



УДК 577.152.36:678.744.339

## КАТАЛИЗ СИНТЕЗА И ФОСФОРОЛИЗА ПОЛИРИБОАДЕНИЛАТА ПОЛИНУКЛЕОТИДФОСФОРИЛАЗОЙ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА НОСИТЕЛЕ НОВОГО ТИПА

© 1999 г. Г. А. Платонова<sup>#</sup>, М. А. Суржик\*, Т. Б. Тенникова, Г. П. Власов, А. Л. Тимковский\*

Институт высокомолекулярных соединений РАН,  
199004, Санкт-Петербург, Большой пр., 31;

\*С.-Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН, Гатчина

Поступила в редакцию 18.12.97 г. Принята к печати 21.04.98 г.

Полинуклеотидфосфорилазу *Thermus thermophilus* иммобилизовали на полимерных носителях монолитного типа "СІМ-Disk" с оптимальным размером пор и определенным уровнем гидрофильно-гидрофобного баланса, ранее разработанных и применявшихся для получения высокоселективных аффинных иммуносорбентов. В биореакторе проточного типа исследован ферментативный катализ синтеза полирибоаденилата из АDР и обратной реакции – его фосфоролиза. Для иммобилизованной и растворимой полинуклеотидфосфорилазы определены значения константы Михаэлиса прямой и обратной реакций и зависимость обоих типов активности от рН и концентрации ионов магния. Показано, что иммобилизация на пористых монолитных носителях усугубляет различия в специфике взаимодействия фермента с высокомолекулярным и низкомолекулярным субстратами. Производительность реактора сохранялась неизменной при работе в течение 6 месяцев при 65°C и многократной смене субстратной смеси.

**Ключевые слова:** полинуклеотидфосфорилаза; иммобилизация; твердофазный носитель; пористые материалы; "СІМ-Disk".

Синтетические полирибонуклеотиды находят широкое применение при исследовании биосинтеза белков, структуры генов, механизма действия ферментов, а их высокомолекулярные дуплексы используют в медицинской практике в качестве противовирусных и иммуностимулирующих препаратов [1-5]. Ферментативный синтез полирибонуклеотидов с применением иммобилизованной полинуклеотидфосфорилазы (ПНФаза, полирибонуклеотид:ортофосфат нуклеотидилтрансфераза, КФ 2.7.7.8) технологически и экономически оправдан. Субстратом для ПНФазы служат рибонуклеозид-5'-дифосфаты, которые можно получать фосфоролизом РНК также с использованием иммобилизованной ПНФазы. Известны способы иммобилизации ПНФазы на сорбентах различного типа: полисахаридах, альдегидсилихромах и макропористых стеклах [6-9]. Недостатки этих носителей: для полисахаридов – ухудшение проницаемости колонок и разрушение носителя микроорганизмами, а для силикатных носителей – постепенная утрата части иммобилизованного фермента вследствие выщелачивания поверхностного силикатного слоя. Тенниковой с соавт. разработаны макропористые полимерные носители

монолитного типа с оптимальными размером пор и уровнем гидрофильно-гидрофобного баланса – мембраны (диски) на основе глицидилметакрилата, сшитого этилендиметакрилатом (GMA-EDMA) [10]. В настоящее время эти носители выпускаются фирмой ВІА (Словения) под коммерческим названием "СІМ-Disk" (Convective Interaction Media-Disk). Такие макропористые диски (СІМ-диски) были использованы ранее в качестве высокоселективных аффинных носителей [11, 12]. Нами исследована иммобилизация на СІМ-диске ПНФазы *Thermus thermophilus* и изучены параметры реакций синтеза и фосфоролиза полирибоаденилата – poly(A).

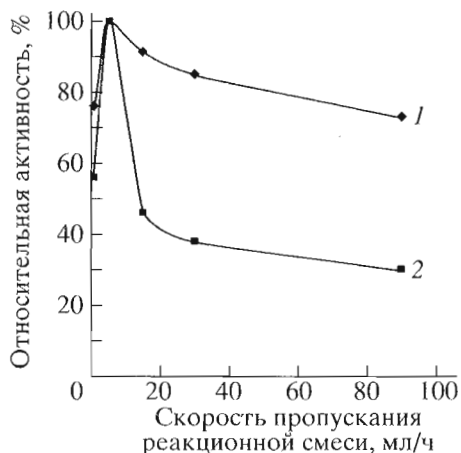
ПНФазу иммобилизовали на макропористом диске размером 12 × 3 мм. В отличие от описанной ранее [13] 3-стадийной иммобилизации трипсина на poly(GMA-EDMA) с добавлением спейсеров мы осуществляли одностадийную иммобилизацию. Из таблицы видно, что суммарная активность связанной ПНФазы составила 22% исходной активности (58% расчетного значения). Эффективность иммобилизованной ПНФазы изучали в термостабируемом реакторе, через который пропускали реакционную смесь в режиме рециркуляции при температуре 65°C с различными скоростями: от 1 до 90 мл/ч. На основании соотношения общего

<sup>#</sup> Адрес для переписки (e-mail: gim@bird.macro.ru; тел.: (812) 323-34-50; факс: (812) 218-68-69).

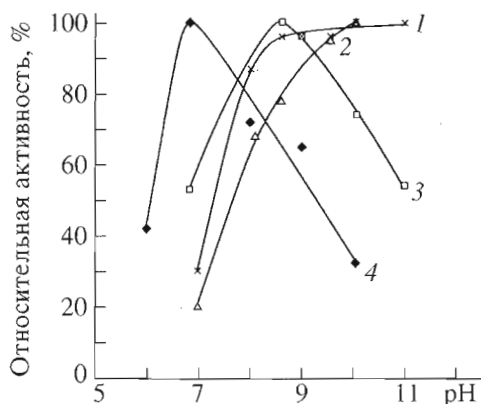
Баланс белка и ферментативной активности при иммобилизации ПНФазы *Th. thermophilus* на СИМ-диске

Количество фермента в инкубационной смеси до иммобилизации		Количество фермента в инкубационной смеси и промывочных растворах после иммобилизации		Связанное с диском расчетное количество белка		Связанная с диском активность ПНФазы			
ед. акт.	мг белка	ед. акт.	мг белка	мг	%	расчетная		измеренная	
						ед. акт.	%	ед. акт.	%
221	5.20	138	3.56	1.64	31.5	83	37.6	48	21.7

объема реакционной смеси и объема диска определяли время контакта субстратной смеси с ферментом.



**Рис. 1.** Зависимость активности иммобилизованной на СИМ-диске ПНФазы от скорости пропускания реакционной смеси (в режиме рециркуляции, 65°C) в реакциях синтеза (кривая 1) и фосфоролиза (кривая 2) poly(A). Реакционная смесь (3 мл) для синтеза: 0.2 М Трис-НСl, pH 8.0; 6 мМ MgCl<sub>2</sub>; 1 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, 20 мМ ADP; для фосфоролиза: 0.2 М Трис-НСl, pH 8.0; 2 мМ Na<sub>2</sub>EDTA; 1.4 мМ poly(A); 14 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3 мМ MgCl<sub>2</sub>.



**Рис. 2.** Зависимость от pH активности растворимой ПНФазы (кривые 1, 3) и ПНФазы, иммобилизованной на СИМ-диске (кривые 2, 4) в реакциях синтеза (1, 2) и фосфоролиза poly(A) (3, 4). Условия опыта см. в подписи к рис. 1, pH варьировали от 6 до 11 для растворимой ПНФазы и от 6 до 10 для иммобилизованной ПНФазы.

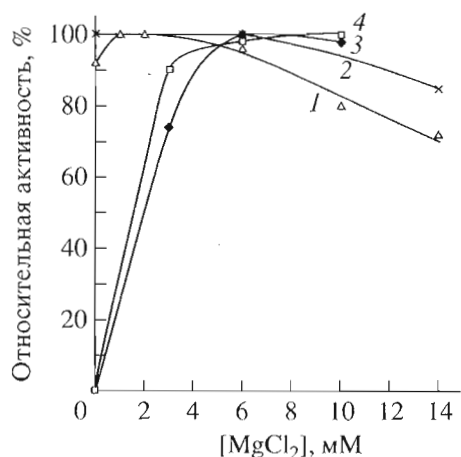
### 1. Синтетазная активность

Как видно из рис. 1 (кривая 1), синтетазная активность ПНФазы слабо зависит от скорости пропускания реакционной смеси. В дальнейшей работе мы использовали оптимальную скорость 5 мл/ч при определении оптимума pH, влияния содержания ионов магния в реакционной смеси и значений констант Михаэлиса.

Аналогично опубликованным ранее данным [14], общий вид зависимости синтетазной активности ПНФазы от pH во всем испытанном нами интервале, вплоть до pH 10, почти не меняется после иммобилизации фермента, хотя и наблюдается некоторый сдвиг активности в щелочную область (рис. 2, кривые 1, 2). Во избежание щелочного гидролиза высокомолекулярного продукта реакции, синтез poly(A) проводили при pH 8.0.

Принято, что для каталитической активности ПНФазы необходимо присутствие двухвалентного металла, преимущественно Mg<sup>2+</sup> или Mn<sup>2+</sup> [15]. Мы показали (рис. 3, 1, 2), что данный фермент, как иммобилизованный, так и растворимый, синтезировал poly(A) почти с одинаковой активностью при содержании ионов Mg<sup>2+</sup> во всем исследованном диапазоне концентраций от 0 до 14 мМ. Возможно, что обнаруженная слабая зависимость активности от присутствия Mg<sup>2+</sup> является следствием примеси Mg<sup>2+</sup> в реактивах или же особенностью ПНФазы *Th. thermophilus*. Возможно также, что в случае синтеза полинуклеотидов роль кофактора для этого фермента может выполнять сам нуклеотид ADP [16].

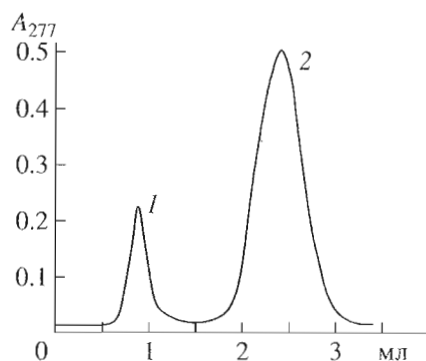
На основании измеренных нами зависимостей скорости реакции от концентрации ADP, линеаризованных тремя разными общепринятыми методами: Эди-Хофсти, Вульфа и Корниш-Боудена [17], были определены значения константы Михаэлиса с использованием компьютерной программы Microsoft Excel. Усредненные для трех методов значения составляют:  $K_m = 2.8$  мМ для растворимого (близко к значению 4.7 мМ, определенному с субстратом ADP в работе [18]) и  $K_{m(каж.)} = 10.8$  мМ для иммобилизованного фермента. Увеличение значения константы Михаэлиса для иммобилизованного фермента может быть следствием как изменения конформации молекулы ПНФазы в результате химического



**Рис. 3.** Зависимость от концентрации  $MgCl_2$  активности растворимой (1, 3) и иммобилизованной (2, 4) ПНФазы в реакциях синтеза (1, 2) и фосфорилиза poly(A) (3, 4). Синтез poly(A): состав реакционной смеси: 0.2 М Трис-НCl; pH 8.0, 1 мМ  $Na_2EDTA$ ; 20 мМ ADP; варьируемые концентрации  $MgCl_2$ ; фосфорилиза poly(A): состав реакционной смеси: 0.2 М Трис-НCl, pH 8.0; 2 мМ  $Na_2EDTA$ ; 1.4 мМ poly(A); 10 мМ  $NaH_2PO_4$ ; варьируемые концентрации  $MgCl_2$ . В опытах с растворимой ПНФазой к реакционным смесям добавляли по 0.7 ед. акт. фермента.

связывания с носителем, так и стерических затруднений при взаимодействии субстрата с иммобилизованным на пористом носителе ферментом.

Максимальная конверсия субстрата при выходе реакции на плато для иммобилизованного фермента достигала 32%, тогда как для растворимого – 56%. Гель-хроматография показывает накопление в ходе реакции высокомолекулярной poly(A) (рис. 4).

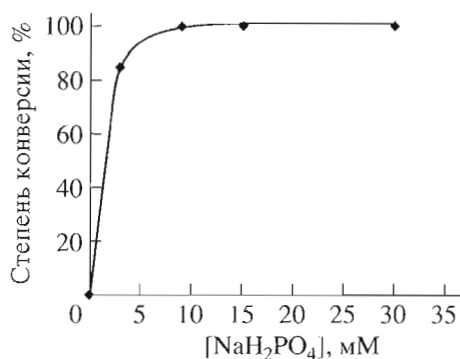


**Рис. 4.** Профиль гель-хроматографии на сефадексе G-200 реакционной смеси синтеза poly(A), катализируемого иммобилизованной на СИМ-диске ПНФазой. Состав реакционной смеси см. в подписи к рис. 1 для синтеза. Проба отобрана и проанализирована при степени конверсии субстрата 25%. Пик 1 – высокомолекулярная poly(A); пик 2 – непрореагировавший ADP. Условия разделения см. "Эксперимент. часть".

## 2. Фосфоролитическая активность

В отличие от синтетазной активности, фосфоролитическая активность иммобилизованной ПНФазы резко возрастала при увеличении скорости пропускания реакционной смеси через диск вплоть до 5 мл/ч (рис. 1, 2). При дальнейшем повышении скорости наблюдалось падение активности фермента, а в диапазоне 30–90 мл/ч эффективность фосфорилиза poly(A) практически не зависела от скорости подачи субстрата. Скорость 5 мл/ч была выбрана нами для дальнейших исследований. Снижение скорости фосфорилиза poly(A) при увеличении скорости потока реакционной смеси в интервале от 10 до 30 мл/ч мы объясняем возможным изменением конформации полинуклеотидной цепи poly(A) в потоке. Кроме этого, увеличение скорости потока приводит к уменьшению времени пребывания в тонком слое сорбента высокомолекулярного субстрата, что с учетом достаточно низкого коэффициента диффузии может служить препятствием к достижению его макромолекулами стенок каналов с иммобилизованным ферментом [19]. Очевидно, что поведение высокомолекулярного субстрата в порах отлично от поведения низкомолекулярного ADP, для которого коэффициент диффузии на два порядка выше. Дальнейшее повышение скорости потока субстратной смеси с poly(A) не сопровождается падением активности. Данный эффект может быть объяснен открытием новых, более узких пор (каналов) при повышении давления в системе, что способствует стабилизации ферментативного процесса.

Из рис. 5 следует, что степень фосфорилиза poly(A) достигает максимума при соотношении молярных концентраций субстрата poly(A) и фосфата в реакционной смеси, равном 1 : 10. Это со-

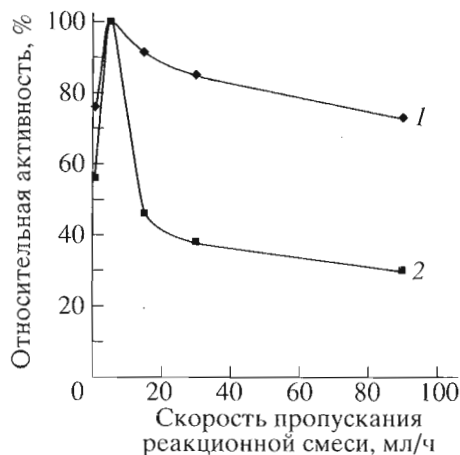


**Рис. 5.** Зависимость степени конверсии poly(A) в ADP в реакции фосфорилиза в присутствии растворимой ПНФазы от концентрации неорганического фосфата в реакционной смеси. Состав реакционной смеси: 0.2 М Трис-НCl, pH 8.0; 2 мМ  $Na_2EDTA$ ; 1 мМ poly(A); 5 мМ  $MgCl_2$ ; 0.7 ед. акт. ПНФазы; варьируемые концентрации  $NaH_2PO_4$ .

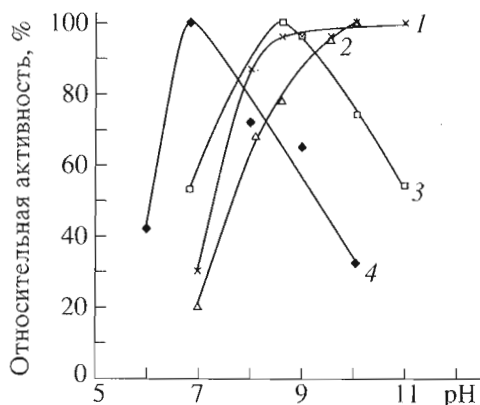
Баланс белка и ферментативной активности при иммобилизации ПНФазы *Th. thermophilus* на СИМ-диске

Количество фермента в инкубационной смеси до иммобилизации		Количество фермента в инкубационной смеси и промывочных растворах после иммобилизации		Связанное с диском расчетное количество белка		Связанная с диском активность ПНФазы			
ед. акт.	мг белка	ед. акт.	мг белка	мг	%	расчетная		измеренная	
						ед. акт.	%	ед. акт.	%
221	5.20	138	3.56	1.64	31.5	83	37.6	48	21.7

объема реакционной смеси и объема диска определяли время контакта субстратной смеси с ферментом.



**Рис. 1.** Зависимость активности иммобилизованной на СИМ-диске ПНФазы от скорости пропускания реакционной смеси (в режиме рециркуляции, 65°C) в реакциях синтеза (кривая 1) и фосфорилиза poly(A) (кривая 2). Реакционная смесь (3 мл) для синтеза: 0.2 М Трис-НСl, рН 8.0; 6 мМ MgCl<sub>2</sub>; 1 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, 20 мМ ADP; для фосфорилиза: 0.2 М Трис-НСl, рН 8.0; 2 мМ Na<sub>2</sub>EDTA; 1.4 мМ poly(A); 14 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3 мМ MgCl<sub>2</sub>.



**Рис. 2.** Зависимость от рН активности растворимой ПНФазы (кривые 1, 3) и ПНФазы, иммобилизованной на СИМ-диске (кривые 2, 4) в реакциях синтеза (1, 2) и фосфорилиза poly(A) (3, 4). Условия опыта см. в подписи к рис. 1, рН варьировали от 6 до 11 для растворимой ПНФазы и от 6 до 10 для иммобилизованной ПНФазы.

### 1. Синтетазная активность

Как видно из рис. 1 (кривая 1), синтетазная активность ПНФазы слабо зависит от скорости пропускания реакционной смеси. В дальнейшей работе мы использовали оптимальную скорость 5 мл/ч при определении оптимума рН, влияния содержания ионов магния в реакционной смеси и значений констант Михаэлиса.

Аналогично опубликованным ранее данным [14], общий вид зависимости синтетазной активности ПНФазы от рН во всем испытанном нами интервале, вплоть до рН 10, почти не меняется после иммобилизации фермента, хотя и наблюдается некоторый сдвиг активности в щелочную область (рис. 2, кривые 1, 2). Во избежание щелочного гидролиза высокомолекулярного продукта реакции, синтез poly(A) проводили при рН 8.0.

Принято, что для каталитической активности ПНФазы необходимо присутствие двухвалентного металла, преимущественно Mg<sup>2+</sup> или Mn<sup>2+</sup> [15]. Мы показали (рис. 3, 1, 2), что данный фермент, как иммобилизованный, так и растворимый, синтезировал poly(A) почти с одинаковой активностью при содержании ионов Mg<sup>2+</sup> во всем исследованном диапазоне концентраций от 0 до 14 мМ. Возможно, что обнаруженная слабая зависимость активности от присутствия Mg<sup>2+</sup> является следствием примеси Mg<sup>2+</sup> в реактивах или же особенностью ПНФазы *Th. thermophilus*. Возможно также, что в случае синтеза полинуклеотидов роль кофактора для этого фермента может выполнять сам нуклеотид ADP [16].

На основании измеренных нами зависимостей скорости реакции от концентрации ADP, линеаризованных тремя разными общепринятыми методами: Эди-Хофсти, Вульфа и Корниш-Боудена [17], были определены значения константы Михаэлиса с использованием компьютерной программы Microsoft Excel. Усредненные для трех методов значения составляют:  $K_m = 2.8$  мМ для растворимого (близко к значению 4.7 мМ, определенному с субстратом ADP в работе [18]) и  $K_{m(каж.)} = 10.8$  мМ для иммобилизованного фермента. Увеличение значения константы Михаэлиса для иммобилизованного фермента может быть следствием как изменения конформации молекулы ПНФазы в результате химического

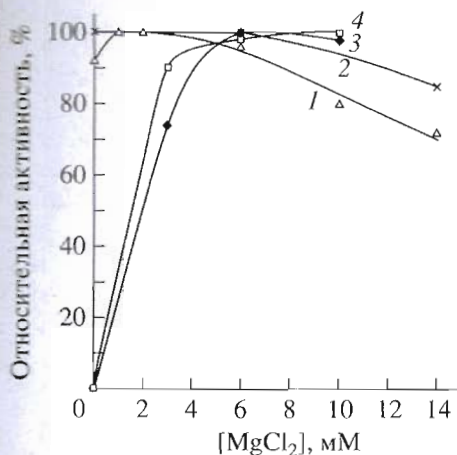


Рис. 3. Зависимость от концентрации  $MgCl_2$  активности растворимой (1, 3) и иммобилизованной (2, 4) ПНФазы в реакциях синтеза (1, 2) и фосфорилиза poly(A) (3, 4). Синтез poly(A): состав реакционной смеси: 0.2 М Трис-НСl; pH 8.0, 1 мМ  $Na_2EDTA$ ; 20 мМ ADP; варьируемые концентрации  $MgCl_2$ ; фосфорилиз poly(A): состав реакционной смеси: 0.2 М Трис-НСl, pH 8.0; 2 мМ  $Na_2EDTA$ ; 1.4 мМ poly(A); 10 мМ  $NaH_2PO_4$ ; варьируемые концентрации  $MgCl_2$ . В опытах с растворимой ПНФазой к реакционным смесям добавляло по 0.7 ед. акт. фермента.

связывания с носителем, так и стерических затруднений при взаимодействии субстрата с иммобилизованным на пористом носителе ферментом.

Максимальная конверсия субстрата при выходе реакции на плато для иммобилизованного фермента достигала 32%, тогда как для растворимого – 56%. Гель-хроматография показывает накопление в ходе реакции высокомолекулярной poly(A) (рис. 4).

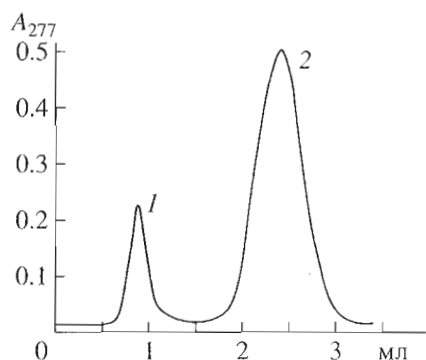


Рис. 4. Профиль гель-хроматографии на сефадексе G-200 реакционной смеси синтеза poly(A), катализируемого иммобилизованной на СИМ-диске ПНФазой. Состав реакционной смеси см. в подписи к рис. 1 для синтеза. Проба отобрана и проанализирована при степени конверсии субстрата 25%. Пик 1 – высокомолекулярная poly(A); пик 2 – непрореагировавший ADP. Условия разделения см. "Эксперимент. часть".

## 2. Фосфоролитическая активность

В отличие от синтетазной активности, фосфоролитическая активность иммобилизованной ПНФазы резко возрастала при увеличении скорости пропускания реакционной смеси через диск вплоть до 5 мл/ч (рис. 1, 2). При дальнейшем повышении скорости наблюдалось падение активности фермента, а в диапазоне 30–90 мл/ч эффективность фосфорилиза poly(A) практически не зависела от скорости подачи субстрата. Скорость 5 мл/ч была выбрана нами для дальнейших исследований. Снижение скорости фосфорилиза poly(A) при увеличении скорости потока реакционной смеси в интервале от 10 до 30 мл/ч мы объясняем возможным изменением конформации полинуклеотидной цепи poly(A) в потоке. Кроме этого, увеличение скорости потока приводит к уменьшению времени пребывания в тонком слое сорбента высокомолекулярного субстрата, что с учетом достаточно низкого коэффициента диффузии может служить препятствием к достижению его макромолекулами стенок каналов с иммобилизованным ферментом [19]. Очевидно, что поведение высокомолекулярного субстрата в порах отлично от поведения низкомолекулярного ADP, для которого коэффициент диффузии на два порядка выше. Дальнейшее повышение скорости потока субстратной смеси с poly(A) не сопровождается падением активности. Данный эффект может быть объяснен открытием новых, более узких пор (каналов) при повышении давления в системе, что способствует стабилизации ферментативного процесса.

Из рис. 5 следует, что степень фосфорилиза poly(A) достигает максимума при соотношении молярных концентраций субстрата poly(A) и фосфата в реакционной смеси, равном 1 : 10. Это со-

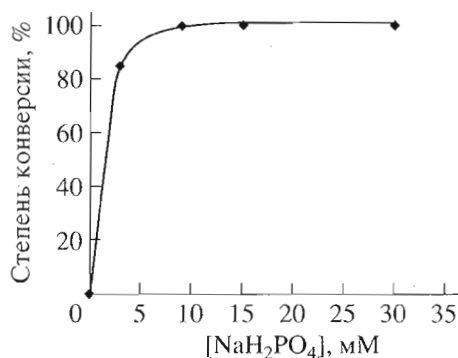


Рис. 5. Зависимость степени конверсии poly(A) в ADP в реакции фосфорилиза в присутствии растворимой ПНФазы от концентрации неорганического фосфата в реакционной смеси. Состав реакционной смеси: 0.2 М Трис-НСl, pH 8.0; 2 мМ  $Na_2EDTA$ ; 1 мМ poly(A); 5 мМ  $MgCl_2$ ; 0.7 ед. акт. ПНФазы; варьируемые концентрации  $NaH_2PO_4$ .

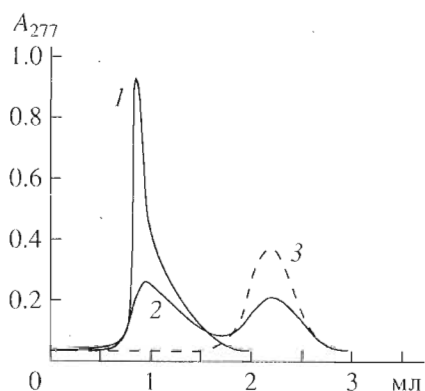


Рис. 6. Профили гель-хроматографии на сефадексе G-200 реакционных смесей фосфоролита poly(A), катализируемого иммобилизованной ПНФазой, при степени конверсии poly(A) в ADP: 0 (1), 44 (2) и 100% (3). Условия разделения см. "Эксперимент. часть".

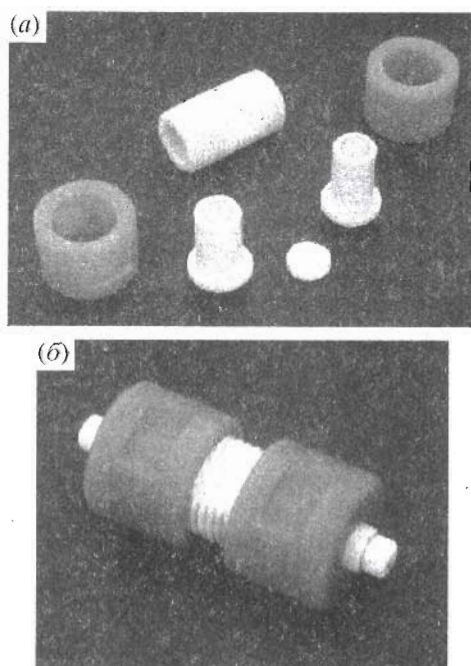


Рис. 7. Фото мембраны "СІМ-Disk" и патрона фирмы VIA (Словения) в разобранном (а) и собранном (б) виде.

отношение мы использовали в дальнейших экспериментах с иммобилизованной ПНФазой. Глубина конверсии при фосфоролите для обеих форм ПНФазы достигает 100%. Профили гель-хроматографии реакционных смесей при разной глубине конверсии приведены на рис. 6.

Из результатов, представленных на рис. 2 (кривые 3 и 4), видно, что в отличие от синтетазной реакции ПНФазы (см. кривые 1 и 2), при фосфоролите poly(A) иммобилизованным ферментом наблюдается колоколообразная зависимость от pH. Особенно существенно, что для

иммобилизованного фермента оптимум pH фосфоролита сдвигается в более кислую область. Анализ зависимости фосфоролитической активности ПНФазы от концентрации ионов  $Mg^{2+}$  в реакционной смеси показал (рис. 3, кривые 3 и 4), что если в отличие от реакции полимеризации, которая, как указывалось выше, слабо зависит от концентрации ионов двухвалентного металла, фосфоролит poly(A) в отсутствие  $Mg^{2+}$  совсем не идет. В этих экспериментах концентрация ионов  $Mg^{2+}$  не превышала 10 мМ. При дальнейшем ее увеличении наблюдалось выпадение осадка фосфата Mg. Определенные нами константы Михаэлиса ( $K_m$  0.66 мМ для нативной и  $K_{m(каж.)}$  0.20 мМ для иммобилизованной ПНФазы) оказались в соотношении, обратном соотношению для реакции синтеза.

Следует отметить, что зависимости от pH параметров прямой и обратной реакции с иммобилизованной ПНФазой в нашем случае следует рассматривать как отражение конформационных изменений молекул фермента при иммобилизации и, в какой-то степени, как недостаточно исследованное пока изменение геометрии полинуклеотидной цепи (высокомолекулярного субстрата) при прохождении пор носителя. Эти зависимости лишены влияния артефактных различий в pH-статусе внутрипорового и межчастичного пространств, часто проявляющихся для носителей гранулированного типа. В примененном нами пористом монолитном носителе вся его активная зона – система протекаемых пор и межчастичное пространство – отсутствует.

Различия параметров прямой и обратной реакций и противоположные тенденции в изменении значений  $K_m$  после иммобилизации позволяют предположить отсутствие полной эквивалентности реакций синтеза и фосфоролита poly(A) в смысле специфичности взаимодействия фермента с высокомолекулярным и низкомолекулярным субстратами. Следует упомянуть высказанное в литературе предположение о нескольких центрах связывания полиаденилата с ферментом в ходе фосфоролита [20]. Таким образом, приведенные результаты можно рассматривать как начальную информацию о новой экспериментальной системе, перспективной для дальнейших исследований. Мы считаем особенно важным, что все параметры реакций обоих типов для иммобилизованной ПНФазы были определены на одном и том же диске и в ряде случаев при чередовании синтеза и фосфоролита. Важно также, что реакции исследованы в проточном режиме, так как для макропористых дисков монолитного типа протекание пор обеспечивается только прокачиванием раствора, и параметры, определенные в статическом режиме, не соответствуют реальным условиям использования дисков.

В отличие от других авторов [7–9], мы не наблюдали снижения ни синтетазной, ни фосфоролитической активности иммобилизованного фермента при постоянной работе с реактором в течение 6 месяцев. Высокую стабильность иммобилизованной ПНФазы в наших экспериментах можно объяснить тем, что мы использовали носитель монолитного типа, где исключены механические трения частиц сорбента друг относительно друга и поэтому нет эффекта так называемого "состригания" фермента в реакционной смеси [21]. Кроме того, известно, что алкиламинная связь является очень прочной и лиганды, присоединенные к эпоксидным группам, чрезвычайно устойчивы [22]. Результаты показывают, что предлагаемый нами способ иммобилизации ПНФазы на макропористом носителе не обладает недостатками других методов и может стать основой для конструирования простого и удобного биореактора для промышленных целей. Найденные в данной работе оптимальные условия реакции синтеза и фосфоролита poly(A) в присутствии иммобилизованной на макропористом диске "СМ-Disk" ПНФазы могут быть применены при препаративном получении полирибонуклеотидов и нуклеозидифосфатов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы натриевые соли ADP и poly(A) (Reanal, Венгрия), полимерный макропористый диск "СМ-Disk" на основе сшитого этилендиакрилатом глицидилметакрилата и разборный патрон (картридж), производимые фирмой VIA (Словения). Концентрации ADP и poly(A) в растворах определяли спектрофотометрически на спектрофотометре СФ-26 (Россия), используя табличные значения молярных коэффициентов поглощения [23]. Характеристики диска: диаметр – 12 мм; толщина – 3 мм; объем – 0.34 см<sup>3</sup>; сухой вес – 0.2 г; пористость – 50%; средний диаметр пор – 700 нм; удельная поверхность – 10 м<sup>2</sup>/г; содержание эпоксидных групп – 3 ммоль/г.

ПНФазу выделяли из биомассы *Th. thermophilus*, штамм НВ-8 по методике, предложенной для РНК-полимеразы [24] и модифицированной в применении к ПНФазе [25]. Макропористый диск помещали в 1 мл 0.02 М Na-карбонатного буфера, рН 9.3, содержащего 221 ед. акт. ПНФазы в 5.2 мг белка и инкубировали в течение 16 ч при 30°C. Ковалентное связывание ПНФазы происходило за счет реакции эпоксидных групп сополимера с аминогруппами фермента. Оставшиеся эпоксидные группы блокировали обработкой 1 М раствором 2-аминоэтанола в том же буфере в течение 2 ч при комнатной температуре, реагент затем удаляли промывкой тем же буфером и водой. Промытый диск помещали на ночь в 0.1 М Трис-НСI-буфер, рН 8.0 при температуре 5°C. Количество связав-

шегося белка определяли по разности его концентраций до и после реакции присоединения, измеренных методом Лоури [26]. Активность иммобилизованной ПНФазы определяли, как описано ниже, и сопоставляли ее с расчетным значением, полученным по разности активности в инкубационной смеси до реакции связывания и суммарной активности в инкубационной смеси и промывочном буфере после реакции связывания.

Свойства иммобилизованной ПНФазы изучали в термостатируемом реакторе, помещенном в суховоздушный термостат ТС-80М-2 при 65°C. Через диск пропускали реакционную смесь в режиме рециркуляции со скоростью от 1 до 90 мл/ч (насос 2132 "Microperplex", ЛКВ, Швеция). При работе с иммобилизованной ПНФазой объем реакционных смесей составлял 3 мл, при работе с растворимой ПНФазой – 0.5 мл.

Реакционная смесь для синтеза содержала: 0.2 М Трис-НСI-буфер (рН варьировали от 6.0 до 11.0); 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; варьируемые концентрации ADP и MgCl<sub>2</sub>. За ходом реакции поликонденсации следили по накоплению в реакционной смеси неорганического фосфата, который определяли методом Фиске–Суббароу [27]. За единицу активности принимали количество фермента, обеспечивающего выделение 1 мкмоль неорганического фосфата за 1 ч при рН 8.0 и 65°C. К пробам объемом 0.05 мл добавляли 1 мл 2.5% HClO<sub>4</sub>, выпавший осадок удаляли центрифугированием в течение 3 мин при 12000 об/мин на микроцентрифуге MPW-310 (Польша) и в супернатанте определяли количество выделившегося фосфата.

Реакционная смесь для фосфоролита содержала: 0.2 М Трис-НСI-буфер (рН варьировали от 6.0 до 9.0); 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA; варьируемые концентрации NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и MgCl<sub>2</sub>, poly(A) в концентрации от 0.5 до 5.0 mM. Степень фосфоролита определяли по увеличению оптического поглощения при 259 нм (максимум поглощения ADP) кислоторастворимой фракции: к пробам объемом 0.05 мл добавляли 1 мл 2.5% HClO<sub>4</sub>, выпавший осадок удаляли центрифугированием, в надосадочной жидкости измеряли ОП<sup>259</sup>.

Аналитическую гель-хроматографию проводили в колонке размером 0.5 × 15 см с сефадексом G-200, элюирование – буфером состава: 5 mM Na-фосфатный буфер, рН 7.4 с добавлением 0.1 M NaCl и 6 M мочевины с регистрацией в проточном денситометре UVICORD SH фирмы "ЛКВ" (Швеция).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lacour F. // J. Biol. Resp. Modif. 1985. V. 4. P. 538–543.

2. Сидорова Н.С., Коган Э.М., Платонова Г.А., Дятлова Н.Г. Синтез, структура и свойства полимеров. Л.: Наука, 1989. С. 214–218.
3. Suhadolnik R.J., Sobol R.W., Reichenbach N.L., Strayer D.R., Gillespie D., Carter W.A. // J. Interferon Res. 1991. V. 11. Suppl. 1. P. S74.
4. Еришов Ф.И., Чижов Н.П., Тазулахова Э.Б. Противовирусные средства. СПб.: Изд. НИИЭМ РАМН, 1993.
5. Krust B., Callenbaut C., Hovanessian A.G. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1993. V. 9. P. 1087–1090.
6. Vang N.H., Drocoürt J.L., Thang M.N. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1979. V. 90. P. 606–614.
7. Кумарев В.П., Райт А.С., Райт В.К., Салганик Р.И. // Биоорганич. химия. 1976. Т. 2. С. 700–705.
8. Глазунов Е.А., Чернаенко В.М. // Прикл. биохим. и микробиол. 1985. Т. 21. С. 533–536.
9. Седельникова Э.А., Смолянинова О.А., Женодарова С.М. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. С. 617–624.
10. Tennikova T.B., Svec F., Belenkii B.G. // J. Liq. Chromatogr. 1990. V. 13. P. 59–70.
11. Платонова Г.А., Тенникова Т.Б., Скворцова Н.Н., Панкова Г.А., Буров С.В., Власов Г.П. // 2-й съезд Биохим. общ. РАН. Тез. Докл. М., 1997. С. 524.
12. Kasper C., Meringova R., Freitag R., Tennikova T. // J. Chromatogr. 1998. V. 798. P. 65–72.
13. Petro M., Svec F., Frechet J.M.J. // Biotechnol. Bioeng. 1996. V. 49. P. 354–363.
14. Иммуобилизованные ферменты. / Ред. И.В. Березин. М.: Изд-во МГУ, 1976. Т. 2. С. 62.
15. Littauer U.Z., Soreg H. // In "The Enzymes". N.Y.: Academic Press, 1982. V. 15. P. 517–553.
16. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 1. С. 98–109.
17. Там же. Т. 2. С. 662.
18. Bauer P.I., Büki K.G. // Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 1981. V. 16. P. 135–144.
19. Tennikov M.B., Gazdina N.V., Tennikova T.B., Svec F. // J. Chromatogr. 1998. V. 798. P. 56–65.
20. Chou J.Y., Singer M.F., McPhie P. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. P. 508–514.
21. Smith J.C., Stratford I.J., Hutchinson D.W., Brentnall H.J. // FEBS Lett. 1973. V. 30. P. 246–248.
22. Аффинная хроматография. Методы. / Ред. П. Дин, У. Джонсон, Ф. Мидл. Пер. с англ. М.: Мир, 1988.
23. Ultraviolet absorption spectra of 5'-ribonucleotides // "P-L Biochemicals". Circular OR-10. Milwaukee, 1969. P. 3–17.
24. Zillig W., Zechel K., Halbwachs H.-J. // Z. Physiol. Chem. 1970. Bd. 351. P. 221–224.
25. Глазунов Е.А., Тимковский А.Л. // V Всесоюзная конф. "Методы получения и анализа биохимических реактивов". Тез. Докл. Рига, 1987. С. 76.
26. Lowry O.H., Posebrough N.J., Farr A.L., Randall P.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
27. Fiske C.H., Subbarow Y. // J. Biol. Chem. 1925. V. 64. P. 375–400.

## The Catalysis of Polyriboadenylate Synthesis and Phosphorolysis by Polynucleotide Phosphorylase Immobilized on a New Type of Carrier

G. A. Platonova<sup>\*\*</sup>, M. A. Surzhik<sup>\*\*</sup>, T. B. Tennikova<sup>\*</sup>, G. P. Vlasov<sup>\*</sup>, and A. L. Timkovskii<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,  
Bol'shoi pr. 31, St. Petersburg, 199004 Russia*

<sup>\*\*</sup>*Konstantinov Nuclear Physics Institute, St. Petersburg, Russian Academy of Sciences,  
Gatchina, Leningrad oblast, 188350 Russia*

Polynucleotide phosphorylase from *Thermus thermophilus* was immobilized on monolithic-type polymeric carriers with an optimal pore size and a certain level of hydrophilic–hydrophobic balance (CIM-Disks), which had been recently developed and used for the preparation of highly selective affinity immunosorbents. This enzymic preparation was placed in a flow-type bioreactor and examined for the ability to synthesize polyriboadenylate from ADP and to carry out its reverse phosphorolysis. The Michaelis constants of the direct and reverse reactions and the dependence of both types of activity on pH and the concentration of magnesium ions were determined for immobilized and soluble polynucleotide phosphorylase. The immobilization on porous monolithic carriers was shown to reinforce differences in the specificity of the enzyme interaction with high- and low-molecular-mass substrates. The productivity of the reactor was retained for six months at 65°C with repeated renewal of the substrate mixture.

*Key words: polynucleotide phosphorylase, immobilization, solid phase carrier, porous materials, CIM-Disk*

<sup>#</sup> *To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (812) 323-1050; fax: +7 (812) 218-6869; e-mail: tim@bird.macro.ru.*