



УДК 547.963.32.057 : 542.95

© 1991 г.

*С. Шмидт, Л. Г. Бузнецова, Е. А. Романова,
А. Нимани, Т. С. Ореукая, Н. Ф. Брынецкая,
В. Г. Метелев*, З. А. Шабарова*

ГИБРИДАЗНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ РНК

IV *. ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ЗОНДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ 2'-ДЕЗОКСИ-2'-ФТОРНУКЛЕОЗИДЫ И АРАБИНОФУРАНОЗИЛЦИТОЗИН

*Химический факультет и *межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Разработан способ синтеза модифицированных синтонов для амидофосфитной схемы твердофазного синтеза олигонуклеотидов, позволяющий вводить в олигонуклеотидную цепь пиримидиновые 2'-дезоксидеокси-2'-фторнуклеозиды. Опробованы два пути получения олигонуклеотидов, содержащих 1-β-D-арабинофуранозилцитозин (аС), с использованием либо производного аС со свободной 2'-ОН-группой, либо производного О²,2'-ангидро-4-тиоксоуридина. Описан синтез 7 модифицированных олигонуклеотидов (от 7 до 11 нуклеотидных звеньев). Изучена их способность образовывать дуплексы с комплементарными ДНК-матрицами, оценены субстратные свойства гибридных дуплексов, образованных 5S РНК рибосом *E. coli* и синтезированными олигонуклеотидными зондами, по отношению к РНКазе Н из *E. coli*.

Модифицированные по углеводному фрагменту олигонуклеотиды представляют собой интересные «антисенсовые» агенты, при их использовании повышается специфичность действия зонда на мишень в системах, содержащих РНКазу Н. Ранее нами было показано, что использование модифицированных олигонуклеотидных зондов, содержащих как 2'-деоксирибо-, так и 2'-О-метилрибо- или рибонуклеозидные звенья, позволяет провести региоспецифическое гибридазное расщепление РНК [2, 3].

В продолжение этих работ настоящее исследование посвящено синтезу и изучению свойств олигонуклеотидов, в состав которых входят 2'-дезоксидеокси-2'-фторпиримидиновые нуклеозиды и арабинофуранозилцитозин. Олигонуклеотидные зонды с такими модификациями в отличие от смешанных олиго(рибо-деоксирибо)нуклеотидных зондов устойчивы при щелочных значениях рН, а также к действию рибонуклеаз.

Исследование проводилось на модельной системе: 5S РНК рибосом *E. coli* — модифицированные олигонуклеотидные зонды, структуры которых представлены ниже:

- | | |
|---|-------|
| (ACCA)аС(CG) | (I) |
| (ACCA)C ^{fl} (CG) | (II) |
| (ACCA)C ^{fl} (CG)C ^{fl} (GCT) | (III) |
| (ACCA)C ^{fl} (CG)C ^{fl} (G)C ^{fl} (T) | (IV) |
| (ACCA)C ^{fl} C ^{fl} (G)C ^{fl} (G)C ^{fl} (T) | (V) |
| (CTAC)U ^{fl} (C)U ^{fl} (CGC) | (VI) |
| (C)U ^{fl} (AC)U ^{fl} (CTCGC) | (VII) |

Синтез олигонуклеотидов с модифицированными звеньями предполагает решение двух проблем: получение модифицированного синтона и выбор методов анализа, подтверждающих наличие аномального звена в заданном положении олигонуклеотидного зонда.

* Сообщение III см. [1]. Использованные сокращения: префикс «d» опущен; 2'-деоксирибонуклеотиды заключены в скобки; U^{fl} — 2'-дезоксидеокси-2'-фторуридин, C^{fl} — 2'-дезоксидеокси-2'-фторцитидин, аС — 1-β-D-арабинофуранозилцитозин (арабиноцитидин).

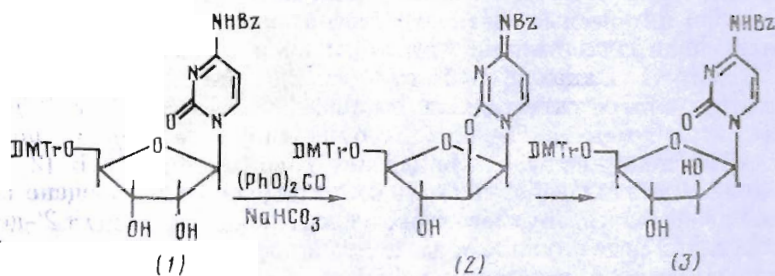
Синтез 2'-фторуридина осуществлялся из O²,2'-ангидроуридина [4, 5], обработкой последнего HF в диоксане. Попытки использовать данный способ для получения 2'-фторцитидина не удалось вследствие крайней неустойчивости O²,2'-ангидроцитидина.

Схема получения 2'-фторцитидина из 2'-фторуридина была разработана в лаборатории Д. Цеха [6]. 4-Тетразолидное производное U¹¹ при переаминировании с последующим удалением защитных групп приводит к искомому C¹¹.

При конструировании синтонов на основе арабинонуклеозидов необходимо блокировать 2'-гидроксильную группу сахара. Ранее [7] в нашей лаборатории был предложен метод введения арабиноуридина в олигонуклеотидную цепь в виде его O²,2'-ангидропроизводного. Таким образом, была решена проблема защиты 2'-гидроксила. При аммиачной обработке олигонуклеотида наряду с удалением защитных групп происходит раскрытие ангидроцикла с образованием арабиноуридина. В настоящей работе нами был усовершенствован метод синтеза ангидропроизводного уридина — замыкание цикла дифенилкарбонатом проводится на 5'-O-диметокситрилуридине. В этом случае выход 5'-O-диметокситритил-O²,2'-ангидроуридина повышается и продукт может быть легко выделен путем его экстракции хлороформом с последующей адсорбционной колоночной хроматографией на силикагеле в системе хлороформ — этанол (95 : 5).

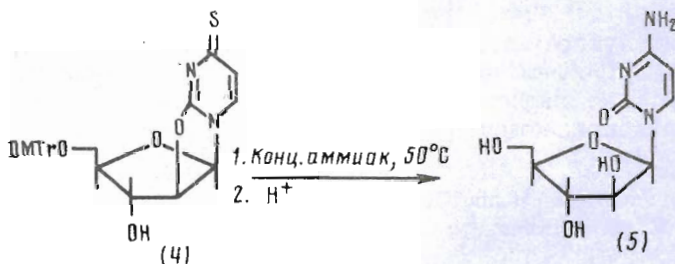
Использовать эту методику для получения производного O²,2'-ангидроцитидина из 5'-O-диметокситритил-4-N-бензоилцитидина (1) не удается. При колоночной хроматографии на силикагеле наблюдается количественное превращение неустойчивого O²,2'-ангидросоединения (2) в производное арабиноцитидина (3) (схема 1).

Схема 1



В связи с этим для введения арабиноцитидина в олигомер были использованы два метода. Первый предполагает включение в олигонуклеотидную цепь мономерного синтона на основе 4-тиоксо-O²,2'-ангидроуридина, который при аммиачной обработке олигомера должен превратиться в арабиноцитидин. Нами был получен и охарактеризован данными УФ- и ПМР-спектроскопии 5'-O-диметокситритил-4-тиоксо-O²,2'-ангидроуридин (4), который далее обрабатывали конц. аммиаком 16 ч при 50° С, а затем детритилировали (схема 2). Анализ обращенно-фазовой ВЭЖХ показал полное превращение исходного нуклеозида в искомый арабиноцитидин (5):

Схема 2

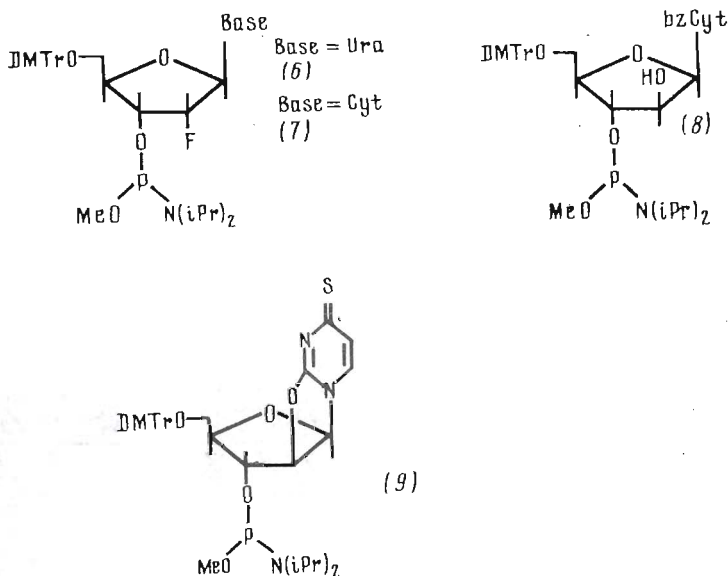


Второй путь — использование в олигонуклеотидном синтезе 3'-амидофосфитного синтона арабиноцитидина, не блокированного по 2'-гидроксильной группе. Ранее был описан такой способ для получения олигонуклеотидов с арабиноуридином и арабиноаденозином [8].

Необходимо отметить, что аналогично 2'-дезокситидину бензоилирование по экзоциклической аминогруппе 2'-деокси-2'-фторцитидина и арабиноцитидина легко протекает при обработке нуклеозидов бензойным ангидридом в абс. этаноле в течение 1 ч (в отличие от цитидина). 5'-О-Диметокситритилирование и фосфитилирование природных и модифицированных нуклеозидов проводили по известным методикам [9]. Фосфитилирование 5'-О-диметокситриил-4-N-бензоил-(1-β-D-арабинофуранозил)цитозина, судя по ТСХ и ¹H-ЯМР-спектру, приводит преимущественно к 3'-фосфитилированному продукту (от 2',3'-бисфосфитилированного нуклеозида отделились при хроматографической очистке на силикагеле).

Синтоны (6)—(9) на основе соответственно 2'-деокси-2'-фторуридина, 2'-деокси-2'-фторцитидина, арабиноцитидина и 4-тиоксо-О²,2'-ангидроуридина были введены в амидофосфитный олигонуклеотидный синтез по стандартной схеме получения олигодезоксирибонуклеотидов на автоматическом ген-синтезаторе «Виктория-4М» [7].

Схема 3



Твердофазный синтез осуществляли на полимерных носителях на основе CPG со средними выходами на стадию 90—96%. Гептануклеотид (I) и модельный пентануклеотид TТаСТТ (VIII) были получены в двух вариантах с использованием синтонов (8) и (9). Модифицированные олигонуклеотиды деблокировали по стандартной схеме и выделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, используя гидрофобные свойства 5'-диметокситритильной группы, с последующим детритилированием целевых продуктов. Выделение целевых олигонуклеотидов, модифицированных введением фтора в 2'-положение углеводного фрагмента пиримидиновых нуклеозидов (II)—(VII), не представляло трудностей.

При ВЭЖХ-анализе всех реакционных смесей после синтеза олигонуклеотидов, содержащих арабиноцитидин, обнаружено, что соотношение целевого и побочного продуктов составляло 4 : 1 (см., например, рис. 1). При использовании синтона (8) побочный продукт (20%) представляет собой олигомер с 2'-5'-неприродной связью в положении модификации (при секвенировании по Максому — Гилберту наблюдается «пропуск» в месте модификации и время ферментативного гидролиза увеличивается до 3 ч), причиной чего может быть образование 2'-амидофосфита при получении нуклеотидного синтона (8).

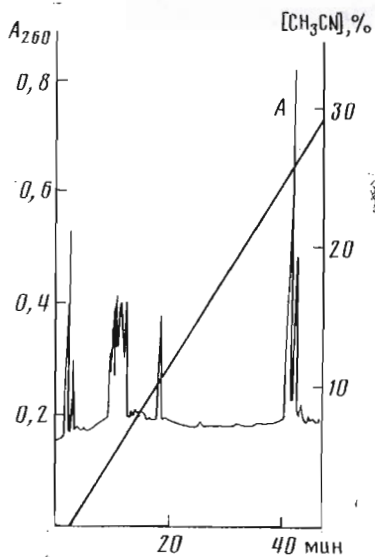


Рис. 1

Рис. 1. Обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционной смеси, полученной при синтезе гептануклеотида DMTr(ACCA)-аС(С). Пик А — целевой продукт. Условия приведены в «Экспер. части»

Рис. 2. Анализ нуклеозидного состава модифицированных олигонуклеотидов (III)–(VII) после их гидролиза смесью щелочной фосфатазы и фосфодиэстеразы змеиного яда, методом ВЭЖХ (Лихросорб С-18, 10 мкм, колонка — 4,6 × 250 мм, в градиенте концентрации (0–12%) ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония, скорость элюции при 20° С 1 мл/мин)

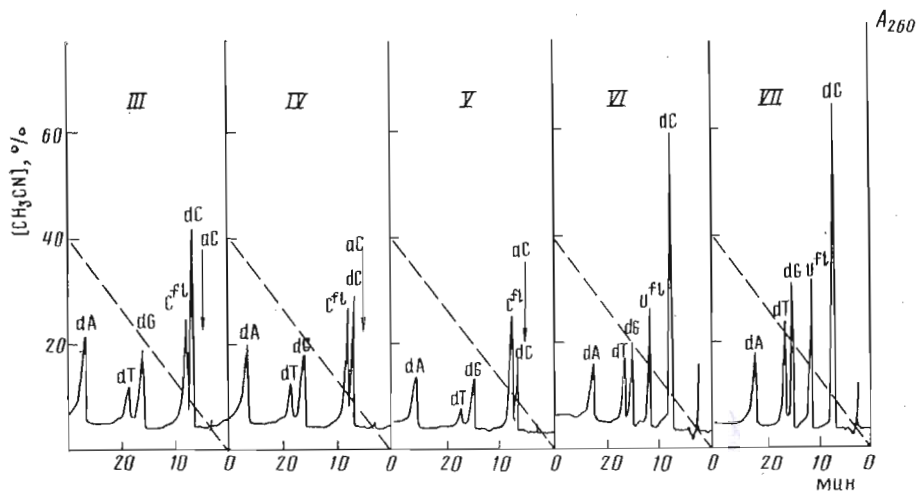


Рис. 2

При использовании синтона (9) побочный продукт (20%) представляет собой олигонуклеотид, содержащий арабиноуридин вместо арабиноцитидина, что можно объяснить следующим образом. Реакционноспособная 4-тиоксогруппа может подвергаться атаке амидофосфитным производным дезоксинуклеозида, активированным тетразолом, давая аддукт, который частично разрушается при кэпировании с образованием производного урацила. Альтернативой является сохранение аддукта, который при обработке аммиаком дает искомое производное цитозина.

Итак, оба рассмотренных способа получения арабиноцитидинсодержащих олигонуклеотидов можно применять только при синтезе олигомеров (до 12–15 нуклеотидных звеньев) с единственным модифицированным звеном. Введение в олигонуклеотид двух или более арабиноцитидиновых звеньев приведет к большому набору продуктов, в котором крайне трудно идентифицировать целевой продукт.

Для доказательства нуклеозидного состава полученных олигомеров был проведен исчерпывающий ферментативный гидролиз последних смесью щелочной фосфатазы и фосфодиэстеразы змеиного яда с последующим анализом гидролизата ВЭЖХ (см. рис. 2). Анализ подтвердил наличие модифицированных нуклеозидов в олигонуклеотидах (I)–(VII). Нуклеотидная последовательность олигонуклеотидов (II)–(VII) была подтверждена также методом Максама — Гилберта.

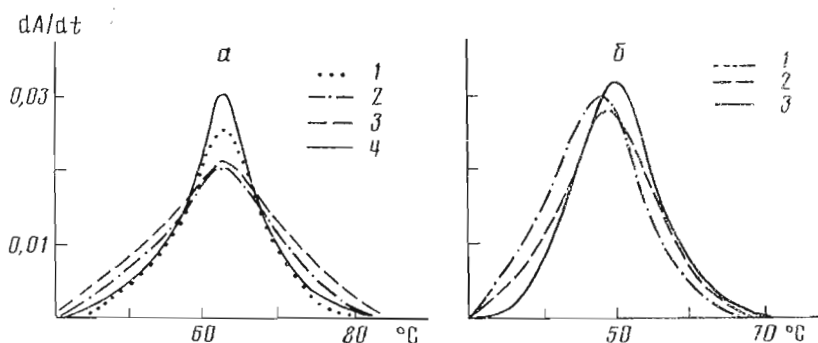


Рис. 3. Дифференциальные кривые плавления дуплексов, образованных олигонуклеотидами (III) (1), (IV) (2), (V) (3) и d(ACCACCGCGCT) (4) с d(GTAGCGCGGTGGTCCC) (а), а также олигонуклеотидами (VI) (1), (VII) (2) и d(CTACTCTCGC) (3) с d(TGCGAGAGTAGG) (б), в SSC-буфере (0,15 М NaCl, 0,015 М цитрат натрия, рН 7,25), $c_0 = 0,3 \cdot 10^{-4}$ М

Использование модифицированных олигонуклеотидов (I)–(VII) в качестве зондов требует оценки изменений конформации и устойчивости дуплексов, образующихся при взаимодействии олигонуклеотидного зонда с НК-мишенью. Нами была изучена методом УФ-спектроскопии термическая устойчивость комплексов, образованных олигонуклеотидами (IV)–(VII) и комплементарными им олигодезоксирибонуклеотидами, синтезированными нами. Из дифференциальных кривых плавления модифицированных дуплексов, содержащих 2'-дезоксид-2'-фторнуклеозиды, видно (рис. 3), что введение модифицированных звеньев в олигонуклеотидный зонд не приводит к существенному изменению термической стабильности модифицированных НК-дуплексов по сравнению с ДНК-ДНК-дуплексами.

Для оценки конформационных изменений структуры дуплексов, образованных модифицированными зондами и комплементарными ДНК-матридами, использовали метод КД. Согласно полученным результатам (см. рис. 4), с увеличением в олигонуклеотидном зонде числа 2'-дезоксид-2'-фторнуклеозидов, закрепляющих СЗ'-эндо(N)-конформацию сахарного кольца, заметно увеличивается вклад элементов А-формы в двойную спираль. Следует отметить, что конформационные изменения, индуцированные введением 2'-дезоксид-2'-фторнуклеозидов, аналогичны введению 2'-О-метилцитидина [2].

Все синтезированные олигонуклеотидные зонды (I)–(VII) были использованы в комплексе с 5S РНК рибосом *E. coli* как субстраты РНКазы Н из *E. coli*, которая катализирует гидролиз РНК внутри гибридных дуплексов. Как видно из рис. 5, количество и положение модифицированных нуклеозидов в олигонуклеотидном зонде изменяют число гидролизуемых фосфодиэфирных связей в РНК. Региоспецифичный гидролиз наблюдается лишь при использовании зонда (V). Подробные данные по сравнению эффективности гидролиза РНК в присутствии зондов, различающихся структурой углеводофосфатного остова, будут опубликованы в следующем сообщении.

Таким образом, в настоящей работе было показано, что полученные описанным методом олигонуклеотиды, содержащие модифицированные нуклеозиды пиримидинового ряда, образуют устойчивые НК-дуплексы; кроме того, такие модифицированные ДНК-РНК-гибриды служат субстратами бактериальной РНКазы Н.

Экспериментальная часть

В работе использовали 1-β-D-арабинофуранозилцитозин («цитарабин» экспериментального завода ИОС АН ЛатвССР); уридин (Reanal, Венгрия), 5'-О-диметокситригил-3'-(N,N-диизопропиламино)-β-цианэтилфосфиты 2'-дезоксидрибонуклеозидов (Pharmacia, США); N-метилимидазол, тетразол, триметилхлорсилан, диметокситригилхлорид, реагент Лоуссона (Fluka,

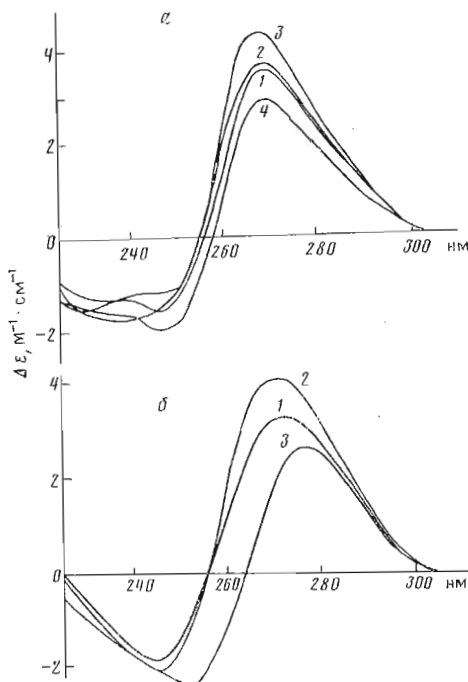


Рис. 4. Спектры КД-дуплексов, образованных ДНК-матрицей и олигонуклеотидами (III) (1), (IV) (2), (V) (3) и d(ACCACCGCGCT) (4) (а), а также олигонуклеотидами (VI) (1), (VII) (2) и d(CTACTCTCGC) (3) (б). Условия см. в подписи к рис. 3. Температура 20° С

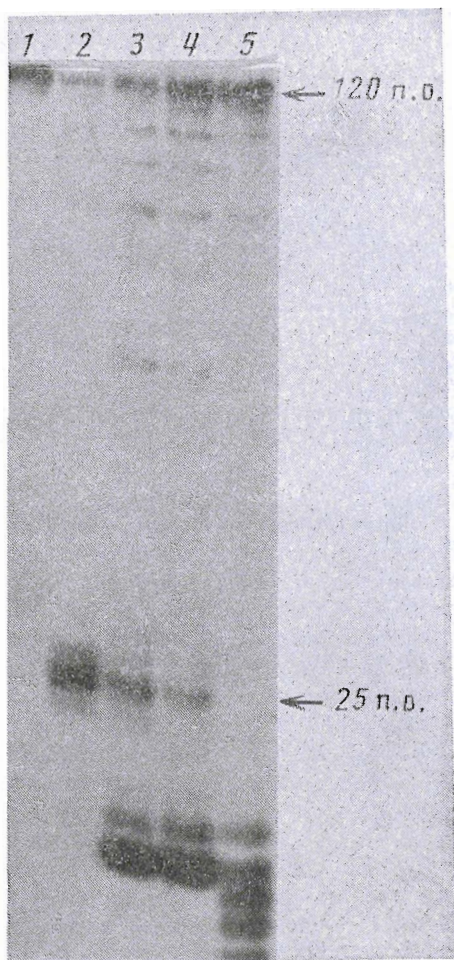


Рис. 5. Авторадиограмма разделения в 20% ПААГ продуктов гидролиза 5'-³²P-меченого фрагмента 1—41 5S РНК после инкубации с РНКазой Н (30 мин, 25° С) в присутствии олигонуклеотидов (V), (IV), (III) (дорожки 2—4) и d(ACCACCGCGCT) (дорожка 5). Дорожка 1 — исходная РНК

Швейцария); щелочную фосфатазу и фосфодиэстеразу змеиного яда (Sigma, США); рибонуклеазу Н (РНКазы Н), 5S РНК рибосом *E. coli* (НПО «Биолар»).

Олигонуклеотидный синтез выполняли на автоматическом ген-синтезаторе «Виктория-4М» производства СКТБ специальной электроники и аналитического приборостроения СО АН СССР.

В качестве полимерного носителя использовали dN-Isaa-CPG (Cruachem, Великобритания) с загрузкой первым нуклеозидным звеном 20—24 мкмоль/г.

¹H- и ³¹P-ЯМР-спектры (в CDCl₃) записаны на приборе VXR-400 (Varian, США); УФ-спектры регистрировались на спектрофотометре 150-20 (Hitachi, Япония).

Кривые температурной зависимости УФ-поглощения регистрировали на спектрофотометре «Cary-219» (США), снабженном термостатированным кюветодержателем в блоком для измерения температуры, при непрерывном повышении температуры со скоростью 1° С/мин (длина оптического пути 1 мм). КД-спектры снимали на дихрографе «Jouan-III» (Франция) при комнатной температуре.

2'-Дезокси-2'-фторуридин (Uⁿ) синтезировали по методике [5].

2'-Дезокси-2'-фторцитидин (C^{11}) получали методом, разработанным Д. Цехом и сотр. [6].

Бензоилирование экзоциклических аминогрупп аС, C^{11} и 5'-С-триметилрование молифицированных нуклеозидов проводили по методикам [9, 10].

5'-О-Диметокситритил-О²,2'-ангидро-4-тиоксоуридин (4)

а) 5'-О-Диметокситритил-2',3'-О-дibenзоилуридин (10) получали, используя в качестве ацилирующего реагента бензойный ангидрид в присутствии диметиламинопиридина [9].

б) Синтез 5'-О-диметокситритил-2',3'-О-дibenзоил-4-тиоксоуридина (11) осуществляли аналогично описанному в работе [11]. 0,76 г (1 ммоль) соединения (10) высушивали переупариванием в вакууме с абсолютным пиридином (3 × 2 мл) и растворяли в 10 мл смеси растворителей диоксан — абсолютный пиридин (4 : 1), добавляли 0,36 г (1,2 ммоль) реагента Лоуссона (2,4-бис(4-метоксифенил)-1,3-дитио-2,4-дифосфетан-2,4-дисульфид). Реакционную смесь кипятили 1,5 ч. Полноту прохождения реакции контролировали ТСХ в системе хлороформ — этанол (95 : 5), R_f соединения (11) 0,79. Реакционную смесь охлаждали и добавляли 3 мл воды, концентрировали, растворяли в 20 мл хлороформа и промывали 0,1 М ТЕАВ, рН 7,5 (2 × 10 мл), затем водой (2 × 10 мл). Объединенные органические вытяжки высушивали Na_2SO_4 , концентрировали и реакционную смесь хроматографировали на колонке с силикагелем, элюент — этилацетат — гексан (1 : 1). Выход целевого продукта (11) 50%. УФ-спектр ($CHCl_3$): λ_{max} 331,2; 244; λ_{min} 280,4 нм.

в) 5'-О-Диметокситритил-4-тиоксоуридин (12) получали обработкой дibenзоильного производного (11) метилатом натрия в метаноле как описано в работе [11]. Выход 70%. УФ-спектр ($CHCl_3$): λ_{max} 332; 242; λ_{min} 291,6 нм.

г) Для получения производного (4) 0,2 г (0,26 ммоль) соединения (12) растворяли в 3 мл смеси растворителей диметилформамид — диоксан (1 : 1), добавляли 0,08 г (0,34 ммоль) дифенилкарбоната и каталитические количества гидрокарбоната натрия, кипятили 2 ч. Полноту прохождения реакции контролировали ТСХ в системе хлороформ — этанол (9 : 1), R_f соединения (4) 0,22. Реакционную смесь упаривали до масла, растворяли в 20 мл хлороформа, промывали 0,1 М ТЕАВ (2 × 10 мл), затем водой (2 × 10 мл). Объединенные органические вытяжки высушивали Na_2SO_4 , концентрировали и реакционную смесь хроматографировали на колонке с силикагелем в градиенте концентрации этанола в хлороформе (от 0 до 15%). Выход целевого продукта (4) 74%. УФ-спектр ($CHCl_3$): λ_{max} 330,8; 278,6; 204,4; λ_{min} 290; 261,6; 222,0 нм. 1H -ЯМР-спектр, δ , м. д.: 6,41 (д, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ 5,71 Гц); 5,55 (д, 1H, H-2', $J_{2',3'}$ 5,41 Гц); 5,28 (т, 1H, H-3'); 4,57 (дт, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ 1,71 Гц); 3,09 (м, 2H, H-5', $J_{4',5'}$ 7,05 Гц); 6,22 (д, 1H, H-5', $J_{5',6'}$ 6,40 Гц); 7,02 (д, 1H, H-6').

3'-(*N,N*-Диизопропиламидо)метилфосфиты защищенных нуклеозидов (6)–(9) получали по методике Карузера [12]. При получении синтона (8) реакционную смесь хроматографировали на колонке с силикагелем, элюент — хлороформ — триэтиламин (99 : 1). ^{31}P -ЯМР-спектр соединения (8), δ , м. д.; 151,0 и 150,33.

Удаление защитных групп после синтеза олигонуклеотидов осуществляли как описано нами ранее [7].

Анализ и выделение олигонуклеотидов, содержащих диметокситритильную группу, проводили обращенно-фазовой ВЭЖХ на приборе «Алтес» (США). Носитель — Лихросорб С-18 (10 мкм, Мерск, ФРГ), размер колонки 4,6 × 250 мм, градиент концентрации (0–40%) ацетонитрила в 0,05 М ацетате аммония, скорость элюции 1 мл/мин. После удаления диметокситритильной группы олигонуклеотиды хроматографировали повторно в обращенно-фазовом варианте на той же колонке (0–12% ацетонитрила).

Нуклеозидный состав олигонуклеотидов определяли гидролизом 0,2 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотидов смесью щелочной фосфатазы (0,25 ед. акт./мкл) и фосфодиэстеразы змеиного яда (0,5 ед. акт./100 мкл) в 60 мкл 0,2 М трис-НСl

(рН 8,5), 0,04 М MgCl₂ в течение 3 ч при 37° С. Затем смесь разбавляли до 400 мкл и продукты гидролиза анализировали ВЭЖХ.

Гидролиз 5S рРНК в гибридных дуплексах с олигонуклеотидными зондами (I)—(VII), катализируемый РНКазой H, проводили 30 мин при 25° С в 0,01 М трис-НСl (рН 7,9), 0,15 М NaCl, 0,01 М MgCl₂, 0,1 мМ дитиотрейте, 1 мМ EDTA, используя 0,05 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотидного зонда, 0,001—0,002 ОЕ₂₆₀ меченого фрагмента РНК (20 000—100 000 имп/мин), 12 ед. акт./мкл РНКазы H.

Реакцию прекращали добавлением 2,5 мкл формамида, продукты гидролиза анализировали электрофорезом в 20% ПААГ с последующей радиоавтографией. Положение расщепляемых фосфодиэфирных связей определяли путем сравнения электрофоретической подвижности продуктов гидролиза РНК с подвижностью [5'-³²P]pGGGAGCGCGGUGGUCC (контроль) и подвижностью продуктов частичного щелочного гидролиза (0,15 М NaHCO₃, 5 мин, 95° С) [5'-³²P]5S рРНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крынецкая Н. Ф., Ташилицкий В. Н., Белков В. М., Метелев В. Г., Шабарова З. А. // Биохимия. 1991. Т. 56. Вып. 4. С. 687—993.
2. Метелев В. Г., Крынецкая Н. Ф., Пурмаль А. А., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. № 4. С. 507—513.
3. Романова Е. А., Ореукая Т. С., Сухомлинов В. В., Крынецкая Н. Ф., Метелев В. Г., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. № 10. С. 1348—1354.
4. Codrington J. F., Doerr J. L., Fox J. J. // J. Org. Chem. 1964. V. 29. № 3. P. 558—564.
5. Joecks A., Koppel H., Schleinitz K. D., Cech D. // J. Prakt. Chemie. 1983. B. 325. H. 6. S. 881—892.
6. Krug A., Schmidt S., Lekschas J., Lemke K., Cech D. // J. Prakt. Chemie. 1989. B. 331. H. 5. S. 835—842.
7. Волков Е. М., Романова Е. А., Круг А., Ореукая Т. С., Потапов В. К., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1034—1039.
8. Damha M. J., Usman N., Ogilvie K. K. // Can. J. Chem. 1989. V. 67. № 5. P. 831—839.
9. Jones R. A. // Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach. Ed. Gait M. J. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1984. P. 23, 24.
10. Schaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G. // J. Amer. Chem. Soc. 1963. V. 85. № 10. P. 3821—3827.
11. Connolly B. A., Newman P. C. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 13. P. 4957—4974.
12. Barone A. D., Tang I. Y., Caruthers M. H. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 10. P. 4051—4061.

Поступила в редакцию
15.X.1990

S. SCHMIDT, L. G. KUZNETSOVA, E. A. ROMANOVA, A. NIMANN,
T. S. ORETSKAYA, N. F. KRYNETSKAYA, V. G. METELEV*, Z. A. SHABAROVA

THE RNA CLEAVAGE BY HYBRIDASE. IV. OLIGONUCLEOTIDE PROBES WITH 2'-DEOXY-2'-FLUORONUCLEOSIDES AND ARABINOFURANOSYLCYTOSINE

*Chemical Department and * A. N. Belozersky Laboratory, M. V. Lomonosov
Moscow State University*

A synthesis of synthons which allow one to introduce 2'-deoxy-2'-fluoropyrimidine derivatives into the oligodeoxynucleotide chain by means of the standard solid phase phosphoramidite method has been developed. Oligonucleotides with 1-β-D-arabinofuranosylcytosine were synthesized using either aC derivative with the unprotected 2'-OH group or O²,2'-anhydro-4-thiouridine. The synthesis of seven modified oligonucleotides (7 to 11 nucleotide residues) is described and their ability to form duplexes with complementary DNA have investigated as well as RNase H hydrolysis of hybrids formed by the *E. coli* 5S RNA and the obtained oligonucleotide probes.