



УДК 577.113.6.088.53:543.422.25

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ  
КОМПЛЕМЕНТАРНОГО КОМПЛЕКСА  
d(pTGTTTGGC)·d(pGССАААС)А В ВОДНОМ РАСТВОРЕ  
МЕТОДОМ <sup>1</sup>Н-ЯМР

Виценкова Е. В., Денисов А. Ю.\*, Кутявин Н. В.,  
Лебедев А. В.

*Новосибирский институт биоорганической химии;*

*\* Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР*

Методом <sup>1</sup>Н-ЯМР (200 и 360 МГц) исследованы октануклеотиды d(pTGTTTGGC) и d(pGССАААС)А, а также их комплементарный комплекс. Проведено отнесение сигналов всех необмениваемых протонов гетероциклических оснований инкрементным методом с использованием фрагментов этих октануклеотидов длиной от двух до семи звеньев. Показано, что на химические сдвиги протонов влияют не только ближайшие с 3'- и 5'-конца нуклеотиды, но и более дальние остатки нуклеотидов (вплоть до третьего, если это dА и dG). Методом <sup>1</sup>Н-ЯМР исследован процесс термической денатурации комплекса d(pTGTTTGGC)·d(pGССАААС)А. Получены кривые зависимости химических сдвигов сигналов от температуры для каждого необмениваемого протона всех гетероциклических оснований. Установлено, что плавление комплекса начинается с концевых пар, причем олигонуклеотидная цепь d(pGССАААС)А имеет в целом более высокую температуру плавления (на 1–5° С), чем цепь d(pTGTTTGGC). Интервал плавления комплекса в исследованных условиях (D<sub>2</sub>O, концентрация олигонуклеотида 1·10<sup>-3</sup> М, 0,1 М NaCl, 0,01 М натрий-фосфатный буфер, 0,01 мМ EDTA, рН 7,0) составил 30° С, а температура плавления – около 60° С.

Ранее был разработан метод специфической модификации нуклеиновых кислот с помощью 2',3'-O-{4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]}бензилиденовых производных моно- и олигонуклеотидов в комплементарном комплексе [1–4]. Можно полагать, что главную роль в эффективности протекания реакции алкилирования играет пространственная организация и динамическое состояние комплекса в водном растворе. Следовательно, для понимания механизма комплементарно-адресованной модификации необходимо изучение геометрических параметров комплементарного дуплекса.

В настоящей работе начато исследование комплементарного дуплекса d(pTGTTTGGC)·d(pGССАААС)А с использованием спектроскопии <sup>1</sup>Н-ЯМР. В последние годы с помощью этого метода (а также метода рентгеноструктурного анализа) был изучен целый ряд комплементарных комплексов олигодезокси-нуклеотидов различного строения [5–15].

Олигонуклеотиды d(pTGTTTGGC)·d(pGССАААС)А, а также их более короткие фрагменты были синтезированы модифицированным триэфирным методом из защищенных по основанию 3'-О-левулинил-2'-дезоксинуклеозид-5'-(4-хлорфенил-2-цианэтил)фосфатов в соответствии с работой [16].

Отнесение сигналов необмениваемых протонов гетероциклических оснований в спектрах <sup>1</sup>Н-ЯМР всех полученных олигонуклеотидов проводили инкрементным методом [17, 18]. Принцип инкрементного метода легко понять из рис. 1 и 2. Наблюдаемые изменения химических сдвигов протонов являются следствием двух причин: 1) появления нового нуклеотидного остатка на 5'-конце олигонуклеотидной цепи; 2) исчезновения одного отрицательного заряда на дважды ионизированной 5'-фосфатной группе. Очевидно, что первый эффект зависит от природы нового нуклеотидного остатка и будет оказывать существенное воздействие на химические сдвиги сигналов протонов не только ближайших, но и сле-

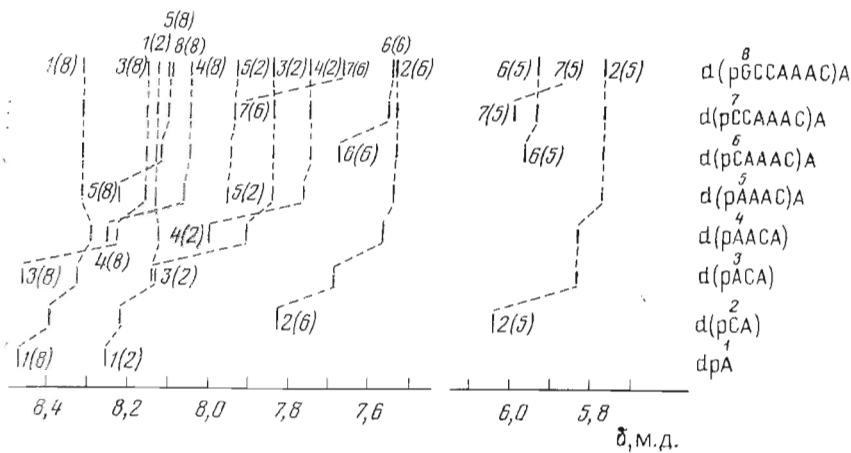


Рис. 1. Схема отнесения сигналов необмениваемых протонов гетероциклических оснований для октануклеотида d(pGCCAAAC)A. Цифры указывают на порядковый номер основания в олигонуклеотидной цепи, цифры в скобках определяют положение протона в этом основании

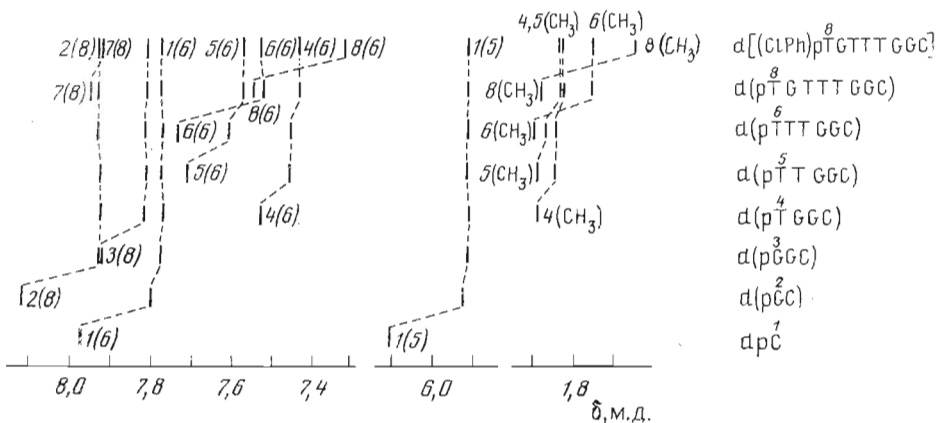


Рис. 2. Схема отнесения сигналов необмениваемых протонов гетероциклических оснований для октануклеотида d(pTGTTCGC). Использованы те же обозначения, что и для рис. 1. CH<sub>3</sub> обозначает сигнал протонов метильной группы тимидина

дующих соседних нуклеозидных остатков [19, 20]. Второй эффект не должен зависеть от природы присоединяемого нуклеотидного остатка и отразится главным образом на сигналах протонов ближайшего соседнего нуклеозидного остатка. Величина этого эффекта должна коррелировать с величинами изменений химических сдвигов сигналов протонов при вторичной ионизации 5'-фосфатной группы ( $pK \sim 6$ ). Как показано в работах [21, 22], для Н-8 эти величины составляют  $\sim 0,1$  м. д., для Н-2  $\sim 0,02$ , для Н-6  $\sim 0,22$ , для Н-5  $\sim 0,06$  м. д. На основании этих данных, результатов работ [19, 20] и настоящей работы (см. табл. 1 и 2) можно заключить, что присоединение нового 5'-нуклеотидного остатка вызывает наибольшие изменения в положении сигналов ароматических протонов ближайшего соседнего остатка нуклеозида. Этот принцип был положен в основу отнесения сигналов протонов октануклеотидов и их фрагментов. Кроме этого, для отнесения сигналов протонов к типу Н-8 или Н-2 остатков dA (или rA) использовали измерение времени спи-решеточной релаксации аналогично работам [17, 18, 23]. Результаты отнесения сигналов представлены на рис. 1 и 2 и в табл. 1 и 2. В подавляющем большинстве случаев отнесение сигналов было однозначным; в некоторых случаях отнесение не удалось провести достаточно строго.

При введении остатка dA<sup>3\*</sup> в динуклеотид d(pCA) (т. е. при переходе

\* Нумерация нуклеотидов — в 3'→5'-направлении.

Значения химических сдвигов сигналов протонов гетероциклических оснований в <sup>1</sup>H-ЯМР-спектрах d(pGССАААС)A и его фрагментов в составе и вне копланарных комплексов

	Остаток нуклеотида (номер протона гетероциклического основания)														t, °C
	A <sup>1</sup> (8)	A <sup>1</sup> (2)	C <sup>2</sup> (6)	A <sup>3</sup> (8)	A <sup>3</sup> (2)	A <sup>4</sup> (8)	A <sup>4</sup> (2)	A <sup>5</sup> (8)	A <sup>5</sup> (2)	A <sup>6</sup> (6)	C <sup>6</sup> (5)	C <sup>7</sup> (6)	C <sup>7</sup> (5)	G <sup>8</sup> (8)	
d pA	8,670	8,254													70
d(pCA)	8,396	8,221	7,826												70
d(pCA)	8,326	8,134	7,687	8,143											70
d(pAACA)	8,297	8,129	7,569	8,230	7,908	8,255	8,001	8,224							70
d(pAAAC)A	8,320	8,133	7,543	8,161	7,843	8,065	7,767	8,224	7,956						70
d(pCAААС)A	8,320	8,133	7,544	8,158	7,844	8,055	7,750	8,124	7,951	7,680	5,975	7,915	6,000		70
d(pССАААС)A	8,320	8,134	7,544	8,160	7,850	8,052	7,759	8,104	7,937	7,558	5,947	7,672	5,846	8,102	70
d(pGССАААС)A *	8,310	8,168	7,600	8,149	7,981	8,174	7,992	8,187	7,979	7,659	5,868	7,717	5,823	8,062	70
d(pСССАААС)A · d(p'IG'ГТГСС)	8,127	7,670	7,155	8,131	7,192	8,127	7,665	8,240	7,247	7,487	5,653	7,477	5,423	8,187	25
d(pGССАААС)A · d[(C1Ph) p1- Г'ТГТГСС]	8,220	7,863	7,081	8,027	7,485	8,124	7,667	8,238	7,266	7,487	5,651	7,477	5,423	8,188	25
d(pGССАААС)A · d(p'IG'ГТГСС)	8,127	7,669	7,162	8,034	7,218	8,128	7,682	8,249	7,356	7,486	5,733	7,591	5,639	7,983	25
d(ССАА \C)A · d(p'ГСГТТГСС)	8,127	7,670	7,164	8,043	7,242	8,128	7,707	8,263	7,347	7,535	5,647	7,725	5,725	—	25

\* В верхней строке приведены экспериментальные значения химических сдвигов, в нижней — расчетные значения химических сдвигов; для d(pG) использованы данные настоящей работы (Ф.Н.8 8,073 м. л.).

Значения химических сдвигов сигналов необмениваемых протонов гетероциклических оснований в <sup>1</sup>H-ЯМР-спектрах d(pTGTGGC) и его фрагментов в составе и вне комплекментарных комплексов

Олигонуклеотиды или комплекментарные комплексы	Остаток нуклеотида (номер протона гетероциклического основания)													t, °C	
	C <sup>1</sup> (6)	C <sup>1</sup> (5)	C <sup>2</sup> (8)	C <sup>2</sup> (8)	T <sup>3</sup> (6)	T <sup>4</sup> (CH <sub>2</sub> )	T <sup>5</sup> (6)	T <sup>6</sup> (CH <sub>2</sub> )	T <sup>6</sup> (6)	T <sup>6</sup> (CH <sub>2</sub> )	C <sup>7</sup> (8)	T <sup>8</sup> (6)	T <sup>8</sup> (CH <sub>2</sub> )		
d pC	7,975	6,108													70
d (pCC)	7,798	5,926	8,419												70
d (pGGC)	7,775	5,948	7,925	7,925											70
d (pTGGC)	7,770	5,945	7,924	7,924	7,529	1,895									70
d (pTTGGC)	7,775	5,948	7,926	7,926	7,454	1,852	7,712	1,895							70
d (pTTGGC)	7,771	5,948	7,932	7,932	7,455	1,850	7,610	1,875	1,905						70
d (pTGTGGC) *	7,775	5,946	7,923	7,923	7,433	1,838	7,573	1,838	1,888	1,905	7,947	7,546	1,884		70
d [(C1Ph)pTGTGGC]	7,769	5,944	7,950	7,950	7,542	1,854	7,602	1,860	1,847	1,847	7,992	7,667	1,899		70
d (pTGTGGC) · d (pCCCAAAC)A	7,773	5,917	7,928	7,928	7,434	1,836	7,574	1,836	1,760	1,760	7,921	7,321	1,695		70
d [(C1Ph)pTGTGGC] · d (pCCCAAAC)A	7,777	5,424	7,781	7,781	7,334	1,708	7,507	1,655	1,386	1,386	8,058	7,629	1,766		25
d [(C1Ph)pTGTGGC] · d (pCCCAAAC)A	7,477	5,425	7,774	7,774	7,327	1,706	7,502	1,697	1,404	1,404	8,027	7,241	1,517		25
d (pTGTGGC) · d (pCCCAAAC)A	—	—	7,853	7,853	7,343	1,724	7,508	1,669	1,396	1,396	8,061	7,614	1,764		25
d (pTGTGGC) · d (pCCCAAAC)A	7,933	5,831	7,765	7,765	7,347	1,753	7,549	1,681	1,397	1,397	8,045	7,614	1,767		25

\* В верхней строке приведены экспериментальные значения химических сдвигов, в нижней — расчетные значения химических сдвигов; для d pT использованы данные настоящей работы (δH-6 7,706 м. д.; δC1, 1,914 м. д.).

от  $d(\text{pCA})$  к  $d(\text{pACA})$ , см. табл. 1) возникает неопределенность в отнесении сигналов Н-2. Ожидаемый химический сдвиг сигнала Н-2 остатка  $dA^1$ , согласно параметрам работы [20], должен составить 8,140 м. д. (8,221—0,081), а остатка  $dA^3$  — 8,151 м. д. (8,254—0,103). Экспериментальные значения положений сигналов Н-2 — 8,134 и 8,143 м. д. Условно первый из этих двух сигналов отнесен к  $dA^1$ , а второй — к  $dA^3$ . В случае тетра-нуклеотида  $d(\text{pAACA})$  также условно отнесены сигналы Н-8 и Н-2 остатков  $dA^3$  и  $dA^4$ . Однако только при данном отнесении сигналов можно объяснить наблюдаемые изменения химических сдвигов протонов Н-8 и Н-2 при переходе от тетра- к пента-нуклеотиду  $d(\text{pAAAC})A$ . Так, из четырех сигналов Н-8  $d(\text{pAAAC})A$  сигнал при 8,320 м. д. принадлежит, очевидно, остатку  $GA^1$  (ожидаемое значение 8,330 м. д.), сигнал при 8,161 м. д. — остатку  $dA^3$  (ожидаемое значение 8,167 м. д.), сигнал при 8,065 м. д. — остатку  $dA^4$  (ожидаемое значение 8,045 м. д.), сигнал при 8,224 м. д. — остатку  $dA^5$  (ожидаемое значение 8,216 м. д.). Ожидаемые значения химических сдвигов получены с использованием параметров экранирования из работ [19, 20], а также предлагаемого условного отнесения сигналов протонов остатков  $dA^3$  и  $dA^4$  в тетра-нуклеотиде  $d(\text{pAACA})$ . В случае альтернативного отнесения сигналов расхождение между ожидаемыми и экспериментальными значениями химических сдвигов сигналов Н-8 становится значительным: 0,041 м. д. для  $dA^3$ , 0,067 м. д. для  $dA^4$  и 0,027 м. д. для  $dA^5$ . Отметим, что химические сдвиги сигналов Н-8 остатков  $dA^3$  и  $dA^4$  в  $d(\text{pAACA})$  достаточно близки (8,230 и 8,255 м. д.), поэтому даже их альтернативное отнесение не влияет на порядок отнесения сигналов Н-8 в  $d(\text{pAAACA})A$ . Аналогичные оценки эффектов, влияющих на химические сдвиги сигналов протонов Н-2, приводят к заключению, что сигнал при 8,133 м. д. принадлежит остатку  $GA^1$ , 7,843 м. д. — остатку  $dA^3$ , 7,767 м. д. — остатку  $dA^4$  и 7,956 м. д. — остатку  $dA^5$ . Существенных затруднений в отнесении сигналов ароматических протонов гекса-, гепта- и октаноуклеотида не возникает.

В случае комплементарного октаноуклеотида  $d(\text{pTGTTTGGC})$  и его фрагментов (табл. 2) неопределенность возникает лишь при отнесении сигналов Н-6 остатков тимидина  $dT^5$ ,  $dT^6$  и  $dT^8$  при переходе от гекса- к октаноуклеотиду. Эта проблема была решена с использованием 5'-4-хлорфенильного производного октаноуклеотида. Из табл. 2 видно, что при переходе от  $d(\text{pTGTTTGGC})$  к  $d[(\text{ClPh})\text{pTGTTTGGC}]$  наблюдается резкое изменение положения сигналов протонов только одного из остатков  $dT$ , а именно  $dT^8$ . Из оставшихся двух сигналов Н-6 октаноуклеотида при 7,523 и 7,573 м. д. первый отнесен к остатку  $dT^6$ , а второй — к  $dT^5$ , поскольку только первый сигнал изменяет свое положение при присоединении 4-хлорфенильной группы к 5'-фосфатному остатку октаноуклеотида.

Помимо отнесения сигналов инкрементным методом мы рассчитали химические сдвиги необмениваемых протонов гетероциклических оснований в составе обоих октаноуклеотидов согласно работам [19, 20]. Сопоставление экспериментальных и расчетных величин химических сдвигов (см. табл. 1, 2) показывает их качественное соответствие, хотя в некоторых случаях расхождение оказалось велико: для Н-8  $dG^3$  разность  $\delta_{\text{эсп}} - \delta_{\text{расч}}$  составляет -0,125 м. д., для Н-6  $dT^4$  -0,109, для Н-8  $dA^1$  -0,112, для Н-2  $dA^4$  -0,233 м. д. Это указывает на то, что параметры экранирования, выведенные авторами для олигорибонуклеотидов, неприменимы полностью для 2'-дезоксипроизводных, либо на то, что выбор самих модельных олигонуклеотидов был неадекватен задаче предсказания химических сдвигов сигналов протонов длинных олигонуклеотидов. Немаловажен также и тот факт, что параметры в работе [20] были получены для 5—12 мМ растворов олигонуклеотидов, в то время как использованная нами концентрация олигонуклеотидов в 5—10 раз ниже. Частично расхождение, возможно, также обусловлено различием использованных внутренних стандартов (*трет*-бутанол — в работах [19, 20] и 4,4-диметил-4-силапентан-1-сульфонат натрия — в настоящей работе).

В итоге проведенной работы были идентифицированы сигналы всех необмениваемых протонов гетероциклических оснований двух октаноуклео-

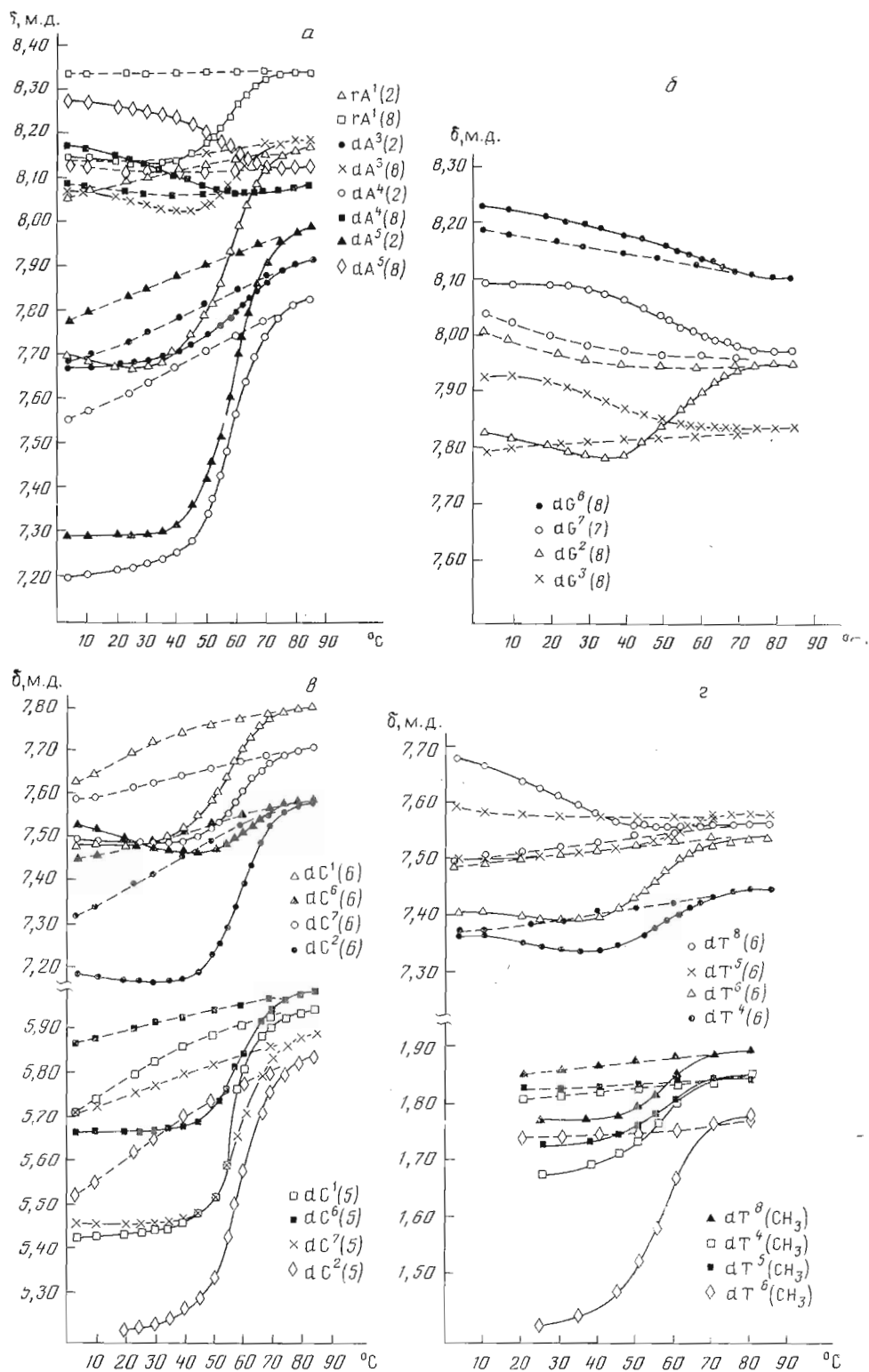


Рис. 3. Температурные зависимости химических сдвигов сигналов необмениваемых протонов гетероциклических оснований  $dA$  и  $rA$  (а),  $dG$  (б),  $dC$  (в) и  $dT$  (г) для  $d(pTGTTTGGC)$ ,  $d(pGCCAAAC)$ А (пунктир) и их смеси (сплошная линия)

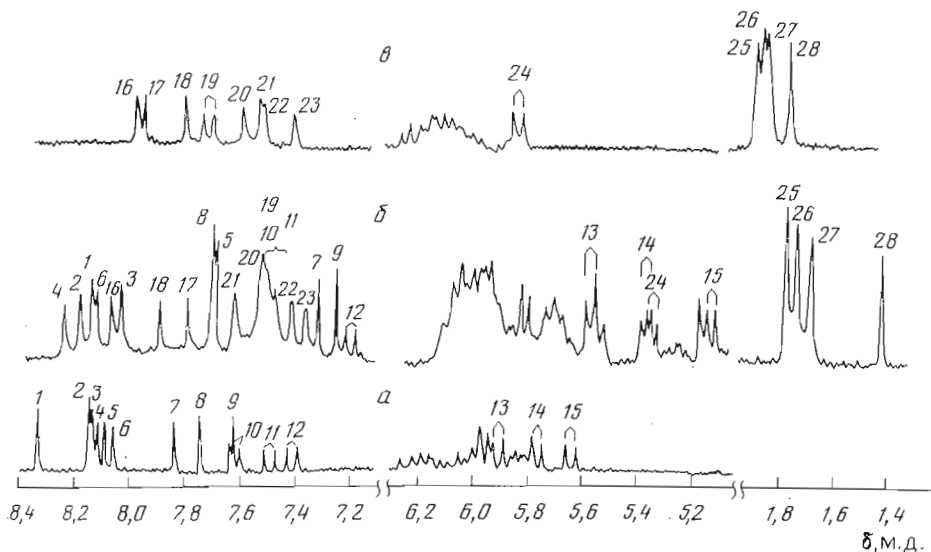


Рис. 4.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры олигонуклеотидов  $d(\text{pGCCAAAC})\text{A}$  (а),  $d(\text{pTGTTCGGC})$  (б) и их комплекса (в) в области резонанса протонов гетероциклических оснований (200 МГц,  $30^\circ\text{C}$ ). Нумерация сигналов (приведены порядковый номер нуклеозида (номер протона гетероциклического основания)): 1 — 1(8), 2 — 8(8), 3 — 3(8), 4 — 5(8), 5 — 1(2), 6 — 4(8), 7 — 5(2), 8 — 3(2), 9 — 4(2), 10 — 7(6), 11 — 6(6), 12 — 2(6), 13 — 6(5), 14 — 7(5), 15 — 2(5) для  $d(\text{pGCCAAAC})\text{A}$  и 16 — 7(8), 17 — 2(8), 18 — 3(8), 19 — 1(6), 20 — 5(6), 21 — 8(6), 22 — 6(6), 23 — 4(6), 24 — 1(5), 25 — 8( $\text{CH}_3$ ), 26 — 5( $\text{CH}_3$ ), 27 — 4( $\text{CH}_3$ ), 28 — 6( $\text{CH}_3$ ) для  $d(\text{pTGTTCGGC})$

тидов и их фрагментов в водном растворе при  $70^\circ\text{C}$ . Затем были получены значения химических сдвигов протонов обоих октануклеотидов в интервале  $3\text{--}70^\circ\text{C}$  (рис. 3). Во всех случаях наблюдали плавное, монотонное изменение химических сдвигов сигналов протонов с ростом температуры.

На следующем этапе работы были отнесены сигналы необмениваемых протонов гетероциклических оснований для смеси двух комплементарных октануклеотидов при  $70^\circ\text{C}$ , т. е. в условиях, когда комплекс практически разрушен. Из данных табл. 1, 2 видно, что химические сдвиги сигналов соответствующих протонов октануклеотидов как взятых отдельно, так и в виде смеси почти полностью совпадают при  $70^\circ\text{C}$ . Это дало основание принять для смеси октануклеотидов при  $70^\circ\text{C}$  то же самое отнесение сигналов протонов, что и в растворе свободных октануклеотидов. Наконец, спектры смеси октануклеотидов были записаны при дискретном понижении температуры от  $85$  до  $3^\circ\text{C}$ . На основании этих данных были построены зависимости химических сдвигов сигналов протонов от температуры (рис. 3). Из сопоставления кривых для одних и тех же прото-

Значения  $T_m$  (точность определения  $\pm 1^\circ\text{C}$ ), полученные из кривых зависимости комплементарного дуплекса  
Прочерк в таблице означает, что температура

$T_m, ^\circ\text{C}$	—	57,0	56,0	59,0	57,0
H	6	$\text{CH}_3$	8	6	$\text{CH}_3$
Комплементарные остатки нуклеозидов		$d\text{T}^8$ $r\text{A}^1$	$d\text{G}^7$ $d\text{C}^2$	$d\text{T}^6$ $d\text{A}^3$	
H	2	8	6	5	2
$T_m, ^\circ\text{C}$	58,0	59,0	60,0	61,0	61,0

нов октануклеотидов и их смеси видно, что эти кривые при высоких температурах стремятся к одному и тому же значению. Более того, в отдельном эксперименте было показано, что разбавление олигонуклеотидов в 2 раза до концентрации  $5 \cdot 10^{-4}$  М не приводит при  $70^\circ\text{C}$  к заметным изменениям химических сдвигов сигналов протонов гетероциклических оснований. Таким образом, при температурах выше  $70^\circ\text{C}$  межмолекулярные взаимодействия комплементарных октануклеотидов практически отсутствуют. С другой стороны, при понижении температуры ход кривых резко различается, причем для смеси комплементарных октануклеотидов кривые имеют сигмоидальный вид, что отражает процесс комплексообразования. Ниже  $30^\circ\text{C}$  существенных изменений химических сдвигов сигналов протонов в обоих случаях не наблюдается.

При  $25^\circ\text{C}$  была осуществлена проверка правильности отнесения сигналов протонов в комплементарном комплексе (рис. 4). Для идентификации сигналов Н-8 остатков 2'-дезоксигуанозина был проведен частичный обмен протонов на дейтерий аналогично методике, приведенной в работе [24]. Четыре сигнала резко уменьшились в интенсивности, что согласуется с количеством остатков dG в составе комплекса. Были записаны также спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР неполных комплексов:  $d(\text{pTGTTTGGC}) \cdot d(\text{pCCAAAC})\text{A}$ ,  $d(\text{pTGTTTGG}) \cdot d(\text{pGCCAAAC})\text{A}$ , а также  $d[(\text{ClPh}) \cdot \text{pTGTTTGGC}] \cdot d(\text{pGCCAAAC})\text{A}$ . Результаты представлены в табл. 1 и 2. Сравнение химических сдвигов сигналов соответствующих протонов в составе этих комплексов и полного комплекса показывает, что наибольшие изменения происходят как раз вблизи от точек «модификаций» в полном соответствии с проведенным отнесением.

Существует и альтернативный подход для отнесения сигналов в спектрах комплементарных комплексов олигонуклеотидов — 2D-спектроскопия ЯМР. В последнее время этот метод наиболее часто используется для решения этой задачи (см., например, [25]). Несмотря на очевидные достоинства, 2D-спектроскопия требует уникального оборудования и относительно больших по сравнению с инкрементным методом затрат приборного времени (по нашим оценкам, в 2–3 раза).

Из кривых зависимости химических сдвигов сигналов протонов от температуры были определены температуры плавления для комплементарного комплекса (табл. 3). Видно, что значения температур плавления для внутренних комплементарных пар комплекса в целом несколько выше, чем для концевых пар. Аналогичные результаты получены ранее для комплексов некоторых коротких олигорибонуклеотидов [26]. В то же время из приведенных данных можно сделать вывод о более прочном стеклинг-взаимодействии оснований в октануклеотиде  $d(\text{pGCCAAAC})\text{A}$  по сравнению с  $d(\text{pTGTTTGGC})$ , так как температуры плавления, определенные из кривых для протонов первого октануклеотида, выше, чем второго. Этого и следовало ожидать, так как октануклеотид  $d(\text{pTGTTTGGC})$  содержит четыре остатка dT, которые значительно хуже

Таблица 3

химических сдвигов сигналов протонов гетероциклических оснований  
 $d(\text{pTGTTTGGC}) \cdot d(\text{pGCCAAAC})\text{A}$   
 плавления не определена

58,0	58,0	59,5	58,0	--	54,0	55,0	56,0
6	CH <sub>3</sub>	6	CH <sub>3</sub>	8	8	6	5
dT <sup>5</sup> dA <sup>4</sup>		dT <sup>4</sup> dA <sup>5</sup>		dG <sup>3</sup> dC <sup>6</sup>	dG <sup>2</sup> dC <sup>7</sup>	dC <sup>1</sup> dG <sup>8</sup>	
2	8	2	8	6	5	6	5
59,5	—	58,0	59,5	60,5	59,0	58,5	59,0
							57,0



участвуют в стекнинг-взаимодействии, чем любой из dA, dG и dC, входящих в состав комплементарного олигонуклеотида.

Таким образом, в настоящей работе был выполнен первый этап исследований модельной системы, которая будет использована для изучения физико-химических и структурных аспектов комплементарно-адресованной модификации. В дальнейшем предполагается исследование этого дуплекса с присоединенным по 2',3'-оксигруппам остатка гА<sup>1</sup> 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилпиденовым остатком, который наиболее часто применяется в качестве активной алкилирующей функции при проведении комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот.

### Экспериментальная часть

Для синтеза октануклеотидов и их фрагментов использовали 4-хлорфениловые эфиры N-ацил-3'-O-левулилизилнуклеозид-5'-фосфатов, N-ацилнуклеозид-5'-(4-хлорфенил-2-цианэтил)фосфаты, триэтилолбензолсульфохлорид (препараты опытного химического производства НИОХ СО АН СССР).

Синтез олигонуклеотидов проводили триэфирным методом согласно работе [16]. В некоторых случаях на последней стадии синтеза использовали N-ацилнуклеозид-5'-(4-хлорфенил-2-цианэтил)фосфаты, а удаление концевых и междууклеотидных 4-хлорфениловых защитных групп после синтеза олигонуклеотидов проводили раствором тетрабутиламмонийфторида, как описано в работе [27]. Полное деблокирование олигонуклеотидов осуществляли обработкой концентрированным водным раствором аммиака в стандартных условиях (50°С, 4 ч).

Выделение деблокированных олигонуклеотидов проводили на хроматографе Алех (США), попообменную хроматографию — на колонке (1,8×30 см) с аминосилсхромом АС<sub>111</sub>-300 в градиенте концентрации калий фосфатного буфера (рН 7,5) в 30% ацетонитриле, обращенно-фазовую хроматографию — на колонке (0,46×25 см) со смолой Lichrosorb 5 RP-18 (Machery-Nagel, ФРГ) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–20%) в 0,05 М LiClO<sub>4</sub>. Осаждение олигонуклеотидов проводили в ацетон по методу [28].

*Приготовление образцов для записи спектров <sup>1</sup>H-ЯМР.* Олигонуклеотиды, предварительно дважды упаренные с D<sub>2</sub>O (99,98%), растворяли в буфере, содержащем 0,1 М NaCl, 0,01 М натрий-фосфатный буфер (рD 7,0) и 0,01 мМ EDTA в D<sub>2</sub>O (99,98%). Концентрация олигонуклеотидов во всех случаях была 1 мМ.

рD измеряли на рН-метре, модель 501 (Orion, США). Поправку на изотопный эффект не вводили.

Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР записывали на спектрометрах Bruker WP-200 SY и WH-360, работающих в импульсном режиме; используемая ширина спектров 2500 и 4500 Гц соответственно, цифровое разрешение 0,3 Гц, число накоплений 75–100. Стабилизацию осуществляли по сигналу ЯМР дейтерия растворителя; в качестве стандарта использовали 4,4-диметил-4-силпантан-1-сульфонат натрия, принимая химический сдвиг его сигнала равным 0,000 м. д. Возможное влияние олигонуклеотидов на химический сдвиг сигнала метильных групп стандарта (см. [29]) не учитывали.

Расчет химических сдвигов сигналов протонов проводили по методу [20] с учетом данных для 2'-дезоксинуклеозидов [19] и данных настоящей работы для dрГ и dрG.

Авторы выражают глубокую благодарность М. Н. Преображенской и И. В. Ярцевой за помощь в записи спектров <sup>1</sup>H-ЯМР на приборе Bruker WH-360.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бласов В. В., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Молекулярн. биология, 1970, т. 4, вып. 2, с. 201–204.
2. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук, 1986, № 12, вып. 5, с. 118–124.
3. Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I. Tetrahedron Lett., 1967, № 37, p. 3557–3562.
4. Беликова А. М., Гринева Н. И. Молекулярн. биология, 1970, т. 4, вып. 5, с. 697–706.
5. Kan L. S., Chen D. M., Jayaraman K., Leutzinger E. E., Miller P. S., Ts'o P. O. P. Biochemistry, 1982, v. 21, № 26, p. 6723–6732.
6. Clore G. M., Gronenborn A. M. Eur. Biophys. J., 1984, v. 11, № 10, p. 95–102.
7. Wemmer D. E., Chou S., Hare D. R., Raid B. R. Biochemistry, 1984, v. 23, № 10, p. 2262–2268.

8. Jamin N., James T. L., Zon G. Eur. J. Biochem., 1985, v. 152, № 1, p. 157-166.
9. Cavailles J.-A., Neumann J.-M., Tran-Dinh S., Huyhn-Dinh T., d'Estaintot B. L., Igolen J. Eur. J. Biochem., 1985, v. 147, № 2, p. 183-190.
10. Patel D. J., Shapiro L., Kozlowski S. A., Gaffney B. L., Kuzmich S., Jones R. A. Biochimie, 1985, v. 67, № 7/8, p. 861-886.
11. Fazakerley G. V., Teoule R., Guy A., Fritzsche H., Guschlbauer W. Biochemistry, 1985, v. 24, № 17, p. 4540-4548.
12. Reid D. G., Sulibury S. A., Brown T., Williams D. H. Biochemistry, 1985, v. 24, № 16, p. 4325-4332.
13. Frey M. H., Leupin W., Srensen O. W., Denny W. A., Ernst R. R., Wüthrich K. Biopolymers, 1985, v. 24, № 12, p. 2371-2380.
14. Rinkel R. J., Mellema J.-R., van der Marel G. A., van Boom J. H., Altona C. Eur. J. Biochem., 1985, v. 154, № 2, p. 259-265.
15. Lee S. J., Akutsu H., Kyogoku Y., Kitano K., Tozuka Z., Ohta A., Ohtsuka E., Ikehara M. J. Biochem., 1985, v. 98, № 6, p. 1463-1472.
16. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 516-521.
17. Borer P. N., Kan L. S., Ts'o P. O. P. Biochemistry, 1975, v. 14, № 22, p. 4847-4862.
18. Chen D. M., Kan L. S., Leutinger E. E., Jayaraman K., Miller P. S., Ts'o P. O. P. Biochemistry, 1982, v. 21, № 4, p. 623-630.
19. Bell R. A., Alkema D., Coddington J. M., Hader P. A., Hughes D. W., Neilson T. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 4, p. 1143-1149.
20. Bell R. A., Everett J. R., Hughes D. W., Coddington J. M., Alkema D., Hader P. A., Neilson T. J. Biomol. Struct. and Dyn., 1985, v. 2, № 4, p. 693-707.
21. Jardeztzky O. D. J. Amer. Chem. Soc., 1960, v. 82, № 1, p. 229-236.
22. Danyluk S. S., Hruska F. E. Biochemistry, 1968, v. 7, № 3, p. 1038-1043.
23. Ts'o P. O. P., Barriett J. C., Kan L. S., Miller P. S. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1973, v. 222, p. 290-306.
24. Schweizer M. P., Chan S. J., Helmcamp G. K., Ts'o P. O. P. J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, № 2, p. 696-700.
25. Clore G. M., Gronenborn A. M. FEBS Lett., 1985, v. 179, № 2, p. 187-198.
26. Petersheim M., Turner D. H. Biochemistry, 1983, v. 22, № 2, p. 269-277.
27. Бауцк Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В. Биоорган. химия, 1985, т. 12, № 6, с. 815-820.
28. Барам Г. И., Грачев С. А. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 10, с. 1420-1422.
29. Live D. H., Chan S. I. Org. Magn. Reson., 1973, v. 5, № 6, p. 275-276.

Поступила в редакцию

3.II.1985

После доработки

7.IV.1986

## <sup>1</sup>H NMR INVESTIGATION OF THERMAL DENATURATION OF COMPLEMENTARY COMPLEX d(pTGTTTGGC)·d(pGCCAAAC)A IN AQUEOUS SOLUTION

BICHENKOVA E. V., DENISOV A. Yu\*, KUTYAVIN I. V., LEBEDEV A. V.

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

The oligodeoxynucleotides d(pTGTTTGGC), d(pGCCAAAC)A and their complementary complex have been studied by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. All resonances of nonexchangeable base protons have been assigned by incremental method using the fragments (chain-length from 2 to 7) of the above octadeoxynucleotides. The proton chemical shifts of a given base have been shown to be influenced not only by its 3'- and 5'-end neighbors, but also by more remote nucleotides (up to a third nucleotide, if the latter is dA or dG). A thermal denaturation process for complex d(pTGTTTGGC)·d(pGCCAAAC)A has been monitored and the temperature dependences of chemical shifts for each nonexchangeable proton of the all heterocyclic bases have been obtained. The complex melting process was found to begin from terminal base pairs. In general the melting temperatures for oligonucleotide d(pGCCAAAC)A were slightly higher (by 1-5° C) than those for d(pTGTTTGGC). The melting interval was 30° C and average melting temperature about 60° C in the conditions used (D<sub>2</sub>O, oligonucleotide concentration 10<sup>-3</sup> M; 0,1 M sodium chloride; 0,01 M sodium phosphate buffer; 0,01 mM EDTA; pD 7,0).