



УДК 577.152.313'2:543.544:547.1'128

## БИОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НУКЛЕАЗ

3\*. СИНТЕЗ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОРГАНОКРЕМНЕЗЕМНЫХ СОРБЕНТОВ  
С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ЦИТИДИНА  
ДЛЯ ОЧИСТКИ ЭКЗОНУКЛЕАЗЫ А5 АКТИНОМИЦЕТОВ*Банникова Г. Е., Варламов В. П., Рогожин С. В.**Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова  
Академии наук СССР, Москва*

Описан синтез биоспецифических сорбентов на органокремнеземной основе, содержащих в качестве лиганда производные цитидин-2'(3'),5'-дифосфата, присоединенные к носителю через гетероциклическое основание и удаленные от него на различные расстояния. Исследовалась емкость полученных сорбентов по белку и нуклеазной активности и возможность применения их для очистки экзонуклеазы А5.

Данное сообщение посвящено синтезу биоспецифических сорбентов для очистки экзонуклеазы А5 актиномицетов. Ранее нами были получены биоспецифические сорбенты, содержащие в качестве стационарного лиганда 5-оксиуридин-2'(3'),5'-дифосфат, присоединенный к носителю с помощью реакции азосочетания [1]. Поскольку аминоарильная группа может отрицательно влиять на связывание фермента с иммобилизованным лигандом, создавая пространственные затруднения, мы обратились к другим способам иммобилизации пиримидиновых нуклеотидов через гетероциклическое основание, используя носители на основе силохрома. В данной работе, так же как и в работе [1], использовали силохром, обработанный солями алюминия и 3-(2',3'-эпоксипропокс)пропилтриметоксисиланом.

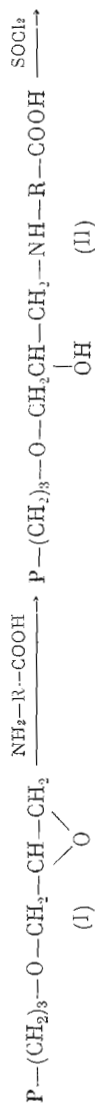
Ранее проводились эксперименты, в которых пытались связать цитидин-2'-монофосфат ковалентно с ВгCN-сефарозой через 4-аминогруппу цитозина, но безуспешно из-за слабой нуклеофильности этой группы в условиях реакции [2]. Учитывая это, мы использовали описанную ранее реакцию переаминирования, инициируемую сульфитом [3], для получения N<sup>4</sup>-(2-аминоэтил)цитидин-2'(3'),5'-дифосфата из цитидин-2'(3'),5'-дифосфата. Цитидин-2'(3'),5'-дифосфат был синтезирован, как описано ранее, с помощью полифосфорной кислоты [4]. Впервые получение 2'(3'),5'-дифосфатов уридина и цитидина с помощью полифосфорной кислоты было описано в 1955 г. [5]. Однако в более поздних исследованиях [6, 7] продукту фосфорилирования цитидина полифосфорной кислотой приписывалась структура 1-β-D-арабинофуранозилцитозин-3',5'-дифосфата, который образуется через промежуточный O<sup>2</sup>,2'-циклонуклеозид.

Для исследования строения сахара в продукте реакции цитидина с полифосфорной кислотой мы провели исчерпывающее ферментативное дефосфорилирование кислой фосфатазой из *Aspergillus terrus* с последующим фракционированием нуклеозидов на дауэксе 1×10 в боратной форме [8]. Было показано, что смесь содержит 60–70% 1-β-D-арабинофуранозилцитозина и 40–30% 1-β-D-рибофуранозилцитозина.

Ранее при изучении влияния структуры сахара в нуклеозиддифосфатах (pNp) на ингибирование ими реакции, катализируемой экзонуклеазой А5, нами было отмечено несущественное различие в значениях  $K_i$  для рибо- и арабино-производных [4]. Это давало возможность использовать

\* Сообщение 2 см. [1].

Схема 1



(II)



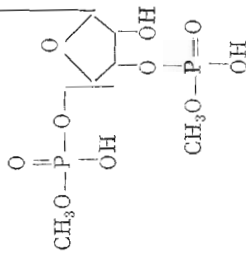
P — силлохром

R = а) —CH<sub>2</sub>—

б) —CH<sub>2</sub>—C(=O)—NH—CH<sub>3</sub>—

в) —CH<sub>2</sub>—C(=O)—NH—CH<sub>2</sub>—C(=O)—NH—CH<sub>3</sub>—

ae<sup>t</sup>C — N<sub>4</sub>-(2-аминоэтил)пиперидин

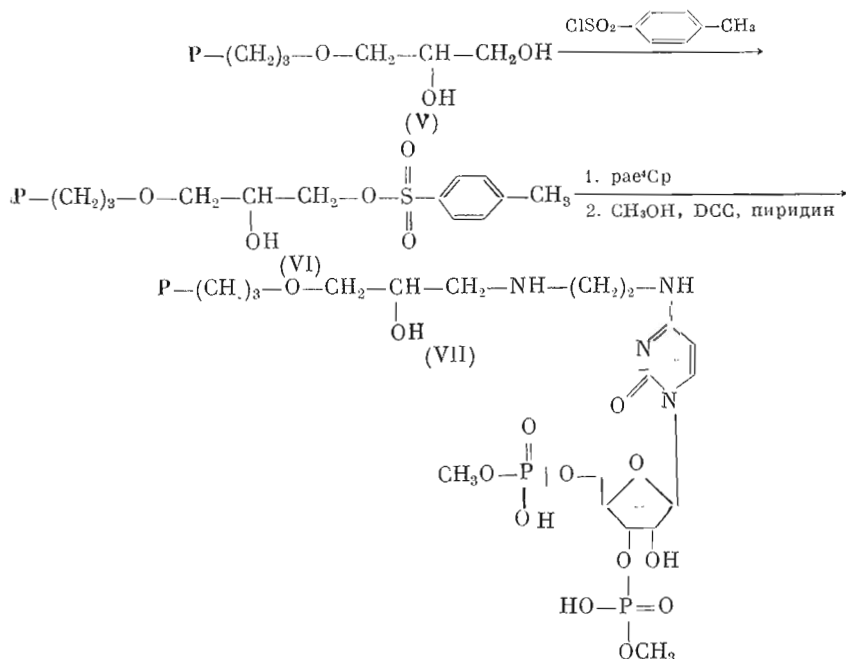


смеси *рибо*- и *арабино*-производных без разделения в качестве стационарных лигандов для аффинной хроматографии экзонуклеазы А5.

Известно, что селективность и емкость биоспецифических сорбентов в значительной степени определяются удаленностью лиганда от поверхности носителя. С целью поиска оптимального биоспецифического сорбента был синтезирован ряд сорбентов, имеющих вставки различной длины между сорбентом и лигандом. В качестве вставок использовали глицин, диглицин и триглицин, присоединенные как показано на схеме 1.

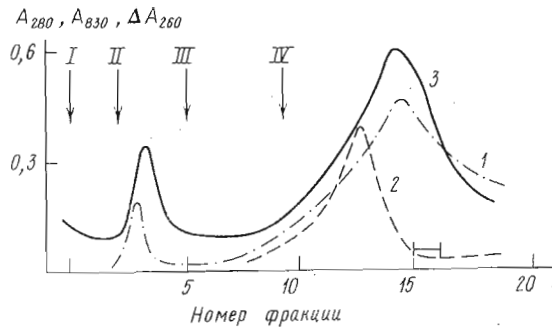
Получить биоспецифический сорбент с этим же лигандом, но без вставки по этой схеме не удалось, так как оптимальные условия реакции присоединения нуклеотида требуют рН 10–11, что нежелательно для сорбентов на основе силихрома, а проведение реакции при рН 9, как в случае получения сорбентов (IVa)–(IVв), не позволило получить сорбент с содержанием лиганда >1 мкмоль/г. Поэтому для получения сорбента без вставки (VII) использовали другую схему синтеза: с *n*-толуолсульфохлоридом в качестве активатора гидроксильной группы [9] (схема 2).

Схема 2



Полученные сорбенты (IVa)–(IVв) и (VII) имели близкое содержание лигандов — от 3,7 до 4,9 мкмоль/г сорбента (таблица). Как видно из таблицы, наибольшей емкостью до нуклеазной активности обладал сорбент (IVб). Вероятно, диглициновая вставка позволяет лиганду наилучшим образом взаимодействовать с ферментом. На сорбенте (IVб) провели биоспецифическую хроматографию экзонуклеазы А5. Соотношение нуклеазной и фосфатазной активностей ~100 в полученном при этом ферментном препарате оказалось несколько хуже, чем в препарате, полученном при хроматографии экзонуклеазы А5 в этих же условиях на иммобилизованном 5-оксиуридин-2'(3'),5'-дифосфате (ср. [1]). Однако прове-

Сорбент	Содержание лиганда, мкмоль/г	Емкость	
		по белку, мг/г	по нуклеазной активности, ед. акт./г
(VII)	4,5	4,5	5100
(IVa)	4,9	9,72	11 400
(IVб)	3,7	10,44	12 300
(IVв)	4,5	9	5400



Повторная биоспецифическая хроматография экзонуклеазы А5 на сорбенте (IVб). Колонка (0,8×0,5 см), объем фракций 3 мл. 1 — нуклеазная активность, пропорциональная  $\Delta A_{260}$ , 2 — фосфатазная активность, пропорциональная  $A_{830}$ , 3 — содержание белка ( $A_{280}$ ). Стрелки указывают смену элюентов: I — 5 мМ трис-НСI-буфер, рН 6,8, содержащий 1 мМ  $MgCl_2$  и 100 мМ  $NaCl$ ; II — раствор  $Na_2HPO_4$  (20 мкмоль/мл) в том же буфере; III — тот же буфер, что и в I; IV — 1 М трис- $CH_3COOH$ -буфер, рН 5, содержащий 5 мМ  $MgCl_2$ .

дение повторной хроматографии на сорбенте (IVб) (см. рисунок) позволило получить ферментный препарат с соотношением нуклеазной и фосфатазной активности ~3000 и удельной активностью 8000 ед. акт./мг белка. Таким образом, сорбент (IVб) может быть использован для биоспецифической хроматографии экзонуклеазы А5.

### Экспериментальная часть

В работе был использован силихром отечественного производства с диаметром пор 1130 Å,  $S_{уд}$  34,1 м<sup>2</sup>/г, размером частиц 0,315—0,5 мм. Обработку солями алюминия проводили по методу [10]. Использовали 3-(2',3'-эпоксипропокс)пропилтриметоксисилан (Serva, ФРГ), цитидин (Keanal, Венгрия), арабиноцитидин (Serva, ФРГ), полифосфорную кислоту, содержащую 94,3%  $P_2O_5$  ( $n_D$  1,467), дауэкс 1×10 (200—400 меш; Serva, ФРГ), кислотную фосфатазу из *A. terreus* (КФ 3.1.3.2) и препарат экзонуклеазы А5 (КФ 3.1.4.1) отечественного производства. Препарат экзонуклеазы А5 содержит ≤1% белка, соотношение нуклеазной и фосфатазной активности ~3, удельная нуклеазная активность ~1000 ед. акт./мг белка. Нуклеазную и фосфатазную активности фермента определяли как описано в работе [11], но неорганический фосфат анализировали как в работе [1]. Соотношение активностей рассчитывали как молярное отношение продуктов основной и побочной реакций согласно работе [11]. ТСХ проводили в системах: *n*-пропиловый спирт — аммиак — вода, 11 : 7 : 2 (А), *n*-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода, 5 : 2 : 3 (Б). Электрофорез проводили на бумаге Whatman № 3 ММ при 1000 В в 0,1 н. боратном буфере, рН 9,2, и при 600 В в 0,005 М оксалатном буфере, рН 1,7.

*Разделение продуктов ферментативного дефосфорилирования цитидин-2'(3'),5'-дифосфата.* Дефосфорилирование цитидин-2'(3'),5'-дифосфата проводили в 0,02 М ацетатном буфере, рН 5,5, при 37° С. На 5 мг нуклеотида было взято ~15 ед. акт. фосфатазы (по *n*-нитрофенилфосфату). После обессоливания на сефадексе G-10 получали хроматографически чистый нуклеозид.

Для разделения нуклеозидов использовали колонку с дауэксом 1×10 (2×2,5 см) в боратной форме [8]. Предварительно разделили модельную смесь, состоящую из 5 мг цитидина и 5 мг арабиноцитидина. Колонку промыли 0,1 М раствором  $Na_2B_4O_7$  (500 мл) и нанесли 17 ОЕ нуклеозида, полученного при дефосфорилировании (поглощение измеряли при 270 нм и рН 6,9). Пик, элюированный водой (10,64 ОЕ), соответствовал арабиноцитидину. При элюции 1 н. НСI получили пик — 6,4 ОЕ (измеряли после нейтрализации раствора 1 н.  $NaOH$ , при рН 6,9), соответствовавший цитидину.

*N<sup>4</sup>-(2-Аминоэтил)цитидин-2'(3'),5'-дифосфат.* К 0,45 г (1,1 ммоль) цитидин-2'(3'),5'-дифосфата, полученного из цитидина с помощью поли-

фосфорной кислоты как описано в работе [3], добавляли 1,44 г (12,5 моль/моль)  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , растворенного в 8 мл воды и 1,43 мл этилендиамина (20 моль/моль), рН доводили до 7 (6 н.  $\text{HCl}$ ) и термостатировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 6 ч. За ходом реакции следили с помощью ТСХ по увеличению нингидрин-положительного продукта.  $R_f$  0,21 (А) и 0,088 (Б). Реакционный раствор наносили на колонку с сефадексом G-10 ( $3,5 \times 90$  см). Элюировали водой со скоростью 54 мл/ч. Фракции, соответствовавшие нужному нуклеотиду, концентрировали и дополнительно очищали препаративно на бумаге в системе (А). Выход 15%. При электрофорезе на бумаге как в кислом, так и в щелочном буфере получали одно поглощающее в ультрафиолете нингидрин-положительное пятно, отличающееся по подвижности от исходного нуклеотида.

*Синтез сорбентов (IVa) — (IVв).* Сорбент (I) был получен при обработке силехрома 3-(2',3'-эпоксипропокси)пропилтриметоксисиланом как описано ранее [1].

*Сорбент (IIa).* К 3 г сорбента (I) добавляли раствор 0,225 г (3 мкмоль) глицина в 15 мл 0,05 М карбонатного буфера, рН 8,7. Перемешивали при  $70^\circ\text{C}$  в течение 3 ч. Промывали на стеклянном пористом фильтре буфером (200 мл) и водой (200 мл). Выдерживали 0,5 ч с 0,1 М  $\text{HCl}$  (100 мл), после чего промывали водой до нейтрального значения рН, ацетоном (100 мл), высушивали на воздухе, а затем в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Концентрацию карбоксильных групп определяли титрованием: 25,5 мкмоль/г.

*Сорбенты (IIб) и (IIв)* получали аналогично, добавляя к сорбенту (I) соответственно ди- и триглицин.

Концентрации карбоксильных групп для сорбентов (IIб) и (IIв) соответственно 64 и 38 мкмоль/г (по результатам титрования), 77 и 31 мкмоль/г (по аминокислотному анализу).

*Сорбент (IVa).* К 2 г сорбента (IIa) ( $[-\text{COOH}]$  26 мкмоль/г) в 30 мл безводного хлороформа добавляли 0,02 мл (260 мкмоль) хлористого тионила и 0,02 мл диметилформамида. Перемешивали при кипении 2 ч. Промывали на стеклянном пористом фильтре безводным хлороформом (100 мл) и ацетоном (50 мл). К полученному сорбенту (IIIa) добавляли водный раствор 0,023 г (52 мкмоль)  $\text{N}^4$ -(2-аминоэтил)цитидин-2'(3'),5'-дифосфата, рН доводили до 9,3 и поддерживали при этом значении с помощью 0,05 н.  $\text{NaOH}$ . После прекращения изменения рН сорбент промывали водой (200 мл), ацетоном (50 мл), высушивали на воздухе и затем в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Получение метиловых эфиров по фосфатным группам проводили так же, как в работе [1].

*Сорбенты (IVб) и (IVв)* получали аналогично.

К 2 г сорбента (IIб) ( $[-\text{COOH}]$  64 мкмоль/г) в 30 мл безводного хлороформа добавляли 0,07 мл (640 мкмоль) хлористого тионила и 0,05 мл диметилформамида. Далее так же, как для сорбента (IVa). К полученному сорбенту (IIIб) добавляли водный раствор 0,058 г (138 мкмоль)  $\text{N}^4$ -(2-аминоэтил)цитидин-2'(3'),5'-дифосфата. Далее так же, как для сорбента (IVa).

К 2 г сорбента (IIв) ( $[-\text{COOH}]$  38 мкмоль/г) в 30 мл безводного хлороформа добавляли 0,05 мл (380 мкмоль) хлористого тионила и 0,02 мл диметилформамида. Далее так же, как для сорбента (IVa). К полученному сорбенту (IIIв) добавляли водный раствор 0,035 г (76 мкмоль)  $\text{N}^4$ -(2-аминоэтил)цитидин-2'(3'),5'-дифосфата. Далее так же, как для сорбента (IVa).

Концентрации лигандов на полученных сорбентах представлены в таблице.

*Сорбент (VII).* К 1,5 г сорбента (V) (сорбент (I) после раскрытия эпоксидного кольца в ацетоне, содержащем 0,1 М соляную кислоту) добавляли раствор 0,29 г (1,5 ммоль) *n*-толуолсульфохлорида в 15 мл безводного диоксана и при перемешивании добавляли 0,29 мл (3,6 ммоль) пиридина. Продолжали перемешивать при  $20^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. Промывали на стеклянном пористом фильтре последовательно диоксаном, раствором диоксана в воде и водой до отсутствия поглощения при 260 нм.

К сорбенту (VI) добавляли раствор 0,015 г (0,033 ммоль) лиганда в боратном буфере, рН 9,2, перемешивали 12 ч при 20°С, промывали водой до отсутствия поглощения при 260 нм, добавляли 1 М моноэтаноламин, рН 8, и перемешивали при 50°С в течение 1 ч, снова промывали водой (200 мл) и метанолом (100 мл), высушивали на воздухе, а затем в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Метиловые эфиры по фосфатным группам получали так же, как в работе [1].

Аффинную хроматографию экзонуклеазы А5 на синтезированных сорбентах проводили как описано в работе [1].

*Рехроматография препарата экзонуклеазы А5 на сорбенте (IVб).* 0,1 г сорбента (IVб) в колонке насыщали раствором ферментного препарата (9 мл, 130 ед. акт./мл, или 80 ед. акт./мг белка) после диализа его против 5 мМ трис-НСI-буфера, рН 6,8, содержащего 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 100 мМ NaCl, со скоростью 6 мл/ч при 4°С в течение 12 ч с использованием циркуляции. Десорбцию фермента с сорбента проводили при 20°С (см. рисунок). Для отделения примесных активностей фосфатазы и 5'-нуклеотидазы использовали элюцию ингибитором Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, после чего колонку промывали исходным буфером до отсутствия в элюате фосфатных анионов (фосфор определяли так же, как и в случае определения фосфатазной активности). Последний пик (фракция 16), элюируемый 1 М трис-CH<sub>3</sub>COOH-буфером, рН 5, соответствовал ферментному препарату с удельной нуклеазной активностью 8000 ед. акт./мг белка и соотношением нуклеазной и фосфатазной активностей ~3000.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Банникова Г. Е., Варламов В. П., Самсонова О. Л., Рогожин С. В. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 212-219.
2. Wilchek M., Gorecki M. Eur. J. Biochem., 1969, v. 11, № 3, p. 491-494.
3. Scofield R. E., Werner R. P., Wold F. Anal. Biochem., 1977, v. 77, № 1, p. 152-157.
4. Банникова Г. Е., Варламов В. П., Рогожин С. В. Биорган. химия, 1978, т. 4, № 6, с. 825-831.
5. Hall R. H., Khorana H. G. J. Amer. Chem. Soc., 1955, v. 77, № 7, p. 1871-1875.
6. Walaick E. R., Roberts W. K., Dekker C. A. Proc. Chem. Soc., 1959, p. 84.
7. Saneyoshi M., Morozumi M., Kodama K., Machida H., Kaninaka A., Yoshino H. Chem. Pharm. Bull., 1980, v. 28, № 10, p. 2915-2923.
8. Chamber R. W., Shapiro P., Kurkov V. J. Amer. Chem. Soc., 1960, v. 82, № 4, p. 970-975.
9. Nilsson K., Norlow O., Mosbach K. Acta chem. scand 1981, v. B35, № 1, p. 19-27.
10. А. с. 688431 (СССР). Способ получения модифицированного кремнеземного носителя/Артемова А. А., Варламов В. П., Киселев А. В., Кустова Г. Л., Липкинд Б. А., Никитин Ю. С., Рогожин С. В., Фалина А. С. Опубл. в Б. И., 1979, № 36.
11. Львова Т. П., Артамонова О. П., Татарская Р. И. Биохимия, 1975, т. 40, вып. 4, с. 703-710.

Поступила в редакцию  
13.V.1983

После доработки  
29.VI.1983

#### BIOSPECIFIC CHROMATOGRAPHY OF NUCLEASES. SYNTHESIS AND USE OF ORGANO-SILICA SORBENTS WITH IMMOBILIZED DERIVATIVES OF CYTIDINE FOR PURIFICATION OF EXONUCLEASE A5 FROM ACTINOMYCETES

BANNIKOVA G. E., VARLAMOV V. P., ROGOZHIN S. V.

*A. N. Nesmeyanov Institute of Organo-Element Compounds, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Synthesis of biospecific sorbents on organo-silica support has been described. The derivatives of cytidine 2'(3'),5'-diphosphate were attached through heterocyclic base to the support. A number of sorbents had a different spacer arm, such as glycine, diglycine or diglycylglycine, between the ligand and support. The sorbents are suitable for purification of exonuclease A5, as revealed by their capacity to bind protein and by determination of nuclease activity.