



УДК 577.113.3:546.11* 3:577.152.27

ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ МЕЧЕННЫХ РАДИОАКТИВНЫМИ ИЗОТОПАМИ НУКЛЕОТИДОВ ВЫСОКОЙ МОЛЯРНОЙ РАДИОАКТИВНОСТИ

Франк-Каменецкая М. Д., Книжничкова Г. В., Мясоедов Н. Ф.

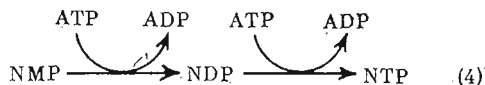
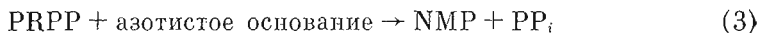
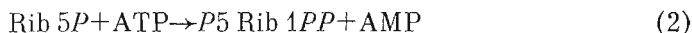
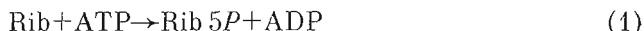
Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Исследован биосинтез меченных радиоактивными изотопами нуклеотидов высокой молярной радиоактивности из соответственно меченых аденина и урацила в присутствии *D*-рибозы или рибозо-5-фосфата и ферментного препарата, выделенного из клеток *E. coli* В. На основании данной работы выбраны условия проведения их препаративного биосинтеза.

Меченные радиоизотопами нуклеотиды различной степени фосфорилирования, необходимые для исследований по молекулярной биологии, генетике и экспериментальной медицине, в настоящее время получают биосинтетическими методами. Использование ферментов дает возможность осуществлять сложные химические превращения в одну стадию — без выделения и очистки промежуточных продуктов. Одностадийность синтеза с точки зрения выделения получаемых препаратов приобретает особое значение при получении кратномеченых нуклеотидов высокой молярной радиоактивности, с увеличением которой уменьшается весовое количество участвующего в биосинтезе субстрата.

В работах [1, 2] описан ферментативный способ получения кратномеченных тритием нуклеотидов разной степени фосфорилирования из соответствующих меченых азотистых оснований и 5-фосфорибозил-1-дифосфата (PRPP). Однако последнее соединение — нестойкий, труднодоступный и дорогой реактив. Поэтому применение его для препаративного биосинтеза меченых нуклеотидов нецелесообразно. Известно, что в клетках микроорганизмов фермент рибозофосфат (Rib 5P)-пирофосфокиназа катализирует процесс биосинтеза 5-фосфорибозил-1-дифосфата из более простых соединений, таких, например, как рибозо-5-фосфат. Показано, что Rib 5P-пирофосфокиназа требует для своей активности высоких концентраций неорганического фосфата [3]. Рибозо-5-фосфат в свою очередь может быть получен фосфорилированием *D*-рибозы при катализе рибокиназой. В работе [4] была показана возможность получения меченного тритием уридинтрифосфата из меченого урацила и *D*-рибозы или рибозо-5-фосфата.

Биосинтез [2,8-³H₂] аденозиннуклеотидов и [5,6-³H₂] уридиннуклеотидов осуществляется последовательными реакциями, катализируемыми ферментами рибокиназой (КФ 2.7.1.15, реакция 1) Rib 5P-пирофосфокиназой (КФ 2.7.6.1, реакция 2), аденин-фосфорибозилтрансферазой (КФ 2.4.2.7, реакция 3) или урацил-фосфорибозилтрансферазой (КФ 2.4.2.9, реакция 3), NMP-киназой (КФ 2.7.4.4, реакция 4) и NDP-киназой (КФ 2.7.4.6, реакция 4), по следующей схеме:



В последние годы возросли требования к молярной радиоактивности, химической и радиохимической чистоте получаемых нуклеотидов. В связи с этим особые требования предъявляются к содержанию в ферментных препаратах примесей нуклеотидной природы, присутствие которых даже в следовых количествах загрязняет синтезируемые препараты и существенно снижает их молярную радиоактивность.

Данная работа посвящена выбору условий проведения биосинтеза кратномеченных тритием аденозин- и уридиннуклеотидов разной степени фосфорилирования из азотистых оснований с ферментным препаратом, выделенным из клеток *E. coli* В и не содержащим примесей нуклеотидной природы.

Преимуществом предлагаемого метода является то, что он дает возможность получать кратномеченные нуклеотиды, молярная радиоактивность которых близка молярной радиоактивности меченых аденина и урацила. Дело в том, что молярная радиоактивность синтезируемых нуклеотидов определяется молярной радиоактивностью исходных меченых азотистых оснований, сохранить которую можно при использовании ферментных препаратов, не содержащих примесей нуклеотидной природы. Именно в связи с этим особое значение необходимо придавать очистке ферментных препаратов от этих примесей, чему совершенно не уделялось внимания в предшествующих работах. Более того, в работе [4] сама методика получения бесклеточного экстракта, используемого в качестве ферментного препарата, не только не гарантировала отсутствия в нем примесей нуклеотидной природы, но заведомо должна была приводить к значительному снижению молярной радиоактивности синтезируемых продуктов за счет нуклеотидов, образующихся в результате обработки экстракта дезоксирибонуклеазой и не удалявшихся диализом.

Ферментный препарат выделяли по методу, описанному в работе [1], но с дополнительным ультрацентрифугированием и обработкой супернатанта дезоксирибонуклеазой и рибонуклеазой (см. «Экспериментальную часть»). За критерий степени очистки ферментного препарата от нуклеотидных примесей было принято отношение поглощения при 257 нм супернатанта, полученного после удаления из ферментного препарата денатурированного при кипячении белка, к концентрации белка в ферментном препарате. Эта величина составляла 0,1–0,15 ОЕ/мг белка, что говорит о практически полном отсутствии в ферментном препарате примесей нуклеотидной природы.

Для выбора условий биосинтеза фосфорибозилдифосфата с участием ферментов рибокиназы и Rib 5P-пирофосфокиназы (реакции 1 и 2) последовательно варьировали количества компонентов реакционной смеси I (см. «Экспериментальную часть») и соотношений между ними, зафиксировав содержание $[2,8\text{-}^3\text{H}_2]$ аденина и АТР на постоянном уровне. Ранее нами было показано, что активность аденин-фосфорибозилтрансферазы в реакционной смеси I зависит только от концентрации субстратов — аденина и фосфорибозилдифосфата [1]. Поэтому о суммарной активности рибокиназы и Rib 5P-пирофосфокиназы можно судить по скорости образования $[2,8\text{-}^3\text{H}_2]$ АТР (при наличии АТР-регенерирующей системы). В работе [3] показано, что Rib 5P-пирофосфокиназа высокоспецифична к АТР как к донору пирофосфата. Активность Rib 5P-пирофосфокиназы в присутствии других доноров пирофосфата (УТР, СТР) составляет менее 3% активности ее при наличии АТР.

При биосинтезе $[2,8\text{-}^3\text{H}_2]$ АТР добавление в реакционную смесь немеченой АТР приводит к уменьшению молярной радиоактивности синтезируемого препарата. Оказалось, что при том количестве АТР, которое приводит к снижению молярной радиоактивности не более чем на 10%, за 15 мин инкубирования 25% $[2,8\text{-}^3\text{H}_2]$ аденина превращается в $[2,8\text{-}^3\text{H}_2]$ АТР. Исследование зависимости выхода $[2,8\text{-}^3\text{H}_2]$ аденозиннуклеотидов от количества ферментного препарата и D-рибозы в реакционной смеси I показало, что скорость биосинтеза $[2,8\text{-}^3\text{H}_2]$ аденозиннуклеотидов пропорциональна количеству ферментного препарата и максимальный выход $[2,8\text{-}^3\text{H}_2]$ аденозиннуклеотидов наблюдается при 1,5–2-кратном избытке D-рибозы над

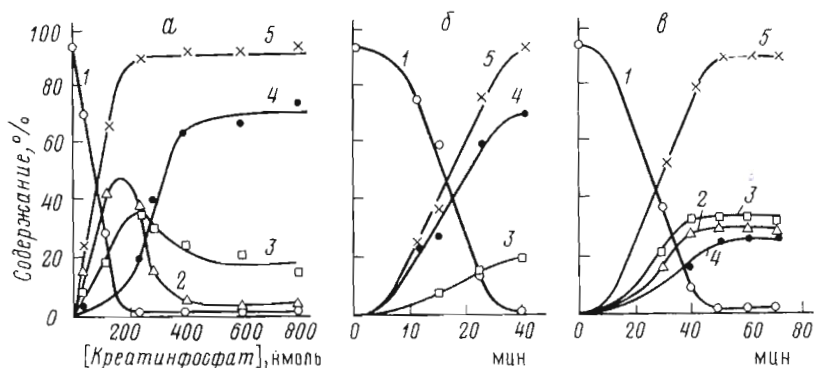


Рис. 1. Зависимость расходования $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденина (1), выхода меченых AMP (2), ADP (3), ATP (4) и суммарного выхода меченых нуклеотидов (5) от количества креатинфосфата в реакционной смеси I (а) (время инкубирования 50 мин) и от времени инкубирования при 20- (б) и 6-кратном (в) избытке креатинфосфата над $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденином

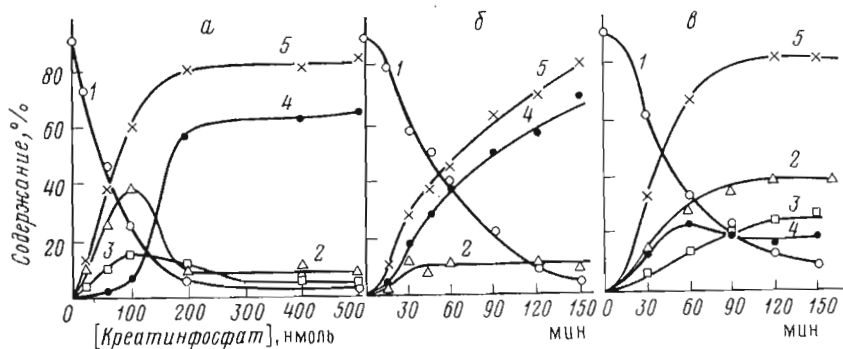


Рис. 2. Зависимость расходования $[5,6-^3\text{H}_2]$ урацила (1), выхода меченых UMP (2), UDP (3), UTP (4) и суммарного выхода меченых нуклеотидов (5) от количества креатинфосфата в реакционной смеси II (а) (время инкубирования 135 мин) и от времени инкубирования при 25- (б) и 8-кратном (в) избытке креатинфосфата над $[5,6-^3\text{H}_2]$ урацилом

$[2,8-^3\text{H}_2]$ аденином. Необходимо отметить, что при проведении биосинтеза меченых нуклеотидов из соответственно меченого аденина в реакционной смеси I с ферментным препаратом, количество которого превышает (по белку) 8 мг/мл, и при длительном времени инкубирования этой реакционной смеси (более 60–70 мин) в ней происходит значительное превращение производных аденина в производные инозина. Однако при проведении биосинтеза в выбранных нами условиях в реакционной смеси I образуются только производные аденина. Контроль на образование в реакционной смеси I дезоксирибонуклеотидов аденина был поставлен и дал отрицательный результат (данные не приводятся).

В выбранных условиях 1 мг ферментного препарата (по белку) осуществляет превращение 6–8 пмоль $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденина в $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденозиннуклеотиды за 1 мин в объеме реакционной смеси 0,5 мл.

Варьируя количество креатинфосфата в реакционной смеси I, можно получить $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденозиннуклеотиды разной степени фосфорилирования (рис. 1а). Так, биосинтез $[2,8-^3\text{H}_2]$ АТР с выходом 60–70% осуществляется при 20-кратном избытке креатинфосфата над $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденином (рис. 1б). Биосинтез набора $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденозиннуклеотидов разной степени фосфорилирования с выходом каждого из них по 20–40% осуществляется при 6-кратном избытке креатинфосфата над $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденином (рис. 1с).

Так же как и при биосинтезе $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденозиннуклеотидов, скорость биосинтеза $[5,6-^3\text{H}_2]$ уридиннуклеотидов пропорциональна количеству ферментного препарата и максимальный выход $[5,6-^3\text{H}_2]$ уридиннуклеотидов наблюдается при 1,5–2-кратном избытке *D*-рибозы над $[5,6-^3\text{H}_2]$ урацилом. Контроли, поставленные на образование в реакционной смеси II (см.

«Экспериментальную часть») производных цитозина и дезоксипроизводных урацила, дали отрицательные результаты (данные не представлены). В выбранных условиях 1 мг ферментного препарата (по белку) осуществляет превращение 0,8–1,0 нмоль $[5,6-^3\text{H}_2]$ урацила в $[5,6-^3\text{H}_2]$ уридиннуклеотиды за 1 мин в объеме реакционной смеси 0,3 мл.

Зависимость выхода $[5,6-^3\text{H}_2]$ уридиннуклеотидов разной степени фосфорилирования от количества креатинфосфата в реакционной смеси II показана на рис. 2а. Биосинтез $[5,6-^3\text{H}_2]$ уридинтрифосфата с выходом 60–70% осуществляется при 25-кратном избытке креатинфосфата над $[5,6-^3\text{H}_2]$ урацилом (рис. 2в). Набор $[5,6-^3\text{H}_2]$ уридиннуклеотидов разной степени фосфорилирования с выходом каждого из них по 20–40% осуществляется при 8-кратном избытке креатинфосфата над $[5,6-^3\text{H}_2]$ урацилом (рис. 2с).

Биосинтез $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденозиннуклеотидов и $[5,6-^3\text{H}_2]$ уридиннуклеотидов осуществляется при замене *D*-рибозы эквимольным количеством рибозо-5-фосфата.

Экспериментальная часть

Препараты $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденина (50 Ки/ммоль) и $[5,6-^3\text{H}_2]$ урацила (50 Ки/ммоль) предоставлены лабораторией изотопного обмена Института молекулярной генетики АН СССР. В работе использовали рибозо-5-фосфат, АТР, креатинфосфат, креатинфосфокиназу (Reanal, ВНР) и *D*-рибозу (Merck, ФРГ); пластинки с РЕИ-целлюлозой (Merck, ФРГ) и DEAE-целлюлозу DE-32 (Whatman, Англия).

Выделение ферментного препарата. Источником ферментов служили клетки *E. coli* В, выращенные на полной питательной среде в условиях интенсивной аэрации до поздней логарифмической фазы роста. Клетки собирали центрифугированием и отмывали от среды физиологическим раствором.

Клетки суспендировали в трехкратном объеме 0,05 М калийфосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 0,4 мл/л меркаптоэтанола. На 1 мл суспензии клеток добавляли 0,5 мг лизоцима и, осторожно перемешивая, выдерживали 20 мин при 4° С. Затем добавляли 5% раствор дезоксихолата натрия до 0,05% концентрации его в суспензии клеток и выдерживали 20 мин при 6–8° С. Нуклеиновые кислоты и остатки клеток удаляли ультрацентрифугированием при 120 000 *g* в течение 1 ч. К полученному супернатанту добавляли растворы дезоксирибонуклеазы до концентрации 5 мкг/мл, рибонуклеазы до 300 мкг/мл, 5 мМ MgCl_2 и выдерживали 1 ч 15 мин при 37° С. Образовавшийся при инкубировании осадок удаляли центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант деализовали 18 ч против приведенного выше буфера, после чего к нему добавляли сульфат аммония до 60% насыщения. Полученный осадок растворяли в 0,05 М калийфосфатном буфере с 0,4 мл/л меркаптоэтанола и диализовали против этого же буфера еще 18 ч.

Концентрацию белка в ферментном препарате определяли методом Лоури в модификации Хартри [5].

Биосинтез $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденозиннуклеотидов. Превращение $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденина в $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденозиннуклеотиды осуществляли в реакционной смеси I следующего состава: 40 нмоль $[2,8-^3\text{H}_2]$ аденина (50 Ки/ммоль), 80 нмоль *D*-рибозы (или рибозо-5-фосфата), 4 нмоль АТР, 5 мкмоль калийфосфатного буфера (рН 8,3), 400 нмоль MgCl_2 , 800 нмоль креатинфосфата, 6 мкг креатинфосфокиназы и 2,5 мкл (100 мкг белка) ферментного препарата в объеме 50 мкл. Реакционную смесь инкубировали при 37° С, время инкубирования варьировали.

Биосинтез $[5,6-^3\text{H}_2]$ уридиннуклеотидов. Превращение $[5,6-^3\text{H}_2]$ урацила в $[5,6-^3\text{H}_2]$ уридиннуклеотиды осуществляли в реакционной смеси II следующего состава: 20 нмоль $[5,6-^3\text{H}_2]$ урацила (50 Ки/ммоль), 40 нмоль *D*-рибозы (или рибозо-5-фосфата), 4 нмоль АТР, 3,5 мкмоль калийфосфатного буфера (рН 8,3), 400 нмоль MgCl_2 , 500 нмоль креатинфосфата, 6 мкг креатинфосфокиназы и 5 мкл (200 мкг белка) ферментного препарата

в объеме 35 мкл. Реакционную смесь инкубировали при 37° С, время инкубирования варьировали.

Реакцию останавливали выдерживанием в водяной бане при 100° С в течение 3–5 мин. Белок определяли центрифугированием. Образовавшиеся продукты реакции разделяли при помощи ТСХ на пластинках с РЕИ-целлюлозой в 1 М NaCl [1, 2]. 2 мкл проинкубированной реакционной смеси наносили на пластинку. Обнаруженные в ультрафиолете пятна элюировали 30 мин 0,5 мл 0,7 М MgCl₂ в 20 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,0) и радиоактивность просчитывали на сцинтилляционном счетчике. Выход нуклеотидов после элюции составлял 80–90%.

В случае препаративного биосинтеза меченных тритием нуклеотидов (2–15 мкмоль) разделение продуктов проводили на колонке (250×30 мм) с ДЕАЕ-целлюлозой в HCO₃⁻-форме (градиент концентрации ТЕАВ 0,05–0,3 М, скорость элюции 80 мл/ч [2, 6]).

Для обнаружения производных инозина пользовались следующей методикой. Полученную после проведения биосинтеза реакционную смесь I гидролизovali в кислой среде при кипячении и образовавшиеся из соответствующих нуклеотидов азотистые основания (гипоксантин и аденин) разделяли методом ТСХ на пластинках с РЕИ-целлюлозой (элюент – вода). Элюцию проводили как описано выше. Радиоактивность просчитывали на сцинтилляционном счетчике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мясоедов Н. Ф., Кузнецова О. Б., Лазуркина Т. Ю., Франк-Каменецкая М. Д. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 2, с. 256–260.
2. Мясоедов Н. Ф., Сидоров Г. В., Кузнецова О. Б., Милов В. М., Иванькови Е. К., Франк-Каменецкая М. Д., Лазуркина Т. Ю., Орлова В. А. Радиохимия, 1981, т. XXIII, № 1, с. 607–613.
3. Switzer R. L. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 11, p. 2854–2863.
4. Pumpen P., Gren E. J. Labelled Compounds, 1971, v. VIII, № 2, p. 193–205.
5. Hartree E. F. Anal. Biochem., 1972, v. 48, № 2, p. 422–428.
6. Сидоров Г. В., Мясоедов Н. Ф. Радиохимия, 1980, т. XXII, № 6, с. 911–917.

Поступила в редакцию
7.IX.1983
После доработки
26.X.1983

ENZYMATIC SYNTHESIS OF LABELED NUCLEOTIDES OF HIGH MOLAR RADIOACTIVITY

FRANK-KAMENETSKAYA M. D., KNIZHNIKOVA G. V., MYASOEDOV N. F.

Institute of Molecular Genetics, Academy of Science of the USSR, Moscow

The biosynthesis of labeled nucleotides of high molar radioactivity from the labeled adenine and uracil in the presence of *D*-ribose or ribose 5-phosphate and the enzyme preparation from *E. coli* B cells is described. On the basis of this study the conditions of the preparative biosynthesis of the labeled nucleotides are chosen.