



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 20 * № 11 * 1994

УДК 577.113.6 : 577.212.2

© 1994 В. Л. Друца *, П. З. Беднарек, О. Н. Королева

ОСОБЕННОСТИ РЕПЛИКАЦИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С НЕПРИРОДНЫМИ ЗВЕНЬЯМИ

НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского и химический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Ключевые слова: олигонуклеотиды модифицированные, ДНК-полимеразы, репликация *in vitro*, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

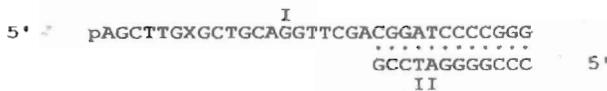
С помощью различных ДНК-полимераз изучена репликация *in vitro* синтетических олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих неприродные межнуклеотидные полифосфатные группировки или алкандиольные «спейсеры» различной величины. Все модификации, за исключением дифосфатной, практически полностью останавливают процесс полимеризации. В случае ревертазы AMV, ДНК-полимераз Таq, фага T7 и кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I *E. coli* наблюдается присоединение к неполной реплике дополнительного звена. ДНК-полимераза фага T4, обладающая наиболее сильной среди изученных ДНК-полимераз 3'-5'-экзонуклеазной активностью, дополнительных звеньев в тех же условиях не присоединяет. Использование олигонуклеотидов с протяженной ненуклеотидной вставкой в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции позволяет получать ДНК-копии, содержащие одноцепочечные 5'-выступающие концы, пригодные для гибридизационного анализа.

Интерес к исследованию свойств и механизмов действия ферментов нуклеинового обмена, в частности ДНК-полимераз, неизменно возрастает. Это в значительной мере связано с тем, что указанные ферменты являются ключевыми при проведении большинства генно-инженерных экспериментов, например при сайт-специфическом мутагенезе, амплификации фрагментов ДНК и т. п. Помимо изучения таких важных свойств полимераз, как точность считывания гетеро- и гомополимерных матриц природного строения [1, 2], предпринимаются попытки установить влияние различных неприродных «узлов» в составе матриц на 5'-3'-полимеризующую и 3'-5'-экзонуклеазную активность этих ферментов [3, 4]. Чрезвычайно перспективным и плодотворным подходом к изучению свойств полимераз является использование синтетических олиго- и полинуклеотидных

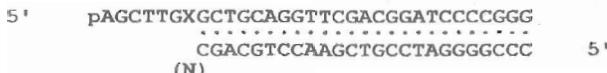
Используемые сокращения: ПААГ — поликариламидный гель, ПЦР — полимеразная цепная реакция, КФ — кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I *E. coli*, γ — ^{32}P fosfat. Префикс d («дезокси»), всюду для краткости опущен.

Адрес для переписки: 119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ, корп. «А», НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского.

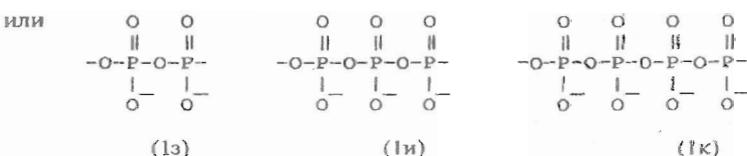
А



↓
 1. ДНК-полимераза + ΣdNTP
 2. Анализ продуктов в ПААГ



где $X = -O-P-O-(CH_2)_n-$
 ||
 |
 O
 n = 0 (1a), 2 (1б), 3 (1в), 4 (1г), 6 (1д), 7 (1е), 9 (1ж)



Б

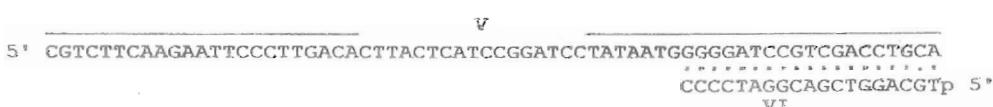
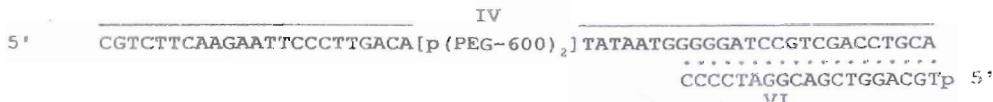
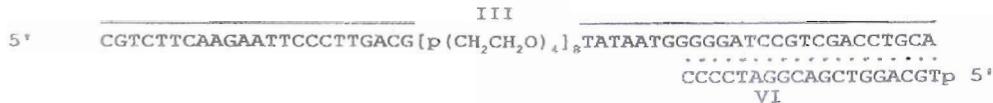


Рис. 1. Модельные системы (А и Б) для изучения влияния ненуклеотидных звеньев на репликацию

матриц, содержащих модифицированные звенья в строго заданных положениях [5]. Имеется много работ, в которых используются модифицированные по гетероциклическим основаниям или сахарофосфатному остатку матрицы (например, [6, 7]), причем в значительном числе случаев авторы пытаются смоделировать апурин/апиримидиновые остатки, так как последние играют существенную роль в таких важнейших процессах, как мутагенез и канцерогенез [8, 9]. Тем не менее систематических исследований влияния тех или иных модификаций на характер полимеризации не проводилось. В связи с этим нами были предприняты исследования влияния ненуклеотидных звеньев различной природы и величины в составе олигонуклеотидных матриц на характер их копирования под действием различных ДНК-полимераз.

С этой целью ранее нами химико-энзиматическим путем были сконструированы две модельные системы (рис. 1). Одна из них (А) включает набор 30-звенных

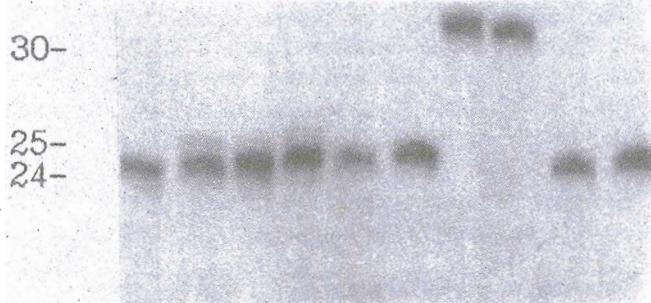


Рис. 2. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 15% ПААГ реакционных смесей при репликации кленовским фрагментом немодифицированного контрольного (Ia) и модифицированных (Ib)—(Ic) олигонуклеотидов (дорожки a — k) в присутствии Σ dNTP и fII. Цифрами слева указаны подвижности 24, 25 и 30-звенных олигонуклеотидов

синтетических матриц с модифицированным межнуклеотидным узлом (Ib)—(Ic), в котором «природная» фосфатная группа заменена либо на ди-, три- или тетрафосфатную, либо на фосфодиэфирный остаток алкандиола [10]. 30-Звенный олигонуклеотид (Ia) той же структуры, но не содержащий модификаций, предназначен для проведения контрольных экспериментов. Другая модельная система (B) базируется на использовании в качестве матриц смешанных олигомеров (III) и (IV) [11], представляющих собой олигонуклеотидные участки, соответствующие по структуре 5'- и 3'-концевым фрагментам 66-звенного (контрольного) олигонуклеотида природной структуры (V) и разделенные протяженными ненуклеотидными «спейсерами» на основе тетраэтиленгликоля (8 фосфатсодержащих остатков, соединение (III)) или полиэтиленгликоля (два фосфатсодержащих остатка ПЭГ-600, соединение (IV)).

Репликативные свойства указанных модифицированных соединений изучали путем анализа продуктов катализируемой ДНК-полимеразами достройки 32 P-меченых праймеров (II) (в случае системы A) или (VI) (система B). Объектами исследования в этих экспериментах были выбраны кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I *E. coli* (далее кленовский фрагмент), ревертаза AMV, ДНК-полимераза *Taq*, а также ДНК-полимеразы фагов T4 и T7.

Для получения стабильных, воспроизводимых результатов в специальных экспериментах с использованием контрольной матрицы (Ia) провели подбор и оптимизацию концентраций трифосфатов, матрицы, затравки, количества вводившихся в реакционную смесь фермента и 32 P-метки, а также температуры и времени полимеризации. Было показано, что при концентрациях дезоксинуклеозидтрифосфатов ниже 0,025 мМ выход полноразмерных продуктов репликации заметно снижается. При увеличении их концентраций общая картина репликации практически не меняется. Во всех реакциях использовали 1—2 пмоль матричного олигонуклеотида и 2—5 пмоль меченого праймера, выдерживая их мольное соотношение 1 : 2,5.

Для максимального снижения возможного влияния элементов вторичной структуры на ход репликации ферментативные реакции проводили при 37° С. При этой температуре и вышеуказанных количествах остальных компонентов репликация немодифицированной матрицы завершалась за 1—2 мин. Учитывая, что репликация матриц с неприродными вставками может идти заметно медленнее, время реакции меняли в интервале от 1 до 30 мин, а в случае системы B — даже до 60 мин. Оказалось, что во всех типах проведенных экспериментов для полного завершения полимеризационных процессов вполне достаточно 15 мин.

Из электрофоретического анализа полимеризационных смесей при репликации контрольного и модифицированных 30-звенных олигонуклеотидов кленовским фрагментом в оптимальных условиях (рис. 2) хорошо видно, что три- и тетрафосфатные группировки, а также вставки фосфодиэфиров всех диолов практически нацело блокируют репликацию содержащей их 30-звенной матрицы: синтез останавливается перед неприродным узлом, и образуются 24-звенные копии. Более длительная экспозиция при радиоавтографии позволяет установить, что во всех случаях все же накапливается небольшое количество (менее 0,1%, а в случае трифосфатной группировки — около 1%) продуктов, соответствующих по длине полноразмерной 30-звенной копии. Дифосфатная межнуклеотидная группировка, напротив, практически не мешает нормальной репликации содержащей ее 30-звенной матрицы: как и в случае немодифицированного олигонуклеотида, получается правильная 30-звенная копия. Присоединение дополнительных звеньев к 30- и 24-звенным соединениям происходит лишь в незначительной степени. Аналогичные данные получены и для ДНК-полимеразы AMV, однако присоединение дополнительного звена было более интенсивным. Для доказательства того, что длины образующихся продуктов-копий под действием того или иного фермента действительно соответствуют указанным, нами было проведено секвенирование по Сэнгеру всех 30-звенных матриц путем добавки в реакционные смеси дидеоксинуклеозидтрифосфатов (см., например, рис. 3).

Результаты наших экспериментов хорошо коррелируют с данными работы Такешита и соавт. [3], где было показано, что ненуклеотидные группировки в составе синтетических олигонуклеотидов, в частности этан- и пропандиольные, почти нацело блокируют *in vitro* матричный синтез комплементарной цепи, катализируемый рядом ДНК-полимераз, в том числе ревертазой AMV и кленовским фрагментом. Лишь в очень незначительной степени ферменты преодолевают подобное препятствие и продолжают направляемый матрицей синтез, допуская при этом ошибки считывания в районе неприродной структуры. В подавляющем же числе случаев ферменты останавливаются перед аналогом апурин/апиримидинового звена или присоединяют дополнительно один «некомплементарный» нуклеотид. Известно, что эффект присоединения дополнительного звена характерен для ДНК-полимераз со слабо выраженной или вовсе отсутствующей 3'-5'-экзонуклеазной (корректирующей) активностью [12]. В связи с этим интересно было установить характер продуктов репликации модифицированных матриц (Iб) — (Iк) при использовании ДНК-полимераз фагов T4 (обладает гораздо более сильно выраженной по сравнению с кленовским фрагментом 3'-5'-экзонуклеазной активностью) и T7 (не обладает 3'-5'-экзонуклеазной активностью). Подобного рода данные для исследуемых нами соединений в литературе не обсуждались.

Электрофоретический анализ продуктов копирования 30-звенных матриц (Iа) — (Iк) с помощью указанных ферментов позволил установить (рис. 4), что в обоих случаях все алкандиольные вставки, а также тетрафосфатная группировка являются эффективными сигналами остановки полимеризации, в то время как дифосфатная группировка лишь слегка тормозит этот процесс. Что касается трифосфатной модификации, то она блокирует элонгацию ДНК-полимеразой фага T4 практически полностью, а ДНК-полимеразой фага T7 — наполовину. В то время как T7-ДНК-полимераза активно присоединяет дополнительные звенья, образуя приблизительно равные количества 24- и 25- или соответственно 30- и 31-звенных продуктов, ДНК-полимераза фага T4 не обладает такой активностью: продуктов присоединения дополнительного звена ни на уровне остановки перед неприродным звеном, ни на уровне полноразмерной копии не было обнаружено ни в одном случае. Все это подтверждает наличие корреляции между корректирующей активностью фермента и характером образующихся соединений.

Данные о влиянии на процесс репликации более протяженных ненуклеотидных вставок, по числу связей имитирующих не апурин/апиримидиновые сайты (1—2

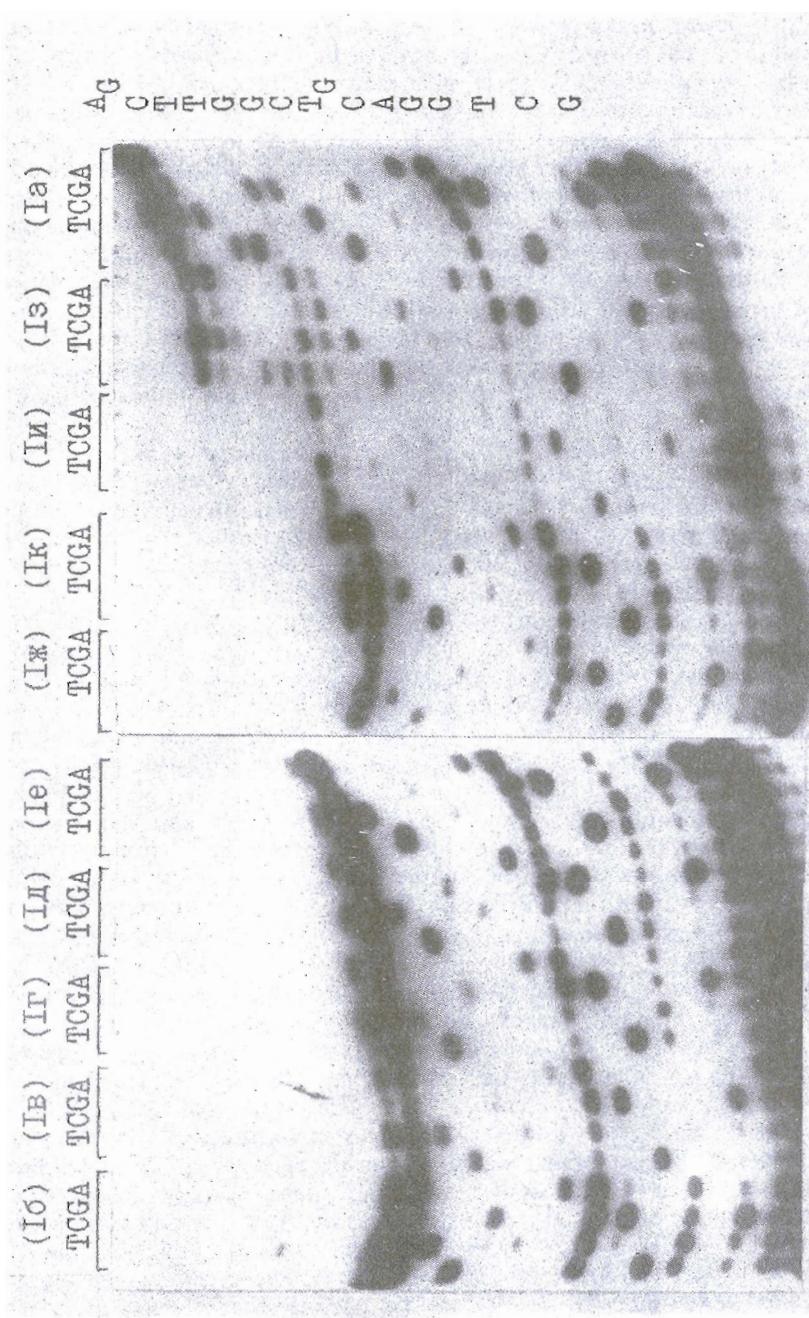


Рис. 3. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 15% ПААГ реакционных смесей при репликации немодифицированного (Ia) и модифицированных (Ib) — (Ik) олигонуклеотидов в присутствии Σ dNTP, соответствующих ddNTP и (III) под действием ревертазы AMV. Буквами справа указана нуклеотидная последовательность матрицы. Буквы сверху — блокировки, ревертазы диизосигматофосфатами A, G, C и T

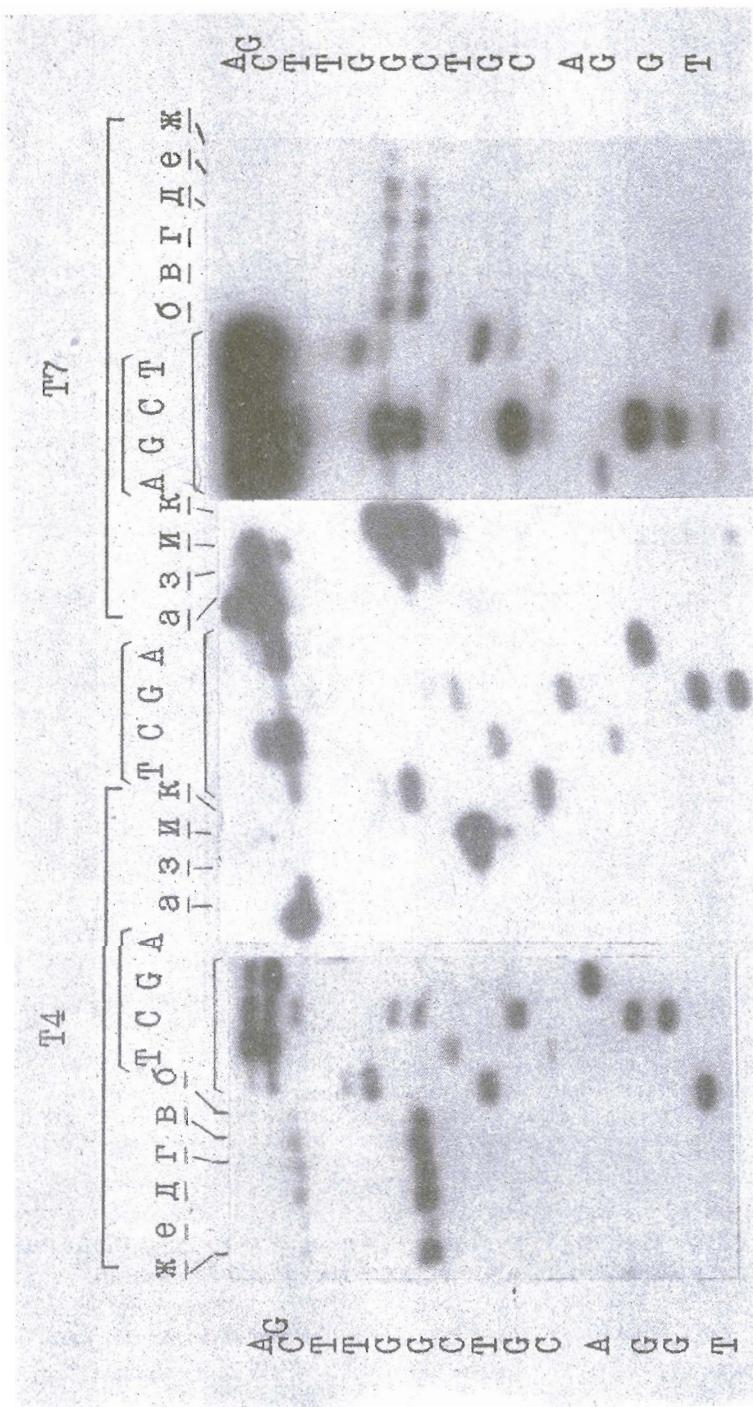


Рис. 4. Радиавтоматограф энзимодиферентического разделения в 1% ПААГ реакционных смесей при религации ДНК-полимеразами T4 и T7 немодифицированных (1a) и модифицированных (1b) олигонуклеотидов. Схорожки a - к) в присутствии SdNTP и фРП. Показан реперный синтез немодифицированной матрицы: буквы сверху — блокировка T7-ДНК-полимеразы; дидезокситрифосфатами A_s, G_s, C_s и T_s. Слева и справа указана нуклеотидная последовательность матрицы.

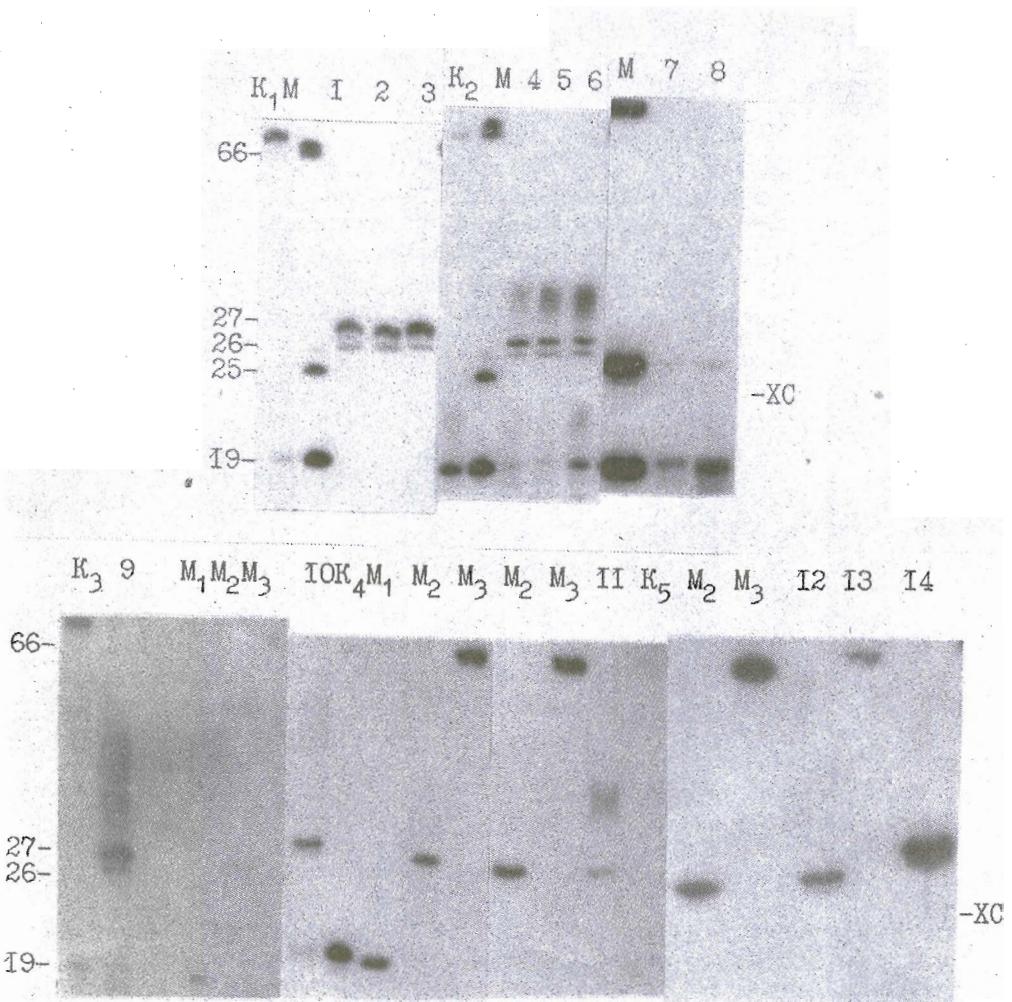


Рис. 5. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 20% ПААГ реакционных смесей при репликации кленовским фрагментом (K_1 , 1—3, K_3 , 9), T7-ДНК-полимеразой (K_2 , 4—6, K_4 , 10) и T4-ДНК-полимеразой (7, 8, 11, K_5) олигонуклеотидов (III) (1—8), (IV) (9—11) и (V) (K_1 — K_5) в присутствии $\Sigma dNTP$ и (рVI). Время реакции 20 (K_1 — K_5 , 1, 4, 7, 9, 10, 11), 40 (2, 5, 8) или 60 (3, 6) мин. Остальные условия — см. «Экспер. часть». Дорожки M_1 , M_2 и M_3 содержат реперные 19, 26 и 66-звенные олигонуклеотиды, а M — смесь олигонуклеотидов «19»+«25»+«26»+«66». Дорожки 12—14 — повторное электрофоретическое разделение «размытых» зон, движущихся несколько медленнее основных продуктов (в дорожках II, K_1 и 9 соответственно)

нуклеотидных звена, как в случае, например, (Iб)—(Iк), а несколько звеньев, практически отсутствуют. В связи с этим чрезвычайно интересно было выяснить характер копирования матриц в системе Б. При достройке 19-звенного праймера на матрице (III) кленовским фрагментом наблюдается преимущественное образование не 26-звенного продукта (что соответствовало бы копированию 3'-концевого олигонуклеотидного фрагмента матриц (III) и (IV)), а 27-звенного продукта полимеризации с присоединением «лишнего» звена (рис. 5, 1—3). Аналогичная картина наблюдается также и в случае достройки 19-звенного праймера T7-ДНК-полимеразой (рис. 5, 4—6). В случае же T4-ДНК-полимеразы 27-звенные соединения не образуются (рис. 5, 7, 8). При использовании в качестве матрицы соединения (IV), содержащего более гидрофобный «спейсер» (остатки полиэти-



Рис. 6. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 15% ПААГ реакционных смесей при репликации ДНК-полимеразой *Taq* немодифицированного (Ia) и модифицированных (Ib)–(Ic) олигонуклеотидов (дорожки a – c) в присутствии Σ dNTP и (3 P). Остальные обозначения как на рис. 4 (ленгликоля), характер образующихся продуктов во всех случаях практически не менялся (рис. 5, 9–11). Следует отметить, что наблюдаемые в некоторых случаях широкие размытые радиоактивные зоны, обладающие меньшей электрофоретической подвижностью, чем основные продукты реакции (см. рис. 5, K₁, 9, 11), связаны с неполной денатурацией двутяжевого комплекса «матрица—копия» до нанесения полимеризационной смеси на гель и с последующей денатурацией его в процессе электрофореза. При повторном электрофоретическом разделении (после элюции) эти зоны идут на уровне соответствующих основных продуктов матричной достройки (см., например, рис. 5, 12–14). Ни в одном из случаев достройки праймера (VI) на матрицах (III) и (IV) не было обнаружено более протяженных продуктов, свидетельствующих о преодолении ферментом неприродного участка. Таким образом, протяженные ненуклеотидные вставки оказываются для ДНК-полимераз весьма эффективными стоп-сигналами.

В последнее время широкое применение в генно-инженерных экспериментах находит техника полимеразных цепных реакций (ПЦР), в которых используются термостабильные полимеразы типа ДНК-полимеразы *Taq* [13]. Использование олигонуклеотидных праймеров, несущих различного рода модифицированные по 5'-концу группировки, позволяет получать соответствующим образом модифицированные ДНК-копии (содержащие, например, нерадиоактивную метку, активные группировки, позволяющие присоединить остатки любых биологически активных молекул и т. д.) [14]. В связи с этим представлялось интересным исследовать влияние неприродных группировок, находящихся внутри сахарофосфатного остава, на функционирование ДНК-полимеразы *Taq* в обычном, изотермическом, а также циклическом режимах копирования матрицы. В первом случае нами была использована система А. Оказалось, что ДНК-полимераза *Taq* останавливается перед всеми исследуемыми типами модификаций, присоединяя «лишнее» звено. Фермент способен преодолевать в заметной степени только дифосфатную группировку (рис. 6).

Для изучения влияния модификаций на работу *Taq*-ДНК-полимеразы в тер-

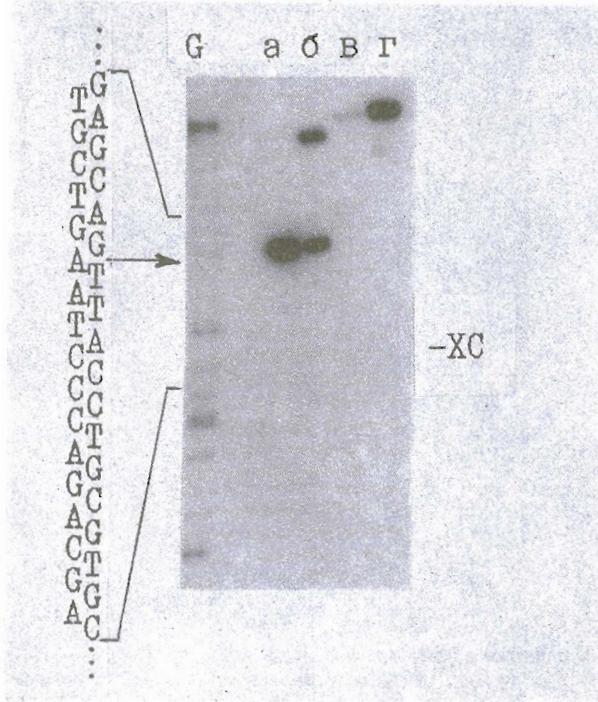


Рис. 7. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 8% ПААГ реакционных смесей, полученных ПЦР на плазмидной ДНК с использованием праймеров (III + \bar{p} VII) (а), (\bar{p} III + \bar{p} VII) (б), (\bar{p} V + VII) (в) и (\bar{p} VII + V) (г). Слева указана нуклеотидная последовательность «нижней» цепи в области остановки полимеразы. Колонка «G» — расщепление фрагмента, полученного с использованием праймеров (\bar{p} VII + V), диметилсульфатом по Максаму — Гилберту [16]

моциклическом режиме нами была использована система, в которой одним из ПЦР-праймеров («верхний» праймер) выступал смешанный олигомер (III), содержащий протяженную неприродную вставку (имитирующую в данном случае 17-звенный фрагмент ДНК), или 66-звенный олигонуклеотид (V) (контроль), копируемой матрицей служила плазмидная ДНК, содержащая участок, полностью или частично гомологичный соединениям (V) и (III). В качестве второго, «нижнего», праймера был использован 25-звенный олигонуклеотид GACTTCCAATGTAACCGCTACCAC (VII), дающий в комбинации с праймером (V) 131-звенную копию. ПЦР в этих системах проводили в одинаковых условиях, рекомендуемых для копирования относительно коротких участков ДНК [15]. Анализ продуктов реакции с помощью электрофореза в денатурирующем ПААГ показал, что в контрольной системе размер образующихся «верхних» и «нижних» цепей-копий одинаков (рис. 7, в, г). А в системе, содержащей модифицированный олигонуклеотид, образуются более короткие и различающиеся между собой по длине продукты, один из которых соответствует верхней цепи, содержащей ненуклеотидный спейсер (рис. 7, б), а второй представляет собой укороченную нижнюю цепь (рис. 7, а, г), образующуюся в результате остановки *Taq*-полимеразы непосредственно перед ненуклеотидной вставкой.

Такие ПЦР-дуплексы, содержащие одноцепочечный концевой олигонуклеотидный участок, могут быть использованы для нерадиоизотопной ДНК-диагностики в комбинированном гибридизационно-амплификационном варианте (по типу «сэндвич»-гибридизации [17]). При этом предполагается, что одноцепочечный фрагмент будет гибридизоваться с иммобилизованным на твердой фазе комплементарным олигонуклеотидом, структура которого может быть универ-

сальной, а нерадиоизотопная метка будет включаться в «нижнюю» цепь в процессе ПЦР с помощью нерадиоизотопно-меченого праймера. В период подготовки настоящей работы к публикации аналогичная схема диагностики с использованием модифицированных праймеров другого типа была описана в работе Ньютона и соавт. [18], однако экспериментальные данные о получении ПЦР-копий с использованием модифицированных праймеров авторами приведены не были.

Таким образом, в настоящей работе было изучено влияние модификаций различной природы и величины в составе олигонуклеотидных матриц на их способность реплицироваться под действием ДНК-полимераз различного биологического происхождения. Показано, что в случае полифосфатных межнуклеотидных связей только матрицы с дифосфатной группой могут почти без задержки прочитываться всеми ферментами, в то время как три- и тетрафосфатные группы частично или полностью блокируют процесс полимеризации. Модификации же на основе различных диолов являются стоп-сигналами для всех изученных ДНК-полимераз, причем тем более эффективными, чем больше физический размер неприродной группировки.

Экспериментальная часть

В работе использованы акриламид, N,N'-метиленбисакриламид (BDH, Англия); трис, EDTA, дитиотрейт, MgCl₂ (Merck); дезоксинуклеозидтрифосфаты, ATP (Sigma, США); [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (1000 Ки/ммоль; «Изотоп»).

Препараты ферментов: полинуклеотидкиназа фага T4 (КФ 2.7.1.78; 25 ед. акт./мкл), ДНК-полимераза фага T4 (КФ 2.7.7.7; 15 ед. акт./мкл), ДНК-полимераза фага T7 (10 ед. акт./мл), кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I *E. coli* (10 ед. акт./мкл), ДНК-полимераза *Thermus aquaticus*, *Taq* (7 ед. акт./мкл) — производства МБИ «Ферментас» (Литва), ревертаза AMV (20 ед. акт./мкл) — производства Омутнинского химического завода (Россия).

Синтез олигонуклеотидов (II) и (VI) осуществляли стандартным твердофазным амидофосфитным методом [19] на автоматическом синтезаторе «Applied Biosystems 380B». Синтез 30-звенных модифицированных олигонуклеотидов, содержащих алкандиольные остатки, описан ранее [10], синтез смешанных олигомеров (III) и (IV) — в работе [11].

Полимеразное копирование матриц (Ia)–(Ik) с помощью праймера (¶II) под действием ревертазы AMV, ДНК-полимераз фагов T4 и T7, а также кленовский фрагмент (5–15 ед. акт.) осуществляли в 40 мкл буферного раствора, содержащего 50 mM трис-HCl (рН 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 1–2 пмоль матрицы, 2–5 пмоль олигонуклеотидного праймера, при 37° С, варьируя время реакции (1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 мин), концентрацию трифосфатов (от 25 мкМ до 1 mM). Реакцию останавливали добавлением EDTA до конечной концентрации 20 mM, смесь прогревали 3 мин при 90° С, фермент экстрагировали смесью фенол — хлороформ (1 : 1), осаждали ДНК этанолом, растворяли в 90% формамиде, содержащем красители-маркеры, и анализировали электрофорезом в 15% ПААГ.

Полимеразное копирование матриц (III) и (IV) (1 пмоль) в присутствии праймера (¶VI) (2,5 пмоль, 50 000 имп./мин) под действием ДНК-полимераз фагов T4 и T7, а также кленовского фрагмента осуществляли аналогично в 10 мкл того же буферного раствора, содержащего Σ dNTP (100 мкМ каждый), варьируя время реакции: 10, 20, 40, 60 мин.

Маркеры для анализа матричных свойств модифицированных олигонуклеотидов получали по модифицированному методу Сэнгера [20]. Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую указанные выше компоненты буфера, 0,25 пмоль матрицы (Ia)–(Ik) и 0,5 пмоль (40 000 имп./мин) ^{32}P -меченого 12-звенного праймера (II), нагревали до 65° С, медленно (2 ч) охлаждали до 20° С и делили на четыре равные части. К четырем аликовтам добавляли по 2,5 мкл соответствующей специально подобранный смеси всех четырех дезоксинуклеозидтрифос-

Оптимальные соотношения dNTP и ddNTP в смесях
для реакций секвенирования по методу Сэнгера

Фермент *	Смесь для терминации	Концентрации (мМ)							
		dATP	dGTP	dCTP	dTTP	ddATP	ddGTP	ddCTP	ddTTP
AMV	«F»	0,014	0,072	0,072	0,072	0,18	—	—	—
	«G»	0,075	0,015	0,075	0,075	—	0,025	—	—
	«C»	0,085	0,085	0,014	0,085	—	—	0,056	—
	«T»	0,078	0,078	0,078	0,016	—	—	—	0,04
T7	«A»	0,02	0,1	0,1	0,1	0,12	—	—	—
	«G»	0,078	0,016	0,078	0,078	—	0,025	—	—
	«C»	0,052	0,052	0,01	0,052	—	—	0,041	—
	«T»	0,052	0,052	0,052	0,01	—	—	—	0,027
КФ	«A»	0,016	0,078	0,078	0,078	3,43	—	—	—
	«G»	0,078	0,016	0,078	0,078	—	1,4	—	—
	«C»	0,078	0,078	0,016	0,078	—	—	1,8	—
	«T»	0,078	0,078	0,078	0,016	—	—	—	2,1

* AMV — ревертаза AMV, T7 — ДНК-полимераза фага T7, КФ — кленовский фрагмент.

фатов и одного из дидезоксинуклеозидтрифосфатов (см. таблицу), получая смеси для терминации по «А», «Г», «С» и «Т». После добавления 1—2 ед. акт. кленовского фрагмента (или ревертазы AMV, или T7-ДНК-полимеразы) смеси инкубировали 15 мин при 37° С, добавляли Σ dNTP (до конечной концентрации каждого 100 мкМ) и выдерживали еще 5 мин. Затем добавляли 2 мкл раствора красителей-маркеров и наносили на гель.

Полимеразное копирование матриц (Ia)—(Ik) (1 пмоль) с помощью праймера (II) (2 пмоль) под действием ДНК-полимеразы *Taq* (3,5 ед. акт.) осуществляли в течение 30 мин при 37° С в 50 мкл буферного раствора, содержащего 10 мМ трис-HCl (рН 8,3), 1,65 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 0,15 мМ EDTA, 0,01% желатин.

Полимеразную цепную реакцию (30 циклов: 94° С, 1 мин; 55° С, 2 мин; 72° С, 1 мин) проводили в 50 мкл того же буферного раствора, содержащего 1 мкМ «верхний» (III или V) и 1 мкМ «нижний» (VII) праймеры, четыре дезоксинуклеозидтрифосфата (0,2 мкМ каждый) и ДНК-полимеразу *Taq* (7 ед. акт.), в термоциклире фирмы Perkin-Elmer-Cetus (США), по методике работы [15]. Водный слой сверху покрывали минеральным маслом. По окончании ПЦР реакционную смесь экстрагировали смесью хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1), осаждали ДНК этанолом и анализировали электрофорезом в 8% денатурирующем ПААГ.

Расщепление по «Г» ³²P-меченой ПЦР-копии, полученной с помощью праймеров (V) и (VII), осуществляли методом Максама — Гилберта [16].

Электрофорез в 8, 15 и 20% денатурирующих ПААГ во всех случаях проводили в пластинах (40×20×0,04 см) в трис-бортатном буфере (рН 8,3), содержащем 7 М мочевину, при напряжении 1 кВ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Boiteux S., Laval J. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 26. P. 6746—6751.
- Bedenek K., Kunkel T. A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 13. P. 4946—4950.
- Takeshita M., Chang C.-N., Johnson F., Will S., Grollman A. P. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 21. P. 10171—10179.
- Eritja R., Walker P. A., Randall S. K., Goodman M. F., Kaplan B. E. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 4. P. 803—814.

5. Vesnauer G., Chang C.-N., Eisenberg M., Grossman A. P., Breslauer K. J.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 10. P. 3614—3618.
6. Miller P. S., Chandrasegaran S., Dow D. L., Pulford S. M., Kan L. S.//Biochemistry. 1982. V. 21. № 22. P. 5468—5474.
7. Singer B., Sagi J., Kusmirek J. T.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 16. P. 4884—4888.
8. Loeb L. A., Preston B. D.//Ann. Rev. Genet. 1986. V. 20. № 1. P. 201—230.
9. Hevroni D., Livneh Z.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 14. P. 5046—5050.
10. Беднарек П. З., Кабердин В. Р., Сергеев В. Н., Романова Е. А., Друца В. Л.//Вестн. МГУ. 1994. В печати.
11. Королева О. Н., Волков Е. М., Друца В. Л.//Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. № 4. С. 420—432.
12. Sagher D., Strauss B.//Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 12. P. 4285—4298.
13. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A.//Science. 1988. V. 239. P. 487—491.
14. Landgarb M., Reckmann B., Pingoud A.//Anal. Biochem. 1991. V. 193. № 2. P. 231—235.
15. Williams J. F.//BioTechniques. 1989. V. 7. № 7. P. 762—767.
16. Maxam A., Gilbert W.//Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
17. Urdea M. S., Warner B. D., Running J. A., Stempien M., Clyne J., Horn Th.//Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 11. P. 4937—4956.
18. Newton C. R., Holland D., Heptinstall L. E., Hodgson J., Edge M. D., Markham A. F., McLean M. J.//Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. № 5. P. 1155—1162.
19. Matteucci M. D., Caruthers M. H.//J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 12. P. 3185—3191.
20. Sanger F., Coulson A. R., Barrel B. E., Smith A. J. H., Roe B. P.//J. Mol. Biol. 1980. V. 143. № 2. P. 161—178.

Поступила в редакцию
24.XI.1993

После доработки
1.IV.1994

V. L. Drutsa, P. Bednarek, O. N. Koroleva

THE *IN VITRO* REPLICATION OF SYNTHETIC MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES

Department of Chemistry and A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Key words: modified oligonucleotides, DNA polymerases, replication *in vitro*, polymerase chain reaction (PCR).

The *in vitro* replication of synthetic oligodeoxyribonucleotides carrying internucleotide polyphosphate groups or alkanediol «spacers» of various sizes with the use of various DNA polymerases has been studied. All modifications, except for the diphosphate group, almost completely block the polymerization process. In the case of AMV reverse transcriptase, *Taq* and T7 DNA polymerases and also the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I, a template-independent addition of a nucleotide at the 3' end of the incomplete replica was observed. T4 DNA polymerase, displaying the strongest 3'-5' exonuclease activity among the polymerases studied, did not incorporate additional nucleotides. The use of oligonucleotides with non-nucleotide inserts as primers in polymerase chain reaction (PCR) allows to obtain DNA copies with protruding 5'-termini, suitable for hybridisation analysis.

Address for correspondence: A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Bldg «A», Vorobjovy Gory, Moscow 119899, Russia.