

ВЫЯВЛЕНИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗНЫХ ПРИМЕСЕЙ В КОММЕРЧЕСКИХ И ЛАБОРАТОРНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ С ПОМОЩЬЮ СВЕРХСКРУЧЕННЫХ ДНК

Ю. Ф. Дрыгин, К. Л. Жуклис

Введение. При выделении интактных плазмид и фаговых ДНК в сверхскрученной форме и изучении структуры природных нуклеопротеидов возникает необходимость выявления нежелательных примесных эндонуклеаз в используемых ферментативных и химических препаратах.

В качестве субстрата для определения неспецифической эндонуклеазной примеси в течение ряда лет мы с успехом используем сверхскрученные бактериальные плазмиды, полученные хлорамфениколзависимой амплификацией, главным образом, плазмиду *pBR322*.

Ранее [1—3] было показано, что сверхскрученные ДНК являются субстратом не только для ДНКаз, специфичных в отношении двуниевых ДНК, но и для эндонуклеаз, гидролизующих преимущественно однонитесвые нуклеиновые кислоты. Известно также, что при хлорамфеникольном блоке в бактериальных плаزمиде — производных плазмиды *ColE1* — консервируются полирибонуклеотидные «праймеры» репликации плазмиды [4], и такие плазмиды гидролизуются панкреатической РНКазой.

Сверхскрученные ДНК могут быть высокочувствительным репортером активности эндонуклеаз, поскольку разрыв лишь одной фосфодиэфирной связи в сверхскрученной ДНК переводит ее в топологически отличную открытую кольцевую форму. Более глубокий гидролиз приводит к появлению линейной ДНК или ее фрагментов. Как исходная сверхскрученная ДНК, так и продукты ее гидролиза четко разделяются и идентифицируются методом электрофореза ДНК в агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

Цель настоящей работы — показать, что сверхскрученные ДНК являются универсальным субстратом для обнаружения примесной эндонуклеазной активности в самых разнообразных коммерческих и лабораторных биохимических препаратах, используемых для работы с ДНК и дезоксиноклеопротеидами.

Материалы и методы. Выделение сверхскрученной ДНК *pBR322*, амплифицированной хлорамфениколом, проводили, как описано в [5]. Для обнаружения эндонуклеаз аликвоту сверхскрученной плазмиды (0,2 мкг) инкубировали с данным препаратом в условиях его применения. Реакцию останавливали резким охлаждением реакционной смеси. Продукты превращения плазмиды анализировали методом горизонтального электрофореза ДНК в слое 0,7 %-ного агарозного геля (3×130×160 мм), 100 В, 2 ч в буферном растворе (40 мМ трис-НСl, рН 7,7; 5 мМ CH_3COONa ; 1 мМ ЭДТА; 0,5 мкг/мл бромистого этидия). Анализированные препараты представлены в табл. 1—3.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 и на рис. 1, А приведены результаты определения эндонуклеазных примесей в протеолитических ферментах, используемых при изучении структуры нуклеопротеидов. Как видно из рисунка, в стандартных, рекомендуемых фирмой-изготовителем, условиях применения папаин и бромелаин обладают значительной эндонуклеазной активностью, гидролизующей двуниевую ДНК (треки 2, 3), в то время как под влиянием эндонуклеазы в препарате проназы Р (особенно заметной в долго хранившихся замороженных растворах этого фермента) предпочтительно происходят однонитесвые разрывы в сверхскрученной ДНК (трек 9). Препарат протеиназы из *Thermoactinomyces vulgaris*, очищенный аффинной хроматографией на бацитрацин-силохроме и бацитрацин-сефарозе, не содержит примеси эндонуклеаз (трек 6). Опытные препараты карбоксипептидазы из

Таблица 1

Определение примеси эндонуклеазной активности в препаратах протеолитических ферментов

Detection of endonucleolytic admixtures in some industrial and extra purified proteolytic enzymes. See fig. 1, A.

№ пробы (рис. 1, А)	Препарат	Условия инкубации	Наличие эндонуклеазной активности
1	Исходная сверхскрученная плаزمиды pBR322	1 ч, 37 °С, буфер ТЭН: 10 мМ трис-НСl, рН 7,5; 10 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА	Контроль
2	Папаин («Merck», ФРГ)	1 мг/мл, 1 ч, 25 °С, буфер: 15 мМ цистеин-НСl, рН 6,2; 100 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА	Полный гидролиз ДНК
3	Бромелаин («Sigma», США)	1 мг/мл, 1 ч, 25 °С, буфер: 100 мМ ацетат натрия, рН 4,5	Есть
4	Трипсин-ТРСК («Serva», ФРГ)	50 мкг/мл, 1 ч, 25 °С, буфер: 40 мМ трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ CaCl ₂	Нет
5	α-Химотрипсин (НПО «Биохимреактив», Олайне, СССР)	50 мкг/мл, 1 ч, 25 °С, буфер ТЭН	Нет
6	Протеиназа из <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> (предоставлена Г. Н. Руденской, МГУ)	1 мг/мл, 1 ч, 37 °С, буфер ТЭН	Нет
7	Протеиназа К («Merck», ФРГ)	2 мг/мл, 2 ч, 37 °С, буфер ТЭН	Нет
8	Протеиназа К («Merck», ФРГ)	200 мкг/мл, 2 ч, 37 °С, буфер ТЭН	Нет
9	Проназа Р («Serva», ФРГ)	1 мг/мл, 1 ч, 37 °С, буфер ТЭН	Есть
10	Проназа Е («Merck», ФРГ)	1 мг/мл, 1 ч, 37 °С, буфер ТЭН	Нет
11	Карбоксипептидаза из <i>Actinomyces species</i> (НПО «Биохимреактив»)	100 мкг/мл, 1 ч, 37 °С, буфер: 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ NaCl, 1 мМ Ca ⁺⁺ , 0,1 мМ Co ⁺⁺	Нет
12	Карбоксипептидаза У (НПО «Биохимреактив», Олайне, СССР)	50 мкг/мл, 1 ч, 37 °С, буфер: 100 мМ Na-фосфат, рН 6,5	Нет

Streptomyces griseus и аминоксипептидазы из *Aspergillus oryzae* производства НПО «Биохимреактив» полностью гидролизировали плазмиду до низкомолекулярных фрагментов, тогда как аминоксипептидаза из *Streptomyces griseus* не содержала эндонуклеазной активности (данные не приведены).

Обнаружение эндонуклеазных примесей в препаратах протеолитических ферментов (даже после их предварительного «самоперевара» или длительного хранения) приводит к выводу о необходимости анализа препаратов протеаз непосредственно перед выделением высокомолекулярных нуклеиновых кислот или исследованием структуры нуклеопротеидов.

Одновременное присутствие в вышеупомянутых препаратах протеолитической и эндонуклеазной активностей можно объяснить высокой устойчивостью последней к соответствующей протеазе, поскольку нам не известны индивидуальные ферменты, катализирующие гидролиз и пептидной, и фосфодиэфирной связей. Мы не знаем также, возникает ли такой ассоциат активностей в процессе очистки препарата протеазы или он исходно присутствует в клетке в виде прочного, слабодиссоциирующего комплекса для координированного гидролиза природного нуклеопротеида.

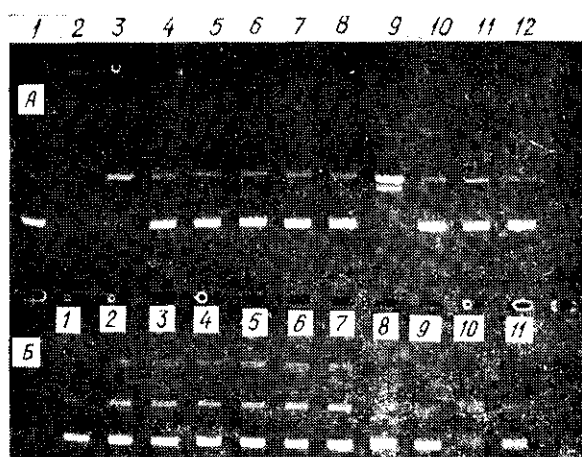


Рис. 1. Электрофорез сверхспиральной ДНК после инкубации с препаратами протеолитических ферментов (А), химическими препаратами и ферментами, используемыми для выделения нуклеиновых кислот (Б). Номера треков соответствуют номерам проб в табл. 1 и 2.

Fig. 1. Electrophoresis of supercoiled DNA after incubation with preparations of proteolytic enzymes (A), chemical preparations and enzymes commonly used for nucleic acid isolation (B). The lane numbers correspond to the numbers in Tables 1 and 2.

В табл. 2, 3 и на рис. 1, Б и 2 приведены результаты анализа коммерческих химических препаратов (трис-буфер, сахара) и ферментов, используемых при выделении ДНК фага $\phi X174$, плазмид и их ковалентных соединений с белками. Легко заметить, что вышеперечисленные отечественные препараты по отсутствию примесных эндонукле-

Таблица 2

Определение примеси эндонуклеазной активности в химических препаратах и ферментах, используемых для выделения нуклеиновых кислот

Detection of endonucleolytic admixtures in some enzymes and chemical preparations commonly used for nucleic acid isolation. See Fig. 1, B.

№ пробы (рис. 1, Б)	Препарат	Условия инкубации	Наличие эндонуклеазной активности
1	Исходная плаزمида <i>pBR322</i>	1 ч, 37 °С, буфер ТЭН	Контроль
2	Исходная плазмида <i>pBR322</i>	1 ч, 37 °С, буфер: 50 мМ трис-НСl, рН 8,0	Контроль
3	Бактериальная щелочная фосфатаза («Worthington», США)	50 мкг/мл, 1 ч, 37 °С, буфер: 50 мМ трис-НСl, рН 8,0	Нет
4	Сахароза чда (СССР)	20 %-ный раствор в буфере ТЭН, 1 ч, 37 °С	Нет
5	Сахароза («Serva», ФРГ)	20 %-ный раствор в буфере ТЭН, 1 ч, 37 °С	Нет
6	Сахароза чда (СССР)	20 %-ный раствор в буфере: 50 мМ трис-НСl, рН 8,0	Нет
7	Сахароза («Serva», ФРГ)	20 %-ный раствор в буфере: 50 мМ трис-НСl, рН 8,0	Нет
8	Лизоцим («Boehringer», ФРГ)	100 мкг/мл, 1 ч, 37 °С, буфер ТЭН	Нет
9	Лизоцим (НПО «Биохимреактив», Олайне, СССР)	100 мкг/мл, 1 ч, 37 °С, буфер ТЭН	Нет
10	Лизоцим («Boehringer», ФРГ)	100 мкг/мл, 1 ч, 37 °С, буфер: 50 мМ трис-НСl, рН 8,0	Есть незнач.
11	Лизоцим (НПО «Биохимреактив», Олайне, СССР)	100 мкг/мл, 1 ч, 37 °С, буфер: 50 мМ трис-НСl, рН 8,0	Нет

Таблица 3

Определение эндонуклеазной активности ряда препаратов ферментов нуклеинового обмена и БСА

Analysis of endonucleolytic activities of some enzymes and BSA used for nucleic acid isolation and study. See Fig. 2

№ пробы (рис. 2)	Препарат	Условия инкубации	Наличие эндонуклеазной активности
1	Исходная плазида <i>pBR322</i>	1 ч, 37 °С, буфер ТЭН	Контроль
2	БСА, фракция V («Sigma», США)	100 мкг/мл, 1 ч, 37 °С, буфер ТЭН	Нет
3	БСА, фракция V («Serva», ФРГ)	100 мкг/мл, 1 ч, 37 °С, буфер ТЭН	Нет
4	T4-полинуклеотидкиназа (НПО «Фермент», СССР)	1000 ед/мл, 2 ч, 37 °С, буфер: 100 мМ трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ MgCl ₂ , 5 мМ ДТТ, 0,05 мМ АТФ	Есть
5	T4-ДНК-лигаза (НПО «Фермент», СССР)	1000 ед/мл, 2 ч, 37 °С, буфер: 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ MgCl ₂ , 10 мМ ДТТ, 0,1 мМ АТФ	Есть
6	РНК-полимераза (СКТБ БАН, Новосибирск)	10 ед/мл, 2 ч, 37 °С, буфер: 40 мМ трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ MgCl ₂ , 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДТТ, 0,15 мМ КСl, 0,15 мМ NTP	Есть
7	T4-РНК-лигаза (ИМБ АН СССР)	1000 ед/мл, 2 ч, 37 °С, буфер: 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ MgCl ₂ , 10 мМ ДТТ, 0,2 мМ АТФ	Есть
8	РНКаза A («Worthington», США)	100 мкг/мл, 1 ч, 37 °С, буфер: 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 5 мМ ЭДТА	Есть
9	РНКаза <i>Pb₂</i> (НПО «Биохим-реактив», СССР)	30 ед/мл, 1 ч, 37 °С, буфер: 10 мМ ацетат аммония, рН 4,5	Есть
10	РНКаза T2 («Sankyo», Япония)	30 ед/мл, 1 ч, 37 °С, буфер: 10 мМ ацетат аммония, рН 4,5	Есть
11	РНКаза T1 («Sankyo», Япония)	500 ед/мл, 1 ч, 37 °С, буфер: 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 5 мМ ЭДТА	Нет
12	РНКаза T1 («Sankyo», Япония)	50 ед/мл, 1 ч, 37 °С, буфер: 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 5 мМ ЭДТА	Нет

аз не уступают импортным. Препараты лизоцима, образующие устойчивые (в условиях анализа) комплексы с плазмидой, обладают некоторой эндонуклеазной активностью, которая подавляется добавлением ЭДТА (рис. 1, Б, треки 8—11).

Высокоочищенный препарат бычьего сывороточного альбумина (БСА), используемого для уменьшения сорбции на поверхностях исследуемых комплексов НК — белок или как соосадитель НК из сильно разбавленных растворов, практически не содержит эндонуклеазной примеси (табл. 3, рис. 2, треки 2, 3). Препараты лигаз и полинуклеотидкиназы фага T4 отечественного производства обладают небольшой, но четко детектируемой эндонуклеазной активностью (табл. 3, рис. 2, треки 4, 5 и 7). Как и ожидалось, РНК-полимераза *E. coli* образует устойчивые в условиях электрофореза комплексы ДНК — белок. Появление двух четко выраженных полос в геле, возможно, связано с частичным гидролизом сверхскрученной плазмиды и образованием комплекса РНК-полимеразы уже с открытой кольцевой ДНК (табл. 3, рис. 2, трек 6).

С помощью сверхскрученной плазмиды проводили также качественное сравнение активности коммерческих препаратов разнообразных ДНКаз и РНКаз. В стандартных, рекомендуемых производителем условиях, под действием РНКазы *Pb₂* отечественного производства (табл. 3, рис. 2, трек 9) сверхскрученная ДНК переходила в открытую кольцевую с эффективностью, близкой к таковой для импортного аналога — РНКазы *T2* (табл. 3, рис. 2, трек 10). Анализ показывает, что даже

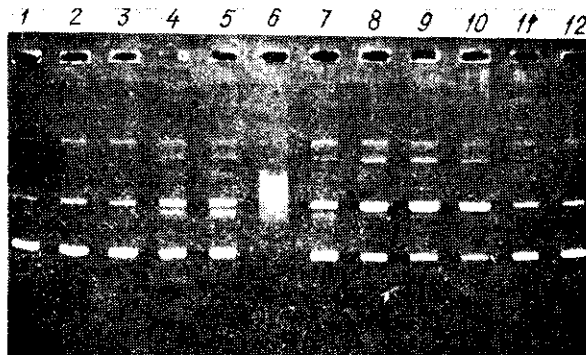


Рис. 2. Электрофорез сверхспиральной ДНК после инкубации с БСА и некоторыми ферментами, используемыми для выделения и изучения нуклеиновых кислот. Номера треков соответствуют номерам проб в табл. 3.

Fig. 2. Electrophoresis of supercoiled DNA after incubation with BSA and certain enzymes used for nucleic acid isolation and study. The lane numbers correspond to the numbers in Table 3.

10-кратное увеличение (по сравнению со стандартной) концентрации РНКазы *T1*, используемой при выделении плазмид в сверхскрученной форме [6], не приводит к заметному расщеплению ДНК *pBR322*. Таким образом, при выделении сверхскрученных ДНК даже жесткая обработка их РНКазой *T1* не снижает доли сверхскрученной ДНК.

В заключение можно сказать, что небольшие сверхскрученные ДНК, содержащие рибонуклеотидные «праймеры», производные плазмиды *ColE1*, амплифицированные в присутствии хлорамфеникола, являются высокочувствительным и универсальным субстратом для обнаружения примесных эндонуклеаз в разнообразных лабораторных и коммерческих препаратах ферментов, белков и низкомолекулярных веществ, а также для сравнительного анализа активности ДНКаз и некоторых РНКаз. С помощью этого субстрата (в сочетании с высокопроизводительным методом электрофореза ДНК в агарозных гелях) можно проанализировать одновременно практически полный набор препаратов, реагентов и условий обработок, используемых при структурном исследовании нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов.

SUPERCOILED DNA AS A SUBSTRATE FOR DETECTION OF ENDONUCLEOLYTIC ACTIVITIES IN COMMERCIAL AND LABORATORY BIOCHEMICAL PREPARATIONS

Yu. F. Drygin, K. L. Zuklys

A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov State University, Moscow

Summary

Supercoiled DNA is known to be a sensitive substrate for detecting the endonucleolytic activity. Supercoiled *pBR322* and other *ColE1*-related plasmids are shown to be highly useful both for detecting nonspecific endonucleolytic admixtures in many biochemical preparations and for comparative estimation of certain DNAses and RNAses activity.

More than 30 enzymes, proteins and chemical substances (salts, sucrose, etc.) commonly used for nucleic acids and nucleoproteins structural study are analyzed. Certain commercial preparations of proteolytic enzymes, kinases, ligases, polymerases, etc. are found to contain a detectable level of the endonucleolytic activity.

1. *Characterization of the single-strand specific nuclease S1 activity on double-stranded supercoiled polyoma DNA* / J. E. Germont, G. N. Godson, V. M. Vogt, B. Hirt // Eur. J. Biochem.—1974.—43, N 2.— P. 591—600.
2. *Sensitivity of superhelical DNA to a single-strand specific endonuclease* / A. C. Kato, K. Bartok, M. J. Fraser, D. T. Denhardt // Biochim. et biophys. acta.—1973.—308, N 1.— P. 68—78.
3. *Дрыгин Ю. Ф., Зверев В. В.* Применение нуклеазы S1 для определения молекулярной массы ДНК в мультиплазмидных штаммах *Escherichia coli* // Молекуляр. биология.—1982.—16, № 3.— С. 633—638.
4. *Isolation of supercoiled colicinogenic factor E1 DNA sensitive to ribonuclease and alkali* / D. G. Blair, D. J. Sherrat, D. B. Clewell, D. R. Helinski // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1972.—69, N 4.— P. 2518—2521.
5. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* Molecular cloning.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.—545 p.
6. *Purification of nucleic acids by RPC-5 analog chromatography: peristaltic and gravity flow applications* / J. A. Thompson, R. W. Blakesley, K. Doran et al. // Meth. Enzymol.—1983.—100.— P. 368—399.

МГУ им. Ломоносова

Получено 25.07.85