



УДК 577.113.6 : 577.212.2

© 1994 О. Н. Королева, Е. М. Волков,
Т. С. Орецкая, З. А. Шабарова

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

XVI. СИНТЕЗ ДНК-ДУПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ РЕГУЛЯРНО ПОВТОРЯЮЩИЕСЯ ПОПЕРЕЧНЫЕ КОВАЛЕНТНЫЕ СШИВКИ

*Химический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты; нуклеотиды, синтез.

Синтезированы два самокомплементарных декануклеотида общей структуры ТААТGC*АТТА (С* — остаток 5-метилцитидина, содержащего присоединенную по экзодиклической аминогруппе с помощью спейсера карбоксильную или аминofункцию). Конденсацией расположенных в разных цепях комплементарных комплексов карбоксильной и аминогруппы под действием водорастворимого карбодимида с выходом около 20% получена ковалентная связь между декануклеотидами. Реакцией с глутаровым альдегидом с выходом до 20% осуществлена поперечная сшивка двух цепей в дуплексе, образованном самокомплементарным декануклеотидом упомянутой выше структуры, несущим алифатическую аминогруппу. Структура полученных «димеров» и положение места сшивки доказаны секвенированием по методу Максама — Гилберта. Изучена поликонденсация под действием Т4-ДНК-лигазы модифицированных декануклеотидов, а также полученных продуктов сшивки. Показано, что фермент с неодинаковой эффективностью лигирует указанные соединения.

Многие жизненно важные процессы в клетке происходят с расплетанием двойной спирали ДНК. В частности, одна из ключевых стадий инициации транскрипции с промоторов *E. coli* — это образование так называемого открытого промоторного комплекса с ферментом РНК-полимеразой, в котором цепи ДНК оказываются расплетенными [1]. С целью изучения механизма этого процесса, а также для разработки путей активного воздействия на него нами были предприняты работы по созданию модельных промотороподобных ДНК-дуплексов, содержащих поперечные ковалентные связи между двумя цепями. Несмотря на то что в литературе имеется достаточно большое количество работ по получению поперечно сшитых фрагментов ДНК (кросслинкингу), большинство из них посвящено созданию ковалентной связи между концевым звеном одной из цепей и «внутренним» звеном (звеньями) другой [2—5], причем образующиеся продукты часто

Префикс d (дезокси) при обозначении олигодезоксирибонуклеотидов опущен. Использованные сокращения: ПААГ — полиакриламидный гель; ФМЭ — фосфомоноэстераза; ФДЭ — фосфодиэстераза; MES — 2-морфолиноэтансульфонат.

весьма неоднородны. Описано лишь несколько способов получения строго специфических ковалентных сшивок между «внутренними» звеньями обеих цепей [6, 7], и практически отсутствуют данные о физико-химических и функциональных свойствах таких соединений.

В настоящем исследовании нами были опробованы два подхода к конструированию поперечно сшитых ДНК-дуплексов, содержащих ковалентные связи между олигонуклеотидами в строго заданных положениях двойной спирали. Первый из них предполагал образование амидной связи между находящимися в противоположных цепях amino- и карбоксильной группами, а второй — образование ковалентного «мостика» между двумя аминогруппами с помощью диальдегидов алифатического ряда, в результате чего получаются Шиффовы основания. Для реализации первого подхода нами была предложена модельная система, состоящая из двух самокомплементарных декануклеотидов общей структуры ТААТGC*АТТА, где С* — остаток 5-метилцитозина, к которому по экзотрической аминогруппе с помощью спейсера в одном случае присоединена аминогруппа (10^N), а в другом — карбоксильная (10^C). При формировании между указанными декануклеотидами комплементарных комплексов карбоксильная и аминогруппы оказываются достаточно сближенными, и можно ожидать, что под действием конденсирующих агентов между двумя модифицированными основаниями будет образовываться ковалентная связь. Первичная структура декануклеотидов была выбрана таким образом, что при их полимеризации (под действием ДНК-лигазы) должен образовываться ДНК-подобный полимер (дуплекс I), содержащий повторяющуюся «идеальную» последовательность Прибноу (отмечена линией), участвующую в стадии «раскрывания» промотора [8].

...ТААТGC*АТТАТААТGC*АТТАТААТGC*АТТА...

...АТТАС*СТААТАТТАС*СТААТАТТАС*СТААТ...

Дуплекс I

...САТТАТААТGCАТТАТААТGCАТТАТААТGC...

...СТААТАТТАССТААТАТТАССТААТАТТАС...

Дуплекс II

Ранее нами было показано, что ДНК-подобные полимеры той же структуры, но не содержащие модификаций (см. дуплекс II), способны *in vitro* формировать устойчивые двойные комплексы с РНК-полимеразой *E. coli*, а *in vivo* в составе промотортестирующей плазмиды инициировать транскрипцию маркерного гена [9]. Поэтому получение и исследование свойств таких полимеров, содержащих сшивки, представляет интерес с точки зрения понимания механизма функционирования промоторов. В указанной структуре модифицированное звено (цитозин) не входит в состав функционально значимого структурного элемента промоторов (ТАТААТ) и предположительно не должно существенно влиять на узнавание этого участка ферментом, однако можно ожидать, что наличие поперечных связей должно препятствовать расплетанию цепей и образованию прочного открытого комплекса. Для получения таких полимеров с регулярно повторяющимися сшивками мы использовали подход, включающий следующие этапы: синтез модифицированных олигонуклеотидов, реакцию между ними в составе комплементарных комплексов, энзиматическую полимеризацию.

Синтез целевых олигонуклеотидов проводили на автоматическом синтезаторе Applied Biosystems 360В стандартным амидофосфитным методом [10]. На стадии присоединения модифицированного звена в реакцию вводили триазолидное производное тимидина. После завершения синтеза полимер с олигонуклеотидом делили на две части, одну из которых обрабатывали этилендиамином, а вторую — β-аминопропионовой кислотой по аналогии с методикой, приведенной в работе [11]. Отщепление олигонуклеотидов от полимерного носителя, удаление

Рис. 2

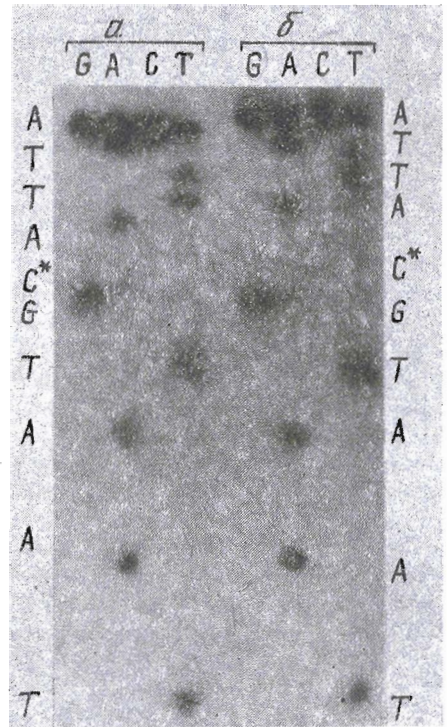


Рис. 1

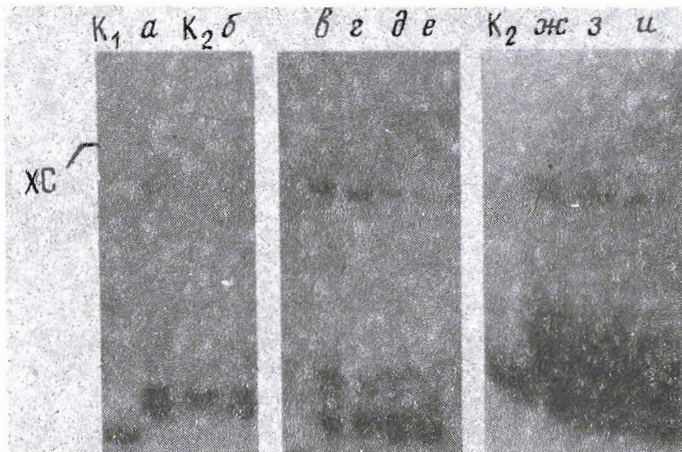
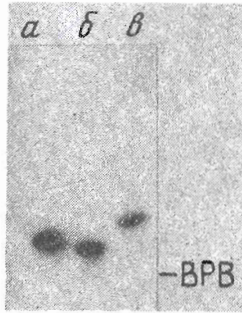


Рис. 3

Рис. 1. Электрофорез в 20% ПААГ 5'-³²P-фосфорилированных декануклеотидов: *a* — САТТАТААТG, *б* — p(10^N), *в* — p(10^C). ВРВ — положение красителя-маркера бромфенолового синего

Рис. 2. Анализ методом Максама — Гилберта декануклеотидов, содержащих карбоксильную группу (*a*) и аминогруппу (*б*). Электрофорез в 20% ПААГ. Реакции расщепления: по G — диметилсульфатом, по A — диэтилпирокарбонатом, по C — гидросиламином, по T — перманганатом калия

Рис. 3. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 20% ПААГ: продуктов конденсации под действием КДИ эквимольных смесей (10^N) и [³²P]p (10^C) (*a*), [³²P]p(10^N) и (10^C) (*б—е*) после 72 ч инкубации при 0 (*a, б*) и 4° С (*в—е*) при рН 5,0 (*в*), 6,0 (*a, б, в*), 7,0 (*д*) и 9,0 (*е*). K₁ и K₂ — исходные декануклеотиды [³²P]p(10^C) и [³²P]p(10^N); продуктов реакции [³²P]p(10^N) (10⁻³ М) с глутаровым альдегидом (0,1 М) при 0 (*ж, з*) и 4° С (*и*) (время реакции 1 ч (*ж*) или 2 ч (*з, и*)) с последующей обработкой боргидридом натрия при 0° С в течение 2 ч. XС — положение красителя-маркера ксиленцианола

защитных групп, анализ и выделение веществ проводили как описано в работе [12].

Некоторые характеристики полученных олигонуклеотидов подтверждают наличие в них модифицированного звена. В частности, электрофоретические подвижности олигонуклеотидов (10^N) и (10^C) отличаются от подвижности природного декануклеотида того же нуклеотидного состава (рис. 1), а время удерживания на колонке при анализе ион-парной ВЭЖХ карбоксилсодержащего соединения больше, чем аминоксодержащего (16,55 и 14,04 мин соответственно), что согласуется с данными по анализу мононуклеотидов, содержащих аналогичные группы (см. «Экспериментальную часть»). При проведении исчерпывающего гидролиза смесью ФМЭ и ФДЭ змеяного яда с последующим анализом гидролизатов ВЭЖХ в специально подобранных условиях, обеспечивающих эффективное разделение нуклеозидов [12], в случае обоих декануклеотидов — (10^N) и (10^C) — отсутствовал пик, соответствующий элюции с колонки природного цитозинового нуклеозида, но появлялся пик с другим временем выхода. Для подтверждения первичной структуры продуктов (10^N) и (10^C) был использован метод Максама — Гилберта, при этом в стандартных условиях обработки химическими реагентами (см. рис. 2) [13] в обоих случаях не происходило заметной модификации (деструкции) неприродных гетероциклов (отсутствие соответствующей расщеплению полосы на радиоавтографе). На наличие нерасщепляемого звена указывает увеличение расстояния между сигналами, относящимися к предшествующему и следующему за модификацией звеньям. Оба радиоавтографа имеют идентичный вид в нижней части, где расположены продукты расщепления, не содержащие модифицированного звена, но различаются в «верхней» области, для которой характерно отличие в подвижностях фрагментов, несущих карбоксильную и аминогруппу. Соответствующие зоны ведут себя так же, как и исходные декануклеотиды: карбоксилсодержащие соединения движутся быстрее, чем аминоксодержащие.

Для реализации следующего этапа работы мы в первую очередь попытались провести реакцию конденсации между amino- и карбоксильной группами под действием водорастворимого карбодиимида в эквимольной смеси декануклеотидов. Принимая во внимание обогащенность декануклеотидов, составляющих дуплекс, АТ-парами и литературные данные (полученные в аналогичных системах) о дестабилизирующем действии модифицированных оснований [11], реакцию проводили в условиях, наиболее благоприятствующих формированию двутяжевых комплексов: при пониженной температуре (0°C) и относительно высокой концентрации олигонуклеотидов (10^{-4}M). Анализ реакционной смеси после 72 ч инкубации (время выхода реакции на плато) показал, что с выходом около 20% образуются продукты ковалентного соединения двух противоположных цепей с электрофоретической подвижностью, равной 20-звенному олигонуклеотиду (рис. 3а, б). Поскольку оба декануклеотида самокомплементарны, в растворе принципиально возможно образование трех типов комплексов: (10^N):(10^N), (10^C):(10^N) и (10^C):(10^C). В работе Макмиллана и Вердина [11] было показано, что модифицированные комплексы, в которых содержатся две карбоксильные группы, обладают меньшей термостабильностью, чем комплексы с двумя амино-функциями (разница в т. пл. около 8°C).

На основании этого можно предположить, что в нашем случае наиболее прочный комплекс будет образовываться в случае (10^N):(10^N) за счет электростатических взаимодействий расположенных в разных цепях фосфатных и аминогрупп, а наименее стабильный — в случае (10^C):(10^C) за счет возможного дополнительного отталкивания отрицательных зарядов карбоксильных групп. Поэтому относительно невысокий выход поперечно сшитого димера отчасти может объясняться существованием различных типов комплексов с преобладанием дуплекса (10^N):(10^N). На это также косвенно указывает тот факт, что увеличение времени конденсации (до 120 ч), повышение концентрации олигонуклеотидов (в 5 раз), изменение соотношения двух типов олигонуклеотидов не влияют существенно на выход продукта сшивки.

Исследование влияния температуры и pH среды на ход реакции показало, что оптимальными условиями для данной системы следует считать 0—4° С и pH 5,5—6,0. Отклонения от этих параметров приводят к снижению выхода целевых соединений или увеличению количества побочных продуктов (в результате карбодиимидной модификации гетероциклических оснований) (рис. 3*в—е*). Следует отметить, что в том случае, когда ³²P-метка находится в декануклеотиде (10^с), в реакционной смеси наблюдается накопление продукта, обладающего немного меньшей электрофоретической подвижностью, чем исходный (10^с), что, скорее всего, свидетельствует об образовании аддукта с КДИ по карбоксильной группе. Подтверждением образования сайт-специфической ковалентной связи между двумя модифицированными декануклеотидами служит отсутствие продуктов сшивки при обработке карбодиимидом каждого из олигонуклеотидов в отдельности в тех же условиях.

Для исследования другого подхода к созданию ковалентно сшитых ДНК-дуплексов, базирующегося на получении оснований Шиффа между amino- и альдегидной группами, мы использовали тот же самокомплементарный декануклеотид (10^н), а в качестве бифункционального поперечно сшивающего агента — глутаровый альдегид. Первая стадия реакции предполагала образование неустойчивого соединения типа R¹—СН=N—R², а вторая — восстановление двойной связи боргидридом натрия с образованием устойчивого вторичного амина. Условия проведения первой реакции подбирали на основании литературных данных о протекании подобной реакции в аналогичных системах [14], а также с учетом реального состава используемых реагентов (коммерческие препараты глутарового альдегида представляют собой достаточно гетерогенную смесь с преобладанием полимерных продуктов). Известно, что в гетероциклических основаниях нуклеиновых кислот имеется несколько реакционных центров, способных взаимодействовать с альдегидными группировками (экзоциклические аминогруппы гуанина, аденина и цитозина) [15]. Однако в составе дутьяжевых комплексов они, как правило, оказываются незатронутыми. Поэтому мы предполагали, что при проведении реакции с глутаровым альдегидом в условиях стабильности дуплекса (10^н): (10^н) в реакцию будут вступать только алифатические аминогруппы модифицированных 5-метилцитозиновых звеньев. Реакцию проводили в натрий-карбонатном буферном растворе, pH 9,5, при 0 или 4° С, варьируя время реакции (0,5—2 ч) и концентрацию олигонуклеотида (в диапазоне 10⁻⁴—10⁻³ М) или диальдегида (0,05—0,15 М). Затем реакционную смесь обрабатывали боргидридом натрия (конечная концентрация 0,1 М) в течение 2 ч при 0° С по аналогии с методикой, описанной в работе [16], и продукты реакции анализировали электрофорезом в ПААГ (рис. 3*ж—и*). В оптимальных условиях реакции (0,1 М глутаровый альдегид, 10⁻³ М олигонуклеотид, 0° С, 2 ч) степень превращения исходного декануклеотида (10^н) составляла 15—20%. Относительно невысокий выход ковалентно сшитого соединения, возможно, связан с неблагоприятным взаимным расположением двух алифатических аминогрупп, препятствующим протеканию реакции по двум химически активным группировкам глутарового альдегида. В пользу этого предположения говорит накопление в реакционной среде продукта, обладающего немного меньшей электрофоретической подвижностью, чем исходный декануклеотид, и являющегося, вероятнее всего, продуктом реакции только одной альдегидной группировки бифункционального реагента с аминогруппой модифицированного основания.

Структура полученных поперечно сшитых соединений была подтверждена методом Максама — Гилберта (рис. 4). Набор продуктов расщепления после стандартных специфических реакций химической модификации гетероциклических оснований соответствует тому, который можно было ожидать при наличии в соединении ковалентной связи между модифицированными звеньями противоположных цепей: на радиоавтографах наблюдаются два кластера радиоактивных зон, разделенных значительным по величине «пробелом». «Нижний» кластер соответствует продуктам расщепления по первым 5 звеньям (отсчет от 5'-конца).

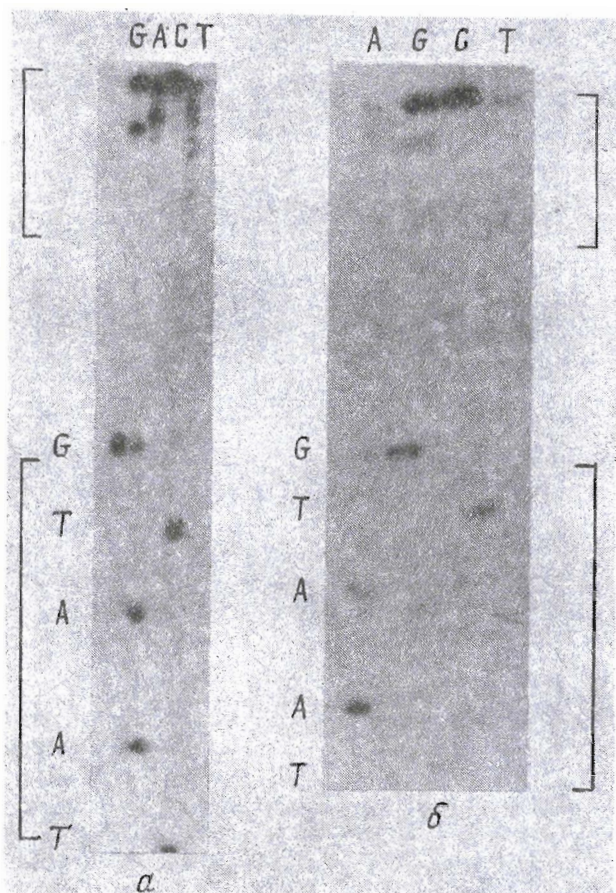


Рис. 4. Анализ методом Максама — Гилберта продуктов карбодимидиндуцируемой поперечной «сшивки» декануклеотидов [^{32}P]p(10^{N}) и (10^{C}) (а) и димера [^{32}P]p(10^{N}), «сшитого» глutarовым альдегидом (б). Скобками указаны два кластера продуктов расщепления

Подвижность и характер распределения по дорожкам радиоактивных зон «верхнего» кластера соответствуют продуктам расщепления, содержащим фрагменты противоположной цепи, присоединенные через ковалентный «спейсер».

Следующим этапом получения дуплексов типа I являлась полимеризация полученных продуктов сшивки под действием Т4-ДНК-лигазы. Известно, что этот фермент «нечувствителен» к структуре гетероциклических оснований, входящих в состав лигируемых фрагментов, однако эффективность его работы зависит от стабильности двойной спирали, что особенно резко проявляется в случае лигирования коротких субстратов [17]. Поэтому все факторы, способствующие дестабилизации спирали, должны приводить к снижению эффективности ферментативной реакции. Поскольку в литературе отсутствуют данные о возможности лигирования ДНК-лигазой соединений типа p(10^{N}) и p(10^{C}), т. е. содержащих модифицированное гетероциклическое основание относительно близко от соединяемых концов, представляло интерес изучить энзиматическую поликонденсацию также и этих соединений. Реакцию во всех случаях проводили в стандартных условиях (0, 4 или 8° С, 12 ч) при концентрации олигонуклеотидов 10^{-5} М. Продукты реакции анализировали электрофорезом в ПААГ (рис. 5). Оказалось, что эффективности лигирования p(10^{N}) и p(10^{C}) заметно различаются, степень превращения в первом случае составляет около 80—90%, в то время как во

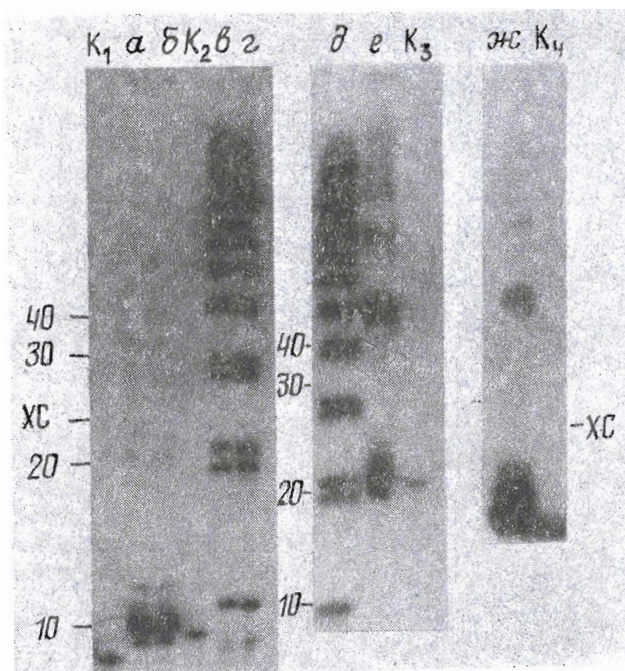


Рис. 5. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 20% ПААГ продуктов ферментативной поликонденсации $5'$ - ^{32}P -меченых соединений: $p(10^{\text{C}})$ (а, б), $p(10^{\text{N}})$ (в, г), $p\text{CATTATAATG}$ (д), $p(10^{\text{N}})\text{-}p(10^{\text{C}})$ (е), $p(10^{\text{N}})\text{-}p(10^{\text{N}})$ (ж) при 0 (а, в), 4 (б, г) и 8° С (д, е, ж). K_1 , K_2 , K_3 и K_4 — исходные $5'$ - ^{32}P -меченые $p(10^{\text{C}})$, $p(10^{\text{N}})$, $p(10^{\text{N}})\text{-}p(10^{\text{C}})$ и $p(10^{\text{N}})\text{-}p(10^{\text{N}})$ соответственно. XС — положение красителя-маркера ксиленианола. Цифры сбоку — длина продуктов поликонденсации

втором — 10—20%. Это согласуется с данными о стабильности соответствующих комплексов (см. выше) и свидетельствует о том, что этот фактор существенно влияет на эффективность протекания ферментативной реакции при лигировании коротких субстратов. Нельзя, однако, исключить также непосредственного влияния модифицирующих группировок на активность фермента. При исследовании энзиматической полимеризации полученных нами поперечно сшитых $5'$ -фосфорилированных «димеров» $p(10^{\text{N}})\text{-}p(10^{\text{C}})$ и $p(10^{\text{N}})\text{-}p(10^{\text{N}})$ выяснилось, что в обоих случаях также образуются высокополимерные соединения, хотя и с неодинаковой эффективностью. Это, по всей видимости, объясняется влиянием поперечных ковалентных «сшивок» различной длины на локальную конформацию двойной спирали. Возможно, в первом случае конформация двойной спирали вблизи модификации гораздо ближе к природной, чем во втором случае. Следует отметить, что подвижности полимерных продуктов ферментативной поликонденсации поперечно сшитого «димера» отличаются от подвижностей соответствующих продуктов поликонденсации обычного самокомплементарного декануклеотида (рис. 5д, е). Это еще одно подтверждение наличия ковалентной связи между цепями: в денатурирующем геле продукты сшивки имеют подвижность дуплекса, а не одноцепочечных фрагментов.

Таким образом, в настоящей работе продемонстрирована принципиальная возможность синтеза поперечно сшитых фрагментов ДНК на базе олигонуклеотидов, содержащих модифицированные гетероциклические основания. В настоящее время ведется дальнейший поиск оптимальных структур, позволяющих с высокой эффективностью создавать устойчивые сайт-специфические ковалентные связи между противоположными цепями ДНК. По предварительным данным,

полученные поперечно сшитые полимеры, содержащие последовательность Прибноу, не способны образовывать устойчивых к гепарину комплексов с РНК-полимеразой *E. coli*.

Экспериментальная часть

В работе использованы 5'-О-диметокситритил-3'-(N,N-диизопропиламидо)-β-цианэтилфосфиты 2'-дезоксирибонуклеозидов (Applied Biosystems, США), тимидин производства Омутнинского химического завода (Россия), N-метилимидазол, триметилхлорсилан, N,N-диизопропилэтиламин, 1,2,4-триазол (Fluka, Швейцария), акриламид, N,N'-метиленбисакриламид (ВДН, Англия), трис, EDTA, дитиотреит, MgCl₂, MES, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимид (Merck, Германия), боргидрид натрия (Aldrich, США), глутаровый альдегид (Serva, Германия).

Ферменты: полинуклеотидкиназа фага T4 (КФ 2.7.1.78; 2,4 ед. акт./мкл), ДНК-лигаза фага T4 (КФ 6.5.1.1; 8 ед. акт./мкл) — производства МБИ «Ферментас» (Литва); ФДЭ змеиного яда (КФ 3.1.4.1, Worthington Biochemical Corp., США); ФМЭ (КФ 3.1.3.1, Sigma, США).

Хроматографию в тонком слое осуществляли на пластинах Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системах: (К-5) — хлороформ — этанол (95 : 5), (К-10) — хлороформ — этанол (9 : 1). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле марки Silicagel L40/100 (Chemapol, Чехо-Словакия).

Синтез олигонуклеотидов выполняли на автоматическом синтезаторе Applied Biosystems 380В (США). В качестве полимерного носителя использовали Small Scale dN CPG (Applied Biosystems, США) с загрузкой первым нуклеозидным звеном 20—24 мкмоль/г.

Тетразолид β-цианэтил-N,N-диизопропиламидофосфита 5-метилцитидина получен по методике [11]. После окончания синтеза олигонуклеотида полимер разделили на две части по 15 мг. Первую часть помещали в пробирку и выдерживали в 250 мкл смеси этилендиамина — этиловый спирт (1 : 4, по объему) в течение 12 ч при 20° С. Вторую часть помещали в пробирку и выдерживали в 200 мкл насыщенного раствора β-аминопропионовой кислоты в течение 20 ч при 50° С.

Защитные группы после синтеза олигонуклеотидов удаляли по стандартным методикам.

Анализ реакционных смесей и выделение олигонуклеотидов осуществляли с использованием хроматографических колонок размером 4×250 мм; носитель — Диасорб С16Т (7 мкм, «Элсико», Россия). Обращенно-фазовую хроматографию олигонуклеотидов, содержащих диметокситритильную группу, осуществляли на хроматографе Altex (США) в градиенте концентрации (0—40%) ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония, рН 6,5 (время анализа 60 мин, скорость элюции 1 мл/мин, 45° С).

После удаления диметокситритильной группы олигонуклеотиды анализировали повторно обращенно-фазовой и ион-парной ВЭЖХ. Обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на хроматографе Tracor (Голландия) в градиенте концентрации (0—40%) ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония, рН 6,5 (время анализа 80 мин, скорость элюции 1 мл/мин, 45° С). Ион-парную хроматографию осуществляли на приборе Waters (США) в градиенте концентрации (5—40%) ацетонитрила в 48 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7) в присутствии 2 мМ дигидрофосфата тетрабутиламмония (скорость элюции 1 мл/мин, 45° С).

Для определения нуклеозидного состава 0,2 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида растворяли в 8 мкл буферного раствора, содержащего 0,2 М трис-НСl (рН 8,5) и 0,04 М MgCl₂, добавляли 1 мкл щелочной фосфатазы (0,26·10⁻³ ед. акт./мкл) и 1 мкл ФДЭ змеиного яда (0,48·10⁻² ед. акт./мкл). Реакционную смесь инкубировали 3 ч при 37° С. Продукты гидролиза анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ на хрома-

тографе Altex (США) в градиенте концентрации (0—12%) ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония, рН 6,5 (время анализа 40 мин, скорость элюции 1 мл/мин, 45° С).

Электрофорез во всех случаях проводили в 20%-ном ПААГ в пластинах 20×20×0,4 см в присутствии 7 М мочевины в трис-боратном буфере, рН 8,3, при 1 кВ.

Ковалентную сшивку декануклеотидов под действием водорастворимого карбодиимида проводили в MES-буфере, рН 6,0, при 0, 4 или 20° С, суммарной концентрации декануклеотидов (10^N) и (10^C) 10^{-4} или 10^{-3} М, варьируя их соотношения (от 1 : 5 до 5 : 1), время реакции (отбор проб производили с интервалами: 12, 24, 36, 48, 72, 120 ч). При изучении влияния рН среды реакцию проводили в MES-буфере (рН 5, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0) и натрий-карбонатном буфере (рН 9,0 и 9,5).

Ковалентную сшивку декануклеотида (10^N) под действием глutarового альдегида осуществляли в 10 мкл натрий-карбонатного буферного раствора (рН 9,5), содержащего 10 мМ $MgCl_2$ и олигонуклеотид в концентрации 10^{-4} или 10^{-3} М, при 0 или 4° С в течение 0,5, 1, 1,5 или 2 ч; концентрация диальдегида варьировалась: 0,05, 0,1 или 0,15 М. Затем добавляли 2 мкл 0,6 М раствора боргидрида натрия и смесь инкубировали при 0° С в течение 2 ч. По окончании реакции олигонуклеотидный материал осаждали этанолом и анализировали в ПААГ.

Поликонденсацию декануклеотидов и продуктов их ковалентной сшивки под действием ДНК-лигазы фага Т4 проводили в 10 мкл инкубационной смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ АТР, 0,02 мМ олигонуклеотиды и 8 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4 при 0, 4 и 8° С в течение 12 ч. Реакцию останавливали добавлением EDTA до конечной концентрации 20 мМ и после высушивания и добавления красителей-маркеров реакционную смесь наносили на 20% ПААГ и проводили электрофорез.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chamberlin M. J.//Ann. Rev. Biochem. 1974. V. 43. P. 721—775.
2. Knorre D. G., Vlasov V. V.//Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 1985. V. 32. P. 291—320.
3. Chu B. C. F., Orgel L. E.//Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 9. P. 3671—3691.
4. Graff E. S., Orgel L. E.//Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 24. P. 6849—6854.
5. Chu B. C. F., Orgel L. E.//DNA and Cell Biol. 1990. V. 9. № 1. P. 71—76.
6. Webb T. R., Matteucci M. D.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 19. P. 7661—7674.
7. Kumaresan K. R., Ramaswamy M., Yeung A. T.//Biochemistry. 1992. V. 31. P. 6774—6783.
8. Siebenlist U., Simpson R. B., Gilbert W.//Cell. 1980. V. 20. P. 269—281.
9. Королева О. Н., Друца В. Л., Шабарова З. А.//Биополимеры и клетка. 1988. Т. 4. № 1. С. 7—14.
10. Matteucci M. D., Caruthers M. H.//J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 11. P. 3185—3191.
11. MacMillan A. M., Verdine G. L.//J. Org. Chem. 1990. V. 55. P. 5931—5933.
12. Волков Е. М., Кубарева Е. А., Ташлицкий В. Н., Орецкая Т. С.//Химия природ. соед. 1991. № 5. С. 698—704.
13. Maxam A., Gilbert W.//Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
14. Takahashi T., Arakawa H., Maeda M., Tsuji A.//Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 12. P. 4899—4900.
15. Чочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф., Шибяев В. Н. Органическая химия нуклеиновых кислот. 1970. М.: Химия.
16. Brown D. M., Pead A. P.//J. Chem. Soc. 1965. № 9. P. 5072—5074.
17. Королева О. Н., Друца В. Л.//Молекулярн. биология. 1988. Т. 22. № 6. С. 1632—1641.

Поступила в редакцию
5.V.1993

O. N. Koroleva, E. M. Volkov, T. S. Oretskaya,
Z. A. Shabarova

**CHEMICAL REACTIONS IN DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS.
XVI. SYNTHESIS OF DNA-DUPLEXES WITH REGULARLY REPEATED
CROSS-LINKINGS**

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

Two self-complementary decadeoxyribonucleotides TAATGC*ATTA (where C* is a derivative of 5-methyl cytosine with a carboxy- or aminofunction attached through a spacer to the exocyclic amino group) were synthesized. Carbodiimide induced condensation of the amino and carboxyl groups in the opposite strands to give the crosslinks with a yield up to 20%. Cross-linking of two opposite strands in the duplex formed by the self-complementary aliphatic amino group-containing decanucleotide was performed with the use of glutaric aldehyde with a similar efficiency. The structure of the dimers obtained and position of the crosslinks were confirmed by the Maxam — Gilbert method. Efficiencies of the T4 DNA ligase-induced polycondensations of the double-stranded modified decanucleotides and of the cross-linked products differed significantly.