



УДК 547.963.32.07+577.153.9

**ПРАЙМЕРЗАВИСИМЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ  
ПОЛИНУКЛЕОТИДФОСФОРИЛАЗОЙ *E. coli****Ренхоф Р. Ф., Шеринь Л. А., Микелсоне Л. Х.,  
Грен Э. Я.**Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Изучены условия праймерзависимого синтеза в ряду олигорибонуклеотидов низкоочищенными препаратами нативной полинуклеотидфосфорилазы *E. coli*. В качестве праймеров использован ряд олигорибонуклеотидов от ди- до гексамеров, в качестве субстратов — четыре природных нуклеозид-5'-дифосфата. В препаративном масштабе синтезированы два олигонуклеотида — элементы структуры рибосомных сайтов фаговых РНК:  $UrUrUrG$  и  $ArArArUrG$ .

Из полифункциональных свойств полинуклеотидфосфорилазы (ПН-фосфорилаза) (КФ 2.7.7.8) для целей энзиматического синтеза олиго- и полинуклеотидов используется ее способность катализировать полимеризацию нуклеозид-5'-дифосфатов как без инициации, так и с применением праймеров. Хорошо разработан целенаправленный синтез олигорибонуклеотидов, катализируемый праймерзависимой ПН-фосфорилазой из *Micrococcus luteus* [1–6], начато использование фермента без заметной фосфорилитической активности из *Thermus thermophilus* [7, 8]. Для ПН-фосфорилазы из *E. coli*, выделенной в высокоочищенном состоянии [9], было проведено детальное изучение ее структуры и кинетических параметров [10–12], разработаны условия праймерзависимого синтеза в ряду олигодезоксирибонуклеотидов [13–17]. В случае же олигорибонуклеотидов показаны лишь отдельные примеры синтеза с использованием праймеров [5, 18, 19]. Способность фермента, выделенного из *E. coli*, катализировать полимеризацию нуклеозид-5'-дифосфатов, модифицированных в гетероциклическом основании [20] или в рибозной части [21, 22], может оказаться полезной для создания аналогов олигонуклеотидов.

Настоящее исследование посвящено разработке метода синтеза олигорибонуклеотидов с помощью низкоочищенной нативной формы ПН-фосфорилазы из *E. coli* путем оптимального присоединения к праймеру одного (нескольких) нуклеотидных остатков.

Начальные моменты полимеризации нуклеозид-5'-дифосфатов высокоочищенными препаратами нативной ПН-фосфорилазы *E. coli* характеризуются *lag*-периодом [9], снимаемым праймерами — олигорибонуклеотидами со свободной 3'-гидроксильной группой [10]. Величина *lag*-периода находится в обратной зависимости от количества ПН-фосфорилазы. В присутствии препаратов выделенного нами низкоочищенного нативного фермента (рис. 1) такого *lag*-периода не обнаруживается из-за интенсивной полимеризации нуклеозид-5'-дифосфата.

Сравнение разрозненных данных в работах, посвященных синтезам с ферментами, выделенными из *M. luteus* [1—3, 6] и *E. coli* [15—17, 19], указывало на то, что скорость полимеризации нуклеозид-5'-дифосфатов с использованием праймеров зависит от присутствия в инкубационной среде хлористого натрия. Мы показали, что при определенных, различающихся в зависимости от образцов фермента, концентрациях NaCl в реакциях полимеризации UDP, катализируемых нашим препаратом фермента, формируется *lag*-период, характеризующий протекание праймерзависимого процесса (рис. 2а—в). Прямой зависимости оптимальной концентрации NaCl от активности фермента или содержания белка в используемом образце ПН-фосфоорилазы мы не наблюдали.

Роль хлористого натрия, видимо, состоит в облегчении диссоциации фермент-нуклеотидного комплекса [16], а необходимая в каждом конкретном случае его концентрация связана со степенью очистки фермента от нуклеотидного материала, служащего эндогенным праймером. Скрытый период полимеризации, вызываемый NaCl, связан с формированием праймер-зависимости фермента, так как одновременное добавление праймеров снимает эффект задержки образования продуктов (рис. 2в). При этом различие в скоростях полимеризации с праймерами разной длины находится в соответствии с их сродством к ферменту [10].

Мы изучали влияние NaCl (0—1 М) на выход продуктов полимеризации в присутствии праймера  $UpUpUpU$  (табл. 1) и показали, что увеличение выхода олигонуклеотидов с повышением концентрации NaCl коррелирует с подавлением реакций, идущих без инициации (ср. рис. 2).

Важными факторами регулирования выхода целевых продуктов полимеризации, катализируемой ПН-фосфоорилазой, являются концентрации компонентов и их соотношение. Для присоединения к ди- и трипуклеотидным праймерам 1—3 нуклеотидных остатков используется соотношение праймер — нуклеозид-5'-дифосфат от 2 : 1 [4, 5, 23] и 1 : 1 [3, 19, 23] до 1 : 4 и 1 : 6 [3]. Для присоединения 4—7 нуклеотидных остатков к тетра- и пентануклеотидам оно повышается до 1 : 24 [2], достигая в синтезе полинуклеотидов 1 : 25 000 [6].

В качестве стандартных условий полимеризации мы выбрали: концентрацию праймера 0,33 мМ, донора 1 мМ (1 : 3), фермента 1—5 ед. акт./мл, 0,6 М NaCl, время реакции 1,5 ч. Удлинение времени синтеза до 3—4 ч (см. табл. 1) не приводит обычно к повышению выхода продуктов первых ступеней полимеризации.

Влияние природы донора фосфатной группы изучалось нами с тетрауридилатом в качестве праймера (табл. 2). Здесь же показан пример использования праймера другой структуры и длины —  $UpUpUpApA$ . Выход продуктов синтеза варьирует в зависимости от условий эксперимента и от количества фермента (ср. табл. 1 и 2). Выявленного преимущества какого-либо донора не проявляется, хотя худшие результаты дает использование аденозин-5'-дифосфата. Отметим, что с ферментом из *M. luteus* не удалось получить присоединения коротких адениловых последовательностей к олигоуридилатным праймерам [1]. С помощью ПН-фосфоорилазы из

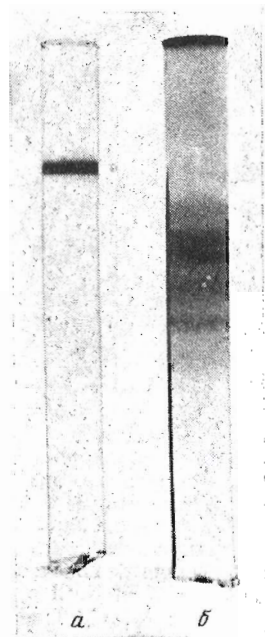


Рис. 1. Электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле препарата низкоочищенной ПН-фосфоорилазы *E. coli*; а — проявление зоны фермента (см. «Экспериментальную часть»), б — окрашивание белков

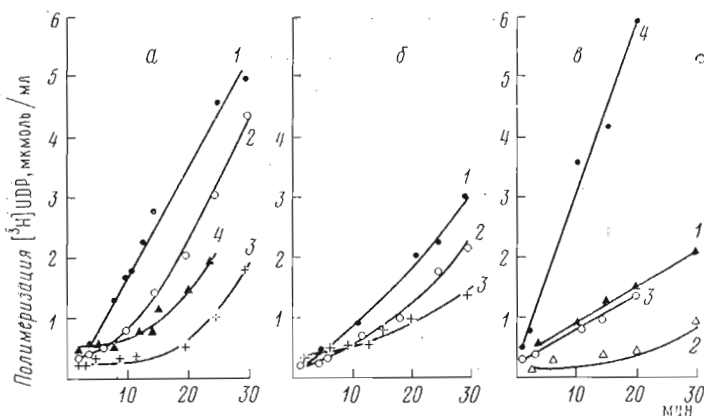


Рис. 2. Полимеризация  $[^3\text{H}]\text{UDP}$  разными образцами ПН-фосфорилазы: *a* — препарат с активностью 10 ед. акт./мл и уд. акт. 5 ед. акт./мг белка, концентрация  $\text{NaCl}$ : 1 — 0,4; 2 — 0,5; 3 — 0,6 М; 4 — высокоочищенный фермент (разбавлен в 160 раз) без добавки  $\text{NaCl}$ ; *b* — препарат с активностью 6 ед. акт./мл и уд. акт. 30 ед. акт./мг белка, концентрация  $\text{NaCl}$ : 1 — 0,2; 2 — 0,3; 3 — 0,4 М; *c* — препарат с активностью 4 ед. акт./мл (уд. акт. 4,8 ед. акт./мг белка) в отсутствие  $\text{NaCl}$  (1), в присутствии 0,7 М  $\text{NaCl}$  (2) и 0,7 М  $\text{NaCl}$  с одновременным добавлением 0,4 мМ  $(\text{U}_p)_3\text{U}$  (3) и 0,1 мМ  $(\text{U}_p)_{11}\text{U}$  (4)

*E. coli* нами выполнены такие синтезы (табл. 2 и 3), при этом увеличение соотношения праймер —  $\text{ADP}$  до 1 : 10 и 1 : 50 увеличивает выход и набор продуктов синтеза. Одновременно образуется много высокополимерного материала, количество которого не снижается ни 1 М  $\text{NaCl}$ , ни увеличением концентрации фермента.

При синтезе олигодезоксирибонуклеотидов с помощью ПН-фосфорилазы из *E. coli* было показано, что наиболее коротким праймером может служить дезоксириботрипнуклеозиддифосфат [13]. Для синтеза олигорибонуклеотидов известны случаи использования в качестве праймеров динуклеозидмонофосфатов [5, 18, 19]. Мы показали, что праймеры  $\text{GpU}$ ,  $\text{UpU}$  и  $\text{ApU}$  с ферментом *E. coli* или не иницируют синтез, или иницируют крайне слабо (например, при избытке фермента 40 ед. акт./мл  $\text{ApUpU}$  синтезируется с выходом 8,5%). В то же время с ферментом *M. luteus* в наших условиях они образуют продукты синтеза с ожидаемым в сравнении с работой [4] выходом.

В стандартных условиях тетра- и пентануклеотиды эффективно иницируют синтез без избытка фермента (табл. 4), что было использовано нами в препаративных синтезах для экономии фермента, улучшения очистки продуктов и регенерации праймера.

По сродству к ферменту трипнуклеозиддифосфаты как праймеры занимают промежуточное положение. Поэтому выход продуктов в основном зависит от количества фермента, что заметно в случае реакции  $\text{UpUpU} + \text{GDP}$  и хорошо прослеживается при использовании аденозин-5'-дифосфата (табл. 5, а также 1-я строка табл. 3).

Таким образом, в результате изучения полимеризации  $\text{UDP}$  и аналитических синтезов олигорибонуклеотидов нативной формой низкоочищенных препаратов полинуклеотидфосфорилазы, выделенной из *E. coli*, были подобраны оптимальные условия синтеза с использованием ряда олигорибонуклеотидов в качестве праймеров. На основе полученных данных нами выполнен препаративный синтез двух олигонуклеотидов —  $\text{UpUpUpG}$  и  $\text{ApApApUpG}$ . Тетрануклеотид  $\text{UpUpUpG}$ , являющийся одним из общих элементов структуры для ряда сайтов инициации в фаговых РНК [24], был синтезирован в одну стадию (табл. 5). Гексануклеотид  $\text{ApApApApUpG}$ , содержащий кодон инициации, синтезирован в две стадии. На первой стадии с использованием праймера  $\text{ApApApA}$  и  $\text{UDP}$  получен пентануклеотид, к которому на второй стадии присоединен оста-

Таблица 1

Зависимость выхода продуктов синтеза олигорибонуклеотидов в присутствии ПН-фосфориллазы с удельной активностью 30 ед. акт./мг белка (А) и 5 ед. акт./мг белка (Б) от концентрации NaCl \*

А, [Е] 3 ед. акт./мл			Б, [Е] 5 ед. акт./мл			
[NaCl], М	Выход продуктов <sup>2*</sup> , %		[NaCl], М	Выход продуктов <sup>2*</sup> , %		
	1	2		1	2	3
0,05	19,3	8,0	—	11,6	7,0	6,3
0,2	26,4	8,2	—	8,8 <sup>3*</sup>	6,6	5,1
0,4	28,0	8,4	0,4	14,0 <sup>4*</sup>	10,6	5,3
0,6	27,3	8,8	0,6	19,9 <sup>4*</sup>	10,1	4,7
0,8	18,8	5,6	0,6	23,2	14,4	10,0
1,0	18,5	5,5				

\* Праймер 0,33 мМ UpUpUpU, донор 1 мМ GDP, 1,5 ч, 37° С.

<sup>2\*</sup> Здесь и далее указаны выходы продуктов последовательного присоединения 1, 2, 3 и т. д. доноров.

<sup>3\*</sup> Время инкубации 3 ч.

<sup>4\*</sup> [Е] 3 ед. акт./мл.

Таблица 2

Выход продуктов синтеза олигорибонуклеотидов в стандартных условиях (праймер UpUpUpU 0,33 мМ, донор 1 мМ, 0,6 М NaCl, 1,5 ч, 37° С) в зависимости от природы нуклеозид-5'-дифосфата

Донор	ПН-фосфориллаза, ед. акт./мл	Выход продуктов, %				
		1	2	3	4	сумма
ADP	5	20,7	7,4	3,5	2,3	33,9
CDP	5	23,2	14,4	10,0	—	47,6
GDP	5	26,3	13,5	7,9	4,2	51,9
	2	31,0	5,6	4,2	—	40,8
	1	28,4	4,2	1,9	—	34,5
UDP	5	34,2	13,5	3,0	—	50,7
UDP *	5	34,1	11,5	2,8	—	48,4

\* Синтез выполнен в 1 М NaCl. Праймер UpUpUpA.

Таблица 3

Выход продуктов синтеза олигорибонуклеотидов с аденозин-5'-дифосфатом и олигоуридилатами разной длины  
Праймер 0,33 мМ, ПН-фосфориллаза 16 ед. акт./мл, время реакции 1,5 ч, 37° С

Праймер	Праймер/ ADP, моль/моль	[NaCl], М	Выход продуктов, %						
			1	2	3	4	5	6	7
UpUpU *	1 : 10	0,6	12,2	9,1	5,3	3,3	—	—	—
UpUpUpUpU	1 : 10	0,4	23,3	13,4	7,6	5,7	3,0	1,4	—
	1 : 50	0,4	27,6	19,3	14,0	11,9	10,6	—	—
UpUpUpUpUpU	1 : 50	0,4	33,0	18,3	5,7	3,7	2,5	1,3	0,9
	1 : 50	1,0	43,0	22,0	5,0	2,9	2,2	1,7	1,0

\* ПН-фосфориллаза 5 ед. акт./мл.

ток гуаниловой кислоты (табл. 4, рис. 3). Структура продуктов подтверждена результатами щелочного и ферментативного гидролиза, их гомогенность охарактеризована микроколоночной жидкостной хроматографией. Синтезированные олигонуклеотиды могут быть использованы для создания более длинных матриц.

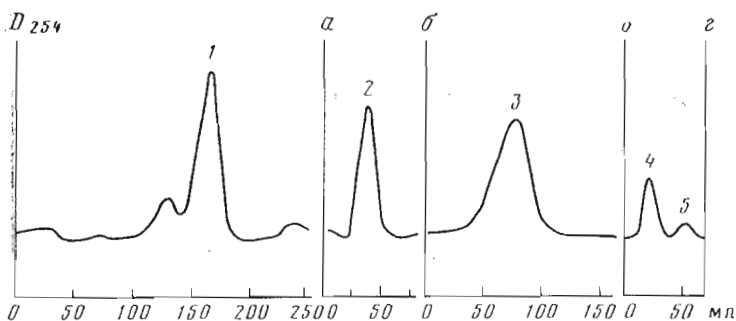


Рис. 3. Хроматографическое разделение продуктов катализируемого ПН-фосфорилазой препаративного синтеза АрАрАрАрUpG в градиенте концентрации  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,0, —  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ . Из продуктов реакции 0,75 мкмоль (53  $\text{OE}_{260}$ ) АрАрАрАрU и 2,25 мкмоль (27  $\text{OE}_{260}$ ) GDP с 3 ед. акт. фермента и 0,6 M NaCl в 2,3 мл выделили: 1 — 14,4  $\text{OE}_{260}$  GDP; 2 — 16,7  $\text{OE}_{260}$  (31,5%) АрАрАрАрU; 3 — 17,7  $\text{OE}_{260}$  (0,22 мкмоль; 28,5%) АрАрАрАрUpG; 4 — 5,2  $\text{OE}_{260}$  (0,05 мкмоль; 7,4%) АрАрАрАрUpGrG; 5 — 2,4  $\text{OE}_{260}$  неустановленного состава. Состав элюирующих растворов а, б, в и г см. в «Экспериментальной части»

### Экспериментальная часть

*Полинуклеотидфосфорилазу* выделяли из *E. coli* B сочетанием известных методик [9, 19, 25–28]. Конечные растворы фермента после пропускания через колонку с сефадексом G-200 (например, 11 мл с активностью 10 ед. акт./мл, 5 ед. акт./мл с  $D_{280}/D_{260}$  1,60 из 20 г *E. coli* B) в буфере, содержащем 0,1 M трис-HCl (pH 8,1), 0,01 M  $\text{MgCl}_2$  и 0,001 M  $\beta$ -меркаптоэтанол, замораживали и хранили до использования при  $-20^\circ\text{C}$ . Образец высокоочищенной ПН-фосфорилазы *E. coli* (450 ед. акт./мл) использован нами при изучении скорости полимеризации  $[^3\text{H}]\text{UDP}$  (рис. 2а–4) и в аналитических синтезах (табл. 3).

*Активность* фермента в процессе очистки определяли согласно методике [25] и оценивали в мкмоль/ч по полимеризации  $[^3\text{H}]\text{UDP}$  при  $37^\circ\text{C}$ .  $[^3\text{H}]\text{UDP}$  с удельной радиоактивностью 6 Ки/ммоль, синтезированный в ИОС В. Э. Таурином, был разбавлен до 5 мКи/ммоль немеченым UDP (Serva).

*Рибонуклеазную активность* определяли по радиоактивности в кислоторастворимой фракции после инкубации 0,05 мл образца фермента с 0,05 мл  $[^{14}\text{C}]\text{pPHK}$  (100  $\text{OE}_{260}/\text{мл}$ ;  $4,5 \cdot 10^3$  имп/мин/ $\text{OE}_{260}$ ) в 0,1 M трис-HCl, pH 8,0, в течение 1 ч при  $37^\circ\text{C}$  и осаждения 0,1 мл 5%  $\text{HClO}_4$ . Высокомолекулярную  $[^{14}\text{C}]\text{pPHK}$  выделяли согласно [29] из *E. coli*, выращенной на среде с  $[^{14}\text{C}]\text{урацилом}$ . Препараты ПН-фосфорилазы не проявляли рибонуклеазной активности.

*Скорость полимеризации*  $[^3\text{H}]\text{UDP}$  определяли в буфере 0,2 M трис-HCl (pH 8,1), 0,01 M  $\text{MgCl}_2$  и 0,002 M EDTA (буфер А). К 0,1 мл нагретого до  $37^\circ\text{C}$  10 мМ субстрата  $[^3\text{H}]\text{UDP}$  в буфере 2А приливали 0,1 мл ферментного раствора. Отбирали во времени пробы по 0,02 мл, наносили их на диски бумаги «Whatman 3ММ» (Англия), которые замачивали в 10% трихлоруксусной кислоте (ТХУ) в ледяной бане. Диски промывали 5% ТХУ (15 мин), холодным этанолом (15 мин), споласкивали эфиром, высушивали и просчитывали радиоактивность. В указанных случаях в реакционные смеси добавляли NaCl и олигоуридилаты  $(\text{Up})_3\text{U}$  или  $(\text{Up})_{11}\text{U}$ . Полимеризацию  $[^3\text{H}]\text{UDP}$  оценивали в мкмоль/мл исходного ферментного раствора.

*Гель-электрофорез* проводили в 7,5% полиакриламидном геле (1,5% бисакриламида) в буфере 0,1 M трис-глицин, pH 8,8, в трубочках диаметром 5 мм и высотой геля 6 см при силе тока 2 мА на трубку в течение 2 ч, заканчивая разделение через 20 мин после выхода бромфенолового син-

Таблица 4

## Выход продуктов синтеза олигорибонуклеотидов без избытка фермента

Праимер 0,33 мМ, донор 1 мМ, ПН-фосфорилаза  
1,25 ед. акт./мл, 0,6 М NaCl, 1,5 ч, 37°С

Праимер	NDP	Выход продуктов, %	
		1	2
UpUpUpG	ADP	15,7	7,8
ApApApA	UDP	26,3 *	13,2 *
		31,5 *	14,0 *
ApApApApU	GDP	24,0	3,0
		28,5 *	7,4 *

\* Синтез препаративный.

Таблица 5

## Иницирование синтеза олигорибонуклеотидов тринуклеозиддифосфатами

Праимер 0,33 мМ, донор 1 мМ, 0,6 М NaCl, 1,5 ч, 37°С

Праимер	NDP	ПН-фосфорилаза, ед. акт./мл	Выход продуктов присоединения, %			
			1	2	3	4
UpUpU	GDP	4	23,8	15,3	10,6	3,1
		2	20,4	4,8	2,1	—
ApUpU	ADP	1,25	5,1	—	—	—
		1,0	6,0	—	—	—
		12,5	14,0	6,6	—	—

го, нанесенного вместе с 50 мкг образца в глицерине. Белки окрашивали в течение 1 ч кумасси синим (1,25 г красителя в смеси 454 мл 50% водного метанола и 46 мл ледяной уксусной кислоты). Промывали большим объемом 7,5% уксусной кислоты. Для проявления зоны ПН-фосфорилазы гели инкубировали 1 ч при 37°С в 1 мМ растворе ADP в буфере А. Затем продукт реакции окрашивали 1 ч 0,2% (вес/объем) метиленовым синим в 0,4 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , pH 4,3, и промывали многократной сменой воды.

Колоночную хроматографию олигонуклеотидов и продуктов синтеза выполняли на стандартной колонке (1,4×13 см) с DEAE-сефадексом А-25 в  $\text{HCO}_3^-$ -форме. Применялся градиент от 0,01 до 1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,0, по 150 мл со скоростью 16–18 мл/ч, а также комбинированный, частично перекрывающийся градиент концентрации элюирующих растворов а–г (см. далее). Очищенные нуклеотиды обессоливали многократным уцариванием с добавлением этанола.

Олигонуклеотиды  $(\text{Up})_n\text{U}$  с  $n$  1–12 и  $(\text{Ap})_n\text{A}$  с  $n$  1–6 выделяли колоночной хроматографией из смеси, полученной щелочным гидролизом poly(U) и poly(A) (Reanal, Венгрия) соответственно, и инкубацией со щелочной фосфатазой *E. coli* (ФМЭ). Poly(A) (20 мг) гидролизovali в 2 мл 0,1 н. КОН 2,5 ч при 37°С, добавляли HCl до концентрации 0,1 н. и выдерживали 1 ч при 37°С. Нейтрализовали до pH 7,0, добавляли  $1/_{10}$  объема буфера, содержащего 0,1 М трис-HCl, pH 8,0, и 0,1 М  $\text{MgCl}_2$ , инкубировали 2,5 ч с ФМЭ (180 мкмоль/ч), затем, после выдерживания 2 мин при 100°С, смесь депротенизировали и осаждали 2,5 объемами спирта. Осадок (175  $\text{OE}_{260}$ ) оставляли, супернатант (420  $\text{OE}_{260}$ ) фракционировали на колонке с DEAE-сефадексом А-25. Гидролизovali 20 мг poly(U) в 2 мл 0,1 н. щелочи 1,5 ч, после аналогичной обработки HCl и ФМЭ и депро-

теинизации, смесь олигоуридилатов (470  $OE_{260}$ ) непосредственно фракционировали на колонке с DEAE-сефадексом А-25.

*Нуклеозид-5'-дифосфаты* (Reanal, Венгрия) очищали на стандартной колонке (1,2×14 см) с QAE-сефадексом А-25 (в  $CO_3^{2-}$ -форме). Раствор 15–20 мг NDP с содержанием основного вещества 65–90% хроматографировали в градиенте концентрации  $(NH_4)_2CO_3$  от 0,05 до 0,4 М (по 200 мл). NDP вымываются в интервале 0,18–0,28 М карбоната аммония. Сродство к аниониту увеличивается в последовательности  $CDP < ADP < UDP < GDP$ .

*Примерзависимый синтез* выполняли в буфере А. Выход продуктов синтеза оценивался в процентах по содержанию в них праймера от взятого в реакцию его количества. Preparативный синтез  $UpUpUpG$  был выполнен в объеме 13 мл из  $UpUpU$  (4,3 мкмоль, 130  $OE_{260}$ ) и  $GDP$  (13 мкмоль, 156  $OE_{260}$ ). После реакции с ПН-фосфорилазой (1,5 ч) продукты выдерживали 2 мин при 100°С, затем инкубировали 1 ч при 37°С с ФМЭ (1400 мкмоль/ч) и депротеинизировали. Фенольный слой промывали водой, разбавляя реакцию смесь в 5 раз перед хроматографией. На стандартной колонке с DEAE-сефадексом А-25 в градиенте 0,01–1 М  $NH_4HCO_3$  было выделено 33,5  $OE_{260}$  (23,5%) исходного  $UpUpU$  и 0,58 мкмоль (24,5  $OE_{260}$ )  $UpUpUpG$  (13,5%).

$ArArArU$  синтезирован в реакции 2,2 мкмоль (132  $OE_{260}$ )  $ArArArA$  с 6,6 мкмоль (66  $OE_{260}$ )  $UDP$ . В градиенте а: 0,01–1 М  $NH_4HCO_3$  (по 150 мл) элюировались исходные субстраты 60  $OE_{260}$   $UDP$  и 39  $OE_{260}$   $ArArArA$  (29,6%), затем в градиенте б: 0,6–1 М  $NH_4HCO_3$  (по 100 мл) выходил продукт синтеза —  $ArArArArU$  0,69 мкмоль, 48,6  $OE_{260}$  (31,5%) и в градиенте в: 0,8 М  $NH_4HCO_3$  — 1 М  $(NH_4)_2CO_3$  (по 100 мл) выделяли 24,8  $OE_{260}$  (14%)  $ArArArArUpU$ . 1 М  $(NH_4)_2CO_3$  (г) вымывали еще 4,7  $OE_{260}$  нуклеотидного материала неустановленного строения.

*Состав* исходных олигонуклеотидов и продуктов синтеза определяли после их щелочного гидролиза и хроматографии на бумаге «Whatman 1» в системе *n*-пропанол — аммиак — вода (55 : 10 : 25). Соотношение нуклеотид — нуклеозид составило для  $UpUpU$  2,07 (Uр : U), для  $UpUpUpG$  — 2,5 (Uр : G), для  $ArArArA$  — 2,95 (Ar : A) и для  $ArArArArU$  — 4,09 (Ar : U).

*Аналитические синтезы* выполнены в объеме 0,1 мл. В случае праймеров динуклеозидмофосфатов и тринуклеозиддифосфатов продукты реакции инкубировали с ФМЭ (8 мкмоль/ч). Для синтеза с ПН-фосфорилазой *M. luteus* фермент (B grade; Calbiochem) брали в концентрации 6 мг/мл реакционной смеси в буфере А, рН 9. После депротеинизации фенольный слой многократно промывали водой и объединяли с продуктами синтеза. После 10-кратного разбавления исходной реакционной смеси 30 мкл ее наносили на микроколонку с DEAE-целлюлозой (Reanal) и хроматографировали с использованием ступенчатого градиента концентрации  $NaCl$  0–0,4 М в 0,005 М трис- $HCl$ , рН 7,5, с 7 М мочевиной. Элюирующий раствор (ступень градиента 0,05 М, 60 мкл) подавали со скоростью 120 мкл/ч; в другом варианте (0,05 М и 120 мкл) — со скоростью 250 мкл/ч. Использовали приставку МСФП-1 или жидкостный хроматограф ХЖ-1305. Характерное соотношение  $D_{280}/D_{260}$  и молярность элюции хлористым натрием у праймеров и продуктов синтеза составили соответственно для:  $UpUpU$  0,48 и 0,1 М;  $UpUpUpG$  0,52 и 0,15 М;  $ArArArA$  0,29 и 0,1–0,15 М;  $ArArArArU$  0,33 и 0,15 М;  $ArArArArUpG$  0,42 и 0,15–0,2 М. Гидролизовали 0,5  $OE_{260}$  последнего с 0,4 мкг панкреатической рибонуклеазы (Worthington) в 0,025 мл 0,01 М трис- $HCl$  (рН 7,4); 0,001 М EDTA. Микроколоночной хроматографией, кроме несорбирующегося гуанозина, 0,2 М  $NaCl$  элюируется  $ArArArArUp$  ( $D_{280}/D_{260}$  0,33).

Выражаем благодарность В. К. Райту (Новосибирский государственный университет) за предоставление образца высокоочищенной полинук-

леотидфосфорилазы *E. coli* и С. М. Женодаровой (ИБФ АН СССР) за предоставление праймеров GrU и ApUpU и коммерческого препарата полинуклеотидфосфорилазы *M. luteus*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Martin F. H., Uhlenbeck O. C., Doty P. (1971) *J. Mol. Biol.*, **57**, 201–215.
2. Borer P. N., Uhlenbeck O. C., Dengler B., Tinoco I. Jr (1973) *J. Mol. Biol.*, **80**, 759–771.
3. Thach R. E., Doty P. (1965) *Science*, **148**, 632–634.
4. Zhenodarova S. M., Kljagina V. P., Smoljaninova O. A., Habarova M. I. (1975) *Nucl. Acids Res.*, **3**, 151–154.
5. Zhenodarova S. M., Kljagina V. P., Smoljaninova O. A., Khabarova M. I., Antonovich E. G., Prokof'ev M. A. (1977) *Nucl. Acids Res.*, **4**, 2099–2107.
6. Both G. W., Furuichi Y., Muthukrishnan S., Shatkin A. J. (1976) *J. Mol. Biol.*, **104**, 637–658.
7. Kikuchi Y., Someno K., Sakaguchi K. (1977) *Agricult. and Biol. Chem.*, **41**, 1531–1532.
8. Kikuchi Y., Sakaguchi K. (1978) *Nucl. Acids Res.*, **5**, 591–593.
9. Williams F. R., Grunberg-Manago M. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **89**, 66–89.
10. Godefroy T., Cohn M., Grunberg-Manago M. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **12**, 236–249.
11. Portier C. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **55**, 573–582.
12. Guissani A., Portier C. (1976) *Nucl. Acids Res.*, **3**, 3015–3024.
13. Gillam S., Waterman K., Smith M. (1975) *Nucl. Acids Res.*, **2**, 613–624.
14. Gillam S., Waterman K., Doel M., Smith M. (1974) *Nucl. Acids Res.*, **1**, 1649–1664.
15. Gillam S., Rottman F., Jahnke P., Smith M. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 96–100.
16. Gillam S., Jahnke P., Smith M. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 2532–2539.
17. Trip E. M., Smith M. (1978) *Nucl. Acids Res.*, **5**, 1529–1538.
18. Singer M. F., Heppel L. A., Hilmoe R. E. (1960) *J. Biol. Chem.*, **235**, 738–750.
19. Havier R. G., Straus D. B. (1975) *Prep. Biochem.*, **5**, 423–432.
20. Golaš T., Fikus M., Kazimierzczuk Z., Shugar D. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **65**, 183–192.
21. Simuth J., Strehlke P., Niedballa U., Vorbrüggen H., Scheit K. H. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **228**, 654–663.
22. Ikehara M., Kakiuchi N., Fukui T. (1978) *Nucl. Acids Res.*, **5**, 3315–3324.
23. Leder P., Singer M. F., Brimacombe R. L. C. (1965) *Biochemistry*, **4**, 1561–1567.
24. Steitz J. (1977) In: *Biol. regulation and control*, Plenum publ. Corp., N. Y.
25. Бреслер С. Е., Фирсов Л. М., Чернаенко В. М. (1974) *Прикл. биохим. и микробиол.*, **10**, 80–86.
26. Kimhi Y., Littauer U. Z. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 231–240.
27. Атанасова Ю. Г., Ребров Л. Б., Сялаева С. А., Дебов С. С. (1972) *Биохимия*, **37**, 163–169.
28. Кумарев В. П., Райт А. С., Райт В. К., Салганик Р. И. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 700–705.
29. Ренхоф Р. Ф., Янсоне И. В., Грен Э. Я. (1972) *Молекулярн. биология*, **6**, 754–759.

Поступила в редакцию  
16.IV.1980

#### PRIMER-DEPENDENT SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES WITH POLYNUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE FROM *E. coli*

RENHOF R. F., SHERINYA L. A., MIKELSONE L. H., GREN E. J.

[*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences  
of the Latvian SSR, Riga*]

The conditions of primer-dependent synthesis of oligoribonucleotides using the *E. coli* polynucleotide phosphorylase of low degree of purification have been studied. Various oligoribonucleotides ranging from di- to hexamers have been used as primers with four natural nucleoside 5'-diphosphates. Two preparative synthesis of oligonucleotides — UpUpUpG and ApApApApUpG — representing structural elements of the ribosomal binding sites of phage RNAs have been performed.