



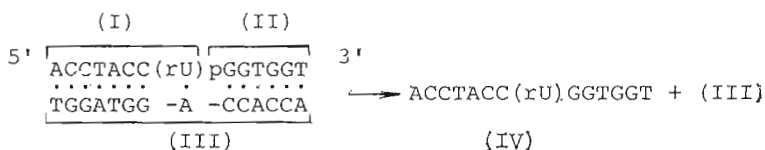
УДК 577.113.4

## ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУХСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ. ПРИРОДА СВЯЗИ, ОБРАЗУЮЩЕЙСЯ ПРИ ХИМИЧЕСКОМ ЛИГИРОВАНИИ С УЧАСТИЕМ ЦИС-ДИОЛЬНОЙ ГРУППИРОВКИ

*Кузнецова С. А., Ивановская М. Г., Шабарова З. А.*

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

Разработка методов конструирования рекомбинантных нуклеиновых кислот требует создания эффективных методов лигирования дезокси- и рибоолигонуклеотидов. С этой целью мы изучили реакции химического и ферментативного лигирования в дуплексе, образованном тремя олигонуклеотидами\* (I) — (III), синтез которых проведен по методикам [1].



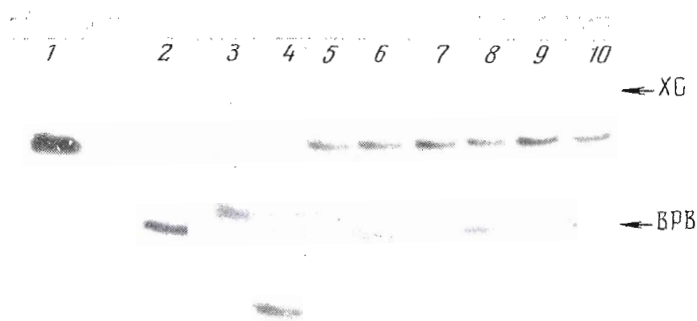
Характерная особенность этого дуплекса состоит в том, что в узле синтеза связи оказываются сближенными 5'-концевой фосфат одного олигонуклеотида и 2',3'-*цис*-гликольная группировка 3'-концевого рибозе на другого олигонуклеотида. Представлялось важным сравнить эффективность химического и ферментативного лигирования в указанном дуплексе, а также проанализировать соотношение 2',5'- и 3',5'-изомеров, образующихся в результате реакции.

Для синтеза межнуклеотидной связи в указанном дуплексе были использованы три метода химической активации фосфата: карбодимидный с использованием 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимида [2], имидазолидный [2] и N-оксибензотриазоловых эфиров [3], а также ферментативный с использованием T4-ДНК-лигазы ([4], с. 3—26).

Реакции химического лигирования проводили при концентрации нуклеотидов на мономерное звено 1 мМ, ферментативного лигирования — при концентрациях 1 и 0,1 мМ. Ферментативное лигирование и карбодимидную конденсацию осуществляли как описано в работе [5], две другие конденсации — в 0,4 М N-метилимидазольном буфере (рН 8,0), содержащем 0,12 М MgCl<sub>2</sub>, 0,2 М NaCl, при 0°С в течение 24 ч.

Ход реакций контролировали методом электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях, используя олигонуклеотиды, несущие <sup>32</sup>P-концевую метку. Выход образующегося при лигировании тетрадекануклеотида (IV) определяли по соотношению радиоактивности соответствующих зон геля. Эффективность синтеза фосфодиэфирной межнуклеотидной связи оказалась различной при использовании разных способов активации фосфата. Выход продукта конденсации (IV) составил 15—20% за 24 ч для имидазолидной активации, 35% за это же время для активации с использованием N-оксибензотриазоловых эфиров и 15% за 6 сут для карбодимидной активации. Выход продукта ферментативного лигирова-

\* В формулах дезоксиолигонуклеотидов индекс «d» опущен.



Электрофорез в 20% ПААГ продуктов гидролиза РНКазой А тетрадекануклеотида (IV). Условия гидролиза: буфер — 50 мМ трис-НСl, 2 мМ EDTA (рН 7,46), 37° С, 1 ч; на 0,01 ОЕ<sub>260</sub> олигонуклеотида бразил 1,2·10<sup>-3</sup> ед. акт. фермента. 1 — АССТАСС(гU)-GGTGGT (IV), полученный с помощью Т4-ДНК-лигазы, 2 — продукт его гидролиза, 3 — г(рАААUUU), 4 — продукт гидролиза г(рАААUUU), 5 — (IV), полученный при конденсации с использованием N-оксисбензотриазоловых эфиров, 6 — продукт его гидролиза, 7 — (IV), полученный при имидазолидной конденсации, 8 — продукт его гидролиза, 9 — (IV), полученный при карбодимидной конденсации, 10 — продукт его гидролиза. Указаны положения маркеров: ксиленицианола (XC) и бромфенолового синего (BPB)

ния составлял 100% при суммарной нуклеотидной концентрации 0,1 мМ и 40% при концентрации 1 мМ. Структура продуктов лигирования (IV), полученных во всех опытах, подтверждена анализом их нуклеотидной последовательности методом Максама — Гилберта. Наличие фосфодиэфирной межнауклеотидной связи, образованной с участием *цис*-гликольной группировки, подтверждено ее количественным расщеплением в условиях полного щелочного гидролиза РНК (0,3 н. КОН, 1 ч, 37° С).

Особую важность представляет вопрос об установлении природы образующейся при лигировании межнауклеотидной связи, поскольку возможно образование как природной 3',5'-фосфодиэфирной, так и 2',5'-фосфодиэфирной межнауклеотидной связи.

Природу этой связи в продуктах лигирования (IV) устанавливали с помощью РНКазы А, а также РНКазы Т<sub>2</sub>, которые избирательно расщепляют 3',5'- и не расщепляют 2',5'-фосфодиэфирную связь ([4], с. 317—435; [6]). В стандартных условиях гидролиза ([4], с. 317—435; [7]) тетрадекануклеотид (IV), содержащий фосфодиэфирную связь, образованную с участием 3'-гидроксила рибонуклеотидного звена, должен гидролизироваться обоими ферментами до октануклеотида АССТАСС(гU)р. Тетрадекануклеотид (IV), содержащий 2',5'-фосфодиэфирную связь, гидролизироваться не должен.

На рисунке представлен радиоавтограф разделенных гель-электрофорезом продуктов гидролиза РНКазой А тетрадекануклеотида (IV), полученного при ферментативном лигировании, а также образцов, синтезированных тремя различными химическими методами. Для сравнения на том же рисунке приведены данные по гидролизу контрольного гексарибонуклеотида г(АААUUU), который в этих условиях гидролизует до тетра-нуклеотида г(АААU)р. При действии на различные образцы соединения (IV) РНКазы Т<sub>2</sub> идентифицированы те же самые продукты гидролиза и только контрольный гексануклеотид г(АААUUU) гидролизировался до мононуклеотидов.

Поскольку тетрадекануклеотид (IV), полученный с помощью ДНК-лигазы, количественно расщепляется обоими рибонуклеазами, можно заключить, что образующаяся при ферментативном лигировании связь является исключительно 3',5'-фосфодиэфирной. В то же время оказалось, что ни один из методов химического лигирования не дает возможности получать продукт только с природной 3',5'-фосфодиэфирной связью. При обработке РНКазой А и РНКазой Т<sub>2</sub> соединений (IV), синтезированных всеми тремя методами химического лигирования в условиях количествен-

ного гидролиза контрольного образца r(AAAUUU), во всех случаях остается заметная часть негидролизуемого соединения (IV) (рисунок). Зоны, соответствующие негидролизуемому исходному веществу (IV), вырезали из геля и подвергали повторному гидролизу теми же ферментами. При этом дополнительных продуктов гидролиза не появлялось. Измерение радиоактивности зон геля, соответствующих гидролизуемой и негидролизуемой части соединения (IV), показало, что независимо от метода химического лигирования соотношение 2',5'- и 3',5'-изомеров постоянно и составляет 55–60 и 40–45% соответственно. Возможно, найденное соотношение изомеров характерно лишь для данного дуплекса и меняется с изменением первичной структуры гибридного ДНК–РНК-дуплекса.

Таким образом, использование химических методов для лигирования фрагментов нуклеиновых кислот позволяет синтезировать не только природную, но и неприродную 2',5'-фосфодиэфирную связь, что может быть использовано как для синтеза олигонуклеотидов с аномальной межнуклеотидной связью, так и в тех случаях, когда ферментативное лигирование оказывается низкоэффективным.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Sproad B. S., Gait M. J. // Oligonucleotide synthesis – a practical approach. / Ed. Gait M. J. Oxford, Washington DC, IRL Press, 1984. P. 99–120.
2. Shabarova Z. A. // Physicochemical biology reviews. Soviet Scientific Reviews. Section D. V. 1 / Ed. Skulachev V. P. Harwood Acad. Publ. GmbH, 1984. P. 1–51.
3. Иванювская М. Г., Гортух М. Б., Шабарова З. А. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 293. № 2. С. 477–480.
4. Blackburn P., Moore S. // The Enzymes. 3<sup>rd</sup> ed. V. 15. Nucleic Acids. Pt. B / Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1982. P. 3–26, 317–435.
5. Долинная П. Г., Грязнова О. Н., Соколова Н. Н., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 6. С. 755–763.
6. Sawai H., Shibata T., Ohno M. // Tetrahedron. 1981. V. 37. № 3. P. 481–485.
7. Nomoto A., Fon Lee J., Wimmer E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. № 2. P. 375–380.

Поступило в редакцию  
23.II.1987

#### CHEMICAL REACTIONS IN DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS. THE NATURE OF THE PHOSPHODIESTER BOND FORMED WITH THE PARTICIPATION OF THE RIBOSE 2',3'-CIS-GLYCOL GROUP

KUZNETSOVA S. A., IVANOVSKAYA M. G., SHABAROVA Z. A.

*Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University*

Chemical and enzymatic ligation between the 5'-terminal phosphate of one oligonucleotide and the 3'-terminal 2',3'-cis-diol group of the other oligonucleotide on a complementary template was studied. Carbodiimide, imidazolide and N-hydroxybenzotriazole ester methods were used for chemical activation of the phosphate group, and T4 DNA ligase for enzymatic ligation. All the chemical activation methods produced 3',5'- and 2',5'-phosphodiester bonds (40–45 and 55–60%, resp.), whereas enzymatic ligation gives the product only with 3',5'-phosphodiester bond.