

Рис. 1. Выделение додекануклеотида (VIII) (опыт 7). Хроматография на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $2 \times 30$  см) в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 40%-ном спирте, фракции по 8 мл/8 мин. Пик I содержит 1570  $\text{OE}_{280}$  тетрапуклеотида (VII), пик II (1000  $\text{OE}_{280}$ ) содержит додекануклеотид (VIII)

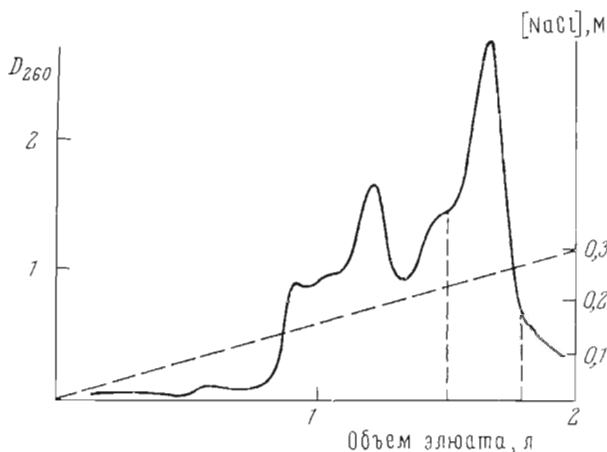


Рис. 2. Рехроматография додекануклеотида (VIII) на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой ( $\text{Cl}^-$ ,  $2 \times 40$  см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины, 0,02 М трис-HCl, pH 7,5, фракции по 6,5 мл/8 мин. Отмеченная пунктиром часть основного пика содержит 365  $\text{OE}_{260}$  додекануклеотида (VIII) (опыт 7)

с выходом 35%), причем в избытке использовали нуклеозид как более доступный из компонентов. Реакционную смесь разделяли методом избирательной экстракции тритилсодержащих нуклеотидов органическими растворителями из разбавленных растворов в ТЕАВ [3]; в данном случае метод оказался особенно эффективным из-за резкого увеличения гидрофильности при удлинении цепи на два мононуклеотидных звена. В результате трипуклеозиддифосфат (II) был выделен с выходом 47%. В остальных синтезах разделение проводили, как правило, с использованием ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе.

Синтез трипуклеотида d(pT-T-bzA) (III) был осуществлен последовательным присоединением к тимидиловой кислоте сначала dpT, а затем

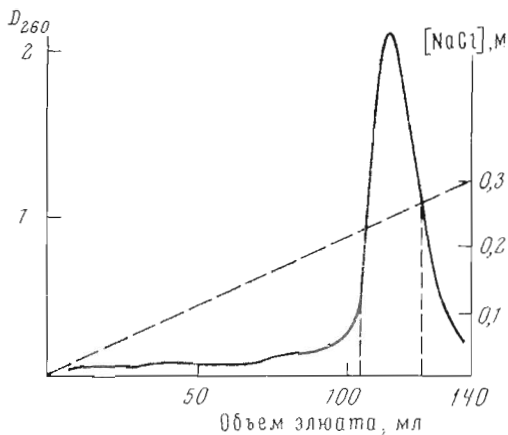


Рис. 3. Выделение додекануклеотида (IX). Хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{Cl}^-$ ,  $0,6 \times 10$  см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine, 0,02 М трис-HCl, pH 7,5, скорость элюции 30 мл/ч. Центральная часть пика, отмеченная пунктиром, содержит 27 ОЕ<sub>260</sub> додекануклеотида (IX)

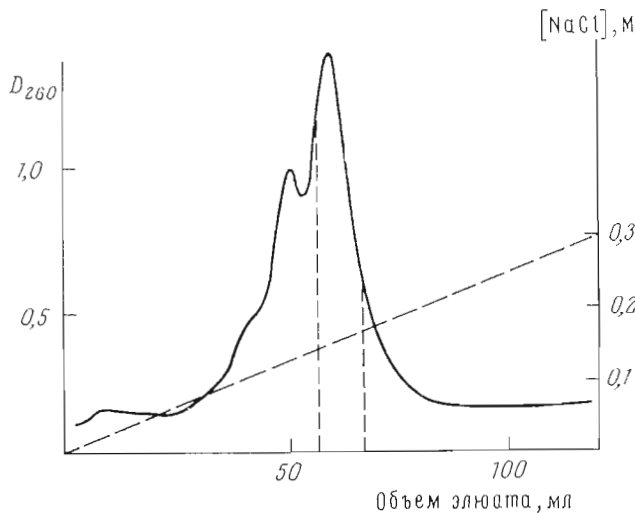


Рис. 4. Реchromатография додекануклеотида (IX) на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{Cl}^-$ ,  $0,6 \times 10$  см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine, pH 3,5, скорость элюции 34 мл/ч. Часть пика, отмеченная пунктиром, содержит 12 ОЕ<sub>260</sub> додекануклеотида (IX)

dprbA с использованием  $\beta$ -цианэтильного остатка в качестве Р-защитной группы; выход на стадии заключительной конденсации составил 60%. Взаимодействием динуклеотидов d(prbA-anC) (в виде 5'-цианэтильного производного) и d(pibG-anC) (в виде 3'-ацетата) получили 3'-концевой тетра-нуклеотид (VII) с выходом 20%.

Последующие этапы синтеза состояли в наращивании 5'-концевого тринуклеозиддифосфата (II) тремя блоками: три- (III), ди- (V) и тетра-нуклеотидом (VII), причем первую из этих реакций проводили с эквимолекулярными количествами Р- и ОН-компонента (поскольку они имеют одинаковую длину), а на последующих стадиях для повышения выхода использовали 8—10-кратный избыток более короткого Р-компонента. Выход гекса- (IV), окта- (VI) и додекануклеотида (VIII) составил соответствен-

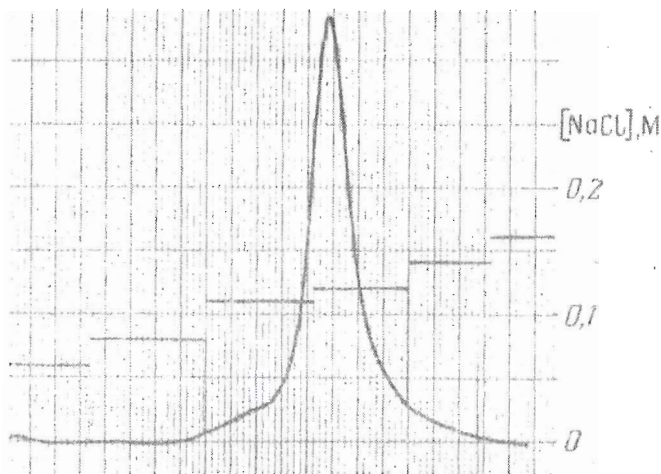


Рис. 5. Микроколоночная хроматография додекануклеотида (IX) на DEAE-целлюлозе (СГ<sup>-</sup>, 0,8 × 80 мм) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine, pH 3,5 (0—0,2 М, объем градиента 600 мкл), скорость элюции 300 мкл/ч. Запись на МСФП-1 при 260 нм, чувствительность 1 ОЕ/шкала

но 34, 40 и 29%. В первой из трех реакций в качестве конденсирующего реагента использовали мезитилсульфонилмидазолид, непрореагировавший ОН-компонент (II) извлекали органическими растворителями, а продукт конденсации (IV) выделяли хроматографией на тритилированной целлюлозе, используя повышенное сродство этого адсорбента к три-

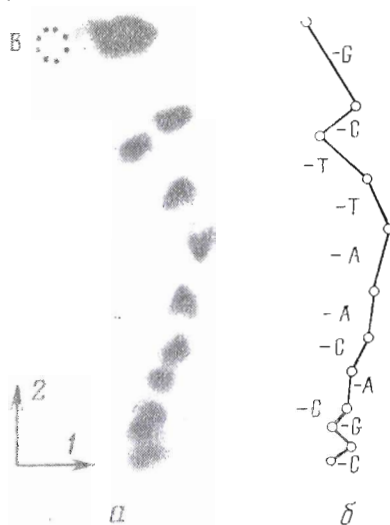


Рис. 6. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза додекануклеотида  $d(^{32}P\text{T-G-C-T-T-A-A-C-A-C-G-C})$  фосфодиэстеразой змеиного яда (опыт 8). Первое направление — электрофорез на ацетилцеллюлозе при pH 3,5; второе — гомохроматография на DEAE-целлюлозе (B — исплещивания FF); а — радиоавтограмма, б — схема

тилсодержащим олигонуклеотидам [4]. Октануклеотид (VI) был выделен и очищен двукратной анионообменной хроматографией в ТЕАВ. Аналогичным образом был выделен додекануклеотид (VIII) (рис. 1, 2). Далее это вещество подвергли аммонолизу и гидролизу уксусной кислотой, удалив таким образом все защитные группы, и хроматографировали на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine при pH 7,5 (рис. 3). После этого проводили рехроматографию в аналогичных условиях, но при pH 3,5 (рис. 4), в результате чего был получен незащищенный додекануклеотид (IX).

Промежуточные олигонуклеотиды характеризовали с помощью хроматографии на бумаге и микроколоночной анионообменной хроматографии (до и после удаления защитных групп), УФ-спектрами и нуклеотидным составом, определенным как описано ранее [6] (см. таблицу). Гомогенность конечного додекануклеотида (IX) была доказана микроколоночной анионообменной хроматографией в кислой среде (рис. 5) и электрофорезом в полиакриламидном геле (после введения концевой метки фосфорилированием с помощью [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] АТФ и Т4-полинуклеотидкиназы), а нуклеотидная последовательность — двухмерным разделением продуктов частичного 3'-фосфодиэстеразного гидролиза с последующим анализом нуклеотидной карты [5] (рис. 6).

### Экспериментальная часть

Общие сведения об эксперименте см. [1]. В работе использовали мононуклеотиды производства опытного химического цеха НИОХ СО АН СССР и СКТБ БАВ Главмикробиопрома (Новосибирск), [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТФ фирмы «Amersham» (Англия), ацетилцеллюлозу фирмы «Schleicher und Schüll» (ФРГ), DEAE-целлюлозу DE-23 (для колоночной хроматографии) и DE-41 (для гомохроматографии) фирмы «Whatman» (Англия), целлюлозу MN-300 фирмы «Serva» (ФРГ), фосфодиэстеразу змеиного яда (КФ 3.4.1) фирмы «Worthington» (США); Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) была любезно предоставлена М. Ф. Шемякиным и А. В. Честухиным (Москва). Хроматографию на бумаге проводили в системах EtOH — 1 М AcONH<sub>4</sub>, 7 : 3 (рН 7,5) (А) и *n*-PrOH — конц. NH<sub>3</sub> — H<sub>2</sub>O, 11 : 2 : 7 (Б).

Свойства синтезированных олигонуклеотидов приведены в таблице.

1. *d(pibG-anC)* (I). Смесь пиридиновых солей *d*(CNEt)pibG (5,2 г, 8,2 ммоль) и *d*ranC (Ac) (8,7 г, 15,5 ммоль) высушили упариванием с пиридином (4 × 40 мл), растворили в 60 мл пиридина, прибавили 15 г (8,2 ммоль) TPS и оставили на 5 ч при 20°. При охлаждении до -20° прилили 60 мл воды и оставили на 16 ч при 20°, затем при 0° смешали с равным объемом 2 н. NaOH, выдержали 15 мин при той же температуре и нейтрализовали дауэксом 50 (PyH<sup>+</sup>) до рН 8. Смолу отфильтровали, промыли 2 М водным пиридином и объединенный фильтрат напесли на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 4,5 × 100 см), предварительно уравновешенную 0,05 М TEAB. Хроматографировали в линейном градиенте TEAB в 10%-ном спирте (7,5 л 0,05 М — 7,5 л 0,35 М), собирая фракции по 27 мл/9 мин. Из фракций 340—440 после упаривания с пиридином и осаждения из пиридинового раствора эфиром выделили 81 000 ОЕ<sub>280</sub> (35%) динуклеотида (I). Возврат *d*pibG 37%, *d*ranC 44%.

2. *d[(MeOTr)T-ibG-anC]* (II). К раствору 3,0 г (5,8 ммоль) *d*(MeOTr)T [7] и 1,87 г (1,8 ммоль) *d*[pibG-anC(Ac)] в 25 мл пиридина прибавили 1,9 г (6 ммоль) TPS и выдержали 5 ч при 20°. Затем при охлаждении до -20° прибавили 16 мл 1 М раствора *n*-трибутиламина в пиридине. Спустя 16 ч при 20° раствор упарили досуха, остаток растворили в 200 мл 0,1 М TEAB и проэкстрагировали последовательно эфиром (3 × 300 мл), этилацетатом (1 × 250 мл), смесью этилацетат — *n*-бутанол, 9 : 1 (3 × 250 мл) и смесью *n*-бутанол — хлористый метилен, 3 : 7 (3 × 200 мл). Фракции, содержащие бутанол, были объединены и упарены с пиридином. К остатку, растворенному в 60 мл смеси пиридин — этанол (1 : 1), при охлаждении до 0° прибавили 60 мл 2 н. NaOH, через 10 мин избыток щелочи нейтрализовали 150 мл дауэкса 50 (PyH<sup>+</sup>), смолу отфильтровали и промыли 300 мл 50%-ного пиридина. Объединенные фильтраты упарили досуха и остаток осадили 1 л эфира из 30 мл пиридина. Выход тринуклеозиддифосфата (II) 1,25 г 47%; возврат *d*(MeOTr)T 66%.

3. *d(pT-T-bzA)* (III) получен взаимодействием 1,6 г (2,9 ммоль) *d*pzbA (Ac) и 0,72 г (0,75 ммоль) *d*[(CNEt)pT-T] [8] в присутствии 1,46 г (4,8 ммоль) TPS в течение 5 ч в условиях опыта 1. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 2,5 × 40 см) в градиенте концен-

Олигонуклеотиды	R <sub>дрТ</sub> в системе		УФ-спектр (в воде)					Нуклеотидный состав				
	А	Б	λ <sub>макс</sub> , нм	ε <sub>240</sub> /ε <sub>260</sub>	ε <sub>270</sub> /ε <sub>280</sub>	ε <sub>280</sub> /ε <sub>260</sub>	ε <sub>240</sub> /ε <sub>280</sub>	дрТ	дрС	дрГ	дрА	
Защищенные												
d (pIbG-anC) (I)	1,4		260, 290	0,83	0,91	0,95	1,01					
d [(MeOTr) T-ibG-anC] (II)	1,8		262, 270**	0,86	0,96	0,96	0,87					
d (pT-T-bzA) (III)	0,6		272	0,71	1,41	1,08	0,91					
d (pbzA-anC-ibG-anC) (VII)	0,87		283, 260**	0,86	1,04	1,21	1,18					
d [(MeOTr) T-ibG-anC-T-T-bzA] (IV)	1,05		269	0,84	1,03	0,97	0,74					
d [(MeOTr) T-ibG-anC-T-T-bzA-bzA-anC] (VI)	0,31		278	0,88	1,06	1,12	1,03					
d [(MeOTr) T-ibG-anC-T-T-bzA-bzA-anC bzA-anC-ibG-anC] (VIII)			280	0,85	1,05	1,12	1,01					
Незащищенные *												
d (pC-C)		0,63	255, 268**	1,0	0,96	0,73	0,20		1,0	1,1		
d (T-G-C)		0,94	259	0,93	0,95	0,66	0,24		1,0	0,95		
d (pT-T-A)		0,82	263	0,75	0,85	0,42	0,13	1,95				
d (pA-C-G-C)		0,30	260	0,90	0,88	0,58	0,24		1,1	2,0	1,0	
d (T-G-C-T-T-A)		0,27	262	0,84	0,93	0,61	0,20		1,0	1,2	0,97	
d (T-G-C-T-T-A-A-C)		0,17	261	0,80	0,90	0,58	0,22		1,0	1,2	0,93	
d (T-G-C-T-T-A-A-C-A-C-G-C) (IX)			261	0,84	0,91	0,59	0,23		1,15	2,0	1,85	

\* Выделены хроматографией на бумаге в системе Б после удаления защитных групп, как описано в опыте 7.

\*\* Палео.

трации ТЕАВ в 10%-ном спирте (0,8 л 0,05 М — 0,8 л 0,25 М; 0,8 л 0,25 М — 0,8 л 0,35 М); собирая фракции по 14 мл/12 мин. Из фракций 180 — 205 выделили 15 000 ОЕ<sub>280</sub> (60%) тринуклеотида (III). Возврат dpbzA 65%.

4. *d(pbzA-anC-ibG-anC)* (VII) получен взаимодействием 410 мг (0,39 ммоль) *d[(CNEt)pbzA-anC]* [9] и 1,0 г (0,96 ммоль) *d[pibG-anC(Ac)]* в присутствии 0,92 г (3 ммоль) TPS в течение 5 ч в условиях опыта 1. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $3 \times 40$  см) в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 10%-ном спирте (2,5 л 0,05 М — 2,5 л 0,4 М), собирая фракции по 15 мл/10 мин. Из фракций 320—350 выделили 5000 ОЕ<sub>280</sub> (20%) тетрауклеотида (VII). Возврат *d(pbzA-anC)* (фракции 250—295) 31%, *d(pibG-anC)* (фракции 165—195) 41%.

5. *d[(MeOTr)T-ibG-anC-T-T-bzA]* (IV) получен из 1,26 г (0,85 ммоль) *d[(MeOTr)T-ibG-anC]* и 1,12 г (0,85 ммоль) *d[pT-T-bzA(Ac)]* в присутствии 0,64 г (2,55 ммоль) мезитиленсульфоилимидазолида в течение 5 сут при 20°. При охлаждении до -20° прибавили 5 мл 1 М раствора *n*-бутиламина в пиридине и 2 мл воды и смесь выдержали 16 ч при 4°. Раствор упарили досуха, остаток растворили в 0,1 М ТЕАВ (100 мл) и проэкстрагировали последовательно эфиром (1 × 300 мл), этилацетатом (1 × 300 мл), смесью *n*-бутанол — этилацетат, 1 : 9 (1 × 300 мл), смесью *n*-бутанол — хлористый метилен, 3 : 7 (3 × 250 мл). Водный слой упарили досуха, остаток растворили в 50 мл 50%-ного водного пиридина, при охлаждении до 0° прибавили 50 мл 2 н. NaOH, через 10 мин избыток щелочи нейтрализовали дауэксом 50 ( $\text{PyH}^+$ ), смолу отфильтровали, промыли 250 мл 50%-ного пиридина. Объединенные фильтраты упарили досуха, растворили в 100 мл 0,1 М ТЕАВ в 10%-ном спирте и пропустили через колонку с тритильированной целлюлозой (5 × 6 см; получена по методу [4]). Колонку промыли 500 мл 0,1 М ТЕАВ в 10%-ном спирте для удаления олигонуклеотидов, не содержащих тритильной группы, затем гексануклеотид (IV) элюировали 500 мл 0,5 М ТЕАВ в 75%-ном спирте. Выход гексануклеотида (IV) 17 000 ОЕ<sub>280</sub> (36%); возврат тринуклеотида (III) 50%, тринуклеозиддифосфата (II) (из бутанольных экстрактов, см. выше) 50%.

6. *d[(MeOTr)T-ibG-anC-T-T-bzA-bzA-anC]* (VI) получен из 380 мг (0,1 ммоль) гексануклеотида (IV) и 800 мг (0,8 ммоль) *d[pbzA-anC(Ac)]* в присутствии 750 мг (2,4 ммоль) TPS в условиях опыта 1. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $4,5 \times 16$  см) в градиенте концентрации ТЕАВ и спирта (2 л 0,05 М в 5%-ном спирте — 2 л 0,5 М в 50%-ном спирте), собирая фракции по 15 мл/8 мин. Вещество из фракций 220—240 было рехроматографировано на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $2 \times 16$  см) в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 50%-ном спирте (0,4 л 0,1 М — 0,4 л 0,5 М; фракции по 3,5 мл/7 мин.). Из фракций 85—125 выделили 3800 ОЕ<sub>280</sub> октануклеотида (VI) (40%); возврат динуклеотида (V) 39%.

7. *d(T-G-C-T-T-A-A-C-A-C-G-C)* (IX). Додекануклеотид (VIII) получен из 800 ОЕ<sub>280</sub> (7,7 мкмоль) октануклеотида (VI) и 150 мг (75 мкмоль) *d[pbzA-anC-ibG-anC(Ac)]* в присутствии 135 мг (0,45 ммоль) TPS в течение 4,5 ч в условиях опыта 1. Условия хроматографии приведены на рис. 1; вещество из фракций 115—180 рехроматографировали (см. рис. 2). Выход додекануклеотида (VIII) 365 ОЕ<sub>280</sub> (29%); возврат тетрауклеотида (VII) 70%.

37 ОЕ<sub>280</sub> додекануклеотида (VIII) обработали 2 мл 25%-ного водного  $\text{NH}_3$  (72 ч при 20°) и упарили, остаток растворили в 1 мл смеси  $\text{AcOH}$  — пиридин —  $\text{H}_2\text{O}$  (14 : 1 : 3), выдержали 24 ч при 20°, несколько раз упарили с водой (до полного удаления уксусной кислоты) и остаток дважды хроматографировали в 7 М мочевины — при pH 7,5 и 3,5 (рис. 3 и 4)\*.

\* Во всех остальных случаях олигонуклеотиды после удаления защитных групп выделяли хроматографией в системе В.

Выход додекануклеотида (IX) 12 ОЕ<sub>260</sub> (70%). Гомогенность полученного вещества подтверждена микроколоночной хроматографией (рис. 5).

8 Анализ додекануклеотида (IX). а. 5' - Ф о с ф о р и л и р о в а - н и е. 0,08 ОЕ<sub>260</sub> (0,7 нмоль) додекануклеотида (IX) инкубировали 30 мин при 37° в 40 мкл раствора, содержащего 2 нмоль [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ (удельная радиоактивность 6 Ки/ммоль), 10 мкл Т4-полинуклеотидкиназы (фракция (VI) [10]), 0,05 М трис-НСl (рН 7,5), 0,01 М MgCl<sub>2</sub> и 0,005 М меркаптоэтанол. Реакционную смесь хроматографировали на колонке с сефадексом G-50 в 0,1 М ТЕАВ, фракцию додекануклеотида ( $4,3 \times 10^6$  нм/мин) упарили досуха и остаток растворили в 60 мкл воды.

6. Ч а с т и ч н ы й г и д р о л и з. Три порции <sup>32</sup>P-додекануклеотида (IX) по 20 000 нмп/мин упарили досуха, к каждому из остатков прибавили 1 мкл 0,01 М раствора MgCl<sub>2</sub> в 0,05 М трис-НСl, рН 8,9, и 1 мкл раствора фосфодиэстеразы змеиного яда (концентрации 50, 100 или 200 мкг/мл) в том же буфере, после чего инкубировали 30 мин при 20°. Все три гидролизата смешали и нанесли на полоску ацетилцеллюлозы (3 × 55 см), смоченную пиридин-ацетатным буфером в 7 М мочевины, рН 3,5. Электрофорез проводили в том же буфере, не содержащем мочевины, при 5000 В в течение 1 ч, используя в качестве стандарта смесь красителей (1%-ные растворы ксиленилгола FF, оранжевого G и кислого фуксиня). Смесь продуктов гидролиза перенесли на пластинку (20 × 20 см, толщина слоя 0,25 мм) со смесью целлюлозы MN-300 и DEAE-целлюлозы DE-41 (7,5 : 1) и проводили гомохроматографию в 2%-ной гомосмеси [11] при 55°. Радиоавтограмма нуклеотидной карты (пленка РТ-1, экспозиция 72 ч) приведена на рис. 6.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Ю. А., Бочарова Т. Н., Вульфсон А. Н., Колосов М. Н., Коробко В. Г. (1976) Биоорг. химия, 2, 762—771.
2. Berlin Yu. A., Shakhmakhcheva O. G., Elimov B. A., Kolosov M. N., Korobko V. G. (1973) Tetrahedron Lett., 1353—1354.
3. Agarwal K. L., Berlin Yu. A., Kleid D. G., Smirnov V. D., Khorana H. G. (1975) J. Biol. Chem., 250, 5563—5573.
4. Cashion P. J., Fridkin M., Agarwal K. L., Jay E., Khorana H. G. (1973) Biochemistry, 12, 1985—1990.
5. Sanger F. (1973) in Virus Research (Fox C. F., Robinson W. S., eds.), pp. 573—598, Acad. Press, N. Y.—London.
6. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) Биохимия, 39, 747—751.
7. Schaller H., Weinmann G., Lerch B., Khorana H. G. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 3821—3827.
8. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г. (1976) Биоорг. химия, 2, 166—178.
9. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Шингарова Л. Н. (1975) Биоорг. химия, 1, 1738—1746.
10. Richardson C. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54, 158—165.
11. Jay E., Vambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) Nucleic Acid Research, 1, 331—353.

Поступила в редакцию  
22.XII.1975

#### SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES.

#### XIII. THE SYNTHESIS OF THE DODECADEOXYRIBONUCLEOTIDE HOMOLOGOUS TO THE 30-41 SEGMENT OF THE YEAST tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub>

BERLIN Yu. A., KOLOSOV M. N., KOROBKO V. G.,  
SHAKHMAKHCHEVA O. G., SHINGAROVA L. N.

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

The dodecadeoxyribonucleotide d(T-G-C-T-T-A-A-C-A-C-G-C) homologous to the 30-41 segment of the yeast valine tRNA<sub>1</sub> has been chemically synthesized. The oligonucleotide chain was elongated in the 5' → 3' direction by blocks according to the 1 + 2 + 3 + 2 + 4 scheme. Phosphodiester method was used with triisopropylbenzenesulphonyl chloride and mesitylenesulphonyl imidazolide as condensing reagents. The dodecanucleotide was purified by anion-exchange chromatography in 7 M urea at pH 7,5 and 3,5, and its sequence was corroborated by fingerprint technique.