

Г. В. Турковская, В. Ф. Шалак, К. В. Семенихин, Б. С. Негруцкий

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРОЛИКА

Предложен простой и быстрый метод получения фенилаланил-тРНК синтетазы из печени кролика. Процедура состоит из трех стадий и включает в себя осаждение постмитохондриального супернатанта полиэтиленгликолем с последующими хроматографиями на анионо-(ДЭАЭ-целлюлоза) и катионо-(фосфоцеллюлоза) обменниках.

Введение. Фенилаланил-тРНК синтетаза отличается от других аминоксил-тРНК синтетаз из высших эукариот целым рядом особенностей, в числе которых уникальная тетрамерная структура и большое сродство к рибосомам [1, 2]. Необходимость поиска быстрого и надежного метода очистки этого фермента объясняется, среди прочего, доступностью и глубокой изученностью его субстрата — фенилаланиновой тРНК. В то же время адекватного по простоте и надежности метода получения фенилаланил-тРНК синтетазы, несмотря на ряд попыток, предпринятых в последнее время [3, 4], все еще не предложено. Изучение же особенностей фермент-субстратного взаимодействия, равно как и исследование влияния фактора элонгации 1 на этот процесс, как предложено нами ранее [5], требуют получения препаративных количеств высокоочищенного фермента.

Задача настоящего исследования состояла в разработке простого и быстрого метода выделения фенилаланил-тРНК синтетазы из печени кролика.

Материалы и методы. Препарат суммарной тРНК получали, как описано ранее [6]. Активность фенилаланил-тРНК синтетазы определяли в реакции аминокислотирования тРНК. Реакционная смесь содержала в объеме 50 мкл 50 мМ НЕРЕС, рН 7,8, 100 мМ КСl, 15 мМ MgCl₂, 3 мМ АТФ, 133 мкг суммарной тРНК из печени кролика, 55,5 мкМ L-[¹⁴C]фенилаланин. Реакцию вели 15 мин при 37 °С и останавливали добавлением 0,5 мл охлажденной 10 %-й трихлоруксусной кислоты. Осадки отмывали на фильтрах GF/C («Whatman», Англия), фильтры высушивали и радиоактивность определяли на счетчике ЛКВ. Электрофорез белков в 12,5 %-м полиакриламидном геле с 0,1 %-м DS-Na проводили по методу Леммли [7]. Ультрацентрифугирование фенилаланил-тРНК синтетазы в градиенте плотности 15—25 % глицерина осуществляли в 20 мМ НЕРЕС, рН 7,55, содержащем 5 мМ MgCl₂ и 3 мМ ДТТ при 4 °С в течение 16 ч при 39 000 об/мин (ротор SW-65, Spinco L5).

Результаты и обсуждение. Нами предложена следующая схема очистки фенилаланил-тРНК синтетазы: 1) фракционирование полиэтиленгликолем; 2) хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе, 3) хроматография на фосфоцеллюлозе.

Печень шести кролей (после двух дней голодания) гомогенизировали в двух объемах 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, содержавшего 5 мМ MgCl₂, 6 мМ ДТТ, 2 мМ ПМСФ, 10 %-й глицерин. К постмитохондриальному супернатанту по каплям прибавляли 50 %-й раствор полиэтиленгликоля 6000 в том же буфере, исключая глицерин и ПМСФ, до ко-

нечной концентрации 3 %. При такой концентрации полиэтиленгликоля происходило количественное осаждение фракции полирибосом. Осадок формировали без перемешивания 20 мин, отделяли центрифугированием и растворяли в 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, содержащем 5 мМ MgCl₂, 35 мМ KCl, 10 %-й глицерин, 1 мМ ДТТ, 0,1 мМ ЭДТА (буфер А) при помощи гомогенизатора Поттера. Для отделения фенилаланил-тРНК синтетазной активности от рибосом к полученному раствору прибавляли 4 М KCl до конечной концентрации 0,4 М и после перемешивания в течение 20 мин при 4 °С центрифугировали 2 ч при

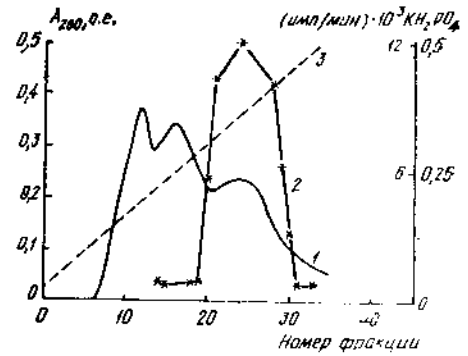
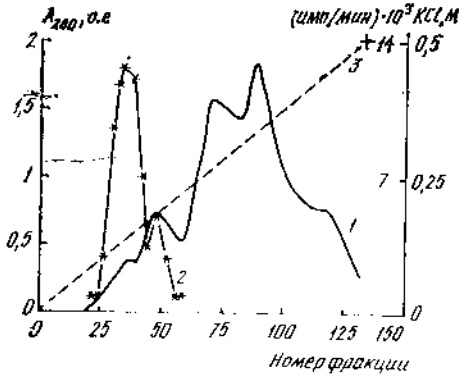


Рис. 1. Хроматография препарата фенилаланил-тРНК синтетазы на ДЭАЭ целлюлозе: 1 — оптическая плотность при 280 нм; 2 — фенилаланил-тРНК синтетазная активность; 3 — градиент KCl. На колонку с сорбентом (объем 180 мл) наносили 170 мл раствора белка с концентрацией 56 мг/мл. Элюцию проводили линейным градиентом KCl (объемом 700 мл), собирая 3-мл фракции. Активность фермента определяли, как описано в разделе «Материалы и методы»

Рис. 2. Хроматография препарата фенилаланил-тРНК синтетазы на фосфоцеллюлозе P11: 1 — оптическая плотность при 280 нм; 2 — фенилаланил-тРНК синтетазная активность; 3 — градиент калий-фосфатного буфера. На колонку с сорбентом (объем 15 мл) наносили 210 мл раствора белка. Элюцию проводили линейным градиентом калий-фосфатного буфера (объем 40 мл), собирая фракции по 2 мл

22 000 об/мин (ротор SW-27, Spinco L5) для осаждения полирибосом. Надосадочную жидкость диализовали в течение ночи против 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, содержащего 5 мМ MgCl₂ и 1 мМ ДТТ, осветляли центрифугированием и наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой («Reanal», Венгрия), уравновешенной буфером А. После промывки этим же буфером до исчезновения на выходе колонки оптической плотности при 280 нм связавшиеся с сорбентом белки элюировали линейным градиентом концентрации (0,035—0,5 М) KCl в буфере А, собирая фракции по 3 мл (рис. 1). Фенилаланил-тРНК синтетазную активность определяли по реакции аминоацелирования. Фракции, содержащие наибольшую активность, объединяли, разбавляли в 5 раз буфером Б (25 мМ К-фосфатный буфер, рН 6,8, 1 мМ ДТТ, 0,05 мМ ПМСФ, 0,1 мМ ЭДТА, 10 %-й глицерин) и наносили на колонку с фосфоцеллюлозой P11 («Whatman»), уравновешенной буфером Б. Затем промывали двумя объемами буфера Б и связавшиеся с колонкой белки элюировали линейным градиентом К-фосфатного буфера (0,25—0,5 М), собирая фракции по 2 мл (рис. 2). После определения ферментативной активности по градиенту и электрофореза фракций, содержащих активность, фракции с максимальной степенью очистки (80—90 %) объединяли, диализовали в течение ночи против 50 мМ НЕРЕС, рН 7,5, и 20 %-го глицерина и хранили в жидком азоте. Молекулярная масса субъединиц фенилаланил-тРНК синтетазы из печени кролика составила, по данным электрофореза, 68 000 и 74 000, что полностью коррелирует с аналогичными показателями для фенилаланил-тРНК синтетазы из других эукариотических источников [1, 3, 4].

При разработке данного метода мы стремились максимально использовать уже имеющиеся в литературе данные об особенностях фе-

нилаланил-тРНК синтетазы из высших эукариот. Поскольку значительная часть молекул этого фермента в клетке связана с рибосомами [2], логично исключить на первом этапе очистки огромную массу клеточных белков, не имеющих средства к рибосомам. Для этого рибосомную фракцию осаждали полиэтиленгликолем непосредственно из постмитохондриального супернатанта. Непрочно связанные с рибосомами белки, включая фенилаланил-тРНК синтетазу, были затем смыты с рибосом 0,4 М KCl.

Еще одной особенностью белка, отразившейся на выборе дальнейшего пути очистки, был его слабощелочной заряд. По литературным данным, изоэлектрическая точка фенилаланил-тРНК синтетазы из высших эукариот находится в области 8,0 [3]. Такой белок должен обладать небольшим, но вполне определенным средством к слабому анионообменнику, например, к ДЭАЭ-целлюлозе. Как выяснилось, фенилаланил-тРНК синтетаза связывалась с данным сорбентом, однако элюция этого фермента происходила при весьма низкой ионной силе (рис. 1), что и обеспечивало значительную степень очистки (таблица). С другой стороны, такому белку должно быть присуще существенное средство к сильному катионообменнику (фосфоцеллюлозе). Действительно, при хроматографии на данном носителе фенилаланил-тРНК синтетаза элюировалась с колонки уже при высоких концентрациях элюэнта (рис. 2), причем кратность очистки на этом этапе достигала 2138 раз (таблица).

Следует отметить, что длительное хранение либо повторное размораживание — замораживание фермента не приводило к заметному снижению его активности, но характеризовалось появлением в геле двух минорных полос в более низкомолекулярной области. Интересно, что похожая картина наблюдалась при ограниченном протеолизе фенилаланил-тРНК синтетазы из печени овцы [3]. Наличие двух пиков фенилаланил-тРНК синтетазной активности при ультрацентрифугировании такого препарата в градиенте плотности глицерина (данные не приведены) позволяет предположить, что данные пептиды являются продуктами расщепления исходного белка, не потерявшими ферментативной активности.

В последнее время описано несколько методик выделения фенилаланил-тРНК синтетазы из различных источников [3, 4, 6]. Преимущества предложенного нами метода заключаются, во-первых, в существенном сокращении (с пяти до трех) количества стадий очистки и, во-вторых, в исключении являвшихся прежде обязательными процедур хроматографии на гидроксипатите, приводивших к значительному снижению активности фермента [3]. Поскольку эукариотические аминоксил-тРНК синтетазы характеризуются повышенной структурной лабильностью [1], сокращение количества стадий очистки должно благоприятно влиять на нативность полученного препарата, а исключение хроматографии на гидроксипатите, в свою очередь, приводит к сохранению активности фермента. Немаловажное значение имеет также и применение в данной методике общедоступных носителей и обычного хроматографического оборудования.

Очистка фенилаланил-тРНК синтетазы из печени кролика

Стадия очистки	Общее количество белка, мг	Специфическая активность, ед/мг*	Выход, %	Степень очистки
Постмитохондриальный супернатант	45 000	0,08	100	1
ПЭГ, 3 %	9 520	0,3	92	3,7
ДЭАЭ-целлюлоза	90	32,2	80,5	402,5
Фосфоцеллюлоза	3,5	171	16,6	2138

* Специфическую активность определяли как количество фермента, необходимое для синтеза 1 нмоль фенилаланил-тРНК за 1 мин при 37 °С.

Таким образом, нами разработан простой и быстрый метод получения фенилаланил-тРНК синтетазы из печени кролика, что будет использовано для изучения роли этого фермента в структурно-функциональных взаимоотношениях компонентов эукариотического аппарата трансляции.

Работа частично финансировалась Государственным Комитетом по вопросам науки и технологий (грант 5.2/130)

Г. В. Турковська, В. Ф. Шалак, К. І. Семеніхін, Б. С. Негруцький

ЭКСПРЕС-МЕТОД ВИДІЛЕННЯ ФЕНІЛАЛАНИЛ-тРНК СИНТЕАЗИ ІЗ ПЕЧІНКИ КРОЛЯ

Резюме

Запропоновано швидкий, простий та не потребує дорогого обладнання метод одержання фенілаланіл-тРНК синтетази із печінки кроля. Він складається з трьох стадій і включає осаджування поліетиленгліколем постмітохондріального супернатанта з наступними хроматографіями на ДЕАЕ-целюлозі і фосфоцелюлозі.

H. V. Turkovskaya, V. F. Shalakh, K. V. Semenikhin, B. S. Negrutskii

FAST PROCEDURE FOR ISOLATION OF PHENYLALANYL-tRNA SYNTHETASE FROM RABBIT LIVER

Summary

Simple and fast method for isolation of phenylalanyl-tRNA synthetase from rabbit liver is proposed. Three-step procedure includes polyethylene glycol precipitation of post-mitochondrial supernatant with subsequent DEAE-cellulose and phosphocellulose chromatographies.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК.— М.: Наука, 1984.— С. 10—215.
2. Tscherne J. S., Weinstein I. B., Lanks K. W. et al. Phenylalanyl-transfer ribonucleic acid synthetase activity associated with rat liver ribosomes and microsomes // Biochemistry.— 1973.— 12, N 20.— P. 3859—3865.
3. Pallez J.-P., Waller J.-P. Phenylalanyl-tRNA synthetase from sheep liver and yeast // J. Biol. Chem.— 1984.— 259, N 24.— P. 15491—15496.
4. Варганяк О. А., Машанов-Голиков А. В., Вольфсон А. Д. и др. Быстрый метод выделения фенилаланил-тРНК синтетазы из млекопитающих и получение моноклональных антител к этому ферменту // Молекуляр. биология.— 1990.— 24, № 3.— С. 788—793.
5. Negrutskii B. S., Deutscher M. P. Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis *in vivo* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1991.— 88.— P. 4991—4995.
6. Brungraber E. F. A simplified procedure for the preparation of «soluble» RNA from rat liver // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1962.— 8, N 1.— P. 1—3.
7. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.— 1970.— 227, N 5259.— P. 680—685.
8. Ducruix A., Hounwanou N., Reinbolt J. et al. Purification and reversible subunit dissociation of overproduced *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetase // Biochim. et biophys. acta.— 1983.— 741.— P. 244—250.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН України, Київ

Получено 18.10.93