



УДК 547.963.32.07

15 - 19-ЗВЕННЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДЫ КАК МОДЕЛИ ИНИЦИАТОРНОГО УЧАСТКА ТРАНСЛЯЦИИ ГЕНА РЕПЛИКАЗЫ ФАГА *φ*1

© 1995 г. В. Х. Кумпиньш, Н. Г. Лицис, Р. Ф. Ренхоф,
Э. И. Станкевич, В. М. Берзинь*

*Исследовательский и учебный центр биомедицины, Университет Латвии,
Латвия, LV 1067, Рига, ул. А. Кирхенштейна, 1*

Поступила в редакцию 05.12.94 г.

Проведен автоматический твердофазный синтез олигорибонуклеотидов длиной 15 - 19 н. о. с использованием 5'-О-диметокситритил-2'-О-(2-тетрагидропиранил)- (или 2'-О-(2-тетрагидрофуранил))-N-ацилрибонуклеозид-3'-О-(метил-N,N-диизопропил)фосфамидитных синтонов и 1-N-тетразола в качестве активирующего агента. Сравнительный анализ матричной активности синтезированных олигорибонуклеотидов - моделей инициаторного участка трансляции гена репликазы фагов MS2 и *φ*1 показал, что минимальным активным фрагментом РНК является 16-членный нуклеотид, содержащий инициаторный AUG-кодон гена, короткий спейсер и домен Шайна-Дальгарно, а также 5'-концевую последовательность AUGA с функционально важным терминаторным кодоном AUG.

Ключевые слова: 5'-О-диметокситритил-2'-О-(2-тетрагидрофуранил)- (или 2'-О-(2-тетрагидропиранил))-N-ацилрибонуклеозид-3'-О-(метил-N,N-диизопропил)фосфамидиты; олигонуклеотиды, химический синтез; мРНК-модели; фаговые РНК, матричная активность фрагментов.

Специфическое взаимодействие рибосомы с участком инициации трансляции на прокариотических мРНК является ключевой стадией, определяющей точность и эффективность считывания матрицы. Основные структурные элементы сайта связывания рибосомы - инициаторный кодон AUG (редко GUG или UUG), последовательность Шайна-Дальгарно, спейсер между упомянутыми детерминантами матрицы, а также определенная вторичная структура инициаторного участка [1, 2]. Однако результаты статистического анализа [3] и данные экспериментальных исследований функциональной активности ряда участков инициации трансляции [4 - 9] убедительно доказывают, что кроме вышеупомянутых детерминантов в процессе инициации участвуют и другие последовательности мРНК, расположенные рядом со стартовым кодоном. В наших предыдущих публикациях [4, 10] было показано, что минимальный функционально активный участок инициации трансляции гена репликазы фагов MS2 и *φ*1 длиной в 20 нуклеотидов содержит истинный кодон инициации и тетрауклеотид Шайна-Дальгарно.

В настоящей работе с целью более подробного изучения всех структурных детерминантов инициации был разработан и проведен химический синтез ряда олигорибонуклеотидов, содержащих нативные и целенаправленно измененные последовательности участка инициации, и изучена их активность в связывании рибосом (образование рибосомного комплекса инициации).

Полученные данные свидетельствуют, что 70S-комплекс инициации эффективно образуется на 16-членной нуклеотидной минимальной матрице, которая кроме истинного AUG-кодона и последовательности Шайна-Дальгарно содержит также расположенный на 5'-конце тетрауклеотид AUGA, соответствующий перекрывающимся последовательностям кодонов инициации и терминации.

Твердофазный синтез матричных олигорибонуклеотидов

Существенные результаты в синтезе олигорибонуклеотидов в настоящее время достигнуты при наращивании цепи на твердой фазе фосфамидитным методом при сочетании трет-бутилдиметилсилильной защитной группы для 2'-ОН и монометокситритильной или диметокситритильной группы для 5'-гидроксила [11, 12]. Однако

Сокращения: Thf - 2-тетрагидрофуранил, Thp - 2-тетрагидропиранил, DMAP - диметиламинопиридин, TEAA - триэтиламонийацетат.

*Автор для переписки.

выделение конечных продуктов осложнено (в отличие от метода с применением ацетальных 2'-О-защитных групп) необходимостью очистки целевого олигонуклеотида от тетрабутиламмоний-фторида, который используется для отщепления *трет*-бутилдиметилсилильной группы. Есть также данные о применении 5'-О-левулинильной защитной группы вместо групп тритильного типа в сочетании с 2'-О-ацетальной группой [13], что, однако, сильно осложняло сам олигорибонуклеотидный синтез. Применение нуклеозидов, содержащих замещенные 4-метоксиперидильные группы в качестве 2'-О-защиты [14 - 16], также ограничено из-за многостадийного синтеза исходных соединений. Следует упомянуть о синтезе 6 - 19-звенных олигорибонуклеотидов Н-фосфонатным методом с использованием 5'-О-диметокситритил-2'-О-(2-тетрагидропиранил)-N-ацилрибонуклеозид-3'-Н-фосфонатов [17]. Мы выбрали сочетание кислотолabileных 5'-О-диметокситритильной и 2'-О-(2-тетрагидрофуранильной) (или 2-тетрагидропиранильной) групп в фосфамидитном синтезе. Выбор сделан вопреки утверждению [18 - 21], что применение этих защит не позволяет получать

олигорибонуклеотиды длиной более 12 н. о. Для 5'-О-детритилирования во избежание частичного отщепления Thf- и Thr-групп мы применяли 1% $\text{CHCl}_2\text{CO}_2\text{H}$ в CH_2Cl_2 (1.5 мин) [17].

В качестве истинной матрицы с помощью ферментативных методов был синтезирован функционально активный 20-членный олигорибонуклеотид frR(-17-3) [10], содержащий стартовый кодон AUG гена репликазы, последовательность нативного спейсера и тетра-нуклеотид Шайна-Дальгарно, а также дополнительно семь 5'-концевых нуклеотидов (таблица).

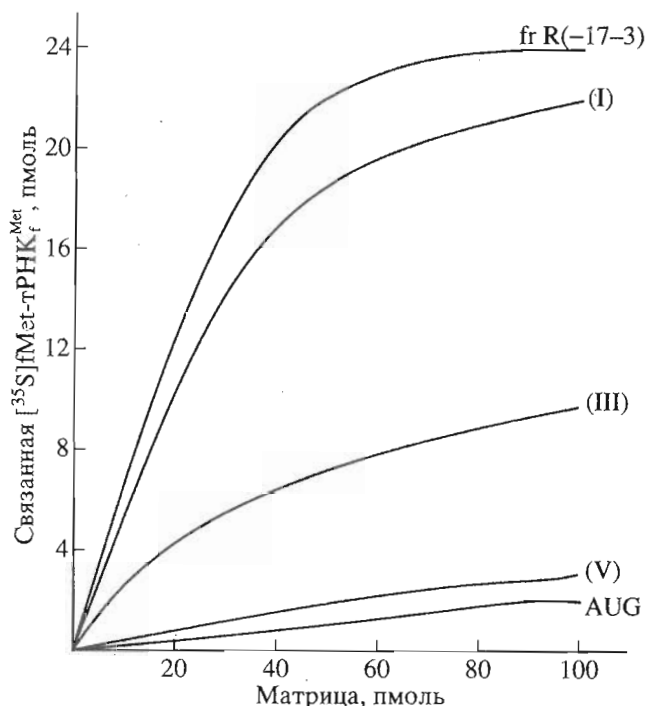
Далее при помощи методов химического синтеза [22 - 27], а в некоторых случаях энзиматического синтеза [10] был синтезирован также ряд олигорибонуклеотидов с различными изменениями в нуклеотидной последовательности матрицы. Чистоту и первичную структуру синтезированных олигонуклеотидов проверяли ПААГ-электрофорезом препаратов в денатурирующих условиях и энзиматическим секвенированием матрицы. Были синтезированы два аналога нативного frR(-17-3), где у одного олигорибонуклеотида, (I), 5'-концевой нуклеотид C_{-17} был заменен на A_{-17} (что наблюдается

Матричная активность фрагментов РНК фага fr, содержащих инициаторный участок трансляции гена репликазы*

Олигорибонуклеотид**	Присутствие элемента структуры участка инициации трансляции				Относительная активность, %
	инициаторный AUG	последовательность SD	ложный AUG	терминатор UGA	
Нативная матрица: frR (-17-3)					
5' <u>САА</u> СА <u>У</u> Г <u>А</u> Г <u>Г</u> А <u>А</u> УА <u>С</u> С <u>С</u> А <u>У</u> Г	+	+	+	+	100
Синтетические матрицы:					
(I) ААА <u>СА</u> У <u>Г</u> А <u>Г</u> Г <u>А</u> А <u>У</u> А <u>С</u> С <u>С</u> А <u>У</u> Г	+	+	+	+	100
(II) ААА <u>СА</u> У <u>Г</u> А <u>Г</u> Г <u>А</u> А <u>А</u> А <u>С</u> С <u>С</u> А <u>У</u> Г	+	+	+	+	95
(III) ААА <u>СА</u> У <u>Г</u> А <u>А</u> Г <u>А</u> А <u>У</u> А <u>С</u> С <u>С</u> А <u>У</u> Г	+	-	+	+	27
(IV) ААА <u>СА</u> У <u>Г</u> А <u>А</u> Г <u>А</u> А <u>А</u> А <u>С</u> С <u>С</u> А <u>У</u> Г	+	-	+	+	27
(V) ААА <u>С</u> А <u>С</u> Г <u>А</u> Г <u>Г</u> А <u>А</u> А <u>А</u> А <u>С</u> С <u>С</u> А <u>У</u> Г	+	+	-	-	11
(VI) АА <u>СА</u> У <u>Г</u> А <u>Г</u> Г <u>А</u> А <u>У</u> А <u>С</u> С <u>С</u> А <u>У</u> Г	+	+	+	+	100
(VII) А <u>У</u> Г <u>А</u> Г <u>Г</u> А <u>А</u> УА <u>С</u> С <u>С</u> А <u>У</u> Г	+	+	+	+	100
(VIII) У <u>Г</u> А <u>Г</u> Г <u>А</u> А <u>У</u> А <u>С</u> С <u>С</u> А <u>У</u> Г	+	+	-	+	59
(IX) У <u>С</u> А <u>С</u> С <u>А</u> А <u>У</u> А <u>С</u> С <u>С</u> А <u>У</u> Г	+	-	-	-	9

* Состав реакционной смеси см. "Экспер. часть", количество матрицы 40 пмоль.

** Инициаторный кодон репликазы подчеркнут двумя чертами, последовательность Шайна-Дальгарно - одной чертой, последовательность AUGA, образующаяся от перекрывающихся ложного кодона инициации AUG и кодона терминации UGA, обозначена пунктиром. Олигорибонуклеотиды (I) - (V) являются продуктами энзиматического синтеза, матрицы (VI) - (IX) синтезированы при помощи химических методов. Нуклеотидные замены показаны жирным шрифтом.



Матричная активность синтетических моделей инициаторного участка трансляции гена репликазы фага fr, полученных с использованием олигорибонуклеотидов (I), (III), (V).

в инициаторном участке фага MS2 [4, 10]), а у другого, (II), была внесена дополнительная замена U_{-5} на A_{-5} . Далее с целью более точного установления роли 5'-концевой структуры участка инициации был получен ряд укороченных вариантов матрицы (олигонуклеотиды (VI) - (IX)).

Кроме того, были внесены замены, приводящие к разрушению района Шайна-Дальгарно (олигонуклеотиды (III), (IV)) и/или к удалению перекрывающихся кодонов инициации и терминирования в блоке AUGA, расположенном на 5'-конце матрицы. Важно отметить, что все замены и делеции, введенные в последовательность исходного frR(-17-3), сохраняли или снижали стабильность вторичной структуры матриц.

Функциональная активность олигорибонуклеотидов

Для определения функциональной активности мы использовали метод фиксации комплекса инициации на мембранных фильтрах, измеряя количество инициаторной $[^{35}S]fMet\text{-тРНК}^{Met}$ на 70S-рибосомах *E. coli* в присутствии олигорибонуклеотидов в возрастающей концентрации (рисунок).

Как видно из таблицы, синтетические олигонуклеотиды (I) и (II), содержащие замены нуклеотидов в спейсерном районе и на 5'-конце инициаторного участка, демонстрируют высокую мат-

ричную активность, сравнимую с активностью исходного олигонуклеотида frR(-17-3). Удаление 5'-концевых звеньев, вплоть до 16-членного олигонуклеотида (VII) (frR(-13-3), содержащего инициаторный кодон AUG гена репликазы, спейсер и блок AUGA на 5'-конце), также не оказывает сколько-нибудь заметного влияния на эффективность образования инициаторного комплекса.

Потеря следующего 5'-концевого нуклеотида вызывает некоторое снижение способности полученного олигорибонуклеотида frR(-12-3) (матрица (VIII)) стимулировать связывание инициаторной $[^{35}S]fMet\text{-тРНК}^{Met}$ с рибосомой. Если учесть, что при укорачивании олигорибонуклеотида ликвидируется расположенный вне зоны считывания ложный инициаторный кодон AUG, то данные по наличию матричной активности у нуклеотида (VIII) указывают на отсутствие сколько-нибудь значительной роли этого триплета в связывании рибосом. Такое предположение подтверждают наши предыдущие данные [4] о "молчании" ложного AUG в составе более длинных фрагментов РНК инициаторного участка гена репликазы.

Олигонуклеотиды (III) и (IV) содержат специфичную нуклеотидную замену G_{-9} на A_{-9} , устраняющую природную последовательность Шайна-Дальгарно в составе исходного frR(-17-3). Такие матрицы проявляют заметно сниженную, но устойчивую активность (рисунок и таблица), что в какой-то мере подтверждает высказанное ранее предположение [28] о том, что комплементарные взаимодействия домена Шайна-Дальгарно с 3'-концевой последовательностью 16S рибосомальной РНК не играют исключительной роли в регулировании эффективности инициации трансляции. Более серьезные замены в этом районе (матрица (IX)) полностью устраняют инициаторную активность олигорибонуклеотида.

Матричная активность почти полностью теряется при точечной замене U_{-12} на C_{-12} (матрица (V)). В данном случае одиночная замена нуклеотида одновременно приводит к удалению как ложного инициаторного (AUG), так и терминаторного (UGA) кодона в блоке AUGA, расположенном на 5'-конце матрицы рядом с последовательностью Шайна-Дальгарно. Приведенные выше данные указывают на то, что кодон терминирования трансляции UGA, по-видимому, является существенным элементом фрагмента инициаторного участка гена репликазы и участвует в процессе связывания рибосом. Ранее были высказаны предположения, что такие терминаторные кодоны, как UAA и UGA, составляют часть инициаторных участков трансляции мРНК и необходимы при подготовке рибосом перед инициацией [29, 30].

В итоге наши данные позволяют заключить, что минимальный активный в связывании рибосом 16-членный инициаторный участок гена

репликазы фагов fr и MS2 должен содержать истинный инициаторный кодон AUG, короткую последовательность спейсера, домен Шайна-Дальгарно, а также на 5'-конце от него последовательность AUGA с функционально важным терминальным кодоном UAG.

Последовательность AUGA оказывает существенное влияние на процесс инициации трансляции *in vitro*, что в какой-то мере подтверждается количественными данными тоупринта рибосомных комплексов инициации на вариантах мРНК гена *rIIB* фага T4 [9], свидетельствующими о том, что короткие последовательности на 5'-конце от домена Шайна-Дальгарно существенны для эффективной инициации трансляции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали пластины с PEI-целлюлозой (Merck, Германия), РНКазы T1 и U2 (Sankeo, Япония), РНКазу *Bacillus cereus*, нуклеазу P1, T4-РНК-лигазу и T4-полинуклеотидкиназу (Pharmacia, Швеция), АТР, ГТР и тРНК_f^{Met} (Boehringer-Mannheim, Германия), нитроцеллюлозные фильтры BA85 (Schleicher und Schuell, Германия), [³²P]АТР и [³⁵S]Met ("Изотоп", Россия).

Химический синтез олигорибонуклеотидов проводили на автоматическом синтезаторе Gene Assembler (Pharmacia, Швеция). Использовались 5'-О-диметокситритил-2'-О-(2-тетрагидрофуранил)- или 2'-О-(2-тетрагидропиранил)-N-ацилрибонуклеозиды (Biolar, Латвия), ацетонитрил ("Реахим", Украина), дихлоруксусная кислота, 1Н-тетразол, коллидин, ДМАР (Fluka, Швейцария), молекулярные сита 3Å (Ferak, Германия). Метиленхлорид перегоняли над P₂O₅ и CaH₂, ацетонитрил – над P₂O₅, а затем дважды над CaH₂ и выдерживали 15 ч над молекулярными ситами. Тетразол дважды сублимировали в вакууме. В качестве твердофазного носителя использовали стекло аминопропил-CPG-550 (Fluka, Швеция) и Bio-Glas-500 (Bio-Rad, США). Bio-Glas-500 аминопропилировали по методу [22]. Модификацию твердой фазы и присоединение первого нуклеозидного звена проводили согласно работам [23, 24]. Фосфамидиты синтезированы по описанным в литературе методам [18, 25, 26]. В основном использовалась схема операции для серийного синтезатора Gene Assembler. Конденсацию проводили в присутствии 1Н-тетразола в течение 5 мин. Колонку фирмы Pharmacia, из которой нами был удален твердый стандартный носитель, наполняли 20 мг аминопропил-CPG-550 с присоединенным первым нуклеозидом. Количество введенного нуклеозида составляло в среднем 40 - 60 мкмоль/г.

Удаление защитных групп и выделение олигорибонуклеотидов. После завершения последней стадии конденсации к носителю добавляли 600 мкл

конц. NH₄OH (*d* 0.89) и выдерживали 16 ч при 55°C. Раствор декантировали, а носитель 2 раза промывали водно-этанольным (1 : 1) раствором. После упаривания сухой остаток растворяли в 0.1 М ТЕАА (рН 7.1) и центрифугировали. Супернатант наносили на колонку C₁₈-PerRPC HR 5/5 (Pharmacia, Швеция) и проводили хроматографию в обращенной фазе (ОФХ) в системе быстрой хроматографии белков FPLC (Pharmacia, Швеция) в градиенте концентрации ацетонитрила (0 - 40%) в 0.1 М ТЕАА. Выделяли фракцию, содержащую целевые 5'-О-диметокситритил-2'-О-(2-тетрагидрофуранил)- или 5'-О-диметокситритил-2'-О-(2-тетрагидропиранил)-защищенные олигонуклеотиды. Далее эту фракцию обрабатывали 80% уксусной кислотой в течение 3 ч при 37°C. Образец упаривали досуха, растворяли в 0.1 М ТЕАА и выделяли при помощи ОФХ (см. выше). Скорость элюции 1 мл/мин.

Индивидуальность синтезированных олигорибонуклеотидов проверяли электрофоретически в 18% ПААГ в присутствии 7 М мочевины; их нуклеотидная последовательность была подтверждена гель-электрофорезом продуктов энзиматического гидролиза [31].

Ферментативный синтез олигорибонуклеотидов осуществляли как описано ранее [10]. Нуклеотидную последовательность продуктов проверяли двумерным фракционированием Р1-нуклеазных гидролизатов: первое направление – высоковольтный электрофорез на ацетате целлюлозы (рН 3.5), второе – хроматография на PEI-целлюлозе при 65°C.

Стимулируемое олигорибонуклеотидами связывание [³⁵S]fMet-тРНК_f^{Met} с рибосомами. Реакционная смесь (50 мкл) содержала 0.05 М трис-НСl (рН 7.8), 0.1 М NH₄Cl, 5 мМ MgCl₂, 0.001 М дитиотреит, 0.002 М ГТР, 60 пмоль 70S рибосом, очищенные факторы инициации: IF1 – 0.4, IF2 – 3.77 и IF3 – 0.63 мкг, 60 пмоль [³⁵S]fMet-тРНК_f^{Met} синтетические олигорибонуклеотиды (20 - 100 пмоль). После инкубации при 37°C в течение 10 мин смесь фильтровали через мембранные фильтры, промывали и количество связанной [³⁵S]fMet-тРНК_f^{Met} определяли в жидкостном сцинтилляционном спектрометре (Intertechnique SL4000, Франция).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stormo G.D. // Maximizing Gene Expression / Eds W. Reznikoff, L. Gold. Boston: Butterworth, 1986. P. 195 - 224.
2. de Smith M.H., van Duin J. // Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. 1990. V. 4. P. 1 - 35.
3. Schneider T.D., Stormo G.D., Gold L. // J. Mol. Biol. 1986. V. 188. P. 415 - 431.
4. Berzin V., Cielens I., Jansone I., Gren E. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. P. 7763 - 7775.

5. Bingham A.M., Busby S.J.M. // *Mol. Microbiol.* 1987. V. 1. P. 117 - 124.
6. Olins P.O., Rangwala S.H. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 16973 - 16976.
7. Deyfus M. // *J. Mol. Biol.* 1988. V. 204. P. 79 - 84.
8. Boni I.V., Isaeva D.M., Musyuchenko M.L., Tzareva N.V. // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. P. 155 - 162.
9. Hartz D., McPheeters D.S., Gold L. // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 218. P. 83 - 97.
10. Renhof R., Cielens I., Nikitina T., Sherina L., Shomstein Z., Gren E. // *FEBS Lett.* 1985. V. 185. P. 277 - 281.
11. Ogilvie K.K., Usman N., Nicoghosian K., Cedergren R.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. P. 5764 - 5768.
12. Lyttle H.M., Wright P.B., Sinha N.D., Bain J.D., Chamberlain A.R. // *J. Org. Chem.* 1991. V. 56. P. 4608 - 4615.
13. Iwai S., Sasaki T., Ohtsuka E. // *Tetrahedron.* 1990. V. 46. P. 6673 - 6688.
14. Beijer B., Sulston I., Sproat B.S., Rider P., Lamond A.I., Neuner P. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 5143 - 5151.
15. Rao M.V., Reese C.B., Schehlmann V., Yu P.S. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 1993. P. 43 - 55.
16. Sakatsume O., Ohtsuki M., Takaku H., Reese C.B. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. P. 3689 - 3697.
17. Веньямина А.Г., Горн В.В., Зенкова М.А., Комарова Н.И., Репкова М.Н. // *Биоорган. химия.* 1990. Т. 16. С. 941 - 950.
18. Tanaka T., Fujino K., Tamatsukuri S., Ikehara M. // *Chem. Pharm. Bull.* 1986. V. 34. P. 4126 - 4132.
19. Ohtsuka E., Yamane A., Ikehara M. // *Chem. Pharm. Bull.* 1983. V. 31. P. 1534 - 1543.
20. Kierzek R., Caruthers M.H., Longfellow C.E., Swinton D., Turner D.H., Freier S.M. // *Biochemistry.* 1986. V. 25. P. 7840 - 7846.
21. Iwai S., Ohtsuka E. // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. P. 9443 - 9456.
22. *Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach* / Ed. M.I. Gait. Oxford: IRL Press, 1984. P. 46.
23. Ефимов В.А., Бурякова А.А., Ревердатто С.В., Чахмачева О.Г. // *Биоорган. химия.* 1983. Т. 9. С. 1367 - 1387.
24. Ломакин А.И., Ястребов С.О., Попов С.Г. // *Биоорган. химия.* 1985. Т. 11. С. 920 - 926.
25. Веньямина А.Г., Косолапова З.А., Левина А.С. // *Биоорган. химия.* 1987. Т. 13. С. 125 - 127.
26. Varone F.D., Tang I.Y., Caruther M.N. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. P. 4051 - 4061.
27. Никитина Т., Шомштейн Э., Шерина Л., Ренхоф Р., Грен Э. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. С. 482 - 489.
28. Cologero R.A., Pon C.L., Sanoteco M.A., Gualerzi C.O. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. P. 6427 - 6431.
29. Ganoza M.C. // *Can. J. Biochem.* 1977. V. 55. P. 267 - 281.
30. Atkins J.F. // *Nucl. Acids Res.* 1977. V. 7. P. 1035 - 1041.
31. Donis-Keller H., Maxam A.M., Gilbert W. // *Nucl. Acids Res.* 1977. V. 4. P. 2527 - 2538.

Synthetic 15 - 19-meric Oligoribonucleotides as Models for Translation Initiation of the Phage fr Replicase Gene

V. Kh. Kumpin'sh, N. G. Litsis, R. F. Renhof, E. I. Stankevich, and V. M. Berzin¹

*Research and Education Center of Biomedicine, Latvian University,
ul. A. Kirchensteina 1, Riga, LV 1067 Latvia*

Abstract – Automatic solid-phase synthesis of 15 - 19-meric oligoribonucleotides was carried out using 5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-(2-tetrahydropyranyl)- [or 2'-O-(2-tetrahydrofuranlyl)-] N-acylribonucleoside-3'-O-(methyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidite synthons and 1-H-tetrazole as an activator. Comparative analysis of the template activity of the oligoribonucleotides synthesized, which are models of the translation initiation region of the replicase gene of MS2 and fr phages, showed that the minimal active fragment of RNA is a 16-mer containing the initiation AUG codon of the gene, a short spacer, a Shine-Dalgarno domain, and the 5'-terminal AUGA sequence with a functionally important termination AUG codon.

Key words: oligoribonucleotide phosphoramidites; oligonucleotides, chemical synthesis; mRNA models; phage RNA, template activity of enzymes.

¹ To whom correspondence should be addressed.