



УДК 577.113.4

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

VI*. N-ОКСИБЕНЗОТРИАЗОЛОВЫЕ ЭФИРЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ — РЕАГЕНТЫ ДЛЯ СИНТЕЗА ДНК-ДУПЛКСОВ С МОДИФИЦИРОВАННЫМ САХАРОФОСФАТНЫМ ОСТОВОМ

Готтлик М. В., Ивановская М. Г., Ибраева З. А.

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

Описан новый тип фосфорилирующих реагентов для реакций химического лигирования — N-оксисбензотриазоловые эфиры олигонуклеотидов. На синтетическом ДНК-дуплексе с одним разрывом цепи показано, что эти реагенты по реакционной способности превышают используемые ранее имидазолы олигонуклеотидов. С применением N-оксисбензотриазоловых эфиров синтезированы дуплексы, в которых в заданное положение сахарофосфатного остова введены остатки алифатических диаминов или аминокислот, заменяющие одно или два нуклеотидных звена. При использовании в качестве акцептора фосфата олигонуклеотида, содержащего на 3'-конце остаток рибонуклеотида, получен дуплекс, содержащий в середине цепи рибонуклеотидное звено. Предложенный тип реагентов можно рекомендовать для химического лигирования природных и модифицированных дезоксирибо- и рибоолигонуклеотидов.

Фрагменты ДНК, содержащие химические модификации в сахарофосфатном остове молекулы, широко используются в настоящее время для изучения механизма действия ферментов метаболизма ДНК: ДНК-полимераз [2], специфических ДНКаз [3], эндонуклеаз рестрикции [4–6]. Эти соединения представляют также несомненный интерес для изучения пространственной организации нуклеиновых кислот и белково-нуклеиновых комплексов, для направленного мутагенеза, изучения структурно-функциональных зависимостей в нуклеиновых кислотах.

Для получения модифицированных по сахарофосфатному остову олиго(поли)нуклеотидных дуплексов наиболее перспективен, по-видимому, метод химического лигирования — конденсация олигонуклеотидов на комплементарной им матрице под действием химического агента [7].

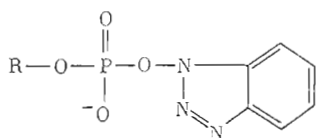
К настоящему времени разработаны два подхода к химическому лигированию нуклеиновых кислот: с использованием конденсирующих агентов [8, 9] и предварительно синтезированных фосфорилирующих производных олигонуклеотидов [10, 11]. Второй подход привлекателен тем, что позволяет исключить воздействие конденсирующих агентов на «сшиваемый» олигонуклеотидный дуплекс.

До сих пор для химического лигирования использовался только один тип активированных производных — фосфоазолиды олигонуклеотидов [10, 11]. Наиболее реакционноспособными из описанных к настоящему времени фосфоазолидов являются синтезированные Зарытовой и др. [12] производные олигонуклеотидов с N-метилимидазолом. Однако сложность получения этих соединений, а также высокая скорость их гидролиза (время полугидролиза ~10 мин) затрудняют применение N-метилимидазолидов для химического лигирования. Поэтому остается актуальной задача

Сообщение V см. [1]. Принятые сокращения: ОБТ — оксисбензотриазольная группа, MeIm — N-метилимидазол, Im — имидазол, МКХ — микроколоночная хроматография, ³²P — [³²P]фосфат. Префикс d (дезоксис) опущен, поскольку использовались олигонуклеотиды только дезоксириада.

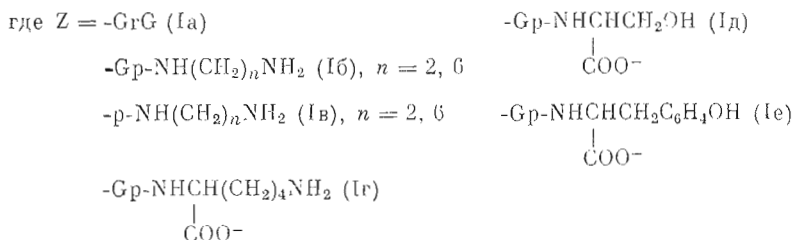
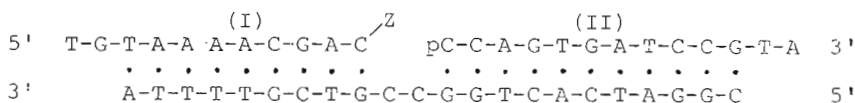
получения новых, более устойчивых и обладающих фосфорилирующим действием реагентов, которые можно было бы использовать для лигирования нуклеиновых кислот.

В связи с этим нами был осуществлен синтез и изучена реакционная способность нового типа производных — N-оксибензотриазоловых эфиров олигонуклеотидов [13]:



(R_pОВТ), где R — остаток олигонуклеотида. Изучение свойств этих соединений проводили в сравнении с хорошо известными фосфоимидазолидами олигонуклеотидов. Было установлено, что N-оксибензотриазоловые эфиры достаточно устойчивы в водной среде при pH ≤ 8 в отсутствие нуклеофильных катализаторов (имидазолиды устойчивы при pH ≥ 7). Установлено также, что в реакциях с amino- и гидроксисоединениями, протекающих в водной среде, N-оксибензотриазоловые эфиры олигонуклеотидов являются фосфорилирующими агентами и по своей реакционной способности превосходят соответствующие имидазолиды [13]. Использование N-оксибензотриазоловой активации фосфатной группы позволило нам получить производные олигонуклеотидов с аминокислотами и пептидами, не защищенными по карбоксильной группе: глицином, глицилглицином, аланином, лизином, серином и тирозином. При этом выходы соответствующих аминокислотных производных составляли 80–90% за 3–4 ч, в то время как при использовании имидазольной активации фосфата удается получить такие производные с выходом не более 30% за 24 ч [13]. Метод N-оксибензотриазоловой активации фосфатных групп является в настоящее время единственным, позволяющим с высокой эффективностью и строго селективно получать фосфамидные производные олигонуклеотидов при их взаимодействии с полифункциональными соединениями (например, белками).

Полученные данные о высокой реакционной способности N-оксибензотриазоловых эфиров олигонуклеотидов явились основанием для того, чтобы опробовать эти соединения в качестве реагентов для химического лигирования и, в частности, для синтеза ДНК-дуплексов с модифицированным сахарофосфатным остовом. В настоящей работе изучено химическое лигирование в синтетическом ДНК-дуплексе, в котором в качестве олигонуклеотида — акцептора фосфата мы использовали олигодезоксирибонуклеотиды, модифицированные по 3'-концу сахарофосфатного остова:



Синтез ДНК-дуплекса, содержащего остаток рибонуклеотида. Для введения остатка рибонуклеотида в заданное положение ДНК-дуплекса мы проводили конденсацию олигонуклеотидов (II) и (Iа) на комплементарной 22-звенной матрице. В качестве фосфорилирующих агентов использо-

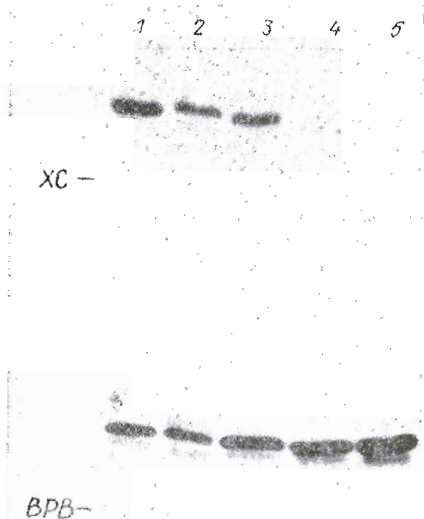


Рис. 1

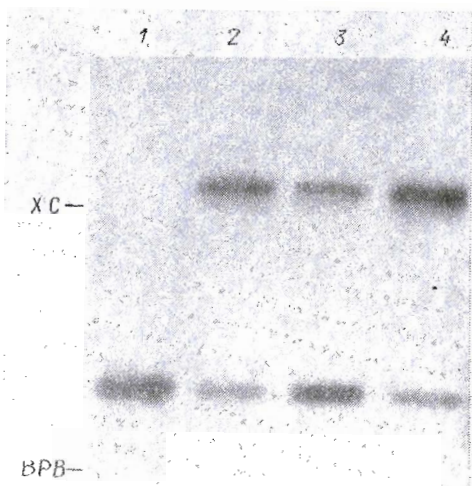


Рис. 2

Рис. 1. Анализ электрофорезом в денатурирующем ПААГ реакционных смесей, полученных при конденсации тридекануклеотида (Ia) с активированным эфиром (III) (1, 2) или имидазолидом (IV) (3, 4) в присутствии MeIm-буфера (1, 3) или в его отсутствие (2, 4); буферные растворы А и Б соответственно (см. таблицу). 5 — исходный тридекануклеотид (II). ВРВ и ХС — положение красителей бромфенолового синего и кемпидианола FР

Рис. 2. Анализ реакционных смесей, полученных при химическом лигировании (Ia) и оксибензотриазолового эфира (III) в буфере А (2) и Б (3) (см. таблицу), а также при лигировании (Ia) и (II) с помощью Т4-ДНК-лигазы (4). 1 — исходный тридекануклеотид (II)

вали N-оксибензотриазоловый эфир (III) или имидазолид (IV) тридекануклеотида $^{32}\text{pCCAGTGATCCGTA}$ (II), конденсацию проводили в условиях существования устойчивого комплементарного комплекса в присутствии катализатора — N-метилимидазола (буфер А) и в его отсутствие (буфер Б).

Анализ реакционных смесей осуществляли методом высоковольтного электрофореза в плоском 20% ПААГ в денатурирующих условиях с последующей радиоавтографией.

Результаты химического лигирования с участием соединений (III) и (IV) в буферах А и Б представлены на рис. 1 и в таблице. В случае N-оксибензотриазоловой активации образование 26-звенного продукта конденсации TGTA AAAACGACGrGCCAGTGATCCGTA (V) происходит как в присутствии, так и в отсутствие катализатора, катализ N-метилимидазолом повышает скорость реакции и несколько увеличивает эффективность лигирования (рис. 1, 1, 2). В случае имидазолида (IV) конденсация протекает только в присутствии N-метилимидазола (дорожка 3), что хорошо согласуется с ранее полученными данными [7, 11]. Эффективность лигирования в N-метилимидазольном буфере для обоих типов активации сравнима (см. таблицу), что свидетельствует о том, что в обоих случаях реакция протекает через промежуточное образование N-метилимидазолида. Возможность конденсации N-оксибензотриазоловых эфиров без участия MeIm указывает на то, что они являются более активными фосфорилирующими агентами, чем широко использующиеся имидазолиды олигонуклеотидов.

Образующиеся в результате химического лигирования олигонуклеотиды идентифицированы по подвижности в ПААГ с олигонуклеотидом, полученным при ферментативном лигировании (II) и (Ia) с помощью ДНК-лигазы (рис. 2).

Первичная структура продукта химического лигирования в случае

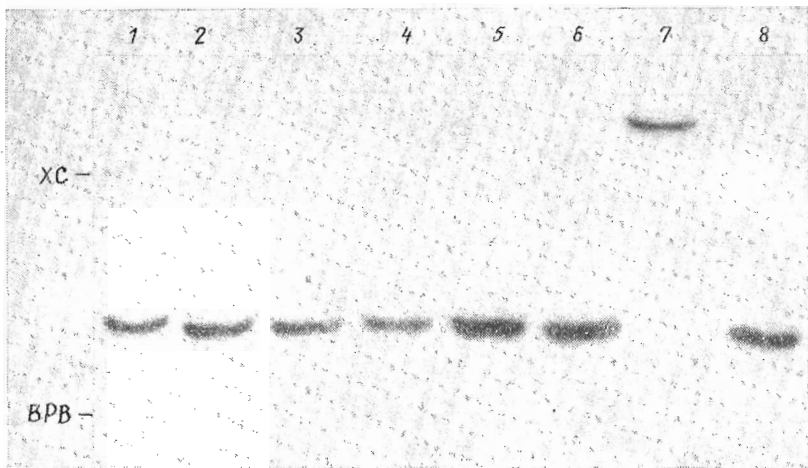


Рис. 3. Анализ продуктов щелочного гидролиза, полученных лигированием (Ia) и (III) в буфере А (1) и Б (2), (Ia) и (IV) в буфере А (3) и при ферментативном сшивании олигонуклеотидов (II) и (Ia) (4). В последнем случае гидролиз осуществляли также с помощью РНКаз: T₁ (5) и T₂ (6). 7 — продукт ферментативного лигирования, 8 — контрольный тридекануклеотид (Ia)

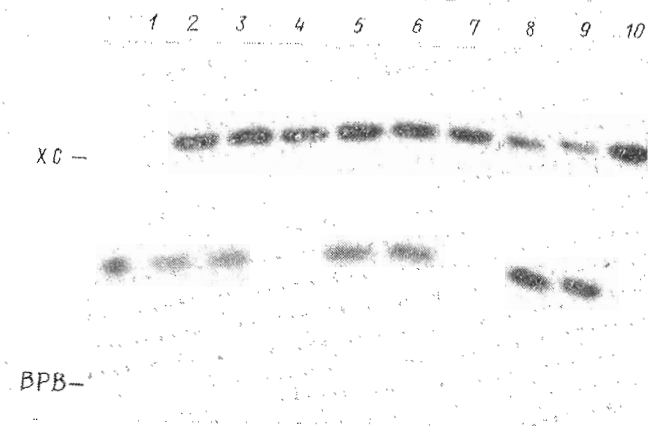


Рис. 4. Ферментативный гидролиз продуктов химического лигирования (анализ ПААГ): 4 — продукт лигирования в буфере А олигонуклеотидов (Ia) и (IV), 3, 2 — его гидролизат РНКазами T₁ и T₂ соответственно; 7 — продукт лигирования в буфере А олигонуклеотидов (Ia) и (III), 6, 5 — его гидролизат РНКазами T₁ и T₂ соответственно; 10 — продукт лигирования в буфере Б олигонуклеотидов (Ia) и (III), 9, 8 — его гидролизат РНКазами T₁ и T₂ соответственно. 1 — контрольный тридекануклеотид (Ia)

N-оксисбензотриазоловой активации фосфата подтверждена методом Максама — Гилберта.

Для подтверждения того, что образующийся в результате лигирования олигонуклеотид (V) содержит остаток рибонуклеотида в середине цепи, проводили его гидролиз щелочью и РНКазами T₁ и T₂. При обработке щелочью (0,3 М КОН, 16 ч, 37° С) происходило количественное расщепление продукта лигирования с образованием соединения, соответствующего по подвижности в ПААГ фосфорилированному тридекануклеотиду (Ia) (рис. 3, 1—4). Это свидетельствует о том, что при всех способах лигирования в образовании новой межнуклеотидной связи принимает участие *цис*-диольная группировка рибонуклеотида. Поскольку в реакции лигирования может участвовать как 2'-, так и 3'-гидроксильная группа остатка рибозы, образующаяся связь может быть 2'-5'- или 3'-5'-фосфо-

**Условия конденсации олигонуклеотида (Ia-e) с олигонуклеотидами (II),
(III) и (IV) на комплементарной 22-звенной матрице**
Концентрация олигонуклеотидов 10^{-3} М, 8° С

Донор фосфата (активирующая группа)	Акцептор фосфата — группа Z на схеме (см. текст)	Буфер **	Время реакции, ч	Выход, %					
IV (Im)	-CrG	A	40	47-50					
		B	90	0					
III (OBT)		A	40	57-60					
		B	90	45-48					
II (OH) *		B *	24	77-80					
III (OBT)	-Gp-NH(CH ₂) ₂ NH ₂	A	72	67-70					
		B	72	47-50					
III (OBT)	-Gp-NH(CH ₂) ₆ NH ₂	A	72	30-33					
		A	72	22-25					
		A	72	33-36					
III (OBT)	-Gp-NHCH(CH ₂) ₄ NH ₂	A	72	32-35					
	$\begin{array}{c} \\ \text{COO}^- \\ \\ \text{-Gp-NHCHCH}_2\text{OH} \end{array}$	A	72	3-5					
	$\begin{array}{c} \\ \text{COO}^- \\ \\ \text{-Gp-NHCHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH} \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$	A	72	5-8					

* Приведены данные по лигированию с неактивированным олигонуклеотидом (II) под действием T4-ДНК-лигазы в буфере В: 0,05 С трис-НСl, 0,01 М MgCl₂, 0,1 мМ EDTA, 0,01 М 2-меркаптоэтанол (рН 7,5).

** Состав буферных растворов: А — 0,4 М MeIm, 0,2 М NaCl, 0,12 М MgCl₂ (рН 8,0); В — 0,2 М HEPES, 0,1 М MgCl₂ (рН 8,75).

диэфирной. Для установления природы этой связи мы использовали ферменты: гуанинспецифичную РНКазу T₁ и РНКазу T₂, расщепляющие только 3'-5'-фосфодиэфирные связи в рибоолигонуклеотидах и не расщепляющие 2'-5'-фосфодиэфирные. Все полученные образцы 26-звенных продуктов (V) гидролизовали обеими РНКазами и установили, что соотношение 2'-5'- и 3'-5'-изомеров в этих олигонуклеотидах различно и зависит от способа лигирования. В то же время продукт ферментативного лигирования количественно гидролизовался обоими ферментами (рис. 3, 5, 6).

Во всех случаях химического лигирования получается смесь 2'-5'- и 3'-5'-изомеров. Продукт (V), образующийся при лигировании в N-метилимидазольном буфере с участием имидазолида (IV), расщепляется обоими ферментами на 25-27%, а образующийся с участием N-оксибензотриазолового эфира — на 40-42% (рис. 4, 2-7). Данные ферментативного гидролиза позволяют таким образом определить процентное содержание изомера с 3'-5'-фосфодиэфирной связью в продукте химического лигирования. Интересно, что продукт, образующийся при участии N-оксибензотриазолового эфира в отсутствие катализатора, отличается более высоким содержанием 3'-5'-изомера (до 70%) (рис. 4, 8-10).

Увеличение содержания природной 3'-5'-фосфодиэфирной связи при конденсации в отсутствие N-метилимидазола объясняется, по-видимому, тем, что в этом случае реакция идет по другому механизму (без промежуточного образования N-метилимидазолида).

Таким образом, мы установили, что N-оксибензотриазоловые эфиры олигонуклеотидов являются перспективными реагентами для синтеза ДНК-дуплексов, содержащих рибонуклеотидные звенья, причем в зависимости от условий лигирования можно получать олигомерные продукты с разным содержанием 2'-5'- и 3'-5'-изомеров. Предложенный метод активации фосфата может быть использован, по-видимому, и для химического лигирования олигонуклеотидов риборяда.

Введение полиметиленовых цепей в состав ДНК-дуплексов. С точки зрения структурных исследований биополимеров представляет интерес

введение в сахарофосфатный остов полинуклеотидов различных неприродных звеньев. Так, «встраивание» углеводородных цепей приведет к нарушению стэкинг-взаимодействия в полинуклеотиде и, следовательно, к локальному изменению его вторичной структуры. Такие модифицированные полинуклеотиды могут использоваться для изучения структурной организации нуклеиновых кислот, белково-нуклеиновых взаимодействий, а также применяться в качестве специфических гибридизационных зондов.

Получить полинуклеотид, содержащий в своей структуре полиметилновый фрагмент, вероятно, проще всего путем введения в его сахарофосфатный остов остатка алифатического диамина. Мы использовали для этой цели тот же подход, что и ранее, — химическое лигирование с *N*-оксибензотриазоловой активацией концевой фосфатной группы. Для получения ДНК-дуплекса, в котором одно нуклеотидное звено заменено на остаток алифатического диамина, мы проводили конденсацию производных олигонуклеотидов (II) и (Iб, $n=2,6$) на комплементарной матрице. Для получения ДНК-дуплекса, в котором остаток диамина заменяет два нуклеотидных звена, мы конденсировали на матрице олигонуклеотиды (II) и (Iв, $n=2,6$). При этом 5'-концевая фосфатная группа (II) ковалентно сшивалась с алифатической аминогруппой 3'-аминоалкиламидами (Iб) и (Iв).

Исходными соединениями для синтеза (Iб) и (Iв) служили 3'-фосфорилированные олигонуклеотиды TGTAАААСGАСр (VI) и TGTAААЛСGАСр (VII), которые были получены из (Iа) и TGTAАААС·GАСrG (VII) соответственно путем окисления 3'-концевого остатка рибозы 0,4 М водным раствором NaIO_4 с последующим β -элиминированием под действием 1 М водного циклогексиламина. Степень превращения исходных олигонуклеотидов в соответствующие 3'-фосфаты, по данным микроколоночной хроматографии (МКХ), составляла не менее 95%.

Аминоалкиламидные производные (Iб) и (Iв) получали прямой конденсацией олигонуклеотидов (VI) и (VII) с этилендиамином или гексаметилендиамином под действием 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимида в водной среде [14]. По данным МКХ, степень превращения фосфорилированных олигонуклеотидов (VI) и (VII) в их аминоэтиламиды практически количественная, а в аминогексиламиды — не ниже 90%.

При конденсации олигонуклеотидов в дуплексе, содержащем в разрыве цепи пропуск одного нуклеотидного звена, было установлено, что реакция *N*-оксибензотриазолового эфира (III) с аминоэтиламидом (Iб, $n=2$) додекануклеотида (VI) протекает как в присутствии, так и в отсутствие MeIm (рис. 5, 4, 5). Однако при наличии катализатора (буфер А) эффективность реакции выше. При замене этилендиамина на гексаметилендиамин катализ MeIm становится необходимым условием протекания реакции (рис. 5, 6, 7). Эффективность конденсации с аминогексиламидом (Iб) ниже, чем при конденсации этилендиаминового производного (рис. 5, таблица), что связано, вероятно, с увеличением основности свободной аминогруппы в аминогексиламиде, а также с более высокой, чем в этилендиаминах, подвижностью углеводородной цепи.

При синтезе ДНК-дуплекса, в котором два нуклеотидных звена заменены на остаток этилендиамина, эффективность химического лигирования резко падает по сравнению с дуплексом, где пропущено одно звено (таблица, рис. 6, 4). Очевидно, длины этилендиаминового мостика недостаточно для того, чтобы обеспечить пространственное сближение реагирующих амино- и фосфатной групп в таком дуплексе. Более протяженный остаток гексаметилендиамина обеспечивает сближение реагирующих групп как в дуплексе с пропуском одного нуклеотидного звена, так и в дуплексе с пропуском двух нуклеотидных звеньев, поэтому эффективность химического лигирования в случае аминогексиламидов в обоих этих дуплексах одинакова и составляет 30–35%.

Наличие фосфамидных связей в олигонуклеотидах, полученных путем химического лигирования и содержащих этилендиаминовый или гексаметилендиаминовый мостик, подтверждали кислотным гидролизом в услови-

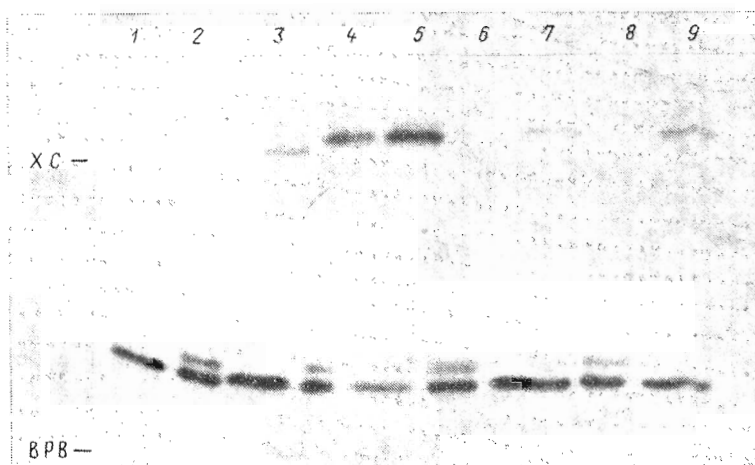


Рис. 5

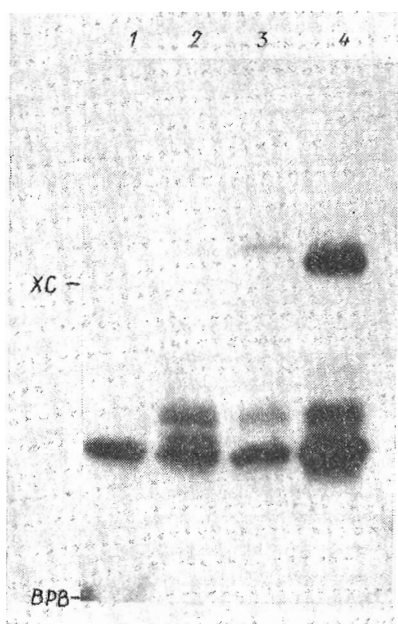


Рис. 6

Рис. 5. Анализ реакционных смесей, полученных конденсацией активированного эфира (III) с аминогексиламидом (Iв, $n=6$) (2, 3), аминоэтил-амидом (Iб, $n=2$) (4, 5), аминогексиламидом (Iб, $n=6$) (6, 7) и с лизинным производным (Iг) (8, 9) в буфере Б (без MeIm, 2, 4, 6, 8) и буфере А (в присутствии MeIm, 3, 5, 7, 9). 1 — исходный тридекануклеотид (II)

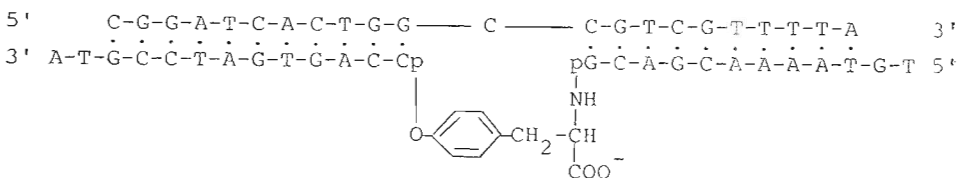
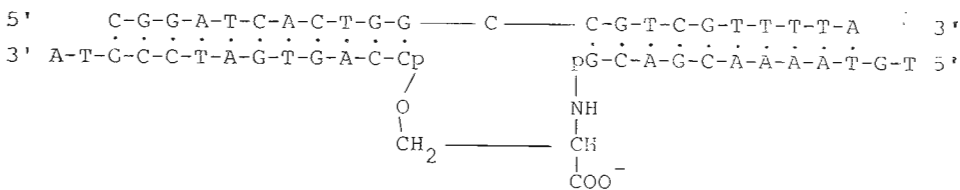
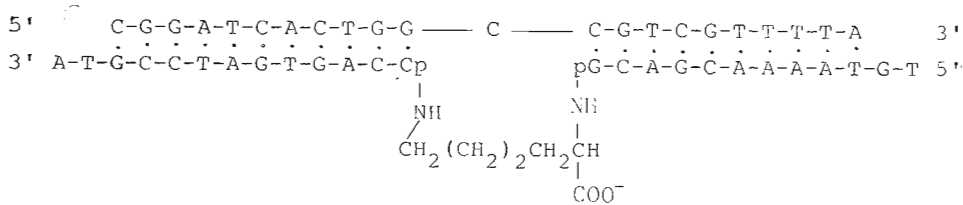
Рис. 6. Анализ реакционных смесей, полученных при химическом лигировании в буфере А эфира (III) с сериновым производным (Iд) (2), тирозиновым производным (Iе) (3), аминоэтил-амидом (Iв, $n=2$) (4). 1 — исходный тридекануклеотид (II)

ях избирательного расщепления фосфоамидной связи (15% CH_3COOH , 30 мин, 50°C). Анализ всех гидролизатов электрофорезом в ПААГ показал расщепление соединений, содержащих фосфамидные связи, с образованием исходного тридекануклеотида (II).

Полученные нами 24- и 25-звенные олигонуклеотиды, содержащие остатки этилендиамина и гексаметилендиамина, используются в настоящее время для направленного мутагенеза ДНК фага M13.

Введение в состав ДНК-дуплекса аминокислотных остатков. Важность получения таких соединений, в которых в сахарофосфатную цепь ДНК встроена аминокислота или пептид, обусловлена тем, что они являются моделями природных нуклеотидопептидных структур, присутствующих в хромосомных ДНК из различных эукариотических систем и, возможно, участвующих в прикреплении ДНК к структурам ядра [15]. До сих пор были синтезированы только простейшие нуклеотидопептиды такого типа, состоящие из двух нуклеотидов, связанных между собой аминокислотой [15]. Структур, в которых аминокислота соединяла бы длинные полинуклеотидные цепи, синтезировать не было.

Используя N-оксибензотриазоловую активацию фосфатной группы, мы синтезировали олигонуклеотидные дуплексы, в которых одно нуклеотидное звено заменено на остаток лизина, серина или тирозина:

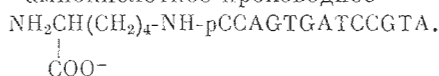


Для получения этих дуплексов проводили матрично-направляемую конденсацию N-оксибензотриазолового эфира олигонуклеотида (II) с производным додекануклеотида, содержащим остаток соответствующей аминокислоты (Iг-e).

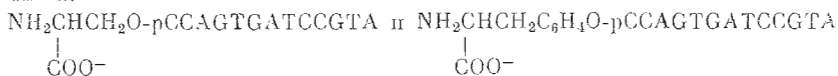
Аминокислотные производные (Iг-e) получали путем обработки N-оксибензотриазолового эфира (IX) додекануклеотида (VI) 1 M водными растворами лизина (pH 9,0), серина (pH 9,6) или тирозина (pH 11,2) в течение 16 ч при 8° С. По данным МКХ, степень превращения (VI) в соответствующие аминокислотные производные составляла 80–90%. Соотношение продуктов присоединения лизина к олигонуклеотиду (VI) по α- и ε-аминогруппам = 5:1, в случае серина и тирозина продуктов присоединения аминокислот по гидроксигруппе не обнаружено.

При изучении матрично-направляемой конденсации активного эфира (III) и лизинового производного (Iг) было установлено, что реакция эффективно протекает только в присутствии MeIm. Выход 25-звенного олигонуклеотида, содержащего остаток лизина, составил 35% (рис. 5, 8, 9). Замена аминогруппы лизина в соединении (Iг) на менее нуклеофильную гидроксигруппу серина в соединении (Iд) или тирозина в соединении (Iе) приводит к резкому снижению эффективности конденсации. Выход 25-звенного продукта, содержащего остаток серина, составляет всего 3–4%; продукта, содержащего остаток тирозина, — 5–8% (рис. 6, 2, 3).

Все полученные нами олигонуклеотиды, содержащие аминокислотные остатки в сахарофосфатном остове, расщепляются 15% CH_3COOH (0,5 ч, 50° С), что подтверждает наличие в них фосфамидных связей (рис. 7, 2, 4, 7). В результате гидролиза олигонуклеотида, содержащего в середине цепи остаток лизина, образуется тридекануклеотид (II) и продукт неполного гидролиза — аминокислотное производное



В результате гидролиза продуктов, содержащих остатки серина и тирозина, образуются только аминокислотные производные фосфодиэфирного типа:



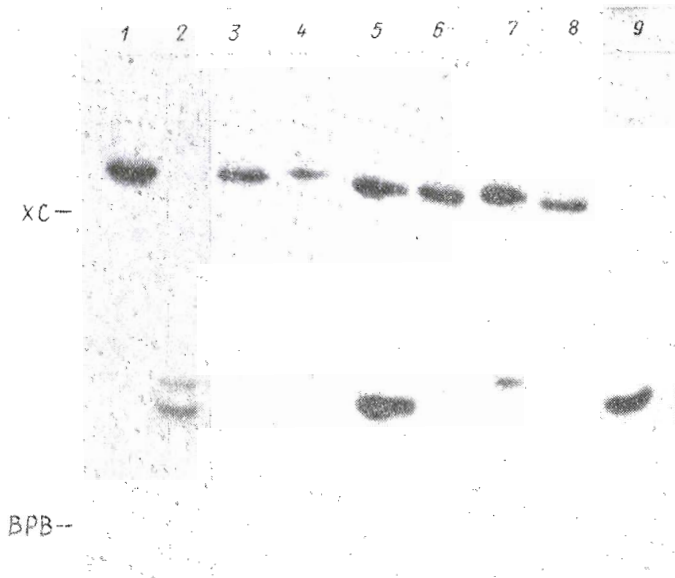


Рис. 7. Анализ гидролизатов, полученных при кислотной и щелочной обработках олигонуклеотидов, содержащих аминокислотные остатки. Продукт лигирования с остатком серина (3) после щелочного (5) и кислотного (4) гидролизом. Продукт, содержащий остаток тирозина (6), после кислотного (7) и щелочного (8) гидролизом. Продукт, содержащий остаток лизина (1), после кислотного гидролиза (2). 9 — контрольный тридекануклеотид (II)

Известно, что сериновые эфиры мононуклеотидов гидролизуются в щелочной среде по механизму β -элиминирования, в то время как тирозиновые эфиры в щелочной среде стабильны [16]. На основании этих данных можно было предположить, что полученный нами продукт, содержащий остаток серина, будет гидролизоваться в щелочной среде с образованием тридекануклеотида (II), а продукт, содержащий остаток тирозина, не будет подвергаться щелочному гидролизу. Действительно, инкубация указанных соединений в концентрированном водном растворе аммиака (16 ч, 50° С) привела к расщеплению только олигонуклеотида, содержащего остаток серина (рис. 7, 5, 8). Все эти данные подтверждают наличие остатков аминокислот в их сахарофосфатном остове.

Таким образом, предложенные N-оксибензотриазоловые эфиры олигонуклеотидов оказались эффективными фосфорилирующими агентами в реакциях химического лигирования. С помощью этих соединений были синтезированы ДНК-дуплексы с различными модификациями сахарофосфатного остова. Важно подчеркнуть, что при получении ДНК-дуплексов со встроенными в олигонуклеотидную цепь аминокислотами N-оксибензотриазоловая активация фосфатной группы использовалась на всех стадиях синтеза: как при получении аминокислотных производных, так и при химическом лигировании. Альтернативного метода, позволяющего так же быстро и эффективно синтезировать полимерные нуклеотидопептидные структуры, до настоящего времени не разработано. Свободная карбоксильная группа, содержащаяся в полученных модифицированных ДНК-дуплексах, уникальна в структуре олигонуклеотидов, и путем ее избирательной активации возможно дальнейшее присоединение к ней различных соединений с заданными свойствами.

Авторы выражают благодарность В. А. Петренко, П. И. Позднякову и Г. Ф. Сиволобовой (ВНИИ молекулярной биологии, Кольцово) за любезно предоставленные ими олигонуклеотиды и С. А. Кузнецовой за помощь в проведении кислотного гидролиза.

В работе использованы N-гидроксibenзотриазол (Fluka, Швейцария); гидрохлорид 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид, дигидрохлорид этилендиамина (Merck, ФРГ); 1,6-диаминогексан, АТР, акриламид, N,N'-метиленисакриламид (Serva, ФРГ), аминокислоты (Reanal, ВНР); РНКазы T₁ и T₂ (Sigma, США); остальные реактивы отечественного производства.

Ионообменную МКХ проводили на колонках (2×62 мм) с полисилоном СА в лисейном градиенте калий-пирофосфатного буфера (0–0,12 М, рН 7,0) в 20% водном ацетонитриле на приборе «Мидхром» отечественного производства. Гель-фильтрацию осуществляли на колонке (8×170 мм) с биогеом Р-2 (200–400 меш, Bio-Rad, США). Гель-электрофорез проводили в пластинах 20% ПААГ в 0,05 М трис-боратном буфере (рН 8,3), содержащем 1 мМ EDTA.

Получение 3'-фосфорилированных олигонуклеотидов (VI) и (VII). Олигонуклеотид (Ia) или (VIII) в количестве 10–100 нмоль растворяли в 50 мкл 0,1 М водного раствора NaIO₄ и выдерживали 10 ч при 20°С. Затем олигонуклеотид отделяли от солей на биогеом Р-2, упаривали, растворяли в 1 М циклогексиламине и выдерживали 16 ч при 20°С. Полученный 3'-фосфорилированный олигонуклеотид обессоливали гель-фильтрацией на биогеом Р-2 и анализировали МКХ на полисиле СА.

Синтез N-оксibenзотриазоловых эфиров (II), (IX) олигонуклеотидов (II) и (VI) проводили по методике [14]. К олигонуклеотиду (1–10 нмоль), растворенному в 5 мкл воды, добавляли 25 мкл 2 М раствора N-оксibenзотриазола в 60% водном диметилформамиде с рН 5,5 и 3 мг 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид. Реакционную смесь инкубировали 2,5–3 ч при 8°С, затем добавляли 100 мкл 2 М водного раствора LiClO₄ и 1 мг ацетона. Смесь перемешивали, выдерживали 5 мин при 0°С и центрифугировали 5 мин (скорость 8000 об/мин). Супернатант сливали, а осадок растворяли в 50 мкл 2 М LiClO₄, добавляли 500 мкл ацетона, пересаждали как указано выше и промывали 300 мкл ацетона. По данным МКХ, степень превращения олигонуклеотида в N-оксibenзотриазоловый эфир не ниже 95–98%.

Синтез имидазолида (IV) тридекануклеотида (II) проводили по методу [14]: 4–10 нмоль олигонуклеотида (II) растворяли в 20 мкл 3 М имидазола (рН 6,0), добавляли 2–3 мг 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид и выдерживали 2,5–3 ч при 8°С. Затем добавляли 100 мкл 1 М ацетата калия (рН 7,0) и 1 мл этанола. Смесь перемешивали, выдерживали 10 мин при –70°С и центрифугировали 5 мин (8000 об/мин). Супернатант сливали, осадок растворяли в 50 мкл 1 М ацетата калия, пересаждали 500 мкл этанола как описано выше и промывали 300 мкл этанола. По данным МКХ, степень превращения (II) в его имидазолид (IV) не ниже 90%.

Химическое лигирование. Упаренные досуха 22-звенный олигонуклеотид-матрицу (0,022 ОЕ₂₆₀) и олигонуклеотид-акцептор фосфата (Ia)–(Ie) (0,02 ОЕ₂₆₀) растворяли в 5 мкл буфера А или Б (выбор буфера для химического лигирования обоснован в тексте), охлаждали до 10°С и прибавляли к предварительно осажденному N-оксibenзотриазоловому эфиру (III) олигонуклеотида (II) (или имидазолиду (IV)) (0,015 ОЕ₂₆₀). Смесь инкубировали при 8–10°С в течение времени, указанного в таблице, затем осаждали олигонуклеотиды 200 мкл 2% раствора LiClO₄ в ацетоне, промывали осадок 200 мкл ацетона и анализировали в 20% ПААГ.

Ферментативное лигирование. Упаренные досуха 22-звенный олигонуклеотид-матрицу (0,022 ОЕ₂₆₀), тридекануклеотид (II) (0,026 ОЕ₂₆₀) и тридекануклеотид (Ia) (0,03 ОЕ₂₆₀) растворяли в 10 мкл 50 мМ трис-НСl-буфера (рН 7,5), содержащего 10 мМ MgCl₂, 0,1 мМ EDTA, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ АТР. Добавляли 5 ед активности T₄-ДНК-лигазы и смесь инкубировали 24 ч при 8°С, затем упаривали в вакууме и анализировали электрофорезом в ПААГ.

Ферментативный гидролиз. Полученные после электрофореза зоны радиоактивности, соответствующие продукту лигирования (V), вырезали, приливали к ним 800 мкл 0,5 М водного LiClO₄ и выдерживали 4 ч при 37°С. Элюат концентрировали до объема 200 мкл n-бутанолом и осаждали олигонуклеотид 1 мл ацетона, как описано выше. Осадок растворяли в 3 мкл 50 мМ трис-НСl-буфера, рН 7,0, добавляли 1 мкл РНКазы T₁ (концентрация 1 мг/мл) и инкубировали 1,5 ч при 37°С. Гидролиз РНКазой T₂ проводили аналогично по методике [17] (1,5 ч, 37°С, 20 мМ аммоний-ацетатный буфер, рН 4,5; концентрация фермента 0,2 мг/мл).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецова С. А., Ивановская М. Г., Готтх М. Б., Елов А. А., Шабарова З. А. // Био-орган. химия. 1988. Т. 14. № 4. С. 490–499.
2. Невиский Г. А., Фролова Е. И., Лесина А. С., Подуст В. Н., Лебедев А. В. // Био-орган. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 45–57.
3. Hamblin M. R., Cummins J. H., Potter B. V. L. // Biochem. J. 1987. V. 241. № 3. P. 827–833.
4. Ohtsuka E., Ishino Y., Ibaraki K., Ikehara M. // Eur. J. Biochem. 1984. V. 139. № 2. P. 447–450.
5. Connolly B. A., Potter B. V. L., Eckstein F., Pingoud A., Grotzahn L. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 13. P. 3443–3453.
6. 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.

7. *Shabarova Z. A.* // In: Physicochemical biology reviews. Soviet Scientific Reviews. Section D./Ed. Skulachev V. P. Harwood Acad. Publ. GmbH. 1984. P. 1-51.
8. *Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Drutsa V. L., Melnikova N. P., Furnal A. A.* // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 21. P. 5747-5759.
9. *Kanaya E., Yanagawa H.* // Biochemistry. 1986. V. 25. № 23. P. 7423-7430.
10. *Inoue T., Orgel L. E.* // Science. 1983. V. 219. № 4586. P. 859-862.
11. *Shabarova Z. A., Ivanovskaya M. G., Isaguliants M. G.* // FEBS Lett. 1983. V. 154. № 2. P. 288-291.
12. *Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М.* // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475-481.
13. *Ивановская М. Г., Гортух М. Б., Шабарова З. А.* // Докл. АН СССР. 1987. Т. 293. № 2. С. 477-481.
14. *Ivanovskaya M. G., Gottikh M. B., Shabarova Z. A.* // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 5. P. 913-924.
15. *Юодка Б. А., Курьялене В. А.* // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 8. С. 1073-1078.
16. *Юодка Б. А.* // Ковалентные нуклеиново-белковые структуры и их химическое моделирование. Вильнюс: Мокслас, 1985. С. 176.
17. *Nomoto A., Fon Lee., Wimmer E.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. № 2. P. 375-380.

Поступила в редакцию
17.VII.1987

CHEMICAL REACTIONS IN DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS.

VI. HYDROXYBENZOTRIAZOLE ESTERS OF OLIGONUCLEOTIDES AS REAGENTS FOR SYNTHESIZING DNA DUPLEXES WITH THE MODIFIED SUGAR-PHOSPHATE BACKBONE

GOTTIKH M., IVANOVSKAYA M., SHABAROVA Z.

M. V. Lomonosov State University, Moscow

With the aid of a new type of phosphorylating agents, N-hydroxybenzotriazole phosphodiester of oligonucleotides, template-directed synthesis of DNA duplexes was carried out with ribonucleotide, aliphatic diamine or amino acid residues at a predetermined position of the sugar-phosphate backbone. Introduction of a ribonucleotide into an oligonucleotide strand gives rise to a mixture of 2'-5' and 3'-5' isomers, whose ratio depends on the condensation conditions. Residues of amino acids (lysine, serine, tyrosine) or aliphatic diamines were substituted for one or two mononucleotides in the duplex. Phosphoamide bonds with the participation of an aliphatic diamine or lysine are formed most efficiently in the presence of N-methylimidazole and if the reacting groups are in the close proximity to each other. Phosphodiester bond synthesis with the participation of hydroxy groups of serine or tyrosine proceeds less effectively. Oligonucleotide N-hydroxybenzotriazole esters exceeds previously used phosphoimidazolides in efficiency of the chemical ligation. An amino acid residue incorporated into the duplex may be used in construction of new compounds by joining the carboxyl with various groups.