



УДК 577.113.4

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУХСПИРАЛЬНЫХ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ
VIII*. СБОРКА ГИБРИДНЫХ РНК-ДНК-ДУПЛЕКСОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВОДОРАСТВОРИМЫХ КОНДЕНСИРУЮЩИХ
АГЕНТОВ

*Долинная Н. Г., Аширбекова Д. Т., Соколова Н. И.,
Шабарова З. А.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
им. А. И. Белозерского и Химический факультет*

Изучена конденсация на ДНК-матрице олигонуклеотидов, содержащих различные рибонуклеотидные вставки — от одного рибонуклеозида до полной рибонуклеотидной последовательности. В качестве конденсирующих агентов были использованы ВгСN и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид. Эффективность химического лигирования (ХЛ) фрагментов РНК оказалась существенно ниже, чем ДНК-аналогов. Обнаружена сильная зависимость эффективности ХЛ от расположения рибонуклеотидного блока в гибридном дуплексе, а также от положения фосфатной группы в реакционном узле. Длина рибонуклеотидного блока практически не влияет на выход продуктов конденсации. Обсуждаются причины низкой эффективности матричных конденсаций с участием рибонуклеотидных акцепторов фосфата. Методом ХЛ с выходом 4–8% проведена репарация единичного разрыва в большой петле 5S РНК *E. coli*.

Матричная конденсация олигонуклеотидов под действием химических реагентов является наиболее универсальным методом направленного введения модификаций в двухспиральные ДНК [2]. В качестве реагентов, активизирующих фосфатные группы олигодезоксирибонуклеотидов непосредственно в составе дуплексов, были успешно использованы CDI и ВгСN. Проведено сравнительное исследование их эффективности в реакциях ХЛ и даны практические рекомендации для выбора конденсирующего агента в зависимости от природы дуплекса [4].

Следующий принципиально важный этап в развитии метода ХЛ — его применение для конденсации фрагментов РНК (или РНК с ДНК) на комплементарной ДНК-матрице.

Создание эффективного метода лигирования рибонуклеотидных фрагментов необходимо для разработки технологии рекомбинантных РНК. Поиск чисто химических путей решения этой задачи связан с отсутствием ферментов, способных соединять олиго(поли)рибонуклеотиды на комплементарной матрице. А именно возможность сблизить концевые взаимодействующие группы РНК-цепей, которые могут быть вовлечены в образование собственной вторичной структуры, делает привлекательными матрично-направленные реакции. Успешным приложением наших разработок в области ХЛ является матричная конденсация d(TGTGATTr) с r(GCCAU) с помощью CDI [3]. Кроме того, описана конденсация r(pA)₄₋₆ на полиуридиловой матрице под действием ВгСN в буфере, содержащем имидазол [4].

В настоящей работе изучено ХЛ на серни дуплексов (табл. 1), построенных из ДНК-матрицы и двух комплементарных ей олигонуклеоти-

* Сообщение VII см. [1]. Используются следующие сокращения: ХЛ — химическое лигирование, CDI — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, гидрохлорид; MES — 2-морфолипоэтансульфокислота; DMF — диметилформамид; p — ³²P-меченая фосфатная группа.

Выходы продуктов ХЛ в гибридных РНК-ДНК-дуплексах

Номер дуплекса	Строение дуплексов *	Конденсирующий агент **	
		BrCN	CDI
I	$5' \text{ACGGGA(U)} \downarrow \text{p}^* \text{CCAGGAGTGAC}$ $- \text{GCCT A} - \text{GGTCCTCAC}$	16	35
II	$\text{p}^* \text{ACGGGA(U)p} \downarrow \text{CCAGGAGTGAC}$ $\text{GCCT A} - \text{GGTCCTCAC}$	2	2
III	$\text{p}^* \text{ACGGGA(U)p} \downarrow \text{p}^* \text{CCAGGAGTGAC}$ $- \text{GCCT A} - \text{GGTCCTCAC}$	8	42
IV	$\text{ACGGAT} \downarrow \text{p}^* \text{CCAGGAGTGAC}$ $\text{GCCTA} - \text{GGTCCTCAC}$	35 (67)	75
V	$\text{AATGG} \downarrow (\text{p}^* \text{AAAACCCAUG})$ $\text{TTTACC} - \text{TTTTGGGTACC}$	7	10
VI	$\text{p}^* \text{AATGGp} \downarrow (\text{AAAACCCAUG})$ $\text{TTTACC} - \text{TTTTGGGTACC}$	40 (74)	90
VII	$\text{AATGGp} \downarrow (\text{p}^* \text{AAAACCCAUG})$ $\text{TTTACC} - \text{TTTTGGGTACC}$	35 (65)	85
VIII	$(\text{AAUGG}) \downarrow (\text{p}^* \text{AAAACCCAUG})$ $\text{TTTACC} - \text{TTTTGGGTACC}$	4	16

* Префикс d везде опущен, рибонуклеотидные звенья (последовательности) заключены в скобки, стрелкой указано место одноцепочечного разрыва, полярность цепей везде как в дуплексе (I).

** Время конденсации при использовании BrCN — 1 мин, CDI — 6 сут, в скобках указан выход при 3-кратном добавлении BrCN.

дов, содержащих различные рибонуклеотидные вставки — от одного рибозвена (дуплексы I—III) до полной рибонуклеотидной последовательности одного из тяжелей (дуплекс VIII). При этом оценивалось влияние на эффективность реакции размеров рибонуклеотидного фрагмента, его положения в дуплексе, а также природы и ориентации «сшиваемых» рибо- и дезоксирибонуклеотидных остатков. Определялось также соотношение образующихся 3'-5'- и 2'-5'-изомеров. Использовали конденсирующие агенты двух типов — BrCN и CDI.

На первый взгляд казалось, что матричная конденсация рибонуклеотидных звеньев должна идти более эффективно, чем конденсация с участием дезоксирибонуклеозидов в силу большей реакционной способности гидроксильных групп РНК по сравнению с ДНК. Однако, как видно из экспериментальных данных, приведенных в табл. 1 и в работе [5], выход продуктов реакции под действием CDI в дуплексе (I) падает более чем вдвое по сравнению с дуплексом (IV), который отличается только заменой в реакционном узле уридина на тимидин. При использовании же в качестве конденсирующего агента BrCN эффективность ХЛ в дуплексе (I) еще ниже.

Такое снижение выхода продуктов лигирования может быть обусловлено конформационными различиями между рибо- и дезоксирибонуклеотид-

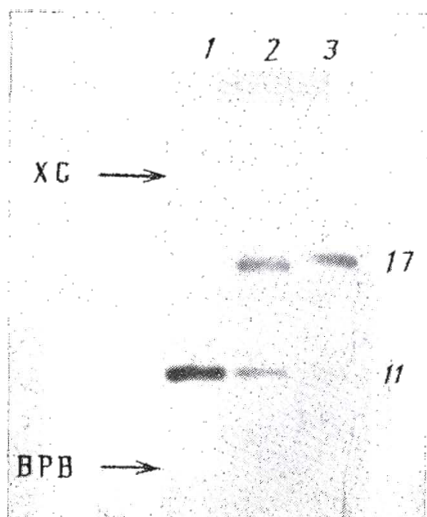


Рис. 1

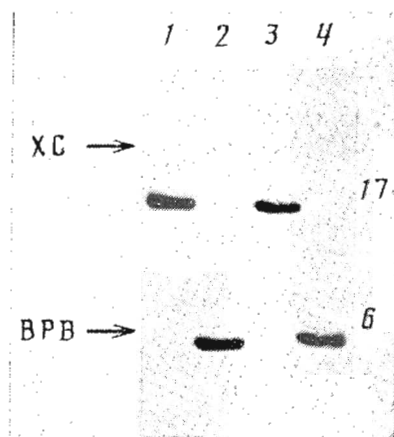


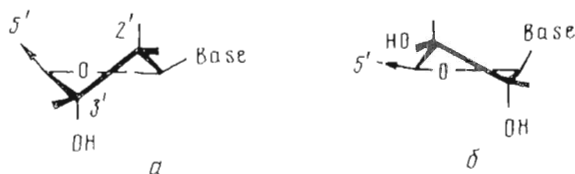
Рис. 2

Рис. 1. Радиоавтограф электрофореза в 20% ПААГ реакционных смесей до (1) и после (3) инкубации дуплекса (1) с Т4-ДНК-лигазой; 2 – ферментативное лигирование в дуплексе (1) проведено после обработки бромцианом d(ACCGA)rU, входящего в состав этого дуплекса (условия см. в «Экспер. части»). Цифры справа указывают длину олигомеров. ХС – ксиленинаол, ВРВ – бромфеноловый синий

Рис. 2. Радиоавтограф электрофореза в 20% ПААГ гептадекануклеотида d(ACCGA)-rUd(pCCAGGAGTGAC), полученного в дуплексе (1) с помощью ВrCN (1) и Т4-ДНК-лигазы (3); 2, 4 – продукты гидролиза этих гептадекануклеотидов РНКазой А соответственно. Обозначения как на рис. 1

ными звеньями в двойной спирали. Известно, что для В-формы ДНК характерна С2'-эндо-конформация фуранозных циклов с аксиальным положением 3'-гидроксильной группы [6] (схема 1а). В гибридном же дуплексе, в состав которого входят ковалентно-связанные РНК- и ДНК-блоки, рибонуклеотидные звенья ввиду своего структурного консерватизма сохраняют С3'-эндо-конформацию, характерную для А-формы [7]. При этом 3'-гидроксильная группа занимает экваториальное положение (схема 1б), что может стерически затруднять ее взаимодействие с фосфатной группой соседней молекулы.

Схема 1



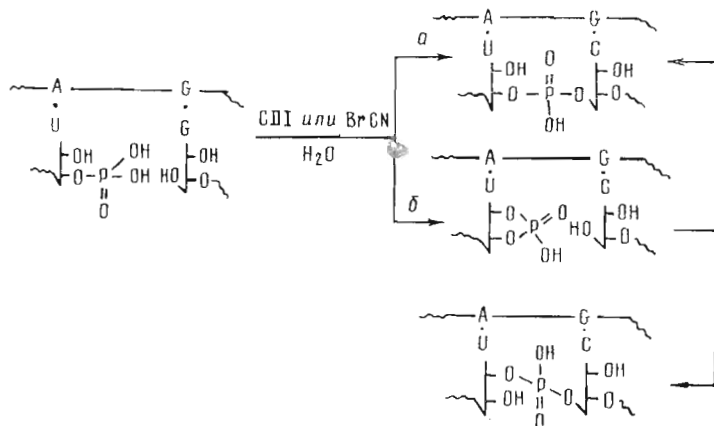
Дополнительной причиной снижения выхода «сшитого» олигонуклеотида при ВrCN-индуцируемом ХЛ в дуплексе (1) может быть модификация *цис*-гликольной группировки 3'-концевого уридина, входящего в реакционный центр. Феррис и сотр. [8] показали, что при обработке уридина ВrCN в течение 45 мин при 20° С и рН 11 образуется смесь 2',3'-карбомата, 2,2'- и 2,3'-циклокарбоматов. Определяющую роль в этих превращениях играет 2'-гидроксильная группа, нуклеофильность которой выше, чем 3'-ОН-группы. Хотя изучаемая нами матричная конденсация под действием ВrCN протекает в течение 1 мин и в более мягких условиях (0° С, рН 7,5), нельзя полностью исключить такого рода модификацию *цис*-гликольной группировки уридина в узле «сшивания». Это предположение было подтверж-

дено в опыте, показавшем, что эффективность ферментативного лигирования в дуплексе (I) снижается с 95 до 60%, если перед добавлением T4-ДНК-лигазы гексануклеотид d(ACGGA)rU, входящий в состав этого дуплекса, обработать раствором BrCN (рис. 1). Поскольку акцептором фосфата в дуплексе (I) является *цис*-гликольная группировка уридина, возможно образование как 3'-5'-, так и 2'-5'-межнуклеотидных связей. Для определения соотношения изомеров была использована РНКаза А, избирательно гидролизующая только 3'-5'-межнуклеотидные связи. Оказалось, что

РНКазой А расщеплялось 86% d(ACGGA)rUd^{*}(pCCAGGAGTGAC), полученного при BrCN-индуцируемом ХЛ в дуплексе (I) (рис. 2). Ранее то же процентное содержание природного изомера было определено при СДИ-индуцируемом ХЛ в том же дуплексе [2]. В контрольном опыте продукт ферментативного лигирования в дуплексе (I) гидролизовался РНКазой А количественно.

Дуплексы (II) и (III) имеют такую же нуклеотидную последовательность, что и дуплекс (I), но различаются положением фосфатных групп в реакционном центре: в дуплексе (II) имеется 3'-фосфатная группа, в дуплексе (III) фосфорилированы оба конца разорванной цепи. Эффективность ХЛ в обоих дуплексах низка (табл. 1). Очевидно, это обусловлено протеканием двух конкурирующих реакций, представленных на схеме 2: межмолекулярной, приводящей к образованию природной 3'-5'-фосфодиэфирной связи (путь *а*), и внутримолекулярной, приводящей к образованию 2',3'-циклофосфата (путь *б*).

Схема 2



Соотношение продуктов реакции будет зависеть от прочности дуплекса и конформации реагирующих групп в реакционном узле. Новая межнуклеотидная связь в дуплексе (II) может, вероятно, образовываться не только по пути «*а*», но и по пути «*б*», поскольку 2',3'-циклофосфаты — активные производные и могут реагировать с 5'-гидроксильной группой соседнего олигомера с образованием смеси 2'-5'- и 3'-5'-изомеров [9].

В дуплексе (III) при наличии концевых фосфатных групп у обоих сближенных на матрице олигонуклеотидов выходы продуктов ХЛ с пирофосфатной связью между олигомерами несколько выше (табл. 1). Однако они далеки от количественных выходов, легко достигаемых при ХЛ дезоксирибонуклеотидных блоков с 3'- и 5'-фосфатными группами в реакционном центре [2]. Очевидно, это связано с побочной внутримолекулярной реакцией образования 2',3'-циклофосфата, рассмотренной выше для дуплекса (II) (схема 2, б).

В контрольном эксперименте было показано, что при обработке d(ACGGA)rUр бромцианом в условиях ХЛ происходит количественное превращение 3'-концевой фосфатной группы в 2',3'-циклофосфат. О протекании этой реакции судили по устойчивости образовавшегося соединения к щелочной фосфатазе.

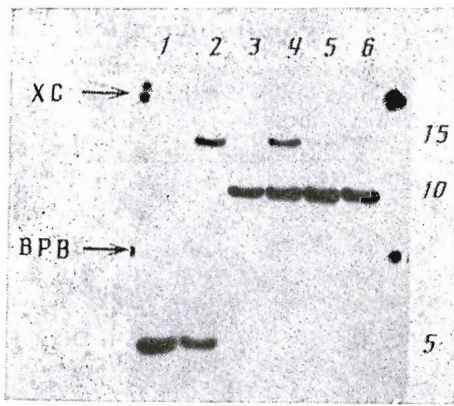


Рис. 3

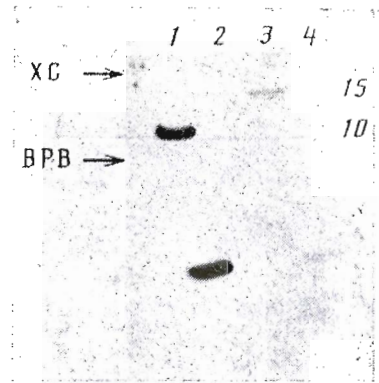


Рис. 5

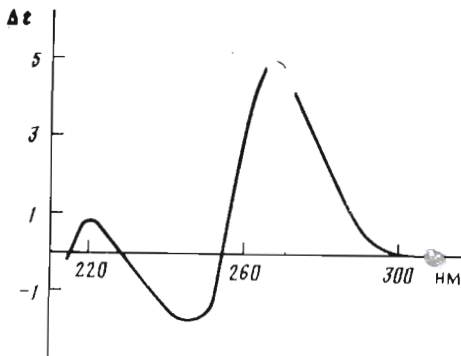


Рис. 4

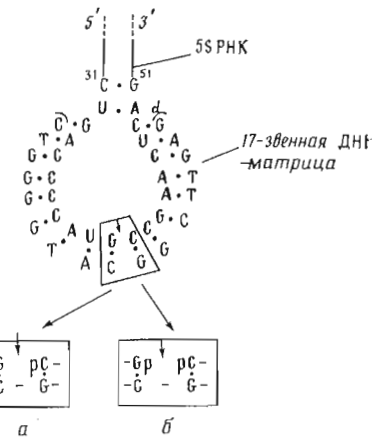


Рис. 6

Рис. 3. Радиоавтограф электрофореза в 20% ПААГ продуктов ВгСN-индуцируемого ХЛ в дуплексах (VI) — 2, (VII) — 4, (V) — 5, (VIII) — 6. Дорожки 1 и 3 соответствуют олигонуклеотидам $d(pAATGGp)$ и $r(pAAAAACCCAUG)$

Рис. 4. Спектр КД дуплекса (VIII) в буфере Б. Концентрация олигонуклеотидов (на мономерное звено) — $3 \cdot 10^{-4}$ М, 20°C

Рис. 5. Радиоавтограф электрофореза в 20% ПААГ олигонуклеотидов: контрольного $r(A_4C_3AUGpCp)$ (1) и $r(A_2UGGpA_4C_3AUG)$ (3), полученного при ВгСN-индуцированном ХЛ в дуплексе (VIII), 2, 4 — продукты гидролиза этих олигонуклеотидов РНКазой T_2

Рис. 6. Дуплексы (IXа, б), построенные из двух фрагментов 5S РНК *E. coli* и комплементарного им гептадекадезоксирибонуклеотида (изображен снаружи петли 5S РНК). В прямоугольниках показано строение шиваемых узлов, а стрелкой внутри них — место разрыва цепи РНК

Гибридные дуплексы (V) — (VII), в которых на ДНК-матрице конденсируются рибо- и дезоксирибонуклеотидные блоки, имеют одинаковую первичную структуру и различаются только положением (дуплексы (V) и (VI)) или количеством (дуплекс (VII)) фосфатных групп в реакционном центре. Получение такого рода смешанных блок-сополимеров имеет самостоятельный интерес. Во-первых, подобные олигонуклеотиды начинают широко использоваться в качестве аналогов субстратов ряда ферментов нуклеинового обмена. Так, смешанные рибо-дезоксирибонуклеотиды оказались эффективными зондами для направленного расщепления РНК РНКазой Н [10]. Во-вторых, они являются уникальным объектом изучения структурных аспектов биологического функционирования биополимеров (моделирование изгибов в двойной спирали).

В этой группе дуплексов, как и следовало ожидать, наиболее эффективно протекало «сшивание» 3'-фосфорилированных ДНК-блоков с олигорибонуклеотидами, несущими 5'-гидроксильную (дуплекс (VI)) или 5'-фосфатную группы (дуплекс (VII)). Однако в целом выход продуктов ХЛ в таких гибридных дуплексах ниже, чем в ДНК-аналогах с той же природой реагирующих групп в точке разрыва (рис. 3). Снижение эффективности ХЛ, возможно, связано с изгибом двойной спирали в месте стыка участков разных конформаций [11]. Ведь в дуплексах (V)–(VII) область одноцепочечного разрыва является также границей между двумя формами двойной спирали: А-формы для гибридного (РНК·ДНК)-участка дуплекса и В-формы для (ДНК·ДНК)-участка. Низкая эффективность матричной конденсации олигомеров в дуплексе (V) обусловлена неблагоприятным взаимным расположением 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной групп в реакционном центре, которое усугубляется изгибом двойной спирали.

В дуплексе (VIII), в котором «сшиваются» рибонуклеотидные блоки, эффективность ХЛ низка (см. табл. 1 и рис. 3), хотя в этом случае весь дуплекс находится в А-форме, что подтверждается видом спектра КД (рис. 4), характерным для А-формы нуклеиновых кислот [12]. На наш взгляд, решающими для химических матричных реакций являются конформационные особенности 3'-концевого звена, акцептирующего фосфатную группу. Когда это звено имеет рибонуклеотидную природу, оно в составе дуплекса принимает неблагоприятную для реакции С3'-эндо-конформацию (схема 1, б). Нельзя, конечно, исключить и влияние макромолекулярной структуры дуплекса на эффективность ХЛ. Так, расчетным путем показано, что доступность атомов кислорода фосфатных групп растворителю (а тем самым и конденсирующему реагенту) в А-форме почти вдвое меньше, чем в В-форме [13]. Кроме того, в А- и В-формах заметно варьирует расстояние между соседними фосфатными группами в одной цепи (5,4 и 6,6 Å соответственно [14]), что может влиять на стерические аспекты химических реакций в составе таких спиральных структур.

Для определения природы межнуклеотидной связи, образовавшейся при ХЛ в дуплексе (VIII), была использована РНКазы T_2 . Этот фермент гидролизует только природные 3'-5'-межнуклеотидные связи во фрагментах РНК с образованием в качестве конечных продуктов нуклеозид-3'-фосфатов. Как видно на рис. 5, РНКазы T_2 полностью расщепляет

г(AAUGGrAAAACCCAUG) до мононуклеотидов. На основании этих экспериментов можно сделать вывод, что независимо от природы конденсирующего агента при ХЛ в дуплексе (VIII) образуется только 3'-5'-межнуклеотидная связь.

Метод ХЛ был использован для репарации разрыва в большой петле 5S РНК *E. coli* между фрагментами (1U - ^{41}G) и (^{42}C - ^{120}U). Эти фрагменты были предварительно получены избирательным гидролизом 5S РНК гуанилспецифической РНК-азой C_2 и выделены электрофорезом в 12% ПААГ. Матрицей служил синтетический 17-звенный олигодезоксирибонуклеотид, комплементарный участку G^{33} - C^{49} 5S РНК. На рис. 6 схематически представлен сконструированный гибридный дуплекс (IX), а в квадратах выделена структура реакционных узлов. Дуплексы (IXа) и (IXб) различаются природой реагирующих групп в месте разрыва: в (IXа) — 3'-гидроксильная и 5'-фосфатная группы, а в (IXб) — две фосфатные группы. Компоненты этих дуплексов готовили следующим образом: для дуплекса (IXб) фрагмент (1U - ^{41}G) обрабатывали муравьиной кислотой (размыкание концевого 2',3'-циклофосфата), для дуплекса (IXа) этот фрагмент дефосфорилировали обработкой фосфатазой, 5'-фосфорилирование фрагмента (^{42}C - ^{120}U), входящего в состав обоих дуплексов, проводили по стандартной методике, используя АТФ и Т4-полинуклеотидкиназу. ХЛ проводили по стандартной методике с использованием не эквимольного, как в дуплексах (I)–(VIII), а 20-кратного избытка олигомера-матрицы. В качестве конденсирующих агентов был применен как $BrCN$, так и CDI . Как видно из табл. 2, выходы при ХЛ низки, причем

Выход (%) в реакции репарации разрыва между ($^1\text{U}^{41}\text{G}$)- и ($^{42}\text{C}^{120}\text{U}$)-фрагментами 5S РНК *E. coli* методами химического и ферментативного лигирования

Номер дуплекса	Олигонуклеотидные компоненты	Конденсирующий агент		
		BrCN	CDI	T4-РНК-лигаза
IXа	($^1\text{U}^{41}\text{G}$) + ($\text{p}^{42}\text{C}^{120}\text{U}$) + +d(GAGT ₂ CG ₂ CATG ₄ TC)	3	3	—
IXб	($^1\text{U}^{41}\text{Gp}$) + ($\text{p}^{42}\text{C}^{120}\text{U}$) + +d(GAGT ₂ CG ₂ CATG ₄ TC)	4	8	—
— *	($^1\text{U}^{41}\text{G}$) + ($\text{p}^{42}\text{C}^{120}\text{U}$)	—	—	40

* Ферментативное лигирование в отсутствие олигодезоксирибонуклеотида-матрицы.

эффективность образования пирофосфатной связи между фрагментами 5S РНК в дуплексе (IXб) несколько выше, чем сложноэфирной (дуплекс IXа). Эти данные полностью согласуются с результатами, полученными выше при XII модельных дуплексов, и указывают на возможность применения метода XII для репарации одноцепочечных разрывов в природных нуклеиновых кислотах.

При анализе результатов XII, полученных как на коротких модельных РНК-ДНК-гибридах, так и на дуплексах с участием фрагментов природной РНК (табл. 1 и 2), обращает на себя внимание корреляция в действиях обоих реагентов: при переходе от системы к системе выход продуктов лигирования, индуцированного BrCN и CDI, меняется симбатно, причем под действием CDI выходы несколько выше. Однако преимуществом BrCN является быстрота протекания реакции и отсутствие продуктов модификации. Кроме того, повторная обработка реакционной смеси BrCN существенно повышает выход продукта (табл. 1). Таким образом, эффективность XII определяется преимущественно структурой дуплекса. Замена дезоксирибо- на рибонуклеотиды в узле лигирования приводит к резкому снижению эффективности реакции. Этот эффект наблюдается независимо от положения (3'- или 5'-) фосфатных групп.

Если фосфатная группа находится в 3'-положении рибозвена, матричная конденсация сопровождается побочной реакцией образования малоактивного 2',3'-циклофосфата. При локализации же фосфатной группы в 5'-положении снижение эффективности реакции связано, вероятно, с неблагоприятной конформацией рибонуклеотидного звена — акцептора фосфата.

По-видимому, соотношение изомеров с 2'-5'- и 3'-5'-фосфодиэфирной связью должно сильно зависеть от ориентации реагирующих групп в месте одноцепочечного разрыва.

При «сшивании» рибо- и дезоксирибонуклеотидных блоков все отмеченные выше негативные закономерности сохраняются, если рибонуклеотидный блок является 5'-концевым фрагментом блок-сополимера. В случае обратной ориентации РНК- и ДНК-блоков с локализацией фосфатной группы на ДНК-блоке эффективность XII высока. Введение в место одноцепочечного разрыва еще одной фосфатной группы, вызывающее образование пирофосфатной связи, незначительно улучшает ситуацию. При этом более высокие выходы достигаются при использовании в качестве конденсирующего агента CDI.

Хотя сравнение результатов ферментативного и химического лигирования фрагментов РНК не в пользу последнего, химический подход представляется более общим и легко может быть унифицирован.

Экспериментальная часть

В работе использовали 4-(2-гидроксиэтил)-4-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES), MES, CDI, трис, бромистый циан (Merck, ФРГ), акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, тетраацетат натрия (Reanal,

ВНР), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, АТР, 1,2-дифосфат (Serva, ФРГ), [γ - ^{32}P]АТР (Изотоп, СССР), а также ферменты отечественного производства: Т4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1), Т4-РНК-лигазу (КФ 6.5.1.3), Т4-полициклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), РНКазу А (КФ 3.1.27.5), РНКазу Т₂ (КФ 3.1.27.1), РНКазу С₂ (КФ 3.1.27.3), щелочную фосфатазу *E. coli* (КФ 3.1.3.1).

Были использованы следующие буферные растворы: 0,25 М MES (рН 7,5), 20 мМ MgCl₂ (А); 50 мМ MES (рН 6,0), 20 мМ MgCl₂ (Б); 50 мМ трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ 1,4-дифосфат, 2 мМ спермидин (В); 50 мМ HEPES (рН 7,8), 2 мМ 1,4-дифосфат, 0,02 М MgCl₂, 0,15 мг/мл альбумин бычий (Г); 0,1 М трис-НСl (рН 7,2), 2 мМ EDTA (Д), 0,02 М ацетат аммония (рН 4,5), 0,002 М EDTA (Е); 1 М ацетат натрия, рН 5,0 (Ж); 0,05 М трис-НСl (рН 7,5), 0,01 М MgCl₂, 0,2 М NaCl (З); 0,05 М трис-НСl (рН 7,5), 10⁻⁴ М EDTA (И).

Условия электрофореза в ПААГ, а также методика 5'- ^{32}P -фосфорилирования олигонуклеотидов описаны ранее [1, 5].

3'-Концевую метку в олигорибонуклеотиды вводили с помощью Т4-РНК-лигазы. 0,02 ОЕ₂₆₀ олигорибонуклеотида растворяли в 10 мкл буфера Г, содержащего 5 мкКи рСр, и добавляли 1 ед. акт Т4-РНК-лигазы. Смесь инкубировали 12 ч при 10° С. Меченый продукт выделяли электрофорезом в 20% ПААГ с последующей элюцией с геля буфером Ж.

Получение d(ACGGA)rU > p. 0,2 ОЕ₂₆₀ d(ACGGA)rUp растворяли в 18 мкл буфера А и добавляли 2 мкл 2 М раствора BrCN в диметилформамиде. Через 1 мин гексануклеотид осаждали этанолом.

Для подтверждения циклообразования полученный олигонуклеотид растворяли в 10 мкл буфера И, добавляли 0,5 ед. акт. щелочной фосфатазы и смесь инкубировали 30 мин при 37° С. Фермент экстрагировали смесью хлороформ — изопропанол, 24 : 1. Нуклеотидный материал осаждали этанолом и анализировали электрофорезом в 20% ПААГ.

Химическое лигирование в дуплексах (I) — (VIII): а) под действием BrCN проводили по методике, описанной ранее [1]; *б)* под действием CDI проводили в буфере Б при концентрации олигонуклеотидов (в расчете на мономер) 10⁻³ М, концентрации CDI — 0,2 М. Смеси инкубировали при 10° С в темноте. Через 6 сут нуклеотидные фракции осаждали этанолом и анализировали электрофорезом в ПААГ.

Ферментативное лигирование в дуплексе (I). К смеси, содержащей 1 мкл 0,1 мМ раствора d(pCCAGGAGTGAC) (10–50 тыс. имп./мин), 1,5 мкл 0,1 мМ раствора матричного тетрадекануклеотида, добавляли 1,5 мкл 0,1 мМ d(ACGGA)rU. В контрольном эксперименте d(ACGGA)rU предварительно обрабатывали 10³-кратным избытком BrCN (0,5 М) в течение 1 мин при 0° С. Затем обе смеси упаривали и к сухому остатку добавляли 10 мкл буфера В, содержавшего 1 мМ АТР и 5 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы. Растворы инкубировали 12 ч при 10° С и анализировали в ПААГ.

Гидролиз РНКазой А. К раствору d(ACGGA)rUd(pCCAGGAGTGAC) (10–50 тыс. имп./мин), полученного при ХI в дуплексе (I), в 4 мкл буфера Д добавляли 1 мкл РНКазы А в том же буфере (0,01 мг/мл). Смесь инкубировали 1,5 ч при 37° С, упаривали и анализировали электрофорезом в 20% ПААГ.

Гидролиз РНКазой Т₂. К раствору ^{32}P -меченого r(AAUGGpAAAACCCAUG) (10–50 тыс. имп./мин) в 4 мкл буфера Г добавляли 2 мкл РНКазы Т₂ (1 мкг/мл) в том же буфере. Смесь инкубировали 1 ч при 37° С, упаривали и анализировали в 20% ПААГ. В контрольном эксперименте действию фермента подвергали r(AAAACCCAUGpCp).

*Получение фрагментов (^1U - ^{41}G) и (^{42}C - ^{120}U) 5S РНК *E. coli*.* Гидролиз 5S РНК РНКазой С₂. 1 ОЕ₂₆₀ 5S РНК растворяли в 45 мкл буфера З. Смесь отжигали от 65 до 20° С в течение 40 мин, затем охлаждали до

0° С, добавляли 15 ед. акт. фермента в 5 мкл буфера З, смесь инкубировали 10 мин при 0° С. Фермент экстрагировали фенолом, насыщенным буфером И, нуклеотидный материал осаждали добавлением двух объемов этанола, осадок промывали спиртом и высушивали. Фрагменты ($^1U-^{41}Gr$) и ($^{42}C-^{120}U$) выделяли электрофорезом в 12% ПААГ с последующей элюцией из геля.

Гидролиз циклофосфатной группировки на 3'-конце фрагмента ($^1U-^{41}G > p$). 0,2 ОЕ₂₆₀ вещества растворяли в 10 мкл 4 М НСООН, раствор выдерживали 3 ч при 20° С, после чего олигонуклеотиды осаждали этанолом.

Обработка фрагмента ($^1U-^{41}Gr$) щелочной фосфатазой. К раствору 0,1 ОЕ₂₆₀ фрагмента ($^1U-^{41}Gr$) в 10 мкл буфера И добавляли 0,2 ед. акт. фосфатазы. Ферментативный гидролиз и анализ реакционной смеси проводили как указано выше.

Химическое лигирование фрагментов 5S РНК. а) Действием BrCN. К 0,05 ОЕ₂₆₀ смеси фрагментов ($^1U-^{41}G$) и ($p^{42}C-^{120}U$), взятых в молярном соотношении 1,5 : 1, добавляли 10 тыс. имп/мин ($p^{42}C-^{120}U$). Смесь упаривали, растворяли в 5 мкл буфера А и проводили отжиг от 95 до 35° С в течение 15 мин. Затем добавляли 0,1 ОЕ₂₆₀ (20-кратный избыток) d(GAGTTCGGCATGGGGTC) в 4 мл буфера А. Смесь охлаждали до 0° С и добавляли 1 мкл 2 М раствора BrCN в DMF. Через 1 мин нуклеотидный материал осаждали этанолом и анализировали электрофорезом в 12% ПААГ. Выход определяли по отношению радиоактивности полученной 5S РНК к общей радиоактивности реакционной смеси.

б) Лигирование действием CDI проводили в буфере Б после сборки дуплекса, как описано выше, при 0° С в течение 6 сут. Анализ реакционной смеси проводили как описано выше.

Ферментативное лигирование фрагментов ($^1U-^{41}G$) и ($p^{42}C-^{120}U$). К 0,05 ОЕ₂₆₀ смеси фрагментов в молярном соотношении 1,5 : 1 добавляли фрагмент ($p^{42}C-^{120}U$). Смесь упаривали и остаток растворяли в 10 мкл буфера Г, содержащего 1 мМ АТР, 7 ед. акт. РНК-лигазы и инкубировали при 10° С. Через 12 ч раствор упаривали и анализировали электрофорезом с 12% ПААГ.

Авторы выражают глубокую признательность Р. Рейнхофф (ИОС АН ЛатвССР) за предоставление олигорибонуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аширбекова Д. Т., Соколова Н. И., Долинная Н. Г., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 166–174.
2. Dolinnaya N. G., Sokolova N. I., Grayaznova O. I., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids: Res. 1988. V. 16. № 9. P. 3721–3738.
3. Зайкина Г. В., Крынецкая Н. Ф., Метелев В. Г., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 2. С. 266–268.
4. Канава Е., Yanagawa H. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 23. P. 7425–7430.
5. Долинная Н. Г., Грязнова О. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 921–927.
6. Иванов В. И. // Молекулярная биология. 1983. Т. 17. Вып. 3. С. 616–620.
7. Mellema J.-R., Haasnoot C. A. G., van der Marel G. A., Wille G., van Boeckel C. A. A., van Boom J. H., Altona C. // Nucl. Acid. Res. 1983. V. 11. № 16. P. 5717–5738.
8. Ferris J. P., Yanagawa H. // J. Org. Chem. 1984. V. 49. № 12. P. 2121–2125.
9. Usher D. A., Mchale A. H. // Science. 1976. V. 192. № 4234. P. 53–54.
10. Метелев В. Г., Крынецкая Н. Ф., Зайкина Г. В., Родионова Н. П., Тюлькина Л. Г., Атабеков К. И., Карпова О. В., Атабеков И. Г., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 10. С. 1425–1428.
11. Selsing E., Wells R. D. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 12. P. 5410–5416.
12. Иванов В. И. // Биополимеры и клетка. 1985. Т. 1. № 1. С. 5–13.
13. Зенгер В. // Принципы структурной организации нуклеиновых кислот/Ред. Вайнштейн Б. К. М.: Мир, 1987. С. 398–402.
14. Saenger W., Hunter W. N., Kennard O. // Nature. 1986. V. 324. P. 385–388.

Поступила в редакцию
26.XII 1988.

CHEMICAL REACTIONS IN NUCLEIC ACID DUPLEXES. VIII.
ASSEMBLY OF HYBRID RNA-DNA-DUPLEXES USING
WATER-SOLUBLE CONDENSING AGENTS

DOLINNAYA N. G., ASHIRBEKOVA D. T., SOKOLOVA N. I., SHABAROVA Z. A.

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

Condensation of oligonucleotides containing ribonucleotide segments (from mononucleotide to full sequence) on DNA-template was studied, with cyanogen bromide and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide as condensing agents. Efficiency of the chemical ligation of RNA oligomers was much lower than that of DNA analogues. The yield of chemical ligation products was found to depend on the position of RNA segment in the hybrid duplexes and on the position of the phosphate group in the nick. The oligoribonucleotide's length does not affect the yield of condensation products. A nick in 5S RNA loop was repaired by means of the chemical ligation method.