



УДК 577.214.3 : 577.152.277*6'135

1-(3'-С-МЕТИЛ-β-D-РИБОФУРАНОЗИЛ)УРАЦИЛ-5'-ТРИФОСФАТ — ТЕРМИНАТОР СИНТЕЗА РНК, КАТАЛИЗИРУЕМОГО РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ *E. COLI*

Айвазашвили В. А., Михайлов С. Н*, Падюкѳва Н. Ш*, Карпейский М. Я*, Виблашвили Р. Ш**.

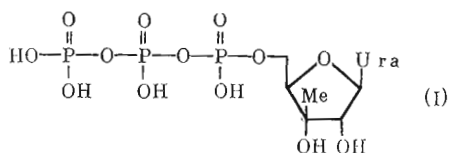
Филиал по разработке ГЛС НИИ по ВИХС Министерства медицинской и микробиологической промышленности СССР, Москва;

* Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

** Всесоюзный кардиологический научный центр Академии медицинских наук СССР, Москва

Действие 3'-замещенных 3'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов на синтез РНК *in vitro* тщательно изучен [1—5]. Эти соединения включаются в РНК вместо одноименных субстратов и прерывают ее удлинение из-за отсутствия 3'-ОН-группы, необходимой для присоединения следующего нуклеотида.

Настоящее сообщение посвящено изучению субстратных свойств ранее синтезированного 1-(3'-С-метил-β-D-рибофуранозил)урацил-5'-трифосфата (I) [6] в реакции синтеза РНК, катализируемой ДНК-зависимой РНК-полимеразой *E. coli*.



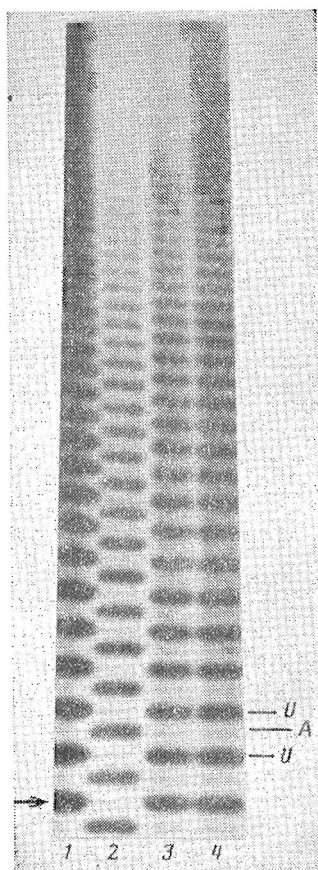
В этом аналоге содержатся все функциональные группы природного УТР, но изменена реакционная способность 3'-ОН-группы (замена вторичной гидроксильной группы на третичную).

На рисунке представлены результаты высокоразрешающего электрофореза [³²P]poly(A-U), синтезированной на матрице polyd(A-T) в отсутствие (дорожка 2) и в присутствии (дорожки 3, 4) этого аналога. Poly(A-U), синтезированная при 10 мкМ АТР и 2 мкМ УТР, представлена чередующимися полосами высокой и низкой интенсивности (дорожка 2). Первые соответствуют транскриптам с 3'-концевыми А, вторые — с 3'-концевыми У. Правильность отнесения следует из эксперимента, в котором синтез poly(A-U) прерывали добавлением 3'-амино-3'-деоксиуридин-5'-трифосфата (II) с конечной концентрацией 100 мкМ. Образующиеся при этом транскрипты с 3'-концевыми остатками 3'-амино-3'-деоксиуридина [5] (дорожка 1) соответствуют по электрофоретической подвижности полосам с низкой интенсивностью на дорожке 2. При добавлении к синтезирующейся poly(A-U) трифосфата (I) до конечной концентрации 100 мкМ (дорожка 3) происходят аналогичные изменения: также образуются транскрипты с 3'-концевыми остатками 3'-С-метилуридина, а транскрипты с 3'-концевыми А на геле отсутствуют.

Трифосфат (I) может быть также использован вместо аналога (II) при секвенировании ДНК фага T7 D111. При этом, как и в случае трифосфата (II) [5] или 3'-О-метилуридин-5'-трифосфата [4], требуется примерно 50 — 100-кратный избыток аналога относительно субстрата.

После включения аналога (I) в 3'-концы РНК образовавшиеся транскрипты сохраняются в комплексах с ДНК и РНК-полимеразой. Это поз-

Электрофореграмма ^{32}P poly(A-U), синтезированной в присутствии или в отсутствие трифосфата (I) (15% полиакриламидный гель с 8 М мочевиной). Синтез проводили как описано ранее [4] на матрице poly d(A-T) (10 мкг/мл) в присутствии 100 мкМ иницирующего динуклеотида UpA, 10 мкМ АТР, 2 мкМ ^{32}P УТР и 20 мкг/мл РНК-полимеразы в течение 4 мин при 20° С. Реакцию останавливали добавлением EDTA до конечной концентрации 0,05 М. На 4-й мин добавлено: 1 — трифосфат (II) (конечная концентрация 100 мкМ, инкубация 10 мин); 2 — EDTA до конечной концентрации 0,05 М; 3 — трифосфат (I) (конечная концентрация 100 мкМ, инкубация 10 мин); 4 — реакцию проводили аналогично опыту 3, затем добавляли АТР и УТР до конечной концентрации 100 мкМ и инкубировали смесь 10 мин. Стрелкой показан транскрипт длиной 40 нуклеотидов, иницированный с праймерного динуклеозид-фосфата UpA



волило выделить такие комплексы и определить скорость пирофосфорилаза остатков 3'-С-метилуридина из РНК по описанной ранее схеме [7]. Как и в случае 3'-замещенных аналогов нуклеозидов [7], скорость пирофосфорилаза исследуемого соединения оказалась такой же, как и для остатка уридина.

Включение трифосфата (I) в 3'-конец РНК необратимо прекращает ее удлинение. Ни увеличение времени реакции, ни последующее добавление высоких концентраций NTP не приводят к удлинению РНК (рисунок, дорожка 4).

Ранее было предположено [8], что противовирусная активность 3'-С-метилнуклеозидов [9] может быть связана с терминованием синтеза РНК. Полученные в настоящей работе данные находятся в соответствии с этим предположением. Исследованный аналог (I) по эффективности ингибирования синтеза РНК сравним с известными 3'-дезоксиг-3'-замещенными NTP и может быть использован для секвенирования нуклеиновых кислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shigeura H. T., Boxer G. E. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1964, v. 17, № 6, p. 758—763.
2. Armstrong V. W., Eckstein F. Eur. J. Biochem., 1978, v. 70, № 1, p. 33—38.
3. Axelrod V. D., Vartikyan R. M., Aivazashvili V. A., Bebealashvili R. Sh. Nucleic Acids Res., 1978, v. 5, № 10, p. 3549—3563.
4. Айвазашвили В. А., Библашвили Р. Ш., Флорентьев В. Л. Молекулярн. биология, 1982, т. 16, № 3, с. 493—498.
5. Kutateladze T., Bebealashvili R., Azhayev A., Kravetsky A. FEBS Lett., 1983, v. 153, № 2, p. 420—426.
6. Карнейский М. Я., Михайлов С. Н., Падюкова И. Ш., Яковлев Г. М. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 522—529.
7. Rozovskaya T. A., Chenchik A. A., Bebealashvili R. Sh. FEBS Lett., 1982, v. 137, № 1, p. 100—104.

- Mikhailov S. N., Beigelman L. N., Gurskaya G. V., Padyukova N. Sh., Yakovlev G. I., Karpeisky M. Ya. Carbohydr. Res., 1983, v. 124, № 1, p. 75—96.
9. Walton E., Jenkins S. R., Nutt R. F., Holly F. W., Nemes M. J. Med. Chem., 1969, v. 12, № 2, p. 306—309.

Поступило в редакцию
20.XII.1985

**1-(3'-C-METHYL- β -D-RIBOFURANOSYL)URACIL 5'-TRIPHOSPHATE,
A TERMINATOR OF RNA SYNTHESIS CATALYZED BY *E. COLI* RNA
POLYMERASE**

AIVAZASHVILI V. A., MIKHAILOV S. N.*, PADYUKOVA N. Sh.*,
KARPEISKY M. Ya.*, BIBILASHVILI R. Sh.**

*Branch of the Institute for Biological Testing of Chemical
Compounds, Moscow;*

**Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;*

***All-Union Cardiology Research Center, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow*

It is shown that 1-(3'-C-methyl- β -D-ribofuranosyl)uracil 5'-triphosphate is a terminator of RNA synthesis and may be used for nucleic acid sequencing with DNA-dependent RNA polymerase from *E. coli*.