



УДК 547.963.32.07

ПОЛУЧЕНИЕ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДНЫХ МАТРИЦ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СИНТЕЗА ПОЛИАДЕНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ,
ОСУЩЕСТВЛЯЕМОГО РНК-ПОЛИМЕРАЗой *E. COLI*

Бочарова Т. Н., Андреева Л. А.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Ларионов О. А.

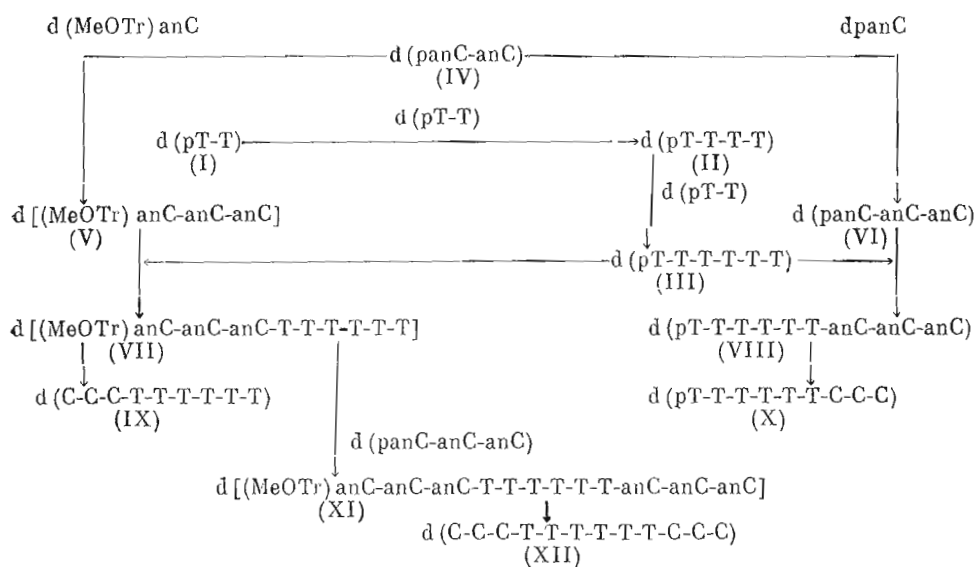
Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов, Москва

Фосфодиэфирным методом осуществлен химический синтез олигонуклеотидов: $d(pT-T-T-T-T-T)$, $d(pT-T-T-T-T-T-C-C-C)$, $d(C-C-C-T-T-T-T-T-T)$ и $d(C-C-C-T-T-T-T-T-T-T-C-C-C)$. Полученные олигонуклеотиды, а также дефосфорилированные по 5'-положению первые два соединения были использованы в качестве матриц для изучения синтеза полиадениловой кислоты, осуществляемого РНК-полимеразой *E. coli*. Показано, что скорость синтеза $poly(A)$ возрастает с увеличением размера матрицы в следующем порядке: $d(T)_6 < d(pT)_6 < d(T_6C_3) < d(pT_6C_3) < d(C_3T_6) < d(C_3T_6C_3)$.

Как известно, ДНК-зависимая РНК-полимераза может осуществлять синтез длинной цепи полиадениловой кислоты на коротких олигодезокситимидиловых последовательностях ДНК-матрицы [1-3]. Ранее было показано, что бактериальной РНК-полимеразе *E. coli* для заметного синтеза $poly(A)$ необходима последовательность по крайней мере из шести дезокситимидиловых остатков, в то время как фермент фага T7 синтезировал $poly(A)$ уже на $d(T)_3$ [4, 5]. Кроме того, при использовании матрицы $d(A_3T_3A_3)$ выяснилось, что скорость синтеза $poly(A)$ РНК-полимеразой фага T7 резко повышается с увеличением общей длины матрицы за счет нетранскрибируемых нуклеотидов. Бактериальному ферменту было недостаточно последовательности $d(T)_3$ независимо от общих размеров матрицы. Поэтому мы решили провести дальнейшее изучение синтеза $poly(A)$ в системе РНК-полимеразы *E. coli* с использованием других матриц, на которых заведомо должен идти синтез. С этой целью химическим путем были получены следующие олигонуклеотиды: $d(pT-T-T-T-T-T)$, $d(pT-T-T-T-T-T-C-C-C)$, $d(C-C-C-T-T-T-T-T-T)$ и $d(C-C-C-T-T-T-T-T-T-T-C-C-C)$. Синтез проводили фосфодиэфирным методом [6] с применением триизопробилбензолсульфохлорида в качестве конденсирующего агента.

Схема синтеза указанных олигонуклеотидов предусматривала получение ключевого соединения — гексануклеотида тимидиловой кислоты (III) (см. схему) и последующее наращивание цепи с 5'- или 3'-конца с использованием тринуклеотидов (V) и (VI).

Выбор схемы синтеза определялся стремлением создать благоприятные условия для разделения компонентов реакционных смесей и неоднократного использования синтезированных блоков. Так, динуклеотид (IV) применяли при получении тринуклеозиддифосфата (V) и тринуклеозидтри-



фосфата (VI), а гексануклеотид (III) — при синтезе соединений (VII) и (VIII).

Первым этапом синтеза было получение динуклеотида $d(\text{pT-T})$. В реакции использовали избыток нуклеотидного компонента, выход продукта составил 70%.

Тетратимидилат (II) получен с выходом 30%, а гексатимидилат (III) — с выходом 41% (табл. 1).

Синтез блоков (V) и (VI) осуществляли с использованием одного и того же динуклеотида (IV), который являлся в первом случае нуклеотидным, а во втором — нуклеозидным компонентом. При получении метокси-трифосфорированного тринуклеозиддифосфата (V) был взят избыток нуклеозидного компонента как более доступного. Реакционную смесь разделяли методом избирательной экстракции трифосфорсодержащих нуклеотидов органическими растворителями из разбавленных растворов триэтиламиний-бикарбонатного буфера [7]. В данном случае этот метод особенно эффекти-

Таблица 1

Межнуклеотидные конденсации

P-компонент		OH-компонент		Конд. агент, ммоль	Время, ч	Продукт конденсации	Выход, %
структура	ммоль	структура	ммоль				
$d\text{pT}(\text{Ac})$	14	$d(\text{CNEt})\text{pT}$	7,5	52	9	(I)	70
$d[\text{pT-T}(\text{Ac})]$	0,4	$d[(\text{CNEt})\text{pT-T}]$	1,3	3,5	8	(II)	30
$d[\text{pT-T-T-T}(\text{Ac})]$	0,12	$d[(\text{CNEt})\text{pT-T-T-T}]$	0,45	1,0	8	(III)	41
$d\text{panC}(\text{Ac})$	2,1	$d(\text{CNEt})\text{panC}$	0,88	5,1	13	(IV)	50
$d[\text{panC-anC}(\text{Ac})]$	0,5	$d(\text{MeOTr})\text{anC}$	1,5	1,5	8	(V)	54
$d[\text{panC-anC}(\text{Ac})]$	0,41	$d(\text{CNEt})\text{panC}$	0,51	1,75	10	(VI)	27
$d[\text{pT-T-T-T-T-T}(\text{Ac})]$	0,05	$d[(\text{MeOTr})\text{anC-anC-anC}]$	0,15	0,7	8	(VII)	28
$d[\text{panC-anC-anC}(\text{Ac})]$	0,046	$d[(\text{CNEt})\text{pT-T-T-T-T-T-T}]$	0,027	0,3	8	(VIII)	15
$d[\text{panC-anC-anC}(\text{Ac})]$	0,026	$d[(\text{MeOTr})\text{anC-anC-anC-T-T-T-T-T-T}]$	0,0016	0,23	8	(XI)	28

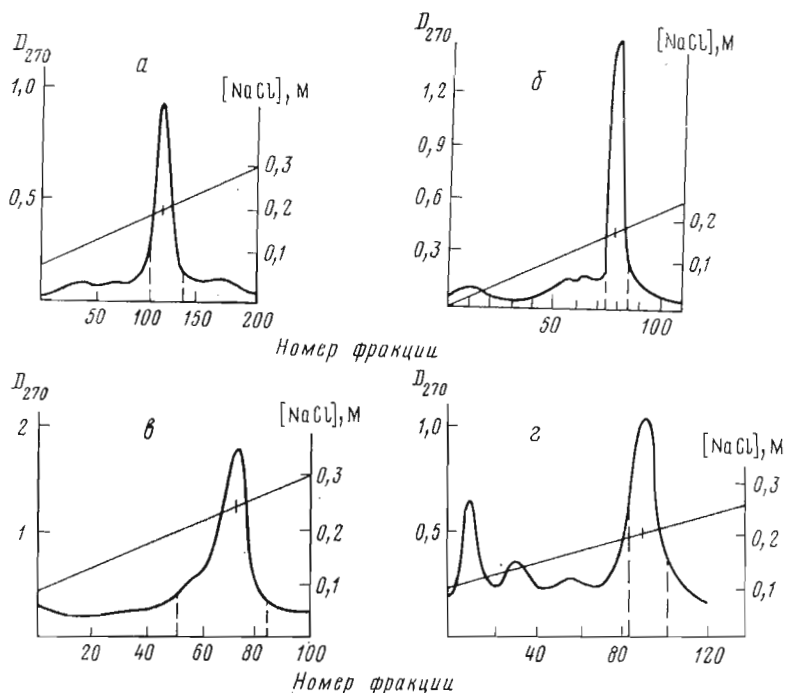


Рис. 1. Хроматография нонануклеотидов (IX) и (X) на DEAE-целлюлозе (Cl⁻, 0,9×30 см) в градиенте NaCl в 8 М мочеvine, скорость элюции 1 мл/мин, объем фракции 4 мл: а – выделение нонануклеотида (IX) в 0,03 М трис-НСl, рН 7,4 (51 ОЕ₂₇₀); б – повторная хроматография нонануклеотида (IX) при рН 3,5 (26 ОЕ₂₇₀); в – выделение нонануклеотида (X) в 0,03 М трис-НСl, рН 7,4 (79 ОЕ₂₇₀); г – повторная хроматография нонануклеотида (X) при рН 3,5 (23 ОЕ₂₇₀)

вен, так как по сравнению с нуклеозидом полученный тринуклеотид обладает значительно большей гидрофильностью. Выход соединения (V) составил 54%, причем выделение его заняло гораздо меньше времени, чем выделение тринуклеотида (VI) с помощью ионообменной хроматографии. Соединение (VI) получено по обычной методике с выходом 27%.

Синтез нонануклеотидов (VII) и (VIII) состоял в парацивании цепи гексамидилата (III) с 5'- или 3'-конца с помощью блоков (V) и (VI). В первом случае синтез проводился с использованием трехкратного избытка нуклеозидного компонента как более доступного, а во втором — по той же причине, с избытком нуклеотидного компонента (см. табл. 1). Выходы соединений (VII) и (VIII) составили 28 и 15% соответственно.

Додекануклеотид (XI) получен с выходом 28% из нонануклеотида (VII) и 16-кратного избытка тринуклеотида (VI).

Выделение и очистку полученных защищенных олигонуклеотидов (VII), (VIII) и (XI) проводили с использованием ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе в 8 М мочеvine при рН 7,4 в градиенте концентрации NaCl. Далее олигонуклеотиды подвергали аммонолизу для удаления N-ацильной группы, а затем в случае нонануклеотида (VII) и додекануклеотида (XI) — гидролизу 80% уксусной кислотой для отщепления монометокситритильного остатка. Незащищенные олигонуклеотиды (IX), (X) и (XII) хроматографировали в 8 М мочеvine при рН 7,4 (рис. 1а, в, 2а). Повторную хроматографию этих соединений проводили при пониженном значении рН (3,5), т. е. в условиях более тщательного разделения (см. рис. 1б, г, 2б). Для соединений (IX) и (XII) провели также обращенно-фазовую хроматографию (рис. 3).

Все полученные олигонуклеотиды идентифицировали на основании их спектральных свойств и хроматографических характеристик, а также по

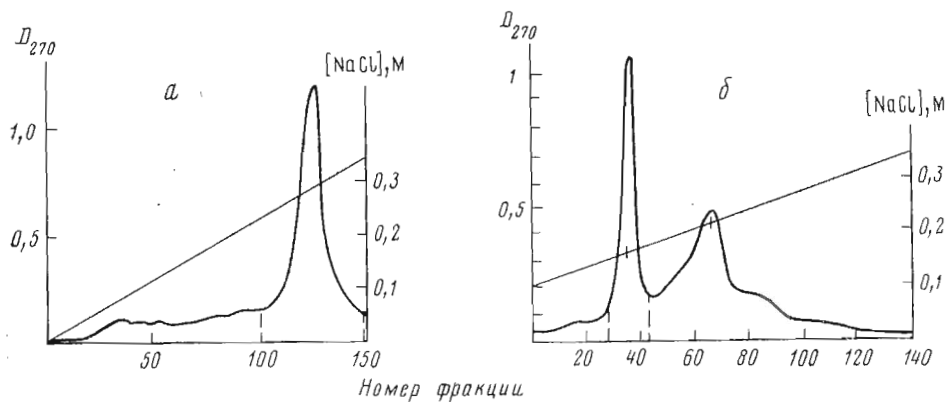


Рис. 2. Хроматография додекануклеотида (XII) на DEAE-целлюлозе (Cl^- , $0,9 \times 30$ см) в градиенте NaCl в 8 М мочеvine, скорость элюции 1 мл/мин, объем фракции 3 мл: а – выделение додекануклеотида (XII) в 0,03 М трис-НСl, pH 7,4 (50 OE_{270}); б – повторная хроматография додекануклеотида (XII) при pH 3,5 (15 OE_{270})

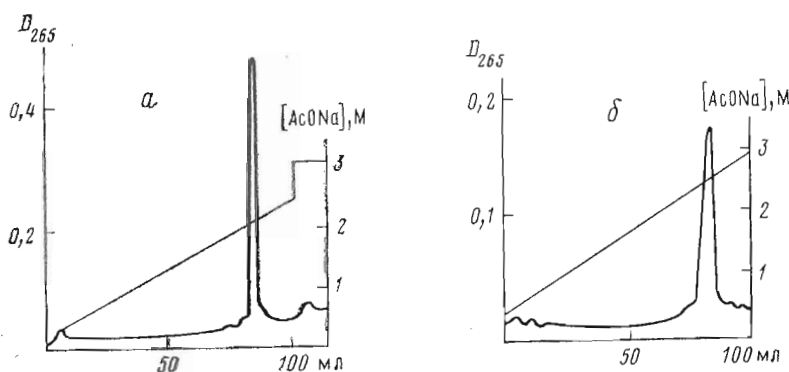


Рис. 3. Ионнообменная обращенно-фазовая хроматография на колонке RPC-5 ($0,8 \times 11$ см) в градиенте концентрации AcONa, pH 4,3, скорость элюции 15 мл/ч: а – нонануклеотид (IX); б – додекануклеотид (XII)

данным полного экзонуклеазного гидролиза (табл. 2). Структура соединений подтверждена анализом по методу нуклеотидных карт [8] (рис. 4), проведенным в лаборатории химии гена ИБХ АН СССР им. М. М. Шемякина.

Матричную активность синтетических олигонуклеотидов исследовали в условиях синтеза poly(A) РНК-полимеразой *E. coli* при добавлении только АТР. Кроме уже перечисленных матриц, мы использовали также дефосфорилированные по 5'-положению гексамидилат (III) и нонануклеотид (X) (табл. 3). Наличие фосфатной группы на 5'-конце олигонуклеотида ускоряет синтез poly(A) в $\sim 1,5-2$ раза. Эти данные согласуются с результатами работ [9, 10], в которых было обнаружено, что при отсутствии концевых фосфатов уменьшается матричная активность олигонуклеотида. Авторы предположили, что в этом случае сказывается уменьшение не только размера матрицы, но и сродства олигонуклеотида к РНК-полимеразе [10].

Из сравнения результатов, полученных для соединений $d(\text{T}_6)$, $d(\text{T}_6\text{C}_3)$, $d(\text{C}_3\text{T}_6)$ и $d(\text{C}_3\text{T}_6\text{C}_3)$, видно, что для бактериального фермента сохраняется та же закономерность роста скорости синтеза poly(A) с увеличением общей длины матрицы за счет несчитываемых нуклеотидов, которую мы наблюдали при исследовании фермента фага T7 [4, 5]. Так, при увеличении длины матрицы в 2 раза без изменения размера транскрибируемого участка [ср. $d(\text{T}_6)$ и $d(\text{C}_3\text{T}_6\text{C}_3)$] скорость синтеза poly(A) возрастает

Нуклеотидный состав полученных соединений

Олигонуклеотид	Состав			
	dpT	dT	dpC	dC
d(pT-T) (I)	1	1,07		
d(pT-T-T) (II)	3	1		
d(pT-T-T-T) (III)	4,8	1		
d(pC-C)			0,9	1
d(pC-C-C)			1,89	1
d(C-C-C-T-T-T-T) (IV)	3		1*	
d(pT-T-T-T-T-C-C) (X)	1,92		1	
d(C-C-C-T-T-T-T-C-C) (XII)	1,29		1	

* Определялось только соотношение нуклеотидов.

Таблица 3

Влияние размеров матричных олигонуклеотидов и немеченого GTP на синтез poly(A) РНК-полимеразой *E. coli**

Матрица	Включение [³ H]АМР, %	
	без GTP	с добавлением GTP
d(T) ₆	0,85	0,75
d(pT) ₆	1,22	—
d(T ₆ C ₃)	1,35	0,51
d(pT ₆ C ₃)	2,44	1,21
d(C ₃ T ₆)	8,16	4,86
d(C ₃ T ₆ C ₃)	15,48	29,2
T2-ДНК денатурированная	100	62,7

* Инкубировали как описано в «Экспериментальной части». За 100% принято включение [³H]АМР с матрицей — денатурированной T2-ДНК. При расчетах радиоактивность проб без матрицы вычтена. Приведены средние данные двух опытов.

примерно в 18 раз. Из полученных данных также следует, что ферменту безразлично, с какой стороны от тимидиловой последовательности находится нетранскрибируемый тринуклеотид цитидиловой кислоты: расположение на 5'-конце [d(C₃T₆)] предпочтительнее, чем на 3'-конце [d(T₆C₃)]. Таким образом, полученные олигодезоксирибонуклеотиды по их матричной активности можно расположить в следующий ряд:

$$d(T)_6 < d(pT)_6 < d(T_6C_3) < d(pT_6C_3) < d(C_3T_6) < d(C_3T_6C_3)$$

(1) (1,4) (1,6) (2,9) (9,6) (18,2)

Предполагается, что образование poly(A) на коротких матрицах может происходить по двум механизмам: «рейтеративным» синтезом на одной и той же молекуле олигонуклеотида [2] или синтезом с движением вдоль олигонуклеотидов, последовательно подстраивающихся в РНК-полимеразу [11, 12]. На всех исследованных матрицах полимеризация [³H]АТР тормозится добавлением немеченого GTP в количестве, эквивалентном количеству АТР. Исключение составляет только матрица d(C₃T₆C₃), на которой GTP значительно стимулирует включение [³H]АМР. Стимуляция GTP была подтверждена в опыте с другими препаратами [³H]АТР и GTP: без GTP на d(C₃T₆C₃) включение [³H]АМР составило 576 имп/мин, а при добавлении GTP — 2069 имп/мин (фон везде вычтен). Можно предполагать, что разное влияние GTP на включение [³H]АМР в РНК-продукт на

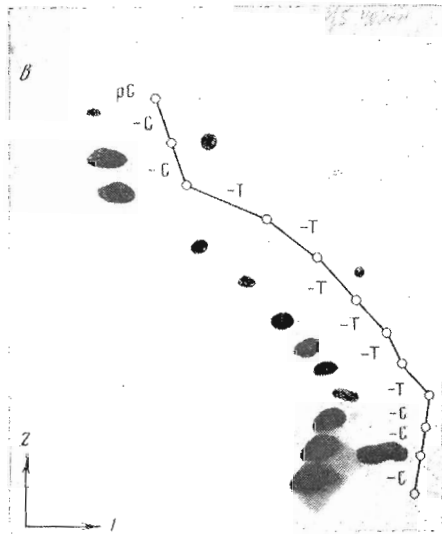
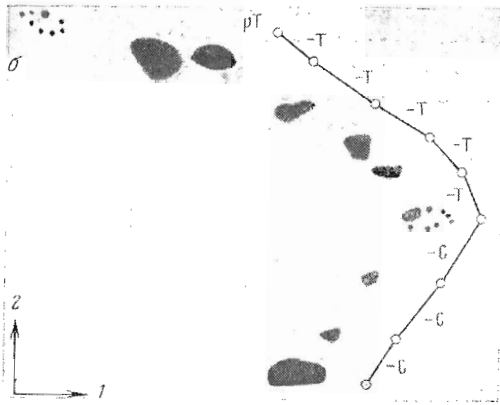
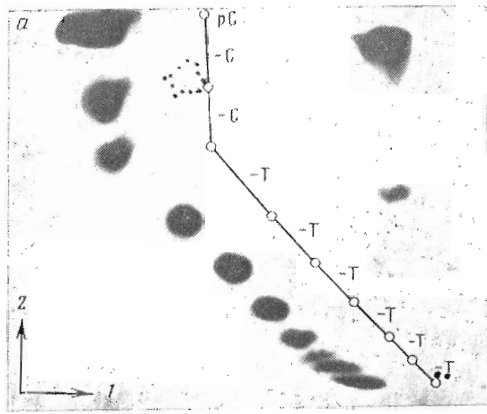


Рис. 4. Двумерное разделение продуктов частичного гидролиза олигонуклеотидов $[^{32}\text{P}](\text{IX})$ (а), $[^{32}\text{P}](\text{X})$ (б) и $[^{32}\text{P}](\text{XII})$ (в) фосфодиэстеразой змеиного яда. Направление 1 – электрофорез на ацетилцеллюлозе при pH 3,5; 2 – гомохроматография

различных матрицах зависит от соотношения «рейтеративного» синтеза и синтеза на подставляемых олигонуклеотидах.

Таким образом, (С)₃-концы исследованных олигонуклеотидов могут иметь значение не только для их удержания в РНК-полимеразе (см. выше), но и для способности к подстановке конец в конец с переходом синтеза *oligo*(A) в *oligo*(G).

Наконец, следует отметить, что на $d(C_3T_6C_3)$ может осуществляться и синтез *poly*(G) из [³H]GTP (данные не представлены). Учитывая потребность РНК-полимеразы в минимум шестичленных матрицах для синтеза полирибоаденилатов, можно предполагать, что образование *poly*(G) происходит на сомкнувшихся в молекуле РНК-полимеразы 3'- и 5'-(С₃)-концах двух молекул $d(C_3T_6C_3)$. Однако это требует дальнейшей проверки.

Экспериментальная часть

В работе использованы мононуклеотиды производства СКТВ БАВ Главмикробиопрома (Новосибирск), триизопрпилбензолсульфохлорид (Merck, ФРГ), DEAE-целлюлоза DE-23 (Whatman, Англия), DEAE-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция), щелочная фосфатаза *E. coli* (КФ 3.1.3.1), фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1), немеченые NTP (Reanal, Венгрия), [³H]АТФ приготовлен Н. Ф. Мясоедовым с сопр.

Хроматографию на бумаге марки FN-3 проводили в системах: 96% EtOH — 1 М AcONH₄ (рН 7,5), 7:3; *n*-PrOH — конц. NH₃ — H₂O, 11:2:7; изомасляная кислота — конц. NH₃ — H₂O, 66:1:33; насыщ. (NH₄)₂SO₄ — *n*-PrOH — 1 М AcONa, 80:2:12. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках Silufol UV₂₅₄ в системах: CH₃Cl — MeOH, 9:1 и 95:5; CH₃CN — H₂O, 85:15.

УФ-спектры олигонуклеотидов снимали на спектрофотометре СФ-16 в водных растворах.

Цианэтильные и ацетильные производные нуклеотидов получали как описано ранее [13]. Ацетильные и цианэтильные группы удаляли действием 1 н. NaOH.

Продукты межнуклеотидных конденсаций выделяли ионообменной хроматографией на колонках с DEAE-целлюлозой или DEAE-сефадексом в хлоридной (при 20°C) или бикарбонатной форме (при 4°C), используя в качестве элюента триэтиламмонийбикарбонат или NaCl в 8 М мочеvine. Обессоливание проводили на DEAE-целлюлозе.

Выход вещества определяли в оптических единицах (OE₂₇₀) и рассчитывали в процентах от теоретического по реагенту, взятому в недостатке; при этом коэффициент молярной экстинкции олигонуклеотида принимали равным сумме коэффициентов экстинкций мононуклеотидов (9600 для dрТ и 22430 для dранС [14]). Анизольную группу удаляли действием 25% NH₃ (1 мл на 10 OE₂₇₀ олигонуклеотида, 15–20 ч при 50°C), 5'-метокситритильную — действием 80% уксусной кислоты (0,5 мл на 10 OE₂₇₀ олигонуклеотида, 2–4 ч, 20°C).

Нуклеотидный состав синтезированных соединений после удаления защитных групп определяли с помощью последовательного проведения гидролиза щелочной фосфатазой и фосфодиэстеразой змеиного яда, как описано ранее [15].

Фосфодиэфирная межнуклеотидная конденсация. Смесь 0,4 ммоль Р-компонента (например, в случае синтеза соединения (II)) и 1,3 ммоль ОН-компонента уваривали 3 раза с абс. пиридином для удаления следов воды. Прибавляли 3,5 ммоль триизопрпилбензолсульфохлорида в 10 мл пиридина, раствор концентрировали до объема 5 мл и оставляли при перемешивании в темноте на 8 ч при 20°C. Реакцию останавливали добавлением к охлажденной реакционной смеси 30% водного пиридина. Щелочной гидролиз реакционной смеси проводили с помощью 1 н. NaOH при

0°C в течение 30 мин. Условия проведения реакции межнуклеотидной конденсации при получении других соединений приведены в табл. 1.

Выделение и очистка олигонуклеотидов. Короткие олигонуклеотиды (I) — (IV) и (VI) выделяли из реакционной смеси и очищали с помощью двукратной ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе А-25 в градиенте концентрации триэтиламмонийбикарбоната (ТЕАВ). Тринуклеозид-дифосфат (V), полученный при взаимодействии 1,5 ммоль $d(\text{MeOTr})\text{anC}$ [16] и 0,5 ммоль $d[\text{ranC-anC}(\text{Ac})]$, выделяли экстракционным методом, последовательно проводя четыре экстракции: из раствора смеси в 20 мл 0,1 М ТЕАВ (рН 7,5) эфиром, этилацетатом, 10% бутанолом в этилацетате и 15% бутанолом в хлористом метиле.

Все процессы экстракции контролировали с помощью ТСХ на силуфол-е UV₂₅₄ в системе ацетонитрил — вода.

Защищенные нонануклеотиды (VII), (VIII) и додекануклеотид (XI) выделяли ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте NaCl при рН 7,5 в 8 М мочевины. После удаления защитных групп эти соединения хроматографировали в тех же условиях и повторно хроматографировали при рН 3,5.

Дефосфорилирование олигонуклеотидов (III) и (X) проводили с помощью щелочной фосфатазы *E. coli*, иммобилизованной на сефарозе 4В.

Синтез poly(A) РНК-полимеразой E. coli. РНК-полимеразу выделяли из *E. coli* 3.050 как описано в работе [17]. Poly(A) синтезировали в пробах объемом 50 мкл, содержащих 0,05 М трис-НСl (рН 8,0), 0,05 М KCl, 0,004 М MnCl₂, 10 мМ дитиотреит, 13% глицерина, 100 мкг/мл АТР, 1 мкКи [³H]АТР (уд. акт. 6 Ки/ммоль), 13 мкг РНК-полимеразы *E. coli*, 0,017 мкМ олигонуклеотид или 0,4 м/мл Т2-ДНК (денатурированной). Пробы инкубировали 20 мин при 37° С. О скорости синтеза poly(A) судили по включению [³H]АМР в кислотонерастворимую фракцию. Там, где это указано, в реакцию вводили GTP в эквимольном количестве по отношению к АТР.

Авторы выражают благодарность Е. Ф. Болдыревой (ИБХ им. М. М. Шемякина) за получение нуклеотидных карт, А. Н. Вульфсону (ИБХ им. М. М. Шемякина) за обращенно-фазовую хроматографию олигонуклеотидов, а также Р. Б. Хесину (ИМБ) за обсуждение результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chamberlin M., Berg P. (1962) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 48, 81—94.
2. Chamberlin M., Berg P. (1964) J. Mol. Biol., 8, 708—726.
3. Chamberlin M., Ring J. (1973) J. Biol. Chem., 248, 2235—2244.
4. Патрушев Л. И., Бочарова Т. Н., Хесин Р. Б. (1978) Биоорган. химия, 4, 229—245.
5. Patrushev L. I., Bocharova T. N., Khesin R. B. (1978) FEBS Lett., 86, 108—112.
6. Agarwal K. L., Yamazaki A., Cashion P. J., Khorana H. G. (1972) Angew. Chem., 84, 489—498.
7. Agarwal K. L., Berlin Yu. A., Kleid D. G., Smirnov V. D., Khorana H. G. (1975) J. Biol. Chem., 250, 5563—5573.
8. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г. (1976) Биоорган. химия, 2, 166—177.
9. Clark V. F. C., Jaouni T. M. (1965) J. Biol. Chem., 240, 3379—3387.
10. Денисова Л. Я., Загребельный С. Н., Пустошилова Н. М. (1974) Молекулярн. биология, 8, 643—649.
11. Белова Н. В., Денисова Л. Я., Загребельный С. Н., Пустошилова Н. М., Сайко-нич Е. Г. (1979) Молекулярн. биология, 13, 845—853.
12. Nishimura S., Jacob T. M., Khorana H. G. (1964) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 52, 1494—1501.
13. Weimann G., Khorana H. G. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 419—430.
14. Kumar A., Khorana H. G. (1969) J. Amer. Chem. Soc., 91, 2743—2749.
15. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) Бюохимия, 39, 747—751.
16. Kumar A., Otsuka E., Khorana H. G. (1972) J. Mol. Biol., 72, 289—307.
17. Larionov O. A., Gragerov A. I., Kalyaeva E. S., Nikiforov V. G. (1979) Mol. and Gen. Genet., 176, 105—111.

Поступила в редакцию
28.II.1980

**SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDE TEMPLATES FOR INVESTIGATION
OF POLYADENYLIC ACID SYNTHESIS BY *E. COLI* RNA POLYMERASE**

BOCHAROVA T. N., ANDREEVA L. A., LARIONOV O. A.

*Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow*

The phosphodiester technique was used to synthesize oligonucleotides d(pT-T-T-T-T-T), d(pT-T-T-T-T-T-C-C-C), d(C-C-C-T-T-T-T-T-T) and d(C-C-C-T-T-T-T-T-T-C-C-C). Spectral and chromatographic data and those of complete exonuclease hydrolysis were used to characterize the synthesized compounds, whose primary structure was confirmed by a finger-print technique. These oligonucleotides, along with the first two of them dephosphorylated at 5'-position, were used as templates in a study of polyadenylic acid synthesis by *E. coli* RNA polymerase.
