



УДК 547.963.32.07

## СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

XXXII \*. СИНТЕЗ ЛИНКЕРНЫХ И АДАПТОРНЫХ  
ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ  
С ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ РЕСТРИКЦИИ

Берлин Ю. А., Звонок Н. М., Чувпило С. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

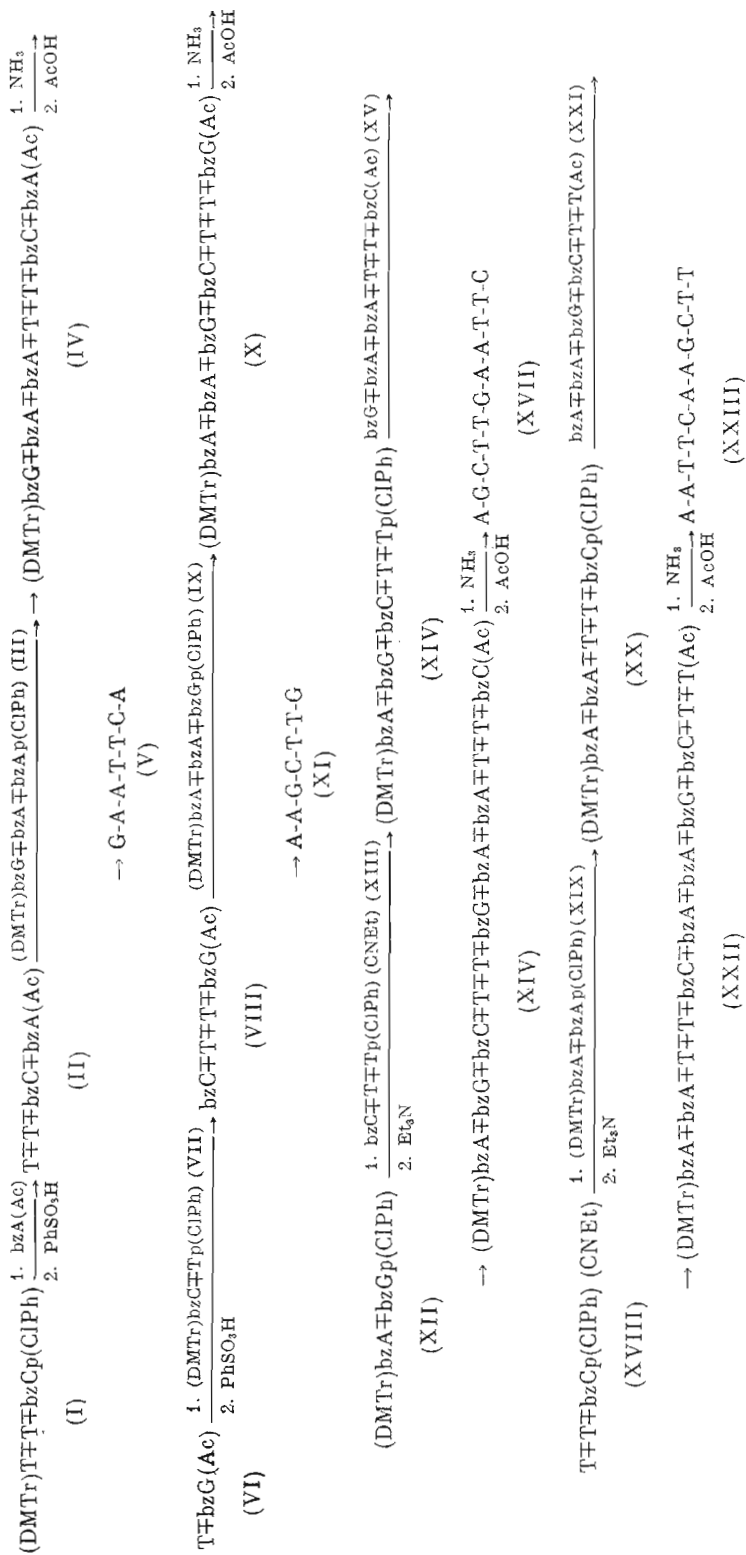
Фосфотриэфирным методом синтезированы олигодезоксинуклеотиды GAATTCA (V), AAGCTTG (XI), AGCTTGAATTC (XVII) и AATTC AAGCTT (XXIII), которые попарно образуют дуплексы (V)-(XVII) и (XI)-(XXIII), имеющие соответственно *EcoRI*-сайт и выступающий *HindIII*-конец, а также *HindIII*-сайт и выступающий *EcoRI*-конец. В результате лигазной сшивки каждого из этих дуплексов по выступающим или ровным концам были получены октадекадезоксинуклеотиды (XXIV), (XXV), (XXVI) и (XXVII), структура которых подтверждена методом Максама — Гилберта; это позволило показать принципиальную возможность использования синтезированных дуплексов в качестве линкерных и адапторных молекул. Изучено действие эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *HindIII* на синтетические олигодезоксинуклеотиды, содержащие соответствующие участки узнавания. Показано, что для рестриктазы *EcoRI* необходимо и достаточно минимальное фланкирование участка узнавания, в то время как для нормального функционирования рестриктазы *HindIII* размер субстрата должен составлять не менее двух витков двойной спирали.

Важным элементом конструирования рекомбинантных ДНК является введение изучаемого генетического материала в векторную молекулу. В связи с этим мы предприняли синтез ряда олигодезоксинуклеотидов, которые могут быть использованы в качестве линкерных и адапторных молекул для направленной модификации фрагментов ДНК путем введения по их концам участков узнавания некоторых рестриктаз [3—5], а также для изучения механизма действия этих ферментов [6, 7].

В ходе работы нами были синтезированы гептануклеотиды GAATTCA (V) и AAGCTTG (XI), а также ундекануклеотиды AGCTTGAATTC (XVII) и AATTC AAGCTT (XXIII) (схема 1). Синтез проводили модифицированным фосфотриэфирным методом [8] из защищенных нуклеозид-3'-фосфатов и ранее синтезированных блоков [1] с использованием TPST в качестве конденсирующего реагента (таблица). Продукты конденсации выделяли адсорбционной хроматографией на силикагеле, а конечные олигонуклеотиды после деблокирования — анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в нейтральном и кислом растворе 7 М мочевины (рис. 1). Индивидуальность и первичную структуру доказывали с помощью анионо-

\* Сообщение XXXII см. [1], предварительное сообщение см. [2]. Префикс d (дезокс) для краткости всюду опущен. Использованы следующие нестандартные сокращения: TPST — триэтилопропилбензолсульфотетразолид, DMTr — диметокситригид, ClPh — *n*-хлорфенил. Символом  $\nabla$  обозначена межнуклеотидная связь, защищенная *n*-хлорфенильным остатком.

Схема 1



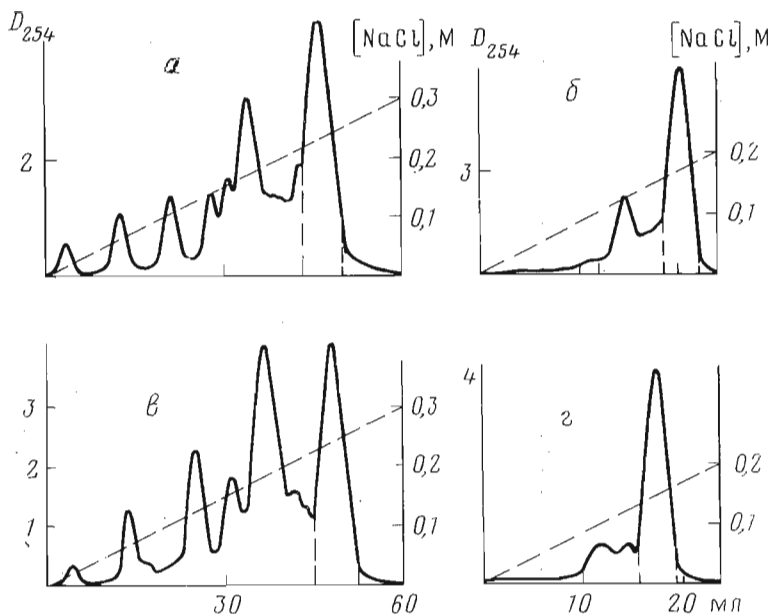
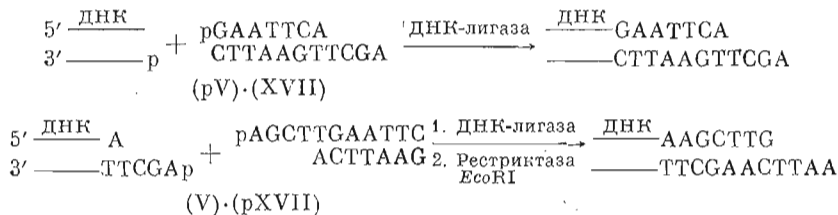


Рис. 1. Выделение олигонуклеотидов хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl<sup>-</sup>) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины. *а* — ундекануклеотид (XVII), колонка 0,4×20 см, 0,02 М транс-HCl (pH 7,4), 0 — 0,30 М NaCl (60 мл, скорость элюции 0,42 мл/мин), выделено 26,6 ОЕ<sub>260</sub>; *б* — рехроматография (XVII), колонка 0,2×29 см, HCl (pH 3,5), 0 — 0,2 М NaCl (24 мл, 0,17 мл/мин), выделено 16,6 ОЕ<sub>260</sub>; *в* — ундекануклеотид (XXIII), колонка 0,4×20 см, 0,02 М трис-HCl (pH 7,4), 0 — 0,30 М NaCl (60 мл, 0,46 мл/мин), выделено 12,3 ОЕ<sub>260</sub>; *г* — рехроматография (XXIII), колонка 0,2×29 см, HCl (pH 3,5), 0 — 0,2 М NaCl (24 мл, 0,18 мл/мин), выделено 8,4 ОЕ<sub>260</sub>

обменной микроколоночной хроматографии (рис. 2) и нуклеотидных карт (рис. 3) [9].

Синтезированные олигонуклеотиды образуют попарно дуплексы (V) · (XVII) и (XI) · (XXIII). Каждый из этих дуплексов после 5'-фосфорилирования гептануклеотида может служить линкером для введения по ровным концам ДНК с помощью ДНК-лигазы «половинного сайта» *EcoRI* или *HindIII*, т. е. преформированного липкого конца соответствующей рестриктазы, что позволяет избежать последующей стадии рестрикции; одновременно при этом вводится участок узнавания второй рестриктазы, который может быть использован для дальнейших модификаций. С другой стороны, после 5'-фосфорилирования ундекануклеотида, лигазной сшивки и расщепления соответствующей рестриктазой эти дуплексы могут в принципе использоваться в качестве адапторов для превращения одного липкого конца в другой: *EcoRI* в *HindIII* или наоборот (схема 2).

#### Схема 2



Чтобы показать принципиальную возможность такого использования этих дуплексов, мы провели их лигазные сшивки после предварительного 5'-<sup>32</sup>P-фосфорилирования гептануклеотидного или ундекануклеотидного компонента (схема 3).

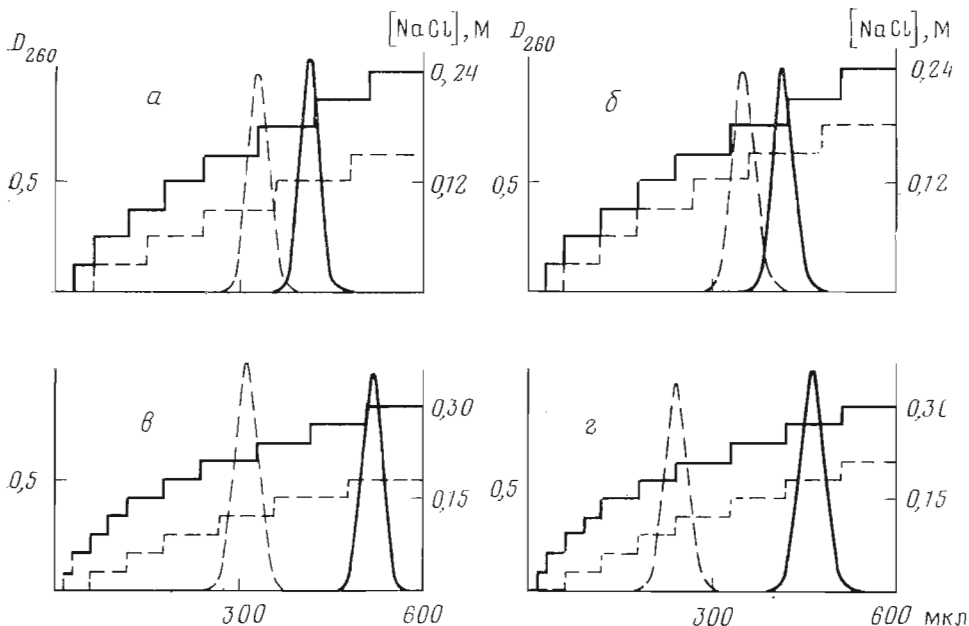
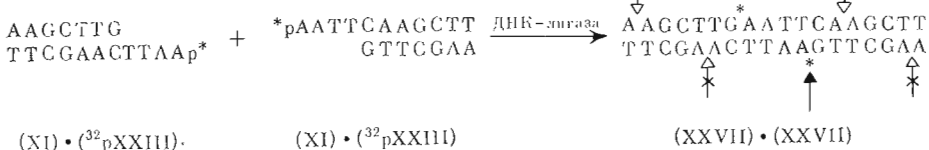
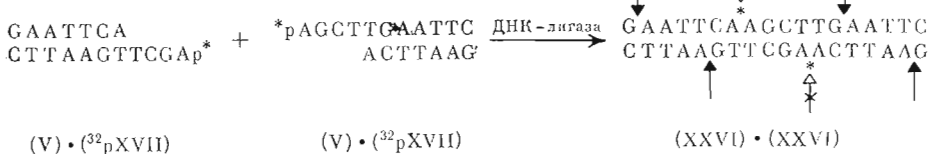
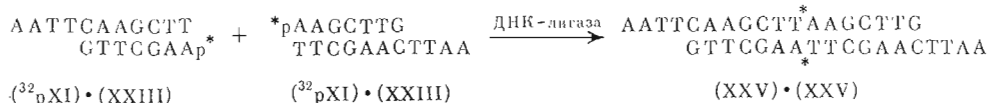
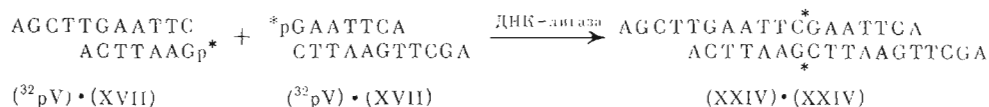


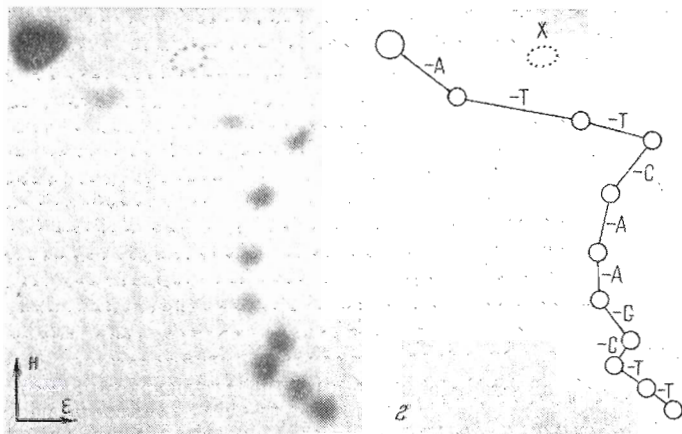
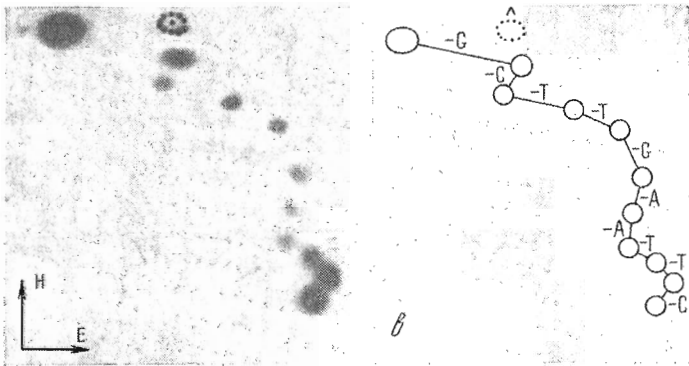
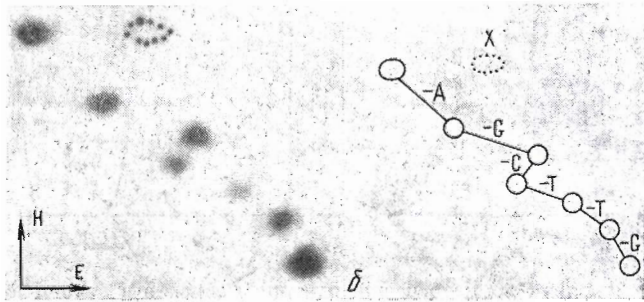
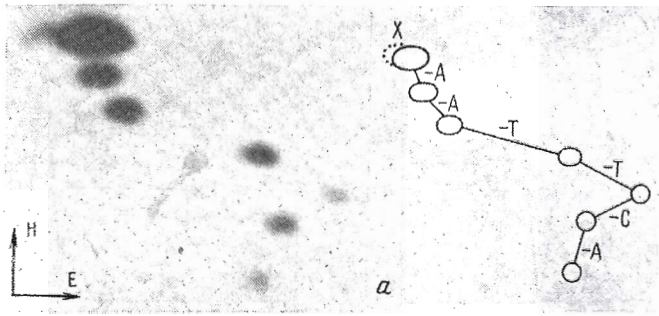
Рис. 2. Микроколоночная хроматография олигонуклеотидов в ступенчатом градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины. Колонка 0,09×5 см, скорость элюции 0,30 мл/ч, сплошная линия — хроматография в 0,02 М трис-HCl (pH 7,4), штриховая — в HCl (pH 3,5): а — гептануклеотид (V), б — гептануклеотид (XI), в — ундекануклеотид (XVII), г — ундекануклеотид (XXIII)

Схема 3\*



↓-1, ↓-2, ↓-3

На этой и следующей схеме символом \*р или \* обозначен концевой или межнуклеотидный [<sup>32</sup>P]фосфат, стрелки типа 1, 2, 3 — соответственно места расщепления рестриктазами *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*; зачеркнутые стрелки обозначают отсутствие соответствующего расщепления.



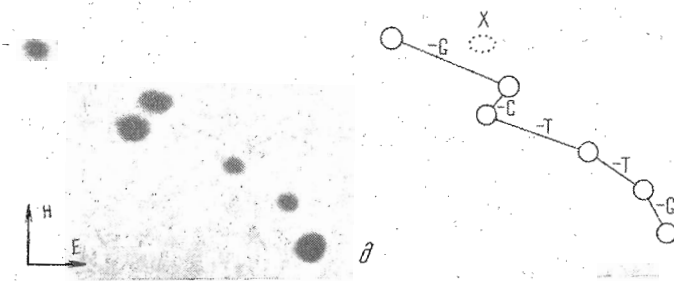


Рис. 3. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза 5'-<sup>32</sup>P-фосфорилированных олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда; направление E — электрофорез на ацетилцеллюлозе в пиридин-ацетатном буфере (pH 3,5) при 90 В/см, направление H — гомохроматография в гомосмеси VI [9]; X — пятно красителя ксиленцианолоа FF. a — гептануклеотид <sup>32</sup>pGAATCA (<sup>32</sup>pV), б — гептануклеотид <sup>32</sup>pAAGCTTG (<sup>32</sup>pXI), в — ундекануклеотид <sup>32</sup>pAGCTTGAATTC (<sup>32</sup>pXVII), г — ундекануклеотид <sup>32</sup>pAAATCAAGCTT (<sup>32</sup>pXXXIII), д — гексануклеотид <sup>32</sup>pAGCTTG (<sup>32</sup>pXXXIII)

В первом случае в результате сшивки по ровным концам были получены частично самокомплементарные октадекануклеотиды: из (<sup>32</sup>pV) · (XVII) — (XXIV), образующий дуплекс с выступающими *Hind*III-концами и двумя смежными *Eco*RI-сайтами, а из (<sup>32</sup>pXI) · (XXIII) — (XXV), у которого в дуплексе два смежных *Hind*III-сайта сочетаются с выступающими *Eco*RI-концами. С другой стороны, при лигировании дуплексов (V) · (<sup>32</sup>pXVII) и (XI) · (<sup>32</sup>pXXXIII) получаются полностью самокомплементарные октадекануклеотиды (XXVI) и (XXVII), представляющие собой (в виде дуплексов) комбинации *Eco*RI- и *Hind*III-сайтов, которые можно рассматривать как симметричные линкеры, пригодные для модификации ДНК по ровным концам. Структура полученных 18-звенных олигонуклеотидов (XXIV), (XXV), (XXVI) и (XXVII) была доказана анализом по модифицированному методу Максама — Гилберта [10—12] (рис. 4).

Изучение свойств описанных выше и полученных ранее [1] соединений позволило выяснить некоторые структурные особенности субстратов рестриктаз *Eco*RI и *Hind*III. Чтобы установить, способны ли эти рестриктазы расщеплять соответствующие участки узнавания, не фланкированные нуклеотидной цепью, мы использовали в качестве субстратов «изолированные» сайты — 5'-меченые самокомплементарные гексануклеотиды

#### Межнуклеотидные конденсации

Синтезированный олигонуклеотид	Исходные вещества, мкмоль			Время, мин	Выход, %
	P-компонент	OH-компонент	TPST		
T≠T≠bzC≠bzA (Ac) (II)	16	8	32	90	48
(DMTr)bzG≠bzA≠bzA≠T≠T≠bzC≠bzA (Ac) (IV)	7,6	3,8	15	90	58
T≠bzG (Ac) (VI)	64	32	128	45	95
(DMTr)bzC≠Tp (ClPh) (VII) *	96	64	192	30	98
bzC≠T≠T≠bzG (Ac) (VIII)	16	8	32	60	60
(DMTr)bzA≠bzA≠bzG≠bzC≠T≠T≠bzG (Ac) (X)	9,6	4,8	19	90	78
(DMTr)bzA≠bzGp (ClPh) (XII) *	144	96	288	60	46
(DMTr)bzA≠bzG≠bzC≠T≠T≠bzG≠bzA≠bzA≠T≠T≠bzC (Ac) (XVI)	13,7	6,6	27,4	90	55
(DMTr)bzA≠bzA≠T≠T≠bzCp (ClPh) (XX) *	3,6	1,8	18	150	77
(DMTr)bzA≠bzA≠T≠T≠bzC≠bzA≠bzA≠bzG≠bzC≠T≠T (Ac) (XXII)	8,8	4	18	90	66
	2,9	1,4	15	120	48

\* Вещество выделено в виде 3'-цианэтилового эфира.

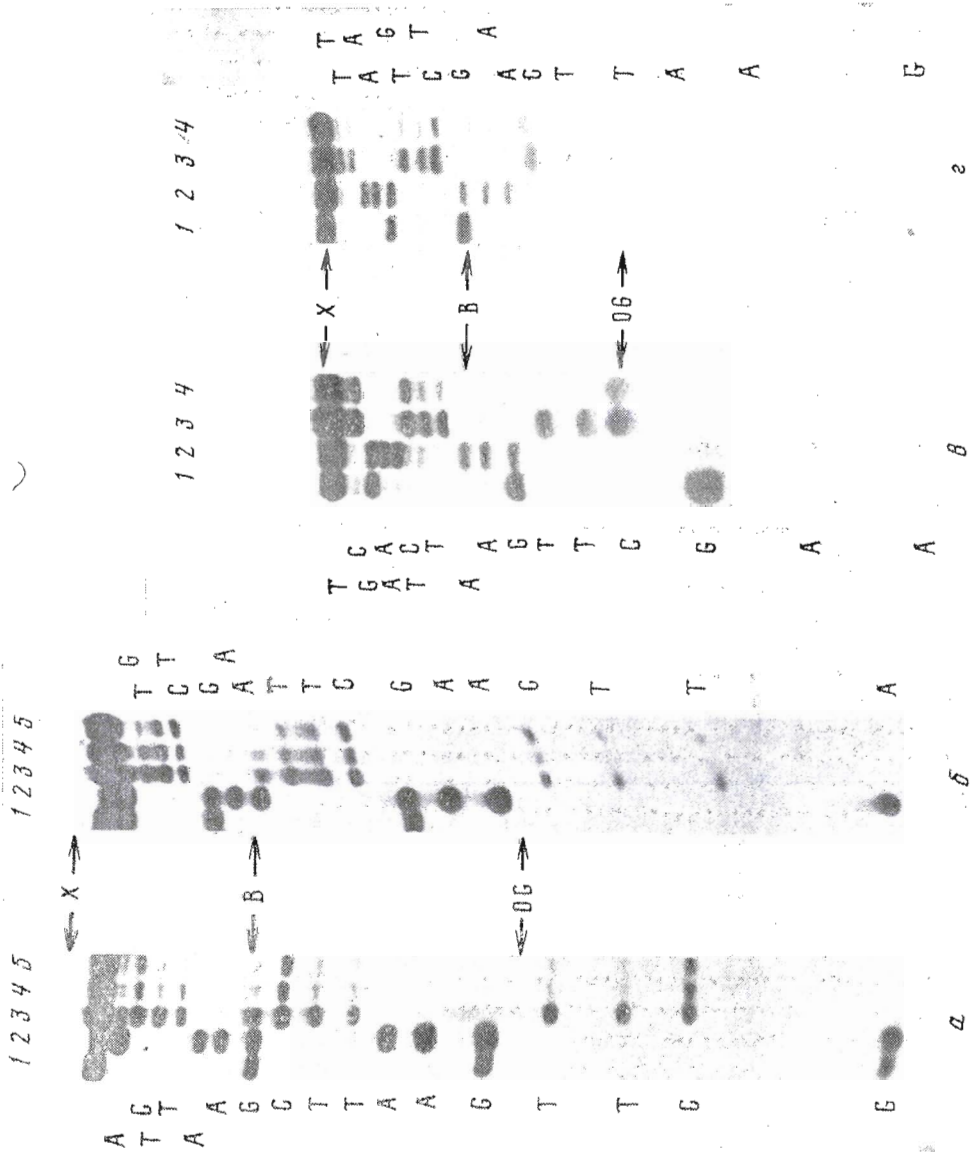
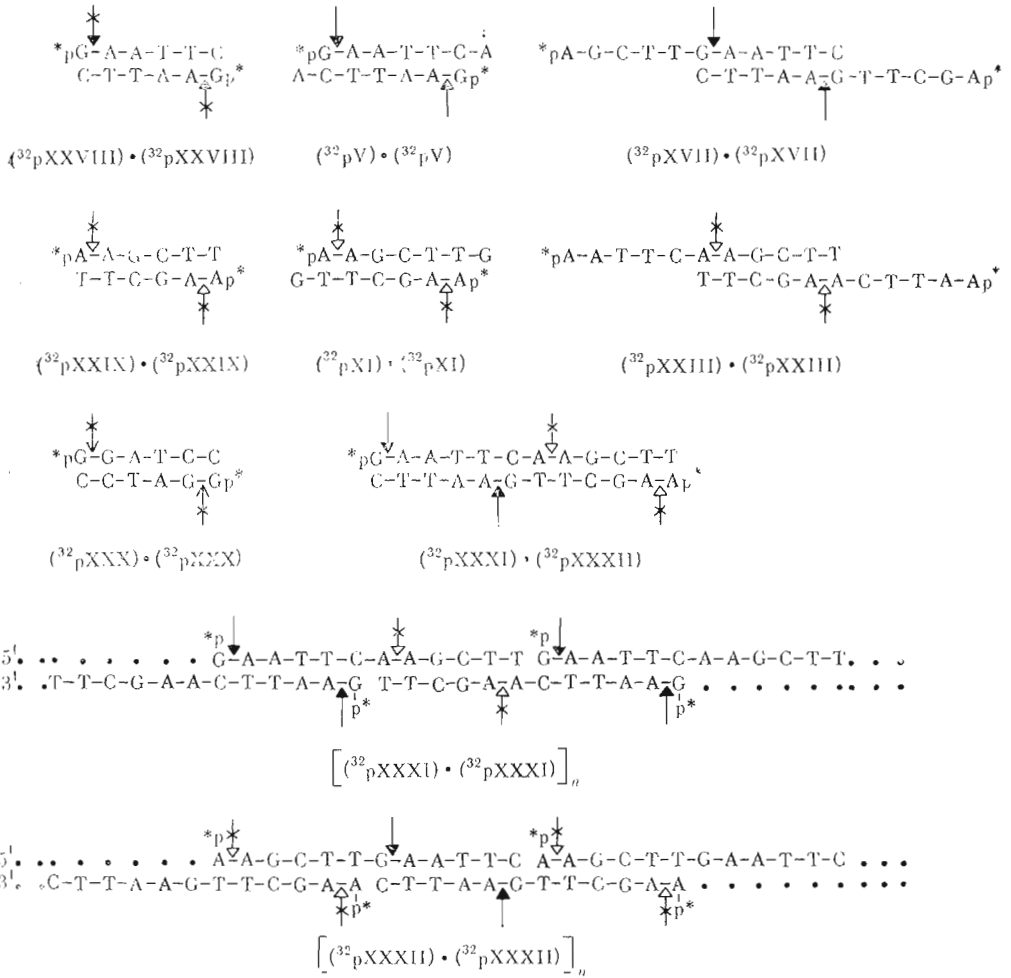


Рис. 4. Анализ первичной структуры октадекануклеотидов (XXIV), (XXV), (XXVI) и (XXVII) модифицированным методом Максама — Гилберта [14, 12]. Электрофорез в 20% полиакриламидном геле в 50 мМ трис-боратном буфере, рН 8,3: а, б, в, г — соответственно октадекануклеотиды (<sup>32</sup>рХХIV), (<sup>32</sup>рХХV), (<sup>32</sup>рХХVI) и (<sup>32</sup>рХХVII) и (3<sup>2</sup>рХХVII); 1 — модификация по остаткам С, 2 — по А+С, 3 — по Т+С, 4 — по С (2 М NaCl в N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O [11]), 5 — по С (4,5 М NaCl в N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O). X, B и BG — соответственно положение красителей ксиленианола GF, бромфенолового синего и бразжевого G

С х е м а 4



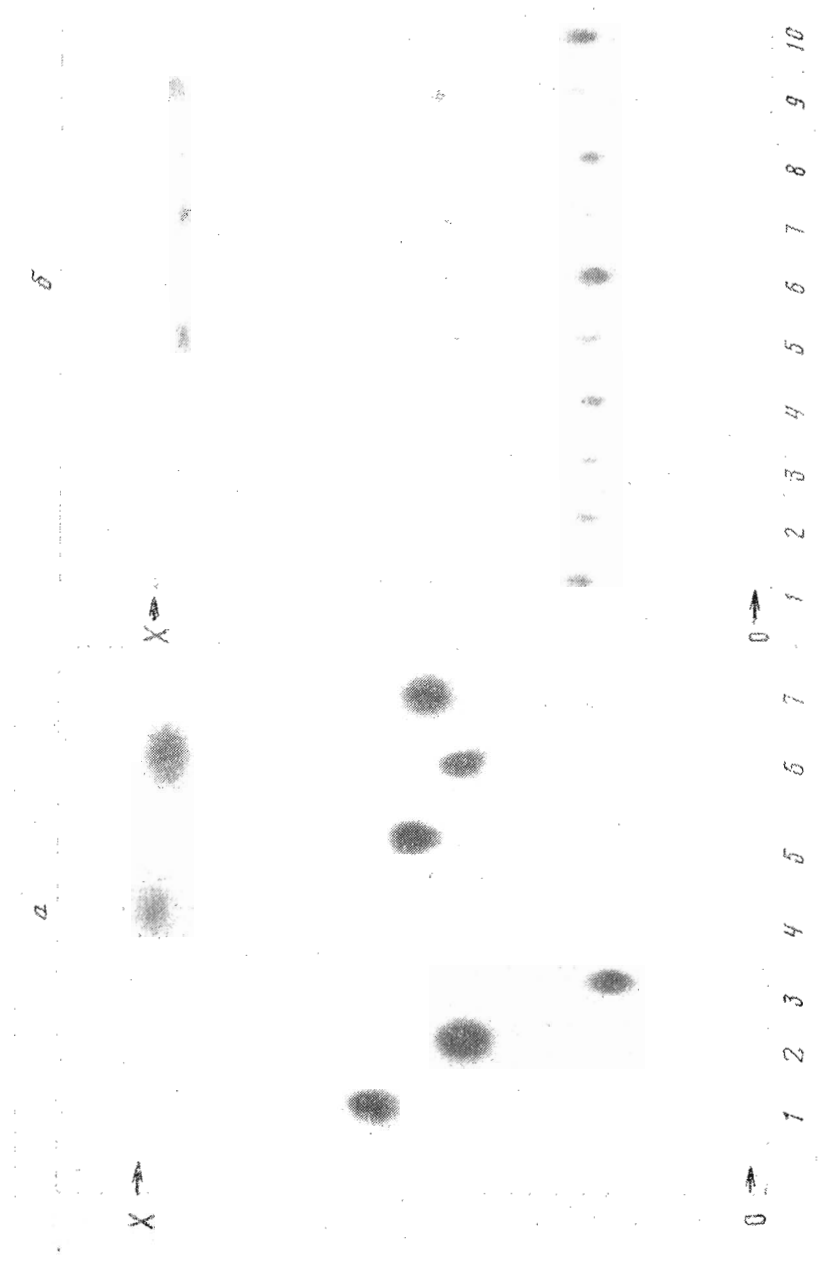
${}^{32}pGAATTC$  ( ${}^{32}pXXVIII$ ) и  ${}^{32}pAAGCTT$  ( ${}^{32}pXXIX$ ) [1]. Оказалось, что при температуре от 4 до 12° С, т. е. в условиях, при которых эти гексануклеотиды хотя бы частично должны существовать в виде дуплексов (XXVIII)·(XXVIII) и (XXIX)·(XXIX), они не расщепляются рестриктазами в различных концентрациях (см. схему 4\*).

При рассмотрении этих результатов следовало принять во внимание неустойчивость коротких дуплексов и недостаточно высокую активность рестриктаз в низкотемпературных условиях существования таких дуплексов\*\*. Действительно, значительно более устойчивый 12-звенный дуплекс ( ${}^{32}pXXXI$ )·( ${}^{32}pXXXII$ ) [1] расщепляется рестриктазой *EcoRI* в ожидаемых местах (рис. 5б) с образованием гуанозин-5'-фосфата (идентифицирован гомохроматографией и высоковольтным электрофорезом на бумаге) и гептануклеотида  ${}^{32}pAAGCTTG$  ( ${}^{32}pXI$ ), который по всем характеристикам, включая нуклеотидную карту (рис. 5в), оказался идентич-

\* Обозначения см. на схеме 3.

\*\* Следует отметить, что гексануклеотид  ${}^{32}pGGATCC$  ( ${}^{32}pXXX$ ) [1], образующий более устойчивый дуплекс, чем соединения (XXVIII) и (XXIX), благодаря наличию в нем четырех G-C-пар вместо двух и представляющий собой «изолированный» сайт рестриктазы *BamHI*, аналогичным образом оказался устойчивым к этой эндонуклеазе.





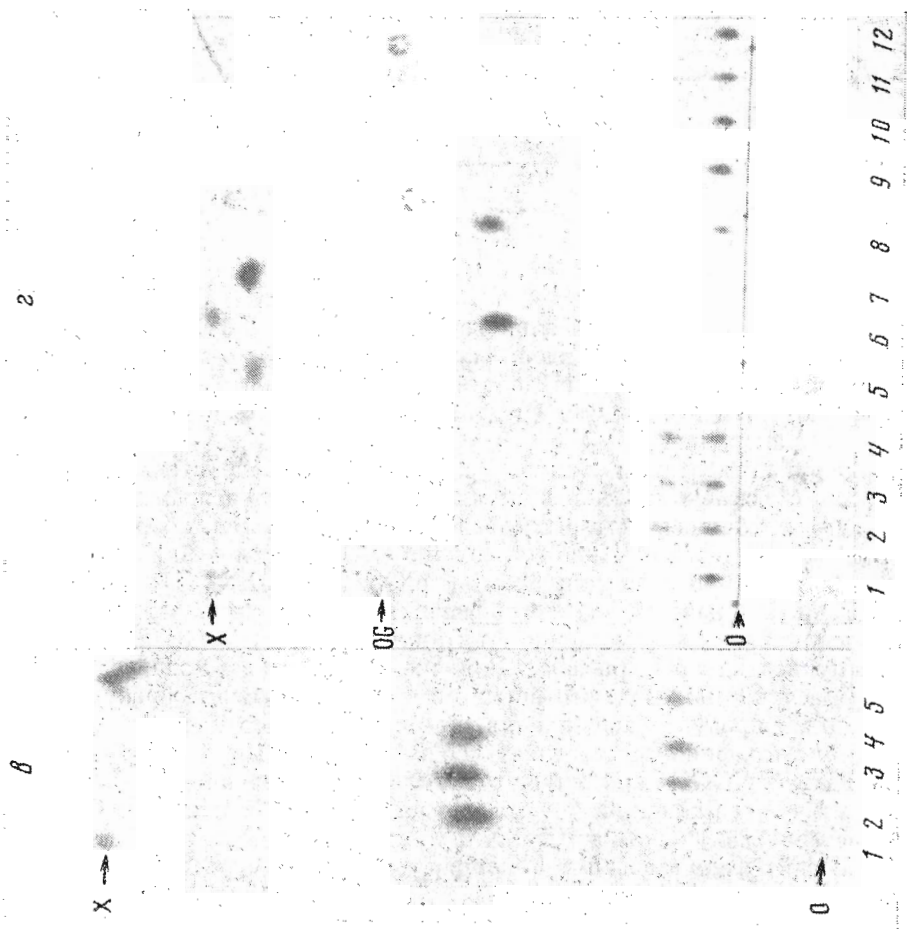


Рис. 5. Действие рестриктаз *EcoRI* и *HindIII* на олигонуклеотидные дуплексы (анализ гомохромографией в гомосмеси VI [9]; 0 — старт, X и OG — положение красителей ксантанола FF и оранжевого G): а — 5, 6, 7 — соответственно  $(^{32}\text{PXXVIII}) \cdot (^{32}\text{PXXVIII})$ ,  $(^{32}\text{PXXVII}) \cdot (^{32}\text{PV}) \cdot (^{32}\text{PV})$  и  $(^{32}\text{PXXVIII}) \cdot (^{32}\text{PXXVII})$  через 17 ч после добавления рестриктазы *EcoRI*; 1—4 — соответственно нуклеотиды  $(^{32}\text{PXXVIII})$ ,  $(^{32}\text{PV})$ ,  $(^{32}\text{PXXVII})$  и  $^{32}\text{P}$ Г (свидетели); 6 — 1, 3, 5, 7 и 9 — додекануклеотидный дуплекс  $(^{32}\text{PXXXI}) \cdot (^{32}\text{PXXXII})$  через 1, 2, 3, 6 и 11 ч после добавления рестриктазы *EcoRI*; 2, 4, 6, 8 и 10 — то же после добавления рестриктазы *HindIII*; 6 — 3, 4 и 5 — соответственно додекануклеотидные комплексы  $(^{32}\text{PXXXII}) \cdot (\text{XXXI})$ ,  $[(^{32}\text{PXXXII}) \cdot (^{32}\text{PXXXII})]_n$  и  $[(^{32}\text{PXXXI}) \cdot (^{32}\text{PXXXI})]_n$  через 14 ч после добавления рестриктазы *EcoRI*; 1 и 2 —  $^{32}\text{P}$ Г и тетра-нуклеотид  $(^{32}\text{PXI})$  (свидетели); 2 — 2, 3, 4 и 5 — октадекануклеотидный дуплекс  $(^{32}\text{PXXVI}) \cdot (^{32}\text{PXXVI})$  через 15, 45, 105 мин и 18 ч после добавления рестриктазы *EcoRI*; 9, 10, 11 и 12 — то же после добавления рестриктазы *HindIII*; 8 — октадекануклеотидный дуплекс  $(^{32}\text{PXXVII}) \cdot (^{32}\text{PXXVII})$  через 48 ч после добавления рестриктазы *EcoRI*; 1, 6 и 7 — соответственно октадекануклеотид  $(^{32}\text{PXXVI})$ , тетра-нуклеотид  $(^{32}\text{PXI})$  и  $^{32}\text{P}$ Г (свидетели)

ным описанному выше продукту химического синтеза. Расщеплению рестриктазой *EcoRI* с образованием того же гептануклеотида ( $^{32}\text{pXI}$ ) подвергается и дуплекс ( $^{32}\text{pXXXII}$ )·(XXXI), в котором 5'-гидроксил *EcoRI*-сайта не фосфорилирован (рис. 5б). Правда, рестриктаза *EcoRI* расщепляет также додекануклеотиды ( $^{32}\text{pXXXI}$ ) и ( $^{32}\text{pXXXII}$ ) по отдельности с образованием в первом случае мононуклеотида  $^{32}\text{pG}$ , а во втором — гептануклеотида ( $^{32}\text{pXI}$ ) (рис. 5в), т. е. тех же веществ, которые идентифицированы при рестрикции дуплекса ( $^{32}\text{pXXXI}$ )·( $^{32}\text{pXXXII}$ ). По-видимому, субстратами при этом являются соответствующие конкатомеры [ $^{32}\text{pXXXI}$ ]·( $^{32}\text{pXXXI}$ )<sub>n</sub> и [ $^{32}\text{pXXXII}$ ]·( $^{32}\text{pXXXII}$ )<sub>n</sub>, которые, образуясь благодаря самокомплементарности половин обоих додекануклеотидов, могут стабилизироваться рестриктазой и возможность существования которых (в присутствии ДНК-лигазы и ДНК-полимеразы I) мы показали ранее [1]. Тем не менее в случае дуплексов ( $^{32}\text{pXXXI}$ )·( $^{32}\text{pXXXII}$ ) и ( $^{32}\text{pXXXII}$ )·(XXXI), значительно более устойчивых, чем конкатомеры [1], именно они, а не конкатомеры, по всей вероятности, являются субстратами рестриктазы *EcoRI*.

Дополнительная информация о свойствах субстратов этой рестриктазы была получена при изучении ее взаимодействия с другими частично самокомплементарными олигонуклеотидами — GAATTCA (V) и AGCTTGAATTC (XVII), не способными к конкатомеризации. Эти олигонуклеотиды в виде дуплексов содержат *EcoRI*-сайт, фланкированный соответственно остатком аденозина с 3'-конца и пентануклеотидной последовательностью AGCTT с 5'-конца. Оказалось, что оба этих дуплекса — ( $^{32}\text{pV}$ )·( $^{32}\text{pV}$ ) и ( $^{32}\text{pXVII}$ )·( $^{32}\text{pXVII}$ ) — расщепляются рестриктазой *EcoRI* (рис. 5а) с образованием соответственно мононуклеотида  $^{32}\text{pG}$  (ср. выше) и гексануклеотида  $^{32}\text{pAGCTTG}$  ( $^{32}\text{pXXXIII}$ ), структура которого доказана с помощью нуклеотидной карты (рис. 3д). Поскольку выступающие концы обычно дестабилизируют дуплекс, устойчивость комплексов (V)·(V) и (XVII)·(XVII) должна быть не выше, чем у комплекса (XXVIII)·(XXVIII). Поэтому полученные нами результаты свидетельствуют о том, что устойчивость «изолированного» сайта (XXVIII)·(XXVIII) к рестриктазе *EcoRI* обусловлена не диссоциацией 6-членного дуплекса, а особенностями механизма действия этого фермента, для функционирования которого необходимо (и достаточно) минимальное фланкирование участка узнавания.

Следующим этапом явилось изучение взаимодействия рестриктазы *EcoRI* с самокомплементарными октадекануклеотидами (XXVI) и (XXVII), дуплексы которых представляют собой симметричные комбинации *EcoRI*- и *HindIII*-сайтов (схема 3). Как и следовало ожидать, при действии фермента на дуплексы ( $^{32}\text{pXXVII}$ )·( $^{32}\text{pXXVII}$ ) и ( $^{32}\text{pXXVI}$ )·( $^{32}\text{pXXVI}$ ) в каждом случае образуется единственный меченый продукт расщепления — соответственно гептануклеотид  $^{32}\text{pAAGCTTG}$  ( $^{32}\text{pXI}$ ) и мононуклеотид  $^{32}\text{pG}$  (рис. 5г). В то же время анализ хода рестрикции во втором случае показал, что наряду с мононуклеотидом образуется промежуточный продукт расщепления, который, судя по подвижности при гомохроматографии, представляет собой тридекануклеотид  $^{32}\text{pGAATTCAA}\cdot\text{GCTTG}$  ( $^{32}\text{pXXXIV}$ ); следует отметить, что в течение первых 2 ч этого вещества в реакционной смеси содержится вдвое больше, чем  $^{32}\text{pG}$ . Появление тридекануклеотида ( $^{32}\text{pXXXIV}$ ) показывает, что та цепь, в которой *EcoRI*-сайт фланкирован с 5'-конца, расщепляется рестриктазой преимущественно по сравнению с цепью, в которой этот сайт фланкирован с 3'-конца.

Существенно иные результаты были получены с рестриктазой *HindIII*. Оказалось, что она не расщепляет дуплексы ( $^{32}\text{pXI}$ )·( $^{32}\text{pXI}$ ), ( $^{32}\text{pXXXIII}$ )·( $^{32}\text{pXXXIII}$ ), ( $^{32}\text{pXXXI}$ )·( $^{32}\text{pXXXII}$ ) и даже октадекануклеотидный дуплекс ( $^{32}\text{pXXVII}$ )·( $^{32}\text{pXXVII}$ ), в котором *HindIII*-сайт с обеих сторон фланкирован гексануклеотидами. Это означает, что минимальные разме-

ры дуплекса, необходимые для нормального функционирования рестриктазы *Hind*III, значительно больше, чем в случае *Eco*RI, и, по-видимому, составляют не менее двух витков двойной спирали ДНК.

### Экспериментальная часть

В работе использовались нуклеозиды фирмы Calbiochem, [ $\gamma$ - $^{32}$ P]гАТФ (Amersham), акриламид, метиленбисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Reanal), DEAE-целлюлоза DE-23, DEAE-бумага DE-81 (Whatman), DEAE-целлюлоза MN 300 и целлюлоза MN 300 (Serva), сефадекс G-50 (Pharmacia), дауэкс 50×8 (Serva), полоски ацетилцеллюлозы 3×55 см (Schleicher und Schüll), силикагель L 40—100 (Chemapol), пластинки Silufol UV 254 (Kavalier); фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1) (Worthington), щелочная фосфатаза *E. coli* (КФ 3.1.3.1) [13], Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) [14], Т4-ДНК-лигаза (КФ 6.5.1.1; 1 ед. акт. фермента лигирует 1 пмоль [ $5'$ - $^{32}$ P] (pT)<sub>12</sub> на матрице poly(dA) за 1 мин при 32°С) и рестриктазы *Eco*RI и *Hind*III (Институт прикладной энзимологии, Вильнюс; рестриктаза *Eco*RI была дополнительно очищена хроматографией на DEAE-целлюлозе), рестриктаза *Bam*HI предоставлена Г. В. Шпаковским. Активность рестриктаз контролировали по расщеплению ДНК фάга  $\lambda$ ; 1 ед. акт. фермента полностью расщепляет 1 мкг этой ДНК за 1 ч при 37°С.

1. *Синтез олигонуклеотидов.* Получение TPST и полностью защищенных нуклеозид-3'-фосфатов, удаление диметокситригильных и цианэтильных групп см. [8]. Межнуклеотидные конденсации и полное деблокирование проводили как описано в работе [1]. Условия и результаты межнуклеотидных конденсаций представлены в таблице. Синтез соединений (I), (III), (IX), (XIII), (XV), (XVIII), (XIX) и (XXI) описан ранее [1]. Результаты деблокирования защищенных олигонуклеотидов: из 3 мг гептануклеотида (IV) и по 4 мг гептануклеотида (X) и ундекануклеотидов (XVI) и (XXII) было получено соответственно 13,8 и 15,8 ОЕ<sub>260</sub> гептануклеотидов (V) и (XI), 16,6 и 8,4 ОЕ<sub>260</sub> ундекануклеотидов (XVII) и (XXIII). Условия выделения незащищенных олигонуклеотидов приведены на рис. 1, данные микроколоночной хроматографии — на рис. 2; нуклеотидные карты — на рис. 3.

2. *Лигирование олигонуклеотидов.* 5'- $^{32}$ P-фосфорилирование осуществляли как в работе [1]. Лигазные реакции проводили в растворе, содержащем 20 мМ трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дитиотреит и (после отжига) 0,1 мМ гАТФ. Ход реакции контролировали, определяя долю [ $^{32}$ P]фосфата, устойчивого к щелочной фосфатазе [1]. Продукт сшивки выделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (0,3×28 см) в буфере 1 мМ трис-НСl (рН 8,0), 1 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA.

а. *Получение октадекануклеотидов (XXVI) и (XXVII).* Смесь 0,8 нмоль гептануклеотида (V), 0,6 нмоль (2,7·10<sup>7</sup> имп/мин) ундекануклеотида ( $^{32}$ pXVII) и 75 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы в 100 мкл лигазного буфера инкубировали 5 ч при 7°С. Степень сшивки составила 84%, выход октадекануклеотида (XXVI) — 2·10<sup>7</sup> имп/мин (74%).

В аналогичных условиях дуплекс (XI)·( $^{32}$ pXXIII) (3,1·10<sup>7</sup> имп/мин) был превращен в октадекануклеотид (XXVII), степень сшивки 82%, выход 2,4·10<sup>7</sup> имп/мин (77%).

б. *Получение октадекануклеотидов (XXIV) и (XXV).* Смесь 0,4 нмоль (1,6·10<sup>7</sup> имп/мин) гептануклеотида ( $^{32}$ pV), 0,5 нмоль ундекануклеотида (XVII) и 100 ед. акт. ДНК-лигазы в 50 мкл лигазного буфера инкубировали 20 ч при 8°С; степень сшивки составила 26%. Октадекануклеотид (XXIV) был выделен как в опыте 2а и после 5'- $^{32}$ P-фосфорилирования очищен электрофорезом в 20% полиакриламидном геле в 50 мМ трис-бонатном буфере, рН 8,3. Для извлечения вещества соответствующий участок геля, локализованный радиоавтографией, вырезали, измельчали

и инкубировали 16 ч при 37° С в растворе, содержащем 0,5 М  $\text{AcONH}_4$ , 10 мМ  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , 0,1% SDS, 0,5 мМ EDTA, после чего центрифугировали, к супернатанту добавляли 40 мкг тРНК в качестве носителя и нуклеотид осаждали 2,5 объемами спирта. Аналогично дуплекс  $(\text{XXIII}) \cdot ({}^{32}\text{pXI})$  ( $1,5 \cdot 10^7$  имп/мин) был превращен в октадекануклеотид (XXV), степень сшивки 32%.

Доказательство первичной структуры октадекануклеотидов (XXIV), (XXV), (XXVI) и (XXVII) проводили как описано в работах [11, 12]\*. Продолжительность модификации: G — 20, A+G — 35, C и C+T — 60 мин. Результаты определения представлены на рис. 4.

3. Действие эндонуклеаз рестрикции на олигонуклеотиды. Реакции проводили в растворах (30 мкл) следующего состава: *EcoRI* — 50 мМ NaCl, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ дитиотреит, 40 мМ трис-HCl (pH 7,4); *HindIII* — 50 мМ NaCl, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ дитиотреит, 6 мМ трис-HCl (pH 7,4); *BamHI* — 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ дитиотреит, 10 мМ трис-HCl (pH 7,4). Перед добавлением рестриктазы раствор нагревали 5 мин при 80° С и медленно охлаждали до нужной температуры. Реакционные смеси анализировали с помощью гомохроматографии в гомосмеси VI [9]. Для определения степени расщепления радиоактивные пятна, локализованные радиоавтографией (пленка РТ-1), вырезали и радиоактивность просчитывали в толуольном сцинтилляторе. Мононуклеотидный продукт расщепления ( ${}^{32}\text{pG}$ ) дополнительно идентифицировали электрофорезом на бумаге Ватман 1 в пиридин-ацетатном буфере (pH 3,5) при 90 В/см. Олигонуклеотидные продукты расщепления выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 (ср. выше) и анализировали путем частичного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда с последующим двухмерным разделением смеси электрофорезом на ацетилцеллюлозе (pH 3,5; 90 В/см) и гомохроматографией (нуклеотидная карта).

а. Гексануклеотиды  ${}^{32}\text{pGAATTC}$  ( ${}^{32}\text{pXXVIII}$ ),  ${}^{32}\text{pAAGCTT}$  ( ${}^{32}\text{pXXIX}$ ) и  ${}^{32}\text{pGGATCC}$  ( ${}^{32}\text{pXXX}$ ). Раствор 50 пмоль гексануклеотида и соответствующей рестриктазы (концентрацию фермента изменяли от 0,5 до 2 ед. акт./мкл, температуру — от 4 до 12° С) инкубировали 20 ч. Во всех опытах рестрикции не наблюдалось.

б. Гептануклеотид ( ${}^{32}\text{pV}$ ) и ундекануклеотид ( ${}^{32}\text{pXVII}$ ) в условиях опыта 3а (20 ч при 7° С) расщеплялись рестриктазой *EcoRI* (0,6 ед. акт./мкл) на 50 и 85% (рис. 5а) с образованием соответственно  ${}^{32}\text{pG}$  и гексануклеотида  ${}^{32}\text{pAGCTTG}$  ( ${}^{32}\text{pXXXIII}$ ) (нуклеотидная карта приведена на рис. 3д).

Гептануклеотид ( ${}^{32}\text{pXI}$ ) и ундекануклеотид ( ${}^{32}\text{pXXIII}$ ) в аналогичных условиях не расщепляются рестриктазой *HindIII*.

в. Смесь додекануклеотидов ( ${}^{32}\text{pXXXI}$ ) и ( ${}^{32}\text{pXXXII}$ ) (по 25 пмоль) и 30 ед. акт. рестриктазы *EcoRI* инкубировали при 15° С, отбирая пробы через 1, 2, 3, 6 и 11 ч; степень расщепления составила соответственно 29, 39, 51, 71 и 82% (рис. 5б). Идентифицированы  ${}^{32}\text{pG}$  и гептануклеотид ( ${}^{32}\text{pXI}$ ) (см. рис. 3б).

В аналогичных условиях степень расщепления дуплекса ( ${}^{32}\text{pXXXII}$ ) · ( ${}^{32}\text{pXXXI}$ ) составила 86%, додекануклеотида ( ${}^{32}\text{pXXXII}$ ) — 67% [в обоих случаях идентифицирован гептануклеотид ( ${}^{32}\text{pXI}$ )], додекануклеотида ( ${}^{32}\text{pXXXI}$ ) — 72% (идентифицирован  ${}^{32}\text{pG}$ ) (см. рис. 5е).

В условиях опыта 3а (15–25° С, концентрация фермента 0,3–1,3 ед. акт./мкл) рестриктаза *HindIII* не расщепляет дуплекс ( ${}^{32}\text{pXXXI}$ ) · ( ${}^{32}\text{pXXXII}$ ), додекануклеотиды ( ${}^{32}\text{pXXXI}$ ) и ( ${}^{32}\text{pXXXII}$ ) (рис. 5б).

\* При синтезе октадекануклеотидов (XXIV) и (XXV) модификацию гидразином по остаткам цитидина проводили не только как описано ранее [11], но и в более концентрированном растворе соли (вместо 2 М раствора NaCl в гидразингидрате использовали насыщенный (~4,5 М) раствор), что позволило повысить специфичность модификации (см. рис. 4а, б).

2. Октадекануклеотид ( $^{32}\text{pXXVI}$ ) (1 пмоль) и 10 ед. акт. рестриктазы *EcoRI* инкубировали 18 ч при 20°C, анализируя пробы через 15, 45, 105 мин и 18 ч. Степень расщепления составила соответственно 44, 49, 54 и 95% (рис. 5з). Октадекануклеотид ( $^{32}\text{pXXVII}$ ) в этих условиях (5 ед. акт. рестриктазы *EcoRI*) расщепился на 68% (рис. 5з).

При действии рестриктазы *HindIII* (15 ед. акт.) оба октадекануклеотида не расщепляются (рис. 5з).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Ю. А., Звонок Н. М., Каюшин А. Л. (1980) Биоорг. химия, 6, 1182–1195.
2. Берлин Ю. А., Звонок Н. М. (1980) Биоорг. химия, 6, 141–143.
3. Scheller R. H., Dickerson R. E., Boyer H. W., Riggs A. D., Itakura K. (1977) Science, 196, 177–180.
4. 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.
5. Norris K. E., Iserentant D., Contreras R., Fiers W. (1979) Gene, 7, 355–362.
6. 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.
7. Baumstark B. R., Roberts R. J., RajBhandary U. L. (1979) J. Biol. Chem., 254, 8943–8950.
8. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. (1977) Nucl. Acids Res., 4, 353–371.
9. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) Nucl. Acids Res., 1, 331–353.
10. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 560–564.
11. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биоорг. химия, 3, 1420–1422.
12. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. (1978) Биоорг. химия, 4, 1281–1283.
13. Gareb A., Levinthal C. (1960) Biochim. et biophys. acta, 38, 470–481.
14. Берлин Ю. А., Каюшин А. Л., Тактакишвили М. О., Лебедевко Е. Н., Коробко В. Г., Чувпило С. А., Колосов М. Н. (1980) Биоорг. химия, 6, 1026–1036.

Поступила в редакцию  
6.II.1980

#### SYNTHESIS OF OLIGO AND POLYNUCLEOTIDES. XXXIII. THE SYNTHESIS OF SOME LINKER AND ADAPTOR OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AND THEIR INTERACTION WITH THE RESTRICTION ENDONUCLEASES

BERLIN Yu. A., ZVONOK N. M., CHUVPILLO S. A.

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

Heptanucleotides dGAATTCA (V), dAAGCTTG (XI), and undecanucleotides dAGCTTGAATTC (XVII) and dAATTCAGCTT (XXIII) have been synthesized by the phosphotriester method from protected deoxynucleoside-3'-phosphates with triisopropylbenzenesulphonyl tetrazolide as the condensing reagent. The nucleotides form duplexes (V)·(XVII) and (XI)·(XXIII) which, in construction of recombinant DNAs, are useful as linkers with a preformed *EcoRI* or *HindIII* cohesive end, or as adaptors to transform *EcoRI* ends into *HindIII* or vice versa. Ligation of the 5'-monophosphorylated duplexes (pXVII)·(V) and (pXXIII)·(XI) afforded the self-complementary 18-mers dGAATTCAA·GCTTGAATTC (XXVI) and dAAGCTTGAATTCAGCTT (XXVII), whereas blunt-ligation of the same but differently phosphorylated duplexes (pV)·(XVII) and (pXI)·(XXIII) resulted in the partially self-complementary 18-mers dAGCTTGAATTCGAA·TTCA (XXIV) and dAATTCAGCTTAAAGCTTG (XXV), respectively. The action of the *EcoRI*, *HindIII*, and *BamHI* restrictases on the deoxyoligonucleotides described in the present and previous papers has been studied. Hexanucleotides (pXXVIII), (pXXIX), and (pXXX) were tested as putative minimal substrates for the restriction nucleases, and found to resist their action. On the other hand, the duplexes (pV)·(pV) and (pXVII)·(pXVII), which due to the presence of protruding ends should be less stable than (pXXVIII)·(pXXVIII), were specifically cut by the *EcoRI* nuclease. The enzyme cut also the duplexes (dpGAATTCAAGCTT)·(dpAAGCTTGAATTC) [(pXXXI)·(pXXXII)], (XXXI)·(pXXXII), and (pXXVI)·(pXXVI), the intermediate in the last reaction being apparently tridecanucleotide dpGAATTCAAGCTTG. In contrast to *EcoRI*, *HindIII* restriction nuclease did not cleave duplexes (pXI)·(pXI), (pXXIII)·(pXXIII), (pXXXI)·(pXXXII), nor (pXXVI)·(pXXVI) which contains a *HindIII* site surrounded by two hexanucleotide sequences. There it follows that a minimal flanking of the recognition site in the substrate is necessary (and sufficient) for the *EcoRI* nuclease action, while the *HindIII* enzyme normally requires its recognition site to be included into a longer DNA sequence, apparently, not less than two turns of the double helix.