БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 7 * № 9 * 1981

УДК 547.963.32.07

СИНТЕЗ АФФИННЫХ РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ ГЕПТА- И ОКТАДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ УЧАСТКУ РНК БАКТЕРИОФАГА MS2

Готтих М. Б., Ивановская М. Г., Вейко В. П., Шабарова З. А.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Твердофазным фосфодиэфирным методом с блокированием межнуклеотидных фосфатных групп синтезированы гомологичные гептануклеотид d(TTGAATGp) и октануклеотид d(TTGAATG)rG, комплементарные участку 1738—1745 РНК бактериофага MS2. На основе полученных олигонуклеотидов синтезированы алкилирующий d[TTGAATGp($NHCH_2CH_2NHCOC_6H_4CH_2Br$)] и фотоактивируемый d(TTGAATG)rG·[2′(3′)$OCOC_6H_4N_3$-*n*] аффинные реагенты. На примере синтеза этих соединений описаны новые методики введения химически активных групп по концевому фосфатному остатку олигодезоксирибонуклеотидов и 3′-концевой *цис*-диольной группе в смешанных дезоксирибо(рибо)олигонуклеотидах. Описанные методы модификации олигонуклеотидов могут быть использованы как для синтеза аффинных реагентов, так и для зондов, содержащих флуоресцентные, парамагнитные или иммунохимические метки.

Создание аффинных реагентов на основе олигонуклеотидов открывает широкие возможности направленной модификации нуклеиновых кислот и белков, образующих специфические комплексы с олигонуклеотидами (ферменты нуклеинового обмена, регуляторные и расплетающие белки и т. д.) [1—3]. Проведение такой модификации возможно лишь при наличии реагентов на основе 8—10-членных олигонуклеотидов с заданной первичной структурой, способных образовывать достаточно прочные и строго специфичные комплексы с определенными участками биополимера. Синтез аффинных реагентов представляет самостоятельную задачу и в данном случае состоит из двух этапов: синтеза олигонуклеотида и введения в него химически активной группы, способной реагировать с функциональными группами белков и нуклеиновых кислот.

В настоящем сообщении описан синтез двух аффинных реагентов на основе гомологичных гепта- и октануклеотидов — d(TTGAATGp) (I) и d(TTGAATG)rG (II), комплементарных односпиральному 1738—1745-участку РНК бактериофага MS2. Для синтеза олигонуклеотидов (I) и (II) был выбран твердофазный метод, так как он позволяет достаточно быстро и просто получать необходимые (0,1—1 мкмоль) количества этих соединений. Присоединение химически активной группы к олигонуклеотиду (I) осуществлялось по 3′-концевой фосфатной группировке, а к олигонуклеотиду (II) — по *цис*-диольной группе 3′-концевого рибонуклеотида, специ-

Сокращения: МКХ — микроколоночная хроматография; MsCO- — мезитиленкарбонил; TPS — триизопропилбензолсульфохлорид.

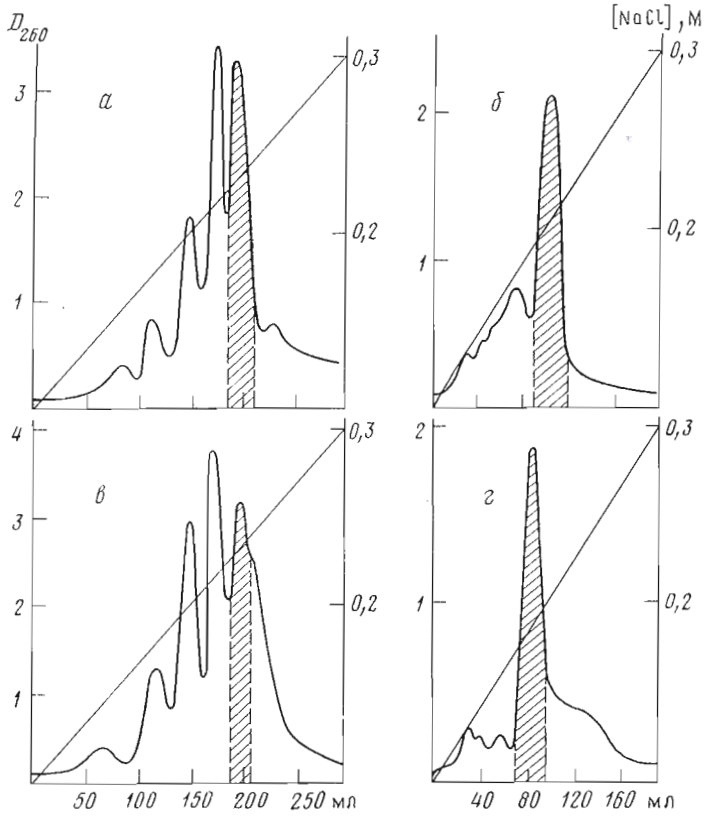
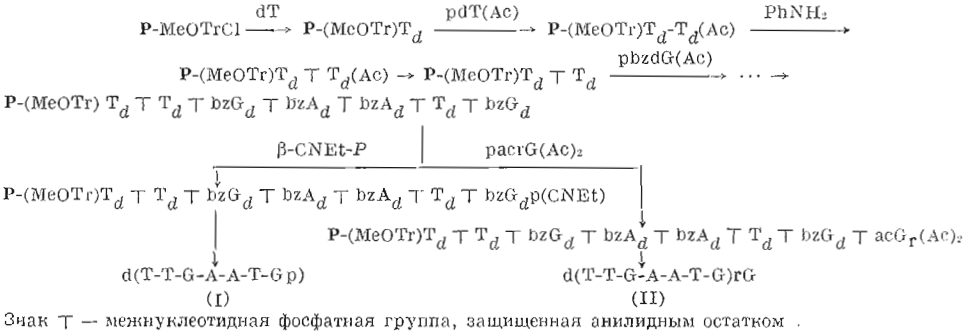


Рис. 1. Выделение и очистка олигонуклеотидов (I) (*а*, *б*) и (II) (*в*, *г*) хроматографией на DEAE-целлюлозе в 7 М мочевине: *а* — при pH 7,5; *б* — рехроматография при pH 3,5; *в* — при pH 7,5; *г* — рехроматография при pH 3,5. Заштрихованные пики соответствуют выделяемым олигонуклеотидам

ально введенного для этой цели в состав октануклеотида. В качестве химически активных групп были выбраны алкилирующая *п*-бромметилбензоильная и фотоактивируемая *п*-азидобензоильная группы, обладающие способностью модифицировать полинуклеотид по различным положениям.

Синтез олигонуклеотидов (I) и (II) проводили на полимерном носителе привитого типа ступенчатым фосфодиэфирным методом с постадийным блокированием межнуклеотидных фосфатных групп [4] (схема 1). Контроль за ходом синтеза осуществляли методом МКХ на DEAE-целлюлозе

Схема 1



Знак ⊤ — межнуклеотидная фосфатная группа, защищенная анилидным остатком .

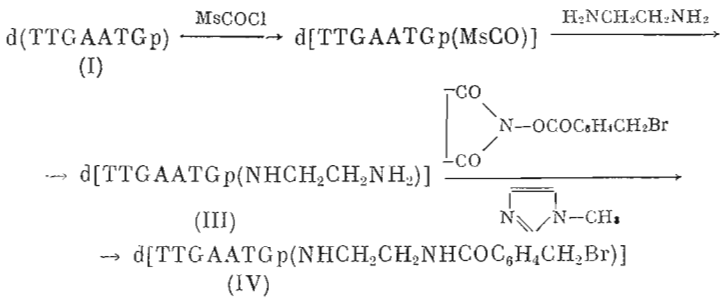
в 7 М мочевине при pH 7,5. Степень превращения на каждой стадии составляла не ниже 80%. Олигонуклеотиды (I) и (II) выделяли ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в 7 М мочевине (рис. 1). Выход гептануклеотида 5%, октануклеотида — 4% (считая на 5′-концевой дезокситимидин). Гомогенность соединений (I) и (II) показана методом МКХ на DEAE-целлюлозе и на смоле «Аминосилохром» $АС_{III}$-300. Для установления нуклеотидного состава полученные олигонуклеотиды подвергали исчерпывающему ферментативному гидролизу. Структура гептануклеотида (I) доказана с помощью модифицированного метода Максама — Гилберта [5].

Селективная модификация выбранного участка биополимера предполагает наличие специфического комплекса реагента с биополимером, поэтому следующим этапом работы явилось изучение способности полученных олигонуклеотидов образовывать комплексы с фрагментом РНК бактериофага MS2. Фрагмент РНК 1708—1766 был получен в результате гидролиза комплекса РНК — белок оболочки РНКазой T_1 [6]. Специфичность образующегося комплекса олигонуклеотида (I) с комплементарной областью фрагмента РНК была доказана с помощью фермента РНКазы H из *E. coli* и описана в работе [7], где показано, что при действии фермента происходит направленное расщепление РНК вблизи 5′-конца связанного в комплекс олигонуклеотида.

Региоселективность нековалентных взаимодействий гептануклеотида (I) с фрагментом РНК послужила основой для создания аффинных реагентов на базе этого гептануклеотида и гомологичного ему 8-членного олигонуклеотида.

Для введения химически активных групп по концевому фосфатному остатку олигодезоксирибонуклеотидов ранее нами был разработан метод, основанный на избирательном ацилировании алифатической аминогруппы в соответствующем аминоалкиламиде олигонуклеотида [8]. Этот же подход использован нами при получении *n*-бромметилбензоильного производного гептануклеотида (I), синтез которого был проведен по схеме 2.

Схема 2



Аминоэтиламид (III) был получен известным методом смешанных ангидридов с мезитиленкарбоновой кислотой [9], но с применением новой методики, впервые описанной в настоящей работе. Мы обнаружили, что ацилирование моно- и олигонуклеотидов протекает высокоэффективно не только в безводной среде, но и в среде водного пиридина, содержащего не более 15% воды. При этом выходы соответствующих смешанных ангидридов составляют 80—90%. При ацилировании гептануклеотида (I) избытком хлорангидрида мезитиленкарбоновой кислоты в 90% водном пиридине и последующей обработке образующегося смешанного ангидрида этилендиамином аминоэтиламид (III) был получен с выходом 90% (рис. 2, *а*). Ацилирование аминоэтиламида (III) N-оксисукцинимидным эфиром *n*-бромметилбензойной кислоты [8] протекает с выходом не более 50%. Для повышения эффективности этой реакции мы использовали N-метилимидазол, который, как известно, является хорошим катализатором пере-

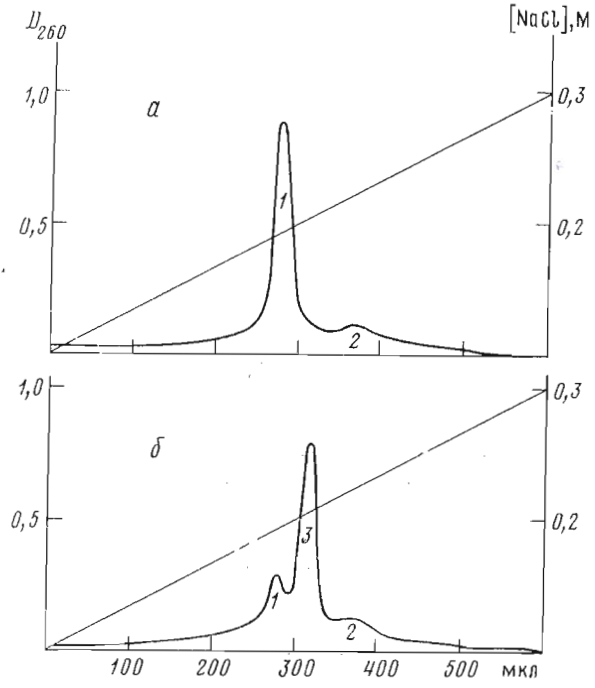
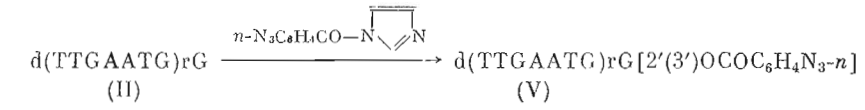


Рис. 2. Микроколоночная хроматография реакционных смесей при синтезе соединений (III) (*а*) и (IV) (*б*) на DEAE-целлюлозе в 7 М мочевине при pH 7,5; *1* — аминоэтиламид гептануклеотида (III); *2* — гептануклеотид (I); *3* — *n*-бромметилбензоильное производное гептануклеотида (IV). Колонка 1×55 мм, скорость элюции 300 мкл/ч

носа ацильных групп на амины и в безводной, и в водной среде [10]. Этот прием позволил сократить время реакции и увеличить выход соединения (IV) до 75% (рис. 2*б*).

Разработанная методика позволяет достаточно просто и эффективно получать на основе гетерогенных олигодезоксирибонуклеотидов как алкилирующие, так и другие, например фотоактивируемые, аффинные реагенты. Применение водно-органической среды на всех стадиях синтеза обеспечивает хорошую растворимость олигонуклеотидов и позволяет исключить трудоемкую операцию перевода олигонуклеотида в форму, растворимую в безводных растворителях.

Для введения реакционноспособных групп по концевому остатку рибозы в смешанные дезоксирибо(рибо)олигонуклеотиды мы впервые использовали метод, основанный на ацилировании *цис*-диольной группы концевого рибонуклеотида имидазолидом соответствующей кислоты. Этим методом был получен фотоактивируемый реагент на основе октануклеотида (II):



Выбор реакции ацилирования основан на том, что имидазолиды карбоновых кислот ацилируют в водно-органической среде *цис*-диольную группу рибозы с образованием смеси 2′- и 3′-О-ацилпроизводных, не затрагивая при этом гетероциклические основания и фосфатные группы [11].

Методику ацилирования отрабатывали на гуанозин-5′-фосфате. При обработке Na-соли pG избытком имидазолида *n*-азидобензойной кислоты в среде водного DMFA через 2 ч выход 5′-фосфата 2′(3′)-О-*n*-азидобензо-

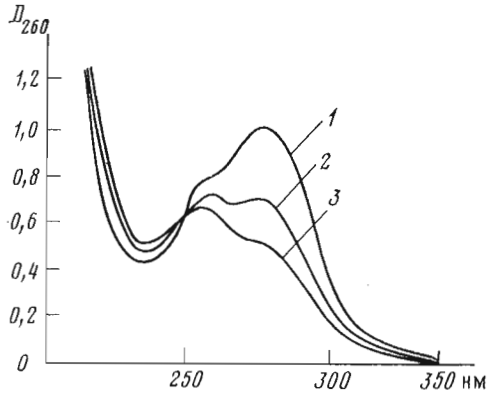


Рис. 3. Фотолиз водного раствора 5′-фосфата 2′(3′)-О-азидобензоилгуанозина при облучении светом с λ≥300 нм. Источник света — лампа ДРШ-250 с кварцевым фильтром. Расстояние от лампы до образца 20 см. Время облучения: *1* — 0; *2* — 2; *3* — 7 мин

илгуанозина (VI) составил 85%. Подтверждением структуры соединения (VI) служило характерное для арилазидов фотохимическое разложение при облучении УФ-светом (рис. 3). Выделение соединения (VI) проводили колоночной хроматографией на бензоилированной DEAE-целлюлозе по методике [12]. Найденные условия ацилирования были использованы для получения фотоаффинного реагента (V) — производного октануклеотида (II). Соединение (V) выделяли также на бензоилированной DEAE-целлюлозе. Преимуществом разработанного метода является его экспериментальная простота: синтез реагента проводится в одну стадию в водно-органической среде в течение 2—3 ч. Метод можно рекомендовать для получения как аффинных реагентов, так и различного рода зондов — производных олигонуклеотидов, содержащих флуоресцентные, парамагнитные или иммунохимические метки.

Таким образом, в настоящей работе описан синтез двух олигонуклеотидов, комплементарных выбранному участку РНК, и на примере синтеза двух аффинных реагентов — производных этих олигонуклеотидов — описаны приемы введения химически активных групп по концевому фосфатному остатку и 3′-концевой *цис*-диольной группировке в составе смешанных дезоксирибо(рибо)олигонуклеотидов.

Экспериментальная часть

В работе использованы мононуклеотиды производства СКТБ БАВ Главмикробиопрома (Новосибирск), триизопропилбензолсульфохлорид, β-цианэтилфосфат, N,N′-карбонилдиимидазол, трифенилфосфин, N-метилимидазол (Merck, ФРГ), *п*-бромметилбензойная кислота (Merck-Schuchardt, ФРГ), N,N′-дициклогексилкарбодиимид, N-оксисукцинимид (Fluka, Швеция), DEAE-целлюлоза DE-32 для колоночной хроматографии (Whatman, Англия), смола «Аминосилохром» (СКТБ БАВ, Новосибирск), биогель P-2 (200—400 меш) (Bio Rad, США), дауэкс 50×8 (200—400 меш, Serva, ФРГ), фосфодиэстераза змеиного яда и бактериальная фосфатаза (Worthington, США). Бензоилированная DEAE-целлюлоза любезно предоставлена В. Л. Друцей. По описанным методикам получали *п*-азидобензойную кислоту [13], N-оксисукцинимидный эфир *п*-бромметилбензойной кислоты [14], хлорангидрид мезитиленкарбоновой кислоты [15], pbzdA, pbzdC и pacG(Ac)$_2$ [16], ацетилирование 3′-гидроксильной группы проводили по [17].

УФ-спектры снимали на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (ГДР), для регистрации оптического поглощения элюатов использовали проточный денситометр «ISCO UA-5» (США). Оптическое поглощение элюатов при МКХ регистрировали с помощью спектрофотометра МСФП-3, как описано в работе [18]. Анализ смесей нуклеозидов и нуклеотидов прово-

цили с использованием жидкостного хроматографа высокого давления «Varian 8500» (США).

Присоединение дезокситимидина к полимеру-носителю. В работе использовали полимер, получение которого описано ранее [4]. К 5 г полимера, промытого абсолютным пиридином и охлажденного до −10° С, добавляли охлажденную смесь 1 мл $SOCl_2$ и 1,5 мл абс. пиридина. Через 1,5 ч полимер отмывали абс. пиридином, добавляли раствор 1,5 г dT в абс. пиридине. Через 24 ч добавляли к полимеру 0,5 мл CH_3OH, выдерживали 0,5 ч и отмывали полимер последовательно абсолютным и водным пиридином. Степень нагрузки полимера определяли как описано ранее [3]. Количество связанного с полимером тимидина составило 0,06 ммоль/г. Для синтеза олигонуклеотидов (I) и (II) использовали 1 г полученного полимера.

Конденсация. Для активации фосфатной группы нуклеотидного компонента к 0,5 ммоль нуклеотида в 3—4 мл абс. пиридина добавляли 302 мг (1 ммоль) TPS. Через 1,5—2 ч эту смесь добавляли к полимеру, промытому абс. пиридином. Конденсацию проводили 3,5—4 ч, затем отмывали полимер от избытка реагентов сначала безводным, затем 70% водным пиридином.

Фосфорилирование гептануклеотида на полимере проводили β-цианэтилфосфатом (пиридиниевая соль). Для активации фосфатной группы к 1 ммоль β-цианэтилфосфата в 3,5 мл абс. пиридина добавляли 2 ммоль TPS. Через 1,5 ч смесь добавляли к полимеру, промытому абс. пиридином, оставляли на 4 ч, отмывали полимер от избытка реагентов последовательно безводным и 70% водным пиридином.

Защита межнуклеотидных фосфатных групп (проводили на каждой стадии синтеза). К полимеру, промытому абс. пиридином, добавляли смесь 524 мг (2 ммоль) трифенилфосфина в 2 мл. абс. пиридина, 0,2 мл (2 ммоль) CCl_4 и 0,4 мл (2 ммоль) анилина. Через 4 ч отмывали полимер сначала безводным, затем 70% водным пиридином.

Удаление 3′-О-ацетильной защитной группы проводили 1 М гидроокисью тетраэтиламмония в 70% водном пиридине в течение 15—20 мин. Избыток щелочи отмывали водным пиридином, затем 2% CH_3COOH в безв. пиридине и безв. пиридином.

Удаление Р-защитных анилидных групп. Полимер, полученный после стадий конденсации, промывали этанолом, эфиром и высушивали на воздухе. Затем добавляли смесь 1 мл абс. пиридина, 1 мл ледяной уксусной кислоты и 0,7 мл изоамилнитрита. Смесь выдерживали 3—4 ч при 37° С и промывали полимер абс. пиридином, затем эфиром и высушивали на воздухе.

Удаление N-защитных, ацетильной и β-цианэтильной групп. К полимеру, полученному по предыдущей методике, добавляли смесь пиридина и концентрированного NH_4OH (1 : 3) и оставляли в герметично закрытом сосуде на 10—12 ч при 50° С. Затем полимер промывали этанолом, эфиром и высушивали на воздухе.

Отщепление олигонуклеотида от полимера-носителя проводили после удаления всех защитных групп. Полимер промывали абсолютным CH_2Cl_2, охлаждали до −30° С и добавляли 1—1,5 мл 1% CF_3COOH в абсолютном CH_2Cl_2. Через 10—15 мин полимер отмывали от избытка кислоты абсолютным CH_2Cl_2 и смесь отщепленных олигонуклеотидов последовательно экстрагировали пиридином, смесью пиридин — конц. NH_4OH, этанол — конц. NH_4OH (1 : 1). Пиридин удаляли упариванием с водным NH_4OH. Количество отщепленной смеси олигонуклеотидов определяли методом количественной УФ-спектрометрии.

Выделение гептануклеотида d(TTGAATGp) (I) и октануклеотида d(TTGAATG)rG (II). После синтеза гептануклеотида (I) со 100 мг полимера было получено 300 OE_{260} смеси олигонуклеотидов; после синтеза октануклеотида (II) со 120 мг полимера — 380 OE_{260} смеси олигонуклео-

тидов. Фракционирование олигонуклеотидных смесей проводили ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе (Cl^-, 9×600 мм) в 7 М мочевине при pH 7,5 в линейном градиенте концентрации NaCl в 0,01 М трис-HCl-буфере (150 мл 0,1 М – 150 мл 0,3 М). Скорость элюции 0,3 мл/мин (рис. 1*а*, *в*). Для дополнительной очистки олигонуклеотидов (I) и (II) проводили рехроматографию на DEAE-целлюлозе (Cl^-, 6×300 мм) в 7 М мочевине при pH 3,5 и градиенте концентрации NaCl (100 мл 0,1 М – 100 мл 0,3 М). Скорость элюции 0,4 мл/мин (рис. 1*б*, *г*). После обессоливания олигонуклеотидов (I) и (II) на DEAE-целлюлозе (HCO_3^-) получили гептануклеотида (I) 25 OE_{260} (0,31 мкмоль), $\lambda_{макс}$ 263, $\lambda_{мин}$ 232 нм; октануклеотида (II) 24 OE_{260} (0,24 мкмоль), $\lambda_{макс}$ 260, $\lambda_{мин}$ 236 нм. Состав гептануклеотида (I) подтвержден соотношением нуклеозидов, образующихся после гидролиза смесью фосфодиэстеразы змеиного яда и бактериальной фосфатазы (dT : dA : dG=1,62 : 1,02 : 1,00). Состав октануклеотида (II) подтвержден соотношением нуклеотидов, образующихся в результате гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда (pdT : pdA : pdC : : pdC=3,21 : 2,10 : 2,07 : 1,00). Структура гептануклеотида (I) подтверждена модифицированным методом Максама – Гилберта [5], разработанным для анализа коротких олигонуклеотидов К. Г. Скрябиным с сотрудниками (ИМБ АН СССР).

d[*TTGAATGp*(*NH*(CH_2)$_2$*NH*$_2$)] (*III*). К раствору 10 OE_{260} (0,13 ммоль) гептануклеотида (I) в 20 мкл воды и 180 мкл пиридина прибавляли 16 мкл (100 мкмоль) хлорангидрида мезитиленкарбоновой кислоты, выдерживали 20 мин, добавляли 3 мл воды и избыток кислоты экстрагировали эфиром (4×3 мл). Водный слой упаривали, вещество растворяли в 500 мкл 10% водного пиридина, добавляли 10 мкл (150 мкмоль) этилендиамина и оставляли на 48 ч при 37° С. Смесь упаривали, растворяли в 100 мкл воды и обессоливали на биогеле Р-2 (колонка 7×270 мл, скорость элюции 2 мл/ч), элюируя олигонуклеотид водой. Контроль за ходом синтеза проводили МКХ на DEAE-целлюлозе в 7 М мочевине при pH 7,5 (рис. 2*а*). Выход соединения (III) 90% (относительно исходного олигонуклеотида).

d[*TTGAATGp*(*NH*(CH_2)$_2$*NHCOC*$_6$*H*$_4$*CH*$_2$*Br*)] (*IV*). К раствору 1 OE_{260} (0,013 мкмоль) соединения (III) в 25 мкл 0,5 М TEAB (pH 9) и 50 мкл DMFA добавляли 3 мг (10 мкмоль) N-оксисукцинимидного эфира *n*-бромметилбензойной кислоты в 50 мкл DMFA и 4 мкл (50 мкмоль) N-метилимидазола. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при 4° С и обессоливали на биогеле Р-2. Олигонуклеотидную фракцию анализировали методом МКХ на DEAE-целлюлозе в 7 М мочевине при pH 7,5 (рис. 2*б*). Выход соединения (IV) 75%.

5′-Фосфат 2′(3′)-О-n-азидобензоилгуанозина (VI). К раствору 30 OE_{260} (2 мкмоль) Na-соли pG в 50 мкл воды и 100 мкл DMFA добавляли раствор 10 мкмоль имидазолида *n*-азидобензойной кислоты в 100 мкл DMFA. Через 2 ч полученное соединение (VI) выделяли хроматографией на бензоилированной DEAE-целлюлозе. Выход соединения (VI) 85%, $\lambda_{макс}$ 275, $\lambda_{мин}$ 235 нм. Фотолиз водного раствора соединения (VI) проводили в 1-см кварцевых кюветах (методику см. под рис. 3).

Синтез 2′(3′)-О-n-азидобензоильного производного d(*TTGAATG*)*rG* (*V*). Ацилировали 4 OE_{260} (0,05 мкмоль) октануклеотида (II) 100-кратным избытком имидазолида *n*-азидобензойной кислоты [19] как описано выше. После обессоливания на биогеле Р-2 соединение (V) отделяли от непрореагировавшего октануклеотида (II) хроматографией на бензоилированной DEAE-целлюлозе. Выход соединения (V) 50%.

Авторы выражают глубокую благодарность А. С. Краеву и Н. В. Батчиковой за выполнение анализа гептануклеотида (I) методом Максама – Гилберта, В. Л. Друце и А. А. Пурмалю за помощь в проведении микроколоночной хроматографии олигонуклеотидов и их производных.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кнорре Д. Г.* Аффинная модификация белков, нуклеиновых кислот и их комплексов.– Молекулярн. биология, 1977, т. 11, № 6, с. 1304–1310.
2. *Гринева Н. И.* Химическое алкилирование в специфичных комплексах как метод исследования структуры и функций нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов.– Биохимия, 1977, т. 42, № 2, с. 370—374.
3. *Прокофьев М. А., Шабарова З. А.* Производные нуклеотидов и олигонуклеотидов – инструмент исследования в молекулярной биологии.– Молекулярн. биология, 1978, т. 12, № 2, с. 245–259.
4. *Potapov V. K., Veiko V. P., Koroleva O. N., Shabarova Z. A.* Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides on a grafted polymer support.— Nucleic Acids Res., 1979, v. 6, № 6, p. 2041–2056.
5. *Haseltine W. A., Maxam A. M., Gilbert W.* Rous sarcoma virus genome is terminally reductant: the 5′-sequence.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 3, p. 989.
6. *Berzin V., Borisova G. P., Cielens I., Gribanov V. A., Jansone I., Rosenthal G., Gren E. J.* The regulatory region of MS2 phage RNA replicase cistron. Functional activity of individual MS2 RNA fragment.— J. Mol. Biol., 1978, v. 119, № 1, p. 101.
7. *Metelev V. G., Rodionova N. P., Chichkova N. V., Atabekov J. G., Bogdanov A. A., Shabarova Z. A., Berzin V., Jansone I., Gren E. J.* Addressed fragmentation of RNA molecules. Determination of a specific cleavage site on MS2 bacteriophage RNA.— FEBS Lett., 1980, v. 120, № 1, p. 17–20.
8. *Ивановская М. Г., Поздняков П. И., Зельцер И. Э., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А.* Реагенты для модификации белков и нуклеиновых кислот. Синтез глиоксаль- и бромацилсодержащих амидов динуклеотида.– Докл. АН СССР, 1977, т. 236, № 4, с. 1022–1024.
9. *Соколова Н. И., Носова В. В., Шабарова З. А., Прокофьев М. А.* Новый метод синтеза амидов олигонуклеотидов.– Докл. АН СССР, 1972, т. 206, № 1, с. 129–131.
10. *Дженкс В.* Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972, с. 61–63.
11. *Цилевич Т. Л., Краевский А. А., Готтих Б. П.* Методы химического синтеза аминокислотных и пептидных эфиров нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов.– Успехи химии, 1972, т. 41, № 10, с. 1766–1787.
12. *Друца В. Л.* Получение меченных тритием олигодезоксирибонуклеотидов с мезитоилированным концевым фосфатом. Дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: МГУ, 1978. 168 с.
13. *Galardy R. E., Craig L. C., Jamieson J. D., Printz M. P.* Photoaffinity labeling of peptide hormone binding sites.— J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 11, p. 3510–3518.
14. *Sternbach H., Sprinzl M., Hobbs J. B., Cramer F.* Affinity labeling of tRNA nucleotidyltransferase from Baker's yeast with $tRNA^{Phe}$ modified on the 3′-terminus.— Eur. J. Biochem., 1976, v. 67, № 1, p. 215–221.
15. Синтезы органических препаратов. Сб. статей под ред. Б. А. Казанского. М.: Иностранная литература, 1952, т. 3, с. 462.
16. *Колобушкина Л. И., Флорентьев В. Л.* Улучшенный метод получения защищенных по аминогруппе гетероциклического основания нуклеозид-5′-фосфатов.– Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 11, с. 1467–1470.
17. *Gilham P. T., Khorana H. C.* Studies on polynucleotides. 1. A new and general method for the chemical synthesis of the $C_{5'}$–$C_{3'}$ internucleotidic linkage. Synthesis of deoxyribodinucleotides.— J. Amer. Chem. Soc., 1958, v. 80, № 23, p. 6212–6222.
18. *Грачев М. А.* Микроспектрофотометр МСФП-I и его применение для микроколоночной хроматографии и спектрального анализа олигонуклеотидов.– В кн.: Ультрамикроанализ нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1973, с. 104–122.
19. *Готтих Б. П., Краевский А. А., Пурыгин П. П.* Аминоацильные производные нуклеозидов, нуклеотидов и полинуклеотидов. 4. Синтез 3′(2′)-О-пептидил-нуклеотидов.– Изв. АН СССР. Сер. хим., 1970, № 5, с. 1104–1109.

Поступила в редакцию 16.II.1981

SYNTHESIS OF AFFINITY REAGENTS ON THE BASIS OF HEPTA-AND OCTADEOXYRIBONUCLEOTIDES COMPLEMENTARY TO A SITE OF MS2 BACTERIOPHAGE RNA

GOTTIKH M. B., IVANOVSKAYA M. G., VEIKO V. P., SHABAROVA Z. A.
M. V. Lomonosov State University, Moscow

Synthesis of d(TTGAATGp) and d(TTGAATG)rG oligonucleotides, which are complementary to the 1738-1745 site of the MS2 bacteriophage RNA, has been accomplished relying on a solid phase phosphodiester method and a stepwise blocking the internucleotide phosphate groups. From these an alkylating d[TTGAATGp($NHCH_2CH_2NH$·$COC_6H_4CH_2B$)] and a photoactivable d(TTGAATG)rG[2′(3′)$OCOC_6H_4N_3$-*p*] affinity reagents were prepared. New procedures for incorporating the reactive groupings at the oligodeoxyribonucleotide terminal phosphate or 3′-terminal *cis*-diol in mixed deoxyribo(ribo)oligonucleotides were exemplified with the synthesis of the above compounds. These methods can be used for the synthesis of affinity reagents as well as for various probes containing fluorescent, paramagnetic or immunochemical labels.