



УДК 557.113(4+6)

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

III. СИНТЕЗ КОНЦЕВЫХ ИНВЕРТИРОВАННЫХ ПОВТОРОВ IS1-ЭЛЕМЕНТА

*Шабарова З. А., Вейко В. П., Долгина Н. Г.,
Друца В. Л., Метелев В. Г., Орецкая Т. С.,
Шурмаль А. А.*

Химический факультет и Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Синтезированы три 35-звенных ДНК-дуплекса, «верхние» цепи которых соответствуют либо несовершенному (природному), либо совершенному концевому инвертированному повтору IS1-элемента. Олигонуклеотиды синтезировали фосфотриэфирным методом в растворе. Сборку ДНК-дуплексов осуществляли параллельно ферментативным (T4-ДНК-лигаза) и химическим (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимид) путем. Предварительно изучали (УФ-спектроскопия) термическую устойчивость ДНК-дуплексов, составленных из 2–6 различных олигонуклеотидов. Показано, что ДНК-лигаза эффективно катализирует соединение олигонуклеотидных блоков даже в условиях нестабильности ДНК-дуплекса; однако для нее существует минимальный дуплекс-субстрат (размер лежит в интервале 9–15 нуклеотидных пар), уменьшение которого приводит к резкому снижению эффективности лигирования. Химическая сборка дуплексов происходит только в условиях устойчивости двойной спирали, выход целевого продукта, полученного в результате двух последовательных сшивок, достигает 50%. Обнаружено, что эффективность химического лигирования зависит от природы нуклеотидных звеньев, между которыми образуется новая фосфодиэфирная связь.

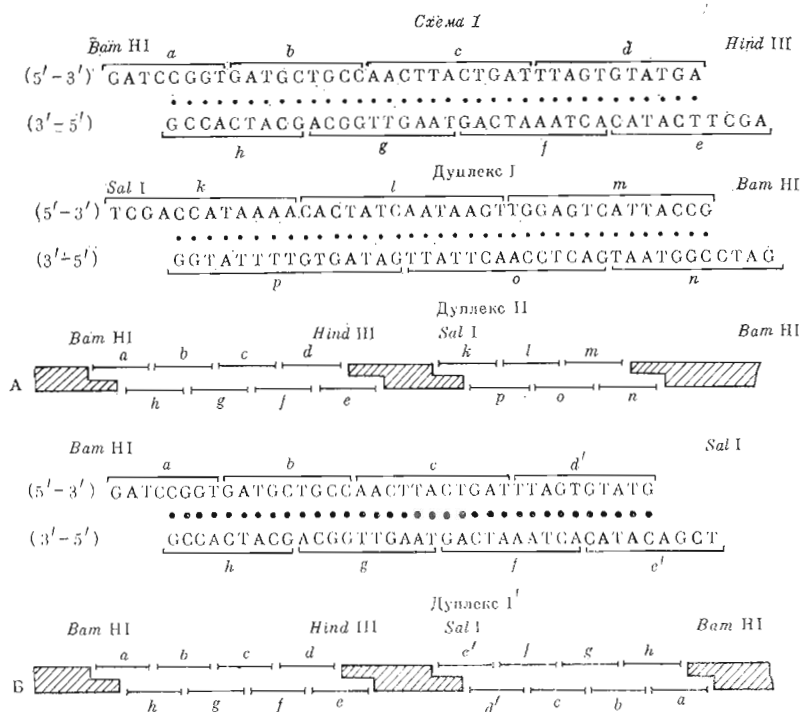
На базе систематического изучения химических реакций в составе конкатемерных ДНК-дуплексов был разработан альтернативный энзиматическому метод сборки двуспиральных ДНК из олигонуклеотидных блоков под действием химического реагента (химическое лигирование) [1, 2]. Использование химических реакций, моделирующих действие T4-ДНК-лигазы, позволяет значительно расширить масштаб синтеза генетического материала, а также вводить в процессе сборки ДНК-дуплексов точечные модификации сахарофосфатного остова, например неприродные межнуклеотидные связи (пиррофосфатные, фосфоамидные), аномальные углеводные остатки и т. д. [3, 4].

Несмотря на ряд преимуществ метода химического лигирования перед ферментативным, скорость и эффективность образования межполимерных связей при химической активации фосфомоноэфира, особенно с участием достаточно слабого нуклеофила — 3'-концевой гидроксильной группы (синтез природной межнуклеотидной связи), значительно ниже, чем при ферментативной реакции. В связи с этим оставалось неясным, можно ли при химической сборке уникального фрагмента ДНК из нескольких олигонуклеотидов различной первичной структуры добиться эффективного протекания всех актов матричного «сшивания».

Чтобы ответить на этот вопрос, мы предприняли синтез двух типов функционально значимых 35-звенных ДНК-дуплексов (схема 1), причем их сборка из олигонуклеотидных блоков *a* — *p* осуществлялась параллельно ферментативным (T4-ДНК-лигаза) и химическим (водорастворимый карбодимид) путем. «Верхние» цепи дуплексов I и II соответствуют ле-

Сокращения: $T_{пл}$ — температура плавления; EDAC — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимид, гидрохлорид; MES — 2-морфолиноэтансульфонат; TPS — 1,3,5-триизопропилбензолсульфохлорид. Префикс «d» (дезокс) всюду опущен.

вому и правому фрагментам концевой инвертированного несовершенного повтора IS1-элемента (рис. 1) — генетической структуры, ответственной за транспозицию фрагментов клеточного генома. Концы дуплексов I и II соответствуют липким концам, индуцируемым указанными на схеме 1 эндонуклеазами рестрикции. С целью получения дуплексов различной термической устойчивости варьировали длину перекрывающихся блоков. В дуплексе I, построенном из 8—10-звенных олигонуклеотидов, она составляла 4—6 звеньев, в дуплексе II, сформированном из 12—15-звенных олигомеров, — 7—8 звеньев. Оба дуплекса предполагается встроить в плазмиду так, как показано на схеме 1А, с образованием системы концевых инвертированных повторов IS1-элемента.



Известно, что структура дуплексов, образующихся при транспозиции фрагментов генома, как правило, несовершенна и имеет много петель [5]. Роль этого явления не выяснена. Несомненный интерес представляет сравнить активность при транспозиции природного и «идеального» (с точки зрения комплементарности) «стебля» транспозона или IS-элемента. С целью получения искусственного IS1-элемента с совершенным концевым инвертированным повтором нами был дополнительно синтезирован дуплекс I' (схема I), который отличается от дуплекса I последовательностью двух концевых олигонуклеотидов d и e (в дуплексе I' олигонуклеотиды d' и e' образуют липкий конец SalI вместо липкого конца HindIII, заданного в дуплексе I). Совершенный концевой инвертированный повтор может быть легко получен встраиванием дуплексов I и I' в природную ДНК (схема 1Б).

Таким образом, целью настоящей работы явилось: а) синтез трех 35-звенных ДНК-дуплексов, способных образовывать несовершенный (природный) или совершенный концевой инвертированный повтор IS1-элемента; б) изучение особенностей сборки дуплексов I (I') и II из синтетических олигонуклеотидов химическим и ферментативным путем; в) исследование термической устойчивости двух типов ДНК-дуплексов с несопадающими одноцепочечными разрывами, различающихся длиной перекрывающихся олигонуклеотидных блоков.

Синтез исходных олигонуклеотидов а — р, входящих в состав дуплексов I, I' и II, проводили фосфоритриэфирным методом [6, 7], исходя из пол-

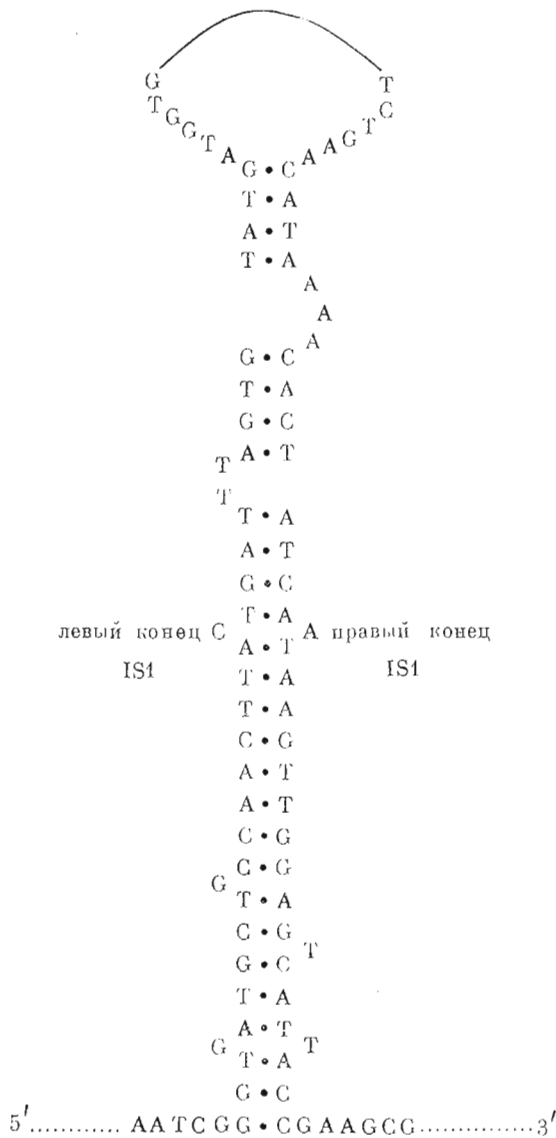
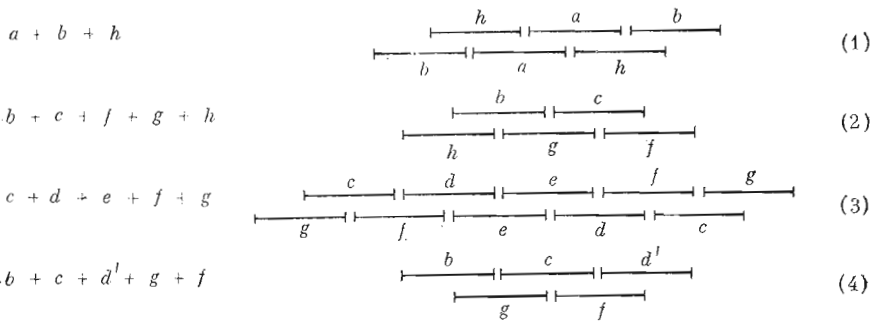


Рис. 1. Структура концевых инвертированных повторов IS1-элемента [5]

ностью защищенных дезоксирибонуклеозид-3'-фосфатов. Было получено 16 8—15-звенных олигодезоксирибонуклеотидов в количестве 60—200 ОЕ₂₇₃. Гомогенность выделенных веществ, по данным ВЭЖХ, составляла 95—98%. Нуклеотидная последовательность всех синтезированных олигонуклеотидов подтверждена методом Максама — Гилберта [8].

Изучение термической устойчивости олигонуклеотидных дуплексов I (I') и II — необходимый этап предпринятого исследования, поскольку эффективность химических реакций в составе двуспиральных ДНК зависит от стабильности двойной спирали [9]. В литературе практически отсутствуют данные по термодинамике, кинетике и пространственному строению нуклеотидных дуплексов с несовпадающими разрывами в комплементарных цепях, образованных гетерогенными олигонуклеотидами. В то же время информация об устойчивости и строении таких комплексов в зависимости от числа компонентов, а также длины и природы перекрывающихся блоков была бы полезна при изучении не только химического, но и ферментативного лигирования.

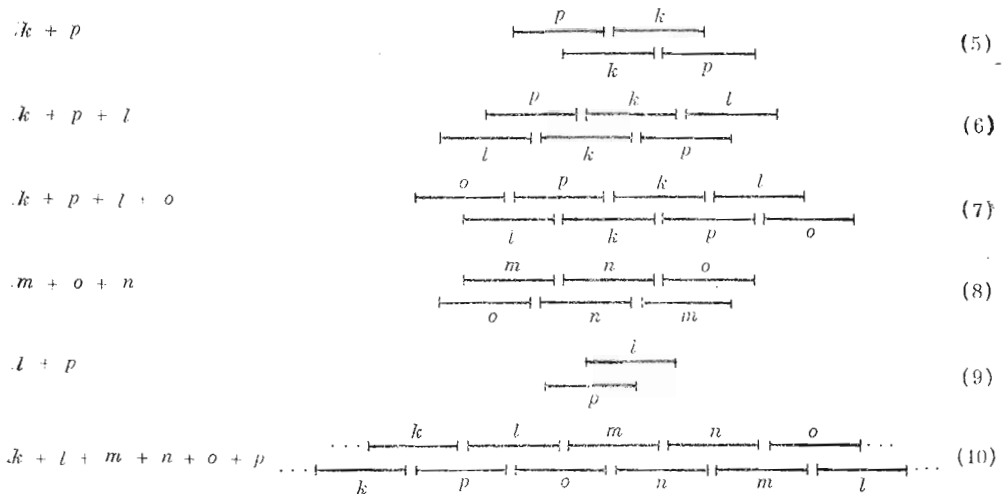
Для характеристики термической устойчивости дуплекса I (I') были приготовлены эквимольные 3—5-компонентные смеси олигонуклеотидов (без концевых фосфатных групп), приведенные на схеме 2 (справа схематически показаны возможные полные дуплексы):



Низкие значения гипохромии, h (табл. 1), и общий вид кривых плавления (рис. 2) не типичны для двуспиральных олигонуклеотидных комплексов [10]. Однако они не совпадают также и с кривыми температурной зависимости УФ-поглощения свободных компонентов (кривая b на рис. 2а), отражающими изменение стэкинг-конформации одноцепочечных олигонуклеотидов. По-видимому, при понижении температуры комплементарные комплексы начинают образовываться, но в связи с их нестабильностью комплексобразование в исследуемых условиях не является полным (низкотемпературное плато на кривых плавления отсутствует). Полученные данные свидетельствуют о том, что перекрывание в 4–6 нуклеотидных звеньев при наличии 4–6-звенных некомплементарных последовательностей является недостаточным для формирования устойчивых комплексов при температуре $>0^\circ\text{C}$. В то же время в случае конкатемерных систем наблюдалось образование достаточно стабильных комплексов при самоассоциации октануклеотида TGCACATG (перекрывание в 4 нуклеотидных звена) [11], а также декануклеотида TGGCCAAGCTP (4 и 6 звеньев) [1]. По-видимому, на стабильность комплексов в случае таких коротких липких концов большое влияние оказывает их неоднородность. Следует отметить, что в смеси из n разных по составу олигонуклеотидов концентрация концов определенного типа в n раз меньше, чем в случае конкатемеров. В последних за счет унификации участков перекрывания нет «сильных» и «слабых» мест, которые неизбежно возникают в комплексах первого типа.

Иная картина наблюдается при изучении термической устойчивости дуплекса II. На рис. 2б, в приведены кривые температурной зависимости УФ-поглощения в следующих смесях олигонуклеотидов (схема 3).

Схема 3



Видно, что во всех изученных смесях наблюдается образование комплементарных комплексов (рис. 2б и в, табл. 1). Даже при ассоциации двух олигонуклеотидов (смесь 9) образуется достаточно устойчивый ($T_{пл} \sim 30^\circ \text{C}$) комплекс, удерживаемый 7 нуклеотидными парами (табл. 1). При последовательном добавлении компонентов к смеси олигонуклеотидов $T_{пл}$ образующихся комплексов и их гипохромия практически не меняются (ср. смеси 5–7 и 10 на рис. 2б и в и табл. 1). При переходе от смеси 5 (2-компонентная) к смеси 10 (6-компонентная) только незначительно увеличивается кооперативность плавления комплекса.

Из полученных данных следует, что перекрытия в 7–8 нуклеотидных звеньев достаточно для формирования устойчивых при $0-5^\circ \text{C}$ комплементарных комплексов в используемом диапазоне концентраций; удлинение двуспирального кора за счет присоединения следующих молекул олигонуклеотидов не вызывает заметного изменения термической устойчивости и гипохромии комплексообразования. При этом очевидно, что при добавлении следующего олигомерного блока происходит достраивание комплементарного комплекса, так как в противном случае гипохромия понижалась бы параллельно с уменьшением мольной доли двуспирального фрагмента в смеси. Независимо от числа олигонуклеотидных компонентов ДНК-дуплексы плавятся однофазно; их образование в первом приближении можно описать в терминах образования конкатемерных двуспиральных структур [11].

Таким образом, как видно из экспериментальных данных, дуплексы I (I') и II неравноценны: в отличие от II дуплекс I (I') в нейтральном буферном растворе при $0-5^\circ \text{C}$ не является термически стабильным.

Ферментативное лигирование ДНК-дуплексов. Предварительно была изучена эффективность реакции в каждом из участков контакта олигонуклеотидов в дуплексах I, I' и II. Смеси для лигирования составляли из 4–5 олигонуклеотидов так, чтобы за счет комплементарных взаимодействий они могли образовывать достаточно крупные 5–10-компонентные ДНК-дуплексы, причем только один «внутренний» олигонуклеотид содержал 5'-фосфатную группу (табл. 2). Результаты ферментативного лигирования представлены на рис. 3 и табл. 2. Видно, что репарация любого «внутреннего» одноцепочечного разрыва в относительно длинных

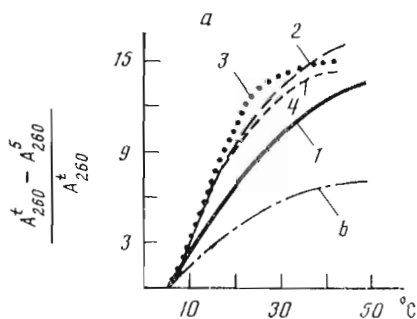
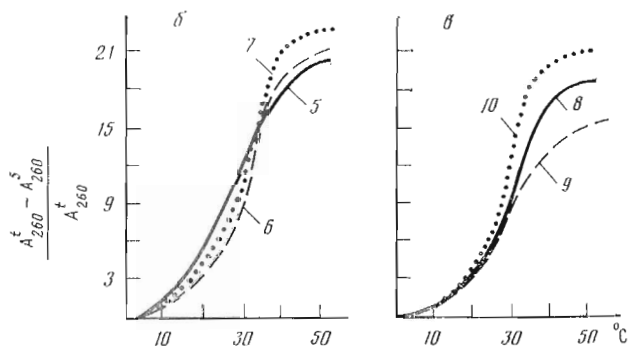


Рис. 2. Кривые температурной зависимости УФ-поглощения олигонуклеотидных смесей 1–4 (схема 2) и нонауклеотида b (кривая b) – a, а также смесей 5–10 (схема 3) – б и в. Буфер В, $C_0 (0,2-0,5) \cdot 10^{-4}$ М. Номера кривых соответствуют номерам смесей на схемах 2 и 3



11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

ХС →



Рис. 3. Анализ в 20% ПААГ реакционных смесей 11–21 (состав в табл. 2) после инкубации с Т4-ДНК-лигазой. Условия см. в «Экспер. части». Номера колонок соответствуют номерам смесей. Положение маркера ксиленилапола (ХС) обозначено стрелкой

(20–50 нуклеотидных пар) дуплексах независимо от первичной структуры составляющих их олигомеров проходила с выходом, близким к 100%. Однако, судя по физико-химическим данным, 8–11-звенные олигонуклеотиды в условиях лигирования не способны реально образовывать устойчивые дуплексы I и I'. В литературе отмечено множество случаев успешного ферментативного лигирования фрагментов ДНК, которые в условиях реакции не должны образовывать термодинамически устойчивые комплексы с матрицей, например соединение протяженных дуплексов за счет 2–4-звенных липких концов [12] и даже по тупым концам [12, 13]. Высказано предположение, что фермент может стабилизировать двуспиральную структуру [14].

Таблица 1

Гипохромия эквимольных смесей олигодезоксирибонуклеотидов * в буфере Б

Номер смеси	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$h^{**}, \% (\pm 0,2)$	13,0	16,0	15,0	14,5	20,3	21,0	22,5	18,6	15,5	21,0

* См. схемы 2 и 3.

** $h = \frac{A_{260}^{\max} - A_{260}^5}{A_{260}^{\max}} \cdot 100\%$, где A_{260}^{\max} и A_{260}^5 — УФ-поглощение раствора (λ 260 нм) при максимальной измераемой для данной системы температуре и при 5°С соответственно.

Эффективность отдельных актов ферментативного * и химического сшивания олигонуклеотидов

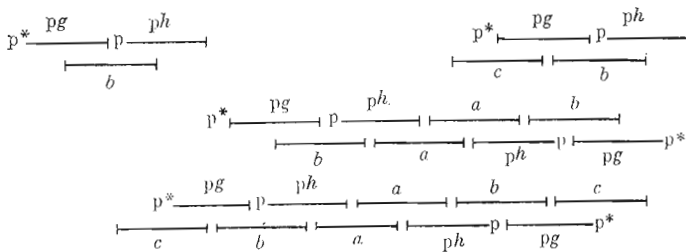
Номер	Состав системы	Структура комплекса	Выход продукта химического лигирования, %
11	$pa+h+b$		<5
12	$pb+a+g+h$		<5
13	$pc+b+f+g+h$		<5
14	$pd+c+e+f+g$		<5
15	$pe+d+f$		<5
16	$pf+c+d+e$		<5
17	$pg+b+c+d+f$		<5
18	$ph+a+b+c+g$		<5
19	$pd'+c+e'+g+f$		<5
20	$pe'+d'+f$		<5
21	$pf+c+d'+e'$		<5
22	$pk+l+p$		34
23	$pl+k+o+p$		32
24	$pm+l+n+o+p$		60
25	$pn+m+o$		14

Номер	Состав системы	Структура комплекса	Выход продукта химического лигирования, %
26	$po + l + m + n$	$\left(\begin{array}{c} \overline{\overline{l}} \quad \overline{\overline{m}} \\ \overline{po} \quad \overline{p} \quad \overline{n} \end{array} \right)_2$	24
27	$pp + k + l + m + o$	$\left(\begin{array}{c} \overline{\overline{k}} \quad \overline{\overline{l}} \quad \overline{\overline{m}} \\ \overline{pp} \quad \overline{p} \quad \overline{o} \end{array} \right)_2$	28

* Выход продукта ферментативного лигирования во всех случаях >90%.

В настоящей работе на базе предварительного изучения термической устойчивости собираемых дуплексов впервые экспериментально показано, что Т4-ДНК-лигаза эффективно работает при температуре выше $T_{пл}$ дуплекса, т. е. фермент способен использовать в качестве субстрата короткоживущую двойную спираль.

Другие закономерности ферментативной сборки «легкоплавких» ДНК-дуплексов были выявлены в экспериментах по репарации одного и того же одноцепочечного разрыва, но в различных системах. Такие системы были составлены из трех, четырех и пяти различных олигонуклеотидов, способных формировать соответственно 3, 4, 8 и 10-компонентные дуплексы:



p^* и p — соответственно ^{32}P -меченая и немеченая фосфатная группа.

Из наших экспериментов (рис. 4) можно вывести следующий ряд увеличения эффективности ферментативного лигирования в зависимости от положения репарируемого одноцепочечного разрыва в дуплексе: (выход 5%) $\leq L4/P5 < L4/P22 < L10/P5 < L10/P22 \leq$ (выход 95%), где L и P — число нуклеотидных пар слева и справа от репарируемого разрыва. Видно, что в дуплексах, в которых одноцепочечный разрыв находится на расстоянии менее чем 5 нуклеотидных пар от «края» дуплекса, лигирование идет плохо. Поскольку Т4-ДНК-лигаза способна катализировать матрично направленные соединения олигонуклеотидов даже в условиях неустойчивости двойной спирали (см. выше), можно заключить, что для протекания ДНК-лигазной реакции важна не столько термостабильность дуплексов, сколько их «физические» размеры.

По-видимому, для этого фермента существуют «минимальные» дуплексы-субстраты, уменьшение размеров которых приводит к резкому снижению эффективности лигирования. Размер такого минимального субстрата лежит в интервале 9 (лигирование практически не идет) — 15 нуклеотидных пар (эффективное лигирование). Заметим также, что в достаточно крупных (>15 нуклеотидных пар) ДНК-дуплексах фермент может эффективно репарировать одноцепочечные разрывы, отстоящие от края дуплекса на 5 нуклеотидных пар и более; разрывы, находящиеся на

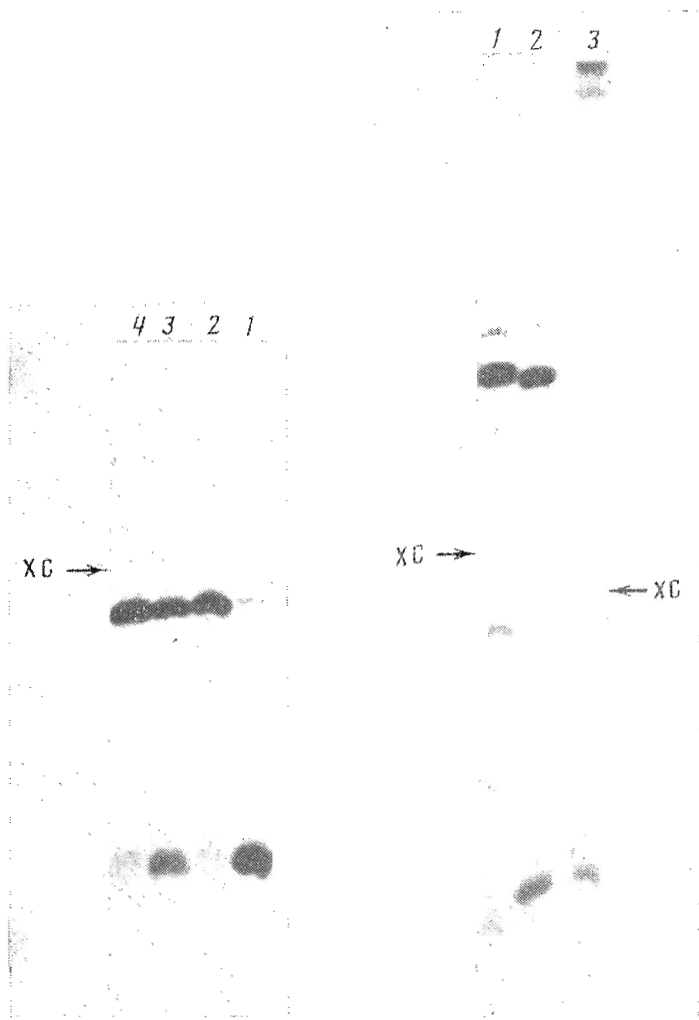


Рис. 4

Рис. 5

Рис. 4. Анализ в 20% ПААГ реакционных смесей олигонуклеотидов - ${}^3\text{H}+\text{p}h+b$ (1), ${}^3\text{H}+\text{p}g+\text{p}h+b+c$ (2), ${}^3\text{H}+\text{p}g+\text{p}h+b+a$ (3), ${}^3\text{H}+\text{p}g+\text{p}h+c+b+a$ (4), после инкубации с Т4-ДНК-лигазой. Условия см. в «Экспер. части»

Рис. 5. Анализ в 20% ПААГ сборки с помощью Т4-ДНК-лигазы «верхней» (1) и «нижней» (2) цепи дуплекса I, а также ферментативного лигирования полной смеси фосфорилированных олигонуклеотидов (3). Условия см. в «Экспер. части»

меньшем расстоянии, репарируются заметно хуже, и эта величина является, по-видимому, пределом.

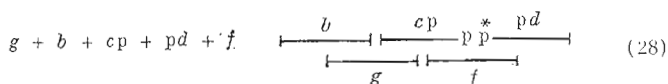
При ферментативной сборке полных дуплексов I, I' и II были использованы условия и данные, полученные при исследовании репарации отдельных одноцепочечных разрывов. Напомним, что смеси всех олигонуклеотидов, из которых составлены дуплексы I, I' или II, способны формировать в растворах протяженные (теоретически без ограничения длины) комплементарные дуплексы. Лигирование полных смесей фосфорилированных олигонуклеотидов приводило к получению полимеров длиной >200 нуклеотидных пар (рис. 5). Целевые дуплексы I, I' и II были получены с высокими выходами при использовании фосфорилированных концевых олигонуклеотидов в качестве терминаторов полимеризации. Однако, на наш взгляд, более удобно получать структуры типа I, I' или II путем формирования дуплексов из двух предварительно собранных в растворе (ферментативно или химически) и очищенных ВЭЖХ или электрофорезом в ПААГ полных односторонних фрагментов. Аналогичная стратегия описана ранее в работах [15–17]. Именно таким путем в на-

стоящей работе были получены дуплексы I, I' и II очень высокой чистоты в количествах ~0,1 ОЕ₂₆₀. При сборке одной из цепей дуплекса составляли смеси нефосфорилированных концевых и «матричных» олигонуклеотидов с фосфорилированными олигонуклеотидами собираемой цепи. Выходы всех шести однотяжевых фрагментов дуплексов I, I' и II ~90% (см. рис. 5).

Сборка ДНК-дуплекса с помощью водорастворимого карбодимида. В настоящей работе впервые предпринята попытка собрать функционально значимые дуплексы, образующиеся из различных олигонуклеотидных блоков, с помощью химического реагента — EDAC. Для проверки эффективности химического лигирования в каждом из возможных мест образования фосфодиэфирной связи составляли перечисленные в табл. 2 смеси олигоуклеотидов. Это давало возможность прямого сравнения результатов химического и ферментативного лигирования. Концентрация фосфорилированного олигонуклеотида составляла 0,1 мМ, нефосфорилированные компоненты брали в 1,5-кратном избытке по отношению к фосфорилированным, концентрация EDAC 0,02 М.

Как и следовало ожидать, в системах 11—21 (см. табл. 2), составленных из компонентов дуплекса I (I'), химическое лигирование протекает малоэффективно (рис. 6а) — степень превращения <5%. Это связано с низкой термической устойчивостью комплексов. Следует отметить, что добавление конденсирующего реагента приводит к дополнительной дестабилизации олигонуклеотидных комплексов: $T_{пл}$ понижается в среднем на 2—8°С в зависимости от нуклеотидного состава компонентов и концентрации реагента [18].

Имеются косвенные данные, подтверждающие присутствие значительной фракции свободных олигонуклеотидов в реакционных смесях 11—21. Так, известно, что только одноцепочечные олиго(поли)нуклеотиды могут подвергаться карбодимидной модификации. Такие модифицированные продукты [1] были найдены в указанных реакционных смесях (дополнительные полосы на автордиограмме, рис. 6а). Известно также, что в термически стабильных конкатемерных комплексах на основе рТGGCCAAGСТр пирофосфатная связь под действием EDAC образуется с выходом, близким к 100%, уже за 24 ч [3]. В противоположность этому в смеси 28 скорость и эффективность образования пирофосфатной связи (рис. 6в) были сравнимы с соответствующими параметрами образования фосфодиэфирной связи (рис. 6а).



С другой стороны, в смесях 22—27, составленных из компонентов устойчивого в условиях реакции дуплекса II, выход продуктов химического лигирования значительно выше: соответственно 34, 32, 60, 14, 24 и 28%. Характерно, что в этих реакционных смесях практически отсутствуют продукты карбодимидной модификации (рис. 6б).

При сопоставлении положения полос на автордиограммах (рис. 3 и 6) видно, что продукты ферментативного и химического лигирования идентичны.

Как показано выше, термическая устойчивость дуплексов этой серии (22—27) приблизительно одинакова. Тем не менее эффективность химического лигирования сильно варьирует в зависимости от природы нуклеотидных звеньев, между которыми образуется новая фосфодиэфирная связь. На наш взгляд, это объясняется тем, что конформация реагирующих групп в различных одноцепочечных разрывах двойной спирали не одинакова, что обусловлено зависящей от нуклеотидной последовательности геометрией стэкинг-контактов. Сиквенс-зависимая вариабельность конформации сахаро-фосфатного остова полинуклеотидных дуплексов отмечалась ранее в работах [19, 20]. По-видимому, реакции химического лигирования более чувствительны к пространственной ориентации реагирующих групп, чем соответствующие ферментативные реакции. На пе-

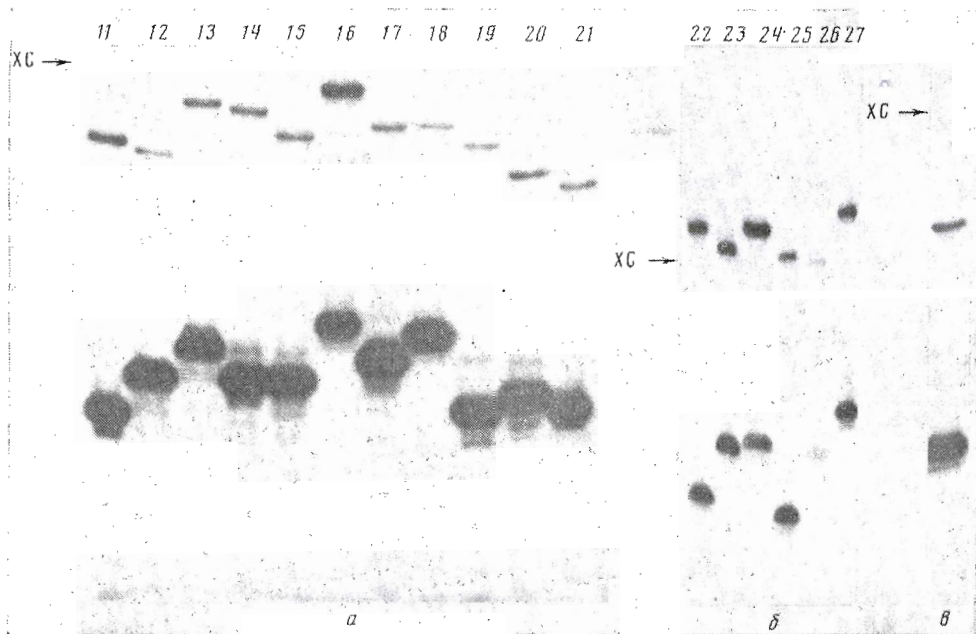
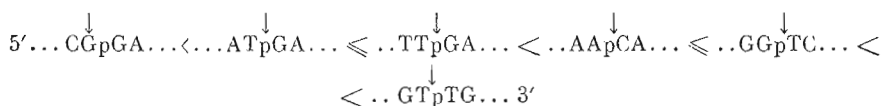


Рис. 6. Анализ в 20% ПААГ реакционных смесей после инкубации с 0,02 М EDAC при 4° С (3 сут, буфер Б). Состав смесей 11–21 (а) и 22–27 (б) см. в табл. 2. Состав смеси 28 (в) (образование пиродифосфатной межнуклеотидной связи) см. в тексте

большом материале трудно выявить наиболее предпочтительную нуклеотидную последовательность, тем не менее на основании полученных данных можно составить ряд взаимодействующих партнеров, расположенных в порядке увеличения эффективности химического лигирования:



С учетом вышеизложенного метод химического лигирования был применен только для сборки дуплекса II. Каждый однотяжевой фрагмент дуплекса собирали отдельно. Олигонуклеотидные смеси составляли так же, как и в случае ферментативной сборки. С целью повышения эффективности химического лигирования были несколько изменены условия реакции по сравнению с теми, которые использовали для репарации отдельных одноцепочечных разрывов. Начальную концентрацию карбодимиды повысили до 0,2 М, а через 5 сут инкубации в реакционные смеси добавили новую порцию EDAC до концентрации 0,4 М. Для компенсации дестабилизирующего действия EDAC в 3 раза повысили общую нуклеотидную концентрацию. Как видно из рис. 7, при сборке «нижней» цепи выход конечного продукта составляет 32%, а промежуточного димера — 35%. Во второй реакционной смеси (сборка верхнего тяжа) через 7 сут выход тримера достигает 49%, а исходный олигонуклеотидный компонент почти полностью (на 92%) вступает в реакцию химического лигирования. Интересно, что, хотя в использованных условиях эффективность химического лигирования при сборке дуплекса II существенно выше (выходы на стадиях варьируют от 57 до 70%), чем при репарации отдельных разрывов, в целом сохраняется отмеченная зависимость эффективности лигирования от нуклеотидной последовательности.

Первичная структура обоих тяжей дуплекса II, собранных химическим путем, подтверждена методом Максама — Гилберта (рис. 8).

На основании литературных данных [4, 12, 14, 21] и результатов полученных в настоящей работе, можно охарактеризовать возможности

Рис. 7. Состав реакционных смесей в зависимости от времени инкубации (на основании анализа в ПЛАГ). Индуцируемая EDAC сборка «нижней» (а) и «верхней» (б) цепи дуплекса II; исходный ^{32}P -меченый олигонуклеотид (1), промежуточный димер (2), полный одноцепочечный фрагмент, тример (3). Стрелкой обозначено добавление новой порции EDAC. Условия реакции и детали см. в тексте

Рис. 8. Анализ нуклеотидной последовательности по Максаму — Гилберту 40-звенного полинуклеотида («верхней» цепи дуплекса II) — продукта химического лигирования

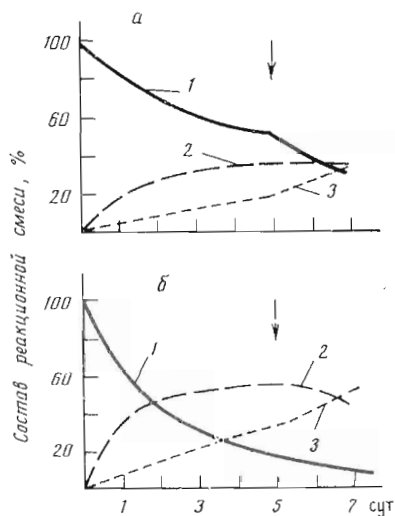


Рис. 7

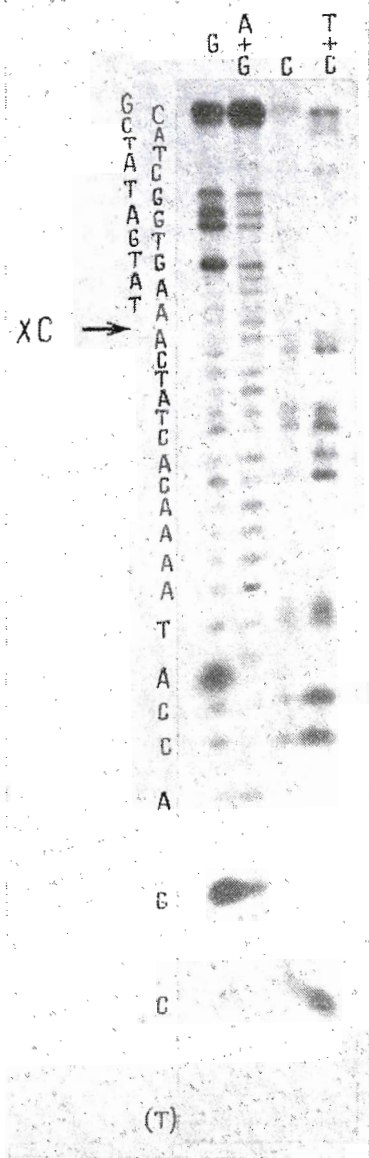


Рис. 8

химического и ферментативного лигирования и сформулировать требования, предъявляемые к ДНК-дуплексам — субстратам Т4-ДНК-лигазы и «химической лигазы».

Для успешного протекания химического лигирования основным требованием является наличие термодинамически устойчивого двуспирального комплекса. Химический метод чувствителен к нуклеотидной последовательности вблизи репарируемого участка. С его помощью можно получить с достаточно высокой эффективностью межнуклеотидные узлы с широким спектром модификаций сахаро-фосфатного остова. Скорость образования новой межнуклеотидной связи сильно зависит от нуклеофильности группы, атакующей активированный фосфат; в случае синтеза природной фосфодиэфирной связи скорость реакции под действием водорастворимого карбодимида существенно ниже скорости ферментативной реакции.

Для протекания Т4-ДНК-лигазной реакции не столь существенна термостабильность двойной спирали — фермент может работать при температуре как ниже, так и выше $T_{пл}$ дуплекса. Эффективность лигирования зависит от физических размеров дуплекса; минимальный дуплекс-

субстрат должен содержать 9 нуклеотидных пар. Фермент мало чувствителен к нуклеотидной последовательности и катализирует исключительно образование природной межнуклеотидной связи.

Резюмируя, можно подчеркнуть, что, хотя химический метод пока менее эффективен, чем ферментативный, он в то же время менее специфичен и способен утилизировать широкий круг субстратов.

В настоящей работе впервые с помощью химического реагента с выходом целевого продукта до 50% проведена сборка 35-звенного ДНК-дуплекса неконкатемерного типа. Очевидно, что выход продуктов может быть увеличен при использовании более активных в реакциях химического лигирования 3'-фосфорилированных олигонуклеотидов. Полученные результаты позволяют надеяться на то, что химическое лигирование может стать реальным путем получения протяженных двуспиральных ДНК. Однако на настоящем этапе исследований преимущества химического лигирования над ферментативным проявляются лишь при сборке ДНК, содержащей модифицированные межнуклеотидные узлы в заданном положении цепи [4, 21]. Поэтому весьма актуален поиск более эффективных химических реагентов, которые, сохранив способность индуцировать синтез не природных межнуклеотидных связей, позволили бы производить сборку двуспиральных ДНК со скоростью, близкой к скорости ферментативных процессов.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксирибонуклеозиды производства ОХП НИОХ СО АН СССР, этилендиамин, триазол, N-метилимидазол, тетразол, диметилсульфат, EDAC, MES, Лихросорб-NH₂ (Merck, ФРГ), акриламид, N,N'-метиленбисакриламид (BDH, Англия), [γ -³²P]АТФ (Amersham, Англия), Т4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1; НИКТИ БАН, Бердск), DEAE-целлюлозу DE-23 (Whatman, Англия). ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, ФРГ), колоночную хроматографию — на силикагеле L 40/100 (Chemapol, ЧССР).

Были использованы следующие буферные растворы: 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 0,1 мМ EDTA, 10 мМ β-меркаптоэтанол (буфер А для Т4-ДНК-лигазы), 50 мМ MES (рН 6,1), 20 мМ MgCl₂ (буфер Б).

Приготовление защищенных мононуклеотидов для олигонуклеотидного синтеза проводили по методикам [22, 23].

Общая методика синтеза олигонуклеотидов. Смесь 1,0 ммоль фосфатного и 0,8 ммоль гидроксильного компонентов абсолютировали трехкратным упариванием с абсолютным пиридином (или с другим растворителем, например 1,2-дихлорэтаном). Последний раз упаривали до объема, при котором суммарная концентрация компонентов с учетом добавляемого далее N-метилимидазола (6,0 ммоль) составляла 0,1 М. Затем в реакционную смесь добавляли 3 ммоль TPS и выдерживали при 20° С 10—30 мин. Целевой продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации этилового спирта в хлороформе (0—10%). Аналогичным образом осуществляли синтез с использованием в качестве конденсирующего агента смеси TPS и тетразола в пиридине, хлороформе, дихлорэтане или хлористом метиле. Выходы продуктов конденсации после колоночной хроматографии составляли 78—95%.

3'-Фосфорилированный олигонуклеотид с получали по методике [24].

Олигодезоксирибонуклеотиды *a-p* после удаления всех защитных групп выделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе DE-23 (Cl⁻) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины, 10 мМ трис-НСl, рН 7,5 или 3,5. Затем проводили окончательную очистку ВЭЖХ на обращенно-фазовой колонке (0,46×25 см) с Zorbax С8, используя хроматограф Tracor (Нидерланды).

5'-³²P-Фосфорилирование олигонуклеотидов, электрофорез в 20% ПААГ и элюцию олигонуклеотидов из геля осуществляли по стандартным методикам [8]. Препаративное 5'-фосфорилирование олигодезоксирибонуклеотидов проводили как в работе [9].

Температурную зависимость УФ-поглощения олигонуклеотидных смесей измеряли на спектрофотометре Cary-219 (США) в термостатированной кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 мм в буфере Б. Кон-

центрацию олигонуклеотидов измеряли спектрофотометрически; за коэффициент молярного поглощения олигонуклеотидов принимали сумму коэффициентов составляющих мононуклеотидов. Использовали эквимольные смеси компонентов с общей олигонуклеотидной концентрацией $C_0 = (0,2-0,5) \cdot 10^{-4}$ М.

Ферментативная сборка ДНК-дуплексов. К 10–100 мкл буфера А, содержащего 0,01 мМ фосфорилированные олигонуклеотиды, нефосфорилированные олигонуклеотиды (каждый в концентрации 0,015 мМ) и 0,3 мМ АТР, охлажденного до 0° С, добавляли 5–50 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы [25] и инкубировали смесь 12–15 ч при 8–10° С. Фосфорилированные олигонуклеотиды содержали небольшую 5'-³²P-метку (~10 нКи), позволяющую контролировать сшивку, но не мешавшую последующему структурному анализу полинуклеотидов. Аликвоты реакционной смеси анализировали электрофорезом в ПААГ. В отдельных опытах показано, что отжиг смеси (нагревание до 60° С и медленное охлаждение до 0° С) перед добавлением ДНК-лигазы не влияет на эффективность лигирования.

Сборка ДНК-дуплексов с помощью EDAC. Смесь фосфорилированных (содержащих 10–50 нКи ³²P) и нефосфорилированных олигонуклеотидов в 1 (10) мкл буфера Б охлаждали до 4° С и добавляли к раствору EDAC в 1 (10) мкл того же буфера. Конечная концентрация в реакционной смеси фосфорилированных олигонуклеотидов 0,1 (0,3) мМ, каждого нефосфорилированного олигонуклеотида — по 0,15 (0,45) мМ, EDAC — 0,02 (0,4) М. Смесь инкубировали в темноте 3 (7) сут при 4° С. В скобках приведены значения соответствующих параметров в случае сборки цепей дуплекса II. Олигонуклеотидную фракцию осаждали этанолом и анализировали в ПААГ. Выход продуктов химического и ферментативного сшивания определяли по соотношению радиоактивности полос исходных соединений и продуктов реакции в теле.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Druza V. L., Melnikova N. P., Purmal A. A. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 21. P. 5747–5761.
2. Shabarova Z. A., Ivanovskaya M. G., Isagulians M. G. // FEBS Lett. 1984. V. 154. № 2. P. 258–261.
3. Пурмаль А. А., Друца В. Л., Шабарова З. А. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. № 3. С. 394–400.
4. Долинная Н. Г., Грязнова О. И., Соколова И. И., Шабарова З. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 6. С. 755–763.
5. Ohtsubo H., Ohtsubo E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 2. P. 615–619.
6. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 2. P. 353–371.
7. Ефимов В. А., Ресердатто С. В., Чазмахчева О. Г. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 2. С. 231–238.
8. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
9. Королева О. Н., Друца В. Л., Долинная Н. Г., Цытович А. В., Шабарова З. А. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. Вып. 1. С. 146–160.
10. Долинная Н. Г., Громова Е. С. // Успехи химии. 1983. Т. LII. № 1. С. 138–167.
11. Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Turkin S. I., Gromova E. S. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 11. P. 2413–2429.
12. Ferretti L., Sgaramella V. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 1. P. 85–93.
13. Sgaramella V., Khorana H. G. // J. Mol. Biol. 1972. V. 72. № 2. P. 493–502.
14. Engler M. J., Richardson C. C. // The Enzymes/Ed. Boyer P. N. Y.: Acad. Press, 1982. V. XV. P. 3–29.
15. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Нгуен Куанг Винь, Подкладчиково О. Н., Северцова И. В., Быстров Н. С., Болдырева Е. Ф., Чувпило С. А., Колосов М. Н. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 9. С. 1285–1289.
16. Смирнов В. Д., Сергиенко О. В., Скрипкин Е. А., Дубичев А. А., Лукин В. Г., Григорьев В. Г., Тихоненко Т. И., Карелин В. П. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 10. С. 1388–1394.
17. Вейко В. П., Пурмаль А. А., Орецкая Т. С., Куприянова Е. А., Метелев В. Г., Друца В. Л., Ваканова В. А., Ивановская М. Г., Кузнецова С. А., Долинная Н. Г., Шабарова З. А. Рукопись деп. в ВИНТИ № 6392 от 30.11.83.
18. Громова Е. С., Виноградова М. Н., Елов А. А., Вейко В. П., Долинная Н. Г., Друца В. Л., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Шабарова З. А. // Молекулярн. биология. 1984. Т. 18. Вып. 2. С. 370–381.
19. Dickerson R. E., Drew H. R. // J. Mol. Biol. 1981. V. 149. № 4. P. 761–786.

20. Флорентьев В. Л. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 7. С. 885-899.
21. Долинная Н. Г., Грязнова О. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 921-928.
22. Ralph R. K., Khorana H. G. // J. Amer. Chem. Soc. 1961. V. 83. № 13. P. 2926-2937.
23. Ti G. S., Gaffney B. L., Jones R. A. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. № 5. P. 1316-1319.
24. Шабарова З. А., Волков Е. М., Орецкая Т. С., Туркин С. И., Долинная Н. Г., Каграманова В. К., Прокофьев М. А. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 258. № 4. С. 914-917.
25. Weiss B., Jacquemin-Sablon A., Li T. R., Fareed G. C., Richardson C. C. // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. № 17. P. 4543-4555.

Поступила в редакцию
16.VII.1986

CHEMICAL REACTIONS IN DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS. III. SYNTHESIS OF TERMINAL INVERTED REPEATS OF THE ISI ELEMENT

SHABAROVA Z. A., VEIKO V. P., DOLINNAYA N. G., DRUTSA V. L.,
METELEV V. G., ORETSKAYA T. S., PURMAL A. A.

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

Three 35 bp-DNA duplexes have been assembled from synthetic oligonucleotides by means of DNA ligase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide in two parallel series of experiments. The «top» strands of these duplexes correspond either to the imperfect (natural) or perfect terminal inverted repeats of the IS1. T_m of DNA duplexes composed of 2 to 6 different oligonucleotides were investigated by UV spectroscopy. It was shown that DNA ligase effectively joined oligonucleotides even under conditions of DNA duplex instability. However, there is a minimum duplex size (within the range of 9-15 bp) below which the enzymatic ligation is ineffective. Chemical assembly of duplexes took place only if the double helix was stable. The yield was 50% after two successive ligation cycles. Efficiency of the chemical ligation depends on the nature of the nucleotide units to be joined.