



УДК 547.963.32.07

## СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

XXXI\*. ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ 5'-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА СТРУКТУРНОГО ГЕНА ДРОЖЖЕВОЙ тРНК<sub>I</sub><sup>Val</sup>

*Берлин Ю. А., Каюшин А. Л., Тактакишвили М. О.,  
Лебедеко Е. Н., Коробко В. Г., Чупило С. А.,  
Колосов М. Н.*

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

Фосфотриэфирным методом синтезированы понадезоксинуклеотид ААТТСГГТТ, четыре звена которого гомологичны участку 1–4 дрожжевой тРНК<sub>I</sub><sup>Val</sup>, и ундекадезоксинуклеотид ССАСГАААССГ, 10 звеньев которого комплементарны участку 1–10 той же тРНК. Эти олигонуклеотиды вместе с полученными ранее додекадезоксинуклеотидами ТААССГАСТАГА и ТCGTGGTCTAGT сшиты при помощи ДНК-лигазы фага Т4 с образованием 21- и 23-звенного нуклеотидов, структура которых доказана анализом по методу Максама–Гилберта. Синтезированные олигонуклеотиды составляют 5'-концевой фрагмент гена тРНК<sub>I</sub><sup>Val</sup>, имеющий половинный сайт рестриктазы *EcoRI* и выступающий 6-звенный конец для сшивания с центральной частью гена.

В ходе исследований по созданию искусственного гена валиновой тРНК дрожжей мы провели химико-ферментативный синтез двухцепочечного фрагмента ДНК, соответствующего участку 1–16 этой тРНК и имеющего выступающие 5'-концы, один из которых представляет собой половинный сайт рестриктазы *EcoRI*, а второй предназначен для соединения с центральной частью гена.

Первым этапом настоящей работы являлся химический синтез двух частично комплементарных олигонуклеотидов ААТТСГГТТ (IX) и ССАСГАААССГ (XVIII). Этот синтез (схема 1) был осуществлен фосфотриэфирным методом [4], исходя из полностью защищенных нуклеозид-3'-фосфатов. Межнуклеотидные конденсации проводили под действием TPST или NBST, следя за ходом реакции с помощью ТСХ на силифоле. Промежуточные продукты синтеза выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, а конечные, деблокированные олигонуклеотиды — анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в 7 М растворе мочевины при pH 7,4 и затем при pH 3,5 (рис. 1 и 2). Индивидуальность полученных олигонуклеотидов (IX) и (XVIII) была доказана микроколоночной

\* Сообщения XXIX и XXX см. [1] и [2], предварительное сообщение см. [3]. Префикс d(деокси) для краткости всюду опущен. Используются следующие нестандартные сокращения: TEAB — бикарбонат триэтиламония, TPST — триэтилопропионилсульфотетразолид, NBST — *n*-нитробензолсульфотриазолид, DMTr — диметокситригид, ClPh — *p*-хлорфенил. Символом  $\ddagger$  обозначена межнуклеотидная фосфатная группа, защищенная *n*-хлорфенильным остатком.



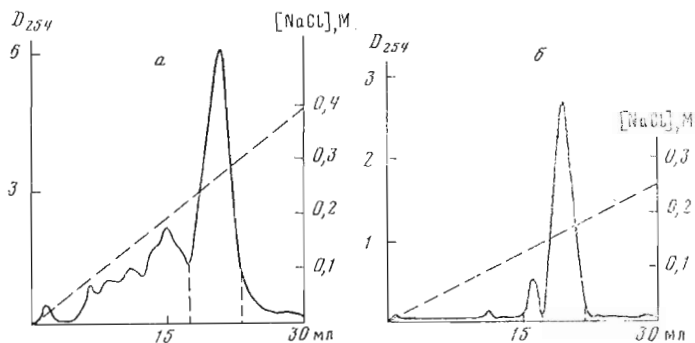


Рис. 1. Выделение нонануклеотида (IX) хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{Cl}^-$ ;  $0,2 \times 28$  см) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine; скорость элюции  $0,25$  мл/мин. *a* —  $0,02$  М трис-HCl, pH 7,5 ( $0-0,38$  М NaCl, 30 мл), отмеченный пик содержит 8  $\text{OE}_{260}$ ; *b* — HCl, pH 3,5 ( $0-0,25$  М NaCl, 30 мл), отмеченный пик содержит 5  $\text{OE}_{260}$  нонануклеотида (IX)

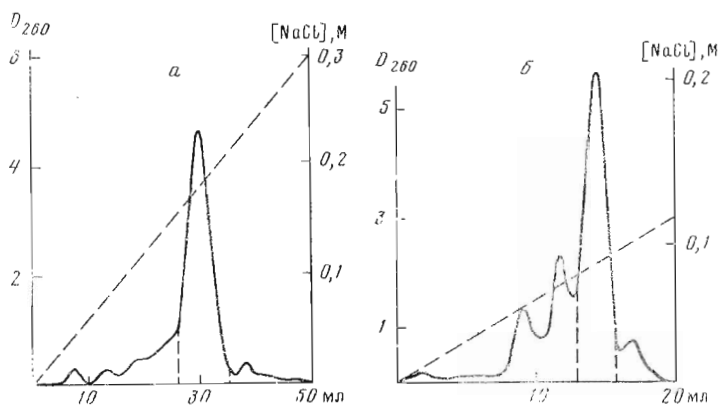


Рис. 2. Выделение ундекануклеотида (XVIII) хроматографией на DEAE-целлюлозе ( $\text{Cl}^-$ ) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine, *a* — колонка  $0,34 \times 25$  см,  $0,02$  М трис-HCl, pH 7,5 ( $0-0,3$  М NaCl, 50 мл), скорость элюции  $0,33$  мл/мин; отмеченный пик содержит 49  $\text{OE}_{260}$ ; *b* — колонка  $0,2 \times 28$  см, HCl, pH 3,5 ( $0-0,15$  М NaCl, 30 мл), скорость элюции  $0,40$  мл/мин; отмеченный пик содержит 18,7  $\text{OE}_{260}$  ундекануклеотида (XVIII)

хроматографией (рис. 3), а первичная структура — методом нуклеотидных карт (рис. 4).

На следующем этапе нонануклеотид (IX) и ундекануклеотид (XVIII) в составе 4-компонентного комплекса с описанными ранее додекануклеотидами (XIX) [5] и (XX) [6] были сшиты при помощи T4-ДНК-лигазы с образованием двухцепочечного нуклеотида (XXI) · (XXII) (схема 2). В этой сшивке 3'-концевые компоненты использовались в виде  $[5'-^{32}\text{P}]$ -фосфатов, а 5'-концевые оставались нефосфорилированными. Это позволило, с одной стороны, контролировать ход лигирования по возрастанию количества  $[^{32}\text{P}]$ фосфата, устойчивого к действию фосфатазы (максимальная доля такого фосфата в смеси составила 64%, см. рис. 5), а с другой — дало возможность вводить затем в продукты сшивания 5'-концевую  $^{32}\text{P}$ -метку высокой удельной активности, необходимой для дальнейшего структурного анализа. Кроме того, отсутствие фосфата на 5'-конце нонануклеотида (IX) предотвращало димеризацию образующегося дуплекса (XXI) · (XXII), возможную из-за самокомплементарности выступающего конца ААТТ.

После отделения от не вступивших в реакцию исходных олигонуклеотидов с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50 (рис. 6) продукт

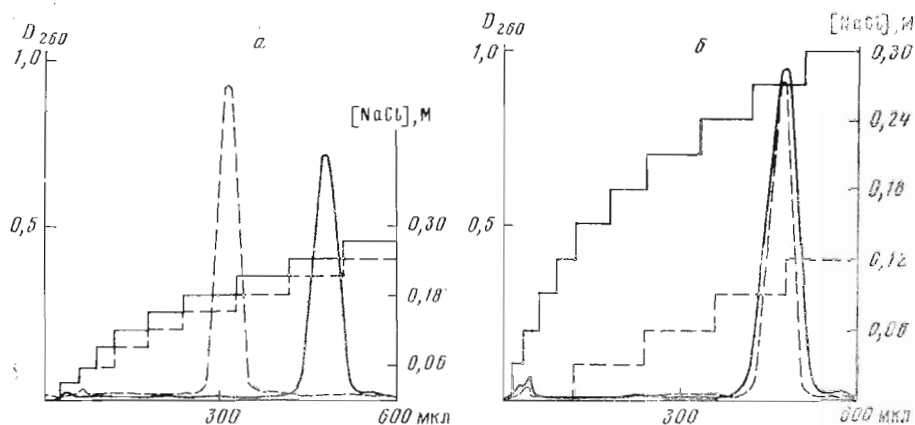


Рис. 3. Микроколоночная хроматография нонануклеотида (IX) (а) и ундекануклеотида (XVIII) (б) в ступенчатом градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеине. Колонка 0,8×60 мм, скорость элюции 300 мкл/ч, запись на МСФП-3. Сплошная линия — хроматография в 0,01 М трис-НСl, рН 7,4; штриховая — в HCl, рН 3,5

лигазной сшивки (XXI) · (XXII) был выделен с выходом 42%. Его анализ методом ближайших соседей показал переход метки из рТ и рС в Тр и Ар, что согласуется с ожидаемой структурой. Для окончательного доказательства строения синтезированный фрагмент гена (XXI) · (XXII) был 5'-фосфорилирован действием  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{rATP}$  и Т4-полинуклеотидкиназы и его комплементарные цепи разделены электрофорезом на ацетилцеллюлозе и гомохроматографией. Индивидуальные олигонуклеотиды ( $^{32}\text{pXXI}$ ) и ( $^{32}\text{pXXII}$ ) были элюированы 30% раствором ТЕАВ, и их нуклеотидная последовательность определена модифицированным методом Максама — Гилберта [7, 8] (рис. 7).

### Экспериментальная часть

В работе использованы дезоксирибонуклеозиды, выпускаемые фирмами Serva и Calbiochem, акриламид, метиленабисакриламид и трис (Ranal), DEAE-целлюлоза DE-23 (Whatman), MN 300 DEAE (Serva), целлюлоза MN 300 (Serva), бумага Ватман 1 и DEAE-бумага DE-81 (Whatman), полоски ацетилцеллюлозы (Schleicher und Schüll), силикагель L40-100 (Chemapol), фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1), фосфодиэстераза селезенки (КФ 3.1.4.18) и микрококковая нуклеаза (КФ 3.1.4.7) (Worthington). Щелочная фосфатаза *E. coli* (КФ 3.1.3.1) получена по методу [9], Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) — по методу [10], причем заключительной стадией была гель-хроматография на сефадексе G-100 в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 7,6), 0,1 М КСl, 5 мМ дитиотреит, 5% глицерина и 0,01 М гАТФ (ср. [11]); уд. акт. 0,65 ед/мкл. ДНК-лигаза фага Т4 (КФ 6.5.1.1) выделена по методу [12] и после хроматографии на DEAE-целлюлозе сконцентрирована диализом против 30% полиэтиленгликоля (М 20 000), а затем против буфера в 50% глицерине; уд. акт. 8 ед/мкл (1 ед. акт. фермента лигирует 1 пмоль 5'- $^{32}\text{P}$ (рТ)<sub>12</sub> на матрице poly(dA) за 1 мин при 32°С, ср. [10]). ДНК-лигазу тестировали на 3'-экзонуклеазную активность, инкубируя 1 ед. акт. фермента 5 ч при 37°С в пробе (10 мкл), содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 7,6), 1 мМ дитиотреит, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 5 пмоль (2·10<sup>4</sup> имп/мин)  $^{32}\text{P}$ (рТ)<sub>12</sub>, и анализируя с помощью гомохроматографии в гомосмеси VI [14] (рис. 8). В качестве носителя для осаждения олигонуклеотидов использовали тРНК, очищенную следующим образом: раствор 1 г суммарной дрожжевой тРНК (производство СКТБ БАВ, Главмикробиопром) в 50 мл 10 мМ трис-НСl (рН 7,6) трижды экстрагировали равным объемом фенола, насыщенного тем же буфером, затем прибавили АсОНа до концентрации 0,3 М,

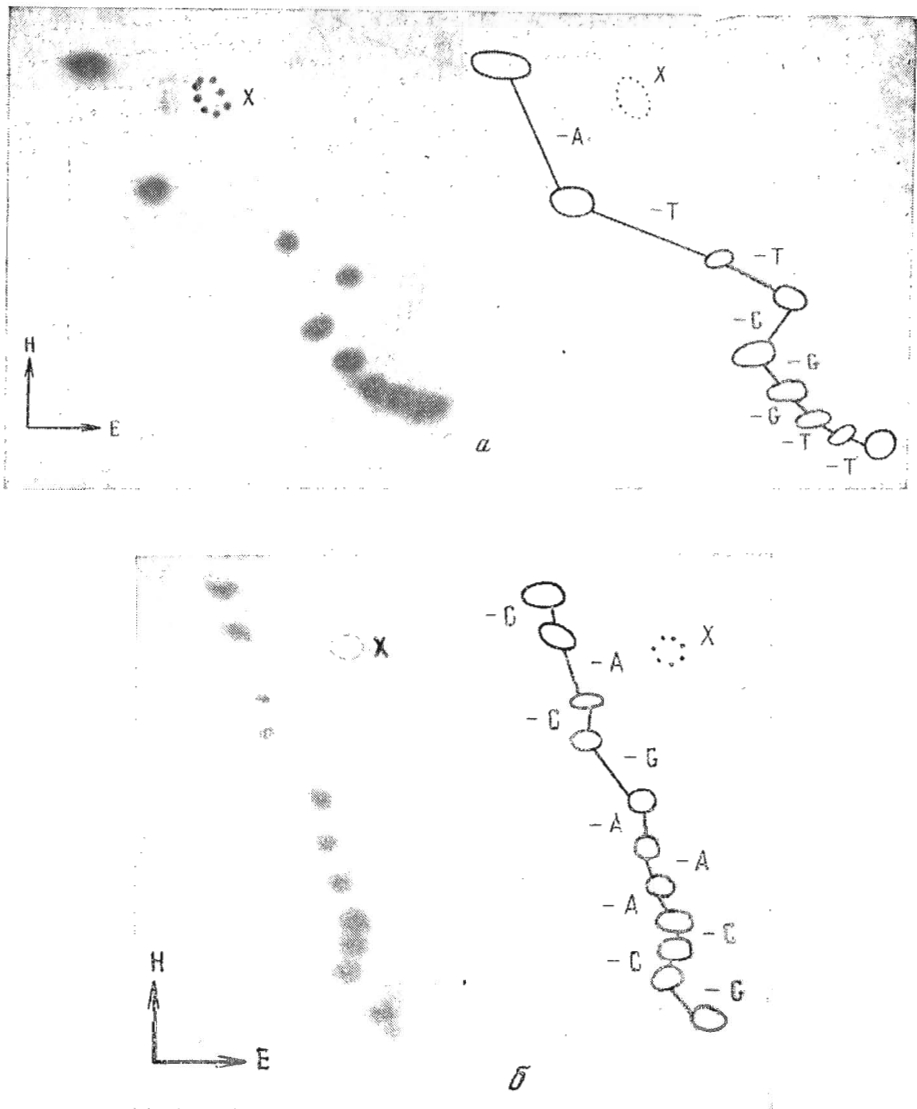


Рис. 4. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза меченых олигонуклеотидов ( $^{32}\text{pIX}$ ) (а) и ( $^{32}\text{pXVIII}$ ) (б). Направление Е — электрофорез на ацетицеллюлозе в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5) при 90 В/см, направление Н — гомохроматография в гомосмеси VI; X — пятно красителя ксиленианола FF

тРНК осадил 2-кратным объемом спирта и повторил осаждение еще 2 раза. ТСХ проводили в системе хлороформ — метанол; 9 : 1, на пластинках Silufol UV 254. Пиридин для межнуклеотидных конденсаций обезвоживали кипячением с  $\text{BaO}$ , а затем  $\text{CaH}_2$  и хранили над молекулярными ситами 4 Å. N-Бензоилнуклеозиды получали действием на нуклеозиды хлористого бензоила с последующим частичным щелочным гидролизом [13], диметокситригильное проводили по методу [4]. Полностью защищенные нуклеозид-3'-фосфаты получали, обрабатывая 5', N-защищенный нуклеозид (n-хлорфенил)фосфобистриаоломидом и затем этиленциангидрином [4]. TPST синтезировали по методу [4], NBST — по методу [15].

1. Удаление диметокситригильной группы. 1 г полностью защищенного 3'-нуклеотида обрабатывали 15 мл 2% раствора  $\text{PhSO}_3\text{H}$  в смеси хлороформ — метанол, 7 : 3. Через 2–3 мин выливали в 20 мл охлажденного до



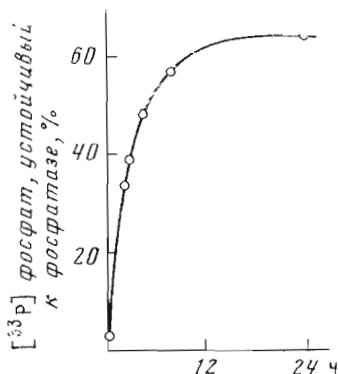


Рис. 5

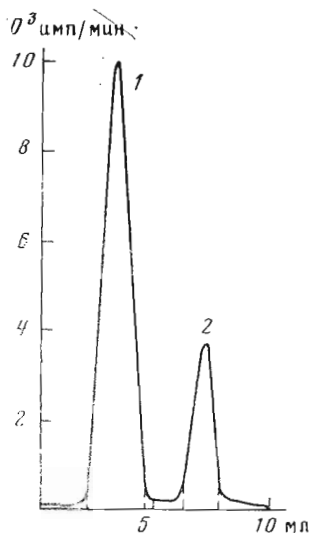


Рис. 6

Рис. 5. Кинетика лигазной реакции (см. опыт 6)  
 Рис. 6. Выделение продуктов лигазной реакции (опыт 6) гелей-фильтрацией на сефадексе G-50 (0,57×20 см) в буфере, содержащем 1 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA и 1 мМ трис-HCl, pH 8,0; скорость элюции 10 мл/ч. Пик 1 содержит продукт сшивки (XXI)·(XXII) ( $11,1 \cdot 10^6$  имп/мин), пик 2 — исходные олигонуклеотиды ( $3,3 \cdot 10^6$  имп/мин)

0° С водного 5% NaHCO<sub>3</sub>, водный слой экстрагировали хлороформом, экстракт промывали раствором NaHCO<sub>3</sub> и водой, высушивали и после упаривания хроматографировали на колонке с силикагелем (3×5 см) в градиенте концентрации метанола в хлороформе. Выходы продукта детритилирования 75–90%.

2. Межнуклеотидная конденсация. Фосфатный компонент растворяли в смеси пиридин — триэтиламин (10 : 3, 25 мл смеси на 1 ммоль нуклеотида) и выдерживали 16 ч при 20° С. Растворитель отгоняли, остаток упаривали с пиридином для удаления следов триэтиламина, прибавляли гидроксильный компонент и 3–4 раза упаривали с пиридином. Затем прибавляли конденсирующий реагент, упаривали до объема, при котором суммарная концентрация всех трех компонентов составляла ~1 М, и оставляли при комнатной температуре, контролируя ход реакции с помощью ТСХ. По окончании реакции добавляли равный объем воды и через 30–45 мин выливали в смесь хлороформа с 0,1 М ТЕАВ. Водный слой трижды экстрагировали хлороформом, экстракт промывали 0,1 М ТЕАВ и водой, отгоняли хлороформ и 2–3 раза упаривали с толуолом для полного удаления пиридина и воды. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя сначала хлороформом, а затем ступенчатым градиентом метанола в хлороформе. Количество исходных веществ, продолжительность реакции и выход продуктов межнуклеотидной конденсации указаны в таблице.

3. А-А-Т-Т-С-С-Т-Т (IX). 6 мг защищенного нонануклеотида (VIII) детритилировали в обычных условиях, затем обработали 3 мл 25% водного NH<sub>3</sub> при 60° С в течение 3,5 ч и упарили. Остаток хроматографировали на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (Cl<sup>-</sup>) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine при pH 7,4 (рис. 1а). Вещество из указанной на рисунке фракции хроматографировали на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 0,7×3 см), элюируя 1 М ТЕАВ; в результате выделили 9 ОЕ<sub>260</sub> соединения (IX). После рехроматографии при pH 3,5 (рис. 1б) и обессоливания получено 5 ОЕ<sub>260</sub> (51 нмоль) нонануклеотида (IX). Данные

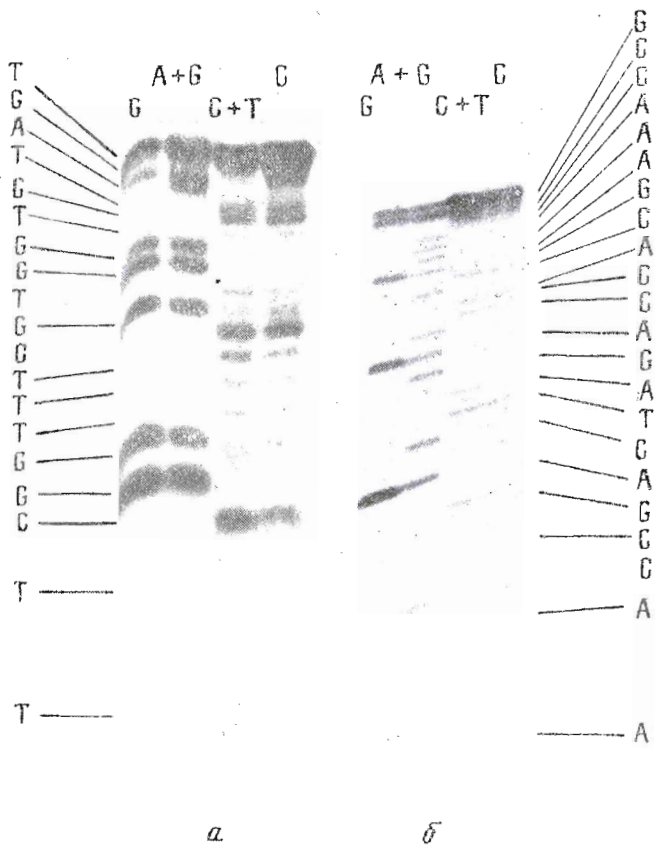


Рис. 7. Определение нуклеотидной последовательности синтезированного фрагмента гена тРНК<sup>Val</sup> (опыт 8). Электрофорез в 20% полиакриламидном геле (50 мМ трис-борат, рН 8,3). а - верхняя цепь (<sup>32</sup>pXXI), б - нижняя цепь (<sup>32</sup>pXXII)

микроколоночной хроматографии приведены на рис. 3а, нуклеотидная карта - на рис. 4а.

4. С-С-А-С-Г-А-А-А-С-С-Г (XVIII). Раствор 5,2 мг защищенного ундекануклеотида (XVII) в 5 мл 25% водного NH<sub>3</sub> выдерживали 46 ч при 20° С и 10 ч при 50° С, упарили досуха, остаток обработали 5 мл 80% AcOH (30 мин при 20° С), упарили и хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl<sup>-</sup>) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine, рН 7,4 (рис. 2а); после обессоливания получено 49 ОЕ<sub>260</sub> соединения (XVIII). Половину этого вещества хроматографировали при рН 3,5 (рис. 2б); после обессоливания получено 18,7 ОЕ<sub>260</sub> (154 нмоль) ундекануклеотида (XVIII). Результаты микроколоночной хроматографии приведены на рис. 3б, нуклеотидная карта - на рис. 4б.

5. 5'-<sup>32</sup>P-фосфорилирование олигонуклеотидов. К раствору 2 нмоль олигонуклеотида и 4 нмоль [γ-<sup>32</sup>P]rATP (9,8 Ки/ммоль) в киназном буфере, содержащем 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ дитиотреит и 5 мМ трис-НСl (рН 9,0), прибавляли 10-15 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы и реакционную смесь (общий объем 50 мкл) инкубировали 1 ч при 37° С. Меченый олигонуклеотид выделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (0,3×15 см), элюируя буфером, содержащим 1 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA и 1 мМ трис-НСl, рН 8,0. Выход 60-70% (по включению <sup>32</sup>P).

6. Лигазная сшивка олигонуклеотидов. Раствор 1,2 нмоль нонануклеотида (IX), 1 нмоль (11,5·10<sup>6</sup> имп/мил) ундекануклеотида (<sup>32</sup>pXVIII),



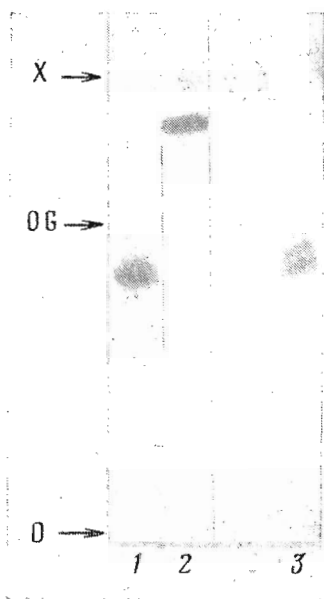


Рис. 8. Тестирование Т4-ДНК-лигазы на экзонуклеазную активность (взаимодействие с  $[^{32}\text{P}](\text{pT})_{12}$  и гомохроматография в гомосмеси VI). 1 — субстрат; 2 — субстрат, обработанный лигазой после 1-й хроматографии (на фосфоцеллюлозе); 3 — субстрат, обработанный лигазой после 2-й хроматографии (на ДЕАЕ-целлюлозе). О — старт, Х и ОГ — положения красителей кислещенцианола FF и оранжевого G

1 нмоль ( $15 \cdot 10^6$  имп/мин) додекануклеотида ( $^{33}\text{pXIX}$ ) и 1,2 нмоль додекануклеотида (XX) в 150 мкл буфера, содержащего 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ дитиотреит и 20 мМ трис- $\text{HCl}$  (рН 7,6), нагревали 10 мин при  $80^\circ\text{C}$ , после чего постепенно (за 5 ч) охладили до  $8^\circ\text{C}$  и оставили при этой температуре на 14 ч. Затем прибавили гАТР до концентрации 0,1 мМ, 100 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы и реакционную смесь (общий объем 200 мкл) инкубировали при  $8^\circ\text{C}$ , периодически определяя количество  $[^{32}\text{P}]$ фосфата, устойчивого к действию щелочной фосфатазы. Для этого аликвоты (по 1 мкл) реакционной смеси обрабатывали 1 ч при  $60^\circ\text{C}$  избытком фосфатазы в 4 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис- $\text{HCl}$  (рН 9,4), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 0,4 мМ меркаптоэтанол, и продукты реакции разделяли электрофорезом на ДЕАЕ-бумаге в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5) в течение 15–20 мин при 35 В/см. Вещества локализовали радиоавтографией (подвижность неорганического фосфата в 3 раза больше, чем у кислещенцианола FF, а олигонуклеотиды остаются на старте), соответствующие зоны вырезали и радиоактивность определяли в толуольном сцинтилляторе (рис. 5). После завершения лигирования (24 ч) к реакционной смеси добавили 8 мкл 0,5 М EDTA, нагревали 5 мин при  $100^\circ\text{C}$ , охладили и хроматографировали на сефадексе G-50 (рис. 6). Двухцепочечный продукт сшивки (XXI) · (XXII) был получен с выходом 42%.

7. Анализ двухцепочечного олигонуклеотида (XXI) · (XXII) методом ближайших соседей. а. Гидролиз до 5'-моонуклеотидов.  $2 \cdot 10^4$  имп/мин ( $\sim 1$  пмоль) олигонуклеотида нагревали 3 ч при  $37^\circ\text{C}$  в 10 мкл раствора, содержащего 60 мМ трис- $\text{HCl}$  (рН 7,5), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ дитиотреит и 5 мкг (0,1–0,2 ед. акт.) фосфодиэстеразы змеиного яда. Продукты гидролиза разделяли электрофорезом на бумаге Ватман 1 в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5) в течение 45 мин при 100 В/см, зоны 5'-моонуклеотидов вырезали и их радиоактивность измеряли в толуольном сцинтилляторе.

б. Гидролиз до 3'-моонуклеотидов. Олигонуклеотид ( $2 \cdot 10^4$  имп/мин) инкубировали 2 ч при  $37^\circ\text{C}$  в 10 мкл буфера, содержащего 50 мМ глицин (рН 8,9), 10 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 2 ед. акт. микрококковой нуклеазы. Реакционную смесь нейтрализовали 1 мкл 0,1 М  $\text{AsOH}$ , прибавили 11 мкл буфера, содержащего 0,1 М  $\text{AsONH}_4$ , 2 мМ EDTA и 0,5% твин-80 (рН 5,6), а затем 0,14 ед. акт. фосфодиэстеразы селезенки в 10 мкл вдвое разбавленного буфера того же состава и гидролизат анализировали, как в опыте 7а.

Межнуклеотидные конденсации

Синтезированный олигонуклеотид	Исходные вещества, мкмоль			Время, ч	Выход, %
	P-компонент	OH-компонент	TPST		
(DMTr) T≠Tp (CNEt) (ClPh) (I)	130	105	267	0,7	90
(DMTr) bzA≠bzAp (CNEt) (ClPh) (II)	470	310	940	0,3	62
(DMTr) bzA≠bzA≠T≠Tp (CNEt) (ClPh) (III)	260	220	590	1	60
(DMTr) bzG≠Tp (CNEt) (ClPh) (IV)	458	381	1380 *	44	65
(DMTr) bzG≠T≠T (Ac) (V)	108	160	164	0,3	65
(DMTr) bzC≠bzGp (CNEt) (ClPh) (VI)	329	250	536	0,5	65
(DMTr) bzC≠bzG≠bzG≠T≠T (Ac) (VII)	50	40	110	1	25
(DMTr) bzA≠bzA≠T≠T≠bzC≠bzG≠bzG≠T≠T (Ac) (VIII)	13	8	51	3	39
(DMTr) bzA≠bzCp (CNEt) (ClPh) (X)	180	145	274	0,5	73
(DMTr) bzC≠bzCp (CNEt) (ClPh) (XI)	470	410	690	0,5	71
(DMTr) bzC≠bzC≠bzA≠bzCp (CNEt) (ClPh) (XII)	102	64	202	0,75	67
(DMTr) bzG≠bzA≠bzAp (CNEt) (ClPh) (XIII)	350	230	710	0,5	86
bzC≠bzG (Ac) (XIV)	560	370	1120	0,3	54 **
bzA≠bzC≠bzC≠bzG (Ac) (XV)	250	200	520	1	20 **
bzG≠bzA≠bzA≠bzA≠bzC≠bzC≠bzG (Ac) (XVI)	58	39	233	1	47 **
(DMTr) bzC≠bzC≠bzA≠bzC≠bzG≠bzA≠bzA≠bzA≠bzC≠bzC≠bzG (Ac) (XVII)	11,7	5,3	48	3	42

\* В качестве конденсирующего реагента использован NBST.

\*\* Суммарный выход на стадиях конденсации и детритилирования.

Результаты анализа:  $^{33}\text{P}$  10690 имп/мин,  $^{32}\text{P}$  4040 имп/мин,  $\text{T}^{33}\text{p}$  10630 пмп/мин,  $\text{A}^{33}\text{p}$  6650 имп/мин.

8. Получение олигонуклеотидов ( $^{32}\text{pXXI}$ ) и ( $^{32}\text{pXXII}$ ) и определение их нуклеотидной последовательности. Раствор 5 пмоль дуплекса (XXI) · (XXII), 30 пмоль (90 мкКи) [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]гАТФ и 5 ед. акт. 4Т-полинуклеотидкиназы в 20 мкл киназного буфера (см. опыт 5) инкубировали 1 ч при 37° С. Добавили  $\text{AsONH}_2$  до концентрации 0,5 М и 20 мкг тРНК, олигонуклеотиды осадили прибавлением 3-кратного объема спирта и отделили центрифугированием. Осадок промыли спиртом, высушили, растворили в 10 мкл воды и подвергли двухмерному разделению — сначала электрофорезом на ацетилцеллюлозе в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5), а затем гомохроматографией в 7% растворе РНК в 7 М мочеvine, 0,04 М трис-НСl, рН 7,4. Олигонуклеотиды ( $^{32}\text{pXXI}$ ) и ( $^{32}\text{pXXII}$ ) локализовали радиоавтографией, элюировали из соответствующих зон 100 мкл 30% ТЕАВ (рН 8,0), лиофилизировали, растворили в 100 мкл 0,3 М  $\text{AsONa}$ , добавили 50 мкг суммарной тРНК и осадили 300 мкл спирта. Химическую модификацию и расщепление по отдельным звеньям нуклеотидной цепи и электрофорез в 20% полиакриламидном геле проводили, как описано в работах [7, 8]. Продолжительность модификации: G — 20, A+G — 35, C — 60, C+T — 60 мин. Результаты определения представлены на рис. 7.

Авторы благодарны Э. А. Шабаровой и В. Д. Смирнову (МГУ) за предоставленный образец додекануклеотида (XIX).

ЛИТЕРАТУРА

1. Добрынин В. Н., Чернов Б. К., Колосов М. Н. (1980) Биоорган. химия, 6, 138–140.
2. Берлин Ю. А., Звонок Н. М. (1980) Биоорган. химия, 6, 141–143.
3. Берлин Ю. А., Каюция А. Л., Тактакишвили М. О., Коробко В. Г., Колосов М. Н. (1979) Биоорган. химия, 5, 943–944.

4. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. (1977) Nucl. Acids Res., 4, 353-371.
5. Джапаридзе Н. Ш., Метелев В. Г., Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1977) Биоорг. химия, 3, 501-510.
6. Берлин Ю. А., Каюшин А. Л., Звонков Н. М., Якимов С. А., Колосов М. Н. (1979) Биоорг. химия, 5, 1793-1801.
7. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биоорг. химия, 3, 1420-1422.
8. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. (1978) Биоорг. химия, 4, 1281-1283.
9. Garen A., Levinthal C. (1960) Biochim. et biophys. acta, 38, 470-481.
10. Panet A., van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Raae A. J., Lillehaug J. R., Kleppe K. (1973) Biochemistry, 12, 5045-5050.
11. Efstratiadis A., Younakis J. N., Donis-Keller H., Chaconas G., Dougall D. K., Kafatos F. C. (1977) Nucl. Acids Res., 4, 4165-4174.
12. Moore S. K., James E. (1976) Analyt. Biochem., 75, 545-554.
13. Ralph R. K., Khorana H. G. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 2926-2937.
14. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) Nucl. Acids Res., 1, 331-353.
15. Katagiri N., Itakura K., Narang S. A. (1975) J. Amer. Chem. Soc., 97, 7332-7337.

Поступила в редакцию  
17.I.1980

**SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES.**  
**XXXI. THE CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS OF A 5'-TERMINAL**  
**FRAGMENT OF A STRUCTURAL GENE FOR THE YEAST tRNA<sub>4</sub><sup>Val</sup>**

BERLIN Yu. A., KAYUSHIN A. L., TAKTAKISHVILI M. O.,  
LEBEDENKO E. N., KOROBKO V. G., CHUVPILO S. A., KOLOSOV M. N.

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

Nonadeoxynucleotide dAATTCGGTT (IX) and undecadeoxynucleotide dCCACGAAACCG (XVIII) have been synthesized by the phosphotriester approach using triisopropylbenzenesulfonyltetrazolide as condensing reagent. The nucleotides (IX) and (<sup>33</sup>pXVIII) were ligated with the previously described nucleotides dTAACCGACTAGA and d<sup>33</sup>pTCGTGGTCTAGT to yield a 21-mer (XXI) and 23-mer (XXII), whose structures were proved by the nearest-neighbour analysis and by the modified Maxam - Gilbert method. The synthetic duplex (XXI)·(XXII) corresponds to the nucleotide sequence 1-16 of the yeast tRNA<sub>4</sub><sup>Val</sup> structural gene and contains an EcoRI half-site and a protruding end for joining with a cloning vector and the central part of the gene, respectively.