



УДК 547.963.32 : 678.6 : 577.15.072

СИНТЕЗ ПОЛИГУАНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В ПРИСУТСТВИИ
ЧАСТИЧНО ОЧИЩЕННОЙ ПОЛИНУКЛЕОТИДФОСФОРИЛАЗЫ
ИЗ *ESCHERICHIA COLI*

Тихомирова-Сидорова Н. С., Коган Э. М., Тимковский А. Л.,
Устюжанин Г. Е., Коломейцева В. В.,
Бондаржевская Л. Г., Тихомирова В. П.

Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР,
Ленинград

Разработан метод синтеза высокомолекулярной полигуанилиновой кислоты в присутствии частично очищенной полинуклеотидфосфорилазы из *E. coli* безиспользования колоночной хроматографии при очистке фермента. Для выделения полинуклеотидфосфорилазы производился ряд осаджений сульфатом аммония и протаминсульфатом. С фракцией фермента, осажденной сульфатом аммония 34—43% насыщения, может быть синтезирована полигуанилиловая кислота с выходом ~ 50% и $M > 300\ 000$, которая легко образует комплекс с полицитидиловой кислотой, обладающий высокой интерферогенной и противовирусной активностью.

Разработаны методы очистки коммерческих препаратов GDP, применяемого для синтеза высокомолекулярной poly(G) с использованием частично очищенной полинуклеотидфосфорилазы. Предлагается простой и удобный метод — дробное осаждение кальциевых солей GMP и GDP, основанное на их различной растворимости в кислых средах.

Ранее нами была показана высокая интерферогенная и противовирусная активность двухнитевого полирибонуклеотидного комплекса полигуанилата с полицитидилатом, которая зависит от молекулярного веса исходных полинуклеотидов [1—4]. Было найдено, что максимальной активностью обладает комплекс, полученный из полигуанилиновой кислоты с M не менее 300 000. Высокая интерферогенная и противовирусная активность этого комплекса, а также низкая токсичность дают основание применять этот препарат для профилактики и терапии вирусных заболеваний и для изучения теоретических аспектов индукции интерферона [3, 5, 6].

Настоящая работа посвящена разработке удобного препаративного метода синтеза высокомолекулярной полигуанилиновой кислоты, свободной от белковых, солевых и олигонуклеотидных примесей, которые мешают образованию комплекса с высокой биологической активностью.

Синтез полигуанилиловой кислоты поликонденсацией GDP в присутствии полинуклеотидфосфорилазы [КФ 2. 7. 7. 8] из *Escherichia coli* был впервые осуществлен М. Грюнберг-Маного с соавт. [7]. Высокомолекулярная полигуанилиловая кислота была получена только с высокоочищенной полинуклеотидфосфорилазой, выделенной после двух фракционирования сульфатом аммония, осаждения нуклеиновых кислот протаминсульфатом и трех стадий хроматографии на колонках [8]. В качестве

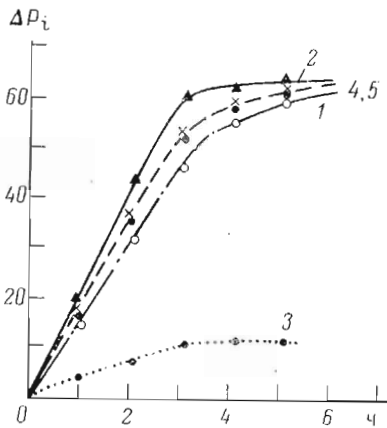


Рис. 1

Рис. 1. Прирост P_i при синтезе poly(G) в присутствии ферментного препарата А (1, 3–5) и высокоочищенной полинуклеотидфосфорилазы [10] (2); (1 ед. акт. в 1 мл инкубационной смеси). В качестве субстрата использованы GDP «Sigma» (1, 2), GDP-1 (3), GDP-2 (4), GDP-3 (5)

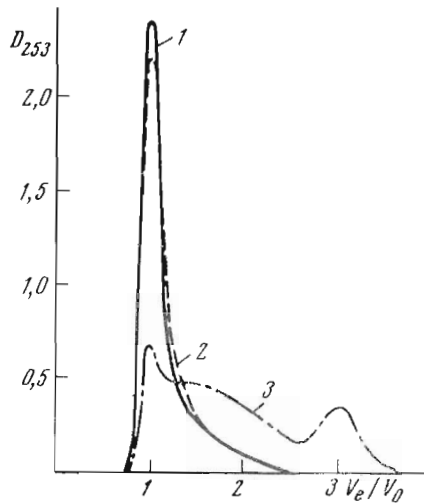


Рис. 2

Рис. 2. Гель-хроматография на сефадексе G-200 препаратов poly(G), синтезированных из GDP «Sigma» в присутствии ферментного препарата А (1), полинуклеотидфосфорилазы высокой степени очистки (2), ферментного препарата (А + В) (3)

субстрата авторы рекомендовали коммерческий препарат GDP высокой степени чистоты фирмы «Sigma». Попытки очищать другие препараты GDP на дауэксе 1×2 не привели к удовлетворительным результатам [9].

Нами изучены условия поликонденсации GDP в присутствии полинуклеотидфосфорилазы из *E. coli*, выделенной в соответствии с первыми стадиями метода [8], но без применения колоночной хроматографии (таблица), а также различные методы очистки коммерческих препаратов GDP. Условия поликонденсации исследовались с GDP фирмы «Sigma». В присутствии препарата А при использовании субстрата высокой степени чистоты фирмы «Sigma» через 3 ч скорость реакции поликонденсации уменьшается (рис. 1, 1). Через 5 ч, когда достигалось равновесие реакции и прирост P_i составлял около 60%, инкубацию реакционной смеси пре-

Выделение частично очищенной полинуклеотидфосфорилазы из *E. coli*

Стадии выделения полинуклеотидфосфорилазы	Содержание белка, мг	D_{260}/D_{280}	Удельная активность, ед. акт./мг белка
1. Сырой экстракт	9450	0,68	—
2. I фракционирование сульфатом аммония, фракция 25–55% насыщения $(NH_4)_2SO_4$	4560	0,58	0,96
3. Осаждение нуклеиновых кислот протаминсульфатом	2654	0,83	1,31
4. II фракционирование сульфатом аммония:			
34–43% насыщения (препарат А)	704	1,1	2,28
43–55% насыщения (препарат Б)	352	—	—

Рис. 3. Гель-хроматография poly(G) на сефарозе 4В при инкубации реакционной смеси в течение 6 ч (1) и 9 ч (2)

Рис. 4. Гель-хроматография на сефадексе G-200 реакционной смеси синтеза poly(G) из GDP «Sigma»: 1 — poly(G), 2 — GDP

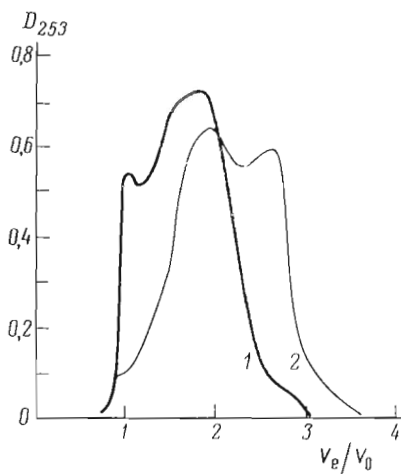


Рис. 3

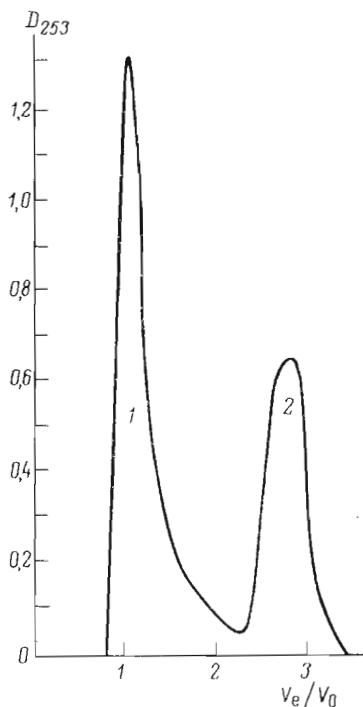


Рис. 4

крашали. Выход лиофилизованного полинуклеотида в этих условиях составлял 45—50%.

Разница в кинетике выделения P_i при использовании препарата А (рис. 1, 1) и фермента высокой степени очистки, выделенного по методу [10] (рис. 1, 2), незначительна, хотя в случае синтеза с ферментом высокой степени очистки равновесие достигается несколько быстрее.

Для анализа молекулярно-вещного распределения синтезированной poly(G) мы применили гель-хроматографию на сефадексе G-200 в присутствии мочевины. Показано, что poly(G), синтезированные с полинуклеотидфосфорилазой высокой степени чистоты и с препаратом А, практически не удерживаются гелем (рис. 2). Предварительные эксперименты показали, что константа седиментации этих препаратов poly(G) $s_{20w}^0 = 6,7 S$ и выше. Известно, что poly(G) в растворе образует стабильную многонитевую вторичную структуру, поддерживаемую водородными связями [11, 12]. Поэтому для оценки молекулярного веса синтезированного полинуклеотида по константе седиментации нам пришлось использовать формулу для упорядоченных спиральных структур, т. е. ДНК [13]. Из нее следует, что константе седиментации 6,7S соответствует $M \sim 300\,000$.

В некоторых опытах исследовалась возможность применения более широкой фракции фермента для синтеза poly(G). При использовании препарата А вместе с препаратом Б образуется более полидисперсная и низкомолекулярная poly(G) (рис. 2, 3) и лишь небольшая ее часть не удерживается сефадексом G-200. Возможно, выделение более узкой фракции 34—43% насыщения сульфатом аммония освобождает полинуклеотидфосфорилазу от ферментов с фосфоэстеразной активностью.

Было исследовано также влияние длительности инкубации на молекулярный вес синтезированной в присутствии препарата А poly(G). Выделение P_i заканчивалось через 5 ч. Дополнительное выдерживание реакционной смеси при 60° в течение 4 ч после окончания реакции уменьшало

средний молекулярный вес полинуклеотида (рис. 3), однако, как показывает параллельная гель-хроматография на сефадексе G-200, фракции с M ниже 200 000 практически не появлялись.

Таким образом, частично очищенную полинуклеотидфосфоорилазу можно использовать для синтеза высокомолекулярной poly(G) из GDP «Sigma» при длительности инкубации 5—6 ч.

Коммерческие препараты GDP, согласно данным нашего анализа (см. «Экспериментальную часть»), как правило, содержат значительные примеси GMP и неорганических фосфатов. Поэтому мы изучали различные способы очистки GDP для получения субстратов, пригодных для синтеза высокомолекулярной poly(G) с частично очищенной полинуклеотидфосфоорилазой.

Мы исследовали препараты GDP: а) очищенные на ионообменных смолах дауэкс-1 \times 4 или ФАФ и выделенные осаждением из элюата смесью спирт — ацетон в виде их литиевой соли (GDP-1); б) очищенные аналогичным образом, но осажденные в виде кальциевой соли (GDP-2); в) выделенные из смеси с GMP и неорганическим ортофосфатом дробным осаждением в виде кальциевой соли (GDP-3). В сравнительных экспериментах использовали высокоочищенный GDP фирмы «Sigma».

Разделение GDP на анионите ФАФ ранее было проведено в линейном градиенте концентрации хлористого лития [14]. Мы модифицировали метод, применяя ступенчатую элюцию. На дауэксе 1 \times 4 GDP очищали по методу [15].

Анализ препаратов GDP-1 не обнаруживал примесей неорганического фосфата и GMP. Однако получить с этими препаратами GDP высокомолекулярную poly(G), как правило, не удавалось, а кинетические кривые прироста P_i при синтезе poly(G) значительно отличались от кривых прироста P_i для других препаратов GDP (рис. 1, 3). Как видно из рисунка, для GDP-1 прирост P_i составлял 4% в 1 ч и достигал 12%, после чего синтез poly(G) прекращался. С некоторыми партиями GDP-1 удавалось достичь прироста P_i 60%, но только за 12 ч. Можно было предположить, что очищенные с использованием анионитов препараты GDP, хотя и не содержат P_i и GMP, имеют аналитически трудно определяемые примеси ингибиторов полинуклеотидфосфоорилазы, возможно вымываемые со смолы и соосаждающиеся с литиевой солью GDP; после пропускания раствора GDP-1 через дауэкс-50 в Li^+ -форме синтез poly(G) с полученными дифосфатами проходил так же, как с «Sigma».

Таким образом, очевидно, что хроматографическая однородность препарата является недостаточным критерием его пригодности для синтеза высокомолекулярной poly(G). Для оценки качества субстрата был разработан дополнительный тест: гель-хроматография реакционной смеси на сефадексе G-200 в присутствии 7М мочевины через 5—6 ч после начала синтеза poly(G). Как видно из рис. 4, при гель-хроматографии достигается разделение реакционной смеси на два пика: 1 соответствует высокомолекулярной poly(G) и 2 — GDP (возможно, с примесью коротких олигонуклеотидов); по соотношению площадей пиков можно судить о выходе высокомолекулярного полинуклеотида при использовании различных субстратов. Это позволяет оценивать пригодность субстрата без определения P_i и без выделения продукта.

Известно, что кальциевые соли GDP имеют ограниченную растворимость в водно-спиртово-солянокислых средах, чем обычно пользуются при выделении GDP [16]. С уменьшением кислотности растворимость уменьшается. Это позволило осуществить количественное осаждение кальциевой соли GDP после очистки препаратов на анионитах добавлением к нейтрализованному элюату 1—4 объемов спирта, содержащего 0,2 М $CaCl_2$. Кальциевая соль GDP переводится далее в литиевую на катионите дауэкс-50. При таком методе очистки получают препараты GDP, пригодные для синтеза poly(G) (рис. 1, 4).

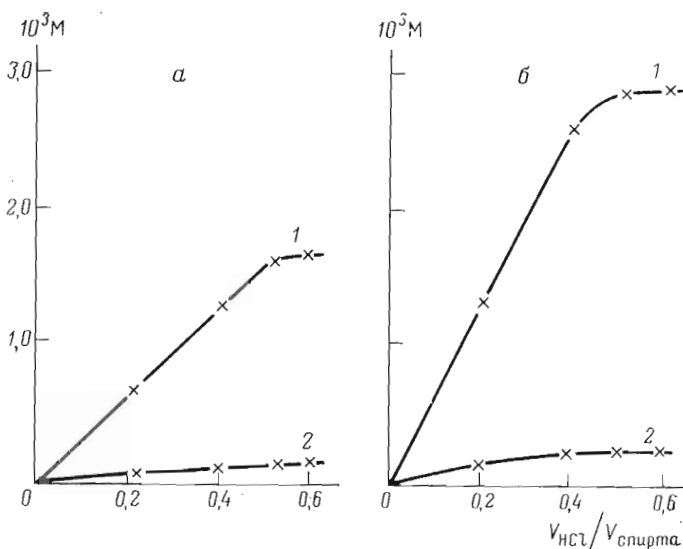


Рис. 5. Растворимость кальциевых солей GMP (1) и GDP (2) в смеси спирт — 0,1 н. HCl при 0° (а) и 20° (б)

Представлялось также интересным изучить возможность разделения GMP и GDP, основанного на различной растворимости их кальциевых солей. На рис. 5 показаны кривые растворимости кальциевых солей GMP и GDP в водно-спиртово-солянокислых средах. Для изучения растворимости кальциевые соли GMP и GDP по отдельности суспендировали в водно-спиртово-солянокислых растворах до установления равновесия между жидкой и твердой фазами, концентрацию гуанозинфосфатов в жидкой фазе определяли спектрофотометрически. Растворимость кальциевой соли фосфорной кислоты значительно больше растворимости кальциевой соли GMP и на графике не приведена. Сравнение кривых 1 и 2 показывает, что можно добиться разделения GMP и GDP дробным осаждением их кальциевых солей в широком интервале температур и соотношений концентраций спирта и соляной кислоты без предварительного разделения на анионитах. В зависимости от количества примесей GMP (30 — 50%) требуется 3—5 переосаждений.

Кривые выделения P_i при синтезе poly(G) в присутствии ферментного препарата А из очищенных дробным осаждением субстратов (рис. 1, 5) не отличались от кривых, полученных как при использовании GDP-3, выделенного осаждением в виде кальциевой соли после элюирования с анионита (рис. 1, 4), так и при использовании коммерческого препарата GDP «Sigma» высокой степени чистоты (рис. 1, 1). Профили гель-хроматографии реакционных смесей при синтезе poly(G) не отличались от представленных на рис. 4, а профили гель-хроматографии выделенных препаратов poly(G) соответствовали рис. 2, 1 и 2.

Все полученные нами препараты poly(G), синтезированные описанным методом с частично очищенной полинуклеотидфосфорилазой, взаимодействовали в стандартных условиях с полицитидиловой кислотой, образующие комплексы имели характерный УФ-спектр [3].

В ряде случаев препараты poly(G) содержали 3—5% примесей олигонуклеотидов с $M < 20\ 000$. Освобождение poly(G) от этих примесей проводили на сефадексе G-75. После такой очистки комплексы синтезированных нами препаратов poly(G) с $M\ 300\ 000$ и poly(C) обладали высокой интерферогенной активностью [2,3].

Экспериментальная часть

Применяли динатриевую соль GDP фирмы «Sigma» (США), а также препараты фирмы «Reanal» (Венгрия): динатриевую соль GDP и тринатриевую соль GDP с истекшим паспортным сроком хранения, тринатриевую соль ADP.

Использовали анионообменные смолы ФАФ (Олайнского завода химических реактивов, ТУ-10 П-173-68) и дауэкс-1 \times 4 в Cl-форме.

Степень чистоты GDP проверяли БХ в системе изомасляная кислота — вода — концентрированный аммиак (66 : 33 : 1, рН 3,7); электрофорезом на бумаге в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере, рН 4,1 (1 ч, 30 В/см); аналитической хроматографией на смоле ФАФ (на смолу объемом 1 мл наносили 100 ОЕ₂₆₀). В качестве свидетелей использовали GMP, GDP и GTP фирмы «Sigma».

Бактериальную массу E. coli, штамм В, выращивали соответственно работе [8]. Полинуклеотидфосфорилазу выделяли при 0—4°. К 70 г клеток добавляли 250 мл 0,02 М трис-НСl-буфера, рН 7,4. Клетки вскрывали во френч-прессе [17] при давлении 1000 кг/см², клеточные оболочки отделяли центрифугированием в течение 40 мин при 15 000 g. Использовали фракции фермента, осажденные сульфатом аммония, 34—43 или 34—55 % насыщения. Применяли протаминсульфат фирмы «Srofa» (Чехословакия), сульфат аммония квалификации х. ч. Препараты полинуклеотидфосфорилазы хранили при —15 ÷ — 20°. За единицу активности полинуклеотидфосфорилазы принимали активность, соответствующую выделению 1 мкмоль Р₁ за 1 ч при поликонденсации ADP. Удельную активность выражали в единицах активности на 1 мг белка. Р₁ определяли по методу Фиске и СуббаРоу [18], содержание белка — по биуретовой реакции [19].

Очистка GDP. На колонку со смолой ФАФ объемом 35 мл, уравновешенную 0,01 н. HCl, сорбировали 1 г смеси гуанозин-5'-фосфатов в 100 мл 0,01 н. HCl. GMP, GDP и GTP вымывали соответственно 0,02; 0,08 и 0,5 М LiCl в 0,01 н. HCl. Если препараты GDP не содержали примеси GTP, для уменьшения объема элюента GDP вымывали 0,5 М LiCl. С анионита вымывали 80—90 % пуклеотидного материала.

GDP-1. Фракции GDP нейтрализовали гидратом окиси лития до рН 7, упаривали на роторном испарителе, GDP осаждали в виде литиевой соли прибавлением 10-кратного объема смеси этанола и ацетона (1 : 1), суспензию выдерживали 2—3 ч при 5—10° и центрифугировали. Осадок растворяли и GDP вторично осаждали аналогичным образом из водного раствора, промывали ацетоном, растворяли в воде и лиофилизировали.

GDP-2. Для выделения в виде кальцевой соли фракцию GDP после анионита нейтрализовали, упаривали, осаждали тремя объемами 0,2 М хлористого кальция в спирте, осадок калицевой соли GDP отделяли центрифугированием, промывали спиртом и переводили в литиевую соль переметиванием водной суспензии с катионитом дауэкс-50 (Li⁺-форма). Раствор упаривали до 10—20 мл и лиофилизировали.

GDP-3. Для очистки препаратов GDP, содержащих 30—50 % GMP, применяли дробное осаждение их кальциевых солей. Динатриевую соль GDP (1 г) растворяли в 30 мл 0,1 н. HCl, к раствору прибавляли 45 мл 0,2 М хлористого кальция в этиловом спирте. Выпавший осадок центрифугировали, растворяли в 30 мл 0,1 н. HCl и переосаждали добавлением 80 мл этилового спирта. После перевода кальцевой соли GDP в литиевую на катионите дауэкс-50 выход очищенного GDP составлял 84%.

Поликонденсация. Состав реакционной смеси при синтезе poly(G) в мкмоль/мл: GDP (натриевая или литиевая соль) — 10; мочевины — 400; трис-НСl-буфер (рН 8,5) — 10; MnSO₄ — 2. Концентрация полинуклеотидфосфорилазы 0,5—1 ед. акт./мл. Объем реакционной смеси для микросинтеза — 1 мл, при препаративных синтезах — до 120 мл.

Реакционную смесь инкубировали при 60°, для контроля за ходом реакции через каждый час отбирали пробы по 0,05—0,1 мл и определяли прирост P_1 . По окончании реакции реакционную смесь охлаждали до 0°, дважды экстрагировали при 0° равным по объему раствором свежеперегнанного 90%-ного раствора фенола в 0,1 М трис-НСI-буфере, рН 7,4. Фенольный слой отделяли центрифугированием при 4° (6000 об/мин, 40 мин), промывали 0,1 М трис-НСI-буфером. Объединенные водные фракции обрабатывали при 0° смесью изоамиловый спирт — хлороформ (1 : 2,5), на каждые 10 мл водного раствора 3,5 мл смеси, и экстрагировали эфиром. Poly(G) осаждали из водного раствора двукратным объемом этанола и выдерживали при 4° в течение ночи. Осадок poly(G) отделяли центрифугированием, растворяли в минимальном количестве 0,1 М трис-НСI-буфера, диализовали против 0,5 М раствора хлористого натрия, содержащего 0,001 М этилендиаминтетрауксусную кислоту, трижды против дистиллированной воды и лиофилизовали.

Молекулярно-весовое распределение препаратов poly(G) определяли с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-200 и на сефарозе 4В [2]. Применяли колонки размером 0,4 × 30 см, уравновешенные 0,005 М натрий-фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 0,1 М NaCl. В случае гель-хроматографии на сефадексе G-200 добавляли 7 М мочевины. На колонку наносили 1,5—2 ОЕ₂₆₀ poly(G) в 0,15 мл буфера, элюирование проводили тем же буфером со скоростью 1,5—2 мл/ч.

Низкомолекулярные примеси отделяли на сефадексе G-75. На колонку размером 1,2 × 40 см папосили 15 мг poly(G) в 5 мл 0,005 М натрий-фосфатного буфера, рН 7,4, содержащего 0,1 М NaCl, и элюировали тем же буфером.

Хроматографические профили разделений получены на проточном денситометре с непрерывной записью оптической плотности при 253,7 нм.

Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре СФД-2. Коэффициенты молярной экстинкции при 260 нм для GMP и GDP принимали равными $11,8 \cdot 10^3$ при рН 2, для poly(G) при рН 7,4 — $8,7 \cdot 10^3$ [20, 21].

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксенов О. А., Тимковский А. Л., Агеева О. Н., Коган Э. М., Бреслер С. Е., Смородиццев Ал. А., Тихомирова-Сидорова Н. С. (1973) *Вопр. вирусологии* № 3, 345—350.
2. Тимковский А. Л., Аксенов О. А., Бреслер С. Е., Коган Э. М., Смородиццев Ал. А., Тихомирова-Сидорова Н. С. (1973) *Вопр. вирусологии*, № 3, 350—355.
3. Тихомирова-Сидорова Н. С., Аксенов О. А., Бреслер С. Е., Бродская Л. М., Вильнер Л. М., Ершов Ф. И., Коган Э. М., Тимковский А. Л. (1973) *Тр. Ин-та полиомеикита и вирусных энцефалитов АМН СССР*, 21, вып. 2, 38—46.
4. Вильнер Л. М., Бродская Л. М., Коган Э. М., Тимковский А. Л., Тихомирова-Сидорова Н. С., Бреслер С. Е. (1974) *Вопр. вирусологии*, № 1, 45—49.
5. Вильнер Л. М., Бродская Л. М., Чумаков М. П., Родин И. М. (1973) *Вопр. вирусологии*, № 5, 545—548.
6. Каспаров А. А., Зейтленок Н. А., Вильнер Л. М., Попова З. С., Бродская Л. М., Тихомирова-Сидорова Н. С., Тимковский А. Л., Коган Э. М. (1974) *Офтальмол. ж.*, № 4, 292—294.
7. Thang M. N., Graffe M., Grunberg-Manago M. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, 108, 125—131.
8. Williams F. R., Grunberg-Manago M. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, 89, 66—89.
9. Thang M. N., Grunberg-Manago M. (1968) *Methods in Enzymol.*, 12, part B, 522—529.
10. Бреслер С. Е., Фирсов Л. М., Чернаенко В. М. (1974) *Прикл. биохимия и микробиол.*, 10, 80—85.
11. Pochon F., Michelson A. M. (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 53, 1425—1430.
12. Arnott S., Chandrasekaran R., Maritila C. M. (1974) *Biochem. J.*, 141, 537—543.
13. Eigner J., Doty P. (1965) *J. Mol. Biol.*, 12, 549—580.
14. Чернаенко В. М. (1973) *Прикл. биохимия и микробиол.*, 9, 918—921.
15. Hurlbert R. V. (1957) *Methods in Enzymol.*, 3, 785—796.
16. Michelson A. M. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, 91, 1—13.
17. French C. S., Milner H. W. (1965) *Methods in Enzymol.*, 1, 64—67.

18. Fiske C. H., Subbarow Y. (1925) *J. Biol. Chem.*, **66**, 375—400.
19. Бейли Д. (1965) Методы химии белков, «Мир», М.
20. Laffleur L., Rice J., Thomas G. J., Jr. (1972) *Biopolymers*, **11**, 2423—2437.
21. Венкстерн Т. В., Баев А. А. (1966) Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонуклеиновых кислот, **14**, М.

Поступила в редакцию
1.VIII.1975

THE SYNTHESIS OF POLY(G) WITH PARTIALLY PURIFIED POLYNUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE FROM *ESCHERICHIA COLI*

TIKHOMIROVA-SIDOROVA N. S., KOGAN E. M., TIMKOVSKY A. L.
USTJUZHANIN G. E., KOLOMEJZEVA V. V., BONDARZEVSKAJA L. G.,
TIKHOMIROVA V. P.

*Institute of High Molecular Weight Compounds, Academy
of Sciences of the USSR, Leningrad*

The method was elaborated for synthesizing poly (G) of high molecular weight in the presence of partially purified polynucleotide phosphorylase (PNP) from *Escherichia coli* B. Purification of the enzyme included protamine sulfate and ammonium sulfate fractionation without subsequent column chromatography. Using the enzyme fraction precipitated by ammonium sulfate of 34-43% saturation, poly (G) characterized by molecular weight > 300000 was synthesized with the yield of about 50%. These poly(G) readily formed double-stranded complexes with poly(C) which possessed high interferon-inducing and antiviral activity. Several different methods for purification of commercial GDP were worked out. The most simple and convenient one involved selective precipitation of GMP and GDP in the form of calcium salts based on their different solubility in acidic media.
