

Рис. 1. Профили гель-фильтрации на сефадексе G-25 исходных олигонуклеотидов (I) (1) и (II) (2) (а), смеси олигонуклеотидов (I) и (II), взятых в эквимольных количествах (б): в воде при 20° С (1) и в буфере А при 40° С (2); в: профиль ионообменной хроматографии на капиллярной колонке с DEAE (DE-41)-целлюлозой в градиенте концентраций KN_2PO_4 в 7 М мочевины исходных олигонуклеотидов (I) (1) и (II) (2) при 20° С и их комплекса (3) при 50° С

нонуклеотидов [9], превращенных в соответствующие фосфорилпиримидиновые производные пропусканием через полистиролсульфохлорид.

Синтез проводили на полистироле, привитом на тефлон [9]; в качестве якорной использовали монометокситритильную группу. Олигонуклеотиды (I) и (II) были гомогенны по данным микроколоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе. Однако анализ электрофорезом в полиакриламидном геле показал, что они содержат до 5 и 15% примесей соответственно. Первичная структура полученных олигонуклеотидов (I) и (II) подтверждена методом нуклеотидных карт.

Исследование образования комплекса между олигонуклеотидами (I) и (II) (рис. 1) проводили на эквимольной смеси олигонуклеотидов с концентрацией 4 $OE_{260}/мл$ при хроматографии на сефадексе G-25 в 0,04 М NaCl, 0,01 М трис-HCl, pH 7,4 (буфер А) при 40° С. Пик комплекса (рис. 1 б) отличается по положению от контрольных пиков исходных олигонуклеотидов (рис. 1 а). Хроматография на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации KN_2PO_4 в 7 М мочевины при 50° С приводит к количественному разделению этого комплекса на исходные олигомеры (рис. 1 в).

При смешении бесцветных растворов олигонуклеотидов (I) и (II) той же концентрации и последующей хроматографии при 20° С на сефадексе G-25 с элюцией водой лишь ~85% нуклеотидного материала выходит в виде комплекса (рис. 1 б). При хроматографии на DEAE-целлюлозе в 7 М мочевины при 20° С оставшиеся 15% нуклеотидного материала разделяются на исходные олигомеры (I) и (II). Таким образом, ~15% олигонуклеотидов имеют дефекты структуры, препятствующие комплексообразованию в данных условиях.

Нонануклеотид (II) обработкой 4- $[^{14}C]$ (N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегидом ($[^{14}C]OCH_2RCl$) в диметилформамиде в присутствии CF_3COOH и 2,2-диметоксипропана по методике работы [10] превращен в

**Состав и хроматографическая подвижность продуктов
внутрикомплексного алкилирования олигонуклеотида
(I) хлоридом (III) при 40° С после обработки 1 н. HCl ***

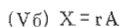
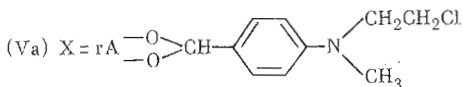
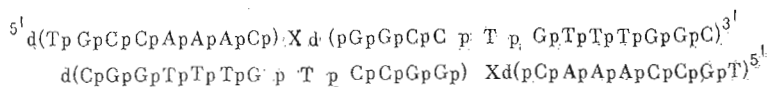
Соединение	R _f в системах			Содержание, %
	А	Б	В	
1	0,40	0,42	0,58	90
2	0,82	0,80	0,87	10
7-OCHRGua	0,42	0,40	0,60	
3-OCHRCyt	0,60	0,58	0,74	
OCHRON [25]	0,86		0,88	

* 7-OCHRGua — 7[2-(N-метил-N-4-формилфениламино)этил]гуанин, 3-OCHRCyt — 3[2-(N-метил-N-4-формилфениламино)этил]цитозин, OCHRON — 4(N-2-оксэтил-N-метиламино)бензальдегид.

алкилирующее производное (III). Чтобы избежать апуринизации, реакцию проводили при 5° С (ср. [10]). Соединение (III), полученное при ~20° С, содержало до 20% примеси, не способной образовывать комплекс с олигонуклеотидом (I), выдерживающий последующую хроматографию на сефадексе G-25 при 40° С в буфере А.

Выдерживание додекануклеотида (I) с алкилирующим производным (III) в течение 10 мин при 40° С в буфере А и последующая хроматография реакционной смеси на ДЕАЕ-целлюлозе в 7 М мочеvine при 50° С в градиенте концентрации KН₂РO₄ не приводит к разделению основной массы исходных олигонуклеотидов, что указывает на их ковалентное присоединение. Доля ковалентно связанного производного (III) достигает ~85–90%. Это же подтверждает анализ продуктов внутрикомплексного алкилирования после обработки реакционной смеси 1 н. HCl при 100° С: из 1 моль олигонуклеотида (I) образуется 0,9 моль 7-OCHRGua (таблица, соед. 1). Другие продукты алкилирования в гидролизате практически отсутствовали, что указывает на протекание реакции внутри комплекса. Отношение скорости алкилирования полинуклеотидов аналогичными производными 2-хлорэтиламина вне комплекса к скорости гидролиза С–Cl-связи в этих производных, деленное на концентрацию нуклеотидных остатков, составляет ~10 М⁻¹ [11]. Поэтому в случае протекания реакции вне комплекса в той же реакционной смеси с концентрацией нуклеотидных остатков 2 · 10⁻⁵ М на алкилирование израсходовалось бы всего 0,05% реагента.

Поскольку додекануклеотид (I) на 5'-конце содержит самокомплементарную последовательность GpGpGpC, априори нельзя исключить наличие в исследуемой реакционной смеси тетрамерного комплекса (Va):



Так как в комплексе (Va) стеклинг между rA и G-1 нарушен из-за присутствия бензильденового остатка, исследование проведено на комплексе (Vб) методом химической модификации реагентами, чувствительными к участию оснований в образовании уотсон-криковских пар: тозилатом N-циклогексил-N'-2-(4-метилморфолиний)этилкарбодимида (СМЕ-карбодимид) и n-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламино (NH₂CH₂RCI). СМЕ-карбодимид модифицирует остатки тимина и гуанина [12, 13], а NH₂CH₂RCI алкилирует остатки цитозина, находящиеся в односпиральных участках [14]. Кроме того, гуанин алкилируется соединением NH₂CH₂RCI как в одноплетневых, так и в двуспиральных участках. Ясно, что при образовании комплекса типа (Vб) СМЕ-карбодимид будет моди-

фицировать только Т-1 в нонануклеотиде (II) и степень модификации составит 1 в расчете на эквимольную (по 1 моль) смесь олигонуклеотидов (I) и (II). В случае образования комплекса типа (IV) модификации должны подвергаться G-1, G-2 в соединении (I) и Т-1 в соединении (II), степень модификации будет равна 3, а соотношение степеней модификации между олигомерами (I) и (II) — 2 : 1.

Выдерживание смеси олигонуклеотидов (I) и (II) с [^{14}C]СМЕ-карбодимидом при 40° С в течение 20 ч приводит к включению 2,2 моль СМЕ-карбодимида в расчете на смесь 1 моль соединения (I) и 1 моль соединения (II). Соотношение радиоактивности, найденное после разделения комплекса на составляющие, близко к 2 : 1 в соответствии с ожидаемым для комплекса типа (IV). В контрольном эксперименте, проведенном в этих же условиях, показано, что степень модификации самокомплементарного олигонуклеотида d(pGpGpApArTpTpCpC) не превышает 0,2 моль СМЕ-карбодимида на 1 моль олигонуклеотида.

Анализ алкилированных оснований после выдерживания комплекса (I) · (II) при 40° С в присутствии [^{14}C]NH₂CH₂RCI в течение 8 ч показал наличие NH₂CH₂RCyt. В контрольном эксперименте с нативной ДНК алкилирование цитозина не наблюдалось. В денатурированной ДНК цитозин модифицировался [14]. Степень модификации остатков цитозина в комплексе (I) · (II) составляла 6% от количества остатков цитозина в односпиральных участках комплекса (IV), что удовлетворительно согласуется со степенью модификации остатков цитозина в денатурированной ДНК (4,5%), алкилированной в тех же условиях [14]. Эти данные позволяют заключить, что в исследуемых условиях (буфер А, 40° С) олигонуклеотиды (I) и (II) существуют в виде комплекса типа (IV), а не в виде (Vб), так как в последнем случае все остатки цитозина находились бы только в двутяжевых участках и не подвергались модификации. Об этом же свидетельствуют данные электрофореза в 20% полиакриламидном геле реакционной смеси соединений (I) и (II) после выдерживания в условиях алкилирования при 40° С — электрофоретическая подвижность продукта близка подвижности самокомплементарного додекануклеотида d(ApCpGpGpApArTpTpCpCpGpT).

Ранее на примере взаимодействия рРНК, ДНК и poly(A) с алкилирующими производными олигонуклеотидов, несущими на 3'- или 5'-конце 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)фенильный остаток, было показано, что реакция алкилирования в комплексе происходит в основном по двухстадийному механизму с промежуточным образованием этилениммониевого катиона [3, 11, 15]. Время полупревращения реагента в активную промежуточную частицу при 40° С составляет 100 мин [16]. При алкилировании олигонуклеотида (I) в комплексе с соединением (III) при 40° С было замечено, что реакция протекает количественно уже за 10 мин. Такое резкое ускорение реакции в комплексе ранее наблюдалось при алкилировании 23S РНК [17]. Причина ускорения реакции в комплексе (I) · (III) остается неясной. Для объяснения этого явления требуется проведение систематического исследования механизма алкилирования в комплексе на различных моделях.

Для выяснения точки модификации олигонуклеотид (I) с ковалентно пришитым соединением (III) выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25 при 50° С в 7 М мочеvine, 0,01 М трис-НСI, рН 7,4 (рис. 2а) и выдерживали в условиях количественного элиминирования алкилированных пуринов (рН 6; 60° С). Затем расщепляли бензильденовую связь между алкилированным гуанином и олигонуклеотидным фрагментом соединения (III) (рН 4; 40° С) [5, 18]. После такой обработки додекануклеотид (I) превращается в олигонуклеотид с апуриновым звеном (Iа), а из хлорида (III) образуется олигомер (II). Комплекс (Iа) · (II) отделяли от элиминированного 7-ОСН₂С₂Ua гель-фильтрацией на сефадексе G-25 при 20° С (рис. 2б) и выдерживали в лизинном буфере [5]. Продукты расщепления по апуриновому звену анализировали ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в 7 М мочеvine при 20° С. Расщепление производного (Iа) по апуриновому звену приводит к появлению двух фракций веществ

нуклеотида (I) от участка связывания, что хорошо согласуется с данными, полученными при алкилировании 2',3'-O-(4-N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиденовым производным (pdCpdG)rA дрожжевой tРНК_{val} [7].

Экспериментальная часть

В работе использовали защищенные мононуклеотиды, полкстиролсульфохлорид производства ОХП НИОХ СО АН СССР, DEAE (DE-32), (DE-41)-целлюлозу (Whatman, Англия), ДНК селезенки быка (производство Олайнского завода химреактивов, Латвийской ССР). Концентрацию ДНК определяли по УФ-поглощению при 260 нм и экстинкции усредненного нуклеотида, равной $7,20 \cdot 10^3$ моль⁻¹ см⁻¹ [21], и выражали в миллимолярной концентрации нуклеотидов. [¹⁴C]СМЕ-карбодимид (3,8 мКи/ммоль) любезно предоставлен И. И. Горшковой. [¹⁴C]4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегид и [¹⁴C]4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламин ([¹⁴C]NH₂CH₂RCI) с удельной радиоактивностью 18,5 мКи/ммоль получали по методикам [22, 23]. Самокомплементарный олигонуклеотид d(pGpGpApArTpTpCpC) любезно предоставлен Е. М. Ивановой.

Радиоактивность растворов просчитывали в диоксановом сцинтилляторе, радиоактивность на бумаге — в толуольном, используя счетчик «Mark III» (Nuclear Chicago, США). Для хроматографии на бумаге FN-1 (Filtrak, ГДР) применяли следующие системы растворителей: А — изопропанол — аммиак — вода (7 : 1 : 2); Б — изопропанол — конц. HCl — вода (170 : 41 : 39); В — этанол — 1 М ацетат аммония, рН 7,5 (7 : 3). Для регистрации оптического поглощения использовали проточный денситометр «Uvicord S» (LKB, Bromma, Швеция) и ультрамикроспектрофотометр МСФП-3, изготовленный в НИОХ СО АН СССР.

d(pGpGpCpCpTpGpTpTpTpGpGpC) (I) получали по методике работы [8]. За молярную экстинкцию принимали сумму молярных экстинкций соответствующих нуклеотидов, равную 118 400.

d(TpGpCpCpApApApC)rA (II). Через реактор, содержащий 5 мл полистиролсульфохлорида, пропускали 0,2 М раствор нуклеотидного компонента в абс. пиридине со скоростью 2—2,5 мл/ч. Затем реактор промывали 4 ч 10 мл абс. пиридина. Раствор активированного мононуклеотида, выходящий из реактора, подавали в другой реактор, содержащий полимерный носитель (емкость 150 мкмоль тимидина на 1 г носителя). По окончании реакции полимерный носитель отмывали от избытка нуклеотидного компонента сначала абсолютным, а затем 70% водным пиридином. Удаление 3'-O-ацетильных защитных групп на каждой стадии синтеза, деблокирование и отщепление синтезированного нонануклеотида (II) с полимера проводили как указано в работе [9]. С 250 мг полимера получено 1700 ОЕ₂₆₀ смеси олигонуклеотидов. Выделение олигонуклеотида (II) проводили ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе (Cl⁻, 1,4 × 30 см) в 7 М мочевины при рН 7,5 в линейном градиенте концентрации NaCl в 0,01 М трис-HCl (250 мл 0,05 М — 250 мл 0,3 М). Скорость элюции 30 мл/ч. Для дополнительной очистки рехроматографировали на DEAE-целлюлозе (Cl⁻, 0,9 × 10 см) в 7 М мочевины при рН 3,5 в градиенте концентрации NaCl (50 мл 0,05 М — 50 мл 0,25 М). Скорость элюции 12 мл/ч.

Олигонуклеотид (II) обессоливали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻, 0,9 × 10 см). Выход 67 ОЕ₂₆₀. За величину ϵ_{260}^{pH7} принимали сумму молярных экстинкций соответствующих олигонуклеотидов, равную 104 500.

[¹⁴C]d(TpGpCpCpApApApC)rACHRCI (III) (3,2 мКи/ммоль) получили, как описано в работе [10], проводя реакцию при 5°С в течение 8 ч. Соотношение (II): [¹⁴C]ОСНRCI, определенное либо по радиоактивности с учетом ϵ_{260}^{pH7} для (II) и ϵ_{260}^{pH7} для фрагмента >СНRCI, либо спектрофотометрически после гидролиза бензилиденовой связи при рН 2 и температуре 20°С [24, 25], равно 1 : 0,9.

Комплекс (I)·(II) получали, выдерживая по 0,02 ОЕ₂₆₀ соединенный (I) и (II) в 10 мкл воды или буфера А при 20°С. Отделение комплекса от несвязавшихся олигонуклеотидов проводили гель-фильтрацией на колонке

с сефадексом G-25 (Superfine, Pharmacia, Швеция, 0,2×7 см) в воде или буфере А при 20°С. Скорость элюции 180 мкл/ч.

Комплекс разрушали ионообменной микроколоночной хроматографией на капиллярной колонке (~30 мкл) с DEAE (DE-41)-целлюлозой, в градиенте концентрации $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ от 0,005 до 0,4 М в 7 М мочевины, рН 7,5, при 50°С. На колонку наносили 0,04 ОЕ₂₆₀ комплекса.

Алкилирование додекануклеотида (I) в комплексе (I)·(III). Смесь 0,4 ОЕ₂₆₀ соединения (I) и 0,4 ОЕ₂₆₀ соединения (III) выдерживали 10–30 мин в 200 мкл буфера А при 40°С. Олигонуклеотид (I) с ковалентно связанным соединением (III) отделяли от несвязанных исходных веществ гель-фильтрацией реакционной смеси на колонке с сефадексом G-25 (0,5×10 см) в 0,01 М трис-НСl, рН 7,5, в 7 М мочевины при 50°С. Скорость элюции 1,2 мл/ч.

Идентификация алкилированных оснований. Реакционную смесь после алкилирования выдерживали 1 ч в 1 н. HCl при 100°С. Гидролизат многократно упаривали с водой для удаления HCl, растворяли в 0,1 мл 0,1 н. HCl и хроматографировали в системах А, Б и В в присутствии соединений 7-ОСНRGua и 3-ОСНRCyt, полученных ранее [26]. В хроматограммах просчитывали радиоактивность (см. таблицу).

Элиминирование алкилированных оснований. Раствор 0,6 ОЕ₂₆₀ соединения (I), ковалентно связанного с соединением (III), в 200 мкл 0,04 М ацетата натрия выдерживали 8 ч при 60°С [5]. Затем рН доводили до 4 добавлением 15 мкл 1 М ацетата натрия (рН 3,8) и выдерживали 5 ч при 40°С для полного гидролиза бензильдиэтерной связи между алкилированным основанием и олигонуклеотидным фрагментом (III). Комплекс (Ia)·(II) отделяли от элиминированных оснований гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25 (0,5×10 см) в буфере А при ~20°С. Скорость элюции 1 мл/ч.

Расщепление олигонуклеотида (Ia) по апуриновому звену проводили в лизиновом буфере как в работе [5]. Затем реакционную смесь разбавляли водой до конечной концентрации соли 0,005 М и хроматографировали на капиллярной колонке (~50 мкл) с DEAE (DE-41)-целлюлозой в градиенте концентрации $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ от 0,005 до 0,4 М в 7 М мочевины, рН 7,5, при 20°С.

Модификация комплекса (I)·(II) [¹⁴C]СМЕ-карбодимидом [27]. К 20 мкл 0,1 М трис-НСl, рН 8,0, содержащим 0,4 ОЕ₂₆₀ комплекса (I)·(II), добавляли 1 мг [¹⁴C]СМЕ-карбодимид и реакционную смесь выдерживали 20 ч при 40°С. Модифицированный комплекс выделяли из реакционной смеси гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25 (0,3×8,5 см) в 0,005 М трис-НСl, рН 8,0. Скорость элюции 440 мкл/ч. Степень модификации определяли по оптической плотности и радиоактивности фракции, содержащей модифицированный комплекс. Разделение модифицированного комплекса на компоненты проводили ионообменной хроматографией на капиллярной колонке с DEAE (DE-41)-целлюлозой в градиенте концентраций $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ от 0,04 до 0,5 М, рН 7,5, в 7 М мочевины при 50°С. Фракции, содержащие соединения (I) и (II), собирали, просчитывали в них радиоактивность и определяли количество молей [¹⁴C]СМЕ-карбодимид, ковалентно присоединившихся к 1 моль соединений (I) и (II).

Алкилирование нативной ДНК селезенки быка и комплекса (I)·(II) с помощью [¹⁴C]NH₂CH₂RCI проводили как описано в работе [14] для денатурирующей ДНК. Идентификацию алкилированных пуриновых оснований и идентификацию 3-NH₂CH₂RCyt осуществляли как описано в работе [15].

Электрофорез реакционной смеси олигонуклеотидов (I) и (III), выдержанной в условиях алкилирования при 40°С, проводили в пластине (20×16×0,2 см) в 20% полиакриламидном геле в 0,05 М трис, 0,05 М H₃BO₃, 0,001 М EDTA, рН 8,3 (ТВЕ-буфер) при напряжении 200 В в течение ночи при ~20°С. Состав геля (50 мл): 10 мг акриламида, 0,5 г N,N'-метиленабисакриламида, 40 мл ТВЕ-буфера, 50 мг персульфата аммония, 25 мкл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина. Для нанесения на гель к 12 мкл реакционной смеси олигомеров (I) и (III) в буфере А добавляли

2 мкл раствора, содержащего 50% глицерин, 0,2% бромфеноловый синий и 0,2% ксилецианол. В качестве контроля использовали самокомплементарный додекануклеотид d(ApCpGpGpApApTpTpCpCpGpT) (любезно предоставлен А. Г. Плетневым). После электрофореза гель прокрашивали бромистым этидием (1 мкг/мл) в течение 30 мин. Гель промывали водой и в УФ-свете фиксировали прокрашенные полосы.

Авторы благодарят Е. Ф. Зайчикову за получение нуклеотидных карт для олигонуклеотидов (I) и (II) и А. Г. Плетнева за помощь в проведении электрофореза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зарытова В. Ф., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Попова В. С., Стефанович Л. Е., Шешегова Е. А. Докл. АН СССР, 1980, т. 255, с. 110–113.
2. Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Рыте А. С., Стефанович Л. Е. FEBS Lett., 1980, v. 122, p. 21–24.
3. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. П., Райт А. С., Стефанович Л. Е. Биоорг. химия, 1981, т. 7, с. 1512–1522.
4. Кнорре Д. Г., Зарытова В. Ф., Карпова Г. Г., Стефанович Л. Е. Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 195–198.
5. Бенимецкая Л. З., Герасимова Л. М., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. Молекулярн. биология, 1978, т. 12, с. 988–1001.
6. Гринева Н. И. Вестн. АМН СССР, 1981, № 2, с. 83–94.
7. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Кuznetsova L. M., Venkstern T. V., Bayev A. A. Nucleic Acids Res., 1977, v. 4, p. 1609–1631.
8. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кутявин И. В. Биоорг. химия, 1982, т. 8, с. 224–230.
9. Potarov V. K., Veiko V. P., Koroleva O. N., Shabarova Z. A. Nucleic Acids Res., 1979, v. 6, p. 2041–2056.
10. Райт В. К., Карпова Г. Г., Гринева Н. И. Биоорг. химия, 1977, т. 3, с. 31–37.
11. Бенимецкая Л. З., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Пичко Н. П., Чумитова Т. А. Биоорг. химия, 1977, т. 3, с. 903–913.
12. Angusti-Tocco G., Brown G. L. Nature, 1965, v. 206, p. 683–685.
13. Drevitch V. F., Salganik R. I., Knorre D. G., Malugin E. G. Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 123, p. 207–209.
14. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Мызина С. Д., Ноговицына Г. К. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1974, вып. 6, с. 125–135.
15. Гимаурдинова О. И., Карпова Г. Г., Ломакина Т. С., Шелпакова Е. Л., Чемасова А. Н., Гринева Н. И. Биоорг. химия, 1980, т. 6, с. 70–80.
16. Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1969, вып. 1, с. 104–109.
17. Карпова Г. Г., Пичко Н. П., Чумитова Т. А., Гринева Н. И. Молекулярн. биология, 1979, т. 13, с. 1012–1020.
18. Бенимецкая Л. З., Карпова Г. Г., Гринева Н. И. Биоорг. химия, 1978, т. 4, с. 1372–1381.
19. Великова А. М., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кабашева Г. Н., Кнорре Д. Г. Докл. АН СССР, 1970, т. 195, с. 1337–1340.
20. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кабашева Г. Н., Кнорре Д. Г., Козоровицкий А. Я. Докл. АН СССР, 1974, т. 198, с. 582–584.
21. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Мызина С. Д., Чемасова А. Н. Биоорг. химия, 1975, т. 1, с. 1707–1715.
22. Великова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбагов В. А. Молекулярн. биология, 1969, т. 3, с. 210–219.
23. Богачев В. С., Веньяминова А. Г., Гринева Н. И., Ломакина Т. С. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1970, вып. 6, с. 110–116.
24. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Ж. общ. химии, 1970, т. 40, с. 215–222.
25. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1970, вып. 2, с. 111–118.
26. Великова А. М., Гринева Н. И. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1971, вып. 5, с. 119–127.
27. Древич В. Ф., Кнорре Д. Г., Малугин Э. Г., Салганик Р. И. Молекулярн. биология, 1967, т. 1, с. 249–256.

Поступила в редакцию
16.II.1982

INTRACOMPLEX ALKYLATION OF DODECADEOXYNUCLEOTIDE
pGpGpCpCpTpGpTpTpTpGpGpC WITH d(TpGpCpCpApApApC)rA
2',3'-O-(4-N-2-CHLOROETHYL-N-METHYLAMINO)BENZYLIDENE
DERIVATIVE COMPLEMENTARY TO ITS 3'-TERMINAL SEQUENCE

GORN V. V., KARPOVA G. G., KNORRE D. G., KUTYAVIN I. V., PICHKO N. P.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Alkylation of oligonucleotide d(pGpGpCpCpTpGpTpTpTpGpGpT) (I) within the complementary complex with 2',3'-O-(4-N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzylidene derivative of d(TpGpCpCpApApApC)rA (III) was investigated. Up to 90% of the reagent (III) bound in the complex is consumed for alkylating the oligonucleotide (I), G-2 being the main site of alkylation. The alkylation rate is several orders of magnitude higher than that for the formation of ethyleneimmonium cation. Such a cation was earlier shown to be the active intermediate in alkylation reactions with aromatic 2-chloroethylamines.