



УДК 547.963.32.07

РНК-ЛИГАЗА БАКТЕРИОФАГА Т4

III*. СИНТЕЗ НОНАРИБОНУКЛЕОТИДА, СОДЕРЖАЩЕГО
КОДОН ИНИЦИАЦИИ НА 5'-КОНЦЕ МОЛЕКУЛЫ*Венъяминова А. Г., Франк Л. А., Ялковой В. И.**Новосибирский государственный университет*

Осуществлен катализируемый РНК-лигазой синтез нонарибонуклеотида А-U-G-U-U-U-U-U-U-, содержащего кодон инициации на 5'-конце молекулы, из гексарибоуридилловой кислоты, полученной гидролизом poly(U) эндонуклеазой из яда кобры, и химически синтезированного триэфирным методом тринуклеотида А-U-G. Структура полученного соединения была подтверждена гидролизом рибонуклеазой T₁.

Олигорибонуклеотиды, содержащие триплет А-U-G на 5'-конце молекулы, нашли применение в качестве моделей мРНК в исследованиях процессов функционирования рибосом [4, 5]. Известен простой способ получения таких соединений. Он заключается в наращивании на 3'-конце тринуклеотида А-U-G монотонной последовательности нуклеотидов с помощью праймерзависимой полинуклеотидфосфорилазы (КФ 2.7.7.8) [4, 5]. Однако получаемые таким способом олигорибонуклеотиды представляют собой не индивидуальные соединения, а статистическую смесь молекул разной длины.

Наиболее перспективным и универсальным при синтезе олигорибонуклеотидов с определенной последовательностью гетероциклических оснований представляется метод, основанный на использовании РНК-лигазы бактериофага Т4 (КФ 6.5.1.3) для «сшивания» химически синтезированных коротких олигорибонуклеотидов. С целью иллюстрации возможностей этого метода и для обеспечения работ по выяснению функциональной топографии рибосом мы предприняли химико-ферментативный синтез нонарибонуклеотида А-U-G-U-U-U-U-U-U-, содержащего кодон инициации на 5'-конце молекулы.

Донор фосфата в катализируемой РНК-лигазой реакции представлял собой гексарибоуридилловую кислоту, полученную гидролизом poly(U) эндонуклеазой из яда кобры (КФ.3.1.4), как описано в работе [6].

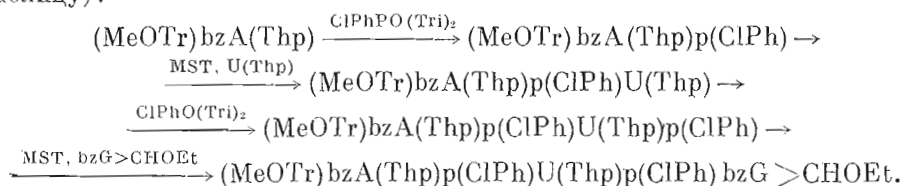
Акцептор А-U-G синтезировали триэфирным методом. Необходимые для этого защищенные производные аденозина, уридина и гуанозина были получены известными методами [7-10].

* Сообщения I, II — см. [1, 2], предварительное сообщение — см. [3]. Сокращения: МКХ — микроколоночная хроматография, Thr — тетрагидропиранил, MeOTr — монометокситриил, >CNOEt — этоксиметил, ClPh — *n*-хлорфенил, Tri-*с.и.м.* — триазол-1-ил, MST — мезитилсульфотетразолид.

Хроматографическая подвижность и выход хлорфениловых ди- и триэфиров защищенных рибоолигонуклеотидов

Соединение	R _f в системе			Выход, %
	Б	В	Г	
(MeOTr)bzA(Thp)p(ClPh)		0,17	0,51	57
(MeOTr)bzA(Thp)p(ClPh)U(Thp)	0,30	0,54		62
(MeOTr)bzA(Thp)p(ClPh)U(Thp)p(ClPh)		0,12	0,48	47
(MeOTr)bzA(Thp)p(ClPh)U(Thp)p(ClPh)bzG>CHOEt	0,23	0,42		58

Строение каждого соединения подтверждено элементарным анализом, методами ТСХ, ИК-, УФ- и ПМР-спектроскопии. Выходы веществ близки к литературным. Получение защищенного триэфирного производного А-У-Г проводили одним из вариантов триэфирного метода синтеза, а именно постадийным наращиванием олигонуклеотидной цепи с 3'-конца по схеме, аналогичной схеме Наранга и сотр. [11] для дезокси-серии (см. таблицу):



После удаления защитных групп и соответствующей очистки (см. «Экспериментальную часть») было получено 250 ОЕ₂₆₀ А-У-Г.

Катализируемый РНК-лигазой синтез нонарибонуклеотида А-У-Г-У-У-У-У-У проводили в описанных ранее условиях при температуре 30°С — оптимальной для сшивания «хороших» субстратов и неоптимальной для самоконденсации гексарибоуридилевой кислоты [2]. За изменением состава реакционной смеси по ходу реакции следили, анализируя отобранные пробы методом микроколоночной хроматографии [12] на носителе с обращенной фазой, представляющем собой полихлортрифторэтиленовый порошок с нанесенным на него тетраэтиламмонийбромидом [13]. Результаты анализа состава реакционной смеси по достижении плато приведены на рис. 1. Как видно из рисунка, целевой продукт (пик 4) является основным продуктом реакции, несмотря на то что при соотношении донор — акцептор, равном 1:1, донор не был защищен по 3'-концевой гидроксильной группе.

Синтезированный нонарибонуклеотид А-У-Г-У-У-У-У-У был выделен препаративной хроматографией на QAE-сефадексе А-25. Выход целевого продукта после обессоливания и лиофилизации 25–30% (степень превращения для А-У-Г и гексарибоуридилевой кислоты, рассчитанная по данным рис. 1, равна соответственно 47 и 83%). Нонарибонуклеотид хроматографически гомогенен (рис. 2), а сравнение хроматографической подвижности продуктов гидролиза выделенного нонарибонуклеотида рибонуклеазой T₁ (рис. 2б) и последовательного гидролиза рибонуклеазой T₁ и фосфомоноэстеразой из *E. coli* (рис. 2в) с маркерами (рис. 2г) однозначно подтверждает его строение.

Экспериментальная часть

В работе использованы следующие реактивы и хроматографические носители: дитиотреит (Koch-Light, Англия); глицерин, трис (Serva, ФРГ); АТР, аденозин, уридин, альбумин из сыворотки крови человека, фосфомоноэстераза из *E. coli* (КФ 3.1.3.1), рибонуклеазы T₂ (КФ 3.1.4.23;

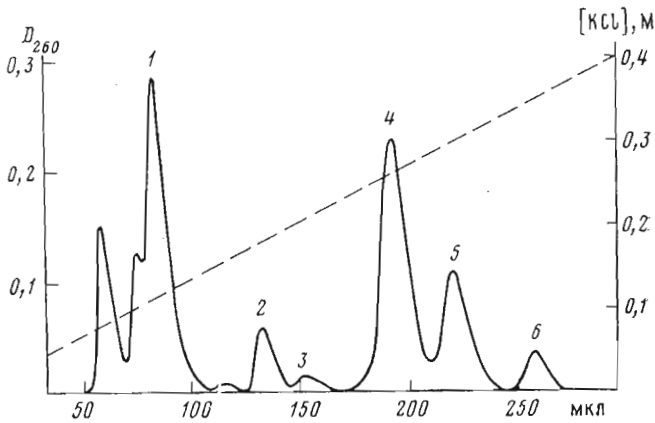


Рис. 1. Микроколоночная хроматография аликвоты реакционной смеси при синтезе нонарибонуклеотида А-У-Г-У-У-У-У-У на хроматографическом носителе с обращенной фазой в линейном градиенте концентрации КСl в 0,01 М имидазол-НСl-буфере (рН 7,0) с 7 М мочевиной. Колонка объемом 40 мкл и длиной 50 мм, скорость элюции 660 мкл/ч, запись на МСФП-3. Пики: 1 — АТР и А-У-Г; 2 — рU-U-U-U; 3 — А(5')ppU-U-U-U; 4 — А-У-Г-У-У-У-У-У; 5 — циклическая форма (U)₁₂; 6 — А-У-Г-(U)₁₂. Пики 3 и 5 идентифицировали как описано в работе [2], структуру пика 6 подтверждали гидролизом рибонуклеазой T₁ с последующей идентификацией продуктов реакции

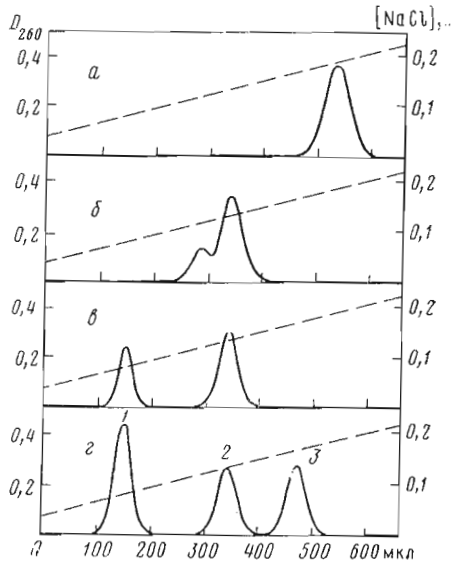


Рис. 2. Микроколоночная хроматография нонарибонуклеотида А-У-Г-У-У-У-У-У (а), продуктов гидролиза его рибонуклеазой T₁ (б), продуктов последовательного гидролиза рибонуклеазой T₁ и фосфомоноэстеразой из *E. coli* (в) и смеси маркеров (г) на DEAE-целлюлозе в линейном градиенте концентрации NaCl в 0,02 М трис-НСl-буфере (рН 7,5) с 7 М мочевиной, колонка объемом 30 мкл и длиной 30 мм, скорость элюции 330 мкл/ч, запись на МСФП-3. Пики: 1 — А-У-Г; 2 — U-U-U-U-U, 3 — рU-U-U-U-U

Sigma, США) и T₁ (КФ 3.1.4.8; ICN, США); гуанозин («Союзреактив»); poly(U) (СКТБ БАВ, Новосибирск); мезитиленсульфотетразолид, полученный по [11] с некоторыми модификациями; тетразол и *n*-хлорфенилфосфодихлоридат, любезно предоставленные Бровко В. В. (СО ВАСХНИЛ);

DEAE-целлюлоза DE-52 (Whatman, Англия); QAE-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция); марки остальных реактивов х.ч. или ос.ч.

Анализ и идентификацию веществ проводили методом нисходящей хроматографии на бумаге (БХ) FN-1 (ГДР), а также тонкослойной хроматографии на силикагеле (ТСХ) Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системах растворителей: А — этанол — 1 М ацетат аммония, pH 7,5 (7:3); Б — хлороформ — метанол (95:5); В — хлороформ — метанол (90:10); Г — хлороформ — метанол — триэтиламин (80:19:1).

Адсорбционную колоночную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 F (Merck, ФРГ).

РНК-лигазу выделяли из биомассы *E. coli* В, инфицированной бактериофагом T4 amN 82, по методу, описанному нами ранее [1]. Полученный препарат фермента (2,4 мкМ — концентрация РНК-лигазы, 0,9 мг/мл — концентрация белка) содержал не более 1,8 ед. акт. 3'-экзонуклеазы на 1 пмоль РНК-лигазы [1].

Хлорфениловые диэфиры. К охлажденной смеси 0,2 г (2,9 ммоль) триазола и 0,15 мл (0,92 ммоль) *n*-хлорфенилфосфодихлоридата в 5 мл абс. диоксана при перемешивании добавляли 0,25 мл (1,8 ммоль) абс. триэтиламина в 1 мл абс. диоксана. Смесь нагревали до 20°С, выдерживали 1 ч и фильтровали в колбу с раствором 0,5 ммоль защищенного нуклеозида в 5 мл абс. пиридина. Через 30 мин реакция фосфорилирования проходила полностью (контроль — ТСХ, система В). Реакционную смесь упаривали, растворяли в 5 мл хлороформа, содержащего 30% *n*-бутанола, и промывали порциями 1 М раствора триэтилammонийбикарбоната (ТЭАБ), pH 7,5. Затем органический слой упаривали с толуолом и этанолом до удаления пиридина, растворяли в хлороформе и наносили на колонку с SiO₂ (100–150 мл). Смесь хроматографировали в градиенте концентрации метанола в хлороформе (от 0 до 10%), содержащем 2% триэтиламина. Фракции, содержащие диэфир нуклеозида, объединяли, упаривали и пересаждали из сухого хлороформа в смесь абс. петролейного и серного эфиров (1:1). Выход диэфиров 50–60% (см. таблицу).

Хлорфениловые триэфиры. Высушенную навеску (0,1 ммоль) хлорфенилового диэфира защищенного нуклеозида растворяли в 1 мл абс. пиридина и добавляли 0,3 ммоль мезитилсульфотетразолида и 0,13 ммоль второго защищенного нуклеозида. Через 1 ч реакция проходила полностью (контроль — ТСХ, система В). К раствору добавляли равный объем 1 М ТЭАБ (pH 7,5) и экстрагировали хлороформом (3×1 мл). Объединенные органические слои упаривали с толуолом и спиртом (до удаления пиридина). Остаток растворяли в хлороформе и наносили на колонку с SiO₂ (100–150 мл). Элюцию веществ вели хлороформом и хлороформом, содержащим 1 и 3% метанола. Фракции, содержащие триэфир, объединяли, упаривали и пересаждали из сухого хлороформа в абс. петролейный эфир. Выход триэфиров 50–60% (см. таблицу).

Тринуклеотид А-U-G. Навеску (MeOTr)bzA(Thp)p(ClPh)U(Thp)p(ClPh)bzG>CHOEt растворяли в пиридине, добавляли 10-кратный объем конц. NH₄OH и выдерживали 2 ч при 50°С. Смесь упаривали досуха, заливали избытком 20% уксусной кислоты и вновь выдерживали 2 ч при 50°С. Полученный раствор упаривали с добавлением бензола и этанола для удаления уксусной кислоты. Разделение полученной смеси проводили методом бумажной хроматографии в системе А. Полосу вещества с R_f 0,33 вырезали, вещество элюировали водой. Выход А-U-G 30–45%. Дополнительную очистку синтезированного тринуклеотида проводили на колонке с QAE-сефадексом А-25 в градиенте концентрации раствора бикарбоната аммония (0–0,6 М), содержащего 15% диоксана. Гомогенность полученного тринуклеотида доказывали микроколоночной хроматографией. Строение его подтверждали гидролизом рибонуклеазой T₂ в стандартных условиях [14] с последующим количественным анализом гидролизата МКХ.

Понарибонуклеотид А-U-G-U-U-U-U-U-U. Реакцию «сшивания» гекса-

рибоуридиловой кислоты с А-U-G проводили в объеме 2 мл. В реакционную смесь входили 1 мМ А-U-G, 1 мМ (pU)₆, 2 мМ АТР, 0,05 М трис-НСl-буфер (рН 8,7 при 30° С), 10 мМ MgCl₂; 10 мМ дитиотреит, 0,6 мкМ РНК-лигаза, 0,2 мг/мл альбумина, 12,5 об. % глицерина. Время реакции 12 ч, температура 30° С. По окончании реакции реакционную смесь разбавляли в 3 раза водой и наносили на хроматографическую колонку (2×25 см) с QAE-сефадексом А-25 в HCO₃⁻-форме. Элюцию вели со скоростью 40 мл/ч 2 л раствора бикарбоната аммония (линейный градиент концентрации от 0,4 до 0,8 М бикарбоната аммония в 15 % диоксане). В описанных условиях целевой нонарибонуклеотид элюировался с колонки при концентрации бикарбоната аммония, равной 0,67 М. Фракции, соответствующие пику целевого продукта, объединяли и упаривали несколько раз с добавлением воды для удаления бикарбоната аммония, после чего лиофилизовали.

Гомогенность полученного нонарибонуклеотида доказывали микроколоночной хроматографией. Строение его подтверждали гидролизом рибонуклеазой T₁. Реакцию проводили в объеме 20 мкл. Концентрации компонентов реакционной смеси были следующие: А-U-G-U-U-U-U-U-U-U — 0,06 мМ; трис-НСl-буфера (рН 8,5) — 0,05 М; MgCl₂ — 2,5 мМ; рибонуклеаза T₁ — 0,2 мг/мл. Время реакции 30 мин, температура 37° С. По окончании реакции отбирали аликвоту 5 мкл для анализа, а к оставшейся реакционной смеси добавляли 0,5 мкг фосфомоноэстеразы из *E. coli* и инкубировали еще 3 ч при 37° С. Пробы анализировали методом микроколоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе в системе Томлинсона — Тенера (рН 7,5).

Авторы выражают признательность чл.-кор. АН СССР Д. Г. Кнорре за постоянный интерес к работе и благодарят Л. Г. Болдыреву и Н. Н. Филатову за помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Василенко С. К., Веняминава А. Г., Ямковой В. И., Майоров В. И. (1979) Биорган. химия, 5, 621–627.
2. Ямковой В. И. (1980) Биорган. химия, 6, 1808–1812.
3. Веняминава А. Г., Корочкина С. Е., Франк Л. А., Ямковой В. И. (1979) III Всес. конф. по методам получения и анализа биохимических реактивов, тез. докл. с. 58, Олайн.
4. Manderschied U., Bertram S., Gassen H. G. (1978) FEBS Lett., 90, 162–166.
5. Ganoza M. C., Fraser A. R., Neilson T. (1978) Biochemistry, 17, 2769–2775.
6. Василенко С. К., Србо Н. А., Веняминава А. Г., Болдырева Л. Г., Будкер В. Г., Кобец Н. Д. (1976) Биохимия, 41, 260–263.
7. Gregoire R. J., Neilson T. (1978) Can. J. Chem., 56, 487–490.
8. Griffin B. E., Jarman M., Reese C. B. (1968) Tetrahedron, 24, 639–662.
9. Neilson T., Werstiuk E. (1971) Can. J. Chem., 49, 493–499.
10. Zemlicka J., Chladek S., Holy A., Smrt J. (1966) Coll. Czech. Chem. Commun., 31, 3198–3210.
11. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. (1977) Nucl. Acids Res., 4, 353–371.
12. Грачев М. А. (1973) в сб.: Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот (Кнорре Д. Г., Венкстерн Т. В., ред.), с. 104–122, «Наука», М.
13. Ямковой В. И. (1979) Бюл. изобр., № 34; Авт. свид. № 685975.
14. Irie S., Uchida T., Egami F. (1970) Biochim. et biophys. acta, 209, 289–295.

Поступила в редакцию
3.III.1980

BACTERIOPHAGE T4 RNA LIGASE. III. SYNTHESIS OF NONARIBONUCLEOTIDE CONTAINING THE INITIATION CODON AT 5'-TERMINUS

VENYAMINOVA A. G., FRANK L. A., YAMKOVY V. I.

Novosibirsk State University, Novosibirsk

Hexaribouridylic acid, prepared by digestion of poly(U) with cobra venom endonuclease, and trinucleotide A-U-G, synthesized chemically by triester approach were joined by RNA ligase to yield a nonaribonucleotide A-U-G-U-U-U-U-U-U bearing the initiation codon at its 5'-terminus. The structure of the reaction product was proved by enzymatic hydrolysis with T₁ ribonuclease.