



УДК 577.113.6 : 577.152.31\*27'17

© 1990 г.

Э. А. Седельникова, О. А. Столянинова, С. М. Женодарова

## СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

XXXV \*. НАТИВНАЯ И ИММОБИЛИЗОВАННАЯ  
ПОЛИНУКЛЕОТИДФОСФОРИЛАЗА *THERMUS THERMOPHILUS*  
В ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДНОМ СИНТЕЗЕ

Институт биологической физики АН СССР, г. Пущино

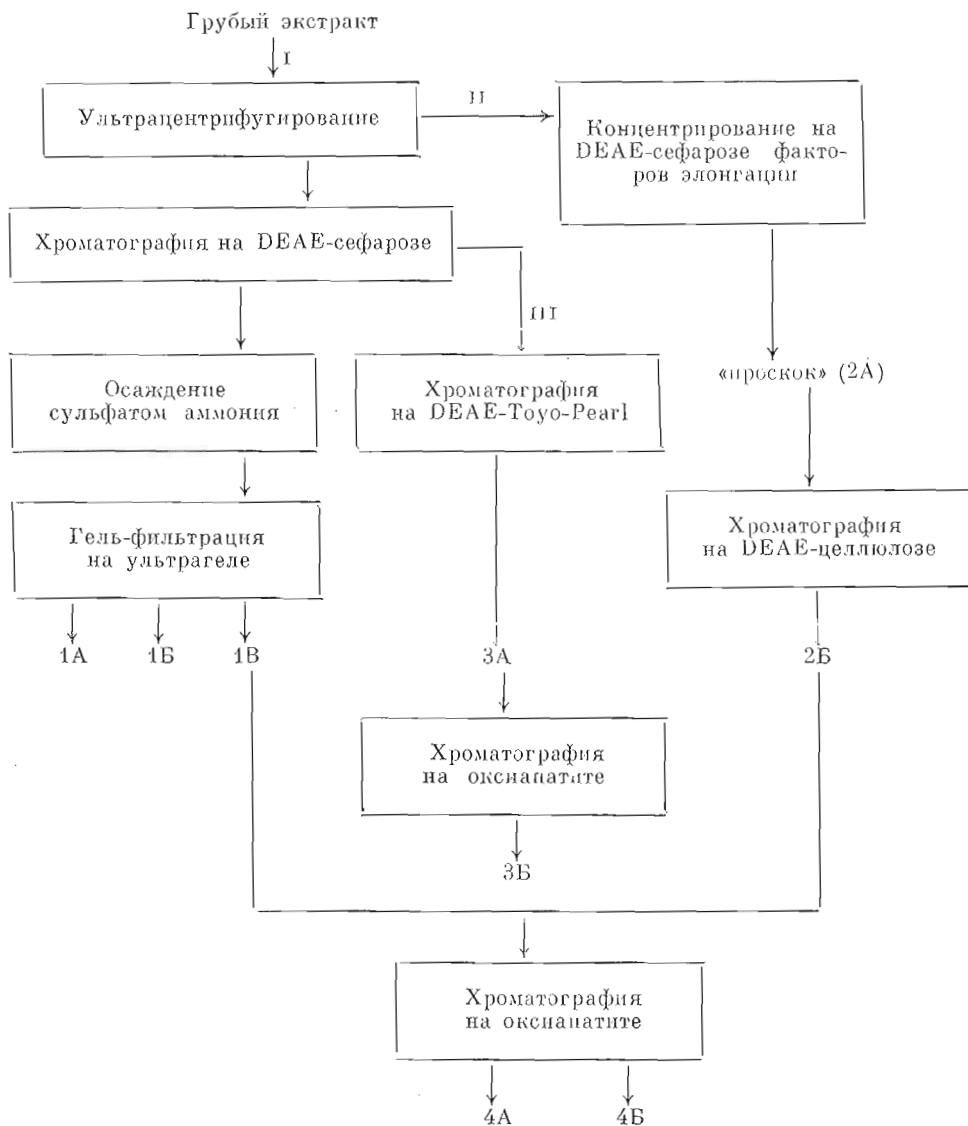
Полинуклеотидфосфорилаза *Thermus thermophilus* НВ 8 была выделена из белковых фракций, полученных на разных стадиях очистки факторов элонгации, и иммобилизована на агарозе, активированной бромцианом, и на широкопористом стекле, модифицированном обработкой (3,3-дигетоксипропил)триэтоксисилоном. Препараты нативной и иммобилизованной ПНФазы *Th. thermophilus* в отличие от ПНФаз *Escherichia coli* и *Micrococcus luteus* с достаточной эффективностью катализировали присоединение остатков адениловой и гуаниловой кислот к олигонуклеотидному праймеру. Были синтезированы три-, тетра- и пентануклеотиды, содержащие на 3'-конце остатки гуанозина и аденозина, в том числе структурные аналоги антикодонного участка 34—37 дрожжевой фенилаланиновой тРНК.

Комплексное использование ферментов нуклеинового обмена как катализаторов синтеза межнуклеотидной связи — эффективный метод получения олигорибонуклеотидов [2]. Однако субстратная специфичность ферментов налагает на этот метод ряд ограничений. Так, для синтеза олигорибонуклеотидов, имеющих аденозин или гуанозин на 5'-конце, можно применять рибонуклеазу  $Rb_2$  или гуанилспецифичные рибонуклеазы  $T_1$ ,  $C_2$ ,  $V_1$ , тогда как олигонуклеотиды с пуриновым нуклеозидом на 3'-конце получаются с низким выходом как в синтезах с участием рибонуклеаз [3], так и при проведении реакции в присутствии полинуклеотидфосфорилаз *Micrococcus luteus* [4] и *Escherichia coli* [5]. Поэтому расширение набора ферментов, применяемых в олигорибонуклеотидном синтезе, включение в этот набор ферментов, специфичность которых позволила бы снять это ограничение, остается по-прежнему актуальным.

Одним из таких ферментов, обладающих особой специфичностью, является полинуклеотидфосфорилаза из экстремально-термофильного микроорганизма *Thermus thermophilus* НВ 8, впервые выделенная и изученная Сакагучи и др. [6]. В отличие от других известных полинуклеотидфосфорилаз, например ПНФазы *E. coli* или ПНФазы *M. luteus*, ПНФаза *Th. thermophilus* катализирует образование полигуаниловой кислоты [7] и ограниченное присоединение гуаниловых остатков (одного или двух) к олигонуклеотидному праймеру [8—10]. Температурный оптимум первой реакции — 70°С, второй — 37°С, причем в последнем случае образование poly(G) ингибируется. Кроме того, этот фермент отличается низкой фосфоролитической активностью по отношению к олигонуклеотидам.

Настоящее сообщение посвящено выделению ПНФазы *Th. thermophilus*, ее иммобилизации и использованию в олигорибонуклеотидном синтезе, в том числе для получения структурных аналогов антикодонного участка 34—37 дрожжевой фенилаланиновой тРНК.

\* Сообщение XXXIV — [1]. Сокращения: ПНФаза — полинуклеотидфосфорилаза; Аг-ПНФаза и ШПС-ПНФаза — ПНФазы, иммобилизованные на агарозе и широкопористом стекле.



ПНФазу *Th. thermophilus* НВ 8 выделяли или из клеток по описанной методике [6], или из белковых фракций, полученных на разных стадиях очистки факторов элонгации и любезно предоставленных нам М. Б. Гарбер и И. А. Кашаровым (Институт белка АН СССР). Второй метод выделения ПНФазы более экономичен, так как позволяет полнее использовать бактериальную массу. Выделение факторов элонгации проводят как описано в работе [11] (см. схему), при этом на стадии ионообменной хроматографии (на DEAE-сефарозе или DEAE-Toyo-pearl, использованной для дополнительной очистки) ПНФаза перекрывается с Ti-фактором и может быть отделена от него гель-фильтрацией на ультрагеле. Фракция 1А, выделенная по этой схеме (путь I), обладает довольно высокой удельной активностью и может быть использована без последующей очистки. При модификации метода выделения факторов элонгации (пути II и III) очистка ПНФазы включала хроматографию на DEAE-целлюлозе и оксиапатите для 2А и хроматографию на оксиапатите для остальных использованных фракций (табл. 1).

Активность ПНФазы определяли по выделению неорганического фосфата при полимеризации 5'-дифосфата уридина или цитидина [12], а концентрацию белка — по методу [13]. Кроме того, активность каждого ферментного препарата определяли по образованию олигоаденилатов из ррА, используя в качестве праймера триуклеозиддифосфат АрАрА (табл. 2, см. также

Выделение ПНФазы *Th. thermophilus* (см. схему) и характеристики препаратов

Исходные фракции и последующая очистка	Препарат	Объем фракций, мл	Общий белок, мг	Общая активность, ед. акт.	Удельная активность, ед. акт./мг
Исходные фракции	1А	31	4,8	220	46
	1Б	16	7,3	125	17
	1В	16	12,5	117	9,4
	2А	800	360	6000 *	17
	3А	131	103	950 *	9,2
Последующая очистка					
1. Хроматография 2А на DEAE-целлюлозе	2Б	68	28	313	12
2. Хроматография фракций 1В+2Б на оксиапатите	4А	28	3,6	224	62
	4Б	42	6,6	113	21,4
3. Хроматография фракций 3А на оксиапатите	3Б	63	7,6	422	56

\* Высокая общая активность, определяемая по выделенно неорганического фосфата (см. «Экспериментальную часть»), может быть обусловлена присутствием фосфатаз в исходных фракциях.

Таблица 2

Синтез олигоаденилатов с использованием различных препаратов ПНФазы *Th. thermophilus*

[Ar<sub>2</sub>A]=0,4 мМ; [ррА]=2 мМ; [ПНФаза]=0,5 ед. акт./мл; 37° С, 24 ч

Препарат ПНФазы *	Состав реакционной смеси, %					
	ArA	(Ar) <sub>2</sub> A	(Ar) <sub>3</sub> A	(Ar) <sub>4</sub> A	(Ar) <sub>5</sub> A	(Ar) <sub>6</sub> A
3А 2*	27	36	22	11	4	—
3Б	30	31	18	10	7	4
2Б	—	38	33	20	9	—
1А	—	48	42	9	—	—
Аг-ПНФаза 2*	35	38	16	8	3	—
Аг-ПНФаза	25	39	19	10	7	—
Аг-ПНФаза 3*	31	32	19	11	6	—
ШПС-ПНФаза	—	47	39	13	—	—
ШПС-ПНФаза 4*	—	75	20	5	—	—

\* Обозначения ферментных препаратов приведены в табл. 1, 3 и в сокращениях к статье.

2\* Синтез проводили при 60° С.

3\* Время инкубации 48 ч.

4\* Применен препарат, уже использованный ранее 4 раза.

«Экспериментальную часть»). Выход основного продукта — тетрааденилата — достигает ~40%; присоединение следующего остатка адениловой кислоты происходит в среднем на ~11%; образование гексааденилата (6—8%) наблюдали не со всеми препаратами.

При очистке препарата *Th. thermophilus* после DEAE-Toyo-pearl на оксиапатите как исходные фракции (3А, табл. 1), так и очищенные (3Б, табл. 1) не только катализировали присоединение остатков адениловой кислоты к праймеру, но и расщепляли олигоаденилаты до ArA, что может быть связано с наличием нуклеазных примесей или с фосфоролитической активностью самой ПНФазы.

Ферментативный синтез олигорибонуклеотидов в препаративном масштабе наиболее эффективен при применении иммобилизованных ферментных препаратов. В литературе описана фиксация на твердой подложке полинуклеотидфосфорилаз *E. coli* и *M. luteus* с использованием в качестве матрицы сефарозы [14, 15] или целлюлозы [16], активированных бромцианом, а также альдегидсилохрома [17] или широкопористого стекла, несущего альдегидные группы [18]. В нашей работе для иммобилизации были использованы агароза, активированная бромцианом, и широкопористое стекло, модифицированное нами путем обработки его (3,3-диэтокси-

Иммобилизация ПНФазы *Th. thermophilus*

Носитель	Вес носителя, мг	Количество фермента в реакционной смеси		Объем реакционной смеси, мл	Буфер	Связанный белок, %	Удельная активность, ед. акт./мг носителя
		ед. акт.	мг				
Агароза, активированная бромцианом	100 (3Б)	118	5,25	5,0	0,01 М бозлидин-НСI, рН 8,2	50	0,34
Модифицированное широкопористое стекло	150 (1Б+4Б)	211	4,2	5,1	0,1 М ацетатный, рН 6,1	40	0,05

пропил)триэтоксисилоаном с последующим превращением ацетала в альдегид в кислой среде по методу [18].

Препараты ПНФазы *Th. thermophilus* предварительно концентрировали с помощью полиэтиленгликоля. Иммобилизацию на агарозе проводили как описано для ПНФазы *E. coli* [15, 16]. Ковалентно связанным с носителем оказалось 50% исходного белка; активность связанной ПНФазы составляла ~60% от нативной.

Иммобилизацию ПНФазы на модифицированном широкопористом стекле проводили в 0,1 М ацетатном буфере, рН 6,1, придерживаясь в остальных условиях, описанных в работе [18] (табл. 3), поскольку попытка провести иммобилизацию при рН 4,75, более близком к значению изоэлектрической точки ПНФазы *Th. thermophilus* (рI, 4,3), в соответствии с рекомендациями работы [18], окончилась неудачей: при диализе белкового раствора относительно 0,1 М ацетатного буфера, рН 4,75, произошло осаждение белка, сопровождавшееся инактивацией. При рН 6,1 40% исходного белка оказалось ковалентно связанным с носителем. Суммарная активность связанной ПНФазы составила ~8% от нативной; удельная активность ~0,018 ед. акт./мг влажного веса носителя (всего 427 мг) или ~0,05 ед. акт./мг сухого веса.

Активность иммобилизованных препаратов, как и активность нативного фермента, определяли по выделению неорганического фосфата при полимеризации ррU или ррС [12], а также по образованию олигоаденилатов (табл. 2). Оба иммобилизованных препарата (Аг-ПНФаза и ШПС-ПНФаза) катализируют образование тетра- и пентааденилатов при инкубировании тринуклеотида АрАрА и ррА. Выходы практически совпадают с результатами, полученными для нативного фермента. Реакционные смеси с Аг-ПНФазой, полученной из препарата 3Б, наряду с исходными АрАрА и продуктами синтеза АрАрАрА и АрАрАрАрА, как и в случае синтеза олигоаденилатов с препаратами нативной ПНФазы (3А и 3Б, табл. 2), содержали динуклеозидмонофосфат АрА, т. е. при иммобилизации активность препарата, вызывающая расщепление олигоаденилатов, не претерпела изменений. Это расщепление особенно интенсивно (до 35% АрА в смеси) протекает при 60° С.

Повторное использование препаратов показало, что активность иммобилизованных ферментов сохраняется (см. синтез GrCrA с Аг-ПНФазой в табл. 4 и синтез олигоаденилатов с ШПС-ПНФазой в табл. 2). Снижение выхода олигоаденилатов в присутствии ШПС-ПНФазы после 5-кратного использования (табл. 2), по-видимому, связано с известным «состриганием» фермента в реакционной смеси, особенно заметным при механическом перемешивании [15]. Чтобы избежать этого, при переходе к препаративным синтезам целесообразно проводить реакцию, пропуская реакционную смесь через колонку с иммобилизованным ферментом.

Нативную и Аг-ПНФазу *Th. thermophilus* мы использовали для получения олигорибонуклеотидов, содержащих на 3'-конце остатки гуанозина и аденозина (табл. 4 и 5), в том числе структурных аналогов антикодонного участка 34—37 дрожжевой фенилаланиновой тРНК (GrArArG,

Синтез олигонуклеотидов с использованием Ag-ПНФазы *Th. thermophilus*  
 [акцептор]=0,4 мМ; [донор]=2 мМ; [ПНФаза]=1,6 ед. акт./мл; 37° С, 24 ч

Акцептор	Донор	Основной продукт	Выход, %	Другие продукты	Выход, %
АрАрА	ppG	АрАрАрG	31	АрАрАрGpG	16
GpАрА	ppG	GpАрАрG	36	GpАрАрGpG	13
GpCpA	ppG	GpCpАрG	28	GpCpАрGpG	10
GpC	ppA	GpCpA	18	Не выделяли	
GpC *	ppA	GpCpA	14	»	

\* Использован ферментный препарат из предыдущего опыта.

Таблица 5

Синтез олигонуклеотидов с использованием нативной ПНФазы *Th. thermophilus*  
 [акцептор]=0,4 мМ; [донор]=2 мМ

Акцептор	Донор	ПНФаза, ед. акт./мл	t, °С	Время, ч	Основной продукт	
					состав	выход, %
АрАрА	ppG	0,2	37	102	АрАрАрG	9
АрАрА	ppG	0,6	60	40	АрАрАрG	23
АрАрА	ppG	0,6 *	60	40	АрАрАрG + АрАрАрGp	39
GpC	ppA	1,25	60	24	GpCpA	17

\* Реакционная смесь содержала также гуанилспецифичную рибонуклеазу С<sub>2</sub>, концентрация которой составляла 3 ед. акт./мл.

GpCpАрG), представляющих интерес в связи с изучением механизма кодо-антикодонового взаимодействия в рибосомах, в частности при определении вклада модификации нуклеотидного остатка, соседнего с 3'-концом антикодона, в общую энергию взаимодействия тРНК на рибосомных сайтах.

Как уже было показано (см. табл. 2), ПНФаза *Th. thermophilus* с достаточно высоким выходом (до 42%) катализирует присоединение остатка адениловой кислоты, когда праймером служит тринуклеозиддифосфат АрАрА. Присоединение остатка гуаниловой кислоты к АрАрА происходит с меньшей эффективностью, но выход АрАрАрG можно повысить, добавляя в реакционную смесь гуанилспецифичную рибонуклеазу С<sub>2</sub> (табл. 4) с последующим дефосфорилированием образовавшегося АрАрАрGp.

Известно, что ПНФаза *E. coli* с меньшей эффективностью катализирует присоединение одного нуклеотидного остатка, если праймером служит динуклеозидмонофосфат [19]. Способность ПНФазы *Th. thermophilus* использовать такой короткий праймер была показана в работе [10], однако активность АрА как праймера оказалась ниже, чем у АрАрА и АрАрG, и основным продуктом реакции АрА с ppG был тетрамер АрАрGpG, тогда как АрАрG не был найден в реакционной смеси [10]. Используя нативную и Ag-ПНФазу *Th. thermophilus*, мы провели синтез GpGpA из GpC и ppA. Оказалось, что динуклеозидмонофосфат GpC— достаточно активный праймер: в обоих случаях выход CpCpA был ~17%, что заметно выше, чем с другими ПНФазами [5]. Полученный GpCpA был использован в синтезе GpCpАрG (табл. 5).

Ag-ПНФаза *Th. thermophilus* достаточно эффективно катализирует образование АрАрАрG из АрАрА и ppG (табл. 5), при этом образуется также довольно большое количество АрАрАрGpG. Изменения в структуре праймера (GpАрА или GpCpA) мало влияют на выход соответствующих тетра- и пентануклеотидов.

Структуру полученных олигонуклеотидов подтверждали, расщепляя их неспецифичной рибонуклеазой P<sub>b</sub>2 с последующим анализом гидролизатов хроматографией на бумаге или на микроколонке с Дауэкс-1 (табл. 6).

## Определение нуклеотидного состава синтезированных олигонуклеотидов

Олиго- нуклеотид	Метод выделения продуктов гидролиза	Соотношение компонентов
АрАрАрG ГрАрАрG	Хроматография на бумаге в системе Б Хроматография на бумаге в системе Г с последующим разделением смеси Ар+G электрофорезом на бумаге в 0,05 М бикарбонате триэтиламония, рН 7,6	(Ар+А>р) : G=2,7 : 1 Гр : Ар : G=1 : 1,96 : 1,12
ГрСрАрG	Хроматография на микроколонке с да- уэкс-1 в градиенте (0-0,5) М NH <sub>4</sub> Cl (рН 10), 20% этанол	Гр : Ср : Ар : G=0,8 : 1 : 0,9 : 1,2
ГрСрА	Хроматография на бумаге в системе В	Гр : Ср : А=1,07 : 1,02 : 1

## Экспериментальная часть

В работе были использованы натриевые соли UDP, GDP и DEAE-целлюлоза (pearl) (Reanal, Венгрия), натриевая соль ADP, литиевая соль CDP, полиэтиленгликоль-40 000 (Serva, ФРГ), β-меркаптоэтанол (Merck, ФРГ), оксиапатит (Bio-Rad, США), сефадексы G-10 и G-15 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), агароза, активированная бромцианом (опытный завод Института химии АН ЭССР), широкопористое стекло 2000В (опытный завод ВНИИ нефтяной промышленности). ADP и GDP очищали от примеси соответствующих монофосфатов гель-фильтрацией на сефадексе G-15, нанося на колонку (2,6 × 85 см) 4 мг нуклеотидного материала в 0,5 мл воды и элюируя водой со скоростью 100—120 мл/ч.

Рибонуклеазы Pb<sub>2</sub> (КФ 3.1.27.1) и С<sub>2</sub> (КФ 3.1.27.3) получены от С. И. Безбородовой (ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва), фосфомоноэстераза *E. coli* (КФ 3.1.3.1) — от Р. Ф. Ренхоф (ИОС АН ЛатвССР).

Хроматографию и электрофорез проводили на бумагах 2043 в (Schleicher und Schüll, ФРГ) и FN-3 (Filtrak, ГДР); для нисходящей хроматографии использовали следующие системы растворителей: этанол — 1 М ацетат аммония, рН 5,0, 1 : 1 (А); этанол — 1 М ацетат аммония, рН 5,0, 7 : 3 (Б); этанол — 1 М ацетат аммония, рН 5,0, 5 : 3 (В); изомасляная кислота — 0,5 М аммиак, рН 3,7 (Г).

АрАрА получали гидролизом poly(A) эндонуклеазой *Serratia marcescens* (НИКТИ БАВ, Бердск) с последующим удалением 5'-фосфата фосфомоноэстеразой [20]. ГрАрА получали из G > р и АрА, используя рибонуклеазу С<sub>2</sub>, как описано в [10].

ПНФазу *Th. thermophilus* выделяли из клеток *Th. thermophilus* НВ 8 или белковых фракций, полученных на разных стадиях очистки факторов элонгации, используя методики работ [6, 11] (см. схему и табл. 1).

Определение активности ПНФазы *Th. thermophilus*. а) Полимеризация UDP или CDP: к 0,1 мл раствора фермента прибавляли 0,1 мл раствора UDP или CDP (5 мг/мл) в 0,1 М трис-НСl (рН 9), 2 мМ MgCl<sub>2</sub> и выдерживали 1 ч при 55° С. Пробирку быстро переносили в ледяную баню, добавляли 0,2 мл 5% HClO<sub>4</sub> и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин, отбирали аликвоту надосадочной жидкости (0,1 или 0,2 мл) и добавляли 0,2 мл свежеприготовленного реактива Фиске — Суббароу [21], который готовили, смешивая на ледяной бане (по одному объему, предварительно охладив) раствор из 250 мг молибденовокислого аммония в 10 мл 6 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10% раствор аскорбиновой кислоты и 3 объема воды. За единицу активности принимали количество фермента, обеспечивающее выделение 1 мкмоль неорганического фосфата за 1 ч при 55° С.

б) Присоединение аденилиловых остатков к праймеру АрАрА: АрАрА (0,08 мкмоль) и ADP (0,4 мкмоль) растворяли в 0,2 мл 0,05 М трис-НСl, рН 9, содержащего 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и нативную или иммобилизованную ПНФазу *Th. thermophilus* (0,5 ед. акт./мл), и выдерживали 24 ч при 37 или 60° С.



Реакционную смесь (после отделения и отмывания фермента, если он был иммобилизован) наносили на бумагу производства Schleicher und Schüll (6 см) и дважды хроматографировали в системе А нисходящим способом. Пятна, соответствующие компонентам реакционной смеси, вырезали, элюировали и определяли содержание нуклеотидного материала спектрофотометрически.

*Иммобилизация ПНФазы Th. thermophilus.* а) Препарат ПНФазы 3Б с удельной активностью 56 ед. акт./мг (5 мг белка в 35 мл 0,01 М трис-НСl (рН 7,4), 1 мМ β-меркаптоэтанол) концентрировали с помощью полиэтиленгликоля до концентрации белка ~1 мг/мл. Полученный раствор диализовали против 600 мл 0,01 М коллидин-НСl, рН 8,2, при 5° С и добавляли NaCl до концентрации 0,25 М. 100 мг агарозы, активированной бромцианом, выдерживали 15 мин в 1 мМ НСl, затем промывали ее на стеклянном фильтре № 4 сначала 1 мМ НСl (20 мл), потом 0,01 М коллидин-НСl, рН 8,2 (20 мл) и переносили в приготовленный раствор ПНФазы *Th. thermophilus*. Суспензию перемешивали 16 ч при 5° С, носитель отфильтровывали, переносили в 1 М триэтанолламин, рН 8,6 (1 мл) и перемешивали 2 ч в тех же условиях, после чего отфильтровывали и промывали растворами, охлажденными в ледяной бане: 0,01 М коллидин-НСl, рН 8,2 (100 мл), 1 М NaCl (70 мл) и водой (100 мл). Модифицированную агарозу переносили в 3 мл воды и хранили при 2° С, добавив 0,02% NaN<sub>3</sub>. Аг-ПНФаза сохраняла не менее 70% активности при хранении в течение 2 лет.

б) Препараты ПНФазы *Th. thermophilus* 1Б и 4Б (табл. 1) объединяли, концентрировали с помощью полиэтиленгликоля, диализовали против 500 мл 1 М ацетата натрия, рН 6,1. Получили раствор фермента, содержащий 4,2 мг белка в 5 мл раствора. 1,1 г широкопористого стекла 2000В со средними диаметром пор 2460 Å, удельной поверхностью 31 м<sup>2</sup>/г, удельным объемом пор 1,92 см<sup>3</sup>/г (фракция 0,15—0,315 мм) обрабатывали диэтоксипропилтриэтоксисиланом и затем 1 н. НСl, как описано в работе [18]. Количество образовавшихся альдегидных групп определяли потенциометрическим титрованием прсбы модифицированного широкопористого стекла, обработанного раствором 0,5 мМ NH<sub>2</sub>OH · НСl, 0,57 мМ NaOH в 90% метаноле [22] на титраторе ТТТ2 (Radiometer, Copenhagen). Содержание альдегидных групп ~10 мг-экв. на 1 г носителя. 150 г модифицированного широкопористого стекла промывали 0,1 М ацетатным буфером, рН 6,15, и переносили в приготовленный раствор ПНФазы *Th. thermophilus*. Суспензию перемешивали на магнитной мешалке 16 ч при 5° С. Модифицированное стекло отделяли центрифугированием, переносили в 1 мл 1% NaBH<sub>4</sub> и перемешивали еще 1 ч в тех же условиях, снова отделяли, промывали охлажденным 1 М NaCl (3 × 2 мл) и 0,01 М трис-НСl (рН 7,4) с 1 мМ β-меркаптоэтанолом и переносили в 3 мл 0,02% NaN<sub>3</sub>.

*Синтез GrCpA.* 115 ОЕ<sub>260</sub> (6 мкмоль) GrС и 450 ОЕ<sub>260</sub> (30 мкмоль) ADP растворяли в 14 мл 0,05 М трис-НСl (рН 9), 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, добавляли 1 мл суспензии Аг-ПНФазы *Th. thermophilus* (концентрация фермента в реакционной смеси 1 ед. акт./мл) и выдерживали 24 ч при 37° С. Фермент отфильтровывали и промывали водой до исчезновения в фильтрате поглощения при 260 нм (20 мл). Фильтрат упаривали до ~0,6 мл и наносили на хроматографическую бумагу FN-3, предварительно промытую 2 М НСl и водой: после электрофореза в 0,05 М бикарбонате триэтиламония, рН 7,6, GrCpA концентрировали и дополнительно очищали повторным электрофорезом в тех же условиях, перешив полосы, содержащие GrCpA, в три слоя на новый лист. Выход GrCpA 29,3 ОЕ<sub>260</sub> (15%). GrCpA из нескольких опытов хроматографировали на DEAE-сефадексе А-25 в системе Томлинсона — Тенера с последующим обессоливанием на сефадексе G-15.

*Синтез АрАрАрG, GrАрАрG и GrCpАрG.* Тринуклеозиддифосфат (0,4 мкмоль) и CDP (2 мкмоль) растворяли в 0,89 мл 0,05 М трис-НСl (рН 8,5), 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, прибавляли 0,11 мл суспензии Аг-ПНФазы *Th. thermophilus* (концентрация фермента в реакционной смеси 1,6 ед. акт./мл) и выдерживали 24 ч при 37° С, изредка перемешивая. Фермент отделяли, а реакционную смесь делили хроматографией на бумаге в системе А (АрАрАрG или GrАрАрG) или электрофорезом на бумаге в случае

GrCrArG. Олигонуклеотиды, выделенные хроматографически, обессоливали на сефадексе G-15. Выходы продуктов приведены в табл. 5.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Женодарова С. М., Смолянинова О. А., Соболева И. А., Хабарова М. И. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1023—1030.
2. Женодарова С. М. // Итоги науки и техники. Сер. Биоорган. химия. Т. 11. М., 1987. С. 145.
3. Zhenodarova S. M., Khabarova M. I. // Biochim. et biophys. acta. 1969. V. 195. № 1. P. 1—7.
4. Martin F. II., Uhlenbeck O. C., Doty P. // J. Mol. Biol. 1971. V. 57. № 1. P. 201—215.
5. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 10. С. 1505—1515.
6. Hishinuma F., Hirai K., Sakaguchi K. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 77. № 3. P. 575—583.
7. Kikuchi Y., Hirai K., Hishinuma F., Sakaguchi K. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 476. № 4. P. 287—294.
8. Kikuchi Y., Someno K., Sakaguchi K. // Agric. Biol. Chem. 1977. V. 41. № 8. P. 1531—1532.
9. Kikuchi Y., Sakaguchi K. // Nucl. Acids Res. 1978. V. 5. № 2. P. 591—598.
10. Kikuchi Y., Hirai K., Sakaguchi K. // J. Biochem. 1979. V. 86. № 5. P. 1427—1432.
11. Гарбер М. Б., Решетникова Л. С. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 11. С. 1572—1575.
12. Бреслер С. Е., Фирсов Л. М., Чернаенко В. М. // Прикл. биохим. и микробиология. 1974. Т. 10. № 1. С. 80—86.
13. Bradford M. M. // Analyt. Biochem. 1976. V. 72. № 1—2. P. 248—254.
14. Hoffman C. H., Harris E., Chodroff S., Michelson S., Rothrock J. W., Peterson E., Reuter W. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1970. V. 41. № 3. P. 710—714.
15. Smith J. C., Stratford I. J., Hutchinson D. W., Brentnall H. J. // FEBS Lett. 1973. V. 30. № 2. P. 246—248.
16. Vang N. H., Drocourt J. L., Thang M. N. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1979. V. 90. № 2. P. 606—614.
17. Кумарев В. П., Райт А. С., Райт В. К., Салганик Р. И. // Биоорган. химия. 1976. Т. 2. № 5. С. 700—705.
18. Глазунов Е. А., Чернаенко В. М. // Прикл. биохим. и микробиология. 1985. Т. 21. № 4. С. 533—536.
19. Ренкоф Р. Ф., Шеринь Л. А., Микелсоне Л. Х., Грен Э. Я. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 2. С. 228—235.
20. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 4. С. 524—533.
21. Кочетов Г. А. // Практическое руководство по энзимологии. М.: Высш. школа, 1980. С. 215—216.
22. Bryant W. M. D., Smith D. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1935. V. 57. № 1. P. 57.

Поступила в редакцию  
7.VII.1989  
После доработки  
26.X.1989

E. A. SEDEL'NIKOVA, O. A. SMOLYANINOVA, S. M. ZHENODAROVA

#### STEPWISE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES. XXXV. THE NATIVE AND IMMOBILIZED *THERMUS THERMOPHILUS* POLYNUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE IN THE OLIGORIBONUCLEOTIDE SYNTHESIS

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

A polynucleotide phosphorylase was isolated from the *Thermus thermophilus* protein fractions, obtained at different steps of purification of elongation factors, and immobilized on agarose activated with cyanogen bromide and macroporous glass modified with (3,3-diethoxypropyl)triethoxysilane. The preparations of the native and immobilized enzyme catalyzed rather efficiently the addition of adenylyl and guanylyl residues to oligonucleotide primers, in contrast to the *E. coli* and *M. luteus* polynucleotide phosphorylases. Tri-, tetra- and pentanucleotides with 3'-terminal guanosine and adenosine were obtained including structural analogues of the anticodon fragment 34—37 of yeast tRNA<sup>Phe</sup>.