

10. Патон Е. Б., Живолуп А. Н., Вараница Л. А. Присутствие двух сильных промоторов определяет ориентацию фрагмента ДНК при встраивании в плазмиду *pUC19* // Биополимеры и клетка.—1986.—2, № 4.— С. 217—219.
11. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Ориентационные эффекты, вызываемые присутствием в плазмиде *pUC* фрагментов *rplIL-rpoBC*-оперона *Escherichia coli* // Там же.—1988.—4, № 3.— С. 163—167.
12. Plasmid vector *pBR322* and its special-purpose derivatives — a review / P. Balbas, X. Sobregon, E. Merino et al. // Gene.—1986.—50, N 1.— P. 3—40.

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

Получено 20.06.88

УДК 577.112.088.3

ВЫДЕЛЕНИЕ ТРЕОНИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ИЗ *Thermus thermophilus**

А. Д. Яремчук, М. А. Тукало, С. П. Егорова, Г. Х. Мацука

Аминоацил-тРНК синтетазы представляют группу ферментов, играющих существенную роль в реализации генетической информации. Их специфическое взаимодействие с тРНК до сих пор является одной из важнейших проблем молекулярной биологии. Особый интерес вызывает треонил-тРНК синтаза бактерий, поскольку для этого фермента показана отрицательная авторегуляция биосинтеза на уровне трансляции [1]. При этом установлено, что нуклеотидная последовательность участка собственной мРНК, с которым связывается треонил-тРНК синтаза при ингибировании трансляции, гомологична последовательности антикодонового стебля тРНК^{Thr}, который взаимодействует с треонил-тРНК синтазой. Следовательно, изучение комплекса тРНК^{Thr} с треонил-тРНК синтазой может способствовать выяснению молекулярного механизма взаимодействия оператора и репрессора трансляции. Для исследований удобным объектом является треонил-тРНК синтаза из экстремального термофила *T. thermophilus*, которая обладает высокой термостабильностью.

В настоящем сообщении описан метод выделения высокоочищенного препарата треонил-тРНК синтазы из *T. thermophilus*.

Бактериальная масса *T. thermophilus* выращена в Ин-те физиологии и биохимии микроорганизмов АН СССР, пострибосомальный супернатант был любезно предоставлен М. Б. Гарбер (Ин-т белка АН СССР). Суммарный препарат тРНК из *Escherichia coli* получен из ВНИИ прикл. биохимии (Олайне, ЛатвССР). Треонил-тРНК синтазную активность определяли по начальной скорости образования аминоксил-тРНК. Инкубационная смесь в 0,05 мл содержала 100 мМ трис-НСl-буфер, рН 8,0, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ АТФ, 0,4 мМ ¹⁴С-треонин, 4 мг/мл суммарной тРНК *E. coli*, 0,2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 10 мМ KCl и от 0,1 до 10 мкг белка (в зависимости от степени очистки фермента). Смесь инкубировали при 55 °С в течение 30 с. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 10 %-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Образовавшиеся осадки отмывали на миллиметровых фильтрах 50 мл 5 %-ной ТХУ. Радиоактивность проб определяли на сцинтилляционном счетчике SL-30 фирмы «Intertechnique» (Франция). За единицу активности треонил-тРНК синтазы принимали количество фермента, катализирующее аминокислотирование 1 нмоля тРНК^{Thr} за 1 мин при 55 °С. Молекулярную массу треонил-тРНК синтазы изучали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в нативных условиях при разных концентрациях геля [2], молекулярную массу субъединиц — с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии DS-Na [3].

На первой стадии очистки треонил-тРНК синтазы использовали высаливание пострибосомального супернатанта сульфатом аммония (45 % насыщения). Полученный осадок диализовали против 50 мМ трис-НСl-буфера, рН 7,8, содержащего 5 мМ MgCl₂, 0,1 мМ азид натрия, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид (буфер А) и наносили на колонку (5×50 см) с ДЭАЭ-сефарозой («Pharmacia», Швеция), уравновешенную этим же буфером. Элюцию проводили в буфере А в градиенте концентрации NaCl от 0,03 до 0,3 М. Фракцию, обладающую треонил-тРНК синтазной

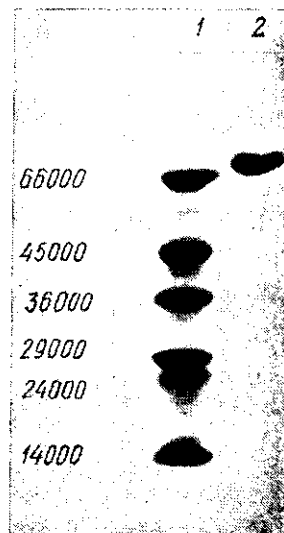
* Представлена членом редколлегии А. В. Ельской.

активностью, диализовали против 10 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,8, содержащего 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0,1 мМ азид натрия, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид (буфер Б) и наносили на колонку (2,5×55 см) с оксиантитом («Bio-Rad», США), уравновешенную буфером Б. Фермент элюировали в градиенте концентрации калий-фосфатного буфера от 0,01 до 0,2 М. Активную фракцию треонил-тРНК синтетазы высаливали сульфатом аммония (45 % насыщения) и хроматографировали на колонке (2,5×60 см) с поливинилловым сорбентом Toyopearl HW-65 («Toyo Soda», Япония) в буфере А в обратном градиенте концентрации сульфата аммония от 35 до 10 % насыщения. Фракцию, содержащую треонил-тРНК синтетазную активность, диализовали против буфера А и наносили на колонку (0,9×25 см) с гепарин-сефарозой («Pharmacia», Швеция), уравновешенную этим же буфером. Элюцию проводили в буфере А в градиенте концентрации КСl от 0 до 0,25 М. Высокоочищенный препарат треонил-тРНК синтетазы хранили при -20 °С в буфере А, содержащем 50 % глицерина. Данные, характеризующие степень очистки треонил-тРНК синтетазы на каждой стадии выделения, представлены в таблице.

Из 1 кг бактериальной массы *T. thermophilus* было получено около 9 мг высокоочищенного препарата трео-

Электрофорез в ПААГ в присутствии DS-Na: 1 — смесь стандартных белков; 2 — треонил-тРНК синтетаза *T. thermophilus* после хроматографии на гепарин-сефарозе

Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate: 1 — molecular mass standard; 2 — threonyl-tRNA synthetase *T. thermophilus* after chromatography on a Heparin-Sephrose column



Очистка треонил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus*
Purification of threonyl-tRNA synthetase from *T. thermophilus*

Основные стадии очистки	Общий белок, мг	Общая активность, ед. акт.	Удельная активность, ед. акт./мг	Степень очистки	Выход, %
Пострибосомальный супернатант	39200	3528	0,09	1	100
Высаливание сульфатом аммония, 45 % насыщения	16000	4640	0,29	3,2	131,5
Хроматография на ДЭАЭ-сефарозе	2700	4428	1,64	18,2	125,5
Хроматография на оксиантитате	360	3701	10,28	114,2	104,9
Гидрофобная хроматография на Toyopearl	94	2080	22,12	245,8	58,9
Хроматография на гепарин-сефарозе	9	612	68,00	755,5	17,3

нил-тРНК синтетазы с удельной активностью 68 ед./мг. Кроме результатов электрофоретического анализа (рисунок), о высокой степени чистоты полученного препарата фермента свидетельствуют также данные об отсутствии примесей других аминоксил-тРНК синтетаз, содержание которых определяли, используя смесь ¹⁴С-аминокислот гидролизата хлореллы и избыток ¹²С-треонина. Молекулярная масса треонил-тРНК синтетазы, по данным электрофореза в ПААГ, составляет 148000. Фермент представляет собой структурный димер, состоящий из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 74000. Аналогичная олигомерная структура и близкие молекулярные массы показаны для треонил-тРНК синтетаз из других прокариотических объектов [4, 5].

ISOLATION OF THREONYL-tRNA SYNTHETASE
FROM *THERMUS THERMOPHILUS*

A. D. Yaremchuk, M. A. Tukalo, S. P. Egorova, G. Kh. Matsuka

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

Summary

A method for isolation of high-purified threonyl-tRNA synthetase from *T. thermophilus* is described, including ammonium sulfate fractionation, chromatography on DEAE-sepharose, hydroxyapatite, heparine-sepharose and hydrophobic chromatography on Toyopearl HW-65. Yield of the purified enzyme was 9 mg from 1 kg of *T. thermophilus* cells. The enzyme is a dimer protein (α_2 type) with molecular mass of 148 kDa.

1. Grunberg-Manago M. Regulation of the expression of aminoacyl-tRNA synthetases and translation factors // *E. coli* and *S. typhimurium*: cellular and molecular biology / Eds J. L. Ingraham et al.—Washington, 1987.—P. 1386—1409.
2. Hedrick J. L., Smith A. J. Estimation of molecular weight by polyacrylamide gel electrophoresis // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1968.—126, N 1.—P. 155—164.
3. Weber K., Osborn M. The reability of molecular weight by dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis // *J. Biol. Chem.*—1969.—244, N 16.—P. 4406—4412.
4. Threonyl-transfer ribonucleic acid synthetase from *Escherichia coli*: subunit structure and genetic analysis of the structural gene by means of a mutated enzyme and of a specialized transducing lambda bacteriophage / H. Hennecke, A. Böck, J. Thomale, G. Nass // *J. Bacteriol.*—1977.—131, N 2.—P. 943—950.
5. Yamada H. Rapid purification of threonyl-tRNA synthetase from phosphocellulose // *J. Biochem.*—1978.—83, N 6.—P. 1583—1589.

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

Получено 01.11.88