

СИНТЕЗ НА ОДНОНИТЕВОЙ КОЛЬЦЕВОЙ ДНК ФАГА *M13*, НАПРАВЛЯЕМЫЙ ДНК-ПОЛИМЕРАЗой ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Д. О. Атаева, К. А. Марлыев, П. К. Куллыев, В. С. Михайлов

Введение. Инфекция клеток насекомых вирусом ядерного полиэдроа (ВЯП) приводит к появлению в инфицированных клетках вирусспецифичной ДНК-полимеразы [1, 2]. Этот фермент отличается от клеточных ДНК-полимераз α , β , γ по физико-химическим и энзиматическим свойствам и предположительно кодируется вирусным геномом. Используя специфическое мечение белков вируса после ВЯП-инфекции клеток *Spodoptera frugiperda*, Ванг и Келли [2] показали, что вирусная ДНК-полимераза является полипептидом с молекулярной массой 126 000. Получить в очищенном виде этот фермент и изучить его энзиматические свойства авторам не удалось. Ранее нами было показано, что после ВЯП-инфекции в куколках тутового шелкопряда возрастает активность хозяйской α -полимеразы и появляется вирусспецифичная ВЯП-полимераза. Необычным свойством ВЯП-полимеразы была высокая активность на однонитевой ДНК фага *M13* в отсутствие затравки. В настоящей работе мы провели очистку ВЯП-полимеразы из инфицированных куколок тутового шелкопряда, описали матричные свойства фермента и механизм утилизации ВЯП-полимеразой ДНК фага *M13*.

Материалы и методы. Однонитевую ДНК фага *M13* и ДНК плазмиды *pBR322* получали по описанным методам [3, 4]. Вирус ядерного полиэдроа получали и куколки тутового шелкопряда инфицировали, как описано ранее [5]. Суспензию ВЯП инъецировали в куколки на 3-й день метаморфоза. Инфицированные куколки инкубировали при 25 °С в течение 72 ч и собирали на жидком азоте. Процедура очистки ВЯП-полимеразы включала получение гомогената, супернатанта, фракционирование сульфатом аммония, хроматографию на фосфоцеллюлозе, оксиапатите и ультрацентрифугирование в градиенте глицерина (табл. 1). Экспериментальные детали выделения фермента будут описаны в отдельном сообщении. Препарат ВЯП-полимеразы хранили при -20 °С в буферном растворе А: 10 мМ фосфат калия, рН 7,5, 50 %-ный глицерин, 0,1 мМ ЭДТА, 5 мМ 2-меркаптоэтанол.

Т а б л и ц а 1

Выделение ВЯП-полимеразы из куколок тутового шелкопряда, инфицированных ВЯП
Purification of B. m. NPV-polymerase from silkworm pupae infected with NPV

№ стадии	Стадия	Белок, мг	ДНК-полимеразная активность, ед.**	Удельная активность, ед./мг	Коэффициент очистки
1	Гомогенат*	20900	4670	0,223	—
2	Супернатант	7780	5390	0,693	3,1
3	(NH ₄) ₂ SO ₄ -фракция	911	2520	2,76	12,4
4	Фосфоцеллюлоза	14,5	510	35,3	158
5	Оксиапатит	3,4	390	116	522
6	Градиент глицерина	0,2	91	471	2110

* Количество исходного материала составляло 46 куколок. ** Единицу активности определяют как включение 1 нмоля dNMP в ДНК за 30 мин.

Активность ВЯП-полимеразы определяли в реакционной смеси следующего состава: 100 мМ фосфат калия, рН 7,5, 10 мМ MgCl₂, 200 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА), 2 мМ дитиотрейтол, dATP, dCTP, dGTP — 25 мкМ каждый, 10 мкМ [³H]ТТР с удельной активностью 20 мКи/мл. В качестве матрицы использовали ДНК тимуса теленка, активированную ДНКазой I (125 мкг/мл), или ДНК фага *M13* (10 мкг/мл). Препарат ВЯП-полимеразы в буфере А добавляли до 1/5 конечного объема реакции 50 мкл. После инкубации при 37 °С в течение 30 мин реакцию останавливали и кислотонерастворимую радиоактивность определяли, как описано ранее [6]. Единицу

активности определяли как включение 1 нмоля dNMP в ДНК за 30 мин инкубации. Для седиментационного или электрофоретического анализа новообразованной ДНК реакцию останавливали добавлением ЭДТА до концентрации 20 мМ и DS-Na — до 1 %. ДНК собирали после гель-фильтрации на биогеле А-1,5 *m* и осаждали этанолом.

Щелочные градиенты сахарозы (5—20 %) готовили на буфере: 0,3 н. NaOH, 0,7 М NaCl, 5 мМ ЭДТА. Препараты центрифугировали в роторе SW 50.1 в течение 6 ч при 47 000 об/мин и 10 °С. Горизонтальный электрофорез ДНК проводили в геле 1 %-ной агарозы размером 12×8×0,5 см в буфере: 40 мМ трис-ацетат, рН 8,0, 20 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии DS-Na проводили по методу Лэммли [7] в плоском геле размером 14×12××0,14 см. Концентрирующий гель содержал 4 % акриламида, разделяющий — градиент 5—20 % или 5—15 % акриламида. Гель окрашивали серебром [8]. Ультрацентрифугирование ВЯП-полимеразы в градиенте глицерина (10—30 %) проводили, как описано ранее для ДНК-полимеразы α из икры выюна [9].

Результаты и обсуждение. Способность ВЯП-полимеразы к синтезу на ДНК фага *M13* позволила отделить активность вирусной ДНК-полимеразы от активности клеточных ДНК-полимераз в неочищенных экстрактах инфицированных куколок и разработать эффективный метод очистки вирусного фермента. В табл. 1 представлен способ получения частично очищенной ВЯП-полимеразы из инфицированных куколок тутового шелкопряда. Фракционирование экстракта куколок сульфатом аммония позволило получить две фракции, одна из которых обогащена клеточной α -полимеразой, а другая — ВЯП-полимеразой. Полное разделение этих ферментов было достигнуто при хроматографии на фосфоцеллюлозе. ДНК-полимераза α элюируется с ионообменника при концентрации KCl 0,3 М, тогда как ВЯП-полимераза — при 0,44 М. После хроматографии на оксиапатите и ультрацентрифугирования в градиенте глицерина был получен препарат ВЯП-полимеразы, очищенный примерно в 2 000 раз. Электрофорез в полиакриламидном геле выявил наличие в препарате ряда балластных белков. Идентификация ВЯП-полимеразы как полипептида с молекулярной массой 136 000 была сделана после дополнительной хроматографии препарата на гепарин-сефарозе, в результате которой может быть получен близкий к гомогенности препарат фермента. После гепарин-сефарозы ВЯП-полимераза была нестабильна и теряла 50 % активности за 5 ч при 4 °С. Добавление БСА до 100 мкг/мл предотвращало инактивацию фермента. В работе анализировали частично очищенные препараты ВЯП-полимеразы после стадии ультрацентрифугирования в градиенте глицерина (стадия 6, табл. 1), которые были очищены в 2 100—4 800 раз и не теряли активности в течение нескольких месяцев хранения при —20 °С.

Таблица 2

Матричная специфичность ВЯП-полимеразы

Template specificity of *B. m.* NPV-polymerase

Матрица	Концентрация, мкг/мл	ДНК-полимеразная активность, нмоль dNMP
Нативная ДНК	100	15,0
Денатурированная ДНК	100	16,1
Активированная ДНК	100	37,8
poly(A)	50	0,42
poly(A)·oligo(dT)	50·10	0,38
poly(dA)	50	1,0
poly(dA)·oligo(dT)	50·10	276
ДНК фага <i>M13</i>	50	46,0
ДНК плазмиды <i>pBR322</i>	20	20,3

В табл. 2 представлены матричные свойства ВЯП-полимеразы. Фермент не использует в качестве матрицы poly(A), но обнаруживает высокую активность при использовании poly(dA). В этом отношении он напоминает ДНК-полимеразу, обнаруженную ранее в препаратах

ВЯП большой вошинной моли [10]. Активность на poly (dA) абсолютно зависит от присутствия затравочного фрагмента oligo(dT). Синтез на природных ДНК является матричным процессом, поскольку удаление из реакционной смеси любого из dNTP приводит к полному подавлению синтеза. Константа Михаэлиса для dTTP при синтезе на активированной ДНК равна 0,38 мкМ. K_m для активированной ДНК равна 8,2 мкМ (2,7 мкг/мл). Обращает на себя внимание высокая активность ВЯП-полимеразы на кольцевых ДНК фага *M13* и плазмиды *pBR322*, лишенных

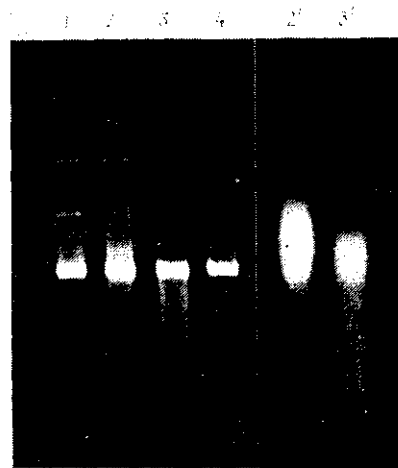
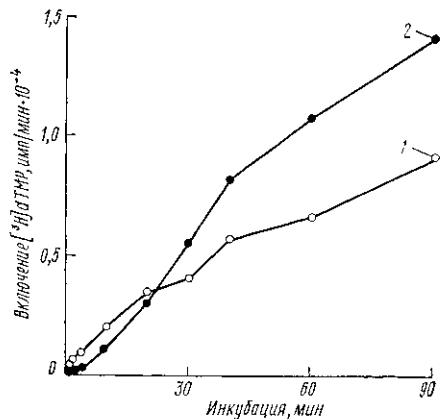


Рис. 1. Кинетика синтеза ДНК ВЯП-полимеразой на активированной ДНК (1) и на ДНК фага *M13* (2).

Fig. 1. Kinetics of DNA synthesis by NPV polymerase on the activated DNA (1) and phage *M13* DNA (2).

Рис. 2. Электрофорез в 1%-ной агарозе ДНК фага *M13*: 1 — без инкубации в реакционной смеси; 2 — после инкубации в реакционной смеси с ВЯП-полимеразой в присутствии 10 мкМ, 150 мкКи/мл $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$; 3 — как 2, но после тепловой денатурации (100 °С, 5 мин); 4 — как 1, но после тепловой денатурации (100 °С, 5 мин); 1—4 — окраска бромистым этидием; 2', 3' — автордиография дорожек 2, 3.

Fig. 2. Gel electrophoresis of phage *M13* DNA in 1% agarose 1-4 — ethidium bromide staining: 1 — without incubation; 2 — after incubation in the reaction mixture with B. m. NPV polymerase in the presence of $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$; 3 — the same as 2 but after thermal denaturation (100 °C, 5 min); 4 — the same as 1 but after thermal denaturation (100 °C, 5 min). 2', 3' — autoradiographs of tracks 2, 3.

затравочных 3'-ОН-концов. K_m фермента для ДНК *M13* оказывается ниже, чем для активированной ДНК, и составляет 2,3 мкМ (0,78 мкг/мл).

Способность к синтезу на ДНК фага *M13* может быть обусловлена присутствием в препарате ВЯП-полимеразы ДНК-праймазной активности. Ранее комплекс ДНК-полимеразы α и ДНК-праймазы был выделен нами из грены тутового шелкопряда [11]. Активность этого комплекса на ДНК *M13* абсолютно зависит от присутствия гNTP в реакционной смеси. Однако активность ВЯП-полимеразы на ДНК *M13* наблюдается в отсутствие гNTP и не стимулируется при добавлении гNTP в реакционную смесь. Обработка смеси dNTP перед реакцией периодатом натрия для удаления возможной примеси гNTP не снимает способности ВЯП-полимеразы инициировать синтез ДНК фага *M13*. Эти данные свидетельствуют против инициирования синтеза на ДНК *M13* с участием ДНК-праймазы.

На рис. 1 представлена кинетика включения метки ВЯП-полимеразой в активированную ДНК и ДНК фага *M13*. В отличие от синтеза на активированной ДНК, протекающего с высокой скоростью с начала инкубации при 37 °С, синтез на ДНК *M13* протекает с низкой скоростью в течение первых 3—5 мин инкубации. Это свидетельствует о наличии в полимеризующей реакции на ДНК *M13* lag-периода, в течение которого происходит активация системы.

Электрофоретический анализ в агарозе продукта синтеза на ДНК *M13* (рис. 2) позволяет сделать следующие заключения: 1) в ходе синтеза происходит увеличение молекулярной массы матричных молекул; 2) после тепловой денатурации новосинтезированная ДНК высвобождается из комплекса с матрицей и представлена гетерогенными полинуклеотидами; 3) в ходе синтеза не наблюдается существенной деградации ДНК *M13*. Однако в условиях электрофореза не могут быть разделены интактные молекулы ДНК фага и молекулы, несущие один разрыв.

Рис. 3. Ультрацентрифугирование новообразованной ВЯП-полимеразой ДНК фага *M13* в щелочном 5—20 %-ном градиенте сахарозы: 1—5 мин синтеза в присутствии 10 мкМ [α - 32 P]dTTP; 2—как 1+25 мин синтеза после добавления 1 мМ dTTP; 3—30 мин синтеза в присутствии 10 мкМ [α - 32 P]dTTP. Включение, равное 5984 (1), 4539 (2) и 121 409 (3) имп/мин, принято за 100 %. Стрелкой указано положение ДНК фага *M13* в градиенте.

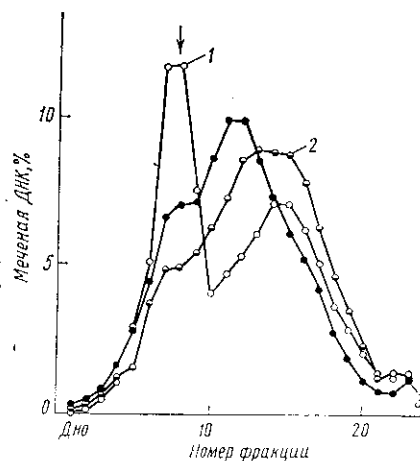


Fig. 3. Alkaline sucrose gradient (5-20 %) ultracentrifugation of phage *M13* DNA labelled by B. m. NPV polymerase: 1—5 min of the synthesis in the presence of 10 μ M [α - 32 P]dTTP, 2—5 min of the synthesis in the presence of 10 μ M [α - 32 P]dTTP followed by 25 min of the synthesis after the addition of 1 mM dTTP, 3—30 min of the synthesis in the presence of 10 μ M [α - 32 P]dTTP. Incorporations of [α - 32 P]dTTP into DNA equal to 5984 (1), 4539 (2) and 121 409 (3) cpm are taken as 100 %. The arrow shows the position of phage *M13* DNA.

При ультрацентрифугировании в щелочных градиентах сахарозы новообразованная за 5 мин инкубации ДНК представлена молекулами длиной, примерно равной размеру ДНК *M13*, и гетерогенными по размеру фрагментами (рис. 3). Дополнительные 25 мин синтеза в условиях 100-кратного разбавления меченого предшественника ([α - 32 P]dTTP) немеченым аналогом (dTTP) приводят к увеличению фракции гетерогенных фрагментов. Эти данные указывают на присутствие в препарате нуклеазной активности.

Наличие эндонуклеазной активности в препарате ВЯП-полимеразы было выявлено после инкубации ДНК плазмиды *pBR322* и фага *M13* в реакционной смеси в присутствии фермента (рис. 4). Характерным свойством эндонуклеазы является специфичность в отношении двунитевой ДНК. Переход ковалентно замкнутой ДНК плазмиды *pBR322* в релаксированную форму происходит со скоростью, примерно на порядок большей, чем деградация ДНК фага *M13*. Соответствующий расчет, учитывающий размер молекул ДНК фага и плазмиды, а также одноударный механизм перехода из формы I в форму II для ДНК *pBR322* и двуударный механизм распада зоны интактных молекул ДНК *M13* показали, что одностранные разрывы в двунитевой ДНК возникают под действием эндонуклеазы в 5,6 раза чаще, чем на той же длине (в нуклеотидах) одностранный разрыв. Полученную оценку специфичности эндонуклеазы в отношении двунитевой ДНК можно рассматривать как минимальную, поскольку природные одностранные ДНК, в том числе ДНК *M13*, обладают несовершенной вторичной структурой и не являются полностью одностранными. Эндонуклеаза является Mg^{2+} -зависимым ферментом и не активна при замене Mg^{2+} на Ca^{2+} (рис. 5). При низкой концентрации фосфата калия фермент вызывает появление двунитевых разрывов в ДНК, а при концентрации фосфата выше 100 мМ в ДНК образуются одностранные разрывы. Фосфат калия в концентрации выше 100 мМ ингибирует нуклеазу.

Эндонуклеаза может быть отделена от полимеразы при ультрацентрифугировании в градиенте глицерина (рис. 6). В присутствии 200 мМ фосфата калия нуклеаза имеет седиментационный коэффициент около 3 S. Помимо ДНК-полимеразной активности на активированной ДНК во фракциях градиента обнаруживается активность на ДНК *M13*.

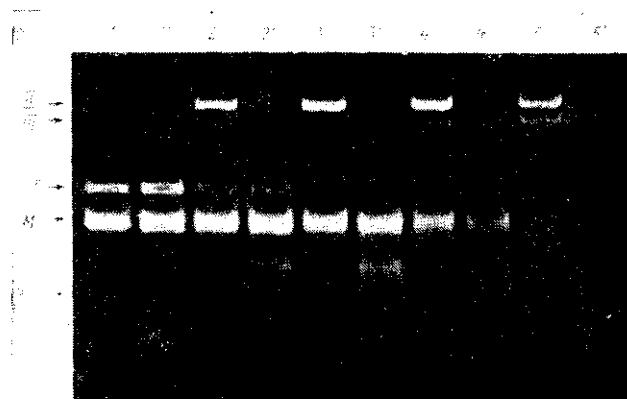


Рис. 4. Электрофорез в 1 %-ной агарозе с 1 мкг/мл бромистого этидия ДНК плазмиды *pBR322* и фага *M13* после инкубации в реакционной смеси с ВЯП-полимеразой в течение 0 (1, 1'); 5 (2, 2'); 15 (3, 3'); 30 (4, 4') и 60 мин (5, 5'); 1'-5' — после тепловой денатурации (100 °С, 5 мин); I, II, III — формы ДНК плазмиды *pBR322*; M — положение ДНК фага *M13* в геле.

Fig. 4. Gel electrophoresis of plasmid *pBR322* DNA and phage *M13* DNA in 1 % agarose with 1 µg/ml ethidium bromide after incubation in the reaction mixture with B. m. NPV polymerase for 0 min (1, 1'), 5 min (2, 2'), 15 min (3, 3'), 30 min (4, 4') and 60 min (5, 5'). 1'-5' — the same as 1-5 but after thermal denaturation (100 °C, 5 min). I, II, III — forms of plasmid *pBR322* DNA; M — the position of phage *M13* DNA in gel.

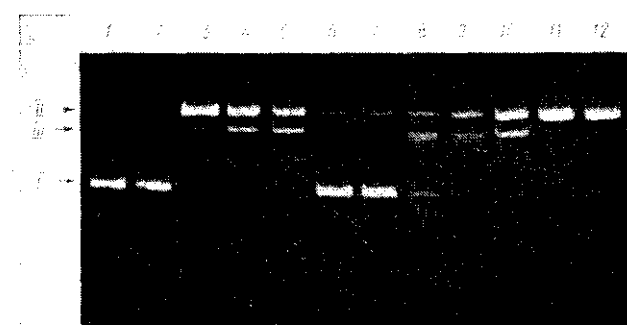


Рис. 5. Электрофорез в 1 %-ной агарозе с 1 мкг/мл бромистого этидия ДНК плазмиды *pBR322* после инкубации в реакционной смеси без фермента (1) и в присутствии ВЯП-полимеразы (2—12) в условиях: концентрация $MgCl_2$ равна 0 (2); 2 (3); 5 (4); 10 мМ (5); без $MgCl_2$ в присутствии $CaCl_2$ в концентрации 2 (6); 5 мМ (7); в присутствии 10 мМ $MgCl_2$ при концентрации фосфата калия (рН 7,5), равной 0 (8); 50 (9); 100 (10); 150 (11); 200 мМ (12). I, II, III — формы ДНК *pBR322*.

Fig. 5. Gel electrophoresis of plasmid *pBR322* DNA in 1 % agarose with 1 µg/ml ethidium bromide after incubation in the reaction mixture without enzyme (1) and with B. m. NPV polymerase (2-12) under the following conditions: $MgCl_2$ concentration of 0 mM (2), 2 mM (3), 5 mM (4), 10 mM (5); without $MgCl_2$ at $CaCl_2$ concentration of 2 mM (6), 5 mM (7); with 10 mM $MgCl_2$ at potassium phosphate (pH 7.5) concentration of 0 mM (8), 50 mM (9), 100 mM (10), 150 mM (11), 200 mM (12). I, II, III — forms of plasmid *pBR322* DNA.

Распределение активности на ДНК *M13* по фракциям градиента сдвинуто относительно распределения полимеразной активности на активированной ДНК в низкомолекулярную область градиента, т. е. в зону, где седиментирует эндонуклеаза. Добавление материала из фракций, содержащих нуклеазу, к фракциям, содержащим ВЯП-полимеразу, приводит к увеличению полимеразной активности на ДНК *M13*. Так, в одном из опытов ДНК-полимеразные активности на ДНК *M13* в

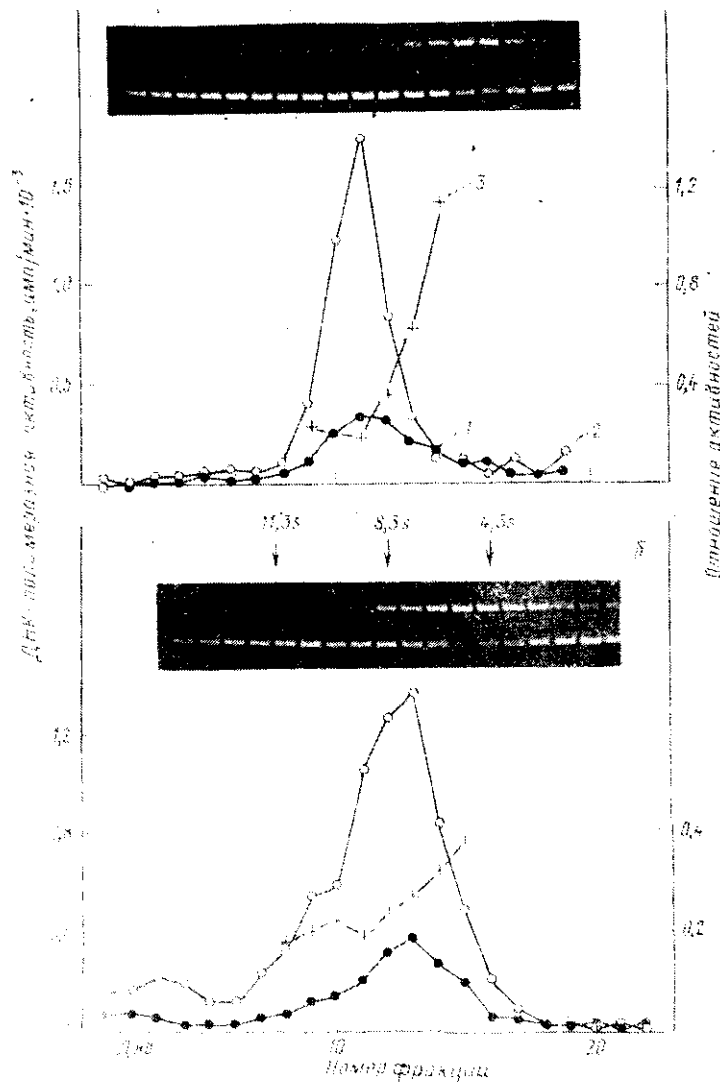


Рис. 6. Повторное ультрацентрифугирование препарата ВЯП-полимеразы в 10—30 % -ном градиенте глицерина в присутствии 200 (а) и 50 мМ (б) фосфата калия (рН 7,5). Представлены ДНК-полимеразные активности на ДНК фага *M13* (1), активированной ДНК (2), а также отношение указанных активностей (3). Электрофограммы представляют эндонуклеазную активность фракций, определенную на ДНК плазмиды *pBR322*. Стандарты: каталаза (11,3 S), альдолаза (8,3 S), БСА (4,3 S).

Fig. 6. Second glycerol gradient (10-30 %) ultracentrifugation of *B. m.* NPV polymerase in the presence of 200 mM (a) and 50 mM (b) potassium phosphate (pH 7.5). DNA polymerase activities on phage *M13* DNA (1), activated DNA (2) and a ratio of the activities (3) are shown. Electrophoregrams show the endonuclease activity in the gradient fractions determined by means of plasmid *pBR322* DNA. Standards: catalase (11.3 S), aldolase (8.3 S), BSA (4.3 S).

аликвотах по 5 мкл из фракций градиента, соответствующих ВЯП-полимеразе в эндонуклеазе, а также их смеси были равны соответственно 10 800, 1 080 и 38 980 имп/мин. Снижение концентрации соли в градиенте с 200 до 50 мМ фосфата калия приводит к агрегации ДНК-полимеразной и эндонуклеазной активностей. Об этом свидетельствуют гетерогенные распределения ферментативных активностей в градиенте и увеличение седиментационных коэффициентов.

Полученные данные позволяют предложить следующую схему синтеза на ДНК фага *M13*, осуществляемого частично очищенным препаратом ВЯП-полимеразы. Активация системы обеспечивается активностью эндонуклеазы. Эндонуклеаза генерирует затравочные 3'-ОН-концы в ДНК *M13*, преимущественно в двунитевых участках, которые могут являться матрицей для ВЯП-полимеразы. В ходе синтеза происходит удлинение двунитевой области ДНК, что делает вовлеченные в синтез молекулы ДНК *M13* избирательной мишенью для нуклеазы. Последним обстоятельством объясняется появление гетерогенных по размеру меченых фрагментов в условиях, когда основная масса молекул ДНК *M13* в реакционной смеси не деградировала (рис. 2). Атакуемый нуклеазой двунитевый участок ДНК *M13* может являться «шпилькой» или быть образованным двумя отстоящими друг от друга участками молекулы.

Природные однонитевые кольцевые ДНК являются матрицей для репликативных комплексов, содержащих ДНК-полимеразу и ДНК-праймазу. Подобный комплекс был выделен нами ранее из гены тутового шелкопряда [11]. Его активность на ДНК *M13* инициируется образованием короткой РНК-затравки. В настоящей работе описан другой механизм инициации синтеза на ДНК *M13*, который состоит в образовании затравки специфической эндонуклеазной атакой двунитевого участка ДНК.

Авторы выражают признательность проф. И. Б. Збарскому за ценные советы при выполнении настоящей работы.

SYNTHESIS ON SINGLE-STRANDED CIRCULAR PHAGE *M13* DNA BY DNA POLYMERASE OF NUCLEAR SILKWORM POLYHEDROSIS VIRUS

D. O. Atueva, K. A. Marlyev, P. K. Kullyev, V. S. Mikhailov

Institute of Zoology, Academy of Sciences of the Turkmen SSR, Ashkhabad;
N. K. Koltzov Institute of Developmental Biology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

A virus-induced DNA polymerase (*B. m.* NPV polymerase) was purified from the silkworm *Bombyx mori* pupae infected with nuclear polyhedrosis virus (*B. m.* NPV). NPV polymerase is a polypeptide with a molecular weight of 136 kDa and a sedimentation coefficient of 6.3 S. As a template, *B. m.* NPV polymerase prefers polydeoxynucleotide poly(dA) with a primer (dT)₁₀ and is inactive when using poly(A). Partially purified *B. m.* NPV polymerase is active on the single-stranded circular phage *M13* DNA in the absence of a primer. The ability to utilize phage *M13* DNA as a template is due to the presence of a Mg²⁺-dependent endonuclease specific to double-stranded DNA in the preparations of *B. m.* NPV polymerase. The endonuclease exists in the *B. m.* NPV polymerase preparations after ammonium sulphate fractionation, phosphocellulose and hydroxyapatite chromatography but may be separated from *B. m.* NPV polymerase by glycerol gradient ultracentrifugation in the presence of 200 mM potassium phosphate. At the lower salt concentrations *B. m.* NPV polymerase and the endonuclease reveal a tendency to aggregation.

1. Miller L. K., Jewell J. E., Browne D. Baculovirus induction of a DNA polymerase.— *J. Virol.*, 1981, **40**, N 1, p. 305—308.
2. Wang X., Kelly D. C. Baculovirus replication: purification and identification of the *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus-induced DNA polymerase.— *J. Gen. Virol.*, 1983, **64**, N 10, p. 2229—2236.
3. Zinder N. D., Boeke J. D. The filamentous phage (Ff) as vectors for recombinant DNA — a review.— *Gene*, 1982, **19**, N 1, p. 1—10.
4. Zaslouff M., Ginder G., Felsenfeld G. A new method for the purification and identification of covalently-closed circular DNA molecules.— *Nucl. Acids Res.*, 1978, **5**, N 4, p. 1139—1152.
5. The nucleic acid of nuclear-polyhedrosis virus of the silkworm/K. Onodera, T. Komano, M. Himeno, F. Sakai.— *J. Mol. Biol.*, 1965, **13**, N 2, p. 532—539.

6. Mikhailov V. S., Gulyamov D. B. Changes in DNA polymerase α , β , γ activities during early development of the teleost fish *Misgurnus fossilis* (loach).— Eur. J. Biochem., 1983, 135, N 2, p. 303—306.
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. Oakley B. R., Kirsch D. R., Morris N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels.— Anal. Biochem., 1980, 105, N 2, p. 361—363.
9. Михайлов В. С., Гулямов Д. Б. Выделение двух форм ДНК-полимеразы α из икры вьюна. Физико-химическая характеристика изоферментов.— Биохимия, 1983, 48, № 9, с. 1530—1537.
10. ДНК-полимеразная активность вируса ядерного полиэдроза большой вошинной моли / А. В. Рындич, Л. П. Сутугина, В. М. Кавсан и др.— Докл. АН УССР. Сер. Б, 1975, № 4, с. 347—349.
11. Выделение репликативного комплекса, содержащего ДНК-полимеразу α и ДНК-праймазу, из гены тутового шелкопряда *Bombyx mori* / В. С. Михайлов, Д. О. Атаева, К. А. Марлыев, П. К. Куллыев.— Докл. АН СССР, 1984, 275, № 2, с. 502—505.

Ин-т зоологии ТССР, Ашхабад
Ин-т биологии развития
им. Н. К. Кольцова АН СССР, Москва

Получено 22.01.85

УДК 577.213.32

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ α И β ИЗ ЭМБРИОНОВ МОРСКОГО ЕЖА

Л. Л. Терентьев, Н. А. Терентьева, В. А. Рассказов

Исследование биосинтеза ДНК в клетках эукариот является одной из центральных проблем молекулярной биологии. Согласно современным представлениям синтез ДНК осуществляется мультиферментным комплексом, ключевую роль в котором играют ДНК-полимеразы. В клетках эукариот обнаружены три типа ДНК-полимераз, которые в соответствии со своими физико-химическими свойствами классифицированы как α , β и γ [1]. В яйцеклетках и эмбрионах морского ежа, как и в других эукариотических клетках, присутствует несколько отличающихся по свойствам ДНК-полимераз [2, 3]. Впервые из клеток эмбрионов морского ежа была выделена Лебом [4] высокомолекулярная ДНК-полимераза, впоследствии классифицированная как ДНК-полимераза α . Сузуки-Хори и др. [5], а также Хобарт и Инфант [6] выделили ДНК-полимеразу, напоминающую по своим свойствам ДНК-полимеразу β эукариот. Однако сравнительный анализ свойств этих ферментов затруднен тем, что эти ферменты выделяли из эмбрионов морских ежей разных видов и на разных стадиях развития. К тому же основное внимание исследователи уделяли характеристике лишь основных физико-химических свойств ферментов, необходимых для отнесения ферментов к соответствующему классу ДНК-полимераз. В то же время для выяснения функций этих ферментов необходимо исследовать молекулярный механизм синтеза ДНК, осуществляемый ДНК-полимеразами, в частности, взаимодействие ДНК-полимераз с различными участками матрицы-затравки, характер копирования матрицы и эффективность утилизации одноцепочечного пробела.

В настоящей работе обобщены результаты исследования двух ДНК-полимераз — α и β , выделенных из клеток эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* [7—10].

Для исследования спектра ДНК-полимераз суммарный белковый препарат из эмбрионов морского ежа был подвергнут хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Как видно из рис. 1, в результате хроматографии обнаруживают три белковые фракции, обладающие ДНК-полимеразной активностью. Анализ молекулярной массы ДНК-полимераз, входящих в активные фракции, и исследование чувствительно-