

УДК 577.1:547.96

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Э. М. ГОНИКБЕРГ, И. А. ДЕГТЕРЕВ, М. С. УНУКОВИЧ,
А. В. ШИШКОВ, Э. С. ФИЛАТОВ

**ПОЛУЧЕНИЕ ^3H -РИБОНУКЛЕАЗЫ МЕТОДОМ АКТИВАЦИИ
ТРИТИЯ ПРИ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ И ЕЕ ОЧИСТКА
ПРИ ПОМОЩИ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 3 III 1976)

Имеющиеся в настоящее время методы получения меченых белков можно разделить на три группы: 1) синтез *de novo* из меченых предшественников, 2) модификация выделенных белков по различным группам, 3) водородный обмен. Большинство методов введения трития в белки, относящихся к последней группе, основано на методе Вильцбаха (¹), существенным недостатком которого является возникновение значительных количеств биологически неактивных продуктов. Различные модификации этого метода (см. обзоры (²⁻⁴)) привели к существенному повышению эффективности мечения и к уменьшению количества образующихся высоко radioактивных примесей. К этой группе относится метод активации трития атомизацией на вольфрамовой нити при высоких температурах, который, как было показано (⁵), может быть использован для получения меченных тритием биологически активных соединений.

С другой стороны, наиболее серьезным вопросом при использовании различных способов введения метки является вопрос о чистоте меченого соединения и в особенности меченых макромолекул (см. (⁶)). Таким образом, необходим метод избирательного отделения биологически активного белка от биологически инертных компонентов, с которыми может быть связана значительная доля радиоактивности в меченом препарате.

Как известно, наилучшим способом выделения биологически активных макромолекул является аффинная хроматография. В настоящее время методы аффинной хроматографии применяются для выделения самых различных биологических объектов (⁷).

В настоящей работе впервые для получения меченого белка использован метод активации трития при высокой температуре. В качестве объекта исследования был выбран фермент рибонуклеаза, структура которого полностью известна; этот белок очень стабилен и для него имеется метод очистки при помощи аффинной хроматографии на колонке с сефарозой-4В, замещенной 5'-(4-аминофенил)-фосфорируридин-2' (3')-фосфатом (⁸).

Рибонуклеазу из поджелудочной железы быка (фирмы «Reanal», Венгрия) наносили в виде тонкой пленки на боковые стенки цилиндрического стеклянного сосуда диаметром 4 см методом лиофильной сушки. По осевой линии сосуда помещалась вольфрамовая нить (диаметром 0,1 мм и длиной 100 мм), нагреваемая электрическим током до температуры примерно 2500° К. Сосуд охлаждали жидким азотом. Реакционный сосуд заполняли молекулярным тритием через палладиевый натекаль. Давление трития устанавливали с таким расчетом, чтобы осуществлялся свободный пробег атомов ^3H от нити до поверхности сосуда (в данном случае 10^{-2} – 10^{-3} тор). После окончания экспозиции белок растворяли в воде или буфере и подвергали дальнейшему анализу. Содержание ^3H в растворах определяли счетом в сцинтилляторе диоксан — метанол (4 : 1 *v/v*), содержащем 80 г/л нафталина, 4 г/л ППО и 0,4 г/л ПОПОП, на счетчике Mark-2 (США). Эф-

фективность счета (определенная с использованием стандарта — ^3H -уридина с известной удельной активностью) составляла 43%.

Уридин-2'(3'), 5'-дифосфат синтезировали из уридина (фирмы «Reanal», Венгрия) с β -цианоэтилфосфатом и дициклогексилкарбодиимидом; продукты реакции разделяли на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-25 в градиенте концентрации триэтиламинкарбонатного буфера pH 7,5. Уридин-2'(3'), 5'-дифосфат выходил в основном пике при концентрации буфера около 0,35 *M*. Продукт был отождествлен хроматографией на бумаге в системе изопропанол — 1% сульфат аммония и в системе этанол — ацетат аммония. Синтез 5'-(4-нитрофенилфосфорил)-уридин-2'(3')-фосфата проводили, как описано в работе (8). Продукт был идентифицирован тонкослойной хроматографией на силикагеле (Силуфол, Чехословакия) в системе изопропанол — аммиак — вода (R_f 0,25). Определение чистоты продукта с фосфодиэстеразой яда гюрзы показало, что на 1 эквивалент уридина выделяется 1 эквивалент *n*-нитрофенола. Гидрирование нитропроизводного в соответствующее аминопроизводное проводили в метаноле в присутствии катализатора — палладия на активированном угле до поглощения рассчитанного количества водорода. Восстановление контролировали по изменению спектра поглощения: при гидрировании исчезает характерное плечо в спектре нитропроизводного в области 300 нм. Продукт при хроматографии на силикагеле в описанной выше системе имел R_f 0,12 (8). Приготовление замещенной сефарозы-4В (фирмы «Pharmacia», Швеция) с предварительной активацией бромцианом (фирмы «Serva», ФРГ) проводили, как описано в работе (8).

Было получено 3 мл замещенной сефарозы и заполнена колонка с внутренним диаметром 5,8 мм и высотой 11 см. На колонку наносили до 3 мг рибонуклеазы в 0,02 *N* ацетатном буфере pH 5,2 и начинали элюирование этим же буфером; при этом белок, не обладающий рибонуклеазной активностью, не задерживался на колонке. Ферментативноактивную фракцию вымывали 0,2 *N* уксусной кислотой. Скорость потока (30 мл/час) задавали перистальтическим насосом (фирмы LKB, Швеция) и регистрировали поглощение при 278 нм (запись с помощью проточной кюветы к СФ-4 и ЭППВ-60М). Во фракциях измеряли также каталитическую активность рибонуклеазы по (9) с 1% дрожжевой РНК (фирмы «Worthington», США). Для определения концентрации рибонуклеазы снимали ее спектр поглощения от 240 до 360 нм и определяли концентрацию из оптической плотности при 275 нм, исправленной с учетом рассеяния, как описано в работе (10).

Аффинная хроматография исходной немеченой рибонуклеазы (рис. 1А) показала, что в ней содержится только 37% активного фермента. Электрофорез активной (II) и неактивной (I) фракций в 10% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (11) показал отсутствие в неактивной фракции полипептидных цепей с молекулярным весом более 14 000. Спектры поглощения неактивной и активной фракций сильно различались. Для активной фракции отношение A_{278}/A_{250} равнялось приблизительно 3, а для неактивной фракции 1. Удельная активность фермента на 1 мг белка (9) составляла у исходного препарата 1020 ед/мг; у первой (неактивной) фракции она равнялась нулю, а у второй (активной) — 2800 ед/мг.

Для получения ^3H -рибонуклеазы в реакционный сосуд поместили 5 мг фермента (слоем приблизительно 40 мкг/см²) и экспонировали его 1,5 мин., а затем растворили в 0,02 ацетатном буфере pH 5,2. Полученный белок имел удельную радиоактивность 9,1 С/ммоль, а его удельная ферментативная активность понизилась от 1020 ед/мг до 750 ед/мг. На рис. 1Б приведены результаты аффинной хроматографии ^3H -рибонуклеазы — профили оптической плотности при 278 нм (кривая 1) и радиоактивности (кривая 2). Доля активного фермента понизилась с 37% в исходном препарате до 25% в меченом, в соответствии с отмеченным снижением ферментативной активности. Удельная ферментативная активность активной фракции

тесняется из этого комплекса гомологичным нерадиоактивным белком из исследуемой смеси. Чувствительность этого метода определяется удельной радиоактивностью меченого белка. В связи с этим отметим, что использование при экспозиции более тонких слоев белка (метится, вероятно, лишь поверхностный слой белка) должно привести к получению меченых белков со значительно более высокой удельной радиоактивностью (ср., например, данные ⁽⁴⁾). В принципе использованный в данной работе метод введения трития можно применять и для получения других меченных *in vitro* макромолекул, например, нуклеиновых кислот.

Авторы выражают благодарность за ценные советы В. М. Андрееву, Р. И. Жданову и Б. П. Уланову.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
27 II 1976

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. E. Wilzbach, J. Am. Chem. Soc., v. 79, 1013 (1957). ² Э. Эванс, Тритий и его соединения, М., Атомиздат, 1970. ³ A. P. Wolf, In: Proc. Intern. Conf. on Methods of Preparing and Storing Labelled Compounds, 2nd, Brussels, 1968, p. 907. ⁴ W. C. Hemmree, R. E. Ehrenkaufer et al., J. Biol. Chem., v. 248, 5532 (1973). ⁵ А. В. Шушков, Э. С. Филатов и др., ДАН, т. 228, № 5 (1976). ⁶ P. Peyser, In: Proc. Intern. Conf. on Methods of Preparing and Storing Labelled Compounds, 2nd., Brussels, 1968, p. 1081. ⁷ S. C. March, I. Parikh, P. Cuatrecasas, In: Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography, N. Y.—London, 1974, p. 3. ⁸ M. Wilchek, M. Gorecki, Europ. J. Biochem., v. 11, 491 (1969). ⁹ G. Kalnitsky, J. P. Hummel, C. Dierks, J. Biol. Chem., v. 234, 1512 (1959). ¹⁰ S. J. Leach, J. Hill, Biochemistry, v. 2, 807 (1963). ¹¹ U. K. Laemmli, Nature, v. 227, 680 (1970). ¹² J. J. Langone, H. van Vunakis, L. Levine, Accounts Chem. Res., v. 8, 335 (1975).