



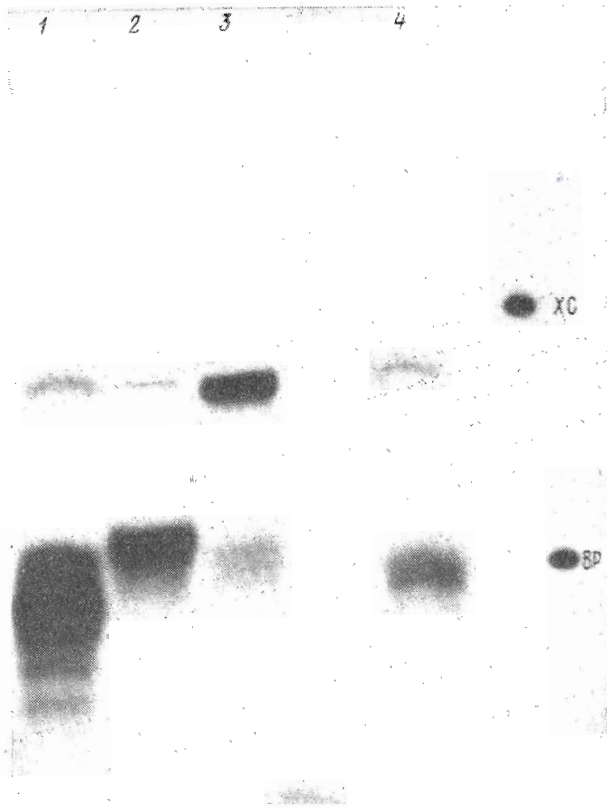
УДК 547.963.32.04

СПИВКА АНАЛОГОВ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ  
С P—S—C(5')-СВЯЗЯМИ ПОЛИНУКЛЕОТИДЛИГАЗОЙ ФАГА Т4*Рыбаков В. Н., Ривкин М. И., Богачев В. С.,  
Егумарев В. П.**Новосибирский институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Академии наук СССР, Новосибирск*

Исследование субстратных свойств аналогов нуклеиновых кислот имеет важное значение для изучения специфичности и механизма действия ферментов, метаболизма нуклеиновых кислот и выявления уникальных свойств этих аналогов, обеспечивающих их последующее научное и практическое применение. Одним из наиболее перспективных классов аналогов являются, на наш взгляд, нуклеиновые кислоты, в которых один из атомов кислорода каждой межнуклеотидной фосфодиэфирной связи замещен на атом серы. В зависимости от положения замещаемого атома кислорода эти аналоги можно разбить на три группы: 1) аналоги с C(3')—S—P-связями; 2) аналоги с S=P—O—C(5')-связями; 3) аналоги с P—S—C(5')-связями. Синтез аналогов первой группы, по-видимому, не проводился вообще. Аналоги второй группы, как было показано, обладают очень интересными субстратными свойствами и являются мощными индукторами интерферона [1]. Методы синтеза аналогов третьей группы были разработаны давно, однако их субстратные свойства изучены пока еще слабо [2].

Мы обнаружили, что аналоги олигодезоксинуклеотидов с P—S—C(5')-связями являются субстратами полинуклеотидлигазы фага Т4, сшивающей их как друг с другом, так и с природными олигодезоксинуклеотидами на матрице — олигодезоксинуклеотиде. Результаты электрофоретического анализа этих сшивок (рисунк) свидетельствуют, что в ходе ферментативной реакции в каждой реакционной смеси кроме исходного меченного <sup>32</sup>P олигонуклеотида появляется новое меченное <sup>32</sup>P вещество, электрофоретическая подвижность которого практически не отличается от электрофоретической подвижности докосануклеотида — продукта сшивки природных олигодезоксинуклеотидов (дорожка 4). Относительно невысокая степень сшивки природных олигодезоксинуклеотидов, вероятно, связана с тем, что меченный <sup>32</sup>P декадезоксинуклеотид оказался частично деградировавшим. В контрольных реакционных смесях, идентичных по составу реакционным смесям, но не содержащих либо полинуклеотидлигазы фага Т4, либо гексадекадезоксинуклеотида, эти новые меченные <sup>32</sup>P вещества не появлялись (радиоавтограф полиакриламидного геля после электрофореза в нем контрольных реакционных смесей здесь не приведен).

Полученные результаты, демонстрирующие возможность встройки аналогов олигодезоксинуклеотидов с P—S—C(5')-связями в ДНК, представ-



Результаты гель-электрофоретического анализа сшивки олигодезоксинуклеотидов  $^{32}\text{pCAAATGGAAA}$  (I) и  $\text{pGGATGGATGTAA}$  (II) и их аналогов с P-S-C(5')-связями соответственно (III) и (IV) полинуклеотидлигазой фага T4. Реакционные смеси содержали фермент, гексадекадезоксинуклеотид-матрицу  $\text{pCCATCCTTTCCATTTG}$  и дезоксинуклеотиды (I) и (IV) – дорожка 1, (III) и (IV) – дорожка 2, (II) и (III) – дорожка 3, (I) и (II) – дорожка 4. Красители-маркеры: BP – бромфеноловый голубой, XC – ксиленцанол

ляют, на наш взгляд, большой интерес в свете необычных субстратных свойств этих аналогов, делающих возможным ряд интересных и важных их применений в энзимологии и молекулярной биологии [2].

### Экспериментальная часть

Синтез олигодезоксинуклеотидов и их аналогов с P-S-C(5')-связями и выделение полинуклеотидкиназы фага T4 проводили по методам работы [2]. Полинуклеотидлигазу фага T4 выделяли по методу [3]. Ферментативное фосфорилирование олигонуклеотидов и их аналогов и их очистку проводили как указано в работе [2].

Сшивку олигодезоксинуклеотидов и их аналогов полинуклеотидлигазой фага T4 осуществляли при  $5^{\circ}\text{C}$  в течение 6 ч. Каждая реакционная смесь объемом 0,04 мл содержала 0,02 М трис-HCl (pH 7,6), 0,01 М дитиотреит, 0,01 М  $\text{MgCl}_2$ , 2 ед. акт. полинуклеотидлигазы фага T4 (определение единицы активности дано в работе [3]), гексадекадезоксинуклеотид  $\text{pCCATCCTTTCCATTTG}$  и фосфорилированные по 5'-концу додекамер и декамер (декамер мечен  $^{32}\text{P}$ ). Концентрация каждого из олигодезоксинуклеотидов и их аналогов в реакционных смесях была  $1,2 \cdot 10^{-6}$  М. По окончании времени сшивки все олигонуклеотиды в каждой реакционной смеси осаждали этанолом в присутствии носителя-тРНК, каждый осадок

растворяли в 0,01 мл 80% формамида, содержавшего красители-маркеры, инкубировали 0,5 мин в кипящей водяной бане и подвергали электрофорезу при 1200 В в блоке (20×20×0,04 см) 20% полиакриламидного геля, содержавшего 7 М мочевины.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шомбергйн З. А., Гиллер С. Н. В кн.: Успехи химии гетероциклов. Рига: Зинатне, 1976, с. 307—322.
2. Rybakov V. N., Rivkin M. I., Kumarev V. P. Some substrate properties of analogues of oligothymidilates with P—S—C(5')-bonds.—Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 1, p. 189—201.
3. Weiss B., Jacquemin-Sablon A., Live T. R., Fareed G. C., Richardson C. C. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4.—J. Biol. Chem., 1968, v. 243, № 17, p. 4543—4555.

Поступила в редакцию  
13.IV.1981

### JOINING OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDE ANALOGS HAVING P — S — C(5') BONDS BY FAGE T4 POLYNUCLEOTIDE LIGASE

РЫБАКОВ В. Н., РИВКИН М. И., БОГАЧЕВ В. С., КУМАРЕВ В. П.

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch  
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Oligonucleotide analogs with P—S—C(5') bonds were shown to be the substrates for the fage T4 polynucleotide ligase. This enzyme catalyzes joining of these analogs between themselves and also their joining with natural oligodeoxynucleotides on the oligodeoxynucleotide template. This finding paves the way for introducing these analogs, possessing unusual substrate properties, into DNA.