

А. Г. БАДАШКЕЕВА, Г. Н. КАБАШЕВА,
член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОРРЕ, Г. Г. ШАМОВСКИЙ,
Т. Н. ШУБИНА

КОНДЕНСАЦИЯ ТРИДЕЗОКСИАДЕНИЛАТА С ПОМОЩЬЮ ВОДОРАСТВОРИМОГО КАРБОДИИМИДА В ПРИСУТСТВИИ ПОЛИУРИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Метод синтеза полидезоксирибонуклеотидов с заданной нуклеотидной последовательностью, предложенной Корана и позволивший ему осуществить синтез гена аланиновой тРНК ⁽¹⁾, включает в качестве одной из ключевых стадий конденсацию двух олигонуклеотидов в присутствии комплементарной матрицы. В тройном комплексе, образованном соединяемыми олигонуклеотидами и матрицей, 3'-оксигруппа нуклеозидной компоненты и 5'-фосфорильный остаток нуклеотидной компоненты оказываются пространственно сближенными, что позволяет осуществить специфическое образование межнуклеотидной связи. Для образования межнуклеотидной связи в таком тройном комплексе в работе Корана была использована полинуклеотидлигаза.

Наряду с ферментативным методом соединения пространственно сближенных олигонуклеотидов были предложены химические способы решения той же задачи. Гилхэм ⁽²⁾ предложил проводить образование межнуклеотидной связи между олигонуклеотидами в присутствии комплементарной матрицы с помощью водорастворимых карбодиимидов и показал, что гексамидилат d(pT)₆ в присутствии *n*-толуолсульфоната N-циклогексил-N'-β-(4-метилморфолиний)-этилкарбодиимида (ЦМЭ-карбодиимид) и полиадениловой кислоты образует d(pT)₁₂ с выходом до 5%. З. А. Шабарова и М. А. Прокофьев ⁽³⁾ предложили в качестве нуклеотидной компоненты для соединения двух олигонуклеотидов, находящихся в комплексе с комплементарной матрицей, использовать фосфамиды олигонуклеотидов, т. е. предварительно активировать фосфорильную группу нуклеотидной компоненты. Выдерживая дезоксиаденилил-(5' → 3')-дезоксиаденилил-(5' → N)-фенилаланин с полиуридилевой кислотой (поли-U) в условиях, когда между ними образуется комплекс, они получили олиго- и полидезоксиденилаты с выходом до 10%.

Важным преимуществом подхода, предложенного Гилхэмом, является то, что в этом случае не требуется предварительной активации фосфорильного остатка. Активация проходит непосредственно в реакционной смеси, причем не вступившее в реакцию конденсации активное промежуточное соединение, как можно полагать по аналогии с реакциями карбоновых кислот с ЦМЭ-карбодиимидом ⁽⁴⁾, должно гидролизаться до исходного олигонуклеотида, который может быть повторно активирован. Это дает основание рассчитывать, что при достаточном избытке карбодиимида в определенных условиях можно добиться высоких выходов в реакции конденсации. Низкий выход d(pT)₁₂, полученный в работе ⁽²⁾, мог быть результатом разрушения комплекса d(pT)₆ с полиадениловой кислотой при добавлении ЦМЭ-карбодиимида, который, как это показано в работе ⁽⁵⁾ на примере тРНК, является денатурирующим агентом.

В настоящей работе мы исследовали действие ЦМЭ-карбодиимида на стабильность комплексов олигонуклеотидов с полинуклеотидами на при-

мере комплекса полиуридилевой кислоты (поли-U) с тридезоксиаденилатом $d(pA)_3$ и провели реакцию образования межнуклеотидной связи в условиях, обеспечивающих устойчивость комплекса в присутствии ЦМЭ-карбодимида.

В работе использовали тридезоксиаденилат $d(pA)_3$ с молярным коэффициентом экстинкции $\epsilon = 11,6 \cdot 10^3$, полученный из $d(pA)_2$ по общей методике Корана ⁽⁶⁾. В качестве матрицы использовалась полиурпидиловая кислота с $\epsilon = 9,2 \cdot 10^3$ (при 20°), синтезированная В. К. Райтом. ЦМЭ-карбодимид получен по ⁽⁷⁾. Образование комплекса поли-U с $d(pA)_3$ и реакцию конденсации проводили в присутствии 2-(N-морфолинил)-этансульфоната калия (МЭС) (в качестве буфера, не взаимо-

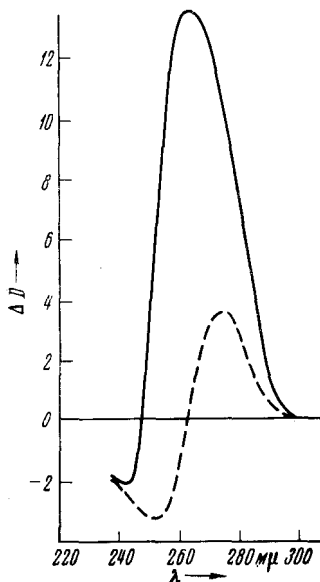


Рис. 1

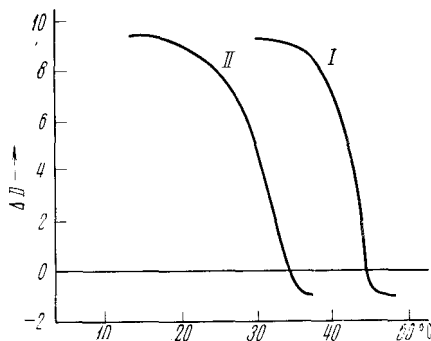


Рис. 2

Рис. 1. Спектр к.д. комплекса $d(pA)_3:2(\text{поли-U})$ при 10° (0,02 M $MgCl_2$ — 0,05 M МЭС, pH 6,0—0,2 M ЦМЭ-карбодимид). Суммарная концентрация нуклеотидного материала 0,01 M; кювета длиной оптического пути 0,1 мм. Сплошная кривая — спектр смеси $d(pA)_3 + 2$ поли-U, штриховая — расчетный спектр

Рис. 2. Кривые плавления комплекса $d(pA)_3:2(\text{поли-U})$ при 256 мμ. I — 0,02 M $MgCl_2$ — 0,05 M МЭС; II — 0,02 M $MgCl_2$ — 0,05 M МЭС — 0,2 M ЦМЭ-карбодимид

действующего с ЦМЭ-карбодимидом ⁽⁸⁾). Об образовании комплекса поли-U с $d(pA)_3$ судили по резкому изменению спектра кругового дихроизма (к.д.) смеси по сравнению с рассчитанным спектром не взаимодействующих компонент. Спектры к.д. снимали на дихрографе CD-185 фирмы «Roussel — Joan» (Франция).

По аналогии с олигорибоаденилатами можно было ожидать, что в исследуемой нами системе будет образовываться трехспиральный комплекс состава $d(pA)_3:2(\text{поли-U})$ ⁽⁹⁾. Во всех условиях, в которых нами было зарегистрировано комплексообразование поли-U с $d(pA)_3$, комплекс характеризовался спектром к.д., приведенным на рис. 1. Этот спектр практически не отличался от спектра трехспирального комплекса тририбоаденилата с поли-U, приведенного в ⁽⁹⁾. Поскольку известно, что замена одного из компонентов в двух- и трехспиральных полирибонуклеотидных комплексах на соответствующий полидеоксирибонуклеотид мало влияет на спектр к.д. ⁽¹⁰⁾, отмеченное совпадение спектров свидетельствует о том, что в исследуемой системе мы имеем дело с трехспиральным комплексом.

Проведенные нами исследования показали, что в условиях, использованных в работе ⁽²⁾ для синтеза $d(pT)_{12}$, т. е. при 0° в присутствии 0,17 M ЦМЭ-карбодимида и 1 M NaCl в смеси $d(pA)_3 + 2$ поли-U спиральный комплекс не образуется. При тех же концентрациях NaCl и буфера в отсут-

ствие карбодиимида образуется трехспиральный комплекс с т.пл. 31°. Таким образом, действительно ЦМЭ-карбодиимид обладает сильным денатурирующим действием на исследуемый комплекс.

В то же время, как видно из рис. 1, в растворе 0,02 *M* $MgCl_2$ и 0,2 *M* ЦМЭ-карбодиимида комплекс может образоваться. На рис. 2 приведены кривые плавления комплекса (по величине разностного дихроичного поглощения при 256 мμ) в 0,02 *M* $MgCl_2$ в присутствии и в отсутствие ЦМЭ-карбодиимида. Видно, что даже в растворе 0,02 *M* $MgCl_2$ ЦМЭ-карбодии-

мид понижает стабильность комплекса — температура плавления его уменьшается от 43 до 32°. Ниже 15° комплекс поли-U с d(pA)₃ в 0,02 *M* $MgCl_2$ практически стабилен в присутствии ЦМЭ-карбодиимида.

В условиях образования стабильного комплекса нами была исследована конденсация d(pA)₃. Реакционная смесь объемом 5 мл содержала 3,3 ммол. d(pA)₃, 6,7 ммол поли-U (в расчете на число нуклеотидных остатков), 0,05 *M* 2-(*N*-морфолинил)-этансульфонат калия, pH 6,0 0,02 *M* $MgCl_2$ и 0,2 *M* ЦМЭ-карбодиимид. Реакцию проводили 4 суток при

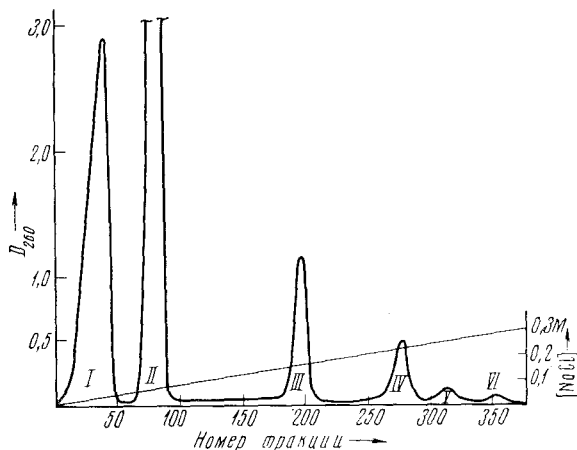


Рис. 3. Хроматография реакционной смеси на ДЭАЭ-сефадексе А-25 в Cl⁻-форме. Размер колонки 1 × 18 см. Смеситель 1000 мл 0,01 *M* трис-HCl в 7 *M* мочеvine, pH 7,5. Резервуар 1000 мл 0,3 *N* NaCl в 0,01 *M* трис-HCl в 7 *M* мочеvine, pH 7,5. Скорость элюции 19 мл в час. Объем фракций 3,2 мл

5°. По истечении этого времени по данным анализа и.к. спектров (4) в реакционной смеси осталось менее 10% ЦМЭ-карбодиимида. К реакционной смеси добавляли КОН до концентрации 0,5 *N* и полученный раствор выдерживали при 80° 50 мин. для разрушения поли-U. После нейтрализации и разбавления до концентрации солей 0,05 *M* реакционную смесь хроматографировали на ДЭАЭ-сефадексе А-25 в Cl⁻-форме в 7 *M* мочеvine в градиенте концентрации NaCl. Профиль элюции проведен на рис. 3. Вещества, содержащиеся в пиках III–VI, имеют спектр дезокси-АМФ. По положению на профиле элюции и по *R_f* в системе *n*-пропанол : конц. NH_3 : вода (55 : 10 : 35) вещество, соответствующее пику III, представляет собой непрореагировавший d(pA)₃. Вещество, соответствующее пику IV, было обработано последовательно фосфомоноэстеразой из *E. coli* и фосфодиэстеразой яда гюрзы и после хроматографии на бумаге в системе этанол : 1 *M* CH_3COONH_4 (7 : 3), pH 7,5, дало соотношение dA : dpA = 1 : 4,76, что соответствует d(pA)₆. Вещества, соответствующие пикам V и VI, представляют собой более длинные олигомеры, по-видимому, d(pA)₉ и d(pA)₁₂. Общий выход продуктов конденсации составил 35,4% (26,4% d(pA)₆, пик IV 6%, пик VI 3%).

В контрольном эксперименте, проведенном в идентичных условиях в отсутствие поли-U, был получен d(pA)₆ с выходом 5,5%.

Полученные данные дают основание утверждать, что низкий выход в реакции конденсации олигонуклеотидов водорастворимым карбодиимидом в присутствии комплементарной матрицы, полученный в работе (2), связан с тем, что не было учтено денатурирующее действие карбодиимида на комплекс. Стабилизация комплекса к денатурирующему действию ЦМЭ-карбодиимида, достигнутая в нашем случае добавлением соли магния, позволила существенно повысить выход. Это дает основание полагать, что

конденсация олигонуклеотидов на матрице с помощью карбодимидов может стать удобным методом при синтезе длинных олигодезоксирибонуклеотидов.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило
24 IV 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. G. Khorana, *Biochem. J.*, **109**, 709 (1968). ² R. Naylor, P. T. Gilham, *Biochemistry*, **5**, 2722 (1966). ³ Z. A. Shabarova, M. A. Prokofiev, *FEBS Letters*, **11**, 237 (1970). ⁴ И. К. Коробейничева, Е. Д. Кривоусова, О. А. Миргородская, *Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим. наук*, в. I, 115 (1969). ⁵ Ж. М. Беккер, Ю. Н. Молин и др., *Молек. биол.*, **3**, 366 (1969). ⁶ S. A. Narang, T. M. Jacobs, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 2158 (1967). ⁷ Д. Г. Кнорре, Т. Н. Шубина, *Кинетика и катализ*, **1**, 549 (1960). ⁸ N. E. Good, G. D. Winget et al., *Biochemistry*, **5**, 467 (1966). ⁹ Г. И. Барам, Н. И. Гриневан и др., *ДАН*, **201**, № 1, 95 (1971). ¹⁰ J. T. Gang, T. Sanrejima, *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **9**, 223 (1969).