



УДК 577.112.088.3

О. И. Гудзера, Л. Л. Сидорик, И. В. Золотухина,
М. А. Тукало, Г. Х. Мацука

ВЫДЕЛЕНИЕ СЕРИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ ЭКСПРЕСС-МЕТОДОМ

Описан экспресс-метод выделения высокоочищенного препарата серил-тРНК синтетазы из печени животных. В процессе выделения фермента использовали метод осаждения белка 50 %-ным раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000), хроматографию на сорбенте DEAE-Toyopearl 650M и хроматографию на системе FPLC с использованием сорбентов MonoS и MonoQ. Выход очищенного фермента составлял около 600 мкг на 1 кг ткани печени.

Серил-тРНК синтетаза из печени животных является структурным димером α_2 -типа. Молекулярная масса фермента составляет 120 000.

Механизм биосинтеза белков во всем многообразии их биологической активности и видовой специфичности был и остается одной из крупнейших проблем современной биохимии и молекулярной биологии. Аминоацил-тРНК синтетазы и тРНК играют ключевую роль в этом процессе. Кроме того, в последнее время были открыты новые интересные функции аминоацил-тРНК синтетаз и тРНК, отличные от их функций в белковом синтезе [1]. Методы выделения и очистки тРНК в индивидуальном состоянии и наработки их в достаточных для исследования количествах разработаны в настоящее время сравнительно хорошо как для прокариот, так и для эукариот. В случае же аминоацил-тРНК синтетаз — остаются трудной проблемой, особенно для эукариотических ферментов. Поэтому очень важны разработки новых способов быстрого и эффективно-го выделения аминоацил-тРНК синтетаз высокой чистоты из эукариотических объектов.

В данном сообщении представлен метод быстрого выделения высокоочищенных препаратов серил-тРНК синтетаз из печени животных. Для сравнения выделяли фермент из печени быка и кроля.

Печень кроля извлекали после забоя животных с последующей немедленной гомогенизацией ткани. Печень быка получали на мясокомбинате, и немедленно замораживали ткань в жидком азоте. Суммарный препарат тРНК выделяли из печени животных по описанному методу [2]. Серил-тРНК синтетазную активность определяли по начальной скорости образования аминоацил-тРНК. Инкубационная смесь в объеме 0,05 мл содержала 200 мМ трис-НСl буфер, рН 8,0, 20 мМ MgCl₂, 10 мМ АТР, 0,08 мМ ¹⁴C-серин (ЧССР), 3 мкг/мл суммарного препарата тРНК печени и от 10 до 0,01 мкг белка (в зависимости от степени очистки фермента). Смесь инкубировали в течение 3 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл холодной 10 %-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Образовавшиеся осадки наносили на фильтры Whatman GF-C и отмывали 30 мл 5 %-ной ТХУ. Радиоактивность проб регистрировали на сцинтилляционном счетчике 1219 Rackbeta фирмы «LKB» (Швеция). Молекулярную массу серил-тРНК синтетазы изучали методом электрофореза в градиенте концентрации (5—15 %) полиакриламидного геля (ПААГ) в нативных условиях [3] и методом гель-фильтрации [4]; молекулярную массу субъединиц — электрофоретически в градиенте концентрации (8—25 %) ПААГ по Лэммли [5]. Концентрацию белка определяли по Брэдфорду [6]. За единицу активности серил-тРНК синтетазы принимали количество фермента, катализирующее аминоацилирование 1 нмоль тРНК^{ser} за 1 мин при 37 °С.

Первый этап очистки фермента проводили соответственно [14]. Печень измельчали и гомогенизировали в двух объемах 50 мМ трис-НСl буфера, рН 7,5, содержащего 10 мМ MgCl₂, 1 мМ РМSФ и 1 мМ диизопропилфторсульфат, 10 мМ β-меркаптоэтанол. Гомогенат центрифугировали 30 мин при 30 000 g. Серил-тРНК синтетаза из супернатанта 30 000 g осаждали 50 %-ным раствором ПЭГ-6000 («Fluka», ФРГ) на

холоду на магнитной мешалке. Серил-тРНК синтетазная активность содержалась преимущественно во фракции 9—12 % ПЭГ. Осадок белка собирали центрифугированием при 30 000 *g* (30 мин), осадок растворяли в 25 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 2 мМ β-меркаптоэтанол, 5 % глицерина, 1 мМ MgCl₂ и 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид (буфер А), и наносили на колонку с DEAE-Toyopearl 650M («Toyo Soda», Япония) размером 4,5×21 см, уравновешенным тем же буфером А. Затем наносили белок и колонку отмывали тремя объемами буфера А, после чего материал элюировали в градиенте концентрации KCl (от 0,01 до 0,3 М) в том же буфере: объем

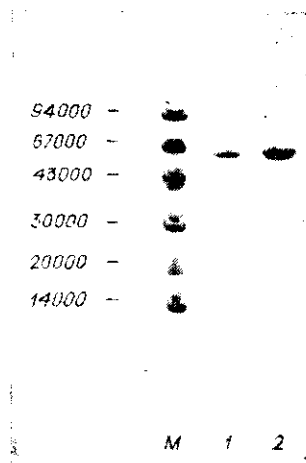
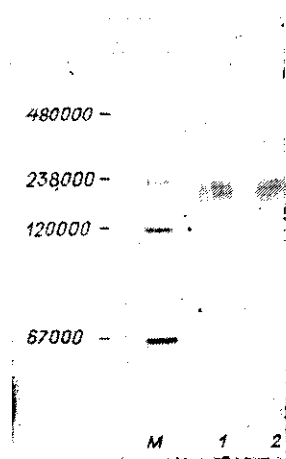


Рис. 1. Электрофорез в денатурирующих условиях очищенного препарата серил-тРНК синтетазы: 1, 2 — ферменты, выделенные из печени кроля и быка соответственно; М — маркеры молекулярной массы
Fig. 1. SDS-electrophoresis of purified sample of seryl-tRNA synthetase: 1 — enzyme from the rabbit liver; 2 — enzyme from the bovine liver; M — markers of molecular weight

Рис. 2. Нативный электрофорез очищенного препарата серил-тРНК синтетазы: 1, 2 — ферменты, выделенные из печени кроля и быка соответственно; М — маркеры молекулярной массы

Fig. 2. Native electrophoresis of purified sample of seryl-tRNA synthetase: 1 — enzyme from the rabbit liver; 2 — enzyme from the bovine liver; M — markers of molecular weight



градиента 1600 мл. Фракционирование на DEAE-Toyopearl проводили со скоростью 500—600 мл/ч. В некоторых случаях осуществляли хроматографию на небольшой колонке DEAE-Toyopearl в тех же условиях.

Далее серил-тРНК синтетазу очищали на системе FPLC («Pharmacia», Швеция). Активные фракции после DEAE-Toyopearl разводили в три раза буфером А и порциями по 20—30 мг наносили на колонку MonoS HR 5/5, уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили линейным градиентом KCl (0—0,3 М). Скорость элюции 1 мл/мин. Активные фракции объединяли, разводили в три раза буфером А, наносили на колодку MonoQ HR 5/5, после чего элюировали градиентом KCl (0—0,3 М) со скоростью 1 мл/мин. Фракции, обладающие серил-тРНК синтетазной активностью, объединяли. Чистоту полученного фермента определяли при помощи электрофореза в градиентном ПААГ в нативных и денатурирующих условиях (рис. 1, 2). По данным электрофореза, препарат гомогенен. Из 1 кг печени было получено около 600 мкг высокоочищенной серил-тРНК синтетазы. Вся процедура получения фермента занимала 4 дня.

Степень чистоты полученного фермента определяли также по наличию примесей других аминоксил-тРНК синтетаз в реакции аминокислотирования со смесью ¹⁴C-аминокислот и избытком ¹²C-серина. Нами было отмечено отсутствие загрязнения препарата примесями других аминоксил-тРНК синтетаз как для фермента, выделенного из печени быка, так и для фермента из печени кроля. Значение удельной активности полученно-

го препарата серил-тРНК синтетазы при оптимальных условиях реакции аминокислотирования составляет: 30 моль/мин на моль фермента для серил-тРНК синтетазы из печени кроля и 18 моль/мин на моль фермента для серил-тРНК синтетазы из печени быка.

Как оказалось, выделенный нами фермент имеет очень высокую способность к агрегации, что следует из некоторых данных нативного электрофореза (рис. 2) и гель-фильтрации при ЖХВД на геле TSK-250 («Toyo Soda», Япония); молекулярная масса препарата в этих условиях иногда оказывалась около 240 000–480 000 [7–12]. Из совокупности данных, полученных различными методами, можно заключить: серил-тРНК синтетаза из печени животных представляет собой структурный димер, состоящий из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой около 64 000 (рис. 1). Аналогичная структура и близкие молекулярные массы показаны для серил-тРНК синтетаз, выделенных из других высших эукариот.

Ранее мы пытались получить высокоочищенный препарат серил-тРНК синтетазы из печени быка по методике [13], которая была более трудоемкой и длительной. Ни по этой, ни по экспресс-методике нам не удалось получить фермент с молекулярной массой 180 000, как отмечалось в этой работе [13].

ISOLATION OF SERYL-tRNA SYNTHETASE FROM THE ANIMAL LIVER BY PROXIMATE METHOD

*O. I. Gudzera, L. L. Sidarik, I. V. Zolotukhina,
M. A. Tukalo, G. Kh. Matsuka*

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

A proximate method to isolate seryl-tRNA synthetase from the animal liver is described. It includes polyethylene glycol 6000 fractionation, chromatography on DEAE-Toyoppearl 650 M, and chromatography on the FPLC system of Mono S and Mono Q sorbents. A yield of the purified enzyme was about 600 μ g per 1 kg of liver. The enzyme is a structural dimer (α_2 type) with molecular weight of 120 kDa.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминокислот-тРНК.— М.: Наука, 1984.— 408 с.
2. Brungaber E. A. Simplified procedure for the preparation of «soluble» RNA from rat liver // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*— 1962.— 8, N 1.— P. 1–3.
3. Davis B. J. Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 1964.— 121, N 2.— P. 404–427.
4. Andrews P. Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel-filtration // *Biochem. J.*— 1970.— 119, N 1.— P. 691–697.
5. Laemmli U. K. Cleavage proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*— 1970.— 227, N 5259.— P. 680–685.
6. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // *Anal. Biochem.*— 1976.— 72, N 1.— P. 248–254.
7. Триптофанил-тРНК синтетаза: выделение и характеристика двух форм фермента / О. О. Фаворова, Л. Л. Кочкина, М. Шайко и др. // *Молекуляр. биология.*— 1974.— 8, № 2.— С. 729–741.
8. Baldwin A. V., Berg P. Purification and properties of isoleucyl ribonucleic acid synthetase from *E. coli* // *J. Biol. Chem.*— 1966.— 241, N 2.— P. 831–838.
9. DeLorenzo F., Natale P., Schechter A. N. Chemical and physical studies on the structure of the histidyl transfer ribonucleic acid synthetase from *Salmonella typhimurium* // *Ibid.*— 1974.— 249, N 2.— P. 908–913.
10. Purification and properties of methionyl-tRNA synthetase from yellow lupine seeds / A. Joachimiak, J. Barciszewski, J. Twardowski et al. // *FEBS Lett.*— 1978.— 93, N 1.— P. 51–54.
11. Murasugi A., Hayashi H. Purification and properties of leucyl-tRNA synthetase from *Candida utilis* // *Eur. J. Biochem.*— 1975.— 57, N 1.— P. 169–175.
12. Multiple molecular forms of cysteinyl-tRNA synthetase from rat liver: purification and subunit structure / F. Fan, H. H. Lee, S. H. Pai et al. // *Biochim. et biophys. acta.*— 1976.— 452, N 2.— P. 271–283.
13. Mizutani T., Narihara T., Hashimoto A. Purification and properties of bovine liver seryl-tRNA synthetase // *Eur. J. Biochem.*— 1984.— 143, N 1.— P. 9–13.
14. Polymorphic crystal forms of the complex between yeast tRNA^{Asp} and aspartyl-tRNA synthetase / M. Ruff, V. Mikol, B. Lorber et al. // *Crystal growth of biological macromolecules: FEBS Adv. Lecture.*— Bishenberg-Alsace, 1987.— P. 132.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 04.06.89