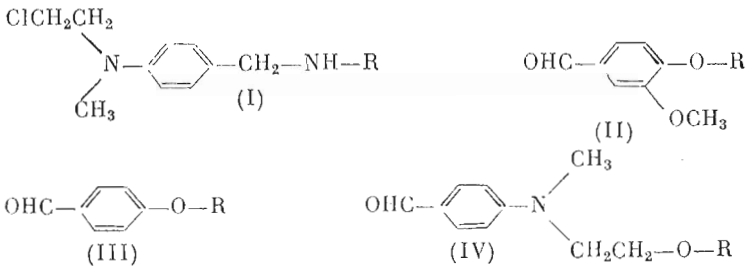
УДК 577.152.277'6.01:577.112.4

ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНОЕ АФФИННОЕ МЕЧЕНИЕ ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ БАКТЕРИОФАГА Т7

Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Лухтанов Е. А.,
Максимова Т. Г., Мустаев А. А.

Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

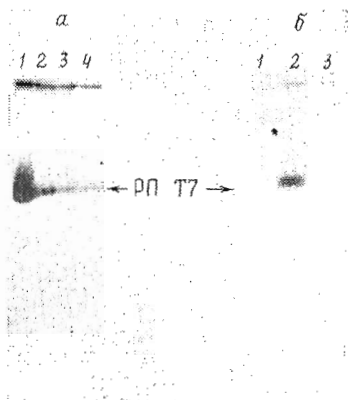
РНК-полимераза бактериофага Т7 — один из наиболее просто устроенных ферментов матричного копирования [1]. Она представляет собой полипептид длиной 883 аминокислотных остатка и молекулярной массой ~100 кДа и способна самостоятельно осуществлять весь процесс синтеза РНК начиная от поиска промотора и кончая терминацией транскрипции с освобождением синтезированного продукта. Первичная структура этого фермента известна [2, 3]. В то же время для него нет никаких данных о топографии активного центра и механизме ферментативного катализа. Ранее нами был предложен подход к высокоселективному аффинному мечению многосубстратных ферментов, успешно реализованный на примере ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* [4—6]. Недавно с помощью этого подхода была выявлена субъединица РНК-полимеразы II из проростков пшеницы, содержащая активный центр синтеза фосфодиэфирной связи [7]. В настоящем сообщении описаны результаты по высокоселективному аффинному мечению РНК-полимеразы бактериофага Т7 реагентами (I) — (IV) — производными АТР, синтезированными как описано в работах [8, 9]:



Для экспериментов использовали РНК-полимеразу фага Т7, выделенную из биомассы *E. coli* HMS174/pAR1219 (штамм — суперпродукент этого фермента) [10]; очистку проводили до стадии хроматографии на «голубой Сефарозе». Согласно результатам диск-электрофореза в 10% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS), чистота препарата составляла не менее 90%; удельная ферментативная активность [11] была более 100 000 ед. акт./мг. В качестве матрицы использовали фрагмент ДНК Т7, выделенный из ее *VspI*-гидролизата как описано в работе [12]. Фрагмент имеет длину 1462 п.о. и содержит помимо промоторов А₀, А₁, А₂ и А₃ для РНК-полимеразы *E. coli* еще и промотор для РНК-полимеразы фага Т7, кодирующий РНК с 5'-концевой последовательностью rrrArGrGrA... [13, 14].

Высокоселективное мечение проводили следующим образом. К комплексу РНК-полимеразы фага Т7 (10⁻⁷ М) с промоторным фрагментом

Аффинное мечение РНК-полимеразы бактериофага Т7: *a* — результаты экспериментов с производными (I) — (IV) — дорожки 1–4; *b* — результаты экспериментов с производным (I) в стандартной реакционной смеси (2), а также при исключении из смеси матрицы (1) или реагента (3). Стрелкой указано положение РНК-полимеразы фага Т7 (РП Т7), выявленное путем окрашивания геля кумасси R-250



(10^{-7} M) в буферном растворе состава 40 mM трис-HCl (pH 7,9), 8 mM $MgCl_2$, 0,1 mM дитиотреит добавляли один из реагентов (I) — (IV) (до 10^{-3} M). В случае реагента (I) смесь инкубировали 45 мин при 37° C; в случае реагентов (II) — (IV) через 30 мин инкубации при 37° C в смесь вводили боргидрид натрия (до концентрации 10^{-2} M) и инкубировали еще 15 мин при 37° C. После этого в каждую смесь добавляли [α - ^{32}P]GTP (2000 Ки/ммоль) до концентрации 10^{-6} M и выдерживали 30 мин при 37° C. Фермент денатурировали прогреванием смесей при 100° C в течение 2 мин в присутствии 1% SDS и 1% меркаптоэтанол. Анализ осуществляли электрофорезом по Лэммли [15] в 10% полиакриламидном геле с последующей автордиографией. Результаты представлены на рисунке, *a*. Видно, что у всех реагентов наблюдается ковалентное присоединение радиоактивного остатка к ферменту, причем эффективность его падает в ряду реагентов (I) > (II) > (III) > (IV). Стехиометрия такого присоединения, определенная путем измерения радиоактивности соответствующих радиоактивных зон геля, невелика (менее 1%), однако мечение высоко-специфично, так как в отсутствие реагента или матрицы присоединения радиоактивной метки к РНК-полимеразе не наблюдалось (рисунок, *b*). Очевидно, что здесь, так же как и в случае других РНК-полимераз [4–7], мечение происходит в результате ферментативной элонгации остатка реагента, ковалентно связанного на первой стадии в области активного центра:



где *x* — модифицируемая группа фермента.

Известно, что альдегидные группировки реагентов (II) — (IV) способны образовывать основания Шиффа исключительно с первичными аминогруппами. Поэтому можно заключить, что мишенью модификации этими реагентами является один или несколько остатков лизина, расположенных вблизи центра связывания иницирующего субстрата. Что же касается реагента (I), то ввиду его относительно меньшей специфичности для идентификации модифицируемых им остатков аминокислот требуются дополнительные эксперименты. В целом полученные данные свидетельствуют о том, что использованный в настоящей работе подход перспективен для исследования структуры активного центра РНК-полимеразы бактериофага Т7.

Авторы выражают благодарность А. Г. Плетневу за интерес к работе и полезные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chamberlin M., Ryan T. // The Enzymes. V. XV/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1982. P. 87–108.
2. Grachev M. A., Pletnev A. G. // FEBS Lett. 1981. V. 127. № 1. P. 53–56.
3. Stahl S. J., Zinn K. // J. Mol. Biol. 1981. V. 148. № 4. P. 481–485.
4. Смирнов Ю. В., Липкин В. М., Овчинников Ю. А., Грачев М. А., Мустаев А. А. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 7. С. 1113–1116.

5. Grachev M. A., Mustaev A. A. // FEBS Lett. 1982. V. 137. № 1. P. 89-94.
6. Grachev M. A., Колочева Т. И., Мустаев А. А. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 281. № 3. С. 723-727.
7. Grachev M. A., Hartmann G. R., Maximova T. G., Mustaev A. A., Schöffner A. R., Sieber H., Zaychikov E. F. // FEBS Lett. 1986. V. 200. № 2. P. 287-290.
8. Knorre D. G., Kurbatov V. A., Samukov V. V. // FEBS Lett. 1976. V. 70. № 1. P. 105-108.
9. Grachev M. A., Лукханов Е. А., Мустаев А. А. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 8. С. 1079-1087.
10. Davanloo P., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Studier F. W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 7. P. 2035-2039.
11. Chamberlin M., McGrath J., Washell L. // Nature. 1970. V. 228. № 5268. P. 227-231.
12. Grachev M. A., Зайчиков Е. Ф., Кравченко В. В., Плетнев А. Г. // Докл. АН СССР. 1978. Т. 239. № 2. С. 475-478.
13. Grachev M. A., Плетнев А. Г. // IV Советско-западногерманский симпозиум «Структура и транскрипция генома» (тез. докл.). Ереван, 1981. С. 102.
14. Dunn J. J., Studier F. W. // J. Mol. Biol. 1983. V. 166. № 2. P. 680-685.
15. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680-685.

Поступило в редакцию
10.XII.1986

HIGHLY SELECTIVE AFFINITY LABELLING OF T7 PHAGE RNA POLYMERASE

GRACHEV M. A., ZAYCHIKOV E. F., LUKHTANOV E. A., MAXIMOVA T.G.,
MUSTAEV A. A.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division
of the Academy of Sciences of the USSR*

T7 phage RNA polymerase was affinity labelled in the presence of its promoter by treatment with an ATP γ -derivative (a phosphoamide obtained from 4-(N-chloroethyl, N-methyl)aminobenzylamine, or one of esters obtained from 2-methoxy-4-formylphenol, 4-formylphenol, and 2-[N-(4-formylphenyl), N-methyl]-aminoethanol) followed by addition of [α - 32 P]GTP. The most efficient labelling took place with the alkylating phosphoamide reagent.