



УДК 577.113.4

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУХСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

IV. БРОМЦИАН — ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ РЕАГЕНТ ПРИ КОНДЕНСАЦИИ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

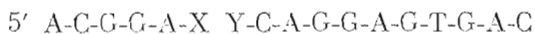
*Соколова Н. И., Аширбекова Д. Т., Долинная Н. Г.,
Шабарова З. А.*

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

Для получения протяженных двухспиральных ДНК в последние годы нами активно разрабатывается метод химического лигирования [1], основанный на том, что образование ковалентной связи между олиго(поли)нуклеотидами, сближенными на матрице, происходит не с помощью фермента, а под действием химических реагентов. Роль химического лигирования особенно возросла в связи с его эффективностью при конструировании модифицированных ДНК [2, 3], в том числе содержащих аномальные межнуклеотидные связи. Т4-ДНК-лигаза, как было показано [4], катализирует сборку только природных ДНК-дуплексов.

Наиболее удобный и технологичный прием химического лигирования — использование конденсирующих реагентов, активирующих фосфатные группы олигомеров непосредственно в комплементарном комплексе. В качестве таких реагентов использовались водорастворимые карбодимиды [5, 6], недостатком которых является длительность реакций (от 0,2 до 6 сут) и возможность модификаций гетероциклических оснований в одноцепочечных участках нуклеиновых кислот.

В настоящем сообщении в качестве реагента для химического лигирования предлагается использовать бромциан. Этот реагент, успешно применяемый для активации полисахаридных сорбентов, пока не нашел широкого применения в химии нуклеотидов. Описаны лишь реакции бромциана с отдельными мононуклеотидами [7, 8], и недавно появилось сообщение об использовании этого реагента при изучении пребиотического синтеза рибонуклеиновых кислот [9]. Мы обнаружили, что под действием бромциана чрезвычайно быстро и эффективно в водной среде происходит конденсация олигонуклеотидных блоков в составе ДНК-дуплексов. Эта реакция протекает в течение 1–2 мин при 0°С. В контрольных экспериментах было показано, что в условиях химического лигирования бромциан даже при 10⁴–10⁵-кратном избытке не модифицирует моно- и олигонуклеотиды. Удобной формой хранения и дозировки бромциана является его 2 М раствор в абс. диметилформамиде, который хранится без разложения в течение месяца при –10°С. Оптимальные условия химического лигирования под действием бромциана определялись на модельном трехкомпонентном дуплексе I, описанном нами ранее [10]; префикс d на схеме опущен:



Дуплекс I

а) X = Tr, Y = C; б) X = T_{NH₂}, Y = pC; в) X = Tr, Y = pC!

Реакцию проводили в 2-морфолиноэтансульфонатном буфере при 0°С,

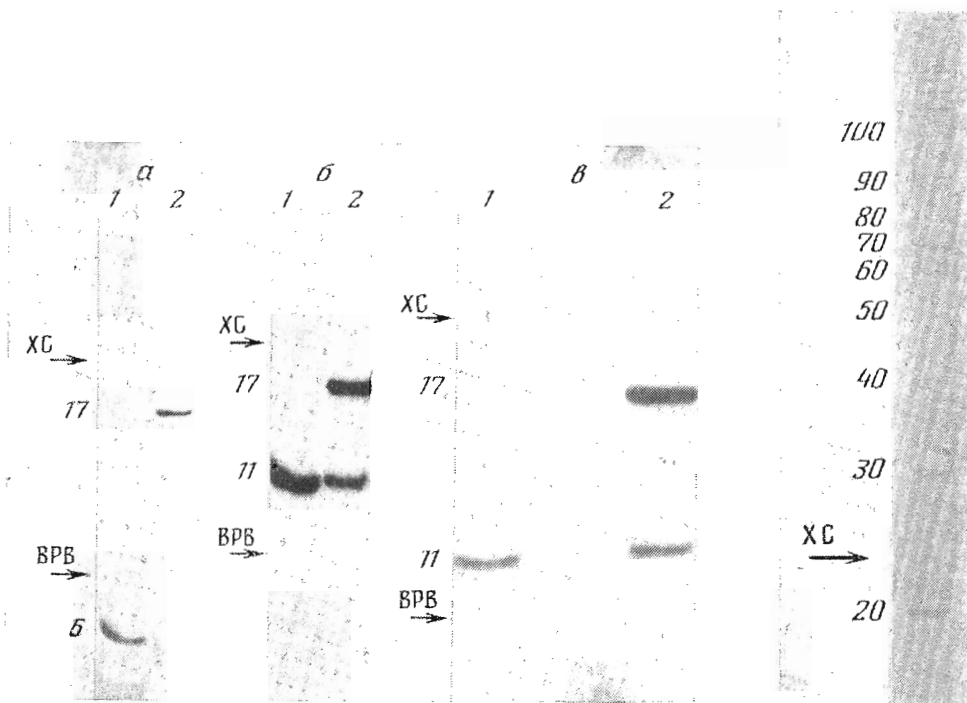


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Радиоавтограф электрофореза в 20% ПААГ реакционных смесей, содержащих дуплексы Ia (а), Ib (б) и Iv (в) до (дорожка 1) и после (дорожка 2) обработки бромцианом. Цифры слева указывают длину олигонуклеотидов. Стрелками обозначено положение маркеров (XC – ксиленицианол, BPB – бромфеноловый синий)

Рис. 2. Электрофорез в 20% ПААГ продуктов, полученных после обработки раствора d(TGGCCAGCTp) бромцианом. Цифры слева указывают длину полимеров, стрелка – положение ксиленицианола. Гель прокрашивали метиленовым синим

используя 1000-кратный избыток бромциана; концентрация олигонуклеотидов (на мономер) составляла 10^{-3} – 10^{-4} М. Через 2 мин реакцию останавливали осаждением нуклеотидного материала спиртом. Реакционную смесь анализировали электрофорезом в 20% ПААГ с последующей авто-радиографией геля. Выход целевого продукта, определенный по соотношению радиоактивности полученного 17-мера d(32 pACGGATCCAGGAG·TGAC) и исходного гексануклеотида d(32 pACGGAT) составил 90% (рис. 1а). Новый конденсирующий агент удалось с успехом применить для синтеза модифицированных ДНК. При аналогичной обработке дуплексов Ib и Iv с выходами 86 и 67% образуются 17-звенные олигонуклеотиды соответственно с фосфоамидной и пирофосфатной связью внутри цепи (рис. 1б и в). При действии бромциана на раствор d(TGGCCAAGC·Tp), способного образовывать конкатемерный дуплекс [6], за 2 мин при 0° С с выходом 85% проходит поликонденсация декануклеотида с образованием набора полинуклеотидов d(TGGCCAAGCTp)_n, где n=2–16 (рис. 2).

Структура полученных фрагментов ДНК с фосфодифирной межнуклеотидной связью подтверждена анализом по Максаму – Гилберту [11]. Природа пирофосфатной и фосфоамидной связей в спитых дуплексах Ib и Iv доказана их избирательным расщеплением трифторуксусным ангидридом [2] и 15% уксусной кислотой [4] соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

- 1, Shabarova Z. A. // Physicochemical Biology Reviews, Soviet Scientific Reviews. Section D. /Ed. Skulachev V. P. Harwood Acad. Publ. GmbH, 1984. P. 1–51.
2. Пурмаль А. А., Друца В. Л., Шабарова З. А. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. № 3. С. 394–400.

3. Долинная Н. Г., Грязнова О. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 921–928.
4. Долинная Н. Г., Грязнова О. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 6. С. 755–763.
5. Naylor R., Gilham P. T. // Biochemistry. 1966. V. 5. № 8. P. 2722–2728.
6. Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Drutza V. L., Melnikova N. P., Purmai A. A. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 21. P. 5747–5761.
7. Ferris J. P., Yanagawa H. // J. Org. Chem. 1984. V. 49. № 12. P. 2121–2125.
8. Ferris J. P., Yanagawa H., Dudgeon P. A., Hagan W. J., Mallare T. E. // Origin Life. 1984. V. 15. № 1. P. 29–43.
9. Капая Е., Yanagawa H. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 23. P. 7423–7430.
10. Грязнова О. И., Долинная Н. Г., Исагулянц М. Г., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Удалов Н. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 124–132.
11. Mazam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.

Поступило в редакцию
24.III.1987

CHEMICAL REACTIONS IN NUCLEIC ACID DUPLEXES. IV. CYANOGEN BROMIDE AS AN EFFICIENT REAGENT IN CONDENSATION OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES

SOKOLOVA N. I., ASHIRBEKOVA D. T., DOLINNAYA N. G., SHABAROVA Z. A.

Department of Chemistry, A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, Moscow State University

Cyanogen bromide was found to induce a smooth and highly efficient condensation of oligonucleotide blocks within DNA duplexes. This template-directed reaction proceeds in the aqueous solution at 0° C for 1–2 min. Cyanogen bromide catalyzes the formation not only of phosphodiester, but also of unnatural phosphoramidate and pyrophosphate interoligomer bonds.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 19.06.87	Подписано к печати 21.08.87	Т-0591	Формат бумаги 70×108 ^{1/16}
Высокая печать	Усл. печ. л. 12,6	Усл. вкр.-отг. 12,0 тьс.	Уч.-изд. 14,5
		Тираж 931 экз.	Бум. л. 4,5
		Зак. 583	

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука»,
103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6