



УДК 577.123.38:577.113.6

ХИМИЧЕСКИЙ И ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ α -ТИОТРИФОСФАТОВ НУКЛЕОЗИДОВ

© 2003 г. К. В. Антонов[#], Р. С. Есипов, А. И. Гуревич, Д. В. Чувицкий,
Г. В. Микулинская, С. А. Феофанов, А. И. Мирошников

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 13.06.2002 г. Принята к печати 04.09.2002 г.

Предложены методы химического и химико-ферментативного синтеза 5'-тиофосфатов и 5'- α -тиотрифосфатов нуклеозидов. Полученные 5'- α -тиотрифосфаты были использованы в качестве субстратов для матричного ферментативного синтеза в ПЦР и в транскрипционной системе с T7-РНК-полимеразой.

Ключевые слова: дезоксирибонуклеозидмонофосфаткиназа фага T5, иммобилизованный препарат, нуклеотиды, станниловые эфиры, фосфотиоатные аналоги.

ВВЕДЕНИЕ

Фосфотиоатные аналоги нуклеиновых кислот нашли широкое применение в молекулярной биологии. Интерес к таким аналогам РНК и ДНК обусловлен в первую очередь их устойчивостью к деградации под воздействием нуклеаз, что позволяет использовать их в качестве возможных эффективных терапевтических агентов.

Наиболее простым способом получения тиоаналогов нуклеиновых кислот является матричный синтез с помощью РНК- и ДНК-полимераз, которые, как оказалось, способны использовать для этой цели в качестве субстратов S_p -диастереомеры нуклеозид- α -тиотрифосфатов [1, 2].

Разработка эффективного метода синтеза рибо- и 2'-деоксирибонуклеозид- α -тиотрифосфатов, (d)NTP_S, является, таким образом, важным условием для получения тиоаналогов нуклеиновых кислот в достаточном количестве для различных целей.

Существуют два подхода к химическому синтезу α -тиотрифосфатов нуклеозидов: непосредственное и избирательное тиофосфорилирование нуклеозидов фосфоротиотрихлоридом [3, 4] и окисление серой соответствующих производных трехвалентного фосфора [5]. Первый путь, несомненно, более перспективен в технологическом смысле. Главный недостаток этого метода – невысокие (25–50%) вы-

ходы целевых продуктов, что, по нашему мнению, связано с существенно пониженной по сравнению с хлорокисью фосфора реакционной способностью фосфоротиотрихлорида. Обойти это ограничение можно, повышая активность второй компоненты – нуклеозидного гидроксила, например, путем использования соответствующих алкоколятов, как это было сделано в работе [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы использовали для тиофосфорилирования нуклеозидов хорошо разработанный метод активации гидроксильной группы через образование станниловых эфиров [7, 8]. Трибутилстанниловые эфиры углеводов обычно получают при кипячении последних в толуоле в присутствии бис(трибутилолово)оксида (I). При этом сами эфиры, как вещества недостаточно стабильные, не выделяются и об их структуре судят по продуктам дальнейших реакций. Как правило, при взаимодействии полиолов с одним эквивалентом оксида (I) происходит этерификация первичных гидроксильных групп [7].

В качестве субстратов для тиофосфорилирования мы выбрали аденозин и дезоксиаденозин. Кипячение дезоксиаденозина с эквивалентом оксида (I) в толуоле или диоксане приводит к его растворению. Смесь остается гомогенной и после охлаждения. ТСХ-контроль реакции после добавления фосфоротиотрихлорида показал быстрое исчезновение исходного нуклеозида (до которого разлагается станниловый эфир в условиях ТСХ) и образование одного продукта с большим значением R_f . Исследование реакционной смеси методом ³¹P-ЯМР показало наличие, кроме сигнала

Сокращения: (d)NMP_S, (d)NDP_S, (d)NTP_S – рибонуклеозид- или 2'-деоксирибонуклеозид-5'-O-тиомоно-, α -тиоди- и α -тиотрифосфаты соответственно; AcP – ацетилфосфат; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ИФП – иммобилизованный ферментный препарат.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-72-47; эл. почта: kid@ibch.ru).

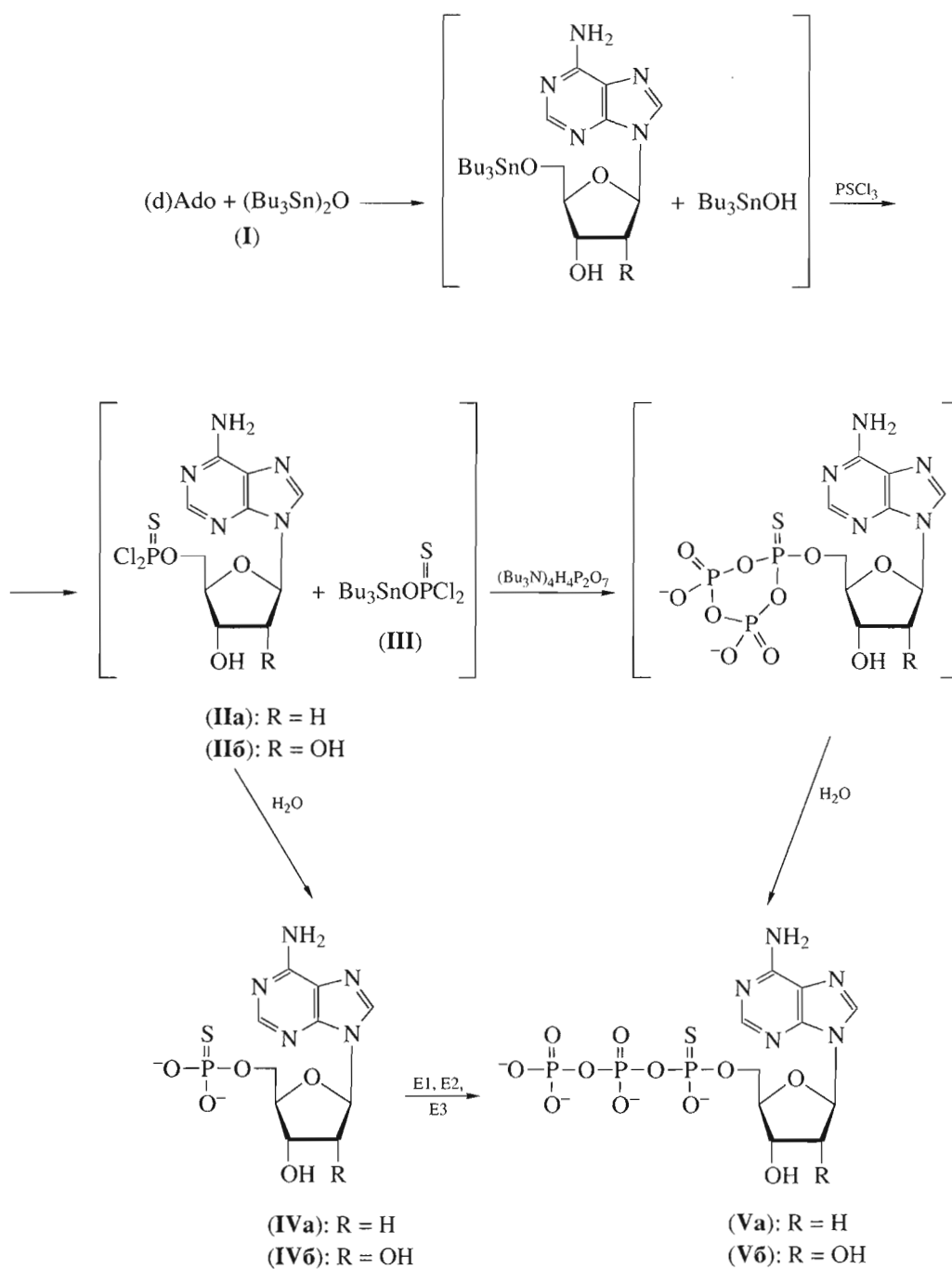


Схема 1. Синтез 5'-тиофосфата и 5'-α-тиотрифосфатов нуклеозидов и 2'-дезоксинуклеозидов.

исходного PSCl₃ при 30.7 м.д., еще двух синглетов равной интенсивности при 45.3 и 56.8 м.д., принадлежащих, видимо, нуклеозиддихлортиофосфату (IIa) и трибутиловооксиддихлортиофосфату (III) (схема 1).

2'-Дезоксиаденозин-5'-тиофосфат (IVa) был получен с выходом 80% после гидролиза реакци-

онной смеси раствором Na₂CO₃ и ионообменной хроматографии на DEAE-Тоуорearl. Строение продукта (IVa) подтверждено спектрами ¹³C- и ³¹P-ЯМР (а также превращением в α-тиотрифосфат (Va) при ферментативном фосфорилировании). В частности, тиофосфорилирование 5'-положения остатка дезоксирибозы (региоселектив-

ность реакции) подтверждалось расщеплением сигналов C4' и C5' на атоме фосфора в спектре ^{13}C -ЯМР.

Добавление к реакционной смеси избытка тетра(три-*n*-бутиламмоний)пирофосфата приводит, по данным ТСХ, к исчезновению промежуточного соединения (IIa) и образованию смеси с преобладанием вещества, близкого по подвижности к нуклеозидтрифосфатам. После гидролиза этот продукт был выделен ионообменной хроматографией и охарактеризован спектрами ^{31}P -ЯМР как целевой α -тиотрифосфат (Va) (эквимольная смесь R_p - и S_p -диастереомеров). Следует отметить, что высокие выходы соединения (Va) (60–70%) достигались только при использовании свежеприготовленного раствора тетра(три-*n*-бутиламмоний)пирофосфата в DMF или при получении его *in situ* из тетрапиридиниевой соли пирофосфата и три-*n*-бутиламина. В первом случае продукт реакции выделяется из раствора в виде эмульсии, во втором, имела место гетерофазная реакция, скорость которой не зависела от применяемого растворителя (толуол или диоксан).

Аналогичным образом, из аденозина был получен аденозин-5'-*O*-(α -тио-трифосфат) (Vб) с общим выходом 70%. Следует отметить, что взаимодействие аденозина с оловооксидом (I) происходит только при добавлении к смеси значительного (10–20%) количества полярного апротонного растворителя (DMF или триметилфосфата), что, по-видимому, связано с меньшей растворимостью станилового эфира рибонуклеозида.

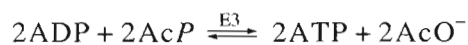
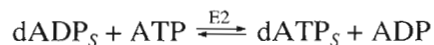
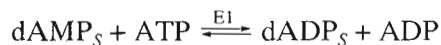
Мы изучали также поведение в реакциях станилирования–тиофосфорилирования некоторых производных аденозина, а именно: 2'- и 3'-моно- и 2',3'-ди-*O*-бензоиладенозинов (здесь не описано). Реакция с PSCl_3 идет только в случае 2'-бензоиладенозина. После добавления тетра(три-*n*-бутиламмоний)пирофосфата, исчерпывающего гидролиза водным аммиаком был получен тиотрифосфат (Vб), однако, со значительно меньшим общим выходом.

Предложенным нами вариантом метода тиофосфорилирования были синтезированы также 5'- α -тиотрифосфаты тимидина, дезоксигуанозина и уридина. Эти результаты будут опубликованы отдельно.

Альтернативный путь получения (d)NTP₅ из (d)NMP₅ основан на использовании ферментативного фосфорилирования. Его главное преимущество – стереоспецифический характер ферментативного процесса, приводящего только к одному диастереомеру (S_p).

Для фосфорилирования dAMP₅ (IVa) мы использовали иммобилизованные ферментные препараты (ИФП), полученные на основе экстрактов контрольных клеток *E. coli* (контрольный ИФП) и клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой,

содержащей ген дезоксинуклеозидмонофосфаткиназы (dNMP-киназы, КФ 2.7.4.13) бактериофага T5. Известно, что фаговый фермент, в отличие от бактериальных dNMP-киназ, обладает широкой субстратной специфичностью [9]. Процесс, по нашему мнению, протекает по следующей схеме:



Здесь E1 – dNMP-киназа *E. coli* или фага T5, E2 и E3 – бактериальные нуклеозиддифосфаткиназа (КФ 2.7.4.6) и ацетаткиназа (КФ 2.7.2.1) соответственно. Последняя, при добавлении в реакционную смесь донора макроэргического фосфата – ацетилфосфата – регенерирует АТФ, что позволяет в 50–100 раз снизить расход АТФ и упрощает выделение dATP₅ из реакционной смеси (нет необходимости отделять продукт от большого количества АТФ).

Показано, что ИФП с dNMP-киназой бактериофага T5 фосфорилирует dAMP₅, хотя и с меньшей скоростью, чем dAMP: степень превращения тиоаналога нуклеотида в тиотрифосфат в выбранных условиях составила примерно 5% за первые 2 ч и около 50% за сутки. В случае контрольного ИФП с бактериальными ферментами *E. coli* синтеза тиотрифосфата не наблюдалось.

Таким образом, химико-ферментативный синтез в нашей системе с ИФП менее продуктивен по сравнению с химическим методом.

Полученные нами α -тиотрифосфаты нуклеозидов были использованы для матричного ферментативного синтеза в ПЦР с *Taq*-ДНК-полимеразой на матрице гена проинсулина с праймерами А и В [10] и dATP₅ + dNTP в качестве субстратов (схема 2a). Поскольку скорость включения *Taq*-ДНК-полимеразой dNTP₅ в цепь ДНК в 20 раз ниже, чем dNTP [11], то для повышения эффективности мы увеличили длительность стадии элонгации до 90 с, а число циклов амплификации до 35. Результаты разделения продуктов амплификации в 2% агарозном геле показаны на рис. 1.

АТФ₅ + NTP в качестве субстратов использовали для ферментативного синтеза РНК (схема 2б) в транскрипционной системе с T7-РНК-полимеразой на матрице гена проинсулина, клонированного в плазмиде pET-20b(+) (Novogen). Образование транскриптов иллюстрируют данные электрофореза в 2% агарозном геле (рис. 2). Количество мРНК в образцах оценивали по результатам гибридизации с ^{32}P -меченым радиоактивным зондом Z (схема 2б). При этом в образцах с АТФ₅ + 3NTP оно

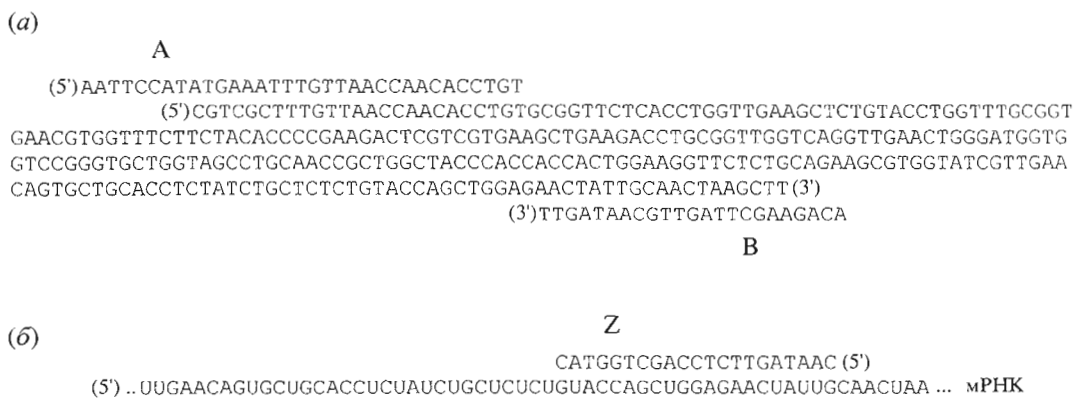


Схема 2. Матричный синтез с использованием 5'- α -тиотрифосфатов нуклеозидов и 2'-дезоксинуклеозидов. (а) – ПЦР с *Taq*-полимеразой на матрице гена проинсулина [10] с использованием в качестве субстратов dATP₅ + dNTP и олигодезоксинуклеотидных праймеров А и В; (б) – транскрипция гена проинсулина [10], клонированного в плазмиде рЕТ-20b(+), T7-РНК-полимеразой с использованием в качестве субстратов ATP₅ + NTP. Приведены: фрагмент последовательности мРНК и структура олигодезоксинуклеотидного зонда Z, использованного для гибридизации.

составляло около 60% количества мРНК в образцах, полученных с участием всех четырех NTP.

Тем самым было показано, что полученные нами α -тиотрифосфаты нуклеозидов пригодны для использования в ферментативных реакциях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) в системах: хлороформ–метанол, 4 : 1 (А), изопропанол–нас. водный аммиак–вода, 15 : 10 :

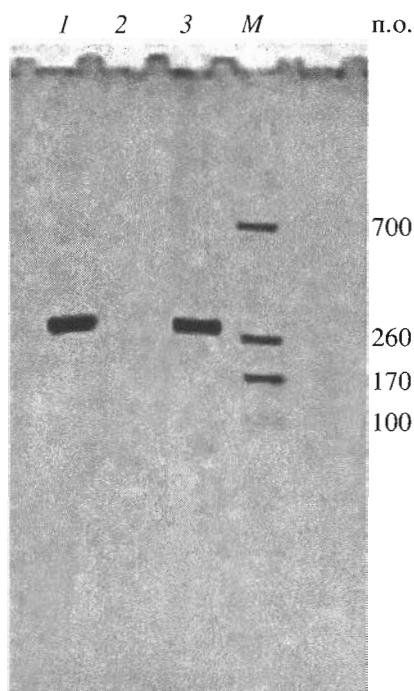


Рис. 1. Разделение в 2% агарозном геле с бромистым этидием продуктов амплификации гена проинсулина, полученных методом ПЦР: с суммой всех dNTP (контроль) (1); с тремя dNTP без dATP (контроль) (2); с тремя dNTP и dATP₅ (3). М – стандарты размеров ДНК.

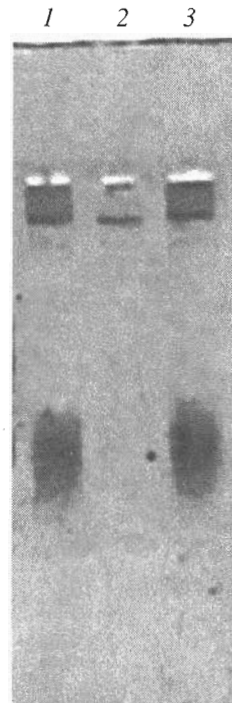


Рис. 2. Транскрипция гена проинсулина, клонированного в плазмиде рЕТ-20b(+), T7-РНК-полимеразой с использованием в качестве субстратов суммы всех NTP (1), трех NTP без ATP (2), трех NTP и ATP₅ (3). Электрофорез в 2% агарозном геле с бромистым этидием.

: 3 (Б), диоксан–5 М водный аммиак–1 М ацетат аммония, 43 : 54 : 3 (В).

ВЭЖХ осуществляли на колонке (4.6 × 125 мм) с сорбентом Nucleosil 100 C₁₈ (5 мкм) при изократическом элюировании 100 мМ ацетатом аммония (рН 7.9) с 6% ацетонитрила со скоростью 1 мл/мин. Спектры ЯМР записаны на приборе Bruker AM-300 (250 МГц) в D₂O с 75% H₃PO₄ (³¹P) и 1,4-диоксаном (¹³C) в качестве внешних стандартов. В работе использовали Трис, акриламид, *N,N*-метиленбисакриламид, персульфат аммония (Merck); PSCl₃, бис(трибутилолово)оксид (Fluka); агарозу, АТР, dNTP, бромистый этидий (Sigma); мочевины, “ос. ч.” (Реахим); [γ-³²P]АТР, [α-³²P]dАТР (2000 Ки/ммоль, Обнинск); T4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1), *Taq*-ДНК-полимеразу (КФ 2.7.7.7); T7-РНК-полимеразу (КФ 2.7.7.6) (Fermentas, Литва).

Содержание белка в ферментных препаратах определяли по методу [12].

Получение биомассы штамма-продуцента дезоксирибонуклеозидмонофосфаткиназы (dNMP-киназы) бактериофага T5. Для получения биомассы штамма-продуцента dNMP-киназы бактериофага T5 клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) трансформировали плазмидой, содержащей ген dNMP-киназы (Г.В. Микулинская, А.А. Зимин, С.А. Феофанов. Персональное сообщение). После достижения оптического поглощения A_{550} равного 1.0, индуцировали синтез dNMP-киназы клетками добавлением к среде изопропил-β-тио-галактозида до концентрации 1 мМ. По истечении 2.5 ч после индукции клетки собирали центрифугированием при 5000 *g* в течение 10 мин.

Для получения контрольной биомассы клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) растили такое же время, затем собирали центрифугированием.

Приготовление ИФП dNMP-киназы бактериофага T5 [9]. Все процедуры проводили при 4°C. К 1 г полученной биомассы добавляли 3 мл 50 мМ К-Р_i (рН 7.4), содержащего 2 мг/мл лизоцима, ресуспендировали. После начала лизиса клетки разрушали ультразвуком при помощи звукового дезинтегратора мощностью 40 Вт в течение 1 мин. Далее осуществляли межфазное фракционирование в системе ПЭГ–декстран. К полученному экстракту при постоянном перемешивании добавляли 125 мкл 20% декстрана-500Т и 400 мкл 40% ПЭГ 6000 на каждый мл смеси. Через 20 мин смесь центрифугировали при 10000 *g* в течение 10 мин. Верхнюю фазу, содержащую 5 мг/мл тотального белка, иммобилизовали на аминопропилированном силикохроме С-80, обработанном глутаровым диальдегидом [13]. Полученный иммобилизованный ферментный препарат (ИФП) содержал не менее 20 мг белка на мл сорбента. ИФП dNMP-киназы бактериофага T5 и ИФП из контрольных

клеток *E. coli* BL21(DE3) использовали для синтеза тиотрифосфатов.

2'-Дезоксиаденозин-5'-тиофосфат (IVa). К суспензии 252 мг (1 ммоль) 2'-дезоксиаденозина в 25 мл диоксана добавляли 600 мкл бис(трибутилолово)оксида (1.1 экв.). Смесь кипятили 1 ч, отгоняя растворитель (всего отогнано 15 мл). Гомогенный раствор охлаждали до комнатной температуры и добавляли 210 мкл PSCl₃ (2 экв.). После окончания реакции (контроль ТСХ, система А), смесь гидролизовали 3 мл холодного насыщ. раствора Na₂CO₃, добавляли 7 мл воды, экстрагировали хлороформом (2 × 30 мл), водный слой отделяли, фильтровали и наносили на колонку с DEAE-Toyorearl (4 × 15 см). Элюировали водой (200 мл) и 0.1 М раствором LiCl (400 мл). Содержащие продукт фракции упаривали, остаток обрабатывали ацетоном и отфильтровывали. Осадок растворяли в 5 мл воды, фильтровали через Celite, добавляли 5 мл метанола и 90 мл ацетона. Осадок отделяли центрифугированием, повторяли пересаживание 2 раза. Полученную литиевую соль (IVa) сушили в вакууме над P₂O₅. Выделено 290 мг (80%); ³¹P-ЯМР (δ, м.д.): 40.81; ¹³C-ЯМР (δ, м.д.; *J*, Гц): 155.49 (C6); 152.86 (C2); 148.57 (C4); 142.5 (C8); 118.56 (C5); 86.98 (д, 1C, *J*_{C4,P} 9.17, C4'); 84.31 (C1'); 72.37 (C3'); 64.9 (д, 1C, *J*_{C5,P} 2.91, C5'); 40.2 (C2').

2'-Дезоксиаденозин-5'-O-(α-тиотрифосфат) (Va). К суспензии 126 мг (0.5 ммоль) 2'-дезоксиаденозина в 15 мл диоксана добавляли 300 мкл бис(трибутилолово)оксида (1.1 экв.). Смесь кипятили 1 ч, отгоняя растворитель (всего отогнано 8 мл). Гомогенный раствор охлаждали до комнатной температуры и добавляли 110 мкл PSCl₃ (2 экв.). После окончания реакции (1 ч, контроль ТСХ, система А) добавляли к смеси 500 мг твердого пирофосфата пиридиния и 0.5 мл трибутиламина. После перемешивания в течение 0.5 ч добавляли 5 мл воды и оставляли на ночь при 4°C. Полноту гидролиза контролировали ТСХ (система Б). Смесь экстрагировали хлороформом (2 × 30 мл), водный слой отделяли, фильтровали и наносили на колонку. Элюировали ступенчатым градиентом LiCl (по 500 мл 0.1, 0.2, 0.3 М). Соответствующие фракции упаривали. Остаток растворяли в 5 мл воды, фильтровали через Celite, добавляли 5 мл метанола и 90 мл ацетона. Осадок отделяли центрифугированием, повторяли пересаживание 2 раза. Полученную литиевую соль (Va) сушили в вакууме над P₂O₅. Выделено 160 мг (62%). Аналитические образцы R_p- и S_p-диастереомеров получали обращенно-фазовой хроматографией [3] на сорбенте Si100 Polyol RP 18 (0.003 мм, Serva) элюируя 3% (300 мл) и 4% (200 мл) ацетонитрила в 100 мМ растворе ацетата триэтиламмония (рН 7.8). ВЭЖХ (*RT*, мин): 7.3 (S_p), 9.4 (R_p); ³¹P-ЯМР (δ, м.д.; *J*, Гц): (Va) (S_p): 46.3 (д, *J*_{ра,рр} 27.12, P^α); -7.9 (д, *J*_{р,рр} 19.44, P^γ); -21.14 (дд, *J*_{р,р} P^α

27.12, $J_{P\beta, P\gamma}$ 19.44, P^β). (Va) (R_p): 45.9 (д, $J_{P\alpha, P\beta}$ 27.7, P^α); -8.01 (д, $J_{P\gamma, P\beta}$ 19.8, P^γ); -21.25 (дд, $J_{P\beta, P\alpha}$ 27.7, $J_{P\beta, P\gamma}$ 19.8, P^β).

Ферментативный синтез 2'-дезоксиаденозин-5'-O-(α -тиотрифосфата) (Va) при помощи ИФП dNMP-киназы бактериофага T5. Реакцию проводили при температуре 37°C. Состав реакционной смеси (400 мкл): 0.2 М Трис-HCl (pH 7.4), 40 мМ MgCl₂, 100 мкл ИФП, 5 мМ тиофосфат (IVa), 50 мМ ацетилфосфат, 0.5 мМ АТР. Пробы анализировали полуколичественно методом ТСХ (система В).

Аденозин-5'-O-(α -тиотрифосфат) (Vб). К суспензии 67 мг аденозина (0.25 ммоль) в смеси 9 мл толуола и 1 мл триметилфосфата добавляли 160 мкл бис(трибутилолово)оксида (1.1 экв). Смесь кипятили 0.5 ч, отгоняя растворитель (всего отогнано 8 мл). Гомогенный раствор охлаждали до комнатной температуры и добавляли 60 мкл PSCl₃ (2 экв.). После окончания реакции (1 ч, контроль ТСХ, система А) добавляли к смеси 350 мг твердого пиррофосфата пиридиния и 400 мкл трибутиламина. Смесь тщательно перемешивали 1.5 ч, добавляли 5 мл воды и оставляли на ночь при 4°C. Полноту гидролиза контролировали ТСХ (система Б). Смесь экстрагировали хлороформом (2 × 30 мл), водный слой отделяли, фильтровали и наносили на колонку. Элюировали ступенчатым градиентом LiCl (по 200 мл 0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 М). Соответствующие фракции упаривали. Остаток растворяли в 5 мл воды, фильтровали через Celite, добавляли 5 мл метанола и 90 мл ацетона. Осадок отделяли центрифугированием, повторяли переосаждение 2 раза. Полученную литиевую соль (Vб) сушили в вакууме над P₂O₅. Выделено 95 мг (72%); ВЭЖХ (RT, мин): 4.3 (S_p), 6.7 (R_p); ³¹P-ЯМР (δ , м.д.): (Vб) (R_p, S_p): 41.4–40.96 (м, P^α); -7.2–7.4 (м, P^γ); -23.5–23.9 (м, P^β). ¹³C-ЯМР (δ , м.д.; J, Гц): 155.92 (C6); 153.31 (C2); 149.45 (C4); 143.2 (C8); 118.96 (C5); 87.65, 87.54 (C4'- R_p, S_p); 84.57, 84.37 (C1'- R_p, S_p); 75.16 (C2'); 71.11 (C3'); 66.31 (д, $J_{C5, P}$ 7.1, $C5'_{(R)}$); 65.9 (д, $J_{C5, P}$ 5.68, $C5'_{(S)}$).

Олигонуклеотиды синтезировали традиционным фосфоамидитным методом на синтезаторе ASM-102T (БИОССЕТ, Новосибирск) и после деблокирования выделяли как описано в работе [14].

ПЦР осуществляли на амплификаторе Gene-Cycler (Bio-Rad) в 50 мкл инкубационной смеси, содержащей около 20 пмоль ДНК-матрицы гена проинсулина, по 80 пмоль соответствующих праймеров, сумму dNTP и dATP_S (каждый в концентрации 0.5 мМ), 67 мМ Трис-HCl (pH 8.3), 6 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 9 мкг желатина и 5 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы. Инкубацию проводили в ДНК-амплификаторе в следующем режиме (35 циклов): денатура-

ция – 30 с при 94°C, отжиг – 30 с при 52°C, элонгация – 90 с при 72°C. Продукты амплификации идентифицировали после разделения в 2% агарозном геле (рис. 1) [10].

Транскрипция T7-РНК-полимеразой. Реакционная смесь (20 мкл) содержала буфер (Fermentas), 15 ед. акт. ингибитора рибонуклеаз (Stratagene), смесь АТР_S и NTP (без АТР) (каждый в концентрации 0.5 мМ), 8–10 ед. акт. T7-РНК-полимеразы, 0.3–0.8 мкг ДНК-матрицы гена проинсулина, клонированного в плазмиде pET-20b(+) (Novogen) [14]. Смесь инкубировали 2–2.5 ч при 37°C. В контрольных экспериментах в качестве субстратов использовали смесь всех NTP и смесь трех NTP (без АТР) (рис. 2). Препарат экстрагировали фенолом (pH 5.0) и смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25 : 24 : 1), к водной фазе добавляли 1/10 объема 3 М ацетата натрия (pH 5.2) и 3 объема этанола, выдерживали ночь при -20°C и мРНК осаждали центрифугированием (10 мин при 12000 об/мин). Осадок промывали 70% этанолом, подсушивали, растворяли в 4 мкл воды, добавляли 2 мкл 20 × SSC-буфера и аликвоты наносили на три идентичные нитроцеллюлозные мембраны для дот-гибридизации. Мембраны нагревали 2 ч при 80°C между листами бумаги Ватман 3ММ и количество мРНК в образцах оценивали по результатам гибридизации с ³²P-меченым радиоактивным зондом Z (схема 2б).

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 00-15-97947, 01-04-97004).

Авторы выражают благодарность Л.О. Кононову (ИОХ РАН) за запись и интерпретацию спектров ЯМР, А.Л. Каюшину за синтез олигодезоксинуклеотидов и К.Н. Веревкиной за получение иммобилизованных ферментных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eckstein F., Gish G. // Trends Biochem. Sci. 1989. V. 14. P. 97–100.
2. Eckstein F. // Ann. Rev. Biochem. 1985. V. 54. P. 367–402.
3. Goody R.S., Isakov M. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. P. 3599–3602.
4. Arabshahi A., Frey P.A. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1994. V. 204. P. 150–155.
5. Ludwig J., Eckstein F. // J. Org. Chem. 1989. V. 54. P. 631–635.
6. Szczepanik M.B., Desaubry L., Johnson R.A. // Tetrahedron Lett. 1998. V. 39. P. 7455–7458.
7. David S., Hanessian S. // Tetrahedron. 1985. V. 41. P. 643–663.
8. Wagner D., Verheyden J.P.H., Moffatt J.G. // J. Org. Chem. 1974. V. 39. P. 24–30.

9. Bessman M.J., Herriott S.T., van Bibber Orr M.J. // *J. Biol. Chem.* 1964. V. 240. P. 439–445.
10. Есинов Р.С., Гуревич А.И., Мирошников А.И. // Пат. РФ № 2181771, 2002.
11. Ciafre S.A., Rinaldi M., Gasparini P., Seripa D., Bisceglia L., Zelante L., Farace M.G., Fazio V.M. // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. P. 4134–4142.
12. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
13. Yamauchi H., Machida H., Midorikawa Y., Kuninaka A. // *J. Ferment. Technol.* 1986. V. 64. P. 445–457.
14. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мирошников А.И. // *Биоорганическая химия.* 1993. Т. 19. С. 629–632.

Chemical and Chemoenzymatic Synthesis of Nucleoside 5'- α -Thiotriphosphates

K. V. Antonov[#], R. S. Esipov, A. I. Gurevich, D. V. Chuvikovsky,
G. V. Mikulinskaya, S. A. Feofanov, and A. I. Miroshnikov

[#]Phone: +7 (095) 330-7247; e-mail: kid@ibch.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

New methods of chemical and chemoenzymatic synthesis of nucleoside 5'-thiophosphates and 5'- α -thiotriphosphates are developed. The 5'- α -thiotriphosphates are used as substrates both in template-dependent enzymatic PCR synthesis and in a T7-RNA transcription polymerase system. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: phage T5 deoxyribonucleoside monophosphate kinase, immobilized preparation; nucleotides, phosphorothioate analogues, stannyl ethers