

На правах рукописи



Бочков Денис Владимирович

**НОВЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКООЧИЩЕННЫХ
НУКЛЕАЗ И НУКЛЕОТИДОВ ИЗ ЖИВОТНОГО И
МИКРОБИАЛЬНОГО СЫРЬЯ**

03.00.04.-биохимия

**Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

Уфа-2005

Работа выполнена в Новосибирском институте органической химии им
П.Н.Ворожцова СО РАН и Новосибирском государственном педагогическом
университете

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ: доктор биологических наук
Хомов Виктор Васильевич
доктор биологических наук
Толстикова Татьяна Генриховна

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОЦЕНОЧЕЛЫ: доктор биологических наук, профессор
Башкагов Сергей Александрович
доктор медицинских наук, профессор
Маянская Наиля Намибовна

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Институт биохимии СО РАН

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2005 г. в ____ часов
на заседании Регионального диссертационного совета КМ 002/33.01 при
Институте биохимии и генетики УИЦ РАН по адресу: 450054, Республика
Башкортостан, г. Уфа, проспект Октября, 71

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Уфимского
научного центра РАН по адресу: 450054, Уфа, проспект Октября, 71

Автореферат разослан « ____ » _____ 2005 г.

Учёный секретарь Регионального
диссертационного совета, к.б.н.



Викбулатова С.М.

2006-4
28494

2257153

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Постоянное расширение исследований в области молекулярной биологии, генной диагностики ставит задачу — создания высокоэффективных методов получения ферментов обмена нуклеиновых кислот.

Анализ литературы, касающейся получения ферментов из биологического сырья, показал, что практически все методы ограничены получением одного, реже двух индивидуальных ферментов из одной партии сырья. Большое количество так называемого “балластного” белка, при этом отбрасывается. Между тем каждый вид биологического сырья содержит целый ряд ферментов, которые при надлежащем технологическом подходе можно извлекать, в том числе и в промышленном масштабе.

В этой связи усовершенствование методов фракционирования клеточных экстрактов, направленных на разработку технологий, позволяющих получать несколько ферментных препаратов из одной партии биоматериала, приобретает всё большее значение.

Однако реальных методов по выделению одновременно нескольких ферментов из одного образца сырья пока очень мало. Их разработка, по сути дела, началась в самое последнее время. Исследования в этом направлении весьма актуальны, поскольку разработка новых методов создаёт основу для организации в конечном итоге производств ферментов современного уровня, отличающихся экономичностью и комплексным использованием биологического сырья.

Интенсивное развитие молекулярной биологии и генной инженерии вызвало возрастающую потребность в нуклеотидах, необходимых как для проведения исследований, так и для разработки медицинских диагностических тест-систем, используемые для диагностики бактериальных, вирусных, онкологических, генетических и других заболеваний.

Поэтому актуальной является разработка новых технологий получения дезокси- и рибонуклеотидов, практическая реализация которых могла бы



обеспечить растущие потребности.

Видимыми путями снижения себестоимости нуклеотидов, а, следовательно, и всемерного расширения диагностических возможностей медицины являются:

- разработка и внедрение доступных ферментных препаратов, например, микробных, способных проводить гидролиз нуклеиновых кислот;
- создание биореакторов на основе иммобилизованных ферментов.

Цель исследования. Разработка нового подхода, позволяющего получить высокоочищенные ферментные препараты *рибонуклеазу (РНКазу)*, *дезоксирибонуклеазу (ДНКазу)*, *трипсин* и *холестеролэстеразу*. Создание нового экономичного метода препаративного синтеза нуклеотидов и их полифосфатов.

Задачи исследования:

1. Предложить новый подход и разработать технологичный метод получения высокоочищенных и высокоактивных ферментных препаратов *РНКазы*, *ДНКазы*, *холестеролэстеразы* и *трипсина* из одной партии животного сырья.

2. Создать базу высокоочищенных субстратов РНК и ДНК для анализа ферментов нуклеазного действия.

3. Создать ферментную базу для получения нуклеотидов: *ДНКазы* из поджелудочной железы крупного рогатого скота (ПЖ КРС) и *5'-нуклеазы* из амилоризина.

4. Получить с использованием собственной субстратной и ферментной базы высокоочищенные дезокси- и рибонуклеозид-5'- монофосфаты с высокими выходами.

5. Разработать новые процедуры сопряжённого фосфорилирования продуктов гидролиза РНК и ДНК до дезокси- и рибонуклеозид трифосфатов.

Научная новизна: Найден подход, позволяющий разработать метод одновременного получения *РНКазы*, *ДНКазы*, *трипсина* и *холестеролэстеразы* высокой чистоты, из одной партии животного сырья.

Впервые, для очистки белков использованы методы ультрафильтрации на установках с полыми волокнами и хроматографической очистки на ДЭАЭ-целлюлозе, позволяющие добиться высокой очистки фермента *рибонуклеазы*.

Создана ферментная база для получения нуклеотидов на основе доступного сырья: дезоксирибонуклеазы из поджелудочной железы крупного рогатого скота и S^I -нуклеазы из амилоризина.

Впервые показано, что использование проточного биореактора с иммобилизованной S^I -нуклеазой является перспективным общим подходом к получению рибо- и дезоксирибонуклеозид- 5^I -монофосфатов.

Разработаны новые процедуры сопряжённого фосфорилирования продуктов гидролиза РНК и ДНК до дезокси- и рибонуклеозид- 5^I -трифосфатов с высокими выходами и высокой чистотой.

Практическая значимость.

Разработан лабораторный регламент получения ферментов *РНКазы*, *ДНКазы*, *трипсина* и *холестеролэстеразы*, который может быть положен в основу создания промышленной технологии.

С применением метода ковалентной иммобилизации S^I -нуклеазы на силикатных носителях разработан биореактор непрерывного действия, перспективный для реализации экономичной технологии получения дезокси- и рибонуклеозид- 5^I -монофосфатов.

Разработана процедура фосфорилирования с помощью суммарного препарата *нуклеотидилкиназы* с *ацетокиназой* ("киназная фракция") продуктов гидролиза РНК и ДНК до дезокси- и рибонуклеозид- 5^I -трифосфатов.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены, обсуждены и опубликованы в материалах конференций «Материалы 1-ого Международного Конгресса по биотехнологии» (Москва, 2002), «Материалы XL международной научной студенческой конференции (Студент и научно-

технический прогресс)» (Новосибирск, 2002), «Материалы 2-ого Международного Конгресса по биотехнологии» (Москва, 2003), «The Second International Conference on Chemical Investigation and Utilization of Natural Resources» (Ulan-Bator (Mongolia), 2003).

Диссертационная работа Бочкова Д.В. выполнена по программе НИР НИОХ СО РАН «Ферментативный синтез биологически активных соединений» в рамках интеграционной программы СО РАН №146 «Разработка лекарственных и профилактических препаратов для медицины. Фундаментальные основы и реализация».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 4 статьи в отечественных реферируемых журналах, 2 статьи в сборнике статей аспирантов НГПУ и 4 тезиса докладов на международных конференциях.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 130 листах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов и обсуждения, экспериментальной части, заключения и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 15 рисунками и 12 таблицами. Список литературы содержит 209 источников, из которых 86 опубликованы в отечественных и 123 в зарубежных изданиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве сырья для выделения целевых ферментов использовали поджелудочную железу крупного рогатого скота, амилоризин П10Х (Рассказовский биохимический завод, Россия), биомасса *E. coli* B-78 MRE-600, генотип: F-ma (1,2,41,53;37) НИКТИ БАВ ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Бердск, Россия).

Холестеролэстераза, маркерные белки (Human albumin 65 кДа, Ovalbumin 45 кДа, Carbonic anhydrase 30 кДа, Tripsin inhibitor 20,1 кДа, α -lactalbumin 14,4 кДа) фирмы Sigma (США); *дезоксирибонуклеаза*, *рибонуклеаза* и *трипсин* фирмы «Самсон-Мед» (Россия). Трис-HCl и ДНК фирмы «SIGMA»; АТР (Reanal. Венгрия), пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (Новосибирский дрожжевой завод); силохром С-80, анионообменная смола DOWEX 1×2 фирмы

«Serva» (Германия), сефароза 4В фирмы «Pharmacia» (Швеция), хроматографические пластинки Kieselgel 60 F₂₅₄ фирмы «Merck» (Германия).

Суммарную РНК, для анализа активности фермента *рибонуклеазы* (РНКазы) и получения рибонуклеозид-5'-(3')-монофосфатов, получали по методу (Дужак А.Б. и др. 1982.).

Для выделения смеси целевых ферментов в индивидуальном виде использовали метод осаждения белков сульфатом аммония (Тугунов С.С. и др. 1967).

Получение индивидуального фермента *холестеролэстеразы* осуществляли следующим образом: осадок, содержащий *холестеролэстеразу*, собирали, растворяли в 0,1 М калий фосфатном буфере, pH 7,0. Раствор дотитровывали гидроокисью натрия до pH 7,3, добавляли холат натрия до 0,33 М и центрифугировали. Супернатант замораживали в морозильной камере при -18°C.

Содержание трипсина определяли по методу (Фармакопейная статья / ФС 3435, 1997) и проанализированный раствор замораживали в морозильной камере при -18°C.

ДНК получали из молок лососевых рыб с использованием нижеописанной методики: для очистки от примесных веществ измельченные молоки лососевых рыб экстрагировали 0,15 М водным раствором хлорида натрия. Полученный после центрифугирования супернатант насыщали 96% этиловым спиртом в соотношении 1:1 и собирали ДНК, затем её сушили в вакуумном эксикаторе над безводным CaCl₂. Чистоту ДНК определяли спектрофотометрически.

Фермент *5'-нуклеазу* получали из амилоризина по методу (Vogt V., 1973) с модификацией (Хомов В.В. и др. 1997).

Для выделения суммарного препарата *нуклеотидилкиназы с ацетокиназой* использовали клетки *E coli* В-78 MRE-600, генотип: F-та. Разрушение клеток проводили по методу (Хомов В.В. и др. 1997).

Фосфорилирование дезокси- и рибонуклеозид-5'-монофосфатов проводили суммарным препаратом *нуклеотидилкиназ с ацетокиназой*. Хроматографическое выделение продуктов фосфорилирования проводили на «Dowex 1.2» в линейном градиенте 0,05-1 М бикарбоната аммония, pH 8,8.

Фракцию, соответствующую трифосфату, собирали, измеряли общий объем, упаривали до концентрации 0,15 М бикарбоната аммония. К упаренному раствору добавляли 1/10 объема 2 М HCl. Трифосфаты осаждали десятикратным объемом этилового спирта. Осадок центрифугировали и сушили в эксикаторе под P_2O_5 . Высушенный препарат анализировали на содержание основного вещества и хроматографическую чистоту.

В работе было использовано следующее оборудование: спектрофотометр СФ-46 ЛОМО (Россия), центрифуга Sigma 6K15 (Германия), ультрафильтрационная установка УПВ-6, укомплектованная разделительными аппаратами типа AP-3-50ПС/15ПА/5ПА производства г. Кириши (Россия), лиофильная сушка LioPro-3000 ID: 88872244 (НЕТО-HOLTEN A/S фирма Jouan Nordic); Uvicord S 2 LKB 2238 (Швеция); испаритель ротационный ИР – 1 М 2 (Россия); прибор для вертикального электрофореза (стёкла 13 × 15 см), кондуктометр «Анион-7020» диапазон измерения: 1мкСм/см – 100 мСм/см. (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Новый подход к получению ферментов: РНК-азы, ДНК-азы, холестеролэстеразы и трипсина высокой очистки из поджелудочной железы крупного рогатого скота

Главными особенностями нашего подхода к получению *ДНКазы*, *РНКазы*, *холестеролэстеразы* и *трипсина* являются:

- использование повышающейся концентрации сульфата аммония как приема, обеспечивающего селективное разделение всех четырех ферментов, содержащихся в сернокислотном экстракте поджелудочной железы крупного рогатого скота (ПЖ КРС) после экстракции этанолом при температуре (-18°C);
- применение для тонкой очистки *РНКазы* ультрафильтрации на полых волокнах и ионообменной хроматографии на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой.

На рис. 1. приведена разработанная нами принципиальная схема выделения всех ферментов, начиная со стадии первичной обработки ПЖ. Предложенное нами поэтапное увеличение концентрации сульфата аммония обеспечивает четкое разделение всех четырех ферментов. Оптимальные

градиенты концентрации были найдены после изучения поведения упомянутых ферментов по отношению к растворам сульфата аммония.

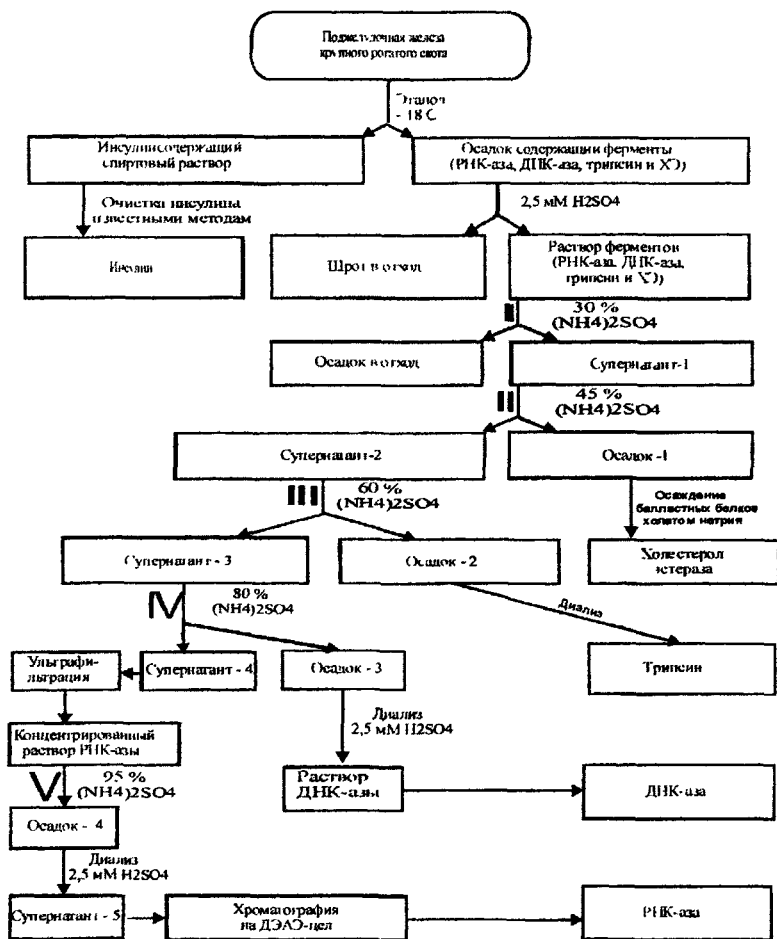


Рис.1. Схема получения БАВ из поджелудочной железы крупного рогатого скота (общий вид)

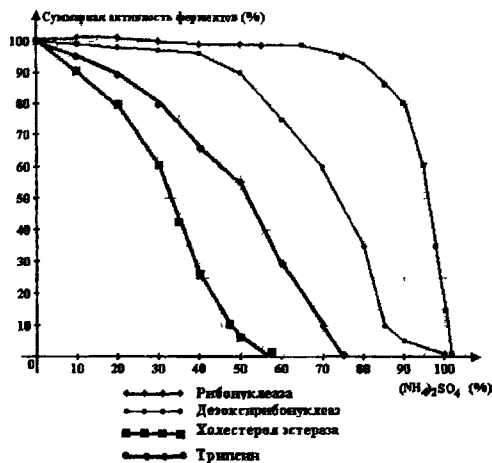


Рис. 2. Изменение активности ферментов (РНКазы, ДНКазы, трипсина и холестеролэстеразы) в растворе при фракционировании клеточного экстракта сульфатом аммония

Как видно из рис. 2. при доведении концентрации сульфата аммония в серноокислотном экстракте до 45%, в осадок переходит основное количество холестеролэстеразы. Дальнейшее насыщение раствора сульфатом аммония до 60% приводит к выпадению в осадок трипсина. При повышении содержания соли до 80% осаждается основное количество ДНКазы, тогда как РНКазы остается в супернатанте.

Таким образом, простой процедурой обеспечивается селективность разделения всех указанных ферментов.

Учитывая возможность выделения холестеролэстеразы из осадка-1 и трипсина из осадка-2 (рис. 1.) с помощью стандартных методов, главное внимание уделено разработке подходов к получению высокоочищенных ДНКазы и РНКазы.

ДНКазы выделялась последовательным растворением осадка-3 (рис. 1.) в 2,5 мМ серной кислоте, диализом, отделением балластных белков центрифугированием и заключительной очисткой раствора фермента на колонке с активированным углем.

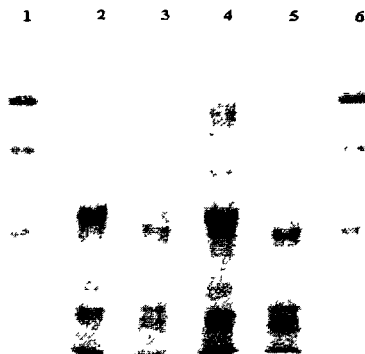


Рис. 3. Анализ дезоксирибонуклеазы в 10% ПААГ, полученной по предлагаемой технологии (3 и 5 дорожки) и препарата ОАО «Самсон-Мед» (2 и 4 дорожки)
1 и 6 дорожки – маркеры: Human albumin (65 кДа), Ovalbumin (45 кДа) и Carbonic anhydrase (30 кДа)

Как видно из рис. 3, ДНКазы, полученная по предлагаемому методу, является более чистой (дорожки 3 и 5) по сравнению с ферментом, выпускаемым фирмой «Самсон-Мед» (дорожки 2 и 4).

Для выделения РНКазы супернатант-4 (рис. 1.) подвергался последовательной ультрафильтрации на установке УПВ-6 с использованием колонок с полыми волокнами, имеющими размеры пор 50 и 5 кДа. Полученный после ультрафильтрации раствор донасыщали сульфатом аммония до концентрации 95%, в результате чего РНКазы выпадала в осадок (осадок-4), который растворяли в 2,5 мМ серной кислоте, и подвергали диализу. Удельная активность ($A_{уд}$) фермента после диализа составила 275000 е.а./мг белка, выход 2,6 г/кг ПЖ КРС. Ионообменной хроматографией этого фермента на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой с элюированием градиентом концентрации NaCl (0,01М и 2 М) растворами показано, что он является смесью белков (Рис. 4).

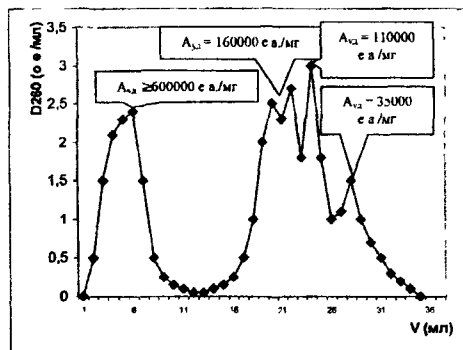


Рис. 4. Хроматограмма рибонуклеазы, очищенной на колонке с ДЭАЭ-32 целлюлозой

Как видно из рис. 4, этот продукт представляет собой смесь белков с разными молекулярными массами. Были выделены фракции белков с следующими значениями удельной активности ($A_{уд} = \text{е.а./мл}$): 35000, 110000, 160000 и 600000. Наибольший интерес представляла фракция с $A_{уд} \geq 600\,000$ е.а./мл. Методом белкового электрофореза в ПААГ (Остерман Л.А., 1985) установлено, что этот белок имеет молекулярную массу ≤ 14 кДа, соответствующую ферменту *рибонуклеаза панкреатическая*.

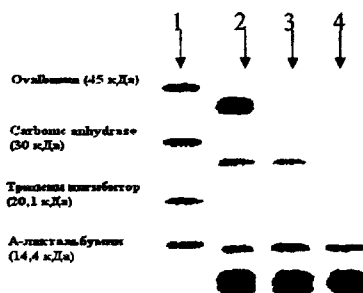


Рис. 5. Электрофорез рибонуклеазы

Дорожка 1 – маркеры; дорожка 2 – рибонуклеаза фирмы «Самсон-мед»; дорожка 3 – рибонуклеаза, полученная по нашему методу с использованием диализа против серной кислоты; дорожка 4 – рибонуклеаза, полученная по нашему методу с использованием диализа против NaP -буфера (рН 6,4)

Из рис. 5, видно, что препарат *рибонуклеазы*, полученный по нашему методу, по молекулярному весу соответствует препарату ОАО «Самсон-мед» (дорожка 2), но по чистоте превосходит его. Вероятно, что основная примесь в препарате *рибонуклеазы* ОАО «Самсон-Мед» является *ДНКазы*, а также полимеры (димеры, тримеры и тетрамеры) *РНКаза*. В ферменте *РНКаза*, которая была получена по нашему способу после очистки на ДЭАЭ-целлюлозе с диализом против серной кислоты основной примесью, вероятно, является димер *РНКаза* (дорожка 3). Если провести диализ раствора фермента против NaР-буфера (рН 6,4) с последующей инкубацией при +44°C, полоса, предполагаемого димера *РНКаза*, исчезает (дорожка 4). Таким образом, отделив пик, соответствующий белку с молекулярной массой ≤ 4 кДа, методом ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой мы получили белок, соответствующий ферменту *рибонуклеазе панкреатической* с чистотой более 90% с выходом 1,15 г/кг ПЖ КРС (табл. 1).

Таблица 1. Характеристики *РНК-азы, ДНК-азы, трипсина и холестеролэстеразы*, выделенных по предлагаемому подходу

Фермент	Удельная активность $A_{уд}$ (е.а./мг белка)	Выход (г/кг)	Суммарная активность ЕА (е.а./кг ПЖ**)
Рибонуклеаза	600000	1,15	$6,9 \times 10^8$
Дезоксирибонуклеаза	2500	2,9	$5,45 \times 10^6$
Холестерол эстераза	2420	3,1	$7,5 \times 10^5$
Трипсин	12,0*	1,8	$1,2 \times 10^7$

*- активность в тирозиновых единицах ($TE_{35,5}^{HB}$)

** - поджелудочная железа крупного рогатого скота

Фракции белка с удельной активностью 35000 до 160000, скорее всего, являются полимерами *РНКаза*, снижение активности которых можно объяснить наличием примесей белков. В этой связи, следует подчеркнуть, что в работах, (А.М Crestfild et al., 1962; R.G. Fruchter, et al., 1965; G. Gotte, et al., et al. 1997; M. Libonati, et al., 1996) при разделении бычьей *рибонуклеазы А*,

констатировано образование полимеров, отличающиеся друг от друга не только молекулярной массой, но и активностями по отношению к субстрату РНК.

Возвращаясь к *холестеролэстеразе* и *трипсину*, заметим, что, проведя извлечение их из осадка-1 и осадка-2 стандартными методами, мы получили препараты также высокой чистоты (табл. 1).

В таблице 2 приведены сравнительные данные по удельным активностям всех ферментов, полученных по разработанной нами технологии в сравнении с коммерческими препаратами:

Таблица 2 Сравнительные характеристики ферментов полученных по разработанному методу и коммерческих препаратов

Ферменты	РНК-аза	ДНК-аза	Трипсин	Холестерол эстераза
Коммерческий препарат	330000* ЕА/мг	1700 ЕА/мг	8,0 ЕА/мг**	1900 ЕА/мг
Препарат, полученный по разработанной технологии	600000* ЕА/мг	2500 ЕА/мг	12,0 ЕА/мг**	2420 ЕА/мг

* - активность проверена на *ЕРНК* обогащенной высокополимерной фракцией

** - активность в тирозиновых единицах ($TE^{HB}_{35,5}^0$).

Как видно из табличных данных, по описанному выше подходу можно получать четыре фермента: *РНКазу*, *ДНКазу*, *холестеролэстеразу* и *трипсин* с высокими выходами и активностями.

2. Новые подходы к синтезу нуклеотидов (дезокси- и рибонуклеозид-5'-монофосфатов) и их полифосфатов

2.1. Гидролиз ДНК с получением дезоксирибонуклеозид -5'-монофосфатов

Как известно, фермент *ДНКазы* гидролизует ДНК до олигонуклеотидов, *5'-нуклеаза* гидролизует олигонуклеотиды до нуклеозидмонофосфатов. Для гидролиза ДНК, полученной по стандартному методу, использовалось два фермента: *ДНКазы*, выделенная из ПЖ КРС, по описанному в предыдущем

разделе методу, второй фермент – S' -нуклеаза, выделенная из амилоризина по модифицированному нами методу и иммобилизованная на силиохроме С-80.

Модификация метода заключалась в следующем: экстракция амилоризина в течение 12 часов 0,01 М калий фосфатным буфером с pH 7,5 (Буфер А) и диализ раствора белка, содержащего S' -нуклеазу на колонке ($V=100$ мл) с ДЭАЭ-целлюлозой. Кроме того, элюцию S' -нуклеазы проводили раствором хлорида натрия в буфере Б (0,01 М калий фосфатного буфера (pH 7,5) с добавлением 0,1 мМ $ZnSO_4$) с линейным градиентом концентрации хлорида натрия от 0,05 М до 0,4 М. Скорость элюирования 50 мл/час. На выходе в полученных фракциях анализировали активность фермента S' -нуклеазы.

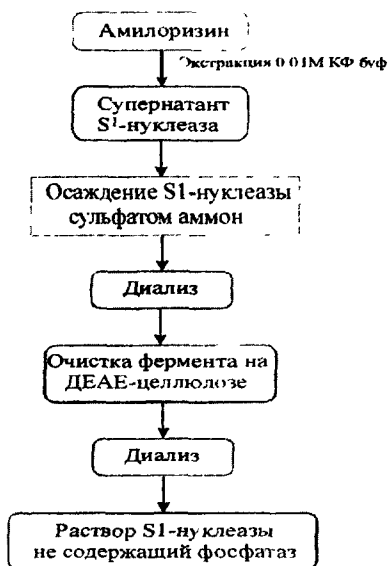


Рис.6. Схема получения S1-нуклеазы

В результате таких операций, можно получать высокоочищенный электрофоретически гомогенный препарат S' -нуклеазы, со степенью очистки 3000 и выходом фермента по массе белка 27%, обладающей высокой специфичностью к вторичной структуре ДНК. Выход S' -нуклеазы – 12000

ед.акт./г амилоризина, что составляет 430 мг S^I -нуклеазы из 1 кг амилоризина.

Удельная активность S^I -нуклеазы – 28000 ед.акт./мг белка (табл. 3).

Таблица 3. Характеристика фермента S^I -нуклеазы

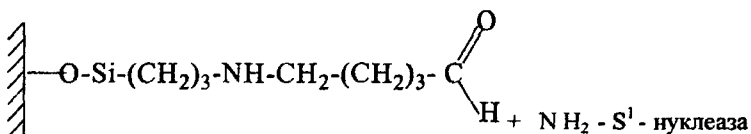
Стадии	Выход по $M_{\text{белка}}$ (%)	Ауд* (ЕА/мг)	Степень очистки	Выход из 1 кг амилоризина (мг)	Суммарная активность ЕА(ЕА/кг.)
1.Экстракция калийфосфатным буфером	100	9,8	1	6150	$6,03 \times 10^4$
2.Диализ против калийфосфатного буфера с добавлением $ZnSO_4$	27	28000	3000	430	$1,21 \times 10^7$

Для иммобилизации S^I -нуклеазы использовали силихром С-80 с удельной поверхностью 80 м²/г и размером пор 700-1000 А. Сорбент получен от к.х.н. В.А.Симакова (Институт катализа им Г.К.Борескова СО РАН).

Модификацию поверхности проводили γ -аминопропил-триэтоксисиланом с последующей активацией модифицированного силихрома глутаровым альдегидом

Иммобилизацию S^I -нуклеазы проводили в три стадии:

- модификация Силохрома С–80 γ -аминопропил-триэтоксисиланом;
- активация аминопропилсилохрома глутаровым альдегидом;
- ковалентное присоединение S^I - нуклеазы к активированному аминопропилсилохрому.



Количество S^I -нуклеазы, связанной с аминопропилсилохромом, определяли по уменьшению активности в прошедшем через колонку растворе. Количество белка ковалентно связанного с аминопропилсилохромом рассчитывали по материальному белковому балансу в исходном растворе и

растворе, прошедшем через колонку с аминопропилсилохромом. Концентрацию белка определяли по методу (Christopherson R.I., et al., 1979).

2.1.1. Гидролиз ДНК, не иммобилизованной S^I -нуклеазой

Были исследованы два метода

1. Последовательный гидролиз.

Для последовательного гидролиза ДНК ферментами *ДНКазой* и не иммобилизованной S^I -нуклеазой использовали ДНК с концентрацией 2 мг/мл в 20 мМ натрий ацетатном буфере (рН 4,6), содержащем 5 мМ $MgSO_4$. Для получения олигонуклеотидов, к этому раствору ДНК ($V=50$ мл) прибавляли 20 мл раствора фермента *ДНКазы* в концентрации 0,3 мг/мл и активностью $A_{уд} = 2500$ е.а./мг. Реакционную смесь инкубировали при $+37^\circ C$ в течение полутора часов. Через каждые 5 мин отбирали пробы по 100 мкл для анализа полноты гидролиза. Реакцию в пробах останавливали добавлением охлажденной 1 М хлорной кислоты в соотношении 1:5. Полноту гидролиза анализировали спектрофотометрически на длине волны 260 нм и методом тонкослойной хроматографии.

Для дальнейшего гидролиза полученных олигонуклеотидов, к раствору добавляли $ZnSO_4$ до концентрации 1 мМ и 380 мкл S^I -нуклеазы с активностью $A_{уд} = 28000$ е.а./мг и концентрацией 1 мг/мл и инкубировали при $+44^\circ C$ в течение полутора часов. Реакцию останавливали нагреванием до $+100^\circ C$ и полученную смесь центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин для отделения белка.

2. Гидролиз ДНК S^I -нуклеазой.

Гидролиз ДНК S^I -нуклеазой проводили, используя раствор ДНК с концентрацией 2,5 мг/мл, в 20 мМ натрий ацетатном буфере (рН 4,6), содержащем 1 мМ $ZnSO_4$. Раствор ($V=50$ мл) нагревали в течение 10 мин при $+100^\circ C$, быстро охлаждали, после чего, добавляли раствор фермента с концентрацией 2,5 мг/мл ($V=1,4$ мл) с активностью $A_{уд} = 28000$ е.а./мг. Смесь инкубировали при $+44^\circ C$, отбирая пробы по 100 мкл для анализа стандартным методом.

В таблице 4 представлены результаты гидролиза ДНК с использованием не иммобилизованной S^I -нуклеазой

Таблица 4. Гидролиз ДНК ферментами ДНКазой и не иммобилизованной S^1 -нуклеазой

№ пр.	Нагрузка на 1 мг ДНК	Содержани е Σ NMP, %	Содержание олиго- нуклеотидов, %	Время инкубации (мин)
1	64 ЕА ДНК-азы	<3	95	90
2	350 ЕА S^1 -нуклеазы	35,3	65	90
3	700 ЕА S^1 -нуклеазы	50	50	140
4	784 ЕА S^1 -нуклеазы	$\cong 100$	0	210
5	64 ЕА ДНК-азы + 78,4 ЕА S^1 -нуклеазы	33	67	120
6	64 ЕА ДНК-азы + 106,4 ЕА S^1 -нуклеазы	$\cong 100$	0	170

Как видно, для полного гидролиза ДНК до монофосфатов необходимо проводить процесс в течение 210 мин. Последовательный гидролиз с помощью ДНКазы, а затем S^1 -нуклеазы позволяет сократить время процесса и в 7 раз снизить затраты S^1 -нуклеазы.

2.1.2. Гидролиз ДНК иммобилизованной S^1 -нуклеазой

Процесс вели в биореакторе, который представлял собой колонку емкостью 100 мл, наполненную силохромом С-80 с иммобилизованной S^1 -нуклеазой. Испытан режим прямого и последовательного гидролиза ДНК.

При прямом гидролизе раствора ДНК с концентрацией 2,5 мг/мл производительность биореактора составила 1 г в час дезоксирибонуклеозид- S^1 -монофосфатов (0,14 г dCMP, 0,18 г dTMP, 0,29 г dAMP, 0,34 г dGMP). При последовательном режиме работы использовался раствор олигонуклеотидов, полученный описанный выше способом. К раствору добавляли $ZnSO_4$ до концентрации 1 мМ и пропускали через реактор при температуре +44°C в течение одного часа. Каждые 10 мин отбирали пробы, анализировали

стандартным методом. При работе в таком режиме производительность биореактора возрастает в 10 раз.

2.2. Гидролиз РНК с получением рибонуклеозид-5'-монофосфатов

2.2.1. Гидролиз РНК не иммобилизованной S^1 -нуклеазой

Гидролиз РНК не иммобилизованной S^1 -нуклеазой, проводили с использованием 12 г дрожжевой суммарной РНК, которую растворяли в 200 мл 0,15 М натрий ацетатного буфера (рН 4,6), содержащего $ZnSO_4$ в концентрации 0,1 мМ. В раствор РНК добавляли 2 мл S^1 -нуклеазы с концентрацией 2,5 мг/мл и активностью $A_{уд} = 28000$ е.а./мг и инкубировали при температуре $+44^\circ C$ в течение 6 ч. Пробы анализировали стандартным методом. Таким образом, нами из 12 г дрожжевой суммарной РНК было получено 1,7 г CMP, 2,2 г UMP, 3,48 AMP, 4,2 г GMP. Физико-химические характеристики полученных образцов рибонуклеотидов соответствуют лучшим образцам нуклеотидов выпускаемых ведущими зарубежными фирмами.

2.2.2. Гидролиз РНК с участием иммобилизованной S^1 -нуклеазы

Процесс вели в биореакторе, описанном выше. Испытан режим прямого гидролиза раствора РНК с концентрацией 20 мг/мл. Производительность биореактора составила 6 г рибонуклеозидмонофосфатов в час. в том числе 0,85 г CMP, 1,1 г UMP, 1,74 г AMP, 2,1 г GMP.

2.3. Получение дезокси- и рибонуклеозид-5'-трифосфатов

Было использовано два способа получения трифосфатов: по первому – проводили фосфорилирование индивидуальных монофосфатов; по второму – вели фосфорилирование смесей монофосфатов, полученных ферментативным гидролизом ДНК и РНК с последующим разделением трифосфатов.

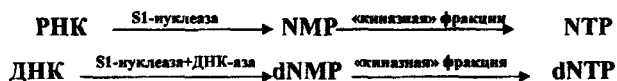
Фосфорилирование индивидуальных дезокси- и рибонуклеозид-5'-монофосфатов проводили по стандартной методике с использованием так называемой «киназной фракции», содержащей набор нуклеотидилкиназ с ацетокиназой, способный осуществить фосфорилирование любого нуклеотидмонофосфата. Установлено, что полученные таким способом индивидуальные АТР, СТР, УТР, ГТР и dАТР, dСТР, dТТР, dГТР по спектральной характеристике и отношениям D_{280}/D_{260} и D_{250}/D_{260} соответствовали спектральным характеристикам трифосфатов,

синтезированных традиционным способом (Бреслер С.У. и др. 1974; Богачёв В.С., 1996; Kornberg A., Aposhian H.V., 1962; Warburg G., Christian W., 1941). Основные спектральные характеристики представлены в таблицах 5,6.

Полнота фосфорилирования суммарных NMP и dNMP была не менее 86% для NMP (99% AMP превращается в АТР, 96% СМР превращается в СТР, 86% UMP превращается в UTP, 87% GMP превращается в GTP) и не менее 90% для dNMP (99% dAMP превращается в dATP, 96% dCMP превращается в dCTP, 92% dTMP превращается в dTTP, 90% dGMP превращается в dGTP).

Фосфорилирование NMP и dNMP в смеси.

Фосфорилирование NMP и dNMP в смеси проводили с использованием также «киназной фракции», но без выделения из гидролизата РНК и ДНК индивидуальных NMP и dNMP по схеме:



Спектральные характеристики и отношения D_{280}/D_{260} и D_{250}/D_{260} полученных АТР, СТР, UTP, GTP и dATP, dCTP, dTTP, dGTP идентичны результатам, полученным при фосфорилировании индивидуальных монофосфатов (табл.5,6).

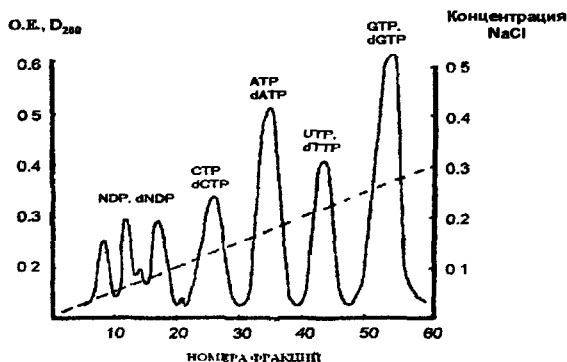


Рис. 7. Хроматография продуктов реакции фосфорилиза

Из рис. 7 видно, что при фосфорилировании дезокси- и рибонуклеозид-5'-монофосфатов в смеси образуется минимальное количество дезокси- и рибонуклеозид-5'-дифосфатов, которые также подвергаются фосфорилированию до соответствующих трифосфатов.

Таким образом, минуя стадию разделения монофосфатов и стадию получения дифосфатов, мы получаем смесь либо рибонуклеозид-5'-трифосфатов, либо смесь дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов. В таблицах 5 и 6 приведены основные характеристики dNTP и NTP, полученных сопряжённым фосфорилированием в сравнении с аналогичными трифосфатами, синтезированными из индивидуальных монофосфатов.

Таблица 5. Спектральные характеристики рибонуклеозид-5'- трифосфатов

NTP	ATP	CTP	UTP	GTP
Содержание основного вещества в сухом препарате	98,4% (99,4%)*	99,2% (99,2%)*	98,8% (98,8%)*	99,4% (99,4%)*
Хроматографическая однородность	98% (98%)*	99% (98%)*	97% (96%)*	99,4% (99,4%)*
Соотношение величин оптических плотностей при pH 2,0				
A250/A260	0,85	0,45	0,75	0,96
A280/A260	0,22	2,12	0,38	0,67
Соотношение величин оптических плотностей при pH 7,0				
A250/A260	0,80	0,84	0,75	1,17
A280/A260	0,15	0,97	0,38	0,66

* Трифосфаты, полученные из индивидуальных монофосфатов

Таблица 6. Спектральные характеристики дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов

dNTP	dATP	dCTP	dTTP	dGTP
Содержание основного вещества в сухом препарате	98,5% (99,5%)*	99,4% (99,7%)*	99,6% (98,6%)*	99,2% (98,2%)*
Хроматографическая чистота	96% (96%)*	98% (97%)*	98,8% (98%)*	99% (98 %)*
Соотношение величин Оптических ьплотностей при pH 2,0				
A250/A260	0,81	0,44	0,63	1,01
A280/A260	0,22	2,14	0,71	0,71
Соотношение величин оптических плотностей при pH 7,0				
A250/A260	0,78	0,82	0,65	1,16
A280/A260	0,15	0,98	0,73	0,66

*Трифосфаты, полученные из индивидуальных монофосфатов

ВЫВОДЫ

1. Разработан новый комплексный подход выделения ферментов из поджелудочной железы крупного рогатого скота, позволяющий получать высокоочищенные и высокоактивные ферментные препараты *РНКа*зы, *ДНК*азы, *холестеролэстера*зы и *трип*сина из одной партии сырья.
2. Создана база высокоочищенных субстратов РНК и ДНК для анализа активности нуклеаз и получения на их основе dNTP и NTP.
3. Создана ферментная база для получения нуклеотидов на основе доступного сырья *ДНК*-азы из поджелудочной железы крупного рогатого скота и *S^I*-нуклеазы из амилоризина.
4. Получены с использованием собственной субстратной и ферментной базы высокоочищенные дезокси- и рибонуклеозид-5'-монофосфаты с высокими выходами.
5. Разработаны новые процедуры сопряженного фосфорилирования

продуктов гидролиза РНК и ДНК до дезокси- и рибонуклеозид-5'-трифосфатов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Хомов В.В., Рябенко А.В., Бочков Д.В., Боровцова О.А. Гетерогенные катализаторы в процессе биоконверсии нуклеиновых кислот и их предшественников // Материалы 1-ого Международного Конгресса по биотехнологии. – Москва, 2002.- С. 443 – 444.

2. Бочков Д.В., Рябенко А.В. Разработка комплексной технологии получения биологически активных веществ из поджелудочной железы крупного рогатого скота // Материалы XL международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». – Новосибирск, 2002.- С. 29 – 30.

3. Бочков Д.В. Новые подходы к синтезу нуклеотидов (дезокси- и рибонуклеозид – 5'-монофосфатов) и их полифосфатов // Аспирантский сборник статей. – НГПУ (Новосибирск).- № 3.- 2003.- С. 225.

4. Бочков Д.В., Рябенко А.В. Совмещенная технология получение биологически активных веществ из поджелудочной железы крупного рогатого скота и перспективы их использования // Аспирантский сборник статей.- НГПУ (Новосибирск).- № 3.- 2003.- С. 218.

5. М. Bayarjargal., Khomov V.V., Bochkov D.V., Dolgor D., Gan-Erdene T., Regdel D. A new approach in the technology for obtaining pancreatin // The Second International Conference on Chemical Investigation and Utilization of Natural Resources.- Ulan-Bator. (Mongolia).- 2003.- С. 45.

6. Бочков Д.В., Хомов В.В., Пашковская Н.В. Комплексная технология получения высокоочищенных ферментных препаратов: РНК-азы, ДНК-азы, холестерол эстеразы и трипсина из поджелудочной железы крупного рогатого скота // Наука производству - 2004.- № 5.- С. 56 – 59.

7. Хомов В.В., Бочков Д.В., Боровцова О.Ю. Гетерогенный биокатализ в процессах получения (дезокси) рибонуклеозид-5'-монофосфатов и их

полифосфатов // Материалы 2-ого Международного Конгресса по биотехнологии.- Москва, Часть 2, 2003.- С. 192 – 193.

8. В.В. Хомов, Д.В.Бочков, Т.Г.Толстикова. Новый подход к получению ДНКазы, РНКазы, холестеролэстеразы и трипсина высокой активности из поджелудочной железы крупного рогатого скота // Доклады академии наук.- 2005.- том 400.- №3.- С. 409 – 412.

9. Хомов В.В., Бочков Д.В., Толстикова Т.Г. Новый подход к получению дезоксирибо- и рибонуклеозид-5'-монофосфатов и их трифосфатов // Доклады академии наук.- 2005.- том 401.- № 3.- С. 403 – 405.

10. В.В. Хомов, Д.В.Бочков, Т.Г.Толстикова. Гидролитический способ получения дезокси- и рибонуклеозид-5'-монофосфатов и ферментативный синтез их полифосфатов // Биохимия.- 2006.- том 71.- № 1.- С. 97 – 102.

Лицензия ЛР №020059 от 24.03.97

Подписано в печать 7.11.05 Формат бумаги 60×84/8.
Печать RISO. Уч.-изд.л. 1,5. Усл. п.л. 1,4. Тираж 100 экз.
Заказ № 64.

Педуниверситет, 630126, Новосибирск, Вилковой, 28

№ 25 1 1 6

РНБ Русский фонд

2006-4

28797