



УДК 547.962.32

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$  ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ.  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ГУАНИЛ-РИБОНУКЛЕАЗНОГО  
ГИДРОЛИЗАТА

*Крюков В. М., Горбулев В. Г., Аксельрод В. Д.*

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР,  
Москва*

Определена последовательность оснований в олигонуклеотидах гуанил-РНКазного гидролизата  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$  пекарских дрожжей. Олигонуклеотиды разделены колоночной хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе в 7 М мочеvine при нейтральном рН и рехроматографией на том же сорбенте при рН 3,5. Для анализа состава и структуры олигонуклеотидов использовали их полный гидролиз  $T_2$ -РНКазой, пиримидил-РНКазой, фосфодиэстеразой змеиного яда (ФДЭ), экзонуклеазой А-5 и частичные гидролизы А-5 экзонуклеазой и ФДЭ. Продукты гидролиза разделяли ТСХ на целлюлозе и идентифицировали по составу нуклеозидов и УФ-спектрам.

Ранее нами было описано [1] фракционирование валиновых  $t\text{РНК}$  пекарских дрожжей и показано, что помимо  $t\text{РНК}_1^{\text{Val}}$ , структура которой была определена в 1967 г. [2], имеются еще по крайней мере три изоакцепторных валиновых  $t\text{РНК}$ .

Данная статья посвящена описанию деталей исследования гуанил-рибонуклеазного гидролизата  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$ , первичная структура которой была нами опубликована ранее [3, 4].

Как можно видеть из рис. 1, хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе в 7 М мочеvine при рН 7,5 с последующей рехроматографией трех групп пиков при 3,5 достаточно для получения всех олигонуклеотидов гуанил-РНКазного гидролизата  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$  в гомогенном состоянии. Гомогенность полученных олигонуклеотидов была подтверждена с помощью ТСХ. Фракции, соответствующие каждому пику, объединяли, освобождали от мочеvine и солей гель-фильтрацией на биогеле Р-2 [5] и определяли строение содержащихся в них олигонуклеотидов.

В данной работе использованы три метода определения нуклеотидного состава: два варианта микроколоночной хроматографии и двумерная ТСХ нуклеозидов на целлюлозе. Для колоночной хроматографии в микромасштабе мы применяли стандартные проточные денситометры с заменой стандартной кюветы на кювету объемом  $\sim 30$  мкл. Это позволило при соответствующем уменьшении всего масштаба хроматографии и работе на максимальной чувствительности получать надежные количественные данные при содержании в пике 0,01—0,03 ОЕ нуклеотидного материала. Использованная нами катионообменная хроматография нуклеозидов на хромексе UA-8 (рис. 2, а) аналогична широко применяемому методу Узиеля и др. [6]. Основное отличие заключается в замене используемого этими авторами

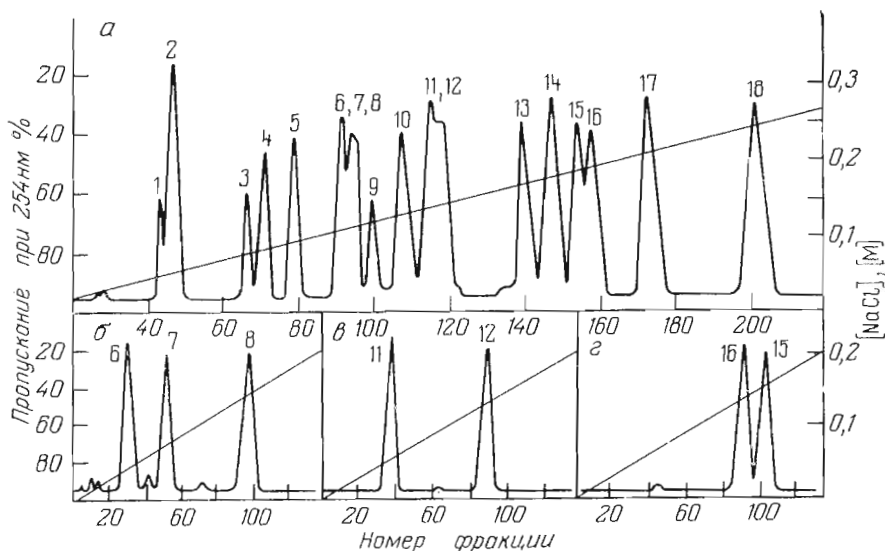


Рис. 1. Разделение на DEAE-целлюлозе продуктов гуанил-РНКазного гидролизата тРНК<sub>2a</sub><sup>Val</sup>: а — хроматография 210 ОЕ гидролизата в 7 М мочеvine, рН 7,4. Колонка 75 × 0,7 см. Смесь: 600 мл 7 М мочеvины, 0,02 М трис-НСl, рН 7,4. Резервуар: 600 мл 7 М мочеvины, 0,3 М NaCl, 0,02 М трис-НСl, рН 7,4. Скорость элюции 9 мл/ч, объем фракции 4,5 мл; б, в, г — рехроматография на DEAE-целлюлозе в 7 М мочеvине при рН 3,5 групп пиков 6—7—8, 11—12 и 15—16 соответственно. Колонка 60 × 0,6 см. Смесь: 200 мл 7 М мочеvины, рН 3,5. Резервуар: 200 мл 7 М мочеvины, 0,2 М NaCl, рН 3,5. Скорость элюции 4,5 мл/ч, объем фракции 2,25 мл

формата аммония на 0,15 М NaCl в 0,005 М фосфатном буфере, рН 4,65. Этот элюент дает несколько растянутые пики для аденозина и цитидина, но позволяет получать спектральные характеристики пиков не только при кислых, но и при щелочных значениях рН, что делает возможным идентификацию дигидроуридина и спектрофотометрию без предварительной обработки элюата. Хроматография нуклеотидов на DE-32, примеры использования которой можно видеть на рис. 2, б, в, является микромодификацией описанного ранее метода [7] и используется для подтверждения данных, полученных другими методами.

Основным методом определения состава была двумерная ТСХ нуклеозидов на целлюлозе в системах А и В (рис. 3). Преимуществом использованной комбинации систем растворителей является компактность пятен и чистота спектров элюированного нуклеотидного материала. Кроме того, отсутствие подвижности нуклеотидов в первом направлении (система В, двукратно) и удовлетворительное разделение их (за исключением Ур и Gр) во втором (система А) позволили использовать этот метод без изменений и для анализа фрагментов неполного гидролиза ФДЭ (рис. 4) и динуклеозидмонофосфата после гидролиза экзонуклеазой А-5.

После определения состава все олигонуклеотиды подвергали гидролизу экзонуклеазой А-5 [8]. Этот фермент, расщепляющий олигонуклеотиды с 3'-конца, оставляет два нуклеотида с 5'-конца в виде динуклеозидмонофосфата (рис. 5, б), что позволяет определить структуру всех три- и тетра-нуклеотидов и существенно облегчает анализ более длинных последовательностей.

Частичный гидролиз ФДЭ, впервые примененный Холли [9] и Василенко [10], — в настоящее время главный метод определения структуры олигонуклеотидов. Однако при применении его трудно получить достаточно полный набор фрагментов, необходимых для выведения полной структуры. На практике обычно необходимое количество фермента подбирают

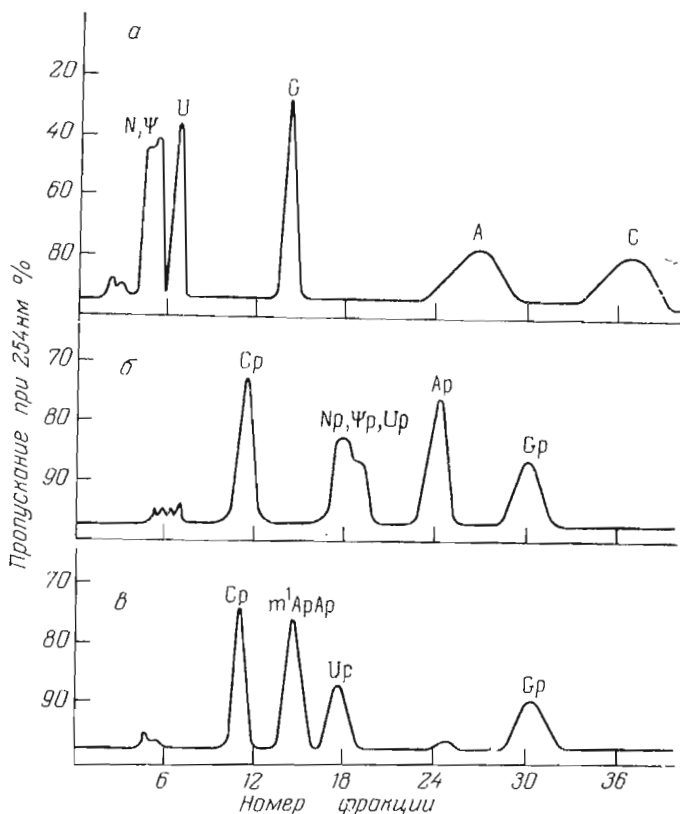


Рис. 2. Определение состава олигонуклеотидов микроколоночной хроматографией: *a* — определение состава олигонуклеотида (18) хроматографией нуклеозидов на хромексе UA-8. Колонка 200 мл. Сорбировано 0,25 ОЕ дефосфорилированного T<sub>2</sub>-РНКазного гидролизата. Элюция 0,15 М NaCl, 0,005 М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН 4,65. Скорость элюции 0,48 мл/ч. Объем фракции 0,075 мл; *б* — хроматография нуклеотидов на DE-32. Колонка 0,75 мл, h = 35 см. Сорбировано 0,12 ОЕ олигонуклеотида (18), гидролизованного смесью панкреатической РНКазы и T<sub>2</sub>-РНКазы. Элюент: 0,075 М CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, рН 4,05. Скорость элюции 0,48 мл/ч, объем фракции 0,075 мл; *в* — разделение на DE-32 продуктов гидролиза 0,150 ОЕ олигонуклеотида (14) смесью T<sub>2</sub>-РНКазы с панкреатической РНКазой. Колонка и условия хроматографии как в 2, б

для каждого конкретного олигонуклеотида в предварительных экспериментах. В основе разработанного нами для этих целей методического приема лежит наблюдение, что нанесение с высушиванием на пластинку достаточно эффективно останавливает гидролиз, что делает ненужной предварительную инактивацию фосфодиэстеразы. Непрерывное нанесение гидролизата, начиная от времени добавления фосфодиэстеразы и до  $\frac{3}{4}$  времени, необходимого для исчерпывающего гидролиза, обеспечивает полный набор фрагментов. Варьируя время начала нанесения гидролизата и (или) скорость нанесения на разных этапах гидролиза, можно получать желаемый набор фрагментов. Частичный гидролиз ФДЭ и гидролиз экзонуклеазой А-5 мы проводили в присутствии щелочной фосфатазы. На рис. 4, *a* дан пример применения неполного гидролиза ФДЭ, и на рис. 4, *б* приведена типичная хроматограмма анализа одного из полученных при этом фрагментов. Подвижность в системе В нуклеозидов, получаемых из мононуклеотидной фракции при частичном гидролизе ФДЭ, облегчает отделение их от исследуемых нуклеотидных фрагментов.

Применение больших количеств фосфатазы повышает вероятность получения побочных продуктов за счет следовой эндонуклеазной активно-

Рис. 3. Двумерная ТСХ нуклеозидов, полученных гидролизом и дефосфорилированием 1 ОЕ олигонуклеотида (18). 1-е направление — система *B* (дважды), 2-е направление — система *A*

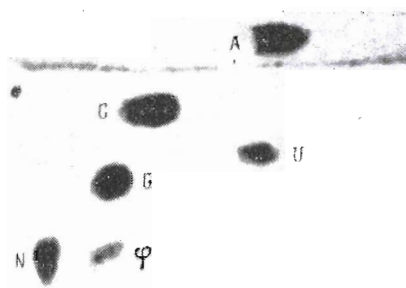


Рис. 4. Неполный гидролиз олигонуклеотида (15) (AphUpCpm<sup>3</sup>CpCpGp) ФДЭ: *a* — двумерная ТСХ продуктов неполного гидролиза. На пластинку нанесен гидролизат 1,0 ОЕ олигонуклеотида. 1-е направление — система *B*, 2-е направление — система *A* и затем *B*. 1 — исходный олигонуклеотид; 2 — AphUpCpm<sup>3</sup>CpC; 3 — AphUpCpm<sup>3</sup>C; 5, 6, 7 — нуклеозиды; 6 — определение состава фрагмента 2 (рис. 4, *a*) двумерной ТСХ после гидролиза смесью T<sub>2</sub>-РНКазы и панкреатической РНКазы. Нанесено 0,12 ОЕ. 1-е направление — система *B*, два раза, 2-е направление — система *A* и затем *B*. Свидетели: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 — Ap, Cp, Gp, Up, A, C, U, G перед пропуском системы *A*



Рис. 3.



Рис. 4.

сти, которая обычно имеется даже в максимально очищенных препаратах. Незначительные количества таких продуктов были отмечены для олигонуклеотидов, имеющих CpA-фосфодиэфирную связь. Лабильность этой связи была использована для специфического расщепления по ней олигонуклеотида (16)(hU-hU-C-A-A-Gp) при применении 10—20-кратных, по сравнению с нормальным, количеств щелочной фосфатазы. Подобное расщепление только по связи CpA было получено и при частичном гидролизе панкреатической РНКазой олигонуклеотида (17) (рис. 5, *г*). Известно,

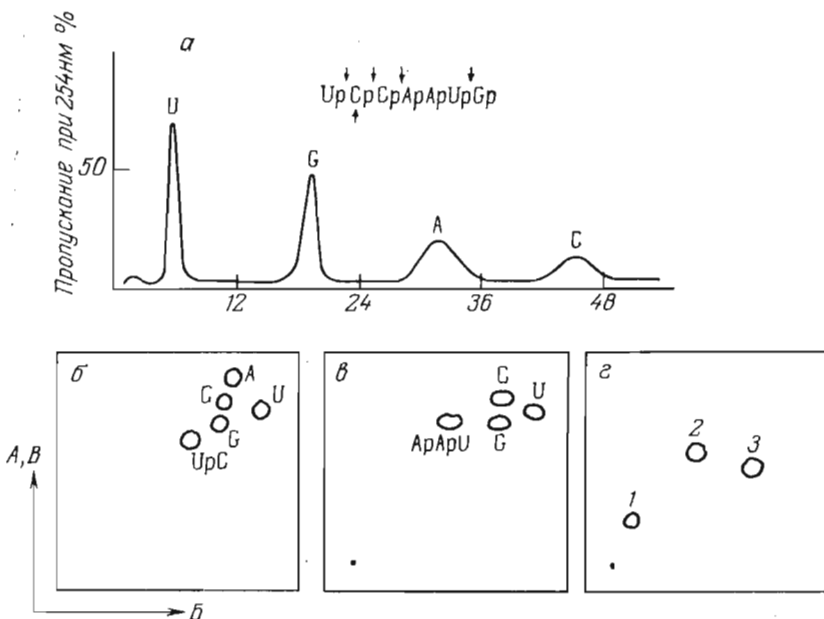


Рис. 5. Исследование структуры олигонуклеотида (17): *a* — определение состава хроматографией нуклеозидов на хромексе UA-8. Колонка 75 мкл. Условия — см. подпись к рис. 2, *a*; *b* — двумерная ТСХ продуктов гидролиза 0,5 ОЕ олигонуклеотида (17) экзонуклеазой А-5 и щелочной фосфатазой. 1-е направление — система В, 2-е направление — система А и затем В; *c* — двумерная ТСХ продуктов исчерпывающего гидролиза 0,6 ОЕ олигонуклеотида панкреатической РНКазой и щелочной фосфатазой; *c* — двумерная ТСХ продуктов частичного гидролиза 1 ОЕ олигонуклеотида (17) панкреатической РНКазой. 1 — исходный продукт, 2 — UrCpCp, 3 — ArArUrGp

что эта связь гидролизует пиримидиновой РНКазой с максимальной скоростью [11]. На основании этого можно думать, что наш препарат щелочной фосфатазы из *E. coli* содержал следовые количества эндонуклеазы подобной специфичности.

Установленные структуры олигонуклеотидов гуанил-РНКазного гидролизата  $tRNK_{2a}^{Val}$  приведены в таблице.

Нуклеозид N — пиримидин, поскольку при гидролизе олигонуклеотида (18) или  $tRNK_{2a}^{Val}$  панкреатической РНКазой он обнаруживается в мононуклеотидной фракции [12]. Его УФ-спектр [3] напоминает спектр тимидина и карбоксиметилуридина или его метилового эфира [13, 14]. Однако по подвижности в ряде систем он отличается от указанных нуклеозидов (см. рис. 6). Кроме того, его подвижность не меняется после обработки 0,3 н. КОН, а образцы, выделенные после щелочного или  $T_2$ -РНКазного гидролиза олигонуклеотида (18), идентичны. Нуклеозид N не является карбоксиуридином, так как в отличие от последнего не сорбируется на DEAE-целлюлозе. В то же время элюция в начале профиля при хроматографии нуклеозидов на катионообменнике хромекс UA-8 (рис. 2, *a*) исключает наличие у него значительного положительного заряда.

Ниже изложены детали определения структуры олигонуклеотидов, полученных при хроматографии на DEAE-целлюлозе гуанил-РНКазного гидролизата  $tRNK_{2a}^{Val}$ .

Пики 1 и 2 ( $m^2Gp$  и Gp)

Фракции, соответствующие этим двум пикам, объединяли и освобождали от мочевины и солей при слабощелочном pH (8,5). Компоненты этих пиков разделили ТСХ в системе А и идентифицировали как  $m^2Gp$  и Gp соответственно по их УФ-спектрам, а также с помощью ТСХ в системах А, Г, Д.

Олигонуклеотиды гуанил-рибонуклеазного гидролизата тРНК<sub>2a</sub><sup>Val</sup>

Олигонуклеотид	Моль/моль рГр	Получен из пика (рис. 1)	Олигонуклеотид	Моль/моль рГр	Получен из пика (рис. 1)
m <sup>2</sup> Gp	0,87	1	A-A-Gp	0,92	10
Gp	5,4 (5)	2	A-U-C-A-C-C	0,89	11
hU-Gp	0,92	3	T-Ψ-C-Gp	1,03	12
C-Gp	1,05	4	U-C-C-A-Gp	0,90	13
A-Gp	1,14	5	m <sup>1</sup> A-A-C-C-U-C-Gp	0,87	14
A-C-m <sup>2</sup> Gp	0,84	6	A-hU-C-m <sup>2</sup> C-C-Gp	0,91	15
Ψ-C-Gp	0,98	7	hU-hU-C-A-A-Gp	0,90	16
U-U-Gp	1,00	8	U-C-C-A-A-U-Gp	0,89	17
pGp	1,00	9	C-C-Ψ-U-N-A-C-A-C-Gp	0,86	18

*Пик 3 (hUpGp)*

Материал этого пика освобождали от незначительных примесей двумерной ТСХ в системах *A* и *B*. Его УФ-спектры при pH 1 и 7 соответствовали спектру гуаниловой кислоты, но характерное уменьшение во времени в области 230—235 нм при pH 13 свидетельствовало о наличии дигидроуридина. Олигонуклеотид дефосфорилировали щелочной фосфатазой из *E. coli*, освобождали от фосфатазы хроматографией в системе *B* и подвергали гидролизу T<sub>2</sub>-РНКазой. Продукты гидролиза разделяли хроматографией в системе *A* и *B*. В качестве единственного УФ-поглощающего материала идентифицировали гуанозин. Участок хроматограммы, соответствующий месту Up в системе *A*, элюировали и элюат проверяли на наличие hUp снятием УФ-спектра при pH 13 через 2, 4 и 6 мин. Количество идентифицированной таким образом hUp составляло 0,89 моль на 1 моль гуанозина. Следовательно, пик 3 соответствует динуклеотиду hUpGp. Дополнительным подтверждением этому служит совпадение его подвижности с подвижностью UpGp в системах *A* и *B*.

*Пики 4, 5 (CpGp и ApGp)*

Олигонуклеотиды этих пиков идентифицировали по их УФ-спектрам, нуклеотидному составу и с помощью ТСХ в системах *A*, *B* и *Г*.

*Пик 6 (ApCp<sub>m</sub><sup>2</sup>Gp)*

После гидролиза данного олигонуклеотида T<sub>2</sub>-РНКазой и щелочной фосфатазой и последующего разделения полученных нуклеозидов в системах *B* и *A* идентифицировали аденозин, цитидин и m<sub>2</sub><sup>2</sup>G в соотношении 0,98 : 1,1 : 1. Гидролиз панкреатической РНКазой и щелочной фосфатазой дал нуклеозид m<sub>2</sub><sup>2</sup>G и динуклеозидмонофосфат. После гидролиза последнего T<sub>2</sub>-РНКазой и разделения продуктов гидролиза в системах *A* и *B* идентифицировали нуклеотид Ap и цитидин, что отвечает структуре ApC. ApC идентифицировали также и после гидролиза олигонуклеотида 6 экзонуклеазой А-5. Следовательно, структура данного тринуклеотида ApCp<sub>m</sub><sup>2</sup>Gp.

*Пик 7 (ΨpCpGp)*

Багохромный сдвиг спектра этого олигонуклеотида в щелочной среде указывал на возможное наличие Ψp. Определение состава дало псевдоуридин, цитидин и гуанозин в соотношении 0,92 : 0,89 : 1, что подтвердило это предположение. После гидролиза экзонуклеазой А-5 в присутствии щелочной фосфатазы получили гуанозин и динуклеозидмонофосфат ΨpC, что доказывает для данного тринуклеотида структуру ΨpCpGp.

*Пик 8 (UpUpGp), пик 10 (ApApGp)*

Указанная структура тринуклеотидов однозначно следует из их состава (U : G = 1,88 : 1, A : G = 1,96 : 1) и подтверждается их спектрами.

### Пик 9 (pGr)

Место элюции данного пика (рис. 1, а), его УФ-спектр и идентификация после обработки фосфатазой единственного продукта — гуанозина свидетельствуют о том, что пик 9 соответствует pGr.

### Пик 11 (ArUrCrArCrC)

При определении состава в данном случае идентифицировали аденозин, уридин и цитидин в соотношении 2,1 : 0,92 : 3. Отсутствие гуанозина указывает на то, что рассматриваемый олигонуклеотид является 3'-концевым в молекуле  $\text{tRNK}_{2a}^{\text{Val}}$ . Гидролиз панкреатической РНКазой дал динуклеотиды ArUr и ArCr, нуклеотид Cr и цитидин. После гидролиза экзонуклеазой А-5 и щелочной фосфатазой в качестве 5'-концевого динуклеозидмонофосфата идентифицировали ArU. На основании этих данных для олигонуклеотида (11) может быть предложена предварительная структура ArUr(ArCr, Cr)C. Для выяснения оставшегося неясным взаимного расположения ArCr и Cr олигонуклеотид подвергали гидролизу экзонуклеазой А-5 с  $1/5$  количества фермента, применяемого при полном гидролизе. После разделения гидролизата в системах А и Б в качестве основных фрагментов идентифицировали ArU, ArUrC и ArUrCrA. Следовательно, олигонуклеотид (11) имеет структуру ArUrCrArCrC.

### Пик 12 (TrΨrCrGr)

Спектр олигонуклеотида (12) и его состав (Т : Ψ : С : G = 0,96 : 0,9 : : 1,1 : 1) позволяют предположить, что это «универсальный» тетра-нуклеотид TrΨrCrGr. Предположение подтверждается идентификацией динуклеозидмонофосфата TrΨ после гидролиза олигонуклеотида (12) экзонуклеазой А-5.

### Пик 13 (UrCrCrArGr)

Структуру олигонуклеотида вывели на основе следующих данных: а) в его состав входят аденозин, уридин, цитидин и гуанозин в соотношении 1,08 : 0,95 : 2,09 : 1; б) гидролиз панкреатической РНКазой и щелочной фосфатазой дал уридин, цитидин и динуклеозидмонофосфат ArG; в) после гидролиза экзонуклеазой А-5 и щелочной фосфатазой идентифицировали 5'-концевой динуклеозидмонофосфат UrC.

К этой же структуре приводит и исследование продуктов неполного гидролиза олигонуклеотида (13) ФДЭ (см. методы), в результате которого получили все три ожидаемых фрагмента: UrC, UrCrC и UrCrCrA.

### Пик 14 ( $m^1\text{ArArCrCrUrCrGr}$ )

При определении состава хроматографией на DE-32  $T_2$ -РНКазного гидролизата олигонуклеотида (14) (рис. 2, в) идентифицировали Gr, Ur, Cr (1 : 0,91 : 2,82) и пик между Cr и Ur, не соответствующий ни одному из мононуклеотидных компонентов  $\text{tRNK}_{2a}^{\text{Val}}$ . Аналогично этому при определении состава нуклеозидов, полученных после гидролиза  $T_2$ -РНКазой и дефосфорилирования щелочной фосфатазой с помощью ТСХ, идентифицированы гуанозин, уридин и цитидин (1 : 0,96 : 3,07) и недвигающийся со старта в системе В нуклеотидный материал. При дальнейшем анализе последний идентифицировали как  $m^1\text{ArA}$  на основе следующих данных: а) в результате щелочного гидролиза получили  $m^6\text{Ar}$  и аденозин ( $m^6\text{Ar} : A = 0,94 : 1$ ); б) гидролиз 10-кратным избытком  $T_2$ -РНКазы дал  $m^1\text{Ar}$  и аденозин (примерно половина исходного материала осталась негидролизованной). Окончательные данные о составе олигонуклеотида (14) получили разделением щелочного гидролизата в системах А и Б. При этом идентифицировали  $m^6\text{Ar}$ , Ar, Ur, Cr и Gr в соотношении 0,93 : 1,08 : 0,89 : : 2,87 : 1. Поскольку известно, что  $T_2$ -РНКазы с большим трудом гидролизует связь, образованную  $N^1$ -замещенными пуринами [15], и что в щелочной среде  $m^1\text{Ar}$  количественно превращается в  $m^6\text{Ar}$ , очевидно, что в состав олигонуклеотида входит  $m^1\text{Ar}$ , а не  $m^6\text{Ar}$ . В результате гидролиза олигонуклеотида (14) панкреатической РНКазой и щелочной фосфатазой



получили уридин, цитидин и гуанозин (0,97 : 1,89 : 1) и тринуклеотиддифосфат  $m^1ArArC$ , который является 5'-концевым, что доказывается идентификацией нуклеозида  $m^1A$  после гидролиза дефосфорилированного олигонуклеотида (14) ФДЭ. Это позволяет предположить структуру  $m^1ArArCp(Cp, Cr, Up)Gp$ . Чтобы получить информацию о структуре 3'-конца олигонуклеотида, провели неполный гидролиз ФДЭ. Основными из выделенных фрагментов были  $m^1ArArCpC$ ,  $m^1ArArCpCpU$  и  $m^1ArArCpCpUpC$ . Этого достаточно для выведения окончательной структуры олигонуклеотида (14).

*Иж 15* ( $AphUpCp^m^5CpCpGp$ )

Методом ТСХ нуклеозидов идентифицировали аденозин, цитидин,  $m^5C$  и гуанозин в соотношении 1,11 : 2,07 : 0,98 : 1. При определении состава методом катионообменной хроматографии нуклеозидов получили аналогичные результаты, причем при снятии щелочного спектра фракций, соответствующих месту элюции уридина, идентифицировали дигидроуридин в количестве  $\sim 1$  моль на 1 моль гуанозина. Гидролиз панкреатической РНКазой и щелочной фосфатазой дал цитидин,  $m^5C$  и гуанозин, а также динуклеозидмонофосфат, который идентифицировали как  $AphU$  на основании его спектров при рН 1, 7 и 13 и совпадения его подвижности с подвижностью  $ArU$  в системах *B* и *A*. Поскольку при гидролизе дефосфорилированного олигонуклеотида ФДЭ идентифицировали аденозин,  $AphU$  представляет 5'-концевую последовательность олигонуклеотида (15). На рис. 4, *a* приведена хроматограмма разделения неполного гидролизата олигонуклеотида (15) ФДЭ и щелочной фосфатазой. Как можно видеть, при этом получили набор фрагментов, ожидаемых для данного гексануклеотида, определения состава которых достаточно для выведения его полной структуры.

Следует отметить, что преобладающим продуктом гидролиза ФДЭ был фрагмент  $AphUpCp^m^5C$ , оканчивающийся на  $m^5C$ . Этот же фрагмент обнаружили в большем количестве и при гидролизе олигонуклеотида (15) экзонуклеазой А-5.

*Иж 16* ( $hUphUpCpArArGp$ )

При определении состава идентифицировали аденозин, цитидин и гуанозин (2,13 : 0,96 : 1), что не согласуется с местом элюции олигонуклеотида в области гексануклеотидов и может быть объяснено наличием дигидроуридина. Олигонуклеотид (16) гидролизовали  $T_2$ -РНКазой и проверили на наличие  $hUp$  изучением его УФ-спектра при рН 13 через фиксированные интервалы времени. Количество идентифицированного  $hUp$  соответствовало  $\sim 2$  моль на 1 моль олигонуклеотида —  $hUp : (Cp, 2Ar, Gp) = 1,88 : 1$ . Аналогичные данные получили и при определении состава методом колоночной хроматографии нуклеозидов на хромексе UA-8. Гидролиз олигонуклеотида (16) панкреатической РНКазой и щелочной фосфатазой дал два УФ-поглощающих продукта: цитидин и  $ArArG$ . Это определяет 3'-концевую последовательность и приводит к неполной структуре ( $hUp, hUp, Cp$ ) $ArArGp$ . Установление окончательной структуры было основано на том факте, что олигонуклеотид при дефосфорилировании подвергался заметному расщеплению на два фрагмента, по-видимому, за счет незначительной примеси РНКазой активности, которая имела в нашем препарате фосфатазы. При обработке 10-кратным избытком щелочной фосфатазы олигонуклеотид был количественно расщеплен на два фрагмента. Структура одного из них однозначно вытекает из его состава ( $A : G = 2,1 : 1$ ), а второй идентифицирован как  $hUphUpC > p$  на основе следующих данных: а) его спектр при рН 1 и 7 был аналогичен спектру  $Cr$ , а спектр при рН 13 указывал на наличие двух остатков дигидроуридиловой кислоты. После гидролиза  $T_2$ -РНКазой и разделения полученных продуктов в системе *A* также обнаружили  $Cr$  и  $hUp$  в соотношении  $\sim 1 : 2$ ; б) фрагмент обработали фосфатазой и освободили от нее хроматографией в системе *A* (подвижность его после обработки не изменилась). Гидролиз обработанного фосфатазой фрагмента  $T_2$ -РНКазой с последующим разде-



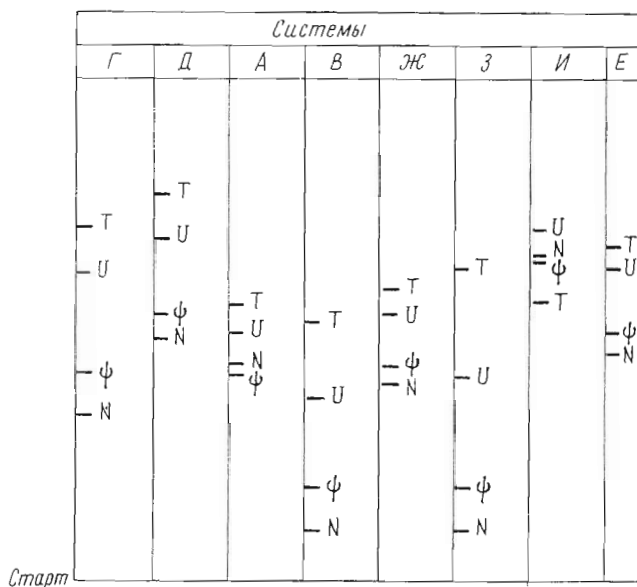


Рис. 6. Схема, иллюстрирующая хроматографическую подвижность нуклеозида N в сравнении с нуклеозидами Т, У и Ф. В некоторых системах растворитель проносился неоднократно

лением гидролизата в системах В и А не выявил нуклеозида. Идентифицировали Ср и hUp (1 : 1,83), что могло быть объяснено только наличием циклофосфата, так как фосфатаза не разрушает циклофосфат; в) аналогичная обработка фрагмента, предварительно проинкубированного с 4М HCOOH, дала цитидин и два моля hUp. Из этого следует, что оба остатка дигидроуридина находятся на 5'-конце и олигонуклеотид (16) имеет структуру hUphUpCrArGr.

*Пик 17 (UpCrCrArUpGr)*

Структуру этого гептануклеотида выводили на основании следующих данных (рис. 5): а) при определении состава найдены аденозин, уридин, цитидин и гуанозин в соотношении 2,1 : 0,9 : 1,98 : 1; б) на 5'-конце идентифицировали динуклеозидмонофосфат UpC исследованием гидролизата экзонуклеазой А-5; в) после гидролиза панкреатической РНКазой и щелочной фосфатазой идентифицировали гуанозин, уридин, цитидин и АрАрU в соотношении 1 : 0,96 : 1,85 : 0,87. Этих данных достаточно для выведения частично расшифрованной структуры UpCr(Cr, АрАрUp)Gr. Окончательные данные получили методом неполного гидролиза панкреатической РНКазой. Обнаруженные в результате разделения гидролизата в системах А и В три пятна (рис. 5, г) анализировали определением состава и исследованием продуктов гидролиза экзонуклеазой А-5. Пятно 1 оказалось исходным негидролизированным олигонуклеотидом (17), а пятна 2 и 3 имеют структуру UpCrCr и АрАрUpGr соответственно, что приводит к структуре UpCrCrArArUpGr. Ограниченный гидролиз олигонуклеотида (17) ФДЭ дал полный набор фрагментов, ожидаемых для данного гептануклеотида, что подтверждает эту структуру.

*Пик 18 (CrCrUpUpNpArCrArCrGr)*

Методом ТСХ нуклеозидов (рис. 3) было показано, что олигонуклеотид (18) является декануклеотидом следующего состава: (2А, U, Ф, N, 4С)G. Аналогичные результаты получили и при определении его состава методом колоночной хроматографии нуклеозидов на хромексе UA-8 (рис. 2, а) и нуклеотидов на DE-32 (рис. 2, б). На рис. 6 показана хроматографическая подвижность неидентифицированного нуклеозида N в нескольких системах.

При гидролизе олигонуклеотида (18) панкреатической РНКазой и щелочной фосфатазой были найдены нуклеозиды цитидин, псевдоуридин, уридин, гуанозин и N, а также два моля АрС. Расщепление экзонуклеазой А-5 в присутствии щелочной фосфатазы дало 5'-концевой динуклеозидмонофосфат СрС и продукт неполного гидролиза СрСрΨ. При частичном гидролизе пиримидил-РНКазой олигонуклеотида (18) была получена довольно сложная картина. Выделенные фрагменты исследовали определением состава и гидролизом экзонуклеазой А-5. Основными среди них были АрСр, СрΨр, АрСрСр, НрАрСр и ΨрУрНрАрСр. С учетом вышеприведенных данных информация от перекрывания этих фрагментов достаточна для выведения структуры СрСрΨрУрНрАрСрАрСрСр.

### Экспериментальная часть

*Выделение тРНК<sub>2a</sub><sup>Val</sup>.* Препарат тРНК<sub>2a</sub><sup>Val</sup> 90%-ной чистоты выделяли из суммарной тРНК пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* методом, описанным нами ранее [1]. Суммарную тРНК получали из маточных пекарских дрожжей Московского дрожжевого завода в соответствии с прописью [16].

*В работе использованы следующие ферменты:* гуаниловая РНКаза из *Actinomyces aureovercillatus* (КФ 2.7.7.26) [17] и экзонуклеаза А-5 из *Actinomyces sp.* (КФ 3.1.4.1) [8] были любезно предоставлены Татарской и сотр.

Щелочная фосфатаза из *E. coli* (КФ 3.1.3.1) была выделена совместно с Татарской и сотр. по методике [18].

Панкреатическая РНКаза (КФ 2.7.16) Ленинградского мясокомбината была дополнительно очищена, как описано в работе [12].

Фосфодиэстераза змеиного яда (ФДЭ) (КФ 3.1.4.1) гюрзы получена из яда гюрзы по методу [19]. Т<sub>2</sub>-РНКаза (КФ 2.7.7.17) выделена из такадиастазы модифицированным методом Рушицкого и сотр. [12].

*Реактивы.* DEAE-целлюлоза (0,6—0,8 мг-экв/г, «Reanal», Венгрия) промывали 0,5 н. КОН, водой, 0,2 н. НСl, водой, самые мелкие и крупные частицы удаляли декантацией. Далее DEAE-целлюлозу уравнивали со стартовым буфером, содержащим 0,02 М трис-НСl, рН 7,5, и 7 М мочевины.

Биогель Р-2 (100—200 меш, «Bio Rad», США) применяли для обессоливания олигонуклеотидов [5]. Для уменьшения неспецифической сорбции в качестве элюента применяли 0,002 М бикарбонат аммония, рН 7,6—7,8. Перед каждым обессоливанием колонку промывали 10 мл 1М NaCl в 7 М мочевины и 300 мл элюирующего раствора.

Целлюлозу для ТСХ подготавливали как указано в работе [12].

DEAE-целлюлозу DE-32 («Whatman», Англия) фракционировали методом декантации, используя фракцию, не осаждавшуюся в течение 20 мин.

Хромекс UA-8 («Reanal», Венгрия) промывали 0,5 М КОН, 1 М НСl, водой, этанолом, водой.

Соли, кислоты, щелочи и растворители применяли марки х. ч. или ч.д.а., 7 М мочевины очищали пропусканием через колонку, содержащую дауэкс 1 × 8 (ОН<sup>-</sup>-форма) и дауэкс 50 × 10 (Н<sup>+</sup>-форма). Изомасляную и муравьиную кислоты перегоняли и хранили при -10°.

*Применяли следующие приборы:* проточные денситометры «Uvicord» I и II, кондуктолизер, насосы «Vario Perplex», коллектор «Radi Rac» фирмы ЛКВ (Швеция), микроколлектор фракций (ИМБ АН СССР), регистрирующие спектрофотометры «Specord» UV-VIS (ГДР) и «Hitachi», модель EPS-3T (Япония); для регистрации спектров и измерения количества нуклеотидного материала (ОЕ) использовали щелевые кюветы с длиной оптического пути 2, 5 и 10 мм, а также трубчатые кюветы с длиной оптического пути 4 см и объемом 0,2 мл.

ТСХ проводили на кварцевых пластинках. Элюцию компонентов с хроматограммы осуществляли как в работе [12]. Использовали следующие системы растворителей: изомасляная кислота — 0,5 М  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 5 : 3, рН 3,7 (А); трет-бутанол — 0,075 М  $\text{HCOOH}$ , 1 : 1, рН 4,8 (Б); *n*-бутанол —  $\text{H}_2\text{O}$ , 86 : 14 (В); изопропанол — конц.  $\text{HCl}$  —  $\text{H}_2\text{O}$ , 170 : 41 : 39 (Г); изопропанол — конц.  $\text{NH}_3$  —  $\text{H}_2\text{O}$ , 7 : 1 : 20 (Д); изомасляная кислота — конц.  $\text{NH}_3$  —  $\text{H}_2\text{O}$ , 400 : 0,4 : 208 (Е), *n*-бутанол —  $\text{H}_2\text{O}$  — этанол, 50 : 35 : 18 (Ж); этилацетат — *n*-пропанол —  $\text{H}_2\text{O}$ , 4 : 7 : 2 (З); изопропанол — насыщ.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 1 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , 1 : 40 : 9 (И).

*Гидролиз тРНК<sub>2a</sub><sup>Val</sup> гуаниловой РНКазой и хроматография гидролизата на DEAE-целлюлозе.* 210 ОЕ тРНК<sub>2a</sub><sup>Val</sup> инкубировали в 8 мл 0,02 М трис- $\text{HCl}$ , рН 7,5, с 20 000 ед. акт. гуаниловой РНК [17] 24 ч при 37°. В гидролизат добавляли одну каплю  $\text{HClO}_3$ . Наблюдаемый в результате гидролиза гиперхромный эффект составил 11,5%. Полученную смесь олигонуклеотидов разделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе в 7 М мочеvine при рН 7,4 [20] с использованием линейного градиента  $\text{NaCl}$  (рис. 1). Гомогенность нуклеотидного материала пиков 1—18 проверяли ТСХ в системах А и Б.

*Определение состава олигонуклеотидов.* 1. ТСХ нуклеозидов. 0,1—0,3 ОЕ олигонуклеотида гидролизovali щелочью или  $\text{T}_2$ -РНКазой, дефосфорилировали и наносили на пластинку. После двукратного пропускания в первом направлении системы В наносили необходимые свидетели и во втором направлении пропускали последовательно системы А и В.

2. Для колоночной хроматографии нуклеозидов на катионообменнике хромекс UA-8 [6] в зависимости от сложности разделяемой смеси использовали колонки объемом 75 (рис. 4, а) или 200 мкл (рис. 2, а).

3. Разделение нуклеотидов на DE-32 проводили по методу [7], масштаб которого значительно уменьшен с целью использования для анализа 0,1—0,15 ОЕ гидролизата. Типичные примеры хроматографического анализа приведены на рис. 2, б, в.

*Идентификация нуклеотидов и нуклеозидов.* Предварительную идентификацию осуществляли по положению на хроматограмме или месту элюции с колонки. Для окончательной идентификации использовали хроматографию со свидетелями в системах Г и Д и УФ-спектры, полученные при рН 1 и 13. Метилированные пурины идентифицировали также по спектрам и подвижностям соответствующих оснований, полученных после кислотного гидролиза. Все количественные расчеты основаны на коэффициентах экстинкции, приведенных в справочнике [21]. При определении состава методами колоночной хроматографии относительные количества нуклеотидов или нуклеозидов рассчитывали по площади соответствующих пиков, что основано на допущении о линейности начальной части шкалы денситометра при максимальной чувствительности. Для расчетов площадь (или вес) пика умножали на следующие экспериментально определенные коэффициенты: для G — 1, для A — 1,02; для U — 1,56, для C — 2,14. Коэффициенты были вычислены из хроматограммы модельной смеси нуклеозидов и нуклеотидов при использовании денситометра «Uvicord» (254 нм).

*Гидролиз ФДЭ.* 1. Исчерпывающий гидролиз. 0,2—0,3 ОЕ дефосфорилированного олигонуклеотида инкубировали в 50 мкл 0,02 М трис- $\text{HCl}$ , рН 8,5—8,6, содержащего 0,01 М ацетат магния, с 10 мкг фермента в течение 3 ч при 37°.

2. Частичный гидролиз. К 0,8—1,0 ОЕ олигонуклеотида в 50 мкл воды добавляли 20 мкл щелочной фосфатазы (16 ед. акт. [18]) и 80—100 мкл 0,02 М трис- $\text{HCl}$  с 0,01 М ацетатом магния, рН 8,6, содержащего 100—150 мкг ФДЭ. Начиная с 10-й мин гидролизат непрерывно наносили на пластинку. Скорость нанесения корректировали таким образом, чтобы последняя порция гидролизата была нанесена через 1,5 ч после начала

гидролиза. Продукты неполного гидролиза разделяли двумерной ТСХ в системах А и В, элюировали и растворы упаривали.

*Гидролиз смесью  $T_2$ -РНКазы и панкреатической РНКазы.* 0,2—0,3 ОЕ олигонуклеотида в 25 мкл 0,005 М ацетата калия, рН 4,5, и 10 мкл смеси ферментов, содержащей 1000 ед. акт/мл  $T_2$ -РНКазы [12] и 0,1 мг/мл панкреатической РНКазы, инкубировали 16 ч при 37°.

*Обработка щелочной фосфатазой.* 1. Для дефосфорилирования смеси 0,2 ОЕ нуклеотидов после щелочного (см. ниже) или ферментативного гидролиза доводили рН раствора до 8,5, добавляли 5 мкл фосфатазы (4 ед. акт. [18]) и инкубировали 2 ч при 37°.

2. К раствору 1 ОЕ олигонуклеотида в 50 мкл воды добавляли 5 мкл 0,1 М  $NH_4HCO_3$ , рН 8,0, фосфатазу (4 ед. акт.) и инкубировали 2 ч при 37°. Фосфатазу отделяли ТСХ в системе А или В.

*Идентификация дигидроуридина.* Идентификация и количественное определение дигидроуридина основано на специфическом уменьшении поглощения при 235 нм после добавления щелочи [22]. При определении hU в составе олигонуклеотида последний предварительно гидролизуют  $T_2$ -РНКазой.

*Идентификация 3'-концевого нуклеотида.* Анализируемый олигонуклеотид гидролизуют смесью  $T_2$ -РНКазы и панкреатической РНКазы и наносят на пластинку. Пропусканием в первом направлении системы В отделяют 3'-концевой нуклеозид от нуклеотидов.

*Определение 5'-концевого динуклеозидмонофосфата с помощью экзонуклеазы А-5.* К 0,3—0,5 ОЕ олигонуклеотида в 15 мкл 0,02 М  $NH_4HCO_3$ , рН 8,5, с 0,01 М ацетатом магния добавляли 5 мкл фосфатазы (4 ед. акт.) и экзонуклеазу А-5 из расчета 1 ед. активности на 0,01 мкмоль фосфодиэфирных связей, доступных действию экзонуклеазы А-5. Инкубировали 2 ч при 37°. После разделения гидролизата в системах А и В динуклеозидмонофосфат выявляют на пластинке по отсутствию подвижности в системе В, элюировали, элюат упаривали до объема 25 мкл и гидролизуют смесью  $T_2$ -РНКазы и панкреатической РНКазы. Полученные нуклеозид и нуклеотид идентифицировали с помощью ТСХ и после элюирования по УФ-спектрам.

*Щелочной гидролиз.* 0,2—0,3 ОЕ олигонуклеотида упаривали досуха, растворяли в 10 мкл 0,3 н. NaOH и инкубировали 18 ч при 37°. Гидролизат наносили на пластинку без предварительной нейтрализации.

*Кислотный гидролиз.* К упаренной пробе олигонуклеотида добавляли 50 мкл 1 н. HCl, гидролизуют на кипящей водяной бане 1 ч, упаривали досуха, растворяли в 20 мкл воды и наносили на пластинку.

Мы приносим благодарность акад. А. А. Баеву за поддержку и внимание, Р. И. Татарской, Н. М. Абросимовой-Амельянчик и Т. Н. Львовой за любезное предоставление для нашей работы ферментов: гуаниловой РНКазы, щелочной фосфатазы и экзонуклеазы А-5.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Крюков В. М., Исаенко С. Н., Аксельрод В. Д., Баев А. А. (1972) Мол. биол., 6, 860—865.
2. Баев А. А., Венкстерн Т. В., Мирзабеков А. Д., Крутилина А. И., Ли Ж., Аксельрод В. Д. (1967) Мол. биол., 1, 754—767.
3. Axelrod V. D., Kryukov V. M., Isaenko S. N., Bayev A. A. (1974) FEBS Lett., 45, 333—336.
4. Аксельрод В. Д., Крюков В. М., Исаенко С. Н., Баев А. А. (1975) Мол. биол., 9, 55—62.
5. Uziel M. (1967) In Methods in Enzymology (Grossman L., Moldave K., eds.), 12, Part A, 407—414, Acad. Press, N. Y.—London.
6. Uziel M., Koh C. K., Cohn W. E. (1968) Anal. Biochem., 25, 77—99.
7. Holness N. J., Atfield G. (1971) Biochem. J., 121, 371—377.
8. Tatarskaya R. I., Lvova T. N., Abrossimova-Amelyanchik N. M., Korenyako A. I., Bayev A. A. (1970) Eur. J. Biochem., 15, 442—449.
9. Holley R. W., Madison J. T., Zamir A. (1964) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 17, 389—394.

10. Василенко С. К., Демушкин В. П., Будовский Э. И., Кюорре Д. Г. (1965) Докл. АН СССР, **162**, 694—697.
11. Witzel H. (1963) Progr. Nucl. Acid Research and Mol. Biol. (Cantoni G. L., Davies D. R., eds.), **2**, 221—258, Acad. Press, N. Y.
12. Исаенко С. Н., Аксельрод В. Д. (1976) Биоорг. химия, **2**, 43—55.
13. Gray M. W., Lane V. G. (1968) Biochemistry, **7**, 3441—3453.
14. Tumahtis T. D., Lane V. G. (1970) Biochim. et biophys. acta, **224**, 391—403.
15. Uchida T., Egami F. (1971) The Enzymes (Boyer P. D., ed.), **4**, 205—250, Acad. Press, N. Y.— London.
16. Исаенко С. Н., Аксельрод В. Д. (1971) Биохимия, **36**, 956—963.
17. Татарская Р. И., Абросимова-Амельянчик Н. М., Аксельрод В. Д., Корсяко А. И., Нпедра Н. Я., Баев А. А. (1966) Биохимия, **31**, 1017—1026.
18. Абросимова-Амельянчик Н. М., Аксельрод В. Д., Татарская Р. И. (1967) Биохимия, **32**, 240—247.
19. Василенко С. К. (1964) Биохимия, **29**, 1190—1198.
20. Tomlinson R. V., Tener G. M. (1962) J. Amer. Chem. Soc., **84**, 2644—2645.
21. Handbook of Biochemistry selected data for Molecular Biology (1970) 2-nd edition (Sober H. A., ed.), USA, G3-G95.
22. Batt R. D., Martin J. K., Ploeser J. M., Murray J. (1954) J. Amer. Chem. Soc., **76**, 3663—3665.

Поступила в редакцию  
11.VI.1975

### THE PRIMARY STRUCTURE OF tRNA<sub>2a</sub><sup>Val</sup> FROM BAKER'S YEAST. OLIGONUCLEOTIDES OF GUANYL-RNase DIGEST

KRYUKOV V. M., AXEL'ROD V. D., GORBULEV V. G.

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

The oligonucleotides obtained by the digestion of tRNA<sub>2a</sub><sup>Val</sup> from baker's yeast with guanyl-RNase were separated by column chromatography on DEAE-cellulose in 7M urea at pH 7.4 and 3.5. The digest consists of 18 individual components, the larger being decanucleotide. To determine the base composition of the oligonucleotides, TLC of nucleosides on cellulose plates, microcolumn chromatography of nucleosides on cation-exchanger «Chromex-8» and of nucleotides on DE-32 were used. To establish the base sequence of the oligonucleotides the separation of the components was performed by TLC. Exonuclease A-5 was employed for determining 5'-dinucleoside monophosphate in the oligonucleotides. To obtain the products of incomplete digestion of the oligonucleotides, exonuclease A-5 and phosphodiesterase from snake venom were used. 13 minor components T, 3ψ, 4hU, m<sup>5</sup>C, m<sup>2</sup>G, m<sub>2</sub><sup>2</sup>G, m<sup>1</sup>A, and N (the structure is unknown) were identified in guanyl-RNase digest of tRNA<sub>2a</sub><sup>Val</sup>.