



УДК 577.155.2.02:547.963.32

## ИММОБИЛИЗОВАННАЯ ЭКЗОНУКЛЕАЗА А5 И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ 5'-НУКЛЕОТИДОВ

*Варламов В. П., Львова Т. Н., Вальковский Д. Г.,  
Можеев В. Я., Татарская Р. И., Рогожин С. В.*

*Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР, Москва*

Получена экзонуклеаза А5, ковалентно присоединенная к неорганическим носителям, с сохранением до 75% исходной нуклеазной активности. Изучено влияние характеристик носителя (диаметра пор, размера частиц) на активность иммобилизованного фермента. Изучены некоторые свойства иммобилизованного фермента; показано, что иммобилизация повышает термоустойчивость фермента и не влияет на его специфичность. Определен оптимальный режим работы связанного фермента; доказана возможность длительного и непрерывного использования препарата для гидролиза нуклеиновых кислот 5'-нуклеотидов.

Промышленный микробиологический синтез рассматривается как один из наиболее перспективных путей увеличения пищевых белковых ресурсов. Однако высокое содержание нуклеиновых кислот в одноклеточных делает необходимым их специальное удаление в процессе получения белков.

В результате при развитом промышленном производстве микробиологических белков неизбежно получение в значительных количествах нуклеиновых кислот, рациональное использование которых может существенно повысить экономичность основного процесса. Представляет большой интерес их использование для получения 5'-нуклеотидов, которые могут найти широкое применение как интенсификаторы вкуса и запаха, а также в химических и биохимических исследованиях.

При получении 5'-нуклеотидов нами был выбран путь ферментативного гидролиза нуклеиновых кислот. Классическим ферментом для этого является фосфодиэстераза змеиного ядра [1]. Однако вследствие ограниченной доступности этого фермента большой интерес представляют нуклеазы микроорганизмов. В частности, экзонуклеаза А5 актиномицетов гидролизует РНК и ДНК до 5'-мононуклеотидов аналогично фосфодиэстеразе змеиного ядра, хотя и имеет несколько отличную от последней субстратную специфичность [2, 3].

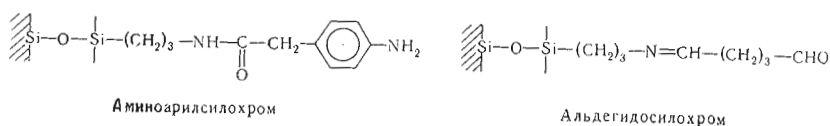
Экзонуклеаза А5 актиномицетов представляет собой кислотолабильный и термолабильный белок, склонный к инактивации при хранении. Мы присоединили его к водонерастворимым полимерам [4, 5]. В качестве матриц были использованы органические полимеры: *m*-аминобензилоксиметилцеллюлоза и поперечносшитый полиакриламид, а также неорганические: хромосорб Р, пористое стекло и силихром (см. таблицу).

**Зависимость нуклеазной активности иммобилизованной экзонуклеазы А5  
от характеристик носителя**

Носитель	Связывающая группа	Поверхность, м <sup>2</sup> /г	Размер пор, А	Размер частиц, мм	А, %
Силохром С-120	Диазо-	120	250	0,25—0,35	35
Силохром С-80	»	80	350	0,1—0,16	71
То же	»	80	350	0,16—0,25	42
»	»	80	350	0,25—0,35	38
»	»	80	350	0,35—0,5	35
Силохром *	»	—	650	0,35—0,5	75
Силохром С-80	Глутаровый альдегид	80	350	0,35—0,5	25
Пористое стекло	Диазо-	—	1600	0,1—0,3	24
Хромосорб Р-АW	»	4	≤10 <sup>6</sup>	0,18—0,25	60

\* Опытный образец.

Структура фермента экзонуклеазы А5 в настоящее время мало изучена, поэтому не было теоретических рекомендаций по химическому способу иммобилизации. Для фиксирования фермента мы остановились на модифицированных силохромах: аминоарилсилохроме и альдегидосилохроме [5,6].



Экзонуклеаза А5, присоединенная к аминоарилсилохрому, проявляла до 75% исходной нуклеазной активности (присоединение белка к носителю составляет 94—95% от взятого количества). Фермент был присоединен к носителям с различным диаметром пор и размером частиц. Для сорбента с одинаковым средним диаметром пор удельная активность возрастает с увеличением внешней поверхности (т. е. с уменьшением размера частиц). Видимо, внутренняя поверхность носителей с диаметром пор 250 и 350 Å оказалась недоступной для полимерных нуклеиновых кислот. Это подтверждается тем, что на колонке с аминоарилсилохромом с диаметром пор 250 и 350 Å тРНК элюируется в свободном объеме (константа распределения  $K_p = 0$ ). Для носителей с диаметром пор 650 и 760 Å  $K_p$  равны соответственно 0,22 и 0,3. Экзонуклеаза А5, присоединенная к хромосорбу Р, проявляла до 60% исходной нуклеазной активности. Это можно объяснить наличием у хромосорба Р гигантских пор, которые позволяют субстрату без препятствий проникать внутрь пор для контакта с иммобилизованным ферментом.

Фермент, присоединенный к альдегидосилохрому, проявлял несколько меньшую активность по сравнению с ферментом, присоединенным к аминоарилсилохрому. Это может быть объяснено различием в способе связывания. Нами был проведен аминокислотный анализ экзонуклеазы А5, присоединенной к альдегидосилохрому и к аминоарилсилохрому. В первом случае содержание лизина в гидролизате составляло 1,2%, а во втором — 10,6% \*. По другим аминокислотам отмечено небольшое различие. Таким образом, можно полагать, что присоединение экзонуклеазы А5 к альдегидосилохрому осуществляется в основном за счет ε-аминогрупп лизина. В случае аминоарилсилохрома присоединение, видимо, идет по нескольким аминокислотам.

\* Полный аминокислотный анализ экзонуклеазы А5, присоединенной к носителю, будет сообщен позднее.

Ковалентное связывание ферментов с носителем может увеличить их термостабильность за счет стабилизации структуры фермента. Поэтому была проверена зависимость нуклеазной активности фермента от температуры. В то время как экзонуклеаза А5 в растворе начинает утрачивать свою активность уже при температурах выше 40°, иммобилизованный фермент, присоединенный к аминоарилсилохрому, сохраняет высокую актив-

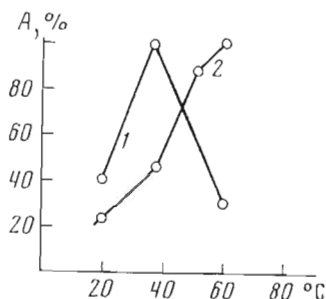


Рис. 1. Зависимость нуклеазной активности фермента (А, % от максимальной) от температуры: 1 — экзонуклеаза А5 в растворе; 2 — экзонуклеаза А5, присоединенная к альдегидсилохрому

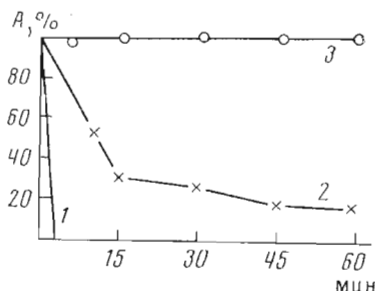


Рис. 2. Изменение нуклеазной активности ферментов (А, % от исходной) при инкубации при 50° (без субстрата): 1 — экзонуклеаза А5 в растворе; 2 — экзонуклеаза А5, присоединенная к альдегидсилохрому; 3 — экзонуклеаза А5, присоединенная к аминоарилсилохрому

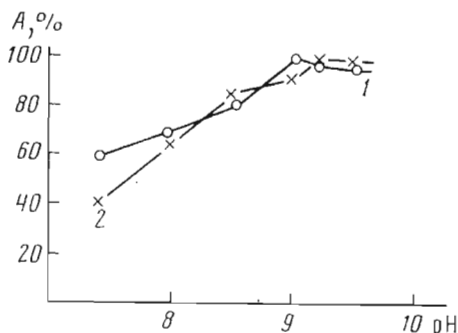


Рис. 3. Зависимость нуклеазной активности (А, % от максимальной) от рН: 1 — экзонуклеаза А5, присоединенная к аминоарилсилохрому; 2 — экзонуклеаза А5, присоединенная к альдегидсилохрому

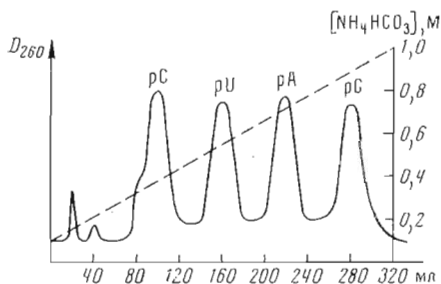


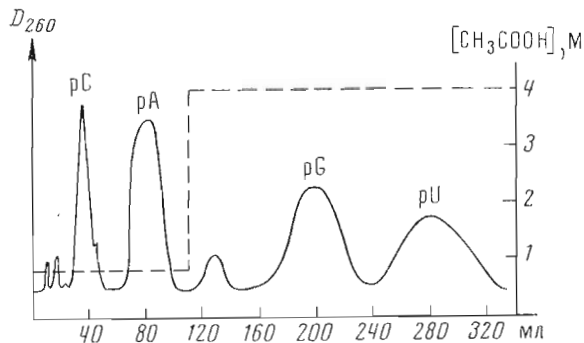
Рис. 4. Хроматография гидролизата РНК на колонке (1 × 12 см) анионитом АВ-17 × 2 (200—400 меш, НСО<sub>3</sub>-форма) в линейном градиенте концентрации NH<sub>4</sub>НСО<sub>3</sub> (0,1—1 М, рН 8,8)

ность даже при 60° (рис. 1). Сравнение термостабильности фиксированной и растворимой экзонуклеазы А5 производилось также по нуклеазной активности, сохранившейся после инкубации этих препаратов при 50° (без субстрата) (рис. 2). Видно, что растворимый фермент полностью инактивируется за три минуты, а фермент, присоединенный к аминоарилсилохрому, полностью сохраняет свою активность после часовой инкубации. Максимум нуклеазной активности иммобилизованного фермента лежит в области рН 9,0—9,4 (рис. 3), тогда как для растворимого фермента [3] он находится при рН 8,5—9,0. Небольшой сдвиг оптимума рН можно объяснить кислой природой поверхности носителя, которая изменяет микроокружение фермента.

С помощью экзонуклеазы А5, присоединенной к аминоарилсилохрому, проведен гидролиз суммарной дрожжевой РНК до 5'-нуклеотидов [4]. В течение месяца непрерывной работы фиксированная экзонуклеаза по-

теряла ~10% своей активности. Содержание 5'-нуклеотидов в гидролизате, по данным ионообменной хроматографии, составляет ~80%. При хроматографии гидролизата на анионите АВ (17 × 2) достигается удовлетворительное разделение 5'-нуклеотидов (рис. 4). В то же время их легко выделить, так как элюирующая система может удаляться в вакууме. Проводили также разделение гидролизата РНК на дауэксе (рис. 5).

Рис. 5. Хроматография гидролизата РНК на колонке (1 × 12 см) с дауэксом 1 × 4 (200—400 меш,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ -форма) в ступенчатом градиенте концентрации  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (0,8 М; 4 М)



Продукты гидролиза были идентифицированы как 5'-нуклеотиды с помощью дефосфорилирования специфичной 5'-нуклеотидазой яда гремучей змеи. Протекание дефосфорилирования подтверждено БХ и ТСХ в системах А и Б. УФ-спектры полученных соединений идентичны стандартным 5'-нуклеотидам.

Таким образом, экзонуклеаза А5, присоединенная к силохрому, может быть с успехом применена для получения 5'-нуклеотидов из нуклеиновых кислот.

### Экспериментальная часть

В работе были использованы следующие препараты: суммарная дрожжевая РНК (Институт элементоорганических соединений АН СССР), суммарная РНК из печени крупного рогатого скота, экзонуклеаза актиномицетов А5 (Институт молекулярной биологии АН СССР) (500 ед. акт/мл 5'-нуклеотидаза яда гремучей змеи (фирма «BDH», Англия). Носители: хромосорб Р-АВ (фирма «Johns-Manvill», США), силохромы С-80, С-120 и опытные (ВНИИ Люминофоров, Ставрополь), пористое стекло (набор для жидкостного хроматографа, Ленинград). В работе использовали ТСХ и БХ в следующих системах: А — этанол — 1 М ацетат аммония (7 : 3), насыщенный бурой и доведенный аммиаком до рН 9,0; Б — этанол — 1 М ацетат аммония (75 : 30).

Для ТСХ использовали готовые стеклянные пластины со слоем целлюлозы (фирма «Merck», ФРГ), для БХ — бумагу FN-1 (ГДР) и ватман 3 мм (фирма «Whatman», Англия).

Нуклеазную активность измеряли по приросту поглощения кислото-растворимых фракций при  $\lambda$  260 нм [3]. Инкубацию субстрата (раствор РНК в воде 6 мг/мл) с иммобилизованным ферментом проводили 20 мин (37°) в термостатированном сосуде с мешалкой (800 об/мин).

*Экзонуклеаза А5, присоединенная к аминоарилсилохрому.* К 0,5 г аминоарилсилохрому в 10 мл 2,5 н. раствора  $\text{NaCl}$  добавляли 5 мл 7%-ного водного раствора  $\text{NaNO}_2$ . Суспензию перемешивали 30 мин при 0—5°, промывали на фильтре ледяной водой до рН 6—7. Полученное диазопроизводное диспергировали в 10 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 8,15), добавляя 10 мл раствора экзонуклеазы А5, перемешивали 21 ч при 0—5°. Суспензию промывали на фильтре 1 М раствором  $\text{NaCl}$  (200 мл) и ледяной водой (200 мл). Продукт хранили в виде водной суспензии при 0—5°.

Экзонуклеаза А5, присоединенная к альдегидосилохрому. К 0,5 г альдегидосилохрому в 10 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,2) добавляли 10 мл раствора экзонуклеазы А5 и перемешивали 30 мин. при 0—5°. Полученное производное промывали 1 М раствором NaCl (200 мл) и ледяной водой (200 мл). Продукт хранили в виде водной суспензии.

Гидролиз РНК. 2 г аминоксилосилохрому с присоединенной экзонуклеазой А5 промывали 200 мл 1 М раствора NaCl и 200 мл H<sub>2</sub>O и загружали в колонку (2 × 10 см), термостатированную при 37°. На колонку подавали 0,5%-ный раствор суммарной дрожжевой РНК со скоростью ~5 мл/ч. Гидролизат упаривали при 30—35° и разделяли на ионообменниках. Содержание 5'-нуклеотидов в гидролизате составляло ~80%.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cohn W. E., Volkin E. (1954) *Nature*, **167**, 483.
2. Татарская Р. И., Баев А. А., Пахомова Т. Н., Кочкина В. М., Цыренов В. Ж., Аксельрод В. Д., Коренько А. И. (1969) Авт. свид. № 203837. Бюлл. изобр. № 24.
3. Tatarskaya R. I., Lvova T. N., Abrossimova-Amelyanchik N. M., Korenyako A. I., Bayev A. A. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **15**, 442—449.
4. Варламов В. П., Вальковский Д. Г., Рогожин С. В., Татарская Р. И., Львова Т. Н. (1974) Положит. решение от 5 мая по заявке № 1886517.
5. Варламов В. П., Вальковский Д. Г., Рогожин С. В., Мокеев В. Я., Чурсанов Ю. В. (1974) Положит. решение от 15 марта по заявке № 1895310.
6. Варламов В. П., Львова Т. Н., Вальковский Д. Г., Рогожин С. В., Татарская Р. И. (1974) Рефераты научных сообщений III Всесоюзного биохимического съезда т. II, стр. 45, Рига.

Поступила в редакцию  
4.XII.1974

#### IMMOBILIZED EXONUCLEASE A5 AND ITS APPLICATION FOR PREPARATION OF 5'-NUCLEOTIDES

VARLAMOV V. P., LVOVA T. N., VALKOVSKY D. G., MOKEYEV V. Ya.,  
TATARSKAYA R. I., ROGOZHIN S. V.

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

Exonuclease A5 (EC 3.1.4.1) has been covalently coupled to inorganic supports such as Chromosorb-P, porous glass and silochrom. Immobilized enzyme showed about 75% of the original activity. Immobilization greatly enhanced the stability of exonuclease A5, which could be used for hydrolysis of nucleic acids to 5'-nucleotides during rather long time (about one month). The properties of insoluble enzyme, as well as the effects of some support parameters (pore diameter, particle size etc.) on activity of immobilized enzyme were examined.