



УДК 577.113.3

## ПОЛУЧЕНИЕ $^{32}\text{P}$ -МЕЧЕННЫХ ДИ- И ТРИФОСФАТОВ 2-МЕТИЛТИОАДЕНОЗИНА

© 1999 г. М. Ю. Скоблов, М. В. Ясько, Ю. С. Скоблов<sup>#</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
117984, Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 12.01.99 г. Принята к печати 25.02.99 г.

Осуществлен химический синтез 5'-моно- и дифосфата 2-метилтиоаденозина и отработаны условия ферментативного фосфорилирования этих нуклеотидов в 5'-дифосфат и трифосфат, меченные  $^{32}\text{P}$ . Выделенные с помощью ВЭЖХ 5'-[ $\beta$ - $^{32}\text{P}$ ]дифосфат и 5'-[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]трифосфат 2-метиладенозина обладали молярной активностью более 1000 Ки/ммоль и радиохимической чистотой более 95%.

*Ключевые слова:* 2-метилтиоаденозин;  $^{32}\text{P}$ -меченые нуклеотиды; АМР-киназа.

$\text{P}_2$ -Пуриновые рецепторы ( $\text{P}_2$ -purinergic receptors  $\text{P}_2\text{R}$ ) клеточных мембран, взаимодействующие с внеклеточными АТР и АДФ, весьма плодотворно исследуются с помощью различных синтетических аналогов своих природных агонистов [1]. Синтетические аналоги АТР и АДФ позволили связать подтипы рецепторов с их биологической ролью и подойти вплотную к выделению и клонированию отдельных субтипов.

Интересными оказались синтетические аналоги природных агонистов этих рецепторов – производные 2-алкилтиоаденозина [2]. Разработанные методы синтеза различных 2-алкилтиоаденозин-5'-трифосфатов (и дифосфатов) позволили изучить особенности биологической активности различных рецепторов [3, 4]. Наиболее важные результаты были получены при работе с 2-метилтиоаденозин-5'-трифосфатом, поэтому в ряде исследований использовали именно 2-метилтиоАТР (IVa) или 2-метилтиоАДФ (IIIa).

В настоящей работе описаны методы синтеза этих двух соединений, меченных  $^{32}\text{P}$ : 5'-[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]трифосфата (IVb) и 5'-[ $\beta$ - $^{32}\text{P}$ ]дифосфата (IIIб) 2-метилтиоаденозина с высокой молярной активностью.

Синтез нуклеотидов, меченных  $^{32}\text{P}$ , высокой молярной активности имеет ряд специфических особенностей:

а) в обычных химических методах фосфорилирования в избытке берется фосфат, а при синтезе  $^{32}\text{P}$ -меченых соединений фосфат используется в недостатке;

Сокращения: CDI – *N,N'*-карбонилдимидазол; GAPD – 3-глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; PGK – 3-фосфоглицераткиназа.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095)135-99-87).

б) чтобы получить соединение с молярной активностью не ниже 1000 Ки/ммоль (37 ПБк/ммоль) синтез приходится проводить с количеством вещества порядка  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  г по фосфату. Это затрудняет анализ продуктов реакции и практически исключает возможности использования многих традиционных методов анализа – ЯМР-, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии;

в) как правило, идентификацию соединений, меченных  $^{32}\text{P}$  высокой молярной активности, проводят косвенно, сравнивая хроматографические характеристики радиоактивного вещества и его нерадиоактивного аналога с помощью ТСХ или ВЭЖХ.

С учетом этих особенностей мы попытались провести химический синтез 2-метилтиоаденозин-5'-[ $\beta$ - $^{32}\text{P}$ ]дифосфата (IIIб) из соответствующего 5'-монофосфата (II) и [ $^{32}\text{P}$ ]ортофосфорной кислоты по ранее описанному методу [5]. Следует отметить, что в оригинальной статье соотношение активированный нуклеотид–ортофосфат было около 1 : 10, в нашем случае это соотношение было более 200 : 1. Реакцию проводили до тех пор, пока оставалось менее 40% исходного [ $^{32}\text{P}$ ]ортофосфата, контролируя глубину прохождения реакции по ТСХ. Однако разделение реакционной смеси с помощью ВЭЖХ (рис. 1а) показало, что только около 10% радиоактивного фосфата находится в виде целевого продукта (IIIб). Остальные радиоактивные продукты идентифицировать сложно, хотя одним из основных побочных продуктов, по видимому, является  $\text{P}^1, \text{P}^3$ -бис[5'-(2-метилтио)аденозил]-[ $\beta$ - $^{32}\text{P}$ ]трифосфат. Сложный набор побочных продуктов (как радиоактивных, так и нерадиоактивных), возможно, обусловлен спецификой синтеза, поскольку  $^{32}\text{P}$  как источник ионизирующего излучения является продуцентом свободных

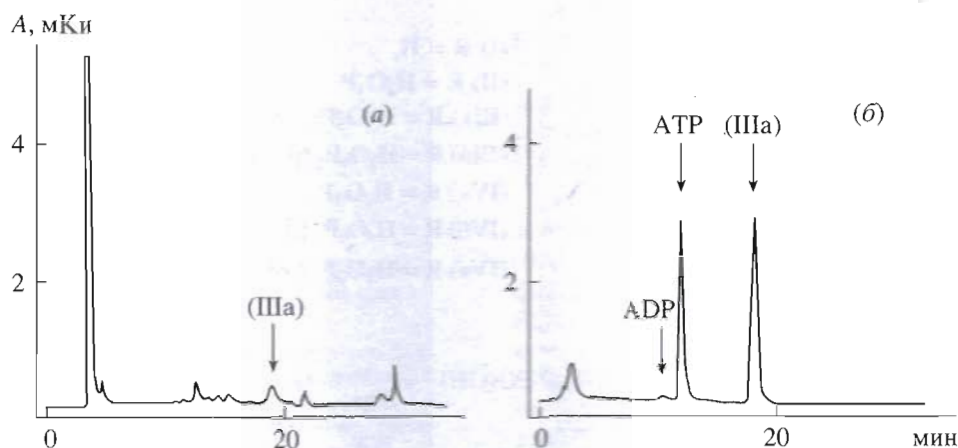


Рис. 1. Хроматографическое выделение 2-метилтиадеозин-5'-[ $\beta$ - $^{32}\text{P}$ ]дифосфата (IIIб) на колонке 4 × 150 мм Lichrosorb C-18 (10 мкм) в градиенте 0.05 М ТЕАВ – 70% EtOH. Профиль элюции приведен по показаниям проточного детектора радиоактивности на основе ДРГЗ-03. Разделение продуктов реакции химического синтеза (а) и ферментативного синтеза (б). Стрелкой указано время выхода соответствующих нерадиоактивных продуктов.

радикалов и за время реакции по свободнорадикальному механизму могут образовываться продукты, которые в “нерадиоактивном” синтезе не образуются. Логично предположить, что синтез 2-метилтиадеозин-5'-[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]трифосфата (IVв) из соответствующего дифосфата (IIIа) и [ $^{32}\text{P}$ ]ортофосфата таким же химическим методом даст аналогичный или худший результат. Поэтому мы попытались провести ферментативные синтезы этих соединений.

Синтез 2-метилтиадеозин-5'-[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]трифосфата (IVв) был проведен как описано для синтеза аденозин-5'-[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]трифосфата [6] с заменой природного ADP на 2-метилтиадеозин-5'-дифосфат (IIIа). Параллельно, в качестве контроля, проводили в таких же условиях синтез аденозин-5'-[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]трифосфата. Никаких существенных различий в скорости образования соответствующих трифосфатов не обнаружено (см. схему 1). По-видимому, фосфоглицераткиназа (фермент, фосфорилирующий ADP до ATP) фосфорилирует оба субстрата с одинаковой эффективностью. Выделение 2-метилтиадеозин-5'-[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]трифосфата (IVв) из ферментативной реакционной смеси не вызывает каких-либо трудностей, и выход продукта (около 90%) соответствует выходу обычного [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (рис. 2).

Синтез 2-метилтиадеозин-5'-[ $\beta$ - $^{32}\text{P}$ ]дифосфата (IIIб) ферментативно мы попытались провести с помощью АМР-киназы *E. coli*. Эксперименты по измерению скорости фосфорилирования 2-метилтиадеозин-5'-монофосфата (II) показали (рис. 3), что 2-метилтиадеозин (II) является менее эффективным субстратом ( $K_m$  в аналогичных условиях в 3.3 раза больше, а  $V_{max}$  в 50 раз меньше, чем для АМР). Однако для синтеза меченного  $^{32}\text{P}$  соединения (IIIб) ферментативную реакцию мож-

но считать приемлемой, так как необходимое количество продукта составляет не более  $10^{-8}$  моль. Важен вопрос о втором субстрате – доноре фосфатной группы. В качестве донора [ $^{32}\text{P}$ ]фосфата

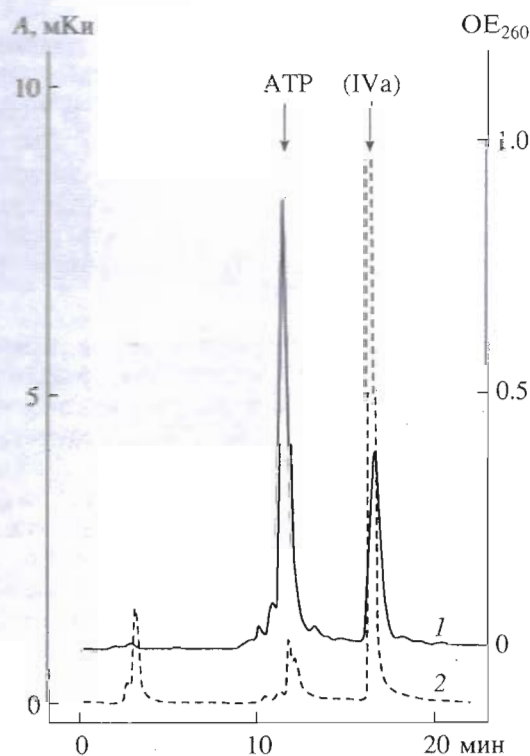
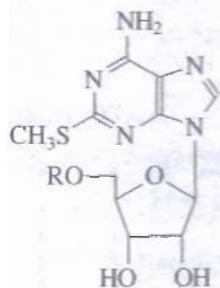


Рис. 2. Хроматографическое выделение 2-метилтиадеозин-5'-[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]трифосфата (IVв). Хроматография проводилась на колонке 4 × 150 мм Lichrosorb C-18 (10 мкм) в градиенте 0.05 М ТЕАВ – 70% EtOH. Приведен профиль элюции по показаниям проточного УФ-детектора при  $\lambda$  260 нм (1) и по показаниям проточного детектора радиоактивности на основе ДРГЗ-03 (2).



- (I) R = H,  
 (II) R = H<sub>2</sub>O<sub>3</sub>P,  
 (IIIa) R = H<sub>3</sub>O<sub>6</sub>P<sub>2</sub>,  
 (IIIб) R = H<sub>3</sub>O<sub>6</sub>P<sub>2</sub> [β-<sup>32</sup>P],  
 (IVa) R = H<sub>4</sub>O<sub>9</sub>P<sub>3</sub>,  
 (IVб) R = H<sub>4</sub>O<sub>9</sub>P<sub>3</sub> [β-<sup>32</sup>P],  
 (IVв) R = H<sub>4</sub>O<sub>9</sub>P<sub>3</sub> [γ-<sup>32</sup>P]

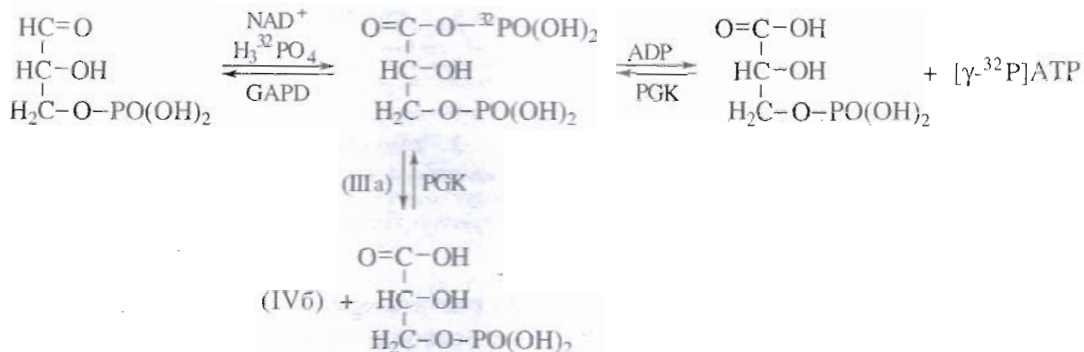


Схема 1.

можно использовать либо 2-метилтиоаденозин-5'-[γ-<sup>32</sup>P]трифосфат (IVв) (схема 2), либо обычный [γ-<sup>32</sup>P]АТФ (схема 3, реакция 1). В первом случае удельная активность целевого 2-метилтиоаденозин-5'-[β-<sup>32</sup>P]дифосфата (IIIб) снижается вдвое за счет изотопного разведения в ходе синтеза (схема 2). Во втором случае продукты реакции (в том числе и радиоактивные) более разнообразны (схема 3, реакции 2, 3).

Сравнить скорости ферментативных реакций, катализируемых АМР-киназой, для разных пар субстратов природных адениновых нуклеотидов и их 2-метилтиоаналогов можно из результатов эксперимента, представленных на рис. 4. Как и предполагалось, максимальная скорость реакции наблюдается у пары АМР-АТФ, а минимальная — у пары 2-метилтиоАМР (II) — 2-метилтиоАТФ (IV). Скорости реакций АМР — 2-метилтиоАТФ (IV) и 2-метилтиоАМР (II) — АТФ занимают про-

межуточное положение. Необходимо отметить, что во всех реакциях этого эксперимента количество фермента одно и то же (0.005 ед. акт.) и, несмотря на избыток фермента, даже за 18 ч инкубации реакция между 2-метилтиоаденозин-5'-[γ-<sup>32</sup>P]трифосфатом (IVв) и 2-метилтиоаденозин-5'-[γ-<sup>32</sup>P]дифосфатом (II) прошла на 8–10% (рис. 4). Эти данные позволяют однозначно сделать выбор: в качестве донора <sup>32</sup>P-фосфатной группы следует использовать обычный [γ-<sup>32</sup>P]АТФ.

За время синтеза в реакционной смеси (схема 3, реакция 1) кроме целевого продукта — 2-метилтиоаденозин-5'-[β-<sup>32</sup>P]дифосфата (IIIб) образуется немодифицированный [β-<sup>32</sup>P]АДП (схема 3, реакции 2 и 3) вследствие обратимости и высокой скорости реакции немодифицированных аденозиновых нуклеотидов. Даже при 100-кратном избытке исходного 2-метилтиоаденозин-5'-монофосфата (II) относительно [γ-<sup>32</sup>P]АТФ образуется около 10% [β-<sup>32</sup>P]АДП (рис. 4). Тем не менее, все радиоактивные компоненты хорошо разделяются с помощью ВЭЖХ (рис. 1б) и радиохимическая чистота полученного 2-метилтиоаденозин-5'-[β-<sup>32</sup>P]дифосфата (IIIб) более 95%. Молярная активность составила около 2000 Ки/ммоль (74 ПБк/моль), конечный выход 30% на исходную [<sup>32</sup>P]ортофосфорную кислоту.

Таким образом, даже несмотря на низкую скорость ферментативного фосфорилирования 2-метилтиоаденозиновых нуклеотидов, ферментатив-



Схема 2.

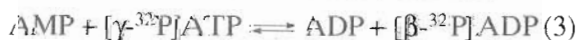
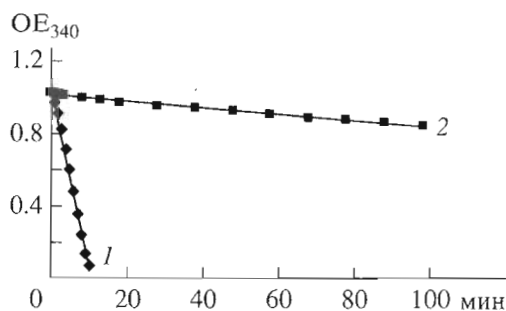


Схема 3.



**Рис. 3.** Определение скорости ферментативного фосфорилирования 2-метилтиаденозин-5'-монофосфата (II). 1 – фосфорилирование природного АМР, 2 – фосфорилирование 2-метилтиаденозин-5'-монофосфата (II). Условия см. в “Эксперимент. части”.

ный путь синтеза таких нуклеотидов, меченных фосфором-32, оказался успешным.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

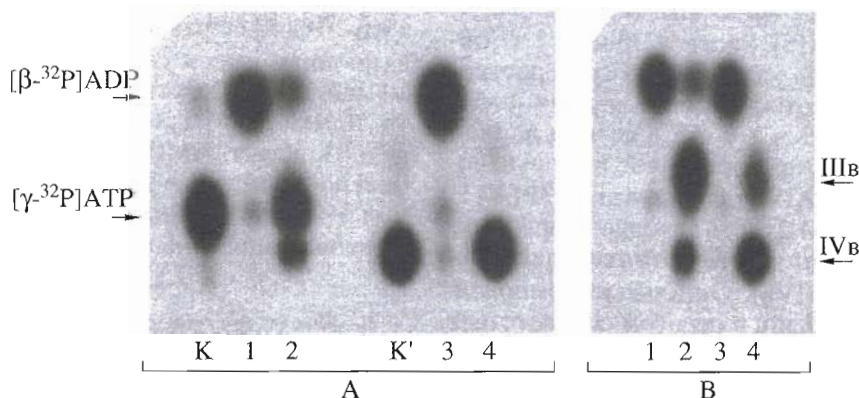
2-Метилтиаденозин (I) был получен аналогично [7], трифосфат (IVa) синтезировали аналогично [3].

Использовались следующие ферменты: PGK, GAPD, пируваткиназа и лактатдегидрогеназа (Sigma); АМР-киназа *E. coli* выделена по методу [8]. В работе использовали DEAE-целлюлозу ( $\text{HCO}_3^-$ -форма) DE-32 (Whatman); силикагель Li-Chroprep RP-18 (25–40 мкм; Merck); Дауэкс-50 × 4, оксихлорид фосфора и CDI (Fluka); триэтилфосфат и DMF (Aldrich), Трис, фосфоенолпируват, NADH (Sigma); [ $^{32}\text{P}$ ]ортофосфорную кислоту (производства ГНЦ ФЭИ, Обнинск, Россия).

ЯМР-спектры регистрировали на приборе Bruker WP-200 SY (США) с рабочей частотой 200.13 МГц для  $^1\text{H}$  и 81 МГц (с подавлением спин-спинового фосфор-протонного взаимодействия, внешний стандарт – 85% фосфорная кислота) для  $^{31}\text{P}$ , в качестве растворителя использовали  $\text{D}_2\text{O}$ .

**2-Метилтиаденозин-5'-фосфат (II), аммониевая соль.** К охлажденной до  $0^\circ\text{C}$  суспензии 50 мг (0.16 ммоль) 2-метилтиаденозина (I) в триэтилфосфате (1 мл) прибавляли 30 мкл (0.32 ммоль)  $\text{POCl}_3$ , выдерживали 18 ч при  $5^\circ\text{C}$ . Реакционную массу нейтрализовали прибавлением 0.5 М триэтиламмонийгидрокарбоната (12 мл), упаривали, разбавляли водой до 100 мл и наносили на колонку ( $10 \times 2.5$  см) с DE-32, промывали колонку водой (200 мл) и элюировали соединение (II) в линейном градиенте концентрации  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ( $0 \rightarrow 0.2$  М, V 1.5 л). УФ-поглощающие фракции (при  $\lambda$  254 нм) упаривали, соупаривали с водой. Дополнительно очищали на колонке ( $2 \times 20$  см) с LiChroprep RP-18, элюировали водой. Фракции, содержащие фосфат (II), лиофильно высушивали. Выход 32 мг (49%). УФ-спектр ( $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7):  $\lambda_{\text{max}}$  275 нм.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\delta$ , м.д., J, Гц): 8.25 с (1H, H-8), 5.97 д (1H, J 4.4, H-1'), 4.68 м (1H, H-2'), 4.43 м (1H, H-3'), 4.24 м (1H, H-4'), 4.01 м (2H, H-5'), 2.42 с (3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР:  $-2.3$  с.

**2-Метилтиаденозин-5'-дифосфат (IIIa), аммониевая соль.** К раствору 10 мг (0.02 ммоль) 2-метилтиаденозин-5'-фосфата (II) в 2 мл DMF прибавляли 20 мг (0.12 ммоль) CDI, перемешивали 1 ч при  $20^\circ\text{C}$ , приливали 0.05 мл (1.2 ммоль) метанола, через 40 мин прибавляли 0.2 мл (0.1 ммоль) 0.5 М раствора моно(три-*n*-бутиламмоний)фосфата в DMF. Через 1 ч разбавляли реакционную массу 10 мл воды и наносили на колонку с DE-32, далее поступали как в случае (II). Выход 4 мг



**Рис. 4.** Сравнение скоростей ферментативных реакций, катализируемых АМР-киназой *E. coli*. Представлены просканированные радиоавтографы ТСХ на PEI-целлюлозе ( $0.5$  М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) продуктов реакции: 1 – реакция между АМР и [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТР, 2 – реакция между 2-метилтиаденозин-5'-монофосфатом (II) и [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТР, 3 – реакция между АМР и [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-2-метилтиаденозин-5'-трифосфатом, 4 – реакция между 2-метилтиаденозин-5'-монофосфатом (II) и [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-2-метилтиаденозин-5'-трифосфатом (IVв), К – контроль [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТР (реакция 2 без добавления фермента), К' – контроль [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-2-метилтиаденозин-5'-трифосфатом (IVв) (реакция 4 без добавления фермента). А – анализ продуктов реакции через 30 мин инкубации с ферментом, В – анализ продуктов реакции через 18 ч инкубации с ферментом.

(42%). УФ-спектр ( $H_2O$ , pH 7):  $\lambda_{max}$  275 нм.  $^1H$ -ЯМР: 8.21 с (1H, H-8), 5.99 д (1H, J 4.4, H-1'), 4.67 м (1H, H-2'), 4.49 м (1H, H-3'), 4.23 м (1H, H-4'), 4.09 м (2H, H-5'), 2.43 с (3H,  $CH_3$ ).  $^{31}P$ -ЯМР: -5.89 д (Рβ), -10.50 д (Рα);  $J_{P\alpha, P\beta}$  21.

**Химический синтез  $[\beta\text{-}^{32}P]$ -2-метилтиоаденозин-5'-дифосфата (Шб).** 2-Метилтиоаденозин-5'-монофосфат (II) (2 мг, 0.005 ммоль) растворяли в воде (1 мл), наносили на колонку ( $0.4 \times 10$  см) с Дауэксом-50  $\times$  4 в пиридиниевой форме и элюировали водой со скоростью 10 мл/ч. Элюат (10 мл) упаривали на роторном испарителе до конечного объема 1 мл, к этому раствору добавляли 3 мкл триэтиламина и 1 мл DMF, упаривали до объема 0.5 мл, снова добавляли 5 мл DMF и упаривали до 1 мл. К полученному раствору добавляли 6 мг (0.037 ммоль) CDI и инкубировали в течение 1 ч при 4°C, далее добавляли еще 3 мг (0.019 ммоль) CDI, через 40 мин реакцию останавливали прибавлением 50 мкл метанола. Этот раствор активированного имидазольного производного (II) расфасовывали на две порции и хранили в пластиковых пробирках при -20°C.

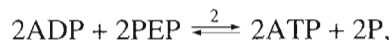
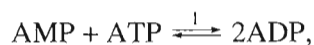
Раствор  $[^{32}P]$ ортофосфорной кислоты объемом 30 мкл (8 мКи) упаривали, затем соупаривали с DMF. Половинное количество имидазольного производного фосфата (II) упаривали до объема около 100 мкл и приливали этот раствор к упаренной  $[^{32}P]$ ортофосфорной кислоте. После 7 ч инкубации при 20°C реакцию останавливали, прибавляя 50 мкл воды. Затем раствор упаривали, остаток растворяли в 100 мкл 0.05 М ТЕАВ и выделение (анализ реакционной смеси) проводили с помощью ВЭЖХ (рис. 1).

Ферментативный синтез  $[\gamma\text{-}^{32}P]$ АТР и 2-метилтиоаденозин-5'- $[\gamma\text{-}^{32}P]$ трифосфата (IVв) проводили как описано ранее [6]. Раствор 20 мКи  $[^{32}P]$ ортофосфорной кислоты упаривали досуха, растворяли в 100 мкл бидистиллята и добавляли 4 мкл 1 М Трис до pH раствора 8-8.5. Раствор делили поровну (по 50 мкл) на две пробирки, в первую добавляли 5 мкл 1 мМ ADP для синтеза  $[\gamma\text{-}^{32}P]$ АТР, во вторую 5 мкл 5 мМ 2-метилтиоаденозин-5'-дифосфата (IIIа) для синтеза 2-метилтиоаденозин-5'- $[\gamma\text{-}^{32}P]$ трифосфата (IVв). Остальные компоненты для синтеза добавляли в строгом соответствии с прописью [6]. Оба продукта  $[\gamma\text{-}^{32}P]$ АТР и 2-метилтиоаденозин-5'- $[\gamma\text{-}^{32}P]$ трифосфат (IVв) выделяли ВЭЖХ на колонке ( $4 \times 150$  мм) с Lichrosorb C-18 (10 мкм) в градиенте 50 мМ ТЕАВ - 70% EtOH.

Скорости ферментативной реакции, катализируемой АМР-киназой, для вычисления  $K_m$ , определяли по методу [8] с некоторыми изменениями.

Активность фермента определяли по скорости изменения УФ-поглощения на длине волны

340 нм, соответствующей максимуму поглощения NADH, в сопряженной реакции:



где PEP - фосфоенолпируват, P - пируват, L - лактат, 1 - АМР-киназа, 2 - пируваткиназа, 3 - лактатдегидрогеназа.

Реакционную смесь состава: 100 мкл фосфоенолпирувата ( $4.5 \times 10^{-2}$  М), 100 мкл NADH ( $6.6 \times 10^{-3}$  М), 100 мкл аденозинтрифосфата (0.01 М), 10 мкл пируваткиназы (0.1 ед. акт.), 10 мкл лактатдегидрогеназы (0.7 ед. акт.), 3 мл буфера А (0.05 М Трис-НСl (pH 8), 5 мМ  $MgCl_2$ , 0.1 М KCl), определенное количество субстрата - акцептора фосфата и 10 мкл АМР-киназы помещали в кювету спектрофотометра и регистрировали изменение оптического поглощения при 340 нм. В качестве субстратов использовали природный АМР и 2-метилтиоаденозин-5'-монофосфат в количестве от 50 до 200 мкл 10 мМ раствора. За ходом реакции следили с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1201.

Активность рассчитывали по формуле:

$$\text{Активность} = \frac{\Delta(D_{340})V_0}{2\Delta t V_{np} \epsilon_{340} C},$$

где  $\Delta(D_{340})$  - изменение поглощения за интервал времени  $\Delta t$ ,  $V_0$  - объем раствора (2 мл),  $V_{np}$  - объем тестируемого препарата (мл),  $\epsilon_{340}$  - молярное поглощение NADH при 340 нм,  $C$  - концентрация белка в препарате (мг/мл).

Ферментативный синтез 2-метилтиоаденозин-5'- $[\beta\text{-}^{32}P]$ дифосфата проводили из  $[\gamma\text{-}^{32}P]$ АТР. Реакционная смесь содержала 8 мКи  $[\gamma\text{-}^{32}P]$ АТР, 10 мкл 10 мМ 2-метилтиоаденозин-5'-монофосфата, 10 мкл 0.5 М Трис-НСl (pH 8), 5 мкл 1 М  $MgCl_2$  и 0.005 ед. акт. АМР-киназы *E. coli*. Общий объем реакционной смеси 150 мкл. Через 18 ч инкубации при 20°C реакционную смесь разделяли ВЭЖХ в условиях, описанных выше для  $[\gamma\text{-}^{32}P]$ АТР.

Работа финансировалась ГНТП "Средства обеспечения исследований по физико-химической биологии и биотехнологии", а также Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 98-03-32930а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cusack N.J., Hourani S.M.O. Purines in Cellular Signaling: Targets for New Drugs, New York: Springer, 1990. P. 254-259.

2. *Dubyak G.R.* // Arch. Biochem. Biophys. 1986. V. 245. P. 84–93.
3. *Zimmet J., Jarlebark L., Hammarberg T., van Galen P.J.M., Jacobson K.A., Heilbronn E.* // Nucleosides & Nucleotides. 1993. V. 132. P. 1–20.
4. *Jacobson K.A., van Galen P.J.M., Williams M.* // J. Med. Chem. 1992. V. 35. P. 407–422.
5. *Rammler D.H., Yengoyan L., Paul A.V., Bax P.C.* // Biochemistry. 1967. V. 6. P. 1828–1837.
6. *Walseth T.F., Yuen P.S.T., Moos M.C.* // Meth. Enzymol. 1991. V. 195. P. 29–44.
7. *Kikugawa K., Suehiro H., Yanase R., Aoki A.* // Chem. Pharm. Bull. 1977. V. 25. P. 1959–1969.
8. *Рухтер В.А., Рабинов И.В., Кузнецов С.А., Павлий Т.Б., Скоблов Ю.С.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1988. Т. 24. С. 310–317.

## The Preparation of $^{32}\text{P}$ -Labeled 2-Methylthioadenosine Di- and Triphosphates

M. Yu. Skoblov, M. V. Yas'ko, and Yu. S. Skoblov<sup>#</sup>

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, GSP-1, Moscow, 117984 Russia*

2-Methylthioadenosine 5'-mono- and diphosphates were prepared by chemical synthesis, and enzymatically phosphorylated to 5'-[ $\beta$ - $^{32}\text{P}$ ]-diphosphate and 5'-[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-triphosphate, respectively. They were isolated by HPLC and had activity exceeding 1000 Ci/mmol and radiochemical purity higher than 95%.

*Key words: AMP kinase, 2-methylthioadenosine,  $^{32}\text{P}$ -labeled nucleotides*

<sup>#</sup> *To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 135-9987.*