



УДК 577.15.07+577.15.08

РНК-ЛИГАЗА БАКТЕРИОФАГА Т4

I. ОЧИСТКА, ТЕСТИРОВАНИЕ, ДИМЕРНАЯ ФОРМА

*Василенко С. Ю., Венъяминова А. Г., Яжковой В. И.**Новосибирский государственный университет**Майоров В. И.**Специальное конструкторско-технологическое бюро
биологически активных веществ, Новосибирск*

Индукцируемую бактериофагом Т4 РНК-лигазу выделяли сочетанием традиционных методов очистки и изоэлектрического фокусирования. Фермент тестировали по образованию кислотонерастворимого [8-³H] АМР-лигазного комплекса. Полученный препарат РНК-лигазы пригоден для целей олигорибонуклеотидного синтеза и практически свободен от нуклеаз. Обнаружена димерная форма фермента.

Химический и ферментативный синтез полирибонуклеотидов с определенной последовательностью гетероциклических оснований до сих пор остается достаточно сложной задачей [1, 2]. В этой связи представляется весьма перспективным применение индуцируемой бактериофагом Т4 РНК-лигазы, катализирующей образование фосфодиэфирной связи между отдельными олигорибонуклеотидами [3-7] и дезоксилигонуклотидами [8-10].

К сожалению, основные методы очистки [3, 11-13] не позволяют получать РНК-лигазу, свободную от 3'-экзонуклеазной активности [6-9], что существенно ограничивает область применения фермента.

Попытки получения препаратов РНК-лигазы, свободных от нуклеазных примесей, в настоящее время осуществляются как путем совершенствования методов выделения фермента, так и путем поисков новых штаммов микроорганизмов-продуцентов РНК-лигазы. Первые успехи в этом направлении были недавно описаны в работе [14], где авторы успешно использовали для выделения РНК-лигазы гиперпродуцирующие клетки *E. coli*, зараженные бактериофагом Т4, несущим мутации по генам *44* и *regA*.

В нашем сообщении предложен способ очистки фермента, пригодного для целей олигорибонуклеотидного синтеза, представляющий собой комбинацию традиционных методов с изоэлектрическим фокусированием на колонке с инертным носителем — биогелем Р-2.

РНК-лигазу выделяли из биомассы *E. coli* В, инфицированной бактериофагом Т4amN82.

Первые стадии очистки, включающие разрушение клеток ультразвуком, фракционирование экстракта стрептомицином и сульфатом аммония, а также фракционирование и хроматографию на DEAE-целлюлозе, были выполнены по Вейсу и соавт. [15]. Эти стадии являются одновременно

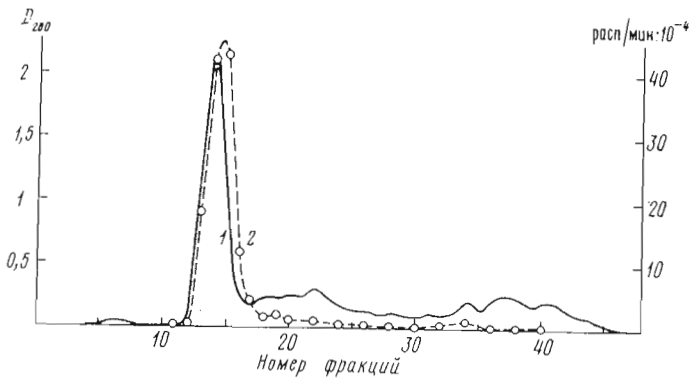


Рис. 1. Хроматография РНК-лигазы на QAE-сефадексе А-25: 1 — поглощение при 280 нм, 2 — радиоактивность $[8\text{-}^3\text{H}]\text{АМР}$ -лигазного комплекса

первыми стадиями очистки ДНК-лигазы, что позволяет рационально использовать исходную биомассу.

Далее фермент очищали градиентной гель-фильтрационно-ионообменной хроматографией [3] с использованием QAE-сефадекса А-25 (рис. 1) и гель-фильтрацией на сефадексе G-100 (рис. 2).

Результаты последней стадии очистки — изоэлектрического фокусирования по методу О'Брайена [16] — представлены на рис. 3.

РНК-лигазу тестировали методом, разработанным на основе известного свойства фермента образовывать кислотонерастворимый АМР-лигазный комплекс [12]. Недавно было показано, что функционально активные молекулы РНК-лигазы образуют комплекс с АМР в эквивальном отношении [14]. Однако в связи с тем, что первая стадия катализируемой ферментом реакции обратима [9], необходимо было уточнить условия, при которых равновесие сдвинуто в сторону образования комплекса.

Кинетические кривые образования $[8\text{-}^3\text{H}]\text{АМР}$ -лигазного комплекса при разных температурах приведены на рис. 4. Как видно из рисунка, реакция при 20° достигает состояния равновесия за 5 мин. При 37° плато достигается менее чем за 1 мин, но уровень связывания $[8\text{-}^3\text{H}]\text{АМР}$ РНК-лигазой в этом случае в 2 раза ниже.

Разная высота плато может отражать зависимость константы связывания АМР-лигазного комплекса от рН реакционной смеси или от температуры. Контрольные опыты показали, что при уменьшении рН с 7,5 до 7 связывание $[8\text{-}^3\text{H}]\text{АМР}$ РНК-лигазой уменьшается не более чем на 14%. Поэтому был поставлен эксперимент по выяснению зависимости состояния равновесия исследуемой реакции от температуры.

Несмотря на избыток $[8\text{-}^3\text{H}]\text{АТФ}$ в реакционной смеси, полученная кривая (рис. 5) при температуре ниже 28° резко выходит на плато. Очевидно, в этом случае равновесие полностью сдвигается в сторону образования АМР-лигазного комплекса.

Диссоциация комплекса при температуре выше 28° не связана с инактивацией фермента. Если стандартную реакционную смесь, содержащую $[8\text{-}^3\text{H}]\text{АТФ}$ и РНК-лигазу, прогреть 5 мин при 40° , а затем охладить до комнатной температуры, то в этом случае с ферментом связывается такое же количество $[8\text{-}^3\text{H}]\text{АМР}$, как и на плато (рис. 5).

Зависимость количества $[8\text{-}^3\text{H}]\text{АМР}$, вступающего в комплекс с РНК-лигазой, от концентрации белка имеет S-образный характер, как и в случае определения активности фермента по циклизации полирибонуклеотидов [13].

Стандартные условия тестирования РНК-лигазы с учетом выявленных закономерностей образования кислотонерастворимого АМР-лигазного

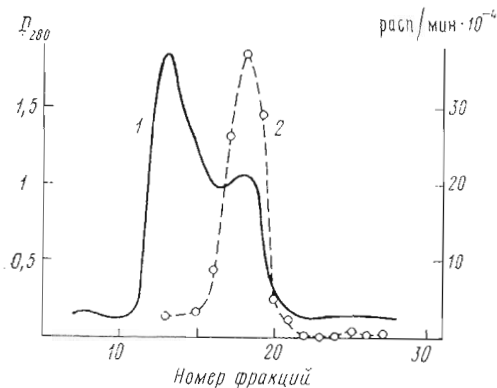


Рис. 2

Рис. 2. Гель-фильтрация РНК-лигазы на сефадексе G-100: 1 — поглощение при 280 нм, 2 — радиоактивность $[8\text{-}^3\text{H}]$ АМР-лигазного комплекса

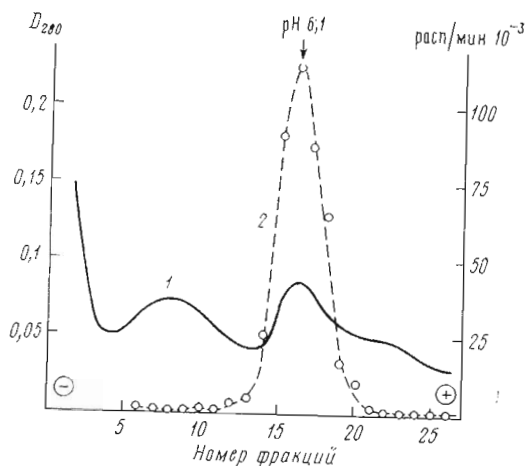


Рис. 3

Рис. 3. Изоэлектрическое фокусирование РНК-лигазы: 1 — поглощение при 280 нм, 2 — радиоактивность $[8\text{-}^3\text{H}]$ АМР-лигазного комплекса

комплекса приведены в «Экспериментальной части». Разработанный метод позволяет выражать содержание фермента в препаратах непосредственно в единицах концентрации.

Итоги очистки РНК-лигазы суммированы в таблице. Количество фермента на каждой стадии приведено по данным после промежуточного концентрирования. Отсутствие исчерпывающей характеристики РНК-лигазы на стадии изоэлектрического фокусирования связано с трудностями определения белка в присутствии амфолинов, которые, по-видимому, не удаляются полностью из препарата фермента при последующем концентрировании.

В таблице представлены также данные о наличии в препаратах РНК-лигазы примесей нуклеаз. Для определения активности эндонуклеаз были выбраны наиболее чувствительные методы с радиоактивными субстратами, предложенные в работе [14]. 3'-Экзонуклеазную активность тестировали по деградации $(A)_6$ в условиях, описанных в «Экспериментальной части». При замене $(A)_6$ на $(U)_6$ в контрольном эксперименте скорость деградации не увеличивалась.

На всех стадиях очистки после хроматографии на DEAE-целлюлозе РНК-лигаза была практически свободна от ДНК-специфичных эндонуклеаз.

Как видно из таблицы, каждая стадия вносит свой вклад в освобождение фермента от примесей РНК-специфичных нуклеаз. Следы этих примесей, остающиеся в РНК-лигазе после изоэлектрического фокусирования, при «сшивании» $(A)_6$ в условиях, описанных в работе [17], разрывают в среднем одну фосфодиэфирную связь на каждые 250 вновь образованных.

В процессе выделения РНК-лигазы было обнаружено свойство фермента превращаться в димерную форму. Это происходит в случае уменьшения рН раствора сульфата аммония до 5,5–6,0 при концентрировании РНК-лигазы перед гель-фильтрацией на сефадексе G-100 (см. «Экспериментальную часть»).

Молекулярный вес мономерной и димерной форм фермента, определенный гель-фильтрацией на калиброванных колонках с сефадексами G-100 и G-150, оказался равным соответственно 47 500 и 81 000.

В литературе описана склонность РНК-лигазы к агрегации [13], однако прямое доказательство существования димеров получено нами впервые.

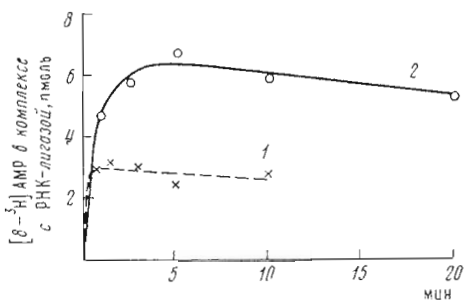


Рис. 4

Рис. 4. Кинетика образования $[8-^3\text{H}]$ АМР-лигазного комплекса при 37° (1) и 20° (2). $120 \mu\text{моль}$ $[8-^3\text{H}]$ АТР инкубировали с $10 \mu\text{кг}$ РНК-лигазы (препарат после очистки на сефадексе G-100) в $600 \mu\text{мл}$ буфера А. Во времени отбирали пробы по $100 \mu\text{мл}$. Количество $[8-^3\text{H}]$ АМР-лигазного комплекса в пробах определяли как описано в «Экспер. части»

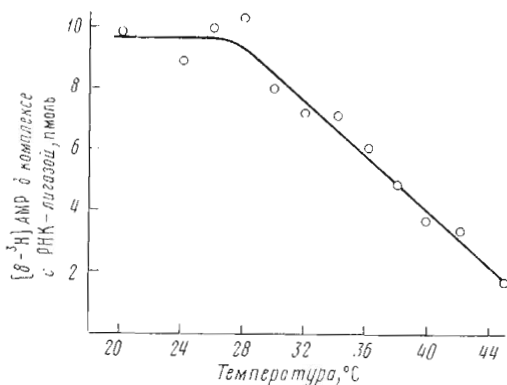


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость высоты плато реакции образования $[8-^3\text{H}]$ АМР-лигазного комплекса от температуры. $20 \mu\text{моль}$ $[8-^3\text{H}]$ АТР инкубировали с $3 \mu\text{кг}$ РНК-лигазы (препарат после очистки на сефадексе G-100) в $100 \mu\text{мл}$ буфера А при температуре опыта в течение 5 мин . Количество $[8-^3\text{H}]$ АМР-лигазного комплекса в пробах определяли как описано в «Экспер. части»

Способ превращения РНК-лигазы в димерную форму может быть полезен в связи с обнаруженным недавно свойством фермента в форме ТГЕ-белка катализировать присоединение фибрилл к концевой пластинке на последней стадии морфогенеза фага Т4 [18].

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реактивы и хроматографические носители: дитиотреит (Koch-Light, Англия), 2-меркаптоэтанол, глицерин, трис (Serva, ФРГ), $[8-^3\text{H}]$ АТР (24 Ки/ммоль , Amersham, Англия), EDTA (Reanal, ВНР), амфолины, рН 5–8 (LKB, Швеция), миллипоровые фильтры с диаметром пор $1,2 \mu\text{м}$ (RAWP, Millipore corp., США), poly(A, $[5-^3\text{H}]$ U) ($0,47 \text{ Ки/ммоль}$, $M 10^5-10^6$; A:U \approx 2:3, «Изотоп», СССР),

Очистка РНК-лигазы бактериофага Т4

Этапы очистки	Белок, мг	РНК-лигаза, нмоль	Выход РНК-лигазы, %	Удельное содержание, нмоль/мг белка	Эндорибонуклеазная активность		3'-Экзонуклеазная активность	
					ед./мгг белка	ед./нмоль РНК-лигазы	ед./мгг белка	ед./нмоль РНК-лигазы
Хроматография на DEAE-целлюлозе	27,8	19,46	100	0,7	24,2	30,3	97,2	138,9
Хроматография на QAE-сефадексе А-25	13,4	16,08	83	1,2	17,6	14,7	82	68,3
Гель-фильтрация на сефадексе G-100	3	8,88	46	2,96	3,8	1,3	43	14,5
Изоэлектрическое фокусирование	**	2,35 (5,1) *	12 (26) *	**	**	0,54	**	4,38

* В скобках приведены данные, полученные до концентрирования фермента.

** Отсутствие данных связано с трудностями определения белка в присутствии амфолинов.

DEAE-целлюлоза DE-52 (Whatman, Англия), биогель P-2 (100—200 меш, Bio-Rad, США), QAE-сефадекс А-25, сефадексы G-100 и G-150 (Pharmacia, Швеция), остальные реактивы были марок х.ч. или ос.ч.

(А)₆ и (U)₆ получали гидролизом соответствующих полирибонуклеотидов эндонуклеазой из яда кобры, как описано в работе [19].

Белок определяли модифицированным методом Лоури [20] и спектрофотометрически при 280 нм.

Тестирование РНК-лигазы. Аликвоту раствора фермента (2—15 мкг белка) инкубировали 10 мин при 20—25° с 20 пмоль [8-³H]АТР (содержание основного вещества по радиоактивности 85%) в 100 мкл буфера А (0,05 М трис-НСl; 10 мМ MgCl₂; 10 мМ дитиотреит; рН 7,5). Затем в пробу добавляли 1 мл охлажденной до 0° 5% трихлоруксусной кислоты и выдерживали ее при 0° в течение 30 мин. Далее пробу фильтровали через миллипоровый фильтр и для удаления избытка [8-³H]АТР промывали его 40—50 мл холодной 1% трихлоруксусной кислоты. Уровень радиоактивности сорбированного на фильтре [8-³H]АМР-лигазного комплекса регистрировали на счетчике Mark-II (США) с последующим пересчетом результатов на число распадов. В некоторых случаях (рис. 4, 5) число распадов пересчитывали далее на количество [8-³H]АМР в комплексе с ферментом (в пмолях).

Очистка РНК-лигазы. Фермент выделяли из 100 г биомассы *E. coli* В, инфицированной бактериофагом T4amN82. Все операции проводили при 0—4°.

Первые стадии очистки, от разрушения клеток до хроматографии на DEAE-целлюлозе включительно, были выполнены как описано в работе [15]. С DEAE-целлюлозы РНК-лигазу элюировали при концентрации NaCl, равной 0,23 М.

Хроматография на QAE-сефадексе А-25 (рис. 1). Колонку SR 25/45 (Pharmacia, Швеция), заполненную на 35 см QAE-сефадексом А-25, уравнивали 0,175 М KCl в буфере В (0,1 М трис-НСl; 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 0,1 мМ EDTA; рН 7,5). Снизу вверх в уравновешенную колонку вводили со скоростью 40 мл/ч 50 мл раствора KCl в линейном градиенте концентрации от 0,175 до 0,4 М KCl в буфере В. Далее аналогично вводили в колонку 4,5 мл раствора фермента в 0,75 М KCl (27,8 мг белка) и 10 мл 1 М KCl в 50% глицерине. Элюцию осуществляли снизу вверх 1 М KCl со скоростью 20 мл/ч. Объем фракции 3,45 мл. Для тестирования РНК-лигазы отбирали алиquotы по 10 мкл. Фракции, содержащие фермент, объединяли и концентрировали диализом против насыщенного раствора сульфата аммония, рН 7,5—8,0.

Гель-фильтрация на сефадексе G-100 (рис. 2). Колонку (1,2×43 см) с сефадексом G-100 (сверхмелким) уравнивали буфером В (0,02 М трис-НСl; 0,1 М KCl; 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 0,1 мМ EDTA; рН 7,5). Осадок РНК-лигазы (13,4 мг белка), полученный на предыдущей стадии, растворяли в 1,5 мл буфера В, наносили на колонку и элюировали этим же буфером со скоростью 2,5 мл/ч. Объем фракции 1,25 мл. Для тестирования РНК-лигазы отбирали алиquotы по 5 мкл. Как видно из рис. 2, основная часть РНК-лигазы обнаруживается в трех фракциях второго пика. Эти фракции объединяли и концентрировали диализом против 1 л буфера 0,01 М трис-НСl (рН 7,5) в 50% глицерине с 10 мМ дитиотреитом.

Изоэлектрическое фокусирование выполняли по методу О'Брайена [16]. В отдиализованный препарат РНК-лигазы (1,5 мл, 3 мг белка) добавляли амфолины с диапазоном рН 5—8 до 1,5% (по объему). 0,5 мл из полученного раствора с общим содержанием белка 1 мг наносили на термостатируемую (0—2°) колонку К 16/40 (Pharmacia, Швеция), заполненную на 20 см биогелем P-2 (свободный объем 15,5 мл) и уравновешенную 1,5% раствором амфолинов (рН 5—8) в 10% глицерине. Изоэлектрическое фокусирование проводили 12 ч при напряжении 800 В. По окончании опыта содержимое колонки элюировали 10% глицерином. Объем фракции

0,58 мл. Для тестирования РНК-лигазы отбирали аликвоты по 5 мкл. Фракции, содержащие фермент, объединяли и РНК-лигазу осаждали диализом против 100-кратного объема насыщенного раствора сульфата аммония (рН 7,5), содержащего 2-меркаптоэтанол в концентрации 10 мМ. Отцентрифугированный осадок растворяли в 300 мкл буфера 0,02 М трис-НСl, 0,1 М NaCl (рН 7,5). Раствор диализовали в течение суток против 100 мл буфера 0,02 М трис-НСl, 10 мМ дитиотреит (рН 7,5) в 50% глицерине. Отдиализованный препарат РНК-лигазы хранили при -10° в течение полугода без потери активности.

Определение молекулярного веса РНК-лигазы. Молекулярный вес мономерной и димерной форм РНК-лигазы определяли методом гель-филтрации на колонках К 16/70 (Pharmacia, Швеция), заполненных на 64 см сефадексами G-100 и G-150 с размером частиц 40–120 мкм. Гели были уравновешены буфером В. В качестве маркеров использовали цитохром с, миоглобин лошади, химотрипсиноген А, яичный альбумин, бычий сывороточный альбумин и щелочную фосфатазу из *E. coli*.

Тестирование примесей нуклеаз в препаратах РНК-лигазы. Эндонуклеазную активность определяли по образованию кислоторастворимых продуктов при инкубации фермента с poly(A, [5- 3 H]U) или меченой [3 H]тимидином ДНК фага λ . Для этого аликвоту раствора фермента, содержащую 10 мкг белка, инкубировали 30 мин при 37° с 2 нмоль субстрата (в пересчете на мономер) в 100 мкл буфера А. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл раствора ДНК из селезенки быка с концентрацией 1,5 мг/мл и 100 мкл 0,07% уранилацетата в 2,5 М HClO₄. Пробу выдерживали 30 мин при 0° , центрифугировали и уровень перешедшей в кислоторастворимую фракцию радиоактивности регистрировали на счетчике Mark-II. За единицу эндонуклеазной активности принимали количество фермента, превращающее в условиях эксперимента в кислоторастворимую форму за 1 ч 1 пмоль субстрата.

3'-Экзонуклеазную активность тестировали по деградации (A)_n. Для этого аликвоту раствора РНК-лигазы, содержащую 10 мкг белка, инкубировали 5 ч при 37° с 16,7 нмоль (A)_n (в пересчете на мономер) в 100 мкл буфера А. Реакцию останавливали прогреванием реакционной смеси в течение 2 мин при 100° . Продукты реакции анализировали методом микроколоночной хроматографии [21] на DEAE-целлюлозе в системе Томлинсона — Тенера (рН 7,5). За единицу 3'-экзонуклеазной активности принимали количество фермента, расщепляющее в условиях эксперимента за 1 ч 1 пмоль фосфодиэфирных связей.

Авторы благодарят А. С. Солонина (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Академии наук СССР, г. Пущино-на-Оке), принявшего участие в разработке метода тестирования РНК-лигазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kossel H., Seliger H. (1975) Fortschritte d. Chem. org. Natur. (Hers W., Grisebach H., Kirby G. W., eds.), vol. 32, pp. 297–508, Springen-Verlag, Wien — New York.
2. Михайлов С. Н., Флорентьев В. Л. (1976) Биоорган. химия, 2, 1293–1317.
3. Walker G. C., Uhlenbeck O. C., Bedows E., Gumpert R. I. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 122–126.
4. Kaufmann G., Kallenbach N. R. (1975) Nature, 254, 452–454.
5. Юодка Б., Уленбек О. (1976) Биоорган. химия, 2, 898–902.
6. Ohtsuka E., Nishikawa S., Sugiura M., Ikehara M. (1976) Nucl. Acids Res., 3, 1613–1623.
7. Sninsky J. J., Last J. A., Gilham P. T. (1976) Nucl. Acids Res., 3, 3157–3166.
8. Snopek T. J., Sugino A., Agarwal K. L., Cozzarelli N. R. (1976) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 68, 417–424.
9. Sugino A., Snopek T. J., Cozzarelli N. R. (1977) J. Biol. Chem., 252, 1732–1738.
10. Юодка Б. А. (1976) Биоорган. химия, 2, 1583–1584.
11. Silber R., Malathi V. G., Hurwitz J. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3009–3013.

12. Cranston J. W., Silber R., Malathi V. G., Hurwitz J. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 7447-7456.
13. Last J. A., Anderson W. F. (1976) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **174**, 167-176.
14. Higgins N. P., Geballe A. P., Snopek T. J., Sugino A., Cozzarelli N. R. (1977) *Nucl. Acids Res.*, **4**, 3175-3186.
15. Weiss B., Jacquemin-Sablon A., Live T. R., Fareed G. C., Richardson C. C. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 4543-4555.
16. O'Brien T. J., Liebke H. H., Cheng H. S., Johnson L. K. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 38-44.
17. Ohtsuka E., Nishikawa S., Fukumoto R., Tanaka S., Markham A. F., Ikehara M., Suqiura M. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **81**, 285-291.
18. Snopek T. J., Wood W. B., Conley M. P., Chen P., Cozzarelli N. R. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 3355-3359.
19. Василенко С. К., Сербо Н. А., Веньяминова А. Г., Болдырева Л. Г., Будкер В. Г., Кобец Н. Д. (1976) *Биохимия*, **41**, 260-263.
20. Hartree E. F. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427.
21. Грачев М. А. (1973) в сб.: *Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот* (Кнорре Д. Г., Венкстерн Т. В., ред.), с. 104-122, «Наука», М.

Поступила в редакцию
1.VIII.1978

После доработки
2.X.1978

BACTERIOPHAGE T4 RNA LIGASE. I. PURIFICATION, ENZYME ASSAY, DIMER FORM

VASILENKO S. K., VENIYAMINOVA A. G., YAMKOVVOY V. I.,
MAIYOROV V. I.

*Novosibirsk State University, Special Design and Technology
Bureau of Biologically Active Compounds, Novosibirsk*

T4 induced RNA ligase was isolated by the combination of the common methods of purification and isoelectric focusing. The enzyme activity was determined by monitoring the formation of acid-insoluble [8-³H]AMP-ligase complex. The RNA ligase obtained may be used for oligoribonucleotide synthesis and is essentially nuclease-free. The dimeric form of the enzyme was detected.