



УДК 547.963.32

ДНК-ПОДОБНЫЕ ДУПЛЕКСЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ПОВТОРЫ
IV. МАТРИЧНО-НАПРАВЛЕННАЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ ИМИДАЗОЛИДА
ДЕКАДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА

Ивановская М. Г., Готтих М. Б., Шабарова З. А.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Проведена матрично-направленная химическая полимеризация синтетического декадезоксирибонуклеотида, последовательность оснований в котором выбрана таким образом, что при самоассоциации он образует конкатемерный ДНК-подобный дуплекс. Для активации концевого 3'-фосфата использован имидазольный метод. Установлено, что при инкубировании $d(TGGCCAAGCTp)(Im)$ в N-метилимидазольном буфере в условиях существования комплементарного комплекса полимеризация протекает на 50% с образованием олигомеров с природной 3'-5'-фосфодиэфирной связью.

Создание химического аналога ДНК-лигазы, традиционно используемой для «сборки» синтетических олигонуклеотидов в длинные двуцепочечные полинуклеотиды, позволит осуществлять синтез генетического материала чисто химическим путем. Это открывает новые возможности синтеза полинуклеотидов, например возможность автоматической «сборки» фрагментов нуклеиновых кислот или синтеза полинуклеотидов с неприродным характером межнуклеотидной связи. Один из подходов, предложенный в 1966 г. Гилхамом [1], состоит в использовании водорастворимого карбодимида для конденсации блоков олигонуклеотидов, сближенных на комплементарной матрице. Другой подход, по сути моделирующий действие ДНК-лигазы, состоит в использовании интермедиатов лигазной реакции — аминокислотных фосфоамидов олигонуклеотидов, которые в условиях матрично-направленного синтеза могут являться фосфорилирующими агентами [2]. Оба эти подхода в течение ряда лет развивались в разных лабораториях [1—7] на модельных системах с использованием гомогенных [1—6] или статистического состава олигонуклеотидов [7], образующих, как правило, несовершенные трехспиральные структуры [4, 6], в результате чего эффективность реакций в таких комплексах была невелика [1—4, 6, 7].

В 1981 г. была предложена новая система для отработки химической модели лигазной реакции — конкатемерные ДНК-подобные дуплексы, образующиеся при самоассоциации одного или нескольких синтетических олигонуклеотидов [8]. Удобство этой системы состоит в том, что она дает возможность конструировать достаточно длинные ДНК-подобные структуры, несущие определенную генетическую информацию, с помощью ограниченного числа олигонуклеотидов [8]. На примере дуплекса, образующегося при самоассоциации декануклеотида $d(TGGCCAAGCTp)$, был разработан эффективный метод матрично-направленной блочной конденсации под действием водорастворимого карбодимида [9]. Известно в то же время, что карбодимиды являются денатурирующими агентами, обладающими свойством дестабилизировать комплементарные комплексы [4, 6] и модифицировать основания нуклеиновых кислот в односпиральных участках, т. е. основания «липких концов» дуплексов, образующихся из комплементарных олигонуклеотидов. В связи с этим в настоящей работе изучалась полимеризация того же декануклеотида $d(TGGCCAAGCTp)$ (I),

Сокращения: Im — имидазол, МКХ — микроколоночная хроматография, ФДЭ — фосфодиэстераза, ФМЭ — фосфомоноэстераза.

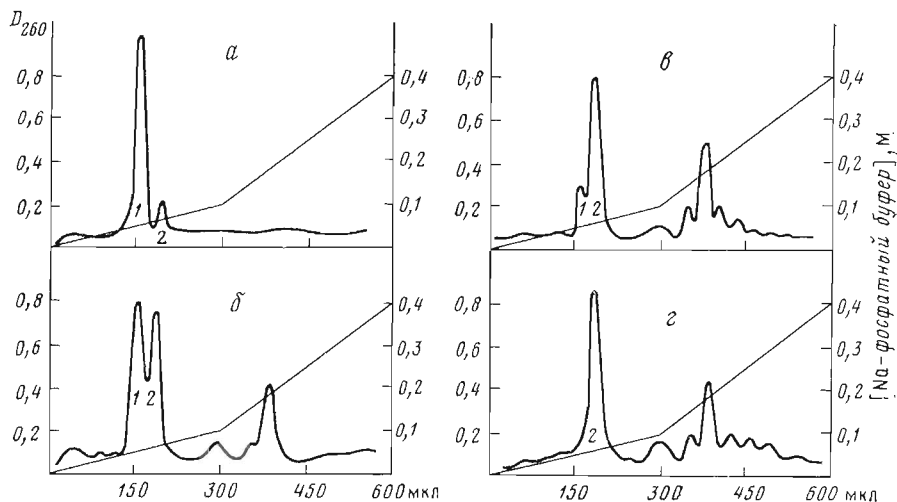
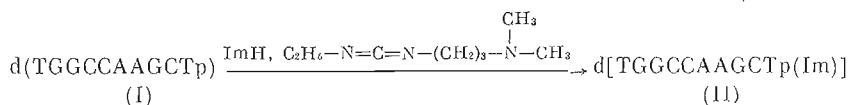


Рис. 1. Графики МКХ реакционной смеси, содержащей $0,25 \cdot 10^{-3}$ М d[TGGCCAAGCTp(Im)], 0,2 М N-метилимидазол, 0,2 М NaCl, 0,075 М MgCl₂, рН 8,0, сразу после смешивания реагентов (а); после инкубирования реакционной смеси при 4° С в течение 2 (б), 10 (в), 20 сут (г). Колонка с аминосилхромом (1×40 мм), элюция в линейном градиенте концентрации Na-фосфатного буфера в 7 М мочевины при рН 7,0 со скоростью 600 мкл/ч

образующего при самоассоциации ДНК-подобный дуплекс, но без применения карбодимида.

Активацию концевого фосфата в декануклеотиде проводили предварительно путем превращения его в соответствующий фосфоимидазолид. Ранее в работах Оргела по пребиотическому синтезу нуклеиновых кислот было установлено, что имидазолиды моно- и олигонуклеотидов в присутствии комплементарной матрицы самоконденсируются с образованием олиго- и полинуклеотидов [10, 11], причем конденсация протекала эффективно только в случае соединений *рибо*-ряда [12] и, кроме того, с преимущественным образованием не природной 2'—5'-фосфодиэфирной связи [13]. Следует отметить, что добавки металлов, например Zn²⁺-ионов, влияют на стереоспецифичность реакции, в результате чего происходит преимущественное образование 3'—5'-связи [14]. В настоящей работе впервые имидазолиды олигонуклеотидов применялись для синтеза природной межнуклеотидной связи в олигонуклеотидах дезокси-ряда, образующих двухспиральный конкатемерный комплекс.

Имидазолид декануклеотида (II) получали карбодимидным методом по схеме



Исходный 3'-фосфорилированный декануклеотид (I) синтезирован фосфотриэфирным методом в растворе [15]. Имидазолид (II) получали в водном растворе при 20° С в течение 1,5 ч. Избыток имидазола и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида отделяли путем гель-фильтрации на био-геле Р-2. Анализ полученной смеси олигонуклеотидов проводили методом МКХ на аминосилхромом (рис. 1). По данным микроколлонной хроматографии, содержание имидазолида (II) составляло 90—95%. Полученный препарат без дополнительной очистки использовали для полимеризации.

Полимеризацию проводили в буфере, применявшемся ранее в работе [13]. Изучение зависимости УФ-поглощения имидазолида (II) от температуры, проведенное как описано в работе [9], показало, что в этом буфере образуется достаточно прочный комплементарный комплекс с т. пл. 37° С при нуклеотидной концентрации в расчете на мономер $0,49 \cdot 10^{-2}$ М и

марную полимерную фракцию, выделенную из реакционной смеси путем колоночной хроматографии на аминсилохроме, подвергали исчерпывающему гидролизу смесью ФДЭ и ФМЭ. При этом вся полимерная фракция целиком расщеплялась до смеси нуклеозидов, что свидетельствует о том, что в полученных соединениях имеется только природная 3'-5'-фосфодиэфирная связь.

Образование природного типа связи в данной системе может происходить лишь в том случае, если реагирующие концевые группы в олигонуклеотидах сближены в составе двухспирального комплекса. В контрольном эксперименте, когда ту же реакцию проводили в буфере, содержащем 30% формамида (условия денатурации комплекса), наблюдался лишь гидролиз имидазолида до исходного декануклеотида (I).

Таким образом, впервые имидазолидным методом осуществлена матрично-направленная полимеризация синтетического декадезоксирибонуклеотида в составе конкатемерного дуплекса. Продуктами полимеризации являются фрагменты ДНК заданной первичной структуры, заложенной в последовательности исходного синтетического олигонуклеотида. Показан матрично-направленный характер реакции и в полученных соединениях установлен 3'-5'-фосфодиэфирный тип связи. Указанный метод может использоваться для синтеза межнуклеотидной связи в составе дуплексов при сборке ДНК-подобных структур из соответствующих блоков как природной, так и не природной структуры. Удобство предлагаемого метода состоит в легкой утилизации непрореагировавшего олигонуклеотида, так как он не подвергается длительному воздействию конденсирующего агента.

Экспериментальная часть

В работе использовали ФДЭ змеиного яда и ФМЭ из *E. coli* — препараты фирмы «Worthington Biochemical Corporation» (США), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, N-метилимидазол и реактивы для электрофореза в геле фирмы «Serva» (ФРГ), аминсилохром (Союзхимреактив, Новосибирск).

$d[GGCCAAGCTp(Im)]$ (I). Водный раствор, содержащий 1 OE_{260} ($0,01 \text{ мкмоль}$) NH_4^+ -соли декануклеотида (I), упаривали досуха, добавляли 100 мкл 3 M водного раствора имидазола и 10 мг (50 мкмоль) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид. Через $1,5 \text{ ч}$ при 20° C реакционную смесь наносили на колонку ($7 \times 30 \text{ см}$) с биогелем P-2 ($200-400 \text{ меш}$). Олигонуклеотиды элюировали водой, затем раствор упаривали и анализировали с помощью МКХ. Полученная смесь содержала 90% имидазолида (II) и 10% исходного декануклеотида (I) (рис. 1а).

Полимеризация $d[GGCCAAGCTp(Im)]$. Водный раствор, полученный после гель-фильтрации по предыдущей методике и содержащий $0,25 \text{ OE}_{260}$ имидазолида (II), упаривали досуха и добавляли 100 мкл буфера: $0,2 \text{ M}$ N-метилимидазол, $0,2 \text{ M}$ NaCl, $0,075 \text{ M}$ MgCl_2 , pH 8,0. Реакционную смесь инкубировали при 4° C . Через каждые $2-3 \text{ сут}$ отбирали по 5 мкл смеси, разбавляли водой до 90 мкл и анализировали с помощью МКХ на аминсилохроме (рис. 1). Выход продуктов полимеризации определяли как отношение суммарной площади пиков, элюирующихся после декануклеотида, к сумме площадей всех имеющихся пиков.

Гидролиз полимерной фракции смесью ФМЭ и ФДЭ. Суммарную фракцию олигонуклеотидов ($0,01-0,02 \text{ OE}_{260}$), элюирующуюся с колонки с аминсилохромом позже декануклеотида, обессоливали на колонке ($2 \times 20 \text{ мм}$) с DEAE-целлюлозой в HCO_3^- -форме. Элюцию нуклеотидного материала вели 1 M NH_4HCO_3 . После удаления NH_4HCO_3 многократным упариванием с водным этанолом при 50° C к пробе добавляли смесь ФМЭ ($0,1-1 \text{ ед. акт.}$) и ФДЭ ($0,02-0,2 \text{ ед. акт.}$) и смесь инкубировали 16 ч при 37° C в $0,04 \text{ M}$ NH_4HCO_3 -буфере, pH 8,0, содержащем $0,02 \text{ M}$ MgCl_2 и $0,2 \text{ мг/мл}$ сывороточного альбумина (объем реакционной смеси 50 мкл). Анализ гидролизата проводили также методом МКХ на аминсилохроме.

Авторы выражают благодарность Н. Г. Долинной за определение термической устойчивости комплексов соединений (I) и (II) в условиях матрично-направленной полимеризации, а также А. В. Цытович и М. Г. Исагулянц за выполнение электрофореза в полиакриламидном геле.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Naylor R., Gilham P. T.* Biochemistry, 1966, v. 5, № 8, p. 2722–2728.
2. *Shabarova Z. A., Prokofiev M. A.* FEBS Lett., 1970, v. 11, № 4, p. 237–240.
3. *Недбай В. К., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А.* Докл. АН СССР, 1972, т. 205, № 5, с. 1114–1116.
4. *Бадашкева А. Г., Кубашева Г. Н., Кнорре Д. Г., Шамовский Г. Г., Шубина Т. Н.* Докл. АН СССР, 1972, т. 206, № 4, с. 870–873.
5. *Uesugi S., Ts'o P. O. P.* Biochemistry, 1974, v. 13, № 15, p. 3142–3152.
6. *Попов С. Г.* Индуцируемая водорастворимым карбодимидом конденсация олигонуклеотидов в комплексах с комплементарными олигонуклеотидами и структура этих комплексов: Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук, Новосибирск, 1976.
7. *Ninio J., Orgel L. E. J.* Mol. Evol., 1978, v. 12, № 1, p. 91–99.
8. *Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Turkin S. I., Gromova E. S.* Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 11, p. 2413–2429.
9. *Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Druzva V. L., Melnikova N. P., Purmal A. A.* Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 21, p. 5747–5761.
10. *Weimann B. J., Lohrmann R., Orgel L. E., Schneider-Bernloehr H., Sulston J. E.* Science, 1969, v. 161, № 3839, p. 387.
11. *Lohrmann R., Orgel L. E. J.* Mol. Evol., 1979, v. 14, № 2, p. 243–250.
12. *Schneider-Berloehr H., Lohrmann R., Sulston J., Orgel L. E. J.* Mol. Biol., 1970, v. 47, № 2, p. 257–260.
13. *Lohrmann R., Orgel L. E. J.* Tetrahedron, 1978, v. 34, № 7, p. 853–855.
14. *Bridson P. K., Orgel L. E. J.* Mol. Biol., 1980, v. 144, № 4, p. 567–577.
15. *Шабарова З. А., Волков Е. М., Орецкая Т. С., Туркин С. И., Долинная Н. Г., Каграманова В. К., Прокофьев М. А.* Докл. АН СССР, 1981, т. 258, № 4, с. 914–917.

Поступила в редакцию
6.I.1982

DNA-LIKE DUPLEXES WITH REPETITIONS. IV THE TEMPLATE-GUIDED POLYMERIZATION OF DECADEOXYRIBONUCLEOTIDE IMIDAZOLIDE

IVANOVSKAYA M. G., GOTTIKH M. B., SHABAROVA Z. A.

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

The template-guided chemical polymerization of synthetic decanucleotide d(TGCCCAAGCTp), associated into self-complementary concatemer-type duplex, has been carried out. The imidazolide method of activation of the 3'-end phosphate was used. Incubation of d[FGGCCAAGCTp(Im)] in N-methylimidazole buffer under the conditions favoring the complementary complex results in a 50% yield polymerization producing oligomers having the 3'-5'-diester linkage.