



УДК 577.113.6:577.152.31*27'17

СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

XXXIV. ПРЕПАРАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ТРИНУКЛЕОЗИДДИФОСФАТОВ И БОЛЕЕ ДЛИННЫХ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ РИБОНУКЛЕАЗАМИ

*Женодарова С. М., Смолянинова О. А., Соболева И. А.,
Хабарова М. И.*

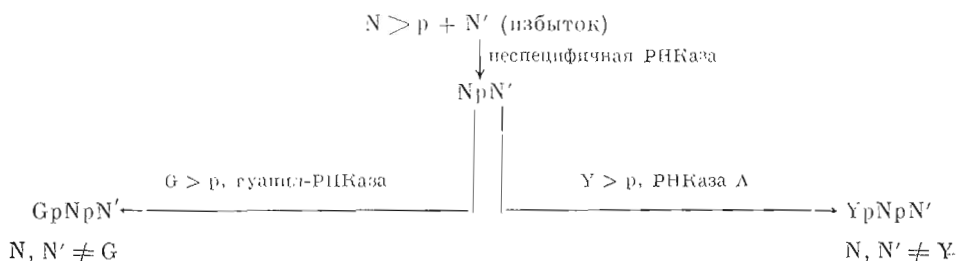
*Институт биологической физики Академии наук СССР,
г. Пущино Московской обл.*

Иммобилизованные гуанилспецифичные рибонуклеазы *Aspergillus clavatus* (C₂), *A. oryzae* (T₁) и *Bacillus intermedius* 7P(Bi) были применены для препаративного синтеза 10 тринуклеозиддифосфатов, трех тетра- и пентануклеотидов, имеющих на 5'-конце единственный остаток гуаниловой кислоты. Целесообразность использования того или иного фермента определяется нуклеотидным составом синтезируемого олигонуклеотида.

Синтетические олигорибонуклеотиды широко используются как модельные соединения для решения различных задач, стоящих перед молекулярной биологией и биоорганической химией [2]. Обычно исходными блоками для синтеза олигорибонуклеотидов служат ди- и тринуклеотиды. Тринуклеотиды нужны и сами по себе, например как минимальные субстраты при изучении субстратной специфичности РНК-лигазы T₄ [3, 4], в качестве кодонов при изучении различных аспектов биосинтеза белка [5] и т. д. Удобным и эффективным методом их получения является энзиматический синтез с использованием рибонуклеаз [6].

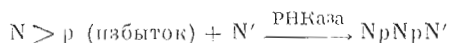
Синтез тринуклеозиддифосфатов гетерогенного состава, катализируемый рибонуклеазами, можно представить следующим образом:

Схема 1



В соответствии со схемой 1 могут быть получены 28 тринуклеозиддифосфатов, имеющих на 5'-конце гуанозин (12) или пиримидиновый нуклеозид (16), на 3'-конце — любой нуклеозид, а в «центре» — аденозин, цитидин или уридин в первом случае и аденозин или гуанозин во втором. Еще 16 тринуклеозиддифосфатов, имеющих на 5'-конце два одинаковых нуклеотидных остатка, можно синтезировать по схеме 2:

Схема 2



Остальные 20 из 64 возможных тринуклеозиддифосфатов рациональнее

Сообщение XXXIII см. [1]. Сокращения: СМ-рибонуклеаза — рибонуклеаза, ковалентно связанная с СМ-целлюлозой; СМ-А, СМ-Рb₂, СМ-T₁, СМ-Bi — иммобилизованные на СМ-целлюлозе рибонуклеазы: панкреатическая, *Penicillium brevicompactum*, T₁ и *Bacillus intermedius* 7P; sil-C₂ — иммобилизованная на силихроме рибонуклеаза С₂ *Aspergillus clavatus*; остальные сокращения соответствуют рекомендациям ИЮПАК.

Макромасштабный синтез динуклеозидмонофосфатов

Динуклеозид- монофосфат	[Донор], М	$\frac{[\text{Акцептор}]}{[\text{Донор}]}$	СМ-РНКаза *, мг/мл	Время, ч	Выход, %	Всего синте- зировано, мг
ApC	0,26	3	28	72	22	74
ApU	0,25	6	16	90	18	57
UpU	0,25	5	12,5	3	10	23
CpU	0,25	4	12,5	3	11	36
CpC	0,25	3	12,5	1	11	30
UpC **	0,06	8	0,2	24	64	720

* ApC и ApU синтезировали с СМ-Рb₂; UpU, CpU, CpC, UpC — с СМ-А.

** Синтез проводили при -15° С с нативной панкреатической рибонуклеазой.

Таблица 2

Влияние концентрации субстратов на синтез тринуклеозиддифосфатов GpNpN'

GpNpN'	Иммобилизованная РНКаза		[G>p]	[NpN']	Выход, * %
	тип	концентрация, мг/мл	М		
1. Изменение концентрации акцептора при постоянной концентрации донора					
GpUpC	СМ-Bi	4,1	0,06	0,3	17
		7,5	0,06	0,48	29
GpUpU	СМ-T ₁	4,1	0,06	0,6	30
		83	0,1	0,05	6
		83	0,1	0,2	11
	sil-C ₂	83	0,1	0,8	25
		80	0,1	0,8	19
СМ-Bi	10	0,1	0,8	17	
2. Изменение концентрации донора при постоянной концентрации акцептора					
GpCpU	sil-C ₂	75	0,09	0,7	34 (19)
		75	0,35	0,7	12 (22)
3. Изменение концентрации субстратов при эквимолярном отношении					
GpUpU	СМ-T ₁	83	0,1	0,1	6
		83	0,5	0,5	5
		83	1,0	1,0	6
4. Изменение концентрации субстратов при постоянном отношении [G>p]/[NpN']					
GpUpC	sil-C ₂	12	0,02	0,16	19
		12	0,05	0,4	24
		12	0,1	0,8	34
GpUpC	СМ-T ₁	10	0,02	0,2	25
	СМ-Bi	4,1	0,03	0,3	30
GpCpU	СМ-T ₁	7,5	0,08	0,8	53
		50	0,04	0,32	13
		80	0,1	0,8	15

* Выход определен на субстрат, взятый в недостатке; в скобках приведены выходы, рассчитанные на израсходованный акцептор фосфата.

получать, применяя для паращивания динуклеозидмонофосфата поли-
нуклеотидфосфорилазу [6].

В литературе описан синтез тринуклеозиддифосфатов с помощью раз-
личных рибонуклеаз [7—9], однако для большинства из них исследования
были проведены лишь в аналитическом варианте и только панкреатиче-
ская рибонуклеаза была применена для препаративных целей [10, 11].

В настоящей работе мы приводим результаты использования в макро-
масштабном синтезе тринуклеозиддифосфатов и более длинных олигори-
бонуклеотидов иммобилизованных гуанилспецифичных рибонуклеаз As-

pergillus clavatus (C₂), *Bacillus intermedius* 7P(Bi) и T₁ по схеме 1. Ранее нами было показано, что синтетические активности связанных с карбоксиметилцеллюлозой рибонуклеаз T₁ [4] и Bi [12], а также иммобилизованной на силихроме рибонуклеазы C₂ [13] не отличаются от синтетических активностей нативных ферментов. Препараты характеризуются высокой стабильностью как в условиях многократного использования, так и при хранении. Все это позволяло надеяться, что препаративный синтез олигонуклеотидов осуществим в условиях, близких к найденным для нативных ферментов, при одновременном обеспечении эффективности и технологичности разрабатываемой методики.

Тринуклеозиддифосфаты синтезировали из гуанозин-2',3'-циклофосфата и динуклеозидмонофосфатов, устойчивых к действию гуанилрибонуклеаз. Необходимые динуклеозидмонофосфаты были получены с помощью неспецифичной рибонуклеазы Pb₂ (ApC, ApU) или панкреатической рибонуклеазы (UpU, CpU, CpC, UpC), ковалентно связанных с СМ-целлюлозой (табл. 1) [14, 15].

Важные параметры, влияющие на выход олигонуклеотида, — начальные концентрации субстратов и фермента. Выбор этих величин был сделан с учетом результатов, полученных при работе с нативными ферментами [8, 12, 16]. Анализ данных, приведенных в табл. 2, показывает, что включение в продукт субстрата, взятого в недостатке, увеличивается с ростом концентрации акцептора при постоянной концентрации донора фосфата, достигая некоторого плато (практически уже нет разницы между 8- и 10-кратным избытком). Напротив, повышение концентрации донора фосфата при постоянной концентрации акцептора может вызывать снижение выхода (см. синтез GpCpU в табл. 2). При постоянном отношении [акцептор]/[донор] увеличение концентрации субстратов (от 0,18 до 0,9 М) может повысить выход почти вдвое (см. синтез GpUpC с sil-C₂ и СМ-Bi в табл. 2), хотя и не для любых субстратов (например, для GpCpU такого эффекта не наблюдали). Дальнейшее повышение концентрации субстратов нежелательно из-за образования гелей в процессе инкубации с ферментом при 0°С — явления, хорошо известного для гуанинсодержащих соединений [17]. Это снижает выход тринуклеозиддифосфата и осложняет разделение реакционной смеси. Агрегацию при высоких концентрациях реагентов как причину уменьшения $K_{\text{наб}}$ реакции образования межнуклеотидной связи отмечали еще авторы работы [18].

Таким образом, наиболее высокие выходы были получены при значительном избытке акцептора фосфата. Избыток акцептора повышает также специфичность реакции, так как препятствует образованию побочных продуктов за счет конденсации G>p. Это справедливо для всех трех ферментных препаратов.

Однако из двух субстратов, участвующих в синтезе, акцептор фосфата (динуклеозидмонофосфат) менее доступен, поэтому для более полного его использования авторы работы [9] рекомендуют вести синтез при эквимолярном отношении субстратов. Мы синтезировали GpUpU, соблюдая это условие и меняя начальные концентрации субстратов от 0,1 до 1,0 М (табл. 2). Во всех случаях выход был низким (~6%), а включение димерного акцептора в продукт в расчете на израсходованный акцептор (17%) сопоставимо с той величиной, которая была получена при проведении синтеза GpUpU в условиях 8-кратного избытка (15%). Принимая во внимание сложность работы с концентрированными растворами субстратов и появление олигогуанилатов в реакционной смеси при эквимолярном отношении субстратов, мы считаем более целесообразным работать с избытком акцептора, поскольку последний довольно легко регенерируется и может быть использован повторно.

Используя полученные данные, мы провели препаративный синтез 10 различных тринуклеозиддифосфатов, применив для этого иммобилизованные препараты рибонуклеаз C₂, Bi и T₁ и варьируя состав акцепторов фосфата, в качестве которых служили динуклеозидмонофосфаты типа UpY, UpA, ApY и ApA (табл. 3). Выход тринуклеозиддифосфата сильно зависит от структуры акцептора: наибольшие выходы были получены с

Синтез тринуклеозиддифосфатов GpNpN' с иммобилизованными гуанил-РНКазами

GpNpN'	Гуанил-РНКаза		[G>p]	[NpN']	Выход GpNpN'	Возврат NpN'
	тип	концентрация, мг/мл	M		%	
GpCpU	sil-C ₂	75	0,09	0,72	33	78
	CM-Bi	10	0,1	0,8	24	90
	CM-T ₁	80	0,1	0,8	14	70
GpCpC	sil-C ₂	75	0,1	0,8	40	70
	CM-Bi	10	0,1	0,8	26	84
	CM-T ₁	83	0,1	0,8	23	72
GpCpA	C ₂ *		0,04	0,02	10	72
GpUpU	sil-C ₂	80	0,1	0,8	19	96
	CM-Bi	10	0,1	0,8	17	90
	CM-T ₁	83	0,1	0,8	25	81
GpUpC	sil-C ₂	75	0,1	0,8	34	77
	CM-Bi	7,5	0,1	0,8	53	75
	CM-T ₁	10	0,02	0,2	25	—
GpUpA	sil-C ₂	75	0,1	0,3	13	68
	CM-T ₁	100	0,1	0,16	8	80
	CM-Bi	30	0,05	0,4	14	90
GpApU	CM-Bi	3,3	0,03	0,24	6 **	—
	CM-T ₁	30	0,02	0,2	8	70
	sil-C ₂	10	0,02	0,2	12	61
GpApC	CM-T ₁	24	0,02	0,2	12	70
	CM-Bi	10	0,1	0,8	9	82
	sil-C ₂	30	0,05	0,4	11	—
GpApA						
GpApC		15	0,02	0,16	10	65

* Синтез проводили с нативной РНКазой C₂, концентрация которой в реакционной смеси составляла 6 ед. акт./мл.

** Через 2 ч инкубации при 0°С реакционная смесь превратилась в гель, который не разрушался при центрифугировании.

динуклеозидмонофосфатами типа YpY. Эффективность реакции для акцепторов с пиримидиновым нуклеозидом на 3'-конце в зависимости от структуры 5'-концевого нуклеозида меняется в следующем порядке: C > U > A. Аналогично проявляется влияние 3'-концевого нуклеозида, если на 5'-конце акцептора находится пиримидиновый нуклеозид. Наименьшие выходы были получены с акцепторами, в состав которых входит аденозин, независимо от положения последнего в динуклеозидмонофосфате. Попытка применить акцепторы, имеющие на 3'-конце гуанозин, была неудачной: реакционные смеси, содержавшие 0,05 M G>p, 0,4 M CpG и sil-C₂ или CM-Bi, через 2 ч инкубации при 0°С превратились в гели, которые не разрушались при центрифугировании, что затрудняло отделение ферментов; выход составил в обоих случаях не более 1%.

Эти результаты можно объяснить, рассматривая синтез межнуклеотидной связи как реакцию, обратную стадии деполимеризации [6], и принимая во внимание развиваемые в ряде работ представления о существовании в рибонуклеазе T₁ участков, ответственных за связывание гуанина (участок первичного связывания), аденина (пурина) и пиримидиновых

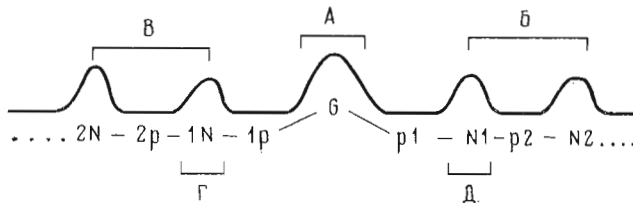


Рис. 1. Схематическое изображение участков связывания субстратов рибонуклеазой T₁ в соответствии с работами [19-21]: А — участок первичного связывания (донор фосфата); Б — участок «правильного» связывания акцептора (динуклеозидмонофосфата); В — участок «неправильного» связывания акцептора (динуклеозидмонофосфата); Г и Д — участки вторичного связывания: Г — аденин (пурин) специфичный, Д — цитозинспецифичный

оснований (участки вторичного связывания) (см. рис. 1) [19–21]. Высокая степень гомологии РНКаз T_1 и C_2 [22], подобие пространственной организации этих ферментов [23] и, наконец, структурное сходство внеклеточных РНКаз прокариот и эукариот, в частности РНКаз B_i и C_2 [24], позволяють считать, что подобные представления могут быть справедливы и для рибонуклеаз C_2 и B_i .

На рис. 1 схематически представлено взаимодействие субстратов с рибонуклеазой T_1 : $1N$ — пурипспецифичный, возможно аденозиспецифичный, участок [19, 20]; $N1$ — место связывания «уходящей группы», т. е. нуклеозида, участвующего в расщепляемой (или синтезируемой) фосфодиэфирной связи 5'-гидроксилом [19, 21] — «проявляет» предпочтение к цитидину. Обсуждаемая схема подтверждается данными, недавно полученными в работе [25], из которых следует, что РНКаз T_1 связывает в активном центре три нуклеотидных остатка.

В процессе синтеза тринуклеозиддифосфата донор фосфата ($G \rangle p$) всегда должен связываться в участке первичного связывания, в то время как акцептор фосфата — динуклеозидмонофосфат — может быть связан с ферментом или через $N1$ -участок («правильное» связывание), или через $1N$ -участок («неправильное» связывание). Таким образом, возникают два типа фермент-субстратных комплексов, различающихся положением субстратов на ферменте: продуктивный и непродуктивный комплексы. Наличие в активном центре аденин(пурип)специфичного участка связывания в положении, соответствующем непродуктивному комплексу, по-видимому, приводит к тому, что динуклеозидмонофосфаты, имеющие в своем составе аденозис, чаще образуют непродуктивный комплекс, чем пиримидиновые динуклеозидмонофосфаты. Участок связывания «уходящей группы» ($N1$), проявляющий предпочтение к цитидину, при образовании продуктивного комплекса в случае синтеза тринуклеозиддифосфата должен использоваться для связывания 5'-концевого нуклеозида акцептора. Действительно, наиболее высокие выходы были получены с акцепторами, имеющими цитидин на 5'-конце. Одновременное увеличение начальных концентраций субстратов приводит к насыщению участков первичного и вторичного связывания, т. е. к повышению концентрации продуктивного комплекса и соответственно к повышению выхода тринуклеозиддифосфатов. Точно так же при избытке акцептора в реакционной смеси количество «правильно» связанного акцептора возрастает, т. е. растет концентрация продуктивного комплекса и соответственно выход тринуклеозиддифосфата.

В качестве примера макромасштабного синтеза тринуклеозиддифосфата с участием иммобилизованной гуанилрибонуклеазы приведем синтез $GpUpC$ — исходного блока, необходимого для получения более крупных фрагментов D-ветви дрожжевой валиновой тРНК_i [26]: из 8 мг (22 мкмоль) гуанозин-2',3'-циклофосфата и 123 мг (220 мкмоль) уридил-л-(3'-5')-цитидина в присутствии рибонуклеазы B_i , ковалентно связанной с СМ-целлюлозой, в одну стадию получили 21 мг (12,2 мкмоль) гуанил-л-(3'-5')-уридил-л-(3'-5')-цитидина, что составляет 58% от взятого в

Таблица 4

Синтез тетра- и пентануклеотидов с иммобилизованными гуанилрибонуклеазами

Донор	Концентрация, М	Акцептор	Концентрация, М	Фермент, мг/мл	Олигонуклеотид	Выход	Возврат акцептора
						%	
$G \rangle p$	0,05	$UpUpU$	0,4	sil- C_2 30	$GpUpUpU$	13	96
$G \rangle p$	0,05	$ApApA$	0,4	30	$GpApApA$	10	79
$pG \rangle p$	0,08	$UpUpC$	0,02	СМ- B_i 7,6	$pGpUpUpC$	20	63
$pG \rangle p$	0,08	$ApUpCpC$	0,02	7,6	$pGpApUpCpC$	22	49

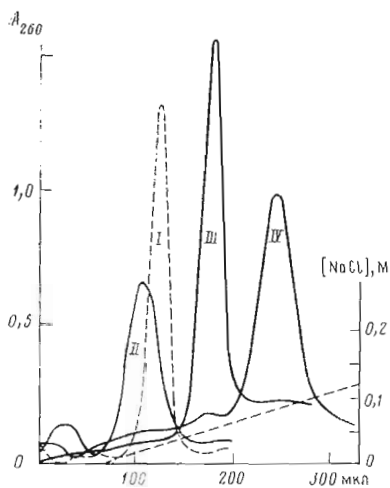


Рис. 2. Микроколоночная хроматография G>p (I), CpC (II), CpCpC (III) и GpApApA (IV) на DEAE-целлюлозе

хроматографии и электрофореза на бумаге и микрохроматографии на DEAE-целлюлозе в системе Томлинсона — Генера (рис. 2). Их структура была подтверждена ферментативным гидролизом (рибонуклеазой Pb₂ или панкреатической РНКазой) с последующим анализом гидролизата методами хроматографии на бумаге и УФ-спектрофотометрии. Характеристики олигорибонуклеотидов приведены в табл. 5.

Таким образом, иммобилизованные препараты гуанилрибонуклеаз С₂, Vi и T₁ — эффективные катализаторы синтеза три-, тетра- и пентапуклеотидов, имеющих остаток гуаниловой кислоты на 5'-конце. Целесообразность использования того или иного фермента определяется нуклеотидным составом синтезируемого олигонуклеотида (см. табл. 3). Тринуклеозиддифосфаты, тетра- и пентапуклеотиды, синтезированные из G>p (pG>p) и динуклеозидмонофосфатов или более длинных олигонуклео-

реакцию G>p и 22% в расчете на израсходованный УрС (~75% УрС было регенерировано). Всего получено 90 мг GpUpC.

Наряду с синтетами тринуклеозиддифосфатов иммобилизованные гуанилрибонуклеазы были использованы нами для препаративного получения более длинных олигорибонуклеотидов (табл. 4). Удлинение акцептора на один нуклеотидный остаток практически не влияет на выход олигонуклеотида как для пиримидилового, так и для пуринового акцептора (ср. синтезы GpUpU, GpApA и GpUpUpU, GpApApA соответственно). В случае 5'-замещенного донора фосфата (pG>p) тетра- и пентапуклеотид образуются с достаточно высоким выходом при избытке донора фосфата.

Все синтезированные олигонуклеотиды были гомогенны по данным

Таблица 5

Характеристики синтезированных олигонуклеотидов

Олигонуклеотид	R* в системах		E _{Gp}	Ферментативный гидролиз		УФ-спектр (H ₂ O)	
	A	B		РНКазы	продукты (соотношение)	λ _{max}	λ _{min}
GpCpU	0,86	0,26	0,80	Pb ₂ Панкреатическая	Gp : Cp : U (1 : 0,8 : 1)	260	230
GpCpC	0,94	0,23	0,78		GpCp : C** (1 : 1)	270	230
GpCpA	1,0	0,50	0,81	Pb ₂	Gp : Cp : A (1 : 1 : 1)	260	235
GpCpG	0,63	0,30	0,75		Gp : Cp : G (1 : 1 : 1)	259	237
GpUpU	1,04	0,85	0,85	Панкреатическая	Gp : Up : U (1 : 1 : 1)	258	230
GpUpC	1,0	0,35	0,84		GpUp : C** (1 : 1)	258	229
GpUpA	1,04	0,30	0,74	Pb ₂	Gp : Up : A (1 : 1 : 0,9)	258	232
GpApU	1,05	0,34	0,81		Gp : Ap : U (1 : 0,9 : 1)	259	230
GpApC	0,89	0,30	0,76		Gp : Ap : C (1 : 1 : 0,9)	260	228
GpApA	1,0	0,44	0,76	—	—	—	—
GpApG	0,56	0,41	0,74	—	—	255	230
GpUpUpU	0,38	0,16	0,91	Pb ₂	Gp : Up : U (1 : 2 : 1)	256	236
GpApApA	0,45	0,16	0,83	Pb ₂	Gp : Ap : A (1 : 2 : 1)	258	232
pGpUpUpC	0,30	—	1,02	—	—	258	230
pGpApUpUpCpC	0,12	—	1,0	T ₁	pGp : ApUpCpC (1 : 1,1)	263	233

* В системе А определены относительно Gp, а в системе В — относительно соответствующего динуклеозидмонофосфата — акцептора.

** Гидролиз РНКазой Pb₂ образовавшихся динуклеотидов GpCp и GpUp приводит к образованию Gp и Cp в отношении 1 : 0,9 и Gp : Up = 1 : 1 соответственно.

тидов, устойчивых к действию гуанилрибонуклеаз, не только служили моделями для проверки предлагаемого способа синтеза, но и использовались нами как субстраты РНК-лигазы [3] или как исходные блоки при получении более крупных фрагментов рибонуклеиновых кислот [26] или их аналогов [27].

Экспериментальная часть

В работе использовали уридин, цитидин, натриевую соль 2',3'-циклофосфата аденозина (Reanal, Венгрия), циклогексилгуанидиневые соли 2',3'-циклофосфатов гуанозина, цитидина и уридина (Calbiochem, США), которые превращали в аммониевые соли обработкой дауэксом 50W×2 (NH_4^+ -форма). Цитидин был дополнительно очищен колоночной хроматографией на дауэксе 50W×2 (H^+ -форма; Serva, ФРГ) и на сефадексе G-15 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция).

Получение иммобилизованных препаратов ферментов CM-Pb₂, CM-T₁, CM-Bi и sil-C₂ описано в работах [14, 1, 12 и 13] соответственно. Удельная активность этих препаратов, определенная по расщеплению A>p (CM-Pb₂ [14]) или G>p (CM-T₁ [1], CM-Bi [12]), составляла 0,13; 0,06 и 0,006 ед. акт./мг соответственно. Удельную активность sil-C₂ определяли, используя в качестве субстрата суммарную дрожжевую РНК и принимая за единицу активности количество фермента, дающее увеличение поглощения кислоторастворимых продуктов на 0,1 ОЕ₂₆₀ при 37°С за 15 мин. Ковалентно связанная с CM-целлюлозой панкреатическая РНКаза получена от фирмы Merck (ФРГ).

Хроматографию исходящим способом в системах растворителей этанол – пропанол-2 – конц. аммиак – вода, 60 : 5 : 10 : 25 (А); этанол – 1 М ацетат аммония, 7 : 3 (Б) и вертикальный электрофорез в 0,05 М бикарбонате триэтиламмония (рН 7,6) при напряжении 20 В/см в течение 1,5 ч проводили на бумагах FN-1, FN-2 или FN-15 (Filtrack, ГДР), предварительно промытых перед хроматографией соответствующей системой растворителей.

Гомогенность олигонуклеотидов проверяли микроколоночной хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте концентраций (0–0,2 М) NaCl в 0,01 М трис-HCl (рН 7,6), содержащем 7 М мочевины; размер колонки 1,2×50 мм; скорость элюции 600 мкл/ч (рис. 2).

УФ-спектры снимали на спектрофотометре Specord, остальные спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре СФ-26.

Макромасштабные синтезы динуклеозидмонофосфатов. Синтез ApC, ApU и UpC проводили как описано нами ранее [14, 26]. Начальные концентрации субстратов и ферментов, продолжительность инкубации приведены в табл. 1.

Для получения UpU и CpU раствор 140 мг (0,4 ммоль) U>p (NH_4^+ -соль) или 145 мг (0,4 ммоль) C>p (NH_4^+ -соль) и 488 мг (2 ммоль) или 366 мг (1,5 ммоль) уридина соответственно в 1,6 мл 0,05 М трис-HCl (рН 7,6) инкубировали с 20 мг рибонуклеазы CM-A в течение 3 ч. После отделения фермента центрифугированием реакционную смесь в случае UpU наносили на колонку (2,6×40 см) с DEAE-целлюлозой в HCO_3^- -форме и элюировали в линейном градиенте концентрации бикарбоната аммония (0–0,1 М, 2 л) со скоростью 1,8 мл/мин, объем фракций – 9,5 мл. В первом случае фракции 96–118, содержавшие UpU и U>p, упаривали, удаляли бикарбонат аммония многократным упариванием с 50% этанолом. UpU выделяли затем хроматографией на бумаге в системе А. Получено 25 мг (41,3 ммоль, 10%) UpU. Во втором случае нуклеозид отделяли от реакционной смеси гель-фильтрацией на сефадексе G-15 в воде, после чего CpU выделяли хроматографией на бумаге в системе А. Выделено 24,3 мг (40,5 ммоль, 10%) CpU.

CpC синтезировали 1 ч из 54,2 мг (150 ммоль) C>p (NH_4^+ -соль) и 110 мг (450 ммоль) цитидина в 0,6 мл 0,05 М трис-HCl (рН 7,6) в присутствии 8 мг рибонуклеазы CM-A при 0°С. Целевой продукт выделяли так же, как при получении CpU. Выделено 11 мг (11%) CpC.

Препаративные синтезы тринуклеозиддифосфатов и тетра- и пентануклеозидтрифосфатов. Раствор G>p (NH_4^+ -соль) и динуклеозидмонофосфата или тринуклеозиддифосфата в соответствующем буфере инкубировали при 0°С с иммобилизованным ферментом. Синтезы с использованием CM-T₁ и sil-C₂ проводили в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,0), с CM-Bi – в 0,1 М трис-HCl (рН 7,5). Объем реакционной смеси обычно составлял 20–60 мкл. Начальные концентрации субстратов и ферментов и результаты приведены в табл. 2–4. Продолжительность инкубации, как правило, была 24 ч. Реакционную смесь хроматографировали в системе А, полюсу с $R_{G,p}=1,0$ освобождали от примесей электрофорезом и повторной хроматографией в системе В.

Препаративные синтезы тетра- и пентануклеотида. а) pGrTrUpC: 94,5 ОЕ₂₆₀ (8 ммоль) pG>p и 54 ОЕ₂₆₀ (2 ммоль) TrUpC инкубировали с 0,76 мг CM-Bi в 0,1 мл трис-HCl (рН 7,5) в течение 24 ч при 0°С, фермент удаляли фильтрацией и компоненты реакционной смеси разделяли хроматографией в системе А; полюсу с $R_{G,p}=0,2$, содержащую pGrTrUpC, pGr и TrUpC, элюировали водой и подвергали электрофорезу. Целевой продукт с $E_{G,p}=1$ элюировали водой и обессоливали на сефадексе G-15 в воде. Выделено 17 ОЕ₂₆₀ (0,43 ммоль, 21,5%) pGrTrUpC.

б) pGrArUpCpC: синтез проводили аналогично (а) из 131 ОЕ₂₆₀ (11 ммоль) pG>p и 113 ОЕ₂₆₀ (2,8 ммоль) ArUpCpC. Получено 32 ОЕ₂₆₀ (0,61 ммоль, 21,8%) pGrArUpCpC.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соболева И. А., Хабарова М. И., Женодарова С. М. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 4. С. 508–515.
2. Кнорре Д. Г., Веньяминова А. Г., Женодарова С. М. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. № 6. С. 1703–1705.
3. Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Женодарова С. М. // Биооргани. химия. 1984. Т. 10. № 4. С. 498–505.
4. Romaniuk E., McLaughlin L. W., Neilson T., Romaniuk P. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 125. № 3. P. 633–643.
5. Веньяминова А. Г., Овчаренко Г. В., Репкова М. Н., Франк Л. А. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. № 5. С. 1376–1379.
6. Женодарова С. М. // Успехи химии. 1970. Т. 39. № 8. С. 1479–1483.
7. Bernfield M. R. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 9. P. 2014–2023.
8. Grünberger D., Holý A., Sorm F. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1968. V. 33. № 1. P. 286–295.
9. Uchida T., Funayama-Machida Ch. // J. Biochem. 1977. V. 81. № 5. P. 1237–1246.
10. Gassen H. G., Nolte R. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1974. V. 44. № 6. P. 1410–1415.
11. Vormbrock R., Morawietz R., Gassen H. G. // Biochim. et biophys. acta. 1974. V. 340. № 3. P. 348–358.
12. Шарипова Ф. Р., Балабан Н. П., Рязанов С. М., Лещинская И. Б., Хабарова М. И., Женодарова С. М. // Биооргани. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 505–510.
13. Варламов В. П., Балникова Г. Е., Орпа Л. А., Безбородова С. И., Рогожин С. В. // Тез. докл. V Всесоюз. симп. по инж. энзимологии. 1985. Т. 2. С. 251.
14. Соболева И. А., Хабарова М. И., Женодарова С. М. // Биооргани. химия. 1983. Т. 9. № 1. С. 36–42.
15. Хабарова М. И., Смолянинова О. А., Вагдонас А. С., Коваленко М. П., Женодарова С. М. // Биооргани. химия. 1978. Т. 4. № 6. С. 740–744.
16. Женодарова С. М., Гуляева В. И., Безбородова С. И. // Биооргани. химия. 1977. Т. 3. № 11. С. 1475–1478.
17. Lipsitt M. N. // J. Biol. Chem. 1964. V. 239. № 4. P. 1250–1255.
18. Mohr S. C., Thach R. E. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. № 24. P. 6566–6576.
19. Walz F. G., Terenna B. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 13. P. 2837–2842.
20. Osterman H. L., Walz F. G. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 10. P. 1984–1988.
21. Walz F. G., Osterman H. L., Libertin Ch. // Arch. Biochem. and Biophys. 1979. V. 195. № 1. P. 95–102.
22. Bezborodova S. I., Khodova O. M., Stepanov V. M. // FEBS Lett. 1983. V. 159. № 12. P. 256–258.
23. Шляпников С. В., Куликов В. А., Яковлев Г. И. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 346–357.
24. Hill Ch., Dodson G., Heinemann U., Saenger W., Mitsui Y., Nakamura K., Borisov S., Tischenko G., Polyakov K., Pavlovsky S. // TIBS. 1983. V. 8. № 10. P. 364–369.
25. Watanabe H., Ando E., Ohgi K., Irie M. // J. Biochem. 1985. V. 98. № 5. P. 1239–1245.
26. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 220–229.
27. Хабарова М. И., Женодарова С. М. // Тез. докл. V Всесоюзн. биохим. съезда. 1986. Т. 2. С. 422.

Поступила в редакцию
10.IX.1986
После доработки
1.XII.1986

STEPWISE OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS. XXXIV. PREPARATIVE SYNTHESIS OF TRIRIBONUCLEOSIDE DIPHOSPHATES AND LONGER OLIGORIBONUCLEOTIDES CATALYZED BY IMMOBILIZED RIBONUCLEASES

ZHENODAROVA S. M., SMOLYANINOVA O. A., SOBOLEVA I. A.,
KHABAROVA M. I.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR,
Pushchino, Moscow Region*

Immobilized guanyl-specific ribonucleases from *Aspergillus clavatus* (C₂), *A. oryzae* (T₁), and *Cacillus intermedius* 7P (Bi) have been used for preparative synthesis of trinucleoside diphosphates, three tetra- and one pentanucleotide having the only guanylic acid residue at the 5'-end. The nucleotide sequence of the oligonucleotide synthesized determined the choice of the ribonuclease.