



УДК 547.963.32.057:577.152.651.3.01

РНК-ЛИГАЗА БАКТЕРИОФАГА Т4

IV*. СИНТЕЗ ПЕНТАДЕКАРИБОНУКЛЕОТИДА $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$

Анциферова В. В., Вельяминова А. Г., Ренкова М. Н.*, Ялковой В. И.*

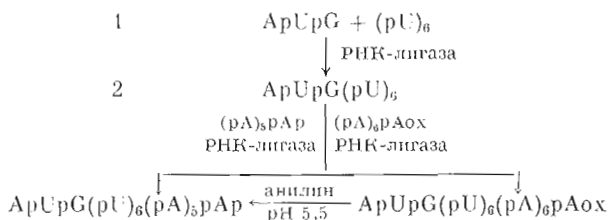
Новосибирский государственный университет;

** Новосибирский институт биорганической химии Сибирского отделения Академии наук СССР*

Осуществлен катализируемый РНК-лигазой синтез пентадекарибоуклеотида $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$ из гексарибоадениловой кислоты и нонарибонуклеотида $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$. Синтез данного соединения вели в условиях, оптимальных для сшивки «плоских» акцепторов (20° С, 48 ч, рН 8,7). В качестве защитных групп для блокирования 3'-конца донора $(\text{pA})_6$ были использованы или 3'-фосфат, или модифицированный периодатным окислением остаток АМР. Применение последнего приводило к меньшему количеству побочных продуктов. Выход $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$ в препаративном варианте синтеза после соответствующей очистки составил 20%. Структура полученного соединения доказана методами Питти и Донис-Келлер. Подтверждена описанная Кругом и Уленбеком способность РНК-лигазы отщеплять 3'-концевой нуклеозид-3',5'-дифосфат от олигорибонуклеотидов, терминированных 3'-фосфатной группой.

Синтетические олигорибонуклеотиды с определенной последовательностью гетероциклических оснований в настоящее время широко используются в качестве инструментов исследования для решения целого ряда проблем биорганической химии и молекулярной биологии. В частности, олигорибонуклеотиды, содержащие кодон инициации ArUpG на 5'-конце молекулы, нашли применение в качестве моделей мРНК в исследованиях процессов функционирования рибосом [2—4].

В настоящей работе описан катализируемый РНК-лигазой (КФ 6.5.1.3) препаративный синтез аналога мРНК-пентадекарибоуклеотида $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$, проведенный по следующей схеме:



где Аох — окисленный периодатом натрия аденозин.

Катализируемый РНК-лигазой синтез нонарибонуклеотида $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$ из гексарибоуридилловой кислоты, полученной гидролизом $\text{poly}(\text{U})$ эндонуклеазой из яда кобры (КФ 3.1.4.27) [5], и химически синтезированного [4] тринуклеотида ArUpG (реакция 1) проводили в условиях, близких к описанным нами ранее [1]. Всего было получено 300 ОЕ₂₆₀ нонарибонуклеотида $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$, который был использован далее в качестве акцептора фосфатного компонента в реакции 2.

На следующем этапе синтеза с целью апробации предложенных ранее простейших защитных групп [6] для блокирования 3'-конца донора $(\text{pA})_6$ были использованы 3'-фосфатная группа или модифицированный периодатным окислением остаток АМР—pAox. Оба типа блокированных по 3'-концу доноров получали по методу [7] из гексарибоадениловой кисло-

* Сообщение III см. [1].

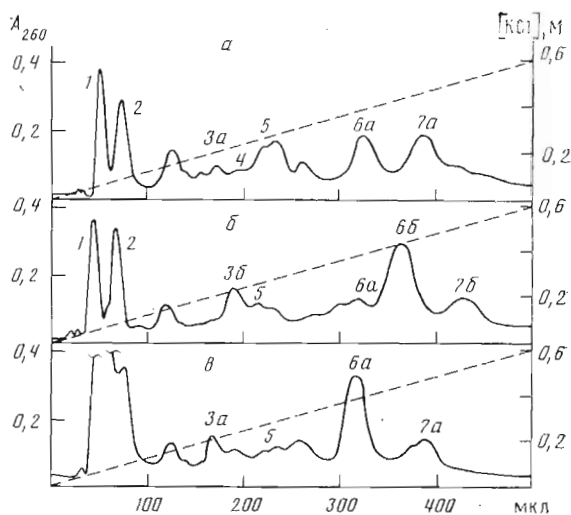


Рис. 1. Микроколоночная хроматография на носителе с обращенной фазой [9] аликвот реакционных смесей, отобранных через 48 ч от начала реакции, при синтезе пентадекарбонуклеотида $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$ с использованием доноров $(\text{pA})_5\text{pAr}$ (а), $(\text{pA})_6\text{pAox}$ (б), $(\text{pA})_6\text{pAox}$ (в) (реакционная смесь обработана анилином). Пики: 1 — АМР, 2 — АТР, 3а — $(\text{pA})_5\text{pAr}$, 3б — $(\text{pA})_6\text{pAox}$, 4 — $\Lambda(5')\text{ppA}(\text{pA})_4\text{pAr}$, 5 — $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$, 6а — $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$, 6б — $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_6\text{pAox}$, 7а — $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_{10}\text{pAr}$, 7б — $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_{11}\text{pAox}$. Пики 1, 2, 3а, 3б и 5 идентифицированы по соответствующим маркерам, пик 4 — по включению радиоактивной метки при добавлении в реакционную смесь $[8\text{-}^3\text{H}]\text{АТР}$; структура пиков 6б и 7б подтверждена обработкой анилином

ты $(\text{pA})_7$ путем окисления ее 3'-концевой *cis*-диолевой группировки периодатом натрия (донор $(\text{pA})_6\text{pAox}$) и затем последующей элиминации окисленного аденозина анилином (донор $(\text{pA})_5\text{pAr}$). После соответствующей очистки (см. «Экспериментальную часть») защищенные по 3'-концевым гидроксильным группам доноры были «сшиты» РНК-лигазой с акцептором $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$ при эквимолярном соотношении донор — акцептор. Условия реакции 2 (20°C , 48 ч, pH 8,7) соответствовали описанным ранее [8] оптимальным условиям для случая использования «плохих» акцепторов.

Из результатов хроматографического анализа состава аликвот реакционных смесей, отобранных после «сшивания» в течение 48 ч РНК-лигазой акцептора $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$ с донором, блокированным по 3'-концу фосфатом $(\text{pA})_5\text{pAr}$ (рис. 1а), видно, что при использовании этого донора наряду с целевым продуктом реакции — пентадекарбонуклеотидом $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$ (пик 6а) — в реакционной смеси накапливается в значительном количестве еще один продукт (пик 7а), идентифицированный позднее как 20-звенный олигорибонуклеотид $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_{10}\text{pAr}$. При использовании донора $(\text{pA})_6\text{pAox}$ аналогичный побочный продукт (7б) образуется в значительно меньшем количестве (рис. 1б).

Учитывая это обстоятельство, а также практически одинаковую при использовании обоих доноров глубину реакции (рис. 1), препаративный синтез пентадекарбонуклеотида был осуществлен лигированием акцептора $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$ с донором $(\text{pA})_6\text{pAox}$. Для снятия защитной группы Аох реакционную смесь обрабатывали анилином и далее выделяли целевой продукт хроматографией на носителе [9] (рис. 1в). Выход пентадекарбонуклеотида $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$ в препаративном варианте синтеза после проведения всех процедур составил 20% (при степени превращения для донора и акцептора, достигающей, по данным аналитической хроматографии (рис. 1б, пики 3б и 5 соответственно), 82 и 90%). Хроматографическая гомогенность синтезированного пентадекарбонуклеотида показана на рис. 2, а его строение однозначно подтверждено рис. 3а и 4. Всего таким образом было получено 105 OE_{260} пентадекарбонуклеотида $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$.

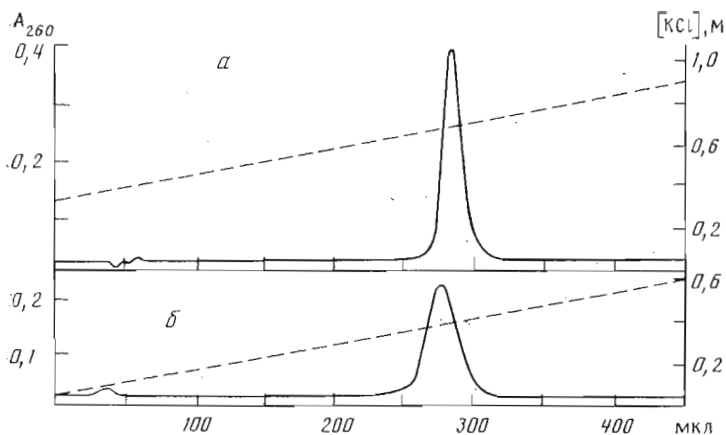


Рис. 2: Микроколоночная хроматография пентадекарбонуклеотида $\text{ApUpG(pU)}_6(\text{pA})_5\text{pAr}$ на Аминохроме (а) и носителе с обращенной фазой [9] (б)

Как видно из рис. 1а, наряду с ожидаемым пентадекарбонуклеотидом в реакции 2 образуется несколько побочных продуктов, в том числе и большей длины. Один из этих продуктов (пик 7а) был выделен аналогично $\text{ApUpG(pU)}_6(\text{pA})_5\text{pAr}$ в хроматографически однородном виде. По первоначально полученным нами данным, этот олигорибонуклеотид соответствовал продукту двукратного присоединения донора $(\text{pA})_5\text{pAr}$ к акцептору ApUpG(pU)_6 . При последующем установлении его структуры методом Питти [10] (рис. 3б) было показано, что это $\text{ApUpG(pU)}_6(\text{pA})_{10}\text{pAr}$. Появление такого побочного продукта в реакционной смеси может быть объяснено тем, что, как и в случаях, описанных Кругом и Уленбеком [12], РНК-лигаза при синтезе пентадекарбонуклеотида $\text{ApUpG(pU)}_6 \cdot (\text{pA})_5\text{pAr}$ способна удалить 3'-концевой остаток рАр образующегося целого продукта. Последующее присоединение к акцептору $\text{ApUpG(pU)}_6 \cdot (\text{pA})_5$ донора $(\text{pA})_5\text{pAr}$ приводит к образованию 20-звенного олигорибонуклеотида $\text{ApUpG(pU)}_6(\text{pA})_{10}\text{pAr}$.

Экспериментальная часть

В работе были использованы дитиотреит (Koch-Light, Англия); глицерин, трис (Serva, ФРГ); АТФ альбумин из сыворотки крови человека (Sigma, США); QAE-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция); poly(A), poly(U) (НИКТИ БАН, Бердск); хроматографический носитель Аминохром (ИИС НГУ, Новосибирск); остальные реактивы были марок х. ч. или ос. ч.

Хроматографический носитель с обращенной фазой, представляющий собой полихлортрифторэтиленовый порошок с нанесенным на него тетраэтиламмонийбромидом, получали по методу [9].

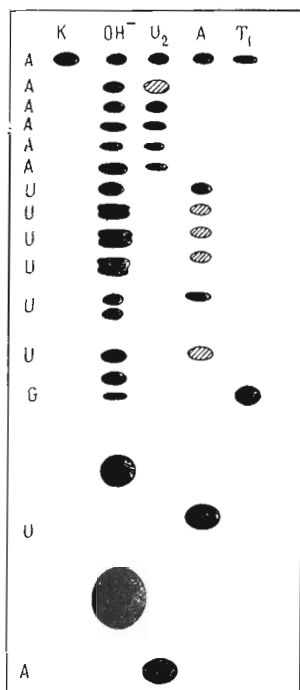
Эндонуклеазу из яда кобры Naja naja oxiana выделяли по методу, близкому к описанному в работе [13] путем последовательного фракционирования раствора яда гелефильтрацией на сефадексе G-75 (сверхмелком) и катионообменной хроматографией. При этом предварительная стадия очистки — диализ [13] — была опущена, а при выполнении катионообменной хроматографии вместо SE-целлюлозы (0,6 экв/г) был использован более емкий SP-сефадекс С-25 (2,3 экв/г).

РНК-лигазу выделяли из биомассы *E. coli* В, инфицированной бактериофагом T4amN82, по методу [14]. Полученный препарат фермента (43,4 мкМ РНК-лигаза; 8,4 мг белка/мл) содержал не более 1 ед. акт. 3'-экзонуклеазы на 1 пмоль РНК-лигазы [15].

Гомеолигорибонуклеотиды, терминированные 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной группами, получали путем гидролиза соответствующих полирибонуклеотидов эндонуклеазой из яда кобры по методу [5].

Донор $(\text{pA})_5\text{pAr}$ получали периодатным окислением гептарыбоадениловой кислоты по методу [7] с некоторыми модификациями. Для этого 300 OE_{260} $(\text{pA})_7$ инкубировали в темноте 30 мин при 0°С с 20 мг NaIO_4 в 2 мл 0,05 М NaCl . Окисленную периодатом натрия гептарыбоадениловую кислоту осаждали 3–5-кратным объемом охлажденного до -20°С этанола. Через 1 ч сформировавшийся осадок $(\text{pA})_5\text{pAr}$ отделяли центрифугированием, растворяли в 2 мл бидистиллированной воды и обессоливали диализом против трех порций по 1 л бидистиллированной воды, после чего раствор $(\text{pA})_5\text{pAr}$ замораживали.

Рис. 4. Радиоавтограмма (реконструкция) полиакриламидного геля при определении первичной структуры $^{32}\text{PArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$ по методу [11]. Слева направо — контроль (исходный пентадекарбонуклеотид), щелочной и рибонуклеазные (U_2 , A и T_1) гидролизаты. Разделение электрофорезом в 20% полиакриламидном геле в присутствии 7 М мочевины



Донор $(\text{pA})_5\text{pAr}$. К полученному, как описано выше, осадку $(\text{pA})_6\text{pAox}$ добавляли 2 мл 0,3 М раствора анилина в 0,01 М ацетатном буфере, pH которого был доведен до 5,0 концентрированной HCl (использовали свежеприготовленный раствор). Реакционную смесь выдерживали 3 ч при 25° С. Гексарибонуклеотид $(\text{pA})_5\text{pAr}$ освобождали от анилина и отщепившегося аденозина двукратным осаждением этанолом и очищали дополнительно ионообменной хроматографией на колонке (2×25 см) с QAE-сефадексом А-25 в HCO_3^- -форме. Элюцию вели со скоростью 50 мл/ч 1 л раствора бикарбоната аммония (линейный градиент концентрации от 0,5 до 1,5 М в 15% дioxане). Целевой гексарибонуклеотид элюировался при концентрации бикарбоната аммония, равной 0,85 М. Фракции, соответствующие пику целевого продукта, объединяли и упаривали несколько раз с добавлением бидистиллированной воды, после чего лиофилизовали.

Акцептор ArUpG синтезировали, исходя из защищенных нуклеозидов, с помощью *p*-хлорфенилфосфотриазолида и 4-диметиламинопиридина, как описано нами ранее [4], с некоторыми модификациями. Выделение ArUpG и доказательство строения проводили в соответствии с [4].

Акцептор $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$ получали по методу [1], за исключением того, что концентрация РНК-лигазы была снижена до 0,25 мкМ, а время реакции увеличено до 24 ч. Объем реакционной смеси составлял 10 мл. Выделение и доказательство строения $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$ проводили как описано в работе [1]. Выход целевого продукта после обессоливания и лиофилизации — 30%.

Пентадекарбонуклеотид $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$ получали «сшиванием» блокированных по 3'-концу доноров $(\text{pA})_5\text{pAr}$ и $(\text{pA})_6\text{pAox}$ с понарибонуклеотидом $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$ при 20° С в объеме 0,1–1,75 мл. Концентрации компонентов реакционной смеси были следующие: $\text{ArUpG}(\text{pU})_6$ — 1 мМ, доноров — 1 мМ, АТФ — 2 мМ, трис-HCl-буфера (pH 8,7 при 20° С) — 0,05 М, MgCl_2 — 10 мМ, дитиотрепта — 10 мМ, РНК-лигазы — 3 мкМ, альбумина — 0,2 мг/мл, глицерина — 12,5% (по объему).

За ходом реакции следили, анализируя отобранные во времени пробы (1 мкл пробы разбавляли 20 мкл воды и прогревали в течение 2 мин при 100° С) методом МКХ [16] на хроматографическом носителе с обратной фазой [9]. Для анализа использовали канюлярную колонку (объем 40 мкл, длина 50 мм). Элюцию вели со скоростью 500 мкл/ч в линейном градиенте концентрации KCl (от 0 до 0,6 М) в 0,01 М имидазол-HCl-буфере (500 мкл, pH 7,0) с 7 М мочевиной (рис. 1).

Через 48 ч от начала реакции реакционную смесь с донором $(\text{pA})_5\text{pAr}$ замораживали. К реакционной смеси с донором $(\text{pA})_6\text{pAox}$ добавляли 4-кратный объем свежеприготовленного 0,3 М раствора анилина в 0,01 М ацетатном буфере, pH которого был доведен до 5,5 концентрированной HCl. Реакционную смесь выдерживали 3 ч при 40° С. В этих несколько более жестких по сравнению с традиционными [7] условиях окисленный периодатом натрия 3'-концевой аденозин донора $(\text{pA})_6\text{pAox}$ отщепляется анилином практически количественно.

Синтезированный пентадекарбонуклеотид $\text{ArUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAr}$ выделяли из реакционной смеси порциями по 20 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотидного материала, используя колонку (0,65×14 см) с сорбентом, полученным по методике [9], и элюируя вещества со скоростью 10 мл/ч 40 мл раствора KCl (линейный градиент концентрации KCl от 0,05 до 0,5 М в 0,01 М имидазол-HCl-буфере (pH 7,0) с 9 М мочевиной). В этих

условиях пентадекаримбонуклеотид $\text{ApUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAp}$ элюировался с колонки при концентрации KCl , равной 0,3 М. Целевой продукт собирали, обессоливали диализом (4×1 л бидистиллированной воды) и лиофилизировали.

Гомогенность полученного пентадекаримбонуклеотида доказывали МХХ на Аминохроме и хроматографическом носителе с обращенной фазой [9] (рис. 2). В работе использовали капиллярные колонки (объем 40 мкл, длина 50 мм). Элюцию вели со скоростью 500 мкл/ч в линейном градиенте концентрации KCl от 0,35 до 0,9 М (в случае Ампрохрома) и от 0,05 до 0,6 М (в случае хроматографического носителя с обращенной фазой) в 0,01 М имидазол- HCl -буфере (450 мкл, pH 7,0), содержащем 7 М мочевины.

Авторы сердечно благодарят А. С. Манькина (МГУ) за анализ нуклеотидных последовательностей олигоримбонуклеотидов методом Плтти.

Авторы глубоко признательны акад. Д. Г. Кнорре за постоянный интерес к работе и ее поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веньямина А. Г., Франк Л. А., Ямковой В. И. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 1. С. 98–102.
2. Ganoza M. C., Frazer A. R., Neilson T. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 14. P. 2769–2775.
3. Ganoza M. C., Sullivan P., Cunningham Ch., Hader P., Kofoed E. C., Neilson T. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 14. P. 8228–8232.
4. Бабкина Г. Т., Карпова Г. Г., Берзиль В. А., Грен Э. Я., Циеленс И. Э., Веньямина А. Г., Репкова М. Н., Ямковой В. И. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 11. С. 1535–1543.
5. Василенко С. К., Сербо И. А., Веньямина А. Г., Болдырева Л. Г., Будкер В. Г., Кобец Н. Д. // Биохимия. 1976. Т. 41. Вып. 2. С. 260–263.
6. Веньямина А. Г., Ямковой В. И. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 10. С. 1445–1466.
7. Френкель-Конрат Г., Стайншнайдер А. // Методы исследования нуклеиновых кислот. М.: Мир. 1970. С. 105–107.
8. Ямковой В. И. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1808–1812.
9. Ямковой В. И. Хроматографический носитель для фракционирования олигонуклеотидов. А. с. 685975 СССР // Б. И. 1979. № 34.
10. Peattie D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 4. P. 1760–1764.
11. Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 8. P. 2527–2538.
12. Krug M., Uhlenbeck O. C. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 8. P. 1858–1864.
13. Василенко С. К., Райт В. К. // Биохимия. 1975. Т. 40. Вып. 3. С. 578–583.
14. Ямковой В. И., Веньямина А. Г., Василенко С. К., Нечаев Ю. С., Бакланов М. М., Чистяков П. Г., Опищенко А. М. Способ получения РНК-лигазы. А. с. 910762 СССР // Б. И. 1982. № 9.
15. Ямковой В. И. РНК-лигаза бактериофага Т4: оптимизация процесса выделения и условий катализируемой реакции с целью использования в олигоримбонуклеотидном синтезе. Канд. дис. Новосибирск. 1982.
16. Varan G. J., Grachev M. A., Komarova N. J., Perelroyzen M. P., Bolvanov Yu. A., Kuzmin S. V., Kargaltsev V. V., Kuper E. A. // J. Chromatogr. 1983. V. 264. № 1. P. 69–90.

Поступила в редакцию
9.VII.1986

После доработки
26.XII.1986

BACTERIOPHAGE T4 RNA LIGASE. IV. SYNTHESIS OF PENTADECARIBONUCLEOTIDE $\text{ApUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAp}$

ANTSIFEROVA V. V., VENIJAMINOVA A. G.*, REPKOVA M. N.*,
YAMKOVY V. I.

Novosibirsk State University;

* *Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch,
Academy of Sciences of the USSR*

Oligoribonucleotide $\text{ApUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_5\text{pAp}$ (I) has been prepared by means of RNA ligase. ApUpG , synthesised by the phosphotriester approach, was elongated in the 3'-direction by adding $(\text{pU})_6$ and then $(\text{pA})_6$, which was 3'-blocked with the phosphate or with the periodate-oxidized AMP residue, the latter giving considerably lower level of by-products. Condensation of $\text{ApUpG}(\text{pU})_6$ with blocked $(\text{pA})_6$ was carried out under conditions optimal for poor acceptors (20°C , 48 h, pH 8.7) to afford (I) with the yield of 20% (105 OE₂₆₀); $\text{ApUpG}(\text{pU})_6(\text{pA})_{10}\text{pAp}$ was identified as a by-product.