



УДК 547.963.3

СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

XXV *. СИНТЕЗ ТРИНУКЛЕОЗИДДИФОСФАТОВ,
СОДЕРЖАЩИХ ФЛЮОРЕСЦЕНТНУЮ МЕТКУ

Женодарова С. М., Клягина В. П.

Институт биологической физики Академии наук СССР, Пущино

На примере синтеза 1,N⁶-этенoadенилил-(3' → 5')-уридиллил-(3' → 5')-уридина и гуанилил-(3' → 5')-3, N⁴-этенoцитидилл-(3' → 5')-уридина показана принципиальная возможность энзиматического получения олигорибонуклеотидов с флуоресцентной меткой в разных положениях путем последовательного применения различных нуклеолитических ферментов: рибонуклеаз с различной специфичностью и полинуклеотидфосфорилазы.

Флуоресцирующие производные нуклеотидов и олигонуклеотидов представляют большой интерес как соединения, которые могут быть использованы во многих биохимических исследованиях, и прежде всего при изучении механизма действия ферментов, катализирующих различные превращения нуклеиновых кислот и их компонентов. Ранее нами было показано, что этеновые производные аденозина и цитидина могут служить субстратами в ферментативном синтезе динуклеозидмонофосфатов, катализируемом малоспецифичной рибонуклеазой *Penicillium brevicompactum* [2] или гуанилспецифичными рибонуклеазами из различных источников [3]. Динуклеозидмонофосфаты εArC или GrεC получают с выходами от 30 до 60% и могут рассматриваться как исходные соединения для дальнейшего удлинения олигонуклеотидной цепи.

В настоящей работе мы синтезировали тринуклеозиддифосфаты, содержащие флуоресцирующие гетероциклические основания, применив для синтеза новой межнуклеотидной связи нуклеолитический фермент другого типа — ПНФаза *Micrococcus luteus*. При определенных условиях этот фермент осуществляет «одиночное» присоединение нуклеотидного остатка к олигонуклеотидному праймеру (акцептору фосфата), причем минимальным акцептором фосфата может быть динуклеозидмонофосфат [6]:



В качестве донора фосфата использовали UDP, а акцептором фосфата служили синтезированные ранее [2, 3] динуклеозидмонофосфаты εArU и GrεC, содержащие этеновую группировку в 5'- или в 3'-нуклеотидном остатках. Синтез тринуклеозиддифосфатов и разделение реакционных смесей проводили, как описано в работе [7]. Результаты синтеза приведены в табл. 1.

* Сообщение XXIV см. [1]. Сокращения: ε — этеновая группа [4]; ПНФаза — полинуклеотидфосфорилаза; остальные сокращения соответствуют общепринятым [5].

Таблица 1

Тринуклеозиддифосфаты с флуоресцирующими гетероциклическими основаниями

Акцептор фосфата	Время синтеза, ч	Тринуклеозиддифосфат	Выход, %
ϵ ApU	2	ϵ ApUpU	11,4
ApU	2	ApUpU	21,6
GpC	24	GpCpU	5,6
GpC	2	GpCpU	52,6

Таблица 2

Характеристики тринуклеозиддифосфатов

Тринуклеозиддифосфат	R^*f	E_{Up}	Ферментативный гидролиз		
			РНКаза	Продукты	Отношение оснований
ϵ ApUpU	0,75	0,69	A	ϵ ApUp, U	1,1:1
ApUpU	0,89	0,74	A	ApUp, U	1,1:1
GpCpU	0,88	0,79	<i>P. brev.</i>	Gp, ϵ Cp, U	1:0,8:1
GpCpU	0,73	0,79	A	GpCp, U	1:1

* Определены относительно Up в системе этанол — конц. аммиак — вода (65:10:25).

Таблица 3

УФ-спектры тринуклеозиддифосфатов (H₂O)

Тринуклеозиддифосфат	$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$	D_{250}/D_{260}	D_{270}/D_{280}	D_{280}/D_{290}	D_{290}/D_{260}
ϵ ApUpU	261	242	0,82	0,79	0,39	0,25
ApUpU	259	230	0,78	0,77	0,30	0,04
GpCpU	259	232	0,89	0,94	0,73	0,43
GpCpU	258	226	0,85	0,81	0,68	0,30

Тринуклеозиддифосфаты образуются в обоих случаях, хотя и с меньшими выходами, чем для немодифицированных субстратов — акцепторов фосфата. Особенно заметно влияние модифицирующей группы, когда она находится в нуклеотидном остатке, непосредственно участвующем в образовании новой межнуклеотидной связи: не только резко уменьшается выход, но и значительно снижается скорость синтеза GpCpU по сравнению с GpCpU. По-видимому, это связано с субстратной специфичностью ПНФазы *M. luteus*. Таким образом, в случае «одиночного» присоединения нуклеотидного остатка к динуклеозидмонофосфату ПНФаза *M. luteus* может использовать не только доноры фосфата, содержащие флуоресцентную метку [8], но и праймеры с этеновой группировкой как в 5'-, так и в 3'-положении.

Синтезированные тринуклеозиддифосфаты очищали с помощью электрофореза на бумаге в 0,05 М растворе бикарбоната триэтиламония (рН 7,6) и БХ в системе пропанол-2 — конц. аммиак — вода (7 : 1 : 2). Структура полученных тринуклеозиддифосфатов подтверждалась ферментативным гидролизом с последующим анализом гидролизатов методами БХ и УФ-спектрофотометрии. Характеристики вновь синтезированных тринуклеозиддифосфатов приведены в табл. 2, 3.

Таким образом, приведенные выше примеры синтеза тринуклеозиддифосфатов ϵ ApUpU и GpCpU показывают принципиальную возмож-

ность энзиматического получения олигорибонуклеотидов с флуоресцентной меткой в разных положениях путем последовательного применения различных нуклеолитических ферментов: рибонуклеаз с различной субстратной специфичностью и ПНФазы.

Экспериментальная часть

В работе использовали Na-соль UDP (Reanal, Венгрия) и ПНФазу *M. luteus* (Calbiochem, США). Динуклеозидмонофосфат ApU был синтезирован по методике [9]. εApU синтезирован способом, описанным в работе [2]; GpC и GpεC были приготовлены в соответствии с работой [3].

БХ, электрофорез на бумаге, УФ-спектрофотометрирование и установление структуры олигонуклеотидов проводили, как описано в работах [2, 3, 7].

Синтез тринуклеозиддифосфатов. 5 мкмоль динуклеозидмонофосфата, 2,5 мкмоль UDP и 3 мг ПНФазы *M. luteus* растворяли в 0,5 мл 0,05 M Трис-HCl-буфера, содержащего 0,01 M MgCl₂ и 0,5 mM EDTA, и инкубировали при 37°. Реакционную смесь разделяли с помощью нисходящей БХ в системе этанол — конц. аммиак — вода (65 : 10 : 25) в течение 15—20 ч. Полосы, соответствующие тринуклеозиддифосфату и исходному динуклеозидмонофосфату, элицировали водой, полученные олигонуклеотиды очищали дополнительно с помощью электрофореза в 0,05 M бикарбонате триэтиламония и БХ в системах этанол — 1 M ацетат аммония (7 : 3) и изопропанол — конц. аммиак — вода (7 : 1 : 2).

Авторы приносят глубокую благодарность В. И. Гуляевой, А. А. Косту, М. И. Хабаровой за синтез динуклеозидмонофосфатов и В. Н. Шибаву за полезное обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Женодарова С. М., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Соболева И. А., Хабарова М. И. (1977) Биоорг. химия, 3, 1479—1483.
2. Женодарова С. М., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Кост А. А., Шибав В. Н. (1975) Биоорг. химия, 1, 1345—1351.
3. Женодарова С. М., Гуляева В. И., Безбородова С. И. (1976) Биоорг. химия, 2, 1111—1116.
4. Secrist III J. A., Barrio J. R., Leonard N. J., Weber G. (1972) Biochemistry, 11, 3499—3506.
5. IUPAC — IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1971) Biochim. et biophys. acta, 247, 1—12.
6. Leder Ph., Singer M. F., Brimacombe R. J. C. (1965) Biochemistry, 4, 1561—1567.
7. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Пономарева В. М. (1975) Биоорг. химия, 1, 598—603.
8. Walker G. C., Uhlenbeck O. C. (1975) Biochemistry, 14, 817—824.
9. Хабарова М. И., Женодарова С. М. (1972) Мол. биол., 6, 682—688.

Поступила в редакцию
22.IV.1977

STEP-WISE OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS. XXV. THE SYNTHESIS OF TRINUCLEOSIDE DIPHOSPHATES CONTAINING THE FLUORESCENCE LABEL

ZHENODAROVA S. M., KLYAGINA V. P.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino*

A principle possibility of the enzymatic synthesis of oligoribonucleotides bearing fluorescence label at different positions was demonstrated by preparing 1,N⁶-ethenoadenylyl-(3' → 5')-uridylyl-(3' → 5')-uridine and guanylyl-(3' → 5')-3,N⁴-ethenocytidylyl-(3' → 5')-uridine.