



УДК 577.15.082

НОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ
ДЕЗОКСИПОЛИНУКЛЕОТИДЛИГАЗЫ*Сладкова И. А., Кривцов Г. Г., Дебабов В. Г.,
Чермогоров В. И., Богуш Б. Г.**Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва*

Разработан новый способ определения активности ДНК-лигазы, основанный на использовании кинетического формальдегидного метода определения дефектов вторичной структуры ДНК. Этот способ позволяет работать со стабильным немеченым субстратом (ДНК, содержащей однонитевые разрывы между 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной группами в полинуклеотидной цепи) и выражать активность фермента в абсолютных единицах (число репарированных разрывов), аналогичных классическим единицам Вейса и Ричардсона.

Дезоксиполинуклеотидлигазы — ферменты, катализирующие образование фосфодиэфирной связи между 5'-фосфорильным и 3'-гидроксильным концами в разрывах полинуклеотидной цепи двунитевой ДНК, широко распространены в природе и играют важную роль в клетке при репликации и репарации генетического материала (см., например, обзор [1]).

К наиболее изученным ферментам этого класса относится ДНК-лигаза, индуцируемая в клетках *E. coli* при инфекции четными Т-фагами [2]. В данной работе использовался фермент, индуцируемый в клетках *E. coli* фагом Т4.

В последние годы ДНК-лигазы широко используются в работах, связанных с геной инженерией. Так, Корана применял этот фермент при синтезе гена аланиновой тРНК [3], Коэн [4] и другие авторы [5] — для сшивки фрагментов ДНК, обладающих «лишними концами», при получении гибридных молекул ДНК *in vitro*.

Несмотря на широкое использование ДНК-лигаз, определение активности этих ферментов до настоящего времени весьма затруднено. Классический метод количественного определения активности ДНК-лигазы, разработанный Вейсом и Ричардсоном [6], заключается во введении однонитевых разрывов в молекулу ДНК с помощью панкреатической ДНКазы, удалении фосфатной группы в точках разрыва щелочной фосфатазой, фосфорилировании 5'-ОН-групп $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ с помощью полинуклеотидкиназы. Модифицированная таким образом ДНК, содержащая 5'- ^{32}P фосфатные группы в областях однонитевых разрывов, и является субстратом для определения активности лигазы. При действии лигазы на такой субстрат однонитевые разрывы репарируются, и радиоактивный фосфор не отщепляется при последующей обработке репарированного субстрата фосфатазой. В контрольном опыте следят за выходом ^{32}P в кислоторастворимую фракцию при обработке субстрата, не подвергавшегося лигазной

обработке. Единица активности фермента соответствует переходу 1 нмоль ^{32}P в форму, устойчивую к фосфатазе, при инкубации лигазы и субстрата в стандартных условиях (20 мин, 37°).

Метод Вейса и Ричардсона требует работы с радиоактивным фосфором и включает ряд ферментативных стадий. Хотя этот метод обладает большим недостатком — нестабильностью субстрата (из-за короткого периода полураспада ^{32}P), он выгодно отличается от других известных способов определения активности ДНК-лигаз тем, что дает результаты, выраженные в количестве репарированных разрывов (нмоль фосфата, устойчивого к фосфатазе).

Другие способы определения активности ДНК-лигаз, например основанные на устойчивости ковалентно сшитой ДНК к необратимой денатурации (ДНК может быть закрепленной на целлюлозе [7] или поперечно сшитой бифункциональными алкилирующими агентами [8]), дают возможность определять лишь сравнительную активность препаратов фермента и не позволяют надежно выражать ее в абсолютных единицах.

В данной статье описан новый метод определения активности ДНК-лигазы, позволяющий использовать стабильные и легко приготавливаемые субстраты и выражать активность фермента в абсолютных единицах. Метод основан на количественном определении однопитевых разрывов в двуспиральной ДНК, репарированных ДНК-лигазой. Для определения числа однопитевых разрывов был использован кинетический формальдегидный метод, предложенный для количественного определения дефектов вторичной структуры ДНК [9, 10], поскольку было показано, что однопитевые разрывы в ДНК тестируются этим методом как дефекты вторичной структуры [11]. В качестве исходной ДНК в принципе может быть использована любая двунитевая ДНК, не имеющая заметных количеств дефектов вторичной структуры и превышающая по молекулярному весу $(3-5) \cdot 10^6$. В настоящей работе нативную ДНК фага Т7 обрабатывали панкреатической ДНКазой, депротенизировали, диализовали и полученный раствор, являющийся субстратом для лигазы, хранили в замороженном состоянии. Такой субстрат стабилен при хранении по крайней мере в течение 6 месяцев.

Кинетический формальдегидный метод основан на изучении степени деспирализации $(1 - \theta)$ под действием формальдегида. Результаты, полученные нами для нативной и «дефектной» ДНК, приведены на рис. 1.

Из теоретических разработок кинетического формальдегидного метода следует, что прирост ординаты, отсекаемой анаморфозой кинетической кривой процесса деспирализации «дефектной» ДНК, по сравнению с ординатой анаморфозы нативной молекулы прямо пропорционален концентрации дефектов:

$$\Delta J = J - J_0 = 2V\Delta c.$$

Здесь J_0 — начальная скорость деспирализации нативной ДНК; Δc — концентрация образовавшихся в ДНК однопитевых разрывов после обработки ее ДНКазой (число разрывов (Z), отнесенное к общему количеству (n) пар оснований в молекуле); V — константа скорости деспирализации, определяемая из опытов с ДНК, содержащей дефекты в известной концентрации. Для нахождения величины V мы использовали гидродинамически фрагментированную ДНК; в этом случае дефектами являются концы молекул образовавшихся фрагментов. Мы получили для фрагментированной ДНК следующие величины: $\Delta J_{\text{ср}} (5,8 \pm 0,8) \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$, $\Delta c_{\text{ср}} = 3,77 \cdot 10^{-3}$. Исходя из этих величин была вычислена константа $V = 0,8 \pm 0,1 \text{ мин}^{-1}$.

В процессе обработки ДНКазой и последующей депротенизации наблюдалась некоторая деполимеризация исходной ДНК. Среднечисленный молекулярный вес полученного препарата ДНК, используемого в качестве субстрата для лигазы, был равен $2,3 \cdot 10^6$ (по данным электрон-

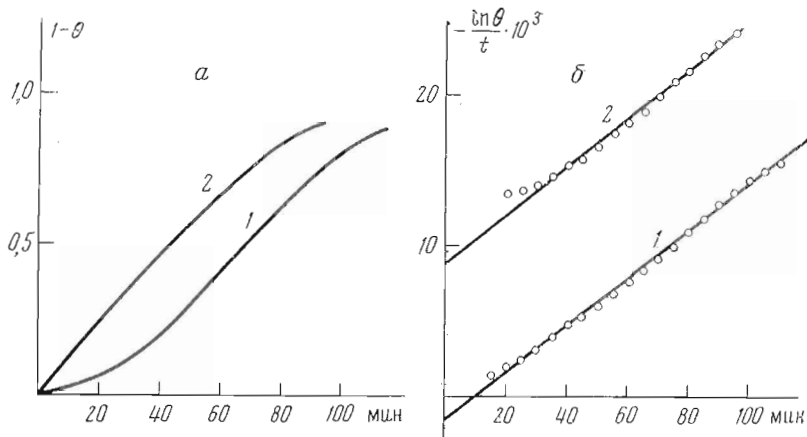


Рис. 1. Взаимодействие нативной ДНК(1) и ДНК, обработанной ДНКазой и депротенизированной (2), с формальдегидом: *a* — кинетические кривые, *б* — соответствующие этим кривым анаморфозы

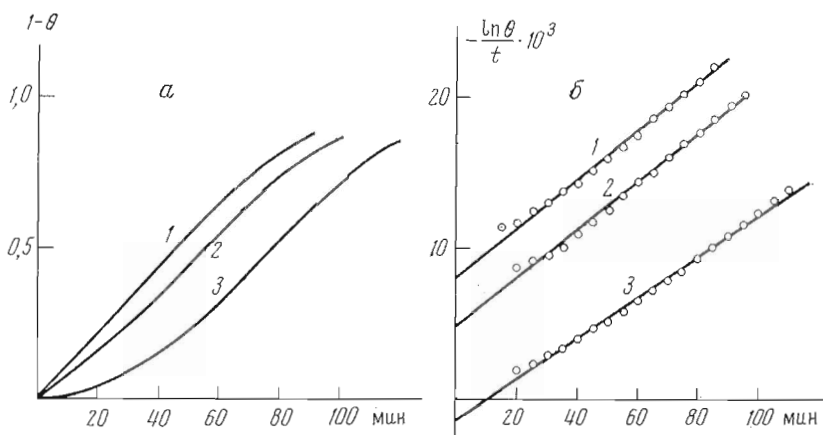


Рис. 2. Взаимодействие формальдегида с ДНК, инкубированной с 1 (1), 2 (2) и 10 мкл (3) лигазы: *a* — кинетические кривые, *б* — соответствующие этим кривым анаморфозы

ной микроскопии), т. е. в 11 раз меньше молекулярного веса нативной ДНК фага Т7 ($25 \cdot 10^6$). Теоретически ожидаемый в результате такой деполимеризации прирост ординаты, отсекаемой анаморфозой кинетической кривой, должен равняться $\Delta J' = 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$. Эта величина находится в пределах ошибки кинетического формальдегидного метода. Таким образом, весь прирост ординаты кривой, построенной по экспериментальным данным (рис. 1), следует отнести за счет одноститевых разрывов, возникающих при обработке ДНК ДНКазой. Концентрация дефектов, вычисленная по формуле $\Delta c = \Delta J / 2V$, в препарате, используемом нами в качестве субстрата для лигазы, составила величину, равную $(6,4 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$, что соответствует 236 ± 18 одноститевым разрывам на одну нативную молекулу ДНК фага Т7 (число пар оснований (n) равно 36 870). Нами было показано, что присутствие лигазы в препарате ДНК не влияет на ход кинетики деспирализации ДНК под действием формальдегида. В отдельном опыте ДНК-субстрат инкубировали с лигазой, АТР, Mg^{2+} и избытком EDTA (лигаза — абсолютно зависимый от Mg^{2+} фермент), диализовали против стандартного буфера и исследовали кинетику деспирализации. Наблюдали полное тождество кинетических кривых для исходного препарата ДНК и ДНК, инкубированной с лигазой в присутствии

избытка EDTA. Таким образом, оказалось возможным упростить методику, опустив вторую депротеинизацию после обработки ДНК ДНК-лигазой.

Исследование действия лигазы на ДНК с одностранными разрывами показало, что при стандартных условиях инкубации увеличение количества лигазы, добавленной к пробе ДНК, ведет к уменьшению начальной скорости деспирализации ДНК под действием формальдегида (рис. 2, а). Этому отвечает уменьшение начальной ординаты, отсекаемой анаморфозами кинетических кривых (рис. 2, б). Добавление 10 мкл препарата лигазы к ДНК-субстрату приводит к полной репарации разрывов, о чем можно судить по совпадению кинетических кривых деспирализации, отвечающих такому препарату и препарату нативной ДНК фага Т7 (ср. рис. 1, б, 1 и 2, б, 3). Это совпадение является дополнительным доказательством того, что присутствие лигазы не влияет на ход деспирализации под действием формальдегида. Результаты обработки ДНК-субстрата различными концентрациями лигазы приведены в таблице.

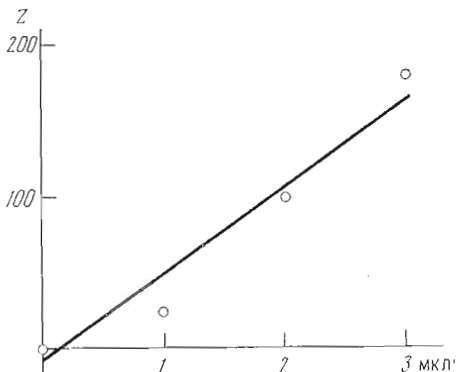


Рис. 3. Зависимость числа репарированных разрывов (на одну нативную молекулу ДНК фага Т7) от количества лигазы в пробе

Определение концентрации одностранных разрывов в ДНК-субстрате, обработанном различными количествами лигазы

Количество лигазы, добавленной в стандартную пробу, мкл	$\Delta j \cdot 10^3$, мин ⁻¹	$\Delta c \cdot 10^3$	Z, количество дефектов на 1 молекулу Т7 ДНК
0	$10,3 \pm 0,8$ *	$6,4 \pm 0,5$ *	236 ± 18 *
1	9,1	5,7	210
2	5,8	3,6	134
3	2,2	1,4	52
10	0	0	0
20	0	0	0

* Указаны максимальные отклонения от средних величин.

Зависимость числа репарированных разрывов на молекулу ДНК от количества добавленной в пробу лигазы практически линейна (рис. 3) и может быть использована для оценки удельной активности ДНК-лигазы. Поскольку репарация каждого однострannого разрыва в нашем методе эквивалентна переходу одного атома фосфора в методе Вейса и Ричардсона в форму, устойчивую к фосфатазе, активность фермента, определенная по нашему методу, может быть выражена в классических единицах Вейса и Ричардсона [6]. Согласно рис. 3, 1 мкл нашего препарата лигазы репарировал в стандартных условиях (20 мин, 37°) 60 одностранных разрывов на молекулу ДНК фага Т7, т. е. $(0,6 \pm 0,04) \cdot 10^{14}$ разрывов в пробе ДНК. Так как одна единица активности ДНК-лигазы по Ричардсону репаррует $6,02 \cdot 10^{14}$ одностранных разрывов (1 нмоль фосфора $\times 6,02 \times 10^{23}$ моль⁻¹), то 1 мл фермента в наших экспериментах содержал 103 ± 11 стандартных единиц активности. Линейная зависимость между количеством фермента в пробе и числом репарированных разрывов сохранялась в интервале $(0-2,46) \cdot 10^{14}$ одностранных разрывов.

Экспериментальная часть

Препараты. ДНК фага Т7, очищенного в градиенте плотности хлористого цезия, выделяли с помощью фенольной депротеинизации. В работе использовали панкреатическую ДНКазу I фирмы «Worthington» (США), АТР, дитиоэритрит и альбумин фирмы «Serva» (ФРГ). ДНК-лигазу (полиуклеотид-синтетаза (АТР), КФ 6.5.1.4) выделяли из клеток *E. coli* В, инфицированных фагом Т7 (амбер 81), по модифицированному нами методу Вейса и Ричардсона [6]. Модификации касались стадий разрушения клеток и получения грубого экстракта и были введены нами в связи с комплексным использованием одной и той же порции бактериальной биомассы для одновременного выделения фаговой ДНК-полимеразы, белка — продукта гена 32 и ДНК-лигазы. После разрушения клеток ультразвуком и переваривания ДНК панкреатической ДНКазой (90 мин, 10°, буфер: 29 мМ трис-НСl, 1 мМ ЕDТА, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ СаCl₂, 1 мМ дитиоэритрит, рН 8,0) экстракт наносили на колонку с однонитевой ДНК-целлюлозой, уравновешенной буфером, содержащим 0,02 М трис-НСl, 0,1 М NaCl, 0,085 М ЕDТА и 10 мМ дитиоэритрит (рН 8,1). Белки, не сорбиравшиеся в этих условиях на колонке, осаждали сульфатом аммония и очищали далее по методике Вейса и Ричардсона до стадии VII [6].

Использовали формальдегид, очищенный по методике работы [9]; его концентрацию определяли сульфитным методом [12].

Фрагментация ДНК. Фрагментация нативных молекул ДНК фага Т7 проводили гидродинамически, продавливая раствор через специальный пресс (прибор Института атомной энергии им. И. В. Курчатова). Степень фрагментации оценивали по длине молекул, измеренной с помощью электронного микроскопа JEM-100 В (Япония; увеличение 10 000—20 000), препараты для которого готовили по методу Кляйншмита [13]. Среднечисленный молекулярный вес фрагментированной ДНК составлял $180 \cdot 10^3$.

Получение препарата ДНК с однонитевыми разрывами (ДНК-субстрат). К 10 мл раствора нативной ДНК фага Т7 (200 мкг/мл) в 0,01 М трис-НСl (рН 8,6), содержащем 0,005 М MgCl₂, добавляли 0,1 мл раствора ДНКазы I (50 мкг/мл) и альбумина (500 мкг/мл). После 30 мин инкубации при 20° к смеси приливали 2 мл 10%-ного раствора додецилсульфата натрия, смесь перемешивали несколько минут, приливали 7 мл 4 М раствора NaCl, охлаждали до + 5° и центрифугировали 30 мин при 6000 об/мин. Осадок отбрасывали, а к супернатанту добавляли KCl до конечной концентрации 1 М и снова центрифугировали. Надосадочную жидкость диализовали против 0,01 М трис-НСl (рН 7,0), отбирали аликвоты (0,8 мл) и хранили их в замороженном состоянии. Анализ «ДНК-субстрата» в электронном микроскопе показал, что препарат содержит фрагменты, молекулярный вес которых лежит в пределах $(1,1—10,7) \cdot 10^6$. Среднечисленный молекулярный вес такой ДНК $2,3 \cdot 10^6$.

Обработка ДНК-субстрата ДНК-лигазой. К 0,8 мл ДНК-субстрата (54 мкг/мл) добавляли 0,3 мл инкубационного буфера (0,033 М дитиоэритрит, 0,23 М трис-НСl (рН 7,6), 0,027 М MgCl₂, 0,6 мМ АТР) и различные количества (от 1 до 20 мкл) раствора лигазы. Реакционную смесь 20 мин инкубировали при 37°. Реакцию останавливали добавлением 0,15 мл 0,25 М ЕDТА (рН 7,8) и раствор диализовали против 3 л 0,03 М NaCl, содержащего 0,003 М цитрат натрия (рН 7,0).

Кинетический эксперимент. Деспирализацию ДНК под действием формальдегида наблюдали с помощью спектрофотометра «Pye Unicam SP-1800» (Англия) при длине волны 260 нм. К 2,4 мл реакционной смеси (15%-ный формальдегид, 0,015 М триэтаноламин, 0,04 NaCl, рН 8,8) добавляли 0,3 мл раствора ДНК (43 мкг/мл в 0,03 М NaCl, содержащего 0,003 М цитрат натрия, рН 7,0), реакцию вели при 37,5°.

ЛИТЕРАТУРА

1. Газиев А. И. (1974) Успехи соврем. биол., 78, вып. 2(5), 171—187.
2. Richardson C. C., Masamune J., Live T. R., Jacquemin-Sablon A., Weiss B., Fareed G. C. (1968) Cold. Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 33, 151—164.
3. Khorana H., Chang S., Gupta H., Kumar A., Ohtsuka B., Weber H. (1968) Gold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 33, 35—44.
4. Cohen S. N., Chang A. C. Y., Boyer H. W., Helling R. B. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 3240—3253.
5. Tanaka T., Weisblum B. (1975) J. Bacteriol., 121, 354—362.
6. Weiss B., Jacquemin-Sablone A., Live T. R., Fareed G. C., Richardson C. C. (1968) J. Biol. Chem., 243, 4530—4538.
7. Bertazzoni U., Campagnari F., de Luca U. (1971) Biochim. et biophys. acta, 240, 515—521.
8. Zimmerman S. B., Little J. W., Oshinsky C. K., Gellert M. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57, 1841—1859.
9. Трифонов Э. Н., Лазуркин Ю. С., Франк-Каменецкий М. Д. (1967) Молекулярн. биология, 1, 164—175.
10. Трифонов Э. Н., Шафараповская Н. Н., Франк-Каменецкий М. Д., Лазуркин Ю. С. (1968) Молекулярн. биология, 2, 887—896.
11. Банников Ю. А., Трифонов Э. Н. (1970) Молекулярн. биология, 4, 734—742.
12. Walker J. F. (1964) Formaldehyde «reinhold», p. 76—78, N. Y.
13. Kleinschmidt A. K., Zahn R. K. (1959) Z. Naturforsch., 14b, 770—791.

Поступила в редакцию
11.VIII.1975

A NEW METHOD FOR THE ESTIMATION OF DNA-LIGASE ACTIVITY

SLADKOVA I. A., KRIVTSOV G. G., DEBAVON V. G.,
PERMOGOROV V. I., BOGUSH V. G.

*Institute of Genetics and Selection of Industrial
Microorganisms, Moscow*

A new approach to the quantitative estimation of DNA-ligase activity has been developed which is based on the determination of the number of nicks in DNA by means of kinetic formaldehyde method (KF-method). The technique permits to utilize the stable nonradioactive substrate (DNA with the single-stranded breaks between 5'-PO₄ and 3'-OH groups) and to express the activity in the absolute units (namely, the number of repaired nicks) analogous to the classical units of Weiss and Richardson.
