



УДК 547.9:542.953.2

СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

XVIII. СИНТЕЗ ДОДЕКАДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДА, ГОМОЛОГИЧНОГО УЧАСТКУ
42—53 ВАЛИНОВОЙ тРНК ДРОЖЖЕЙ **Берлин Ю. А., Вульфсон А. Н., Колосов М. Н.,
Коробко В. Г., Якимов С. А.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Осуществлен химический синтез додекадезоксинуклеотида А-Г-А-А-С-Г-Т-С-С-С-А, гомологичного участку 42—53 дрожжевой тРНК_I^{Val}. В процессе синтеза нуклеотидную цепь наращивали блоками как в направлении от 5'- к 3'-концу, так и в противоположном направлении. Показана эффективность применения избытка гидроксильного компонента в межнуклеотидных конденсациях. При выделении конечного додекануклеотида использовалась высокоскоростная хроматография на метокситритилированной ДЕАЕ-целлюлозе (МТД-целлюлозе), сочетающая ионный обмен с избирательной адсорбцией. Строение полученных соединений доказано с помощью нуклеотидных карт.

Недавно мы описали синтез додекануклеотида Т-Г-С-Т-Т-А-А-С-А-С-Г-С, гомологичного участку 30—41 молекулы дрожжевой тРНК^{Val} [3]. В развитие этой работы мы синтезировали додекануклеотид А-Г-А-А-С-Г-Т-С-С-С-А (XIV), гомологичный смежному сегменту этой тРНК — ее участку 42—53. Схема синтеза этого додекануклеотида аналогична использованной нами ранее [4] и заключается в последовательном присоединении к динуклеозидфосфату (III) двух тринуклеотидных и одного тетра-нуклеотидного блоков. Динуклеозидмонофосфат (III), полученный с выходом 77% при взаимодействии приблизительно эквимольных количеств (MeOTr)bzA и ribG(Ac), конденсировали с ацетатом трипуклеотида (II) [5], причем проводили реакцию с 3-кратным избытком гидроксильного компонента; выход 5'-концевого пентануклеотида (IV) составил 50%. Избыток гидроксильного компонента использовали также при синтезе динуклеотида рТ-anC (выход до 75%; см. опыт 3 и табл. 1, из которых следует преимущество проведения конденсации с избытком OH-компонента) и при его превращении в тринуклеотидный блок ribG-T-anC (VI) (выход 89%). Полученным блоком наращивали пентануклеотид (IV); в этом случае в избытке брали фосфатный компонент, так как он является более доступным; выход октануклеотида (VII) составил 38%. 3'-Концевой тетра-нуклеотид ranC-anC-anC-bzA (XI) был получен из соответствующим образом за-

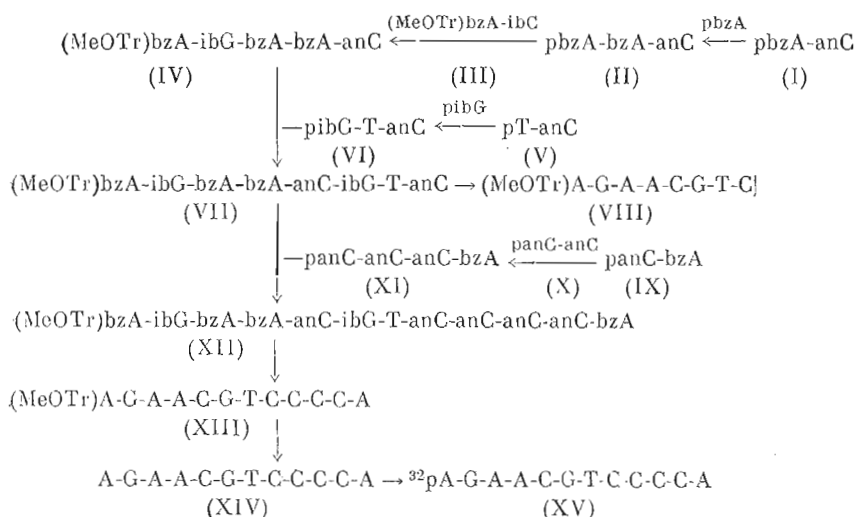
* Сообщения XVI и XVII см. [1, 2]. Используются следующие нестандартные сокращения: ib — изобутирил, TEAB — бикарбонат триэтиламония, MS — мезитилсульфохлорид, TPS — 2, 4, 6-тринизопропилбензолсульфохлорид. Все упоминаемые в этой статье нуклеотиды принадлежат к дезоксирибозе, поэтому префикс d' ради краткости всюду опущен.

Таблица 1

Опыт	(CNEt) pT, мкмоль (A)	panC (Ac), мкмоль (B)	MS или TPS, мкмоль (C)	A : B : C	C/Σ мкэкв. P	Выход динуклеотида, %
a	55	25	130	2,2 : 1,0 : 5,2	1,2	60
б	53	24	250	2,2 : 1,0 : 10,0	2,4	62
в	17	75	170	1,0 : 4,4 : 10,0	1,0	51
г	18	75	360	1,0 : 4,2 : 20,0	2,2	52
д	82	25	270	3,3 : 1,0 : 10,8	2,0	64
e	68	45 *	130	2,7 : 1,0 : 5,2	1,1	75
ж	23	76 *	180	1,0 : 3,3 : 7,8	1,0	53
з	91	25 *	105	3,6 : 1,0 : 4,2	0,75	56

* Опыт с предварительной активацией panC(Ac) под действием TPS.

щищенных динуклеотидов panC-anC (X) [6] и panC-bzA (IX) [7] (молярное соотношение 1 : 1,8) с выходом 31%. Заключительный этап синтеза состоял во взаимодействии октануклеотида (VII) с 3-кратным избытком 3'-ацетата тетрапуклеотида (XI), в результате чего был получен додекануклеотид (XII) с выходом 25%.



Выделение и очистку синтезированных олигонуклеотидов проводили ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе или DEAE-сефадексе в градиенте концентрации TEAB или NaCl; исключением являлся динуклеозидфосфат (III), который выделяли избирательной экстракцией и очищали адсорбционной хроматографией на силикагеле. Ионообменную хроматографию тетрапуклеотида (XI) и октануклеотида (VII) проводили последовательно в градиенте концентрации TEAB (в воде или в водном спирте), NaCl в 8 М мочевины и снова TEAB. Для выделения додекануклеотида (XIV) наряду с уже упомянутыми методами (рис. 1, а и б) был использован еще один: реакцию смесь после аммонолиза (для удаления N-ацильных групп) хроматографировали на МТД-целлюлозе. Этот адсорбент обладает сродством к нуклеотидам, имеющим метокситритильную группу, благодаря чему удалось удалить избирательно тетрапуклеотид pC-C-C-A и его пирофосфат водными системами (TEAB или NaCl в 8 М мочевины), а элюция и разделение метокситритилсодержащих октануклеотида (VIII) и додекануклеотида (XIII) происходили при добавлении в элюент пропилового или *tert*-бутилового спирта в концентрации 30—50% (рис. 1, в). Выделенный таким образом додекануклеотид (XIII) детритилировали и затем хроматографировали на DEAE-целлюлозе в 8 М мочевины при pH 3,4 (рис. 1, г).

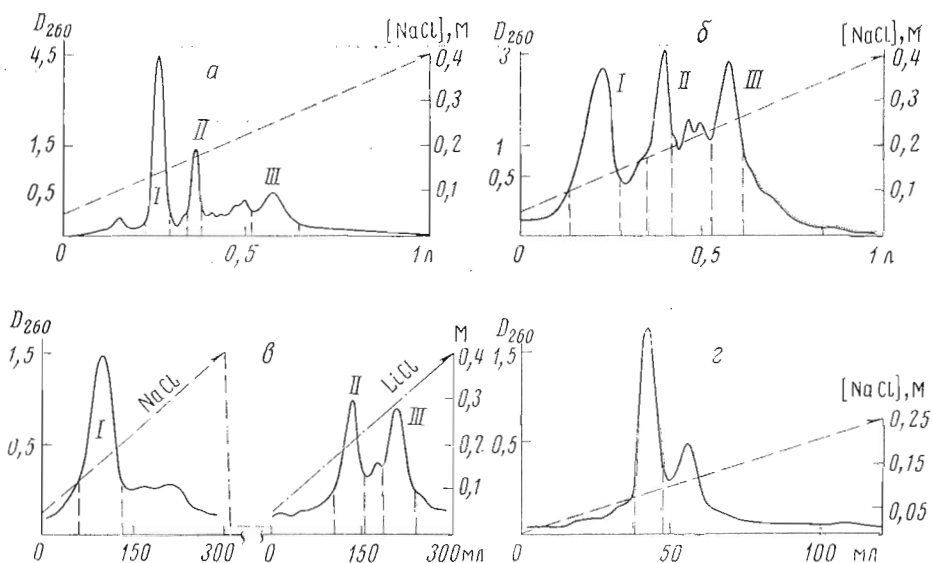


Рис. 1. Выделение додекануклеотида (XIV). *a* — Хроматография реакционной смеси из опыта 7а на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (Cl^- ; 1×45 см; уравновешена 0,05 М NaCl в 8 М мочеvine и 0,03 М трис-НСl, рН 7,3) в градиенте концентрации NaCl в том же буфере, фракции 5,5 мл/5 мин. I — рС-С-С-А, II — А-Г-А-А-С-Г-Т-С, III — додекануклеотид (XIV). *б* — Хроматография аликвоты А из опыта 7а на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (Cl^- ; 1×45 см) в условиях, указанных в подписи к рис. 1, а; фракции 5,25 мл/5 мин. I — рС-С-С-А, II — А-Г-А-А-С-Г-Т-С, III — додекануклеотид (XIV). *в* — Хроматография аликвоты В из опыта 7б на колонке с МТД-целлюлозой (Cl^- ; $0,6 \times 54$ см, уравновешена 0,05 М NaCl в 8 М мочеvine с 0,01 М трис-НСl, рН 7,0) в градиенте концентрации NaCl в том же буфере, затем промывка 100 мл буфера, не содержащего NaCl, 100 мл 0,02 М LiCl в 7 М мочеvine и 0,01 М трис-НСl, рН 7,0, в 30% пропаноле и хроматография в градиенте концентрации LiCl в буфере с пропанолом. Скорость 80 мл/ч. Пик III содержит 40 OE_{260} додекануклеотида (XIII), пик I — 54 OE_{260} рС-С-С-А, пик II — 26 OE_{260} октануклеотида (VIII). *г* — Рехроматография додекануклеотида (XIV) (15 OE_{260}) на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (Cl^- ; $0,74 \times 13$ см) в градиенте концентрации NaCl в 8 М мочеvine, подкисленной HCl до рН 3,4, со скоростью 72 мл/ч. Из отмеченной части пика выделили 9 OE_{260} додекануклеотида (XIV). Регистрация с помощью проточного денситометра Uvicord-II (LKB) при 280 нм с последующим отнесением к 260 нм

Полученные олигонуклеотиды были охарактеризованы спектрально и хроматографически до и после удаления защитных групп (табл. 2 и рис. 2). Состав коротких олигонуклеотидов, от двух- до четырехчленных, доказывали анализом продуктов полного гидролиза фосфодиэстеразой

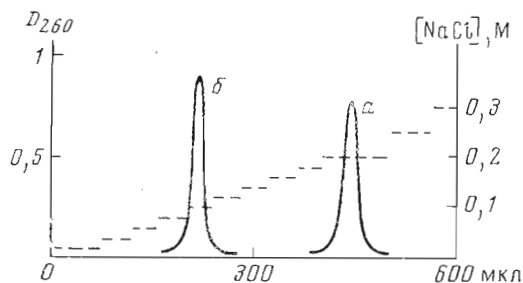


Рис. 2. Микроколоночная хроматография додекануклеотида (XIV) на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (Cl^- ; $0,8 \times 80$ мм) в ступенчатом градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine, содержащей: *a* — 0,02 М трис-НСl, рН 7,0; *б* — HCl, рН 3,5; скорость 500 мкл/ч; выполнена на микроколоночном жидкостном хроматографе ХЖ-1305 (СРБ АП АН СССР)

Таблица 2

Олигонуклеотид	R (pT) в системе*		$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\frac{\epsilon_{250}}{\epsilon_{260}}$	$\frac{\epsilon_{270}}{\epsilon_{260}}$	$\frac{\epsilon_{280}}{\epsilon_{260}}$	$\frac{\epsilon_{290}}{\epsilon_{260}}$	$\frac{\epsilon_{300}}{\epsilon_{260}}$	Нуклеотидный состав**								
	A	B							A	C	T	рА	рС	рТ			
(MeOTr)bzA-ibG (III)	2,24		260, 280	0,95	0,98	1,09	0,94	0,54									
A-G	1,63		260	0,93	0,75	0,40	0,16										
(MeOTr)bzA-ibG-bzA-anC (IV)	1,87		281	0,93	1,09	1,33	1,18	0,80									
A-G-A-A-C		0,41	258	0,90	0,76	0,42	0,42								1		
pT-anC (V)	1,00		274, 304	0,77	1,16	1,15	1,08	1,11									
pT-C		0,70	269	0,75	1,12	0,81	0,28										
pibG-T-anC (VI)	0,80		264	0,78	0,98	0,90	0,82	0,71									
pG-T-C		0,40	260	0,92	0,97	0,74	0,33										
(MeOTr)bzA-ibG-bzA-anC-ibG-T-anC (VII)			281	0,88	1,07	1,23	1,10	0,79									
A-G-A-A-C-G-T-C			259	0,80	0,80	0,52	0,21										
panC-anC-anC-bzA (XI)	0,74		290	0,85	1,16	1,45	1,61	1,49									
pC-C-C-A		0,16	267	0,85	1,05	0,74	0,33										
A-G-A-A-C-G-T-C-C-C-C-A (XIV)			261	0,90	0,90	0,56	0,21										

* Система A:EtOH — 1 M NH₄OH, 7:3, рН 7,5; система B: *n*-PrOH — 25% водн. NH₃—H₂O, 11:2:7.

** Определен энзиматическим гидролизом и по нуклеотидным картам, как описано в тексте.

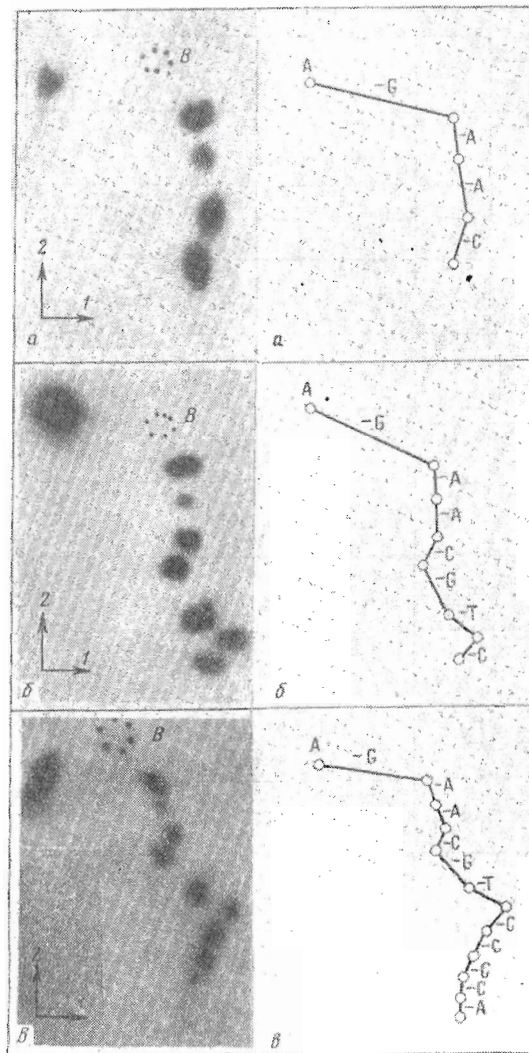


Рис. 3. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза 5'-меченых олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда: *a* — пентануклеотид $^{32}\text{pA-G-A-A-C}$, *б* — октануклеотид $^{32}\text{pA-G-A-A-C-G-T-C}$, *в* — додекануклеотид $^{32}\text{pA-G-A-A-C-G-T-C-C-C-A}$. Направление *1* — электрофорез на ацетилцеллюлозе (3×55 см), *2* — гомохроматография; *B* — пятно ксиленицианола *FF*. Слева — радиоавтограммы, справа — схемы

змеиного яда (в случае необходимости — после 5'-дефосфорилирования щелочной фосфатазой). Структура пентануклеотида A-G-A-A-C, октануклеотида A-G-A-A-C-G-T-C и додекануклеотида (XIV) была подтверждена введением 5'-концевой метки с последующим анализом нуклеотидных карт (рис. 3) по методу [8]; 5'-концевое звено в этих соединениях (^{32}pA) идентифицировано с помощью электрофореза после исчерпывающего гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда.

Ранее мы показали, что додекануклеотид C-G-A-A-C-T-G-G-G-G-A-C, комплементарный участку 47—58 тРНК^{V^{al}}, образует устойчивый комплекс с фрагментом 36—77 («3'-половина») этой тРНК [4]. Попытка гибридизовать в аналогичных условиях ту же «половину тРНК» с додекануклеотидом A-G-A-A-C-G-T-C-C-C-C-A (XIV) не привела к сколько-нибудь устойчи-

вому ассоциату, несмотря на возможность образования додекануклеотидом (XIV) шести комплементарных пар (четырёх G·C и двух A·T) с участием 63—74 рассматриваемой тРНК. Эти результаты свидетельствуют о высокой специфичности такого комплексообразования, позволяющей использовать его для изучения вторичной и третичной структуры тРНК.

Экспериментальная часть

Общие сведения об эксперименте см. [4]. В работе использовали дезоксицуклеозид-5'-фосфаты производства опытного химического цеха НИОХ СО АН СССР и СКТБ БАВ Главмикробиопрома (Новосибирск). Цианэтильные и ацетильные производные нуклеотидов получали, как описано ранее [9]. Аниониты (DEAE-целлюлоза DE-23 и DE-32 фирмы Whatman, сефадекс А-25 фирмы Pharmacia) предварительно фракционировали в восходящем потоке воды (50 мл/см²·ч; колонка 10 × 150 см), отбирая нижнюю фракцию высотой 12 см. Использовали колонки размером от 2,5 × 45 до 1 × 100 см, заполненные суспензией, содержащей 100 мл анионита в 1 л 0,5 М ТЕАВ в 30% спирте или 1 л 1 М NaCl. Хроматографию проводили со скоростью до 250 мл/см²·ч под давлением до 3 атм и 500—700 мл/см²·ч под давлением 10—15 атм.

1. (MeOTr)bzA-ibG(III). Смесь 2,63 г (4,2 ммоль) (MeOTr)bzA [10] и 2,53 г (4,7 ммоль) ribG(Ac) высушили упариванием с пиридином (5 × 25 мл), растворили в 40 мл пиридина, прибавили 6,62 г (21,8 ммоль) TPS, раствор упарили до 20 мл и оставили на 6,5 ч при 20°. При охлаждении до -20° прилили 50 мл охлажденного 20% водного пиридина, через 1 ч при 20° раствор упарили, остаток растворили в 40 мл воды, при 0° прилили 60 мл 2 н. NaOH в 40% спирте, выдержали 20 мин при 0° и нейтрализовали дауэксом 50 (PyH⁺). Смолу отфильтровали, промыли 1,5 л 50% пиридина, фильтрат упарили, остаток растворили в 200 мл 0,2 М ТЕАВ и проэкстрагировали эфиром (10 × 250 мл), после чего при 0° в течение 8 ч непрерывно экстрагировали смесью диизопропиловый эфир — этилацетат, 7 : 3. Водный слой упарили с пиридином, остаток растворили в 20 мл хлороформа, содержащего 5% пиридина, и нанесли на колонку с силикагелем (Woelm, для распределительной хроматографии; 2,5 × 20 см), импрегнированным такой же смесью растворителей. Хроматографировали в ступенчатом (по 1 л) градиенте концентрации метанола (по 1 л 5, 10, 15% и 2 л 20%) в смеси хлороформ — пиридин при содержании пиридина в суммарной смеси 5%, анализируя фракции с помощью ТСХ на силикагеле в системе ацетонитрил — вода, 9 : 1. Фракции, содержащие 20% метанола, объединили, упарили, остаток растворили в 20 мл пиридина и осадили 1 л эфира. Выход динуклеозидфосфата (III) 3,34 г (77%).

2. (MeOTr)bzA-ibG-bzA-bzA-anC (IV) получен взаимодействием 1,23 г (1,2 ммоль) (MeOTr)bzA-ibG (III), 0,5 г (0,38 ммоль) pbzA-bzA-anC(Ac) [4] и 0,83 г (2,76 ммоль) TPS в 10 мл пиридина в условиях опыта 1. При охлаждении до -20° прилили 10 мл 20% пиридина, через 1 ч при 0° добавили 30 мл 2 н. NaOH в 40% спирте, выдержали 15 мин при 0° и нейтрализовали дауэксом 50 (PyH⁺). Смолу отфильтровали, промыли 1 л 50% пиридина, фильтрат упарили, остаток растворили в 100 мл 0,01 М ТЕАВ и нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻; 2,5 × 100 см; уравновешена 0,01 М ТЕАВ). Колонку промыли 0,5 л 0,01 М и 1,5 л 0,1 М ТЕАВ, после чего хроматографировали в градиенте концентрации ТЕАВ в воде (0,1—0,3 М, 5 л), а затем в 50% спирте (0,005—0,3 М, 6 л), собирая фракции по 20 мл/6 мин. Из фракций 360—550 (0,1—0,3 М) выделили 17 000 OE₂₈₀ (52%) пентануклеотида (IV); возврат тринуклеотида (II) 25%, динуклеозидфосфата (III) 80%. Пентануклеотид (IV) рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻; 1,5 × 100 см; уравновешена 0,005 М ТЕАВ) в градиенте концентрации ТЕАВ в воде (0,05—0,3 М,

2,4 л), а затем в 50% спирте (0,005—0,3 М, 2,4 л), собирая фракции по 18 мл/25 мин. Из фракций 203—221 (0,17—0,20 М) выделили 11 650 ОЕ₂₈₀ соединения (IV).

3. *pT-anC* (V) получен в серии опытов взаимодействием (CNEt)₃pT с *ranC*(Ac) в 0,3 мл пиридина в присутствии MS (опыты *a* — *г*, продолжительность реакции 5 ч) или в 0,5 мл пиридина в присутствии TPS (опыты *д* — *ж*, продолжительность реакции 10 ч; опыт *з* — 8 ч). К смеси сухих компонентов (опыты *a* — *д*) прибавляли пиридин и реакционную смесь встряхивали в течение указанного времени при 20°. В опытах *e* — *з* нуклеотид *ranC*(Ac) предварительно активировали, выдерживая 3 ч в пиридиновом растворе с TPS, после чего прибавляли (CNEt)₃pT. По окончании конденсации реакционную смесь охлаждали до -30° и прибавляли охлажденный 2 л. NaOH в 40% спирте (0,3 мл в опытах *a* — *г*, 0,5 мл в опытах *д* — *ж*). Через 0,5 ч при 0° раствор нейтрализовали 2 мл дауэкса 50 (РyH⁺), разбавляли водой до объема 20 мл и наносили на колонку с DEAE-сефадексом (HCO₃⁻; 0,7 × 15 см; уравновешена 0,05 М TEAB). После промывания колонки 100 мл 0,05 М TEAB хроматографировали в линейном градиенте концентрации TEAB (0,05—0,4 М, 400 мл) со скоростью 200 мл/ч (520 мл/см²·ч). Динуклеотид (V) элюировался при 0,2—0,3 М. Соотношения реагентов и выходы приведены в табл. 1.

4. *ribG-T-anC* (VI) получен взаимодействием 1,17 г (2,24 ммоль) (CNEt)₃ribG, 0,75 г (0,75 ммоль) *pT-anC*(Ac) и 1,4 г (4,6 ммоль) TPS в 10 мл пиридина в условиях опыта 2. После обработки смесь хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом (HCO₃⁻; 2,4 × 40 см) в линейном градиенте концентрации TEAB (0,05—0,45 М, 6 л), собирая фракции по 21 мл/1,7 мин. Из фракций 190—280 (0,32—0,45 М) выделили 24 400 ОЕ₂₆₀ тринуклеотида (VI) (89%); возврат *ribG* 35%, динуклеотида (V) 8%. Тринуклеотид (VI) (20 000 ОЕ₂₆₀) рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻; 2,5 × 45 см) в градиенте концентрации TEAB (0,05—0,2 М, 1,7 л; 0,2 М, 0,6 л; 0,2—0,4 М, 2,4 л), собирая фракции по 19 мл/4,3 мин. Из фракций 79—105 (0,18—0,20 М) выделили 15 000 ОЕ₂₆₀ тринуклеотида (VI).

5. (*MeOTr*)*bzA-ibG-bzA-bzA-anC-ibG-T-anC* (VII) получен взаимодействием 10 000 ОЕ₂₈₀ (0,116 ммоль) пентануклеотида (IV), 12 500 ОЕ₂₈₀ (0,36 ммоль) *ribG-T-anC*(Ac) и 0,65 г (2,16 ммоль) TPS в 5 мл пиридина в условиях опыта 2. Смесь хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻; 1,5 × 100 см) в градиенте концентрации TEAB в воде (0,1—0,3 М, 2,4 л), а затем в 50% спирте (0,05—0,32 М, 2,6 л), собирая фракции по 17,3 мл/17 мин. Из фракций 207—268 (0,18—0,29 М) выделили 5300 ОЕ₂₈₀ (38%) октануклеотида (VII); возврат тринуклеотида (VI) 55%, пентануклеотида (IV) 25%. Октануклеотид (VII) (4600 ОЕ₂₈₀) рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl⁻; 1,5 × 100 см; уравновешена 8 М мочевиной, содержащей 0,03 М трис-HCl, pH 7,3) в градиенте концентрации NaCl в том же буфере (0,05—0,22 М, 1,6 л; 0,22 М, 160 мл; 0,22—0,30 М, 460 мл), собирая фракции по 10,3 мл/6,2 мин. Из фракций 142—170 (0,20—0,22 М) выделили 3730 ОЕ₂₈₀ октануклеотида (VII). Часть этого вещества (1780 ОЕ₂₈₀) рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻; 1,3 × 20 см) в градиенте концентрации TEAB в воде (0,05—0,35 М, 0,9 л), а затем в 50% спирте (0,05—0,30 М, 0,9 л), собирая фракции по 10,6 мл/7,8 мин. Из фракций 126—155 (0,17—0,25 М) выделили 1670 ОЕ₂₈₀ октануклеотида (VII).

6. *ranC-anC-anC-bzA* (XI) получен взаимодействием 0,29 г (0,25 ммоль) (CNEt)₃*ranC-anC* [6], 0,46 г (0,44 ммоль) *ranC-bzA*(Ac) (получен описанным способом [7] с выходом 66%) и 1,05 г (3,3 ммоль) TPS в 7 мл пиридина (6 ч при 20°). После обработки, как в опыте 2, смесь хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻; 2,6 × 50 см) в линейном градиенте концентрации TEAB в 10% спирте (0,05—0,5 М, 6 л), со-

бирая фракции по 17,5 мл/5 мин. Из фракций 210—263 (0,33—0,38 M) выделено 4950 OE_{280} (31%) тетра nukлеотида (XI); суммарный возврат исходных динуклеотидов 22%. Тетрануклеотид (XI) рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (C1-; $1,5 \times 100$ см; уравновешена 0,02 M NaCl в 8 M мочевины, содержащей 0,03 M трис-HCl, pH 7,4) в градиенте концентрации NaCl в том же буфере (0,02—0,22 M, 2,4 л), собирая фракции по 10,6 мл/6,3 мин. Вещество из фракций 124—144 (0,13—0,15 M; 4100 OE_{280}) рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- ; $1,5 \times 100$ см) в градиенте концентрации TEAB (0,10—0,28 M, 2,2 л; 0,28 M, 0,4 л; 0,28—0,40 M, 1,2 л), собирая фракции по 11 мл/5,5 мин. Из фракций 200—240 (0,28 M) выделили 2440 OE_{280} тетра nukлеотида (XI).

7. A-G-A-A-C-G-T-C-C-C-C-A (XIV). а) Смесь 125 OE_{280} (1,03 мкмоль) октануклеотида (VII), 290 OE_{280} (3,4 мкмоль) 3'-ацетата тетра nukлеотида (XI) и 7,3 мг (24 мкмоль) TPS растворили в 0,3 мл пиридина, раствор выдержали 6 ч при 20°, охладили до -20°, прилили 0,5 мл воды, выдержали 15 ч при 0° и упарили. Остаток обработали 40 мл 25% NH_3 (24 ч при 50°), затем (после упаривания) 20 мл смеси $AsOH - Py - H_2O$, 14 : 1 : 3 (24 ч при 20°), вновь упарили и хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (рис. 1, а). Из фракций 95—106 (0,24—0,27 M) (пик III) выделили 17 OE_{260} (13%) додекануклеотида (XIV); пик I содержит 123 OE_{260} тетра nukлеотида pC-C-C-A (возврат 80%), пик II — 48 OE_{260} октануклеотида A-G-A-A-C-G-T-C (возврат 50%).

б) Смесь 120 OE_{280} (0,98 мкмоль) октануклеотида (VII) и 270 OE_{280} (3,2 мкмоль) 3'-ацетата тетра nukлеотида (XI) высушили упариванием с пиридином (3×2 мл), растворили в 2 мл пиридина, упарили до 1 мл, прибавили 5,7 мг (26 мкмоль) MS и упарили до объема 0,5 мл. Выдержали 4,5 ч при 20°, после охлаждения до -10° прилили 1 мл воды, через 1 ч упарили, остаток растворили в 5 мл 1 M TEAB и раствор упарили несколько раз со спиртом. Хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- ; $1,3 \times 20$ см) в градиенте концентрации TEAB (0,05—0,3 M, 0,6 л; 300 мл/ч) выделили 190 OE_{280} тетра nukлеотида (XI) (возврат 70%). Затем 200 мл 1 M TEAB в 50% спирте элюировали смесь октануклеотида (VII) и додекануклеотида (XII), раствор упарили, защитные группы удалили, как описано в опыте 7а, смесь хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой аналогично опыту 7а. Из фракций 99—115 (0,25—0,27 M) выделили 22 OE_{280} (17%) додекануклеотида (XIV); возврат октануклеотида 35%.

в) Взаимодействие 590 OE_{280} (4,86 мкмоль) октануклеотида (VII), 1230 OE_{280} (15,3 мкмоль) 3'-ацетата тетра nukлеотида (XI) и 48,7 мг (222 мкмоль) MS проводили аналогично опыту 7б. Затем реакционную смесь охладили до -10°, прилили 1 мл воды, через 1 ч раствор упарили, остаток растворили в 60 мл 25% NH_3 и выдержали 24 ч при 55°. Раствор разделили на две части (А — 45 мл, В — 15 мл) и упарили порознь. Часть А подвергли детритилированию и далее хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой аналогично опыту 7а (рис. 1, б). Из фракций 103—118 (0,24—0,26 M) (пик III) выделили 125 OE_{260} (26%) додекануклеотида (XIV); пик I содержит 163 OE_{260} тетра nukлеотида pC-C-C-A (возврат 33%), пик II — 80 EO_{260} октануклеотида A-G-A-A-C-G-T-C (возврат 23%).

Часть В непосредственно хроматографировали на колонке с MTD-целлюлозой (рис. 1, в), выделенный додекануклеотид (XIII) детритилировали, объединили с ранее выделенными порциями вещества (XIV) (опыты 7а — в) и хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой при pH 3,4 (рис. 1, в).

8. $^{32}pA-G-A-A-C-G-T-C-C-C-C-A$ (XV) и его полный и частичный фосфодистеразный гидролиз. 5'-Меченый додекануклеотид (XV) получили из 1 пмоль немеченого додекануклеотида (XIV) и 2 нмоль $[\gamma-^{32}P]rATP$ (8 Ки/ммоль) в описанных ранее условиях [11]. Для проведения полного гидролиза смесь (XV) (10^4 имп/мин) в 5 мкл буфера, содержащего 0,01 M

трис-НСI (рН 8,9), 0,005 М MgCl₂ и 0,5 мкг фосфодиэстеразы змеиного яда (КФ 3.4.1, Worthington), в 5 мкл того же буфера инкубировали 2 ч при 37°, после чего гидролизат нанесли на бумагу Ватман № 1 и подвергли электрофорезу в пиридин-ацетатном буфере, рН 3,5 (5000 В, 1 ч). Для проведения частичного гидролиза к каждой из трех порций раствора додекануклеотида (XV) (1 мкл, 5·10⁴ имп/мин) в указанном выше буфере, рН 8,9, прибавили 1 мкл раствора фосфодиэстеразы (концентрации соответственно 50, 100 и 200 мкг/мл), смеси инкубировали 30 мин при 20°, все три порции смешали и подвергли электрофорезу на ацетилцеллюлозе (см. выше), а затем гомохроматографии (гомосмесь VI [12]). Аналогично анализировали пентануклеотид А-Г-А-А-С и октануклеотид А-Г-А-А-С-Г-Т-С. Нуклеотидные карты представлены на рис. 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Чахмахчева О. Г., Шингарова Л. Н. (1976) Биоорг. химия, 2, 1505—1512.
2. Быстров Н. С., Добрынин В. Н., Колосов М. Н., Чернов Б. К. (1976) Биоорг. химия, 2, 1271—1272.
3. Берлин Ю. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Чахмахчева О. Г., Шингарова Л. Н. (1976) Биоорг. химия, 2, 773—780.
4. Берлин Ю. А., Бочарова Т. Н., Вульфсон А. Н., Колосов М. Н., Коробко В. Г. (1976) Биоорг. химия, 2, 762—772.
5. Берлин Ю. А., Вульфсон А. Н., Колосов М. Н. (1975) Биоорг. химия, 1, 851—852.
6. 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 природн. соедин., 3, 402—440.
7. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Шингарова Л. Н. (1975) Биоорг. химия, 1, 1738—1745.
8. Sanger F. (1973) in *Virus Research*, pp. 573—599, eds. Fox C. F. and Robinson W. S., Academic Press, New York — London.
9. Weimann G., Khorana H. G. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, 84, 419—430.
10. Smith M., Rammer D. H., Goldberg J. H., Khorana H. G. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, 84, 430—440.
11. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г. (1976) Биоорг. химия, 2, 166—178.
12. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1971) *Nucleic Acids Research*, 1, 331—353.

Поступила в редакцию
8.VII.1976

SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES. XVIII. THE SYNTHESIS OF THE DODECADEOXYNUCLEOTIDE HOMOLOGOUS TO THE SEGMENT 42-53 OF A YEAST tRNA^{Val}

BERLIN Yu. A., WULFSON A. N., KOLOSOV M. N.,
KOROBKO V. G., YAKIMOV S. A.

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

The dodecanucleotide d(A-G-A-A-C-G-T-C-C-C-A) homologous to the 42-53 segment of the yeast tRNA^{Val} was chemically synthesized by phosphodiester method, the nucleotide chain being elongated by blocks both in the 5' → 3' and 3' → 5' directions. The merits were demonstrated of taking hydroxyl component in excess of P-component for internucleotide condensation. High-speed chromatography on a new resin, methoxytritylated DEAE-cellulose (MTD-cellulose), was employed for isolation of the dodecanucleotide, which combines ion-exchange with affinity chromatography. The structures of oligonucleotides synthesized were substantiated by the fingerprinting technique.