

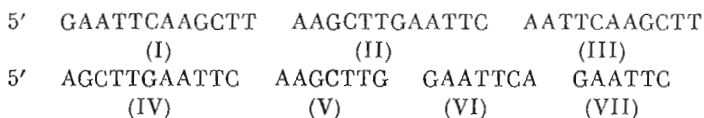


УДК 547.962.32.07+577.155.2

**СИНТЕТИЧЕСКИЕ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДЫ,  
СОДЕРЖАЩИЕ УЧАСТКИ УЗНАВАНИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗ  
РЕСТРИКЦИИ *EcoRI* и *HindIII*****Берлин Ю. А., Звонок Н. М.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Вследствие интенсивного изучения и широкого использования эндонуклеаз рестрикции [1] значительный интерес представляют синтетические олигонуклеотиды, которые содержат участки узнавания этих ферментов и могут быть использованы в качестве липкерных или адапторных молекул для конструирования рекомбинантных ДНК [2, 3] и для изучения механизма действия рестриктаз [4]. Среди них особенно интересны такие олигонуклеотиды, в которых имеются различные комбинации сайтов разных рестриктаз: они пригодны для одновременного введения во фрагменты ДНК более чем одного сайта рестрикции и для модификации выступающих концов, что расширяет методические возможности рекомбинации *in vitro*.

В связи с этим мы синтезировали и исследовали ряд олигодезоксинуклеотидов (I–IX), содержащих участки узнавания рестриктаз *EcoRI* (GAATTC; префикс «d» (дезокси) для краткости всюду опущен) и *HindIII* (AAGCTT). Синтез проводился фосфоритриэфирным методом исходя из N-защищенных нуклеозидов [5]. Ключевые соединения после полного деблокирования очищали анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в нейтральном и кислом 7 М растворе мочевины и анализировали микроколоночной хроматографией, а также методом нуклеотидных карт [6].



Додекануклеотиды (I) и (II) взаимно комплементарны и образуют устойчивый дуплекс (I)·(II), представляющий собой тандем участков узнавания рестриктаз *EcoRI* и *HindIII*. Он предназначен для одновременного введения сайтов обеих рестриктаз по тупым концам ДНК, причем направленность его сшивания с ДНК может быть обеспечена 5'-фосфорилированием той или другой из его цепей, (I) или (II).

В основе иного подхода к модификации концов ДНК лежит использование линкеров с преформированными липкими концами, что позволяет избежать стадии рестрикции после присоединения линкера к ДНК [3].

Для этой цели мы синтезировали два ундекануклеотида ААТТСААГСТТ (III) и АГСТТГААТТС (IV), а также комплементарные им гептануклеотиды ААГСТТГ (V) и ГААТТСА (IV). Эти четыре олигонуклеотида попарно образуют два 7-членных дуплекса с 4-звенным выступающим концом. Соединение такого дуплекса [(III)·(pV) или (IV)·(pVI)] встык с фрагментом ДНК позволяет создать у ДНК липкий конец, отвечающий соответственно рестриктазе *EcoRI* или *HindIII*; при этом в молекулу вводится также участок узнавания второй рестриктазы, который может быть использован для дальнейших модификаций.

С другой стороны, эти дуплексы могут применяться в качестве адапторных молекул для превращения одного липкого конца в другой — *EcoRI* в *HindIII* или наоборот. Аналогичные дуплексы (pIII)·(V) и (pIV)·(VI), фосфорилируемые по выступающим 5'-концам, были димеризованы при помощи ДНК-лигазы, в результате чего были получены 18-членные двухцепочечные нуклеотиды (VIII)·(VIII) и (IX)·(IX), представляющие собой симметричные липкеры с разными комбинациями сайтов *EcoRI* и *HindIII*. Строение этих веществ было доказано [5'-<sup>32</sup>P]-фосфорилированием с последующим анализом по Максему — Гилберту [7].



Синтез описанных выше соединений позволил выяснить некоторые структурные особенности субстратов рестриктаз *EcoRI* и *HindIII*. Нас интересовало, в частности, способны ли эти рестриктазы расщеплять соответствующие участки узнавания, не фланкированные полинуклеотидной цепью. Оказалось, что при действии рестриктазы *EcoRI* на дуплекс (<sup>32</sup>pI)·(<sup>32</sup>pII) происходит его расщепление в ожидаемых местах с образованием мононуклеотида <sup>32</sup>pG и гептануклеотида <sup>32</sup>pAAGCTTГ (<sup>32</sup>pVI) (продукты расщепления были идентифицированы с помощью гомохроматографии, а структура гептануклеотида, кроме того, подтверждена фингерпринтом). Расщеплению рестриктазой *EcoRI* подвергается и дуплекс (I)·(<sup>32</sup>pII), в котором 5'-гидроксил *EcoRI*-сайта не фосфорилирован. В отличие от них самокомплементарный гексануклеотид pGAATTC (pVII), который мог бы быть минимальным субстратом *EcoRI*, не расщепляется этой рестриктазой.

Чтобы выяснить, вызвано ли это просто неустойчивостью 6-членного дуплекса (VII)·(VII) или тем, что в нем по обе стороны от *EcoRI*-сайта нет никаких нуклеотидов, мы исследовали взаимодействие рестриктазы *EcoRI* с двумя другими самокомплементарными олигонуклеотидами — ГААТТСА (V) и АГСТТГААТТС (IV), в дуплексах которых этот сайт фланкирован соответственно с 3'- и 5'-конца. Оказалось, что оба этих олигонуклеотида (в виде 5'-фосфатов) расщепляются рестриктазой *EcoRI* между звеньями G и A (в случае гептануклеотида (<sup>32</sup>pV) меченый продукт расщепления <sup>32</sup>pG был идентифицирован гомохроматографией, а строение гексануклеотида <sup>32</sup>pAGCTTГ, образовавшегося при расщеплении ундекануклеотида (<sup>32</sup>pIV), доказано фингерпринтом). Поскольку выступающие концы обычно дестабилизируют дуплексы, устойчивость

комплексов (V)·(V) и (IV)·(IV) должна быть не выше, чем у (VII)·(VII). Поэтому полученные нами данные свидетельствуют о том, что неспособность рестриктазы *EcoRI* расщеплять «изолированный сайт» (VII)·(VII) связана с особенностями механизма действия этого фермента, для функционирования которого необходимо (и достаточно) минимальное фланкирование участка узнавания.

Существенно иные результаты были получены с рестриктазой *HindIII*: было найдено, что она не расщепляет не только дуплексы (I)·(II), (VI)·(VI) и (III)·(III), но даже 18-членник (IX)·(IX), в котором *HindIII*-сайт с обеих сторон фланкирован гексануклеотидами. Это означает, что минимальные размеры дуплекса, необходимые для функционирования нуклеазы *HindIII*, значительно больше, чем в случае *EcoRI*, и, по-видимому, составляют не менее двух витков двойной спирали ДНК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts R. J. (1978) *Gene*, **4**, 183–193.
2. Scheller R. H., Dickerson R. E., Boyer H. W., Riggs A. D., Itakura K. (1977) *Science*, **196**, 177–180.
3. Bahl C. P., Wu R., Brousseau R., Sood A. K., Hsiung H. M., Narang S. A. (1978) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **81**, 695–703.
4. Greene P. J., Poonian M. S., Nussbaum A. L., Tobias L., Garfin D. E., Boyer H. W., Goodman H. M. (1975) *J. Mol. Biol.*, **99**, 237–261.
5. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. (1977) *Nucl Acids Res.*, **4**, 353–374; Sood A. K., Narang S. A. (1977) *ibid.*, **4**, 2757–2765.
6. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) *Nucl Acids Res.*, **1**, 331–354.
7. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 560–564.

Поступило в редакцию  
1.IX.1979

#### THE SYNTHETIC OLIGODEOXYNUCLEOTIDES CONTAINING *EcoRI* AND *HindIII* RECOGNITION SITES

BERLIN Yu. A., ZVONOK N. M.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Several oligodeoxynucleotides containing recognition sites for restriction endonucleases *EcoRI* and/or *HindIII* have been synthesized by the phosphotriester method, namely dGAATCAAGCTT (I), dAAGCTTGAATTC (II), dAATTCAGCTT (III), dAGCTTGAATTC (IV), dAAGCTTG (V), dGAATTC (VI), and dGAATTC (VII). Self-ligation of duplexes (pIII)·(V) (an *EcoRI* cohesive end) and (pIV)·(VI) (a *HindIII* cohesive end) led to self-complementary 18-mers dAAGCTTGAATTCAGCTT (VIII) and dGAATTCAGCTTGAATTC (IX), respectively. The primary structures of the compounds synthesized were proved by the Sanger and Maxam — Gilbert techniques. The oligonucleotides are useful as linkers or adaptors in construction of recombinant DNAs. The hexanucleotide (VII)·(VII), a putative minimal substrate for endonuclease *EcoRI*, was found to resist *EcoRI* digestion, while duplexes (I)·(II), (IV)·(IV), and (VI)·(VI) containing the same site (which in two latter duplexes should be even less stable due to the protruding ends) are specifically cut by the nuclease. In contrast to *EcoRI*, *HindIII* restrictase does not cleave duplexes (I)·(II), (III)·(III), (V)·(V), nor even (IX)·(IX) which contains the *HindIII* site surrounded by two hexanucleotide sequences. There it follows that a minimal flanking of the recognition site is necessary (and sufficient) for normal functioning of the *EcoRI* nuclease, while the *HindIII* enzyme requires its recognition site to be included into a longer DNA sequence, apparently, two turns of double helix at least.