



УДК 577.113.4+535.217+535.338.43

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННАЯ
ЛАЗЕРНАЯ МОДИФИКАЦИЯ (РАСЩЕПЛЕНИЕ)
ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ**

Бенимеуцкая Л. З., Булычев Н. В., Козионов А. Л.,
Кожихин А. А.*, Лебедев А. В.*, Новожилов С. Ю.,
Иттокман М. И.*

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

** Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Осуществлена и исследована комплементарно адресованная нелинейная фотомодификация олигодезоксинуклеотида AGAGTATTGACTTA («мишени») с помощью флуоресцентных производных олигодезоксинуклеотида рААТАСТСТ («адресованного хромофора»). Хромофорами служили три различных производных бромистого этидия. Фотомодификацию индуцировали излучением азотного лазера (337 нм, $I=15$ МВт/см²). Облучение индуцировало расщепление мишени в области адресации с выходом основного фрагмента (октануклеотида) до $\approx 10\%$, образование специфического ковалентного аддукта мишень – адресованный хромофор с выходом 20–70%, «скрытые» (не выявленные на геле-электрофорезе) повреждения мишени с выходом 7–27% (для различных хромофоров). Полный выход специфической (локализованной вблизи сайта адресации) модификации 50–80%. Фрагментация мишени и генерация скрытых повреждений являются оптически нелинейными процессами. Обработка пиперидином продуктов облучения приводит к адресованному расщеплению мишени с выходом до 40%. Все обнаруженные виды модификаций не чувствительны к высоким концентрациям перехватчиков свободных радикалов: 1,3 М Вн⁴ОН, 10 мМ дистамин. Совокупность данных согласуется с механизмом нелинейной фотомодификации (расщепления и генерации скрытых повреждений), основанным на переносе энергии двухфотонного возбуждения с хромофора на мишень.

В химии нуклеиновых кислот (НК) для целей специфической модификации наиболее перспективным представляется метод комплементарно адресованной модификации [1, 2]. Суть его заключается в присоединении реакционноспособной группировки к олигонуклеотиду (адресу) с последовательностью оснований, комплементарной к заданному участку НК. Химическая модификация НК происходит вблизи места связывания адреса после образования комплементарного комплекса.

Для осуществления комплементарно адресованной фотомодификации НК к олигонуклеотидному адресу присоединяется хромофор. Используется метод двухквантовой аффинной модификации (ДАМ) [3, 4]: облучение производится лазерным светом, насыщающим первый синглетный уровень хромофора (для этидия его плотность мощности ≥ 10 МВт/см²), который не поглощается НК, но квазирезонансно поглощается хромофорной группой. При этом происходит ступенчатое двухквантовое возбуждение хромофорной группы и безрадиационный перенос энергии этого возбуждения на НК в радиусе нескольких ангстремов вокруг хромофора. Переданная на НК энергия (5–7 эВ) достаточна для индукции различных видов фотомодификации, включая разрывы фосфодиэфирных связей.

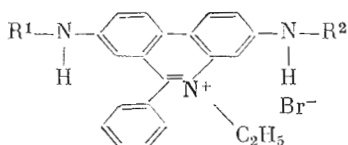
Физико-химические основы ДАМ изучены ранее в экспериментах как с неадресованными [5–8], так и с комплементарно адресованными [9, 10] хромофорами. Обнаружена генерация разрывов НК [5], показано, что

Принятые сокращения: НК – нуклеиновая кислота, ДАМ – двухквантовая аффинная модификация, EtdBr – бромистый этидий, CL – ковалентный аддукт нуклеотида-мишени с адресованным хромофором. Префикс «d» для дезоксинуклеотидов всюду опущен.

она индуцируется только связанными с НК хромофорами [6], доказана универсальность явления по типу хромофора [7,8]. В экспериментах [9,10], где в качестве адреса использовался гомогенный олигонуклеотид с дансильным хромофором на 5'-конце, показана селективность расщепления полинуклеотидов по набору оснований и доказана его оптическая нелинейность. С использованием дансильных производных гетерогенных олигонуклеотидов показана принципиальная возможность сайт-специфичного расщепления [11,12]. Выход и селективность расщепления были, однако, недостаточно велики. Поэтому встала задача улучшения указанных характеристик.

Одним из путей достижения данной цели является применение более эффективного хромофора. Как было установлено ранее в экспериментах по неадресованной модификации [7,8], среди исследованных красителей нелинейное лазерное расщепление НК с наибольшим выходом индуцирует бромистый этидий (EtdBr). В связи с этим нами были синтезированы и охарактеризованы флуоресцентные производные олигонуклеотидов, содержащие этидиевый хромофор, исследовано их комплексообразование с олигонуклеотидом-мишенью (будет опубликовано отдельно).

В настоящей работе осуществлены комплементарно адресованная модификация и расщепление олигонуклеотидов с применением в качестве адресованных хромофоров трех производных EtdBr (I) — (III).



- (I): $R^1=H$, $R^2=(-COCH_2CH_2NH)_pAATACTCT$
 (II): $R^1=(-COCH_2CH_2NH)_pAATACTCT$, $R^2=H$
 (IIIa): $R^1=(-COCH_2CH_2NH)_pAATACTCT$, $R^2=-COCH_2CH_2NH_2$
 (IIIб): $R^1=-COCH_2CH_2NH_2$, $R^2=(-COCH_2CH_2NH)_pAATACTCT$.

Нами использовано соединение (III), которое предположительно является смесью изомеров (IIIa) и (IIIб). Мишенью модификации служил тетрадекануклеотид $pAGAGTATTGACTTA$ (IV), комплементарный на участке A^1-T^8 нуклеотиду адресованных хромофоров (I) — (III).

Для перехвата продуктов облучения, способных реагировать с облучаемой системой и индуцировать неспецифическую фотомодификацию, использовались частично самокомплементарные олигонуклеотиды (V) и (VI). В контрольных экспериментах использовался адресный олигонуклеотид (VII), не содержащий флуоресцентной группы.

- (IV): $pAGAGTATTGACTTA$; (VI): $pSTCGAGCAAGCCG$
 (V): $pGTGTGAATTCAC$; (VII): $pAATACTCT$.

Мишень (IV) метилась по 5'-концу радиоактивной меткой ^{32}P . Концентрация адресованного хромофора составляла $5 \cdot 10^{-6} - 10^{-5}$ М, т. е. на порядок превышала константу диссоциации комплементарного комплекса мишень — адресованный хромофор ($3 \cdot 10^{-7}$ М), найденную нами (данные не приведены) по кривым плавления. Концентрация мишени составляла примерно 10^{-7} М.

На рис. 1 представлена автордиограмма геля после электрофореза продуктов облучения. Данный эксперимент проводился с целью обнаружения адресованного расщепления, исследования влияния дозы и плотности мощности облучения, а также перехватчиков свободных радикалов (цистамин, Bu^4OH , (V)).

Как видно из рис. 1 (дорожки 4—9, 11, 12, 14, ср. с дорожкой 1), облучение нуклеотида (IV) сфокусированным лазерным излучением в присутствии адресованного хромофора (III) непосредственно (без каких-либо дополнительных воздействий) приводит к селективному расщеплению мишени вблизи сайта адресации (T^8-G^9) и образующиеся фрагменты имеют электрофоретическую подвижность соответствующих продуктов частичного расщепления нуклеотида (IV) по $A+G$ с фосфатной группой на 3'-конце.

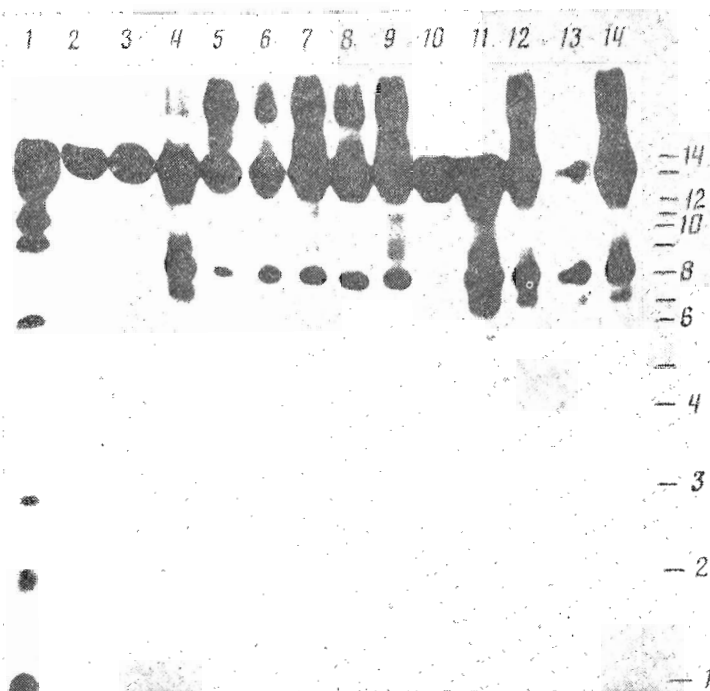


Рис. 1. Автордиограмма геля после электрофореза продуктов фотомодификации додекануклеотида (IV). Дорожки: 1 — репер длин (продукты частичного расщепления по А+Г), 2 — необлученный олигонуклеотид (IV) (контроль), 3 — (IV), облученный в стандартных условиях (см. 6) в присутствии цистамина (контроль). Стандартные условия представлены на дорожке 6: смесь 0,1 мкМ (IV) + 6 мкМ (III), плотность мощности 15 МВт/см², доза (падающая) облучения 200 Дж/см². Далее указаны отличия от стандартных условий. 4 — доза облучения 400 Дж/см², 5 — доза облучения 50 Дж/см², 7 — в присутствии 10 мМ цистамина, 8 — в присутствии 300 мкМ олигонуклеотида (V), 9 — при указанных выше концентрациях цистамина и (V), 10 — смесь 0,1 мкМ (IV) и 6 мкМ немодифицированного адресного олигонуклеотида (VII) + 6 мкМ EtдBr, 11 — плотность мощности облучения 150 МВт/см², 12 — концентрация соединения (III) 30 мкМ, 13 — после облучения стандартная смесь (дорожка 6) обработана пиперидином, 14 — облучение в присутствии 1,3 М Bu'OH. Справа приведена шкала длин

Искажение электрофоретической подвижности в репере длин (дорожка 1) по сравнению с дорожками 4–9, 11, 12, 14 связано с прослеживаемым на рис. 1 уменьшением к краям геля электрического поля при электрофорезе, обусловленном техническими причинами. Точное соответствие подвижностей продуктов облучения и репера длин может быть установлено с помощью рис. 3 (см. ниже).

Наблюдается (см. рис. 1) также образование продукта, имеющего подвижность, меньшую, чем у исходного олигонуклеотида (IV). Образование аналогичных продуктов наблюдалось ранее [11, 12] при использовании дансильного и флуоресцеинильного хромофоров. В этих работах посредством применения меченых мишени и адресованного хромофора было показано, что наблюдаемый продукт является аддуктом (далее будем называть его СЛ, от английского cross-links). Представленный на рис. 1 (см. также ниже) продукт с низкой подвижностью, по-видимому, имеет ту же природу. В пользу такого предположения свидетельствует дозовая зависимость (ср. между собой дорожки 4–6): наибольшее количество СЛ наблюдается уже при минимальной дозе облучения (дорожка 5); с увеличением дозы выход СЛ падает, а продуктов адресованного расщепления растет. Отсюда следует, что СЛ действительно содержит хромофор (о наличии в СЛ нуклеотида-мишени свидетельствует ³²P-метка).

При отсутствии хромофора или без облучения расщепление не происходит (контрольные дорожки 2, 3). Облучение смеси мишени (IV) с адресным олигонуклеотидом (VII) и свободным красителем (в concentra-

Константы скоростей реакций (k) компонентов смеси с радикалами [13]
 В скобках указаны значения коэффициента подавления r , рассчитанные согласно уравнению (1)

Соединение	Концентрация, мМ	k , М ⁻¹ ·см ⁻¹	
		ОН•	e-
Цистамин	10	—	4,1·10 ¹⁰ (5·10 ³)
Bu ¹ ОН	1300	7,6·10 ⁸ (10 ⁴)	10 ⁴ (1,1)
Нуклеотиды (V), (VI)	1,3–7	4·10 ⁸ (7,0–33)	1,4·10 ⁸ (3,2–12)
Нуклеотиды (мишень+адресованный хромофор)	0,05	4·10 ⁸	1,4·10 ⁸
N(CH ₃) ₄ ⁺ (компонент буфера)	10	6,6·10 ⁶	5,6·10 ⁶

ции, эквимольной адресу) также не приводит к заметному расщеплению (дорожка 10). Это доказывает, что наблюдаемая модификация индуцируется только ковалентно присоединенным хромофором.

На дорожках 7–9, 14 приведены результаты для системы мишень (IV) — адресованный хромофор (III) в присутствии перехватчиков свободных радикалов — цистамин, Bu¹ОН, а также олигонуклеотида (V). Константа скорости реакции последнего с неадресованными фотопродуктами близка к таковой для мишени, т. е. нуклеотид (V) является универсальным ингибитором неспецифических реакций. Константы скоростей реакций перехватчиков со свободными радикалами [13] и ожидаемые степени подавления (т. е. во сколько раз уменьшается выход свободно-радикальной реакции при добавлении перехватчика), рассчитанные согласно уравнению (1) (см. Приложение), приведены в табл. 1. Из нее видно, что если бы наблюдаемая фотомодификация вызывалась объемными свободными радикалами, то ее выход подавлялся бы в (0,5–1)·10 000 раз при использовании цистамин или Bu¹ОН и более чем в 10 раз при добавлении нуклеотида (V). Из сравнения (см. рис. 1) дорожек 7–9, 14 с дорожкой 6 видно, что добавление перехватчиков свободных радикалов не приводит к подавлению расщепления. Данный факт позволяет полностью исключить наличие свободных радикалов, распределенных в объеме облученной смеси, в качестве причины наблюдаемой модификации.

Помимо расщепления при облучении можно было ожидать иных повреждений мишени — обнаруживаемых с помощью гель-электрофореза аддуктов СL, а также «скрытых» повреждений, таких, как элиминация и модификация оснований. Для выявления скрытых повреждений, а также для установления положения повой связи в аддукте СL продукты облучения были обработаны пиперидином (см. рис. 1, дорожку 13). Это позволяет расщепить мишень по возникшим в результате фотомодификации точкам элиминации оснований и некоторым другим повреждениям цепи [14].

Как видно из сравнения дорожек 13 и 6, после обработки пиперидином относительный выход расщепления намного повышается при сохранении столь же высокой степени адресованности, а выход СL резко падает.

Количественная информация содержится в гистограммах распределений продуктов облучения по подвижностям. Как видно из рис. 2а, распределение продуктов по длинам имеет вид пика, центрированного вблизи сайта адресации (T⁸—G⁹). Ширина пика — одно-два основания. Она может быть обусловлена как делокализацией возбуждения, переданного мишени, так и возможным расположением хромофора между различными основаниями. Из данного результата следует, что радиус миграции двухквантового возбуждения не превышает двух оснований. Относительный выход адресованного (на T⁸—G⁹) расщепления более 10%.

Данные рис. 2а позволяют также сделать вывод об оптимальности стандартных условий облучения (дорожка 6 на рис. 1). При уменьшении дозы падает выход адресованного расщепления. Увеличение плотности мощности, так же как и увеличение дозы облучения или концентрации

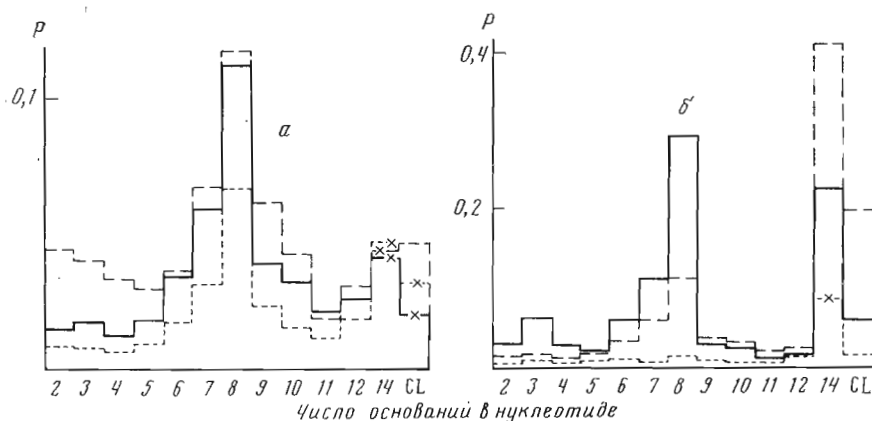


Рис. 2. Распределение продуктов фотомодификации по длинам, полученное по результатам гель-электрофореза рис. 1. P — доля продуктов от суммы. Крайний правый столбец представляет CL . Столбцы, помеченные крестиками, уменьшены по высоте в 10 раз. Представлены дорожки: $a-6$ (сплошная линия), 11 (штриховая), 5 (пунктирная); $b-13$ (сплошная линия), 6 (штриховая), 10 (пунктирная)

адресованного хромофора (ср. дорожки $4, 11, 12$ на рис. 1), не приводя к существенному увеличению выхода адресованного расщепления, вызывает значительное усиление неспецифической модификации.

В результате обработки пиперидином (см. рис. 2б) выход продукта адресованного расщепления резко возрастает и достигает 30%, в то время как доля расщепления вне сайта адресации увеличивается незначительно (на одноступенчатом участке оно на уровне фона). Можно заключить, что в сайте адресации индуцируются скрытые повреждения, которых в несколько раз больше, чем непосредственно возникающих разрывов.

Из рис. 2б следует также, что свободный краситель EtdBr, добавленный к смеси мишени (IV) с комплементарным октануклеотидом (VII) в той же концентрации, что и адресованный хромофор в стандартном образце, вызывает весьма малую (на уровне фона) модификацию статистического характера. Таким образом, эффективен только адресованный хромофор, что объясняется значительно меньшей константой диссоциации (K_d) его комплексов с мишенью по сравнению с величиной K_d для свободного EtdBr.

Эксперименты, аналогичные представленным на рис. 1 и 2, были проведены также с адресованными хромофорами (I) и (II). Во всех опытах наблюдалась воспроизводимость адресованного расщепления, которое наиболее эффективно происходило при использовании соединения (III) и наименее эффективно для (I). Последний, напротив, наиболее эффективно (с выходом до 70%) генерировал CL (табл. 2).

После обработки пиперидином выход октануклеотида во всех случаях значительно возрастает, причем адресованный хромофор (III) остается наиболее эффективным, а (I) и (II) сравнимы по эффективности. Пиперидин расщепляет значительную часть CL . Во всех случаях, как и для адресованного хромофора (III), при использовании соединений (I) и (II) обработка пиперидином не только увеличивает выход адресованного расщепления, но и существенно повышает степень адресованности (остроту пика на гистограммах).

Для решения вопроса о том, из каких продуктов под действием пиперидина образуется октануклеотид, т. е. что увеличивает выход продуктов адресованного расщепления, рассмотрим состав основных продуктов в экспериментах, представленный в табл. 2. Для хромофора (I) после обработки пиперидином доля октануклеотида увеличивается на 0,19, в то время как доля нуклеотида исходной длины падает на 0,07, а CL — на 0,28 (все доли по отношению к полному количеству вещества). Отсюда ясно, что увеличение содержания продукта адресованного расщепления не может быть обусловлено только расщеплением тетрадекануклеотида (IV).

Относительная доля основных продуктов непосредственно после облучения комплексов мишень—адресованный хромофор (верхняя строка) и с последующей обработкой пиперидином (нижняя строка)

Приведены средние величины из 2 опытов и оценки статистических погрешностей (в скобках, в единицах порядка последнего указанного знака). S — оценка относительного выхода специфической модификации, вычисленная согласно уравнению (3)

Продукт (длина фрагмента)	Адресованный хромофор		
	(I)	(II)	(III)
8	0,031 (1) 0,22 (2)	0,048 (1) 0,22 (3)	0,088 (6) 0,36 (2)
14	0,19 (3) 0,12 (3)	0,62 (2) 0,38 (8)	0,42 (2) 0,15 (1)
CL	0,68 (3) 0,40 (5)	0,20 (1) 0,06 (1)	0,22 (1) 0,036 (3)
S	0,79 (5)	0,49 (9)	0,58 (3)

Следовательно, в адресованное расщепление обязательно дают вклад другие продукты, в основном, по-видимому, аддукты CL ввиду их большого количества (0,68).

Напротив, для хромофора (III) после обработки пиперидином уменьшение доли CL на 0,18 недостаточно для увеличения доли октануклеотида на 0,27. Следовательно, продукт адресованного расщепления образуется также за счет иных процессов. Содержание (доля) олигонуклеотида исходной длины при обработке пиперидином падает как раз на 0,27 (т. е. выход скрытых повреждений в продукте исходной длины составляет не менее 0,27). Таким образом, значительная часть прироста продукта адресованного расщепления в этом случае, по-видимому, обусловлена гидролизом исходного олигонуклеотида (IV) по сайтам скрытой модификации.

Таким образом, вероятно, что под действием пиперидина выход продукта адресованного расщепления увеличивается за счет как гидролиза по сайтам скрытой модификации, так и разрушения аддуктов CL. Относительный вклад данных двух механизмов, однако, для различных хромофоров может различаться.

Добавление неспецифического перехватчика (V) (см. рис. 1) или (VI) (данные не включены) приводит к повышению выхода адресованного и некоторому подавлению неадресованного расщепления. Данный факт исключает наличие свободных радикалов в объеме в качестве причины наблюдаемой модификации (концентрация свободных радикалов понижается обоими перехватчиками в несколько раз, см. табл. 1). Уменьшение доли неадресованного расщепления может объясняться тем, что добавленный самокомплементарный олигонуклеотид (V) или (VI) связывает свободный хромофор, который может образовываться в результате саморасщепления адресованного хромофора (например, по механизму ДАМ), что наблюдалось ранее с дансильным хромофором [12]. Усиление адресованного расщепления может быть следствием подавления неадресованного (они находятся в конкурентных отношениях), а также уменьшения модификации адресованного хромофора образовавшимся свободным EtdBr.

Эксперимент, представленный автораддиограммой теля после электрофореза (см. рис. 3), проведен с целью выяснения роли оптической нелинейности (т. е. зависимости результатов от плотности мощности излучения при фиксированной дозе) в формировании разрывов и аддуктов CL, а также для подтверждения обсуждавшегося выше механизма действия олигонуклеотида-перехватчика на свободный хромофор.

Несфокусированное (плотность мощности 0,1 МВт/см²) излучение (дорожка 8) не вызывает расщепления непосредственно (ср. с дорожкой 1) в согласии с механизмом ДАМ. Однако при этом происходит образование аддуктов CL (см. дорожку 8), являющееся, таким образом, опти-чески линейным процессом. Обработка пиперидином приводит к разру-

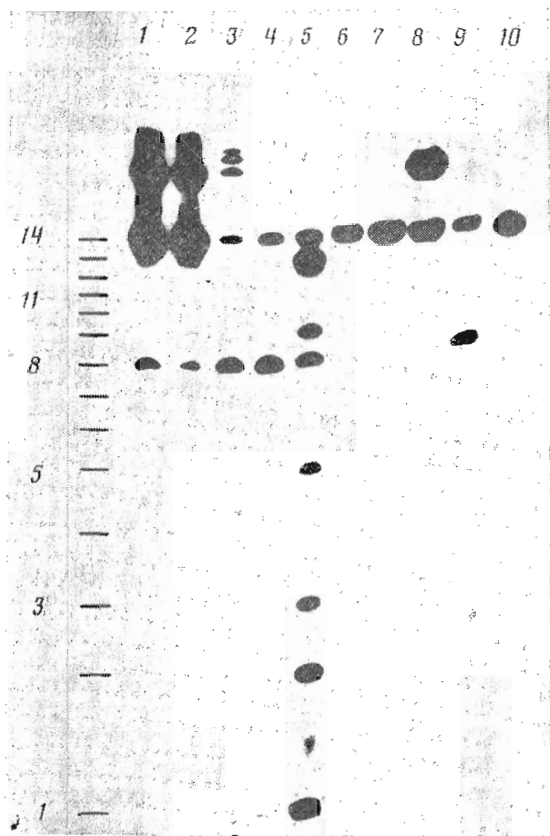


Рис. 3. Авторадиограмма геля после электрофореза продуктов фотомодификации (плотность мощности излучения 15 МВт/см²) смеси 0,1 мкМ тетрадекануклеотида-мишени (IV) и 10 мкМ адресованного хромофора (I) (стандартный образец и условия — дорожка 1). Отличия дорожек: 2 — добавлен 0,1 мМ олигонуклеотид (VI), 3, 4 — образцы 1, 2 обработаны пиперидином, 5 — частичное расщепление по А+G (репер длин), 6 — смесь 0,1 мкМ мишени+10 мкМ немодифицированного октануклеотида (VII)+10 мкМ свободного красителя EtdBr, 7 — образец дорожки 6 с добавлением 0,1 мМ перехватчика (VI), 8 — облучение при плотности мощности 0,1 МВт/см², 9 — образец 8 обработан пиперидином, 10 — необлученный образец (контроль). Слева указана шкала длин

шению аддуктов СL, сопровождающемуся адресованным расщеплением мишени. Образование октануклеотидов происходит высокоселективно (см. рис. 4), что свидетельствует о локализации модификации, образующей СL, в сайте адресации. Вероятно, СL образуется между хромофором и G⁹ мишени.

Доля нуклеотида исходной длины при обработке пиперидином не уменьшается (см. рис. 4) в отличие от того, что наблюдалось при сфокусированном облучении (ср. с табл. 2). Таким образом, нет оснований предполагать наличие скрытой модификации олигонуклеотида исходной длины в случае излучения ненасыщающей интенсивности.

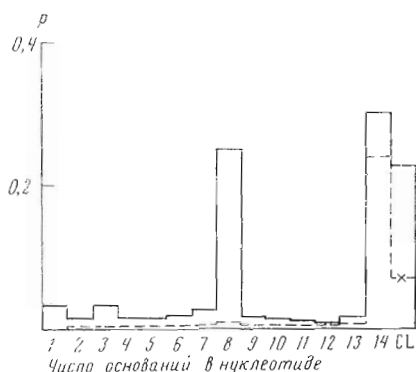
Кратко подытожим и обсудим полученные результаты. Осуществлена высокоэффективная адресованная лазерная фотомодификация олигонуклеотида-мишени в комплементарном комплексе с адресованным хромофором. В качестве последнего использованы производные этидия, ковалентно присоединенные к 5'-концу олигонуклеотида.

Непосредственно в процессе облучения происходит адресованное расщепление тетрадекануклеотида-мишени в области адресации с преимущественным образованием октануклеотида. Выход данного процесса максимален ($\approx 10\%$) для адресованного хромофора (III). Облучение приводит также к генерации «скрытых» (мало влияющих на электрофоретическую подвижность) повреждений, а также к образованию ковалентных аддуктов мишень — адресованный хромофор (СL). Выход скрытых повреждений максимален для хромофора (III) и составляет не менее 27%. Наибольшая доля СL ($\approx 70\%$) наблюдается для хромофора (I).

Таким образом, непосредственно в процессе облучения индуцируются специфические модификации широкого спектра: разрывы сахарофосфатной цепи, скрытые повреждения, образование аддуктов СL. Их суммарный выход для разных хромофоров составляет 50—80% (см. табл. 2).

Селективная модификация целиком обусловлена адресованным хромофором, т. е. хромофором, ковалентно связанным с олигонуклеотидом, — адресом.

Рис. 4. Распределение продуктов фотомодификации по данным, полученное по результатам гелелектрофореза рис. 3. Столбцы, помеченные крестиками, уменьшены по высоте в 10 раз. Представлены дорожки рис. 3: 8 — сплошная, 9 — штриховая линии



Ширина пика адресованной модификации позволяет заключить, что большинство разрывов отстоит от сайта адресации не более чем на одно основание. Следовательно, как радиус миграции двухквантового возбуждения по цепи НК, так и расстояние от хромофора до точки адресации не могут превосходить $\approx 4 \text{ \AA}$.

Вопрос о влиянии на адресованность фотомодификации первичной структуры мишени вблизи сайта адресации, в частности наличия гуанина в положении 9, остается открытым, для его решения в будущем необходимо проделать эксперименты с разными мишенями. Здесь отметим только, что значителен также выход гелтануклеотидного продукта (см. рис. 2), соответствующего расщеплению по T⁸. Это является косвенным указанием на возможную универсальность данного метода модификации по отношению к первичной структуре мишени.

Причиной модификации не могут служить свободные радикалы, образующиеся в объеме реакционной смеси. Полученные данные не исключают, однако, участия локальных свободных радикалов, рождаемых вблизи хромофора и реагирующих с ближайшими основаниями НК. Эффект перехватчика на такие радикалы описывается уравнением (2) (см. Приложение). Если модификация вызывается свободными радикалами, то радиус миграции последних (R) ограничивается полушириной пика адресованного разрезания (ср. выше): $R \leq 4 \text{ \AA}$. Отсюда, используя константы скоростей реакций (табл. 1) и принимая значение коэффициента диффузии $D = 2,5 \cdot 10^5 \text{ см}^2/\text{с}$, для концентраций перехватчика, уменьшающих выход продуктов модификации в 2 раза, получим: $C_{1/2} = 100 \text{ М}$ ($\text{Bu}^{\cdot}\text{OH}$) и $C_{1/2} = 2 \text{ М}$ (цистамин). Эти концентрации, очевидно, нереалистично велики. Таким образом, перехватчики не могут подавить реакции, вызванные локальными радикалами. Вопрос о том, участвуют ли последние в превращениях, не может быть решен с помощью перехватчиков. Ответ на него может быть получен, по-видимому, с помощью анализа продуктов модификации.

Расщепление цепи и образование скрытых повреждений непосредственно при облучении являются оптически нелинейными процессами (см. обсуждение рис. 3, 4). Данный факт, а также специфичность модификации и неэффективность перехватчиков свободных радикалов согласуются с механизмом ДАМ [3]. Этот механизм включает прямую модификацию НК вследствие ее электронного возбуждения и в принципе независим от часто встречающихся посредников фотохимических превращений: радикалов OH^{\cdot} и e^{-} , а также кислорода. Ранее эта независимость от кислорода была показана в экспериментах с адресованным дансильным хромофором [11, 12] и по неадресованной модификации (с различными интеркалирующими красителями, включая EtdBr) [8].

Авторы искренне признательны акад. Д. Г. Кнорре (НИБХ), акад. Ю. Е. Нестерихину (ИАЭ) и чл.-кор. АН СССР С. Г. Раутиану (ИАЭ) за участие в постановке задачи, ценные рекомендации и неизменную помощь в работе, проф. Э. И. Будовскому (ИОХ) и проф. М. Д. Франк-Каменецкому (ИМГ) за полезные обсуждения.

Экспериментальная часть

Олигонуклеотиды метили по 5'-концу радиоактивным фосфором ^{32}P по методике [15]. Концентрация молекул модифицируемого олигонуклеотида (мишени) при облучении составляла примерно 0,1 мкМ, растворителем являлся буфер 0,01 М тетраметиламмоний-борат (рН 7,5), содержащий 0,01 М MgCl_2 и 0,2 М NaCl .

Облучение проводили в специально сконструированных герметичных кварцевых микрокуветках толщиной 200 мкм и рабочим объемом 2 мкл при 20° С. Источником излучения служил азотный лазер ЛГИ-21 (длина волны излучения 337 нм, средняя мощность 4 мВт, частота следования импульсов 100 Гц, длительность импульса 8 нс, плотность мощности в фокусе 15 МВт/см²). Лазерное излучение фокусировалось внутрь кюветы кварцевой линзой ($f=10$ см) в пятно диаметром ≈ 200 мкм. Кювету автоматически сканировали в плоскости, перпендикулярной лазерному пучку, с тем чтобы равномерно засветить весь рабочий объем. Плотность дозы падающего на образец излучения 200 Дж/см².

Обработку пиперидином проводили при 100° С в течение 30 мин.

Пробы анализировали методом гель-электрофореза в 20% ПААГ, напряженность поля 30 В/см, буфер: 10 мМ трис-борат (рН 8,0), 7 М мочевины и 0,5 мМ EDTA. Использовали метод автордиографии: на гель накладывали рентгеновскую пленку РМ-1 с усиливающим экраном ЭУИ-1 (отечественного производства). После нескольких часов экспозиции гель разрезали, выделяли отдельные полосы и измеряли их радиоактивность по эффекту Черенкова с помощью счетчика Delta-300 (TM Analytic, США) в тритиевом канале. По этим измерениям количественно определяли относительные выходы фотомодификации.

ПРИЛОЖЕНИЕ. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ

Рассмотрим кинетику подавления свободнорадикальных реакций перехватчиками. Если бы модификация индуцировалась радикалами в объеме раствора, то при добавлении перехватчика наблюдалось бы уменьшение выхода фотомодификации в

$$r = 1 + k_s C_s / \sum_b k_b C_b \quad (1)$$

раз. Здесь k_s , C_s — константа скорости реакции и концентрация перехватчика, k_b , C_b — константы скоростей реакций и концентрации соединений, присутствующих в стандартном растворе (нуклеотидов и буфера). Константы скоростей реакций [13], концентрации веществ и рассчитанные с помощью уравнения (1) коэффициенты подавления реакций с объемными свободными радикалами приведены в табл. 1.

Оценим действие перехватчиков на локальные радикалы. Таковые могут рождаться связанным хромофором вблизи оснований НК и быстро гибнуть там же (вследствие реакции с ближайшим окружением). Скорость гибели радикалов v (обратная их времени жизни, τ) связана с их коэффициентом диффузии (D) и расстоянием (R_m), на которое они успевают продиффундировать, соотношением Смолуховского — Эйнштейна $v=4D/R_m^2$. Поскольку увеличение скорости гибели радикалов вследствие добавления перехватчика составляет $k_s C_s$, а скорости аддитивны, концентрация радикалов и, следовательно, число порождаемых ими продуктов уменьшаются в r_1 раз:

$$r_1 = 1 + C_s / C_{1/2}, \quad C_{1/2} = 4D / k_s R_m^2. \quad (2)$$

Константа $C_{1/2}$ имеет смысл концентрации перехватчика, при которой скорость индуцируемых радикалами превращений падает в 2 раза.

В табл. 2 приведены оценки средних выходов основных продуктов фотомодификации и оценки статистических ошибок этих величин, полученные обработкой экспериментальных данных. Выход специфической модификации оценен следующим образом. До действия пиперидина видимый выход специфической модификации равен $\{S\} + \{CL\}$, где в фигурных скобках приведены доли соответствующих продуктов (для олигонуклеотидов указывается длина). В этом выражении не учтены скрытые повреждения. Выход последних H может быть оценен по убыванию доли продукта исходной длины после обработки пиперидином $H = \{14\} - \{14\}_{\text{пип}}$, где пип означает обработку пиперидином. Суммируя указанные выше вклады, получим оценку полного выхода S специфической модификации:

$$S = \{8\} + \{CL\} + \{14\} - \{14\}_{\text{пип}}. \quad (3)$$

ЛИТЕРАТУРА

1. Grineva N. I., Karpova 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. // Биоорганическая химия. 1981. Т. 7. № 10. С. 1512–1522.
3. Stockmann M. I. // Phys. Lett. 1980. V. 76. № 2. P. 191–193.
4. Раутиан С. Г., Штокман М. И. // Тр. 7-й Вавиловской конф. по нелинейной оптике / Ред. Раутиан С. Г. Ч. 2. Новосибирск, 1982. С. 148–161.
5. Пархоменко А. И., Раутиан С. Г., Штокман М. И. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 250. № 1. С. 225–228.
6. Венимецкая Л. З., Козионов А. Л., Новожилков С. Ю., Штокман М. И. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272. № 1. С. 217–220.

7. *Бенимецкая Л. З., Козионов А. Л., Новожилов С. Ю., Штокман М. И.* Универсальность нелинейного лазерного разрезания ДНК по типу красителя. Препринт ИАНЭ СО АН СССР 230. Новосибирск, 1984.
8. *Бенимецкая Л. З., Козионов А. Л., Муратов Л. С., Новожилов С. Ю., Штокман М. И.* // *Биофизика*. 1987. Т. 32. № 4. С. 716–731.
9. *Benimetskaya L. Z., Bulyshev N. V., Kozionov A. L., Lebedev A. V., Nesterikhin Yu. E., Novozhilov S. Yu., Rautian S. G., Stockmann M. I.* // *FEBS Lett.* 1983. V. 163. № 1. P. 144–149.
10. *Бенимецкая Л. З., Булычев Н. В., Козионов А. Л., Лебедев А. В., Нестерихин Ю. Е., Новожилов С. Ю., Раутян С. Г., Штокман М. И.* // *Биоорганич. химия*. 1984. Т. 9. № 4. С. 144–149.
11. *Бенимецкая Л. З., Булычев Н. В., Горн В. В., Козионов А. Л., Лебедев А. В., Новожилов С. Ю., Подыминогов М. А., Штокман М. И.* // *Биофизика*. 1985. Т. 31. № 1. С. 151–152.
12. *Бенимецкая Л. З., Булычев Н. В., Горн В. В., Козионов А. Л., Кутявин И. В., Лебедев А. В., Новожилов С. Ю., Подыминогов М. А., Штокман М. И.* Комплементарно адресованное лазерное расщепление олигодезоксинуклеотидов. Препринт ИАНЭ СО АН СССР 252. Новосибирск, 1984.
13. *Пикаев А. К., Кабакчи С. А.* Реакционная способность первичных продуктов радиолиза воды. Справочник. М.: Энергоиздат. 1982. С. 210.
14. *Кочетков И. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф., Шibaев В. Н.* Органическая химия пуклеиновых кислот. М.: Химия, 1970.
15. *Richardson C. C.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1965. V. 54. № 1. P. 158–162.

Поступила в редакцию
18.III.1987

После доработки
22.VI.1987

HIGH-EFFICIENCY COMPLEMENTARY ADDRESSED LASER MODIFICATION (CLEAVAGE) OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDES

BENIMETSKAYA L. Z., BULYSHEV N. V.*, KOZIONOV A. L., KOSHKIN A. A.*,
LEBEDEV A. V.*, NOVOZHILOV S. Yu., STOCKMANN M. I.

Institute of Automation and Electrometry, Novosibirsk:

** Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,
Academy of Sciences of the USSR*

Complementary addressed nonlinear photomodification of oligodeoxynucleotide dAGAGTATTGACTTA («target») has been carried out by means of fluorescent derivatives of oligonucleotide dpAATACTCT («addressed chromophore»). Three different ethidium derivatives were used as a chromophore. The photomodification was induced by nitrogen laser radiation (337 nm, 15 MW/cm²), which led to the target cleavage in the addressation region with the yield of the main fragment (8 bases long) about 10%, formation of specific covalent adduct target-addressed chromophore with the yield 20–70%, «hidden» (not revealed by gel electrophoresis) target damages with 7–27% yield (for different chromophores). The total yield of specific (i. e. localized in the vicinity of the addressation site) modification was 50–80%. The target cleavage and hidden damage generation are optically nonlinear processes. Piperidine treatment of the irradiated samples caused addressed cleavage of the target with up to 40% yield. All kinds of observed modification are not effected by high concentrations of free radical scavengers, 1.3 M *t*-BuOH or 10 mM cystamine. The bulk of the data is in agreement with the mechanism of nonlinear photomodification (the cleavage and hidden damage generation) based on the transfer of two-photon excitation energy from the chromophore to the target.