БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 10 * № 9 * 1984

УДК 577.113.4

КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННОЕ АЛКИЛИРОВАНИЕ ДНК *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM* В КОМПЛЕКСАХ С АЛКИЛИРУЮЩИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ КОРОТКИХ ПОЛИАДЕНИЛАТОВ И ПОЛИУРИДИЛАТОВ

Крынецкий Е. Ю., Гринева Н. И., Соколенко А. А., Пословина А. С.,* Салганик Р. И.,* Герасимова Л. М.,** Ямковой В. Я.,** Картова Г. Г.****

*ЦНИИ гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения СССР, Москва; * Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Академии наук СССР, Новосибирск; ** Новосибирский государственный университет; *** Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения Академии наук СССР*

Обработкой A_n и U_m ^{14}C-меченым 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегидом в присутствии 2,2-диметоксипропана и трифторуксусной кислоты получены алкилирующие производные олигорибоаденилатов и олигорибоуридилатов A_nRCl и U_mRCl с длиной цепи от 10 до 30 нуклеотидов. В денатурирующих условиях при 40—50° С эти производные образуют комплексы с dT_{25}- и dA_{25}-последовательностями денатурированной ДНК *Dictyostelium discoideum*. В комплексах протекает алкилирование с насыщением при увеличении концентрации производных. Алкилирование ингибируется исходными полиуридилатами и полиаденилатами. При модификации ДНК реагентом A_nRCl алкилируются в основном остатки аденина. Число участков алкилирования в условиях насыщения при 50—70° С составляет 11 000—15 000 на геном *D. discoideum*, что соответствует количеству dT_{25}- и dA_{25}-трактов в этой ДНК, найденному в работе [1] при апуринизации по Бартону. На основании полученных результатов сделан вывод о возможности направленной модификации с помощью A_nRCl и U_mRCl оснований у 5′-концов dT_{25}- и dA_{25}-трактов, т. е. оснований на 5′-концах оперонов ДНК *D. discoideum*.

Протяженные oligo(T)- и oligo(A)-тракты встречаются в геномах многих эукариот. Так, в ядерной ДНК слизневика *Dictyostelium discoideum* найдены dA_{25}- и dT_{25}-тракты [2, 3]. Фрагмент ДНК кролика, несущий бета-глобиновый ген, фланкирован $dT_{12}\cdot dA_{12}$-последовательностями [4, 5]. В нетранслируемом спейсере рибосомного оперона дрожжей присутствует $dT_{39}\cdot dA_{39}$-участок [6]. Протяженным $dT_n\cdot dA_n$-трактам приписывают участие в терминации транскрипции [7, 8]. Избирательная модификация ДНК в районах протяженных $dA_n\cdot dT_n$-трактов интересна как способ мечения этих трактов, изучения их распределения и их роли в терминации транскрипции.

Направленные на избранный участок ДНК модификации описаны для алкилирования денатурированных или одноцепочечных ДНК в комплементарных комплексах с олигонуклеотидами, содержащими на 3′-конце β-хлорэтилметиламинобензилиденовую группу (длина цепи до 10 нуклеотидов) [9], и производными полинуклеотидов с алкилирующими группами, расположенными вдоль цепи полинуклеотидов [10]. Показано, что алкилирование производными 6—10-звенных олигонуклеотидов может протекать не только в истинных комплексах с полностью спаренными основаниями реагента и матрицы, но и в комплексах с частично спаренными основаниями [11].

Целью данной работы являлась разработка мягких денатурирующих условий для комплементарно адресованного алкилирования только про-

Сокращения: A_n и U_m — полирибоаденилаты с $n=19-25$ и полирибоуридилаты с $m=10-30$; RCl — 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегид; A_nRCl и U_mRCl — 2′,3′-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]овые производные A_n и U_m.

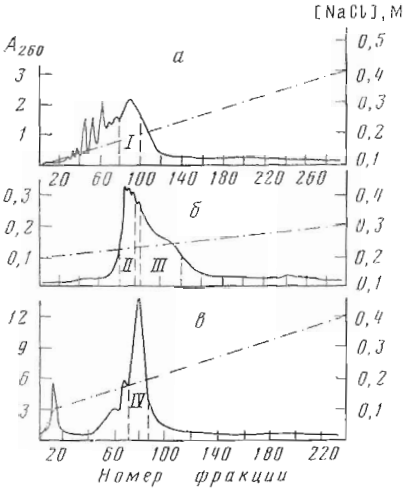

Рис. 1

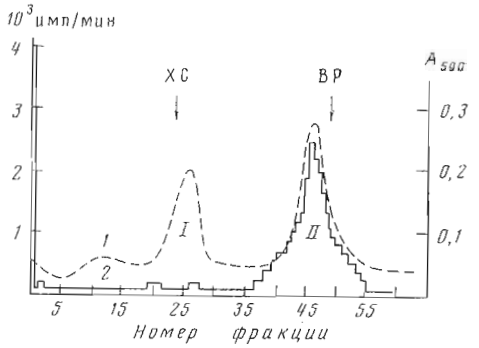

Рис. 2

Рис. 1. Хроматографическое разделение: *а* – гидролизата poly(A) на ТЕАЕ-целлюлозе (колонка 2,6×85 см, линейный градиент концентрации NaCl (0,1–0,4 М) в 7 М мочевине, содержащей 0,01 М трис-HCl (pH 7,5), 4–8° С, скорость элюции 39 мл/ч, объем фракции 20 мл; зона I содержит 1600 $ОЕ_{260}$ pA_n, $15<n<30$); *б* – зоны I из предыдущего разделения (рехроматография, линейный градиент концентрации NaCl (0,2–0,3 М), прочие условия – см. *а*, зона III содержит 133 $ОЕ_{260}$ pA_{19-26}); *в* – гидролизата poly(U) на DEAE-целлюлозе (колонка 1,6×60 см, линейный градиент концентрации NaCl (0–0,4 М) в 7 М мочевине, содержащей 0,01 М трис-HCl (pH 7,5), скорость элюции 30 мл/ч, объем фракции 10 мл; зона IV содержит 2600 $ОЕ_{260}$ pU_m, $10<m<30$)

Рис. 2. Электрофоретическое разделение реакционной смеси poly(C) и U_mRCl (контроль по A_{590} (*1*) и по радиоактивности (*2*)). Пик I – poly(C), пик II – продукты превращения U_mRCl. XC – ксиленцианол, BP – бромфеноловый синий

тяжевных dT_n- и dA_n-трактов эукариотических ДНК без модификации в районе коротких oligo(T)- и oligo(A)-последовательностей. Для этого изучали взаимодействие A_nRCl и U_mRCl с денатурированной ДНК *D. discoideum*, которая содержит известное количество $dT_{25}\cdot dA_{25}$-трактов, а именно 11 000–15 000 [1].

ДНК *D. discoideum* выделяли из ядер биомассы аксенического штамма *D. discoideum* Ax-2. ДНК применяли после обработки проназой, РНКазой, α-амилазой и ультрацентрифугирования в градиенте плотности щелочной сахарозы. Такая ДНК (20–30S) не меняла своей длины при денатурации и в условиях алкилирования.

При синтезе алкилирующих реагентов исходили из смеси дефосфорилированных олигорибонуклеотидов A_n и U_m, где $n=19-25$, а $m=10-30$. Использование смеси олигонуклеотидов ограниченной длины, во-первых, представлялось целесообразным для разработки метода алкилирования в гибридных комплексах, длина участков связывания реагентов матрицей в которых негомогенна, и, во-вторых, существенно упрощало задачу выделения соответствующих олигонуклеотидов. Необходимые A_n и U_m получали ограниченным гидролизом полиаденилатов или полиуридилатов эндонуклеазами яда кобры по методу [12] и эндонуклеазой *Serratia marcensens* с последующей ионообменной хроматографией (рис. 1), дефосфорилированием и анализом длины с помощью гель-электрофореза.

В качестве алкилирующих производных использовали ^{14}C-меченые A_nRCl и U_mRCl (A_nR^*Cl и U_mR^*Cl соответственно), которые получали из триметилцетиламмониевых солей указанных олигонуклеотидов и [^{14}C]RCl, несущего метку по формильной группе, в присутствии 2,2-диметоксипропана и трифторуксусной кислоты по методу [13].

Для исключения образования комплексов с частично спаренными основаниями реакцию вели в денатурирующих средах в отсутствие ионов магния (0,2 М NaCl и 0,001 М EDTA в 0,02 М трис-HCl-буфере, pH 7,5–

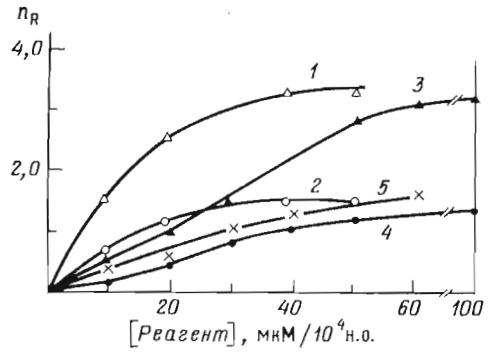

Рис. 3

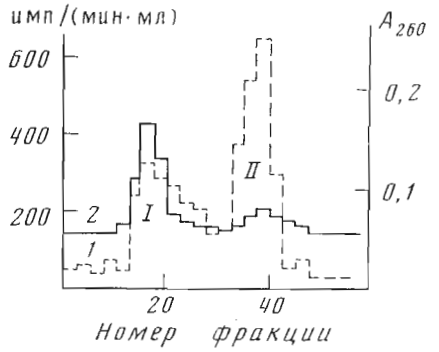

Рис. 4

Рис. 3. Зависимость степени алкилирования ДНК *D. discoideum* от концентрации A_nRCl ([ДНК]=2 OE_{260}/мл, $[A_nRCl]$=0,1–2 нМ) при 40 (*1*), 50 (*2*), 70° С (*5*) и U_mRCl ([ДНК]=1 OE_{260}/мл, $[U_mRCl]$=0,1–2 нм) при 40 (*3*), 50° С (*4*). n_R – число оснований, алкилированных реагентом, в расчете на 10^4 нуклеиновых оснований

Рис. 4. Гель-фильтрация реакционной смеси ДНК *D. discoideum* и A_nRCl (60° С) на сефадексе G-75 (колонка 1,2×44 см, скорость элюции 72 мл/ч, объем фракции 2,3 мл). I – высокополимерный компонент, II – продукты превращения A_nRCl. Контроль по A_{260} (*1*) и по радиоактивности (*2*)

7,8). Мочевина в качестве денатурирующего агента оказалась предпочтительнее формамида, из-за постепенного разложения которого в условиях реакции снижается pH и разрушаются ацетальные связи модифицирующей группировки реагента с адресующим полинуклеотидом.

При выдерживании реагентов с poly(C), не образующим комплементарных комплексов с A_n или U_m, в течение времени, достаточного для полного превращения их в активную алкилирующую частицу [9] и разделения смеси гель-электрофорезом (рис. 2) или гель-фильтрацией, не обнаруживается продуктов алкилирования poly(C). (Методика эксперимента приведена только для U_mRCl.) Таким образом, A_nRCl и U_mRCl не являются алкилирующими реагентами для полинуклеотидов вне комплекса с ними.

Выдерживание растворов денатурированной при 100° С ДНК *D. discoideum* с указанными реагентами при 40–70° С в присутствии мочевины и без нее ведет к присоединению к ДНК заметного количества радиоактивного материала. Это включение реагентов в ДНК является, вероятно, результатом высокоэффективного алкилирования в комплексах. В пользу такого предположения свидетельствует вид зависимости степени алкилирования (протекающего с насыщением аналогично комплексообразованию) от концентрации реагентов (рис. 3). Согласно работе [11], концентрационные кривые алкилирования аналогичны изотермам комплексообразования. К насыщению ведет тем меньший избыток реагента, чем ниже температура алкилирования: так, в случае A_nRCl для насыщения необходима концентрация реагента при 40, 50 и 70° С соответственно 1, 1,4 и >2 мкМ.

В условиях насыщения при 40–70° С в 5 М мочевине достигается практически одинаковая степень модификации ДНК (рис. 3). Для насыщения ДНК U_mRCl при 40° С необходима концентрация $2\cdot10^{-6}$ М, а при 50° С – $2{,}4\cdot10^{-6}$ М [14].

Степень модификации ДНК с помощью A_nR^*Cl определяли после гель-фильтрации реакционной смеси при 60° С на сефадексе G-75 (рис. 4) в первой половине фракций полимерного материала по соотношению содержания ^{14}C и оптического поглощения при 260 нм и выражали в импульсах в минуту на 10^4 нуклеотидов ДНК либо на 1 OE_{260}. В случае U_mRCl степень модификации ДНК *D. discoideum* определяли аналогично после обработки реакционной смеси рибонуклеазой А и последующей гель-фильтрации на сефадексе G-75. Такая обработка приводит к деградации ковалентно не связанного реагента и облегчает выделение алкилированной ДНК.

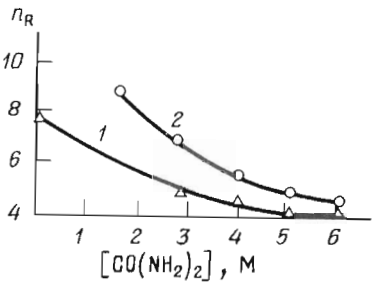

Рис. 5

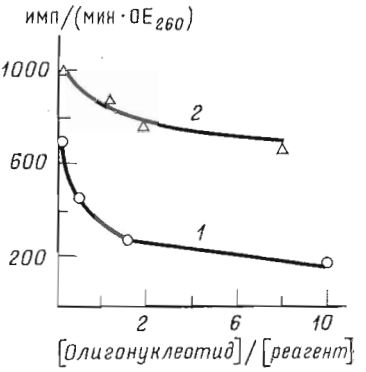

Рис. 6

Рис. 5. Зависимость степени алкилирования ДНК *D. discoideum* реагентами A_nRCl (*1*) и U_mRCl (*2*) от концентрации мочевины при 40° С

Рис. 6. Ингибирование реакции алкилирования ДНК *D. discoideum* A_nRCl в присутствии pA_{17} (*1*) ([ДНК]=2 OE_{260}/мл) и U_mRCl в присутствии pU_m (*2*) ([ДНК]=1 OE_{260}/мл) при 40° С

При одинаковой концентрации реагирующих веществ степень алкилирования ДНК понижается с ростом температуры от 40 до 70° С в 2 раза.

Степень алкилирования ДНК *D. discoideum* реагентами при 40° С падает в 2—2,5 раза при увеличении концентрации мочевины от 1 до 4 М (рис. 5). Дальнейшее повышение концентрации мочевины от 4 до 6 М при такой температуре практически не влияет на глубину алкилирования, что указывает на независимость комплексообразования (концентрации образующихся комплексов) ДНК *D. discoideum* с производными A_{19-26} и U_{10-30} от концентрации мочевины в этом интервале. На этом основании можно заключить, что при температуре выше 40° С в 5 М мочевине в комплексообразовании с реагентами участвуют наиболее протяженные участки связывания ДНК *D. discoideum*.

Рисунок 6 демонстрирует ингибирование алкилирования ДНК *D. discoideum* реагентами A_nRCl и U_mRCl в присутствии A_{17} и U_m. Снижение степени алкилирования ДНК можно объяснить тем, что в присутствии олигонуклеотидов ингибируется образование комплементарных комплексов реагентов с политимидиловыми или полиадениловыми последовательностями ДНК *D. discoideum*.

ДНК, алкилированная в комплексе с A_nRCl в условиях насыщения, количественно теряет алкилированные основания при выдерживании в условиях гидролиза гликозидных связей алкилированных пуринов [15], причем в основном отщепляется алкилированный аденин.

Анализ степени алкилирования ДНК *D. discoideum* в условиях насыщения A_nRCl при 50 и 70° С в 5 М мочевине (0,2 М NaCl и 1 мМ EDTA) в расчете на геном *D. discoideum* (50 млн. пар оснований [1]) выявляет 15 000 участков алкилирования. По данным алкилирования ДНК реагентом U_mRCl в условиях насыщения при 50° С, это число составляет 11 000 на геном, что отвечает количеству $dA_{25}\cdot dT_{25}$-трактов этой ДНК (11 000—15 000), определенному в работе [1] с помощью апуринизации по Бартону.

Совокупность обсуждаемых данных позволяет заключить, что в выбранных условиях A_nRCl и U_mRCl образуют в денатурированной ДНК комплексы практически только с протяженными dT_{25}- и dA_{25}-трактами, не затрагивая более короткие oligo(T)- и oligo(A)-последовательности. Модификация в таких комплексах с помощью A_nRCl ведет к алкилированию аденинов, примыкающих, очевидно, к 5′-концам последовательностей dT_{25}, а с U_mRCl — к алкилированию оснований на 5′-концах dA_{25}-трактов в противоположной цепи ДНК. Соответственно реакция в комплексах ведет к образованию специфично алкилированной ДНК, которая в условиях эли-

минирования алкилированных пуринов образует ДНК с апуринизованными звеньями на 5′-концах dA_{25}- и dT_{25}-трактов. Согласно работе [1], эти тракты ДНК *D. discoideum* транскрибируются в A_{25}-последовательности про-мРНК *D. discoideum* и сохраняются в мРНК после ее созревания. A_{25}-Последовательности расположены на расстоянии 2—40 нуклеотидов от посттранскрипционной 3′-концевой poly(A). В ДНК *D. discoideum* dA_{25}- и dT_{25}-тракты приблизительно одинаковы по длине и их число коррелирует с числом белков *D. discoideum,* что указывает на присутствие тракта в каждом опероне. На этом основании можно полагать, что алкилирование пуринов в комплексах с dT_{25} и dA_{25} и, следовательно, элиминирование алкилпуринов протекает на концах оперонов ДНК *D. discoideum.* В связи с этим обе эти модификации могут иметь самостоятельное значение, а совместно они могут обеспечить разделение генома *D. discoideum* на функционально значимые опероны.

Экспериментальная часть

В работе использовали штамм *D. discoideum* Ах-2, любезно предоставленный доктором Д. Уотсом (Великобритания), poly(C), акриламид, N,N′-метилен(бисакриламид), РНКазу А (КФ 3.1.4.22) производства Reanal (ВНР), α-амилазу, проназу (Calbiochem), poly(A), эндонуклеазу из яда кобры (*Naja naja oxiana*), эндонуклеазу *S. marcescens* отечественного производства, фосфомоноэстеразу из *E. coli* (Worthington, США), DEAE- и TEAE-целлюлозу (Serva, ФРГ). Хроматографию проводили на бумаге FN-1 (ГДР). Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике Mark-II (Nuclear Chicago, США).

Биомассу наращивали по методу, описанному Фиртелем и Боннер [16] с некоторыми модификациями (глюкозу заменяли равным количеством мальтозы, вместо дрожжевого экстракта прибавляли 15 мл автолизата на 1 л питательной среды).

Ядра выделяли из 150 г биомассы по методу [16]. Для этого промытые 0,05 М натрий-фосфатным буфером (pH 6,5) клетки суспендировали в 3 л 0,25 М сахарозы, содержащей 0,05 М $CaCl_2$ (pH 7,2), и к суспензии добавляли на холоду 10% тритон Х-100 до концентрации 0,01%. Через 10 мин центрифугировали 15 мин при 1500*g* и ядра промывали 0,5 л исходного раствора.

ДНК *D. discoideum* выделяли, лизируя ядра в 130 мл раствора (pH 8), содержащего 2% додецилсульфат натрия, 0,1 М трис и 0,1 М EDTA. Лизат дважды экстрагировали равным объемом насыщенного буфером фенола. К водной фазе добавляли 4 М NaCl до концентрации 1 М и экстрагировали равным объемом смеси хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1). ДНК осаждали двумя объемами спирта и дважды переосаждали из 0,1 SSC * спиртом. После растворения ДНК в 0,1 SSC добавляли 20 SSC до концентрации 2 SSC и раствор обрабатывали РНКазой А (200 мкг/мл), предварительно прогретой в течение 10 мин при 80° С, затем α-амилазой в концентрации 0,5 мг/мл при 37° С (1 ч) и, наконец, инкубировали 1 ч с проназой в концентрации 200 мкг/мл при 37° С. ДНК дважды экстрагировали смесью хлороформ — изоамиловый спирт и 2—3 раза переосаждали одним объемом спирта с переводом из 0,1 SSC в 2 SSC, как указано выше. Выход ДНК 5 мг. Для дополнительной очистки с целью получения ДНК, выдерживающей денатурацию и инкубирование в денатурированном состоянии в условиях алкилирования (50° С, 4 ч), ДНК подвергали ультрацентрифугированию в градиенте плотности сахарозы (5—25%) в растворе, содержащем 0,1 М NaOH, 0,9 М NaCl и 0,01 М EDTA (25 тыс. об/мин, 7 ч, 20° С, ротор SW 27 или SW 25 к ультрацентрифуге L-5-65 Beckman, США). В качестве маркера использовали ДНК фага T7 in situ, наслаивая на градиент фаг T7. Получена ДНК *D. discoideum* с константой седиментации 20—34 S. Выход 50%.

---

* Стандартный буфер SSC — 150 мМ NaCl, 15 мМ цитрат натрия (pH 7,0). Цифра перед аббревиатурой означает, что концентрацию всех компонентов буфера следует умножить на указанное число.

Получение коротких полиаденилатов и полиуридилатов. Для получения A_n 300 мг poly(A) гидролизовали эндонуклеазой из яда кобры или эндонуклеазой *S. marcescens* (степень гидролиза 4,54%), как описано в работе [12]. Глубину гидролиза оценивали потенциометрически по расходу щелочи на поддержание pH 7,5 гидролизата. Гидролизат разбавляли бидистиллированной водой вдвое и хроматографировали на колонке (2,6×85 см) с TEAE- целлюлозой (см. рис. 1*а*).

Фракции 80—100 объединяли, разбавляли в 2 раза водой и хроматографировали на той же колонке после ее регенерации 1 М NaCl, содержащей 0,01 М трис-HCl (pH 7,5) (рис. 1*б*). Фракции 101—140 объединяли, разбавляли водой в 2 раза и обессоливали на колонке (1×10 см) с TEAE-целлюлозой в HCO_3^--форме, элюируя pA_n 30 мл 1 М NH_4HCO_3. После упаривания и удаления NH_4HCO_3 выход pA_{19-26} составил 300 OE_{260} (4,3% от исходного poly(A)).

Аналогично из фракций 80—95 повторной хроматографии (рис. 1*б*) выделяли pA_{17}.

Для получения U_m 250 мг (6600 OE_{260}) poly(U) растворяли в 100 мл буфера (0,05 М NaCl, 0,01 М $MgCl_2$, 0,01 М трис-HCl, pH 7,8) и гидролизовали 10 мин 2 мг эндонуклеазы *S. marcescens* при 37° С. Гидролиз останавливали добавлением 20 мл 0,2 М EDTA. Белок экстрагировали из реакционной смеси 3 раза равным объемом смеси хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1) и проводили разделение гидролизата на колонке (1,6×60 см) с DEAE-целлюлозой (рис. 1*в*). Фракции 72—87 объединяли (пик IV) и обессоливали, как описано выше. Выделено 2600 OE_{260} препарата pU_m (40%); m=10—30.

Получение реагентов A_nR^*Cl и U_mR^*Cl. 230 OE_{260} pA_n в 1 мл 0,1 М трис-HCl (pH 8,2) инкубировали 4 ч с 8000 ед. акт. фосфомоноэстеразы *E. coli* при 37° С. Смесь разбавляли в 2 раза водой и хроматографировали на колонке (1,2×14 см) с TEAE-целлюлозой (линейный градиент концентрации NaCl (0—0,4 М) в 7 М мочевине, содержащей 0,02 М трис-HCl, pH 7,5). Объем элюента 400 мл, скорость элюции 20 мл/ч, объем фракций 5 мл. Центральную часть пика фракций 80—95, элюирующуюся при 0,250—0,270 М NaCl, собирали, обессоливали и выделяли как описано выше. Дефосфорилирование pU_m осуществляли аналогично.

Раствор триметилцетиламмониевых солей A_n и U_m, полученных из 5 мг аммониевых солей полинуклеотидов осаждением 0,2% раствором цетавлона, в абсолютном диметилформамиде обрабатывали 0,6 М [^{14}C]RCl, 0,5 М 2,2-диметоксипропаном и затем при —70° С добавляли раствор трифторуксусной кислоты до концентрации 0,9 М. Через 40 мин смесь нейтрализовали при —70° С, упаривали в вакууме, выливали в абсолютный эфир, осадок промывали эфиром и переводили в натриевую соль обработкой 1 М NaI в ацетоне. В препарате определяли содержание ^{14}C и примеси свободного RCl и полинуклеотида по методу [11]. Для препаратов A_nR^*Cl соотношение $A_n : R^*Cl$ составляет 1 : 0,85, удельная радиоактивность — 5—20 Ки/моль; для препаратов U_mR^*Cl соотношение $U_m : R^*Cl$ равно 1 : 0,85, удельная радиоактивность — 11 Ки/моль.

Взаимодействие poly(C) с U_mR^*Cl. 0,3 OE_{260} poly(C) длиной более 150 нуклеотидов смешивали с 1,85 OE_{260} U_mR^*Cl и выдерживали 8 ч при 40° С в 0,22 мл 0,2 М NaCl (содержащем 0,01 М EDTA, 0,02 М трис-HCl, pH 7,5) в 5 М мочевине. Полинуклеотиды осаждали спиртом, растворяли в воде и анализировали гель-фильтрацией на сефадексе G-75 до и после гидролиза ацетальных связей при pH 4,0 в 0,1 М натрий-ацетатном буфере (40° С, 40 мин), а также электрофорезом в денатурирующем геле (5% акриламид — 0,17% бисакриламид, 8,3 М мочевина). Гель прокрашивали красителем Stains-all и сканировали на денситометре ОР-503 (ВНР) при 590 нм. Содержание в пробе ^{14}C анализировали после элюции полос геля шириной 0,5 см с помощью 1 мл буфера (500 мМ CH_3COONH_4, 10 мМ $(CH_3COO)_2Mg$, 1 мМ EDTA, 0,1% додецилсульфат натрия) при 37° С в течение ночи.

Алкилирование ДНК D. discoideum с помощью A_nR^*Cl. 1—2 OE_{260} ДНК *D. discoideum* денатурировали 10 мин при 100° С в 0,3 мл 0,02 М трис-HCl

(pH 7,8) и быстро охлаждали до температуры опыта (40, 50 или 70° С). К раствору добавляли 0,5 мл буфера (0,4 М NaCl, 2 мМ EDTA, 0,02 М трис-HCl (pH 7,8) в 8 М мочевине) и раствор A_nR^*Cl в 0,02 М трис-HCl (pH 7,8) до конечного состава раствора (объем реакционной смеси 1 мл): 1—2 OE_{260}/мл ДНК, 0,1—2 мкМ A_nR^*Cl, 0,2 М NaCl, 0,02 М трис-HCl (pH 7,8), 1 мМ EDTA, 5 М мочевина. Реакционную смесь инкубировали в зависимости от температуры опыта: 15 мин при 70° С, 3 ч при 50° С, 8 ч при 40° С, 3 сут при 30° С. Реакционную смесь наносили на колонку (1,2×50 см) с сефадексом G-75, G-100 или G-150 и элюировали с 0,01 М трис-HCl (pH 7,8) при 60° С. Скорость элюции 60 мл/ч, объем фракций 0,5 мл. Степень модификации анализировали во фракциях I и II полимерного материала (рис. 4), измеряя A_{260} и радиоактивность пробы. Степень модификации n_R выражали в моль остатков R на 10^4 нуклеотидных остатков ДНК (10^4 н. о.) или в имп/(мин·OE_{260}).

Зависимость степени алкилирования ДНК D. discoideum от концентрации A_nR^*Cl и температуры определяли, проводя реакцию алкилирования 1—2 OE_{260} ДНК в присутствии 0,1—2 мкМ A_nR^*Cl при 40, 50, 70° С, как указано выше.

Денатурирующее влияние мочевины определяли аналогично, проводя реакцию при 40° С в присутствии 1—6 М мочевины.

Ингибирование реакции алкилирования ДНК D. discoideum избытком A_{17} изучали, проводя реакцию 1—2 OE_{260} ДНК в присутствии 1,9 мкМ A_nR^*Cl и 1—20 мкМ A_{17} (50° С, 3 ч). Прочие условия аналогичны используемым в опытах по алкилированию. Степень модификации ДНК определяли как описано выше.

Алкилирование ДНК D. discoideum с помощью U_mR^*Cl. 0,5 OE_{260} ДНК *D. discoideum* денатурировали при 100° С в 100 мкл буфера (0,05 М трис-HCl, pH 7,4; 1 мМ EDTA) и быстро охлаждали до температуры опыта (40 или 50° С). К раствору добавляли 167 мкл буфера (0,6 М NaCl; 0,06 М трис-HCl, pH 7,4; 0,015 М EDTA), 0—180 мг сухой мочевины (при изучении ее влияния) и воду до конечного объема 0,5 мл. Раствор тщательно перемешивали и вносили 0,05—1 нмоль U_mR^*Cl. Смесь инкубировали 8 ч при 40° С или 4 ч при 50° С, добавляли 50 мкл 3 М ацетата натрия и 1 мл этанола. Осадок отделяли центрифугированием, промывали этанолом, растворяли в 90 мкл буфера (0,2 М NaCl; 0,05 М трис-HCl, pH 7,4; 1 мМ EDTA в 5 М мочевине) и добавляли 0,1 ед.акт. РНКазы А в 10 мкл 0,05 М трис-HCl (pH 7,4), содержащем 1 мМ EDTA, предварительно прогретой 10 мин при 100° С. Реакционную смесь инкубировали 1 ч при 37° С. Смесь наносили на колонку (0,8×24 см) с сефадексом G-75, уравновешенную буфером (0,05 М трис-HCl, 1 мМ EDTA, pH 7,4), и собирали фракции объемом 300 мкл за 5 мин. Степень модификации ДНК определяли как описано для A_nR^*Cl.

Ингибирование реакции алкилирования ДНК D. discoideum избытком U_m изучали, проводя реакцию с 0,5 OE_{260} ДНК в присутствии 1 нмоль U_mR^*Cl (40° С, 8 ч). Степень модификации определяли как описано для A_nR^*Cl.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Jacobson A., Firtel R. A., Lodish H. F.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 5, p. 1607—1611.
2. *Jacobson A., Lodish H. F.* Ann. Rev. Gen., 1975, v. 9, p. 145—185.
3. *Devine J. M., Williams J. G.* Nucl. Acis Res., 1982, v. 16, № 4, p. 1231—1241.
4. *Mol J. N. M., Flavell R. A., Borst P.* Nucl. Acids Res., 1976, v. 3, № 9, p. 2367—2377.
5. *Flavell R. A., Van den Berg F. M., Grosveld G. C.* J. Mol. Biol., 1977, v. 115, № 4, p. 714—741.
6. *Maxam A. M., Tizard R., Scryabin K. G., Gilbert W.* Nature, 1977, v. 267, № 5608, p. 643—645.
7. *Gilbert W.* In: RNA polymerase/Eds Losiek R., Chamberlin M. N. Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1976, p. 193—205.
8. *Janofsky C.* In: Molecular mechanismes in the control of gene expression/Eds Nierlich P., Rutter W., Fox C. F. N. Y.: Acad. Press, 1976, p. 75—87.
9. *Гринева Н. И.* Вестн. АМН СССР, 1981, № 2, с. 83—93.
10. *Salganic R. I., Dianov G. L., Ovchinnikova L. P., Voronina E. N., Kokoza E. B., Mazin A. V.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 5, p. 2796—2800.

11. *Бенимецкая Л. З., Герасимова Л. М., Карпова Г. Г., Гринева Н. И.* Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1791–1801.
12. *Василенко С. К., Сербо Н. А., Веньяминова А. Г., Болдырева Л. Г., Будкер В. Г., Кобец Н. Д.* Биохимия, 1976, т. 41, вып. 2, с. 260–263.
13. *Власов В. В., Гринева Н. И., Карпова Г. Г.* Молекулярн. биология, 1974, т. 8, вып. 5, с. 752–761.
14. *Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Пичко Н. П.* Молекулярн. биология, 1978, с. 12, вып. 1, с. 135–146.
15. *Бенимецкая Л. З., Гринева Н. И., Карпова Г. Г.* Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1372–1381.
16. *Firtel R. A., Bonner J.* J. Mol. Biol., 1972, v. 66, № 3, p. 339–361.

Поступила в редакцию
19.X.1983
После доработки
2.II.1984

COMPLEMENTARY DIRECTED ALKYLATION OF *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM* DNA COMPLEXES WITH SHORT POLYADENYLATE AND POLYURIDILATE ALKYLATING DERIVATIVES

KRYNETSKY E. Yu., GRINEVA N. I., SOKOLENKO A. A.*, POSLOVINA A. S.*, SALGANIK R. I.*, GERASIMOVA L. M.**, YAMKOVOI V. Ya.**, KARPOVA G. G.***

Central Institute of Hematology and Blood Transfusion, Moscow; **Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*;** *Novosibirsk State University, Novosibirsk;* *** *Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Complementary directed alkylation of *Dictyostelium discoideum* DNA by means of oligoadenylate and oligouridilate alkylating derivatives was studied. The conditions for preferable modification of DNA regions adjacent to dT_{25}·dA_{25}-tracts were found. The results revealed specific modification of heterocyclic bases at the 5′-ends of *D. discoideum* DNA operons.