



УДК 577.113.4:541.127

© 1994 О. С. Федорова, А. Д. Одинаев, В. В. Горн,
Г. А. Максакова, О. С. Перебоева, Д. Г. Кнорре

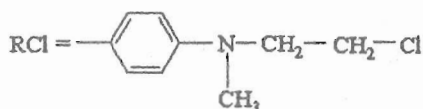
КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МОДИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ АЛКИЛИРУЮЩИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В ПРИСУТСТВИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЭФФЕКТОРОВ

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, направленная модификация, олигонуклеотиды, алкилирующие производные, N-(2-гидроксиэтил)феназиновые производные, олигонуклеотидные эффекторы.

Исследована модификация 26-звенного фрагмента ДНК (TTGCCTTGAATGGGAAGAGGGTCAAT) 5'-{4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)]бензил}фосфамидным производным шестизвенного олигодезоксирибонуклеотида рТТСССА в присутствии двух эффекторов реакции — ди-3',5'-N-(2-гидроксиэтил)феназиновых производных октадезоксирибонуклеотидов, образующих комплементарные комплексы с участками мишени, непосредственно примыкающими с 3'- и 5'-концов к сайту узнавания реагента*. В использованных условиях олигонуклеотиды-эффекторы хотя и увеличивали стабильность комплекса мишени с реагентом, но не приводили к ее полной модификации. Это, скорее всего, обусловлено тем, что модификация протекает в квазиравновесном режиме.

Реакционноспособные производные олигонуклеотидов широко используются для проведения специфичной к последовательности модификации одноцепочечных и двухцепочечных нуклеиновых кислот [1, 2]. Впервые такой подход был предложен в работе [3] для 2', 3'-O-[N-метиламино-N-(2-хлорэтил)]бензильденных производных олигонуклеотидов $(p)N_{n-1}rN > CH-RCl$.

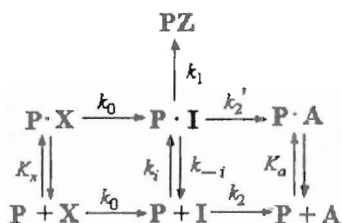


Позднее были синтезированы 5'-{4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)]бензил}фосфамидные производные олигонуклеотидов $ClR-CH_2NH-pN_n$ [4]. К настоящему

* Префикс «d» в обозначении олигодезоксирибодезоксинуклеотидов опущен.

времени получено достаточно большое количество данных, позволяющих не только делать выводы относительно тонких деталей механизма модификации, но и предсказывать пути повышения эффективности и селективности этого процесса. Кинетическая схема процесса модификации нуклеиновых кислот этими производными предложена в работах [5, 6] и выглядит следующим образом:

Схема 1



В этой схеме P — нуклеиновая кислота-мишень, X — реагент $(p)N_{n-1}rN > CH-RCl$ или $ClR-CH_2NH-pN_n$, I — промежуточный реакционно-способный этилениммониевый катион, образующийся из реагента в лимитирующей стадии, A — продукт побочного превращения реагента вне комплекса (в случае ароматических 2-хлорэтиламинонов это в основном продукт гидролиза, содержащий вместо атома Cl гидроксигруппу, $(p)N_{n-1}rN > CH-ROH$ или $HOR-CH_2NH-pN_n$), PZ — продукт модификации мишени $(p)N_{n-1}rN > CH-R-P$ или $P-R-CH_2NH(5')pN_n$; P·X, P·I, P·A — соответствующие комплексы с мишенью, K_x и K_a — константы устойчивости комплексов P·X и P·A; $k_0, k_1, k_2, k_i, k_{-i}, k_2'$ — константы скорости реакций. В работе [6] анализ этой схемы выполнен в предположении, что концентрации P·X и P·A квазиравновесны, а концентрации промежуточного катиона I и его комплекса с полимером P·I квазистационарны. Также предполагали, что реагент находится в избытке и $k_2 \gg k_1 [P]$. Если олигонуклеотидный фрагмент реагента не претерпевает изменений в ходе реакции, то можно ожидать, что $K_x = K_a$. С учетом сделанных допущений в работе [6] было получено кинетическое уравнение, которое при $t \rightarrow \infty$ дает следующее выражение для предельной степени модификации (p_0 и x_0 — начальные концентрации мишени и реагента):

$$[PZ]_{\infty}/p_0 = 1 - \exp \{-\gamma_0^f K_x x_0 / (1 + K_x x_0)\}, \quad (1)$$

где

$$\gamma_0^f = (1 + k_i/k_2 K_x) / [1 + (k_{-i} + k_2')/k_1]. \quad (2)$$

Уравнение (1) означает, что выход модификации зависит от степени насыщения биополимера реагентом, равной $K_x x_0 / (1 + K_x x_0)$. При $x_0 \rightarrow \infty$ $[PZ]_{\infty}/p_0$ стремится к значению

$$\lim ([PZ]_{\infty}/p_0) = 1 - \exp(-\gamma_0^f). \quad (3)$$

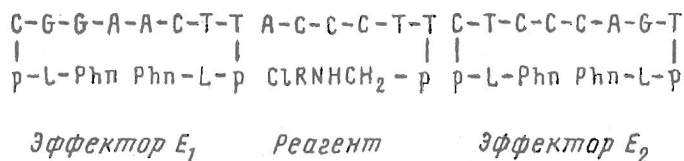
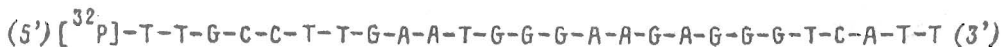
Следовательно, при высоких концентрациях реагента степень модификации стремится к значению, определяемому комбинацией констант скорости реакций промежуточного этилениммониевого катиона, входящих в выражение (2), для γ_0^f .

В соответствии с проведенным выше анализом и на основании уравнений (1) и (2) следует, что с помощью алкилирующих производных олигонуклеотидов, которые реагируют через образование промежуточной частицы и параллельно расходуются в растворе, нельзя достичь полной модификации нуклеиновой кислоты-мишени. Это связано с тем, что в условиях квазиравновесного процесса за время реакции успевает произойти обмен между реагентом, находящимся в комплексе, и его нереакционноспособной формой в растворе. Отсутствие полной

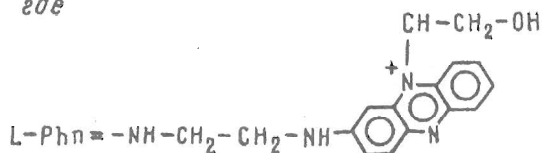
модификации мишени наблюдалось экспериментально в работах [7—13]. В то же время в работах [14, 15] при температуре, близкой к нулю, была достигнута количественная модификация нуклеиновой кислоты. Как было показано в работе [16], это может быть вызвано невыполнением условий квазиравновесия.

Недавно в работах [17, 18] было предложено проводить модификацию реакционноспособными производными олигонуклеотидов в присутствии вспомогательных олигонуклеотидов (эффекторов), которые, связываясь с мишенью по соседству с реагентом, повышают его сродство к мишени за счет кооперативного взаимодействия. Это означает, что высокая эффективность модификации может быть достигнута при существенно меньших концентрациях реагента. Для дальнейшего повышения эффективности модификации в работе [19] было предложено использовать два эффектора, фланкирующих реагент на мишени с 3'- и 5'-концов. В этой работе была исследована направленная модификация модельного 302-звенного одноцепочечного фрагмента ДНК реагентами $\text{ClR}-\text{CH}_2\text{NH}-\text{pN}_n$ в присутствии эффекторов — N-(2-гидроксиэтил)феназиниевых производных тетра- и октадезоксирибонуклеотидов, образующих комплексные комплексы с участками мишени, непосредственно примыкающими к сайтам узнавания реагента.

Чтобы избежать возможных искажений при количественной оценке результатов, связанных с неспецифическим расщеплением длинной мишени при пиперидиновой обработке (см. ниже), и одновременно сохранить преимущество с данными работы [19], в качестве мишени мы взяли 26-мер, который представлял собой участок 253—276 302-нуклеотидного фрагмента ДНК, использованного в работе [19]. Он содержит участки связывания реагента и эффекторов E_1 и E_2 и фланкирован с двух сторон (Т)₂:



где



Реагент включал в себя шестичленный олигонуклеотидный остаток, а эффекторы имели длину восемь нуклеотидов и содержали в 5'- и 3'-концевых фосфатных группах остатки N-(2-гидроксиэтил)феназиния (Phn), присоединенные через этилендиаминовый линкер (L).

Модификацию проводили при 25 °С. На 5'-конец 26-мера вводили радиоактивную метку ³²P. Точки модификации определяли путем сравнения дорожек на радиоавтографах, полученных при разделении электрофорезом в полиакриламидном геле продуктов модификации 26-мера после обработки пиперидином и продуктов расщепления 26-мера методом Максама — Гилберта [20]. Модификация проходила по остаткам G¹², G¹³, G¹⁴, G¹⁷, причем основную долю модификации составил остаток G¹⁷. Такое положение модифицируемых оснований согласуется с образованием полностью комплексного комплекса между олигонуклеотидной частью реагента и участком 11—16 26-мера.

При исследовании количественных характеристик модификации реакционная смесь наносилась на гель без предварительной обработки пиперидином. Продукту

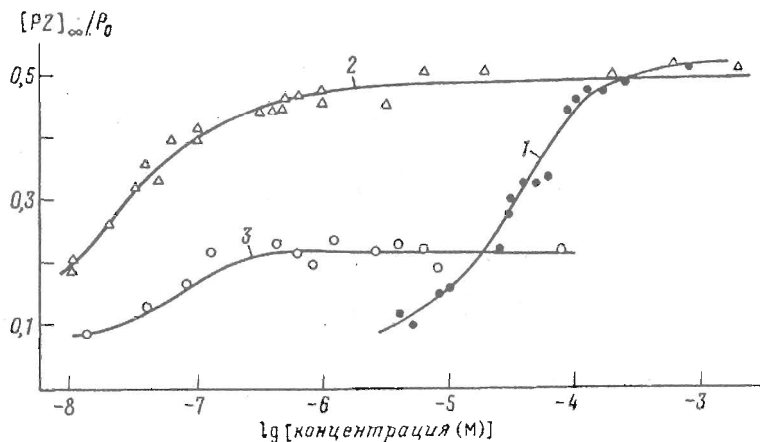


Рис. 1. Зависимость предельной степени модификации 26-мера ($[PZ]_{\infty}/p_0$) от начальной концентрации реагента в координатах $[PZ]_{\infty}/p_0 + \lg(x_0)$ в отсутствие эффекторов E_1 и E_2 (кривая 1), от начальной концентрации эффектора E_1 (e_{01}) (кривая 2, $x_0 = 5 \cdot 10^{-6}$ М, $e_{02} = 0$) и от начальной концентрации эффектора E_2 (e_{02}) (кривая 3, $x_0 = 5 \cdot 10^{-6}$ М, $e_{01} = 0$) при 25°C ($p_0 \leq 5 \cdot 10^{-9}$ М)

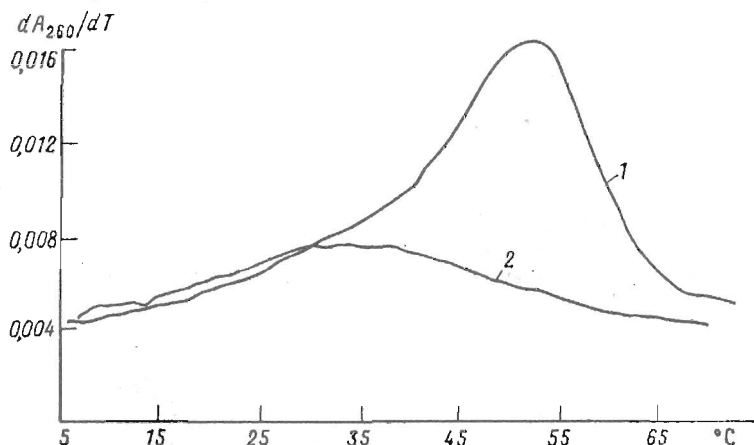


Рис. 2. Дифференциальные кривые плавления комплекса 26-мера с эффектором E_1 (1) и самого 26-мера (2)

ковалентной сшивки между мишенью и реагентом, образуемому в ходе алкилирования, в этих условиях соответствовало пятно с меньшей по сравнению с исходной мишенью электрофоретической подвижностью. Были получены зависимости степени модификации 26-мера от начальной концентрации реагента x_0 в отсутствие эффекторов, а также от начальной концентрации эффектора E_1 (e_{01}) при постоянном значении начальной концентрации реагента $x_0 = 5 \cdot 10^{-6}$ М (рис. 1). Во всех случаях концентрации мишени, реагента и эффекторов были таковы, чтобы соблюдалось условие $x_0, e_{01} \gg p_0$.

Из рис. 1 видно, что модификация в отсутствие эффектора E_1 не является полной, что согласуется с уравнением (1) и свидетельствует о квазиравновесных условиях реакции. Обработка этой зависимости по уравнению (1) с помощью программы нелинейной регрессии позволяет рассчитать константу связывания K_x реагента X с 26-мером K_x и величину коэффициента γ'_0 . Кривая 1 на рис. 1 является теоретической, рассчитанной с помощью этих величин. Результаты расчета представлены в таблице.

Как видно из этой таблицы, алкилирующее производное гексануклеотида связывается с мишенью с не очень высокой константой ассоциации $K_x = (2,16 \pm$

Комплекс	Параметры	
P·X	$K_x = (2,16 \pm 0,38) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$	$\gamma_0^{ef} = 0,83 \pm 0,06$
P·E ₁ ·X	$\alpha_1 \cdot K_1^1 = (3,95 \pm 0,43) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$	$\gamma_1^{ef} = 0,70 \pm 0,02$

$\pm 0,38) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, что отражает низкую эффективность процесса модификации при доступных концентрациях реагента ($\leq 10^{-5} \text{ M}$). Параметр γ_0^{ef} меньше единицы и равен 0,83, т. е. предельная степень модификации не превышает величину $1 - \exp(-0,83) = 0,56$.

При концентрации реагента $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ модификация практически не наблюдается. Однако при добавлении эффектора — дифеназиниевого производного олигонуклеотида рТТСААГГСр (E₁) происходит модификация, и с увеличением концентрации E₁ степень модификации достигает предельного значения $\approx 0,5$ (рис. 1, 2).

Кинетическая схема модификации нуклеиновых кислот P алкилирующими производными олигонуклеотидов X в присутствии одного эффектора, рассмотренная в работе [7], имеет несколько осложненный, но аналогичный схеме 1 вид. Образование продуктов реакции PZ, PE₁Z происходит из двух комплексов: P·I, P·E₁·I. Разное сродство реагента к мишени в последних комплексах связано с разными значениями констант k_{-p} , k_{-1}^1 , что приводит к появлению двух разных параметров γ^{ef} (γ_0^{ef} , γ_1^{ef} соответственно).

Кинетическое уравнение, описывающее накопление продукта PZ и представленное в работе [7], для случая, когда начальные концентрации реагента x_0 и эффектора e_{01} намного превышают концентрацию ДНК-мишени p_0 и $t \rightarrow \infty$, может быть преобразовано к виду

$$\frac{[PZ]}{P_0} = 1 - \exp \left[\frac{-K_x x_0 (\gamma_0^{ef} + \gamma_1^{ef} \alpha_1 K_1^1 e_{01})}{1 + K_x x_0 (1 + \alpha_1 K_1^1 e_{01})} \right], \quad (4)$$

где K_1^1 — константа связывания эффектора E₁ с нуклеиновой кислотой, α_1 — коэффициент кооперативности, а

$$\gamma_1^{ef} = (1 + k_i / k_2 K_x) / (1 + k_{-1}^1 / k_1). \quad (5)$$

Остальные обозначения имеют тот же смысл, что и на схеме 1.

Из данных, представленных на рис. 1, с помощью уравнения (4) и на основании уже оцененных значений γ_0^{ef} и K_x были рассчитаны величины γ_1^{ef} и произведение $\alpha_1 K_1^1$ (таблица). Поскольку γ_1^{ef} равна 0,70, предельная степень модификации в присутствии эффектора E₁ не может превышать величину $1 - \exp(-0,70) = 0,50$ (см. рис. 1). Проведение модификации в присутствии эффектора позволяет снизить концентрацию реагента более чем на порядок, при этом концентрация эффектора также невелика (кривые 1 и 2 на рис. 1).

Для определения параметра α_1 , характеризующего степень кооперативности при совместном связывании с мишенью реагента и эффектора E₁, необходимо знание константы связывания эффектора E₁ с комплементарным участком мишени. Эту величину можно определить из кривой плавления дуплекса (26-мер)·(E₁). Из рис. 2 видно, что дифференциальная кривая плавления имеет максимум при 52 °С, однако форма кривой несимметрична. Последнее свидетельствует о наличии дополнительных структурных переходов и делает сложной ее количественную обработку с целью определения термодинамических параметров стабильности

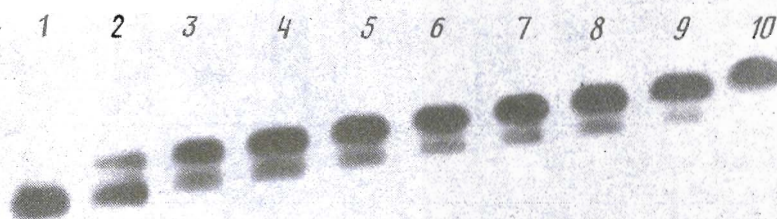


Рис. 3. Электрофоретическое разделение свободного 12-мера (нижние полосы) и его комплекса с эффектором E_1 (верхние полосы) при 25 °С. Дорожки 1—10 соответствуют начальным концентрациям эффектора E_1 (e_{01}): 0 (1), 0,1 (2), 0,3 (3), 0,4 (4), 0,5 (5), 0,6 (6), 0,7 (7), 1 (8), 6 (9), $7 \cdot 10^{-7}$ М (10). Концентрация мишени $\leq 5 \cdot 10^{-9}$ М

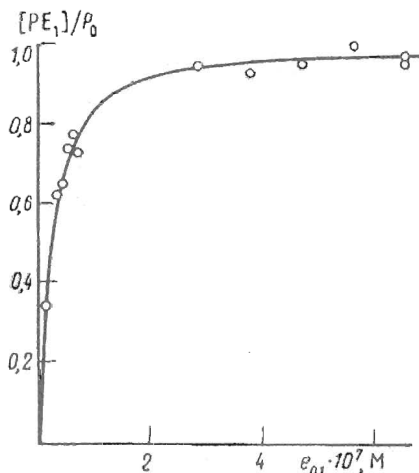


Рис. 4. Зависимость степени комплексообразования 12-мера ($[PE_1]/P_0$) с эффектором E_1 от начальной концентрации эффектора E_1 (e_{01}) при 25 °С ($p_0 \leq 5 \cdot 10^{-9}$ М)

дуплекса, ΔH и ΔS . Плавление исходного 26-мера (рис. 2) характеризуется низкотемпературным максимумом при 35 °С, который относится к собственному структурному переходу мишени и обуславливает, вероятно, несимметричную форму дифференциальной кривой плавления 26-мера с E_1 .

Следует иметь в виду, что константа ассоциации K_x в уравнении (1) учитывает как собственно образование дуплекса, так и разрушение внутренней структуры мишени, обусловленной взаимодействием участков связывания реагента и эффектора E_1 . Аналогичный процесс может иметь место и при связывании мишени с эффектором. Чтобы не учитывать этот эффект дважды и полагать, что коэф-

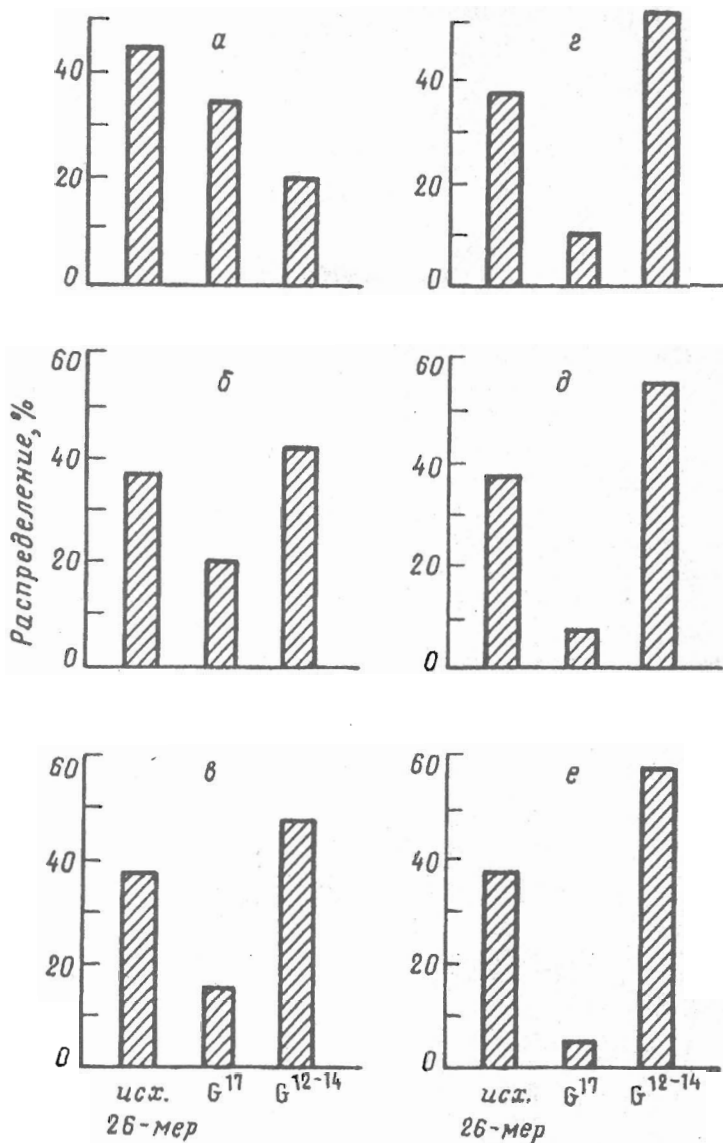


Рис. 5. Распределение радиоактивности между исходным 26-мером и продуктами его модификации реагентом в присутствии эффектора E_1 в постоянной концентрации и эффектора E_2 в концентрациях 0 (а), 0,014 (б), 0,028 (в), 0,041 (г), 0,55 (д) и 1,4 мкМ (е) ($x_0 = 5 \cdot 10^{-6}$ М, $e_{01} = 1 \cdot 10^{-6}$ М, $p_0 \leq 5 \cdot 10^{-9}$ М)

коэффициент α_1 учитывает только взаимодействие 3'-конца реагента с 5'-концом эффектора E_1 , было проведено измерение сродства эффектора E_1 к 12-звенному олигонуклеотиду, содержащему только участок связывания эффектора E_1 , фланкированный с двух сторон (T)₂.

Литературные данные [21] и некоторые наши результаты [22] свидетельствуют о том, что термодинамические параметры стабильности дуплексов, определяемые из кривых плавления, не соответствуют параметрам стабильности дуплексов, получаемых в «изотермических» экспериментах. В связи с этим величину константы связывания эффектора E_1 с 12-мером при 25 °С в данной работе определяли с помощью метода «задержки в геле» (gel retardation method [23—26]). Благодаря разной подвижности в нативном полиакриламидном геле можно было разделить

свободный 12-звенный олигонуклеотид, содержащий на 5'-конце метку ^{32}P , от его комплекса с эффектором E_1 (рис. 3).

Выражение для доли 12-мера, находящейся в комплексе с эффектором E_1 при $e_{01} \gg p_0$, имеет следующий вид:

$$[PE_1]/p_0 = K'_2 e_{01} / (1 + K'_2 e_{01}). \quad (6)$$

На рис. 4 представлена зависимость степени комплексообразования 12-мера от начальной концентрации эффектора E_1 (e_{01}). Кривая, изображенная на рисунке, была получена путем обработки экспериментальных данных с помощью программы нелинейной регрессии по уравнению (6). При этом было оценено значение константы связывания K'_2 , равное $(5,06 \pm 0,23) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. С помощью этой величины и приведенного в таблице произведения $K'_2 \alpha_1$ было рассчитано значение коэффициента кооперативности $\alpha_1 \approx 8$. Это означает, что при совместном связывании с мишенью реагента и эффектора E_1 их сродство к мишени увеличивается примерно на порядок, т. е. насыщение мишени реагентом происходит при более низких концентрациях реагента, и предельная степень модификации $[PZ]_{\infty}/p_0$ достигается при более низких концентрациях реагента. При этом присутствие эффектора E_1 практически не влияет на саму величину предельной степени модификации $[PZ]_{\infty}/p_0$.

Было также проведено исследование модификации 26-мера при совместном присутствии эффекторов E_1 и E_2 . Эффектор E_2 связывается с участком 17—24 мишени со стороны 5'-конца реагента. При увеличении концентрации эффектора E_2 наблюдалось постепенное уменьшение эффективности модификации по остатку G^{17} и возрастание эффективности модификации по остаткам $G^{12} - G^{14}$ (рис. 5). Это означает, что эффектор E_2 влияет на позиционную селективность модификации, как это наблюдали и в работе [19]. Степень модификации при этом возрастала незначительно и не превышала значения 0,6. Таким образом, как и при модификации в присутствии только одного эффектора E_1 , модификация, по-видимому, тоже протекает в условиях квазиравновесия.

В отсутствие эффектора E_1 при концентрации реагента $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, когда модификация практически не наблюдается, добавление эффектора E_2 также приводило к модификации мишени, но при увеличении концентрации эффектора E_2 степень модификации возрастала лишь до значения 0,24 (рис. 1, кривая 3). Таким образом, эффектор E_2 увеличивает эффективность модификации в меньшей степени, чем эффектор E_1 . Это может быть связано с тем, что при увеличении концентрации эффектора E_2 кроме правильного комплекса (26-мер) (эффектор E_2) образуется еще и неправильный комплекс, когда эффектор E_2 связывается с мишенью тремя $G \cdot C$ -парами в участке 12—14 мишени, где связывается и реагент. В этом случае эффектор E_2 одновременно выступает в роли ингибитора реакции модификации, конкурируя с реагентом за связывание с мишенью.

Таким образом, результаты данной работы показывают, что при модификации 26-мера алкилирующими производными 6-звенного олигонуклеотида в присутствии 8-звенных олигонуклеотидов, несущих на 3'- и 5'-концах остатки N -(2-оксиэтил)феназиния, значение предельной степени модификации не превышает величину 0,6. Это означает, что выполняются условия квазиравновесия для образования всех комплексов реагента и его нереакционноспособной формы с мишенью. В этом случае нереакционноспособная форма реагента конкурирует с реагентом за связывание с мишенью, что приводит к неполной модификации мишени.

Работа выполнена при поддержке Государственной научно-технической программы России «Новейшие методы биоинженерии» (раздел «Ген-направленные биологически активные вещества»).

Авторы благодарят С. Г. Лохова за регистрацию кривых плавления.

Экспериментальная часть

Олигодезоксирибонуклеотиды рТТСССА, ТТГССТТГААТГГГААГАГГГ-ТСАТТ, ТГАСССТСр, ТТСААГГССр, ТТГССТТГААТТ были синтезированы в Отделе технологии биохимических процессов НИБХ СО РАН. Олигонуклеотиды без концевых фосфатных групп или с 3'-концевым фосфатом были синтезированы твердофазным фосфитамидным методом [27] на автоматическом синтезаторе «Виктория-5М». В качестве полимерного носителя использовали макропористое аминопропильное стекло МПС-700 (НПО «Вектор», Новосибирская обл., пос. Кольцово). В случае олигонуклеотидов с 3'-концевым фосфатом проводили пришивку к полимерному носителю 3'-концевого звена по методу, описанному в работе [28]. В качестве 3'-концевого звена использовали (2-О-4,4'-диметокси-тримил-оксиэтилсульфонил)этанол, который синтезировали по методике [29]. Олигонуклеотиды, фосфорилированные по 5'-концу, синтезированы твердофазным фосфотриэфирным методом [30].

Реагент $\text{ClRCH}_2\text{NH-pTTCSSA}$ был синтезирован по методу [31]. Его очистку от непрореагировавшего олигонуклеотида и следов нереакционноспособной формы реагента, несущей HOR -группу, проводили с помощью микроколоночной обращенно-фазовой хроматографии на колонках с сорбентом LiChrosorb RP-18 (Merck, Германия) в градиенте концентрации метанола в буфере 0,05 М триэтиламмоний-ацетат, pH 8,0, на хроматографе «Милихром» (НПО «Научприбор», г. Орел).

Для получения производных олигодезоксирибонуклеотидов $\text{Phn-L-pTTC-AAGGCSr-L-Phn}$ (E_1) и $\text{Phn-L-pTGACCSTCSr-L-Phn}$ (E_2), содержащих на 5'- и 3'-концах остаток феназиния (Phn), к 3'-концевому фосфату олигонуклеотидов TGACCSTCSr , TTC-AAGGCSr присоединяли остаток феназиния, как описано в работе [17], затем вводили 5'-концевой фосфат с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и АТР, а затем присоединяли второй остаток феназиния.

Молярные коэффициенты поглощения олигонуклеотидов рассчитывали по данным работы [32]. Вклад группы $\text{ClRCH}_2\text{NH-}$ в молярный коэффициент поглощения реагента на длине волны 260 нм составляет $14,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}$ [33]. Вклад группы Phn- составляет $1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}$ [34].

Введение метки ^{32}P по 5'-концу олигонуклеотидов $\text{TTCGCTTGAATGGG-AAGAGGGTCAAT}$ и TTCGCTTGAAT проводили по стандартной методике [35]. Для этого 30 мкл раствора, содержащего 30 пмоль олигонуклеотида в буфере 0,05 М трис- HCl (pH 7,6), 0,01 М MgCl_2 , 5 мМ дитиотреит, 0,1 мМ спермидин и 0,1 мМ EDTA; 30 пмоль $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (уд. акт. $3,3 \cdot 10^{-3} \text{ мКи/пмоль}$) обрабатывали 30 мин Т4-полинуклеотидкиназой (10–20 ед. акт.) при 37 °С. Раствор после добавления 20 мкл формамида, содержащего маркерные красители (0,5% бромфеноловый синий и 0,5% ксиленцианол FF), наносили на 10% ПААГ и проводили электрофорез. Затем гель радиоавтографировали на рентгеновскую пленку РМ-1 или РМ-В. Полосу геля, содержащую меченый олигонуклеотид, вырезали и проводили электроосложцию на фильтры из бумаги DE-51. Меченый олигонуклеотид смывали с фильтров раствором 3 М LiClO_4 , осаждали и промывали ацетоном.

Реакцию модификации олигонуклеотида $\text{TTCGCTTGAATGGGAAGAGGG-TCATT}$ проводили в буфере (pH 7,5), содержащем 0,16 М NaCl , 0,02 М Na_2HPO_4 , 0,001 М EDTA, при 25 °С. Реакционную смесь инкубировали до полной ионизации связи S-Cl в реагенте в течение времени, в 5 раз превышающем время полупревращения реакции ионизации S-Cl -связи реагента [11]. Реакцию останавливали добавлением 10-кратного по объему избытка 2% LiClO_4 в ацетоне [36]. Осадок отделяли центрифугированием и промывали 85% спиртом, ацетоном и эфиром. Для расщепления олигонуклеотида по положениям модифицированных пуринов осадок растворяли в 1 М пиперидине и инкубировали 20 мин при 100 °С [20]. После этого олигонуклеотиды осаждали 2% LiClO_4 в ацетоне, промывали 85% спиртом, ацетоном и эфиром, сушили на воздухе, растворяли в формамиде, содержащем 0,05% бромфенолового синего и 0,05% ксиленцианола

FF, и наносили на 10% ПААГ, содержащий 7 М мочевины. Электрофорез проводили при напряжении 50 В/см на приборах, изготовленных в НИБХ СО РАН.

Определение константы связывания эффектора E_1 с 12-мером методом задержки в геле проводили при 25 °С в 10 мкл буфера (рН 7,5), содержащего 0,16 М NaCl, 0,02 М Na_2HPO_4 , 1 мМ EDTA; $\leq 5 \cdot 10^{-9}$ М $5'-^{32}\text{P}$ -меченый 12-мер и $1 \cdot 10^{-8}$ — $1 \cdot 10^{-6}$ М эффектор E_1 . Раствор инкубировали 1 ч, добавляли к нему 2 мкл раствора буфера, содержащего маркерные красители (0,25% бромфеноловый синий, 0,25% ксиленианол FF, 15% Ficol) и быстро наносили на 10% неде-натурирующий ПААГ, находящийся под напряжением 15 В/см и охлаждаемый с помощью термостата до 10 °С. Электрофорез проводили 2 ч в буфере, содержащем 0,1 М трис-бонат, 0,01 М MgCl_2 , 1 М EDTA, рН 8,0, на приборе «Mасrophor 2010» (LKB, Швеция) при напряжении 15 В/см. В связи с тем что пробы наносились на гель под напряжением, их вхождение в гель происходило неод-новременно, и в результате пятна, соответствующие одному и тому же компоненту реакционной смеси, за время электрофореза проходили разные расстояния от старта (см. рис. 3).

Для определения степени модификации ($[\text{PZ}]_{\infty}/\rho_0$) и степени комплексооб-разования ($[\text{PE}]_1/\rho_0$) проводили денситометрирование рентгеновской пленки с помощью лазерного сканера UltraScan XL (LKB, Швеция). Для случая модифи-кации рассчитывали отношение площадей пиков, соответствующих продуктам, к сумме площадей пиков, соответствующих продуктам и исходному олигонук-леотиду. Для метода задержки в геле рассчитывали отношение площади пика, соответствующего комплексу, к сумме площадей пиков, соответствующих ком-плексу и свободному 12-меру. Значения γ_0^f и K_x , $\alpha_1 K_c^1$ и γ_1^f , K_c^1 на основании уравнений (1), (4), (6) соответственно оценивали с помощью программы нели-нейной регрессии [37].

Для определения положения оснований, подвергшихся модификации, прово-дили частичное расщепление олигонуклеотидов по остаткам гуанина и аденина [20]. Полученные таким образом продукты расщепления наносили на гель в качестве контрольных дорожек.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knorre D. G., Vlassov V. V. // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 1985. V. 32. P. 292—320.
2. Uhlmann E., Peyman A. // *Chem. Rev.* 1990. V. 90. № 4. P. 564—584.
3. Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I. // *Tetrahedron Lett.* 1967. № 37. P. 3557—3562.
4. Гринева Н. И., Ломакина Т. С. // *Журн. общей химии.* 1972. Т. 42. № 6. С. 1629—1634.
5. Кнорре Д. Г., Попов С. Г., Чимитова Т. А. // *Докл. АН СССР.* 1976. Т. 230. № 6. С. 1369—1373.
6. Knorre D. G., Chimitova T. A. // *FEBS Lett.* 1981. V. 131. № 2. P. 249—252.
7. Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Левина А. С., Мамаев С. В., Назарова Ю. Н., Федорова О. С. // *Биоорган. химия.* 1991. Т. 17. № 4. С. 470—482.
8. Zenkova M. A., Fedorova O. S., Levina A. S., Mamaev S. V., Karпова G. G. // *FEBS Lett.* 1990. V. 269. № 1. P. 26—28.
9. Гимаутдинова О. И., Горшкова И. И., Карпова Г. Г., Кутявин И. В., Грайфер Д. М. // *Молекулярн. биология.* 1984. Т. 18. № 5. С. 1419—1423.
10. Гимаутдинова О. И., Горн В. В., Горшкова И. И., Грайфер Д. М., Карпова Г. Г., Мундус Д. А., Теплова Н. М. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. № 4. С. 490—498.
11. Кнорре Д. Г., Зарытова В. Ф., Подуст Л. М., Федорова О. С. // *Докл. АН СССР.* 1988. Т. 300. № 4. С. 1006—1010.
12. Подуст Л. М., Гайдамаков С. А., Абрамова Т. В., Власов В. В., Горн В. В., Федорова О. С. // *Биоорган. химия.* 1989. Т. 15. № 3. С. 363—369.
13. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плетнев А. Г., Подыминогин М. А. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. № 2. С. 240—246.
14. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Подыминогин М. А., Сильников В. Н., Шшикин Г. В. // *Биоорган. химия.* 1987. Т. 13. № 9. С. 1212—1220.

15. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф. //Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 3. С. 379—386.
16. Кнорре Д. Г., Федорова О. С. //Докл. АН СССР. 1990. Т. 313. № 1. С. 222—224.
17. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Левина А. С., Мамаев С. В. //Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. № 1. С. 102—104.
18. Kutyavin I. V., Podyuminogin M. A., Bazhina Yu. N., Fedorova O. S., Knorre D. G., Levina A. S., Matayev S. V., Zarytova V. F. //FEBS Lett. 1988. V. 238. № 1. P. 35—38.
19. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Подыминогин М. А. //Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 12. С. 1653—1660.
20. Maxam A. M., Gilbert M. //Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
21. Vesnaver G., Breslauer K. J. //Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 11. P. 3569—3573.
22. Федорова О. С., Подуст Л. М., Горн В. В., Максаква Г. А. //Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 19. С. 1496—1504.
23. Lima W. F., Monia B. P., Ecker D. J., Freier S. M. //Biochemistry. 1992. V. 31. № 48. P. 12055—12061.
24. Freid M., Crothers M. //Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 9. P. 6505—6525.
25. Carner M. M., Revzin A. //Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 13. P. 3047—3060.
26. Revzin A. //BioTechniques. 1989. V. 7. № 4. P. 346—355.
27. Грязнов С. М., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Кумарев В. П., Левина А. С., Полищук А. С., Потапов В. К., Потемкин Г. А., Средин Ю. Г., Шабарова З. А. //Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1987. С. 119—123.
28. Gait M. J., Sing M., Sheppard R. C., Edge M. D., Greene A. R., Heathcliffe G. R., Atchinson T. C., Newton C. R., Markham A. F. //Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 5. P. 1031—1095.
29. Horn T., Urdea M. S. //Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 39. P. 4705—4708.
30. Горн В. В., Зарытова В. Ф., Потемкин Г. А., Средин Ю. Г., Полищук А. С. //Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 8. С. 1054—1062.
31. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф. //Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475—481.
32. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 3rd Ed./Ed. Fasman G. D.: CRC Press, 1975. P. 589.
33. Богачев В. С., Веньямина А. Г., Гринева Н. И., Ломкина Т. С. //Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1970. Вып. 6. С. 110—116.
34. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. //Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911—920.
35. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генной инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 132.
36. Барам Г. И., Грачев С. А. //Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1420—1421.
37. Эберт К., Эберер Х. Компьютеры в химии. М.: Мир, 1988. С. 284.

Поступила в редакцию
16.II.1993

После доработки
25.II.1994

O. S. Fedorova^{*}, *A. D. Odinaev*, *V. V. Gorn*, *G. A. Maksakova*,
O. S. Pereboeva, *D. G. Knorre*

**QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF THE NUCLEIC ACIDS
MODIFICATION BY ALKYLATING OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES
IN THE PRESENCE OF OLIGONUCLEOTIDE EFFECTORS**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian
Academy of Sciences, Novosibirsk*

Key words: nucleic acids, site-directed modification; oligonucleotides, alkylating derivatives, N-(2-hydroxyethyl)phenazinium derivatives, oligonucleotide effectors.

Modification of the 26-meric DNA fragment d(TTGCCTTGAATGGGAAGAGGG-TCATT) with 4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzyl-5'-phosphamide derivative of hexadeoxyribonucleotide d(pTTCCCA) was investigated in the presence of two

bis-3',5'-N-(2-hydroxyethyl)phenazinium derivatives of octadeoxyribonucleotides (effectors E_1 and E_2) forming complementary complexes with the target next to 3'- and 5'-ends of the reagent's recognition site, respectively. In the absence of effectors, G^{17} is predominantly modified. Some minor modification of G^{12} , G^{13} and G^{14} was also observed. The association constant of the target with the reagent was calculated using the dependence of the modification extent on the initial concentration of the reagent and was found to be $K_x = (2,16 \pm 0,38) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ at 25 °C. At the reagent concentration $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ the target modification was nearly absent. In the presence of E_1 the modification extent of the 26-mer increased with its concentration to a plateau value of $\approx 0,5$. Quantitative treatment of this concentration dependence permitted to estimate the value of the product $K_c^1 \alpha = (3,95 \pm 0,43) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, where α_1 is the cooperativity coefficient and K_c^1 is the association constant of the target with E_1 . To determine α_1 , the K_c^1 value was measured by the gel retardation method and found to be $(5,06 \pm 0,23) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Consequently, $\alpha_1 \approx 8$. Effector E_2 is less efficient and permits to reach the plateau value only as low as 0.24. This may be due to the competition of the reagent and E_2 for the reagent recognition site, since the latter is partially complementary to this site. The increase of the E_2 concentration results in a decrease of the modification extent of G^{17} accompanied with an increase of the modification extent of $G^{12} - G^{14}$. Thus, in the conditions used the oligonucleotide effectors although increasing the duplex stability do not permit to achieve quantitative yields as it should be for reactions proceeding in quasi-equilibrium conditions.

* Author to whom correspondence should be addressed: Institute of Bioorganic Chemistry, Lavrentjev St. 8, 630090, Novosibirsk, Russia.