



УДК 577.113.4:541.127

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДИФИКАЦИИ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО ФРАГМЕНТА ДНК АЛКИЛИРУЮЩИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

*Власов В. В., Енорре Д. Г., Кутявин И. В.,
Мамаев С. В., Подуст Л. М., Федорова О. С.*

*Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР*

Проведена модификация 303-членного нуклеотидного фрагмента ДНК адресованными реагентами $d(pTGACCCCTTTCCCGA \text{ } \rangle CHRCI \text{ (I)}, d(pACCCCTTTCCCGA \text{ } \rangle CHRCI \text{ (II)}, d(pCCCTTTCCCGA \text{ } \rangle CHRCI \text{ (III)}$ и $d(pTCTTTCCCGA \text{ } \rangle CHRCI \text{ (IV)}$, комплементарным участку 261–274. Показано, что кроме модификации G^{258} , расположенного вблизи места связывания реагентов, происходит модификация G^{179} , который, по-видимому, пространственно сближен с алкилирующей группой реагентов, а также незначительно модифицируется участок 19–24 за счет не полностью комплементарного связывания реагентов. Из анализа зависимости степени модификации G^{258} и G^{179} от концентраций реагентов (I)–(IV) оценены их константы ассоциации с участком 261–274 фрагмента ДНК при 25 и 35° С, которые равны соответственно 160 и 31 (I), 0,5 и 2 (II), 0,46 и 0,43 (III), 0,0020 и 0,0023 (IV) $мкМ^{-1}$.

Направленная модификация нуклеиновых кислот может быть проведена с помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов, образующих комплементарные комплексы с определенными нуклеотидными последовательностями (комплементарно адресованная модификация) [1–4]. При этом модификации должны подвергаться участки нуклеиновой кислоты, расположенные вблизи этих последовательностей [5]. Однако в ряде работ было показано, что в случае олигонуклеотидных производных ароматических 2-хлорэтиламинов могут модифицироваться остатки нуклеозидов нуклеиновой кислоты-мишени, расположенные вдали от предполагаемого места связывания реагентов по нуклеотидной цепи [6–8]. По-видимому, особенности вторичной и, вероятно, третичной структуры нуклеиновой кислоты-мишени могут определять положение точек модификации комплементарно адресованными реагентами. В связи с этим представляет интерес количественное исследование вопроса о направленности модификации протяженных фрагментов ДНК алкилирующими производными олигонуклеотидов.

В настоящей работе было изучено протекание комплементарно адресованной модификации 303-членного нуклеотидного фрагмента ДНК, являющегося копией фрагмента РНК вируса клещевого энцефалита. Первичная структура данного фрагмента ДНК приведена в работе [7]. Эта нуклеотидная последовательность, как следует из оценки, проведенной по методу [9], может образовывать по меньшей мере три шпильчатые структуры. Для модификации использовали алкилирующие производные олигонуклеотидов длиной 14, 12, 10 и 8 звеньев (реагенты (I)–(IV) соответственно), комплементарных к петле, ближайшей к 3'-концу фрагмента шпильчатой структуры (рис. 1). Предварительные результаты модификации данного фрагмента ДНК реагентом (I), полученные в работе [7], показали, что модификации подвергаются два нуклеозидных остатка: G^{258} и G^{179} , а при больших концентрациях происходит также модификация участка $G^{17} - G^{34}$, содержащего 18 остатков гуанозина.

В настоящей работе установлено, что все реагенты (I)–(IV) осуществляют модификацию по остаткам G^{258} и G^{179} , а в случае реагентов

Сокращения: $\rangle CHRCI - 2',3'-O-[4-N-(2\text{-хлорэтил})-N\text{-метиламино}]бензилиден$.
Lev – левулинил.

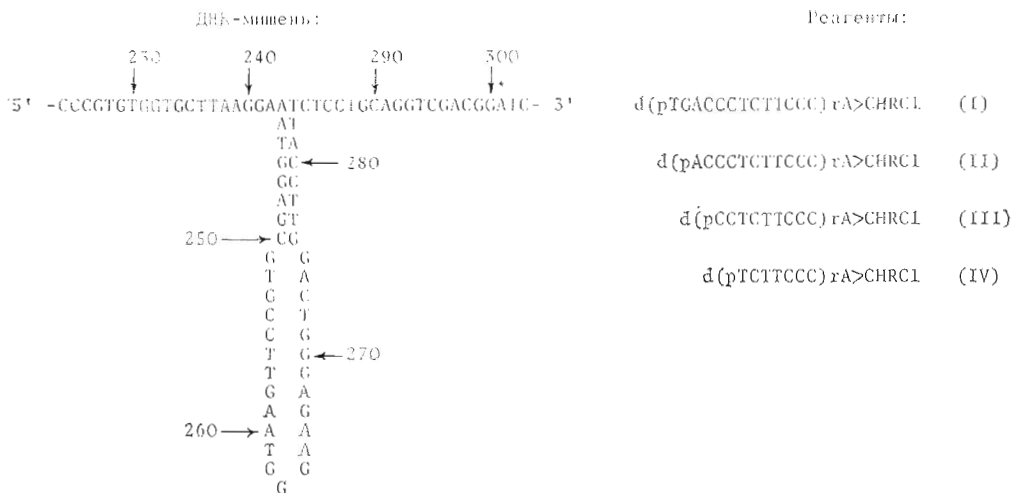
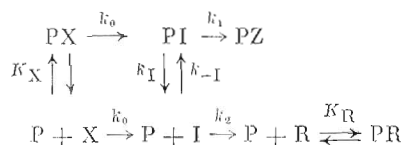


Рис. 1. Вторичная структура участка ДНК, к которому комплементарны олигонуклеотидные части реагентов (I)–(IV), и структура реагентов

(I) и (II) при концентрации $\geq 0,5 \cdot 10^{-5}$ М наблюдается модификация участка G¹⁷–G³⁴ (рис. 2).

Модификация фрагмента ДНК по пиримидиновым нуклеозидам практически не имеет места, поскольку при разделении с помощью электрофореза в полпакриламидном теле реакционной смеси, обработанной пиперидином (условия, в которых расщепления по модифицированным пиримидинам не происходит [10]), количество продуктов спивки с адресующим реагентом, обладающих меньшей подвижностью, чем исходная ДНК, составляет не более 1–2%.

Анализ количественных характеристик модификации проводили в соответствии со следующей кинетической схемой [11]:



где P – биополимер-мишень; X – реагент; I – промежуточный этилениммониевый катион, образующийся из реагента в лимитирующей стадии; PZ – продукт комплементарно адресованной модификации; R – продукт гидролиза катиона I в растворе; PX, PI, PR – соответствующие комплексы с мишенью; K_X , K_R – константы ассоциации для PX и PR; k_0 , k_1 , k_2 , k_{-1} , k_{-I} – константы скорости реакций, указанных на схеме. Полагая концентрации I и PI квазистационарными, а концентрации PX и PR квазиравновесными, а также $k_2 \gg k_{-1} \cdot [P]$ и $K_X = K_R$, для случая, когда $[P]$ (полная концентрация мишени) много меньше начальной концентрации реагента x_0 , в работе [11] получили выражение для зависимости степени модификации биополимера P от времени:

$$\xi = [PZ]/P_t = 1 - \exp\{-\gamma_{\text{эфф}} K_X x_0 [1 - \exp(-k_0 t)] / (1 + K_X x_0)\}, \quad (1)$$

где

$$\gamma_{\text{эфф}} = (1 + y_1 y_2) / (1 + y_2), \quad (2)$$

$$y_1 = (k_1/k_2) (k_1/k_{-1}) / K_X, \quad y_2 = k_{-I}/k_1. \quad (3)$$

Предположение о том, что $K_X = K_R$, означает, что основной вклад в связывание реагента с мишенью вносит комплементарное взаимодействие, а вклад от групп RCl и ROH невелик и тем более невелико различие во вкладах этих групп. Неравенство $k_2 \gg k_{-1} [P]$ или $y_1 y_2 K_X [P] \gg 1$ выполняется в следующем случае: поскольку $k_2 = \sum_i k_2^i [N_i]$ (N_i – нуклеофилы

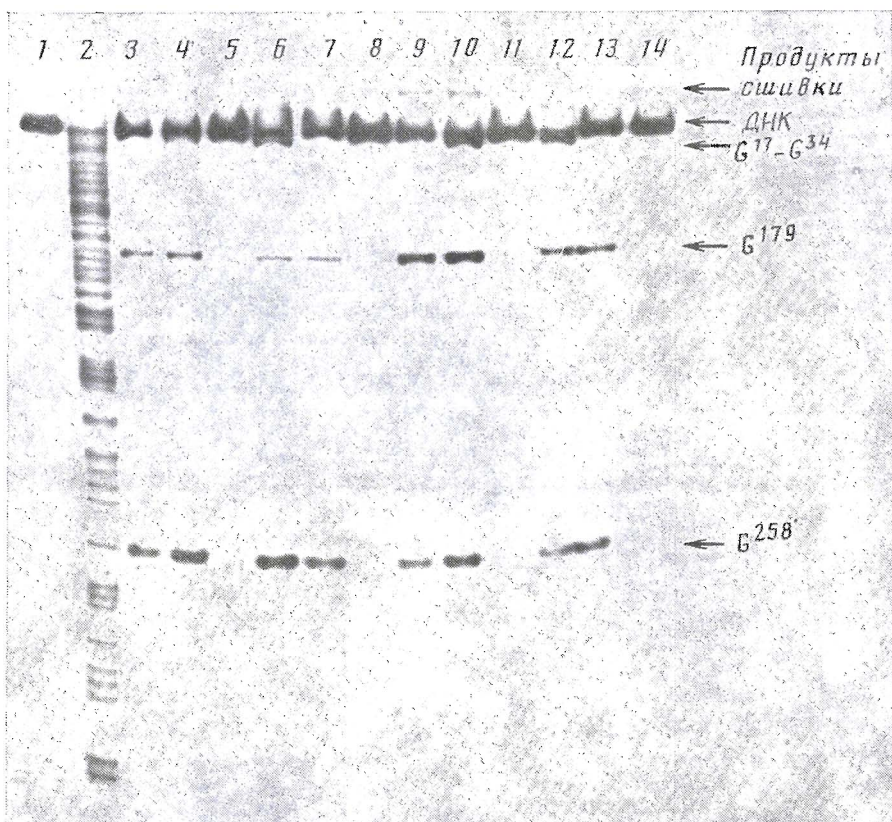


Рис. 2. Радиоавтограф геля после проведения электрофореза (^{32}P -метка введена на 3'-конец фрагмента ДНК): 1 - фрагмент ДНК; 2 - фрагмент ДНК, расщепленный по остаткам G [10], 3-14 - расщепленный ниперидином по местам аффинной модификации фрагмента ДНК. Модификацию проводили при 35° (3-8) и 25° С (9-14). Аффинные реагенты и их концентрации, М: 3, 9 - [I] = $1,2 \cdot 10^{-7}$; 4, 10 - [I] = $4,6 \cdot 10^{-6}$; 5, 11 - [II] = $1 \cdot 10^{-5}$; 6, 12 - [II] = $5 \cdot 10^{-5}$; 7, 13 - [III] = $1 \cdot 10^{-5}$; 8, 14 - [IV] = $6,4 \cdot 10^{-5}$

среды, k_2^i - соответствующие бимолекулярные константы скорости), необходимо, чтобы выполнялось условие $k_2^i/k_1 \gg [P]/[N_i]$. Так как концентрация мишени $\sim 10^{-8}$ М, а основного нуклеофила среды - $\text{H}_2\text{O} \sim 10^2$ М, то это отношение должно превышать 10^{-10} . Учитывая, что k_1 не должна отличаться от диффузионной, это означает, что энергия активации для реакции интермедиата I с водой не должна быть выше 50 кДж/моль. Это вполне вероятно для реакции такого высокорекреационноспособного интермедиата, как ароматический этилениммониевый катион.

Из уравнения (1) следует, что предельная степень модификации биополимера (ζ_∞) зависит от концентрации реагента следующим образом:

$$-\ln(1 - \zeta_\infty)^{-1} = \gamma_{\text{эфф}}^{-1} [1 + (K_X x_0)^{-1}]. \quad (4)$$

Таким образом, с помощью данного уравнения из зависимости предельной степени модификации фрагмента ДНК от концентрации реагентов (I) - (IV) можно рассчитать величины констант связывания K_X и параметров $\gamma_{\text{эфф}}$.

Олигонуклеотидные производные ароматических 2-хлорэтиламинов способны модифицировать нуклеиновые кислоты без предварительного образования комплементарного комплекса, т. е. за счет неадресованной реакции. Модификации при этом подвергаются преимущественно остатки гуанозина [12]. Неадресованное алкилирование характеризуется фактором конкуренции p , представляющим отношение константы скорости взаимодействия промежуточного этилениммониевого катиона I с биополимером к удельной скорости гидролиза этого катиона [13]. Степень мо-

дификации биополимера за счет неадресованной реакции на временах, соответствующих полной ионизации реагента ($\xi_{\infty}^{\text{неадр}}$), можно оценить по формуле, выведенной в работе [13], которая при малых степенях модификации преобразуется к виду

$$\xi_{\infty}^{\text{неадр}} = px_0. \quad (5)$$

В расчете на один остаток гуанозина фактор конкуренции p равен 10 M^{-1} и не зависит от температуры (см. [8] и ссылки в данной работе).

Для оценки эффективности адресованной модификации в работе [8] было предложено использовать отношение скоростей адресованной и неадресованной реакции (f). В условиях наших экспериментов, когда $[P_t] \ll x_0$, скорость адресованной реакции описывается выражением

$$v_{\text{адр}} = k_0 \frac{K_X [P_t] x_0}{1 + K_X x_0}. \quad (6)$$

Поскольку в случае комплементарно адресованной модификации олигонуклеотидными производными ароматических 2-хлорэтиламинов величина $\gamma_{\text{эфф}}$ близка к единице, из уравнения (4) получаем

$$\frac{K_X x_0}{1 + K_X x_0} = -\ln(1 - \xi_{\infty}). \quad (7)$$

Следовательно,

$$v_{\text{адр}} = -k_0 [P_t] \ln(1 - \xi_{\infty}). \quad (8)$$

Скорость неадресованной реакции в предположении, что комплементарно связанный с биополимером реагент не препятствует протеканию неадресованной модификации, равна

$$v_{\text{неадр}} = \frac{p [P_t] x_0}{1 + p [P_t]} \approx k_0 p [P_t] x_0. \quad (9)$$

Таким образом, получаем

$$f = \frac{v_{\text{адр}}}{v_{\text{неадр}}} = -\frac{\ln(1 - \xi_{\infty})}{p x_0}. \quad (10)$$

С помощью уравнения (8) можно получить, что при использованных в работе концентрациях реагентов $< 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ степень модификации за счет неадресованной реакции по любому из остатков нуклеозидов должна составлять не более чем 1%, т. е. должна быть существенно ниже величин, наблюдающихся для модификации G^{253} и G^{179} . Следовательно, избирательная модификация этих гуанозинов обусловлена аффинным характером процесса. Аналогичный вывод можно сделать относительно модификации участка $G^{17}-G^{34}$ реагентами (I) и (II), поскольку степень неадресованной модификации этого участка при концентрации реагента $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ не должна превышать 0,2%, что значительно ниже опытных величин. Можно предположить, что модификация происходит вследствие образования комплекса, включающего G·C- и G·T-пары между реагентом и участком $G^{17}-G^{34}$ ДНК-мишени:



Для более точного определения положения модифицированных гуанозинов ^{32}P -меченный по 5'-концу фрагмент ДНК обрабатывали 1 M пиридином и проводили разделение продуктов расщепления электрофорезом в полиакриламидном геле. Из рис. 3 видно, что модифицируется в основном участок $G^{19}-G^{24}$, что находится в соответствии с предполагаемой моделью связывания реагента с данным участком ДНК.

По данным контекстного анализа, проведенного по методу [9], вблизи G^{179} отсутствует место для связывания с олигонуклеотидными последовательностями реагентов (I)–(IV), имеющее менее четырех некомплементарных нуклеотидов. Этот вывод подтверждается данными работы [7], где было показано, что алкилирующие производные тех же оли-

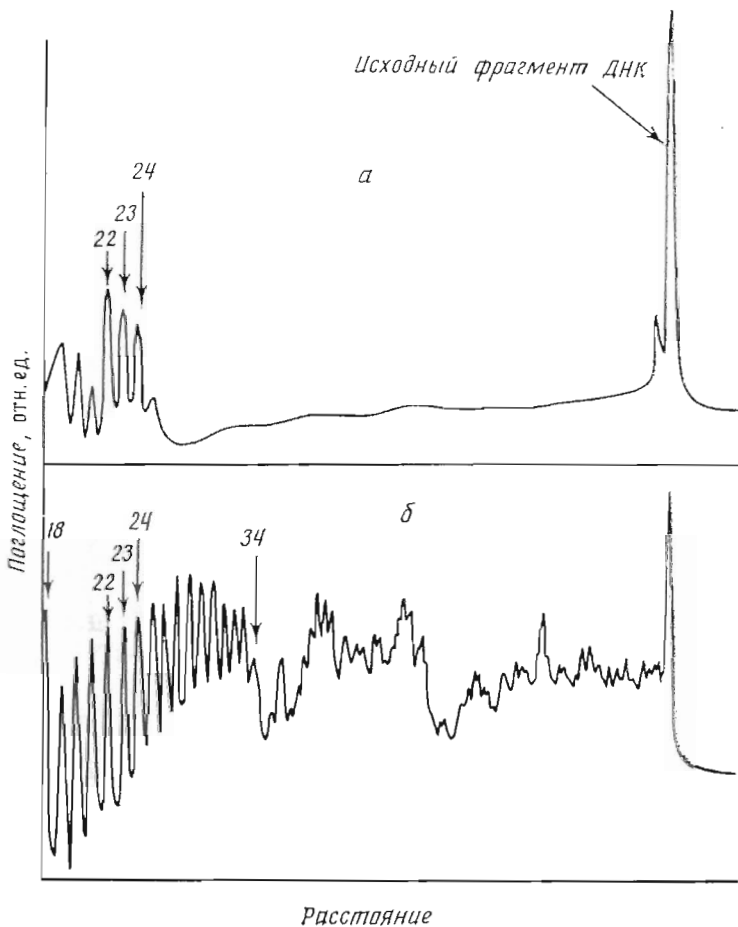


Рис. 3. *а* — денситометрический профиль рентгеновской пленки, полученной в результате радиоавтографии геля после проведения электрофореза модифицированного реагентом (I) фрагмента ДНК, расщепленного пшеридином; *б* — G-специфическое расщепление фрагмента ДНК по методу Максама — Гилберта [10] (^{32}P -метка введена на 5'-конец). Цифры — номер остатка гуанозина, считая от 5'-конца фрагмента ДНК

гоцуклеотидов, что и в случае реагентов (I)–(IV), но несущие на 5'-конце группу $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, не модифицируют участок фрагмента ДНК вблизи G^{179} . Поэтому можно предположить, что модификация G^{179} происходит при взаимодействии с реагентами, которые находятся в комплементарном комплексе с участком 261–274 фрагмента ДНК, однако G^{179} оказывается при этом сближен с алкилирующей группой реагента благодаря особенностям пространственной структуры фрагмента. По этой причине при анализе количественных характеристик связывания реагентов с этим участком ДНК необходимо учитывать модификацию не только G^{258} , но и G^{179} .

В таблице представлены результаты количественной обработки экспериментальных данных по модификации фрагмента ДНК реагентами (I)–(IV). Данные относятся только к модификации остатков G^{258} и G^{179} . При этом в расчетах модификация участка $\text{G}^{17}-\text{G}^{34}$ не учитывалась, так как эксперименты проводились при больших избытках реагентов, и модификация этого участка должна происходить независимо от модификации G^{258} и G^{179} . При расчете эффективности (f) фактор конкуренции (p) принимали равным 20 M^{-1} , учитывая, что модификации подвергаются два остатка гуанозина. Предельную степень модификации (ξ_∞) принимали равной сумме предельных степеней модификации остатков G^{258} (ξ_∞^{258}) и G^{179} (ξ_∞^{179}).

Количественные характеристики модификации фрагмента ДНК реагентами (I)–(IV)
 Концентрация фрагмента ДНК при модификации реагентом (I) составляла $1 \cdot 10^{-9}$ М,
 во всех остальных случаях – $1 \cdot 10^{-8}$ М

Реагент	Концентрация, М	k_0, c^{-1}	ξ_{∞}^{258}	ξ_{∞}^{179}	K_X, M^{-1}	$\gamma_{эфф}$	t
При 35° С							
I	$5 \cdot 10^{-9}$	$4,2 \cdot 10^{-5}$	0,076	0,035	$3,1 \cdot 10^7$	0,8	$1 \cdot 10^6$
	$1 \cdot 10^{-8}$		0,12	0,037			$8,4 \cdot 10^5$
	$5 \cdot 10^{-8}$		0,33	0,066			$5,0 \cdot 10^5$
	$1 \cdot 10^{-7}$		0,28	0,076			$2,2 \cdot 10^5$
	$5 \cdot 10^{-7}$		0,41	0,071			$6,5 \cdot 10^4$
II	$7 \cdot 10^{-7}$	$5,0 \cdot 10^{-5}$	0,46	0,087	$2,0 \cdot 10^6$	1	$5,7 \cdot 10^4$
	$4,7 \cdot 10^{-8}$		0,034	0,011			$4,9 \cdot 10^4$
	$9,4 \cdot 10^{-8}$		0,075	0,025			$5,6 \cdot 10^4$
	$4,7 \cdot 10^{-7}$		0,14	0,050			$2,2 \cdot 10^4$
	$9,4 \cdot 10^{-7}$		0,25	0,083			$2,1 \cdot 10^4$
III	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$	0,26	0,088	$1,3 \cdot 10^5$	0,68	$1,3 \cdot 10^3$
	$8,7 \cdot 10^{-6}$		0,32	0,11			$3,1 \cdot 10^2$
	$1 \cdot 10^{-6}$		0,065	0,008			$3,8 \cdot 10^3$
	$1 \cdot 10^{-5}$		0,31	0,074			$2,4 \cdot 10^3$
	$1 \cdot 10^{-4}$		0,39	0,076			$3,0 \cdot 10^2$
IV	$3 \cdot 10^{-4}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$	0,33	0,060	$2,3 \cdot 10^3$	0,61	82
	$5 \cdot 10^{-5}$		0,061	0,00			63
	$1 \cdot 10^{-4}$		0,12	0,00			64
	$3 \cdot 10^{-4}$		0,27	0,031			60
	$1 \cdot 10^{-3}$		0,24	0,93			16

При 25° С

I	$4,2 \cdot 10^{-9}$	$9,5 \cdot 10^{-6}$	0,14	0,074	$1,6 \cdot 10^8 *$	0,6	$2,9 \cdot 10^6$
	$8,3 \cdot 10^{-9}$		0,20	0,091			$2,1 \cdot 10^6$
	$4,2 \cdot 10^{-8}$		0,24	0,10			$4,9 \cdot 10^5$
	$8,3 \cdot 10^{-8}$		0,34	0,14			$3,9 \cdot 10^5$
	$4,2 \cdot 10^{-7}$		0,34	0,18			$8,7 \cdot 10^4$
II	$7,0 \cdot 10^{-8}$	$9,5 \cdot 10^{-6}$	0,040	0,020	$5,0 \cdot 10^5$	0,42	$4,4 \cdot 10^4$
	$3,5 \cdot 10^{-7}$		0,058	0,043			$1,5 \cdot 10^4$
	$7,0 \cdot 10^{-7}$		0,13	0,085			$1,7 \cdot 10^4$
	$2,1 \cdot 10^{-6}$		0,11	0,096			$5,5 \cdot 10^3$
	$3,5 \cdot 10^{-6}$		0,20	0,13			$5,7 \cdot 10^3$
III	$1 \cdot 10^{-6}$	$9,5 \cdot 10^{-6}$	0,07	0,07	$4,6 \cdot 10^5$	0,46	$7,5 \cdot 10^3$
	$1 \cdot 10^{-5}$		0,15	0,14			$1,7 \cdot 10^3$
	$1 \cdot 10^{-4}$		0,19	0,16			$2,1 \cdot 10^2$
	$3 \cdot 10^{-4}$		0,17	0,14			62
IV	$5,6 \cdot 10^{-5}$	$9,5 \cdot 10^{-6}$	0,051	0,051	$2,0 \cdot 10^3$	1	96
	$8,4 \cdot 10^{-5}$		0,11	0,066			89
	$1,1 \cdot 10^{-4}$		0,073	0,077			92
	$1,4 \cdot 10^{-4}$		0,13	0,083			85
	$2,8 \cdot 10^{-4}$		0,21	0,17			85

* В данном случае в координатах, определяемых уравнением (5), зависимость не линейная, поэтому значения K_X и $\gamma_{эфф}$ имеют здесь приближенный характер.

Из таблицы видно, что при 35° С константы ассоциации реагентов с фрагментом ДНК падают с уменьшением длины олигонуклеотидного адреса, причем уменьшение величины K_X составляет ~15–20 раз при уменьшении длины адреса на два нуклеотида. Такое изменение константы связывания является вполне разумным и согласуется с известными величинами изменения свободной энергии при образовании дуплексов в расчете на одну комплементарную пару [14].

По сравнению с данными для 35° С значения констант ассоциации K_X при 25° С «аномальны». С понижением температуры константа связывания должна увеличиваться, однако для реагентов (III) и (IV) она осталась примерно той же, для реагента (II) даже уменьшилась, а в случае реагента (I) хотя и увеличилась, однако в данном случае эта величина имеет лишь оценочное значение, так как при 25° С степень модификации фрагмента ДНК не линеаризуется в координатах $[\ln(1 - \xi_{\infty})]^{-1} + 1/x_0$, что указывает на более сложное протекание процесса.

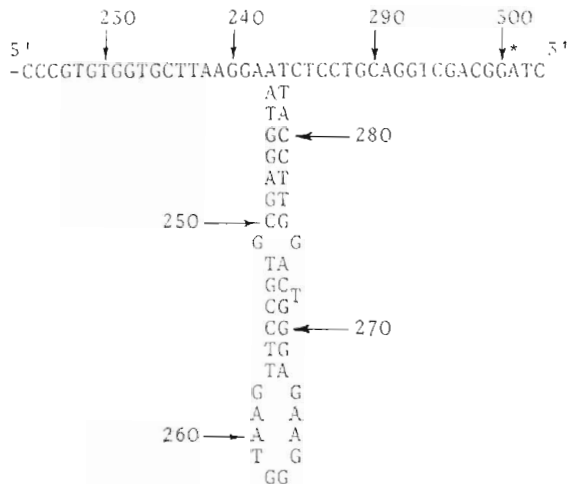


Рис. 4. Предполагаемая структура участка ДНК при 25° С

Константы ассоциации K_x для реагентов (II) и (III) при 25° С примерно одинаковы, что, по-видимому, свидетельствует об участии одного и того же числа нуклеотидных пар в образовании комплементарного комплекса.

Такое «аномальное поведение» констант ассоциации при 25° С можно объяснить следующим образом. Можно предположить, что при 25° С размер петли фрагмента ДНК, к которой комплементарны реагенты (I)–(IV), становится меньше, чем при 35° С, за счет образования дополнительного участка стебля с неполным спариванием (рис. 4). Примерно такой же вывод относительно структуры данного участка фрагмента ДНК был сделан в работе [15], где рассматривалось влияние связывания 5'-биотинированных олигонуклеотидов с ДНК при 22° С ($[NaCl]=0,15 M$) на гидролиз микрококковой пуклеазой. По этой причине удлинение адреса реагента от 10 нуклеотидов (реагент (III)) до 12 нуклеотидов (реагент (II)) не приводит к увеличению K_x . Для 14-членного нуклеотидного адреса (реагент (I)) увеличение K_x происходит, однако процесс образования комплекса, по-видимому, конкурирует с процессом спаривания оснований в стебле шпильки, что приводит к отклонению от зависимости, предсказываемой уравнением (5).

В таблице представлены значения констант скорости ионизации связи C—Cl в реагентах (I)–(III), полученные с помощью уравнения (1) из анализа кинетических кривых модификации фрагмента ДНК. Видно, что эти значения находятся в хорошем согласии с величинами k_0 , рассчитанными из данных работы [16], равными $4,35 \cdot 10^{-5}$ и $1,07 \cdot 10^{-5} c^{-1}$ для 35 и 25° С соответственно.

Все четыре реагента модифицируют одни и те же остатки пуклеозидов фрагмента ДНК. Модификация G^{258} согласуется с данными работы [17], где было показано, что олигонуклеотиды, несущие на 3'-конце группу $>CH_2Cl$, модифицируют третий нуклеотид мишеня, считая от 3'-концевого нуклеотида реагента. Модификация G^{179} вызвана, вероятно, тем, что он пространственно ближе к алкилирующей группе реагента. Пространственная структура фрагмента ДНК при различных температурах может быть разной, поэтому, хотя при 25° С степени модификации G^{258} и G^{179} близки друг к другу, при 35° С G^{179} становится менее доступен и плохо алкилируется по сравнению с G^{258} .

Величина параметра $\gamma_{\text{эфф}}$ в большинстве случаев меньше единицы. Это означает, что эффективность модификации фрагмента ДНК в комплексе с ионизованным реагентом (PI) меньше единицы за счет диссоциации этого комплекса или гидролиза катиона I в комплексе PI.

Полученные данные показывают, что, используя комплементарно адресованные реагенты с длиной адреса в восемь и более звеньев при

достаточно высокой концентрации реагентов можно получать с хорошими выходами модификацию по определенным точкам полинуклеотидной последовательности. Однако этот процесс может сопровождаться, во-первых, модификацией в областях, содержащих не полностью комплементарные адресу последовательности, и, во-вторых, модификацией некоторых других точек, по-видимому сближенных с областью образования комплекса за счет вторичной и третичной структур полинуклеотида. Количественные закономерности модификации могут осложняться формированием в районе модификации дополнительных структурированных областей с неполным спариванием. Эти обстоятельства необходимо учитывать при конструировании реагентов для направленной модификации нуклеиновых кислот.

Экспериментальная часть

Методика выделения фрагмента ДНК и введения 3'-концевой ^{32}P -метки описана в работе [7]. ^{32}P -Метку на 5'-конец вводили с помощью T4-полинуклеотидкиназы (1000 ед./мл) и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (>1000 Ки/ммоль) отечественного производства.

*Олигонуклеотиды d(pTGACCTCTTCCC)гА, d(pACCTCTTCCC)гА, d(pCCTCTTCCC)гА, d(pTCTTCCC)гА синтезировали по методу [18], используя в качестве стандартных блоков динуклеотиды (C1Ph)(CNet)pdNp(C1Ph)dN(Lev) или (CNet)pdNp(C1Ph)dN(Lev) – 5'-концевые блоки, а также 3'-концевой блок (C1Ph)r[асА(Ac)₂] отечественного производства. Хлорфенильные защитные группы удаляли с полностью блокированных олигомеров с помощью *n*-нитробензальдоксимата лития по методу [19]. Остальные защитные группы удаляли концентрированным аммиаком (50°С, 5 ч).*

Реагенты (I) – (IV) синтезировали по методу [20], их очистку осуществляли обратной-фазовой хроматографией на смоле Lichrosorb RP-18 (Merck, ФРГ) в градиенте ацетонитрила на хроматографе Altex (США).

Реакцию модификации проводили в буфере состава 0,1 М NaCl, 0,01 М трис-НСl (рН 7,6), 0,001 М EDTA. Реакцию останавливали осаждением нуклеотидного материала, добавляя 10–20 объемов 2% перхлората лития в ацетоне [21]. Осадок ДНК отделяли центрифугированием и промывали спиртом. Для расщепления ДНК по положениям модифицированных пуринов осадок ДНК растворяли в 1 М пиперидине и инкубировали 20 мин при 100°С [10]. После обработки пиперидином ДНК осаждали 2% LiClO₄, промывали спиртом, сушили в вакууме, растворяли в 5 мкл 80% формамида, содержащего 0,05% бромфенолового синего и 0,05% ксиленцианола FF, и разделяли продукты расщепления электрофорезом на пластинках (15×20××0,04 см) в 10% полиакриламидном геле при напряжении 50 В/см. Гель радиоавтографировали на пленку РТ-1.

Степень модификации фрагмента ДНК определяли двумя способами: 1) из геля вырезали участки, соответствующие продуктам расщепления модифицированного фрагмента ДНК и немодифицированному фрагменту, и определяли их радиоактивность по Черенкову. Отношение радиоактивности участков геля, соответствующих расщеплению по отдельным основаниям, к общей радиоактивности в дорожке геля принимали равной степени модификации по данному основанию;

2) с помощью лазерного сканера LKB Ultrosan XL (Швеция) регистрировали деситометрический профиль рентгеновской пленки после радиоавтографии соответствующей дорожки геля и рассчитывали отношение плотности поглощения. Предельную степень модификации определяли на временах, превышающих пять времен полупревращения для ионизации связи С-Cl в реагентах.

Для определения положений модифицированных пуринов проводили частичное расщепление фрагмента ДНК по гуанинам [10] и по пуринам [22]; полученные таким образом продукты расщепления наносили на гель в качестве контрольных дорожек.

В работе использовали акриламид, N,N-метиленбисакриламид, трис, dNTR (Serva, ФРГ). Остальные реактивы были квалификации х.ч. или ос.ч.

ЛИТЕРАТУРА

1. Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I. // Tetrahedron Lett. 1967. V. 8. № 37. P. 3557–3562.
2. Grineva N. I. // Аффинная модификация биополимеров. /Ред. Кнорре Д. Г. Новосибирск: Наука, 1983. С. 187–211.
3. Grineva N. I. // Биохимия. 1977. Т. 42. № 2. С. 370–374.
4. Кнорре Д. Г. // Молекулярн. биология. 1977. Т. 11. № 7. С. 1304–1310.
5. Vlassov V. V., Gaidamakov S. A., Gorn V. V., Grachev S. A. // FEBS Lett. 1985. V. 182. № 2. P. 415–418.
6. Грачев М. А., Ошевский С. И. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272. № 5. С. 1259–1262.
7. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плетнев А. Г., Подыминов М. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 240–247.

8. Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Левина А. С., Пичко Н. П., Поду-г Л. М., Федорова О. С. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 230-239.
9. Колчанов Н. А., Соловьев В. В., Жарких А. А. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 273. № 3. С. 741-745.
10. Махат А. М., Gilbert M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499-560.
11. Кнорре Д. Г., Чилигова Т. А. // Молекулярн. биология. 1978. Т. 12. № 4. С. 814-821.
12. Беликова А. М., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1972. Вып. 4. С. 110-116.
13. Беликова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. // Молекулярн. биология. 1969. Т. 3. № 2. С. 210-219.
14. Aboul-ela F., Koh D., Tinoco I. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 13. P. 4811-4824.
15. Бросалина Е. Б., Грачев С. А. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 248-256.
16. Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1969. Вып. 1. С. 104-109.
17. Grineva N. I., Karпова G. G., Kuznetsova L. M., Venkstern T. V., Bayev A. A. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 5. P. 1609-1631.
18. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // Биооргани. химия. 1982. Т. 9. № 4. С. 516-521.
19. Jones S. S., Rayner B., Rees C. B., Ubasawa A., Ubasawa M. // Tetrahedron Lett. 1980. V. 21. № 36. P. 3075-3085.
20. Райт В. К., Карпова Г. Г., Гринева Н. И. // Биооргани. химия. 1977. Т. 2. № 1. С. 31-37.
21. Барал Г. И., Грачев С. А. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1420-1422.
22. Коробко В. Г., Грачев С. А. // Биооргани. химия. 1977. Т. 3. № 10. С. 1420-1422.

Поступила в редакцию

11.VIII.1986

После доработки

16.XII.1986

EFFICIENCY OF MODIFICATION OF A SINGLE-STRANDED DNA FRAGMENT WITH ALKYLATING DERIVATIVES OF OLIGONUCLEOTIDES

VLASSOV V. V., KNORRE D. G., KUTJAVIN I. V., MAMAEV S. V.,
PODUST L. M., FEDOROVA O. S.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,
Academy of Sciences of the USSR*

Modification of a single-stranded DNA fragment 303 nucleotides long with addressed reagents d(pTGACCCTCTTCCC)A>CHRCI (I), d(pACCCTCTTCCC)A>CHRCI (II), d(CCTCTTCCC)A>CHRCI (III) and d(TCTTCCC)A>CHRCI (IV) complementary to the sequence 261-274 has been studied. It was shown that not only G²⁵⁸ residue, located near to the above sequence, but also G¹⁷⁹ residue is modified. The latter can be explained by the vicinity of G¹⁷⁹ and the alkylating group in the three-dimensional structure of the complex. Some modification of fragment 19-24 was observed due to non-complementary binding of the reagent. Association constants of the reagents (I)-(IV) with 261-274 sequence of the fragment were calculated using the dependence of the modification extent of G²⁵⁸ and G¹⁷⁹ on the reagent concentration. The constants at 25 and 35° C were found to be 260 and 31 (I), 0,5 and 2 (II), 0,46 and 0,13 (III), 0,0020 and 0,0023 (IV) μM⁻¹.