



УДК 547.963.32.057+577.152.6'14

ЛИГАЗНАЯ СШИВКА ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ
НА МАТРИЦЕ — ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДНОМ АНАЛОГЕ,
СОДЕРЖАЩЕМ P—S—C(5')-МЕЖНУКЛЕОТИДНЫЕ СВЯЗИ

Рыбаков В. Н., Богачев В. С.

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Академии
наук СССР, Новосибирск

Исследовалась сшивка гексадекадезоксинуклеотидов TGGACCGTGTTCAT* и ^{32}P ССАТСТТТССАТТТГ ДНК-лигазой фага Т4 на матрице — додекадезоксинуклеотидном аналоге G-sG-sA-sT-sG-sG-sA-sT-sG-sT-sA-sA, содержащем P-S-C(5')-межнуклеотидные связи. Показано, что сшивка происходит, но ее скорость оказалась аномально низкой. Гель-электрофоретический анализ показал, что в условиях эксперимента основной продукт реакции — промежуточное аденилированное производное гексадекадезоксинуклеотида ^{32}P ССАТСТТТССАТТТГ. Это производное является продуктом второй из трех частичных реакций общей реакции лигирования; при использовании в качестве матриц природных ДНК его до сих пор не удавалось обнаружить в нормальных для работы фермента условиях.

Исследование субстратных свойств аналогов нуклеиновых кислот имеет важное значение для изучения специфичности и механизма действия целого ряда ферментов и выявления уникальных свойств этих аналогов, обеспечивающих их последующее научное и практическое применение [1—3]. Один из наиболее перспективных классов аналогов нуклеиновых кислот включает в себя аналоги с модифицированными межнуклеотидными связями, но с природными остатками рибозы и гетероциклических оснований. Относящиеся к этому классу аналоги олигонуклеотидов, содержащие P—S—C(5')-межнуклеотидные связи, обладают необычными субстратными и физико-химическими свойствами, делающими возможными ряд интересных их применений в молекулярной биологии [4—6]. Ранее нами было обнаружено, что эти соединения эффективно сшиваются ДНК-лигазой фага Т4 друг с другом и с олигодезоксинуклеотидами на олигодезоксинуклеотидных матрицах [5]. Настоящая работа посвящена изучению сшивки этим ферментом олигодезоксинуклеотидов на матрице — олиготионуклеотиде.

Мы обнаружили, что ДНК-лигаза фага Т4 действительно сшивает олигодезоксинуклеотиды на комплементарной им матрице — олиготионуклеотиде, но скорость сшивки оказалась аномально низкой (рис. 1). За кинетикой этой реакции следили, используя модификацию стандартного метода [7], по накоплению в реакционной смеси полимерных продуктов, содержащих устойчивый к действию щелочной фосфатазы *E. coli* радиоактивный фосфатный остаток. Гель-электрофоретический анализ продуктов сшивки дал, однако, неожиданные результаты (рис. 2). Оказалось, что в ходе ферментативной реакции в реакционной смеси кроме исходного, меченного ^{32}P гексадекануклеотида (I) и продукта его сшивки с гексадекануклеотидом (II) появляется еще один меченный ^{32}P продукт с несколько меньшей электрофоретической подвижностью, чем у гексадекануклеотида (I). На наш взгляд, этот неизвестный продукт ферментативной реакции представляет собой аденилированное производное 5'- ^{32}P -фосфорилированного гексадекануклеотида (I), так как, во-первых, это промежуточное производное действительно образуется на второй стадии реакции лигирования [8] и, во-вторых, соотношение электрофоретических подвижностей 5'- ^{32}P -фосфорилированного гексадекануклеотида (I) и не-

* В сокращенных обозначениях олиготионуклеотидов префикс «d» для краткости всюду опущен.

Рис. 1. Лигирование TGGAC·CGTGGTTTACAT (II) и 32 PCCATCCTTTCCATTTG (I) в присутствии (1) и в отсутствие (2) матрицы G-sG-sA-sT-sG-sG-sA-sT-sG-sT-sA-sA (III). N-содержание в реакционной смеси полимерных продуктов, несущих устойчивый к действию щелочной фосфатазы *E. coli* радиоактивный фосфат

Рис. 2. Гель-электрофоретический анализ продуктов лигирования 16-меров (I) и (II) ДНК-лигазой фага T4 в присутствии (1, 2) и в отсутствие (3) матрицы-додекатрионуклеотида (III). Время лигирования 360 (1) или 500 ч (2, 3). ХС и ВР — положения красителей ксиленианола и бромфенолового синего

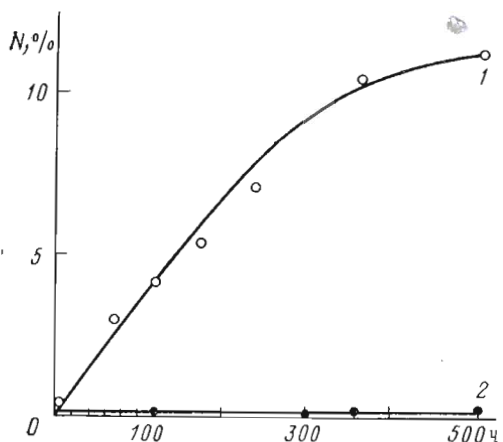


Рис. 1

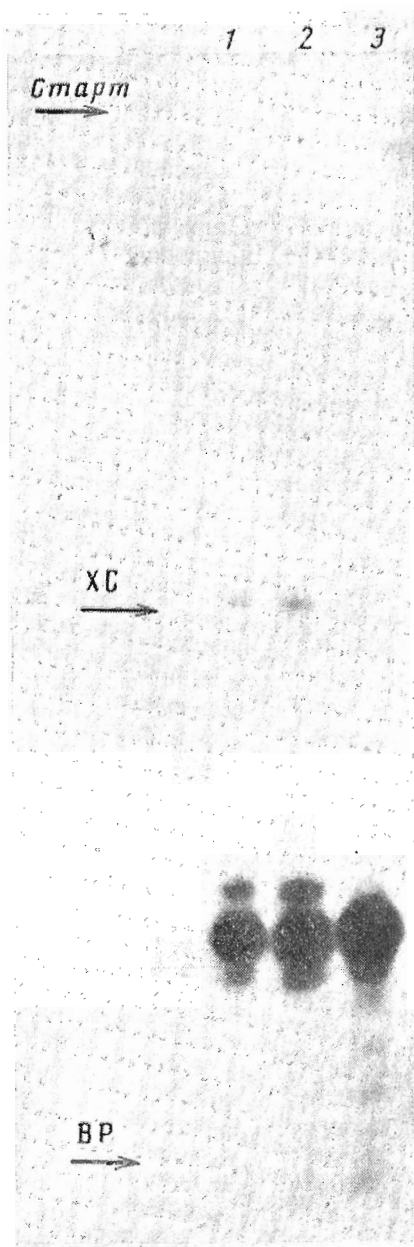


Рис. 2

известного продукта примерно соответствует наблюдавшимся ранее соотношениям электрофоретических подвижностей меченного 32 P гексадекадезоксинуклеотида и его аденилированного производного [9].

До сих пор при сшивке фрагментов ДНК на ДНК-матрице ДНК-лигазой фага T4 обнаружить это промежуточное аденилированное производное ДНК удавалось лишь при кратковременной обработке содержащей одноцепочечные разрывы ДНК большим количеством фермента, взятого в уже аденилированной форме, и лишь в ненормальных для работы фермента условиях (рН 5,6) [8, 10]. По-видимому, это обусловлено тем, что в нормальных для работы фермента условиях скорость третьей из трех частичных реакций общей реакции лигирования (скорость образования фосфодиэфирной связи в результате действия 3'-гидроксильной группы на аденилированный фосфат в одноцепочечном разрыве ДНК) гораздо выше скорости второй частичной реакции.

Использование олиготионуклеотида вместо олигодезоксинуклеотида в качестве матрицы позволило разъединить эти две частичные реакции. Это обусловлено, по-видимому, тем, что вследствие большей длины и, вероятно, иной стереохимической ориентации связи P-S-C(5') матрицы-олиготионуклеотида по сравнению со связью P-O-C(5') [11, 12] преимущественная взаимная ориентация гексадекадезоксинуклеотидов (I) и (II) в месте их сшивки и, следовательно, взаимное положение смежных 3'-гидроксильной и 5'-фосфатной групп таковы, что протекание третьей частичной реакции лигирования сильно затруднено и в условиях экснеримента промежуточное аденилированное производное 5'-фосфорилированного гексадекануклеотида (I) становится основным продуктом реакции.

Представляется вероятным, что матрица-олиготионуклеотид в данном случае работает в качестве «молекулярного выключателя» ферментативной реакции, «включая» ее на очень короткий промежуток времени, когда смежные 3'-гидроксильная и 5'-фосфатная группы занимают благоприятное для сшивки положение, и тут же «выключая», вновь ориентируя сшиваемые олиготионуклеотиды в такое преимущественное для них в данном случае положение друг относительно друга, которое препятствует протеканию сшивки.

Ранее, при изучении репарирующей репликации матрицы-олиготионуклеотида ДНК-полимеразами, мы обнаружили, что замена матрицы-олигодезоксинуклеотида на ее аналог с P-S-C(5')-связями приводила к тому, что присущий ДНК-полимеразе I *E. coli* процессивный характер репарирующей репликации матрицы (при обычных концентрациях ингредиентов реакционной смеси) был нарушен: репликация матрицы-аналога пошла ступенчатый, непроцессивный характер [6]. Вероятно, и в данном случае матрица-аналог служила «молекулярным выключателем» ферментативной реакции, лишь на очень короткий промежуток времени ориентируя затравку, фермент и дезоксирибонуклеозидтрифосфат в благоприятное для протекания репликации положение друг относительно друга, что и делало репликацию матрицы-аналога непроцессивной. Это необычное свойство олиготионуклеотидов, вероятно, расширит сферу их применения в молекулярной биологии.

Экспериментальная часть

Синтез олигодезоксинуклеотидов и их аналогов с P-S-C(5')-связями описан ранее [13-15]. ДНК-лигазу, индуцируемую фагом T4, получали как описано в работах [4, 5]. Ферментативное фосфорилирование олигонуклеотидов и их аналогов, а также их очистку осуществляли согласно [4]. Электрофорез проводили в блоках 20% полиакриламидного геля (20×40×0,04 см), содержащего 7 М мочевины, в трис-боратном буфере, pH 8,3, при 1500 В.

Сшивку олигодезоксинуклеотидов на матрице-олиготионуклеотиде ДНК-лигазой фага T4 проводили при 0° С. Реакционная смесь содержала 0,05 М трис-HCl (pH 7,6), 0,01 М MgCl₂, 0,01 М дитиотреит, 0,2 мМ АТР, олигомеры (концентрация каждого 14 мкМ) и фермент (280 ед. акт. Вейсса/мл [16]). Перед добавлением фермента реакционную смесь прогрели 10 мин при 37° С и затем в течение 1 ч охлаждали до 0° С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шомштейн З. А., Гиллер С. Н. Успехи химии гетероциклов. Рига: Зинатце, 1976. С. 307-322.
2. Zamecnic P. C., Stephenson M. L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 1. P. 280-284.
3. Eckstein F. // Accounts Chem. Res. 1979. V. 12. № 6. P. 204-210.
4. Rybakov V. N., Rivkin M. I., Kumarev V. P. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 1. P. 189-201.
5. Рыбаков В. Н., Ривкин М. И., Богачев В. С., Кумарев В. П. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 9. С. 1423-1425.
6. Поганов В. А., Рыбаков В. Н., Богачев В. С., Ривкин М. И., Кумарев В. П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 7. С. 954-957.

7. Kleppe K., van de Sande J. H., Khorana H. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1970. V. 67. № 1. P. 68-73.
8. Lehman I. R. // Science. 1974. V. 186. № 11. P. 790-797.
9. Deugau K. V., van de Sande J. H. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 4. P. 724-729.
10. Harvey C. L., Gabriel T. F., Will E. M., Richardson C. C. // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. № 14. P. 4523-4530.
11. Scheit K. H., Stutz A. J. // J. Carbohydrates, Nucleosides, Nucleotides. 1974. V. 1. № 5, 6. P. 485-490.
12. Haschemeyer A. E., Rich A. // J. Mol. Biol. 1967. V. 27. № 2. P. 369-384.
13. Kumarev V. P., Rivkin M. I., Bogachev V. S., Baranova L. V., Merkulov V. M., Rybakov V. N. // FEBS Lett. 1980. V. 114. № 2. P. 273-277.
14. Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф., Баранова Л. В., Ривкин М. И., Рыбаков В. Н. // Биооргани. химия. 1982. Т. 8. № 11. С. 1525-2534.
15. Богачев В. С., Кумарев В. П., Рыбаков В. Н. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 133-140.
16. Weiss B., Jacquemin-Sablon A., Live T. R., Fareed G. C., Richardson C. C. // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. № 17. P. 4543-4555.

Поступила в редакцию
25.X.1988

**JOINING OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDES BY T4 POLYNUCLEOTIDE
LIGASE ON AN OLIGODEOXYNUCLEOTIDE TEMPLATE ANALOGUE
HAVING P—S—C(5') BONDS**

РЫБАКОВ В. Н., БОГАЧЕВ В. С.

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

Joining of oligodeoxynucleotides by T4 polynucleotide ligase on an oligodeoxynucleotide template analogue having P—S—C(5') internucleotide bonds was investigated. The enzyme did ligate the oligodeoxynucleotides but with an extremely low rate. The major product of the enzymatic reaction proved to be the adenylylated intermediate of the 5'-phosphorylated oligodeoxynucleotide, the product of the second stage of the overall ligation reaction. It is noteworthy that this intermediate is not accumulated in ligase reactions under standard conditions when DNA templates rather than template analogues were used.