



УДК 547.962.32.057:577.152.314'135

ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ И СВОЙСТВА
ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ СУБСТРАТОВ ДЛЯ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ
РЕСТРИКЦИИ *Vam*HI И МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ *Eco* *dam*

Горбунов Ю. А., Зиновьев В. В., Речкунова Н. И.,
Овечкина Л. Г., Попов С. Г., Малыгин Э. Г.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
молекулярной биологии, пос. Кольцово Новосибирской обл.

Фосфотриэфирным методом в растворе синтезированы олигодезоксирибонуклеотиды, образующие дуплексы, в которых содержатся полные или дефектные участки узнавания эндонуклеазы рестрикции *Vam*HI и ДНК-метилтрансферазы *Eco* *dam*. Описано получение 3'-фосфорилированных олигодезоксирибонуклеотидов из их триэфирных S-метилтиофосфатных производных. Изучено действие эндонуклеазы рестрикции *Vam*HI и метилтрансферазы *Eco* *dam* на синтетические субстраты, в которых отсутствуют различные элементы структуры участка узнавания этих ферментов.

Эндонуклеазы рестрикции, специфично расщепляющие двухцепочечные ДНК, и метилтрансферазы, отвечающие за перенос метильных групп на определенные участки ДНК, являются привлекательными объектами для изучения процессов белково-нуклеинового взаимодействия [1]. Наиболее удобными субстратами для ферментов рестрикции-модификации служат синтетические олигонуклеотиды, имеющие соответствующий участок узнавания фермента. Такие субстраты успешно используются для исследования действия рестриктаз [2–5] и ДНК-метилтрансфераз (далее — метилазы) [6]. Целенаправленные изменения структуры участка узнавания фермента позволяют выяснить роль отдельных элементов этого участка в процессе взаимодействия фермента с ДНК [7, 8]. Кроме того, синтетические олигонуклеотиды, содержащие различные сайты рестрикции, нашли широкое применение в качестве линкерных и адаптерных элементов при конструировании рекомбинантных ДНК [9–11].

Ранее нами было установлено, что под действием эндонуклеазы *Vam*HI происходит расщепление не только синтетических субстратов, которые содержат полный участок узнавания фермента, но и субстратов, содержащих дефекты в участке узнавания: разрывы фосфодиэфирных связей, отсутствие межнуклеотидного фосфата, пропуск нуклеотида в структуре участка узнавания или однонитевое состояние части участка узнавания [12, 13]. Исследование субстратных свойств подобных дуплексов позволяет оценить важность отдельных элементов участка узнавания олигонуклеотидного субстрата для взаимодействия с рестриктазой. Очевидно, что подобный метод применим и для изучения других классов ферментов, специфично взаимодействующих с определенными последовательностями нуклеиновых кислот. Представлялось целесообразным использовать метод структурного вычитания для исследования специфичности метилаз — ферментов, существенно отличающихся по своей функции от эндонуклеаз рестрикции [1]. Проведенное нами предварительное исследование взаимодействия метилазы *Eco* *dam* с дефектными олигонуклео-

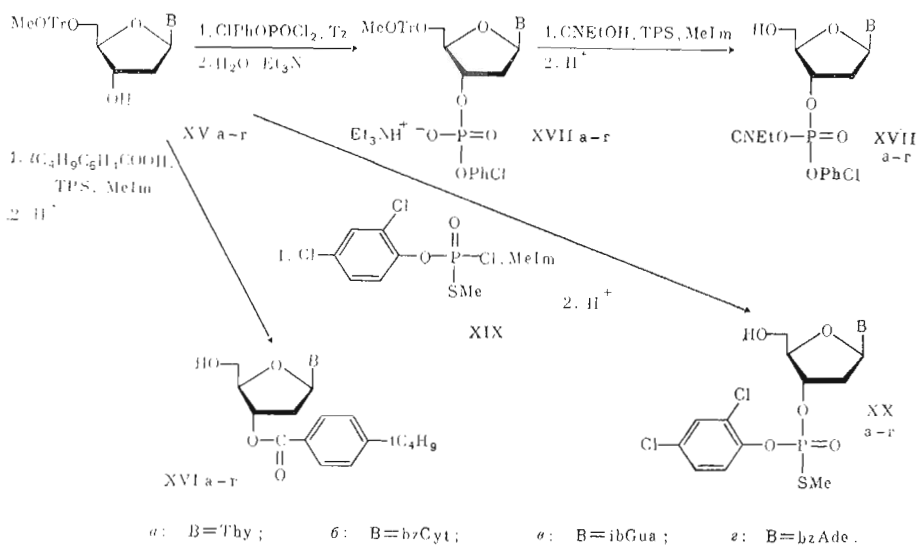
Принятые сокращения: TPS — 2,4,6-тринизопропилбензолсульфохлорид, TPSNT — 1-(2,4,6-тринизопропилбензолсульфонил)-3-нитро-1,2,4-триазол, MeIm — N-метилимидазол, Tz — 1,2,4-триазол, CNEt — 2-цианэтил, PhCl — *n*-хлорфенил, *ib* — изобутирил, Tetr — тетразол. Префикс «d» в формулах моно- и олигонуклеотидов для краткости опущен.

тидными субстратами продемонстрировало перспективность использования синтетических олигонуклеотидов в исследовании ДНК-метилаз [6].

Данная работа является продолжением исследования субстратной специфичности ферментов рестрикции-модификации с помощью синтетических олигонуклеотидов, образующих полный или дефектные участки узнавания эндонуклеазы *VamHI* и метилазы *Eco dam*, которым отвечают нуклеотидные последовательности ...G-G-A-T-C-C... и ...G-A-T-C... соответственно [1]. Структура олигонуклеотидов, синтез которых предпринят нами с целью изучения действия этих ферментов методом структурного вычитания, приведена в табл. 1.

Олигонуклеотиды синтезировали модифицированным фосфотриэфирным методом в растворе [14]. В качестве N-защитных групп гетероциклических оснований использовали бензоильную (для аденина и цитозина) и изобутирильную (для гуанина) группы. Для защиты 3'-гидроксильных групп концевых нуклеозидов применяли 4-*tert*-бутилбензоильный остаток, который вводили с помощью TPS в присутствии MeIm (см. «Экспер. часть»). Нуклеозиды с 3'-O-*tert*-бутилбензоильным остатком (XVIa-г, схема 1) позволяют увеличить хроматографическую подвижность триэфирных олигонуклеотидных блоков при адсорбционной хроматографии на силикагеле и повысить их растворимость в органических растворителях [15]. Для блокирования 5'-гидроксила нуклеозидов использовали монометокситритильную группу [16]. Защищенные дезоксирибонуклеотиды: 5'-O-монометокситриэтил-2'--дезоксинуклеозид-3'-*n*-хлорфенилфосфаты (XVIIa-г, схема 1) синтезировали как описано в «Экспериментальной части», используя метод, предложенный в работе [17]. Для синтеза 2'--дезоксинуклеозид-3'-(*n*-хлорфенил, β-цианэтил)фосфатов (XVIIIa-г) использовали метод, описанный в работе [18].

Схема 1



С целью получения олигонуклеотидных субстратов, содержащих 3'-концевой фосфатный остаток в участке узнавания рестриктазы *VamHI* и метилазы *Eco dam*, нами предпринят синтез олигомеров (XIII) и (XIV) (табл. 1). Из большого числа известных методов синтеза 3'-фосфорилированных олигонуклеотидов нами выбран метод, в котором с помощью монофункционального фосфорилирующего реагента (XIX) в присутствии MeIm [19] получают 3'-O-(2,4-дихлорфенил)-S-метилтиофосфаты нуклеозидов (XXa-г, схема 1). Триэфирные нуклеотиды (XX) со свободной 5'-гидроксильной функцией использовали в качестве 3'-концевых мономеров в синтезе нуклеотидов (XIII) и (XIV). Тиометильная и 2,4-дихлорфенильная группы оказались устойчивыми при реакции конденса-

Синтетические олигонуклеотиды для исследования рестриктазы *Bam*HI и метилазы *Eco* dam

Номер олигонуклеотида	Структура	Исходное количество 3'-концевого нуклеотида, мкмоль	Конденсирующий агент	Количество синтезированного олигонуклеотида после очистки, мкмоль
I	C-C-A-G-G-A-T-C-C-T-G-G	10	TPS+Tetr	0,25
II	T-C-C-A-G-A-T-C-T-G-C-A	50	TPS+Tetr	1,40
III	C-A-G-T-T-T-A-G-G-A-T-C-C-A-T-T-T-C-A-C	80	TPSNT	1,26
IV	C-C-T-A-A-A-C-T-G	40	TPS+MeIm	2,36
V	T-C-C-T-A-A-A-C-T-G	40	TPS+MeIm	1,38
VI	A-T-C-C-T-A-A-A-C-T-G	40	TPS+MeIm	1,38
VII	G-T-G-A-A-A-T-G-G	20	TPS+MeIm	0,81
VIII	G-T-G-A-A-A-T-G-G-A	40	TPS+MeIm	2,16
IX	G-T-G-A-A-A-T-G-G-A-T	40	TPS+MeIm	0,48
X	G-T-G-A-A-A-T-G-G-G	10	TPSNT	0,30
XI	G-T-G-A-A-A-T-G-G- <i>Ap</i> (SMe)	10	TPSNT	0,62
XII	G-A-A-A-T-G-G-A-Tp(SMe)	40	TPSNT	1,01
XIII	G-T-G-A-A-A-T-G-G- <i>Ap</i>	—	—	0,20
XIV	G-A-A-A-T-G-G-A-Tp	—	—	0,22

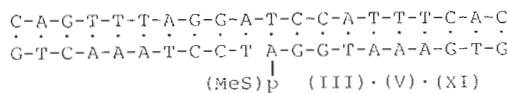
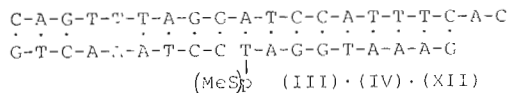
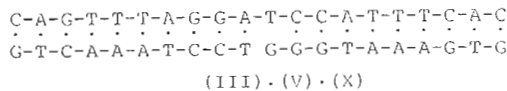
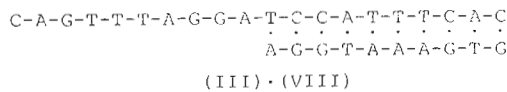
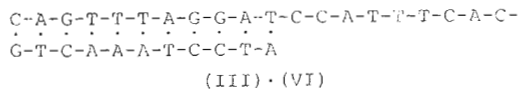
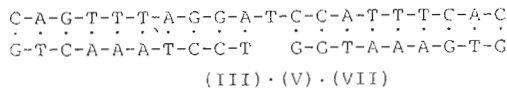
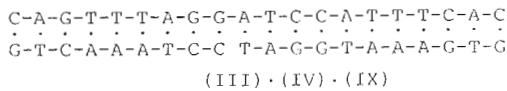
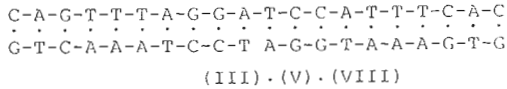
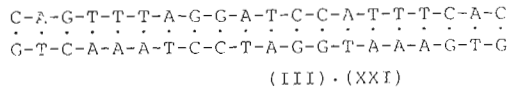
ции с помощью TPSNT или TPS и MeIm, в условиях удаления монометокситритильной группы трихлоруксусной кислотой и при хроматографической очистке триэфирных блоков на колонках с силикагелем. Кроме того, нуклеотиды (XX) устойчивы при хранении по крайней мере в течение года при комнатной температуре. Таким образом, предложенный в работе [19] фосфорилирующий агент (XIX) удобен для введения концевых фосфорильных остатков и позволяет после стадий наращивания олигонуклеотидной цепи и деблокирования легко получать 3'-фосфорилированные олигодезоксирибонуклеотиды.

Сборку олигонуклеотидов (I)–(XIV) осуществляли ди- и тринуклеотидными блоками, полученными из мономеров (XVI)–(XVIII) или (XX) экстракционным методом [20]. Определяющим фактором в выборе схемы синтеза являлось наличие повторяющихся последовательностей нуклеотидов в различных олигомерах. Олигодезоксирибонуклеотиды (I) и (II) синтезировали с использованием в качестве конденсирующего агента TPS и тетразола в мольном соотношении 1:3 [21]. Остальные олигомеры синтезировали, проводя реакции конденсации в присутствии TPS и MeIm [18] или в присутствии TPSNT [22]. Продукты конденсации выделяли адсорбционной колоночной хроматографией на силикагеле или обращенно-фазовой хроматографией, как описано в работе [23]. Циацетильную группу с промежуточных блоков в ходе синтеза олигомеров удаляли обработкой смесью триэтилмина – ацетонитрил (1:1) в течение 1 ч при комнатной температуре или 10–15 мин при 50°С [24]. Монометокситритильную группу удаляли обработкой трихлоруксусной кислотой в смеси хлороформ – этанол (9:1) в течение 10 мин при комнатной температуре [25]. Дециацетилированные и детритилированные блоки вводили в последующую реакцию конденсации без дополнительной очистки. Продукт последней стадии конденсации полностью деблокировали последовательной обработкой 4-нитробензальдоксиматом лития и водным аммиаком (см. «Экспер. часть») и выделяли ионообменной хроматографией, после чего проводили дополнительную очистку обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Полностью защищенные олигомеры (XII) и (XIII), имеющие 3'-концевой O-(2,4-дихлорфенил)-S-метилтиофосфат, детритилировали, как описано выше, обрабатывали 4-нитробензальдоксиматом лития в водном пиридине для удаления *n*-хлорфенильных групп с межнуклеотидных фосфатов и 2,4-дихлорфенильного остатка с концевого 3'-фосфата. Затем олигонуклеотиды обрабатывали водным аммиаком и после обессоливания гель-фильтрацией на биогеле Р-2 выделяли их ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Полученные олигомеры, содержащие S-метилтиофос-

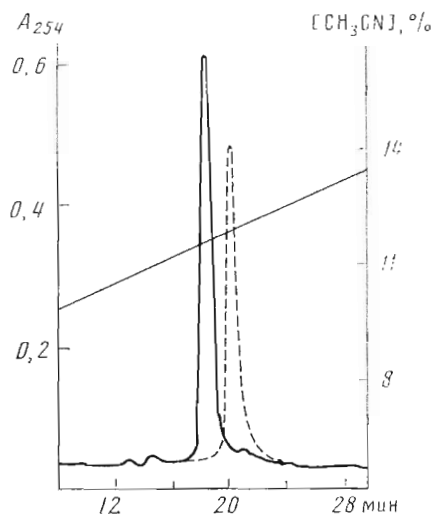
фатный остаток на 3'-конце, использовали для формирования дуплексов-субстратов эндонуклеазы *Bam*HI и метилазы *Eco* *dam*, а также превращали в соответствующие 3'-фосфаты путем окисления тиометильной группы 0,3 н. раствором иода в 1 М водном растворе иодистого натрия. Окисление протекало количественно за 30 мин при 20° С. После удаления избытка иода 3'-фосфаты олигонуклеотидов выделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ (рисунок). Гомогенность всех синтетических олигодезоксирибонуклеотидов подтверждалась электрофорезом их 5'-³²P-меченых производных в 20% ПААГ, а нуклеотидная последовательность устанавливалась методом Максама — Гилберта [26].

Схема 2



Синтетические олигодезоксирибонуклеотиды (III) — (XIV) использовали для образования двухцепочечных субстратов, структура которых показана на схеме 2, путем смешивания эквимольных растворов соответствующих олигомеров. Взаимодействие субстратов, образованных самокомплементарными олигонуклеотидами (I) и (II), с эндонуклеазой *Bam*HI, описано нами ранее [12] и здесь рассматриваться не будет. Олигонуклеотидные комплексы, показанные на схеме 2, представляют собой субстраты для рестриктазы *Bam*HI и метилазы *Eco* *dam*. В этих субстратах 20-членный олигонуклеотид (III) служит матрицей, с которой связываются более короткие олигонуклеотиды таким образом, что образующиеся участки узнавания этих ферментов содержат следующие дефекты: отсутствие фосфатной группы, отсутствие одного или нескольких нуклеотидов в одной из цепей, наличие в разрыве олигонуклеотидной цепи S-метилтиофосфатного остатка, разрыв сахарофосфатного остова с одновременной заменой аденозина на гуанозин в одной из цепей. В использованных условиях

Обращенно-фазовая ВЭЖХ продукта окисления иодом олигонуклеотида G-T-G-A-A-T-G-G-Ap(SMe) на колонке (3,2×250 мм) с LiChrosorb RP-18 в градиенте концентрации ацетонитрила (5–20%) в 0,05 М триэтиламмоний-ацетатном буфере (рН 6,5), скорость элюции 1 мл/мин. Пунктиром обозначен пик неокисленного олигонуклеотида



олигомеры образуют достаточно стабильные комплексы, температура плавления которых выше 20°С (табл. 2). Следует отметить, что в присутствии метилазы *Eco dam* наблюдается дополнительное повышение стабильности олигонуклеотидных комплексов*. В качестве контрольного субстрата использовали не имеющий дефектов дуплекс (III)·(XXI) (схема 2), который получали в результате лигазной сшивки 5'-фосфорилированного олигомера (V) с олигомером (VIII) на матрице (III).

Для контроля за расщеплением дуплексных субстратов рестриктазой *VamNI* использовали 5'-³²P-меченый олигонуклеотид — 20-членную матрицу (III). При изучении метилирования субстратов для формирования дуплексов применяли нефосфорилированные олигонуклеотиды. Поскольку схема 2 отображает структуру субстратов, использованных как для *VamNI*, так и для метилазы *Eco dam*, 5'-фосфат олигомера (III) не указан. Результаты действия эндонуклеазы *VamNI* и метилазы *Eco dam* на различные варианты олигонуклеотидных комплексов приведены в табл. 2. Как и ожидалось, наиболее эффективное расщепление (как и метилирование) происходит в субстратах, близких к полной двухцепочечной структуре участка узнавания. Отсутствие остатков адениловой или гуаниловой кислот в комплексах (III)·(V)·(VII) и (III)·(VI) приводит к потере субстратных свойств, тогда как в дуплексе (III)·(VIII), не содержащем тимидина и цитозина в участке узнавания, наблюдается лишь снижение ферментативной активности *Eco dam*-метилазы, несмотря на значительное отличие структуры субстрата от нативной. Наблюдается слабое расщепление 20-членного олигонуклеотида (III) эндонуклеазой *VamNI* во всех трех комплексах.

Необходимость наличия последовательности -G-A- в обеих цепях участка узнавания для функционирования метилтрансферазы *Eco dam* подтверждается отсутствием метилирования олигонуклеотидного комплекса (III)·(V)·(X), в котором аденин в участке узнавания заменен на гуанин. Этот комплекс эндонуклеазой *VamNI* не расщепляется. Отсутствие фосфатного звена между остатками тимидина и аденозина в комплексе (III)·(V)·(VIII) в 3 раза уменьшает степень метилирования в сравнении с комплексом (III)·(IV)·(IX), который не имеет фосфата между цитидином и тимидином. Это указывает на возможную роль фосфатного остатка в связывании с ферментом. Однако введение в участок разрыва 3'-фосфата увеличивало степень метилирования незначительно (в табл. 2 и на схеме 2 эти субстраты не показаны, так как их структуру дублируют 3'-S-метилтнфосфатные аналоги). Оказалось, что степень метилирования

* Подробные данные о зависимости температуры плавления олигонуклеотидных комплексов от их состава и об эффекте стабилизации комплексов ферментами рестрикции-модификации будут опубликованы позже.

Влияние отсутствия элементов структуры в участке узнавания на взаимодействие эндонуклеазы *Bam*HI и метилазы *Eco* dam с синтетическими субстратами

Олигонуклеотидный комплекс	Структура участка узнавания	Температура плавления олигонуклеотидного комплекса, °С	Степень расщепления олигомера (IП) при 20° С, % *	Степень метилирования комплекса при 20° С, % **
(III)·(XXI)	$\begin{array}{c} \dots\text{G}\cdot\text{A}\cdot\text{T}\cdot\text{C}\cdot\dots \\ \dots\text{C}\cdot\text{T}\cdot\text{A}\cdot\text{G}\cdot\dots \end{array}$	—	75	73
(III)·(VIII)	$\begin{array}{c} \dots\text{G}\cdot\text{A}\cdot\text{T}\cdot\text{C}\cdot\dots \\ \text{A}\cdot\text{G}\cdot\dots \end{array}$	30	10	28
(III)·(IV)·(IX)	$\begin{array}{c} \dots\text{G}\cdot\text{A}\cdot\text{T}\cdot\text{C}\cdot\dots \\ \dots\text{C}\cdot\text{T}\cdot\text{A}\cdot\text{G}\cdot\dots \end{array}$	31	65	71
(III)·(V)·(VIII)	$\begin{array}{c} \dots\text{G}\cdot\text{A}\cdot\text{T}\cdot\text{C}\cdot\dots \\ \dots\text{G}\cdot\text{A}\cdot\text{T}\cdot\text{G}\cdot\dots \end{array}$	—	96	24
(III)·(V)·(X)	$\begin{array}{c} \dots\text{G}\cdot\text{A}\cdot\text{T}\cdot\text{C}\cdot\dots \\ \dots\text{C}\cdot\text{T}\cdot\text{G}\cdot\text{G}\cdot\dots \end{array}$	28	0	0
(III)·(V)·(VII)	$\begin{array}{c} \dots\text{G}\cdot\text{A}\cdot\text{T}\cdot\text{C}\cdot\dots \\ \dots\text{C}\cdot\text{T}\cdot\text{G}\cdot\dots \end{array}$	24	9	0
(III)·(VI)	$\begin{array}{c} \dots\text{G}\cdot\text{A}\cdot\text{T}\cdot\text{C}\cdot\dots \\ \dots\text{C}\cdot\text{T}\cdot\text{A}\cdot\dots \end{array}$	—	13	2
(III)·(IV)·(XII)	$\begin{array}{c} \dots\text{G}\cdot\text{A}\cdot\text{T}\cdot\text{C}\cdot\dots \\ \dots\text{C}\cdot\text{T}\cdot\text{A}\cdot\text{G}\cdot\dots \\ \text{(MeS)}\text{p} \end{array}$	—	92	94
(III)·(V)·(XI)	$\begin{array}{c} \dots\text{G}\cdot\text{A}\cdot\text{T}\cdot\text{C}\cdot\dots \\ \dots\text{C}\cdot\text{T}\cdot\text{A}\cdot\text{G}\cdot\dots \\ \text{(MeS)}\text{p} \end{array}$	22	97	32

* За 100% принята степень расщепления рестриктазой *Bam*HI не содержащего дефектов комплекса (III)·(XXI) при 37° С.

** За 100% принята степень метилирования комплекса (III)·(XXI) при 37° С.

субстратов (III)·(IV)·(XII) и (III)·(V)·(XI) по сравнению с комплексами, содержащими 3'-фосфат в участке узнавания, отличается незначительно и больше, чем у соответствующих комплексов (III)·(IV)·(IX) и (III)·(V)·(VIII) без фосфатной группы, что свидетельствует о незначительном искажении структуры участка узнавания тиометильной группой. Различное положение тиометильной группы в участке узнавания эндонуклеазы *Bam*HI в комплексах (III)·(IV)·(XII) и (III)·(V)·(XI) не оказывает существенного влияния на степень расщепления 20-членного олигонуклеотида (III) этим ферментом.

В предыдущем сообщении [6] нами рассмотрен более широкий круг немодифицированных олигонуклеотидных субстратов и показано, что метилаза *Eco* dam не взаимодействует с нуклеотидной последовательностью -G-A-T-C-, находящейся в одноцепочечной форме. Полученные в данной работе результаты позволяют заключить, что для эффективного переноса метильных групп на двухспиральный субстрат необходима поворотная симметрия второго порядка в расположении динуклеотидных фрагментов -G-A-. При нарушении симметрии в расположенных фрагментах -G-A-, как следует из примера с заменой аденина на гуанин, продуктивного взаимодействия не происходит. Мономерная структура метилазы *Eco* dam в растворе [1, 27], с одной стороны, и взаимодействие этого фер-

мента только с двухцепочечными структурами, обладающими элементом поворотной симметрии второго порядка, — с другой, позволяют предположить, что метилаза *Eco dam* функционирует в виде димера или же имеет два центра связывания с двухспиральным субстратом. Наблюдается определенная аналогия в структурах субстратов, которые необходимы для продуктивного взаимодействия с эндонуклеазой рестрикции *VamHI* и метилазой *Eco dam*.

Таким образом, применение синтетических субстратов, в которых отсутствуют отдельные элементы структуры участка узнавания, позволяет получить важную информацию о закономерностях взаимодействия ДНК с ферментами рестрикции-модификации. Очевидно, что с помощью исключения нуклеотидных звеньев из состава участка узнавания невозможно получить информацию о месте связывания ферментов с эпитопами двойной спирали, поэтому в дальнейшем предполагается расширить набор искусственных субстратов путем введения модификаций в гетероциклические основания и сахарофосфатный остов.

Экспериментальная часть

В работе использовали триазол, диметилдисульфид, 4-трет-бутилбензойную кислоту, N-метилимидазол (Fluka); акриламид, метилбисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилаэтилендиамин, монометокситритилхлорид (Sigma). Дезоксирибонуклеозиды получены из НИКТИ БАВ (Бердск). В работе использовали также $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (2000 Ки/ммоль) и S-аденозил $[\text{}^3\text{H}]\text{метионин}$ (15 Ки/ммоль; Amersham).

Пиридин обезвоживали перегонкой над P_2O_5 и затем над CaH_2 и хранили над молекулярными ситами 4 Å (Fluka). Ацетонитрил перегоняли над P_2O_5 и затем над CaH_2 . Тетразол получали по методу [28]. Хлорангидрид O-(2,4-дихлорфенил)-S-метилтиофосфорной кислоты (XIX) синтезировали из 2,4-дихлорфенилдихлорфосфита [29] по методу [30]. TPSNT получали согласно методу [22]. Аминозащитные группы в нуклеозиды вводили как описано в работе [16].

Ход реакции фосфотриэфириого синтеза контролировали ТСХ на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck) в системе хлороформ — этанол, 9:1 (А) или хлороформ — этанол, 1:1 (Б). Пятна тритилсодержащих веществ выявляли обработкой пластинок парами трифторуксусной кислоты. Вещества, содержащие дезоксирибозу, выявляли кратковременным нагреванием пластинок, смоченных цистеиновым реактивом Диле. Препаративную адсорбционную хроматографию на колонках (4×10 см) с силикагелем Kieselgel 60 (40–63 мкм, Merck) проводили в линейном градиенте концентрации этанола в хлороформе, препаративную обращенно-фазовую хроматографию — как описано в работе [23]. Деблокированные олигонуклеотиды выделяли с помощью жидкостного хроматографа Altex 332 на колонках с аминообменником Partisil SAX-10 (Whatman). Обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на LiChrosorb RP-18 (Merck).

Выходы продуктов межнуклеотидных конденсаций определяли взвешиванием после хроматографической очистки или с помощью ТСХ.

Рестриктазу *VamHI* (КФ 3.1.23.6) выделяли из *Bacillus amyloliquefaciens* по методу Уилсона и Янга [31]. Метилтрансферазу *Eco dam* выделяли из *E. coli* B839 по методу [27]. Олигонуклеотиды 5'- ^{32}P -фосфорилировали в присутствии Т4-полинуклеотидкиназы (КФ 2.7.1.78; НИКТИ БАВ, Бердск) в условиях, описанных в работе [32]. Условия проведения реакции и анализ продуктов гидролиза синтетических субстратов рестриктазой *VamHI* см. в работе [13], условия проведения реакции и определение степени метилирования синтетических субстратов *Eco dam*-метилазой — в работе [6].

Температуру плавления олигонуклеотидных комплексов определяли в 30 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,8), используя эквивалентные количества олигонуклеотидов с общей концентрацией 1 ОЕ/мл.

1. Синтез 3'-O-(4-трет-бутилбензоил)-2'-дезоксинуклеозидов. Растворяли (1 ммоль) 5'-O-монометокситритилнуклеозида, 0,214 г (1,2 ммоль) 4-трет-бутилбензойной кислоты и 0,25 мл (3 ммоль) MeIм в пиридине и упаривали с сухим пиридином (3××10 мл) до объема 5 мл. К раствору добавляли 0,725 г (2,4 ммоль) TPS и оставляли на 1 ч при 20°С. Затем добавляли 0,1 мл воды и реакционную смесь упаривали в вакууме. К остатку добавляли толуол и вновь упаривали до исчезновения следов пиридина. Остаток растворяли в 5 мл смеси хлороформ — этанол (9:1) и добавляли трихлоруксусную кислоту до появления оранжевой окраски. Смесь выдерживали 10 мин при комнатной температуре, разбавляли в 4 раза хлороформом, промывали насыщ. KHCO_3 и вещества, содержащиеся в органической фазе, хроматографировали на колонке с силикагелем в линейном градиенте концентрации этанола в хлороформе. После осаждения пептаном из 5 мл хлороформа и высушивания в вакуум-экспикаторе над окисью бария получили 3'-O-трет-бутилбензоил-2'-дезоксинуклеозиды (указаны выход в расчете на исходный 5'-O-монометокситритилнуклеозид (%), значение R_f в системе А и т. п.): XVIa, 89; 0,56; 105–110°С; XVIb, 82; 0,68; 225°С (разл.); XVIв, 75; 0,51; 148–152°С; XVIг, 70; 0,6; 112–115°С.

2. Синтез 5'-О-монометокситритил-2'-дезоксинуклеозид-3'-(*n*-хлорфенил)фосфатов. К перемешиваемому при 0°С раствору 15,55 г (222 ммоль) триазола в сухом пиридине (250 мл) добавляли 18,4 мл (75 ммоль) *n*-хлорфенилдихлорфосфата в течение 5 мин, затем перемешивали еще 10 мин и к полученному раствору фосфорилирующего агента постепенно прибавляли раствор 50 ммоль *N*-ацил-5'-О-монометокситритил-2'-дезоксинуклеозида в 200 мл сухого пиридина. Прибавив весь нуклеозид (4–5 мин), ледяную баню убирали и реакционную массу перемешивали 30 мин. Затем при охлаждении смешивали с 100 мл 0,5 М ТЕАВ и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 500 мл хлороформа, промывали 0,2 М ТЕАВ (3×200 мл), органическую фазу высушивали, упаривали до объема 50 мл и нуклеотид осаждали 1 л пентана, содержащего 1% триэтиламина. Выход триэтиламмониевых солей 5'-О-монометокситритил-2'-дезоксинуклеозид-3'-(*n*-хлорфенил)фосфатов 90–100%.

3. Синтез 2'-дезоксинуклеозид-3'-(2,4-дихлорфенил)-S-метилтиофосфатов. К раствору 1 ммоль 5'-О-монометокситритилнуклеозида в пиридине (5 мл), содержащем 0,32 мл MeIm (4 ммоль), прибавляли 0,419 г (1,4 моль) фосфорилирующего агента (XIX) и смесь выдерживали 1 ч при комнатной температуре. Затем добавляли 1 мл воды и упаривали в вакууме, остаток растворяли в хлороформе (100 мл), промывали 0,1 М ТЕАВ (50 мл) и водой (50 мл), органическую фазу несколько раз упаривали с толуолом и остаток растворяли в 4 мл смеси хлороформ–этанол (9:1). К раствору добавляли трихлоруксусную кислоту до появления оранжевой окраски и смесь выдерживали 8 мин при комнатной температуре. Раствор разбавляли хлороформом до 50 мл, промывали насыщ. KHCO_3 (2×10 мл) и после высушивания и упаривания остаток хроматографировали на колонке с силикагелем в градиенте концентрации этанола в хлороформе. Выделенное вещество осаждали из 5 мл хлороформа пентаном. Получены *N*-ацил-2'-дезоксинуклеозид 3'-О-(2,4-дихлорфенил)-S-метилтиофосфаты (указано вещество, выход (%), значение R_f в системе А, т.пл.): XXа, 86; 0,53; 75–78°С; XXб, 71; 0,62; 180°С (разл.); XXв, 63; 0,45; 106–110°С; XXг, 81; 0,61; 82–85°С.

4. Синтез олигонуклеотидов. Межнуклеотидные конденсации в синтезе олигонуклеотидов (I) и (II) проводили в присутствии TPS и 3-кратного избытка тетразола в пиридине как описано в работе [21]. Время реакции конденсации 1 ч, средний выход на стадии конденсации 59%. Олигомеры (IV)–(IX) синтезировали с использованием смеси TPS и MeIm в пиридине в условиях, описанных в работе [18]; средний выход продуктов межнуклеотидных конденсаций составлял 71%. Олигонуклеотиды (III) и (X)–(XIV) синтезировали с использованием TPSNT в пиридине (1–2 ч) как описано в работе [22]; средний выход 72%.

5. Полное удаление защитных групп и выделение олигонуклеотидов. Полностью защищенные олигонуклеотиды детритилировали трихлоруксусной кислотой и, не выделяя их из реакционной смеси, обрабатывали 0,5 М раствором 4-нитробензальдоксимата лития в водном пиридине (3 мл) в течение 10 ч при комнатной температуре. Раствор нейтрализовали 50% уксусной кислотой и экстрагировали этилацетатом. Водный слой упаривали и продукт деблокирования обрабатывали кош. NH_3 в воде (5 мл) при 45°С в течение ночи. Аммиак удаляли в вакууме, продукт обессоливали на колонке с биогеелем P-2 0,01 М ТЕАВ и олигомеры выделяли ионообменной ВЭЖХ на Partisil 10-SAX в градиенте концентрации KH_2PO_4 (0,02–0,3 М, pH 6,5) в 30% ацетонитриле. Дополнительную очистку олигонуклеотидов проводили обращенно-фазовой хроматографией в градиенте концентрации ацетонитрила (5–20%).

6. Окисление тиометильных групп в 5'-фосфорилированных олигонуклеотидах. Очищенный ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ олигонуклеотид (XI) или (XII) (по 50 ОЕ₂₆₀) пропускали через колонку с биогеелем P-2. Элюат упаривали, растворяли в 100 мкл воды и смешивали со 100 мкл 0,3 н. раствора пероксида в 1 М иодистом натрии. Смесь выдерживали 30 мин при 20°С и затем экстрагировали эфиром (5×1 мл). Водный слой разбавляли 50 мл воды и упаривали в вакууме. 3'-Фосфорилированные олигонуклеотиды (XIII) и (XIV) выделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ (рисунок).

ЛИТЕРАТУРА

1. Modrich P. // C. R. C. Crit. Rev. Biochem. 1982. V. 13. № 3. P. 287–323.
2. Goppelt M., Pingoud A., Maass G., Mayer H., Köster H., Frank R. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 104. № 1. P. 101–107.
3. Baumstark B. R., Roberts R. J., Rajbhandary U. L. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 18. P. 8943–8950.
4. Alves J., Pingoud A., Haupt W., Langowski J., Peters F., Maass G., Wolff C. // Eur. J. Biochem. 1984. V. 140. № 1. P. 83–92.
5. Берлин Ю. А., Звонок П. М., Чуепило С. А. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 10. С. 1522–1535.
6. Зинovieв В. В., Горбунов Ю. А., Попов С. Г., Малыгин Э. Г., Бурьянов Я. И., Нестеренко В. Ф., Баев А. А., Вепожинский И. Т. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. Вып. 4. С. 947–954.
7. Dwyer-Hallquist P., Kezdy F. J., Agarwal K. L. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 19. P. 4693–4700.
8. Ono A., Sato M., Ohtani Y., Ueda T. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 23. P. 8939–8949.
9. Bahl C. P., Wu R., Brousseau R., Sood A. K., Hsiung H. M., Narang S. A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1978. V. 81. № 3. P. 695–703.

10. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова Н. В., Быстров Н. С., Болдырева Е. Ф., Чернов Б. К., Колосов М. Н. // Биоорг. химия. 1978. Т. 4. № 12. С. 1600-1611.
11. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Шингарова Л. Н., Быстров Н. С., Филиппов С. А., Болдырева Е. Ф., Колосов М. Н., Матвиенко Н. Н., Крамаров В. М. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. № 4. С. 1002-1005.
12. Зиновьев В. В., Колесников В. А., Безнедельная Н. Н., Гилев А. Ф., Горбунов Ю. А., Попов С. Г., Малигин Э. Г. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. Вып. 1. С. 169-175.
13. Zinoviev V. V., Gorbunov Yu. A., Vaslanov M. M., Popov S. G., Malugin E. G. // FEBS Letters. 1983. V. 154. № 2. P. 282-284.
14. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 2. P. 353-371.
15. Köster H., Hoppe N., Kohli V., Kröpelin M., Kaut H., Kulikowski K. // Nucl. Acids Res., Symposium Ser. 1980. № 7. P. 39-60.
16. Schaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G. // J. Amer. Chem. Soc. 1963. V. 85. № 23. P. 3821-3827.
17. Gait M. J., Matthes H. W. D., Singh M., Sproat B. S., Titmas R. C. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 20. P. 6243-6254.
18. EJimov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 21. P. 6675-6694.
19. Reese C. B., Yau L. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1978. № 23. P. 1050-1052.
20. Hirose T., Crea R., Itakura K. // Tetrahedron Lett. 1978. V. 19. № 28. P. 2449-2452.
21. Seth A. K., Jay E. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 22. P. 5445-5459.
22. Jones S. S., Rayner B., Reese C. B., Ubasawa A., Ubasawa M. // Tetrahedron. 1980. V. 36. № 21. P. 3075-3085.
23. Калашников В. В., Самуков В. В., Шубина Т. П., Ямщиков В. Ф. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 5. С. 666-672.
24. Беликов С. И., Горбунов Ю. А., Попов С. Г. Способ удаления цитрильной защитной группы с производных моно- и олигонуклеотидов: А. с. 809866 СССР. // Б. И. 1982. № 12. С. 285.
25. Беликов С. И., Горбунов Ю. А., Попов С. Г. Способ удаления тритильных защитных групп с производных нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов: А. с. 828671 СССР // Б. И. 1982. № 12. С. 285.
26. Mazam A., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560-564.
27. Бурьянов Я. И., Захарченко В. Н., Баев А. А. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 259. № 6. С. 1492-1495.
28. Finnegan W. G., Hervey R. A. // J. Org. Chem. 1959. V. 24. № 10. P. 1565-1567.
29. Tolkmith H. // J. Org. Chem. 1958. V. 23. № 11. P. 1682-1684.
30. Петров К. А., Неймышева А. А., Доцев Г. В., Варич А. Г. // Журн. общ. химии. 1961. Т. XXXI. Вып. 4. С. 1366-1371.
31. Wilson G. A., Young F. E. // J. Mol. Biol. 1975. V. 97. № 1. P. 123-125.
32. Lillehaug J. R., Kleppe R. K., Kleppe K. // Biochemistry. 1976. V. 15. № 9. P. 1858-1865.

Поступила в редакцию
15.1.1987

CHEMICAL SYNTHESIS AND CHARACTERISTICS OF OLIGONUCLEOTIDE SUBSTRATES FOR RESTRICTION ENDONUCLEASE *Bam*HI AND METHYLASE *Eco* dam

GORBUNOV Yu. A., ZINOVIEV V. V., RECHKUNOVA N. I., OVECHKINA L. G.,
POPOV S. G., MALYGIN E. G.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology,
Koltsovo, Novosibirsk Region*

Oligodeoxyribonucleotides which form a number of duplexes, containing the recognition sequences for endonuclease *Bam*HI and DNA methylase *Eco* dam, were synthesised by the phosphotriester approach. Furthermore, synthesis of 3'-phosphorylated oligodeoxyribonucleotides from corresponding S-methyl phosphorothioate triester oligomers is described. The synthetic duplexes are characterised by some defects in the recognition sequences for endonuclease *Bam*HI and methylase *Eco* dam, viz. nick, absence of an internucleotide phosphate, modifications (including partial single-strandedness) of the recognition site. Interaction of the enzymes with these synthetic substrates was investigated.