



УДК 541.(145+127):547.963.32.07:577.113.4

ФОТОМОДИФИКАЦИЯ ДНК ПЕРФТОРАРИЛАЗИДОПРОИЗВОДНЫМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДА

© 1997 г. В. В. Коваль, Г. А. Максакова, О. С. Федорова[#]

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

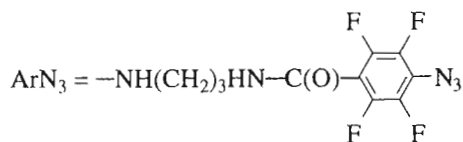
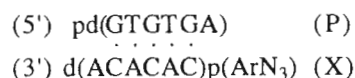
Поступила в редакцию 08.08.96 г. Принята к печати 20.12.96 г.

Изучена кинетика фотомодификации при 20°C 6-звенного дезоксирибоолигонуклеотида pd(GTGTGA) производным комплементарного ему дезоксирибоолигонуклеотида pd(CACACA), несущим на концевой фосфатной группе остаток 3-(*n*-азидотетрафторбензоиламино)пропиламина (ArN₃). Установлено, что в мишени модифицируется преимущественно остаток G₃. Параллельно с превращением арилазидной части происходила деградация олигонуклеотидного фрагмента реагента с частичной потерей сродства. С использованием меченного по 5'-концу реагента найдены положения модификации его адресной части в процессе облучения. Из зависимости степени модификации от концентрации реагента на начальных временах облучения была определена константа ассоциации K_x, равная $(1.40 \pm 0.24) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, а из зависимости степени модификации от концентрации предварительно облученного реагента – константа ассоциации с мишенью продукта превращения реагента в растворе K_r, равная $(2.49 \pm 0.30) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Из зависимости степени модификации [PZ]/p₀ от времени определена константа скорости лимитирующей стадии фотомодификации k₀ = $(5.31 \pm 0.28) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и эффективность модификации мишени в составе комплекса с реагентом γ, равная 1.

Ключевые слова: производные олигонуклеотидов, фотомодификация ДНК, кинетика.

Фотоаффинная модификация широко используется для исследования структуры и динамики функционирования биополимеров [1]. К фотоаффинным реагентам относятся, например, производные олигонуклеотидов, несущие арилазидные группировки. Показано, что такие производные олигодезоксирибонуклеотидов, комплементарных определенным последовательностям ДНК, могут проводить специфичную модификацию как ДНК, так и белков, взаимодействующих с ДНК и РНК, например ДНК-полимераз и белков хроматина [2–7]. Применение этих производных для исследования динамики функционирования белково-нуклеиновых комплексов требует знания кинетических особенностей протекания процесса фотомодификации. В предыдущей работе [8] при исследовании взаимодействия ДНК-мишени с N-[3-(*n*-азидотетрафторбензоиламино)пропил]-5'-фосфамидом комплементарного дезоксирибоолигонуклеотида pd(TCTTCCSA) нами было показано, что параллельно с модификацией мишени протекала модификация олигонуклеотидного фрагмента реагента. При этом реагент полностью терял сродство к мишени. Представляло интерес выяснить, зависит ли самомодификация реагента от его нуклеотидной последовательности, и установить положения

модифицируемых нуклеотидов. В настоящей работе в качестве реагента было выбрано N-[3-(*n*-азидотетрафторбензоиламино)пропил]-5'-фосфамидное производное олигодезоксирибонуклеотида pd(CACACA), а в качестве мишени – олигонуклеотид pd(GTGTGA). Модификация мишени протекала в дуплексе



Из рис. 1 видно, что в спектре поглощения *n*-азидотетрафторбензойной кислоты (кривая 1) имеется максимум при 256 нм. Чтобы селективно возбуждать арилазидную группировку и не затрагивать олигонуклеотидную часть реагента, необходимо облучать образцы в области >300 нм. С этой целью проводили облучение с использованием различных фильтров, отсекающих УФ-область излучения ртутной лампы (рис. 1). Только при использовании фильтра БС-4, пропускающего свет с длиной волны более 290 нм, наблюдали достаточно быстрый фотолит *n*-азидотетрафторбензойной кислоты с увеличением поглощения в области

[#] Автор для переписки (тел.: (3832) 35-64-36, факс: (3832) 35-16-65, e-mail: fedorova@modul.bioch.nsk.su).

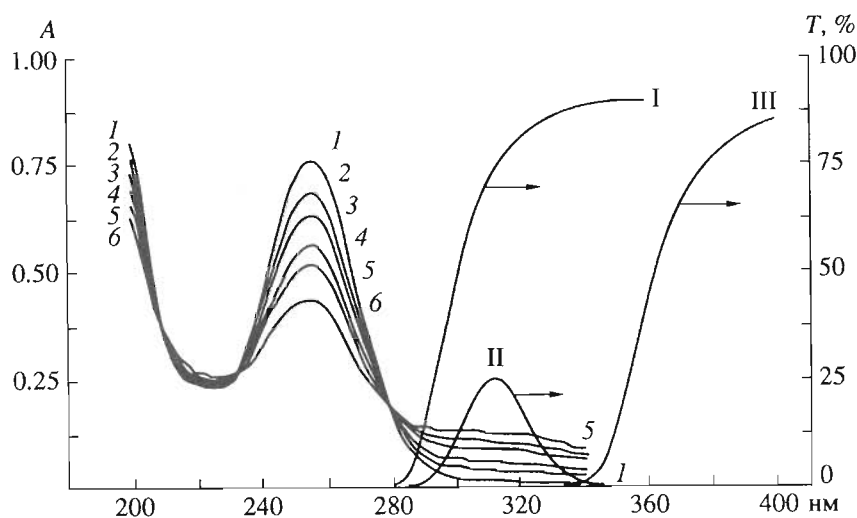


Рис. 1. Изменение спектра поглощения *n*-азидотетрафторбензойной кислоты (3.0×10^{-4} М водный раствор, $l = 0.1$ см) в зависимости от времени облучения светом ртутной лампы через фильтр БС-4 (кривым 1–6 соответствуют времена облучения 0, 500, 1000, 2000, 3000, 5000 с). Приведены спектры пропускания фильтров БС-4 (I), УФС-2 + ЖС-3 (II), БС-7 (III).

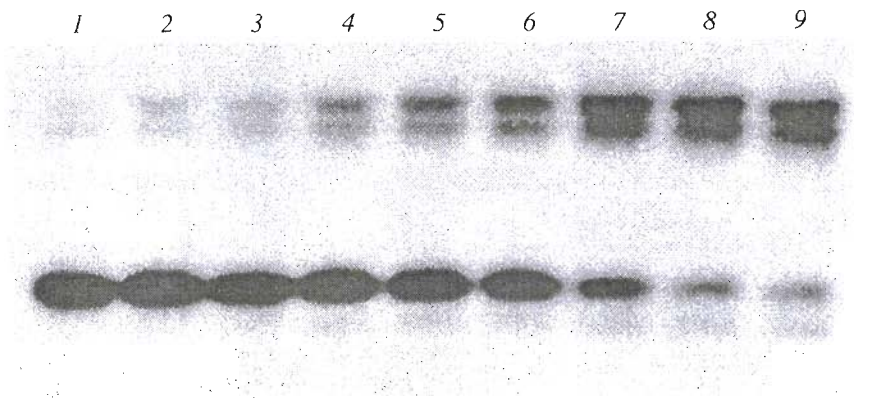


Рис. 2. Радиоавтограф, полученный при разделении в 20% денатурирующем ПААГ продуктов фотомодификации 6-мера – мишени реагентом ($x_0 = 4.9 \times 10^{-5}$ М), концентрация мишени 1×10^{-8} М. Дорожкам 1–9 соответствуют образцы с временем облучения 0, 100, 300, 500, 1000, 1500, 3000, 5000, 7000 с.

300–320 нм (рис. 1, 2–6). При фотоллизе происходило уменьшение оптического поглощения на длине волны 256 нм и увеличивалось поглощение в районе 290–340 нм. Наличие в спектре трех изобестических точек свидетельствует о превращении азида преимущественно в один продукт. В дальнейшем облучение растворов реагента в присутствии нуклеотидной мишени проводили с использованием фильтра БС-4.

Образцы, содержащие ^{32}P -меченую мишень* и реагент, облучали при 20°C, затем наносили на денатурирующий 20% ПААГ. После разделения реакционной смеси электрофорезом и радиоавтографии геля наблюдали появление двух интенсивных полос с меньшей электрофоретической

подвижностью, чем исходная мишень, соответствующих продуктам сшивки, и слабой полосы с большей электрофоретической подвижностью (рис. 2). Для определения точек фотомодификации мишени часть образцов обрабатывали пиперидином и разделяли в 20% денатурирующем ПААГ. Согласно радиоавтографу (не приведен), основная часть модификации приходилась на остаток G³ (80–90% общей степени модификации); кроме того, модификации подвергались остатки G⁵ и T² (5%). Следует отметить, что при использовании светофильтра БС-7 (рис. 1, III) продуктов модификации не наблюдалось, из чего можно заключить, что активация азидогруппы производится светом с длиной волны <340 нм. В этой области спектра основной вклад в излучение используемой лампы ДРШ-1000 вносит полоса 313 нм [9].

* [^{32}P]фосфат обозначен далее р.

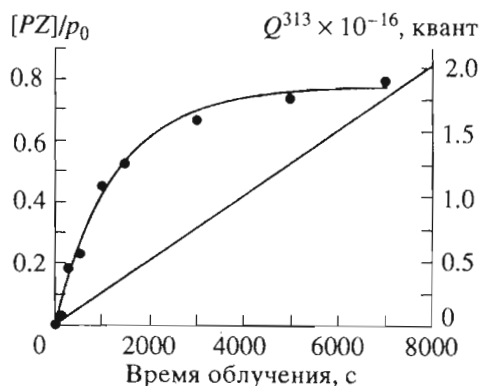


Рис. 3. Кинетическая кривая зависимости $[PZ]/p_0$ от времени модификации 6-мера реагентом ($x_0 = 4.9 \times 10^{-5}$ М, $p_0 = 1 \times 10^{-8}$ М). Прямой представлена доза облучения (количество квантов света) реакционной смеси при длине волны 313 нм.

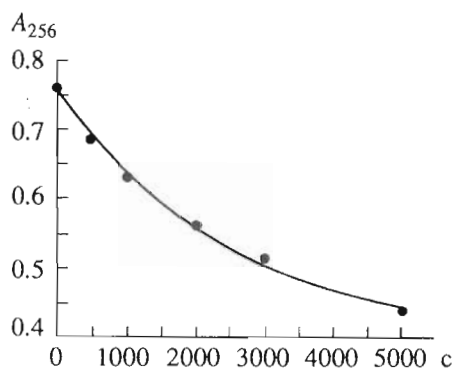


Рис. 4. Зависимость поглощения раствора *n*-азидотетрафторбензойной кислоты на длине волны 256 нм от времени облучения t .

Зависимость суммарной степени модификации от времени (рис. 3) выходит на плато через 6000–8000 с. Предельное значение степени модификации достигает 80%.

Из данных, представленных на рис. 1, можно определить константу скорости фотолиза *n*-азидотетрафторбензойной кислоты. Исходная *n*-азидотетрафторбензойная кислота имеет максимум поглощения при длине волны 256 нм. Константу скорости фотолиза k_p находили с помощью обработки кинетической кривой A_t^{256} (рис. 4) по уравнению (6) (см. “Экспериментальную часть”). Получено, что $k_p = (4.05 \pm 0.38) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, т.е. время полупревращения $\tau_{1/2}$ составляет 1710 с. Это время примерно коррелирует с временем, необходимым для модификации мишени на 50% от максимального (платового) значения (см. рис. 3).

Чтобы выяснить, происходит ли деградация реагента в процессе облучения, проводили экспе-

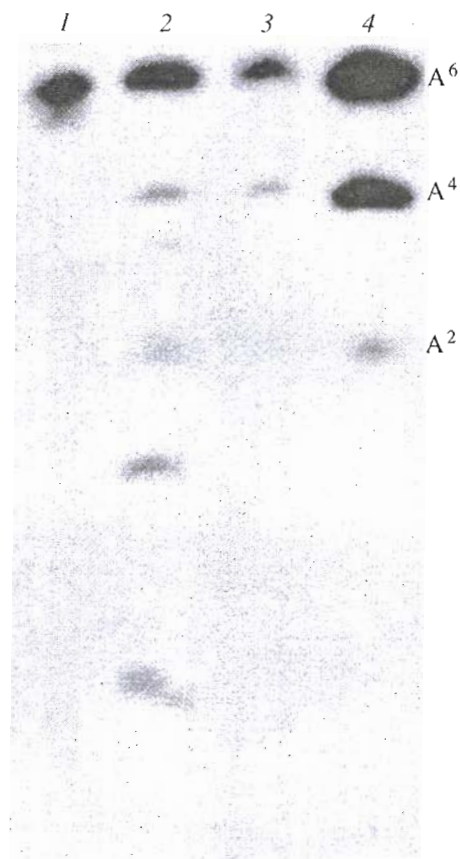


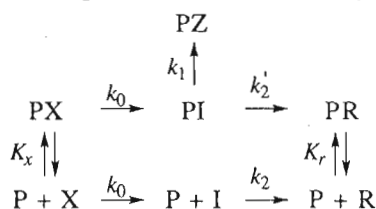
Рис. 5. Радиоавтограф, полученный при разделении в 20% денатурирующем ПААГ продуктов пиперидиновой обработки реагента $(\text{ArN}_3)^*\text{pd}(\text{CACACA})$ ($x_0 = 6.0 \times 10^{-5}$ М) после облучения. Время облучения 1800 с. 1 – исходный реагент; 2 – реагент, облученный в растворе; 3 – в составе дуплекса ($p_0 = 1 \times 10^{-4}$ М); 4 – расщепленный по методу Максама–Гилберта по основаниям А олигонуклеотид $^*\text{pd}(\text{CACACA})$.

рименты с ^{32}P -меченым реагентом. По результатам, представленным на рис. 5, видно, что в процессе облучения реагента в растворе имела место модификация его адресной части почти по всем основаниям, суммарная степень модификации составляет 44%. При облучении реагента в присутствии избытка мишени $\text{pd}(\text{GTGTGA})$ при концентрации, когда весь реагент находится в дуплексе, модификация проходила лишь по остатку A^4 , причем степень модификации составляла 29%.

С целью установить, обладают ли продукты деградации реагента средством к ДНК, проводили исследование фотомодификации олигонуклеотида-мишени в присутствии предварительно облученного реагента. Результаты свидетельствуют (рис. 6), что олигонуклеотид $\text{pd}(\text{CACACA})$ сильнее ингибирует модификацию, чем облученный реагент. Следовательно, в ходе облучения реагент частично теряет средство к мишени.

Согласно существующим представлениям о механизме фотолиза ароматических азидов [10, 11], модификация нуклеиновых кислот протекает через промежуточное образование синглетного или триплетного нитрена. Возбуждение азидной группы реагента при используемой в работе длине волны и интенсивности облучения – самая медленная стадия процесса фотолиза (ср. данные, приведенные в [12]), поэтому константа скорости этой стадии и определяет величину k_0 . Эта константа в свою очередь определяется интенсивностью облучения и величиной молярного поглощения азидогруппы при длине волны облучения.

Ранее [8] для количественной обработки данных мы использовали следующую кинетическую схему фотомодификация нуклеиновых кислот арилазидными производными олигонуклеотидов:



где P – ДНК-мишень; X – реагент; I – производное олигонуклеотида с промежуточным нитреном, образующимся из арилазидной группы реагента в лимитирующей стадии; R – продукт превращения реагента в растворе; PZ – продукт модификации мишени; PX, PI и PR – соответствующие комплексы X, I и R с мишенью; K_x, K_r – константы ассоциации X и R с мишенью; k_0 – константа скорости лимитирующей стадии, k_1 – константа скорости модификации мишени активированным реагентом внутри комплекса, k_2 – константа скорости первого порядка взаимодействия активного интермедиата I с водой и компонентами буфера, k_2' – константа скорости инактивации активной группы реагента в составе комплекса PI в побочных реакциях с раствором. Эта схема аналогична кинетической схеме, предложенной для модификации нуклеиновых кислот производными олигонуклеотидов, несущими алкилирующие N-(2-хлорэтильные) группы [1].

Кинетическое уравнение, описывающее накопление продукта в условиях квазиравновесия для образования комплексов PX и PR и квазистационарности для продуктов I и PI, а также в условиях избытка реагента по отношению к мишени, по аналогии с данными работы [14] выглядит следующим образом:

$$\begin{aligned}
 [\text{PZ}]/p_0 = & 1 - \left\{ (1 + K_x x_0) / [1 + K_r x_0 - \right. \\
 & \left. - x_0 (K_r - K_x) \exp(-k_0 t)] \right\}^{\gamma \frac{K_x}{K_r - K_x}}, \quad (1)
 \end{aligned}$$

где

$$\gamma = k_1 / (k_1 + k_2'). \quad (2)$$

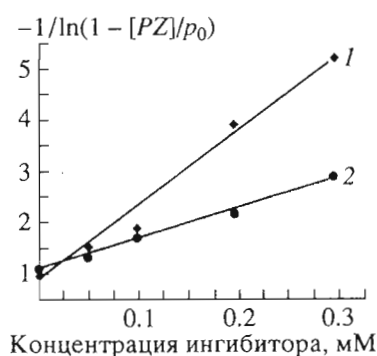


Рис. 6. Зависимость функции $-\frac{1}{\ln(1 - [\text{PZ}]/p_0)}$ от концентрации r_0 (предварительно облученного в течение 2.5 ч реагента) (прямая 2) и олигонуклеотида pd(CACACA) (прямая 1). Концентрация $x_0 = 4.9 \times 10^{-5}$ М, $p_0 = 1 \times 10^{-8}$ М. Время облучения 1800 с.

При этом p_0 и x_0 представляют собой начальные концентрации мишени и реагента соответственно, а коэффициент γ – величину эффективности модификации мишени в составе комплекса с реагентом.

Следует отметить, что k_0 , строго говоря, является дозовой константой и может быть представлена в виде

$$k_0 = (I_0 \phi \epsilon_a l \times 10^3) / N_A, \quad (3)$$

где I_0 – интенсивность потока света, ϕ – квантовый выход реакции, ϵ_a – молярный коэффициент поглощения хромофора при длине волны полосы поглощения, l – длина оптического пути, N_A – число Авогадро, а 10^3 – множитель для сведения уравнения к единой размерности. Следовательно, кинетическая кривая (рис. 3) может быть представлена как зависимость от дозы облучения при длине волны, соответствующей основной полосе излучения лампы – 313 нм.

Квантовый выход реакции оценивали в предположении, что возбуждение азидогруппы происходит светом именно этой длины, и считая, что на данную полосу приходится около 20% излучаемой энергии [9]. Значение коэффициента экстинкции азидогруппы ϵ_{313} полагали равным $6.64 \times 10^2 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Квантовый выход принимает значение $\phi = 0.27$. Учитывая, что приведенная оценка является сугубо приближенной, такое значение можно считать удовлетворительным, так как, по данным работы [12], квантовые выходы при фотолизе азидов имеют значения около 1.

Поскольку все остальные величины в уравнении (1) не имеют отношения к фотохимическому процессу, то смысл k_0 не влияет на их определение из экспериментальных данных по предельным выходам.

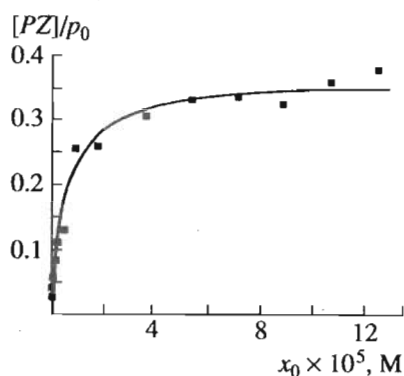


Рис. 7. Зависимость степени модификации $[PZ]/p_0$ 6-мера при времени облучения 1800 с от концентрации x_0 реагента ($p_0 = 1 \times 10^{-8}$ М).

Кинетическое уравнение (1) содержит четыре неизвестные величины: K_x , K_r , k_0 и γ . Их невозможно определить одновременно из одной кинетической кривой. Поэтому одну из этих величин, а именно K_x , находили следующим образом: получили зависимость степени модификации на начальных временах превращения от концентрации реагента при 20°C при времени облучения 180 с. Представленные на рис. 7 данные обработали по приближенному уравнению

$$[PZ]_t/p_0 = \alpha \frac{K_x x_0}{1 + K_x x_0}, \quad (4)$$

где α – коэффициент, пропорциональный эффективности модификации мишени внутри комплекса. Константа связывания реагента с олигонуклеотидом-мишенью K_x была рассчитана с помощью программы нелинейной регрессии из кривой, представленной на рис. 7. Она оказалась равной $(1.40 \pm 0.24) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Значение константы сродства облученного реагента K_r находили путем количественной обработки зависимости, представленной на рис. 6. Эта зависимость по аналогии с модификацией алкилирующими производными олигонуклеотидов [14] описывается уравнением

$$[PZ]_{\infty}/p_0 = 1 - \left[\frac{1 + K_x x_0 + K_r r_0}{1 + K_r(x_0 + r_0)} \right]^{\gamma \frac{K_x}{K_r - K_x}}. \quad (5)$$

Для упрощения расчетов кривые линеаризовали относительно концентрации предварительно облученного реагента r_0 (рис. 6). Получено, что отношение $K_r/K_x = 0.18 \pm 0.01$, т.е. в процессе облучения олигонуклеотидный адрес реагента частично теряет сродство к мишени.

Для нахождения величин k_0 и γ данные рис. 3 были обработаны по уравнению (1) с использованием полученных из предыдущих экспериментов значений K_x и $K_r = (2.49 \pm 0.30) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Вычис-

лено, что $k_0 = (5.31 \pm 0.28) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, $\gamma = 1.02 \pm 0.04$. Видно, что константа скорости лимитирующей стадии приблизительно на 30% выше константы скорости фотолиза *n*-азидотетрафторбензойной кислоты в растворе. Эффективность модификации мишени в составе комплекса с реагентом, определяемая коэффициентом γ , достигает 100%. При этом, согласно рис. 5, имеет место модификация олигонуклеотидного остатка реагента по основанию A^5 , протекающая с эффективностью 29%. Данный результат можно объяснить лишь возможностью одновременной модификации мишени и реагента в комплексе, когда модифицированное основание одной из цепей дуплекса в лимитирующей стадии взаимодействует с одним из оснований соседней цепи.

Ранее в работе [8] эффективность модификации мишени $pd(TTGCCTTGAATGGGAAGAGGGT-CATT)$ производными олигонуклеотидов, несущими такую же фотоактивируемую *N*-[3-(*n*-азидотетрафторбензоиламино)пропил]-5'-фосфамидную группу, составляла примерно 30%. Модификация подвергался преимущественно остаток G^{19} мишени, расположенный за пределами дуспиральной области, сформированной реагентом. В настоящей работе показано, что модифицируется остаток G^3 , входящий в дуспиральную область дуплекса. Высокая эффективность модификации мишени в составе комплекса свидетельствует о том, что арилизидная группировка, по-видимому, практически не контактирует с растворителем. Таким образом, вероятнее всего, она укладывается в большую или малую бороздку цепи, которые являются гидрофобными областями. Продукты, получаемые при фотомодификации нуклеиновых кислот ароматическими азидами, в настоящее время не исследованы. Высказывалось предположение [15], что возникающие при возбуждении арилизидов синглетные нитрены атакуют нуклеофильные центры гетероциклических оснований. С другой стороны, триплетные нитрены должны взаимодействовать с гетероциклическими основаниями с образованием радикалов, которые, в свою очередь, могут реагировать с гетероциклами соседней цепи дуплекса. В обоих случаях будут образовываться продукты сшивки мишени и реагента. Эти аддукты в условиях щелочного гидролиза должны давать продукты расщепления рибозофосфатного остова. Полученные в настоящей работе данные не противоречат этим предположениям.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотиды, фосфорилированные по 5'-концу $pd(GTGTGA)$, $pd(CACACA)$, были получены твердофазным фосфотриэфирным методом [16].

Производное $(\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH})\text{pd}(\text{CACACA})$ синтезировали по методу [17]. Для этого активировали концевую фосфатную группу смесью трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида в присутствии *N*-метилимидазола и добавляли 5 мкл пропилендиаминна в расчете на 6–7 OE_{260} цетавлонной соли олигонуклеотида в 50 мкл DMSO. Через 30 мин реакционную смесь осаждали 15-кратным объемом эфира. Затем трижды переосаждали 1 мл ацетона из 70 мкл водного раствора 3 М LiClO_4 . Осадок дважды промывали ацетоном и высушивали под вакуумом.

Реагент $(\text{N}_3\text{Ag})\text{pd}(\text{CA})_3$ был получен из *N*-оксисукцинимидного эфира *n*-азидотетрафторбензойной кислоты, синтезированного Т.А. Приходько в лаборатории органического синтеза НИИХ СО РАН по методике [18], и производного $(\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH})\text{pd}(\text{CACACA})$ по методике, описанной в работах [19, 20]. Реагент выделялся методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке с сорбентом LiChrosorb RP-18 (Merck) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.05 М LiClO_4 на хроматографе Waters 600E (Millipore, США). Наличие N_3Ag -группы в реагенте доказывали с помощью ИК-спектроскопии по появлению в спектре полосы с волновым числом 2157 см^{-1} .

Молярные коэффициенты поглощения олигонуклеотидов на длине волны 260 нм рассчитывали по данным [21], принимая вклад группы N_3Ag в коэффициент экстинкции реагентов равным $2.33 \times 10^4\text{ М}^{-1}\text{ см}^{-1}$ [19].

Для введения ^{32}P -метки по 5'-концу олигонуклеотидов 30 мкл раствора, содержащего 30 пмоль олигонуклеотида в буфере (рН 6.6) 0.05 М имидазол- HCl , 0.01 М MgCl_2 , 5 мМ дитиотреит, 0.1 мМ спермидин, 0.5 мМ ADP, 0.1 мМ EDTA, 30 пмоль $[5'\text{-}\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (уд. акт. 3.3×10^{-3} мКи/пмоль), выдерживали 30 мин с 10–20 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы при 37°C . Реакционную смесь осаждали 10-кратным объемом 2% LiClO_4 в ацетоне [22]. Меченый олигонуклеотид выделяли электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ, радиоактивную полосу выявляли радиоавтографией и вырезали из геля. Из геля олигонуклеотид перенесли электрооэлюзией на бумажный фильтр DE-81, откуда смывали нагретым до 56°C 3 М раствором LiClO_4 и осаждали 2% раствором LiClO_4 в ацетоне. Осадок трижды промывали 200 мкл ацетона, высушивали в вакууме и растворяли в 100 мкл бидистиллята. Концентрация полученного раствора меченого олигонуклеотида не превышала $2.5 \times 10^{-7}\text{ М}$.

Облучение образцов проводили в прямоугольной кварцевой кювете с длиной оптического пути 0.1 см, помещенной в термостатированную кварцевую кювету большего объема, заполненную дистиллированной водой. Облучение проводили светом ртутной лампы ДРШ-1000 с расстояния 200 мм через светофильтр БС-4, отсекающий об-

ласть спектра $<290\text{ нм}$ (см. рис. 1). Объем проб составлял 10 мкл, а температура раствора во всех экспериментах поддерживалась равной 20°C . Интенсивность попадающего в кювету света была определена с помощью ферриоксалатного актинометра Хатчарда–Паркера [23] и составила $(1.35 \pm 0.01) \times 10^{15}$ квант/с см^2 .

Фотомодификацию исследовали в буфере состава: 0.16 М NaCl , 0.02 М Na_2HPO_4 (рН 7.4), 1 мМ EDTA. Облученные растворы немедленно переносили в полипропиленовые пробирки, содержащие 1 мкл 1.4 мг/мкл раствора суммарной тРНК из *E. coli*. К растворам добавляли 400 мкл 2% LiClO_4 в ацетоне. Осадки отделяли центрифугированием, дважды промывали 80% этанолом, а затем ацетоном и высушивали в вакууме.

Для расщепления олигонуклеотидов по положениям модифицированных пуринов осадок растворяли в 50 мкл 1 М пиперидина и выдерживали 45 мин при 95°C [24]. Затем осаждали и промывали так, как описано выше.

Перед нанесением на денатурирующий 20% ПААГ осадки растворяли в 5 мкл раствора 7 М мочевины, содержащего 0.1% бромфенолового синего и 0.1% ксиленцианола FF. Электрофорез проводили при напряженности 50 В/см. Радиоавтографию геля на рентгеновскую пленку РМ-1 с усиливающим экраном проводили в течение 10–20 ч при -10°C .

^{32}P -Меченый реагент синтезировали по описанной выше методике с использованием в качестве исходного вещества ^{32}P -меченого олигонуклеотида $^*\text{pd}(\text{CA})_3$.

Степень модификации определяли с помощью сканирования радиоавтографов на лазерном денситометре LKB 2222 UltraScanXL. Величины $[PZ]/p_0$ рассчитывали как отношение площадей пиков продуктов к сумме площадей пиков продуктов и пика исходного олигонуклеотида. Ошибка определения степени модификации, как правило, не превышала 20%.

При исследовании кинетики фотолиза *n*-азидотетрафторбензойной кислоты 50 мкл раствора помещали в кювету и облучали как описано выше в течение требуемого времени. Затем 50 мкл раствора разбавляли до 200 мкл и регистрировали спектр оптического поглощения на спектрометре Specord M40. Данные обрабатывали по уравнению

$$A_t^{256} = (A_0^{256} - A_\infty^{256}) \exp(-k_p t) + A_\infty^{256} \quad (6)$$

Количественную обработку результатов экспериментов проводили с помощью программы нелинейной регрессии MicroCal "Origin". Кривые, представленные на рисунках, являются теоретически рассчитанными по соответствующим уравнениям с помощью параметров, полученных при количественной обработке.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 95-04-11980а и 96-04-48615).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knorre D.G., Vlassov V.V. Affinity Modification of Biopolymers. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1989.
2. Черноловская Е.Л., Черепанов П.П., Горожанкин А.В., Добриков М.И., Власов В.В., Кобец Н.Д. // Биоорганич. химия. 1993. Т. 19. С. 889–893.
3. Кобец Н.Д., Горожанкин А.В., Годовикова Т.С., Сильников В.Н., Кнорре Д.Г. // Докл. РАН. 1996. Т. 349. С. 822–825.
4. Hanna M.M., Zhang Y., Reidling J.C., Thomas M.J., Jou J. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 2073–2079.
5. Doronin S.V., Dobrikov M.I., Lavrik O.I. // FEBS Lett. 1992. V. 313. P. 31–33.
6. Doronin S.V., Dobrikov M.I., Buckle M., Roux P., Bus H., Lavrik O.I. // FEBS Lett. 1994. V. 354. P. 200–202.
7. Dobrikov M.I., Doronin S.V., Safronov I.V., Shishkin G.V., Lavrik O.I. // Chem. Sustainable Dev. 1994. V. 2. P. 1–6.
8. Казанцев А.В., Максакова Г.А., Федорова О.С. // Биоорганич. химия. 1995. Т. 21. С. 767–773.
9. Немодрук А.А., Безрогова Е.В. Фотохимические реакции в аналитической химии. М.: Химия, 1972. С. 167.
10. Schnapp K.A., Poe R., Leyva E., Soundararajan N., Platz M.S. // Bioconj. Chem. 1993. V. 4. P. 172–177.
11. Schnapp K.A., Platz M.S. // Bioconj. Chem. 1993. V. 4. P. 178–183.
12. Грицан Н.П., Притчина Е.А. // Успехи химии. 1992. Т. 61. С. 910–939.
13. Кнорре Д.Г., Чимитова Т.В. // Молекулярн. биология. 1978. Т. 12. С. 814–821.
14. Knorre D.G., Chimitova T.V. // FEBS Lett. 1981. V. 131. P. 249–252.
15. Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Левина А.С., Халимская Л.М., Шишкин Г.В. // Биоорганич. химия. 1996. Т. 22. С. 200–207.
16. Горн В.В., Зарытова В.Ф., Потемкин Г.А., Средин Ю.Г., Полищук А.С. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. С. 1054–1062.
17. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Халимская Л.М. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. С. 475–481.
18. Добриков М.И., Приходько Т.А., Сафронов И.В., Шишкин Г.В. // Сиб. хим. журн. 1992. № 2. С. 18–24.
19. Добриков М.И., Зарытова В.Ф., Комарова Н.И., Левина А.С., Лохов С.Г., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Биоорганич. химия. 1992. Т. 18. С. 540–549.
20. Levina A.S., Tabatadze D.R., Khalimskaya L.M., Pritchodko T.A., Shishkin G.V., Alexandrova L.A., Zarytova V.F. // Bioconj. Chem. 1993. V. 4. P. 319–325.
21. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 3rd Ed. / Ed. G.D. Fastman. CRC Press, Inc., 1975. P. 589.
22. Барам Г.И., Грачев С.А. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. С. 1420–1421.
23. Калверт Дж., Питтс Дж. Фотохимия. М.: Мир, 1968. С. 635.
24. Maxam A.M., Gilbert M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.

DNA Photomodification with a Perfluoroarylazido Oligonucleotide Derivative

V. V. Koval', G. A. Maksakova, and O. S. Fedorova

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

Abstract—The kinetics of photomodification of oligodeoxyribonucleotide pd(GTGTGA) with a derivative of the complementary oligodeoxyribonucleotide pd(CACACA) bearing a 3-(*n*-azidotetrafluorobenzoylamino)propylamine residue (ArN₃) at the terminal phosphate group was studied at 20°C. It was found that the target's G₃ residue is preferentially modified. Along with the transformation of the arylazido moiety, degradation of the oligonucleotide fragment of the reagent occurred with a partial loss of affinity. With the use of the reagent labeled at the 5'-end, sites of photomodification were found. From the dependence of the modification level on the reagent concentration at the initial time of irradiation, the association constant ($K_x = (1.40 \pm 0.24) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) was determined. From the dependence of the modification level on the concentration of the pre-irradiated reagent, the constant of the transformed reagent–target association in solution ($K_r = (2.49 \pm 0.30) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) was determined. From the time-dependence of the modification level $[PZ]/p_0$, the rate constant for the limiting step of photomodification ($k_0 = (5.31 \pm 0.28) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) and the modification efficiency of the target in the complex with the reagent ($\gamma = 1$) were found.

Key words: oligonucleotide derivatives; DNA photomodification, kinetics.