



УДК 547.962.32.07

**СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ GGTACC, И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ
С ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ РЕСТРИКЦИИ *Kpn*I***Берлин Ю. А., Буткус В. В.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

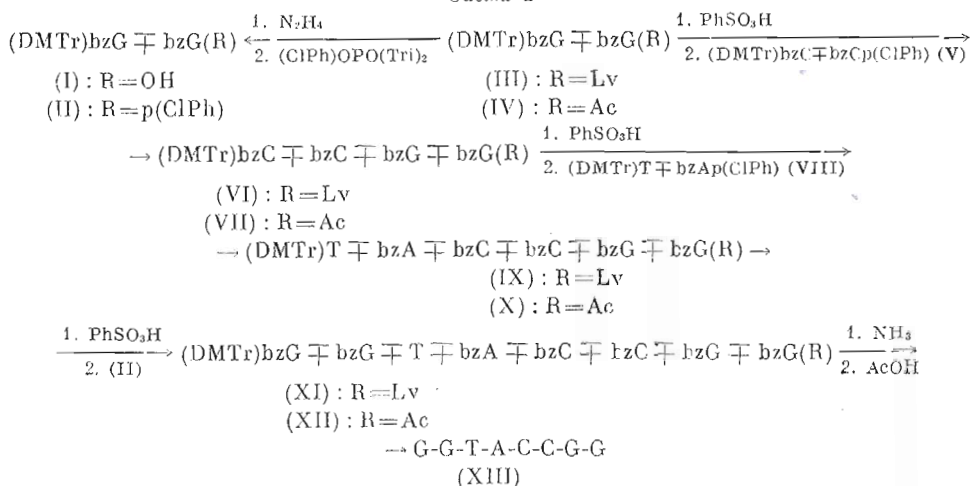
Показано, что в фосфотриэфирном синтезе олигодезоксинуклеотидов одновременное применение диметокситритильного и левулинильного остатков для защиты соответственно 5'-ОН и 3'-ОН позволяет наращивать олигонуклеотидную цепь в обоих направлениях: 3'→5' и 5'→3'. С использованием этого подхода синтезированы олигодезоксинуклеотиды GGTACC, GGTACCGG, CCGGTACC и CCGGTACCGG, содержащие участок узнавания эндонуклеазы рестрикции *Kpn*I. При изучении их взаимодействия с этой рестриктазой найдено, что для нормального функционирования фермента необходимо, чтобы в его субстрате сайт GGTACC был фланкирован в обеих цепях с 5'-конца и хотя бы в одной цепи с 3'-конца.

Несмотря на широкое применение эндонуклеаз рестрикции в молекулярной биологии, о механизме действия этих ферментов почти ничего не известно. Для изучения их взаимодействия с ДНК удобными субстратами являются синтетические олигонуклеотиды, содержащие участок узнавания соответствующей эндонуклеазы в различном структурном окружении [1—4]. Рациональным подходом к получению такой серии веществ представляется синтез изолированного участка узнавания и его последующее наращивание как в 5'-, так и в 3'-направлении. Однако при проведении синтеза обычными методами один из концов растущей нуклеотидной цепи фиксируется защитной группой (5'-метокситритильной в фосфотриэфирном методе [5] или 3'-ацетильной в фосфотриэфирном методе [6]), которая сохраняется на всех промежуточных этапах и удаляется лишь при деблокировании конечного соединения. Поэтому наращивание олигонуклеотидной цепи в обоих направлениях этими методами неосуществимо. В настоящей работе для этой цели применена модификация фосфотриэфирного метода, основанная на блокировании 3'-гидроксила остатком левулиновой кислоты. Селективное отщепление этого остатка делает возможным удлинение нуклеотидной цепи в 3'-направлении, причем сохраняется возможность 5'-детритилирования и удлинения цепи по 5'-концу.

Введение левулинильной группы в молекулу нуклеозида и ее отщепление под действием NaNH_4 были впервые описаны в работе [7]. Эта группа

В работе использованы следующие нестандартные сокращения: TPST — триизопротилбензолсульфотетразолид, DMTr — диметокситритил, ClPh — *n*-хлорфенил, Lv — левулинид, Trt — триазолил. Символом \mp обозначена межнуклеотидная связь, защищенная *n*-хлорфенильным остатком. Префикс d (дезокси) для краткости всюду опущен.

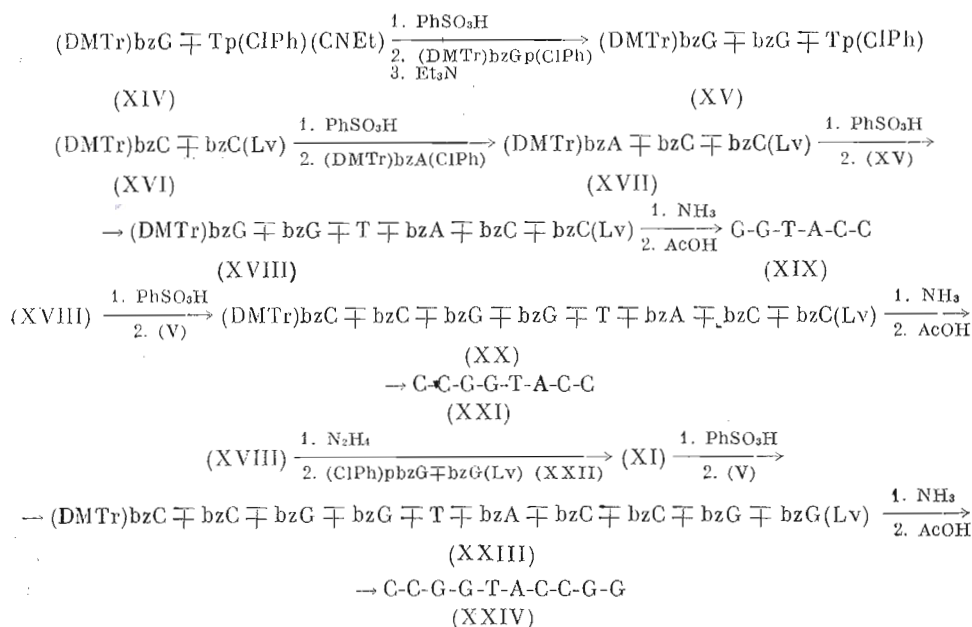
Схема 1



применялась также в синтезе олигорибонуклеотидов [8, 9], причем для ее удаления был предложен мягкий гидразинолиз, ранее использованный в случае бензоилпропионильной группы [10]. Мы вводили остаток левулиновой кислоты по 3'-гидроксилу действием левулинового ангидрида в пиридине на 5'-диметокситритильный эфир нуклеозида (ср. [7]) с последующим детритилированием. Синтез олигонуклеотидов проводили фосфотриэфирным методом [6] исходя из N-бензоилнуклеозид-3'-n-хлорфенилфосфатов, в которых 5'-гидроксил защищен диметокситритильной группой (фосфатный компонент) или же фосфат блокирован β-цианэтильным остатком (гидроксильный компонент). Конденсирующим реагентом для образования межнуклеотидных связей служил TPST. Чтобы убедиться в возможности использовать левулильный остаток в качестве 3'-защитной группы, мы превратили 3'-левулилат N-бензоилдезоксигуанозина взаимодействием с мононуклеотидом (DMTr)bzGp(ClPh) в динуклеозидфосфат (III) (схема 1), а затем в результате последовательных конденсаций с тремя динуклеотидами, (V), (VIII) и (II), получили октануклеотид (XI) (динуклеотид (II) был получен из динуклеозидфосфата (III) после удаления левулильной группы и фосфорилирования образовавшегося соединения (I) (схема 1); таким образом, один и тот же блок был использован как в виде 3'-концевого, так и для наращивания нуклеотидной цепи). Аналогичное соединение (XII) было получено стандартным методом [6] исходя из 3'-O-ацетата бензоилдезоксигуанозина. Полное деблокирование обоих веществ привело к одному и тому же октануклеотиду (XIII), идентифицированному с помощью нуклеотидных карт (см. ниже).

В ходе дальнейшей работы мы аналогичным путем синтезировали самокомплементарный гексануклеотид GGТАСС (XIX) (схема 2), отвечающий изолированному участку узнавания рестриктазы *KpnI*, а затем удлинили его по 5'- и/или 3'-концу динуклеотидными блоками, получив серию субстратов этого фермента, включающую в себя октануклеотиды (XXI) и (XIII) и декануклеотид (XXIV). Для этого из полностью защищенного дезоксицитидина (DMTr)bzC(Lv) после детритилирования и двух конденсаций с диметокситритильными производными дезоксицитидин- и дезоксиаденозин-3'-фосфата были получены соответственно динуклеозидфосфат (XVI) и тринуклеозиддифосфат (XVII). С другой стороны, исходя из 3'-фосфата Tr(ClPh)(CNEt), сходным образом синтезировали тринуклеотид (XV). Его конденсация с детритилированным соединением (XVII) привела к гексануклеотиду (XVIII). В этом соединении каждая из концевых защитных групп может быть избирательно удалена: диметокситритильная — кислотным гидролизом, а левулильная — гидразинолизом.

Схема 2



В первом случае наращивание нуклеотидной цепи по 5'-концу конденсацией с динуклеотидом (V) привело к октануклеотиду (XX). Нарращивание же нуклеотидной цепи (XVIII) по 3'-концу после удаления левулинильного остатка можно проводить, фосфорилируя освободившийся 3'-гидроксил хлорфенилфосфатом и конденсируя полученный фосфат с веществом, содержащим свободную 5'-ОН-группу. Однако если 5'-гидроксильный компонент существенно меньше по длине цепи, может оказаться целесообразным фосфорилировать именно его и вести последующую конденсацию с участием 3'-гидроксипла и 5'-фосфата. Именно этим путем мы превратили гексануклеотид (XVIII) в октануклеотид (XI): после отщепления левулинильного остатка 3'-ОН-компонент был сконденсирован с 5'-хлорфениловым эфиром (XXII), который в свою очередь был получен в результате детритилирования динуклеозидфосфата (III) и последующего фосфорилирования *n*-хлорфенилфосфобистриазолоидом. Продукт конденсации был полностью деблокирован и образовавшееся соединение идентифицировано с описанным выше веществом (XIII). Полученный таким путем октануклеотид (XI) взаимодействием с динуклеотидом (V) был затем превращен в декануклеотид (XXIII).

Продукты межнуклеотидных конденсаций выделяли адсорбционной хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации метанола в хлороформе. После удаления защитных групп аммонолизом и кислотным гидролизом деблокированные олигонуклеотиды очищали анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в нейтральном и кислотном 7 М растворе мочевины (рис. 1). Индивидуальность синтезированных соединений была доказана высокоэффективной жидкостной хроматографией, а их первичная структура — методом нуклеотидных карт [12] (рис. 2). В случае незащищенного декануклеотида (XXIV) высокоэффективная жидкостная хроматография была использована также для препаративной очистки вещества (рис. 1) после деблокирования и анионообменной хроматографии в нейтральном растворе.

Синтезированные нами олигонуклеотиды полностью или частично самокомплементарны и могут образовывать как гомодуплексы (А—Г), так и гетеродуплексы (Д—З) (схема 3). Оказалось, что среди гомодуплексов

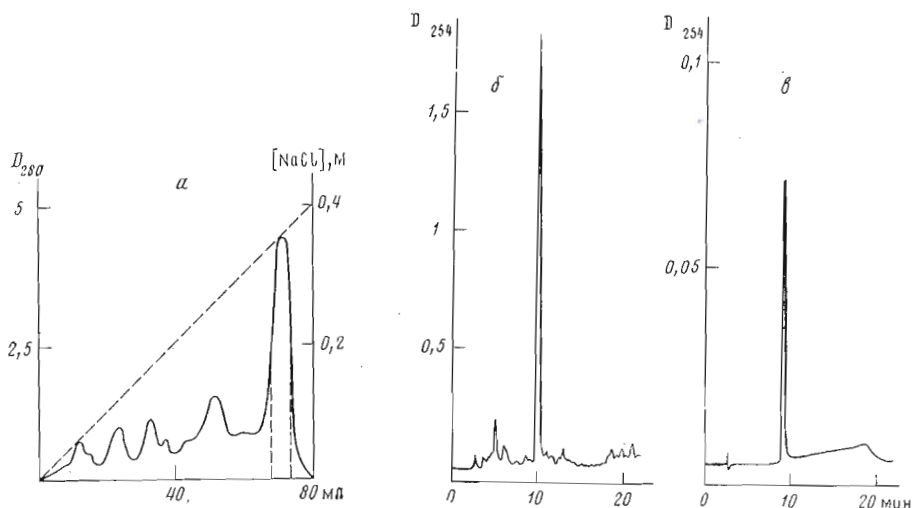


Рис. 1. а — Выделение декануклеотида (XXIV) хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^-) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины, колонка $0,4 \times 20$ см, 0,02 М трис-HCl (pH 7,4), 0 — 0,4 М NaCl (80 мл, скорость элюции 0,5 мл/мин), выделено 15 ОЕ₂₆₀ (б); выделение 8 ОЕ₂₆₀ декануклеотида (XXIV) (в), анализ гомогенности 0,02 ОЕ₂₆₀ выделенного декануклеотида (XXIV) высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографией на колонке Zorbax-C8 ($0,46 \times 25$ см, хроматограф Dupont 830)

только десятичленник Г, в котором участок узнавания рестриктазы *KpnI* с обеих сторон флажирован двумя парами оснований, расщепляется рестриктазой. При этом образуется ожидаемый продукт рестрикции — гептануклеотид $^{32}\text{pCCGGTAC}$ (рис. 3), который был выделен гелем-фильтрацией на сефадексе G-50 и охарактеризован нуклеотидной картой (рис. 2б). Три остальных гомодуплекса — изолированный *KpnI*-сайт (А), а также дуплексы Б и В, образуемые октануклеотидами и содержащие шестизвенный двухцепочечный участок и соответственно динуклеотидную 3'- и 5'-концевую избыточность, не расщепляются рестриктазой при температуре от 0 до 20°С. Ни один из этих октануклеотидов не расщепляется и в составе гетеродуплекса З. Гексануклеотид ($^{32}\text{pXIX}$) и октануклеотид ($^{32}\text{pXIII}$) оказались устойчивыми к рестриктазе также в составе гетеродуплексов Д и Ж (в случае этих дуплексов может расщепляться только более длинная, 10-звенная цепь, которая полностью самокомплементарна и образует гомодуплекс Г). Напротив, второй октануклеотид ($^{32}\text{pXXI}$) в составе аналогичного гетеродуплекса Е расщепляется рестриктазой; происхождение образующегося при этом гептануклеотида $^{32}\text{pCCGGTAC}$ из октануклеотида ($^{32}\text{pXXI}$), а не из декануклеотида (XXIV) было доказано тем, что 5'-меченным в составе дуплекса Е был только октануклеотидный компонент. Таким образом, для нормального функционирования рестриктазы *KpnI* ее шестизвенный сайт должен быть флажирован в обеих цепях с 5'-конца и, кроме того, хотя бы в одной цепи с 3'-конца.

Ранее уже отмечалась устойчивость изолированных сайтов ряда рестриктаз (*EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*) к соответствующему ферменту [1, 3]. В случае *EcoRI* это было приписано низкой устойчивости дуплекса (GAATTC) · (GAATTC) [3], однако такому объяснению противоречит способность *EcoRI* расщеплять более длинные олигонуклеотиды, содержащие ту же последовательность и образующие еще менее устойчивые шестизвенные дуплексы с выступающими концами [1]. Представляется вероятным, что рестриктазы в принципе способны стабилизировать, а затем расщеплять даже малостойчивые дуплексы, однако соблюдают минимальные структурные требования к расщепляемому субстрату (общая длина нуклеотидной цепи, характер флажирования сайта и др.), существенно

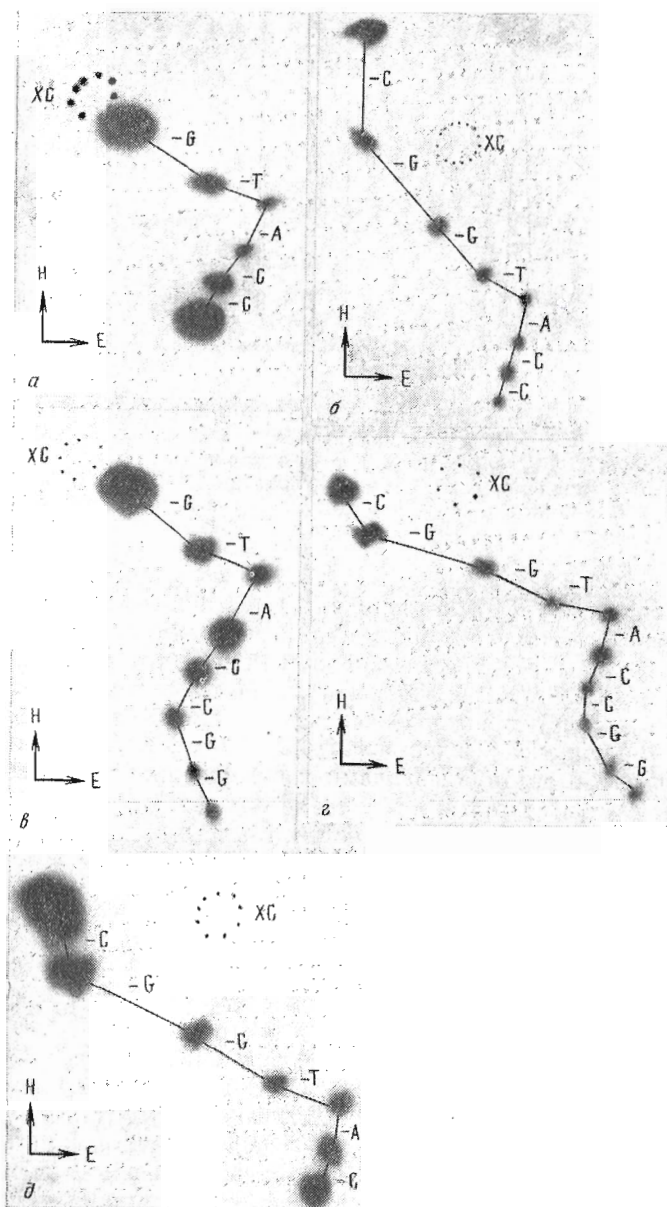
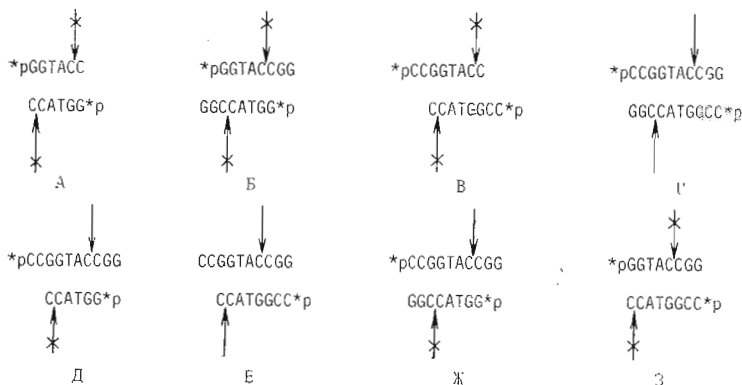


Рис. 2. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза 5'-³²P-фосфорилированных олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда на ацетицеллюлозе; направление E — электрофорез в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5) при 90 В/см, направление H — гомохроматография в гомомесели VI [12]; XG — пятно красителя ксиленацанола FF. а — гексануклеотид ³²pGGTACC (³²pXIX), б — октануклеотид ³²pCCGGTACCGG (³²pXXI), в — октануклеотид ³²pGGTACCGG (³²pXIII), г — декануклеотид ³²pCCGGTACCGG (³²pXXIV), д — гептануклеотид ³²pCCCGGTAC

Схема 3



Символом *р обозначен концевой [³²P]фосфат, стрелкой отмечено ожидаемое место рестрикции; перечеркнутая стрелка означает отсутствие соответствующего расщепления

различающиеся для разных рестриктаз (ср. [1–4]). Устойчивость к действию рестриктаз как изолированных сайтов, так и некоторых других сайтовсодержащих олигонуклеотидов, вероятно, в первую очередь объясняется тем, что они не удовлетворяют соответствующим структурным требованиям.

Экспериментальная часть

В работе использованы нуклеозиды фирм «Sigma» и «Calbiochem» [γ -³²P]rATP с уд. акт. 2000 Ки/ммоль (Amersham), DEAE-целлюлоза DE-23 (Whatman), DEAE-целлюлоза MN-300 и целлюлоза MN-300 HR (Serva), сефадек G-50, сверхтонкий (Pharmacia), дауэкс 50×8 (Serva), полоски ацетилцеллюлозы 3×55 см (Schleicher und Schüll), силикагель L40-100 (Chemapol), пластинки «Silufol UV 254» (Kavalier), фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1; Worthington), T4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) [11]; эндонуклеаза рестрикции *KpnI* выделена по общему методу [14].

Левулиновый ангидрид получен взаимодействием 23,2 г (0,2 моль) левулиновой кислоты и 20,6 г (0,1 моль) дициклогексилкарбодимида в 100 мл абс. эфира в течение 5 ч при 20°С (ср. [7]). После фильтрования, упаривания и кристаллизации из смеси эфир — гексан, 10 : 1, выход 90%, т. пл. 28°С, v_{max} 1710, 1760, 1810 см⁻¹.

(DMTr)bzC(Lv) получен взаимодействием 0,31 г (0,5 ммоль) (DMTr)bzC и 0,53 г (2,5 ммоль) левулинового ангидрида в 10 мл пиридина в течение 12 ч при 20°С (ср. [7]). После разложения реакционной смеси водой, экстракции хлороформом и хроматографии на силикагеле в градиенте концентрации метанола в хлороформе выход 95%. Аналогично получен (DMTr)bzG(Lv) с выходом 92%. Детритилирование (см. ниже) обоих веществ привело соответственно к bzC(Lv) и bzG(Lv), R_f 0,54 и 0,42 (ТСХ в системе хлороформ — метанол, 9 : 1).

Синтез олигонуклеотидов. TPST и (DMTr)bzNp(ClPh)(CNEt) получали по методу [6]. (CNEt)(ClPh)pbzG≡bzG(Lv)(CNEt-XXII) получен взаимодействием 32 мг (33 мкмоль) детритилированного (III) с 41 мг (132 мкмоль) *n*-хлорфенилфосфобистриазолида, а затем с 12 мг (170 мкмоль) этиленциангидрина [6] с выходом 43%, R_f 0,58 (ТСХ в системе хлороформ — метанол, 9 : 1). DMTr-группу удаляли действием 2% PhSO₃H в растворе хлороформ — метанол, 7 : 3, в течение 3 мин при 0°С [6], цианэтильную группу — смесью пиридин — триэтиламин — вода, 3 : 1 :

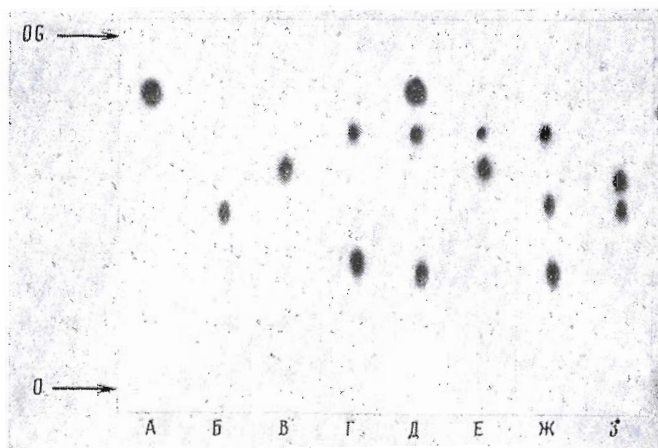


Рис. 3. Действие рестриктазы *KpnI* на олигонуклеотидные дуплексы А — З (после инкубирования реакционной смеси в течение 24 ч при 15° С анализ гомохроматографией в гомосмеси VI [12]; О — старт, OG — положение красителя оранжевого G). А — (³²pXIX)·(³²pXIX), Б — (³²pXIII)·(³²pXIII), В — (³²pXXI)·(³²pXXI), Г — (³²pXXIV)·(³²pXXIV), Д — (³²pXXIV)·(³²pXIX), Е — (XXIV)·(³²pXXI), Ж — (³²pXXIV)·(³²pXIII), З — (³²pXIII)·(³²pXXI)

: 1, в течение 25 мин при 20° С [15]. Отщепление левулинильного остатка проводили действием 0,5М гидразина в растворе пиридин — уксусная кислота, 4:1 (7 мин при 20° С), останавливая реакцию избытком ацетилацетона [8]; ход отщепления контролировали с помощью ТСХ, опрыскивая хроматограмму 0,04% раствором 2,4-динитрофенилгидразина в 2 н. HCl (DMTr-содержащие соединения непосредственно перед ТСХ обрабатывали PhSO₃H). Межнуклеотидные конденсации проводили в основном как описано в работе [13]; после разложения реакционной смеси 50% водным пиридином раствор несколько раз упаривали с толуолом, затем с хлороформом и остаток хроматографировали в линейном градиенте метанола (3—10% в зависимости от длины олигонуклеотида) в хлороформе. Условия и результаты межнуклеотидных конденсаций представлены в таблице. Целевые олигонуклеотиды полностью деблокировали действием 25% водн. NH₃ (12 ч при 50° С) и затем 80% уксусной кислоты (30 мин при 20° С). В результате из 4 мг гексануклеотида (XVIII), 1 мг октануклеотида (XX), 2 мг октануклеотида (XI) и 6 мг декануклеотида (XXIII) было получено соответственно 31 ОЕ₂₆₀ гексануклеотида (XIX), 4 ОЕ₂₆₀ октануклеотида (XXI), 7 ОЕ₂₆₀ октануклеотида (XIII) и 15 ОЕ₂₆₀ декануклеотида (XXIV) (см. рис. 1); нуклеотидные карты приведены на рис. 2 а — г.

Взаимодействие рестриктазы KpnI с олигонуклеотидами. 5'-³²P-фосфорилирование проводили как в работе [13]; активность меченых олигонуклеотидов составляла ~40 000 имп/мин·пмоль. Раствор олигонуклеотидов в буфере, содержащем 0,06 М трис-HCl (pH 7,8), 0,06 М MgCl₂ и 0,02 М дитиотреит, нагревали до 75° С и постепенно охлаждали до нужной температуры в течение 12 ч, после чего прибавляли эндонуклеазу *KpnI* до концентрации 0,5 ед. акт./мкл (общий объем реакционной смеси 20 мкл), инкубировали 24 ч и анализировали гомохроматографией в гомосмеси VI [12]. Радиоактивность пятен, локализованных радиоавтографией (пленка РТ-1), просчитывали в толуольном сцинтиляторе, определяя таким образом степень расщепления олигонуклеотида.

а) Декануклеотид ³²pCCGGTACCGG (5,6 пмоль) (дуплекс Г) инкубировали с рестриктазой при 4, 10, 15 и 20° С; степень расщепления составила соответственно 21, 37, 60 и 77%. Гептануклеотид ³²pCCGGTAC выде-

Синтезированный олигонуклеотид *	Исходные в-ва, мкмоль			Время конденсации, мин	Выход, %
	P-компонент	OH-компонент	TPST		
(DMTr)bzG≠bzGp(ClPh) (II) **	630	420	1500	15	89
(DMTr)bzG≠bzG(Lv) (III)	190	130	500	20	93
(DMTr)bzG≠bzG(Ac) (IV)	150	100	300	30	77
(DMTr)bzC≠bzCp(ClPh) (V) **	230	160	520	15	89
(DMTr)bzC≠bzC≠bzG≠bzG(Lv) (VI)	55	25	80	45	58
(DMTr)bzC≠bzC≠bzG≠bzG(Ac) (VII)	35	20	80	30	63
(DMTr)T≠bzAp(ClPh) (VIII) **	400	250	750	15	78
(DMTr)T≠bzA≠bzC≠bzC≠bzG≠bzG(Lv) (IX)	28	14	45	50	55
(DMTr)T≠bzA≠bzC≠bzC≠bzG≠bzG(Ac) (X)	26	13	45	60	61
(DMTr)bzG≠bzG≠T≠bzA≠bzC≠bzC≠bzG≠bzG(Lv) (XI)	21	7	28	90	43
(DMTr)bzG≠bzG≠T≠bzA≠bzC≠bzC≠bzG≠bzG(Ac) (XII)	28	8	32	120	48
(DMTr)bzG≠Tp(ClPh) (CNEt) (XIV)	240	180	540	15	85
(DMTr)bzG≠bzG≠Tp(ClPh) (XV) **	210	130	500	35	77
(DMTr)bzC≠bzC(Lv) (XVI)	355	220	360	25	91
(DMTr)bzA≠bzC≠bzC(Lv) (XVII)	270	150	450	60	79
(DMTr)bzG≠bzC≠T≠bzA≠bzC≠bzC(Lv) (XVIII)	110	55	180	70	65
(DMTr)bzC≠bzC≠bzG≠bzG≠T≠bzA≠bzC≠bzC(Lv) (XX)	18	6	24	90	51
(DMTr)bzC≠bzC≠bzG≠bzG≠T≠bzA≠bzC≠bzC≠bzG≠bzG(Lv) (XXIII)	8	2	10	120	41
(DMTr)bzG≠bzG≠T≠bzA≠bzC≠bzC≠bzG≠bzG(Lv) (XI)	18	6	24	120	31

* Знаком ≠ обозначена ClPh-защищенная фосфатная связь, образовавшаяся в заключительной конденсации.

** Вещество выделено в виде 3'-цианатилевого эфира.

лили на колонке с сефадексом G-50 (0,4×20 см) в буфере 1 мМ трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA; нуклеотидная карта приведена на рис. 2, д.

б) Смесь октануклеотида $^{32}\text{pCCGGTACC}$ и декануклеотида CCGGTACC GG (по 1,5 пмоль) (дуплекс Е) инкубировали с *KpnI* при 15° С; степень расщепления 28%.

в) Гексануклеотид $^{32}\text{pGGTACC}$ (1,9 пмоль) (дуплекс А), октануклеотид $^{32}\text{pGGTACC GG}$ (2,4 пмоль) (дуплекс Б), октануклеотид $^{32}\text{pCCGGTACC}$ (1,6 пмоль) (дуплекс В), а также смеси гексануклеотида $^{32}\text{pGGTACC}$ и декануклеотида $^{32}\text{pCCGGTACC GG}$ (по 1,5 пмоль) (дуплекс Д), октануклеотидов $^{32}\text{pGGTACC GG}$ и $^{32}\text{pCCGGTACC}$ (дуплекс З), октануклеотида $^{32}\text{pGGTACC GG}$ и декануклеотида $^{32}\text{pCCGGTACC GG}$ (дуплекс Ж) инкубировали с *KpnI* при температуре 0, 4, 10, 15 и 20° С. Во всех опытах рестрикции не наблюдалось.

Авторы благодарны А. Н. Вульфсону и С. А. Якимову за проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии олигонуклеотидов (методика хроматографии будет описана позднее).

ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Ю. А., Звонок Н. М., Чуенило С. А. Синтез олиго- и полинуклеотидов. XXXIII. Синтез линкерных и адапторных олигодезокси-нуклеотидов и их взаимодействие с эндонуклеазами рестрикции. — Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1522–1535.
2. 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.

3. *Coppeli M., Pingoud A., Mauss G., Mayer H., Köster H., Frank R.* The interaction of *EcoRI* restriction endonuclease with its substrate.— *Eur. J. Biochem.*, 1980, v. 104, p. 101–107.
4. *Green P. J., Poonian M. S., Nussbaum A. L., Tobias L., Garfin D. L., Boyer H. W., Goodman H. M.* Restriction and modification of a self-complementary octanucleotide containing the *EcoRI* substrate.— *J. Mol. Biol.*, 1975, v. 99, p. 237–261.
5. *van de Sande J. H., Caruthers M. H., Kumar A., Khorana H. G.* Total synthesis of the structural gene for the precursor of a tyrosine suppressor transfer RNA from *Escherichia coli*. 2. Chemical synthesis of the deoxypolynucleotide segments corresponding to the nucleotide sequence 1–31.— *J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251, № 3, p. 571–587.
6. *Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R.* Arylsulfonyltetrazoles, new coupling reagents and further improvements in the triester method for the synthesis of deoxyribooligonucleotides.— *Nucl. Acids Res.*, 1977, v. 4, № 2, p. 353–371.
7. *Hassner A., Strand G., Rubinstein M., Patchornik A.* Levulinic esters. An alcohol protecting group applicable to some nucleosides.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1975, v. 97, № 6, p. 1614–1615.
8. *van Boom J. H., Burgers P. M. J.* Use of levulinic acid in the protection of oligonucleotides via the modified phosphotriester method: synthesis of decaribonucleotide U A U-A-U-A-U-A-U-A.— *Tetrahedron Lett.*, 1976, № 52, p. 4875–4878.
9. *Ogilvie K. K., Nemer M. I.* The synthesis of oligoribonucleotides. VI. The synthesis of a hexadecamer by a block condensation approach.— *Can. J. Chem.*, 1980, v. 58, № 14, p. 1389–1397.
10. *Letsinger R. L., Miller P. S.* Protecting groups for nucleosides used in synthesizing oligonucleotides.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1969, v. 91, № 12, p. 3356–3359.
11. *Берлин Ю. А., Каюшин А. Л., Тактакишвили М. О., Лебедевко Е. П., Горобко В. Г., Чувило С. А., Колосов М. Н.* Синтез олиго- и полинуклеотидов. XXXI. Химико-ферментативный синтез 5'-концевого фрагмента структурного гена дрожжевой тРНК^{Val}.— *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 7, с. 1026–1036.
12. *Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R.* DNA sequence analysis: a general, simple and rapid method for the sequencing large oligoribonucleotide fragments by mapping.— *Nucl. Acids Res.*, 1974, v. 1, № 3, p. 331–353.
13. *Берлин Ю. А., Звонко Н. М., Каюшин А. Л.* Синтез олиго- и полинуклеотидов. XXXII. Олигодезоксинуклеотиды, содержащие участки узнавания рестриктаз *EcoRI*, *HindIII* и *BamHI*.— *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 8, с. 1182–1195.
14. *Green P. J., Heyneker H. L., Bolivar F., Rodriguez R. L., Betlach M. C., Covarrubias A. A., Backman K., Russel D. J., Tait R., Boyer H. W.* A general method for the purification of restriction enzymes.— *Nucl. Acids Res.*, 1978, v. 5, № 7, p. 2373–2380.
15. *Crea R., Kraszewski A., Hirose T., Itakura K.* Chemical synthesis of genes for human insulin.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, № 12, p. 5765–5769.

Поступила в редакцию
10.IV.1981

SYNTHESIS OF THE OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES CONTAINING THE GGTACC SEQUENCE AND THEIR INTERACTION WITH THE *KpnI* RESTRICTION ENDONUCLEASE

BERLIN Yu. A., BUTKUS V. V.

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

Four oligodeoxyribonucleotides, namely dGGTACC, dCCGGTACC, dGGTACCGG and dCCGGTACCGG, containing the recognition site of the restriction endonuclease *KpnI* have been synthesized by the modified phosphotriester approach. Use of levulinyl and dimethoxytrityl residues to protect 3'- and 5'-hydroxyls, respectively, allowed to selectively elongate the nucleotide chain in 5'→3' and in 3'→5' direction and, therefore, to synthesize the above compounds from the «key» hexanucleotide dGGTACC.

The oligonucleotides synthesized are fully or partially self-complementary and can form a number of homo- and heteroduplexes. Only duplexes (³²pCCGGTACCGG)·(³²pCCGGTACCGG) and (CCGGTACCGG)·(³²pCCGGTACC) are cleaved by the restriction endonuclease *KpnI* to give heptanucleotide ³²pCCGGTACC isolated by gel filtration and identified by finger-printing technique. The data obtained show that the two 5'-ends and at least one 3'-end of the recognition site must be flanked in the substrate for the *KpnI* endonuclease action.