



УДК 547.963.32.07 + 542.953.2

СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

XXI. ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ДВУХ ДОДЕКАНУКЛЕОТИДОВ,
КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ 5'-КОНЦЕВОМУ УЧАСТКУ 16S-рРНК *E. COLI**

Берлин Ю. А., Винogradov С. В., Колосов М. Н.

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

Осуществлен химический синтез додекануклеотидов d(C-A-A-A-C-T-T-C-T-C-A)-гА и d(C-A-A-A-C-T-C-T-T-C-A)-гА, комплементарных 5'-концевому участку 4—15 16S-рРНК *E. coli*, и их структура доказана с помощью нуклеотидных карт. Синтезированные олигонуклеотиды образуют специфические комплексы с 16S-рРНК *E. coli* и могут быть использованы в качестве праймеров при изучении первичной структуры участков бактериального генома.

Структура рибосомных оперонов *E. coli* представляет значительный интерес в рамках развития представлений о механизме транскрипции у прокариот. Известно, что каждая из нескольких транскрипционных единиц этого генома, кодирующих рибосомные РНК, содержит по одному структурному гену соответствующей рРНК (в последовательности 16S, 23S и 5S), которые разделены спейсерными участками [2]. Для изучения первичной структуры этих участков бактериального генома, а также участка, предшествующего структурному гену 16S-рРНК и, вероятно, участка, предшествующего транскрипции оперона рРНК, мы предприняли синтез ряда олигонуклеотидов, комплементарных 5'-концевым сегментам рибосомных РНК и, следовательно, соответствующих смысловым последовательностям ДНК. В данной работе описан химический синтез двух додекануклеотидов (I) и (II), комплементарных 5'-концевому сегменту 4—15 16S-рРНК *E. coli* и содержащих 3'-концевое рибо-звено (см. схему 1); гетерогенность этой РНК [3], по-видимому, отражает наличие нескольких природных последовательностей, синтезируемых различными оперонами.

Синтез додекануклеотидов (I) и (II) был осуществлен фосфодиэфирным методом с использованием традиционных защитных групп и конденсирующих реагентов (см. обзор [4]), исходя из 5'-О-монометокситригидро-N-анизонилдезокситидина в качестве 5'-концевого звена; нуклеотидную цепь наращивали сначала мононуклеотидами (до стадии тетрануклеотида), а затем последовательно ди- и тетрануклеотидными блоками (см. схему 2). 5'-Концевой тетрануклеотид (V) был синтезирован не только ступенчатым

* Сообщение XX см. [1]. В синтезе, за исключением 3'-концевой рибоадениловой кислоты, использовались только дезоксирибонуклеотиды, поэтому префикс d перед формулами олигонуклеотидов опущен. Нестандартные сокращения: TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид; TEAB — бикарбонат триэтиламония.

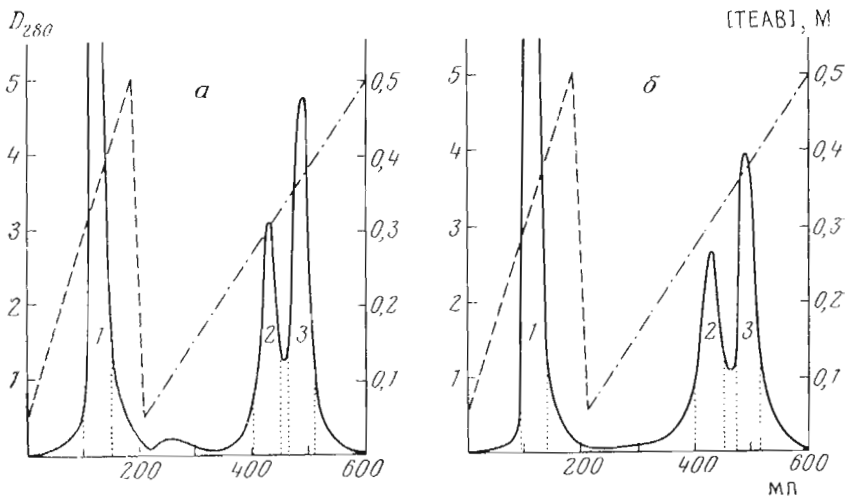


Рис. 1. Выделение защищенных додекануклеотидов (X) и (XI) хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , $1,5 \times 17$ см) в градиенте концентрации TEAB в воде (пунктир) и в 50% спирте (штрихпунктир). *a* — пик 1 содержит 656 OE_{280} тетра-нуклеотида (IX), пик 2 — 132 OE_{280} октануклеотида (VII), пик 3 — 226 OE_{280} доде-кануклеотида (X); *б* — пик 1 содержит 647 OE_{280} тетра-нуклеотида (IX), пик 2 — 128 OE_{280} октануклеотида (VII), пик 3 — 196 OE_{280} додекануклеотида (XI)

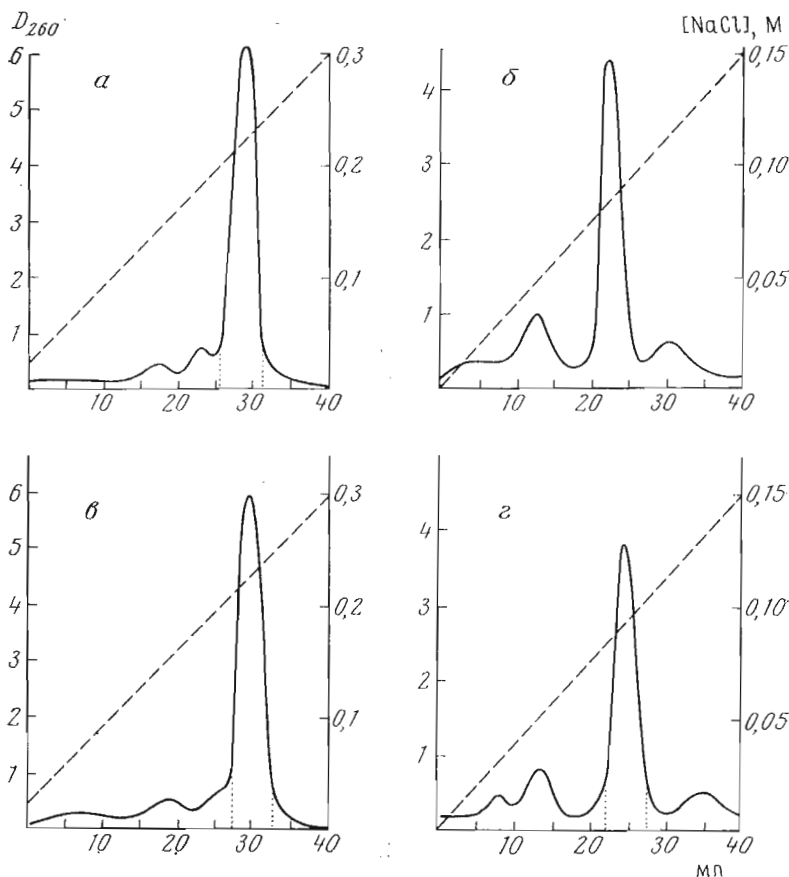


Рис. 2. Выделение незащищенных додекануклеотидов (I) и (II) хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^- , $0,4 \times 12$ см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины, сначала в нейтральном, а затем в кислом растворе. *a* — 0,02 М трис-HCl, pH 7,5, основной пик содержит 20,6 OE_{260} (I); *б* — HCl (pH 3,5), 11,8 OE_{260} (I); *в* — 0,02 М трис-HCl (pH 7,5), 18,5 OE_{260} (II); *г* — HCl (pH 3,5), 10,3 OE_{260} (II)

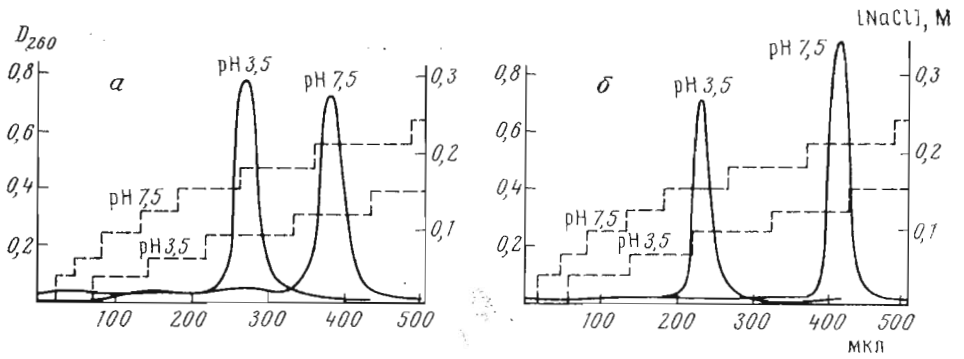


Рис. 3. Микроколоночная хроматография на DEAE-целлюлозе (Cl^- , объем 25 мкл) в ступенчатом градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины в 0,02 М трис- HCl , pH 7,5, или в HCl , pH 3,5. а — додекануклеотид (I), б — додекануклеотид (II)

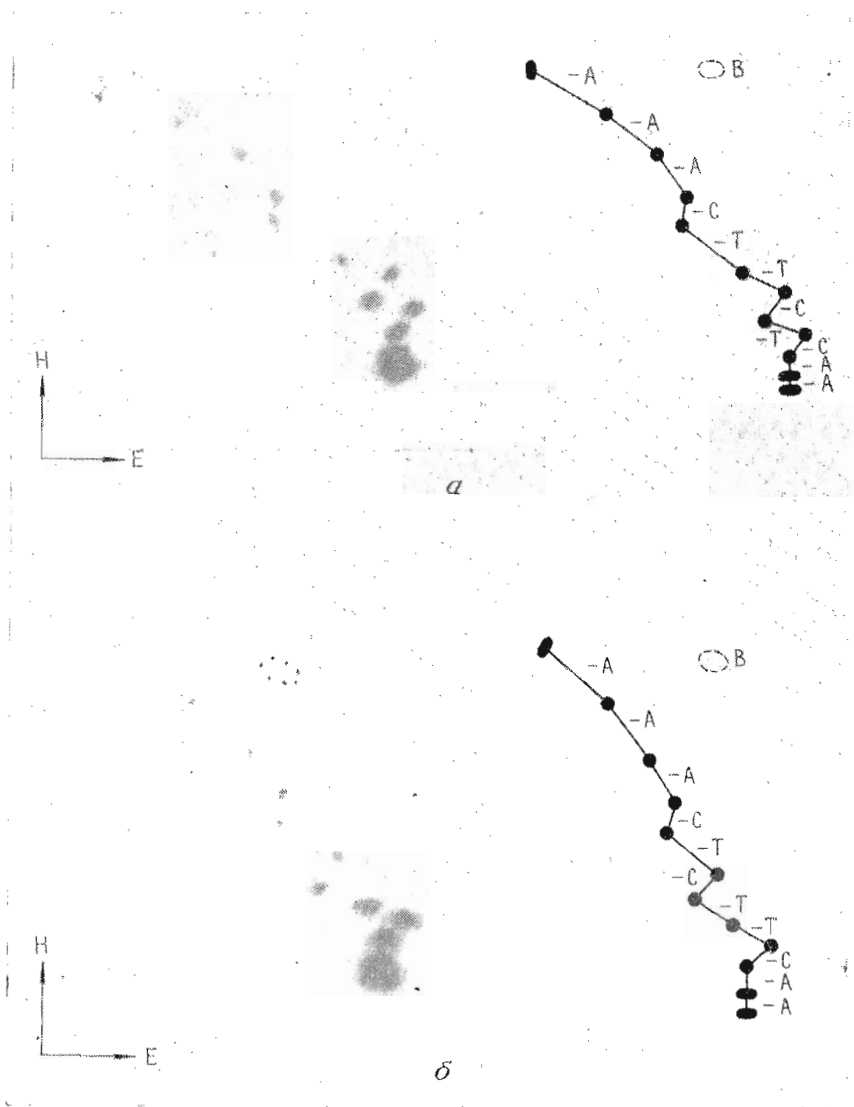


Рис. 4. Нуклеотидные карты додекануклеотидов (I) (а) и (II) (б). Е — электрофорез на ацетилцеллюлозе, Н — гомохроматография, В — положение красителя бромфенолового синего

Таблица 1

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\lambda_{\text{мин}}$, нм	$\epsilon_{250}/\epsilon_{260}$	$\epsilon_{270}/\epsilon_{280}$	$\epsilon_{280}/\epsilon_{300}$	$\epsilon_{280}/\epsilon_{340}$	$\epsilon_{280}/\epsilon_{360}$	$\epsilon_{280}/\epsilon_{400}$	R _{pT} в системах			Нуклеотидный состав							
									А	Б	В	С	рА	рС	рТ	рГ			
(MeOTr) anC-bzA (III)	285	256	1,02	1,15	1,50	1,55	1,28												
C-A	263	236	0,83	0,91	0,53	0,23													
(MeOTr) anC-bzA-bzA (IV)	283	251	1,17	1,53	1,49	1,49	1,12												
C-A-A	261	232	0,80	0,80	0,33	0,10													
(MeOTr) anC-bzA-bzA (V)	283	250	0,97	1,15	1,54	1,47	1,07												
C-A-A-A	261	235	0,82	0,90	0,56	0,24													
panC-T	277, 303	239	1,19	0,78	1,20	1,25	1,20												
pC-T	270	244	0,80	1,18	0,92	0,40													
(MeOTr) anC-bzA-bzA-anC-T (VI)	284	247	0,91	1,18	1,45	1,35	1,05												
C-A-A-C-T *	262	238	0,80	0,92	0,58	0,19													
pT-anC	275, 303	239	1,12	0,76	1,20	1,19	1,11												
pT-C	270	242	0,76	1,18	0,92	0,35													
(MeOTr) anC-bzA-bzA-anC-T-anC (VII)	283	247	0,89	1,17	1,40	1,31	1,05												
C-A-A-C-T-T-C *	262	239	0,82	0,94	0,60	0,22													
(MeOTr) anC-bzA-bzA-anC-T-anC-T (VIII)	282	247	0,89	1,15	1,39	1,28	1,03												
C-A-A-C-T-C-T *	262	239	0,83	0,94	0,60	0,23													
pBzA-rbzA	281	247	0,92	1,17	1,59	1,38	0,77												
pA-rA	259	238	0,83	0,76	0,47	0,11													
pT-anC-bzA-rbzA (IX)	282	249	0,86	1,16	1,40	1,26	0,91												
pT-C-A-rA	262	236	0,78	0,90	0,59	0,21													
(MeOTr) anC-bzA-bzA-anC-T-anC-T-anC-bzA-rbzA (X)	282	249	0,90	1,16	1,37	1,27	0,99												
C-A-A-C-T-T-C-T-C-A-rA (I) *	263	235	0,80	0,93	0,59	0,20													
(MeOTr) anC-bzA-bzA-anC-T-anC-T-anC-bzA-rbzA (XI)	282	249	0,89	1,15	1,37	1,26	0,97												
C-A-A-C-T-T-C-T-C-A-rA (II) *	262	236	0,80	0,94	0,59	0,21													

* Состав определен на основании нуклеотидной карты данного олигонуклеотида.

Гибридизация додекануклеотидов (I) и (II) с 16S- и 23S-рРНК *E. coli*

№	5'- ³² P-меченый олигонуклеотид, пмоль	рРНК, пмоль *	Молярное соотношение олигонуклеотид — рРНК	Радиоактивность высокомолекулярной фракции, имп/мин **	Связывание олигонуклеотида с рРНК, %
1	(p-I), 36	16S (6)	6	520	3
2	(p-I), 400	16S (8)	50	9340	26
3	(p-I), 80	16S (8)	10	1550	13
4	(p-I), 200	16S (4)	50	11810	64
5	(p-I), 800	16S (8)	100	9130	76
6	(p-I), 400	16S (1,8)	222	4500	87
7	(p-I), 400	23S (8)	50	840	2
8	(p-II), 400	16S (8)	50	2820	20
9	(p-II), 200	16S (4)	50	4850	67
10	(p-II), 400	23S (8)	50	470	3
11	(p-II), 200	23S (4)	50	820	7

* Рассчитано исходя из величин ϵ_{260} $1,65 \cdot 10^7$ для 16S- и $2,53 \cdot 10^7$ для 23S-рРНК при pH 7. В опытах 3 — 6, 9 и 11 инкубационная смесь содержала 0,5 М NaCl.

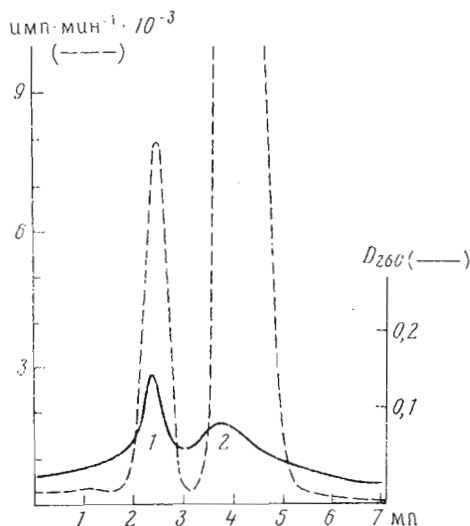
** Удельная радиоактивность исходного [³²P](p-I) составляла 1500 (оп. 3 и 5), 3140 (оп. 1 и 6) и 4590 (оп. 2, 4 и 6) имп/мин·пмоль, а [³²P](p-II) — 1800 (оп. 8 — 10) и 3000 (оп. 11) имп/мин·пмоль.

дов (рис. 4) (ср. [7]). Додекануклеотиды (X) и (XI), представляющие собой конечные продукты синтеза, были полностью деблокированы, и незащищенные олигонуклеотиды (I) и (II) очищены анионообменной хроматографией в градиенте концентрации хлористого натрия в 7 М мочевины сначала при pH 7,5, а затем при pH 3,5 (рис. 2). Индивидуальность этих соединений была доказана микроколоночной хроматографией в аналогичных условиях (рис. 3). Дополнительное доказательство индивидуальности, а также подтверждение первичных структур (I) и (II) были получены с помощью ферментативного 5'-³²P-фосфорилирования этих соединений и последующего частичного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда; смеси продуктов гидролиза разделяли электрофорезом на ацетилцеллюлозе и гомохроматографией во взаимно перпендикулярных направлениях и полученные нуклеотидные карты (рис. 4) интерпретировали согласно работе [8]. Свойства синтезированных олигонуклеотидов приведены в табл. 1.

Была изучена способность додекануклеотидов (I) и (II) гибридизоваться с 16 S-рРНК *E. coli*. Для этого смесь рРНК и 5'-³²P-меченого олигонуклеотида подвергали отжигу и образовавшийся комплекс выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-100, определяя степень связывания по количеству радиоактивности в высокомолекулярной фракции (см. табл. 2, рис. 5). Отжиг при 65° даже при больших молярных избытках олигонуклеотида относительно рРНК приводил к низкой величине гибридизации (~5%), что может быть связано с наличием на 5'-конце 16 S-рРНК шпильчатой структуры [3]. Лучшие результаты были получены при температуре отжига 85°, при которой заканчивается разрушение вторичной структуры 16S-рРНК, и высокой ионной силе (ср. [9]). Заметных различий между додекануклеотидами (I) и (II) в степени комплексообразования с 16S-рРНК обнаружено не было. Оба олигонуклеотида в этих условиях практически не связывались с 23S-рРНК, что свидетельствует о структурной специфичности комплексообразования.

Олигонуклеотиды (I) и (II) могут быть использованы для структурно-аналитического исследования оперонов рРНК *E. coli* в качестве праймеров в системе ДНК-зависимого синтеза одноцепочечной ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой I или A (см., например, [10]), или же в качестве носителей реагентов, избирательно модифицирующих соответствующие участки генома или транскриптов; наличие рибо-звена на 3'-конце

Рис. 5. Выделение комплекса додекануклеотида $[^{32}\text{P}](\text{p-I})$ с 16S-рРНК гель-фильтрацией на сефадексе G-100 при 4° в ТМЕ-буфере, содержащем 0,5 М NaOH. Реакционная смесь содержала 0,26 OE_{260} 16S-рРНК, 0,11 OE_{260} $[^{32}\text{P}](\text{p-I})$ ($1,2 \cdot 10^6$ имп/мин, молярное отношение олигонуклеотид — рРНК = 50) и 25 мкмоль NaCl в ТМЕ-буфере. Пик 1 — $[^{32}\text{P}](\text{p-I})$ (14700 имп/мин, связанный с 16S-рРНК (комплексобразование 61%), пик 2 — избыточный $[^{32}\text{P}](\text{p-I})$



олигонуклеотида позволяет легко отщепить праймер после элонгации от вновь синтезированного фрагмента (щелочным или РНКазным гидролизом) или же ввести по этому звену нужный модифицирующий реагент.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксирибонуклеотиды (pT, paпC и pbzA) производства НИОХ СО АН СССР (Новосибирск), предварительно очищенные с помощью анионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе А-25 (HCO_3^-). (MeOTr)anC синтезировали из нуклеозида [11], а rpbzA — из рибоадениловой кислоты [12]. Для введения CNet- и Ac-групп пользовались методиками, приведенными в работе [11]. TPS (Merck) непосредственно перед использованием перекристаллизовывали из пентана. Общие условия эксперимента приведены в работе [13]. БХ проводили на бумаге FN-17 в системах: (А) этанол — 1М ацетат аммония (pH 7,5), 7 : 3; (Б) *n*-пропанол — 25% водный NH_3 — вода, 55 : 10 : 35; ТСХ — на пластинках с силикагелем (Eastman Kodak) в системе (В) ацетонитрил — вода, 8 : 2. Суммарную рРНК выделили из фракции рибосом *E. coli* MRE-600 по методу [14] с фенолом и додецилсульфатом натрия и разделили на индивидуальные 5S-, 16S- и 23S-рРНК хроматографией на кизельгуре, покрытом метилированным альбумином [15].

1. (MeOTr)anC-bzA (III). Смесь 4,31 г (6 ммоль) (MeOTr)anC и 6,13 г (11 ммоль) rpbzA(Ac) высушили пятикратным упариванием с пиридином, прибавили 6,8 г (22,5 ммоль) TPS, раствор сконцентрировали до объема 40 мл и выдержали 5 ч при 20° . Смесь охладили, обработали 45 мл 1 М раствора диизопропилэтиламина в пиридине, 90 мл воды (16 ч, 4°) и упарили с пиридином. Остаток растворили в 250 мл 0,2 М ТЕАВ, проэкстрагировали эфиром (5 × 250 мл) для удаления сульфокислоты и нецореагировавшего нуклеозида, смесью эфир — этилацетат, 1 : 1 (250 мл), для извлечения оставшегося нуклеозида, после чего продукт конденсации извлекли смесью этилацетат — *n*-бутанол, 19 : 1 (4 × 250 мл) и 9 : 1 (250 мл), контролируя ход экстракции с помощью ТСХ в системе ацетонитрил — вода, 9 : 1. Объединенный экстракт упарили с пиридином, растворили в смеси пиридин — этанол (1 : 1) и гидролизовали равным объемом 2н. NaOH (10 мин, 0°). Раствор нейтрализовали дауэксом-50 (PyH^+) и высушили упариванием с пиридином. После осаждения эфиром из пиридина получили 4,95 г (68%) динуклеотида (III).

2. (MeOTr)anC-bzA-bzA (IV) получен взаимодействием 4,95 г (4,1 ммоль) динуклеотида (III), 3,86 г (6,9 ммоль) rpbzA(Ac) и 5,85 г (19,3 ммоль)

TPS в 32 мл пиридина (6 ч, 20°). Реакционную смесь обработали, как в опыте 1, исходный динуклеотид (III) извлекли смесью этилацетат — *n*-бутанол, 19 : 1 (4 × 250 мл) (возврат 10%), а продукт конденсации — смесью этилацетат — *n*-бутанол, 9 : 1 (4 × 250 мл) и 4 : 1 (250 мл). После щелочного гидролиза в условиях опыта 1 и осаждения получили 4,23 г (60%) тринуклеотида (IV).

3. (*MeOTr*)*anC-bzA-bzA-bzA* (V). А. Получен взаимодействием 4,24 г (2,5 ммоль) соединения (IV), 2,84 г (5,2 ммоль) *pbzA*(Ac) и 6,05 г (20 ммоль) TPS в 27 мл пиридина (6 ч, 20°). После обработки реакционной смеси, как в опыте 1, исходный тринуклеотид (IV) выделили экстракцией смесью этилацетат — *n*-бутанол, 9 : 1 (7 × 250 мл) (возврат 35%), а продукт конденсации извлекли смесью этилацетат — *n*-бутанол, 7 : 3 (5 × 250 мл). После щелочного гидролиза и нейтрализации тетра-нуклеотид (V) хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻, 2,5 × 50 см) в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 50% спирте (0,05—0,30 М, 4 л), собирая фракции по 31 мл/10 мин. Из фракций 59—84 выделили 58 400 ОЕ₂₈₀ (33%) тетра-нуклеотида (V).

Б. Смесью 2,5 г (3,5 ммоль) (*MeOTr*)*anC*, 5,33 г (10,4 ммоль) *pbzA*, 1,0 г (1,8 ммоль) *pbzA*(Ac) и 7,93 г (26,2 ммоль) TPS в 40 мл пиридина выдержали 6,5 ч при 20°. Реакционную смесь обработали, как в опыте 1, и тритилсодержащие соединения извлекли смесью этилацетат — *n*-бутанол, 3 : 2 (2 × 250 мл). Экстракт упарили, гидролизовали щелочью в условиях опыта 1 и хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻, 2,5 × 30 см) в градиенте концентрации ТЕАВ в 50% спирте (0,05—0,25 М, 3 л), собирая фракции по 16 мл/5 мин. Из фракций 11—27 было выделено 34 800 ОЕ₂₈₀ (28%) динуклеотида (II), из фракций 42—63—31 000 ОЕ₂₈₀ (16%) тринуклеотида (IV), из фракций 75—95—12 600 ОЕ₂₈₀ (5%) тетра-нуклеотида (V); фракции 96—120 содержали 12 000 ОЕ₂₈₀ более высокомолекулярных продуктов. При хроматографии водного раствора, содержащего нетритилированные вещества, на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻, 3,5 × 59 см) в градиенте концентрации ТЕАВ в воде (0,04—0,35 М, 10 л; фракции по 36 мл/5 мин) были выделены *pbzA* (фракции 162—185, 15 700 ОЕ₂₈₀, возврат 10%), *pbzA-bzA* (фракции 200—219, 4000 ОЕ₂₈₀), *pbzA-bzA-bzA* (фракции 220—239, 7100 ОЕ₂₈₀) и *pbzA-bzA-bzA-bzA* (фракции 240—262, 7200 ОЕ₂₈₀).

4. (*MeOTr*)*anC-bzA-bzA-bzA-anC-T* (VI) получен взаимодействием 1,4 г (0,64 ммоль) тетра-нуклеотида (V), 1,81 г (2,1 ммоль) *anC-T*(Ac) [16] и 3,4 г (11,2 ммоль) TPS в 11 мл пиридина (6 ч, 20°). Реакционную смесь обработали 23 мл 1 М раствора диизопропилэтиламина в пиридине и 35 мл воды (16 ч, 4°), прибавили 75 мл 2 н. NaOH, выдержали 10 мин при 0°, избыток щелочи нейтрализовали катионитом и элюаты упарили до минимального объема. Остаток растворили в 200 мл 0,05 М ТЕАВ, нанесли на колонку с DEAE-сефадексом А-25 (HCO₃⁻, 2,5 × 40 см) и хроматографировали в градиенте концентрации ТЕАВ в воде (0,05—0,50 М, 2,6 л), а затем в 50% спирте (0,05—0,50 М, 4 л), собирая фракции по 35 мл/10 мин. Из фракций 165—180 выделили 25 900 ОЕ₂₈₀ (43%) гексануклеотида (VI). Возврат динуклеотида *anC-T* 40%.

5. (*MeOTr*)*anC-bzA-bzA-bzA-anC-T-T-anC* (VII) получен взаимодействием 5400 ОЕ₂₈₀ (0,057 ммоль) гексануклеотида (VI), 5800 ОЕ₂₈₀ (0,25 ммоль) *pT-anC*(Ac) [16] и 0,37 г (1,2 ммоль) TPS в 3 мл пиридина в условиях опыта 4. После хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻, 2 × 20 см) в градиенте концентрации ТЕАВ в воде (0,05—0,40 М, 1,8 л), а затем в 50% спирте (0,05—0,40 М, 3 л) из фракций 235—265 (по 17 мл/10 мин) выделили 3450 ОЕ₂₈₀ (51%) октануклеотида (VII). Возврат динуклеотида *pT-anC* 68%, гексануклеотида (VI) — 11%.

6. (*MeOTr*)*anC-bzA-bzA-bzA-anC-T-anC-T* (VIII) получен взаимодействием 5400 ОЕ₂₈₀ (0,057 ммоль) гексануклеотида (VI), 5300 ОЕ₂₈₀ (0,23 ммоль) *anC-T*(Ac) и 0,35 г (1,15 ммоль) TPS в 2 мл пиридина в условиях

опыта 4. После хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 2×40 см) в градиенте концентрации ТЕАВ в воде (0,05—0,40 М, 2 л), а затем в 50% спирте (0,05—0,40 М, 2,2 л) из фракций 167—177 (по 22 мл/10 мин) выделили 3960 OE_{280} (58%) октануклеотида (VIII). Возврат динуклеотида рпсС-Т 69%, гексануклеотида (VI) — 12%.

7. *pbzA-rbzA*. Раствор 0,67 г (1,19 ммоль) (CNET) *pbzA*, 0,45 г (0,78 ммоль) *rbzA*(Ac)₂ и 1,0 г (3,33 ммоль) TPS в 5 мл пиридина выдержали 6 ч при 20°, затем при -20° обработали 10 мл 50% водного пиридина, выдержали 16 ч при 4° и гидролизовали 16 мл 2 н. NaOH (15 мин, 20°). После нейтрализации и упаривания смесь хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 2×40 см) в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в воде (0,05—0,30 М, 3 л), собирая фракции по 24 мл/12 мин. Из фракций 39—64 выделили 17 460 OE_{280} (60%) динуклеотида *pbzA-rbzA*. Возврат *pbzA* 30%.

8. *pT-anC-bzA-rbzA* (IX) получен взаимодействием 0,49 г (0,5 ммоль) (CNET) *pT-anC*, 0,62 г (0,58 ммоль) *pbzA-rbzA*(Ac)₂ и 1,0 г (3,33 ммоль) TPS в 6 мл пиридина, как описано в опыте 7. После хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 2×50 см) в градиенте концентрации ТЕАВ в воде (0,05—0,45 М, 3,4 л) из фракций 64—73 (по 30 мл/12 мин) выделили 8400 OE_{280} (28%) тетра-нуклеотида (IX). Возврат динуклеотидов *pbzA-rbzA* 62%, *pT-anC* — 27%.

9. (*MeOTr*)*anC-bzA-bzA-bzA-anC-T-T-anC-T-anC-bzA-rbzA* (X) получен взаимодействием 400 OE_{280} (3,4 мкмоль) октануклеотида (VII), 800 OE_{280} (13,4 мкмоль) *pT-anC-bzA-rbzA*(Ac)₂ и 65 мг (215 мкмоль) TPS в 0,3 мл пиридина в условиях опыта 4. Условия и кривые хроматографического разделения приведены на рис. 1а. Выход соединения (X) 226 OE_{280} (37%), возврат октануклеотида (VII) 33%, тетра-нуклеотида (IX) — 80%.

10. (*MeOTr*)*anC-bzA-bzA-bzA-anC-T-anC-T-T-anC-bzA-rbzA* (XI) получен взаимодействием 400 OE_{280} (3,4 мкмоль) октануклеотида (VIII), 800 OE_{280} (13,4 мкмоль) *pT-anC-bzA-rbzA*(Ac)₂ и 65 мг (215 мкмоль) TPS в 0,3 мл пиридина в условиях опыта 4. Условия и кривые хроматографического разделения приведены на рис. 1б. Выход додекануклеотида (XI) 196 OE_{280} (32%); возврат октануклеотида (VIII) 30%, тетра-нуклеотида (IX) — 78%.

11. *C-A-A-C-T-T-C-T-C-A-rA* (I). 46 OE_{280} додекануклеотида (X) обработали 5 мл 25% водного NH_3 (3 ч, 50°) и далее, после упаривания, смесью уксусная кислота — вода — пиридин, 14 : 3 : 1 (48 ч, 20°). Уксусную кислоту удалили многократным упариванием с водой и остаток дважды хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^- , $0,4 \times 12$ см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины сначала при pH 7,5 (рис. 2а), а затем при pH 3,5 (рис. 2б). Выход незащищенного додекануклеотида (I) 11,8 OE_{260} . Результаты микроколonoчной хроматографии при pH 7,5 и 3,5 приведены на рис. 3а.

12. *C-A-A-A-C-T-T-C-T-C-A-rA* (II) получен из 36 OE_{280} додекануклеотида (XI), как описано в опыте 11 (см. рис. 2в и 2г). Выход продукта (II) 10,3 OE_{260} . Аналитические характеристики приведены на рис. 3б.

13. ³²P-фосфорилирование и получение нуклеотидных карт олигонуклеотидов. 1 нмоль олигонуклеотида инкубировали 1,5 ч при 37° с 2 нмоль [γ -³²P]АТР (10—15 Кп/ммоль, Amersham) и 10 мкл Т4-поли-нуклеотидкиназы (КФ 2.7.1.78) (фракция VI [17]) в 40 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂ и 5 мМ меркаптоэтанол. Меченые олигонуклеотиды выделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (0,75 × 15 см), собирая фракции по 0,3 мл/5 мин, и упаривали досуха. Нуклеотидные карты были получены, как описано ранее [13] (см. рис. 4).

14. Гибридизация додекануклеотидов (I) и (II) с 16S- и 23S-рРНК. Компоненты в TME-буфере (40 мМ трис-НСl, pH 7,5; 10 мМ MgCl₂; 1 мМ

EDTA-Na₂) (общий объем смеси 50 мкл; см. табл. 2) нагревали 10 мин при 85°, затем в течение 3 ч охлаждали до 20°, выдерживали 20 ч при 4° и при этой температуре подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100 (0,75 × 21 см) в ТМЕ-буфере, собирая фракции по 0,3—0,5 мл/10 мин и измеряя их радиоактивность в толуольном сцинтилляторе (см., например, рис. 5). Связывание додекануклеотидов с рРНК рассчитывали относительно теоретически возможного включения радиоактивности в высокомолекулярную фракцию, принимая соотношение олигонуклеотид — рРНК в комплексе за эквимольное (см. табл. 2).

Авторы благодарны В. Г. Коробко, Е. Ф. Болдыревой и Е. А. Шульгиной за получение нуклеотидных карт ³²P-фосфорилированных олигонуклеотидов, А. В. Честухину за Т4-полинуклеотидкиназу и М. К. Кухановой за препарат рибосом *E. coli* MRE 600.

ЛИТЕРАТУРА

1. Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н. (1978) Биоорганич. химия, 4, 523—534.
2. Jaskunas S. R., Nomura M. (1976) Trends Biochem. Sci., 1, 159—161.
3. Ehresmann C., Ebel J. P. (1975) Biochimie, 57, 741—748.
4. Kössel H., Seliger H. (1975) Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Vol. 32, pp. 297—560, Springer-Verlag, Wien — N. Y.
5. Agarwal K. L., Berlin Yu. A., Kleid D. G., Smirnov V. D., Khorana H. G. (1975) J. Biol. Chem., 250, 5563—5573.
6. Seliger H. (1975) Makromol. Chem., 176, 3127—3134.
7. Schott H., Kössel H. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 3778—3785.
8. Sanger F. (1973) in Virus Research, pp. 573—598, Acad. Press, N. Y.—London.
9. Hochkeppel H. K., Craven G. R. (1976) Nucl. Acids Res., 3, 1883—1902.
10. Sekiya T., Contreras R., Kupper H., Landy A., Khorana H. G. (1976) J. Biol. Chem., 251, 5124—5140.
11. Kumar A., Ohtsuka H., Khorana H. G. (1972) J. Mol. Biol., 72, 289—307.
12. Weimann G., Khorana H. G. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 419—430.
13. Берлин Ю. А., Бочарова Т. Н., Вульфсон А. Н., Колосов М. Н., Коробко В. Г. (1976) Биоорганич. химия, 2, 762—772.
14. Riskov A. P., Tokarskaya O. V., Georgiev G. P., Coutell C., Berndt T. (1976) Nucl. Acids Res., 3, 1487—1498.
15. Осана С., Сябатани А. (1970) в сб. Методы исследования нуклеиновых кислот, с. 116—121, «Мир», М.
16. Weber H., Khorana H. G. (1972) J. Mol. Biol., 72, 249—233.
17. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) Nucl. Acids Res., 1, 331—353.

Поступила в редакцию
10.IV.1978

SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES. XXI. THE CHEMICAL SYNTHESIS OF TWO DODECANUCLEOTIDES COMPLEMENTARY TO THE 5'-TERMINAL SEQUENCE OF 16S rRNA OF *E. COLI*

BERLIN Yu. A., VINOGRADOV S. V., KOLOSOV M. N.
*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Dodecanucleotides d(C-A-A-A-C-T-T-C-T-C-A)-rA and d(C-A-A-A-C-T-C-T-T-C-A)-rA complementary to the 5'-terminal sequence 4-15 of *E. coli* 16S rRNA were chemically synthesized by the phosphodiester method, their structures being substantiated by the finger-printing technique. Both oligonucleotides form specific complexes with the rRNA and can be used as primers for sequencing the corresponding DNA.