



УДК 547.963.32.02

СИНТЕЗ 5'-БИОТИНИРОВАННЫХ ОЛИГО-
И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ И ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ИХ
КОМПЛЕКСОВ С АВИДИНОМ *

Бросалина Е. Б., Грачев С. А.

Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Предлагается эффективная методика получения 5'-биотинированных (через $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ -мостик, где $n=3-5$) олиго- и полинуклеотидов. Исследована стехиометрия их комплексов с авидином и показано, что с авидином может связаться не более двух молекул 5'-биотинированного олиго- или полинуклеотида. Комплекс 5'-биотинированного додекануклеотида с комплементарной одноцепочечной ДНК денатурирует при добавлении авидина.

Олиго- и полинуклеотиды, несущие биотиновую группу, начинают широко использоваться в качестве специфических зондов при выявлении нуклеиновых кислот гибридизацией. Впервые их получение описано в работе [1], где РНК сшивали с биотинированным цитохромом с с помощью формальдегида. Введение биотина в РНК осуществляли также после окисления 3'-концевого нуклеотидного звена и присоединения по образовавшимся альдегидным группам алкилдиамин или полиамина [2, 3]. В ДНК [4, 5] и дезоксирибоолигонуклеотиды [6] биотиновую метку вводят, используя биотиновый аналог тимидинтрифосфата. Недавно описано присоединение биотина через аминоэтанольный остаток к 5'-концевой фосфатной группе мононуклеотида и использование полученного соединения в олигонуклеотидном синтезе [7]. В работе [8] продемонстрирована возможность введения остатков биотина в ДНК с помощью фотоактивируемого аналога биотина.

Для выявления биотиновых производных нуклеиновых кислот используют свойство биотина образовывать прочный комплекс с авидином ($K=10^{-15}$) или стрептавидином ($K=10^{-14}$) — четырехсубъединичными белками, имеющими центры связывания биотина в каждой из субъединиц [9]. После образования комплекса авидин — нуклеиновая кислота к нему добавляют биотинированный фермент (обычно фосфатазу или пероксидазу) и проявляют образовавшийся тройной комплекс хромогенным субстратом, образующим под действием фермента окрашенный продукт.

Цель настоящей работы — разработка простой методики введения концевой биотиновой метки в олигонуклеотиды, изучение комплексов таких производных с авидином и комплементарной одноцепочечной ДНК.

Синтез биотинированных олигонуклеотидов (Bio-олигонуклеотидов) проводили по схеме, приведенной на с. 249.

5'-Концевую фосфатную группу активировали обработкой хлорангидридом мезитиленкарбоновой кислоты; полученный смешанный ангидрид обрабатывали алифатическим диамином $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, где $n=3-5$ [10]. Присоединение биотина по 5'-концевой алифатической аминогруппе осуществляли действием N-оксисукцинимидного эфира биотина, синте-

* В работе использованы олигонуклеотиды дезоксириада, поэтому префикс «d» для простоты опущен.

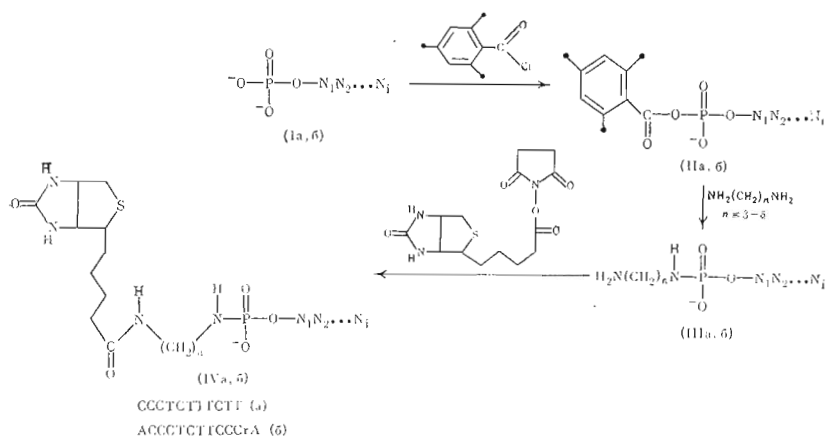


Схема синтеза 5'-биотиновых производных олигонуклеотидов следующей структуры: CCCTCTTCTT (a) и ACCCTCTTCCCA (б)

изированного по [14]. Продукты реакций на всех стадиях анализировали микроколоночной ионообменной хроматографией (рис. 1). Выход Био-олигонуклеотидов после проведения всех реакций составляет 90–95% и зависит в основном от выхода на первой стадии — получения смешанного ангидрида олигонуклеотида.

Для изучения свойств Био-олигонуклеотидов эти производные также были получены после предварительного введения в олигонуклеотиды 5'-концевой ^{32}P -метки с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$. В этом случае продукты реакций анализировали гель-электрофорезом в денатурирующих условиях (рис. 2).

Наличие биотиновой группы в составе Био-олигонуклеотида было доказано связыванием с авидином. Как известно [12], авидин имеет четыре попарно сближенных центра связывания биотина, расположенных на противоположных сторонах молекулы. Наличие объемного заместителя по карбоксильной группе биотина (в нашем случае олигонуклеотида) должно приводить к блокированию соседнего биотинсвязывающего центра авидина. Так, добавление большого избытка авидина (рис. 3) вызывает образование продукта с очень низкой электрофоретической подвижностью в ПААГ в денатурирующих условиях, что, очевидно, обусловлено присоединением к Био-олигонуклеотиду объемной положительно заряженной белковой молекулы (M 68 000). При уменьшении соотношения авидин: Био-олигонуклеотид до 1 и ниже образуется еще один продукт, имеющий несколько большую подвижность в геле, а первый продукт исчезает (рис. 3). Других продуктов не обнаружено. Очевидно, продукт, образующийся при больших избытках авидина, представляет собой комплекс авидина и Био-олигонуклеотида состава 1:1; комплекс, образующийся при относительном избытке Био-олигонуклеотида, имеет состав 1:2. По-видимому, стерически доступными для связывания биотиновой группы олигонуклеотида действительно являются лишь два центра, расположенные на противоположных сторонах молекулы авидина.

Далее нами было исследовано образование комплекса Био-олигонуклеотида (IVb) с комплементарным участком одноцепочечной ДНК длиной 303 нуклеотида (ДНК-303). Этот фрагмент получали гидролизом рестриктазой *Bam*HI одноцепочечной ДНК фага M13mp7, содержащей вставку по *Pst*I-сайту фрагмента ДНК — аналога участка РНК вируса клещевого энцефалита. Возможность отщепления нуклеазами рестрикции одноцепочечных фрагментов ДНК, клонированных в составе ДНК фага M13mp7, была продемонстрирована в работе [13].

Ранее было показано [14], что ДНК-303, полученная описанным выше способом, строго специфически взаимодействует с комплементарным ей олигонуклеотидом (Ib), несущим алкилирующую группу (аналог азотистого иприта) на 5'-концевом фосфатном остатке. При этом образу-

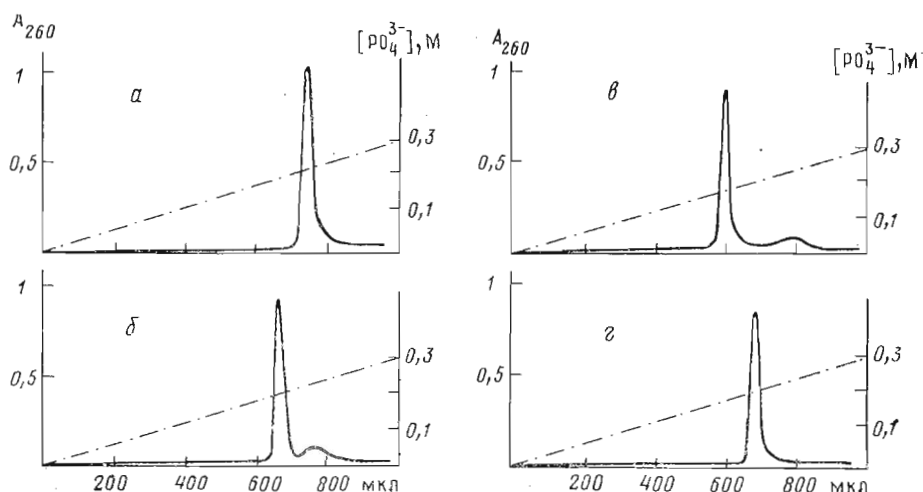


Рис. 1. Хроматографическое разделение продуктов на различных стадиях синтеза 5'-биотинированного олигонуклеотида (IVa). Хроматографию проводили на колонке объемом 20 мкл со смолой Partisil-10SAX в градиенте калий-фосфатного буфера, pH 6,3. Скорость элюции 50 мкл/мин, детекция при 260 нм на микроспектрофотометре «Обь». а — исходный олигонуклеотид (Ia), б — реакционная смесь после обработки его мезитиленкарбонилхлоридом (IIa), в — продукт взаимодействия активированного ангидрида с пропилендиамином (IIIa), г — 5'-биотинированный олигонуклеотид (IVa)

ются продукты алкилирования ДНК-303 по стерически доступным, расположенным вблизи алкилирующей группы гетероциклическим основаниям. Таким образом, в этой работе было показано, что данный олигонуклеотид способен реагировать в комплементарном комплексе с соответствующим участком одноцепочечной ДНК.

На рис. 4 изображена возможная вторичная структура 5'- и 3'-концевых областей ДНК-303. 3'-Концевой участок показан после введения ^{32}P -радиоактивной метки по *Bam*III-сайту с помощью ДНК-полимеразы А и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов dGTP, dATP и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{TTP}$. Олигонуклеотид (Iб) комплементарен ДНК-303 в районе нуклеотидов 32–43 от 3'-конца фрагмента. Для подтверждения существования в этом районе изображенной на рисунке шпильчатой структуры фрагмент был подвергнут частичному гидролизу микрококковой нуклеазой. По завершении гидролиза продукты разделяли денатурирующим гель-электрофорезом в денатурирующих условиях в присутствии контрольной смеси продуктов расщепления после частичной апуринизации по методу [15]. Полученные результаты позволили выявить сайты преимущественного гидролиза на этом участке ДНК-303, что схематически изображено на рис. 4.

В недавно опубликованной работе [16] детально исследовано действие некоторых эндонуклеаз (в том числе и микрококковой) на модельные двухцепочечные и содержащие шпильку одноцепочечные фрагменты ДНК. Положение точек расщепления ДНК-303 не противоречит результатам этой работы и находится в соответствии с предлагаемой вторичной структурой данного участка фрагмента.

Затем частичный гидролиз ДНК-303 был проведен в присутствии додекануклеотида (Iб) или его биотинового производного (IVб) (рис. 5). Видно, что картина гидролиза меняется существенно в обоих случаях и сходным образом. На рис. 4 обозначены точки повышения и понижения чувствительности фрагмента к действию нуклеазы. Полученные результаты и в этом случае находятся в соответствии с данными работы [16] и позволяют, таким образом, сделать вывод о существовании правильного комплементарного комплекса олигонуклеотид — ДНК.

Добавление авидина к комплексу (Iб) — ДНК-303 в количестве, эквивалентном по отношению к олигонуклеотиду, не изменяет картины гидролиза. Добавление же авидина к комплексу (IVб) — ДНК-303 приводит

1 2 3 4 5
← старт

1 2 3 4 5 6 7
← старт



Рис. 2

Рис. 2. Электрофоретическое разделение продуктов, полученных на разных стадиях синтеза $[5'-^{32}\text{P}]-5'$ -биотинированного олигонуклеотида (IVa), очищенных с помощью ионообменной хроматографии. Электрофорез проводили в 16% ПААГ (1/30 бис-акриламида) в 0,1 М трис-борате (рН 8,3), 1 мМ EDTA в 7 М мочеине. 1, 5 — исходный олигонуклеотид (Ia); 4 — смешанный ангидрид (IIa); 3 — пропилендиаминовое производное (IIIa); 2 — Био-олигонуклеотид (IVa). В — положение бромфенолового синего

Рис. 3

Рис. 3. Гель-электрофоретический анализ продуктов взаимодействия Био-олигонуклеотида (IVa) с авидином. Условия электрофореза как на рис. 2. 1 — Био-олигонуклеотид (IVa); 2–7 — титрование Био-олигонуклеотида (IVa) (0,5 пмоль в 10 мкл 10 мМ трис-HCl, рН 7,5) авидином (1 мкл авидина с концентрацией соответственно 2,5; 1,25; 0,61; 0,3; 0,15; 0,075 пмоль/мкл в 10 мМ бикарбонате натрия). В — положение бромфенолового синего

к разрушению комплекса и восстановлению картины гидролиза не вовлеченного в комплекс одноцепочечного фрагмента ДНК. Таким образом, связывание авидина с Био-олигонуклеотидом сильно дестабилизирует его комплекс с одноцепочечной ДНК.

Для изучения стерических возможностей образования комплексов двухцепочечной биотинированной ДНК с авидином нами была проведена достройка Био-олигонуклеотида (IVб) на ДНК-303 в качестве матрицы с помощью ДНК-полимеразы А и четырех dNTP. При этом образуется двухцепочечный (кроме 30 нуклеотидов, предшествующих месту связывания олигонуклеотида) фрагмент ДНК (дцДНК-303). Предварительно нами было показано, что в присутствии ограниченного набора dNTP Био-олигонуклеотид (IVб) достраивается на фрагменте ДНК с образованием ожидаемых по длине продуктов, щелочелавильных из-за наличия на 3'-конце олигонуклеотидной заправки рибонуклеотидного звена (данные не приведены).

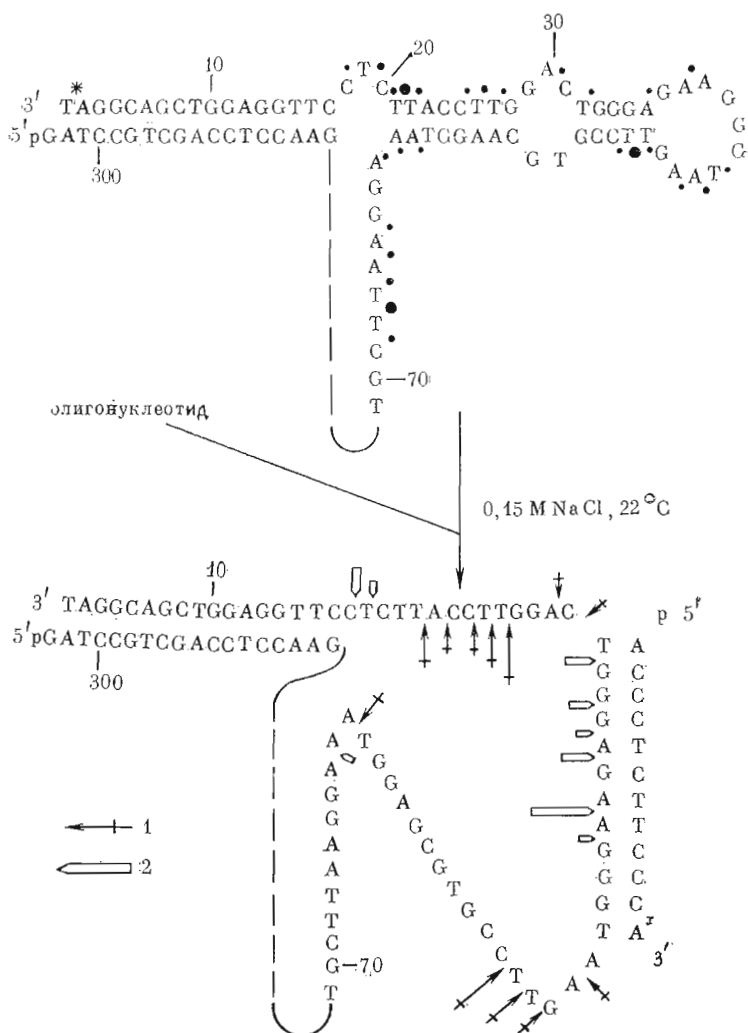


Рис. 4. Предполагаемая структура участка ДНК-303, включающая последовательность, комплементарную олигонуклеотиду (16). Обозначены места отщепления микрококковой нуклеазой, сайты усиления (1) и ослабления (2) гидролиза после добавления олигонуклеотида (16). Линейные размеры условных знаков качественно соответствуют степени расщепления фрагмента

На рис. 6 показана картина накопления двухцепочечного фрагмента ДНК в процессе элонгации ДНК-полимеразой А. Видно, что дцДНК-303 имеет значительно большую подвижность в ПААГ без добавления мочевины, чем одноцепочечный фрагмент-матрица. По завершении полимеризации дуплекс выделяли гель-электрофорезом и использовали для изучения его комплексов с авидином.

Продукты титрования дцДНК-303 различными количествами авидина были анализированы гель-электрофорезом в неденатурирующих условиях (рис. 7). При добавлении избытка авидина образуется эквимольный комплекс, имеющий несколько меньшую подвижность в геле, чем исходный дуплекс. При уменьшении соотношения авидин: дцДНК-303 наблюдается формирование еще одного комплекса с низкой подвижностью в геле. Судя по подвижности в геле и выбранному соотношению авидин: дцДНК-303, этот комплекс должен иметь состав 1:2. Других продуктов, как и в случае титрования биотинированного олигонуклеотида авидином, нами не обнаружено. Полученный результат также свидетельствует о стерической доступности лишь двух биотинсвязывающих центров в молекуле авидина.

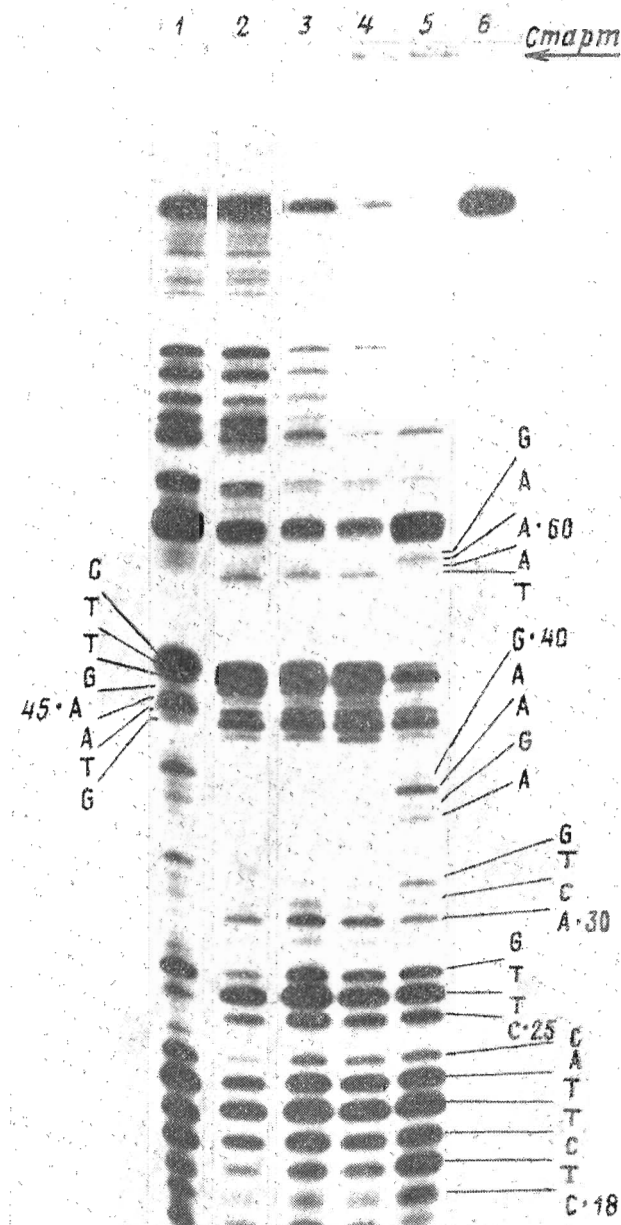


Рис. 5. Гель-электрофоретическое разделение в 12% ПААГ (условия см. на рис. 2) продуктов частичного гидролиза ДНК-303 и его комплексов олигонуклеотидами микрококковой нуклеазой. Олигонуклеотид добавляли в 30-кратном (мольном) избытке по отношению к гидролизуемой ДНК, авидин — в эквимольном количестве по отношению к олигонуклеотиду. 1 — частичный гидролиз ДНК-303; 2 — ДНК-303 в присутствии олигонуклеотида (IVб); 3 — ДНК-303 в присутствии Био-олигонуклеотида (IVб); 4 — ДНК-303 в присутствии олигонуклеотида (Iб) и авидина; 5 — ДНК-303 в присутствии Био-олигонуклеотида (IVб) и авидина; 6 — интактный фрагмент ДНК-303

В литературе [9, 17] уже приводились данные о стерических затруднениях при связывании с молекулой авидина более чем двух остатков биотина с присоединенным по карбоксильной группе объемным заместителем. Однако мы не нашли подобных данных в отношении биотинированных различным образом молекул ДНК. Более того, в недавней публикации [18] подразумевается наличие трех доступных для связывания биотина центров после присоединения авидина к биотинированным по положению 5 остаткам тимидина в ДНК. Из наших данных однозначно вытекает, что при присоединении авидина к биотиновым группам на

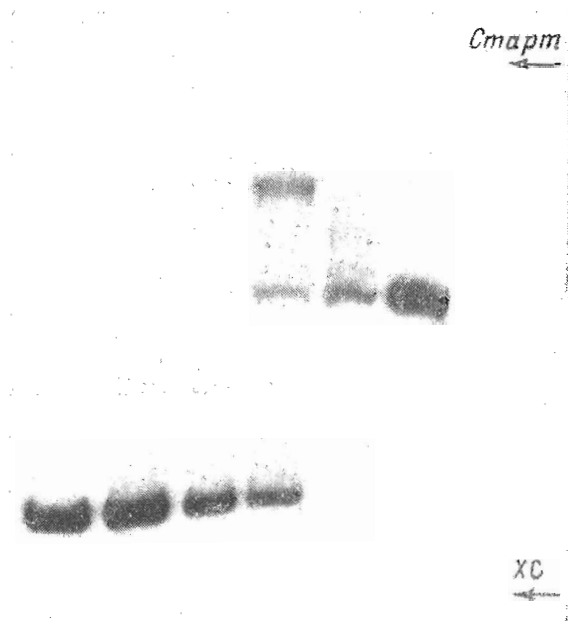


Рис. 6

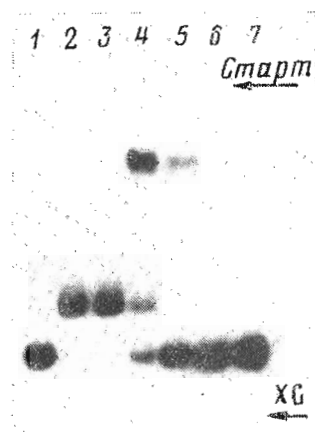


Рис. 7

Рис. 6. Разделение продуктов элонгации Био-олигонуклеотида (IVb) на ДНК-303 в присутствии четырех dNTP с помощью ДНК-полимеразы А. Справа налево: 0, 5, 15, 25, 40, 70 мин инкубации. Гель-электрофорез в 5% ПААГ (1/30 бис-акриламида) в 0,1 М трис-борате (рН 8,3), 1 мМ EDTA. XC — положение ксиленианола FF

Рис. 7. Анализ продуктов взаимодействия биотинированной по 5'-концу короткой цепи дДНК-303 с авидином. Условия электрофореза как на рис. 6. 1 — дДНК-303; 2–7 — титрование дДНК уменьшающимися в 2 раза для каждой последующей дорожки количествами авидина. Условия образования комплекса как на рис. 3, но концентрации ДНК и авидина ниже на 2 порядка

ДНК или олигонуклеотидах, а также, очевидно, и к достаточно объемным молекулам биотинированных ферментов, используемых при гибридизации, необходимо считать молекулу авидина имеющей два центра связывания, а не четыре.

При проведении гибридизации необходимо учитывать также не только несколько меньшую стабильность комплементарных комплексов биотинированных олигонуклеотидов, как это показано в работе [7] по понижению температуры плавления, но и еще большее понижение стабильности комплекса после связывания с авидином. Так, в работе [14] олигонуклеотид (Iб), несущий алкилирующую группу, был способен модифицировать ДНК в комплементарном комплексе даже при 37° С в 0,15 М NaCl, однако комплекс этого же 5'-биотинированного олигонуклеотида с ДНК после добавления авидина не был обнаружен нами уже при 20° С в 0,15 М NaCl.

Экспериментальная часть

В работе использованы акриламид, бис-акриламид, трис, EDTA (Serva, ФРГ); биотин, dNTP (Sigma, США); [α - 32 P]TTP, [γ - 32 P]ATP (Изотоп, СССР); Partisil 10SAX (Whatman, США); CM-целлюлоза (Bio-Rad, США); сефадексы G-10, G-25 (Pharmacia, Швеция); нуклеаза из стафилококка (Calbiochem, Швеция); T4-полинуклеотидкиназа (НИКТИ БАВ, Бердск).

Синтез Bio-NH(CH₂)₃NH₂CCCTCTTTCTT (IVa). К раствору 23 нмоль ундекануклеотида (Ia) в 50 мкл 90% водного пиридина добавляли 10 мкл хлорангидрида мезитиленкарбоновой кислоты и выдерживали 40 мин при 20° С. Затем к реакционной смеси добавляли 1 мл воды и мезитиленкарбоновую кислоту экстрагировали эфиром (4×1 мл). Водный слой концент-

рировали экстракцией *n*-бутанолом и упаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 50 мкл 10% водного пиридина, добавляли 3 мкл (50 мкмоль) пропилендиамин и выдерживали 2 ч при 56° С. Нуклеотидный материал отделяли от пропилендиамина и пиридина гель-фильтрацией на сефадексе G-10 (элюция водой). Олигонуклеотид (IIIa) выделяли с помощью ионообменной хроматографии в условиях, указанных на рис. 1, и обессоливали вновь на сефадексе G-10.

Раствор олигонуклеотида (IIIa) в воде концентрировали до объема 180 мкл, добавляли 20 мкл 1 М бикарбоната натрия, 10 мкл *N*-оксисукцинимидного эфира биотина (0,1 мг/мл) в диметилформамиде и выдерживали 1 ч при 20° С. По завершении реакции биотинирующийся олигонуклеотид отделяли от низкомолекулярных компонентов реакционной смеси гель-фильтрацией на сефадексе G-10 в воде.

Анализ продуктов (Ia)–(IVa) проводили микроколоночной ионообменной хроматографией (рис. 1). Выход ВЮ-олигонуклеотида, по данным микроколоночной хроматографии, составил 90% (относительно исходного олигонуклеотида).

Достройка ВЮ-олигонуклеотида (IVб) на фрагменте ДНК-303 и титрование авидином. [³²P]меченый фрагмент ДНК-303 получали как описано в работе [14]. Достройку ВЮ-олигонуклеотида (IVб), синтезированного аналогично олигонуклеотиду (IVa), и олигонуклеотида (Iб) на ДНК-303 проводили в присутствии всех четырех dNTP (0,1 мМ) при концентрации ДНК $5 \cdot 10^{-8}$ М, олигонуклеотида $2,5 \cdot 10^{-6}$ М в 10 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,5), 0,05 М NaCl, 10 мМ MgCl₂, 0,1 мМ β-меркаптоэтанол, добавив в инкубационную смесь 5 ед. ДНК-полимеразы А (фрагмент Кленова). Реакцию завершали через 70 мин при 20° С добавлением раствора EDTA до 10 мМ (рис. 6).

дцДНК-303 очищали гель-электрофорезом, экстрагировали из геля 2 М LiClO₄, как описано в работе [19], концентрировали экстракцией *n*-бутанолом и выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 (элюция 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 0,05 М NaCl). Концентрацию дцДНК-303 определяли по данным микроколоночной хроматографии (одновременно с гель-фильтрацией) и с помощью титрования известными количествами авидина (рис. 7).

Частичный гидролиз микрококковой нуклеазой проводили в 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 0,15 М NaCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ CaCl₂, 0,1 мМ β-меркаптоэтанол при 20° С. Время гидролиза и количество фермента, необходимое для частичного расщепления, подбирали экспериментально. Реакцию останавливали добавлением раствора EDTA, рН 8,0, до концентрации 10 мМ. Продукты анализировали гель-электрофорезом в 12% ПААГ в денатурирующих условиях [16] (рис. 5).

Выделение авидина. Использовали комбинацию описанных методов [20–21] с некоторыми изменениями. Яичный белок разбавляли равным количеством воды и проводили сорбцию белка на добавляемую последовательно тремя порциями СМ-целлюлозу (как в работе [20]). СМ-целлюлозу каждый раз отделяли от супернатанта центрифугированием в течение 10 мин при 10 000 об/мин. СМ-целлюлозу тщательно суспендировали и промывали 20 объемами 50 мМ ацетата аммония, повторяя циклы центрифугирования и суспендирования. Процедуру промывки повторяли, используя 50 мМ ацетат натрия (рН 9,0) и затем карбонат аммония (рН 9,0). Элюцию белка осуществляли гомогенизацией целлюлозы в 5–10 объемах 1% бикарбоната аммония (рН 9,0). Дальнейшую очистку проводили на биоцин-сефарозе, как описано в [21].

Авторы выражают благодарность Е. М. Ивановой, В. В. Горну, И. В. Кутявину и М. А. Подыминогой (НИБХ, Новосибирск) за предоставление олигонуклеотидов, М. М. Бакланову — за препарат рестриктазы *Bam*HI, С. Х. Дегтяреву (ВНИИМБ, Кольцово) — за препарат ДНК-полимеразы.

Перед направлением статьи в печать появилась работа A. Chollet и E. H. Kawashima (Nucl. Acid. Res, 1985, т. 13, № 5, р. 1529–1544), в которой предложен альтернативный способ синтеза 5'-биотиновых производ-

ных олигонуклеотидов с гексаметилендиаминным мостиком (через 5'-фосфоимидазольное производное) и продемонстрирована возможность использования фосфамидных производных для гибридизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Manning J. E., Hershey N. D., Broker T. R., Pellegrini M., Davidson N. *Chromosoma* (Berlin), 1975, v. 53, № 2, p. 107-117.
2. Broker T. R., Angerer L. M., Yen P. H., Hershey N. D., Davidson N. *Nucl. Acids Res.*, 1978, v. 5, № 3, p. 363-384.
3. Sodja A., Davidson N. *Nucl. Acids Res.*, 1978, v. 5, № 3, p. 385-401.
4. Langer P. R., Waldrop A. A., Ward D. C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, v. 78, № 11, p. 6633-6637.
5. Leery J. J., Brigati D. J., Ward D. C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, v. 80, № 6, p. 4045-4049.
6. Murosugi A., Wallace B. *DNA*, 1984, v. 3, № 3, p. 269-276.
7. Kempe T., Sundquist W. J., Chow F., Shin Lok Hu. *Nucl. Acids Res.*, 1985, v. 13, № 1, p. 45-57.
8. Forster A. C., McInnes J. L., Skingle D. C., Symons R. H. *Nucl. Acids Res.*, 1985, v. 13, № 3, p. 745-761.
9. Green N. M. In: *Advances in protein chemistry*/Eds Anfinsen C. B., Edsall J. T., Richards F. M. N. Y.-L.: Acad. Press, 1975, v. 29, p. 85-133.
10. Горух М. Б., Неаповская М. Г., Вейко В. П., Шабарова З. А. *Биоорганич. химия*, 1981, т. 7, № 9, с. 1310-1317.
11. Heitzmann H., Richards F. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, № 9, p. 3537-3541.
12. Green N. M., Konieczny L., Toms E. J., Valentine R. C. *Biochem. J.*, 1971, v. 126, p. 781.
13. Patton J. R., Chi-Bom Chae. *Anal. Biochem.*, 1982, v. 126, p. 231-234.
14. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамеев С. В., Плетнев А. Г. *Докл. АН СССР*, 1985, т. 285, № 6.
15. Коробко В. Г., Грачев С. А. *Биоорганич. химия*, 1977, т. 3, № 10, 1420-1422.
16. Drew H. R. J. *Mol. Biol.*, 1984, v. 176, № 2, p. 535-557.
17. Safer D., Hainfeld J., Wall I. S., Reardon J. E. *Science*, 1982, v. 218, № 4569, p. 290-291.
18. Malcolm S. *Nature*, 1982, v. 300, № 5888, p. 108.
19. Варам Г. П., Грачев С. А. *Биоорганич. химия*, 1985, т. 11, № 10, с. 1420-1422.
20. Melamed M. D., Green N. M. *Biochem. J.*, 1963, v. 89, № 3, p. 591-599.
21. Guatrecases P., Wilchek M. *Biophys. and Biochem. Res. Commun.*, 1968, v. 33, № 2, p. 235-239.

Поступила в редакцию
14.VI.1985

THE SYNTHESIS OF 5'-BIOTIN-LABELLED OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES AND INVESTIGATION OF THEIR COMPLEXES WITH AVIDIN

BROSALINA E. B., GRACHEV S. A.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

An effective method for preparation of 5'-biotinylated oligo- and polynucleotides (via $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{NH}$ spacers, $n=3-5$) has been developed. The stoichiometries of complexes of these derivatives with avidin were determined. It was shown that no more than two molecules of a 5'-biotinylated oligo- or polynucleotide could be attached to one molecule of avidin. Binding of avidin to the complex of a 5'-biotinylated dodecanucleotide with complementary single-stranded DNA caused its dissociation.