



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.15.072 : 543.544.42

### ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ФАГА Т4 С ПОМОЩЬЮ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Микоян В. С.

Институт общей генетики Академии наук СССР,  
Москва

ДНК-полимераза (КФ 2.7.7.7) фага Т4 *E. coli* представляет собой фермент, осуществляющий репликацию ДНК этого фага и обладающий 3'-ОН экзонуклеазной активностью. Выращивание бактерий, инфицированных фагом Т4 *at* N 81, и получение клеточного экстракта, свободного от ДНК и  $Mg^{++}$ , проводили по методу Альбертса [1, 2] с некоторыми модификациями. Клеточный экстракт, содержащий 5% глицерин и 0,1 М NaCl, наносили на ДНК-целлюлозную колонку, приготовленную по методу Литман [3]. Для элюции использовали промывочный буфер (0,02 М Трис-НСl, рН 8,2; 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 0,1 М NaCl), в котором концентрация NaCl была повышена сначала до 0,45 М, а затем до 2,0 М (фракции А и В). В таблице приведены результаты типичного опыта.

Было показано, что нуклеазную активность во фракции А, элюируемой раствором, содержащим 0,45 М NaCl, не удается отделить от ДНК-полимеразной активности, используя градиент концентрации NaCl при элюции с ДНК-целлюлозной колонки, а также с помощью хроматографии на DEAE-целлюлозе. Поэтому для дальнейшей очистки была использована гель-фильтрация на сефадексе G-200 в 2,0 М NaCl и 0,02 М  $NaN_3$  (рис. 1).

Нуклеазная и ДНК-полимеразная активность фракций, полученных в ходе очистки ДНК-полимеразы фага Т4

Препарат	Объем, мл	Всего белка, мг	Активность	
			ДНК-полимеразы, ед. акт./мг	нуклеазы, нг/мг
Пропущенный экстракт	26,3	326	7,4	—
А	4,6	3,9	7200	55
В	4,8	6,74	0	—
С <sub>1</sub>	2,0	0,93	10260	7
С <sub>2</sub>	2,0	0,86	0	31

Примечание. За 1 ед. акт. ДНК-полимеразы принимали количество фермента, которое за 30 мин инкубации при 37° (рН 8,8) включало в кислотонерастворимую фракцию 1 нМ тимидин-5'-трифосфата. Нуклеазную активность, выраженную в таблице в нг панкреатической ДНКазы (Worthington, США, 2070 ед/мг) на мг белка, определяли по методу Шимада и сотр. [4]. Сырой вес инфицированных клеток — 21 г.

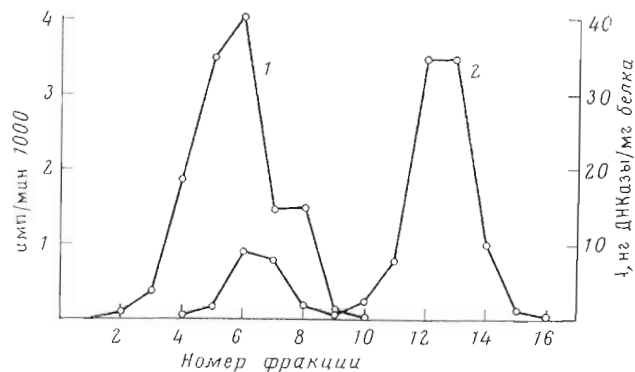


Рис. 1

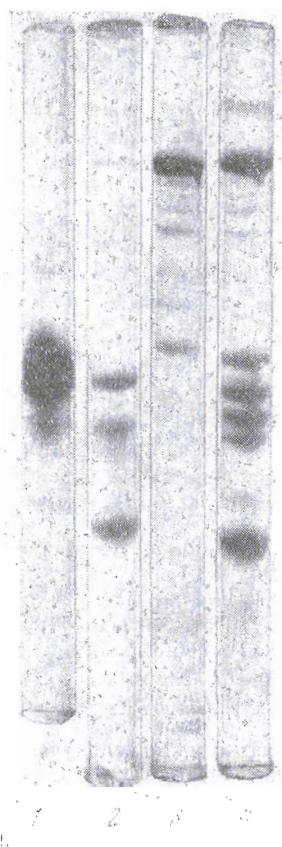


Рис. 1. Гель-фильтрация фракции А на колонке с сефадексом G-200 superfine ( $1,3 \times 75$  см). Нанесенный объем 2 мл, объем фракций 2,8—3,2 мл. 1 — активность ДНК-полимеразы (21-кратное разведение), 2 — активность нуклеазы ( $\mu\text{г ДНКазы/мг белка}$ )

Рис. 2. Электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия в полиакриламидном геле. Для оценки молекулярного веса использовались в качестве маркеров бычий сывороточный альбумин, каталаза, гамма-глобулин кролика, пепсин. 1 — фракция В, 2 — С<sub>2</sub>, 3 — С<sub>1</sub>, 4 — фракция А. Стрелкой указана полоса, соответствующая ДНК-полимеразе фага Т4

Рис. 2

Молекулярный вес белков, соответствующих пикам ДНК-полимеразной и нуклеазной активности, находится в пределах  $(120-140) \cdot 10^3$  и  $(30-40) \cdot 10^3$ . Фракции, соответствующие обоим пикам активностей, были объединены и сконцентрированы (обозначены через С<sub>1</sub> и С<sub>2</sub>).

На рис. 2 показаны результаты электрофореза полученных препаратов в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [5]. Видно, что фракция В представляет собой практически чистый белок гена 32 фага Т4 [4] с незначительной примесью ( $M$  31 000), заметной лишь при большом избытке белка (80 мкг/гель). Остаточная нуклеазная активность фракции С<sub>1</sub> (см. таблицу) частично связана с тем, что методи-

ка [4] не позволяет в данном случае различить эндонуклеазную активность (примесь) и экзонуклеазную активность, присущую ДНК-полимеразе фага Т4. Чтобы оценить эндонуклеазную активность препарата, ДНК *E. coli* обрабатывали 40 мин фракцией С<sub>1</sub> при 37° (соотношение ДНК — С<sub>1</sub> = 1) и центрифугировали в градиенте концентрации сахарозы. Результаты свидетельствуют, что за это время образуется максимум 1 одностранный разрыв на 3 молекулы двунитчатой ДНК. При этом профиль распределения обработанной ДНК по фракциям в градиенте концентрации сахарозы не отличается от контрольного.

Данный метод позволяет с достаточной для практических целей степенью чистоты (> 90%) выделить из одного клеточного экстракта два продукта генов фага Т4 — ДНК-полимеразу (ген 43) и расплетающий белок (ген 32) — и получить ДНК-полимеразу фага Т4, практически свободную от эндонуклеазной активности, сократив число стадий очистки с 6—7 до 2 и повысив выход конечного продукта в 3 раза по сравнению с ранее описанной методикой [6]. Полученный препарат ДНК-полимеразы может быть использован для целей генной инженерии и для определения первичной структуры ДНК.

Автор выражает глубокую благодарность проф. Д. М. Гольдфарбу за ценные советы и обсуждение работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Alberts B. M., Amodio F. J., Jenkins M., Gutman E. D., Ferris F. J. (1968) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 289—305.
2. Alberts B. M., Herrick G. (1974) Methods in Enzymology, v. XXI, 198—217.
3. Litman R. M. (1968) J. Biol. Chem., 243, 6222—6233.
4. Shimada K., Nishimoto T., Takagi Y. (1974) J. Biochem., 75, 611—617.
5. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406—4412.
6. Julian M., Lucas S. J., Kornberg A. (1968) J. Biol. Chem., 243, 627—638.

Поступила в редакцию  
17.XI.1976

#### ISOLATION OF T4 PHAGE DNA POLYMERASE BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY

МИКОУАН V. S.

*Institute of General Genetics,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A two-step technique which involves the DNA-cellulose chromatography followed by gel filtration in high ionic strength solution is described. The method allows simultaneous isolation of two gene products of T4 phage — DNA polymerase (gene 43) and the unwinding protein (gene 32) — with a purity higher than 90%. The DNA polymerase preparation is practically devoid of endonuclease activity, whereas the yield of DNA polymerase is 3 times higher than those attainable using previously described methods.