



УДК 547.963.32.07

СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

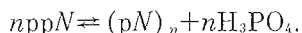
XXIX *. ПОЛИНУКЛЕОТИДФОСФОРИЛАЗА В СИНТЕЗЕ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ

Женодарова С. М., Елягина В. П., Смолянинова О. А.

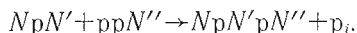
Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пущино

Полинуклеотидфосфориллаза *Micrococcus luteus* может быть эффективно использована для синтеза тринуклеозиддифосфатов с 3'-концевым пиримидиновым нуклеотидом. Фермент осуществляет присоединение одного нуклеотидного остатка к динуклеозидмонофосфату с максимальным выходом, если начальная концентрация нуклеозид-5'-дифосфата составляет 5–10 мМ, концентрация динуклеозидмонофосфата (акцептор фосфата) — 10–20 мМ, время инкубирования субстратов с ферментом не превышает 1 ч для ррU и 2 ч для ррС при 37°С. Повышение температуры до 50°С увеличивает расход акцептора фосфата за счет образования более длинных олигонуклеотидов и их последующего фосфороллиза. Понижение температуры значительно уменьшает выход тринуклеозиддифосфата, но количество более длинных олигонуклеотидов при этом не снижается. Выход тринуклеозиддифосфатов зависит от структуры нуклеозид-5'-дифосфата и обоих нуклеотидных остатков в акцепторе фосфата. Структурные требования фермента, обеспечивающие более активное присоединение пиримидиновых нуклеотидных остатков, не изменяются при повышении температуры. В идеальном случае оптимальные условия следует подбирать для каждой пары субстратов. Синтезировано большое число тринуклеозиддифосфатов и ряд тетрапентануклеозидтрифосфатов. Полинуклеотидфосфориллаза *E. coli*, как и фермент *M. luteus*, катализирует одиночное присоединение нуклеотида к динуклеозидмонофосфату, причем и в этом случае с большей эффективностью присоединяются пиримидиновые нуклеотиды. Выход тринуклеозиддифосфата сильно зависит от концентрации фермента, а величина концентрации, необходимая для эффективного присоединения, определяется длиной акцептора фосфата.

Полинуклеотидфосфориллаза — фермент, широко распространенный в природе [2]. Наиболее известная функция этого фермента — образование полинуклеотидов из рибонуклеозид-5'-дифосфатов и обратная реакция — фосфороллиз полирибонуклеотидов:



Зингер и др. [3] показали, что при определенных условиях ПН-фосфориллаза может присоединять один или более нуклеотидных остатков к олигонуклеотидному праймеру. Минимальным праймером является динуклеозидмонофосфат:



Несмотря на то что для ступенчатого синтеза олигорибонуклеотидов этот фермент применяется более 10 лет [4–10], в большинстве случаев экспериментальные данные, относящиеся к синтезу, в этих работах

* Сообщение XXVIII см. [1]. Сокращения: ПН-фосфориллаза — полинуклеотидфосфориллаза, остальные сокращения соответствуют общепринятым.

почти не приводятся. С другой стороны, свойства препаратов ПН-фосфо-риказы, в том числе и способность катализировать ограниченное присоеди-нение нуклеотидных остатков к олигонуклеотидному праймеру, в значи-тельной степени определяются способом выделения фермента [11, 12].

Ранее в нашей лаборатории были найдены условия для проведения ступенчатого синтеза олигорибонуклеотидов с участием коммерческого препарата ПН-фосфоорилазы *Micrococcus luteus* [13]. В настоящей работе мы продолжили изучение свойств этого препарата: поиск условий, наиболее благоприятных для последовательного присоединения нуклеотидных остатков, и определение структурных требований фермента к субстратам, а также провели сравнение с ПН-фосфоорилазой *E. coli*.

Определение оптимальных условий для одиночного присоединения нуклеотидных остатков к динуклеозидмонофосфату в присутствии ПН-фосфоорилазы *M. luteus* связано с решением следующих задач: 1) выбор оптимальных начальных концентраций субстратов и фермента; 2) опре-деление продолжительности инкубирования субстратов с ферментом; 3) выбор оптимальной температуры. Основным критерием при подборе этих параметров, естественно, служил выход тринуклеозиддифосфата. В связи с тем что наряду с тринуклеозиддифосфатом реакционная смесь может содержать некоторое количество более длинных олигорибонуклеотидов (к динуклеозидмонофосфату может присоединяться и более одного нуклео-тидного остатка), другим существенным критерием является уменьшение образования тетра-, пента- и т. д. олигонуклеотидов.

Для изучения зависимости выхода тринуклеозиддифосфата от концен-трации исходных веществ и полинуклеотидфосфоорилазы мы использовали в качестве модельной системы синтез GrCrU из GrC (акцептор фосфата) и ppU (донор фосфата) при постоянном отношении концентраций послед-них 2 : 1 (табл. 1). С учетом данных Ледера [5] и результатов, получен-ных нами ранее [13], начальная концентрация динуклеозидмонофосфата составляла 0,01 М. Ее повышение до 0,02 М практически не влияет на вы-ход GrCrU, а уменьшение вдвое снижает выход. При проведении синтеза можно использовать ПН-фосфоорилазу в концентрации 3 мг/мл*.

Зависимость выхода тринуклеозиддифосфата от отношения [акцептор]/[донор] и продолжительности инкубирования с ферментом мы изучали на примере синтеза GrUpU из GrU и ppU (табл. 2). Снижение вдвое кон-центрации 5'-дифосфата мало влияет на выход GrUpU. Оптимальное вре-мя инкубирования составляет 1—2 ч. При более продолжительном инку-бировании выход падает: по-видимому, фосфоролиз начинает преобладать над синтезом. При уменьшении времени инкубирования выход тринуклео-зиддифосфата также снижается.

Наряду с тринуклеозиддифосфатом реакционные смеси в обоих слу-чаях содержали некоторое количество тетра- и пентануклеозидтрифосфата и более длинных (пента- и гекса-) олигонуклеотидов. При эквимолекулярном от-ношении начальных концентраций субстратов и непродолжительном инку-бировании (до 0,5 ч) реакционная смесь содержит примерно одинаковые количества GrUpU и GrUpUpU. Содержание последнего снижается при одновременном уменьшении концентрации донора фосфата и времени ин-кубирования. В отличие от синтеза GrCrU присоединение остатка уриди-ловой кислоты к GrU-праймеру в присутствии ПН-фосфоорилазы *M. luteus* протекает более эффективно. С другой стороны, обращает на себя внима-ние тот факт, что в случае синтеза ArUpC [14] влияние изменений в соот-ношении концентраций донора и акцептора носит иной характер: выход ArUpC существенно увеличивается (от 3 до 12%) при снижении концен-трации донора фосфата от 0,01 до 0,005 М, т. е. при увеличении вдвое от-ношения [акцептор]/[донор]. Иными словами, зависимость выхода три-

* Характеристика ферментного препарата приведена в «Экспериментальной части».

Таблица 1

Зависимость выхода ГрСрU от начальной концентрации субстратов, ПН-фосфорилазы *M. luteus* и времени

[ГрС] *, М	ПН-фосфори- лаза, мг/мл	Время, ч	Выход, %		Регенери- ровано ГрС, %
			ГрСрU	ГрСрUрU	
0,01	3	1	8,2 (12,5) **	3,2	36,8
0,01	3	2	10,4 (13,9)	4,0	28,0
0,01	6	2	9,0 (11,0)	3,0	24,0
0,02	6	1	9,2 (12,2)	3,4	28,4
0,02	6	2	8,5 (10,6)	3,2	25,4
0,005	6	2	4,8 (5,3)	2,4	10,0

* Здесь и далее, где не указано специально, соотношение акцептора и донора фосфата составляет 2 моль/моль.

** Здесь и далее в скобках приведен выход в расчете на израсходованный акцептор фосфата.

Таблица 2

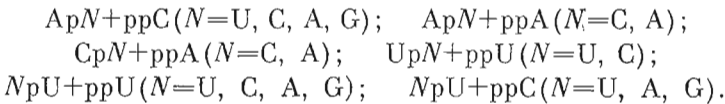
Зависимость выхода ГрUрU от отношения [акцептор]/[донор] и времени

[Акцептор]/ [Донор], моль/моль	Время, ч	Выход, %		Регенери- ровано ГрU, %
		ГрUрU	ГрUрUрU	
1 : 1	0,5	7,4 (15,0) *	5,9 (12,0)	50,7
1 : 1	1	14,2 (19,0)	2,1 (2,8)	25,3
1 : 1	2	14,0 (23,0)	3,5 (5,7)	39,0
1 : 1	3	5,5 (10,0)	1,5 (2,7)	45,0
2 : 1	2	11,3 (22,5)	5,0 (10,0)	50,0
2 : 1	0,5	11,0 (31,0)	2,1 (6,0)	64,5
2 : 1	0,25	8,6 (17,3)	Следы	50,0
4 : 1	0,5	2,6 (8,8)	»	65,0

нуклеозиддифосфата от начальной концентрации субстратов в значительной степени определяется их структурой.

Влияние структуры донора фосфата на результаты синтеза мы изучили на реакции типа $\text{GrU} + \text{ppN}$ (табл. 3). Наиболее активен 5'-дифосфат уридина, наименьший выход получен с гуанозин-5'-дифосфатом.

Зависимость выхода тринуклеозиддифосфата от структуры 3'- и 5'-концевого нуклеозида акцептора фосфата мы пытались выяснить в следующих сериях синтезов:



Полученные результаты приведены в табл. 4, 5.

Наибольшие выходы тринуклеозиддифосфатов достигаются в случае пиримидиновых 5'-дифосфатов, особенно уридин-5'-дифосфата. По-видимому, это определяется субстратной специфичностью фермента и совпадает с наблюдениями Фарбера и Чаргафа, показавших, что при полимеризации смеси ppC и ppA ПН-фосфорилаза *M. luteus* включает в полинуклеотидную цепь преимущественно ppC [15]. В общих чертах это подтверждается данными Ледера и др. [4]. Структурные требования ПН-фосфорилазы *E. coli* к донору фосфата, по данным работы [16], прямо противоположны: выходы олигонуклеотидов в случае пуриновых нуклеозид-5'-дифосфатов почти вдвое выше, чем для пиримидиновых (70 и 40% соответственно).

Определенной закономерности влияния 3'-концевого нуклеозида акцеп-

Таблица 3

Зависимость выхода тринуклеозиддифосфатов типа GrUpN от структуры донора фосфата при синтезе с участием ПН-фосфорилазы *M. luteus*

Донор фосфата	Выход, %		Регенерировано GrU, %
	GrUpN	GrUpNpN	
ppU	14,0 (23,0)	4,0 (6,5)	39,1
ppC	5,5 (11,0)	2,4 (4,8)	50,0
ppA	1,8 (5,3)	—	66,0
ppG	1,0 (2,9)	—	65,5

Таблица 4

Влияние 3'-концевого нуклеозида акцептора фосфата на синтез тринуклеозиддифосфатов с ПН-фосфорилазой *M. luteus*

Акцептор фосфата	Донор фосфата	Выход тринуклеозиддифосфата, %	Регенерировано акцептора, %
ApU	ppC	8,0 (23,0) [6,0] *	65
ApC	ppC	8,0 (10,0)	20
ApA	ppC	3,8 (7,0) [6,0]	46
ApG	ppC	10,0 (14,2) [21,0]	30
ApC	ppA	3,0 (5,2)	42
ApA	ppA	4,0 (6,0)	33
SpC	ppA	2,7	—
SpA	ppA	3,3 (4,6)	28
UpU	ppU	8,6 (16,5)	48
UpC	ppU	9,4 (17,1)	45

* В квадратных скобках указаны выходы, полученные в работе [4].

Таблица 5

Влияние 5'-концевого нуклеозида акцептора фосфата на синтез тринуклеозиддифосфатов с ПН-фосфорилазой *M. luteus*

Акцептор фосфата	Донор фосфата	Выход тринуклеозиддифосфата, %	Регенерировано акцептора, %
UpU	ppU	8,6 (16,5)	48,0
SpU	ppU	7,4 (11,2)	34,0
ApU	ppU	11,4 (22,9) [15,0] *	50,0
GrU	ppU	14,0 (23,0)	39,1
UpU	ppC	3,7 (13,0)	72,0
ApU	ppC	8,0 (23,0) [6,0]	65,0
GrU	ppC	5,5 [11,0]	50,0

* В квадратных скобках указаны выходы, полученные в работе [4].

тора на выход выявить не удалось. Что же касается 5'-нуклеозидного остатка, то более высокие выходы тринуклеозиддифосфатов были получены, когда на 5'-конце акцептора находился пуриновый радикал. Расхождения в выходах, полученных нами и в работе [4] (см. табл. 4, 5), следует объяснить зависимостью свойств фермента от способа его выделения и очистки [11, 12].

Низкие выходы тринуклеозиддифосфатов в случае использования пуриновых нуклеозид-5'-дифосфатов потребовали изучения зависимости выхода тринуклеозиддифосфата от продолжительности инкубирования субстратов с ферментом на примере синтезов $UpCrA$ и $CpCrA$ (см. табл. 6). Выход тринуклеозиддифосфатов не превышал 3–5%, но полученные результаты показали, что при одном и том же доворе фосфата в зависимости от структуры акцептора требуется разное время инкубирования для достижения одинакового выхода, т. е. в идеальном случае, используя ПН-фосфорилазу *M. luteus* для ограниченного присоединения нуклеотидных остатков к олигонуклеотидному праймеру, оптимальные условия следует подбирать для каждой пары субстратов. Это соображение подтверждается целым рядом других примеров. В частности, при проведении синтеза $ApUpU$ в «стандартных» условиях (см. табл. 5) выход тринуклеозиддифосфата составлял 11,4% в расчете на взятый и 22,9% на израсходованный акцептор фосфата. Увеличение концентрации ПН-фосфорилазы и уменьшение продолжительности инкубирования субстратов с ферментом позволило получить $ApUpU$ с более высоким выходом (табл. 7). Присоединение остатка уридилевой кислоты к ApU -праймеру, катализируемое ПН-фосфорилазой *M. luteus*, протекает примерно с такой же или даже несколько более высокой эффективностью, что и к GpU , но в иных условиях.

Влияние температуры на реакцию одиночного присоединения нуклеотида к олигонуклеотиду-акцептору до сих пор не изучалось. Как правило, синтез олигонуклеотидов с участием полинуклеотидфосфорилазы проводят при 37°С — температуре, при которой исследовались другие реакции, катализируемые этим ферментом: полимеризация нуклеозид-5'-дифосфатов и фосфороллиз полинуклеотидов. Однако из литературы [1] известно, что температурный оптимум для полимеризации или фосфороллиза меняется в зависимости от структуры субстрата: например, в случае ПН-фосфорилазы *M. luteus* он составляет 50°С для ppA и 36°С для ppU [17].

Так как синтез $GpUpU$ из GpU и ppU в присутствии ПН-фосфорилазы *M. luteus* представляет собой удобную модель для изучения влияния различных факторов на выход тринуклеозиддифосфата ($GpUpU$ образуется с хорошим выходом и легко выделяется из реакционной смеси), мы изучили влияние температуры на выход тринуклеозиддифосфата на примере этого синтеза (табл. 8). Повышение температуры до 50°С не повышает выход тринуклеозиддифосфата, но увеличивает расход акцептора фосфата за счет образования более длинных олигонуклеотидов и их последующего фосфороллиза. Понижение температуры до ~0°С значительно уменьшает выход $GpUpU$, но количество более длинных олигонуклеотидов при этом не снижается.

Так как оптимальная температура полимеризации ppA в присутствии ПН-фосфорилазы *M. luteus* составляет 50°С [17], мы провели синтез $UpCrA$ при этой температуре (табл. 9). Сравнение полученных результатов с данными, относящимися к синтезу при 37°С, показывает, что и в случае ограниченного присоединения pA повышение температуры не увеличивает выход тринуклеозиддифосфата, т. е. структурные требования фермента не изменяются при повышении температуры.

Следует подчеркнуть, что при прочих равных условиях для пиримидиновых доноров фосфата характерно появление в реакционной смеси наряду с тринуклеозиддифосфатом довольно заметных количеств более длинных олигонуклеотидов, в то время как при использовании пуриновых нуклеозид-5'-дифосфатов они или не образуются, или быстро подвергаются фосфороллизу.

Преимущество синтеза тринуклеозиддифосфатов с участием ПН-фосфорилазы состоит в том, что динуклеозидмонофосфат, используемый как один из субстратов, не подвергается фосфороллизу, может быть регенерирован и вновь использован для синтеза. Однако еще в работе [13] мы обратили

Таблица 6

Зависимость выхода УрСрА и СрСрА от продолжительности инкубирования с ПН-фосфоорилазой *M. luteus*

Анцептор фосфата	Донор фосфата	мин				
		10	30	60	120	180
УрС	ррА	3,3	5,0	2,9	2,7	—
СрС	ррА	—	—	2,5 (7)	2,7 (5)	5,2 (12)

Таблица 7

Зависимость выхода АрУрУ от времени и концентрации ПН-фосфоорилазы *M. luteus*

[АрУ] *, М	Фермент, мг/мл	Время, ч	Выход, %		Регенериро- вано АрУ, %
			АрУрУ	АрУрУрУ	
0,01	6	2	11,4 (22,9)	—	50,0
0,01	12	1	12,7 (25,8)	3,3	52,0
0,01	12	0,5	15,5 (38,0)	4,7	60,0
0,006	12	0,5	15,3 (38,0)	4,8	60,7

Таблица 8

Влияние температуры на выход ГрУрУ при синтезе с участием ПН-фосфоорилазы *M. luteus* в концентрации 6 мг/мл

Температура, °С	Время, ч	Выход, %			Регенериро- вано ГрУ, %
		ГрУрУ	ГрУрУрУ	$N_{n>4}$	
37	0,5	11 (31)	2 (6)	1 (2)	65
50	0,25	4 (19)	1 (7)	1 (4)	80
50	0,5	7 (16)	2 (4)	2 (4)	56
50	1	11 (23)	3 (6)	1 (3)	51
0	3	3 (5)	2 (3)	Следы	48
0	6	5 (8)	2 (4)	1 (1,4)	48
0	6 *	7 (12)	3 (6)	2 (5)	46
0	22	8 (12)	3 (5)	6 (9)	36

* Концентрация фермента 12 мг/мл.

Таблица 9

Синтез УрСрА при 50° С

Время, мин	$\frac{[УрС]}{[ррА]}$	Выход УрСрА, %	Регенери- ровано УрС, %	Время, мин	$\frac{[УрС]}{[ррА]}$	Выход УрСрА, %	Регенери- ровано УрС, %
15	2 : 1	1,8	70	120	2 : 1	0,8	12
15	1 : 1	2,2	65	120 *	2 : 1	1,6	22

* При 37° С.

внимание на то, что при инкубировании субстратов с ферментом реакционная смесь кроме исходных веществ и образующихся из них олигонуклеотидов содержит то или иное количество нуклеозида и 5'-монофосфата, структура которых соответствует расщеплению исходного дануклеозиднофосфата по схеме $NpN' \rightarrow N + pN'$. Структура этих продуктов подтверждалась хроматографией на бумаге, пропитанной 0,5% раствором бората

аммония и УФ-спектрофотометрией. Появление таких продуктов нельзя объяснить щелочным гидролизом или рибонуклеазными примесями. Контрольные опыты по инкубированию динуклеозидмонофосфатов с ПН-фосфорилазой в отсутствие донора фосфата показали, что динуклеозидмонофосфаты устойчивы к действию фермента и препарат не содержит никаких фосфодиэстеразных примесей. По-видимому, сначала идет удлинение акцептора, а образующиеся олигонуклеотиды частично подвергаются фосфоролиту, который может проходить «глубже», чем для томоолигонуклеотидов [18]. Если это справедливо, то обнаруживаемый в смеси 5'-монофосфат, не соответствующий исходному 5'-дифосфату, можно рассматривать как продукт гидролиза дифосфата, образовавшегося в результате такого фосфоролита.

Как следует из табл. 10, «расщепление» динуклеозидмонофосфата сильно зависит как от его состава, так и от структуры присоединяемых к нему нуклеотидных остатков. Четкой закономерности здесь выявить не удалось. Так как исходный динуклеозидмонофосфат не только расходуется на образование желаемого тринуклеозиддифосфата, но и теряется вследствие отмеченного расщепления, при планировании синтезов с участием полинуклеотидфосфорилазы следует учитывать эти потери.

Кроме тринуклеозиддифосфатов с помощью полинуклеотидфосфорилазы *M. luteus* можно синтезировать тетрануклеозидтрифосфаты и более длинные олигорибонуклеотиды. Существуют по меньшей мере две возможности, позволяющие получать тетрануклеозидтрифосфаты в присутствии ПН-фосфорилазы: 1) ограниченное присоединение нуклеотидного остатка к тринуклеозиддифосфату, 2) изменение отношения концентраций донора фосфата и динуклеозидмонофосфата-акцептора и времени инкубирования, что увеличивает долю более длинных олигонуклеотидов в реакционной смеси. Возможность ограниченного присоединения нуклеотидных остатков к более длинному, чем динуклеозидмонофосфат, акцептору была показана на примере синтеза $GpUpUpC$ и $GpTpUpC$ [19]. В настоящей работе мы применили ПН-фосфорилазу *M. luteus* для синтеза тетрануклеозидтрифосфатов в соответствии со вторым вариантом. Олигонуклеотиды $ArArArA$, $ArCrArA$ и $CrArArA$ были приготовлены из ppA и ArA , ArC , CrA соответственно, при более высоком отношении ppA /динуклеозидмонофосфат, чем это рекомендуется для присоединения только одного нуклеотидного остатка (1,5 вместо 0,5) (табл. 11). Выходы тетрануклеозидтрифосфатов составляют 4—5% на израсходованный акцептор фосфата, что связано в первую очередь с субстратной специфичностью фермента. Несмотря на невысокие выходы, во многих случаях этот путь синтеза тетрануклеозидтрифосфатов может быть использован, так как зачастую для решения той или иной задачи требуются небольшие количества олигонуклеотида. Полученные тетрануклеозидтрифосфаты, в частности, были использованы при изучении регуляции процессов транскрипции [20], а также для идентификации тРНК, выделенных из семян *Lupinus luteus* [21].

Для ступенчатого синтеза олигорибонуклеотидов мы применили также ПН-фосфорилазу *E. coli*. Модельной системой служил синтез $GpUpU$. Оказалось, что выход $GpUpU$ сильно зависит от концентрации фермента (табл. 12). Полинуклеотидфосфорилаза *E. coli*, как и фермент *M. luteus*, весьма чувствительна к структуре акцептора фосфата (табл. 13): тринуклеозиддифосфаты $ArCrU$ и $UpCrU$ образуются с более низкими выходами, чем $GpUpU$, причем и в случае ПН-фосфорилазы *E. coli* более высокий выход был получен для акцептора, имеющего пуриновый нуклеозид на 5'-конце.

Несколько неожиданными оказались результаты синтезов $UpCrA$, $ArCrA$ и $GpCrA$: одиночное присоединение остатка адениловой кислоты к динуклеозидмонофосфату в присутствии ПН-фосфорилазы *E. coli* проходит столь же малоэффективно, как и в присутствии фермента из *M. luteus* (ср. табл. 6 и 13). По-видимому, расхождение наших результатов с дан-

Образование нуклеозида, соответствующего 5'-концевому нуклеозиду акцептора фосфата, в составе реакционной смеси при синтезе тринуклеозиддифосфатов с участием ПН-фосфорилазы *M. luteus*

NpN'pN''	Выход, %	Нуклеозид		NpN'pN''	Выход, %	Нуклеозид	
		N	Количество, условные ед. *			N	Количество, условные ед. *
GpUpU	14,0 (23,0)	G	1	ApUpC	10,0 (23,0)	A	0,6
Gpbr ⁶ UpU	10,8 (32,0)	G	0,8	UpUpG	1,8 (5,0)	U	3,3
GpCpU	12,0 (52,0)	G	5,4	UpCpA	2,2 (6,0)	U	3,6
GpUpC	6,6 (11,0)	G	1,5	UpCpG	1,8 (3,0)	U	8,6
GpUpA	1,8 (5,3)	G	1	CpUpC	3,6 (7,2)	C	7,4
ApUpU	13,0 (22,9)	A	1,3				

* Количество гуанозина в мкмоль, выделяемого из стандартной реакционной смеси при получении GpUpU (см. «Экспериментальную часть»), принято за единицу.

Таблица 11

Синтез тетрануклеозидтрифосфатов при участии ПН-фосфорилазы *M. luteus*

Тетрануклеозидтрифосфат	Объем реакционной смеси, млл	Состав реакционной смеси, мкмоль		Выделено, мкмоль		
		донор	акцептор	тринуклеотида	тетрануклеотида	акцептора
ApApApA	1500	22,5	15,0	0,62	0,18	10,0
ApCpApA	700	11,0	7,0	0,46	0,2	2,9
CpApApA	900	13,5	9,0	0,19	0,1	4,0

Таблица 12

Синтез GpUpU при участии ПН-фосфорилазы *E. coli*

ПН-фосфориллаза, ед. акт./мл	Время, ч	Выход, %		Регенерировано GpU, %
		GpUpU	GpUpUpU	
12	2	2,0 (13,5)	1,2	86,6
48	2	6,6 (15,5)	2,0	60,0
48	4	10,2 (25,5)	3,2	60,0
15 *	2	22,7 (60,0)	6,0	62,5

* Синтез проведен с препаратом ПН-фосфорилазы (СКТВ БАВ), за единицу активности которой принимали количество фермента, превращающее 1 мкмоль ppA в полинуклеотид за 20 мин при оптимальных условиях.

Таблица 13

Синтез тринуклеозиддифосфатов при участии ПН-фосфорилазы *E. coli*

Тринуклеозиддифосфат	Время, ч	Выход, %		Регенерировано акцептора, %
		тринуклеотид	тетрануклеотид	
ApCpU	2	3,3 (11,3)	2,6	76,0
»	3	8,6 (25,2)	5,6	65,0
UpCpU	3	1,4 (16,3)	1,5	91,5
»	5	1,2	1,2	—
UpCpA	3	Следы	—	84,6
ApCpA	2	0,5 (8,6)	0,6	94,0
GpCpA	2	1,0	—	—

Характеристики олигорибонуклеотидов

Олиго- нуклеотид	R в системе В *	U [*] Отн	Ферментативный гидролиз		
			рибонуклеаза	продукты	отношение
GpUpU	0,81	0,77	Неспец. <i>P. brev.</i> Панкреатич.	Gp, Up, U	1 : 0,9 : 0,9
GpUpA	0,81	0,81		GpUp, A	1 : 1,1
GpUpC	0,65	0,84	»	GpUp, C	1 : 0,8
GpUpG	0,78	0,75	»	GpUp, G	1 : 1
GpCpU	0,73	0,79	»	GpCp, U	1 : 1
GpCpA	0,96	0,75	»	GpCp, A	0,9 : 1
ApUpU	0,74	0,89	»	ApUp, U	1 : 1,1
ApUpC	0,74	0,76	»	ApUp, C	1 : 1,1
ApCpA	0,69	0,72	»	ApCp, A	1,1 : 1
ApCpC	0,74	0,63	»	ApCp, C	1,1 : 1
ApCpU	0,81	0,76	»	ApCp, U	0,9 : 1
ApGpC	0,74	0,61	T ₁	ApGp, C	1 : 1
ApApC	0,83	0,69	Неспец. <i>P. brev.</i>	Ap, C	2 : 1
ApApA	0,84	0,70	»	Ap, A	1,9 : 1
CpUpU	0,76	0,86	Панкреатич.	Cp+Up, U	1 : 1,1
CpUpC	0,82	0,77		»	Cp+Up, C
CpApA	0,69	0,70	»	Cp, ApA	1 : 1,2
UpUpU	0,95	0,86	»	Up, U	2 : 1
UpCpU	0,80	0,86	»	Up+Cp, U	1 : 1
ApApApA	0,56	—	Неспец. <i>P. brev.</i>	Ap, A	3 : 1
CpApApA	0,63	—	»	Cp+Ap, A	1 : 1,2
ApCpApA	0,65	—	Панкреатич.	ApCp, ApA	1 : 1

* Определены относительно 3'-концевого 5'-моонуклеотида.

Таблица 15

УФ-спектры олигорибонуклеотидов (H₂O, pH 7)

Олиго- нуклеотид	λ _{макс}	λ _{мин}	D ₂₅₀	D ₂₇₀	D ₂₈₀	D ₂₉₀	Олиго- нуклеотид	λ _{макс}	λ _{мин}	D ₂₅₀	D ₂₇₀	D ₂₈₀	D ₂₉₀
			$\frac{D_{250}}{D_{260}}$	$\frac{D_{270}}{D_{260}}$	$\frac{D_{280}}{D_{260}}$	$\frac{D_{290}}{D_{260}}$				$\frac{D_{250}}{D_{260}}$	$\frac{D_{270}}{D_{260}}$	$\frac{D_{280}}{D_{260}}$	$\frac{D_{290}}{D_{260}}$
GpUpU	259	231	0,86	0,85	0,50	0,15	ApGpC	259	230	0,96	0,85	0,58	0,31
GpUpA	259	230	0,88	0,84	0,57	0,25	ApApC	260	233	0,84	0,81	0,43	0,12
GpUpC	256	234	1,02	0,94	0,85	0,58	ApApA	259	232	0,81	0,78	0,37	0,12
GpUpG	257	231	0,95	0,82	0,62	0,35	CpUpU	264	232	0,78	0,91	0,63	0,28
GpCpU	258	226	0,85	0,81	0,68	0,30	CpUpC	269	247	0,88	1,08	0,88	0,51
GpCpA	260	236	0,92	0,89	0,61	0,32	CpApA	262	235	0,83	0,88	0,56	0,26
ApUpU	259	230	0,78	0,77	0,30	0,04	UpUpU	262	231	0,76	0,86	0,43	0,08
ApUpC	269	232	0,86	0,88	0,47	0,18	UpCpU	264	232	0,77	0,98	0,66	0,28
ApCpA	263	233	0,78	0,88	0,51	0,21	ApApApA	259	232	0,81	0,78	0,37	0,12
ApCpC	263	239	0,85	0,92	0,64	0,32	CpApApA	260	233	0,81	0,83	0,50	0,10
ApCpU	264	236	0,80	0,92	0,55	0,24	ApCpApA	260	231	0,76	0,80	0,31	0,06

ными, приведенными в работе [16], можно объяснить тем, что при одном и том же доноре фосфата поведение фермента по отношению к праймерам разной длины (динуклеозидмонофосфаты в нашем случае и тринуклеозиддифосфаты в работе [16]) не одинаково. Действительно, мы установили, что присоединение остатка цитидиловой кислоты к динуклеозидмонофосфату ApU и к тринуклеозиддифосфату ApUpC в присутствии ПН-фосфоорилазы *E. coli* при концентрации фермента 0,6 ед. акт./мл синтез ApUpC почти не идет (~0,5%), тогда как ApUpCpC образуется с выходом 15% в расчете на взятый и 26% — на израсходованный акцептор.

Олигонуклеотиды выделяли, используя хроматографию и электрофорез на бумаге, и анализировали обычным образом. Характеристики синтезированных олигонуклеотидов приведены в табл. 14, 15.

Экспериментальная часть

В работе использовали ПН-фосфорилазу *M. luteus* (КФ 2.7.7.8), рибонуклеазу T_1 (КФ 2.7.7.26) (Calbiochem, США), ПН-фосфорилазу *E. coli* (КФ 2.7.7.8) (СКТБ БАВ, Новосибирск), панкреатическую рибонуклеазу (КФ 2.7.7.16), Na-соли UDP, ADP, GDP (Reanal, Венгрия), Li-соль CDP (Serva, ФРГ). Перед употреблением ADP и GDP очищали БХ в системе В, UDP и CDP применяли без дополнительной очистки. Динуклеозидмонофосфаты ApG и CpA были получены от фирмы Calbiochem (США), остальные синтезированы в нашей лаборатории с применением рибонуклеаз различной специфичности [13, 22]. Неспецифическая рибонуклеаза *Penicillium brevicompactum* (КФ 2.7.7.17) была выделена С. И. Безбородовой и соотр. (ИБФМ АН СССР).

Хроматографию и электрофорез проводили на бумаге FN-1 и FN-3 (Filtrak, ГДР). Для хроматографии использовали следующие системы растворителей: А — этанол — конц. аммиак — вода (65:10:25); Б — этанол — 1 М ацетат аммония (7:3); В — этанол — пропанол-2 — конц. аммиак — вода (60:5:10:25). Вертикальный электрофорез проводили 2 ч при напряжении 20 В/см в 0,05 М растворе бикарбоната триэтиламония (рН 7,6).

УФ-спектры снимали на приборе «Specord» (ГДР) с автоматической записью, остальные измерения проводили на спектрофотометре СФ-26.

Гидролиз олигонуклеотидов и анализ гидролизата проводили как описано в работе [13].

Синтез олигорибонуклеотидов. Раствор 5 мкмоль динуклеозидмонофосфата, 5 мкмоль 5'-дифосфата ppU или ppG (2,5 мкмоль в случае ppC или ppA) и 3 мг (0,02 ед. акт./мг) ПН-фосфорилазы *M. luteus* в 0,5 мл 0,05 М трис-HCl-буфера, рН 9,0, содержащего 0,01 М MgCl₂ и 0,05 мМ EDTA, инкубировали при 37°С. При использовании ПН-фосфорилазы *E. coli* концентрация фермента составляла 48 ед. акт./мл. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль ppA из poly(A) в течение 15 мин при 37°С и рН 8,3 (*M. luteus*), или количество фермента, способное превращать 1 мкмоль ppA в poly(A) за 60 мин при 37°С и рН 8,0 (*E. coli*). Те случаи, когда начальные концентрации субстратов или фермента были отличны от указанных, отмечены в тексте. По истечении определенного времени реакционную смесь наносили на бумагу и хроматографировали нисходящим способом в системе А в течение 15–20 ч. Полосы, соответствующие различным компонентам реакционной смеси, элюировали водой и анализировали с помощью электрофореза и хроматографии в системе Б, ферментативного гидролиза и УФ-спектрофотометрии. Синтез тетра- и трифосфатов ApApApA, ApCpApA и CpApApA был проведен в аналогичных условиях при отношении [ppA]/[динуклеозидмонофосфат] 1,5:1. Как правило, при препаративных синтезах компоненты реакционной смеси после первой хроматографии в системе В очищали электрофорезом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Женодарова С. М., Соболева И. А., Хабарова М. И., Ежов В. А., Приходько А. Г. (1980) Биоорганическая химия, 6, 736–742.
2. Godefrou-Colbern T., Grunberg-Manago M. (1972) in: Enzymes (3 Ed., Boyer P. D., ed.), vol. 7, pp. 533–574.
3. Singer M. F., Heppel L. A., Hilme R. J. (1960) J. Biol. Chem., 235, 738–749.
4. Leder Ph., Singer M. F., Brimacombe R. L. C. (1965) Biochemistry, 4, 1561–1567.
5. Leder Ph. (1968) in: Methods in Enzymology (Grossman L., Moldave K., eds), vol. XIIB, pp. 833–852.
6. Thach R. E. (1966) in: Procedures in Nucleic Acid Research (Cantoni G. L., Davis D. R., eds), pp. 520–534, N. Y.
7. Nirenberg M., Leder Ph., Bernfield M., Brimacombe R., Trupin J., Rottman F., O'Neal C. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 1161–1168.
8. Uhlenbeck O. C., Baller J., Doty P. (1970) Nature, 225, 508–510.

9. Borer P., Uhlenbeck O. C., Dengler B., Tinoco I. (1973) *J. Mol. Biol.*, **80**, 759-771.
10. Pongs O., Reinwald E. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **50**, 357-363.
11. Singer M. (1966) in: *Procedures in Nucleic Acid Res.* (Cantoni G. L., Davis D. R., eds), pp. 245-262, N. Y.
12. Арбузов В. А., Мардашев С. Р., Ребров Л. Б. (1974) *Успехи соврем. биол.*, **78**, 23-56.
13. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Пономарева В. М. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 598-603.
14. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Антонович Е. Г., Манькин А. С., Прокофьев М. А., Загребельный С. Н., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М., Болезнин М. И., Смолянинов В. В. (1980) *Биоорган. химия*, **6**, 1037-1046.
15. Farber F. E., Chargaff E. (1967) *Eur. J. Biochem.*, **2**, 433-441.
16. Breneman F. N., Singer M. F. (1964) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **17**, 401-406.
17. Walker G. C., Uhlenbeck O. C. (1975) *Biochemistry*, **14**, 817-824.
18. Singer M. F. (1958) *J. Biol. Chem.*, **232**, 211-228.
19. Zhenodarova S. M., Klyagina V. P., Smolyaninova O. A., Khabarova M. I., Antonovich E. G., Prokof'ev M. A. (1977) *Nucl. Acids Res.*, **4**, 2099-2107.
20. Паррушев Л. И., Бочарова Т. Н., Хесин Р. Б. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 229-244.
21. Augustyniak H., Pawelkiewicz J. (1978) *Phytochemistry*, **17**, 15-18.
22. Хабарова М. И., Женодарова С. М. (1972) *Молекулярн. биология*, **6**, 682-688.

Поступила в редакцию
28.XI.1979

STEPWISE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES. XXIX. POLYNUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE IN THE OLIGORIBONUCLEOTIDE SYNTHESIS

ZHENODAROVA S. M., KLYAGINA V. P., SMOLYANINOVA O. A.

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

Polynucleotide phosphorylase *Micrococcus luteus* can be effectively used for the synthesis of triribonucleoside diphosphates containing 3'-terminal pyrimidine nucleotide. The enzyme catalyzes the addition of only one nucleotide residue to dinucleoside monophosphate with maximal yield, provided the initial concentrations of a nucleoside 5'-diphosphate and a dinucleoside monophosphate acceptor are 5-10 mM and 10-20 mM respectively, substrates are incubated with the enzyme at 37° C no more than 1 hour for ppU and 2 hours for ppC. The temperature rise to 50° C results in the increase of the phosphate acceptor consumption due to formation of longer oligonucleotides and their following phosphorolysis. The fall of the temperature decreases considerably the trinucleoside diphosphate yield, whereas the amount of longer oligonucleotides is not reduced. The trinucleoside diphosphate yield depends on the structures of nucleoside 5'-diphosphate and of the phosphate acceptor. The structural requirements of the enzyme for more active addition of pyrimidine nucleotide residues are not altered at higher temperature. The optimal conditions may be found for each pair of substrates. Polynucleotide phosphorylase from *E. coli*, similarly to the *M. luteus* enzyme, catalyzes the addition of only one nucleotide residue to a dinucleoside monophosphate, the pyrimidine nucleotides being attached more effectively. The enzyme concentration necessary for the effective addition depends on the phosphate acceptor length.