



УДК 577.413.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА тРНК₂^{Leu} МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КОРОВ.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
ПИРИМИДИЛ-РНКАзНОГО ГИДРОЛИЗАТА

тРНК₂^{Leu} МИКРОСПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Тукало М. А., Васильева И. Г., Мацука Г. Х.

Институт молекулярной биологии и генетики Академии наук УССР, Киев

Бласов В. В.

*Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР*

С использованием микроспектрофотометрических методов определена последовательность оснований в олигонуклеотидах пиримидил-РНКАзного гидролизата тРНК₂^{Leu} молочной железы коров. Разделение олигонуклеотидов проводили микроколоночной хроматографией на DEAE-целлюлозе при pH 7,5 и 3,7, а также на дауэксе 1×2 в формиатной системе. Нуклеотидный состав определяли гидролизом Т₂-РНКАзой с последующим разделением нуклеотидов на микроколоночке с АС 1×8. Нуклеозиды разделяли на аминексе А-6 при pH 9,7. Минорные компоненты идентифицировали после гидролиза соответствующих олигонуклеотидов нуклеазами по подвижности и УФ-спектрам. Строение олигонуклеотидов устанавливали с помощью концевой анализа, гидролиза Т₁-РНКАзой и посредством неполного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда.

В наших предыдущих работах были представлены данные по изменению спектра изоакцепторных лейциновых тРНК в результате изменения функционального состояния молочной железы коров [1], разработан хроматографический метод выделения некоторых изоакцепторных тРНК^{Leu} [2] и установлена первичная структура одной из этих изоакцепторных тРНК — тРНК₂^{Leu} [3]. Данная статья посвящена подробному описанию исследования олигонуклеотидов пиримидил-РНКАзного гидролизата тРНК₂^{Leu} с использованием разработанного нами микроспектрофотометрического варианта блочного метода.

В основе микроспектрофотометрического варианта блочного метода для исследования первичной структуры тРНК лежит применение в качестве детектора приставки МСФП-3 и оборудования для микроколоночной хроматографии, созданных в Новосибирском институте органической химии [4]. Ранее этими методами на данном приборе была решена частная и сравнительно простая задача — идентификация олигонуклеотидов тРНК известного строения [5]. Применение микроспектрофотометрии для исследования тРНК с неизвестной первичной структурой потребовало разработки ряда методических приемов и накопления новых данных, позволяющих решать поставленную задачу.

Стратегия расщипровки первичной структуры тРНК основывалась на классическом блочном принципе. В свою очередь на каждом этапе необходимо было решить более конкретные задачи: разделить олигонуклеотиды и их обессолить, определить нуклеотидный состав олигонуклеотидов и их структуру и т. д. Хотя большинство обычных методов структурного анализа может быть выполнено в микромасштабе без принципиальных изменений, необходимо было оптимизировать хроматографические процедуры, подобрать ионообменники, пригодные для микроколоночной хроматографии.

Для первичного фракционирования олигонуклеотидов пиримидил-РНКАзного гидролизата тРНК₂^{Leu} использовали систему Томлинсона — Те-

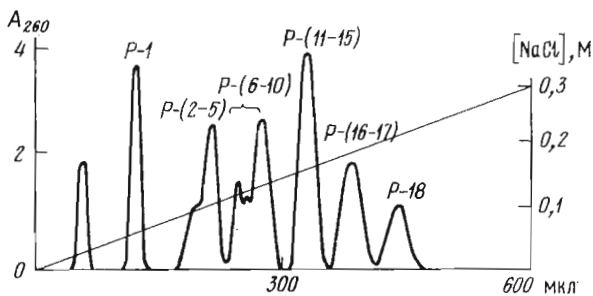


Рис. 1. Хроматография исчерпывающего пиримидил-РНКазного гидролизата $tRNA_2^{Leu}$ из молочной железы коров (0,3 OE_{260}) на DEAE-целлюлозе (колонка 0,5×50 мм). P-1, P-(2-5), P-(6-10), P-(11-15), P-(16-17), P-18 — объединенные фракции, содержащие соответственно моно-, ди-, три-, тетра-, пента- и гексануклеотиды

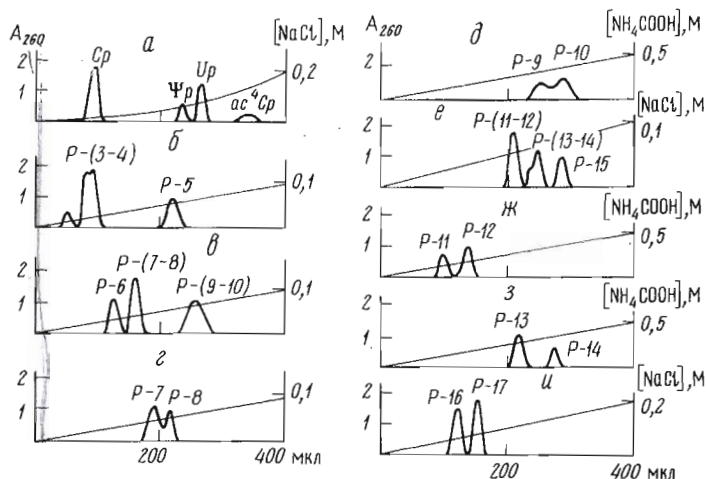


Рис. 2. Рехроматография объединенных фракций рис. 1: а — P-1, АГ 1×8, колонка 0,5×20 мм; б, в — P-(2-5) и P-(6-10), DEAE-целлюлоза, 7 М мочевины, pH 3,7, колонка 0,5×40 мм; г, д — дополнительная хроматография фракций P-(7-8) и P-(9-10) рис. в, дауэкс 1×2, формидная система, колонка 0,5×150 мм; е — P-(11-15), условия как в б и в; ж, з — дополнительная хроматография фракций P-(11-12) и P-(13-14), условия как в г и д; и — P-(16-17), условия как в б и в

нера на DEAE-целлюлозе в 7 М мочевины [5]. Было установлено, что оптимальными являются колонки объемом 7–10 мл (0,5×50 мм) в случае 0,05–0,3 OE_{260} наносимого материала и колонки объемом 30 мл (0,8×60 мм) — в случае 1–3 OE_{260} наносимого материала. Увеличение размеров колонок при той же нагрузке незначительно улучшает эффективность разделения олигонуклеотидов, но при этом увеличивается неспецифическая сорбция некоторых олигонуклеотидов (например, GGAGGm⁵Cp).

На рис. 1 представлены результаты фракционирования олигонуклеотидов пиримидил-РНКазного гидролизата $tRNA_2^{Leu}$ из молочной железы коров. Удовлетворительное разделение с записью поглощения элюата по пяти-шести длинам волн достигается за 5 ч. Если запись проводить по двум-трем длинам волн, то хроматографию можно осуществить за 2,5 ч.

Рехроматографию изоплитов, т. е. олигонуклеотидов одинаковой длины, но разного состава, проводили на DEAE-целлюлозе при pH 3,7 в 7 М мочевины (рис. 2). Для этого использовали колонки объемом 5–10 мл. Комбинация двух хроматографий на DEAE-целлюлозе при pH 7,5 и 3,7 позволяет получить большинство олигонуклеотидов в индивидуальном состоянии. О гомогенности пиков можно было судить по спектральным отношениям, а также по количеству олигонуклеотида.

Для разделения нескольких особенно близких по свойствам олигонуклеотидов мы использовали другие хроматографические системы. Среди них наиболее приемлемыми оказались хроматографические системы с примене-

Данные по определению состава и последовательности оснований в олигонуклотидах
 полного пиримидил-РНКазного гидролизата
 $\text{тРНК}_2^{\text{Leu}}$

Фракция	Моно- или олигонуклеотид	Метод расщепления	Продукты гидролиза (соотношение, моль/моль)
P-1	Мононуклеотиды		Cp, Up, Ψ p, ac ⁴ Cp (15,0 : 5,0 : 1,8 : 1,0)
P-2	ACp	ФДЭ, ФМЭ	A, C (1,0 : 0,9)
P-3	m ² G Cp	То же	m ² G, C (1,0 : 1,1)
P-4	GCp	»	G, C (1,0 : 1,1)
P-5	GUp	»	G, U (1,0 : 1,0)
P-6	GACp	»	A, G, C (1,0 : 1,0 : 1,1)
P-7	Gm ¹ AAUp	T ₁ -РНКаза T ₂ -РНКаза T ₁ -РНКаза	Gp, ACp Gp, Ap, Up (1,0 : 0,9 : 1,0) Gp, m ¹ AAUp
P-8	Gm ² GCp	ФДЭ, ФМЭ То же Концевой анализ	G, A, U, m ² A G, m ² G, C (1,1 : 0,9 : 1,0) G
P-9	GGDp	T ₂ -РНКаза 0,1 н. КОН T ₂ -РНКаза	Gp Dp Gp, UmUp
P-10	GUmUp	ФДЭ, ФМЭ	U
P-11	UmUp* GAGCp	То же T ₁ -РНКаза Концевой анализ	A, C, G (1,0 : 1,0 : 1,8) Gp, AGp, Cp G
P-12	AGp* AGUmCp	ФДЭ, ФМЭ То же T ₁ -РНКаза	A, G (1,0 : 0,9) A, G, Um, C (0,8 : 1,0 : 1,0 : 1,0) AGp, UmCp
P-13	AGm ¹ GNp	ФДЭ, ФМЭ T ₁ -РНКаза T ₂ -РНКаза	A, G, m ¹ G (1,1 : 1,0 : 1,2) AGp, m ¹ GNp Ap, m ¹ Gp, Np
P-14	pGUp	ФДЭ, ФМЭ T ₂ -РНКаза	G, U pGp, Up
P-15	GGGTp	ФДЭ, ФМЭ	G, T (2,9 : 1,0)
P-16	AAGGCp	То же T ₁ -РНКаза	G, A, C (1,7 : 1,7 : 1,0) Gp, Cp
P-17	AAGp* AGm ² GAUp	Концевой анализ T ₂ -РНКаза ФДЭ, ФМЭ T ₁ -РНКаза	Тринуклеотид A Ap, Gp (2,2 : 1,0) A, G, m ² G, U (1,9 : 1,0 : 1,3 : 1,3) m ² Gp, AGp, AUp
P-18	GGAGGm ⁵ Cp	Концевой анализ ФДЭ, ФМЭ	A A, G, m ⁵ C (1,5 : 3,7 : 1,0) GG, GGA, GGAG, GGAGG, GGAGGm ⁵ Cp
	GGAp* GGAGp*	Неполный гидролиз ФДЭ T ₂ -РНКаза T ₂ -РНКаза	Ap, Gp (1,0 : 2,0) Ap, Gp (1,0 : 3,0)

* Олигонуклеотиды, полученные в результате расщепления исходного олигонуклеотида пиримидил-РНКазного гидролизата и подвергнутые дальнейшему анализу.

нием дауэкса 1×2 в формиатной форме [6, 7]. С помощью последней удалось разделить все олигонуклеотиды пиримидил-РНКазного гидролизата $\text{тРНК}_2^{\text{Leu}}$, которые не разделялись на DEAE-целлюлозе при pH 3,7 (рис. 2). При использовании пологого градиента удалось разделить даже такие близкие по строению тринуклеотиды, как GGDp и GUmUp (рис. 2, 3б). Правда, в этом случае применяли колонку довольно большой длины (до 20 см) и хроматографию вели на малой скорости (75 км/ч).

Пиримидил-РНКазный гидролизат $\text{тРНК}_2^{\text{Leu}}$, таким образом, дает смесь, состоящую из 23 мононуклеотидов, шести динуклеотидов, четырех тринуклеотидов, пяти тетра- и пентануклеотидов, двух гексануклеотидов, одного гексануклеотида и одного динуклеозидтрифосфата (таблица).

Количество препарата тРНК , необходимое для определения ее первичной структуры блочным методом, в основном зависит от чувствительности

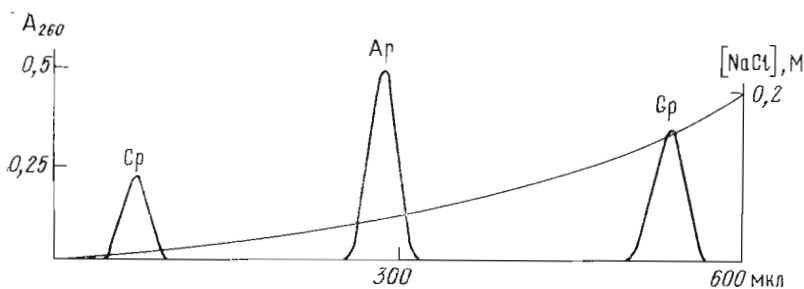


Рис. 3. Хроматография Т₂-РНКазного гидролизата пентануклеотида ААGGSр (P-16) на дауэксе AG 1×8 в градиенте концентраций NaCl [8]. Колонка 0,5×20 мм, скорость элюции 75 мкл/ч

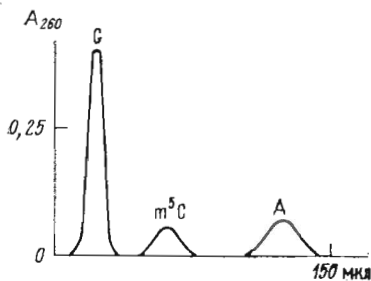


Рис. 4

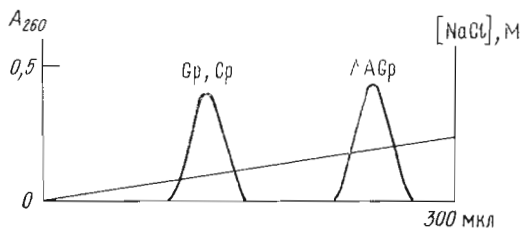


Рис. 5

Рис. 4. Хроматография фосфодиэстеразного гидролизата (в присутствии ФМЭ) олигонуклеотида GGAGGm⁵Cp (P-18) на аминоксе А-6. Колонка 0,8×180 мм. Элюцию проводили 0,02 М бикарбонатом аммония, рН 9,8, скорость 75 мкл/ч

Рис. 5. Анализ продуктов гидролиза олигонуклеотида ААGGSр Т₁-РНКазой с помощью фракционирования на DEAE-целлюлозе в системе Томлинсона – Тенера, рН 7,5. Колонка 0,5×50 мм. Скорость элюции 75 мкл/ч, объем элюента 600 мкл, градиент NaCl от 0 до 0,3 М

метода определения состава оснований в олигонуклеотиде. Поэтому были подобраны хроматографические системы, обеспечивающие высокую чувствительность и эффективное разрешение нуклеозидов и нуклеотидов с использованием различных микросферических аналогов дауэкса 1×8.

Эффективной системой для разделения нуклеозид-2' (3')-монофосфатов, включая минорные компоненты, оказалась предложенная нами ранее хроматография на дауэксе 1×8 с использованием градиента соляной кислоты и хлорида натрия [8]. Пример ее использования представлен на рис. 3.

Высокое разрешение нуклеозидов было достигнуто в системе ионного исключения на аминоксе А-6 при рН 9,8 [9]. В этой системе нам удалось разделить практически все минорные компоненты, которые встречались при расшифровке структуры олигонуклеотидов пириимидил-РНКазного гидролизата тРНК₂^{Leu}. В качестве примера на рис. 4 приведен профиль разделения нуклеозидов, полученных при гидролизе гексануклеотида GGAGGm⁵Cp.

Последовательность нуклеотидов в олигонуклеотидах определяли по совокупности данных, получаемых тремя основными методами, модифицированными нами применительно к ультрамикромасштабу: концевым анализом, гидролизом нуклеазами дополнительной специфичности и неполным гидролизом фосфодиэстеразами.

Для концевого анализа использовали способность фосфодиэстеразы змеиного яда (ФДЭ) при рН 6,0 и высокой концентрации фермента гидролизовать олигонуклеотид без предварительного дефосфорилирования его 3'-конца, что упрощало процедуру анализа. В результате такого гидролиза 5'-концевой фрагмент получали в виде нуклеозида, который идентифицировали при помощи хроматографии на аминоксе А-6 по подвижности и УФ-спектрам.

При гидролизе олигонуклеотидов РНКазами дополнительной специфичности идентификация полученных продуктов значительно облегчалась благодаря наличию спектральных отношений, которые получали из данных по автоматической записи поглощения элюата по нескольким длинам волны в процессе хроматографии. При гидролизе, например, пентауклеотида ААГГСр T_1 -РНКазой образуются мононуклеотиды Гр и Ср и тринуклеотид ААГр, который легко идентифицировать по спектральным отношениям и подвижности в данной хроматографической системе (рис. 5). Если описанные выше методы не давали возможности установить структуру олигонуклеотида, использовался метод неполного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда (ФДЭ).

Для неполного гидролиза олигонуклеотидов ферменты ФДЭ и фосфомоноэстеразу (ФМЭ) иммобилизовали на сефарозе 4В. Варьировали концентрацию субстрата и время гидролиза, которое регулировали скоростью пропускания раствора через колонки, относительно легко получали удовлетворительный для структурного анализа неполный гидролиз олигонуклеотида.

Количество материала, необходимое для установления структуры олигонуклеотида, зависит от используемого метода. Для конечного анализа и гидролиза РНКазами дополнительной специфичности необходимо 0,005—0,01 OE_{260} олигонуклеотида. В случае неполного гидролиза ФДЭ с идентификацией продуктов гидролиза по спектральным отношениям необходимо такое же количество вещества. Когда же идентификацию проводили путем определения нуклеотидного состава каждого фрагмента, получаемого при неполном гидролизе олигонуклеотида, в опыт брали 0,01—0,02 OE_{260} вещества.

При определении структуры олигонуклеотидов на всех стадиях работы проводилась автоматическая запись спектральных характеристик продуктов гидролиза.

Основные результаты, не требующие дополнительных разъяснений, суммированы в таблице. Приводимые ниже комментарии относятся лишь к олигонуклеотидам, содержащим минорные компоненты, либо к олигонуклеотидам, содержащим минорные компоненты, либо к олигонуклеотидам достаточно большой длины.

Пик Р-7 (Gm^1AAUp). При T_2 -РНКазном гидролизе олигонуклеотида Р-7 и разделении нуклеотидов на колонке с АГ 1×8 были обнаружены нуклеотиды Ср, Ар и Ур в молярных соотношениях 1,0 : 0,9 : 1,0. При этом спектральные отношения всех трех нуклеотидов свидетельствовали о том, что они не относятся к минорным нуклеотидам. Высокая же подвижность олигонуклеотида Р-7 на ДЕАЕ-целлюлозе при рН 7,5 свидетельствовала о наличии в его составе дополнительного положительного заряда. Это было подтверждено при проверке нуклеозидного состава олигонуклеотида Р-7 хроматографией на аминксе А-6. Был обнаружен нуклеозид N^6 -метиладенозин, который, как известно, образуется в щелочной среде из N^1 -метиладенозина [10].

Для установления последовательности нуклеотидов в этом тетрауклеотиде его подвергали гидролизу T_1 -РНКазой, а продукты гидролиза разделяли на ДЕАЕ-целлюлозе при рН 7,5 в 7 М мочевице. В результате был получен мононуклеотид Гр и тринуклеотид m^1AAUp . Следовательно, структура олигонуклеотида — Gm^1AAUp .

Пик Р-9 ($GGDp$). Спектральные отношения для олигонуклеотида Р-9 были близки к спектральным отношениям гуанозин-2' (3')-фосфата. При определении нуклеотидного и нуклеозидного составов были обнаружены только гуанозин и гуанозин-2' (3')-фосфат. Характерное падение поглощения олигонуклеотида Р-9 при 235 нм в 0,1 М КОН [11] свидетельствовало о наличии дигидроуридиловой кислоты в составе олигонуклеотида. Из полученных данных однозначно следует структура тринуклеотида Р-9: $GGDp$.

Пик Р-10 ($GUmUp$). При гидролизе олигонуклеотида Р-10 T_2 -РНКазой и последующей хроматографии на колонке с АГ 1×8 обнаружили гуаниловую кислоту и динуклеотид со спектральными отношениями, близкими

к таковым для уридиловой кислоты. Гидролиз этого динуклеотида ФДЭ в присутствии ФМЭ даст только уридин. Мы предположили, что один из уридинов в этом динуклеотиде, занимающий 5'-концевое положение, является метилированным по рибозе, а значит, эта связь устойчива при гидролизе T_2 -РНКазой, в то время как ФДЭ ее гидролизует. Наши предположения подтвердились при изучении олигонуклеотидов T_1 -РНКазного гидролизата $tRNK_2^{Leu}$. Таким образом, структура данного тринуклеотида — GUmUp.

Пик P-13 (AGm'GNp). При гидролизе фракции P-13 (рис. 2з) T_2 -РНКазой получали нуклеотиды Ap, m'Gp, Np и набор неидентифицированных продуктов. Часть из этих продуктов могут представлять m'G>p и m'GNp, так как известно, что T_2 -РНКаза плохо гидролизует олигонуклеотиды, содержащие метилированные производные гуанина.

Неизвестный минорный нуклеотид Np имеет следующие спектральные отношения, определенные при pH 2,0: $A_{250}/A_{260}=0,96$; $A_{270}/A_{260}=0,88$; $A_{280}/A_{260}=0,74$; $A_{290}/A_{260}=0,43$. Когда же олигонуклеотид P-13 гидролизовали ФДЭ в присутствии ФМЭ, получали нуклеозиды A, G, m'G. Нуклеозид N не удалось обнаружить. Возможно он деградирует при щелочном значении pH. Таким образом, нуклеотид Np остается неидентифицированным.

В результате гидролиза олигонуклеотида P-13 T_1 -РНКазой получили два динуклеотида — AGp и m'GNp, что давало возможность определить структуру тетрапуклеотида как AGm'GNp.

Экспериментальная часть

Реактивы: DEAE-целлюлоза (DEAE 23SS, Serva, ФРГ), емкость 0,6 мг-экв/г; дауэкс 1×2 (Serva, ФРГ) для микроколонок с размером зерен 10—30 мкм, получен фракционированием в аппарате Гамильтона [12]; дауэкс AG 1×8, аминоксы А-6, А-7 и А-28 (Bio-Rad, США). Ионообменник, аналог дауэкса 1×8, с диаметром гранул 12 ± 2 мкм любезно предоставлен д-ром Л. Арлингером (ЛКВ, Швеция). RPC-5 готовили согласно [13]. Сефароза 4В — препарат фирмы Pharmacia (Швеция). Мочевина — квалификации ос.ч. 7 М раствор мочевины имел нейтральное значение pH и нулевую оптическую плотность после очистки на колонке с DEAE-целлюлозой.

Нуклеазы: панкреатическая РНКаза (КФ 3.1.27.5, Worthington, США), T_1 -РНКаза и T_2 -РНКаза (КФ 3.1.27.3 и КФ 3.1.27.4, Sankyo Co, Япония), щелочная фосфатаза из *E. coli* (ФМЭ) (КФ 3.1.3.1) и фосфоэстераза змеиного яда (ФДЭ) (КФ 3.1.4.1) — фирмы Worthington (США). ФМЭ и ФДЭ, иммобилизованные на сефарозе 4В, получены В. К. Райтом и Ф. Ф. Димитровой (НИС Новосибирского государственного университета).

Выделение $tRNK_2^{Leu}$. Суммарную $tRNK$ из лактирующей молочной железы коров выделяли как описано ранее [2]. Препарат $tRNK_2^{Leu}$ 90% чистоты получали из суммарной $tRNK$, используя ряд последовательных хроматографий: на сефарозе 4В в обратном градиенте сульфата аммония, на RPC-5 при pH 4,5, на RPC-5 при pH 7,5 и на RPC-5 в 7 М мочеvine при pH 3,3 или на аминоксе А-28 [2].

Гидролиз $tRNK$ панкреатической РНКазой (пиримидил-РНКазой) вели 4 ч в 0,01 М трис-НСl, pH 7,5, при 37° С в конических микропробирках. В 30 мкл реакционной смеси содержалось 0,3—1 OE_{260} $tRNK$ и 0,6—2 мкг пиримидил-РНказы.

Гидролиз олигонуклеотидов T_1 -РНКазой. Обессоленные олигонуклеотиды пиримидил-РНКазного гидролизата $tRNK_2^{Leu}$ гидролизовали 3 ч при 37° С в 30 мкл 0,02 М трис-НСl-буфера, pH 7,5. T_1 -РНКазу добавляли из расчета 0,05 ед. акт. фермента на 0,05 OE_{260} олигонуклеотида.

Гидролиз олигонуклеотидов T_2 -РНКазой проводили 5 ч при 37° С в объеме 30 мкл в 0,01 М какодилате натрия, pH 6,0, в присутствии 0,13 ед. акт. фермента (из расчета на 0,01 OE_{260} олигонуклеотида).

Гидролиз олигонуклеотидов до нуклеозидов проводили смесью ФДЭ и ФМЭ. В 30 мкл 0,02 М $(NH_4)_2CO_3$, 0,001 М $MgCl_2$, pH 8,7, содержалось

0,01 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида, 0,02 ед. акт. ФДЭ и 0,01 ед. акт. ФМЭ. Гидролиз вели 13—15 ч при комнатной температуре. Затем гидрелизат высушивали под вакуумом.

Гидролиз олигонуклеотидов для концевого анализа. Предварительно обессоленный олигонуклеотид ((5—8)·10⁻³ ОЕ₂₆₀) растворяли в 30 мкл раствора 0,01 М какодилата натрия и 2,5 мМ MgCl₂, рН 5,8. К смеси добавляли 0,06 ед. акт. ФДЭ и вели гидролиз 2—3 ч при 37° С. Гидролизат высушивали под вакуумом.

Фракционирование олигонуклеотидов пиридил-РНКазного гидролизата тРНК₂^{Leu}. Нанесение гидролизата на колонку производили со скоростью 300—600 мкл/ч. Первичную хроматографию гидролизата вели обычно при рН 7,5 в буфере 0,01 М трис-НСl — 7 М мочевины, в градиенте концентрации NaCl (рис. 1). В ходе элюции вели запись поглощения элюата при 250, 260, 270, 280, 290 нм. По ходу хроматографии собирали объединенные фракции. Для рехроматографии фракции разбавляли 7 М мочевиной в 5—10 раз.

Рехроматографию олигонуклеотидов проводили на DEAE-целлюлозе в 7 М мочевины, рН 3,7 (рН доводили муравьиной кислотой), в градиенте концентрации NaCl, объем элюента 400 мкл (рис. 2).

Разделение близких по свойствам олигонуклеотидов осуществляли рехроматографией на дауксе 1×2 в формиатной форме. Колонки размерами 0,5×150 или 0,5×250 мм переводили в формиатную форму последовательной промывкой 4 М муравьиной кислотой, 2 М формиатом аммония и водой. Обессоленные олигонуклеотиды, растворенные в воде, наносили на колонку со скоростью 300 мкл/ч. Элюцию осуществляли сначала градиентом концентрации муравьиной кислоты (0—4 М), объемом 400 мкл со скоростью 75 мкл/ч, затем градиентом концентрации формиата аммония (0,0—0,5 М) в 4 М муравьиной кислоте, объемом 400 мкл.

Обессоливание олигонуклеотидов после хроматографии проводили на микроколонках с DEAE-целлюлозой. Перед нанесением на колонку фракцию, содержащую олигонуклеотид, разбавляли 0,01 М ТЕАВ-буфером, рН 7,7, до конечной концентрации NaCl 0,02 М. Элюцию проводили 60 мкл 1,5 М ТЕАВ. Элюат высушивали под вакуумом.

Нуклеотидный и нуклеозидный анализ олигонуклеотидов. Нуклеотидный состав олигонуклеотидов определяли с помощью гидролиза T₂-РНКазой и хроматографии на анионообменнике AG 1×8 в хлоридной системе [8]. Состав нуклеозидов определяли посредством гидролиза смесью ФДЭ и ФМЭ с последующей хроматографией на аминексе А-6 [14]. Значение коэффициентов молярного поглощения для нуклеозидов брали из работы [9].

Неполный гидролиз олигонуклеотидов с помощью ФДЭ змеиного яда. Гидролиз проводили с использованием иммобилизованных ФДЭ и ФМЭ. Препараты иммобилизованной на ВгCN-сефарозе 4В ФДЭ (78 ед. акт. мл) и ФМЭ *E. coli* (7,3 ед. акт. мл) были упакованы в колонки: 1) с ФМЭ объемом 10 мкл, 2) с ФДЭ объемом 2—3 мкл и 3) с ФМЭ объемом 3—5 мкл. В такой последовательности колонки соединяются в единую систему и перед работой промываются 200—300 мкл раствора 0,02 М (NH₄)₂CO₃ (рН 8,7) со скоростью 600 мкл/ч. Гидролиз проводили при 20° С пропусканием 60 мкл 0,02 М (NH₄)₂CO₃, содержащего 0,02 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида, со скоростью 300—600 мкл/ч. Гидролизат разводили в 2 раза 7 М мочевиной и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой. Хроматографию осуществляли в градиенте концентрации NaCl (0—0,3 М) в 7 М мочевины. Пики собирали, обессоливали и проводили нуклеозидный анализ.

В ряде опытов использовали сочетание гидролиза ФМЭ в растворе с гидролизом ФДЭ, иммобилизованной на колонке. Дефосфорилирование олигонуклеотидов проводили 1 ч при 37° С в 60 мкл раствора 0,02 М (NH₄)₂CO₃, содержащего 10⁻³ ед. акт. ФМЭ. Неполный гидролиз олигонуклеотидов осуществляли на колонках с иммобилизованной ФДЭ в условиях, описанных выше. Затем проводили дефосфорилирование продуктов, образующихся при гидролизе, так как мононуклеотиды имеют одинаковую хроматографическую подвижность на DEAE-целлюлозе с тринуклеозид-

дифосфатами, что затрудняет анализ. Для этого в гидролизат добавляли ФМЭ и гидролиз вели 1 ч при 37° С. Затем гидролизат наносили на DEAE-целлюлозную колонку и хроматографировали.

Мы приносим благодарность акад. Д. Г. Кнорре за постоянную поддержку и внимание к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Elska A. V., Matsuka G. Kh.* Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 247, № 1, p. 430-434.
2. *Коваленко М. И., Желтовская Н. И., Елькая А. В., Тукало М. А., Мацука Г. Х.* В кн.: Методы молекулярной биологии. Киев: Наукова думка, 1979, с. 98-110.
3. *Тукало М. А., Власов В. В., Васильченко И. Г., Мацука Г. Х., Кнорре Д. Г.* Докл. АН СССР, 1980, т. 253, № 1, с. 253-256.
4. *Грачев М. А.* В кн.: Ультрамикроанализ нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1973, с. 104-122.
5. *Власов В. В., Грачев М. А., Комарова Н. И., Кузьмин С. В., Мензорова Н. И.* Молекулярн. биология, 1972, т. 6, № 6, с. 808-816.
6. *Dozyagi S., Irouc J. J.* Mol. Biol., 1968, v. 243, № 3, p. 514-520.
7. *Аксельрод В. Д., Венкстерн Т. В., Баев А. А.* Биохимия, 1965, т. 30, № 5, с. 999-1004.
8. *Власов В. В., Меламед Н. В., Чижиков В. В., Тукало М. А.* Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 6, с. 892-897.
9. *Singhal R. P.* Arch. Biochem. and Biophys., 1972, v. 52, № 2, p. 800-810.
10. *Madison J. T., Everett G. A., Kung H.-K. J.* Biol. Chem., 1967, v. 242, № 6, p. 1318-1323.
11. *Bott R. D., Martin J. K., Ploesen J. M., Murray J. J.* Amer. Chem. Soc., 1954, v. 76, № 32, p. 3663-3665.
12. *Hamilton P. B.* Anal. Chem., 1958, v. 30, № 5, p. 914-919.
13. *Pearson R., Weiss S., Kelmets A.* Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 229, № 4, p. 770-774.
14. *Тукало М. А., Васильченко И. Г., Власов В. В.* В кн.: Методы молекулярной биологии. Киев: Наукова думка, 1979, с. 111-126.

Поступила в редакцию

19.IV.1983

После доработки

29.VI.1983

THE PRIMARY STRUCTURE OF tRNA₂^{Leu} FROM COW MAMMARY GLAND. STRUCTURE DETERMINATION FOR OLIGONUCLEOTIDES OF THE PANCREATIC RIBONUCLEASE DIGEST BY MICROSPECTROPHOTOMETRICAL METHODS

TUKALO M. A., VASIL'EVA I. G., MATSUKA G. Kh., VLASSOV V. V.

Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev; Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

tRNA₂^{Leu} from cow mammary gland has been degraded with pancreatic ribonuclease, and the fragments obtained were separated by DEAE-cellulose micro-column chromatography in 7 M urea at pH 7.5. Rechromatography was performed on a DEAE-cellulose micro-column at pH 3,7 and also on Dowex 1×2 in a formiate system. Nucleotide analysis was carried out with the aid of T₂-RNase hydrolysis followed by chromatography on anion-exchanger AG 1×8. Nucleosides were separated on Aminex A-6 at pH 9,8. 15 minor components were shown to be present: T, 2φ, 2Um, 2D, m⁵C, ac⁴C, m¹G, 2m²G, m²G, m¹A and N, the N is not identified so far. The structure of oligonucleotides was established by terminal analysis, hydrolysis with T₁-RNase and also using incomplete hydrolysis by the snake venom phosphodiesterase.