



УДК 577.413.4

## ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУХСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

## I. ХИМИЧЕСКОЕ ЛИГИРОВАНИЕ КАК МЕТОД ВВЕДЕНИЯ ФОСФОАМИДНЫХ И ПИРОФОСФАТНЫХ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ СВЯЗЕЙ В ДНК-ДУПЛЕКСЫ

*Долинная Н. Г., Грязнова О. И., Соколова Н. И.,  
Шабарова З. А.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория  
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского  
и Химический факультет*

Показано, что короткие ДНК-дуплексы с единичным разрывом в одной из цепей являются удобными моделями для получения количественных характеристик реакций химического лигирования и оценки возможностей этого метода для введения точечных модификаций в сахарофосфатный остов ДНК. Отработаны оптимальные условия сборки ДНК-дуплексов под действием водорастворимого карбодимиды. Показано, что замена 3'-гидроксильной группы в участке «спивания» на амино- или фосфогруппу приводит к 70- или 45-кратному увеличению начальной скорости реакции соответственно, причем положение (3'- или 5'-)аминогруппы существенно не влияет на скорость реакции. Выход модифицированных ДНК-дуплексов через 6 ч достигает 96—100%. ДНК-лигаза не способна катализировать образование неприродных фосфоамидной или пирофосфатной связей при сборке соответствующих дуплексов.

В современной молекулярной биологии и биоорганической химии все более заметную роль начинают играть синтетические модифицированные аналоги ДНК-дуплексов. Изучение их статической и динамической конформации позволяет расширить наши знания о конформационных возможностях ДНК. Применение их в качестве субстратов и ингибиторов важно для изучения проблемы белково-нуклеинового узнавания и более глубокого понимания механизма действия широкого круга ферментов, таких, как эндонуклеазы рестрикции, РНК- и ДНК-полимеразы, а также белков, участвующих в процессах транспозиции генов, в процессинге и т. д. Интересным в этом плане, но пока малоизученными являются ДНК-дуплексы с точечными модификациями в сахарофосфатном остове, в частности содержащие неприродные или конформационно-измененные межнуклеотидные связи.

Для получения таких модифицированных дуплексов весьма перспективным представляется предложенный нами ранее [1] метод химического лигирования (альтернативный ферментативному лигированию), который заключается в сборке двухспиральных ДНК путем конденсации олигонуклеотидных блоков на комплементарной матрице под действием химических реагентов. Этот метод позволяет в процессе сборки ДНК-дуплексов вводить точечные модификации в заданное положение полинуклеотидной цепи, поскольку при химическом лигировании снимаются ограничения, обусловленные требованиями субстратной специфичности фермента. Именно таким путем удалось впервые получить ДНК-дуплексы конкатемерного типа, содержащие неприродные фосфоамидные [2] или пирофосфатные [3] межнуклеотидные связи. Однако на конкатемерных системах трудно получить четкие сравнительные характеристики образования природных и модифицированных связей. Удобными для этой цели являются короткие фрагменты ДНК с единичным разрывом в одной из це-

Сокращения: МКХ — микроколоночная хроматография; MES — 2-морфолиноэтансульфонат.

Структура исследованных ДНК-дуплексов \*

№	Олигонуклеотидный состав дуплексов	Структура узла «сшивания»
(I)	$\begin{array}{l} \text{5' A-C-G-G-A-TpC-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C} \\ \text{3' G-C-C-T-A-G-G-T-C-C-T-C-A-C} \end{array}$	
(II)	$\begin{array}{l} \text{A-C-G-G-A-TpC-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C} \\ \text{G-C-C-T-A-G-G-T-C-C-T-C-A-C} \end{array}$	
(III)	$\begin{array}{l} \text{A-C-G-G-A-TpNH}_2\text{C-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C} \\ \text{G-C-C-T-A-G-G-T-C-C-T-C-A-C} \end{array}$	
(IV)	$\begin{array}{l} \text{A-C-G-G-A-TNH}_2\text{pC-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C} \\ \text{G-C-C-T-A-G-G-T-C-C-T-C-A-C} \end{array}$	
(V)	$\begin{array}{l} \text{A-C-G-G-A-TpC-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C} \\ \text{G-C-C-T-A-G-G-T-C-C-T-C-A-C} \end{array}$	

\* Префикс d везде опущен; стрелкой указано место одноцепочечного разрыва; p обозначает  $^{32}\text{P}$ -метку.

пей. В настоящей работе исследована серия таких модельных дуплексов (табл. 1).

Как видно из табл. 1, все дуплексы построены из трех олигодезоксирибонуклеотидов — матричного тетрадекануклеотида и ряда комплементарных ему 6- и 11-звенных олигомеров, различающихся только структурой примыкающих к разрыву звеньев. Синтез и термическая устойчивость сконструированных дуплексов описаны нами в работе [4]. Такой набор дуплексов позволяет сравнить скорость и эффективность образования природной фосфодиэфирной, фосфоамидных (5'-N—P) или (3'-N—P), а также пиррофосфатной связей. Причем во всех случаях природа нуклеотидных звеньев, между которыми образуется новая межнуклеотидная связь, одинакова; неизменны также длина и нуклеотидная последовательность исходных дуплексов. Следует отметить, что в первичной структуре дуплексов заложен участок узнавания эндонуклеазы рестрикции *EcoRII*, непосредственно примыкающий к месту модификации.

Целью настоящего исследования было: а) определение оптимальных условий комплементарно-направленной конденсации двух олигонуклеотидов с гетерогенной нуклеотидной последовательностью под действием водорастворимого карбодимида; б) изучение влияния на скорость и эффективность химического лигирования замены гидроксильной группы в месте одноцепочечного разрыва на более нуклеофильные фосфатную и аминогруппы; в) сравнение возможностей химического реагента и ДНК-лигазы при сборке ДНК-дуплексов с модифицированными межнуклеотидными связями.

В качестве химического реагента, моделирующего действие ДНК-лигазы, был использован водорастворимый 1-этил-3-(3'-диметиламино-

## Химическое лигирование в дуплексе (I)

№ реакционной смеси	Условия химического лигирования				Выход через 24 ч, %
	$C_0$ , М	$C_{КДИ}$ *, М	Температура, °С	pH	
1	$10^{-3}$	0,05	0	6	48
2	$10^{-3}$	0,1	0	6	51
3	$10^{-3}$	0,2	0	6	70
4	$10^{-3}$	0,5	0	6	72
5	$10^{-4}$	0,2	0	6	40
6	$10^{-3}$	0,2	-15	6	37
7	$10^{-3}$	0,2	+15	6	67
8	$10^{-3}$	0,2	+37	6	—
9	$10^{-3}$	0,2	0	5	65
10	$10^{-3}$	0,2	0	7	63

\* КДИ — карбодимид.

пропил)карбодимид (далее — карбодимид). Высокая активность этого карбодимида как конденсирующего агента обусловлена его самоактивацией за счет образования внутримолекулярного 6-членного цикла с фиксированным положительным зарядом вблизи электрофильного центра [5].

Для определения оптимальных условий химического лигирования был использован дуплекс I (табл. 1), в состав которого входят немодифицированные гексануклеотид с 3'-концевой фосфатной группой и ундекануклеотид. В этом дуплексе акцептором активированного фосфата является 5'-гидроксильная группа, которая, как было показано [6], является более активной в реакциях химического лигирования по сравнению с 3'-гидроксильной. Условия реакции приведены в табл. 2. Варьировали концентрацию карбодимида, нуклеотидную концентрацию, температуру протекания реакции, pH буферного раствора. Реакционные смеси инкубировали в течение 6 сут, отбирая пробы через 6, 24 ч, 2, 4 и 6 сут. Анализ смесей проводили микроколоночной ионообменной хроматографией на сорбенте Lichrosorb-NH<sub>2</sub> в 7 М мочеvine (рис. 1). В условиях хроматографического разделения дуплекс, образованный гептадекануклеотидом — продуктом лигирования и тетрадекануклеотидной матрицей, не денатурирует, а выходит в виде симметричного пика (пик 4, рис. 1). Этот дуплекс удалось разделить методом электрофореза в ПААГ (рис. 2) после его выделения и мечения. По-видимому, образующийся комплекс является достаточно прочным, чтобы противостоять денатурирующему действию мочевины [7] в условиях микроколоночного разделения, при котором в связи с малым объемом элюирующей интерфазы создается высокая нуклеотидная концентрация.

Сравнение выходов продукта химического лигирования через 24 ч (табл. 2) свидетельствует о том, что увеличение концентрации карбодимида от 0,05 до 0,2 М приводит к значительному повышению выхода, причем, по данным микроколоночной хроматографии, реакционная смесь практически не содержит продуктов карбодимидной модификации. Дальнейшее повышение концентрации карбодимида не оказывает заметного влияния на выход гептадекануклеотида, в то же время повышает вероятность накопления модифицированных олигонуклеотидов [6]. Поэтому повышение концентрации конденсирующего агента выше 0,2 М нецелесообразно. Уменьшение в 10 раз нуклеотидной концентрации ( $C_0$ ) от стандартно используемой  $10^{-3}$  М (на мономер) вызывает уменьшение выхода продукта, что, вероятно, связано с частичной дестабилизацией дуплекса. Ранее нами было установлено, что устойчивость дуплекса является решающим фактором успешного химического лигирования [1]. Поэтому реакционные смеси обычно инкубировались при 0° С, когда двухспиральный комплекс заведомо устойчив. Изменение температуры проведения реакции в интервале от -15 до 37° С подтвердило, что при 0° С выход продукта лигирования

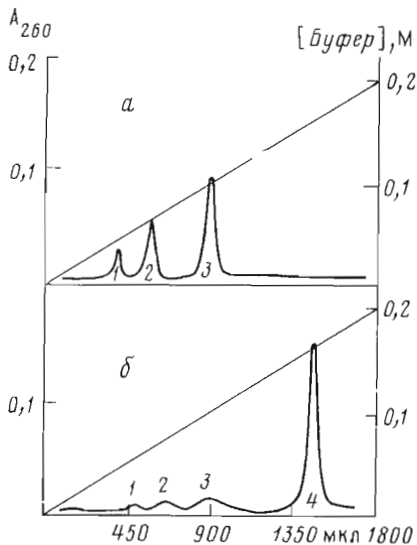


Рис. 1

Рис. 1. МКХ на сорбенте Lichrosorb-NH<sub>2</sub> реакционной смеси, содержащей дуплекс (I) и карбодимид в начальный момент времени (а), через 3 сут инкубации (б) (условия реакции см. в тексте). Пик 1 — d(ACGGATp); пик 2 — d(CCAGGAGTGAC); пик 3 — d(CACTCCTGGATCCG); пик 4 — дуплекс (I) после проведения конденсации

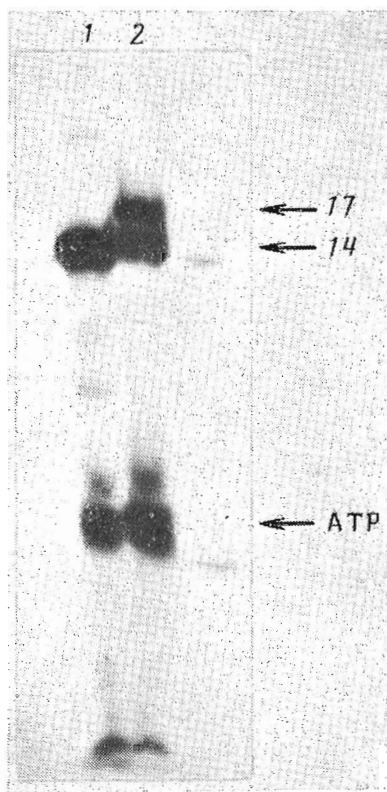


Рис. 2

Рис. 2. Радиоавтограф электрофореза в 20% ПААГ олигонуклеотидного материала из выделенного МКХ пика 4 (см. рис. 1) (2), тетрадекануклеотид-матрица (1)

максимальный. В замороженном растворе конденсация замедляется, а при повышении температуры до 37° С гептадекануклеотид не образуется, что связано с денатурацией дуплекса. Следует отметить, что по мере повышения температуры в реакционной смеси накапливаются побочные продукты карбодимидной модификации олигонуклеотидов. Матрично-зависимый характер химического лигирования подтверждается также тем, что в контрольном эксперименте в отсутствие матрицы конденсация гекса- и ундекануклеотидов не наблюдается.

Изменение рН буферного раствора от рН 6 на единицу в кислую или щелочную области не оказывает существенного влияния на скорость реакции и не вызывает накопления побочных продуктов; следовательно, рН в этом диапазоне значений можно варьировать.

Таким образом, на основании экспериментальных данных можно сделать вывод, что наиболее эффективно химическое лигирование идет в реакционной смеси 3 (табл. 2). Через 3 сут выход продукта конденсации достигает 90%.

В установленных оптимальных условиях было проведено химическое лигирование в дуплексах (II)—(V) (табл. 1). Реакционные смеси анализировали двумя методами. Анализ смесей (I) и (III), содержащих 3'-фосфорилированный гексануклеотид, осуществляли с помощью МКХ, причем в этих случаях компоненты смешивали в эквимольных соотношениях. В смесях (II), (IV) и (V) использовали <sup>32</sup>P-меченый ундекануклеотид, который брали в 1,5-кратном недостатке по отношению к немеченым компо-

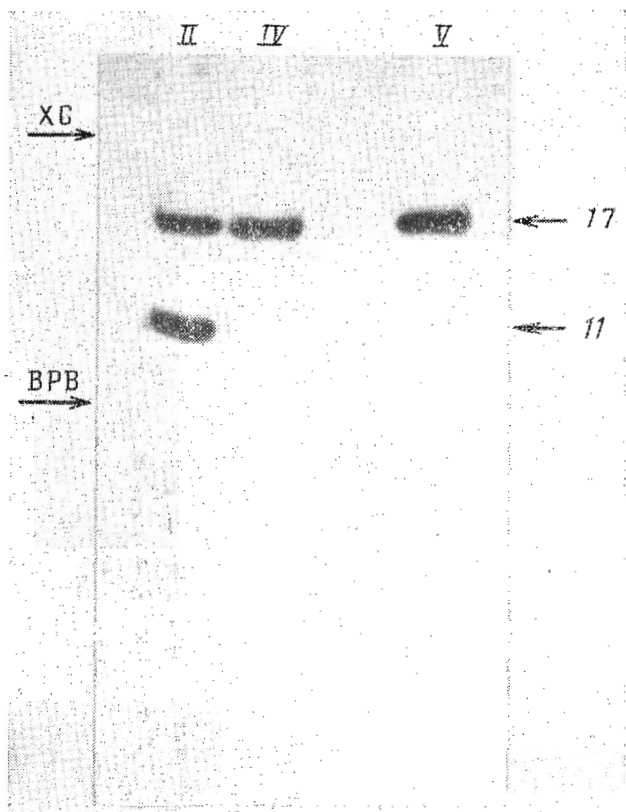


Рис. 3. Радиоавтограф электрофореза в 20% ПААГ реакционных смесей после химического лигирования в дуплексах (II), (IV) и (V) через 2 сут инкубации. Над дорожками обозначены номера соответствующих дуплексов. Цифры справа указывают длину олигонуклеотидов. ХС — ксиленианол, ВРВ — бромфеноловый синий

нентам. Анализ всех реакционных смесей проводили через одинаковые промежутки времени с помощью электрофореза в ПААГ.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что химическое лигирование протекает эффективно во всех реакционных смесях. На рис. 3 в качестве примера приведен радиоавтограф электрофореза в ПААГ реакционных смесей (II), (IV) и (V) через 2 сут инкубации. На рис. 4 и 5 суммированы кривые накопления продуктов химического лигирования во всех изученных дуплексах. Из представленных данных видно, что скорость химического лигирования сильно зависит от нуклеофильности группы, атакующей активированный фосфат, что согласуется с полученными ранее данными на конкатемерных системах [2, 3]. Замена 3'-гидроксильной группы в участке «сшивания» на амино- или фосфогруппу приводит к 70- или 45-кратному увеличению начальной скорости реакции соответственно (рис. 4, 5). Выход гептадекануклеотида с пирофосфатной или фосфоамидной межнуклеотидной связью близок к 100% уже через 6 ч инкубации, причем скорость образования фосфоамидной связи выше, чем пирофосфатной. Термическая устойчивость всех изученных дуплексов практически одинакова [4], т. е. введение «лишней» фосфатной группы или замена гидроксильной группы на аминогруппу в месте разрыва не сказывается существенно на термодинамических и геометрических параметрах спирали, хотя очевидно, что взаимная ориентация и сближенность реагирующих групп в этих случаях будут иными, чем в узле гидроксил — фосфат. В связи с этим можно считать, что увеличение скорости реакции в в дуплексах (III)—(V) обусловлено главным образом увеличением нуклеофильности групп, атакующих активированный фосфат.

Сопоставление скоростей химического лигирования в дуплексах (I) и (II), а также (III) и (IV) (табл. 1), различающихся положением нуклео-

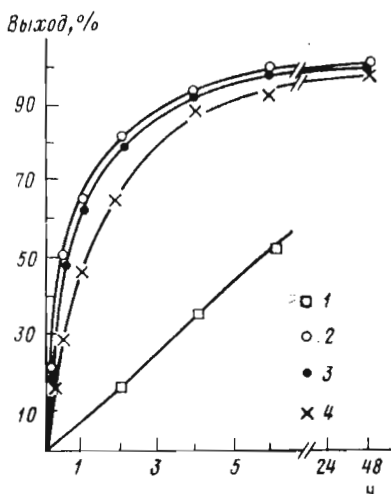


Рис. 4

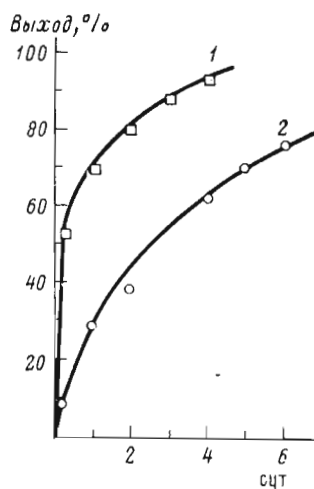


Рис. 5

Рис. 4. Кривые накопления продуктов химического лигирования в дуплексах (I) (1), (II) (2), (IV) (3), (V) (4)

Рис. 5. Кривые накопления продуктов химического лигирования в дуплексах (I) (1) и (II) (2)

фильной группы в реакционном узле, показывает, что новая межнуклеотидная связь образуется быстрее, если гидроксильная или аминогруппа находятся в 5'-положении олигомера (смеси (I) и (II), табл. 1). Так, начальная скорость образования фосфодиэфирной связи в дуплексе (I) в 10 раз выше, чем в дуплексе (II). Однако при образовании фосфоамидной связи скорости реакции, обусловленные положением аминогруппы, различаются в 1,4 раза, т. е. значительно меньше, чем при образовании фосфодиэфирной связи (см. рис. 4, 5). По-видимому, с ростом нуклеофильности различия в реакционной способности 3'- или 5'-концевых групп, связанные с химическим строением и конформационными особенностями, такими, как экспонированность, гибкость, пространственная ориентация и т. д., нивелируются. В работах Оргела и др. [8] также было показано, что в матрично-направленных реакциях сильные нуклеофилы могут активно реагировать даже при ориентации взаимодействующих групп, далекой от оптимальной.

Для доказательства природы образующихся при конденсациях в дуплексах (III)–(V) межнуклеотидных связей аномального типа — фосфоамидных и пирофосфатных — было проведено избирательное расщепление модифицированных межнуклеотидных связей в полученных продуктах (комплементарные цепи образующихся дуплексов не разделяли): в первом случае — 15% уксусной кислотой, во втором — трифторуксусным ангидридом. Полученные после обработки смеси анализировали методом МКХ. В обоих случаях продукты реакции полностью расщеплялись до исходных олигонуклеотидов (рис. 6). Первичная структура гептадекануклеотидов, полученных химическим лигированием в дуплексах (I) и (II), подтверждена методом Максама — Гилберта (рис. 7).

Для изучения возможностей сборки модифицированных ДНК-дуплексов с помощью ДНК-лигазы были использованы дуплексы (IV) и (V) (табл. 1), содержащие 5'-фосфорилированный ундекануклеотид. Дуплекс (II), образованный немодифицированными олигонуклеотидами, использовался как контрольный. Полученные результаты представлены на рис. 8. Оказалось, что фермент не способен синтезировать неприродные межнуклеотидные связи. На рис. 8 видно, что в результате реакции с ДНК-лигазой образовались новые  $^{32}\text{P}$ -меченые продукты, отличающиеся по подвижности в ПААГ от исходного  $^{32}\text{P}$ -меченого ундекануклеотида. На основании литературных данных [9, 10] этим соединениям может быть приписана

Рис. 6. Анализ методом МКХ продукта химического лигирования в дуплексе (III) до (а) и после (б) обработки 15% уксусной кислотой. Пик на рис. 6а соответствует дуплексу (III) после «сливания». Рис. 6б: пик 1 — d (ACGGATp), пик 2 — d (NH<sub>2</sub>CCAGGAGTGAC), пик 3 — d (CACTCCTGGATCCG)

Рис. 7. Анализ по методу Максама — Гилберта нуклеотидной последовательности продукта химического лигирования в дуплексе (II)

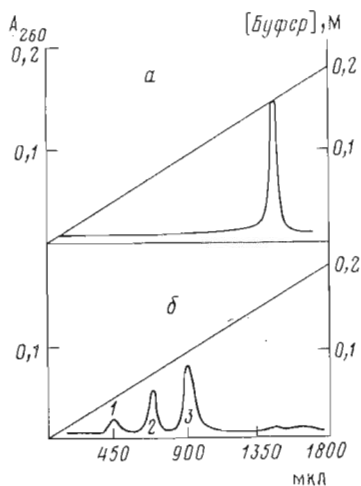


Рис. 6

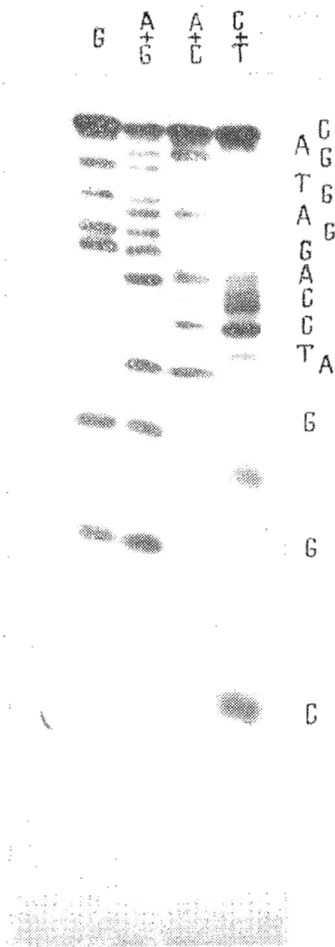


Рис. 7

структура смешанного ангидрида АМР и исходного ундекануклеотида. По-видимому, в этих случаях образуется каталитически неактивный фермент-субстратный комплекс, в котором не может реализоваться атака фосфо- или аминогруппами активированного фосфата (в силу чужеродной химической природы нуклеофила и (или) геометрического несоответствия реагирующих групп). Дальнейшее изучение таких субстратоподобных ингибиторов ДНК-лигазы может дать ценную информацию о стереохимических и энергетических особенностях ее активного центра.

Полученные данные показывают, что химическое лигирование является в настоящее время наиболее реальным методом введения неприродных межнуклеотидных связей в заданное положение ДНК-дуплексов. Замена гидроксильной группы на более нуклеофильные фосфо- и аминогруппы приводит к значительному ускорению реакции матрично-направленной конденсации олигодезоксинуклеотидов под действием карбодимида. Выход продуктов лигирования при этом близок к количественному через 6 ч инкубации.

Полученные ДНК-дуплексы с фосфоамидными или пиродифосфатными связями в настоящее время используются для изучения субстратной специфичности и механизма действия эндонуклеазы рестрикции *EcoRII*. Такого рода исследования выполнялись ранее на конкатемерных модифицированных дуплексах [11].

Авторы выражают благодарность В. Л. Друце за помощь при работе с мечеными олигонуклеотидами.

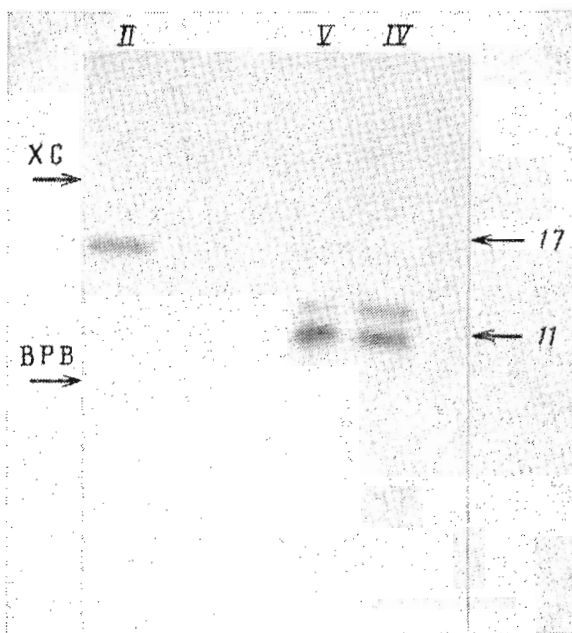


Рис. 8. Радиоавтограф электрофореза в 20% ПААГ продуктов ферментативного лигирования в дуплексах (II), (IV) и (V). Обозначения см. в подписи к рис. 3

### Экспериментальная часть

В работе использовали 2-морфолиноэтансульфонат, гидрохлорид 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид, трис, акриламид, Lichrosorb-NH<sub>2</sub> с частицами 10 мкм (Merck, ФРГ); N,N'-метиленбисакриламид (BDH, Англия); N,N,N',N'-тетраметилендиамин (Serva, США); [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ (Изотоп, СССР), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), Т4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1).

Были использованы следующие буферные растворы: 50 мМ MES (рН 6,0), 20 мМ MgCl<sub>2</sub>(А); для Т4-полинуклеотидкиназы 50 мМ трис-НСl (рН 9,0), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ дитиотреит, 2 мМ спермидин (В); для Т4-ДНК-лигазы 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мМ EDTA, 10 мМ 2-меркаптоэтанол (С).

Микроколоночную хроматографию проводили на сорбенте Lichrosorb-NH<sub>2</sub> в градиенте концентраций натрий-фосфатного буфера (0—0,2 М), рН 7, в присутствии 7 М мочевины. Выход олигонуклеотидов после конденсации рассчитывали по отношению площади пика конечного продукта к суммарной площади пиков исходных олигонуклеотидов и продукта.

Электрофорез осуществляли в 20% полиакриламидном геле толщиной 0,3 или 0,5 мм в присутствии 7 М мочевины в трис-боратном буфере, рН 8,3, при постоянном напряжении 1000 В. Выход продукта конденсации определяли по отношению его радиоактивности к суммарной радиоактивности исходного 5'-<sup>32</sup>Р-ундекануклеотида и продукта.

5'-<sup>32</sup>Р-Фосфорилирование олигонуклеотидов проводили в 10 мкл буфера В, содержащего 0,1 мМ олигонуклеотид, 10 мКи [ $\gamma$ -<sup>32</sup>Р]АТФ и 1 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы при 37° С в течение 20 мин. 5'-<sup>32</sup>Р-Олигонуклеотиды выделяли электрофорезом в 20% ПААГ.

Химическое лигирование в дуплексах с помощью карбодимидов проводили в буфере А при концентрации дуплекса и карбодимидов 0,1 мМ и 0,2 М соответственно. Реакционные смеси инкубировали в темноте при 0° С. По окончании инкубации олигонуклеотидную фракцию осаждали этанолом и анализировали.

Ферментативное лигирование олигонуклеотидов в аналитическом варианте осуществляли в 10 мкл буфера С, содержащего по 0,1 мМ гекса-



и тетрадекануклеотидов, 0,07 мМ 5'-<sup>32</sup>P-ундекануклеотида, 1 мМ АТР и 5 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы. Смесь инкубировали при 8° С в течение 12 ч. Реакцию останавливали добавлением EDTA до конечной концентрации 20 мМ. Смесь выдерживали 30 мин при комнатной температуре, концентрировали в вакууме до минимального объема и анализировали электрофорезом в ПААГ.

*Гидролиз фосфоамидной связи.* 0,1 ОЕ<sub>260</sub> дуплекса, содержащего гептадекануклеотид с фосфоамидной связью, растворяли в 10 мкл 15% СН<sub>3</sub>СООН и выдерживали на водяной бане 5 мин при 95° С. Раствор упаривали, следы уксусной кислоты удаляли многократным упариванием со спиртом и анализировали методом МКХ.

*Гидролиз пиродифосфатной связи.* 0,2 ОЕ<sub>260</sub> дуплекса, содержащего гептадекануклеотид с пиродифосфатной связью, растворяли в 15 мкл смеси пиридин — вода, 9 : 1, и обрабатывали 10 мкл свежеперегнанного трифторуксусного ангидрида. Раствор выдерживали 20 мин при комнатной температуре. Олигонуклеотидную фракцию осаждали спиртом и анализировали методом МКХ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Shabarova Z. A.* In: Physicochemical biology reviews, Soviet Scientific Reviews. Section D./Ed. Skulachev V. P. Harwood Acad. Publ. GmbH, 1984, p. 1—51.
2. *Исагулянц М. Г., Ивановская М. Г., Потапов В. К., Шабарова З. А.* Биоорганическая химия, 1985, т. 11, № 2, с. 239—247.
3. *Пурмаль А. А., Друца В. Л., Шабарова З. А.* Биоорганическая химия, 1984, т. 10, № 3, с. 394—400.
4. *Грязнова О. И., Долинная Н. Г., Исагулянц М. Г., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Удалов Н. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А.* Биоорганическая химия, 1986, т. 12, № 1, с. 124—131.
5. *Ibrahim I. T., Williams A. J.* Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, № 23, p. 7420—7421.
6. *Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Druza V. L., Melnicova N. P., Pурmal A. A.* Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 21, p. 5747—5761.
7. *Асланян В. М., Бабаян Ю. С., Арутюнян С. Г.* Биофизика, 1984, т. XXIX, вып. 3, с. 372—376.
8. *Zielinski W. S., Orgel L. E.* Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, № 7, p. 2469—2484.
9. *Deugau K. V., Sande J. H.* Biochemistry, 1978, v. 17, № 4, p. 723—729.
10. *Sgaratella V., Khorana H. G.* J. Mol. Biol., 1972, v. 72, № 2, p. 427—444.
11. *Пурмаль А. А., Виноградова М. Н., Елов А. А., Громова Е. С., Друца В. Л., Метелев В. Г., Холодков О. А., Бурьянов Я. И., Шабарова З. А.* Докл. АН СССР, 1984, т. 276, № 4, с. 992—995.

Поступила в редакцию  
26.XI.1985

#### CHEMICAL REACTIONS IN NUCLEIC ACID DUPLEXES. I. CHEMICAL LIGATION AS A METHOD FOR INTRODUCTION OF PHOSPHOAMIDE AND PYROPHOSPHATE INTERNUCLEOTIDE BONDS INTO DNA DUPLEXES

DOLINNAYA N. G., GRYAZNOVA O. I., SOKOLOVA N. I., SHABAROVA Z. A.

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

It was shown that short DNA duplexes with a nick are the suitable models for obtaining quantitative characteristics of chemical ligation reactions and for studying the possibilities of the method for introducing selective modifications into the DNA sugar-phosphate backbone. Optimal conditions for DNA duplex assembly using a water-soluble carbodiimide were developed. The substitution of amino- or phospho-group for a 3'-hydroxyl group at the joining site was demonstrated to result in a 70- or 45-fold acceleration of the reaction, respectively. The amino group position (3' or 5') had no tangible effect on the reaction rate. The yield of modified DNA duplexes attained 96—100% within 6 hours. DNA ligase was not capable of catalyzing unnatural, phosphoamide and pyrophosphate, bond formation in the assembly of these duplexes.