



УДК 547.963.32 + 542.953.2

СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

XX. СИНТЕЗ ДОДЕКАДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ АТСТТАСТГСАТ
И САТСГТАССГТГ ФОСФОТРИЭФИРНЫМ МЕТОДОМ *

Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С.,
Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н.

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

Осуществлен синтез додекадезоксинуклеотидов А-Т-С-Т-Т-А-С-Т-Г-С-А-Т (XXVI) и С-А-Т-С-Г-Т-А-С-С-Г-Г-Г (XLIV), содержащихся в промоторах A_2 и A_3 ДНК бактериофага Т7. Синтез проводился триэфирным методом Наранга и сотр., причем додекануклеотид (XXVI) был получен по схеме $(2 + 2) + [(2 + 2) + (2 + 2)]$, а (XLIV) — по схеме $[(1 + 2) + 2] + [(2 + 1) + (2 + 2)]$. Исходными веществами служили полностью N, O, P-защищенные 3'-нуклеотиды, приготовленные из соответствующих N-ацил-5'-диметокситриэтилнуклеозидов и *n*-хлорфенилфосфобистриазолидата в присутствии пиридина; найдено, что пиридин значительно ускоряет реакцию фосфорилирования. В качестве активирующего реагента для межнуклеотидных конденсаций использовали *n*-нитробензолсульфотриазолид. С помощью ^{31}P -ЯМР установлено, что при взаимодействии с NBST хлорфениловые эфиры 3'-нуклеотидов превращаются в соответствующие пирофосфаты и триазолиды, которые являются активными фосфорилирующими промежуточными соединениями в этих конденсациях.

Одной из интересных областей ДНК бактериофага Т7 являются промоторы ранних генов A_1 , A_2 и A_3 , эффективно узнаваемые РНК-полимеразой *E. coli*. Для двух из них, A_2 и A_3 , недавно была определена нуклеотидная последовательность участков связывания РНК-полимеразы [2], но структура сайтов узнавания фермента осталась невыясненной. С целью ее изучения мы предприняли химический синтез додекануклеотидов А-Т-С-Т-Т-А-С-Т-Г-С-А-Т (XXVI) и С-А-Т-С-Г-Т-А-С-С-Г-Г-Г (XLIV), которые содержатся в *n*-цепи промоторов A_2 и A_3 , находясь соответственно на расстоянии 7 и 6 нуклеотидных звеньев перед точкой инициации транскрипции (в районе так называемых боксов Прибова). Благодаря этому они могут служить затравками для ферментативного синтеза с помощью ДНК-полимеразы предшествующей части промотора, в которой расположен сайт узнавания РНК-полимеразы.

Оба додекануклеотида (XXVI) и (XLIV) синтезированы фосфотриэфирным путем по способу Наранга и сотр. [3, 4] с небольшими изменениями методического характера. В качестве исходных веществ (см. схему 1) ис-

* Сообщение XIX см. [1]. Используются обозначения, рекомендованные номенклатурной комиссией IUPAC — IUB, но символ d для краткости везде опущен, так как в статье упоминаются нуклеозиды и нуклеотиды только дезокси-ряда. Другие сокращения: ClPh — *n*-хлорфенил; CNEt — 2-цианэтил; MST — мезитилсульфотриазолид; NBST — *n*-нитробензолсульфотриазолид; SPDE — фосфодиэстераза селезенки [КФ 3.1.4.1]; TEAB — бикарбонат триэтиламония; Trt — сим-триазол-1-ил; VPDE — фосфодиэстераза змеиного яда [КФ 3.1.4.1].

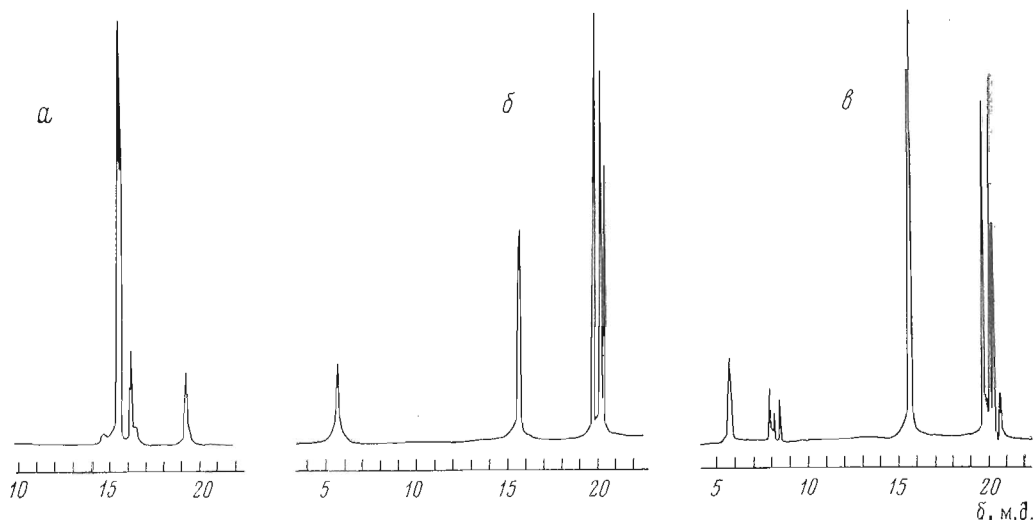
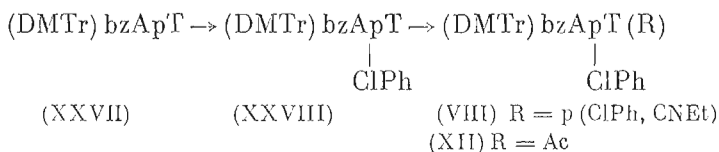


Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР реакционных смесей: *a* — 0,5 ммоль 5'-диметокситриптимидина (Ia) и 0,75 ммоль *n*-хлорфенилфосфобистриазолидата в 3 мл диоксана через 5 ч после смешения; *b* — 0,25 ммоль *n*-хлорфенил-5'-диметокситриптимидилата (Va) и 0,75 ммоль *n*-нитробензолсульфонилтриазолида в 3 мл пиридина через 2 ч; *v* — тот же раствор, что и *b*, но через 16 ч

соединениями и находятся в состоянии динамического равновесия из-за присутствия в реакционном растворе триазола и исходного диэфира (V). В какой степени межнуклеотидная конденсация (V) + (VI) \rightarrow (VII) под действием NBST протекает через стадию образования пиродифосфата (IV) и в какой степени через стадию триазолида (II), должно зависеть от степени электрофильности (по отношению к спиртовой группе) и пространственного экранирования атомов фосфора в этих соединениях. Вероятно, на дальнейших этапах синтеза, по мере увеличения длины нуклеотидной цепи, пространственные эффекты приобретают все большее значение.

Полученные описанным выше способом динуклеотиды (VIII) — (XII) были превращены сначала в тетра-нуклеотиды (XV) — (XXI), затем в октано-нуклеотиды (XXII) и (XXIV) и, наконец, в додекануклеотиды (XXV) и (XXVI), как показано на схеме 2. Динуклеотиды (VIII) и (XII), кроме того, синтезированы другим путем:



В динуклеозидмонофосфате (XXVII) по разработанному ранее методу [6] межнуклеотидная фосфатная группа была этерифицирована *n*-хлорфенолом с помощью NBST или MST. Образовавшийся Р-защищенный динуклеозидфосфат со свободным 3'-гидроксилом (XXVIII) превращен в 3'-ацетат (XII) или подвергнут фосфорилированию посредством *n*-хлорфенилфосфобистриазолидата и затем циантилированию с образованием защищенного динуклеотида (VIII). Несмотря на очевидное достоинство этого пути, в котором оба динуклеотидных блока (VIII) и (XII) получаются из общего предшественника (XXVIII), он оказался менее выгодным, чем синтез по схеме 1, вследствие большей трудоемкости и меньшего суммарного выхода.

Синтез второго додекануклеотида — C-A-T-C-G-T-A-C-C-G-T-G (XLIV) изображен на схеме 3. Если в предыдущем синтезе (схема 2) пук-

леотидные блоки соединялись в последовательности $(2 + 2) + [(2 + 2) + (2 + 2)]$ и один динуклеотид (XIII, обозначен курсивной двойкой) использовался два раза в качестве ОН-компонента — для получения тетра-нуклеотидов (XV) и (XVI), то второй синтез проводился путем $[(1 + 2) + 2] + [(2 + 1) + (2 + 2)]$, причем один и тот же динуклеотид (XXIX, обозначен курсивной двойкой) служил ОН-компонентом для получения пентануклеотида (XXXVIII) и Р-компонентом для получения тетра-нуклеотида (XXXV).

Выделение продуктов межнуклеотидных конденсаций во всех случаях проводили путем адсорбционной хроматографии на силикагеле и полученные вещества использовали далее без дополнительной очистки. Очевидно, что такая хроматография по своей разрешающей способности уступает более длительной и трудоемкой хроматографии Р-незащищенных олигонуклеотидов на DEAE-целлюлозе. Кроме того, Р-защищенные олигонуклеотиды представляют собой многокомпонентные смеси (2^n стереоизомеров, где n — число фосфотриэфирных групп), вследствие чего обычно элюируются в виде широких зон. По этим причинам представлял особый интерес анализ промежуточных и конечных продуктов синтеза после их полного деблокирования.

Для удаления защитных групп продукты межнуклеотидных конденсаций последовательно обрабатывали 30% NH_3 (2 сут, 20°) и 80% уксусной кислотой (20°, 30 мин). При аммонолизе в этих условиях отщепляются все Р-защитные группы (а также О- и N-ацильные), кроме 3'-концевой Р-хлорфенильной группы, которая полностью сохраняется подобно межнуклеотидным фосфодизэфирным связям.

Анализ мономерного состава проводился на стадии 4—5-членных нуклеотидных блоков. Для этого тетра-нуклеотиды (XV) — (XVII) (схема 2) и пентануклеотид (XXVIII) (схема 3) были деблокированы описанным выше способом, образовавшиеся незащищенные олигонуклеотиды (XVIII), (XIX), (XXI) и (XL) выделены анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в линейном градиенте концентрации ТЕАВ и подвергнуты энзиматическому гидролизу. Так как хлорфенилфосфатная группа устойчива к действию фосфодиэстераз, все олигонуклеотиды, содержащие ее, гидролизировали при помощи SPDE и лишь 3'-незащищенный тетра-нуклеотид (XXI) гидролизировали посредством VPDE. Продукты гидролиза разделяли хроматографией на бумаге и определяли спектрофотометрически; результаты анализа представлены в табл. 1.

Более длинные, 7—12-членные, олигонуклеотиды после освобождения от защитных групп хроматографировали на DEAE-целлюлозе в 7 М растворе мочевины сначала при pH 7,5, а затем при pH 3,5. Судя по результатам рехроматографии в тех же условиях, все выделенные таким способом соединения были хроматографически чистыми. В качестве примера на рис. 2 приведены хроматографические профили выделения и очистки конечных додекануклеотидов (XXVI) и (XLIV). Каждый из них вначале содержал значительную примесь октануклеотида (XXIII) или гептануклеотида (XLII), которые в защищенном виде служили ОН-компонентами

Таблица 1

Ферментативный гидролиз олигонуклеотидов

Олигонуклеотид	Фермент	Найдено			
		Ар или рА	Ср или рС	Тр или рТ	С
A ₄ TrCpTp(ClPh) (XVIII)	SPDE	0,87	1,07	1,00	1,05
T ₄ ArCpTp(ClPh) (XIX)	SPDE	0,93	1,00	1,00	
G ₄ CpApT (XXI)	VPDE	0,89	1,00	1,00	
C ₄ ApTpCpGp(ClPh) (XL)	SPDE	0,89	1,96	1,00	

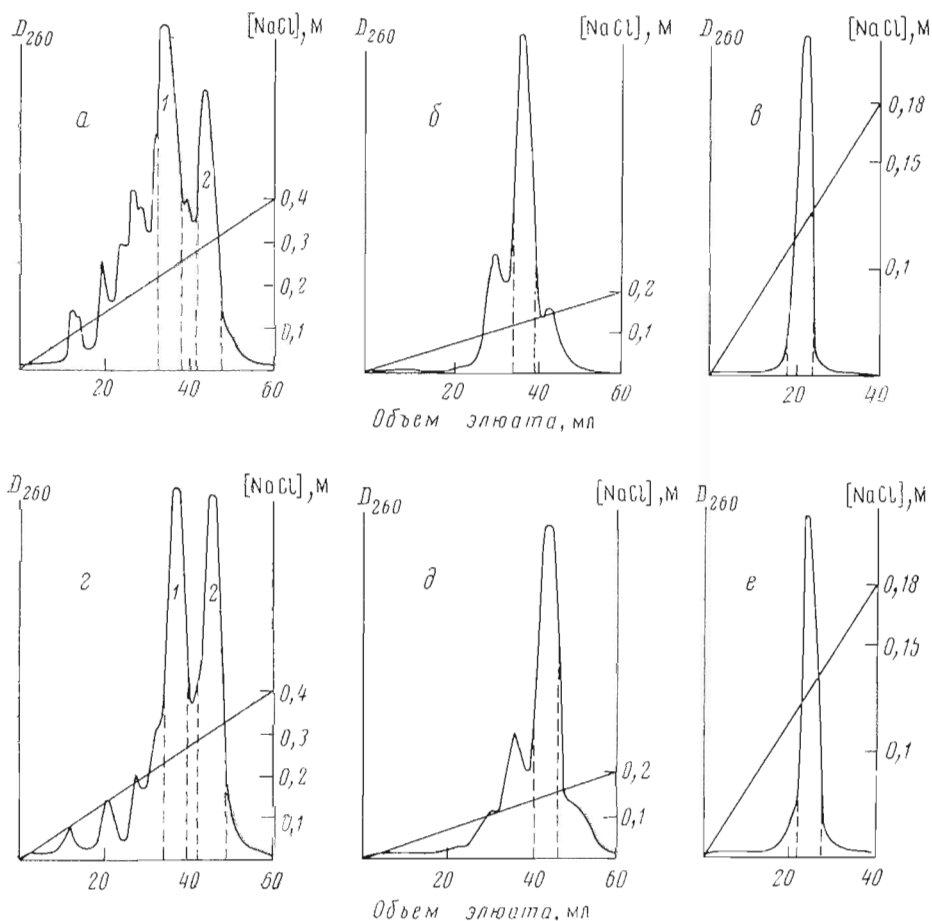


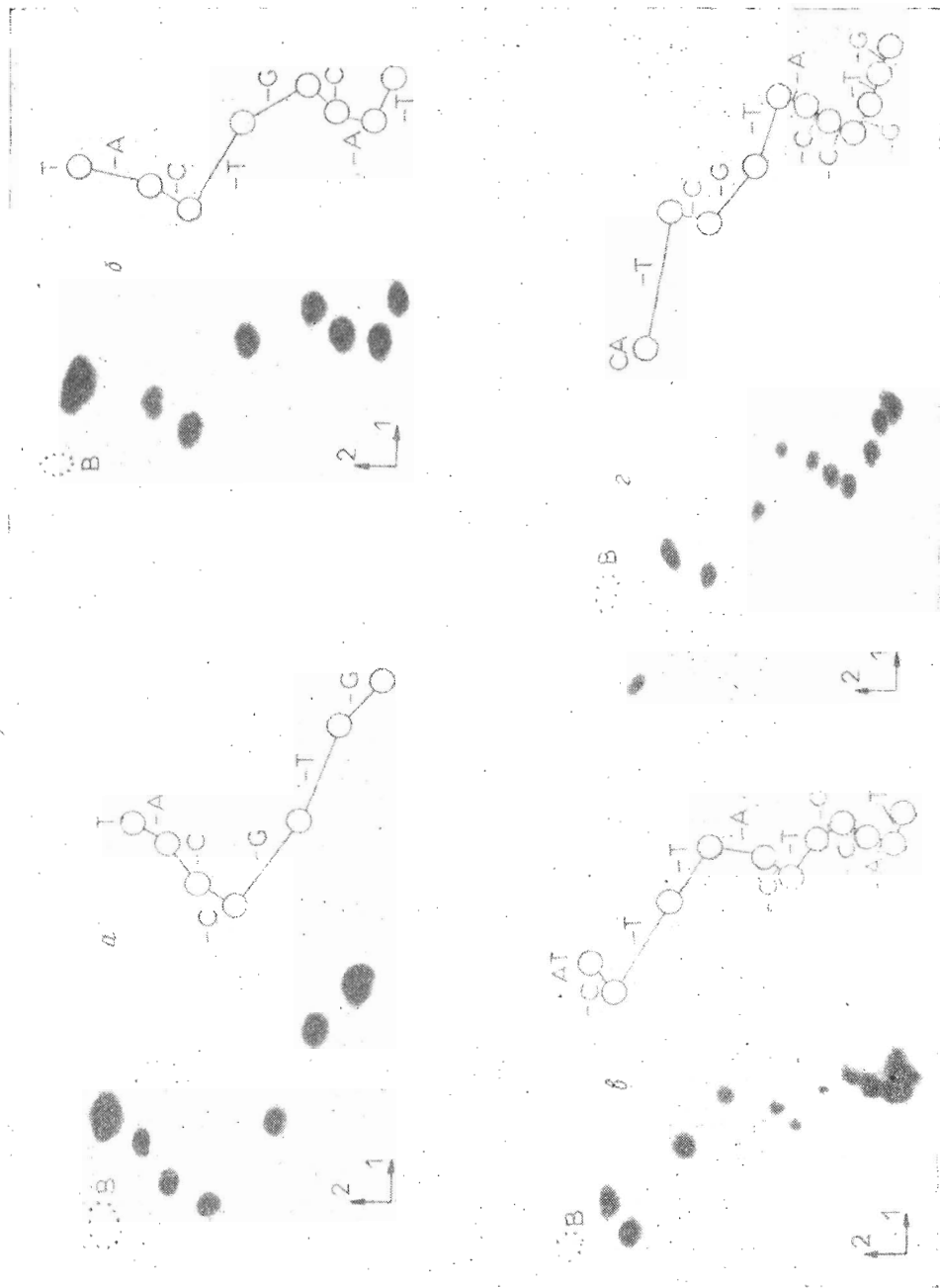
Рис. 2. Хроматография додекануклеотидов (XXVI) и (XLIV) на DEAE-целлюлозе (Cl^- , 4×200 мм) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеине, скорость элюции 0,3 мл/мин: а — выделение додекануклеотида (XXVI), 0,02 М трис-HCl, pH 7,5; фракции содержат: 1 — 38 ОЕ₂₆₀ октануклеотида (XXIII), 2 — 20 ОЕ₂₆₀ додекануклеотида (XXVI); б — очистка фракции 2 из опыта «а» при pH 3,5; центральная часть пика содержит 14 ОЕ₂₆₀ додекануклеотида (XXVI); в — выделение додекануклеотида (XLIV) в условиях опыта «а»; фракции содержат: 1 — 23 ОЕ₂₆₀ гентауклеотида (XLI), 2 — 19 ОЕ₂₆₀ додекануклеотида (XLIV); г — очистка фракции 2 из опыта «г» при pH 3,5; е — рехроматография отмеченной пунктиром фракции из опыта «д» при pH 3,5; центральная часть пика содержит 14 ОЕ₂₆₀ додекануклеотида (XLIV)

(XXII) и (XLI) для межнуклеотидной конденсации на предшествующей стадии синтеза и не смогли быть отделены адсорбционной хроматографией от продуктов конденсации — соответствующих полностью защищенных додекануклеотидов (XXV) и (XLIII).

Для подтверждения чистоты и доказательства нуклеотидной последовательности рептануклеотид (XLII), октануклеотид (XXIII) и додекануклеотиды (XXVI) и (XLIV) были 5'-фосфорилированы действием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и T4 полинуклеотидкиназы. Образовавшиеся 5'-меченые олигонуклеотиды $[\text{}^{32}\text{P}]\text{p}$ -(XLII), $[\text{}^{32}\text{P}]\text{p}$ -(XXIII), $[\text{}^{32}\text{P}]\text{p}$ -(XXVI) и $[\text{}^{32}\text{P}]\text{p}$ -(XLIV) были подвергнуты частичному гидролизу при помощи VPDE с последующим двухмерным разделением посредством электрофореза и гомохроматографии. Полученные нуклеотидные карты (рис. 3) интерпретированы в соответствии с известными правилами [8].

Оценивая на основании результатов этой работы достоинства фосфотриэфирного метода получения олигонуклеотидов по Нарангу в сравнении

Рис. 3. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза олигонуклеотидов с помощью VPDE: *a* — [³²P]p-(XLII), *б* — [³²P]p-(XXIII), *в* — [³²P]p-(XXVI), *г* — [³²P]p-(XLIV). Направление 1 — электрофорез на ацетилцеллюлозе при pH 3,5 (5000 В); направление 2 — гомохроматография на пластинках (20 × 20 × 0,02 см) DEAE-целлюлозы, гомомесь В. В — положение красителя-маркера ксиленианола FF



с традиционным фосфодиэфирным методом Кораны, можно заключить, что фосфотриэфирный метод более удобен — требует меньших затрат труда, времени и исходного нуклеотидного материала, приводя в конечном итоге к препаратам, которые по обычным критериям являются достаточно чистыми (см. рис. 2в, е и 3в, г).

Экспериментальная часть

Общие сведения об эксперименте см. [1]. В работе использованы дезоксирибонуклеозиды производства фирмы «Reanal». 5'-Диметокситритил-N-бензоил (или-ацетил)нуклеозиды получены по методу [7]. Для хроматографии на колонках использовали силикагель марки Silicagel L 100—160 (Chemapol, СССР), для ТСХ — Silufol UV₂₅₁ (Chemapol). Хлороформные экстракты сушили безводным Na₂SO₄.

1. *Получение защищенных 3'-моонуклеотидов. (DMTr)acGp(ClPh, CNEt) (IIIг).* Раствор *n*-хлорфенилфосфобистриазолидата, приготовленный из 1,17 г (4,76 ммоль) (ClPh)OPOCl₂ и 0,7 г (10,16 ммоль) *сис*-триазола в 12 мл диоксана и 0,96 г (9,5 ммоль) триэтиламина, фильтровали без доступа влаги в раствор 1,46 г (2,38 ммоль) (DMTr)acG (Iг) в 2,5 мл пиридина. Через 15 мин, когда ТСХ (хлороформ — метанол, 9 : 1) показывала отсутствие исходного нуклеозида, прибавляли 2,4 г (34 ммоль) цианэтанола. Смесь выдерживали 1,5 ч при 20°, охлаждали до 0° и приливали 5 мл 50% водного пиридина. Через 1 ч растворители отгоняли, вязкий остаток растворяли в 50 мл хлороформа, трижды промывали 0,1 М ТЕАВ и водой, высушивали и упаривали, удаляя следы пиридина отгонкой с толуолом. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (70 мл), элюируя смесями хлороформ — метанол в соотношении от 99 : 1 до 96 : 4. Из фракции, содержащей 3% MeOH, получили 1,47 г (72%) соединения (IIIг); λ_{макс} 262, 278 нм (ε 18 000, 16 900).

При проведении реакции в тех же условиях в отсутствие пиридина выход продукта (IIIг) составлял 55—60%; по данным ТСХ, фосфорилирование заканчивалось лишь через 6 ч, а цианэтирование — через 20 ч.

Аналогично получены:

(DMTr)Tp(ClPh, CNEt) (IIIа) из 1,64 г (3,11 ммоль) (DMTr)T (Iа) с выходом 89%. λ_{макс} 267 нм (ε 11 000);

(DMTr)bzCp(ClPh, CNEt) (IIIб) из 2,11 г (3,34 ммоль) (DMTr)bzC (Iб) с выходом 93%. λ_{макс} 261, 305 нм (ε 20 900, 9250).

(DMTr)bzAp(ClPh, CNEt) (IIIв) из 1,7 г (2,59 ммоль) (DMTr)bzA (Iв) с выходом 90%. λ_{макс} 280 нм (ε 20 100).

2. *Удаление О-защитной диметокситритильной группы. а. Из соединений, не содержащих bzA.* Раствор 0,5 ммоль соединений (IIIа), (IIIб) или (IIIг) в 8 мл 80% AcOH выдерживали 30 мин при 20° и упаривали в вакууме при температуре не выше 30°. Остатки AcOH отгоняли с толуолом, продукт детритилирования выделяли хроматографией на колонке с силикагелем (40 мл) в системе метанол — хлороформ. Выход 85—90%.

б. *Из bzA-содержащих соединений.* Раствор 0,5 ммоль моонуклеотида (IIIв) в 2 мл метанола смешивали с 8 мл 80% AcOH, выдерживали 50 мин при 20° и обрабатывали, как в опыте 2а. Выход 75%.

3. *Удаление Р-защитной цианэтильной группы.* К раствору 0,5 ммоль соединения (III) в 20 мл диоксана при перемешивании приливали 5 мл 0,5 н. NaOH. Через 45 с реакционную смесь нейтрализовали, прибавляя 5 мл дауэкса-50 (Py⁺), раствор фильтровали и с помощью ТСХ проверяли отсутствие Р-цианэтилового эфира (если он присутствовал, то обработку щелочью повторяли). Фильтрат упаривали несколько раз с пиридином и остаток использовали в качестве Р-компонента для межнуклеотидной конденсации.

4. *Фосфотриэфирная межнуклеотидная конденсация.* Смесь 0,76 ммоль Р-компонента [например, соединение (V)] и 0,66 ммоль ОН-компо-

Таблица 2

Межнуклеотидные конденсации

Р-Компонент *		ОН-Компонент *		Время, сут	Формула	Выход, %	M _{OH} в %
Структура и формула	Мкмоль	Структура и формула	Мкмоль				
(DMTr)Tp (CNEt) (IIIa)	1000	асG (Ac)	920	2	(XXX)	38	3
(DMTr)Tp (CNEt) (IIIa)	510	BzAp (CNEt) (VIb)	420	2	(X)	69	3
(DMTr)bzCp (CNEt) (III6)	1100	Tr (CNEt) (VIa)	1000	2	(IX)	61	3
(DMTr)bzCp (CNEt) (III6)	850	асGp (CNEt) (VIr)	790	2	(XXIX)	38	5
(DMTr)bzAp (CNEt) (IIIb)	730	T (Ac)	630	2	(XII)	73	3
(DMTr)bzAp (CNEt) (IIIb)	1000	Tr (CNEt) (VIa)	880	2	(VIII)	76	4
(DMTr)acGp (CNEt) (IIIr)	760	BzCp (CNEt) (VI6)	660	2	(XI)	82	5
(DMTr)bzCp (CNEt) (III6)	140	BzApTr (CNEt) (XXXI)	130	2	(XXXII)	47	3
(DMTr)TpBzAp (CNEt) (X)	110	BzCp (CNEt) (VI6)	100	2	(XXXIV)	63	3
(DMTr)bzApTr (CNEt) (VIII)	200	BzCpTr (CNEt) (XIII)	190	2	(XXV)	70	4
(DMTr)TpBzAp (CNEt) (X)	200	BzCpTr (CNEt) (XIII)	170	2	(XXVI)	41	5
(DMTr)acGpbzCp (CNEt) (XI)	220	BzApTr (Ac) (XIV)	190	2	(XVII)	67	4
(DMTr)bzCpbzApTr (CNEt) (XXXIII)	52	BzCpAcGp (CNEt) (XXXVI)	43	2	(XXXVIII)	38	5
(DMTr)TpBzApbzCp (CNEt) (XXXIV)	51	BzCpAcGpTrAcG (Ac) (XXXVII)	43	3	(XXXIX)	42	8
(DMTr)TpBzApbzCpTr (CNEt) (XVI)	66	асGpbzCpbzApTr (Ac) (XX)	61	3	(XXII)	33	7
(DMTr)bzApTrbzCpTr (CNEt) (XV)	5,5	TrbzApbzCpTrAcGpbzCpbzApTr (Ac) (XXIV)	4,6	4	(XXVI)	5 ***	
(DMTr)bzCpbzApTrbzCpAcGp (CNEt) (XXXVIII)	2,5	TrbzApbzCpbzCpAcGpTrAcG (Ac) (XLI)	2,5	4	(XLIV)	5 ***	

* p — п-хлорофенилфосфатная группа PO₂(ClPh).

** Элемент при выплении хроматографией на силикагеле.

*** Выход дидекануклеотида после удаления всех защитных групп и очистки, указанной в тексте и на рис. 2.

нента упаривали 3 раза с абс. пиридином для удаления следов воды. Прибавляли 2 ммоль NBST в 20 мл пиридина, раствор концентрировали до объема 2 мл и оставляли на 2 сут при 20°. Затем при 0° прибавляли 1,5 мл 50% водного пиридина, выдерживали 1 ч при 20° и упаривали. Остаток растворяли в хлороформе, трижды промывали 0,1 М ТЕАВ (рН 7,5) и водой, высушивали и упаривали, причем пиридин полностью удаляли отгонкой с толуолом. Продукт конденсации выделяли на колонке с силикагелем (70 мл), элюируя раствором метанола в хлороформе. Результаты проведенных конденсаций представлены в табл. 2.

5. *Получение динуклеотидов (VIII) и (XII) через стадию фосфодиэфирной конденсации. а. (DMTr)bzApT(XXVII)*. 250 мг (0,38 ммоль) (DMTr)·bzA (Iв) и 254 мг (0,57 ммоль) рТ (Ac) упаривали 3 раза с абс. пиридином, прибавляли 295 мг (1,14 ммоль) NBST в 5 мл пиридина, раствор концентрировали до объема 2 мл и оставляли на 2 сут при 20°. Затем прибавляли 2 мл 50% водного пиридина, выдерживали 1 ч при 20° и упаривали. Остаток растворяли в хлороформе, экстрагировали 0,2 М ТЕАВ (рН 7,5), промывали водой и высушивали. Полученный после упаривания хлороформ-ма маслообразный остаток растворяли в 4 мл пиридина, охлаждали до 0° и при перемешивании приливали 4 мл 2 н. NaOH. Через 10 мин смесь нейтрализовали, прибавляя 10 мл дауэкса-50 (Р⁺), раствор фильтровали и упаривали. После переосаждения из пиридина эфиром получили (XXVII) с выходом 63%; $\lambda_{\text{макс}}$ 278 нм (ϵ 30 600).

б. *(DMTr)bzAp(CIPh)T(XXVIII)*. Раствор 162 мг (0,15 ммоль) динуклеозидфосфата (XXVII), 192 мг (1,2 ммоль) *n*-хлорфенола и 254 мг (1,0 ммоль) NBST или 301 мг (1,2 ммоль) MST в 5 мл сухого пиридина выдерживали 60 ч при 20°. Реакционную смесь разлагали и обрабатывали по методике 4. В результате хроматографии на колонке с силикагелем выделили 90 мг (56%) Р-защитенного динуклеозидфосфата (XXVIII); $\lambda_{\text{макс}}$ 278 нм (ϵ 31 500).

в. *(DMTr)bzAp(CIPh)Tp(CIPh, CNEt)(VIII)*. 280 мг (0,26 ммоль) соединения (XXVIII) в условиях опыта 1 фосфорилировали *n*-хлорфенилфосфобистриазолидатом, приготовленным из 148 мг (0,6 ммоль) (CIPh)OPOCl₂, а затем цианэтилировали 105 мг (1,5 ммоль) цианэтанолола. Выход защищенного динуклеотида (VIII) 225 мг (66%).

г. *(DMTr)bzAp(CIPh)T(Ac)(XII)*. Раствор 200 мг (0,187) ммоль Р-защитенного динуклеозидфосфата (XXVIII) в 4 мл пиридина и 1 мл As₂O выдерживали 16 ч при 20°, охлаждали, прибавляли 5 мл метанола и оставляли при 5°. Через 5 ч упаривали, обрабатывали обычным способом и хроматографировали на колонке с силикагелем. Выход 3'-ацетата (XII) 156 мг (75%).

б. *Удаление всех защитных групп (кроме концевой Р-хлорфенильной)*. Раствор 3 мг полностью защищенного олигонуклеотида в 10 мл 30% аммиака выдерживали в закрытой колбе 2 сут при 20°, упаривали досуха, остаток растворяли в 5 мл 80% уксусной кислоты и выдерживали 30 мин при 20°. Уксусную кислоту отгоняли, остаток растворяли в воде и снова упаривали. Полученное вещество хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой в градиенте концентрации ТЕАВ или NaCl в 7 М моче-вине, рН 7,5.

7. *Ферментативный гидролиз*. К 5 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида в 7 мкл воды прибавляли 5 мкл 0,4 М аммоний-ацетатного буфера (рН 6,8) и 8 мкл раствора SPDE (5 мг/мл). Смесь инкубировали 3 ч при 37° и хроматографировали на бумаге Ватман № 1 в системе (NH₄)₂SO₄ — 1 М AcOH — изо-PrOH, 40 : 6 : 1. Мононуклеотиды элюировали 0,01 н. HCl из соответствующих зон и определяли спектрофотометрически.

Гидролиз с помощью VPDE проводили, как описано ранее [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Чахмахчева О. Г., Шингарова Л. Н. (1978) Биоргани. химия, 4, 208—219.
2. Pribnow D. (1975) J. Mol. Biol., 99, 419—443.
3. Itakura K., Katagiri N., Narang S. A. (1975) J. Biol. Chem., 250, 4592—4600.
4. Katagiri N., Itakura K., Narang S. A. (1975) J. Amer. Chem. Soc., 97, 7332—7337.
5. Knorre D. G., Lebedev A. V., Zarytova V. F. (1976) Nucleic Acids Res., 3, 1401—1418.
6. Быстров Н. С., Добрынин В. Н., Колосов М. Н., Чернов Б. К. (1976) Биоргани. химия, 2, 1271—1272.
7. Schaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 3821—3841; (1965) J. Amer. Chem. Soc., 87, 2988—2995.
8. Jay E., Bambara R., Padmana Chan P., Wu R. (1974) Nucleic Acids Res., 1, 331—353.
9. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) Биохимия, 39, 747—751.

Поступила в редакцию
13.IX.1977

SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES. XX. THE SYNTHESIS OF DODECADEOXYNUCLEOTIDES ATCTTACTGCGAT AND CATCGTACCGTG BY PHOSPHOTRIESTER APPROACH

DOBRYNIN V. N., BOLDYREVA E. F., BYSTROV N. A.,
SEVERTSOVA I. V., CHERNOV B. K., KOLOSOV M. N.

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

Dodecadeoxynucleotides A-T-C-T-T-A-C-T-G-C-A-T (XXVI) and C-A-T-C-G-T-A-C-C-G-T-G (XLIV) have been synthesized. These sequences are the constituents of the A_2 and A_3 promoters of T7 bacteriophage DNA. The phosphotriester approach proposed by Narang et al. was employed and the syntheses of (XXVI) and (XLIV) were carried out according to the schemes $(2 + 2) + [(2 + 2) + (2 + 2)]$ and $[(1 + 2) + 2] + [(2 + 1) + (2 + 2)]$, respectively. As starting compounds served completely N, O, P-protected 3'-nucleotides prepared by phosphorylation of appropriate N-acyl-5'-dimethoxytrityl nucleosides with *p*-chlorophenyl phosphobistriazolidate in the presence of pyridine which was found to significantly accelerate the reaction. For internucleotide condensations *p*-nitrobenzenesulphonyltriazolide (NBST) was used as a coupling reagent. This compound was shown by ^{31}P -NMR to transform chlorophenyl nucleoside-3'-phosphates into corresponding pyrophosphates and triazolides, which are probably the active phosphorylating intermediates in these condensations.