



УДК 577.113.4 : 577.217.34

АЛКИЛИРОВАНИЕ тРНК^{Phe}
4-(N-2-ХЛОРЕТИЛ-N-МЕТИЛАМИНО)БЕНЗИЛ-5'-
ФОСФАМИДОМ d(ATTTTCA)

Гимаутдинова О. И., Горн В. В., Горшкова И. И.,
Грайфер Д. М., Карпова Г. Г., Мундуе Д. А.,
Теплова Н. М.*

Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР;

* Новосибирский государственный университет

Исследовано алкилирование тРНК^{Phe} *E. coli* 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензил-5'-фосфамидом олигонуклеотида d(ATTTTCA), комплементарного последовательности UGAms²i⁶AAψ в антикодонной петле. Алкилированию подвергаются три остатка гуанина: G^{28/29}, G²⁴ и G¹⁰. Сделано предположение о существовании двух участков связывания реагентов с тРНК. Оценены эффективности алкилирования тРНК из этих участков и усредненная K_d реагентов с тРНК (3,8·10⁸ M⁻¹).

Для изучения взаимодействия тРНК с рибосомами и ферментами (амп-ноацил-тРНК-синтетазами, метилтрансферазами и пр.) перспективны производные тРНК, содержащие реакционноспособные группы во внутренних участках ее молекулы. Для аффинной модификации рибосом широко используются производные тРНК, несущие арилазидогруппы, статистически распределенные по остаткам гуанозинов тРНК [1, 2]. Особый интерес представляет использование производных тРНК с более ограниченным числом точек модификации.

В отдельных случаях фотоактивируемую группу удается ввести в тРНК селективно по одному положению — например, по остатку 4-тиоуридина [3] или 3-(3-амино-3-карбоксипропил)уридина [4], используя повышенную реакционную способность этих минорных оснований по отношению соответственно к бромангидридам и N-гидроксисукцинимидным эфирам карбоновых кислот.

Общим подходом к направленному введению реакционноспособных групп в нуклеиновую кислоту может быть метод комплементарно-адресованной модификации с помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов [5, 6]. Для изучения комплементарно-адресованной модификации высокоструктурированных природных полимеров удобным объектом является тРНК с известной пространственной структурой. При алкилировании тРНК производными олигонуклеотидов, содержащими реакционноспособную группу на 3'-или 5'-конце, модификация происходит вблизи последовательностей, частично или полностью комплементарных олигонуклеотидной части реагента и не занятых существенно в образовании вторичной структуры [5, 6]. Для направленного введения фотоактивируемых групп в тРНК представляет интерес использование 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензил-5'-фосфамидов олигонуклеотидов [6], поскольку после алкилирования тРНК этими производными фосфамидную связь в остатке реагента можно гидролизовать в слабокислой среде и по освободившейся алифатической аминогруппе селективно ввести фотоактивируемую группировку обработкой 2,4-динитро-5-фторфенилазидом по аналогии с работой [1]. Недавно с использованием реагента d[(ClRCH₂NH)_pAACCA] нам удалось получить производное тРНК^{Phe}

Принятые сокращения: ClRCH₂NH₂ — 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламин, ms²i²A — 2-метилмеркапто-6-изопентиладенозин.

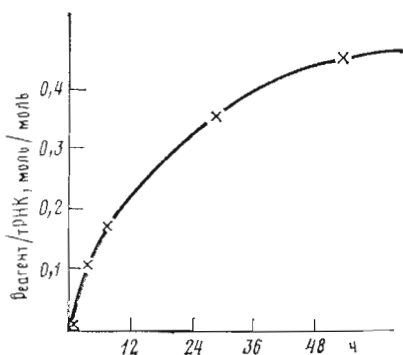


Рис. 1

Рис. 1. Кинетическая кривая алкилирования тРНК^{Phe} реагентом d[(ClRCH₂NH)pATTTTCA]

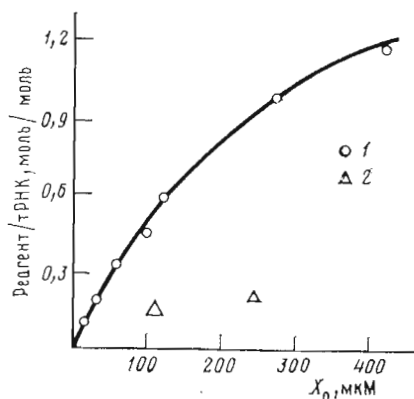


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость степени модификации тРНК^{Phe} от начальной концентрации реагента d[(ClRCH₂NH)pATTTTCA] в условиях комплексообразования (1) и в денатурирующих условиях (2)

E. coli, содержащее группу NH₂CH₂R, ковалентно связанную с атомами N7 остатка G²⁴ [6].

Цель настоящей работы — исследование алкилирования тРНК^{Phe} (*E. coli*) реагентом d[(ClRCH₂NH)pATTTTCA], меченным ¹⁴C, олигонуклеотидная часть которого комплементарна последовательности ³³UGA Ams²i³⁹AAψ в антикодонной петле тРНК^{Phe}.

Алкилирование во всех экспериментах (если не указано особо) проводили в условиях прочного комплексообразования в присутствии 10 мМ Mg²⁺, 0,4 М NaCl при 20° С. Время полуреакции для алкилирования тРНК составило 10—12 ч (рис. 1), что совпадает с временем полуионизации С—Cl-связи в реагентах используемого типа в данных условиях [7]. Вероятно, реакция идет по механизму S_N1 через лимитирующую стадию ионизации связи С—Cl с образованием активной промежуточной частицы — этилениммониевого катиона, что характерно для алкилирования в комплексе ароматическими 2-хлорэтиламинами [8].

Зависимость предельной по времени степени модификации тРНК от концентрации реагента (изотерма модификации) рассчитана по уравнению

$$\frac{\alpha}{2} = 1 - \exp\left(-\frac{K_x X_0}{1 + K_x X_0}\right), \quad (1)$$

где X₀ — начальная концентрация модифицирующего реагента, K_x — константа ассоциации. Изотерма модификации имеет тенденцию к насыщению (рис. 2), что характерно для реакций, проходящих в комплементарных комплексах; плато тем не менее не достигается даже при значениях степени модификации тРНК, превышающих 1 моль реагента на 1 моль тРНК. Это свидетельствует о том, что алкилирование в данном случае может проходить в составе не только одного комплементарного комплекса. При алкилировании тРНК в денатурирующих условиях (6 М мочевины, 1 мМ EDTA, 60° С), практически исключаящих возможность образования комплементарных комплексов с участием относительно коротких олигонуклеотидов, степень модификации тРНК существенно ниже (рис. 2).

Для дальнейшего исследования алкилированную тРНК^{Phe}, содержащую 0,45 моль реагента на 1 моль тРНК, выдерживали в условиях гидролиза фосфамидной связи для удаления олигонуклеотидной части реагента. В целях установления природы и строения алкилированных оснований модифицированную тРНК подвергали полному кислотному гидролизу (1 М HCl, 100° С, 1 ч) и анализировали продукты хроматографией

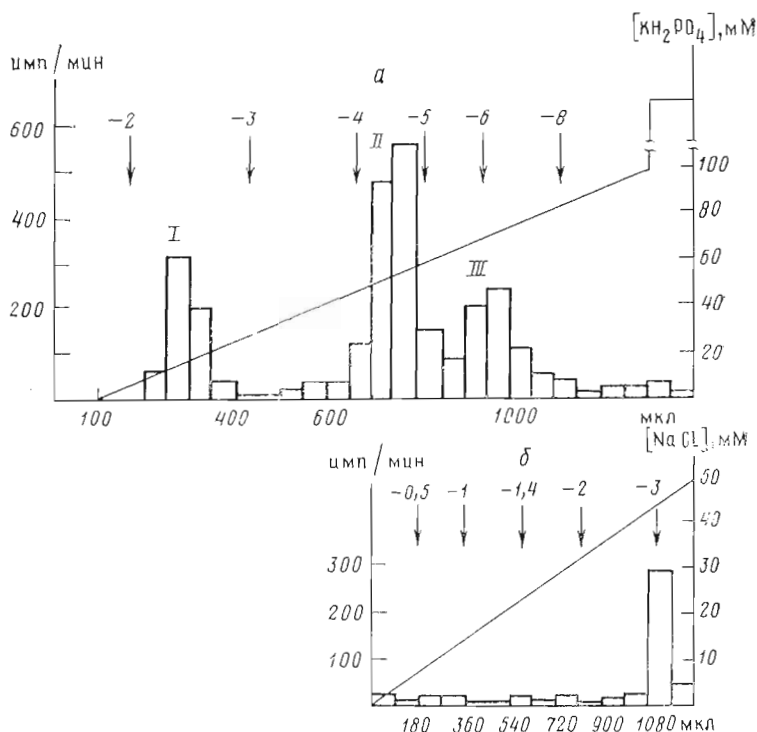


Рис. 3. Анализ пириmidил-РНКазного гидролизата тРНК^{Phe}, алкилированной d[(CIRCH₂NH)PATTTCSA и выдержанной в условиях гидролиза фосфамидной связи. а — микроколоночная ионообменная хроматография на амфиохроме АС-15 при pH 7,5; б — рехроматография фракции III на DEAE-целлюлозе при pH 3,5

на бумаге. Единственный радиоактивный продукт был идентичен по подвижности (R_f 0,1 в системе А и R_f 0,22 в системе В) заведомому образцу 7-{2-[N-4-(аминометил)фенил-N-метиламипо]этил}гуанина (7NH₂CH₂·RGu) [9]. Для установления положения алкилированных остатков гуанина в структуре тРНК^{Phe} алкилированную тРНК подвергали исчерывающему гидролизу РНКазой А и полученные олигонуклеотиды делили по зарядам микроколоночной ионообменной хроматографией при pH 7,5. При этом радиоактивность обнаруживается в трех фракциях (рис. 3), содержащих соответственно олигонуклеотиды с зарядами между -2 и -3 (фракция I), между -4 и -5 (фракция II) и около -6 (фракция III). Остаток реагента, группа RCH₂NH₂, придает модифицированному олигонуклеотиду дополнительный заряд +1,5 при pH 7,5: +0,5 вследствие присоединения реагента по атому N7 остатка гуанина [10] и +1 за счет протонирования бензиламиногруппы.

С учетом этого в табл. 1 выписаны все возможные олигонуклеотиды пириmidил-РНКазного гидролизата алкилированной тРНК^{Phe}, содержащие модифицированный остаток гуанина (G^{*}), и их заряды при pH 7,5 и 3,5 (заряды при pH 3,5 рассчитаны по данным работы [11] с учетом того, что группа RCH₂NH₂ при этом значении pH придает олигонуклеотиду дополнительный заряд +2). Сравнивая данные рис. 3а и табл. 1, можно сделать вывод, что фракции II соответствует единственный модифицированный олигонуклеотид ArGrArGrCp, в котором алкилирован один из двух остатков G^{22/24}, а фракции III — один из двух олигонуклеотидов: ArGrGrGrArpfr или CrArArms²¹ArArpfr.

При рехроматографии фракции III при pH 3,5 радиоактивная метка обнаруживалась в единственной фракции, соответствующей олигонуклеотиду с зарядом около -3 при pH 3,5 (рис. 3б). После обработки выделенного при рехроматографии олигонуклеотида РНКазой T₁ и нанесения

Возможные олигонуклеотиды пиримидил-РНКазного гидролизата
алкилированной тРНК^{Phe}, содержащие модифицированный остаток

гуанина (G) *

Заряды олигонуклеотидов при pH 3,5 рассчитаны с учетом данных [11]

Положение G в тРНК ^{Phe}	Олигонуклеотид	Заряд при pH	
		7,5	3,5
1	pGpCp	-3,5	-0,15
5-6	(*) (*) GpGpApS ⁴ Up	-3,5	-1,35
10	ApGpCp	-2,5	+0,40
15	ApGpDp	-2,5	-0,45
18-19	(*) (*) GpGpDp	-2,5	-0,90
22, 24	(*) (*) ApGpApGpCp	-4,5	-1,00
27-30	(*) (*) (*) (*) ApGpGpGpGpApUp	-6,5	-3,60
34	GpApApms ²¹⁶ ApApUp	-5,5	-1,65 ÷ -2,65
44	GpUp	-1,5	0
52, 53	(*) (*) GpGpTp	-2,5	-0,90
57	(*) GpApUp	-2,5	-0,45
63, 65	(*) (*) GpApGpUp	-3,5	-1,35
69-71	(*) (*) (*) GpGpGpCp	-3,5	-1,00

* При наличии в молекуле олигонуклеотида одного остатка модифицирующего реагента на несколько равновероятных мест модификации они обозначаются G.

реакционной смеси на колонку с DEAE-целлюлозой при pH 3,5 было обнаружено, что радиоактивный продукт не сорбируется на DEAE-целлюлозе, т. е. олигонуклеотид не имеет отрицательного заряда при pH 3,5. Следовательно, фракция III соответствует только олигонуклеотид

²⁶ArCpGpCpGpArp (образующийся после T₁-РНКазного гидролиза динуклеотид GpGp не заряжен при pH 3,5, в то же время РНКаза T₁ не

может гидролизовать олигонуклеотид GpArApms²¹⁶ApArp, поскольку «не узнает» гуанин, алкилированный по 7-му положению [12]), причем модифицированным является один из двух остатков: G²⁸ или G²⁹.

Фракция I может соответствовать довольно много различных олигонуклеотидов (см. табл. 1), поэтому для точной идентификации эта фракция была рехроматографирована при pH 3,5. При этом радиоактивный продукт не сорбировался на DEAE-целлюлозе; это значит, что модифицированный олигонуклеотид, соответствующий фракции I, не имеет отрицательного заряда при pH 3,5. Следовательно, модификации подвергнулся только олигонуклеотид AGCp (см. табл. 1). Олигонуклеотиды AGDp и GAUp при pH 3,5 имеют небольшой отрицательный заряд (-0,45) и должны были сорбироваться на DEAE-целлюлозе (см. рис. 3б).

Таким образом, модификация тРНК происходит по остаткам G¹⁰, G²⁸ или G²⁹ и по одному из остатков G²² или G²⁴.

Для подтверждения и уточнения места модификации алкилированную тРНК гидролизовали РНКазой T₁; образующиеся олигонуклеотиды (табл. 2) делили микроколонной ионообменной хроматографией при pH 7,5. При этом радиоактивная метка обнаруживается в четырех фракциях (рис. 4 а). Фракция I (заряд между 0 и -2) соответствует динуклео-

Возможные олигонуклеотиды T₁-РНКазного гидролизата
 алкилированной тРНК^{Phe}, содержащие модифицированный остаток G^{*}
 Заряды олигонуклеотидов при pH 3,5 рассчитаны с учетом данных [11]

Положе- ние G [*] в тРНК ^{Phe}	Олигонуклеотид	Заряд при pH	
		7,5	3,5
1	pGpCpCpCpGp	-6,5	-1,35
5	CpCpCpGpGp	-4,5	-0,35
6	GpAps ⁴ UpApGp	-4,5	-1,80
10	Aps ⁴ UpApGpCpUpCpApGp	-8,5	-3,35
15	CpUpCpApGpDpCpGp	-6,5	-2,80
18	DpCpGpGp	-3,5	-1,05
19	GpDpApGp	-3,5	-1,35
22	DpApGpApCp	-4,5	-1,80
24	ApGpCpApGp	-4,5	-1,05
27	CpApGpGp	-3,5	-0,50
28-29	GpGp	-1,5	+0,10
30	GpApΨpUpGp	-4,5	-2,35
34	ApΨpUpGpApAps ² i ⁶ ApApΨpCpCpCpGp	-13,5	-6,85
44	ApAps ² i ⁶ ApApΨpCpCpCpCpGpUpGp	-11,5	-4,95
52	XpCpCpUpUpGpGp	-6,5	-3,20
53	GpTpΨpCpGp	-4,5	-2,05
57	TrΨpCpGpApUpUpCpCpCpGp	-10,5	-4,95
63	ApUpUpCpCpCpGpApGp	-7,5	-3,10
65	ApGpUpCpCpGp	-5,5	-1,65
69	UpCpCpGpGp	-4,5	-1,20
70	GpGp	-1,5	+0,10
71	GpCpApCpCpAон	-3,5	+0,65

тиду G^{*}Gp, фракция II (заряд между -4 и -5) — одному из двух пентануклеотидов — DAGAGp или AGCAGp; фракция III (заряд около -8) — декануклеотиду As⁴UAGCUCAGp; фракция IV — более крупным фрагментам тРНК, не гидролизованым РНКазой T₁ в использованных условиях (вероятно, содержащим последовательности антикодонного и акцепторного стеблей, относительно медленно гидролизующим ферментом [13]).

Фракция II была рехроматографирована при pH 3,5; при этом радиоактивная метка была обнаружена в единственной фракции, соответствующей олигонуклеотиду с зарядом около -1 (рис. 4б), что соответствует одному из двух упомянутых выше пентануклеотидов — AGCAGp. Второй из них, DAGAGp, при pH 3,5 имеет заряд -1,8 и в использованной системе имел бы существенно меньшую подвижность (рис. 4б).

Таким образом, при алкилировании тРНК^{Phe} d[(ClCH₂NH)рАТТТ-ТСА] модификации подвергаются три остатка гуанина: G¹⁰, G²⁴ и G^{25/26}. Остаток G^{25/26} модифицируется скорее всего реагентом из его комплекса (полного или частичного спаривания) с антикодонной петлей (рис. 5). В то же время модификацию остатков G¹⁰, G²⁴ реагентом из этого же комплекса

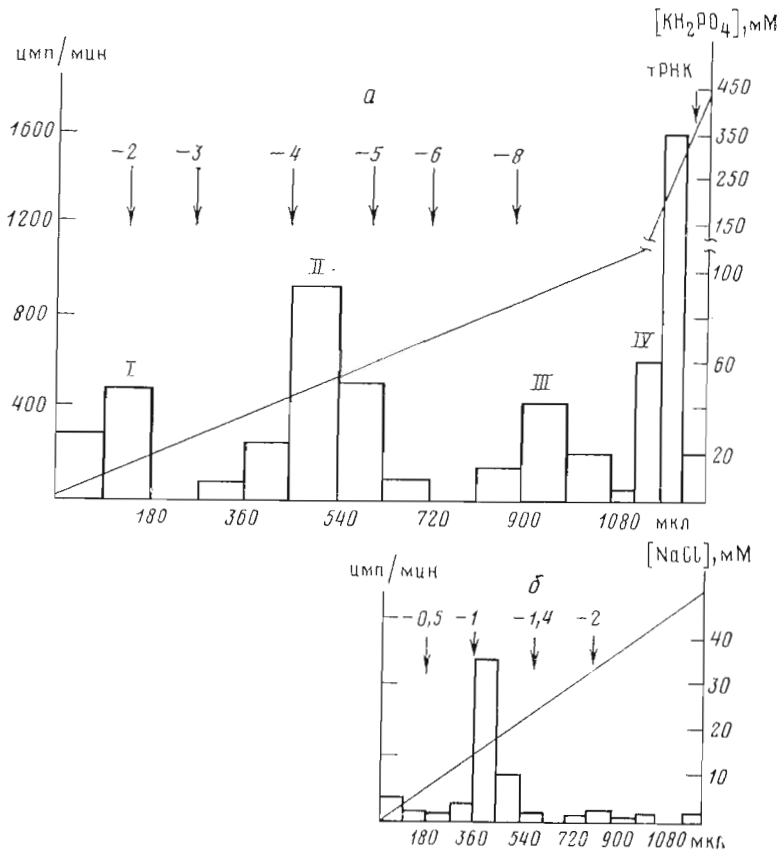


Рис. 4. Анализ T_1 -РНКазного гидролизата тРНК^{Phe}, алкилированной $d[(CIRCH_2NH) \cdot pATTTTCA]$ и выдержанной в условиях гидролиза фосфамидной связи. *a* — микроколоночная ионообменная хроматография на аминохроме АС-15 при рН 7,5; *б* — рехроматография фракции II на DEAE-целлюлозе при рН 3,5.

объяснить довольно затруднительно (рис. 5). Следовательно, можно предположить, что имеется еще один участок связывания реагента с тРНК^{Phe}. На существование более чем одного участка связывания $d[(CIRCH_2NH) \cdot pATTTTCA]$ указывает также изотерма модификации (рис. 2). Если учесть, что в тРНК часто встречаются комплементарные пары G·U [14], то можно предположить, что в определенных случаях реализуются и пары G·T. Тогда можно найти гипотетический второй участок связывания адреса $d(pATTTTCA)$ (с образованием комплекса неполного спаривания) с последовательностью $CGGDA^17GA^{23}$ в D-петле тРНК^{Phe}. В составе такого комплекса алкилирующая группировка будет сближена с остатками G¹⁰ и G²⁴ (рис. 5).

В предположении существования двух участков модификации можно оценить усредненные параметры взаимодействия реагента с тРНК — \bar{K}_x (константу ассоциации) и $\bar{\gamma}$ (кажущееся отношение скоростей превращения в комплексе и в растворе) подобно тому, как это было сделано нами ранее [6]. Значения \bar{K}_x и $\bar{\gamma}$, определенные на основании данных рис. 2, равны $(3,8 \pm 0,9) \cdot 10^3 M^{-1}$ и $1,0 \pm 0,1$ соответственно. Кривая, рассчитанная по уравнению (1) при указанных значениях параметров \bar{K}_x и $\bar{\gamma}$ [6], хорошо описывает экспериментальные данные (рис. 2). Однако усредненные значения этих параметров могут не отражать всей сложности процесса, если модификация идет не менее чем из двух участков связывания. Один из них — антикодоновая петля — является, по-видимому, участком наиболее сильного связывания (центр I) (соответствующий комплекс может содержать до семи комплементарных пар). Однако реакция в нем будет идти очень медленно, так как модификации в этом случае подвер-

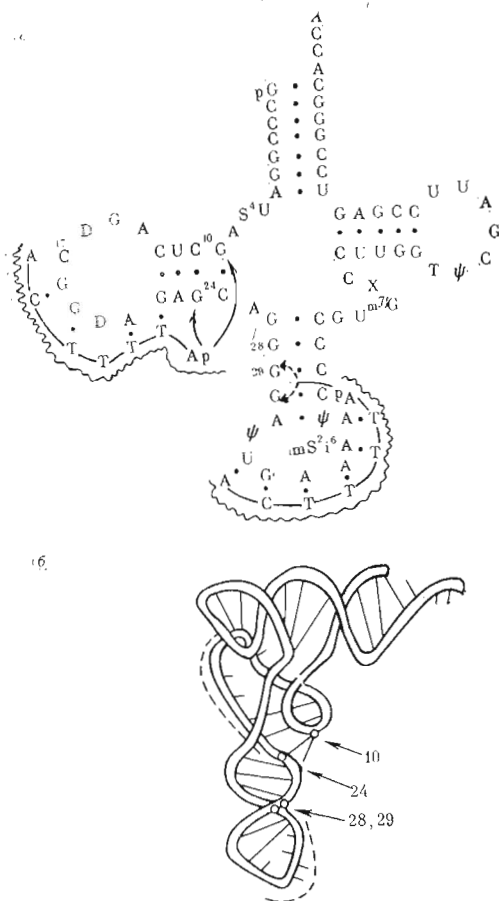


Рис. 5. Вторичная (а) и пространственная (б) структура тРНК^{Phe} [22]. Пунктиром обозначен гипотетический второй участок связывания реагента. На рисунке а волнистой линией отмечен «адресный» олигонуклеотид. Стрелками указано направление алкилирования

гаются практически нереакционно-способные по отношению к алкилирующим 2-хлорэтиламинам остатки G^{27/28} [15]. Константа связывания реагента со вторым центром — D-петля — может быть ниже, чем с первым, и он будет заполняться только при достаточно больших избытках реагента (центр II). Однако скорость реакции в нем может значительно превышать скорость реакции в центре I, так как модификации подвергаются наиболее реакционноспособные остатки гуанозина G¹⁰ и G²⁴ [15]; атомы N7 которых находятся рядом в центральной части L-образной структуры тРНК^{Phe} (рис. 5). Вследствие существенной разницы в реакционной способности реагирующих остатков гуанозина в центрах I и II (рис. 5) представляет интерес оценка эффективности модификации f_i в каждом из этих центров. Выражение для f_i , равной отношению скоростей алкилирования из специфического комплекса и из раствора, получено при условии избытка биополимера по отношению к аффинному реагенту в работе [16]. Однако исходя из уравнения изотермы модификации при условии избытка реагента [17], легко можно получить выражение для f_i в этих условиях:

$$f_i = \frac{\ln(1 - \alpha_i)}{x_0 \Sigma p_i} \quad (2)$$

где α_i — степень модификации в данном центре, p_i — суммарный фактор конкуренции реагирующих остатков гуанозина в данном центре [15] (фактор конкуренции — это реакционная способность остатков гуанозина в реакции с активной промежуточной частицей — этилениммониевым катионом вне комплекса, определяемая как отношение скоростей реакции алкилирования и гидролиза). В табл. 3 приведены значения f_i , найденные по уравнению (2) для каждого из этих центров при концентрации реагента $9 \cdot 10^{-5}$ М и общей глубине модификации 0,45 моль реагента на 1 моль тРНК (распределение степени модификации по остаткам G²⁴, G¹⁰ и G^{28/29} составляет 55, 24 и 21 % соответственно). Из табл. 3 видно, что в обоих центрах алкилирование идет в комплексе. Уровень неадресованной

Таблица 3

Эффективность алкилирования тРНК^{Phe} d[(CIRCH₂NH)рАТТТТСА] в центрах I и II

Центр	Остатки G*	α_i	p_i, M^{-1} [16]	f_i
I	G ^{28/29}	0,09	2,4	460
II	G ²⁴	0,11	40,3	
	G ¹⁰	0,25	44,2	

модификации не превышает 2% в центре II и 0,2% в центре I. Обращает на себя внимание тот факт, что эффективность реакции в центре I примерно на порядок превышает таковую в центре II.

Экспериментальная часть

В работе использовали тРНК^{Phe} *E. coli* (Boehringer Mannheim), РНКазы А и T₁ (Sankyo Co, Япония). Олигонуклеотид d(pApTpTpTp·TpCpA) синтезирован твердофазным триэфирным методом с активацией фосфатного компонента, связанного с носителем [18]; он был гомогенным более чем на 95% по данным микроколоночной ионообменной хроматографии на Partisil-10SAX и Lichrosorb RP-18; чистота олигонуклеотида подтверждена методом нуклеотидных карт. 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)[¹⁴C]бензил-5'-фосфамид d(pApTpTpTpTpCpA), d[(ClRCH₂NH)·pATTTTCA] с уд. акт. 20 мКи/ммоль был получен по методике [19]. Препарат содержал не менее 90% основного вещества по данным микроколоночной ионообменной хроматографии на Lichrosorb RP-18. Содержание ковалентного хлора, найденное по реакции с этилендиамином, составляло не менее 85%.

Алкилирование тРНК^{Phe} (5·10⁻⁶ М) d[(ClRCH₂NH)pATTTTCA] (9·10⁻⁵ М) проводили, если не указано особо, при 20° С в буфере А (0,02 М трис-НСl, рН 7,5), 1 мМ EDTA, 0,4 М NaCl, 0,01 М MgCl₂, 0,5% CHCl₃) в течение 72 ч. тРНК^{Phe} предварительно денатурировали инкубацией в буфере Б (0,02 М трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ EDTA) при 37° С в течение 10 мин. Затем проводили ренатурацию в буфере А при 37° С в течение 10 мин.

Алкилированную тРНК^{Phe} отделяли от реагента гель-фильтрацией на колонке объемом 1 мл и высотой 12 см, наполненной на 1/2 снизу сефадексом G-75, сверхтонким, а сверху — сефадексом G-50, сверхтонким. Объем наносимой смеси был не более 70 мкл; элюцию вели (если не указано особо) при 20° С буфером Б.

Алкилирование тРНК^{Phe} d[(ClRCH₂NH)pATTTTCA] в денатурирующих условиях проводили в буфере В (0,02 М трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ EDTA, 6 М мочевины) при 60° С в течение 3,5 ч.

Гидролиз фосфамидной связи в остатках реагента, ковалентно связанных с тРНК, осуществляли при рН 3 (в 5% HAc) и 37° С в течение 2 ч после предварительного выделения алкилированной тРНК гель-фильтрацией, как описано выше. Затем раствор осторожно нейтрализовали до рН 6 добавлением 1 М NaOH, осаждали тРНК этанолом и осадок растворяли в буфере Б. Алкилированную тРНК после гидролиза фосфамидной связи выделяли как описано выше. Для проверки интактности полинуклеотидной цепи в алкилированную тРНК^{Phe} вводили метку с помощью [³²P]pCp и РНК-лигазы по методике [20], меченую тРНК^{Phe} анализировали электрофорезом в 20% полиакриламидном геле как описано [21]. Основная часть метки (70—80%) находилась в полосе, соответствующей интактной тРНК^{Phe}. Остальные 20—30% относились к многочисленным полосам примерно одинаковой интенсивности, соответствующим продуктам неспецифического кислотного гидролиза тРНК. Поскольку каких-либо специфических разрывов в алкилированной тРНК^{Phe}, прошедшей все стадии обработки, не наблюдалось, полученный, как описано выше, препарат алкилированной тРНК^{Phe} непосредственно использовали для идентификации и локализации точек алкилирования.

Идентификацию алкилированных оснований в тРНК^{Phe} проводили, как описано в работе [6], с помощью хроматографии на бумаге продуктов полного кислотного гидролиза алкилированной тРНК^{Phe}.

Гидролиз алкилированной тРНК^{Phe} РНКазой А и T₁ осуществляли (после удаления олигонуклеотидного адреса) инкубацией при 37° С в буфере Б в течение 3 ч; концентрация тРНК составляла 10 А₂₆₀/мл, РНКазы А — 2·10⁻⁶ М, РНКазы T₁ — 10—30 ед. акт./мл.

Анализ олигонуклеотидов РНКазного гидролизата алкилированной тРНК^{Phe} проводили методом микроколоночной хроматографии при рН 7,5 на смоле аминохром AC-15, любезно представленной В. П. Кумаре-

вым (ИЦиГ СО АН СССР). Объем колонки составлял 50 мл, скорость элюции — 100 мл/мин. В отдельных экспериментах в аналогичных условиях на эту же колонку наносили растворы различных «калибровочных» олигонуклеотидов для определения их подвижности в данной системе.

Рехроматографию фракций РНКазного гидролизата алкилированной тРНК^{Phe} проводили с помощью микроколоночной хроматографии при рН 3,5 на DEAE-целлюлозе ДЕ-23SS. Перед нанесением на колонку (объемом 50 мл) фракции разбавляли 6 М мочевиной в 5 раз. Скорость элюции составляла 5—10 мл/мин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Власов В. В., Лаврик О. И., Мамаев С. В., Ходырева С. Н., Чижиков В. Е., Швалье А. Ф. Молекуляр. биология, 1980, т. 14, вып. 3, с. 531—538.
2. Карпова Г. Г. Молекуляр. биология, 1984, т. 18, вып. 5, с. 1194—1206.
3. Hsu L., Lin F.-L., Nurse K., Ofengand J. J. Mol. Biol., 1984, v. 172, № 1, p. 57—76.
4. Schwartz I., Ofengand J. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 697, № 2, p. 330—335.
5. Grineva N. I., Karпова G. G., Kuznetsova L. M., Venkstern T. V., Bayev A. A. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 5, p. 1609—1631.
6. Гимаутдинова О. И., Горшкова И. И., Грайфер Д. М., Карпова Г. Г., Кутявин И. В. Молекуляр. биология, 1984, т. 18, вып. 5, с. 1419—1423.
7. Grineva N. I., Ломакина Т. С., Тизеева Н. Т., Чимитова Т. А. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 2, с. 210—213.
8. Бенимецкая Л. З., Grineva N. I., Карпова Г. Г., Пичко Н. П., Чимитова Т. А. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 7, с. 903—913.
9. Гимаутдинова О. И., Карпова Г. Г., Ломакина Т. С., Шелпакова Е. Л., Челмазова А. Н., Grineva N. I. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 1, с. 70—80.
10. Lawley P. D. Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol., 1966, v. 5, p. 89—131.
11. Шабарова З. А., Богданов А. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978, с. 236.
12. Власов В. В., Грачев М. А., Grineva N. I., Кнорре Д. Г. Молекуляр. биология, 1973, т. 7, вып. 1, с. 12—19.
13. Wrede P., Wurst R., Vournakis J., Rich A. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 19, p. 9608—9616.
14. Микельсаар Р. Н. Молекуляр. биология, 1980, т. 14, вып. 3, с. 694—706.
15. Власов В. В., Скобелъцyna Л. М. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 4, с. 550—561.
16. Абрамова Т. В., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Пичко Н. П., Федорова О. С. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1642—1649.
17. Knorre D. G., Chimitova T. A. FEBS Lett., 1981, v. 131, № 2, p. 249—252.
18. Горн В. В., Зарытова В. Ф. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 808—814.
19. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 886—893.
20. Маннатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование/Ред. Баев А. А., Скрыбин К. Г. М.: Мир, 1984, с. 135.
21. Donis-Keller H., Maxam A., Gilbert W. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 10, p. 2527—2538.
22. Quigley C. J., Rich A. Science, 1976, v. 194, p. 796—806.

Поступила в редакцию
17.IX.1985

ALKYLATION OF tRNA^{Phe} WITH 4-(N-2-CHLOROETHYL-N-METHYLAMINO)BENZYL-5'-PHOSPHAMIDE OF d(ATTTTCA)

GIMAUTDINOVA O. I., GORN V. V., GORSHKOVA I. I.,
GRAIFER D. M., KARPOVA G. G., MUNDUS D. A., TEPLOVA N. M. *

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk;
* Novosibirsk State University, Novosibirsk*

Alkylation of *E. coli* tRNA^{Phe} with 4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzyl-5'-phosphamide of oligonucleotide d(ATTTTCA) complementary to the sequence UGA^{Am}s²ⁱ⁶AAΨ in the anticodon loop of tRNA^{Phe} was studied. Three guanine residues — G^{28/29}, G²⁴ and G¹⁰ were found to be alkylated. Two binding sites for the reagent in the tRNA were assumed to be present. The efficiency of the alkylation of tRNA from these sites as well as an average association constant (K_a 3,8·10⁹M⁻¹) for the reagent interaction with tRNA were evaluated.