



УДК 577.155.2

СТАБИЛИЗАЦИЯ НУКЛЕАЗ КОВАЛЕНТНЫМ СВЯЗЫВАНИЕМ
С РАСТВОРИМЫМ ДЕКСТРАНОМ *

Куриченко В. М., Калачева Н. В., Габдуллина Г. Б.

Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина

Получены препараты панкреатической ДНКазы и нуклеазы *Ser. marcescens*, ковалентно связанные при помощи реакции диазосочетания с *m*-аминобензилдоксиметилдекстраном. Модификация нуклеаз растворимым декстраном сопровождается увеличением их термостабильности, устойчивости при хранении и при обработке растворами мочевины. Показано, что связывание ферментов с растворимым декстраном увеличивает их стабильность при инкубации в питательной среде с культурой ткани, а также *in vivo*, при введении в брюшную полость животных.

Со времени получения высокоочищенных препаратов ферментов предпринимаются попытки их использования в биохимии, медицине и биологии в качестве аналитических инструментов, лекарственных или биологически активных веществ. Одним из факторов, ограничивающих такое использование ферментов, помимо протеолиза, блокирования ингибиторами и антителами, является денатурация ферментов. Снижение скорости денатурации можно обеспечить подбором физико-химических условий, оптимальных для сохранения функционально активной конформации молекул. Однако не всегда эти условия, оптимальные для стабилизации фермента, могут быть оптимальными для систем, в которых ферменты используются.

Более общим способом стабилизации ферментов, эффективным даже для экстремальных условий, является широко распространенная иммобилизация их на нерастворимых носителях [1, 2, 3]. Однако если иммобилизованные на нерастворимых носителях ферменты могут быть с успехом использованы в промышленности и в качестве аналитических инструментов в лабораторной практике, то их применение в биологии и медицине весьма ограничено из-за нерастворимости.

Нами была предпринята попытка использовать принципы иммобилизации для получения модифицированных ферментов, более стабильных по сравнению с нативными и растворимых в воде и солевых растворах. Результаты экспериментов на примере панкреатической ДНКазы (дезоксирибонуклеинат-5¹-олигонуклеотидогидролаза, КФ 3.1.4.5), и нуклеазы *Ser. marcescens* (рибонуклеинат(дезоксирибонуклеинат)-5¹-олигонуклеотидогидролаза, КФ 3.1.4.9) излагаются в данной статье.

Модификацию осуществляли ковалентным связыванием ферментов с растворимым декстраном при помощи реакции диазосочетания. Связыв-

* Сокращения: NO₂ПГ — *m*-нитробензилдоксиметилполиглюкин, NH₂ПГ — *m*-аминобензилдоксиметилполиглюкин.

вание ферментов с диазотированным $\text{NH}_2\text{ПГ}$ осуществляется через посредство — $\text{N}=\text{N}$ —групп, являющихся хромофорами. Введение этих групп в белки и в ариллированный полиглюкин сопровождается батохромным смещением их спектров поглощения (рис. 1). Появление в комплексе, исходные компоненты которого поглощают в УФ-области, полосы поглощения в видимой части спектра характеризует образование — $\text{N}=\text{N}$ —групп и может быть использовано для доказательства образования ковалентной связи с белком.

Полученный препарат представляет собой смесь продуктов превращения непрореагировавшего диазополиглюкина, нативного и модифицированного ферментов. Смесь фракционировали при помощи гель-фильтрации, позволяющей довольно эффективно отделять иммобилизованные

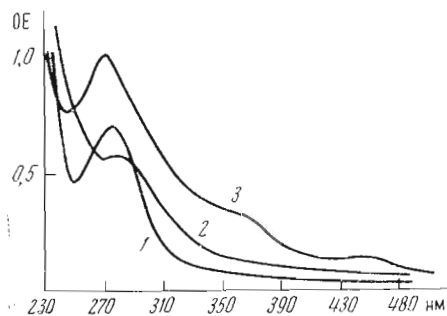


Рис. 1. Спектры панкреатической ДНКазы: 1 — 0,6 мг/мл: *m*-аминобензил-оксиметилдекстрана; 2 — 0,9 мг/мл: модифицированной панкреатической ДНКазы; 3 — 3,5 мг/мл

фермента активность снижается на 50% (рис. 3, б). Что касается ковалентно связанной панкреатической ДНКазы, то она также значительно дольше сохраняет активность при хранении по сравнению с немодифицированным ферментом.

Интересно отметить влияние ионов Ca^{2+} на стабильность модифицированной панкреатической ДНКазы. У препаратов ДНКазы, ковалентно связанной с декстраном, в отсутствие Ca^{2+} стабильность при хранении повышается, но незначительно. Связывание же фермента в присутствии ионов Ca^{2+} приводит к значительно более выраженному увеличению стабильности. Более того, фермент, связанный в присутствии ионов Ca^{2+} , после удаления последних обладает значительно большей стабильностью по сравнению с модифицированным препаратом, полученным в отсутствие ионов Ca^{2+} (рис. 3, а).

По данным Прайса и соавт. [4] Ca^{2+} стабилизирует панкреатическую ДНКазу. Очевидно, что предшествующая модификации обработка фермента Ca^{2+} способствует поддержанию нативной конформации значительной части молекул ДНКазы в момент ее связывания с декстраном. Последующее удаление ионов Ca^{2+} играет уже значительно меньшую роль в поддержании нативной конформации молекул фермента. Его роль, по-видимому, выполняют связи, образующиеся между ферментом и полиглюкином.

Температурная стабильность модифицированных препаратов также значительно выше стабильности нативных ферментов. На рис. 4 видно, что снижение активности исходных нуклеаз с повышением температуры при рН 7,0 значительно превосходит снижение активности ферментов, связанных с декстраном.

Обработка модифицированных ферментов растворами мочевины различной концентрации (при рН 7,0) приводит к снижению ферментативной активности с увеличением концентрации мочевины. Однако уровень

ферменты, которые идентифицировали по поглощению при 450 нм и специфической энзиматической активности (рис. 2). Выход продукта колеблется в пределах 25—50% для нуклеазы *Ser. marcescens* и 40—60% для панкреатической ДНКазы. Полученные препараты подвергали дальнейшему исследованию.

Результаты исследования стабильности препаратов при хранении представлены на рис. 3. Хранение в течение двух месяцев при температуре 12—15° и рН 7,0 не влияет на активность модифицированной нуклеазы *Ser. marcescens*, тогда как в контрольном препарате исходного фермента

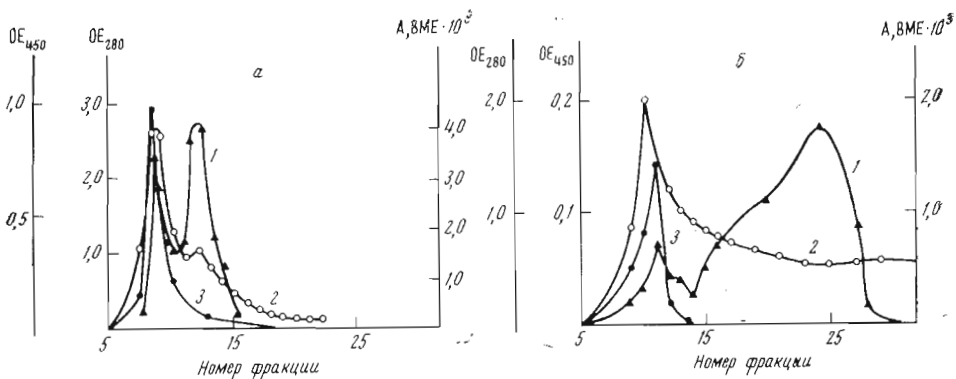


Рис. 2. Гель-фильтрация продуктов, образующихся в результате модификации панкреатической ДНКазы (а) и нуклеазы *Ser. marcescens* (б); 1 — ДНКазная активность А в вискозиметрических единицах (ВМЕ); 2 — OE_{280} ; 3 — OE_{450} . Гель-фильтрацию проводили на колонках (1,9 × 58 см) с сефадексами G-75 (а) и G-100 (б), уравновешенных 0,1 М раствором NaCl. Скорость прохождения элюента — 50 мл/ч, объем фракций — 6 мл (а) и 10 мл (б)

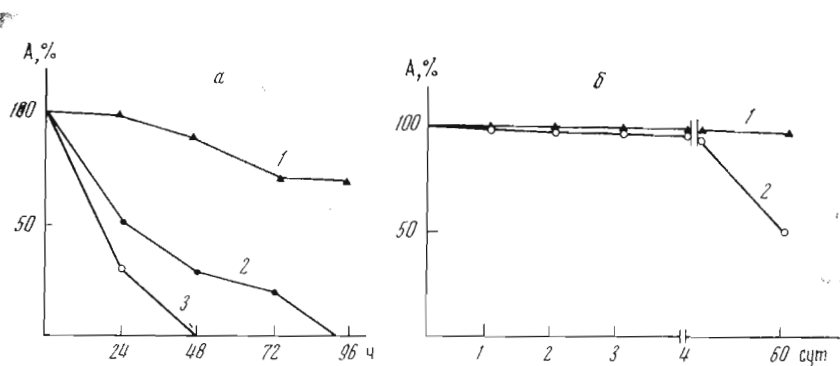


Рис. 3. Стабильность при хранении панкреатической ДНКазы и ее модифицированного производного (а) и нуклеазы *Ser. marcescens* (б): а: 1 — панкреатическая ДНКазамодифицированная в присутствии 0,005 М Ca^{2+} , после модификации ионы Ca^{2+} удалены диализом; 2 — панкреатическая ДНКаза, модифицированная в отсутствие ионов Ca^{2+} ; 3 — панкреатическая ДНКаза; б: 1 — модифицированная нуклеаза *Ser. marcescens*; 2 — нуклеаза *Ser. marcescens*

снижения активности стабилизированных модификацией нуклеаз значительно меньше по сравнению с исходными препаратами панкреатической ДНКазы и нуклеазы *Ser. marcescens*, обработанными мочевиной в аналогичных условиях (рис. 5). Панкреатическая ДНКаза после обработки раствором 4 М мочевины сохраняет ~ 45% от исходной активности, тогда как модифицированный фермент — 65%. Подобные же результаты получены и с нуклеазой *Ser. marcescens*. После воздействия раствором 4 М мочевины активность в препарате исходного фермента составляла 7%, а в препарате модифицированного — 40% от первоначальной активности.

Увеличение термостабильности модифицированных декстраном ферментов свидетельствует, по-видимому, об увеличении жесткости их структуры. Увеличение жесткости структуры, естественно, ограничивает пределы конформационных флуктуаций, лежащих в основе денатурации ферментов. Подтверждением этому являются и эксперименты с обработкой модифицированных нуклеаз растворами мочевины. Связывание ферментов с декстраном, вероятно, ограничивает подвижность в пространстве полипептидных цепей молекул белка, денатурированных мочевиной. Это обстоятельство значительно увеличивает вероятность сохранения белком в растворе мочевины черт исходной структуры, что способствует восста-

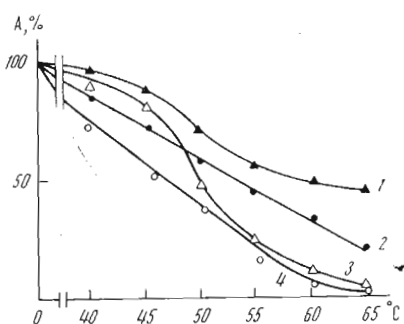


Рис. 4

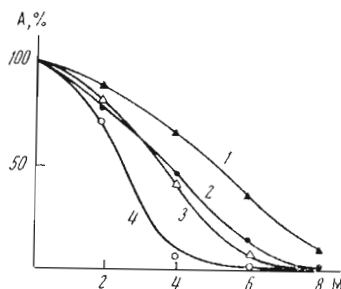


Рис. 5

Рис. 4. Влияние температуры на активность нативных и модифицированных ферментов: 1 — модифицированная панкреатическая ДНКазы; 2 — панкреатическая ДНКазы; 3 — модифицированная нуклеаза *Ser. marcescens*; 4 — нуклеаза *Ser. marcescens*. Измеряли остаточную активность препаратов, прогретых в течение 5 мин при соответствующих температурах и рН 7,0

Рис. 5. Влияние мочевины на активность нативных и модифицированных ферментов. Ферменты инкубировали в растворе мочевины в течение 30 мин при 20°, рН 7,0. Активность измеряли в препаратах, диализованных против H_2O . Обозначения те же, что и на рис. 4

повлечению высших уровней организации белковой молекулы после удаления денатурирующего агента. Следовательно, связанные с растворимым декстраном ферменты с полным основанием можно отнести к группе стабилизированных модификацией растворимым полимером.

Увеличение стабильности модифицированных нуклеаз способствует сохранению их активности в культуральной среде с перевиваемыми клетками культуры ткани (рис. 6). Из рисунка видно, что нативная нуклеаза *Ser. marcescens* теряет свою активность в культуральной среде в зависимости от исходной концентрации в течение одного — двух дней. В то же время модифицированный фермент независимо от исходной концентрации практически не теряет активности в течение четырех дней.

При введении ферментов в брюшную полость животных, зараженных асцитной формой карциномы Эрлиха, видна довольно существенная разница в динамике сохранения ДНКазной активности в асцитной жидкости при введении нативных и модифицированных декстраном ферментов. Как видно из рис. 7, ДНКазная активность асцитной жидкости после внутрибрюшинного введения нативной панкреатической ДНКазы снижается в течение 15—20 мин до уровня активности, характерного для асцита контрольных животных. После внутрибрюшинного введения нативной нуклеазы *Ser. marcescens* ДНКазная активность асцитной жидкости снижается до уровня ферментативной активности контрольных животных в течение 4 ч. Совершенно иной результат отмечается при использовании модифицированных ферментов. В этом случае ДНКазная активность асцита также уменьшается в зависимости от времени, однако это уменьшение значительно более плавное, достигающее уровня ДНКазной активности асцита контрольных животных через 12 ч после введения панкреатической ДНКазы и через 24 ч после введения нуклеазы *Ser. marcescens*.

Более высокий уровень сохранения активности модифицированных ферментов в культуре ткани и в особенности в брюшной полости животных говорит не только о замедлении денатурации модифицированных декстраном нуклеаз, но и об ограничении эффективности гомеостатических механизмов, обеспечивающих регуляцию нуклеазной активности в биологической системе.

Приведенные примеры показывают, что модификация ферментов растворимыми декстранами позволяет получать препараты, имеющие ряд

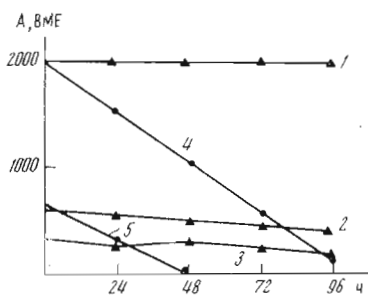


Рис. 6

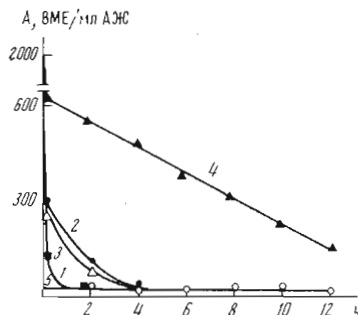


Рис. 7

Рис. 6. Изменение активности нативной и модифицированной нуклеазы в питательной среде перевиваемой культуры клеток почки эмбриона поросенка: 1 — модифицированная нуклеаза *Ser. marcescens* 80 мкг/мл; 2 — 24 мкг/мл; 3 — 12 мкг/мл; 4 — нативная нуклеаза *Ser. marcescens* 40 мкг/мл; 5 — 13 мкг/мл. Питательная среда содержала равный во всех экспериментах объем стерильного раствора фермента различной концентрации, выраженной в количестве белка нативной и белка комплекса модифицированной нуклеазы. Учет сохраняющейся активности производили в пробирках без цитонатического эффекта

Рис. 7. Изменение активности нативных и модифицированных ферментов в асцитной жидкости (АЖ) животных, зараженных карциномой Эрлиха: 1 — панкреатическая ДНКаза; 2 — модифицированная панкреатическая ДНКаза; 3 — нуклеаза *Ser. marcescens*; 4 — модифицированная нуклеаза *Ser. marcescens*; 5 — уровень ДНКазной активности в асцитной жидкости контрольных животных. Ферменты вводили на 5-й день после заражения животных с учетом количества асцита, образовавшегося к этому времени

преимуществ по сравнению с нативными. Вследствие более высокой стабильности как *in vitro*, так и *in vivo* модифицированные ферменты значительно легче стандартизировать. Их использование в биологических и медицинских экспериментах может гарантировать более постоянный уровень активности исследуемых экзогенных ферментов.

Экспериментальная часть

Хлористый (*m*-нитробензил-оксиметил)-пиридиний синтезировали по методу Курсанова и соавт. [5]. В качестве растворимого полимерного носителя использовали коммерческий препарат декстрана — полиглюкин Саранского завода медпрепаратов M_w 60 000.

В качестве субстрата для определения РНКазной активности использовали коммерческий препарат дрожжевой РНК фирмы «Reanal» (Венгрия), предварительно переосажденный подкисленным спиртом и отдиализованный против 0,1 М ацетатного буфера (рН 5,0).

В экспериментах использовали коммерческий препарат панкреатической ДНКазы Ленинградского мясокомбината и нуклеазу *Ser. marcescens*. Препарат нуклеазы получали по методу, разработанному в нашей лаборатории [6]. Препараты очищенной нуклеазы не содержали фосфоэстеразы и фосфомоноэстеразы, определенных по способности расщеплять бис-*n*-нитрофенилфосфат кальция и *n*-нитрофенилфосфат натрия соответственно [7].

ДНКазную активность определяли вискозиметрически по методу Ласковского и Зейдель в модификации Бенинга [7]. ДНК получали по методу Кея в модификации Бенинга [8]. Белок определяли по методу Лоури [9] и биуретовым методом по Делекторской [10]. Азот определяли по Кьельдалю [11].

Наличие диазогрупп, образующихся при диазотировании *m*-аминобензил-оксиметил-полиглюкина, проверяли качественной реакцией с β -нафтолом. С этой целью диазотированный препарат *m*-аминобензил-оксиме-

тилполиглюкина (до и после контакта с соответствующими ферментами) добавляли к насыщенному раствору β -нафтола в 0,1 М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (рН 8,5). О наличии диазогрупп судили по появлению оранжевой окраски.

Активация декстрана. К 1 г полиглюкина добавляли 2,0 мл 20%-ного раствора хлористого (*m*-нитробензилоксиметилпиридиния) в 0,7% CH_3COONa . Полученный прозрачный раствор сушили в течение 12—24 ч в вакууме над CaCl_2 . Сухую смесь полиглюкина с хлористым (*m*-нитробензилоксиметилпиридинием) прогревали при 100—110° в течение 30 мин, после чего растворяли в воде и после пересаживания спиртом вновь растворяли в 3,0 мл воды. Образовавшийся $\text{NO}_2\text{ПГ}$ восстанавливали гидросульфитом до $\text{NH}_2\text{ПГ}$. Для этого к раствору $\text{NO}_2\text{ПГ}$ добавляли равный объем 15—30%-ного раствора гидросульфита Na и прогревали на водяной бане в течение 40 мин в температурном интервале 50—60°. $\text{NH}_2\text{ПГ}$ диализовали против дистиллированной H_2O , осаждали спиртом, промывали эфиром и сушили на воздухе. В высушенном активированном декстране определяли содержание азота. Количество азота составляло 0,38—0,4%.

Связывание ферментов с активированным декстраном. 300 мг $\text{NH}_2\text{ПГ}$ растворяли в охлажденном 0,5%-ном растворе HCl. К полученному раствору добавляли эквимольное (по азоту) количество NaNO_2 . Диазотированный $\text{NH}_2\text{ПГ}$ осаждали спиртом, после чего быстро растворяли в минимальном объеме холодной H_2O . рН такого раствора не превышал 2—3. К раствору диазополиглюкина при постоянном перемешивании струйно приливали раствор фермента в 0,2М трис-HCl или боратном буфере (рН 8,5). Смесь оставляли на 10—12 ч для разложения непрореагировавших диазогрупп.

Наряду с вышеприведенной методикой связывание панкреатической ДНКазы проводили в присутствии Ca^{+2} . В этом случае все рабочие растворы дополнительно содержали 0,005 М CaCl_2 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Joustra M. R. (1971) Voedingmiddelen technologie, 2, 29, 30, 3—10.
2. Conte A., Lehman K. (1971) J. Physiol. chem., 352, 533—539.
3. Ryle A. P. (1972) Int. J. Peptide and Protein Res., 4, 123—124.
4. Price P. A., Stein W. H. and Moore S. (1969) J. Biol. Chem., 244, 929—932.
5. Курсанов Д. Н., Солодков Г. А. (1943) Ж. прикл. химии, 16, вып. 11—12, 351—355.
6. Беляева М. И., Лещинская И. Б., Имамов А. Х. (1968) Авт. свид. № 230052.
7. Белинг Г. П. (1964) в сб.: Бактериальные нуклеазы, стр. 17—32. изд-во КГУ, Казань.
8. Белинг Г. П. (1969) в сб.: Бактериальные нуклеазы и их действие на опухолевый рост, стр. 226—234, изд-во КГУ, Казань.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
10. Делекторская Л. Н., Сентебова Н. А., Салуэнья А. И. (1971) Лабораторное дело, № 8, 483—487.
11. Ариункина Д. Г. (1962) в кн. Руководство по химическому анализу почв, стр. 140—150, изд-во МГУ, М.

Поступила в редакцию
27.VI.1974

STABILISATION OF NUCLEASES BY COVALENT BINDING TO SOLUBLE DEXTRAN

KURINENKO B. M., KALACHEVA N. V., GABDULLINA G. K.

State University, Kazan

The preparations of pancreatic DNAase and nuclease *Ser. marcescens* covalently bound to *m*-aminobenzyloxymethyl dextran by diazocoupling have been obtained. Nuclease modification by soluble dextran is followed by the increase in thermal stability, urea resistance and the stability under storage conditions. Enzymes conjugation with soluble dextran is shown to increase their stability upon incubation in nutrient medium with tissue culture, as well as in vivo when administrated into abdominal cavity of animals.