



УДК 547.963.32

МАТРИЧНАЯ ХИМИЧЕСКАЯ КОНДЕНСАЦИЯ ГЕТЕРОГЕННЫХ  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ*Долгинная Н. Г., Шабарова З. А.**Химический факультет и Межфакультетская проблемная  
научно-исследовательская лаборатория им. А. Н. Белоозерского  
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Изучена индуцируемая водорастворимым карбодимидом конденсация гетерогенных олигодезоксирибонуклеотидов в составе ДНК-подобных коротких дуплексов —  $d(pG-G-T) \cdot d(p^*A-C-C)_n$ ,  $d(pT-G-G) \cdot d(p^*A-C-C)_n$  и  $d(T-G-Gp) \cdot d(p^*A-C-C)_n$ . Образование продуктов химической конденсации тринуклеотидов в присутствии додекануклеотидной матрицы наблюдалось только в реакционной смеси, содержащей тример с 3'-концевой фосфатной группой —  $d(T-G-Gp)$ . Выход гекса- и нонануклеотидов составил соответственно 25 и 10%. В условиях образования псевдополимерного дуплекса (двухспирального конкатемера) осуществлено химическое «сшивание» (димеризация) октануклеотида  $[^{32}P]d(pT-G-C-A-C-A-T-G)$  с выходом 13%.

Разработка аффинных и матричных реакций, в основе которых лежит принцип сродства реагента к определенным участкам биополимеров, является весьма перспективным направлением в органической химии нуклеиновых кислот (НК). К таким реакциям относятся регниоселективная модификация НК или белков, матричная блок-конденсация олигонуклеотидов, аффинное мечение и т. д. Привлекательность этого подхода заключается в том, что для повышения селективности реакции используются свойства, заложенные в самой природе нуклеиновых кислот и белков. В настоящей работе рассмотрены некоторые аспекты матричного «сшивания» олигонуклеотидных блоков химическим путем с целью дальнейшей разработки химических моделей энзиматического лигирования и перехода к полностью химическому синтезу генетического материала.

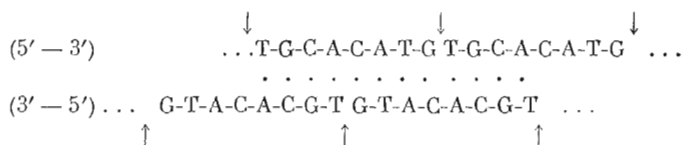
Химический способ синтеза межнуклеотидной связи предполагает предварительную активацию фосфоэфирной группировки олигомера. В литературе описываются два подхода к решению этой задачи: активация фосфатного остатка непосредственно в составе комплементарного комплекса с помощью конденсирующих агентов типа водорастворимого карбодимида [1–4] и использование предварительно активированных производных олигонуклеотидов, например фосфоамидов олигомеров [5, 6].

Первый подход, предложенный Нейлором и Гилхемом [1], был использован для синтеза гомогенных олигонуклеотидов в составе олигомер-полимерных комплексов —  $2 poly(U) \cdot oligo(A)$  и  $2 poly(U) \cdot oligo(dA)$  [7–9],  $poly(C) \cdot (Imp)_6$  [3],  $poly(A) \cdot oligo(dT)$  [4],  $2 poly(C) \cdot d(dG)_2$  [2]. Оказалось, однако, что основным продуктом конденсации олигомеров в трехцепочечных комплексах AU- и GC-состава являются 5'-5'-пирофосфатные производные олигонуклеотидов [2, 9]. Образование продуктов с природным типом связи наблюдалось только в двухцепочечных спиралах:

poly(C) · (Imp)<sub>6</sub> [3] и poly(A) · oligo(dT) [4]. В настоящей работе для проведения индуцируемой водорастворимым карбодинимидом матричной блок-конденсации были использованы два типа двухцепочечных систем, образованных гетерогенными олигодезоксирибонуклеотидами.

1. Комплексы тринуклеотидов и олигомеров с повторяющейся тринуклеотидной последовательностью — d(pG-G-T) · d(p'A-C-C)<sub>i</sub>\*, d(pT-G-G) · d(p'A-C-C)<sub>i</sub> и d(T-G-Gp) · d(p'A-C-C)<sub>i</sub> (варьировалась нуклеотидная последовательность в тринуклеотиде и положение конечного фосфатного остатка). Ранее нами было показано, что в этих системах происходит образование двухцепочечных комплексов с непрерывным заполнением матрицы комплементарными тринуклеотидами [10].

2. Псевдополимерный дуплекс с повторяющимися олигонуклеотидными фрагментами (конкатемер), образованный [<sup>32</sup>P]d(pT-G-C-A-C-A-T-G). Методами кругового дихроизма и УФ-спектроскопии было показано, что при комплексообразовании октануклеотида d(T-G-C-A-C-A-T-G) происходит образование межмолекулярного комплементарного комплекса следующего типа:



Геометрия образующейся двойной спирали близка к геометрии ДНК в В-форме. По предварительной оценке (данные ферментативного «сшивания»), псевдополимер состоит из нескольких десятков октануклеотидных молекул. Рассчитанные термодинамические параметры комплексообразования d(T-G-C-A-C-A-T-G),  $\Delta H_1^\circ$  и  $\Delta S_1^\circ$  на усредненную нуклеотидную пару составляют соответственно  $-9,2 \pm 0,3$  ккал/моль и  $-27 \pm 1$  э.с. Более полно оптические свойства и термодинамика образования конкатемера, а также важность этого нового класса синтетических ДНК-подобных комплексов для решения различных задач молекулярной биологии рассмотрены в статье [11].

На основании анализа литературных данных [3, 4, 7] были выбраны условия, способствующие наиболее полному протеканию матричных реакций — 0,15 М раствор *n*-толуолсульфоната N-циклогексил-N'-2-(4-метилморфолиний)этилкарбодинида (ЦМЭК) в 0,05 М растворе 2-(N-морфолино)этансульфоната калия (МЭС), рН 6,0, содержащем 0,02 М MgCl<sub>2</sub>; общая нуклеотидная концентрация 10 мМ (в расчете на мономер). При выборе значения рН реакционной среды были приняты во внимание два фактора. С одной стороны, повышение рН от 5,5 до 6,9 способствует увеличению выхода продуктов конденсации за счет замедления кислотно-каталитической гидратации ЦМЭК [8], с другой — в области нейтральных значений рН усиливается процесс карбодинимидной модификации тимино-вых и гуаниновых оснований олигомера, отрицательно сказывающийся на выходе продуктов [4, 12].

Так как устойчивость олигомерных комплексов существенно зависит от ионной силы раствора и заметно уменьшается при добавлении карбодинида [4, 7], необходимо было охарактеризовать исследуемые дуплексы в условиях матричной реакции. Близкое совпадение спектров КД комплексов d(pG-G-T) · d(p'A-C-C)<sub>i</sub>, d(pT-G-G) · d(p'A-C-C)<sub>i</sub> и d(T-G-Gp) · d(p'A-C-C)<sub>i</sub> в условиях эксперимента ( $-3^\circ\text{C}$ ) (рис. 1) со спектрами КД соответствующих дуплексов в отсутствие карбодинида (приведены в [10])\*\* указывает на то, что повышение концентрации ЦМЭК до 0,15 М не препятствует образованию комплементарных комплексов; основные парамет-

\* Формулой d(p'A-C-C)<sub>i</sub> обозначен 5'-О-метиловый эфир олигонуклеотида.

\*\* Комплекс d(T-G-Gp) · d(p'A-C-C)<sub>i</sub> сравнивали с комплексом d(pT-G-G) · d(p'A-C-C)<sub>i</sub>.

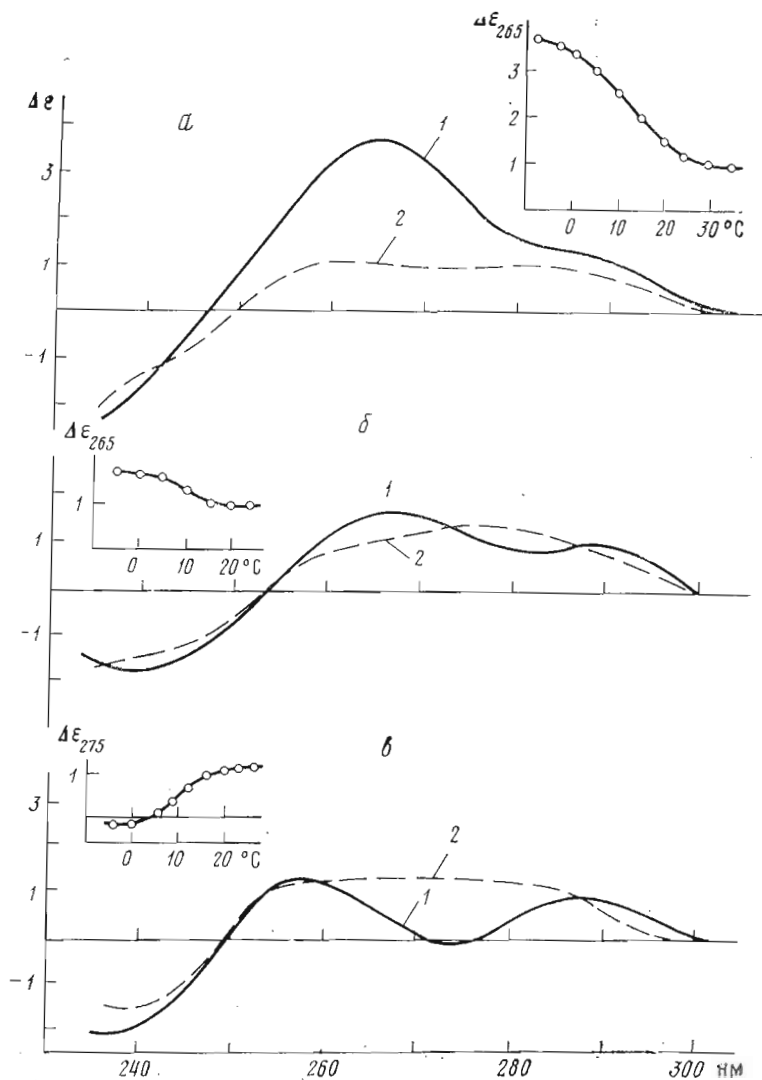


Рис. 1. Спектры КД комплексов  $d(pG-C-T) \cdot d(p'A-C-C)_4$  (а),  $d(pT-G-G) \cdot d(p'A-C-C)_4$  (б) и  $d(T-G-Gp) \cdot d(p'A-C-C)_4$  (в) при  $-5^\circ$  (1) и  $25^\circ\text{C}$  (2) в 0,05 М МЭС (рН 6,0), 0,15 М ЦМЭК, 0,02 М  $MgCl_2$ ; нуклеотидная концентрация на мономер 10 мМ. На вставках — зависимость  $\Delta\epsilon_\lambda$  от температуры

ры двойных спиралей близки. Однако стабильность комплексов в присутствии карбодимида уменьшается, причем температуры плавления во всех системах близки и составляют примерно  $12^\circ\text{C}$  (вставки к рис. 1).

Во всех экспериментах матричные реакции проводили в следующем температурном режиме: реакционные смеси в течение 2 недель выдерживали при  $0^\circ$ , а затем при  $-10^\circ\text{C}$ ; через 7 и 14 сут после начала реакции в реакционные смеси добавляли новые порции водорастворимого карбодимида в количестве, необходимом для получения 0,15 М раствора (прием, предложенный в работе [3]). Анализ продуктов конденсации осуществляли при помощи микроколонной хроматографии в системе Томлинсона — Тенера [13].

На рис. 2 приведен типичный хроматографический профиль исходной реакционной смеси. Вещества пиков I, II и III представляют собой *n*-толуолсульфонат ЦМЭК, тринуклеотид и  $d(p'A-C-C)_4$  соответственно. Обра-

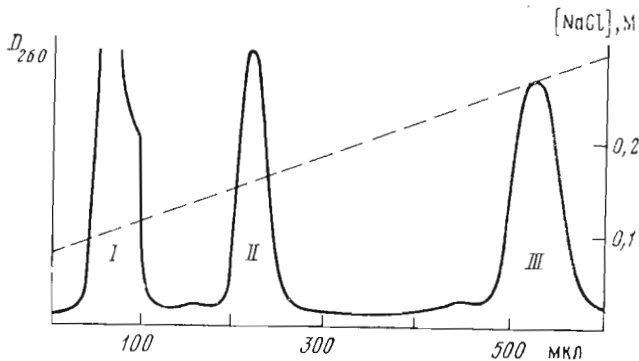


Рис. 2. Профиль элюции на ДЕАЕ-целлюлозе (градиент концентрации NaCl в 7 М мочеvine, pH 7,5) исходной реакционной смеси, содержащей  $d(T-G-Gp) \cdot d(p^*A-C-C)_4$

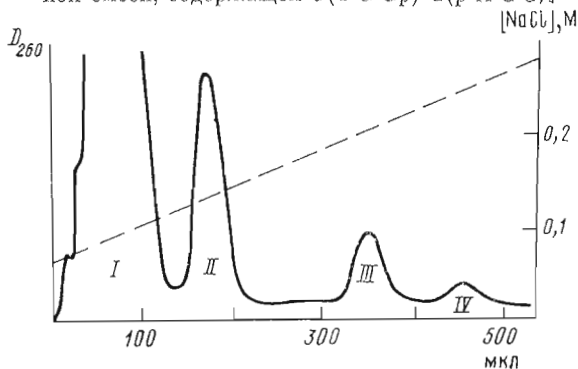


Рис. 3. Профиль элюции на ДЕАЕ-целлюлозе (градиент концентрации NaCl в 7 М мочеvine, pH 3,5) реакционной смеси, содержащей 10 мМ (на мономер)  $d(T-G-Gp) \cdot d(p^*A-C-C)_4$ , 0,15 М ЦМЭК и 0,02 М  $MgCl_2$  в 0,05 М МЭС (pH 6,0) через 28 сут после начала реакции. Пик II —  $d(T-G-Gp)$ , пики III и IV — продукты реакции

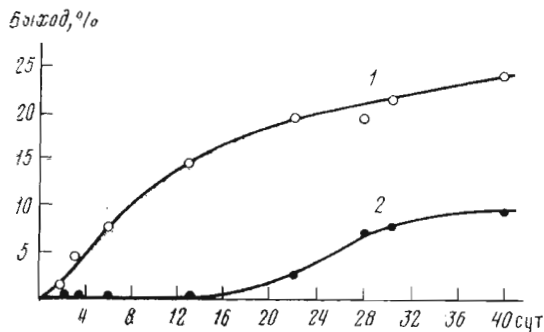


Рис. 4. Кинетические кривые накопления  $d(T-G-Gp)_2$  (1) и  $d(T-G-Gp)_3$  (2). Условия матричной реакции те же, что и на рис. 3

зующиеся в результате реакции олигомеры состава  $(G)_2$ , Т резко отличаются по спектральным характеристикам от матричного додекануклеотида. Кроме того, олигомеры, обогащенные остатками цитозина и аденина, легко отличить от гуанин- и тиминсодержащих последовательностей, сравнивая положения пиков на профиле элюции в нейтральной и кислой (pH 3,5)

среде. В то время как хроматографическая подвижность тринуклеотидов и продуктов их конденсации при pH 3,5 изменится незначительно по сравнению с подвижностью в нейтральном буфере, место выхода  $d(p^*A-C-C)_4$  в кислой среде будет сильно смещено в область более низких концентраций элюирующего буфера (додекануклеотид будет элюироваться вместе с *n*-толуолсульфонатом). Это объясняется тем, что в отличие от G и T остатков A и C обладают выраженными основными свойствами и при pH 3,5 в значительной степени протонирования ( $pK_a$  dA 3,8, dC — 4,3 [14]).

Анализ реакционных смесей, содержащих тринуклеотиды  $d(pG-G-T)$  и  $d(pT-G-G)$ , показал, что даже после выдерживания комплексов в указанных условиях в течение месяца образования продуктов матричной реакции не происходит. В отличие от этих систем в реакционной смеси, одним из компонентов которой является  $d(T-G-Gp)$ , наблюдается накопление продуктов конденсации олигомера (рис. 3). Вещество пика I представляет собой смесь *n*-толуолсульфоната ЦМЭК с  $d(p^*A-C-C)_4$ , а вещество пика II —  $d(T-G-Gp)$  (идентифицированы по положению на профиле элюции в нейтральной и кислой среде и по величине спектральных отношений  $D_{230}/D_{270}$  и  $D_{270}/D_{250}$ ). Вещества пиков III и IV не отличаются по спектральным характеристикам от  $d(T-G-Gp)$  и являются продуктами конденсации тринуклеотида. По положению на профиле элюции в нейтральной системе Томлинсона — Тенера вещество пика III соответствует 7-зарядному аниону и может представлять собой гексануклеотид  $d(T-G-Gp)_2$ . После выделения, обессоливания и обработки вещества пика III фосфомоноэстеразой хроматографическая подвижность его уменьшается, что свидетельствует о наличии у продукта конденсации концевой фосфатного остатка. Дополнительным доказательством того, что вещество пика III представляет собой гексануклеотид с природной 3'-5'-фосфодиэфирной связью, является смещение пика при хроматографии при pH 3,5 в сторону более низких концентраций элюирующего буфера по сравнению с местом выхода в нейтральной среде, обусловленное тем, что в этих условиях вторая ступень диссоциации концевой фосфатного остатка подавлена. Вещество пика IV по положению на профиле элюции в кислой среде и по спектральным характеристикам соответствует нонануклеотиду  $d(T-G-Gp)_3$ . В контрольном эксперименте, проводившемся в отсутствие  $d(p^*A-C-C)_4$ , никаких продуктов конденсации в измеримых количествах не образуется.

В рамках настоящей работы не был проведен анализ кинетических закономерностей образования фосфодиэфирных связей между компонентами олигомерных комплексов. Однако кривые накопления продуктов матричной реакции позволяют сделать некоторые выводы о скорости протекания отдельных стадий процесса в исследуемых условиях. Так, из сопоставления кинетических кривых (рис. 4) видно, что  $d(T-G-Gp)_3$ , как и следовало ожидать, образуется в последовательной реакции  $d(T-G-Gp)_2$  с  $d(T-G-Gp)$ , а выходы гекса- и нонануклеотидов приближаются к максимальным только через 25 сут после начала реакции. По-видимому, активность водорастворимого карбодимида как конденсирующего агента сохраняется в замороженных растворах достаточно долго.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что химический метод матричной конденсации олигомеров может быть с успехом применен для синтеза гетерогенных олигонуклеотидных последовательностей в составе достаточно коротких олигомерных дуплексов. На примере конденсации  $d(T-G-Gp)$  в присутствии додекануклеотидной матрицы показана возможность синтеза с выходом соответственно 25 и 10% гекса- и нонануклеотидов, обогащенных остатками гуанина, для которых реакция образования межнуклеотидной связи протекает особенно неблагоприятно. Показано, что в данной системе решающим фактором эффективности матричной реакции является реакционная способность 5'-гидроксильной группы тринуклеотида. Это согласуется с данными Попова и др. [4, 8], показавших, что в присутствии водорастворимого карбодимида матричная конденсация

идет с большим выходом, если акцептором активированной фосфатной группы является первичный спиртовой 5'-гидроксил.

В отличие от матричных реакций в составе трехспиральных комплексов конденсация дезоксириботринуклеотидов на олигомерной матрице не приводит к образованию продуктов с неестественным типом связи. Это обусловлено двухспиральным строением комплекса и точным фиксированием взаимодействующих олигомеров на гетерогенной матрице.

Индукцируемую водорастворимым карбодимидом блок-конденсацию октануклеотида [ $^{32}\text{P}$ ]d(pT-G-C-A-C-A-T-G) проводили в 0,05 М МЭС, pH 6,0, содержащем 0,02 М  $\text{MgCl}_2$  и 0,1 М ЦМЭК. Нуклеотидная концентрация на мономерное звено 1 мМ. В этих условиях температура плавления конкатемера составляла 13° С. Реакционную смесь выдерживали при 0° С. Разделение компонентов смеси проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в условиях денатурации конкатемера. Уже через 36 ч после добавления ЦМЭК в реакционной смеси был обнаружен продукт димеризации исходного октануклеотида — 16-членный олигонуклеотид. Выход димера через 6 сут после начала реакции составил 13%. Более высокомолекулярные продукты реакции в измеримых количествах не образуются. Отметим, что при действии на [ $^{32}\text{P}$ ]d(pT-G-C-A-C-A-T-G) в условиях образования конкатемера полинуклеотидлигазы происходит почти количественное образование полинуклеотидов (данные сотрудника ИМБ АН СССР П. М. Рубцова). Причины малой эффективности химического «сшивания» объясняются, по-видимому, недостаточной устойчивостью комплекса в условиях реакции, а также низкой реакционной способностью 3'-ОН-группы [4, 8]. После обработки полученного химической конденсацией гексадекануклеотида фосфомоноэстеразой подвижность его в ПААГ несколько увеличивается, хотя радиоактивная метка сохраняется. Эти данные свидетельствуют о том, что синтезированный гексадекануклеотид имеет концевую фосфатную группу, т. е. содержит природную 3'-5'-фосфодиэфирную связь.

Полученные результаты показывают, что сравнительно легко доступные ДНК-подобные конкатемеры, образованные при самоассоциации одного синтетического олигомера гетерогенного состава, могут служить удобной моделью для изучения и проведения химических матричных реакций.

### Экспериментальная часть

Олигодезоксирибонуклеотиды — d(pT-G-G), d(pG-G-T) и d(p\*A-C-C)<sub>n</sub> синтезированы в нашей лаборатории П. И. Поздняковым и Е. В. Ильиной по методике [15]. Синтез d(T-G-Gp) осуществлен В. П. Вейко с использованием твердофазного метода. Октануклеотид d(T-G-C-A-C-A-T-G) синтезирован сотрудником лаборатории С. И. Туркиным [16]. [ $^{32}\text{P}$ ]d(pT-G-C-A-C-A-T-G) получен сотрудником ИМБ АН СССР П. М. Рубцовым путем фосфорилирования d(T-G-C-A-C-A-T-G) с помощью [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТР и полинуклеотидкиназы по методике [17]. Чистота использованных олигодезоксирибонуклеотидов, по данным микроколоночной хроматографии в системе Томлинсона — Генера (pH 3,5) [13], составляла не менее 90%.

ЦМЭК и МЭС — препараты фирмы Merck (ФРГ).

Спектры КД и кривые температурной зависимости дихроичного поглощения измеряли на дихрографе Jouan-II (Франция). Измерение УФ-поглощения проводили на спектрофотометре Cary-15 (США). Для работы использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 0,01 см. Температуру в кюветном отделении регистрировали с помощью термометра медь — константа. Для спектрофотометрического определения концентрации нуклеотидного материала использовали следующие коэффициенты молярной экстинкции при 260 нм: 9350 для d(T-G-C-A-C-A-T-G), 9730 для d(T-G-Gp);  $\epsilon_{260}$  других олигонуклеотидов приведены в работе [10].

Условия индуцированной ЦМЭЖ матричной конденсации олигонуклеотидов приведены в тексте. Анализ реакционных смесей, содержащих трипуклеотиды и  $d(p^*A-C-C)_4$ , проводили при помощи микроколоночной хроматографии в системе Томлинсона — Тенера [13] в нейтральной и кислой (рН 3,5) среде. Выходы продуктов конденсации определяли как отношение площадей соответствующих пиков к сумме площадей пиков исходного трипуклеотида и всех продуктов его конденсации. Анализ продуктов конденсации [ $^{32}P$ ]d(pT-G-C-A-C-A-T-G) в составе конкатемера осуществляли при помощи электрофореза на плоском 20%-ном ПААГ (20% акриламид, 0,66%  $N,N'$ -метиленбисакриламид, 7 М мочевины). Электрофорез проводили в 0,05 М трис-боратном буфере, рН 8,3, содержащем 0,1 мМ EDTA, при напряжении 20 В/см в режиме постоянного напряжения или мощности. Полосы меченых олигонуклеотидов в геле детектировали с помощью автордиографии. Выход продуктов конденсации определяли, измеряя радиоактивность соответствующих полос геля. Элюцию вещества с ПААГ осуществляли как описано в [18].

Авторы выражают большую благодарность П. М. Рубцову за помощь в освоении техники гель-электрофореза и методик работы с радиоактивными препаратами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Naylor R., Gilham P. T. (1966) *Biochemistry*, **5**, 2722–2728.
2. Бадашкева А. Г., Горбунов Н. П., Шамо́вский Г. Г., Шубина Т. Н. (1974) *Изв. Сиб. отд. АН СССР*, № 2, вып. 1, 96–102.
3. Uesugi S., Ts'o P. O. P. (1974) *Biochemistry*, **13**, 3142–3152.
4. Попов С. Г., Шамо́вский Г. Г. (1976) *Изв. Сиб. отд. АН СССР*, № 7, вып. 3, 14–19.
5. Shabarova Z. A., Prokofiev M. A. (1970) *FEBS Lett.*, **11**, 237–240.
6. Гатинская Л. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, № 1, 221–223.
7. Бадашкева А. Г., Кабашева Г. Н., Кюрре Д. Г., Шамо́вский Г. Г., Шубина Т. Н. (1972) *Докл. АН СССР*, **206**, 870–873.
8. Меламед Н. В., Попов С. Г., Шамо́вский Г. Г. (1974) *Изв. Сиб. отд. АН СССР*, № 12, вып. 5, 90–98.
9. Попов С. Г., Шамо́вский Г. Г. (1976) *Молекулярн. биология*, **10**, 576–583.
10. Долиная Н. Г., Громова Е. С., Михайлов С. Н., Шабарова З. А. (1978) *Биоорганич. химия*, **4**, 535–549.
11. Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Turkin S. I., Gromova E. S. (1979) *Nucl. Acids Res.*, in press.
12. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симуква Н. А., Турчинский М. Ф., Шибанов В. Н. (1970) *Органическая химия нуклеиновых кислот*, с. 383–385, «Химия», М.
13. Грачев М. А. (1973) в кн.: *Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот* (Кюрре Д. Г., Венкстерн Т. В., ред.), с. 104–122, «Наука», М.
14. Шабарова З. А., Богданов А. А. (1978) *Химия нуклеиновых кислот и их компонентов*, с. 111–115, «Химия», М.
15. Смирнов В. Д., Сергеева Н. Ф., Ильина Е. В., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) *Докл. АН СССР*, **218**, 722–725.
16. Туркин С. И., Ямщиков В. Ф., Потапов В. К., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1979) *Докл. АН СССР*, **245**, 614–617.
17. Sekiya T., Besmer P., Takeya T., Khorana H. G. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 634–641.
18. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 560–564.

Поступила в редакцию  
6.VI.1979

после доработки  
9.VII.1979

## TEMPLATE CHEMICAL CONDENSATION OF HETEROGENEOUS OLIGONUCLEOTIDES

DOLINNAYA N. G., SHABAROVA Z. A.

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

A study has been made of water-soluble carbodiimide-induced template condensation of heterogeneous oligodeoxyribonucleotides within DNA-like short duplexes —  $d(pG-G-T) \cdot d(p^*A-C-C)_4$ ,  $d(pT-G-G) \cdot d(p^*A-C-C)_4$  and  $d(T-G-Gp) \cdot d(p^*A-C-C)_4$ . Formation of products of chemical trinucleotide condensation in the presence of dodecanucleotide template was observed only in the reaction mixture containing a trimer with 3'-terminal phosphate —  $d(T-G-Gp)$ . The yield of hexa- and nonanucleotides was 25% and 10%, respectively. Under the conditions of pseudopolymeric duplex (double-helix concatenmer) formation, a chemical «coupling» (dimerization) of octanucleotide [ $^{32}P$ ]  $d(pT-G-C-A-C-A-T-G)$  was performed with a yield of 13%.

---