

**В. Г. МЕТЕЛЕВ, В. Л. ДРУЦА, В. Д. СМИРНОВ, З. А. ШАБАРОВА,  
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ**

## **СИНТЕЗ МЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ ГЕКСАДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДА, КОМПЛЕМЕНТАРНОГО УЧАСТКУ РНК ФАГА R17**

В настоящее время все большее внимание уделяется выяснению структуры и роли нетранслируемых участков в нуклеиновых кислотах. Удобными объектами для изучения при этом являются РНК-содержащие бактериофаги R17, MS2 и т. д. (1). В РНК таких бактериофагов определена цуклеотидная последовательность крупных фрагментов, а для гена, кодирующего структурный белок бактериофага MS2, предложена вторичная структура (2). При относительной доступности сейчас олиго- и полидезоксинуклеотидов задачной структуры появилась возможность выяснения роли функционально-активных участков РНК методом избирательного блокирования последних синтетическими олигонуклеотидами за счет образования пар комплементарных оснований между синтетической и нативной цепями (3).

Настоящая работа посвящена синтезу гексадезоксинуклеотида d(pGpGpTpApApT), комплементарного по составу (при антишаралль-

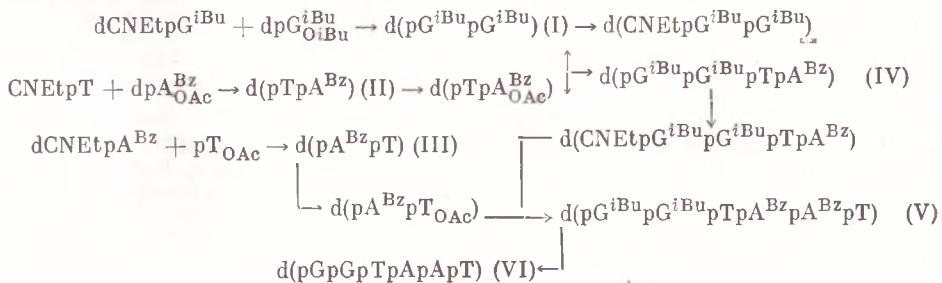
Т а б л и

Соединение	$\lambda_{\min}$	$\lambda_{\max}$	$R_f$ в системах *			Соотношение продуктов ферментативного гидролиза **
			B	C	D	
I	228	258	0,47	0,22	—	$dG : dpG = 1,00 : 1,08$
II	241	279	—	0,48	0,54	$dpA : pT = 1,06 : 1,00$
III	239	280	0,39	0,52	0,49	$dA : pT = 1,00 : 0,96$
IV	242	259	1,1 отн. рТ	0,9 отн. рТ	0,9 отн. рТ	$dT : dA : dG = 1,00 : 0,8 : 1,87$
V	234	262	0,1	—	—	$pI : dpA : dpG = 2,45 : 1,45 : 1,00$
VI	230	258	0,25 отн. рТ	на старте	—	$pT : dpA : dpG = 1,09 : 1,03 : 1,00$

\* Состав систем и условия ферментативного гидролиза см. эксперимент

ном расположении цепей) участку РНК бактериофага R17, входящему в инициирующий участок цистрона РНК-синтетазы, и введению в него три-тиевой метки.

Синтез гексануклеотида был проведен по схеме



Методики блокирования мононуклеотидов и синтеза олигодезоксинуклеотидов принципиально разработаны в лаборатории Кораны (4) и описаны в ряде работ нашей лаборатории (5, 6). В качестве конденсирующего агента на стадиях синтеза соединений II—V использован мезитиленсульфохлорид, на стадии синтеза соединения I — триизопропилбензольсульфохлорид. Выделение олигонуклеотидов проводили с помощью ионообменной хроматографии на диэтиламиноэтилцеллюлозе. Все олигонуклеотиды охарактеризованы хроматографически и спектрофотометрически. Состав подтвержден данными ферментативного гидролиза щелочной фосфатазой и фосфодиэстеразой змеиного яда. Характеристики приведены в табл. 1.

Удаление зашит с гетероциклических оснований осуществляли обработкой концентрированным аммиаком. Гомогенность препарата гексануклеотида была подтверждена хроматографией на микроколонке с ДЕАЕ-целлюлозой (7).  $\epsilon_{250}/\epsilon_{260} = 0,85$ ;  $\epsilon_{270}/\epsilon_{260} = 0,78$ ;  $\epsilon_{250}/\epsilon_{260} = 0,49$  (вычислено суммированием молярных экстинкций мононуклеотидов без учета гипохромизма 0,87; 0,81; 0,46).

Для введения в синтезированный гексануклеотид радиоактивной метки был выбран метод гомогенного изотопного обмена в жидкой фазе. Этот метод основывается на способности гетероциклических оснований нуклеотидов к очень медленному обмену водорода у определенных атомов углерода. Такой водородный обмен заметно идет при повышенных температурах у C<sub>8</sub>-пуринов и у C<sub>5</sub>- и C<sub>6</sub>-пиримидинов (в пиримидинах обмен в 10–100 раз медленнее, чем в пуринах). При исследовании кинетики медленного обмена водорода в аденоцинах.

Таблица 2  
Условия и результаты введения тритиевой метки в d(pGpGpTpApApT) методом гомогенного изотопного обмена с тритиевой водой

№ п.п.	Молярная концентрация NaOH	Температура, °C	Время, час.	Удельная активность $\mu\text{C}/\text{o.e.}^*$	Деструкция, %
1	0,1	60	8	0,51	2
2	0,1	75	4	0,56	22
3	0,1	90	2	0,67	42
4	1,0	60	2	0,89	10

\* Здесь оптическая единица поглощения при 257 м $\mu$ .

Условия синтеза и выход олигонуклеотидов

Синтезированный олигонуклеотид	Нуклеотидная компонента, ммол.	Нуклеозидная компонента, ммол	Конденсирующий агент, ммол.	Время, час.	Выход, %
d(pG <sup>i</sup> Bu <sub>p</sub> G <sup>i</sup> Bu)	14,5 dG <sup>i</sup> Bu <sub>O</sub> <sup>i</sup> Bu	10 dCNEtpG <sup>i</sup> Bu	29 TPS	4	17
d(pTpA <sup>Bz</sup> )	8,5 dTpA <sup>Bz</sup>	10 CNEtpT	21,2 MsCl	3	50
d(pA <sup>Bz</sup> pT)	9 pTpA <sup>Bz</sup>	3,15 dCNEtpA <sup>Bz</sup>	27 MsCl	2,5	53
d(pG <sup>i</sup> Bu <sub>p</sub> G <sup>i</sup> Bu <sub>p</sub> TpA <sup>Bz</sup> )	4d(pTpA <sup>Bz</sup> )	0,8 d(CNEtpG <sup>i</sup> Bu <sub>p</sub> G <sup>i</sup> Bu <sub>p</sub> TpA <sup>Bz</sup> )	12 MsCl	2,5	24
d(pG <sup>i</sup> Bu <sub>p</sub> G <sup>i</sup> Bu <sub>p</sub> TpA <sup>Bz</sup> pA <sup>Bz</sup> pT)	0,2d (pA <sup>Bz</sup> pTpA <sup>Bz</sup> )	0,02d(CNEtpG <sup>i</sup> Bu <sub>p</sub> G <sup>i</sup> Bu <sub>p</sub> TpA <sup>Bz</sup> )	0,5 MsCl	3,0	15

не и гуанозине обнаружено увеличение скорости обмена не только с возрастанием температуры, но и при увеличении pH раствора. Это явление щелочного ускорения медленного водородного обмена и было положено в основу введения тритиевой метки в гексадезоксинуклеотид d(pGpGpTpApApT). Основные данные об условиях и результатах экспериментов по введению трития в гексадезоксинуклеотид приведены в табл. 2.

Сравнение полученных экспериментальных данных показывает, что достаточно высокая удельная активность гексануклеотида может быть достигнута во всех опытах. Однако для сведения к минимуму деструкции выгоднее вводить метку при более низкой температуре, одновременно увеличивая длительность инкубации.

Тритиевая метка, введенная описанным способом в гексадезоксиунуклеотид, прочно удерживается при нейтральных, слабо кислых и слабо щелочных значениях pH растворов, что позволяет при относительно низких температурах работать с меченным соединением с минимальным искаражением результатов экспериментов из-за обратного обмена трития с водными растворами.

Хроматография проводилась на бумаге «Filtrak» № 3 и Ватман 1. Системы растворителей для хроматографии: изопропанол — аммиак — вода (7 : 1 : 2) — система А; *n*-пропанол — аммиак — вода (55 : 10 : 35) — система В; этанол — 1*M* ацетат аммония (7 : 3) — система С; изомасляная кислота — аммиак — вода (66 : 1 : 33) — система D; *n*-бутанол, насыщенный 1*M* аммиаком, — система Е.

В работе использовали монодезоксирибонуклеотиды и иммобилизованные ферменты производства опытного химического цеха Новосибирского института органической химии АН ССР.

Для синтеза олигонуклеотидов использовали методику, опубликованную ранее (5, 6). Условия синтеза и выход приведены в табл. 3.

Хроматографию олигонуклеотидов проводили на микрокристаллической диэтиламиногруппированной целлюлозе ДЕ-32, используя линейный градиент триэтиламмонийбикарбонатного буфера (ТЭАБ), содержащего 10% этанола. На рис. 1 приведен профиль элюции реакционной смеси при синтезе гексануклеотида.

Гидролиз щелочной фосфатазой. Гидролиз оли-

Рис. 1. Выделение соединения V. Размер колонки  $1.5 \times 70$  см; скорость элюции 0,5 мл/мин, объем фракций 12 мл. а — [ТЭАБ], б —  $D_{260}$ . III—V — синтезированные продукты, см. текст; III' — симметричный пирофосфат III

гонуклеотидов проводили с использованием щелочной фосфатазы, закрепленной на ДЕАЕ-целлюлозе (8). 0,1 мл раствора, содержащего 8—10 о.е. олигонуклеотида в 0,2*M* ТЭАБ, наносили на колонку с иммобилизованным ферментом и термостатировали 15 час. при 37°. Нуклеотидный материал элюировали 1,5 мл 0,3*M* ТЭАБ, элюат упаривали и хроматографировали в системе А.

Гидролиз олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда проводили с использованием фосфодиэстеразы, закрепленной на ДЕАЕ-целлюлозе (ФДЭ-целлюлоза). 0,1 мл раствора, содержащего 8—10 о.е. олигонуклеотида в 0,05*M* ТЭАБ (pH 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 0,25*M* ТЭАБ, элюат упаривали и хроматографировали в системе С.

Введение тритиевой метки в гексадезоксиунуклеотид. К тщательно высушенному в вакууме смеси гексануклеотида (около 1,2 о.е.) и рассчитанного количества щелочи добавляли 1 мл тритиевой воды с удельной активностью около 20 С/моль так, что концентрация щелочи соответствовала деци- или однонормальной, и смесь инкубировали от 2 до 8 час. при температуре от 60 до 90°. Тритиевую воду удаляли в вакууме, остаток нейтрализовали и отделяли от быстро обмениваемого трития, как описано ранее (9).

Удельная активность гексануклеотида определялась путем просчета его водного раствора известной концентрации методом гомогенного сцин-

тилляционного счета в диоксановом сцинтилляторе Брэя на счетчике фирмы «Nuclear Chicago» Mark I.

Эффективность счета трития при величине образца 1 мл раствора нуклеотида на 10 мл сцинтиллятора составляла 19–20 %.

Гомогенность препарата проверялась хроматографией в 7M мочевине на микроколонке с ДЕАЕ-целлюлозой (?). Процент деструкции рассчитывался из сравнения данных по хроматографическому анализу гексануклеотида до и после введения метки.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
23 XI 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> И. Г. Атабеков, Реализация генетической информации в вирусных РНК, «Наука», 1972. <sup>2</sup> W. Min, G. Haegeman et al., Nature, v. 237, 82 (1972). <sup>3</sup> В. Н. Каграманов, В. Д. Смирнов и др., ДАН, т. 208, № 4, 858 (1973). <sup>4</sup> K. L. Agarwal, A. Yamazaki et al., Angew. Chem., B. 11, 6, 451 (1972). <sup>5</sup> А. Г. Бадашкесева, Ю. А. Берлин и др., Химия природн. соед., т. 3, 394 (1973). <sup>6</sup> В. Д. Смирнов, В. Н. Каграманов и др., Молек. биол., т. 6, 292 (1972). <sup>7</sup> Ультрамикроанализ нукleinовых кислот, «Наука», 1973. <sup>8</sup> Д. Г. Кнорре, Н. В. Меламед и др., Биохимия, т. 38, 121 (1973).  
<sup>9</sup> В. Н. Каграманов, В. Л. Друца и др., ДАН, т. 214, № 5 (1974).