



УДК 577.143.6.088.5

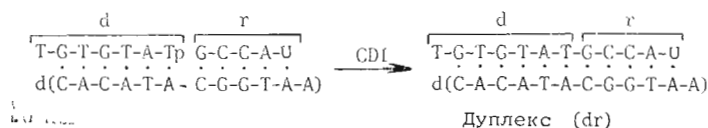
## ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА СМЕШАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Заякина Г. В., Крымская Н. Ф., Метелев В. Г.,  
Шабарова З. А.

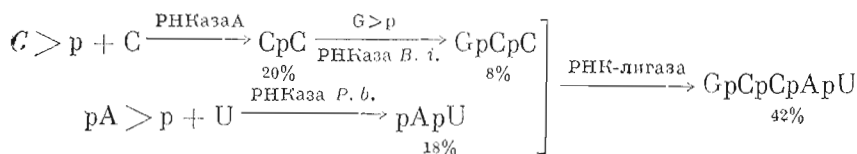
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
химический факультет

Для изучения специфичности и механизма действия ряда ферментов нуклеинового обмена важное значение имеет исследование субстратных свойств смешанных олиго(рибо-дезоксирибо)нуклеотидов. Однако поэтапный химический синтез таких соединений очень трудоемок (см., например, [1]).

В настоящей работе для синтеза смешанных олигонуклеотидов предлагается использовать разработанный ранее в нашей лаборатории метод матрично-направленного химического лигирования олигодезоксирибонуклеотидов под действием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимиды (CDI) [2]. Для получения смешанных олигонуклеотидов 3'-фосфорилированный олигодезоксирибонуклеотид вводится в конденсацию с олигорибонуклеотидом, не содержащим концевых фосфатных групп, в присутствии комплементарной олиго(поли)дезоксирибонуклеотидной матрицы:



3'-Фосфорилированный олигодезоксирибонуклеотид d(TGTGTATr) получен путем направленного расщепления рибозного звена [3] в d(TGTGTAT)U, синтезированного триэфирным методом [4]. Олигорибонуклеотид GCCAU синтезирован с помощью набора РНКаз различной специфичности (*A*, *Bacillus intermedius* и *Penicillium brevicompactum*) по методикам, описанным в работах [5, 6], и РНК-лигазы [7] по следующей схеме:



Реакционную смесь ( $10^{-4}$  М раствор олигонуклеотидов) для проведения химического лигирования инкубировали в течение 6 сут при 0° С в буфере, содержащем 0,05 М 2-морфолиноэтансульфонат, 0,02 М MgCl<sub>2</sub> и 0,2 М CDI. Анализ смеси осуществляли микроколоночной хроматографией на Полисиле СА в 20% ацетонитриле в градиенте концентрации пирофосфата натрия (0–0,12 М, pH 6,5) \*. Следует отметить, что в описанных условиях дуплекс (dr) выходит в виде симметричного пика (пик V на рис. 1а).

Разделение олигонуклеотидных цепей дуплекса (dr) проводили двумя способами: а) обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке (4,6×250 мм) с носи-

\* Использование градиента пирофосфата натрия предложено С. И. Ястребовым (ВНИИ МБ, Кольцово).

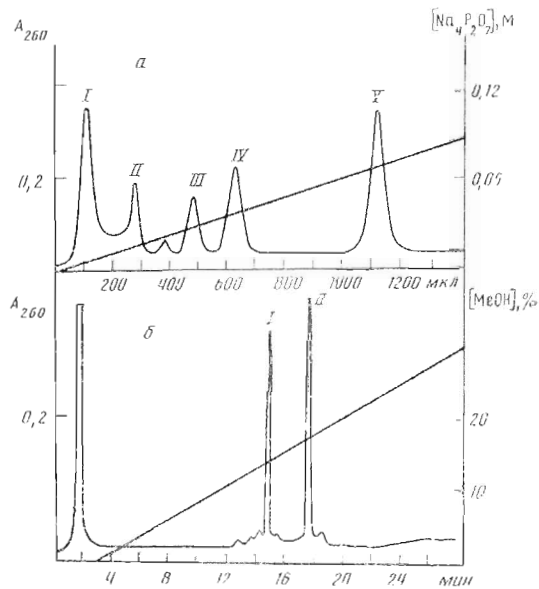


Рис. 1. Хроматографическое разделение: *a* — продуктов химического лигирования в градиенте пиродифосфата натрия (0–0,12 М, рН 6,5) в 20% ацетонитриле при скорости элюции 100 мкл/млн: I — СДИ, II — ГССАУ, III — d(TGTGTATp), IV — d(AATGGCATACAC), V — дуплекс (dr); *b* — дуплекса (dr), в градиенте метанола (условия см. в тексте): I — d(TGTGTAT)ГССАУ, II — d(AATGGCATACAC)

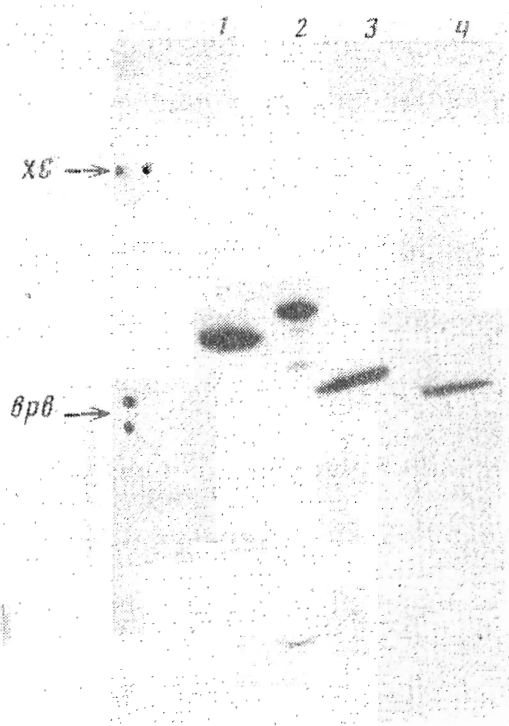


Рис. 2. Авторадиограмма электрофоретического разделения в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины: d(AATGGCATACAC) (1); d(TGTGTAT)ГССАУ до (2) и после (3) щелочной обработки; d(TGTGTATp) (4). Стрелками отмечено положение маркеров-красителей ксиленацанола (ХС) и бромфенолового синего (ВРВ)

телем Zorбах С-8 в градиенте концентрации метанола (0--40%) в 0,1 М ацетате аммония при скорости элюции 1 мл/мин и температуре 50°С (рис. 1б); б) электрофорезом в 20% ПААГ в 8 М мочеvine после введения <sup>32</sup>P-метки.

Структуру смешанного додекануклеотида d(TGTGTAT)GCCAU подтверждали данными щелочного гидролиза. При полном щелочном гидролизе (0,3 М КОН, 90°С, 1 ч [8]) <sup>32</sup>P-меченого олигонуклеотида образуется d(<sup>32</sup>P-TGTGTAT)Gp, который был идентифицирован по электрофоретической подвижности (рис. 2).

Таким образом, в настоящем сообщении описаны использование метода химического лигирования для получения смешанных олигонуклеотидов из рибо- и дезоксирибонуклеотидных блоков с незащищенными функциональными группами, методики выделения гибридного дуплекса и однотяжевого смешанного олигонуклеотида.

Авторы выражают глубокую признательность С. М. Женодаровой за предоставление препаратов для синтеза олигорибонуклеотидов и ценные советы, а также Н. Г. Долинной за участие в обсуждении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Wang A., Fujii J.-H., van Boom J. H., van der Marel G. A., van Boeckel S. A. A., Rich A. *Nature*, 1982, v. 299, № 5884, p. 601-604.
2. Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Druza V. L., Melnicova N. P., Purnal A. A. *Nucl. Acids Res.*, 1981, v. 9, № 21, p. 5747-5761.
3. Крынецкая Н. Ф., Заякина Г. В., Елов А. А., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1985, т. 285, № 2, с. 489-492.
4. Шабарова З. А., Волков Е. М., Ореука Т. С., Туркин С. И., Долинная Н. Г., Каграманова В. К., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1981, т. 258, № 4, с. 914-918.
5. Хабарова М. И., Смолянинова О. А., Багдонас А. С., Коваленко М. И., Женодарова С. М. *Биоорган. химия*, 1978, т. 4, № 6, с. 740-743.
6. Женодарова С. М., Соболева И. А., Хабарова М. И., Ежов В. А., Приходько А. Г. *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 5, с. 736-741.
7. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 4, с. 524-533.
8. Loring H. S. In: *The Nucleic Acids/Eds Davidson J. N., Chargaff E. N. Y.* - L.: Acad. Press, 1955, v. 1, p. 137.

Поступило в редакцию  
26.VII.1986

#### A CHEMICAL-ENZYMATIC METHOD OF SYNTHESIS OF OLIGO(RIBODEOXYRIBO) NUCLEOTIDES

ZAYAKINA G. V., KRYNETSKAYA N. P., METELEV V. G., SHABAROVA Z. A.

*M. V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow*

Oligo(ribodeoxyribo)nucleotide d(TGTGTAT)r(GCCAU) was synthesized from oligonucleotide blocks by chemical ligation, the oligoribonucleotide and oligodeoxynucleotide blocks being prepared by enzymatic and chemical synthesis, resp. A general procedure of the hybride duplex strand separation is described.