



УДК 547.963.32.07+577.3+535.217

СЕЛЕКТИВНОЕ ЛАЗЕРНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ПОЛИАДЕНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПРОИЗВОДНОГО ОЛИГОТИМИДИЛАТА

Булычев Н. В., Лебедев А. В.

*Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР*

*Бенимецкая Л. Э., Козионов А. Л., Нестерихин Ю. Е.,
Новожилов С. Ю., Раутиан С. Г., Штокман М. И.*

*Институт автоматики и электрометрии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

На примере синтеза нонатимидилата, содержащего на 5'-фосфатной группе остаток N-(5-диметиламино-1-нафталинсульфонил)-2-аминоэтанола, разработан метод введения флуоресцентной метки в олигодезоксирибонуклеотиды. Полученное флуоресцентное производное (DnsNH₂Et)(pT)_n образует стабильный комплекс с poly(A) (T_{пл} комплекса 30°С). Обнаружено, что при облучении этого комплекса светом азотного лазера (λ 337 нм) расщепляется цепь poly(A), в то время как в этих же условиях в присутствии (DnsNH₂Et)(pT)_n расщепление poly(U) или poly(C) практически не происходит. Расщепление poly(A) происходит вследствие безрадиационного переноса на полинуклеотид энергии двухфотонного возбуждения хромофорной группы (DnsNH₂Et)(pT)_n, фиксированной вблизи цепи poly(A) за счет образования комплементарного комплекса.

Осуществление направленного химического воздействия на биополимеры — одна из центральных задач молекулярной биологии. В области нуклеиновых кислот наиболее перспективным с точки зрения специфичности представляется подход, основанный на комплементарно-адресованной модификации [1, 2]. Суть этого подхода состоит в том, что реакционноспособную группировку химически присоединяют к олигонуклеотиду, имеющему последовательность оснований, комплементарную к выбранному участку НК. Модификация НК (химическое взаимодействие реакционноспособной группы олигонуклеотида и НК) происходит специфично после образования комплекса вблизи места связывания олигонуклеотида. В этой связи большой интерес представляет фотохимическая комплементарно-адресованная модификация. Очевидно ее преимуществом является высокая селективность и возможность «включения» реакции в определенный момент, без изменения внутренних условий исследуемой системы. Для осуществления фотоаффинной модификации в качестве реакционноспособной группировки необходимо иметь хромофорную группу, а облучение проводить лазерным излучением ближней УФ-области (λ > 300 нм), которое НК непосредственно не поглощает, в то время как хромофорная группа поглощает квазирезонансно [3, 4].

При достаточной интенсивности излучения (≥ 50 МВт/см²) с заметной вероятностью может происходить ступенчатое двухквантовое возбуждение хромофорной группы и безрадиационный перенос этого возбуждения на НК в радиусе ≤ 5 Å вокруг хромофорной группы [4]. Передаваемая энергия (6–8 эВ) достаточна для эффективной модификации (в частности, разрыва цепи) НК. Таким образом, в данном подходе [3–6], названном

Сокращения: DnsNH₂Et — N-(5-диметиламино-1-нафталинсульфонил)-2-аминоэтил; ClPh — 4-хлорфенил, Lev — левулинил, TPS-Cl — 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид; СИД — светондуцированная диффузия; НК — нуклеиновая кислота; для произ водных тимидина префикс «d» всюду опущен.

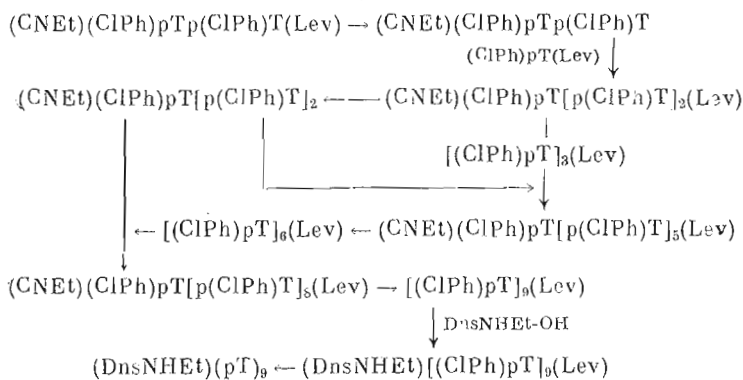
методом двухквантовой аффинной модификации, сочетается специфичность связывания реагента на макромолекуле по химическому средству (аффинности) [1, 2], высокая оптическая селективность, свойственная квазирезонансному нелинейному возбуждению, и эффективность, присущая фотохимии УФ-области.

Физические основы метода двухквантовой аффинной модификации подтверждены в модельных экспериментах [5, 7] с использованием красителя 8-метоксипсоралена (неадресованного реагента), который, как известно, интеркалирует в двойную спираль ДНК. Обнаружено явление нелинейного лазерного расщепления ДНК (индуцированной лазерным облучением фрагментации молекул ДНК в оптически нелинейном процессе) [5, 6] и показано, что это расщепление происходит только через посредство связанного с ДНК красителя [7].

В настоящей работе впервые обнаружено нелинейное лазерное расщепление цепи poly(A) с использованием адресованного флуоресцентного производного олигонуклеотида, содержащего дансильную хромофорную группу.

На первом этапе работы был разработан общий метод введения хромофорной группы в олигонуклеотид. Требования, которые предъявлялись к хромофорной группе, были следующими: 1) она должна обладать способностью поглощать свет в области $\lambda > 300$ нм; 2) легко вводиться в олигонуклеотид, независимо от его первичной структуры; 3) находиться на 3'- или 5'-конце олигонуклеотида, чтобы не препятствовать образованию комплекса олигонуклеотида с полинуклеотидом; 4) выдерживать условия удаления с олигонуклеотида защитных групп.

В качестве реагента для введения хромофорной группы, удовлетворяющей этим требованиям, нами предложен N-(5-диметиламино-1-нафталинсульфонил)-2-аминоэтанол, максимум длинноволновой полосы поглощения которого (см. «Экспериментальную часть») близок к длине волны азотного лазера (λ 337 нм). Присоединение DnsNH₂-OH к 5'-фосфатной группе защищенного нонатимидилата [(ClPh)pT]₉(Lev) (схема) было осуществлено стандартной реакцией конденсации в присутствии TPS-Cl и N-метилимидазола в хлороформе. При обработке полученного флуоресцентного производного олигонуклеотида раствором тетраметилгуанидиниевой соли *n*-нитробензальдоксимата в 50% водном пиридине в течение 3 сут наряду с удалением *n*-хлорфенильных и левулинильных защитных групп произошло и частичное отщепление (~40%) флуоресцентной группы. Однако (DnsNH₂)(pT)₉ удалось выделить последовательным применением ионообменной и высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографий. Полученное соединение было гомогенно при анализе методами ионообменной, обращенно-фазовой и гель-хроматографии. В УФ-спектре (рис. 1) присутствуют две полосы поглощения, соответствующие остаткам DnsNH₂-и нонатимидилата. В спектре флуоресценции (рис. 1) в области 550 нм присутствует полоса, характерная для дансильных производных.



При исследовании комплексообразующих свойств флуоресцентного производного олиготимидилата получено, что (DnsNH₂)(pT)₉ образует ста-

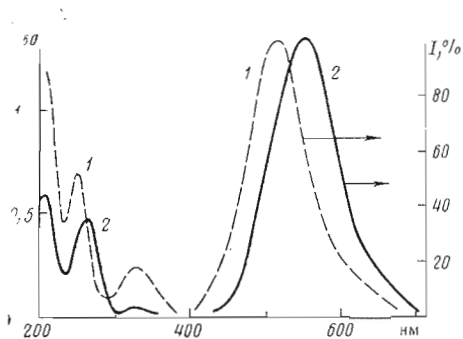


Рис. 1

Рис. 1. УФ-спектры и спектры флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} 337 \text{ нм}$) DnsNHEt-OH в метаноле (1) и (DnsNHEt)(pT)₉ в воде, pH 6,0 (2)

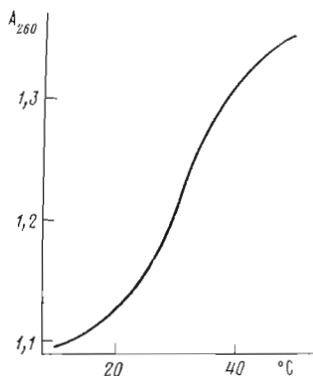


Рис. 2

Рис. 2. Профиль плавления комплекса poly(A) с (DnsNHEt)(pT)₉ в 0,01 М трис-HCl (pH 7,5), содержащем 0,2 М NaCl и 0,01 М MgCl₂

бильный комплекс с poly(A) (рис. 2), температура плавления которого (30° С) совпадает с температурой плавления комплекса (pT)₉ с poly(A) в аналогичных условиях.

Альтернативным методом введения дансильной метки в олигонуклеотид является прямая реакция дансилхлорида с 3'- или 5'-оксигруппой защищенного олигонуклеотида. Однако мы установили, что полученное таким образом флуоресцентное производное олигонуклеотида в условиях удаления защитных групп теряет флуоресцентную метку.

На рис. 3а приведены результаты гель-хроматографии смеси poly(A) и (DnsNHEt)(pT)₉ при разных дозах облучения. Видно, что с ростом дозы происходит падение интенсивности пика исходной poly(A), сопровождающееся его уширением и смещением в область более коротких молекул (рис. 3а, пик I). В отдельном эксперименте показано, что облучение poly(A) (доза 42 Дж/см²) в отсутствие (DnsNHEt)(pT)₉ не приводит к каким-либо заметным изменениям ни в ширине, ни в месте выхода пика по сравнению с необлученным образцом poly(A). Небольшой пик II, возникающий в ходе облучения, вероятно, является продуктом фотодимеризации нонатимидилата (аналогичный пик наблюдается при облучении (DnsNHEt)(pT)₉ с poly(U) и poly(C) (рис. 3б, в). Пик III — (DnsNHEt)(pT)₉, пик IV — низкомолекулярные продукты деградации (DnsNHEt)(pT)₉, а также, вероятно, poly(A). Расщепление (DnsNHEt)(pT)₉ наблюдали при облучении его в смеси и с poly(U), и с poly(C) (рис. 3б, в) и в отсутствие полинуклеотидов. Деградация (DnsNHEt)(pT)₉, по-видимому, обусловлена передачей возбуждения хромофора на собственную олигонуклеотидную цепь.

В экспериментах по облучению смеси (DnsNHEt)(pT)₉ и некомплементарного ему полинуклеотида (poly(U) или poly(C)) расщепления полинуклеотида не наблюдали: при анализе смеси методом гель-хроматографии на сефадексе G-100 после облучения в отличие от случая с poly(A) не произошло заметного уширения либо смещения пика полинуклеотида по сравнению с необлученной контрольной смесью (рис. 3б, в).

Исследование расщепления poly(A) в присутствии (DnsNHEt)(pT)₉ проводили также при помощи эффекта светоиндуцированной диффузии НК [8, 9]. Сущность этого эффекта состоит в том, что образовавшиеся в процессе расщепления короткие фрагменты НК диффундируют из зоны облучения быстрее, чем туда успевают проникнуть из соседних областей целые молекулы, имеющие меньшие коэффициенты диффузии. В результате плотность вещества, а следовательно, и оптическое поглощение НК в зоне облучения понижается, а в прилегающих областях повышается.

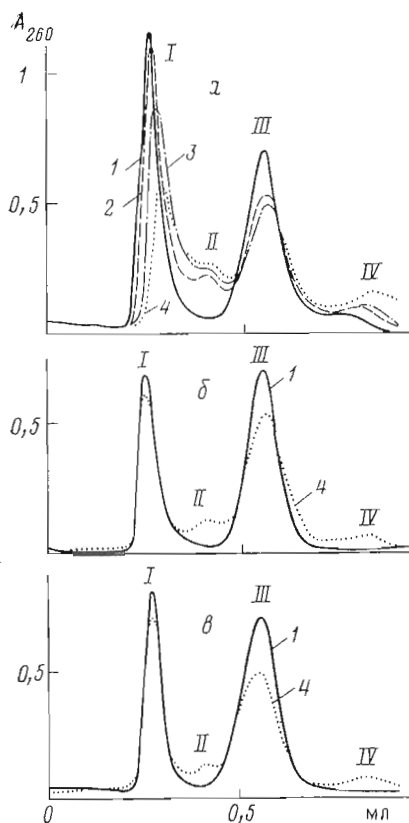


Рис. 3

Рис. 3. Гель-хроматография на сефадексе G-100 superfine смесей (DnsNHET) (pT), с poly(A) (а), poly(U) (б) и poly(C) (в) до (I) и после облучения с дозой 4,7 (2), 14 (3) и 42 Дж/см² (4). Колонка 0,25×17 см, элюция 7 М мочевиной (рН 7,5) со скоростью 0,59 мл/ч. Пики I—IV см. в тексте

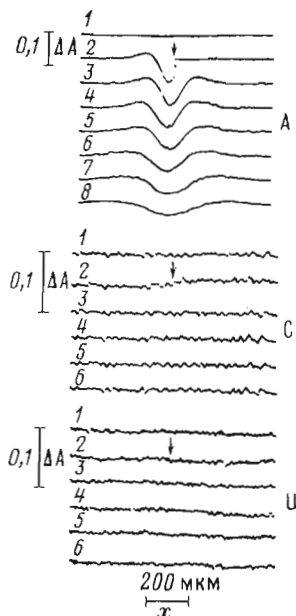


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость вариации оптического поглощения ΔA (λ 254 нм) от координаты x для разных моментов времени. А, U, С отвечают трем независимым экспериментам с poly(A), poly(U) и poly(C). 1 — до облучения; 2 — сканирование оптического поглощения до облучения справа налево до точки, указанной стрелкой, затем сканирование прерывали, в течение 3 мин проводили лазерное облучение, лазер выключали и возобновляли сканирование; 3, 4 и т. д. записаны с интервалом 2 мин после окончания предыдущего сканирования. Время сканирования одной кривой 26 с. Эквивалентная смесь полинуклеотида и (DnsNHET) (pT), (в расчете на мононуклеотид). Среднее оптическое поглощение A_{337} 0,09, A_{254} 0,6

Теория СИД показывает, что изменение оптического поглощения ΔA (при $\Delta A \ll 1$) пропорционально полному числу расщепленных при облучении молекул НК [3].

Результаты экспериментов по СИД полинуклеотидов приведены на рис. 4. В случае poly(A) эффект СИД ярко выражен, величина модуляции оптического поглощения $\Delta A_m = A_{\max} - A_{\min}$ достигает 0,1, пространственный интеграл $\int \Delta A(x) dx$ с хорошей точностью равен нулю, т. е. интегральное оптическое поглощение смеси остается постоянным. Это свидетельствует о том, что причиной возникновения модуляции оптического поглощения служит именно нелинейное лазерное расщепление, а не деградация хромофоров. В случае poly(U) и poly(C), несмотря на двукратное увеличение чувствительности по ΔA , заметного эффекта СИД не наблюдали.

Оптическая нелинейность лазерного расщепления НК в присутствии хромофорной группы обусловлена тем, что для эффективного безрадиационного переноса энергии, достаточной для разрыва полинуклеотидной цепи, необходимо, чтобы хромофорная группа поглотила два кванта света. Экспериментально это должно выражаться квадратичной зависимостью эффекта СИД от мощности излучения. В случае лазерного расщепления poly(A) в присутствии (DnsNHET) (pT), квадратичная зависимость вели-

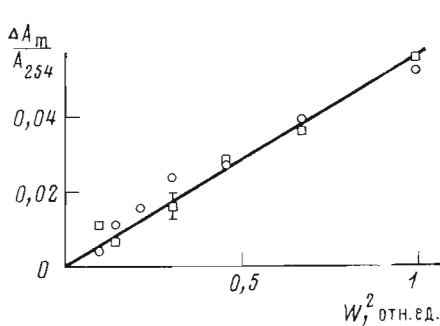


Рис. 5

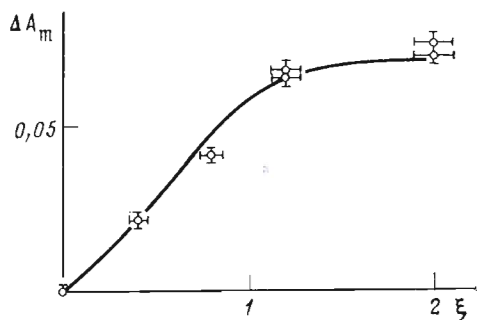


Рис. 6

Рис. 5. Относительная величина эффекта СИД $\Delta A_m/A_{254}$ как функция средней мощности лазерного излучения, падающего на кювету W_c . Максимальное значение $W_c = 1,4$ мВт (соответствующая максимальная интенсивность в импульсе ≈ 70 МВт/см²). Точки, обозначенные квадратами и кружками, соответствуют результатам двух независимых экспериментов. Прямая построена по методу наименьших квадратов

Рис. 6. Зависимость величины эффекта СИД ΔA_m от относительной концентрации $(DnsNHet)(pT)_9$ (ξ). Концентрация poly(A) равна $2 \cdot 10^{-4}$ М (в расчете на нуклеотид); соответствующее значение $c_s = 2,2 \cdot 10^{-5}$ М. Принцип построения сплошной линии описан в «Экспериментальной части»

чины эффекта СИД от мощности излучения (рис. 5) хорошо согласуется с ненасыщенным ступенчатым возбуждением.

Подтверждением индуцирования расщепления poly(A) именно связанным с ним $(DnsNHet)(pT)_9$ является то, что при температуре, при которой проводился эксперимент ($18-19^\circ\text{C}$), $\sim 80\%$ эквимолярной смеси poly(A) и $(DnsNHet)(pT)_9$, находились в комплексе ($T_{пл} = 30^\circ\text{C}$) (см. рис. 2). Прямое подтверждение дает зависимость величины эффекта СИД от концентрации $(DnsNHet)(pT)_9$ (рис. 6). Теоретическая кривая (рис. 6) была рассчитана для изотермы адсорбции $(DnsNHet)(pT)_9$ на poly(A) с константой диссоциации $K_d = 1 \cdot 10^{-6}$ М. Эта величина хорошо согласуется с K_d , равной $(1,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$ М, найденной по плавлению комплекса $(DnsNHet)(pT)_9 \cdot poly(A)$.

Специфичность лазерного расщепления poly(A) подтверждена также результатом эксперимента по ингибированию: после добавления избытка $(pT)_9$ к смеси, содержащей фиксированные концентрации poly(A) и $DnsNHet(pT)_9$, эффект СИД значительно подавляется.

Таким образом, в настоящей работе разработан общий метод синтеза олигонуклеотидов, содержащих дансильную группу, и впервые показано, что такие производные можно использовать для комплементарно-адресованного лазерного расщепления полинуклеотидов. Этот метод может найти применение для исследования структуры и функций нуклеиновых кислот.

Экспериментальная часть

Полностью защищенный динуклеотид, $(CNet)(ClPh)pTp(ClPh)T(Lev)$ синтезировали согласно методу [10]. Мононуклеотид, $(ClPh)pT(Lev)$ и TPS-Cl — препараты опытного химического производства Новосибирского института органической химии СО АН СССР; poly(A), poly(U) и poly(C) — препараты фирмы Reanal (Венгрия); N-метилимидазол — Ega Chemie (ФРГ); 5-диметиламино-1-нафталинсульфохлорид — Fluka AG (Швейцария); силикагель 60 — Merck (ФРГ); сефадек G-100 superfine — Pharmacia (Швеция). Пиридин содержал менее 0,02% воды. Хлороформ, используемый в реакциях конденсации, дважды перегоняли над P_2O_5 и хранили над Al_2O_3 в темноте.

Запись УФ-спектров поглощения и кривой плавления комплекса poly(A) и $(DnsNHet)(pT)_9$ производили на спектрофотометрах DU-8 (Beckman, США) и Gilford-250 (Франция), спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре MPF-4 (Hitachi, Япония), толщина кювет 1 мм.

¹H-ЯМР-спектры записывали на импульсном спектрометре HX-90 (рабочая частота 90 МГц) с фурье-преобразованием на ЭВМ BNC-12 (Bruker,

ФРГ). Химические сдвиги приведены относительно гексаметилдисилоксана как внутреннего стандарта.

Обращенно-фазовую и гель-хроматографии проводили с использованием жидкостного хроматографа «Миличром» отечественного производства.

N-(5-Диметиламино-1-нафталинсульфонил)-2-аминоэтанол. 0,28 г 5-диметиламино-1-нафталинсульфохлорида добавляли к смеси 0,2 мл пиридина и 0,2 мл 2-аминоэтанола. Через 1 ч реакционную смесь досуха упаривали. Остаток растворяли в 0,5 мл хлороформа и наносили на колонку с силикагелем (1×20 см). Элюцию проводили метанолом в хлороформе (линейный градиент 0–10%, общий объем 500 мл). Фракции, содержащие DnsNH₂Et-OH, собирали и упаривали. Выход 0,18 г (58%). Структуру и чистоту продукта анализировали методами ТСХ на силикагеле, ЯМР-спектроскопии, УФ- и флуоресцентными спектрами (см. рис. 1). ¹H-ЯМР (CDCl₃), δ, м.д.: 8,465 (H-8, J_{4,8} 0,8 Гц, J_{6,8} 1,2 Гц, J_{7,8} 7,3 Гц), 8,245 (H-4, J_{2,4} 0,8 Гц, J_{3,4} 8,3 Гц), 8,16 (H-6, J_{6,7} 8,5 Гц), 7,46 (H-3, J_{2,3} 7,8 Гц), 7,42 (H-7), 7,08 (H-2), 3,53 (CH₂O, J_{1',2'} 5,0 Гц), 2,98 (CH₂N), 2,80 (CH₃). Ранее реагент был получен другим методом [11].

Синтез (CNEt)(ClPh)pT[p(ClPh)T]_s(Lev) проводили новым вариантом триэфирного метода, в (3'→5')-направлении согласно работе [12], с использованием 5'-*n*-хлорфенил- и 3'-свободных производных моно- и олигонуклеотидов в присутствии *N*-метилимидазола и TPS-Cl в хлороформе (см. схему). β-Цианэтильную защитную группу удаляли с концевой 5'-фосфатной группы (CNEt)(ClPh)pT[p(ClPh)T]_s(Lev) обработкой абс. триэтиламинном в ацетонитриле [13]. Удаление левулинильного остатка производили в соответствии с работой [14].

(DnsNH₂Et)(pT)₉. [(ClPh)pT]₉(Lev) (650 ОЕ₂₆₆) несколько раз упаривали с 1–2 мл абс. хлороформа. Затем к остатку добавляли 0,12 мл абс. хлороформа, 16 мг DnsNH₂Et-OH, 25 мг TPS-Cl и 0,012 мл *N*-метилимидазола. Через 40 мин реакционную смесь наносили на колонку с силикагелем (1×20 см). Элюцию проводили метанолом в хлороформе (линейный градиент концентрации 0–20%, общий объем 500 мл). Фракции, содержащие флуоресцентный нуклеотидный материал, собирали и упаривали. Получено 410 ОЕ₂₆₆ (DnsNH₂Et)(ClPh)pT[p(ClPh)T]_s(Lev). *n*-Хлорфенильные защитные группы удаляли обработкой раствором тетраметилгуанидиниевой соли *n*-нитробензальдоксима в 50%-ном водном пиридине в течение 3 сут при ~20°С [15], причем одновременно наблюдалось отщепление остатка левулиновой кислоты. При этой обработке отмечается частичное отщепление (~40%) флуоресцентной группы от нонатимидилата. (DnsNH₂Et)(pT)₉ выделяли ионообменной хроматографией на колонке с аминсилохромом AC-300 (0,5×7 см). Элюцию проводили калий-фосфатным буфером, pH 7,0 (линейный градиент 0,01 М (в воде) – 0,1 М (в 30% водном метаноле), общий объем 400 мл). Дальнейшую очистку фракций, содержащих (DnsNH₂Et)(pT)₉, осуществляли частями, примерно по 10 ОЕ₂₆₆, обращенно-фазовой хроматографией на колонке (0,2×6 см, с эффективностью более 3000 теоретических тарелок) с Nucleosil 5C-18 (Macherey-Nagel, ФРГ) с элюцией ацетонитрилом в 0,04 М триэтиламмоний-ацетате, pH 7,0 (линейный градиент 16–24%, объем 2 мл). Спектры поглощения и флуоресценции полученного соединения представлены на рис. 1.

Перед использованием в экспериментах по облучению препараты poly(A), poly(U) и poly(C) подвергали гель-хроматографии на колонке (0,5×35 см) с сефадексом G-100. Для работы отбирали узкие фракции гомополимеров, содержащие близкие по длине молекулы полинуклеотида.

Проведение экспериментов по облучению. 100 мкл раствора, содержащего полинуклеотид в концентрации 1·10⁻³ М и/или (DnsNH₂Et)(pT)₉ в концентрации 1·10⁻³ М (оба в расчете на мононуклеотид), в буфере 0,01 М трис-HCl (pH 7,5), содержащем 0,01 М MgCl₂ и 0,2 М NaCl, облучали при 18–19°С в кварцевой кювете (Carl Zeiss, Иена, ГДР) толщиной 1 мм (в направлении лазерного луча). Источником излучения служил азотный лазер ЛГИ-21 (средняя мощность 3 мВт, λ 337 нм, энергия импульса 30 мкДж, частота следования импульсов 100 Гц, длительность импульса

~ 8 нс, импульсная плотность мощности в фокусе ~ 150 МВт/см²). Лазерный свет фокусировался внутрь кюветы кварцевой линзой (f 3 см) в пятно диаметром 60 мкм, длина конфокальной перетяжки ≈ 3 мм. При помощи сканирующей системы излучение равномерно распределялось по поверхности кюветы. Через определенные промежутки времени из кювет отбирали по 30 мкл раствора и анализировали методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-100.

Установка и условия экспериментов по СИД аналогичны описанным в работах [7–9]: средняя мощность 1,4 мВт, импульсная плотность мощности в фокусе ~ 70 МВт/см². Лазерный луч сканировался в вертикальном направлении, засвечивая зону высотой 0,8 см и шириной 80 мкм. Спустя несколько минут лазер выключался, и оптическое поглощение кюветы автоматически записывалось с точностью $\sim 0,1\%$.

Теоретическая кривая на рис. 5 была построена, исходя из следующих соотношений. Уравнение равновесия комплекса (DnsNH₂Et) (pT)₉ с poly(A) имеет вид

$$K_d c_c = (c_s - c_c)(c_0 - c_c), \quad (1)$$

где c_c и K_d — концентрация и константа диссоциации комплекса соответственно, c_s — концентрация мест связывания (каждые девять последовательных нуклеотидов poly(A) считаются местом связывания), c_0 — полная концентрация (DnsNH₂Et) (pT)₉.

Обозначая $\xi = c_0/c_s$, разрешим уравнение (1) относительно c_c :

$$c_c = c_s f(\xi), \quad (2)$$

где

$$f(\xi) = \frac{1}{2} \left\{ 1 + \xi + \frac{K_d}{c_s} - \left[\left(1 + \xi + \frac{K_d}{c_s} \right)^2 - 4\xi \right]^{1/2} \right\}.$$

При избытках (DnsNH₂Et) (pT)₉, значительно превышающих насыщающие ($\xi \rightarrow \infty$), функция $f(\xi) \rightarrow 1$, т. е. $c_c \rightarrow c_s$.

Далее учтем, что относительная величина эффекта СИД НК пропорциональна среднему числу разрывов цепи НК, которое, в свою очередь, пропорционально числу комплексов, т. е.

$$\Delta A/A_0 = q c_c, \quad (3)$$

где q — некоторая константа, зависящая от квантового выхода разрывов и времени облучения, A_0 — полное оптическое поглощение молекул, участвующих в СИД НК (poly(A) со связанным (DnsNH₂Et) (pT)₉). Очевидно,

$$A_0 = \varepsilon_s (c_s - c_c) + \varepsilon_c c_c, \quad (4)$$

где ε_s — коэффициент молярного поглощения участка poly(A), занимаемого одной молекулой (DnsNH₂Et) (pT)₉, ε_c — коэффициент молярного поглощения комплекса на участке poly(A), занимаемого одной молекулой (DnsNH₂Et) (pT)₉.

Комбинируя (2)–(4), получим

$$\Delta A = \Delta A_m \frac{1}{1 + \alpha} f(\xi) [1 + \alpha f(\xi)], \quad (5)$$

где $\alpha = (\varepsilon_c - \varepsilon_s)/\varepsilon_s$, $\Delta A_m = q c_s^2 \varepsilon_c$, ΔA_m — максимальное значение ΔA при $\xi \rightarrow \infty$, определяющее высоту плато на рис. 6.

Данные по термической диссоциации комплекса (рис. 2) свидетельствуют, что гипохромный эффект при образовании комплекса составляет $\sim 25\%$. Эта величина в совокупности со значением ε_s и коэффициентом молярного поглощения (DnsNH₂Et) (pT)₉ (оба значения полагали $\sim 10^5$ л·моль⁻¹·см⁻¹, λ 254 нм) позволяет оценить $\alpha \approx 0,5$. Параметр α определяет вогнутость кривой $\Delta A(\xi)$ при малых ξ (см. рис. 6), за которую ответствен следующий эффект: при повышении концентрации комплексов увеличивается как число разрывов, так и суммарное поглощение молекул, участвующих в СИД, а амплитуда СИД ΔA пропорциональна произведению указанных двух величин.

Авторы благодарны акад. Д. Г. Кнорре (НИОХ СО АН СССР) за принципиальное участие в постановке задачи, полезные обсуждения и неизменную помощь в работе. Авторы признательны И. В. Кутявину (НИОХ СО АН СССР) за ценные рекомендации по синтезу флуоресцентного производного олиготимидилата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grineva N. I., Karova G. G. FEBS Lett., 1973, v. 32, № 2, p. 352–355.
2. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. П., Райт А. С., Стефанович Л. Е. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1512–1522.
3. Раутиан С. Г., Штокман М. И. В кн.: Нелинейная оптика. Тр. VII Вавиловской конференции/Ред. Раутиан С. Г. Новосибирск, 1982, ч. 2, с. 148–162.
4. Stockmann M. I. Phys. Lett., 1980, v. 76A, № 2, p. 191–193.
5. Штокман М. И., Пархоменко А. И. В кн.: Нелинейная оптика. Тр. VI Вавиловской конференции/Ред. Чеботаев В. П. Новосибирск, 1979, ч. 2, с. 85–90.
6. Пархоменко А. И., Раутиан С. Г., Штокман М. И. Докл. АН СССР, 1980, т. 250, № 1, с. 225–229.
7. Бенимецкая Л. З., Козионов А. Л., Новожилов С. Ю., Штокман М. И. Докл. АН СССР, 1983, т. 272, № 1, с. 217–220.
8. Козионов А. Л., Новожилов С. Ю., Солобоев В. Е., Штокман М. И. Письма в ЖЭТФ, 1980, т. 31, № 10, с. 606–610.
9. Козионов А. Л., Новожилов С. Ю., Солобоев В. Е., Штокман М. И. Автометрия, 1981, № 6, с. 73–86.
10. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. Докл. АН СССР, 1982, т. 265, № 4, с. 878–891.
11. Seiller N., Wieckmann M. Z. Anal. Chem., 1966, B. 220, № 2, S. 109–127.
12. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 516–521.
13. Duchworth M. L., Gait M. J., Goelet P., Horg G. P., Sing M., Titmas R. C. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 7, p. 1691–1706.
14. Van Boom J. H., Burgers P. M. J. Tetrahedron Lett., 1977, v. 52, № 10, p. 4875–4878.
15. Reese C. B., Zard L. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 18, p. 4611–4626.

Поступила в редакцию

28.VII.1983

После доработки

3.X.1983

SELECTIVE LASER SCISSION OF POLYADENYLIC ACID USING A FLUORESCENT OLIGOTHYMYDYLATE DERIVATIVE

BULYCHEV N. V., LEBEDEV A. V., BENIMETSKAYA L. Z., KOZIOV A. L.,
NESTERIKHIN Yu. E., NOVOZHILOV S. Yu., RAUTIAN S. G., STOCKMANN M. I.

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry and Institute of Automation
and Electrometry, Siberian Branch of the Academy of Sciences
of the USSR, Novosibirsk*

A general method for synthesizing fluorescent oligodeoxyribonucleotide derivatives was proposed. 2'-Deoxynonathymidylate containing N-(5-dimethylamino-2-naphthalene-sulfonyl)-2-aminoethanol (DnsNHET-OH) residue bound to the 5'-phosphomonoester group was synthesized by this method. (DnsNHET)(pdT)₉ was shown to form a stable complex with poly(A) (*t_m* ~ 30° C). The poly(A) chain was cleaved as a result of the complex irradiation by the nitrogen laser light (λ 337 nm). In the presence of (DnsNHET)(pdT)₉, under the same conditions, the scission of poly(C) or poly(U) chains was not detected. The poly(A) scission is considered to be a consequence of the radiationless transfer of the energy of two-quantum stepwise excitation onto the polynucleotide chain from the (DnsNHET)(pdT)₉ chromophoric group fixed nearly poly(A) due to the formation of a complementary complex.