



УДК 577.113.4

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА СМЕШАННЫХ РИБО-ДЕЗОКСИРИБООЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ДУПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ МЕЖНУКЛЕОТИДНУЮ ТРИЗАМЕЩЕННУЮ ПИРОФОСФАТНУЮ СВЯЗЬ

© 1996 г. Н. А. Нарышкин, М. Г. Ивановская[#], Т. С. Орецкая, Е. М. Волков, М. Дж. Гейт*, З. А. Шабарова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет и Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119899, Москва, Воробьевы горы;

* Медицинский исследовательский центр, лаборатория молекулярной биологии, Кембридж, Англия

Поступила в редакцию 09.11.95 г.

Синтезированы фрагменты двутяжевых рибо-, а также смешанных рибо-дезоксирибоолигонуклеотидов, содержащих в заданном положении сахарофосфатного остова тризамещенную пирофосфатную межнуклеотидную связь. Модифицированная межнуклеотидная связь вводилась в синтетические олигонуклеотиды методом химического лигирования под действием EDC. Подобраны условия эффективного химического лигирования в серии дуплексов, различающихся содержанием и взаимным расположением рибо- и дезоксирибоолигонуклеотидных блоков. Выход олигонуклеотида, содержащего тризамещенную пирофосфатную межнуклеотидную связь, в полностью дезоксидуплексе составил 90%; в дуплексах, содержащих фрагменты рибоолигонуклеотидов, – от 15 до 68%. Полученные модифицированные дуплексы относительно устойчивы в водном растворе при pH 5.5–7.5, а при взаимодействии с аминсоединениями расщепляются по модифицированной межнуклеотидной связи с образованием фосфамидного производного олигонуклеотида. Описано получение 3'-этиловых эфиров олигорибонуклеотидов автоматическим твердофазным методом.

Ключевые слова: олигорибонуклеотиды, реагенты для ковалентного связывания с белком, тризамещенная пирофосфатная межнуклеотидная связь, химическое лигирование, 3'-этилфосфаты олигорибонуклеотидов.

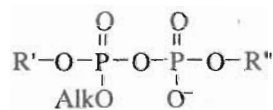
Одно- и двухцепочечные олигонуклеотиды являются в настоящее время важным инструментом исследования в молекулярной биологии. Среди большого количества доступных на сегодняшний день природных и модифицированных олигонуклеотидов особого внимания заслуживают производные, содержащие химически активные группы и поэтому обладающие способностью образовывать ковалентные связи с другими биополимерами. Интерес к этим соединениям вызван возможностью их использования для направленной модификации биополимеров, образующих комплексы с нуклеиновыми кислотами [1–3].

Ранее в нашей лаборатории был предложен новый тип химически активных реагентов –

Сокращения: EDS – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, MES – морфолинэтансульфокислота. Префикс d (деокси) в обозначениях дезоксирибонуклеотидов опущен, олигорибонуклеотидные последовательности изображены в круглых скобках.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 939-31-53, fax: (095) 939-31-81, e-mail: mgi@nuclacid.genebee.msu.su).

ДНК-дуплексов, содержащих в заданном положении сахарофосфатного остова тризамещенную пирофосфатную межнуклеотидную связь [2–4]:



где Alk – Me, Et,

R', R'' – остатки олигонуклеотидов

Олигодезоксирибонуклеотиды с замещенной пирофосфатной группой легко фосфорилируют по аминогруппам в водной среде аминокислоты, пептиды и белки [2–4]. Наличие активной связи внутри сахарофосфатного остова ДНК-дуплекса позволило использовать эти реагенты для аффинной модификации белков, узнающих определенные последовательности в структуре двойной спирали ДНК [2, 3]. Первые эксперименты по модификации метилаз *EcoRI* и *RsrI* и эндонуклеаз рестрикции *EcoRI*, *RsrI* и *SsoII* субстратами, содержащими внутри сайтов узнавания тризамещенную

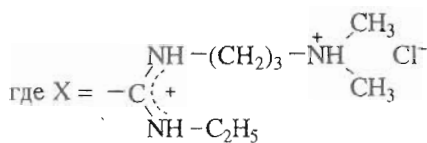
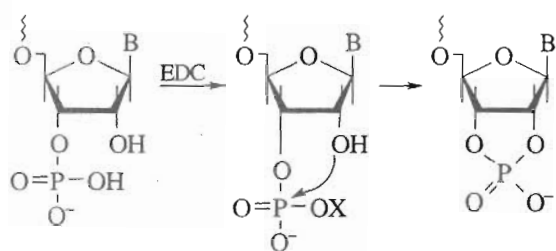


Схема.

пирофосфатную межнуклеотидную связь, показали высокую эффективность ковалентного присоединения таких производных к белку [2, 3]. Преимущество указанного типа реагентов заключается в том, что введение замещенной пирофосфатной связи не вносит существенного искажения в структуру межнуклеотидного узла, поэтому ковалентное связывание реагента с белком может протекать с участием лишь той аминокислоты, которая в комплексе белок-НК сближена с данной модифицированной межнуклеотидной связью, т.е. региоселективно.

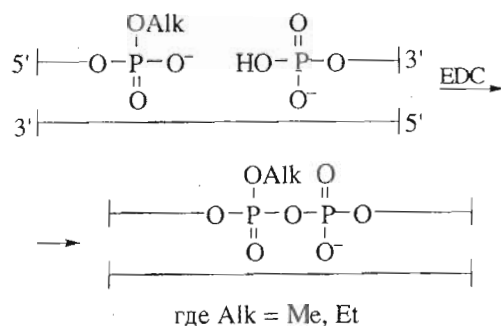
К настоящему времени синтез тризамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связи описан только для ДНК. Методы получения аффинных реагентов на основе рибоолигонуклеотидов пока не описаны, так как автоматический синтез РНК вошел в практику сравнительно недавно. Актуальность же таких разработок очевидна, учитывая бурное развитие исследований с использованием синтетических фрагментов РНК. Химически активные производные олигорибонуклеотидов могут быть полезными при решении многих вопросов РНК-белковых взаимодействий, механизмов генной экспрессии, биохимии РНК-содержащих вирусов.

Поэтому целью настоящей работы являлась отработка метода введения тризамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связи в заданную позицию рибо- и смешанных рибо-дезоксирибоолигонуклеотидов, а также изучение устойчивости и химических свойств этих соединений в сравнении с ранее описанными [2, 4] производными олигонуклеотидов дезоксирибозы.

Автоматический твердофазный олигонуклеотидный синтез в его современном виде непригоден для получения химически активных производных олигонуклеотидов, так как в условиях удаления защитных групп с синтетического олигонуклеотида активная группа неизбежно инактивируется. Наиболее удобный метод введения

химически активных группировок в структуру межнуклеотидного узла одно- и двухцепочечных олигонуклеотидов – химическое лигирование [5].

Олигонуклеотиды с тризамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связью образуются при проведении конденсации в дуплексе, в котором в одноцепочечном разрыве сближены концевой фосфат одного олигонуклеотида и алкиловый эфир концевого фосфата второго олигонуклеотида [2, 4]:

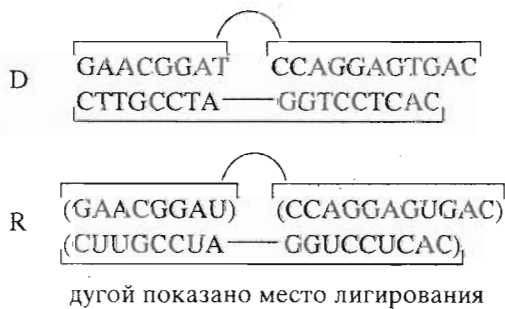


В таких дуплексах, как правило, дизамещенный фосфат располагается в 3'-положении, а монозамещенный – в 5'-положении одноцепочечного разрыва исходного дуплекса. Сочетание 3'-дизамещенного фосфата и свободного 5'-концевого фосфата при лигировании ДНК предпочтительно по следующим соображениям: 1) для анализа продуктов ковалентного присоединения олигонуклеотида к белку в олигонуклеотид вводится радиоактивная метка, которая впоследствии остается связанной с этим белком. Поскольку атака нуклеофильной группы белка всегда направлена по дизамещенному атому фосфора в тризамещенном пирофосфате, меченым при лигировании должен быть именно незазамещенный концевой фосфат; 2) введение радиоактивно меченого 5'-концевого фосфата осуществляется, как известно, проще, чем 3'-фосфата; 3) в РНК при наличии свободного 3'-концевого фосфата при действии конденсирующего агента в первую очередь идет образование 2',3'-циклофосфата [6] (схема).

Для получения 3'-алкилфосфатов олигорибонуклеотидов метод, разработанный ранее для дезоксирибозы и заключающийся в конденсации олигонуклеотида со спиртом в водной среде под действием EDC [7], не может быть использован по причине протекания побочной реакции внутримолекулярной циклизации с участием 2'-ОН рибозы. Поэтому мы разработали описанный ниже автоматический твердофазный метод синтеза. Для смешанных рибо-дезоксирибоолигонуклеотидов, не содержащих 3'-концевого рибозена, был оптимизирован метод конденсации со спиртом под действием EDC, что позволило получить этиловые эфиры олигонуклеотидов в мягких условиях и с высокими выходами (см. "Экспер. часть").

3'-Этилфосфаты олигорибонуклеотидов получали по стандартной методике амидофосфитного синтеза. В качестве полимерного носителя использовали СРГ-500 с β-оксиэтилсульфонильной якорной группой, хорошо зарекомендовавшей себя в синтезе олигодезоксирибонуклеотидов с 3'-концевым фосфатом [8]. Для получения этилового эфира олигонуклеотида на первой стадии синтеза в реакцию вводили 5'-О-диметокситритил-2'-О-*трет*-бутилдиметилсиллил-3'-(*N,N*-диизопропиламидо)этилфосфит уридина. Время конденсации на стадии присоединения модифицированного звена увеличивали до 10 мин. Далее синтез олигонуклеотидов осуществляли в стандартных условиях. По окончании синтеза олигонуклеотид отщепляли с СРГ и удаляли защитные группы, как описано в работе [9]. После очистки обращенно-фазовой ВЭЖХ и обессоливания наличие дизамещенной фосфатной группы в полученных олигонуклеотидах подтверждали отсутствием реакций с фосфомоноэстеразой и с водным раствором этилендиамина (EDC, рН 4.5) [7].

Для сравнения эффективности химического лигирования при синтезе тризамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связи в олигонуклеотидах дезокси- (d) и рибо- (r) ряда были выбраны два базовых дуплекса: D, состоящий только из дезоксирибоолигонуклеотидов (8-, 11- и 17-звеньев), и его рибоаналог R:



На основе олигонуклеотидов, формирующих дуплексы D и R, была составлена серия из 9 дуплексов с различным взаимным расположением рибо- и дезоксирибоолигонуклеотидов в дуплексе (табл. 1) для выяснения зависимости эффективности химического лигирования от природы матрицы и компонентов, участвующих в конденсации.

Для проведения лигирования в дуплексах 1–9 в качестве конденсирующего агента использовали EDC аналогично тому, как описано нами ранее для ДНК [4]. Предварительно методом УФ-плавления было показано, что изучаемые дуплексы устойчивы в условиях химического лигирования. Ход реакций контролировали методом гель-электрофореза в 20% ПААГ с последующей авторадиграфией. Выходы продуктов конденсации определяли по радиоактивности соответствующих зон геля.

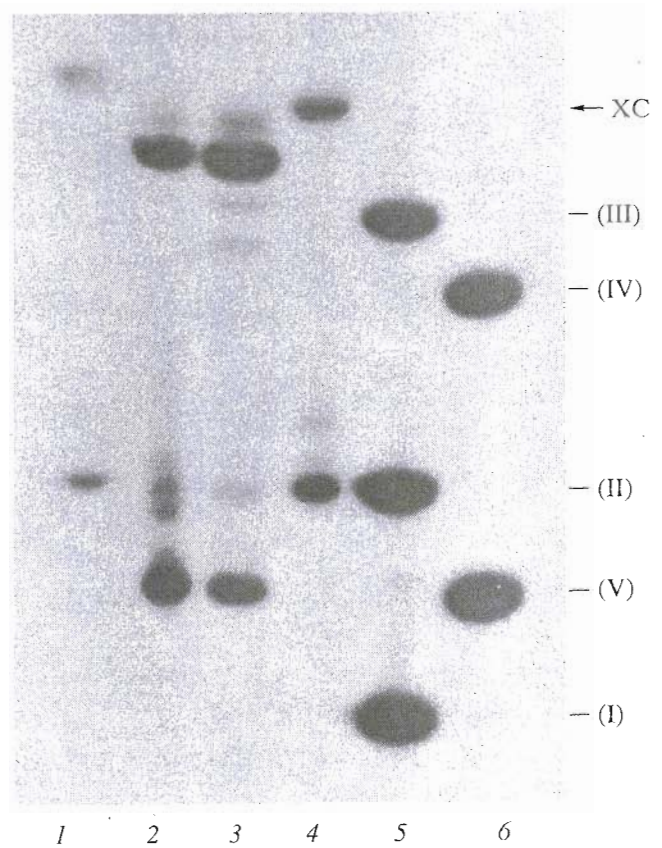


Рис. 1. Авторадиграмма 20% ПААГ, полученного при электрофоретическом разделении продуктов химического лигирования в дуплексах 1 (I), 3 (2), 4 (3), 2 (4); 5 – смесь ³²P-меченых исходных рибоолигонуклеотидов (I)–(III); 6 – смесь ³²P-меченых исходных дезоксирибоолигонуклеотидов (IV) и (V). XC – положение ксиленцианола.

Наиболее характерные авторадиграммы, полученные после конденсации в изучаемой трехкомпонентной системе при частичной или полной замене олигонуклеотидов дезоксирибоаналогом, приведены на рис. 1, 2.

Природу синтезированной межнуклеотидной связи в дуплексах 1–9 (табл. 1) доказывали реакцией с этилендиамином при рН 8 как описано в работе [4]. Единственным продуктом химического лигирования во всех системах (дуплексы 1–9) оказался олигонуклеотид с тризамещенной пирофосфатной связью.

Анализируя данные табл. 1, можно сделать вывод, что конденсация протекает с высокой эффективностью как в РНК-, так и в ДНК-дуплексах. В подобранных условиях в дуплексе ДНК (дуплекс 6, табл. 1) эффективность конденсации достигала 90%, а в дуплексах, содержащих олигорибонуклеотиды, выход целевого продукта составил 15–68%. Замена олигонуклеотидов дезоксирибоаналогом при синтезе тризамещенной

Таблица 1. Синтез дуплексов олигонуклеотидов дезокси- и риборяда, содержащих тризамещенную пирофосфатную межнуклеотидную связь*

| Дуплекс | Состав дуплексов для лигирования | Выход, % |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1 | $\begin{array}{ccc} \text{I} & & \text{II} \\ (\text{GAACGGA})\text{T}_{\text{POEt}} & \text{НОР} & (\text{CCAGGAGUGAC}) \\ (\text{CUUGCCU-A} & \text{-----} & \text{GGUCCUCAC}) \\ & & \text{III} \end{array}$ | 48 |
| 2 | $\begin{array}{ccc} \text{I} & & \text{II} \\ (\text{GAACGGA})\text{T}_{\text{POEt}} & \text{НОР} & (\text{CCAGGAGUGAC}) \\ \text{CTTGCCT-A} & \text{-----} & \text{GGTCCTCAC} \\ & & \text{IV} \end{array}$ | 60 |
| 3 | $\begin{array}{ccc} \text{I} & & \text{V} \\ (\text{GAACGGA})\text{T}_{\text{POEt}} & \text{НОР} & (\text{CCAGGAGTGAC}) \\ (\text{CUUGCCU-A} & \text{-----} & \text{GGUCCUCAC}) \\ & & \text{III} \end{array}$ | 34 |
| 4 | $\begin{array}{ccc} \text{I} & & \text{V} \\ (\text{GAACGGA})\text{T}_{\text{POEt}} & \text{НОР} & (\text{CCAGGAGTGAC}) \\ \text{CTTGCCT-A} & \text{-----} & \text{GGTCCTCAC} \\ & & \text{IV} \end{array}$ | 68 |
| 5 | $\begin{array}{ccc} \text{VI} & & \text{V} \\ \text{GAACGGAT}_{\text{POEt}} & \text{НОР} & (\text{CCAGGAGTGAC}) \\ (\text{CUUGCCUA} & \text{-----} & \text{GGUCCUCAC}) \\ & & \text{III} \end{array}$ | 40 |
| 6 | $\begin{array}{ccc} \text{VI} & & \text{V} \\ \text{GAACGGAT}_{\text{POEt}} & \text{НОР} & (\text{CCAGGAGTGAC}) \\ \text{CTTGCCTA} & \text{-----} & \text{GGTCCTCAC} \\ & & \text{IV} \end{array}$ | 90 |
| 7 | $\begin{array}{ccc} \text{VII} & & \text{V} \\ \text{GAACGGA}(\text{U})_{\text{POEt}}^{\text{OH}} & \text{НОР} & (\text{CCAGGAGTGAC}) \\ \text{CTTGCCT-A} & \text{-----} & \text{GGTCCTCAC} \\ & & \text{IV} \end{array}$ | 70 |
| 8 | $\begin{array}{ccc} \text{VII} & & \text{II} \\ \text{GAACGGA}(\text{U})_{\text{POEt}}^{\text{OH}} & \text{НОР} & (\text{CCAGGAGUGAC}) \\ \text{CTTGCCT-A} & \text{-----} & \text{GGTCCTCAC} \\ & & \text{IV} \end{array}$ | 40 |
| 9 | $\begin{array}{ccc} \text{VII} & & \text{II} \\ \text{GAACGGA}(\text{U})_{\text{POEt}}^{\text{OH}} & \text{НОР} & (\text{CCAGGAGUGAC}) \\ (\text{CUUGCCU-A} & \text{-----} & \text{GGUCCUCAC}) \\ & & \text{III} \end{array}$ | 15 |

* Условия конденсации: 0.05 M MES-буфер (pH 6.0), 0.02 M MgCl₂, 0.5 M EDC, 5°C, 72 ч, концентрация нуклеотидов 0.25 × 10⁻⁴ M (в расчете на мононуклеотид). Олигонуклеотиды (II) и (V) 5'-³²P-мечены.

пирофосфатной межнуклеотидной связи вызывает снижение выхода целевого продукта. Примечательно, что введение только одного 3'-концевого рибонуклеотида в состав олигодезоксирибонуклеотида заметно снижает эффективность химического лигирования (дуплексы 6 и 7, табл. 1).

Результаты химического лигирования в дуплексах 1–9 (табл. 1) позволяют вывести одну общую закономерность: химическое лигирование всегда эффективнее и быстрее протекает на дезоксиматрице, чем на ее рибоаналоге (ср. дуплексы 1 и 2, 3 и 4, 5 и 6, 8 и 9, табл. 1). На рис. 3 в качестве примера приведены кривые накопления одного и того же 19-звенного олигонуклеотида, полученного на рибо- и соответствующей дезоксиматрицах (дуплексы 1 и 2).

Наиболее неблагоприятными для химического лигирования в рассматриваемой трехкомпонентной системе оказались комбинации, когда на рибоматрице сближены олигонуклеотиды рибо- и дезоксиряда. Это может быть следствием резкого перехода между двумя формами двойной спирали (А и С [10, 11]) в месте одноцепочечного разрыва. Возможно, в этом месте образуется “излом”, и реагирующие группы оказываются удаленными друг от друга или экспонированными в сторону от сахарофосфатного остова, что затрудняет конденсацию.

Более высокие выходы продуктов химического лигирования при использовании дезоксиматрицы в сравнении с соответствующей рибоматрицей могут быть объяснены, по-видимому, большей конформационной подвижностью первой [10]. Дезоксиматрица сглаживает различия в структуре двойных спиралей г-d- и d-d-участков (А- и В-типа [10]) в смешанных г,d-дуплексах, переход между этими участками получается более плавным, без резких изломов, и реагирующие группы имеют более выгодное для конденсации пространственное расположение.

Химические свойства рибо- и смешанных рибо-дезоксирiboолигонуклеотидов с тризамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связью оказались аналогичными свойствам олигонуклеотидов дезоксиряда, содержащих ту же межнуклеотидную связь [4]. Рибо- и смешанные рибо-дезоксирiboолигонуклеотиды с тризамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связью устойчивы в водных растворах при pH 5.5–7.5 в отсутствие сильных нуклеофилов; степень их гидролиза в воде не превышала 2% за 24 ч при 20°C. При взаимодействии этих соединений с этилендиамином или лизином при pH 8 протекала реакция нуклеофильного замещения у дизамещенного атома фосфора тризамещенного пирофосфата, приводящая к расщеплению ангидридной связи с образованием фосфамидного производного оли-

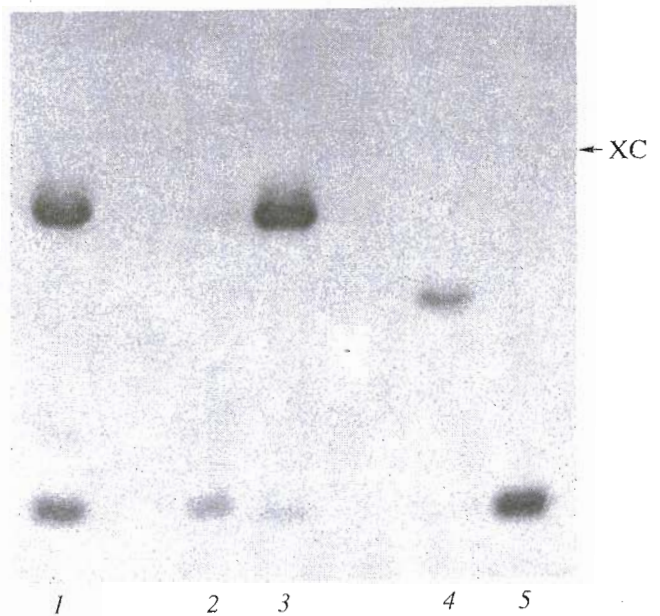


Рис. 2. Авторадиограмма 20% ПААГ, полученного при электрофоретическом разделении продуктов химического лигирования в дуплексах 5 (2), 6 (3), 7 (1); 4 – ³²P-меченый исходный олигонуклеотид (IV); 5 – ³²P-меченый олигонуклеотид (V).

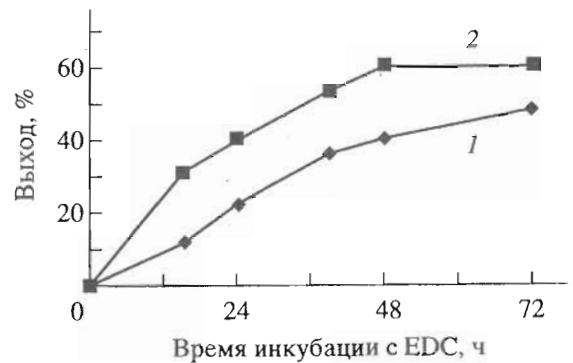
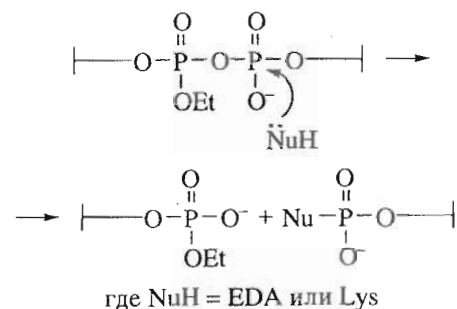


Рис. 3. Кривые накопления продуктов конденсации при проведении химического лигирования в дуплексах 1 и 2 (кривые 1 и 2).

гонуклеотида аналогично тому, как это описано ранее для олигонуклеотидов дезоксиряда [4]:



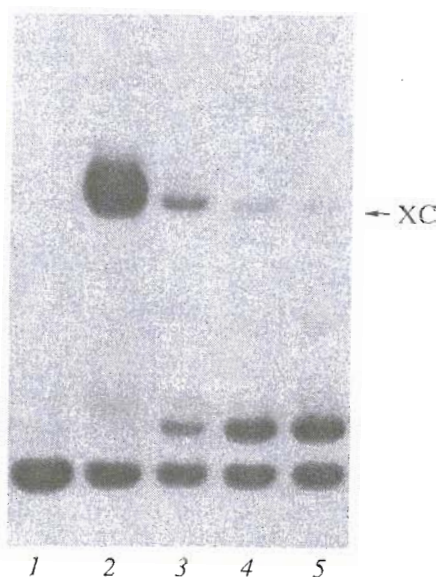
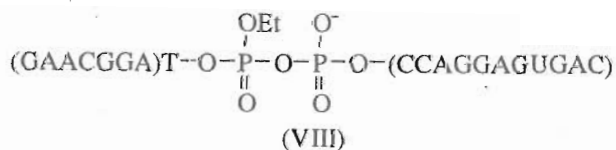


Рис. 4. Авторадиограмма 20% ПААГ, полученного при электрофоретическом разделении продуктов взаимодействия олигонуклеотида (VIII) с 0.5 М этилендиамином (рН 8.0) при 37°C в течение 1 (3), 5 (4) и 10 (5) ч; 1 – ³²Р-меченый исходный олигонуклеотид (II), 2 – реакционная смесь после химического лигирования в дуплексе 1.

Расщепление продукта химического лигирования в дуплексе 1 – олигонуклеотида



под действием 0.5 М водного этилендиамина (рис. 4) при рН 8.0 ускоряется при повышении температуры. Так, в присутствии 0.5 М этилендиамина при рН 8.0 и температуре 10°C за 1 ч расщепляется 25% олигонуклеотида, а при 37°C – 40% (табл. 2).

Высокая эффективность реакций с этилендиамином и лизином свидетельствует о том, что оли-

Таблица 2. Расщепление рибоолигонуклеотида (VIII) (продукт конденсации в дуплексе 1) при обработке 0.5 М лизином или 0.5 М этилендиамином в водной среде (рН 8.0)

| Реагент | t, °C | Время, ч | Степень расщепления, % |
|--------------|-------|----------|------------------------|
| Этилендиамин | 10 | 1 | 25 |
| | | 1 | 40 |
| | 37 | 5 | 90 |
| | | 10 | 98 |
| Лизин | 10 | 10 | 50 |

гонуклеотиды риборяда с тризамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связью, так же как и дезоксианалоги, могут быть использованы для ковалентного связывания с белками, образующими комплексы с РНК.

Данные по синтезу рибо- и смешанных рибо-дезоксирибоолигонуклеотидов в изученной серии дуплексов позволяют проводить оптимальный подбор компонентов реакционных систем для достижения максимального выхода модифицированных олигонуклеотидов в реакциях химического лигирования. Описанный метод дает возможность получать олигонуклеотиды, содержащие рибофрагменты и тризамещенную пирофосфатную межнуклеотидную связь, с выходом до 68%.

Высокая эффективность синтеза модифицированных олигонуклеотидов дезоксириба (90%) позволяет получать такие химически активные дуплексы без стадии выделения, что расширяет сферу их применения в научных и прикладных исследованиях, а также открывает перспективу их применения в качестве терапевтических средств.

Полученные в настоящей работе новые аффинные реагенты на основе рибо- и смешанных рибо-дезоксирибоолигонуклеотидов могут быть использованы при изучении активных центров РНК-узнающих ферментов, картировании электростатических контактов в комплексах белок-РНК; создании РНК-“ловушек” для белков и в общем случае для изучения различных биохимических процессов, протекающих с участием РНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использованы EDTA, LiClO₄ (Fluka, Швейцария); MES, гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (Sigma, США), NaCl (Merck, ФРГ), бромфеноловый синий и ксиленцианол (Reanal, Венгрия); акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, MgCl₂, гидрохлорид трис(гидроксиэтил)аминометана (Serva, ФРГ); T4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78; Fermentas, Литва); остальные реактивы отечественного производства.

Для синтеза 8-звенного рибоолигонуклеотида (I) применяли амидофосфиты с 2'-O-трет-бутилдиметилсилильными защитными группами фирмы Glen Research, для синтеза олигонуклеотидов (II) и (III) – амидофосфиты фирмы Applied Biosystems.

Гель-электрофорез проводили в пластинах 20% ПААГ, содержащего 7 М мочевины, в 0.05 М трис-боратном буфере (рН 8.3) с 1 мМ EDTA. Для нанесения в ячейки геля олигонуклеотиды растворяли в 5–10 мкл 1% раствора бромфенолового синего и ксиленцианола в смеси формамид-вода (8 : 2) с 1 мМ EDTA. Элюцию из геля проводили 2 М водным раствором LiClO₄ в течение 1 ч при 37°C или 12 ч при 4°C.

5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов дезокси- и риборядов проводили стандартным методом с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и [γ - 32 P]АТР [12].

Синтез 3'-этилфосфатов олигонуклеотидов (I) и (VI) в водном MES-буфере. К раствору 1–10 нмоль олигонуклеотида, содержащего 3'-концевой фосфат, в 30 мкл MES-буфера, рН 4.5, небольшими частями добавляли 20 мкл этанола. После каждого добавления раствор тщательно перемешивали. Водно-спиртовой раствор олигонуклеотида охлаждали до 10°C и прибавляли 5 мг EDC. Смесь инкубировали 6 ч при 5°C, затем к реакционной смеси добавляли 200 мкл 2 М LiClO₄ и 1000 мкл ацетона, охлаждали 20 мин при –20°C и центрифугировали 5 мин (8000 об/мин). Супернатант отбирали, осадок растворяли в 50 мкл 2 М раствора LiClO₄, добавляли 300 мкл ацетона, осадок промывали 200 мкл ацетона и олигонуклеотиды выделяли в 20% ПААГ, как описано выше. Выходы олигонуклеотидов (I) и (VI) составили 96 и 98% соответственно.

Синтез природных и модифицированных олигонуклеотидов. 5'-О-Диметокситритил-2'-О-трет-бутилдиметилсилил-3'-(N,N-диизопропиламидо)-этилфосфит уридина получали по методике [13]. Синтез природных и модифицированного (VII) олигонуклеотидов осуществляли на автоматическом ген-синтезаторе Applied Biosystems 380B (США). В качестве полимерных носителей использовали Small Scale dN CPG Applied Biosystems (США) с удельной загрузкой 24 мкмоль/г и для синтеза 3'-фосфорилированных олигонуклеотидов полимер с β -оксиэтилсульфонильной группой, полученный по методике [8] с загрузкой 40 мкмоль/г. Для получения олигонуклеотида (VII) использовали раствор модифицированного амидофосфита с концентрацией 0.15 М. Деблокирование олигонуклеотидов после синтеза, ВЭЖХ-анализ реакционных смесей и выделение олигонуклеотидов осуществляли согласно [9, 14].

Синтез олигонуклеотидов с тризамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связью. Эквивалентные количества олигонуклеотидов (всего 0.5 нмоль) растворяли в 20 мкл MES-буфера, рН 6.0, содержащего 0.02 М MgCl₂, и проводили отжиг, медленно охлаждая реакционную смесь от 80 до 10°C. Затем к реакционной смеси добавляли 2 мг EDC, перемешивали и инкубировали 3 сут при 5°C. Продукты реакции осаждали, как описано выше, и анализировали с помощью электрофореза в 20% ПААГ с 7 М мочевиной. Выходы продуктов лигирования приведены в табл. 1.

Взаимодействие рибоолигонуклеотида (VIII) с водным раствором лизина или этилендиамина. К смеси олигонуклеотидов, полученной в результа-

те конденсации в дуплексе 1, после осаждения добавляли 20 мкл 0.5 М водного раствора этилендиамина или лизина. После инкубации смеси (условия в табл. 2) продукты реакции дважды осаждали ацетоном из раствора в 2 М LiClO₄ и анализировали с помощью электрофореза в 20% ПААГ с 7 М мочевиной. Степень расщепления олигонуклеотида (VIII) оценивали по активности соответствующих зон геля (см. рис. 4, табл. 2).

Авторы выражают глубокую признательность Т. Смиту, Д. Фогг и Р. Гринфиллу за помощь в синтезе олигорибонуклеотидов.

Работа была частично поддержана Международным научным фондом (грант № MLX300), Европейским союзом, INTAS (грант №94-3810), международным фондом "Культурная инициатива" (грант № а963-х), а также Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 94-04-12649-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власов В.В., Грачев М.А., Лаврик О.И. и др. // Афинная модификация биополимеров / Ред. Д.Г. Кнорре. Новосибирск: Наука, 1983.
2. Purnal A.A., Shabarova Z.A., Gumpori R.I. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20, P. 3713–3719.
3. Шабарова З.А., Шефлян Г.Я., Кузнецова С.А., Кубарева Е.А., Сысоев О.Н., Ивановская М.Г., Громова Е.С. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 413–419.
4. Кузнецова С.А., Ивановская М.Г., Шабарова З.А. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 219–225.
5. Shabarova Z.A. // Biochimie. 1988. Т. 70. P. 1323–1334.
6. Шабарова З.А., Богданов А.А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978. С. 204.
7. Ivanovskaya M.G., Gottikh M.B., Shabarova Z.A. // Nucleosides Nucleotides. 1987. V. 6. P. 913–934.
8. Волков Е.М., Романова Е.А., Круг А., Орецкая Т.С., Потапов В.К., Шабарова З.А. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. С. 1034–1039.
9. Pritchard C.E., Grashy J.A., Hamy F., Zacharek A.M., Singh M., Karn J., Gait M.J. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 2592–2600.
10. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987. С. 260–303.
11. Fedoroff O.Yu., Salazar M., Reid B.R. // J. Mol. Biol. 1993. V. 233. P. 509–523.
12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
13. Koziolkiewicz M., Wilk A. // Protocols for Oligonucleotides and Analogs / Ed. S. Agrawal. N.Y.: Humana Press Inc., 1993. P. 213–215.
14. Кузнецова М.Г., Романова Е.А., Волков Е.М., Таулицкий В.Н., Орецкая Т.С., Крынецкая Н.Ф., Шабарова З.А. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 455–466.

Synthesis and Properties of Mixed Ribo- and Deoxyribooligonucleotide Duplexes Containing an Internucleotide Trisubstituted Pyrophosphate Bond

N. A. Naryshkin*, M. G. Ivanovskaya*, T. S. Oretskaya*, E. M. Volkov*,
M. J. Gait**, and Z. A. Shabarova*

* *Department of Chemistry and Belozersky Institute of Physicochemical Biology,
Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119899 Russia*

** *Medical Research Centre, Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, England*

Abstract—Fragments of double-stranded RNAs and mixed double-stranded ribo/deoxyribooligonucleotides containing an internucleotide trisubstituted pyrophosphate bond in a predetermined position of the sugar-phosphate backbone were synthesized. The modified internucleotide bond was created between synthetic oligonucleotides by chemical ligation with carbodiimide. The chemical ligation conditions were optimized for a series of duplexes that differed in the content and mutual arrangement of ribo- and deoxyribonucleotide blocks. The yield of oligonucleotides containing the trisubstituted internucleotide pyrophosphate bond was 90% in an all-deoxy duplex and 15–68% in ribooligonucleotide-containing duplexes. The modified duplexes thus obtained are relatively stable in an aqueous solution at pH 5.5–7.5, whereas the modified internucleotide bond is cleaved by amines to form phosphamide derivatives of the corresponding oligonucleotides. Automated solid-phase synthesis of oligonucleotide 3'-ethylphosphates is described.

Key words: oligoribonucleotides; reagents for covalent protein binding; trisubstituted internucleotide pyrophosphate bond; chemical ligation; oligoribonucleotide 3'-phosphates.