



УДК 577.217.337.32

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕЙЦИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ ИЗ ТКАНЕЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Л. Л. Иванов, Р. Р. Стапуленис, Л. Ю. Лукошавичюс

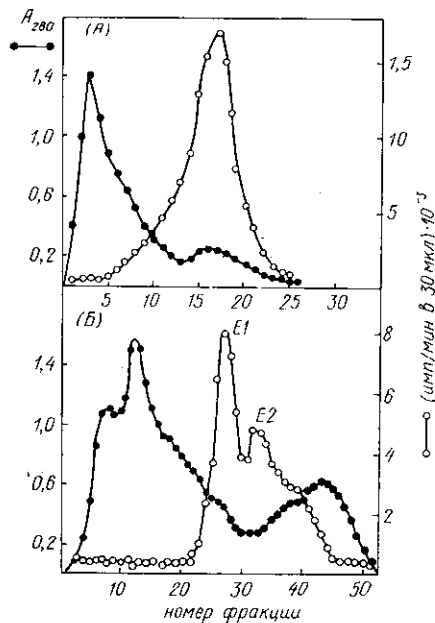
Изучению структуры и функциональных свойств лейцил-тРНК-синтазы (лейРС) (КФ 6.1.1.4) посвящены работы ряда авторов, однако эти исследования, в основном, выполнены на ферментах, выделенных из бактериальных и растительных объектов [1]. Что касается лейРС тканей млекопитающих, то к настоящему времени выделен и изучен гомогенный препарат фермента только из молочной железы коров [2].

В данной работе описано выделение лейРС из печени кролика и миокарда свиньи и приведены результаты изучения некоторых физико-химических свойств фермента.

Материалы и методы. Аминоацилирование тРНК. Стандартная смесь для определения скорости образования лейцил-тРНК печени кроликов содержала в 0,1 мл: 15 мкмоль трис-НСl, рН 8,2, 1 мкмоль АТФ, 0,5 мкмоль MgCl₂, 1,5 мкмоль KCl, 0,1 мкмоль [¹⁴C]-лейцина и 100 мкг суммарной тРНК печени. Реакционная смесь для определения активности лейРС миокарда свиньи отличалась лишь количеством тРНК — 40 мкг и величиной рН — 7,6. Фермент вносили в инкубационную смесь в количестве 2—5 мкг. Время инкубации 5 мин при 25 °С. Молекулярные массы ферментов определяли по методу Хедрика и Смита [3].

Выделение лейцил-тРНК-синтазы. ЛейРС из печени кролика выделяли, используя в качестве основы схемы, предложенные для выделения этих ферментов из *Escherichia coli* [4] и молочной железы коров [2]. Очистка фермента состояла из следующих этапов: получение пострибосомальной надосадочной жидкости, хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе при рН 8,2, осаждение белков сульфатом аммония (65 % от насыщения), хроматография на оксиапатите при рН 6,8, гельхроматография на сефадексе G-150 и хроматография на оксиапатите при рН 8,0.

Отличия в схеме очистки лейРС из миокарда свиньи состояли в следующем: 1) белки осаждали из пострибосомаль-



Хроматография частично очищенной лейцил-тРНК-синтазы печени кроликов (А) и миокарда свиньи (Б) на оксиапатите при рН 6,8.

Chromatography of the partially purified leucyl-tRNA-synthetase from rabbit liver (A) and from pig myocardium (B) on the hydroxylapatite column рН 6.8.

ной надосадочной жидкости сульфатом аммония, диализировали, а затем фракционировали на ДЭАЭ-целлюлозе при рН 8,2; 2) применили дополнительный этап очистки — хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе при рН 6,8.

Результаты и их обсуждение. Используя описанные выше схемы выделения ферментов, удалось очистить лейРС из печени кролика и миокарда свиньи в 260 и 60 раз соответственно. Указанная величина кратности очистки фермента из миокарда значительно ниже истинной. Это объясняется тем, что полученный фермент значительно теряет активность в процессе очистки.

В отличие от фермента печени, лейРС миокарда при хроматографии на окспаптитате разделяется на два компонента: E_1 и E_2 (рис). Аналогичное разделение наблюдается при хроматографии частично очищенной лейРС миокарда на ДЭАЭ-сефадексе А-50 при рН 7,5.

О высокой степени чистоты фермента печени и E_1 миокарда свидетельствуют данные аналитического электрофореза в полиакриламидном геле, а также данные о практическом отсутствии примесей других аминоксил-тРНК-синтетаз (АРСаз). Методом

Свойства лейцил- тРНК-синтетазы из тканей млекопитающих
Properties of Leucyl-tRNA-Synthetase from the Mammalian Tissues

Каталитические свойства	Печень кролика	Миокард свиньи	
		E_1	E_2
Km			
АТР, $M \cdot 10^{-4}$	1,6	3,8	—
лейцин, $M \cdot 10^{-5}$	1,9	0,7	2,8
тРНК, $M \cdot 10^{-6}$	0,6	2,0	0,2
V_{\max} , $M/мин/мг \cdot 10^{-6}$	18,0	21,2	—
Молекулярная масса	185000	158000	800000

электрофореза при разных концентрациях полиакриламидного геля (5—8 %) по Хедрику и Смуту [3] установлено, что молекулярная масса лейРС печени кролика составляет 185000, а E_1 миокарда свиньи — 158000. Что касается E_2 миокарда, то его молекулярная масса составляет приблизительно 800000. Чрезвычайно высокое значение молекулярной массы этого компонента позволило предположить, что он представляет собой комплекс АРСаз. В пользу этого предположения свидетельствуют образование [^{14}C]-аминоацил-тРНК при использовании смеси [^{14}C]-аминокислот гидролизата хлореллы с добавлением 100-кратного избытка нерадиоактивного лейцина, а также седиментационные свойства E_2 . Установлено, что E_2 содержит лизил- и глутамил-тРНК-синтетазные активности.

Следующий этап исследований был посвящен изучению оптимальных условий аминокислотирования для лейРС печени и двух форм лейРС миокарда. Показано, что оптимальное значение рН для фермента из печени кроликов составляет 8,2, а для фермента из миокарда свиньи — 7,6. Количество тРНК, не лимитирующее начальную скорость образования лейцил-тРНК миокарда, составляет 40 мкг в 0,1 мл, что значительно ниже, чем в случае фермента печени (100 мкг в 0,1 мл). Различия в оптимальных условиях аминокислотирования для E_1 и E_2 миокарда свиньи не обнаружены.

В последующей серии экспериментов были изучены кинетические характеристики реакции аминокислотирования. Данные обрабатывали методом двойных обратных величин Лайнуивера-Берка [5]. Значения Km и V_{\max} для лейРС печени и миокарда (таблица) являются величинами одного порядка и типичны для этого класса ферментов.

Таким образом, проведено сравнение свойств лейцил-тРНК-синтетаз из двух объектов животного происхождения — печени кролика и миокарда свиньи. Согласно нашим данным, изученные ферменты имеют более высокие значения молекулярных масс, чем лейРС из большинства других объектов. Высокая молекулярная масса, практически сравнимая с молекулярными массами исследованных ферментов, установлена лишь для лейРС из семян желтого люпина [6] и молочной железы коров [2]. Различия в молекулярных массах лейРС печени кролика и миокарда свиньи могут быть связаны с разными размерами полипептидных цепей их мономеров либо с наличием в ферменте из печени кролика углеводного компонента, что показано для некоторых эукариотических АРСаз [7].

Наличие двух форм лейРС миокарда связано со способностью эукариотических ферментов образовывать высокомолекулярные комплексы [7]. Так, разделение при хроматографии практически в равных количествах на свободную и связанную в комплексе

формы показано для аргинил-тРНК-синтетазы из печени крыс [8] и аспарагил-тРНК-синтетазы из шишковидной железы свиньи [9]. Отсутствие ассоциированной формы лейПС печени может быть связано с меньшей стабильностью АРСазного комплекса либо с невозможностью тестировать его в данных экспериментальных условиях. Дальнейшие исследования направлены на выяснение этих вопросов.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF LEUCYL-tRNA-SYNTHEASE FROM THE MAMMALIAN TISSUES

L. L. Ivanov, R. R. Stapulionis, L. J. Lukoševičius

Medical Institute, Kaunas

Summary

The method of purification of leucyl-tRNA-synthetase (LeuRS) from rabbit liver and pig myocardium is described. Two forms (E_1 and E_2) of LeuRS are distinguished by hydroxylapatite chromatography of partially purified enzyme from pig myocardium. The molecular mass was calculated to be 185000 for LeuRS from rabbit liver and 158000 for E_1 from pig myocardium. E_2 is stated to contain aminoacyl-tRNA synthetase activities of other amino acid specificities and is a complex of enzymes with molecular mass of about 800000.

1. *Joachimiak A., Barciszewski J.* Amino acid: tRNA ligases (EC 6.1.1.).—FEBS Lett., 1980, **119**, N 2, p. 201—211.
2. *Выделение и характеристика лейцил-тРНК-синтетазы из молочной железы коров / О. И. Гудзера, А. В. Ельская, Г. В. Овчаренко и др.—Молекуляр. биология, 1979, 13, № 3, с. 550—557.*
3. *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.
4. *Purification of leucyl transfer ribonucleic acid synthetase from Escherichia coli / Н. Hayashi, J. R. Knowles, J. R. Katze et al.—J. Biol. Chem., 1970, 245, N 6, p. 1401—1406.*
5. *Корниш-Бодуэн Э.* Основы ферментативной кинетики.—М.: Мир, 1979.—280 с.
6. *Legocki A. B., Pawelkiewicz J.* Amino acid activating enzymes in yellow lupin seeds, and purification on leucyl-tRNA synthetase.—Acta biochim. pol., 1967, **14**, N 3, p. 3131—3138.
7. *Dang C. V., Johnson D. L., Vang D. C. H.* High molecular mass amino acyl-tRNA synthetase complexes in eukaryotes.—FEBS Lett., 1982, **142**, N 1, p. 1—6.
8. *Deutcher M. P., Ni R. C.* Purification of a low molecular weight form of rat liver arginyl-tRNA synthetase.—J. Biol. Chem., 1982, **257**, N 11, p. 6003—6006.
9. *Vellekamp G. J., Kull F. J.* Allotropism of aspartyl-tRNA-synthetase from porcine thyroid.—Eur. J. Biochem., 1981, **118**, N 2, p. 261—269.

Каунас. мед. ин-т

Получено 26.10.84

УДК 575.113.576.851.5:576.851.48

ИЗУЧЕНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ ЛИЗИНОВОГО ОПЕРОНА У *BACILLUS SUBTILIS*

З. М. Алексиева, Т. Н. Шевченко, С. С. Малюта

Биосинтез лизина у микроорганизмов осуществляется в девять стадий [1]. Наиболее полно организация оперона биосинтеза лизина и регуляция его экспрессии изучена у *E. coli*. Лизиновые гены у этого вида микроорганизмов расположены в нескольких областях хромосомы [2], не образуя единой группы сцепления. Чрезвычайно мало данных о структуре лизинового оперона *Bacillus subtilis* — вида микроорганизмов, широко используемого в микробиологической промышленности для получения биологически активных метаболитов. Ранее нами были клонированы *Sall*-, *BglII*-фрагменты ДНК *B. subtilis*, содержащие ряд генов биосинтеза лизина [3, 4]. Однако рекомбинантные плазмиды *pLRS33* и *pLRB4*, содержащие эти гены, несли также регуляторную область опе-