



УДК 547.9 : 542.953.2

СИНТЕЗ ДОДЕКАДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА, СООТВЕТСТВУЮЩЕГО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ 5—16 тРНК^{Val} ИЗ ДРОЖЖЕЙ

*Джанапиридзе Н. Ш., Метелев В. Г., Смирнов В. Д.,
Шабарова З. А., Прокофьев М. А.*

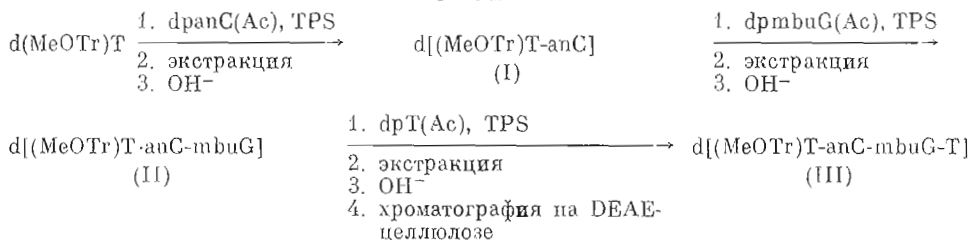
*Химический факультет и Лаборатория им. А. И. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

С использованием ступенчатого и блочного методов наращивания олигонуклеотидной цепи синтезирован додекануклеотид d(T-C-G-T-G-G-T-C-T-A-G-T), соответствующий последовательности 5—16 тРНК^{Val} из дрожжей. На стадии синтеза ди- и тринуклеотидных производных использован экстракционный метод разделения компонентов реакционной смеси, а при получении тетра- и гексануклеотидного производных — сочетание экстракционного метода с ионообменной хроматографией.

При синтезе октануклеотида исследована возможность использования «ускоренного» варианта фракционирования реакционных смесей, предусматривающего блокирование 3'-гидроксильных групп не вступившего в реакцию компонента и осуществление переноса тетра- → гекса- → октануклеотид без выделения гексануклеотида.

В настоящей работе описан синтез додекадезоксирибонуклеотида, соответствующего последовательности 5—16 тРНК^{Val} из дрожжей, который является частью работы по синтезу фрагмента 1—16 структурной части гена этой тРНК, проводимой совместно ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР, НИОХ СО АН СССР и МГУ [1]. Синтез осуществлен с применением методов введения защитных групп, конденсации и разделения реакционных смесей, разработанных Кораной и сотр. [2]. Схема синтеза предусматривает использование в качестве 5'-концевого фрагмента 5'-О-метокситритилнуклеозида и ступенчатое наращивание олигонуклеотидной цепи до стадии тетра- и пентануклеозидтрифосфата. Липофильность метокситритильной группы позволила фракционировать реакционные смеси экстракцией органическими растворителями [3] (схема 1).

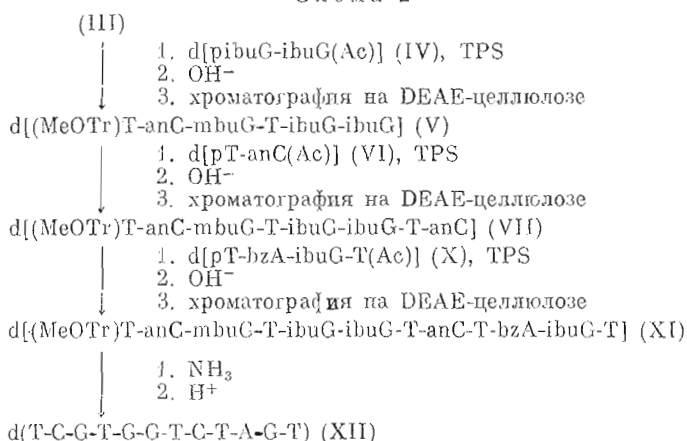
Схема 1



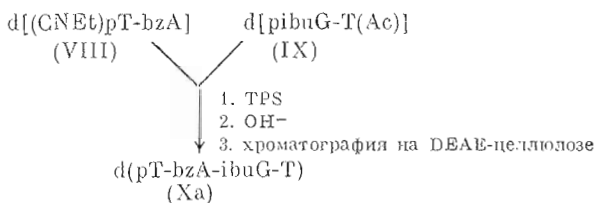
Использованы следующие нестандартные сокращения: ibu — изобутирил; mbu — α-метилбутирил; TEAB — бикарбонат триэтиламония; TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид.

При синтезе тринуклеозиддифосфата (II) для блокирования N²-амино-группы гуаниловой кислоты использована метилбутирильная группа, сохраняющаяся в ходе многостадийного синтеза. На стадиях синтеза гекса-, окта- и додекануклеотидов применен блочный метод, облегчающий разделение компонентов реакционной смеси и уменьшающий число конденсаций, в которых участвуют относительно высокомолекулярные олигонуклеотиды. На всех стадиях образования межнуклеотидной связи фосфорилирующий агент брали в избытке (от 1,5-кратного на стадии синтеза динуклеозидфосфата до 12,5-кратного при синтезе додекануклеотида), а в качестве конденсирующего агента использовали 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид (схема 2).

Схема 2



Тетрануклеотид (X) синтезирован из соответствующих динуклеотидов, причем для блокирования 5'-фосфатного остатка использована цианэтильная группа:



Динуклеозидфосфат (I) и тринуклеозиддифосфат (II) были извлечены из реакционных смесей экстракцией органическими растворителями и получены с выходами 60 и 66% соответственно. Для очистки тетрануклеозидтрифосфата (III) после его экстракции была использована хроматография на DEAE-целлюлозе. Путем экстракции реакционной смеси было достигнуто отделение гексануклеотидного производного (V) и непрореагировавшего тетрануклеозидтрифосфата (III) от триизопропилбензолсульфокислоты, динуклеотида (IV) и его симметричного пирофосфата; разделение соединений (III) и (V) удалось осуществить только ионообменной хроматографией. Нужно отметить, что, хотя применение препаративной хроматографии на DEAE-целлюлозе обеспечивает высокую степень чистоты выделенного препарата, оно приводит к значительным потерям нуклеотидного материала. Так, анализ реакционной смеси, полученной при синтезе гексануклеотида (V), методами хроматографии на бумаге и на микроколонке с DEAE-целлюлозой доказал, что степень превращения тетрануклеотида (III) в гексануклеотид (V) составляет более 60%, однако препаративно последний удалось получить лишь с выходом 36%.

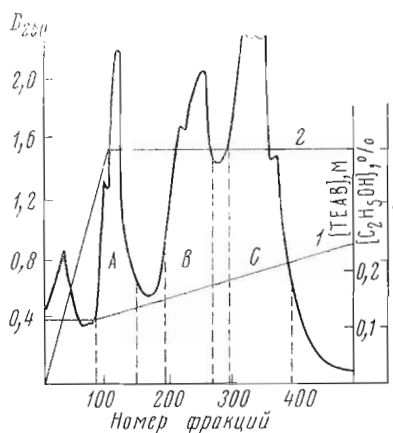


Рис. 1

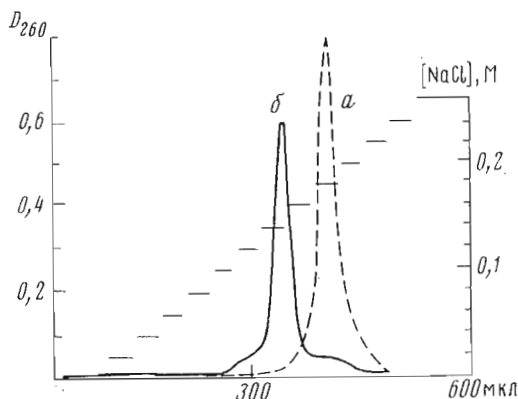


Рис. 2

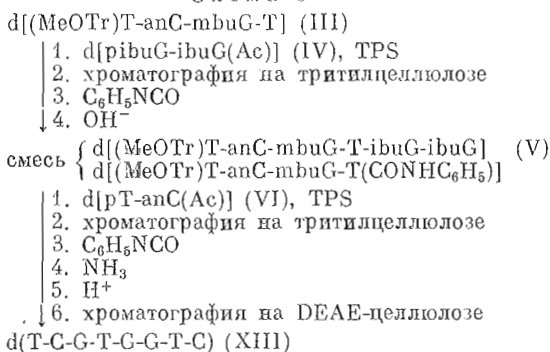
Рис. 1. Выделение октануклеотида (VII). Хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- ; $2,5 \times 24$ см) в градиенте концентраций TEAB (1) и этанола (2), фракции по 14 мл/9 мин. Пик А содержит симметричный пирофосфат динуклеотида (VI), пик В — гексануклеотид (V), пик С — октануклеотид (VII)

Рис. 2. Аналитическая микроколоночная хроматография октануклеотида d(T-C-G-T-G-G-T-C) (XIII) при pH 7,5 (a) и 3,5 (б)

Синтез октануклеотида d(T-C-G-T-G-G-T-C) (XIII) осуществлен в двух вариантах. В препаративном масштабе защищенный октануклеотид (VII) получен конденсацией соответствующих гекса- (V) и динуклеотида (VI) с выходом 28%. График разделения реакционной смеси на DEAE-целлюлозе приведен на рис. 1. Гомогенность препарата подтверждена данными хроматографии на бумаге (таблица) и на микроколоне с DEAE-целлюлозой [4] (рис. 2), а состав установлен посредством определения относительного содержания нуклеозидов в гидролизате деблокированного нуклеотида (XIII) смесью фосфатазы и фосфодиэстеразы змеиного яда (см. таблицу). Структура соединения подтверждена также анализом по методу нуклеотидных карт [5], проведенным в лаборатории химии продуктов микробного синтеза ИВХ АН СССР.

В аналитическом масштабе синтез был проведен без выделения гексануклеотида, с использованием метода блокирования 3'-гидроксильной группы не вступившего в реакцию компонента путем его обработки фенолизоцианатом [6] (схема 3).

Схема 3



Хроматография на тритилцеллюлозе, использованная для первичного фракционирования продуктов обеих конденсаций, позволила отделить динуклеотиды и продукты превращения TPS. Полученные в результате

Характеристики синтезированных олигонуклеотидов

Соединение	Rf в системе		Спектральные характеристики				Нуклеотидный состав								
			$\lambda_{\text{мин}}, \lambda_{\text{макс}}$	$\epsilon_{259}/\epsilon_{260}$	$\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$	$\epsilon_{290}/\epsilon_{260}$	dT	dпГ	dпС	dпА	dT	dпГ	dпС	dпА	
	A	B													
d[(MeOTr)T-anC] (I)			250; 275, 303	0,89	1,14	1,0	1,0								
d[(MeOTr)T-anC-mbuC] (II)			240, 260	0,9	0,92	0,75	1,0								
d(T-C-G)	0,4		245, 264	0,84	0,92	0,7	1,0								
d[(MeOTr)T-anC-mbuG-T] (III)			230, 265	0,88	0,68	0,27	1,1								
d(T-C-G-T)	0,53		230, 258	0,91	0,71	0,58	1,0								
d(pibuG-ibuG)															
d(pG-G)															
d(pT-anC)	0,61		235; 270, 300	0,78	1,07	1,0	1,0								
d(pT-C)	0,46		237, 268	0,79	0,83	0,34	1,0								
d(pT-bzA)	0,22		236, 277	0,80	1,2	0,90	1,0								
d(pT-A)	0,1		235, 263	0,69	0,4	0,25	1,0								1,02
d(pibuG-T)	0,45		230, 261	0,89	0,66	0,4	1,0								
d(pG-T)	0,16		228, 255				1,1								
d(pT-bzA-ibuG-T)	0,53		232, 263	0,65	0,92	0,61	1,06								
d(pT-A-G-T)	0,22		230, 258	0,89	0,53	0,22	2,04								1,0
d[(MeOTr)T-anC-mbuG-T-ibuG-ibuG] (V)			235, 265	0,82	0,84	0,69	1,0								
d(T-C-G-T-C-G)	0,15		230, 255	1,0	0,63	0,18	0,87								
d[(MeOTr)T-anC-mbuG-T-ibuG-ibuG-T-anC] (VII)							1,0								
d(T-C-G-T-G-G-T-C) (XIII)	0,12		240, 265	0,82	0,88	0,7	dГ 1,3**								
d[(MeOTr)T-anC-mbuG-T-ibuG-ibuG-T-anC-T-bzA-ibuG-T] (XI)			230, 258	0,97	0,69	0,29	dГ 1,4								
d(T-C-G-T-G-G-T-C-T-A-G-T) (XII)			230, 258	0,99	0,64	0,22	5,0**								

* Обозначения систем приведены в «Экспериментальной части».

** Приведен результат гидролиза смесью щелочной фосфатазы и фосфоэстеразы змеиного яда.

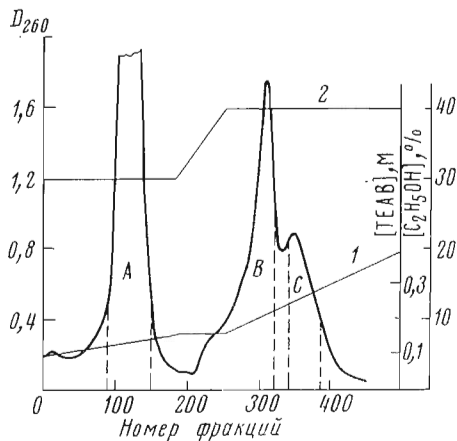


Рис. 3. Выделение додекануклеотида (XI). Хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- ; 2×22 см) в градиенте концентраций ТЕАВ (1) и этанола (2), фракции по 15 мл/15 мин. Пик А содержит тетра-нуклеотид (X), пик В — октануклеотид (VII) и симметричный пиррофосфат тетра-нуклеотида (X), пик С — додекануклеотид (XI)

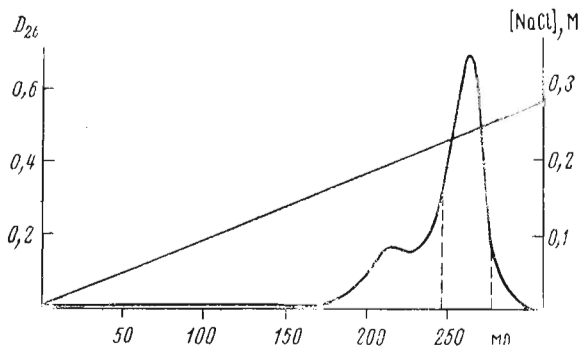


Рис. 4. Рехроматография 20 OE_{260} додекануклеотида (XII) на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^- ; $0,63 \times 43$ см) в линейном градиенте концентраций NaCl в 8 М мочеvine, 0,03 М Трис-HCl; pH 7,0, скорость элюции 55 мл/ч. Во фракции, отмеченной пунктиром, содержится 14 OE_{260} додекануклеотида

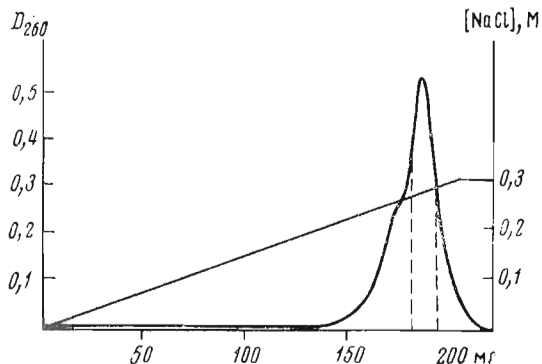


Рис. 5. Хроматография 14 OE_{260} додекануклеотида (XII) на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^- ; $0,6 \times 20$ см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 8 М мочеvine, pH 3,5. Скорость элюции 56 мл/ч. Во фракции, отмеченной пунктиром, содержится 5 OE_{260}

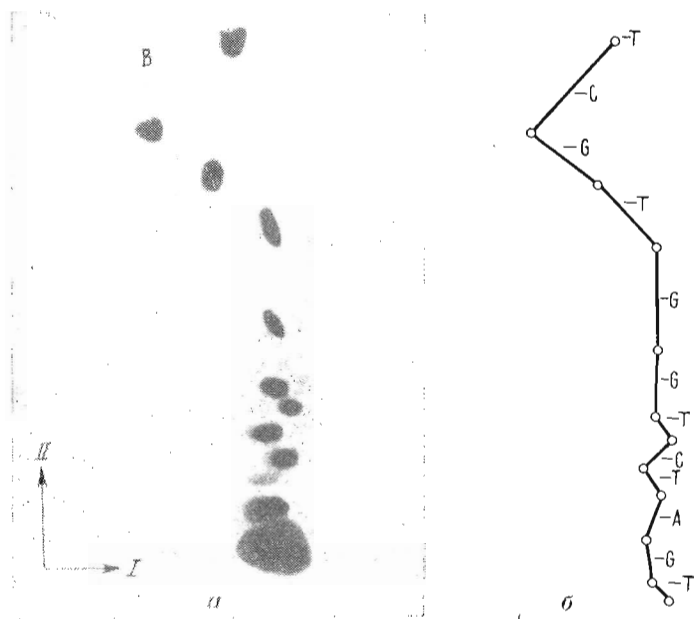


Рис. 6

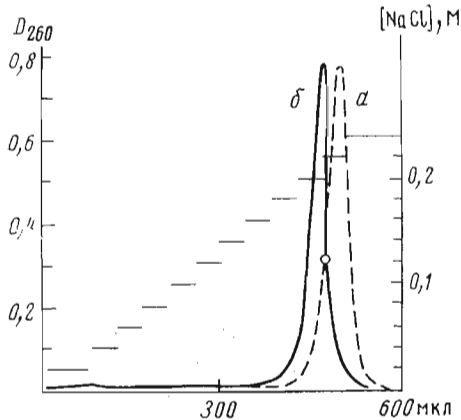


Рис. 7

Рис. 6. Двумерное разделение продуктов частичного гидролиза фосфодиэстеразой додекануклеотида $d(^{32}P\text{-T-C-G-T-G-G-T-C-T-A-C-T})$. Первое направление — электрофорез на ацетилцеллюлозе при pH 3,5; второе — гомохроматография на DEAE-целлюлозе. *a* — радиоавтомат, *b* — схема. Анализ выполнен в ИБХ АН СССР

Рис. 7. Аналитическая микроколоночная хроматография додекануклеотида (XII) при pH 7,5 (*a*) и 3,5 (*b*)

смеси тетра-, гекса- и октануклеотидных производных были обработаны фенилизотиоцианатом, что привело к образованию 3'-О-карбамоильных производных из нефосфорилированных нуклеотидов. Однако вопреки ожиданиям после снятия N- и 5'-О-защитных групп карбамоильные производные тетра- (III) и гексануклеотида (V) оказались недостаточно гидрофобными, и нам не удалось добиться их эффективного отделения от октануклеотида (XIII) путем хроматографии на тритилцеллюлозе. Поэтому октануклеотид (XIII) был выделен (с выходом ~5%) ионообменной хроматографией по Томлинсону-Тенеру и охарактеризован данными хроматографии на бумаге, микроколоночной хроматографии при pH 7,5 и 3,5 и определением нуклеозидного состава ($dT : dC : dG = 1,5 : 1,0 : 1,7$).

Достаточно полное сопоставление эффективности двух описанных вариантов синтеза октануклеотида провести затруднительно прежде всего ввиду различия их масштабов. Однако сама по себе возможность сравнительно быстрого (из-за упрощения стадий фракционирования реакционных смесей) получения относительно высокомолекулярного олигодезоксирибонуклеотида представляется привлекательной. Выход октануклеотида

(насколько можно судить по аналитическому варианту синтеза) при использовании второго метода несколько меньше на стадии перехода тетра- → гекса- → октануклеотид, однако быстрота выделения отчасти компенсирует этот недостаток.

Защищенный додекануклеотид (XI) был выделен хроматографией на DEAE-целлюлозе (рис. 3). Дальнейшее блокирование групп осуществлено по методикам, описанным Кораной [2]. Додекануклеотид (XII) очищен хроматографией на DEAE-целлюлозе при pH 7,5 (рис. 4) и 3,5 (рис. 5) с последующим обессоливанием на DEAE-целлюлозе. Анализ структуры додекануклеотида (XII) проведен аналогично анализу октануклеотида (см. таблицу и рис. 6), а его гомогенность подтверждена хроматографией на микроколонке с DEAE-целлюлозой при pH 7,5 и 3,5 (рис. 7).

Экспериментальная часть

В работе использованы дезоксирибонуклеотиды фирмы Calbiochem (США) (dpA, dpG) и производства опытного химического цеха НИОХ СО АН СССР (dpC, dpT), триизопропилбензолсульфохлорид фирмы Merck (ФРГ). Хроматографию на бумаге FN-1 и Ватман № 1 проводили в системах этанол — 1 М ацетат аммония, 7 : 3; pH 7,5 (А) и *n*-пропанол — конц. аммиак — вода, 55 : 10 : 35 (В), ТСХ — на пластинках фирмы Eastman Kodak № 6060 в системах ацетонитрил — вода 8% (С), ацетонитрил — вода 15% (D) и ацетонитрил — вода 20% (Е). Аналитическую микроколоночную хроматографию осуществляли с помощью прибора МКСФП-4 на DEAE-целлюлозе (Cl⁻, 1 × 55 мм) при линейном градиенте концентраций NaCl в Трис-HCl-буфере (0,005 М; pH 7,5) и 7 М мочевины, скорость элюции 360 мкл/ч. Соотношение нуклеозидов в гидролизатах олигонуклеотидов фосфатазой и фосфодиэстеразой змеиного яда определяли с использованием жидкостного хроматографа фирмы Varian (США) на колонке с Aminex А-6 (2,4 × 250 мм), элюент — 0,4 М формиат аммония, pH 4,55, скорость элюции 15 мл/ч. Для препаративной колоночной хроматографии применяли диэтиламиноэтилцеллюлозу DE-32 фирмы Whatman. Деблокирование экзоциклических аминогрупп достигалось обработкой олигонуклеотидов концентрированным водным раствором аммиака (50°, 12—18 ч), а метокситригильные группы удаляли обработкой 80%-ной уксусной кислотой (20°, 45 мин). Все конденсации проводили в сухой камере с использованием абсолютного пиридина, очищенного перегонкой над хлорсульфоновой кислотой и КОН. Хроматографические и спектральные характеристики, а также результаты ферментативных гидролизоз синтезированных олигонуклеотидов приведены в таблице.

d[(MeOTr)T-anC] (I). К раствору 2,34 г (4 ммоль) *d*(MeOTr)T и 3,5 г (6,2 ммоль) *d*ranC(Ac) в 30 мл абсолютного пиридина прибавляли 5,4 г (18 ммоль) TPС и выдерживали 10 ч при 20°. При охлаждении до -10° добавляли 18 мл 2 М раствора диизопропилэтиламина в пиридине, 18 мл воды и выдерживали 18 ч при 20°. Раствор упаривали, остаток растворяли в 70 мл 0,2 М ТЕАВ и раствор экстрагировали эфиром в жидкостном экстракторе (6 ч). 3'-О-Ацетат соединения (I) извлекали из буферного раствора смесью этилацетата и *n*-бутанола (85 : 15; 3 × 100 мл), контролируя ход экстракции с помощью ТСХ, *R_f* в системе С 0,5. Органический слой упаривали, остаток растворяли в 60 мл смеси пиридин — этанол (1 : 1) и обрабатывали 2 н. NaOH (60 мл, 0°, 6 мин). Раствор нейтрализовали добавлением 200 мл дауэкса-50 (PyH⁺). Смолу отделяли фильтрованием, промывали 1 л 50% водного раствора пиридина, раствор упаривали, остаток растворяли в 150 мл абсолютного пиридина и выливали в 3 л безводного эфира. Осадок отделяли центрифугированием. Выход динуклеозидфосфата (I) 2 г (2,4 ммоль; 60%).

d[(MeOTr)T-anC-mbuG] (II). Получен аналогично из 2 г (2,4 ммоль) *d*[(MeOTr)T-anC] (I) и 2,7 г (5 ммоль) *d*pmbuG(Ac) с использованием 4 г

(13 ммоль) TPS (20°, 6 ч). После разложения TPS и упаривания раствора остаток растворяли в 100 мл 0,1 М ТЕАВ и экстракцией эфиром в экстракторе (5 ч), затем этилацетатом (2 × 100 мл) и смесями этилацетат — *n*-бутанол (85 : 15; 2 × 100 мл, и 70 : 30; 3 × 100 мл) отделяли примеси. 3'-О-Ацетат соединения (II) выделяли из буферного раствора экстракцией смесью хлористого метилена и *n*-бутанола (7 : 3; 4 × 100 мл), контролируя ход экстракции с помощью ТСХ в системе D (R_f 0,28). Дальнейшая обработка аналогична описанной для выделения соединения (I). Выход продукта (II) 2,5 г (1,6 ммоль; 66%). Возврат соединения (I) 22%.

$d[(MeOTr)T-anC-mbuG-T]$ (III) получен аналогично из 1,73 г (1 ммоль) $d[(MeOTr)T-anC-mbuG]$ (II) и 2,1 г (4,8 ммоль) $dpT(Ac)$ с использованием 3,65 г (12 ммоль) TPS (20°, 5 ч). После стандартных обработок реакционную смесь растворяли в 50 мл 0,1 М ТЕАВ и раствор экстрагировали последовательно эфиром (6 ч), смесями этилацетат — *n*-бутанол [9 : 1; 2 × 50 мл; органический слой содержит соединение (II)], этилацетат — *n*-бутанол (8 : 2; 3 × 100 мл) и хлористый метилен — *n*-бутанол (7 : 3; 4 × 100 мл), контролируя ход экстракции с помощью ТСХ в системе E. Последние два экстракта, содержащие преимущественно соединения (II) (R_f 0,4) и 3'-О-ацетил (III) (R_f 0,37), объединяли, упаривали, подвергали гидролизу 1 н. NaOH и затем наносили в 300 мл 3% пиридина на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- ; 3 × 28 см). Колонку промывали 1 л 0,05 М ТЕАВ в 10% этаноле и далее компоненты смеси элюировали, используя линейные градиенты 0,6 л 0,05 М ТЕАВ в 10% этаноле — 0,6 л 0,05 М ТЕАВ в 40% этаноле и 3 л 0,05 М ТЕАВ в 40% этаноле — 3 л 0,2 М ТЕАВ в 40% этаноле; фракции по 15 мл/10 мин. Из фракций 200—280 выделили 0,76 г (0,4 ммоль; 40%) соединения (III). Возврат тринуклеотида (II) 20%.

$d[pibuG-ibuG(Ac)]$ (IV) получен конденсацией 3,4 г (5 ммоль) $d(CNEt)pibuG$ и 4 г (7 ммоль) $dpibuG(iBu)$ с использованием 5,4 г (18 ммоль) TPS (20°, 6 ч). После омыления динуклеотид был выделен хроматографией на DEAE-целлюлозе (HCO_3^- ; колонка 3 × 80 см) и подвергнут 3'-О-ацетилированию. Соединение (IV) получено в количестве 1,96 г (2,7 ммоль, 53%).

$d[pT-anC(Ac)]$ (VI) получен конденсацией 1,2 г (2,7 ммоль) $d(CNEt)pT$ и 3,2 г (3,7 ммоль) $dpanC(Ac)$ с использованием 3 г (10 ммоль) TPS (20°, 6ч), выход 1,34 г (1,74 ммоль; 64%).

$d(pT-bzA)$ (VIIa) получен аналогично из 1,7 г (4 ммоль) $d(CNEt)pT$ и 5 г (10 ммоль) $dpbzA(Ac)$ с использованием 6,6 г (22 ммоль) TPS (20°, 5 ч), выход 24 700 ОЕ₂₈₀ (1,0 ммоль; 25%).

$d(pibuG-T)$ (IXa) получен аналогично из 2,2 г (4,4 ммоль) $d(CNEt)pibuG$ и 4,6 г (10 ммоль) $dpT(Ac)$ с использованием 7,5 г (25 ммоль) TPS (20°, 5 ч), выход 33 000 ОЕ₂₆₀ (1,3 ммоль; 30%).

$d(pT-bzA-ibuG-T)$ (Xa) получен аналогично из 0,83 г (0,85 ммоль) $d[(CNEt)pT-bzA]$ (VIII) и 1,3 г (1,3 ммоль) $d[pibuG-T(Ac)]$ (IX) с использованием 1,7 г (5,6 ммоль) TPS (20°, 3,5 ч). Реакционную смесь после обработки 1 н. NaOH разделяли на DEAE-целлюлозе (HCO_3^- ; 2,5 × 83 см) в линейном градиенте ТЕАВ (5 л 0,07 М ТЕАВ в 10% этаноле — 5 л 0,32 М ТЕАВ в 10% этаноле), собирая фракции по 15 мл/20 мин. Тетрануклеотид (X) выделили из фракций 200—240 в количестве 5000 ОЕ₂₈₀ (100 мкмоль; 12%).

$d[(MeOTr)T-anC-mbuG-T-ibuG-ibuG]$ (V) получен конденсацией 10 700 ОЕ₂₆₀ (0,22 ммоль) $d[(MeOTr)T-anC-mbuG-T]$ (III) и 47 700 ОЕ₂₆₀ (1,4 ммоль) $d[pibuG-ibuG(Ac)]$ (IV) с использованием 1,6 г (5,2 ммоль) TPS (20°, 4,5 ч). После разложения TPS раствор упаривали и остаток растворяли в 100 мл 0,05 М ТЕАВ. Динуклеотид (IV) и соль триизопронилбензолсульфокислоты удаляли экстракцией диизопронилловым эфиром (3 × 100 мл), а метокситритильные производные олигонуклеотидов извле-

кали смесью хлористого метилена и *n*-бутанола (1 : 1; 3 × 100 мл). Второй экстракт упаривали, удаляли защитные группы с 3'-гидроксильных групп олигонуклеотидов, смесь наносили в 300 мл 4% водного раствора пиридина на колодку с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻; 2,5 × 24 см), которую элюировали линейными градиентами 0,6 л 0,07 М ТЕАВ в 10% этаноле — 0,6 л 0,07 М ТЕАВ в 40% этаноле и 4 л 0,07 М ТЕАВ в 40% этаноле — 4 л 0,25 М ТЕАВ в 40% этаноле, собирая фракции по 15 мл/10 мин. Гексануклеотид (V) был выделен из фракций 345—435 в количестве 0,22 г (5400 OE₂₆₀, 77 мкмоль; 36%). Возврат тетрануклеотида (III) 30%, динуклеотида (IV) 42%.

d[(MeOTr)T-anC-mbuG-T-ibuG-ibuG-T-anC] (VII). А. Синтез в препаративном масштабе. Октануклеотид получен из 0,22 г (5400 OE, 77 мкмоль) *d[(MeOTr)T-anC-mbuG-T-ibuG-ibuG]* (V) и 1,3 г (22 400 OE, 1 ммоль) *d[pT-anC(Ac)]* (VI) с использованием 1 г (3,3 ммоль) TPS (20°, 3 ч). После разложения TPS и деблокирования 3'-гидроксильных групп олигонуклеотидов реакционную смесь разделяли на DEAE-целлюлозе (HCO₃⁻; 2,5 × 24 см; см. рис. 1) в линейных градиентах 0,5 л 0,1 М ТЕАВ в 10% этаноле — 0,5 л 0,1 М ТЕАВ в 40% этаноле и 2,5 л 0,1 М ТЕАВ в 40% этаноле — 2,5 л 0,2 М ТЕАВ в 40% этаноле; фракции по 14 мл/9 мин. Октануклеотид (VII) выделен из фракций 290—375 в количестве 2570 OE₂₆₀ (22 мкмоль; 28%). Характеристики препарата и полученного из него незамещенного нуклеотида (XIII) приведены в таблице и на рис. 2. Возврат гексануклеотида (V) 18%.

Б. Синтез в аналитическом масштабе без выделения гексануклеотида. Гексануклеотид (V) синтезирован из 22 мкмоль *d[(MeOTr)T-anC-mbuG-T]* (III) и 110 мкмоль *d[riBuG-ibuG(Ac)]* (IV). После гидролиза TPS реакционную смесь растворяли в 0,05 М ТЕАВ и пропустили через колонку с тритилцеллюлозой (2 × 7 см), приготовленной по методике Агарвала [6]. Тритилсодержащие компоненты элюировали 0,05 М ТЕАВ, содержащим 80% этанола, тщательно высушивали, растворяли в абсолютном пиридине и обрабатывали свежеперегнанным фенолизоцианатом (220 мкмоль, 20°, 10 ч). Тетра- и гексануклеотидные производные осаждали эфиром из пиридинового раствора. После обработки щелочью смесь соединения (V) и 3'-O'-защитного тетрануклеозидтрифосфата (III) вводили в реакцию с 50 мкмоль *d[pT-anC(Ac)]* (VI). После гидролиза TPS, хроматографии реакционной смеси на тритилцеллюлозе и обработки полученной смеси 5'-O-защитных олигонуклеотидов фенолизоцианатом проводили удаление N- и 5'-O-защитных групп в полученных производных. Аликвоту полученной смеси (100 OE₂₆₀ нуклеотидного материала) хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl⁻; 1 × 10 см) в градиенте NaCl в 0,05 М Трис-HCl-буфере, содержащем 7 М мочевины. Октануклеотид выделен в количестве 10 OE₂₆₀. Соединение однородно при хроматографии на бумаге (R_f 0,13 в системе В) и на микроколонке с DEAE-целлюлозой в системе Томлинсона-Тенера при pH 7,5 и 3,5; ε₂₅₀/ε₂₆₀ = 0,93; ε₂₈₀/ε₂₆₀ = 0,89; соотношение нуклеозидов, полученных расщеплением смесью щелочной фосфатазы и фосфодиэстеразы змеиного яда: dT : dC : dG = 1,5 : 1,0 : 1,7.

d[(MeOTr)T-anC-mbuG-T-ibuG-ibuG-T-anC-T-bzA-ibuG-T] (XI) получен из 800 OE₂₆₀ (8 мкмоль) *d[(MeOTr)T-anC-mbuG-T-ibuG-ibuG-T-anC]* (VII) и 4670 OE (100 мкмоль) *d[(pT-bzA-ibuG-T(Ac)]* (X) с использованием 180 мг (0,6 ммоль) TPS (20°, 6 ч). Условия хроматографического разделения реакционной смеси приведены на рис. 3. Додекануклеотид (XI) выделен из фракций 342—380 в количестве 300 OE₃₀₀.

d(T-C-G-T-G-G-T-C-T-A-G-T) (XII). Додекануклеотид (XI) в количестве 150 OE₃₀₀ был подвергнут обработке аммиаком и уксусной кислотой для удаления всех защитных групп, а затем хроматографии на DEAE-целлюлозе (Cl⁻; 1,5 × 10 см) в линейном градиенте концентрации NaCl в Трис-

HCl-буфере (рН 7,5), содержащем 7 М мочевины (500 мл 0,15 М NaCl — 500 мл 0,3 М NaCl), с последующим обессоливанием на DEAE-целлюлозе (HCO_3^- ; $0,8 \times 3$ см). Получено 55 ОЕ₂₆₀ додекануклеотида (XII). 20 ОЕ₂₆₀ додекануклеотида (XII) были хроматографированы в системе Томлинсона-Тенера при рН 7,5 (см. рис. 4), а выделенная фракция (14 ОЕ₂₆₀) хроматографировалась на DEAE-целлюлозе при рН 3,5 (см. рис. 5). Очищенный додекануклеотид (XII) выделен в количестве 5 ОЕ₂₆₀. Характеристики соединения приведены в таблице и на рис. 6 и 7.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ИБХ АН СССР В. Г. Коробко и С. В. Чувшило за проведение анализа структуры олигонуклеотидов по методу нуклеотидных карт и А. П. Вульфсону за помощь в хроматографической очистке додекануклеотида, а также сотрудникам отдела хроматографии лаборатории им. А. Н. Белозерского МГУ В. К. Каграмановой и М. Лукати за анализ состава синтезированных олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бадашкеева А. Г., Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ивановская М. Г., Кнорре Д. Г., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Прокофьев М. А., Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Шубина Т. Н. (1973) *Химия природы*, соедин., 394—402.
2. Agarwal K. L., Yamazaki A., Cashion P. J., Khorana H. G. (1972) *Angew. Chem.*, 84, 489—498.
3. Agarwal K. L., Berlin Yu. A., Kleid D. G., Smirnov V. D., Khorana H. G. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 5563—5573.
4. Кузьмин С. В. (1973) в сб. *Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот* (под ред. Кнорре Д. Г. и Венкстерн Т. В.), с. 95—103, «Наука», М.; Грачев М. А., там же, с. 104—122.
5. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г. (1976) *Биоорган. химия*, 2, 166—177.
6. Agarwal K. L., Khorana H. G. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, 94, 3578—3585.

Поступила в редакцию
23.VII.1976

После доработки
26.X.1976

SYNTHESIS OF THE DODECADEOXYRIBONUCLEOTIDE CORRESPONDING TO THE SEQUENCE 5—16 OF tRNA^{Val}₁ FROM BAKER'S YEAST

DZHPARIDZE N. Sh., METELEV V. G., SMIRNOV V. D.,
SHABAROVA Z. A., PROKOFIEV M. A.

[*Chemistry Department and A. N. Belozersky Laboratory
of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow*]

The dodecadeoxyribonucleotide d(T-C-G-T-G-G-T-C-T-A-G-T) was synthesized in a monomer-to-oligomer and oligomer-to-oligomer fashion. Extraction was workable for separating di- and trinucleotide derivatives, whereas for separating tetra- and hexanucleotides both extraction and ion-exchange chromatography were used. In the octanucleotide synthesis the possibility was checked of exploiting a more rapid version of reaction mixture fractionation, which involves blocking 3'-hydroxy groups in unreacted component and performing the stages tetra- → hexa- → octanucleotide without isolation of hexanucleotide.