



УДК 546.963 + 546.854 + 546.416

КОМПЛЕМЕНТАРНО-АДРЕСОВАННОЕ АЛКИЛИРОВАНИЕ ДНК
ПРОИЗВОДНЫМ ГЕКСААДЕНИЛАТА **Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Мызина С. Д.,
Чемасова А. Н.**Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР**Новосибирский государственный университет*

Алкилирующее производное гексааденилата, $(Ar)_5ACHRCl$, образует с денатурированной ДНК *E. coli* и ДНК селезенки крупного рогатого скота довольно стабильные комплексы. Характер связывания и число участков связывания зависят от соотношения концентраций реагента и ДНК и указывают на присутствие в ДНК 25—50 олиго(dT)-последовательностей на каждые 10^4 нуклеотидов. Нативная двухтяжевая ДНК реагент не связывает. При 20° реагент образует комплексы с 25—28 участками и количественно их алкилирует, образуя ДНК, содержащую вблизи 5'-концов участков связывания алкилированные гуанин и аденин. Алкилирование ДНК в комплексе протекает по меньшей мере на 4 порядка эффективнее, чем вне комплекса. После алкилирования всех участков связывания, образующих продуктивные комплексы, реакция ДНК с $(Ar)_5ACHRCl$ практически прекращается. Цитозин, тимин и фосфодиэфирные группы в реакцию в комплексе не вступают. Нативную ДНК реагент алкилирует незначительно; при 20° в ДНК (на 10^4 моль нуклеотидов) алкилируется и, следовательно, связывается не более 3 участков. При pH 6 и 60° алкилированные гуанин и аденин количественно элиминируются из ДНК.

Ранее мы показали, что алкилирование рРНК алкилирующими производными олигонуклеотидов протекает в комплементарных комплексах и ведет к алкилированию оснований рРНК вблизи участков связывания [1—4]. Позиционная специфичность такого алкилирования [5] близка точности ферментативного аминокислотирования тРНК и включения аминокислот в строящуюся на рибосомах полипептидную цепь [6]. Этот метод модификации — комплементарно-адресованное алкилирование — позволяет выявить и маркировать последовательности в нуклеиновых кислотах, комплементарные олигонуклеотидным фрагментам реагентов [2, 3]. Особый интерес представляет применение комплементарно-адресованного алкилирования для анализа различных последовательностей ДНК и расщепления полинуклеотидных цепей по точкам алкилирования [7, 8].

В связи с этим в данной работе исследовали взаимодействие ДНК *E. coli* и ДНК селезенки крупного рогатого скота с алкилирующим производным гексааденилата с модифицирующей группой на 3'-конце:

* Сокращения: $(Ar)_5ACHRCl$ — 2'3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензильден]гексааденилат; OCHR — остаток β -(N-метил-N-4-формилфениламино)этил.

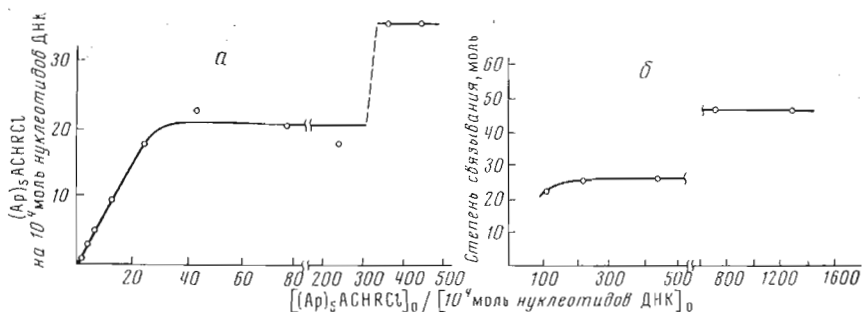


Рис. 1. Изотермы адсорбции $(\text{Ap})_5\text{ACNRCI}$ с денатурированными ДНК *E. coli* (а) и селезенки (б) при 0° . Концентрации ДНК: *E. coli* — 1,70 мМ, селезенки — 1,4 мМ нуклеотидов

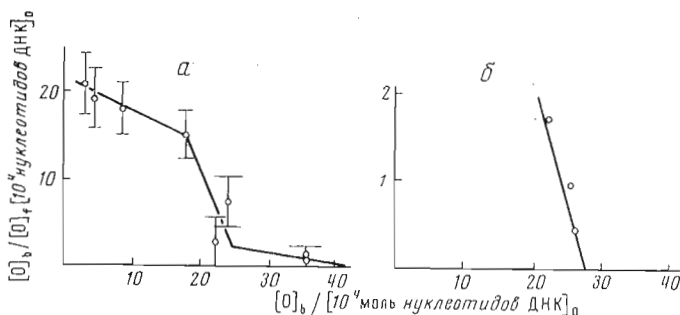
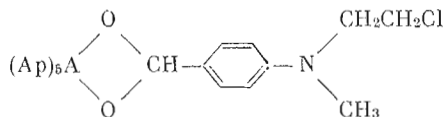


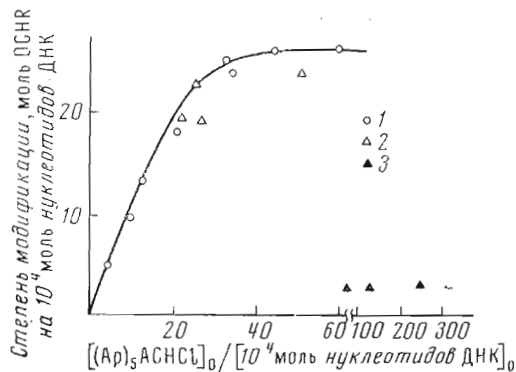
Рис. 2. Кривые Скэтчарда для связывания $(\text{Ap})_5\text{ACNRCI}$ с ДНК *E. coli* (а) и селезенки (б) при 0° . $[\text{O}]_b$ и $[\text{O}]_f$ — концентрации свободного и связанного реагента соответственно

2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]пентаденилиладенозин-ном:



Денатурированная нагреванием или действием щелочи ДНК связывает $(\text{Ap})_5\text{ACNRCI}$ в довольно прочные комплексы; эти комплексы отделяются от избытка реагента гель-фильтрацией при 0° через сефадекс G-75 или G-100. После повторной гель-фильтрации при 0° комплексы диссоциируют не более чем на 10%. При 40° комплексы диссоциируют практически количественно; при 45° реагент и ДНК элюируются с сефадекса в разных фракциях. На рис. 1 приведены изотермы связывания ДНК *E. coli* и селезенки. Видно, что характер связывания реагента зависит от его избыточной концентрации и от степени связывания с ДНК. Эта зависимость отчетливо проявляется в координатах Скэтчарда (рис. 2). Ранее в координатах Скэтчарда подробно анализировалось влияние концентрации алкилирующего производного тетраденилата на характер его связывания с рРНК [4]. Кривая Скэтчарда для связывания $(\text{Ap})_5\text{ACNRCI}$ с денатурированной ДНК при 0° показывает, что на линейном участке зависимости при $[\text{O}]_b/[\text{ДНК}]_0 = 3-15$ протекает связывание с однотипными, одинаково доступными реагенту участками. Затем характер связывания заметно меняется. При $[\text{O}]_b/[\text{ДНК}]_0 = 18-22$ появляется несколько участков, связывающих реагент с большей константой. В большом избытке реагент взаимодействует с участками, независимыми и одинаково доступными, но образующими более слабые комплексы. Изменение характера связывания от связывания с меньшими константами к связыванию с боль-

Рис. 3. Степень алкилирования ДНК в комплексе с $(\text{Ar})_5\text{ACHRCI}$ при 20° в зависимости от концентрации реагента: 1 — денатурированная ДНК *E. coli*, концентрация — 0,3 мМ нуклеотидов; 2 — денатурированная ДНК селезенки, концентрация — 0,14 мМ нуклеотидов и 3 — нативная, концентрация — 1,5 мМ нуклеотидов



шими константами указывает, по-видимому, на конкуренцию реагента при его определенной и достаточно большой концентрации за участки связывания с последовательностями самой ДНК, взаимодействующими с теми же участками связывания. Применение очень больших (~20-кратных) избытков реагента выявляет дополнительные участки связывания. Как видно из рис. 1 и 2, число участков связывания $(\text{Ar})_5\text{ACHRCI}$ в ДНК *E. coli* равно 26 на первой ступени насыщения и 42 — на второй; в ДНК селезенки их число 28 и 50 соответственно (на 10^4 моль нуклеотидов ДНК). Из наклона разных участков зависимости связывания реагента с ДНК *E. coli* в координатах Скэтчарда (рис. 2, а) можно заключить, что второй ступени насыщения (рис. 1) соответствует образование наиболее слабых комплексов.

Выдерживание выделенных комплексов $n[(\text{Ar})_5\text{ACHRCI}] \cdot \text{ДНК}$ селезенки (где $n = 22; 25,4; 26; 53$ и 51 на 10^4 моль нуклеотидов ДНК) при 20° в течение времени, достаточного для алкилирования*, ведет к образованию алкилированной ДНК: $n'[(\text{Ar})_5\text{ACHRCI}] \cdot \text{ДНК}$, где n' — число молей реагента, ковалентно связанного с ДНК, т. е. число алкилированных участков ДНК: $n' = 19,3; 23; 19,2; 20$ и 24 соответственно указанным выше значениям n . Следовательно, в комплексах первого типа насыщения (число участков связывания ~28) алкилированию подвергается 75—90% участков, заключенных в комплексы, т. е. число продуктивных комплексов, образуемых реагентом с ДНК селезенки, не менее максимального значения n' . В денатурированной ДНК *E. coli* при 20° алкилированию подвергается до 25 участков (рис. 3). Из рис. 3 видно, что при 20° предельная глубина алкилирования ДНК достигается уже при 2-кратном избытке реагента над числом участков связывания, образующих продуктивные комплексы. В нативной ДНК селезенки в условиях насыщения, как, вероятно, и на начальном участке зависимости, алкилируются 3 участка связывания (рис. 3).

Существенное различие в степени алкилирования нативной и денатурированной ДНК (примерно на порядок) указывает на неспособность реагента связываться с двухтяжевыми ДНК. Алкилирование в условиях насыщения ~3 участка в ДНК длиной 10^4 нуклеотидов обнаруживает, вероятно, число олиго(dT)-последовательностей в денатурированных локусах данного образца ДНК селезенки. Совокупность данных (различие в глубине алкилирования нативной и денатурированной ДНК, изменение характера связывания реагента денатурированной ДНК по мере связывания) свидетельствует о том, что длинные двухтяжевые участки нативных ДНК не поддаются денатурирующему действию олигомеров. В то же время одноцепочечные ДНК, которые, очевидно, имеют некоторое количество

* Алкилирование $(\text{Ar})_5\text{ACHRCI}$ в комплексе [1, 2], как и в растворе [9], протекает через лимитирующую стадию образования активной промежуточной частицы. Полное превращение реагента в активную частицу при 20° занимает 7 сут.

недлиных двухтяжевых или иначе организованных участков, под влиянием ассоциации с олигомером перестраивают пространственную структуру, открывая в результате конкурирующего действия реагента новые комплементарные ему участки (рис. 2).

Как видно из концентрационной зависимости алкилирования ДНК *E. coli* (Ap)₅ACHRCI при 20° (рис. 3), вначале степень и, следовательно, скорость модификации пропорциональна концентрации реагента, затем, после алкилирования 25—26 участков, степень модификации не меняется. Иными словами, реакция практически останавливается после алкилирования всех доступных реагенту участков связывания, образующих продуктивные комплексы, и после этого глубина модификации становится независимой от концентрации реагента. Этот факт свидетельствует о протекании реакции в комплексе. Еще одним указанием на реакцию в комплексе служит высокая эффективность алкилирования.

Ранее было показано, что на алкилирование тРНК и рРНК вне комплексов расходуется ничтожная доля реагента (<0,3%), а остальная часть реагента претерпевает побочные превращения по конкурентной схеме [1, 3, 10]. Следовательно, в изучаемой реакции ДНК при 20° протекает алкилирование именно в комплексе, а не в растворе, так как эффективность этого алкилирования, вычисленная как отношение долей реагента, израсходованного на алкилирование ДНК и на прочие превращения реагента на начальном участке концентрационной зависимости (рис. 3), и равная 9, по меньшей мере на 4 порядка выше эффективности алкилирования нуклеиновых кислот в растворе при равных концентрациях компонентов ($3 \cdot 10^{-3}$) [1, 3].

Все ли участки ДНК, способные давать комплексы при 20°, образуют продуктивные комплексы? Необходимые для этого данные нельзя получить непосредственно, так как при 20° параллельно со связыванием с заметной скоростью протекает алкилирование (период полупревращения реагента 30 ч). Совпадение предела насыщения первой ступени (рис. 1) и предельной степени модификации (рис. 3) позволяет предположить, что все прочные комплексы, образуемые реагентом с ДНК, продуктивны. Если это так и если вблизи участков связывания основания располагаются статистически в соответствии с нуклеотидным составом, определение химической направленности алкилирования в комплексах ДНК — реагент может дать ответ на этот вопрос.

Для исследования химической направленности алкилирования ДНК в комплексах мы воспользовались свойством алкилированных гуанинов и аденинов, в том числе и производных, содержащих диалкиламинобензильденные остатки [7, 12], элиминироваться из ДНК [7, 11]. Элиминирование алкилированных оснований из ДНК проводили при pH 6 и 60° [7, 12]. В этих условиях бензильденная связь в алкилированном фрагменте гидролизует (за 8 ч в значительной степени, за 40 ч полностью). За 8 ч из алкилированной ДНК элиминируются 24 из 25 алкилированных оснований (95%). В этих условиях алкилированные остатки цитозина остаются связанными с ДНК [7]. Таким образом, к алкилированным в комплексе остаткам цитозина можно отнести не более 5% модифицированных оснований. Основания, элиминированные из ДНК, хроматографировали на бумаге в 3 системах растворителей в сравнении с аутентичными соединениями: алкилцитозином, -аденином и -гуанином (см. таблицу). В числе элиминированных оснований были идентифицированы OCHRAde и OCHRGua, содержание которых в сумме составляло 90% всех элиминированных оснований. В ДНК *E. coli* их количество было одинаковым, а в ДНК селезенки OCHRAde было обнаружено в 2 раза больше, чем OCHRGua. Кроме них было обнаружено вещество с R_f 0,12 в системе А (6—10%), которое может быть, судя по R_f , производным короткого олигонуклеотида, случайно или из-за алкилирования отщепившегося от полинуклеотида при обработке перед или во время элиминирования ос-

Состав и содержание алкилированных оснований, элиминированных из ДНК, алкилированной $(Ar)_5ACHRCl$ в комплексе

Алкилированные основания	Вид ДНК	R_f в системах				Содержание, %
		А	Б	В	Г	
7-ОСНRGua ОСНRAde Не идентифицированы	<i>E. coli</i>	0,42 0,68 0,12	0,63 0,75 0,07	0,40 0,60 0,10		48 43 9
7-ОСНRGua ОСНRAde Не идентифицированы	Селезенки	0,33 0,66 0,017 0,85	— — — —	0,36 0,61 — 0,75	0,03 0,30 — 0,70	31 54 6 10
7-ОСНRCua [13] 1-ОСНRAde [5] 3-ОСНRCyt [5] 3-ОСНRCp [13]	Аутентичные вещества	0,44 0,68 0,60 0,39	0,64 0,74 0,78 0,55	0,42 0,61 0,59 0,52		

нований. Поскольку это вещество не превращается в ОСНRGua и ОСНRAde, оно может быть производным олигонуклеотида, содержащим остаток алкилцитозина, или быть эфиром 4-(N-2-оксиэтил-N-метиламино)-бензальдегида, возникающим в результате алкилирования фосфодиэфирной группы и последующего расщепления образующегося при этом фосфотриэфира. Продукты алкилирования остатков тимина (ОСНRdTThd, ОСНRdTThd или ОСНRThy) не были найдены.

Ранее было показано, что в комплексах $(Ar)_5ACHRCl$ с рРНК количественно алкилируются остатки гуанина, аденина и цитозина, расположенные вблизи 5'-концов участков связывания в одном определенном положении, конформационно удобном для алкилирования [5]. В растворе (вне комплекса) атака реагента направлена в основном на гуанин [7, 11, 13]. Уридин не алкилируется ни в комплексах, ни в растворе. Вместо уридина в комплексе может алкилироваться соседняя фосфодиэфирная группа [5].

Цитозин и фосфодиэфирная группа в комплексе ДНК — реагент алкилируются по крайней мере в 10 раз медленнее, чем гуанин и аденин, если вообще алкилируются. Но состав продуктов алкилирования ДНК в комплексе (равное количество ОСНRGua и ОСНRAde или большее количество ОСНRAde) свидетельствует о низкой химической специфичности алкилирования ДНК в комплексе. Различие в химической направленности алкилирования в комплексах $(Ar)_5ACHRCl$ с ДНК и РНК, заключающееся в инертности цитозина ДНК, может быть следствием трех причин: отсутствия или пониженного содержания цитозина вблизи 5'-концов участков связывания; различной конформации двухтяжевых комплексов, образуемых ДНК и РНК с реагентом, и способности реагента алкилировать в комплексе с ДНК основания, расположенные на разных расстояниях от различных участков связывания, и возможности проявления в результате этого различий в реакционной способности оснований [14].

Если остатки цитозина, тимина и фосфодиэфирные группы ДНК инертны при алкилировании в комплексе, то число непродуктивных комплексов, образуемых реагентом, может достигать 50%, и тогда алкилирование 26 участков выявляет только половину олиго(dT)-последовательностей. Образование при 0 и 20° одних и тех же комплексов кажется сомнительным, так как $A_6 \cdot T_3$ -ассоциаты безусловно не способны существовать при 20°. Следовательно, либо все наблюдаемые при 0° комплексы образованы (dT)_n ≥ 1-последовательностями, либо вблизи 5'-концов олиго(dT)-

участков понижено содержание цитозина и все комплексы $(Ar)_5ACNRCI$ с ДНК, образующиеся при 20° , продуктивны.

Следует отметить, что найденное в ДНК *E. coli* MRE 600 число участков связывания $(Ar)_5ACNRCI$ при 0° (42) и участков алкилирования при 20° (26) в условиях насыщения соответствует числу олиго(dT)-участков, найденному Раднером и Ледо [15] в ДНК *E. coli* B₂₃. Они обнаружили, что число $(dT)_n$, вблизи 5'-концов которых нет остатков цитозина, насчитывается для $n \geq 4$ — 28 и для $n \geq 3$ — 78 на 10^4 нуклеотидов. Общее количество олиго(dT)-фрагментов, $(dC)_m(dT)_n$ при $m \geq 0$ и $n \geq 4$, можно оценить, по данным Раднера и Ледо [15], приблизительно в 38. Соответствие числа участков алкилирования в комплексе в условиях насыщения количеству олиго(dT)-участков, найденных в работе [15], а также конкуренция $(Ar)_5ACNRCI$ и $(Ar)_5A$ за участки связывания в рРНК [4] свидетельствуют в пользу взаимодействия $(Ar)_5ACNRCI$ именно с олиго(dT)-участками ДНК.

Экспериментальная часть

ДНК *E. coli* выделена Т. Е. Вахрушевой из биомассы *E. coli* MRE 600 (производство СКТБ БАВ, Новосибирск) экстракцией фенолом и смесью изопропанол — хлороформ. ДНК селезенки крупного рогатого скота (препарат завода химреактивов, г. Олайне, Латв. ССР). ДНК очищали гель-фильтрацией через сефадекс G-100 («Pharmacia», Швеция), затем осаждали спиртом и центрифугировали («Spinco L-65», ротор SW-25, США) при 25 000 об/мин в щелочном градиенте плотности сахарозы (5—25%) в течение 20 ч при 20° . Фракции, содержащие ДНК, нейтрализовали и осаждали спиртом. Коэффициенты седиментации выделенных ДНК: 8—10 S (ДНК селезенки) и 9—11 S или 50 S (ДНК *E. coli*). Примесей РНК и белка в полученных препаратах ДНК не обнаружено. Экстинкция при 260 нм усредненного нуклеотида денатурированной ДНК *E. coli* $7,25 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹ и ДНК селезенки $7,20 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹. Эти величины рассчитывали на основании содержания фосфора, поглощения растворов ДНК до и после гидролиза ДНКазой и фосфодиэстеразой змеиного яда (растворитель 0,2 M NaCl, 0,01 M MgCl₂ и 0,01 M трис-HCl, pH 7,3) и нуклеотидного состава ДНК *E. coli* (G 26,0, C 26,2, A 23,9, T 23,9 [16]) и ДНК селезенки (G 22,7, C 22,1 A 27,9, T 27,3 [7]). Нативная ДНК селезенки: $OE_{260}^{0,1\%} = 18$ при pH 7; гиперхромный эффект 32%. Концентрацию ДНК выражали в миллимолярной концентрации нуклеотидов. ДНК денатурировали, нагревая ее растворы при 96° 15 мин и быстро охлаждая до температуры опыта.

[¹⁴C] $(Ar)_5ACNRCI$ (5 мКи/моль) получали по методу [1]; чистота препарата 92—94%. Радиоактивность растворов просчитывали в диоксидном сцинтилляторе, радиоактивность на бумаге — в толуольном, используя счетчик «Mark 2» (фирма «Nuclear Chicago», США).

Получение комплексов $(Ar)_5ACNRCI$ с ДНК. К 1,4 мМ раствору ДНК в 0,2 M NaCl, 0,01 M MgCl₂, 0,01 M трис-HCl, pH 7,3—7,8 (буфер 1) при 0° добавляли раствор $(Ar)_5ACNRCI$ в том же буфере. Реагент вначале растворяли в 0,02 M трис-HCl, pH 7,5 (буфер 2) и затем к раствору добавляли равный объем 0,4 M NaCl, содержащего 0,02 M MgCl₂. Раствор ДНК с реагентом выдерживали 2—24 ч при 0° , а затем 1 мл раствора фильтровали через термостатированную колонку с сефадексом G-75 (43 × 0,8 см), уравновешенную буфером 1. Колонку промывали буфером 1, поддерживая температуру $0 \pm 1^\circ$. Скорость элюции 48 мл/ч; объем фракций 0,4—0,8 мл, длительность гель-фильтрации 1 ч. Количество олигомера в комплексе, количество несвязанного олигомера в комплексе, а также количество свободного олигомера определяли по доле радиоактивности объединенных фракций полимерного материала от суммы радиоактивности мономерного и полимерного материала. Выход с колонки ДНК — 97%;

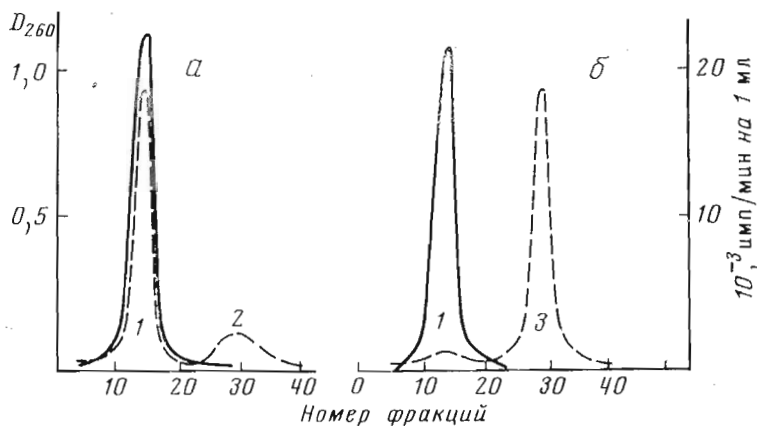


Рис. 4. Гель-фильтрация реакционных смесей через сефадекс G-100 при 45°: а — после алкилирования ДНК *E. coli* $(Ar)_5ACHRCI$ при 20°; б — после элиминирования оснований из алкилированной ДНК *E. coli*, выделенной гель-фильтрацией при 45°; 1 — алкилированная ДНК; 2 — продукты превращения реагента, не вступившего в реакцию с ДНК; 3 — элиминированные из ДНК алкилированные основания. Сплошная линия — поглощение при 260 нм, штриховая — радиоактивность

олигомера — 94%. Результаты по связыванию олигомера с ДНК выражали в молях $(Ar)_5ACHRCI$, связанных с 10^4 моль нуклеотидов ДНК, концентрацию которых устанавливали по исходному раствору ДНК.

Разрушение комплексов проводили по методу [4] с помощью гель-фильтрации их растворов через сефадекс G-75 в буфере 2 при 45°. В этих условиях ДНК и реагент элюируются отдельно. С ДНК, выделенной из комплексов, остается связанной не более 2% радиоактивности. При повторной гель-фильтрации выделенного комплекса ДНК· $(Ar)_5ACHRCI$ при 0° в пике ДНК элюируется 92% радиоактивности. Это указывает на диссоциацию не более 8% комплексов в условиях гель-фильтрации.

Зависимость связывания $(Ar)_5ACHRCI$ с ДНК от концентрации реагента определяли с помощью равновесного диализа по методу [17] при 0° в буфере 1. Концентрация ДНК 1,70 мМ; объем ячеек 0,25 или 0,5 мл. Для определения концентрации реагента в ячейках отбирали по 2 пробы объемом 0,02—0,15 мл и просчитывали их радиоактивность. Равновесие в ячейках устанавливалось через 2 сут (концентрация реагента в ячейках в последующие сутки не изменялась). Результаты по связыванию выражали в молях реагента на 10^4 моль нуклеотидов ДНК.

Алкилирование ДНК в выделенных комплексах. Растворы комплексов ДНК $(Ar)_5ACHRCI$, полученные при гель-фильтрации (концентрация ДНК — 0,14 мМ), выдерживали при 20° 7 сут в присутствии хлороформа (растворы перед использованием обрабатывали бентонитом). За это время реагент полностью превращается в алкилирующую частицу [9]. Затем растворы (не более 5 мл) фильтровали при 45° через сефадекс G-75 (43 × 0,8 см), промывая колонку буфером 2; при этом получали в первом пике алкилированную ДНК, во втором — продукты превращения реагента, не вступившего в реакцию с ДНК. О количестве реагента, связанного с ДНК, судили по радиоактивности и степень модификации выражали в молях остатков реагента на 10^4 моль нуклеотидов ДНК. Доля реагента, ковалентно связавшегося с ДНК, составила 0,88; 0,91; 0,74; 0,40 и 0,50 для комплексов, содержащих 22; 25,4; 26; 53,4 и 51 моль реагента на 10^4 моль нуклеотидов ДНК соответственно.

Зависимость степени алкилирования ДНК в комплексах с $(Ar)_5ACHRCI$ от концентрации реагента определяли, алкилируя ДНК (концентрация — 0,3 мМ нуклеотидов) в 1 мл буфера 1 при 20° в течение 7 сут. Для этого

смешивали растворы компонентов в возрастающей концентрации (Ar)₂АСНРСl. Степень алкилирования определяли как указано выше.

Элиминирование алкилированных оснований из ДНК. К раствору алкил-ДНК, полученному при гель-фильтрации после алкилирования, добавляли 0,2 М ацетат Na (рН 3,8) до рН раствора 6,0—6,2. Раствор выдерживали при 60° в течение 8—36 ч, подвергали гель-фильтрации (элюция буфером 2) и получали в первой фракции ДНК и во второй — элиминированные основания. Профиль гель-фильтрации приведен на рис. 4. Остаточную степень модификации ДНК и количество элиминированных оснований определяли по радиоактивности.

Идентификация алкилированных оснований. Фракцию оснований, отщепившихся от ДНК при рН 6, упаривали, выдерживали в 0,2 М ацетате Na, рН 3,8, 40 мин при 40° и аликвоты хроматографировали на бумаге в 3 системах растворителей со свидетелями: ОСНRCua [13], ОСНRAde [5], ОСНRCp [13] и ОСНRCyt [5,] полученными как описано ранее [5]. Согласно данным работ [7, 11, 12, 18], в мягких условиях из ДНК элиминируются 7-алкилгуанин, 3- и 7-алкиладенины; 1-алкиладенин и 3-алкилцитозин остаются связанными с ДНК. По данным работ [18, 19], 1-, 3- и 7-алкиладенины в большинстве хроматографических систем не разделяются.

Содержание алкилированных оснований, элиминированных из ДНК, определяли, измеряя радиоактивность хроматограмм. Применяемые системы растворителей для БХ: А — изопропанол — конц. аммиак — вода (7 : 1 : 2); Б — изопропанол — вода (6 : 4); В — изопропанол — конц. HCl — вода (170 : 41 : 39); Г — *n*-бутанол — вода (86 : 14).

Авторы благодарят Т. Е. Вахрушеву за предоставление ДНК *E. coli*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grineva N. I., Karpova G. G. (1973) FEBS Lett., 32, 351—355.
2. Grineva N. I., Karpova G. G. (1974) Молекулярн. биол., 8, 832—844.
3. Василенко С. К., Grineva N. I., Karpova G. G., Козоровицкий А. Я., Ломакина Т. С., Саарма М. Ю., Туилов М. П. (1973) Докл. АН СССР, 212, 1227—1230.
4. Grineva N. I., Karpova G. G., Шамо́вский Г. Г. (1974) Молекулярн. биол., 8, 358—374.
5. Grineva N. I., Karpova G. G. (1975) Биоорган. химия, 1, 558—597.
6. Loftfield R. V. (1963) Biochem. J., 89, 82—92.
7. Беликова А. М., Grineva N. I., Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. (1973) Докл. АН СССР, 212, 876—879.
8. Grineva N. I., Karpova G. G., Мызина С. Д., Фодор И., Басв А. А. (1975) Докл. АН СССР, 223, 1477—1481.
9. Власов В. В., Grineva N. I., Кнорре Д. Г. (1969) Изв. СО АН СССР. Сер. хим., вып. 1, 104—109.
10. Беликова А. М., Власов В. В., Вахрушева Т. Е., Grineva N. I., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. (1969) Молекулярн. биол., 3, 210—220.
11. Lawley P. D. (1966) Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, v. 5, p. 89. Acad. Press, L.—N. Y.
12. Grineva N. I., Мызина С. Д. (1975) Молекулярн. биол., 9, 502—508.
13. Беликова А. М., Grineva N. I. (1971) Изв. СО АН СССР. Сер. хим., вып. 5, 119—127.
14. Беликова А. М., Grineva N. I., Karpova G. G. (1972). Изв. СО АН СССР. Сер. хим., вып. 4, 110—116.
15. Rudner R., LeDoux M. (1974) Biochemistry, 13, 188—125.
16. Спирин А. С. (1962) Усп. биол. химии, 4, 93.
17. Uhlenbeck O. C. (1972) J. Mol. Biol., 65, 25—41.
18. Lawley P. D., Вrookes P. (1964) Biochem. J., 92, 19c—20.
19. Grineva N. I., Ломакина Т. С., Мызина С. Д., Наговицина Г. (1974) Изв. СО АН СССР. Сер. хим., вып. 6, 135—140.

Поступила в редакцию
10.III.1975

COMPLEMENTARILY ADDRESSED ALKYLATION OF DNA WITH HEXAADENYLATE DERIVATIVE

GRINEVA N. I., KARPOVA G. G., MYISINA C. D.,
CHEMASOVA A. N.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of Academy
of Sciences of the USSR and State University, Novosibirsk*

The alkylating derivative of hexaadenylate is shown to bind to denatured DNA from *E. coli* and to DNA from bovine spleen. The complexes formed are rather stable at 0—20°. The mode of DNA binding and the number of binding sites depend on the reagent ratio and DNA concentration. Double stranded DNA does not incorporate the reagent. At 20° the reagent can bind to 25—26 regions per 10^4 nucleotides of DNA and within a complex does quantitatively alkylate guanine and adenine adjacent to the 5'-terminus of binding sites of DNA. The reaction stops after alkylation of all the binding sites that are capable to form productive complexes. Cytosine, thymine and phosphodiester bond are not affected within the complex. At 60° and pH 6 alkylated guanine and adenine are quantitatively eliminated to yield DNA with specific apurinic sites.
