



УДК 577.113.6

© 1991 г.

*А. В. Мудраковская, В. И. Ямковой***РНК-ЛИГАЗА БАКТЕРИОФАГА Т4
VIII. ТВЕРДОФАЗНЫЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ
ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ***Новосибирский государственный университет*

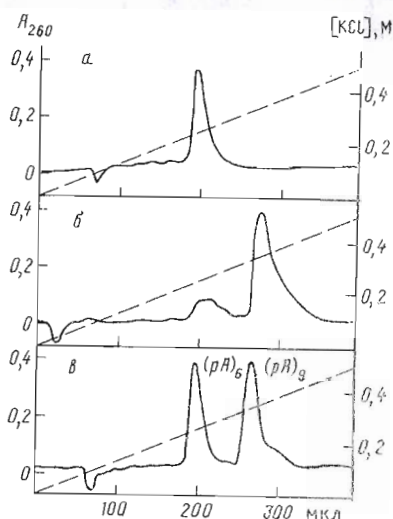
Предложена схема твердофазного ферментативного синтеза олигорибонуклеотидов, включающая в себя иммобилизацию донора за 3'-конец на водонерастворимой матрице и последующее наращивание нуклеотидной цепи в 5'-направлении тринуклеозиддифосфатами с помощью РНК-лигазы и полинуклеотидкиназы бактериофага Т4. На первом этапе реализации этой схемы в качестве матрицы для иммобилизации донора (pA)₆pAox (3'-концевой нуклеозидный остаток окислен действием периодата натрия *) использовали гидразид биогеля Р-300. При этом в катализируемом РНК-лигазой присоединении акцептора АрАpА к иммобилизованному донору был достигнут 50% выход (Ар)₆.

В настоящее время наиболее перспективным и универсальным методом синтеза не слишком протяженных олигорибонуклеотидных последовательностей является твердофазный химический метод (см., например, [1]). Однако при синтезе олигорибонуклеотидов, содержащих модифицированные нуклеозиды, определенные преимущества имеет ферментативный метод [2]. В данной работе предлагается схема синтеза олигорибонуклеотидов, сочетающая преимущества как твердофазного, так и ферментативного методов. Эта схема включает в себя иммобилизацию донора за 3'-конец на водонерастворимой матрице и последующее наращивание нуклеотидной цепи в 5'-направлении сразу на три звена в каждом из циклов, состоящих из следующих операций: 1) фосфорилирование донора (Т4-полинуклеотидкиназа и АТФ); 2) промывка; 3) межнуклеотидная конденсация (РНК-лигаза и тринуклеозиддифосфат); 4) промывка. Синтез заканчивается отщеплением олигорибонуклеотида от матрицы и его очисткой.

Следует отметить, что иммобилизация донора за 3'-конец решает существующую в катализируемом РНК-лигазой синтезе проблему его защиты. Использование же тринуклеозиддифосфатов для наращивания нуклеотидной цепи в 5'-направлении не является строго обязательным. Можно присоединять с помощью РНК-лигазы синтезированные химически или ферментативно дефосфорилированные олигорибонуклеотиды большей длины. Однако тринуклеозиддифосфаты имеют по крайней мере три преимущества: 1) «библиотеку» троек легче синтезировать; 2) реакционная способность акцепторов-триплетов известна [3, 4], что существенно упрощает выбор условий лигирования; 3) поскольку динуклеозидмонофосфаты не являются акцепторами в РНК-лигазной реакции [5], частичная деградация тринуклеозиддифосфата в ходе лигирования (РНК-лигаза чаще всего содержит трудноотделимую 3'-экзонуклеазу [5]) не отразится на результатах синтеза при небольшом избытке последнего.

Ниже приведены результаты экспериментов, подтверждающие возможность использования РНК-лигазы бактериофага Т4 (КФ 6.5.1.3) в твердофазном синтезе олигорибонуклеотидов по предложенной здесь схеме.

* Суффикс «ох» в 3'-концевой части олигонуклеотида означает окисленный периодатом натрия остаток нуклеозида с разрывом 2'-3'-С—С-связи.



Микроколоночная хроматография отщепленного от гидразида биогеля Р-300 гексарибонуклеотида $(pA)_3pA$ (а), продуктов присоединения к нему донора pA (б) и смеси маркеров (в) на носителе с обращенной фазой [16]. Условия лигирования, десорбции и хроматографии описаны в «Экспер. части»

В качестве матрицы для иммобилизации донора — окисленного периодатом натрия $(pA)_7$ в работе был использован гидразид биогеля Р-300. Этот гидрофильный биогель является наиболее крупнопористым из известных полиакриламидных гелей. Посредством гидразинолиза часть амидных групп биогеля легко превращается в гидразидные [6, 7]. Иммобилизация диальдегидных (окисленных по 3'-концевому звену) производных олигорибонуклеотидов на гидразидах полиакриламидных гелей обусловлена образованием гидразоновых связей, стабильных в отсутствие первичных аминов при рН 4,4—9,0 [6]. В наших условиях (см. «Экспериментальную часть») иммобилизация донора $(pA)_6pA$ на гидразиде биогеля Р-300 достигала 92%. Концентрация иммобилизованного донора в геле составляла 0,75 мМ.

Катализируемое РНК-лигазой присоединение акцептора pA к иммобилизованному за 3'-конец донору $(pA)_6pA$ проводили при 30° С в течение 24 ч (условия лигирования «хороших» акцепторов [8]). Доказательство происходящего при этом образования $(pA)_9$ (после десорбции с гидразида биогеля Р-300) представлено на рисунке. Как видно из рисунка б, после инкубации с РНК-лигазой и pA донор (рисунок а) удлиняется на три нуклеотида (рисунок в). Степень превращения донора в продукт в этой реакции зависит от концентрации pA и РНК-лигазы. При исходной степени превращения в 51% 2-кратное увеличение концентрации акцептора в реакционной смеси увеличивает ее на 9% (таблица). Последующее более чем 6-кратное увеличение концентрации фермента приводит к увеличению степени превращения еще на 19%. Более высокой степени превращения добиться не удалось. Видимо, размер пор биогеля Р-300 не позволяет РНК-лигазе (47,5 кДа [9]) проникать в него на большую глубину.

Элиминацию олигорибоаденилатов с гидразида биогеля Р-300 осуществляли метиламином, как описано в работе [6]; выход 95% при степени деградации целевого продукта не более 8% (см. рисунок а).

Зависимость степени превращения иммобилизованного за 3'-конец донора $(pA)_6pA$ в продукт $(pA)_9$ от концентрации акцептора pA и РНК-лигазы *

$[(pA)_6pA]_0$, мМ	$[pA]$, мМ	$[РНК-лигаза]$, мкМ	Степень превращений, %
0,75	1	1,2	51
0,75	2	1,2	60
0,75	2	2,5	74
0,75	2	7,6	79

* Условия реакции см. в «Экспер. части».

Основную часть потерь в синтезе $(Ar)_9$ составила частичная элиминация донора и целевого продукта, достигающая за 24 ч лигирования 16%, что обусловлено, вероятно, присутствием в реакционной смеси непротонированных молекул триса. Поэтому при 79%-ной степени превращения выход $(Ar)_9$ в катализируемом РНК-лигазой присоединении акцептора $ArArA$ к иммобилизованному за 3'-конец донору $(pA)_6pAox$ составил 50%, что тем не менее на 20% больше аналогичного показателя, достигнутого в работе [10] при «сшивании» РНК-лигазой иммобилизованного за 5'-конец олигодезоксирибонуклеотида $d(pTpTpA)$ с $pdTp$.

Экспериментальная часть

В работе использованы АТР, альбумин из сыворотки крови человека (Sigma, США); биогель Р-300 (100—200 меш), трис (Bio-Rad, США); дитиотреит (Reanal, ВНР); глицерин, гидразингидрат (ч. д. а.); метиламин (ч.); остальные реактивы были марок х. ч. или ос. ч.

Олигорибоаденилаты, содержащие фосфат на 5'-конце молекулы, получали гидролизом $poly(A)$ эндонуклеазой из яда кобры, как описано в работе [11], акцептор $ArArA$ — дефосфорилированием $(pA)_3$ фосфоноэстеразой из *E. coli* по методу [12], донор $(pA)_6pAox$ — периодатным окислением $(pA)_7$ по методу [13], за исключением того, что диализ проводили против 0,05 М NaCl. РНК-лигазу выделяли из биомассы *E. coli* В, инфицированной бактериофагом T4amN82 по методу, описанному в работе [14].

Гидразид биогиеля Р-300 синтезировали по методу [7]. Для этого 0,4 г биогиеля Р-300 замачивали в 40 мл дистиллированной воды при 20° С в течение 2 сут. К замоченному биогиелю добавляли 40 мл 30% гидразингидрата и инкубировали при мягком перемешивании 1 ч при 50° С. По окончании реакции гидразид биогиеля Р-300 промывали на колонке $(1,2 \times 10 \text{ см})$ 250 мл 0,05 М NaCl и хранили при 2° С.

Иммобилизация $(pA)_6pAox$ на гидразиде биогиеля Р-300. Термостатируемую колонку $(0,6 \times 2 \text{ см})$ заполняли гидразидом биогиеля Р-300, подслоив предварительно под него «подушку» (примерно 0,5 см) из биогиеля Р-2 (100—200 меш). Колонку охлаждали до 2° С и наносили на нее при этой температуре 100 мкл 0,82 мМ раствора $(pA)_6pAox$ в 0,05 М NaCl. Затем колонку прогревали до 20° С и инкубировали 1 ч. Несорбированную $(pA)_6pAox$ элюировали с колонки 15 мл 0,05 М NaCl.

Твердофазный РНК-лигазный синтез. На колонку с иммобилизованной $(pA)_6pAox$ наносили 200 мкл раствора, содержащего 1—2 мМ $ArArA$, 2 мМ АТР, 0,05 М трис-НСl (рН 8,7 при 30° С), 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ дитиотреит, 1,2—7,6 мкМ РНК-лигазу, 0,2 мг/мл альбумина и 12,5% глицерин. Реакцию вели 24 ч при 30° С. По окончании реакции колонку промывали 4 мл 0,05 М NaCl.

Десорбцию олигорибоаденилатов с гидразида биогиеля Р-300 проводили по методу [6]. Для этого колонку с иммобилизованными олигорибоаденилатами заполняли 200 мкл 5 М метиламинового буфера (рН 9,5) и инкубировали при 20° С в течение 20 ч. Десорбированные олигорибоаденилаты элюировали с колонки 4 мл 0,05 М NaCl и анализировали методом микроколоночной хроматографии [15] на хроматографическом носителе с обращенной фазой [16]. Для анализа использовали капиллярную колонку (объем 40 мкл, длина 50 мм). Элюцию вели со скоростью 800 мкл/ч в линейном градиенте концентрации KCl (от 0 до 0,5 М) в 0,01 М имидазол-НСl-буфере (400 мкл, рН 7,0), содержащем 7 М мочевины. Поглощение в элюате регистрировали с помощью микроспектрофотометра МСФП-3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Веньяминова А. Г., Горн В. В., Зенкова М. А., Комарова Н. И., Репкова М. Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 7. С. 941—950.
2. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Соболева И. А., Хабарова М. И., Гуляева В. И., Фролова Н. М. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1037—1044.

3. *Romaniuk E., McLaughlin L. W., Neilson T., Romaniuk P. J.* // Eur. J. Biochem. 1982. V. 125. № 3. P. 639—643.
4. *Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М., Клягина В. П., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Женодарова С. М.* // Биооргани. химия. 1984. Т. 10. № 4. С. 498—505.
5. *Веньяминова А. Г., Ямковой В. И.* // Биооргани. химия. 1981. Т. 7. № 10. С. 1445—1466.
6. *Василенко С. К., Обухова Л. В., Ямковой В. И.* // Биохимия. 1971. Т. 36. Вып. 6. С. 1288—1293.
7. *Intan J. K., Dintzis H. M.* // Biochemistry. 1969. V. 8. № 10. P. 4074—4082.
8. *Ямковой В. И.* // Биооргани. химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1808—1812.
9. *Василенко С. К., Веньяминова А. Г., Ямковой В. И., Майоров В. И.* // Биооргани. химия. 1979. Т. 5. № 4. С. 621—627.
10. *Крынецкая Н. Ф., Туманов Ю. В., Потапов В. К., Шабарова Э. А., Прокофьев М. А.* // Докл. АН СССР. 1981. Т. 258. № 5. С. 1242—1245.
11. *Мудраковская А. В., Ямковой В. И.* // Ферменты микроорганизмов и деградация биополимеров / Ред. Дебабов В. Г., Гордон И. О. М.: НПО «Медбиоэкономика», 1990. С. 199—206.
12. *McCutchan T. F., Gilham P. T.* // Biochemistry. 1973. V. 12. № 24. P. 4840—4846.
13. *Анциферова В. В., Веньяминова А. Г., Репкова М. И., Ямковой В. И.* // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1031—1036.
14. *Врацких Л. В., Ямковой В. И.* // Ферменты микроорганизмов и деградация биополимеров / Ред. Дебабов В. Г., Гордон И. О. М.: НПО «Медбиоэкономика», 1990. С. 122—134.
15. *Baran G. J., Grachev M. A., Komarova N. I., Perelroyzen M. P., Volvanov Yu. A., Kuzmin S. V., Kargaltsev V. V., Kuper E. A.* // J. Chromatogr. 1983. V. 264. № 1. P. 69—90.
16. *Ямковой В. И.* Хроматографический носитель для фракционирования олигонуклеотидов: А.с. 685975 СССР // Б.И. 1979. № 34. С. 194.

Поступила в редакцию
5.VI.1990

A. V. MUDRAKOVSKAYA, V. I. YAMKOVY

RNA LIGASE OF BACTERIOPHAGE T4, VIII, A SOLID-PHASE ENZYMIC SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES

Novosibirsk State University

A method of the solid-phase enzymic synthesis of oligoribonucleotides has been suggested. The donor is fixed through its 3'-end on a water-insoluble matrix followed by the stepwise RNA ligase- and T4 polynucleotide kinase-assisted coupling of trinucleoside diphosphates in the 5'-direction. As an example, (pA)₆pAox was immobilised on Biogel P-300 hydrazine and the RNA ligase-catalyzed addition of acceptor ApApA to the donor gave (Ap)₆ with the 50% yield.