



УДК 547.455.522'(853+857.7)'11*3.057

СИНТЕЗ НУКЛЕОЗИДОВ, МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ПРИ 5'-АТОМЕ УГЛЕРОДА РИБОЗНОГО ОСТАТКА

Акулов Г. П., Каминский Ю. Л., Шестаков А. Д.,
Калюмов В. Г., Черышова Л. Ф., Патокина Н. А.

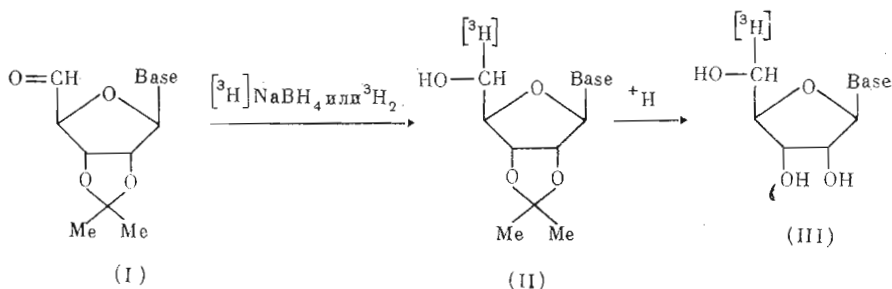
Радиесый институт им. В. Г. Хлопина, Ленинград

Разработаны химические и ферментативные методы синтеза рибонуклеозидов, меченных тритием при 5'-атоме углерода углеводных остатков. В химических синтезах использованы реакции восстановления β -D-рибо-пентадиальдо-1,4-фуранозилпроизводных соответствующих нуклеозидов газообразным тритием или специально полученным высокоактивным бор[^3H]гидридом натрия; в ферментативских синтезах — реакции рибозилирования гетероциклических оснований, катализируемые нуклеозидфосфорилазами.

Для получения меченных тритием пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов наиболее разработанными являются методы введения тритиевой метки в азотистые гетероциклические основания. Методы же введения трития в углеводный остаток рибонуклеозидов изучены сравнительно мало, и в литературе имеется всего лишь несколько примеров таких синтезов [1, 2]. В то же время рибонуклеозиды, меченные тритием в углеводном остатке, необходимы для решения некоторых специальных задач биохимии. Например, для изучения механизма передачи водорода в реакциях с участием коэнзима B_{12} используют [$5\text{'-}^3\text{H}$]аденозин [1]. Кроме того, введение метки не только в гетероциклическое основание, но и в углеводную часть молекулы открывает путь повышения молярной радиоактивности ($A_{\text{мол}}$) меченных тритием компонентов нуклеиновых кислот.

В данной работе на примерах синтеза аденозина, гуанозина и уридина рассмотрены химические и ферментативные методы получения рибонуклеозидов, меченных тритием при 5'-атоме углерода рибозного остатка.

В основу химического метода синтеза [$5\text{'-}^3\text{H}$]нуклеозидов положена реакция восстановления β -D-рибо-пентадиальдо-1,4-фуранозильных производных (5'-альдегидов) соответствующих нуклеозидов (I) газообразным тритием в присутствии катализатора или бор[^3H]гидридом натрия:



где Base = Ade (Ia, IIa, IIIa), Gua (Iб, IIб, IIIб) и Ura (Iв, IIв, IIIв).

Исходные 5'-альдегиды получали по методу Моффатта при мягком окислении сульфоксид-карбодимидной смесью соответствующих изопропилиденовых производных нуклеозидов [3, 4]. Этот метод ранее использовался для получения 5'-альдегидов многих природных нуклеозидов, однако синтез 1-(β -D-рибо-пентадиальдо-1,4-фуранозил)гуанина (Iб) в литературе не описан и в данной работе приводится впервые.

Зависимость молярной радиоактивности [5'-³H]нуклеозидов (IIIa), (IIIб), (IIIв) от молярной радиоактивности бор[³H]гидрида натрия при восстановлении соответствующих 1-(β-D-рибо-пентадильдо-1,4-фуранозил)-производных аденина (Ia), гуанина (Iб) и урацила (Iв)

Исходное производное	Молярная радиоактивность			
	[³ H]NaBH ₄		Продукт	
	ТБк/моль	кКи/моль	ТБк/моль	кКи/моль
Ia	93	2,5	22	0,6
Iб	74	2,0	15	0,4
	2146	58,0	185	5,0
Iв	74	2,0	15	0,4
	566	15,3	111	3,0
	1147	31,0	186	5,0
	1924	32,0	222	6,0
	2146	58,0	222	6,0

Одним из возможных ключевых соединений для восстановления альдегидов служит меченный тритием боргидрид натрия. Известно, что [³H]NaBH₄ может быть получен путем изотопного обмена NaBH₄ с газообразным тритием при температуре выше 350°С [5, 6], однако молярная радиоактивность продукта не превышала 444 ТБк/моль (12 кКи/моль). Нами показано, что при соответствующем времени обмена и количестве газообразного трития молярная радиоактивность полученного [³H]NaBH₄ достигает 2220 ТБк/моль (60 кКи/моль).

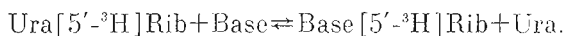
При восстановлении карбонильной группы в соединении (I) бор[³H]гидридом натрия следовало ожидать, что величина молярной радиоактивности продуктов восстановления (II) и полученных после удаления в них изопропилиденовой защиты нуклеозидов (III) будет составлять $\frac{2}{3} A_{\text{мол}}$ исходного [³H]NaBH₄. Однако проведенные нами исследования показали, что молярная радиоактивность полученных [5'-³H]нуклеозидов была близка к теоретически ожидаемой только при использовании сравнительно малоактивных препаратов [³H]NaBH₄ ($A_{\text{мол}} < 70$ ТБк/моль). В остальных случаях она была ниже теоретических значений, причем это отклонение было тем существеннее, чем выше была молярная радиоактивность исходных препаратов [³H]NaBH₄. Согласно табл. 1, предельная молярная радиоактивность получаемых [5'-³H]нуклеозидов составляет ~200 ТБк/моль (6 кКи/моль). Поскольку механизм восстановления альдегидов боргидридом натрия еще недостаточно изучен [7], объяснить установленную нами связь молярных радиоактивностей [³H]NaBH₄ и продуктов восстановления (III) в настоящее время не представляется возможным.

Так как при восстановлении соединения (I) бор[³H]гидридом натрия не удается получить [5'-³H]нуклеозиды с высокой молярной радиоактивностью, были предприняты попытки восстановления этих производных газообразным тритием*. Из литературных данных следует, что для восстановления альдегидных групп водородом необходимо использовать катализаторы, характеризующиеся низкой энергией связи водород — металл [9]. В нашей работе, так же как и в [8], для этой цели был использован скелетный Ni Ренея, относящийся к числу таких катализаторов. При этом установлено, что гидрирование 5'-альдегидов рибонуклеозидов на скелетном Ni сопровождается образованием никельсодержащих комплексов, которые в случае пуриновых производных (Ia) и (Iб) являются практически единственными продуктами реакции, что исключает возможность получения этим методом меченных тритием аденозина и гуанозина. При

* Имеется пример использования подобной схемы синтеза в ряду дезокси-нуклеозидов: для получения [5'-³H]тимидина проводили восстановление 3'-ацетилтимидин-5'-альдегида [8].

восстановлении же альдегида уридина (Iv) этот побочный процесс менее выражен* и после хроматографического отделения продукта восстановления от никельсодержащего комплекса и последующего снятия изопропилиденовой защиты был выделен с выходом 30–40% [$5\text{'-}^3\text{H}$]уридин, молярная радиоактивность которого составляла 370–740 ТБк/моль (10–20 кКи/моль).

Располагая полученным таким образом высокоактивным [$5\text{'-}^3\text{H}$]уридином, мы разработали ферментативный метод синтеза других [$5\text{'-}^3\text{H}$]нуклеозидов, основанный на реакции рибозилирования соответствующих азотсодержащих гетероциклических оснований при использовании [$5\text{'-}^3\text{H}$]уридина в качестве донора меченого рибозильного остатка:



Реакцию катализировали добавлением препарата пентозилтрансфераз (нуклеозидфосфорилаз, КФ 2.4.2.1–6) *Escherichia coli*. Ранее аналогичные синтезы широко применялись для получения меченых нуклеозидов, исходя из соответствующих меченых оснований [11].

Для определения оптимальных условий ферментативных синтезов [$5\text{'-}^3\text{H}$]аденозина и [$5\text{'-}^3\text{H}$]гуанозина была исследована кинетика рибозилирования аденина и гуанина при различных соотношениях донор–акцептор, при различном количестве ферментного препарата, при использовании различных буферов и различных pH (табл. 2 и 3). Как видно из табл. 2, при проведении синтеза [$5\text{'-}^3\text{H}$]аденозина в фосфатном буфере (0,05 М, pH 7,4) и эквимольном соотношении донор–акцептор выход [$5\text{'-}^3\text{H}$]аденозина возрастает с увеличением времени инкубации, достигая максимального значения через 2–2,5 ч. Увеличение концентрации фермента ведет к увеличению выхода аденозина, однако при этом возрастает вероятность внесения в инкубационную смесь экзогенного материала, что может вызвать снижение молярной радиоактивности целевого продукта. При увеличении соотношения аденин–уридин максимальный выход нуклеозида достигается за более короткое время (~30 мин) как в фосфатном, так и в трис-HCl-буфере, причем в трис-HCl-буфере выход аденозина примерно на 15% выше, чем в фосфатном.

Из данных табл. 3 следует, что, как и в случае аденозина, при получении гуанозина выход возрастает с увеличением количества фермента, с увеличением соотношения акцептор–донор; из использованных буферов лучшим также является трис-HCl. Существенное отличие состоит в том, что для достижения высоких выходов [$5\text{'-}^3\text{H}$]гуанозина необходимо использовать буфер значительно большей концентрации; кроме того, из-за низкой растворимости гуанина невозможно применять высокие соотношения гуанин–уридин.

На основании приведенных результатов были подобраны составы инкубационных смесей, при использовании которых выходы [$5\text{'-}^3\text{H}$]гуанозина и [$5\text{'-}^3\text{H}$]аденозина составляли соответственно 60–70 и 45–50%. Молярная радиоактивность продуктов (IIIa) и (IIIб) при использовании донора ([$5\text{'-}^3\text{H}$]уридина) с $A_{\text{мол}}$ 740 ТБк/моль (20 кКи/моль) составляла 550 и 370 ТБк/моль (15 и 10 кКи/моль) соответственно.

Одной из наиболее вероятных причин снижения молярной радиоактивности продуктов реакции относительно исходного [$5\text{'-}^3\text{H}$]уридина может служить наличие нуклеотидного материала в используемом ферментном препарате. Наблюдавшаяся нами антибатность между молярной радиоактивностью [$5\text{'-}^3\text{H}$]нуклеозидов и количеством используемого в их синтезе фермента является косвенным подтверждением этого предположения. Кроме того, при контрольной инкубации соответствующего количества фермента в буфере и последующем разделении смеси на сефадексе G-10 в элюате были обнаружены нерадиоактивные аденозин и гуанозин в количествах, достаточных для объяснения величины занижения

* Этот результат согласуется с известным фактом, что пиримидиновый атом азота N-3 координирует с металлами слабее, чем имидазольный атом N-7 пуриновых нуклеозидов [10].

Влияние условий ферментативного рибозилирования аденина в реакции с уридином на выход аденозина

Буфер	Аденин/ /уридин ^а , моль/моль	Количество фермента, мг	Время инку- бации, ч	Выход ^б , %	
Фосфатный, 0,05 М, рН 7,4	1 : 1	3,0	1	39	
			2	47	
			4	41	
			8	38	
			24	7	
	1 : 2	1,0	1	14	
			2,5	26	
			4,0	34	
			6,7	33	
			10,0	34	
	7 : 1 *	1,0	1	29	
			0,25	31	
0,5			36		
1,0			47		
2,0			37		
Трис-НСl, 0,05 М, рН 7,4	7 : 1 *	1,0	0,25	37	
			0,5	45	
			1,0	41	
			2,0	37	
	7 * : 1	4,0	0,5	70	
			7 * : 1 *	4,0	57
			7 * : 1 *	2,0	46

^а Звездочкой обозначен меченный тритием компонент.

^б Выход определен по отношению к уридину.

Таблица 3

Влияние условий ферментативного рибозилирования гуанина в реакции с уридином на выход гуанозина

Буфер	Гуанин/ /уридин ^а , моль/моль	Количество фермента, мг	Время инку- бации, ч	Выход ^б , %
Какодилатный, 0,05 М рН 7,4 рН 5,0	1 : 1	2,0	0,3-24	0
	1 : 1	2,5	4	2
Сукциватный, 0,5 М рН 5,0	1 : 1	2,5	4	13
	1 * : 2	3,0	5	12
Фосфатный, рН 7,4 0,1 М 0,2 М 0,5 М	1 : 1	2,0	0,3-24	0
	1 : 1	2,0	4	2
	1 : 1	2,0	4	40
Трис-НСl, 0,05 М рН 7,4	1 : 1	2,0	0,3-24	0
Трис-НСl, 0,5 М рН 9,0	1 : 2	2,0	5	32
	1 : 2	4,0	5	47
	1 : 2	7,0	5	75
	1 : 2	10,0	5	93
	1 * : 2	3,0	5	37
	2 * : 1 *	2,6	5	50
	2 * : 1	3,0	5	70
	2 * : 1	1,0	5	43

^а Звездочкой обозначен меченный тритием компонент.

^б Выход определен по отношению к уридину.

молярной радиоактивности целевых [$5\text{'-}^3\text{H}$]нуклеозидов относительно исходного [$5\text{'-}^3\text{H}$]уридина.

Для удаления примесей нами была проведена иммобилизация нуклеозидфосфорилаз в полиакриламидном геле [12]. При использовании такого фермента в синтезе [$5\text{'-}^3\text{H}$]нуклеозидов скорость реакции заметно уменьшалась и для достижения примерно тех же выходов меченых нуклеозидов, что и с немобилизованным ферментом, потребовалось значительно увеличить время реакции (~ 70 ч). При этом молярные радиоактивности [$5\text{'-}^3\text{H}$]нуклеозидов и исходного донора меченого рибозного остатка были равны.

В аналогичных условиях были проведены энзиматические синтезы многократно меченных тритием нуклеозидов, исходя из меченого донора [$5\text{'-}^3\text{H}$]уридина и соответствующих меченых оснований ([$2,8\text{'-}^3\text{H}$]аденина, [$8\text{'-}^3\text{H}$]гуанина и [$5,6\text{'-}^3\text{H}$]урацила). При этом молярные радиоактивности достигали для аденозина и уридина 1850 ТБк/моль (50 кКи/моль), а для гуаноина 1100 ТБк/моль (30 кКи/моль).

Экспериментальная часть

Использованы аденозин, уридин, гуанозин (Reanal, ВНР), дициклогексилкарбодимид (Fluka, Швейцария), боргидрид натрия (Merck, ФРГ), [$2,8\text{'-}^3\text{H}$]аденин ($A_{\text{мол}} 1100$ ТБк/моль), [$8\text{'-}^3\text{H}$]гуанин ($A_{\text{мол}} 370$ ТБк/моль), [$5,6\text{'-}^3\text{H}$]урацил ($A_{\text{мол}} 1100$ ТБк/моль) (В/О «Изотоп», СССР), бор[^3H]гидрид натрия («Изотоп», СССР; NEN, США, и приготовленный в настоящей работе), препарат нуклеозидфосфорилаз (НИКТИ БАВ, Бердск). Удельная активность фермента составляла 0,15 ед. акт./мг*. Иммобилизацию нуклеозидфосфорилаз в полиакриламидном геле проводили по методике [12]. Радиохимическую чистоту продуктов определяли методом тонкослойной радиохроматографии на силуфоле UV-254 (Kavalier, ЧССР) в системе растворителей изопропиловый спирт — аммиак — вода (7 : 1 : 2) (система А).

Бор[^3H]гидрид натрия. В атмосфере сухого гелия 5–6 мг боргидрида натрия в изобутиламиноном растворе (0,1 мл) наносили на никелевую фольгу пятном площадью ~ 120 мм². После удаления изобутиламина при 50–100° С фольгу помещали в атмосферу газообразного трития 925–1110 ГБк (25–30 Ки) и выдерживали 9–10 ч при 350–390° С. Меченный тритием боргидрид натрия экстрагировали изобутиламиноном (2 раза по 1 мл), растворитель удаляли лиофильной сушкой, сухой остаток растворяли в 2 мл 0,1 М NaOH. Раствор содержал 2–4 мг (37–192 ГБк, 1–5,2 Ки) [^3H]NaBH₄ с $A_{\text{мол}} 1850\text{--}2220$ ТБк/моль (50–60 кКи/моль). Содержание боргидрида в растворе определяли спектрофотометрически с помощью 2,4,6-тринитробензолсульфонокислоты [13].

Радиохимическую чистоту меченого боргидрида определяли хроматографически на пластинках Люцефол (Kavalier, ЧССР), элюент — изобутиламин, $R_f 0,74$.

Для устранения артефактов, вызванных химическим взаимодействием микроколичеств радиоактивного [^3H]NaBH₄ с карбонильными группами хроматографического сорбента, на старт и на расстоянии 1 см выше старта перед нанесением радиоактивного препарата наносится пятно нерадиоактивного боргидрида натрия. Нерадиоактивный боргидрид натрия в предложенной системе может быть проявлен при опрыскивании хроматограмм 0,02%-ным раствором кристаллического фиолетового (белое пятно на фиолетовом фоне).

Корректность использованных аналитических методик подтверждена измерением радиоактивности коммерческих препаратов [^3H]NaBH₄.

2',3'-О-Изопропилиден-β-D-рибо-пентадильдо-1,4-фуранозилгуанин (16). 2',3'-О-Изопропилиденгуанозин (180 мг) растворяли в смеси тщательно осушенных диметилсульфоксида (2,5 мл), бензола (2 мл), пиридила (0,04 мл) и трифторуксусной кислоты (0,02 мл), а затем при постепенном перемешивании добавляли дициклогексилкарбодимид (310 мг). Реакцию проводили при 20° С при перемешивании в течение 5 ч. Отфильтровывали выпавшую дициклогексилмочевину, к фильтрату добавляли 0,2 мл 1 М HCl. Выпавший осадок отфильтровывали, раствор нейтрализовали щелочью и упаривали в вакууме при 55–60° С до сиропа желтого цвета. Кристаллизацию продукта проводили из 10 мл этилацетата. Осадок отфильтровывали и сушили в вакууме. В качественной реакции на альдегидную группу с 2,4-динитрофенилгидразином получен гидразон с т. пл. 197–199° С, имеющий в УФ-спектре два характерных максимума поглощения (256 и 385 нм).

Производные (Ia) и (Iв) получали аналогично по методикам [3, 4].

Восстановление альдегидов нуклеозидов бор[^3H]гидридом натрия. Растворяли 5–6 мг соответствующего 5'-альдегида (I) в 0,5 мл этанола, pH раствора доводили с помощью 0,1 М NaOH до 8–9, раствор добавляли к 0,3–0,4 мг [^3H]NaBH₄ и выдерживали при 20° С 1 ч. По окончании реакции смесь подкисляли 0,1 М HCl до pH 1–2 и через 5–10 мин нейтрализовали 0,1 М NaOH до pH 6–7. Растворитель удаля-

* За единицу активности принято количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль дезоксиаденозина из аденина за 5 мин при 37° С.

ли в вакууме и снимали изопропилиденную защиту нагреванием продукта восстановления (IIa и IIb) с уксусной кислотой. Очистку и обессоливание $[5\text{-}^3\text{H}]$ нуклеозидов проводили на колонке с сефадексом G-10 (50 мл) при элюировании водой [14].

Восстановление 5'-альдегидов нуклеозидов газообразным тритием. Реакцию проводили на скелетном Ni, приготовленном по методу [8]. Восстановление вели в диоксиде при давлении трития 100–120 кПа в течение 6–7 ч. По окончании реакции отделяли катализатор и изопропилиденную защиту удаляли 20% уксусной кислотой при 90–95° С в течение 65–70 мин. Полученные $[5\text{-}^3\text{H}]$ нуклеозиды выделяли с помощью хроматографии на колонке с сефадексом G-10 (элюент – вода) или тонко-слойной хроматографией на силикофоре UV-254 в системе А.

Энзиматические синтезы $[5\text{-}^3\text{H}]$ нуклеозидов (IIIa)–(IIIc). Синтез $[5\text{-}^3\text{H}]$ аденозина с помощью иммобилизованного ферментного препарата нуклеозидфосфорилаз проводили в инкубационной смеси, содержащей 0,5 мкмоль $[5\text{-}^3\text{H}]$ уридина, 3,5 мкмоль аденина, 1 мг фермента (0,15 ед. акт.) в 0,1 мл трис-НСI-буфера (0,05 М, pH 7,4) при 38° С в течение 30 мин; синтез $[5\text{-}^3\text{H}]$ гуанозина – в смеси 0,5 мкмоль $[5\text{-}^3\text{H}]$ уридина, 1 мкмоль гуанина, 3 мг фермента (0,45 ед. акт.) в 0,1 мл трис-НСI-буфера (0,5 М, pH 9,0) при 38° С в течение 5 ч. После термической дезактивации фермента и отделения белка фильтрованием $[5\text{-}^3\text{H}]$ нуклеозиды выделяли как описано выше.

При использовании иммобилизованного фермента в синтезе $[5\text{-}^3\text{H}]$ аденозина инкубационная смесь содержала 0,5 мкмоль $[5\text{-}^3\text{H}]$ уридина, 3,5 мкмоль аденина, 100 мг ферментного препарата в 0,1 мл трис-НСI-буфера (0,05 М, pH 7,5); инкубацию проводили при 38° С в течение 8–9 ч. При синтезе $[5\text{-}^3\text{H}]$ гуанозина инкубационную смесь, содержащую 0,5 мкмоль $[5\text{-}^3\text{H}]$ уридина, 1 мкмоль гуанина и 500 мг ферментного препарата в 1 мл трис-НСI-буфера (0,5 М, pH 9,0), выдерживали при 38° С в течение 70 ч. По окончании реакции иммобилизованный фермент отделяли фильтрацией и выделяли $[5\text{-}^3\text{H}]$ нуклеозиды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Frey P. A., Abeles R. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 11. P. 2732–2733.
2. Hogenkamp H. P. C., Chamber R. K., Brownson C., Blakley R. L., Vitols E. // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. № 4. P. 799–808.
3. Pfaltzner E. E., Moffatt J. G. // J. Amer. Chem. Soc. 1965. V. 87. № 24. P. 5661–5670.
4. Moffatt J. G. // Oxidation. V. 2./Eds Augustine R. L., Trecker D. J. N. Y.: Acad. Press, 1971. P. 1–64.
5. Brown W. G., Kaplan L., Wilzbach K. E. // J. Amer. Chem. Soc. 1952. V. 74. № 5. P. 1343–1344.
6. Tanacs B., Szarvas T. // Radioisotopy. 1971. V. 12. № 4. P. 627–633.
7. Общая органическая химия. Т. 6. Соединения селена, теллура, кремния и бора/ Под ред. Саммса П. Г. Пер. с англ. под ред. Кочеткова П. К. и Бублиова Ю. Н. М.: Химия, 1984.
8. Pleiss U. // Radiochem. Radioanal. Lett. 1982. V. 51. № 6. P. 363–372.
9. Сокольский Д. В. Гидрирование в растворах. Алма-Ата: Наука КазССР, 1979. С. 343.
10. Ионы металлов в биологических системах. Амбивалентные свойства нуклеотидов/Под ред. Зигеля Х. Пер. с англ. Давыдовой С. И. М.: Мир, 1982. С. 17.
11. Cardinaud R., Fromageot J. P. // Proceedings of the Second Intern. Conf. on Methods of Preparing, Storing Labelled Comp., 1966. Brussel: EAEC, 1968. P. 499–524.
12. Гаевая Л. В., Кеснер А. И., Загребельный С. Н., Беллева Г. А. Способ получения иммобилизованных ферментов: А. с. 722197 СССР // В. И. 1984. № 4.
13. Elamin B., Means G. E. // Anal. chim. acta. 1979. V. 107. P. 405–409.
14. Яковлева Л. А., Каминский Ю. Л., Соснова Л. П., Патоккина П. А., Козырева О. И., Назорский А. И. // Радиохимия. 1985. Т. 27. № 4. С. 455–460.

Поступила в редакцию
6.XI.1986

После доработки
11.II.1987

CHEMICAL AND ENZYMATIC SYNTHESIS OF $[5\text{-}^3\text{H}]$ NUCLEOSIDES

AKULOV G. P., KAMINSKI Yu. L., SHESTAKOV A. D., KAJUMOV V. G.,
CHERNYSHOVA L. P., PATOKINA N. A.

V. G. Khlopin Radium Institute, Leningrad

Chemical and enzymatic syntheses of $[5\text{-}^3\text{H}]$ adenosine, $[5\text{-}^3\text{H}]$ guanosine, and $[5\text{-}^3\text{H}]$ uridine have been developed. The reduction of β -D-ribo-pentadialdo-1,4-furanosyl derivatives of corresponding bases is used in the chemical synthesis. The maximum molar activity of the labelled products was 220 TBk/mol in reactions with $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ and 370–740 TBk/mol in reactions with gaseous tritium. The enzymatic synthesis was performed by the reboylation of heterocyclic bases with nucleoside phosphorylase and $[5\text{-}^3\text{H}]$ uridine as a ribosyl donor. Nucleoside phosphorylase is proposed to be used in the immobilized form to avoid the decrease of molar activity. Nucleosides labelled with tritium both in ribosyl and heterocyclic moieties were synthesised enzymatically.