

С. И. БЕЗБОРОДОВА, Т. В. ИЛЬИНА, В. П. КРУПНЯНКО
ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКООЧИЩЕННОЙ РНКазы
PENICILLIUM BREVICOMPACTUM

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 2 VI 1970)

Успехи в области расшифровки первичной структуры тРНК, достигнутые благодаря применению специфичных РНКаз, и в частности РНКазы T_1 , продуцентом которой является гриб *Aspergillus oryzae* (1), привлекли внимание ученых к РНКазам микроорганизмов.

Безбородовой и др. (2-4) показано, что многие грибы способны продуцировать внеклеточные РНКазы в сравнительно больших количествах. Плесневой гриб *Penicillium brevicom pactum* выделяет в питательную среду кислую РНКазу, расщепляющую РНК до нуклеозид-3'-фосфатов с образова-

Таблица 1

Очистка РНКазы *P. brevicom pactum*

Этап	Объем, мл	Активность, ед/мл	У. а. *	Выход, %	Степень очистки
Фильтрат культурной жидкости	700	47,5	5,0	100	1
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе (3,6 × 8,7 см), 0,005 М фосфатный буфер рН 6,5. Элюция 0—0,5 М NaCl в буфере	85	157,0	51,0	40	10
Рехроматография на ДЭАЭ-целлюлозе (1,8 × 39,5 см) в фосфатном буфере. Элюция 0—0,3 М NaCl	58	198,0	386,0	36	77
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе (1,2 × 27 см), 0,05 М ацетатный буфер рН 5,6. Элюция 0,05—0,3 М ацетатным буфером рН 5,6	50	192,0	570,0	29	114
Концентрирование на ДЭАЭ-целлюлозе (1,4 × 4,0 см). Элюция 0,3 М ацетатным буфером рН 5,6	5	800,0	870,0	12	174
Гель-хроматография на Сефадексе Г-75 (2 × 97 см) в 0,05 М трис-HCl-буфере с 0,1 М KCl, рН 7,5	20	184,0	1120,0	40	224

* Удельную активность выражали в виде отношения величины активности в 1 мл раствора к его оптической плотности при 280 мμ.

нием в качестве промежуточных продуктов реакции различных нуклеозид-2',3'-фосфатов (КФ 2.7.7.17). РНКазы *P. brevicom pactum* является аналогом РНКазы T_2 *Asp. oryzae* (1) и РНКазы *M. Asp. saitoi* (5) и представляет интерес с точки зрения сравнительной и препаративной биохимии.

Целью настоящей работы явилось выделение РНКазы *P. brevicom pactum* из фильтрата культуральной жидкости и очистка его до гомогенного состояния.

Культуру выращивали глубинно на качалках при $24 \pm 1^\circ$ на комплексной питательной среде (2) в течение 4 суток. Мицелий отделяли фильтрованием под вакуумом и выбрасывали. Активность РНКазы определяли по методу Анфинсена (6). За единицу активности фермента принимали

$\Delta E_{280} = 1$. Белок определяли по поглощению при 280 м μ . Оптическую плотность в у.-ф. области измеряли на спектрофотометрах СФ-16 и СФ-4DR, «Optica Milano», в 1-сантиметровой кварцевой кювете. Очистку РНКазы вели при помощи ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (емкость 0,6—0,8 мэкв/г, «Reanal») и гель-хроматографии на Сефадексе Г-75 (superfine 10—40 μ , «Pharmacia») при температуре 4°. Перед каждой хроматографией, за исключением гель-хроматографии, раствор фермента диализовали против исходного буфера в течение 8—12 час. с неоднократной заменой буфера. Сорбцию и элюцию вели со скоростью 10—20 мл/час, за исключением первой хроматографии, при которой скорость сорбции была

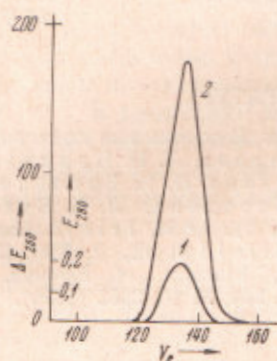


Рис. 1. Гель-хроматография РНКазы на Сефадексе Г-75. 1 — белок (E_{280}), 2 — активность РНКазы (ΔE_{280})

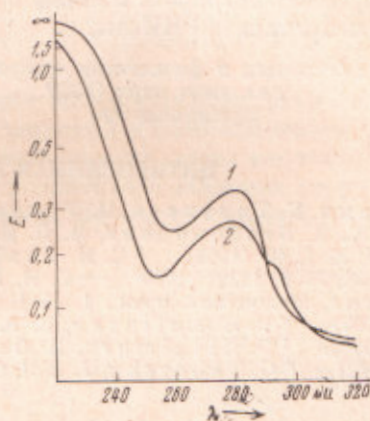


Рис. 2. У.-ф. спектры РНКаз. 1 — РНКазы А, 2 — РНКазы Р. brevicomractum

50 мл/час. Результаты очистки суммированы в табл. 1. Получен препарат фермента с высокой удельной активностью и высокой степенью чистоты, судя по совпадению пиков белка и активности при гель-хроматографии на Сефадексе Г-75 (рис. 1). Удельная активность фильтрата культуральной жидкости от ферментации к ферментации колебалась в пределах 1,6—5,0, и в связи с этим степень очистки изменилась соответственно от 700 до 224 раз при постоянной удельной активности фракций, полученных в результате гель-хроматографии. Используя предварительно построенную калибровочную кривую зависимости объема элюции (V_e) от молекулярного веса различных белков, установили, что молекулярный вес РНКазы Р. brevicomractum равен $36\,000 \pm 1000$, т. е. соответствует молекулярному весу описанных ранее РНКаз микроскопических грибов с оптимумом рН в кислой среде — РНКазы *T. Asp. oгузае* (1) и РНКазы *M. Asp. saitoi* (2). Оптимум рН исследуемой нами РНКазы равен 5,2 (ацетатный, фосфатный и триацетатный буферы) при использовании в качестве субстрата РНК, а при гидролизе $C > p$ и $U > p$ 4,7. На рис. 2 приведен у.-ф. спектр РНКазы Р. brevicomractum и РНКазы А (КФ 2.7.7.16). При 293 м μ у исследуемой нами РНКазы наблюдали плечо, которое отсутствует у РНКазы А. Внеклеточная РНКазы *Vac. subtilis*, отличающаяся от РНКазы А наличием в ее составе триптофана и отсутствием дисульфидных мостиков, также имеет плечо в области 290 м μ (3).

Удельная активность РНКазы Р. brevicomractum, рассчитанная по начальным скоростям гидролиза $C > p$ и $U > p$ в 0,1 М ацетатном буфере, рН 4,7 и температуре 20°, равнялась 36,0 $\mu\text{мол/мг}\cdot\text{мин}$ ($C > p$) и 25,5 $\mu\text{мол/мг}\cdot\text{мин}$ ($U > p$). Если допустить, что раствор фермента, содержащий 1 мг/мл белка имеет $E_{280} = 1$, то молекулярная активность РНКазы составит 1330 мин^{-1} на $C > p$ и 945 мин^{-1} на $U > p$. Гидролазная актив-

ность РНКазы А, выделенной по методу Таборского⁽⁸⁾ из препарата РНКазы Ленинградского завода Медпрепаратов, значительно ниже. При гидролизе $C > p$ удельная активность составила 0,733 $\mu\text{мол}/\text{мг}\cdot\text{мин}$, а молекулярная $10,7 \text{ мин}^{-1}$ при pH 7,0 в трис-HCl-буфере с ионной силой 0,2 при температуре 20°. Следовательно, внеклеточная РНКаза *P. brevicompactum* обладает примерно в 100 раз большей гидролазной активностью, чем РНКаза А. Сравнение интенсивности расщепления РНК («Gree Lawson, Chemical LTD 6/6») РНКазой А и исследуемым ферментом выявило сопоставимую каталитическую активность обеих РНКаз. При электрофорезе в полиакриламидном геле в трис-глициновом буфере pH 8,3 РНКаза *P. brevicompactum* мигрирует к аноду в виде одной полосы, что показывает гомогенность препарата РНКазы.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
26 V 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ф. Эгами, К. Такахаси, Ц. Усида, В кн. Нуклеиновые кислоты, М., 1966, стр. 144. ² С. И. Безбородова, Л. И. Бородаева, Л. Н. Паикова, Микробиология, 37, № 1, 10 (1968). ³ С. И. Безбородова, Л. И. Бородаева и др., Биохимия, 34, № 6, 1129 (1969). ⁴ С. И. Безбородова, Л. Б. Базенкова, Т. В. Ильина, Микробиол. пром., 1, № 1, 19 (1970). ⁵ M. Irie, J. Biochem., 62, № 5, 509 (1967). ⁶ C. B. Anfinsen, R. R. Redfield et al., J. Biol. Chem., 207, № 1, 201 (1954). ⁷ S. Nishimura, H. Ozawa, Biochim. et biophys. acta, 55, № 4, 431 (1962). ⁸ G. Taborsky, J. Biol. Chem., 234, № 10, 2652 (1959).