

УДК 577.113.6,088.5

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТОВ РЕСТРИКЦИИ И МОДИФИКАЦИИ EcoRII С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ФРАГМЕНТАМИ ДНК. СИНТЕЗ СУБСТРАТОВ С ОДНИМ УЧАСТКОМ УЗНАВАНИЯ

С. А. Кузнецова, Е. А. Кубарева, Т. С. Орецкая, Н. Г. Долинная, Н. Ф. Крынецкая, Е. С. Громова, З. А. Шабарова, Д. Цех

Введение. Изучение механизма действия ферментов рестрикции и модификации II типа представляет значительный интерес как для решения проблемы белково-нуклеинового узнавания, так и в связи с поиском более эффективных путей использования этих ферментов в генной инженерии. В продолжение исследований эндонуклеазы рестрикции *EcoRII*, проводимых в нашей лабораторин [1—3], возникла необходимость расчета термодинамических и кинетических параметров, характеризующих взаимодействие эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* с узнаваемой последовательностью, определения природы и числа специфических и неспецифических контактов белка и ДНК, а также выяснения структурных особенностей белково-нуклеинового комплекса. Представляется также важным провести сравнительное изучение фермента *EcoRII* и его изошизомеров. Для решения этих задач в настоящее время осуществлен синтез 14-звенных олигонуклеотидных дуплексов I—V и более протяженного ДНК-дуплекса VI, содержащих один природный или модифицированный участок узнавания *EcoRII* (обозначен чертой):

[°] ACCTACCTGGTGGT ^{3/*}	ACCTACCÜCGTGGT	A C C TA C C T G G T G G T	₩;
, TGGATGGACCACCA ₅ , ^I ;	TGGATGGACCACCA Ī!;	T G G A T G G A C C A C C A	



[™]U=5-фтордезокспуридин (f⁹U); С[™]=5-метилдезоксицитидин (m⁵C). ДНК-дуплекс II содержит в центре участка узнавания 5-фтор-2'-дезоксиуридин. Это делает возможным применение метода ЯМР на ядрах ¹⁹F для изучения структуры белково-нуклеинового комплекса. В олигонуклеотидных дуплексах III—V метилированы соседние с центральной

БПОПОЛИМЕРЫ И КЛЕТКА. — 1987. — Т. 3, № 6

^{*} Здесь и далее префикс d (дезокси) опущен, направление связи во всех дуплексах, как в дуплексе I.

парой остатки дезоксицитидина, которые моднфицируются метилазой *EcoRII*. Путем комбинации тяжей, входящих в состав дуплексов 1 и III, получаются полуметилированные субстраты IV и V. Кроме того, нами сконструирован 29-звенный ДНК-дуплекс VII, имеющий ту же нуклеотидную последовательность, что и субстрат VI, за исключением участка узнавания *EcoRII*, в котором отсутствует центральная АТ-пара:

^b GATGCTGCCAACCGGCTCTAGCTTCATAC CTACGACGGTTGGCCGAGATCGAAGTAT G 3' 5'

Наряду с синтезом задачей настоящей работы является определение некоторых физико-химических характеристик полученных дуплексов.

Материалы и методы. В работе использовали дезоксинуклеозиды отечественного производства; Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 27.1.7.8), Т4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1) (Вильнюс); 5-фтор-2'-дезоксиуридин («Fluka», Швеция), этиленциангидрин, триазол, N-метилимидазол, бензойный ангидрид, 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид, монометокситритилхлорид, 2-меркаптоэтанол, диметилсульфат, пиперидин, безводный гидразин («Merck», ФРГ); ДЭАЭ-целлюлозу ДЭ-23 («Whatman», Англия), [ү-³²P]АТР, 37 ТБк/ммоль (ВО «Изотоп», Моск. отд-ние).

Концентрацию олигонуклеотидов (на мономер), С₀, определяли спектрофотометри чески. Коэффициенты молярной экстинкции, ε_{260} , олигонуклеотидов принимали равными сумме ε_{260} составляющих мономеров, используя значение ε_{260} для m⁵C — 5600 M⁻¹ см⁻¹ и для f⁵U — 5250 M⁻¹ см⁻¹ [3]. Изучение комплексообразования олигонуклеотидов проводили в 0,015 M цитратном буфере, pH 7,25, 0,15 M NaCl (дуплексы I—III), в 0,05 M MЭС-буфере, pH 6,0, 0,02 M MgCl₂ (дуплекс VI'), C₀ (0,2—0,4)·10⁻³ M или в 0,04 M трис-HCl-буфере, pH 7,6, 0,05 M NaCl, 0,005 M MgCl₂, 0,007 M 2-меркаптоэтанол (дуплекс VII), C₀ 0,1·10⁻⁴ M. Температурную зависимость УФ-поглощения комплексов измеряли на спектрофотометре «Cary-219» (США) при непрерывном повышении температуры со скоростью 0,5 °C в 1 мин в термостатируемых кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 и 10 мм. Температуру регистрировали при помощи медноконстантановой термопары. Гипохромию (h) и энтальпию (ΔH°) комплексообразования определяли по [4].

Спектры кругового дихроизма (КД) ДНК-дуплексов снимали на дихрографе «Jouan-III» (Франция) при комнатной температуре.

Синтез олигонуклеотидов ACCTACCTGGTGGT (a), ACCTACCÜGG-TGGT (b), ACCTACCTGGTGGT (c), ACCACCAGGTAGGT (c), ACCACCAGGTAGGT (d), GATGCTGCC (e), AACCTGGCTCT (ж), AGCTTCATAC (s), AGGTTGGCAGCATC (u), GTATGAAGCTAGAGCC (к) осуществляли фосфотриэфирным методом в растворе [5]. Целевые олигонуклеотиды после полного их деблокирования (обработки смесью концентрированный NH₃— пиридин, 3:1, 50 °C, 24 ч и 80 % CH₃COOH, 20 °C, 20 мин) выделяли с помощью ионообменной хроматографии на колонке (15×300 мм) с ДЭАЭцеллюлозой в 0,005 М трис-HCl-буферс, pH 7,5, содержащем 7 М мочевину, в градиенте концентрации NaCl (0—0,36 M) с последующей рехроматографией методом обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе «Tracor» (Нидерланды) на колонке «Ultrasphere TM-octyl» (5 мк, 4,6 мм×25 см) в линейном градиенте концентрации метанола (0—0,35 M), содержащем 0,1 М ацетат аммония.

Синтез динуклеотида (MeO) TrbzCp (ClPh) m⁵bzCp (ClPh, CNEt). (MeO)₂Trm⁵C_{Lev} получали из тимидина по методике [6]. Бензонлирование, детритилирование этого соединения и конденсацию полученного m⁵bzC_{Lev} с (MeO) TrbzCp (ClPh, Et₃N) осуществляли по [7]. Выход 80 %. Левулинильную защитную группировку удаляли, как в работе [8]. Продукт реакции выделяли на колонке с силикагелем L40/100 в градиенте концентрации этанола в хлороформе (от 0 до 10 %). Динуклеозидфосфат (MeO) TrbzCp (ClPh) m⁵bzC фосфорилировали по стандартной методике [7]. Выход динуклеотида 65 %.

Синтез олигонуклеотидов GATGCTGCCAACC (л), GGCTCTAGCTTCA-TAC (м), TAGAGCCGGTTGGC (н), GCCAACCGGCTCTA (о), GGTTGGCAGCATC (п) описан в работе [9]. Синтез GATGCTGCCAACCTGGCTCTAGCTTCATAC (p) и GTATGAAGCTAG-AGCCAGGTTGGCAGCATC (c). 5'-фосфорилирование олигонуклеотидов проводили с помощью Т4-полинуклеотидкиназы в присутствии ATP или [γ -³²P]ATP [1]. Ферментативное лигирование олигонуклеотидов GATGCTGCC, pAACCTGGCTCT и pAGCTTCATAC, один из которых содержал 5'-концевую метку ³²P, осуществляли на матрице из двух олигонуклеотидов AGGTTGGCAGCATC и GTATGAAGCTAGAGCC с помощью T4-ДНКлигазы в течение 16—18 ч (5—8 °C) в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 7,6, содержащем 0,01 M MgCl₂, 0,005 М 2-меркаптоэтанол, 0,001 М спермидин и 1 мМ ATP. Аналогично проводили лигирование ³²P-меченного олигонуклеотида pAGGTTGGCAGCATC и GTATGAAGCTAGAGCC на матрице из GATGCTGCC, AACCTGGCTCT и AGCTTCATAC. Выходы «верхнего» и «нижнего» тяжей 30-звенного дуплекса VI составили 85—95 %. Анализ продуктов ферментативного сшивания олигонуклеотидов T4-ДНК-лигазой проводили электлофорезом в 20%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 7 М мочевину, ³²P-меченные 30-звенные олигонуклеотиды выделяли элюцией с геля.

Синтез GATGCTGCCAACCGGCTCTAGCTTCATAC (r) и GTATGAAGCTAGAG-CCGGTTGGCAGCATC (y). Соединения (r) и (y) получали аналогично (p) и (c)ферментативным лигированием олигонуклеотидов (л) и (м) на матрице (n) и олигонуклеотидов (κ) и (n) на матрице (o) соответственно

Результаты и обсуждение. Для получения ДНК-дуплексов I—V, содержащих природный или моднфицированный участок узнавания эндонуклеазы *EcoR11*, осуществлен синтез пяти 14-звенных олигонуклеотидов (a - d), в том числе содержащих 5-фтордезоксиуридин и 5-метилдезоксицитидин, триэфирным растворным методом. Преимуществом этого метода в данном случае является возможность введения модифицированных звеньев в олигонуклеотиды в процессе синтеза. При синтезе олигонуклеотидов с модифицированными звеньями первым этапом было преобразование 5-фтор-дезоксиуридина и 5'-О-диметокситритил-3'-левулинил-5-метилдезоксицитидина * в стапдартные компоненты триэфирного синтеза. Для фторпроизводного это был 5'-О-монометокситритил-5-фтор-дезоксиуридин-3'- (n-хлорфенил- β -цианэтил) фосфат, полученный по методике [7]. (MeO)₂Trm⁵C_{Lev} претерпевал превращения по следующей схеме:

 $(Me0)_{2} Trm^{5}C_{Lev} \longrightarrow (Me0)_{2} Trm^{5}bzC_{Lev} \longrightarrow m^{5}bzC_{Lev} \longrightarrow$ $(Me0)TrbzCp(CLPh, Et_{J}N) \qquad (Me0)TrbzCp(CLPh)m^{5}bzC_{Lev} \longrightarrow$ $(Me0)TrbzCp(CLPh)m^{5}bzC \longrightarrow$ $(Me0)TrbzCp(CLPh)m^{5}bzCp(CLPh, CNEt).$

Конденсацию нуклеотидной и нуклеозидной компонент проводили, используя их в соотношениях от 1,25:1 до 1:1,5, что не влияло на выход нужного продукта. Выходы на стадиях конденсации составили 80— 90 %. Этот результат хорошо согласуется с литературными данными [5, 7].

Схема синтеза отдельных олигонуклеотидов, входящих в состав дуплексов I—VI, определялась наличием повторяющихся блоков и модифицированных нуклеозидов:



Таким образом были получены олигонуклеотиды (а--к) в количествах 50-170 ед. А₂₆₀. Чистота препаратов составляла 95-98 %.

Нуклеотидную последовательность 14-звенных олигонуклеотидов $(a--\partial)$ подтверждали методом Максама — Гилберта в твердофазном варианте [10], а остальных $(e-\kappa)$ — тем же методом в растворе [11].

БИОПОЛИМЕРЫ И КЛЕТКА. — 1987. — Т. 3, № 6 2 — 7-539

^{*} Соединение (MeO)₂Trm⁵C_{Lev} синтезировано Л. Л. Сухановой по методике [6].

Дуплекс VI получен ферментативным лигированием пяти олигорибонуклеотидов, собирающихся в растворе за счет комплементационных взаимодействий в дуплекс VI' с тремя одноцепочечными разрывами:



Разбивку дуплекса VI на составляющие олигонуклеотиды проводили таким образом, чтобы короткие перекрывающиеся блоки были обогащены G·C-парами. Это должно повысить общую термическую устойчи-



Рис. 1. Электрофорез в 20 %-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевину, продуктов ферментативного лигирования олигонуклеотидов: $a \rightarrow GATGCTGCC$, * р.А.ССТGGCTCT и р.А.GCTTCATAC на матрице AGGTTGGCAGCATC и GTATGAAGCTAGAGCC (I - реакционная смесь после 16 ч инкубирования, 2 -исходный препарат рААССТGGCTCT); $\delta -$ рАGGTTGGCAGCATC и GTATGAAGCC на матрице GATGCTGCC, ААССТGGCTCT и AGCTTCATAC (I - реакционная смесь после 16 ч инкубирования, 2 -исходный препарат рААССТGGCTCT); $\delta -$ рАGGTTGGCAGCATC и GTATGAAGCC, на матрице GATGCTGCC, ААССТGGCTCT и AGCTTCATAC (I - реакционная смесь после 16 ч инкубирования, 2 - исходный препарат рАGG-ТТGGCAGCATC). Звездочкой отмечен фосфатный остаток, несупий з2-метку. Стрелкой указано положение краситедей-маркеров: XC - кеплеяцианол, BPB -бромфеполовый спний

Fig. 1. Separation of the enzymic ligation products in the 20% polyaerylamide gel containing 7 M urea: a = GATGCTGCC, $\overset{*}{p}AACCTGGCTCT$ and pAGCTTCATAC on the matrix formed by AGGTTGGCAGCATC and GTATGAAGCTACAGCC (*I* = reaction mixture 16 h after incubation, 2 = initial $\overset{*}{p}AACCTGGCTCT$); $\sigma = \overset{*}{p}AGGTTGGCAGCATC$ and GTATGAAGCTAGAGCC on the matrix formed by GATGCTGCC, AACCTGGCTCT and AGCTTCATAC (*I* = reaction mixture 16 h after incubation, 2 = initial $\overset{*}{p}AGGTTGGCAGCATC$), $\overset{*}{P}$ -labelled phosphate group is indicated with asterisk. Nylencianol (*XC*) and browplachol blue (*BPB*) markers are indicated with arrows

вость ДНК-дуплекса с тремя одновеночечными разрывами. Для репарации последних использовали Т4-ДНК-лигазу, причем собирали во отдельности каждую из целей дуплекса (рис. 1).

Предложенная схема снитеза позволяет получить отдельно «верхний» и «нижний» тяжи олисопуклеотидного дуплекса, а также дает возможность расширить набор субстратов для фермента рестрикини *EcoRII* при минимальных затратах нуклеотидного материал и Так, комбинируя 30-звенные олигонуклеотиды и олигонуклеотиды ($e - \kappa$), не песущие 5'-концевой фосфатной группы, можно получить дуплексы с контролируемым одноценочечным разрывом:

G-A-T-G-C-T-G-C-C C-T-A-C-G-A-C-G-G-	$\begin{array}{c} A-A + \overline{\mathcal{C} - \mathcal{C} - \mathcal{I} - \mathcal{G} - \mathcal{G}} + \overline{\mathcal{C} - \mathcal{I} - \mathcal{C} - \mathcal{I} - \mathcal{A} - \mathcal{C} - \mathcal{C} - \mathcal{I} - \mathcal{I} - \mathcal{C} - \mathcal{A} - \mathcal{I} - \mathcal{A} - \mathcal{C} \\ \overline{\mathcal{I} - \mathcal{I} - \mathcal{G} - \mathcal{A} - \mathcal{C} - \mathcal{L} - \mathcal{C} - \mathcal{C} + \mathcal{C} - \mathcal{A} - \mathcal{I} - \mathcal{C} - \mathcal{C} - \mathcal{A} - \mathcal{A} - \mathcal{C} - \mathcal{I} - \mathcal{A} - \mathcal{I} - \mathcal{C} \\ \end{array}$
G-A-T-G-C-T-G-C-C- C-T-A-C-G-A-C-G-G-	$\begin{array}{c} A - A + \overleftarrow{C - C - T - C - G} + C - T - C - T - A - G - C - T - T - C - A - T - A - C \\ \overrightarrow{T - T - C - G - A} + C - C - \overrightarrow{G - A - G} - \overrightarrow{T - C - G} - \overrightarrow{A - G} - \overrightarrow{T - A - C} - \overrightarrow{G} - \overrightarrow{A - G} - \overrightarrow{T - A - C} - \overrightarrow{G} - \overrightarrow{A - G} - \overrightarrow{T - A - C} - \overrightarrow{G} - \overrightarrow{A - G} - \overrightarrow{T - A - C} - \overrightarrow{G} - \overrightarrow{A - G} - \overrightarrow{T - A - C} - \overrightarrow{G} - \overrightarrow{A - G} - \overrightarrow{T - A - C} - \overrightarrow{G} - \overrightarrow{A - G} - \overrightarrow{T - A - C} - \overrightarrow{G} - \overrightarrow{A - G} - \overrightarrow{T - A - C} - \overrightarrow{G} - \overrightarrow{A - G} - \overrightarrow{G} - \overrightarrow{A - G} - \overrightarrow{T - A - C} - \overrightarrow{G} - \overrightarrow{A - G} - \overrightarrow{G} - \overrightarrow{A - C} - \overrightarrow{G} - \overrightarrow{A - G} - \overrightarrow{G} - \overrightarrow{A - C} - \overrightarrow{G} - \overrightarrow{A - G} - \overrightarrow{G} - $

Для оценки термической устойчивости полученных ДНК-дуплексов и влияния введенных модификаций на структуру двойной спирали были использованы УФ-спектроскопия и КД. Хотя эти методы не позволяют охарактеризовать локальные возмущения, вносимые модифицированны-

БИОПОЛНМЕРЫ И КЛЕТКА. - 1987. - Т. 3. № 6

ми основаниями, они дают возможность выяснить, как влияют модификации на геомстрию и термодинамические параметры дуплекса в целом. Такая информация полезна для корректной интерпретации данных, полученных при изучении белково-нуклеяновых взаимодействий.

Кривые плавления дуплексов I—III, VI' и VII в дифферепциальной форме представлены на рис. 2, значения h, $T_{n,n}$ н ΔH° комплексообразования приведены в таблице. Из экспериментальных данных видно, что введение вместо остатка тимидина 5-фтордезокснуридина практически не влияет на $T_{n,n}$ н h, но несколько понижает энтальнию комплексообразования. Результаты изучения дуплекса II согласуются с литератур-



Рис. 2. Кривые плавления (в дифференциальной форме) ДНК-дуплексов: $a \rightarrow I$ (1), II (2), III (3) в 0.015 М цитратиом буфере, pH 7.25, содержащем 0.15 М NaCl, C_0 (0.2—0.4)·10⁻³ М; $6 \rightarrow VI'$ (1) в 0.05 М МЭС-буфере, pII 6.0, содержащем 0.02 М MgCl₂, C_e 0.3·10⁻³ М и VII (2) в 0.04 М трис-HCl-буфере, pH 7.6, содержащем 0.05 М NaCl. 0.005 М MgCl₂, 0.007 М 2-меркантоэтанол, C_0 0.1·10⁻³ М

Fig. 2. Melting curves (in differential form) for DNA-duplexes: a = 1 (1), II (2), III (3) in 0.015 M of citrate buffer, pH 7.25, containing 0.15 M of NaCl, C_0 (0.2–0.4) $\cdot 10^{-3}$ M; $\delta = VI'$ (1) in 0.05 M of MES-buffer, pH 6.0 containing 0.02 M of MgCl₂, C_0 0.3 $\cdot 10^{-3}$ M and VII (2) in 0.04 M of tris-HCI-buffer, pH 7.6 containing 0.05 M of NaCl, 0.005 M of MgCl₂, 0.007 M of 2-mercaptoethanol, C_0 0.1 $\cdot 10^{-4}$ M

ными данными. Так, недавно методом ЯМР-спектросконии было нока-

запо, что $A \cdot \tilde{U}$ -пара менее устойчива, чем $A \cdot T$ -пара, однако 12-звенный ДНК-дуплекс, содержащий 5-фтордезоксиуридин, в целом не дестабилизирован [12]. В случае дуплекса III, содержащего 5-метилдезоксицитидии, можно было ожидать изменения термодинамических нараметров комплексообразования, так как известно, что 5-метильная группа цитозина экспопирована в большую бороздку двойной сипрали, а это должно вызвать изменение в гидратной оболочке дуплекса [13]. Однако полученные результаты (рис. 2, *a*, таблица) свидетельствуют о том, что введение одной — двух модификаций такого рода на 14 нуклеотидных нар не влияет существенно на термодинамические свойства системы. Для дуплекса VII характерно высокое значение T_{nn} ; плавление происходит в узком интервале температур (рис. 2, *б*, таблица). В отличие от этой системы плавление дуплекса VI', содержащего три разрыва в цепи фосфодиэфирных связей, не однофазно (рис. 2, *б*), что связано с гетерогенностью участков спаривания по длине и составу. В таблице приведена температура полуперехода, отвечающая последней ступени.

Данные КД свидетельствуют о незначительных конформационных изменениях, индуцированных указанными выше модификациями. Как видно из рис. 3, спектры КД дуплексов I—III почти полностью совпадают. Спектр КД дуплекса VI' (рис. 3) аналогичен спектру ДНК в В-форме с 50 %-ным содержанием G-С-пар [14]. В отличие от этого спектры дуплексов I—III имеют существенное сходство со спектром КД

БИОПОЛИМЕРЫ И КЛЕТКА. — 1987. — Т. З, № 6

ДНК в А-форме: точка нулевого перехода и максимум положительной полосы смещены в коротковолновую область, положительная полоса КД превышает отрицательную по амплитуде. Это позволяет нам сделать предположение о наличии элементов А-формы в двойной спирали ДНК-дуплексов I—III. Недавно появились сообщения об А-форме спирали в кристаллическом состоянии у коротких двутяжевых олигодезок-

 $\cdots G - G \cdots$ ····ċ-ċ···^{[15, 16].} В дупсирибонуклеотидов, содержащих кластеры лексах I--- III имеются четыре такие последовательности. Другая возможная причина отклонения спектров КД дуплексов I-III от канонического вида В-формы — влияние нуклеотидной последовательности на



Fig. 3. CD spectra of DNA duplexes I (1), II (2), III (3), VI' (4). Conditions as indicated in Fig. 2

Некоторые характеристики
синтетических дуплексов *
Some properties of the duplex
synthesized

№ Дуп- лекса	h, %(±1)	Т _{пл} , °С (±1)	Δ <i>Н</i> °**, ккал/моль (±5)
I	18	56	94
II	21	55	
Ш	19	56	
VI'	22	40	
VII	11	73	

* Условия см. в подписи к рис. 2. ** Для дуплекса VI' не рассчитывали ΔH° бифазного конформационного перехода.

вид спектра при изогеометричности структуры коротких ДНК-дуплексов — кажется нам значительно менее вероятной.

Таким образом, результаты физико-химического изучения олигонуклеотидных дуплексов I—III показывают, что введение нуклеотидных аналогов m5C и f5U не снижает устойчивости дуплексов и не приводит к существенному искажению геометрии двойной спирали в целом. Следовательно, эти дуплексы можно с успехом использовать в качестве субстратов эндонуклеазы рестрикции EcoRII, и при интерпретации результатов этих исследований исключить фактор «измененной» по сравнению с немодифицированным субстратом структуры.

Авторы выражают благодарность В. Г. Метелеву и А. А. Пурмалю за помощь при проведении ВЭЖХ.

INTERACTION BETWEEN ECORII RESTRICTION/MODIFICATION ENZYMES AND SYNTHETIC DNA FRAGMENTS. SYNTHESIS OF SUBSTRATES CONTAINING A SINGLE RECOGNITION SITE

S. A. Kuznetsova, E. A. Kubareva, T. S. Oretskaya, N. G. Dolinnaya, N. F. Krynetskaya, E. S. Gromova, Z. A. Shabarova, D. Cech

M. V. Lomonosov State University, Moscow; A. Humboldt University, GDR, Berlin

Summary

9-16 membered oligodeoxyribonucleotides forming DNA-duplexes with one EcoRII site (native or modified) were synthesized by the block triester method. The modifications involved the replacement of one (or two) cytidine or thymidine moieties in duplexes for m⁵dC or f⁵dU, respectively. 30-membered DNA-duplex was obtained by enzymatic ligation of five overlapping oligonucleotides. The substitutions introduced neither result in any significant destabilization nor distort the double helix geometry as is evidenced by the UV- and CD-spectroscopy methods.

- 1. ДНК-подобные дуплексы, содержащие повторы. VIII. Синтез и свойства фрагмен-тов ДНК-субстратов эндонуклеазы рестрикции EcoRII / Е. С. Громова, М. Н. Виноградова, А. А. Елов и др. // Молскуляр. биология. 1984. 18, № 2. С. 370-381
- Jateraction of EcoRII restriction and modification enzymes with synthetic DNA fragments. V. Study of single-strand cleavages / A. A. Yolov, E. S. Gromova, E. A. Kubareva et al. // Nucl. Acids Res.— 1985.— 13, N 24.— P. 8969—8981.
 Interaction of EcoRII restriction and modification enzymes with synthetic DNA fragments. VI. The binding and cleavage of substrates containing nucleotide analogs / A. A. Yolov, M. N. Vinogradova, E. S. Gromova et al. // Ibid.— P. 8983—8998.

- А. А. Yolov, М. N. Vinogradova, Е. S. Gromova et al. // Ibid.— Р. 8983—8998.
 Синтез и изучение термической устойчивости олигодезоксирибонуклеотидных дуплексов со структурными аномалиями / О. И. Грязнова, Н. Г. Долинная, М. Г. Исагулянц и др. // Биоорг. химия.— 1986.— 12, № 1.— С. 124—131.
 Narang S. A. DNA-synthesis // Tetrahedron.— 1983.— 39, N 1.— Р. 3—22.
 Chemische Synthese von Nonadeoxyribonucleotiden mit den Abgewandelten Basen Uracil, 5-Bromuracil und 5-Metylcytosin nach dem Triester Verlahren / А. Rozenthal, D. Cech, V. P. Veiko et al. // Tetrahedron Lett.— 1984.— 25, N 39.— Р. 4353—4356.
 Химические реакции в двуспиральных нуклеиновых кислотах. III. Синтез концевых инвертированных повторов IS1-элемента / З. А. Шабарова, В. П. Вейко, Н. Г. Долинная и др. // Биоорг. химия.— 1987.— 13, № 5.— С. 628—642.
 Синтез олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих З'-концевую фосфатную группу / В. П. Вейко, Т. С. Орецкая, Е. М. Волков и др. // Химия прврод. соединсний.— 1984.— № 5.— С. 637—641.
- 9. Изменения в регламенте синтеза олигодезоксирибонуклеотидов на автоматах-синте-
- стояснения в регламенте синтеза олигодезоксириоонуклеотидов на автоматах-синте-заторах «Виктория-2» и «Виктория-4М» / Т. С. Орецкая, Е. А. Кубарева, С. М. Гряз-нов и др. // Химия природ. соединений.— 1987.— № 1.— С. 153—155.
 Chemische Synthese, Isolierung und Sequenzierung von Tetradecadesoxyribonucleoti-den mit den Abgewandelten Basen 5-Fluoruracii und 5-Methylcytosin / A. Rozenthal, F. Shubert, D. Cech et al. // Biomed. Biochim. Acta.— 1985.— 44, N 10.— S. 75—83.
 Margam A. Gilbert W. A new method for conversion DNA // Desc. Net Acta.
- Maxam A., Gilbert W. A new method for sequencing DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74, N 2.— P. 560—564.
 Cremer A. B., Mikita T., Beardsley G. P. Chemical consequences of incorporation of 5-fluorouracil into DNA as studied by NMR // Biochemistry.- 1987.—26, N 2.—
- P. 391—397.

- P. 391-397.
 13. Molecular structure of (m⁵dC-dG)₃: the role of the methyl group in 5-methyl cytosine in stabilizing ZDNA/S. Fuju, A. H.-J. Wang, G. A. van der Marel et al. // Nucl. Acids Res.- 1982.- 10, N 23.- P. 7879-7892.
 14. March C., Guschlbauer W. A simple method for the computation of first neighbour frequencies of DNAs from CD spectra // Ibid.- 1978.- 5, N 6.- P. 2013-2031.
 15. Shakked Z., Rabinovich D. Sequence-dependent conformation of an A-DNA double helix. The crystal structure of the octamer d(G-G-T-A-T-A-C-C) // J. Mol. Biol.- 1983.- 166, N 2.- P. 183-201.
 16. Raman spectra of single crystals of r(GCG)d(CGC) and d(CCCCGGGG) as models to A DNA, their structure transitions in aqueous solution and comparison with double-helical poly(dG) poly(dC) / L. M. Benevides, A. H.-J. Wang, A. Rich et al. // Biochemistry.- 1986.- 25, N 1.- P. 41-50.

МГУ им. М. В. Ломоносова Гумбольдт. ун-т, Берлин

Получено 20.06.86

УЛК 577.151.45

ИЗБИРАТЕЛЬНОСТЬ РЕСТРИКТАЗЫ ВspRI В ОТНОШЕНИИ СОБСТВЕННЫХ САЙТОВ НА ДНК *

В. Р. Сагитов, А. З. Метлицкая, А. А. Александров

Введение. Для ряда рестриктаз (HaeIII, HhaI [1], EcoRI [2, 3], PstI [4], HinfI [5], HindIII и BamHI [6]) показано, что скорость гидролиза ДНК в различных сайтах существенно отличается. В предельных случаях некоторые сайты полностью устойчивы к действию фермента, хотя и обладают канонической последовательностью для данной рестриктазы [7]. Причина этого явления неизвестна. Предполагают, что эффективность гидролиза ДНК определяется ближайшим окружением сайта [2]. Действительно, на олигонуклеотидах было показано, что скорость гидролиза ДНК для рестриктаз Haelli, BspRI и BsuRI зависит от того.

^{*} Представлена членом редколлегии М. Д. Франк-Каменецким.

БИОПОЛИМЕРЫ И КЛЕТКА. — 1987. — Т. 3, № 6