



УДК 547.963.32.07

## СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

XXXII. СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ РИБОНУКЛЕАЗЫ *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM*, КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННОЙ С КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗОЙ, И ПРЕПАРАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ

Соболева И. А., Хабарова М. И., Женодарова С. М.

Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пущино, Московской обл.

Субстраты, модифицированные в гетероциклической ( $m^1A > p$ ,  $m^6A > p$ ,  $m^1G > p$ ,  $m^7G > p$ ) или углеводной ( $pA > p$ ,  $pG > p$ ,  $aC$ ) частях молекулы, были использованы для изучения субстратной специфичности рибонуклеазы *Penicillium brevicompactum*, ковалентно связанной с СМ-целлюлозой. Установлено, что при иммобилизации требования фермента к структуре субстрата не изменяются. На примере получения АрСр, АрU, АрС показана возможность использования СМ-рибонуклеазы в макромасштабных синтезах.

Ранее нами было описано получение рибонуклеазы *Penicillium brevicompactum*, ковалентно связанной с СМ-целлюлозой [2]. Иммобилизованный фермент оказался стабильным при многократном использовании и не терит активности при продолжительном (более года) хранении. Применяя обычные субстраты, мы показали, что в синтезе динуклеозидмонофосфатов СМ-рибонуклеаза ведет себя подобно исходной рибонуклеазе, за исключением синтеза GrC, для которого рН-оптимум после связывания фермента перемещается из кислой области (4,6) к нейтральным значениям рН.

Следующий этап изучения субстратной специфичности СМ-рибонуклеазы, результаты которого изложены в настоящей работе, был связан с применением модифицированных субстратов. Выбор субстратов, представленных в табл. 1, был определен следующими задачами: во-первых, надо было установить, не изменились ли при иммобилизации структурные требования фермента по отношению к модифицированным субстратам, уже применявшимся для зондирования активного центра исходной рибонуклеазы *P. brevicompactum* [3, 4]; во-вторых, необходимо было выяснить, можно ли использовать рибонуклеазу и ее иммобилизованную форму, в частности, для синтеза олигонуклеотидов, содержащих метилированные производные гуанозина, и, наконец, в-третьих, следовало на конкретных примерах показать возможность получать олигонуклеотиды с помощью этого препарата в макромасштабе.

Проведенная ранее качественная оценка влияния отдельных функциональных групп или отдельных участков молекулы субстрата на синтез межнуклеотидной связи, катализируемый рибонуклеазой *P. brevicompactum*, показала: а) существенную роль во взаимодействии пуринового донора фосфата и фермента играют N1-атом, заместители при C6- и C8-атомах гетероциклического основания; б) способность нуклеозида быть акцептором фосфата в значительной степени определяется наличием в его молекуле фрагмента  $H_2N-C(4)=N(3)$ ; в) фермент неспецифичен относительно 5'-гидроксильного донора и 2', 3'-диольной группировки акцептора фосфата [3, 4].

В связи с этим при решении первой задачи мы использовали 2'3'-циклофосфаты 5'-фосфориладенозина, 5'-фосфорилгуанозина, N<sup>1</sup>-метиладено-

Сообщение XXXI см. [1]. Сокращения: Y – изоцитидин,  $m^7G^*$  – продукт расщепления имидазольного цикла в 7-метилгуанозине, СМ-рибонуклеаза – рибонуклеаза *P. brevicompactum*, ковалентно связанная с СМ-целлюлозой; остальные сокращения соответствуют рекомендациям ИЮПАК.

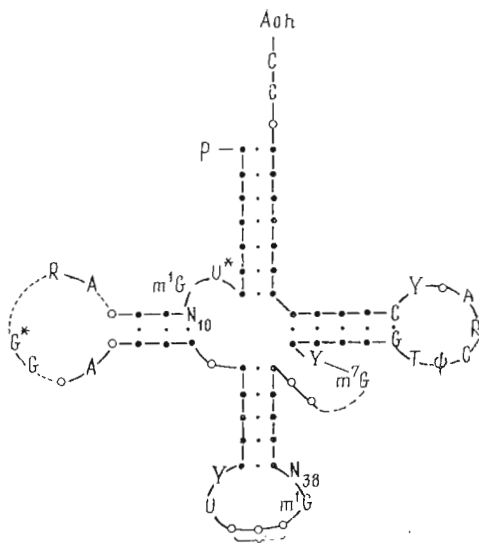


Рис. 1. Обобщенная структура тРНК и фрагменты, содержащие  $m^1G$  и  $m^7G$ :  $m^1G-9$  (20 из 120);  $N^{10}=G$  (9 из 120),  $m^2G$  (11 из 120);  $m^1G-37$  (6 из 120);  $N^{38}=C$  (3 из 120), A (3 из 120);  $m^7G-46$  (58 из 120); Y=U (28 из 120), D (16 из 120) и т. д. Звездочкой отмечены нуклеотиды, которые могут быть модифицированы

зина и  $N^6$ -метиладенозина ( $pA > p$ ,  $pG > p$ ,  $m^1A > p$ ,  $m^6A > p$  — доноры фосфата), цитидин-2'(3)-фосфат, изоцитидин и 1- $\beta$ -D-арабиозилцитидин (Cp, Y, aC — акцепторы фосфата). Оказалось, что принципиальные отличия в структурных требованиях водорастворимого и иммобилизованного фермента отсутствуют и в случае модифицированных субстратов:  $m^1A > p$  не участвует в реакциях, катализируемых СМ-рибонуклеазой, а метилирование аминогруппы при С6-атоме основания снижает выход динуклеозидмонофосфата по сравнению с «нормой» (синтез  $ApC$ ); СМ-рибонуклеаза неспецифична относительно 5'-гидроксила донора и 2',3'-диольной группировки акцептора (синтезы  $pApC$ ,  $ApCp$  и  $ApAc$  идут примерно с одинаковым выходом для обеих форм фермента); замена цитидина на его аналог изоцитидин приводит к низкому выходу соответствующего динуклеозидмонофосфата. Как и в случае немодифицированных субстратов, реакции модифицированных субстратов с участием иммобилизованного фермента, как правило, протекают заметно медленнее. Исключение составляет синтез  $pApC$ , в котором максимальный выход динуклеотида выше и достигается быстрее в случае иммобилизованного фермента, а также гидролиз  $m^6A > p$  и синтез  $m^6ApC$ , отличающиеся более высокими выходами продуктов реакции (табл. 1).

Олигонуклеотиды, содержащие метилированные остатки аденозина и гуанозина, представляют интерес как фрагменты транспортных рибонуклеиновых кислот. Следует иметь в виду, что все синтезированные до сих пор фрагменты тРНК (см., например, [5, 6]) не содержат метилированных по атомам азота гетероцикла оснований. Особый интерес представляет синтез фрагментов, включающих метилированные производные гуанозина. На рис. 1 представлена обобщенная структура транспортной РНК, в которой с учетом данных работы [7] отмечены положения, занимаемые метилированными производными гуанозина: из 120 тРНК, структура которых была установлена к 1978 г., 58 содержат  $N^7$ -метилгуанозин в положении 46. Химический синтез олигонуклеотидов с  $N^7$ -метилгуаниловыми остатками пока не осуществлен, вероятно, в связи с тем, что это производное гуанозина чрезвычайно неустойчиво как в кислых, так и в щелочных средах: в кислых растворах легко разрывается N-гликозидная связь, а в щелочных происходит разрыв имидазольного кольца. Это объясняет трудности, с которыми приходится сталкиваться при химическом синтезе,

Модифицированные субстраты в реакциях, катализируемых рибонуклеазой  
*P. brevicompactum*

Субстраты	Время инкубирования, ч		Продукт реакции	Выход, %	
	исходный фермент	иммобил. фермент		исходный фермент	иммобил. фермент
m <sup>6</sup> A > p	15	15	m <sup>6</sup> Ap	51	79
m <sup>1</sup> A > p	18	18	Реакция не идет		
m <sup>6</sup> A > p+C	133	288	m <sup>6</sup> ApC	8	18
A > p+Cp	12	24	ApCp	31	25
A > p+Y	4,5	23	ApY	4	2
A > p+aC	10	10	ApaC	32	24
m <sup>7</sup> G > p	15	15	m <sup>7</sup> Gp	95	95
m <sup>1</sup> G > p	15	15	m <sup>1</sup> Gp	22	17
m <sup>7</sup> G > p+C	264	264	m <sup>7</sup> GpC	21	11
m <sup>1</sup> G > p+C	168	364	m <sup>1</sup> GpC	4	3
pA > p+C	170	72	pApC	29	43
pG > p+U	—	192	pGpU	—	15

Таблица 2

## Характеристики модифицированных динуклеозидмонофосфатов

Динуклеозид- монофосфат	R * (система)	E *	Ферментативный гидролиз		УФ-спектр в H <sub>2</sub> O, λ <sub>макс</sub> , нм
			Фермент	Продукты, поглощения в УФ (соотношение)	
ApC	1,3 (A)	0,7	Рибонуклеаза	Ap, aC (1 : 0,9)	263 **
ApY	—	0,7	»	Ap, Y (1 : 1)	259
m <sup>6</sup> ApC	1,5 (A)	0,7	»	m <sup>6</sup> Ap, C (1 : 0,9)	268
m <sup>7</sup> GpC	1,4 (B)	0,7	Фосфодиэстераза	m <sup>6</sup> A, pC (1 : 0,8)	
m <sup>1</sup> GpC	1,8 (A)	0,7	Рибонуклеаза	m <sup>7</sup> Gp, C (1 : 1,1)	266
	3,25 (B)		»	m <sup>1</sup> Gp, C (1 : 1)	263
	1,8 (B)		Фосфодиэстераза	m <sup>1</sup> G, pC (1 : 1,1)	
pApC	—	1,1	Рибонуклеаза	pAp, C (1 : 1,1)	263
pGpU	1,5 (A)	—	»	pGp, U (1 : 1)	256

\* Определены относительно Ap для аденилилнуклеотидов или Gp для гуанилилнуклеотидов.

\*\* λ<sub>макс</sub> 267 нм (0,1 М HCl), 263 нм (0,1 М КОН).

и подчеркивает те преимущества, которые может дать ферментативный синтез, если бы удалось найти фермент с подходящей субстратной специфичностью. Гуанилспецифичные рибонуклеазы, исследованные ранее в нашей лаборатории В. И. Гуляевой [8], предъявляют к структуре субстрата довольно жесткие требования: N7-атом и N1-атом гуанинового основания имеют наиболее существенное значение для взаимодействия с ферментом и не должны иметь заместителей.

Мы изучили гидролиз 2',3'-циклофосфатов N<sup>7</sup>-метилгуанозина и N<sup>1</sup>-метилгуанозина, а также их способность быть донорами фосфата в синтезе олигонуклеотидов. Рибонуклеаза как в водорастворимой, так и в иммобилизованной форме расщепляет оба циклофосфата, однако степень их превращения за одно и то же время неодинакова: более эффективно фермент гидролизует N<sup>7</sup>-метилпроизводное (табл. 1). Динуклеозидмонофосфат m<sup>7</sup>GpC также образуется с более высоким выходом, чем m<sup>1</sup>GpC, причем в обоих случаях скорость образования межнуклеотидной связи очень мала. Таким образом, субстратная специфичность рибонуклеазы *P. brevicompactum* позволяет использовать этот фермент для введения метилированных остатков гуанозина в олигонуклеотидную цепь.

Разделение реакционных смесей проводили, как правило, с помощью электрофореза на бумаге в 0,05 М бикарбонате триэтиламмония (рН 7,5) с последующей очисткой динуклеозидмонофосфатов хроматографией на

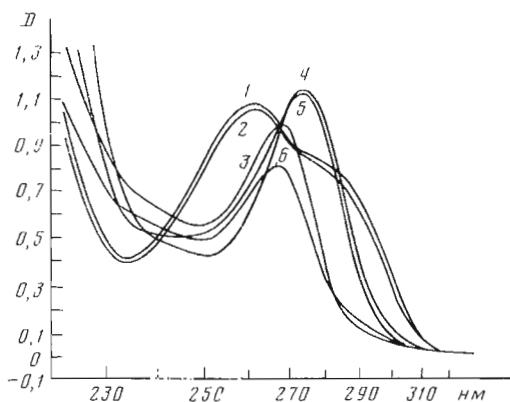


Рис. 2

Рис. 2. УФ-спектр  $m^7G > p$  (1-3) и  $m^7G^* > p$  (4-6): 1, 4 -  $H_2O$ ; 2, 5 - 0,1 н.  $HCl$ ; 3, 6 - 0,1 н.  $KOH$

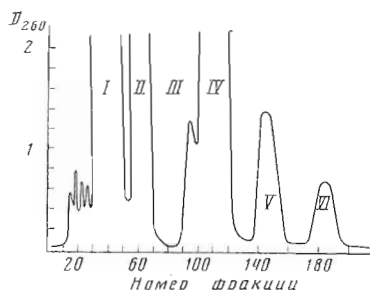


Рис. 3

Рис. 3. Разделение реакционной смеси, полученной при синтезе  $ArCr$ , на колонке (1,6×70 см) с DEAE-целлюлозной в градиенте (0,05-0,2 М) бикарбоната триэтиламмония: пик I -  $A > p + Cr$ , II -  $A > p$ , III -  $ArA > p$ , IV -  $ArCr$ , V -  $ArAr$ , VI -  $ArArAr$ . Объем фракций 9 мл

бумаге (табл. 2). Исключение составляет  $m^7GrC$ . Оказалось, что в ходе электрофореза рН 0,05 М раствора бикарбоната триэтиламмония несколько сдвигается в щелочную область (до 9,6). Поэтому при достаточно длительном (2 ч) контакте  $N^7$ -метилированных производных гуанозина ( $m^7G > p$ ,  $m^7Gr$ ,  $m^7GrC$ ) с буферным раствором происходит расщепление имидазольного кольца в  $N^7$ -метилгуаниновом остатке [9], сопровождающееся изменением УФ-спектра (рис. 2). Соответствующие производные ( $m^7G^* > p$ ,  $m^7G^*p$ ,  $m^7G^*pC$ ) при хроматографировании на бумаге имеют те же значения подвижностей, люминесцируют и являются субстратами рибонуклеазы *P. brevicompactum*; при обработке этим ферментом  $m^7Gr^*C$  в гидролизате обнаружены  $m^7G^*p$  и  $C$ .

В связи с вышеизложенным при получении  $m^7GrC$  реакционную смесь делили, проводя электрофорез на бумаге в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,0). Так как в этом случае динуклеозидмонофосфат плохо отделяется от цитидина, полосу, содержащую  $m^7GrC$  с примесью  $C$ , переносили на хроматограмму, которую проявляли в системе В. Обессоливание  $m^7GrC$  проводили также на бумаге, промывая ее 70% этанолом.

Поскольку СМ-рибонуклеаза оказалась столь же эффективным катализатором синтеза динуклеозидмонофосфатов из нативных и модифицированных субстратов, как и нативный фермент, было важно показать, что иммобилизованный препарат будет успешно «работать» в макромасштабных синтезах. Следующие примеры (табл. 3) убедительно иллюстрируют возможности СМ-рибонуклеазы.

Из 70 мг натриевой соли  $A > p$  и 200 мг цитидиловой кислоты в одну стадию мы получили ~35 мг  $ArCr$ . Реакционную смесь разделяли на колонке с DEAE-целлюлозой в градиенте бикарбоната триэтиламмония

Таблица 3

Макромасштабные синтезы динуклеотидов с СМ-рибонуклеазой

Динуклеотид	Взято, мг		Получено динуклеотида, мг
	$A > p$	акцептора фосфата	
$ArCr$	70	200	35
$ArU$	205	544	45
$ArC$	175	333	74

(рис. 3). Аналогично из 205 мг А>р и 544 мг уридина, используя препарат СМ-рибонуклеазы, уже применявшийся в синтезе, мы получили ~45 мг АрU. Реакционную смесь в этом случае пропускали через колонку с сефадексом G-10, отделяя основную массу уридина и циклофосфата (95% U и 30% А>р удается регенерировать на этой стадии). АрU выделяли из смеси с Ар и небольшим количеством А>р хроматографией на DEAE-сефадексе А-25 в градиенте бикарбоната аммония. Из 175 мг натриевой соли А>р и 333 мг С было получено 74 мг АрС. Для разделения реакционной смеси применяли хроматографию на дауэксе 50 W (Н<sup>+</sup>-форма), используя для элюции линейный градиент аммиака (0—0,2 М), что позволило отделить А>р и Ар от С и АрС, собранных в одном пике. В результате последующих хроматографий смеси АрС и С на DEAE-целлюлозе в градиенте бикарбоната триэтиламмония и обессоливания на сефадексе G-10 получен чистый динуклеозидмонофосфат и регенерировано ~300 мг С.

### Экспериментальная часть

В работе использовали бариевые соли 2'(3')-фосфатов цитидина и гуанозина, натриевую соль 2',3'-циклофосфата аденозина, цитидин (Reanal, Венгрия), фосфодиэстеразу змеиного яда *Crotalus adamantus* (КФ 3.1.4.1, Koch Light, Англия), сефадекс G-10, DEAE-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция), DEAE-целлюлозу Cellex D (Bio Rad, США), дауэкс 50W×2, дауэкс 1×2, *n*-толуолсульфонат *N*-циклогексил-*N'*-β-(4-метилморфолиний)этилкарбодиимида (Serva, ФРГ). Бариевую соль гуанозин-2'(3')-фосфата превращали в свободную кислоту обработкой дауэксом 50W (Н<sup>+</sup>-форма); аммониевую соль цитидин-2'(3')-фосфата получали из бариевой соли обработкой дауэксом 50W (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-форма). 1-Метиладениловую кислоту и 6-метиладениловую кислоту получали по методу [10] и [11] соответственно, 1-метилгуаниловая кислота была приготовлена в соответствии с работой [12], 7-метилгуаниловая — по методу [13]. 2'3'-Циклофосфаты метилированных производных аденозина и гуанозина получали циклизацией соответствующих производных 2'(3')-фосфатов в присутствии водорастворимого карбодиимида как описано в работе [3].

Изоцитидин и 1-β-*D*-арабинозилцитозин были синтезированы Т. А. Масленицковой [4], 5'-фосфорилированные 2',3'-циклофосфаты аденозина и гуанозина получены Е. Г. Антонович [14].

Малоспецифичная рибонуклеаза *P. brevicompactum* была выделена В. А. Ежовым и сотр. (ИБФМ АН СССР), СМ-рибонуклеаза приготовлена нами как описано в работе [2]. За единицу активности принимали количество фермента, расщепляющее при 37° С 1 мкмоль С>р за 1 мин при рН 5,2 (рибонуклеаза *P. brevicompactum*) или А>р за 1 мин при рН 7,0 (СМ-рибонуклеаза).

Хроматографию и электрофорез на бумаге проводили на бумаге FN-1, FN-3 (Filtrak, ГДР). Для нисходящей хроматографии использовали следующие системы растворителей: этанол — пропанол-2 — конц. аммиак — вода, 65 : 5 : 10 : 20 (А); пропанол-2 — конц. аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (Б); этанол — 1 М ацетат аммония, 7 : 3 (В). Вертикальный электрофорез проводили в течение 2 ч при напряжении 20 В/см в 0,05 М бикарбонате триэтиламмония (рН 7,5) или в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,0).

Синтез динуклеозидмонофосфатов и гидролиз нуклеозид-2',3'-циклофосфатов проводили как описано в работе [2].

*Макромасштабные синтезы АрСр, АрU и АрС. а)* К раствору 70,4 мг (200 мкмоль) А>р (Na<sup>+</sup>-соль) и 208 мг (600 мкмоль) цитидиновой кислоты в 0,8 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 7,0) прибавили 10,4 мг СМ-рибонуклеазы (0,25 ед. акт./мг) и оставили смесь при ~0° С. Через 24 ч ферментный препарат отделяли центрифугированием суспензии, отбирая пипеткой надосадочную жидкость и промывая осадок несколько раз водой, охлажденной до 0° С. Супернатант, объединенный с промытыми водами (общий объем ~12 мл), наносили на колонку (1,6×70 см) с DEAE-целлюлозой, уравновешенной 0,05 М бикарбонатом триэтиламмония. Пропускаемая через колонку при 4° С линейный градиент бикарбоната триэтил-

аммония (0,05–0,2 М, по 900 мл) со скоростью 1 мл/мин, получили профиль элюции, представленный на рис. 3. Фракции 98–130 с общей плотностью 1180 ОЕ содержали только АрСр, что соответствует 55 мкмоль динуклеотида (27% в расчете на взятый А>р). Выделено также 4869 ОЕ смеси А>р и Ср, возвращаемой в реакцию после определения соотношения компонентов и добавления А>р (фракции 28–54), 70 мкмоль Ар (фракции 56–70), ~2 мкмоль АрА>р (фракции 91–97), ~4,5 мкмоль АрАр (фракции 133–160) и ~1 мкмоль АрАрАр (фракции 175–190). Фракции, содержащие динуклеотид, упаривали в вакууме досуха, остаток несколько раз упаривали с этанолом, после чего для более полного обессоливания нанесли на колонку (2,6×100 см) с сефадексом G-10, элюировали водой. После лиофилизации элюата получили ~35 мг АрСр.

б) К раствору 205 мг (0,6 ммоль) А>р (Na<sup>+</sup>-соль) и 544 мг (2,2 ммоль) уридина в 3,2 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 7,0) добавили 40 мг СМ-рибонуклеазы, многократно использовавшейся в других синтезах, и оставили смесь при ~0° С. Через 10 сут фермент отделили центрифугированием и промывали несколько раз водой, охлажденной до 0° С. Супернатант вместе с промывными водами (общий объем ~5 мл) нанесли на колонку (2,6×100 см) с сефадексом G-10, которую затем промывали водой со скоростью 31 мл/ч, собирая фракции по 4,6 мл. Фракции 30–48 (пик I) с общей плотностью 6650 ОЕ содержали АрU, Ар и А>р; фракции 50–55 (пик II) имели общую плотность ~16 000 ОЕ и содержали U, А>р и Ар (88, 10 и 2% соответственно); во фракциях 55–67 (пик III) был обнаружен только уридин (0,8 ммоль). Пики II и III были использованы при последующем получении АрU после добавления соответствующего количества А>р. Пик I упарили в вакууме, остаток растворили в 0,02 М бикарбонате аммония и нанесли на колонку (0,9×100 см) с DEAE-сефадексом А-25 в бикарбонатной форме. При элюции линейным градиентом (0,02–0,2 М, по 1,5 л) бикарбоната аммония со скоростью ~4 мл/мин получили два пика: фракции 128–162 при общей плотности 1632 ОЕ содержали АрU с примесью (~20%) А>р, во фракциях 222–252 был обнаружен только Ар (0,28 ммоль). Для окончательной очистки АрU и обессоливания применяли хроматографию на бумаге в системе Б, после которой получили 1242 ОЕ (~0,06 ммоль) АрU.

в) К раствору 175 мг (453 мкмоль) А>р (Na<sup>+</sup>-соль) и 333 мг (1360 мкмоль) С в 1,73 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 7,0) добавили ~50 мг СМ-рибонуклеазы, многократно использовавшейся с других синтезах, и, периодически встряхивая, сохраняли суспензию при ~0° С. Через 72 ч раствор отделили от фермента центрифугированием и промыли ферментный препарат несколько раз охлажденной водой. Смесь была разделена на колонке (1,6×20 см) с дауэксом 50W×2, 200–400 меш (H<sup>+</sup>-форма). При пропускании через колонку градиента NH<sub>4</sub>OH (0–0,2 М, по 200 мл) со скоростью 1,5 мл/мин получили два пика: фракции 16–45 содержали 301 мкмоль смеси А>р и Ар; фракции 54–58 – АрС и С (~15 000 ОЕ). Смесь АрС и С после упаривания в вакууме наносили на колонку (2,6×40 см) с DEAE-целлюлозой; элюцию проводили линейным градиентом бикарбоната триэтиламмония (0–0,12 М, по 500 мл) со скоростью 2 мл/мин; фракции 11–26 содержали С (1257 мкмоль), фракции 55–77 – АрС (102 мкмоль). После упаривания в вакууме, обессоливания на колонке (2,6×100 см) с сефадексом G-10 и лиофильного высушивания получили ~74 мг АрС.

Структура синтезированных динуклеозидмоофосфатов была подтверждена ферментативным гидролизом рибонуклеазой *P. brevicompactum* и фосфодиэстеразой змеиного яда с последующим анализом гидролизата методами хроматографии на бумаге и УФ-спектрофотометрии. Характеристики динуклеозидмоофосфатов приведены в табл. 2.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Хабарова М. П., Клягина В. П., Соболева Н. А., Женодарова С. М. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1496–1502.
2. Женодарова С. М., Соболева Н. А., Хабарова М. И., Ежов В. А., Приходько А. Г. Биорган. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 736–742.

3. Седельникова Э. А., Клягина В. П., Женодарова С. М. Молек. биология, 1973, т. 7, № 1, с. 27–35.
4. Масленникова Т. А., Седельникова Э. А., Клягина В. П., Женодарова С. М. Молек. биология, 1973, т. 7, № 1, с. 36–41.
5. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Антонович Е. Г., Прокофьев М. А., Манькин А. С., Загребельный С. И., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М., Болезин М. И., Смолянинов В. В. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 7, с. 1037–1045.
6. Ohtsuka E., Tanaka Sh., Tanaka T., Miyake T., Markham A. F., Nakagawa E., Wakabayashi T., Taniyama Y., Nishikawa S., Fukumoto R., Uemura H., Doi T., Tokunaga T., Ikehara M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 9, p. 5493–5497.
7. Gauss D. H., Grüter F., Sprinzl M. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 1, p. r1–r20.
8. Женодарова С. М., Гуляева В. И., Безбородова С. И. Биооргани. химия, 1976, т. 2, № 8, p. 1111–1116.
9. Townsend L. B., Robins R. K. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 2, p. 242–243.
10. Griffin B. E., Reese C. B. Biochim. et biophys. acta, 1963, v. 68, № 2, p. 185–192.
11. Brookes P., Dipple A., Lawly P. D. J. Chem. Soc., 1968, C, № 16, p. 2026–2028.
12. Pochon F., Michelson A. M. Biochim. et biophys. acta, 1967, v. 145, № 2, p. 321–327.
13. Jones J. W., Robins R. K. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 2, p. 193–201.
14. Женодарова С. М., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Антонович Е. Г. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1516–1521.

Поступила в редакцию  
30.VI.1982

STEPWISE OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS. XXXII. SUBSTRATE SPECIFICITY  
OF RIBONUCLEASE *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM*  
BOUND COVALENTLY TO CM-CELLULOSE AND PREPARATIVE SYNTHESIS  
OF OLIGORIBONUCLEOTIDES

SOBOLEVA I. A., KHABAROVA M. I., ZHENODAROVA S. M.

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

The substrates modified in the heterocyclic ( $m^1A > p$ ,  $m^6A > p$ ,  $m^1G > p$ ,  $m^7G > p$ ) or carbohydrate ( $pA > p$ ,  $pG > p$ ,  $araC$ ) moieties were used to study the substrate specificity of the ribonuclease *Pen. brevicompactum* bound covalently to CM-cellulose (CM-ribonuclease).  $m^6ApC$ ,  $m^1GpC$ ,  $m^7GpC$ ,  $pApC$ ,  $pGpU$ ,  $ApCp$ ,  $AparaC$  and  $ApisoC$  were synthesized in the presence of CM-ribonuclease with the yields 18, 17, 11, 43, 15, 24 and 2%, respectively. Immobilization was shown not to change the enzyme requirements towards the structure of modified substrates:  $m^1A > p$  does not enter into the CM-ribonuclease – catalyzed reaction, methylation of 6-exoamino-group decreases the dinucleoside monophosphate yield, the enzyme shows no specificity in respect of a donor 5'-hydroxyl and acceptor 2',3'-diol group. A possibility of using CM-ribonuclease for large-scale syntheses was demonstrated by preparing  $ApCp$ ,  $ApU$  and  $ApC$ .