



УДК 579.254.45 : 579.222 : 577.152.277

© 1992 г.

Н. А. Коваленко, Н. Н. Соколов, Т. А. Черкасова*,
В. Е. Вонский, Ю. А. Лейкин*

ИММОБИЛИЗАЦИЯ РЕСТРИКТАЗ *EcoRI*, *PaeI* и *LprI*

Институт биологической и медицинской химии АМН, Москва
*Химико-технологический институт им. Д. И. Менделеева, Москва

Проведен поиск возможных сорбентов, синтезированных на основе отечественных носителей (сополимеры стирола и дивинилбензола, силикагели), для иммобилизации ряда рестриктаз. Установлено, что производные силохрома, содержащие тритильные группы, эффективно сорбируют эндонуклеазы рестрикции *PaeI*, *EcoRI* и *LprI*, при этом иммобилизованный препарат проявляет соответственно 10–20, 60–70 и 40–60% активности исходного фермента. Иммобилизованные препараты рестриктаз не изменяют специфичность действия, активны при многократном использовании и стабильны при хранении. Тритиламинопропилсилохром рекомендован в качестве возможного носителя для иммобилизации рестриктаз.

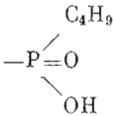
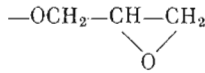
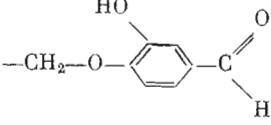


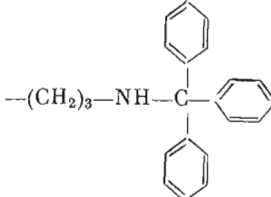
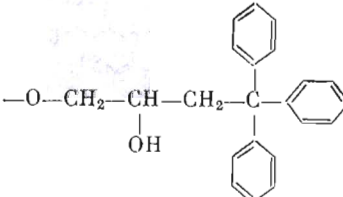
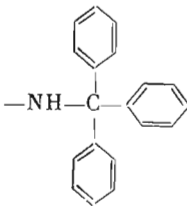
Интерес к исследованиям, связанным с иммобилизацией рестриктаз II класса (КФ 3.1.23.X), объясняется перспективностью многократного использования иммобилизованных ферментов для специфической фрагментации ДНК и возможностью препаративного получения фрагментов ДНК [1]. К настоящему времени известно более 1000 рестриктаз [2], однако в литературе описано получение не более 10 иммобилизованных эндонуклеаз рестрикции. Так, успешной оказалась иммобилизация рестриктаз *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *TagI*, *HpaI*, *HhaI*, *PvuII*, *SalI* и *PaeI* на активированной BrCN-сефарозе [3–5], неудачная для *PstI* [6]. Эффективность ковалентного связывания эндонуклеаз рестрикции с сефарозой варьирует от 5–15 до 90% и, как считают авторы, зависит от концентрации белка в растворе, качества сефарозы и других факторов [3]. Отмечается повышение термостабильности иммобилизованных рестриктаз примерно на 10%, для многих ферментов наблюдается снижение удельной активности. Не выявлено различий в субстратной специфичности и ферментативной кинетике у иммобилизованных на BrCN-сефарозе и растворимых рестриктаз. Иммобилизованные эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* и *BamHI* в отличие от растворимых ферментов выдерживают лиофильное высушивание [3].

Обнадеживающие результаты были получены при иммобилизации ряда рестриктаз за счет гидрофобных взаимодействий с тритилагарозой или тритилсефарозой [7]. При этом достигалось 100% связывание с носителем рестриктаз *EcoRI*, *BamHI* и *HindIII*. Относительная активность (по сравнению с растворимым ферментом) составляла 80% для *EcoRI* и *HindIII* и 20% для *BamHI*. Рестриктазы *EcoRI* и *PstI* удалось иммобилизовать в 1% геле агарозы с 85% выходом [8]. Однако вымывание ферментов из геля при повторном использовании иммобилизованных рестриктаз снижает ценность данного способа иммобилизации.

Цель настоящей работы заключалась в получении иммобилизованных на отечественных носителях (сополимеры стирола и дивинилбензола, силикагели с различными функциональными группами) (табл. 1) препаратов ряда рестриктаз. Предварительные результаты работы были опубликованы [17].

Структура носителей, испытанных в качестве сорбентов для иммобилизации рестриктаз

Носитель	Лиганд (R)	Литература
(I)		[9]
(II)		[9]
(III)		[9]
(IV)		[9]
(V)		[9]
(VI)		[9]
(VII)		[10]
(VIII)		[10]
(IX)		[11]

Носитель	Лиганд (R)	Литература
(X)		[12]
(XI)		[11]
(XII)		[13]
(XIII)		[14]
(XIV)		[15]
(XV)		[16]
(XVI)	То же	[16]
(XVII)		[16]
(XVIII)		[7]

* (I) — (XV) — носители на основе макропористого сополимера стирола и дивинилбензола с разными лигандами (R), (XVI) и (XVII) — носители на основе силихрома, (XVIII) — носитель на основе сефарозы.

В качестве объекта для иммобилизации были использованы рестриктазы *PaeI*, *LplI*, *EcoRI*. Эндонуклеазы рестрикции *PaeI* (изошизомер *SphI*) и *LplI* (*ClaI*) впервые обнаружены, выделены и идентифицированы в нашей лаборатории [18, 19] и являются ценным инструментом исследования в молекулярно-генетических работах. Выбор рестриктазы *EcoRI* обусловлен тем, что это один из наиболее детально изученных ферментов рестрикции [20]. Препараты рестриктаз, использованные для

Таблица 2

Влияние присутствия в инкубационной смеси носителей на ДНК фага λ и активность рестриктазы *PaeI*

Носитель	Влияние на ДНК	Ингибирование активности, % *
(I)	Не влияет	0
(II)	То же	10—20
(III)	»	0
(IV)	»	20—30
(V)	»	50—60
(VI)	»	60—70
(VII)	Гидролиз	—
(VIII)	Слабый гидролиз	10—20
(IX)	Не влияет	0
(X)	То же	80—90
(XI)	»	10—20
(XII)	»	50—70
(XIII)	»	0
(XIV)	Слабая сорбция	—
(XV)	То же	70—80

* Ингибирующий эффект оценивали по увеличению минимального количества фермента, необходимого для расщепления 1 мг ДНК фага λ , в пробах с носителем и без него. Метод определения активности рестриктаз накладывает известные ограничения на точность оценки степени ингибирования.

Таблица 3

Иммобилизация рестриктазы *PaeI* на носителях на основе сополимера стирола и дивинилбензола

Носитель	Связывание фермента *, % от исходной активности	Активность на носителе, % от сорбированной
(I)	40	10
(II)	10	15—20
(III)	10	0
(IV)	0	—
(VIII)	20—40	0
(IX)	20—30	10
(XI)	0	—
(XIII)	0	—

* Определяется как разность между исходной и остаточной активностями в растворе после проведения иммобилизации.

иммобилизации, не содержали примесей неспецифических эндонуклеаз, экзонуклеаз и фосфатаз.

Поскольку исследуемые сорбенты могли влиять на активность ферментов как непосредственно, так и в результате сорбции носителем ДНК-субстрата (и фрагментов ДНК) или ее гидролиза, были поставлены соответствующие контрольные эксперименты. Установлено, что носители (VII), (VIII) и (XIV) гидролизуют или сорбируют ДНК-субстрат. Сильными ингибиторами рестриктазы *PaeI* оказались носители (II), (V), (VI), (X), (XII) и (XV) (табл. 2). Эти сорбенты, влияющие на ДНК-субстрат или на активность фермента, были исключены из дальнейших исследований по иммобилизации рестриктазы *PaeI*.

Анализ строения носителей, ингибирующих ферментативную активность, выявляет наличие в их структуре либо крупной гидрофобной группы, связанной с гидрофобным полимером (сополимер), либо гидроксильной или альдегидной группы. Ранее нами было показано, что иммобилизованная на BгCN-сефарозе рестриктаза *PaeI* имеет значительно более низкую удельную активность по сравнению с растворимым ферментом [4]. На основании вышесказанного можно сделать вывод о важности гидрофобных взаимодействий и NH_2 -групп для сохранения каталитически активной конформации рестриктазы *PaeI* и (или) о прямом участии этих групп в активном центре фермента. Эти предположения согласуются с выводами ряда авторов о важности аминокислотных групп для катализа и (или) связывания с ДНК эндонуклеаз рестрикции *PstI*, *BglII*, *EcoRI* и *BamHI* [8, 20—22].

Как видно из табл. 3, среди носителей, синтезированных на основе сополимера стирола и дивинилбензола, не оказалось сорбентов, эффективных для иммобилизации рестриктазы *PaeI*.

Иммобилизация рестриктаз *PaeI*, *EcoRI* и *LplI* на носителях, содержащих тритильный радикал

Носитель	<i>PaeI</i>		<i>EcoRI</i>		<i>LplI</i>	
	связывание *	активность **	связывание	активность	связывание	активность
(XV)	50	10	10—20	10	—	—
(XVI)	60—80	10—20	60—70	60—70	80—100	50—60
(XVII)	20—30	10	—	—	—	—
(XVIII)	40—60	10—20	50—60	60—70	50—60	40—50

* Связывание фермента, % от исходной активности (см. примечание к табл. 3).

** Активность фермента на носителе, % от сорбировавшейся.

В табл. 4 приведены результаты опытов по иммобилизации эндонуклеаз рестрикции *PaeI*, *LplI* и *EcoRI* на носителях, в структуре которых имеется тритильный радикал. Носители, содержащие тритил, связанный с гидрофильными полимерами сефарозой и силохромом, являются сильными сорбентами рестриктазы *PaeI*. Следует отметить снижение активности иммобилизованных препаратов фермента. Те же носители эффективно сорбировали эндонуклеазы рестрикции *LplI* и *EcoRI*. Тритиламинопропилсилохром (XVI), синтезированный на основе отечественного аминокпропилсилохрома [16], оказался более эффективным сорбентом для рестриктаз *PaeI* и *LplI*, чем тритилсефароза (XVIII). К преимуществам тритиламинопропилсилохрома по сравнению с тритилсефарозой следует отнести его большую устойчивость к механическим воздействиям и загрязнению микроорганизмами. Иммобилизованные нами на тритиламинопропилсилохроме эндонуклеазы рестрикции не изменяли специфичность действия, их стабильность в случае хранения при комнатной температуре была на 10—20% выше таковой растворимых ферментов, стабилизированных буферным раствором с 50% глицерином. На основании изложенных выше результатов можно рекомендовать тритиламинопропилсилохром в качестве удобного носителя для иммобилизации рестриктаз и, возможно, других ферментов обмена нуклеиновых кислот.

Экспериментальная часть

В опытах по иммобилизации использованы препараты рестриктаз *EcoRI*, *PaeI* и *LplI*, выделенные по разработанным нами способам [18, 19, 23]. ДНК фага λ C1857S7 получали как описано ранее [24].

Инкубацию иммобилизованных и нативных препаратов рестриктаз с ДНК фага λ проводили в оптимальных для этих ферментов условиях [18, 25]. Фрагменты ДНК разделяли методом электрофореза в агарозном геле [19]. За единицу активности рестриктаз принимали минимальное количество фермента (в мкл), необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК фага λ при 37°С за 60 мин в стандартных условиях.

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически по поглощению при 260 нм и рассчитывали по соотношению: $A_{260}=1$ ОЕ соответствует 50 мкг/мл. Концентрацию белка определяли с кумасси голубым [26].

Синтез сорбентов для иммобилизации рестриктаз проводили по методам, указанным в табл. 1. Носители предварительно отмывали и уравнивали 0,01 М калий-фосфатным буфером, pH 8,0.

При изучении способности носителей гидролизовать либо сорбировать ДНК-субстрат пробы объемом 30 мкл, содержащие 2 мг сорбента, 1 мкг

ДНК фага λ и 0,01 М калий-фосфатный буфер, рН 8,0, встряхивали (10 мин, 20° С) и инкубировали в течение 1 ч при 37° С. После этого проводили электрофоретический и спектрофотометрический анализ ДНК.

В опытах по изучению влияния сорбентов на активность рестриктаз готовили пробы, содержащие вышеперечисленные компоненты (исключая ДНК) и 1–5 ед. акт. фермента и инкубировали 1 ч при 37° С. Далее определяли активность фермента. Контрольные пробы не содержали носитель.

Иммобилизацию рестриктаз на носителях проводили при 4° С в микролонках объемом 1 мл (наконечники типа С20/ТУ «Gilson») с рециркуляцией раствора фермента в 0,01 М калий-фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 0,01 М азид натрия, 0,0001 М EDTA, 0,01 М 2-меркаптоэтанол, со скоростью 0,3 мл/ч.

Такая методика постановки экспериментов по иммобилизации позволила уменьшить количество сорбента до 10 мг и препарата фермента до 0,1 мг и исключить потери и погрешности, неизбежные при механическом перемешивании реагентов, промывании носителя и центрифугировании. После насыщения носителя ферментом (обычно это достигалось через 48 ч) сорбент трижды отмывали порциями по 1 мл буфера. Далее определяли ферментативную активность несвязавшейся рестриктазы в растворах после иммобилизации и отмывки сорбента и активность иммобилизованной рестриктазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коваленко Н. А., Соколов Н. Н. // Молекул. генетика. 1988. № 7. С. 13–15.
2. Roberts R. J. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. Suppl. P. 2331–2365.
3. Lee Y. H., Blakesley R., Smith L. A., Chirikjian J. G. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. Pt. 1. P. 173–182.
4. Коваленко Н. А., Варламова Е. А. // Тез. докл. «Всесоюз. конф. по медицинской энзимологии». Махачкала, 1986. С. 194–195.
5. Вах Н. Л., Семина И. Э. // Журн. микробиол. 1985. № 2. С. 32–34.
6. Singh P., Goldman J., Jackson C. E. // Artific Organs. 1982. V. 6. № 2. P. 145–150.
7. Cashion P., Javed A., Harrison D., Seeley J., Lentini V., Sathe G. // Biotechnol. and Bioeng. 1982. V. 24. № 2. P. 403–423.
8. Singh P. // Appl. Biochem. and Biotechn. 1984. V. 9. № 2. P. 161–172.
9. Черкасова Т. А., Лейкин Ю. А., Савина О. Е. // Тез. докл. XIV Международ. съезда по общей и прикл. химии. Наука, 1989. Т. 2. С. 109.
10. Черкасова Т. А., Лейкин Ю. А., Цицманис А. Х., Костылева Е. В. Способ получения фосфорсодержащего компонента: А. с. 1039935 СССР // Б. И. 1983. № 33. С. 65.
11. Лейкин Ю. А., Черкасова Т. А., Даванков А. Б., Ренард Т. Л. Способ получения амфотерных понитов: А. с. 267903 СССР // Б. И. 1970. № 13. С. 73.
12. Лейкин Ю. А., Даванков А. Б., Коршак В. В. // Высокомолекуляр. соединения. 1967. Т. 9Б. № 10. С. 744–749.
13. Цицманис А. Х., Воробьева В. К., Любинский Ф. А., Черкасова Т. А., Лейкин Ю. А. Способ получения формилсополимеров стирола и дивинилбензола: А. с. 1134566 СССР // Б. И. 1985. № 2. С. 96.
14. Шеррингтон Д. К., Ходж П. Реакции на полимерных подложках в органическом синтезе. Мир, 1983. С. 580–581.
15. Богданов В. И., Черкасова Т. А., Янина М. М., Лейкин Ю. А. // Тр. МХТИ. Конвертер с иммобилизованной уреазой для разложения мочевины в биологических жидкостях. 1985. С. 51–55.
16. Коршак В. В., Шгильман М. И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. М.: Наука, 1984. С. 95–96.
17. Коваленко Н. А., Соколов Н. Н., Черкасова Т. А., Вонский В. Е., Лейкин Ю. А. // Тез. докл. Всесоюз. конф. «Ферменты рестрикции – модификации ДНК: от генов до белков». Тракай, 1989. С. 32.
18. Sokolov N. N., Fitzner A. B., Anikeitcheva N. V., Choroshoutina E. B., Samko O. T., Kolosha V. O., Fodor I. I., Votrin I. I. // Molec. Biol. Res. 1985. V. 10. № 1. P. 159–161.
19. Соколов Н. Н., Манялене З. П., Бугкус В. В., Фицнер А. Б., Хорошугина Э. Б., Калугин А. А., Янулайтис А. А. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 8. С. 1040–1044.

20. Woodhead J. L., Malcolm A. D. P. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 3. P. 389-402.
21. Lee Y. H., Chirikjian G. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 15. P. 6838-6841.
22. George J., Nardon G., Chirikjian G. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 26. P. 14387-14392.
23. Соколов Н. Н., Вотрин И. И., Фицнер А. Б., Кирсанова И. Д. // Вопр. мед. химии. 1980. Т. 26. № 4. С. 568-571.
24. Соколов Н. Н., Вотрин И. И., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В. // Биохимия. 1978. Т. 43. № 5. С. 865-871.
25. New England Biolabs Catalog 1989/1990.
26. Read S. M., Northote D. H. // Anal. Biochem. 1981. V. 116. № 1. P. 53-64.

Поступила в редакцию

26.IV.1991

После доработки

5.VIII.1991

N. A. KOVALENKO, N. N. SOKOLOV, T. A. CHERCASOVA*, V. E. VONSKY*,
Уч. А. LEIKIN*

**IMMOBILIZATION OF RESTRICTION ENDONUCLEASES *EcoRI*,
PaeI AND *LpII***

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences,
Moscow;*

* *D. I. Mendeleev Moscow Chemical-Technological Institute, Moscow*

In search for sorbents (silica gels, styrene - divinylbenzene copolymers), for immobilization of some restriction endonucleases, derivatives of trityl-containing silochroms are shown to bind *EcoRI*, *PaeI* and *LpII* endonucleases with the retention of 10-20, 60-70 and 40-60% activity, respectively. The immobilized restriction endonucleases have the unchanged substrate specificity, can be used several times and are stable at storage. Tritylaminopropylsilochrom is suggested to be the sorbent of choice.