



УДК 577.155.04

## ИММОБИЛИЗОВАННАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА А236 И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ 5'-НУКЛЕОЗИДФОСФАТОВ

*Варламов В. П., Львова Т. Н., Банникова Г. Е.,  
Абросимова-Амельяничук Н. М., Вальковский Д. Г.,  
Татарская Р. И., Рогожин С. В.*

*Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР, Москва*

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Получены препараты эндонуклеазы А236, иммобилизованной на силохроме, покрытом двуокисью циркония и модифицированном введением альдегидо- и аминоарильных групп с разной длиной «ножки», и имеющие до 80% исходной нуклеазной активности.

Изучено влияние на активность иммобилизованного фермента рН, ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , количества функциональных групп на поверхности носителя и длины ножки.

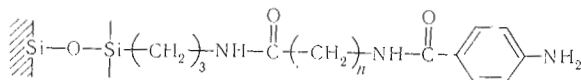
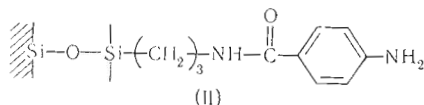
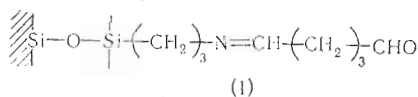
Предложена схема получения 5'-нуклеозидфосфатов из РНК с 80—90%-ным выходом, состоящая в последовательном использовании для гидролиза колонок с иммобилизованными эндонуклеазой А236 и экзонуклеазой А5. При периодической работе в таком режиме в течение месяца теряется 30% ферментативной активности.

Показано, что эффективность гидролиза может быть повышена путем совместной иммобилизации эндонуклеазы А236 и экзонуклеазы А5 на одном носителе.

Ранее мы сообщали об использовании иммобилизованной экзонуклеазы А5 для получения 5'-нуклеозидфосфатов [1]. Эффективность процесса можно повысить, проводя предварительный гидролиз РНК до олигонуклеотидов с концевым 5'-фосфатом с помощью эндонуклеазы А236 [2, 3].

Целью настоящей работы являлось получение активного и стабильного препарата иммобилизованной эндонуклеазы А236 и использование его вместе с иммобилизованной экзонуклеазой А5 для гидролиза рибонуклеиновых кислот до 5'-нуклеозидфосфатов.

В качестве матрицы мы использовали альдегидосилохром (I) и аминоарилсилохромы (II)—(IV), полученные на основе силохрома, покрытого двуокисью циркония [4].



(III),  $n = 2$ ; (IV),  $n = 6$

Иммобилизованный на силохромах (I) и (II) фермент был стабилен при хранении в виде суспензии в 0,05 М водном растворе хлористого кальция

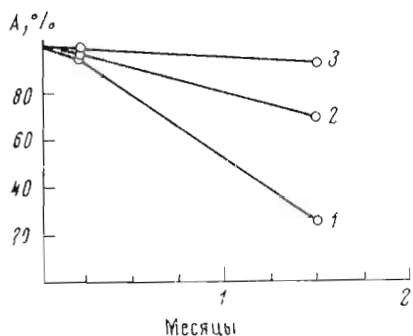


Рис. 1

Рис. 1. Изменение активности ( $A$ ) иммобилизованной на аминоарил-силохроме (II) эндонуклеазы при хранении при  $4^\circ$  в зависимости от концентрации ионов кальция.  $[Ca^{2+}]$ , М: 1 —  $10^{-2}$ ; 2 —  $5 \cdot 10^{-3}$ ; 3 —  $5 \cdot 10^{-2}$

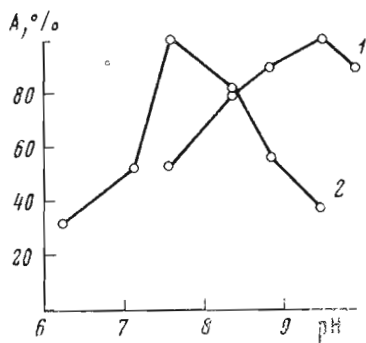


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость нуклеазной активности от pH для эндонуклеазы A236 в растворе (I) и эндонуклеазы A236, присоединенной к альдегидсилохрому (I) или к аминоарилсилохрому (II) (2)

(рис. 1). И хотя ионы кальция несколько снижают активность иммобилизованной эндонуклеазы A236, это снижение полностью компенсируется высокой стабильностью препарата. Все операции с эндонуклеазой A236 (включая иммобилизацию) проводили при концентрации ионов кальция  $10^{-2}$  М. В отличие от ионов кальция ионы магния не оказывают на иммобилизованный фермент стабилизирующего действия, но они необходимы для проявления максимальной активности иммобилизованного фермента.

Для иммобилизованной на силохромах (I) и (II) эндонуклеазы наблюдается сдвиг оптимума pH примерно на 1,8 единицы в кислую область (рис. 2), хотя обычно для ферментов, фиксированных на кремнеземных носителях, характерен сдвиг оптимума pH в щелочную область [1]. В данном случае это не связано с кислой поверхностью носителя [1, 5], и, следовательно, смещение оптимума pH фиксированного фермента можно объяснить не только природой матрицы, как обычно принято, но и изменениями, происходящими в белке в результате иммобилизации.

Увеличение количества ковалентных связей фермента с носителем обычно повышает его стабильность, однако при этом уменьшается активность. На основе аминоарилсилохромов (II), содержащих разное количество функциональных групп, нами были получены препараты иммобилизованной эндонуклеазы A236 с различным количеством ковалентных связей с матрицей. Как видно из таблицы, увеличение в 10 раз количества функциональных аминоарильных групп носителя повышает проявляемую активность фермента примерно в 3 раза. Видимо, для максимального проявления ферментативной активности вторичная структура эндонуклеазы A236 должна быть достаточно жестко фиксирована.

Зависимость активности иммобилизованной эндонуклеазы A236 от степени связывания с носителем \*

Количество групп $NH_2$ -арил-, моль/мг белка $\cdot 10^4$	Активность, % к исходной	Количество групп $NH_2$ -арил-, моль/мг белка $\cdot 10^4$	Активность, % к исходной
3,72	25,4	0,62	11,0
1,24	18,7	0,37	8,0

\* Приведены результаты, полученные для аминоарилсилохрому (II).

В нашей работе субстратом эндонуклеазы А236 являлась полимерная РНК, поэтому важно было свести к минимуму стерические трудности при образовании фермент-субстратного комплекса. Нами были получены аминоарилсилохромы (II)—(IV) с различной длиной ножки. Для этих сорбентов было определено количество аминоарильных групп и установлена активность иммобилизованной эндонуклеазы А236 в пересчете на 1 моль аминоарильных групп. Для носителей (II), (III) и (IV) были получены величины, равные  $3930 \cdot 10^3$ ,  $4180 \cdot 10^4$  и  $2080 \cdot 10^4$  ед. соответственно. Видно, что увеличение длины ножки не привело к повышению активности, а в случае носителя (IV) нуклеазная активность даже несколько понизилась. Можно допустить, что в последнем случае имеет место либо складывание ножки, либо появление с увеличением ее длины стерических препятствий для той части фермента, которая иммобилизована внутри пор.

С целью повышения стабильности связи между эндонуклеазой А236 и альдегидосилохромом (I) нами было проведено восстановление иммобилизованного фермента с помощью боргидрида натрия. Неожиданно оказалось, что активность иммобилизованного фермента после восстановления увеличивается в 1,5 раза. Аналогичный эффект был обнаружен при восстановлении эндонуклеазы А236, присоединенной к аминоарилсилохрому (II) (рис. 3).

Было проведено также мягкое восстановление иммобилизованных препаратов с помощью дитиотрепта, восстанавливающего только —S—S—связи. Результаты, полученные при восстановлении с помощью боргидрида натрия и дитиотрепта, аналогичны. Роль сульфгидрильных групп в эндонуклеазе А236 в настоящее время не изучена.

С помощью боргидрида натрия мы проводили также стабилизацию связи между экзонуклеазой А5 и альдегидосилохромом. При этом не было обнаружено изменений в активности фермента. Интересно было проверить отношение к восстановлению боргидридом натрия пиримидилрибонуклеазы, присоединенной к альдегидосилохрому. Как известно, структура этого фермента стабилизирована дисульфидными связями, поэтому восстановление иммобилизованной пиримидилрибонуклеазы проводили в 8 М растворе мочевины. В условиях нашего опыта восстановление иммобилизованного фермента боргидридом натрия приводило к потере 60—70% активности, что свидетельствует о восстановлении дисульфидных мостиков, а не только шиффовых оснований между ферментом и альдегидосилохромом.

При проведении иммобилизации эндонуклеазы А236 в присутствии  $10^{-2}$  М  $\text{Ca}^{2+}$  с последующим восстановлением боргидридом натрия были получены препараты, содержащие до 80% исходной нуклеазной активности. Эти препараты были использованы далее для гидролиза РНК с целью получения 5'-нуклеозидфосфатов. Мы проводили последовательный и одновременный гидролиз субстрата с помощью иммобилизованных препаратов эндонуклеазы А236 и экзонуклеазы А5.

При пропускании раствора субстрата через колонку с эндонуклеазой А236 в гидролизате обнаруживается 5—10% нуклеотидов, а при прохождении через колонку с иммобилизованной экзонуклеазой А5 выход нуклеотидов составляет 40—45%. Пропуская тот же субстрат последовательно через две колонки, в гидролизате получают нуклеотиды с 80—90%-ным выходом. В последовательном режиме колонки работали периодически в течение месяца, при этом наблюдалась потеря около 30% ферментативной активности. Гидролизат далее разделяли на анионообменниках [1]. Конечные продукты гидролиза идентифицировали как 5'-нуклеозидфосфаты с помощью 5'-нуклеотидазы, а также с использованием БХ, ТСХ и УФ-спектрометрии.

Еще более эффективен гидролиз РНК с помощью эндонуклеазы А236 и экзонуклеазы А5, фиксированных на одном носителе. В этом случае

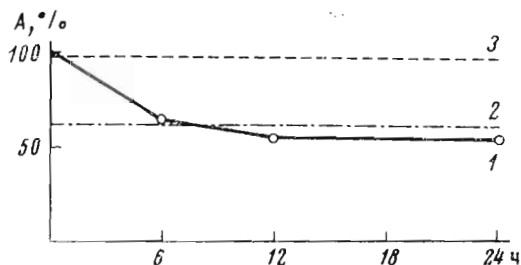


Рис. 3. Изменение активности иммобилизованной на аминоарилсидохроме (II) эндонуклеазы A236 при гидролизе нуклеиновых кислот в проточке на колонке (37°, рН 7,6,  $[Mg^{2+}] 5 \cdot 10^{-3} M$ ): 1 —  $[Ca^{2+}] 0$ , не восстановлена  $NaBH_4$ ; 2 —  $[Ca^{2+}] 10^{-2} M$ , не восстановлена  $NaBH_4$ ; 3 —  $[Ca^{2+}] 10^{-2} M$ , восстановлена  $NaBH_4$

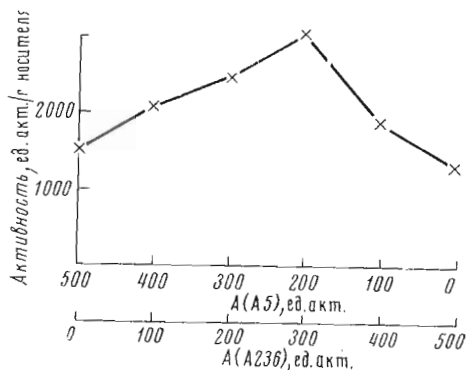


Рис. 4. Зависимость нуклеазной активности препарата, полученного совместной иммобилизацией на аминоарилсидохроме (II) двух ферментов, от соотношения активностей ферментов, взятых для иммобилизации

для экзонуклеазы А5 отсутствует стадия диффузии субстрата из раствора через диффузионный слой к ферменту, так как продукты расщепления РНК эндонуклеазой А236 являются субстратами для экзонуклеазы А5. Мы определили соотношение двух ферментов, дающее при иммобилизации максимальную нуклеазную активность. Как видно из рис. 4, максимальную активность проявлял препарат, полученный путем иммобилизации 200 ед. акт. экзонуклеазы А5 и 300 ед. акт. эндонуклеазы А236. Это соотношение зависит от полимерности субстрата, удельной активности ферментов, диаметра пор носителя и некоторых других факторов.

Были сопоставлены активности двухферментной системы по ДНК и РНК. Известно, что денатурированная ДНК расщепляется экзонуклеазой А5, но не расщепляется эндонуклеазой А236 [6], поэтому активность препарата по ДНК характеризует вклад экзонуклеазы А5 в гидролиз РНК. При использовании для совместной иммобилизации растворов экзонуклеазы А5 и эндонуклеазы А236 с активностями 1320 и 1000 ед. акт. соответственно получен препарат, обладающий активностью по РНК, равной 3000, а по ДНК — 908 ед. акт. Но несмотря на высокую активность двухферментного препарата, его применению мешает малая стабильность при длительной работе, которая уступает стабильности индивидуально иммобилизованных ферментов. Причины этого явления нами пока не установлены.

Таким образом, иммобилизованные нуклеазы актиномицетов могут быть успешно применены для получения 5'-нуклеозидфосфатов из нуклеиновых кислот.

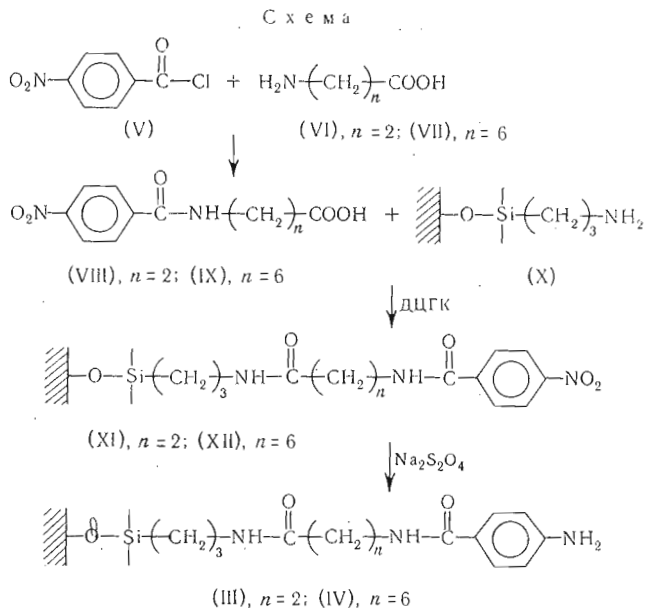
## Экспериментальная часть

В работе были использованы следующие препараты: суммарная дрожжевая РНК (ИНЭОС АН СССР), суммарная РНК крупного рогатого скота (СКТББАВ, Новосибирск), эндонуклеаза актиномицетов А236 КФ 3.1.4 (500 ед. акт./мл) (ИМБ АН СССР), экзонуклеаза актиномицетов А5 КФ 3.1.4.1 (100 ед. акт./мл) (ИМБ АН СССР), 5'-нуклеотидаза яда гремучей змеи КФ 3.1.3.5 (фирма «BDH», Англия), пиримидилрибонуклеаза (Ленинградский мясокомбинат). ТСХ и БХ проводили в системах этанол — 1 М ацетат аммония, 7 : 3 (система насыщена бурой и доведена аммиаком до pH 9) (А); этанол — 1 М ацетат аммония, 75 : 30 (В); изомасляная кислота — H<sub>2</sub>O — NH<sub>3</sub>, 66 : 33 : 1 (В). Для ТСХ использовали готовые стеклянные пластины со слоем целлюлозы (фирма «Merck», ФРГ), для БХ — бумагу FN-1 (ГДР) и Ватман 3 ММ (фирма «Wahltman», Англия).

Количество белка определяли по методу Лоури [7], концентрацию аминокислотных групп на носителе — колориметрическим титрованием с β-нафтолом [4]. Нуклеазную активность измеряли по приросту поглощения кислоторастворимой фракции при λ 260 нм [6] и за единицу активности принимали прирост поглощения на 1 ОЕ<sub>260</sub>. Инкубацию субстрата (раствор РНК в воде, 6 мг/мл) с иммобилизованными ферментами проводили 20 мин при 37° в термостатированном сосуде с мешалкой (800 об/мин).

УФ-спектры регистрировали на приборе «Specord UV-Vis» (ГДР) и СФ-16 (ЛОМО, Ленинград). При определении белка и аминокислотных групп использовали спектроколориметр «Specol» (ГДР). ИК-спектры сняты на приборе UR-10 (ГДР) в вазелиновом масле.

Носители (I) и (II) получены на основе силохрома с диаметром пор 630 Å, покрытого двуокисью циркония, как описано в работе [4], носители (III) и (IV) — по схеме



**Аминоарилсилохром (III).** К 2 г (0,022 моль) β-аланина (VI) в 22 мл 1 н. NaOH при перемешивании и охлаждении до 0—5° добавляли одновременно 4,48 г (0,024 моль) *n*-нитробензоилхлорида (V) в 10 мл хлороформа и 11 мл 2 н. NaOH. Реакционную массу перемешивали 1,5 ч при 0—5°, фильтровали и водно-хлороформный фильтрат подкисляли до pH 4. Выпавший осадок отфильтровывали. Выход соединения (VIII) 3,55 г (67%), т. пл. 165° (этилацетат).

Найдено, %: С 50,49; Н 4,37; N 11,46.  $C_{10}H_{10}N_2O_5$ . Вычислено, %: С 50,42; Н 4,23; N 11,76. ИК-спектр ( $cm^{-1}$ ): 3280 (Н), 1700 (COOH), 1630 (амид I), 1605 (бензольное кольцо), 1550 (амид II). К 2 г аминоалкилсилохрому (X) [4] в 25 мл сухого метанола добавляли 0,29 г соединения (VIII) и 0,07 г дициклогексилкарбодимида в 10 мл сухого метанола, перемешивали при комнатной температуре 24 ч. Полученный продукт (XI) отмывали от дициклогексилмочевины метанолом, суспендировали в 50 мл 10%-ного водного раствора пиридина, содержащего 0,4 г  $Na_2S_2O_4$ , и кипятили 1,5 ч. Соединение (III) промывали на фильтре 500 мл воды, 50 мл ацетона и сушили в вакуумном шкафу 1 ч при 70–80°.

*Аминоарилсилохром (IV)*. Получали, как носитель (III), но вместо  $\beta$ -аланина (VI) использовали  $\omega$ -аминоэнантовую кислоту. Получали соединение (IX) с т. пл. 117–120° (спирт).

Найдено, %: С 56,41; Н 6,11; N 9,29.  $C_{14}H_{18}N_2O_5$ . Вычислено, %: С 57,14; Н 6,16; N 9,52. Строение продукта (IX) подтверждалось также ИК- и ПМР-спектрами.

*Иммобилизация эндонуклеазы А236 на силохромах (I)–(IV)*. Иммобилизацию проводили как описано в работе [1], но буферные и промывные растворы дополнительно содержали ионы  $Ca^{2+}$  в концентрации  $10^{-2}$  М.

*Одновременная иммобилизация эндонуклеазы А236 и экзонуклеазы А5 на аминоксилохроме (II)*. 0,15 г аминоксилохрому (II) суспендировали в 5 мл 2,5 н. HCl, добавляли 0,5 мл 14%-ного  $NaNO_2$  и перемешивали механической мешалкой 15 мин при 0–5°. Промывали на фильтре водой до pH 6–7 и суспендировали в 0,05 М трис-HCl-буфере (pH 8,3), содержащем  $5 \cdot 10^{-3}$  М  $Mg^{2+}$  и  $10^{-2}$  М  $Ca^{2+}$ . К активированному носителю добавляли 2 мл экзонуклеазы А5 (200 ед. акт.), 0,6 мл эндонуклеазы А236 (300 ед. акт.) и инкубировали при 5°, периодически встряхивая в течение 18 ч. Полученный препарат промывали на фильтре 500 мл 1 М NaCl, 200 мл 0,1 М трис-HCl (pH 8,5) и 300 мл воды. Промывные растворы содержали ионы кальция в концентрации  $10^{-2}$  М. Промытый препарат хранили в виде суспензии в  $10^{-2}$  М растворе  $CaCl_2$ .

*Восстановление эндонуклеазы А236, иммобилизованной на силохроме (I)*. К 0,5 г фиксированного фермента (993 ед. акт./г) в 5 мл 0,1 М трис-HCl (pH 8,2), содержащего  $10^{-2}$  М  $Ca^{2+}$ , добавляли 40 мг боргидрида натрия, перемешивали 0,5 ч при комнатной температуре и промывали на фильтре 0,01 М раствором  $CaCl_2$ . Восстановленный препарат имел активность 1500 ед. акт./г. Препарат хранили в виде суспензии при 0–5°.

Восстановление экзонуклеазы А236, иммобилизованной на силохроме (II), проводили аналогично. Полученный препарат фермента на носителе (II) в дальнейшем использовали для гидролиза РНК.

*Гидролиз РНК*. 2 г иммобилизованной эндонуклеазы А236 (1000 ед. акт./г) промывали предварительно 200 мл 1 н. NaCl, содержащего ионы кальция в концентрации  $10^{-2}$  М, и загружали в колонку ( $2 \times 10$  см), термостатированную при 37°. Вторую колонку заполняли экзонуклеазой А5 [1] в количестве 2 г с активностью 1500 ед. акт./г. 0,5%-ный раствор РНК в 0,05 М трис-HCl (pH 8,3), содержащем  $5 \cdot 10^{-3}$  М  $Mg^{2+}$  и  $10^{-2}$  М  $Ca^{2+}$ , подавали на обе колонки как последовательно, так и параллельно с помощью двухканального перистальтического насоса со скоростью 10–15 мл/ч. Гидролизат упаривали при 30–35° и разделяли как описано ранее [1].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Варламов В. П., Львова Т. Н., Вальковский Д. Г., Можеев В. Я., Татарская Р. И., Рогожин С. В. (1975) Биоорган. химия, 1, 816–820.
2. Абросимова-Амельянич Н. М., Артамонова О. И., Татарская Р. И., Баев А. А. (1972) Докл. АН СССР, 207, 985–987.
3. Львова Т. Н., Абросимова-Амельянич Н. М., Татарская Р. И. (1972) Тезисы II Международного симпозиума по молекулярной биологии вирусов, с. 14, М.

4. Рогожин С. В., Варламов В. П., Вальковский Д. Г. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1718—1721.
5. Weetall H. H. (1971) Res. Develop., 18—22.
6. Tatarskaya R. I., Lvova T. N., Abrossimova-Amelyanchik H. M., Korenyako A. I., Bayev A. A. (1970) Eur. J. Biochem., 15, 442—449.
7. Lowy H. O., Rosenbroug T. N., Farr G. A., Randall R. I. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.

Поступила в редакцию  
30.VII.1975

## IMMOBILIZED ENDONUCLEASE A236 AND ITS APPLICATION FOR PREPARATION OF 5'-NUCLEOTIDES

VARLAMOV V. P., L'VOVA T. N., BANNIKOVA G. E.,  
ABROSSIMOVA-AMELYANCHIK N. M., VAL'KOVSKY D. G.,  
TATARSKAYA R. I., ROGOZHIN S. V.

*Institute of Organoelement Compounds, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

Endonuclease A236 [EC 3.1.4] was covalently coupled to silochrome derivatives. The support was precoated by  $ZrO_2$  that greatly enhanced the stability in alkaline media. The preparation of immobilized enzyme possessed 10—80% of the original activity depending on the type of support and immobilization conditions. A study was made of pH, divalent metal ions, functional groups concentration on the surface of support and the spacer-arm effects on the activity of immobilized enzyme. The activity of immobilized endonuclease A236 was shown to increase as a result of  $NaBH_4$  treatment. This preparation in combination with immobilized exonuclease A5 was successfully applied for hydrolysing RNA into 5'-nucleoside phosphates. It was shown that the efficacy of hydrolysis may be increased by co-immobilization of endonuclease A236 and exonuclease A5 on the same support.

---