



УДК 547.9 : 542.953.2

СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

XII *. СИНТЕЗ ДОДЕКАДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА, КОМПЛЕМЕНТАРНОГО УЧАСТКУ 47—58 ВАЛИНОВОЙ тРНК₁ ДРОЖЖЕЙ

*Берлин Ю. А., Бочарова Т. Н., Вульфсон А. Н.,
Колосов М. Н., Коробко В. Г.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Осуществлен химический синтез додекануклеотида d(C-G-A-A-C-T-G-G-G-G-A-C), комплементарного участку 47—58 дрожжевой тРНК₁^{Val}. В процессе синтеза нуклеотидная цепь наращивалась блоками в обе стороны: от 5'-конца к 3'-концу и в обратном направлении, от 3'- к 5'-концу. Синтезированный додекануклеотид образует устойчивый комплекс с сегментом 36—77 тРНК₁^{Val}. Показана возможность многократного увеличения скорости анионообменной хроматографии при выделении и очистке синтезированных олигонуклеотидов.

Ранее мы описали химический синтез ундекануклеотида d(G-T-T-C-T-G-C-G-T-G-T), комплементарного участку 36—46 молекулы дрожжевой тРНК₁^{Val} [1]. Настоящая работа посвящена получению смежного сегмента значащей цепи структурного гена этой тРНК — додекануклеотида d(C-G-A-A-C-T-G-G-G-G-A-C) (X), комплементарного участку 47—58 ее молекулы.

Схема построения этого сегмента (см. схему) заключалась в синтезе 5'-концевого пентануклеотидного фрагмента (IV) и затем его последовательном превращении в окта-(VII) и додекамер (IX). Нарращивание олигонуклеотидной цепи на этих стадиях проводилось в направлении от 5'-к 3'-концу блочным методом с использованием избытка фосфатного компонента. Однако в ходе синтеза было обнаружено, что такая схема, традиционно используемая в олигонуклеотидном синтезе (см., например, [3]), не всегда оптимальна и во многих случаях лучшие результаты можно получить, применяя избыток не фосфатного, а гидроксильного компонента [4]. Если в синтезе использовать более доступные в дезоксирияду 5'-фосфаты, то применение избытка гидроксильного компонента (при этом более короткого, чем фосфатный) означает обращение обычной схемы синтеза, т. е. наращивание нуклеотидной цепи в направлении от 3'- к 5'-концу. Именно таким способом мы синтезировали 5'-концевой пентануклеотид d[(MeOTr)anC-ibG-bzA-bzA-anC] (IV). Сначала взаимодействием d(CNEt)pbzA с dranC(Ac) (молярное соотношение 1,2 : 1) был получен динуклеотид d(pbzA-anC) (I) с выходом 72%. В виде 3'-ацетата он был сконденсирован с избытком d(CNEt)pbzA, что привело к тринуклеотиду

* Сообщения X, XI см. [1, 2]. В статье использованы следующие нестандартные сокращения: ib — изобутирил, TEAB — бикарбонат триэтиламония.

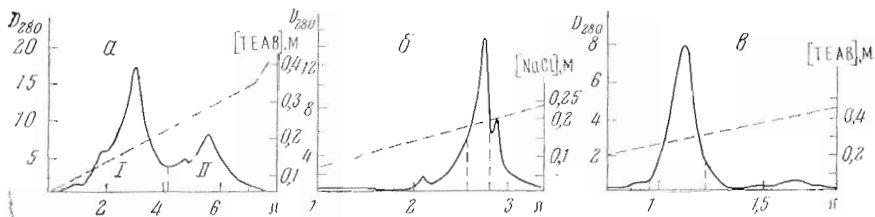


Рис. 1. Выделение октануклеотида (VII): *a* — хроматография реакционной смеси из опыта 6 на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (HCO_3^- ; $3,2 \times 31$ см) в градиенте концентрации ТЕАВ в 50%-ном спирте (0,05—0,22 М, 4,2 л, затем 0,22—0,35 М, 3,2 л), фракции 20 мл/6 мин. Пик I содержит 18 700 OE_{230} тринуклеотида (VI) и пентануклеотида (IV) (38%), пик II — 11 350 OE_{230} (36%) октануклеотида (VII); *b* — рехроматография 5600 OE_{230} октануклеотида (VII) на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой DE-52 (Cl^- ; $1,6 \times 60$ см) в градиенте концентрации NaCl (0,025—0,25 М, 3,6 л) в 8 М мочевины, 0,02 М трис-HCl (pH 7,5), фракции 20 мл/24 мин. Из фракций 129—140 выделили 1700 OE_{230} октануклеотида (VII); *c* — повторная рехроматография 1200 OE_{230} октануклеотида (VII) на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (HCO_3^- ; $2,3 \times 25$ см) в градиенте концентрации ТЕАВ в 50%-ном спирте (0,05—0,5 М, 2 л), фракции 8,7 мл/5,2 мин. Из фракций 110—140 выделили 1000 OE_{230} октануклеотида (VII)

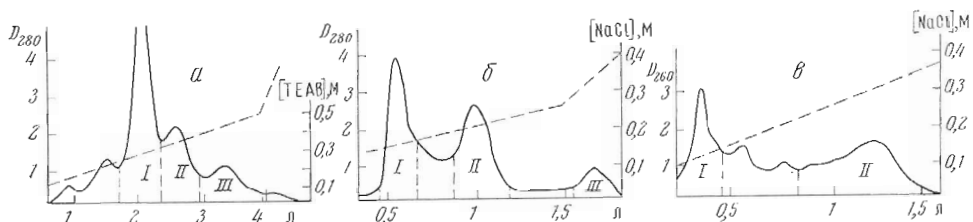


Рис. 2. Выделение додекануклеотида (IX): *a* — хроматография реакционной смеси из опыта 8 на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (HCO_3^- ; $1,6 \times 60$ см) в градиенте концентрации ТЕАВ в 50%-ном спирте (0,05—0,5 М, 4 л), фракции 17 мл/5 мин. Пик I содержит 2340 OE_{230} (тетрануклеотидная фракция), пик II — 800 OE_{230} (октануклеотидная фракция), пик III — 930 OE_{230} (додекануклеотидная фракция); *b* — рехроматография октануклеотидной фракции (800 OE_{230}) на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (Cl^- ; $1,1 \times 80$ см) в градиенте концентрации NaCl (0,1—0,26 М, 1,5 л, затем 0,26—0,4 М, 300 мл) в 8 М мочевины с 0,02 М трис-HCl, pH 7,5; фракции 8 мл/5,3 мин. Из фракций 185—208 (пик I) выделили 100 OE_{230} додекануклеотида (IX); *c* — рехроматография додекануклеотидных фракций (930 + 100 OE_{230}) на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (Cl^- ; $1,1 \times 80$ см) в градиенте концентрации NaCl (0,05—0,4 М, 1,6 л) в 8 М мочевины и 0,02 М трис-HCl (pH 7,5), фракции 6 мл/9 мин. Из фракций 121—220 выделили 495 OE_{230} (36%) додекануклеотида (IX)

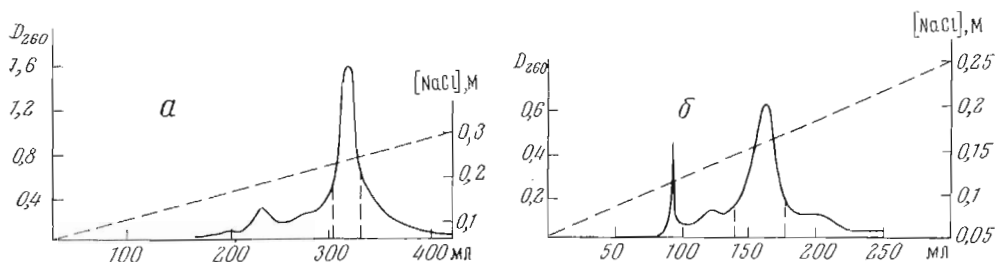


Рис. 3. Выделение додекануклеотида (X): *a* — хроматография реакционной смеси из опыта 9 на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (Cl^- ; $0,28 \times 70$ см) в градиенте концентрации NaCl (0,05—0,45 М, 700 мл) в 8 М мочевины и 0,02 М трис-HCl (pH 7,5), фракции 2,2 мл/10 мин. Из фракции 134—147 выделили 33 OE_{230} додекануклеотида (X); *b* — рехроматография на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (Cl^- ; $0,89 \times 16$ см) в 8 М мочевины, содержащей HCl (pH 3,5), в градиенте концентрации NaCl (0,05—0,25 М, 300 мл); скорость 60 мл/ч. Из отмеченной части пика выделили 20 OE_{260} додекануклеотида (X)

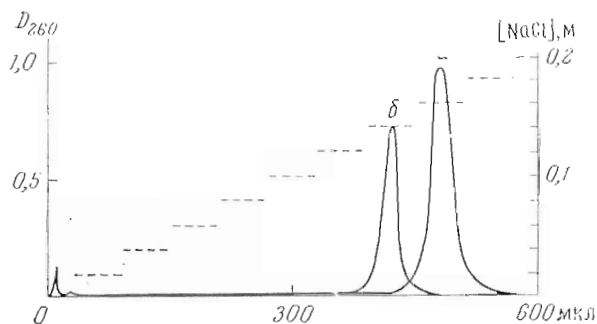


Рис. 4. Аналитическая микроколоночная хроматография додекануклеотида (X) на DEAE-целлюлозе (Cl^- ; $0,8 \times 80$ мм) в ступенчатом градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine: а — с 0,02 М трис-HCl, pH 7,0; б — с HCl, pH 3,5. Скорость 360 мкл/ч, регистрация с помощью МСФП-1

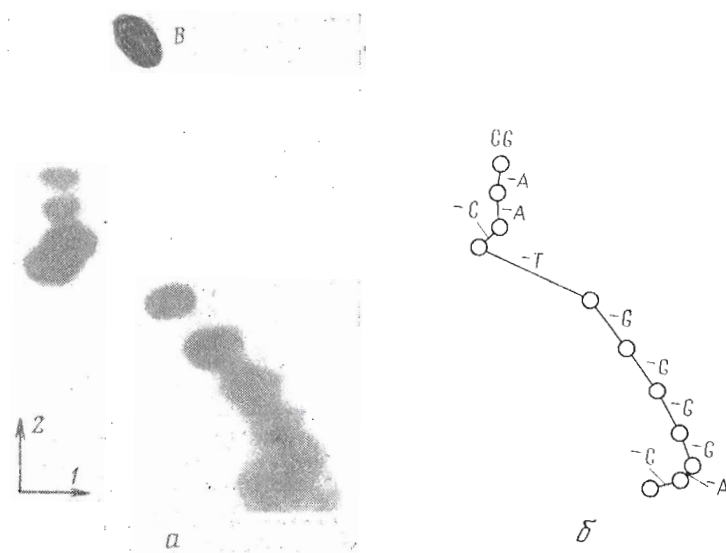


Рис. 5. Двухмерное разделение продуктов частичного экзонуклеазного гидролиза додекануклеотида (^{32}P -X) (опыт 10). В — пятно ксиленцианола FF. Направление 1 — электрофорез на ацетилцеллюлозе при pH 3,5 (5000 В на полосе длиной 55 см), 2 — гомохроматография; а — радиоавтограмма, б — схема

соответствующие сегменты, а также использовать в олигонуклеотидном синтезе продукты детритилирования, содержащие N-защитные группы, в качестве гидроксильных компонентов.

Полученные олигонуклеотиды идентифицировали на основании их спектральных свойств и хроматографических характеристик, а также по данным полного экзонуклеазного гидролиза [5] (см. таблицу).

Дополнительную очистку незащищенного додекануклеотида (X) проводили с помощью анионообменной хроматографии в 8 М мочеvine при пониженном значении pH (3,5), т. е. в условиях, делающих возможным более точное разделение олигонуклеотидов благодаря различной степени протонирования гетероциклических оснований (рис. 3, б). Чтобы избежать при этом апуринизации, хроматографию проводили с высокой скоростью, немедленно нейтрализуя объединяемые фракции водным аммиаком. Следует отметить, что вообще при синтезе олигонуклеотидов фосфодиэфирным методом большая часть времени тратится на ионообменную хроматографию, которая проводится обычно со скоростью 5—25 мл/ч на 1 см^2 сечения колонки. Мы нашли, что как при хроматографическом анализе олигонуклеотидов, так и при их препаративном разделении скорость элю-

Характеристики полученных олигонуклеотидов

Олигонуклеотид	R _d рТ		λ _{макс.} , нм	Нуклеотидный состав				
	А	Б		dC	dрТ	dрG	dрА	dрC
d (pbzA-anC) (I)	1,03		285					
d (pbzA-bzA-anC) (II)	0,87		282					
d [(MeOTr) anC-ibG] (III)	2,02		260, 285					
d [(MeOTr) anC-ibG-bzA-bzA-anC] (IV)	1,71		283, 260*					
d (pT-ibG-ibG) (VI)	1,19		260, 280*					
d [(MeOTr) anC-ibG-bzA-bzA-anC-T-ibG-ibG] (VII)	0,87		281, 260*					
d (pibG-ibG-bzA-anC) (VIII)	0,66		261, 282					
d [(MeOTr) anC-ibG-ibzA-bzA-anC-T-ibG-ibG-ibG-ibG-ibzA anC] (IX)		0,73	260, 280	1,0			1,0	1,15
d (pA-C)			262	1,9				1,0
d (pA-A-C)	0,22		260					
d [(MeOTr) C-G]	1,58		233, 255*, 270*					
d (anC-ibG)	1,77		260, 285					
d (C-G)	1,00		253, 270*	1,1		1,0		
d [(MeOTr) C-G-A-A-C]	0,33		259					
d (anC-ibG-bzA-bzA-anC)	1,17		283, 260*					
d (C-G-A-A-C)	0,18		259	1,05		1,0	1,95	1,05
d (pT-G-G)		0,39	254, 270*		1,0	1,9		
d (C-G-A-A-C-T-G-G)		0,09	258	1,05	1,1	2,7	1,9	1,0
d (pG-G-A-C)		0,44	256			2,0	1,1	1,0
d (C-G-A-A-C-T-G-G-G-G-A-C) (X)			257	1,0		5,25	3,3	2,2

* Илечо.

ции может быть резко увеличена (до 200—500 мл·ч·см²) без заметного снижения разрешающей способности колонки. При этом в ряде случаев наблюдалось даже лучшее разделение компонентов смеси и лучшая воспроизводимость величины ионной силы, при которой происходит элюция вещества.

Индивидуальность конечного додекануклеотида (X) была доказана микроколоночной анионообменной хроматографией в градиенте концентрации NaCl в 7 М нейтральном и кислом растворах мочевины (рис. 4, а и б); аналогичные характеристики были получены и для всех промежуточных олигонуклеотидов. Далее, действием [γ -³²P]АТР и полинуклеотидкиназы фага Т4 додекануклеотид (X) был ³²P-фосфорилирован по 5'-гидроксилу, а затем подвергнут полному и частичному гидролизу фосфодиэстеразой змеиного яда. В смеси продуктов полного гидролиза единственным меченым нуклеотидом оказался dPc, что подтвердило природу 5'-концевого звена. Продукты частичного гидролиза были разделены электрофорезом на ацетилцеллюлозе и гомохроматографией на DEAE-целлюлозе во взаимно перпендикулярных направлениях; анализ полученной при этом нуклеотидной карты (рис. 5) в соответствии с эмпирическими правилами [6] подтвердил структуру нуклеотида (X).

Додекануклеотид (X) комплементарен рибонуклеотидной последовательности m⁷G-D-m⁵C-C-C-A-G-T-Ψ-C-G в положении 47—58 валиновой тРНК дрожжей, в связи с чем мы исследовали его гибридизацию с 3'-половиной (т. е. с сегментом 36—77) этой тРНК. С помощью хроматографии на сефадексе G-50 было показано, что отжиг эквимольной смеси доде-



Рис. 6. Электрофорез в 15%-ном полиакриламидном геле в 0,01 М Mg(OAc)₂, 0,001 М этилендиаминтетрауксусной кислоте и 0,04 М трис-АсОН, рН 7,4 (0 — стартовая линия, В — положение пятна бромфенолового синего). 1 — додекануклеотид (³²p-X), 3,5 · 10³ имп/мин, 2 — комплекс нуклеотида (³²p-X) с сегментом 36—77 тРНК₁^{Val} (см. опыт 11а).

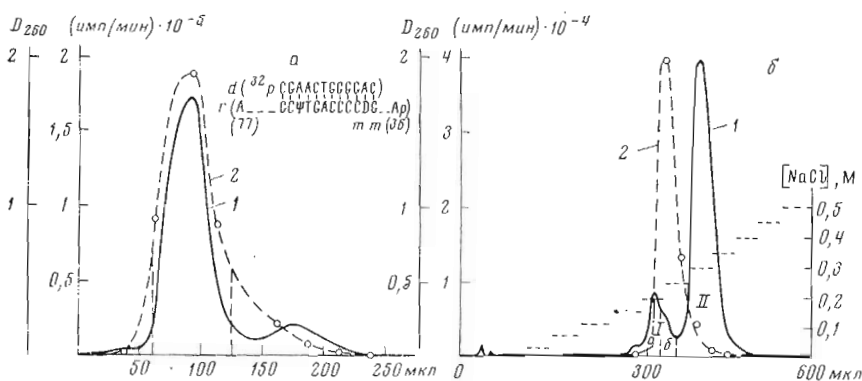


Рис. 7. Выделение комплекса додекануклеотида (³²p-X) с 3'-половиной тРНК₁^{Val} и его диссоциация: 1 — оптическая плотность, 2 — радиоактивность. а — хроматография реакционной смеси из опыта 11 б на колонке с сефадексом G-50 (сверхтонкий, 250 мкл) при 2° в 0,01 М MgCl₂, 0,001 М этилендиаминтетрауксусной кислоте и 0,05 М трис-АсОН, рН 7,5; скорость 150 мкл/ч; б — хроматография вещества из основного пика рис. 7, а на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl⁻; 0,8 × 80 мм) в 7 М мочевины и 0,02 М трис-НСl (рН 7,5) в градиенте концентрации NaCl. Пики 1а и 1б — соответственно додекануклеотиды (X) и (³²p-X), пик 11 — сегмент 36—77 тРНК₁^{Val}.

кануклеотида ($^{32}\text{p-X}$) и 3'-половины тРНК приводит к включению радиоактивности в высокомолекулярную фракцию (рис. 7, а, см. также данные гель-электрофореза, рис. 6). При хроматографии этой фракции на DEAE-целлюлозе в денатурирующих условиях (рис. 7, б) наблюдаются дискретные пики, отвечающие радиоактивному додекануклеотиду ($^{32}\text{p-X}$) (вместе с 5'-нефосфорилированным нуклеотидом (X): соответственно пики 1б и 1а) и помеченному фрагменту тРНК (пик II). Таким образом, додекануклеотид (X) с 3'-половиной тРНК^{Val} образует комплекс, который диссоциирует в денатурирующих условиях. Если к отожженной смеси додекануклеотида ($^{32}\text{p-X}$) и 3'-половины тРНК прибавить 5'-половину тРНК (ее сегмент 1—35) и полученный ассоциат использовать в качестве субстрата для валил-тРНК-синтетазы, то оказывается, что в этом случае аминокислотирование протекает вдвое хуже, чем при тестировании комплекса двух половин тРНК в присутствии додекануклеотида (X) (данные А. Д. Мирзабаскова и О. В. Преображенской, ИМБ АН СССР, Москва). Эти результаты свидетельствуют о значительной устойчивости комплекса ($^{32}\text{p-X}$)·3'-половина тРНК^{Val}, очевидно, вследствие высокого содержания цитозина и гуанина в додекануклеотиде (X).

Экспериментальная часть

Нуклеотиды использовались в виде пиридиниевых солей. Дезоксирибонуклеозид-5'-фосфаты (производства опытного химического цеха НИОХ СО АН СССР и СКТБ БАВ Главмикробиопрома, Новосибирск) для перевода в пиридиниевую форму пропускали в растворе 50%-ного водного пиридина через колонку с дауэксом 50 (PyH⁺). Безводный пиридин для межнуклеотидных конденсаций получали из пиридина марки ч. д. а. последовательной перегонкой над КОН, тозилхлоридом, ВаО и хранили над молекулярными ситами (4Å), активированными в вакууме при 450°. Хроматографию на бумаге Ватман № 1 (длина полосы 30 см) проводили в восходящем потоке в системе 96% EtOH — 4 М AcONH₄, 7 : 3, рН 7,5 (система А) или *n*-PrOH — конц. NH₃ — H₂O, 11 : 2 : 7 (система Б). Цианэтильные и ацетильные производные нуклеотидов получали, как описано ранее [7]. Продукты межнуклеотидных конденсаций выделяли ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой DE-23 («Whatman») или DEAE-сефадексом А-25 («Pharmacia») в бикарбонатной форме (при 4°) или хлоридной форме (при 20°), используя в качестве элюента ТЕАВ или NaCl в 8 М мочевице. Элюат, содержащий NaCl и мочевину, разбавляли водой в 3—4 раза, пропускали через колонку с DEAE-целлюлозой, соль и мочевину удаляли промыванием 0,05 М ТЕАВ, после чего олигонуклеотиды элюировали 1 М ТЕАВ. Полученный раствор вдвое разбавляли пиридином и упаривали в вакууме, полностью удаляя триэтиламин многократным упариванием с пиридином, а остаток после упаривания осаждали эфиром из пиридина. Выход определяли в оптических единицах (1 ОЕ₂₈₀ вещества в 1 мл раствора дает при 280 нм оптическую плотность $D_{1\text{см}} = 1$) и рассчитывали в процентах от теоретического по реагенту, взятому без избытка; при этом коэффициент молярной экстинкции олигонуклеотида принимали равным сумме коэффициентов экстинкции мононуклеотидов (ϵ_{267} 9600 для dpT, ϵ_{302} 22 430 для dpanC, ϵ_{259} 16 700 для dpibG и ϵ_{280} 18 300 для dpbzA [8]).

N-Ацильные группы удаляли действием 25% NH₃ (1 мл на 10 ОЕ₂₈₀ олигонуклеотида, 15—20 ч при 50°), а для отщепления 5'-метокситритильной группы обрабатывали смесью AcOH — пиридин — вода, 14 : 1 : 3 (0,5 мл смеси на 10 ОЕ₂₈₀ олигонуклеотида, 48 ч при 20°). Нуклеотидный состав синтезированных соединений после удаления защитных групп определяли с помощью гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда (КФ 3.1.4.1), как описано ранее [5].

1. *d(pbzA-anC)* (I). Смесь 4,14 г (7,3 ммоль) *d*(CNEt)pbzA и 3,75 г (6,7 ммоль) *d*ranC(Ac) высушили 5-кратным упариванием с пиридином, растворили в 50 мл пиридина, прибавили 7,35 г (33,5 ммоль) мезитиленсульфохлорида, раствор упарили до объема 15 мл и оставили на 5 ч при 20°. При охлаждении до -20° прилили охлажденный раствор 8,8 мл триэтиламина в 14,2 мл пиридина, затем 80 мл воды, смесь выдержали 15 ч при 0°, обработали 200 мл 2 н. NaOH (20 мин при 20°) и нейтрализовали дауэксом 50 (PyH⁺). Смолу отфильтровали, промыли 1 л 50%-ного водного пиридина, фильтрат упарили до объема 200 мл и нанесли на колонку с DEAE-сефадексом (HCO₃⁻; 4,6 × 53 см), уравновешенную 0,05 М ТЕАВ. Пиридин отмыли таким же буфером, после чего хроматографировали в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 10%-ном спирте (0,05—0,35 М, 20 л), собирая фракции по 35 мл/12 мин. Из фракций 440—540 (0,28—0,33 М) выделили 132 000 ОЕ₂₈₅ (72%) динуклеотида (I), $\epsilon_{285}/\epsilon_{260}$ 1,57; $\epsilon_{285}/\epsilon_{302}$ 1,34. Возврат *d*pbzA 17%, *d*ranC 33%.

2. *d(pbzA-bzA-anC)* (II) получен взаимодействием 1,9 г (3,5 ммоль) *d*(CNEt)pbzA, 1,85 г (2 ммоль) *d*[pbzA-anC(Ac)] и 2,18 г (10 ммоль) мезитиленсульфохлорида в 20 мл пиридина (4 ч при 20°). К реакционному раствору при -10° прилили 60 мл 15%-ного водного пиридина, затем 100 мл 2 н. NaOH в 40%-ном водном спирте и обработали, как в опыте 1. Хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом (HCO₃⁻; 3,5 × 50 см; уравновешена 0,05 М ТЕАВ в 5%-ном метаноле) в градиенте концентрации ТЕАВ (2,5 л 0,05 М — 2,5 л 0,25 М, затем 0,6 л 0,25 М — 1,2 л 0,5 М), собирая фракции по 20 мл/9 мин. Из фракций 365—530 (0,36—0,5 М) выделили 73 700 ОЕ₂₈₀ (69%) тринуклеотида (II), $\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$ 1,58; $\epsilon_{280}/\epsilon_{302}$ 1,58. Возврат *d*pbzA 20%, динуклеотида (I) 28%. Рехроматографию тринуклеотида (II) проводили на колонке (2,5 × 50 см) в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 15%-ном спирте (0,15—0,4 М, 6 л, фракции 15 мл/9 мин); тринуклеотид выделен из фракций 290—370.

3. *d[(MeOTr)anC-ibG]* (III). Раствор 5,5 г (8,8 ммоль) *d*[(MeOTr)anC] [9], 3 г (5,4 ммоль) *d*pibG(Ac) и 5,5 г (25,2 ммоль) мезитиленсульфохлорида в 30 мл пиридина выдержали 4 ч при 20°, затем при -10° последовательно обработали 7,5 мл триэтиламина в 20 мл пиридина и 30 мл воды, выдержали 15 ч при 0° и упарили. Остаток растворили в 200 мл 0,1 М ТЕАВ и проэкстрагировали эфиром (4 × 400 мл) и хлороформом (3 раза, всего 1 л). Хлороформный экстракт упарили, остаток растворили в 50 мл спирта и 50 мл пиридина, охладили до 0°, прилили 130 мл 2 н. NaOH и оставили на 20 мин при 0°. Раствор нейтрализовали дауэксом 50 (PyH⁺), смолу отфильтровали, промыли 1 л 70%-ного пиридина и фильтрат упарили. Остаток растворили в 40 мл смеси хлороформ — пиридин (9 : 1) и нанесли на колонку с силикагелем для распределительной хроматографии («Woelm») (3,6 × 20 см), промытым такой же смесью растворителей. Хроматографировали в ступенчатом (по 0,5 л) градиенте концентрации метанола (3, 5, 10, 10, 15, 20, 30, 30%) в смеси хлороформ — пиридин при содержании пиридина в суммарной смеси 10%, анализируя фракции с помощью ТСХ на силикагеле. Вещество из фракций, содержащих 10, 15 и 20% метанола, рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻; 2,8 × 60 см; уравновешена 0,02 М ТЕАВ в 5%-ном метаноле) в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 5%-ном метаноле (0,03 — 0,25 М, 4 л), а затем в 50%-ном спирте (0,02—0,25 М, 8 л), собирая фракции по 16 мл/10 мин. Из фракций 270—470 выделили 83 800 ОЕ₂₆₀ (52%) динуклеозидфосфата (III), $\epsilon_{260}/\epsilon_{250}$ 1,08; $\epsilon_{280}/\epsilon_{270}$ 1,06; $\epsilon_{280}/\epsilon_{300}$ 1,11.

4. *d[(MeOTr)anC-ibG-bzA-bzA-anC]* (IV) получен взаимодействием 2,8 г (2,7 ммоль) *d*[(MeOTr)anC-ibG], 1,1 г (0,75 ммоль) *d*[pbzA-bzA-anC(Ac)] и 0,8 г (4 ммоль) MS в 10 мл пиридина в условиях опыта 2. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻; 2,5 × 70 см; уравновешена 0,03 М ТЕАВ в 5%-ном метаноле) в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 5%-ном метаноле (0,05—0,4 М, 5,5 л), а затем в 50%-ном спирте

(0,01—0,4 M, 4 л), собирая фракции по 20 мл/12 мин. Из фракций 481 — 620 (0,14—0,25 M) выделили 43 400 ОЕ₂₈₀ (68%) пентануклеотида (IV), $\epsilon_{280}/\epsilon_{240}$ 1,41; $\epsilon_{280}/\epsilon_{270}$ 1,17; $\epsilon_{280}/\epsilon_{300}$ 1,26. Возврат тринуклеотида (II) 28%, динуклеозидфосфата (III) 80%.

5. *d(pT-ibG-ibG) (VI)* получен взаимодействием 1,5 г (3,7 ммоль) d(CNEt)pT, 1,4 г (1,5 ммоль) d[pibG-ibG(Ac)] [10] и 1,7 г (7,85 ммоль) мезитиленсульфохлорида в 20 мл пиридина (5 ч при 20°). После обработки, как в опыте 2, хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом (HCO₃⁻; 2,3 × 65 см) в градиенте концентрации TEAB (0,05—0,25 M, 4 л, затем 2 л 0,25 M), собирая фракции по 20 мл/6,5 мин. Из фракций 210 — 300 (0,25 M) выделили 31 300 ОЕ₂₆₀ (49%) тринуклеотида (VI) (ср. [11]), $\epsilon_{260}/\epsilon_{240}$ 2,27; $\epsilon_{260}/\epsilon_{250}$ 1,23; $\epsilon_{260}/\epsilon_{280}$ 1,43. Возврат динуклеотида (V) 20%.

6. *d[(MeOTr)anC-ibG-bzA-anC-T-ibG-ibG] (VII)* получен взаимодействием 0,8 г (0,27 ммоль) пентануклеотида (IV), 1,07 г (0,86 ммоль) d[pT-ibG-ibG(Ac)] и 0,9 г (4,3 ммоль) мезитиленсульфохлорида в 15 мл пиридина (5 ч при 20°) с последующей обработкой в условиях опыта 2. Результаты хроматографии приведены на рис. 1. Выход октануклеотида (VI) 36%, $\epsilon_{280}/\epsilon_{250}$ 1,30; $\epsilon_{280}/\epsilon_{270}$ 1,09; $\epsilon_{280}/\epsilon_{300}$ 1,50. Суммарный возврат пентануклеотида (IV) и тринуклеотида (VI) 66%.

7. *d(pibG-ibG-bzA-anC) (VIII)* получен взаимодействием 0,83 г (0,9 ммоль) d[(CNEt)pibG-ibG], 0,89 г (0,9 ммоль) d[pbzA-anC(Ac)] и 1,35 г (4,5 ммоль) триизопропилбензолсульфохлорида в 10 мл пиридина (12 ч при 20°). После обработки, как в опыте 2, смесь хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом (HCO₃⁻; 2,3 × 45 см) в линейном градиенте концентрации TEAB в воде (0,1—0,5 M, 4 л), собирая фракции по 20 мл/5 мин. Из фракций 130—180 (0,36—0,45 M) выделили 17 800 ОЕ₂₈₀ (33%) тетрапентануклеотида (VIII), $\epsilon_{280}/\epsilon_{250}$ 1,19; $\epsilon_{280}/\epsilon_{270}$ 1,06; $\epsilon_{280}/\epsilon_{300}$ 1,49. Возврат динуклеотида (V) 22%, динуклеотида (I) 39%. Часть тетрапентануклеотида (VIII) (13 000 ОЕ₂₈₀) рехроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом (HCO₃⁻; 2,3 × 20 см) в линейном градиенте концентрации TEAB (0,15—0,5 M, 2,4 л), собирая фракции по 20 мл/5 мин. Из фракций 66—81 (0,34—0,38 M) выделили 7500 ОЕ₂₈₀.

8. *d[(MeOTr)anC-ibG-bzA-bzA-anC-T-ibG-ibG-ibG-ibG-bzA-anC] (IX)* получен взаимодействием 950 ОЕ₂₈₀ (8,3 мкмоль) октануклеотида (VII), 3500 ОЕ₂₈₀ (60 мкмоль) 3'-ацетата тетрапентануклеотида (VIII) и 0,16 г (0,72 ммоль) мезитиленсульфохлорида в 5 мл пиридина (4,5 ч при 20°). После обработки, как в опыте 2, смесь хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (см. рис. 2). Выход додекануклеотида (IX) 36%, $\epsilon_{260}/\epsilon_{240}$ 1,30; $\epsilon_{260}/\epsilon_{250}$ 1,10; $\epsilon_{260}/\epsilon_{280}$ 1,05. Возврат октануклеотида 48%, тетрапентануклеотида (VIII) 60%.

9. *d(C-G-A-A-C-T-G-G-G-A-C) (X)*. 80 ОЕ₂₆₀ додекануклеотида (IX) в 10 мл 25% NH₃ нагревали 15 ч при 50°, упарили, к остатку прилили 10 мл смеси AcOH — пиридин — вода (14 : 1 : 3), выдержали 48 ч при 20° и вновь упарили. Остаток растворили в 10 мл воды и проэкстрагировали этилацетатом (3 × 10 мл). Вещество из водного слоя хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (рис. 3). Выделили 20 ОЕ₂₆₀ додекануклеотида (X), $\epsilon_{260}/\epsilon_{240}$ 1,43; $\epsilon_{260}/\epsilon_{250}$ 1,04; $\epsilon_{260}/\epsilon_{280}$ 1,72.

10. *d(³²P-C-G-A-A-C-T-G-G-G-A-C) (³²P-X)* и его фосфодиэстеразный гидролиз. 5'-Меченый додекануклеотид (³²P-X) получен из 0,75 ммоль немеченого додекануклеотида (X) и 1 ммоль [γ -³²P]АТФ (10 Ки/ммоль) в описанных ранее условиях [1]. Для проведения полного гидролиза ³²P-додекануклеотид (³²P-X) (10⁴ имп/мин) в 5 мкл буфера, содержащего 0,01 M трис-HCl (pH 8,9) и 0,005 M MgCl₂, и 0,5 мкг фосфодиэстеразы змеиного яда («Worthington») в 5 мкл того же буфера инкубировали 2 ч при 37°, после чего гидролизат нанесли на бумагу Ватман № 1 и подвергли электрофорезу в пиридин-ацетатном буфере, pH 3,5 (5000 В, 1 ч). Для проведения частичного гидролиза к каждой из трех порций раствора додекануклеотида (³²P-X) (1 мкл, 7,5 · 10⁴ имп/мин) в указанном выше буфере,

pH 8,9, прибавили 1 мкл раствора фосфодиэстеразы (концентрация соответственно 50, 100 и 200 мкг/мл), смеси инкубировали 30 мин при 20°, все три порции смешали и подвергли электрофорезу на ацетилцеллюлозе, а затем гомохроматографии (гомосмесь VI [12]) в ранее описанных условиях [1]. Результаты опыта представлены на рис. 5.

11. Комплекс додекануклеотида (^{32}p -X) с сегментом 36—77 тРНК₁^{Val}.

а) Раствор 30 пмоль сегмента 36—77 дрожжевой тРНК₁^{Val} и 60 пмоль ($4,5 \cdot 10^5$ имп/мин) нуклеотида (^{32}p -X) в 10 мкл буфера, содержащего 0,01 М Mg(OAc)₂, 0,001 М этилендиаминтетрауксусную кислоту и 0,04 М трис-АсОН, pH 7,4, нагревали 10 мин при 80°, затем постепенно охладили до 4° и выдержали при этой температуре 14 ч. Далее прибавили 5 мкл 0,1%-ного раствора бромфенолового синего в 20%-ной сахарозе в буфере с pH 7,4 (см. выше) и полученную смесь нанесли на блок 15%-ного полиакриламидного геля (20 × 20 см), заподимеризованного в том же буфере. Электрофорез вели при 200 В (20 мА) в течение 14 ч при 4°, после чего проводили автордиографию на рентгеновской пленке РТ-1 в течение 8 ч (рис. 6).

б) Смесь 90 пмоль сегмента 36—77 тРНК₁^{Val} и 90 пмоль додекануклеотида (^{32}p -X) ($2 \cdot 10^5$ имп/мин) в 25 мкл буфера, содержащего 0,01 М MgCl₂, 0,001 М этилендиаминтетрауксусную кислоту и 0,05 М трис-АсОН, pH 7,5, нагревали 3 мин при 100°, медленно охладили до 2° и через 14 ч нанесли на колонку с сефадексом G-50 (сверхтонкий, 0,8 × 450 мм), уравновешенную тем же буфером. Хроматографировали при 2°, собирая фракции по 30 мкл/12 мин (рис. 7, а). Фракции, содержащие комплекс, объединили, вдвое разбавили водой и нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (Cl⁻; 0,8 × 80 мм). Колонку промыли 150 мкл 0,01 М трис-НСl, pH 7,5, в 7 М мочевины, после чего хроматографировали при 25° в ступенчатом градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины (0,0—0,5 М, 600 мкл), собирая фракции по 30 мкл/6 мин (рис. 7, б).

Авторы выражают благодарность М. Ф. Шемякину и А. В. Честухину (Москва) за препарат Т4-полинуклеотидкиназы и А. Д. Мирзабекову (Москва) за образец 3'-половины дрожжевой тРНК₁^{Val}.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г. (1976) Биоорганическая химия, 2, 166—178.
2. Berlin Yu. A., Chakhmakheva O. G., Efimov V. A., Shingarova L. N. (1975) Nucleic Acids Research, Special Publication No 1, s105—s108.
3. Agarwal K. L., Yamazaki A., Cashion P. J., Khorana H. G. (1972) Angew. Chemie, 84, 489—498.
4. Берлин Ю. А., Вульфсон А. И., Колосов М. Н. (1975) Биоорганическая химия, 1, 851 — 852.
5. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) Биохимия, 39, 747—751.
6. Sanger F. (1973) in Virus Research (Fox C. F., Robinson W. S., eds.), pp. 573—599, Acad. Press, New York — London.
7. Weimann G., Khorana H. G. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 419—430.
8. Kumar A., Khorana H. G. (1969) J. Amer. Chem. Soc., 91, 2743—2749.
9. Kumar A., Otsuka E., Khorana H. G. (1972) J. Mol. Biol., 72, 289—307.
10. Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Полякова И. А. (1973) Химия природн. соедин., 402—410.
11. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Чахмакчева О. Г., Шингарова Л. Н. (1975) Биоорганическая химия, 1, 1121—1129.
12. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) Nucleic Acids Research, 1, 331—353.

Поступила в редакцию
22.XII.1975

SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES. XII. THE SYNTHESIS
OF THE DODECADEOXYRIBONUCLEOTIDE COMPLEMENTARY
TO THE 47-58 SEGMENT OF YEAST tRNA₁^{Val}

BERLIN Yu. A., BOCHAROVA T. N., WULFSON A. N.,
KOLOSOV M. N., KOROBKO V. G.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The chemical synthesis of the dodecadeoxyribonucleotide d(C-G-A-A-C-T-G-G-G-G-A-C) (X) complementary to the 47-58 segment of yeast tRNA₁^{Val} has been carried out according to the 5 + 3 + 4 scheme. The 5'-terminal pentanucleotide was synthesized by the reverse traditional pathway, i. e. in the 5' ← 3' direction. Spectral and chromatographic properties and complete exonuclease digestion were used for identification of the compounds obtained. The primary structure of the final dodecanucleotide has been proved by fingerprinting of the products of partial exonuclease digestion of dodecanucleotide (³²p-X) prepared from (X) by 5'-³²P-phosphorylation with [γ -³²P]ATP and T4-poly-nucleotide kinase. Complex formation of (³²p-X) with the 3'-half of tRNA₁^{Val} was demonstrated by gel chromatography and disc electrophoresis. It was shown that the flow rate in ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose and DEAE-Sephadex could be considerably increased (up to 200-500 ml·cm⁻²·h⁻¹) without noticeable loss in resolution.
