



УДК 577.152.6*513'134

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ РНК-ЛИГАЗЫ Т4.
ВЛИЯНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
МИНИМАЛЬНОГО АКЦЕПТОРА ФОСФАТА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ
МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ЛИГИРОВАНИЯ

Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М.

Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт
биологически активных веществ, г. Бердск

Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А.,
Женодарова С. М.

Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пущино Московской области

2'(3'),5'-Дифосфаты цитидина, уридина и аденозина и тринуклеозиддифосфаты типа NrCrC , NrCrU , NrUpC , NrUpU и ArNrC ($\text{N}=\text{U}, \text{C}, \text{A}, \text{G}$) были использованы как субстраты при изучении субстратной специфичности РНК-лигазы Т4. При одном и том же доноре фосфата результаты лигирования сильно зависят не только от нуклеотидного состава акцептора, но и от нуклеотидной последовательности. Влияние изменений в одном положении акцептора фосфата на эффективность межмолекулярного лигирования нельзя проследить независимо от остальных нуклеозидных остатков: для четырех исследованных серий акцепторов и rCr в качестве донора получены четыре различных соотношения между структурой нуклеозидного остатка, занимающего положение 3 в акцепторе, и эффективностью акцептора: $\text{C}>\text{A}>\text{U}>\text{G}$ (для NrCrC); $\text{G}>\text{U}\approx\text{A}>\text{C}$ (для NrCrU); $\text{A}>\text{U}>\text{C}>\text{G}$ (для NrUpC) и $\text{A}>\text{G}>\text{C}>\text{U}$ (для NrUpU). Выход продукта лигирования при одном и том же акцепторе фосфата в существенной степени зависит от структуры донора: пиримидиновые доноры фосфата более эффективны, чем аденозин-3',5'-дифосфат, и во всех изученных в настоящей работе случаях rCr был более эффективен, чем rUr .

РНК-лигаза Т4 (КФ 6.5.1.3) за 10 лет, прошедшие со времени ее открытия [1], стала незаменимым инструментом синтеза олигорибонуклеотидов с определенной нуклеотидной последовательностью, фрагментов и даже целых молекул тРНК [2—4]. Для рационального построения схемы синтеза необходимы сведения о субстратной специфичности РНК-лигазы, т. е. о тех требованиях, которые предъявляет фермент к структуре сшиваемых им субстратов. Известно, что выход в реакции межмолекулярного лигирования зависит от нуклеотидного состава донора и акцептора фосфата, однако эта информация была получена в основном на гомоолигомерных субстратах и только в последнее время для изучения субстратной специфичности стали использовать гетероолигонуклеотиды [5].

В настоящей работе начато систематическое исследование влияния нуклеотидного состава и последовательности акцептора фосфата на эффективность межмолекулярного лигирования. В качестве модельной была выбрана реакция между минимальным донором и минимальным акцептором. Донором фосфата служили 2'(3'),5'-дифосфаты цитидина, уридина и аденозина, а акцептором — тринуклеозиддифосфаты типа NrCrC , NrCrU , NrUpC , NrUpU и ArUpC ($\text{N}=\text{U}, \text{C}, \text{A}, \text{G}$). В качестве меры эффективности акцептора принимали выход тетра-нуклеотида. Реакцию проводили в стандартных условиях в течение 4 ч при 37°С, отношении [донор]/[акцептор] = 3 : 1 и концентрации фермента 1000 ед. акт./мл. Реакционные смеси анализировали хроматографией на DEAE-сефадексе в системе Топлинсона — Тенера (рис. 1) или микроколоночной хроматографией на сорбенте Partisol 10 SAX (рис. 2). Идентификацию продукта проводили по положению пика на кривой элюции и по нуклеотидному составу.

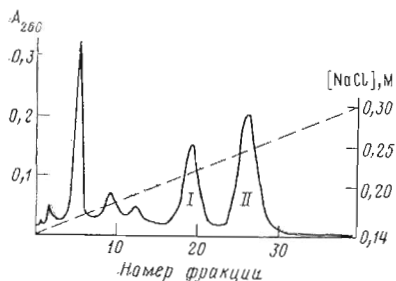


Рис. 1

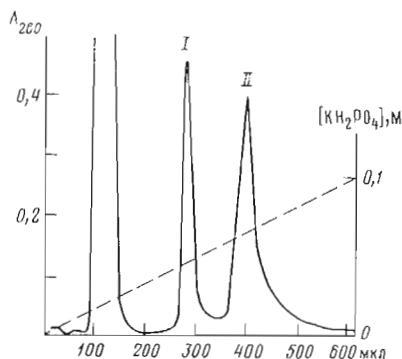


Рис. 2

Рис. 1. Разделение реакционной смеси, полученной при синтезе CrCrUpCr , на колонке ($0,9 \times 24$ см) с DEAE-сефадексом в системе Томлинсона — Генера: пик I — CrCrUpCr , пик II — CrCrUpCr

Рис. 2. Микроколоночная хроматография аликвоты реакционной смеси при синтезе ArUpUpCr на сорбенте Partisil 10 SAX: пик I — ArUpU , пик II — ArUpUpCr

В табл. 1 представлены результаты взаимодействия тринуклеозиддифосфатов серий NpCrC , NpCrU , NpUpC и NpUpU с pCr в присутствии РНК-лигазы. Анализ этих данных показывает, что влияние нуклеозида в положении 3* на выход тетрауклеотида довольно значительно и сильно зависит от двух других нуклеозидов. Оказалось, что в целом более высокие выходы получаются для серии NpUpU (исключение составляет UpUpU), в которой с 3'-конца имеются два уридиновых остатка. Таким образом, сделанный ранее [2] вывод о том, что присутствие U и тем более двух U в любом из трех положений с 3'-конца акцептора сильно снижает его эффективность, не подтверждается ни результатами работы [5], ни нашими данными. По-видимому, это связано с неоправданно поспешным обобщением данных, полученных на отдельных примерах, и приданием этому частному наблюдению значения общего вывода.

Из двух одинаковых по составу серий (NpCrU и NpUpC) более высокие выходы были получены для второй, что совпадает с литературными данными для ArArU и UpArA : выход ниже, если уридин находится на реагирующем 3'-конце [5].

Таким образом, изучение влияния занимающего положение 3 нуклеозидного остатка на эффективность акцептора показало, что для исследуемой в настоящей работе модельной реакции акцепторы с двумя уридиновыми остатками с 3'-конца более эффективны, чем акцепторы, имеющие в этом положении два остатка цитидина, но акцептор, несущий на 3'-конце CrU , менее эффективен, чем акцептор, у которого на 3'-конце UpC . При одном и том же доноре (pCr) результаты сильно зависят не только от нуклеотидного состава акцептора (NpCrC и NpUpU), но и от нуклеотидной последовательности (NpCrU и NpUpC). По-видимому, последнее будет справедливо для акцепторов любого состава, но какие-то общие закономерности в отношении предпочтительной структуры третьего нуклеозида в акцепторе (если это вообще возможно) могут быть установлены лишь на более обширном материале. Действительно, для четырех исследованных нами серий акцепторов и одного и того же донора pCr мы получили четыре различных соотношения между структурой нуклеозидного остатка, занимающего положение 3 в акцепторе, и эффективностью акцептора: $\text{C} > \text{A} > \text{U} > \text{G}$ (для NpCrC); $\text{G} > \text{U} \approx \text{A} > \text{C}$ (для NpCrU); $\text{A} > \text{U} > \text{C} > \text{G}$ (для NpUpC) и $\text{A} > \text{G} > \text{C} > \text{U}$ (для NpUpU).

В работе [5] для NpCrA и NpArU эти соотношения также не совпадали: $\text{C} > \text{A} > \text{U} > \text{G}$ и $\text{G} > \text{A} > \text{C}$ соответственно. Таким образом, «порядок предпочтительности» меняется в зависимости от двух других нуклеозидов.

* Для удобства обсуждения полученных результатов и сравнения их с литературными данными [5] нуклеозидные остатки в тринуклеозиддифосфатах-акцепторах мы обозначили цифрами от 1 до 3 в 3'→5'-направлении.

Влияние нуклеозида, занимающего положение 3 в акцепторе фосфата, на выход тетра nukлеотида при взаимодействии pCp с тринуклеозиддифосфатами типа NpCpC, NpCpU, NpUpC и NpUpU в присутствии РНК-лигазы T4

Акцептор	Выход тетра nukлеотида (%) за время реакции					Порядок изменения выхода
	0,5 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	
ApCpC	47	65	68	74	75	C>A≈U>G
GpCpC					48	
CpCpC					90	
UpCpC	70		70	70	72	
ApCpU	37	38	38	51	61	G>U≈A>C
GpCpU	72	74			69	
CpCpU					56	
UpCpU	53	60	62			
ApUpC	46	71	87	100	100	A>U>C>G
GpUpC	45	46	53	60		
CpUpC	40	46	49	64	64	
UpUpC	65	70	80			
ApUpU	49	78	83	87	91	A>G>C>U
GpUpU	26	38	67	79	80	
CpUpU					72	
UpUpU					44	

Отмеченная для последних двух серий более низкая реакционная способность акцепторов, склонных к образованию вторичной структуры (GpCpA и CpApU), не наблюдалась нами в случае ApUpU и ApUpC, которые сшиваются с pCp на 90—100% (табл. 1). Выход GpCpUpCp ниже (69%), но, по всей вероятности, что вызвано другими причинами, так как неспособный образовать вторичную структуру ApCpU превращается в тетра nukлеотид ApCpUpCp с еще более низким выходом (61%).

Влияние нуклеозида, занимающего положение 2, на эффективность акцептора было изучено нами на примере серии ApNpC и некоторых других тринуклеозиддифосфатов (табл. 2). Установлено, что для ApNpC выход тетра nukлеотида в зависимости от структуры N изменяется в следующем порядке: U>>C≈A, хотя через 30 мин во всех трех случаях образуется примерно одинаковое количество продукта лигирования. Для CpNpA, т. е. для акцепторов с тем же нуклеотидным составом, но иной последовательностью нуклеотидов, была получена иная зависимость: A≈C>U>G [5], т. е. и в случае нуклеозида, занимающего положение 2, результаты межмолекулярного лигирования сильно зависят от соседних нуклеозидов. Тем не менее сравнение результатов, полученных для пар акцепторов ApCpU и ApUpU, GpCpN и GpUpU, CpCpU и CpUpU, UpCpC и UpUpC, имеющих в положении 2 пиримидиновый нуклеозид, показывает, что при разных нуклеотидных составах акцептора более высокие выходы тетра nukлеотида получаются, когда в положении 2 находятся уридин, как и для ApNpC, хотя в ряде случаев реакция идет быстрее, когда положение 2 занимает цитидин.

Влияние нуклеозида в положении 1 можно проследить, сравнивая результаты, полученные для следующих пар акцепторов, на 3'-конце которых находится пиримидин: ApUpC и ApUpU, UpCpC и UpCpU, CpCpC и CpCpU, GpUpC и GpUpU, CpUpC и CpUpU (табл. 3). В зависимости от состава реакционная способность акцептора может меняться по-разному: для первых трех пар более высокие результаты получаются, если в положении 1 находится цитидин, а из двух последних более реакционноспособными оказались те акцепторы, у которых 3'-концевым остатком является уридин. Таким образом, приводимый в работе [5] порядок изменения реакционной способности акцептора при замене нуклеозида в положении 1

Таблица 2

Влияние нуклеозида, занимающего положение 2 в акцепторе фосфата, на выход тетра nukлеотида при взаимодействии рСр с АрNрС и другими тринуклеозидифосфатами в присутствии РНК-лигазы Т4

Акцептор	Выход тетра nukлеотида через 4 ч, %	Порядок изменения выхода
АрСрС	75	U > C ≈ A
АрУрС	100	
АрАрС	76	
АрСрU	61	U >> C
АрУрU	91	
GrСрU	69	U > C
GrУрU	80	
СрСрU	56	U > C
СрУрU	72	
УрСрС	72	U > C
УрУрС	80 *	

* Приведен выход тетра nukлеотида, полученный через 3 ч.

Таблица 3

Влияние нуклеозида, занимающего положение 1 в акцепторе фосфата, на выход тетра nukлеотида при взаимодействии рСр с тринуклеозиддифосфатами в присутствии РНК-лигазы Т4

Акцептор	Выход тетра nukлеотида через 4 ч, %	Порядок изменения выхода
АрУрС	100	C > U
АрУрU	91	
УрСрС	72	C > U
УрСрU	62 *	
GrУрС	60 **	U > C
GrУрU	80	
СрУрС	64	U > C
СрУрU	72	
СрСрС	90	C > U
СрСрU	56	

* Выход, полученный через 2 ч.

** Выход, полученный через 3 ч.

(A > G ≈ C > U) не является универсальным и справедлив, по-видимому, только для изученной в этой работе серии акцепторов АрАрN.

Итак, рассматривая катализируемое РНК-лигазой Т4 взаимодействие рСр с акцепторами — тринуклеозиддифосфатами, различными по составу и последовательности нуклеозидных остатков, — можно видеть, что присутствие уридина в положении 3, 2 и даже 1 бывает во многих случаях более предпочтительным с точки зрения реакционной способности акцептора, чем присутствие цитидина, хотя уридин «на фоне» одного только цитидина снижает реакционную способность акцептора, причем тем больше, чем более близкое к 3'-концу положение он занимает: выходы тетра nukлеотида при взаимодействии рСр с СрСрС, УрСрС, СрУрС и СрСрU составляют 97, 72, 64 и 56% соответственно.

Результаты лигирования тринуклеозиддифосфатов различного состава с рАр представлены в табл. 4. Сравнивая данные, полученные для таких пар акцепторов, как АрУрС и УрУрС, GrСрU и УрСрU, можно видеть, что реакционная способность акцептора, имеющего в положении 3 пурин, выше, чем у акцептора с 5'-концевым пиримидином, и что порядок изменения эффективности акцептора совпадает с тем, что получается при лигировании тех же акцепторов с рСр, но разница в выходе тетра nukлеотидов при сшивке с рАр значительно больше: A >> U и G >> U соответственно.

Таблица 4

Влияние последовательности нуклеотидов в акцепторе фосфата на выход тетрауклеотида при взаимодействии рАр с тринуклеозиддифосфатами в присутствии РНК-лигазы Т4

Акцептор	Выход тетрауклеотида (%) за время реакции					Порядок изменения выхода
	0,5 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	
Влияние нуклеозида в положении 3						
АрUpC	34	42	54	63	62	A ≫ U
UpUpC	9	19	27	34	34	
GpCpU	13	25	36	45	67	G ≫ U
UpCpU	18	20	24	23	24	
Влияние нуклеозида в положении 2						
АрUpC					62	A ≈ U
АрArC	60	62	64			
UpCpC	22	34	40		40	C > U
UpUpC					34	
Влияние нуклеозида в положении 1						
АрUpU	5	11	15	18	22	C ≫ U
АрUpC					62	
UpCpU					24	C ≫ U
UpCpC					40	

Таблица 5

Влияние последовательности нуклеотидов в акцепторе фосфата на выход тетрауклеотида при взаимодействии рUp с тринуклеозиддифосфатами в присутствии РНК-лигазы Т4

Акцептор	Выход тетрауклеотида (%) за время реакции					Порядок изменения выхода
	0,5 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	
Влияние нуклеозида в положении 3						
GpUpC	23	37	47	51		C > G
CpUpC	55	62	60			
Влияние нуклеозида в положении 1						
UpCpC	54	59	63	65	70	C > U
UpCpU				51	55	
АрUpU	12	24	39	38	40	

Напротив, из сравнения данных для акцепторов АрUpC и АрArC, UpUpC и UpCpC следует, что результаты лигирования одних и тех же акцепторов фосфата с разными донорами (рCp и рAr) различаются не только величинами выхода тетрауклеотидов, но и порядком изменения реакционной способности акцептора в зависимости от структуры нуклеозида, занимающего положение 3: для АрNpC и рAr получили A ≈ U (при большей скорости образования тетрауклеотида для N=A), а для UpNpC и рAr получили C > U (ср. табл. 2).

Наконец, сравнивая результаты лигирования с рAr таких акцепторов, как АрUpC и АрUpU, UpCpC и UpCpU, можно видеть, что влияние изменений структуры нуклеозида, занимающего положение 1 акцептора, по характеру совпадает с тем, что наблюдали при сшивании этих акцепторов с рCp, только различие в выходе тетрауклеотидов для акцепторов, имеющих C или U на 3'-конце, значительно больше: C ≫ U.

Анализ результатов лигирования рUp с тринуклеозиддифосфатами UpCpC и UpCpU, GpUpC и CpUpC (табл. 5) показывает, что для этих акцепторов порядок изменения реакционной способности при изменении 3'- и 5'-концевого нуклеозида совпадает с тем, что мы получили при сшивании их с рCp, хотя выход тетрауклеотидов ниже.

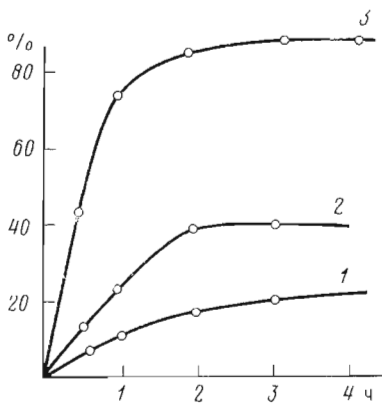


Рис. 3

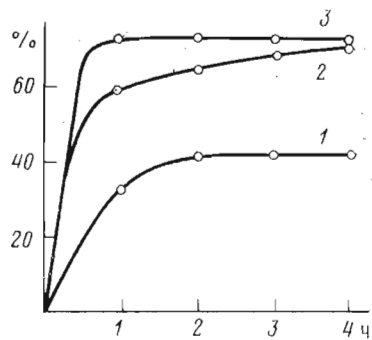


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость выхода тетрануклеотида ApUpUpNp от времени реакции и структуры донора фосфата: 1 — pAp , 2 — pUp , 3 — pCp

Рис. 4. Зависимость выхода тетрануклеотида UpCpCpNp от времени реакции и структуры донора фосфата: 1 — pAp , 2 — pUp , 3 — pCp

Из всех приведенных примеров следует, что влияние изменений в одном положении акцептора фосфата на эффективность межмолекулярного лигирования нельзя проследить независимо от остальных нуклеозидных остатков и что выход продукта лигирования в существенной степени зависит от структуры донора. Пиримидиновые доноры фосфата более эффективны, чем аденозин-3',5'-дифосфат (рис. 3, 4), и во всех изученных в настоящей работе случаях pCp был более эффективен, чем pUp . Эти результаты в основном совпадают с полученными на других примерах литературными данными [4], хотя при удлинении тринуклеотида UpCpC с 3'-конца активированным мононуклеотидом (P^1 -аденозин-5') P^2 - (нуклеозид-5')-пирофосфатом) в работе [6] наблюдали иной порядок эффективности донора: $\text{G} > \text{A} > \text{U} > \text{C}$ и для трех других акцепторов (ApCpC , UpUpC и TrpCpC) наиболее эффективным донором был pGr .

Экспериментальная часть

В работе использовали аденозин, уридин, цитидин, аденозин-2',3'-циклофосфат (натриевая соль), панкреатическую рибонуклеазу (Reanal, Венгрия), натриевые соли UDP и CDP, дитиоэритрит (Serva, ФРГ), циклогексилгуанидининовые соли гуанозин-, цитидин- и уридин-2',3'-циклофосфатов, полинуклеотидфосфорилазу *Micrococcus luteus* (Calbiochem, США), рибонуклеазу T_2 (Sigma, США), DEAE-целлюлозу, сорбент Partisol 10 SAX (Whatman, Англия), [^{14}C]АТФ с удельной радиоактивностью 58 мКи/ммоль (Amersham, Англия), poly(A), poly(U), poly(C), АТФ, эндонуклеазу *Serratia marcescens* и щелочную фосфомоноэстеразу *E. coli* (НИКТИ БАН, г. Бердск), полинуклеотидфосфорилазу *E. coli* (Биохимреактив, г. Олайне).

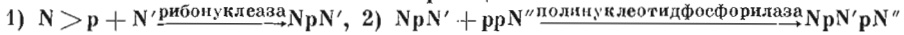
Циклогексилгуанидининовые соли нуклеозид-2',3'-циклофосфатов превращали в аммониевые обработкой дауэксом 50 W (NH_4^+ -форма).

Малоспецифичная рибонуклеаза *Penicillium brevicompactum* (КФ 2.7.7.17) и гуанилрибонуклеаза *Aspergillus clavatus* (КФ 2.7.7.26) получены от С. И. Безбородовой (ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов).

РНК-лигаза T4 была выделена как описано в работе [7].

2' (3'),5'-Дифосфаты аденозина, цитидина и уридина получали, фосфорилируя соответствующие нуклеозиды пирофосфорилхлоридом по методу [8] или обрабатывая соответствующие полинуклеотиды последовательно эндонуклеазой *Ser. marcescens* и рибонуклеазой T_2 с последующим разделением продуктов на DEAE-целлюлозе в системе Томлинсона — Тенера.

Ферментативный синтез тринуклеозиддифосфатов – акцепторов фосфата по реакциям:



Тринуклеозиддифосфат $NpN'pN''$	Ферменты * в реакциях		Время реакции, ч		Выход, %	
	1	2	1	2	1	2
ApUpU	<i>P. brev.</i>	<i>M. lut.</i>	240	0,5	10	15
ApUpC	»	»	240	1	10	10
ApCpC	»	»	168	2	50	8
ApCpU	»	<i>E. coli</i>	168	16	50	10
GpUpU	»	<i>M. lut.</i>	46	2	17	12
GpUpC	»	»	46	2	17	6
GpUpC **	Панкр.	<i>Asp. clav.</i>	2	4	28	20
GpCpC	<i>P. brev.</i>	<i>E. coli</i>	214	20	50	6
GpCpU	»	<i>M. lut.</i>	214	2	50	12
GpCpU	»	<i>E. coli</i>	214	16	50	10
CpUpU	Панкр.	<i>M. lut.</i>	24	2	21	7
CpUpC	»	»	24	2	21	4
CpCpU	»	»	1	3	26	22
UpUpC	»	»	24	2	14	4
UpCpC	»	<i>E. coli</i>	2	16	28	10
UpCpU	»	»	2	16	28	10

* Сокращения: *P. brev.* — малоспецифичная рибонуклеаза *P. brevicompactum*; *M. lut.* — полинуклеотидфосфорилаза *M. luteus*; *E. coli* — полинуклеотидфосфорилаза *E. coli*; панкре. — панкреатическая рибонуклеаза; *Asp. clav.* — гуанилрибонуклеаза *Asp. clavatus*.

** Схема синтеза: 1) $U > p + C$ панкре.; UpC; 2) $G > p + UpC$ *Asp. clav.*, GpUpC.

Хроматографию на DEAE-сефадексе (градиент концентрации NaCl (0,14→0,3 M) в 0,02 M трис-HCl-буфере, pH 7,6, содержащем 7 M мочевины) проводили в колонке (0,9×24 см) при скорости элюции 18 мл/ч, собирая фракции через 30 мин.

Микроколоночную хроматографию проводили на сорбенте Partisil 10 SAX в капиллярных колонках объемом 50 мкл (длина 50 мм) (калий-фосфатный буфер, pH 7,6, градиент концентрации 0→0,2 M, скорость элюции 600 мкл/ч) или на DEAE-целлюлозе (градиент концентрации NaCl (0→0,2 M) в 7 M мочевины, скорость элюции 300 мкл/ч).

Тринуклеозиддифосфаты синтезировали, применяя рибонуклеазы различной специфичности и полинуклеотидфосфорилазу в соответствии с ранее предложенным методом [9]. Схемы синтеза и результаты приведены в табл. 6.

Синтезы с участием РНК-лигазы T4. Раствор донора и акцептора фосфата в 0,05 M трис-HCl-буфере, pH 7,6, содержащем 1,5 mM АТФ, 3,3 mM дитиотреит, 20 mM MgCl₂, бычий сывороточный альбумин (150 мкг/мл) и РНК-лигазу (1000 ед. акт./мл), выдерживали 4 ч при 37° С. Концентрация донора и акцептора составляла 3 и 1 mM соответственно. Пробы, взятые из реакционной смеси через определенные промежутки времени (0,5; 1, 2, 3 и 4 ч), после обработки щелочной фосфатазой анализировали методом микроколоночной хроматографии (рис. 2). Всю реакционную смесь делили на DEAE-сефадексе (рис. 1). Результаты приведены в табл. 1–5.

ЛИТЕРАТУРА

1. Silber R., Malathi V. G., Hurvitz J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 10, p. 3009–3013.
2. Gumpert R. I., Uhlenbeck O. C. In: Gene amplification and analysis. Analysis of nucleic acid structure by enzymatic methods/Eds Chirikjian I. G., Papas T. S. N. Y.: Elsevier/North Holland, 1981, v. II, p. 312–355.
3. Веньяминова А. Г., Ямковой В. И. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1445–1446.
4. Uhlenbeck O. C., Gumpert R. I. In: Enzymes/Ed. Boyer P. D. New York – London: Acad. Press, 1982, v. XVb, p. 31–58.
5. Romaniuk E., McLaughlin L. W., Neilson T., Romaniuk P. J. Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 3, p. 633–643.
6. Ohtsuka E., Miyake T., Nagao K., Uemura H., Nishikawa S., Sugiura M., Ikehara M. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 3, p. 601–610.

7. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Антонович Е. Г., Манькин А. С., Прокофьев М. А., Загребельный С. Н., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М., Болезнин М. И., Смолянинов В. В. *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 7, с. 1037-1046.
8. Barrio J. R., Barrio M. C. G., Leonard N. J., England T. E., Uhlenbeck O. C. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 11, p. 2077-2081.
9. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Пономарева В. М. *Биоорганическая химия*, 1975, т. 1, № 5, с. 598-603.

Поступила в редакцию
16.IX.1983

SUBSTRATE SPECIFICITY OF T4 RNA LIGASE. THE EFFECT OF THE MINIMUM PHOSPHATE ACCEPTOR NUCLEOTIDE SEQUENCE ON THE EFFICIENCY OF INTERMOLECULAR LIGATION

MAISTRENKO V. F., PUSTOSHILOVA N. M., KLYAGINA V. P.,
SEDELNIKOVA E. A., SMOLYANINOVA O. A., ZHENODAROVA S. M.

*Design and Technology Institute for Biologically Active Compounds, Berdsk;
Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

The 2'(3'),5'-diphosphates of cytidine, uridine, adenosine and the trinucleoside diphosphates, such as NpCpC, NpCpU, NpUpC, NpUpU and ApNpC (where N=U, C, A, G), were used to study the substrate specificity of the T4 RNA ligase. The outcome of ligating various phosphate acceptors to a common phosphate donor was governed not only by nucleotide composition but also the nucleotide sequence of a phosphate acceptor. The effect of the changes in a single position of the phosphate acceptor on the efficiency of the intermolecular ligation cannot be defined independently of the other nucleotide residues. For four examined groups of phosphate acceptors and pCp as a donor, four different ranks were obtained (in order of decreasing reactivity): C>A>U>G (for NpCpC); G>U≈A>C (NpCpU); A>U>C>G (NpUpC) and A>G>C>U (NpUpU). The yield of ligation products with various phosphate donors and a common phosphate acceptor significantly depends on the donor structure: pyrimidine phosphate donors are more effective than pAp, while pCp is more effective than pUp.