

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXVIII, 28

SECTIO C

1973

Institut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Biologii Molekularnej

Andrzej STĄCZEK

Izolacja kompleksów DNA-białko u *Escherichia coli*

Изоляция комплексов ДНК-белок у *Escherichia coli*

Isolation of the Complexes DNA-Protein in *Escherichia coli*

Istnieje wiele metod izolacji bakteryjnych kompleksów DNA z białkami, jak: frakcjonowanie wirowanie (12), ekstrakcja w układzie dwufazowym (3), chromatografia na Sephadexie G 200 (8) i chromatografia na DNA-celulozie (1). Wśród nich najbardziej swoista wydaje się chromatografia na DNA-celulozie, jakkolwiek zastosowanie jej do celów preparatywnych jest utrudnione.

Celem niniejszej pracy jest zastosowanie chromatografii filtracyjnej do izolacji kompleksów DNA-białko i wstępna charakterystyka składnika białkowego kompleksu.

MATERIAŁ I METODY

Bakterie. Prototroficzny szczep *E. coli* CA-7 hodowano w 37°C na podłożu płynnym z glukozą w ciągu 4,5 godz. do osiągnięcia fazy stacjonarnej. Następnie bakterie odwirowywano, odmywano od resztek pożywki i ponownie odwirowywano (7 000 g). Masę bakteryjną przechowywano w temp. -15°C.

Przygotowywanie ekstraktu bakteryjnego. Ekstrakt przygotowywano przestrzegając niskiej temperatury (2-4°C). Bakterie dezintegrowano, ucierając je w móżdżerku na lepką masę z 4-krotną ilością korundu (5), ekstrahowano 2-krotną ilością buforu zawierającego 0,05 m Tris-HCl i 0,1 m NaCl, pH 7,4 i usuwano korund przez wirowanie w ciągu 10 min. przy 2 000 g. Klarowny, bezkomórkowy ekstrakt otrzymywano przez 30-minutowe wirowanie przy 20 000 g. Rybosomy z bezkomórkowego ekstraktu usuwano przez wytrącanie siarczanem amonu dodawanym do 15-20% nasycenia. Wytrącone rybosomy i część białek cytoplazmatycznych odwirowywano przy niskiej sile odśrodkowej i osad odrzucono. Jedynie minimalne ilości DNA znajdowano w osadzie. Supernatant dializo-

wano przez noc wobec buforu używanego do równoważenia żelu (0,05 m Tris-HCl i 0,1 NaCl; pH 7,4), a następnie zagęszczano w chłodni do małej objętości przy pomocy środka wiążącego wodę — Aquacide. Tak otrzymany materiał poddawano filtracji na kolumnach zawierających Bio-Gel P-300, Sepharozę 2 B lub Sephadex G 200.

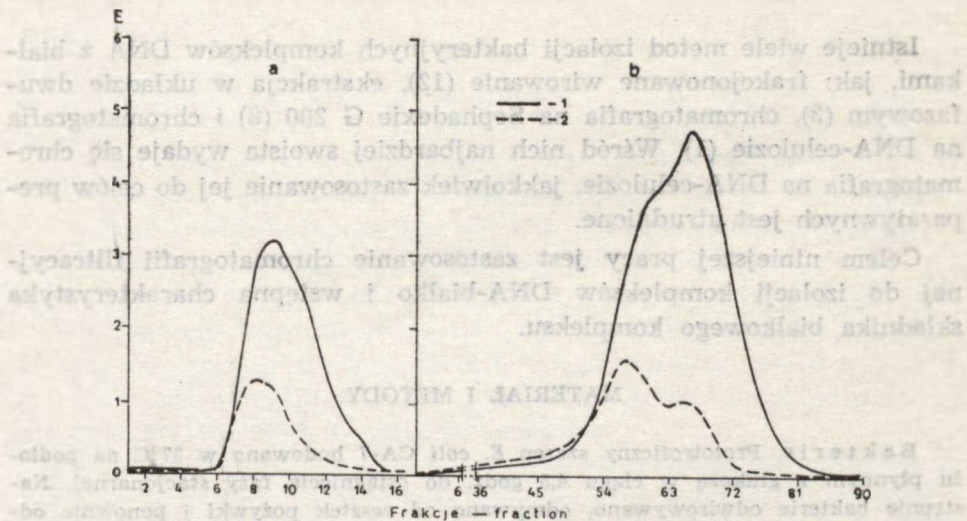
Izolacja, frakcjonowanie i elektroforeza żelowa białek. Białka wiążące się z DNA we frakcjach z kolumn filtracyjnych izolowano i frakcjonowano na DEAE-celulozie wg Grankowskiego i Bytnar (7). Elektroforezę na akrylamidzie przeprowadzono wg Fogela i Sypherda (4) w modyfikacji Grankowskiego i Bytnar (7).

Metody analityczne. Białko oznaczano metodą Lovry i współaut. (11) lub spektrofotometrycznie, DNA natomiast metodą Burtona (2).

WYNIKI

IZOLACJA KOMPLEKSÓW DNA-BIAŁKO NA KOLUMNACH FILTRACYJNYCH

Jak wynika z ryc. 1 jedynie w przypadku Sepharozy 2 B DNA jest minimalnie przesunięty w lewo w stosunku do maksimum białkowego we frakcjach wycieku (ryc. 1 b). Nie udało się uzyskać wyraźniejszej

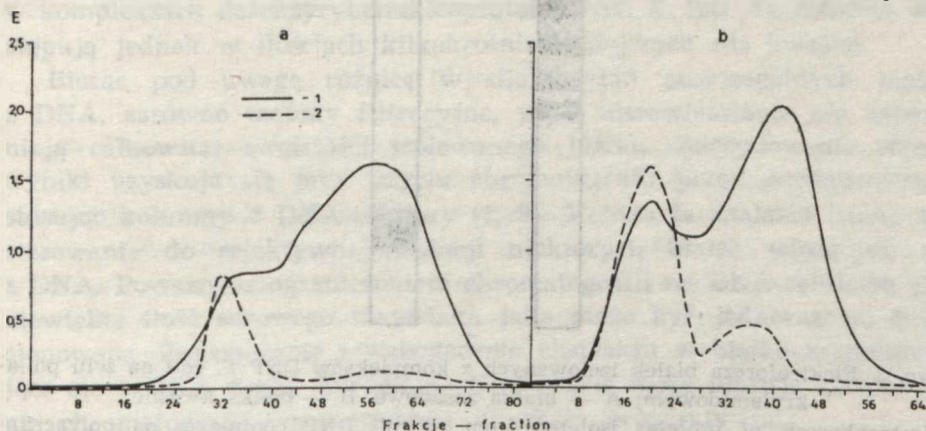


Ryc. 1. Izolacja kompleksów DNP *E. coli* na kolumnach; a — Bio-Gel P 300, b — Sepharoza 2 B; 1 — białko 660 μ m, 2 — DNA 620 μ m

Isolation of *E. coli* DNP complexes on columns; a — Bio-Gel P 300, b — Sepharose 2 B; 1 — 660 μ m protein, 2 — 620 μ m DNA

separacji mimo stosowania różnej wielkości kolumn, różnych stężeń buforu, soli itp. Dobre wyniki uzyskano natomiast stosując Sephadex G 200. Jak wynika z ryc. 2 a, obecność DNA ogranicza się do kilku frakcji wpływających tuż za pustą objętością kolumny. Większość białek znajdowano w dalszych frakcjach wycieku.

Materiał zawierający DNA i białko (frakcje 28—40) zagęszczano i poddawano rechromatografii na Sephadexie G 200, uzyskując dodatkowe usunięcie pewnej części białek nie wykazujących zdolności do tworzenia kompleksów z DNA (ryc. 2 b). Nie wykluczone, że białko wystę-



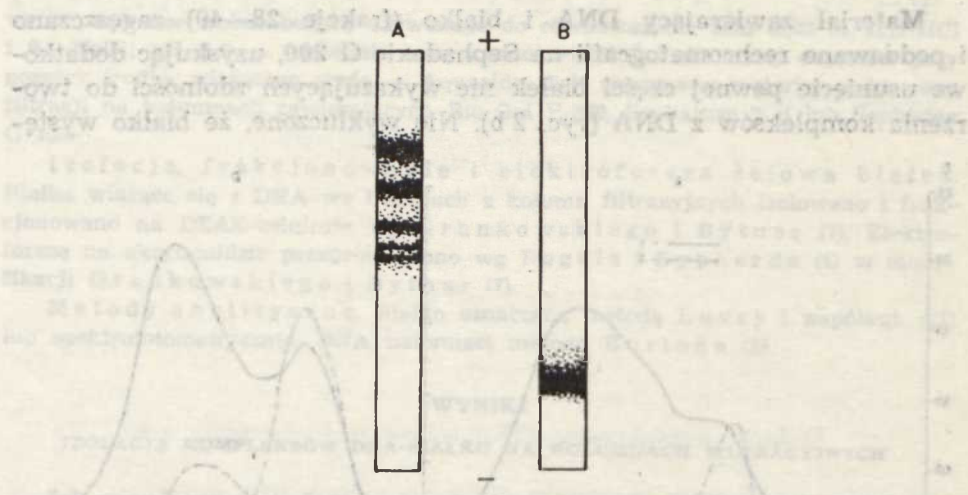
Ryc. 2. Izolacja kompleksów DNP *E. coli* na Sephadexie G 200; a — chromatografia, b — rechromatografia; objaśnienia patrz ryc. 1

Isolation of *E. coli* DNP complexes on Sephadex G 200; a — chromatography, b — rechromatography; for explanation see Fig. 1

pujące we frakcjach 28—52 uwalnia się w wyniku częściowej degradacji kompleksu, czego dowodem jest spadek ilości wysokocząsteczkowego DNA i jednocześnie pojawienie się produktów jego rozkładu (frakcje 28—44). Szczytowe frakcje (14—24), zawierające rechromatografowany materiał, łączono i zagęszczano do małej objętości. Przeprowadzone oznaczenia wykazały, że oba wysokocząsteczkowe składniki występują w stosunku 1:1 we frakcjach poddanych rechromatografii. Materiał filtrowany jednorazowo zawiera dwukrotną ilość białka.

WSTĘPNA CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK KOMPLEKSU DNA-BIAŁKO

Białko rechromatografowanych kompleksów izolowano według sposobu opisanego przez Gąsiora i współaut. (5). Końcową próbkę pozabawioną DNA rozpuszczano w 0,02 m buforze Tris-HCl, pH 8,0 zawierającym 8 m mocznik i 0,006 m merkaptoetanol i frakcjonowano na DEAE-celulozie (7) na białka kwaśne i zasadowe. Wykazano, że białka kwaśne występują w ilości 3-krotnie większej niż zasadowe. Obie grupy białek rozdzielano przy pomocy elektroforezy na żelu poliakrylamidowym wg Grankowskiego i Bytnar (7). Stwierdzono (ryc. 3) obecność 5 frakcji białek zasadowych i nie rozdzielającą się kwaśną komponentę białkową.



Ryc. 3. Elektroforyza białek izolowanych z kompleksów DNP *E. coli* na żelu poliakrylamidowym; A — białka zasadowe, B — białka kwaśne
Electrophoresis of proteins isolated from *E. coli* DNP complexes on polyacrylamide gel; A — basic proteins, B — acid proteins

DYSKUSJA

Zagadnienia występowania, charakterystyki i roli biologicznej kompleksów DNA-białko w komórce bakteryjnej znajdują się w centrum zainteresowania wielu pracowni naukowych. Wiadomo obecnie, że kompleksy bakteryjne różnią się od dezoksyrybonukleoproteidów komórek organizmów wyższych zarówno własnościami chemicznymi, jak i biologicznymi (12). Białko kompleksu bakteryjnego nie stabilizuje na przykład DNA przed termiczną denaturacją; nie wywiera również wyraźnego wpływu hamującego aktywność matrycową DNA w procesie syntezy RNA. Wydaje się, że główną przyczyną wyżej wymienionych różnic jest znacznie mniejsza trwałość wiązania pomiędzy DNA a białkami u bakterii. Labilność wiązania elektrostatycznego w kompleksach bakteryjnych utrudnia izolację tych połączeń. Dlatego też w zależności od użytej metody izolacji kompleksy DNA-białko różniły się składem ilościowym obu składników. Według Raafa i Bonnera (12) kompleks *E. coli* otrzymywany przez frakcjonowanie ultrawierowaniem charakteryzuje się stosunkiem DNA — białko=1:2,3, natomiast preparaty filtrowane na Sephadexie G 200 dają zawartość składników, jak 1:0,25 (8) i 1:1 w niniejszej pracy.

Z dotychczasowych doświadczeń wynika, że najmocniej wiążącymi się z DNA białkami są DNA- i RNA-polimerazy (8) oraz inne enzymy związane z aktywacją matrycy DNA. Stwierdzono także obecność mini-

malnej ilości białek zasadowych (10) związanych z DNA. Nie ulega wątpliwości, że także białka represorowe, jak np. represor operonu laktozy (6), mogą tworzyć przejściowe kompleksy z DNA. Moje doświadczenia wykazują obecność zarówno białek kwaśnych, jak i zasadowych w kompleksach dezoksyrybonukleoproteidowych *E. coli*. Te ostatnie występują jednak w ilościach kilkakrotnie mniejszych niż kwaśne.

Biorąc pod uwagę różnicę w sile wiązań poszczególnych białek z DNA, zarówno metody filtracyjne, jak i ultrawierowanie nie zapewniają całkowitej swoistości izolowanego białka. Zdecydowanie lepsze wyniki uzyskuje się przy użyciu chromatografii przez powinowactwo, stosując kolumny z DNA-celulozy (1, 9). Metoda ta znalazła liczne zastosowania do selektywnej izolacji niektórych białek wiążących się z DNA. Poważnym ograniczeniem chromatografii na DNA-celulozie jest niewielka ilość surowego materiału, jaka może być jednorazowo frakcjonowana. Zagęszczenie i wzbogacenie ekstraktu w białka kompleksujące się z DNA drogą filtracji na Sephadexie może ułatwić zastosowanie chromatografii powinowactwa na skalę preparatywną.

Dziękuję bardzo doc. dr hab. Eugeniuszowi Gąsiorowi za cenne rady, pomoc przy wykonywaniu pracy i przy redagowaniu tekstu.

PIŚMIENNICTWO

1. Alberts B. M., Amodio F. J., Jenkins M., Gutman E. D., Ferris F. L.: Studies with DNA-cellulose Chromatography. I DNA binding Proteins from *Escherichia coli*. Cold Spring Harbor Symposia 33, 289 (1968).
2. Burton K.: A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Method. Biochem. J. 62, 315 (1965).
3. Favre J., Pettijaku D. E.: A Method for Extracting Purified DNA or Protein — DNA Complex from *Escherichia coli*. European J. Biochem. 3, 33 (1967).
4. Fogel S., Sypherd P. S.: Extraction and Isolation of Individual Ribosomal Proteins from *Escherichia coli*. J. Bact. 92, 2, 358—364 (1969).
5. Gąsior E., Grankowski N., Turkowska T., Sz waj M.: Purification of *Escherichia coli* Ribosomes and Fractionation of Ribosomal Protein. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C, 23, 1—10 (1968).
6. Gilbert W., Muller-Hill B.: Isolation of the Lac Repressor, Proc. US Nat. Acad. Sci. 56, 1891 (1966).
7. Grankowski N., Bytnar E.: Acidic Fraction of Ribosomal Proteins *Lactobacillus acidophilus*. Acta Microb. Pol. seria A, 4, 21—26 (1972).
8. Kadoya M., Mitsui H., Takagi Y., Otaka F., Suzuki H. and Osawa H.: A Deoxyribonucleic Acid-protein Complex Having DNA-Polymerase and RNA-Polymerase Activities in Cell-free Extract of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Acta 91 (1), 36—45 (1964).
9. Kurek E.: Praca doktorska UMCS. 1971.
10. Learev I., Cruft H. J.: Investigation into the Distribution and Properties of Histones and other Basic Proteins in Bacteria. Biochem. J. 101, 665—667 (1966).

11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Tarr A. L., Rondall R. J.: Protein Measurement with the Folin Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
12. Raaf J., Bonner J.: Properties of *Escherichia coli* Deoxyribonucleoproteins as Compared with the Higher Organisms. *Arch. Bioch. Biophys.* **125**, 567—579 (1968).

РЕЗЮМЕ

Описывается проба изоляции и очистки DNP *E. coli* методом фильтрации на следующих веществах: Bio-Gel P 300, Sepharoza 2 B, Sephadex G 200. Два первых препарата дали отрицательные результаты, а на Sephadex'e G 200 произошло сепарирование относительно чистой DNP. Из полученных комплексов изолировались белки, которые потом разделялись на DEAE-целлюлозе на щелочные и кислотные компоненты. Щелочных белков было в 3 раза меньше, чем кислотных.

SUMMARY

Attempts at the isolation and purification of *E. coli* DNP by filtration on Bio-Gel P 300, Sepharose 2 B and Sephadex G 200 were described. The first two preparations brought negative results, whereas relatively pure DNP was separated on the Sephadex G 200. Proteins were isolated from the obtained complexes and then separated into basic and acid components on DEAE-cellulose. The amount of basic proteins was three times smaller than that of acid proteins.

11. Gandy G. H., Fawcett J. K. J., Tarr A. L., Marshall E. J., *Protein Measurement with the Folin Reagent*, *J. Biol. Chem.*, **28**, 369 (1958).

12. East A., Bonner J., *Properties of Nucleic Acid-DNAase Complexes as Compared with the Higher Organisms*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 337-350 (1976).

РЕЗЮМЕ

Описаны три пробы выделения и очистки ДНП *E. coli* методом ультрафильтрации с использованием мембран: Bio-Gel P 300, Sepharose 2 B, Sephadex G 200. Два первых примера дали отрицательные результаты, а на Sephadex G 200 проведено тщательное исследование свойств ДНП. Не удалось комплексовать и сорбировать белки, которые потом разделялись на DEAE-целлюлозе на цитонин и инсультин. Молекулярный вес был в 3 раза меньше, чем ожидалось.

SUMMARY

Attempts in the isolation and purification of *E. coli* DNP by filtration on Bio-Gel P 300, Sepharose 2 B and Sephadex G 200 were described. The first two preparations brought negative results, whereas relatively pure DNP was separated on the Sephadex G 200. Attempts were made to form the obtained complexes and then separate into basic and acid components on DEAE-cellulose. The amount of basic protein was three times smaller than that of acid protein.

ANNALES UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA

Nakład: 950 + 50 egz. Ark. wyd. 31,5, ark. druk. 23,0 + 2 str. kred. + 6 wklejek.

Pap. druk. sat. kl. III, B-1, 80 g.

Oddano do składu w listopadzie 1972 r., podpisano do druku w kwietniu 1973 r., wydrukowano w czerwcu 1973 r.

Cena zł 84,—

Tłoczono w Oficynie Drukarskiej UMCS w Lublinie, nr zam. 413/72. — G-4.

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXVII

SECTIO C

1972

11. I. Zelazna-Kowalska: Indukcja lizogennego szczepu *Rhizobium meliloti* przez mitomycynę C.
Induction of Lysogenic Strain of *Rhizobium meliloti* by Mitomycin C.
12. K. Karczmarz: Mszaki torfowisk obrzeżenia Gór Świętokrzyskich.
Bryophytes of Peat Bogs Surrounding the Święty Krzyż Mountains.
13. H. Mamczarz: Mszaki rezerwatu leśnego Jata.
Bryophytes of the Forest Reserve Jata.
14. J. Rydzak, B. Zabińska: Badania nad szybkością wzrostu porostów.
Część III.
Investigations on the Growth Rate of Lichens. Part III.
15. J. Bystrek, M. Motyka-Zgłobicka: Gatunki rodzaju *Parmelia* Ach. na Lubelszczyźnie.
Species of the Genus *Parmelia* Ach. in the Lublin Region.
16. J. Bystrek i J. Bystrek: Materiały do flory porostów okolic Suśca na Rostoczu Środkowym.
A Contribution to the Flora of Lichens in the Vicinity of Susiec in Central Rostocze.
17. J. Romaszewska-Sałata: Nowe dla flory Polski gatunki grzybów wroślikowych (*Peronosporales*).
Espèces de Péronosporacées (*Peronosporales*) nouvelles pour la flore de Pologne.
18. D. Fijałkowski, B. Warmińska: Zmienność kostrzew kępkowych (*Festuca* sp.) województwa lubelskiego.
Variability of *Festuca* sp. in the Lublin Province.
19. D. Fijałkowski, M. Pękala: Osobliwości flory naczyniowej okolic Sobiboru koło Włodawy.
Peculiarities of Higher Flora in the Environs of Sobibór near Włodawa.
20. K. Izdebski: Zbiorowiska roślinne projektowanego rezerwatu leśnego „Zwierzyniec”.
Plant Communities of the Future Forest Reserve „Zwierzyniec”.
21. F. Święs: Geobotaniczna charakterystyka lasów na obszarze dorzecza górnego biegu Białej Dunajcowej w Beskidzie Niskim. Część IV. Lasy sosnowe.
A Geobotanical Characteristics of Forests in the River Basin of the Biała Dunajcowa in the Low Beskid. Part IV. Pine Forests.
22. Z. Popiołek: Roślinność wodna i przybrzeżna jezior okolic Ostrowa Lubelskiego na tle warunków siedliskowych. Część II. Jezioro Kleszczów.
Aquatic and Littoral Vegetation of the Lakes near Ostrów Lubelski against the Background of Habitat Conditions. Part II. The Lake Kleszczów.

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIÆ C
LUBLIN—POL
VOL. XXVII
SECTIO C

Biblioteka Uniwersytetu
MARIË CURIE-SKŁODOWSKIEJ
w Lublinie

4053 28

CZASOPIS 1913

23. J. Malicki: Rodzaj *Pediastrum* Meyen w jeziorach Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego.
The Genus *Pediastrum* Meyen in Lakes of the Łęczna and Włoda-wa Lake District.
24. K. Olech: Wpływ zaciemnienia na następczą aktywność fotosyntetyczną liści niektórych roślin wyższych.
Photosynthetic Activity of Leaves of some Higher Plant in the Absence of Light.
25. J. Malicki: Szybka metoda bezpośredniego określania liczby komórek bakterii w glebie.
A Method of Quick and Direct Determination on the Number of Bacterial Cells in Soil.
26. H. Zderkiewicz: Zróżnicowanie cech morfologicznych w grupach wiekowych ludności wiejskiej z powiatu biłgorajskiego i puławskiego.
Differentiation of Morphological Features in Age Groups of Rural Population from the Biłgoraj and Puławy Districts.

Adresse:

UNIWERSYTET MARIË CURIE-SKŁODOWSKIEJ

BIURO WYDAWNICTW

Plac Litewski 5

20-080 LUBLIN

POLOGNE