

УДК 547.963:547.391.1:547.495.9

ХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОРРЕ, Г. Ф. МИШЕНИНА, Т. Н. ШУБИНА

**СОПОЛИМЕР АКРИЛАМИДА И 5'-О-АКРИЛИЛГУАНОЗИН-2',
3'-ЦИКЛОФОСФАТА КАК СУБСТРАТ ГУАНИЛ-РНКАЗЫ
ПРИ ОБРАЗОВАНИИ МЕЖНУКЛЕОТИДНОЙ СВЯЗИ**

Для получения олигонуклеотидов сейчас используют химический синтез в гетерогенной системе, где растущая полинуклеотидная цепь ковалентно связана с нерастворимым полимерным носителем (¹⁻⁵). Такой метод перспективен, так как позволяет легко отделить продукт синтеза от избытка одного из конденсируемых компонентов, конденсирующих реагентов и продуктов их превращения. Однако этот путь в настоящее время используют только для синтеза олигодезоксирибонуклеотидов. Химический же синтез олигорибонуклеотидов до сих пор является проблемой; исследователи все чаще стали обращаться к их ферментативному синтезу, основанному, в частности, на конденсации 2',3'-циклофосфатов нуклеозидов или олигонуклеотидов с нуклеотидной компонентой в присутствии нуклеаз — панкреатической РНК-азы, гуанил-РНКаза, Т₁-РНКаза (⁶⁻⁸).

Цель настоящей работы — синтез сополимера акриламида и акрилилгуанозин-2',3'-циклофосфата и использование его в качестве субстрата гуанил-РНКаза при образовании межнуклеотидной связи в гетерогенной системе. Ферментативные реакции, как правило, проводятся в водных растворах, поэтому носителем олигонуклеотидной цепи следовало выбрать какой-либо набухающий в воде полимер. Наиболее распространенными гидрофильными полимерами являются сшитые полиакриламидные и декстрановые гели. Мы остановились на полиакриламидном геле, так как он лишен оксигрупп, которые в принципе могут служить неспецифическими акцепторами фосфорильного остатка в олигонуклеотидном синтезе.

Поскольку акриламид не имеет функциональных групп, к которым можно непосредственно присоединить нуклеотид, последний вводится в полимер в процессе его получения. С этой целью нами синтезирован 5'-акрилилгуанозин-2',3'-циклофосфат, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-(\text{G}>\text{p})$ конденсацией гуанозин-2',3'-циклофосфата с акриловой кислотой в присутствии дициклогексилкарбодиимида по аналогии с (⁹). Это соединение получено с выходом 40% и выделено хроматографией на бумаге. Его строение было подтверждено у.-ф. спектроскопией, щелочным гидролизом и электрофорезом в кислой (рН 4,3) и щелочной (рН 8,9) средах. Гомогенность препарата проверена в нескольких хроматографических системах.

Сополимеризацией акриламида, метилен-бисакриламида и $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-(\text{G}>\text{p})$ получен сополимер, содержащий до 50% от взятого в реакцию $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-(\text{G}>\text{p})$ при сшивке 2,5 (и 80—90% при сшивке 3,5%). Количество (μмол.) взятого в реакцию сополимеризации $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-(\text{G}>\text{p})$ составляло 1—2% от общего количества реагирующих веществ. Гуанозин-2'(3')-фосфат отщепляется количественно от полимерной основы 0,5 N NaOH при комнатной температуре в течение суток. Обработка сополимера 1 N HCl 2 часа при 100° приводит к количественному отщеплению гуанина. Оказалось также, что гуанозин-2',3'-фосфат количественно отщепляется от полимерного носителя в бикарбонатном буфере (рН 10) в течение суток.

Полученный гель был испытан как субстрат гуанил-РНКаза в реакции с C¹⁴-уридином. При использовании соответственно 30, 120 и 320-кратного избытка уридина по отношению к G>p наблюдали в присутствии гуанил-РНКаза связывание радиоактивного уридина с полимером в количестве 0,023; 0,07; 0,13 моля на 1 моль присоединенного к полимеру (G>p).

Если гель обработать гуанил-РНКазой в условиях гидролиза межнуклеотидной связи, то C^{14} -уридин полностью отщепляется. Следовательно, можно утверждать, что синтезирован связанный с полимерным носителем гуанилил-($3' \rightarrow 5'$)-уридин, однако выход его значительно ниже, чем в подобных условиях в гомогенной системе (¹). Для того чтобы подобрать оптимальные условия для ферментативного синтеза межнуклеотидной связи с участием субстрата, закрепленного на полимерном носителе, необходимы кинетические исследования такой системы. Изложенный в данной работе подход к ферментативному синтезу олигонуклеотидов обеспечивает быстрое удаление фермента из реакционной среды и, возможно, откроет новые пути для синтеза таких соединений.

5'-О-Акрилил-гуанозин-2',3'-циклофосфат. К 0,1 ммол. три-*N*-бутиламмониевой соли гуанозин-2',3'-циклофосфата в 2,5 мл абсолютного пиридина и диметилформамида (1 : 1) добавляют 0,1 ммол. свежеперегнанной акриловой кислоты и 0,1 ммол. дициклогексилкарбодимида. Реакцию ведут при перемешивании 48 час. (температура комнатная), дважды добавляя по 0,1 ммол. акриловой кислоты и карбодимида. Выпавшую дициклогексилмочевину отфильтровывают и промывают метанолом. Фильтрат упаривают в вакууме до небольшого объема и дважды переосаждают продукт реакции из метанола в абсолютный эфир. Осадок растворяют в воде и полученное соединение выделяют нисходящей хроматографией в системе 1 *M* ацетат аммония — этиловый спирт (при объемном отношении 2 : 5) при pH 6,5. Пятно с *R_f* 0,64 вырезают, элюируют водой, элюат упаривают в вакууме при температуре не выше 30° и лиофилизируют. Выход 26 мг (43%), содержание нуклеотидного материала 81%.

Сополимер акриламида, метилен-бисакриламида и 5'-О-акрилил-гуанозин-2',3'-циклофосфата. 8,5 ммол. 5'-акрилил-гуанозин-2',3'-циклофосфата, 850 ммол. акриламида и 2,1 мг метилен-бис-акриламида (3,5% от веса, взятого в реакцию акриламида) растворяют в 0,7 мл 0,04 *M* трисового буфера, pH 7,6. Добавляют 0,04 мл β-диметиламинопропионитрила и 8,5 ммол. персульфата аммония. Полученную сильным встряхиванием гелеобразную массу протирают через сито и промывают 0,5 *N* NaCl. Эффективность сополимеризации, определяемая отношением количества вступившего в реакцию $CH_2=CH-CO-(G>p)$ к его количеству, взятому в реакцию, составляет 80%.

Синтез гуанилил- $3' \rightarrow 5'$ -уридина. К гелю, полученному выше (сшивка 3,5%, общее содержание $G>p$ 6,8 ммол.), в 0,02 *M* фосфатном буфере (pH 7,2) добавляют 816 ммол. C^{14} -уридина (удельная радиоактивность 4270 имп/ммоль за 100 сек.) в том же буфере. Реакционную смесь охлаждают до 0° и добавляют 0,05 мл гуанил-РНКазы (2000 е.а.). Реакцию проводят в течение суток при 0°. Гель отмывают центрифугированием в 0,02 *M* фосфатном буфере (pH 7,2). Затем синтезированный динуклеозидмонофосфат, связанный с полимерным носителем, выдерживают с гуанил-РНКазой (450 е.а.) в условиях гидролиза межнуклеотидной связи. Гель отмывают до отсутствия радиоактивности в промывных водах и по количеству радиоактивной метки в гидролизате определяют выход продукта, составляющий ~7%.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило
20 I 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. Kramer, R. Helbig et al., *Angew. Chem.*, **78**, 640 (1966). ² H. Hayatsu, N. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3880 (1967). ³ L. R. Melby, D. R. Strobach, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 450 (1967). ⁴ L. R. Melby, D. R. Strobach, *J. Org. Chem.*, **34**, № 2, 427 (1969). ⁵ F. Kramer, H. Köster, *Angew. Chem.*, **80**, 473 (1968). ⁶ L. A. Herpel, P. Whitfield, R. Markham, *Biochem. J.*, **60**, 8 (1955). ⁷ Н. И. Абросимова-Амельянич, Р. И. Татарская, А. А. Баев, *Молек. биол.*, **1**, 307 (1967). ⁸ S. Mohn, R. Tach, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6566 (1969). ⁹ З. А. Шабарова, Н. И. Соколова, М. А. Прокофьев, *ДАН*, **128**, 740 (1959).