

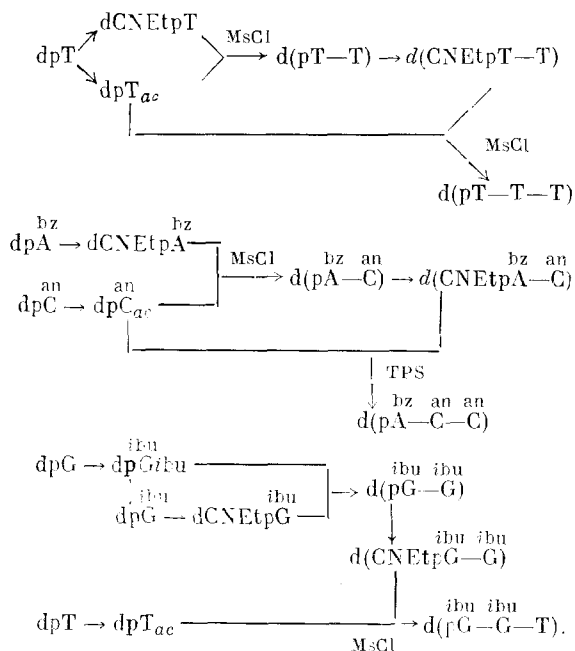
В. Д. СМЕРНОВ, Н. Ф. СЕРГЕЕВА, Е. В. ИЛЫНА,  
З. А. ШАБАРОВА, член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

**СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ  
ПОЛИМЕРИЗАЦИЕЙ ТРИНУКЛЕОТИДНЫХ БЛОКОВ**

Несмотря на активное использование в молекулярной биологии комплексов олигонуклеотидов с нативными нуклеиновыми кислотами, практически отсутствуют работы, посвященные систематическому анализу свойств олигомер-олигомерных комплексов, образуемых олигодезоксирибонуклеотидами. В то же время вопрос о структуре и устойчивости таких комплексов представляет особый интерес по крайней мере для двух направлений биоорганической химии — исследования транскрипции относительно коротких олигонуклеотидов (1) и разработки метода ковалентного соединения олигонуклеотидных блоков на матрице (2).

Для исследования физико-химических свойств монотонной  $d(pT)_n - d(pA)_3$  и немонотонной  $d(pA-C-C)_n - d(pG-G-T)$  систем, был осуществлен синтез ряда олигодезоксирибонуклеотидов  $d(pT)_n$ ,  $d(pA-C-C)_n$  и тринуклеотида  $d(pG-G-T)$ . Синтез тринуклеотида  $d(pA)_3$  описан ранее (3).

Синтез тринуклеотидных блоков представлен на схеме:



Методики блокирования мононуклеотидов и синтез олигодезоксинуклеотидов, принципиально разработанные Кораной, описаны нами в предыдущих сообщениях (3, 4). В табл. 1 приведены хроматографические и

спектральные характеристики и результаты ферментативного гидролиза синтезированных олигонуклеотидов.

Синтезированные тринуклеотидные блоки  $d(\overset{bz}{pA}-\overset{an}{C}-C)$  и  $d(pT-T-T)$  были подвергнуты полимеризации по методу, предложенному Кораной (5). С целью уменьшения количества образующихся циклических олигомеров в реакцию вводили смесь (1:4) ацетилированного по 3'-ОН-группе и свободного тринуклеотида. Симметричные пирсофосфаты, образующиеся при полимеризации, разрушали обработкой реакционной смеси уксусным ангидридом (6). Защитные группы удаляли обработкой 25% водным аммиаком (50°, 3 часа). Разделение продуктов полимеризации осуществляли

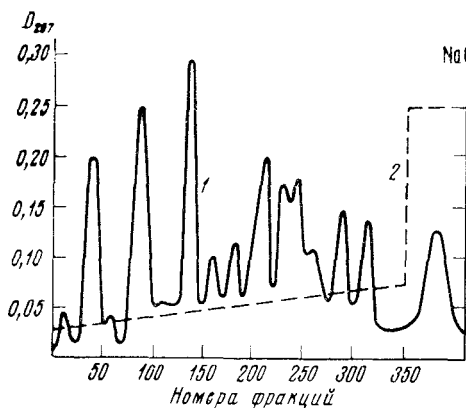


Рис. 1

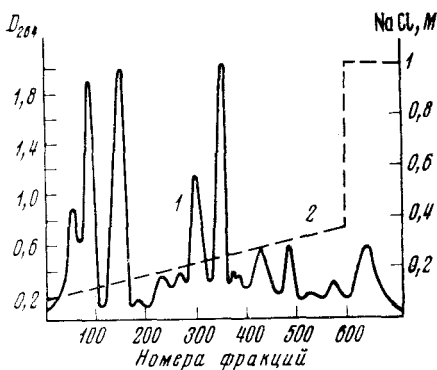


Рис. 2

Рис. 1. Разделение реакционной смеси при полимеризации тринуклеотида  $d(pT-T-T)$ . Размер колонки 2×80 см. Объем фракций 17 мл. 1 —  $D_{267}$ , 2 —  $[NaCl]$

Рис. 2. Разделение реакционной смеси при полимеризации тринуклеотида  $d(pA-C-C)$ . Размер колонки 2×50 см. Объем фракций 12 мл. 1, 2 — то же, что и на рис. 1

ионообменной хроматографией по Томлинсону — Тенеру (7) на ДЭАЭ-сефадексе А-25 (хлор-форма) в градиенте хлористого натрия. Профили разделения продуктов полимеризации представлены на рис. 1 и 2. Сведения о выходе и некоторые характеристики полимеров приведены в табл. 2.

Таблица 1

Некоторые характеристики синтезированных олигонуклеотидов

Соединение	$\lambda_{max}$ , нм	$\lambda_{min}$ , нм	$R_f$ в системах			Соотношение молярных количеств продуктов гидролиза олигонуклеотидов ФДЭ змеиного яда
			А	В	С	
$d(\overset{bz}{pA}-\overset{an}{C})$	285	242	0,55	0,60		$dpA : dpC = 1 : 0,84$
$d(\overset{bz}{pA}-\overset{an}{C}-C)$	286	240	0,14	0,45		
$d(\overset{ibu}{pA}-\overset{ibu}{C}-C)$	264	232	0,04	0,30	0,20	$dpA : dpC = 0,42 : 1$
$d(\overset{ibu}{pG}-G-T)$	258	230	0,19	0,30	0,12	
$d(\overset{ibu}{pG}-G-T)$	256	230	0,16	0,20	0,03	$dpG : dpT = 2 : 1,2$
$d(pT-T-T)$	267	234	0,28	0,97	0,21	$dT : dpT = 1 : 1,81$

Гомогенность отдельных фракций подтверждена хроматографией на микроколонке с ДЭАЭ-целлюлозой в градиенте  $NaCl$  (8). Состав каждой фракции устанавливался на основании хроматографических характеристик и результатов ферментативного гидролиза.

Таблица 2

## Выход и характеристики продуктов полимеризации

№ фракции	Соединение	Количество (отн. ед. при $\lambda_{\max}$ )	Выход, %	$R_f$ в системах		Соотношение молярных количеств продуктов ферментативного гидролиза *
				А	В	
<b>d(pT-T-T)**</b>						
75-100	Цикло-d(pT-T-T)	900	7,8	—	—	Не гидролизуется
125-138	d(pT-T-T)	1550	13,5	—	—	1 : 2,1
200-240	d(pT) <sub>6</sub>	550	5,1	0,43	0,90	1 : 4,7
235-250	d(pT) <sub>9</sub>	155	1,5	0,33	0,85	1 : 7,6
275-300	d(pT) <sub>12</sub>	500	4,5	0,11	0,80	1 : 11,1
307-325	d(pT) <sub>15</sub>	300	2,7	0,05	0,76	1 : 13,2
<b>d(pA-C-C)***</b>						
70-90	Цикло-d(pA-C-C)	230	4,3	—	—	Не гидролизуется
130-165	d(pA-C-C)	420	8,0	—	—	—
325-365	d(pA-C-C) <sub>2</sub>	480	9,2	0,15	0,28	1 : 1,15 : 3,8
380-405	d(pA-C-C) <sub>3</sub>	56	1,0	0,10	0,25	1 : 1,5 : 5,3
405-450	d(pA-C-C) <sub>4</sub>	120	2,5	0,00	0,08	1 : 3,3 : 7
505-555	d(pA-C-C) <sub>5</sub>	60	1,15	0,00	0,00	1 : 2,75 : 6

\* Приведены соотношения молярных количеств продуктов последовательного гидролиза фосфомоноэстеразой и фосфодиэстеразой змеиного яда (dN : dPN<sub>1</sub> : dPN<sub>2</sub>).

\*\* Номера фракций относятся к рис. 1; значения  $R_f$  рассчитаны относительно подвижности тринуклеотида d(pT-T-T);  $\lambda_{\max} = 267$  нм.

\*\*\* Номера фракций относятся к рис. 2; значения  $R_f$  рассчитаны относительно подвижности тринуклеотида d(pA-C-C);  $\lambda_{\max} = 264$  нм.

Результаты работы показывают, что хотя синтез каждого тринуклеотида продолжает оставаться самостоятельной задачей из-за сравнительно низких выходов, полимеризация тринуклеотидных блоков является удобным и хорошо воспроизводимым методом получения олигомеров с повторяющейся тринуклеотидной последовательностью. Использование 3'-ацетилированного тринуклеотида в качестве терминатора полимеризации позволяет свести к минимуму образование циклоолигонуклеотидов, а применение хроматографии по Томлинсону обеспечивает надежное фракционирование полимеров с длиной цепи до 15 мононуклеотидов.

Хроматографию на бумаге Ватман I проводили в следующих системах: А — этанол (96%) — 1 M ацетат аммония (7:3); В — *n*-пропанол — аммиак — вода (55:10:35); С — изомасляная кислота — аммиак — вода (66:1:33); D — насыщенный сульфат аммония — 1 M ацетат натрия — изопропанол (80:18:2).

Тонкослойную хроматографию проводили на целлюлозе Ватман СС-31 в системах А и D.

Гидролиз олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда проводили в 0,01 M трис-HCl и 0,05 M MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5-7,8 (37°, 3 часа). Продукты разделяли двумерной хроматографией в тонком слое в системах А и D.

Синтез тринуклеотидных блоков и разделение продуктов проводили по методикам, описанным ранее (4, 5). Условия синтеза и хроматографического разделения олигонуклеотидных блоков приведены в табл. 3.

Полимеризация тринуклеотида d(pT-T-T). Раствор пиридиневых солей d(pT-T-T) (0,3 ммоль) и d(pT-T-T<sub>ac</sub>) (0,075 ммоль) в безводном пиридине (7 мл) обрабатывали мезитилсульфохлоридом (1,9 ммоль) и выдерживали 3,5 часа при 20°. Затем при охлаждении (-20°) добавляли 3,8 мл 1 M раствора триэтиламина в пиридине и 10,8 мл воды. Смесь выдерживали 16 час в темноте при 20°. Пирофосфаты были разрушены обработкой уксусным ангидридом (2 мл, 3 суток, 20°). Демаскирование 3'-ОН-групп проводили обработкой смеси олигонуклеотидов

## Условия синтеза и хроматографического выделения полученных олигонуклеотидов

Синтезированный олигонуклеотид	Компоненты синтеза		Количество конденсированного агента, ммоль	Время реакции, час.	Размер колонки ДЭАЭ (целлюлозой), см	Элюэнт **		Выход, %
	нуклеозидный	нуклеотидный *				смесь	резервуар	
$d(\overset{ibu}{p}G-\overset{ibu}{G}-T)$	$dCNEtpG-\overset{ibu}{G}$ (0,445)	$dpT_{ac}$ (5)	15	4,0	$2,5 \times 95$	6 0,05 10	6 0,25 10	36
$d(\overset{bz}{p}A-\overset{an}{C})$	$dCNEtpA$ (0,8)	$dpC_{ac}$ (1,85)	6	2,75	$2 \times 58$	4 0,05 10	4 0,26 10	27
$d(\overset{bz}{p}A-\overset{an}{C}-\overset{an}{C})$	$dCNEtpA-\overset{an}{C}$ (0,2)	$dpC_{ac}$ (0,4)	0,8	2,3	$2 \times 58$	4 0,05 10	4 0,35 10	20
$d(\overset{p}{T}-\overset{T}{T}-T)$	$dCNEtpT-\overset{T}{T}$ (2)	$dpT_{ac}$ (7)	21	2	$2,5 \times 95$	6 0,05 10	6 0,3 10	32

\* В скобках — количество в ммольях.

\*\* Первое число — объем (л); второе — концентрация ТЭАБ (мол.); третье = этанол (%).

концентрированным водным аммиаком ( $50^\circ$ , 3 часа). Реакционную смесь упаривали на роторном испарителе, остаток растворяли в 4,5 мл 0,005 *M* трис-НСI-буфера, содержащего 7 *M* мочевины (рН 7,5), и наносили на колонку  $2 \times 80$  см с ДЭАЭ-сефадексом А-25 (хлор-форма). Колонку промывали 300 мл 0,12 *M* NaCl в 7 *M* мочевины и проводили элюцию, используя линейный градиент NaCl (0,12—0,3 *M*). Профиль элюции приведен на рис. 1.

Полимеризацию  $d(\overset{bz}{p}A-\overset{an}{C}-\overset{an}{C})$  проводили аналогично, исходя из 0,04 ммоль  $d(\overset{bz}{p}A-\overset{an}{C}-\overset{an}{C}_{ac})$ , 0,12 ммоль  $d(\overset{bz}{p}A-\overset{an}{C}-\overset{an}{C})$  и 0,64 ммоль MsCl в течение 4 час. Разделение проводили аналогично на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-25 ( $2 \times 50$  см). Характер использованного градиента NaCl и профиль элюции представлен на рис. 2.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
16 V 1974

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> T. Terao, J. Dahlberg, H. G. Khorana, J. Biol. Chem., v. 247, 6157 (1972); R. Kleppe, H. G. Khorana, J. Biol. Chem., v. 247, 6149 (1972). <sup>2</sup> В. К. Недбай, Н. И. Соколова и др., ДАН, т. 205, № 5, 1114 (1972). <sup>3</sup> В. Д. Смирнов, В. Н. Каграманов и др., Молек. биол., т. 6, 292 (1972). <sup>4</sup> В. Д. Смирнов, М. Г. Ивановская и др., ДАН, т. 206, 1133 (1972). <sup>5</sup> S. A. Narang, T. M. Jacob, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., v. 89, 2167 (1967). <sup>6</sup> H. G. Khorana, J. P. Kizsolvi, R. H. Rajph, J. Am. Chem. Soc., v. 84, 414 (1962). <sup>7</sup> R. V. Tomlinson, L. M. Tener, J. Am. Chem. Soc., v. 84, 2644 (1962).  
<sup>8</sup> Ультрамикроанализ нуклеиновых кислот, «Наука», 1973.