

5. Прочно связанные с ДНК белки в составе нуклеоида *E. coli* / А. И. Газиев, Л. А. Фоменко, Д. Г. Закржевская, В. А. Сигаева // Биохимия.— 1985.— 50, № 5.— С. 814—816.
6. Kleinschmidt A. K. Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules // Meth. Enzymol.— 1968.— 12.— P. 361—379.
7. Laemmli H. K. Cleavage of structure DNA *E. coli* // Nature.— 1970.— 227, N 5259.— P. 680—682.
8. Berezny R. Dynamic properties of the nuclear matrix // The cell nucleus / Ed. H. Busch — New York: Acad. press, 1979.— V. 7.— P. 413—456.
9. Wolf-Wotz H., Norquist A. H. Deoxyribonucleic acid and outer membrane; binding to outer membrane involves a specific protein // J. Bacteriol.— 1979.— 140, N 1.— P. 43—49.
10. Nicolaidas A. A., Rolland I. B. Evidens for specific of chromosomal origin with outer membrane fraction isolated from *E. coli* // J. Bacteriol.— 1978.— 135, N 1.— P. 178—189.

ВНИИ прикл. микробиологии, Серпухов Моск. обл.

Получено 30.08.88

УДК 577.214.3

© Л. Я. Денисова, С. Н. Загребельный, Н. М. Пустошилова,
А. Г. Веняминова, В. В. Горн, В. Ф. Зарытова, М. Н. Репкова, 1990

ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ РИБООЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ЗАДАННОГО СТРОЕНИЯ ПУТЕМ ТРАНСКРИПЦИИ ДЕЗОКСИРИБООЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Транскрипция дезоксирибоолигонуклеотидных матриц в системе РНК-полимеразы *Escherichia coli* является одним из перспективных методов получения рибоолигонуклеотидов заданного строения. Для получения препаративных количеств AGGGGAUUGAA-LAUC-фрагмента антикодонной петли фенилаланиновой тРНК и AUGAGGAAUACCC-AUG-фрагмента РНК фага MS2 проведена транскрипция комплементарных дезоксирибоолигонуклеотидов. Уровень включения нуклеотидов в продукт транскрипции при этом составил не менее 70 % нуклеотидного материала матрицы.

Разработана процедура извлечения транскрипта из реакционной смеси, включающая хроматографию на гепарин-агарозе, хроматографию на гидрофобном сорбенте Lichroprep RP18 и электрофорез в 20 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей электроэлюцией целевого продукта из геля. При использовании в РНК-полимеразной реакции 5 о. е. A₂₆₀ дезоксирибоматрицы конечный выход точной РНК-копии составил 1,0—1,5 о. е. A₂₆₀.

Введение. В настоящее время олигорибонуклеотиды приобретают огромное значение как инструменты в молекулярно-биологических исследованиях при изучении структуры и функции РНК. Однако эти исследования развиваются недостаточно эффективно, и одна из основных причин сложившейся ситуации — сложность методов синтеза достаточно протяженных олигорибонуклеотидов. Несмотря на значительный прогресс в области автоматизации синтеза олигорибонуклеотидов в последние годы, химический синтез олигорибонуклеотидов все еще остается трудоемким процессом. При использовании РНК-лигазы удалось синтезировать полирибонуклеотиды длиной до 20—70 звеньев, однако эффективность этого метода крайне низка.

Ранее при изучении функциональных свойств ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* мы обнаружили, что этот фермент достаточно эффективно транскрибирует однонитчатые дезоксирибоолигонуклеотиды как выделенные из природных источников, так и полученные синтетическим путем [1—4]. Это послужило основанием считать транскрипцию дезоксирибоматриц одним из эффективных методов синтеза рибоолигонуклеотидов заданного строения. Последнему способствует и то обстоятельство, что синтез дезоксирибоолиго- и полинуклеотидов в настоящее время является практически решенной задачей.

В предлагаемой работе представлены данные по препаративному синтезу рибоолигонуклеотида длиной 15 звеньев —

AGGGGAUUGAAAAUC (фрагмента антикодоновой петли фенилаланиновой тРНК) и 16-звешного рибоолигонуклеотида AUGAGGAAUACCCAUG (фрагмента РНК фага MS2) путем транскрипции комплементарных матриц.

Материалы и методы. Дезоксирибоолигонуклеотиды GATTTTCAATCCCCTp, pGATTTTCAATCCCCTp и pCATGGGTATTCCCTCAT синтезировали на серийном автоматическом синтезаторе «Виктория-4М» производства СКТБ спецэлектроники и аналитического приборостроения Сиб. отделения АН СССР (Новосибирск) фосфитамидным методом [5]. Для введения концевых фосфатных групп к соответствующему концу олигонуклеотида присоединяли остаток уридина через 5'-оксигруппу. После деблокирования и выделения полученных смешанных олигонуклеотидов проводили окисление инс-диольной группировки концевого фрагмента периодатом натрия и отщепляли этот фрагмент в реакции β -элиминирования [6].

Риботрифосфаты AUG и AGG синтезировали фосфотриэфирным методом с использованием бифункционального фосфорилирующего агента - (*n*-хлорфенил)-фосфонитриазолида [7].

Нуклеозидтрифосфаты АТР, ГТР, УТР и СТР, ДНК-зависимая РНК-полимераза *E. coli* (КФ 2.7.7.6) и полинуклеотидкиназа фага T4 (КФ 2.7.1.78) — производства НИКТИ БАН.

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ с удельной радиоактивностью не менее 37 ТБк/ммоль — фирмы «Amersham» (Англия).

Рибонуклеазы А (КФ 3.1.27.5) и Т1 (КФ 3.1.27.3) — фирмы «Serva» (ФРГ).

Реакцию транскрипции олигонуклеотидов проводили в смеси, содержащей 40 мМ трис-НСl, рН 7,9, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ MnCl₂, 200 мкг/мл РНК-полимеразы («core»-фермент) с удельной активностью не ниже 1000 ед. на мг белка, 0,1 или 0,5 мМ дезоксирибоолигонуклеотид*, 5-кратный молярный избыток рибозатравки над молями матрицы (AGG в случае GATTTTCAATCCCCT и AUG — для CATGGGTATTCCCTCAT) и 5—6-кратный избыток рибонуклеозидтрифосфатов над мононуклеотидной концентрацией матрицы. При этом рибонуклеозидтрифосфаты АТР, ГТР, СТР и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (с удельной радиоактивностью 37—165 кБк/ммоль) брали в соотношении, пропорциональном таковому комплементарных нуклеотидов в участке матрицы, следующем за затравкой.

Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 20 ч.

По окончании реакции смесь наносили на колонку с гепарин-агарозой («Sigma», США) (1 см³), соединенную на выходе с колонкой (0,5 см³) с гидрофобным сорбентом Lichrospher RP18 («Serva», ФРГ). Систему колонок промывали 0,2 М NH₄Cl до полного отсутствия радиоактивной метки на выходе с колонки с Lichrospher RP18 (радиоактивность определяли на счетчике Mark-III «Nuclear Chicago», США). Затем колонки рассоединяли. С гепарин-агарозы элюировали РНК-полимеразу 0,7 М NH₄Cl, а с гидрофобного сорбента — олигонуклеотидный материал 30 %-ным ацетонитрилом. Осаждали олигонуклеотиды 10 объемами ацетона, содержащего 2 % LiClO₄.

Олигонуклеотиды фракционировали с помощью электрофореза в блоке (32×18××0,05 см) 20 %-ного ПААГ, содержащего 7 М мочевины, по [8].

Транскрипт из геля извлекали путем его электроэлюции на ДЭАЭ-бумагу DE-81 («Whatman», Англия) с последующим смывом с бумаги 1 М LiClO₄ и осаждением 10 объемами ацетона.

5'-конец транскрипта метили с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и полинуклеотидкиназы фага T4, как описано в работе [9].

Первичную структуру определяли по методу Донис-Келлер и др. [10].

Результаты и обсуждение. Ранее нами показано, что при транскрипции дезоксирибоолигонуклеотидов в системе ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* синтезируемые транскрипты гетерогенны по размеру [3]. Эту гетерогенность в большой степени удастся устранить при использовании коротких рибоолигонуклеотидов-затравок, комплементарных какому-либо участку матрицы [3, 4].

Известно также, что стимулирующий эффект затравок увеличивается при низких концентрациях субстратов (общая концентрация

* Концентрации олигонуклеотидов выражены в мононуклеотидных единицах.

0,05--0,1 мМ) и использовании РНК-полимеразы, лишенной сигма-фактора («core»-фермента) [11].

Однако следует отметить, что при снижении концентрации рибонуклеозидтрифосфатов значительно снижается общее включение рибонуклеотидов в продукт по сравнению с полной системой транскрипции. Так, при считывании 15-звенного олигонуклеотида

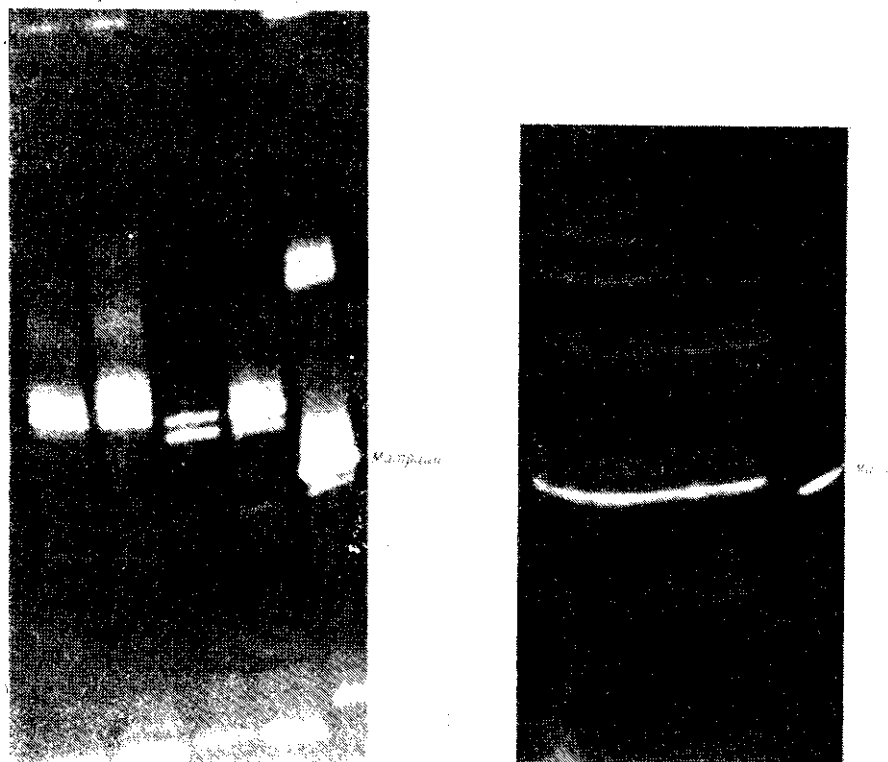


Рис. 1. Электрофореграмма транскриптов, полученных на GATTTTCAATCCCCTp (1, 3) и pGATTTTCAATCCCCTp (2, 4) в отсутствие затравки с РНК-полимеразой «holo» (1, 2) и в присутствии rAGG и РНК-полимеразы «core» (3, 4); 5 — 32 pGATTTTCAATCCCCTp

Fig. 1. Electrophoresed transcripts synthesized on the GATTTTCAATCCCCTp template (1, 3) and the pGATTTTCAATCCCCTp template (2, 4) with RNA polymerase «holo»-enzyme in the absence of a primer (1, 2) and with «core»-enzyme in the presence of rAGG (3, 4). 5 — sequence 32 pGATTTTCAATCCCCTp

Рис. 2. Авторадиограмма препаративного электрофореза транскрипта, полученного на pCATGGGTATTTCCTCAT

Fig. 2. The preparative electrophoresis of the transcript synthesized on the pCATGGGTATTTCCTCAT template.

GATTTTCAATCCCCT — дезоксиконии антикодонной петли фенил-аланиновой тРНК — в присутствии затравки rAGG и 0,1 мМ нуклеозидтрифосфатов включение нуклеотидов за 20 ч реакции не превышает 5% нуклеотидного материала матрицы.

Поэтому для повышения уровня синтеза целевого продукта была проведена реакция при более высоких концентрациях субстратов (0,6 мМ). Матричный олигонуклеотид при этом использовали в двух вариантах — фосфорилированный только с 3'-конца и содержащий фосфатные остатки на обоих концах. Было обнаружено значительное повышение уровня включения нуклеотидов в продукт реакции, достигающее 70% уровня матрицы.

На рис. 1 представлены электрофореграммы транскриптов, полученных на этих двух матрицах в системе РНК-полимеразы «holo» в

отсутствии затравки (дорожки 1, 2), а также в присутствии триплеклеотида γ AGG и РНК-полимеразы «соге» (дорожки 3, 4). Видно, что во всех случаях синтезируются преимущественно продукты, достаточно близкие матрице по размерам (дорожка 5). Тем не менее транскрип-

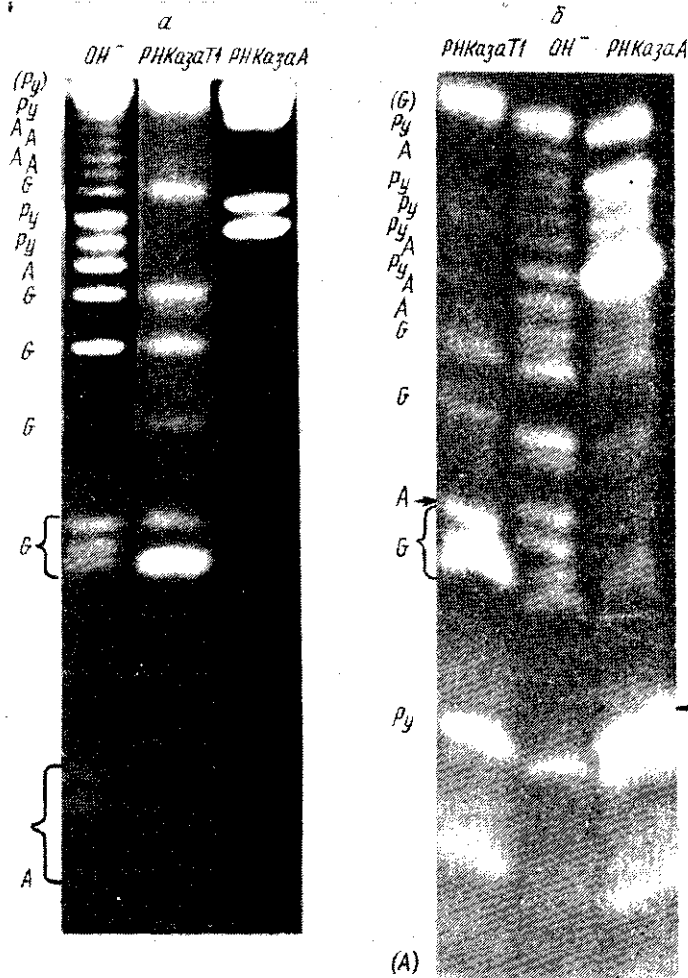


Рис. 3. Авторадиограмма секвенирующего геля, содержащего продукты неполного гидролиза $[5'-^{32}P]$ меченных транскриптов, полученных на $pGATTTTCAATCCCCTp$ (а) и $pCATGGGTATTCCTCAT$ (б)

Fig. 3. The sequencing gel containing the incomplete hydrolysis products of $5'-[^{32}P]$ -labeled transcripts synthesized on the $pGATTTTCAATCCCCTp$ template (а) and the $pCATGGGTATTCCTCAT$ template (б)

ты, полученные в отсутствие затравки, более гетерогенны и выход их ниже 30—40 % нуклеотидного материала матрицы.

На рис. 2 представлена авторадиограмма препаративного электрофореза транскриптов, полученных в присутствии затравки γ AUG, на олигонуклеотиде $pCATGGGTATTCCTCAT$, комплементарном участку РНК фага MS2.

Как и с предыдущим олигонуклеотидом, основной продукт транскрипции этого олигомера имеет размеры, близкие к размерам матрицы.

На рис. 3 представлены авторадиограммы секвенирующих гелей, содержащих продукты неполного гидролиза транскриптов. Видно, что оба транскрипта комплементарны своим матрицам и имеют равные с ними размеры.

Ранее при исследовании транскрипции коротких (7—10-звенных) дезоксирибоолигонуклеотидов нами было показано, что только фосфорилированные с обоих концов олигомеры дают транскрипты, равные им по длине [1—3]. При транскрипции же дефосфорилированных с одного или обоих концов олигонуклеотидов продукты транскрипции превышают матрицу в несколько раз.

Однако, как показали наши дальнейшие исследования, этот феномен с увеличением длины считываемого олигонуклеотида постепенно исчезает, и при транскрипции 15—16-звенных матриц в наборе транскриптов доля продуктов, равных матрице по размеру, становится преобладающей. Тем не менее во избежание синтеза более длинных транскриптов, а следовательно, для повышения выхода целевого РНК-продукта рекомендуется использовать дезоксиматрицы, фосфорилированные с обоих концов.

При транскрипции рGATTTTCAATCCCTp в присутствии AGG в наборе транскриптов также были обнаружены более высокомолекулярные продукты (рис. 1, дорожка 4), однако это, скорее всего, связано с транскрипцией полинуклеотидных примесей, обнаруженных в препарате матрицы (рис. 1, дорожка 5 — верхняя полоса).

При препаративном синтезе рибоолигонуклеотидов методом транскрипции комплементарных дезоксирибоолигонуклеотидов возникают проблемы выделения транскриптов из реакционной смеси, а также возможности регенерации матрицы и РНК-полимеразы для их повторного использования.

Мы обнаружили, что РНК-полимеразу легко отделить хроматографией на колонке с гепарин-агарозой. Фермент связывается с этим сорбентом в 0,2 М хлористом аммонии, в то время как другие компоненты реакционной смеси в этих условиях не связываются совсем и элюируются в свободном объеме колонки. РНК-полимераза, элюируемая с гепарин-агарозы 0,7 М NH₄Cl сохраняет не менее 70 % активности и может использоваться вторично.

Матрица и синтезированный рибоолигонуклеотид отделяются от нуклеозидтрифосфатов на гидрофобном сорбенте Lichrospher RP18, а их отделение друг от друга происходит только во время электрофореза в 20 %-ном ПААГ в денатурирующих условиях (7 М мочевины). Как показано на рис. 1 и 2, дезоксиматрицы имеют большую электрофоретическую подвижность, чем комплементарные, равные им по длине транскрипты.

Данным методом было получено 1,0—1,5 о. е. A₂₆₀ рибоолигонуклеотида — точной копии дезоксиматрицы на 5 о. е. A₂₆₀ последней.

Дезоксирибоолигонуклеотид, выделенный из ПААГ, также сохраняет свои матричные свойства, хотя включение рибоуклеотидов на нем идет в 2—3 раза менее эффективно, чем на исходной матрице.

PREPARATIVE SYNTHESIS OF RIBOOLIGONUCLEOTIDES WITH THE PRESET SEQUENCE BY TRANSCRIPTION OF DEOXYRIBONUCLEOTIDES

L. Ya. Denisova, S. N. Zagrebelny, N. M. Pustoshilova

Research and Technology Institute of Biologically Active Substances, Berdsk, Novosibirsk Region

A. G. Venyaminova, V. V. Gorn, V. F. Zaritova, M. N. Repkova

Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Summary

The transcription of complementary deoxyribooligonucleotides was performed to obtain AGGGGAUUGAAAAUC (tRNA^{Phe} anticodon loop fragment) and AUGAGGAUACCCAUG (the MS2 phase RNA fragment) in preparative amounts. The nucleotide incorporation into the transcription product was shown to achieve 70 % of the template nucleotide level. The procedure was developed for the isolation of the transcript from the reaction mix-

ture. The isolation steps involve geparine-agarose chromatography, Lichroprep RP 18 one and the electrophoresis in 20 % polyacrylamide gel under denaturation conditions followed by electroelution of the desired product from gel.

Being an exact copy of deoxyribotemplate the ribooligonucleotide gave the yield of 1.0-1.5 U_{260} on 5.0 U_{260} of the template.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Денисова Л. Я., Загребельный С. Н., Пустошилова Н. М. Изучение матричной активности шпиримидиновых дезоксирибоолигонуклеотидов в системе РНК-полимеразы *E. coli* // Молекуляр. биология.— 1974.— 8, № 5.— С. 643—650.
2. Исследование матричных свойств декадезоксинуклеотида d(pCCACGAAACC) в системе РНК-полимеразы *Escherichia coli* / А. Г. Бадашкева, Л. Я. Денисова, С. Н. Загребельный и др. // Там же.— 12, № 2.— С. 327—333.
3. Транскрипция синтетических олигонуклеотидов / Н. М. Белова, Л. Я. Денисова, С. Н. Загребельный и др. // Там же.— 1979.— 13, № 4.— С. 845—853.
4. Непрерывное копирование коротких матриц ДНК-зависимой РНК-полимеразой / Л. Я. Денисова, С. Н. Загребельный, И. В. Кутявин, Н. М. Пустошилова // Докл. АН СССР.— 1982.— 267, № 2.— С. 475—478.
5. Автоматический синтез олигодезоксирибонуклеотидов фосфитамидным методом на установке «Виктория-4М» / С. М. Грязнов, В. В. Горн, В. Ф. Зарытова и др. // Изв. Сиб. отд-ния АН СССР, Сер. хим. наук.— 1987.— 2, № 1.— С. 119—123.
6. Сравнительные характеристики методов синтеза олигодезоксирибонуклеозид-3'-фосфатов / Е. М. Волков, С. М. Грязнов, Н. Ф. Крышечкая и др. // Химия природ. соединений.— 1986.— № 2.— С. 228—234.
7. Синтез кодонов лейцина и их использование для изучения кодового соответствия тРНК^{Leu} / А. Г. Веняминашова, Г. В. Овчаренко, М. Н. Респкова, Л. А. Франк // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 5.— С. 1376—1379.
8. Maniatis T., Jeffrey A., van de Sande H. Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis // Biochemistry.— 1975.— 14, N 17.— P. 3787—3794.
9. Richardson Ch. C. Polynucleotide kinase exchange reaction // Ibid.— 1965.— 54, N 1.— P. 158—165.
10. Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. Mapping adenines, guanines and pyrimidines in RNA // Nucl. Acids Res.— 1977.— 4, N 8.— P. 2527—2538.
11. Nath K., Hurwitz J. Covalent attachment of ribonucleotides at 3-hydroxyl ends of deoxyribonucleic acid catalysed by deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid polymerase of *Escherichia coli* // J. Biol. Chem.— 1974.— 249, N 9.— P. 2605—2615.

НИКТИ БАВ, Бердск

Получено 25.08.89

Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск

УДК 577.17.049

© А. А. Ккладзе, В. Г. Биркая, Э. М. Ломидзе,
Д. Р. Монаселидзе, 1990

ИССЛЕДОВАНИЕ рН-ЗАВИСИМЫХ СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ M_4 ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ ЦИНКА

Методами микрокалориметрии и УФ-спектроскопии установлено, что на молекуле ЛДГ M_4 существует один специфический центр связывания для ионов цинка. По данным кругового дихроизма, при связывании ферментом иона цинка не наблюдается изменений во вторичной структуре, хотя при этом изменяются кинетические параметры фермента.

Введение. Известно, что высокая эффективность и селективность ферментов в качестве катализаторов обусловлена особенностями их строения. Связывание ферментов с низкомолекулярными лигандами, в частности с ионами металлов, имеет, как правило, специфический характер и значительно влияет на их кинетические параметры. Одной из причин, определяющих кинетическое поведение олигомерных ферментов, является характер ассоциации составляющих их субъединиц. В этом плане принципиально важно изучить вопрос о влиянии на ассоциацию — диссоциацию лактатдегидрогеназы (ЛДГ) эндогенно связанных