



УДК 547.963.32.07

СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

XXXV*. СИНТЕЗ АДАПТОРНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ *Hind*III/*Eco*RI
и *Eco*RI/*Bam*HI, СОДЕРЖАЩИХ УЧАСТКИ УЗНАВАНИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗ
РЕСТРИКЦИИ *Cla*I и *Pst*I

Берлин Ю. А., Тактакишвили М. О., Колосов М. Н.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Заалишвили М. М.

Тбилисский государственный университет

Фосфотриэфирным методом синтезированы частично комплементарные додекадезоксинуклеотиды AGCTTATCGATG(I) и AATTCATCGATA(II), а также декадезоксинуклеотиды AATTCCTGCAG(III) и GATCCTGCAG(IV). Эти олигонуклеотиды попарно составляют два адапторных дуплекса, один из которых, (I)·(II), содержит сайт *Cla*I и половинные *Eco*RI- и *Hind*III-сайты, а другой, (III)·(IV), содержит *Pst*I-сайт и половинные *Eco*RI- и *Bam*HI-сайты.

Синтез линкеров и адапторов, содержащих различные комбинации участков узнавания эндонуклеаз рестрикции, значительно расширил возможности конструирования рекомбинантных ДНК [1–3]. Кроме того, эти олигонуклеотиды представляют интерес в качестве субстратов при изучении функционирования рестриктаз [4, 5]. В настоящей работе описан синтез двух дезоксинуклеотидных дуплексов, (I)·(II) и (III)·(IV), которые могут быть использованы для замены во фрагментах ДНК *Eco*RI-выступающего конца на *Hind*III- или *Bam*HI-конец и для введения в ДНК участков узнавания рестриктаз *Cla*I(ATCGAT) и *Pst*I(CTGCAG).

A-G-C-T-T-A-T-C-G-A-T-G

A-A-T-T-C-T-G-C-A-G

A-T-A-G-C-T-A-C-T-T-A-A

G-A-C-G-T-C-C-T-A-G

(I)·(II)

(III)·(IV)

Синтез был осуществлен фосфотриэфирным методом [6] исходя из нуклеозид-3'-фосфатов, в которых аминогруппа ацилирована (бензонлирована в аденине и цитозине, изобутирилирована в гуанине), 5'-гидроксил

* Предыдущее сообщение см. [1]. В работе использованы обозначения, рекомендованные IUPAC-IUB, и следующие сокращения: DMTr – *n,n*-диметокситритил, ClPh – *n*-хлорфенил, TPST – триизопропилбензолсульфотетразолид, NBST – *n*-нитробензолсульфотриазолид, CNEt – β-цианэтил, TEAB – бикарбонат триэтиламмония, VPDE – фосфоэстераза змеиного яда, XC – ксиленилацол FF, BB – бромфеноловый синий, OG – оранжевый G. Символом ≡ обозначен межнуклеотидный фосфат, защищенный *n*-хлорфенильной группой. Префикс «d» (дезоксид) для краткости опущен.

Межнуклеотидные конденсации

Синтезированный олигонуклеотид *	Исходные вещества, мкмоль			Выход, %
	P-компонент	OH-компонент	TPST	
(DMTr) T≡ibG (Ac)	100	160	320	40
(DMTr) ibG≡bzAp (ClPh)	120	150	300	48
(DMTr) bzA≡ibGp (ClPh)	170	260	520	55
(DMTr) bzA≡Tp (ClPh)	320	480	960	62
(DMTr) T≡Tp (ClPh)	2360	2060	7080 **	53
(DMTr) bzA≡bzAp (ClPh)	1670	1910	5730 **	25
(DMTr) bzC≡bzAp (ClPh)	480	600	1200	40
(DMTr) bzC≡Tp (ClPh)	600	720	1640	58
(DMTr) ibG≡bzAp (ClPh)	300	450	375	92
(DMTr) T≡bzCp (ClPh)	180	220	660	50
(DMTr) bzC≡T≡Tp (ClPh) (V)	80	120	240	52
(DMTr) bzA≡ibG≡bzC≡T≡Tp (ClPh) (VI)	45	80	240	74
(DMTr) bzA≡T≡bzCp (ClPh) (VII)	170	240	490	92
(DMTr) bzA≡ibG≡bzC≡T≡T≡bzA≡T≡bzCp (ClPh) (IX)	11	16	62	21
(DMTr) ibG≡bzA≡T≡ibG (Ac) (X)	28	42	84	50
(DMTr) bzA≡bzA≡T≡Tp (ClPh) (XI)	220	260	780	60
(DMTr) bzA≡bzA≡T≡T≡bzCp (ClPh) (XII)	38	46	90	98
(DMTr) bzA≡bzA≡T≡T≡bzC≡bzA≡T≡bzCp (ClPh) (XIII)	11	15	60	71
(DMTr) ibG≡bzA≡Tp (ClPh) (XIV)	100	130	260	62
(DMTr) ibG≡bzA≡T≡bzA (Bz) (XV)	52	71	140	48
(DMTr) bzC≡T≡ibGp (ClPh) (XVI)	120	150	375	78
(DMTr) bzC≡bzA≡ibG (Ac) (XVII)	100	120	300	78
(DMTr) bzC≡T≡ibG≡bzC≡bzA≡ibG (Ac) (XVIII)	20	30	120	50
(DMTr) ibG≡bzA≡T≡bzCp (ClPh) (XX)	180	220	660	50

* Вещества, содержащие 3'-фосфат, выделены в виде 3'-цианэтиловых эфиров.

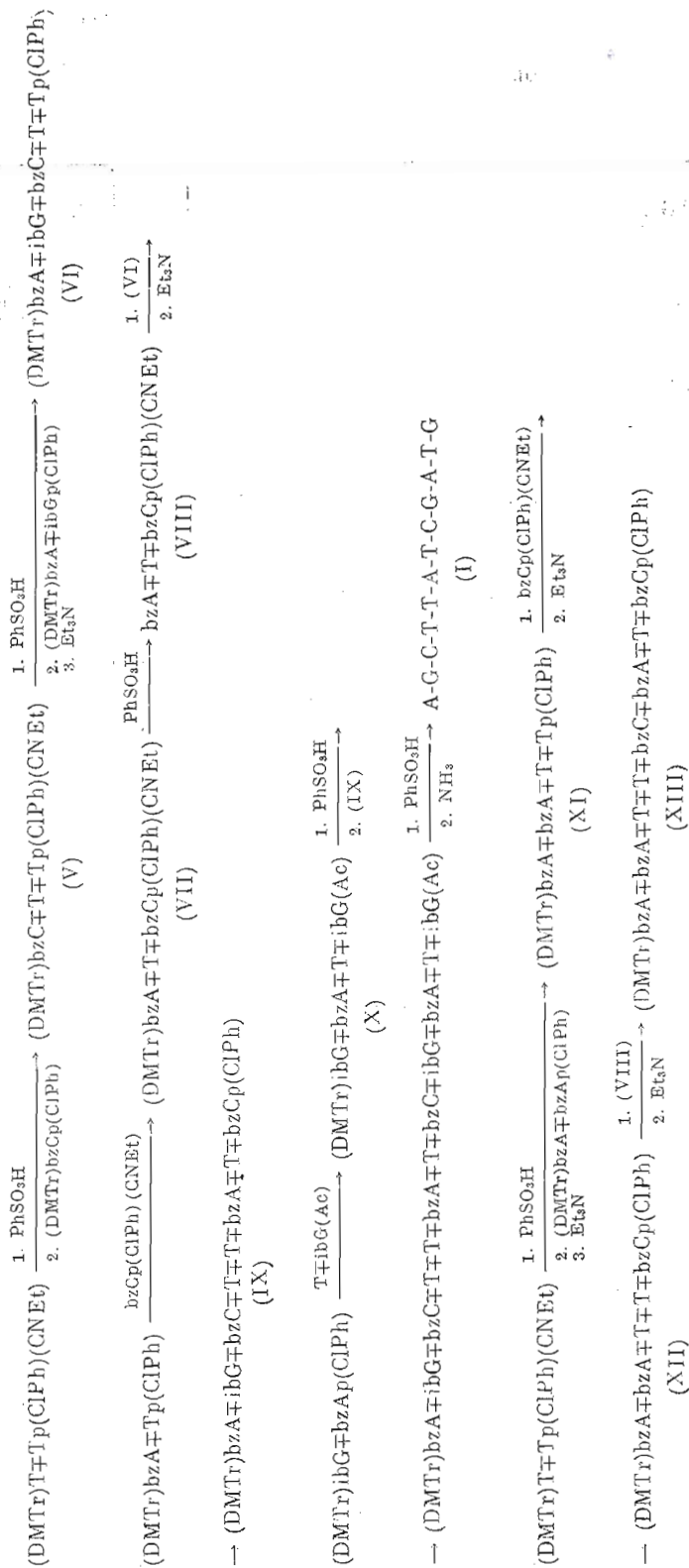
** В качестве конденсирующего реагента использовался NBST.

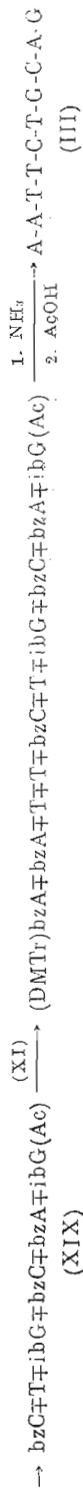
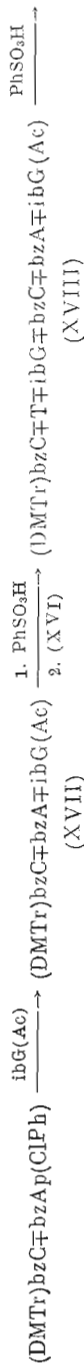
защищен диметокситритильной группой, а фосфат — *n*-хлорфенильной и β-цианэтильной группами. Нуклеотидную цепь наращивали в направлении от 3'- к 5'-концу, вторичная спиртовая группа на 3'-концевом нуклеозиде была блокирована ацетильным или бензоильным остатком. В качестве конденсирующего реагента для образования межнуклеотидных связей использовали TPST и NBST. Ход синтеза представлен на схеме, условия межнуклеотидных конденсаций — в таблице.

Защищенные олигонуклеотиды выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, а после деблокирования — анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе последовательно в нейтральном и кислом 7 М растворе мочевины (рис. 1, 2). Индивидуальность полученных олигонуклеотидов контролировали путем микроколоночной анионообменной хроматографии в аналогичных условиях (рис. 3), а первичную структуру доказывали, после 5'-³²P-фосфорилирования, с помощью нуклеотидных карт [7, 8] (рис. 4) и модифицированного метода Максама — Гилберта [9–11] (рис. 5).

Экспериментальная часть

В работе использованы дезоксинуклеозиды фирм «Sigma» и «Calbiochem» (США), [γ-³²P]rATP с уд. акт. 3000 Ки/ммоль (Amersham, Англия), силикагель для колоночной хроматографии L 40–100 и 100–160 (Chemapol, СССР), DEAE-целлюлоза DE-23 для колоночной хроматографии (Whatman, Англия), пластинки с силикагелем для адсорбционной ТСХ «Silufol UV 254» (Kavalier, СССР), «Kieselgel 60F₂₅₄» (Merck, ФРГ),





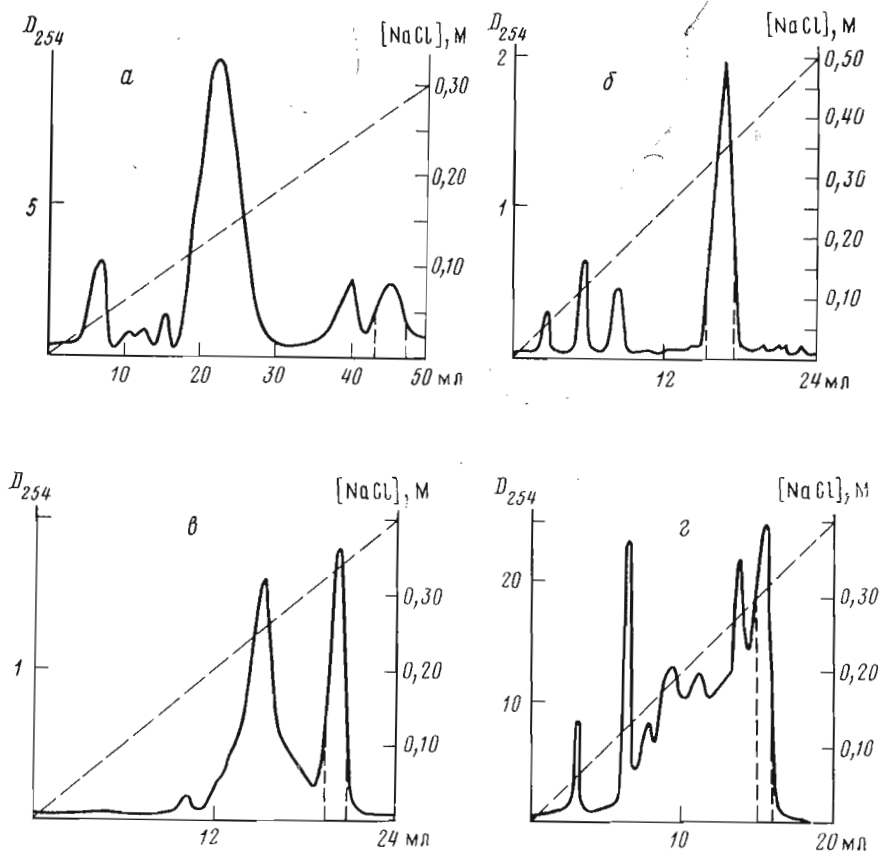


Рис. 1. Выделение олигонуклеотидов хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl⁻; 0,4×10 см) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины (0,01 М трис-HCl, pH 7,4), скорость элюции 0,2 мл/мин. а — додекануклеотид (I), выделено 9 ОЕ₂₆₀; б — додекануклеотид (II), выделено 3 ОЕ₂₆₀; в — декануклеотид (III), выделено 3 ОЕ₂₆₀; г — декануклеотид (IV), выделено 35 ОЕ₂₆₀

«Chromagram» (Eastman Kodak, США), целлюлоза MN-300 и DEAE-целлюлоза MN-300 HR (Serva, ФРГ) для гомохроматографии, сефадекс G-50, сверхтонкий (Pharmacia, Швеция), акриламид и N,N'-метиленабисакриламид (Reanal, ВНР), трис (Merck, ФРГ и Reanal, ВНР), дитиотреит (Calbiochem, США), VPDE (КФ 3.1.4.1; Worthington, США); Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) выделена по модифицированному методу [12]. В качестве носителя при электрофорезе и при осаждении олигонуклеотидов использовали суммарную тРНК производства СКТБ БАН (Главмикробиопрот); ее трижды экстрагировали фенолом и трижды осаждали спиртом. Мочевину для ионообменной хроматографии деионизировали, пропуская ее 7 М раствор через колонки с катионитом (дауэкс 50, H⁺) и анионитом (AG 1, OH⁻). Пиридин абсолютировали кипячением и перегонкой последовательно над окисью бария и гидридом кальция и хранили над молекулярными ситами 4 Å. N-Защищенные нуклеозиды получали действием на нуклеозиды соответствующих хлорангидридов с последующим частичным щелочным гидролизом [6]; затем 5'-О-диметокситриптилировали по методу [6]. Полностью защищенные нуклеозид-3'-фосфаты получали, обрабатывая 5', N-защищенный нуклеозид (*n*-хлорфенил)фосфобистриазолидом и затем этиленциангидрином [6], TPST синтезировали по методу [6], NBST — по методу [14].

Удаление 5'-О-диметокситриптильной группы проводили по методу [6] действием 2% раствора бензолсульфокислоты в смеси хлороформ — мета-

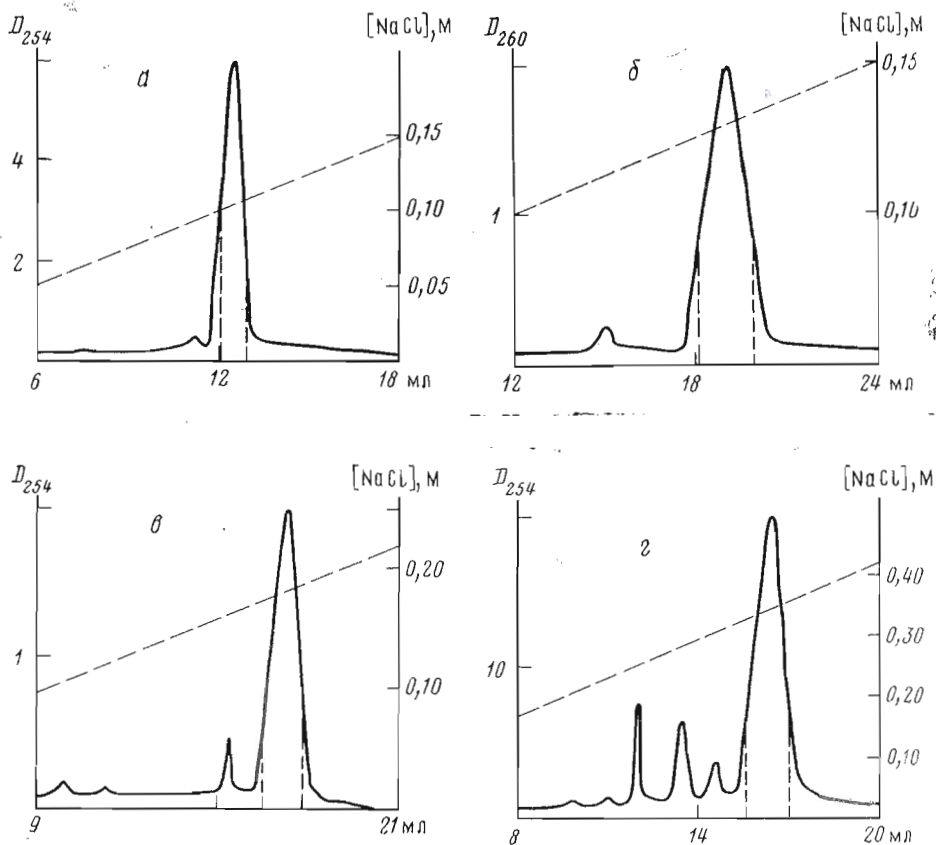


Рис. 2. Выделение олигонуклеотидов хроматографией на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (Cl^- : $0,4 \times 10$ см) (соответствующие фракции рис. 1 *a*-*г*) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины (HCl, pH 3,5), скорость элюции 0,2 мл/мин. *a* — додекануклеотид (I), выделено 8 OE_{260} ; *б* — додекануклеотид (II), выделено 2,5 OE_{260} ; *в* — декануклеотид (III), выделено 2,5 OE_{260} ; *г* — декануклеотид (IV), выделено 27 OE_{260}

под (7 : 3) из расчета 15 мл раствора кислоты на 1 г нуклеотида. Выдерживали 3—4 мин при $0^\circ C$, экстрагировали хлороформом и хроматографировали на силикагеле в градиенте концентрации метанола в хлороформе. Полученное вещество использовали в межнуклеотидной конденсации в качестве OH-компонента.

Удаление Р-защитной цианэтильной группы осуществляли по методу [15] действием 25% раствора триэтиламина в пиридине в течение 15 ч при $20^\circ C$ (25 мл раствора на 1 ммоль олигонуклеотида). Остаток после 2—3 упариваний с пиридином без дальнейшей очистки сразу же использовали в качестве Р-компонента.

Раствор Р- и OH-компонентов и конденсирующего реагента (таблица) в пиридине (суммарная концентрация всех трех веществ 1 М) выдерживали 1 ч при $20^\circ C$, обрабатывали равным объемом водного пиридина, через 30 мин выливали в насыщенный раствор $NaHCO_3$, экстрагировали хлороформом, экстракт промывали водой, упаривали и остаток хроматографировали на силикагеле в ступенчатом градиенте концентрации метанола в хлороформе (около 3, 4, 7, 10, 12 и 15% метанола соответственно для ди-, три-, тетра-, гекса-, окта- (или дека-) и додекануклеотидов).

Выделенный олигонуклеотид детритилировали, как описано выше, снова хроматографировали, растворяли в 1 мл пиридина и 2—3 мл 25% водного аммиака, выдерживали 16 ч при $55^\circ C$ и упаривали (додекануклео-

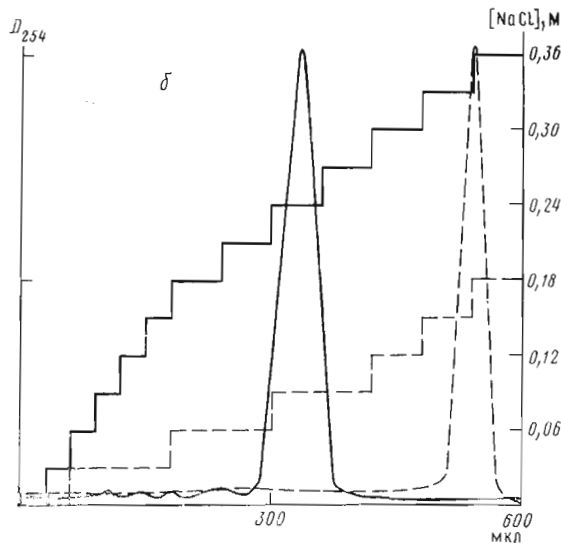
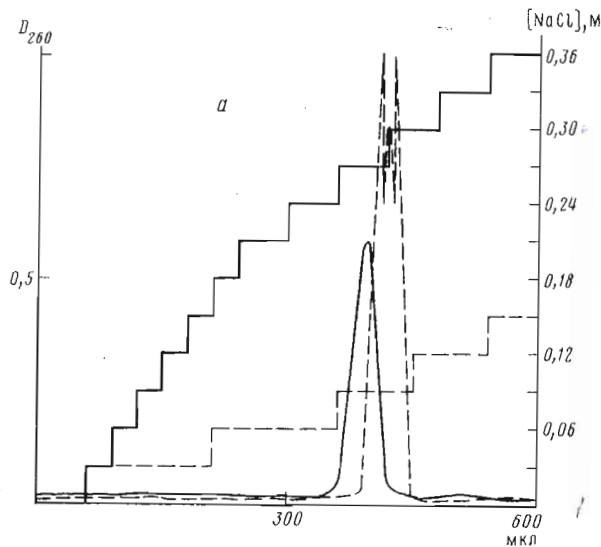


Рис. 3. Микроколоночная хроматография выделенных (рис. 1, 2) олигонуклеотидов в ступенчатом градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины. Колонка 0,09×5 см, скорость элюции 0,30 мл/ч, сплошная линия — хроматография в 0,01 М трис-HCl (pH 7,4), штриховая — в HCl (pH 3,5): а — додекануклеотид (I), б — додекануклеотид (II)

тид (I). В остальных случаях сначала проводили аммонолиз, затем обрабатывали 80% АсОН (30 мин при 20° С) и упаривали (олигонуклеотиды (II), (III) и (IV)). Незащищенные олигонуклеотиды очищали хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl⁻) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины при pH 7,4, а затем при pH 3,5. В результате было получено 8 ОЕ₂₆₀ додекануклеотида (I) (из 2,4 мкмоль (IX)), 2,4 мкмоль дедиметокситриптированного (X) и 12 мкмоль TPST), 25 ОЕ₂₆₀ додекануклеотида (II) (из 5 мкмоль (XIII)), 15 мкмоль дедиметокситриптированного (XV) и 35 мкмоль TPST, pA : pG : pC : pT, 4,0 : 1,0 : 1,9 : 3,8; нуклеозид А не определяли), 4 ОЕ₂₆₀ декануклеотида (III) (из 3,6 мкмоль

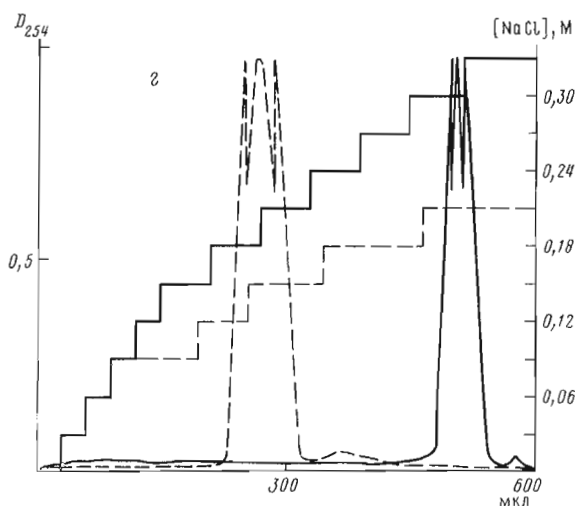
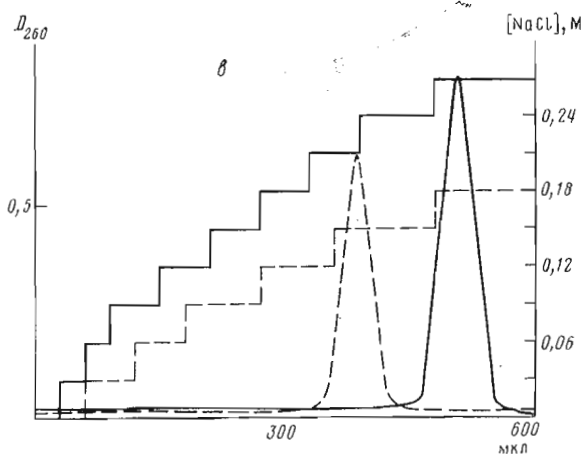


Рис. 3. а — декануклеотид (III), б — декануклеотид (IV)

(XI), 6,9 мкмоль дедиметокситриптированного (XVIII) и 35 мкмоль TPST, A : pA : pG : pC : pT 1,3 : 2,1 : 2,0 : 2,0 : 3,05) и 27 OЕ₂₆₀ декануклеотида (IV) (из 3,5 мкмоль (XX), 10,5 мкмоль дедиметокситриптированного (XVIII) и 50 мкмоль TPST, G : pA : pG : pC : pT 1,1 : 2,0 : 2,1 : 3,15 : 1,7).

5'-P³²-фосфорилирование олигонуклеотидов проводили в 30 мкл раствора, содержащего 0,5 нмоль олигонуклеотида, 5 пмоль [γ -³²P]rATP, 1 мМ MgCl₂, 0,5 мМ дитиотреит, 5 мМ трис-НСl, рН 9,0, и 1–2 ед. акт. Т4-поли-нуклеотидкиназы. После инкубации в течение 1 ч при 37° С добавляли 1 нмоль rATP и инкубировали еще 1 ч при 37° С. Меченый олигонуклеотид выделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (1–2 мл) в буфере, содержащем 1 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA и 1 мМ трис-НСl, рН 8,0.

Нуклеотидные карты получали в основном по методу [7, 8]. Четыре порции [5'-³²P] олигонуклеотида обрабатывали по отдельности раствором VPDE (результатирующие концентрации фермента 12, 25, 50 и 100 мкг/мл) в буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl, рН 8, 9, и 10 мМ MgCl₂, все пор-

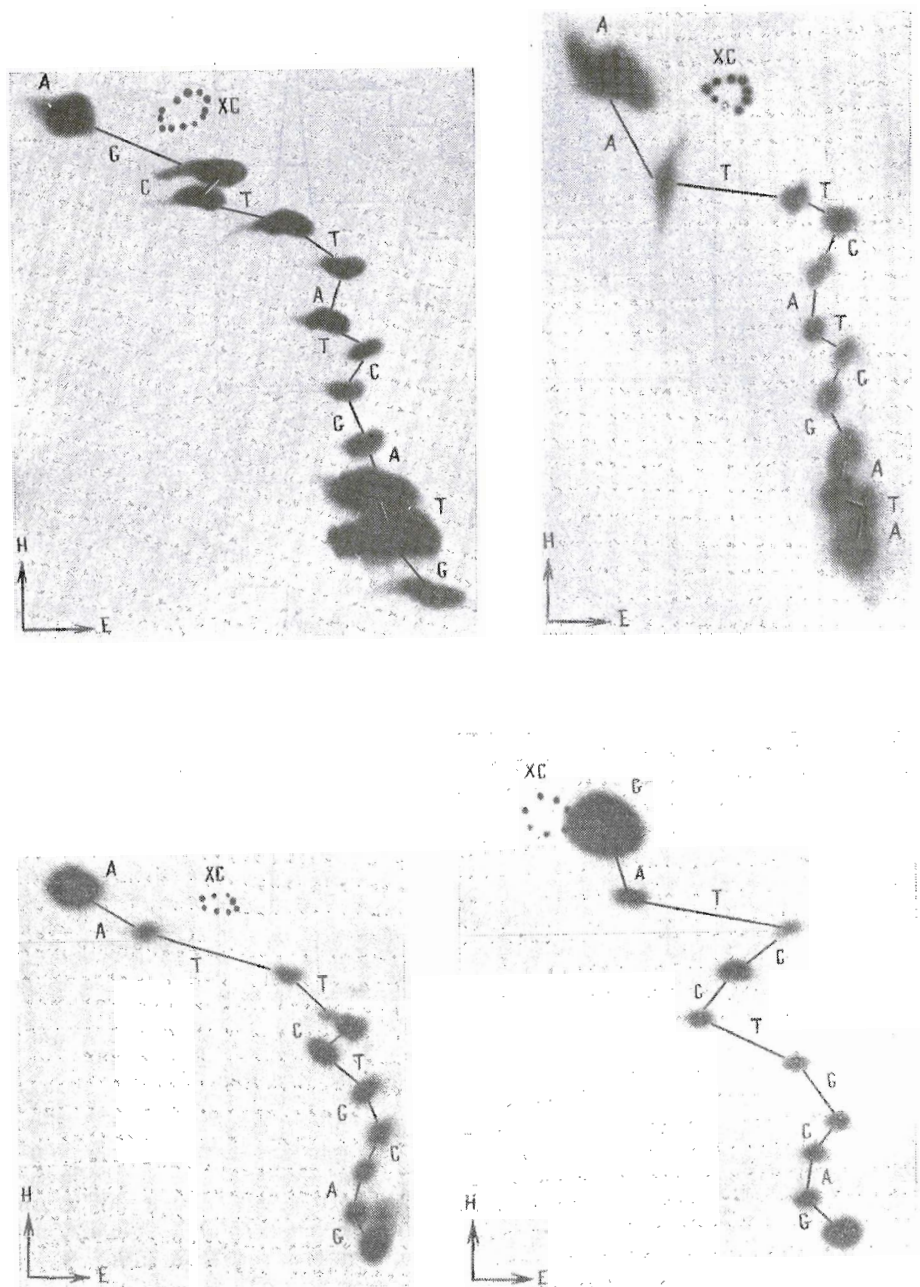
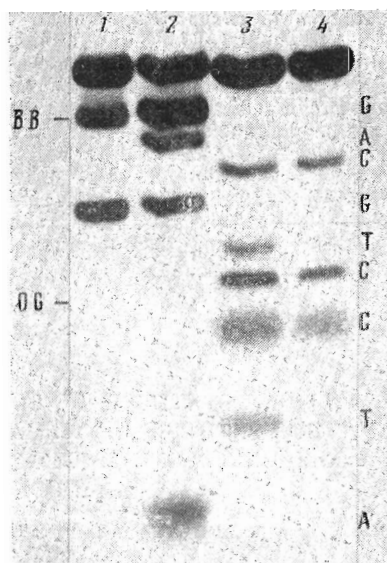


Рис. 4 *а, б*

Рис. 4. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза 5'- ^{32}P -фосфорилированных олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда; направление *Е* — электрофорез на ацетилцеллюлозе в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5) при 90 В/см, направление *Н* — гомохроматография в гомомеси VI [3]; *а* — додекануклеотид $^{32}\text{pAGSTTATCGATG}$ (^{32}pI), *б* — додекануклеотид $^{32}\text{pAATTCATCGATA}$ (^{32}pII), *в* — декануклеотид $^{32}\text{pAATTCTGCAG}$ ($^{32}\text{pIII}$), *г* — декануклеотид $^{32}\text{pGATCCTGCAG}$ (^{32}pIV)

Рис. 5. Анализ первичной структуры декануклеотида (IV) модифицированным методом Максама — Гилберта [9—11]. Электрофорез в 20% полиакриламидном геле в 50 мМ трис-боратном буфере, pH 8,3: 1 — модификация по остаткам G, 2 — по G+A, 3 — по C+T, 4 — по C.



ции объединяли и полученную смесь продуктов частичного гидролиза подвергали двумерному разделению электрофорезом на ацетилцеллюлозе в пиридин-ацетатном буфере при pH 3,5 и гомохроматографии в гомосмеси VI [8].

Анализ по методу Максама — Гилберта проводили, используя следующие варианты химических модификаций [9—11]: диметилсульфат в 50 мМ HCOONH_4 (pH 3,5), 20 мин (по остаткам G), 66% муравьиная кислота, 20 мин (по остаткам A и G), гидразингидрат, 60 мин (по остаткам C и T), 2 М NaCl в гидразингидрате, 75 мин (по остаткам C) с последующим электрофорезом в 20% полиакриламидном геле (акриламид — бисакриламид, 30 : 1) в трис-боратном буфере, pH 8,3. Радиоавтограмма геля представлена на рис. 5.

Авторы благодарны Е. Ф. Болдыревой за получение части нуклеотидных карт и А. Н. Вульфсону и С. А. Якимову за помощь в анализе мономерного состава олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Быстров Н. С., Колосов М. Н. Синтез промоторных линкеров для экспрессии генов *E. coli*.— Биоорганич. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1740—1742.
2. Scheller R. H., Dickerson R. E., Boyer H. W., Riggs A. D., Itakura K. Chemical synthesis of restriction enzyme recognition sites useful for cloning.— Science, v. 196, № 4286, p. 177—180.
3. Norris K. E., Iserentant D., Contreras R., Fiers W. Asymmetric linker molecules for recombinant DNA constructions.— Gene, v. 7, № 3/4, p. 355—362.
4. Green P. J., Poonian M. S., Nussbaum A. L., Tobias L., Garfin D. E., Boyer H. W., Goodman H. M. Restriction and modification of a self-complementary octanucleotide containing the *EcoRI* substrate.— J. Mol. Biol., 1975, v. 99, № 2, p. 237—261.
5. Baumstark B. R., Roberts R. J., RajBhandary U. L. Use of short synthetic DNA duplexes as substrates for the restriction endonucleases *HpaII* and *MnoI*.— J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 18, p. 8943—8950.
6. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Arylsulfonyl tetrazoles, new coupling reagents and further improvement in the triester method for the synthesis of deoxyribooligonucleotides.— Nucleic Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353—371.
7. Sanger F. New Techniques in DNA sequencing.— In: Virus Research (Fox C. F., Robinson W. S., eds). New York — London: Acad. Press, 1973, p. 573—599.
8. Jay E., Vambara R., Padmanabhan R., Wu R. DNA sequence analysis: a general, simple and rapid method for sequencing large oligodeoxyribonucleotide fragments by mapping.— Nucleic Acids Res., 1974, v. 1, № 3, p. 331—353.
9. Gilbert W., Maxam A. A new method for sequencing DNA.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560—564.
10. Коробко В. Г., Грачев С. А. Определение нуклеотидной последовательности в ДНК модифицированным химическим методом.— Биоорганич. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1420—1422.
11. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. G-специфическое расщепление односплочечной ДНК. Определение нуклеотидной последовательности рестриктных фрагментов ДНК фага M13.— Биоорганич. химия, 1978, т. 4, № 9, с. 1281—1283.
12. Panet A., Van de Sande I. H., Loewen P. G., Khorana H. G., Raas A. J., Lille-

- haug I. R., Kleppe K. Physical characterization and simultaneous purification of bacteriophage T4 induced polynucleotide kinase, polynucleotide ligase, and deoxyribonucleic acid polymerase.—*Biochemistry*, 1973, v. 12, № 25, p. 5045–5050.
13. Ralph R. K., Khorana H. G. Studies on polynucleotide. XI. Chemical polymerization of mononucleotides — synthesis and characterization of mononucleotide deoxyadenosine polynucleotides.—*J. Amer. Chem. Soc.*, 1961, v. 83, № 13, p. 2926–2937.
14. Katagiri N., Itakura K., Narang S. A. The use of arylsulfonyl triazoles for the synthesis of oligonucleotides by the triester approach.—*J. Amer. Chem. Soc.*, 1975, v. 97, № 25, p. 7332–7337.
15. Sood A. K., Narang S. A. A rapid and convenient synthesis of poly-thymidylic acid by the modified triester approach.—*Nucleic Acids Res.*, 1977, v. 4, № 8, p. 2757–2765.

Поступила в редакцию
8.XII.1980

SYNTHESIS OF OLIGO AND POLYNUCLEOTIDES.

XXXV. THE SYNTHESIS OF THE ADAPTOR *Hind*III/*Eco*RI AND *Eco*RI/*Bam*HI OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING *Cla*I AND *Pst*I RESTRICTION ENDONUCLEASES SITES

BERLIN Yu. A., TAK TAKISHVILI M. O., KOLOSOV M. N.,
ZAAALISHVILI M. M.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of the USSR, Moscow; Tbilisi State University, Tbilisi*

The oligodeoxynucleotides dAGCTTATCGATG (I), dAATTCATCGATA (II), dAATTCTGCAG (III), and dGATCCTGCAG (IV) have been synthesized by the phosphotriester approach. The nucleotides form two adaptor duplexes, namely, (I)·(II) containing *Cla*I-site as well as *Eco*RI and *Hind*III half-sites, and (III)·(IV) which contains *Pst*I site, *Eco*RI and *Bam*HI half-sites.