



УДК 547.962.32

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$  ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ.  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ПОЛНОГО ПИРИМИДИЛ-РИБОНУКЛЕАЗНОГО  
ГИДРОЛИЗАТА  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$

*Исаенко С. Н., Аксельрод В. Д.*

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР,  
Москва*

Определена последовательность оснований в олигонуклеотидах пириимидил-РНКазного гидролизата  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$  пекарских дрожжей. Разделение олигонуклеотидов проведено колоночной хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе в 7 М мочеvine при нейтральном рН, микроколоночной рехроматографией на дауэксе  $1 \times 4$  в формиатной системе и рехроматографией в тонком слое целлюлозы. Для анализа структуры олигонуклеотидов использовали полные гидролизаты  $T_2$ -РНКазой, гуанил-РНКазой, экзонуклеазой А-5 и фосфодиэстеразой зменного яда. Продукты гидролиза разделяли ТСХ на целлюлозе и идентифицировали по составу нуклеозидов и УФ-спектрам. Во фракции мононуклеотидов обнаружен нуклеотид  $N_p$  неизвестной структуры, а также  $\Psi_r$ ,  $T_r$ ,  $m^3C_r$ . Модифицированные мононуклеотиды  $m^2G_r$ ,  $m^2C_r$ ,  $m^1A_r$  найдены как фрагменты олигонуклеотидов  $m^2G_r\Psi_r$ ,  $G_r m^2G_r U_r$ ,  $G_r m^1A_r A_r G_r$ . Описан упрощенный метод получения  $T_2$ -РНКазы.

Ранее нами было проведено исследование содержания изоакцепторных  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$  в клетках пекарских дрожжей, разработан хроматографический метод выделения  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$  [1] и определена ее первичная структура [2, 3]. Данная статья посвящена подробному описанию исследования олигонуклеотидов пириимидил-рибонуклеазного гидролизата  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$ .

90 ОЕ  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$  были гидролизованы пириимидил-РНКазой (см. «Экспериментальную часть»).

Хроматографический профиль разделения смеси олигонуклеотидов пириимидил-РНКазного гидролизата  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$  на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой в 7 М мочеvine [4] показан на рис. 1. Пики 1, 2 и 8 были разделены далее на составляющие компоненты ТСХ на целлюлозе. Пики 5 и 7 рехроматографированы на колонках с дауэксом  $1 \times 4$  в формиатной системе (см. ниже). Гомогенность каждого олигонуклеотида была проверена двумерной ТСХ на целлюлозе в системах Б и А.

В пириимидил-РНКазном гидролизате  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$  не содержались олигонуклеотиды длиннее шестичленного, как, впрочем, в большинстве пириимидил-РНКазных гидролизатов других  $t\text{РНК}$ .

**Фракция** (7) тринуклеотидов пириимидил-РНКазного гидролизата  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$  состояла из шести компонентов, три из которых ( $G_r G_r U_r$ ,  $G_r m^2G_r U_r$  и  $G_r C_r p h U_r$ ) оказались столь близкими по свойствам, что каждый из них удалось получить в гомогенном виде, лишь используя дополнительно ТСХ и колоночную хроматографию. Исследование струк-

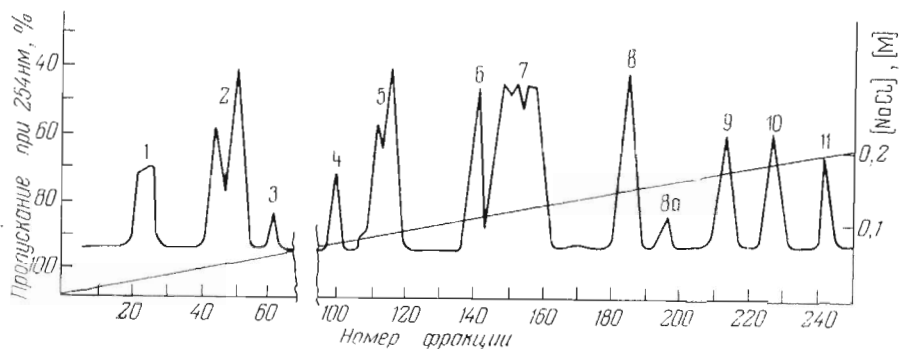


Рис. 1. Хроматографии исчерпывающего пиримидил-РНКазного гидролизата тРНК<sub>2a</sub><sup>Val</sup> на DEAE-целлюлозе. Колонка объемом 14 мл, высотой 70 мм, сорбировано 90 ОЕ 260 мкм) гидролизата тРНК<sub>2a</sub><sup>Val</sup>, в смесителе 200 мл 0,005 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 7 М мочевины, рН 7,5, в резервуаре 200 мл 0,3 М NaCl, 0,005 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 7 М мочевины, рН 7,5, скорость элюции 3 мл/ч, объем фракций 2 мл

туры смешанных олигонуклеотидов в принципе осуществимо, но может сопровождаться нежелательными артефактами и, следовательно, менее надежно. Основным методом разделения олигонуклеотидов в данной работе был метод ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе в 7 М мочевины [4] и рехроматографии на дауэксе-1 [5]. Для рехроматографии группы олигонуклеотидов, полученных по методу [4], известны различные способы: рехроматография в мочевины при кислом рН [6], электрофорез на DEAE-бумаге [7], рехроматография на дауэксе-1 в формиатной системе [5] и другие, менее популярные методы. Мы применили рехроматографию на дауэксе-1, поскольку эта система обладает большой разрешающей способностью и позволяет сконцентрировать и обессолить полученные фракции, содержащие муравьиную кислоту и формиат аммония, с помощью лиофилизации. Следует отметить, что высокая разрешающая способность данной хроматографической системы полезна еще в том отношении, что позволяет не только разделить значащие олигонуклеотиды, но и освободить их от примесных, которые появляются как следствие не 100%-ной чистоты исходной тРНК и неабсолютной специфичности пиримидил-РНКазы. Дауэкс-1 обладает значительной емкостью, поэтому колонки объемом 100—200 мкл могут быть использованы для разделения как малых, так и больших количеств материала (например, 10 ОЕ). К тем фракциям, которые элюировались в градиенте муравьиной кислоты, мы добавляли перед лиофильной сушкой формиат аммония (до 0,8 М концентрации). Лиофильную сушку проводили при 30 и 20° и никогда не обнаруживали деструкции в олигонуклеотидах, о чем свидетельствовал их дальнейший анализ.

Обессоливание и освобождение олигонуклеотидов от мочевины и NaCl весьма ответственная часть работы. Важно на этой стадии свести потери к минимуму. Известно несколько способов обессоливания: сорбция и десорбция на колонках с DEAE-целлюлозой [8], гель-фильтрация на биогеле Р-2 [9] или сефадексе G-10. Удовлетворительные результаты при обессоливании на биогеле Р-2 олигонуклеотидов пиримидил-РНКазного гидролизата нами были получены, когда элюцию стали производить 0,005 М бикарбонатом аммония, содержащим 5%-ный этанол. В дальнейшем мы предпочли применить для обессоливания метод диализа на ацетилцеллюлозных мембранах УАМ-40 [10], поскольку он представлялся нам более простым. После обессоливания все растворы олигонуклеотидов лиофилизовали и хранили в эксикаторе над Р<sub>2</sub>О<sub>5</sub> при -10°. Этот способ хранения дает возможность избежать потерь ценных продуктов от разложения по крайней мере в течение года.

Для исследования состава и последовательности оснований в олигонуклеотидах мы пользовались в подавляющем большинстве случаев ТСХ на пластинах с целлюлозой. Чувствительность этого метода мы повысили благодаря применению УФ-прозрачной подложки и наложения стекла, покрытого люминофором при визуальном просмотре хроматограмм. Пластины были из кварца среднего качества (марка КВ),  $16 \times 16$  см, но их с тем же успехом могли заменить УФ-прозрачное стекло (например, фиолетовое, фильтры УФС) или другой УФ-прозрачный материал, обладающий достаточной адгезией к целлюлозе и стойкостью к хроматографическим элюентам. При просмотре хроматограмм мы видели контрастные, черные пятна на светло-желтом фоне. Накладывание стекла, покрытого люминофором, избавляет от необходимости введения люминофора в сорбент, как это иногда делают для достижения аналогичного эффекта, и, кроме того, не лишает экспериментатора возможности просмотреть хроматограмму обычным путем (без люминофора), что также часто позволяет получить полезную информацию. Фотографирование УФ-прозрачных пластин, не содержащих люминофора, осуществляется простым способом контактной печати на рефлексной фотобумаге. Чувствительность применяемой методики ТСХ не лимитировала минимальное количество материала, необходимого, например, для анализа состава оснований того или иного олигонуклеотида. Ограничение возникало на уровне УФ-спектрофотометрии. Специальные трубчатые кюветы [3], которые мы употребляли, имели длину оптического пути 4 см при объеме 0,2 мл. В них можно было получить крупный спектр при наличии 0,03—0,05 ОЕ материала, растворенного в объеме 0,2 мл. В таком объеме (0,2—0,25 мл) мы обычно проводили элюцию веществ из пятен и после удаления целлюлозы центрифугированием вносили элюат непосредственно в кювету. Это избавляло от необходимости производить концентрирование элюата и, кроме того, давало возможность получить элюат контрольного пятна наиболее адекватным опытным. Короткие олигонуклеотиды (ди- и три-) требуют для анализа меньшего количества материала по сравнению с более длинными. В среднем для определения полной структуры олигонуклеотида было достаточно 1 ОЕ материала. Учитывая, что в гидролизате содержалось 16 олигонуклеотидов и пять мононуклеотидов, нетрудно подсчитать, что для анализа всех компонентов гидролизата необходимо, как минимум, 20 ОЕ. Мы взяли 90 ОЕ вещества в связи с тем, что многие элементы наших методов и техники находились в стадии освоения, особенно в начальной части исследования. Тем не менее значительная часть гидролизата оказалась избыточной и не была использована. В итоге 30—40 ОЕ материала можно считать нормальным для проведения работы, изложенной в данной статье.

Способность пиримидил-РНКазы частично расщеплять олигонуклеотиды по аденину зависит от конкретной последовательности оснований в олигонуклеотиде [11]. В данной работе выбирали оптимальное количество фермента путем анализа пробных гидролизатов на колонках с DEAE-целлюлозой объемом 200 мкл. Такой анализ при наличии денситометра «Uvicord», снабженного кюветой, объемом 16—20 мкл и насоса «Vario Perrex» требует 0,2—0,3 ОЕ тРНК. Оптимальным отношением фермента к субстрату мы сочли такое, при котором наиболее длинные олигонуклеотиды АрАрGrArCr и GrArArGrAphUp не претерпевали чрезмерной деструкции. При меньшем количестве фермента эти олигонуклеотиды сохранялись полностью, но сохранялись также циклофосфатные формы других олигонуклеотидов, что приводило к увеличению числа пиков и затрудняло анализ. Тем не менее и в наших условиях часть мононуклеотидов и динуклеотида  $m_2^2GrUp$  оказалась в виде циклофосфатов.

При анализе состава олигонуклеотидов или их фрагментов мы предпочли ферментативный гидролиз  $T_2$ -РНКазой и фосфатазой *E. coli*, с тем

Олигонуклеотиды исчерпывающего пириимидил-рибонуклеазного гидролизата  
 $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$

Олиго- нуклеотид	Моль/моль рGpрUp	Получен из пика (рис. 1)	Олигонук- леотид	Моль/моль рGpрUp	Получен из пика (рис. 1)	Олигонуклеотид	Моль/моль рGpрUp	Получен из пика (рис. 1)
C	0,9	1	$m_2^2\text{Gp}\Psi\text{p}$	0,9	4	$\text{Gpm}^2\text{GpUp}$	1,0	
$C > p$	2,7		$\text{ApCp}$	2,7	5	$\text{GpGphUp}$	0,9	
$U > p$	1,7		$\text{GpCp}$	0,9		$\text{GpGpApUp}$	0,8	8
Cp	8,8	2	$\text{Gpm}^1\text{ApApCp}$	1,0	6	$\text{GpApGpTp}$	0,9	
$m^5\text{Cp}$	0,8		$\text{ApApUp}$	0,8	7	$\text{pGpGpUp}$	1	9
Up	1,9		$\text{GpGpCp}$	0,7		$\text{ApApGpApCp}$	0,7	10
$\Psi\text{p}$	2,0		$\text{ApGphUp}$	1,0		$\text{GpApApGpAphUp}$	0,4	11
Np	0,9	2	$\text{GpGpUp}$	1,0				

чтобы не пропустить возможный новый минорный компонент, который мог встретиться в  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$ . Для этого попутно нами была найдена простая модификация метода выделения  $T_2$ -РНКазы из такадиастазы (см. «Экспериментальную часть»).

Основным приемом хроматографического анализа состава была двумерная ТСХ нуклеозидов на целлюлозе в системах В и А [12] в присутствии заведомых образцов в системе А и последующая УФ-спектрофотометрия для определения количества компонентов и их качественной идентификации.

Характерно, что хроматографическая подвижность нуклеозида более чувствительный тест, чем его УФ-спектр. Так, например, обнаруженный нами нуклеозид N, структура которого пока неизвестна, по спектру едва отличим от тимидина, в то время как его хроматографическая подвижность отличается сильно [12].

Создается впечатление, что для определения состава при наличии высокоразрешающей хроматографической системы, позволяющей надежно локализовать на хроматограмме все нуклеозиды анализируемой  $t\text{РНК}$ , в УФ-спектрофотометрии нет необходимости. Такой подход позволит еще более сократить количество  $t\text{РНК}$ , требуемой для анализа ее первичной структуры.

Полезно отметить специфические черты поведения некоторых олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды, содержащие метильные группы, имели большую подвижность, чем соответствующие по длине аналоги при хроматографии на DEAE-целлюлозе в 7 М мочеvine при нейтральном pH. Так,  $m_2^2\text{Gp}\Psi\text{p}$  элюируется раньше основной группы динуклеотидов, тетра-нуклеотид  $\text{Gpm}^1\text{ApApCp}$  занимает позицию, предшествующую группе тринуклеотидов. Тринуклеозидтетрафосфат  $\text{pGpGpUp}$  располагается между тетра- и пентануклеотидами. При расщеплении  $T_2$ -РНКазой олигонуклеотидов, содержащих метилированное производное гуанина, гидролиз затормаживается на стадии циклофосфата этого производного. Гуаниловая рибонуклеаза из *Actinomyces* расщепляет аналогичные циклофосфаты полностью. Встречающиеся иногда указания на лабильность дигидроуридиловой кислоты сильно преувеличены. Так, например, в аммиачных хроматографических системах Д и Е никакой деструкции тринуклеотида  $\text{GpGphUp}$  мы не наблюдали. Немало аналогичных фактов содержится в работах, посвященных исследованию первичной структуры  $t\text{РНК}^{\text{Phe}}$  из дрожжей [13].

Список идентифицированных олигонуклеотидов пириимидил-РНКазного гидролизата  $t\text{РНК}_{2a}^{\text{Val}}$  помещен в таблице.

Ниже изложены детали определения структуры олигонуклеотидов, полученных при хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе пиридил-РНКазного гидролизата тРНК<sub>2a</sub><sup>Val</sup>.

**Пик 1** ( $C > p$ ,  $U > p$ ,  $C$ )

Для идентификации составляющих компонентов материал пика предварительно подвергли дополнительному пиридил-РНКазному гидролизу с целью дециклизации циклофосфатов, далее хроматографировали в тонком слое целлюлозы последовательно в системах *B* и *A* и вещества идентифицировали сравнением с известными образцами и по УФ-спектрам. При ТСХ было получено четыре пятна. Одно по подвижности в системе *B* и по УФ-спектру совпало с цитидином. Два других пятна в системе *B* остались на старте. Они были разделены в системе *A* и идентифицированы как *Sp* и *Up*. Четвертое пятно присутствовало в количестве 6% от исходной смеси и не было идентифицировано. Компоненты цитидин, *Up* и *Sp* находились в соотношении 1 : 2 : 2,5.

**Пик 2** (*Sp*,  $m^6Sp$ , *Up*,  $\Psi p$ , *Np*,  $hUp$ )

8 ОЕ материала из пика 2 разделяли на пластинке с целлюлозой в системах *A* и *B* при четырехкратном пропускании каждой системы (рис. 2). При этом обнаружены *Sp*,  $m^6Sp$ , *Up*,  $\Psi p$ , *Np* в отношении 11 : 1 : 1,9 : :2,3 : 0,9. Уменьшение поглощения *Up* при 235 мкм в 0,1 М КОН свидетельствовало о наличии  $hUp$  в составе пятна *Up*.

**Пик 3**

Суммарное количество материала пика 3 по отношению ко всему нуклеотидному материалу гидролизата составило 0,5%. Анализ пика на его хроматографическую чистоту в системах *A* и *B* показал, что пик 3 состоит по крайней мере из пяти компонентов. На тонкослойной хроматограмме обнаружили пять основных пятен и два трудно просматриваемых визуально.

**Пик 4** ( $m_2^3Gp\Psi p$ )

Для определения состава пика 4 смесь подвергли  $T_2$ -РНКазному гидролизу с последующим дефосфорилированием щелочной фосфатазой и хроматографировали полученные нуклеозиды в тонком слое целлюлозы в системах *A* и *B*. Идентификация пятен по положению на хроматограмме и по спектральным данным показала наличие  $m_2^2G$  и  $\Psi$ . Кроме того, вещество пика 4 расщепили гуаниловой РНКазой и продукты гидролиза разделили в виде нуклеозидов на хромексе UA-8 при pH 4,65. При этом получили два пика (рис. 3), соответствующие по УФ-спектрам  $m_2^2G$  и  $\Psi$ . По площади вырезанных с диаграммы пиков определили соотношение  $m_2^2G$  к  $\Psi$ , оно составило 1,2 : 1.

**Пик 5** ( $ArSp$ ,  $GpSp$ )

Эту фракцию хроматографировали на дауэксе  $1 \times 4$  в формиатной системе (рис. 4).

УФ-спектры пиков 1 и 2 свидетельствовали о том, что они представляют собой динуклеотиды  $ArSp$  и  $GpSp$ , содержащиеся в молярном соотношении 2,6 : 1,0 соответственно. Определение состава подтвердило спектральные данные. Кроме того, смесь компонентов пика 5 (рис. 1) разделяли ТСХ (системы *A* и *B*). Обнаружили два основных пятна и два примесных. Последние составляли 2 и 4% от исходной смеси. Состав нуклеозидов основных пятен подтвердил указанную структуру динуклеотидов (молярное соотношение 3,2 : 1).

**Пик 6** ( $Gpm^1ArArSp$ )

Состав олигонуклеотида показал наличие гуанозина, 1-метиладенозина, аденозина и цитидина в молярном отношении 1,1 : 1,1 : 0,78 : 1,0.

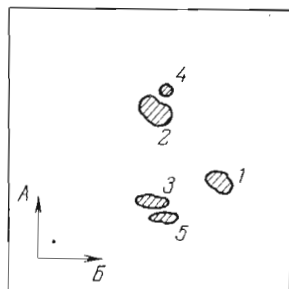


Рис. 2. Двумерная ТСХ на целлюлозе 8 ОЕ фракций мононуклеотидов (пик 2, рис. 1)

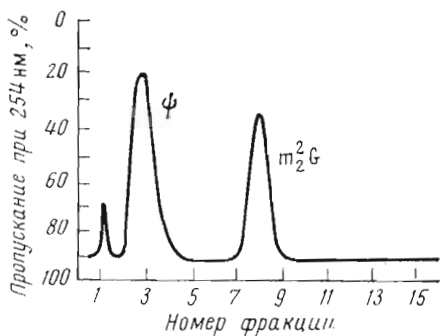


Рис. 3

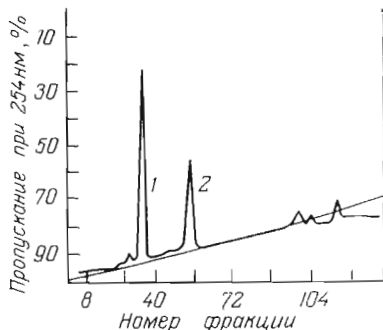


Рис. 4

Рис. 3. Хроматография гуанил-РНКазного гидролизата пика 4 (0,5 ОЕ) (рис. 1) на хромексе UA-8. Колонка объемом 300 мкл. Сорбировано 0,5 ОЕ дефосфорилированного гидролизата. Элюция 0,16 М NaCl, 0,001 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 4,65). Скорость 0,6 мл/ч. Объем фракций 0,08 мл

Рис. 4. Рехроматография фракции динуклеотидов (пик 5, рис. 1) на дауэксе  $1 \times 4$  (~ 400 меш). Объем колонки 100 мкл, высота 12,5 см, сорбировано 1,9 ОЕ; 1-й градиент: в смесителе 5 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , в резервуаре 5 мл 4 М  $\text{HCOOH}$ ; 2-й градиент: в смесителе 3 мл 4 М  $\text{HCOOH}$ , в резервуаре 3 мл 0,8 М  $\text{NH}_4\text{COOH}$ , 4 М  $\text{HCOOH}$ . Скорость элюции 0,5 мл/ч, объем фракций 0,12 мл

Часть материала пика (~0,2 ОЕ) гидролизовали 18 ч при  $37^\circ$  0,3 н. КОН и после удаления ионов  $\text{K}^+$  хлорной кислотой смесь нуклеотидов обработали щелочной фосфатазой и разделили на микроколонке хромекс UA-8.

Найдены нуклеозиды G,  $m^6A$ , A, C в молярном отношении 1,1 : 1,2 : 0,9 : 1,0.

Для определения последовательности оснований олигонуклеотид пика 6 гидролизовали одновременно экзонуклеазой А-5 и щелочной фосфатазой. Гидролизат нанесли на пластинку с целлюлозой и хроматографировали в системах В и А. В системе В динуклеозидмонофосфат неподвижен, его легко можно отличить от двух обнаруженных нуклеозидов — аденозина и цитидина. Пятно динуклеозидмонофосфата элюировали, гидролизовали  $T_2$ -РНКазой, продукты гидролиза разделили в системах В и А. Нуклеозид соответствовал  $m^1A$ , нуклеотид представлял собой Gp. Таким образом, концевой динуклеозидмонофосфат имел структуру  $Gpm^1A$ . Из полученных результатов однозначно следует структура тетра-нуклеотида пика 6:  $Gpm^1ArpArCp$ .

**Пик 7** ( $ArpArUp$ ,  $GpGpCp$ ,  $ArGphUp$ ,  $GpGpUp$ ,  $Gpm^2CpUp$ ,  $GpGphUp$ )

Этот пик состоял из шести тринуклеотидов, каждый из которых идентифицировали исследованием состава и анализом фосфодиэстеразного гидролизата, но прежде их необходимо было разделить. 5 ОЕ материала пика 7 было нанесено на пластинку с целлюлозой и хроматографировано в системах А и В. ТСХ не дала удовлетворительных результатов. Далее 5 ОЕ материала хроматографировали на дауэксе  $1 \times 4$  в формиатной системе (рис. 5, а). Как видно из рисунка, смесь была при этом разделена на четыре компонента, которые обессолили и концентрировали лиофилизацией. Гомогенность вещества каждого из пиков 7-1—7-4 (по 1 ОЕ) проверяли двумерной ТСХ в системах А и В. Первые три были однородны, четвертый явно состоял более чем из двух олигонуклеотидов.

При определении состава олигонуклеотида, соответствующего пику 7-1, были найдены нуклеозиды аденозин и уридин в молярном отношении 2 : 1. После дефосфорилирования и отделения от фосфатазы в системе А олигонуклеотид 7-1 расщепили фосфодиэстеразой змеиного яда (ФДЭ), а продукты гидролиза хроматографировали в системах В и А. При этом получили три пятна, одно из которых соответствовало аденозину, вто-

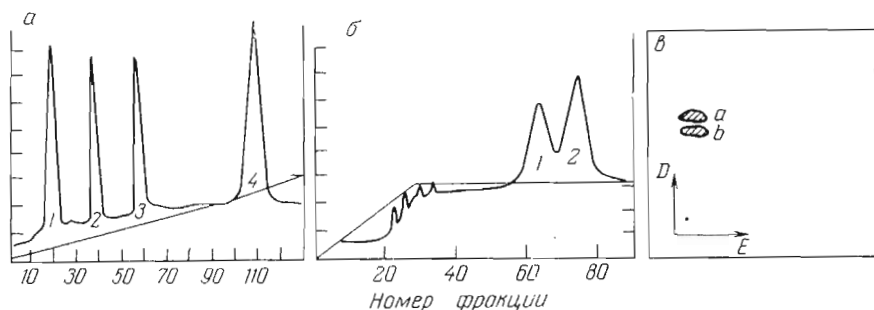


Рис. 5. Реchromатография фракции тринуклеотидов (пик 7, рис. 1). *a* — хроматография на дауэксе  $1 \times 4$  (~ 400 меш). Колонка объемом 200 мкл, высота 23 см, сорбировано 50Е 1-й градиент: в смесителе 5 мл  $H_2O$ , в резервуаре 5 мл 4 М  $HCOOH$ ; 2-й градиент: в смесителе 10 мл 4 М  $HCOOH$ , в резервуаре 10 мл 0,8 М  $NH_4COOH$ , 4 М  $HCOOH$ . Скорость элюции 0,22 мл/ч. Фракции по 0,12 мл; *b* — хроматография пика 7-4 (см. рис. 5, *a*) на дауэксе  $1 \times 4$  (~ 400 меш). Колонка объемом 200 мкл, высота 24 см; сорбировано 1,44 ОЕ. Элюция 3,3 М  $HCOOH$ . Скорость элюции 0,5 мл/ч. Фракции по 0,25 мл; *c* — схема хроматограммы пика 7-4-1 (см. рис. 5, *b*) (0,8 ОЕ) в тонком слое целлюлозы

рое — нуклеотиду рА и третье — нуклеотиду рU. Таким образом, этот олигонуклеотид представляет собой тринуклеотид АрАрUр.

Олигонуклеотид пика 7-2 (рис. 5, *a*) аналогично предыдущему подвергли анализу на состав (молярное соотношение G : C = 1,8 : 1) и идентификации продуктов расщепления ФДЭ. Анализ показал наличие тринуклеотида GrGpCp.

Пик 7-3 исследовали подобно предыдущим двум. При определении состава были найдены аденозин и гуанозин в соотношении 1 : 1,1, а при расщеплении олигонуклеотида ФДЭ обнаружены аденозин и нуклеотид рG. Характерное падение поглощения при 235 нм рG в 0,1 М КОН свидетельствовало о наличии рhU в составе пятна рG. Действительно, в системе АрG и рhU не разделяются и, таким образом, пятно рG на хроматограмме служит удобным маркером рhU. Пик 7-3 представляет собой АрGpHUp.

При определении нуклеотидного состава пика 7-4 оказалось, что он содержит гуанозин, уридин и  $m^2G$  (5,5 : 2,4 : 1). Это давало предварительную информацию о том, что пик представляет собой смесь трех тринуклеотидов, причем наличие только двух молей уридина свидетельствовало о присутствии в одном из них hU на 3'-конце.

Смесь олигонуклеотидов пика 7-4 освободили от 3'-концевого фосфата с помощью щелочной фосфатазы и затем подвергли дополнительной хроматографии на дауэксе  $1 \times 4$  при постоянной концентрации муравьиной кислоты (рис. 5, *b*). Получили два пика (обозначим их 7-4-1 и 7-4-2), каждый из которых гомогенен, по данным ТСХ, в системах А и Б. Вещество пика 7-4-2 было разделено в системе Д на два пятна (рис. 5, *c*). Обозначим их 7-4-2а и 7-4-2б. Тринуклеотиды 7-4-1, 7-2-а и 7-4-2б были идентифицированы путем определения состава нуклеозидов и анализа продуктов фосфодиэстеразного гидролизата, как описано для веществ пиков 7-1, 7-2 и 7-3. Тринуклеотид 7-4-1 представлял собой GrGpUp, тринуклеотиды 7-4-2а и 7-4-2б — соответственно Gr $m^2$ GpUp и GrGpHUp.

**Пик 8 (GrGpArUp, GrArGpUp)**

При анализе пика 8 (рис. 1) на его гомогенность были обнаружены два олигонуклеотида, присутствующие в соотношении 1 : 1,2. Смесь олигонуклеотидов разделили ТСХ на целлюлозе (рис. 6), при этом получили два пятна (8-1 и 8-2), каждое из которых анализировали на состав и последовательность оснований. Гидролизат пятна 8-1 состоял из трех нуклеозидов — гуанозина, аденозина и уридина (2,4 : 1 : 1,25). Для определения последовательности оснований в тетрауклеотиде 8-1 использовали экзонуклеазу А-5 с щелочной фосфатазой. Компоненты разделили в системах

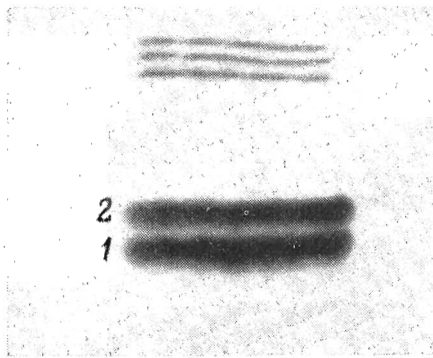


Рис. 6

Рис. 6. ТСХ на целлюлозе 2 ОЕ пика 8 (рис. 1) при 4-кратном пропускании раствора пика А (контактный фотоотпечаток)

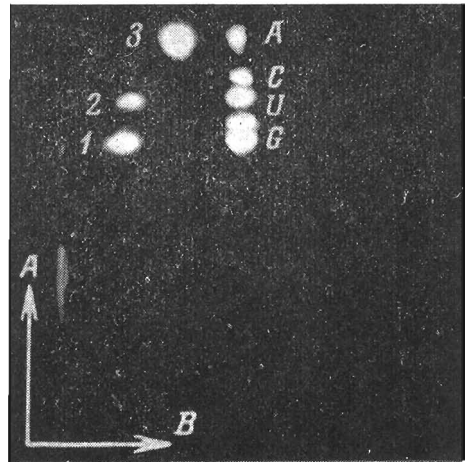


Рис. 7

Рис. 7. Двумерная ТСХ на целлюлозе  $T_2$ -РНКазного гидролизата пика 10 (рис. 1) (контактный фотоотпечаток). Гидролизат (0,25 ОЕ) перед нанесением на пластинку дефосфорилировали. В направлении *A* наносили смесь нуклеозидов А, Г, С и U

*B*, А. Были получены нуклеозиды аденозин и уридин, а также динуклеозидмонофосфат, который гидролизовали  $T_2$ -РНКазой.

Продукты гидролиза идентифицировали как гуанозин и Gr, что указывало на структуру 5'-концевого динуклеозидмонофосфата GrG. Таким образом, пятно 8-1 соответствовало тетра-нуклеотиду GrGrArUr. Олигонуклеотид пятна 8-2 (рис. 6) аналогично предыдущему подвергли анализу на нуклеозидный состав (молярное соотношение  $G : A : T = 2,4 : 1 : 1$ ) и расщеплению экзонуклеазой А-5. Анализ показал присутствие тетра-нуклеотида GrArGrTr.

#### Пик 8а

По количеству оптических единиц пик 8а (рис. 1) составлял 9% от пика 8 и, следовательно, содержался в неэквимольном количестве.  $T_2$ -РНКазный и фосфатазный гидролизат пика 8а содержал нуклеозиды аденозин, гуанозин и цитидин (3 : 1,5 : 1). При двумерной ТСХ в системах *A* и *B* пик 8а был разделен на три компонента (69, 23 и 8% от исходного 8а). Результаты анализов указывали на то, что пик 8а неэквимольрен, неоднороден и, следовательно, не является значащим.

#### Пик 9 (pGrGrUr)

Исследование состава этого олигонуклеотида показало наличие гуанозина и уридина в молярном соотношении 1,8 : 1. Разделение  $T_2$ -РНКазного гидролизата (системы *A*, *B*) без предварительного дефосфорилирования показало наличие трех пятен, соответствующих по УФ-спектру 1 — Gr, 2 — Gr, 3 — Ur; при этом пятно 1 двигалось медленнее, чем 2, и представляло собой pGr, поскольку его УФ-спектр соответствовал Gr, а после дефосфорилирования его хроматографическая подвижность (система *A*) совпала с подвижностью гуанозина. Далее олигонуклеотид 9 был расщеплен гуаниловой РНКазой, а продукты гидролиза после дефосфорилирования хроматографированы в системах *A*, *B*. Два пятна на хроматограмме идентифицированы как гуанозин и уридин в соотношении 1,7 : 1,0. Из результатов анализа следует, что данный олигонуклеотид — тринуклеозидтетрафосфат pGrGrUr. Кроме того, положение тринуклеотида 9 на хроматографическом профиле (рис. 1) также свидетельствует о наличии у него дополнительной фосфатной группы.



### Пик 10 (АрАрGrАрСр)

Пик 10 свободен от примесей. Его состав, по данным ТСХ, — аденозин, гуанозин и цитидин в молярном соотношении 3 : 1 : 0,7 (рис. 7). Продукты полного гуанил-РНКазного гидролизата олигонуклеотида 10 разделили двумерной ТСХ на целлюлозе (системы А и В) и определили состав оснований в каждом из двух полученных пятен. С помощью гидролиза  $T_2$ -РНКазой получена последовательность для вещества пятна 1 — АрАрGr (A : G = 2,2 : 1) и пятна 2 — АрСр (A : C = 1,07 : 1,0). Таким образом, олигонуклеотид 10 представляет собой АрАрGrАрСр.

### Пик 11 (GrАрАрGrАрhUp)

Исследование состава показало, что олигонуклеотид 11 содержит нуклеозиды гуанозин и аденозин в соотношении 1 : 1,6; при этом доказано отсутствие пиримидина. Олигонуклеотид гидролизовали гуанил-РНКазой, а продукты гидролиза разделили ТСХ на целлюлозе в системах А и В на три фракции, в каждой из которых определили состав нуклеозидов. Два из полученных продуктов идентифицированы как Gr и тринуклеотид АрАрGr (A : G = 2,3 : 1,0). УФ-спектр  $T_2$ -РНКазного гидролизата третьего продукта при рН 1 и 7 соответствовал аденозину, а при рН 13 наблюдалось типичное для hU снижение экстинкции во времени. После дефосфорилирования  $T_2$ -РНКазного гидролизата этого вещества и ТСХ на целлюлозе наблюдали одно пятно, по подвижности в системах А и В и по УФ-спектру совпадающее с аденозином. Кроме того, это вещество было обработано последовательно щелочной фосфатазой и ФДЭ и гидролизат хроматографирован в двух направлениях (системы В и А). Из УФ-поглощающих компонентов был обнаружен только аденозин. Таким образом, структура третьего компонента гуанил-РНКазного гидролизата олигонуклеотида 11 — АрhUp. Этот динуклеотид находится на 3'-конце олигонуклеотида 11, что следует из специфичности пиримидил-РНКазы.

Из структуры трех компонентов гуанил-РНКазного гидролизата (Gr, АрАрGr и АрhUp) вытекает структура олигонуклеотида 11: GrАрАрGrАрhUp. Кроме того, олигонуклеотид 11 подвергли действию экзонуклеазы А-5 и в полученных фрагментах исследовали нуклеозидный состав. Был обнаружен 5'-концевой динуклеозидмонофосфат GrА и нуклеозиды аденозин и гуанозин, что подтвердило структуру гексануклеотида 11.

## Экспериментальная часть

DEAE-целлюлозу (0,7 мг-экв/г, завод «Олайне», СССР) дважды перемешивали по 20 мин с 0,5 М КОН и отфильтровывали на воронке Бюхнера, затем производили удаление самых мелких и крупных частиц методом декантации. Собирали фракцию, осаждающуюся после 40 мин отстаивания и не осаждающуюся при 5-минутном отстаивании. Затем DEAE-целлюлозу промывали водой, этанолом, снова водой, суспендировали в 0,005 М фосфатном буфере, рН 7,5, доводили рН суспензии до 7,5 по стеклянному электроду. Далее DEAE-целлюлозу суспендировали в стартовом буфере (рис. 1), контролировали рН, отфильтровывали стартовый буфер, добавляли свежую его порцию и повторяли уравнивание. Набитую колонку промывали 5-кратным объемом стартового буфера. Неиспользованную уравнивленную DEAE-целлюлозу отмывали от мочевины водой и во избежание самопроизвольного измельчения хранили в виде суспензии в этаноле при  $-10^\circ$ .

7 М мочевины (ч.д.а.) фильтровали через слой фильтровальной бумаги, размоченной и уплотненной на воронке Шотта, затем пропускали через двухслойную колонку, содержащую дауэкс 1 × 8 (ОН<sup>-</sup>-форма) и дауэкс 50 × 10 (Н<sup>+</sup>-форма) 100—200 меш.

Целлюлозу для ТСХ (FND, ГДР) гомогенизировали в стеклянном цилиндрическом сосуде с помощью тефлонового пестика (2,5 г целлюлозы

в 12 мл воды). Суспензию наносили на кварцевые пластины [3] размером  $16 \times 16$  см и высушивали на воздухе при комнатной температуре.

СМ-целлюлозу (0,5 мг-экв/г, «Reanal») обрабатывали смесью 0,25 М КОН и 0,25 М NaCl дважды по 15 мин при перемешивании, отжимали на воронке Шотта, промывали водой, этанолом, снова водой, отделяли от мелких и крупных частиц декантацией.

Хромекс UA-8 («Reanal», Венгрия) промывали 0,5 М КОН, 1 М HCl, водой, этанолом и снова водой.

Ацетилцеллюлозные мембраны УАМ-40 (ВНИИСС, г. Владимир, СССР) уплотняли нагреванием в дистиллированной воде 5—6 мин при  $90^\circ$ . Нагрев прекращали, погружая мембрану в холодную воду.

Соли, кислоты, щелочи и растворители применяли марки х.ч. или ч.д.а. Изомасляную и муравьишую кислоту перегоняли и хранили при  $-10^\circ$ .

Были применены насосы «Vario Perrex», коллектор «RadiRac», проточные денситометры «Uvicord I и II» (фирмы LKB, Швеция), микроколлектор фракций с объемом ячеек 0,4 мл (ИМБ АН СССР), регистрирующие спектрофотометры «Spekord UV-VIS» (ГДР), «Hitachi EPS-3T» (Япония), кварцевые пластины для ТСХ ( $16 \times 16$  см, кварц марки KB отечественного производства), для регистрации спектров и измерения количества оптических единиц (ОЕ) использовали целевые кюветы с длиной оптического пути 2, 5 и 10 мм, а также трубчатые кюветы (ИМБ АН СССР) с длиной оптического пути 4 см и объемом 0,2 мл [3]. Люминофорное стекло изготовляли пульверизационным покрытием стеклянной пластинки краской, представляющей собой суспензию неорганического люминофора (Luminescent Powder, Lot No 9616, США) в растворе поливинилацетата в этаноле. Прибор для диализа [10] на ацетилцеллюлозных мембранах (ИМБ АН СССР) был выполнен из тефлона и снабжен магнитом для внутреннего перемешивания с помощью магнитной мешалки.

*Получение препарата тРНК<sub>2a</sub><sup>Val</sup>*. Суммарный препарат тРНК выделяли из маточных пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisia*, штамм 14) Московского дрожжевого завода методом, описанным нами ранее [14].

тРНК<sub>2a</sub><sup>Val</sup> выделена сочетанием четырех хроматографических систем [1]: ВД-целлюлоза (рН 3, 5; ЭДТА); DEAE-сефадекс А-25; ВД-целлюлоза (рН 4,5; Mg<sup>2+</sup>); обращенно-фазовая хроматография в системе РС-3.

Далее приведена характеристика ферментов, которые использовали при анализе структуры тРНК<sub>2a</sub><sup>Val</sup>.

Панкреатическую РНКазу (КФ 2.7.7.16) (Ленинградский мясокомбинат) подвергали кислотной обработке: 100 мг фермента выдерживали в 15 мл 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при температуре  $+2^\circ$  в течение 2 сут. Далее раствор нейтрализовали, диализовали и хроматографировали на СМ-целлюлозе в системе, описанной Аквистом и др. [15].

Гуаниловая РНКаза из *Actinomyces aeroverticillatus* Kras. at Dishen штамм 1306 [16] (КФ 2.7. 7.26) была любезно предоставлена Р. И. Татарской и сотр.

Щелочную фосфатазу из *E. coli* (КФ 3.1.3.1) получали по методу [17].

Экзонуклеазу А-5 (КФ 3.1.4.1) любезно предоставили авторы метода получения фермента [18].

Диэстеразу змеиного яда (КФ 3.1.4.1) выделяли по методу [19].

Т<sub>2</sub>-РНКазы (КФ 2.7.7.17) была получена из такадиастазы. Экстракцию, кислотную обработку и ацетоновое осаждение проводили по методу Рушицкого и др. [20]. Далее вытяжку из такадиастазы хроматографировали на СМ-целлюлозе («Reanal») при рН 3,2 в цитратном буфере (рис. 8).

*Расщепление тРНК<sub>2a</sub><sup>Val</sup> пиримидил-РНКазой*. тРНК<sub>2a</sub><sup>Val</sup> (90 ОЕ) инкубировали при  $37^\circ$  в течение 16 ч с панкреатической рибонуклеазой (0,12 мг) в 6 мл 0,01 М фосфатного буфера, рН 7,0. Для удаления фермента гидролизат пропускали через колонку ( $1 \times 5$  см) с СМ-целлюлозой.

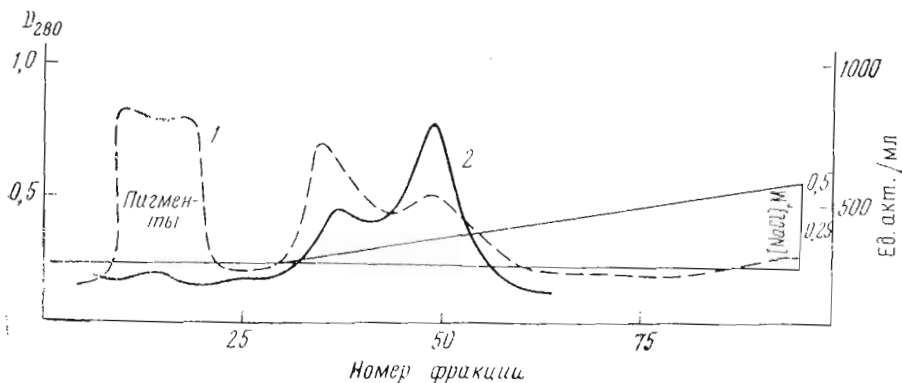


Рис. 8. Хроматография  $T_2$ -РНКазы на СМ-целлюлозе. Колонка объемом 300 мл. Сорбирована вытяжка из 30 г такадиастазы, в смеси 500 мл 0,02 М цитрата натрия, рН 3,2, в резервуаре 500 мл 0,5 М NaCl, 0,02 М цитрата натрия, рН 3,2. Скорость элюции 30 мл/ч. Фракции 10 мл. 1 — оптическая плотность, 2 — акцепторная активность. Для дальнейшей работы собирали фракции 45—60.

**Гуанил-РНКазное расщепление.** Препарат фермента содержал 5000 ед. акт. [17] в 1 мл. На 1 ОЕ олигонуклеотида брали 150 ед. акт. фермента и расщепление проводили в 50 мкл 0,01 М бикарбоната аммония, рН 7,5, при 37° в течение 14 ч.

**Расщепление экзонуклеазой А-5** проводили в 100 мкл 0,05М бикарбоната аммония, рН 8,7, в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  ( $10^{-3}M$ ) в течение 4 ч при 37°. На 0,5 ОЕ олигонуклеотида брали 30 мкл экзонуклеазы, содержащей 640 ед. акт. [18] в 1 мл.

**Дефосфорилирование фосфомоноэстеразой E. coli.** Брали 10 мкл фосфатазы (4 ед. акт.) [17] на 0,2 ОЕ нуклеотидов или 1 ОЕ олигонуклеотида, растворенного в 20 мкл 0,05 М бикарбоната аммония, рН 8,5. Гидролиз проводили при 37° в течение 2 ч.

**$T_2$ -РНКазный гидролиз** проводили в 50 мкл 0,001 М калий-ацетатного буфера, рН 4,5, при 37° в течение 6 ч. На 1 ОЕ олигонуклеотида брали 5 мкл  $T_2$ -РНКазы (2000 ед. акт. [16] в 1 мл).

**Расщепление ФДЭ.** К 0,1 ОЕ дефосфорилированного олигонуклеотида, растворенного в 50 мкл воды, добавляли 50 мкл ФДЭ (100 мкг на 1 ОЕ олигонуклеотида) и 10 мкл 0,1 М бикарбоната аммония, рН 8,5. Гидролиз продолжали 1,5 ч при 37°.

**Щелочной гидролиз.** Олигонуклеотид гидролизовали 18 ч при 37° в 50 мкл 0,3 М КОН. Ионы калия осаждали  $HCIO_4$  (25%), осадок удаляли центрифугированием, рН надосадочной жидкости доводили 1 М аммиаком до 8,5, нуклеотиды дефосфорилировали, как описано выше, и гидролизат наносили на колонку с хромексом UA-8.

**Хроматография пиримидил-РНКазного гидролизата  $mRNK_{2a}^{Val}$  на DEAE-целлюлозе.** Условия хроматографии приведены в подписи к рис. 1. 90 ОЕ пиримидил-РНКазного гидролизата  $mRNK_{2a}^{Val}$ , приготовленного как описано выше, разводили вдвое водой и наносили на хроматографическую колонку со скоростью 8 мл/ч. Далее дважды смывали гидролизат со стенок свободной части колонки двумя небольшими порциями исходного буфера (0,005 М фосфатный буфер, рН 7,5, в 7 М мочеvine). Элюцию проводили в линейном градиенте NaCl в этом же буфере. Регистрацию поглощения производили при 254 нм с помощью проточного денситометра «Uvisord». Фракции, соответствующие пику, объединяли, освобождали от солей и мочевины методом диализа, как описано ниже, упаривали досуха на роторном испарителе и помещали в эксикатор над  $P_2O_5$  при  $-10^\circ$ . Затем фракция была подвергнута колоночной рехроматографии на дауексе-1 или ТСХ на пластинках с целлюлозой с целью получения гомогенных оли-

гонуклеотидов. После колоночной рехроматографии олигонуклеотиды, содержавшие муравьиную кислоту и формиат аммония, были обессолены лиофилизацией. Олигонуклеотиды, рехроматографированные в тонком слое, элюировали водой; далее и те и другие анализировали на состав и последовательность оснований.

*Отделение олигонуклеотидов от солей и мочевины.* Обессоливание мононуклеотидов проводили гель-фильтрацией на биогеле Р-2 (100—200 меш). Объем колонки 150 мл, высота 75 см, объем наносимых фракций 5 мл. Элюировали 0,005 М бикарбонатом аммония, рН 7,8, содержащим 5% этилового спирта. В дальнейшем эта операция была заменена диализом через ацетицеллюлозные мембраны [10] против 200-кратного объема воды в течение 8 ч при +2°. Воду меняли дважды. Выход динуклеотидов составлял 86—100% и зависел от состава оснований; для тринуклеотидов и более длинных олигонуклеотидов выход был близок к 100%.

При ТСХ в слое целлюлозы использовали как одно-, так и двумерную хроматографию, а также разделение на одномерных хроматограммах с последовательным пропусканием растворителей. Для разделения нуклеозидов, мононуклеотидов и олигонуклеотидов употребляли следующие хроматографические системы: изомасляная кислота — 0,5 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 10 : 6, рН 3,6 (А), *трет*-бутанол —  $\text{HCOOH}$  (0,032М), 1 : 1, рН 4,8 (В), *н*-бутанол —  $\text{H}_2\text{O}$ , 86 : 14 (В), *изопропанол* — конц.  $\text{HCl}$  —  $\text{H}_2\text{O}$ , 170 : 41 : 39 (Г), *н*-пропанол — конц.  $\text{NH}_3$  — вода, 55 : 10 : 35 (Д), *изопропанол* — конц.  $\text{NH}_3$  — вода, 7 : 1 : 20 (Е).

Пятна с пластинок соскабливали, переносили в центрифужные пробирки диаметром 8—9 мм, вещества элюировали водой (в объеме 0,25 мл) при непрерывном перемешивании в течение 15 мин, центрифугировали и супернатант подвергали дальнейшему исследованию.

*Идентификацию нуклеозидов и нуклеотидов* проводили по их положению на профиле хроматограмм и по подвижности при ТСХ на целлюлозе в присутствии соответствующих свидетелей, а также методом спектрофотометрии в УФ-области спектра при рН 1, 7 и 13.

Для определения состава олигонуклеотиды гидролизуют  $\text{T}_2$ -РНКазой, образец упаривали на роторном испарителе досуха, растворяли в бикарбонатном буфере, дефосфорилировали, переносили в лунки тефлоновой пластинки, коцентрировали в струе воздуха до объема 10—15 мкл, наносили на пластинку для ТСХ и хроматографировали в системах В и А [12]. Во втором направлении одновременно хроматографировали свидетели. Пятна элюировали водой и снимали их УФ-спектры.

В редких случаях нуклеозиды разделяли на хромексе UA-8 (элюция 0,15 М  $\text{NaCl}$  в 0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 4,65) [12].

Дигидроуридиловую кислоту идентифицировали по уменьшению поглощения в щелочной среде (рН 13) при 235 нм [21]. При количественном определении hU в олигонуклеотиде последний предварительно гидролизуют  $\text{T}_2$ -РНКазой.

Хроматографически чистые олигонуклеотиды, проверенные на гомогенность двумерной ТСХ на целлюлозе в системах А и В, всегда исследовали вначале спектрофотометрически. Это позволяло получить дополнительную информацию относительно природы олигонуклеотида с учетом также положения пика на хроматографическом профиле. Для идентификации тринуклеотидов определяли состав и исследовали 5'-концевой нуклеозид в гидролизате, полученном обработкой ФДЭ. Перед гидролизом ФДЭ олигонуклеотид предварительно дефосфорилировали фосфатазой *E. coli* и освобождали от фосфатазы ТСХ на целлюлозе в системе А или В. При этом можно было судить о полноте дефосфорилирования. Образующийся 5'-концевой нуклеозид отделяли в системе В. Последовательность оснований в тетрануклеотидах устанавливали одновременным расщеплением экзонуклеазой А-5 и фосфатазой с отделением 5'-концевого динуклеозид-монофосфата (системы В и А) и идентификацией его по составу. Для опре-

деления последовательности оснований в пента- и гексануклеотидах исследования экзонуклеазного гидролизата недостаточно, но поскольку эти олигонуклеотиды содержали гуанин, проводили также их гидролиз гуанил-РНКазой. Полученные моно-, ди- и тринуклеотиды разделяли в системах *A* и *B* и идентифицировали.

Мы благодарим акад. А. А. Баева за поддержку и внимание и выражаем свою признательность Р. И. Татарской, Н. М. Абросимовой-Амельянчик и Т. Н. Львовой за любезное предоставление необходимых для данной работы ферментов: гуаниловой рибонуклеазы, экзонуклеазы А-5 и щелочной фосфатазы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Крюков В. М., Исаенко С. Н., Аксельрод В. Д., Баев А. А. (1972) Молекулярн биология, 6, 860—865.
2. Axel'rod V. D., Kryukov V. M., Isaenko S. N. and Bayev A. A. (1974) FEBS Lett., 45, 1, 333—336.
3. Аксельрод В. Д., Крюков В. М., Исаенко С. Н., Баев А. А. (1975) Молекулярн биология, 9, 55—62.
4. Tomlinson R. V., Tener G. M. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 2644—2645.
5. Аксельрод В. Д., Венкстерн Т. В., Баев А. А. (1965) Биохимия, 30, 999—1014.
6. Rushisky G. W., Skavensky I. H., Sober H. A. (1965) J. Biol. Chem., 240, 3984—3990.
7. Gangloff J., Keith G., Ebel J. P. and Dirheimer G. (1971) Biochim. et biophys. acta, 259, 198—209.
8. Delihias N. and Staehelin P. (1966) Biochim. et biophys. acta, 119, 385—391.
9. Uziel M. (1967) Methods in Enzymology, v. 12, part A, p. 407, Acad. Press, N. Y.—London.
10. Kutateladze T. V., Axel'rod V. D., Perepechkin L. P., Dubyga V. P. (1975) Anal. Biochem. (in press).
11. Witzell H. (1963) Progr. Nucl. Acid Research and Mol. Biol. (Cantoni G. L., Davies D. R., eds.), Acad. Press, N. Y., 2, 221—258.
12. Крюков В. М., Горбулев В. Г., Аксельрод В. Д. (1976) Биоорган. химия, 2, 56—68.
13. Rajbhandary U. L., Faulkner R. D., Stuart A. (1968) J. Biol. Chem., 243, 575—583.
14. Исаенко С. Н., Аксельрод В. Д. (1971) Биохимия, 36, 956—960.
15. Arqvist S. E. G. and Anfinsen C. B. (1959) J. Biol. Chem., 234, 1112—1117.
16. Татарская Р. И., Абросимова-Амельянчик Н. М., Аксельрод В. Д., Коре-няко А. И., Ниедра Н. Я., Баев А. А. (1966) Биохимия, 31, 1017—1026.
17. Абросимова-Амельянчик Н. М., Аксельрод В. Д. и Татарская Р. И. (1967) Биохимия, 32, 240—247.
18. Tatarskaya R. I., Lvova T. N., Abrosimova-Amelyanchik N. M., Korenyako A. I. and Bayev A. A. (1970) Eur. J. Biochem., 15, 442—449.
19. Василенко С. К. (1964) Биохимия, 29, 1190—1198.
20. Rushizky G. W. and Sober H. A. (1963) J. Biol. Chem., 238, 371—376.
21. Batt R. D., Martin J. K., Proeser J. M. and Murray J. (1954) J. Amer. Chem. Soc., 76, 3663—3665.

Поступила в редакцию  
11.VI.1975

### THE PRIMARY STRUCTURE OF tRNA<sup>Val</sup><sub>2a</sub> FROM BAKER'S YEAST. OLIGONUCLEOTIDES OF THE COMPLETE PANCREATIC RIBONUCLEASES DIGEST

ISAENKO S. N., AXEL'ROD V. D.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

Valine 2a transfer RNA (tRNA<sup>Val</sup><sub>2a</sub>) from baker's yeast has been degraded with pancreatic ribonuclease and the fragments obtained were separated by DEAE-cellulose chromatography in 7M urea at pH 7.4. Rechromatography of some fractions was performed on Dowex 1 × 4 (superfine) column or TLC on cellulose. Two dinucleotides, six trinucleotides, one trinucleotide tetraphosphate, three tetranucleotides, one pentanucleotide and one hexanucleotide were found. Seven minor nucleotides were present: m<sup>5</sup>C, ψ, m<sup>2</sup>G, m<sup>2</sup>G, m<sup>1</sup>A, hU, T, and N, the chemical structure of N being unknown. The methods of enzymatic degradation, separation and characterization of nucleosides and nucleotides by TLC are described in detail.