



УДК 547.963.32.05 : 577.152.61
© 1991 г.

Е. В. Шубанова, [С. А. Филиппов], Д. С. Есипов,
В. Г. Коробко, В. Н. Добрынин

ЭНЗИМАТИЧЕСКОЕ ЛИГИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК, СОДЕРЖАЩИХ ФОСФАМИДНУЮ МОДИФИКАЦИЮ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Синтезированы и выделены в индивидуальном виде стереомерные фрагменты ДНК, несущие фосфамидную (циклогексиламидную или морфолидную) модификацию в сахаро-фосфатном остове. Установлена конфигурация хиральных амидофосфатных групп в модифицированных ДНК на основании химической корреляции со стандартными тиофосфатными аналогами. Выяснена зависимость времени удерживания амидированных фрагментов ДНК в условиях обращенно-фазовой хроматографии от конфигурации хирального атома фосфора: R_p -стереомеры обладают меньшим временем удерживания в сравнении с S_p -стереомерами. Установлено, что при лигировании под действием T4-ДНК-лигазы наличие в сшиваемых компонентах фосфатамидной группы и ее конфигурация оказывают влияние на результат образования новой фосфодиэфирной связи. Посредством ферментативных сшивок модифицированных и немодифицированных блоков получены 31-мерные ДНК с сайтами эндонуклеаз рестрикции *FokI* и *EcoRI*, расположенными друг относительно друга таким образом, что места расщепления обеих рестриктаз совпадают, причем именно эти межнуклеотидные группы несут фосфамидную модификацию. Исследовано расщепление указанными рестриктазами двуцепевых ДНК, в которых лишь одна из цепей модифицирована и содержит амидофосфатную группу с определенной конфигурацией: S_p -конфигурация не препятствует расщеплению немодифицированной цепи обеими рестриктазами, тогда как R_p -конфигурация позволяет расщепить немодифицированную цепь рестриктазой *FokI* и препятствует ее расщеплению эндонуклеазой *EcoRI*.

Утрачивание межнуклеотидными группами ДНК отрицательного заряда в результате замены фосфодиэфирной группировки на фосфотриэфирную, метилфосфонатную или на фосфамидную делает модифицированное фосфатное звено устойчивым к действию экзо- и эндонуклеаз [1—3], относящихся к разряду фосфодиэстераз. Утрачивается ли вместе со способностью расщепляться и способность модифицированных ДНК быть узнаваемыми эндонуклеазами рестрикции?

Для исследования взаимодействия ферментов с модифицированными по межнуклеотидным фосфатам нуклеиновыми кислотами мы запланировали синтез модельной двухцепочечной ДНК с сайтами эндонуклеаз *FokI* и *EcoRI* (рис. 1). Рестриктаза *FokI* узнает в одной из цепей ДНК последовательность GGATG и расщепляет фосфодиэфирную связь на расстоянии 9 нуклеотидных звеньев за этой последовательностью, в другой цепи фермент узнает комплементарную последовательность CATCC и расщепляет сахаро-фосфатный остов между 13-м и 14-м звеньями перед этой последовательностью. Рестриктаза *EcoRI* узнает гексануклеотидную последовательность GAATTC и гидролизует обе цепи между G и A. В запланированной ДНК эти сайты узнавания расположены таким образом, что места расщепления обеих рестриктаз оказались совмещенными. Именно эти фосфо-

Использованные сокращения: DMTr — диметокситригил, MeIm — N-метилимидазол, MSNT — 1-(2-метилсульфонил)-3-нитро-1,2,4-триазол, Py — пиридин, SVPDE — фосфодиэстераза змеиного яда, BAP — бактериальная щелочная фосфатаза. Индексы «f» и «s» в названии олигонуклеотида обозначают соответственно меньшее и большее время удерживания индивидуального стереоизомера олигонуклеотида на обращенно-фазовой колонке.

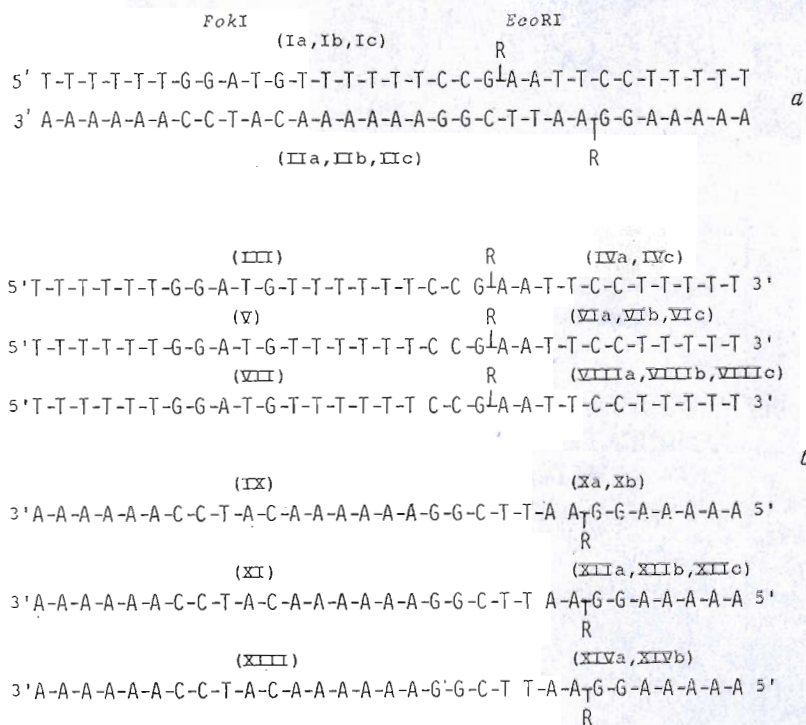


Рис. 1. Строение модифицированных ДНК-дуплексов. *a* — *P*-модифицированный 31-мерный дуплекс с сайтами узнавания эндонуклеаз *FokI* и *EcoRI*. *б* — разбивка верхней и нижней цепей на блоки, исследованные в ферментативном лигировании. Буква «а» при римской цифре или отсутствие буквы указывают на немодифицированный вариант олигонуклеотида (R = OH); соединения, содержащие в качестве заместителя (R) морфолидную группу, обозначены буквой «б», циклогексиламидную группу — буквой «с»

диэфирные связи решено было модифицировать, придав им фосфамидный характер за счет введения морфолидного или циклогексиламидного остатков.

Введение нового заместителя в межнуклеотидный фосфат придает атому фосфора хиральность, обуславливающую появление двух стереомеров. При формировании двухцепочечной ДНК заместитель, модифицирующий межнуклеотидное звено (в нашем случае амидный остаток), в зависимости от конфигурации фосфорного центра оказывается ориентированным либо в сторону большой бороздки, либо наружу от сахара-фосфатного остова (рис. 2).

Отмеченные пространственные особенности *P*-модифицированных дуплексных ДНК побудили нас получить каждый из стереомерных амидированных олигонуклеотидов в индивидуальном виде. Предвидя сложность разделения модифицированных 31-меров на индивидуальные стереомеры, мы намеревались получить их путем сборки из синтетических фрагментов (коротких *P*-модифицированных и более протяженных немодифицированных) посредством энзиматического лигирования. Однако нам не было известно, какие ограничения на протекание лигазных реакций накладывает 1) наличие фосфамидной модификации в сахаро-фосфатном остове сшиваемых компонентов, 2) размещение фосфамидного звена по отношению к месту сшивки, 3) конфигурация хирального атома фосфора. Чтобы выяснить влияние всех этих факторов на результат энзиматического лигирования, были синтезированы и выделены *P*-модифицированные и немодифицированные блоки, составляющие запланированную ДНК (рис. 1б). При этом было предусмотрено несколько вариантов расположения модифицированного звена как в фосфатном, так и в гидроксильном компонентах, участвующих в лигазных реакциях.

Немодифицированные фрагменты ДНК были синтезированы твердо-

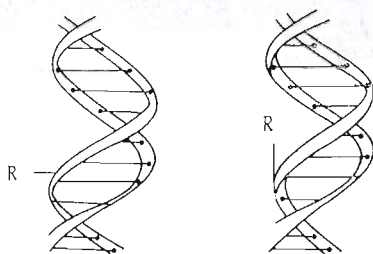


Рис. 2. Схема пространственного строения двухцепочечных ДНК, показывающая две возможные ориентации заместителя, модифицирующего межнуклеотидный фосфат одной из цепей, в зависимости от конфигурации фосфорного центра

фазным *N*-фосфонатным методом. Синтез *P*-модифицированных блоков не потребовал приготовления специализированных синтонов, так как целиком базировался на ключевых соединениях фосфамидитного и *N*-фосфонатного методов. В направлении от 3'-конца цепь наращивалась вплоть до места модификации за счет фосфамидитных конденсаций с *N*-ацил-5'-DMTr-2'-дезоксинуклеозид-3'-(*N,N*-диизопропиламино)метоксифосфинами. Далее посредством *N*-фосфонатной конденсации создавалась гидрофосфорильная межнуклеотидная связь, которая путем окислительного амидирования в условиях реакции Атертона — Тогда превращалась в морфолидофосфатную или циклогексиламидофосфатную. Завершали построение олигонуклеотидной цепи фосфитамидным методом, исключение составил блок (pIVc)*, завершающая стадия в его синтезе заключалась в 5'-концевом химическом фосфорилировании, для чего была проведена конденсация с *n*-нитрофенилэтил-*N*-фосфонатом, описанная нами ранее [4].

Опасаясь, что β-цианэтильная защита на межнуклеотидных фосфатах не выдержит присутствия сильного основания в реакции Атертона — Тогда, мы отдавали предпочтение метильным синтонам при построении 3'-концевого участка олигонуклеотидов. Однако в условиях специально проведенного синтеза с использованием β-цианэтильных синтонов было показано, что эта защитная группа выдерживает непродолжительное воздействие триэтиламина, необходимого компонента в реакции окислительного амидирования фосфонатов, и тем самым была устранена необходимость прибегать к применению в синтезе менее эффективных метильных синтонов.

Выделение синтезированных *P*-модифицированных олигонуклеотидов выполнено с помощью двух последовательных обращенно-фазовых ВЭЖХ. Сначала от побочных отделили главные продукты в форме их 5'-DMTr-производных. Здесь еще не достигается разделение на стереомеры. Способность разделяться на быстрый (*f*) и медленный (*s*) компоненты в условиях повторной ВЭЖХ проявилась у соединений (IVc), (VIb), (VIc), (VIIIb), (VIIIc), (Xb), (XIb), (XIc) и (XIVb) лишь после 5'-деблокирования. В отличие от 5'-гидроксильного соединения (IVc) его 5'-фосфатный аналог (pIVc) не удалось хроматографическими методами разделить на быстрый и медленный компоненты. По этой причине олигонуклеотид (pIVc) испытывался в лигазной реакции в виде неразделенной смеси стереомеров.

ДНК-лигаза бактериофага T4 катализирует при участии АТФ образование связи между 5'-фосфатом одного компонента и 3'-гидроксильным другим компонентом, когда они оба правильно расположены друг относительно друга на комплементарной матрице. С этой целью соединения, которым отводилась роль фосфатных компонентов в лигазных реакциях а именно (IX), (XI), (XIII), а также индивидуальные стереомеры (VIb-f) (VIb-s), (VIc-f), (VIc-s) и (VIIIb-f), (VIIIb-s), (VIIIc-f), (VIII-s), был

* Здесь и далее префикс «р» в обозначении олигонуклеотида означает, что он 5'-фосфорилирован химически или ферментативно.

подвергнуты 5'-фосфорилированию с помощью АТР и Т4-полинуклеотидкиназы. Подобным образом были фосфорилированы и немодифицированные олигонуклеотиды (IVa), (VIa), и (VIIIa).

Для исследования поведения *P*-модифицированных ДНК в реакции, катализируемой Т4-ДНК-лигазой, использовался прием лигирования по цепям [5]: в шивке участвуют фосфатный и гидроксильный компоненты лишь одной цепи, компоненты противоположной цепи не фосфорилированы и выполняют роль комплементарных подложек. Это дает возможность отделить продукт шивки от не вступивших в реакцию олигонуклеотидов и вспомогательных подложек посредством электрофореза в ПААГ. Таким путем было установлено, что ни один из стереомеров (Xb) не способен сшиваться ДНК-лигазой с (pIX) на немодифицированных подложках (III) + (IVa). Отметим, что результаты этих реакций оценивались в непосредственном сопоставлении с результатами шивки немодифицированных (Xa) + (pIX) на тех же подкладочных олигонуклеотидах. Подобным контролем сопровождались все остальные опыты по лигированию, результаты которых приводятся ниже.

Когда место модификации в гидроксильном компоненте удалено на одно звено от 3'-конца, в лигазной шивке с (pXI) способен участвовать лишь 9-мер с меньшей хроматографической подвижностью (XIIc-s), в то же время стереомер с большей хроматографической подвижностью (XIIc-f), в тех же условиях оказался абсолютно не способным сшиваться с тем же фосфатным компонентом. Подобным образом ведут себя в лигазной реакции и морфолидные аналоги (XIIb-s) и (XIIb-f): первый из них способен участвовать в шивке, а второй — нет. Когда модифицированное звено в НО-компонентах удалено еще более от места энзиматической реакции, как в случае нуклеотида (XIVb), то оба его стереомера, f и s, беспрепятственно участвуют в шивке с (pXIII), образуя соответственно цепи (IIb-f) и (IIb-s).

Таким образом, наличие фосфамидной модификации в НО-компоненте препятствует лигированию в случае, когда модифицированное звено расположено в непосредственной близости от 3'-конца. Перемещение фосфамидной модификации на одно звено дальше от места лигирования выявило зависимость результата энзиматической реакции от конфигурации амидированного фосфата. Что же препятствует лигированию — оккупирование амидным заместителем большой бороздки ДНК или его направленность в сольватный объем, наружу от сахара-фосфатного остова? Ответить на этот вопрос оказалось возможным лишь после приписания конфигурации хиральным атомам фосфора.

Индивидуальные циклогексиламидные 9-меры (XIIc-f) и (XIIc-s) были гидролизваны по немодифицированным межнуклеотидным фосфатным связям с помощью фосфодиэстеразы змеиного яда в присутствии фосфомоноэстеразы и соответственно образовавшиеся амидированные динуклеозидфосфаты (XVII-s) и (XVII-f) отделены хроматографически от мономерных продуктов.

Для корреляции абсолютной конфигурации были синтезированы и выделены в индивидуальном состоянии полностью защищенные циклогексиламидотрифосфатные блоки, различающиеся хроматографической подвижностью — (XV-f) и (XV-s). Каждое из этих соединений было подвергнуто ряду превращений (см. схему). С одной стороны, из соединения (XV-f) путем его деблокирования и последующей десульфуризации с помощью H_2O_2 получена амидированная двойка (XVII-f), а из блока с меньшей хроматографической подвижностью (XV-s) тем же путем получено соединение (XVII-s), уступающее по подвижности стереомеру (XVII-f). С другой стороны, из тех же защищенных тиофосфамидов (XV-f) и (XV-s) путем нитрозирования с изоамилнитритом в среде уксусная кислота — пиридин были получены индивидуальные тиофосфаты, соответственно S_p -(XVI) и R_p -(XVI), конфигурация которых была уже известна [6]. Принимая во внимание, что обе реакции, и дезаминирования [7], и десульфуризации [8], протекают с сохранением конфигурации, сделано отнесение неизвестной конфигурации фосфамидов к известной конфигура-

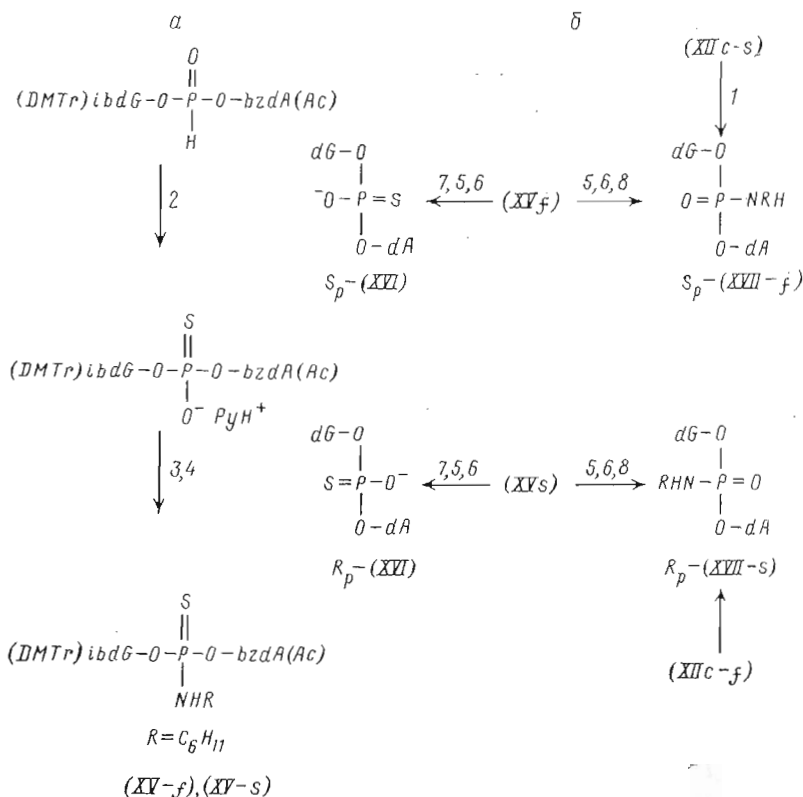


Схема синтеза амидотиофосфатов (XV) — (а) и схема превращений, с помощью которых осуществлена корреляция абсолютной конфигурации тиофосфатов (XVI) и циклогексиламидофосфатов (XVIIc) — (б). 1. SVPDE + BAP; 2. S_8/Py ; 3. $\text{MSNT} + \text{MeIm}$; 4. циклогексилламин; 5. NH_3 ; 6. $\text{AcOH} + \text{H}_2\text{O}$; 7. изоамилнитрит + AcOH/Py ; 8. H_2O_2

ции тиофосфатов. На этом основании 9-меру (XIIc-f) с большей хроматографической подвижностью приписана R_p -конфигурация, а стереомеру (XIIc-s) с меньшей подвижностью — S_p -конфигурация.

Выполненные стереохимические отнесения позволили однозначно трактовать результаты лигирования (XIIc-s) и (XIIc-f) стереомеров, т. е. те случаи, когда один из стереомеров вовлекался в лигазную реакцию, а другой нет. Наше заключение: лигазная реакция протекает с S_p -стереомером (его модифицирующий заместитель ориентирован в сторону большой бороздки дуплекса). Направленный наружу от двойной спирали амидный заместитель (стереомер с R_p -конфигурацией), по нашим допущениям, создает пространственные затруднения в налаживании контакта между ферментом и ДНК-дуплексом. Одинаковым образом в лигазной реакции ведут себя циклогексиламидный и морфолидный аналоги 9-мера (XII), стереомеры с меньшим временем удерживания в условиях обращенно-фазовой хроматографии, (XIIc-f)- R_p и (XIIb-f), в сшивку с фосфатным компонентом не вступают, а лигируются лишь стереомеры с меньшей хроматографической подвижностью — (XIIc-s)- S_p и (XIIb-s). Их сходство в поведении в реакции энзиматического лигирования дает нам основание приписать конфигурацию и стереомерным фосфоморфолидам: соединению (XIIb-s) — конфигурацию S_p , а соединению (XIIb-f), — R_p . Исчерпывающий гидролиз SVPDE этих стереоизомерных олигонуклеотидов (XIIb- S_p) и (XIII- R_p), выполненный в присутствии фосфатазы, дал эталонные S_p - и R_p -динуклеозидфосфоморфолиды.

На основании ферментативного расщепления остальных синтезированных стереомерных фосфоморфолидных олигонуклеотидов, результатов ВЭЖХ-анализа продуктов расщепления и сопоставления их хроматографических характеристик с характеристиками эталонных морфолидных

двоек исследуемым модифицированным аналогам ДНК была приписана абсолютная конфигурация: стереомерам, проявляющим большую хроматографическую подвижность (f), — R_p -конфигурацию, а стереомерам с меньшей хроматографической подвижностью (s) — S_p -конфигурацию.

При исследовании влияния расположения фосфамидной группы по отношению к 5'-фосфату в Р-компоненте шивки тем же приемом лигирования по цепям было установлено, что лишь фосфамидная группа, непосредственно примыкающая к 5'-концу, делает лигазную реакцию запрещенной. Удаление модифицированной фосафтной группы на одно или два нуклеотидных звена от 5'-фосфата, принимающего участие в энзиматическом образовании новой фосфодиэфирной связи, не предъявило заметных пространственных ограничений в действии фермента и привело к образованию 31-меров как с S_p -, так и с R_p -конфигурацией фосфамидных групп.

Существенным результатом исследования лигирования амидированных олигонуклеотидов явились индивидуальные 31-мерные фрагменты ДНК (Ib), (Ic) и (IIb), (IIc), содержащие точечную фосфамидную модификацию с установленной абсолютной конфигурацией атома фосфора, а также немодифицированные ДНК (Ia) и (IIa). Все перечисленные выше цепи были помечены по 5'-концу радиоактивным фосфатом с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и Т4-полинуклеотидкиназы. Меченые соединения были использованы в различных комбинациях при формировании дуплексных ДНК для исследования взаимодействия с ними эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *FokI*. Результаты расщепления эндонуклеазами оценивались с помощью электрофореза в ПААГ и радиоавтографии. Как и ожидалось, обе рестриктазы не способны расщеплять дуплексы, составленные из обеих Р-модифицированных цепей, независимо от конфигурации фосфамидного центра. Исследуя поведение дуплексов, составленных из одной амидированной и другой немодифицированной цепей, можно было ожидать, что эндонуклеазы проявят способность к расщеплению немодифицированной цепи, как это наблюдалось Экштейном для тиофосфатных аналогов ДНК [9]. Действительно, смешанные дуплексы, составленные с участием S_p -стереомеров, способны предоставлять для расщепления обеим рестриктазам свои немодифицированные цепи. Когда же дуплексы формировались с участием R_p -изомеров, то наблюдалось характерное различие: фермент *FokI* расщеплял немодифицированную цепь, тогда как эндонуклеаза *EcoRI* оказывалась не в состоянии расщепить эту цепь.

Мы пока не даем окончательного ответа на вопрос, во всех ли случаях эндонуклеазы рестрикции способны связываться со своими субстратами, Р-модифицированными по фосфатной группе.

Экспериментальная часть

В работе использованы рестриктазы *FokI* (Amersham, США), *EcoRI* (НПО «Фермент»), Т4-полинуклеотидкиназа, Т4-ДНК-лигаза (выделены в лаборатории), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Amersham, США), изоамильтрит, триэтиламин, акриламид, трис (Merck, ФРГ). Пиридин, морфолин, циклогексил-амин выдерживали над твердой щелочью, кипятили и перегоняли над CaH_2 . Четыреххлористый углерод встряхивали с горячим раствором КОН, сушили над CaCl_2 и перегоняли над P_2O_5 . Контроль протекания реакций осуществляли с помощью ТСХ на пластинках Alufolien (Merck, ФРГ) в системе А: хлороформ — метанол — триэтиламин (90 : 9 : 1).

Все операции по наращиванию олигонуклеотидной цепи проводили на автоматическом синтезаторе System 1 plus (Beckman, США). Обращенно-фазовую хроматографию осуществляли на жидкостном хроматографе Du Pont 8800 с колонкой Ultrasphere ODS (4,5 × 250 мм) при скорости потока 1 мл/мин в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1 М триэтиламинийацетате, рН 7,0. Были использованы градиенты: ацетонитрила I — от 30 до 80% за 50 мин, II — от 5 до 40% за 35 мин.

Олигонуклеотиды, не имеющие модификаций в сахаро-фосфатном остове, были синтезированы Н-фосфонатным методом [10, 4] и выделены

препаративным электрофорезом в ПААГ. 5'-фосфатные группы вводились с использованием Т4-полинуклеотидкиназы и АТР [11] либо по методу [4]. Синтез соединений, несущих циклогексиламидную (IVc, VIc, VIIIc, XIIc) и морфолидную (VIb, VIIIb, Xb, XIIb, XIVb) модификации, с использованием комбинации фосфитамидного и фосфонатного подходов и их выделение проводили как описано в работе [12].

Стереомерные циклогексиламидотиофосфаты (XV-f) и (XV-s). N⁶-Бензопл-2'-дезоксаденозин-3'-O-ацетат (24 мг, 60,4 мкмоль) и триэтиламмонийную соль 5'-DMTr-N⁴-изобутирил-2'-дезоксигуанозин-3'-H-фосфоната (52 мг, 65 мкмоль) трижды упарили с абс. CH₃CN, добавили 32,5 мг (162,5 мкмоль) адамантилкарбонилхлорида в смеси пиридин — CH₃CN (1 : 1) и через 3 мин 5% раствор серы в безводном пиридине. Ход реакции контролировали ТСХ в системе А. Стереомерные динуклеозидтиофосфаты, не разделяя на индивидуальные компоненты, выделили обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте I. После упаривания с водой и трижды с абсолютным пиридином 3 мг (3 мкмоль) смеси полученных соединений в 30 мкл пиридина выдержали 1 ч с 3 мг (15 мкмоль) MSNT и 10 мкл (80 мкмоль) Melm, а затем 1 ч с 30 мкл циклогексилamina. Образовавшиеся диастереомерные амидотиофосфаты выделили обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте I. Время удерживания (XV-f) — 47 мин, (XV-s) — 49 мин.

Превращение стереоизомерных амидотиофосфатов (XV) в тиофосфаты (XVI-s) и (XVI-f). Индивидуальные циклогексиламидотиофосфаты (XV-f) и (XV-s) отдельно (по 0,5 ОЕ₂₆₀ каждого) растворили в 500 мкл смеси пиридин — уксусная кислота — изоамилазидит (2 : 2 : 1) и выдержали 20 ч при 20° С. Реакцию остановили добавлением 2 М триэтиламмоний-ацетата, pH 7,0, и смесь трижды упарили с водным ацетонитрилом. Анализ ВЭЖХ в градиенте I показал, что произошло превращение изомера (XV-f) в соединение, дающее после аммонолиза и детритилирования с 30%-ным выходом «медленный» изомер S_p-(XVI-s) (время удерживания 15 мин в градиенте II) [6]. В тех же условиях превращения из амидотиофосфата (XV-s) получен «быстрый» изомер R_p-(XVI-f) (время удерживания 13,7 мин в градиенте II).

Превращение стереомерных циклогексиламидотиофосфатов (XV-f) и (XV-s) в фосфамиды (XVII-f) и (XVII-s). Отдельно к раствору «быстрого» и «медленного» диастереомеров, полученных после аммонолиза и детритилирования соответственных соединений (XV-f) и (XV-s), в 90 мкл CH₃CN — H₂O (1 : 1) добавили по 10 мкл 30% водного раствора перекиси водорода и выдержали 18 ч при 20° С. Анализ ВЭЖХ в градиенте II показал, что «быстрый» изомер полностью превратился в (XVII-f) (время удерживания 24,7 мин), а «медленный» изомер — в (XVII-s) (время удерживания 25 мин).

Энзиматический гидролиз диастереомерных олигонуклеотидов (XIIc-f) и (XIIc-s). К раствору олигонуклеотида (0,2 ОЕ₂₆₀) в буфере, содержащем 10 mM трис-HCl (pH 8,9), 10 mM MgCl₂, 1 mM меркаптоэтанол, добавили по 6 ед. акт. SVPDE и VAR и инкубировали 6 ч при 37° С. ВЭЖХ-анализ смеси продуктов, полученной после гидролиза (XIIc-f), выявил dG и dA в соотношении 1:6, а также (XVII-s), идентичность которого синтетическому R_p-(XVII) была подтверждена совместной элюцией. В результате ферментативного гидролиза в тех же условиях из олигонуклеотида (XIIc-s) получили «быстрый» S_p-изомер (XVII).

Лигирование олигонуклеотидов. К раствору 5'-фосфорилированного олигонуклеотида (2 нмоль) в 50 мкл буфера, содержащего 50 mM трис-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, добавили HO-компонент и два олигонуклеотида, составляющие подложку (по 2 нмоль каждого), в 120 мкл того же буфера, прогрели при 70° С 3 мин, охладили за 3 ч до 10° С, добавили 50 нмоль АТР, 100 нмоль дитиотреита и 200 ед. Т4-ДНК-лигазы и смесь инкубировали при 10° С 16 ч. Продукты лигирования выделили электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ.

Взаимодействие модифицированных ДНК с эндонуклеазами рестрикции EcoRI и FokI. 5'-[γ-³²P]фосфорилированные олигонуклеотиды (Ia и Ib) или (IIa и Ib) (каждой цепи по 50 пмоль) в буфере, содержа-

щем 20 mM трис-HCl (pH 7,6), 50 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 1 mM дитиотреит, прогрели при 80° С 2 мин, охладили до 37° С и добавили 10 ед. акт. фермента (*EcoRI* или *FokI*). Смесь инкубировали 1 ч при 37° С. Продукты реакции разделили с помощью электрофореза с 20% ПААГ в денатурирующих условиях и визуализовали с помощью радиоавтографии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller P. S., McParland K. B., Jayaraman V., Ts'o P. O. P. // *Biochemistry*. 1981. V. 20. № 7. P. 1874—1880.
2. Agrawal S., Goodchild J., Civeira M. P., Thornton A. H., Sarin P. S., Zamecnik P. C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. № 19. P. 7079—7083.
3. Guga P., Koziolkiewicz M., Okruszek A., Uznanski B., Stec W. J. // *Nucleosides and Nucleotides*. 1987. V. 6. № 1—2. P. 111—119.
4. Филиппов С. А., Есинов Д. С., Калининко С. В., Добрынин В. Н. // *Биоорганическая химия*. 1989. Т. 15. № 4. С. 527—529.
5. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Шингарова Л. Н., Чушило С. А., Филиппова Л. Ю., Звонок Н. М., Васильева Т. Е., Колосов М. Н. // *Биоорганическая химия*. 1987. Т. 13. № 1. С. 69—81.
6. Stec W. J., Zon G., Uznanski B. // *J. Chromatogr.* 1985. V. 326. P. 263—280.
7. Bunyan P. J., Cadogan J. I. // *J. Chem. Soc.* 1962. № 4. P. 1304—1308.
8. Stec W. J., Okruszek A., Michalski J. // *J. Org. Chem.* 1976. V. 41. № 2. P. 233—238.
9. Taylor J., Schmidt W., Cossick R., Okruszek A., Eckstein F. // *Nucl. Acids Res.* 1985. V. 13. № 24. P. 8749—8764.
10. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 13. P. 5389—5407.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование*. М.: Мир, 1984. С. 134.
12. Филиппов С. А., Калининко С. В., Есинов Д. С., Шибанова Е. В., Шингарова Л. Н., Коробко В. Г., Добрынин В. Н. // *Биоорганическая химия*. 1990. Т. 16. № 8. С. 1045—1051.

Поступила в редакцию
19.IV.1990

E. V. SHYBANOVA, [S. A. FILIPPOV], D. S. ESIPOV,
V. G. KOROBKO, V. N. DOBRYNIN

ENZYMATIC LIGATION OF SYNTHETIC DNAs CARRYING POINT AMIDOPHOSPHATE INTERNUCLEOTIDE LINKAGE MODIFICATION

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

DNA fragments with the point amidophosphate (cyclohexylamido- or morpholidic-) modification in the sugar-phosphate backbone were synthesized and separated into individual diastereoisomer. The isomers were separated by the reversed-phase HPLC (RPC), and chirality at phosphorus was assigned by a stereochemical correlation scheme using phosphorothioate standards. The RPC-retention time values for R_p -isomers were found to be lower than for S_p -analogues. Amidophosphate DNA fragments were used as P- and OH-components in the T4 DNA-ligation. The enzyme does not ligate amidated fragments with modified internucleotide linkage near 5'- or 3'-end, independently of the amidophosphate chirality. When an unmodified phosphodiester linkage separates the amidophosphate group from 3'-end in O-component, the ligation occurs only with S_p -isomer, whereas R_p -analogue does not give the ligation product. In the P-component of the ligation, configuration of the modified linkage separated from 5'-phosphate by an unmodified linkage does not affect the result of the enzymatic reaction: both S_p - and R_p -stereoisomers do take part in the ligation. As a result of the ligation of the modified fragments on unmodified templates a set of 31-mers was obtained. They contain *FokI* and *EcoRI* recognition sites with the cleavage points of both endonucleases coinciding and being amidated. Upon treatment of duplex DNA consisted of unmodified and amidated strands with these endonucleases S_p -configuration did not hinder the cleavage of the unmodified strand, whereas R_p -configuration inhibited the *EcoRI* and did not affect the *FokI* cleavage.