

УДК 547.963.3

**СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ.
СИНТЕЗ ДИНУКЛЕОЗИДМОНОФОСФАТОВ,
КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ РНКазой *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM***

М. И. ХАБАРОВА и С. М. ЖЕНОДАРОВА

Институт биологической физики Академии наук СССР, Пуцзино, Московская область

Изучен синтез дирибонуклеозидмонофосфатов АрС, АрU, GrС, GrU, СрС, СрU, UpС, UpU, АрА и GrА из нуклеозид-2',3'-циклофосфатов и нуклеозидов при участии неспецифической РНКазы *Penicillium brevicompactum*. Для осуществления синтеза 3'—5'-фосфодиэфирной связи оба субстрата (донор и акцептор фосфата) должны быть связаны с ферментом. Лучшими донорами фосфата для изученной РНКазы являются пуриновые нуклеозид-2', 3'-циклофосфаты, а лучшим акцептором — цитидин. Выход АрС и GrС равен 50%. Определены $K_{каж}$ равновесия для этих реакций. Значения $K_{каж}$ для субстратов $A > p + C$ и $G > p + C$ варьируют от 0,4 до 3 M^{-1} в зависимости от начальной концентрации субстратов, причем $K_{каж}$ уменьшается с увеличением концентрации, что, вероятно, связано с агрегацией реагентов в растворе при более высоких концентрациях. $K_{каж}$ для пиримидиновых нуклеозид-2', 3'-циклофосфатов, а также для всех случаев, когда акцептором является уридин, существенно ниже 0,1—0,2 M^{-1} . Оптимальное значение рН для синтеза АрС — 7,0, для синтеза GrС — 4,6. По-видимому, конформационная форма фермента, существующая при рН 7,0, лучше связывает $A > p$, тогда как при рН 4,6 РНКазы активнее взаимодействует с $G > p$. Специфичность фермента характеризуется тем, что уридин слабее связывается с ферментом, чем цитидин. Более низкая концентрация тройного фермент-субстратного комплекса в растворе приводит к более низкому выходу динуклеозидмонофосфатов АрU и GrU (~15%). Цитидин-5'-фосфат полностью ингибирует синтез АрU. Пиридин ингибирует как синтетическую, так и гидролитическую активность РНКазы *Penicillium brevicompactum*. С повышением температуры (от 0 до 37°) при небольшом изменении равновесной концентрации динуклеозидмонофосфата значительно увеличивается (в 3 раза) отношение скорости синтеза к скорости гидролиза.

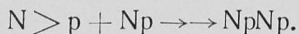
Ферментативные методы ступенчатого синтеза олигорибонуклеотидов все более широко используются в последние годы [1]. Для успешного развития этих методов необходимо увеличение числа ферментов, обладающих соответствующими каталитическими свойствами, а также изучение механизма их действия. Синтез 3'—5'-межнуклеотидной связи, катализируемый РНКазой, осуществляется путем переноса остатка фосфорной кислоты из 2'-О-положения нуклеозид- 2',3'-циклофосфата (донор фосфата) в 5'-О-положение нуклеозида, нуклеотида или их производных со свободной 5'-ОН-группой (акцептор фосфата)*:



Одновременно с синтезом происходит гидролиз 2',3'-циклофосфатной группировки в доноре фосфата до 3'-монофосфатной: $N > p \rightarrow Np$. Образующийся 3'-фосфат нуклеозида при достаточно высокой концентрации можно использовать как акцептор, что снижает выход динуклеозидмо-

* Сокращения даны в соответствии с «Правилами», установленными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC—IUB [2].

нофосфата и усложняет состав реакционной смеси:



Обычно через определенный промежуток времени выход динуклеозидмонофосфата NpN' достигает плато, что указывает на установление равновесия. В зависимости от типа фермента, а также от условий, в которых осуществляется синтез, время установления этого равновесия меняется очень резко: для гуанил-РНКаз оно измеряется часами [3—5], тогда как для неспецифических РНКаз — сутками [6; 7]. Если отношение скорости синтеза (скорости включения донора фосфата в динуклеозидмонофосфат) к скорости гидролиза донора фосфата достаточно велико (≥ 1), то гидролиз не мешает синтезу и даже при относительно невысокой равновесной концентрации динуклеозидмонофосфата его выход может быть существенно повышен благодаря повторному использованию регенерируемого донора фосфата.

Настоящая работа посвящена изучению синтеза динуклеозидмонофосфатов при участии неспецифической РНКазы *Penicillium brevicompactum*.

МЕТОДИКА

В работе использовали Na-соли аденозин-, цитидин- и уридин-2',3'-циклофосфата, а также цитидин, уридин и аденозин фирмы «Reanal» (Венгрия). Гуанозин-2',3'-циклофосфат (аммонийная соль) был синтезирован по методу, описанному в работе [8]. Препарат неспецифической РНКазы *P. brevicompactum* был выделен и любезно предоставлен нам С. И. Безбородовой (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР) [9]. За единицу активности фермента принимали количество РНКазы, способное расщепить 1 μ моль цитидин-2',3'-циклофосфата за 1 мин при pH 5,2 и 37°.

Синтез динуклеозидмонофосфатов. Смесь нуклеозид-2',3'-циклофосфата и нуклеозида инкубировали с ферментом в 0,09 мл буферного раствора (концентрации компонентов даны в таблицах) при 0°; отобранные из реакционной смеси пробы (0,004 мл) анализировали методом электрофореза на бумаге и УФ-спектрофотометрии. Для анализа динуклеозидмонофосфаты очищали хроматографией на бумаге. Структуру полученных динуклеозидмонофосфатов подтверждали обычными способами [6].

Хроматографию и электрофорез проводили на ленинградской бумаге марки «медленная», предварительно промытой 2 М соляной кислотой, 0,5%-ным раствором динатриевой соли ЭДТА и водой. При хроматографировании использовали систему растворителей: пропанол-2 — концентрированный аммиак — вода (7 : 1 : 2). Вертикальный электрофорез проводили в течение 2 час при напряжении 20 в/см² в 0,05 М бикарбонате триэтиламмония (pH 8,0).

УФ-спектры снимали на спектрофотометрах СФ-4А и Unicam SP-800 с автоматической записью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В реакции, катализируемой неспецифической РНКазой *P. brevicompactum*, равновесная концентрация динуклеозидмонофосфатов устанавливается за 2—6 суток, причем время достижения равновесия ($t_{\text{равн}}$) и равновесная концентрация динуклеозидмонофосфата ($C_{\text{равн}}$) зависят как от концентрации субстратов и фермента, так и от природы гетероциклического основания субстрата (табл. 1). Скорость образования динуклеозидмонофосфата и степень превращения донора фосфата в динуклеозидмонофосфат, как и следовало ожидать, увеличиваются с повышением концентрации субстрата, однако при концентрации донора $>0,25$ М это влияние практически не сказывается. Равновесие устанавливается медленнее для больших концентраций, отношение скоростей синтеза и гидролиза оказывается максимальным при концентрации донора 0,25 М. При эквимолекулярных концентрациях донора и акцептора синтез не достигает равновесного состояния, кинетическая кривая проходит через максимум и начинается довольно быстрый гидролиз динуклеозидмонофосфата. С повышением концентрации акцептора выход динуклеозидмонофосфата и отношение скорости синтеза к скорости гидролиза увеличиваются. Отмеченные закономерности справедливы не для всех изученных

Таблица 1

Синтез динуклеозидмонофосфатов, катализируемый РНКазой *P. brevicompactum*
Синтезы проводили при 0° в 0,2 М фосфатном буфере, рН 7,0 и концентрации фермента 0,8 ед/мл

Динуклеозид- монофосфат	Концентрация, М		$t_{\text{равн.}}$ час	Выход NpN', %	Синтез/гидро- лиз	$K_{\text{каж.}}$ М ⁻¹
	N>p	N'				
ApC	0,028	0,084	70	24,5	0,89	2,98
	0,05	0,15	120	37,2	1,06	2,4
	0,1	0,30	120	41,7	1,16	1,4
	0,25	0,25	50 ^a	28,5	0,74	1,12
	0,25	0,50	100	42,0	1,55	0,8
	0,25	0,75	168	48,5	1,74	0,65
	0,25	1,25	192	47,5	2,41	0,35
	0,4	1,2	144	50,0	1,63	0,42
ApU	0,25	0,75	100	14,6	0,20	0,19
ApA	0,25	0,50	16	5,6	0,07	—
CpC	0,028	0,084	22	6,0	0,09	0,72
	0,028	0,28	39	9,4	0,17	0,33
	0,25	0,75	38	9,8	0,16	0,13
	0,25	1,25	120	9,3	0,12	0,07
	0,25	0,75	168	12,1	0,15	0,16
	0,25 ^b	0,75	72	12,0	0,20	0,16
	0,25	0,75	40	4,9	0,07	0,06
	0,028	0,084	20	4,5	0,06	0,55
CpU	0,028	0,28	38	9,7	0,13	0,34
	0,25	0,75	38	9,1	0,15	0,12
	0,25	1,25	48	9,8	0,16	0,08
	0,25	0,75	143	15,2	0,23	0,20
	0,25	0,75	40	7,4	0,08	0,10
	0,028	0,084	64	5,2	0,08	0,62
	0,25	0,75	38	8,6	0,14	0,11
	0,25	1,25	192	13,4	0,23	0,10
UpU	0,25	0,75	214	49,5	2,4	0,66
	0,25	1,25	310	49,3	3,3	0,40
	0,25	0,75	46	16,9	0,30	0,22
	0,25	0,50	40	5,6	0,07	—
	0,25	0,75	46	16,9	0,30	0,22
	0,25	0,50	40	5,6	0,07	—
	0,25	0,75	46	16,9	0,30	0,22
	0,25	0,50	40	5,6	0,07	—
GpC	0,028	0,084	64	5,2	0,08	0,62
GpU	0,25	0,75	38	8,6	0,14	0,11
	0,25	1,25	192	13,4	0,23	0,10
	0,25	0,75	214	49,5	2,4	0,66
	0,25	1,25	310	49,3	3,3	0,40
	0,25	0,75	46	16,9	0,30	0,22
	0,25	0,50	40	5,6	0,07	—
	0,25	0,75	46	16,9	0,30	0,22
	0,25	0,50	40	5,6	0,07	—
GpA	0,25	0,50	40	5,6	0,07	—

Примечание. ^a Время максимального выхода. ^b Результаты, полученные при использовании 0,2 М ацетатного буфера, рН 5,2. ^c Синтез проводили в 0,05 М имидазольном буфере, рН 7,0. ^г Синтез проводили в 0,2 М ацетатном буфере, рН 4,65.

субстратов; для смесей C>p+C и U>p+C изменение концентрации донора при постоянном отношении [донор]/[акцептор] не влияет на выход динуклеозидмонофосфата.

Концентрация фермента влияет только на время установления равновесия и практически не влияет на выход динуклеозидмонофосфата

Таблица 2

Синтез ApC при разных концентрациях РНКазы *P. brevicompactum*
Условия синтеза: [A>p] = 0,25 М; [C] = 0,75 М; рН 7,0 (0,2 М фосфатный буфер)

Концентра- ция фермен- та, ед/мл	$t_{\text{равн.}}$ час	Выход ApC, %	Синтез/гид- ролиз	$K_{\text{каж.}}$ М ⁻¹	Концентра- ция фермен- та, ед/мл	$t_{\text{равн.}}$ час	Выход ApC, %	Синтез/гид- ролиз	$K_{\text{каж.}}$ М ⁻¹
0,225	240*	42,7	2,07	0,56	1,80	72	49,8	1,73	0,66
0,45	240*	49,2	1,79	0,65	2,25	72	48,1	1,38	0,64
0,90	120	50,0	1,53	0,67	3,15	48	45,1	1,38	0,60
1,35	96	48,6	1,86	0,64					

* Реакция не приходит в равновесие состояние за 240 час.

(табл. 2). Интересно отметить, что отношение скорости синтеза динуклеозидмонофосфата к скорости гидролиза донора фосфата почти не меняется при значительных изменениях концентрации фермента.

Наибольшее влияние на ход реакции и выход динуклеозидмонофосфата оказывает структура нуклеинового основания донора и акцептора фосфата. Для всех доноров фосфата равновесие устанавливается более медленно, но $C_{равн}$ динуклеозидмонофосфата значительно выше, если акцептором фосфата служит цитидин. Синтез динуклеозидмонофосфатов, содержащих уридин с 3'-конца, значительно быстрее достигает равновесного состояния при более низкой $C_{равн}$ динуклеозидмонофосфата. Пиримидиновые нуклеозид-2',3'-циклофосфаты в качестве доноров фосфата дают значительно более низкий выход динуклеозидмонофосфатов, чем пуриновые. К сожалению, результаты синтеза с пуриновыми нуклеозидами в качестве акцепторов не могут быть рассмотрены в этом плане, так как низкий выход динуклеозидмонофосфатов и быстрый гидролиз донора фосфата могут быть обусловлены малой растворимостью пуриновых нуклеозидов, недостаточной для того, чтобы обеспечить требующуюся концентрацию акцептора.

Константа равновесия, определенная для различных субстратов из соотношения

$$K_{каж} = \frac{[NpN']}{[N > p][N']},$$

где $[NpN']$ — равновесная концентрация динуклеозидмонофосфата, $[N > p]$ и $[N']$ — начальные концентрации донора и акцептора фосфата соответственно, оказалась весьма невысокой ($0,1-0,2 \text{ M}^{-1}$) для пиримидиновых нуклеозид-2',3'-циклофосфатов, а также во всех случаях, когда акцептором фосфата был уридин. При расчете $K_{каж}$ при синтезе ApC и GpC для разных начальных концентраций субстратов обнаружена тенденция к увеличению значений $K_{каж}$ в случае разбавленных реакционных смесей, что совпадает с данными, полученными с РНКазой T_1 [3]. Вероятно, это связано с частичной агрегацией реагентов при более высокой концентрации.

Для выяснения оптимальных условий синтеза динуклеозидмонофосфатов были изучены гидролиз нуклеозид-2',3'-циклофосфатов и синтез динуклеозидмонофосфатов при различных значениях pH (табл. 3 и 4). Для всех нуклеозид-2',3'-циклофосфатов минимальное расщепление наблюдается при pH 6,5. G > p расщепляется очень медленно при всех исследованных значениях pH; при pH 6,5 за 30 мин в реакционной смеси обнаруживаются только следы Gr. Оптимальное значение pH, определенное для гидролитической функции РНКазы *P. brevicompactum*, равно 5,2 [9].

Влияние pH на ход синтеза проявляется по-разному в зависимости от природы нуклеинового основания субстрата: оптимальное значение pH в

Таблица 3

Гидролиз нуклеозид-2', 3'-циклофосфатов при различных значениях температуры и pH
11,25 мкмоль N > p в 0,045 мл буфера + 0,9 ед/мл фермента; 0,2 М ацетатный буфер, pH 3,5—5,8; 0,2 М фосфатный буфер, pH 6,5—7,6

N > p	Количество N > p, расщепляющегося за 30 мин, %									
	0°					37°				
	4,65	5,2	5,8	6,5	7,0	4,65	5,2	5,8	6,5	7,0
A > p	33,6	36,4	31,4	9,7	20,0	49,9	44,9	45,7	10,4	27,6
G > p	5,9	5,9	4,0	—	—	11,4	8,4	6,4	—	—
C > p	30,7	26,5	25,4	12,4	28,9	54,1	46,9	42,6	10,6	36,9
U > p	44,4	—	8,0	5,6	12,0	45,4	18,4	7,4	7,3	16,9

Таблица 4

Синтез динуклеозидмонофосфатов типа NpC при различных значениях pH
 NpC (кроме ApC) синтезировали в стандартных условиях: $[N > p] = 0,25 M$; $[C] = 0,75 M$; концентрация фермента — $0,8 \text{ ед/мл}$; общий объем реакционной смеси — $0,09 \text{ мл}$. Синтез ApC проводили при $[A > p] = 0,028 M$, $[C] = 0,084 M$ и концентрации фермента $0,04 \text{ ед/мл}$. Буферные растворы для различных значений pH см. в табл. 3; pH $8,0-0,05 M$ имидазольный буфер

pH	ApC		GpC		CpC		UpC	
	выход, %	синтез/гидролиз	выход, %	синтез/гидролиз	выход, %	синтез/гидролиз	выход, %	синтез/гидролиз
3,5	—	—	39,6	0,98	—	—	—	—
4,0	—	—	49,0	2,13	10,2	0,12	9,75	0,13
4,6	10,1	0,12	49,5	2,4	9,2	0,14	11,5	0,15
5,2	13,2	0,12	8,6	0,14	9,8	0,16	9,1	0,15
5,8	15,5	0,23	—	—	—	—	—	—
6,5	25,0	0,78	—	—	—	—	—	—
7,0	25,8	1,0	14,3	0,29	12,0	0,45	15,2	0,23
7,6	23,2	1,27	—	—	12,0	0,45	—	—
8,0	—	—	—	—	8,7	0,13	—	—

Таблица 5

Состояние нуклеиновых оснований субстратов при различных значениях pH

Субстрат	$pK_a [10]^*$	Ионизированная форма [11], %		Субстрат	$pK_a [10]^*$	Ионизированная форма [11], %	
		pH 7,0	pH 4,6			pH 7,0	pH 4,6
$A > p$	3,7	0,0	11,0	$U > p$	9,4	0,0	0,0
$G > p$	9,4	0,0	0,2	C	4,2	0,13	27,0
$C > p$	4,1	0,0	23,8	U	9,4	0,4	0,0

* В тех случаях, когда сведения о величинах pK_a для $N > p$ отсутствуют, использовали значения pK_a для нуклеозидов.

случае синтеза ApC — 7,0, для синтеза GpC — 4,6 (табл. 4). Синтез CpC и UpC в изученном интервале от pH практически не зависит. Так как в синтезе динуклеозидмонофосфатов типа NpC использовался один и тот же акцептор, можно было предполагать, что влияние pH связано с изменением состояния донора фосфата. Однако, как показывают расчеты (табл. 5), при переходе от нейтральных к кислым значениям pH изменения происходят в $A > p$ и $C > p$: при pH 4,6 эти нуклеозид-2',3'-циклофосфаты протонируются на 11 и 23% соответственно. $G > p$ и $U > p$ практически не ионизируются в исследованных условиях (речь идет о нуклеиновом основании; 2', 3'-циклофосфатная группировка, имеющая $pK_a \sim 1$ [10], в этих условиях полностью ионизована). Следовательно, корреляция между изменением pH среды, состоянием доноров фосфата и ходом синтеза отсутствует.

Синтез динуклеозидмонофосфатов типа NpU (табл. 6), проведенный в условиях, аналогичных условиям синтеза динуклеозидмонофосфатов типа NpC , показал, что изменение pH не влияет на выход динуклеозидмонофосфата, если акцептором фосфата служит уридин. Следует отметить, что при этом равновесная концентрация NpU существенно ниже, чем NpC , а отношение скорости синтеза к скорости гидролиза очень мало (0,1—0,2).

Гидролиз $A > p$ и синтез ApU полностью ингибируются при добавлении к реакционной смеси цитидин-5'-фосфата в высокой концентрации (табл. 7).

Таблица 6

Синтез динуклеозидмонофосфатов типа NpU
Условия синтеза — см. табл. 4

NpU	pH	$t_{\text{равн}}$, час	Выход NpU, %	Синтез/гидролиз
ApU	7,0	100	14,6	0,2
	4,0	70	12,9	0,16
	4,6	70	13,0	0,16
GpU	4,6	46	16,9	0,3
CpU	7,0	40	4,9	0,07
UpU	7,0	40	7,4	0,08

Таблица 7

Синтез ApU в присутствии pC

Начальная концентрация, М		Концентрация pC, М	Выход ApU, %	Синтез/гидролиз
A>p	U			
0,25	0,75	—	14,6	0,2
0,25	0,75	0,001	16,0	0,23
0,25	0,75	0,75	—	—

Таблица 8

Синтез ApC и CpC при разных температурах

NpC	$t_{\text{равн}}$, час			Выход NpC, %			Синтез/гидролиз	
	0°	20°	37°	0°	20°	37°	0°	37°
ApC	168	6	2	49,0	37,8	32,4	1,7	3,0
CpC	143	—	5	11,8	—	14,6	0,16	0,5

Влияние температуры (табл. 8) проявляется в возрастании скорости синтеза с повышением температуры при небольшом изменении равновесной концентрации динуклеозидмонофосфата (уменьшение в случае ApC и увеличение для CpC), но неожиданно возрастает при этом и отношение скорости синтеза к скорости гидролиза. Анализ данных табл. 3 показывает, что при pH 6,5 гидролиз N>p практически не зависит от температуры.

Проведение синтеза ApC в среде, содержащей органические растворители, показало, что 30%-ный пиридин полностью ингибирует действие РНКазы *P. brevicompactum*: в течение 120 час инкубации с ферментом в присутствии цитидина A>p не использовался ни в гидролизе, ни в синтезе. В 30%-ном диметилформамиде синтез идет медленнее, чем в воде ($t_{\text{равн}} = 180$ час), и с меньшим выходом (34,3%); отношение скорости синтеза к скорости гидролиза в этих условиях уменьшается.

Таким образом, результаты исследования синтеза динуклеозидмонофосфатов типа NpC и NpU, катализируемых РНКазой *P. brevicompactum*, позволяют сделать следующие выводы: 1) для осуществления синтеза 3'-5'-фосфодиэфирной связи оба субстрата (донор и акцептор фосфата) должны быть связаны с ферментом; 2) лучшими донорами фосфата для РНКазы *P. brevicompactum* являются пуриновые нуклеозид-2' 3'-циклофосфаты, лучшим акцептором фосфата служит цитидин; 3) влияние pH на ход синтеза ApC и GpC связано, по-видимому, с конформационной перестройкой фермента при переходе от нейтральных к кислым

значениям рН; конформационная форма фермента, существующая при рН 7,0, лучше связывает $A > p$, тогда как при рН 4,6 РНКазы активнее взаимодействует с $G > p$; 4) специфичность РНКазы *P. brevicompactum* характеризуется тем, что уридин слабее связывается с ферментом, чем цитидин; более низкая концентрация фермент-субстратного комплекса в растворе приводит к более низкому выходу динуклеозидмонофосфатов ApU и GpU ; pC является конкурентным ингибитором в этой реакции; 5) синтетическая и гидролитическая функция фермента неодинаково зависят от температуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Женодарова С. М., Успехи химии **39**, 1479, 1970
2. Комиссия по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Временные правила, *Biochim. et biophys. acta* **108**, 1, 1965
3. Mohr S. C., Thach R. E., *J. Biol. Chem.* **244**, 6566, 1969
4. Rowe M. J., Smith M. A., *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* **38**, 393, 1970
5. Koike T., Uchida T., Egami F., *Biochim. et biophys. acta* **190**, 257, 1969
6. Zhenodarov S. M., Habarova M. J., *Biochim. et biophys. acta* **195**, 1, 1969
7. Saito M. J., Furuichi Y., Takeishi K., Yoshida M., Jamasaki M., Arima K., Hayatsu H., Ukita T., *Biochim. et biophys. acta* **195**, 229, 1969
8. Czer W., Shugar D., *Biochem. Preps* **10**, 139, 1963
9. Безбородова С. И., Ильина Т. В., Крупяно В. И., Докл. АН СССР **196**, 1460, 1971
10. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф., Шибаев В. Н., Органическая химия нуклеиновых кислот, «Химия», М., 1970
11. Альберт А., Сергент Е., Константы ионизации кислот и оснований, «Химия», М., 1964

Поступила в редакцию
8.VI 1971

GRADUAL SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES. THE SYNTHESIS OF DIRIBONUCLEOSIDE MONOPHOSPHATES CATALYZED BY NON-SPECIFIC RIBONUCLEASE FROM *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM* M. I. HABAROVA and S. M. ZHENODAROVA

*Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the USSR,
Poustchino, Moscow Region, USSR*

The synthesis of ribonucleoside monophosphates, ApC , ApU , GpG , GpU , CpC , CpU , UpC , UpU , ApA , GpA from nucleoside 2',3'-cyclic phosphates and nucleosides in the presence of a non-specific ribonuclease from *Penicillium brevicompactum* was studied. In order to form 3'—5'-phosphodiester linkage, both donor and acceptor must be bound with the enzyme. Purine nucleoside 2',3'-cyclic phosphates and cytidine are the best donors and acceptor, respectively, for this ribonuclease. The yields of ApC and GpC are about 50%. The apparent equilibrium constant for this reaction was determined. K_{app} values for substrates $A > p + G$ and $G > p + C$ fall in the range of 0.4 to $3 M^{-1}$ depending on the initial substrate concentration. K_{app} values tend to be higher in the case of more dilute reaction mixture. This may reflect partial aggregation of the reactants at a higher concentration. K_{app} values for pyrimidine 2',3'-cyclic phosphates and in all cases when uridine is an acceptor are essentially lower: 0.1—0.2 M^{-1} . The ApC synthesis has pH optimum at 7.0 and the GpC synthesis at 4.6. Apparently, the conformation of the enzyme existing at pH 7.0 preferentially binds $A > p$ whereas at pH 4.6 a conformer is formed with higher affinity in respect to $G > p$. The binding ability of the ribonuclease in respect to uridine is lower than that for cytidine. When uridine is used as acceptor concentration of enzyme — substrate complex is lower that results in lower yields of ApU and GpU (about 15%). Cytidine 5'-phosphate inhibits this reaction at high concentrations. Pyridine inhibits both synthetic and hydrolytic activity of the ribonuclease. The synthesis rate increases with the increase of temperature from 0 to 37°. The equilibrium concentration of the dinucleoside monophosphate alters slightly whereas the ratio of the synthesis rate to the hydrolysis rate changes considerably (3 times approximately).