



УДК 547.962.32.07

СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

XXXII*. ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ УЧАСТКИ
УЗНАВАНИЯ РЕСТРИКТАЗ *EcoRI*, *HindIII* и *BamHI*

Берлин Ю. А., Звонок Н. М., Каюшин А. Л.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

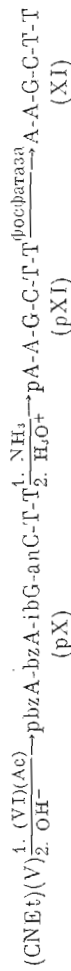
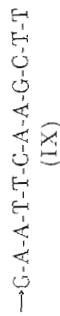
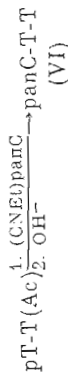
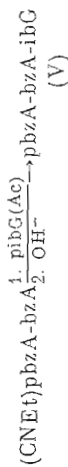
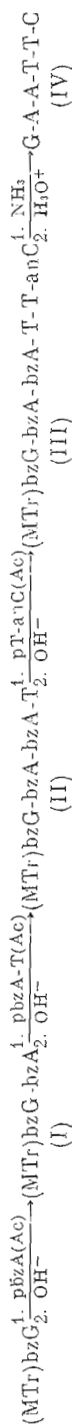
Синтезированы самокомплементарные гексадезоксинуклеотиды GAATTC (*EcoRI*-сайт), AAGCTT (*HindIII*-сайт), GGATCC (*BamHI*-сайт), а также додекадезоксинуклеотиды GAATTC AAGCTT и AAGCTT GAATTC, которые в паре образуют устойчивый комплекс (комбинация сайтов *EcoRI* и *HindIII*), а в отдельности — конкатомерные структуры, стабилизирующиеся ДНК-лигазой и ДНК-полимеразой I.

Для изучения механизма действия эндонуклеаз рестрикции удобными субстратами являются синтетические олигонуклеотиды, в которых легко варьировать структуру соответствующего сайта и соседних участков; некоторые из таких нуклеотидов могут быть использованы также в качестве линкеров или адапторов для введения или модификации липких концов в фрагментах ДНК. В связи с этим мы предприняли синтез двух комплементарных додекануклеотидов (IX) и (XXVII), которые в виде дуплекса представляют собой комбинацию сайтов двух рестриктаз — *EcoRI* и *HindIII*; в ходе синтеза были получены соответствующие самокомплементарные гексануклеотиды GAATTC (IV) и AAGCTT (XI), являющиеся «изолированными» сайтами этих рестриктаз.

Один из додекануклеотидов, GAATTC AAGCTT (IX), был синтезирован фосфодиэфирным методом [3]. В качестве N-защитных групп использовали бензоильную (для аденина), анизоильную (для цитозина) и изобутирильную (для гуанина); аминогруппу в 5'-концевом гуанозине, который на протяжении синтеза неоднократно подвергался щелочной обработке, защищали более устойчивым бензоильным остатком. Конденсирующим реагентом для образования межнуклеотидных связей служил TPS. В ходе синтеза олигонуклеотидную цепь наращивали, как правило, блоками в направлении от 5'- к 3'-концу; при этом 5'-гидроксил растущей цепи защищали монометокситритильной, 3'-гидроксил в R-компоненте — ацетильной, а 5'-фосфат в OH-компоненте — β-цианэтильной группой. Из конечных продуктов синтеза 3'-O- и N-защитные группы удаляли аммонолизом, а монометокситритильную группу — кислотной обработкой. Незащищен-

* Сообщение XXXI см. [1], предварительное сообщение см. [2]. Префикс «d» (дезокси) для краткости всюду опущен. Используются следующие нестандартные сокращения: TEAB — бикарбонат триэтиламония, TPS — триизопробилбензолсульфотриазолид, TPST — триизопробилбензолсульфотриазолид, MTg — монометокситритил, DMtg — деметокситритил, ClPh — *n*-хлорфенил. Символом \mp обозначена межнуклеотидная связь, защищенная *n*-хлорфенильным остатком.

Схема 1



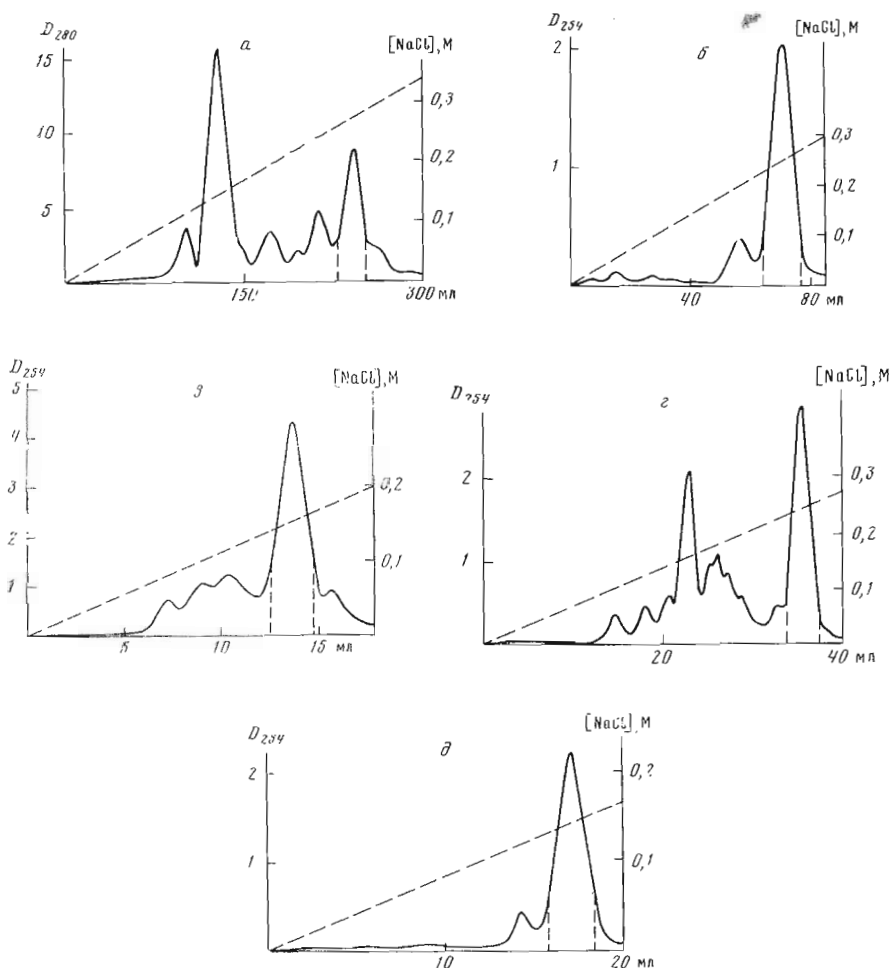
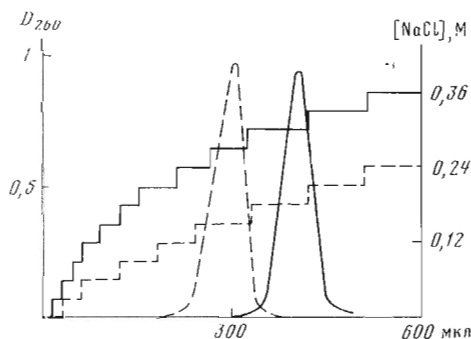


Рис. 1. Выделение олигонуклеотидов хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^-) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины. *a* – защищенный додекануклеотид (VIII), колонка $0,8 \times 20$ см, ТМ-буфер (20 мМ трис- HCl , pH 7,4), 0–0,35 М NaCl , 320 мл, скорость элюции 0,25 мл/мин, выделено 100 OE_{280} (40%); *б* – додекануклеотид (IX), колонка $0,6 \times 18$ см, ТМ-буфер, 0–0,35 М NaCl , 100 мл, 0,42 мл/мин, выделено 15,5 OE_{260} ; *в* – рехроматография (IX), колонка $0,2 \times 29$ см, HCl (pH 3,5), 0–0,3 М NaCl , 28 мл, 0,17 мл/мин, выделено 6,5 OE_{260} ; *г* – додекануклеотид (XXVII), колонка $0,35 \times 28$ см, ТМ-буфер, 0–0,30 М NaCl , 44 мл, 0,30 мл/мин, выделено 7,2 OE_{260} ; *д* – рехроматография (XXVII), колонка $0,22 \times 30$ см, HCl (pH 3,5), 0–0,2 М NaCl , 26 мл, 0,17 мл/мин, выделено 5 OE_{260} .

ные олигонуклеотиды выделяли анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в нейтральном 7 М растворе мочевины и дополнительно очищали в кислом растворе мочевины. Их индивидуальность и первичную структуру доказывали с помощью микроколоночной хроматографии, анализом мономерного состава [4] и методом нуклеотидных карт [5].

Гексануклеотид (III) был синтезирован исходя из (MTr)bzG в результате последовательного парацелирования мононуклеотидом pbzA (Ac) и двумя динуклеотидными блоками (схема 1). Из этого гексануклеотида при взаимодействии с 3'-ацетатами тринуклеотидов (V) и затем (VI) получили соответственно нонануклеотид (VII) и додекануклеотид (VIII), а из тринуклеотидов (V) и (VI) – гексануклеотид (pX). Большинство защищенных олигонуклеотидов выделяли анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе и DEAE-сефадексе; в случае ди- (I) и тетра- (II) нуклеоти-

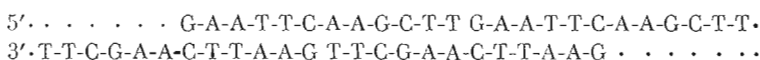
Рис. 2. Микроколоночная хроматография додекануклеотидов (IX) и (XXVII) в ступенчатом градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевице. Колонка 0,9×50 мм, скорость элюции 300 мкл/ч, сплошная линия — хроматография в ТМ-буфере, штриховая — в HCl (рН 3,5)



да (II) для этой цели использовали экстракцию органическими растворителями. После удаления защитных групп деблокированные олигонуклеотиды (IV), (IX), (рXI) и (XIV) были выделены в нейтральном и рехроматографированы в кислом растворе мочевины. Часть соединения (рXI) была дефосфорилирована на колонке с иммобилизованной фосфатазой [4]. Хроматографические характеристики и нуклеотидные фосфы некоторых из полученных олигонуклеотидов приведены на рис. 1—3.

Синтез второго, комплексного додекануклеотида AAGSTTGAATTС (XXVII) предполагалось осуществить химико-ферментативным путем, используя додекануклеотид (IX) в качестве матрицы и 5'-³²P-фосфорилированный гексануклеотид (³²рXI) в качестве праймера. Мы пытались достроить этот праймер нуклеозид-5'-трифосфатами с помощью ДНК-полимеразы 1; ход реакции контролировали гомохроматографией. Оказалось, однако, что в этих условиях достройки гексануклеотида (³²рXI) вообще не происходит (рис. 4). Поэтому мы решили использовать другой подход и попытались с помощью ДНК-лигазы сшить гексануклеотиды (XI) и (³²рIV) на додекануклеотиде (IX) в качестве матрицы; о ходе реакции судили по появлению [³²P]фосфата, устойчивого к фосфатазе. Однако и в этом случае образования додекануклеотида (XXVII) не наблюдалось.

Отрицательные результаты в обоих этих опытах, по-видимому, обусловлены свойствами матрицы: из-за самокомплементарности обеих шестизвенных половин додекануклеотида (IX) могут возникать конкатомерные комплексы типа:



препятствующие образованию комплексов (IX)·(³²рXI) и (IX)·(³²рIV)·(XI) и, следовательно, протеканию реакций элонгации или лигирования с образованием додекануклеотида (XXVII). Обнаружить существование таких конкатомеров с помощью гель-фильтрации меченого додекануклеотида (³²рIX) на калиброванной колонке с сефадексом G-50 не удалось — единственный пик соответствовал исходному додекануклеотиду (IX) (рис. 5а). Поэтому можно было предполагать, что подобные структуры стабилизируются ферментом. Действительно, при обработке меченого додекануклеотида (³²рIX) ДНК-лигазой большая часть радиоактивного фосфата (74%) стала устойчива к фосфатазе. Разделение продуктов шивки в полиакриламидном геле и последующая радиоавтография показали, что при этом образовалась смесь полинуклеотидов, кратных по длине додекануклеотиду (IX) (рис. 6). Преобладание конкатомеризации при действии лигазы на смесь додекануклеотида (IX) и гексануклеотидов (XI) и (IV) было продемонстрировано в опыте, в котором гексануклеотид (IV) был мечен ³³P, а додекануклеотид (IX) — ³²P: доля устойчивого к фосфатазе [³²P]фосфата составила при этом 75%, а [³³P]фосфата — менее 9%. Следует отметить, что появление в ходе этой реакции [³³P]фосфата, устойчи-

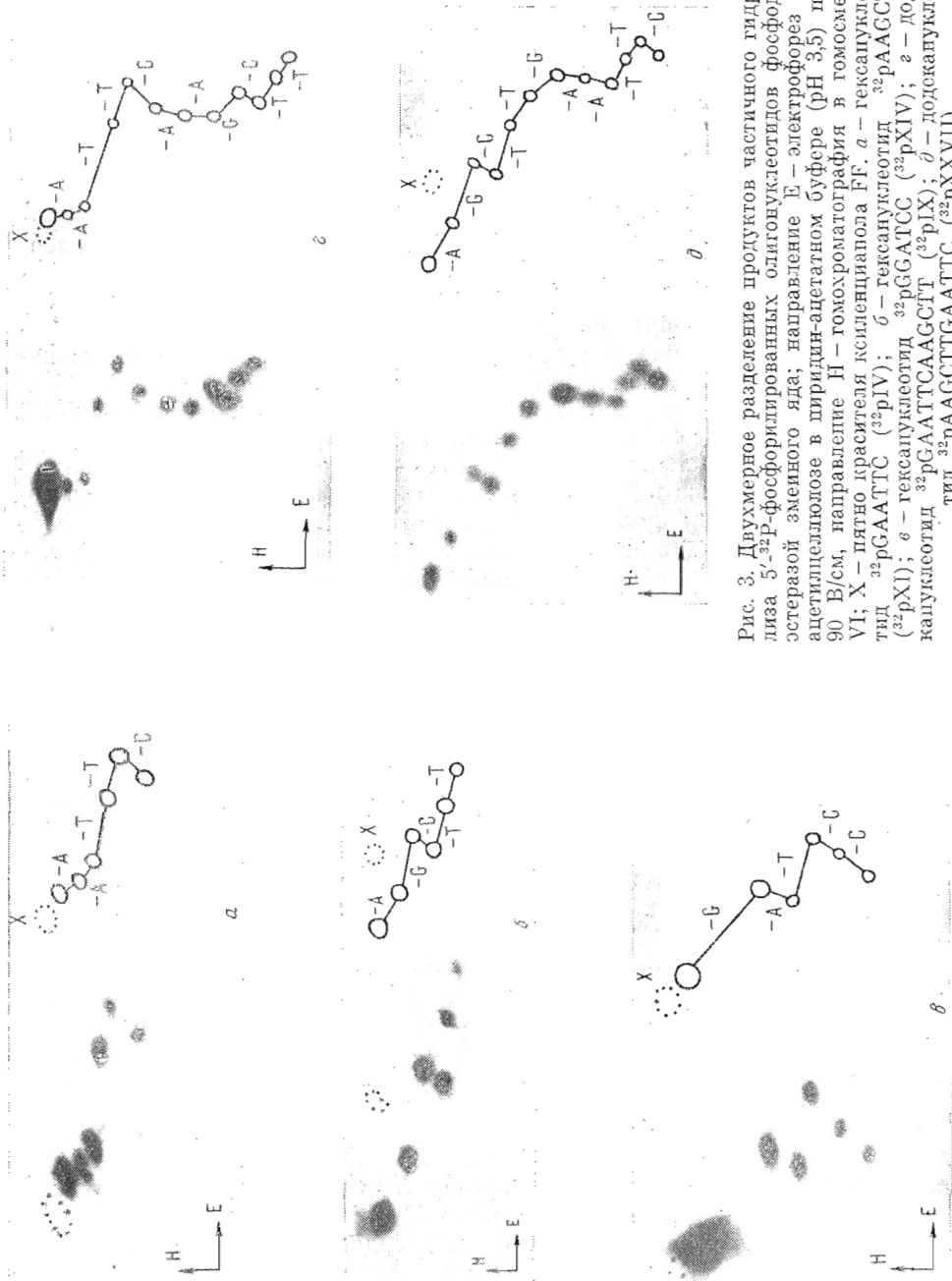


Рис. 3. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза 5'-³²P-фосфорилированных олигонуклеотидов фосфоэстеразой эменного яда; направление E — электрофорез на ацетилцеллюлозе в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5) при 90 В/см, направление H — гомохроматография в гомомесели VI; X — пятно красителя ксианцианола FF. а — гексануклеотид ³²pGAATTС (³²pIV); б — гексануклеотид ³²pAAGCCTT (³²pXI); в — гексануклеотид ³²pGGATCC (³²pXIV); г — додекануклеотид ³²pGAATTCAAGCCTT (³²pIX); д — додекануклеотид ³²pAAGCCTTGAATTС (³²pXXVII)

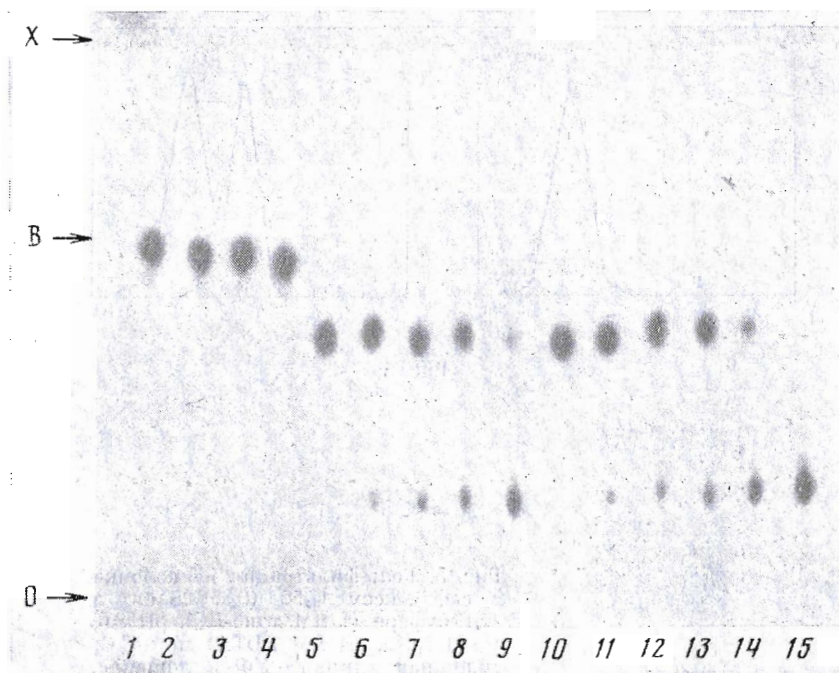


Рис. 4. Анализ продуктов матричной достройки гекса- и гептануклеотидов с помощью ДНК-полимеразы I (гомохроматография в гомосмеси VI; O — старт, X и B — положение красителей ксиленицианола FF и бромфенолового синего). 2 и 4 — соответственно гексануклеотид (^{32}pIV) + додекануклеотид (XXVII) + 4 NTP и гексануклеотид (^{32}pXI) + додекануклеотид (IX) + 4 NTP через 18 ч после прибавления ДНК-полимеразы; 6, 7, 8 и 9 — гептануклеотид ($^{32}\text{pXXXVI}$) + додекануклеотид (XXVII) + 4 NTP через 1, 3, 5 и 18 ч после добавления ДНК-полимеразы; 11, 12, 13 и 14 — гептануклеотид ($^{32}\text{pXXXVII}$) + додекануклеотид (IX) + 4 NTP через 1, 3, 5 и 18 ч после добавления ДНК-полимеразы; 1, 3, 5, 10 и 15 — соответственно гексануклеотиды (^{32}pIV) и (^{32}pXI), гептануклеотиды ($^{32}\text{pXXXVI}$) и ($^{32}\text{pXXXVII}$) и додекануклеотид (^{32}pIX) (свидетели)

вого к фосфатазе, можно объяснить также олигомеризацией самокомплементарного гексануклеотида (^{33}pIV) по тупым концам соответствующего дуплекса. Однако при действии лигазы на гексануклеотид (^{32}pIV) при различных концентрациях фермента и температуре практически не образуется [^{32}P]фосфата, устойчивого к фосфатазе. Аналогичные результаты были получены в случае AAGCTT (XI) и даже гексануклеотида GGATCC (XIV), который представляет собой сайт рестриктазы *Bam*HI и содержит четыре G·C-пары, т. е. должен образовывать более устойчивый дуплекс, чем олигонуклеотиды (IV) и (XI). Вероятно, неэффективность гексануклеотидов в качестве субстратов при лигазной шпивке по тупым концам связана со специфическими требованиями лигазы к структуре субстрата и обусловлена не столько неустойчивостью 6-членных дуплексов, сколько их недостаточными размерами.

В связи с неудавшимися попытками синтезировать дуплекс (IX) · (XXVII) ферментативным путем мы предприняли химический синтез обоих его компонентов модифицированным триэфирным методом из защищенных нуклеозид-3'-фосфатов [6]. В этом синтезе аминогруппы оснований были бензоилированы, 5'-гидроксил дезоксирибозного остатка защищали диметкокситриэтильной, а 3'-гидроксил (в 3'-конце звена) — ацетиловой группой, межнуклеотидный фосфат блокировали *n*-хлорфенильным остатком, а концевой фосфат — *n*-хлорфенильным и цианэтильным остатками. В качестве конденсирующего реагента при образовании межнуклеотидных связей использовали TPST. Ход конденсации и чистоту

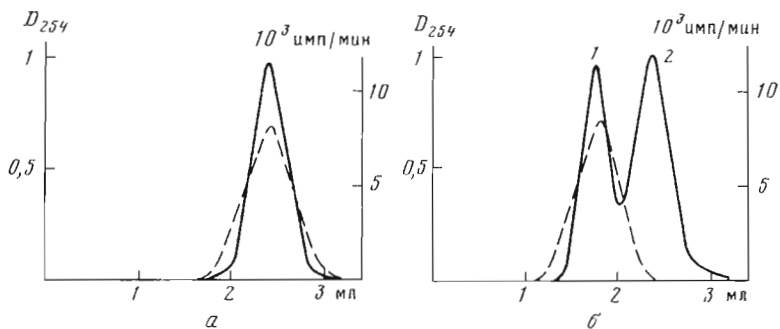


Рис. 5



Рис. 6

Рис. 5. Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-50 (0,35×28 см) в TSE-буфере (1 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA) при 4° С; сплошная линия – УФ-поглощение, штриховая – радиоактивность: а – додекануклеотид (^{32}pIX); б – дуплекс додекануклеотидов (^{32}pIX) · ($^{32}\text{pXXVII}$) в смеси с ундекануклеотидом CCACGAAACCG (пик 2)

Рис. 6. Анализ продуктов лигирования додекануклеотида (^{32}pIX) электрофорезом в 20% полиакриламидном геле (50 мМ трис-боратный буфер). О – старт, X и B – положение красителей ксиленцианола FF и бромфенолового синего

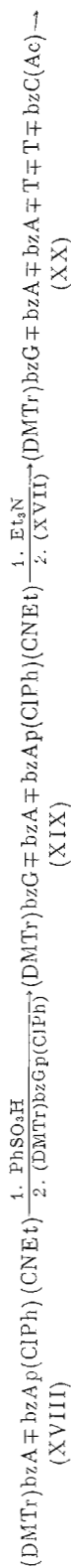
полученных защищенных олигонуклеотидов контролировали с помощью ТСХ. Продукты конденсации очищали колоночной хроматографией на силикагеле. 3'-О-, N- и Р-защитные группы удаляли аммонолизом, диметокситритильную группу – кислотным гидролизом. Незащищенные олигонуклеотиды выделяли и анализировали теми же методами, что и в диэфирном синтезе.

Ход синтеза додекануклеотидов (XXVII) и (IX) в значительной степени определялся наличием в них повторяющихся последовательностей (схема 2). Используя динуклеотиды (XV) и (XVIII) в одних случаях в качестве Р-компонента (после децианэтилирования), а в других – в качестве ОН-компонента (после детритилирования), мы получили тринуклеотиды (XIX), (XXII) и (XXIV). 3'-Концевой тринуклеотид (XVI) был получен взаимодействием 3'-ацетата цитидина с динуклеотидом (XV). Конденсации соответствующих тринуклеотидов – (XIX) и (XVII), (XXIV) и (XXIII) – привели к двум гексануклеотидам, (XX) и

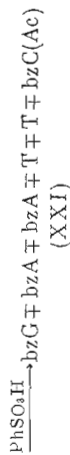
Схема 2



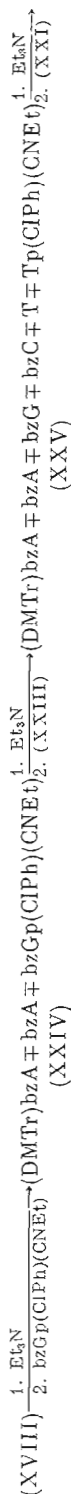
(XVI)



(XX)



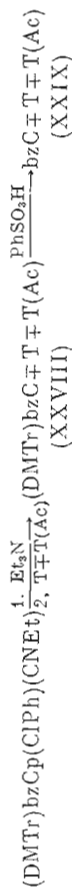
(XXIII)



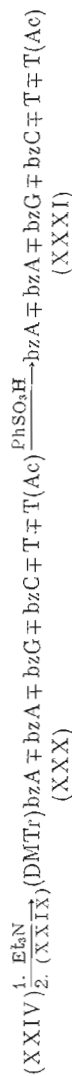
(XXV)



(XXVII)



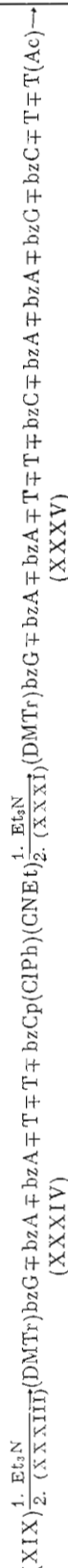
(XXIX)



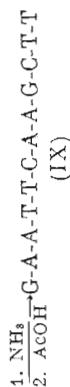
(XXXI)



(XXXIII)



(XXXV)



(XXV), при взаимодействии которых образовался додекануклеотид (XXVI). Аналогичным образом был синтезирован додекануклеотид (XXXV). Хроматографические характеристики незащищенного додекануклеотида (XXVII) приведены на рис. 1 и 2, а нуклеотидная карта — на рис. 3б; продукт полного деблокирования соединения (XXXV) оказался идентичным додекануклеотиду (IX).

Существование и возможность выделения устойчивого дуплекса (IX) · (XXVII) были показаны с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50; детекцию осуществляли спектрофотометрически и по радиоактивности, в качестве маркера использовали ундекануклеотид CCACGAAACCG [1], не комплементарный исследуемым додекануклеотидам (см. рис. 5б).

Как и следовало ожидать, комплементарная достройка гексануклеотида (IV) на додекануклеотидной матрице (XXVII) с помощью ДНК-полимеразы не удалась (см. рис. 4); отрицательный результат был получен и при попытке лигазного сшивания гексануклеотидов (IV) и (32 pXI) на той же матрице. Однако достаточно было удлинить затравку на одно звено, чтобы положение резко изменилось: элонгация гептануклеотидов (32 pXXXVI) и (32 pXXXVII) на соответствующих додекануклеотидах (XXVII) и (IX) протекала с выходом 65 и 72% (рис. 4). Размер продуктов элонгации (32 pIX) и (32 pXXVII) был доказан гомохроматографией, а их первичная структура — с помощью нуклеотидных карт*.

Из полученных данных следует, что конкатомерные структуры, образуемые додекануклеотидами (IX) и (XXVII), устойчивее дуплексов (IV) · (XXVII) и (XI) · (IX) (с участием гексануклеотидов), но лабильнее дуплексов (XXVII) · (XXXVI) и (IX) · (XXXVII) (с участием гептануклеотидов) — по крайней мере, в присутствии ДНК-полимеразы. Если такое соотношение стабильностей сохраняется в присутствии ДНК-лигазы, то представляется вероятным, что додекануклеотидный дуплекс (IX) · (XXVII) может быть использован не только в качестве субстрата соответствующих рестриктаз, но и в качестве линкера для одновременного введения сайтов *EcoRI* и *HindIII* по тушым концам ДНК. Направленность сшивания этого линкера с ДНК может быть обеспечена фосфорилированием одного из его додекануклеотидных компонентов, а структура возникающего липкого конца — последующим выбором рестриктазы.

Экспериментальная часть

В работе использованы N-защищенные нуклеозид-5'-фосфаты (СКТБ БАВ Главмикробиопроба, Новосибирск) и динуклеотиды pT-T, pT-anC и pbzA-bzA производства опытного химического цеха НГУ (эти соединения предварительно очищались хроматографией на DEAE-целлюлозе), нуклеозиды (Calbiochem), тризопропилбензолсульфохлорид (TPS) (Merck), дициклогексилкарбодимид (La Chema), диизопропилэтиламин (Merck), [γ - 32 P]rATP (Amersham), акриламид, метиленбисакриламид, N,N,N',N'-тетраметиленадмин и персульфат натрия (Reanal), DEAE-целлюлоза DE-23, хроматографическая бумага Ватман 1 и 3ММ, DEAE-бумага DE-81 (Whatman), DEAE-сефадекс А-25 и сефадекс G-50 (Pharmacia), DEAE-целлюлоза MN300 DEAE и целлюлоза MN300 (Serva), даукс 50×8 (Serva), ацетилцеллюлоза (Schleicher und Schüll), силикагель L 40—100 (Chemapol), пластинки Silufol UV 254; фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1) (Worthington), щелочная фосфатаза *E. coli* (КФ 3.1.3.1) [7], иммобилизованные фосфатаза и фосфодиэстераза змеиного яда [4], Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) [1], Т4-ДНК-лигаза (КФ 6.5.1.1) [1],

* Наряду с элонгацией наблюдалось частичное расщепление затравок до гексануклеотидов, вероятно, из-за 3'-экзонуклеазного действия ДНК-полимеразы на дуплексы (32 pXXXVI) · (32 pXXXVI) и (32 pXXXVII) · (32 pXXXVII) с отщеплением выступающих мононуклеотидных концов.

ДНК-полимераза I (КФ 2.7.7.7) [8]. Буферные растворы: ТМ-буфер — 20 мМ трис-НСl (рН 7,4), 7 М мочевины; ТСЕ-буфер — 1 мМ трис-НСl (рН 8,0), 1 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA.

1. Межнуклеотидная конденсация (фосфодиэфирный метод) (табл. 1). Ацилирование аминогрупп, цианэтилирование 5'-фосфата, метокситриптилирование 5'-гидроксила и ацетилирование 3'-гидроксила проводили как описано ранее [9, 10]. Смесь Р- и ОН-компонентов, высушенную упариванием с пиридином, растворяли в пиридине (6 мл/ммоль), упаривали вдвое, прибавляли TPS (1 ммоль на 1 мг-экв. ионизируемого фосфата), упаривали до реакционного объема (1 мл/ммоль каждого компонента) и выдерживали 5—7 ч при комнатной температуре. После разложения реакционной смеси диизопропилэтиламиноом (2 моль/моль TPS; добавление при 0°, затем 16 ч при 20° С) приливали при 0° С равный объем 2 н. NaOH в 50% спирте, выдерживали при этой температуре 10 мин (снятие ацетильных группы) или 25 мин (снятие цианэтильной группы), избыток щелочи нейтрализовали дауэксом 50X8 (РyH⁺) и смесь после упаривания хроматографировали на DEAE-целлюлозе или DEAE-сефадексе в водном или водно-спиртовом ТЕАВ или же в растворе NaCl в 7 М мочевины. После хроматографии в растворе мочевины олигонуклеотид сорбировали на DEAE-целлюлозе (НСO₃⁻; 5-кратный избыток сорбента), NaCl и мочевины отмывали 0,05 М ТЕАВ, после чего элюировали 0,7 М ТЕАВ в 30% спирте. Раствор олигонуклеотида в ТЕАВ упаривали и вещество осаждали эфиром из пиридина. При синтезе динуклеозидфосфата (I) и тетра-нуклеотида (II) после разложения реакционной смеси раствор упаривали и экстрагировали из 0,1—0,2 М ТЕАВ последовательно эфиром, этилацетатом и смесью *n*-бутанол — этилацетат [3 : 20 в случае (I), 3 : 7 в случае (II)]. Экстракты, содержащие бутанол, упаривали, после чего проводили омыление и осаждение, как описано выше.

2. GAATTC (IV). Защищенный гексануклеотид (III) был выделен на колонке с DEAE-целлюлозой (НСO₃⁻) в градиенте концентрации ТЕАВ — сначала в воде (0—0,3 М), а затем в 50% спирте (0—0,45 М; вещество элюируется при 0,38 М). Защитные группы удаляли аммонолизом (25% NH₃, 20 ч при 60° С), затем кислотным гидролизом (уксусная кислота — пиридин — вода, 14 : 1 : 3; 36 ч при 20° С). Продукт полного деблокирования 61 ОЕ₂₆₀ вещества хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl⁻, 0,6×18 см) в градиенте концентрации NaCl в ТМ-буфере (0—0,25 М, 100 мл, скорость элюции 0,81 мл/мин) и рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl⁻, 0,3×30 см) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины при рН 3,5 (0—0,15 М, 45 мл, скорость элюции 0,38 мл/мин). Выход гексануклеотида (IV) 26 ОЕ₂₆₀; нуклеотидная карта приведена на рис. 3а.

3. GAATTCAGCTT (IX). Условия выделения защищенного и незащищенного додекануклеотидов (VIII) и (IX) приведены на рис. 1а, б, в, кривые микроколоночной хроматографии — на рис. 2, нуклеотидная карта — на рис. 3г.

4. AAGCTT (XI). Защищенный гексануклеотид (рX) выделяли хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой в градиенте концентрации ТЕАВ в воде (0,05—0,75 М; вещество элюируется при 0,54 М). Удаление защитных групп и выделение гексануклеотида (рXI) проводили как в опыте 2. Раствор 15 ОЕ₂₆₀ (рXI) в 100 мкл 0,25 М ТЕАВ нанесли на колонку (0,2 мл) с иммобилизованной бактериальной щелочной фосфатазой [4], выдержали 3 ч при 37° С, вещество элюировали 2 мл 0,25 М ТЕАВ, элюат упарили и хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (НСO₃⁻, 0,3×15 см) в градиенте концентрации ТЕАВ (0—0,5 М, 30 мл). Получено 8 ОЕ₂₆₀ гексануклеотида (XI); нуклеотидная карта приведена на рис. 3б.

5. GGATCC (XIV). Защищенный гексануклеотид (XIII) выделяли как в опыте 2. Продукт деблокирования 20 ОЕ₂₆₀ вещества хроматографиро-

Межнуклеотидная конденсация (фосфориэфирный метод)

Синтезированный олигонуклеотид	Исходные вещества, мкмоль		Время, ч	Выход, %	Мономерный состав *			
	ОН-компонент	Р-компонент			TPS	G	pC	
			рА	рГ			рТ	
(MT) bzG-bzA (I)	1010	3030	6660	66	1	1,03		
(MT) bzG-bzA-bzA-T (II)	490	2020	6750	46	1	2,10		1,02
(MT) bzG-bzA-bzA-T-T-anC (III)	230	1030	4090	36	1	1,96		2,05
pbzA-bzA-ibG (V)	680	2900	7600	38		2,07	1	
panC-T-T (VI)	370	1160	2670	38				
(MT) bzG-bzA-bzA-T-T-anC-bzA-ibG (VII)	8,54	43	250	35	1	4,02	1	2,10
(MT) bzG-bzA-bzA-T-T-anC-bzA-ibG-anC-T-T (VIII)	1,6	14	86	40	1,1	3,94	1	2,03
pbzA-bzA-ibG-anC-T-T (pX)	42,5	90	500	27		1,98	1	1,99
(MT) bzG-ibG-bzA-T (XII)	150	50	300	33	1	0,94	1	1,06
(MT) bzG-ibG-bzA-T-anC-anC (XIII)	14	70	330	43	1	0,96	1,1	1,03

* Определен по методу [4].

Таблица 2

Межнуклеотидная конденсация (фосфотриэфирный метод)

Синтезированный олигонуклеотид	Исходные вещества, мкмоль		Время, мин	Выход, %	
	ОН-компонент	Р-компонент			TPST
			(DMT) T-Tp (ClPh) (CNEt) (XV)	2000	
T-T-bzC (Ac) (XVII)	143	110	286	35	49
(DMT) bzA-bzAp (ClPh) (CNEt) (XVIII)	2500	1670	5000	60	67
(DMT) bzG-bzAp (ClPh) (CNEt) (XIX)	230	160	460	35	82
(DMT) bzG-bzA-bzA-T-T-bzC (Ac) (XX)	62	41	248	90	90
(DMT) bzC-T-Tp (ClPh) (CNEt) (XXI)	320	193	730	40	67
(DMT) bzA-bzA-bzGp (ClPh) (CNEt) (XXIV)	328	250	660	50	72
(DMT) bzA-bzA-bzG-bzG-T-Tp (ClPh) (CNEt) (XXV)	43	22	172	90	49
(DMT) bzA-bzA-bzG-bzG-T-T-bzG-bzA-T-T-bzC (Ac) (XXVI)	7	3,5	35	180	91
(DMT) bzC-T-T (Ac) (XXVIII)	46	30	100	60	56
(DMT) bzA-bzA-bzG-bzG-T-T (Ac) (XXX)	22,5	15	90	120	50
(DMT) T-T-bzCp (ClPh) (CNEt) (XXXI)	90	60	480	40	95
(DMT) bzG-bzA-bzA-T-T-bzCp (ClPh) (CNEt) (XXXIV)	45	18	180	120	81
(DMT) bzG-bzA-bzA-T-T-bzC-bzA-bzA-T-T-bzC-T-T (Ac) (XXXV)	7,2	3,2	36	120	44

ли на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- , $0,2 \times 29$ см) в градиенте концентрации TEAB в воде ($0,05-0,45$ М, 25 мл). Получено 8 OE_{260} гексануклеотида (XIV); нуклеотидная карта приведена на рис. 3в.

6. *Межнуклеотидная конденсация (фосфотриэфирный метод)*. TPST и полностью защищенные нуклеозид-3'-фосфаты получали по методу [6], 5'-О-диметокситрилитильные и 3'-Р-дианэтильные защитные группы удаляли как описано ранее [6]. Смесь OH^- и Р-компонентов (избыток Р-компонента 25–100%), высушенную упариванием с пиридином, растворяли в пиридине (3 мл/ммоль), добавляли TPST (2–5-кратный избыток по отношению к Р-компоненту), упаривали до суммарной концентрации всех трех реагентов ~ 1 М и оставляли при 20°C на 0,3–3 ч. После исчезновения OH^- -компонента (по данным ТСХ в системе хлороформ–метанол, 9:1) к раствору при 0°C прибавляли равный объем 50% водного пиридина (20°C), выдерживали 30 мин и упаривали. Остаток выливали в смесь равных объемов хлороформа и 0,5 М NaHCO_3 , дважды экстрагировали хлороформом, объединенный экстракт после обычной обработки упаривали и остатки пиридина удаляли упариванием с толуолом. Продукт конденсации выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя ступенчатым градиентом концентрации метанола в хлороформе.

7. *AAGCTTGAATTC (XXVII)*. Синтезы защищенных олигонуклеотидов (XV)–(XXVI) описаны в табл. 2. Раствор 2 мг защищенного додекануклеотида (XXVI) в 3 мл 25% водн. NH_3 выдержали 20 ч при 60°C , упарили досуха, остаток обработали 3 мл 80% уксусной кислоты (30 мин при 20°C), снова упарили, тщательно удаляя остатки уксусной кислоты, и хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^-) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine при pH 7,5 и 3,5 (рис. 1г, д). Получено 5 OE_{260} незащищенного додекануклеотида (XXVII). Кривые микроколоночной хроматографии приведены на рис. 2, нуклеотидная карта — на рис. 3д.

8. *GAATTC AAGCTT (IX)*. Синтезы защищенных олигонуклеотидов (XXVIII)–(XXXV) описаны в табл. 2. Додекануклеотид (IX) получен деблокированием 2 мг (XXXV), как в предыдущем опыте. После выделения в условиях опыта 7 получили 8,3 OE_{260} (хроматография при pH 7,5) и 5 OE_{260} (хроматография при pH 3,5) додекануклеотида (IX). Кривые микроколоночной хроматографии и нуклеотидная карта совпали с описанными выше для продукта фосфодиэфирного синтеза (рис. 2, 3г).

9. *5'- ^{32}P -фосфорилирование олигонуклеотидов*. 30 мкл раствора, содержащего 1 нмоль олигонуклеотида, 2 нмоль $\gamma\text{-ATP}$, 10 мкКи $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 5–10 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы [1], 10 мМ MgCl_2 , 5 мМ дитиотреит и 50 мМ трис- HCl (pH 9,0), инкубировали 1 ч при 37°C и меченый олигонуклеотид выделяли гель-фильтрацией на сефадекс G-50 ($0,3 \times 22$ см; сверхтонкий), элюируя TSE-буфером.

10. *Лигирование олигонуклеотидов*. Реакционную смесь отжигали (5 мин при 80°C , охлаждение до 20°C в течение 1–2 ч, затем быстрое охлаждение до 4°C) в лигазном буфере (20 мМ трис- HCl (pH 7,6), 10 мМ MgCl_2 , 10 мМ дитиотреит), добавляли $\gamma\text{-ATP}$ до концентрации 0,1 мМ, Т4-ДНК-лигазу и инкубировали. Для определения степени лигирования аликвоту (1 мкл) реакционной смеси обрабатывали 1 ч при 60°C избытком щелочной фосфатазы в 4 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис- HCl (pH 9,3) и 2 мМ MgCl_2 , и смесь продуктов дефосфорилирования разделяли электрофорезом на DEAE-бумаге в пиридин-ацетатном буфере (pH 3,5) в течение 20 мин при напряжении 35 В/см. Радиоактивные пятна, локализованные с помощью радиоавтографии, вырезали и радиоактивность определяли в толуольном сцинтиляторе.

а. Самокомплементарные гексануклеотиды (IV), (XI) и (XIV). 50 мкл раствора, содержащего 1 нмоль $[\text{5}'\text{-}^{32}\text{P}]\text{гексануклеотида}$ (^{32}pIV) или (^{32}pXI) или ($^{32}\text{pXIV}$) и 150 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы, инкубировали 5 ч при 5°C , добавили 100 ед. акт. лигазы и выдержали 13 ч при 8°C . В серии

опытов концентрация гексануклеотидов варьировала от 8 до 33 мкМ, концентрация ДНК-лигазы — от 1 до 5 ед/мкл, температура — от 5 до 12°С. Пробы на устойчивость [³²Р]фосфата к фосфатазе показали отсутствие сшивок.

б. Гексануклеотиды (³²рIV) и (XI) на додекануклеотидной матрице (IX). Смесь (100 мкл), содержащую 1 нмоль додекануклеотида (IX), 1,2 нмоль гексануклеотида (³²рIV), 1,4 нмоль гексануклеотида (XI) и 75 ед. акт. ДНК-лигазы, инкубировали 7 ч при 6°С, прибавили 50 ед. акт. лигазы и выдержали еще 15 ч при 8°С. Степень сшивки (³²рIV) и (XI) составила 5%.

в. Гексануклеотиды (³²рXI) и (IV) на додекануклеотидной матрице (XXVII). В условиях опыта б степень сшивки составила 4%.

г. Гексануклеотиды ³³рGAATTC (³³рIV) и AAGCTT (XI) на додекануклеотидной матрице ³²рGAATTCAAGCTT (³²рIX). В условиях опыта б степень сшивки составила 75% (по [³²Р]фосфату) и 9% (по [³³Р]фосфату; последнее значение может быть завышено из-за частичного перекрытия каналов счета обоих радиоактивных изотопов).

д. Додекануклеотид ³²рGAATTCAAGCTT (³²рIX). Раствор (30 мкл), содержащий 0,3 нмоль додекануклеотида (³²рIX) и 15 ед. акт. ДНК-лигазы, инкубировали 0,5 ч при 10°С и затем 1 ч при 20°С. Доля [³²Р]фосфата, устойчивого к фосфатазе, составила 74%; продукты сшивки разделяли электрофорезом в 20% полиакриламидном геле (рис. 6).

II. Комплексообразование додекануклеотидов (IX) и (XXVII).

а. Смесь додекануклеотидов (³²рIX) и (³²рXXVII) (по 0,25 нмоль) и ундекануклеотида CCACGAAACCG (0,5 нмоль) в качестве маркера в 20 мкл лигазного буфера (опыт 10а) была отожжена и подвергнута гель-фильтрации при 9–25°С (см. рис. 5б).

б. Раствор 0,4 нмоль додекануклеотида (³²рIX) в 20 мкл буфера обрабатывали как в опыте 11а и хроматографировали при 1–9°С (см. рис. 5а).

12. Матричная достройка олигонуклеотидов с помощью ДНК-полимеразы I. а. Достройка гексануклеотида (³²рIV) и гептануклеотида (³²рXXXVI) на додекануклеотиде (XXVII). Реакцию проводили 18 ч при 6°С в буфере (50 мкл), содержащем 20 мМ трис-НСl (рН 7,4), 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 50 пмоль гекса- или гептануклеотида, 60 пмоль додекануклеотида, ТТР, СТР, АТР, ГТР (по 2 пмоль) и 4 ед. акт. ДНК-полимеразы I. По данным гомохроматографии (рис. 4) гексануклеотид (³²рIV) остался неизмененным; гептануклеотид (³²рXXXVI) был достроен до додекануклеотида (³²рIX) за 1 ч на 12%, за 3 ч — на 27%, за 5 ч — на 38%, за 18 ч — на 72% и расщеплен до гексануклеотида соответственно на 0,5; 1,6; 2,3 и 7%. Продукт достройки (³²рIX) был выделен и очищен гель-фильтрацией на сефадексе G-50 (колонка 0,34×28 см) в TSE-буфере; нуклеотидная карта идентична приведенной на рис. 3г.

б. Достройка гексануклеотида (³²рXI) и гептануклеотида (³²рXXXVII) на додекануклеотиде (IX). Полимеразную реакцию и последующий анализ проводили в условиях опыта а (см. рис. 4). Гексануклеотид (³²рXI) остался неизмененным; гептануклеотид (³²рXXXVII) был достроен до додекануклеотида (³²рXXVII) на 9, 20, 28 и 65% и расщеплен до гексануклеотида на 0,5; 1,2; 1,9 и 5%. Нуклеотидная карта продукта достройки идентична приведенной на рис. 3д.

Авторы благодарны А. И. Гуревичу за ДНК-полимеразу I, Е. Н. Лебеденко за ДНК-лигазу, Е. Ф. Болдыревой за нуклеотидные карты гексануклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Ю. А., Каюшин А. Л., Тактакишвили М. О., Лебеденко Е. Н., Коробко В. Г., Чувпидо С. А., Колосов М. Н. (1980) Биоорг. химия, 6, 1026–1036.
2. Берлин Ю. А., Звонко Н. М. (1980) Биоорг. химия, 6, 141–143.

3. Kössel H., Seliger H. (1975) in: Progress in Chemistry of Organic Natural Products (Herz W., Grisebach H., Kirby G. W., eds), vol. 32, pp. 297-508, Springer - Verlag, Wien - N. Y.
4. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) Биохимия, 39, 747-750.
5. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) Nucleic Acids Res., 1, 331-353.
6. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. (1977) Nucleic Acids Res., 4, 353-371.
7. Garen A., Levinthal C. (1960) Biochim. et biophys. acta, 38, 470-481.
8. Jovin T. M., Englund P. T., Bertsch L. L. (1969) J. Biol. Chem., 244, 2996-3008.
9. Ralph R. K., Khorana H. G., (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 2926-2937.
10. Weimann G., Khorana H. G. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 419-430.

Поступила в редакцию
17.I.1980

SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES.
XXXII. OLIGODEOXYNUCLEOTIDES CONTAINING THE RECOGNITION
SITES FOR *EcoRI*, *HindIII*, AND *BamHI* RESTRICTASES

BERLIN Yu. A., ZVONOK N. M., KAYUSHIN A. L.

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

Oligodeoxynucleotides dGAATTC, dAAGCTT, dGGATCC, dGAATTCAAGCTT, and dAAGCTTGAATTC containing the recognition sites for restriction endonucleases *EcoRI*, *HindIII*, and *BamHI* have been synthesized by the phosphodiester and phosphotriester methods. Each of the dodecanucleotides self-associates into concatomers stabilized by T4 DNA ligase or *E. coli* DNA polymerase I, whereas the two 12-mers form a stable duplex which is a potential blunt-ended linker combining *EcoRI* and *HindIII* sites.