



УДК 547.963.3:542.98

ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И НУКЛЕОТИДОПЕПТИДЫ

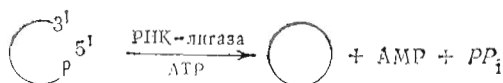
XXIII. ПРИМЕНЕНИЕ T4 РНК-ЛИГАЗЫ ДЛЯ СПИВАНИЯ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ

Юодка Б., Уленбек О.

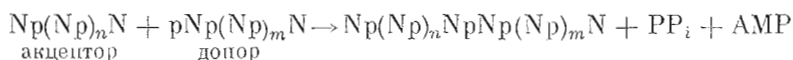
*Кафедра биохимии и биофизики Вильнюсского государственного университета,
Кафедра биохимии Иллинойского университета (США)*

В реакцию, катализируемую ферментом РНК-лигазой, вводили в качестве акцептора тРНК со свободной 5'-гидроксильной группой и в качестве донора синтетический олигорибонуклеотид $p(A)_n$ Ср. Показано, что выход синтезируемого полирибонуклеотида тРНК- $p(A)_n$ Ср зависит от количества акцептора. При эквимольных количествах компонентов значительно более высокий выход продукта наблюдался при использовании в качестве акцептора синтетического олигорибонуклеотида $(A)_n$ С. Также показано, что присутствие 3'-концевой фосфатной группы в доноре исключает реакцию донор — донор. РНК-лигазу выделяли из бактерий *E. coli* В, зараженных бактериофагом T4г⁺.

Одной из актуальнейших проблем молекулярной биологии является исследование специфического взаимодействия между нуклеиновыми кислотами и белками. Для моделирования нуклеиново-белкового взаимодействия необходимо иметь олигонуклеотиды с определенной последовательностью мономеров. В настоящее время достигнуты большие успехи в области химического и ферментативного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов [1—5]. Однако химический синтез олигорибонуклеотидов ($n > 10$) с определенной последовательностью мономерных единиц остается очень сложной задачей. Недавно из бактерий *E. coli* D-110, зараженных бактериофагом T4 amt B5, был выделен фермент РНК-лигаза * [6, 7], катализирующий АТР-зависимую циклизацию олигорибонуклеотидов, имеющих фосфорный остаток на 5'-конце цепи и свободную гидроксильную группу на 3'-конце:



Оказалось [8], что РНК-лигаза обладает способностью катализировать сшивание и отдельных олигорибонуклеотидных блоков:



Самыми короткими олигонуклеотидами, пригодными для реакции, являются тримеры. В случае олигонуклеотидов с $n \geq 8$ имеет место их

* РНК-лигаза пока не выделена в чистом виде и не включена в таблицу международной классификации ферментов.

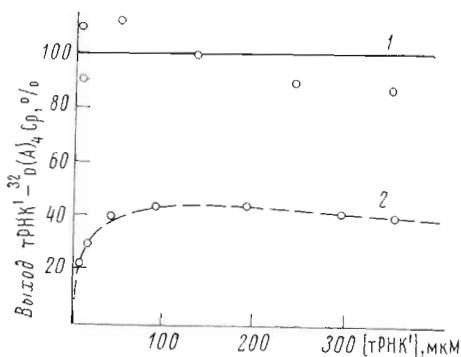


Рис. 1

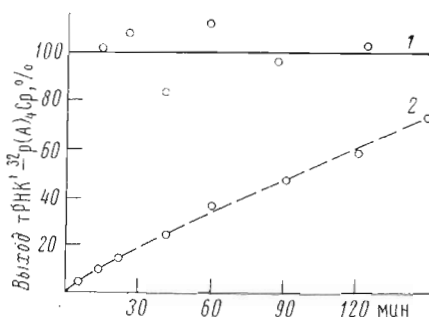


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость выхода тРНК'-³²р(А)₄Ср от концентрации тРНК' в реакции с ³²р(А)₄Ср, катализируемой РНК-лигазой (время реакции 60 мин): 1 — без инкубации с щелочной фосфатазой (контрольные пробы), 2 — с инкубацией с щелочной фосфатазой

Рис. 2. Кинетика реакции тРНК' с ³²р(А)₄Ср, катализируемой РНК-лигазой: 1 — без инкубации с щелочной фосфатазой (контрольные опыты), 2 — с инкубацией с щелочной фосфатазой

циклизация [9]. Поэтому межмолекулярная реакция описана лишь для коротких олигонуклеотидных блоков. Кроме того, было показано, что успешное сшивание акцепторов с донорами происходит лишь при использовании большого избытка акцептора. В противном случае имела место реакция донор — донор. Все это ограничивало использование РНК-лигазы для синтеза олигорибонуклеотидов.

В нашем сообщении приведены предварительные данные о применении РНК-лигазы для сшивания полирибонуклеотида тРНК (акцептор) с синтетическим олигорибонуклеотидом р(А)₄Ср (донор), а также для сшивания отдельных синтетических олигорибонуклеотидов.

Чтобы избежать частичной циклизации тРНК, возникающей при инкубации тРНК с РНК-лигазой, мы удаляли 5'-фосфатный остаток в тРНК с помощью щелочной фосфатазы [КФ 3.1.3.1]. Полученную тРНК со свободной 5'-гидроксильной группой (тРНК') использовали для реакции с ³²р(А)₄Ср. Было исследовано влияние концентрации тРНК' на ее реакцию с р(А)₄Ср.

Как видно из рис. 1, максимальный выход тРНК'-р(А)₄Ср составляет 45% при 500-кратном избытке тРНК' по отношению к р(А)₄Ср. Дальнейшее увеличение концентрации тРНК' частично ингибировало реакцию. Исследование кинетики реакции (рис. 2) показало, что при увеличении продолжительности реакции с 1 до 2,5 ч выход тРНК'-р(А)₄Ср достигает 75%.

Так как используемый нами донор р(А)₄Ср на 3'-конце имел фосфатную группу и реакция донор — донор поэтому была исключена, мы провели сшивание тРНК' с р(А)₄Ср при эквимольных количествах компонентов. Концентрация тРНК', р(А)₄Ср и ³²р(А)₄Ср в реакционной смеси составляла ~43, 42 и 1 мкМ соответственно (рис. 3). Выход тРНК'-р(А)₄Ср за 4 ч достигает ~40%. Значительно более высокие выходы были получены при реакции р(А)₄Ср с эквимольным количеством синтетического олигорибонуклеотида (А)₄С (рис. 4): за 4 ч выход (А)₄Ср(А)₄Ср достигает 80%. Разницу в реакционной способности акцепторных молекул тРНК' и (А)₄С можно объяснить их структурными различиями. Так, недавно было показано [10], что циклизация полинуклеотидов под действием РНК-лигазы затрудняется в присутствии в реакционной смеси комплементарных полинуклеотидов. С другой стороны, при использовании в качестве

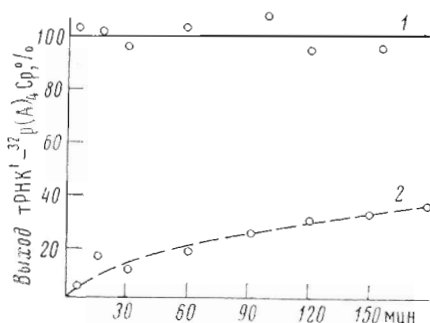


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика реакции синтеза тРНК'-³²р(А)₄Ср из тРНК' и ³²р(А)₄Ср, взятых в эквимольных количествах: 1 — без инкубации с щелочной фосфатазой (контрольные опыты), 2 — с инкубацией с щелочной фосфатазой

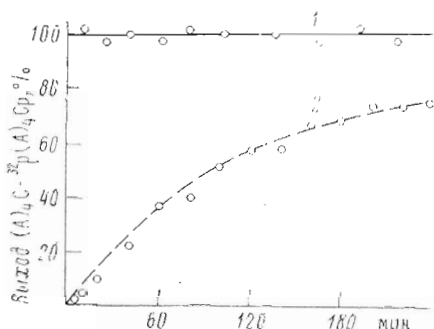


Рис. 4

Рис. 4. Кинетика реакции синтеза (А)₄С-³²р(А)₄Ср из (А)₄С и ³²р(А)₄Ср, взятых в эквимольных количествах: 1 — без инкубации с щелочной фосфатазой (контрольные опыты), 2 — с инкубацией с щелочной фосфатазой

акцептора тРНК' концентрация реагирующих веществ в реакционной смеси была в 40 раз выше, чем при использовании олигорибонуклеотида (А)₄С.

Таким образом, использование молекул донора с фосфорилированным 3'-концом р(А)₄Ср позволило провести реакцию при эквимольных его количествах с акцепторами, а полученные данные позволили сделать вывод, что РНК-лигаза совместно с другими ферментативными и химическими методами может быть использована для синтеза олигорибонуклеотидов с определенной последовательностью мононуклеотидов.

Экспериментальная часть

В работе использовали нуклеозид-5'-дифосфаты фирмы «Sigma» (США), бактериальную щелочную фосфатазу и рибонуклеазу А [КФ 2.7.7.16] фирмы «Worthington» (США). Полинуклеотидкиназу [КФ 2.7.1.10] выделяли из *E. coli* В, зараженных бактериофагом Т4Е4314, по [11]; полинуклеотидфосфорилазу [КФ 2.7.7.8] — из *E. coli* В по [12]. [γ-³²Р]АТФ нам любезно предоставили проф. Р. Гумпорт.

РНК-лигазу выделяли из бактерий *E. coli* В, зараженных бактериофагами Т4г⁺ по методике, описанной нами ранее [8]. Модифицировали лишь последнюю стадию очистки, где для гель-фильтрации вместо сефадекса G-75 использовали сефадекс G-100.

Из 13 г *E. coli* В, зараженных бактериофагом Т4г⁺, получили 19 мл (~2 мг) высокоактивного препарата РНК-лигазы, 2094 ед. акт. * Активность фермента определяли по циклизации синтетического субстрата ³²р(А)₁₅С.

³²р(А)₁₅С получали из (А)₁₅С и [γ-³²Р]АТФ с помощью полинуклеотидкиназы. (А)₁₅С синтезировали с помощью полинуклеотидфосфорилазы. Для разделения олигомеров с общей формулой (А)_nС была использована колоночная хроматография на смоле RPC 5 (США). Этим методом с прекрасным разрешением было фракционировано более 60 олигонуклеотидов с разной длиной цепи.

УФ-поглощение регистрировали с помощью проточного депситометра «Uvicord» фирмы LKB (Швеция). Радиоактивность просчитывали на счетчике фирмы «Beckman» (США).

* За единицу активности РНК-лигазы принимали количество (мкмоль) конечного меченого фосфата в ³²р(А)₁₅С, которое после инкубации с ферментом (1 мг белка, 30 мин, 37°) было нечувствительно к действию щелочной фосфатазы.

Синтез олигорибонуклеотидов. Олигорибонуклеотиды $(A)_4C$ и $(A)_{15}C$ синтезировали с помощью полинуклеотидфосфорилазы. Для этого соответствующие нуклеозид-5'-дифосфаты инкубировали с ферментом и получали смесь $(A)_n(C)_m$ с разной длиной олигорибонуклеотидной цепи, которую инкубировали с рибонуклеазой А и затем с щелочной фосфатазой. Полученную после инкубации смесь $(A)_nC$ (2114 ОЕ₂₆₀) наносили на колонку (3 × 44 см) со смолой RPC 5 и элюировали в линейном градиенте концентрации хлористого калия (0,2 → 1,2 М, 4 л) в 0,01 М трис-НСl-буфере, рН 8,1. Собирали фракции по 10 мл, скорость элюции 112 мл/ч. Структуру $(A)_4C$ и $(A)_{15}C$ доказывали с помощью свидетелей.

Пентануклеотид $(A)_4Cp$ получали из смеси $(A)_n(C)_m$ сразу после гидролиза рибонуклеазой А и фракционирования смеси $(A)_nCp$ на колонке с DEAE-сефадексом А-25 (НСО₃⁻) в линейном градиенте концентрации триэтиламмонийбикарбонатного буфера (рН 7,5) 0,1 → 1,2 М.

5'-ОН-группу в $(A)_4Cp$ и $(A)_{15}C$ фосфорилировали с помощью полинуклеотидкиназы. Меченые $^{32}p(A)_4Cp$ и $^{32}p(A)_{15}C$ выделяли с помощью ТСХ на пластинках с DEAE-целлюлозой в течение 16 ч в системе этиловый спирт — 1 М уксуснокислый аммоний (5 : 5) с последующей элюцией 0,2 М триэтиламмонийбикарбонатным буфером, рН 7,5. Элюаты упаривали, остатки триэтиламмонийбикарбоната удаляли упариванием с метиловым спиртом, а остаток растворяли в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 7,5.

Отщепление 5'-фосфатной группы тРНК с помощью щелочной фосфатазы. Суммарную тРНК из *E. coli* В (25 мг, 500 ОЕ₂₆₀) растворяли в 4,25 мл воды и в 0,5 мл 1 М трис-НСl-буфера, рН 8,2, инкубировали 1,5 ч при 60° с 0,25 мл щелочной фосфатазы (1 мг/мл), прибавляли водный фенол, встряхивали и центрифугировали 10 мин при 19 600 g. К супернатанту прибавляли 2 мл 1 М трис-НСl-буфера, рН 8,2, встряхивали, центрифугировали 10 мин при 19 600 g, водный слой отделяли, оставшийся в нем фенол экстрагировали эфиром (2 × 5 мл) и диализовали 24 ч против 2 л 1 М NaCl. Диализат (~10 мл) подкисляли уксусной кислотой до рН 5 и тРНК осаждали двойным объемом холодного 95%-ного этилового спирта. Полученный осадок центрифугировали 10 мин при 10 000 g. Выход тРНК' 94% (470 ОЕ₂₆₀).

Влияние концентрации тРНК' на ее реакцию с $^{32}p(A)_4Cp$ (рис. 1). Реакционную смесь, содержащую в 50 мкл 50 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,5), 0,1 мМ АТР, 50 мкг/мл альбумина, 10 мМ MgCl₂, 1,3 мМ дитиотреит, 15 мкл РНК-лигазы (1,5 мкг), 0,2 мкМ $^{32}p(A)_4Cp$ (45 000 имп/мин), от 8,65 до 346,2 мкМ тРНК', инкубировали при 37°. Затем к реакционной смеси прибавляли 10 мкл (0,1 мг/мл) щелочной фосфатазы и инкубировали 30 мин при 65°. (В контрольных опытах вместо щелочной фосфатазы прибавляли 10 мкл воды.) Реакционные смеси количественно наносили на DEAE-бумагу (2 × 2 см) и после высушивания бумаги промывали 0,3 М муравьинокислым аммонием, рН 8,2 (4 × 0,5 л), 0,25 М бикарбонатом аммония (4 × 0,5 л), 95%-ным этиловым спиртом (2 × 0,2 л), сушили и измеряли остаточную радиоактивность. Поскольку меченый неорганический фосфат отмывался, полученная радиоактивность в каждой пробе соответствовала количеству меченого фосфора, включившегося в тРНК'- $^{32}p(A)_4Cp$. Выход тРНК'- $^{32}p(A)_4Cp$ (%) рассчитывали по отношению к радиоактивности, внесенной в каждую пробу (контрольный опыт).

Кинетика реакции тРНК' с $^{32}p(A)_4Cp$, катализируемой РНК-лигазой (рис. 2). Реакционную смесь, содержащую в 0,75 мл трис-НСl-буфер (рН 7,5), АТР, альбумин, MgCl₂, дитиотреит в концентрациях, аналогичных предыдущей методике, 0,225 мл (23,6 мкг) РНК-лигазы, 0,3 мкМ $^{32}p(A)_4Cp$ (53 000 имп/мин) и 86,5 мкМ тРНК', инкубировали при 37°. Через 0, 5, 10, 20, 40, 60 и т. д. мин из реакционной смеси отбирали аликвоты (2 × 50 мкл). В одну аликвоту прибавляли 10 мкл щелочной фосфатазы, а в другую (контрольную) — 10 мкл воды. Все пробы инкубировали 30 мин при 65°. Далее все делали аналогично предыдущей методике.

Кинетика реакции тРНК' с $p(A)_4Cp$ при эквимольных количествах компонентов (рис. 3). Реакционную смесь, содержащую трис-НСl-буфер (рН 7,5), АТР, альбумин, дитиотреит и $MgCl_2$ в концентрациях, указанных выше, 150 мкл (15 мкг) РНК-лигазы, 43 мкМ тРНК', 43 мкМ $p(A)_4Cp$ и 1,1 мкМ $^{32}p(A)_4Cp$ (85 000 имп/мин), инкубировали при 37°. Через 5, 15, 30, 60 и т. д. мин из реакционной смеси отбирали по две аликвоты по 50 мкл и определяли выход продукта как описано выше.

Аналогично исследовали кинетику реакции $^{32}p(A)_4Cp$ с $(A)_5C$. Концентрация $^{32}p(A)_4Cp$ (45 000 имп/мин) и $(A)_4C$ в реакционной смеси составляла 1,5 мкМ каждого компонента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Khorana H. G., Agarwal K. L., Buchi H., Caruthers M. H., Gupta N. K., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., Rajbhandary U. L., Van de Sande J. H., Sgaramella V., Te-
rao T., Weber H., Yamada T. (1972) *J. Mol. Biol.*, **72**, 209—492.
2. Narang S. A., Itakura K., Bahl C. P., Katagiri N. (1974) *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**,
7074—7078.
3. Poonian M. S., Nowoswiat E. F., Tobias L., Nussbaum A. L. (1973) *Bioorg. Chem.*,
2, 322—336.
4. Бадашкева А. Г., Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ивановская М. Г., Кворре Д. Г.,
Колосов М. Н., Коробко В. Г., Прокофьев М. А., Смирнов В. Д., Шабарова З. А.,
Шубина Т. Н. (1973) *Химия природн. соедин.*, 394—402.
5. Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г.,
Полякова И. А., Чахмахчева О. Г., Чупрунова О. А. (1973) *Химия природн. соедин.*,
402—410.
6. Silber R., Malathi V. G., Hurwitz J. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3009—
3013.
7. Kaufmann G., Littauer U. Z. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3741—3745.
8. Walker G. C., Uhlenbeck O. C., Bedows E., Gumpert R. I. (1975) *Proc. Nat. Acad.*
Sci. USA, **72**, 122—126.
9. Kaufmann G., Klein T., Littauer U. Z. (1974) *FEBS Lett.*, **46**, 271—275.
10. Cranston J. W., Silber R., Malathi V. G., Hurwitz J. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**,
7447—7457.
11. Richardson C. C. (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **54**, 158—165.
12. Kirkegaard L. H. (1973) *Biochemistry*, **12**, 3627—3632.

Поступила в редакцию
19.XI.1975

После переработки
21.I.1976

OLIGONUCLEOTIDES AND NUCLEOTIDE-PEPTIDES. XXIII. APPLICATION OF T4 RNA LIGASE FOR OLIGONUCLEOTIDE COUPLING

YUODKA B., UHLENBECK O.

*Vilnius State University, Vilnius; Department
of Biochemistry, University of Illinois, USA*

RNA ligase has been isolated from *E. coli* infected with bacteriophage T4r⁺. This enzyme was shown to catalyze covalent coupling of tRNA with synthetic donor oligoribonucleotide $p(A)_4Cp$. The effects of tRNA concentration as well as the reaction kinetics were studied. tRNA and pentanucleotide $(A)_4C$ in equimolar ratio react easily with $p(A)_4Cp$. Phosphate blocking of 3'-hydroxy group in donor $p(A)_4Cp$ prevents the occurrence of donor-donor reactions.