



УДК 577.113.4

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ 2'-ДЕЗОКСИ-5'-ФОСФОТИМИДИН-3'-  
-ФОСФОТИОАТА В РЕАКЦИИ ПРИСОЕДИНЕНИЯ,  
КАТАЛИЗИРУЕМОЙ РНК-ЛИГАЗОЙ ФАГА T4, — ПУТЬ  
ПОЛУЧЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ.  
ПРОИЗВОДНОЕ С «ВКЛЮЧАЕМОЙ» АЛКИЛИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИЕЙ  
НА 3'-КОНЦЕ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДА

Ошевский С. И., Богачев В. С., Кумарев В. П.

*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск*

Описаны синтез и выделение 2'-дезоксиди-5'-фосфотимидин-3'-фосфотиоата (pdTrp<sub>s</sub>). Показано, что РНК-лигаза фага T4 присоединяет его к гексарибонуклеотиду (Ar)<sub>5</sub>A и при этом образуется смешанный олигорибо(дезоксирибо)нуклеотид (Ar)<sub>6</sub>dTrp<sub>s</sub>. Алкилирование 3'-фосфотиоата (Ar)<sub>6</sub>dTrp<sub>s</sub> N-метил-N,N'-ди-(2-хлорэтил)-N'-(n-формилфенил)триметилендиамином (Cl<sub>2</sub>R) приводит с количественным выходом к единственному продукту — S-алкильному производному, которое содержит интактную 2-хлорэтиламиногруппу на 3'-конце олигонуклеотида. Восстановление формильной группы этого производного боргидридом натрия в мягких условиях активизирует 2-хлорэтиламиногруппу. Возможно получение меченных <sup>32</sup>P производных. Такие олигонуклеотидные реагенты могут быть использованы для «адресованной» химической модификации нуклеиновых кислот и белков.

Н. И. Гриневой и др. [1] предложен метод «адресованной» модификации нуклеиновых кислот, в котором используются производные олигонуклеотидов, несущие модифицирующие (алкилирующие) функции на 5'- или 3'-конце олигонуклеотидов. Наиболее широко применяются реагенты с олигорибонуклеотидным «адресом» — бензилиденновые производные 3'-концевого нуклеотидного остатка олигорибонуклеотида и 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегида [2]. Однако их получение затруднено, так как реакция образования бензилиденовой связи проходит в жестких условиях и требует безводной среды [3]. Кроме того, при работе с этими реагентами возможна их преждевременная инактивация и самоалкилирование.

В настоящее время предложены более совершенные реагенты — с «включаемыми» модифицирующими функциями: азидопроизводные олигодоксирибонуклеотидов [4, 5] (не применялись для модификации нуклеиновых кислот) и алкилирующие производные олигодоксирибонуклеотидов [6] (применялись для модификации фрагмента ДНК [7]); совершенствуются также способы введения модифицирующих групп [5, 8, 9].

Так, в работе [6] реагент с «включаемой» алкилирующей функцией на 5'-конце олигонуклеотида получали реакцией алкилирования 5'-тиофосфата олигодоксирибонуклеотида N-метил-N,N'-ди-(2-хлорэтил)-N'-(n-формилфенил)триметилендиамином (Cl<sub>2</sub>R). При этом 5'-тиофосфат олигонуклеотида был получен ферментативной реакцией переноса γ-тиофосфатной группы аденозин-5'-[γ-тио]трифосфата на 5'-гидроксильный конец олигонуклеотида с помощью полинуклеотидкиназы фага T4. Оказалось, что такой ферментативно-химический подход имеет некоторые преимущества [6] перед чисто химическими подходами [5, 8]: обе реакции проходят с микроколичествами олигонуклеотидов, с высокими

Сокращения: pdTrp<sub>s</sub> — 2'-дезоксиди-5'-фосфотимидин-3'-фосфотиоат, Cl<sub>2</sub>R — N-метил-N,N'-ди-(2-хлорэтил)-N'-(n-формилфенил)триметилендиамин.

выходами, в мягких условиях и в водных растворах, а продуктом является «включаемый» алкилирующий олигонуклеотидный реагент.

Известно, что РНК-лигаза фага Т4 предъявляет довольно низкие требования к структуре донора — нуклеозид-3',5'-дифосфата. Так, модификация остатка сахара или гетероциклического основания нуклеозид-3',5'-дифосфата мало сказывается на реакционной способности аналога [10]. Замена остатка 3'-фосфата в нуклеозид-3',5'-дифосфате на тиофосфат представлялась нам менее существенной. Поэтому в настоящей работе мы предприняли попытку, во-первых, использовать ферментативную реакцию межмолекулярного присоединения, катализируемую РНК-лигазой фага Т4, для получения олигорибонуклеотида (смешанного олигорибо(дезоксирибо)нуклеотида) с 3'-концевой тиофосфатной группой и, во-вторых, получить из продукта ферментативной реакции производное олигорибонуклеотида с «включаемой» алкилирующей функцией на 3'-конце молекулы методом, предложенным в работе [6].

Известно, что скорость присоединения дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфата к олигорибонуклеотидному акцептору в реакции, катализируемой РНК-лигазой фага Т4, в 2–3 раза меньше скорости присоединения соответствующего рибонуклеозид-3',5'-дифосфата, но в то же время могут быть достигнуты близкие выходы продуктов реакции (60–90%) [11]. Выбор донора  $pdTr_s$ , использование которого должно было показать принципиальную возможность разрабатываемого подхода, определила простота синтеза и выделения 2'-дезокситимидин-5'-фосфонуклеозид-3'-фосфотиоатов, особенно производного тимидина, по сравнению с соответствующими рибо-5'-фосфонуклеозид-3'-фосфотиоатами. В качестве акцептора был выбран олигонуклеотид  $(Ar)_5A$ , к которому у фермента наблюдается высокое сродство [11].

Для получения  $pdTr_s$  мы применили модифицированный метод синтеза нуклеозид-3'-фосфотиоатов [12], заключающийся в обработке 5'-защищенных производных нуклеозидов избытком  $PSCl_3$  в пиридине. С этой целью 2'-дезокситимидин-5'-ди( $\beta$ -цианэтил)фосфат(I) обрабатывали избытком  $PSCl_3$  в пиридине при 5°С, контролируя ход реакции методом ТСХ в системе А. Через 2 ч наблюдали исчезновение исходного соединения (I) и появление более полярного вещества. Полученный продукт обрабатывали избытком этилендианидрина в пиридине, чтобы предотвратить возможное образование пиррофосфатных производных на стадии деблокирования фосфатной и тиофосфатной групп. Анализ реакционной смеси методом ТСХ в системе Б после деблокирования показал, что смесь содержит основное УФ-поглощающее вещество ( $R_f$  0,3), которое дает положительную реакцию с реактивом Динс и иодом, что свидетельствует о наличии у него остатков дезоксирибозы и тиофосфата.

Результат препаративного разделения  $1/15$  реакционной смеси методом ВЭЖХ представлен на рис. 1. Видно, что в реакционной смеси присутствует основной продукт (~50%) и его хроматографическая подвижность меньше, чем у других компонентов смеси. Ожидалось, что  $pdTr_s$  будет основным продуктом с наименьшей хроматографической подвижностью, так как его суммарный отрицательный заряд в условиях хроматографии больше, чем у других возможных основных продуктов реакции. Его спектр, записанный в 0,02 М трис-НСI-буфере, рН 8,0, имеет характеристические максимум и минимум соответственно при 267 и 240 нм и практически совпадает со спектром тимидина, записанным в этих же условиях, что указывает на сохранность остатка тимина в процессе синтеза. Часть продукта обрабатывали реагентом Элмана, который является реактивом на тиофосфатную группу [13] (см. «Экспериментальную часть»). При этом наблюдали развитие характеристического поглощения при 412 нм. Затем продукт обессоливали; выход  $pdTr_s$  составил 50%. В спектре  $^{31}P$ -ЯМР полученного вещества наблюдали сигналы в области 3,3 и 42,3 м. д., что говорит о наличии моноэфирных фосфатной и тиофосфатной групп нуклеотида (см. обзор [14]). Приведенные данные подтверждают структуру  $pdTr_s$ .

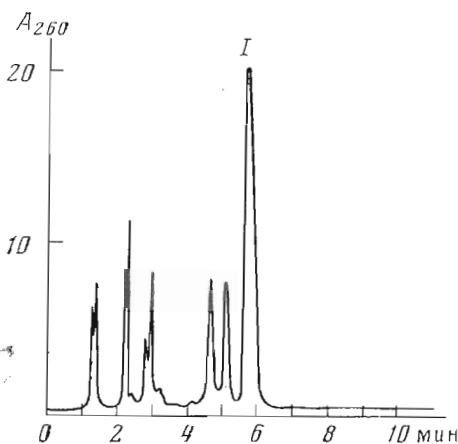


Рис. 1

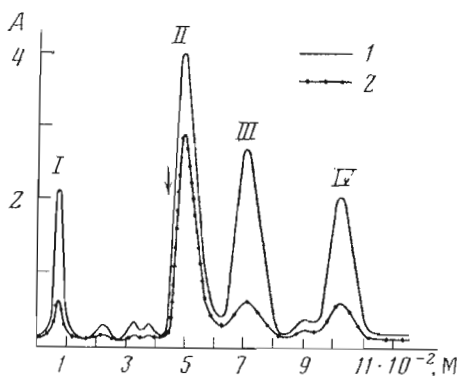


Рис. 2

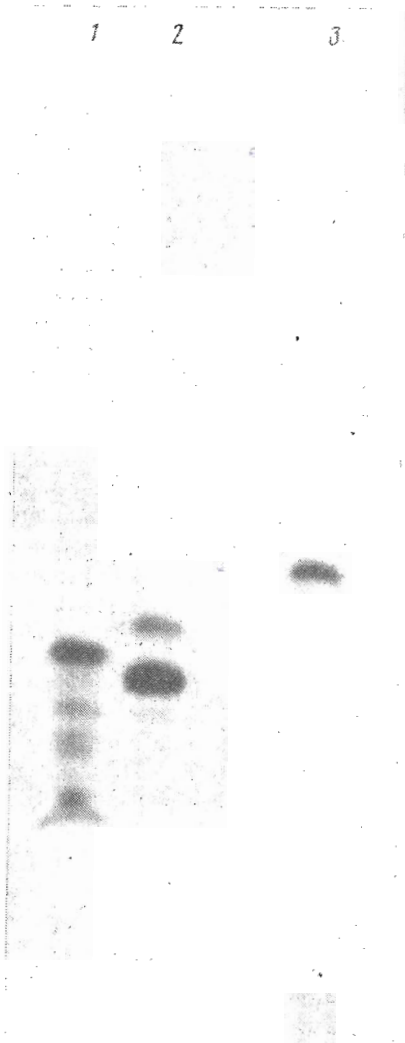


Рис. 3

Рис. 1. Хроматографический профиль препаративного разделения продуктов синтеза 2'-дезоксип-5'-фосфотимидин-3'-фосфоата. I — рdTr<sub>s</sub>. Условия элюции: скорость 20 мл/мин, давление 200 бар (см. «Экспериментальную часть»)

Рис. 2. Хроматографический профиль разделения продуктов реакции присоединения рdTr<sub>s</sub> к олигонуклеотиду (Ap)<sub>5</sub>A, катализируемого РНК-лигазой фага Т4, методом микроколоночной жидкостной хроматографии. Сорбент — Аминохром, объем колонки 100 мкл. I — АМР, II — рdTr<sub>s</sub>, III — АТР, IV — (Ap)<sub>6</sub>dTr<sub>s</sub>. Стрелкой указано место выхода исходного олигонуклеотида (Ap)<sub>5</sub>A. Контроль по поглощению при 260 (1) и 280 нм (2). Условия хроматографии: элюция ступенчатым градиентом концентрации фосфата калия, рН 7,5, от 0,00 до 0,11 в 7 М мочеvine. Общий объем градиента 1200 мкл, объем ступеньки 100 мкл

Рис. 3. Электрофоретический анализ фосфорилированных олигонуклеотидных производных в 20% ПААГ. 1 — основное вещество — [5'-<sup>32</sup>P](Ap)<sub>5</sub>A; 2 — основное вещество — [5'-<sup>32</sup>P](Ap)<sub>6</sub>dTr<sub>s</sub>; примесь, по всей видимости, [5'-<sup>32</sup>P](Ap)<sub>6</sub>dT; 3 — [5'-<sup>32</sup>P](Ap)<sub>6</sub>dTr<sub>s</sub>(RCl)

Для реакции межмолекулярного присоединения рdTr<sub>s</sub> к (Ap)<sub>5</sub>A мы использовали условия, близкие к условиям реакции присоединения дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфатов к олигорибонуклеотидам [11]. Концентрация донора увеличена в 9 раз по сравнению с концентрацией, приведенной в работе [11], чтобы избежать возможного уменьшения скорости реакции вследствие замены рdTr на рdTr<sub>s</sub>.

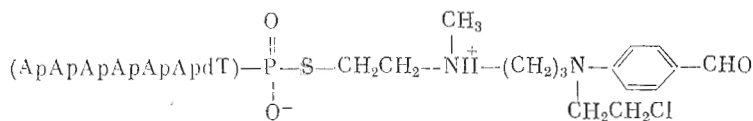
Было найдено, что через 1 ч инкубации олигорибонуклеотида  $(Ap)_5A$  с избытком донора  $pdTp_s$  в присутствии РНК-лигазы фага Т4 и других компонентов реакционной смеси при 37°C заканчивается накопление продукта, который при ионообменной хроматографии элюируется с колонки гораздо позже, чем исходный олигонуклеотид (рис. 2). Место выхода на хроматограмме вещества пика IV соответствует предполагаемому месту выхода продукта реакции  $(Ap)_6dTp_s$ , имеющего суммарный отрицательный заряд 8 в условиях хроматографии. Спектральные отношения вещества пика IV  $A_{280}/A_{260}=0,27$  (рис. 2) близки к спектральным отношениям исходного олигонуклеотида. Так как в условиях хроматографии  $pdTp_s$  и  $(Ap)_5A$  плохо разделяются, об уменьшении количества  $(Ap)_5A$  судили по изменению спектральных отношений левой части пика II. В контрольном эксперименте совместное выдерживание компонентов реакционной смеси в условиях реакции в отсутствие  $(Ap)_5A$  не приводило к изменению состава смеси. Таким образом, вещество пика IV является продуктом ферментативной реакции межмолекулярного присоединения  $pdTp_s$  к  $(Ap)_5A$ .

Вещество пика IV (рис. 2) обессоливали на колонке с сефадексом G-25 и фосфорилировали с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4 и  $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ . Результат анализа меченого продукта методом электрофореза в ПААГ представлен на рис. 3 (дорожка 2). На дорожке 1 —  $[5'\text{-}^{32}P](Ap)_5A$ . Видно, что электрофоретическая подвижность вещества на дорожке 2 выше. Этот результат хорошо согласуется со структурой фосфорилированного продукта РНК-лигазной реакции —  $[5'\text{-}^{32}P] \cdot (Ap)_6dTp_s$ , так как такой гептануклеотид должен иметь большую электрофоретическую подвижность, чем гексануклеотид  $[5'\text{-}^{32}P](Ap)_5A$ , из-за существенно большего удельного заряда нуклеотидного звена в условиях электрофореза [15].

Как будет видно из результата последующего эксперимента, продукт РНК-лигазной реакции эффективно модифицируется алифатической 2-хлорэтиламиногруппой реагента  $Cl_2R$  в условиях, специфических для модификации концевой тиофосфатной группы олигонуклеотидов [6, 9].

Все приведенные выше данные говорят о том, что нами был получен гептануклеотид  $(Ap)_6dTp_s$ .

Для получения производного олигонуклеотида  $(Ap)_6dTp_s$  с «включаемой» алкилирующей функцией на 3'-конце использовали подход, предложенный ранее для получения таких производных 5'-тиофосфатов олигонуклеотидов [6]. Реакцию алкилирования  $(Ap)_6dTp_s$  реагентом  $Cl_2R$  проводили 1 ч в водном растворе при температуре 20°C и концентрации олигонуклеотида и реагента 32 и 700 мкМ соответственно. В реакционной смеси хроматографически обнаружен единственный продукт (выход выше 95%) со спектральным отношением  $A_{350}/A_{260}=0,36$ , что характеризует его как продукт моноалкилирования олигонуклеотида реагентом  $Cl_2R$  (так как молярный коэффициент поглощения для  $Cl_2R$   $\epsilon_{350}$  32 000, а для гептануклеотида —  $\epsilon_{260}$  77 000 [16]). Хроматографическая подвижность продукта указывает на существенное уменьшение суммарного отрицательного заряда молекулы, что связано с образованием S-алкильного производного 3'-тиофосфата олигонуклеотида следующей структуры (ср. с данными работ [6, 9]):



$(Ap)_6dTp_s (RCl)$

Эта структура наиболее вероятна, так как реакционная способность алифатической 2-хлорэтиламиногруппы реагента  $Cl_2R$  существенно выше реакционной способности его ароматической 2-хлорэтиламиногруппы, сниженной в сотни раз за счет электропоакцепторного влияния *p*-формилфенильного остатка [16]. Кроме того, фактор конкуренции тиофосфатного

остатка в реакции алкилирования 2-хлорэтиламиноом почти на три порядка выше фактора конкуренции компонентов нуклеиновых кислот [17].

Часть продукта  $(Ap)_6dTp_s(RCl)$  обессоливали на колонке с сефадексом, упаривали и фосфорилировали с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 и  $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ . Результаты последующего анализа представлены на рис. 3 (дорожка 3). Видно, что подвижность  $[5'\text{-}^{32}P](Ap)_6dTp_s(RCl)$  в ПААГ существенно меньше подвижности  $[5'\text{-}^{32}P](Ap)_6dTp_s$  (дорожка 2). Известно, что у олигонуклеотидов с объемным заместителем электрофоретическая подвижность в ПААГ существенно меньше, чем у тех же олигонуклеотидов без заместителя [18]. Таким образом, данные об электрофоретической подвижности согласуются с данными работы [18] и с тем, что у  $[5'\text{-}^{32}P](Ap)_6dTp_s(RCl)$  удельный заряд нуклеотидного звена меньше, чем у  $[5'\text{-}^{32}P](Ap)_6dTp_s$ . Это также подтверждает структуру, предложенную выше для олигонуклеотидного реагента.

Судя по данным электрофоретического анализа, препарат  $[5'\text{-}^{32}P](Ap)_6dTp_s(RCl)$  является гомогенным. Этот результат говорит о возможности получения меченых  $^{32}P$ -производных смешанных олигорибо (дезоксирибо)нуклеотидов с «включаемой» алкилирующей функцией на 3'-конце олигонуклеотида. Возможен и другой путь получения меченого олигонуклеотидного реагента: алкилирование реагентом  $Cl_2R$  после фосфорилирования олигонуклеотида  $(Ap)_6dTp_s$  с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 и  $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ .

Чтобы проверить активность «включаемой» алкилирующей функции реагента  $(Ap)_6dTp_s(RCl)$ , его активировали путем восстановления альдегидной группы боргидридом натрия и к полученному раствору добавляли раствор нуклеофила — этилендиамина, аналогично методу [6]. После инкубации при 40° С в течение 4,5 ч и обессоливания на колонке с сефадексом G-25 вещество анализировали методом микроколоночной хроматографии. На хроматограмме обнаружен единственный продукт. Полученное вещество не поглощает при 350 нм, что говорит о полноте восстановления формильной группы реагента, т. е. о полноте активации. Очевидно, что этот продукт образуется в результате алкилирования этилендиамина восстановленным олигонуклеотидным реагентом, так как его хроматографическая подвижность соответствует хроматографической подвижности вещества с суммарным отрицательным зарядом молекулы на единицу меньше, чем у исходного реагента (в условиях хроматографического разделения при pH 7,5 прореагировавшая с этилендиамином молекула алкилирующего производного олигонуклеотида имеет дополнительный положительный заряд [19]). В приведенных выше условиях реакция прошла на 95%. Следовательно, исходный реагент содержит по крайней мере 95% интактных 2-хлорэтиламиногрупп. Результат анализа продукта алкилирования этилендиамина также подтверждает структуру, предложенную выше для олигонуклеотидного реагента  $(Ap)_6dTp_s(RCl)$ .

В итоге в настоящей работе получен 2'-дезоксип-5'-фосфотимидин-3'-фосфотиоат. Показано, что он является субстратом РНК-лигазы фага T4. В предложенных условиях акцептор  $(Ap)_6A$  с выходом 70% превращается в 3'-тиофосфат смешанного олигорибо (дезоксирибо)нуклеотида —  $(Ap)_6dTp_s$ . Рассмотрим этот результат подробнее. Известно, что скорость присоединения донора к олигорибонуклеотидному акцептору в РНК-лигазной реакции в большой степени зависит от типа 3'-концевых нуклеотидных звеньев акцептора и уменьшается в ряду  $A > I > C \gg U$  [11]. Однако исследования, результаты которых суммированы в работе [20], показали, что в предлагаемых автором этой работы усовершенствованных условиях возможны количественные выходы реакций даже в случае слабых полиуридиловых акцепторов. Эти данные позволяют надеяться, что предложенный нами подход для получения смешанных олигорибо (дезоксирибо)нуклеотидов с 3'-концевой тиофосфатной группой будет достаточно эффективным в случае олигорибонуклеотидных акцепторов всех типов. Можно ожидать, что он также может быть реализован и с другими дезоксирибонуклеотидными донорами:  $pdCp_s$ ,  $pdAp_s$ ,  $pdGp_s$ . Вероятно, по аналогии с преимуществом донора  $pdCp$  перед другими дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфа-

тами  $p\text{dCp}_s$  окажется самым эффективным донором в реакции присоединения.

Мы также надеемся, что способом, предложенным для получения смешанного олигорибонуклеотида  $(\text{Ap})_n\text{dTp}_s$ , можно будет получать 3'-тиофосфатные производные смешанных полирибонуклеотидов, тРНК и РНК.

Перспективно использование олигорибонуклеотидов с 3'-тиофосфатной группой для введения по 3'-концу олигонуклеотида функциональных группировок. Примером такого использования является получение олигорибонуклеотидного реагента с «включаемой» алкилирующей функцией на 3'-конце молекулы. Этим показана принципиальная возможность получения ферментативно-химическим способом S-алкил-3'-тиофосфатных производных смешанных олигорибо(дезоксирибо)нуклеотидов.

Важно, что реакция алкилирования олигонуклеотида  $(\text{Ap})_n\text{dTp}_s$  реагентом  $\text{Cl}_2\text{R}$ , как и в случае алкилирования 5'-тиофосфата олигонуклеотида  $d\text{-CpTpTpTpCpCpA}$  [6], проходит количественно в мягких условиях в водном растворе при 20° С за 1 ч. Способ выделения — ионообменная хроматография — довольно прост (при количественном выходе реакции алкилирования он может быть заменен на гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G-25).

Предложенный способ получения производных олигорибонуклеотидов позволяет проводить реакции с малыми (пмоль) количествами олигонуклеотидного компонента и поэтому может быть использован в случае природных олигорибонуклеотидов. Важно, что довольно просто можно получать меченые олигонуклеотидные реагенты высокой удельной радиоактивности.

Производные смешанных олигорибо(дезоксирибо)нуклеотидов с «включаемой» алкилирующей функцией можно использовать для «адресованной» модификации ДНК и РНК в системе *in vitro*, а также для аффинной модификации ферментов, специфически взаимодействующих с РНК.

### Экспериментальная часть

В работе использовали: Partisil 10 Sux (Whatman, Англия), Lichrosorb- $\text{NH}_2$  (Merck, ФРГ), Chelex-100 (Bio-Rad, США), сефадексы G-25, A-25 DEAE (Pharmacia, Швеция); Аминохром (НИО НГУ),  $\text{PSCl}_3$ , этиленциангидрин и Нерес (Merck, ФРГ), реактив Элмана (Serva, ФРГ), тимидин-5'-ди( $\beta$ -цианэтил)фосфат (опытное производство НИОХ АН СССР),  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (уд. акт. 2000 Ки/ммоль) отечественного производства. N-Метил-N,N'-ди-(2-хлорэтил)-N'-(*n*-формилфенил)триметилендиамин предоставлен А. А. Галлем (НИОХ), полинуклеотидкиназа фага T4 (КФ 2.7.1.78) получена от М. И. Ривкина (ИЦиГ СО АН СССР), олигорибонуклеотид  $(\text{Ap})_n\text{A}$  и РНК-лигаза фага T4, выделенная по методу [21], любезно предоставлены В. И. Ямковым (НГУ).

ТСХ проводили на пластинках силуфол (Kavalier, ЧССР) в системах хлороформ — метанол, 4:1 (А), хлороформ — метанол — 1 М  $\text{AcONa}$  (рН 6,5), 10:30:4 (Б). Обнаружение продуктов на хроматограммах осуществляли в УФ-свете (хемископ Брумберга), производные дезоксирибозы проявляли реактивом Динше, тиофосфатные производные — парами иода. УФ-спектры записывали на регистрирующем спектрофотометре Specord UV (ГДР),  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектр — на спектрометре НХ-90 (Bruker Physik, ФРГ). Микроколоночную хроматографию выполняли на жидкостном хроматографе «Обь-4» с многоволновой детекцией согласно [22], препаративную жидкостную хроматографию — на хроматографах Series 8800 (Du Pont Instruments, США) и Uvicord S (LKB, Швеция). Растворы упаривали на ротационном испарителе (Buchi, Швейцария) при 12—15 мм рт. ст. и 20—30° С.

Пиридин абсолютировали согласно [23], перегоняли последовательно над  $\text{KOH}$ ,  $\text{ToSCl}$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{CaH}_2$ , и хранили над молекулярными ситами 4 Å. Квалификация остальных реактивов была не ниже х. ч.

2'-Дезокси-5'-фосфотимидин-3'-фосфотимидин. 0,17 г (0,4 ммоль) 2'-дезокситимидин-5'-ди( $\beta$ -цианэтил)фосфата (I) высушивали упариванием с абс. пиридином (3×5 мл), охлаждали до 0° С и добавляли к нему смесь

пиридин — тиофосфорилхлорид (4 мл, 9:1 по объему) при 0° С. (PSCl<sub>3</sub> перед реакцией перегоняли в вакууме над молекулярными ситами 4 Å, охлаждая приемник до -10° С.) Реакционную смесь выдерживали при 5° С, контролируя при помощи ТСХ исчезновение соединения (I) в системе А (R, 0,72). Через 2 ч реакцию смесь упаривали и обрабатывали остаток раствором 0,5 мл (7,5 ммоль) этилендиамидрина в 2 мл пиридина при 20° С. Через 4 ч к реакционной смеси добавляли 0,5 мл 6 н. NaOH и выдерживали смесь 2 ч в вакууме для удаления образующегося акрилонитрила. Щелочь нейтрализовали катионитом дауэкс 50W×2 (H<sup>+</sup>) до pH 7,0, смолу отфильтровывали и промывали водой. Фильтрат и промывную жидкость объединяли и упаривали. Аликвоту реакционной смеси анализировали методом ТСХ в системе Б.

Для препаративного разделения продуктов  $1/_{13}$  полученной реакционной смеси хроматографировали на колонке объемом 17 мл с сорбентом Partisil 10 Sux, элюируя К-фосфатным буфером, pH 7,5 (градиент концентрации 0,00—0,2 М) в 30% ацетонитриле с 10% этаполом (объем 200 мл). Собирали основной продукт (см. рис. 1).

К 2 мл раствора продукта с концентрацией 1 ОЕ<sub>260</sub>/мл в кварцевой кювете добавляли раствор реагента Элмана до концентрации 0,78 мМ. Контрольная кювета содержала реагент Элмана в концентрации 0,78 мМ в той же системе: 0,12 М К-фосфатный буфер (pH 7,5), 30% ацетонитрил, 10% этанол. Через 10 мин на спектрофотометре измеряли поглощение с максимумом при 412 нм.

Для обессоливания 140 ОЕ<sub>260</sub> продукта наносили на колонку с DEAE-сефадексом А-25 (объем 1 мл) и элюировали раствором NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8,0, с градиентом концентрации 0,00—0,75 М. Детекцию осуществляли на приборе Uvicord S при 260 нм. Основное вещество (135 ОЕ<sub>260</sub>) собирали и упаривали 5 раз со спиртом. Остаток растворяли в воде, подщелачивали 1 М раствором трис до pH 8,0 и полученный раствор рdTr<sub>s</sub> (110 ОЕ<sub>260</sub>/мл) хранили при -20° С.

Для измерения спектра ЯМР раствор обессоленного рdTr<sub>s</sub> пропускали через колонку с сорбентом Chelex-100 (объем 200 мкл), доводили до концентрации 0,01 М и добавляли 0,2 М раствор EDTA, pH 8,0, до концентрации 10 мМ. Спектр <sup>31</sup>P-ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 на частоте 36,43 МГц при 30° С с подавлением спин-спинового взаимодействия <sup>32</sup>P-{<sup>1</sup>H}. Для стабилизации резонансных условий использовали D<sub>2</sub>O в качестве внешнего стандарта.

Присоединение рdTr<sub>s</sub> к 3'-концу молекулы олигорибонуклеотида. Реакцию проводили в условиях, близких к использованным в работе [11]: реакционная смесь объемом 15 мкл содержала 0,26 мМ (Ar)<sub>5</sub>A, 2,4 мМ рdTr<sub>s</sub>, 1,4 мМ АТР, 1,6 мкМ РНК-лигазу в буфере 66 мМ Hepes — КОН (pH 8,0), 4,4 мМ дитиотрепт и 26,4 мМ MgCl<sub>2</sub>. Через 1 ч инкубации при 37° С реакционную смесь разделяли методом микроколоночной жидкостной хроматографии с многоволновой детекцией на колонке с сорбентом Аминохром (см. рис. 2). Фракции, содержащие продукт (Ar)<sub>6</sub>dTr<sub>s</sub> (0,2 ОЕ<sub>260</sub>, выход 70%), собирали и обессоливали на колонке с сефадексом G-25 (сверхтонкий). Элюцию вели буфером 2 мМ Hepes — КОН (pH 7,3) — 0,01 мМ EDTA, детекцию осуществляли на приборе «Обь-4». Полимерную фракцию собирали и упаривали до концентрации (Ar)<sub>6</sub>dTr<sub>s</sub> 2,5 ОЕ<sub>260</sub>/мл.

Алкилирование (Ar)<sub>6</sub>dTr<sub>s</sub> реагентом Cl<sub>2</sub>R и выделение алкилирующего олигонуклеотидного реагента проводили аналогично работе [6]. К 18 мкл раствора (Ar)<sub>6</sub>dTr<sub>s</sub>, полученного в предыдущем опыте (концентрации 2,5 ОЕ<sub>260</sub>/мл (≈32 мкМ) в буфере 32 мМ Hepes — КОН (pH 7,3) — 0,16 мМ EDTA), добавляли 2 мкл раствора Cl<sub>2</sub>R в диметилформамиде до концентрации 700 мкМ. После инкубации при 20° С в течение 1 ч реакционную смесь разбавляли водой в 10 раз и хроматографировали на колонке с сорбентом Аминохром. Продукт — (Ar)<sub>6</sub>dTr<sub>s</sub>(RCl) — выделялся в единственном хроматографическом пике.

Активация 2-хлорэтиламиногруппы олигонуклеотидного реагента и алкилирование этилендиамина. Активацию проводили аналогично работе [6]: к 90 мкл хроматографически однородной фракции (Ar)<sub>6</sub>dTr<sub>s</sub>(RCl)

добавляли свежеприготовленный раствор 1 М боргидрида натрия в 0,05 М натрий-боратном буфере, рН 8,3, до концентрации 0,1 М и выдерживали 10 мин при 20°С. К активированному реагенту добавляли раствор 2 М солянокислого этилендиамина, рН 7,5, до концентрации 0,7 М. Реакционную смесь инкубировали 4,5 ч при 40°С и обессоливали на колонке с сефадексом G-25. Вещество, выходящее в полимерном пике, собирали полностью и анализировали на колонке с сорбентом Аминохром.

*Фосфорилирование и анализ олигонуклеотидных производных.* Для введения радиоактивной метки в олигонуклеотидные производные  $(\text{Ar})_6\text{dTr}_s$ ,  $(\text{Ar})_6\text{dTr}_s(\text{RCl})$  и исходный олигонуклеотид  $(\text{Ar})_5\text{A}$  составляли реакционные смеси объемом 10 мкл, которые содержали 3 пмоль  $(\text{Ar})_6\text{dTr}_s$ , 2 пмоль  $(\text{Ar})_6\text{dTr}_s(\text{RCl})$  (использовали часть препарата олигонуклеотидного реагента, которую после выделения обессоливали на колонке с сефадексом G-25 и упаривали) и 3 пмоль  $(\text{Ar})_5\text{A}$  соответственно и по 3 пмоль  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , а также 0,02 М трис- $\text{HCl}$  (рН 7,6), 0,01 М  $\text{MgCl}_2$ , 0,01 М дитиотреит и 0,4 ед. акт. полинуклеотидкиназы фага Т4. Через 10 мин инкубации при 37°С к образцам добавляли красители — ксиленцианол и бромфеноловый синий — в глицерине и анализировали электрофорезом в 20% ПААГ с 7 М мочевиной. Радиоавтограф геля представлен на рис. 3.

Авторы благодарят В. И. Ямкового за препараты РНК-лигазы и  $(\text{Ar})_5\text{A}$ , А. В. Лебедева за запись и анализ спектра ЯМР, а также Н. И. Комарову за помощь в эксперименте по хроматографии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I.* Tetrahedron Lett., 1967, № 37, p. 3557–3562.
2. *Grineva N. I.* В кн.: Аффинная модификация биополимеров. Новосибирск: Наука, 1983, с. 189–190.
3. *Райт В. К., Карпова Г. Г., Grineva N. I.* Биоорганич. химия, 1977, т. 3, № 1, с. 34–37.
4. *Ивановская М. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А.* Биоорганич. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 35–40.
5. *Готлих М. В., Ивановская М. Г., Вейко В. П., Шабарова З. А.* Биоорганич. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1310–1318.
6. *Ошевский С. И., Галль А. А., Шишкин Г. В.* Биоорганич. химия, 1983, т. 9, № 9, с. 1265–1269.
7. *Грачев М. А., Ошевский С. И.* Докл. АН СССР, 1983, т. 272, № 5, с. 1259–1261.
8. *Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н.* Биоорганич. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 886–894.
9. *Oshevski S. I.* FEBS Lett., 1982, v. 143, № 1, p. 119–123.
10. *Barrio J. R., Barrio M. C. G., Leonard N. J., England T. E., Uhlenbeck O. C.* Biochemistry, 1978, v. 17, № 11, p. 2077–2081.
11. *England T. E., Uhlenbeck O. C.* Biochemistry, 1978, v. 17, № 11, p. 2069–2076.
12. *Chladek S., Nagyvary J. J.* Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 6, p. 2079–2085.
13. *Goody R. S., Eckstein F. J.* Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, № 23, p. 6252–6257.
14. *Лебедев А. В., Резвухин А. И.* Биоорганич. химия, 1983, т. 9, № 2, с. 149–185.
15. *Tapper D. P., Clayton D. A.* Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 24, p. 6787–6794.
16. *Галль А. А., Курбатов В. А., Мустаев А. А., Шишкин Г. В.* Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1979, вып. 2, № 4, с. 99–104.
17. *Price C. C., Gaucher G. M., Konecu P., Shibakawa R., Sowa J. R., Yamaguchi M.* Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 166, № 2, p. 327–359.
18. *Kaplan B., Itakura K.* In: Automated Chemical and Enzymic Gene Synthesis, EMBO practical course, March 21st to April 3rd 1982, p. 13.
19. *Зарьтова В. Ф., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Лебедев А. В., Самуков В. В., Шишкин Г. В.* Биоорганич. химия, 1975, т. 1, № 6, с. 793–798.
20. *Ямковой В. И.* Биоорганич. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1808–1812.
21. А. с. 910762 (СССР). Способ получения РНК-лигазы/Ямковой В. И., Вельямкина А. Г., Василевко С. К., Нечаев Ю. С., Бакланов М. М., Чистяков П. Г., Овищенко А. М. Заявл. 13.11.79, № 2856219. Оpubл. в Б. И., 1982, № 9.
22. *Varam G. I., Grachev M. A., Komarova N. I., Perelroyzen M. P., Bolvanov Yu. A., Kuzmin S. V., Kargaltsev V. V., Kuper E. A. J.* Chromatography, 1983, v. 264, p. 69–90.
23. Общий практикум по органической химии. М.: Мир, 1965, с. 605.

Поступила в редакцию  
7.II.1984



THE USE OF 2'-DEOXY-5'-PHOSPHOTHYIMIDINE-3'-PHOSPHOTIOATE  
IN A REACTION CATALYZED BY T4 PHAGE RNA-LIGASE -- A ROUTE  
TO 3'-SUBSTITUTED OLIGORIBONUCLEOTIDES. A DERIVATIVE  
WITH THE 3'-TERMINAL FUNCTION THAT CAN BE «SWITCHED ON»

OSHEVSKI S. I., BOGACHEV V. S., KUMAREV V. P.

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch  
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The synthesis and isolation of 2'-deoxy-5'-phosphothymidine-3'-phosphothioate ((pdTp<sub>s</sub>) are described. The phage T4 RNA-ligase catalyzed reaction of this compound with hexaribonucleotide (Ap)<sub>6</sub>A is shown to involve formation of the mixed oligoribo-(deoxyribo)nucleotide (Ap)<sub>6</sub>dTp<sub>s</sub>. Alkylation of the (Ap)<sub>6</sub>dTp<sub>s</sub> 3'-phosphothioate with N-methyl-N,N'-di-(2-chloroethyl)-N'-(p-formylphenyl)trimethylenediamine gave in a quantitative yield a sole product -- S-alkyl derivative bearing the intact 2-chloroethylamine group at the oligonucleotide 3'-terminus. Sodium borohydride reduction under mild conditions of the formyl group in this derivative results in activation of the 2-chloroethylamine group. The respective <sup>32</sup>P labeled analogues can also be prepared. Such oligonucleotide reagents are suitable for «addressed» chemical modification of nucleic acids and proteins.