



УДК 577.113.4

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

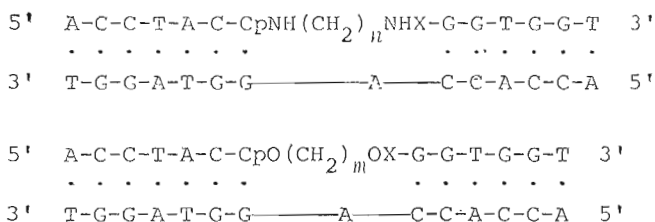
V*. НАПРАВЛЕННОЕ ВВЕДЕНИЕ В САХАРОФОСФАТНЫЙ ОСТОВ ДНК
ОСТАТКОВ АЛИФАТИЧЕСКИХ ДИАМИНОВ ИЛИ ГЛИКОЛЕЙ*Кузнецова С. А., Ивановская М. Г., Готтих М. Б.,
Елов А. А., Шабарова З. А.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет и межфакультетская проблемная научно-исследовательская
лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Описано получение серии синтетических ДНК-дуплексов, в которых остатки алифатических диаминов или гликолей заменяют нуклеозидное звено в одной из комплементарных цепей или одну из природных межнуклеотидных связей. Для введения этих группировок использован метод химического лигирования. Показано, что для синтеза дуплексов подобного типа наиболее удобно использовать метод активированных производных олигонуклеотидов. Нуклеотидные последовательности полученных модифицированных ДНК-дуплексов содержат участок узнавания эндонуклеаз рестрикции *EcoRII*, *SsoII* и *MvaI*, что позволяет использовать их в качестве аналогов субстратов этих ферментов.

Получение фрагментов нуклеиновых кислот, содержащих неприродные группировки в структуре сахарофосфатного остова, представляет большой интерес в плане конструирования широкого круга субстратов для изучения ферментов нуклеинового обмена [2–5], синтеза специфических гибридных зондов на основе олиго- и полинуклеотидов [6], изучения вторичной структуры НК. Одним из подходов, позволяющих модифицировать сахарофосфатный остов НК, т. е. заменять фосфодиэфирную межнуклеотидную связь на неприродную, а также заменять мономерные звенья в одно- или двуспиральных НК в заданном месте, является введение углеводородной цепи в структуру сахарофосфатного остова. Для введения углеводородной цепи мы предлагаем использовать метод химического лигирования [7] — химическую конденсацию олигонуклеотидных блоков, направляемую комплементарной матрицей. Использование этого подхода позволяет получать широкий набор модифицированных дуплексов, вводя в конденсации одни и те же олигонуклеотидные блоки с различным образом модифицированными концевыми группировками.

В настоящем сообщении мы представляем синтез олигонуклеотидов, формирующих два типа олигонуклеотидных дуплексов: дуплексы, в которых остаток алифатического диамина или гликоля заменяет одно нуклеозидное звено в одной из цепей дуплекса, и дуплексы, в которых эти группы заменяют одну из природных межнуклеотидных связей:

* Сообщение IV см. [1]. Сокращения: EDAC — 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид; Melm — N-метилимидазол; MES — 2-морфолиноэтансульфокислота; rU — рибоуридин. Символ d (дезоксид) в обозначении дезоксирибоолигонуклеотидов опущен. ³²P — [³²P]фосфатная группа.

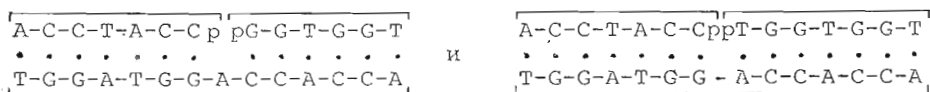


где $n=2, 3, 6$; $m=2, 3$; $X=p, pT$

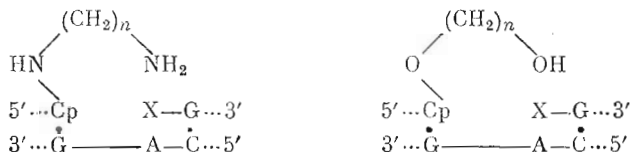
Синтезированные дуплексы являются аналогами субстратов ферментов рестрикции *EcoRII*, *SsoII* и *MvaI* (участок узнавания: 5'CC(A/T)GG3'). В структуре этих субстратов остатки диаминов или гликолей замещают тимидин центральной нуклеотидной пары узнаваемого ферментом участка либо непосредственно связаны с 5'-фосфатом этого тимидина. Введение таких замен представляет интерес в плане изучения механизма действия этих ферментов, так как позволяет выявить значение центрального нуклеозида в процессе узнавания ДНК белком, а также роль контактов белка с углеводофосфатным остовом ДНК.

В качестве исходных блоков для получения модифицированных дуплексов были использованы синтетические олигонуклеотиды АССТАССр (I), рGGTGGT (II), рTGGTGGT (III) и АССАССAGGTAGGT (IV), синтезированные нами фосфортриэфирным блочным методом в растворе с последующим подтверждением строения по методу [8]. Для получения 3'-фосфорилированного олигонуклеотида (I) использовали метод периодатного окисления 3'-концевого рибозвена октануклеотида АССТАССрU [9]. Введение 5'-концевой фосфатной группы в олигонуклеотиды (II—III) осуществляли с помощью Т4-полинуклеотидкиназы.

Олигонуклеотиды (I—IV) образуют следующие комплементарные комплексы, которые явились базовыми при получении всего набора модифицированных дуплексов:



Ранее было установлено, что в комплексах подобного типа возможно образование межнуклеотидной связи при использовании водорастворимых конденсирующих агентов либо предварительно активированных производных олигонуклеотидов [10—12]. Для получения серии модифицированных дуплексов мы применяли тот же принцип химической конденсации блоков, используя при этом олигонуклеотиды, в которых концевые фосфатные группы ковалентно связаны с остатками алифатических диаминов или гликолей. При этом в узле снйтеза межмономерной связи оказывались сближенными аминокламмидная или оксикаммидэфирная группа одного олигонуклеотида и фосфатная группа другого, например



где $X=p$; $n=2$ (дуплекс (а)), 3 (дуплекс (б)), 6 (дуплекс (в)); $m=2$ (дуплекс (г)), 3 дуплекс (д). $X=pT$; $n=2$ (дуплекс (е)), 3 (дуплекс (ж)), 6 (дуплекс (з)); $m=2$ (дуплекс (и)), 3 (дуплекс (к)).

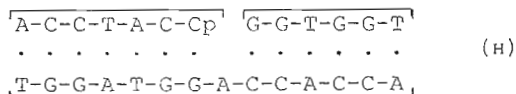
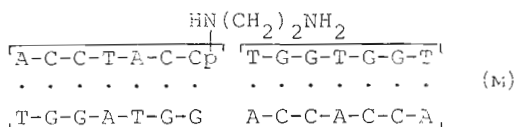
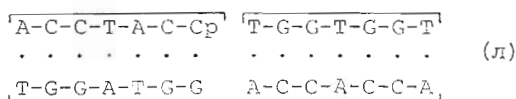
Аналогично возможно использовать соединения, в которых остатки диаминов или гликолей ковалентно связаны с 5'-фосфатом олигонуклеотида. Конденсации в дуплексах подобного типа ранее не изучались.

Для получения оптимальных условий протекания реакций представля-

лось интересным сравнить эффективность химического лигирования при использовании различных методов активации фосфата, различных по нуклеофильности групп-акценторов фосфата, места ковалентного присоединения диамина или гликоля (3'- или 5'-фосфат), а также длины полиметиленового звена.

Характеристика термической устойчивости исследуемых дуплексов

Известно, что химическое лигирование может протекать только в условиях существования устойчивого комплементарного комплекса [7]. Поэтому методом УФ-спектроскопии была изучена термическая устойчивость комплексов (л, м, н) в условиях проведения реакций химического лигирования (см. «Экспериментальную часть»).



В стандартных условиях, обычно используемых для химического лигирования под действием EDAC, температура плавления (T_m) комплекса (л) составляет 28°С (рис. 1). Оказалось, что введение аминоэтиламидной группы (комплекс (м)) не влияет на T_m комплекса, а замена буфера, используемого для конденсации под действием EDAC, на MeIm-буфер (условия протекания конденсаций с участием активных производных) не оказывает существенного влияния на устойчивость комплекса (T_m комплекса (л) в этом случае составляет 29°С) (рис. 1). Дуплекс с пропуском одного нуклеотидного звена в месте, примыкающем к одноцепочечному разрыву (дуплекс (н)), имеет существенно более низкую термическую устойчивость по сравнению с аналогичным дуплексом без пропуска звена (л). Так, кривая плавления комплекса (н) в исследуемом интервале температур не выходит на низкотемпературное плато (рис. 1). Приняв для этого комплекса то же значение гипохромии, что и для комплекса (л), можно оценить его T_m как 16–18°С. Поскольку наличие этилендиаминогруппы не сказывается на устойчивости дуплекса, то T_m дуплекса с пропуском звена, но содержащего аминоэтиламидную группу,

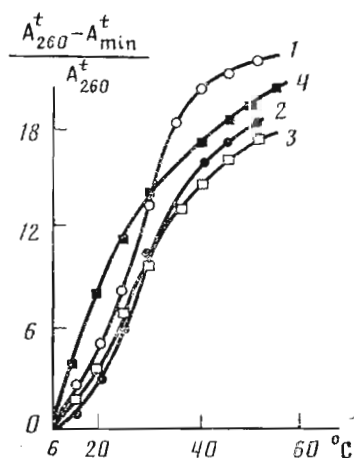


Рис. 1. Кривые плавления олигонуклеотидных дуплексов, $c_0 \cdot 10^{-3}$ М: 1 и 4 — дуплексы (л) и (н) в 0,05 М MES-буфере (рН 6,0), содержащем 0,02 М MgCl_2 ; 2 и 3 — дуплексы (л) и (м) в 0,4 М MeIm-буфере (рН 8,0), содержащем 0,2 М NaCl и 0,12 М MgCl_2 .

ковалентно связанную с 3'-концевым фосфатом гептануклеотида (I), можно предположить также равной 16–18° С. Согласно этим данным, все изученные дуплексы с одноцепочечным разрывом устойчивы при температуре ниже 6° С. Так как реакции химического лигирования протекают только в условиях существования устойчивых комплементарных комплексов, для проведения конденсаций мы выбрали температуру 0° С, поскольку дальнейшее ее понижение ведет к уменьшению эффективности конденсаций [7].

Выбор метода активации фосфатной группы при химическом лигировании

При синтезе модифицированных ДНК-дуплексов, содержащих в сахарофосфатной цепи остатки этилендиамина или этиленгликоля, были опробованы три метода активации фосфата: карбодимидный [7, 10], имидазольный [7, 11] и метод N-оксибензотриазоловых эфиров [12].

Для получения дуплексов, содержащих остатки этилендиамина в середине одной из цепей, в качестве исходных мы использовали комплексы олигонуклеотидов (а) и (е), а для получения дуплексов, содержащих остатки этиленгликоля, исходными являлись комплексы (г) и (и). Накопление продуктов химического лигирования контролировали гель-электрофорезом в ПААГ в денатурирующих условиях. Кривые накопления представлены на рис. 2. В таблице приведены выходы продуктов лигирования в сравнении с данными по химическому лигированию аналогичных немодифицированных дуплексов (л) и (н).

При химическом лигировании под действием EDAC с использованием оксиалкиловых эфиров и аминоклиламидов олигонуклеотидов как с пропуском, так и без пропуска нуклеотидного звена была обнаружена высокая степень протекания побочной реакции — модификации гетероциклических оснований под действием EDAC [13]. На рис. 3 приведен профиль микроколоночной хроматографии (МКХ) реакционной смеси, образующейся при конденсации аминоэтиламида гептануклеотида (I) под действием EDAC в дуплексе (а).

Как и следовало ожидать, наиболее быстрое накопление продуктов

Химическое лигирование в дуплексах (а–к, л, н)
с₀ 10⁻³ M

Метод конденсации	Обозначение дуплекса	Условия конденсации		Время реакции, ч	Выход продукта, %
		буфер	pH		
Метод N-оксибензотриазоловых эфиров	л	MeIm	8,0	24	40–45
	л е а	Hepes	8,75	72	40–45
				48	50
				48	35
	п г б ж в з д к	MeIm	8,0	72	20
				72	8
				48	26
				48	36
				72	4
				72	7
72				17	
Имидазольный	е а	Na-фосфат	7,4	72	35
				72	25
	п г	MeIm	8,0	120 120	12 6
Карбодимидный	л н	MES	6,0	120	65
				240	10

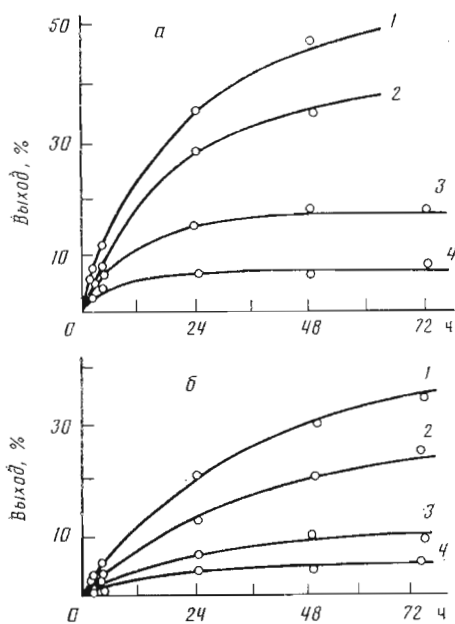


Рис. 2

Рис. 2. Кривые накопления продуктов химического лигирования в дуплексах (а) (2), (г) (4), (е) (1), (и) (3), полученных методом конденсации N-оксибензотриазоловых эфиров (а) и имидазольным методом (б) (условия см. «Экспер. часть»)

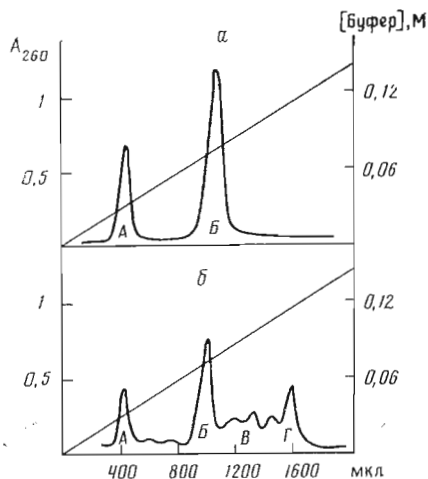


Рис. 3

Рис. 3. Микроколоночная хроматография реакционной смеси, образующейся при химическом лигировании под действием EDAC в дуплексе (а) в нулевой момент времени (а) и после инкубации в течение 6 сут (б). А — аминоктиламид гептануклеотида (I), Б — смесь олигонуклеотидов (II) и (IV), В — продукты модификации нуклеотидного материала EDAC, Г — АССТАССр-NH(CH₂)₂NH-pGGTGGT. Условия хроматографии см. в «Экспер. части»

конденсации отмечено в том дуплексе, где акцептором активированного фосфата служит аминогруппа аминоктиламида (дуплекс (е)). Выход тетрадекануклеотида в этом дуплексе составил 50% за 48 ч при использовании N-оксибензотриазоловых эфиров и 35% при имидазольной активации. Когда акцептором фосфата служит гидроксигруппа этиленгликоля, конденсация протекает медленнее и выход продукта лигирования за 72 ч достигает лишь 20% при использовании N-оксибензотриазоловых эфиров и 12% — при использовании имидазольных (рис. 2, таблица).

Характерной особенностью всех реакций химического лигирования, протекающих в дуплексах, в узле синтеза межнуклеотидной связи которых отсутствует одно мономерное звено, является резкое падение эффективности конденсации. Так, при образовании природной фосфодиэфирной связи в дуплексе (л) выход тетрадекануклеотида составляет 65%, в то же время при конденсации в дуплексе (и) с пропуском нуклеотидного звена — 10% (таблица). В случае, когда нуклеотидное звено заменено на остаток этиленгликоля, выход продукта конденсации существенно не меняется и составляет 8%. Если же нуклеотидное звено заменить остатком этилендиамина, выход продукта конденсации увеличивается до 35% (метод N-оксибензотриазоловых эфиров). Выходы тех же соединений, образующихся при имидазольной активации фосфата, несколько ниже (таблица). Падение эффективности конденсаций в дуплексах (а, г, и) с пропуском нуклеотидного звена связано, по-видимому, со снижением термической устойчивости дуплексов подобного типа [14]. В данном случае дестабилизация составляет 10° С (рис. 1).

Для синтеза модифицированных дуплексов, полученных в настоящей работе, можно использовать два типа производных, в которых остатки этилендиамина или этиленгликоля ковалентно связаны либо с 3'-, либо с 5'-фосфатом олигонуклеотида. Оказалось, что выходы продуктов конденсации одинаковы в обоих случаях. Поэтому при проведении конденсаций

в дальнейшем мы использовали в основном производные по 3'-концевому фосфату, что позволило нам свести к минимуму число исходных соединений, использующихся при лигировании.

Результаты, полученные при использовании трех различных методов химического лигирования для введения непуклеотидного звена в структуру сахарофосфатного остова дуплексов, позволяют заключить, что для синтеза подобных соединений наиболее перспективно использовать такой метод, который исключает воздействие на дуплекс конденсирующего агента, способного модифицировать однотяжевые участки ДНК. Методы с использованием активных производных олигонуклеотидов наиболее полно отвечают всем требованиям, предъявляемым к реакциям данного типа. При этом N-оксибензотриазоловые эфиры олигонуклеотидов оказались более эффективными реагентами, чем соответствующие имидазолиды, что полностью согласуется с данными, полученными ранее в работе [12].

Влияние длины углеводородного мостика на эффективность конденсации

При синтезе модифицированных ДНК-дуплексов, являющихся субстратами ферментов рестрикции, необходимо было учесть, чтобы искажение структуры двойной спирали в месте введения углеводородной цепи (в случае дуплексов, где углеводородная цепь замещает нуклеотидное звено) было минимальным. На основании молекулярных моделей было установлено, что наименьшее искажение двойной спирали будет наблюдаться в том случае, если вместо остатка тимидина ввести этиленовые или пропиленовые звенья. Для подтверждения этого мы осуществили конденсации в дуплексах (б, в, д) и (ж, з, к), в которых варьировалась длина углеводородной цепи (рис. 4, таблица).

Для дуплексов, содержащих в сахарофосфатной цепи пропиленовую и гексаметиленовую углеводородные цепи, сохраняются закономерности, полученные при изучении химического лигирования в дуплексах (а, г, е, и): увеличение эффективности лигирования при замене оксиалкиловых эфиров олигонуклеотидов на их аминокламыды и снижение при удалении мономерного звена в узле синтеза межнуклеотидной связи. Однако в целом выходы продуктов конденсации уменьшаются с увеличением длины углеводородной цепи. Так, при введении в конденсацию аминокламыда гептануклеотида (дуплекс (е)) выход продукта составил 50%, в то время как при использовании аминокламыда (дуплекс (ж)) — 36%. При введении в конденсацию оксиэтилового и оксипропилового эфиров гептануклеотида (дуплексы и, к) выходы продуктов составляют соответственно 20 и 17%. При пропуске нуклеотидного звена в случае конденсации аминокламыда и оксипропилового эфиров гептануклеотида выход продуктов существенно снижается. Увеличение числа метиленовых звеньев до шести приводит к уменьшению выхода продукта конденсации до 7% в случае дуплекса (з) и 4% в случае дуплекса (в). Снижение выходов продуктов конденсации в ряду этил-, пропи-, гексаметил- вызвано, по нашему мнению, структурным фактором: увеличением конформационной подвижности углеводородной цепи в этом ряду, а также (в случае диаминов) основности свободной NH₂-группы аминокламыдов аналогично тому, как меняется основность соответствующих диаминов [15]. Таким образом, можно сделать вывод, что наиболее благоприятная ориентация реагирующих групп наблюдается при введении этиленовой углеводородной цепи в соответствующие дуплексы как с пропуском, так и без пропуска нуклеотидного звена.

Доказательство структуры синтезированных соединений

Структуру соединений, образующихся в результате химического лигирования в дуплексах (а—в, е—з)*, после электрофоретического разделения цепей (см. «Экспериментальную часть») подтверждали путем изби-

* При этом в 5'-концевой из сшиваемых олигонуклеотидов предварительно была введена 5'-³²P-метка с помощью Т4-полинуклеотидкиназы.

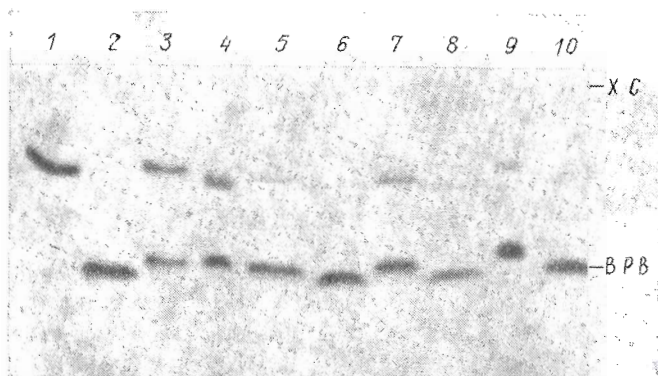


Рис. 4. Электрофорез в 20% ПААГ реакционных смесей, образующихся в результате конденсации методом *N*-оксисбензотриазоловых эфиров. В конденсацию вводили ^{32}P TGGTGGT (III) или ^{32}P GGTGGT (II). 1 и 2 — контрольные олигонуклеотиды (IV) и (I). Реакционные смеси, образующиеся в результате конденсации в дуплексах (е) (3), (а) (4), (ж) (5), (б) (6), (и) (7), (г) (8), (к) (9), (д) (10). XС и ВРВ — положение маркерных красителей ксиленицианола FF и бромфенолового синего

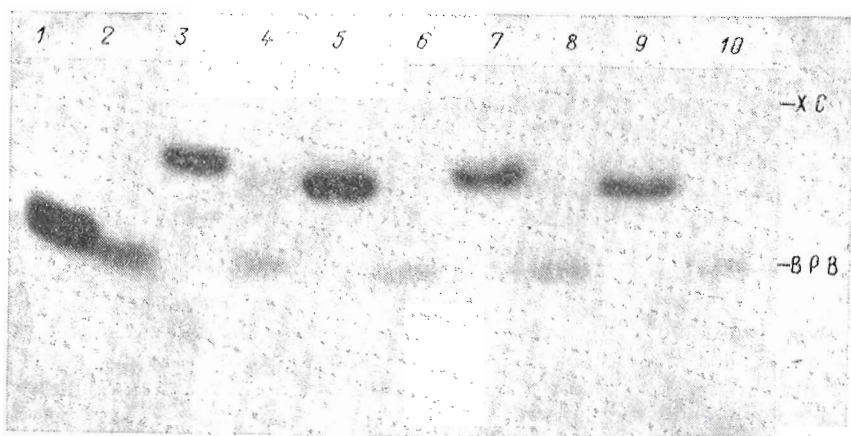


Рис. 5. Электрофорез в 20% ПААГ продуктов кислотного гидролиза три- и тетрадекануклеотидов, содержащих в структуре сахарофосфатного остова остатки этилен- и пропилендиаминов. 1, 2 — контрольные олигонуклеотиды ^{32}P TGGTGGT и ^{32}P GGTGGT соответственно, 3 — АССТАССр-NH(CH₂)₂NH- ^{32}P TGGTGGT, 4 — продукт его гидролиза, 5 — АССТАССр-NH(CH₂)₂NH- ^{32}P GGTGGT, 6 — продукт его гидролиза, 7 — АССТАССр-NH(CH₂)₃NH- ^{32}P TGGTGGT, 8 — продукт его гидролиза, 9 — АССТАССр-NH(CH₂)₃NH- ^{32}P GGTGGT, 10 — продукт его гидролиза

рательного кислотного гидролиза фосфоамидной связи 5'- ^{32}P -меченых продуктов реакций, а также тех же самых продуктов, но в которых ^{32}P -метка была введена в середину сахарофосфатного остова, т. е. АССТАССр-NH(CH₂)_nNH- ^{32}P GGTGGT или АССТАССр-NH(CH₂)_nNH- ^{32}P TGGTGGT, где $n=2, 3, 6$.

Обработка этих соединений в 15% CH_3COOH (50° С, 2 ч) приводила к расщеплению фосфоамидной связи с образованием 3'- или 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов (I) и (II) или (I) и (III). При электрофорезе в ПААГ в гидролизатах были обнаружены: в первом случае гептануклеотид ^{32}P АССТАССр (для всех модифицированных олигонуклеотидов, входящих в состав дуплексов (а-в, е-з)), а во втором — ^{32}P GGTGGT (для олигонуклеотидов, входящих в состав дуплексов (а-в)) или ^{32}P TGGTGGT (е-з) (например, рис. 5). Это позволило сделать вывод о наличии в модифицированных олигонуклеотидах двух фосфоамидных связей. Первичную структуру продуктов химического лигирования в дуплексах (г, д, и, к) подтверждали методом Максама — Гилберта [8] (рис. 6). При обработке 5'- ^{32}P -меченых три- или тетрадекануклеотидов, содержащих в саха-



Рис. 6

Рис. 6. Анализ методом Максама — Гилберта пуклеотидной последовательности АССТАССр-О(СН₂)₃О-рGGT-GGT. Электрофорез в 20% ПААГ

Рис. 7. Электрофорез в 20% ПААГ продуктов гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда три- и тетрадекануклеотидов ³²рАССТАССр-О(СН₂)₃О-рTGGTGGT и ³²рАССТАССр-О(СН₂)₃О-рGGTGGT. Условия гидролиза: 0,2 М трис-НСl (рН 8,5), 0,04 М MgCl₂, 37°С, 3 ч; для гидролиза 0,01 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида брали 2,6 · 10⁻² ед. акт. фермента. 1 — контрольный тетрадекануклеотид ³²рАССАССAGGTAGGT, 2 — продукт его гидролиза, 3 — ³²рАССТАССр-О(СН₂)₃ОН, 4 — продукт его гидролиза, 5 — ³²рАССТАССр-О(СН₂)₃О-рGGTGGT, 6 — продукт его гидролиза, 7 — ³²рАССТАССТО-р(СН₂)₃О-рTGGTGGT, 8 — продукт его гидролиза

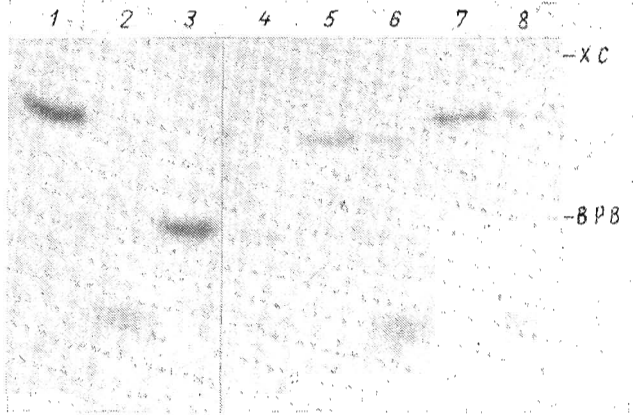


Рис. 7

рофосфатной цепи остатки этилен- или пропиленгликолей, фосфодиэстеразой змеиного яда их гидролиз протекал с образованием 5-³²Р-меченого нуклеотида (³²рА) (рис. 7). Однако в выбранных нами условиях можно было наблюдать образование промежуточного продукта — ³²рАССТАССр-О(СН₂)₃ОН, который идентифицировали в геле сравнением с контрольным препаратом.

Таким образом, в настоящей работе методом химического лигирования осуществлен синтез серии новых аналогов субстратов эндонуклеаз рестрикции для изучения механизма действия этих ферментов. Показано, что синтез модифицированных дуплексов подобного типа наиболее эффективно протекает при использовании активированных производных олигонуклеотидов. Все стадии синтеза выполнены на незащищенных олигонуклеотидах в водной среде, в связи с чем предложенный метод можно считать общим методом введения ненуклеотидных группировок в сахарофосфатный остов нуклеиновых кислот.

Авторы искренне благодарят Н. Г. Долинную за помощь при проведении УФ-плавления указанных дуплексов.

Экспериментальная часть

В работе использованы 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид (EDAC), имидазол, N-метylimидазол, 2-морфолиноэтансульфокислота, лихросорб-NH₂ (10 мкм; Мерск, ФРГ), полисил СА (ЧССР); N-оксисбензотриазол (Fluka, Швейцария); Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78; НПО «Фермент», Вильнюс); фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1; Worthington Biochemical Corp., США); АТФ, этилендиаминдигидрохлорид, 1,6-диаминогексан, 4-морфолиноэтансульфоновая кислота (MES; Serva, ФРГ); 1,3-диаминопропан (Koch-Light, Великобритания); этиленгликоль, 1,3-пропандиол (Fergak, ФРГ); [³²Р]АТФ с уд. акт. 1000 Ки/ммоль («Изотоп»); биогель Р-2, 200—400 меш (Bio-Rad, США), DEAE-целлюлоза DE-23 (Whatman, Англия). Денатурирующий электрофорез в ПААГ проводили в условиях, описанных в работе [8].

Синтез олигонуклеотидов (I)–(IV) осуществляли фосфоритриэфирным методом в растворе по методу [16]. Синтезированные олигонуклеотиды подвергали обработке смесью NH_3 (25%) – пиридин (3:1; 50°С, 24 ч), а затем 80% CH_3COOH (20 мин) для удаления всех защитных групп. Целевые олигонуклеотиды после полного их деблокирования выделяли на колонках (15×300 мм) с DEAE-целлюлозой в 0,005 М трис- HCl -буфере (рН 7,5), содержащем 7 М мочевины в градиенте NaCl (0,00–0,36 М), с последующей обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе «Tracor» (Нидерланды); колонка с сорбентом Ultrasphere TM-octyl (5 мм, 4,6×250 мм), в линейном градиенте метанола (0,00–0,35 М), содержащем 0,1 М ацетат аммония.

Получение аминокламмидов олигонуклеотидов. 0,005–2 мкмоль олигонуклеотида инкубировали при 10°С в растворе 2 М диамина (рН 4–5) и 0,5 М EDAC 1–2 ч в случае этилен- и пропилендиаминов и 16 ч для гексаметилендиамина. Реакционные смеси обессоливали на биогеле Р-2 и анализировали олигонуклеотидную фракцию методом ионообменной микроколоночной хроматографии на лихросорбе- NH_2 (колонок 10×60 мм) в линейном градиенте Na -фосфатного буфера (рН 7,0), содержащего 7 М мочевины.

Получение оксикамидовых эфиров олигонуклеотидов. 0,005–2 мкмоль олигонуклеотида растворяли в 50 мкл 0,5 М MES-буфера (рН 4,5), содержащего 1 М MgCl_2 , и добавляли 50 мкл этилен- или пропиленгликоля и 10 мг (50 мкмоль) EDAC. Реакционную смесь инкубировали 4–5 ч при 10°С и анализировали как описано для аминокламмидов олигонуклеотидов.

Изучение комплексообразования проводили в 0,05 М MES-буфере (рН 6,0), содержащем 0,02 М MgCl_2 (дуплексы (л–п)); в 0,4 М MeIm-буфере (рН 8,0), содержащем 0,2 М NaCl , 0,12 М MgCl_2 (дуплексы (л и м)). Нуклеотидная концентрация в расчете на мономерное звено (c_0) составляла 10^{-3} М. Температурную зависимость УФ-поглощения комплексов измеряли на спектрофотометре Cary-219 (США) при непрерывном повышении температуры со скоростью 0,5°С/мин в термостатируемых кварцевых кюветках с длиной оптического пути 10 мм. Температуру регистрировали при помощи медно-константановой термпары. Результаты плавления олигонуклеотидных дуплексов представляли в виде

$$f(t) = \frac{A_{260}^t - A_{260}^{\text{min}}}{A_{260}^t}$$

Конденсация олигонуклеотидов под действием EDAC. 0,1–2,0 ОЕ₂₆₀ смеси олигонуклеотидов, взятых в эквимольных количествах, упаривали досуха, пробирку охлаждали до 0°С. К полученному остатку добавляли 0,05 М MES-буфер (рН 6,0), содержащий 0,02 М MgCl_2 , до суммарной нуклеотидной концентрации 10^{-3} М и рассчитанное количество EDAC так, чтобы его концентрация в реакционной смеси составляла 0,2 М. Реакционную смесь инкубировали 5–10 сут при 0°С.

Синтез имидазолидов олигонуклеотидов проводили как описано в работе [14]. 0,01–0,5 мкмоль 3'- или 5'-фосфорилированного олигонуклеотида растворяли в 50 мкл 3 М водного раствора имидазола (рН 6,0), добавляли 10 мг (50 мкмоль) EDAC. Реакционную смесь инкубировали 2 ч при 10°С, затем обессоливали на биогеле Р-2 (колонок 0,5×20 см, элюция 0,05 М водным раствором триэтиламина).

Имидазолидная конденсация олигонуклеотидов. К обессоленному имидазолиду олигонуклеотида добавляли в эквимольных количествах два других олигонуклеотида, входящих в состав дуплекса. После упаривания этой смеси досуха и охлаждения до 0°С к остатку добавляли 0,4 М MeIm-буфер (рН 8,0), содержащий 0,2 М NaCl и 0,12 М MgCl_2 или 0,05 М Na_2HPO_4 -буфер (рН 7,4), содержащий 0,2 М NaCl и 0,12 М MgCl_2 до суммарной нуклеотидной концентрации 10^{-3} М (см. таблицу). Реакционную смесь инкубировали 2–5 сут при 0°С.

N-Оксисбензотриазоловые эфиры олигонуклеотидов получали как описано в работе [17]. 0,3 ммоль N-оксисбензотриазола растворяли в смеси 50 мкл диметилформамида и 30 мкл 0,4 М MES-буфера (рН 4,5). Полученную смесь добавляли к 0,01–0,5 мкмоль 3'- или 5'-фосфорилированного олигонуклеотида. После добавления 10 мг (50 мкмоль) EDAC реакционную смесь инкубировали 2,5 ч при 10°С. N-Оксисбензотриазоловый эфир олигонуклеотида осаждали из реакционной смеси 1 мл 2% LiClO_4 в ацетоне.

Конденсации с участием N-оксисбензотриазоловых эфиров олигонуклеотидов К N-оксисбензотриазоловому эфиру олигонуклеотида добавляли раствор двух других олигонуклеотидов, входящих в состав дуплекса, в 0,4 М MeIm-буфере (рН 8,0), содержащем 0,2 М NaCl и 0,12 М MgCl_2 или 0,2 М Hepes (рН 8,75), содержащий 0,1 М MgCl_2 (см. таблицу), таким образом, чтобы c_0 составляла 10^{-3} М. Олигонуклеотиды брали в эквимольных количествах. Реакционную смесь инкубировали 1–3 сут при 0°С.

Разделение реакционных смесей после конденсаций проводили методом микроколоночной хроматографии на полисиле СА в 20% ацетонитриле в градиенте концентрации пирофосфата натрия (0–0,12 М) при рН 6,5, а также электрофорезом ^{32}P -меченых соединений в 20% ПААГ в 7 М мочевины с последующей радиоавтографией.

Разделение цепей дуплексов, образующихся в результате химического лигирования, проводили электрофорезом в пластинках (20×60×0,04 см) 20% ПААГ, содержащего 7 М мочевины, 50 мМ трис-боратный буфер (рН 8,3), 0,1 мМ EDTA, при постоянном напряжении 1000 В.

1. Шабарова З. А., Вейко В. П., Долинная Н. Г., Друца В. Л., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Пурмаль А. А. // Биорган. химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 628-642.
2. Невинский Г. А., Фролова Е. И., Левина А. С., Подуст В. Н., Лебедев А. В. // Биорган. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 45-57.
3. Пурмаль А. А., Виноградова М. Н., Елов А. А., Громова Е. С., Друца В. Л., Метелев В. Г., Холодков О. А., Бурьянов Я. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 276. № 4. С. 992-995.
4. Виноградова М. Н., Громова Е. С., Грязнова О. И., Косых В. Г., Шабарова З. А. // Биорган. химия. 1987. Т. 13. № 10. С. 1194-1204.
5. Hamblin M. R., Cummins J. H., Potters V. V. L. // Biochem. J. 1987. V. 241. № 3. P. 827-833.
6. Millican T. A., Mock G. A., Chauncey M. A., Patel T. P., Eaton M. A. W., Gunning I., Cutbush S. D., Neide S., Mann J. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 19. P. 7435-7453.
7. Shabarova Z. A. // Physicochemical biology reviews. Soviet Scientific Reviews, Section D/Ed. Skulachev V. P. Harwood Acad. Publ. GmbH. 1984. P. 1-51.
8. Mazam A. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560-564.
9. Крынецкая И. Ф., Заякина Г. В., Елов А. А., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 2. С. 489-492.
10. Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Druitsa V. L., Melnikova N. P., Purmal A. A. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 21. P. 5747-5759.
11. Исагуляню М. Г., Ивановская М. Г., Попанов В. К., Шабарова З. А. // Биорган. химия. 1985. Т. 11. № 2. С. 239-247.
12. Ивановская М. Г., Готтих М. Б., Шабарова З. А. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 293. № 2. С. 477-481.
13. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф., Шибаев В. Н. // Органическая химия нуклеиновых кислот/Ред. Кочетков Н. К., Будовский Э. И. М.: Химия, 1970. С. 383-385.
14. Грязнова О. И., Долинная Н. Г., Исагуляню М. Г., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Удалов Н. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биорган. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 124-131.
15. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976. С. 73.
16. Stawinski J., Pozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. P. 353-371.
17. Готтих М. Б., Ивановская М. Г., Якоби Л. В., Шабарова З. А. // Биорган. химия. 1985. Т. 11. № 5. С. 613-620.

Поступила в редакцию
17.VII.1987

CHEMICAL REACTIONS IN DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS.

V. DIRECTED INTRODUCTION OF RESIDUES OF ALIPHATIC DIAMINES OR GLYCOLS INTO THE DNA SUGAR-PHOSPHATE BACKBONE

KUZNETSOVA S., IVANOVSKAYA M., GOTTIKH M., YOLOV A., SHABAROVA Z.

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

The chemical ligation method was used for directed introduction of aliphatic diamines or glycols into sugar-phosphate backbone of DNA. Via condensation of heptanucleotide derivatives at the terminal phosphate (aminoalkylamides or hydroxyalkyl esters) with the adjacent heptanucleotide on the corresponding template, 14 bp DNA duplexes containing residues of ethylene-, propylene- or hexamethylenediamine, as well as residues of ethylene- or propyleneglycol in one of its strands, were synthesised. In a similar way duplexes were obtained in which residues of the above diamines or glycols are substituted for a mononucleotide in one of the complementary strands. Exemplified by synthesis of DNA duplexes containing ethylenediamine or ethyleneglycol residues, three methods of the phosphate group activation using carbodiimide, imidazolid and N-hydroxybenzotriazole ester were tested; the last method gave the highest yields and purity of the products. Yields of duplexes without nucleotide omissions were 50, 36 and 7% for aminoethyl, aminopropyl and aminohexylamides, and 20 and 17% for hydroxyethyl and hydroxypropyl esters, respectively, whereas duplexes with nucleotide omissions were synthesised with lower yields. Each of the modified DNA duplexes thus obtained contains a recognition site of *EcoRII*, *SsoII* or *MvaI* restriction nucleases, thus being a potential substrate of these enzymes.