



УДК 547.963.32.07 : 577.155 + 542.95

СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

XXVI *. ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ДИНУКЛЕОЗИДМОНОФОСФАТОВ
В ПРЕПАРАТИВНОМ МАСШТАБЕ И ПОДХОДЫ
К ИНГИБИРОВАНИЮ ФЕРМЕНТА

*Хабарова М. И., Смолянинова О. А., Багдонас А. С., **
Коваленко М. И., *** Женобарова С. М.*

Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пущино

На модельной системе синтеза CpC из $\text{C} > \text{p}$ и C показано, что синтетическая активность рибонуклеазы А, рибонуклеазы В и панкреатической рибонуклеазы одинакова. Гель-фильтрация на сефадексе G-15 в сочетании с ингибированием 0,01 н. амином или адсорбцией на бентоните малоэффективна для полного подавления действия панкреатической рибонуклеазы. Более эффективным и технологически простым удалением фермента является использование рибонуклеазы, связанной с полимерным носителем. Осуществлен синтез UpC и CrU при использовании панкреатической рибонуклеазы, связанной с карбоксиметилцеллюлозой.

Препаративный синтез олигорибонуклеотидов необходим для обеспечения этими важными модельными соединениями возрастающих потребностей биоорганической химии и молекулярной биологии [2]. Применение для этой цели химических методов [3] в значительной степени сдерживается их большой сложностью, а при использовании энзиматических методов [4] возникает задача ингибирования или удаления фермента, катализирующего не только синтез, но и гидролиз межнуклеотидной связи.

Цель настоящей работы состояла в выяснении, какой из способов подавления действия ферментов (гель-фильтрация, адсорбция на «нейтральном» для реакционной смеси материале, добавление ингибитора или выведение из реакционной смеси фермента, связанного с полимерным носителем) будет наиболее эффективным при энзиматическом синтезе олигорибонуклеотидов с участием рибонуклеаз.

В качестве модельной системы служил синтез динуклеозидмонофосфата CpC из цитидин-2',3'-циклофосфата и цитидина, катализируемый панкреатической рибонуклеазой. Выбор этой модели определялся тем, что достаточно высокая концентрация CpC в реакционной смеси (25—30% от взятого $\text{C} > \text{p}$) может быть достигнута за 1—2 ч, а анализ этой смеси легко осуществить, применяя электрофорез на бумаге в нейтральном буфере. Синтез CpC и его анализ проводили в условиях, используемых нами для синтеза динуклеозидмонофосфатов с участием рибонуклеаз [5].

* Сообщение XXV см. [1].

** Настоящий адрес: Кафедра биохимии и биофизики Вильнюсского государственного университета.

*** Настоящий адрес: Институт молекулярной биологии Академии наук УССР, Киев.

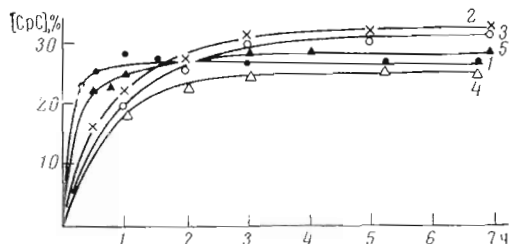


Рис. 1

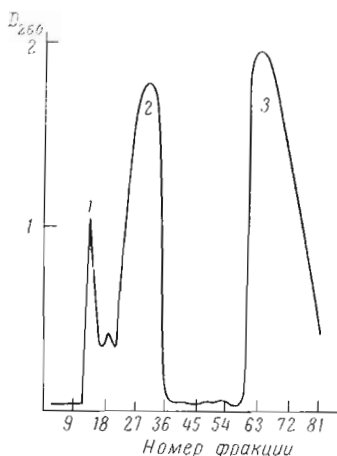


Рис. 2

Рис. 1. Синтез CrC с РНКазой А (1), РНКазой В (2) и различными препаратами панкреатической рибонуклеазы: 3 — препарат фирмы «Koch Light» (Англия), 4 — препарат фирмы «Reanal» (Венгрия), 5 — препарат Ленинградского мясокомбината

Рис. 2. Гель-фильтрация смесей панкреатической рибонуклеазы и субстратов на сефадексе G-15: РНКазы (1), Cr (2) и С (3). Детали см. в «Экспер. части»

Так как коммерческие препараты панкреатической рибонуклеазы представляют собой смесь, содержащую несколько белковых компонентов (РНКазы А, РНКазы В и т. д.) [6], мы сравнили синтетическую активность таких препаратов с синтетической активностью рибонуклеаз А и В. Как видно из рис. 1, для препаративных целей можно применять препараты панкреатической рибонуклеазы Ленинградского мясокомбината или фирмы «Reanal» (Венгрия), не подвергая их предварительной очистке или разделению на отдельные компоненты, тем более что данные А. Хакима об особой склонности РНКазы В к синтезу межнуклеотидной связи [7] не подтвердились.

Чтобы выяснить, можно ли удалить панкреатическую рибонуклеазу из реакционной смеси с помощью гель-фильтрации, как это было сделано для неспецифической рибонуклеазы *Asp. clavatus* [8], смесь Cr, С и рибонуклеазы фильтровали через колонку с сефадексом G-15. Из результатов, представленных на рис. 2, следует, что при элюции водой панкреатическая рибонуклеаза отделяется от субстратов. Однако при гель-фильтрации в аналогичных условиях реакционной смеси, полученной при инкубировании $C > p$ и С с рибонуклеазой и содержащей, по данным электрофоретического анализа, все компоненты в обычных для этого синтеза соотношениях, в элюате были обнаружены лишь Cr и С. Следовательно, CrC и $C > p$ плохо отделяются от фермента и гидролизуются им на колонке.

Принимая во внимание то обстоятельство, что аммиак ингибирует различные рибонуклеазы, в том числе панкреатическую [9, 10], гель-фильтрацию модельной смеси проводили в присутствии 0,01 н. аммиака (рН 10). В этом случае в элюате обнаружены $C > p$ и CrC, однако после гель-фильтрации содержание $C > p$ и CrC по сравнению с исходной реакционной смесью существенно уменьшается. Следовательно, сочетание гель-фильтрации с таким ингибитором, как аммиак, недостаточно для полной дезактивации рибонуклеазы.

Ранее было показано, что панкреатическая рибонуклеаза связывается бентонитом [11]. Это наблюдение использовано, например, в исследованиях рибонуклеазного гидролизата при определении первичной структуры тРНК [12]. Мы обработали бентонитом стандартную реакционную смесь, полученную при синтезе CrC, и после отделения адсорбента фильтрат и промывные воды пропустили через колонку с сефадексом G-15. В элюате

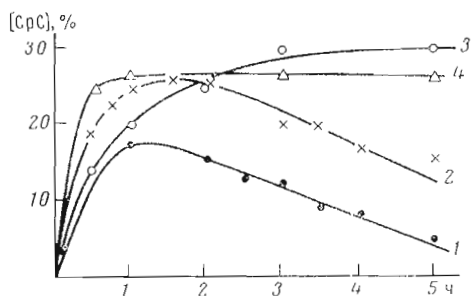


Рис. 3

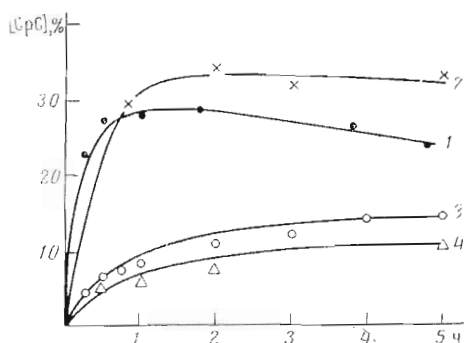


Рис. 4

Рис. 3. Синтез СрС с КМ-РНКазой (1, 2), панкреатической РНКазой (3) и РНКазой А (4): 1 — концентрация фермента как в работе [12]; 2 — концентрация фермента по активности соответствует концентрации в синтезах 3 и 4

Рис. 4. Синтез UpC (1, 2) и CpU (3, 4) с КМ-РНКазой (1, 3) и панкреатической РНКазой (2, 4)

обнаружили лишь Ср и С, т. е. бентонит не связывает рибонуклеазу полностью и оставшийся в смеси фермент гидролизует СрС и $C > p$ на колонке. По-видимому, при значительно больших количествах рибонуклеазы в растворе, чем в работе [12], остаточная концентрация рибонуклеазы может быть снижена за счет уменьшения соотношения рибонуклеаза — бентонит, однако это неизбежно повлечет за собой потери нуклеотидного материала.

Особый интерес представляло применение для синтеза СрС фермента, связанного с полимерным носителем. Мы воспользовались коммерческим препаратом, рибонуклеазой, связанной с карбоксиметилцеллюлозой (КМ-РНКаза) [13]: в процессе инкубирования КМ-РНКаза с субстратами рибонуклеаза не переходит в раствор, препарат может быть неоднократно использован без потери активности и является подходящим катализатором для синтеза терминирующих кодонов UpApA, UpApG и UpCpA.

Результаты синтеза СрС в присутствии КМ-РНКаза представлены на рис. 3. При добавлении к стандартной смеси субстратов КМ-РНКаза в концентрации, соответствующей условиям работы [13], СрС образуется со значительно меньшим выходом, чем в случае водорастворимого фермента (15—16 и 25—30% соответственно), тогда как разница в максимальной концентрации СрС при использовании примерно одинаковых по активности концентраций иммобилизованного и водорастворимого фермента незначительна. Отличительная особенность синтеза с иммобилизованным ферментом состоит в том, что максимальная концентрация СрС достигается так же быстро, как с РНКазой А, и даже несколько быстрее, чем с панкреатической РНКазой, но образовавшийся динуклеозидмонофосфат довольно быстро гидролизует, т. е. соотношение синтетической и гидролитической активности для КМ-РНКаза отличается от того, что наблюдается для панкреатической РНКазы. Действительно, выходы СрС в расчете на прореагировавший $C > p$ составили соответственно 39 и 56%. Аналогичные результаты были получены для динуклеозидмонофосфатов UpC и CpU (см. рис. 4). Используя эти данные, мы осуществили синтез UpC и CpU в препаративном масштабе, получив ~ 10 и 20 мг динуклеозидмонофосфата соответственно. Разумеется, при необходимости масштаб синтезов может быть увеличен [14].

Таким образом, при получении динуклеозидмонофосфатов с участием панкреатической рибонуклеазы в препаративных масштабах для наиболее эффективного и технологически простого удаления фермента рационально использовать рибонуклеазу, связанную с полимерным носителем.

В работе использовали: натриевые соли 2',3'-циклофосфатов уридина и цитидина, уридин, цитидин и панкреатическую рибонуклеазу (Reanal, Венгрия), рибонуклеазы А, В, панкреатические рибонуклеазы (Koch Light, Англия; Calbiochem, США и Ленинградский мясокомбинат), панкреатическую рибонуклеазу, связанную с карбоксиметилцеллюлозой (Serva, ФРГ), сефадекс G-15 (Pharmacia, Швеция), целлюлозный порошок Cellex N (Calbiochem, США). Бентонит, полученный из Минералогического музея им. А. Е. Ферсмана, перед использованием обрабатывали, как описано в работе [12]. Электрофорез и хроматографию на бумаге и УФ-спектрофотометрию для анализа реакционных смесей и СрС проводили, как описано ранее [5]. Гель-фильтрацию осуществляли на колонке с сефадексом G-15 ($1,5 \times 90$ см), уравновешенной водой или 0,01 н. NH_4OH , со скоростью ~ 32 мл/ч, собирая фракции по 2,7 мл (см. рис. 2).

Адсорбция рибонуклеазы на бентоните. Раствор 41 мг цитидин-2',3'-циклофосфата, 91,5 мг цитидина и 0,08 мг панкреатической рибонуклеазы в 0,5 мл 0,05 М трис- HCl (рН 7,6) инкубировали 3 ч при 0° , после чего добавляли ~ 5 мг бентонита и встряхивали 5 мин при $\sim 20^\circ$. Бентонит отфильтровывали, фильтрат и промывные воды наносили на колонку с сефадексом G-15 и проводили гель-фильтрацию, как описано выше.

Синтез динуклеозидмонофосфатов. А. Использовали водорастворимые препараты рибонуклеаз: РНКаз А, В и панкреатической рибонуклеазы разных фирм. Раствор 25 мкмоль нуклеозид-2',3'-циклофосфата и 75 мкмоль нуклеозида в 0,1 мл 0,05 М трис- HCl -буфера (рН 7, 6) инкубировали с ферментом (0,16 мг/мл) при 0° . Пробы из реакционной смеси объемом 4 мкл наносили на бумагу и анализировали с помощью электрофореза на бумаге и УФ-спектрофотометрии.

Б. Раствор 25 мкмоль нуклеозид-2',3'-циклофосфата и 75 мкмоль нуклеозида в 0,1 мл 0,05 М трис- HCl -буфера (рН 7,6) инкубировали при 0° с КМ-РНКазой, концентрация которой составляла 20 мг/мл [13] и 13 мг/мл. Анализ реакционных смесей осуществляли, как описано в опыте А.

В. *Препаративный синтез УрС.* К раствору 125 мкмоль уридин-2',3'-циклофосфата и 375 мкмоль цитидина в 0,5 мл 0,05 М трис- HCl -буфера (рН 7,6) добавляли 6,5 мг КМ-РНКазы и суспензию выдерживали при 0° в течение 70 мин, периодически встряхивая, после чего фермент отфильтровывали, промывали на фильтре ледяной водой ($3 \times 0,5$ мл), фильтрат и промывные воды наносили на колонку с дауэксом 50В $\times$ 2 ($1,6 \times 20$ см) и хроматографировали, как описано в работе [10]. Получено 23 мкмоль УрС.

Г. *Препаративный синтез СрU.* Раствор 400 мкмоль цитидин-2',3'-циклофосфата, 1200 мкмоль уридина в 1,6 мл трис- HCl -буфера (рН 7,6) инкубировали 3 ч при 0° с 64 мг КМ-РНКазы, затем фермент отфильтровывали, промывали ледяной водой, а фильтрат и промывные воды наносили на колонку с целлюлозным порошком Cellex N ($100 \times 2,6$ см) и элюировали смесью изопропанол — конц. аммиак — вода со скоростью 15 мл/ч. Получено 36 мкмоль СрU.

ЛИТЕРАТУРА

1. Женодарова С. М., Клягина В. П. (1977) Биоорг. химия, 3, 1623—1625.
2. Смирнов В. Д., Метелев В. Г., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1976) Биоорг. химия, 2, 293—314.
3. Zhdanov R. I., Zhenodarov S. M. (1975) Synthesis, 222—245.
4. Женодарова С. М. (1970) Успехи химии, 39, 1479—1493.
5. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А. (1974) Ж. общ. химии, 44, 446—449.
6. Hirs C. H. W., Stein W. H., Moore S. (1951) J. Amer. Chem. Soc., 73, 1893.
7. Hakim A. A. (1957) Arch. Biochem. and Biophys., 70, 591—602.

8. Bauer S., Lamed R., Lapidot Y. (1972) *Biotechnol. and Bioeng.*, **14**, 861—870.
9. Mohr S. C., Thach R. E. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 6566—6576.
10. Кавуненко А. П., Калачева Т. Н., Тихомирова-Сидорова Н. С. (1974) *Биохимия*, **39**, 839—844.
11. Jacoli G. G. (1968) *Can. J. Biochem.*, **46**, 1237—1239.
12. Венкстерн Т. В., Ли Л., Крутилина А. И., Аксельрод В. Д., Мирзабеков А. Д., Баев А. А. (1968) *Молекулярн. биология*, **2**, 597—611.
13. Gassen H. G., Nolte R. (1971) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1410—1415.
14. Василенко С. К., Веняминова А. Г., Детиненко Л. Д., Ким Г. А., Кнорре Д. Г. (1972) *Биохимия*, **37**, 527—530.

Поступила в редакцию
17.VIII.1977

После доработки
14.XI.1977

STEPWISE OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS. XXVI. LARGE-SCALE ENZYMATIC SYNTHESIS OF DINUCLEOSIDE MONOPHOSPHATES AND THE APPROACHES TO ENZYME INHIBITION

KHABAROVA M. I., SMOLYANINOVA O. A., BAGDONAS A. S.,
KOVALENKO M. I., ZHENODAROVA S. M.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino*

Ribonucleases A and B, and pancreatic ribonuclease were shown to have the same synthetic activity in model system of CpC synthesis from C > p and C. Gel filtration on Sephadex G-15 in combination with inhibition by 0,01 N ammonia or adsorption onto bentonite was not sufficiently effective as a method for complete suppression of pancreatic ribonuclease activity. More powerful and facile procedure for the enzyme removal involved ribonuclease attached to a polymeric support. The synthesis of UpC and CpU was carried out using bovine pancreatic ribonuclease bound to carboxymethyl cellulose.