



УДК 547.963.32.07

СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

XXVIII *. ИММОБИЛИЗОВАННАЯ РИБОНУКЛЕАЗА *Penicillium brevicompactum* В СИНТЕЗЕ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ

Женодарова С. М., Соболева И. А., Хабарова М. И.

Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пущино

Ежов В. А., Приходько А. Г.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Академии наук СССР, г. Пущино

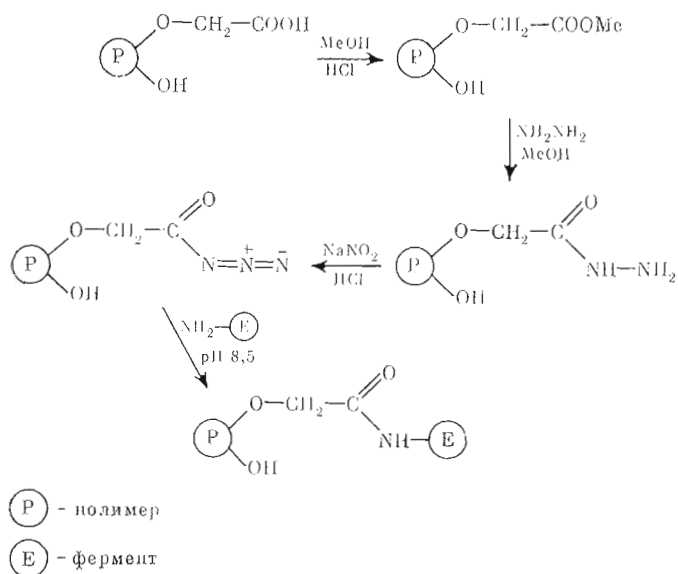
Для препаративного синтеза олигорибонуклеотидов получен препарат малоспецифичной рибонуклеазы *P. brevicompactum*, ковалентно связанной с СМ-целлюлозой. Гидролитическая и синтетическая активность иммобилизованной рибонуклеазы сравнима с соответствующей активностью исходного фермента и не изменяется при многократном (до 10 раз) использовании. Связывание с СМ-целлюлозой не влияет на субстратную специфичность фермента, но изменяет оптимум pH для некоторых субстратов: для синтеза CpC его величина изменяется от 4,6 до 7,0. Полученный препарат является эффективным катализатором олигорибонуклеотидного синтеза.

В последние годы успешно развиваются ферментативные методы синтеза олигорибонуклеотидов [2—4]. Этапом в этом развитии является переход к препаративным масштабам, связанный с растущими потребностями биоорганической химии, молекулярной биологии и молекулярной генетики. При переходе к препаративным синтезам необходимо решить ряд вопросов, и в первую очередь задачи многократного использования фермента, а также удаления фермента, катализирующего не только синтез, но и гидролиз межнуклеотидной связи.

В настоящей работе эти задачи решены на примере малоспецифичной рибонуклеазы *Penicillium brevicompactum*, подробно изученной ранее в нашей лаборатории и оказавшейся весьма эффективным катализатором образования межнуклеотидной связи [5—8]. Учитывая результаты, полученные на модельной системе синтеза CpC с участием панкреатической рибонуклеазы [9], мы считали, что наиболее рациональное решение указанных задач состоит в иммобилизации фермента.

Мы получили препарат рибонуклеазы *P. brevicompactum*, ковалентно связанной с полимерным носителем, и исследовали его свойства. Выбор полимерной матрицы был проведен с учетом доступности полимера, его индифферентности по отношению к компонентам реакционных смесей, в которых должен применяться ферментный препарат, и, естественно,

* Сообщение XXVII см. [1]. Сокращение: Е—СМ-целлюлоза — рибонуклеаза *Penicillium brevicompactum*, иммобилизованная на СМ-целлюлозе.



«удобства» при использовании и хранении этого препарата. До сих пор в олигорибонуклеотидном синтезе применяли лишь пиримидинспецифичную панкреатическую рибонуклеазу, связанную ковалентно с СМ-целлюлозой [9, 10] или иммобилизованную в полиакриламидном геле [11]. В нашей работе в качестве матрицы мы также использовали СМ-целлюлозу и полиакриламидный гель Р-100. Связывание белка с полимером проводили азидным методом [12]. Первые опыты по получению иммобилизованной рибонуклеазы *P. brevicompactum* показали, что полиакриламидная матрица имеет ряд недостатков. Так, при добавлении препарата в реакционную смесь происходит набухание геля, затрудняющее отделение и повторное использование фермента. Поэтому ниже мы приводим только результаты по связыванию рибонуклеазы *P. brevicompactum* с СМ-целлюлозой и изучению свойств иммобилизованного на СМ-целлюлозе фермента (Е—СМ-целлюлоза).

Последовательность реакций, проведенных при сшивании фермента с СМ-целлюлозой, приведена на схеме. Метилловый эфир и гидразид СМ-целлюлозы были приготовлены по методике, описанной в работе [13]. Превращение гидразида в азид и сшивку последнего с рибонуклеазой проводили в условиях, предложенных в работе [12]. Результаты представлены в табл. 1.

Изучение стабильности Е—СМ-целлюлозы и выяснение возможности многократного использования полученного препарата проводили, применяя субстраты, «стандартные» для рибонуклеазы *P. brevicompactum* [5]: А>р (гидролиз) и А>р+С (синтез).

После инкубирования А>р с Е—СМ-целлюлозой в 0,2 М фосфатном буфере (рН 7,0) при 37°С в течение 30 мин смесь центрифугировали, супернатант отбирали шприцем, фильтровали через стеклянный фильтр и анализировали методом вертикального электрофореза на бумаге. Выдерживание фильтрата при 37°С в течение 6 ч не изменяет его состав. Это свидетельствует о том, что рибонуклеаза не смывается с носителя.

Осадок фермента промывали несколько раз водой, каждый раз центрифугируя и отбирая промывные воды шприцем. К промытому ферменту добавляли раствор А>р в 0,2 М фосфатном буфере, повторяя весь цикл. Один и тот же препарат Е—СМ-целлюлозы был использован 10 раз. Гидролитическая активность препарата при многократном использовании сохраняется (рис. 1а).

Синтез АрС с участием Е—СМ-целлюлозы проводили в условиях, найденных ранее для рибонуклеазы *P. brevicompactum* [5]. Продолжитель-

Таблица 1

Связывание рибонуклеазы *P. brevicompactum* с СМ-целлюлозой

Номер опыта	Гидразид СМ-целлюлозы, мг	Рибонуклеаза, взятая для связывания		Е-СМ-целлюлоза		Рибонуклеаза, оставшаяся в растворе	
		ед. акт	ОЕ	мг	ед. акт./мг	ед. акт.	ОЕ
1	50	3480	80	48	1,93	2005	53
2	1000	1825	67	843 *	0,3	876	35
3	1000	876	35	961	0,25	30	11

* Часть препарата теряется при лиофильном высушивании.

Таблица 2

Состав (%) реакционной смеси при синтезе АрС в присутствии Е — СМ-целлюлозы

Компоненты реакционной смеси	Время, ч			
	21	24 *	48 *	72 *
АрС	21,5	21,5	21,8	22,0
А>р	71,5	70,8	71,0	69,4
Ар	6,9	7,7	7,2	8,6

* Время инкубации супернатанта после отделения Е — СМ-целлюлозы.

Таблица 3

Синтез динуклеозидмонофосфатов типа NpC при различных значениях pH

1 — максимальный выход в % на взятый N>p; 2 — отношение «синтез : гидролиз» [5]

pH	ApC		GpC		CpC		UpC	
	1	2	1	2	1	2	1	2
4,6	31,5	0,7	44,5	1,6	8,5	0,14	10,3	0,19
5,2	33,0	0,8	52,0	2,0	9,9	0,16	10,0	0,19
5,8	33,9	0,9	53,8	2,3	9,0	0,15	10,2	0,18
6,4	38,4	1,3	57,7	2,7	9,0	0,17	11,8	0,22
7,0	40,1	1,6	62,3	2,8	10,7	0,24	12,7	0,25
7,6	41,6	1,6	55,9	2,6	10,6	0,15	12,5	0,20
8,0	42,0	1,4	59,9	2,9	11,1	0,19	12,0	0,22

ность инкубирования смеси субстратов (21 ч) была выбрана произвольно, но заведомо меньше оптимальной (168 ч) для водорастворимого препарата [5], чтобы сократить время исследования. Обработку фермента для повторного и т. д. использования в синтезе проводили, как описано выше при исследовании гидролиза А>р. Пробы из реакционной смеси анализировали методом электрофореза на бумаге. Результаты исследования (см. рис. 1б) показывают, что 8-кратное использование одного и того же препарата Е—СМ-целлюлозы не снижает его синтетической активности. Состав реакционной смеси после удаления фермента практически не меняется в течение 72 ч (табл. 2). Это подтверждает, что рибонуклеаза *P. brevicompactum* прочно связана с СМ-целлюлозой.

Из литературы известно, что после связывания панкреатической рибонуклеазы с полимерным носителем оптимальные значения pH деполимеризующей и гидролитической активности не совпадают (6,5 и 7,8 соответственно), хотя в случае самой панкреатической рибонуклеазы они отличаются несущественно и лежат в области 7,2—7,5 [11]. Чтобы выяснить,

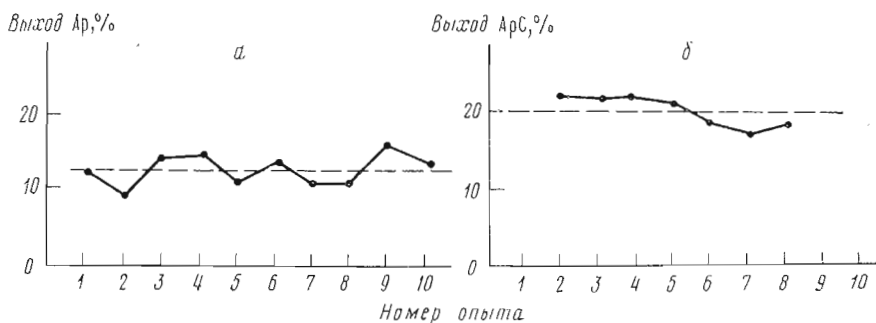


Рис. 1. Многократное использование препарата Е-СМ-целлюлозы при гидролизе аденозин-2',3'-циклофосфата (а) и синтезе аденилил-(3'→5')-цитидина (б)

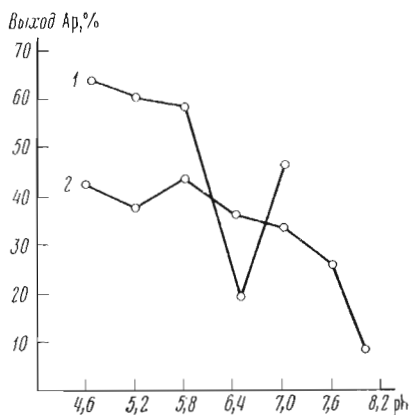


Рис. 2

Рис. 2. Гидролиз А>р при различных значениях рН в присутствии рибонуклеазы *P. brevicompactum* (1) и Е-СМ-целлюлозы (2)

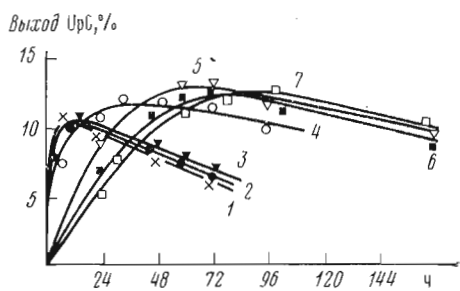


Рис. 3

Рис. 3. Синтез UpC с помощью Е-СМ-целлюлозы при рН 4,6 (1), 5,2 (2), 5,8 (3), 6,4 (4), 7,0 (5), 7,6 (6), 8,0 (7)

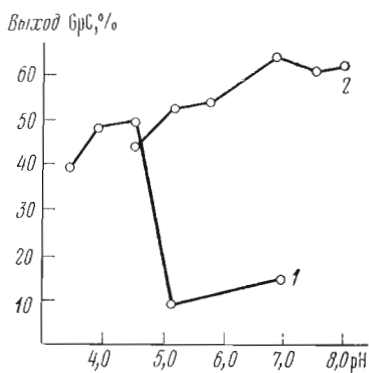


Рис. 4

Рис. 4. Синтез GpC при различных значениях рН в присутствии рибонуклеазы *P. brevicompactum* (1) и Е-СМ-целлюлозы (2)

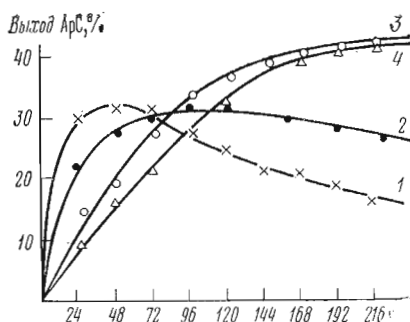


Рис. 5

Рис. 5. Синтез ApC в присутствии препаратов Е-СМ-целлюлозы: 1 - рН 4,6 (первичное использование); 2 - рН 4,6 (после использования при рН 8,0); 3 - рН 8,0 (первичное использование); 4 - рН 8,0 (после использования при рН 4,6)

влияет ли связывание с СМ-целлюлозой на оптимум рН гидролитической и синтетической активности рибонуклеазы *P. brevicompactum*, мы исследовали гидролиз $A > p$ и синтез динуклеозидмонофосфатов типа NpC в присутствии Е—СМ-целлюлозы при различных значениях рН. Как и для рибонуклеазы *P. brevicompactum*, оптимум рН гидролитической активности Е—СМ-целлюлозы находится в области кислых значений рН (рис. 2), но зависимость гидролиза $A > p$ от рН в этом случае имеет иной характер. Синтезы NpC проводили, как описано выше для ApC , отбирая пробы периодически в течение 240 ч и анализируя их методом электрофореза на бумаге и УФ-спектрофотометрии. В качестве примера приведены кинетические кривые, полученные при изучении синтеза UpC (рис. 3). Подобные кривые были получены также для ApC , GpC и CpC . Основные результаты этих исследований представлены в табл. 3. Анализ результатов и сравнение их с данными, полученными для растворимой формы рибонуклеазы *P. brevicompactum* [5], показывают, что в синтезе динуклеозидмонофосфатов Е—СМ-целлюлоза ведет себя подобно исходной рибонуклеазе *P. brevicompactum*, за исключением синтеза GpC , для которого оптимум рН после связывания фермента перемещается из кислой области (4,6) к нейтральным значениям рН — 7,0 (см. рис. 4).

На примере синтеза ApC мы показали, что изменения активности, вызываемые изменениями рН реакционной смеси, обратимы. На рис. 5 представлены результаты, полученные при проведении синтеза с участием препаратов Е—СМ-целлюлозы, уже использовавшихся при других значениях рН: после синтеза при рН 4,6 полимер отмывали водой от нуклеотидного материала и добавляли к смеси субстратов, растворенной в буфере с рН 8,0 (и наоборот). Хотя формы кинетических кривых для рН 4,6 не совпадают, максимальный выход динуклеозидмонофосфата во всех случаях остается неизменным.

Таким образом, связывание рибонуклеазы *P. brevicompactum* с СМ-целлюлозой обеспечивает полное удаление фермента из реакционной смеси после окончания реакции и делает возможным его многократное использование, не влияя на субстратную специфичность фермента, но изменяя оптимум рН для некоторых субстратов.

Экспериментальная часть

В работе использовали натриевые соли 2', 3'-циклофосфатов аденозина, уридина, цитидина и тимидина (Reanal, Венгрия), дидецилгексилгуанидиниевую соль гуанозин-2',3'-циклофосфата (Calbiochem, США), которую превращали в аммонийную соль обработкой дауэксом 50 W (NH_4^+ -форма), и микрогранульную СМ-целлюлозу для колоночной хроматографии (Whatman, Англия).

Рибонуклеазу *P. brevicompactum* выделяли как описано в работе [14]. За единицу активности принимали количество фермента, расщепляющее 1 мкмоль $A > p$ за 1 мин при 37° С и рН 7,0.

Электрофорез на бумаге, УФ-спектрофотометрирование и установление структуры динуклеозидмонофосфатов проводили как описано в работе [5].

Связывание рибонуклеазы P. brevicompactum с СМ-целлюлозой.

а) *Гидразид СМ-целлюлозы:* 10 г СМ-целлюлозы, предварительно освобожденной от мелких частиц многократным отмучиванием в воде, промытой этанолом и высушенной на воздухе, суспендировали в 150 мл перегнанного метанола, добавляли 1 мл конц. HCl и нагревали смесь с обратным холодильником в течение 4 ч, перемешивая суспензию с помощью магнитной мешалки. После охлаждения до ~20° С осадок отфильтровывали, промывали метанолом (3×50 мл) и высушивали на воздухе. Полученный метиловый эфир СМ-целлюлозы (10 г) суспендировали в 100 мл метанола, добавляли 10 мл гидразин-гидрата и перемешивали 72 ч при 40° С. Гидразид СМ-целлюлозы отфильтровывали, промывали метанолом

(2×25 мл), метанолом, насыщенным CO_2 (25 мл), 90% метанолом (25 мл) и абсолютным метанолом (2×25 мл). Осадок высушивали в вакуум-экспикаторе над CaCl_2 . Получено 9 г.

б) *E*-СМ-целлюлоза. Суспензию 1 г гидразида СМ-целлюлозы в 100 мл 0,5 н. HCl охлаждали до 0°C и при перемешивании добавляли по каплям в течение 20 мин 5 мл 5%-ного раствора NaNO_2 . Перемешивание продолжали еще 20 мин, поддерживая температуру 0°C , затем осадок отфильтровывали, промывали ледяной водой (300 мл) и добавляли к раствору рибонуклеазы *P. brevicompactum* в 7,9 мл 0,1 М триэтанолламин- HCl -буфера (pH 8,5) в 0,1 М CaCl_2 , содержащему 67 ОЕ белка с активностью 231 ед. акт./мл. Смесь перемешивали 2 ч при 20°C , осадок промывали небольшим количеством (~1 мл) того же буфера (фильтрат I), затем 500 мл этого буфера, 500 мл фосфатного буфера (pH 8,0), 500 мл 0,1 М NaCl и, наконец, водой до отрицательной реакции на Cl^- -ион. Осадок лиофилизировали из 3 мл воды. Получали 843 мг *E*-СМ-целлюлозы с активностью 0,3 ед. акт./мг. Фильтрат I (9 мл) содержал 35 ОЕ белка с активностью 96,3 ед. акт./мл и был использован как исходный раствор фермента для связывания с СМ-целлюлозой в следующем опыте.

Гидролиз $A > p$. 8,8 мг (25 мкмоль) $A > p$ (Na^+ -соль) и 0,23 мг *E*-СМ-целлюлозы (~2 ед. акт./мг, см. табл. 1, опыт 1) помещали в центрифужную пробирку, добавляли 0,3 мл 0,2 М фосфатного буфера (pH 7,0) и выдерживали при 37°C в течение 30 мин, после чего центрифугировали (4000—5000 об./мин), супернатант отбирали шприцем и фильтровали. Фильтрат сохраняли при 37°C еще 6 ч. Оставшийся в пробирке фермент промывали водой (5×0,5 мл), каждый раз центрифугуя и отбирая промывные воды шприцем. К промытому ферменту вновь добавляли 8,8 мг $A > p$ в 0,3 мл 0,2 М фосфатного буфера (pH 7,0) и т. д. Состав фильтрата анализировали методом вертикального электрофореза на бумаге в 0,05 М бикарбонате триэтиламония (pH 3,0). Результаты представлены на рис. 1а. При исследовании pH-зависимости гидролитической активности *E*-СМ-целлюлозы применяли следующие буферные растворы: pH 4,6; 5,2 и 5,8—0,2 М ацетатный буфер; pH 6,4; 7,0; 7,6 и 8,0—0,2 М фосфатный буфер. Результаты представлены на рис. 2.

Синтез динуклеозидмонофосфатов. Раствор 50 мкмоль нуклеозид-2', 3'-циклофосфата и 150 мкмоль цитидина в 0,2 мл буфера инкубировали с 0,32 мг *E*-СМ-целлюлозы (~2 ед. акт./мг) при 0°C . Пробы из реакционной смеси объемом 3,8 мкл наносили на бумагу и анализировали методом электрофореза и УФ-спектрофотометрии. В качестве растворителя использовали буферные системы, приведенные выше. Результаты представлены на рис. 1б, 3—5 и в табл. 2, 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Женодарова С. М., Хабарова М. И. (1980) Молекулярн. биология, 14, 299—306.
2. Virmbrock R., Morawietz R., Gassen H. G. (1974) Biochim. et Biophys. acta, 340, 348—358.
3. Walker G. C., Uhlenbeck O. C. (1975) Biochemistry, 14, 817—824.
4. Zhenodarova S. M. (1976) in: Synthesis, Structure and Chemistry of tRNA and their Components (Wiewiorowski M., ed.), pp. 186—201. Poznan.
5. Хабарова М. И., Женодарова С. М. (1972) Молекулярн. биология, 6, 682—688.
6. Хабарова М. И., Женодарова С. М. (1973) Молекулярн. биология, 7, 787—794.
7. Седельникова Э. А., Клягина В. П., Женодарова С. М. (1973) Молекулярн. биология, 7, 27—35.
8. Масленникова Т. А., Седельникова Э. А., Клягина В. П., Женодарова С. М. (1973) Молекулярн. биология, 7, 36—41.
9. Хабарова М. И., Смолянинова О. А., Багдонас А. С., Коваленко М. И., Женодарова С. М. (1978) Биоорг. химия, 4, 740—744.
10. Gassen H. G., Nolte R. (1971) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 44, 1410—1415.
11. Василенко С. К., Веняминаева А. Г., Детиненко Л. Д., Ким Г. А., Кнорре Д. Г. (1972) Биохимия, 37, 527—530.

12. Brümmer W., Hennrich N., Klockow M., Lang H., Orth H. D. (1972) Eur. J. Biochem., 25, 129-135.
13. Crook E. M., Brocklehurst K., Wharton C. W. (1970) Methods in Enzymology, 19, 963-978.
14. Ежов В. А. (1980) Прикл. биохим. и микробиол., 15, 564-569.

Поступила в редакцию
26.IX.1979

STEP WISE OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS. XXVIII. THE IMMOBILIZED
RIBONUCLEASE *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM* IN THE
OLIGORIBONUCLEOTIDE SYNTHESIS

ZHENG DAROVA S. M., SOBOLEVA I. A., KHABAROVA M. I.,
EZHOV V. A., PRIKHOD'KO A. G.

*Institute of Biological Physics and Institute of Biochemistry and Physiology
of Microorganisms, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

The *P. brevicompactum* ribonuclease manifesting a low specificity has been covalently bound to CM-cellulose for the purpose of a preparative oligoribonucleotide synthesis. It is shown that the hydrolytic and synthetic activities of immobilized RNase are very similar with those of the native enzyme and are not lost on repeated use of the preparation in the hydrolysis or synthesis (to about 10 times). The immobilization does not affect the substrate specificity but alters the pH optimum of the enzyme for some substrates: pH optimum shifts from 4.6 to 7.0 for the synthesis of GpC. The obtained preparation is effective catalyst of the oligoribonucleotide synthesis.
