



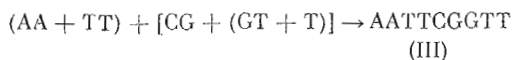
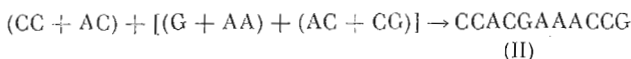
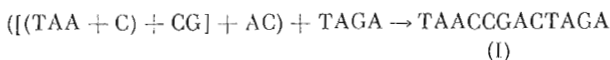
УДК 547.962.32.07+542.953.2

СИНТЕЗ 5'-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА СТРУКТУРНОГО ГЕНА
ВАЛИНОВОЙ тРНК ДРОЖЖЕЙ*Берлин Ю. А., Каюшин А. Л., Тактакишвили М. О.,
Коробко В. Г., Колосов М. Н.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

В ходе исследований по созданию искусственного (неприродного) структурного гена валиновой тРНК, дрожжей нами осуществлен синтез его 5'-концевого фрагмента. Полученная двухцепочечная ДНК соответствует нуклеотидной последовательности 1—22 валиновой тРНК и имеет выступающие 5'-концы для соединения с центральной частью гена и для встраивания в EcoRI-сайт клонирующего вектора.

Промежуточными веществами в этом синтезе являлись одноцепочечные дезоксиолигонуклеотиды (I) — (IV), один из которых, (IV), был описан ранее [1], а остальные получены в настоящей работе (см. схему 1; здесь и далее для краткости префикс «d» (дезокс) опущен). Додекануклеотид (I) был синтезирован фосфодизфирным методом [2] из соответствующим образом защищенных 5'-нуклеотидов с триизопрпилбензолсульфохлоридом в качестве конденсирующего реагента, а ундекануклеотид (II) и нонануклеотид (III) — фосфотриэфирным методом [3, 4] из защищенных 3'-нуклеотидов, причем в качестве конденсирующего реагента использовался триизопрпилбензолсульфотетразолид.

Схема 1

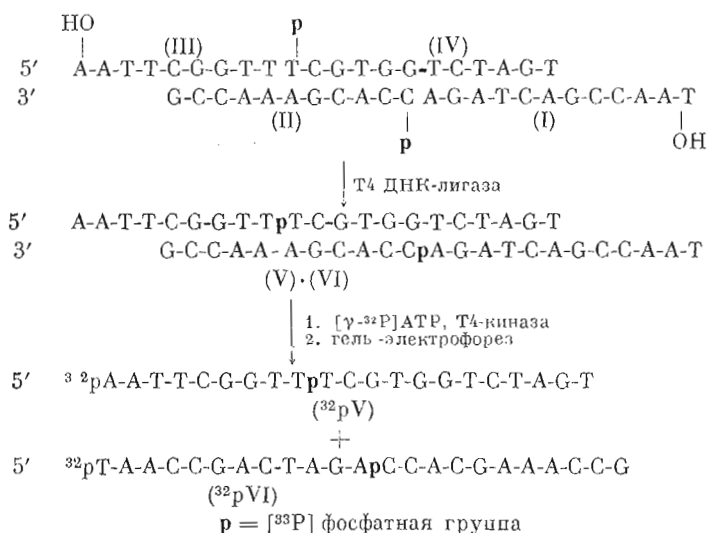


В первом из этих синтезов продукты межнуклеотидных конденсаций выделяли ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе или DEAE-сефадексе, во втором и третьем — адсорбционной хроматографией на силикагеле. После удаления всех защитных групп олигонуклеотиды (I), (II) и (III) хроматографировали на DEAE-целлюлозе в нейтральном и кислом 7 М растворе мочевины. Индивидуальность полученных веществ контролировали микроколоночной хроматографией при pH 7,5 и 3,5, а также гомохроматографией и электрофорезом в полиакриламидном геле. Нуклеотидный состав анализировали путем гидролиза иммобилизованной фос-

фодиэстеразой змеиного яда [5], а первичную структуру определяли по нуклеотидным картам после 5'-фосфорилирования действием Т4-полинуклеотидкиназы и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{rATP}$ или $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{rATP}$ [6].

Сшивание полученных олигонуклеотидов проводили с помощью ДНК-лигазы бактериофага Т4 в один прием, т. е. в составе четырехкомпонентного комплекса (I+II) · (III+IV), причем олигонуклеотиды (II) и (IV) использовали в виде 5'- $[\text{}^{33}\text{P}]$ фосфатов, а (I) и (III) — в нефосфорилированном виде (см. схему 2). Ход лигазной реакции контролировали по возрастанию количества $[\text{}^{33}\text{P}]$ фосфата, устойчивого к бактериальной щелочной фосфатазе [7]; максимальная доля такого фосфата в реакционной смеси составила 64%. Продукты лигазной сшивки отделяли от не вступивших в реакцию исходных олигонуклеотидов с помощью гель-хроматографии. При проведении реакции в масштабе 1 нмоль продукт лигазной сшивки был получен с выходом 45%.

Схема 2



Для доказательства структуры синтезированный фрагмент гена валиновой тРНК_i (V) · (VI) был 5'- ^{32}P -фосфорилирован с помощью Т4-полинуклеотидкиназы, комплементарные цепи (V) и (VI) разделены электрофорезом в денатурирующем полиакриламидном геле и их нуклеотидная последовательность подтверждена анализом ближайших соседей, а также модифицированным методом Максама — Гилберта [8].

Авторы благодарны З. А. Шабаровой и В. Д. Смирнову (МГУ им. М. В. Ломоносова) за образец додекануклеотида (IV).

ЛИТЕРАТУРА

1. Джапаридзе П. Ш., Метелев В. Г., Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1977) *Биоорган. химия*, 3, 501–510.
2. Kössel H., Seiliger H. (1975) in: *Progress in Chemistry of Organic Natural Products* (Herz W., Grisebach H., Kirby G. W., eds), vol. 32, pp. 297–508.
3. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. (1977) *Nucleic Acids Res.*, 4, 353–371.
4. Reese C. B. (1978) *Tetrahedron*, 34, 3143–3179.
5. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) *Биохимия*, 39, 747–751.
6. Sanger F. (1973) in: *Virus Research* (Fox C. F., Robinson W. S., eds), pp. 573–599.
7. Sgaramea V., Khorana H. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, 72, 427–444.
8. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) *Биоорган. химия*, 3, 1420–1422.

THE SYNTHESIS OF A 5'-TERMINAL FRAGMENT OF THE
STRUCTURAL GENE FOR A VALINE tRNA FROM YEASTS

BERLIN YU. A., KAYUSHIN A. L., TAKTAKISHVILI M. O.,
KOROBKO V. G., KOLOSOV M. N.

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

Dodecadeoxynucleotide d(TAACCGACTAGA) (I), undecadeoxynucleotide d(CCAC·GAAACCG) (II), and nonadeoxynucleotide d(AATTCGGTT) (III) have been chemically synthesized, the first by the standard phosphodiester approach, whereas (II) and (III) by the improved phosphotriester method, triisopropylbenzenesulphonyl chloride or tetrazolide, respectively, being used as condensing reagents. The undecanucleotide (II) and the previously synthesized dodecanucleotide d(TCGTGGTCTAGT) (IV) were 5'-³²P-phosphorylated by T4 polynucleotide kinase and ligated with the oligonucleotides (I) and (III) on treatment with T4 DNA ligase. The ligation resulted in a double-stranded polynucleotide (V)·(VI) corresponding to the sequence 1-22 of tRNA_{1^{Val}} and containing protruding 5'-ends to join the duplex with the central part of the gene and to insert it into an EcoRI site of a cloning vehicle. The strands of the duplex were separated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and their structure proved by the nearest-neighbours analysis and by a modified Maxam — Gilbert method.
