



УДК 547.963.32:577.322.23

ВВЕДЕНИЕ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫХ ГРУПП В ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ С ПОМОЩЬЮ МОДИФИКАЦИИ АЦЕТАТОМ РТУТИ

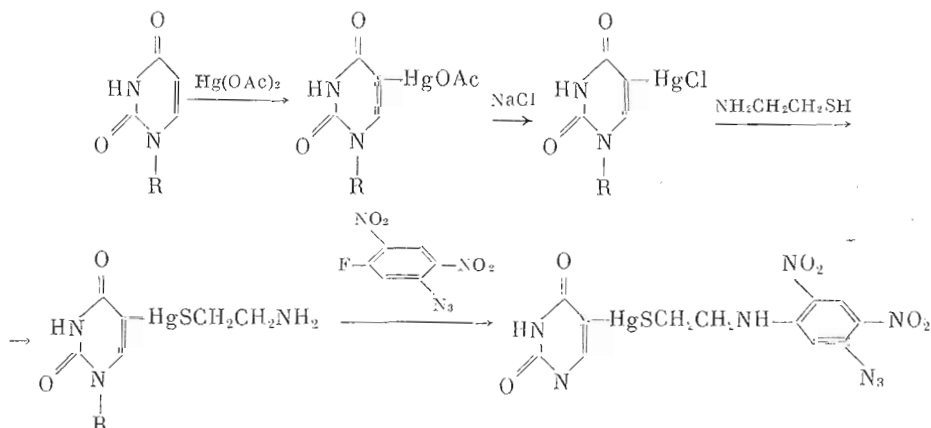
Бросалина Е. В., Власов В. В., Годовиков А. А.

*Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Разработан новый метод введения фотоактивируемых групп в пиримидинсодержащие полинуклеотиды с помощью меркурирования ацетатом ртути и последующей обработки β-меркаптоэтиламином и 5-азидо-2,4-динитрофторбензолом. Получены реакционноспособные производные poly(U) со степенью модификации 30% (моль 5-азидо-2,4-динитрофторбензола / моль оснований poly(U) × 100%), которые были использованы для высокоэффективной модификации комплементарного гексануклеотида (pA)₆.

В последнее время все более широкое применение находит метод комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот с помощью производных олигонуклеотидов и полинуклеотидов, несущих различные реакционноспособные группы [1]. По нашему мнению, перспективным методом для введения реакционноспособных групп в полинуклеотиды является реакция пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот с солями ртути. Реакция протекает в мягких условиях как по одноцепочечным, так и по двухспиральным участкам полинуклеотидов и не препятствует комплементарному взаимодействию оснований [2].

Целью настоящей работы было исследовать возможность использования модификации пиримидиновых оснований солями ртути для введения фотоактивируемых групп в полинуклеотиды. В качестве модельной системы для проверки предлагаемого метода была выбрана модификация олигонуклеотида (pA)₆ реакционноспособным производным poly(U), которое получали, обрабатывая исходный полинуклеотид ацетатом ртути, затем NaCl, β-меркаптоэтиламином и 5-азидо-2,4-динитрофторбензолом (схема).



При проведении реакции в условиях, описанных в «Экспериментальной части», степень модификации составляла 30% (моль 5-азидо-2,4-динитрофторбензола/моль оснований poly(U) × 100%).

Сокращения: poly(hg⁵U) — поли-5-хлормеркуриридилловая кислота, poly(ahg⁵U) — поли-5-[2-(5-азидо-2,4-динитрофениламино)этилтиомерку]ридилловая кислота. Символ R в схеме соответствует единице сахарофосфатного остова полинуклеотида.

Для проведения модификации в комплементарном комплексе poly(ahg⁵ U) и олигонуклеотид (pA)₆, ³²P-меченный по 5'-концу с помощью Т4 полинуклеотидкиназы по описанному методу [3], инкубировали в условиях образования комплекса. Об образовании комплекса судили по данным гель-фильтрации на сефадексе G-75 в условиях стабильности комплекса. Меченый олигонуклеотид количественно связывался с poly(ahg⁵ U). После облучения образовавшегося комплекса УФ-светом продукт реакции отделяли от непрореагировавшего олигонуклеотида (pA)₆ гель-фильтрацией на сефадексе G-75 в условиях диссоциации комплекса. Оказалось, что 70% (pA)₆ после облучения ковалентно присоединилось к poly(ahg⁵ U).

Таким образом, реакционноспособные производные полинуклеотидов, полученные описанным методом, могут быть использованы для модификации комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот. Важным преимуществом полученных производных является возможность удаления реакционноспособных групп в мягких условиях (обработка полученного соединения 10-кратным избытком β-меркаптоэтанола приводила к количественному отщеплению реакционноспособных групп от полинуклеотида), что упрощает анализ продуктов модификации. Удаленность реакционноспособной группы от точки присоединения ее к полинуклеотиду можно варьировать, меняя структуру SH-соединения, используемого в синтезе. Представляется перспективным применить разработанный метод введения реакционноспособных групп в полинуклеотиды для получения производных тРНК для модификации аминоктил-тРНК-синтетаз и рибосом.

Экспериментальная часть

В работе использовались следующие реактивы и хроматографические носители: poly(U) (СКТБ БАВ, Новосибирск), олигонуклеотид (pA)₆ любезно предоставлен В. К. Райтом (НИС НГУ), 5-азидо-2,4-динитрофторбензол получен по методу [4], [γ -³²P] АТФ активностью >2000 Ки/ммоль (Amersham, Англия), сефадексы G-75, G-50 (Pharmacia, Швеция).

Poly(hg⁵ U) получали обработкой poly(U) ацетатом ртути в условиях, указанных в работе [2], за исключением температуры проведения реакции. Реакционную смесь, содержащую 0,6 мМ poly(U) и 4 мМ Hg(OAc)₂ в 5 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 6,0, инкубировали 100 мин при 20° С.

Poly(hg⁵ U) осаждали спиртом, предварительно добавляя NaCl до концентрации 0,5 М. От соосадившегося ацетата ртути освобождались повторным осаждением poly(hg⁵ U) спиртом из 0,5 М NaCl. Осадок промывали спиртом и растворяли в 0,2 М NaCl. К полученному раствору (концентрация полинуклеотида 3,8 мМ) добавляли двукратный избыток (в расчете на моль нуклеотида) β-меркаптоэтиламина. К реакционной смеси добавляли три объема 0,1 М карбонатного буфера, pH 9,8, содержащего 20 мМ MgCl₂, затем насыщенный раствор 5-азидо-2,4-динитрофторбензола в этиловом спирте (0,2 части от общего объема реакционной смеси). Смесь инкубировали 45 мин при 20° С. Poly(ahg⁵ U) отделяли от избытка реагента гель-фильтрацией на сефадексе G-50, уравновешенном 2 мМ трис-HCl, pH 7,0. Степень модификации определяли, исходя из молярного коэффициента погашения 5-азидо-2,4-динитрофторбензола (ϵ_{260} 15·10³), который, как было определено, равен молярному коэффициенту погашения продукта. Для образования комплементарного комплекса poly(ahg⁵ U) и (pA)₆ инкубировали в 0,01 М трис-HCl-буфере, pH 7,4, содержащем 0,2 М NaCl и 0,01 М MgCl₂, в течение 120 мин при 0° С. Смесь объемом 40 мкл содержала 0,1 ОЕ₂₆₀ poly(ahg⁵ U) и 0,03 ОЕ₂₆₀ (pA)₆. Об образовании комплекса судили по данным гель-фильтрации на сефадексе G-75 при 13° С, колонка уравновешена тем же буфером. Комплекс облучали в проточной кювете (скорость протекания 2 мл/ч) с охлаждением (13° С) с помощью ртутной лампы ДРШ-500 через светофильтр ($\lambda \geq 350$ нм). Комплекс poly(ahg⁵ U)

с (pA)₆ разрушали и отделяли poly(ahg⁵U)-(pA)₆ от непрореагировавшего (pA)₆ гель-фильтрацией на сефадексе G-75, уравновешенном водой при 20° С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гринцева И. И. Биохимия, 1977, т. 42, № 2, с. 370-374.
2. Dale R. M. K., Martin E., Livingstone D. S., Ward D. C. Biochemistry, 1975, v. 14, № 11, p. 2447-2457.
3. England T. E., Uhlenbeck O. C. Biochemistry, 1978, v. 17, № 11, p. 2069-2076.
4. Wilson D. F., Miyata Y., Freeinska M., Varderkooi J. M. Arch. Biochem. and Biophys., 1975, v. 171, № 1, p. 104-107.

Поступила в редакцию
19.IV.1982
После доработки
28.VII.1982

INTRODUCTION OF REACTIVE GROUPS INTO POLYNUCLEOTIDES BY MODIFICATION WITH MERCURY ACETATE

BROSALINA E. B., VLASSOV V. V., GODOVIKOV A. A.

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

A new method for introducing photoactivable groups into polynucleotides has been developed. It involves polynucleotide modification with mercury acetate and the following treatment with mercaptoethylamine and 5-azido-2,4-dinitrofluorobenzene. The reactive derivatives of poly(U) with the modification extent equal to 30% were obtained and utilized for a high efficiency modification of the complementary (pA)_n oligonucleotides.