

УДК 547.962.32

ХИМИЯ

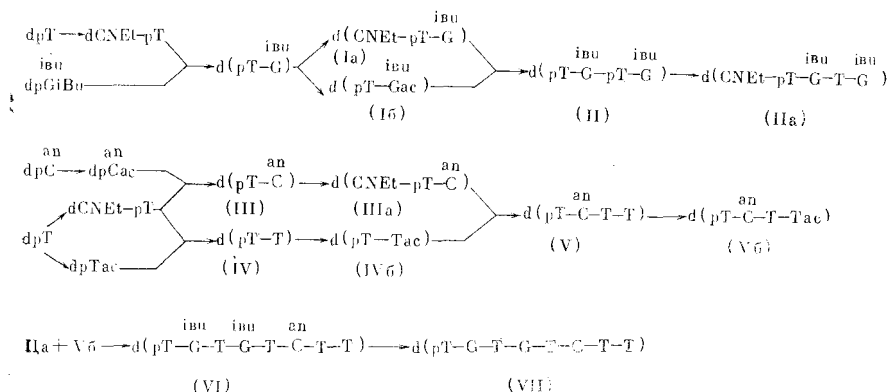
В. Н. КАГРАМАНОВ, В. Д. СМЕРНОВ, А. А. БОГДАНОВ,
З. А. ШАБАРОВА, член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

СИНТЕЗ ОКТАДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДА, КОМПЛЕМЕНТАРНОГО УЧАСТКУ 16 S-РИБОСОМАЛЬНОЙ РНК

Доступность синтетических олиго- и полидезоксинуклеотидов ⁽¹⁾ позволяет в настоящее время ставить вопрос об использовании этих соединений не только в качестве моделей, иллюстрирующих определенные фрагменты нативных структур, но и о применении их как инструмента исследования строения и функциональной активности последних. Ни один из известных сейчас модифицирующих агентов не позволяет осуществлять избирательную модификацию строго определенных участков ДНК или РНК. В то же время исследование специфичности, например, нуклеиново-белковых взаимодействий требует селективного блокирования строго определенных участков нативных молекул нуклеиновых кислот.

До последнего времени такие работы были затруднены из-за почти полного отсутствия сведений о первичной структуре высокомолекулярных НК из разных объектов. Однако сейчас уже существует реальная возможность полной расшифровки структуры ряда рибосомальных ⁽²⁾ и фаговых ⁽³⁾ РНК. В этом случае синтетические олигонуклеотиды заданного состава могут быть использованы для селективного блокирования и локализации функционально-активных участков в нативных биополимерах. Длина цепи и состав синтетического олигонуклеотида должны обеспечивать возможность его прочного и избирательного связывания с определенным участком РНК за счет образования комплементарных пар между основаниями синтетической и нативной цепей. Этот метод может служить также критерием точности установления первичной структуры РНК.

Настоящая работа посвящена синтезу октадезоксинуклеотида d(pT—C—T—C—T—C—T—T), комплементарного по составу (при антипараллельном расположении цепей) участку 6—13 фрагмента А 16S-субъединицы РНК из рибосом *E. coli* ⁽⁴⁾. Синтез был проведен по следующей схеме:



Методики блокирования мононуклеотидов и синтеза олигодезоксинуклеотидов, принципиально разработанные Корана ⁽⁵⁾, описаны нами в предыдущих сообщениях ^(6, 7).

В качестве конденсирующего агента на всех стадиях синтеза использован мезитиленсульфохлорид. Выделение синтезированных олигонуклеотидов из реакционных смесей проводили ионообменной хроматографией на микрокристаллической диэтиламиноэтилцеллюлозе DE-32 с использованием линейного градиента концентрации триэтиламмонийбикарбонатного (ТЭАБ) буфера. График разделения реакционной смеси при синтезе октануклеотида VI приведен на рис. 1.

Интересно отметить, что применение пологого линейного градиента ТЭАБ (при содержании в элюенте 30% эталона) позволяет осуществить разделение тетрануклеотидов по составу.

Удаление защитных групп в соединении VI проводили обработкой последнего 25% водным аммиаком; октануклеотид VII выделяли препаративной хроматографией на бумаге в системе А (см. эксперимент).

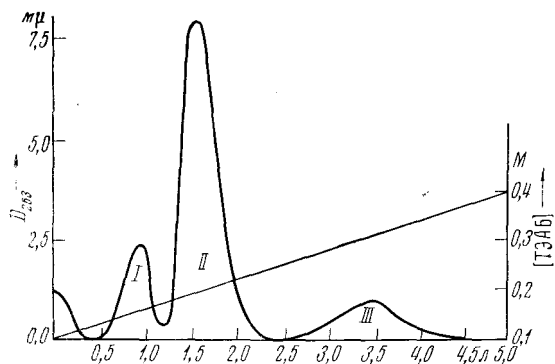


Рис. 1. Разделение реакционной смеси при синтезе октануклеотида VI. Размер колонки 2×60 см. Скорость элюции 1 мл/мин

В табл. 1 приведены хроматографические и спектральные характеристики синтезированных олигонуклеотидов, а также данные кислотного и ферментативных гидролизом.

Хроматографию на бумаге Ватман 1 проводили в следующих системах: А — 96% этиловый спирт — 1М ацетат аммония (7:3); В — изопропиловый спирт — 0,5М ацетат аммония (5:2); С — 96% этиловый спирт — 1М ацетат аммония (1:1); D — *n*-пропиловый спирт — концентрированный водный аммиак — вода (55:10:35).

Тонкослойную хроматографию проводили на целлюлозе Ватман СС-41 в системе А по методике, описанной в ⁽⁸⁾.

Электрофорез на бумаге проводили в 0,05М ТЭАБ (рН 7,8) при напряжении 22 в/см (4 час.).

Синтез олигонуклеотидов и разделение продуктов конденсации проводили по методикам, описанным ранее ^(6,7).

В табл. 2 представлены условия синтеза и хроматографического разделения олигодезоксинуклеотидов I — VI.

Гидролиз октануклеотида VII змеиным ядом. К 0,2 оптического единицам октануклеотида VII добавили 0,1 мл 0,05М фосфатного буфера (0,01М $MgCl_2$; рН 7,8) и 1 мг сухого яда гюрзы. Смесь термостатировали (37°; 24 час.) и продукты гидролиза разделяли хроматографией в тонком слое целлюлозы СС-41 в системе А. По поглощению элюатов у.-ф. поглощающих зон, идентифицированных сравнением с контрольными образцами, определяли соотношение дезокситимидин: дезоксигуанозин: дезоксицитидин по методике ⁽⁸⁾.

Гидролиз олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда проводили с использованием фосфодиэстеразы, закрепленной на ДЭАЭ-целлюлозе. 0,1 мл раствора, содержащего 8–10 оптических единиц олигонуклеотидов в 0,05М ТЭАБ (рН 8,5) наносили на колонку с ФДЭ-целлюлозой (объем колонки 0,2 мл) и термостатировали 3 часа при 37°. Нуклеотидный материал элюировали 1,5 мл 0,25М ТЭАБ, элюат упаривали и хроматографировали в системе А. Соотношение продуктов гидролиза определяли по величине оптического поглощения элюатов зон, соответствующих контрольным образцам мононуклеотидов.

Таблица 1

Некоторые характеристики синтезированных олигодезокснуклеотидов

Соединение	$\lambda_{\max}$	$\lambda_{\min}$	R_f в системах				Продукты гидролиза фосфомоноэстеразой	Соотношение продуктов гидролиза HClO_4	Соотношение продуктов ферментативного гидролиза *
	м μ		A	B	C	D			
^{ibu} d(pT—G) (I)	261	230	0,46 0,21	0,29 0,07	0,67 0,40	0,36	d(T—G)	Tym : Gua = = 1 : 1,04	
^{an} d(pT—C) (III)	272; 302	236; 291	0,41	0,24	0,52		d(T—C)	Tym : Cyt = = 1 : 1	
d(pT—C)			0,25	0,09	0,40	0,35	d(T—C)	Tym : Cyt = = 1 : 1,03	
d(pT—T) (IV)	267	234	0,31	0,14	0,50	0,33	d(T—T)		
^{ibu} d(pT—G—T—G) (II)			0,37	0,12					
^{ibu} d(pT—G—T—G) *	261	228	0,06	0,06		0,27		Tym : Gua = = 1 : 1,01	dpT : dpG = = 1 : 1,02 (ФДЭ)
^{an} d(pT—C—T—T)			0,23	0,05					
^(V) d(pT—C—T—T)	270	236	0,06		0,35	0,25		Cyt : Tym = = 1 : 3,0	dpC : dpT = = 1 : 3,01 (ФДЭ)
^{ibu} d(pT—G—T—G— —T—C—T—T)	264; плечо 302	233	0,03					Cyt : Gua : : Tym =	dC : dG : dT = = 1 : 2,12 : : 5,2 (зм. яд)
^{an} d(pT—G—T—G— —T—C—T—T) (VII)	261	234	На старте	На старте				= 1 : 2,05 : 5,1	

* Данные гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда (ФДЭ) или ядом гюрзы (зм. яд).

Таблица 2

Условия синтеза и хроматографического разделения олигонуклеотидов

Синтезированный олигонуклеотид	Компоненты синтеза *		Количество мезитиленисульфохлорида, ммол	Время реакции, час	Размер колонки с ДЭАЭ-целлюлозой, см	Элюент		Выход, %
	нуклеозидный*	нуклеотидный*				смеситель	резервуар	
^{ibu} d(pT—G) (I)	dCNet—pT (3,0)	^{ibu} dpGibu (6,0)	25,2	2,0	5,5 × ×100	12 0,05	12 0,25	40
^{an} d(pT—C) (III)	dCNet—pT (4,0)	^{an} dpCac (4,0)	18,1	2,0	То же	10 10 0,05	10 10 0,25	32
d(pT—T) (IV)	dCNet—pT (7,4)	dpTac (12,8)	29,1	3,0	» »	То же	То же	62
^{ibu} d(pT—G—T—G)(II)	Ia (0,25)	Iб (0,65)	2,2	3,0	3 × 90	6 0,05 30	6 0,35 30	36
^{an} d(pT—C—T—T) (V)	IIIa (1,1)	IVб (2,9)	9,8	3,0	То же	То же	То же	22
^{ibu} d(pT—G—T—G— —T—C—T—T) (VI)	IIa (0,05)	Vб (0,11)	4,0	3,5	2 × 60	2,5 0,1 30	2,5 0,4 30	16

* В скобках количество в ммол.

** Объем (л); концентрация (мол); этанол (%)

Гидролиз олигонуклеотидов хлорной кислотой проводился по методике Уайта (⁹).

Удаление защитных групп с гетероциклов осуществляли выдерживанием препарата в смеси 25% водного аммиака с пиридином (1:2; 20°; 3 суток) с последующим упариванием раствора и выделением олигонуклеотида препаративной хроматографией на бумаге в системе А.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
10 VII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Х. Г. Корана, Журн. Всесоюз. хим. общ. им. Д. И. Менделеева, **16**, 145 (1971).
² P. Felner, C. Ehresmann, J. P. Ebel, Europ. J. Biochem., **13**, 583 (1970).
³ M. A. Billeter, J. E. Daheberg et al., Nature, **224**, 1084 (1969). ⁴ C. Ehresmann, P. Felner, J. P. Ebel, Nature, **227**, 1321 (1970). ⁵ H. G. Khogana, Pure Appl. Chem., **17**, 349 (1968). ⁶ В. Д. Смирнов, В. Н. Каграманов и др., Молек. биол., **6**, 292 (1972). ⁷ В. Д. Смирнов, М. Г. Ивановская и др., ДАН, **206**, № 5 (1972). ⁸ А. Д. Мирзабеков, Д. Ластить и др., Молек. биол., **6**, 87 (1972). ⁹ G. R. Wyatt, Biochem. J., **48**, 581 (1951).