



УДК 547.962.32+546.07

СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

XIX. СИНТЕЗ 3'-КОНЦЕВОГО ДВУХЦЕПОЧЕЧНОГО ФРАГМЕНТА СТРУКТУРНОГО ГЕНА ВАЛИНОВОЙ тРНК ДРОЖЖЕЙ *

*Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ефимов В. А.,
Колосов М. Н., Коробко В. Г., Чажмахчева О. Г.,
Шингарова Л. Н.*

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

Фосфодиэфирным методом синтезированы додекадезоксирибонуклеотиды G-T-T-C-G-A-T-C-C-T-G-G и G-C-G-A-A-A-T-C-A-C-C-A, гомологичные 3'-концевому участку 54--77 валиновой тРНК дрожжей. Эти олигонуклеотиды и описанный ранее додекадезоксинуклеотид T-T-C-G-C-C-A-G-G-A-T 5'-фосфорилированы гАТР при помощи Т4-полинуклеотидкиназы и в комплексе с гептадезоксинуклеотидом T-G-G-T-G-A-T ковалентно сшиты ДНК-лигазой бактериофага Т4. Тем самым осуществлен химико-ферментативный синтез 3'-концевого фрагмента структурного гена валиновой тРНК, содержащего 24-членный двухцепочечный участок и 5-членный выступающий конец, необходимый для дальнейшего построения гена.

Ранее мы синтезировали додекадезоксинуклеотид (XIII) и гептадезоксинуклеотид (XIV), которые в совокупности комплементарны 3'-концевому участку 59--77 валиновой тРНК дрожжей [3]. В развитие этих исследований мы осуществили химический синтез додекадезоксинуклеотидов (VI) (схема 1) и (XII) (схема 2), гомологичных участку 54--77 этой тРНК. Синтез проводился фосфодиэфирным методом с TPS в качестве конденсирующего реагента, причем нуклеотидная цепь наращивалась блоками в направлении от 5'- к 3'-концу.

5'-Концевой пентануклеотид (I), использованный в синтезе по первой схеме, был описан ранее [4]. Соответствующий пентануклеотид (VIII) (схема 2) был получен из 5'-концевого нуклеозида последовательным наращиванием двумя динуклеотидными блоками. В обоих синтезах к этим пентануклеотидам присоединяли один и тот же тринуклеотид (II), а затем тетрануклеотид (IV) или (X). Все полученные соединения были охарактеризованы спектрально и хроматографически, а их мономерный состав определен (после удаления защитных групп) ферментативным гидролизом (см. табл. 1).

Защищенные додекануклеотиды (V) и (XI) выделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе в ТЕАВ (рис. 1) и рехроматографировали в растворе NaCl, содержащем 7 М мочевины (рис. 2). После удаления всех защитных групп конечные додекануклеотиды (VI) и (XII) очищали двукратной анионообменной хроматографией в присутствии 7 М мочевины сначала в нейтральном или кислом, а затем в кислом растворе (рис. 3). Чистота синтезированных додекануклеотидов была доказана микроколочной хрома-

* Сообщение XVIII см. [1], предварительное сообщение см. [2]. В статье использованы следующие нестандартные сокращения: ТЕАВ — бикарбонат триэтиламония, TPS — 2,4,6-тринизопропилбензолсульфохлорид; символы T, C, A и G обозначают соответствующие дезоксирибонуклеозиды.

Схема 1

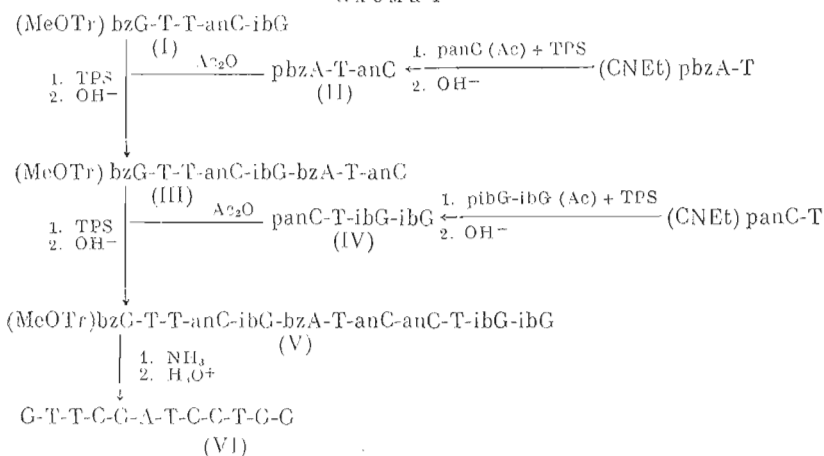
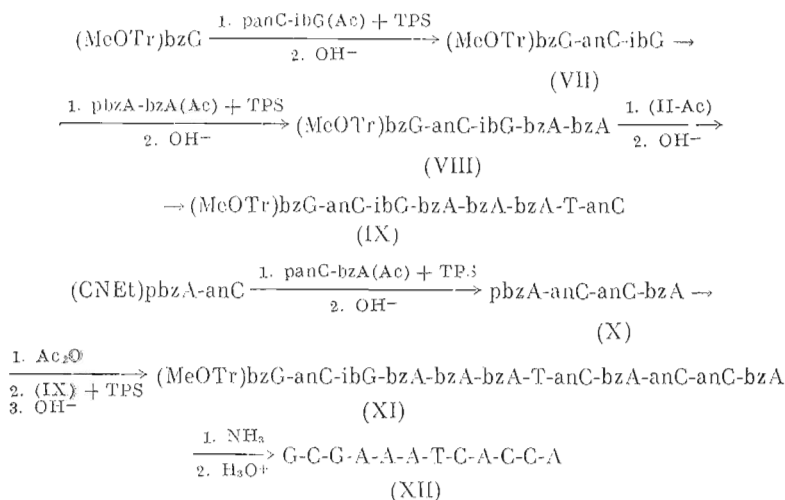


Схема 2



тографией (рис. 4), а первичная структура подтверждена нуклеотидными картами (рис. 5).

Заключительный этап синтеза состоял в ковалентном соединении полученных в этой работе и описанных ранее олигонуклеотидов: (VI) с (XII) и (XIII) с (XIV). Додекануклеотид (XIII) комплементарен додекануклеотидам (VI) и (XII), а гептануклеотид (XIV) — додекануклеотиду (XII). Благодаря этому при антипараллельной ориентации они способны образовывать четырехкомпонентный комплекс, который представляет собой 24-звенный двухцепочечный олигонуклеотид (с 5-членным выступающим 5'-концом), имеющий по одному разрыву в каждой цепи. Образование фосфодиэфирных связей на месте этих разрывов было осуществлено с помощью ДНК-лигазы бактериофага T4. Для этого (см. схему 3) додекануклеотиды (VI), (XII) и (XIII) сначала 5'-фосфорилировали действием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и T4-полинуклеотидкиназы, затем прибавляли избыток немеченого гептануклеотида (XIV) и смесь [вероятно, четырехкомпонентный комплекс $(^{32}\text{p-VI}) \cdot (^{32}\text{p-XIII}) \cdot (^{32}\text{p-XII}) \cdot (\text{XIV})$] инкубировали с ДНК-лигазой*. За ходом лигазной реакции следили по превращению ^{32}P фос-

* Было найдено, что если гептануклеотид (XIV) тоже вводить в эту реакцию в виде 5'-фосфата ($^{32}\text{p-XIV}$), то после образования соответствующего продукта лигазной сшивки — двухцепочечного нуклеотида $(\text{XV}) \cdot (^{32}\text{p-XVI})$ — происходит соединенные встык (blunt ligation) двух его молекул вследствие наличия фосфатной группы на невыступающем (ровном) конце дуплекса (ср. [5]).

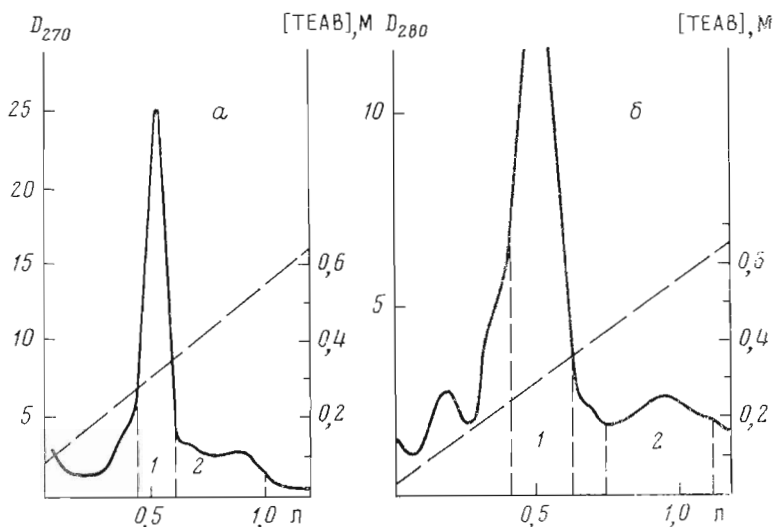


Рис. 1. Выделение защищенных додекануклеотидов (V) и (XI) хроматографией на DEAE-целлюлозе (HCO_3^-) в градиенте концентрации TEAB в спирте: а — выделение (V), колонка 2×33 см, 35% спирт, фракции по 5 мл/5 мин; пик 1 содержит 2600 OE_{270} тетра-нуклеотида (IV), пик 2 (800 OE_{270}) содержит додекануклеотид (V); б — выделение (XI), колонка $1,5 \times 30$ см, 30% спирт, фракции по 6,5 мл/3 мин; пик 1 содержит 1800 OE_{280} тетра-нуклеотида (X), пик 2 (640 OE_{280}) содержит додекануклеотид (XI)

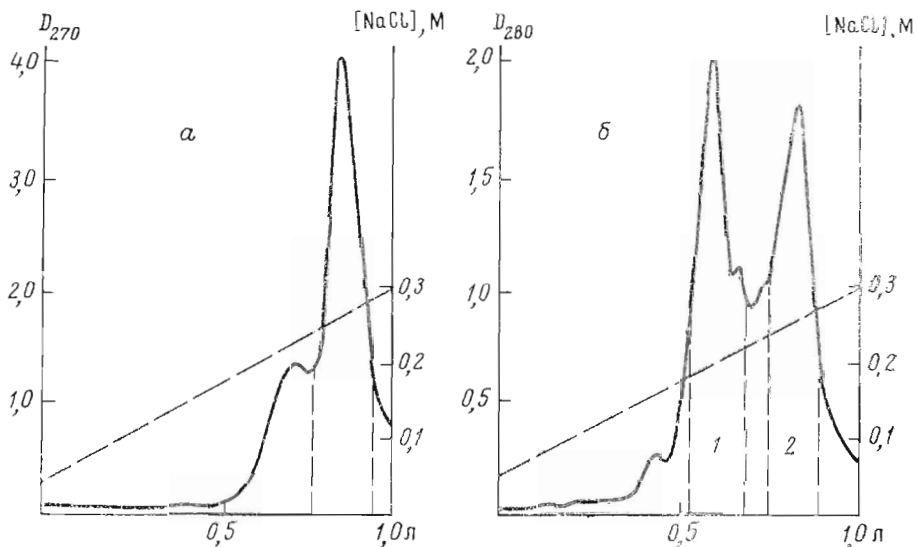


Рис. 2. Рехроматография защищенных додекануклеотидов (V) и (XI) на DEAE-целлюлозе (Cl^-) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины и 0,01 М Трис-HCl, pH 7,5. а — очистка (V), колонка $1,4 \times 32$ см, фракции по 4,7 мл/6 мин; основной пик содержит 380 OE_{280} додекануклеотида (V); б — очистка (XI), колонка $1,5 \times 25$ см, фракции по 5,2 мл/9 мин; пик 1 (250 OE_{280}) содержит смесь октануклеотида (IX) и пирофосфата тетра-нуклеотида (X), пик 2 содержит 220 OE_{280} додекануклеотида (XI)

фата из концевого в межнуклеотидный, устойчивый к действию щелочной фосфатазы *E. coli*; оказалось, что содержание фосфатазостойчивого ^{32}P через 5 ч достигает максимальной величины, равной 54% исходного суммарного количества ^{32}P .

Образовавшийся в результате лигазной сшивки двухцепочечный полинуклеотид (XV)·(XVI) был отделен от исходных веществ (VI), (XII),

Таблица 1

Олигонуклеотид	R _{фрт} в системе		УФ-характеристики				Мономерный состав (определен гидролизом VPDE)							
	А	Б	λ _{абс} , нм	λ _{мин} , нм	ε ₂₅₀		ε ₂₆₀		С	А	pG	pT	pC	pA
					ε ₂₅₀ ^н	ε ₂₆₀ ^н	ε ₂₅₀ ^н	ε ₂₆₀ ^н						
pbzA-T-anC (II)	0,83		258(n), 281, 300(n)	240	0,83	1,19	1,31	1,20				1,0	4,1	0,85
pA-T-C (MeOTr)bzC-T-T-anC-ibC-bzA-T-anC (III)	0,70	0,71	263	232	0,76	0,97	0,52	0,38				1,0	4,1	0,85
G-T-T-C-G-A-T-C panC-T-ibG-ibG (IV)	0,88	0,25	262, 278(n)	234	0,83	0,95	0,92	0,82	0,90	0,85	0,85	3,2	2,0	4,0
pC-T-G-G (MeOTr)bzC-T-T-anC-ibG-bzA-T-anC-anC-T-ibG-ibG (V)	0,50	0,45	258, 270(n)	230	0,87	0,92	0,75	0,37				1,2	0,95	
G-T-T-C-G-A-T-C-T-G-G (VI)	1,85	0,10	260	240	0,90	0,94	0,67	0,26				4*	3*	1*
(MeOTr)bzC-anC-ibG (VII)		0,7	262, 286	247, 273	0,93	0,96	0,99	1,02					1,05	
(MeOTr)bzG-anC-ibG-bzA-bzA (VIII)	1,45	0,60	256, 270(n)	230	1,05	0,90	0,73	0,32	0,96			1,0		
G-C-G-A-A (MeOTr)bzG-anC-ibG-bzA-bzA-T-anC (IX)	0,95		264(n), 283	248	0,95	1,06	1,19	1,15				1,1	4,0	2,0
G-C-G-A-A-T-C G-C-G-A-A-T-C pbzA-anC-anC-bzA (X)	0,75	0,30	256	228	0,97	0,81	0,54	0,25	0,90			1,1	4,0	2,0
pA-C-C-A (MeOTr)bzG-anC-ibG-bzA-bzA-T-anC-bzA-anC-anC-bzA (XI)	0,45	0,45	265(n), 282	245	0,92	1,11	1,22	1,08						
G-C-G-A-A-T-C-A-C-C-A (XII)		0,12	260	235	0,86	0,81	0,47	0,30	1,15			0,80	2,0	2,05
			285	243	0,89	1,20	1,57	1,57		1,0			2,0	1,0
			262	230	0,82	0,85	0,43	0,13						
			263(n), 280	246	0,93	1,08	1,23	1,19						
			259	237	0,91	0,86	0,58	0,29				1*	4*	5*

* Определено на основании нуклеотидной карты, рис. 5.

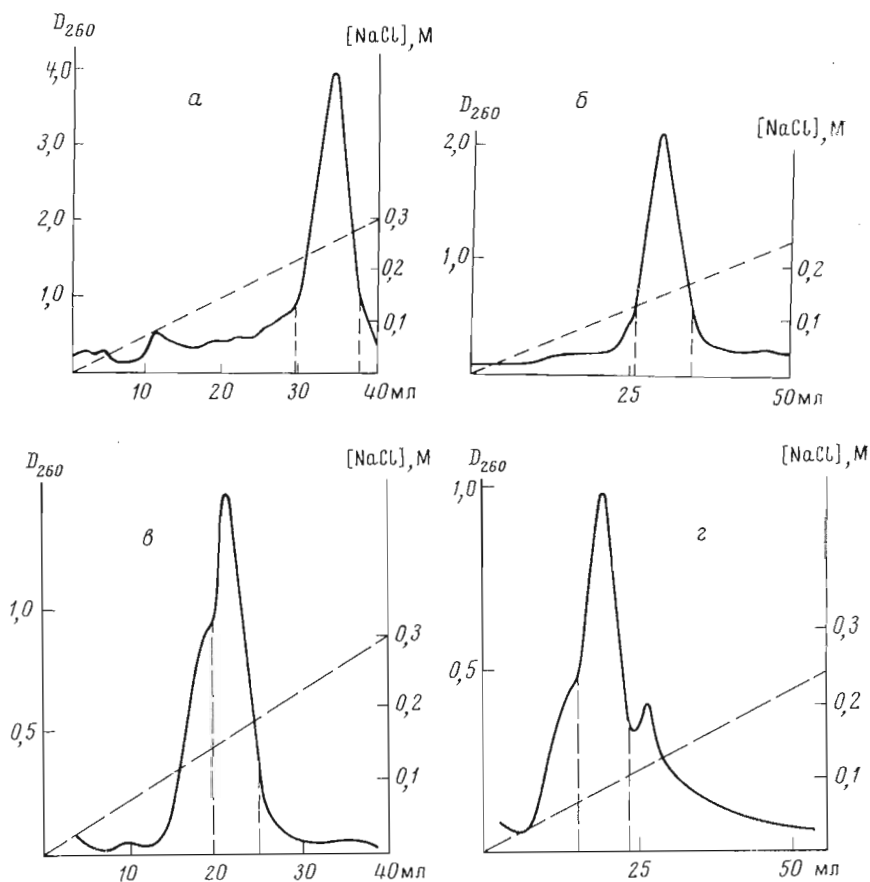


Рис. 3. Выделение и рехроматография незащищенных додекануклеотидов (VI) и (XII) на DEAE-целлюлозе (Cl^-) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины. *а* — выделение (VI), колонка $0,5 \times 3$ см, 0,01 М Трис- HCl , pH 7,5, скорость элюции 0,3 мл/мин; основной пик содержит 20 OE_{260} додекануклеотида (VI); *б* — рехроматография 6 OE_{260} (VI), колонка $0,5 \times 3$ см, pH 3,5, скорость элюции 0,5 мл/мин; основной пик содержит 2,8 OE_{260} додекануклеотида (VI). *в* — выделение (XII), колонка $0,5 \times 5$ см, pH 3,5, скорость элюции 0,33 мл/мин; отмеченная часть пика содержит 6 OE_{260} (XII); *г* — рехроматография (XII), колонка $0,5 \times 5$ см, pH 3,0, скорость элюции 0,33 мл/мин; отмеченная часть пика содержит 3,0 OE_{260} додекануклеотида (XII)

(XIII) и (XIV) хроматографией на сефадексе G-50 (рис. 6), и его строение было доказано (табл. 2) 5'-дефосфорилированием при помощи ВАР с последующим гидролизом VPDE или SPDE (анализ ближайших соседей),

Таблица 2

Олигонуклеотид	Радиоактивность (имп/мин) продуктов после дефосфорилирования действием ВАР и гидролиза фосфодиэстеразой							
	VPDE *				SPDE			
	pT	pC	pA	pG	Tr	Cr	Ar	Gp **
Дуплекс (XV)·(XVI)	7740	<20	<20	8010	6940	<20	<20	4610 **
24-мер (XV)	<20	<20	<20	4310	<20	<20	<20	3220 **
19-мер (XVI)	10 490	<20	<20	<20	11 270	<20	<20	<20

* При гидролизе VPDE без предварительной обработки ВАР были получены следующие результаты: дуплекс (XV)·(XVI) — ^{32}pT и ^{32}pG в соотношении 1:2, 24-мер (XV) — ^{32}pG , 19-мер (XVI) — ^{32}pT .

** Заниженный выход G^{32}p , вероятно, обусловлен примесью пуринаспецифичной 3'-нуклеотидазы в препарате SPDE.

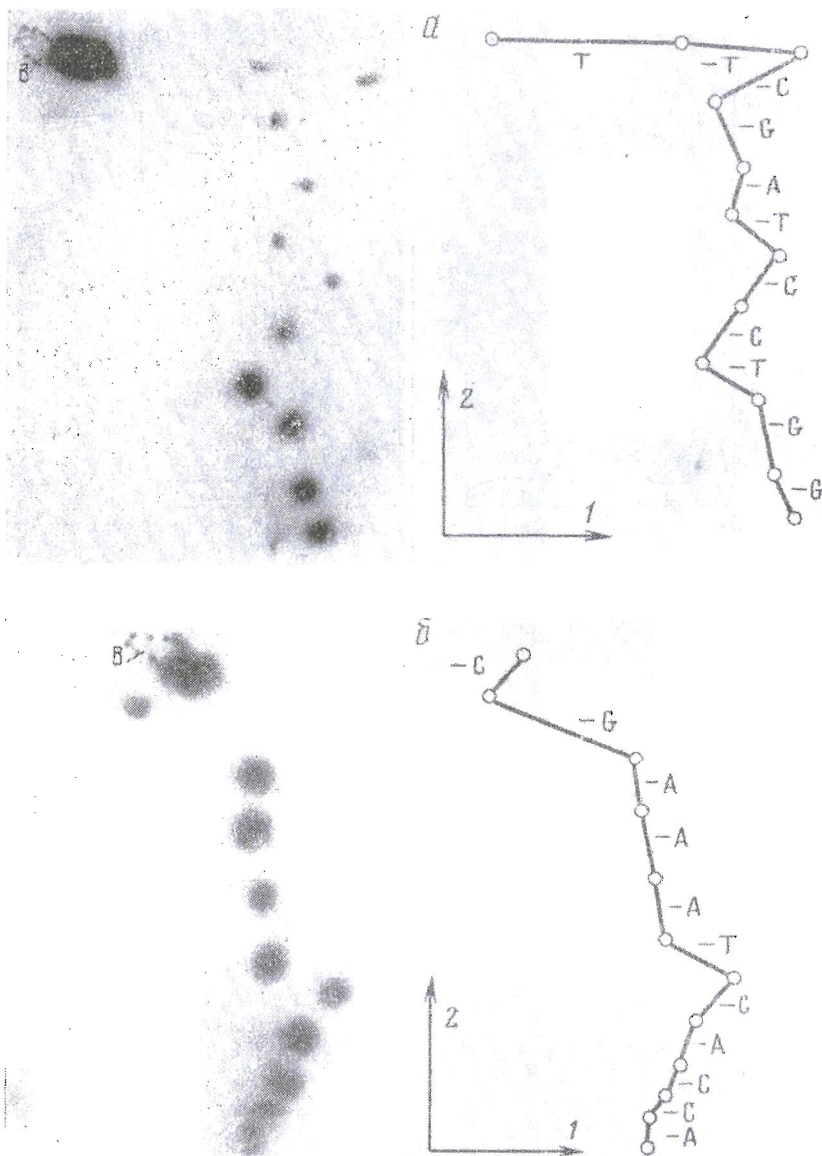


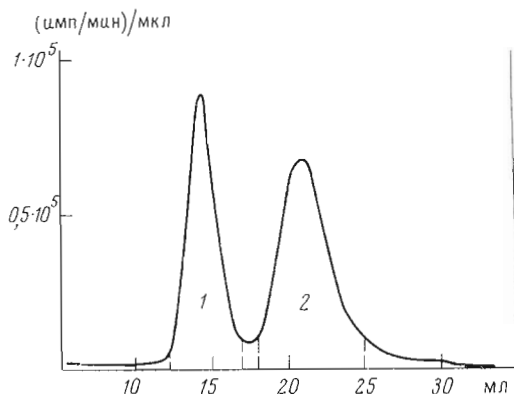
Рис. 5. Двухмерное разделение продуктов частичного VPDE-гидролиза меченых додекануклеотидов. Направление 1 — электрофорез на ацетилцеллюлозе при pH 3,5, направление 2 — гомохроматография на пластинках (20 × 20 см) DEAE-целлюлозы (гомосмесь 6 [14]), В — пятно красителя — маркера ксиленианола FF; а — нуклеотидная карта додекануклеотида $^{32}\text{pG-T-T-C-G-A-T-C-C-T-G-G}$ ($^{32}\text{p-VI}$), б — нуклеотидная карта додекануклеотида $^{32}\text{pG-C-G-A-A-A-T-C-A-C-C-A}$ ($^{32}\text{p-XII}$)

Таким образом, нами осуществлен химико-ферментативный синтез двухцепочечного полинуклеотида (XV)·(XVI), составляющего 5'-концевую часть структурного гена дрожжевой валиновой тРНК.

Экспериментальная часть

Общие сведения об эксперименте см. [6]. В работе использованы мононуклеотиды производства СКТБ БАН Главмикробиопрома (Новосибирск), Трис и акриламид (Merck, ФРГ), дитиотреит (Calbiochem, США), ксиленианол FF (Eastman Organic Chemicals, США), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (10—15 Ки/ммоль) (Amersham, Англия), бумага № 1 Whatman (Англия), ацетил-

Рис. 6. Выделение двухцепочечного полинуклеотида (XV) · (XVI) (см. опыт 12) гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (0,8 × 0,38 см) в 0,05 М ТЕАВ, рН 8,5, фракции 0,25 мл/3 мин. Первый пик (48 · 10⁶ нмп/мин) содержит продукты лигазной сшивки, второй пик (66 · 10⁶ нмп/мин) — исходные олигонуклеотиды



целлюлоза (Schleicher und Schüll, ФРГ), целлюлоза MN-300, DEAE-целлюлоза MN-300 (для гомохроматографии), EDTA и бис-акриламид (Serva, ФРГ), DEAE-целлюлоза DE-23 (для колоночной хроматографии) и DE-81 (бумага) и фосфоцеллюлоза P-81 (бумага) (Whatman, Англия), сефадексы А-25 и G-50 (Pharmacia, Швеция), ДНКаза I (КФ 3.1.4.5), щелочная фосфатаза *E. coli* (КФ 3.1.3.1), фосфодиэстераза змеяного яда (КФ 3.1.4.1) и фосфодиэстераза селезенки (КФ 3.1.4.1) (Worthington, США), микрококковая нуклеаза (КФ 3.1.4.7) P-L (Biochemicals, США); T4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) и T4-ДНК-лигаза (КФ 6.5.1.1), выделенные по методу [7], были предоставлены А. В. Честухиным и О. А. Киселевой (Москва). Микроколочную хроматографию проводили с помощью спектрофотометрической приставки МСФП-1 (Новосибирск). Высоковольтный электрофорез осуществляли в приборе Savant Instruments (США), радиоактивность определяли с помощью сцинтилляционного счетчика Mark II (Nuclear Chicago, США). Хроматографию на бумаге проводили в системах этанол — 1 М ацетат аммония 7 : 3, рН 7,5 (А) и *n*-пропанол — 25% аммиак — H₂O, 11 : 2 : 7 (Б); ТСХ — на пластинках Silufol₂₅₄ (СССР) в водном ацетонитриле. N-Защитные группы удаляли обработкой 25% водным NH₃ (2 мл на 20 ОЕ олигонуклеотида, 5 сут при 20°) с последующим упариванием и хроматографией в системе Б. Для удаления монометокситрильной группы олигонуклеотиды, лишённые N-защитных групп, обрабатывали смесью уксусная кислота — пиридин — вода, 14 : 1 : 3 (5 мл на 20 ОЕ, 36 ч при 20°), раствор упаривали и хроматографировали в системе Б. Нуклеотидный состав полученных веществ определяли ферментативным гидролизом, как описано ранее [8]. Характеристики полученных олигонуклеотидов приведены в табл. 1.

1. *pbzA-T-anC* (II). Смесь 2,0 г (2,0 ммоль) (CNEt)pbzA-T [2] и 2,83 г (5,0 ммоль) ranC(As), высушенную упариванием с пиридином, растворили в 15 мл пиридина, прибавили 5,2 г (17 ммоль) TPS и выдержали 5 ч при комнатной температуре. Для прекращения реакции к смеси при -20° прилили равный объем воды и оставили на ночь при 4°. Затем при 0° прибавили 30 мл охлажденного 2 н. NaOH, выдержали 15 мин при комнатной температуре, нейтрализовали дауэксом-50 (PyH⁺) до рН 8,0, смолу отфильтровали и промыли 2 М водным пиридином. Объединенный фильтрат напесли на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻, 2,5 × 30 см), уравновешенную 0,05 М ТЕАВ в 10% спирте, и хроматографировали в градиенте концентрации ТЕАВ в 10% спирте (0,05—0,45 М, 5 л; 0,45—0,5 М, 1 л), собирая фракции по 12 мл/4 мин. Из фракции 340—390 после упаривания с пиридином и осаждения из пиридина эфиром выделили 25 800 ОЕ₂₈₀ (31%) тринуклеотида (II); возврат ranC 40%, *pbzA-T* 28%.

2. (MeOTr)bzG-T-T-anC-ibG-bzA-T-anC (III) получен взаимодействием 200 мг (0,082 ммоль) пентануклеотида (I) [4], 590 мг (0,42 ммоль) *pbzA-T-anC*(As) и 780 мг (2,5 ммоль) TPS в 5 мл пиридина в условиях опыта 1.

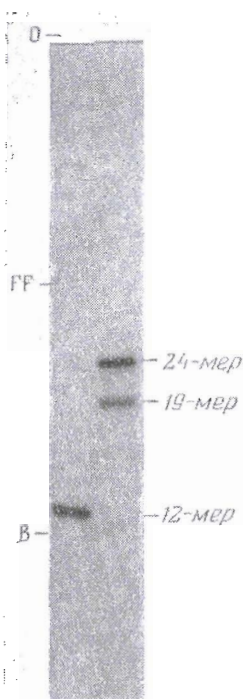


Рис. 7. Разделение полинуклеотидов (XV) и (XVI) электрофорезом (500 В, 17 ч) в 20% полиакриламидном геле (пластина $40 \times 18 \times 0,15$ см) в 0,05 М Трис-боратном буфере (рН 8,3), содержащем 8 М мочевины и 1 мМ EDTA (см. опыт 13). О — старт, FF — ксиленцианол, B — бромфеноловый синий

Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 2×30 см) в градиенте концентрации TEAB и спирта (1 л 0,1 М в 5% спирте — 1 л 0,5 М в 40% спирте, затем 0,5 л 0,6 М в 40% спирте), собирая фракции 7 мл/8 мин. Из фракций 195—230 выделили 3600 OE_{230} (47%) октануклеотида (III); возврат pbzA-T-anC 54%. Рехроматографировали на колонке $1,4 \times 32$ см (0,1—0,6 М TEAB в 40% спирте, 1,6 л); из фракции 120—140 выделили 2000 OE_{280} (26%) октануклеотида (III).

3. panC-T-ibG-ibG (IV) получен взаимодействием 0,44 г (0,46 ммоль) $(\text{CNEt})\text{panC-T}$ [9], 0,62 г (0,61 ммоль) $\text{pibG-ibG}(\text{Ac})$ [10] и 0,91 г (3 ммоль) TPS в условиях опыта 1. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , $2,5 \times 35$ см) в линейном градиенте концентрации TEAB в 10% спирте (0,05—0,5 М, 4 л), собирая фракции по 13 мл/5 мин. Из фракций 205—235 выделили 6000 OE_{280} (27%) тетрапуклеотида (IV); возврат panC-T 20%, pibG-ibG 57%.

4. $(\text{MeOTr})\text{bzG-T-T-anC-ibG-bzA-T-anC-anC-T-ibG-ibG}$ (V) получен взаимодействием 800 OE_{280} (8,1 мкмоль) октануклеотида (III), 4000 OE_{280} (85 мкмоль) 3'-ацетата тетрапуклеотида (IV) и 150 мг (0,5 ммоль) TPS в условиях опыта 1. Результаты хроматографии реакционной смеси и последующей рехроматографии додекануклеотидной фракции приведены на рис. 1а и 2а. Фракции, содержащие додекануклеотид (V), объединили разбавили в 3 раза водой, нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , $2,5 \times 5$ см) и колонку промыли 500 мл 0,05 М TEAB, после чего вещество элюировали 50 мл 1 М TEAB. Элюат несколько раз упарили со спиртом до полного удаления триэтиламина и остаток растворили в 10 мл 0,05 М Трис-НСl, рН 7,5. Выход додекануклеотида (V) 380 OE_{270} (37%); возврат тетрапуклеотида (IV) 63%.

5. $(\text{MeOTr})\text{bzG-anC-ibG}$ (VII) получен взаимодействием 1,50 г (2,34 ммоль) $(\text{MeOTr})\text{bzG}$ [11], 0,76 г (0,73 ммоль) $\text{panC-ibG}(\text{Ac})$ [10] и 1,1 г (3,65 ммоль) TPS в 8 мл пиридина в течение 5 ч при комнатной температуре. Реакцию прекратили добавлением 8 мл 1 М раствора трибутиламина в пиридине и 16 мл воды при -20° . Через 18 ч при 0° прибавили равный объем 2 н. NaOH, через 10 мин нейтрализовали дауэксом-50 (PyH^+), смолу отфильтровали, фильтрат упарили до объема 50 мл, прибавили 2 мл трибутиламина и упарили досуха. Остаток растворили в 100 мл 0,05 М TEAB и последовательно экстрагировали эфиром (3×100 мл), этилацетатом (2×100 мл), смесью этилацетат — *n*-бутанол, 9 : 1 (100 мл) и 8 : 2 (100 мл) и смесью хлористый метилен — *n*-бутанол, 7 : 3 (2×100 мл), контролируя ход извлечения с помощью ТСХ. Экстракты, содержащие хлористый метилен, упарили с пиридином и остаток осадил из пиридина эфиром. Выход тринуклеозиддифосфата (VII) 570 мг (47%). Возврат $(\text{MeOTr})\text{bzG}$ 60% (из этилацетатного экстракта), panC-ibG 35% (из TEAB).

6. $(\text{MeOTr})\text{bzG-anC-ibG-bzA-bzA}$ (VIII) получен взаимодействием 560 мг (0,345 ммоль) $(\text{MeOTr})\text{bzG-anC-ibG}$ (VII), 650 мг (0,62 ммоль) $\text{pbzA-bzA}(\text{Ac})$ (динуклеотид синтезирован с выходом 77%, ср. [9]) и 1,6 г (5,2 ммоль) TPS в 6 мл пиридина в условиях опыта 5. После обработки реакционной смеси экстрагировали последовательно эфиром (500 мл), этилацетатом (250 мл)

и смесью *n*-бутанол — хлористый метилен, 1 : 9 (300 мл); из последних экстрактов выделили тринуклеозиддифосфат (VII) (возврат 15%). Водный раствор досуха упарили с пиридином, остаток растворили в 100 мл 0,05 М ТЕАВ, нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 2×30 см) и хроматографировали в градиенте концентрации ТЕАВ (0,05—0,35 М в воде, 2 л; 0,2 л 0,05 М в воде; 0,3 л 0,05 М в 50% спирте; 0,05—0,5 М в 50% спирте, 2 л), собирая фракции по 15 мл/2 мин. Из фракций 245—310 выделили 14 000 ОЕ₂₈₀ (50%) пентануклеотида (VIII); возврат *pbzA-bzA* 47%. Пентануклеотид (VIII) рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 2×30 см), в линейном градиенте концентрации ТЕАВ в 50% спирте (0,05—0,5 М, 2 л), собирая фракции по 13 мл/14 мин; из фракций 56—76 выделили 10 000 ОЕ₂₈₀ (36%).

7. (*MeOTr*)*bzG-anC-ibG-bzA-bzA-bzA-T-anC* (IX) получен взаимодействием 0,20 г (0,074 ммоль) пентануклеотида (VIII), 0,40 г (0,26 ммоль) *pbzA-T-anC*(Ac) и 0,81 г (2,67 ммоль) TPS в 5 мл пиридина в условиях опыта 1. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , $1,5 \times 30$ см) в градиенте концентрации ТЕАВ и спирта (1 л 0,05 М ТЕАВ в 10% спирте — 1 л 0,6 М ТЕАВ в 40% спирте), собирая фракции по 11 мл/14 мин. Из фракций 130—165 выделили 5500 ОЕ₂₈₀ (60%) октануклеотида (IX); возврат тринуклеотида (II) 73%. Октануклеотид (IX) рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , $1,5 \times 25$ см) в градиенте концентрации ТЕАВ в 40% спирте (0,05 М — 0,6 М, 2 л), собирая фракции по 13 мл/8 мин; из фракций 96—108 выделили 4800 ОЕ₂₈₀ (54%).

8. *pbzA-anC-anC-bzA* (X) получен взаимодействием 185 мг (0,17 ммоль) (CNet)*pbzA-anC* [12], 510 мг (0,485 ммоль) *rapC-bzA*(Ac) [12] и 760 мг (2,5 ммоль) TPS в 2 мл пиридина в условиях опыта 1. Хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , 2×30 см) в градиенте концентрации ТЕАВ в 10% спирте (0,05—0,5 М, 2 л), собирая фракции по 10 мл/6 мин. Из фракций 135—165 выделили 5700 ОЕ₂₈₀ тетра-нуклеотида (X) (38%).

9. (*MeOTr*)*bzG-anC-ibG-bzA-bzA-bzA-T-anC-bzA-anC-anC-bzA* (XI) получен взаимодействием 600 ОЕ₂₈₀ (5 мкмоль) октануклеотида (IX), 1600 ОЕ₂₈₀ (50 мкмоль) 3'-ацетата тетра-нуклеотида (X) и 180 мг (0,6 ммоль) TPS в условиях опыта 1. Результаты хроматографии и рехроматографии представлены на рис. 16 и 26. Выход додекануклеотида (XI) 220 ОЕ₂₈₀ (25%); возврат тетра-нуклеотида (X) 45%.

10. а) *G-T-T-C-G-A-T-C-C-T-G-G* (VI). 40 ОЕ₂₈₀ защищенного додекануклеотида (V) обработали 3 мл 25% водного NH_3 (72 ч при 20°, затем 5 ч при 50°), раствор упарили досуха, остаток растворили в 3 мл смеси уксусная кислота — пиридин — вода (14 : 1 : 3), выдержали 24 ч при 20° и снова упарили. Остаток растворили в 30 мл 7М мочевины и хроматографировали, как показано на рис. 3а и 3б. Аналитическая микроколоночная хроматография выделенного додекануклеотида (VI) представлена на рис. 4а.

б) *G-C-G-A-A-A-T-C-A-C-C-A* (XII) получен из защищенного додекануклеотида (XI) аналогично опыту 10а. Условия и результаты препаративной и аналитической хроматографии приведены на рис. 3в, 3г и 4б.

в) Нуклеотидные карты додекануклеотидов (VI) и (XII) (рис. 5) были получены, как описано ранее [13].

11. 5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов. К 2,5 ммоль додекануклеотида (VI), (XII) или (XIII) в 300 мкл раствора, содержащего 25 мкМ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{rATP}$, 10 мМ MgCl_2 , 1 мМ спермин, 1 мМ дигитотреит и 60 мМ Трис-НСI (рН 7,5), прибавляли 10—15 ед. T4-поли-нуклеотидкиназы [14] и смесь инкубировали 1 ч при 37°. Реакцию прекращали, добавляя 30 мкл 0,2 М EDTA, и 5'- ^{32}P додекануклеотид выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 (колонка 0,8 \times 38 см) в 0,05 М ТЕАВ. Выход (по включению ^{32}P) 85—95%.

12. *Лигазное сшивание олигонуклеотидов.* Раствор 2,5 нмоль ($6,1 \cdot 10^7$ имп/мин) додекануклеотида (^{32}P -VI), 2,5 нмоль ($5,4 \cdot 10^7$ имп/мин) додекануклеотида (^{32}P -XII), 2,1 нмоль ($5,3 \cdot 10^7$ имп/мин) додекануклеотида (^{32}P -XIII) и 3,5 нмоль гептануклеотида (XIV) в 300 мкл буфера, содержащего 60 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl_2 и 1 мМ дитиотреит, выдержали 10 мин при 80° , затем в течение 4 ч постепенно охладили до 10° и оставили при этой температуре на 14 ч. К реакционной смеси прибавили гАТР до концентрации 87 мкМ, 120 ед. Т4-ДНК-лигазы [7] и инкубировали при 10° , периодически определяя долю радиоактивного фосфата, устойчивого к ВАР. Для этого аликвоты (по 1 мкл) обрабатывали 0,005—0,01 ед. ВАР в 10 мкл буфера, содержащего 1 мМ MgCl_2 и 50 мМ Трис-НСl (рН 8,9), в течение 30 мин при 60° и полученную смесь продуктов дефосфорилирования подвергали электрофорезу на DEAE-бумаге в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5) в течение 1,5—2 ч при 30 В/см; в этих условиях олигонуклеотиды остаются на старте, а неорганический фосфат движется в 3,5 раза быстрее голубого красителя ксяленцианола FF. Вещества локализовали радиоавтографией, соответствующие зоны вырезали и радиоактивность определяли в толдуольном сцинтилляторе. После завершения реакции прибавили 30 мкл 0,2 М EDTA, нагревали 1 мин при 100° , охладили до 0° и хроматографировали на сефадексе G-50 (рис. 6).

13. *Выделение одноцепочечных продуктов лигазного сшивания (XV) и (XVI).* Часть полученного в предыдущем опыте вещества ($2 \cdot 10^6$ имп/мин) подвергли электрофорезу в полиакриламидном геле (см. рис. 7). Зоны радиоактивных веществ вырезали из геля, тщательно измельчили скальпелем и поместили каждую в отдельную трубку для электрофореза, закрытую снизу кружком DEAE-бумаги и затем диализной пленкой. Трубку заполнили буфером, содержащим 0,02 М NaOAc , 0,1 мМ EDTA и 0,04 М Трис-ацетат (рН 8,3), поместили в прибор для электрофореза так, чтобы ее нижний край был погружен в аподный раствор на 1—2 мм, и проводили электроолюцию (5—7 мА, 4—5 ч), в результате чего радиоактивное вещество количественно переносилось на DEAE-бумагу. Кружки DEAE-бумаги высушили, несколько раз промыли спиртом и снова высушили, радиоактивные продукты элюировали 150—200 мкл 2 н. раствора NaCl и обессолили гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 в 0,05 М TEAB.

14. *Анализ двухцепочечного (XV)-(XVI) и одноцепочечных (XV) и (XVI) продуктов лигазного сшивания.* Исследуемые олигонуклеотиды (или их смесь) дефосфорилировали, как в опыте 12, после чего щелочную фосфатазу ингибировали прибавлением NaOH до концентрации 0,2 М и нагреванием в течение 1 мин при 100° . Для нейтрализации и удаления остатков фосфатазы реакционную смесь нанесли на полоску фосфоцеллюлозной бумаги, промытой 0,1 н. HCl и водой, бумагу высушили и олигонуклеотиды элюировали 100—200 мкл воды.

Гидролиз до 5'-моонуклеотидов проводили, инкубируя исследуемое вещество ($5 \cdot 10^3$ — $2 \cdot 10^4$ имп/мин) с 2 мкг/мл ДНКазы I и 300 мкг/мл VPDE в течение 3 ч при 37° в 15 мкл буфера, содержащего 60 мМ Трис-НСl, 10 мМ MgCl_2 и 1 мМ дитиотреит (рН 7,5). Реакционную смесь подвергли электрофорезу на бумаге в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5) в течение 45 мин при 100 В/см, пятна 5'-моонуклеотидов локализовали радиоавтографией, вырезали и радиоактивность измеряли в толдуольном сцинтилляторе.

Для гидролиза до 3'-моонуклеотидов исследуемое вещество инкубировали с 2 ед. микрококковой нуклеазы (2 ч при 37°) в 5 мкл буфера, содержащего 50 мМ глицин и 10 мМ CaCl_2 (рН 9,2), затем нейтрализовали 0,2 М HCl , прибавили 0,01 ед. SPDE в 10 мкл буфера, содержащего 0,1 М NH_4OAc и 0,2% твин-80 (рН 6,5), и инкубировали еще 2 ч при 37° . Электрофорез и определение радиоактивности проводили, как при определении 5'-моонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Ю. А., Вульфсон А. Н., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Якимов С. А. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 22—30.
2. Berlin Yu. A., Chakhmakicheva O. G., Efimov V. A., Shingarova L. N. (1975) *Nucleic Acid Res.*, **2**, s105.
3. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Чахмахчева О. Г., Шингарова Л. Н. (1976) *Биоорган. химия*, **2**, 1505—1512.
4. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Чахмахчева О. Г., Шингарова Л. Н. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 1121—1129.
5. Sgaravella V., van de Sande J. H., Khorana H. G. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 1468—1475.
6. Берлин Ю. А., Бочарова Т. Н., Вульфсон А. Н., Колосов М. Н., Коробко В. Г. (1976) *Биоорган. химия*, **2**, 762—771.
7. Panet A., van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Raas A. J., Liljehange J. R., Kleppe K. (1973) *Biochemistry*, **12**, 5045—5050.
8. Берлин Ю. А., Дьяков В. И., Колосов М. Н. (1974) *Биохимия*, **39**, 747—751.
9. Бадаликеева А. Г., Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ивановская М. Г., Кнорре Д. Г., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Прокофьев М. А., Смирнов В. Д., Шарбарова З. А., Шубина Т. Н. (1973) *Химия природн. соед.*, 394—402.
10. Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Полякова И. А., Чахмахчева О. Г., Чуриунова О. А. (1973) *Химия природн. соед.*, 402—410.
11. Weber H., Khorana H. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, **72**, 249—249.
12. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Шингарова Л. Н. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 1738—1745.
13. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г. (1976) *Биоорган. химия*, **2**, 166—178.
14. Richardson C. (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **54**, 158—165.
15. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) *Nucleic Acids Res.*, **1**, 331—353.

Поступила в редакцию
15.VIII.1977

SYNTHESIS OF OLIGO AND POLYNUCLEOTIDES. XIX. THE SYNTHESIS OF A 3'-TERMINAL DOUBLE-STRANDED FRAGMENT OF THE STRUCTURAL GENE FOR A VALINE tRNA FROM YEASTS

BERLIN Yu. A., BOLDYREVA E. F., EFIMOV V. A., KOLOSOV M. N.,
KOROBKO V. G., CHAKHMAKICHEVA O. G., SHINGAROVA L. N.

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

Two dodecadeoxynucleotides d(G-T-T-C-G-A-T-C-C-T-G-G) and d(G-C-G-A-A-A-T-C-A-C-C-A) homologous to the 54—77 segment of the tRNA^{Val}₁ from yeast have been chemically synthesized by the phosphodiester approach according to the 5+3+4 scheme. The substances obtained have been characterized by microcolumn anion — exchange chromatography and fingerprinting technique. These oligonucleotides and the earlier synthesised dodecanucleotide d(T-T-C-G-C-C-A-G-G-A-T) were 5'-phosphorylated by [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide₁ kinase, then complexed with the heptanucleotide d(T-C-G-T-G-A-T) and ligated by T4 DNA ligase to yield a doublestranded deoxypolynucleotide corresponding to the sequence 59—77 of the yeast tRNA^{Val}₁ and containing a 5-membered protruding end. Thus the chemical-enzymatic synthesis of a 3'-terminal fragment of the structural gene for the tRNA^{Val}₁ has been carried out.