

Н. М. АБРОСИМОВА-АМЕЛЬЯНЧИК, О. И. АРТАМОНОВА,
Р. И. ТАТАРСКАЯ, академик А. А. БАЕВ

**РНКаза ИЗ *ACTINOMYCES* SP., ШТАММ 236,
ОБРАЗУЮЩАЯ ФРАГМЕНТЫ С КОНЦЕВЫМ 5'-ФОСФАТОМ
(НУКЛЕАЗА А236)**

Нуклеазы в настоящее время широко применяются в качестве специфических реагентов при исследовании структуры и функции нуклеиновых кислот.

При обследовании различных групп актиномицетов, предпринятом нами недавно с целью выявления продуцентов новых нуклеаз, еще не обнаруженных у актиномицетов, было найдено несколько штаммов, выделяющих в культуральную среду термо- и кислотолабильные нуклеазы, активность которых значительно снижалась в присутствии ЭДТА.

При использовании в качестве субстрата полиуридилевой кислоты и последующего разделения с помощью тонкослойной хроматографии на целлолозе гидролизатов, полученных при действии найденных нуклеаз, было показано (рис. 1), что среди продуктов расщепления поли-У, кроме 5'-УМФ и уридина, появившегося в результате действия содержащейся в культуральной жидкости фосфатазы, имеется также целый набор различных олигонуклеотидов, присутствующих на всех стадиях гидролиза. Это дает основание предполагать, что обнаруженные нами нуклеазы по характеру своего действия на субстраты представляют собой эндонуклеазы. Способность этих нуклеаз расщеплять такие гомополимеры, как поли-У или поли-А, при использовании низких концентраций ферментов свидетельствует о том, что они не являются широко распространенными среди актиномицетов гуанило-РНКазами.

Для дальнейших исследований в качестве источника фермента был выбран *Actinomyces* sp., штамм 236, с относительно низким содержанием фосфатазы в культуральной жидкости. Однако даже для получения предварительных данных о специфичности найденной нуклеазы необходимо было выделить препарат фермента, хотя бы частично освобожденный от примесей мешающих ферментов, в первую очередь — от фосфатаз.

Для избирательной инактивации фосфатаз в культуральной жидкости актиномицетов ранее с успехом было использовано выдерживание культуральных жидкостей при низких значениях рН (^{1, 2}). Однако при попытке использовать этот прием для инактивации фосфатазы в культуральной жидкости штамма 236 оказалось, что нуклеаза почти полностью инактивировалась уже при подкислении культуральной жидкости до рН 5,0—5,5. При подборе условий, способствующих стабилизации нуклеазы в процессе очистки, было показано, что активность фермента практически не изменяется после выдерживания культуральной жидкости при относительно низких значениях рН в присутствии РНК. Стабилизирующее действие на фермент оказывают также ионы Ca^{2+} .

На основании этих данных была разработана предварительная процедура выделения частично очищенных препаратов фермента, которая состоит в следующем.

Сконцентрированную на пленочном испарителе культуральную жидкость прогревают при 43° и рН 4,8 в течение 45 мин. в присутствии РНК (1 мг/мл). При этом нуклеазная активность практически полностью сохра-

няется, а фосфатазная активность снижается на 90%. Далее фермент выделяют из раствора с помощью фракционирования этанолом на холоду. Выделенные таким способом частично очищенные препараты нуклеазы были использованы для изучения специфичности фермента.

Для того чтобы определить, как расщепляются нуклеазой фосфодиэфирные связи в РНК, были использованы обычно применяющиеся для этих целей методы. Прежде всего ферментные гидролизаты РНК, частично расщепленной нуклеазой, подвергали щелочному гидролизу. На рис. 2 пред-

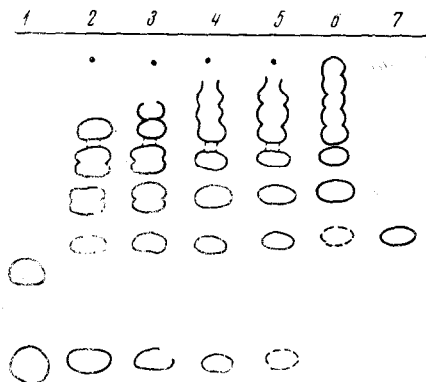


Рис. 1

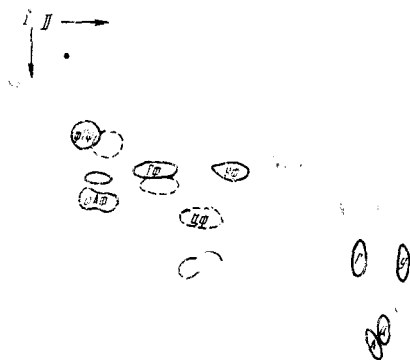


Рис. 2

Рис. 1. Разделение гидролизатов полиуридилевой кислоты, полученных при расщеплении последней культуральной жидкостью из штамма 236, с помощью тонкослойной хроматографии на целлюлозе. Пробу, содержащую 10 опт. ед. (A_{260}) поли-У, 0,05 M буфер трис-НСl, рН 8, 0,005 M $MgCl_2$ и 16 ед. фермента, инкубировали при 37°. Через указанные промежутки времени отбирали аликвоты по 0,01 мл и наносили на стеклянную пластинку, покрытую слоем целлюлозы MN-300 (фирмы «Серва»). I (слева направо) — свидетели 3'-УМФ и уридин, 2—6 — пробы, нанесенные после инкубации в течение, соответственно, 3 час., 1,5 час., 30 мин., 15 мин. и сразу после внесения фермента; 7 — свидетель 5'-УМФ. Разделение проводили в системе изомасляная кислота — NH_4OH 0,5 M (100 : 60), рН 3,6

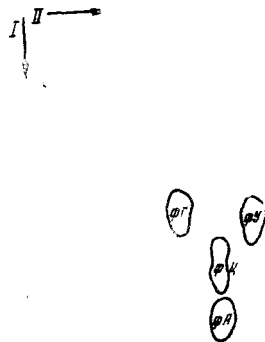
Рис. 2. Разделение продуктов щелочного гидролиза олигонуклеотидов, полученных после расщепления РНК очищенной нуклеазой из штамма 236 (тонкослойная хроматография). Пробу, содержащую 2,3 опт. ед. РНК, 0,03 M буфер трис-НСl рН 8, 0,005 M $MgCl_2$ и 2 ед. фермента, инкубировали при 37° 15 мин., после чего пробу упаривали досуха на пленочном испарителе. К сухому остатку добавляли 0,02 мл 0,3 N КОН и инкубировали при 37° 18 час. Гидролизат наносили на пластинку и разделяли с помощью двумерной хроматографии. I направление: изомасляная кислота — NH_4OH , рН 3,6 (10 : 6); II направление: этанол-ацетатно-аммиачный буфер 1 M , рН 5,0 (75 : 30). Г, У, Ц и А — соответствующие нуклеозиды, Гф, Уф, Цф и Аф — мононуклеотиды, фГф и фАф — нуклеозиддифосфаты

ставлена хроматограмма, на которой видны разделенные продукты щелочного гидролиза: мононуклеотиды, нуклеозиды и нуклеозиддифосфаты. Все эти продукты могли образоваться только при условии, если в олигонуклеотидах, полученных в результате действия нуклеазы, имелись концевые фосфаты в 5'-положении.

Данные о том, что нуклеаза из штамма 236 расщепляет РНК с образованием фрагментов, несущих концевые 5'-фосфаты, были подтверждены также другим способом. Для этого олигонуклеотиды, образовавшиеся в результате действия нуклеазы на РНК, расщепляли экзонуклеазой А5, дающей 5'-мононуклеотиды⁽³⁾. На хроматограмме (рис. 3) были обнаружены только мононуклеотиды. Такой результат мог быть получен лишь в том случае, если в олигонуклеотидах имелись концевые 5'-фосфаты. Эти данные говорят также об отсутствии в препаратах нуклеазы заметных примесей ферментов, дающих при расщеплении РНК олигонуклеотиды с концевыми 3'-фосфатами (например, гуанило-РНКазы), так как в этом случае на хроматограмме были бы обнаружены кроме мононуклеотидов также и другие продукты реакции.

В опытах с использованием в качестве субстратов нативной и денатурированной нагреванием ДНК из тимуса теленка было показано, что нуклеаза из штамма 236 не расщепляет ни нативную, ни денатурированную ДНК в тех условиях, при которых происходит исчерпывающий гидролиз РНК и рибогомополимеров. Тот факт, что нуклеаза не способна расщеплять денатурированную ДНК, свидетельствует также об отсутствии в препаратах фермента примеси неспецифической экзонуклеазы типа экзонуклеазы А5, которая легко расщепляет денатурированную ДНК.

Рис. 3. Разделение продуктов, образовавшихся при действии экзонуклеазы А5 на олигонуклеотиды, полученные после расщепления РНК нуклеазой из штамма 236 (тонкослойная хроматография). Пробу, содержащую 2 опт. ед. олигонуклеотидов, 0,02 М буфер трис-НСl, рН 8, 0,001 М $MgCl_2$ и 6 ед. экзонуклеазы А5 в объеме 0,03 мл, инкубировали при 37° 2 часа. После нанесения пробы на пластинку разделение проводили с помощью двумерной хроматографии в тех же системах растворителей, которые указаны в подписи к рис. 2



Таким образом, из всей совокупности приведенных данных следует, что нуклеаза из *Actinomyces* sp., штамм 236, является эндонуклеазой, образующей моно- и олигонуклеотиды с концевыми 5'-фосфатами. Фермент не проявляет отчетливой специфичности по отношению к основаниям. По предварительным данным, фермент не расщепляет ни нативную, ни денатурированную ДНК и, следовательно, является 5'-РНКазой. Хотя несколько ферментов такого типа было выделено из ряда источников (⁴⁻⁷), у актиномицетов они не были обнаружены до настоящего времени. Нуклеаза, выделенная ранее из актиномицета *Streptomyces aureus*, подобно нуклеазе из штамма 236, расщепляет РНК с образованием фрагментов, несущих концевые 5'-фосфаты. Однако, по данным автора, она способна расщеплять также ДНК (^{8, 9}).

Мы предполагаем, что 5'-РНКаза из *Actinomyces* sp., штамм 236 (нуклеаза А236) может найти себе применение при анализе первичной структуры различных олигонуклеотидов. В сочетании с экзонуклеазой А5 она может оказаться полезной для определения нуклеотидного состава РНК и олигонуклеотидов, а также для препаративного получения 5'-рибомононуклеотидов и олигонуклеотидов с концевыми 5'-фосфатами.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
29 VIII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. И. Татарская, Н. М. Абросимова-Амельянич и др., ДАН, **157**, 725 (1964).
- ² Р. И. Татарская, В. Д. Кольцов, А. И. Коренько, ДАН, **173**, 462 (1967).
- ³ R. I. Tatarskaya, T. N. Lvova et al., *Europ. J. Biochem.*, **15**, 442 (1970).
- ⁴ С. К. Василенко, Г. Т. Бабкина, Биохимия, **30**, 705 (1965).
- ⁵ L. A. Herpel, In: *Procedures in Nucleic Acid. Research*, N. Y.—London, **1**, 1966, p. 31.
- ⁶ M. Higashimaru, T. Uchida, F. Egami, *J. Biochem.*, **65**, 701 (1968).
- ⁷ T. L. Walters, H. S. Loring, *J. Biol. Chem.*, **241**, 2870 (1966).
- ⁸ M. Yoneda, *J. Biochem.*, **55**, 475 (1964).
- ⁹ M. Yoneda, *J. Biochem.*, **55**, 481 (1964).