

Р. Е. АБРАМОВ, Х. О. БЕЗИРДЖЯН, Ж. И. АКОПЯН

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА НУКЛЕАЗЫ $S_1$ ИЗ АМИЛОРИЗИНА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ГРИБОВ *ASPERGILLUS ORYZAE*

Описан модифицированный и упрощенный метод выделения и очистки нуклеазы  $S_1$  из отечественного коммерческого порошка амилоризина, свободной от неспецифической ДНК-азной активности.

Нуклеаза  $S_1$  широко используется при изучении структурной организации нуклеиновых кислот, измерении степени гибридизации ДНК с РНК и т. д. [1—4]. Описанные в литературе методы выделения этого фермента дают возможность получать высокоочищенные препараты из «Такадиастазы» (Sankyo Co. Ltd. Tokyo) или  $\alpha$ -амилазы (Sigma Chemicals Cat. № A6630).

*Материал и методика.* В качестве источника фермента использовали амилоризин Рассказовского завода, полученный из грибов *Aspergillus oryzae*. В качестве субстратов были использованы ДНК эритроцитов цыпленка, РНК *Eischerichia coli* (фирма «Реанал», ВНР), ДЭАЭ—целлюлоза ДЭ-32 фирмы «Ватман» (Англия), трис-фирмы «Реанал».

Нуклеазную активность определяли по Вогту [5] в инкубационной среде, содержащей 150 мкг РНК или депатурированную нагреванием ( $100^\circ$ , 15 мин) ДНК в присутствии 0,03 М ацетатного буфера, рН 4,6, 0,05 М NaCl, 1 мМ ZnSO<sub>4</sub>, 5% глицерина. Пробы инкубировали в течение 10 мин при  $45^\circ$ , реакцию останавливали 10% хлорной кислотой. В надосадочной фракции определяли степень расщепления субстрата спектрофотометрически при длине волны 260 нм. За одну единицу ферментативной активности принимали то количество фермента, которое катализировало образование 10 мкг мононуклеотидов в течение 10 мин при  $45^\circ$ . Пересчет производили по коэффициенту молярной экстинкции субстрата.

Неспецифическую ДНК-азную активность определяли по методу Вогта [5], концентрацию белка—по Лоури [6].

*Результаты и обсуждение.* В табл. 1 представлена схема очистки фермента.

*Экстракция.* 4 г неочищенного амилоризинового порошка растворяли в 200 мл буфера-1, состоящего из 0,02 М ацетата натрия, рН 4,6, 0,1 мМ ZnSO<sub>4</sub>, 0,05 М NaCl и 5% глицерина. После перемешивания на магнитной мешалке в течение часа материал центрифугировали (10 мин при 10.000 g), а затем рН надосадочной жидкости уксусной кислотой доводили до 5,0.

*Нагревание.* Полученную надосадочную фракцию нагревали до  $70^\circ$  в водяной бане в течение 10 мин и быстро охлаждали до  $4^\circ$ , затем дважды центрифугировали при 10.000 g в течение 10 мин. Нуклеаза

Таблица 1

## Схема очистки фермента

Этапы очистки	Объем, мл	Белок, мг	Число единиц активности, килоединицы	Удельная активность, ед./мкг	Степень очистки	Выход, %
Экстракт	200	970	181	0,18	(1)	100
Нагрев	188	479	109	0,23	1,3	60
Фракционирование сульфатом аммония	60	24	55	2,3	13	30
Хроматография на ДЭАЭ — целлюлозе	40,6	5,4	35,6	6,7	36,7	19
Рехроматография на ДЭАЭ — целлюлозе	35	2,2	33,1	15	83	18

S<sub>1</sub> выдерживает кратковременное нагревание до 70° при pH 5,0, без заметной потери активности.

*Фракционирование сульфатом аммония.* Надосадочную фракцию доводили до 200 мл буфером-1 и насыщали перекристаллизованным сухим сульфатом аммония до 97,2% насыщения.

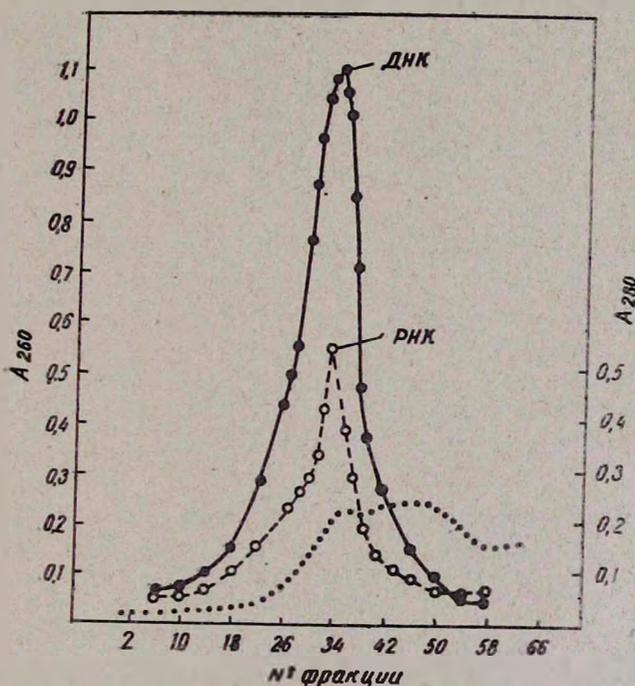


Рис. 1. Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. ●—●— степень расщепления денатурированной ДНК, ○—○— степень расщепления РНК, .....— содержание белка.

После одного часа перемешивания при 4° раствор центрифугировали в течение 10 мин при 10.000 g. К надосадочной фракции добавляли 40 г кристаллического сульфата аммония. Смесь перемешивали в

течение 3 час. при 4°, затем центрифугировали 10 мин при 10.000 g. Коричневый осадок растворяли в 50 мл буфера-2, состоящего из 0,02 M триса, pH 7,5, 0,05 M NaCl, 0,1 mM ZnSO<sub>4</sub> и 5% глицерина. Полученный раствор подвергали диализу против буфера-2 в течение ночи при 4°.

*Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе.* Диализованный раствор фермента наносили на колонку (1,6 см×20 см) ДЭАЭ-целлюлозы, уравновешенную буфером-2, со скоростью 15 мл в час; после нанесения материала колонку промывали 200 мл буфера-2. Ферментативную активность элюировали 400 мл линейного градиента NaCl в диапазоне 0,05—0,35 M в буфере-2. Как видно из рис. 1, нуклеазная активность элюировалась во фракциях, содержащих NaCl в концентрации около 0,02 M, которые объединяли и подвергали диализу в течение ночи против буфера-2 при 4°. Диализованный материал повторно наносили на свежее уравновешенную буфером-2 колонку ДЭАЭ-целлюлозы (1,6 см×10 см) и элюировали 400 мл линейного градиента NaCl, в диапазоне 0,05—0,35 M в буфере-2 (рис. 2). Активные нуклеазные фракции объ-

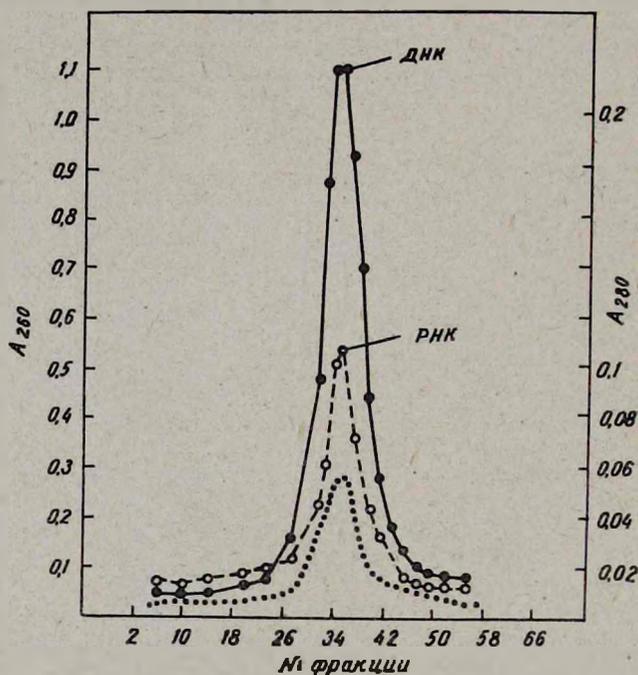


Рис. 2. Рехроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. ●—●— степень расщепления денатурированной ДНК. ○—○— степень расщепления РНК. . . . . — содержание белка.

единяли и подвергали диализу против буфера-2 при 4° в течение ночи. К полученному после диализа материалу прибавляли равный объем глицерина и хранили при температуре —18°.

Ферментный препарат, полученный указанным выше способом, очищен в 83 раза с выходом общей активности 18%.

Аналогичный фермент—нуклеаза S<sub>1</sub>,—выделенный впервые Андо [1] из грибов *Aspergillus oryzae*, был очищен в 1000 раз с выходом общей активности 3%. Последующая очистка методом Вогта [5] имела более высокую степень чистоты с хорошим выходом общей активности (около 27%). Нами несколько модифицирован и упрощен способ получения фермента: хроматография на сульфо-сефадексе и гель-фильтрация на колонке с сефадексом Г-100 заменена рехроматографией на колонке ДЭАЭ-целлюлозой без особого ущерба для чистоты препарата фермента. С другой стороны, при высокой субстратной специфичности фермента к однонитевым ДНК наш препарат полностью свободен от неспецифичной ДНК-азной активности (табл. 2).

Таблица 2  
Субстратная специфичность фермента на этапах очистки

Этапы очистки	Нативная ДНК			Денатурированная ДНК		
	оптическая плотность	число единиц	удельная активность, ед/мг	оптическая плотность	число единиц	удельная активность, ед/мг
Экстракт	1,8	78.560	0,08	1,11	80.000	0,08
Нагрев	0,122	8.360	0,017	0,185	12.800	0,03
Фракционирование сульфатом аммония	0,028	500	0,02	0,088	1760	0,06
Хроматография на ДЭАЭ — целлюлозе	0,007	0	0	0,046	206	0,09
Рехроматография на ДЭАЭ — целлюлозе	0,007	0	0	0,062	286	0,04
Контроль	0,007	—	—	0,027	—	—

Неспецифическую нуклеазную активность определяли в буфере (0,02 М трис, рН 7,5, 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 0,05 М NaCl).

Инкубацию проводили в течение 10 мин при 45°, за одну единицу неспецифичной ДНК-азной активности принимали то количество фермента, которое необходимо для образования 10 мкг мононуклеотидов.

Оптимум рН ферментного препарата, выделенного нами из грибов *Asp. oryzae*, варьирует в пределах 3,9—4,1, половина максимальной активности тестируется при рН 2,7 и 5,6, что согласуется с данными, полученными Вогтом.

Данные зонального электрофореза в полиакриламидном геле свидетельствуют о том, что ферментный препарат является высокоочищенным.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 20.V 1977 г.

Ռ. Ե. ԱՐԲԱՄՈՎ, Խ. Օ. ՔԵԶԻՐՉՅԱՆ, Ժ. Ի. ՀԱԿՈՔՅԱՆ

S<sub>1</sub> ՆՈՒԿԼԵԱԶԻ ՄԱՔՐՈՒՄԸ ASPERGILLUS ORYZAE ՍԵԿՆԻՐՑ  
ՍՍՏՅՎԱԾ ԱՄԻՈՐԻԶԻՆԻՑ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հոդվածում նկարագրվում է S<sub>1</sub> նուկլեազի մաքրման վերադրված և պարզեցված եղանակը *Aspergillus oryzae* սնկերից ստացված, հայրենա-

կան արտադրութեան ամիլորիզինային փոշուց: Մաքրման շրջան աստիճանները ֆերմենտային պատրաստուկը մաքրում են մոտ 83 անգամ, ակտիվութեան ընդհանուր ելքը՝ մոտ 18% է: Ֆերմենտը բացարձակ սպեցիֆիկ է մեկ շղթայանոց նուկլեինային թթուների նկատմամբ: Այն քայքայում է  $\alpha$ -ԴՆԲ-ն,  $\alpha$ -ԴՆԹ-ն: Օպտիմում pH-ը ընկած է 3,9—4,1 միջև:

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Ando T.* Biochem. Biophys. Acta, 114, 158, 1966.
2. *Sutton W. D.* Biochem. Biophys. Acta, 240, 522, 1971.
3. *William E. Hahn et al.* Nucleic Acids Research., 3, 5, 1976.
4. *Wiegand R. C. et al.* J. Biol. Chem., 250, 22, 1975.
5. *Vogt V. M.* Eur. J. Biochem., 33, 1, 1973.
6. *Lowry O. H. et al.* J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.