



УДК 577.158.05

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
Т4-РНК-ЛИГАЗЫ

Болезнин М. И., Смолянинов В. В.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
прикладной микробиологии, г. Серпухов

Описан метод определения биологической активности РНК-лигазы, индуцированной в клетках *E. coli* бактериофагом Т4, основанный на использовании субстрата $(pA)_{20}$, меченого долгоживущими радиоактивными изотопами 3H или ^{14}C . Кольцевые молекулы такого субстрата, образующиеся под действием РНК-лигазы, становятся устойчивыми к рибонуклеазе II.

РНК-лигаза (полинуклеотидсинтаза (АТР), КФ 6.5.1.3), индуцированная в клетках *Escherichia coli* бактериофагом Т4, применяется при ферментативном синтезе олигонуклеотидов с заданной последовательностью гетероциклических оснований [1–7]. Для определения биологической активности РНК-лигазы в процессе ее выделения и изучения свойств используются три основных метода.

Зильбер и др. [8], открывшие РНК-лигазу в фаг-инфицированных клетках *E. coli*, предложили определять биологическую активность фермента по появлению под действием фермента фосфатазостойчивого 5'-концевого [^{32}P] олигорибонуклеотида — субстрата.

Два других метода измеряют скорость первой стадии РНК-лигазной реакции: образования фермент-аденилатного промежуточного соединения [9] и АТР-пирофосфатной обменной реакции [2].

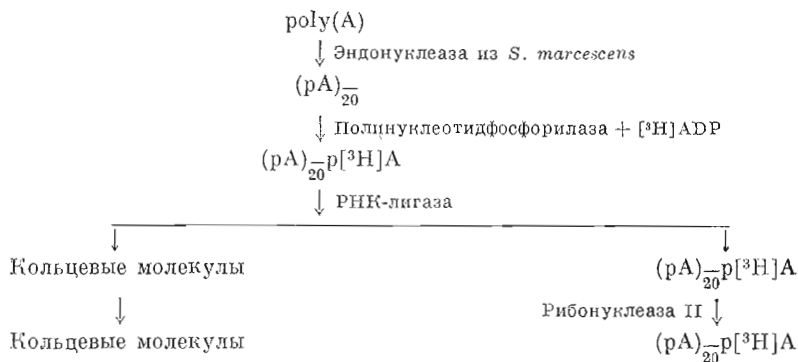
Хотя эти методы вполне применимы для тестирования и количественной характеристики РНК-лигазы, они имеют ряд существенных недостатков. Метод Зильбера и др. [8] отличается трудностью приготовления субстрата, включающего три ферментативные стадии. Методы, которые используют частичные реакции [2, 9], не измеряют действительную каталитическую активность фермента и мало специфичны. Наконец, те методы, которые включают использование ^{32}P -меченого субстрата, нуждаются в частом его приготовлении из-за короткого периода полураспада ^{32}P .

В настоящей работе описан новый быстрый и чувствительный метод определения РНК-лигазной активности. Он основан на том, что РНК-лигаза катализирует образование кольцевых молекул олигорибонуклеотида, и позволяет измерять превращение 3H - или ^{14}C -меченого $(pA)_{20}$ в кольцевую форму, устойчивую к рибонуклеазе II (3'-экзорибонуклеазе из *E. coli*).

Для получения меченых субстратов poly(A) гидролизвали нуклеазой из *Serratia marcescens*, образующей олигорибоаденилаты с 3'-концевой гидроксильной группой, к этим олигорибоаденилатам с помощью полинуклеотидфосфорилазы присоединяли радиоактивно меченный по 3H или ^{14}C нуклеотид (см. схему). Полинуклеотидфосфорилазную реакцию проводили при соотношении олигонуклеотида и [3H]ADP или [^{14}C]ADP 1:2. В этих условиях к молекуле $(pA)_{20}$ присоединялся в среднем один меченый нуклеотид. Такой субстрат сохранял свои свойства в течение года при $-20^\circ C$.

После инкубации полученного субстрата с РНК-лигазой в реакционную смесь добавляли KCl до конечной концентрации 0,1 М и рибонуклеазу II (активность рибонуклеазы II зависит от присутствия K^+ [10]). Обработка реакционной смеси после инкубации с рибонуклеазой II 10% трихлоруксусной кислотой и нанесение на нитроцеллюлозные фильтры при наличии активности РНК-лигазы приводило к появлению на фильтрах радиоактив-

Схема определения активности РНК-лигазы



ности, уровень которой был прямо пропорционален количеству добавляемой РНК-лигазы в пределах 0,2–1,0 ед. акт. на 100 мкл реакционной смеси.

Описанный метод можно использовать для определения активности в клеточном экстракте (таблица), причем определение активности РНК-лигазы на отдельных стадиях выделения фермента [11] предлагаемым методом и методом Зильбера и др. [8] дает близкие количественные результаты.

Таким образом, разработанный метод может применяться для тестирования и количественной характеристики РНК-лигазы и обладает рядом преимуществ по сравнению с известным методом, что определяется более простым способом получения субстрата и использованием долгоживущих радиоактивных изотопов ^3H или ^{14}C .

Экспериментальная часть

В работе использовали poly(A) и дигиотреит (Reanal, Венгрия), $[^3\text{H}]\text{ADP}$ (30 Ки/моль) и $[^{14}\text{C}]\text{ADP}$ (400 мКи/моль) (Amersham, Англия), нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм (ЧССР), эндонуклеазу из *S. marcescens* (КФ 3.1.4.9; 2 600 000 ед./мг белка) и полинуклеотидфосфорилазу из *E. coli* (КФ 2.7.7.8; 30 ед./мг белка; СКТВ БАН, Новосибирск).

Рибонуклеазу II из *E. coli* (КФ 3.1.4.20; 2000 ед./мг белка) и РНК-лигазу фага T4 (2400 ед./мг белка) выделяли соответственно по методам [10] и [11].

Остальные реактивы — марок х.ч. и ос.ч.

Для получения $(\text{pA})_{20}$ 42 мг poly(A) инкубировали 20 мин при 37° С в 2 мл реакционной смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 8,2), 5 мМ MgCl_2 и 200 ед. акт. эндонуклеазы из *S. marcescens*. Реакцию останавливали, прогревая смесь при 100° С в течение 3 мин. Мелкие олигорибонуклеотиды удаляли диализом против 1 и 10 мМ трис-НСl-буфера, рН 8,2, в течение 12 ч. Средняя длина выделенных олигорибонуклеотидов, определенная электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии 7 М мочевины, равнялась 20 нуклеотидам.

Для получения ^3H -меченного (или ^{14}C -меченного) субстрата $(\text{pA})_{20}$ инкубировали 4 ч при 37° С в 1 мл реакционной смеси, содержащей 0,1 М трис-НСl (рН 8,2), 2,5 мМ MgCl_2 , 0,1 мг бычьего сывороточного альбумина, 0,3 мкМ $(\text{pA})_{20}$, 0,6 мкМ $[^3\text{H}]\text{ADP}$ (или 0,6 мкМ $[^{14}\text{C}]\text{ADP}$) и 2 ед. акт. полинуклеотидфосфорилазы. Реакцию останавливали, прогревая смесь 2 мин при 100° С. Меченые олигорибонуклеотиды (40 000 имп/мин/нмоль) экстрагировали фенолом, насыщенным дистиллированной водой, диализовали против 10 мМ трис-НСl-буфера, рН 7,5, содержащего 1 мМ EDTA, и хранили при -20° С.

Определение активности Т4-РНК-лигазы (ед. акт.) разработанным методом (А) и методом Зильбера и др. [8] (Б) * в процессе ее выделения [11]

Стадии выделения	А	Б
Клеточный экстракт	155 000	1600 000
Фракционирование полимином	131 700	134 300
Хроматография на фосфоцеллюлозе— DEAE-целлюлозе	74 400	72 500
Хроматография на оксипнатите	51 200	49 000
Изотахофорез	32 600	31 600
Гель-фильтрация на ультрагеле АсА-44	26 300	26 100

* 1 ед. акт. по обоим методам определяет образование под действием РНК-лигазы 1 нмоль кольцевых молекул субстрата за 30 мин при 37° С.

Активность РНК-лигазы определяли в 100 мкл реакционной смеси, содержащей 50 mM трис-НСI (рН 7,5), 10 mM MgCl₂, 3,3 mM дитиотреит, 0,1 mM АТР, 50 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 10 мкМ (рА) $\text{[}^3\text{H]A}$ и РНК-лигазу (0,2–1,0 ед. акт.). Реакционную смесь инкубировали 30 мин при 37° С. Реакцию останавливали, прогревая смесь 2 мин при 100° С. Затем добавляли 100 мкл 0,2 М КСI и 0,1 ед. акт. рибонуклеазы II. После инкубации при 37° С в течение 30 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл суммарной тРНК (5 мг/мл) и 2 мл холодной 10% трихлоруксусной кислоты. Смесь инкубировали 10 мин при 0° и осадок отделяли фильтрацией через нитроцеллюлозный фильтр. Радиоактивность на фильтре определяли в жидкостном сцинтилляционном счетчике.

За единицу активности принимали такую активность, которая способствует превращению в форму, устойчивую к рибонуклеазе II, 1 нмоль субстрата (в пересчете на фосфатный конец) за 30 мин при 37° С.

Авторы благодарят Н. И. Андросову за помощь в подготовке данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Linné T., Öberg B., Philipson L. Eur. J. Biochem., 1962, v. 42, p. 157–165.
2. Cranston J. W., Sulber R., Malathi V. G., Hurwitz J. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, p. 7447–7456.
3. Kaufmann G., Littauer U. Z. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 3741–3745.
4. Kaufmann G., Klein T., Littauer U. Z. FEBS Lett., 1974, v. 46, p. 271–275.
5. Kaufmann G., Kallenbach N. R. Nature, 1975, v. 254, p. 452–454.
6. Walker G. C., Uhlenbeck O. C., Bedows E., Gumport R. I. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 122–126.
7. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седельникова Э. А., Антонович Е. Г., Манюкин А. С., Прокофьев М. А., Загребельный С. П., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М., Болезнин М. И., Смолянинов В. В. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 7, с. 1037–1046.
8. Silber R., Malathi V. G., Hurwitz J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, p. 3009–3013.
9. Василенко С. К., Веньямина А. Г., Ямковой В. И., Майоров В. В. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 621–627.
10. Singer M. F., Tolber G. Biochemistry, 1965, v. 4, p. 1319–1330.
11. Болезнин М. И., Смолянинов В. В. Микробиол. пром-сть, 1981, № 1, с. 94.

Поступила в редакцию
24.VII.1981

DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF T4 RNA LIGASE

BOLEZNIN M. I., SMOLYANINOV V. V.

All-Union Research Institute of Applied Microbiology, Serpukhov

A method is described for determining biological activity of RNA ligase induced in *E. coli* cells by T4 bacteriophage. It is based on the use of a substrate — $(p\bar{A})_{20}$ — labeled by long-lived radioactive isotopes ^3H or ^{14}C . Circular molecules of such a substrate formed under the action of RNA ligase are resistant to ribonuclease II.