



УДК 577.15.04

СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА АЛЬДЕГИДСИЛОХРОМЕ
ПОЛИНУКЛЕОТИДФОСФОРИЛАЗЫ*Райт А. С., Райт В. К., Салганик Р. И.**Специальное конструкторско-технологическое бюро биологически активных веществ,
Новосибирский государственный университет,**Новосибирский институт цитологии и генетики СО АН СССР*

Исследованы термостабильность и устойчивость иммобилизованной на альдегидсилохроме полинуклеотидфосфорилазы при хранении и в процессе непрерывного использования, определены ее температурный и рН-оптимумы в реакциях синтеза и фосфорилиза полирибонуклеотидов, а также энергия активации. Описано применение иммобилизованной полинуклеотидфосфорилазы в реакции синтеза сополимеров.

Общезвестна та роль, которую сыграли синтетические полирибонуклеотиды в исследованиях биосинтеза белков, структуры генетического кода и механизма действия ряда ферментов. В последнее время синтетические полирибонуклеотиды в составе двуспиральных комплексов нашли применение в медицине в качестве индукторов интерферона [1]. Удовлетворить все возрастающую потребность в полирибонуклеотидах возможно, очевидно, лишь используя иммобилизованную полинуклеотидфосфорилазу (КФ 2.7.7.8), катализирующую их синтез из рибонуклеозид-5'-дифосфатов.

К настоящему времени известен способ иммобилизации полинуклеотидфосфорилазы на активированной бромцианом целлюлозе [2]. Этот способ, однако, обладает рядом существенных недостатков: при иммобилизации фермента сохраняется лишь 26% активности; из-за высокого содержания в препаратах фермента, подвергаемого иммобилизации, эндогенных нуклеиновых кислот необходимо отбрасывать полинуклеотиды, синтезированные в первых циклах использования иммобилизованного фермента; эксплуатация полинуклеотидфосфорилазы в реакторе с перемешиванием осложняется измельчением матрицы, а удаление мелких частиц сложноосуществимо, так как вязкость реакционной среды может увеличиваться во много раз в процессе полимеризации [3].

Разработанным нами методом иммобилизации на широкопористых альдегидсилохромах [4, 5] удается получить водонерастворимые производные высокоочищенной полинуклеотидфосфорилазы с сохранением 57 — 68% активности. Неорганическая природа матрицы предохраняет иммобилизованный фермент от действия микроорганизмов, обеспечивает оперативность в обращении с ним и позволяет использовать фермент в технологически наиболее простом реакторе проточного типа. Ниже будут описаны свойства полинуклеотидфосфорилазы, иммобилизованной на альдегидсилохроме на основе силохрома С-1 — наиболее широкопористом из доступных нам силохромов.

С 1 г носителя ковалентно связывается в среднем 30 мг белка, содержащего полинуклеотидфосфорилазу [5]. Используя значение молекулярного веса полинуклеотидфосфорилазы (200 000) [6] и диаметра молекулы (85 Å) [7], можно рассчитать площадь, занимаемую на поверхности альдегидосилохрома иммобилизованным ферментом: $S = Nd^2$, где N — число молекул полинуклеотидфосфорилазы, d — диаметр молекулы. В этом приближении кажущаяся площадь оказывается равной 6,5 м²/г, т. е. ~ 22% всей удельной поверхности силохрома. В действительности занятая ферментом поверхность еще меньше, так как очищенная нами полинуклеотидфосфорилаза не индивидуальна, а, по предварительным данным, приблизительно 25%-ного содержания. В районе контакта молекулы фермента и носителя в среднем должно находиться 50 остатков пропионового альдегида и, по-видимому, имеет место многоточечное связывание, обуславливающее наблюдаемую частичную инактивацию из-за потери ферментом конформационной гибкости.

Для иммобилизованных ферментов характерна повышенная стабильность при хранении. В нашем случае стабилизирующий эффект носителя также проявляется (рис. 1). В отсутствие субстрата полная потеря активности происходит за 11 месяцев, тогда как водорастворимая полинуклеотидфосфорилаза при 4° инактивируется на 100% за несколько недель [8]. В присутствии нуклеозиддифосфатов и, по-видимому, какого-то количества полинуклеотида активность иммобилизованного фермента остается неизменной по меньшей мере в течение 16 месяцев. Считается, что одной из причин инактивации в растворе препаратов полинуклеотидфосфорилазы является деградация фермента эндогенными протеиназами [6], которая не может происходить после фиксации из-за пространственного разделения белков. Сложнее объяснить консервирующее действие полинуклеотида и нуклеозиддифосфатов. Известно, однако, что у молекулы полинуклеотидфосфорилазы есть участок, связывающий довольно длинные (размером с тРНК) полинуклеотиды [9], что также должно стабилизировать фермент и, возможно, предотвращать диссоциацию субъединиц.

При иммобилизации ферментов происходит изменение не только их активности, но часто и других их свойств. Условия функционирования фермента в гомогенной среде и на поверхности носителя обычно различаются вследствие различного микроокружения, лимитирующего влияния диффузии, меньшей конформационной гибкости закрепленного фермента и пр. В значительной мере природой носителя определяются и условия оптимального функционирования иммобилизованных ферментов. Так, иммобилизация полинуклеотидфосфорилазы из *M. luteus* на целлюлозе сопровождается резким сдвигом в противоположных направлениях рН-оптимумов реакций полимеризации и фосфорилиза [10]. Если обычно полимеризацию нуклеозиддифосфатов водорастворимым ферментом проводят при рН 8—8,5, то с иммобилизованной полинуклеотидфосфорилазой при этих значениях рН реакция практически не идет. Кривая зависимости активности иммобилизованного фермента от рН довольно крутая: 0% при рН 8,4 и 100% при рН 9,2. Высоких рН при синтезе полирибонуклеотидов избегают из-за возможной их щелочной деградации.

Как видно из рис. 2, рН-зависимость реакции полимеризации у полинуклеотидфосфорилазы, иммобилизованной на альдегидосилохроме, по

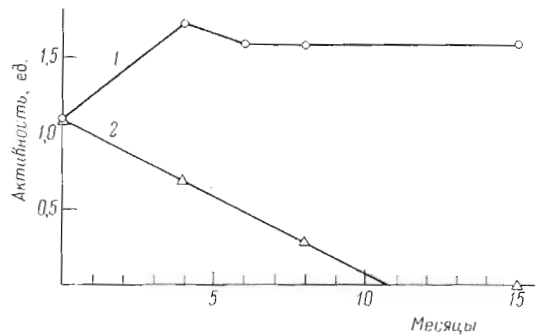


Рис. 1. Изменение активности иммобилизованной полинуклеотидфосфорилазы в процессе хранения в буфере, содержащем ADP (1), и без ADP (2)

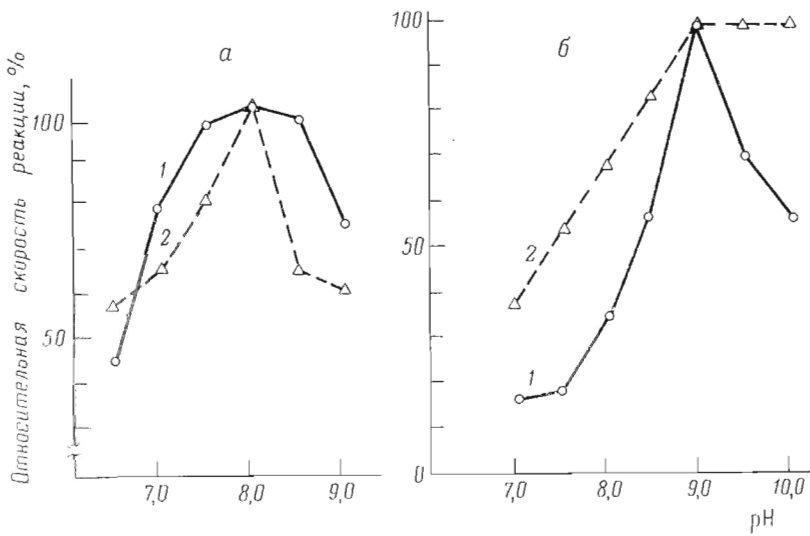


Рис. 2. Зависимости скоростей реакций фосфорилиза poly(A) (а) и полимеризации ADP (б) от рН для водорастворимой (1) и иммобилизованной (2) полинуклеотидфосфорилазы

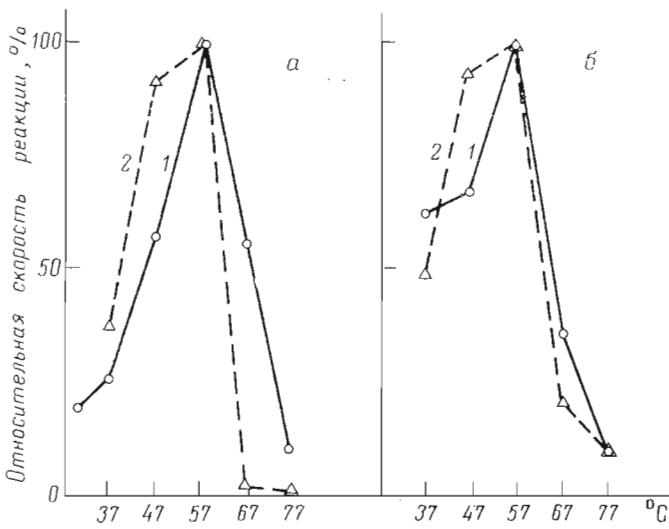


Рис. 3. Зависимость скоростей реакций фосфорилиза poly(A) (а) и полимеризации ADP (б) от температуры для водорастворимой (1) и иммобилизованной (2) полинуклеотидфосфорилазы

сравнению с водорастворимым ферментом существенно не изменяется. Сохраняется оптимум рН и в реакции фосфорилиза, хотя в этом случае зависимость активности от рН выражена более резко.

Данные о влиянии температуры на скорость полимеризации ADP и на скорость фосфорилиза poly(A) водорастворимым и иммобилизованным ферментами представлены на рис. 3. В обеих реакциях наблюдается смещение температурного оптимума в область низких значений с одновременным его уширением. При 47° скорость полимеризации иммобилизованной полинуклеотидфосфорилазой составляет 86% максимальной, а в случае водорастворимого фермента ~ 65%. В реакции фосфорилиза различия еще более существенны: 91% против 57%.

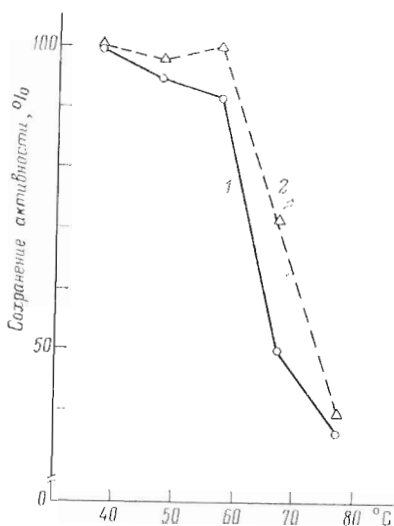


Рис. 4

Рис. 4. Термостабильность водорастворимой (1) и иммобилизованной (2) полинуклеотидфосфорилазы

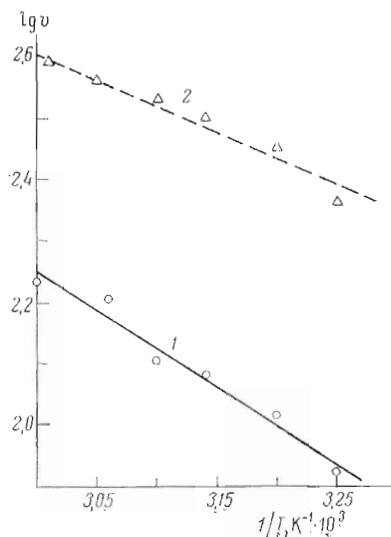


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость $\lg v$ от $1/T$ для водорастворимой (1) и иммобилизованной (2) полинуклеотидфосфорилазы

В большинстве случаев при иммобилизации достигается повышенная термостабильность ферментов. Выдерживая в течение 10 мин иммобилизованную полинуклеотидфосфорилазу при различных температурах, мы убедились в ее большей (по крайней мере до 77°) термостабильности по сравнению с водорастворимой формой фермента (рис. 4).

Из наклона кривых на рис. 5 следует, что у иммобилизованного фермента изменена (уменьшена в 1,44 раза) энергия активации в реакции полимеризации ADP. Абсолютное значение энергии активации для водорастворимой полинуклеотидфосфорилазы, рассчитанное по формуле

$$E_{\text{акт}} = \lg \frac{v_2}{v_1} \cdot 2,303 \cdot R \cdot \frac{T_1 T_2}{T_2 - T_1}$$

(где v_1, v_2 — начальные скорости реакций при соответствующих температурах T_1 и T_2), оказалось равным 5,97 ккал/моль. Существенное расхождение с известным значением $E_{\text{акт}} = 14,6$ ккал/моль [11] связано, по-видимому, с тем, что в упомянутой работе был использован препарат гетерогенного, частично деградированного фермента.

Иммобилизованная полинуклеотидфосфорилаза была испытана в реакторе проточного типа (колонке) в реакции полимеризации ADP. Степень превращения (рис. 6) существенно зависит от скорости пропускания реакционной смеси через колонку с иммобилизованным ферментом. Любопытно, что максимально достижимая глубина реакции составляла 70%, тогда как с водорастворимым ферментом равновесие устанавливается по превращению 61—67% ADP.

Располагая ограниченным количеством нуклеозиддифосфатов, мы эксплуатировали колонку с иммобилизованным ферментом в непрерывном режиме лишь в течение 6 сут. Ниже приведены вариации степени превращения ADP в $\text{poly}(A)$ в зависимости от времени работы колонки (скорость пропускания 9,8 мл/ч)

Время, сут	0,56	0,90	1,53	1,97	2,59	2,72	3,54	4,53	5,54	5,92
Глубина превращения, %	72,0	72,0	68,8	65,2	56,2	62,8	60,4	61,3	71,3	68,5

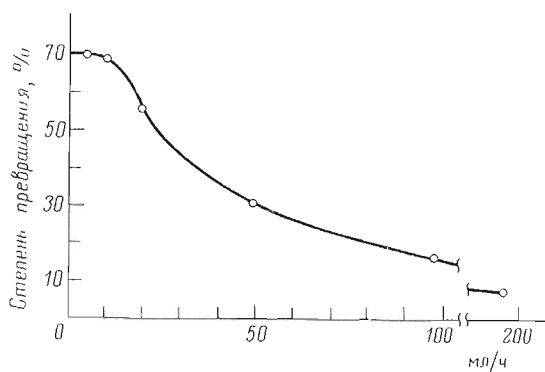


Рис. 6. Зависимость степени превращения ADP в poly(A) от скорости пропускания реакционной смеси через колонку с иммобилизованной полинуклеотидфосфорилазой

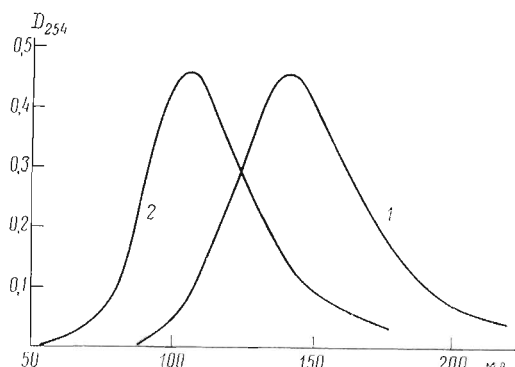


Рис. 7. Гель-хроматография на сефарозе 4В poly(A), синтезированной с водорастворимой (1) и иммобилизованной (2) полинуклеотидфосфорилазой

Таким образом было получено 11 г полинуклеотида, о молекулярно-весовом распределении которого можно судить по гель-хроматографии на сефарозе 4В (рис. 7) и которое даже лучше, чем у poly(A), синтезированной в обычном гомогенном варианте. С тем же количеством фермента, которое было взято для иммобилизации, можно было бы синтезировать не более 0,66 г poly(A).!

Тенденция к некоторому снижению активности при непрерывном использовании иммобилизованной полинуклеотидфосфорилазы связана, по-видимому, с частичным растворением силикатной поверхности, «сдираaniem» молекул фермента вязкой реакционной средой, а также закупориванием пор носителя как высокомолекулярным полинуклеотидом, так и микрочастицами различных примесей. Выделить главную причину в настоящее время затруднительно. Определенный нами ранее период «полужизни» иммобилизованной полинуклеотидфосфорилазы в 25 сут [4] является довольно приблизительным из-за относительно небольшого времени эксплуатации*, а также из-за разброса точек на графике, обусловленного частично выделением пузырьков воздуха из носителя (несмотря на тщательную деаэрацию) в процессе полимеризации.

Иммобилизованная полинуклеотидфосфорилаза использовалась ранее

* Дополнительное испытание иммобилизованной полинуклеотидфосфорилазы в режиме непрерывной эксплуатации выполнено С. А. Магарилл (Новосибирский государственный университет). За 2,5 месяца работы ковалентно связанный фермент теряет менее 50% активности.

только для получения гомополирибонуклеотидов [2, 10]. Особые преимущества этой формы фермента очевидны и для стандартного приготовления сополимеров. Подвергая сополимеризации ADP и UDP, мы отметили, что при самых разных соотношениях нуклеозиддифосфатов в исходной реакционной среде в образующийся сополимер включается больше остатков аденозина, чем уридина:

Соотношение ADP : UDP в исходной реак-	0,11	0,33	1	3	9
ционной смеси					
Соотношение AMP : UMP в сополимере	0,21	0,59	1,9	5,17	9,35

Различие между нуклеотидным составом сополимеров и соотношением исходных нуклеозиддифосфатов, однако, несколько меньше, чем наблюдавшееся ранее при исследовании сополимеризации водорастворимым ферментом [12], что может быть следствием как иммобилизации, так и течения реакции в неравновесных условиях.

Еще одно практическое применение иммобилизованная полинуклеотидфосфорилаза может найти для получения нуклеозиддифосфатов фосфороллизом природных РНК.

Экспериментальная часть

Выделение полинуклеотидфосфорилазы из биомассы *E. coli* В проводили, как описано в работе [5]. Характеристики очищенного фермента: $D_{280}/D_{260} - 1,32$, удельная активность — 12,3 ед/мг (1 ед. акт. превращает 1 мкмоль ADP в poly(A) за 10 мин). Стандартная реакционная смесь (РС) для определения активности содержала 25 мМ ADP, 10 мМ $Mg(CH_3COO)_2$, 1 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту и 0,02% NaN_3 в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 8,0, при 37°. За реакцией полимеризации нуклеозиддифосфатов следили по накоплению в реакционной смеси ортофосфата, который определяли по методу работы [13]. Фосфороллиз poly(A) (50 ОЕ_{25,4}/мл) проводили в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 8,0, содержащем 0,01 М фосфат калия, 5 мМ $Mg(CH_3COO)_2$ и 0,5 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту при 37°. Реакцию фосфоролиза контролировали по накоплению кислоторастворимой фракции (ADP). Иммобилизованная полинуклеотидфосфорилаза получена, как описано в работах [4, 5].

Устойчивость иммобилизованного фермента при хранении определяли, выдерживая его при 4—6° в реакционной смеси в присутствии и без ADP.

Термостабильность полинуклеотидфосфорилазы испытывали, инкубируя ее в течение 10 мин при различных температурах в 0,02 М трис-НСl-буфере (рН 8,0), затем быстро охлаждали в ледяной бане и определяли активность.

При определении рН-оптимумов использовали 0,1 М трис-НСl-буфер (рН 7—9) и 0,1 М боратный буфер (рН 9—11), другие компоненты были как в стандартной реакционной смеси.

Для синтеза poly(A) иммобилизованным ферментом полинуклеотидфосфорилазу (124 ед. акт.) упаковывали в колонку (0,6 × 5 см), снабженную рубашкой для термостатирования, и пропускали через нее стандартную реакционную смесь с помощью перистальтического насоса «Varioреггex» (ЛКВ, Швеция). Собранную на выходе из колонки смесь подвергали исчерпывающему диализу против 0,1 М KCl с 0,001 М этилендиаминтетрауксусной кислотой (в последних сменах без нее) и осаждали poly(A) этиловым спиртом. Степень превращения ADP в poly(A) оценивали по содержанию ортофосфата в реакционной смеси на выходе из колонки.

Гель-хроматографию poly(A) проводили на колонке (2,1 × 60 см) с сефарозой 4В, элюент — 1 М NaCl в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,5.

Синтез сополимеров осуществляли, используя колонку со 100 мг иммобилизованного фермента (13,3 ед. акт.), через которую пропускали реакционную смесь с различным соотношением ADP и UDP (суммарная

концентрация — 25 мМ). Нуклеотидный состав сополимеров определяли, фракционируя их щелочные гидролизаты на микроколонке (объем ~ 45 мкл, высота 120 мм) с дауэксом 50 × 4, элюент — 0,1 М формиат аммония, рН 3,2. Плотность в элюате регистрировали с помощью УМСФ [14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Colby C. (1971) *Progr. Nucleic Acid Res. and Mol. Biol.*, **11**, 1—32.
2. Hoffman C. H., Harris E., Chodroff S., Michelson S., Rothrock J. W., Peterson E., Reuter W. (1970) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **41**, 710—714.
3. Hennage D. W., Crothers D. M., Ludlum D. B. (1969) *Biochemistry*, **8**, 2298—2302.
4. Кумарев В. П., Райт А. С., Райт В. К., Хомов В. В. (1974) Положит. решение от 20 ноября 1974 г. по заявке № 1989378/28-13.
5. Кумарев В. П., Райт А. С., Райт В. К., Салганик Р. И. (1976) *Биоорганич. химия*, **2**, 700—705.
6. Thang M. N., Dondon L., Godefroy-Colburn T. (1971) *Biochimie*, **53**, 291—302.
7. Valentine R. C., Thang M. N., Grunberg-Manago M. (1969) *J. Mol. Biol.*, **39**, 389—391.
8. Kimhi Y., Littauer U. Z. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 231—240.
9. Thang M. N., Harvey R. A., Grunberg-Manago M. (1970) *J. Mol. Biol.*, **53**, 261—280.
10. Smith J. C., Stratford I. J., Hutchinson D. W., Brentnall H. J. (1973) *FEBS Lett.*, **30**, 246—248.
11. Godefroy T., Cohn M., Grunberg-Manago M. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **12**, 236—249.
12. Cherepak M. M., Hansen R. W. (1968) *Biotechnol. and Bioeng.*, **10**, 359—372.
13. Eibl H., Lands W. E. M. (1969) *Anal. Biochem.*, **30**, 51—57.
14. Власов В. В., Грачев М. А., Комарова Н. И., Кузьмин С. В., Мензорова Н. И. (1972) *Молекулярн. биология*, **6**, 809—816.

Поступила в редакцию
9.X.1975

PROPERTIES OF POLYNUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE IMMOBILIZED ON SILICA ALDEHYDES

RAIT A. S., RAIT V. C., SALGANIK R. I.

*Novosibirsk State University, Institute of Cytology and
Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Highly purified polynucleotide phosphorylase immobilized on silica aldehydes possesses higher storage stability and thermostability than the water-soluble form of the enzyme. The energy of activation for polymerization of ADP by immobilized enzyme was decreased 1.44-fold as compared with the reaction catalysed by free enzyme. There were no dramatic changes in pH-optima of the polynucleotide phosphorylase due to immobilization. The temperature optima of the attached enzyme were somewhat broader and shifted to lower temperature than that of the water-soluble enzyme. The half-life time of the immobilized polynucleotide phosphorylase was more than 25 days during continuous polymerization of ADP in flow-through reactor. The application of the attached enzyme for the synthesis of heteropolyribonucleotides is described.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 19/II-1976 г.	Т-07623	Подписано к печати 5/IV—1976 г.	Тираж 850 экз.
Зак. 163	Формат бумаги 70×108 ^{1/16}	Усл. печ. л. 12,6	Бум. л. 4,5
			Уч.-изд. л. 13,4

2-я типография издательства «Наука». Москва, Шубинский пер., 10