



УДК 577.152

НОВЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ И ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА  
АТР-ЗАВИСИМОЙ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЫ  
*BACILLUS SUBTILIS*

Честухин А. В., Греничевский А. А., Прозоров А. А.,  
Шемякин М. Ф.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва;

Институт общей генетики Академии наук СССР, Москва

Разработан новый метод выделения АТР-зависимой дезоксирибонуклеазы *Bacillus subtilis*, с помощью которого получены электрофоретически однородные препараты фермента. По данным центрифугирования в градиенте глицерина и электрофореза в полиакриламидном геле, ДНКазы имеет  $M \sim 300\,000$ . При электрофорезе фермента, денатурированного кипячением в 2% додецилсульфате натрия — 5% меркаптоэтаноле, в полиакриламидном геле обнаруживаются две близко расположенные полипептидные полосы с  $M \sim 155\,000$  и  $140\,000$ . Исходя из полученных результатов можно заключить, что молекула АТР-зависимой ДНКазы *B. subtilis* построена из двух неидентичных, но близких по размеру субъединиц.

АТР-зависимая ДНКазы (экзонуклеаза V) была впервые обнаружена в экстрактах *Micrococcus lysodeicticus* [1], а затем у целого ряда других микроорганизмов [2—5]. Большой интерес к АТР-зависимой ДНКазе возник в связи с появлением данных относительно важной роли этого фермента в процессе генетической рекомбинации [6—9]. Ранее мы сообщили об обнаружении АТР-зависимой ДНКазы в клетках *Bacillus subtilis*, частичной очистке и некоторых свойствах фермента, в частности о его роли в генетической рекомбинации [10, 11].

В настоящей работе описан новый метод очистки АТР-зависимой ДНКазы *B. subtilis*, позволяющий получать электрофоретически гомогенные препараты, а также данные по субъединичному строению фермента.

I. Выделение АТР-зависимой ДНКазы *B. subtilis*

Для успешной очистки АТР-зависимой ДНКазы необходимо было найти условия её стабилизации. Выясняя причины нестабильности ДНКазы, мы обнаружили, что фермент очень плохо выдерживает условия низкой ионной силы и значительно стабилизируется при её повышении (рис. 1). В связи с этим на всех стадиях выделения фермента мы использовали буферные растворы с концентрацией КСl не ниже 0,2 М. Кроме того, заметный положительный эффект был получен в результате замены 2-меркаптоэтанола на диэтилэритрит и Трис-буфера на имидазольный на многих стадиях выделения.

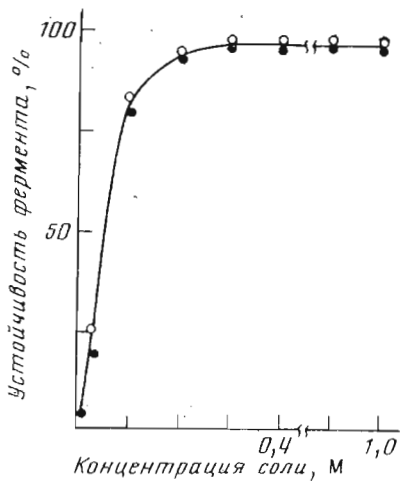


Рис. 1. Влияние NaCl (с) и KCl (•) на стабильность АТР-зависимой ДНКазы

[12]. Смысл этого метода заключается в том, что колонка ионообменника на мелкопористой основе (например, DEAE-сефадекс А-25) перед хроматографией наполовину заполняется градиентом соли так, чтобы максимальная ее концентрация находилась у входа в колонку. Максимальная для градиента концентрация соли создается во фракционируемом экстракте и элюирующем растворе, и экстракт пропускается через колонку. В результате каждый биополимер, движущийся в колонке быстрее градиента соли (градиент движется вместе со всем объемом колонки, а полимеры — только между мелкопористыми частицами адсорбента, так как не могут войти в них), идет с той зоной градиента, где концентрация соли является критической для его адсорбции. Применение этого метода для очистки АТР-зависимой ДНКазы *B. subtilis* дало очень хороший эффект.

Колонку (Pharmacia К 50/100;  $5 \times 100$  см) с DEAE-сефадексом А-25 промывали в нисходящем направлении 5 л 0,3 М KCl в 0,05 М имидазоле-HCl (рН 7), а затем 5 л 0,025 М имидазола-HCl (рН 7) с 1 мМ EDTA. После этого в колонку в восходящем направлении вводили 600 мл линейного градиента (0—0,3 М) KCl в буфере А, 100 мл буфера А с 0,3 М KCl, затем фракцию I и за ней пропускали буфер А с 0,3 М KCl. Собирали фракции по 17 мл. Скорость пропускания всех растворов через колонку составляла 90 мл/ч. Фракции, содержавшие наибольшую АТР-зависимую ДНКазную активность, объединяли (152 мл) (фракция II).

1.3. Фракционирование сульфатом аммония. К фракции II добавляли сульфат аммония до 45% от насыщающей концентрации (27,7 г на 100 мл) и после перемешивания в течение 30 мин осадок удаляли центрифугированием (15 мин при 12 000g). Осадок, полученный при 60% концентрации сульфата аммония, растворяли в 10 мл буфера Б (фракция III).

1.4. Гель-фильтрация на сефадексе G-150 (рис. 3). На колонку (Pharmacia, SR 25/100;  $2,5 \times 100$  см) с сефадексом G-150, уравновешенную 3 объемами буфера Б, наносили фракцию III и элюировали тем же буфером со скоростью 15 мл/ч. Фракции, содержавшие наибольшую активность, объединили (25 мл) (фракция IV).

1.5. Хроматография на DEAE-сефадексе А-50 (рис. 4). Фракцию IV наносили на колонку ( $2 \times 30$  см) DEAE-сефадекса А-50, уравновешенную 700 мл буфера Б, и промывали 70 мл того же буфера; фракционирование проводили линейным градиентом KCl (0,2—0,5 М) в буфере Б (общий объем градиента 500 мл). Фракции, содержавшие наибольшую ДНКазную

1.1. Приготовление экстракта. 50 г замороженной биомассы *B. subtilis* оттаивали и суспендировали в 100 мл буфера А с 0,3 М KCl и инкубировали с лизоцимом (2 мг на 1 г клеток) при 37° до полного лизиса (обычно 10—15 мин). Охлажденный до 4° лизат обрабатывали ультразвуком при максимальной мощности по 20—30 с, не допуская нагревания гомогената выше 8°. Обработку возобновляли после охлаждения до 2—4°, добиваясь исчезновения вязкости. Все дальнейшие операции проводили при 0—4°. После обработки ультразвуком гомогенат центрифугировали 1 ч при 30 000 об/мин и отбирали надосадочную жидкость (102 мл) (фракция I).

1.2. Хроматография на DEAE-сефадексе (рис. 2). На следующей стадии очистки мы использовали новый вариант ионообменной хроматографии

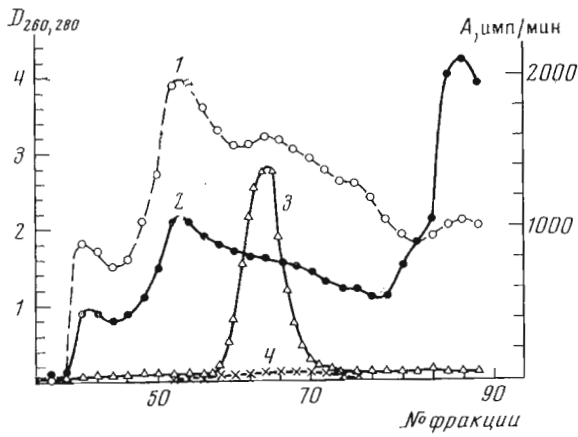


Рис. 2. Хроматография фермента на DEAE-сефадексе А-25: 1 —  $D_{260}$ ; 2 —  $D_{280}$ ; 3 — активность ДНКазы в присутствии АТР; 4 — активность ДНКазы без АТР

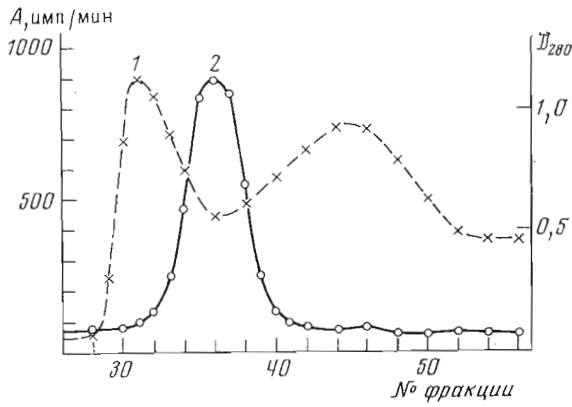


Рис. 3. Гель-фильтрация фермента на сефадексе G-150: 1 —  $D_{280}$ ; 2 — активность фермента

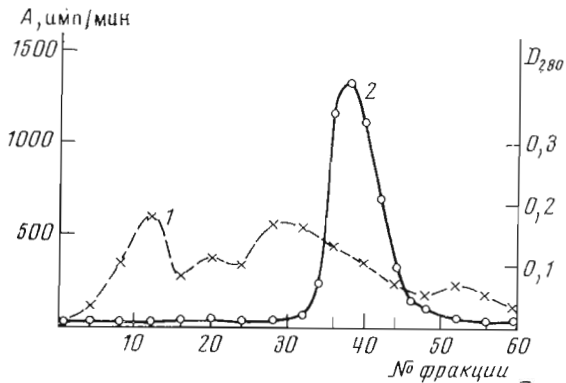


Рис. 4. Хроматография фермента на DEAE-сефадексе А-50: 1 —  $D_{280}$ ; 2 — активность фермента



Рис. 5

Рис. 5. Электрофорез АТР-зависимой ДНКазы в полиакриламидном геле: *a* — по Дэвису [13]; *b* — по Веберу и Осборн [21]

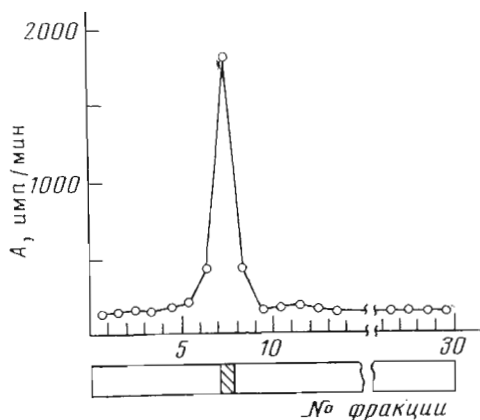


Рис. 6

Рис. 6. Распределение ДНКазной активности в столбике геля после электрофореза

активность, объединяли (70 мл) и концентрировали на маленькой колонке ( $0,9 \times 3,0$  см) DEAE-сефадекса А-50 после снижения концентрации КСI до 0,2 М добавлением буфера Б, не содержащего КСI. Разбавленный раствор пропускали через колоночку со скоростью 100 мл/ч и фермент элюировали 5 мл буфера Б с 0,4 М КСI (фракция V).

*1.6. Хроматография на ДНК-сефарозе.* Фракцию V, предварительно диализованную против буфера В, наносили со скоростью 2,2 мл/ч на колонку ( $0,9 \times 5$  см) ДНК-сефарозы, уравновешенную 100 мл того же буфера. После этого колонку промывали буфером Д и последовательно порциями по 3 мл того же буфера, содержащего 0,3; 0,5 и 0,8 М КСI. Основная часть АТР-зависимой ДНКазной активности элюировалась 0,5 М КСI (фракция VI). Эту фракцию диализовали против 50% глицерина, приготовленного на буфере Б, и хранили при  $-20^\circ$ .

*1.7. Характеристика фермента.* В 50% глицерине при  $-20^\circ$  активность фермента через 3 мес понижалась на  $\sim 30\%$ . Добавление к ферменту БСА (1 мг/мл) значительно стабилизировало фермент: активность практически не изменялась в течение по крайней мере 6 мес.

Описанный метод выделения позволяет получать препараты АТР-зависимой ДНКазы, удельная активность которых превышает удельную

#### Очистка АТР-зависимой ДНКазы

Фракции	Общее количество белка, мг	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед/мг белка	Выход, %	Степень очистки
I. Грубый экстракт	6600	5066	0,77	100	1
II. DEAE-сефадек А-25	560	7866 *	14,04	155	18,3
III. Сульфат аммония	220	6066	27,66	120	36,1
IV. Сефадек G-150	24	4066	169,46	80	221
V. DEAE-сефадек А-50	2,2	1866	848,48	37	1107
VI. ДНК-сефароза	0,11	433	3940	8,5	5140

\* Увеличение общей активности фермента на этой стадии связано, по-видимому, с удалением из экстракта нуклеиновых кислот.

активность в грубом экстракте в  $\sim 5000$  раз. Выход фермента составляет 8—10% (таблица). Препараты фермента свободны от примеси других экзонуклеаз, так как экзонуклеазная активность в отсутствие АТР очень низка уже во фракции II (см. рис. 2) и практически отсутствует во фракции III.

После электрофореза большинства препаратов максимально очищенного фермента в 5% полиакриламидном геле при pH 9 по Дэвису [13] на обработанных кумаси синим столбиках геля выявлялась одна интенсивно окрашенная полоса (рис. 5a). В одном из опытов неокрашенный параллельный столбик геля был разрезан на диски по 2 мм толщиной и в элюатах срезов определена активность фермента (рис. 6). Пик ферментативной активности точно соответствовал полосе белка в параллельном окрашенном геле. Приблизительная оценка распределения красящегося вещества в столбиках геля показывает, что фракция VI представляет собой препарат АТР-зависимой ДНКазы не менее чем 90% чистоты.

### II. Четвертичная структура АТР-зависимой ДНКазы *B. subtilis*

По данным центрифугирования в градиенте концентрации глицерина (рис. 7), коэффициент седиментации АТР-зависимой ДНКазы равен 13—14S, что соответствует  $M \sim 300\,000$ . Приблизительно такое же значение молекулярного веса фермента получается исходя из оценки подвижности АТР-зависимой ДНКазы при электрофорезе в полиакриламидном геле.

После электрофореза денатурированного кипячением в присутствии додецилсульфата натрия и меркаптоэтанола фермента фракции VI в 5% полиакриламидном геле, содержащем 0.1% додецилсульфат натрия и 8 М мочевины, и окраски геля кумаси синим видны только две белковые полосы (рис. 5б). Обе полосы окрашены примерно с одинаковой интенсивностью, что свидетельствует о равном количестве обоих полипептидов.

При сравнении подвижностей этих полос с подвижностями стандартных белков (см. «Экспериментальную часть») были рассчитаны молекулярные веса полипептидов [14], которые оказались равными 155 000 и 140 000. В соответствии с данными по оценке размеров молекул педиссоциированного фермента, полученными при центрифугировании в градиенте глицерина и электрофорезе, эти результаты показывают, что АТР-зависимая ДНКаза *B. subtilis* построена из двух больших, близких по размерам, но неидентичных субъединиц с общим молекулярным весом  $\sim 300\,000$ .

Из всех известных в настоящее время АТР-зависимых ДНКаз субъединичному анализу подвергался только фермент *E. coli* (*rec* ВС-нуклеаза,

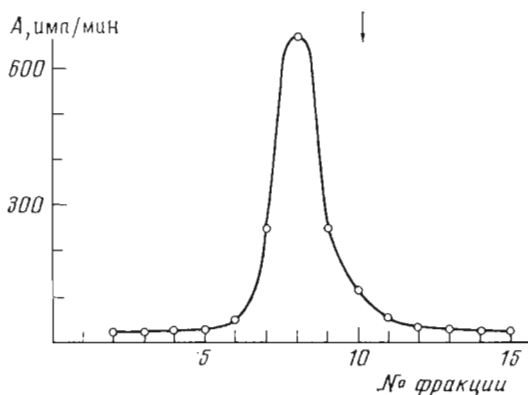


Рис. 7. Седиментация ДНКазы в градиенте глицерина (10—35%). Нумерация фракций — от дна пробирки. Стрелкой показано положение каталазы

названная так потому, что у *E. coli* она кодируется генами *rec B* и *rec C*. Согласно данным Гольдмарка и Линна [15] и Эйклера и Лемана [16], *rec BC*-нуклеаза построена из двух субъединиц с  $M$  130 000—140 000 и 120 000—128 000. На основании этого можно сделать вывод о значительном сходстве в строении АТР-зависимых ДНКаз *E. coli* и *B. subtilis*.

### Экспериментальная часть

В работе использовали DEAE-сефадексы А-25 и А-50, сефадекс G-150 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), Трис (Merck, ФРГ), АТР, дитиотреит, бычий сычороточный альбумин (БСА) (фракция V) — фирма Calbiochem (Швейцария), пептон, додецилсульфат натрия, EDTA (Serva, ФРГ), 2-меркаптоэтанол, акриламид, метиленбисакриламид (Bio-Rad, США), имидазол (Reanal, Венгрия), тимусную ДНК (PL-Biochemicals, США), лизоцим (Олайнский завод химических реактивов); KCl, MgCl<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (х.ч.), использованные для выделения фермента, перекристаллизовывали. Глицерин (ч. д. а.) перегоняли под вакуумом.

*Буферные растворы:* А — 0,05 М имидазол-HCl (pH 7), 10% глицерин, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит; Б — 0,02 М имидазол-HCl (pH 7), 10% глицерин, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 0,2 М KCl; В — 0,02 М калий-фосфатный буфер (pH 8), 10% глицерин, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 0,2 М KCl.

*Выращивание бактерий.* Прототрофный штамм *B. subtilis* SB 25 выращивали при 37° с аэрацией до конца логарифмической фазы на жидкой среде Спицайзена [17], дополненной пептоном (5 мг/мл). Культуру охлаждали, клетки собирали центрифугированием, промывали 0,01 М Трис-HCl (pH 8), содержащим 0,15 М NaCl и 1 мМ EDTA, и хранили при —20°. Клетки обрабатывали ультразвуком при 22 кГц на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1. Ультрацентрифугирование проводили на центрифуге фирмы Векман (США), ротор Ti 42,1.

DEAE-сефадекс А-25 суспендировали в воде и выдерживали 2 ч на кипящей водяной бане, затем перемешивали 30 мин в 10 объемах 0,2 М HCl, отмывали водой до pH 4, суспендировали в 10 объемах 0,2 М KOH и перемешивали 30 мин, отмывали водой до pH 8, суспендировали в 5 объемах 0,25 М имидазола-HCl (pH 7), а затем в 5 объемах 0,05 М имидазола-HCl (pH 7), 0,3 М KCl, 1 мМ EDTA.

DEAE-сефадекс А-50 суспендировали в 0,05 М KCl, кипятили 5 ч на водяной бане, перемешивали 30 мин в 0,2 М HCl, отмывали 0,05 М KCl до pH 4, перемешивали 30 мин в 0,2 М KOH, отмывали 0,05 М KCl до pH 8 и суспендировали в 0,02 М имидазоле-HCl (pH 7), 0,2 М KCl и 1 мМ EDTA.

Сефадекс G-150 суспендировали в воде, кипятили 5 ч в водяной бане, перемешивали 30 мин в 0,1 М KOH, отмывали водой до pH 8 и суспендировали в 0,02 М имидазоле-HCl (pH 7) с 0,2 М KCl и 1 мМ EDTA.

ДНК-сефарозу готовили бромциановым методом [18]. Свежеприготовленную бромцианированную сефарозу 4В (5 мг/мл) добавляли к раствору нативной тимусной ДНК в 0,01 М калий-фосфатном буфере, pH 8 (2 мг/мл), и перемешивали в течение ночи при 20°. Не связавшуюся с сефарозой ДНК удаляли промыванием ДНК-сефарозы 0,01 М калий-фосфатным буфером (pH 8), тем же буфером с 1 М KCl, 0,2 М KCl и хранили ДНК-сефарозу в 0,02 М калий-фосфатном буфере (pH 8) с 0,2 М KCl при 4°. Эффективность связывания ДНК — 76%.

<sup>14</sup>C-ДНК *B. subtilis* получали методом, описанным нами ранее [10].

Активность АТР-зависимой ДНКазы (А) определяли по появлению кислоторастворимой радиоактивности после инкубации фермента с <sup>14</sup>C-ДНК. Реакционные пробы (0,2 мл) содержали 0,05 М Трис-HCl (pH 9), 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA, 0,3 М KCl, 1 мкг <sup>14</sup>C-ДНК, 5·10<sup>-5</sup> М АТР и 0,2—1 ед. фермента. Пробы инкубировали 20 мин при 37°, переносили в ледяную баню и добавляли к ним по 0,05 мл 1% БСА

и по 0,1 мл 18%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Осадки удаляли центрифугированием. Надосадочную жидкость из каждой пробы переносили на алюминиевые подложки; после высушивания их под лампой накаливания радиоактивность определяли в газопроточном счетчике НАГ-βМ (эффективность по  $^{14}\text{C}$  — 70%). За единицу активности ДНКазы принято количество фермента, переводящего 1 нмоль (в расчете на мононуклеотиды) ДНК *B. subtilis* до кислоторастворимого состояния при 37° за 20 мин.

При определении влияния  $\text{NaCl}$  и  $\text{KCl}$  на стабильность АТР-зависимой ДНКазы 1 ед. фермента преинкубировали 40 мин при 37° с различными концентрациями солей в 0,04 мл стандартной инкубационной смеси, но без  $^{14}\text{C}$ -ДНК и АТР. Затем доводили концентрацию солей во всех пробах до одинакового уровня (1 М), добавляли 0,4 мл стандартной инкубационной смеси и пробы инкубировали еще 20 мин при 37°. За 100% принята активность АТР-зависимой ДНКазы в стандартной инкубационной смеси без преинкубации.

*Электрофорез АТР-зависимой ДНКазы в полиакриламидном геле.* а) по Дэвису [13]: предварительный электрофорез проводили в течение 30 мин при 3 мА на трубку, затем наносили 5 ед. фермента. Электрофорез вели 45 мин при силе тока 3 мА на трубку, гели красили кумаси синим в течение 1 ч и отмывали 7%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; б) по Веберу и Осборн [21]: фермент (2 ед.) кипятили 5 мин в присутствии 2% додецилсульфата натрия, 5% 2-меркаптоэтанола и наносили на гель. Электрофорез вели 4,5 ч при 4 мА на трубку. Затем гели красили 30 мин кумаси бриллиантовым синим и отмывали 7%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Молекулярный вес субъединиц фермента рассчитывали по методу [14], сравнивая их подвижность с подвижностью субъединиц РНК-полимеразы, молекулярный вес которых известен [22]. Для того чтобы установить, как распределяется ДНКазная активность в столбиках геля после электрофореза, на 2 геля, приготовленных, как описано выше (а), нанесли по 10 ед. фермента. После электрофореза один гель окрасили, а другой разрежали на 2-мм отрезки и элюировали каждый срез 0,2 мл буфера В в течение 24 ч, после чего определили в каждом элюате активность фермента.

*Определение коэффициента седиментации.* 0,12 мл фермента (12 ед.) наслаивали на 4,8 мл градиента глицерина (10—35%), приготовленного на буфере В. В качестве свидетеля с известным коэффициентом седиментации использовали каталазу (0,5 мг в 0,1 мл того же буфера). Центрифугирование проводили 12 ч при 38 000 об/мин и 4° в роторе РКС-50Т на ультрацентрифуге УЦП-60. Во фракциях градиента определяли поглощение при 280 нм и активность АТР-зависимой ДНКазы.

Белок определяли по Лоури [19] после осаждения ТХУ для удаления тиольных соединений, ДНК — по Спирину [20].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Tsuda J., Strauss B. S. (1964) *Biochemistry*, 3, 1678—1684.
2. Winder F. G., Coughlan M. P. (1967) *Biochim. et biophys. acta*, 134, 215—217.
3. Anai M. (1967) *J. Jap. Biochem. Soc.*, 39, 167—173.
4. Buttin G., Wright M. (1968) *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 33, 259—269.
5. Vovis G. F., Buttin G. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, 224, 29—41.
6. Vovis G. F., Buttin G. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, 224, 42—54.
7. Oishi M. (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 64, 1292—1299.
8. Barbour S. D., Clark A. J. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 65, 955—961.
9. Hout A., Van de Putte P., de Jonge A. J. P., Schuite M. A., Oosterbaan R. A. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, 224, 285—287.
10. Калинина Н. А., Честухин А. В., Прозоров А. А., Шемякин М. Ф. (1973) *Молекулярн. биология*, 7, 491—499.
11. Прозоров А. А., Калинина Н. А., Наумов Л. С., Честухин А. В., Шемякин М. Ф. (1972) *Генетика*, 8, 142—148.
12. Johnson T. J. A., Bock R. M. (1974) *Anal. Biochem.*, 59, 375—385.
13. Davis B. S. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404—427.

14. Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel S. V. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **28**, 815—820.
15. Goldmark P. J., Linn S. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 1849—1860.
16. Eickler D. C., Lehman I. R. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 499—503.
17. Anagnostopoulos C., Spizizen J. (1961) *J. Bacteriol.*, **81**, 741—746.
18. Ardinat-Jovin D. J., Jovin T. M., Bähr W., Frischanf A. M., Marquardt M. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **2**, 411—419.
19. Lowry O., Rosebrought H., Farr A., Randall R. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
20. Спириг А. С. (1958) *Биохимия*, **23**, 656—661.
21. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406—4412.
22. Burgess R. R. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 6168—6176.

Поступила в редакцию  
24.XI.1976

## A NEW METHOD OF PURIFICATION AND THE QUATERNARY STRUCTURE OF ATP-DEPENDENT DEOXYRIBONUCLEASE FROM *BACILLUS SUBTILIS*

CHESTUKHIN A. V., GREPACHEVSKY A. A., PROZOROV A. A.,  
SHEMYAKIN M. F.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry and Institute  
of General Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A new method for purification of *B. subtilis* ATP-dependent DNase which affords the electrophoretically homogeneous enzyme preparations has been proposed. According to the centrifugation in glycerol gradient and polyacrylamide gel electrophoresis, the DNase has a molecular weight of about 300 000. After electrophoresis on polyacrylamide gels of the enzyme dissociated by boiling in 2% SDS — 5% 2-mercaptoethanol, only two polypeptide bands of  $M \sim 155\ 000$  and  $140\ 000$  were seen. The above data imply that *B. subtilis* ATP-dependent DNase is composed of the two unidentical, however similar in size, subunits.

---