



УДК 577.113.6.088.5:543.422.6:542.95

**СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ  
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДНЫХ ДУПЛЕКСОВ  
СО СТРУКТУРНЫМИ АНОМАЛИЯМИ\***

*Грязнова О. И., Долгинная Н. Г., Исагулянц М. Г.,  
Метелев В. Г., Ореужая Т. С., Удалов Н. И.,  
Соколова Н. И., Шабарова З. А.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;  
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория  
им. А. Н. Белозерского и химический факультет*

Для изучения влияния структурных аномалий на химическую и ферментативную сборку двухспиральных ДНК сконструирована серия коротких ДНК-дуплексов, имеющих разрыв в одной из цепей. Дуплексы построены из матричного тетрадекануклеотида и комплементарных ему 6- и 11-звенных олигомеров, в которых варьируются звенья, примыкающие к месту разрыва: концевые нуклеозиды заменены на 3' (5')-амино- или фосфонуклеозиды; комплементарная А-Т-пара заменена на некомплемментарные АА-, АС- или гибридную А-ГU-пары. Кроме того, получен дуплекс, в котором один из матричных нуклеозидов не имеет партнера в комплементарной цепи, т. е. гексануклеотид заменен на пентануклеотид. Олигодезоксирибонуклеотиды получены триэфириным методом в растворе. Методом УФ-спектроскопии изучена термическая устойчивость синтезированных дуплексов. Показано, что в зависимости от природы модификаций наблюдается различный характер плавления — одно- или бифазный.

В последние годы в нашей лаборатории активно изучаются химические методы образования межнуклеотидных связей, моделирующие действие ДНК-лигазы [1, 2]. Замена фермента химическим реагентом для соединения олиго(поли)нуклеотидных блоков на комплементарной матрице дает возможность вводить неприродные межнуклеотидные связи в заданное положение двухспиральной нуклеиновой кислоты. Кроме того, это путь к получению функционально значимых генетических структур в препаративных количествах.

Развитие этих исследований требует детального изучения механизма, кинетики и стереохимии реакций химического лигирования. Ранее было показано, что важнейшим и необходимым условием химического лигирования является термодинамическая устойчивость исходного комплементарного комплекса [3, 4]. Однако остается неясным, какова должна быть ориентация реагирующих групп в месте разрыва, должны ли они быть достаточно жестко фиксированы в конформациях, задаваемых В-формой ДНК. Возможно, с точки зрения стереохимии реакции лучше, если реагирующие группы сохраняют некоторую конформационную свободу или будут ориентированы в пространстве иначе, чем в уотсон-криковской спирали (однако в условиях устойчивости комплекса). Такая ситуация может возникнуть, например, когда место разрыва находится вблизи модифицированного нуклеотидного остатка, некомплемментарной или гибридной рибо-дезоксирибонуклеотидной пары и т. д.

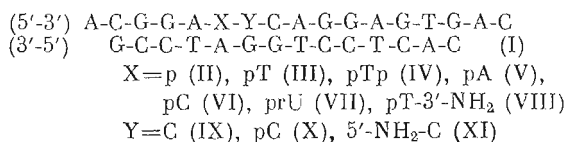
Решить поставленные вопросы можно только на достаточно простой модельной системе, позволяющей детально обследовать единичный акт «сшивания» двух олигомеров на комплементарной матрице.

Изученные ранее конкатемерные дуплексы, которые образуются при самоассоциации одного или нескольких олигомеров, не могут служить объектом такого рода исследования, поскольку в этих системах в резуль-

\* Символ «d» перед обозначением дезокси-нуклеозидов для краткости везде опущен, TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид.

тате химического лигирования образуется смесь полимерных продуктов с широким распределением по длинам [1]. Эффективность отдельного акта лигирования достаточно сложно оценить и при сборке протяженных ДНК-дуплексов из нескольких 10–15-звенных олигомерных блоков ввиду гетерогенности последних по длине и составу. Удобным объектом исследования может служить небольшой ДНК-дуплекс с одним участком репарации. С целью создания простейшей модельной системы был синтезирован 14-звенный олигодезоксирибонуклеотид — матрица и ряд 6- и 11-звенных олигодезоксинуклеотидов, образующих с ним дуплексы (схема 1):

Схема 1



Как видно из схемы, синтезированы не только комплементарные матрице гексануклеотиды (III) и (IV), но и ряд гексануклеозидпентафосфатов, различающихся структурой примыкающего к разрыву 3'-концевого звена. Кроме ундекануклеотидов (IX) и (X) получен их аналог, содержащий на 5'-конце вместо 2'-дезокситидина 5'-амино-2',5'-дидезокситидин (XI). Связываемый набор олигодезоксирибонуклеотидов позволяет сконструировать серию олигомерных дуплексов, различающихся конформационной ситуацией в репарируемом участке. Изучение этих дуплексов позволит оценить возможность и определить оптимальные условия образования под действием химических реагентов как природной, так и не природной — пирофосфатной, фосфоамидной или рибо-дезоксирибо-межнуклеотидных связей. Кроме того, с помощью полученных дуплексов можно определить влияние на эффективность лигирования (химического и ферментативного) различных структурных аномалий в месте разрыва — некомплементарной или гибридной рибо-дезоксирибо-нуклеотидной пары, а также «лишнего» (не имеющего партнера в комплементарной цепи) или модифицированного нуклеозида.

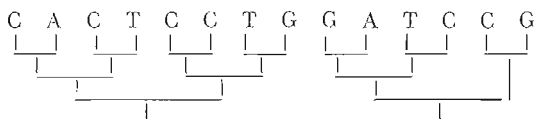
Полученные после лигирования дуплексы с заменами нуклеотидных пар и не природными межнуклеотидными связями являются интересными субстратами для изучения функционирования эндонуклеазы рестрикции *EcoRII*, поскольку участок узнавания этого фермента —  $CC^A_TGG$ , заложенный в последовательности дуплексов, непосредственно примыкает к месту модификации.

Настоящее сообщение посвящено синтезу и изучению термической устойчивости перечисленных выше трехкомпонентных дуплексов.

Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы фосфотриэфирным методом в растворе из защищенных динуклеозидфосфатов. Для максимальной унификации синтетических операций при блокировании экзоциклических аминогрупп всех нуклеозидов, а также 3'-ОН-групп концевых нуклеозидов использовалась бензоильная защита. Нуклеотидные и нуклеозидные компоненты для конденсации подготавливали по стандартным методикам [5]. Реакции проводили в абсолютном пиридине с использованием в качестве конденсирующего агента TPS и N-метил-имидазола.

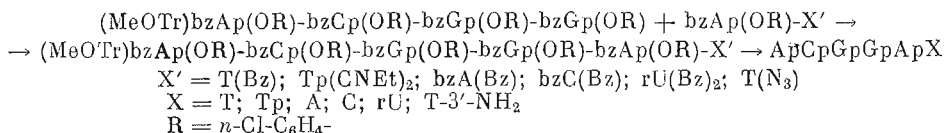
14-звенный олигонуклеотид-матрицу синтезировали по схеме 2:

Схема 2



Гексануклеозидпентафосфаты получали конденсацией тетрануклеотида с различными динуклеозидфосфатами (схема 3).

Схема 3



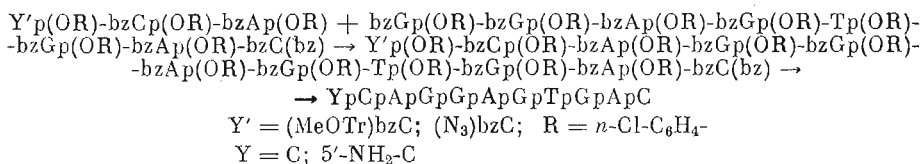
При синтезе всех приведенных выше гексануклеотидов в отличие от общепринятых методик брали в избытке нуклеозидный, а не нуклеотидный компонент, т. е. в конденсацию вводили избытки динуклеозидфосфатов по сравнению с тетра-нуклеотидами. Такое соотношение компонентов приводит к количественному использованию исходного тетра-нуклеотида и значительно упрощает выделение целевых гексамеров.

Пентануклеотид  $\text{ApCpGpGpAp}$  (II) получали из гексануклеозидпентафосфата (VII) окислением периодатом с последующим расщеплением по механизму  $\beta$ -элиминирования циклогексиламином [6].

Для введения аминонуклеозидов на 3'- или 5'-концы олигодезоксирибонуклеотидов (VIII) и (XI) использовались азидонуклеозиды  $\text{T}(\text{N}_3)$  и  $(\text{N}_3)\text{bzC}$ . Устойчивость азидной группы в условиях триэфирного метода синтеза олигодезоксирибонуклеотидов позволяет использовать эту группу в качестве защитной на промежуточных стадиях синтеза.

Ундекануклеотиды получали по схеме 4 (октануклеотид был синтезирован из двух тетра-нуклеотидов, в свою очередь полученных из двух динуклеотидных блоков):

Схема 4



Как видно из приведенных схем, олигонуклеотиды (VIII) и (XI), содержащие на 3'- или 5'-концах аминонуклеозиды, получали восстановлением азидных аналогов соответствующих олигонуклеотидов с помощью трифенилфосфина по методике, предложенной для нуклеозидов [7]. Нуклеотидная последовательность синтезированных олигодезоксирибонуклеотидов подтверждена методом Максама — Гилберта [8] (см., например, рис. 1).

Следующий этап работы — изучение термической устойчивости двух-спиральных комплексов, образованных матричным 14-звенным олигонуклеотидом (I) и перечисленными выше гекса(пента)- и ундекануклеотидами, несущими разнообразные модификации в нуклеозидных фрагментах, примыкающих к месту стыка.

В литературе в последние годы появились данные о влиянии точечных структурных аномалий, в частности некомплементарных и гибридных пар, на строение, а также энергетические и кинетические параметры двойных спиралей, образованных олигонуклеотидами гетерогенной последовательности [9—11]. Интерес к изучению пространственного расположения и энергетических параметров некомплементарных пар, вкрапленных в регулярную двойную спираль, был стимулирован развитием техники сайт-специфического мутагенеза и совпал с успехами синтетической нуклеотидной химии и совершенствованием мощных современных методов структурных исследований. Однако до сих пор не изучены строение и устойчивость олигонуклеотидных двойных спиралей, содержащих разрыв в районе «ошибочной» пары (для олигомер-полимерных комплексов гомогенной последовательности такое исследование было проведено Уленбеком и др. [12]). Более того, вообще свойства олигонуклеотидных комплексов, несущих одноцепочечные разрывы, практически не исследованы, несмотря на то что такие дуплексы широко используются при сборке искусственных генов из синтетических олигонуклео-

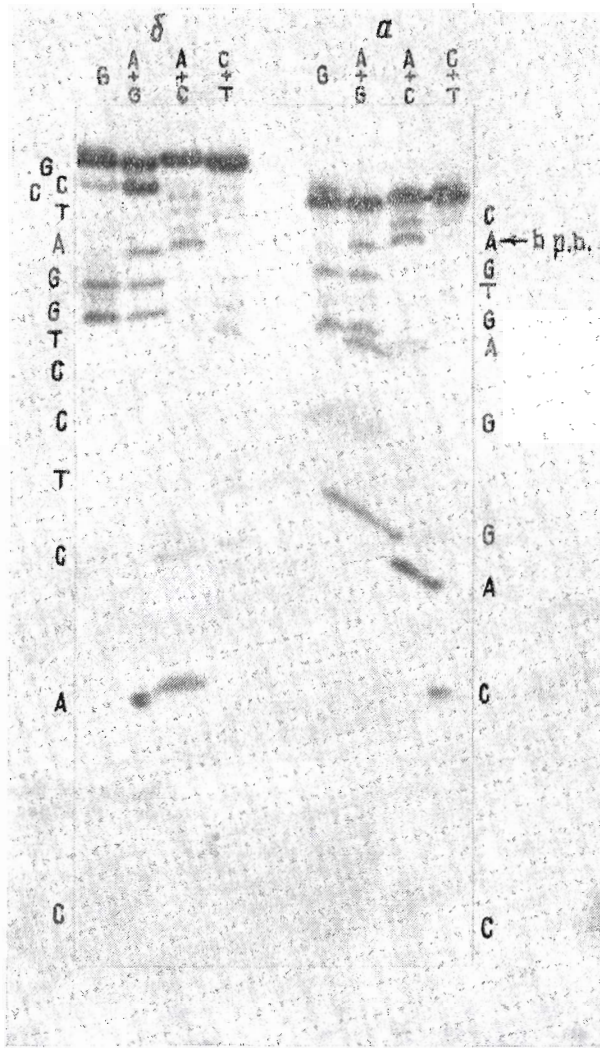


Рис. 1. Анализ по методу Максама – Гилберта нуклеотидной последовательности:  $\alpha$  – CCAGGAGTGC (IX),  $\delta$  – CACTCCTGGATCCG (I). Электрофорез в 20% полиакриламидном геле (50 мМ трис-боратный буфер (pH 8,1), 7 М мочевины, 0,1 мМ EDTA). Стрелкой обозначен краситель-маркер бромфеноловой синий (brb)

тидов с помощью ДНК-лигазы. Можно упомянуть лишь работу [13], в которой показано, что в ДНК вблизи места разрыва имеет место возмущение в структуре, распространяющееся на несколько нуклеотидных остатков. Кантор и др. [14] показали, что наличие разрывов в одной из цепей резко дестабилизирует систему, но не влияет на общую геометрию комплексов. Эти результаты согласуются с нашими данными, полученными при исследовании комплексов с несовпадающими разрывами в комплементарных цепях (конкатемеров) [15].

Термическая устойчивость олигонуклеотидных комплексов, полученных в настоящей работе, была изучена методом плавления с регистрацией по УФ-поглощению в буферном растворе, используемом для проведения химического лигирования. На рис. 2 приведены кривые плавления изученных трехкомпонентных комплексов, представленные для удобства анализа в дифференциальной форме. Значения гипохромии комплексообразования ( $h$ ), температура плавления ( $T_m$ ) вместе с рассчитанными значениями  $\Delta H^\circ$  суммированы в таблице. Для сравнения в таблицу включены характеристики комплекса, образованного олигонуклеотидами (IX) и (I). Поскольку некомплементарные пары, а также «избыточ-

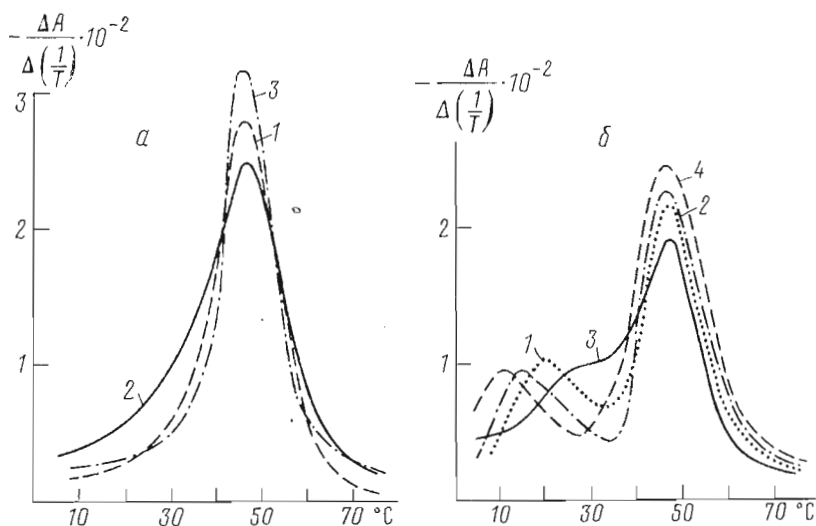


Рис 2. Дифференциальные профили плавления олигонуклеотидных дуплексов: *a* — (VII)+(X)+(I) (1); (IV)+(X)+(I) (2); (I)+(IX) (3); *b* — (V)+(X)+(I) (1); (VI)+(X)+(I) (2); (VII)+(X)+(I) (3); (II)+(IX)+(I) (4).  $c_0 = (0,2-0,4) \cdot 10^{-3}$  М; 0,05 М MES-буфер (рН 6,0), 0,02 М  $MgCl_2$

ные» (не имеющие партнера на комплементарной цепи) нуклеозиды, находящиеся внутри ковалентно-непрерывной двойной спирали, дестабилизируют комплекс [9–11, 16], можно было ожидать, что модифицированный гексануклеотид будет менее прочно связываться с комплексом, образованным 11- и 14-звенными олигомерами, чем немодифицированный. Действительно, анализ полученных дифференциальных кривых плавления показывает, что только дуплексы, в которых все нуклеотидные пары канонические и принадлежат к дезоксирибозидному ряду, плавятся как единая кооперативная единица (комплексы 1–5 в таблице, рис. 2*a*). Для остальных дуплексов кривые плавления имеют выраженный бифазный характер (комплексы 6–9 в таблице, рис. 2*b*).

Это можно трактовать следующим образом: в дуплексах первого типа (рис. 2*a*) полностью комплементарный матрице гексануклеотид является частью термически устойчивого трехкомпонентного дуплекса, который при плавлении ведет себя как единый кооперативный блок. Для дуплексов второго типа (рис. 2*b*) характерно бифазное плавление. Первая ступень соответствует диссоциации модифицированного гексануклеотида, вторая — плавлению комплекса (IX)+(I), причем  $T_m$  второй ступени хорошо коррелирует с  $T_m$  контрольной смеси олигонуклеотидов (IX) и (I) (см. таблицу). Из-за бифазного характера плавления комплексов этого типа трудно корректно оценить их  $T_m$ , но если судить по положению первого максимума дифференциальной кривой на температурной оси, то видно (рис. 2*a*), что наибольшее дестабилизирующее и возмущающее

#### Некоторые характеристики олигонуклеотидных комплексов

Номер комплекса	Состав комплекса	$h, \% \pm 0,5$	$T_m, ^\circ C \pm 1$	$\Delta H^\circ, \text{ккал/моль} \pm 3$
1	(III)+(X)+(I)	19,0	47,5	-58
2	(IV)+(IX)+(I)	18,5	47,5	-55
3	(IV)+(X)+(I)	18,6	47,5	-57
4	(VII)+(X)+(I)	19,1	47,5	-82
5	(IV)+(XI)+(I)	20,1	46,5	-82
6	(VI)+(X)+(I)	16,7	—	—
7	(V)+(X)+(I)	17,3	—	—
8	(VII)+(X)+(I)	17,4	—	—
9	(II)+(IX)+(I)	16,0	—	—
10	(IX)+(I)	17,1	47,0	-70

влияние оказывает отсутствие одного нуклеозидного остатка в месте разрыва, затем следуют некомплементарные АС- и АА-пары, наименьшее дестабилизирующее влияние оказывает гибридная пара. Полученный ряд полностью совпадает с ожидаемым на основании литературных данных по устойчивости олигонуклеотидных дуплексов со структурными аномалиями, не несущими одноцепочечного разрыва [9—11, 16, 17].

Для комплексов первого типа была оценена  $T_m$  и энтальпия комплексообразования. Как видно из таблицы,  $T_m$  комплексов практически не зависит от наличия одной или даже двух фосфатных групп в месте одноцепочечного разрыва (ср. комплексы 1—3 в таблице). В пределах ошибки опыта 3'- или 5'-аминогруппы также не влияют на термическую устойчивость двойных спиралей рассматриваемого типа (комплексы 4, 5, таблица). С другой стороны, ранее мы обнаружили, что в конкатемерной системе на основе декануклеотида TGCATTTATAA, имеющей низкую термическую устойчивость, наличие фосфатных групп в местах контактов олигонуклеотидных блоков резко дестабилизирует дуплекс [3]. По-видимому, чем устойчивее дуплекс, тем в большей степени нивелируется влияние дестабилизирующих (фосфатные группы) или стабилизирующих (аминогруппы) включений. К тому же в указанном выше конкатемерном дуплексе дестабилизирующие узлы чередуются в среднем через каждые пять нуклеотидных пар, в то время как в данной системе один узел приходится на 14 нуклеотидных пар.

Вычисленные из дифференциальных кривых значения  $\Delta H^\circ$  (таблица) значительно варьируют в зависимости от природы составляющих дуплекс компонентов. Наибольшее значение  $\Delta H^\circ$  соответствует системам, содержащим аминокислотные олигонуклеотиды. Полученные значения  $\Delta H^\circ$  и  $h$  характерны для олигонуклеотидных комплексов [18]. Интересно, что  $T_m$  трехкомпонентных комплексов, удерживаемых 14 комплементарными парами и имеющих один разрыв, очень близки к  $T_m$  двухкомпонентного комплекса (IX)+(I), содержащего 9 комплементарных пар и довольно длинное некомплементарное плечо (правда, в последнем случае  $h$  существенно ниже). Этот результат согласуется с полученными нами данными о том, что при комплексообразовании олигонуклеотидов удлинение дуплекса за счет присоединения следующих олигонуклеотидных молекул не вызывает заметного изменения термической устойчивости комплексов.

Таким образом, проведенное исследование показало, что при  $T < 10^\circ \text{C}$  все изученные дуплексы термодинамически устойчивы. Можно предположить, что не связанные ковалентно с модифицированным нуклеозидом, а только сближенные на комплементарной матрице соседние звенья ундекамера практически не будут подвергаться возмущающему влиянию «ошибочных» или гибридных пар. В связи с этим рассмотренные дуплексы представляют очень интересную модель для изучения некоторых стереохимических аспектов реакций химического лигирования.

### Экспериментальная часть

В работе использованы дезоксирибонуклеозиды отечественного производства; этиленциангидрин, триазол, N-метилимидазол, 2-морфолиноэтансульфокислота (MES) (Merck, ФРГ).

ТСХ проводили на пластинках кизельгель 60F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ), колоночную хроматографию — на силикагеле L 40/100 (Chemapol, ЧССР).

T4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) — отечественного производства; фосфодиэстераза змеяного яда (КФ 3.1.4.1) и фосфомоноэстераза из *E. coli* (КФ 3.1.3.1) — фирмы Worthington (США).

*Синтез олигодезоксирибонуклеотидов.* MeOTr-группу в нуклеозиды вводили как описано в работе [5].

N-Бензоилнуклеозиды получали с использованием промежуточной защиты гидроксильных групп сахара триметилхлорсиланом [19].

O,N-Дибензоилдезоксинуклеозиды получали обработкой 1 ммоль (MeOTr)bzN, растворенного в 10 мл абс. пиридина, 1,3 ммоль бензой-

ного ангидрида и 80 мг N,N-диметиламинопиридина в течение 1,5 ч при 20° С (контроль ТСХ). После разложения реакционной смеси ледяной водой раствор упаривали, оставшееся масло растворяли в хлороформе, промывали 0,1 М раствором ТЕАВ (2×20 мл) и водой. Выделяли целевой продукт колоночной хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации этилового спирта в хлороформе (0→10%). Выходы 80–90%. (MeOTr)U(Bz)<sub>2</sub> получали аналогично, используя 2,3-кратные количества реагентов.

Полностью защищенные нуклеозид-3'-фосфаты получали последовательной обработкой 5'-O,N-защищенных нуклеозидов (*n*-хлорфенил)фосфобистриазолидом и этиленциангидрином [15]. Удаление MeOTr- и цианэтильной групп проводили по методикам [20].

*Общая методика межнуклеотидной конденсации.* Смесь 1,0 ммоль нуклеотидного и 0,8 ммоль нуклеозидного компонента тщательно высушивали 3–5-кратным упариванием с абсолютным пиридином. Последний раз упаривали до объема, при котором концентрация нуклеотидного компонента с учетом добавляемого далее N-метилимидазола (6,0 ммоль) составляла 0,1 М. Добавляли 3 ммоль TPS и выдерживали реакционную смесь 10–15 мин при 20° С (контроль по ТСХ). Разлагали и обрабатывали реакционную смесь по стандартной методике [5]. Целевой продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации этилового спирта в хлороформе (0–10%). Выходы после колоночной хроматографии составляли 75–95%.

*Синтез олигонуклеотидов, содержащих на 3'- или 5'-конце азидонуклеозиды.* T(N<sub>3</sub>) получали из (MeOTr)T по работе [21]. Синтез (MeOTr)bzAp(CIPh)-T(N<sub>3</sub>) проводили по общей методике конденсации, приведенной выше. (N<sub>3</sub>)bzC получали из bzC в одну стадию по методу [22]. (N<sub>3</sub>)bzC фосфорилировали по методу [15] и вводили в конденсацию с bzCp(CIPh)-bzAp(CIPh, CNEt).

*Удаление защитных групп.* Олигонуклеотид растворяли в смеси пиридин – конц. NH<sub>3</sub> (1:1) и выдерживали раствор 12 ч при 50° С. Раствор упаривали, оставшееся масло растворяли в 80% уксусной кислоте (20 мин, 20° С), упаривали. Остаток растворяли в воде, водный раствор, содержащий олигонуклеотид, экстрагировали эфиром.

*Выделение олигодезоксирибонуклеотидов* проводили на колонках с DEAE-целлюлозой DE-23 (Cl<sup>-</sup>) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine.

Олигонуклеотиды (IX), (XI), (VIII) и (I) дополнительно очищали с помощью ВЭЖХ на хроматографе Tgasog (США). Использовали колонку (25×0,46 см) с носителем Ultrasphere octyl (размер частиц носителя 5 мкм). Стандартные условия разделения: линейный градиент метанола (3→35%) в 0,1 М ацетате аммония, время 35 или 48 мин, скорость элюции 1 мл/мин, 40° С.

*Хроматографический анализ олигодезоксинуклеотидов* осуществляли на микрохроматографе с непрерывной регистрацией оптического поглощения раствора на микроспектрофотометрической приставке МСФП-1 (ИОХ СО АН СССР).

*Нуклеозидный состав* гексануклеотидов определяли гидролизом 0,1 ОЕ<sub>260</sub> вещества смесью фосфодиэстеразы змеиного яда и фосфомоноэстеразы из *E. coli* в течение 6 ч при 37° С с последующим анализом гидролизата ВЭЖХ (см. выше) в изократическом режиме. Элюцию проводили раствором 6% метанола в 0,1 М ацетате аммония. Площади пиков определяли с помощью интегратора 3390А Hewlett Packard (США).

*Оптические измерения* осуществляли на спектрофотометре Pye Unicam (Англия). Концентрацию нуклеотидного материала определяли спектрофотометрически; молярные коэффициенты поглощения олигонуклеотидов рассчитывали без учета гидрохромии. Температурную зависимость УФ-поглощения измеряли на спектрофотометре Cary-219 (США) при непрерывном повышении температуры со скоростью 0,5 град/мин. Использовали термостатированные кварцевые кюветы Hellma (ФРГ) с длиной оптического пути 1 мм. Общая нуклеотидная концентрация (с<sub>0</sub>) состав-



ляла  $(0,2-0,4) \cdot 10^{-3}$  М (на мономер). Буфер — 0,05 М MES, 0,02 М  $MgCl_2$ , рН 6,0. Результаты плавления олигонуклеотидных дуплексов представляли в виде  $f(t) = \Delta A_{260} / \Delta T^{-1}$ . Гипохромия комплексообразования определяли из кривых плавления согласно уравнению

$$h = \frac{A'_{260} - A''_{260}}{A'_{260}} \cdot 100,$$

где  $A'_{260}$  и  $A''_{260}$  — поглощение раствора при 60 и 8° С соответственно ( $\lambda$  260 нм).

Значение энтальпии комплексообразования и  $T_m$  рассчитывали по формулам [11]:

$$\Delta H^\circ = - \frac{4,37}{1/T_{1/2} - 1/T_{3/4}} \text{ и } T_m = T_{1/2} \left( 1 - \frac{T_{1/2}}{|\Delta H^\circ|} \right),$$

где  $T_{1/2}$  и  $T_{3/4}$  — температура в градусах Кельвина в максимуме дифференциальной кривой и в точке, при которой  $dA/d(T^{-1})$  опустилась на половину максимальной величины, соответственно.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Drutsa V. L., Melnikova N. P., Pirmal A. A.* Nucl. Acids Res., 1984, v. 9, № 21, p. 5747–5761.
2. *Ивановский М. Г., Готтх М. Б., Шабарова З. А.* Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 7, с. 940–944.
3. *Королева О. Н., Друца В. Л., Долинная Н. Г., Цытович А. В., Шабарова З. А.* Молекуляр. биология, 1984, т. 18, вып. 1, с. 146–160.
4. *Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Turkin S. I., Gromova E. S.* Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 11, p. 2413–2429.
5. *Stawinski J., Pozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R.* Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353–371.
6. *Крынецкая Н. Ф., Зякина Г. В., Елов А. А., Шабарова З. А., Прокофьев М. А.* Докл. АН СССР, 1986, т. 285, № 2, с. 489–492.
7. *Gibbs E., Orgel L. E.* Carbohydrates. Nucleosides, Nucleotides, 1976, v. 3, № 5, p. 315–334.
8. *Maxam A. M., Gilbert W.* In: Methods in Enzymology/Eds Grossman L., Moldave K. N. Y.—L.: Acad. Press, 1980, v. 65, p. 499–560.
9. *Patel D. J., Koslowski S. A., Marky L. A., Rice J. A., Dallas J., Itakura K., Breslauer K. J.* Biochemistry, 1982, v. 21, № 3, p. 437–444.
10. *Patel D. J., Koslowski S. A., Ikuta S., Itakura K.* Biochemistry, 1984, v. 23, № 14, p. 3218–3226.
11. *Tibanyenda N., de Bruin S. H., Haasnoot C. A., van der Marel G. A., van Boom J. H., Hilbers C. W.* Eur. J. Biochem., 1984, v. 139, p. 19–27.
12. *Uhlenbeck O., Harrison R., Doty P.* In: Molecular association in biology. N. Y.: Acad. Press, 1968, p. 107–114.
13. *Mingot F., Jorcano J. L., Davila C. A.* Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 520, № 1, p. 1–10.
14. *Cantor C. R., Chin W. W.* Biopolymers, 1968, v. 6, p. 1745–1753.
15. *Громова Е. С., Виноградова М. Н., Елов А. А., Вейко В. П., Долинная Н. Г., Друца В. Л., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Шабарова З. А.* Молекуляр. биология, 1984, т. 18, вып. 2, с. 370–381.
16. *Patel D. J., Koslowski S. A., Marky L. A., Rice J. A., Broka C., Itakura K., Breslauer K. J.* Biochemistry, 1982, v. 21, № 3, p. 445–451.
17. *Martin F. H., Tinoco I., Jr.* Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 10, p. 2295–2299.
18. *Долинная Н. Г., Громова Е. С.* Успехи химии, 1983, т. LII, вып. 1, с. 138–167.
19. *Ti G. S., Gaffney V. L., Jones R. A. J.* Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, p. 1316–1319.
20. *Вейко В. П., Пурмаль А. А., Орецкая Т. С., Куряилова Е. А., Метелев В. Г., Друца В. Л., Баканова В. А., Ивановская М. Г., Кузнецова С. А., Шабарова З. А.* Рукопись депонирована в ВИНТИ, № 6392 от 30.11.83.
21. *Watsuda A., Watanaba K. A., Fox J. J.* J. Org. Chem., 1980, v. 45, p. 3274–3278.
22. *Yamamoto I., Sekino M., Hata T.* J. Chem. Soc., 1980, p. 306–310.

Поступила в редакцию  
11.VI.1985



STUDIES OF SYNTHESIS AND THERMAL STABILITY OF  
OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDE DUPLEXES WITH STRUCTURAL ANOMALIES

GRYAZNOVA O. I., DOLINNAYA N. G., ISAGULYANTS M. G., METELEV V. G.,  
ORETSKAYA T. S., UDALOV N. I., SOKOLOVA N. I., SHABAROVA Z. A.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,  
and Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

To study the influence of structural anomalies on chemical and enzymatic ligation of double-stranded DNA, a series of short DNA-duplexes with nicks in one strand has been constructed. The duplexes were formed by a tetradecadeoxynucleotide matrix and two complementary hexa- and undeca-nucleotide blocks, with various sequences adjoining the nick. The adjoining units were: deoxyribonucleosides, ribonucleosides, 3'(5')-aminonucleosides, nucleotides and phosphate. The stability of duplexes with noncomplementary AA-, AC- and hybrid dA-rU pairs were studied. DNA-duplex was formed also in case of a penta-instead of hexanucleotide, so that one of the matrix nucleotide residues had no counterpart in complementary strand. The oligonucleotides were synthesized using phosphothriester approach in solution. Thermal stability of duplexes was studied by UV-spectroscopy. Mono- or biphasic curves were observed for melting of various anomalous structures.