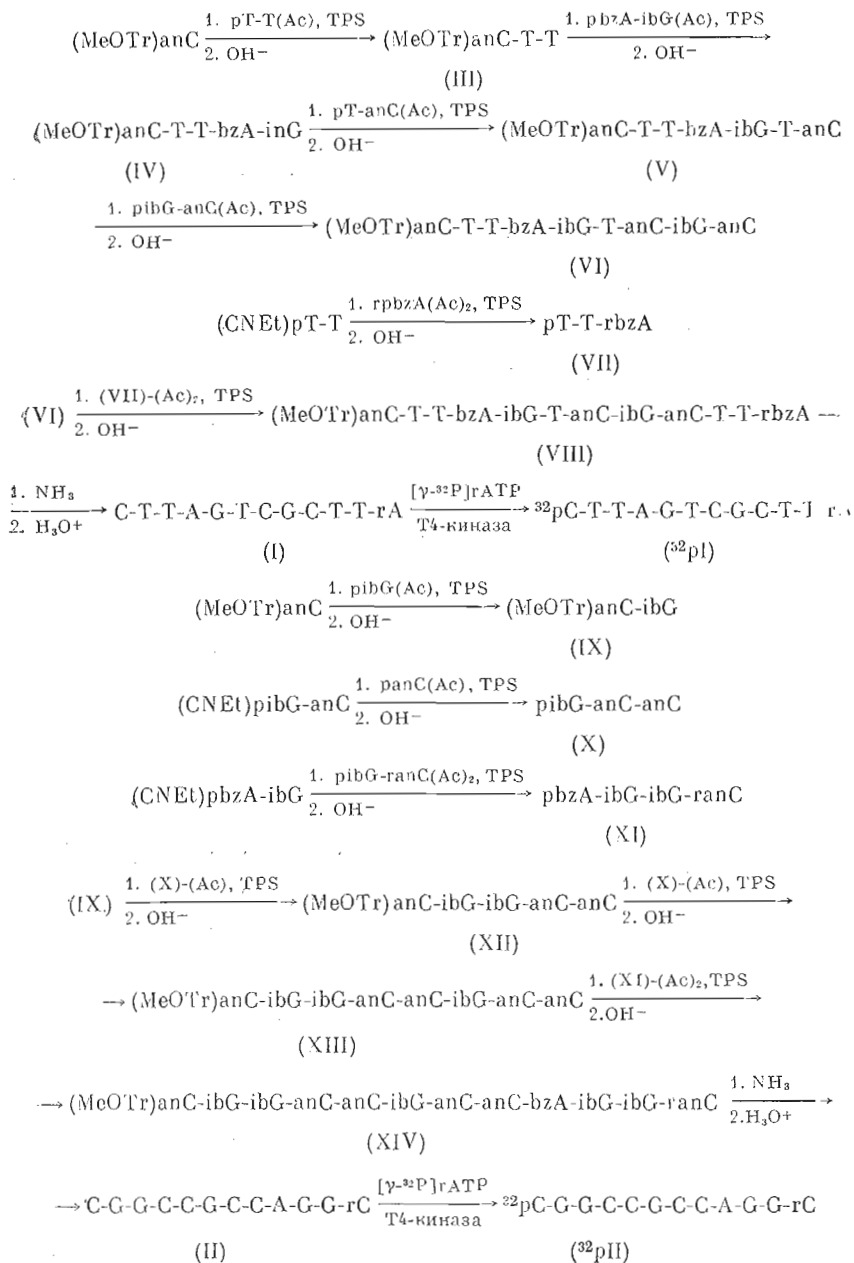


схему 2), чтобы максимально использовать повторяющиеся ди- и три-нуклеотидные блоки и иметь возможность до стадии пентануклеотида выделять продукты конденсации путем экстракции [4] без дополнительной очистки анионообменной хроматографией.

Схема 2



Додекануклеотид (I) был получен из пентануклеотида (IV) последовательным наращиванием цепи двумя и одним тринуклеотидными блоками. Продукты этих конденсаций были выделены анионообменной хроматографией: пентануклеотид (V) — в ТЕАВ, сначала в водном растворе для выделения непрореагировавшего динуклеотида и нетритилированных продуктов, а затем в 50% спирте для разделения тритилсодержащих олиго-

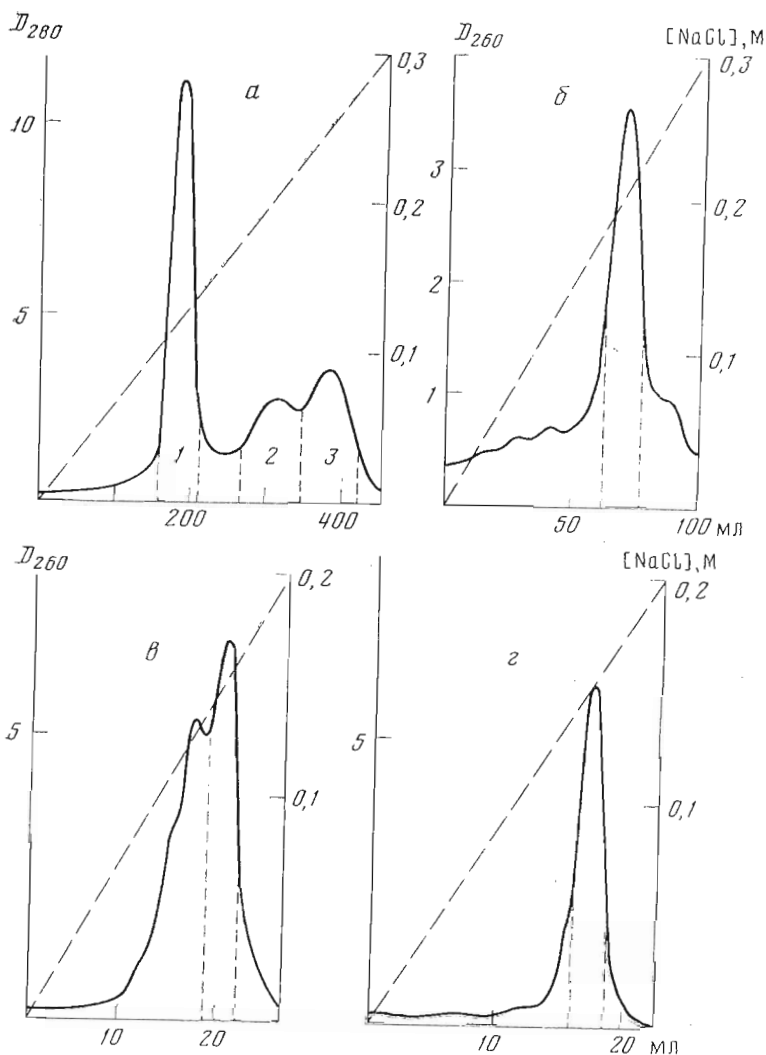


Рис. 1. Выделение додекануклеотида (I) хроматографией на DEAE-целлюлозе (Cl^-) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine. *a* — выделение защищенного додекануклеотида из реакционной смеси: колонка 1×28 см, 0,02 М трис- HCl , pH 7,5; пик 1 содержит 348 OE_{280} тринуклеотида (VII), пик 2 — 98 OE_{280} нонануклеотида (VI), пик 3 — 116 OE_{280} додекануклеотида (VIII). *б* — выделение незащищенного додекануклеотида (I): колонка $0,5 \times 15$ см, 0,02 М трис- HCl , pH 7,5; основной пик содержит 22 OE_{260} . *в* — рехроматография додекануклеотида (I): колонка $0,4 \times 7$ см, HCl , pH 3,5; отмеченная часть пика содержит 9,1 OE_{260} . *г* — рехроматография предыдущего вещества в тех же условиях; выделено 6,8 OE_{260} додекануклеотида (I)

нуклеотидов (ср. [5]); нонануклеотид (VI) — в градиенте концентрации хлористого натрия в 7 М мочеvine при pH 7,5. Оба этих соединения были дополнительно очищены анионообменной хроматографией в 7 М мочеvine при pH 7,5. Нонануклеотид (VI) был затем введен в реакцию с 2',3'-О-диацетатом тринуклеотида (VII), продукт конденсации — додекануклеотид (VIII) — был выделен из реакционной смеси хроматографией в 7 М мочеvine при pH 7,5 (рис. 1*a*). Полученный после удаления защитных групп додекануклеотид (I) был очищен хроматографией сначала при pH 7,5, а затем дважды при pH 3,5 (рис. 1*б*–*г*). Индивидуальность полу-

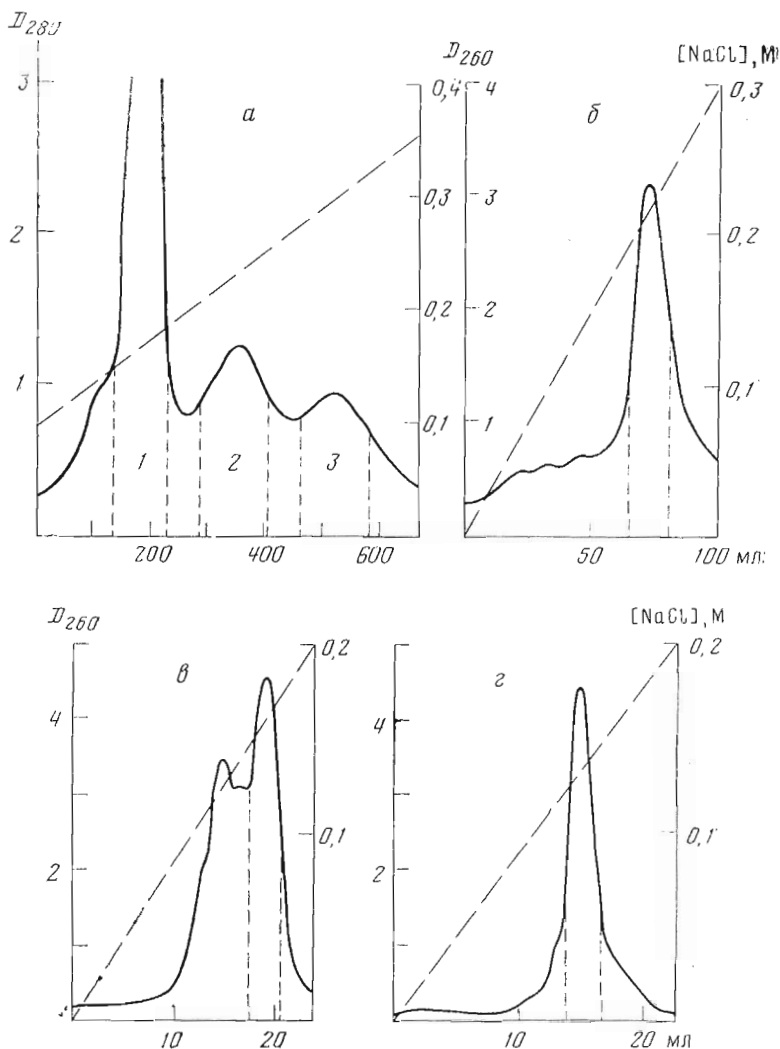


Рис. 2. Выделение додекануклеотида (II) хроматографией на DEAE-целлюлозе (Cl^-) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины. а — выделение защищенного додекануклеотида из реакционной смеси: колонка 1,5×21 см, 0,02 М трис- HCl , pH 7,5; пик 1 содержит 218 OE_{280} тетра-нуклеотида (XI), пик 2 — 146 OE_{280} октануклеотида (XIII), пик 3 — 97 OE_{280} додекануклеотида (XIV). б — выделение незащищенного додекануклеотида (II): колонка 0,5×15 см, 0,02 М трис- HCl , pH 7,5; основной пик содержит 19,3 OE_{260} . в — рехроматография додекануклеотида (II): колонка 0,4×7 см, HCl , pH 3,5; отмеченная часть пика содержит 7,3 OE_{260} . г — рехроматография предыдущего вещества в тех же условиях; выделено 4,8 OE_{260} додекануклеотида (II)

ченного соединения (I) была доказана микроколоночной хроматографией в 7 М мочевины при pH 7,5 и 3,5 (рис. 3а), а первичная структура подтверждена путем ферментативного $5' \text{-}^{32}\text{P}$ -фосфорилирования додекануклеотида (I), последующего частичного гидролиза фосфодиэстеразой зменного яда и двухмерного разделения продуктов гидролиза (рис. 4а). Полученная нуклеотидная карта интерпретировалась согласно работе [6].

Додекануклеотид (II) был получен из пептануклеотида (XII) удлинением цепи вначале тринуклеотидным, а затем тетра-нуклеотидным блоками. Выделение и очистку октануклеотида (XIII), додекануклеотидов (XIV) и (II) проводили соответственно как при синтезе соединений

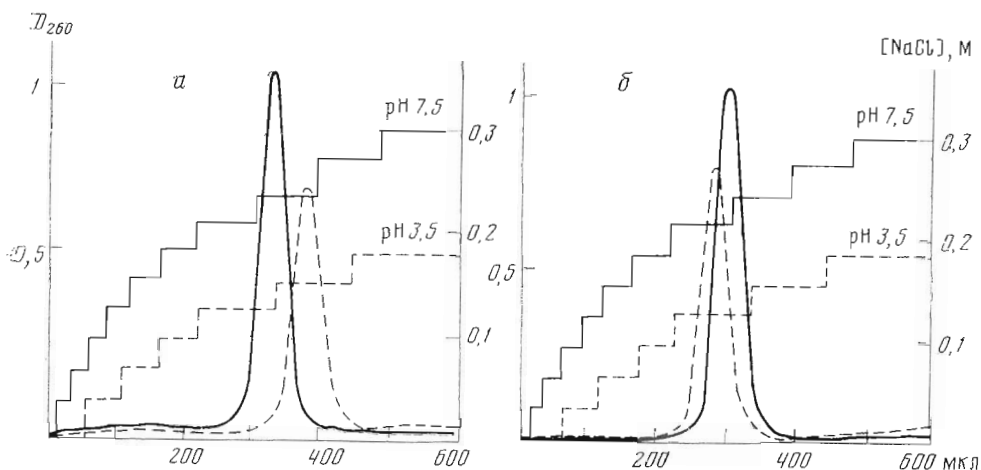


Рис. 3. Микроколоночная хроматография на DEAE-целлюлозе (Cl^- , $0,7 \times 60$ мм) в ступенчатом градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine (0,02 М трис- HCl , pH 7,5, или HCl , pH 3,5). а — додекануклеотид (I), б — додекануклеотид (II). Сплошная линия — pH 7,5, штриховая — pH 3,5

(V), (VIII) и (I) (рис. 2). Индивидуальность полученного соединения (II) была подтверждена микроколоночной хроматографией в 7 М мочеvine при pH 7,5 и 3,5 (рис. 3б), а также с помощью двухмерного разделения (^{32}P II) электрофорезом на ацетилцеллюлозе и гомохроматографией (рис. 4б).

Наличие на 3'-конце додекануклеотида (II) рибо-звена было доказано его превращением в ундекануклеотид С-G-G-C-C-G-C-C-A-G-G в результате периодатного окисления по этому звену с последующим его β -элиминированием в присутствии амина при pH 5 и ферментативным дефосфорилированием; сопоставление подвижностей $5'$ - ^{32}P -меченого ундекануклеотида и (^{32}P II) при гомохроматографии приведено на рис. 5. При получении нуклеотидной карты додекануклеотида (II) оказалось, что в условиях частичного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда (20° , 0,5 ч) большая часть додекануклеотида не расщепляется, что затрудняет интерпретацию сдвигов, отвечающих звеньям вблизи 3'-конца молекулы (рис. 4б). Если же взаимодействие с фосфодиэстеразой проводят при 37° , то уже через 15 мин вещество гидролизуется полностью, а при более короткой инкубации фермент «проскакивает» олигонуклеотидную последовательность, вследствие чего промежуточные олигомеры образуются лишь в незначительном количестве. Возможно, это объясняется частичной самокомплементарностью олигонуклеотида (II); соответствующие дуплексы, образование которых затрудняет гидролиз, распадаются при повышении температуры.

Свойства всех синтезированных олигонуклеотидов приведены в табл. 1.

Была изучена способность додекануклеотидов (I) и (II) гибридизоваться с 23S- и 5S-рРНК *E. coli*. Для этого смесь соответствующей рРНК и $5'$ - ^{32}P -меченого олигонуклеотида подвергали отжигу при 85° в растворе с высокой ионной силой и образовавшийся комплекс выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-75 при 4° , определяя степень связывания по количеству радиоактивности в высокомолекулярной фракции (рис. 6 и табл. 2). Оба додекануклеотида связывались с соответствующими рРНК; в контрольных опытах степень комплексообразования додекануклеотида (I) с 5S- и 16S-рРНК была значительно ниже. В случае додекануклеотида (II) наблюдалась высокая степень связывания с высокомолекулярными

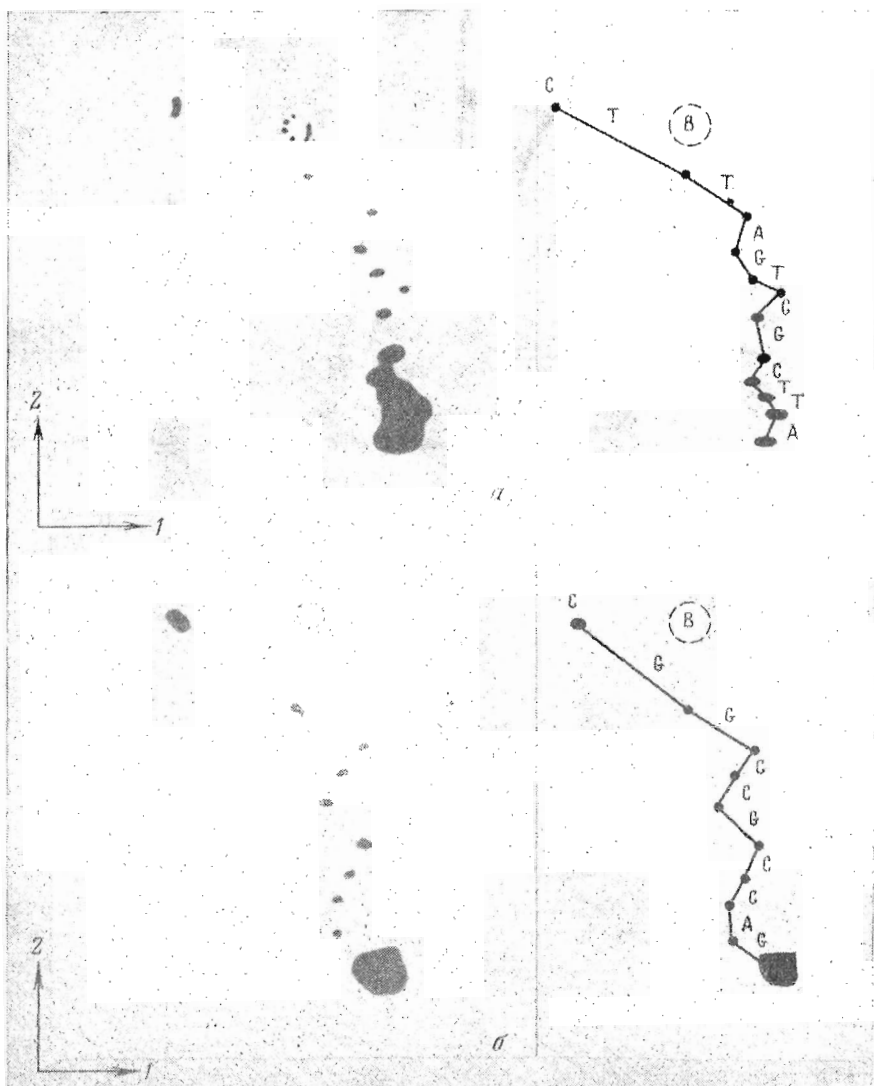


Рис. 4. Нуклеотидные карты додекануклеотидов (^{32}pI) (а) и (^{32}pII) (б). Первое направление — электрофорез на ацетицеллюлозе, второе направление — гомохроматография на DEAE-целлюлозе. В — положение красителя ксиленацитола FF

рРНК, превышающая степень комплексообразования с 5S-рРНК. По-видимому, высокое содержание остатков гуаниловой кислоты в олигонуклеотиде (II) позволяет ему образовывать достаточно прочные комплексы с более высокомолекулярными рРНК, 5'-концевые сегменты которых содержат комплементарные олигонуклеотиды (II) участки (например, G-C-C-U-G, G-G-G-G-G, C-C-G-G-G и G-G-C-C в 23S-рРНК [7] и C-G-G-C-A-G, C-C-U-G-G и G-G-C-C в 16S-рРНК [8]). Постоянство степени связывания додекануклеотида (II) с 5S-рРНК в области 30–50-кратных мольных избытков олигонуклеотида относительно РНК свидетельствует об определенной специфичности комплексообразования в этом интервале, когда, по-видимому, насыщается один энергетически наиболее выгодный участок связывания. Повышение избытка додекануклеотида (II) может приводить к комплементарному взаимодействию его с другими районами 5S-рРНК, например с участком 112–118 (G-C-C-A-G-G-C) [9].

Полученные олигонуклеотиды представляют интерес в качестве праймеров для изучения структуры спейсерных участков рибосомных оперонов *E. coli* (ср., например, [10, 11]) и как специфические зонды для изучения пространственной структуры рРНК в свободном виде и в составе рибосом. В частности, к этим зондам через их 3'-концевое рибо-звено могут быть присоединены различные модифицирующие группы (см., например, [12, 13]).

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксирибонуклеотиды (pT, ranC, pbzA и ribG) производства СКТБ БАВ Главмикробиопрома и опытного химического цеха НИОХ АН СССР (Новосибирск) после дополнительной очистки с помощью анионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе А-25 (HCO_3^-). (MeOTr)anC синтезировали из дезоксицитидина (Calbiochem) [14], а rpbzA и granC — из 5'-адениловой и 5'-цитидиловой кислот (Reanal) [15]. Введение CNEt-группы и 3'-ацетилирование проводили как в работе [16]. TPS (Merck) непосредственно перед использованием перекристаллизовывали из пентана. Общие условия эксперимента приведены в статье [17]. Хроматографию проводили на бумаге FN-17 (Filtrak) в системах этанол — 1 М ацетат аммония (рН 7,5), 7 : 3 (А) и *n*-пропанол — 25% NH_3 — вода, 55 : 10 : 35 (Б) или на пластинках с силикагелем (Eastman Kodak) в системе ацетонитрил — вода, 8 : 2 (В). 5S- и 23S-рРНК выделяли из 50S-субъединиц рибосом *E. coli* MRE-600 по методу [18] и разделяли хроматографией на кизельгуре, покрытом метилированным альбумином [19].

1. (MeOTr)anC-T-T (III) получен взаимодействием 0,89 г (1,4 ммоль) (MeOTr)anC, 1,07 г (1,3 ммоль) pT-T(Ac) [20] и 1,21 г (4,0 ммоль) TPS в 7 мл пиридина (20°, 5 ч). Смесь охладил, обработал 8 мл 1 М раствора диизопропилэтиламина в пиридине и 15 мл воды (4°, 16 ч) и упарил с пиридином. Остаток растворил в 250 мл 0,2 М ТЕАВ, сульфокислоту и непрореагировавший нуклеозид извлекли эфиром (2×250 мл) и смесью эфир — этилацетат, 1 : 1 (3×250 мл), а продукт конденсации экстрагировали смесью этилацетат — *n*-бутанол, 8 : 2 (4×250 мл), и 7 : 3 (250 мл), контролируя ход экстракции с помощью ТСХ в системе ацетонитрил — вода, 9 : 1. Объединенный экстракт упарил с пиридином, остаток растворил в смеси пиридин — этанол, 1 : 1 (20 мл), и гидролизовали равным объемом 2н. NaOH (0°, 10 мин). Раствор нейтрализовали дауэксом 50 (PyH^+) и пропустили через колонку (2,5×20 см) с той же смолой. Колонку промыли 300 мл смеси пиридин — спирт — вода, 1 : 1 : 3, и элюаты упарил с пиридином. После осаждения эфиром из пиридина получили 0,99 г (55%) тринуклеотида (III).

2. (MeOTr)anC-T-T-bzA-ibG (IV) получен взаимодействием 0,36 г (0,29 ммоль) тринуклеотида (III), 0,8 г (0,78 ммоль) rpbzA-ibG(Ac) [20] и 0,88 г (2,9 ммоль) TPS в 4 мл пиридина (20°, 6 ч). После обработки реакционной смеси, как в опыте 1, исходный тринуклеотид (III) выделили экстракцией смесью этилацетат — *n*-бутанол, 8 : 2 (6×250 мл) (возврат 9%), а продукт конденсации — смесью этилацетат — *n*-бутанол, 6 : 4 (5×250 мл) и 1 : 1 (250 мл). Выход пентануклеотида (IV) 0,38 г (54%).



Рис. 5. Гомохроматография продукта удаления 3'-концевого рибо-звена из додекануклеотида (II) периодатным окислением с последующим β-элиминированием. 1 — продукт реакции, 2 — исходный олигонуклеотид (^{32}pII)

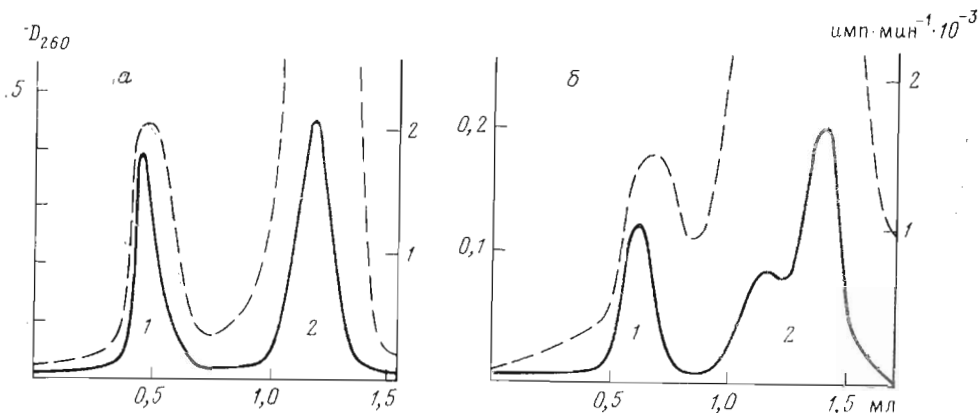


Рис. 6. Выделение комплексов додекануклеотида (I) с 23S-рРНК (а) и додекануклеотида (II) с 5S-рРНК (б) гель-фильтрацией на сефадексе G-75 (0,45×7 см, сверхтопкий) при 4° в ТМЕ-буфере. а – реакционная смесь содержала 0,3 ОЕ₂₆₀ 23S-рРНК, 0,029 ОЕ₂₆₀ (³²рI) (0,5·10⁶ имп/мин, 25-кратный мольный избыток) в 120 мкл ТМЕ-буфера. Пик 1 – олигонуклеотид (³²рI) (7000 имп/мин), связанный с 23S-рРНК (комплексобразование 38%), пик 2 – избыточный меченый додекануклеотид (I), б – реакционная смесь содержала 0,01 ОЕ₂₆₀ 5S-рРНК, 0,023 ОЕ₂₆₀ (³²рII) (0,65·10⁶ имп/мин, 25-кратный мольный избыток) в 20 мкл ТМЕ-буфера. Пик 1 – олигонуклеотид (³²рII) (4980 имп/мин), связанный с 5S-рРНК (комплексобразование 21%), пик 2 – избыточный меченый олигонуклеотид (II). Сплошная линия – УФ-поглощение, штриховая – радиоактивность

3. (MeOTr)anC-T-T-bzA-ibG-T-anC (V) получен взаимодействием 0,28 г (0,12 ммоль) гептануклеотида (IV), 0,64 г (0,6 ммоль) рТ-anC(Ac) [2] и 0,83 г (2,74 ммоль) TPS в 4 мл пиридина (20°, 5 ч). Реакционную смесь при охлаждении обработали 5,5 мл 1 М раствора диизопропилэтиламина в пиридине и 9,5 мл воды (4°, 16 ч), прибавили 18 мл 2 н. NaOH (0°, 10 мин), избыток щелочи нейтрализовали дауэксом 50 (PyH⁺) и элюаты упарили до минимального объема. Остаток растворили в 50 мл 0,05 М ТЕАВ, нанесли на колонку с DEAE-целлюлозой (НСО₃⁻, 2,5×45 см) и хроматографировали в градиенте концентрации ТЕАВ в воде (0,05–0,45 М, 2 л), а затем в 50% спирте (0,05–0,45 М, 3,5 л), собирая фракции по 19,5 мл/6 мин. Из фракций 256–274 выделили 3520 ОЕ₂₈₀ (36%) гептануклеотида (V); возврат динуклеотида рТ-anC 82%, гептануклеотида (IV) 29%.

4. (MeOTr)anC-T-T-bzA-ibG-anC-ibG-anC (VI) получен взаимодействием 2000 ОЕ₂₈₀ (24,4 мкмоль) гептануклеотида (V), 2700 ОЕ₂₈₀ (94,5 мкмоль) динуклеотида ribG-anC(Ac) [20] и 330 мг (1,08 ммоль) TPS в 1 мл пиридина (20°, 6 ч). Реакционную смесь обработали, как в опыте 3, и хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl⁻, 1,5×21 см) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine при pH 7,5 (0–0,3 М, 0,7 л), собирая фракции по 9 мл/4 мин. Из фракций 60–71 выделили 1305 ОЕ₂₈₀ (36%) нонануклеотида (VI); возврат динуклеотида ribG-anC 78%, гептануклеотида (V) 38%.

5. рТ-T-rbzA (VII). Раствор 0,35 г (0,42 ммоль) (CNEt)рТ-T [20], 0,46 г (0,80 ммоль) грbzA(Ac)₂ и 0,88 г (2,9 ммоль) TPS в 5 мл пиридина выдержали 5 ч при 20°, затем при –20° обработали 5 мл 50% водного пиридина, выдержали 16 ч при 4° и гидролизовали равным объемом 2н. NaOH (20°, 15 мин). После нейтрализации и упаривания смесь хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом А-25 (НСО₃⁻, 2,5×45 см) в градиенте концентрации ТЕАВ в воде (0,05–0,40 М, 4 л), собирая фракции по 34 мл/12 мин. Из фракций 93–108 выделили 5520 ОЕ₂₈₀ (44%) тринуклеотида (VII); возврат грbzA 35%, рТ-T 33%.

6. (MeOTr)anC-T-T-bzA-ibG-T-anC-ibG-anC-T-T-rbzA (VIII) получен взаимодействием 170 ОЕ₂₈₀ (1,53 мкмоль) нонануклеотида (VI), 500 ОЕ₂₈₀ (16,7 мкмоль) 2',3'-диацетата тринуклеотида (VII) и 54 мг (178 мкмоль) TPS в 0,5 мл пиридина в условиях опыта 3. Кривая хроматографического разделения реакционной смеси приведена на рис. 1а. Выход додекануклеотида (VIII) 116 ОЕ₂₈₀ (54%); возврат нонануклеотида (VI) 38%, тринуклеотида (VII) 72%.

7. C-T-T-A-G-T-C-G-C-T-T-rA (I). 38 ОЕ₂₈₀ додекануклеотида (VIII) обработали 3 мл 25% водн. NH₃ (50°, 3 ч), упарили и гидролизовали смесью пиридин — уксусная кислота — вода, 1 : 14 : 3 (20°, 48 ч). Уксусную кислоту удалили многократным упариванием с водой и остаток хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl⁻, 0,5×15 см) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеине при pH 7,5 (рис. 1б), а затем дважды на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl⁻, 0,4×7 см) при pH 3,5 (рис. 1в, г). Выход незащищенного додекануклеотида (I) 6,8 ОЕ₂₈₀. Результаты микроколочной хроматографии при pH 7,5 и 3,5 приведены на рис. 3а.

8. (MeOTr)anC-ibG (IX) получен взаимодействием 1,05 г (1,65 ммоль) (MeOTr)anC, 2,19 г (4,05 ммоль) pibG(Ac) и 2,8 г (9,3 ммоль) TPS в 15 мл пиридина (20°, 3 ч). Реакционную смесь обработали, как в опыте 1, сульфокислоту и непрореагировавший нуклеозид извлекли эфиром (3×250 мл) и смесью эфир — этилацетат, 1 : 1 (2×250 мл), а продукт конденсации экстрагировали смесью этилацетат — *n*-бутанол, 9 : 1 (3×250 мл) и 8,5 : 1,5 (2×250 мл). Выход динуклеотида (IX) 1,08 г (59%).

9. pibG-anC-anC (X). Раствор 1,66 г (1,57 ммоль) (CNEt)pibG-anC [20], 3,4 г (6,04 ммоль) ranC(Ac) и 4,6 г (15,2 ммоль) TPS в 23 мл пиридина выдержали 4 ч при 20°, обработали, как в опыте 5, и хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом А-25 (НСО₃⁻, 2,5×35 см) в градиенте концентрации ТЕАВ в воде (0,05—0,50 М, 4 л), собирая фракции по 33 мл/8 мин. Из фракций 107—118 выделили 25 000 ОЕ₂₈₀ (35%) тринуклеотида (X); возврат ranC 29%.

10. (MeOTr)anC-ibG-ibG-anC-anC (XII) получен взаимодействием 0,67 г (0,6 ммоль) динуклеотида (IX), 0,46 г (0,3 ммоль) 3'-ацетата тринуклеотида (X) и 0,61 г (2 ммоль) TPS в 3 мл пиридина (20°, 5,5 ч). После обработки реакционной смеси, как в опыте 1, исходный динуклеотид (IX) извлекли смесью этилацетат — *n*-бутанол, 8,5 : 1,5 (4×250 мл) (возврат 53%), а продукт конденсации экстрагировали смесью этилацетат — *n*-бутанол, 3 : 2 (4×250 мл). После щелочного гидролиза и обработки в условиях опыта 1 получили 0,33 г (42%) пентануклеотида (XII).

11. (MeOTr)anC-ibG-ibG-anC-anC-ibG-anC-anC (XIII) получен взаимодействием 0,143 г (55 мкмоль) пентануклеотида (XII), 0,34 г (0,22 ммоль) 3'-ацетата тринуклеотида (X) и 0,37 г (1,22 ммоль) TPS в 2 мл пиридина (20°, 6 ч). Реакционную смесь обработали, как в опыте 3, и хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом А-25 (НСО₃⁻, 1,8×36 см) в градиенте концентрации ТЕАВ в воде (0,05—0,7 М, 1,2 л), а затем в 50% спирте (0,05—0,7 М, 1,8 л), собирая фракции по 15 мл/5 мин. Из фракций 143—165 выделили 2070 ОЕ₂₈₀ (31%) октануклеотида (XIII); возврат тринуклеотида (X) 69%, пентануклеотида (XII) 15%.

12. pibG-ranC. Раствор 0,89 г (1,63 ммоль) (CNEt)pibG, 0,7 г (1,2 ммоль) ranC(Ac)₂ и 1,27 г (4,2 ммоль) TPS в 6 мл пиридина выдержали 5 ч при 20°, затем обработали, как в опыте 5, и хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (НСО₃⁻, 2,5×45 см) в градиенте концентрации ТЕАВ в воде (0,05—0,40 М, 4 л), собирая фракции по 17 мл/6 мин. Из фракций 91—108 выделили 11 000 ОЕ₂₈₀ (32%) динуклеотида pibG-ranC; возврат ranC 26%, pibG 42%.

13. pbzA-ibG-ibG-ranC (XI) получен взаимодействием 0,167 г (0,15 ммоль) (CNEt)pbzA-ibG [20], 0,385 г (0,36 ммоль) pibG-ranC(Ac)₂ и 0,5 г (1,65 ммоль) TPS в 2,5 мл пиридина (20°, 6 ч), как описано в опыте 5. После хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой (НСО₃⁻,

Свойства синтезированных олигонуклеотидов

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\lambda_{\text{мин}}$, нм
pT-T	270	244
(MeOTr)anC-T-T (III)	274,304	246
C-T-T	269	238
(MeOTr)anC-T-T-bzA-ibG (IV)	275	239
C-T-T-A-G	261	236
pT-anC	275,303	239
pT-C	270	242
(MeOTr)anC-T-T-bzA-ibG-T-anC (V)	265,276	241
C-T-T-A-G-T-C	266	239
(MeOTr)anC-T-T-bzA-ibG-T-anC-ibG-anC (VI)	266,279	240
C-T-T-A-G-T-C-G-C	263	239
pT-T-rbzA (VII)	274	238
pT-T-rA	264	236
(MeOTr)anC-T-T-bzA-ibG-T-anC-ibG-anC-T-T-rbzA (VIII)	276	240
C-T-T-A-G-T-C-G-C-T-T-rA (I)	263	234
(MeOTr)anC-ibG (IX)	263,290	238
C-G	252,270	230
pibG-anC	264,291	238
pG-C	256,270	228
pibG-anC-anC (X)	256,285	233
pG-C-C	258,269	231
(MeOTr)anC-ibG-ibG-anC-anC (XII)	264,290	244
C-G-G-C-C	257,270	230
(MeOTr)anC-ibG-ibG-anC-anC-ibG-anC-anC (XIII)	265,290	240
C-G-G-C-C-G-C-C	263	237
pbzA-ibG	263,280	232
pA-G	255	227
pibG-ranC	261,289	237
pG-rC	255,270	229
pbzA-ibG-ibG-ranC (XI)	268,282	238
pA-G-G-rC	255	234
(MeOTr)anC-ibG-ibG-anC-anC-ibG-anC-anC-bzA-ibG- -ibG-ranC (XIV)	262,292	244
C-G-G-C-C-G-C-C-A-G-G-rC (I)	258	233

* Определено на основании нуклеотидной карты.

2,5×45 см) в градиенте концентрации TEAB в воде (0,05–0,45 М, 4 л) из фракций 134–150 (17,5 мл/5 мин) выделили 2000 ОЕ₂₈₀ (23%) тетра-нуклеотида (XI); возврат динуклеотидов pibG-ranC 62%, pbzA-ibG 31%.

14. (MeOTr)anC-ibG-ibG-anC-anC-ibG-anC-anC-bzA-ibG-ibG-ranC (XIV) получен взаимодействием 190 ОЕ₂₈₀ (1,56 мкмоль) октануклеотида (XIII), 380 ОЕ₂₈₀ (6,4 мкмоль) 2',3'-диацетата тетра-нуклеотида (XI) и 30 мг (99 мкмоль) TPS в 0,5 мл пиридина в условиях опыта 3. Результаты хроматографического разделения приведены на рис. 2а. Выход олигонуклеотида (XIV) 97 ОЕ₂₈₀ (35%); возврат октануклеотида (XIII) 22%, тетра-нуклеотида (XI) 79%.

15. C-G-G-C-C-G-C-C-A-G-G-rC (II) получен из 39 ОЕ₂₈₀ додекануклеотида (XIV), как в опыте 7 (см. рис. 2б–г), с выходом 4,8 ОЕ₂₈₀. Результаты микроколонной хроматографии соединения (II) изображены на рис. 3б.

16. 5'-³²P-Фосфорилирование и получение нуклеотидных карт. 1 нмоль додекануклеотида (I) или (II), 2 нмоль [γ -³²P]rATP (5–20 Ки/ммоль, Amersham) и 5 мкл T4-поли-нуклеотидкиназы (фракция VI [21]) в 40 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂ и 5 мМ β -меркаптоэтанол, инкубировали 1,5 ч при 37°. Меченые олигонуклеотиды выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 (0,75×15 см), собирая

Таблица 1

E_{250}/E_{260}	E_{270}/E_{260}	E_{280}/E_{260}	E_{290}/E_{260}	E_{300}/E_{260}	R_{pT} в системах			Мономерный состав						
					А..	Б	В	С	pG	pC	pT	pA		
0,62	1,19	0,91	0,36		0,57	0,89								
0,79	1,18	1,16	1,03	0,94			0,48							
0,74	1,11	0,82	0,31			0,92		1,00				1,94		
0,78	1,13	1,13	0,83	0,46			0,30							
0,85	0,89	0,55	0,14			0,56		1,00	1,00			1,95	1,13	
1,12	0,76	1,20	1,19	1,11	1,30									
0,76	1,18	0,92	0,35			0,95				1,00		1,05		
0,82	1,08	1,10	0,96	0,78			0,24							
0,85	0,96	0,70	0,29			0,46		1*	1*	1*		3*	1*	
0,83	1,06	1,07	0,98	0,80			0,19							
0,86	0,94	0,72	0,33			0,35		1*	2*	2*		3*	1*	
0,74	1,15	1,09	0,71	0,51	0,52									
0,73	0,89	0,52	0,19			0,75						1,94	1,00	
0,83	1,06	1,05	0,92	0,72										
0,85	0,95	0,68	0,30					1*	2*	2*		5*	2*	
0,81	0,93	0,95	1,00	0,96			0,62							
1,05	0,91	0,75	0,39			0,96		1,06	1,00					
0,77	0,94	0,94	0,99	0,96	0,86									
0,99	0,96	0,75	0,39			0,79			1,00	1,12				
0,94	1,11	1,26	1,28	1,08	0,54									
0,97	0,99	0,79	0,38			0,64			1,00	1,90				
0,89	1,04	1,14	1,22	1,18			0,39							
0,99	0,94	0,74	0,39			0,34		1,00	2,20	2,00				
0,86	1,02	1,11	1,19	1,13			0,23							
0,77	0,96	0,63	0,23			0,26		1*	3*	4*				
0,83	1,00	1,09	0,89	0,47	0,91									
1,01	0,74	0,43	0,19			0,80			1,00				1,11	
0,82	0,93	0,96	1,00	0,94	0,84									
1,00	0,93	0,72	0,36			0,80				1,15	1,00			
0,83	0,97	1,03	0,95	0,71	0,55									
0,99	0,79	0,48	0,17			0,57				2,29	1,03		1,00	
0,89	0,96	0,99	1,03	0,96										
0,96	0,91	0,71	0,44					1*	5*	5*			1*	

фракции по 0,3 мл/5 мин. Нуклеотидные карты (рис. 4) были получены по методу [6].

17. *Определение 3'-рибо-звена в додекануклеотиде (II)* проводили по методу [22]. 2 нмоль олигонуклеотида (II) обработали 10 мкл 5 мМ раствора NaIO_4 (20°, 0,5 ч), затем обессолили на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^-) и нагревали 2 ч при 45° в буфере, содержащем 0,1 М ацетат аммония, pH 5, и 0,05 М хлоридрат *D, L*-лизина. После гидролиза с помощью иммобилизованной на целлюлозе щелочной фосфатазы *E. coli* (37°, 3 ч) полученный олигонуклеотид 5'-³²P-фосфорилировали, как в опыте 16, и подвергли гомохроматографии на пластинке (20×20 см) с DEAE-целлюлозой. Результаты приведены на рис. 5.

18. *Гибридизация додекануклеотидов (I) и (II) с рибосомными РНК.* 0,15–0,45 мкМ раствор РНК* и 2–25 мкМ раствор олигонуклеотида в ТМЕ-буфере, содержащем 40 мМ трис-НСl (pH 7,5), 10 мМ MgCl_2 , 1 мМ Na_2EDTA и 0,5 М NaCl (общий объем смеси 20–100 мкл), нагревали 5 мин при 85°, быстро охлаждали до 60°, затем в течение 1 ч до 20°, выдерживали 20 ч при 4°, после чего подвергали гель-фильтрации на колонке

* Концентрация РНК рассчитывалась исходя из величин E_{260} $1,32 \cdot 10^6$ для 5S-, $1,65 \cdot 10^7$ для 16S- и $2,53 \cdot 10^7$ для 23S-рРНК при pH 7 (значения ϵ вычислены исходя из среднего для четырех мононуклеотидов).

Гибридизация додекануклеотидов (I) и (II) с рРНК *E. coli*

формула	Олигонуклеотид		рРНК	Олигонуклеотид : рРНК, моль/моль	Радиоактивность высокомолекулярной фракции, имп/мин	Связывание олигонуклеотида с рРНК, %
	уд. радиоактивность, имп·мин ⁻¹ ·пмоль ⁻¹	кол-во, пмоль				
^{(32)P} I)	2620	80	23S	10	1990	10
	1670	300	23S	25	7000	38
	830	600	23S	50	4780	52
	420	1200	23S	100	2950	61
	1920	120	23S	30	3240	42
	1920	240	23S	60	3880	50
	1920	360	23S	90	4670	61
	300	1285	5S	50	670	9
	1310	300	16S	50	800	10
	^{(32)P} II)	2080	180	5S	10	1250
3420		190	5S	27	4980	21
570		1140	5S	50	3120	25
855		460	5S	100	4000	63
175		770	5S	30	1130	23
250		1085	5S	60	1350	30
250		1630	5S	90	2730	61
1125		200	23S	50	2080	46
750		300	16S	50	1670	37

с сефадексом G-75 (0,45×9,5 см) при 4° в том же буфере, собирая фракции по 40–90 мкл и измеряя их радиоактивность в толдуольном сцинтилляторе (см. рис. 6). Связывание олигонуклеотидов с рРНК рассчитывали относительно теоретически возможного включения радиоактивности в высокомолекулярную фракцию, принимая соотношение олигонуклеотид – рРНК в комплексе за эквимольное (см. табл. 1).

Авторы благодарны В. Г. Коробко и Е. Ф. Болдыревой за получение нуклеотидных карт меченых олигонуклеотидов и Е. А. Скрипкину за препарат 50S-субъединиц рибосом *E. coli* MRE-600.

ЛИТЕРАТУРА

1. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Свверцова И. В., Быстров Н. С., Болдырева Е. Ф., Чернов В. К., Колосов М. Н. (1978) Биоорг. химия, 4, 1600–1611.
2. Берлин Ю. А., Виноградов С. В., Колосов М. Н. (1978) Биоорг. химия, 4, 1181–1190.
3. Kössel H. (1976) in: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, vol. 32, pp. 297–560. Springer Verlag, Wien – New York.
4. Agarwal K. L., Berlin Yu. A., Kleid D. G., Smirnov V. D., Khorana H. G. (1975) J. Biol. Chem., 250, 5563–5573.
5. Schott H., Kössel H. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 3778–3785.
6. Sanger F. (1973) in: Virus Research, pp. 573–598, Acad. Press, New York – London.
7. Branlant C., Widada S. J., Krol A., Ebel J. P. (1977) Eur. J. Biochem., 74, 155–170.
8. Carbon P., Ehresmann C., Ehresmann B., Ebel J. P. (1978) FEBS Lett., 94, 152–156.
9. Erdmann A. A. (1976) in: Progress Nucl. Acids Research and Mol. Biol., vol. 18, pp. 45–90, Acad. Press, New York – London.
10. Donelson J. E., Barrel B. G., Weith H. I., Kössel H., Schott H. (1975) Eur. J. Biochem., 58, 383–395.
11. Barnes W. M. (1978) J. Mol. Biol., 119, 83–99.
12. Будкер В. Г., Гришова Н. И., Карпова Г. Г., Робец И. Д., Маев С. В. (1978) Молекуляр. биология, 12, 539–545.
13. Girshovich A. S., Pozdnyakov V. A., Ovchinnikov Yu. A. (1976) Eur. J. Biochem., 69, 321–328.
14. Kumar A., Ohtsuka E., Khorana H. G. (1972) J. Mol. Biol., 72, 289–307.
15. Khorana H. G., Turner A. F., Vizsolyi J. P. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 686–698; Ralf R. K., Khorana H. G., *ibid.*, 2926–2934.
16. Weber H., Khorana H. G. (1972) J. Mol. Biol., 72, 219–249.

17. Берлин Ю. А., Бочарова Т. Н., Вульфсон А. Н., Колосов М. Н., Коробко В. Г. (1976) *Биоорганическая химия*, 2, 762-772.
18. Riskov A. P., Tokarskaya O. V., Georgiev G. P., Contell C., Berndt T. (1976) *Nucl. Acids Res.*, 3, 1487-1498.
19. Osawa S., Sibatani A. (1967) in: *Methods in Enzymology* (Grossman L., Moldave K., eds.), vol. 12, part A, pp. 678-683, Acad. Press, New York - London.
20. Khorana H. G., Agarwal K. L., Besmer P., Büchi H., Caruthers M. H., Cashion P. J., Fridkin M., Kleppe K., Kleppe R., Kumar A., Loewen P. C., Miller R. C., Minamoto K., Panet A., RajBhandary U. L., Ramamoorthy B., Sekiya T., Takeya T., Van de Sande J. H. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 565-570.
21. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) *Nucl. Acids Res.*, 1, 331-353.
22. Fraenkel-Conrat H., Steinschneider A. (1968) in: *Methods in Enzymology* (Grossman L., Moldave K., eds.), vol. 12, part B, pp. 243-246, Acad. Press, New York - London.

Поступила в редакцию
24.XII.1978

SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES. XXIII. THE SYNTHESIS OF TWO DODECADEOXYNUCLEOTIDES COMPLEMENTARY TO THE 5'-TERMINAL SEQUENCES OF 23S AND 5S rRNAs OF *E. COLI*

BERLIN Yu. A., VINOGRADOV S. V., KOLOSOV M. N.

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

Dodecadeoxynucleotides d(C-T-T-A-G-T-C-G-C-T-T)-rA and d(C-G-G-C-C-G-C-C-A-G-G)-rC complementary to the 5'-terminal sequences 4-15 of 23S rRNA and 2-13 of 5S rRNA of *E. coli*, respectively, have been chemically synthesized by the phosphodiester method. The oligonucleotides hybridize with the corresponding rRNAs and can be used as probes for studying secondary structure of the rRNAs and as primers for sequencing the rDNA.
