



УДК 577.113.4

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

VII*. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОНДЕНСАЦИИ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ БРОМЦИАНА И ВОДОРАСТВОРИМОГО КАРБОДИМИДА

*Аширбекова Д. Т., Соколова Н. П., Долинная Н. Г., Шабарова З. А.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского и химический факультет*

Показано, что бромциан, так же как и 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид, может быть использован в качестве конденсирующего агента при матрично-направленной сборке ДНК-дуплексов с различными модификациями сахарофосфатного остова. Обнаружена общая для обоих реагентов зависимость выхода продуктов химического лигирования от строения реакционного узла, в частности от конформации реагирующих групп, причем для ВгСN эта зависимость выражена сильнее. Даны практические рекомендации для выбора конденсирующего агента в зависимости от природы дуплекса. На основании данных ³¹P-ЯМР-спектроскопии предложена схема активации бромцианом фосфатной группы нуклеотида.

Изучение неэнзиматической матричной конденсации олигонуклеотидов (ХЛ), проводимое в нашей лаборатории [2], направлено главным образом на исследование реакционной способности и структурной организации двуспиральных нуклеиновых кислот. Кроме того, изучается перспективность ХЛ как нового метода получения протяженных фрагментов ДНК, в том числе модифицированных. Поскольку при ХЛ значительно ниже требования к структуре субстратов по сравнению с ферментативным лигированием, открывается реальная возможность введения широкого круга модификаций в ДНК-дуплексы в процессе их сборки в водных растворах. Так, с помощью водорастворимого КДИ была осуществлена сборка серии ДНК-дуплексов с точечными модификациями; ферментативным путем те же дуплексы получить не удалось [3, 4]. Следует отметить, что развиваемый в зарубежных лабораториях метод неэнзиматической матричной конденсации моно- и олигонуклеотидов направлен главным образом на моделирование пребиотического синтеза биополимеров [5, 6].

Для дальнейшего развития ХЛ наиболее перспективными представляются экспериментально простые и технологичные водорастворимые конденсирующие реагенты. В настоящей работе проведено сравнительное изучение эффективности и «субстратной специфичности» реагентов двух типов — КДИ и недавно предложенного нами бромциана [7]. Основным преимуществом последнего является значительно более высокая скорость протекания реакции (около 1 мин по сравнению с несколькими часами или даже сутками для КДИ) и отсутствие побочных продуктов, вызванных модификацией нуклеотидного материала. Для выяснения границ применимости этих реагентов в реакциях ХЛ были обследованы два семейства ДНК-дуплексов (см. схему 1), различающихся нуклеотидной последовательностью и структурой «лигируемого узла». Механизм действия КДИ и его устойчивость в водных растворах исследованы ранее [8].

* Сообщение VI см. [1]. Использованы следующие сокращения: ХЛ — химическое лигирование на матрице; КДИ — 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид; MES — 2-морфолинотансульфокислота; ДМФ — диметилформамид. Префикс «d» перед олигодезоксирибонуклеотидами для простоты опущен.

были обработаны два дуплекса, в одном из которых в месте одноцепочечного разрыва отсутствуют фосфатные группы, т. е. возможна активация только гидроксильных групп обоих олигомеров (дуплекс II, см. схему 1), а в другом, наоборот, оба олигонуклеотида имеют фосфатные группы (дуплекс Iг). Конденсация идет только в дуплексе (Iг), и в результате образуется олигомер с пирофосфатной межнуклеотидной связью. Эти опыты позволили предположить, что при BrCN-индуцируемой матричной конденсации олигонуклеотидов активируется фосфатная группа. Поскольку структура активированного BrCN монозамещенного фосфата неизвестна, мы исследовали реакцию мононуклеотидов с BrCN методом импульсной ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, так как этот метод позволяет непосредственно в реакционной смеси регистрировать превращения фосфатных групп.

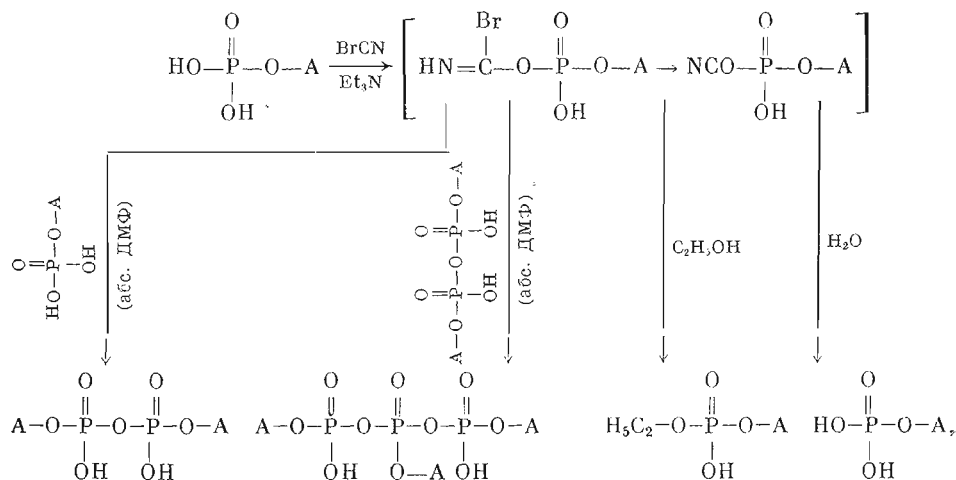
При обработке дезоксирибоадениловой кислоты в буфере А 5-кратным избытком BrCN через 1 мин в спектре регистрируется единственный сигнал с δ 1,05 м.д., положение которого не изменяется при выдерживании реакционной смеси в течение недели. Анализ реакционной смеси методами хроматографии на бумаге и электрофореза выявил наличие в ней только дрА. Различие в химических сдвигах дрА в буфере А до (δ 2,09 м.д.) и после (δ 1,05 м.д.) добавления бромциана обусловлено некоторым снижением рН.

При проведении этой же реакции в абс. ДМФ через 1–2 мин модификация полностью завершалась: в спектре отсутствовал сигнал исходного мононуклеотида (рис. 1) и регистрировались сигналы с химическим сдвигом в области $-10 \dots -12$ и -23 м.д. (рис. 1б). Известно, что образование ангидридной связи у атома фосфора смещает его сигнал примерно на 10 м.д. в сильное поле [11]. На основании этого зарегистрированный в спектре сигнал с $\delta -10,9$ м.д. может быть отнесен к пирофосфату, а две группы сигналов с $\delta -11,3$ и -23 м.д. — к триполифосфату. При хроматографии на бумаге в этой реакционной смеси были обнаружены соединения, соответствующие по подвижности симметричному пирофосфату (R_f 0,25) и дрА (R_f 0,18), образовавшемуся при гидролизе неустойчивого триполифосфата [11].

При обработке дрА 5-кратным избытком BrCN в среде абсолютного этанола в ЯМР-спектре уже через 1–2 мин регистрируется основной сигнал с δ 0,18 м.д. (рис. 2). При электрофорезе на бумаге в реакционной смеси было обнаружено соединение с подвижностью 0,6 относительно дрА. Полученный встречным синтезом этиловый эфир дезоксирибоадениловой кислоты имеет те же хроматографические и электрофоретические характеристики [12].

Таким образом, проведенные эксперименты позволяют представить следующие последовательности реакций:

Схема 2



где А — 5'-(дезоксаденозил).

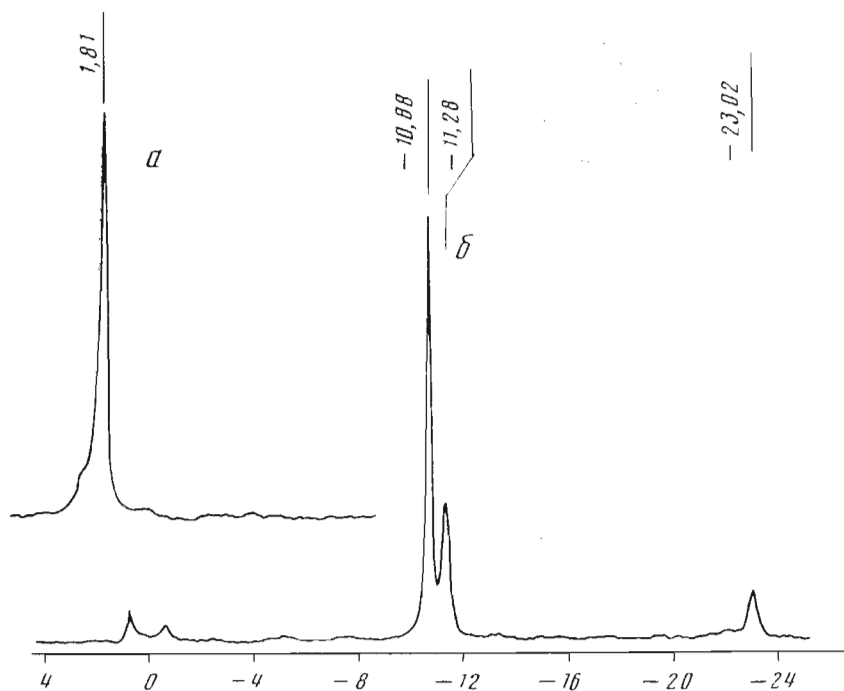


Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР: *a* – дрА в абс. ДМФ, *б* – реакционной смеси, содержащей дрА (0,15 М) и BrCN (0,75 М), в абс. ДМФ

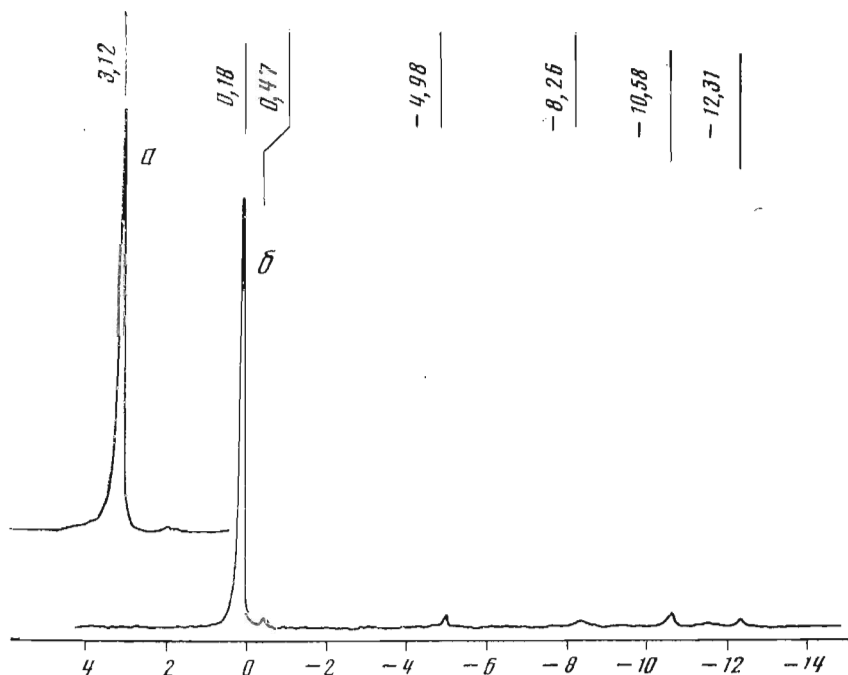


Рис. 2. Спектры ^{31}P -ЯМР: *a* – дрА в абс. этаноле; *б* – реакционной смеси, содержащей дрА (0,15 М) и BrCN (0,75 М), в абс. этаноле

При этом предполагается, что бромциан активирует фосфатную группу мононуклеотида с образованием промежуточных неустойчивых соединений, указанных в скобках (основанием для этого могут служить данные по активации замещенных фосфатов активированными нитрилами [13, 14]). В среде абс. ДМФ эти соединения реагируют с фосфатной группой другой молекулы мононуклеотида или симметричного пирофосфата.

Проведение реакции в абс. этаноле позволяет подавить реакцию активированного интермедиата с наиболее сильным нуклеофилом в реакционной среде, фосфатной группой другой молекулы дрА, и получить этиловый эфир мононуклеотида. В водной среде чрезвычайно быстро идет гидролиз активированного бромцианом фосфатного производного с образованием исходного нуклеотида. И только при проведении реакций в дуплексе из-за пространственной сближенности активированный фосфат может реагировать с гидроксильной группой соседнего олигонуклеотида с образованием новой межнуклеотидной связи.

Сравнительное изучение реакций ХЛ под действием водорастворимых конденсирующих реагентов (КДИ и BrCN) проводили на двух сериях коротких ДНК-дуплексов с одноцепочечным разрывом (Ia—з и IIa—e). Эти дуплексы имеют разный нуклеотидный состав, но построены по общему принципу: в пределах каждой серии неизменной сохраняется матрица и один из комплементарных ей олигомеров, а во втором олигомере меняется природа примыкающих к разрыву звеньев. Модификации в реакционном узле включали замену гидроксильной группы на амино- (Iв) или фосфатную группу (Iг, IIв), комплементарной А·Т-пары на неканонические А·А- (Iд) и А·С-пары (Iе), С·С-пары, отстоящей на одно звено от места одноцепочечного разрыва, на G·G-пару (IIг), пропуск одного нуклеотидного звена (Iж, з) и введение «лишнего» нуклеотида в место разрыва (IIд, е).

На схеме 1, где приведены дуплексы, стрелкой указано место одноцепочечного разрыва, рамкой выделены переменные части дуплексов, X и Y — изменяемые нуклеотидные остатки).

Синтез и термическая устойчивость этих дуплексов описаны ранее [15, 16]. Частично опубликованы также данные по КДИ-индуцируемому ХЛ [3]. Условия матричной конденсации олигонуклеотидов под действием BrCN и КДИ приведены в «Экспериментальной части». Анализ реакционных смесей осуществляли электрофорезом в ПААГ. Первичная структура продуктов химического лигирования подтверждена анализом по Максаму — Гилберту, природа образовавшихся пирофосфатных (Iг, з, IIв) или фосфамидной связей (Iв) доказана их селективным расщеплением, как описано в работе [3].

В таблице приведены выходы продуктов матричной конденсации олигонуклеотидов под действием BrCN и КДИ.

Были проанализированы причины различий эффективности ХЛ при переходе от системы к системе, а также в зависимости от природы конденсирующего реагента.

Как видно из данных, приведенных в таблице, матричная конденсация под действием обоих реагентов значительно эффективнее, если реагирующая фосфатная группа находится на 3'-, а не на 5'-конце олигонуклеотида (ср. в таблице дуплексы Ia и Ib, IIa и IIб). Это, очевидно, объясняется большей стерической доступностью 5'-гидроксильной группы по

Выходы продуктов химического лигирования в дуплексах (I) и (II)

Дуплекс	Конденсирующий реагент			Дуплекс	Конденсирующий реагент		
	BrCN	КДИ			BrCN	КДИ	
	выход, % *	выход, %	время реакции, сут		выход, % *	выход, %	время реакции, сут
Ia	95	95	4	Iз	16	85	6
Iб	35	75	6	IIa	45	72	6
Iв	86	97	0,25	IIб	24	30	6
Iг	67	92	0,25	IIв	47	75	0,25
Iд	5	32	6	IIг	23	30	6
Iе	7	50	6	IIд	7	30	6
Iж	9	25	6	IIе	5	20	6

* Время реакции во всех случаях 1 мин.

сравнительно с 3'-гидроксильной, а также большей конформационной свободой и, следовательно, экспонированностью активированного 5'-фосфата для гидролиза водой. Отметим, что в случае КДИ положение фосфата (3'- или 5'-концевое) оказывает заметное влияние лишь на скорость реакции; на конечный выход продукта влияние этого фактора гораздо меньше, чем при использовании бромциана.

В немодифицированных дуплексах (Ia) и (Iб) выход продуктов ХЛ заметно выше, чем в аналогичных дуплексах (IIa) и (IIб) при использовании обоих реагентов. Это может объясняться как различиями в природе соединяемых звеньев — Т и С в дуплексах (I) и Т и Г в дуплексах (II) (подобная зависимость эффективности ХЛ, обусловленная тонкими различиями локальной конформации сахарофосфатных фрагментов, отмечалась ранее [17]), так и разной вторичной структурой дуплексов (I) и (II).

При ХЛ с помощью КДИ замена 3'-гидроксильной группы на аминогруппу (Iв), как и следовало ожидать, вызывает значительное ускорение реакции и количественный выход продукта реакции достигается не за 6 сут, как для дуплекса (Iб), а за 6 ч. При использовании же BrCN для сшивки дуплекса (Iв) выход целевого продукта достигает 86%.

Относительное снижение выходов продуктов при ХЛ в дуплексах (Iг) и (IIв) (образование пирофосфатной связи) под действием бромциана можно объяснить тем, что в процессе реакции в месте одноцепочечного разрыва накапливаются активные производные сразу по обоим фосфатным группам, что блокирует нуклеофильную атаку. В случае КДИ-индуцируемого ХЛ, согласно кинетической схеме [8], активный промежуточный аддукт, образующийся при реакции КДИ с фосфатной группой, не накапливается, сразу же подвергаясь распаду по продуктивному (с образованием межнуклеотидной связи) или непродуктивному (гидролиз водой) путям. При этом ХЛ идет быстро (6 ч по сравнению с 4–6 сут в дуплексах (Ia) и (Iб)) и эффективно.

В дуплексах (Iд) и (Iе) с неканоническими парами А·А и А·С, примыкающими к одноцепочечному разрыву, эффективность химического лигирования низка при использовании обоих типов конденсирующих реагентов. Это связано с влиянием неканонических пар на конформацию сахарофосфатного остова двойной спирали. В этих дуплексах реагирующие группы получают больше степеней свободы, чем в совершенном дуплексе (например, (Ia)), что способствует атаке активированного фосфата молекулами воды, т. е. распаду по непродуктивному пути.

При замене же комплементарной G·C-пары, отстоящей на одно звено от места разрыва, на некомплементарную G·G-пару (IIг) выход продукта химического лигирования и в случае карбодимидной, и в случае бромциановой активации практически такой же, как в немодифицированном дуплексе (IIб). Полученные данные свидетельствуют о том, что возмущения структуры, вызываемые G·G-парой, не влияют на взаимное расположение реагирующих групп соседнего звена и, следовательно, носят локальный характер. Этот вывод не противоречит литературным данным о степени влияния G·G-пар на физико-химические параметры олигонуклеотидных дуплексов [18].

Низкая эффективность ХЛ в дуплексе (Iж), в состав которого вместо гекса- входит пентануклеотид, т. е. один из нуклеотидов матрицы не имеет партнера в противоположной цепи, объясняется недостаточной сближенностью реагирующих групп вшиваемом узле. В пользу этого предположения говорит тот факт, что при заполнении этой брешки фосфатной группой (Iз) выход продукта ХЛ возрастает почти вдвое.

При введении «лишнего» нуклеозидного звена на акцепторный конец (IIд) и (IIе) выходы продуктов ХЛ также сильно понижаются. Вероятно, неспаренные остатки не полностью встраиваются в двойную спираль и сохраняют конформационную подвижность, приводящую к недостаточной сближенности реагирующих групп в месте одноцепочечного разрыва.

Из данных, представленных в таблице, видна определенная корреляция в действии обоих реагентов, хотя выход целевых продуктов выше при использовании в качестве конденсирующего реагента КДИ. Для протекания

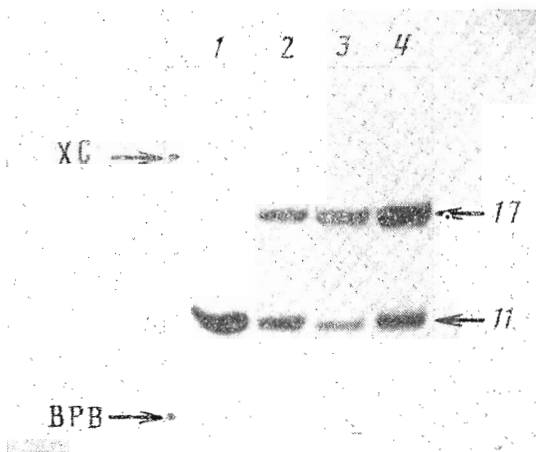


Рис. 3. Радиоавтограф электрофореза в 20% ПААГ реакционных смесей, содержащих дуплекс (16), до (1) и после одно- (2), двух- (3) и трехкратной (4) обработки BrCN . Условия реакции см. в «Экспер. части». Цифры справа указывают длину олигонуклеотидов. ХС — ксиленианол, ВРВ — бромфеноловый синий

ния реакции с BrCN наиболее благоприятна следующая ориентация реагирующих групп в месте одноцепочечного разрыва: гидроксильная группа в 5'-положении, фосфатная — в 3'-положении олигонуклеотида. По видимому, существенное значение имеет степень доступности активированного производного по фосфатной группе молекулам воды. Любые нарушения структуры реакционного узла уменьшают выход продуктов матричной конденсации. Причем в случае BrCN относительное понижение выхода гораздо значительнее, чем при использовании КДИ.

Для повышения выхода продуктов матричной конденсации олигонуклеотидов под действием BrCN был опробован следующий методический прием. Этот лабильный в условиях ХЛ реагент повторно добавлялся к компонентам комплекса, но не непосредственно в реакционную смесь, а после осаждения нуклеотидного материала и последующего его растворения в новой порции буфера. Путем многократного повторения такой процедуры удалось заметно повысить эффективность лигирования даже в дуплексах неблагоприятной структуры. Так, после однократной обработки BrCN дуплекса (16) выход составил 35%, а после трехкратной обработки — 68% (рис. 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что оба конденсирующих реагента могут быть успешно использованы в реакциях ХЛ, но при этом надо учитывать их преимущества и недостатки. Так, для синтеза неприродной межнуклеотидной связи целесообразнее использовать КДИ, который при наличии сильного нуклеофильного акцептора фосфатной группы — амино- или фосфатной групп — может работать быстро и эффективно. При сборке же протяженных ДНК природного строения следует выбрать BrCN , используя в качестве субстратов 3'-фосфорилированные олигонуклеотиды.

Анализ полученных результатов дает основание сделать следующий вывод. Независимо от природы конденсирующих реагентов, даже сильно различающихся по строению, механизму действия и кинетическим схемам, выход продуктов ХЛ определяется главным образом строением «узла сшивания»: реакционной способностью групп (при варьировании природы нуклеофила) или их конформацией в дуплексе (при взаимодействии групп одинаковой химической природы).

Авторы благодарят группу под руководством Т. С. Орецкой за предоставленные олигодезоксирибонуклеотиды и А. В. Цытович за данные по КДИ-индуцируемому ХЛ в дуплексе (II).

Экспериментальная часть

В работе использовали MES, 2-меркаптоэтанол, трис (Merck, ФРГ), N,N' -метиленабисакриламид, акриламид, персульфат аммония, этилендиамин, тетраацетат натрия (Reanal, ВНР), спермидин, бромидан (Fluka,

Швейцария), гАТР, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, 1,4-дитиотреит (Serva, ФРГ), dAMP (Koch-Light Laboratories Ltd., Англия), [γ - ^{32}P]АТР (1000 Кп/ммоль, ВО «Изотоп», Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 7.1.78).

Использованы следующие буферные растворы: 0,25 М MES (рН 7,5), 0,02 М MgCl_2 (А); 0,05 М MES (рН 6,0), 0,02 М MgCl_2 (Б); 0,05 М трис-борат (рН 8,3), 1 мМ EDTA (В); 1 М ацетат калия, рН 8,0 (Г); для Т4-полинуклеотидкиназы — 50 мМ трис-НСl (рН 9,0), 0,01 М MgCl_2 , 5 мМ 1,4-дитиотреит, 2 мМ спермидин (Д).

Хроматографию на бумаге FN-1 проводили в системе этанол — ацетат аммония (7 : 3), рН 7,5.

Электрофорез на бумаге проводили в 0,05 М триэтиламмоний-бикарбонатном буфере (рН 7,5) в течение 1,5 ч при напряжении 35–40 В/см на приборе Labor (Венгрия).

5'-Концевую ^{32}P -метку в олигонуклеотиды вводили фосфорилированием этих олигонуклеотидов [γ - ^{32}P]АТР с помощью Т4-полинуклеотидкиназы. Меченые продукты выделяли электрофорезом в 20% ПААГ.

Электрофорез олигонуклеотидов проводили в 20% полиакриламидном геле толщиной 0,3 мм в присутствии 7 М мочевины в буфере В при постоянном напряжении 1000 В. После проведения автораднографии определяли радиоактивность вырезанных из геля зон, соответствующих ^{32}P -меченым олигонуклеотидам, по Черенкову на счетчике «Delta-300» (Tracor, Нидерланды). Выход в реакциях конденсации определяли по отношению радиоактивности продукта к суммарной радиоактивности исходного олигонуклеотида и продукта. Элюцию олигодезоксинуклеотидов из геля проводили экстракцией буфером Г.

Спектры ^{31}P -ЯМР записаны на спектрометре Bruker HXS-270 (ФРГ) на частоте 121,5 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.) относительно 85% H_3PO_4 . Спектры записывали с гетероядерным подавлением спин-спиновой связи ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$. Диаметр ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 1 мл, температура 20° С.

Химическое лигирование: а) под действием бромциана. К 0,1 ОЕ₂₆₈ смеси трех олигодезоксирибонуклеотидов, содержащей в 1,5-кратном недостатке 5'- ^{32}P -меченый олигонуклеотид — донор фосфата, в 9 мкл буфера А при 0° С добавляли 1 мкл свежеприготовленного 2 М раствора BrCN в абс. ДМФ (использовали возгонанный BrCN). Через 1 мин олигонуклеотиды осаждали 90% этанолом, промывали спиртом и анализировали электрофорезом в 20% ПААГ или вновь растворяли в буфере А и повторяли конденсацию еще 1–2 раза.

б) под действием КДИ. К смеси олигонуклеотидов (приготовленной как указано выше) в 10 мкл буфера Б добавляли КДИ до концентрации 0,2 М. Раствор инкубировали в темноте при 0° С в течение 6 ч, 4 или 6 сут (в зависимости от структуры дуплекса, см. таблицу). Затем олигонуклеотидную фракцию осаждали этанолом и анализировали электрофорезом в 20% ПААГ.

При ХЛ добавляли к дуплексу (Ia) — [$5'$ - ^{32}P]pACGGATp, (Iб — e, з) — [$5'$ - ^{32}P]pCCAGGAGTGAG, (Iж) — [$5'$ - ^{32}P]pACGGAp, (IIa) — [$5'$ - ^{32}P]pAACCTACTp, (IIб — e) — [$5'$ - ^{32}P]pGGTGGT.

Реакция дрА с BrCN в водной среде. 0,225 ммоль дилитиевой соли дрА в 850 мкл буфера А помещали в ампулу и добавляли 1,125 ммоль BrCN в 150 мкл ДМФ. Спектр ^{31}P -ЯМР снимали сразу после добавления BrCN , затем реакционную смесь анализировали методами БХ и электрофореза на бумаге.

Реакция дрА с BrCN в абс. ДМФ. 0,15 ммоль триэтиламмониевой соли дрА в 750 мкл абс. ДМФ помещали в ампулу, добавляли 100 мкл триэтиламина и 0,75 ммоль BrCN в 150 мкл ДМФ. Спектр ^{31}P -ЯМР записывали сразу после добавления BrCN и смесь анализировали как указано выше.

Реакция дрА с BrCN в абсолютном этаноле проводили аналогично, используя в качестве растворителя абсолютный этанол.

1. Готтих М. Б., Ивановская М. Г., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 4. С. 500–510.
2. Shabarova Z. A. // Physicochemical biology reviews. Soviet Scientific Reviews. Section D/Ed. Skulachev V. P. Harwood Akad. Publ. GmbH, 1984. P. 1–51.
3. Долинная Н. Г., Грязнова О. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 6. С. 755–763.
4. Цытович А. В., Долинная Н. Г., Шабарова З. А. // Молекулярн. биология. 1988. Т. 22. Вып. 3. С. 690–699.
5. Lohrman R., Orgel L. E. // Nature. 1973. V. 244. № 5416. P. 418–420.
6. Капая Е., Yanagawa H. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 23. P. 7423–7430.
7. Соколова Н. И., Аширбекова Д. Т., Долинная Н. Г., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1286–1288.
8. Меламед Н. В., Попов С. Г., Шамовский Г. Г. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1974. № 12. Вып. 5. С. 90–98.
9. Kohn U., Wilchek M. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1978. V. 84. № 1. P. 7–14.
10. Ferris J. P., Yanagawa H. // J. Org. Chem. 1984. V. 49. № 12. P. 2121–2125.
11. Зарытова В. Ф. // Итоги науки и техники. Биорганическая химия/Под ред. Шабаровой З. А. М.: ВИНТИ, 1984. Т. 4. С. 58.
12. Shumyantseva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids Res. 1976. V. 3. № 4. P. 903–916.
13. Gramer F., Weiman G. // Chem. Ber. 1961. B. 94. № 4. S. 996–1007.
14. Martin D., Becaloglu R. Organische Synthesen mit Cyansaureestern. Acad. Verlag: Berlin, GDR, 1980. S. 68.
15. Грязнова О. И., Долинная Н. Г., Исагулянц М. Г., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Удалов Н. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 124–131.
16. Цытович А. В., Орецкая Т. С., Долинная Н. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Химия природы. 1987. № 3. С. 421–425.
17. Шабарова З. А., Вейко В. П., Долинная Н. Г., Друца В. Г., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Пурмаль А. А. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 628–642.
18. Werntges H., Steger G., Riesner D., Fritz H.-J. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 9. P. 3773–3790.

Поступила в редакцию
22.VI.1988

CHEMICAL REACTIONS IN NUCLEIC ACID DUPLEXES.
VII. COMPARATIVE CHARACTERISTICS
OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDE CONDENSATION USING
CYANOGEN BROMIDE AND WATER-SOLUBLE CARBODIIMIDE

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

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

Both cyanogen bromide and 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide may be used as coupling reagents for template-directed assembly of DNA duplexes with selective modification in the sugar-phosphate backbone. Yield of chemical ligation products for both reagents depend on the structure of the reaction site. Practical recommendations are given for selection of the condensing reagent depending of properties of the duplex. Based on ^{31}P NMR spectroscopy data, a scheme is suggested for cyanogen bromide activation of nucleotide phosphate group.