



УДК 577.113.(4+6):577.213.7

КОНДЕНСАЦИЯ ФОСФОИМИДАЗОЛИДОВ  
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ В СОСТАВЕ  
КОМПЛЕМЕНТАРНОГО КОМПЛЕКСА — ОБЩИЙ ПУТЬ СИНТЕЗА  
ПРИРОДНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДНК-ДУПЛЕКСОВ

*Исагулянц М. Г., Ивановская М. Г., Потапов В. Е.,  
Шабарова З. А.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
химический факультет и Межфакультетская проблемная  
научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии  
и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Конденсацией фосфоимидазолидов нонадезоксирибонуклеотидов в составе комплементарного комплекса получены 18-звенные олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие модифицированные (фосфоамидные или пирофосфатные) межнуклеотидные связи в середине цепи. Исследованы факторы, влияющие на эффективность конденсации (природа нуклеофила, условия реакции). Использование имидазольной активации концевых фосфатных групп олигонуклеотидов в сочетании с принципом матричной направленности позволило синтезировать олигонуклеотиды, содержащие в заданном положении модифицированные межнуклеотидные связи, быстро и эффективно. Направляемую матрицей конденсацию фосфоимидазолидов олигодезоксирибонуклеотидов — уникальную неэнзиматическую реакцию самосборки нуклеотидного материала — предполагается использовать для полного химического синтеза фрагментов генов.

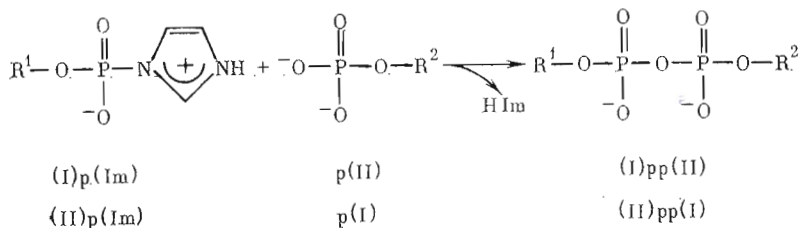
Альтернативой обычного приема энзиматической сборки ДНК-дуплексов [1] является чисто химическая конденсация олигонуклеотидов в составе комплементарного комплекса с активацией фосфата в месте разрыва полинуклеотидной цепи [2—7]. Принципиально возможны два пути: с использованием конденсирующих агентов [2, 5, 8] и конденсация олигонуклеотидов, предварительно активированных по концевой фосфатной группе [3, 4, 7, 9]. Применение в качестве конденсирующего агента 1-этил-3-(3-диметиламипропил)карбодимид позволило получить двутяжевые полинуклеотиды с выходом до 90% [5]. Не менее эффективным оказался и другой путь синтеза, заключающийся в направляемой матрицей конденсации фосфоимидазолидов олигодезоксирибонуклеотидов [6, 7]. Уже сейчас очевидны широкие возможности этих методов как альтернативы лигазного сшивания при получении двутяжевых полидезоксирибонуклеотидов заданной первичной структуры, в том числе содержащих неприродные межнуклеотидные связи [9—13]. Разработка общих методов получения природных и модифицированных ДНК-дуплексов оказалась чрезвычайно своевременной в свете все возрастающего интереса исследователей к модифицированным олиго(поли)дезоксирибонуклеотидам как к инструментам исследования репликации, транскрипции и других клеточных процессов [11—14]. Олиго(поли)нуклеотиды с модифицированными межнуклеотидными связями оказались перспективными аналогами субстратов для изучения механизмов действия и специфичности эндонуклеаз рестрикции и других НК-узнающих белков [11, 12, 14].

С другой стороны, в тех случаях, когда механизм действия фермента известен, интерес представляет химический синтез соединений, являющихся интермедиатами такой ферментативной реакции [15]. Так, например, известно, что фосфоамиды моно- и олигонуклеотидов, в частности

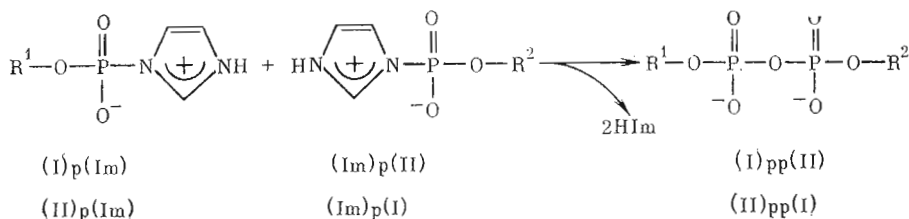
Условные сокращения: МКХ — микроколоночная хроматография, ПААГ — полиакриламидный гель, CD1 — 1-этил-3-(3-диметиламипропил)карбодимид, Lut — 2,6-лутидин, Col — коллидин, HIm — имидазол, MeIm — 1-метилимидазол.



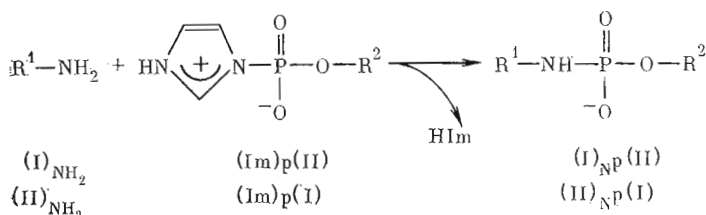
б) синтез 3'-5'-пирофосфатной межнуклеотидной связи:



в) синтез 3'-5'-пирофосфатной межнуклеотидной связи (бисимидазольный вариант):



г) синтез 3'-амино-5'-фосфоамидной межнуклеотидной связи:



где R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> — соответствующие нонануклеотидные остатки.

Ранее было установлено [10], что олигонуклеотиды (II)p и (I)p образуют устойчивый ДНК-подобный дуплекс с температурой плавления 24°С при нуклеотидной концентрации 10<sup>-3</sup> М. ДНК-подобные дуплексы, имеющие в местах разрыва цепей по два фосфатных остатка (типа образующегося из (II)p и p(I)), также устойчивы и имеют температуры плавления, близкие к указанным для (I)p и (II)p [11]. Введение на 3'-конец олигонуклеотидов аминогруппы не должно вызывать существенной дестабилизации комплементарного комплекса. Таким образом, вся система дуплексов в целом чрезвычайно удобна для синтеза различных вариантов межнуклеотидных связей.

Фосфоимидазолиды нонануклеотидов — (I)p(Im), (II)p(Im), (Im)p(I), (Im)p(II) были синтезированы так, как описано в работе [6], выходы практически количественные. Введение имидазольного остатка в концевую фосфатную группу олигодезоксирибонуклеотида не вызывает дестабилизации образуемого им комплементарного комплекса [7].

При инкубации нонануклеотидов и их фосфоимидазолидов в условиях существования устойчивых комплементарных комплексов — пониженные температуры (5–10°С), средняя ионная сила буфера, нуклеотидная концентрация порядка 10<sup>-3</sup> М (условия реакции приведены в подписях к рисункам) — наблюдалась эффективная димеризация по схеме 2. Продукты димеризации анализировали методами ионообменной микроколоночной хроматографии на лихросорбе-NH<sub>2</sub> и электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях, а также ферментативным и кислотным гидролизом. Гель-электрофорез продуктов димеризации показал (рис. 1), что все они являются 18-звенными олигонуклеотидами и идентичны продуктам конденсации этих же нонануклеотидов под действием CDI [9–11]. Фосфоэстераза змеиного яда в смеси с фосфомоноэстеразой из *E. coli* полностью расщепляла димеры (I)p(II) и (II)p(I) до смеси нуклеозидов, что сви-

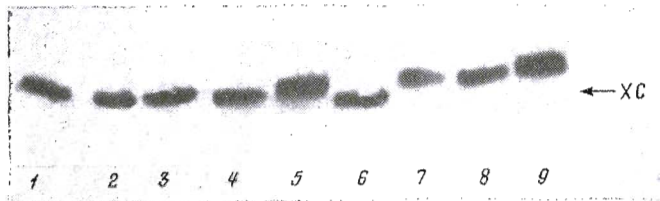


Рис. 1. Электрофорез в 20% ПААГ продуктов фосфоимидазольной конденсации в буфере состава 0,4 М MeIm, 0,2 М NaCl, 0,12 М MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0; 7° С: (II)p(I) (1), (I)p(II) (2), (II)<sub>np</sub>(I) (3), (I)<sub>np</sub>(II) (4), (II)pp(I) (6), (I)pp(II) (7), (I)pp(II) (синтезированный бисимидазольным методом) (8). Для сравнения даны электрофореграммы (II)<sub>np</sub>(I) (5) и (II)pp(I) (9), полученные при CDI-индуцируемой конденсации, как описано в работе [9]. XC — положение краски-маркера — ксиленицианола

детельствовало об образовании между нонануклеотидами природной 3'-5'-фосфодиэфирной связи. Структура димера с фосфодиэфирной связью подтверждена в работе [10] методом Максама — Гилберта. Для доказательства структуры димеров (I)<sub>np</sub>(II) и (II)<sub>np</sub>(I), содержащих фосфоамидную межмономерную связь, проводили их кислотный гидролиз, как описано в работе [9].

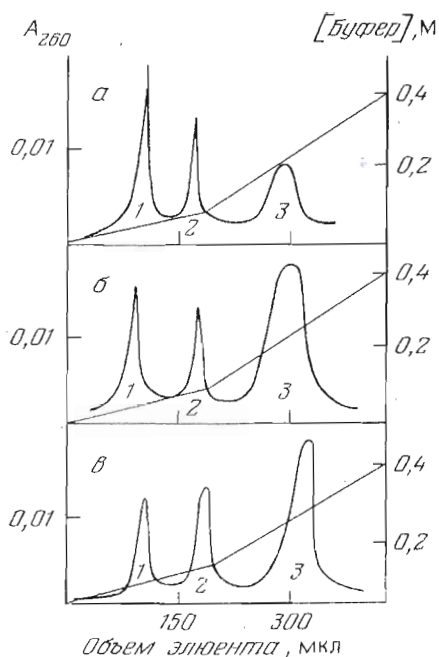
Наличие пирофосфатной межмономерной связи в (I)pp(II) и (II)pp(I) подтверждали гидролизом избытком трифторуксусного ангидрида согласно [8, 11]. Первичная структура пирофосфатсодержащих димеров подтверждена методом Максама — Гилберта в работе Е. С. Громовой, А. А. Елова и др., детальное описание ее будет опубликовано в журнале «Молекулярная биология».

За ходом направляемой матрицей конденсации следили, отбирая из реакционных смесей пробы через определенные промежутки времени и анализируя их методом микроколоночной хроматографии. Характерные профили элюции реакционных смесей через 20 ч приведены на рис. 2. Выходы продуктов конденсации определяли по площадям пиков на основании данных микроколоночной хроматографии. Выход 18-звенных олигонуклеотидов с пирофосфатной межнуклеотидной связью в середине цепи составлял 50–60%, с фосфоамидной — 45–85%, с фосфодиэфирной — 10–35%. Кривые накопления продуктов димеризации с различным типом межмономерных связей приведены на рис. 3–5.

Из схемы 1 видно, что в данной системе имеются два различных узла синтеза межнуклеотидной связи: между олигонуклеотидами (I) и (II) — узел (I)–(II) и (II) и (I) — узел (II)–(I). Узел (II)–(I) отличается от (I)–(II) более высоким содержанием G·C-пар рядом с будущим местом связи. Это обуславливает большую устойчивость участка дуплекса вблизи реакционного центра аналогично описанному в работе [28]. Оказалось, что выходы продуктов конденсации в узле (II)–(I) в среднем выше, чем в узле (I)–(II). Так, за 15 ч выход (II)p(I) составлял 20%, (I)p(II) — 10% (схема 2а), выход (II)<sub>np</sub>(I) — 70%, а (I)<sub>np</sub>(II) — 30–35% (схема 2г) (рис. 3). Кроме того, следует учесть, что в растворе существует набор дуплексов, составленных из 5–7 нонануклеотидов [5]. На конце дуплекса может оказаться как нонануклеотид (II), так и (I). По условиям термодинамической устойчивости дуплекса на конце чаще оказывается нонануклеотид (I), лишний конец которого образует менее устойчивый комплементарный комплекс. Таким образом, структура дуплекса (схема 1) не благоприятствует синтезу димеров типа (I)–(II).

В то же время различие в микроструктуре узлов (II)–(I) и (I)–(II) практически не сказалось на синтезе пирофосфатной межнуклеотидной связи (рис. 4). Видимо, при наличии в узле синтеза межнуклеотидной связи отрицательно заряженных фосфатных остатков возникают электростатические и стерические затруднения, в результате чего маскируются эффекты, вызванные различием в устойчивости участков дуплекса вблизи разрывов. Однако это различие все же проявляется при синтезе пирофосфатной межнуклеотидной связи в бисимидазольном варианте (рис. 5).

Рис. 2. Профили элюции на лихросорбе-NH<sub>2</sub> (10×60 мм, линейный градиент Na-фосфатного буфера от 0 до 0,4 М, содержащего 7 М мочевины, рН 7,0, скорость элюции 300 мкл/ч) реакционных смесей при синтезе: а - (II)p(I); 1 - (II)p(Im) и (I), 2 - (II)p, 3 - (II)p(I); б - (II)p(I); 1 - (II)<sub>NH<sub>2</sub></sub> и (Im)p(I), 2 - p(I), 3 - (II)<sub>NP</sub>(I); в - (II)pp(I); 1 - (II)p(Im), 2 - p(I), 3 - (II)pp(I). Время реакции 20 ч



Направляемая матрицей конденсация олигонуклеотидов идет с высокими скоростями; время полуреакции для синтеза продуктов димеризации с фосфоамидной и пирофосфатной межнуклеотидными связями составляет ~4 ч (рис. 3–5). Синтез фосфодиэфирной межнуклеотидной связи протекает существенно медленнее, за те же 4 ч выход димеров (II)p(I) и (I)p(II) составлял 5%. При этом акцептором активированного фосфатного остатка являлась первичная 5'-ОН-группа. Конденсация с участием вторичной 3'-ОН-группы идет крайне медленно, максимальный выход продуктов конденсации не превышал 5%. «Чувствительность» реакции нуклеофильного замещения у активированного фосфора к силе нуклеофильного агента позволяет предположить, что реакция протекает по ассоциативному механизму с образованием интермедиата со структурой тригональной бипирамиды [15, 29].

Представлялось интересным исследовать влияние на синтез модифицированных межнуклеотидных связей таких факторов, как состав буферов инкубации, рН, температуры реакции. Для этого был взят ряд буферов, обеспечивающих существование устойчивых комплементарных комплексов [7, 30]: метилимидазольный, фосфатный, 2,6-лутидиновый, коллидининовый (состав см. в подписи к рис. 3–5).

Выяснилось, что синтез 3'-5'-фосфодиэфирной межнуклеотидной связи осуществляется только при метилимидазольном катализе [7], в то же время метилимидазольный катализ практически не наблюдается при синтезе

**Влияние 2,6-лутидина ( $pK_a$  6,62 [31]) и коллидина ( $pK_a$  7,43 [31]) на синтез пирофосфатной и фосфоамидной межнуклеотидных связей**  
Приведен выход продукта, % \*

Продукт димеризации	Время реакции, ч	Lut при рН			Col рН 7,8
		7,0	7,6	8,0	
(II) <sub>NP</sub> (I)	20	—*	26	—	26
	70	—	34	—	28
	120	—	36	—	34
(II)pp(I)	20	0	Следы	12	—
	50	0	12	—	—
	250	0	15	40	—

\* Прочерк означает отсутствие экспериментальных данных.

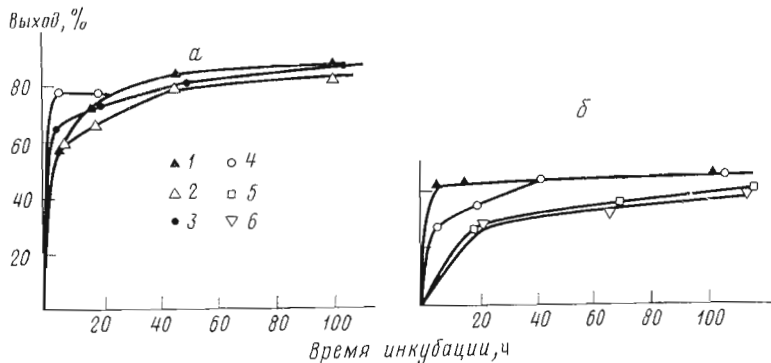


Рис. 3. Кинетические кривые накопления продуктов конденсации с фосфоамидной межнуклеотидной связью (схема 2 г) (II)pp(I) (а) и (I)pp(II) (б) при инкубации ( $\sim 7^\circ\text{C}$ ) в буферах, содержащих 0,2 М NaCl и 0,12 М  $\text{MgCl}_2$ , а также 0,4 М MeIm, pH 8,0 (1); 0,05 М MeIm, pH 8,0 (2); 0,05 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6,85 – 6,95 (3); 0,05 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 8,0 (4); 0,4 М Lut, pH 7,6 (5); 0,4 М Col, pH 7,8 (6)

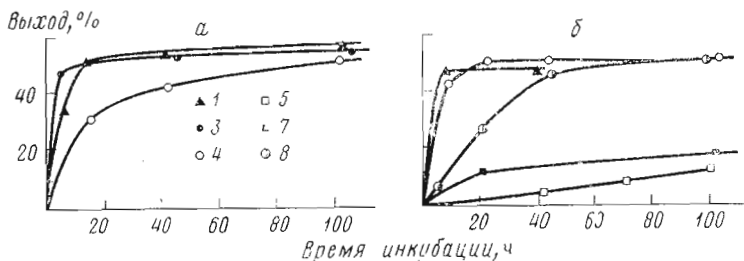


Рис. 4. Кинетические кривые накопления продуктов конденсации с пирофосфатной межнуклеотидной связью (схема 2б) (II)pp(I) (а) и (I)pp(II) (б) при различных условиях инкубации ( $\sim 7^\circ\text{C}$ ). Условия инкубации для кривых 1, 3 – 5 те же, что для кривых рис. 3 с этими обозначениями; 0,4 М Lut, 0,2 М NaCl, 0,12 М  $\text{MgCl}_2$ , pH 8,0 (7); 0,05 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 М NaCl, 0,12 М  $\text{MgCl}_2$ , pH 6,85, при охлаждении в течение первых 2 ч до  $-15^\circ\text{C}$  (8)

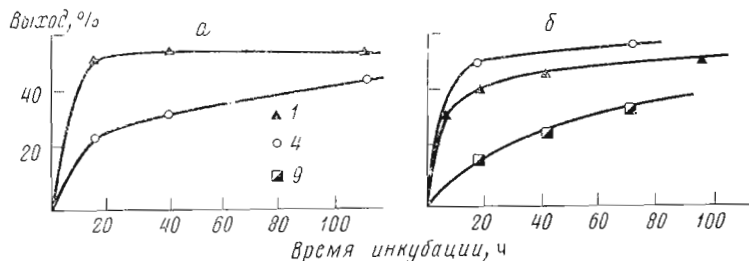


Рис. 5. Кинетические кривые накопления продуктов димеризации (II)pp(I) (а) и (I)pp(II) (б) при синтезе пирофосфатной межнуклеотидной связи по схеме 2в. Условия инкубации для кривых 1 и 4 приведены на рис. 3, для кривой 9 – 0,4 М Lut, 0,2 М NaCl, 0,12 М  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,0,  $\sim 7^\circ\text{C}$

модифицированных межнуклеотидных связей (рис. 3, 4). Это свидетельствует о том, что переаминирование с образованием метилмидазолиевого катиона не является скоростьлимитирующей стадией конденсации.

Мы сделали попытку применить для синтеза межнуклеотидных связей эффективные общесосновные катализаторы: 2,6-лутидин и коллидин. Однако оба соединения вызвали уменьшение выхода продуктов с модифицированными межнуклеотидными связями (рис. 3, таблица) и не катализировали синтез природной фосфодизфирной связи. Ингибирование синтеза пирофосфатных межнуклеотидных связей в присутствии 2,6-лутидина ока-



залось рН-зависимым (таблица), что связано, по-видимому, со степенью протонированности 2,6-лутидина в растворе. Вероятно, протонированный 2,6-лутидин способен образовывать ионные ассоциаты с дианионом концевой фосфата и тем самым препятствовать эффективному протеканию конденсации.

Из всех рассмотренных нами буферов лучшим для синтеза фосфоамидных и пирофосфатных межнуклеотидных связей оказался фосфатный (рН 8,0) при температуре инкубации 5–10° С. Понижение температуры до –15° С (рис. 4б) вызывало существенное замедление реакции.

Единственно возможным конкурентом направляемой матрицы фосфоимидазольной конденсации является гидролиз фосфоимидазолидов олигодезоксирибонуклеотидов до свободных олигонуклеотидов. Как оказалось, гидролиз фосфоимидазолидов в составе комплементарного комплекса протекает существенно медленнее, чем в растворе. Наше предположение о том, что это связано с ограниченной доступностью сахарофосфатного остова ДНК-дуплекса для молекул воды из раствора, вполне согласуется с данными о строении гидратной оболочки ДНК в солевых растворах, когда большая часть молекул воды первого гидратного слоя оказывается вытесненной ионами  $\text{Na}^+$  и  $\text{Mg}^{2+}$  [32].

Как уже отмечалось, при инкубации нонануклеотидов (II) и (Im)p(I) в условиях матричной реакции конденсация практически не идет, что позволяет наблюдать гидролиз (Im)p(I) до p(I).

Построенная на основании данных микроколоночной хроматографии полулогарифмическая анаморфоза кривой гидролиза (Im)p(I) (рис. 6) позволила рассчитать константу скорости гидролиза (Im)p(I) в составе комплементарного комплекса. Она составила  $10^{-2} \text{ ч}^{-1}$ , период полугидролиза ~60 ч (метилимидазольный буфер, 7° С). Фосфоимидазолиды мононуклеотидов в тех же условиях гидролизуются в течение нескольких минут. По нашим данным, в буферах, не содержащих MeIm, фосфоимидазолиды на порядок более устойчивы. Таким образом, в условиях прочного комплементарного комплекса гидролиз фосфоимидазолида не мешает эффективному матрично-направленному синтезу модифицированных межнуклеотидных связей.

Исследованная нами реакция направляемой матрицей конденсации фосфоимидазолидов олигодезоксирибонуклеотидов отличается высокой селективностью: исключены случайные реакции в растворе и реакции по межнуклеотидному фосфату. Использование принципа матричной направленности позволяет быстро и с высокой эффективностью получать протяженные олигонуклеотиды с модифицированными межнуклеотидными связями в заданном положении, что было невозможно при использовании традиционных методов синтеза в растворе [33, 34]. Нуклеотидный материал не подвергается длительному воздействию карбодимида; за время, необходимое для синтеза фосфоимидазолида, карбодимид не вызывает модификации нуклеотидного материала, который полностью сохраняет свою биологическую активность [35]. Учитывая это, можно надеяться, что фосфоимидазольный метод синтеза межнуклеотидных связей в составе комплементарного комплекса окажется возможным применить для получения химической сборки природных и модифицированных фрагментов генов, а также репарации точечных разрывов в двуспиральных участках нуклеиновых кислот.

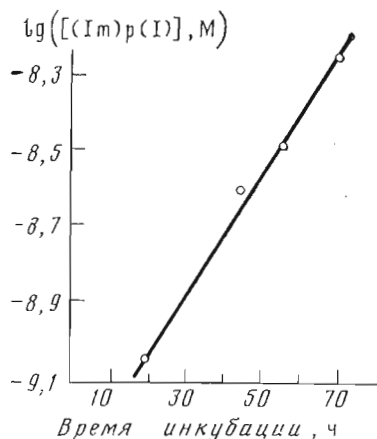


Рис. 6. Полулогарифмическая анаморфоза кинетической кривой гидролиза (Im)p(I) в составе комплементарного комплекса (0,4 М MeIm, 0,2 М NaCl, 0,12 М  $\text{MgCl}_2$ , рН 8,0, 7° С)

Олигодезоксирибонуклеотиды ССТГГААТТр, ССAGGAGСТр, ССТГ·GAATP(NH<sub>2</sub>) и ССAGGAGСТ(NH<sub>2</sub>) синтезированы твердофазным методом [27]. ССТГГААТТ и ССAGGAGСТ получены из исходных нонануклеотидов обработкой щелочной фосфатазой из *E. coli* (Worthington Biochemical Corp., США), рССТГГААТТ рССAGGAGСТ — из дефосфорилированных нонануклеотидов с помощью АТФ (Serva, ФРГ) и полинуклеотидкиназы (НИКТИБАВ Главмикробиопром, Новосибирск). На 1 ОЕ<sub>260</sub> олигонуклеотида брали 10 ед. акт. фермента, 0,4 ОЕ<sub>260</sub> АТФ, 10 мкл буфера следующего состава: 0,05 М трис-НСl (НПО «Биохимреактив», г. Олайне), 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ меркаптоэтанол, 2 мМ спермидин (Serva, ФРГ), рН 9,0. Общий объем реакционной смеси доводили водой из расчета на 5-кратное разбавление буфера.

Имидазол, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (CDI) лихросорб-NH<sub>2</sub> (10 мкм) — препараты фирмы Merck (ФРГ). Гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда (Worthington Biochemical Corp., США) и щелочной фосфатазой проводили как описано в работе [5].

*Общая методика направляемой матрицей конденсации олигонуклеотидов.* 0,1 ОЕ<sub>260</sub> 3'(5')-фосфорилированного нонануклеотида упаривали досуха, растворяли в 50 мкл 3 М водного раствора имидазола (рН 6,0), добавляли 10 мг CDI. Через 1,5 ч фосфоимидазолид нонануклеотида обессоливали на биогеле Р-2 (200—400 меш, Bio Rad (США), колонка 1×5 см, элюция 0,05 М водным раствором триэтиламина). К обессоленному фосфоимидазолиду нонануклеотида («Р-компонент») добавляли второй нонануклеотид («ОН-компонент») в эквимольном количестве, упаривали досуха, пробирку охлаждали до 0° С. К остатку добавляли буфер (составы буферов даны в подписях к рис. 3—5) до суммарной нуклеотидной концентрации 10<sup>-3</sup> М. Реакционные смеси инкубировали при 5—10° С. Из реакционных смесей отбирали пробы: по 0,03 ОЕ<sub>260</sub> вещества, разбавляли до 60 мкл 7 М мочевиной и анализировали методом микроколоночной хроматографии на лихросорбе-NH<sub>2</sub> (условия даны в подписи к рис. 2).

Продукты конденсации выделяли хроматографией на лихросорбе-NH<sub>2</sub> с последующим обессоливанием на биогеле Р-2. Анализ продуктов конденсации осуществляли электрофорезом в плоском 20% ПААГ (размер пластин 20×20×0,2 см) в 0,05 М трис-боратном буфере, содержащем 0,001% EDTA при рН 8,3. Состав геля на 50 мл: 10 г акриламида, 0,5 г N,N'-метиленабисакриламида (BDH Biochemicals, Великобритания), 50 мг персульфата аммония, 25 мкл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, 40 мл буфера. Перед нанесением образцов гель подвергали префорезу в течение 2 ч при 300 В. Образцы для нанесения на гель готовили, растворяя 0,2—0,3 ОЕ<sub>260</sub> олигонуклеотидного материала в 5 мкл воды и добавляя 5 мкл раствора, содержащего 0,2% бромфеноловый синий и 0,2% ксиленцианол в 50% водном глицерине. Пластины геля прокрашивали 0,05% «Stains all» (Serva, ФРГ) в 50% формамиде в течение 10 ч, промывали водой и фотографировали.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Itakura K., Katageri M., Narang S. A. Can. J. Chem., 1974, v. 52, № 21, p. 3689—3693.
2. Naylor R., Gilham P. T. Biochemistry, 1966, v. 5, № 8, p. 2722—2728.
3. Shabarova Z. A., Prokofiev M. A. FEBS Lett., 1970, v. 11, № 4, p. 237—240.
4. Orgel L. E., Lohrmann R. Acc. Chem. Res., 1974, v. 7, № 11, p. 368—377.
5. Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Druzta V. L., Melnikova N. P., Pурмаль A. A. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, p. 5747—5761.
6. Ивановская М. Г., Гортух М. Б., Шабарова З. А. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 7, с. 940—944.
7. Shabarova Z. A., Ivanovskaya M. G., Isagulianz M. G. FEBS Lett., 1983, v. 154, p. 288—292.
8. Пурмаль А. А., Друца В. Л., Шабарова З. А. Биоорганическая химия, 1984, т. 10, № 3, с. 394—400.
9. Ивановская М. Г., Пурмаль А. А., Долинная Н. Г., Горкун А. Ф., Шабарова З. А. Деп. в ВИНТИ 12.12.83, № 6782, 20 с.



10. Громова Е. С., Виноградова М. Н., Елов А. А., Вейко В. П., Долиная Н. Г., Друца В. Л., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Шабарова З. А. Молекулярн. биология, 1984, т. 18, вып. 2, с. 370–381.
11. Пурмаль А. А. Новый тип модификации ДНК. Направленное введение межмолекулярных пирофосфатных связей. Дис. канд. хим. наук. МГУ, 1984, с. 187.
12. Rybakov V. N., Rivkin M. I., Kumarev V. P. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 1, p. 189–201.
13. Kutateladze T., Beabeshvili R., Azaev A., Kraevsky A. FEBS Lett., 1983, v. 153, № 2, p. 420–426.
14. Ohtzuka E., Ishino Y., Ibaraki K., Ikehara M. Eur. J. Biochem., 1984, v. 139, № 3, p. 447–450.
15. Дюга Г., Пенни К. Биоорганическая химия. Химические подходы к механизму действия ферментов/Ред. Овчинников Ю. А. М.: Мир, 1983.
16. Uhlenbeck O. C. Trends Biochem. Sci., 1983, v. 8, № 3, p. 94–96.
17. Filipowicz W., Gross H. I. Trends Biochem. Sci., 1984, v. 9, № 2, p. 68–70.
18. Narayanan C. S., Krakow J. S. Biochemistry, 1982, v. 21, p. 6103–6111.
19. Cho J. M., Carlin R. K., Evans J. E., Kimball A. P. Biochem. Pharm., 1982, v. 31, № 16, p. 2583–2589.
20. Lein S., Yang L., Frey P. A. Biochemistry, 1979, v. 18, № 14, p. 2980–2984.
21. Mizumoto K., Kaziro Y., Lipmann F. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 1982, v. 79, № 6, p. 1693–1697.
22. Worku Y., Luzio J. P., Newby A. C. FEBS Lett., 1984, v. 167, № 2, p. 235–240.
23. Barkakoti N. Eur. J. Biochem., 1983, v. 132, № 1, p. 89–94.
24. Goffin C., Verly W. G. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 22, p. 8103–8109.
25. Cao X. X.-M., Huang L.-H., Farnet C. M., Ehrlich H. Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 741, p. 237–243.
26. Boutorin A. S., Vassilenko S. K., Baklanov M. M., Nechaev Yu. S. FEBS Lett., 1984, v. 165, № 1, p. 93–96.
27. Горкун А. Ф., Вейко В. П., Потанов В. К., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1984, т. 275, № 1, с. 94–97.
28. Tran-Dinh S., Neumann J. M., Taboury J., Huynh-Dinh T., Renous S., Genissel B., Igolen J. Eur. J. Biochem., 1983, v. 133, p. 579–589.
29. Lloyd G. I., Hsu C. M., Cooperman B. S. J. Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, p. 4889–4892.
30. Inoue T., Orgel L. E. J. Mol. Evol. 1982, v. 162, p. 201–217.
31. Свойства органических соединений. Справочник/Под ред. Потехина А. А. Л.: Химия, 1984.
32. Corongiu G. Inorg. chem. acta, 1983, v. 79, p. 56.
33. Kraevsky A. A., Ashaev A. V., Kukhanova M. K. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 9, p. 203–205.
34. Зайцева В. Е., Скапцева Н. В., Ажаев А. В., Краевский А. А. Биооргани. химия, 1984, т. 10, № 3, с. 401–407.
35. Chu B. S. F., Wahl G. M., Orgel L. E. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 18, p. 6513–6529.

Поступила в редакцию  
9.VII.1984  
После доработки  
13.IX.1984

## TEMPLATE-DIRECTED CONDENSATION OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDE PHOSPHORIMIDAZOLIDES — THE GENERAL WAY OF SYNTHESIS OF NATURAL AND MODIFIED DNA-DUPLEXES

ISAGULYANTS M. G., IVANOVSKAYA M. G., ПОТАПОВ В. К.,  
SHABAROVA Z. A.

*Chemical Department and A. N. Belozersky Laboratory of Molecular  
Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State  
University, Moscow*

A new method has been developed for the synthesis of DNA-duplexes with modified internucleotide bonds that is based on the template-directed condensation of oligonucleotide phosphorimidazolides. The yield of the products of template-guided condensation containing pyrophosphate internucleotide bond exceeds 60% and for those with phosphoramidate internucleotide bonds — 85%. The stability of DNA-duplex, nucleophilic properties of the acceptors of the preactivated phosphate and the reaction conditions are shown to be the factors influencing the efficiency of the template-guided condensation. The data obtained indicate that condensation proceeds through an associative mechanism, involving an intermediate with the structure of trigonal bipyramide. Template-directed condensation of oligodeoxyribonucleotide phosphorimidazolides appears to be a powerful means for the large-scale chemical synthesis of native and modified DNA-duplexes, gene construction, as well as for the reparation of nicks in the native double-stranded DNA.