



УДК 577.413.(4 + 6) : 577.213.7

## ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

## IV\*. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБРАЗОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ СВЯЗЕЙ ПРИ МАТРИЧНОЙ КОНДЕНСАЦИИ ФОСФОИМИДАЗОЛИДОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

*Исагулянц М. Г., Ивановская М. Г., Ореуцкая Т. С., Шабарова З. А.**Химический факультет и Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

На синтетических ДНК-дуплексах с одним разрывом в цепи проведено сравнение эффективности химического лигирования при синтезе различных типов межнуклеотидных связей — фосфодиэфирных, пирофосфатных, фосфоамидных, а также фосфодиэфирных связей между рибо- и дезоксирибонуклеотидными звеньями. Для активации фосфата в месте разрыва использован фосфоимидазольный метод. Конденсация с участием 3'-ОН дезоксирибозы идет медленно и неэффективно, с участием 2',3'-циклодильной группы рибозы — с выходом 50—55% за 40 ч. Фосфоамидная и пирофосфатная связи образуются быстро с выходом 90—95%. Увеличение расстояния между реагирующими группами путем удаления одного нуклеотидного звена в месте разрыва цепи ведет к резкому снижению эффективности реакции. Полученные данные позволяют рекомендовать фосфоимидазольный метод для сборки природных и модифицированных ДНК-дуплексов, в том числе дуплексов, в структуре которых содержатся остатки рибонуклеотидов.

Перспективным подходом к синтезу природных и модифицированных ДНК-дуплексов является направляемая матрицей конденсация олигонуклеотидов (химическое лигирование) [2]. Предложены два метода химического лигирования — сборка дуплексов под действием водорастворимого карбодимида [3] и конденсация предварительно активированных производных — фосфоимидазольных олигонуклеотидов [4]. Оба метода химического лигирования были опробованы в синтезе ДНК-дуплексов с природными и модифицированными межнуклеотидными связями [1, 5—8].

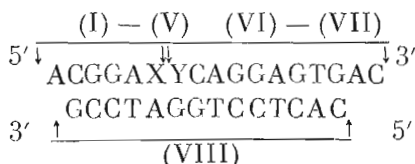
Целью настоящей работы было дать сравнительную характеристику образования фосфоамидной, пирофосфатной и фосфодиэфирной межнуклеотидных связей фосфоимидазольным методом и сопоставить полученные результаты с данными по конденсации под действием водорастворимого карбодимида в тех же комплементарных комплексах [9].

Детальное исследование химического лигирования удобно проводить в дуплексах, где образуется только одна межнуклеотидная связь [1, 8, 9]. В настоящей работе нами использованы трехкомпонентные ДНК-дуплексы [10], структура которых приведена на схеме 1. Представленные дуплексы различаются только природой узла, в котором образуется межнуклеотидная связь (схема 1, табл. 1). Все дуплексы олигонуклеотидов устойчивы при пониженных температурах ( $\leq 10^\circ\text{C}$ ) [10], что делает возможным проведение в их составе направляемой матрицей реакции [2].

Для проведения конденсации смешивали три компонента: донор активированного фосфата — фосфоимидазольный олигонуклеотид, его акцептор и комплементарную матрицу. Синтез фосфоимидазольных прово-

\* Сообщение III см. [1]. Приняты в работе сокращения: МКХ — микроколоночная хроматография,  $C_n$  — суммарная нуклеотидная концентрация в расчете на мономер, MeIm — 1-метилимидазол, Im — остаток имидазола, MES — 2-(N-морфолино)-этансульфокислота; префикс d (дезоксн) опущен.

Схема 1



где X=pTp (I), pT (II), prU (III), p (IV), pT (NH<sub>2</sub>) (V)  
 Y=(OH) Cp (VI), pCp (VII)

дили при помощи водорастворимого карбодимида по ранее описанной методике [11]. Реакционные смеси инкубировали при 10° С в условиях, указанных в подписях к рис. 4а — в. Реакционные смеси анализировали ионообменной МХХ и гель-электрофорезом <sup>32</sup>P-меченых фрагментов в 20% ПААГ в 7 М мочеvine.

**Образование фосфодиэфирных межнуклеотидных связей**

Для сравнения реакционной способности различных гидроксильных групп, участвующих в образовании фосфодиэфирной межнуклеотидной связи: 5'-ОН, 3'-ОН и 2',3'-цис-диоильных, изучали конденсацию в дуплексах А, В и С (табл.1). Конденсацию проводили в присутствии 1-метил-имидазола, так как ранее нами было показано, что он является эффективным катализатором образования фосфодиэфирной межнуклеотидной связи [4].

Продуктами конденсации в дуплексах А—С являются 17-звенные олигонуклеотиды (IX) и (X), идентичные по длине продукту ферментативного лигирования (рис. 1). Первичная структура гептадекануклеотидов (IX) и (X) подтверждена анализом по методу Максама — Гилберта [12] (рис. 2). При анализе соединения (X) было отмечено сильное неспецифическое расщепление по rU-dC-межнуклеотидной связи (рис. 2б).

Природу фосфодиэфирной связи, образующейся между концевыми рибо- и дезоксирибонуклеотидами при синтезе гептадекануклеотида (X)<sub>r</sub>

Таблица 1

Структура и обозначение трехкомпонентных ДНК-дуплексов

| Состав дуплекса | Обозначение дуплекса | Узел, в котором образуется межнуклеотидная связь  | Продукт конденсации — однонаправленный олигонуклеотид |
|-----------------|----------------------|---|---|
| I, VI, VIII     | A                    | $  \begin{array}{c}  5' - \text{Tp (Im) (HO) C} - 3'^* \\  3' - \dot{\text{A}} \text{-----} \dot{\text{G}} - 5'  \end{array}  $         | ACGGATCCAGGAGTGC (IX)                                 |
| II, VII, VIII   | B                    | $  \begin{array}{c}  - \text{T (OH) (Im) pC} - \\  - \dot{\text{A}} \text{-----} \dot{\text{G}} -  \end{array}  $                       | (IX)  |
| III, VII, VIII  | C                    | $  \begin{array}{c}  - \text{rU (Im) pC} - \\  - \dot{\text{A}} \text{-----} \dot{\text{G}} -  \end{array}  $                           | ACGGArUCCAGGAGTGC (X)                                 |
| IV, VI, VIII    | D                    | $  \begin{array}{c}  - \text{Ap (Im) (HO) C} - \\  - \dot{\text{T}} \text{-----} \text{A} \text{-----} \dot{\text{G}} -  \end{array}  $ | ACGGACCAGGAGTGC (XI)                                  |
| V, VII, VIII    | E                    | $  \begin{array}{c}  - \text{T (NH}_2\text{) (Im) pC} - \\  - \dot{\text{A}} \text{-----} \dot{\text{G}} -  \end{array}  $              | ACGGATpCCAGGAGTGC (XII)                               |
| I, VII, VIII    | F                    | $  \begin{array}{c}  - \text{Tp (Im) pC} - \\  - \dot{\text{A}} \text{-----} \dot{\text{G}} -  \end{array}  $                           | ACGGATppCCAGGAGTGC (XIII)                             |
| IV, VII, VIII   | G                    | $  \begin{array}{c}  - \text{Ap (Im) pC} - \\  - \dot{\text{T}} \text{-----} \text{A} \text{-----} \dot{\text{G}} -  \end{array}  $     | ACGGAppCCAGGAGTGC (XIV)                               |

\* Остальные дуплексы имеют такую же полярность цепей.

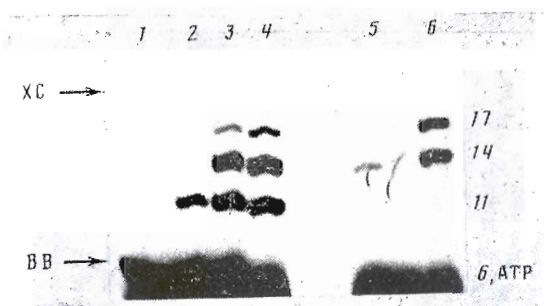


Рис. 1

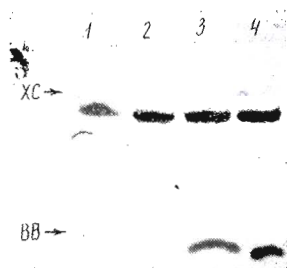


Рис. 3

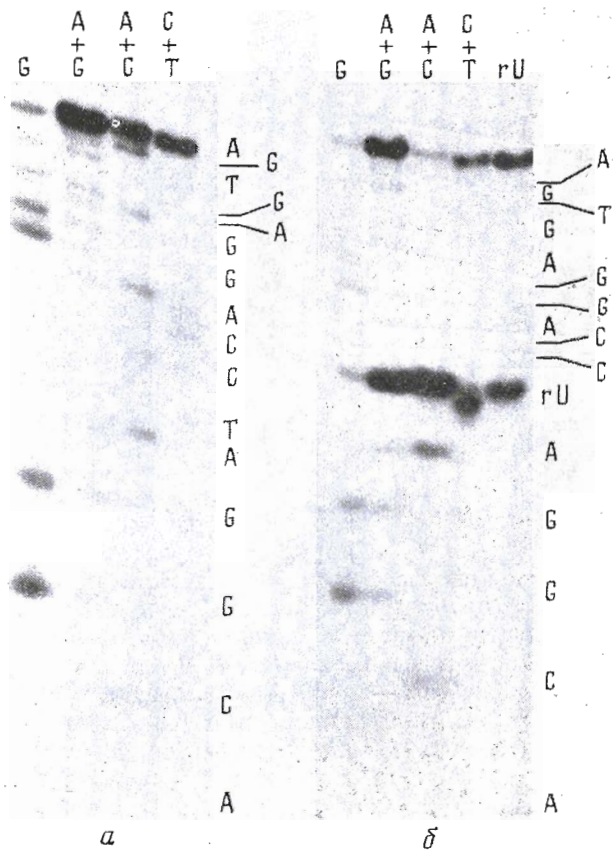


Рис. 2

Рис. 1. Аналитический электрофорез в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины, исходных олигонуклеотидов: 1 — (I), 2 — (VI), 5 — (VIII) и реакционных смесей из опытов № 1 (табл. 2) (3) и № 4 (4). Для сравнения дан продукт сшивания ДНК-лигазой в дуплексе В (табл. 1) (6). Здесь и далее ВВ и ХС — положения красителей-маркеров — бромфенолового синего и ксиленианолола. Цифры справа — число мономерных звеньев в олигонуклеотидах

Рис. 2. Определение нуклеотидной последовательности продуктов фосфоримидазолидной конденсации — гептадекануклеотидов (IX) (а) и (X) (б) методом Максама — Гилберта. Электрофорез в 20% ПААГ в 7 М мочевины

Рис. 3. Электрофорез в 20% ПААГ в 7 М мочевины  $^{32}\text{PACGGAGUCCAGGAGTGAC}$  (X) (1), гидролизата, образующегося при его расщеплении РНКазой А (0,05 М трис-НСl, рН 7,6; 37° С) в течение 1 ч (3) и 4 ч (4) инкубации. В качестве контроля дан (X), инкубированный в 0,05 М трис-НСl при 37° С в течение 4 ч (2)

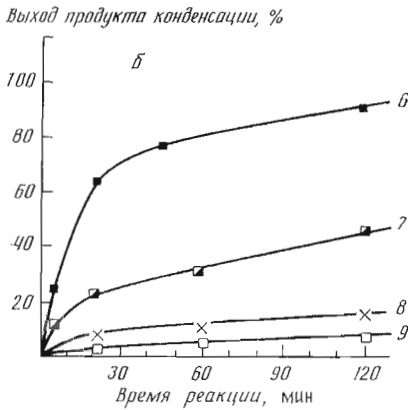
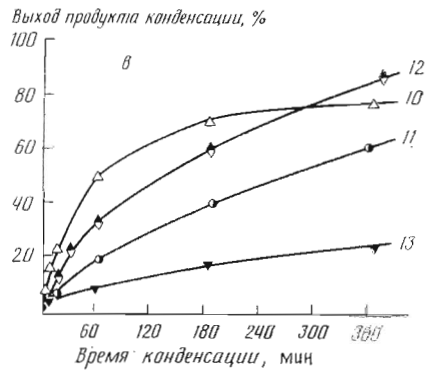
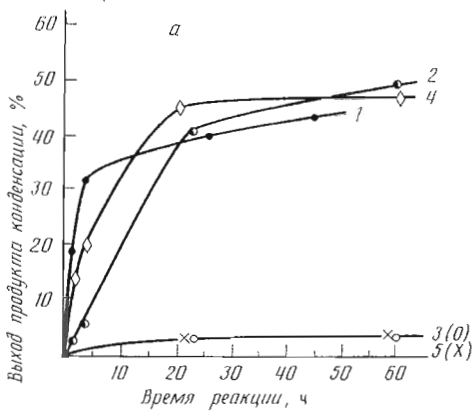


Рис. 4. Кинетические кривые накопления продуктов фосфоимидазолидной конденсации с межполимерной связью различного строения: *a* — с фосфодиэфирной связью в дуплексах А (1, 2), В (3), С (4), D (5). Условия даны в табл. 2, номера 1—5 соответственно; *б* — с фосфоамидной связью в дуплексе Е (6—9) в различных условиях (табл. 2, номера опытов 6—9); *в* — с пирофосфатной связью в дуплексе Г (10—12) при различных условиях (табл. 2, номера опытов 10—12), в дуплексе Г (13) (табл. 2, № 13)

установили по результатам его расщепления РНКазой А. 5'-<sup>32</sup>P-Меченый гептадекануклеотид (X) расщепляется РНКазой А на 30%, в гидролизате присутствует исходный (X) и продукт его расщепления, несущий радиоактивную метку — <sup>32</sup>рАСС GArUр (рис. 3). Результаты гидролиза РНКазой А показывают, что при фосфоимидазолидной конденсации образуется 30% природной и 70% не природной 2',5'-фосфодиэфирной связи.

Кривые накопления продуктов конденсации с фосфодиэфирной межнуклеотидной связью приведены на рис. 4а. Видно, что быстрое накопление продуктов конденсации — гептадекануклеотидов (IX) и (X) (кривые 1 и 4) — происходит там, где в конденсации участвуют достаточно реакционноспособные 5'-ОН- и 2',3'-*цис*-диольная группы. Конечные выходы нуклеотидов (IX) и (X) достигают при этом 50—55% (рис. 4а, табл. 2). Конденсация с участием 3'-ОН гексануклеотида (II) идет крайне медленно и неэффективно (рис. 4а, 3). Отношение начальных скоростей конденсации ( $v_0$ ) с участием 3'-ОН дезоксирибозы, 3'-ОН рибозы и 5'-ОН составляет 1:250:300 (табл. 2, № 3, 4, 1). Низкий выход продуктов конденсации в медленно идущих реакциях обусловлен параллельно протекающим гидролизом имидазолидов олигонуклеотидов в присутствии MeIm. Период полугидролиза фосфоимидазолидов олигонуклеотидов в составе ДНК-дуплекса в 1-метилимидазольном буфере составляет ~ 60 ч [8].

Начальная скорость фосфоимидазолидной конденсации зависит от концентрации ДНК-дуплекса: снижение суммарной нуклеотидной концентрации с  $10^{-3}$  до  $10^{-4}$  М уменьшает начальную скорость реакции на порядок (рис. 4а, 1, 2; табл. 2, № 1 и 2).

На примере конденсации в дуплексе D представилась возможность исследовать направляемый матрицей синтез фосфодиэфирной межнуклеотидной связи в случае, когда реагирующие группы удалены друг от друга в комплементарном комплексе на расстояние одного нуклеотидного звена (табл. 1). Оказалось, что такое увеличение расстояния между реагирующими группами сильно замедляет реакцию: начальная скорость падает

## Фосфоимидазольная конденсация в составе ДНК-дуплексов (см. табл. 1), 10° С

| Номер опыта | Дуплекс | Условия конденсации |   |     | Время реакции, ч | Конечный выход продукта, % | v, %/мин |
|-------------|---------|---------------------|---|-----|------------------|----------------------------|----------|
|             |         | C <sub>н</sub> , М  | буфер (0,2 М NaCl, 0,12 М MgCl <sub>2</sub> ) | pH  |                  |                            |          |
| 1           | A       | 10 <sup>-3</sup>    | 0,4 М MeIm                                    | 8,0 | 40               | 40-50                      | 0,3      |
| 2           | A       | 10 <sup>-4</sup>    | 0,4 М MeIm                                    | 8,0 | 60               | 45-50                      | 0,03     |
| 3           | B       | 10 <sup>-3</sup>    | 0,4 М MeIm                                    | 8,0 | 120              | 5                          | 0,001    |
| 4           | C       | 10 <sup>-3</sup>    | 0,4 М MeIm                                    | 8,0 | 40               | 45-55                      | 0,25     |
| 5           | D       | 10 <sup>-3</sup>    | 0,4 М MeIm                                    | 8,0 | 120              | 5-10                       | 0,001    |
| 6           | E       | 10 <sup>-4</sup>    | 0,4 М MeIm                                    | 8,0 | 1,5-2,0          | 90                         | 4,0      |
| 7           | E       | 10 <sup>-4</sup>    | 0,1 М Hepes                                   | 8,0 | 5,0              | 70-80                      | 1,5      |
| 8           | E       | 10 <sup>-4</sup>    | 0,1 М Hepes                                   | 7,0 | 12,0             | 40-50                      | 0,3      |
| 9           | E       | 10 <sup>-4</sup>    | 0,1 М MES                                     | 6,0 | 12,0             | 20-30                      | 0,15     |
| 10          | F       | 10 <sup>-4</sup>    | 0,4 М MeIm                                    | 8,0 | 3,0              | 70-80                      | 1,3      |
| 11          | F       | 10 <sup>-4</sup>    | 0,05 М Na-фосфат                              | 7,5 | 12               | 90-95                      | 0,5      |
| 12          | F       | 10 <sup>-4</sup>    | 0,1 М Hepes                                   | 7,0 | 5-6              | 90                         | 0,7      |
| 13          | G       | 10 <sup>-4</sup>    | 0,4 М MeIm                                    | 8,0 | 24               | 45-50                      | 0,15     |

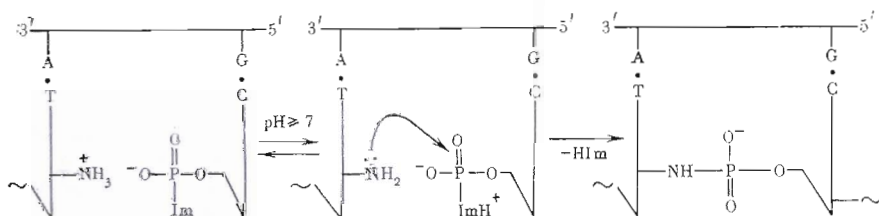
на 2 порядка (табл. 2, № 5; рис. 4а). Очевидно, высокая эффективность конденсации может быть достигнута только при стерической сближенности реагирующих групп.

## Образование фосфоамидной межнуклеотидной связи

Конденсация в дуплексе E (табл. 1) приводит к гептадекануклеотиду с фосфоамидной межнуклеотидной связью (XII). Наличие такой связи подтверждали кислотным гидролизом по методике [6]. Данные по накоплению продукта конденсации (XII) в различных условиях (рис. 4б, табл. 2, № 6, 7) показывают, что конденсация с участием 3'-NH<sub>2</sub>-группы протекает быстро и высокоэффективно. Максимальная скорость и эффективность конденсации достигается в присутствии MeIm: реакция заканчивается за 2 ч, выход гептадекануклеотида (XII) достигает 90% (рис. 4б и табл. 2, № 6). Конденсация с участием аминогруппы может идти и в отсутствие катализатора, однако в этом случае начальная скорость падает в 2,5 раза (рис. 4б, 7; табл. 2, № 7).

Скорость и эффективность образования фосфоамидной межнуклеотидной связи зависят от pH среды. Характер этой зависимости в присутствии MeIm определяется механизмом катализа, предполагающим образование 1-метилимидазольного катиона [4, 13]; оптимально для этого процесса pH 8,0 [4]. Оказалось, что это значение pH оптимально и для образования фосфоамидной связи в отсутствие катализатора: понижение pH вызывает замедление реакции и снижение ее эффективности (рис. 4б, 7-9; табл. 2, № 7-9). Такую pH-зависимость можно объяснить, если предположить, что фосфоамидная связь образуется по механизму, аналогичному описанному нами ранее [14]. Суть его заключается во взаимной активации реагирующих групп внутри дуплекса путем передачи протона с 3'-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-группы гексануклеотида (V) (pK<sub>a</sub> ≈ 8,5 [15]) на сближенный 5'-фосфоимидазольный остаток ундекануклеотида (VII) (pK<sub>a</sub> ≈ 6,5 [13]) (схема 2).

Схема 2



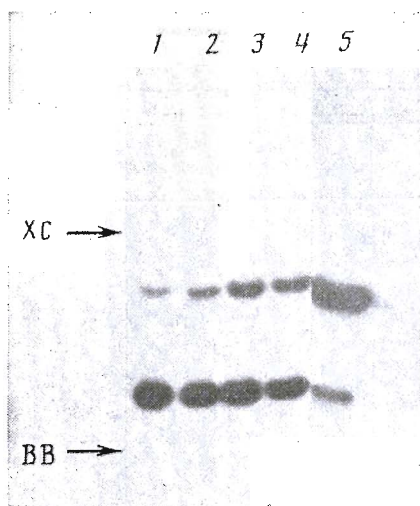


Рис. 5. Накопление АСGGATр-<sup>32</sup>рССAGGAGTGАС (XIII) в дуплексе F. Электрофорез реакционной смеси в 20% ПААГ в 7 М мочеvine при инкубации в 0,4 М MeIm-буфере, содержащем 0,2 М NaCl, 0,12 М MgCl<sub>2</sub>, рН 8,0, при 10° С и C<sub>н</sub> = 10<sup>-4</sup> М в течение 5 (1), 10 (2), 30 (3), 60 (4) и 180 (5) мин

С понижением рН вероятность такой передачи уменьшается и эффективность реакции падает.

### Образование пирофосфатной межнуклеотидной связи

При конденсации в дуплексах F и G идет накопление олигонуклеотидов (XIII) (рис. 5) и (XIV), содержащих пирофосфатную межнуклеотидную связь (табл. 1). Наличие пирофосфатных связей подтверждали расщеплением трифторуксусным ангидридом согласно [7]. Конденсацию исследовали в различных буферах: 1-метилимидазольном, Na-фосфатном, Нерес (табл. 2). Кривые накопления продуктов (XIII) и (XIV) приведены на рис. 4в.

Образование пирофосфатной связи между 3'-концевой фосфатной группой (I) и 5'-концевой фосфатной группой (VII), сближенными в составе дуплекса (табл. 1), идет быстро и эффективно: выходы гептадекануклеотида (XIII) за 6—10 ч реакции приближаются к количественным (табл. 2, № 11, 12). При исследовании конденсации в дуплексе F оказалось, что эффективность реакции не зависит от того, какая из двух фосфатных групп, находящихся в месте разрыва, активируется. Данные, приведенные на рис. 4в и в табл. 2, получены при исследовании конденсации 3'-фосфоимидазольного остатка соединений (I) или (IV) с 5'-фосфатной группой ундекануклеотида (VII) (табл. 1).

В присутствии MeIm конденсация протекает в 2,5 раза быстрее, чем в буфере, не содержащем MeIm, при близком значении рН (рис. 4в и табл. 2, № 10, 11). Степень вызываемого MeIm ускорения реакции в этом случае та же, что и при образовании фосфоамидной межнуклеотидной связи.

Реакция оказалась рН-зависимой, однако характер этой зависимости не совпадает с полученным для образования фосфоамидной связи. Так, при понижении рН реакционной смеси от 7,5 до 7,0 скорость конденсации не уменьшалась, а увеличивалась (рис. 4в, 11, 12). Эти данные согласуются с нашими представлениями о катализе внутри комплементарного комплекса: при рН ≤ 7 становится возможной взаимная активация реагирующих групп за счет передачи протона с моноаниона фосфатного остатка ундекануклеотида (VII) на имидазольный остаток 3'-фосфоимидазолида гексануклеотида (I).

В дуплексе G концевые фосфатные группы в месте разрыва удалены друг от друга на расстояние одного нуклеотидного звена (табл. 1). Образование пирофосфатной межнуклеотидной связи в этом случае идет в 10 раз медленнее, чем обычной пирофосфатной связи (рис. 4в и табл. 2, ср. № 10 и 13). Выход продукта конденсации гексадекануклеотида (XIV) не превышает 50%.



Интересно сопоставить характеристики фосфоимидазолидной конденсации в ДНК-дуплексах (схема 1) с данными по карбодимидиндуцируемой конденсации, исследованной ранее на тех же ДНК-дуплексах [9]. Сравнение выявило, что оба метода химического лигирования обеспечивают одинаковую эффективность образования модифицированных (фосфоамидной и пирофосфатной) межнуклеотидных связей. Фосфоимидазолидная конденсация с участием 5'- и 3'-гидроксильных групп протекает медленнее карбодимидной, результатом чего является меньший выход целевого продукта из-за конкурентной реакции гидролиза фосфоимидазолов до исходных олигонуклеотидов.

Интересное исключение составляет конденсация с участием 2',3'-*цис*-диольной группы рибозы. В случае фосфоимидазолидной конденсации конечный выход продукта составляет 50% за 40 ч реакции (табл. 2), при карбодимидиндуцируемой конденсации выход за то же время составляет 10%, а конечный выход не превышает 30% (150 ч) [9]. Высказано предположение [9], что низкая эффективность карбодимидиндуцируемой конденсации между рибо- и дезоксирибонуклеотидами в дуплексе связана с локальными искажениями конформации ДНК, вызванными включением рибозена. Наши данные показывают, что такое искажение конформации (введение элемента А-формы [16]) в участке образования межнуклеотидной связи не мешает эффективной фосфоимидазолидной конденсации. Таким образом, конденсация фосфоимидазолов идет не только в дуплексах нуклеиновых кислот, имеющих «чистую» А- [17, 18] и В-формы [4, 8], но и в участке контакта этих двух форм.

Данные, полученные при исследовании фосфоимидазолидной конденсации в составе трехкомпонентных ДНК-дуплексов, позволяют сделать выводы о некоторых общих закономерностях этой реакции.

### Общие закономерности фосфоимидазолидной конденсации

1. По способности реагировать с активированным фосфатным остатком нуклеофильные группы располагаются в ряд: 3'-ОН дезоксирибозы  $\lll$   $\lll$  2',3'-ОН рибозы  $<$  5'-ОН  $<$   $-\text{O} - \text{PO}_3^{2-}$   $<$  3'-NH<sub>2</sub>. Соотношение значений  $v_0$  для 5'-ОН,  $-\text{O} - \text{PO}_3^{2-}$  и 3'-NH<sub>2</sub> составило 1:40:130.

2. Увеличение расстояния между реагирующими в составе ДНК-дуплекса группами вызывает резкое снижение эффективности образования межнуклеотидных связей различной природы, при этом начальные скорости конденсации падают на 1—2 порядка.

3. 1-Метилимидазол является катализатором фосфоимидазолидной конденсации, ускоряющим образование всех типов межнуклеотидных связей: фосфодиэфирной, фосфоамидной и пирофосфатной. Эффективность фосфоимидазолидной конденсации зависит также от pH среды. Варьируя pH среды, можно создать условия для дополнительной взаимной активации реагирующих групп в составе дуплекса.

4. Фосфоимидазолидная конденсация является эффективным методом синтеза ДНК-дуплексов с фосфоамидной и пирофосфатной межнуклеотидными связями: выходы продуктов конденсации достигают 95% за несколько часов. Олиго(поли)нуклеотиды с фосфодиэфирными межнуклеотидными связями могут быть получены с выходами 50—55%.

5. Несмотря на изменение конформации ДНК-дуплекса, вызываемое включением рибозена, фосфодиэфирная связь между фосфатным остатком и 2',3'-*цис*-диольной группой рибозы образуется достаточно быстро и эффективно: выходы достигают 55% за 40 ч. Это дает основания полагать, что фосфоимидазолидная конденсация может быть использована как метод химического лигирования фрагментов ДНК и РНК и оказаться полезной для развития генной инженерии РНК.

Ранее в наших работах [14], а также в работах Оргела и соавт. [17] рассматривались представления о направляемой матрицей конденсации фосфоамидов нуклеотидов и коротких олигонуклеотидов как модели действия ферментов. Полученные в настоящей работе характеристики фосфоимидазолидной конденсации отвечают требованиям, предъявляемым к хими-

ческим моделям ферментативных реакций [19, 20]: реагирующие группы стерически сближены в составе дуплекса: в узел, где протекает образование ковалентной связи, вводится фосфоимидазольная группировка, моделирующая активное переходное состояние ряда ферментативных реакций. Реакция протекает с характерной для фермента реглиоспецифичностью. Катализ фосфоимидазольной конденсации путем взаимной активации реагирующих групп — фактор, дополняющий сходство фосфоимидазольной конденсации с ферментативной реакцией. Наши данные показывают, что этот «ферментативный» принцип катализа может быть полезен и при проведении химических реакций в дуплексах нуклеиновых кислот. Заранее заложив в узел образования межнуклеотидной связи группы, способные к взаимной активации, можно существенно повысить скорость и эффективность действия химической лигазы.

### Экспериментальная часть

Олигонуклеотиды (I)—(III), (V), (VI), (VIII) синтезированы фосфотриэфирным методом в растворе [10]. Пентануклеотид (IV) получен из гексануклеотида (III) элиминированием 3'-концевого рибозена по методике [21]. Фосфорилирование олигонуклеотидов по 5'-концу проводили с помощью T4-полинуклеотидкиназы (НИКТИ БАВ, Бердск) и гАТФ (Serva, ФРГ) или  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{гАТФ}$  (В/О «Изотоп», СССР). Анализ первичной структуры олигонуклеотидов (IX) и (X) осуществляли методом Максама — Гилберта по методике, приведенной в [22], модификацию по гU — 50% водным гидразином при 0° С, как в [23]. ДНК-лигаза и РНКаза А — препараты отечественного производства, имидазол, 1-метилимидазол, 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид — препараты фирмы Merck (ФРГ).

Фосфоимидазолиды (I), (IV) и (VII) получали по методике [11].

Для проведения химического лигирования (табл. 2, № 4—5) олигонуклеотиды (I)—(IV), (VI)—(VII) и (VIII) брали в соотношении 1:1,75:1,95 (по оптическому поглощению) в соответствии с величинами молярных коэффициентов поглощения. Условия конденсации приведены в табл. 2. Методика конденсации описана в работе [4]. При проведении химического лигирования с использованием  $^{32}\text{P}$ -меченых олигонуклеотидов смесь фосфоимидазолидов (I) или (VII) с комплементарной матрицей (VIII) готовили отдельно, растворяли в буфере (из расчета на нужную суммарную нуклеотидную концентрацию), охлаждали до 0° С, а затем переносили к упаренному досуха, охлажденному 5'- $^{32}\text{P}$ -меченому олигонуклеотиду, акцептору активированного фосфата ( $5 \cdot 10^4$  имп/(мин·нмоль)). Компоненты реакционной смеси брали в двукратном избытке по отношению к  $^{32}\text{P}$ -меченому олигонуклеотиду. Из реакционных смесей периодически отбирали пробы.

Пробы из реакционных смесей, не содержащих радиоактивной метки (объем проб 3—5 мкл), растворяли в 60 мкл 7 М мочевины, инкубировали 30 мин при 60° С для остановки реакции, а затем анализировали МКХ на Lichrosorb-NH<sub>2</sub> (Merck, ФРГ), как описано в работе [4]. Выход продуктов конденсации рассчитывали по площадям пиков. Пробы (3 мкл) из  $^{32}\text{P}$ -меченых реакционных смесей (табл. 2, № 6—13) растворяли в 30 мкл 1 М ацетата калия, рН 5,0, добавляли 500 мкл этанола и инкубировали 30 мин при 60° С. Далее проводили осаждение, как описано в работе [22]. Пробы анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в 7 М мочевины (300 × 200 × 0,3 мм) с последующей автордиографией. Радиоактивные зоны, соответствующие исходным веществам и продуктам реакции, вырезали из геля и просчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике Delta-300 (Tracor, Франция). Выход продуктов конденсации определяли как долю суммарной радиоактивности.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Шабарова З. А., Вейко В. П., Долгинная Н. Г., Друца В. Л., Метелев В. Г., Ореукая Т. С., Пурмаль А. А. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 628—642.
2. Shabarova Z. A. // Soviet Sci. Rev., Section D./Ed. Skulachev V. P. 1984. V. 5. 1—51.
3. Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Drutza V. L., Melnikova N. P., Pурmal A. A. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 21. P. 5747—5761.



4. *Shabarova Z. A., Ivanovskaya M. G., Isagulians M. G.* // FEBS Lett. 1983. V. 154. № 2. P. 288—292.
5. *Пурмаль А. А., Друца В. Л., Ивановская М. Г., Шабарова З. А., Прокофьев М. А.* // Докл. АН СССР. 1982. Т. 265. № 1. С. 242—245.
6. *Ивановская М. Г., Пурмаль А. А., Долиная Н. Г., Метелев В. П., Горкун А. Ф., Потапов В. К., Шабарова З. А.* Деп. в ВИНИТИ, 12.12.83а. № 6782. 20 с.
7. *Пурмаль А. А., Друца В. Л., Шабарова З. А.* // Биоорганич. химия. 1984. Т. 10. № 3. С. 394—400.
8. *Исагулянц М. Г., Ивановская М. Г., Потапов В. К., Шабарова З. А.* // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 2. С. 239—247.
9. *Долиная Н. Г., Грязнова О. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А.* // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 6. С. 755—763. 1986. Т. 12. № 7. С. 921—928.
10. *Грязнова О. И., Долиная Н. Г., Исагулянц М. Г., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Удалов Н. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А.* // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 124—131.
11. *Готтих М. Б., Ивановская М. Г., Шабарова З. А.* // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 8. С. 1063—1067.
12. *Махат А. М., Gilbert W.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560—564.
13. *Orgel L. E., Lohrman R.* // Accounts Chem. Res. 1974. V. 7. № 11. P. 368—377.
14. *Shabarova Z. A., Prokofiev M. A.* // FEBS Lett. 1970. V. 11. № 4. P. 237—240.
15. *Зайцева В. Е., Скапцова Н. В., Ажаев А. В., Краеский А. А.* // Биоорганич. химия. 1984. Т. 10. № 3. С. 401—407.
16. *Mellema J. R., Haasnoot C. A. G., van der Marel G. A., Wille G., van Boeckel C. A. A., van Boon J. H., Altona C.* // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 16. P. 5717—5738.
17. *Inoue T., Orgel L. E.* // Science. 1983. V. 219. № 4586. P. 859—862.
18. *Chen C. B., Inoue T., Orgel L. E.* // J. Mol. Biol. 1985. V. 181. № 2. P. 271—279.
19. *Пурмаль А. П., Николаев Л. А.* // Успехи химии. 1985. Т. LIV. Вып. 5. С. 786—802.
20. *Maugh T. H. II* // Science. 1984. V. 223. № 4632. P. 154—156.
21. *Nadenu J. G., Singleton C. K., Kelly G. B., Weith H. L., Gough G. R.* // Biochemistry. 1984. V. 23. № 25. С. 6153—6159.
22. Экспериментальные методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М.: Изд. МГУ, 1985. С. 145—154.
23. *Peattie D. A.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 4. P. 1760—1764.

Поступила в редакцию  
11.VII.1986  
После доработки  
15.IX.1986

#### CHEMICAL REACTIONS IN DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS. IV. CHARACTERISTICS OF NATURAL AND MODIFIED INTERNUCLEOTIDE BOND FORMATION IN TEMPLATE-DIRECTED CONDENSATION OF OLIGONUCLEOTIDE PHOSPHOIMIDAZOLIDES

ISAGULIANTS M. G., IVANOVSKAYA M. G., ORETSKAYA T. S.,  
SHABAROVA Z. A.

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

Efficiencies of phosphodiester, phosphoamide and pyrophosphate internucleotide bond formation in the chemical ligation of synthetic DNA-duplexes with one nick are compared. The phosphoimidazolidine method is used to activate the terminal phosphate moiety in the nick. The condensation leading to phosphoamide and pyrophosphate bond formation proceeds rapidly with 90—95% yield. Condensations of 5'-OH or 2',3'-*cis*-diol of ribose yield 50—55% of ligated products. One nucleotide gap between the reacting groups causes considerable loss of reaction efficiency and 10 to 100 fold decrease of the reaction rate. The phosphoimidazolidine method can be used for chemical template-directed condensation of DNA and RNA fragments.