



УДК 577.152.312*36'145

РАСЩЕПЛЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ РНК-ДНК-ГИБРИДОВ
ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ РЕСТРИКЦИИ *Bam*HI И *Sau*3A

Назаренко И. А., Горбунов Ю. А., Малыгин Э. Г.

Всероссийский научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.

Исследовано расщепление синтетических олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих отдельные рибонуклеотидные остатки, а также РНК-ДНК-гибридов эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Sau*3A. Показано, что замена дезоксирибосуанозина на гуанозин в первой позиции *Bam*HI-сайта d(GGATCC) одной из цепей не влияет на скорость гидролиза эндонуклеазой *Bam*HI. Наличие гуанозина во второй позиции сайта замедляет скорость гидролиза модифицированного и в меньшей степени комплементарного ему немодифицированного олигонуклеотида. Использование избытка эндонуклеаз *Bam*HI или *Sau*3A позволяет достигнуть достаточно полного расщепления дезоксирибонуклеотидной цепи в составе синтетического РНК-ДНК-гибрида, РНК-цепь при этом не гидролизуется.

Эндонуклеазы рестрикции типа II представляют собой ферменты, узнающие определенную последовательность ДНК с чрезвычайно высокой специфичностью. Эффективным подходом для исследования фермент-субстратного взаимодействия является модификация отдельных элементов структуры ДНК. Так, использование субстратов с модифицированными основаниями позволило выявить функциональные группы, существенные для узнавания и/или гидролитического действия некоторых рестриктаз [1-9].

Значительно менее исследована роль сахарных остатков полинуклеотидов во взаимодействии с рестриктазами. Наиболее полное исследование было проведено с эндонуклеазой *Eco*RI, где показано, что замена дезоксирибозы в сайте узнавания на рибозу или ее аналоги существенно сказывается на скорости расщепления синтетических олигонуклеотидов [10]. Известно также ингибирующее действие замены тимидина на уридин в сайте узнавания *Hpa*I [11]. Однако введение рибонуклеозидов в ДНК по-разному влияет на подверженность их гидролизу различными рестриктазами. Так, для эндонуклеазы *Hae*III, узнающей последовательность d(GGCC), показано, что замена двух последних остатков на цитидин в одной из цепей не сказывается на расщеплении дуплекса [12]. Еще менее изученным остается вопрос о взаимодействии рестриктаз с РНК-ДНК-гибридами. Молли и Симмонсом получены данные о возможном расщеплении цепи ДНК в комплексе с РНК при действии рестриктаз *Eco*RI, *Hind*II, *Sal*I, *Msp*I, *Hha*I, *Alu*I, *Tag*I и *Hae*III; фрагментация РНК в составе гибрида при этом исследована не была [13]. Позднее Оцука с соавт. [10] показали, что рестриктаза *Eco*RI не гидролизует олигорибонуклеотид в составе РНК-ДНК-дуплекса, однако в этой работе не установлено, расщепляется ли ДНК-цепь в составе гибрида. В то же время очевидно, что изучение действия рестриктаз на РНК-ДНК-гибриды представляет не только теоретический, но и практический интерес.

Данная работа посвящена изучению взаимодействия рестриктаз *Bam*HI и *Sau*3A с РНК-ДНК-гибридами. Исследовано также влияние 2'-гидроксильной группы рибозы в различных позициях *Bam*HI-сайта на скорость и глубину ферментативного гидролиза.

Известно, что на эффективности действия большинства рестриктаз наиболее сильно сказывается модификация нуклеотидных остатков, формирующих гидролизуюмую межнуклеотидную связь [7]. Поэтому в качестве первого шага в изучении расщепления РНК-ДНК-гибридов мы исследовали влияние замены остатков дезоксигуанозина на гуанозин в

сайте d(GGATCC) на эффективность его расщепления рестриктазой *Vam*HI.

Для решения поставленной задачи были синтезированы олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие рибонуклеотидные остатки в сайте узнавания рестриктазами *Vam*HI и *Sau*3A d(GATC). Олигонуклеотиды d(CAGTTTAGGATCCATTTTCAC) (I), d(GTGAAATGGATCCSTAAACTG) (II), d(GATCCTAACTG) (III), d(ATCCTAALLCTG) (IV), d(GTGAAATG)G (V) и d(GTGAAAT)G (VI) синтезировали фосфоритриэфирным методом в растворе с использованием упрощенного (заключающегося в осаждении олигомеров эфиром [14]) способа очистки промежуточных триэфирных блоков на стадии удаления диметокситриэтильной и цианэтильной защитных групп, а также продуктов реакции конденсации. При введении в реакцию конденсации эквимольных количеств исходных компонентов нет необходимости в очистке продукта реакции адсорбционной хроматографией на силикагеле, так как выходы триэфирных блоков при использовании 1-(2,4,6-триизопропилбензолсульфонил)-3-нитро-1,2,4-триазола в качестве конденсирующего агента превышали 95% (по данным ТСХ). Практически полное исключение хроматографии на силикагеле как стадии в фосфоритриэфирном синтезе в растворе позволяет значительно сократить время синтеза и избежать потерь при хроматографической очистке. По завершении синтеза защищенные олигомеры деблокировали и олигонуклеотиды выделяли последовательно понообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Для получения гетеродуплекса, содержащего гуанозин вместо дезоксирибогуанозина в первой или второй позиции *Vam*HI-сайта одной из цепей, был использован 20-членный олигодезоксирибонуклеотид (I) в качестве матрицы, на которой с помощью ДНК-лигазы осуществляли сшивку двух комплементарных ей олигонуклеотидов, один из которых ((III) или (IV)) был предварительно 5'-фосфорилирован, а другой ((V) или (VI)) содержал 3'-концевое рибозвено.

Для синтеза дуплекса, содержащего гуанозин как в первой, так и во второй позиции *Vam*HI-сайта, были последовательно проведены две ферментативные реакции. Сначала с помощью РНК-полимеразы, матрицы (I) и затравки (VI) был синтезирован олигонуклеотид, содержащий два рибонуклеотидных остатка на 3'-конце, а затем полученный олигомер сшивали с 5'-фосфорилированным олигонуклеотидом (III) с помощью ДНК-лигазы. Причем среди олигонуклеотидов, использованных в ферментативных реакциях, 5'-³²P-меченой была либо матрица (I), либо олигонуклеотид, содержащий 3'-концевой рибонуклеозид (V) или (VI). Это позволило получить дуплексы, где меченой была только одна из цепей — немодифицированная или содержащая рибозамены.

Строение всех полученных дуплексов, а также результаты действия на них рестриктазы *Vam*HI представлены в таблице. Видно, что замена дезоксирибогуанозина в первой позиции сайта на гуанозин совершенно не сказывается на эффективности гидролиза как модифицированной, так и комплементарной ей немодифицированной цепи. Замена же сахарного остатка во второй позиции на рибозу уменьшает скорость расщепления олигонуклеотида на 70%, а комплементарного ему немодифицированного олигонуклеотида на 50%. Специфичность гидролиза при этом не уменьшается, так как среди продуктов реакции обнаруживаются только фрагменты ожидаемой длины. Таким образом, модификация сахара в нуклеотидном остатке, образующем 5'-фосфорилированный конец в точке разрезания дуплекса рестриктазой, значительно сильнее сказывается на скорости рестрикции, чем модификация в нуклеотидном остатке, который при гидролизе образует 3'-конец. В этом отношении рестриктаза *Vam*HI напоминает *Eco*RI, для которой показано, что замена дезоксигуанозина в сайте d(GAATTC) на 2'-дезоксид-2'-фторгуанозин не только не уменьшает, но даже увеличивает скорость гидролиза, тогда как аналогичная модификация по остатку адениловой кислоты ингибирует реакцию [10].

Расщепление субстратов, содержащих рибонуклеотидные звенья,
эндоуклеазой *Bam*HI
Сайт узнавания ферментом подчеркнут

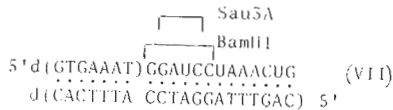
Субстрат *	Степень гидролиза, %	
	через 5 мин ** инкубации	через 1 ч инкубации
5' d(GTGAAATGGATCCTAAACTG) d(CACTTTACCTAGGATTTGAC) 5'	100 100	100 100
5' d(GTGAAAT)Gd(GATCCTAAACTG) d(CACTTGA C CTAGGATTTGAC) 5'	105 100	100 103
5' d(GTGAAATG)Gd(ATCCTAAACTG) d(CACTTTAC C TAGGATTTGAC) 5'	30 50	80 90
5' d(GTGAAAT)GGd(ATCCTAAACTG) d(CACTTTA CC TAGGATTTGAC) 5'	10 35	60 90

* Цепь дуплекса, для которой определялась степень гидролиза, несет 5'-³²P-группу.

** Степень расщепления немодифицированного дуплекса принята за 100%.

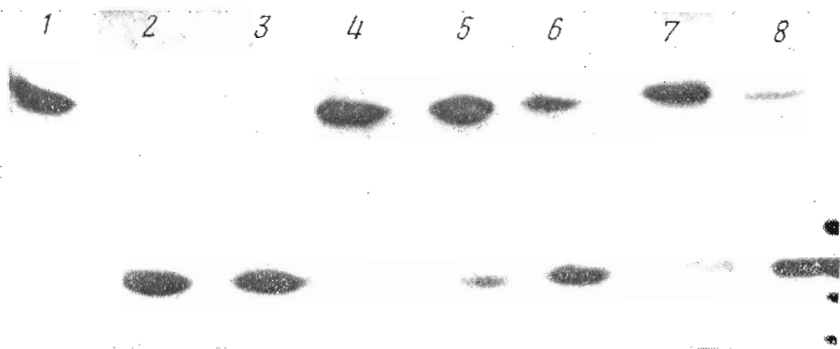
Одновременная замена остатков дезоксигуанозина на гуанозин в первой и второй позициях *Bam*HI-сайта снижает скорость гидролиза модифицированного и немодифицированного олигонуклеотидов на 90 и 65% соответственно, т. е. степень ингибирования в этом случае превышает величину, которую можно было бы ожидать, исходя из простого суммирования влияния замены каждого нуклеотида. Отметим, что использование 10-кратного избытка рестриктазы все же позволяет достигнуть полного расщепления обеих цепей дуплекса даже при наличии двух замещенных дезоксирибогуанозинов.

Нами проведено также исследование расщепления эндоуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Sau*3A гетеродуплекса:



который был синтезирован с использованием олигодезоксирибонуклеотида (I) в качестве матрицы и октануклеотида (VI) в качестве затравки с помощью РНК-полимеразы и четырех рибонуклеозидтрифосфатов, как описано в «Экспериментальной части». Для наблюдения за протеканием гидролиза гетеродуплекса (VII), как и в описанных выше экспериментах, матричный олигонуклеотид (I) или затравку (VI) предварительно 5'-³²P-фосфорилировали.

Оказалось, что даже использование больших избытков *Bam*HI и *Sau*3A и значительное увеличение времени инкубации не обеспечивают расщепления цепи дуплекса (VII), содержащей рибонуклеотидную последовательность, глубже чем на 3–5%. Добавление в реакционную смесь 0,1 мМ гуанидинхлорида или органических растворителей, таких, как ацетон (1%) или диметилсульфоксид (5%), позволяет несколько увели-



Электрофорез в денатурирующем ПААГ продуктов расщепления эндонуклеазами *Bam* III (5, 6) и *Sau* 3A (7, 8) матричной цепи дуплекса (VII) через 10 мин (5, 7) и 1 ч гидролиза (6, 8); *A* — дуплексе (VII) до гидролиза. Для сравнения приведены данные для дуплекса (1+II) до гидролиза (1) и через 10 мин гидролиза рестриктазами *Bam* III (2) и *Sau* 3A (3)

чить степень гидролиза, но и в этом случае расщепление РНК в составе гибрида не превышает 6–8%.

Что касается олигодезоксирибонуклеотидной цепи дуплекса (VII), то в этом случае в условиях избытка *Bam* III и *Sau* 3A были достигнуты 60 и 70%-ные степени гидролиза соответственно (рисунок).

Таким образом, модификация в одной из цепей двуспиральной ДНК, заключающаяся в замене одного или нескольких дезоксирибонуклеотидов в сайтах узнавания эндонуклеазами *Bam* III и *Sau* 3A на соответствующие рибонуклеотидные остатки, влияет на скорость расщепления не только модифицированной, но и комплементарной ей немодифицированной цепи, причем одновременное введение двух рибозвеньев ведет к более существенному подавлению реакции (см. таблицу), чем можно было бы ожидать, исходя из простого суммирования влияния каждого из этих заместителей. На основании этого можно предположить, что наиболее существенный вклад в ингибирование рестрикции РНК-ДНК-гибридов вносит изменение конформации всей спирали. Известны литературные данные, свидетельствующие в пользу предположения о важной роли вторичной структуры сайта узнавания во взаимодействии ДНК с рестриктазами. Показано, что характер сахарного остатка влияет на конформацию полипуклеотидов [15]. Так, полная замена дезоксирибозы на рибозу в одной из цепей двойной спирали обуславливает существование РНК-ДНК-гибридов в «А-форме» [16], причем конформация «А-спирали» в значительно меньшей степени определяется первичной структурой полимера, чем это показано для «В-формы» ДНК [17]. Искажение конформационного состояния сайта узнавания ДНК-цепи в РНК-ДНК-дуплексах приводит к менее эффективному взаимодействию рестриктаз с гибридами, чем с ДНК.

Как показано ранее, большинство рестриктаз с разной скоростью расщепляет цепи ДНК, если одна из них каким-либо образом модифицирована. При этом большая степень ингибирования характерна для модифицированной цепи [6, 9, 10, 18]. Полученные нами результаты согласуются с этим наблюдением: гидролиз немодифицированной олигодезоксирибонуклеотидной цепи дуплекса эндонуклеазами *Bam* III и *Sau* 3A протекает со значительно большей скоростью, чем комплементарной модифицированной цепи, содержащей рибонуклеотидные звенья. Этот факт свидетельствует в пользу механизма независимого гидролиза двух цепей полипуклеотида рестриктазами *Bam* III и *Sau* 3A, по крайней мере в тех случаях, когда одна из цепей модифицирована. Такой вывод согласуется с результатами Поттера и Экштейна, которые показали, что при введении тиофосфатной связи в одну из цепей ДНК эндонуклеаза *Bam* III гидролизует только немодифицированную цепь [18]. Аналогичным образом рестриктаза *Bam* III взаимодействует с синтетическими олигодезоксинун-

клеотидами, если один из комплементарных олигонуклеотидов содержит определенные дефекты в сайте узнавания [19].

Способность эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Sau*3A специфически расщеплять ДНК в составе РНК-ДНК-гибридов может найти и практическое применение, например для введения одноцепочечного разрыва в ДНК, что в свою очередь может быть использовано для проведения сайт-специфического мутагенеза или для решения других задач генетической инженерии.

Экспериментальная часть

В работе были использованы глицерин, EDTA, N,N'-метиленбисакриламид, нуклеозидтрифосфаты (Serva, ФРГ); акриламид, β-меркаптоэтанол (Sigma, США); хроматографическая бумага DE-81 (Whatman, Англия); [γ - 32 P]АТР (0,1 ПБк/ммоль) отечественного производства, дезоксирибонуклеозиды (НИКТИ БАВ, Бердск). Полностью защищенные моно- и динуклеотидные блоки синтезировали по методу [20].

Полинуклеотидкиназа и ДНК-лигаза T4, эндонуклеазы *Bam*HI и *Sau*3A — производства НПО «Фермент» (Вильюс), РНК-полимераза «кор» была любезно предоставлена Е. Ф. Зайчковым (НИИХ).

Остальные реактивы отечественного производства марки х.ч. или ос.ч.

Химический синтез олигонуклеотидов. Межнуклеотидные конденсации в синтезе олигонуклеотидов проводили, используя эквимольные количества нуклеотидного и нуклеозидного компонентов, в присутствии 1-(2,4,6-триизопропилбензолсульфонил)-3-нитро-1,2,4-триазола [21]. Время, необходимое для завершения реакции, составляло 1–2 ч. Продукт реакции осаждали эфиром и отделяли центрифугированием [14]. Диметокситриэтильную группу удаляли 5% трихлоруксусной кислотой в смеси хлороформ — этанол (9 : 1) в течение 5 мин. Цианэтильную группу удаляли обработкой олигомера смесью триэтиламин — ацетонитрил (1 : 1) при 20° С в течение 1 ч.

После проведения последней стадии конденсации реакционную смесь последовательно обрабатывали сначала 5% раствором трихлоруксусной кислоты в смеси хлороформ — этанол (9 : 1) в течение 5 мин, а затем 0,5 М раствором 4-нитробензальдоксимата лития в водном пиридине [22] в течение 12 ч при 20° С. Раствор нейтрализовали 50% уксусной кислотой и экстрагировали этилацетатом. N-Защитные группы удаляли обработкой олигомеров водным аммиаком при 50° С в течение 12 ч. Олигонуклеотиды обессоливали на колонке с биогеом Р-2 в 0,01 М ТЕАВ и выделяли с помощью ионообменной хроматографии на Partisil 10-SAX в градиенте концентрации KH_2PO_4 (0,02–0,3 М, pH 6,5; 30% CH_3CN), а затем обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке (3,2×250 мм) с Lichrosorb RP-18 в градиенте (5–20%) концентрации ацетонитрила в 0,05 М триэтиламинной-ацетатном буфере (pH 6,5).

Фосфорилирование олигонуклеотидов по 5'-концу. 200 пмоль олигонуклеотида инкубировали 30 мин при 37° С в 20 мкл 50 мМ трис-НСI (pH 8,5), содержащего 10 мМ MgCl_2 и 10 мМ β-меркаптоэтанол, с 1 нмоль АТР (либо 10 пмоль [γ - 32 P]АТР) и 10 ед. акт. полинуклеотидкиназы.

РНК-полимеразная реакция. Эквимольные количества (200 пмоль) олигонуклеотидов (20-членной матрицы и затравки), один из которых был 5'- 32 P-меченым, инкубировали с 5 мкг РНК-полимеразы («кор») в 15 мкл 40 мМ трис-НСI (pH 8,0), содержащего 10 мМ MgCl_2 , 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0,5 мМ NTP, в течение 20 ч при 15° С. Выход меченого продукта реакции относительно исходного матрично-затравочного комплекса составлял 90–95%. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20% ПААГ, содержащем 50 мМ трис-борат (pH 8,3), 1 мМ EDTA и 7 М мочевины. Меченые олигонуклеотиды идентифицировали радиоавтографией. Электроэлюцию олигонуклеотидов на бумагу DE-81 проводили в 10 мМ трис-боратном буфере (pH 8,3), 0,2 мМ EDTA при напряжении 300 В. Элюцию с бумаги DE-81 осуществляли 2 М LiClO_4 с последующим осаждением ацетоном [23].

Ферментативная сшивка олигонуклеотидов. 200 пмоль 20-членного олигодезоксинуклеотида-матрицы и по 200 пмоль олигонуклеотидов, один

из которых содержал 5'-фосфат, а другой — 3'-рибонуклеозид, инкубировали 20 ч при 15° С в 20 мкл 6 мМ трис-НСl (рН 7,5), содержащего 6 мМ MgCl₂, 6 мМ β-меркаптоэтанол и 0,1 мМ АТР, с 20 ед. акт. ДНК-лигазы. 5'-³²P-меченые продукты реакции идентифицировали и выделяли методом гель-электрофореза.

Реакция олигонуклеотидов с эндонуклеазами BamHI и Sau3A. 5 пмоль двуспиральных олигонуклеотидов инкубировали в 10 мкл 6 мМ трис-НСl (рН 7,4), содержащего 6 мМ MgCl₂, 6 мМ β-меркаптоэтанол и 10 ед. акт. эндонуклеазы BamHI или Sau3A, при 37° С. 5'-³²P-меченые продукты реакции разделяли гель-электрофорезом, как описано выше. Количественное соотношение исходных олигонуклеотидов и продуктов реакции определяли по содержанию радиоактивности в соответствующих участках геля с помощью счетчика радиоактивности «Mark II» (Nuclear Chicago, США).

ЛИТЕРАТУРА

1. Modrich P., Rubin R. A. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 20. P. 7273-7278.
2. Kaplan D. A., Niculich D. P. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 6. P. 2395-2397.
3. Berkner K. L., Folk W. R. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 10. P. 3185-3193.
4. Berkner K. L., Folk W. R. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 7. P. 2551-2560.
5. Petruska J., Horn D. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. V. 96. № 3. P. 1317-1324.
6. Ono A., Salo M., Ohtani Y., Ueda T. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 23. P. 8939-8949.
7. Bodnar J. W., Zempsky W., Warder D., Bergson C., Ward D. C. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 24. P. 15206-15213.
8. Miller P. B., Wakarchuk W. W., Warren R. A. J. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 7. P. 2559-2568.
9. Yolov A. A., Gromova E. S., Kubareva E. A., Potapov V. K., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 24. P. 8969-8981.
10. Ohtsuka E., Ishino Y., Ibaraki K., Ikehara M. // Eur. J. Biochem. 1984. V. 139. № 3. P. 447-450.
11. Dwyer-Hallquist P., Kezdy F. J., Agarwal K. L. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 19. P. 4693-4700.
12. Brown N. L. // FEBS Lett. 1979. V. 93. № 1. P. 10-15.
13. Molly P. L., Symons R. H. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 13. P. 2939-2946.
14. Hsiung H., Inouye S., West J., Sturm B., Inouye M. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 10. P. 3227-3239.
15. Altona C., Sundaralingham M. // J. Amer. Chem. Soc. 1972. V. 94. № 3. P. 8205-8212.
16. Zimmerman S. B., Pfeiffer B. H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci. 1981. V. 78. № 1. P. 78-82.
17. Dickerson R. E., Drew H. R., Conner B. N., Wing R. M., Fratini A. V., Kopka M. L. // Science. 1982. V. 216. № 4545. P. 475-485.
18. Potter B., Eckstein F. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 22. P. 14243-14248.
19. Zinoviev V. V., Gorbunov Y. A., Baclanov M. M., Popov S. G., Malygin E. G. // FEBS Lett. 1983. V. 154. № 2. P. 282-284.
20. Gait M. J., Matthes H. W. D., Singh M., Sproat B. S., Titmas R. C. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 20. P. 6243-6254.
21. Jones S. S., Reyner B., Reese C. B., Ubasava A., Ubasava M. // Tetrahedron. 1980. V. 36. № 21. P. 3075-3085.
22. Горбунов Ю. А., Данилюк Н. К., Ильичев А. А., Красных В. П., Ломакин А. И., Попов С. Г., Щелкунов С. Н. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 647-654.
23. Баран Г. И., Грачев С. А. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1420-1423.

Поступила в редакцию
31.VII.1986

После доработки
10.XII.1986

CLEAVAGE OF SYNTHETIC RNA — DNA HYBRIDS WITH RESTRICTION ENDONUCLEASES *Bam*H1 AND *Sau*3A

NAZARENKO I. A., GORBUNOV Y. A., MALYGUIN E. G.
*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo,
Novosibirsk Region*

Synthetic oligodeoxyribonucleotides, containing one or two ribonucleotides in the recognition sequence, and RNA — DNA hybrids were tested for their activity in cleavage with *Bam*H1 and *Sau*3A endonucleases. The replacement of dG with G in the first position of *Bam*H1-site (GGATCC) of one of the chains does not affect the rate of the *Bam*H1 hydrolysis. The similar heteroduplex, containing G residue in the second position, displays a decreased rate of the *Bam*H1 hydrolysis of the modified strand and, to a lesser extent, of the unmodified complementary strand. Oligodeoxyribonucleotides in complex with oligoribonucleotides can be cleaved with the excess of *Bam*H1 and *Sau*3A, oligoribonucleotides remaining intact.