



УДК 577.214.3+547.963.32.057

**СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI* И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ
СИНТЕТИЧЕСКИХ ДНК-МАТРИЦ**

*Денисова Л. Я., Загребельный С. Н., Пустошилова Н. М.,
Веньямина А. Г.*, Горн В. В.*, Зарытова В. Ф.*,
Ренкова М. Н.*, Шишкина И. Г.**

*Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт
биологически активных веществ, г. Бердск Новосибирской области;
* Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Синтетические олигорибонуклеотиды приобретают все большее значение как инструменты исследования природных структур и процессов в различных областях биоорганической химии и молекулярной биологии, и это стимулирует активный поиск эффективных химических и ферментативных методов их синтеза [1].

Ранее было показано, что РНК-полимераза *E. coli* считывает *in vitro* синтетические одноцепочечные олигодезоксирибонуклеотиды, давая точную копию матрицы в специально подобранных условиях [2–6]. Основным недостатком этой системы транскрипции — однократное считывание матрицы. Тем не менее наличие современных автоматических методов синтеза олигодезоксирибонуклеотидов позволяет считать транскрипцию в системе бактериальной РНК-полимеразы достаточно эффективным методом получения олигорибонуклеотидов заданного строения.

С целью дальнейшего повышения эффективности данной системы в настоящей работе на примере синтеза двух фрагментов — фрагмента РНК фага *φr* (III) и фрагмента РНК вируса клещевого энцефалита (IV) — исследована возможность транскрипции синтетических ДНК-матриц, иммобилизованных на твердом носителе.

Хотя использование иммобилизованных синтетических олигонуклеотидов в качестве матриц или затравок для ферментативного синтеза олиго- и полинуклеотидов описано в ряде работ (например, [7–9]), для ДНК-зависимых РНК-полимераз такой подход ранее не был реализован.

Иммобилизацию олигодезоксирибонуклеотидов (I) и (II), синтезированных автоматическим фосфитамидным методом [10], на модифицированном силикагеле, содержащем первичные аминогруппы (Lichrosorb-NH₂, Merck, ФРГ), проводили с использованием реакции аминогрупп полимера с активированным 5'-фосфатом олигонуклеотида. Для активации применяли смесь дипиридилдисульфида, трифенилфосфина и *N*-метилимидазола [11]. Непрореагировавшие NH₂-группы блокировали уксусным ангидридом. Количество иммобилизованных олигодезоксирибонуклеотидов (I) и (II) составляло 1,875 и 0,16 мкмоль/г соответственно.

Состав реакционной смеси для транскрипции иммобилизованных олигодезоксирибонуклеотидов аналогичен составу смеси, описанному ранее для растворимых матриц [6, 9]. Затравкой служил *gAUG*, полученный фосфотриэфирым методом [12]. Реакцию проводили при комнатной температуре (22°С) при постоянном перемешивании.

Синтезированный олигорибонуклеотид извлекали из комплекса с иммобилизованной матрицей, разрушая этот комплекс инкубацией при 60°С в буфере, содержащем 10 мМ трис-HCl (рН 7,9), 1 мМ EDTA. Предварительно осадок силикагеля, содержащий иммобилизованный олигодезокси-

рибонуклеозид и находящийся с ним в комплексе транскрипт, отмывали при 0° С от непрореагировавших компонентов реакционной смеси буфером состава 10 мМ трис-НСl, рН 7,9, и 100 мМ NaCl.

Изучение кинетики транскрипции матрицы (II) показало, что, как и в случае растворимых олигодезоксирибонуклеотидов [3—5], реакция выходит на плато через 1 сут. При этом количество синтезированного олигонуклеотида составляет ~20% от нуклеотидного материала матрицы.

Такой же выход наблюдается и на иммобилизованной матрице (I), имеющей в 10 раз большую емкость. Попытки увеличить количество синтезированного РНК-продукта добавлением дополнительных порций РНК-полимеразы, нуклеозидтрифосфатов и реагентов, обычно стимулирующих фаговые РНК-полимеразы (спермидин, тритон X-100, полиэтиленгликоль, бычий сывороточный альбумин), а также варьированием температуры реакции оказались безуспешными.

Иммобилизованные ДНК-матрицы (I) и (II) использовали в пяти последовательных опытах по синтезу олигорибонуклеотидов практически без потери их матричной активности.

Продукты транскрипции, полученные на иммобилизованных олигодезоксирибонуклеотидах (I) и (II), фракционировали электрофорезом в 20% полиакриламидном геле с 7 М мочевиной (рис. 1). В случае матрицы (I) наблюдалась одна полоса транскрипта (III) (не менее 80% от суммарного меченого ³²P олигонуклеотидного материала), а в случае нуклеотида (II) — преимущественно две полосы, соответствующие рибонуклеотидам (IV) и (V).



P — полимер; подчеркнута затравка.

Определение нуклеотидной последовательности этих транскриптов по методу Донис-Келлер и соавт. [13] (рис. 2) показало, что более высокомолекулярный продукт (IV) полностью комплементарен транскрибируемому участку матрицы (II) (начиная с затравки гAUG), в то время как второй транскрипт (V) оказался на 2 нуклеотида с 3'-конца короче. В случае же олигодезоксирибонуклеотида (I) основной продукт транскрипции (III) является полной комплементарной копией матрицы.

Таким образом, мы показали принципиальную возможность транскрипции иммобилизованных ДНК-матриц в системе ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*. С целью подбора оптимальных условий транскрипции в настоящее время исследуется влияние природы полимера и способа его связи с олигодезоксирибонуклеотидом на выход РНК-транскрипта.

В последнее время значительные успехи в области синтеза фрагментов РНК были достигнуты с использованием ДНК-зависимых РНК-полимераз фагов T7 и SP6 и синтетических ДНК-матриц [14—16]. Ферменты этих фагов считывают матрицу многократно. Однако степень однородности образующихся продуктов невелика. В наших условиях продукт получается достаточно однородным, а применение иммобилизованных матриц существенно облегчает отделение продукта от матрицы и позволяет повысить его выход за счет многократного использования матрицы.

В настоящей работе на примере синтеза олигорибонуклеотидов (III) и (IV) предложен новый подход, основанный на использовании для транскрипции синтетических ДНК-матриц, иммобилизованных на твердом носителе. Этот подход может оказаться перспективным при транскрипции ДНК-матриц с использованием фаговых ДНК-зависимых РНК-полимераз.

Рис. 1. Радиоавтограф 20% полиакриламидного геля, содержащего продукты транскрипции имобилизованных олигодезоксирибонуклеотидов (I) и (II). Стрелками показаны РНК-продукты (III-V), для которых определена нуклеотидная последовательность,

Рис. 2. Радиоавтограф 25% ПААГ, содержащего продукты неполного гидролиза щелочью, РНКазами А и Т1 транскриптов (IV), (V) и (II) (а, б, в соответственно). Пятно, соответствующее ^{32}P , очень слабое и на фотографии не видно (обозначено (А))

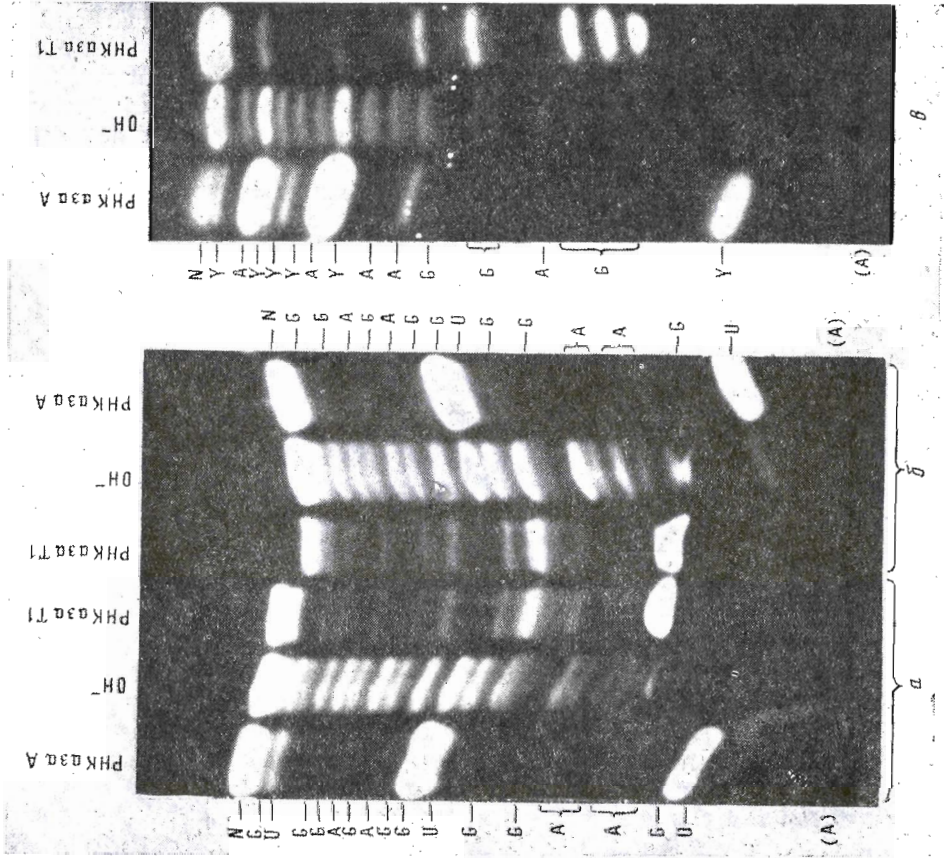


Рис. 2

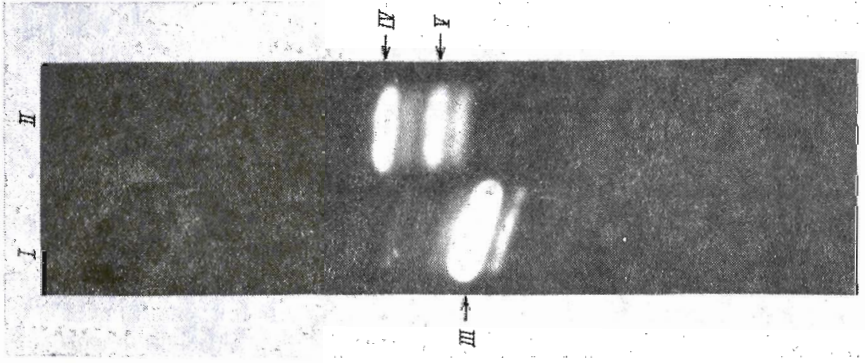


Рис. 1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Женодарова С. М. // Итоги науки и техники. Серия «Биоорганическая химия». М.: ВИНТИ, 1987. 147 с.
2. Nishimura S., Jacob T. M., Khorana H. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1964. V. 52. P. 1494-1501.
3. Денисова Л. Я., Загребельный С. Н., Пустошилова Н. М. // Молекуляр. биология. 1974. Т. 8. № 5. С. 643-650.
4. Белова Н. М., Денисова Л. Я., Загребельный С. Н., Пустошилова Н. М., Сайкович Е. Г. // Молекуляр. биология. 1979. Т. 13. № 4. С. 845-853.
5. Денисова Л. Я., Загребельный С. Н., Кугявин П. В., Пустошилова Н. М. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 267. № 2. С. 475-478.
6. Бадашкеева А. Р., Денисова Л. Я., Загребельный С. Н., Кнорре Д. Г., Пустошилова Н. М., Шубина Т. Н. // Молекуляр. биология. 1978. Т. 12. № 2. С. 327-333.
7. Panet A., Khorana H. G. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 16. P. 5213-5221.
8. Köster H., Albersmeyer K., Skroch D. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1978. B. 359. № 11. S. 1579-1589.
9. Rouchoudhury R., Kühn S., Schott H., Kössel H. // FEBS Lett. 1975. V. 50. № 2. P. 140-143.
10. Грязнов С. М., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Кумарев В. П., Левина А. С., Полищук А. С., Потапов В. К., Потемкин Г. А., Средин Ю. Г., Шабарова З. А. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1987. № 2. Вып. 1. С. 119-123.
11. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская А. М. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475-481.
12. Веняминова А. Г., Овчаренко Г. В., Репкова М. Н., Франк Л. А. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. № 5. С. 1376-1379.
13. Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 8. P. 2527-2538.
14. Milligan J. F., Groebe D. R., Witherell G. W., Uhlenbeck O. C. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 21. P. 8783-8798.
15. Lee G. // Gene Anal. Techn. 1986. V. 3. № 3. P. 45-52.
16. Sharmeen L., Taylor J. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 16. P. 6705-6711.

Поступила в редакцию
13.X.1988

SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES BY *E. COLI* RNA
POLYMERASE ON IMMOBILIZED SYNTHETIC DNA-TEMPLATES

DENISOVA L. Ya., ZAGREBELNY S. N., PUSTOSHILOVA N. M.,
VENIJAMINOVA A. G.*, GORN V. V.*, ZARYTOVA V. F.*, REPKOVA M. N.*,
SHISHKINA I. G.*

Research Institute for Design and Technology
of Biologically Active Compounds, Berdsk,
Novosibirsk Region;

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

A new approach to synthesis of oligoribonucleotides is suggested, based on transcription by *E. coli* RNA polymerase of synthetic immobilized DNA-templates with AUG as primer. The approach has been experimentally verified by synthesis of two oligonucleotides, viz., a RNA fragment of the *φ*r phage (16 nucleotides long) and a RNA fragment of the tickborne encephalitis virus (18 nucleotides long). Fraction of the synthesized RNA fragments in the whole nucleotide material is about 20%. The templates can be used repeatedly. Sequences of the oligoribonucleotides were confirmed. Advantages of this approach and its usefulness for SP6 DNA-dependent RNA polymerase are discussed.