



УДК 577.143.6:577.152.277'435

РИБОНУКЛЕАЗА *BACILLUS INTERMEDIUS* 7P
В СИНТЕЗЕ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВШаринова Ф. Р., Балабан Н. П., Рязанов С. М.,
Лещинская И. Б.,

Казанский государственный университет им. В. И. Ленина

Хабарова М. И., Женодарова С. М.

Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пущино
Московской области

Исследована специфичность синтетической функции РНКазы *Bacillus intermedius* 7P. Показано, что фермент является гуанилспецифичным в синтезе межнуклеотидной связи. Изучен синтез СрС в зависимости от концентрации донора и акцептора фосфата, концентрации фермента и рН реакционной смеси. Синтезированы GrU, IrC и XpC в условиях, оптимальных для синтеза СрС. Получен препарат РНКазы, ковалентно связанной с СМ-целлюлозой. Препарат сохраняет гидrolитическую и синтетическую активность и может быть использован многократно (10 и более раз) без потери активности.

Щелочная внеклеточная рибонуклеаза *Bacillus intermedius* 7P (КФ 3.1.4.23) расщепляет 3'-5'-фосфодиэфирные связи в молекуле РНК с образованием фрагментов, имеющих на конце 2',3'-циклофосфаты, превращающиеся далее в 3'-монофосфаты [1]. Известно, что poly(U), poly(C), poly(A) и poly(I) являются субстратами этого фермента [2], тогда как U > p, C > p и A > p не гидролизуются даже при высоких его концентрациях [2, 3]. Сведения о действии РНКазы *B. intermedius* на динуклеозидмонофосфаты противоречивы: по данным работы [2] UrA, CrA, ArA и GrC устойчивы к действию фермента, тогда как в работе [3] приведены данные о расщеплении GrC, ArA, CrA и ArC до соответствующих нуклеозид-2',3'-циклофосфатов (и Gr в случае GrC) и нуклеозидов. Тем не менее в работе [3] был сделан вывод, что рибонуклеаза *B. intermedius* является гуанилспецифичным ферментом по отношению к низкомолекулярным субстратам.

Задача настоящего исследования состояла в изучении специфичности синтетической функции рибонуклеазы *B. intermedius* и выяснении возможности ее использования в синтезе олигорибонуклеотидов. Успешное развитие ферментативных методов синтеза во многом зависит от наличия ферментных препаратов, их доступности и удобства использования. Пополнение набора различных по своей специфичности рибонуклеаз, применяемых для получения преимущественно коротких ди- и тринуклеотидов, еще одним ферментом расширит возможности метода.

Синтез межнуклеотидной связи с участием рибонуклеаз принято рассматривать как реакцию, обратную первой стадии гидролиза (стадии деполимеризации) [4]. На примере панкреатической рибонуклеазы [5], а также ряда гуанилспецифичных рибонуклеаз, продуцируемых плесневыми грибами [6], было показано, что требования фермента к структуре субстратов, т. е. субстратная специфичность фермента при расщеплении и синтезе межнуклеотидной связи, совпадают. Поэтому, принимая во внимание выводы работы [3], можно было ожидать, что РНКаза *B. intermedius* гуанилспецифична в синтезе олигорибонуклеотидов.

Сокращения: СМ-РНКаза — рибонуклеаза, связанная ковалентно с СМ-целлюлозой; остальные сокращения соответствуют общепринятым.

Выход GrC, %

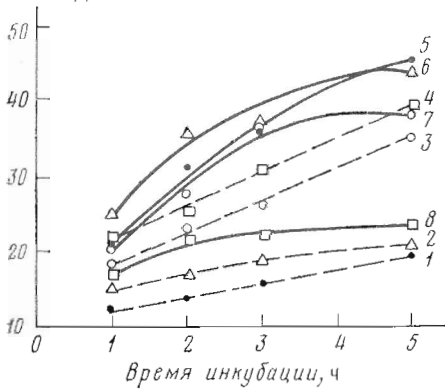


Рис. 1

Выход GrC, %

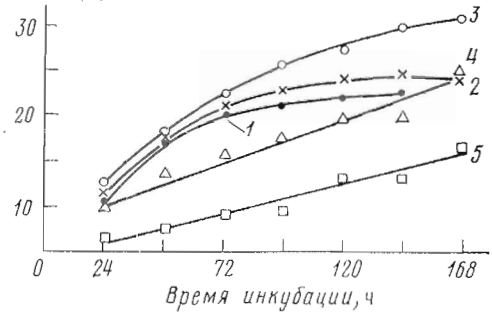


Рис. 2

Выход GrC, %

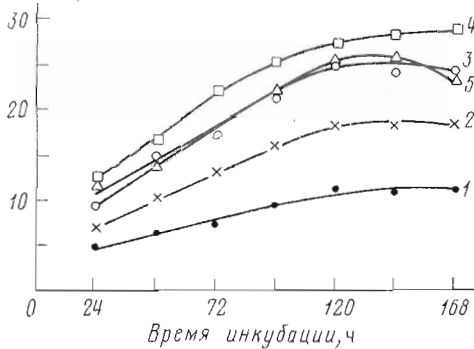


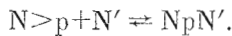
Рис. 3

Рис. 1. Гидролиз G>p при pH 4,6 (1), 5,2 (2), 6,0 (3), 6,5 (4), 7,0 (5), 7,5 (6), 8,0 (7), 8,5 (8). [GrC] 0,02 М, [РНКаза] 0,05 мг/мл

Рис. 2. Синтез GrC при pH 6,5 (1), 7,0 (2), 7,5 (3), 8,0 (4), 8,5 (5). [G>p] 0,02 М, [C] 0,4 М, [РНКаза] 0,05 мг/мл

Рис. 3. Синтез GrC при различной концентрации цитидина. [C]/[G>p] равно 5 (1), 10 (2), 15 (3), 20 (4), 25 (5), [G>p] 0,02 М, [РНКаза] 0,05 мг/мл

Прежде чем приступить к изучению синтетической функции РНКазы *B. intermedius*, мы уточнили гидролитическую активность фермента по отношению к нуклеозид-2',3'-циклофосфатам — донорам фосфата в реакции образования межнуклеотидной связи:



При инкубировании каждого из четырех основных нуклеозид-2',3'-циклофосфатов (A>p, G>p, C>p и U>p) с РНКазой *B. intermedius* соответствующий нуклеозид-2'(3')-фосфат образуется лишь в случае G>p (>20%). В остальных реакционных смесях были обнаружены следы Ap, Cp и Up соответственно, но поставленные параллельно пробы без фермента также содержали следы мононуклеотидов, т. е. происходит незначительное неферментативное расщепление 2',3'-циклофосфатной группировки. Изучение влияния величины pH на гидролиз G>p в интервале значений от 4,6 до 8,5 показало, что фермент проявляет максимальную активность при pH 7,5 (рис. 1); 1 мг очищенного фермента ($1 \cdot 10^6$ ед. акт. по РНК; 1,8 ОЕ₂₈₀) расщепляет 71 мкмоль G>p за 1 ч.

При инкубировании тех же нуклеозид-2',3'-циклофосфатов с ферментом в присутствии цитидина или уридина образуются только два динуклеозидмонофосфата: GrC и GrU. Варьирование величины pH реакционных смесей в интервале значений от 6,5 до 8,5, а также начальных концентраций субстратов и фермента не приводит к образованию других динуклеозидмонофосфатов. Таким образом, рибонуклеаза *B. intermedius* специфична к гуанозину, участвующему 3'-гидроксильной группой в образующейся межнуклеотидной связи.

Для выяснения оптимальных условий синтеза межнуклеотидной связи с участием рибонуклеазы *B. intermedius* было изучено влияние pH и начальных концентраций субстратов и фермента на ход синтеза. В интервале значений от 6,5 до 8,5 оптимальная величина pH составляет 7,5 (рис. 2),

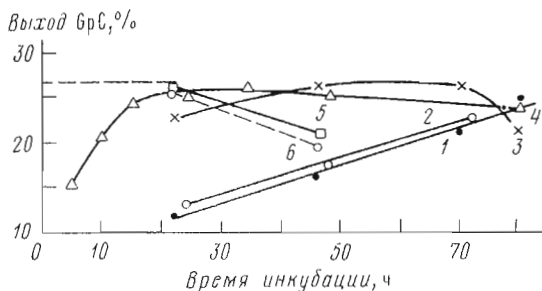


Рис. 4. Синтез GrC при концентрациях РНКазы 0,025 (1), 0,05 (2), 0,1 (3), 0,15 (4), 0,2 (5), 0,25 мг/мл (6). [G>p] 0,02 M, [C] 0,4 M

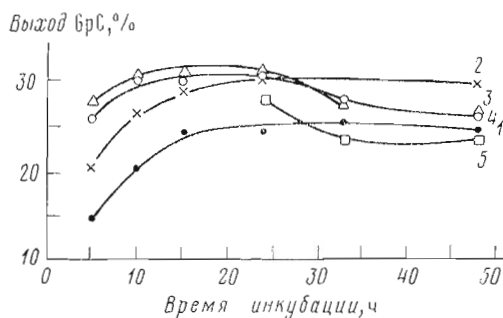


Рис. 5. Синтез GrC при концентрации G>p 0,02 (1), 0,04 (2), 0,06 (3), 0,08 (4), 0,1 M (5). [C]/[G>p] 20

т. е. оптимумы гидролитической и синтетической активностей совпадают. Изменение концентрации акцептора фосфата в пределах от 0,06 до 0,4 M при концентрации донора фосфата 0,02 M, т. е. изменение отношения [акцептор]/[донор] от 3 до 20 приводит к увеличению выхода динуклеозидмонофосфата с 6 до 28%, тогда как дальнейшее увеличение этого отношения (до 25) уже не дает необходимого эффекта (рис. 3).

Повышение начальной концентрации фермента (0,025—0,25 мг/мл) при постоянной концентрации субстратов (0,02 и 0,4 M соответственно) (рис. 4), как и следовало ожидать, увеличивает скорость синтеза, однако концентрация, превышающая 0,15 мг/мл, способствует достаточно быстрому расщеплению продукта синтеза, а при более низких концентрациях РНКазы синтез идет слишком медленно. Поэтому наиболее подходящей для препаративных целей следует считать концентрацию 0,15 мг/мл, тем более что при этой концентрации фермента «равновесная» концентрация динуклеозидмонофосфата устанавливается через ~15 ч и сохраняется на протяжении 35 ч.

Увеличение концентрации донора фосфата от 0,02 до 0,06—0,08 M (рис. 5) несколько повышает выход динуклеозидмонофосфата и сокращает время установления «равновесия», однако дальнейшее увеличение концентрации G>p в реакционной смеси приводит к уменьшению выхода GrC.

Таким образом, на примере синтеза GrC мы показали, что при начальных концентрациях донора фосфата, акцептора фосфата и РНКазы *B. intermedius* 0,06; 1,2 M и 0,45 мг/мл соответственно за 10 ч при pH 7,5 и ~0° C можно получить максимальный выход динуклеозидмонофосфата (~30%). Эти условия оказались оптимальными и для других субстратов: GrU, IpC и XpC были получены с выходом 31, 24 и 36% соответственно; варьирование pH (GrU, IpC) и начальной концентрации акцептора фосфата (XpC) относительно величин, найденных оптимальными для GrC, не дало более эффективных результатов. Влияние структуры субстратов проявляется главным образом на времени достижения максимального выхода: при переходе от C к U (акцептор фосфата), а также от G>p к I>p (донор фосфата) оно увеличивается с 10 до 24 ч, а при замене G>p на X>p максимальный выход достигается за 90 ч.

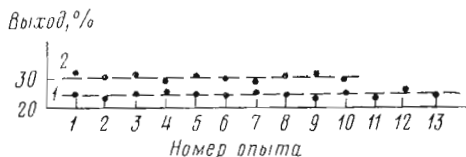


Рис. 6. Многократное использование СМ-РНКаза *B. intermedius* для гидролиза G>p (1) и синтеза GpC (2)

Сравнение результатов, полученных нами в настоящей работе, с литературными данными для других гуанилрибонуклеаз [5—9] показывает, что рибонуклеаза *B. intermedius* отличается от РНКаз T₁, N₁ и C₂ более высокой гидролитической (дециклизирующей) активностью. Поэтому даже в оптимальных для синтеза условиях отношение «синтез/гидролиз»* во всех случаях, кроме синтеза ХрС, меньше 1. Вероятно, этим можно объяснить более низкий выход GpC (32%) по сравнению с тем, что дают другие ферменты: T₁ — 66% [7], N₁ — 44% [8], C₂ — 55% [9]. Тем не менее рибонуклеаза *B. intermedius* представляет интерес как инструмент синтеза олигонуклеотидов, так как при наличии общей для «щелочных» рибонуклеаз способности расщеплять или синтезировать межнуклеотидные связи, образованные остатком гуаниловой кислоты, она отличается, например, от РНКазы C₂ большей эффективностью включения в олигонуклеотид ксантозин-2',3'-циклофосфата.

Чтобы более рационально использовать фермент в препаративных целях, необходимо иметь его нерастворимую форму, т. е. получить иммобилизованный препарат. При иммобилизации РНКазы *B. intermedius* матрицей служила СМ-целлюлоза, преимущества которой перед другими носителями были показаны при получении иммобилизованной формы РНКазы *P. brevicompactum* [10]. В молекуле РНКазы *B. intermedius* имеется пять остатков лизина [11], способных участвовать в связывании с СМ-целлюлозой. Иммобилизацию проводили азидным методом [12] (см. «Экспериментальную часть»).

Гидролитическая активность полученного препарата СМ-РНКазы *B. intermedius* была оценена по расщеплению G>p: 1 мг связанного фермента расщепляет за 1 ч при pH 7,5 и 37°С 2,75 мкмоль G>p. Синтетическую активность определяли, проводя синтез GpC. Анализ реакционных смесей, состав которых сохранялся после удаления фермента в случае ограниченного гидролиза G>p в течение недели и синтеза GpC в течение 2 недель показал, что фермент прочно связан с носителем и не смывается в раствор. На рис. 6 представлены результаты многократного использования одного и того же образца: гидролитическая и синтетическая активность сохраняются при использовании одного и того же препарата более 10 раз. При хранении СМ-РНКазы *B. intermedius* в лиофилизованном состоянии при 0° в течение 5 мес гидролитическая и синтетическая активность также не изменяются.

Таким образом, гуанилспецифичная рибонуклеаза *B. intermedius*, ковалентно связанная с СМ-целлюлозой, сохраняет свою гидролитическую и синтетическую функцию и может быть многократно использована без потери активности, что делает ее удобным инструментом олигорибонуклеотидного синтеза.

Экспериментальная часть

В работе использовали Na-соли 2',3'-циклофосфатов аденозина, цитидина и уридина, а также цитидин и уридин фирмы Reanal (Венгрия). Дидецилгексилгуанидиниевую соль гуанозин-2',3'-циклофосфата (Calbiochem, США) превращали в аммонийную обработкой дауэксом 50W. 2',3'-Циклофосфаты инозина и ксантозина получали циклизацией соответствующих нуклеозид-2'(3')-фосфатов [13], приготовленных дезаминированием

* Отношение количества нуклеозид-2',3'-циклофосфата, включающегося в динуклеозидмонофосфат, к количеству нуклеозид-2',3'-циклофосфата, расщепляющегося до нуклеозид-3'-фосфата (см. [5]).

Ар и Gr соответственно [14]. Для иммобилизации фермента использовали микрогранульную СМ-целлюлозу (Whatman, Англия).

Рибонуклеазу выделяли как описано в работе [2]. РНКазную активность определяли по [1]. За единицу активности фермента принимали такое количество РНКазы, которое вызывает увеличение поглощения раствора РНК в концентрации 1 мг/мл на 1 ОЕ₂₆₀ в пересчете на 1 мл ферментного раствора за 1 ч инкубации. Содержание белка определяли спектрофотометрически при 280 нм (ОЕ).

Электрофорез на бумаге FN-1 (Filtrak, ГДР), УФ-спектрофотометрирование и анализ динуклеозидмонофосфатов проводили как описано в работах [9, 10].

Гидролиз N>p. 2 мкмоль N>p добавляли к 0,1 мл раствора, содержащего 0,05 мг/мл РНКазы в 0,1 М трис-НСl-буфере (рН 7,5). Параллельно ставили контрольные пробы без фермента. При изучении влияния рН на гидролиз G>p использовали следующие буферные растворы: 0,1 М ацетатный (рН 4,6 и 5,2), 0,1 М фосфатный (рН 6,0; 6,5 и 7,0) и 0,1 М трис-НСl-буфер (рН 7,5; 8,0 и 8,5). Реакционную смесь инкубировали в течение 5 ч при 37° С, отбирая каждый час пробы по 0,019 мл и анализируя их методом электрофореза на бумаге. Результаты представлены на рис. 1.

Синтез NpN'. 6 мкмоль N>p и 120 мкмоль нуклеозида растворяли в 0,1 мл 0,1 М трис-НСl-буфера (рН 7,5), содержащего 0,45 мг/мл РНКазы *B. intermedius*. Смесь инкубировали при 0° С, отбирая пробы и анализируя их методом электрофореза на бумаге и УФ-спектрофотометрии. При подборе оптимальных условий синтеза GrC начальные концентрации G>p, С и фермента изменяли, как указано в тексте и в подписях к рисункам. Результаты представлены на рис. 2–5.

Связывание РНКазы B. intermedius с СМ-целлюлозой. Гидразид СМ-целлюлозы получали как описано в работе [10]. К суспензии 0,8 г гидразида СМ-целлюлозы в 80 мл 0,5 н. НСl, охлажденной до 0° С, добавляли по каплям в течение 20 мин 4 мл 5% раствора NaNO₂ и продолжали перемешивание еще в течение 20 мин при 0° С. Осадок отфильтровывали и промывали на фильтре 300 мл ледяной воды, затем переносили в 10 мл ферментного раствора в 0,1 М фосфатном буфере (рН 8,5), содержащего 120 ОЕ белка с активностью 8,5·10⁶ ед. акт./мл, и перемешивали на холоду в течение ночи (~18 ч). Осадок отфильтровывали, промывали небольшим количеством (3 мл) того же буфера, затем 500 мл этого буфера, 750 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 8,0), 750 мл 0,1 М NaCl и водой до отрицательной реакции на ионы Cl⁻. Осадок переносили в 4 мл воды и лиофилизовали. Получили 780 мг СМ-РНКазы *B. intermedius* с активностью 54·10³ ед. акт./мг.

Гидролиз G>p СМ-РНКазой B. intermedius. G>p (6 мкмоль) и фермент (0,21 мг) помещали в центрифужную пробирку и добавляли 0,3 мл 0,1 М трис-НСl-буфера (рН 7,5). После инкубации в течение 2 ч при 37° С смесь центрифугировали при 2500–3000 об./мин. Супернатант отбирали капилляром и инкубировали еще в течение 188 ч, отбирая и анализируя пробы на смываемость фермента с носителя. Осажденный фермент промывали водой (1 мл×5), каждый раз центрифугуя и тщательно отбирая воду капилляром. Затем добавляли в том же количестве компоненты реакционной смеси для повторного использования препарата. Пробы анализировали методом электрофореза на бумаге. Результаты представлены на рис. 6.

Синтез GrC СМ-РНКазой B. intermedius. G>p (6 мкмоль), 120 мкмоль цитидина и 0,83 мг иммобилизованного препарата инкубировали в 0,1 мл 0,1 М трис-НСl-буфера (рН 7,5) при 0° С. Пробы, взятые из реакционной смеси, анализировали обычным образом. СМ-РНКазу отделяли центрифугированием, а затем для возобновления цикла при изучении многократного использования препарата поступали как описано выше. Результаты представлены на рис. 6.

1. Булгакова Р. Ш., Лецинская И. Б., Балабан Н. П., Егорова Г. С. Биохимия, 1974, т. 39, № 2, с. 299–302.
2. Голубенко И. А., Балабан Н. П., Лецинская И. Б., Волкова Т. П., Клейнер Г. И., Чепурнова Н. К., Афанасенко Г. А., Дудкин С. М. Биохимия, 1979, т. 44, № 4, с. 640–648.
3. Карпейский М. Я., Ханданян А. Ж., Чепурнова Н. К., Платонов А. Л., Яковлев Г. И. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1669–1679.
4. Richards F. M., Wysocky H. W. In: The Enzymes. 3d ed/Ed. Boyer P. D. N. Y.—L.: 1971, v. 4, p. 647–806.
5. Женодарова С. М. Ферментативный синтез олигорибонуклеотидов. Автореф. дис. ... д-ра хим. наук. Пушино: Ин-т биол. физики, 1978, с. 293.
6. Гуляева В. И. Специфичность трансферазного этапа реакции катализируемой рибонуклеазами грибов, и синтез олигорибонуклеотидов. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Пушино: Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов, 1980, с. 140.
7. Mohr S. G., Thach R. E. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 24, p. 6566–6576.
8. Koike T., Uchida T., Egami F. Biochim. et biophys. acta, 1969, v. 190, № 2, p. 257–263.
9. Женодарова С. М., Гуляева В. И., Безбородова С. П. Биоорг. химия, 1976, т. 2, № 8, с. 1111–1116.
10. Женодарова С. М., Соболева И. А., Хабарова М. И. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 736–742.
11. Афанасенко Г. А., Дудкин С. М., Каминир Л. Б., Северин Е. С., Голубенко И. А. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 182–202.
12. Brummer W., Hennrich N., Klockow M., Lang H., Orth H. D. Eur. J. Biochem., 1972, v. 25, № 1, p. 129–135.
13. Shugar D. In: Methods in Enzymology/Eds Moldave K. et al. N. Y.: Acad. Press, 1967, v. 42, part A, p. 131–134.
14. Shapiro R., Rohl S. M. Biochemistry, 1968, v. 7, № 1, p. 448–455.

Поступила в редакцию
27.X.1982

RIBONUCLEASE *BACILLUS INTERMEDIUS* 7P IN THE OLIGORIBONUCLEOTIDE SYNTHESIS

SHARIPOVA F. R., BALABAN N. P., RYAZANOV S. M.,
LESHCHINSKAYA I. B., KHABAROVA M. I., ZHENODAROVA S. M.

V. I. Ulyanov-Lenin Kazan State University and Institute of Biological
Physics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino

The synthetic activity of ribonuclease *Bacillus intermedius* 7P has been investigated. The enzyme is shown to be a guanyl-specific ribonuclease in the synthesis of internucleotide bond. Guanylyl-(3', 5')-cytidine (GpC) synthesis was studied with respect to pH, concentration of enzyme, donor and phosphate acceptor. GpU, IpC and XpC were synthesized in conditions optimal for GpC synthesis. The *Bacillus intermedius* 7P ribonuclease has been covalently bound to CM-cellulose. It is shown that the hydrolytic and synthetic activities of the immobilized RNase are very similar to those of the native enzyme and are not lost on repeated use (more than 10 times) of the preparation in the hydrolysis or synthesis.