

УДК 547.962.32

БИОХИМИЯ

В. Г. МЕТЕЛЕВ, В. Л. ДРУЦА, В. Д. СМЕРНОВ, 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 нуклеотидная последовательность крупных фрагментов, а для гена, кодирующего структурный белок бактериофага MS2, предложена вторичная структура (2). При относительной доступности сейчас олиго- и полидезоксинуклеотидов заданной 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 антипараллель-

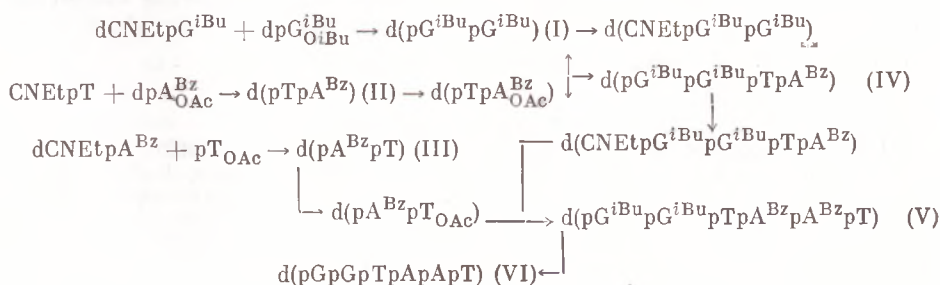
Таблица 1
Некоторые характеристики синтезированных олигодезоксинуклеотидов

Соединение	λ_{\min}	λ_{\max}	R_f в системах *			Соотношение продуктов ферментативного гидролиза *
			В	С	Д	
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	0,9	0,9	dpA : pT = 1,06 : 1,00
V	234	262	отн. pT	отн. pT	отн. pT	dT : dA : dG = 1,00 : 0,8 : 1,87
VI	230	258	0,1	—	—	pT : dpA : dpG = 2,15 : 1,15 : 1,00
			отн. pT	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 иницирующий участок цистрона РНК-синтазы, и введению в него три-тневой 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 — триизопропилбензолсульфохлорид. 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 защит 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 C₈-пуринов и у C₅- и C₆-пиримидинов (в пиримидинах обмен в 10—100 раз медленнее, чем в пуринах). При исследовании кинетики медленного обмена водорода в аденози-

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

№ п.п.	Молярная концентрация NaOH	Температура, °C	Время, час.	Удельная активность мк/о.е.*	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 мμ.

Условия синтеза и выход олигонуклеотидов

Таблица 3

Синтезированный олигонуклеотид	Нуклеотидная компонента, ммол.	Нуклеозидная компонента, ммол.	Конденсирующий агент, ммол.	Время, час.	Выход, %
d(pG ⁱ Bu _p G ⁱ Bu)	14,5 dpG ⁱ Bu _O ⁱ Bu	10 dCNEtpG ⁱ Bu	29 TPS	4	17
d(pTpA ^{Bz})	8,5 dpA ^{Bz} _O Ac	10 CNEtpT	21,2 MsCl	3	50
d(pA ^{Bz} pT)	9 pT _O Ac	3,15 dCNEtpA ^{Bz}	27 MsCl	2,5	53
d(pG ⁱ Bu _p G ⁱ Bu _p TpA ^{Bz})	4d(pTpA ^{Bz} _O Ac)	0,8 d(CNEtpG ⁱ Bu _p G ⁱ Bu)	12 MsCl	2,5	24
d(pG ⁱ Bu _p G ⁱ Bu _p TpA ^{Bz} pA ^{Bz} pT)	0,2d(pA ^{Bz} pT _O Ac)	0,02d(CNEtpG ⁱ Bu _p G ⁱ Bu _p TpA ^{Bz})	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(pGpGrTpArArT). 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 гексадезоксинуклеотид, прочно удерживается при нейтральных, слабо кислых и слабо щелочных значениях рН растворов, что позволяет при относительно низких температурах работать с меченым соединением с минимальным искажением 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 — 1М ацетат аммония (7 : 3) — система С; изомасляная кислота — аммиак — вода (66 : 1 : 33) — система D; *n*-бутанол, насыщенный 1М аммиаком, — система Е.

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

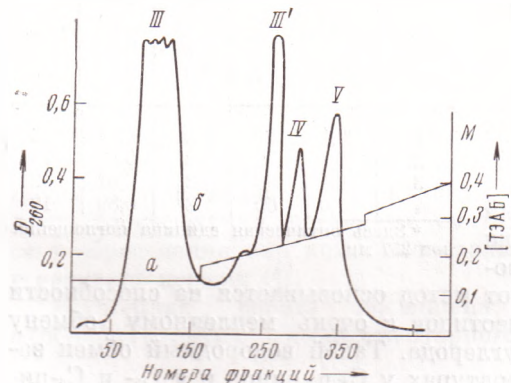


Рис. 1. Выделение соединения V. Размер колонки 1,5×70 см; скорость элюции 0,5 мл/мин, объем фракций 12 мл. а — [ТЭАБ], б — D_{260} . III—V — синтезированные продукты, см. текст; III' — симметричный пиррофосфат III

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

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

Гидролиз щелочной фосфатазой. Гидролиз олигонуклеотидов проводили с использованием щелочной фосфатазы, закрепленной на ДЕАЕ-целлюлозе (⁸). 0,1 мл раствора, содержащего 8—10 о.е. олигонуклеотида в 0,2 М ТЭАБ, наносили на колонку с иммобилизованным ферментом и термостатировали 15 час. при 37°. Нуклеотидный материал элюировали 1,5 мл 0,3 М 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 М 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 0,25 М ТЭАБ, элюат упаривали и хроматографировали в системе С.

Введение тритиевой метки в гексадезоксинуклеотид. К тщательно высушенной 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 простота его водного раствора известной концентрации методом гомогенного сдин-

тплляционного 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 7*M* мочеvine на микроколонке с ДЕАЕ-целлюлозой (⁷). 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

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