



УДК 547.9 : 542.953.2

## СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

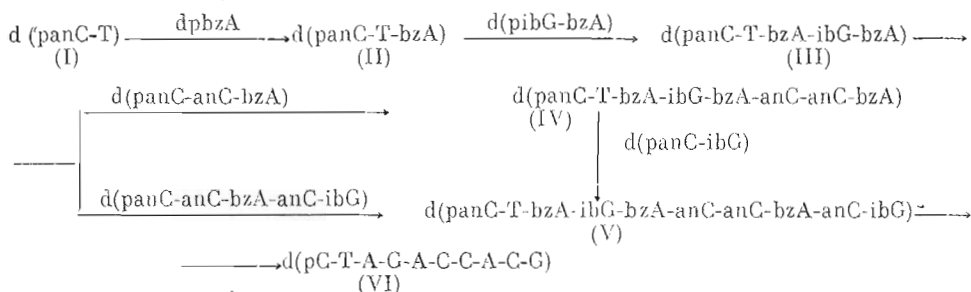
### V. СИНТЕЗ ДЕКАДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА, КОМПЛЕМЕНТАРНОГО УЧАСТКУ 6—15 ДРОЖЖЕВОЙ ВАЛИНОВОЙ тРНК<sub>1</sub> \*

*Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Вульфсон А. Н.,  
Колосов М. Н., Коробко В. Г., Чупрунова О. А.*

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

Осуществлен химический синтез декадезоксирибонуклеотида d(pC-T-A-G-A-C-C-A-C-G), комплементарного участку 6—15 дрожжевой валиновой тРНК<sub>1</sub>. Синтез проводился последовательным наращиванием 5'-концевого пентануклеотида три- и динуклеотидными блоками, а также прямым взаимодействием двух пентануклеотидов.

В развитие исследований по получению олиго- и полинуклеотидов с заданной последовательностью оснований мы предприняли химический синтез декадезоксирибонуклеотида d(pC-T-A-G-A-C-C-A-C-G), комплементарного участку 6—15 дрожжевой валиновой тРНК<sub>1</sub> и включающего ранее синтезированные нами последовательности 6—10 и 11—15 [3, 4]. Общая методология, использованная в этих синтезах, аналогична разработанной Х. Г. Кораной с соавт. [5] и заключается в построении олигонуклеотидного сегмента в направлении от 5'- к 3'-концу сочетанием ступенчатого и блочного наращивания нуклеотидной цепи. В качестве исходных мономеров использовали дезокситимидиловую (dpT), N<sup>6</sup>-бензоилдезоксинадениловую (d**pbz**A), N<sup>2</sup>-изобутирилдезоксигуаниловую (d**rib**G) и N<sup>4</sup>-анизоилдезоксцитидиловую (d**pan**C) кислоты, причем 5'-фосфатный остаток и 3'-гидроксил защищали, соответственно, β-цианэтильной и ацетильной группами; конденсирующими реагентами служили MS и TPS. Синтез декануклеотида (V) был осуществлен двумя путями (см. схему).



Один из них состоял в наращивании 5'-концевого звена, анизоилдезоксцитидиловой кислоты, последовательно двумя мононуклеотидами dpT и

\* Сообщение IV см. [1]. В настоящей статье использована система сокращений и символов, рекомендованная комиссией IUPAC-IUB [2]. Прочие сокращения: **ib** — изобутирил, **MS** — мезитиленсульфохлорид, **TPS** — триизопрпилбензолсульфохлорид, **TEAB** — триэтиламмонийбикарбонат.

dpbзА, затем динуклеотидом d(pibG-bzA), тринуклеотидом d(panC-anC-bzA) и, наконец, динуклеотидом d(panC-ibG). Использование в этом синтезе нуклеотидных компонентов, меньших по длине, чем нуклеозидные, позволило вводить в конденсацию относительно доступные короткие блоки в значительном избытке и тем самым повысить на каждой стадии выход целевого соединения. В другом варианте синтеза пентануклеотид (III) сразу превращался в декануклеотид (V) взаимодействием с пентануклеотидом d(panC-anC-bzA-anC-ibG). В этом случае — при взаимодействии довольно длинных блоков равной величины — применение избытка одного из компонентов оказалось нецелесообразным, так как затруднено регенерация веществ, не вступивших в реакцию, хотя отделение продукта конденсации от исходных соединений несколько упросталось.

Для идентификации синтезированных соединений использовали спектральные свойства, данные полного экзонуклеазного гидролиза и хроматографические характеристики, в особенности результаты микроколлонной анионообменной хроматографии в 7 М растворе мочевины при различных значениях рН с применением микроспектрофотометрической приставки МСФП-1 [6] (см. «Экспериментальную часть»). Первичная структура конечного декануклеотида (VI) была подтверждена картированием продуктов его частичного экзонуклеазного гидролиза. Для этого структурного анализа декануклеотид (VI) был 5'-дефосфорилирован действием щелочной фосфатазы *E. coli*, затем 5'-рефосфорилирован с помощью  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-АТР и Т4-полинуклеотидкиназы и, наконец, подвергнут расщеплению фосфодиэстеразой змеиного яда в мягких условиях. Образовавшуюся смесь продуктов частичного гидролиза разделяли электрофорезом на ацетилцеллюлозе и тонкослойной гомохроматографией на DEAE-целлюлозе во взаимно перпендикулярных направлениях. Положение меченых олигонуклеотидов на карте двухмерного разделения определяли с помощью радиоавтографии и относительные сдвиги интерпретировали в соответствии с эмпирическим правилом [7, 8]. Полученный фингерпринт (см. «Экспериментальную часть») свидетельствует о наличии в анализируемом веществе нуклеотидной последовательности-AGACCACG (5'-концевой d<sup>32</sup>pC оказалась за пределами гомохроматограммы, вследствие чего не удалось идентифицировать d(<sup>32</sup>pC-T) по сдвигу при отщеплении dpT).

Сравнение двух описанных выше путей синтеза декануклеотида (VI) показывает, что оба эти подхода могут быть с успехом использованы для получения достаточно длинных олигонуклеотидов.

### Экспериментальная часть

Использовали монодезоксирибонуклеотиды производства опытного химического цеха НИОХ СО АН СССР и СКТВ БАВ Главмикробиопроба (Новосибирск); для перевода в пиридиниевую форму их пропустили через колонку с дауэксом 50 (PyH<sup>+</sup>) в растворе 2 М водного пиридина и затем лиофилизировали. Цианэтильные и ацетильные производные нуклеотидов, получали, как описано ранее [3]. Для очистки и обезвоживания пиридина продажный препарат марки «ч» кипятили над гранулированным КОН, перегоняли последовательно над КОН, TosCl и снова КОН, а затем выдерживали над молекулярными ситами (4 Å). Хроматографию на бумаге ватман № 1 (длина полосы 47 см) проводили в нисходящем потоке в системе 96% EtOH — 1 М AcONH<sub>4</sub> 7:3, рН 7,5 (система А) или *n*-PrOH — конц. NH<sub>3</sub> — H<sub>2</sub>O 55:10:35 (система Б). Продукты олигонуклеотидного синтеза выделяли ионообменной хроматографией на колонках с DEAE-целлюлозой DE-23 и DE-32 («Whatman», Англия) или DEAE-сефадексом А-25 («Pharmacia», Швеция) в бикарбонатной или хлоридной форме при 4°, используя в качестве элюента, соответственно, водно-спиртовой раствор ТЕАВ или NaCl в 7 М мочевины. ТЕАВ-элюаты вдвое разбавляли пиридином и упаривали в вакууме при 20°, полностью удаляя триэтиламин повторным упариванием с пиридином, а остаток после упа-

ривания осаждали эфиром из пиридина. Выход определяли в оптических единицах (10Е<sub>280</sub> вещества в 1 мл раствора обуславливает оптическую плотность 1 см слоя раствора при 280 нм, равную единице) и рассчитывали в процентах от теоретического по соотношению числа молей продукта реакции и исходного вещества, взятого без избытка; за величину коэффициента молярной экстинкции олигонуклеотида при данной длине волны принимали сумму коэффициентов экстинкций мононуклеотидов (ε<sub>267</sub> 9600 для дрТ, ε<sub>302</sub> 22 430 для драпС, ε<sub>259</sub> 16 700 для дрпбГ и ε<sub>280</sub> 18 300 для дрбзА [9]) без учета гипохромизма.

1. *d(panC-T-bzA)* (II). 1,6 г (2,9 ммоль) дрбзА(Ас) высушили 5-кратным упариванием с пиридином, растворили в 10 мл пиридина и прибавили 2,5 г (11 ммоль) MS, смесь упарили до объема 5 мл, выдержали в течение 30 мин при 20° и прилили раствор 0,5 г (0,5 ммоль) d[(CNEt)panC-T] (получен описанным ранее способом [4] с выходом 49%) в 5 мл пиридина. Реакционную смесь сконцентрировали в вакууме до объема 5 мл и выдержали 5 ч при 20°. При охлаждении до -20° к смеси прибавили предварительно охлажденные 22 мл 1 М триэтиламина в пиридине и 22 мл воды и оставили на ночь при 4°. Затем обработали 50 мл 2 н. NaOH (20 мин, 0°) и нейтрализовали дауэксом 50 (РуН<sup>+</sup>) до рН 8. Катинит отфильтровали, промыли на фильтре 300 мл 2 М водного пиридина и объединенный фильтрат нанесли на колонку с DEAE-сефадексом (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>; 2,5 × 25 см). Хроматографировали в линейном градиенте ТЕАВ в 15%-ном спирте (3 л 0,1 М — 3 л 0,45 М), собирая фракции 20 мл/30 мин. Из фракций 200—250 (0,34—0,4 М) выделили 8450 ОЕ<sub>280</sub> (40%) тринуклеотида (II); R<sub>дрТ</sub> 0,77 (система А); λ<sub>макс</sub> 280 нм, ε<sub>280</sub>/ε<sub>302</sub> 1,51; ε<sub>280</sub>/ε<sub>260</sub> 1,95. Возврат динуклеотида (I) 8%, дрбзА 57%.

Раствор 20 ОЕ<sub>280</sub> тринуклеотида (II) в 2 мл конц. NH<sub>3</sub> выдержали 24 ч при 20° и 1 ч при 50°, трижды упарили в вакууме, отгоняя аммиак с водным спиртом, остаток растворили в 1 мл воды, амиды анисовой и бензойной кислот удалили экстракцией этилацетатом (2 × 1 мл) и водный раствор упарили, после чего хроматографировали на бумаге. Получили 10 ОЕ<sub>260</sub> d(pC-T-A), R<sub>дрТ</sub> 0,71 (система Б). Нуклеотидный состав: дрС — дрТ — дрА 1,0 : 1,1 : 1,0.

2. *d(pibG-bzA)*. а) Смесь 1,8 г (3,28 ммоль) d[(CNEt)pibG], 3,4 г (6,1 ммоль) дрбзА(Ас) и 1,8 г сухого дауэкса 50 (РуН<sup>+</sup>) высушили упариванием с пиридином как в опыте 1, растворили в 10 мл пиридина, прибавили 6 г (30 ммоль) дициклогексилкарбодиимида и перемешивали 72 ч при 20°. Раствор разбавили 10 мл воды, непрореагировавший карбодиимид проэкстрагировали циклогексаном (3 × 30 мл), водный слой отфильтровали, фильтрат обработали 20 мл 2 н. NaOH (20 мин, 0°) и нейтрализовали дауэксом 50 (РуН<sup>+</sup>). Продукты реакции хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>; 3,5 × 100 см) в линейном градиенте ТЕАВ в 15%-ном спирте (5 л 0,05 М — 5 л 0,2 М), собирая фракции по 25 мл/15 мин. Из фракций 200—250 (0,15—0,17 М) выделили 19 200 ОЕ<sub>270</sub> динуклеотида d(pibG-bzA), выход 30%; R<sub>дрТ</sub> 1,42 (система А); λ<sub>макс</sub> 260, 280 нм; ε<sub>250</sub>/ε<sub>260</sub> 0,87; ε<sub>270</sub>/ε<sub>260</sub> 0,97; ε<sub>280</sub>/ε<sub>260</sub> 1,07; ε<sub>290</sub>/ε<sub>260</sub> 0,95; ε<sub>302</sub>/ε<sub>260</sub> 0,49. Возврат дрпбГ 7%, дрбзА 45%.

В результате аммонолиза динуклеотида d(pibG-bzA) получили d(pG-A), R<sub>дрТ</sub> 1,15 (система Б); нуклеотидный состав: дрГ — дрА 1,0 : 1,1.

б) 3,14 г (6 ммоль), дрбзА(Ас) высушили, как в опыте 1, растворили в 15 мл пиридина, прибавили 5,4 г (17 ммоль) TPS и выдержали 2 ч при 20°. Реакционную смесь прилили к раствору 1,14 г (2 ммоль) d[(CNEt)pibG] в 10 мл пиридина, упарили до объема 20 мл и оставили на 6 ч при 20°. После обработки, как в опыте 1, хроматографировали на DEAE-целлюлозе (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>; 5 × 70 см) в линейном градиенте ТЕАВ в 10%-ном спирте (6 л 0,05 М — 6 л 0,35 М), собирая фракции по 32 мл/15 мин. Получили 28 500 ОЕ<sub>280</sub> (49%) d(pibG-bzA); возврат дрбзА 65%.

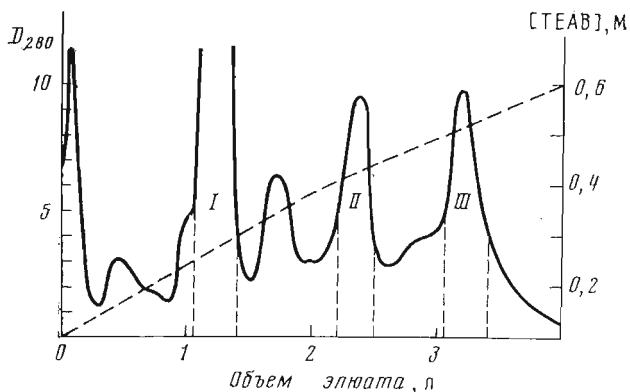


Рис. 1. Выделение пентануклеотида (III). Хроматография на колонке с ДЕАЕ-сефадексом ( $\text{HCO}_3^-$ ;  $2,5 \times 20$  см) в градиенте ТЕАВ в 20%-ном спирте, фракции по 10 мл/17 мин. Пик I содержит 7500  $\text{OE}_{280}$   $d(\text{pibG-bzA})$ , пик II — 2500  $\text{OE}_{280}$   $d(\text{panC-T-bzA})$  (II), пик III — 4500  $\text{OE}_{280}$  пентануклеотида (III)

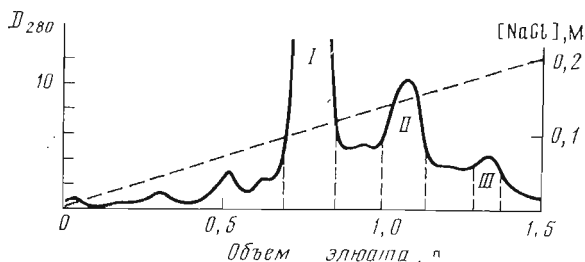


Рис. 2. Выделение октануклеотида (IV). Хроматография на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой ( $\text{Cl}^-$ ;  $2,5 \times 30$  см) в линейном градиенте  $\text{NaCl}$  в 7 М мочеvine, содержащей 0,02 М трис- $\text{HCl}$ , pH 7,5 (1 л 0 М — 1 л 0,25 М), фракции по 4,5 мл/15 мин. Пик I содержит 3700  $\text{OE}_{280}$   $d(\text{panC-anC-bzA})$ , пик II — 800  $\text{OE}_{280}$  пентануклеотида (III), пик III — 420  $\text{OE}_{280}$  октануклеотида (IV) с примесью 180  $\text{OE}_{280}$  пентануклеотида (III)

3.  $d(\text{panC-T-bzA-ibG-bzA})$  (III) получили взаимодействием 0,23 г (0,17 ммоль)  $d[(\text{CNet})\text{panC-T-bzA}]$ , 0,46 г (0,48 ммоль)  $d[\text{pibG-bzA}(\text{Ac})]$  и 0,55 г (2,53 ммоль) MS (4,5 ч, 20°). Реакционную смесь обработали, как в опыте 1, и хроматографировали на колонке с ДЕАЕ-сефадексом ( $\text{HCO}_3^-$ ) (см. рис. 1). Выход пентануклеотида (III) 4500  $\text{OE}_{280}$  (40%),  $R_{\text{дпТ}}$  0,35 (система А);  $\lambda_{\text{макс}}$  280 нм;  $\epsilon_{250}/\epsilon_{260}$  0,88;  $\epsilon_{270}/\epsilon_{260}$  1,06;  $\epsilon_{280}/\epsilon_{280}$  1,18;  $\epsilon_{290}/\epsilon_{260}$  1,07;  $\epsilon_{302}/\epsilon_{260}$  0,72. Возврат  $d(\text{panC-T-bzA})$  42%,  $d(\text{pibG-bzA})$  52%.

После аммонолиза получили  $d(\text{pC-T-A-G-A})$ ,  $R_{\text{дпТ}}$  0,34 (система Б); нуклеотидный состав:  $\text{dpC} - \text{dpT} - \text{dpA} - \text{dpG}$  1,0 : 1,0 : 1,9 : 1,0.

4.  $d(\text{panC-T-bzA-ibG-bzA-anC-anC-bzA})$  (IV) получили взаимодействием 1800  $\text{OE}_{280}$  (24 мкмоль)  $d[(\text{CNet})\text{panC-T-bzA-ibG-bzA}]$ , 8600  $\text{OE}_{280}$  (140 мкмоль)  $d[\text{panC-anC-bzA}(\text{Ac})]$  (см. [4]) и 190 мг (650 мкмоль) TPS в 2 мл пиридина (6 ч, 20°). По окончании реакции смесь вылили в эфир и осадок отделили центрифугированием. После щелочного гидролиза (2 мл 1 н.  $\text{NaOH}$  в 25%-ном пиридине, 20 мин при 0°) и нейтрализации катионитом хроматографировали на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой ( $\text{Cl}^-$ ) (см. рис. 2). Объединенные фракции, отвечающие пику октануклеотида (IV), разбавили двумя объемами воды и обессоливали на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ;  $2 \times 20$  см), отмывая от  $\text{Cl}^-$ -ионов 300 мл 0,05 М ТЕАВ и затем элюируя 200 мл 0,5 М ТЕАВ. Выделенное вещество (600  $\text{OE}_{280}$ ) рехроматографировали на ДЕАЕ-целлюлозе ( $\text{Cl}^-$ ;  $0,9 \times 30$  см) в линейном градиенте  $\text{NaCl}$  в 7 М мочеvine, содержащей 0,02 М трис- $\text{HCl}$

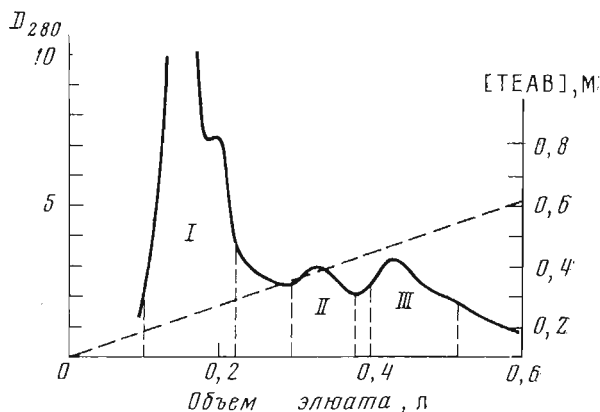


Рис. 3. Выделение декануклеотида (V) (опыт 5а). Хроматография на колонке с DEAE-сефадексом ( $\text{HCO}_3^-$ ;  $0,7 \times 25$  см) в линейном градиенте ТЕАВ в 20%-ном спирте (0,4 л 0,1 М — 0,4 л 0,8 М), фракции по 2 мл/20 мин. Пик I содержит 1260  $\text{OE}_{280}$  d(panC-ibG), пик II — 150  $\text{OE}_{280}$  октануклеотида (IV), пик III — 295  $\text{OE}_{280}$  декануклеотида (V).

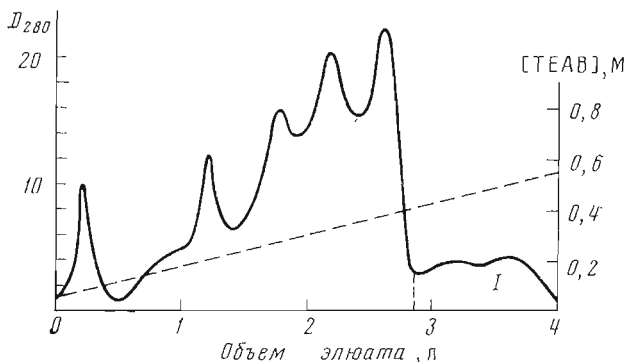


Рис. 4. Выделение декануклеотида (V) (опыт 5б). Хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ;  $2,5 \times 35$  см) в линейном градиенте ТЕАВ в 25%-ном спирте (3 л 0,1 М — 3 л 0,75 М), фракции по 10 мл/12 мин. Пик I (3000  $\text{OE}_{280}$ ) содержит декануклеотид (V).

(0,25 л 0,1 М — 0,25 л 0,22 М), собирая фракции по 4 мл/30 мин. После обессоливания, как описано выше, получили 420  $\text{OE}_{280}$  (14%) октануклеотида (IV),  $R_{\text{дрт}} 0,22$  (система А),  $\lambda_{\text{макс}} 283$  нм,  $\epsilon_{250}/\epsilon_{260} 0,88$ ;  $\epsilon_{270}/\epsilon_{280} 1,13$ ;  $\epsilon_{280}/\epsilon_{260} 1,30$ ;  $\epsilon_{290}/\epsilon_{260} 1,23$ ;  $\epsilon_{302}/\epsilon_{260} 1,06$ . Возврат пентануклеотида (III) 44%, тринуклеотида d(panC-anC-bzA) 43%.

После аммонолиза (72 ч при  $20^\circ$ , 3 ч при  $50^\circ$ ) получили d(pC-T-A-G-A-C-C-A).  $R_{\text{дрт}} 0,19$  (система Б), нуклеотидный состав: dpC — dpA — dpG — dpT 2,8 : 2,7 : 1,0 : 1,3.

5. d(panC-T-bzA-ibG-bzA-anC-anC-bzA-anC-ibG) (V). а) Получили конденсацией 800  $\text{OE}_{280}$  (7,5 мкмоль) d(CNEt)panC-T-bzA-ibG-bzA-anC-anC-bzA) и 1500  $\text{OE}_{280}$  (52 мкмоль) d(panC-ibG(Ac)) (см. [4]) в присутствии 90 мг (298 мкмоль) TPS в 0,5 мл пиридина (4,5 ч,  $20^\circ$ ). Реакционную смесь при  $-20^\circ$  обработали 0,7 мл 1 М пиридинового раствора триэтиламина, затем 0,7 мл воды и оставили на ночь при  $4^\circ$ . После гидролиза 2 мл 2н. NaOH (20 мин,  $0^\circ$ ) и нейтрализации дауэксом 50 ( $\text{PuH}^+$ ) хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом ( $\text{HCO}_3^-$ ) (см. рис. 3). Выход декануклеотида (V) 295  $\text{OE}_{280}$  (29%),  $R_{\text{дрт}} 0,18$  (система А),  $\epsilon_{250}/\epsilon_{260} 0,87$ ;  $\epsilon_{270}/\epsilon_{260} 1,05$ ;  $\epsilon_{280}/\epsilon_{260} 1,26$ ;  $\epsilon_{290}/\epsilon_{260} 1,29$ ;  $\epsilon_{302}/\epsilon_{260} 1,11$ . Возврат октануклеотида (IV) 19%, динуклеотида d(panC-ibG) 84%.

б) Получен конденсацией 7200 ОЕ<sub>280</sub> (0,105 ммоль) d[(CNEt)panC-T-bzA-ibG-bzA] с 11 300 ОЕ<sub>280</sub> (0,135 ммоль) d[panC-anC-bzA-anC-ibG(Ac)] (см. [4]) в присутствии 324 мг (1,07 ммоль) TPS в 3 мл пиридина (7 ч, 20°). После обработки, как в опыте 5а, хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>) (см. рис. 4). Фракции 290—390 (3000 ОЕ<sub>280</sub>) упарили досуха, растворили в 50 мл 7 М мочевины, содержащей 0,02 М трис-НСl (рН 7,5), нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (Cl<sup>-</sup>; 1,6 × 40 см) и хроматографировали в линейном градиенте концентрации NaCl

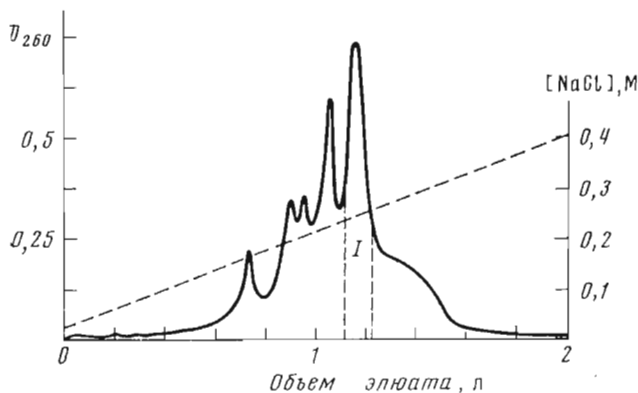


Рис. 5. Хроматография декануклеотида (VI) на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl<sup>-</sup>; 1,6 × 32 см) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine, содержащей 0,01 М трис-НСl, рН 7,5 (1 л 0,05 М — 1 л 0,4 М), фракции по 5 мл/10 мин. Пик I содержит 40 ОЕ<sub>280</sub> декануклеотида (VI)

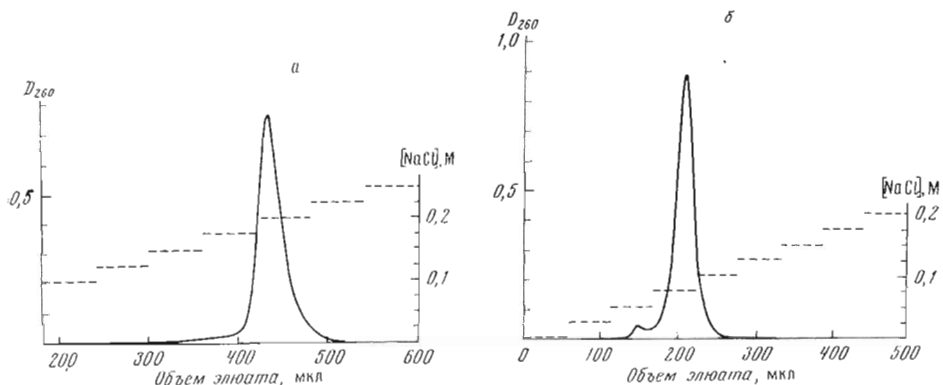


Рис. 6. Микроколоночная хроматография декануклеотида (VI). Колонка с DEAE-целлюлозой (Cl<sup>-</sup>; 0,8 × 80 мм); градиент концентрации NaCl в 7 М мочеvine, содержащей 0,02 М трис-НСl, скорость 360 мкл/ч; регистрация поглощения при 260 нм с помощью микроспектрофотометрической приставки МСФП-1; а — при рН 7,0, б — при рН 3,5

(1 л 0,05 М — 1 л 0,3 М) в том же растворе. Фракции, соответствующие декануклеотиду (V) ( $\epsilon_{280}/\epsilon_{302}$  1,13), объединили, разбавили водой и обессолили на колонке с DEAE-целлюлозой (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>; 1 × 35 см), как в опыте 4. Получили 2100 ОЕ<sub>280</sub> (13%) защищенного декануклеотида (V). Часть этого вещества (100 ОЕ<sub>280</sub>) обработали 5 мл 25% NH<sub>3</sub> (72 ч. при 20°, затем 3 ч при 50°), раствор проэкстрагировали этилацетатом (2 × 2 мл) и эфиром (3 × 2 мл), упарили досуха, растворили в 2 мл 7 М мочевины, содержащей 0,01 М трис-НСl (рН 7,5), и хроматографировали на DEAE-целлюлозе (Cl<sup>-</sup>) (см. рис. 5). Объединенные фракции, соответствующие декануклеотиду (VI), обессолили на колонке с DEAE-целлюлозой (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>; 1,8 × 5 см). Получили 40 ОЕ<sub>260</sub> незащищенного декануклеотида (VI),  $R_{dPT}$  0,11 (система Б);  $\lambda_{max}$  260 нм (рН 7) и 267 нм (рН 1);  $\epsilon_{250}/\epsilon_{260}$  0,86;

$\epsilon_{270}/\epsilon_{260}$  0,88;  $\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$  0,62;  $\epsilon_{290}/\epsilon_{260}$  0,21 (рН 7);  $\epsilon_{250}/\epsilon_{260}$  0,76;  $\epsilon_{270}/\epsilon_{260}$  1,02;  $\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$  0,87,  $\epsilon_{290}/\epsilon_{260}$  0,88 (рН 1,0); нуклеотидный состав:  $dpT - dpG - dpA - dpC$  1,0 : 1,9 : 2,9 : 4,1 (результаты микроколоночной хроматографии см. рис. 6).

6. Получение и частичный гидролиз меченого декануклеотида (VI). Дефосфорилирование проводили иммобилизованной щелочной фосфатазой *E. coli* (КФ 3.1.3.4) в условиях, описанных в работе [10], 5'-рефосфорилирование с помощью  $^{32}\gamma$ -P-ATP (о его получении см [11]) и T4-полинук-

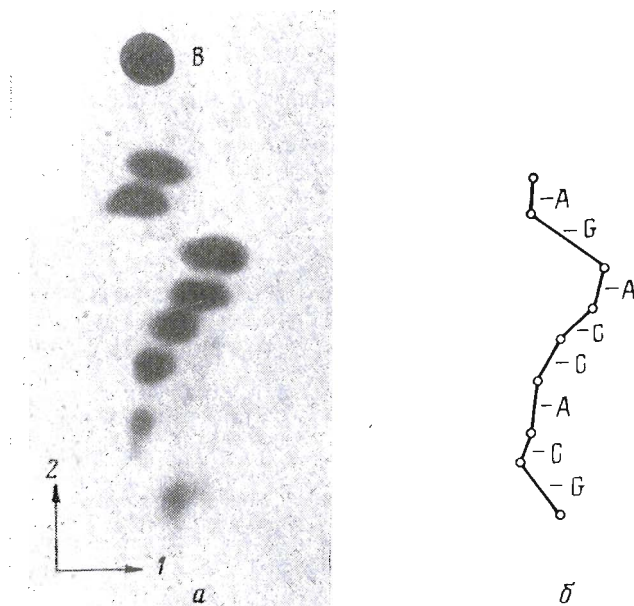


Рис. 7. Двухмерное разделение частичного гидролизата декануклеотида  $d(^{32}pC-T-A-G-A-C-C-A-C-G)$  из опыта 6 (B — ксиленианол FF). Первое направление — электрофорез на ацетилцеллюлозе при рН 3,5, второе — гомохроматография на DEAE-целлюлозе; а — радиоавтограмма, б — схема

леотидкиназы (КФ 2.7.1.78) — по методике [12], а частичный гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда (КФ 3.1.4.1). («Worthington», США) — как описано в работе [13]. Электрофорез на ацетилцеллюлозе (3 × 55 см; «Schleicher und Schüll», ФРГ) проводили при напряжении 5 кВ в течение 50 мин в пиридин-ацетатном буфере, рН 3,5 [14]. Для гомохроматографии (условия см. в работе [15]) на стеклянные пластинки (20 × 20 см) накатывали гомогенизированную и дегазированную суспензию, содержащую 1 г DEAE-целлюлозы DE-41 («Whatman», Англия), 7,5 г целлюлозы MN-300 («Serva», ФРГ) и 50 мл воды; полученный фингерпринт приведен на рис. 7.

Авторы выражают благодарность М. Ф. Шемякину и А. В. Честухину (Институт биоорганической химии АН СССР) за предоставленный препарат T4-полинуклеотидкиназы.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Berlin Yu. A., Chakhmakhcheva O. G., Efimov V. A., Kolosov M. N., Korobko V. G. (1973) *Tetrahedron Lett.*, 1353, 1354.
- Eur. J. Biochem.* (1970) 15, 203—208.
- Бадашкева А. Г., Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ивановская М. Г., Кворре Д. Г., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Прокофьев М. А., Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Шубина Г. И. (1973) *Химия природы. соедин.*, 394—402.

4. 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.*, 402—410.
5. Agarwal K. L., Yamazaki A., Cashion P. J., Khorana H. G. (1972) *Angew. Chem.*, 84, 489—498.
6. Кузьмин С. В. (1973) в сб. *Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот* (под редакцией Кнорре Д. Г. и Венкстерн Т. В.), стр. 95—103, «Наука», М.; Грачев М. А., там же, стр. 104—122.
7. Ling V. (1972) *J. Mol. Biol.*, 64, 87—102.
8. Galibert F., Sedat J., Ziff E. (1974) *J. Mol. Biol.*, 87, 377—407.
9. Kumar A., Khorana H. G. (1969) *J. Amer. Chem. Soc.*, 91, 2743—2749.
10. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) *Биохимия*, 39, 747—751.
11. Glynn I. M., Chappell J. B. (1964) *Biochem. J.*, 90, 147—149.
12. Sgaramella V., Khorana H. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, 72, 427—443.
13. Brownlee G. G., Sanger F. (1969) *Eur. J. Biochem.*, 11, 395—399.
14. Sanger F., Brownlee G. G. (1967) in *Methods of Enzymology*, v. XII, part A, pp. 361—381, Academic Press, New York — London.
15. Brownlee G. G. (1972) *Determination of Sequences in RNA*, pp. 136—142, American Elsevier, New York.

Поступила в редакцию  
3.II.1975

#### SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES.

#### V. THE SYNTHESIS OF THE DECADEOXYRIBONUCLEOTIDE COMPLEMENTARY TO THE 6-15 SEGMENT OF THE YEAST tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup>

BERLIN Yu. A., BOLDYREVA E. F., WULFSON A. N.,  
KOLOSOV M. N., KOROБKO V. G., CHUPRUNOVA O. A.

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

Decadeoxyribonucleotide dpC-T-A-G-A-C-C-A-C-G complementary to the 6-15 segment of the yeast tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> has been chemically synthesized from 5'-terminal dinucleotide by sequential condensations with mono-, di-, tri- and dinucleotide, or with mono-, di- and pentanucleotide.

---