



УДК 547.963.32.057:542.95

КОБАЛЬТ-КОРРИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ КАК РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

© 1995 г. В. М. Белков, Н. Ф. Крынецкая*, Е. М. Волков*, З. А. Шабарова*,
Н. Ю. Крайнова, Г. Н. Новодарова[#], М. Е. Вольпин

Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН,
117813, Москва, ул. Вавилова, 28;

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет
Поступила в редакцию 21.12.94 г.

Предложены способы получения каталитически активных корриновых комплексов кобальта с монофункциональными *e*-карбокси- и *e*-аминогруппами в макролиганде. Исследованы два метода ковалентного присоединения таких Со-корриновых комплексов к концевым 3'- и 5'-фосфатным группам олигодезоксирибонуклеотида: введение комплекса в олигонуклеотид после олигонуклеотидного синтеза в водном растворе и в процессе автоматического олигонуклеотидного синтеза на твердой фазе. Показано, что более эффективен метод введения Со-корринового комплекса в процессе твердофазного синтеза. Найдено, что в присутствии аскорбиновой кислоты полученный олигонуклеотидный зонд обладает нуклеазным действием, причем локализация мест разрыва определяется "адресующим" олигонуклеотидом.

Ключевые слова: корриновый комплекс кобальта; "химическая" нуклеаза, адресующие олигонуклеотиды.

В настоящее время большое внимание уделяется дизайну олигонуклеотидных зондов, несущих химически активную группировку, способную либо модифицировать комплементарную цепь НК [1], либо обеспечивать расщепление фосфодиэфирной связи в ней [2]. Локализация мест разрыва полинуклеотидной цепи в нужном участке обусловлена образованием комплекса НК с олигонуклеотидом, комплементарным этому участку. Такие олигонуклеотиды принято называть зондами. Ранее было показано, что корриновые комплексы кобальта способны неспецифически расщеплять как ДНК [3], так и РНК [4]. Особенностью данного химического реагента является способность катализировать образование гидроксилрадикалов в процессе реакции сопряженного окисления какого-либо восстановителя, например аскорбиновой кислоты. Однако при использовании самого Со-корринового комплекса происходит статистический гидролиз НК. Для обеспечения селективности действия, т.е. гидролиза в

одном, выбранном районе ДНК или РНК, перспективным представляется ковалентное присоединение Со-корринового комплекса к "адресующему" олигонуклеотиду без нарушения способности олигонуклеотида к комплексообразованию. Ранее было описано получение ковалентно связанного с олигонуклеотидом Си-фенантролинового комплекса [5].

В настоящей работе нами предложены способы получения каталитически активных корриновых комплексов кобальта с монофункциональными (*e*-карбокси- и *e*-амино-) группами в макролиганде и методы ковалентного присоединения этих комплексов к концевым фосфатным группам олигодезоксирибонуклеотида.

Корриновый комплекс кобальта, содержащий карбоксильную группу по *e*-положению корринового лиганда, получали путем химической модификации *e*-моноокислоты природного витамина В₁₂ (рис. 1) – *e*-COOH-Cbl(CN) (номенклатуру корриноидов см. [6]). Первая стадия превращения *e*-COOH-Cbl(CN) в дигидроксикобинамид – *e*-COOH-Cbl(OH)₂, содержащий одну функциональную карбоксигруппу (схема 1), заключалась в отщеплении Bza-фрагмента исходной *e*-моноокислоты (I) гидроокисью церия в щелочной среде, согласно работе [7]. Далее образующийся дицианкобинамид (II) восстанавливали

[#] Автор для переписки.

Сокращения: НК – нуклеиновая кислота; *e*-COOH-Cbl(CN), *e*-COOH-Cbl(CN)₂, *e*-COOH-Cbl(OH)₂ – *e*-моноокислоты природного витамина В₁₂, дицианкобинамида, дигидроксикобинамида соответственно; DCC – дициклогексилкарбодимид; НОВТ – N-гидроксибензотриазол; CDI – 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид; DMF – диметилформамид; Bza – бензимидазольный фрагмент.

боргидридом натрия в инертной атмосфере до Co(I)-комплекса (III). Последний окислением кислородом воздуха переводили в дигидроксиформу (IV). Частичный гидролиз амидных групп в корриновом кольце в ходе реакции приводил к сложной смеси производных витамина B₁₂, способов разделения которых в литературе описано не было.

Для очистки и идентификации полученных продуктов в настоящей работе был использован метод обращенно-фазовой ВЭЖХ. Продукты реакции (рис. 2б) по сравнению с исходной *e*-кислотой (рис. 2а) содержат новое вещество с временем выхода 10 мин 57 с (10'57"), отнесенное к *e*-COOH-Cbi(OH)₂ (IV). Выделенный в препаративном режиме ВЭЖХ дигидроксикобинамид был идентифицирован методом масс-спектрометрии в виде соответствующего OMe-производного. По-видимому, замена аксиального OH-лиганда на OMe-группу произошла при выделении COOH-Cbi(OH)₂ в процессе многократной элюции с метанолом. Масс-спектр исходной *e*-COOH-Cbi(CN) (рис. 3а) содержит молекулярный ион (m/z 1355.8), а также два характерных иона, обусловленных распадом рибозы и отщеплением нуклеозида совместно с возникшим формальдегидом (1326.1 и 971.0), что соответствует известным данным [8]. В спектре *e*-COOH-Cbi(OH)(OMe) (рис. 3б) присутствуют интенсивные пики ионов ($M + H$)⁺ и ($M - OMe$)⁺ (m/z 1037.6 и 1005.1). Остальные пики показывают возможный путь фрагментации корринового макролиганда (m/z 988.5, 944.0, 930.0), что позволяет установить структуру полученного соединения. Вместе с тем образования ионов $M^+ - (CH_2)_nCOOMe$ ($n = 0, 1, 2$), свойственных распаду эфиров, не обнаружено.

В настоящей работе нами применялись два метода ковалентного присоединения корриновых комплексов кобальта к конечным фосфатным группам олигодезоксирибонуклеотида: введение Co-корринового комплекса в олигонуклеотид в водном растворе после его синтеза [9] и в процес-

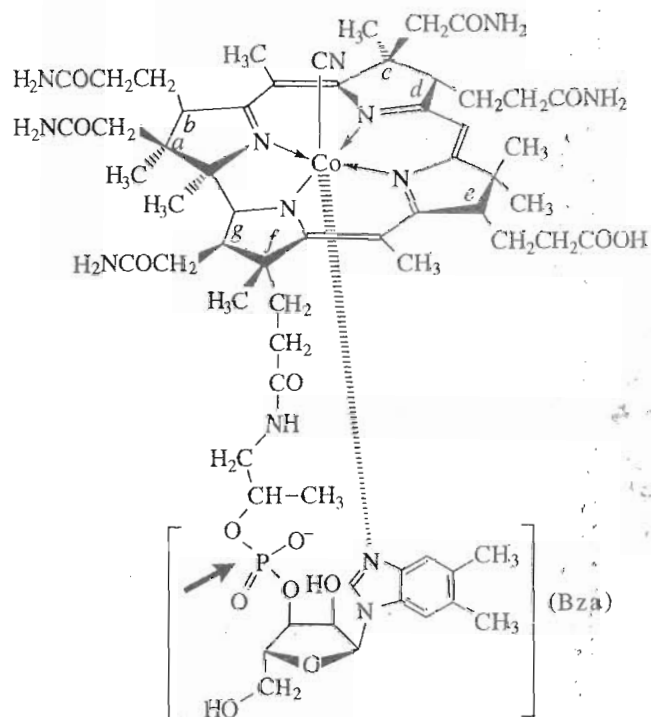


Рис. 1. Структурная формула *e*-моно кислоты витамина B₁₂ – *e*-COOH-Cbi(CN). Утолщенной стрелкой показано место отщепления бензимидазольного фрагмента (Bza) при обработке гидроокисью церия в щелочной среде.

се автоматического олигонуклеотидного синтеза на твердой фазе [10].

Для ковалентного связывания с комплексом кобальта использовали олигонуклеотиды (V) и (VI), полностью комплементарные участкам 13 - 26 и 17 - 27 5S РНК рибосом *E. coli* [11] соответственно:



Для присоединения корринового комплекса со свободной *e*-аминогруппой к олигонуклеотиду (V)

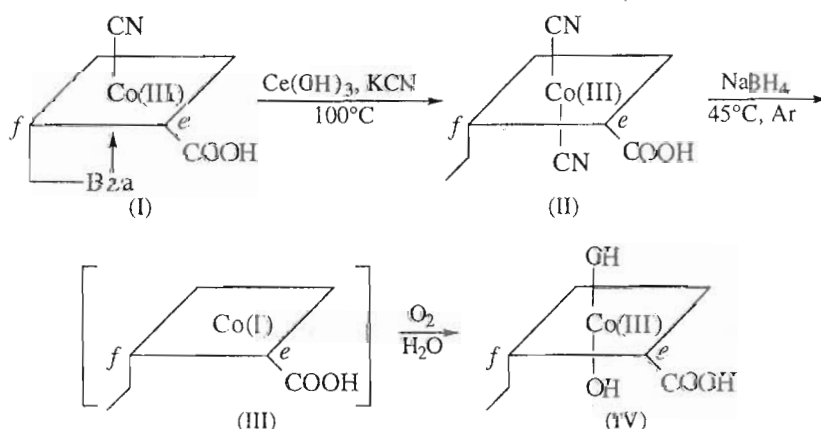


Схема 1. Получение *e*-COOH-Cbi(OH)₂ из *e*-COOH-Cbi(CN).

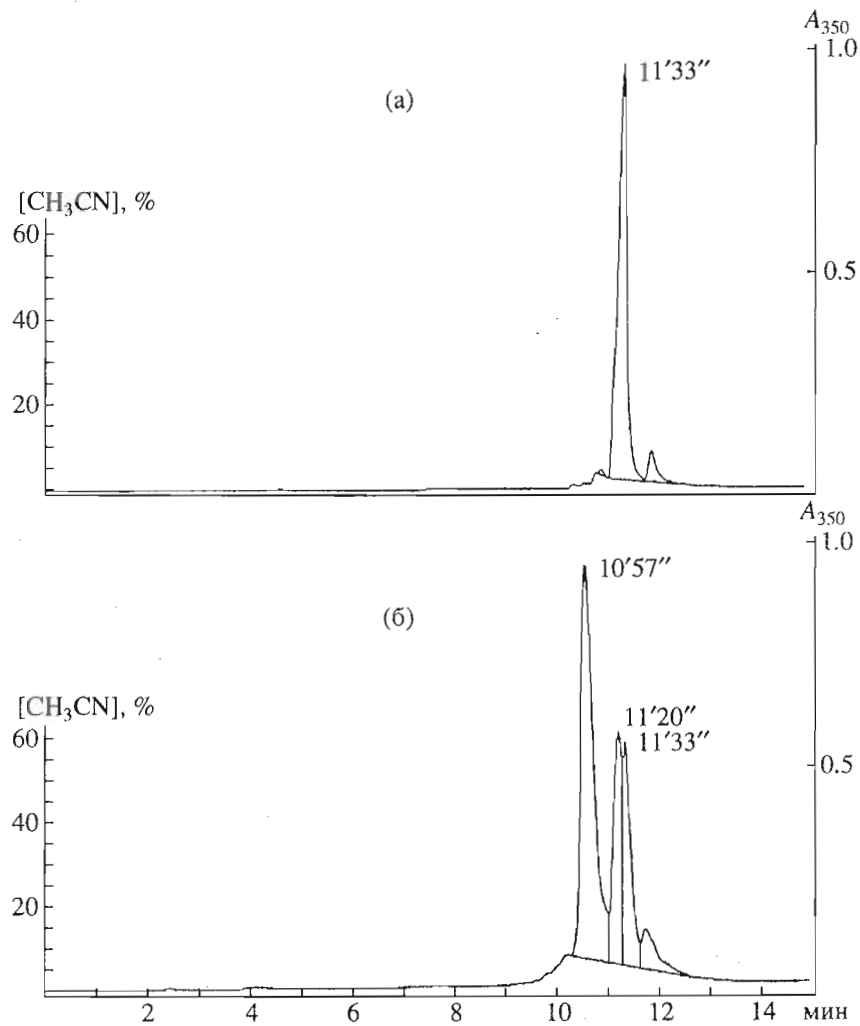


Рис. 2. Аналитическая обращенно-фазовая ВЭЖХ исходной *e*-COOH-Cbl(CN) (а) и продуктов реакции синтеза *e*-COOH-Cbl(OH)₂ (б). Условия см. "Экспер. часть".

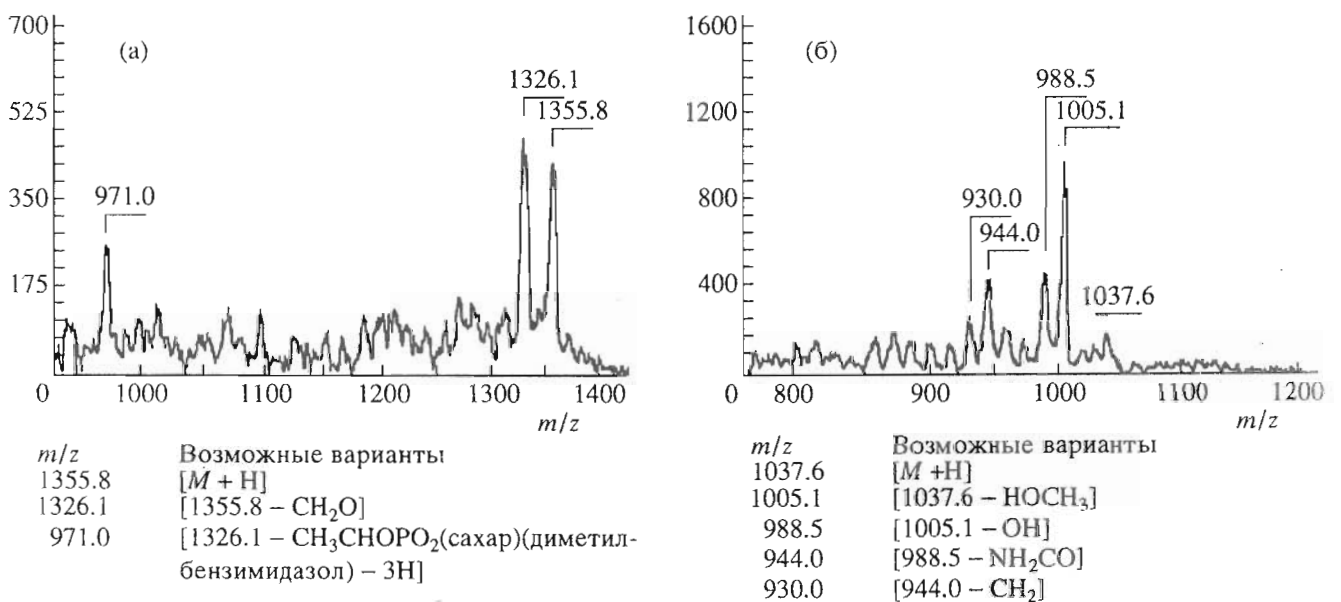


Рис. 3. Масс-спектры *e*-COOH-Cbl(CN) (а) и *e*-COOH-Cbl(OH)₂ (б).

применяли активацию 3'-концевой фосфатной группы с помощью НОВТ в присутствии СДИ. В качестве спейсерной группы использовали ω-аминоэнантовую кислоту. ω-Аминоэнантовое производное олигонуклеотида (VII) выделяли гель-фильтрацией и конденсировали в присутствии 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимида [9] с Со-корриновым комплексом (VIII), содержащим свободную аминогруппу (схема 2). Для получения корринового комплекса с концевой аминогруппой в макролиганде дигидроксикобинамид (IV) конденсировали с 1,4-диаминобутаном в присутствии дициклогексилкарбодимида и N-гидроксисбензотриазола (схема 2). Полученный комплекс e-NH₂(CH₂)₄NHCO-Cbi(OH)₂ очищали методом ВЭЖХ.

Целевой продукт (IX) выделяли из реакционной смеси путем электрофореза в 20% ПААГ. Зону, содержащую целевой продукт, обладающий меньшей электрофоретической подвижностью (рис. 4), чем немодифицированный олигонуклеотид (VII), и имеющий розовую окраску за счет присутствия кобальт-корринового комплекса, вырезали и продукт (IX) элюировали (условия в "Экспериментальной части").

Выход кобальт-корринового производного (25 - 30%) рассчитывали, измеряя помощью УФ-спектроскопии количество продукта (IX) ковалентного присоединения олигонуклеотида к металлокомплексу и исходного производного олиго-

нуклеотида (VII), выделенных из 20% ПААГ при элюции. При этом молярные коэффициенты поглощения нуклеотидов и корринового комплекса принимали следующими (λ 260 нм, ε, mM⁻¹ см⁻¹): dA - 15400, dT - 8800, dC - 7300, dG - 11700, кобальт-коррин - 15800.

При втором методе введение Со-корринового комплекса по 5'-концу олигонуклеотида (VI) осуществляли в условиях стандартного автоматического амидофосфитного синтеза [10]. Связанный с полимером синтезированный целевой олигонуклеотид, содержащий стандартные защитные группировки, фосфорилировали с использованием амидофосфитного производного 6-монометокситритиламиногексанола (X) с последующей конденсацией продукта (XI) в присутствии DCC с Со-корриновым комплексом (IV), содержащим свободную карбоксильную группу (схема 3). Отделение олигонуклеотидного производного (XII) от полимера и снятие с него защитных групп проводили по стандартной методике [12]. Для выделения и очистки целевого продукта (XII) использовали элюцию с ПААГ (см. "Экспериментальную часть"). Выход целевого продукта составлял 80 - 90%.

Наличие кобальта в олигонуклеотиде, модифицированном корриновым комплексом кобальта, было подтверждено методом рентгенофлуоресцентного анализа на энергодисперсионном анализаторе EX-3000 с Si(Li)-детектором и родиевой

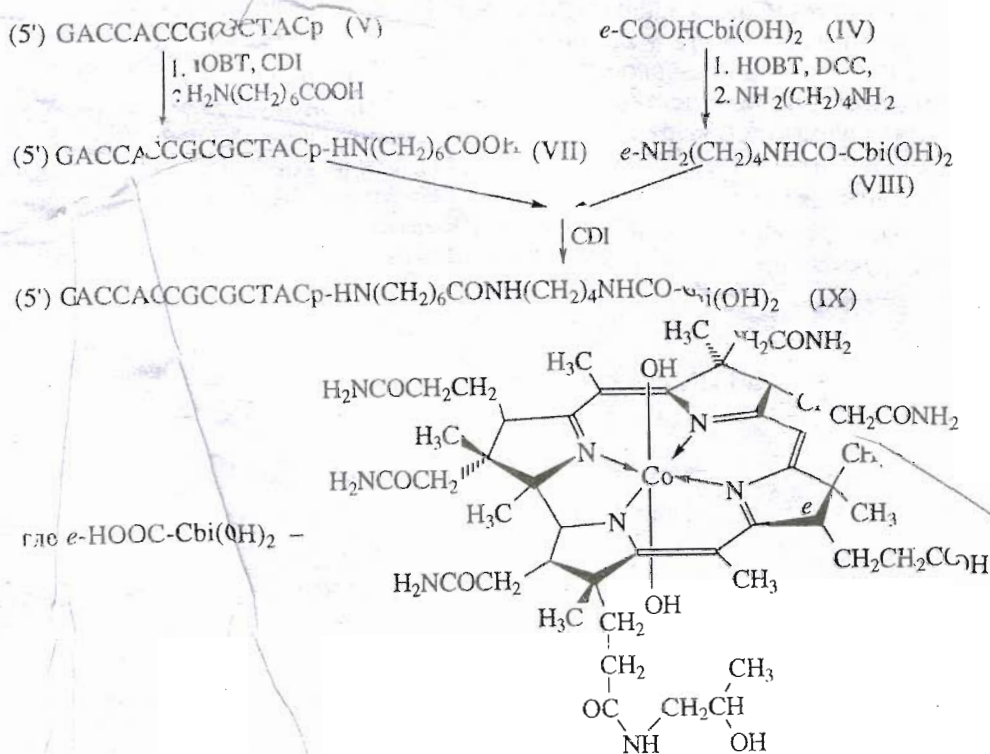


Схема 2. Введение кобальт-корринового комплекса по 3'-фосфатной группе олигонуклеотида.

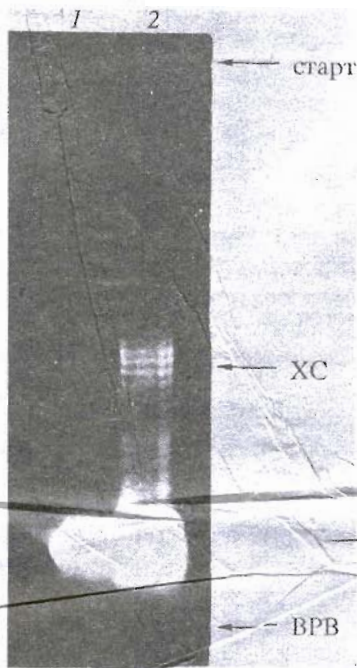


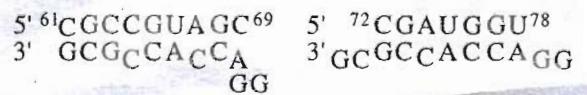
Рис. 4. Анализ реакционной смеси после синтеза дигидроксидинамидного производного олигонуклеотида (IX) в 20% ПААГ. 1 – олигонуклеотид (VII), 2 – реакционная смесь. Стрелками указано положение красителей ксиленианола (ХС) и бромфенолового синего (ВРВ). Для визуализации гель прокрашен этидибромидом.

трубкой (данные получены О.Л. Лепендиной, ИНЭОС). Линия кобальта (CoKα) зафиксирована на пределе чувствительности при накоплении сигнала в течение 400 с. В сравнении со стандартом, содержащим известное количество кобальта, сигнал от анализируемого образца соответствует наличию 0.14 мкг кобальта, что составляет 58% теоретически возможного.

Сравнение методов введения Со-корринового комплекса в олигонуклеотид в водном растворе

или в процессе олигонуклеотидного синтеза позволяет сделать выбор в пользу последнего из-за существенно более высокого выхода продукта.

Нуклеазную активность Со-корринового производного олигонуклеотида (XII) проверяли на 5'-меченном ³²P фрагменте 42 - 120 5S РНК рибосом *E. coli*. Структура дуплексов, образование которых возможно при использовании олигонуклеотидного зонда (VI), приведена ниже (верхний тяж – фрагмент 5S РНК, нижний – олигонуклеотид (VI)):



На рис. 5 приведен радиоавтограф разделения продуктов гидролиза 5'-меченного ³²P фрагмента 42 - 120 5S РНК в 12% ПААГ. Как видно из рисунка, в присутствии олигонуклеотида (VI), модифицированного *e*-COOH-Cbi(OH)₂, наблюдается расщепление РНК-мишени в четырех участках, соответствующих частичной комплементарности олигонуклеотида (VI) фрагменту 42 - 120 5S РНК *E. coli* (дорожка 4). Эффективность гидролиза за 15 мин при 37°C составляла 30 - 40%. В присутствии модифицированного олигонуклеотида (XII), но без аскорбиновой кислоты (дорожка 2), а также в присутствии аскорбиновой кислоты, но без олигонуклеотида (XII) (дорожка 3) расщепления РНК-мишени не наблюдалось.

Таким образом, ковалентное закрепление Со-корринового комплекса на 5'-конце адресующего олигонуклеотида позволяет добиться избирательного гидролиза РНК-мишени в отличие от статистического гидролиза, вызываемого незакрепленным Со-корриновым комплексом [4]. Возможность же введения Со-корринового комплекса в олигонуклеотидный зонд в процессе

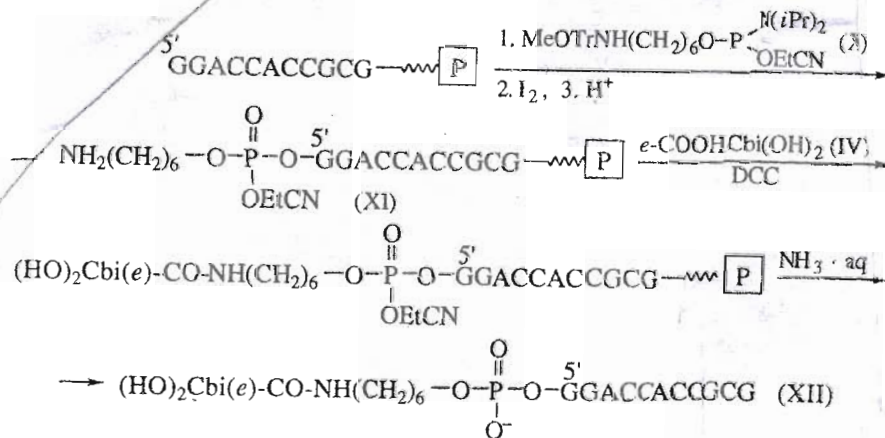


Схема 3. Схема твердофазного синтеза олигонуклеотид-*e*-COOH-Cbi(OH)₂.

твердофазного автоматического синтеза олигодезоксирибонуклеотидов демонстрирует новый простой путь получения олигонуклеотидов, содержащих химически активные группировки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реагенты: 5'-О-диметокситритил-3'-(*N,N*-диизопропиламидо)-β-цианэтилфосфиты 2'-дезоксирибонуклеозидов (Applied Biosystems, США); *e*-COOH-CbI(CN) (НПО "Витамины"), азотнокислый церий (ч. д. а.), 6-аминогексанол (ч. д. а.).

5S РНК рибосом *E. coli* выделяли из 50S рибосомальных частиц (НПО "Биолар") по методике [13], а фрагмент 42 - 120 5S РНК *E. coli* получен гидролизом 5S РНК рибонуклеазой С2 [14].

Олигонуклеотидный синтез выполняли на автоматическом синтезаторе (Applied Biosystems 380В, США) с использованием коммерческих реагентов и растворителей. В качестве полимерного носителя применяли Small Scale dN CPG (Applied Biosystems, США) с загрузкой первым нуклеозидным звеном 20 - 24 мкмоль/г.

Масс-спектры корриновых соединений получены на времяпролетном масс-спектрометре МСБХ В.М. Орловым (ИМБ РАН).

Синтез *e*-COOH-CbI(OH)₂. Смесь 0.3 ммоль *e*-COOH-CbI(CN), 12.8 ммоль $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 25.6 ммоль NaOH, 6.4 ммоль KCN и 136 мл воды перемешивали 3 ч в атмосфере аргона при 100°C. После охлаждения pH среды доводили до 8.5, выпавший осадок $\text{Ce}(\text{OH})_3$ отфильтровывали. Избыточное количество CN-ионов поглощали на ионообменной колонке с анионитом АРА-25П в формиат-форме. Полученный раствор промывали эфиром и обрабатывали 0,4 ммоль NaBH_4 в атмосфере аргона при 45°C. Для связывания CN-ионов добавляли хлорную медь. После окисления кислородом воздуха корриновые соединения выделяли экстракцией смесью хлороформ-фенол (1 : 1); образовавшиеся трис-фенольные комплексы корринов разлагали смесью $i\text{PrOH}-\text{CCl}_4$ (3 : 2). Затем коррины экстрагировали водой, водный раствор упаривали. После этого полученную смесь многократно обрабатывали метанолом, фильтровали и отгоняли растворитель. Выход продукта 80%.

Идентификация и выделение корриновых комплексов методом ВЭЖХ. Обращенно-фазовую ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Gilson (Франция). Качественный состав продуктов реакции определяли в аналитическом режиме (носитель - Nucleosil C₁₈ (5 мкм), размер колонки 4 × 250 мм) в градиенте концентраций от 0 до 60% ацетонитрила в 0.01 М уксусной кислоте. Скорость потока 1 мл/мин, температура 25°C. Поглощение корринов регистрировали при λ 350 нм. Количественно *e*-COOH-CbI(OH)₂ выделяли по-

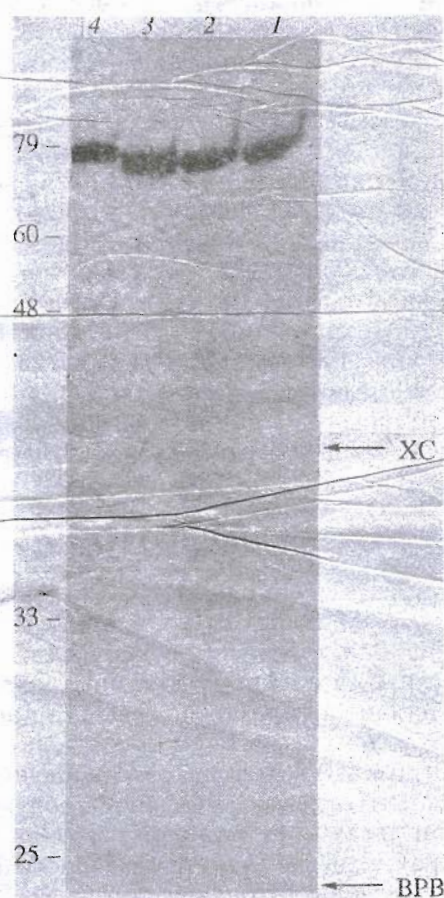


Рис. 5. Авторадиограмма разделения в 12% ПААГ продуктов гидролиза 5'-³²P-меченого фрагмента 42 - 120 5S РНК в присутствии модифицированного олигонуклеотида (XII) (15 мин, 37°C). 1 - исходная РНК, 2 - 4 - продукты реакции в 0.05 М трис-НСI (рН 7.8): 2 - в присутствии модифицированного олигонуклеотида и без аскорбиновой кислоты; 3 - с аскорбиновой кислотой (5×10^{-3} М) без олигонуклеотида; 4 - в присутствии олигонуклеотида и аскорбиновой кислоты (5×10^{-3} М). Цифры слева - длина продуктов расщепления РНК в сравнении с реперами длины.

лупрепаративно (носитель - Econosil C₁₈ (10 мкм), размер колонки 22.5 × 250 мм, элюция смесью ацетонитрил-0.1 М уксусная кислота (45 : 55) со скоростью 7 мл/мин при 25°C).

Синтез *e*-NH₂(CH₂)₄NHCO-CbI(OH)₂. Смесь 0.5 ммоль *e*-COOH-CbI(OH)₂, 2.5 ммоль 1,4-диаминобутана, 0.5 ммоль DCC, 0.67 ммоль НОВТ в 6 мл DMF перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Затем раствор подкисляли 5% HCl до pH 4.0 и добавляли 20 мл воды. Полученные корриновые соединения выделяли фенольной экстракцией. После этого водный раствор корринов очищали от низкомолекулярных органических соединений на колонке с сефадексом LH-20. Выход продукта 80.5%. Полученный *e*-NH₂(CH₂)₄NHCO-CbI(OH)₂ очищали методом ВЭЖХ как описано выше.

Введение Со-корринового комплекса по 3'-концевой фосфатной группе олигонуклеотида. К раствору 0.5 ОЕ₂₆₀ (0.05 нмоль) олигонуклеотида (V) в 5 мкл воды прибавляли 30 мкл 2 М раствора НОВТ (рН 4.5) и 3 мг СДИ. Перемешивали, оставляли на 2.5 ч при 20°C. Затем к реакционной смеси прибавляли 50 мкл холодного 2 М LiClO₄ и 1 мл ацетона, N-оксисбензотриазоловый эфир олигонуклеотида переосаждали, промывали ацетоном, подсушивали и добавляли 50 мкл 2 М раствора ω-аминоэнантовой кислоты (рН 10.5), смесь выдерживали ночь при 20°C. ω-Аминоэнантовое производное олигонуклеотида (VII) отделяли от избытка ω-аминоэнантовой кислоты методом гель-фильтрации на носителе Toyopearl HW-40 с использованием УФ-детекции (λ 260 нм). Водный элюат упаривали, добавляли 20 мкг ε-NH₂(CH₂)₄NHCO-Sbi(OH)₂ (VIII). Полученную смесь с 3 мг карболимида растворяли в 20 мкл MES-буфера (2 М раствор 4-морфолинэтансульфокислоты, рН 3.98) и выдерживали 16 - 20 ч при 20°C. Реакцию прерывали добавлением 50 мкл 2 М раствора перхлората лития и 1 мл ацетона. Раствор центрифугировали, осадок растворяли в 80% водном формамиде, содержащем ксиленцианол и бромфеноловый синий, продукты синтеза разделяли с помощью гель-электрофореза в 20% ПААГ. Зону, содержащую целевой продукт (IX), вырезали, целевой продукт (IX) элюировали с геля 1 М раствором перхлората лития (5 ч при 37°C). К раствору производного олигонуклеотида (IX) добавляли 1 мл ацетона, выдерживали 16 - 20 ч при -20°C. Выход Со-корринового производного олигонуклеотида (IX) 25 - 30%.

Введение Со-корринового комплекса в условиях твердофазного олигонуклеотидного синтеза. Олигонуклеотид (VI), связанный с полимером CPG (40 мг) и содержащий стандартные защитные группировки, обрабатывали амидофосфитным производным 6-монометокситритиламиногексанола (X), детритилировали, полимер отмывали дихлорэтаном, высушивали, добавляли 1 мг (1 мкмоль) ε-COOH-Sbi(OH)₂ (IV) в 100 мкл DMF, 10-кратный избыток DCC (16 мг, 80 мкмоль) и выдерживали 12 ч при 20°C. Затем полимер отмывали метанолом, продукты синтеза отделяли от полимера обработкой водным раствором аммиака в течение 2 ч при 20°C, выдерживали 10 ч при 50°C в этом аммиачном растворе для удаления защитных групп с олигонуклеотида и разделяли с помощью гель-электрофореза в 20% ПААГ; последующую их элюцию с геля 1 М перхлоратом лития и осаждение ацетоном проводили так, как описано выше. Выход целевого продукта 80 - 90%.

Гидролиз РНК в присутствии олигонуклеотидного зонда, содержащего Со-корриновый комплекс. К 2 мкл 5'-³²P-меченого фрагмента 42 - 120 5S РНК *E. coli* (10 × 10³ имп/мин) добавляли 1 мкл 1 М трис-НСI-буфера (рН 7.98), 2.5 мкл 1.5 × 10⁻² М раствора аскорбиновой кислоты, 2 мкл 4 × 10⁻⁴ М

раствора производного олигонуклеотида (XII) и 4.5 мкл воды. Реакционную смесь выдерживали 15 мин при 37°C, затем добавляли 1 мкл тРНК (5 мг/мл) в качестве соосадителя, 5 мкл 3 М ацетата натрия (рН 5.5) и 5 объемов этилового спирта. Смесь выдерживали 18 - 20 ч при -20°C, центрифугировали, осадок высушивали, растворяли в 80% водном формамиде, содержащем ксиленцианол и бромфеноловый синий, продукты гидролиза разделяли в 12% ПААГ. Зоны, соответствовавшие продуктам расщепления, вырезали, просчитывали на приборе Delta 300 (Tracor Analytic, США) и определяли эффективность гидролиза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гринева Н.И., Карпова Г.Г. // Молекулярн. биология. 1974. Т. 8. Вып. 6. С. 832 - 840.
2. Кнорре Д.Г., Зарытова В.Ф., Бадайтеева А.Г., Федорова О.С. // Итоги науки и техники. ВИНИТИ. Сер. Биотехнология. 1991. Т. 37. С. 182.
3. Вольпин М.Е., Кнорре Д.Г., Новодарова Г.Н., Тувин М.Ю., Федорова О.С., Фролова Е.Г. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 298. № 2. С. 363 - 366.
4. Вольпин М.Е., Новодарова Г.Н., Крайнова Н.Ю., Крынецкая Н.Ф., Метелев В.Г., Шабарова З.Ф. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 317. № 3. С. 650 - 652.
5. Sigman D.S., Bruice T.W., Mazumder A., Sutton C.L. // Acc. Chem. Res. 1993. V. 26. P. 98 - 104.
6. NC IUPAC-IUB, Nomenclature Corrinoids // Eur. J. Biochem. 1974. V. 45. P. 7 - 12.
7. Friedrich W., Bernhauer K. // Chem. Ber. 1957. V. 90. № 4. P. 465 - 470.
8. Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D., Tyler A.N. // Biomed. Mass Spectrometry. 1981. V. 8. № 10. P. 492 - 496.
9. Гомтих М.Б., Ивановская М.Г., Скрипкин Е.А., Шабарова З.А. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 4. P. 514 - 523.
10. Jones R.A. // Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach / Ed. M.J. Gait. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1984. P. 23 - 24.
11. Goringe H., Szymkowiak C., Wagner R. // Eur. J. Biochem. 1984. V. 144. P. 25 - 347.
12. Atkinson T., Smith M. // Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach / Ed. M.J. Gait. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1984. P. 68 - 70.
13. Zimmerman P.S. // Biochemistry. 1978. V. 17. P. 2470 - 2473.
14. Крынецкая Н.Ф., Сухомлинов В.В., Рейнтамм Т.Г., Метелев В.Г., Шабарова З.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1990. Т. 31. № 3.

Cobalt–Corrin Derivatives of Oligonucleotides as Reagents for Selective Cleavage of Nucleic Acids

V. M. Belkov*, N. F. Krynetskaya**, E. M. Volkov**, Z. A. Shabarova**,
N. Yu. Krainova*, G. N. Novodarova*,¹ and M. E. Vol'pin*

* *Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 28, Moscow, 117813 Russia*

** *Moscow State University, Moscow, 119899, Russia*

Abstract – Techniques for preparing catalytically active corrin complexes of cobalt with monofunctional *e*-carboxy- and *e*-amino groups in a macroligand are suggested. Two methods of the covalent attachment of such Co–corrin complexes to the terminal 3'- and 5'-phosphate groups of oligodeoxyribonucleotides were studied: the introduction of the complex to the oligonucleotide after oligonucleotide synthesis in aqueous solution and in the course of automated solid-phase oligonucleotide synthesis. Introducing of the Co–corrin complex during solid-phase synthesis was more efficient. It was demonstrated that the oligonucleotide probe thus obtained was able to act as a nuclease in the presence of ascorbic acid, the location of the cleavage sites being determined by the addressing oligonucleotide.

Key words: corrin complex of cobalt, chemical nuclease, addressing oligonucleotides.

¹ To whom correspondence should be addressed.