



УДК 547.9 : 542.953.2

## СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

X\*. СИНТЕЗ ФРАГМЕНТА 36—46 СТРУКТУРНОГО ГЕНА  
ДРОЖЖЕВОЙ тРНК<sup>Val</sup><sub>1</sub>*Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

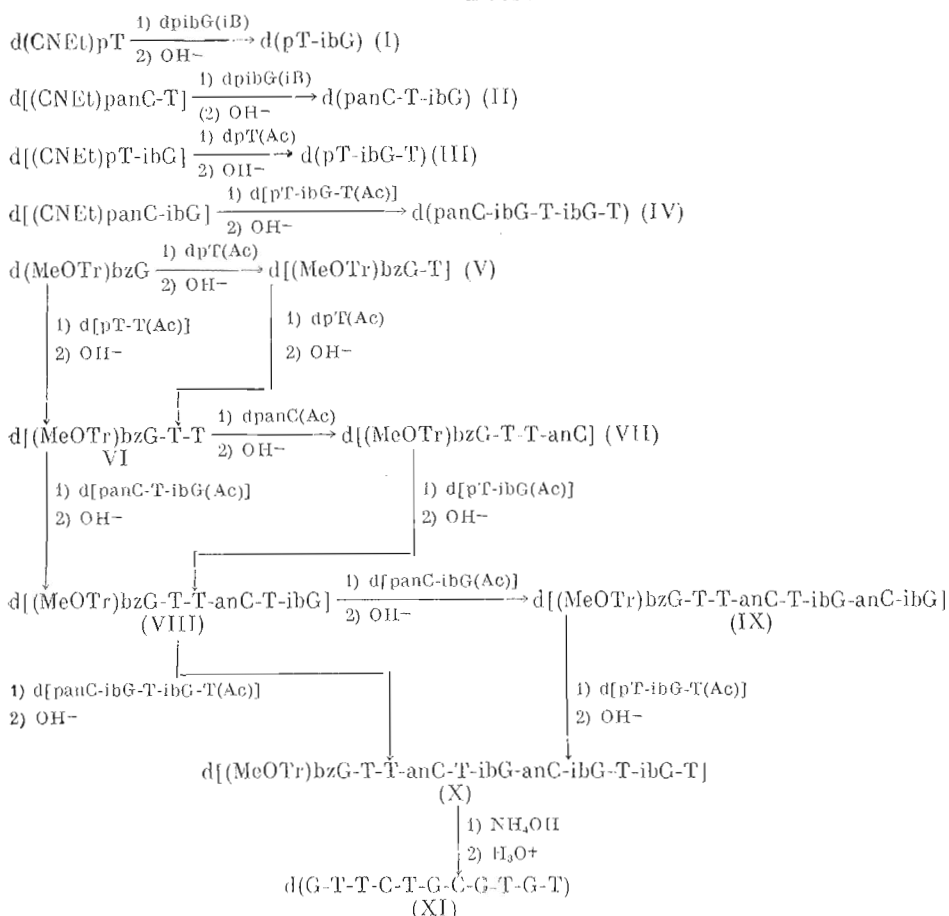
Осуществлен химический синтез ундекадезоксирибонуклеотида d(G-T-T-C-T-G-C-G-T-G-T), комплементарного участку 36—46 дрожжевой тРНК<sup>Val</sup><sub>1</sub>. Полученное вещество проанализировано микроколоночной ионообменной хроматографией в нейтральной и кислой средах, а также путем ферментативного 5'-<sup>32</sup>P-фосфорилирования с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле и гомохроматографией. Нуклеотидная последовательность доказана на <sup>32</sup>P-меченом препарате идентификацией 5'-концевого звена после полного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда и анализом нуклеотидной карты, полученной двухмерным разделением продуктов частичного фосфодиэстеразного гидролиза при помощи электрофореза на ацетилицеллюлозе и гомохроматографии. Получен двухцепочечный комплекс этого ундекануклеотида с ранее синтезированным d(A-C-A-C-G-C-A-G-A-A-C), представляющий собой фрагмент 36—46 структурного гена дрожжевой тРНК<sup>Val</sup><sub>1</sub>.

Ранее мы синтезировали ундекадезоксирибонуклеотид d(A-C-A-C-G-C-A-G-A-A-C), гомологичный участку 36—46 дрожжевой валиновой тРНК [1]. В настоящей работе описывается синтез комплементарного ундекануклеотида d(G-T-T-C-T-G-C-G-T-G-T) (XI) и получение соответствующего двухцепочечного комплекса.

Синтез ундекануклеотида (XI) был нами осуществлен двумя путями (см. схему). В качестве 5'-концевого звена в обоих случаях был использован N<sup>2</sup>-бензоил-5'-монометокситритилдезоксигуанозин. Применение бензоильной группы, более устойчивой, чем изобутирильная, было обусловлено тем, что в ходе многостадийного синтеза 5'-концевой остаток по сравнению с остальными звеньями молекулы большее число раз подвергается действию щелочи, которое может вызывать N-деацилирование. Синтез олигонуклеотидных блоков, содержащих 5'-фосфатный остаток, проводили с применением 5'-β-цианэтильной и 3'-O-ацетильной защитных групп; в качестве конденсирующих реагентов использовали арилсульфохлориды или MSI. Конденсацией d(MeOTr)bzG и dpT(Ac) в присутствии TPS был получен с выходом 88% динуклеозидмонофосфат (V), который выделили избирательной экстракцией органическими растворителями из

\* Сообщение IX см. [1]. Используются сокращения, рекомендованные комиссией IUPAC — IUB; кроме того, введены следующие сокращения: ib, iB — изобутирил, MS — мезитилсульфохлорид, TPS — 2,4,6-триизопропилабензолсульфохлорид, MSI — мезитилсульфонилмидазолид, TEAB — бикарбонат триэтиламина, VPDE — фосфодиэстераза змеиного яда.

## Схема



разбавленного раствора в ТЕАВ по методу [2]. Аналогичным образом был выделен и тринуклеозиддифосфат (VI), полученный из  $d[(\text{MeOTr})\text{bzG-T}]$  и  $\text{d}(\text{pT}(\text{Ac}))$  с выходом 60%. Это же соединение было синтезировано с выходом 50% при взаимодействии  $d[(\text{MeOTr})\text{bzG}]$  с  $\text{d}(\text{pT-T}(\text{Ac}))$  в присутствии  $\text{MSI}$ , причем продукты реакции разделяли хроматографией на силикагеле в смеси хлороформ — метанол — пиридин с возрастающим содержанием метанола. Взаимодействие соединения (VI) с  $\text{d}(\text{panC}(\text{Ac}))$  в присутствии  $\text{MS}$  привело с выходом 55% к тетра нуклеозидтрифосфату  $d[(\text{MeOTr})\text{bzG-T-T-anC}]$  (VII), который был отделен от исходного дифосфата экстракцией последнего органическими растворителями, а затем очищен хроматографией на DEAE-целлюлозе по методу Кёсселя [3].

Следующим этапом явился синтез гексануклеотида (VIII). Для его осуществления были получены динуклеотид  $d(\text{pT-ibG})$  и три нуклеотид  $d(\text{panC-T-ibG})$  и проведена их конденсация соответственно с тетра нуклеозидтрифосфатом (VII) (в присутствии  $\text{MS}$ ) и тринуклеозиддифосфатом (VI) (под действием  $\text{MSI}$ ). В первом случае выход гексануклеотида (VIII) составил 26%, во втором — 34%; очистка проводилась хроматографией на DEAE-целлюлозе по Кёсселю, а затем в градиенте концентрации  $\text{NaCl}$  в 7 М мочеvine.

Далее были получены блоки, необходимые для завершения синтеза ундекануклеотида (X). Упомянутый выше динуклеотид  $d(\text{pT-ibG})$  был превращен с выходом 31% в тринуклеотид  $d(\text{pT-ibG-T})$ , при взаимодействии 3'-О-ацетата которого с  $d[(\text{CNEt})\text{panC-ibG}]$  был синтезирован 3'-концевой пентануклеотид  $d(\text{panC-ibG-T-ibG-T})$  (IV). Конденсация

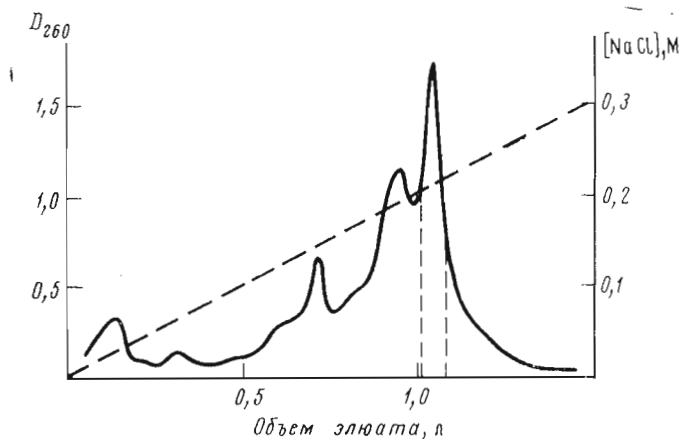


Рис. 1. Выделение ундекануклеотида (XI). Хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{Cl}^-$ ,  $2,5 \times 12,5$  см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine, 0,02 М трис-HCl, pH 7,5, фракции по 5,2 мл/11 мин. Отмеченная пунктиром центральная часть пика содержит 90 ОЕ<sub>260</sub> ундекануклеотида (XI)

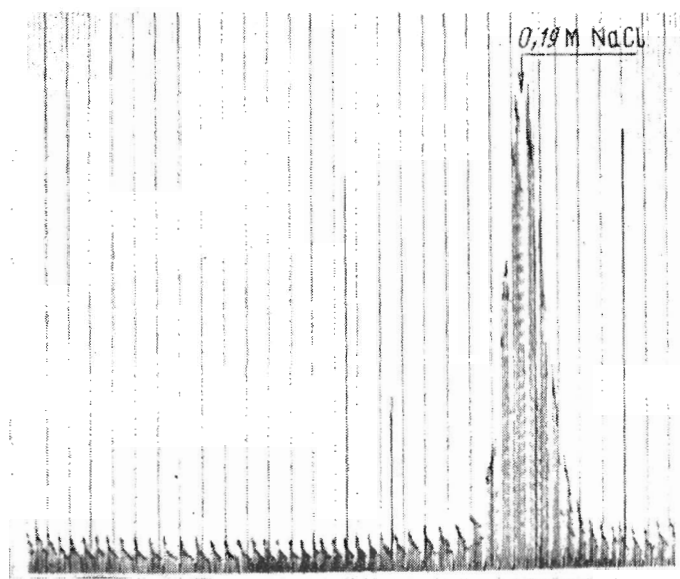


Рис. 2. Микроколоночная хроматография ундекануклеотида (XI) на DEAE-целлюлозе ( $\text{Cl}^-$ ,  $0,8 \times 80$  мм) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine, содержащей 0,01 М трис-HCl, pH 7,5 (0—0,27 М, общий объем градиента 600 мкл), скорость элюции 300 мкл/ч. Запись на МСФП-1 (циклическая смена длин волн 250, 260, 270, 280, 290 нм)

этого вещества с гексануклеотидом (VIII) привела к желаемому ундекануклеотиду (XI), однако его очистка оказалась затруднительной, и выход индивидуального соединения не превышал 4% (см. рис. 1 и 2).

Более эффективный вариант синтеза, при котором конечный ундекануклеотид (XI) легче удалось получить свободным от примесей, близких по длине цепи и заряду, состоял в последовательном наращивании гексануклеотида (VIII) ди- и тринуклеотидным блоками d(papC-ibG) и (III); в обоих случаях в качестве конденсирующего реагента использовали TPS. При этом выход на стадии октануклеотида составил 33%, а в заклю-

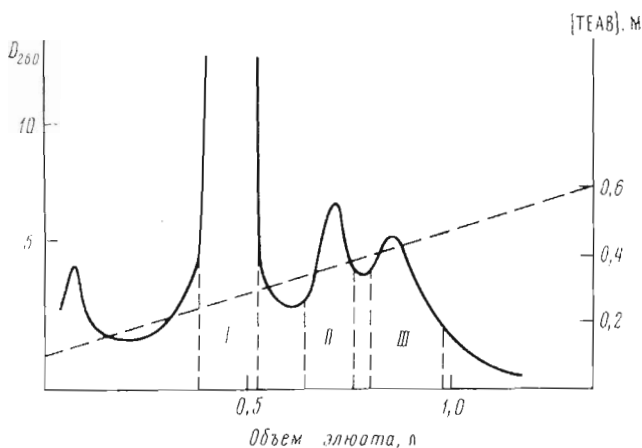


Рис. 3. Выделение ундекануклеотида (X). Хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $2 \times 25$  см) в линейном градиенте концентрации TEAB в 50%-ном спирте (0,8 л 0,1 М — 0,8 л 0,7 М), фракции по 8 мл/8 мин. Пик I содержит 2200  $\text{OE}_{260}$  тринуклеотида (III), пик II (600  $\text{OE}_{260}$ ) — октатнуклеотид (IX), пик III (650  $\text{OE}_{260}$ ) — ундекануклеотид (X)

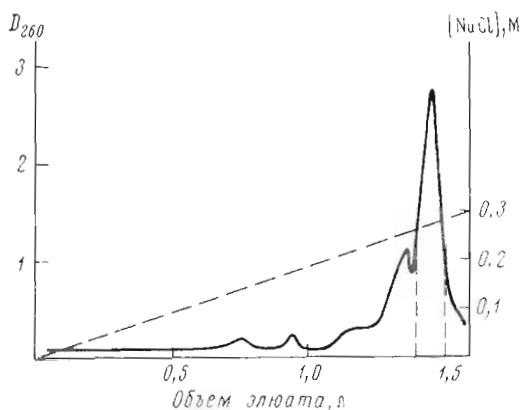


Рис. 4. Рехроматография ундекануклеотида (X) на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{Cl}^-$ ,  $2,5 \times 20$  см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевице, 0,02 М трис-HCl, pH 7,5, фракции по 7 мл/7 мин. Отмеченная пунктиром центральная часть пика содержит 230  $\text{OE}_{260}$  ундекануклеотида (X)

чительной конденсации — 14%. Кривые последовательного хроматографического разделения продуктов этой конденсации приведены на рис. 3 и 4.

После удаления защитных групп и анионообменной хроматографии в 7 М мочевице при pH 3,5 (рис. 5) был получен незащищенный ундекануклеотид d(G-T-T-C-T-G-C-G-T-G-T) (XI). Его гомогенность была доказана микроколоночной хроматографией (рис. 6), а также введением 5'-концевой метки путем фосфорилирования с помощью  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  и T4-полинуклеотидкиназы (рис. 7) с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле и гомохроматографией.

Для доказательства нуклеотидной последовательности этот меченый ундекануклеотид был подвергнут полному и частичному гидролизу с помощью VPDE. Полный гидролиз позволил идентифицировать 5'-концевое звено dpG (рис. 8), а при частичном гидролизе была получена смесь олиго-

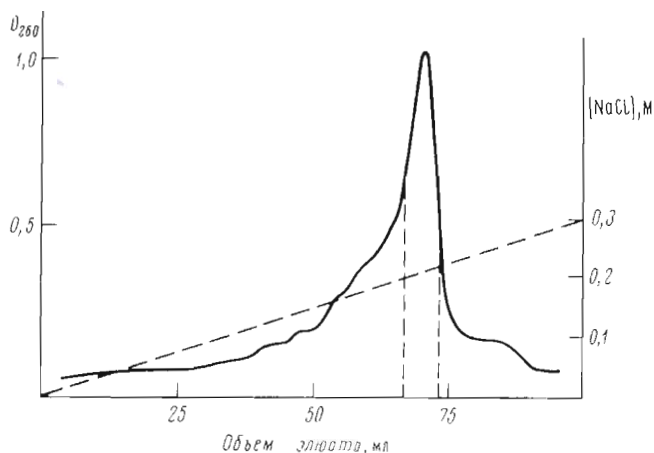


Рис. 5. Выделение ундекануклеотида (XI). Хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{Cl}^-$ ,  $0,6 \times 10$  см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевице, pH 3,5, скорость элюции 0,5 мл/мин. Отмеченная пунктиром центральная часть пика содержит 5  $\text{O}_{260}$  ундекануклеотида (XI)

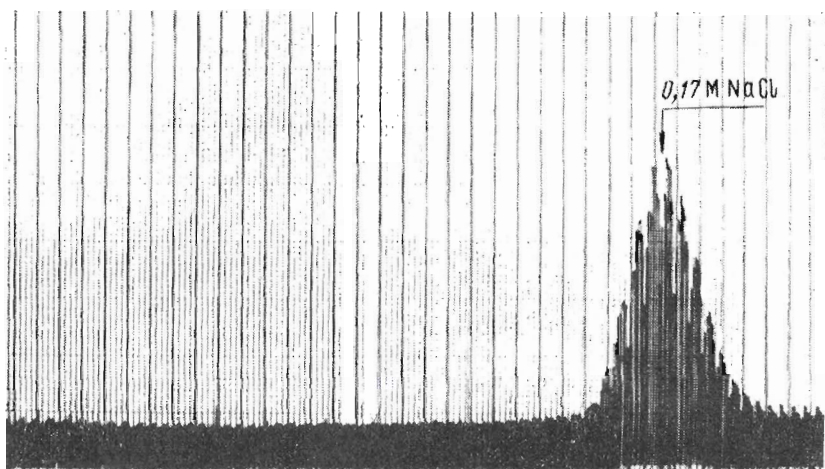


Рис. 6. Микроколоночная хроматография ундекануклеотида (XI) на DEAE-целлюлозе ( $\text{Cl}^-$ ,  $0,8 \times 80$  мм) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевице, pH 3,5 (0—0,20 М, общий объем градиента 600 мкл), скорость элюции 300 мкл/ч. Запись на МСФП-1 (циклическая смена длина волны 250, 260, 270, 280, 290 нм)

нуклеотидов, которую разделили высоковольтным электрофорезом на ацетилцеллюлозе при pH 3,5 и гомохроматографией во взаимно перпендикулярных направлениях (рис. 9). Ранее было найдено, что олигонуклеотиды, различающиеся по длине на одно нуклеотидное звено, располагаются при таком разделении один относительно другого в зависимости от природы этого звена [4]. Их взаимное расположение определяется главным образом различиями в подвижности при электрофорезе в кислой среде, что в свою очередь связано со склонностью соответствующего гетероциклического основания к протонированию. На этом основана структурная интерпретация нуклеотидных карт, подобных приведенной на рис. 9. Однако в ходе наших исследований оказалось, что ранее сформулированные правила не являются универсальными. Мы нашли, что взаимное расположе-

Рис. 7. Хроматографическое разделение реакционной смеси из опыта 11А на колонке с сефадексом G-50 (сверхтонкий;  $0,8 \times 43$  см). Элюировали 0,1 М ТЕАВ, собирая фракции по 0,4 мл/5 мин. Из каждой фракции наносили 2 мкл на DEAE-бумагу ( $1 \times 1$  см) и измеряли радиоактивность в толуольном растворе сцинтиллятора на счетчике Mark II («Nuclear Chicago»)

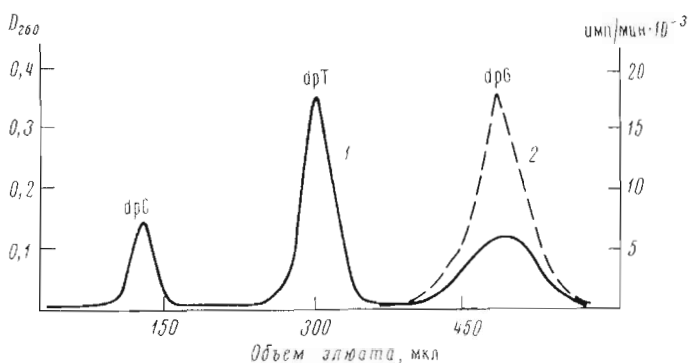
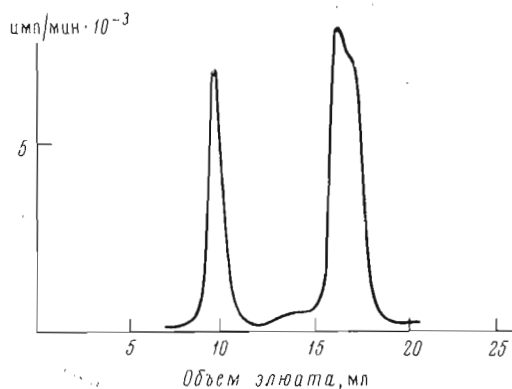


Рис. 8. Хроматографическое разделение продуктов полного фосфодиэстеразного гидролиза из опыта 11В на колонке с дауэксом  $1 \times 2$  ( $0,12 \times 15$  см). Элюировали линейным градиентом концентрации  $\text{NH}_3\text{COOH}$ , рН 4,2 (0,1—1,0 М, общий объем градиента 600 мкл), собирая фракции по 15 мкл. 1 —  $D_{260}$ , 2 — радиоактивность

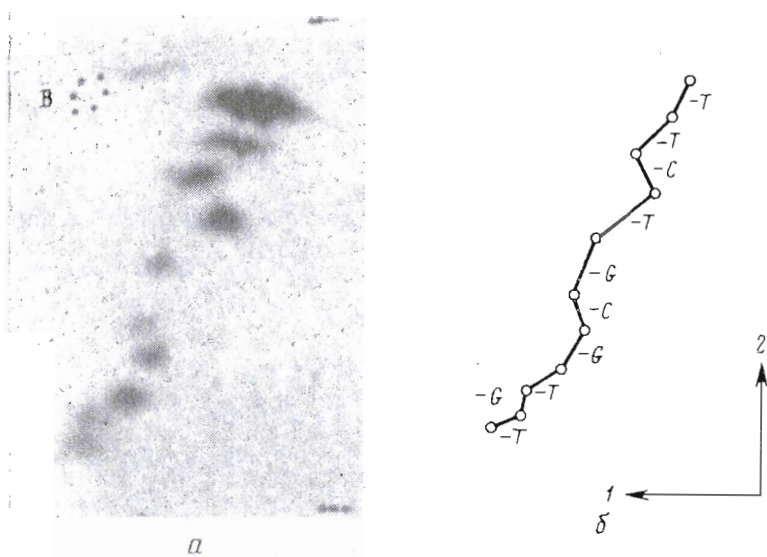


Рис. 9. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза фосфодиэстеразой ундекануклеотида  $d(^{32}\text{pG-T-T-C-T-G-C-G-T-G-T})$  из опыта 11В. Первое направление — электрофорез на ацетилцеллюлозе при рН 3,5; второе — гомохроматография на DEAE-целлюлозе (В — пятно ксиленицианола FF). а — радиоавтограмма, б — схема

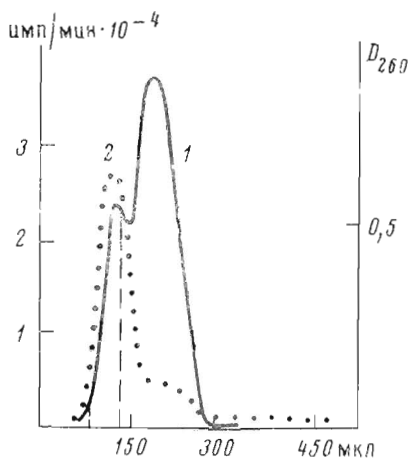


Рис. 10

Рис. 10. Выделение комплекса  $d(^{32}\text{pG-T-T-C-T-G-C-G-T-G-T}) \cdot d(\text{A-C-A-C-G-C-A-G-A-A-C})$  гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 в 0,05 М трис-АсОН (рН 7,5), 0,01 М  $\text{MgCl}_2$ , 0,001 М EDTA, при 2°. 1 —  $D_{260}$ , 2 — радиоактивность

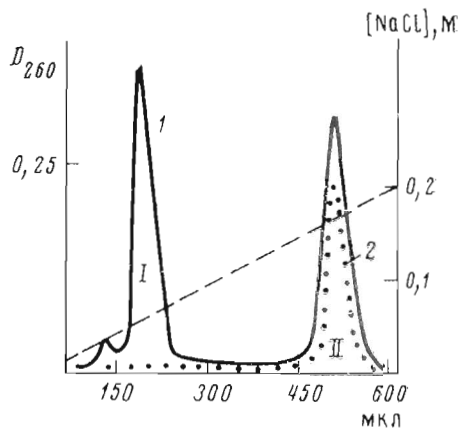


Рис. 11

Рис. 11. Разделение компонентов комплекса после термической денатурации. Хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{Cl}^-$ ) в градиенте концентрации  $\text{NaCl}$  в 7 М мочеvine, рН 3,5. Пик I содержит  $d(\text{A-C-A-C-G-C-A-G-A-A-C})$ , пик II —  $d(^{32}\text{pG-T-T-C-T-G-C-G-T-G-T})$ . 1 —  $D_{260}$ , 2 — радиоактивность

ние продуктов частичного гидролиза определяется не только природой отщепляющегося звена, но и нуклеотидным составом исходного сегмента или даже структурным окружением этого звена. Следует, впрочем, отметить, что в то время как отщепление  $\text{dpC}$  и  $\text{dpT}$  вызывает сдвиги, которые можно считать характеристическими (ср. [4]), отщепление  $\text{dpG}$ , как видно из рис. 9, может сопровождаться лишь незначительным изменением электрофоретической подвижности олигонуклеотида, приводя на фингерпринте к почти такому же сдвигу, какой обычно наблюдается при отщеплении  $\text{dpA}$ . По-видимому, это явление связано с некоторым повышением  $\text{p}K_a$  остатков дезоксигуаниловой кислоты из-за особенностей их структурного окружения в олигонуклеотиде, богатым G и T. Таким образом, далеко идущие структурные выводы, делаемые на основании результатов двухмерного разделения смеси продуктов частичного гидролиза длинных олигонуклеотидов (см., например, [5]), нуждаются в независимой проверке.

Взаимодействие ундекануклеотида (XI) с ранее синтезированным комплементарным ундекануклеотидом  $d(\text{A-C-A-C-G-C-A-G-A-A-C})$  [1] привело к образованию комплекса, выделенного низкотемпературной гель-фильтрацией (рис. 10). Этот комплекс был денатурирован нагреванием и компоненты разделены хроматографией на DEAE-целлюлозе в 7 М мочеvine при рН 3,5. Как видно из кривой разделения (рис. 11), полученный комплекс ундекануклеотидов является двухцепочечным.

### Экспериментальная часть

Общие сведения об эксперименте см. в сообщении [6]. В работе использовали монодезоксирибонуклеотиды производства опытного химического цеха НИОХ СО АН СССР (Новосибирск),  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  фирмы «Amersham» (Англия) с удельной радиоактивностью 10—15 Ки/ммоль, ацетилцеллюлозу фирмы «Schleicher und Schüll» (ФРГ) или производства НИИ синтетических смол (г. Владимир), фосфодиэстеразу змеиного яда (КФ 3.4.1) фирмы «Worthington» (США); Т4-полинуклеотидкиназа

Синтезированные олигонуклеотиды и их свойства

Соединение	R <sub>1</sub> dRT		УФ-характеристики				Нуклеотидный состав			
	в системе A	в системе B	λ <sub>макс.</sub> нм	$\frac{\epsilon_{270}}{\epsilon_{210}}$	$\frac{\epsilon_{282}}{\epsilon_{210}}$	$\frac{\epsilon_{294}}{\epsilon_{210}}$	dG	dпG	dпT	dпC
(I) d(pT-ibG)	1,20	0,65	261	0,94	0,92	0,71	0,28	4,10	1,00	1,00
d(pT-G)			259							
d(panC-T)	1,05	0,75	277,303	0,77	1,15	0,90	0,33	1,00	1,00	1,00
d(pC-T)			269							
(V) d[(MeOTr)bzG-T]	1,80		233,260	0,98	0,90	0,69	0,33	1,00		
d(G-T)		1,05	267,285							
(II) d(panC-T-ibG)	0,98		266	0,81	0,98	0,74	0,29	1,00	1,00	1,04
d(pC-T-G)		0,60	262							
(III) d(pT-ibG-T)	0,88		263	0,90	0,93	0,69	0,32	1,00	1,00	1,98
d(pT-G-T)		0,60	262							
(VI) d[(MeOTr)bzG-T-T]	1,66		267,305	0,88	0,95	0,72	0,34	1,00		
d(G-T-T)		0,88	262							
(VII) d[(MeOTr)bzG-T-T-anC]	1,57		233,270	0,79	1,06	0,80	0,34	0,91	2,03	1,00
d(G-T-T-C)		0,72	302							
(IV) d(panC-ibG-T-ibG-T)	0,36		268	0,94	0,92	0,70	0,31	2,00	2,20	1,00
d(pC-G-T-G-T)		0,24	263,282							
(VIII) d[(MeOTr)bzG-T-TanC-T-ibG]	1,40		257,272	0,90	0,95	0,84	0,34	1,06	2,87	1,00
d(G-T-T-C-T-G)		0,51	263							
(IX) d[(MeOTr)bzG-T-T-anC-T-ibG-anC-ibG]	0,71		260	0,90	0,95	0,75	0,27	2,00	2,92	2,00
d(G-T-T-C-T-G-C-G)		0,38	262							
(X) d[(MeOTr)bzG-T-T-anC-T-ibG-anC-ibG-T-ibG-T]	0,30		261	0,94	0,93	0,73	0,35	3,02	5,06	2,00
(XI) d(G-T-T-C-T-G-C-G-T-G-T)		0,41	262							



(КФ 2.7.1.78) была любезно предоставлена М. Ф. Шемякиным и А. В. Честухиным (Москва). Хроматографию проводили на бумаге ватман № 1 в системах: EtOH — 1 М AcONH<sub>4</sub>, 7 : 3, pH 7,5 (А) и *n*-PrOH — конц. NH<sub>3</sub> — H<sub>2</sub>O, 55 : 10 : 35 (Б).

Характеристики синтезированных олигонуклеотидов приведены в таблице.

1. *d[(MeOTr)bzG-T]* (V). К раствору 1,02 г (1,55 ммоль) *d*(MeOTr)bzG и 2,40 г (4,65 ммоль) *dpT*(Ac) в 15 мл пиридина прибавили 3,40 г (10,2 ммоль) TPS и выдержали 5 ч при 20°. Затем при охлаждении до -20° прибавили 27 мл 1 М раствора *n*-трибутиламина в пиридине и равный объем 20%-ного пиридина. Спустя 16 ч при 20° раствор упарили досуха, остаток растворили в 100 мл 0,2 М ТЕАВ и проэкстрагировали последовательно эфиром (3 × 100 мл), смесью эфир—этилацетат, 1 : 1 (3 × 100 мл), этилацетатом (2 × 100 мл), смесью этилацетат — *n*-бутанол, 85 : 15 (2 × 100 мл) и смесью этилацетат — *n*-бутанол, 8 : 2 (100 мл). Фракции, содержащие бутанол, были объединены и упарены досуха. К остатку, растворенному в 60 мл смеси пиридин — этанол, 1 : 1, при охлаждении до 0° прибавили 60 мл 2 н. NaOH, через 10 мин избыток щелочи нейтрализовали 150 мл дауэкса 50 (PyH<sup>+</sup>), смолу отфильтровали и промыли 300 мл 50%-ного пиридина. Объединенные фильтраты упарили досуха, остаток растворили в 30 мл пиридина и осадили 1 л эфира. Выход *d*[(MeOTr)bzG-T] 1,40 г (88%), возврат *dpT* 36%.

2. *d(pT-ibG)* (I) получен конденсацией 2,7 г (6 ммоль) *d*(CNEt)pT и 5,05 г (8,8 ммоль) *dpibG*(iB) в присутствии 4,7 г (15,5 ммоль) TPS в 35 мл пиридина в течение 5 ч при 20°. Реакционную смесь при -20° обработали 31 мл 1 М раствора триэтиламина в пиридине и равным объемом воды. Через 20 ч при 0° прибавили 120 мл 2 н. NaOH, выдержали 15 мин при комнатной температуре, нейтрализовали дауэксом 50 (PyH<sup>+</sup>), смолу отфильтровали, фильтрат нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 7 × 60 см) и хроматографировали в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 10%-ном спирте (8 л 0,05 М — 8 л 0,25 М), собирая фракции по 16 мл/5 мин. Фракции 700—890 объединили, упарили с пиридином, остаток растворили в 100 мл пиридина и осадили 1 л эфира. Выход динуклеотида (I) 77 000 OE<sub>260</sub> (48%); возврат *dpibG* 34%, *dpT* — 17% (ср. [7]).

3. *d(panC-T-ibG)* (II) получен конденсацией 1,47 г (1,54 ммоль) *d*[(CNEt)panC-T] и 1,3 г (2,3 ммоль) *dpibG*(iB) в присутствии 1 г (4,6 ммоль) MS в 10 мл пиридина в течение 4 ч в условиях опыта 2. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 3 × 50 см) в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 20%-ном спирте (4 л 0,2 М — 4 л 0,4 М), собирая фракции по 15 мл/10 мин. Из фракций 400—470 выделили 21 500 OE<sub>260</sub> (37%) тринуклеотида (II), возврат *d*(panC-T) 15%, *dpibG* — 55%.

4. *d(pT-ibG-T)* (III) получен конденсацией 0,93 г (1 ммоль) *d*[(CNEt)pT-ibG] и 1,96 г (4,4 ммоль) *dpT*(Ac) в присутствии 2,2 г (8,8 ммоль) MSI в 10 мл пиридина в течение 5 сут при 20°. Реакционную смесь при 0° обработали 10 мл воды и 20 мл 2 н. NaOH, выдержали 20 мин при 20°, нейтрализовали дауэксом 50 (PyH<sup>+</sup>), смолу отфильтровали, фильтрат нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 3 × 50 см) и хроматографировали в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 10%-ном спирте (5 л 0,05 М — 5 л 0,25 М), собирая фракции по 21 мл/10 мин. Из фракций 286—335 выделили 10 800 OE<sub>260</sub> (31%) тринуклеотида (III), возврат *dpT* 20%, *d*(pT-ibG) — 15%.

5. *d[(MeOTr)bzG-T-T]* (VI). А. Получен конденсацией 2,3 г (3,6 ммоль) *d*(MeOTr)bzG и 1,2 г (1,26 ммоль) *d*[pT-T(Ac)] в присутствии 0,7 г (2,8 ммоль) MSI в 8 мл пиридина в условиях опыта 4. Хроматографию проводили на колонке с силикагелем (3 × 40 см) в смеси CHCl<sub>3</sub> — MeOH — пиридин в соотношении от 80 : 0 : 20 до 40 : 40 : 20. Элюаты, содержащие тринуклеотид *d*[(MeOTr)bzG-T-T(Ac)] (20—40% метанола), объединили, упарили, остаток растворили в 60 мл охлажденной до 0° смеси этанол —

пиридин — 2 н. NaOH, 2 : 1 : 3, и выдержали 20 мин. Избыток щелочи нейтрализовали дауэксом 50 (PyH<sup>+</sup>), смолу отфильтровали и промыли 250 мл 50%-ного пиридина, фильтрат упарили и остаток растворили в 20 мл пиридина и осадили 1 л эфира. Выход тринуклеотида (VI) 20 100 OE<sub>260</sub> (50%), возврат d(MeOTr)bzG 72%, d(pT-T) — 47%.

Б. К раствору 5,2 г (17,2 ммоль) TPS в 20 мл пиридина прибавили 3,85 г (8,6 ммоль) dpT(Ac) в 10 мл пиридина и через 4 ч 2,1 г (2,04 ммоль) динуклеотида (V) в 10 мл пиридина. Реакционную смесь упарили до объема 30 мл и выдержали 15 ч при 20°. Затем при —20° прибавили 54 мл 1 М раствора *n*-трибутиламина в пиридине и 80 мл 20%-ного пиридина, выдержали 16 ч при 20° и упарили досуха. Остаток растворили в 200 мл 0,1 М ТЕАВ и проэкстрагировали последовательно эфиром (3 × 200 мл), этилацетатом (3 × 200 мл), смесью этилацетат — *n*-бутанол, 9 : 1 (3 × 200 мл) и смесью хлористый метилен — *n*-бутанол, 7 : 3 (2 × 200 мл). Последние два экстракта упарили, остаток растворили в 100 мл 35%-ного спиртового раствора пиридина и при 0° прибавили 100 мл 2 н. NaOH. Дальнейшую обработку проводили в условиях опыта 5 А. Выход тринуклеотида (VI) 1,75 г (60%); вещество спектрально и хроматографически идентично описанному в опыте 5 А. Возврат динуклеотида (V) 15%, dpT — 62%.

6. d[(MeOTr)bzG-T-T-anC] (VII) получен конденсацией 1,1 г (0,75 ммоль) тринуклеотида (VI) и 2,3 г (4,1 ммоль) dpanC(Ac) в присутствии 1,8 г (8,2 ммоль) MS в условиях опыта 2. Объединенные фильтраты после отделения дауэкса 50 упарили досуха, остаток растворили в 100 мл 0,1 М ТЕАВ и проэкстрагировали последовательно эфиром (5 × 100 мл), этилацетатом (3 × 100 мл), смесью этилацетат — бутанол, 85 : 15 (2 × 100 мл) и смесью хлористый метилен — бутанол, 7 : 3 (100 мл). Водный слой упарили досуха, остаток растворили в 200 мл 0,05 М ТЕАВ и панесли на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 7 × 9 см). Элюировали 800 мл 0,3 М водного ТЕАВ, а затем 800 мл 0,4 М ТЕАВ в 60%-ном этаноле, собирая фракции по 50 мл/5 мин. Фракции 20—32, содержащие тетрануклеотид (VII), объединили, упарили с пиридином и рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 6 × 16 см) в градиенте концентрации ТЕАВ (2 л 0,05 М — 2 л 0,35 М в 10%-ном метаноле, 2 л 0,05 М — 2 л 0,35 М в 60%-ном этаноле), собирая фракции по 14 мл/10 мин. Из фракций 432—510 выделили 18 000 OE<sub>260</sub> (55%) тетрануклеотида (VII). Возврат dpanC 84%, трипуклеотида (VI) — 10%.

7. d(panC-ibG-T-ibG-T) (IV) получен конденсацией 0,34 г (0,32 ммоль) d[(CNEt)panC-ibG] [7] и 0,62 г (0,48 ммоль) dIpT-ibG-T(Ac) в присутствии 0,83 г (2,68 ммоль) TPS в 8 мл пиридина в течение 16 ч при 20°. Обработку реакционной смеси проводили в условиях опыта 2. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 3 × 45 см) в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 10%-ном метаноле (2,5 л 0,05 М — 2,5 л 0,5 М), собирая фракции по 16 мл/10 мин. Из фракций 212—236 выделили 4400 OE<sub>260</sub> (22%) пентануклеотида (IV). Возврат d(panC-ibG) 57%, d(pT-ibG-T) — 40%.

8. d[(MeOTr)bzG-T-T-anC-T-ibG] (VIII). А. Получен конденсацией 2,59 г (1,84 ммоль) тринуклеотида (VI) и 810 мг (0,54 ммоль) d[(panC-T-ibG)(Ac)] в присутствии 335 мг (1,34 ммоль) MSI по методике опыта 4. Хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 3 × 60 см) в линейном градиенте концентрации ТЕАВ (2,5 л 0,05 М — 2,5 л 0,4 М в 10%-ном метаноле; 2,5 л 0,05 М — 2,5 л 0,5 М в 30%-ном этаноле), фракции по 15 мл/8 мин. Вещество из фракций 500—650 (12 500 OE<sub>260</sub>) рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl<sup>-</sup>, 2 × 50 см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины, 0,02 М трис-HCl, pH 7,5 (2 л 0 М — 2 л 0,25 М), фракции по 14,5 мл/10 мин. Центральная часть пика содержала 10 500 OE<sub>260</sub> (34%) гексануклеотида (VIII).

Б. Получен конденсацией 780 мг (0,40 ммоль) тетра-нуклеотида (VII) и 2 г (2,18 ммоль)  $d[\text{pT-ibG}(\text{Ac})]$  в присутствии 1,75 г (8 ммоль) MS в условиях опыта 2. Хроматографию проводили на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $6 \times 16$  см) в градиенте концентрации TEAB (2,5 л 0,05 М — 2,5 л 0,4 М в 10%-ном MeOH; 2,5 л 0,05 М — 2,5 л 0,5 М в 50%-ном EtOH), собирая фракции по 13 мл/10 мин. Вещество из фракций 610—660 рехроматографировали на той же колонке в градиенте концентрации TEAB в 60%-ном EtOH (2,5 л 0,05 М — 2,5 л 0,5 М), собирая фракции по 16 мл/10 мин. Из фракций 175—215 выделили 7000  $\text{OE}_{260}$  (26%) гексануклеотида (VIII), идентичного веществу из опыта А. Возврат  $d(\text{pT-ibG})$  48%.

9.  $d[(\text{MeOTr})\text{bzG-T-T-anC-T-ibG-anC-ibG}]$  (IX) получен конденсацией 300 мг (0,104 ммоль) гексануклеотида (VIII) и 1,39 г (1,33 ммоль)  $d[\text{ranC-ibG}(\text{Ac})]$  [7] в присутствии 1,21 г (4 ммоль) TPS аналогично опыту 2. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $6 \times 16$  см) в градиенте концентрации TEAB и спирта (2,5 л 0,05 М в 20% -ном EtOH — 2,5 л 0,6 М в 60%-ном EtOH), собирая фракции по 15 мл/10 мин. Вещество из фракций 226—265 (7000  $\text{OE}_{260}$ ) рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $4,5 \times 23$  см) в градиенте концентрации TEAB в 60%-ном этаноле (2,5 л 0,1 М — 2,5 л 0,6 М), собирая фракции по 15 мл/10 мин. Из фракций 183—210 выделили 3300  $\text{OE}_{260}$  (33%) октануклеотида (IX). Возврат  $d(\text{ranC-ibG})$  68%, гексануклеотида (VIII) — 27%.

10.  $d(\text{G-T-T-C-T-G-C-G-T-G-T})$  (XI). А. Взаимодействие 62 мг (22,4 мкмоль) гексануклеотида (VIII) и 55 мг (24 мкмоль)  $d[\text{ranC-ibG-T-ibG-T}(\text{Ac})]$  в присутствии 52,5 мг (0,24 ммоль) MS в 1 мл пиридина (2,5 ч) провели в условиях опыта 2. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $2 \times 32$  см) в градиенте концентрации TEAB в 30%-ном этаноле (0,75 л 0,1 М — 0,75 л 0,35 М; 0,75 л 0,35 М — 0,75 л 0,7 М), собирая фракции по 7,5 мл/13 мин. Вещество из фракций 240—310 ( $530 \text{ OE}_{260}$ ) подвергли аммонолизу и кислотному гидролизу для удаления всех защитных групп, а затем хроматографировали в условиях, приведенных на рис. 1. Выход ундекануклеотида (XI)  $90 \text{ OE}_{260}$  (4%). Кривая микроколоночной хроматографии приведена на рис. 2.

Б. К раствору 50 мг (12,8 мкмоль) октануклеотида (IX) и 177 мг (135 мкмоль)  $d[\text{pT-ibG-T}(\text{Ac})]$  в 1,5 мл пиридина прибавили 200 мг (0,66 ммоль) TPS и оставили на 4,5 ч. Дальнейшую обработку проводили как в опыте 2. Условия хроматографии приведены на рис. 3. Вещество из фракций 103—126 ( $650 \text{ OE}_{260}$ , пик III) было рехроматографировано (см. рис. 4); выход ундекануклеотида (X)  $230 \text{ OE}_{260}$  (14%).

После удаления защитных групп из  $20 \text{ OE}_{260}$  ундекануклеотида (X) вещество хроматографировали, как показано на рис. 5; из центральной части пика выделили  $5 \text{ OE}_{260}$  ундекануклеотида (XI). Кривая микроколоночной хроматографии приведена на рис. 6.

11. Анализ ундекануклеотида (XI). А. 5'-Фосфорилированы е.  $0,06 \text{ OE}_{260}$  (0,55 ммоль) ундекануклеотида (XI) инкубировали 45 мин при  $37^\circ$  в 120 мкл раствора, содержащего 2 ммоль  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , 20 мкл Т4-поли-нуклеотидкиназы (фракция VI [8]), 0,05 М трис- $\text{HCl}$  (рН 7,5), 0,01 М  $\text{MgCl}_2$  и 0,005 М меркаптоэтанол. Реакционную смесь хроматографировали на колонке с сефадексом G-50 в 0,1 М TEAB (рис. 7), фракцию ундекануклеотида ( $8,6 \cdot 10^6$  имп/мин) упарили досуха и остаток растворили в 160 мкл 0,01 М трис- $\text{HCl}$ , рН 7,5.

Гель-электрофорез меченого нуклеотида проводили в полиакриламидном блоке длиной 20 см с концентрацией акриламида 17,5% при напряжении 200 В в течение 16 ч при  $4^\circ$ . Гомохроматографию проводили на пластинке ( $20 \times 20$  см) со смесью целлюлозы MN-300 («Serva») и DEAE-целлюлозы DE-41 («Whatman») (7,5 : 1, толщина слоя 0,25 мм) в 3%-ной гомосмеси [9] при  $55^\circ$ . Подвижность при электрофорезе составила 0,92 относительно бромфенолового голубого, а при гомохроматографии — 0,20 относительно ксиленицианола FF.

Б. П о л н ы й г и д р о л и з V P D E. Смесь 0,06 ОЕ<sub>260</sub> ундекануклеотида (XI) и алиquotную часть (50 000 имп/мин) <sup>32</sup>P-ундекануклеотида из предыдущего опыта гидролизovali на колонке (30 мкл) иммобилизованной VPDE [10] в 0,05 М трис-НСООН, рН 8,5, в течение 3 ч. Колонку промыли 100 мкл того же буфера, элюат нанесли на колонку с дауэксом 1 × 2 (400 меш, 120 мкл), колонку промыли 350 мкл 0,05 М NH<sub>4</sub>СООН, рН 4,2, после чего хроматографировали в линейном градиенте концентрации той же соли (см. рис. 8).

В. Ч а с т и ч н ы й г и д р о л и з V P D E. Три порции <sup>32</sup>P-ундекануклеотида из опыта 11А (по 25 000 имп/мин) упарили досуха, к остаткам прибавили по 1 мкл 0,01 М раствора MgCl<sub>2</sub> в 0,05 М трис-НСl (рН 8,9) и 1 мкл раствора VPDE в том же буфере, содержащего соответственно 50, 100 и 200 мкг/мл, и инкубировали 30 мин при 20°. Все три раствора смешали и нанесли на полосу ацетилцеллюлозы (3 × 55 см), смоченную пиридин-ацетатным буфером в 7 М мочеvine при рН 3,5; рядом с образцом нанесли смесь красителей (1%-ные растворы ксиленцианола FF, оранжевого G и кислого фуксина). Электрофорез проводили в том же буфере при 5000 В в течение 1 ч, продукты гидролиза перенесли на пластинку для гомохроматографии (см. выше) и хроматографировали в 2%-ной смеси [11]. Радиоавтограмма нуклеотидной карты (пленка РТ-1 или РМ-1, экспозиция 4—18 ч) приведена на рис. 9.

12. К о м п л е к с *d(G-T-T-C-T-G-C-G-T-G-T)·d(A-C-A-C-G-C-A-G-A-A-C)*. Смесь 0,015 ОЕ<sub>260</sub>d(<sup>32</sup>P-G-T-T-C-T-G-C-G-T-G-T) (1,2·10<sup>5</sup> имп/мин) и 0,05 ОЕ<sub>260</sub>d(A-C-A-C-G-C-A-G-A-A-C) в 15 мкл буферного раствора (0,05 М трис-АсОН, рН 7,5; 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 0,001 М EDTA) выдержали 30 мин при 37°, медленно охладили до 4°, выдержали при этой температуре 18 ч и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50 (0,6 × 240 мм) в том же растворе при 2°, собирая фракции по 30 мкл/12 мин и регистрируя оптическую плотность с помощью микроспектрофотометрической приставки МСФП-1 при 260 нм, а радиоактивность — на газопроточном счетчике НАГ-β-М (см. рис. 10). Фракции, содержащие комплекс ундекануклеотидов (на рис. 10 отмечены пунктиром), нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (Cl<sup>-</sup>, 0,8 × 80 мм) и хроматографировали в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine при рН 3,5, собирая фракции по 20 мкл/4 мин (см. рис. 11).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Шингарова Л. Н. (1975) Биоорганич. химия, 1, 1738—1745.
2. Agarwal K. L., Berlin Yu. A., Kleid D. G., Smirnov V. D., Khorana H. G. (1975) J. Biol. Chem., 250, 5563—5573.
3. Schott H., Kössel H. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 3778—3785.
4. Sanger F. (1973) in Virus Research (Fox C. F., Robinson W. S., eds.), pp. 573—598, Acad. Press, New York — London.
5. Sekiya T., van Ormondt H., Khorana H. G. (1975) J. Biol. Chem., 250, 1087—1098.
6. Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Вульфсон А. П., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Чупрунова О. А. (1975) Биоорганич. химия, 1, 1113—1120.
7. Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Полякова И. А., Чахмахчева О. Г., Чупрунова О. А. (1973) Химия природы. соед., 402—410.
8. Richardson C. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54, 158—165.
9. Brownlee G. G., Sanger F. (1969) Eur. J. Biochem., 11, 395—399.
10. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) Биохимия, 39, 747—751.
11. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) Nucleic Acid. Research, 1, 331—333.

Поступила в редакцию  
19.VIII.1975

SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES.  
X. SYNTHESIS OF THE FRAGMENT 36—46 OF THE STRUCTURAL  
GENE FOR THE YEAST tRNA<sub>I</sub><sup>Val</sup>

BERLIN Yu. A., EFIMOV V. A., KOLOSOV M. N.,  
KOROBKO V. G.

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

The undecadeoxyribonucleotide d(G-T-T-C-T-G-C-G-T-G-T) complementary to the 36—46 region of the yeast tRNA<sub>I</sub><sup>Val</sup> has been chemically synthesized. Its homogeneity has been demonstrated by microcolumn anion-exchange chromatography in neutral and acid media and by enzymic 5'-<sup>32</sup>P-phosphorylation followed by gel electrophoresis and homochromatography. The sequence of the undecanucleotide has been proved by identification of the 5'-terminal unit after complete hydrolysis with snake venom phosphodiesterase (VPDE) and also by analysis of a fingerprint obtained on the two-dimensional separation (ionophoresis on cellulose acetate followed by homochromatography) of the partial VPDE hydrolysate. A duplex of this undecanucleotide with the complementary one synthesized previously has been obtained which constitutes the 36—46 fragment of the structural gene for the yeast tRNA<sub>I</sub><sup>Val</sup>.

---