



УДК 577.113.4

## ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУХСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

## II. ВВЕДЕНИЕ ТОЧЕЧНЫХ МОДИФИКАЦИЙ В САХАРО-ФОСФАТНЫЙ ОСТОВ ДНК

*Долгина 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*

На серии коротких ДНК-дуплексов, различающихся структурой примыкающих к единичному разрыву звеньев, проведено сравнительное изучение химического (с помощью водорастворимого карбодимида) и ферментативного (ДНК-лигаза) лигирования. Методом химического лигирования с выходами 25—85% получены ДНК-дуплексы с точечными модификациями сахаро-фосфатного остова. Модификации включали замену природной связи на связь между рибо- и дезоксирибонуклеотидными остатками, на фосфодиэфирную связь, конформационно-измененную некомплементарными А·А- или А·С-парами, или пропуском одного нуклеотидного звена, а также на пирофосфатную связь через пропущенное звено. Установлено, что в дуплексе с гибридной rU·dA-парой образуется исключительно 3',5'-фосфодиэфирная связь. Именно этот дуплекс среди всех изученных модифицированных дуплексов оказался субстратом ДНК-лигазы.

Метод химического лигирования [1], разрабатываемый в нашей лаборатории, позволяет получать различные двухспиральные ДНК с точечными модификациями. Этим методом получены [2, 3] и уже активно используются в молекулярно-биологических исследованиях [4] модифицированные ДНК, содержащие наряду с природными, фосфодиэфирными, также и неприродные — пирофосфатные или фосфоамидные связи. В настоящей работе изучены возможности метода химического лигирования для введения других модификаций в сахаро-фосфатный остов нуклеиновых кислот. Объектом исследования служила серия коротких ДНК-дуплексов, образованных 14-звенным олигонуклеотидом-матрицей, комплементарным ей 11-звенным олигонуклеотидом и рядом гекса(пента)нуклеотидов, различающихся структурой примыкающих к разрыву звеньев (см. таблицу). Такой набор дуплексов позволяет корректно сравнить скорости образования природной межнуклеотидной связи и серии модифицированных связей — фосфодиэфирной между рибо- и дезоксирибонуклеотидными остатками, а также фосфодиэфирных связей, конформационно-измененных некомплементарными парами (А·А, А·С) или делецией нуклеотидного звена в одной из цепей, и, кроме того, пирофосфатной связи через пропущенное звено. Изучение химического лигирования на коротких ДНК-дуплексах с контролируемой структурной аномалией вблизи разрыва позволило бы также оценить зависимость эффективности этой реакции от пространственного расположения реагирующих групп. В комплементарном комплексе эти группы сближены и ориентированы за счет сил, стабилизирующих двойную спираль. Можно предположить, что незначительные изменения в конформации взаимодействующих групп, индуцированные какими-либо структурными аномалиями вблизи реакционного узла, могут значительно увеличить или уменьшить число реакционноспособных конформеров и тем самым изменить эффективность химического лигирования. Интерес к таким исследованиям особенно возрастает в связи с тем, что

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

Структура исследованных ДНК-дуплексов \*

№	Первичная структура олигонуклеотидов, образующих дуплекс	Структура узла «сшиванги»
(I)	5' A-C-G-G-A-T ↓* pC-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C 3' G-C-C-T-A -G-G-T-C-C-T-C-A-C	$\begin{array}{c} \text{---A---} \quad \text{---G---} \\   \quad \quad   \\ \text{T} \quad \quad \text{C} \\   \quad \quad   \\ \text{---OH} \quad \text{p---} \\ \dots \quad \dots \end{array}$
(II)	A-C-G-G-A-A ↓ pC-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C G-C-C-T-A -G-G-T-C-C-T-C-A-C	$\begin{array}{c} \text{---A---} \quad \text{---G---} \\   \quad \quad   \\ \text{A} \quad \quad \text{C} \\   \quad \quad   \\ \text{---OH} \quad \text{p---} \\ \dots \quad \dots \end{array}$
(III)	A-C-G-G-A-C ↓ pC-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C G-C-C-T-A -G-G-T-C-C-T-C-A-C	$\begin{array}{c} \text{---A---} \quad \text{---G---} \\   \quad \quad   \\ \text{C} \quad \quad \text{C} \\   \quad \quad   \\ \text{---OH} \quad \text{p---} \\ \dots \quad \dots \end{array}$
(IV)	A-C-G-G-A-rU ↓ pC-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C G-C-C-T-A -G-G-T-C-C-T-C-A-C	$\begin{array}{c} \text{---A---} \quad \text{---G---} \\   \quad \quad   \\ \text{U} \quad \quad \text{C} \\   \quad \quad   \\ \text{---OH} \quad \text{p---} \\ \dots \quad \dots \end{array}$
(V)	A-C-G-G-Ap ↓ pC-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C G-C-C-T-A-A-G-G-T-C-C-T-C-A-C	$\begin{array}{c} \text{---T---A---G---} \\   \quad \quad   \\ \text{A} \quad \quad \text{C} \\   \quad \quad   \\ \text{---p} \quad \text{p---} \\ \dots \quad \dots \end{array}$
(VI)	A-C-G-G-A ↓ pC-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C G-C-C-T-A-A-G-G-T-C-C-T-C-A-C	$\begin{array}{c} \text{---T---A---G---} \\   \quad \quad   \\ \text{A} \quad \quad \text{C} \\   \quad \quad   \\ \text{---OH} \quad \text{p---} \\ \dots \quad \dots \end{array}$
(VII)	A-C-G-G-Ap ↓ C-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C G-C-C-T-A-A-G-G-T-C-C-T-C-A-C	$\begin{array}{c} \text{---T---A---G---} \\   \quad \quad   \\ \text{A} \quad \quad \text{C} \\   \quad \quad   \\ \text{---p} \quad \text{HO---} \\ \dots \quad \dots \end{array}$

\* Префикс d взде опущен; стрелкой показано место одноцепочечного разрыва. Звездочкой обозначен <sup>32</sup>P-фосфат.

в живых объектах был обнаружен прецедент протекания реакций направленного расщепления и образования новых межнуклеотидных связей в пространственно-организованном комплексе без участия фермента, так называемый самосплайсинг РНК [5].

На всем наборе дуплексов, приведенных в таблице, представлялось целесообразным провести сравнительное изучение субстратной специфичности химического реагента — водорастворимого 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид (далее — карбодимид) и ДНК-лигазы.

Синтез ДНК-дуплексов, их физико-химическая характеристика, а также определение оптимальных условий химического лигирования в данных системах описаны ранее [3, 6].

Реакционные смеси, содержащие 5'-фосфорилированный ундекануклеотид (дуплексы (I)—(VI), таблица), анализировали электрофорезом в ПААГ. Для этого предварительно в ундекануклеотид вводили радиоактивную метку и <sup>32</sup>P-меченый компонент использовали в 1,5-кратном недостатке по

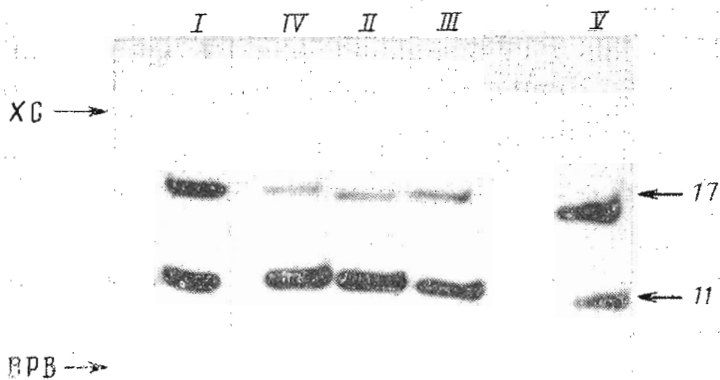


Рис. 1. Радиоавтограф 20% ПААГ после электрофореза реакционных смесей, содержащих дуплексы (I) — (V) через 2 сут инкубации с карбодимидом. Условия реакции см. в «Экспер. части». Над дорожками обозначены номера соответствующих дуплексов. Цифры справа указывают длину олигонуклеотидов. ХС — ксеплещанол, ВРВ — бром-феноловый синий

отношению к немеченым олигомерам. В случае дуплекса (VII) реакционную смесь после химического лигирования анализировали хроматографией на сорбенте Lichrosorb-NH<sub>2</sub> в градиенте фосфатного буфера в 7 М мочеvine. Отбор проб проводили через определенные промежутки времени в течение 6 сут. На рис. 1 приведен радиоавтограф после электрофореза в ПААГ реакционных смесей через 2 сут инкубации, а на рис. 2 — кривые накопления продуктов химического лигирования в исследуемых системах. Видно, что во всех дуплексах со структурными аномалиями, вносящими локальные искажения в макромолекулярную структуру двойной спирали, идет образование гента(гекса)декануклеотидов, хотя и медленней и с меньшими выходами, чем в немодифицированном дуплексе (I) (рис. 1, 2). Наименее эффективно конденсация идет в дуплексах (VI) и (VII), в которых в месте разрыва отсутствует один нуклеозид. Через 6 сут выход продукта химического лигирования в дуплексе (VII) составляет 25%, а в дуплексе (VI) регистрируются лишь следовые количества гексадекануклеотида. Как было показано [7], в ДНК-дуплексах, не содержащих разрыва, «лишнее» основание пуринового типа встраивается в двойную спираль, при этом происходит деформация фосфодиэфирной связи на противоположной цепи, сопровождаемая нарушением стэкинг-взаимодействия между основаниями. В нашем случае «неспаренным» нуклеозидом является аденозин, к тому же ковалентная связь между «сшиваемыми» 5- и 11-звеньными олигонуклеотидами отсутствует, что и приводит к образованию брешки в дефектной цепи. О нарушении стэкинг-взаимодействия между пента- и ундекануклеотидами свидетельствует резкая дестабилизация комплекса (VII) по сравнению с немодифицированным трехкомпонентным комплексом [6]. По-видимому, именно недостаточная сближенность реагирующих групп в дуплексе (VII) является причиной низкой эффективности химического лигирования. Введение еще одной фосфатной группы в место

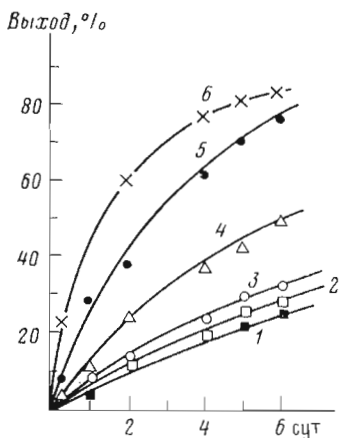


Рис. 2. Кривые накопления продуктов химического лигирования в дуплексах (I) — (V), (VII). 1 — дуплекс (VII), 2 — дуплекс (IV), 3 — дуплекс (II), 4 — дуплекс (III), 5 — дуплекс (I), 6 — дуплекс (V)

разрыва путем 5'-фосфорилирования ундекануклеотида (дуплекс (V), таблица), во-первых, частично заполняет брешь, во-вторых, приводит к замене 5'-гидроксильной группы в лигируемом участке на более сильный нуклеофил-фосфатную группу. Начальная скорость образования межунклеотидной пирофосфатной связи в дуплексе (V) в 10 раз выше скорости химического лигирования в дуплексе (VII) и даже превышает скорость образования фосфодиэфирной связи в немодифицированном дуплексе (I) (рис. 2).

Химическое лигирование в дуплексах (II) и (III), содержащих соответственно некомплементарные А·А- и А·С-пары, протекает заметно хуже, чем в немодифицированном дуплексе (I) (начальная скорость реакции уменьшается в 3,5 раза в случае (II) и в 2,5 раза в случае (III)). Низкая эффективность реакции в этих дуплексах (рис. 1, 2), вероятно, обусловлена тем, что наиболее термодинамически выгодная конформация взаимодействующих фрагментов сахара-фосфатного остова, заданная макромолекулярной структурой их двойных спиралей, менее благоприятна для протекания реакции, чем в полностью комплементарном дуплексе. Влияние некомплементарных пар на конформацию, кинетические и термодинамические параметры двухспиральных ДНК было подробно изучено в ряде работ [8—10]. Авторы показали, что наличие неканонической пары вызывает сильную дестабилизацию 12—16-звенных синтетических ДНК-дуплексов. В зависимости от природы гетероциклических оснований и ближайшего нуклеотидного окружения «ошибочные» пары либо встраиваются в двойную спираль, вызывая некоторые нарушения межплоскостных взаимодействий с соседями, либо частично «выщипываются» из спирали. Нуклеозидные остатки «ошибочных» пар внутри двухспиральных комплексов находятся в *анти*-конформации, основания существуют в обычных таутомерных формах. Для всех аномальных включений зафиксировано искажение сахара-фосфатного остова, причем наибольшие конформационные отклонения наблюдаются вблизи А·А- и А·С-пар, т. е. именно тех некомплементарных пар, которые включены в исследуемые нами дуплексы (II) и (III) (таблица). На основании данных по химическому лигированию в комплексах (II) и (III) можно заключить, что неканонические пары, примыкающие к одноцепочечному разрыву, индуцируют отклонение конформации фосфо- и гидроксильных групп от оптимальной для протекания реакции. Очевидно также, что в дуплексах (II) и (III) взаимодействующие группы не получили дополнительных степеней свободы для увеличения числа реакционноспособных конформеров.

Интересные данные с точки зрения стереохимии реакции были получены при исследовании химического лигирования в дуплексе (IV) (см. таблицу), содержащем гибридную  $gU \cdot dA$ -пару. Как видно из рис. 1 и 2, эффективность химического лигирования в этой системе невелика — выход гептадекануклеотида через 6 сут составляет ~30%. Известно, что 2'-гидроксильные группы увеличивают реакционную способность и ограничивают конформационные возможности РНК по сравнению с ДНК. На основании работ [11, 12], в которых изучалась конформация двухспирального комплекса, содержащего ковалентно связанные фрагменты РНК и ДНК, можно предположить, что углеводные кольца гибридной  $gU \cdot dA$ -пары в дуплексе (IV) будут иметь конформацию, характерную для А-формы нуклеиновых кислот. Соседний же участок дуплекса, образованный ундекануклеотидом и отделенный от гексануклеотида одноцепочечным разрывом, будет находиться в В-форме. Соседство двух различных конформаций, как было показано на молекулярных моделях [13], приводит

к небольшим пространственным искажениям — изгибу двойной спирали на границе двух форм, причем в этой области могут иметь место деформации сахаро-фосфатных связей. Повидимому, закрепленность неблагоприятной для химического лигирования конформации реагирующих групп и является причиной низкой эффективности этой реакции в дуплексе (IV). Однако интересно, что образовавшийся гептадекануклеотид нацело гидролизует РНКазой А (12 ч, 37°C). РНКазный гидролизат  $d(ACGGA)rU^*pd(CCAGGAGTGAC)$  анализировали электрофорезом в ПААГ (рис. 3). При этом единственным  $^{32}P$ -меченым продуктом оказался гексануклеотид —  $d(ACGGA)rU^*p$ . Эти данные однозначно показывают, что в результате химического лигирования в дуплексе (IV) образуется исключительно 3',5'-фосфодиэфирная связь, т. е. достигается стереоспецифичность, характерная, как правило, только для ферментативных реакций. То, что в этом дуплексе активированный фосфат атакуется только 3'-гидроксильной группой, определяется, вероятно, стерическими ограничениями, связанными с комплексообразованием.

Первичная структура олигонуклеотидов, полученных методом химического лигирования, подтверждена анализом по Максаму — Гилберту.

Следующий этап работы включал изучение возможности сборки модифицированных ДНК с помощью фермента — ДНК-лигазы. Для этого были использованы дуплексы (I) — (VI), содержащие 5'-фосфорилированный ундекануклеотид. Дуплекс (I), образованный комплементарными олигодезоксинуклеотидами, использовался как контрольный. Полученные результаты представлены на рис. 4. Оказалось, что ферментативное лигирование, кроме контрольного, идет только в дуплексе (IV), содержащем гибридную  $rU \cdot dA$ -пару. В отличие от контрольной смеси, в которой субстрат утилизируется полностью, выход продукта с неприродной связью между рибо- и дезоксирибонуклеотидными звеньями не превышает 80% (за тот же промежуток времени). Как и следовало ожидать, в результате ферментативной реакции между остатками  $rU$  и  $dC$  образуется только 3',5'-фосфодиэфирная связь. Это доказано, как и в случае химического лигирования, гидролизом продукта РНКазой А. Следует отметить, что в литературе описан [13] ферментативный синтез блок-полимеров типа  $rG_i \cdot dG_k$  (где  $i$  варьирует от 10 до 60, а  $k$  — от 10 до 48) на матрице  $poly(dC)$ .

Имеются данные о том, что Т4-ДНК-лигаза ликвидирует одноцепочечные бреши размером от 1 до 100 нуклеотидных звеньев в природных ДНК [14]. Однако этот процесс мало эффективен (выход до 10%) и протекает в специально подобранных условиях, к тому же размер бреши не контролировался. В исследуемых нами дуплексах (II), (III), (V) и (VI) ДНК-лигаза оказалась неактивна (рис. 4). Полученные данные представляют большой интерес для изучения активного центра этого фермента и его субстратной специфичности. Не кажется удивительным, что фермент не активен при синтезе неприродной пирофосфатной связи через нуклеотидное звено (дуплекс (V), таблица). Однако он не способен катализировать образование и природных фосфодиэфирных связей, если конформацион-

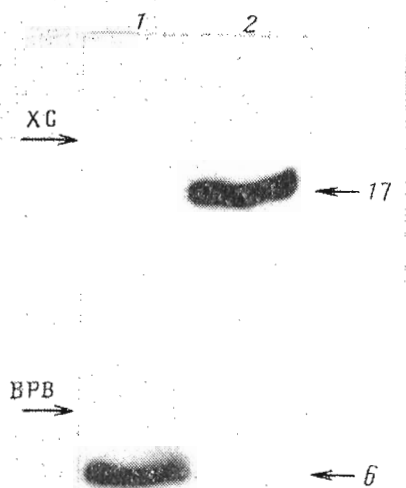


Рис. 3. Радиоавтограф 20% ПААГ после электрофореза  $d(ACGGA)rU^*pd(CCAGGAGTGAC)$  до (2) и после (1) гидролиза рибонуклеазой А. Условия см. в «Экспер. части». Обозначения см. подпись к рис. 1

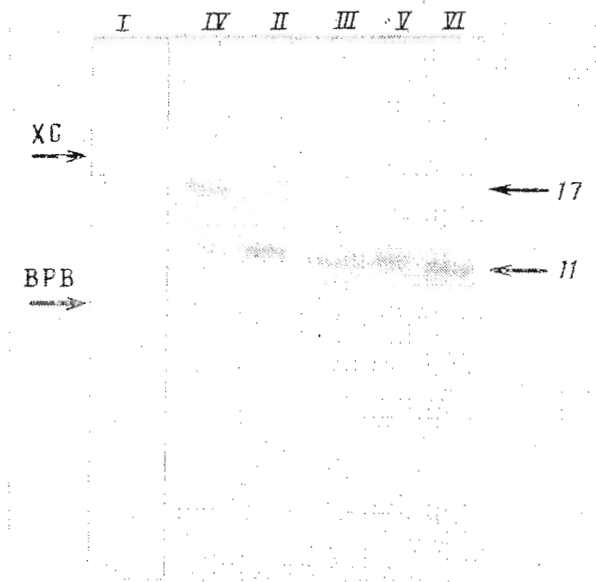


Рис. 4. Радиоавтограф 20% ПААГ после электрофореза продуктов ферментативного лигирования в дуплексах (I)–(VI). Обозначения см. подпись к рис. 1

ная ситуация в реакционном узле изменена, например, введением неканонической пары (дуплексы (II) и (III), см. таблицу) или пропуском одного нуклеозидного звена (дуплекс (VI)). ДНК-лигаза в данных случаях не может подстраивать геометрию реагирующих групп под геометрию своего активного центра. По-видимому, отбраковка таких субстратов происходит на стадии образования фермент-субстратных комплексов.

Таким образом, из результатов работы следует, что с помощью карбодимида можно получать ДНК- и ДНК-РНК-гибридные дуплексы с широким спектром модификаций сахаро-фосфатного остова; ферментативный подход во всех рассмотренных случаях, за исключением образования 3',5'-фосфодиэфирной связи между рибо- и дезоксирибонуклеотидными звеньями, оказался неэффективным. Изменение конформационной ситуации в реакционном узле, обусловленное введением «ошибочного» нуклеозида (дуплексы (II) и (III), таблица) или пропуском одного нуклеозидного звена в «сшиваемой» цепи (дуплексе (VI), таблица), уменьшает скорость образования фосфодиэфирной связи по сравнению со скоростью этой реакции в полностью комплементарном дуплексе.

По-видимому, для таких систем факторами, определяющими скорость и эффективность химического лигирования, являются взаимная ориентация и сближенность реагирующих групп, поскольку их природа и сольватационные эффекты остаются постоянными. Можно считать, что наиболее благоприятной для протекания этой реакции является конформация фосфатной и гидроксильной групп, обусловленная В-формой двойной спирали (канонический конформер). Отклонения от этой структуры вызывают замедление реакции, и по эффективности химического лигирования можно судить о степени отклонения конформации модифицированного узла от канонической.

Под действием химического агента происходит соединение рибо- и дезоксирибонуклеотидных звеньев. Этот процесс, хотя и малоэффективен, но строго специфичен — в результате реакции образуется только 3',5'-фосфодиэфирная связь. Не исключено, что, изменяя взаимную ориентацию реагирующих групп, например проводя «сшивание» олигорибонуклеотидов на дезоксирибонуклеотидной матрице (А-форма спирали) или увеличивая размеры рибонуклеотидного блока в гибридном дуплексе, можно целенаправленно влиять на скорость и селективность образования межнуклео-

тидных связей с участием рибонуклеозидов. Метод химического лигирования может оказаться также перспективным для развития генетической инженерии РНК.

### Экспериментальная часть

В работе использовали 2-морфолиноэтансульфонат, гидрохлорид 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимида, трис, акриламид, Lichrosorb-NH<sub>2</sub>, 10 мкм (Merck, ФРГ); N,N'-метиленабисакриламид (BDH, Англия), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ с уд. акт. 1000 Ки/ммоль (Изотоп, СССР), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 7.1.78), Т4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1; НИКТИ БВАВ, Бердск), РНКазу А (КФ 3.1.27.5; Reanal, Венгрия).

Условия микроколоночной хроматографии на сорбенте Lichrosorb-NH<sub>2</sub> и электрофореза в ПААГ, а также методика  $5'$ -<sup>32</sup>P-фосфорилирования олигонуклеотидов описаны ранее [3].

*Химическое лигирование* в дуплексах проводили в 0,05 М MES-буфере, рН 6,0, содержащем 0,02 М MgCl<sub>2</sub>. Нуклеотидная концентрация (в расчете на мономер) составляла 10<sup>-3</sup> М, концентрация карбодиимида 0,2 М. Смеси инкубировали в темноте при 0° С. По окончании инкубации олигонуклеотидную фракцию осаждали этанолом и анализировали.

*Ферментативное лигирование* проводили по методике [3].

*Гидролиз РНКазой А.* К 5 мкл раствора олигонуклеотида добавляли 5 мкл раствора РНКазы А (1 мг/мл) в 0,1 М трис-НСl, рН 7,8, и смесь выдерживали 20 ч при 37° С. Фермент экстрагировали 40 мкл смеси хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1). Олигонуклеотидную фракцию осаждали спиртом и анализировали электрофорезом в ПААГ.

### 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. *Пурмаль А. А., Друца В. Л., Шабарова З. А.* Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 3, с. 394—400.
3. *Долинная Н. Г., Грязнова О. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А.* Биоорг. химия, 1986, т. 12, № 6, с. 755—763.
4. *Пурмаль А. А., Виноградова М. Н., Ёлов 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.
5. *Kryger K., Grobowski R. J., Zang A. L., Sands J., Cottscheing D. E., Cech S. R.* Cell, 1982, v. 31, № 5, p. 147—157.
6. *Грязнова О. И., Долинная Н. Г., Исагуляц М. Г., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Удалов Н. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А.* Биоорг. химия, 1986, т. 12, № 1, с. 124—131.
7. *Patel D. J., Kozlowski S. A., Marky L. A., Rice J. A., Broka C., Itakura K.* Biochemistry, 1982, v. 21, № 3, p. 445—450.
8. *Patel D. J., Kozlowski S. A., Ikuta S., Itakura K.* Biochemistry, 1984, v. 23, № 14, p. 3207—3217.
9. *Patel D. J., Kozlowski S. A., Ikuta S., Itakura K.* Biochemistry, 1984, v. 23, № 14, p. 3218—3226.
10. *Tibanyenda N., de Bruin S. H., Haasnoot A. G., van der Marel G. A., van Boom J. H., Hibbers C. W.* Eur. J. Biochem., 1984, v. 139, № 1, p. 19—27.
11. *Mellema J.-R., Haasnoot C. A. G., van der Marel G. A., Wille G., van Boeckel C. A. A., van Boom J. H., Altona C.* Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 16, p. 5717—5738.
12. *Wang A. H.-J., Fujii S., van Boom J. H., van der Marel G. A., van Boeckel C. A. A., Rich A.* Nature, 1982, v. 299, № 5884, p. 601—604.
13. *Selsing E., Wells R. D. J.* Biol. Chem., 1979, v. 254, № 12, p. 5410—5416.
14. *Nilsson S. V., Magnusson G.* Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 5, p. 1425—1437.

Поступила в редакцию  
5.XII.1985

CHEMICAL REACTIONS IN NUCLEIC ACID DUPLEXES. II. SELECTIVE  
MODIFICATIONS OF THE DNA SUGAR-PHOSPHATE BACKBONE

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*

A comparative investigation of chemical (with the aid of water-soluble carbodiimide) and enzymatic (DNA ligase) ligation was carried out on a series of short DNA-duplexes adjoining the nick. DNA-duplexes with a selective modification of the sugar-phosphate backbone were obtained by chemical ligation with the 25—85% yields. Modification included substitution of the natural bond for that linking ribo- and deoxyribonucleotide residues, or for phosphodiester bond conformationally changed either by non-complementary A·A- and A·C pairs or by deletion of one nucleoside. Another modification of natural bond involved a pyrophosphate bond across the deleted unit. It was found that in a duplex with the hybrid dA·rU-pair, 3',5'-phosphodiester bond was formed exclusively. DNA-ligase proved ineffective in all the investigated cases, except for bond formation between ribo- and deoxyribonucleotide residues.