



УДК 547.963.32.07

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ НОНАНУКЛЕОТИДА

GrTrUpCrGrArUpCrC — АНАЛОГА
ТΨ-ПЕТЛИ ДРОЖЖЕВОЙ tРНК₁^{Val}**Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А.,
Смолянинова О. А.**Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пущино**Антонович Е. Г., Манькин А. С., Прокофьев М. А.**Московский государственный университет**Загребельный С. Н., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М**Специальное конструкторско-технологическое бюро
биологически активных веществ, г. Новосибирск**Болезинн М. И., Смолянинов В. В.**Институт прикладной микробиологии, г. Протвино*

Синтезирован нонануклеотид GrTrUpCrGrArUpCrC — фрагмент 54–62 дрожжевой tРНК₁^{Val}, в котором остаток псевдоуридина-56 заменен уридином, а остаток N¹-метиладенозина-59 — аденозином. Синтез проводили в три этапа: 1) получение GrTrUpCrC; 2) получение pGrArUpCrC; 3) сшивка тетра- и пентануклеотида. Для синтеза исходных блоков применяли различные нуклеолитические ферменты: мало-специфичную рибонуклеазу *Pen. brevicomtractum*, гуанилспецифичные рибонуклеазы *Asp. oryzae* (T₁) и *Asp. clavatus*, полинуклеотидфосфорилазы *M. luteus* и *E. coli*. Сшивку фрагментов 54–57 и 58–62 осуществляли с помощью РНК-лигазы T₄.

Синтетические олигорибонуклеотиды находят все более широкое применение при изучении структурной организации и механизмов функционирования рибонуклеиновых кислот, а также ферментов, катализирующих их превращения. В частности, наличие фрагментов транспортных РНК и их аналогов обеспечивает возможность получения реконструированных молекул tРНК [3] и исследования роли отдельных участков или отдельных нуклеотидных остатков (например, модифицированных) в функционировании целой молекулы.

Ранее нами была предложена схема ферментативного синтеза ТΨ-петли валиновой tРНК₁ из дрожжей, основанная на использовании различных ферментов нуклеинового обмена [4], и синтезирован ряд фрагментов ТΨ-петли [1, 5, 6]. В настоящей работе мы сообщаем о синтезе нонануклеотида — фрагмента 54–62 валиновой tРНК₁ из дрожжей, в котором остаток псевдоуридина-56 заменен уридином, а остаток N¹-метиладенозина-59 — аденозином (рис. 1).

* Предварительное сообщение см. [1]. Сокращения: ПНК-фосфорилаза — полинуклеотидфосфорилаза; остальные сокращения соответствуют общепринятым [2].

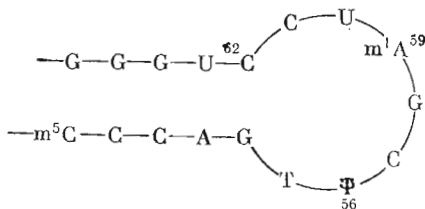
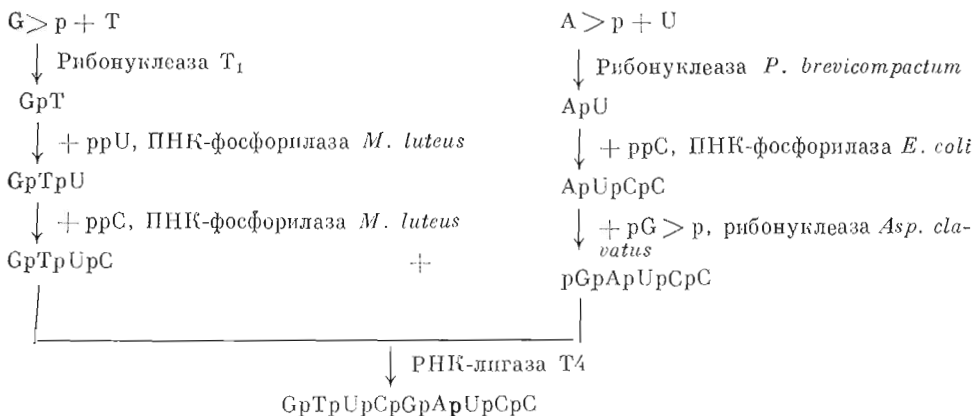


Рис. 1. ТΨ-петля тРНК^{Val} из дрожжей с прилегающими участками

В соответствии с предложенной схемой [4] синтез этого фрагмента состоял из двух частей: синтеза тетра nukлеозидтрифосфата GrTrUpC — аналога фрагмента 54—57 — и синтеза пентануклеотида pGrArUpCrC — аналога фрагмента 58—62 (см. схему). Учитывая результаты работ [1, 5, 6], тетра nukлеозидтрифосфат GrTrUpC, аналог «универсального» олигонуклеотида, найденного в большинстве исследованных тРНК, синтезировали в три стадии, последовательно наращивая олигонуклеотидную цепь с 3'-конца. Первая стадия — получение гуанил-(3'-5')-тимидина из гуанозин-2',3'-циклофосфата и тимидина в присутствии рибонуклеазы T₁ — была подробно изучена в работе [5]. При проведении синтеза в «микрорварианте» объем реакционной смеси не превышал 0,1 мл. Образовавшийся динуклеозидмонофосфат выделяли с помощью электрофореза на бумаге в 0,05 М растворе бикарбоната триэтиламмония (рН 7,6) с последующей хроматографией на бумаге. Выход GrТ составлял ~30% на взятый и ~65% на вошедший в реакцию гуанозин-2',3'-циклофосфат, т. е. был достаточно высок, чтобы считать этот путь пригодным для препаративных целей.



В связи с тем что для синтеза аналога ТΨ-петли требовалось достаточно большое количество исходных блоков, в том числе GrТ, в настоящей работе мы проводили синтез GrТ в препаративном масштабе, исходя из 50 мкмоль гуанозин-2',3'-циклофосфата и 150 мкмоль тимидина (объем реакционной смеси 0,8 мл). Фермент инактивировали добавлением 1 мл 7 М NH₃ и компоненты реакционной смеси разделяли хроматографией на колонке с целлюлозой Cellex N1 в системе растворителей В (см. «Экспериментальную часть»).

Таким образом, при переходе к препаративному масштабу выход динуклеозидмонофосфата сохраняется на том же уровне. Гуанозин-2',3'-циклофосфат и тимидин, не вошедшие в реакцию и выделенные при хроматографии, использовали в синтезе повторно. Всего было получено ~100 мг GrТ. Если при однократной хроматографии на целлюлозе GrТ содержал незначительные примеси Т, G > p и Gr, проводили повторную хроматографию на такой же колонке.

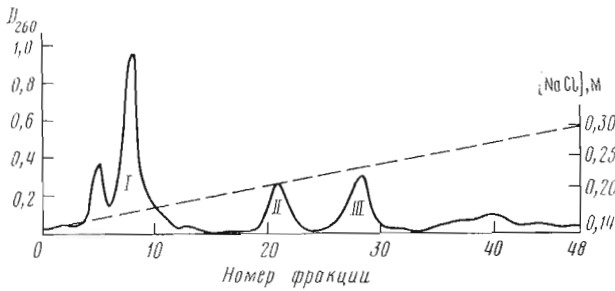


Рис. 2. Разделение реакционной смеси, полученной при синтезе нонануклеотида, на колонке (0,9×22 см) с DEAE-сефадексом в системе Томлинсона – Тенера [10]: I – GpTpUpC, II – pGpApUpCpC+GpApUpCpC, III – GpTpUpCpGpApUpCpC

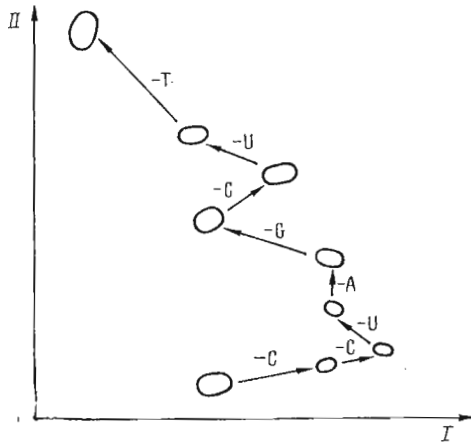


Рис. 3. Нуклеотидная карта нонануклеотида GpTpUpCpGpApUpCpC (реконструкция): I – электрофорез на ацетате целлюлозы, pH 3,5; II – гомохроматография на DEAE-целлюлозе

Следующую стадию – синтез тринуклеозиддифосфата гуанилил-(3'-5')-тимидилл-(3'-5')-уридина из GpT и ppU в присутствии полинуклеотидфосфорилазы *M. luteus* – также проводили в препаративном масштабе в условиях, оптимальных для ограниченного присоединения остатка уридиловой кислоты к GpU [6]. Для разделения реакционной смеси применяли гель-хроматографию на сефадексе G-10. Продукты синтеза GpTpU и GpTpUpU выделяли из пика I (см. «Экспериментальную часть») хроматографией на бумаге в системе В. Из 238 мкмоль GpT получено ~25 мкмоль GpTpU и 112 мкмоль GpT регенерировано.

Таким образом, в препаративных синтезах выход GpTpU составил в среднем ~10% на взятый и ~20% на вошедший в реакцию динуклеозидмонофосфат.

Третья стадия – синтез тетра нуклеозидтрифосфата GpTpUpC путем ограниченного присоединения цитидин-5'-дифосфата, катализируемого полинуклеотидфосфорилазой *M. luteus*, к тринуклеозиддифосфату GpTpU – была проведена в условиях, аналогичных приведенным выше. При этом из 33 мкмоль GpTpU получено ~3,3 мкмоль GpTpUpC и ~13 мкмоль GpTpU регенерировано, т. е. выход GpTpUpC в среднем составил ~10% на взятый акцептор фосфата и ~16% в расчете на вошедший в реакцию тринуклеозиддифосфат. Выделение GpTpUpC из реакционной смеси проводили с помощью препаративной хроматографии и электрофореза на бумаге.

Таблица 1

Реакция АрU с ррС, катализируемая
полнуклеотидфосфорилазой *M. luteus*

{ArU}/[ppC]	Время, ч	Выход, %			
		ArUpC		ArUpCpC *	
		I **	II	I	II
1:1	0,5	4	11	1	5
2:1	0,5	8	19	3	7
2:1	1,0	9	39	3	15
2:1	2,0	12	22	2	3

* Реакционная смесь содержит также небольшие количества пента- и гексануклеотида.

** Выход определен в расчете на взятый (I) и израсходованный (II) ArU.

Таблица 2

Реакция ArUpC с ррС,
катализируемая полнуклеотидфосфорилазами

ПНК-фосфори- лаза	Время, ч	Выход ArUpCpC, % в расчете на ArUpC	
		взятый	вошедший в реакцию
<i>M. luteus</i>	2	14	24
<i>E. coli</i>	1	14	36
<i>E. coli</i>	2	15	26

Таблица 3

Синтез фрагментов 58-61, 58-62

Субстраты * (отношение)	Рибс- нуклеаза	Время, ч	Выход, %		Возврат акцепто- ра, %	
			в расчете на акцептор			
			взятый	израсход.		
G>p+ArUpC	(1:1)	T ₁	5	6	16	63
pG>p+ArUpC	(1:1)	»	5	5	12	61
pG>p+ArUpCpC	(1:1)	»	5	3	5	36
»	(1:1)	<i>Asp. clav.</i>	5	5	15	65
»	(2:1)	»	5	6	24	60
»	(2:1)	»	15	12	35	66
»	(2:1)	»	24	12	30	58

* [донор, фосфата]=[акцептор]=0,03 M; [рибонуклеаза T₁] 20 ед. акт./мл; [рибонуклеаза *Asp. clav.*] 4-6 ед. акт./мл; 0° C.

Пентануклеотид pGrArUpCpC синтезировали также в три стадии (см. схему). Динуклеозидмонофосфат аденилил-(3'-5')-уридин получали исходя из 25 мг (75 мкмоль) A>p и 55 мг (225 мкмоль) уридина в присутствии малоспецифичной рибонуклеазы *Pen. brevicompactum*. Через 48 ч реакционная смесь, содержащая 16% ArU, 11% A>p и 73% Ar, была разделена на колонке с целлюлозным порошком. Динуклеозидфосфат ArU дополнительно очищали препаративной хроматографией на бумаге или повторной хроматографией на той же колонке.

Таблица 4

Характеристики фрагментов аналога ГЧ-петли дрожжевой тРНК₁^{Val}

Олигонуклеотид	R_{Gr} (в системе А)	E_{Gr}	Ферментативный гидролиз		
			Рибонуклеаза	Продукты	Отношение
ArUpC	0,74	0,76	A	ArUp, C	1:1,1
GrTrUpC	0,51 *	0,80	A	GrTr, Up, C	1:1:1
GrArUpC	0,62	0,86	T ₁	Gr, ArUpC	1:0,9
				↓ РНаза ** А	
				ArUp, C	1:1,2
pGrArUpC	0,12	0,91	T ₁	pGr, ArUpC	1:1
				↓ РНаза А	
				ArUp, C	1:1,1
ArUpCpC	0,67 *	0,86	A	ArUp, Cp, C	1:1,1:1,1
pGrArUpCpC	0,04	0,96	T ₁	pGr, ArUpCpC	1:1,1
				↓ РНаза А	
				ArUp, Cp, C	1:0,9:1,3

* R_{Cp} в системе А.

** РНаза — рибонуклеаза.

Таблица 5

УФ-спектры олигонуклеотидов в H₂O

Олигонуклеотид	λ_{\max}	λ_{\min}	D_{230}/D_{260}	D_{270}/D_{260}	D_{280}/D_{260}	D_{290}/D_{260}
ArUpC	262	232	0,86	0,88	0,47	0,18
GrTrUpC	261	231	0,85	0,88	0,63	0,23
GrArUpC	259	233	0,89	0,84	0,54	0,20
pGrArUpC	259	233	0,92	0,85	0,57	0,29
ArUpCpC	264	242	0,89	0,95	0,68	0,37
pGrArUpCpC	260	235	0,96	0,89	0,66	0,10

Таблица 6

Синтез пептида GrTrUpCpCpCpArUpCpC из фрагментов GrTrUpC и pGrArUpCpC в присутствии РНК-лигазы Т4

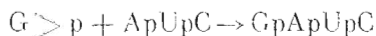
$\frac{[GrTrUpC]}{[pGrArUpCpC]} *$	РНК-лигаза, ед. акт./мл	Выход		Возврат, %	
		ммоль	%	GrTrUpC	pGrArUpCpC **
3,0:1	70	35	41	57	67
2,3:1	225	70	22	59	39
1,3:1	450	76	23	59	28

* $[pGrArUpCpC] = \sim 1$ мм.** Пептид содержал $\sim 50\%$ GrArUpCpC.

Тетрануклеозидтрифосфат ArUpCpC — аналог фрагмента 59–62 — содержит на 3'-конце два одинаковых нуклеотидных остатка. Поэтому он может быть получен непосредственно из ArU и 5'-дифосфата цитидина. Мы проводили синтез, меняя соотношение субстратов (донора и акцептора фосфата) и продолжительность инкубирования (табл. 1). Во всех проведенных нами опытах не удалось добиться преимущественного образования тетрануклеозидтрифосфата, выход которого составлял в лучшем случае $\sim 3\%$ на взятый и $\sim 15\%$ на вошедший в реакцию ArU. Реакционная смесь содержала при этом значительное количество ArUpC, который

был использован для синтеза АрУрСрС (табл. 2). Хотя эффективность полинуклеотидфосфорилаз *M. luteus* и *E. coli* в этом синтезе примерно одинакова, предпочтительнее работать с ферментом из *E. coli*, который менее активно катализирует фосфорилиз АрУрС в исследованных условиях.

Для синтеза пентануклеотида рГрАрУрСрС — аналога фрагмента 58—62 — использовали гуанилспецифичную рибонуклеазу Т₁. Условия для проведения этого синтеза были подобраны на модельной реакции:



После инкубирования в течение 5 ч эквимольной смеси G>p и АрУрС с рибонуклеазой Т₁ мы получили GrArUrC с выходом ~6% на взятый и ~16% на вошедший в реакцию акцептор. Введение фосфорильной группы в 5'-положение донора фосфата, как и в других случаях [7], мало влияет на выход олигонуклеотида (табл. 3). Выход рGrArUrCp увеличился в несколько раз после замены рибонуклеазы Т₁ гуанилспецифичной рибонуклеазой, выделенной из культуральной жидкости *Asp. clavatus* [8] (см. табл. 3).

Разделение реакционных смесей в случае синтезов АрУрС, АрУрСрС, GrArUrC, рGrArUrC и рGrArUrCp проводили, применяя препаративные электрофорез и хроматографию на бумаге. Всего получено ~1,3 мкмоль рGrArUrCp.

Все синтезированные олигонуклеотиды гомогенны при электрофорезе и хроматографии на бумаге в различных системах растворителей. Нуклеотидный состав этих соединений определяли, анализируя гидролизат, полученный при обработке олигонуклеотида тем или иным ферментом, с помощью хроматографии на бумаге и УФ-спектрофотометрии. Характеристики олигонуклеотидов приведены в табл. 4, 5.

Последний этап синтеза аналога ТФ-петли состоял в сшивании тетра-нуклеотида GrTrUrC и пента-нуклеотида рGrArUrCp с участием РНК-лигазы Т₄. Реакцию проводили в условиях, близких к описанным в работе [9] (табл. 6). После инкубирования и инактивации фермента реакционную смесь разделяли на DEAE-сефадексе в системе Томлинсона — Тспера [10] (рис. 2). Фракции, содержащие отдельные компоненты реакционной смеси, обессоливали на сефадексе G-15 и хроматографировали на бумаге в системе Г. Микроколоночная хроматография на модифицированном силикагеле «Аминохром» в градиенте концентрации фосфат-ионов (0,005—0,1 M) в 7 M мочевины показала, что нонануклеотид содержит ~5% примесей*.

Нуклеотидный состав GrTrUrCpGrArUrCp определяли после гидролиза 70%-ной HClO₄ методом жидкостной хроматографии высокого давления и получили отношение G : T : U : A : C 2,3 : 1 : 2,4 : 0,8 : 3.

Для определения нуклеотидной последовательности нонануклеотид фосфорилировали по 5'-концу с помощью полинуклеотидкиназы и [³²P]АТР и индивидуальный меченый нонануклеотид выделяли гель-фильтрацией на микроколошке с сефадексом G-50. После частичного гидролиза [³²P]нонануклеотида фосфодиэстеразой змеиного яда и разделения полученного набора фрагментов методом двумерного фингерпринта [11] получили автордиограмму, подтверждающую структуру аналога ТФ-петли (рис. 3).

Таким образом, ферментативный синтез аналога ТФ-петли дрожжевой валиновой тРНК, показывает, что предложенное одним из нас комплексное использование ферментов нуклеинового обмена рибонуклеаз с различной субстратной специфичностью, полинуклеотидфосфорилаз, РНК-лигазы [12] является рациональным и эффективным методом синтеза олигорибонуклеотидов заданного строения.

* Анализ выполнен В. Л. Друцой (кафедра химии природных соединений МГУ).

Экспериментальная часть

В работе использовали Na-соли аденозин-2'(3')-фосфата, ADP, UDP, уридин и панкреатическую рибонуклеазу (Reanal, Венгрия), риботимидин, Li-соль CDP, норит (Serva, ФРГ), гуанозин, гуанозин-2',3'-циклофосфат (дициклогексилгуанидиниевая соль), рибонуклеазу T₁, полинуклеотидфосфорилазу *M. luteus* и целлюлозный порошок Cellex N-1 (Calbiochem, США), сефадекс G-15, G-50, G-100, DEAE-сефадекс A-25 (Pharmacia, Швеция), фосфоцеллюлозу P-11, DEAE-целлюлозу DE-52 (Whatman, Англия), [¹⁴C]АТФ с удельной радиоактивностью 58 мКи/ммоль, [γ -³²P]АТФ с удельной радиоактивностью 14,6 Ки/ммоль (Amersham, Англия). Модифицированный силикагель аминокром был любезно предоставлен В. П. Кумаревым (СКТБ БАВ, Новосибирск).

Дициклогексилгуанидиниевую соль G>p превращали в аммониевую соль обработкой дауэксом 50W (NH₄⁺-форма). 2'(3'),5'-Дифосфат гуанозина получали из гуанозина, фосфорилируя последний пиродифосфорилхлоридом по методике, описанной в работе [13]. 5'-Фосфорилгуанозин-2',3'-циклофосфат был приготовлен циклизацией 2'(3'),5'-дифосфата гуанозина *n*-толуолсульфонатом циклогексил- β -[N-(N'-метилморфолиний)]этилкарбодимида [14].

Гуанилспецифичная рибонуклеаза *Asp. clavatus* (КФ 2.7.7.26) и мало-специфичная рибонуклеаза *Pen. brevicompactum* (КФ 2.7.7.17) выделены С. И. Безбородовой и сотр. (ИБФМ АН СССР) [8, 15]. За единицу активности принимали количество фермента, расщепляющее 1 мкмоль G>p за 30 мин при 37° С и pH 7,0 (*Asp. clavatus*) или 1 мкмоль G>p за 1 мин при 37° С и pH 5,2 (*Pen. brevicompactum*).

Полинуклеотидфосфорилаза *E. coli* (КФ 2.7.7.8) выделена в лаборатории В. А. Юодки (Вильнюсский университет); единица активности соответствовала количеству фермента, способному превращать 1 мкмоль ррА в ролу(А) за 60 мин.

РНК-лигаза (КФ 6.5.1.3) выделена из клеток *E. coli*, инфицированных фагом T4 am N82 в середине логарифмической фазы роста с множественностью 1–5, по схеме, предложенной в работе [16]. Для определения активности фермента использовали его способность образовывать с АТФ клеточнорастворимый комплекс [17]. Реакцию проводили, выдерживая при 20° С смесь следующего состава: 60 мМ трис-HCl (pH 7,6), 5 мМ дитритрит, 6 мМ MgCl₂, 0,5 мМ [¹⁴C]АТФ с удельной радиоактивностью 58 мКи/ммоль и фермент в количестве 0,4–10 мкл. Через 10 мин к реакционной смеси прибавляли 3 мл охлажденного раствора 5%-ной трихлоруксусной кислоты и выдерживали при 0° С в течение 20 мин, после чего пробу фильтровали через ультрафильтр типа АУФС СБНПОР (ЧССР) и фильтр промывали 20 мл холодного раствора 1%-ной трихлоруксусной кислоты. Радиоактивность осадков на фильтре определяли в толуольном сцинтилляторе на счетчике Mark II (Nuclear Chicago, США). За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое связывает 1 нмоль АМР в вышеописанных условиях. В работе использовали препарат, имеющий активность 3000 ед. акт./мл.

Активность РНК-лигазы определяли также по превращению 5'-[³²P]А(рА)₁₂ в фосфатазостойчивую форму. Реакцию проводили как описано в работе [18]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 нмоль фосфодиэфирных связей за 30 мин при 37° С. Активность препарата по этому тесту составила 600 ед. акт./мл.

Эндонуклеазную активность в препарате РНК-лигазы определяли после обработки ферментом ДНК фага λ анализом степени сохранения ее нативности методом электрофореза в агарозе [19]: 1 мкг ДНК в 30 мкл «лигазного» буфера выдерживали с 40 ед. акт. фермента (здесь и далее единицы активности указаны по АМР-лигазному комплексу) при 10° С в течение 20 ч. После такой обработки ДНК мигрировала одной полосой,

соответствующей нативной ДНК фага λ , при электрофорезе в 1%-ном агарозном геле.

Экзонуклеазную активность в препарате РНК-лигазы определяли по деградации $(pU)_7$: 0,2–1 мМ $(pU)_7$ в 50 мМ трис-НСl, рН 7,6, содержащем 5 мМ дитиотреит и 10 мМ $MgCl_2$, обрабатывали ферментом в концентрации 500 ед. акт./мл. Анализ реакционной смеси микроколоночной хроматографией в системе Томлинсона – Тенера показал, что за 1 ч при 37° С не происходит деградации $(pU)_7$, а через 24 ч при 25° сохраняется 50–60% субстрата.

Фосфатазную активность тестировали по образованию меченого ортофосфата при инкубации 1 мМ раствора АТР в «лигазном» буфере с РНК-лигазой в концентрации 150–300 ед. акт./мл в течение 24 ч при 25° С или 3 ч при 37° С, определяя радиоактивность, не сорбируемую нитритом [20]. Применявшийся в работе препарат не разрушал $[^{32}P]ATP$.

Хроматографию и электрофорез проводили на бумаге FN-2 и FN-3 (Filtrak, ГДР). Для хроматографии использовали следующие системы растворителей: А – этанол – конц. аммиак – вода (65:20:25); Б – пропанол-2 – конц. аммиак – вода (7:1:2); В – этанол – 1 М ацетат аммония (7:3); Г – пропанол-1 – конц. аммиак – вода (5:1:4). Вертикальный электрофорез проводили в течение 2 ч при напряжении 20 В/см в 0,05 М растворе бикарбоната триэтиламмония.

УФ-спектры снимали на спектрофотометре Specord (ГДР) с автоматической записью, остальные спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре СФ-26.

Синтез олигорибонуклеотидов, катализируемый рибонуклеазами. Динуклеозидмонофосфаты GrT и ArU синтезировали, как описано в работах [5] и [1] соответственно, исходя из количеств субстратов, указанных в тексте. При получении GrT реакционную смесь наносили на колонку с целлюлозой Cellex N-1 (100×2,6 см), уравновешенную системой Б; элюцию проводили тем же растворителем со скоростью 12 мл/ч, собирая фракции по 4 мл. Фракции 95–135, 165–180, 190–230 содержали риботимидин, G>р и GrT соответственно. В случае синтеза ArU реакционную смесь хроматографировали на той же колонке, используя систему Б, при скорости элюции 2½ мл/ч и объеме фракций 6 мл. Фракции 120–130 содержали ArU. Тетрануклеотид рGrArUpC и пентануклеотид рGrArUpCpC получали в условиях, приведенных в табл. 3. Объем реакционных смесей составлял 0,1–0,15 мл.

Синтез олигорибонуклеотидов с полинуклеотидфосфорилазой. Динуклеозидмонофосфат или тринуклеозиддифосфат и нуклеозид-5'-дифосфат инкубировали с ферментом при 37° С в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 9,0, содержащем 0,05 мМ EDTA и 0,04 М $MgCl_2$. Начальные концентрации субстратов и фермента: $[ppU] = [ppC] = 1/2$ [акцентор фосфата] = 0,005 М; [ПНК-фосфорилаза *M. luteus*] 6 мг/мл; [ПНК-фосфорилаза *E. coli*] 1,2 ед. акт./мл. Продолжительность инкубирования приведена в соответствующих таблицах. Реакционную смесь делили с помощью препаративной хроматографии на бумаге в системе А (17–20 ч) и/или в системе Б (48 ч). Олигонуклеотиды дополнительно освобождали от примесей электрофорезом на бумаге и повторной хроматографией в системе Б. При синтезе GrTpU первоначальное разделение реакционной смеси проводили на колонке (200×2 см) с сефадексом С-10. При промывании колонки водой рН 7 со скоростью 7 мл/ч (объем фракций 2,3 мл) на пробирке элюции обнаружили два пика: пик I (фракции 85–108) содержит GrTpU, GrTpUpU, ppU, pU; пик II (фракции 120–135) – GrT. Из пика I GrTpU и GrTpUpU выделяли далее препаративным электрофорезом на бумаге с последующей очисткой хроматографией на бумаге в системах А или Б.

Нонануклеотид GrTpUpCpGrArUpCpC. Раствор GrTpUpC и рGrArUpCpC (начальные концентрации приведены в табл. 6) в 0,33 мл 0,05 М трис-НСl-буфера, рН 7,6, содержащего 0,15 мМ АТР, 3,3 мМ дитио-

эритрит, 20 мМ MgCl₂, бычий сывороточный альбумин (150 мкг/мл) и РНК-лигазу (см. концентрацию в табл. 6), выдерживали 4 ч при 37° С, после чего реакционную смесь прогревали 2 мин на кипящей водяной бане, охлаждали и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 0,5 мл 0,14 М NaCl в 0,02 М трис-НСl-буфере, рН 7,6, с 7 М мочевиной и наносили на колонку (22×0,9 см) с DEAE-сефадексом (А-25). Элюцию проводили раствором NaCl (градиент концентрации 0,14–0,3 М) в том же буферном растворе, используя прибор Ultrograd (ЛКВ, Швеция). Скорость элюции ~18 мл/ч, фракции собирали через 30 мин. На рис. 2 представлен ход элюции реакционной смеси, полученной в третьем опыте (табл. 6).

Определение нуклеотидного состава. Гидролизовали 0,05 ОЕ GrTrUpCrGrArUpCrC с помощью 70%-ной HClO₄ 1 ч при 100° С. Гидролизат анализировали на жидкостном хроматографе высокого давления (Varian, Швейцария, модель 8500), используя колонку (30×0,24 см) с полимеризационным катионообменником аминекс А-7 (Bio-Rad, США) (9±2 мкм). Основания вымывали 0,4 М формиатом аммония (рН 4,5) со скоростью 25 мл/мин при 50° С. Пики на хроматограмме идентифицировали по времени удерживания. Количество оснований определяли, измеряя площади пиков с калибровкой соответствующей стандартной смеси.

Авторы приносят глубокую благодарность В. Л. Дуде и А. А. Пурмалю за проведение микроколоночной хроматографии, а также В. К. Каграмановой и Г. С. Гайда за содействие при проведении анализа нонануклеотида методом нуклеотидных карт.

ЛИТЕРАТУРА

- Zhenodarova S. M., Klyagina V. P., Smolyaninova O. A., Soboleva I. A., Khabarova M. I. (1978) *Nucleic Acids Res.*, Spec. Publ. N4, s137–s140.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **247**, 1–12.
- Ohtsuka E., Nishikawa S., Ikehara M., Takemura S. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **66**, 251–255.
- Zhenodarova S. M. (1976) in: *Synthesis, Structure and Chemistry of tRNAs and their Components* (Wiewiorowski M., ed.), pp. 185–201.
- Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Антонович Е. Г., Прокофьев М. А. (1975) *Биоорганич. химия*, **1**, 604–610.
- Zhenodarova S. M., Klyagina V. P., Smolyaninova O. A., Khabarova M. I., Antonovich E. G., Prokof'ev M. A. (1977) *Nucleic Acids Res.*, **4**, 2099–2107.
- Седельникова Э. А., Клягина В. П., Женодарова С. М. (1973) *Молекулярн. биология*, **7**, 27–35.
- Безбородова С. И., Гуляева В. И., Морозова В. Г. (1975) *Прикл. биохимия и микробиология*, **11**, 9–13.
- Uhlenbeck O. C., Cameron V. (1977) *Nucleic Acids Res.*, **4**, 85–98.
- Тенер Г. (1970) в кн.: *Методы исследования нуклеиновых кислот*, с. 85–90, «Мир», М.
- Sanger F. (1973) in: *Virus Research* (Fox C. F., Robinson W. S., eds), pp. 573–599, Acad. Press, New York — London.
- Женодарова С. М. (1978) Докт. дис. «Ферментативный синтез олигорибонуклеотидов», М.
- Barrio J. R., Barrio M. C. G., Leonard N. J., England T. E., Uhlenbeck O. C. (1978) *Biochemistry*, **17**, 2077–2081.
- Кавуцеско А. П., Сухаревич В. П., Тихомирова-Сидорова Н. С. (1971) *Ж. общ. химии*, **41**, 679–687.
- Безбородова С. П., Ильина Т. В., Захарова Н. Г., Крупянко В. И. (1971) *Биохимия*, **36**, 474–482.
- Higgins N. P., Geballe A. P., Snopek T. J., Sugino A., Cozzarelli N. R. (1977) *Nucleic Acids Res.*, **4**, 3175–3186.
- Cranston J. W., Silber R., Malathi V. G., Hurwitz J. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 7447–7456.
- Snopek T. J., Sugino A., Agarwal K. L., Cozzarelli N. R. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **68**, 417–424.
- Helling R. B., Goodman H. M., Boyer H. W. (1974) *J. Virol.*, **14**, 1235–1244.
- Weiss B., Jacquemin-Sablon A., Live T. R., Farced G. C., Richardson C. C. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 4543–4555.

Поступила в редакцию

6.IX.1979

После доработки

28.XI.1979

ENZYMATIC SYNTHESIS OF GpTpUpCpGpApUpCpC NONANUCLEOTIDE — AN
ANALOG OF THE TΨ-LOOP OF YEAST tRNA₄^{Val}

ZHENODAROVA S. M., KLYAGINA V. P., SEDELNIKOVA E. A., SMOLYANINOVA O. A.,
ANTONOVICH E. G., MAN'KIN A. S., PROKOFIEV M. A., ZAGREBELNY S. N.,
MAISTRENKO V. F., PUSTOSHILOVA N. M., BOLEZNIN M. I., SMOLYANINOV V. V.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino;
M. V. Lomonosov State University, Moscow; Special Design and Technology
Bureau for Biologically Active Compounds, Novosibirsk; Institute
of Applied Microbiology, Protvino*

Nonanucleotide GpTpUpCpGpApUpCpC, corresponding to the TΨ-loop fragment of yeast tRNA₄^{Val}, in which pseudouridine-56 is replaced by uridine and N¹-methyladenosine-59 by adenosine, has been synthesized. For this purpose tetranucleoside triphosphate GpTpUpC and pentanucleotide pGpApUpCpC were prepared and joined by RNA ligase. The starting blocks were synthesized enzymatically by consecutive use of different nucleolytic enzymes: nonspecific ribonuclease *Penicillium brevicompactum*, guanyl-specific ribonucleases *Aspergillus oryzae* (T₁) and *Aspergillus clavatus*, polynucleotide phosphorylases *E. coli* and *M. luteus*.
