



УДК 577.1

СШИВАНИЕ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ
С ПОМОЩЬЮ РНК-ЛИГАЗЫ

Юодка Б. А.

Вильнюсский государственный университет им. В. Капсукаса

Известно [1—7], что РНК-лигаза, выделенная из бактерий *E. coli*, инфицированных фагом Т4, катализирует АТФ-зависимую циклизацию олигорибонуклеотидов, имеющих фосфатный остаток на 5'-конце цепи и свободную 3'-гидроксильную группу, а также сшивание отдельных олигорибонуклеотидных блоков без полинуклеотидной матрицы. Недавно появилась работа [8], в которой указывается на возможность использования РНК-лигазы для сшивания отдельных олигодезоксирибонуклеотидов в условиях, аналогичных применяемым к олигорибонуклеотидам.

Мы проверили эту возможность и показали, что сшивание дезоксирибонуклеотидов достигается лишь при замене в реакционной среде ионов Mg^{2+} на ионы Mn^{2+} .

РНК-лигазу выделяли из бактерий *E. coli* В, зараженных бактериофагами Т4г⁺, по ранее описанной нами методике [7]. Активность фермента определяли по циклизации синтетического олигорибонуклеотида $^{32}P(A)_5$.

Реакционную смесь, содержащую в 50 мкл 50 мМ трис-НСl-буфера (рН 7,5), 0,1 мМ АТФ, 50 мкг/мл альбумина, 10 мМ $MgCl_2$, 1,3 мМ диотрепт, 15 мкл РНК-лигазы (1,5 мкг), 1 мкМ $^{32}P(U)_5$ (50 000 имп/мин) и 1 мМ A_4C , инкубировали 3 ч при 37°. Затем в реакционную смесь прибавляли 10 мкл (0,1 мг/мл) бактериальной щелочной фосфатазы и инкубировали 30 мин при 65° (в контрольных опытах вместо щелочной фосфатазы прибавляли 10 мкл воды). Реакционные смеси количественно наносили на DEAE-бумагу (2 × 2 см), промывали 0,3 М муравьинокислым аммонием (рН 8,2), 0,25 М бикарбонатом аммония, 95% этанолом и измеряли остаточную радиоактивность. Поскольку меченый неорганический фосфат отмывался, полученная радиоактивность соответствует количеству меченого фосфора, включившегося в $(A)_4C-^{32}P(U)_5$. Выход $(A)_4C-^{32}P(U)_5$, рассчитанный по радиоактивности, составляет 60—70%.

В аналогичных условиях проведен эксперимент, где в качестве донора фосфата служил $^{32}P(dT)_5$. Оказалось, что сшивание A_4C с $^{32}P(dT)_5$ при этом не происходит. Замена в реакционной среде хлористого магния на хлористый марганец (10 мМ) привела к получению $A_4C-^{32}P(dT)_5$ с выходом до 50%. Аналогичным образом из $(dA)_4$ и $^{32}P(dT)_5$ был синтезирован $(dA)_4-^{32}P(dT)_5$ (выход 45%).

Полученные олигонуклеотиды разделяли с помощью колоночной хроматографии на смоле RPC5 (США). Элюцию проводили в линейном градиенте концентрации хлористого калия (0,2—1,2 М, 150 мл) в 0,01 М трис-НСl-буфере, рН 8,1. Собирали фракции по 1,5 мл и определяли радиоактивность по Черенкову. Все продукты реакций выходили из колонки позже свидетеля A_4C . Меченый фосфат был устойчив к действию щелочной фос-

фатазы из *E. coli*, что свидетельствует о включении концевого фосфата донорных молекул в образование межнуклеотидной связи. Щелочной гидролиз $(A)_4C^{32}P(U)_5$ и $(A)_4C^{32}P(dT)_5$ с последующим разделением нуклеотидов с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге приводил к единственному меченому нуклеотиду, которым явился $[2'(3')^{32}P]CMP$. Гидролиз $(dA)_4^{32}P(dT)_5$ с помощью фосфодиэстеразы из селезенки дал единственный меченый нуклеотид $[3'^{32}P]AMP$. Эти результаты показывают, что полученные с помощью РНК-лигазы олигонуклеотиды являются продуктами сшивания исходных отдельных олигонуклеотидных блоков.

Предварительные данные свидетельствуют о том, что РНК-лигаза может быть использована для синтеза олигодезоксирибонуклеотидов и смешанных рибо- и дезоксирибонуклеотидов с определенной последовательностью мононуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Silber R., Malathi V. G., Hurwitz J. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3009—3013.
2. Kaufmann G., Klein T., Littauer U. Z. (1974) FEBS Lett., 46, 271—275.
3. Kaufmann G., Littauer U. Z. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3741—3745.
4. Walker G. C., Uhlenbeck O. C., Bedows E., Gumpert R. I. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 122—126.
5. Linne T., Oberg B., Phillipson L. (1974) Eur. J. Biochem., 42, 157—165.
6. Kaufmann G., Kallenbach N. R. (1975) Nature, 254, 452—454.
7. Юодка Б., Уленбек О. (1976) Биооргани. химия, 2, 898—902.
8. Snopce T. J., Sugino A., Agarwal K. L., Cozzarelli N. R. (1976) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 68, 417—424.

Поступила в редакцию
24.V.1976

Технический редактор *Е. С. Кузьминкина*

Сдано в набор 20.VIII-1976 г.	Т-15587	Подписано в печать 27.IX-1976 г.	Тираж 825 экз.
Зак. 1055	Формат бумаги 70×108 $\frac{1}{2}$	Усл. печ. л. 13,3	Уч.-изд. л. 11,0

2-я типография издательства «Наука», Москва, Шубинский пер., 10