

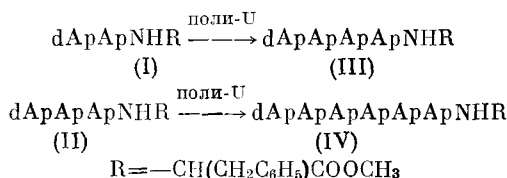
В. К. НЕДБАЙ, Н. И. СОКОЛОВА, З. А. ШАБАРОВА,
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

ХИМИЧЕСКИЙ МАТРИЧНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Идея использования матричных свойств полинуклеотидов (способность образовывать комплементарные комплексы) для химического синтеза межнуклеотидных связей в водных растворах (¹⁻³) интересна в связи с возможностью использования для химического синтеза незащищенных олигонуклеотидов. Основной трудностью при этом является подбор агента, активирующего концевую фосфатную группу олигонуклеотида. Этот агент не должен модифицировать гетероциклические основания, мешать образованию комплементарного комплекса матрица — олигонуклеотиды; он должен образовывать устойчивые в водных растворах производные олигонуклеотидов, неспособные реагировать межмолекулярно (вне матрицы) и в то же время достаточно активные, чтобы реагировать со сближенными на матрице гидроксильными группами другого нуклеотида с образованием межнуклеотидной связи.

Всем этим требованиям отвечают аминокислотные амиды, образованные концевым фосфором олигонуклеотида — соединения, которые могут рассматриваться как близкие аналоги (³⁻⁵) природных ковалентных фермент-субстратных комплексов, переносящих нуклеотидный фосфор (⁶). Такие амиды устойчивы в водных растворах при нейтральных значениях pH (^{4, 5}), они недостаточно активны, чтобы образовать межнуклеотидную связь при межмолекулярных взаимодействиях, но становятся достаточно активными фосфорилирующими агентами при наличии пространственно сближенной нуклеофильной группы, в том числе и гидроксильной (³⁻⁵).

В настоящей работе описывается синтез тетра- и гексануклеотидов дезоксиаденозин-3'-фосфата из амидов ди-(I) и тринуклеотида (II) с использованием в качестве матрицы полиуридиловой кислоты:



Синтез амидов I и II осуществлен по описанной ранее методике (⁷). Поскольку можно было опасаться дестабилизирующего влияния аминокислоты на комплексообразование синтезированных амидов I и II с поли-U, была определена температура плавления комплексов методом у.-ф. спектроскопии. Комплекс амида I с поли-U имеет т. пл. 3°, а для комплекса амида II с поли-U — т. пл. 16°, т. е. комплексы амидов dApAp и dApApAp практически не отличаются по устойчивости от комплексов с поли-U соответствующих свободных олигонуклеотидов (⁸). В связи с тем, что устойчивость олигонуклеотид — полинуклеотидных комплексов повышается с увеличением концентрации олигонуклеотида (⁹), соединения I и II вводились в матричный синтез в концентрации $5 \cdot 10^{-2}$ мол./л. Реакция проводилась при 1—3° в 0,05 M фосфатном буфере (pH 7,5), содержа-

щем 0,075 M MgCl₂ и 0,2 M NaCl. После 7—10 дней инкубации реакционная смесь препаративно хроматографировалась на бумаге в системе этанол — 1 M ацетат аммония (7 : 3). Исходные соединения: поли-U ($R_f = 0$), I ($R_f = 0,55$) или II ($R_f = 0,32$) легко отделялись от продуктов реакции — амида тетра-нуклеотида III ($R_f = 18$) или амида гекса-нуклеотида IV ($R_f = 12$).

В веществе, полученном в результате элюции водой стартовой у.-ф. поглощающей зоны хроматограммы, после гидролиза поли-U панкреатической РНКазой обнаружены в небольших количествах амиды поли-dA.

На рис. 1 даны профили элюции олигонуклеотидов III и IV, полученные при аналитическом хроматографировании этих соединений по Томлинсону⁽¹⁰⁾ на ДЕАЕ-сефадексе А-25. В табл. 1 приводятся данные анализа соединений III и IV. Амиды тетра-(III) и гекса-(IV) нуклеотидов не деполимеризуются при обработке щелочью (0,3 N КОН, 37°, 18 час.).

Таблица 1

Результаты анализа амидов III и IV

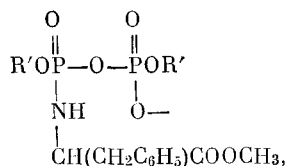
Соединение	Химический гидролиз		Ферментативный гидролиз *	
	0,3 N КОН (37°, 18 час.)	70% НСlO ₄ (105°, 1 час)	ФДЭ змеиного яда	ФДЭ селезенки быка
III	Не гидролизуется	Ade : Phe = = 4; 2 : 1	dA : dpA : dpApNHR = = 1 : 1,87 : 0,83	dAp : dApNHR ** = = 3,12 : 1
IV	Не гидролизуется	Ade : Phe = = 5,6 : 1	dA : dpA : dpApNHR = = 1 : 3,90 : 0,85	dAp : dApNHR = = 5,20 : 1

* Раствор 0,2 о.е. вещества в 0,01 мл 0,05 M трис-буфера, содержащего фермент, инкубировали при 37° в течение 15 час. Продукты гидролиза выделялись методом т.с.х. на целлюлозе MN — 300 в системе этанол — 1 M ацетат аммония (7 : 3).

** При электрофорезе на бумаге в 0,05 M триэтиламоний бикарбонате (рН 7,5; 300 в, 3,5 час) для dApNHR $U_{отн.} p_A = 1,2$; для dApNHR $U_{отн.} p_A = 0,45$. Структуру этих соединений подтверждали также гидролизом 70% НСlO₄ (105°, 1 час). Обнаруживали Ade и Phe в соотношении, близком к 1.

Приведенные данные позволяют ответить на два основных вопроса, связанных с матричной полимеризацией амидов ди-(I) и три-(II) нуклеотидов: 1) о природе связи между олигонуклеотидными блоками и 2) о молекулярном весе соединений III и IV (степени полимеризации олигонуклеотидов I и II).

Возможны два варианта сшивания блоков I и II поли-U: «голова — хвост» (см. схему) и «голова — голова» (если один из олигонуклеотидов ориентирован на матрице параллельно ей) с образованием пирофосфатов (II):



где R' — ди- или тринуклеотид.

Полученные в настоящей работе данные говорят в пользу природной 3'→5' межнуклеотидной связи между олигомерами I и II в соединениях III и IV. Ферментативный гидролиз (табл. 1) протекает в указанных условиях полностью с образованием при гидролизе ФДЭ змеиного яда дезоксиаденозина, dpA и фенилаланинового амида dpAp (dpApNHR) и с образованием dAp и его фенилаланинового амида при действии ФДЭ селезенки. Если бы соединения III и IV имели пирофосфатную связь между блоками, то качественный и количественный состав гидролизата были бы иными. Количественные соотношения продуктов кислотного и фермента-

тивного гидролиза соединений III и IV (см. табл. 1) говорят о том, что основными продуктами полимеризации I и II на поли-У являются тетра (III) и гекса (IV) нуклеотиды. Этот вывод подтверждается данными хроматографии соединений III и IV в присутствии мочевины (рис. 1). Соединение III, имеющее при pH 7,5 суммарный заряд тринуклеотида, элюируется при концентрации соли, при которой элюируется тринуклеотид

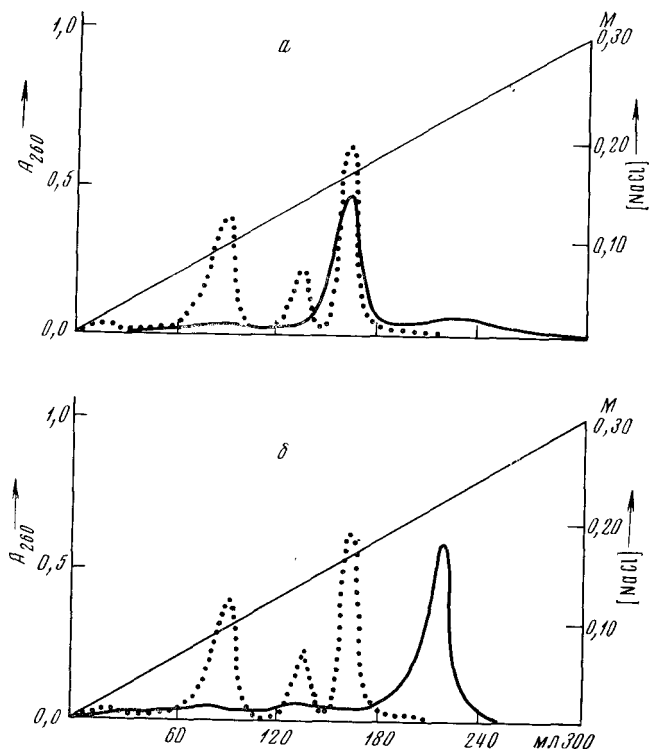


Рис. 1. Хроматография амида тетра-нуклеотида (а) и гекса-нуклеотида (б) (1—2 о.е.) на колонке (0,3 × 70 см) с ДЕАЕ-сефадексом А-25 в 7 М мочевины при pH 7,5. Пунктир — разделение смеси dAr, dArAr и dArArAr

(рис. 1). Соединение IV элюируется концентрацией соли (0,22 М NaCl), при которой элюируется пентануклеотид (суммарные заряды IV и пентануклеотида одинаковы).

Описанный выше эксперимент показывает на принципиальную возможность использования амидов олигонуклеотидов для неферментативного синтеза межнуклеотидных связей между олигонуклеотидами в присутствии комплементарных полинуклеотидов (матриц). Работа с использованием более специфических олигонуклеотидамид — полинуклеотидных комплексов продолжается.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
13 III 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Naylor, P. T. Gilham, *Biochemistry*, **5**, 2722 (1966). ² I. Sulston, R. Rohrmann et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **59**, 726 (1968). ³ Z. A. Shabarova, M. A. Prokofiev, *FEBS Letters*, **11**, 237 (1970). ⁴ Z. A. Shabarova, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **10**, London, 1970, p. 145.
- ⁵ З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, *Проблемы органической химии*, М., 1970, стр. 345. ⁶ R. J. Gumpert, J. R. Lehman, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **68**, 2559 (1971). ⁷ Н. И. Соколова, Л. Г. Гатицкая и др., *ДАН*, **196**, № 3 (1971).
- ⁸ M. N. Lipsett, L. Heppel, D. F. Fradley, *J. Biol. Chem.*, **236**, 857 (1961). ⁹ R. B. Gennis, C. R. Cantor, *Biochemistry*, **9**, 4714 (1970). ¹⁰ R. V. Tomlinson, G. M. Tener, *Biochemistry*, **2**, 697 (1963).