



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 2 * № 8 * 1976

УДК 547.9 : 542.953.2

СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

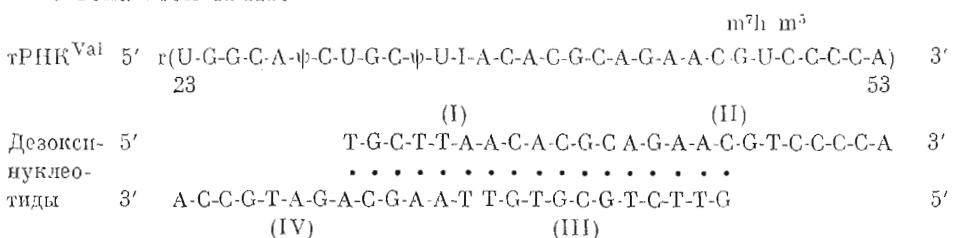
XV. СИНТЕЗ ТРИДЕКАДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА,
КОМПЛЕМЕНТАРНОГО УЧАСТКУ 23—35 ВАЛИНОВОЙ
тРНК ДРОЖЖЕЙ *

*Берлин Ю. А., Каган М. З., Колосов М. Н.,
Коробко В. Г.*

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

Осуществлен химический синтез тридекадезоксирибонуклеотида Т-А-А-G-C-A-G-A-T-G-C-C-A, комплементарного участку 23—35 валиновой тРНК дрожжей. Структура этого соединения подтверждена анализом его нуклеотидной карты.

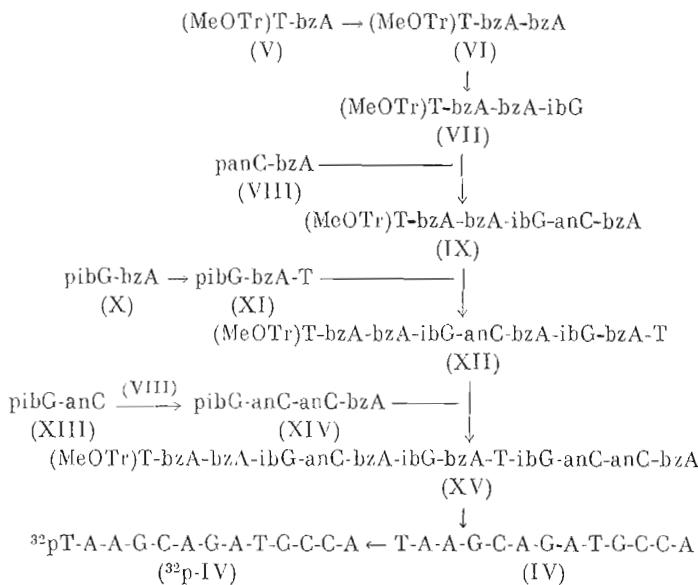
Ранее нами был осуществлен синтез двух додекануклеотидов Т-G-C-T-T-A-A-C-A-C-G-C (I) и A-G-A-A-C-G-T-C-C-C-A (II), в совокупности гомологичных участку 30—53 дрожжевой тРНК^{Val} [1, 2], а также ундекануклеотида G-T-T-C-T-G-C-G-T-G-T (III), комплементарного 3'-концевому сегменту первого из них и 5'-концевому сегменту второго [3]. В настоящем сообщении описывается синтез тридекануклеотида Т-А-А-G-C-A-G-A-T-G-C-C-A (IV), комплементарного участку 23—35 валиновой тРНК и смежного с ундекануклеотидом (III) в значащей цепи структурного гена этой тРНК.



Синтез тридекануклеотида (IV) проводили фосфодиэфирным методом, исходя из монометокситритилтимидина в качестве 5'-концевого звена и наращивая нуклеотидную цепь сначала мононуклеотидами (до стадии тетрануклеотида), а затем последовательно ди-, три- и тетрануклеотидными блоками (см. схему). Аминогруппы в гетероциклических основаниях защищали бензоилом (в аденине), анизоилом (в цитозине) и изобутири-

* Сообщение XIV см. [1]. Использована система обозначений, рекомендованная номенклатурной комиссией IUPAC — IUB, но для краткости префиксы d- и дезокси- везде опущены, поскольку в статье упоминаются нуклеозиды и нуклеотиды только дезокси-ряда. Другие сокращения: TEAB — бикарбонат триэтиламмония; TPS — 2,4,6-триизопропилбензольсульфохлорид.

лом (в гуанине), фосфатную группу в OH-компонентах блокировали β-цианэтильным остатком, а 3'-гидроксил в Р-компонентах — ацетильной группой. В качестве конденсирующего реагента использовали TPS.



Первые два продукта межнуклеотидных конденсаций — динуклеозидмонофосфат (V) и тринуклеозиддифосфат (VI) — были выделены с помощью избирательной экстракции органическими растворителями (ср. [4]). При синтезе тетрануклеотида (VII) после экстракционного выделения оказалось целесообразным подвергнуть его дополнительной очистке с помощью анионообменной хроматографии в спиртовом растворе TEAB. Гексануклеотид (IX) и нонануклеотид (XII) также очищали хроматографией в TEAB, но при этом сначала хроматографировали в метаноле для избирательного удаления нетритилированных нуклеотидов и лишь затем этианольным раствором элюировали тритилясодержащие нуклеотиды, которые обладают повышенным сродством к смоле (ср. [5]). Нонануклеотид (XII) после такого выделения дополнительно очищали анионообменной хроматографией в растворе хлористого натрия в 7 М мочевине. Для выделения из реакционной смеси тридекануклеотида (XV) сразу же проводили хроматографию в 7 М мочевине. Так как это соединение представляет собой конечный продукт синтеза и защитные группы в нем больше не нужны, завершающие стадии очистки были проведены после того, как в результате аммонолиза и кислотного гидролиза был получен незащищенный тридекануклеотид (IV). Он был дважды хроматографирован в 7 М мочевине (сначала при pH 7,5, а затем при pH 3,5), и его индивидуальность была доказана микролоночной хроматографией в аналогичных условиях. Дополнительное доказательство индивидуальности, а также подтверждение первичной структуры тридекануклеотида (IV) было получено с помощью ферментативного 5'-³²P-фосфорилирования этого соединения. Меченный нуклеотид был подвергнут частичному гидролизу фосфодиэстеразой змеиного яда, смесь продуктов гидролиза разделена электрофорезом на ацетилцеллюзое и гомохроматографией во взаимно перпендикулярных направлениях, и полученная нуклеотидная карта интерпретирована согласно работе [6].

Таким образом, нами осуществлен химический синтез группы олигонуклеотидов (I) — (IV), составляющих в сумме центральную часть структурного гена дрожжевой tРНК^{Val}.

Экспериментальная часть

Общие условия эксперимента см. [2]. В работе использовали дезоксирибонуклеозид-5'-фосфаты производства СКТБ БАВ Главмикробиопрома (Новосибирск). ТСХ проводили на пластинах с силикагелем марки «Silufol». Синтезированные олигонуклеотиды были охарактеризованы спектрально и хроматографически, в том числе микроколоночной анионообменной хроматографией с регистрацией поглощения на микроспектрофотометрической приставке МСФИ-1 (Новосибирск), до и после удаления защитных групп. Мономерный состав веществ (V) — (VIII), (XI) и (XIV) был доказан исчерпывающим фосфодиэстеразным гидролизом соответствующих незащищенных олигонуклеотидов в ранее описанных условиях [7], а веществ (IX), (XII) и (XV) — с помощью нуклеотидных карт. Свойства полученных олигонуклеотидов представлены в таблице.

1. (*MeOTr*)*T-bzA* (V). Смесь 1 г (1,94 ммоль) (*MeOTr*)*T* и 2,16 г (3,88 ммоль) *rbzA(Ac)*, высушенную пятикратным упариванием с пиридином, растворили в 25 мл пиридина, прибавили 1,68 г (5,55 ммоль) TPS, раствор сконцентрировали до 20 мл и выдержали 6 ч при 20°. Затем охладили до —20°, добавили 11 мл 1 М раствора динизопропилэтамина в пиридине, через 20 мин прилили 31 мл воды и выдержали 16 ч при 20°. Реакционную массу упарили с пиридином до минимального объема, растворили в 250 мл 0,2 М TEAB и проэкстрагировали эфиром (6 × 200 мл) (при этом извлекаются сульфокислота и непрореагировавший нуклеозид), а затем этилацетатом (5 × 250 мл), контролируя ход экстракции с помощью ТСХ в системе вода — ацетонитрил (1 : 9). Этилацетатный экстракт упарили с пиридином, остаток растворили в 50 мл смеси пиридина и спирта (1 : 1), охладили до —20°, прибавили 50 мл 2 н. NaOH и выдержали 10 мин при 0°. Раствор нейтрализовали дауексом-50 (PyH^+), смолу отфильтровали и промыли 500 мл смеси пиридин — спирт — вода (1 : 2 : 2) и элюаты упарили с пиридином. После осаждения эфиром из пиридина выход динуклеозидмонофосфата (V) 1,31 г (67%).

2. (*MeOTr*)*T-bzA-bzA* (VI) получен взаимодействием 2,34 г (2,31 ммоль) (*MeOTr*)*T-bzA*, 3,93 г (7,08 ммоль) *rbzA(Ac)* и 5,38 г (17,5 ммоль) TPS в 25 мл пиридина в течение 6 ч при 20°. Реакционную смесь обработали, как в опыте 1; после экстракции эфиром водный раствор упарили с пиридином и остаток обработали щелочью, как в опыте 1. После нейтрализации и упаривания остаток растворили в 200 мл 0,2 М TEAB и смесью этилацетат — бутанол, 19 : 1 (8 × 200 мл) извлекли динуклеозидмонофосфат (V) (возврат 21%). Затем проэкстрагировали смесью этилацетат — бутанол, 7 : 3 (5 × 200 мл). Выход тринуклеотида (VI) 2,3 г (65%).

3. (*MeOTr*)*T-bzA-bzA-ibG* (VII) получен взаимодействием 2,06 г (1,34 ммоль) (*MeOTr*)*T-bzA-bzA*, 3,9 г (7,25 ммоль) *ribG(Ac)* и 4,38 г (14,5 ммоль) TPS в 20 мл пиридина (5 ч при 20°). Реакционную смесь обработали, как в опыте 2. После извлечения непрореагировавшего тринуклеотида (VI) смесью этилацетат — бутанол, 7 : 3 (5 × 200 мл) (возврат 45%) тетрануклеотид (VII) проэкстрагировали из водного раствора смесью хлористый метил — бутанол, 7 : 3 (4 × 200 мл). Объединенные экстракти упарили с пиридином, остаток растворили в 200 мл 0,02 М TEAB в 70% спирте и нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 3 × 40 см), предварительно уравновешенную тем же буферным раствором. Хроматографировали в линейном градиенте концентрации TEAB и спирта (2 л 0,02 М в 70% спирте — 2 л 0,4 М в 40% спирте), собирая фракции по 22 мл/15 мин. Из фракций 33—55 выделили 30 000 OE_{280} (41%) тетрануклеотида (VII).

4. *panC-bzA* (VIII). Смесь пиридиниевых солей (CNEt_3)*panC* (0,95 г, 1,65 ммоль) и *rbzA(Ac)* (2,75 г, 4,95 ммоль) высушили упариванием с пиридином (4 × 15 мл), растворили в 20 мл пиридина, прибавили 3,44 г

Олигонуклеотиды	$\lambda_{\text{макс.}}$, нм	R_{dpt} в системе BtOH-1M ACONH ₄ , pH 7,5 (7 : 3)	Нуклеотидный состав					
			$\frac{\varepsilon_{250}}{\varepsilon_{260}}$			$\frac{\varepsilon_{270}}{\varepsilon_{260}}$		
			pA	pC	pG	pT	T	
(MeOTr)T-bzA (V)								
T-A	278	1,82	0,94	1,00	1,06	0,82		
panC-bzA (VIII)	262	1,60	0,76	0,87	0,41	0,14	4,05	
pC-A	285	1,04	0,92	1,14	1,47	1,51		
(MeOTr)T-bzA-bzA (VI)	260	0,95	0,82	0,85	0,42	0,13	1,0	
T-A-A	280	1,63	0,97	1,43	1,26	0,96		
piB-G-bzA-T (XI)	260	1,10	0,79	0,81	0,42	0,14	2,1	
pG-A-T	262	0,81	0,80	0,99	1,00	0,80		
(MeOTr)T-bzA-bzA-ibG (VII)	260	0,62	0,86	0,78	0,45	0,22	1,0	1,05
T-A-A-G	278	1,47	0,88	1,04	1,14	0,89		
piB-G-anC-anc-bzA (XIV)	259	0,31	0,86	0,78	0,44	0,16	2,1	1,05
pG-C-C-A	288	0,85	1,03	1,23	1,28			
(MeOTr)T-bzA-bzA-ibG-anC-bzA (IX)	260	0,24	0,90	0,90	0,62	0,27	1,1	1,95
T-A-A-G-C-A *	280	1,16	0,91	1,09	1,29	1,15		
(MeOTr)T-bzA-bzA-ibG-anC-bzA-ibG-bzA-T (XII)	259	0,05	0,91	0,87	0,57	0,31	3	1
T-A-A-G-C-A-G-A-T *	280	0,86	1,03	1,15	1,01			
(MeOTr)T-bzA-bzA-ibG-anC-bzA-ibG-bzA-T-ibG-anC-anC-bzA (XV)	260	0,87	0,84	0,70	0,30	4	1	2
T-A-A-G-C-A-G-A-T-G-C-C-A * (IV)	284	0,90	1,00	1,12	1,04			
	260	0,87	0,87	0,53	0,23	5	3	1

* Число нуклеотидных остатков определено на основании фильтрпринта.

(11,4 ммоль) TPS и оставили на 6 ч при 20°. При охлаждении до —20° прибавили 20 мл воды и оставили на 16 ч при 20°, затем при 0° смешали с равным объемом 2 н. NaOH, выдержали 15 мин при той же температуре и нейтрализовали дауэксом-50 (РуН⁺) до pH 8. Смолу отфильтровали, промыли 2 М водным пиридином и объединенный фильтрат нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻, 5 × 60 см), предварительно уравновешенную 0,05 М TEAB. Хроматографировали в линейном градиенте концентрации TEAB в 10% спирте (0,05—0,4 М, 12 л), собирая фракции по 33 мл/20 мин. Из фракций 284—329 после упаривания с пиридином и осаждения из пиридинового раствора эфиром выделили 30 000 ОЕ₂₈₀ (47%) динуклеотида (VIII). Возврат pbzA 23%.

5. (*MeOTr*)T-bzA-bzA-ibG-anC-bzA (IX) получен взаимодействием 0,52 г (0,25 ммоль) тетрапиридинукулеотида (VII), 0,92 г (0,82 ммоль) panC-bzA (Ac) и 1,07 г (3,45 ммоль) TPS в 5 мл пиридина (6 ч при 20°). Реакционную смесь охладили до —20°, добавили 7 мл 1 М раствора диизопропилэтиламина в пиридине, через 20 мин прилили 12 мл воды и выдержали 16 ч при 20°, затем при 0° смешали с равным объемом 2 н. NaOH, выдержали 10 мин при той же температуре и нейтрализовали дауэксом-50 (РуН⁺) до pH 8. Смолу отфильтровали, промыли 200 мл 2 М водного пиридина, элюаты нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻, 3,5 × 40 см) и хроматографировали в градиенте концентрации TEAB в 10% метаноле (0,05—0,4 М, 4 л), а затем в 50% спирте (0,05—0,4 М, 8 л), собирая фракции по 36 мл/7 мин. Из фракций 237—265 выделили 6600 ОЕ₂₈₀ гексапиридинукулеотида (IX). Вещество из фракций 206—236 рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻, 2,5 × 40 см) в линейном градиенте концентрации TEAB в 50% спирте (0,05—0,4 М, 4 л; фракции по 23 мл/6 мин). Из фракций 93—108 выделили дополнительное количество (2180 ОЕ₂₈₀) гексапиридинукулеотида (IX), суммарный выход 8780 ОЕ₂₈₀ (39%). Возврат динуклеотида (VIII) 63%.

6. pibG-bzA-T (XI) получен взаимодействием 0,64 г (0,61 ммоль) (CNEt)pibG-bzA, 1,19 г (2,68 ммоль) pT(Ac) и 1,97 г (6,48 ммоль) TPS в 15 мл пиридина (5 ч при 20°). После обработки, как в опыте 4, хроматографировали на колонке с DEAE-сифадексом (HCO₃⁻, 3,5 × 45 см) в линейном градиенте концентрации TEAB (0,05—0,45 М, 8 л), собирая фракции по 20 мл/4 мин. Из фракций 313—348 выделили 7190 ОЕ₂₆₀ (32%) тринуклеотида (XI). Возврат pT 64%, pibG-bzA 21%.

7. (*MeOTr*)T-bzA-bzA-ibG-anC-bzA-ibG-bzA-T (XII) получен взаимодействием 4860 ОЕ₂₈₀ (54 мкмоль) гексапиридинукулеотида (IX), 6750 ОЕ₂₈₀ (188 мкмоль) ацетата тринуклеотида (XI) и 302 мг (1 ммоль) TPS в 2 мл пиридина (6 ч при 20°). После обычной обработки (см. опыт 5) продукты реакции хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой в градиенте концентрации TEAB в 10% метаноле, а затем в 50% спирте (рис. 1). Нонапиридинукулеотидную фракцию (1800 ОЕ₂₈₀) рехроматографировали в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевине (рис. 2). Объединенные фракции, содержащие нонапиридинукулеотид (XII), разбавили водой до объема 2 л, нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻, 1 × 10 см) и промыли 100 мл 0,03 М TEAB, после чего элюировали 30 мл 0,5 М TEAB в 50% спирте. Выход нонапиридинукулеотида (XII) 1380 ОЕ₂₈₀ (20%), кривая микроколоночной хроматографии приведена на рис. 3. Возврат тринуклеотида (XI) 43%, гексапиридинукулеотида (IX) 71%.

8. pibG-anC-anC-bzA (XIV) получен взаимодействием 0,44 г (0,42 ммоль) (CNEt)pibG-anC, 1,18 г (0,93 ммоль) panC-bzA(Ac) и 1,1 г (3,64 ммоль) TPS в 7 мл пиридина (5 ч при 20°). Хроматографировали на колонке с DEAE-сифадексом (HCO₃⁻, 3,5 × 40 см) в линейном градиенте концентрации TEAB (0,05—0,5 М, 10 л), собирая фракции по 20 мл/3 мин. Вещество из фракций 390—450 (13 000 ОЕ₂₈₀) сконцентрировали упариванием с пиридином и рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl⁻, 1,5 × 55 см) в 7 М мочевине, содержащей 0,02 М трис-HCl (pH 7,5),

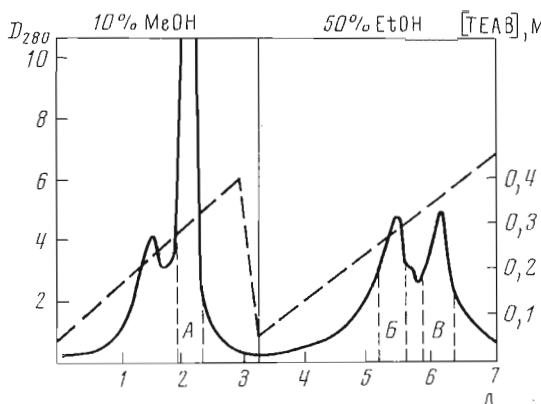


Рис. 1. Выделение нонануклеотида (XII) на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , $2,5 \times 40$ см) в градиенте концентрации TEAB в 10% метаноле ($0,05$ — $0,45$ М, 3 л), а затем в 50% спирте ($0,02$ — $0,5$ М, 4 л), фракции по 16 мл/2,5 мин. Пик А содержит 2900 ОЕ₂₈₀ три-нуклеотида (XI), пик Б — 2000 ОЕ₂₈₀ тетрануклео-тида (IX), пик В — 1800 ОЕ₂₈₀ нонануклео-тида (XII)

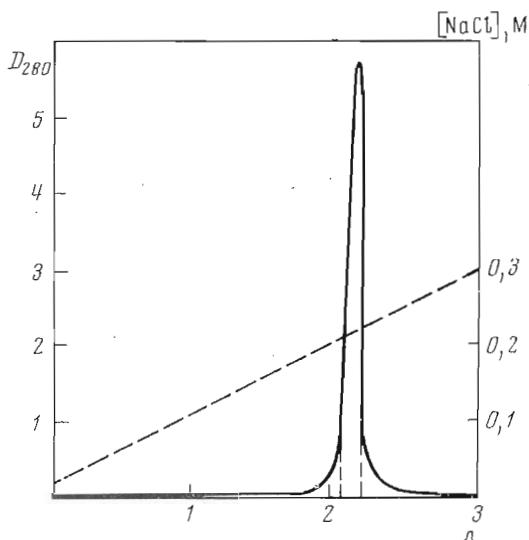


Рис. 2. Рехроматография нонануклеотида (XII) на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^- , $1,8 \times 50$ см) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевине, содержащей $0,02$ М три- HCl , рН 7,5 ($0,02$ — $0,3$ М, 3 л), фракции по 15 мл/7,5 мин. Центральная часть пика (выделена пунктиром) содержит 1380 ОЕ₂₈₀ нонану-клоотида (XII)

в линейном градиенте концентрации NaCl ($0,02$ — $0,25$ М, 2 л; фракции по 19 мл/28 мин). Выход тетрануклеотида (XIV) после обессоливания (см. опыт 7) 7500 ОЕ₂₈₀ (28%).

9. (*MeOTr*)*T*-*bzA*-*bzA*-*ibG*-*anC*-*bzA*-*ibG*-*bzA*-*T*-*ibG*-*anC*-*anC*-*bzA* (XV) получен взаимодействием 125 ОЕ₂₈₀ (1 мкмоль) нонануклеотида (XII), 390 ОЕ₂₈₀ (6 мкмоль) ацетата тетрануклеотида (XIV) и 12 мг (40 мкмоль) TPS в 0,3 мл пиридина (5 ч при 20°). После обычной обработки (см. опыт 5) продукты реакции хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^-) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевине (рис. 4).

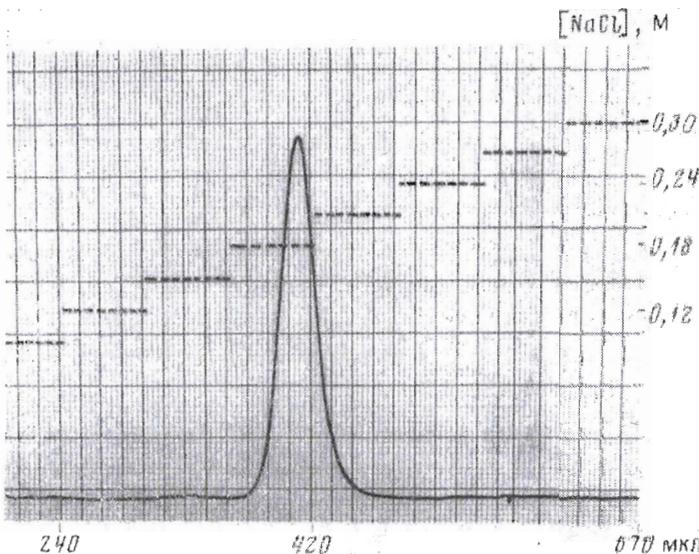


Рис. 3. Микроколоночная хроматография nonануклеотида (XII) на DEAE-целлюлозе ($0,88 \times 50$ мм, Cl^-) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевине, $\text{pH} 7,5$ ($0,0-0,3$ М, общий объем градиента 670 мкл), скорость элюции 380 мкл/ч. Запись на МСФП-1 (чувствительность 1 ОЕ/шкала)

Выход тридекануклеотида (XV) 28 ОЕ₂₈₀ (15%); возврат тетрануклеотида (XIV) 82%, nonануклеотида (XII) 56%.

10. *T-A-A-G-C-A-G-A-T-G-C-C-A* (IV). 10 ОЕ₂₈₀ тридекануклеотида (XV) обработали 1 мл 25% водного NH_3 (72 ч при 20°) и упарили, остаток растворили в 1 мл смеси уксусная кислота — пиридин — вода (14 : 1 : 3), выдержали 32 ч при 20° , несколько раз упарили с водой до полного удаления уксусной кислоты и остаток хроматографировали в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевине при $\text{pH} 7,5$ (рис. 5), а затем при $\text{pH} 3,5$ (рис. 6). Выход незащищенного тридекануклеотида (IV) 5 ОЕ₂₈₀ (65%). Кривые микроколоночной хроматографии приведены на рис. 7 и 8.

11. *Анализ тридекануклеотида (IV). 5'-Фосфорилирование.* 0,1 ОЕ₂₈₀ (0,7 нмоль) тридекануклеотида (IV) инкубировали 30 мин при 37° в 25 мкл раствора, содержащего 1 нмоль [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATР (15 КИ/ммоль), 5 мкл T4-полинуклеотидкиназы (КФ 2.7.1.78) (фракция VI [8]), 0,01 М MgCl_2 , 0,005 М меркаптоэтанол и 0,05 М трис-НCl, $\text{pH} 7,5$. Реакционную смесь подвергли гель-фильтрации на колонке с сепадексом G-50 ($0,8 \times 45$ см) в 0,1 М TEAB, фракцию тридекануклеотида ($12 \cdot 10^6$ имп/мин) упарили досуха и остаток растворили в 100 мкл воды.

Частичный гидролиз. Три порции ^{32}P -тридекануклеотида (^{32}P -IV) по $12 \cdot 10^4$ имп/мин упарили досуха, к каждой из них прибавили 1 мкл 0,01 М MgCl_2 в 0,05 М трис-НCl ($\text{pH} 8,9$) и 1 мкл раствора фосфодиэстеразы змеиного яда (КФ 3.1.4.1) в том же буфере, содержащий соответственно 0,05; 0,1 и 0,2 мкг фермента, и инкубировали 30 мин при 20° . Все три раствора смешали и нанесли на полоску ацетилцеллюлозы (3×55 см), смоченную пиридин-ацетатным буфером в 7 М мочевине с $\text{pH} 3,5$. Электрофорез проводили в том же буфере при 5000 В в течение 1 ч, используя в качестве стандарта смесь красителей (1% растворы ксиленцианола FF, оранжевого G и кислотного фуксина). Смесь продуктов гидролиза перенесли на пластинку (20×20 см) со смесью целлюлозы MN 300 и DEAE-целлюлозы DE-41 (15 : 2, толщина слоя 250 мкм) и проводили гомохроматографию при 55° в 2% гомосмеси [9]. Радиоавтограмма нуклеотидной карты (пленка PT-1, экспозиция 16 ч) приведена на рис. 9.

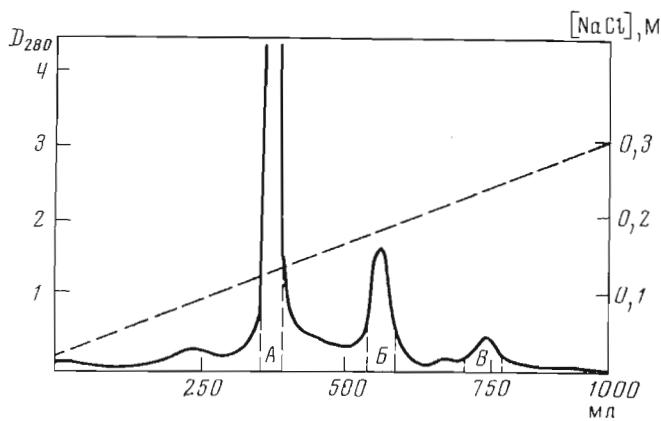


Рис. 4. Выделение тридекануклеотида (XV) на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^- , $0,9 \times 45$ см) в линейном градиенте концентрации NaCl ($0,02$ — $0,3$ М, 1 л) в 7 М мочевине, фракции по $7,5$ мл/10 мин. Пик А содержит 320 OE_{280} тетрануклеотида (XIV), пик Б — 70 OE_{280} нонануклеотида (XII), пик В — 28 OE_{280} тридекануклеотида (XV)

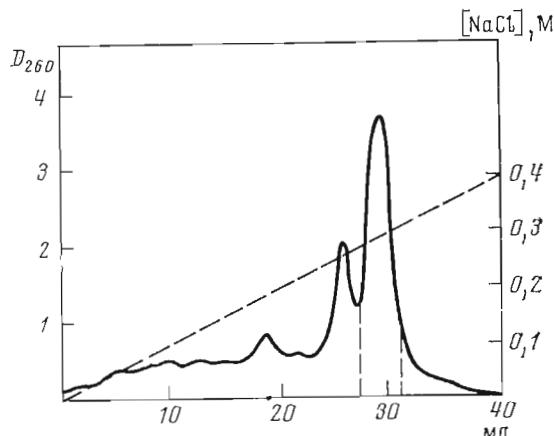


Рис. 5. Хроматография тридекануклеотида (IV) на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^- , $0,25 \times 20$ см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевине, $0,02$ М трис- HCl , рН $7,5$ ($0,0$ — $0,4$ М, 40 мл), фракции по 1 мл/3 мин. Центральная часть пика (отмечена пунктиром) содержит $6,5$ OE_{260} тридекануклеотида (IV)

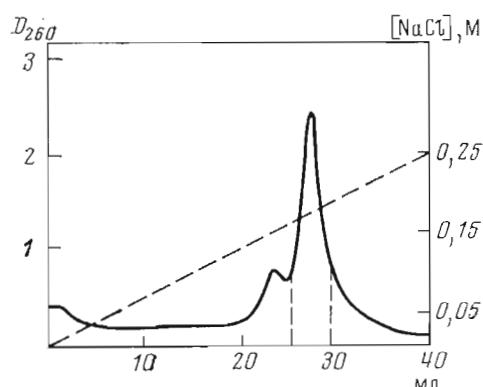


Рис. 6. Рехроматография тридекануклеотида (IV) на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^- , $0,25 \times 20$ см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевине, рН $3,5$ ($0,0$ — $0,25$ М, 40 мл), фракции по 1 мл/3 мин. Центральная часть пика содержит 5 OE_{260} тридекануклеотида (IV)

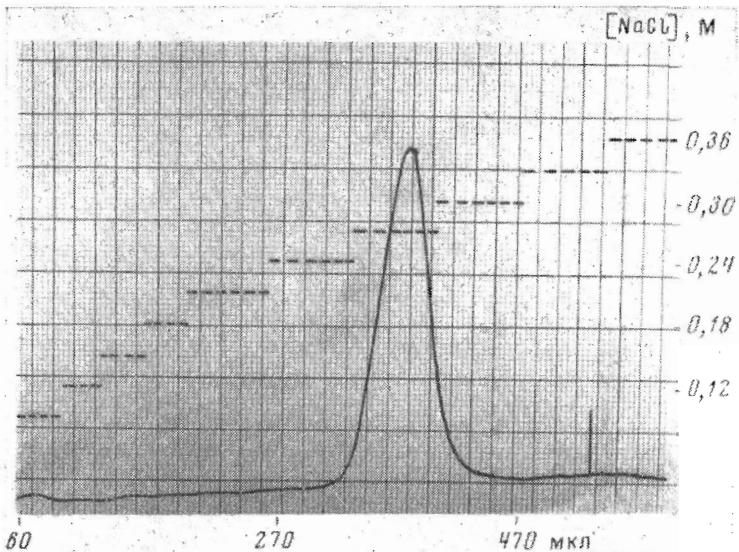


Рис. 7. Микроколоночная хроматография тридекануклеотида (IV) на DEAE-целлюлозе ($0,88 \times 50$ мм, Cl^-) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевине, 0,02 М трис- HCl , рН 7,5 (0,0—0,4 М, общий объем градиента 670 мкл), скорость элюции 380 мкл/ч. Запись на МСФП-1 (чувствительность 2 ОЕ/шкала)

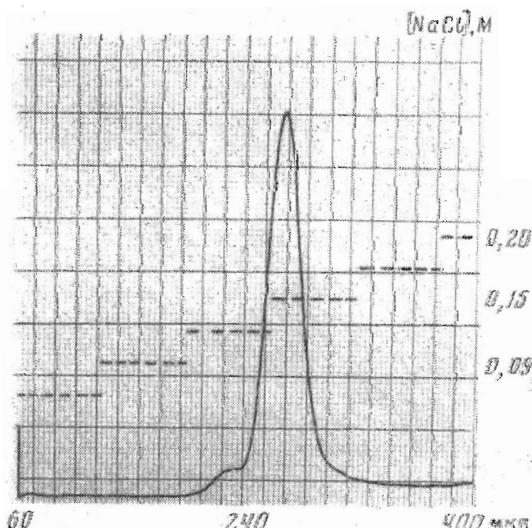


Рис. 8. Микроколоночная хроматография тридекануклеотида (IV) на DEAE-целлюлозе ($0,88 \times 50$ мм, Cl^-) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевине, рН 3,5 (0,0—0,2 М, общий объем градиента 470 мкл), скорость элюции 380 мкл/ч. Запись на МСФП-1 (чувствительность 2 ОЕ/шкала)

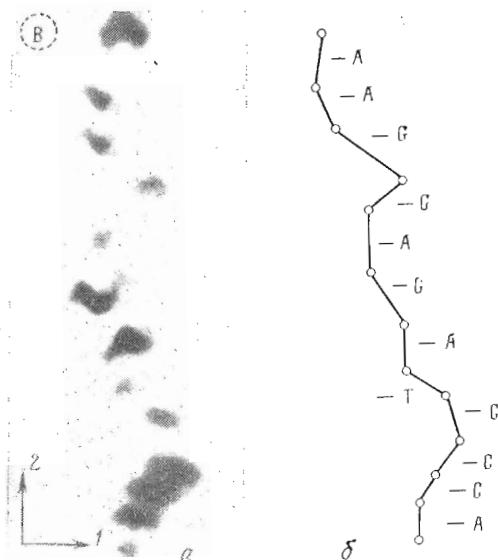


Рис. 9. Двухмерное разделение частичного гидролизата тридекануклеотида (IV) из опыта 11 (В — ксиленцианин FF). Первое направление — электрофорез, второе — гомохроматография; а — радиоавтограмма, б — схема

Авторы выражают благодарность М. Ф. Шемякину и А. В. Честухину за препарат Т4-полинуклеотидкиназы, а также В. П. Демушкину за микроколоночную хроматографию низших олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

- Берлин Ю. А., Долганов Г. М., Каган М. З., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Полякова И. А., Честухин А. В., Шемякин М. Ф. (1976) Биоорганическая химия, 2, 995—996.
- Берлин Ю. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Чахмаччева О. Г., Шингарова Л. Н. (1976) Биоорганическая химия, 2, 773—780.
- Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г. (1976) Биоорганическая химия, 2, 166—178.
- Agarwal K. L., Berlin Yu. A., Kleid D. G., Smirnov V. D., Khorana H. G. (1975) J. Biol. Chem., 5563—5573.
- Schott H., Kössel H. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 3778—3785.
- Sanger F. (1973) in Virus Research (Fox C. F., Robinson W. S., eds.), pp. 573—598, Acad. Press, N.Y.—London.
- Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) Биохимия, 39, 747—751.
- Richardson C. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54, 158—165.
- Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) Nucleic Acid Research, 1, 331—353.

Поступила в редакцию
11.III.1976

SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES. XV. THE SYNTHESIS OF THE TRIDECADEOXYRIBONUCLEOTIDE COMPLEMENTARY TO THE 23-35 REGION OF A YEAST tRNA^{Val}

BERLIN Yu. A., KAGAN M. Z., KOLOSOV M. N.,
KOROBKO V. G.

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

Chemical synthesis of the tridecadeoxyribonucleotide complementary to the region 23-35 of the yeast tRNA^{Val} has been carried out by the phosphodiester approach and its primary structure has been confirmed by the fingerprinting technique.