



УДК 577.152.651'14

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ КОРОТКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ V*. ЛИГИРОВАНИЕ КОРОТКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В ТАНДЕМЕ НА КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ МАТРИЦЕ ДНК

© 1998 г. Д. В. Пышный, А. А. Кривенко*, С. Г. Лохов,
Е. М. Иванова#, Г. М. Дымшиц*, В. Ф. Зарытова

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8;

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Поступила в редакцию 28.08.96 г. Принята к печати 26.12.96 г.

Осуществлено количественное и высокоспецифичное лигирование тетрануклеотида с фланкирующими октануклеотидами, несущими как радиоактивные, так и нерадиоактивные репортерные группы. Исследована последовательность лигирования олигонуклеотидных компонентов в тандеме на комплементарной матрице. Установлено, что первой стадией является активация ферментом фосфатной группы октануклеотида – компонента тандема, обладающего повышенной способностью к гибридизации по сравнению с тетрамером. Показано, что введение в октануклеотиды концевых репортерных группировок не снижает эффективность лигирования их в тандеме.

Ключевые слова: лигирование, короткие олигонуклеотиды, тандемы олигонуклеотидов, ДНК-лигаза фага T4.

В последние годы для диагностики наследственных заболеваний проводится интенсивный поиск методов обнаружения нуклеотидных замен в геномной ДНК. Одним из таких методов является определение точечных мутаций с использованием ДНК-лигазы фага T4 (КФ 6.5.1.1), в основе которого лежит лигирование пары олигодезоксирибонуклеотидных зондов при образовании их комплементарных комплексов с ДНК-мишенью [1, 2]. При образовании несовершенного комплекса из-за наличия однобуквенной замены или делеции в сайте связывания олигонуклеотидов выход лигированного продукта уменьшается по сравнению со случаем образования правильного комплементарного комплекса в отсутствие мутации.

Для повышения сайт-специфичности взаимодействия олигонуклеотидов с ДНК обычно используют протяженные олигонуклеотиды (12–25 звеньев), что обеспечивает узнавание уникальной последовательности в высокополимерной геномной ДНК. Однако такие олигонуклеотиды способны образовывать достаточно прочные несовершенные комплексы, что уменьшает точность

выявления однобуквенных замен. Для повышения надежности и чувствительности метода детекции желательно осуществлять лигирование олигонуклеотидов при температуре, близкой к температуре плавления правильного дуплекса, когда концентрация возможных несовершенных комплексов мала. Однако это приводит к снижению эффективности лигирования олигонуклеотидов, так как температурный оптимум работы ДНК-лигазы лежит существенно ниже температур плавления комплексов протяженных олигонуклеотидов.

Один из подходов к усовершенствованию метода лигирования с целью выявления однобуквенных замен – уменьшение длины лигируемых олигонуклеотидных зондов. Возникающие при этом трудности, связанные с увеличением числа участков комплементарного связывания коротких олигонуклеотидов и снижением их комплексобразующей способности, могут быть преодолены с помощью подхода, разработанного нами ранее для высокоэффективной и строго направленной модификации ДНК-мишени. Подход основан на использовании тандемов производных коротких олигонуклеотидов (эффлектор+реагент+эффлектор) [3, 4]. Было показано, что даже такие олигонуклеотиды, как тетрамеры, обладающие крайне низкими гибридизационными свойствами и несущие реакционноспособную группировку, способны высокоэффек-

*Сообщение IV см. журн. "Биоорганическая химия" №11 за 1997 г.
Сокращения: PEG – полиэтиленгликоль, Flu – остаток флуоресцеина, Phn – N-(2-гидроксиэтил)феназиний, *p – ³²P, префикс "d" в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

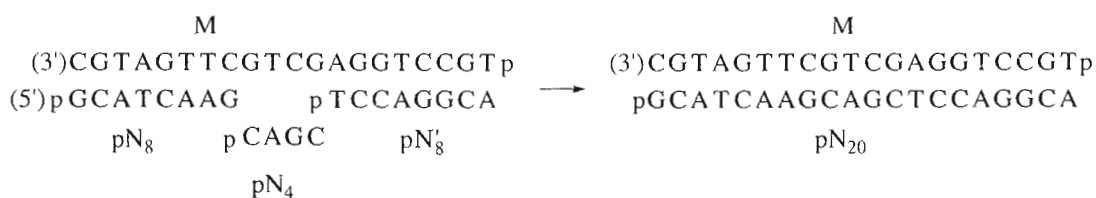
#Автор для переписки.

тивно и исключительно сайт-специфично модифицировать ДНК в присутствии пары фланкирующих эффекторов – дифеназиновых производных коротких олигонуклеотидов [4, 5]. При наличии нескольких участков возможного связывания реакционноспособного производного тетрануклеотида модификация ДНК-мишени протекает в одном, заранее заданном месте, где возможно образование только совершенного комплементарного комплекса тандема олигонуклеотидов с мишенью [4]. Использование тандемов коротких олигонуклеотидов для выявления точечных мутаций может существенно повысить чувствительность метода, основанного на лигировании

олигонуклеотидов. Однако к настоящему времени лигирование содержащих тетрануков тандемов коротких олигонуклеотидов в литературе не описано.

Цель данной работы заключалась в исследовании принципиальной возможности лигирования тетрануклеотида с фланкирующими его олигонуклеотидами в комплементарном комплексе с одноцепочечным фрагментом ДНК.

Исследование проводили на примере лигирования тандема трех олигонуклеотидов – тетрануклеотида pN_4 и фланкирующих его октануклеотидов pN_8 и pN'_8 , используя в качестве матрицы 20-звенный олигонуклеотид М:



Эффективность образования фосфодиэфирной связи при лигировании на ДНК-матрице определяется долей полноразмерных тандемных комплексов олигонуклеотидов, которая зависит от гибридных свойств последних. Поэтому на первом этапе работы было определено влияние компонентов буфера, необходимых для оптимальной работы фермента, на термостабильность тандемного комплекса. За устойчивостью всего ком-

плекса следили по устойчивости наиболее слабого его звена – комплекса матрица – тетрануклеотид. Ранее было показано, что тетрануклеотид pN_4 обладает крайне низкими гибридными свойствами, которые существенно возрастают при образовании тандемного комплекса в присутствии фланкирующих октануклеотидов pN_8 и pN'_8 ($T_{пл}$ 23°C в буфере 0.1 М NaCl, 0.01 М какодилат натрия (pH 7.4), 1 мМ EDTA при концентрации каждого олигонуклеотида 13 мкМ) [5].

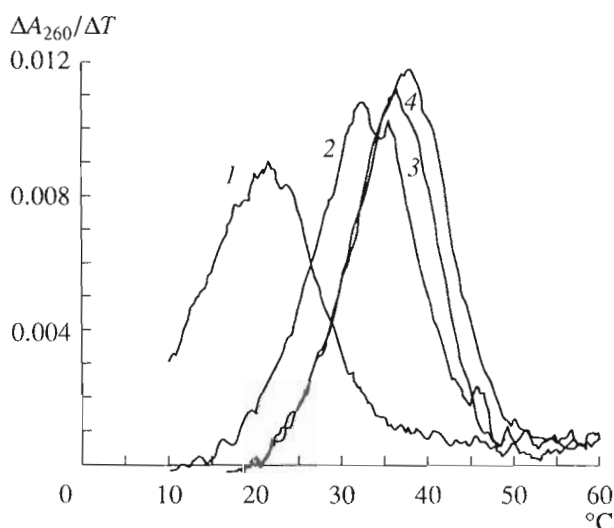


Рис. 1. Дифференциальные кривые термической денатурации комплекса $M \cdot pN_4$ в присутствии фланкирующих октануклеотидов pN_8 и pN'_8 в 20 мМ трис-НCl-буфере, pH 7.5, содержащем: 0.1 М NaCl, 8% PEG (1); 0.1 М NaCl, 10 мМ $MgCl_2$ (2); 8% PEG, 10 мМ $MgCl_2$ (3); 0.1 М NaCl, 8% PEG, 10 мМ $MgCl_2$ (4).

Дифференциальные кривые плавления комплекса $M \cdot pN_4$ (в присутствии фланкирующих октануклеотидов) свидетельствуют о том, что наличие в буфере полиэтиленгликоля (PEG) практически не влияет на стабильность комплекса (рис. 1). Добавление ионов магния (10 мМ) приводит к существенной стабилизации комплекса $M \cdot pN_4$, температура плавления которого возрастает до 34°C. Еще более прочный комплекс с $T_{пл}$ 38°C образуется при наличии в буфере наряду с Mg^{2+} и полиэтиленгликоля. Октануклеотиды pN_8 и pN'_8 образуют в этих условиях близкие по стабильности дуплексы с $T_{пл}$ 44°C.

На основании полученных данных в дальнейшем лигирование тандема олигонуклеотидов проводили в буфере состава: 10 мМ $MgCl_2$, 20 мМ трис-НCl (pH 7.5), 8% PEG, 1 мМ АТР, 0.1 М NaCl, 10 мМ дитиотреит, который обеспечивает как оптимальную стабильность комплементарного комплекса ДНК-матрицы и тандема олигонуклеотидов, так и максимальную репарационную активность фермента [1, 6, 7].

Инкубация дуплекса $M \cdot {}^*pN_8 + pN_4 + pN'_8$ при концентрации каждого олигонуклеотидного компонента 10^{-5} М с лигазой (150 ед. акт.) приводит к образованию полноразмерного олигомера pN_{20} , который с течением времени превращается в полимерные продукты (рис. 2, 5–8). В отсутствие любого из олигонуклеотидных компонентов, составляющих тандем, образование продуктов длиной 12 или 16 нуклеотидов не происходит (рис. 2, 2, 3), что можно было бы ожидать в случае неспецифического лигирования. Лигирование компонентов тандема при отсутствии матрицы также не регистрируется (рис. 2, 4).

Высокая концентрация фермента и увеличение времени реакции может привести к образованию конкатомеров, поэтому была исследована зависимость скорости образования 20-мера от концентрации фермента (рис. 3). Количество фермента в реакционной смеси варьировали от 4 до 75 ед. акт. Максимальный выход продукта pN_{20} (41% за 30 мин) наблюдался при использовании 75 ед. акт. фермента, однако при этом происходило и формирование высокомолекулярного продукта. Поэтому в дальнейшем реакции проводили, используя 50 ед. акт. фермента; в этом случае образования полимерных продуктов не наблюдалось (рис. 3).

Поскольку температурный оптимум работы фермента лежит в интервале $20 - 37^\circ\text{C}$, а температура плавления самого слабого комплекса $M \cdot pN_4$ достигает 38°C , была рассмотрена зависимость образования продукта pN_{20} от температуры. Было показано, что при повышении температуры от 20 до 37°C скорость синтеза 20-мера возрастает и выход продукта через 30 мин реакции во всех случаях находится в интервале 42–44%, хотя степень ассоциации матрицы с тетрамером, находящимся в составе тандема, уменьшается и при 37°C составляет ~ 0.5 (рис. 1).

На следующем этапе работы было исследовано влияние концентрации олигонуклеотидных компонентов на степень лигирования. Было показано, что выход продукта реакции pN_{20} за 15 мин при 25°C снижается с 33 до 28% при уменьшении концентрации как компонентов тандема, так и матрицы с 10^{-5} до 2×10^{-6} М и падает до 18% при аналогичном снижении концентрации только компонентов тандема. В то же время при уменьшении концентрации только одного из составляющих тандем компонентов – окта- или тетрануклеотида (${}^*pN'_8$ или *pN_4) наблюдается практически полное образование продукта pN_{20} по олигонуклеотиду, взятому в недостатке (рис. 4). Так, при использовании ${}^{32}\text{P}$ -меченого тетрануклеотида *pN_4 в низкой концентрации (10^{-6} и 10^{-7} М), без изменения содержания других олигонуклеотидных компонентов, наблюдали 95–100% включение меченого фрагмента в структуру продукта pN_{20} (рис. 4, 2, 5).

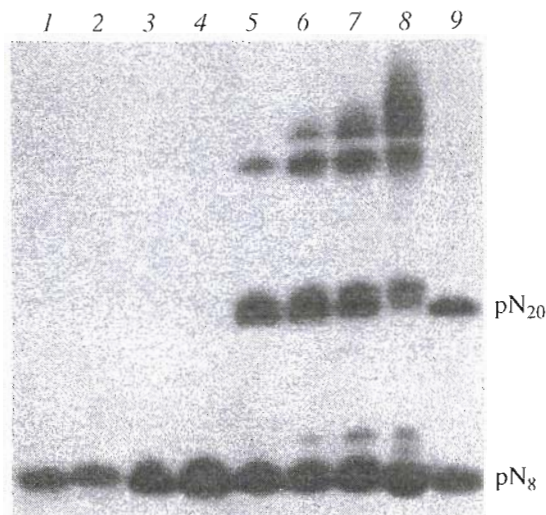


Рис. 2. Радиоавтограф электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ продуктов лигирования: $M \cdot {}^*pN_8$ (1), $M \cdot {}^*pN_8 + pN_4$ (2), $M \cdot {}^*pN_8 + pN'_8$ (3), ${}^*pN_8 + pN_4 + pN'_8$ (4) в течение 60 мин; 5–8 – $M \cdot {}^*pN'_8 + pN_4 + pN_8$ в течение 15 (5), 30 (6), 60 мин (7), 18 ч (8); концентрация олигонуклеотидных компонентов 10^{-5} М, 150 ед. акт. фермента, 25°C ; 9 – маркеры длины *pN_8 , ${}^*pN_{20}$.

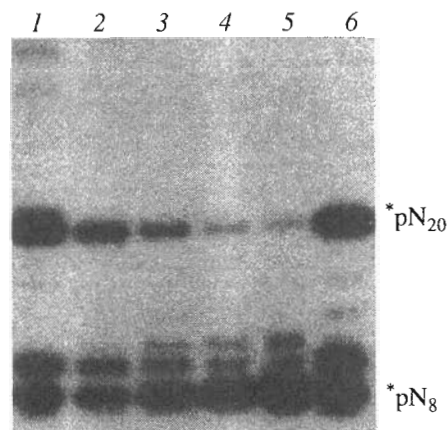
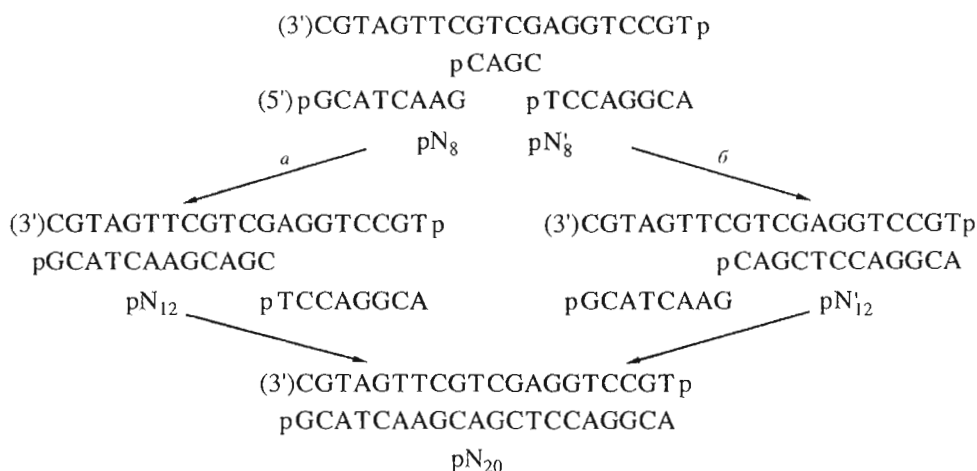


Рис. 3. Радиоавтограф электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ продуктов лигирования тандема ${}^*pN_8 + pN_4 + pN'_8$ в комплементарном комплексе с матрицей М; концентрация олигонуклеотидных компонентов по 10^{-5} М, 25°C , 30 мин. Количество ДНК-лигазы в реакционной смеси (ед. акт.): 75 (1), 37 (2), 18 (3), 9 (4), 4 (5), 50 (6).

При формировании комплекса октануклеотид–тетрамер–октануклеотид образуется структура, имеющая два ника, расположенных друг друга на расстоянии в 4 звена. Можно предположить два возможных варианта последовательности процесса лигирования:



Использование различных меченных по 5'-положению компонентов тандемной системы позволяет выявить промежуточные продукты и тем самым определить последовательность этапов лигирования двух ников в тандемном комплексе.

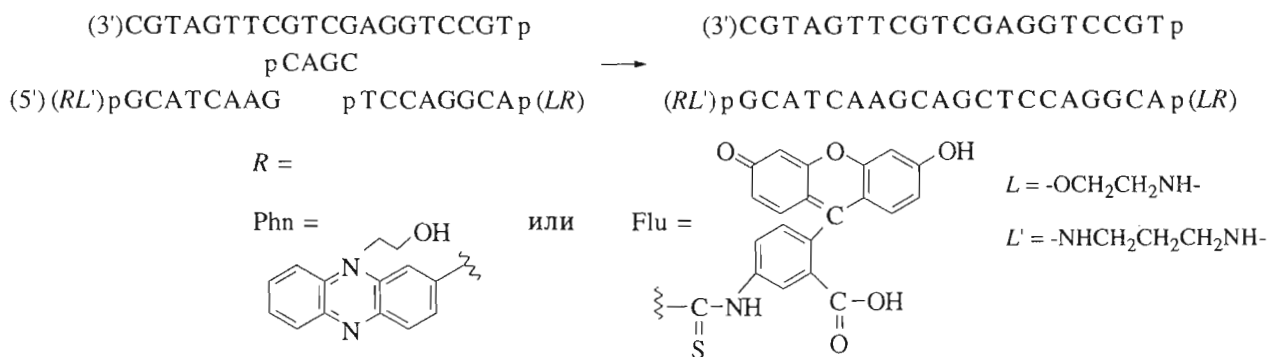
При использовании меченого октануклеотида $*\text{pN}_8$ (рис. 5, 8–10) промежуточное образование додекануклеотида pN_{12} (путь *a*) не наблюдается, что может свидетельствовать об активации немеченого октануклеотида pN'_8 и реализации лигирования по пути *b*. Протекание процесса по пути *b* подтверждается также тем, что промежуточное образование додекануклеотида pN'_{12} происходит при использовании как меченого тетра-нуклеотида $*\text{pN}_4$ (рис. 5, 5–7), так и меченого октануклеотида $*\text{pN}'_8$ (рис. 5, 2–4).

Образование на первой стадии фосфодиэфирной связи между октануклеотидом pN'_8 и тетра-нуклеотидом pN_4 , а не между pN_4 и pN_8 дает основание говорить о корреляции очередности активации 5'-фосфата компонентов тандема с их гибридизационными свойствами. Это подтвержда-

ется тем, что в контрольном тандеме $*\text{pN}'_{12} + \text{pN}_8$, когда происходит активация 5'-фосфата додекануклеотида $*\text{pN}'_{12}$, скорость лигирования выше (рис. 5, 11–13), чем в случае трехкомпонентного тандема $\text{pN}_8 + \text{pN}_4 + *\text{pN}'_8$, когда на первой стадии происходит активация 5'-фосфата октануклеотида $*\text{pN}'_8$ и образование олигомера $*\text{pN}'_{12}$. Концентрация последнего в этом случае поддерживается на постоянном, достаточно низком уровне (2–3%).

Таким образом, совокупность полученных результатов позволяет говорить о высокой специфичности реакции лигирования коротких олигонуклеотидов в составе тандемного комплекса.

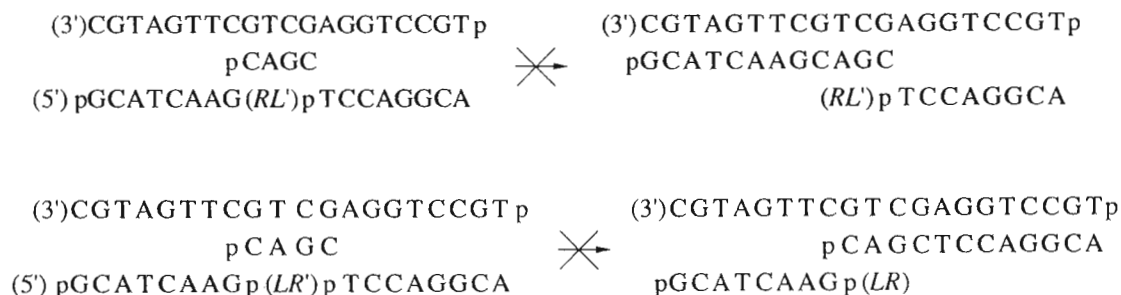
Важным условием применения олигонуклеотидов в практической диагностике является использование нерадиоактивных олигонуклеотидных зондов. В настоящей работе была рассмотрена возможность лигирования коротких олигонуклеотидов, несущих на различных концах тандема либо остаток флуоресцеина (Flu), либо остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния (Phn):



При использовании в качестве компонентов тандема производных октануклеотидов $(RL')pN_8$ и/или $pN_8p(LR)$ лигирование протекает практически так же, как и при использовании нативных октануклеотидов (рис. 6, 1–5).

Однако лигирование олигонуклеотидов воз-

можно только при положении модифицирующего остатка на флангах тандема. Если тетра-нуклеотид граничит хотя бы с одной стороны (3'- или 5'-) с остатком феназиния или флуоресцеина, то образования даже возможного 12-мера не происходит (рис. 6, 6, 7).



По-видимому, введение группировки в олигонуклеотид вблизи точки лигирования (на расстоянии 4 звеньев) вызывает пространственные препятствия для связывания фермента с комплексом или структурные изменения фермент-субстратного комплекса [8].

Возможность введения в тандем концевых модифицирующих группировок позволяет контролировать длину сигнального продукта и направление его синтеза, решать проблему комбинаторных перестановок компонентов тандемной системы при их совместном комплексобразовании с протяженной ДНК-мишенью, а также использовать нерадиоактивную детекцию продуктов лигирования и одновременное введение двух разных репортерных групп.

Таким образом, в работе продемонстрирована возможность высокоспецифичного лигирования тетра-нуклеотида в составе тройного тандемного комплекса на комплементарной матрице при использовании как радиоактивных, так и нерадиоактивных репортерных групп и установлена последовательность протекающих при этом реакций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ДНК-лигазу фага T4 (КФ 6.5.1.1) производства “Сибэнзим” (Россия), флуоресцеинизотиоцианат, изомер I (Fluka, Швейцария). N-(2-Гидроксиэтил)феназинийхлорид любезно предоставлен В.Н. Сильниковым (НИБХ СО РАН).

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали фосфотриэфирным методом в растворе по методу [9], исходя из полностью защищенных 5'-P-β-

цианэтиловых, *n*-хлорфениловых эфиров нуклеотидов.

Олигонуклеотиды и их производные выделяли ионообменной (Полисил-СА, “Теоретическая практика”, Россия) и обращенно-фазовой (LiChroprep RP-18, Merck, Германия) хроматографиями на хроматографе “Beckman-332”.

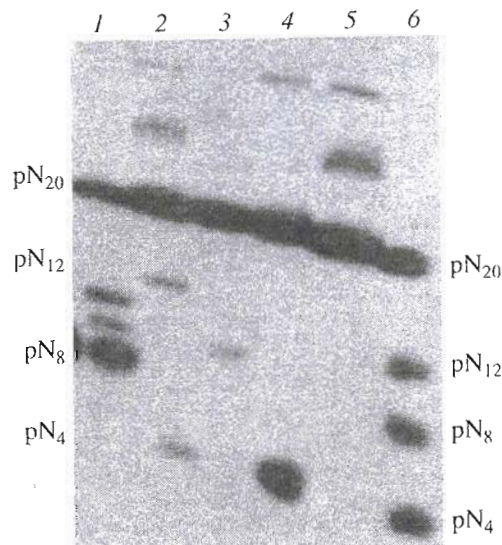


Рис. 4. Радиоавтограф электрофореза в 20% ПААГ продуктов лигирования тандема $pN_8 + pN_4 + pN_8$ при 37°C (30 мин) в присутствии 50 ед. акт. ДНК-лигазы. Концентрация компонентов (M): 1 – [M] = [$*pN_8'$] = [pN_4] = [pN_8] = 10^{-5} ; 2 – [M] = [pN_8] = [pN_8'] = 10^{-5} , [$*pN_4$] = 10^{-6} ; 3 – [M] = [pN_8] = [pN_4] = 10^{-5} , [$*pN_8'$] = 10^{-6} ; 4 – [M] = [pN_8] = [$*pN_4$] = [pN_8'] = 10^{-5} ; 5 – [M] = [pN_8] = [pN_8'] = 10^{-5} , [$*pN_4$] = 10^{-7} . 6 – маркеры длины.

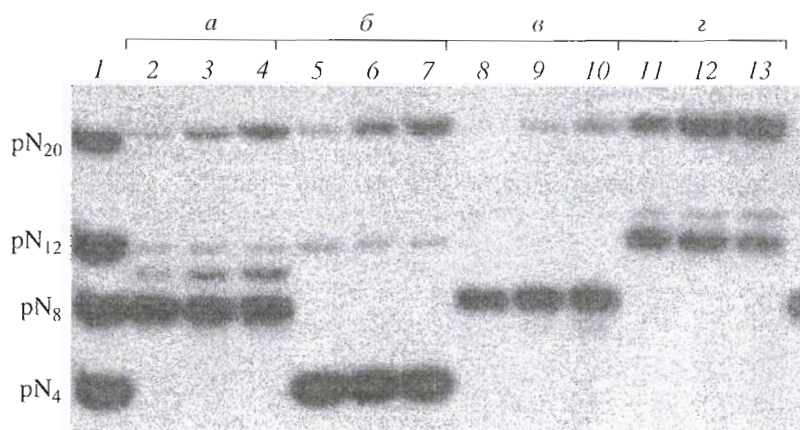


Рис. 5. Радиоавтограф электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ продуктов лигирования на матрице М при концентрации олигонуклеотидов 10^{-5} М, 37°C , 25 ед. акт. ДНК-лигазы, 1 – маркеры длины; а) тандем $\text{pN}_8 + \text{pN}_4 + * \text{pN}_8'$, время реакции, мин: 5 (2), 10 (3), 30 (4); б) тандем $\text{pN}_8 + * \text{pN}_4 + \text{pN}_8'$, время реакции, мин: 5 (5), 10 (6), 30 (7); в) тандем $* \text{pN}_8 + \text{pN}_4 + \text{pN}_8'$, время реакции, мин: 5 (8), 10 (9), 30 (10); г) тандем $\text{pN}_8 + * \text{pN}_{12}'$, время реакции, мин: 5 (11), 10 (12), 30 (13).

Производные октануклеотидов $\text{pN}_8\text{p}(\text{LPhn})$, $(\text{PhnL}')\text{pN}_8$ получали по методу [10]. Анализ полученных производных олигонуклеотидов проводили методом обращенно-фазовой хроматографии (линейный градиент 0–20% ацетонитрила в 0.05 М LiClO_4 за 30 мин, скорость элюции 2 мл/мин), определяя времена удерживания на колонке более гидрофобных продуктов реакции относительно контрольного октануклеотида ($\Delta t_{\text{уд}}$), а также спектрофотометрически по соотношению поглощения растворов целевых продуктов в воде на дли-

нах волн 260 и 530 нм (ϵ_{530} феназиниевого остатка с аминотерминалом = $14 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [11]).

$(\text{PhnL}')\text{pGCATCAAG}$: $\Delta t_{\text{уд}} = 6$ мин, $A_{260}/A_{530} = 6.6$;
 $\text{pTCCAGGCAP}(\text{LPhn})$: $\Delta t_{\text{уд}} = 5$ мин, $A_{260}/A_{530} = 6.2$.

Производные октануклеотидов $\text{pN}_8\text{p}(\text{LFlu})$, $(\text{FluL}')\text{pN}_8$ синтезировали по методу [11], вводя флуоресцеинизотиоцианат в реакцию с олигонуклеотидом, содержащим аминотерминал на 5'- или 3'-концевом фосфате. Аминотерминалы в олигонуклеотиды вводили по методу [10]. Анализ полученных производных олигонуклеотидов проводили методом обращенно-фазовой хроматографии (линейный градиент 0–20% ацетонитрила в 0.05 М LiClO_4 за 30 мин, скорость элюции 2 мл/мин), определяя $\Delta t_{\text{уд}}$, а также по наличию флуоресценции водных растворов полученных продуктов.

$(\text{FluL}')\text{pGCATCAAG}$: $\Delta t_{\text{уд}} = 5$ мин; $\text{pTCCAGGCAP}(\text{LFlu})$: $\Delta t_{\text{уд}} = 4$ мин.

Концентрацию олигонуклеотидов и их производных определяли спектрофотометрически, используя суммарные величины ϵ_{260} моно- и динуклеотидов [12], N-(2-гидроксиэтил)феназиниевого остатка ($1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [10]) и остатка флуоресцеина ($2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ [11]).

Исследование термической денатурации олигонуклеотидных дуплексов проводили при концентрации олигонуклеотидных компонентов, равной 10^{-5} М, на установке с терморегулируемой оптической кюветой на базе УФ-детектора жидкостного хроматографа “Милихром” (Россия) на длине волны 260 нм. Скорость нагрева образцов не превышала $0.7\text{--}1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

$5'$ - ^{32}P -Меченые олигонуклеотиды получали по методу [13], используя $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

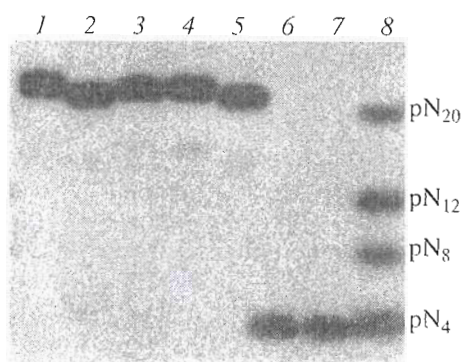


Рис. 6. Радиоавтограф электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ продуктов лигирования (37°C , 30 мин, 50 ед. акт. ДНК-лигазы) тандемов $(\text{FluL}')\text{pN}_8 + * \text{pN}_4 + \text{pN}_8'(\text{LFlu})$ (1); $(\text{FluL}')\text{pN}_8 + * \text{pN}_4 + \text{pN}_8'$ (2); $(\text{PhnL}')\text{pN}_8 + * \text{pN}_4 + \text{pN}_8'(\text{LPhn})$ (3); $(\text{FluL}')\text{pN}_8 + * \text{pN}_4 + \text{pN}_8'(\text{LPhn})$ (4); $\text{pN}_8 + * \text{pN}_4 + \text{pN}_8'(\text{LFlu})$ (5); $\text{pN}_8 + * \text{pN}_4 + (\text{FluL}')\text{pN}_8'$ (6); $\text{pN}_8\text{p}(\text{LFlu}) + * \text{pN}_4 + \text{pN}_8'$ (7). Концентрация $* \text{pN}_4$ 10^{-7} М, матрицы и октануклеотидов – по 10^{-5} М; 8 – маркеры длины.

Активность фермента определяли по методике [14], принимая за 1 ед. акт. количество фермента, необходимое для того, чтобы обеспечить 50% лигирования *Hind*III-фрагментов ДНК фага λ за 30 мин при 16°C в 20 мкл реакционной смеси при концентрации ДНК 0.3 мкг/мкл.

Реакцию лигирования проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 10 mM MgCl₂, 20 mM трис-HCl (pH 7.5), 8% PEG (6000), 1 mM АТР, 0.1 M NaCl, 10 mM дитиотреит при 25 и 37°C. Концентрация каждого олигонуклеотидного компонента в стандартных условиях составляла 10 мкМ. В стандартной реакции использовали 50 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4. Реакцию останавливали прогреванием при 100°C в течение 5 мин. Кинетические характеристики снимали, отбирая аликвоты по 10 мкл и осаждая их 2% раствором LiClO₄ в ацетоне.

Продукты лигирования разделяли гель-электрофорезом в денатурирующем ПААГ (20%). В качестве маркеров длины использовали олигонуклеотиды, полученные химическим методом. Нуклеотидный состав эйкозануклеотида, полученного при лигировании, подтверждали секвенированием по методу Максама-Гилберта [15].

Степень лигирования (%) вычисляли как отношение радиоактивности участков геля, содержащих продукты лигирования, к суммарной радиоактивности в соответствующей дорожке.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu D.Y., Wallace B.R. // *Gene*. 1989. V. 76. P. 245–254.
2. Landergen U., Kaiser R., Sanders J., Hood L. // *Science*. 1988. V. 241. P. 1077–1080.
3. Kutuyavin I.V., Podyminogin M.A., Bazuna Yu.N., Fedorova O.S., Knorre D.G., Levina A.S., Mamayev S.V., Zarytova V.F. // *FEBS Lett.* 1988. V. 238. P. 35–38.
4. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // *Биоорганическая химия*. 1992. Т. 18. С. 895–900.
5. Пышный Д.В., Пышина И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. С. 709–716.
6. Pfeiffer B.J., Zimmerman S.B. // *Nucl. Acids Res.* 1983. P. 7853–7870.
7. Raae A.J., Kleppe R.K., Kleppe K. // *Eur. J. Biochem.* 1975. V. 60. P. 437–443.
8. Montecucco A., Pedrali-Noy G., Spadari S., Lestingi M., Ciarrocchi G. // *Biochem. J.* 1990. V. 266. P. 379–384.
9. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // *Биоорганическая химия*. 1983. Т. 9. С. 516–521.
10. Lokkov S.G., Podyminogin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutuyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.F. // *Bioconj. Chem.* 1992. V. 3. P. 414–419.
11. Haralambidis J., Chai M., Tregear G.W. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. P. 4857–4876.
12. Cantor C.R., Tinoco I. // *J. Mol. Biol.* 1965. V. 13. P. 65–72.
13. Berkner K.L., Folk W.R. // *Biol. Chem.* 1977. V. 252. P. 3176–3184.
14. New England Biolabs, 1990–1991 Catalog. P. 51.
15. Maxam A.M., Gilbert W. // *Meth. Enzymol.* 1980. V. 65. P. 499–560.

Interaction of Derivatives of Short Oligonucleotides with Nucleic Acids.

V*. Ligation of a Tandem of Short Oligonucleotides on the Complementary DNA Template

D. V. Pyshnyi*, A. A. Krivenko**, S. G. Lokhov*,
E. M. Ivanova*, G. M. Dymshits**, and V. F. Zarytova*

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

Abstract—A tetranucleotide was highly specifically and quantitatively ligated with a pair of flanking octanucleotides carrying both radioactive and nonradioactive reporter groups. The sequence of the ligation of oligonucleotide components in a tandem on a complementary template was studied. The first stage was found to be the enzyme-catalyzed activation of the phosphate group of octanucleotide, a tandem component that possesses a higher hybridization capacity than the tetramer. It is shown that the introduction of terminal reporter groups into octanucleotides does not decrease the efficiency of their tandem ligation.

Key words: ligation, short oligonucleotides, oligonucleotide tandems, T4 phage DNA ligase.