



УДК 577.113.6 : 577.152.314.08

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ  
РИБОДИНУКЛЕОЗИДМОНОФосФАТОВ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ  
ГУАНИЛСПЕЦИФИЧНОЙ РИБОНУКЛЕАЗОЙ *BACILLUS*  
*INTERMEDIUS* (БИНАЗОЙ)

Бочаров А. Л.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Преимущество использования дециклизующих РНКаз для ферментативного синтеза ди- и олигонуклеотидов *рибо*-ряда заключается прежде всего в том, что в реакцию вводятся незащищенные нуклеотиды и нуклеозиды и в ряде случаев достигается высокий (до 40—70%) выход целевых продуктов [1].

Однако эти преимущества распространяются лишь на те случаи, когда в качестве акцептора используются пиримидиновые нуклеозиды. При использовании в качестве акцепторов пуриновых нуклеозидов выход обычно очень невелик [2]. В литературе отмечалось, что повышение концентрации акцептора в реакционной среде приводит к увеличению выхода продуктов алкоголиза [3]. Повышению концентрации пуриновых акцепторов в реакционной среде препятствует их плохая растворимость. Мы обнаружили, что высокая концентрация пуринового нуклеозида (аденозина) в реакционной среде (~1 М) легко может быть достигнута посредством образования эквимольного комплекса нуклеозида с борной кислотой при  $\text{pH} > 8$ . Этот же прием значительно облегчает также манипулирование с концентрированными растворами пиримидиновых нуклеозидов. Используя этот прием, мы провели ферментативный синтез гуанилил-3' → 5'-аденозина и гуанилил-3' → 5'-уридина с помощью гуанилспецифичной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* [4, 5] (биназы). Образование боратных комплексов с концевыми 2',3'-*цис*-диольными группами динуклеозидмонофосфатов позволило также очень простым приемом отделять продукты алкоголиза от примесей донорного циклофосфата и продукта его ферментативного гидролиза, нуклеозид-3'-фосфата.

Литиевая соль гуанозин-2',3'-циклофосфата была получена методом, описанным в работе [6]. Эквимольную смесь нуклеозида (аденозина или уридина) с борной кислотой доводили в водном растворе до pH 8,3 добавлением 2 н. LiOH и раствор упаривали досуха. К боратному комплексу нуклеозида добавляли 0,2 экв. Li-соли гуанозин-2',3'-циклофосфата (100 мг) и растворяли смесь в таком количестве воды, чтобы концентрация акцептора (аденозина или уридина) составила ~1 М. Буферная емкость такого раствора вполне достаточна, чтобы проводить ферментативный алкоголиз в отсутствие других буферных солей. К полученным растворам добавляли аликвоты раствора биназы (3,0 мг/мл [7] в 0,1 М LiCl) до конечной ее концентрации в реакционной среде 30 мкг/мл. Реакционную смесь оставляли при комнатной температуре.

Ход катализируемой ферментом реакции алкоголиза контролировали хроматографически (тонкослойная хроматография на Silufol UV<sub>254</sub> в системе изопропанол — аммиак — вода, 7 : 1 : 2). Через 72 ч от начала реакции реакционную смесь пропускали через колонку с сефадексом G-10 (500 мл), уравновешенным 0,02 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Этим приемом достигалось эффективное отделение фермента от продукта реакции, а последнего в свою очередь — от большей части акцепторного нуклеозида [3].

К полученным растворам динуклеозидмонофосфатов, содержащим смеси акцепторного нуклеозида, донорного циклофосфата и продукта его

ферментативного расщепления, гуанозин-3'-фосфата, добавляли борную кислоту из расчета ее конечной концентрации 0,02 М и аммиак до pH 8,1. Этот раствор наносили на колонку 100 мл DEAE-целлюлозы ( $\text{HCO}_3^-$ ) и промывали ее раствором 0,04 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , содержащим 0,02 М борат аммония, pH 8,1. При промывании этим раствором с колонки элюировался акцепторный нуклеозид и донорный гуанозин-2',3'-циклофосфат. Продукты алкоголиза (несущие в этой системе два отрицательных заряда) и гуанозин-3'-фосфат оставались связанными с анионообменником. Далее колонку промывали последовательно небольшой порцией  $\text{H}_2\text{O}$  (30 мл), 0,2 М раствором этиленгликоля в  $\text{H}_2\text{O}$  (100 мл) (эта операция приводит к разрушению боратного комплекса с продуктом алкоголиза и элюции борной кислоты в виде ее комплекса с этиленгликолем), снова  $\text{H}_2\text{O}$  (30 мл). Продукт алкоголиза элюировали с колонки 0,05 М раствором  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (в этих условиях гуанозин-3'-фосфат остается связанным с DEAE-целлюлозой). Динуклеозидмонофосфаты освобождали от избытка  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  упариванием в вакууме водоструйного наноса (12—14 мм рт. ст.,  $\sim 40^\circ\text{C}$ ) и многократным переупариванием с  $\text{H}_2\text{O}$  (до отсутствия аммиачного запаха в колбе) и подвергали лиофилизации из водного раствора. Полученные аммониевые соли динуклеозидмонофосфатов хроматографически индивидуальны. Конечный выход очищенного по описанной методике и лиофилизованного продукта составлял для гуанилил-3'  $\rightarrow$  5'-аденозина 65 мг (40%), для гуанилил-3'  $\rightarrow$  5'-уридина — 80 мг (50%).

Удобство и простота описанного метода вполне очевидны и позволяют надеяться, что метод будет применим для синтеза многих других производных и с использованием более широкого круга ферментов.

Выражаю искреннюю благодарность Н. К. Чепурновой за любезно предоставленный ею препарат гомогенного фермента [7] биназы, а также проф. М. Я. Карпейскому за постоянный интерес и поддержку в работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Женодарова С. М. Успехи химии, 1970, т. 39, № 8, с. 1479—1493.
2. Хабарова М. И., Женодарова С. М. Молекуляр. биология, 1972, т. 6, № 5, с. 682—688.
3. Bauer S., Lamed R., Lapidot Y. Biotechnol. and Bioeng., 1972, v. 14, p. 861—870.
4. Карпейский М. Я., Хандаян А. Ж., Чепурнова П. К., Платонов А. Л., Яковлев Г. И. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1669—1679.
5. Yakovlev G. I., Vocharov A. L., Moiseyev G. P. FEBS Lett., 1984, v. 175, № 2, p. 356—358.
6. Вочаров А. Л. Биоорг. химия, 1986, т. 12, № 8, с. 1125—1126.
7. Голубенко И. А., Балабан Н. П., Лецинская И. Б., Волкова Г. И., Клейнер Г. И., Чепурнова Н. К., Афанасенко Г. А., Дудкин С. М. Биохимия, 1979, т. 44, № 4, с. 640—643.

Поступило в редакцию  
4.III.1986

#### SYNTHESIS OF RIBODINUCLEOSIDE MONOPHOSPHATES CATALYZED BY GUANYL-SPECIFIC RIBONUCLEASE (BINASE) FROM *BACILLUS INTERMEDIUS*

VOCHAROV A. L.

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

[The increase in the concentration of acceptor nucleosides, adenosine and uridine, in the reaction medium due to the formation of their borate complexes at  $\text{pH} > 8,0$  results in a high yield of guanylyl-3'  $\rightarrow$  5'-adenosine and guanylyl-3'  $\rightarrow$  5'-uridine in the reactions of guanosine-2',3'-cyclophosphate alcoholysis catalyzed by guanyl-specific RNase (binase). An effective chromatographic procedure is proposed for the separation of alcoholysis products from admixtures.]