



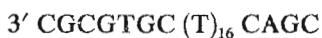
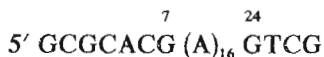
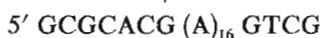
УДК 547.963.07:577.6:544

© 1994 А. С. Левина, Д. Р. Табатадзе,
В. Ф. Зарытова, М. И. Добриков, В. В. Горн,
С. Г. Лохов

КОМПЛЕМЕНТАРНО-АДРЕСОВАННАЯ ФОТОМОДИФИКАЦИЯ
ДНК-МИШЕНЕЙ АРИЛАЗИДНЫМИ И ПЕРФТОРАРИЛАЗИДНЫМИ
ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
IV*. ФОТОМОДИФИКАЦИЯ ss- И ds-ДНК-ФРАГМЕНТОВ

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН

Осуществлена высокоэффективная сайт-специфическая фото-модификация ss- и ds-ДНК-мишеней с использованием производного гексадекатимидилата, R — p(T)₁₆ (R — n-азидотетрафторбензамидная группа), в условиях образования триплексов. В качестве мишени были использованы 27-звенные фрагменты ss- и ds-ДНК:



Основными точками модификации для ss-ДНК являются основания G⁷ и G²⁴, для ds-ДНК — G²² тимидин-богатой цепи и G⁷ аденозин-богатой цепи. Степень фотомодификации ss-мишени достигает 60—77%, а ds-мишени — 10—53% в зависимости от условий реакции. Показано, что степень модификации повышается при проведении реакции в буфере с большой ионной силой (1,0 М) и при пониженной температуре (4° С), что связано с увеличением стабильности тройного комплекса.

Проблема сайт-специфического воздействия на двуцепочечные ДНК является актуальной задачей, перспективы решения которой наметились в последние годы. Такое воздействие стало возможным с помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов, образующих в определенных условиях тройные комплексы с комплементарными участками двуспиральной ДНК. В литературе описано использование алкилирующих [2, 3] и фотоактивных производных олигонуклеотидов для этой цели. Среди последних следует отметить олигонуклеотидные производные с остатками псоралена как эффективные и сайт-специфические фото-реагенты [4, 5]. Менее эффективными оказались производные олигонуклеотидов, несущие арилазидные группы [6—8], остатки порфиринов [9, 10] и эллиптицин [11].

Ранее нами было показано, что олигонуклеотидные реагенты, несущие перфторарилазидную группу, эффективны для фотомодификации одноцепочечных ДНК [12, 13].

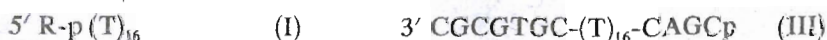
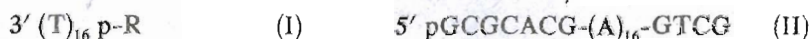
* Сообщение III см. [1]. Префикс «ф» в обозначении дезоксиолигонуклеотидов опущен. Сокращения: ss-ДНК, ds-ДНК — однонитевая и двунитевая ДНК.

Температура плавления триплексов (I)·(II)·(I) и (I)·(II)·(III) и соответствующих дуплексов (I)·(II) и (II)·(III) в буферах Б-1 и Б-2*

Комплексы	Температура плавления, °С	
	Б-1	Б-2
(I)·(II)	49	59
(I)·(II)·(I)	49; 10	58; 34
(II)·(III)	63	68
(I)·(II)·(III)	63; 15	68; 32

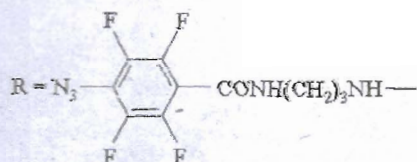
* Концентрация олигонуклеотидов $2 \cdot 10^{-5}$ М во всех случаях, кроме комплекса (I)·(II)·(I), где концентрация $R - p(T)_{16} = 4 \cdot 10^{-5}$ М. Б-1 — 0,1 М LiCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ спермин, pH 7,5; Б-2 — 1,0 М LiCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ спермин, pH 7,5.

В настоящей работе исследована сайт-специфическая фотомодификация 27-звенных ss- и ds-ДНК-фрагментов в условиях образования тройных комплексов с помощью гексадекатимидилата, содержащего перфторарилазидную группу на 5'-концевом фосфате, $R - p(T)_{16}$ (I).



Комплекс (I)·(II)·(I)

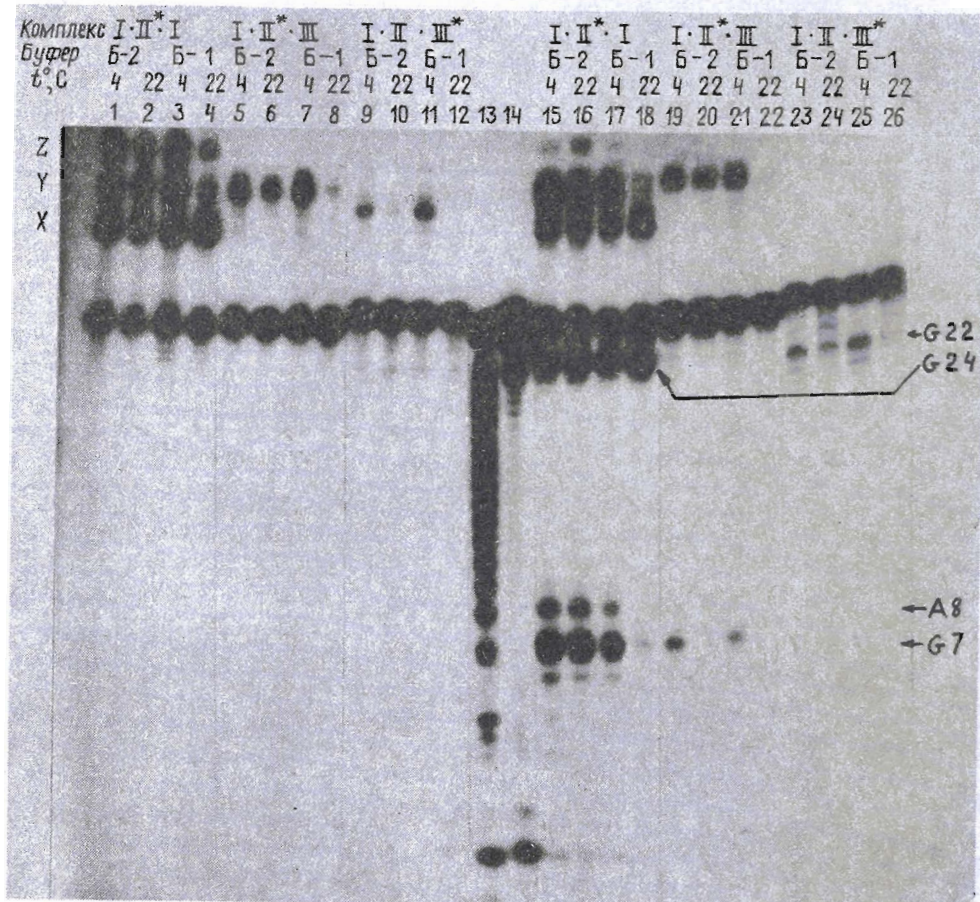
Комплекс (I)·(II)·(III)



Известно [14], что образованию триплексов способствуют высокая концентрация соли, наличие двухвалентных ионов или полиаминов; кроме того, формирование тройных комплексов в отличие от дуплексов требует достаточно длительного времени. Эксперименты, описанные в настоящей работе, проведены в условиях образования триплексов.

Наличие тройных комплексов было подтверждено данными по их термической денатурации. Были определены температуры плавления комплексов (I)·(II), (I)·(II)·(I), (II)·(III) и (I)·(II)·(III) в буферах Б-1 и Б-2 различной ионной силы (0,1 и 1,0 М соответственно) (табл. 1). На дифференциальных кривых плавления фиксируются два максимума, из которых более низкотемпературный соответствует плавлению триплекса, а более высокотемпературный — плавлению дуплекса. Как и следовало ожидать, стабильность комплексов значительно увеличивается в буфере с большей ионной силой (табл. 1).

Фотомодификацию проводили в буферах Б-1 и Б-2 при 4 и 22° С в условиях, описанных в работах [12, 13]. Реакционные смеси после облучения анализировали с помощью гель-электрофореза (рисунок). Во всех случаях облучение вызывает образование ковалентных аддуктов — продуктов присоединения реагента (I) к



Радиоавтограф геля при электрофоретическом анализе ss- и ds-ДНК-мишеней (комплексы (I)·(II)·(I) и (I)·(II)·(III)), подвергшихся облучению светом ртутной лампы ДРК 120 при 303-365 нм в буферах B-1 и B-2 при 4 и 22° С. Дорожки 1—4, 15—18 иллюстрируют модификацию пуриин-богатой цепи (II) в комплексе (I)·(II)·(I); 5—8, 19—22 — той же цепи в комплексе (I)·(II)·(III), 9—12, 23—26 — пиримидин-богатой цепи (III) в комплексе (I)·(II)·(III). 1—12 — реакционные смеси до обработки пиперидином, 15—26 — после такой обработки. 13 и 14 — продукты расщепления цепей (II) и (III) по остаткам пуринов. Состав буферов см. табл. 1. Концентрация мишени $5 \cdot 10^{-6}$ М, реагента — $5 \cdot 10^{-5}$ М. Звездочкой обозначена 5'-³²P-меченая цепь. G⁷, A⁸ и G²⁴ — основания А-богатой цепи (II), G²² — основание Т-богатой цепи (III)

мишени (рисунок, 1—12). В случае комплекса (I)·(II)·(I) образуются ковалентные аддукты X, Y, Z с различной электрофоретической подвижностью (рисунок, 1—4). Подвижность фракции Y совпадает с таковой для продукта присоединения реагента (I) к олигонуклеотиду (II) (А-богатая цепь) при облучении комплекса (I)·(II)·(III) (рисунок, 5—8) и близка к подвижности продукта присоединения реагента (I) к Т-богатой цепи (III) в этом же комплексе (рисунок, 9—12). Суммарный выход продуктов ковалентного присоединения реагента (I) к цепи (II) в комплексе (I)·(II)·(I) составляет 60—77% в зависимости от условий реакции. В комплексе (I)·(II)·(III) реагент присоединяется к обеим цепям (II) и (III) с выходами 27—37 и 6—16% соответственно. Выход ковалентных аддуктов существенно зависит от условий проведения реакции: повышается при охлаждении реакционной смеси, при использовании большого избытка реагента и буфера с большей ионной силой (табл. 2). При фотомодификации в буфере B-1 с низкой ионной силой заметно влияние темпера-

Фотомодификация ss- и ds-ДНК-мишеней с помощью реагента (I) в комплексах (I)·(II)·(I) и (I)·(II)·(III)

Номер строки	Комплекс ^a	Условия реакции		Ковалентные аддукты, % ^b				Щелоче- стабиль- ные про- дукты, % ^c	Щелочлабильные продукты, % ^г			Доля триплек- са, α	
		t° , С	экв. ре- агента (I)	буфер	X	Y	Z		X + Y + Z	G ⁷	A ⁸		G ²⁴
1	(I)·(II) *·(I)	4	2	Б-1	34	16	15	65	29	11	5	34	0,73
2	(I)·(II) *·(I)	22	2	Б-1	55	<5	<5	58	21	<5	<5	57	0,15
3	(I)·(II) *·(I)	4	10	Б-1	26	22	23	71	34	15	7	25	0,91
4	(I)·(II) *·(I)	22	10	Б-1	45	10	10	65	31	11	6	34	0,47
5	(I)·(II) *·(I)	4	10	Б-2	28	23	24	75	33	16	6	19	0,94
6	(I)·(II) *·(I)	22	10	Б-2	28	25	24	77	40	9	5	18	0,94
7	(I)·(II) *·(III)	4	10	Б-1	—	27	—	27	45	30	11	—	—
8	(I)·(II) *·(III)	22	10	Б-1	—	10	—	10	<5	<5	<5	—	—
9	(I)·(II) *·(III)	4	10	Б-2	<5	33	—	35	43	14	4	—	—
10	(I)·(II) *·(III)	22	10	Б-2	<5	35	—	37	37	10	4	—	—
11	(I)·(II) ·(III) *	4	10	Б-1	—	6	—	6	<5	<5	<5	—	<5
12	(I)·(II) ·(III) *	22	10	Б-1	—	—	—	<5	<5	<5	5	—	5
13	(I)·(II) ·(III) *	4	10	Б-2	—	15	—	15	<5	<5	<5	—	34
14	(I)·(II) ·(III) *	22	10	Б-2	—	15	—	16	<5	<5	<5	—	37

^a Звездочкой обозначена 5'-³²P-меченая цепь.^b За 100% принята сумма площадей всех пиков на денситограмме.^c 100% — сумма всех пиков на денситограмме, за исключением исходной мишени.^г G⁷, A⁸, G²⁴ — основания из аденозин-богатой цепи (II), G²² — основание из тимидин-богатой цепи (III). Концентрация цепей (II) и (III) $5 \cdot 10^{-6}$ М. Буферы Б-1 и Б-2 как в подписи к табл. 1. α — доля триплекса в комплексе (I)·(II)·(I), рассчитанная по формуле $\alpha = 2Y + Z / X + Y + Z$.

туры (ср. строки 1 и 2, 3 и 4, 7 и 8, 11 и 12 в табл. 2), а в буфере Б-2 с высокой ионной силой это влияние нивелируется (ср. строки 5 и 6, 9 и 10, 13 и 14 в табл. 2).

Низкая ионная сила и комнатная температура оказались настолько неблагоприятными условиями для образования тройного комплекса, что при этом фотомодификация в комплексе (I) · (II) · (III) минимальная (10%) для цепи (II), а цепь (III) практически вообще не модифицируется (рисунок, 8 и 12; табл. 2, строки 8 и 12).

Следует отметить, что пиримидин-богатая цепь (III) во всех случаях модифицируется слабее пурин-богатой цепи (II). Особенно заметно различие при проведении реакции в буфере Б-1 (рисунок, 7, 8 и 11, 12). Как было показано ранее [13], перфторарилазидные реагенты предпочтительнее модифицируют остаток G, находящийся в непосредственной близости от реакционноспособной группы. Очевидно, в случае цепи (III) остаток G²² расположен дальше от фотоактивной группы, чем остаток G⁷ в цепи (II).

Среди продуктов ковалентного присоединения были обнаружены щелочестабильные продукты (до 45%) и щелочелabile, расщепляющиеся по модифицированным основаниям при обработке пиперидином. Для пиперидин-лабильных продуктов была определена позиционная направленность фотомодификации. Основными точками модификации цепи (II) в комплексе (I) · (II) · (I) являются основания G⁷ и G²⁴ (рисунок, 15—18). Это свидетельствует о том, что фотомодификация происходит в комплементарном тройном комплексе, причем одна из цепей реагента (I) располагается параллельно, а другая — антипараллельно пурин-богатой цепи (II).

В случае комплекса (I) · (II) · (III) цепь (II) модифицируется в основном по основанию G⁷ (рисунок, 18—21), а цепь (III) — по основанию G²² (23—26). Следовательно, модификация также происходит в условиях формирования триплекса при параллельном расположении цепи реагента относительно пурин-богатой цепи мишени. Незначительная (<5%) модификация цепи по основанию G²⁴ (рисунок, 19—22) свидетельствует, что в комплексе (I) · (II) · (III) практически отсутствует дуплекс, образованный пурин-богатой цепью (II) и реагентом (I). Это неудивительно, поскольку гексадекатимидилат не может успешно конкурировать с Т-богатой цепью (III) в создании дуплекса.

Данные о позиционной направленности модификации подтверждают, что в используемых условиях осуществляется наиболее распространенная и изученная структура триплекса с параллельным расположением третьей, пиримидиновой, цепи относительно пурин-богатой цепи [15].

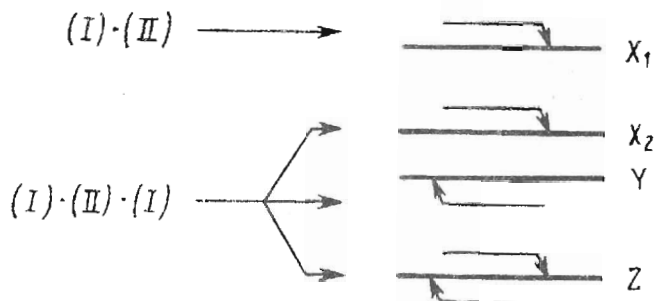
Определив точки модификации мишени, можно с большой долей уверенности идентифицировать фракции ковалентных аддуктов X, Y, Z, образующиеся при фотомодификации комплекса (I) · (II) · (I). Фракция X является, по всей видимости, продуктом присоединения реагента к остатку G²⁴, поскольку она преобладает при фотомодификации мишени (II) в условиях, когда образуется в основном дуплекс (I) · (II) (22° С, 10-кратный избыток реагента, буфер Б-1; рисунок, 4). Присоединение к остатку G²⁴ может происходить как в дуплексе (I) · (II), так и в триплексе (I) · (II) · (I), когда реагент расположен антипараллельно цепи (II).

Фракция Y, очевидно, результат присоединения реагента к цепи (II) по основаниям G⁷ и A⁸, поскольку ее электрофоретическая подвижность, как было отмечено выше, совпадает с подвижностью продукта, полученного при облучении триплекса (I) · (II) · (III) (рисунок, 5—8). В последнем случае невозможна модификация остатка G²⁴, если реагент (I) располагается параллельно цепи (II). Тот факт, что электрофоретическая подвижность модифицированной мишени зависит от места присоединения реагента, не должен вызывать удивления: аналогичные результаты были получены в других работах (например, 16]). Фракция Z является, по-видимому, продуктом присоединения двух молекул реагента (I) к цепи (II) по двум сайтам одновременно (G⁷ и G²⁴), т. е. это тоже результат реакции в триплексе.

Как упоминалось выше, независимо от условий реакции модификация в комп-

лексе(I)·(II)·(III) протекает исключительно из триплекса. Несколько иная ситуация наблюдается для комплекса (I)·(II)·(I). В этом случае может происходить образование дуплекса наряду с триплексом.

Образование смеси продуктов в результате реакций из дуплекса (I)·(II) и триплекса (I)·(II)·(I) можно представить следующей схемой:



Из полученных данных следует, что ковалентные аддукты Y и Z могут образоваться только в условиях формирования триплекса, а продукт X можно представить как сумму продуктов $X_1 + X_2$, где X_1 и X_2 — результат воздействия реагента из дуплекса и триплекса соответственно. Можно допустить, что в тройном комплексе (I)·(II)·(I) реагент с равной вероятностью реагирует по обоим участкам мишени, т. е. $Y = X_2$. Это предположение подтверждается экспериментальными данными. Если в смеси присутствует только триплекс, X_2 должен быть равен X. Это может осуществляться в буфере с высокой ионной силой при большом избытке реагента. Как видно из табл. 2 (строки 5, 6), в этих условиях X или, что то же самое, X_2 приблизительно равен Y.

Из соотношения продуктов X_1 , X_2 , Y и Z можно оценить долю триплекса в смеси с дуплексом (α) в комплексе (I)·(II)·(I). Значения α , определенные по формуле $\alpha = X_2 + Y + Z / X + Y + Z = 2Y + Z / X + Y + Z$, приведены в табл. 2*. Так же как и степень ковалентных аддуктов в целом, соотношение продуктов X, Y, Z, а следовательно, доля триплекса зависит от условий проведения реакции: температуры, избытка реагента, ионной силы раствора. Как видно из табл. 2, доля триплекса колеблется в зависимости от условий от 0,15 до 0,94. Наиболее благоприятными условиями для образования триплекса, как и следовало ожидать и как это было отмечено для комплекса (I)·(II)·(III), были высокая ионная сила, пониженная температура, а также большой избыток реагента ($\alpha = 0,91$ и $0,94$; рисунок, 1—3, 5—7, 9, 11; табл. 2, строки 3, 5, 6). Повышение температуры и снижение ионной силы раствора при сохранении большого избытка реагента привело к уменьшению доли триплекса ($\alpha = 0,47$; рисунок, 4; табл. 2, строка 4). В условиях, наименее благоприятных для образования триплекса (22°C , буфер Б-1, 2-кратный избыток реагента), его доля уменьшается до 0,15 (табл. 2, строка 2). Это подтверждается также тем, что в последнем случае практически отсутствует модификация по остаткам G⁷ и A⁸.

Изменение температуры с 4°C до комнатной существенно влияет на степень образования триплекса при 2-кратном избытке реагента в буфере Б-1 ($\alpha = 0,73$ и $0,15$ соответственно); менее существенно это влияние при увеличении избытка реагента ($\alpha = 0,91$ и $0,47$), и оно практически отсутствует при проведении реакции в буфере Б-2 с большой ионной силой ($\alpha = 0,94$).

С другой стороны, изменение избытка реагента или ионной силы раствора в

* При расчете α учитываются только те дуплексы и триплексы, в которых прошла фото-модификация. Учет комплексов, не приводящих к модификации, усложняет и лишь в незначительной степени корректирует расчеты.

Значения X_1 (%)

Номер строки из табл. 2	$X_1 = (X + Z)(1 - a)$	$X_1 = X - Y$
1	13	18
2	51	50
3	4,5	4
4	30	35
5	3	5
6	3	3

Таблица 4

Степень образования ковалентных аддуктов при модификации ss- и ds-ДНК-фрагментов

$t, ^\circ\text{C}$	Буфер	Сумма ковалентных аддуктов при облучении комплексов, %	
		(I)·(II)·(I)	(I)·(II)·(III)**
4	Б-1	72(65)*	33
22	Б-1	65(30)	10
4	Б-2	75(70)	50
22	Б-2	77(72)	53

* В скобках приведены значения степени образования ковалентных аддуктов из триплекса, рассчитанные с учетом его доли a (см. табл. 2).

** Сумма ковалентных аддуктов, образующихся при модификации цепей (II) и (III). Концентрация олигонуклеотидов (II) и (III) $5 \cdot 10^{-6}$ М, реагента — $5 \cdot 10^{-5}$ М. Буферы Б-1 и Б-2 как в подписи к табл. 1.

большей степени сказывается при проведении реакции при комнатной температуре (ср. строки 2 и 4, 4 и 6 в табл. 2). Другими словами, чем благоприятнее для образования триплекса один из параметров, тем менее заметно на его фоне изменение других параметров.

Из анализа соотношения продуктов X_1 , X_2 , Y , Z можно сделать некоторые интересные, на наш взгляд, выводы. Тот факт, что в тройном комплексе (I)·(II)·(I) реагент с равной вероятностью воздействует на оба участка мишени (см. выше), означает, что две молекулы реагента, одна из которых образует уотсон-криковские, а другая — хугстиновские связи, модифицируют мишень с равной эффективностью. Кроме того, эффективность воздействия реагента, расположенного антипараллельно мишени, т. е. образующего уотсон-криковские связи, приблизительно одинакова независимо от того, находится ли реагент в дуплексе или триплексе. В триплексе реагент, образующий уотсон-криковские связи, дает продукты X_2 и Z (тот, что образует хугстиновские пары, — Y и Z).

Если предположить, что эффективность действия реагента, образующего уотсон-криковские связи, одинакова в дуплексе и триплексе, то продукты X_1 и $X_2 + Z$ должны находиться в таком же отношении, как доли дуплекса и триплекса, т. е. $X_1/X_2 + Z = (1 - a)/a$. Отсюда можно рассчитать X_1 , учитывая, что $X_2 = X - X_1$. Тогда $X_1 = (X + Z)(1 - a)$. С другой стороны, принимая, что $X_2 \cong Y$, можно рассчитать X_1 как разность $X - X_2 = X - Y$. Сравнение значений X_1 , полученных этими двумя способами, показывает хорошее совпадение (табл. 3), что

подтверждает высказанное предположение об эффективности действия реагента в дуплексе и триплексе.

Степень образования ковалентных аддуктов при облучении комплекса (I)·(II)·(I) заметно превышает суммарную степень модификации цепей (II) и (III) в комплексе (I)·(II)·(III) в одинаковых условиях (табл. 4). Частично это можно объяснить тем, что при формировании комплекса (I)·(II)·(I) может образовываться также дуплекс (I)·(II) и модификация может проходить дополнительно из этого дуплекса. Принимая во внимание величину α , можно оценить степень модификации мишени в комплексе (I)·(II)·(I), происходящей из состояния триплекса (табл. 4). Однако и в этом случае степень модификации в комплексе (I)·(II)·(I) превосходит таковую для комплекса (I)·(II)·(III). Вероятно, это обусловлено тем, что модифицируемое основание в первом случае не вовлечено в образование комплементарного комплекса и поэтому более доступно для воздействия фотоактивной группы. Предположение о том, что для более эффективной модификации необходимо наличие свободного основания, не участвующего в комплементарном связывании, было сделано в работе [1] исходя из других экспериментальных данных.

Более эффективная фотомодификация одноцепочечных фрагментов ДНК в тройных комплексах по сравнению с двуцепочечными была показана в работах [7, 11], где использовались азидопрофлавиновые и эллиптициновые производные олигонуклеотидов.

Полученные результаты свидетельствуют, что перфторарилазидные производные олигонуклеотидов — эффективные реагенты для фотомодификации как ss-, так и ds-ДНК-мишеней.

Экспериментальная часть

В работе использовали олигонуклеотиды, синтезированные фосфитамидным или N-фосфонатным методом на синтезаторе «Виктория-6М» [17]. N-Оксисукцинимидный эфир *n*-азидотетрафторбензойной кислоты любезно предоставлен Т. А. Приходько (НИБХ СО РАН). Остаток пропилендиамина присоединяли к концевому фосфату олигонуклеотида в соответствии с работой [18]. Присоединение *n*-азидотетрафторбензоильной группы к аминоконце олигонуклеотида проводили как описано в работе [12]. Молярные коэффициенты поглощения олигонуклеотидов (ϵ) рассчитывали по методу [19]. Значение ϵ_{260} для гексадекатимидилата, содержащего арилазидогруппу, считали равным сумме значений ϵ_{260} для немодифицированного олигонуклеотида и амида азидотетрафторбензойной кислоты ($\epsilon_{260} = 153 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Значения ϵ_{260} для олигонуклеотидов (II) и (III) равны $294 \cdot 10^3$ и $226 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ соответственно. Кривые плавления комплементарных комплексов записывали, используя установку на базе спектрофотометра Милихром-2 (ПО Научприбор, г. Орел) [13].

Фотомодификацию олигонуклеотидов-мишеней и анализ продуктов модификации проводили как описано в работах [12, 13].

Фотомодификация одноцепочечного фрагмента ДНК (II). Образцы (по 20 мкл), содержащие $5'$ - ^{32}P -меченый 27-звенный олигонуклеотид (II) ($5 \cdot 10^6 \text{ M}$) и азидопроизводное гексадекатимидилата (I) ($1 \cdot 10^{-5}$ или $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) в буферах Б-1 или Б-2 (состав буферов см. в подписи к рисунку и табл. I), помещали в 1-мм кварцевую кювету и либо охлаждали вместе с металлическим кюветодержателем до 4°C , либо оставляли при комнатной температуре. Все охлажденные и неохлажденные пробы выдерживали более 7 ч и затем экспонировали светом ртутной лампы ДРК-120 с расстояния 20 см. Для облучения использовали набор стеклянных светофильтров БС-12, УФС-1 (303—365 нм). Источник света — ОИ-18А «ЛЮМО», мощность $W_{303-365} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-2}$. Время экспозиции 5 мин. Реакционные смеси до и после обработки пиперидином (10% пиперидин, 40 мин, 100°C) анализировали с помощью гель-электрофореза в 20% полиакриламидном

денатурирующем геле. Денситометрические профили дорожек радиоавтографа получали, используя лазерный сканер (LKB Ultrosan XL, Швеция). Количество вещества во фракциях X, Y, Z определяли по формуле

$$(I_i/\Sigma I_i) \cdot 100\%,$$

где I_i — площади пиков на денситограммах, соответствующих этим фракциям. Доля триплекса (α) была рассчитана по формуле

$$\alpha = 2Y + Z/X + Y + Z \quad (\text{табл. 2}).$$

Степень модификации по определенному положению мишени (i) после обработки пиперидином (табл. 2) определяли по формуле

$$(I_i/\Sigma I_i - I_0) \cdot 100\%,$$

где I_i и I_0 — площади пиков на денситограмме, соответствующие i -й полосе и исходной мишени. Аналогично определяли количество щелочестойких продуктов.

Фотомодификация двуцепочечного фрагмента ДНК (II)·(III). Образцы (по 20 мкл), содержащие смесь олигонуклеотидов (II) и (III) ($5 \cdot 10^{-6}$ М каждый), один из которых был $5'$ - ^{32}P -меченый, в буфере Б-1 или Б-2, нагревали до 60°C и медленно охлаждали до комнатной температуры. Затем эту смесь добавляли к предварительно осажденному производному гексадекатимидилата (I), результирующая концентрация которого составляла $5 \cdot 10^{-5}$ М. Смесь олигонуклеотидов выдерживали более 7 ч при 4 или 22°C , затем подвергали облучению при соответствующей температуре и анализировали как описано выше.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левина А. С., Табатадзе Д. Р., Зарытова В. Ф., Добриков М. И., Горн В. В., Халимская Л. М. // *Биоорганическая химия*. 1994. Т. 20. № 1. С. 21—29.
2. Povsic T. J., Dervan P. B. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1990. V. 112. N 25. P. 9428—9430.
3. Brassalina E. B., Demchenko E. N., Vlassov B. B., Mamaev S. V. // *Antisense Research and Development*. 1991. V. 1. № 2. P. 229—242.
4. Takasugi M., Cuendout A., Chassignol M., Decout I., Lhomme I., Thuong N., Helene C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. № 7. P. 5602—5606.
5. Giovannagel G., Thuong N. T., Helene C. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. № 16. P. 4275—4281.
6. Praseuth D., Chassignol M., Takasugi M., Le Doan T., Thuong N., Helene C. // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 196. № 4. P. 939—942.
7. Le Doan T., Perrouault L., Praseuth D., Habboub N., Decout J.-L., Thuong N., Lhomme L., Helene C. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. N 19. P. 7749—7760.
8. Praseuth D., Perrouault L., Le Doan T., Chassignol M., Thuong N., Helene C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. N 5. P. 1349—1353.
9. Le Doan T., Praseuth D., Perrouault L., Chassignol M., Thuong N., Helene C. // *Bioconjugate Chem.* 1990. V. 1. № 2. P. 108—113.
10. Fedorova O. C., Savitskii A. P., Shoikhet K. G., Ponomarev G. V. // *FEBS Lett.* 1990. V. 259. N 2. P. 335—337.
11. Le Doan T., Perrouault L., Asseline U., Rivalle C., Thuong N. T., Bisagni E., Helene C. // *Antisense Research and Development*. 1991. V. 1. № 1. P. 43—54.
12. Добриков М. И., Зарытова В. Ф., Комарова Н. И., Левина А. С., Лохов С. А., Приходько Т. А., Шишкин Г. В., Табатадзе Д. Р., Заалишвили М. М. // *Биоорганическая химия*. 1992. Т. 18. № 4. С. 540—549.
13. Добриков М. И., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Левина А. С., Приходько Т. А., Шишкин Г. В., Табатадзе Д. Р., Заалишвили М. М. // *Биоорганическая химия*. 1992. Т. 18. № 6. С. 1190—1196.
14. Rougee M., Fauson B., Mergny J. L., Barcelo F., Giovanangeli C., Garestier T., Helene C. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. № 38. P. 9269—9278.

