



УДК 577.15.02

## РНК-ЛИГАЗА БАКТЕРИОФАГА Т4

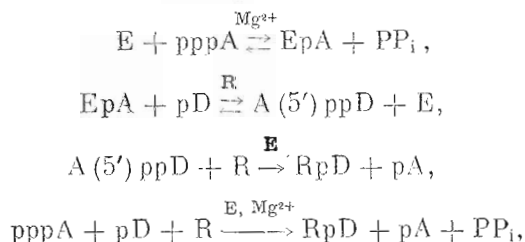
II \*. ОПТИМАЛЬНЫЕ ТЕМПЕРАТУРНЫЕ УСЛОВИЯ РЕАКЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ  
МЕЖНУКЛЕОТИДНОЙ СВЯЗИ ПРИ «СПИВАНИИ» ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ

*Ялковой В. И.*

*Новосибирский государственный университет*

С целью оптимизации условий катализируемой РНК-лигазой реакции исследования самоконденсации гексарибонуклеотидов. Обнаружена ранее не описанная для РНК-лигазы взаимная зависимость оптимумов температуры и pH. Определены оптимальные температуры для «спивания» олигорибонуклеотидов разного типа. В оптимизированных условиях при инкубации с РНК-лигазой гексарибонуклеотидов получены количественные выходы продуктов самоконденсации для (pA)<sub>6</sub> и (pC)<sub>6</sub> и 95% выход для (pU)<sub>6</sub>.

РНК-лигаза бактериофага Т4 (КФ 6.5.1.3) катализирует АТР-зависимое образование фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатным концом олигонуклеотида-донора и 3'-гидроксильным концом олигонуклеотида-акцептора по следующей схеме [3]:



где pD и R — соответственно молекулы донора и акцептора. РНК-лигаза малоспецифична к молекулам донора, и скорость реакции определяется в основном типом и длиной молекул акцептора [4—6]. При использовании наименее реакционноспособных урициловых акцепторов незначительные выходы продуктов [4—7] представляют серьезное препятствие на пути широкого внедрения в практику олигорибонуклеотидного синтеза этого уникального по своим свойствам фермента. С целью оптимизации условий реакции мы изучили образование межнуклеотидной связи при «спивании» РНК-лигазой модельных олигорибонуклеотидов. Успехи, достигнутые в этой области Уленбеком и соавт. [8], и отдельные описанные эксперименты с варьированием температуры [9, 10] позволили нам сосредоточить свои усилия в основном на температурных эффектах.

Предварительные исследования, проведенные на гомогенных гексарибонуклеотидах, терминированных 5'-фосфатом, показали, что оптимум

\* Сообщение I см. [1], предварительное сообщение см. [2].

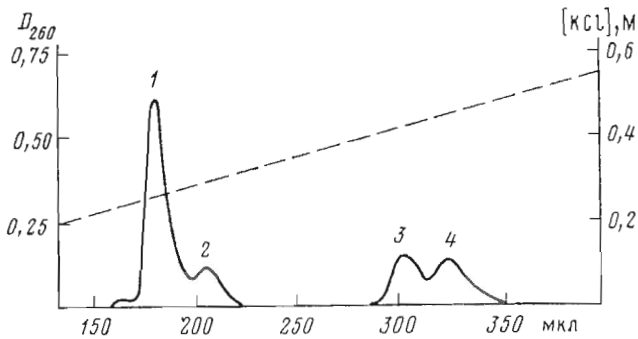


Рис. 1. Хроматография аликвоты реакционной смеси, отобранной через 9 ч от начала реакции, при пивкубации  $(pA)_6$  с РНК-лигазой в стандартных условиях при  $37^\circ C$  и pH 7,5. Условия синтеза и хроматографии описаны в «Эксперимент. части». Пики: 1 —  $(pA)_6$ , 2 —  $A(5')ppA(pA)_5$ , 3 —  $(pA)_{12}$ , 4 —  $cyclo(pA)_{12}$

температуры реакции самоконденсации гексарибонуклеотидов смещается в область низких значений при уменьшении реакционной способности используемого субстрата [2]. В настоящем сообщении представлены результаты детального исследования оптимальных температурных условий реакции образования межнуклеотидной связи при «сшивании» РНК-лигазой гомогенных олигорибонуклеотидов разного типа и длины. Основная часть работы была выполнена, как и ранее [2], на гексарибонуклеотидах.

Стандартные условия катализируемой РНК-лигазой реакции самоконденсации приведены в «Экспериментальной части», индивидуальные — в подписях под рисунками. Продукты реакции анализировали методом микроколоночной хроматографии [11] на синтезированном ранее хроматографическом носителе с обращенной фазой [12]. На рис. 1, демонстрирующем разрешающую способность нового хроматографического носителя, приведена хроматограмма, где гексарибоадениловая и додекарибоадениловая кислоты идентифицированы по соответствующим маркерам, пик 2 соответствует промежуточному соединению — аденилированному гексарибоаденилату, так как при добавлении в реакционную смесь  $[8-^3H]ATP$  он включает радиоактивную метку [5,6];  $cyclo(pA)_{12}$  идентифицирован по устойчивости к фосфодиэстеразе из яда кобры.

Известно, что в большинстве случаев термостабильность ферментов увеличивается в присутствии альбумина и глицерина. Поэтому очищенные препараты РНК-лигазы хранят в 5–50% глицерине [4, 6, 10], а в реакционную смесь при «сшивании» олигорибонуклеотидов вносят от 0,01 до 0,2 мг/мл альбумина [4, 6–10]. Учитывая, что глицерин неизбежно вносится в реакционную смесь с ферментом, а литературные данные о необходимых концентрациях альбумина весьма противоречивы, мы с целью стандартизации условий реакции определили насыщающие концентрации стабилизаторов в катализируемой РНК-лигазой реакции самоконденсации гексарибоуридиловой и гексарибоадениловой кислот. Оказалось, что стабилизирующий эффект альбумина и глицерина не зависит от типа используемого субстрата и при насыщающих концентрациях стабилизаторов (более 12% глицерина или 0,2 мг/мл альбумина) приводит к значительному увеличению выхода продуктов реакции.

На рис. 2 и 3 показана ранее не описанная для РНК-лигазы взаимная зависимость оптимумов температуры и pH. Согласно рис. 2, для всех использованных субстратов положение оптимума температуры зависит от pH реакционной смеси и, наоборот, положение оптимума pH — от температуры реакции (рис. 3). Обнаруженное явление позволило уточнить

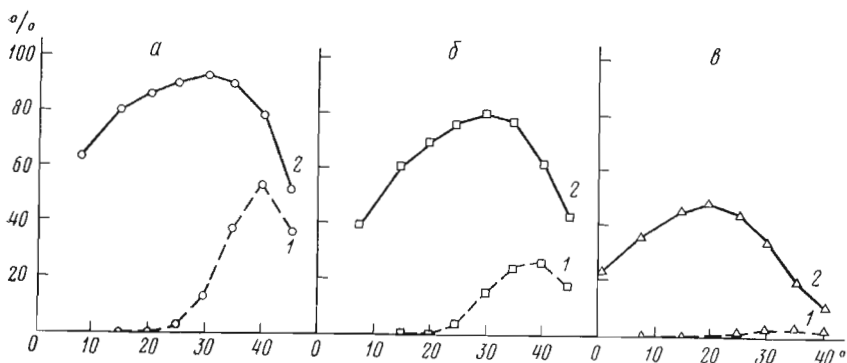


Рис. 2. Зависимость выхода продуктов в катализируемой РНК-лигазой реакции самоконденсации  $(pA)_6$  (а),  $(pC)_6$  (б) и  $(pU)_6$  (в) от температуры при рН 7,5 (1) и 8,7 (2). Остальные условия реакции стандартные (см. «Эксперимент. часть»)

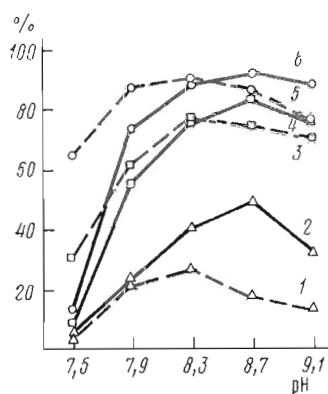


Рис. 3

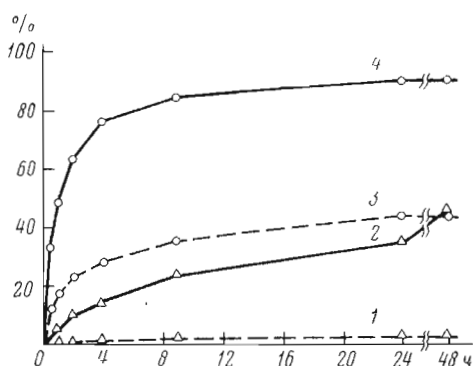


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость выхода продуктов в катализируемой РНК-лигазой реакции самоконденсации  $(pU)_6$  (1, 2),  $(pC)_6$  (3, 4) и  $(pA)_6$  (5, 6) от рН при  $37^\circ\text{C}$  (1, 3, 5) и  $25^\circ\text{C}$  (2, 4, 6). Остальные условия реакции стандартные (см. «Эксперимент. часть»)

Рис. 4. Кинетические кривые накопления продуктов реакции самоконденсации при инкубации  $(pU)_6$  (1, 2) и  $(pA)_6$  (3, 4) с РНК-лигазой в стандартных условиях (см. «Эксперимент. часть») при рН 7,5 (1, 3), 8,7 (2, 4) и температуре  $37^\circ\text{C}$  (1, 3),  $30^\circ\text{C}$  (4),  $20^\circ\text{C}$  (2)

значения оптимальных температур при «сшивании» РНК-лигазой субстратов разного типа (рис. 2) и в оптимизированных по всем исследованным параметрам условиях увеличением концентрации фермента в реакционной смеси добиться для «хороших» субстратов 100% (0,5 мкМ РНК-лигаза при  $30^\circ\text{C}$  и рН 8,7 для  $(pA)_6$  и  $(pC)_6$ ) и для гексарибоуридиловой кислоты 95% (1,2 мкМ РНК-лигаза при  $20^\circ\text{C}$  и рН 8,7) выхода продуктов самоконденсации. Кинетические кривые рис. 4 показывают, что в оптимальных условиях основной причиной значительного увеличения выхода продуктов является увеличение скорости реакции, катализируемой РНК-лигазой.

Влияние степени полимерности акцепторов на положение оптимумов температуры изучали на двух сериях дефосфорилированных акцепторов с различной реакционной способностью (см. «Экспериментальную часть»). Донорами служили меченные тритием одномерные динуклеотиды, содержащие фосфат на 5'-конце молекулы. рН реакционной смеси варьировали от 7,5 до 8,7. При этом существенных различий в положениях оптимумов температуры для каждой серии исследованных акцепторов не обнаружили. Таким образом, оптимизированные в настоящей ра-

боте температурные условия РНК-лигазной реакции достаточно универсальны и, очевидно, могут быть рекомендованы для «сшивания» гетероолигорибонуклеотидов.

Тенденцию к смещению оптимума температуры РНК-лигазной реакции в область низких значений при уменьшении реакционной способности субстратов (рис. 2) с одновременным смещением оптимума рН в щелочную сторону (рис. 3), вероятно, можно экстраполировать на случай «сшивания» РНК-лигазой дезоксиолигонуклеотидов, являющихся, как известно, на порядок «худшими» акцепторами, чем олигорибонуклеотиды [3].

### Экспериментальная часть

В работе были использованы следующие реактивы: дитиотреит (Koch-Light, Англия); глицерин, трис (Serva, ФРГ); АТФ, альбумин из сыворотки крови человека, фосфомоноэстераза из *E. coli* (КФ 3.1.3.1) (Sigma, США);  $[8\text{-}^3\text{H}]\text{АТФ}$  (24 Ки/ммоль, Amersham, Англия); poly(A), poly(C), poly(U) (СКТБ БАН, Новосибирск); poly( $[8\text{-}^3\text{H}]\text{A}$ ), poly( $5\text{-}^3\text{H}]\text{U}$ ) (3,8; 4,05 Ки/ммоль, «Изотоп», СССР); DEAE-бумага DE-81 (Whatman, Англия); остальные реактивы были марок х.ч. или ос.ч.

Эндонуклеазу (КФ 3.1.4) и фосфодиэстеразу (КФ 3.1.4.1) из яда кобры (*Naja oxiana*) выделяли по методу Василенко и соавт. [13]. РНК-лигазу выделяли из биомассы *E. coli* В, инфицированной бактериофагом T4amN 82 по методу, описанному нами ранее [1]. Полученный препарат фермента (2,4 мкМ — концентрация РНК-лигазы, 0,9 мг/мл — концентрация белка) содержал не более 1,8 ед. акт. 3'-экзонуклеазы на 1 пмоль РНК-лигазы.

Олигорибонуклеотиды, содержащие фосфат на 5'-конце молекулы, получали гидролизом соответствующих полирибонуклеотидов эндонуклеазой из яда кобры, как описано в работе [14]. Акцепторы получали дефосфорилированием  $(\text{pA})_6$ ,  $(\text{pA})_{11}$ ,  $(\text{pA})_{20}$ ,  $(\text{pU})_6$  и  $(\text{pU})_{11}$  фосфомоноэстеразой из *E. coli* по методике [15].

Реакцию самоконденсации гексарибонуклеотидов проводили в объеме 20 мкл в микропробирках. Концентрации компонентов стандартной реакционной смеси были следующие: гексарибонуклеотидов — 1 мМ; АТФ — 2 мМ; трис-НСI-буфера — 0,05 М;  $\text{MgCl}_2$  — 10 мМ; дитиотреита — 10 мМ; РНК-лигазы — 0,06 мкМ; альбумина — 0,2 мг/мл; глицерина — 12% (по объему). В каждом конкретном эксперименте необходимое значение рН буферного раствора устанавливали при температуре опыта. При идентификации промежуточных соединений в реакционную смесь вводили  $[8\text{-}^3\text{H}]\text{АТФ}$  в соотношении 1:50 к нерадиоактивному субстрату. С целью исключения отклонений в концентрациях за счет испарения микропробирки с пробами помещали в сцинтилляционных баночках на дно термостатов. Время реакции для  $(\text{pA})_6$  и  $(\text{pC})_6$  — 24 ч, для  $(\text{pU})_6$  — 48 ч. В кинетических экспериментах из реакционной смеси во времени отбирали аликвоты по 1 мкл, разбавляли их 20 мкл воды и прогревали в течение 2 мин при 100°С. При идентификации циклических продуктов в прогретую аликвоту реакционной смеси вводили фосфодиэстеразу из яда кобры и инкубировали в условиях, близких к описанным в работе [15], до полной деградации линейных олигорибонуклеотидов, выполнявших в этом случае роль внутреннего контроля.

Хроматографический анализ проб проводили на хроматографическом носителе с обращенной фазой, представляющем собой полихлортрифторэтиленовый порошок с нанесенным на него бромидом тетраоктиламмония [12]. В работе использовали капиллярные колонки (объем 40 мкл, длина 50 мм). Элюцию вели со скоростью 660 мкл/ч в линейном градиенте концентрации КСI (от 0 до 0,6 М) в 0,01 М имидазол-НСI-буфере

(430 мкл, pH 7,0) с 7 М мочевиной. Поглощение в элюате регистрировали с помощью микроспектрофотометра (МСФП-3), изготовленного в НИОХ СО АН СССР. Выход продуктов реакции (суммарное количество циклической и линейной форм додекарибонуклеотидов) рассчитывали по площадям пиков на хроматограммах. Гипохромный эффект не учитывали.

*Условия реакции «сшивания»* радиоактивных доноров с дефосфорилированными акцепторами не отличались от описанных выше стандартных условий реакции самоконденсации гексарибонуклеотидов, за исключением концентраций, которые в этом случае составляли: для доноров 0,2 мМ, акцепторов — 0,5 мМ, РНК-лигазы — 0,012 мкМ (для адениловых субстратов) и 0,24 мкМ (для уридилловых субстратов). Время реакции 24 ч. Пробы анализировали методом восходящей бумажной хроматографии на DEAE-бумаге в системе: 0,1 М формиат аммония — 4 М муравьиная кислота (pH 1,8). Расстояние от старта до флиниша 10 см. По окончании хроматографии бумагу сушили, разрезали на полоски по 1 см и уровень радиоактивности регистрировали в толуольном сцинтилляторе на счетчике Mark-III (США). О выходе продуктов реакции судили по доле радиоактивности, оставшейся на старте, так как в выбранной системе высокомолекулярные акцепторы и продукты присоединения к ним радиоактивных доноров неподвижны ( $R_f 0$ ), а величина  $R_f$  для динуклеотидов-доноров равна 0,29 для  $(pU)_2$  и 0,76 для  $(pA)_2$ .

Автор выражает глубокую признательность А. Г. Веняминовой за постоянный интерес и внимание к работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Василенко С. К., Веняминова А. Г., Ямковой В. И., Майоров В. И. (1979) Биорган. химия, 5, 624–627.
2. Веняминова А. Г., Корочкина С. Е., Франк Л. А., Ямковой В. И. (1979) III Всесоюзная конференция по методам получения и анализа биохимических реактивов, тезисы докладов, с. 58, Олайн.
3. Sugino A., Snopce T. J., Cozzarelli N. R. (1977) J. Biol. Chem., 252, 1732–1738.
4. England T. E., Uhlenbeck O. C. (1978) Biochemistry, 17, 2069–2076.
5. Sninsky J. J., Last J. A., Gilham P. T. (1976) Nucl. Acids Res., 3, 3157–3166.
6. Ohtsuka E., Nishikawa S., Sugiura M., Ikehara M. (1976) Nucl. Acids Res., 3, 1613–1623.
7. Last J. A., Anderson W. F. (1976) Arch. Biochem. and Biophys., 174, 167–176.
8. Uhlenbeck O. C., Cameron V. (1977) Nucl. Acids Res., 4, 85–98.
9. Ohtsuka E., Nishikawa S., Fukumoto R., Tanaka S., Markham A. F., Ikehara M., Sugiura M. (1977) Eur. J. Biochem., 81, 285–291.
10. Bruce A. G., Uhlenbeck O. C. (1978) Nucl. Acids Res., 5, 3665–3677.
11. Грачев М. А. (1973) в сб.: Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот (Кнорре Д. Г., Венкстерн Т. В., ред.), с. 104–122, «Наука», М.
12. Ямковой В. И. (1979) Бюл. пзобр., № 34; Авт. свид. № 685975.
13. Василенко С. К., Райт В. К. (1975) Биохимия, 40, 578–583.
14. Василенко С. К., Сербо Н. А., Веняминова А. Г., Болдырева Л. Г., Будкер В. Г., Кобец Н. Д. (1976) Биохимия, 41, 260–263.
15. McCutchan T. F., Gilham P. T. (1973) Biochemistry, 12, 4840–4846.

Поступила в редакцию  
11.II.1980

#### BACTERIOPHAGE T4 RNA LIGASE. II. OPTIMAL TEMPERATURE CONDITIONS FOR PHOSPHODIESTER BOND FORMATION BETWEEN OLIGORIBONUCLEOTIDES

YAMKOVY V. I.

Novosibirsk State University, Novosibirsk

The optimize the conditions of T4 RNA ligase catalyzed reaction, a self-condensation of hexaribonucleotides was investigated. The earlier unknown relationship between the temperature and pH optima of the RNA ligase activity was disclosed. Optimal temperatures for joining oligoribonucleotides of different types were determined. Under optimal conditions, the yield in self-condensation was quantitative in the case of  $(pA)_6$  and  $(pC)_6$ , and 95% with  $(pU)_6$ .