



УДК 577.113.4

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АФФИННЫХ РЕАГЕНТОВ С УПРАВЛЯЕМОЙ АЛКИЛИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИЕЙ — ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ПО 5'-ФОСФАТНОМУ ОСТАТКУ

Ошевский С. И.

*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Грачев М. А., Мустаев А. А.

*Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР*

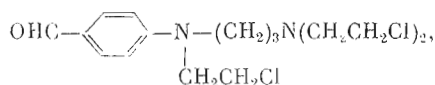
Реакция дезоксирибоолигонуклеотидов* рА-А'-Г-Т-С-С-А-С и рС-Т-Т-Т-С-С-А с N, N, N'-трис(2-хлорэтил)-N'-(*n*-формилфенил)триметилендиамином приводит с выходом 30–40% к продуктам моноалкилирования 5'-фосфатной группы олигонуклеотида алифатической 2-хлорэтиламиногруппой реагента, при этом ароматическая 2-хлорэтиламиногруппа диамина сохраняется интактной из-за электроноакцепторного влияния *n*-формилфенильного остатка. Восстановление формальной группы боргидридом натрия активизирует ароматическую 2-хлорэтиламиногруппу. Новые алкилирующие производные олигонуклеотидов могут быть использованы для аффинной модификации нуклеиновых кислот и белков.

Н. И. Гривевой и др. [1] предложен метод «адресованной» модификации нуклеиновых кислот, который является частным случаем метода аффинной модификации. В нем используются производные олигонуклеотидов, несущие модифицирующие (алкилирующие) функции на 5'- или 3'-конце олигонуклеотида, а аффинность обеспечивается взаимодействием олигонуклеотидного «адреса» с комплементарным ему участком нуклеиновой кислоты.

Для синтеза модифицирующих (алкилирующих) производных олигонуклеотидов предложен ряд методов [2–8]. Однако вводимые алкилирующие группы высокорекреационноспособны. Это затрудняет выделение, хранение и использование таких производных олигонуклеотидов. Поэтому олигонуклеотиды с алкилирующей группой, неактивной («выключенной» в условиях получения, очистки и хранения), но легко активируемой («включаемой» в мягких условиях), представляются более удобными.

Цель данной работы — получение таких производных олигонуклеотидов по 5'-фосфатному остатку.

В настоящее время известно несколько «включаемых» реагентов, пригодных для модификации нуклеиновых кислот. Это фотореакционноспособные производные [5], реагент Саммертона и Барглетта [10] и реагент Галля и др. [11]. Реагент Галля и др., N,N,N'-трис(2-хлорэтил)-N'-(*n*-формилфенил)триметилендиамин (Cl₃R)



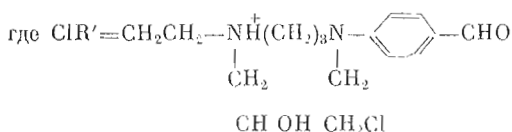
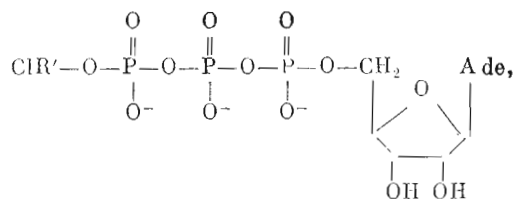
на наш взгляд, сконструирован наиболее удачно: реакционная способность его ароматической 2-хлорэтиламиногруппы снижена в сотни раз из-за электроноакцепторного влияния *n*-формилфенильной группы [9]. Она

* Префикс d (дезокс) в обозначениях олигонуклеотидов везде опущен, так как в статье использовались только производные дезоксириада.

практически не реакционноспособна в «физиологических» условиях [12]. Активация осуществляется восстановлением альдегидной группы до спиртовой боргидридом натрия в мягких условиях. Бис(2-хлорэтил)аминогруппа реагента, напротив, высокореакционноспособна и предназначена для введения «включаемой» алкилирующей группы по нуклеофильным центрам макромолекул [11].

Салганик с сотр. [13, 14] использовали Cl_3R для получения фрагментов ДНК и РНК, несущих «включаемые» алкилирующие группы, присоединенные по остаткам гуанозина.

В работе [12] нами было показано, что реакцией Cl_3R с АТР можно получить алкилирующее производное АТР по γ -фосфатной группе:



В настоящей работе мы предприняли попытку получить аналогичные производные олигонуклеотидов рА-А-Т-Т-С-С-А-С и рС-Т-Т-Т-С-С-А по 5'-фосфатным остаткам путем алкилирования незащищенных олигонуклеотидов реагентом Cl_3R . Эта возможность определяется тем, что при неполной степени превращения исходного олигонуклеотида реакция алкилирования должна пройти преимущественно по 5'-фосфатной группе, так как ее реакционная способность по отношению к алкилирующим агентам значительно выше реакционной способности нуклеозидных остатков олигонуклеотидов и межнуклеотидных фосфатных групп [15–17].

Реакцию алкилирования олигонуклеотида $^{32}pA-A-T-T-C-C-A-C$ трифункциональным азотистым ипритом Cl_3R проводили как описано в «Экспериментальной части», аналогично работе [12]. Реакционную смесь анализировали на колошке с сорбентом «Аминохром»*. Из рис. 1 видно, что профили элюции совпадают при проведении контроля как по оптическому поглощению при 260 нм, так и по радиоактивности. Следовательно, все продукты алкилирования содержат 5'-концевые фосфатные группы. Хорошее совпадение профилей позволяет считать, что в результате реакции алкилирования олигонуклеотида элюируются раньше, чем исходный олигонуклеотид (рис. 1, пик VI), потому что образующийся остаток диамина ClR' в условиях хроматографического разделения положительно заряжен [12].

На рис. 2а показан результат анализа аналогичной реакционной смеси, но с нерадиоактивным олигонуклеотидом, методом микроколоночной хроматографии [18] с детектированием по величине оптической плотности при длинах волн 260 и 350 нм (группа ClR' имеет характерное поглощение в области ~350 нм, ϵ_{350} 32 000 [12]). Вещество пика II — продукт присоединения двух остатков ClR' к молекуле олигонуклеотида, так как его спектральное отношение $A_{350}/A_{260} = 0,7$, а вещества пиков III–V — про-

* «Аминохром» — сорбент на основе микропористых силикохромов, который имеет повышенное сродство к 5'-фосфатному остатку моно- и олигонуклеотидов (производство Новосибирского государственного университета и Института цитологии и генетики СО АН СССР).

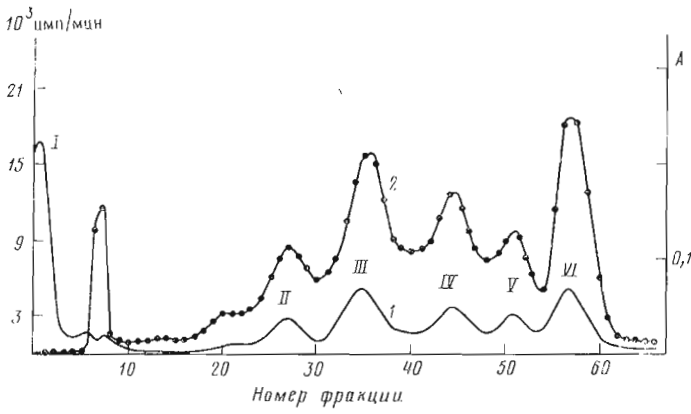


Рис. 1. Хроматографический профиль разделения продуктов реакции алкилирования октануклеотида ^{32}P A-A-T-T-C-C-A-C реагентом Cl_3R на аминокроме (колонка 1 мл): I — Cl_3R , II—V — основные продукты алкилирования, VI — исходный октануклеотид. Объем фракции 1 мл. Контроль по поглощению при 260 нм (1) и по радиоактивности (2). Условия элюции см. «Экспер. часть» раздел 5

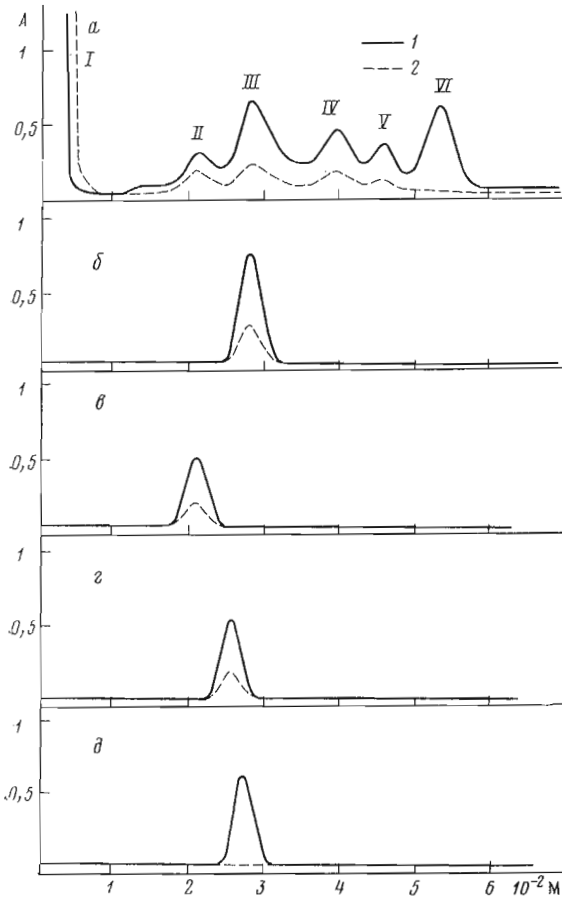


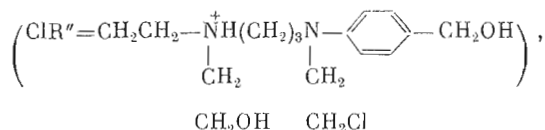
Рис. 2. Анализ продуктов реакции алкилирования октануклеотида pA-A-T-T-C-C-A-C реагентом Cl_3R методом микроколоночной хроматографии (I — Cl_3R , II—V — основные продукты алкилирования, VI — исходный октануклеотид) (a) и профили рехроматографии выделенных продуктов III—V рис. 2a и исходного октануклеотида после обработки щелочной фосфатазой *E. coli* (б—д соответственно). Контроль по поглощению при 260 нм (1) и 350 нм (2). Условия хроматографии см. «Экспер. часть» раздел 6

дукты моноалкилирования, так как их спектральные отношения $A_{350}/A_{260} = 0,4$ (см. рис. 2а).

Очевидно, что среди продуктов моноалкилирования (пики III–V) имеются продукты реакции как по нуклеозидным остаткам, так и по 5'-фосфатному остатку. Последний может быть легко идентифицирован по устойчивости к фосфомоноэстеразе [19]. Исследование действия фосфомоноэстеразы на продукты моноалкилирования олигонуклеотида рА-А-Т-Т-С-С-А-С, выделенные как описано в «Экспериментальной части» (раздел 7), свидетельствует (рис. 2б–г), что только продукт III сохраняет свою хроматографическую подвижность, а значит, и является продуктом моноалкилирования 5'-фосфатной группы олигонуклеотида — производным (ClR') рА-А-Т-Т-С-С-А-С [12].

Следует отметить, что хроматографическая подвижность продукта III точно совпадает с хроматографической подвижностью олигонуклеотида А-А-Т-Т-С-С-А-С (ср. рис. 2б, д), который в условиях хроматографии имеет суммарный отрицательный заряд 7. Это хорошо согласуется со структурой (ClR') рА-А-Т-Т-С-С-А-С.

Алкилирующую способность (ClR') рА-А-Т-Т-С-С-А-С оценивали по его реакции с этилендиамином [20] (в условиях хроматографического разделения прореагировавшая с этилендиамином молекула алкилирующего производного олигонуклеотида имеет дополнительный положительный заряд). На рис. 3 представлен результат анализа продуктов реакции этилендиамина с олигонуклеотидным реагентом, активированным восстановлением боргидридом натрия, при рН 7,5. Вещества пиков I и II не поглощают при 350 нм. Это говорит о том, что реакция восстановления *n*-формилфенильной группы в составе олигонуклеотидного реагента (активация) прошла количественно. Очевидно, что вещество пика I — продукт алкилирования этилендиамина реагентом (ClR'') рА-А-Т-Т-С-С-А-С



так как его хроматографическая подвижность соответствует хроматографической подвижности вещества с зарядом на единицу меньше, чем у исходного реагента. Вещество пика II элюируется при той же концентрации, что и исходный реагент. По-видимому, это продукт побочных реакций активированной 2-хлорэтиламиногруппы реагента с водой или с основанием олигонуклеотидного «адреса». Из отношения площадей пиков на рис. 3 следует, что реагент (ClR'') рА-А-Т-Т-С-С-А-С содержит по крайней мере 60% интактных 2-хлорэтиламиногрупп.

Результаты алкилирования этилендиамина подтверждают структуру, предложенную выше для продукта III (рис. 2), и показывают, что алкилирующая группа может быть активирована в составе олигонуклеотидного реагента в условиях, приемлемых для активации (ClR') рА-А-Т-Т-С-С-А-С в комплексных комплексах.

Алкилирование олигонуклеотида рС-Т-Т-Т-С-С-А проводили при несколько большей концентрации Cl_3R , чем использованная в опытах с рА-А-Т-Т-С-С-А-С. Результат хроматографического разделения продуктов в общих чертах напоминает хроматографический профиль рассмотренной выше реакционной смеси (ср. рис. 4а и 2а). Вещество пика I имеет спектральные отношения продукта присоединения двух остатков ClR' к молекуле олигонуклеотида рС-Т-Т-Т-С-С-А. Вещество пика II имеет спектральные отношения $A_{350}/A_{260} = 0,5$ (моноалкилирование), является основным продуктом реакции и устойчиво к действию фосфомоноэстеразы (см. рис. 4б), т. е. это продукт алкилирования 5'-фосфатной группы олигонуклеотида рС-Т-Т-Т-С-С-А. Выход реагента (ClR') рС-Т-Т-Т-С-С-А по олигонуклеотиду составил 40%.

На рис. 5 приведен результат разделения продуктов алкилирования этилендиамина активированным алкилирующим производным олигонук-

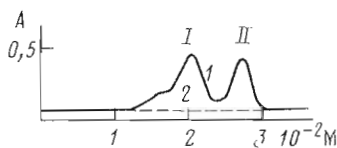


Рис. 3

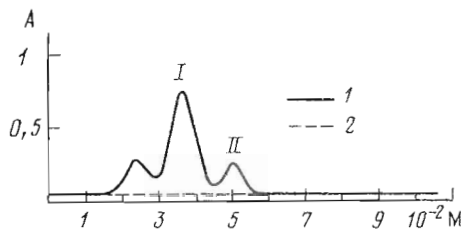


Рис. 5

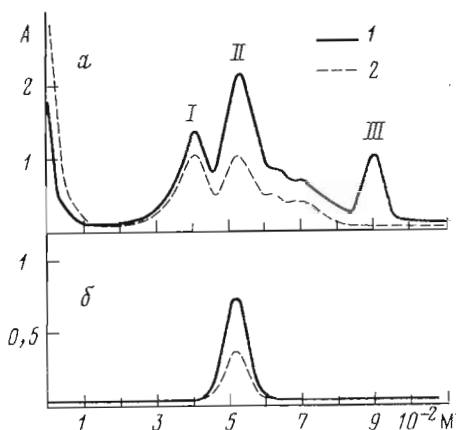


Рис. 4

Рис. 3. Хроматографический профиль разделения продуктов реакции алкилирования этилендиамина реагентом (ClR'') рА-А-Т-Т-С-С-А-С: I — продукт алкилирования этилендиамина, II — продукт побочных реакций алкилирующего агента. Условия хроматографии и контроль как на рис. 2

Рис. 4. Анализ продуктов реакции алкилирования гептануклеотида рС'-Т-Т-Т-С-С-А реагентом Cl_3R методом микроколоночной хроматографии (I, II — основные продукты алкилирования, III — исходный гептануклеотид) (а) и профиль рехроматографии продукта II после его выделения и обработки щелочной фосфатазой *E. coli* (б). Условия хроматографии см. в «Экспер. части», раздел 9. Контроль как на рис. 2

Рис. 5. Хроматографический профиль разделения продуктов реакции алкилирования этилендиамина реагентом (ClR'') рС'-Т-Т-Т-С-С-А: I — продукт алкилирования этилендиамина, II — продукт побочных реакций алкилирующего агента. Условия хроматографии и контроль как на рис. 4

леотида — (ClR'') рС'-Т-Т-Т-С-С-А. Отношение площадей пиков I и II говорит о том, что (ClR'') рС'-Т-Т-Т-С-С-А содержит по крайней мере 70% интактных 2-хлорэтиламиногрупп*.

Таким образом, в настоящей работе на примере реакции алкилирования олигонуклеотидов рА-А-Т-Т-С-С-А-С и рС'-Т-Т-Т-С-С-А трифункциональным азотистым ипритом Cl_3R показана возможность получения производных олигонуклеотидов по 5'-фосфатному остатку алкилированием алифатическими 2-хлорэтиламинами. Этот подход может найти применение для получения различных 5'-О-алкильных производных 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов. Однако он имеет существенный недостаток — невысокий выход продукта, зависящий от состава олигонуклеотида. Чем больше высокорекреационноспособных оснований содержит олигонуклеотид, тем меньше выход целевого продукта. Остаток гуанина наиболее реакционноспособен, поэтому выход производных по 5'-фосфату в случае гуанинсодержащих олигонуклеотидов будет небольшим. С увеличением длины олигонуклеотида выход целевых продуктов также будет убывать.

Тем не менее предлагаемый метод имеет и ряд преимуществ. Так, реакция алкилирования олигонуклеотидов 2-хлорэтиламинами проходит в водных растворах. Поэтому ее удобно проводить с микроколичествами олигонуклеотида в отличие от реакций, которые применялись ранее для введения алкилирующих групп в олигонуклеотиды [2–4, 7, 8]. Это преимущество важно при получении высокорadioактивных олигонуклеотидных реагентов. Вторым преимуществом является то, что получающиеся при алкилировании 5'-фосфата олигонуклеотидов эфирные производные более устойчивы, чем описанные ранее реакционноспособные аналоги оли-

* Природа пиков, выходящих перед пиками, обозначенными единицей на рис. 3 и 5, нами не исследовалась; возможно, они также являются результатом реакции внутримолекулярного алкилирования остатков оснований олигонуклеотидного реагента активированной алкилирующей группой. При расчете содержания интактных 2-хлорэтиламиногрупп эти пики не учитывались.

гонуклеотидов по 5'-фосфатным группам — фосфамидные производные [5, 6, 8, 21].

Однако главным достоинством предлагаемого метода является возможность получать аналоги олигонуклеотидов с «включаемой» алкилирующей функцией.

Полученные производные можно использовать для «адресованной» модификации ДНК в системе *in vitro*, а также для аффинной модификации ферментов, специфически взаимодействующих с ДНК.

Экспериментальная часть

В работе использовали: DEAE-целлюлозу DE-32 (Whatman, Англия), целлюлозы MN-300 и MN-300 DEAE (Macherey — Nagel, ФРГ), сефадексы G-10, G-25, G-50 и A-25 (Pharmacia, Швеция); трис(оксиметил)аминометан, НЕРЕС и дитиотреит (Merck, ФРГ); щелочную фосфатазу *E. coli* марки BAPF и фосфодиэстеразу змеиного яда (Millipore, Англия); [γ - 32 P] АТФ удельной активности 2000 Ки/ммоль отечественного производства, полоски ацетата целлюлозы отечественного производства, препарат суммарной РНК производства СКТБ БАВ (Новосибирск). Олигонуклеотид рА-А-Т-Т-С-С-А-С синтезирован Е. В. Ярмолинской (ИОХ, Новосибирск), олигонуклеотид рС-Т-Т-Т-С-С-А синтезирован А. Н. Сияковым (ВНИИМБ, Новосибирск). N,N,N'-Трис(2-хлорэтил)-N'-(*n*-формилфенил)-триметилендиамин предоставлен А. А. Галлем. Полинуклеотидкиназа фага Т4 (КФ 2.7.1.78) любезно предоставлена М. И. Ривкиным и В. Н. Рыбаковым. Сорбент «Аминохром» предоставлен В. П. Кумаревым (ИЦиГ, Новосибирск).

Радиоактивность определяли сцинтиляционным счетом на приборе Mark III (Nuclear Chicago, США). Анализ веществ и реакционных смесей методом микроколоночной жидкостной хроматографии с многоволновой детекцией осуществляли по методу [18] на жидкостном хроматографе «Обь-4». Препаративную жидкостную хроматографию проводили на комплекте фирмы ЛКВ (Швеция) с использованием денситометра Uvicord. Остальные использованные в работе реактивы имели квалификацию не ниже х.ч.

1. Дефосфорилирование олигонуклеотидов рА-А-Т-Т-С-С-А-С и рС-Т-Т-Т-С-С-А проводили щелочной фосфатазой *E. coli* в 0,02 М трис-НCl, pH 9,5, содержащем 0,01 М MgCl₂ и 0,1 мМ EDTA. Фермент в виде суспензии в 3,4 М растворе (NH₄)₂SO₄ добавляли исходя из соотношения 2 ед. акт. на 1 мкмоль олигонуклеотида и инкубировали реакционную смесь в течение 1 ч при 56° С. Реакцию останавливали добавлением EDTA до 0,02 М концентрации, три раза экстрагировали фенолом и хроматографировали водную фазу на колонке с DEAE-целлюлозой. Элюцию вели калий-фосфатным буфером (pH 7,5) в интервале концентраций от 0 до 0,3 М в 7 М мочевины. Далее олигонуклеотиды обессоливали на колонке с сефадексом G-10 в 0,02 М ТЕАВ, pH 8,0. Собранные фракции упаривали несколько раз с этанолом, остаток растворяли в воде и хранили при -20° С.

2. Фосфорилирование олигонуклеотидов А-А-Т-Т-С-С-А-С и С-Т-Т-Т-С-С-А с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4 и [γ - 32 P] АТФ проводили аналогично работе [22]. Продукты выделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50, сверхтонкий, и аликвоты анализировали методом микроколоночной хроматографии [18] на колонке с DEAE-целлюлозой. Элюат собирали на бумажные мшени и просчитывали на счетчике Mark III. Радиохимические примеси не превышали 10%.

3. Структуру олигонуклеотидов подтверждали методом Сенгера в соответствии с работой [23]. Посторонних загрязнений олигонуклеотиды практически не содержали.

4. Алкилирование олигонуклеотидов 32 рА-А-Т-Т-С-С-А-С (рА-А-Т-Т-С-С-А-С) и рС-Т-Т-Т-С-С-А реагентом Cl₃R. Реакцию вели при 40° С в 0,02–0,04 М натрий-боратном буфере (pH 8,2) при концентрациях олигонуклеотидов: 55 мкМ для 32 рА-А-Т-Т-С-С-А-С (рА-А-Т-Т-С-С-А-С) и 30 мкМ для рС-Т-Т-Т-С-С-А с концентрациями Cl₃R 380 и 540 мкМ соот-

ветственно. Реакционная смесь содержала 4–5% диметилформамида для лучшей растворимости Cl_3R . Через 1 ч продукты разделяли на колонке с «Аминохромом».

5. Анализ продуктов алкилирования олигонуклеотида $^{32}pA-A-T-T-C-C-A-C$ реагентом Cl_3R проводили хроматографией на колонке с «Аминохромом» объемом 1,0 мл с элюцией линейным градиентом концентрации фосфата калия (рН 7,5) от 0 до 0,1 М в 7 М мочеvine (объем градиента 100 мл). Из фракций объемом 1,0 мл отбирали аликвоты по 5 мкл и просчитывали их на счетчике радиоактивности. Детектирование оптического поглощения осуществляли на приборе Uvicord (см. рис. 1).

6. Анализ продуктов реакции алкилирования олигонуклеотида $pA-A-T-T-C-C-A-C$ реагентом Cl_3R методом микроколоночной хроматографии [18]. Аликвоту реакционной смеси (см. раздел 4) разбавляли водой в 10 раз и анализировали на колонке с «Аминохромом» объемом 50 мкл с элюцией ступенчатым градиентом концентрации фосфата калия (рН 7,5) от 0 до 0,06 М в 7 М мочеvine (общий объем градиента 1200 мкл, объем ступеньки 200 мкл). Детектирование осуществляли на приборе «Обь-4» (см. рис. 2а).

7. Выделение продуктов алкилирования олигонуклеотида $pA-A-T-T-C-C-A-C$ реагентом Cl_3R проводили хроматографией на колонке с «Аминохромом», как описано в случае олигонуклеотида $^{32}pA-A-T-T-C-C-A-C$. Фракции, содержащие продукты (III)–(V) (см. рис. 1), разбавляли в 2 раза водой и каждый продукт наносили на колонку с DEAE-сефадексом А-25 (100 мкл). Колонку отмывали 0,2 М ТЕАВ, рН 8,0, и элюировали продукт 1 М ТЕАВ, приготовленным из триэтиламина, очищенного последовательной перегонкой над КОН, *n*-толуолсульфохлоридом, КОН, P_2O_5 . Собранные фракции упаривали в вакууме несколько раз с водным этанолом при температуре бани $\leq 40^\circ C$, растворяли в 0,1 М НЕРЕС, рН 7,3, и использовали для дальнейшего анализа или хранили при $-20^\circ C$ (продукт III).

8. Анализ продуктов моноалкилирования олигонуклеотидов реагентом Cl_3R с помощью щелочной фосфатазы *E. coli*. а) К 0,03–0,06 OE_{260} одного из продуктов (III)–(V) (см. рис. 1 и 2а) или исходного олигонуклеотида в 20 мкл 0,1 М НЕРЕС (рН 7,3) добавляли 0,1 ед. акт. фосфомоноэстеразы. Реакционные смеси инкубировали 0,5 ч при $37^\circ C$ и анализировали методом микроколоночной хроматографии (см. рис. 2б–д), как описано в разделе 6.

б) Продукт (II) (см. рис. 4а) реакции алкилирования олигонуклеотида $pC-T-T-T-C-C-A$ реагентом Cl_3R выделяли как описано ниже и обрабатывали фосфомоноэстеразой аналогично продуктам алкилирования олигонуклеотида $pA-A-T-T-C-C-A-C$. Затем реакционную смесь анализировали методом микроколоночной хроматографии в условиях, приведенных в разделе 9 (см. рис. 4б).

9. Выделение продукта алкилирования олигонуклеотида $pC-T-T-T-C-C-A$ реагентом Cl_3R по 5'-фосфатному остатку. Хроматографическое разделение продуктов реакции алкилирования проводили методом микроколоночной хроматографии на колонке с «Аминохромом» объемом 100 мкл с элюцией ступенчатым градиентом концентрации фосфата калия, рН 7,5, от 0 до 0,1 М в 7 М мочеvine (объем градиента 1100 мкл, объем ступеньки 100 мкл). Детектирование осуществляли на микроспектрофотометре «Обь-4». Собирали вещество пика II (см. рис. 4а) и обессоливали на колонке с сефадексом G-25 в 0,01 М НЕРЕС, рН 7,3. Полимерную фракцию собирали, упаривали и использовали для дальнейшей работы.

10. Активация ароматической 2-хлорэтиламиногруппы алкилирующих производных олигонуклеотидов — восстановление альдегидной группы до спиртовой — проводилось согласно работе [11]. К 30 мкМ раствору (CIR') $pA-A-T-T-C-C-A-C$ или (CIR') $pC-T-T-T-C-C-A$ в 0,3 М НЕРЕС, рН 7,3, добавляли свежеприготовленный 1 М раствор боргидрида натрия в 0,05 М натрий-боратном буфере, рН 8,3, до концентрации 50–100 мМ. Реакционную смесь выдерживали 10 мин при $15-20^\circ C$. Конечное значение рН смеси 7,6.

11. Алкилирование этилендиамина олигонуклеотидными реагентами (ClR') pA-A-T-T-C-C-A-C и (ClR'') pC-T-T-T-C-C-A. К раствору олигонуклеотидного реагента с активированной 2-хлорэтиламиногруппой (см. раздел 10) добавляли равный объем 2 М этилендиамина, доведенного HCl до pH 7,5, и инкубировали при 40° С в течение 2 ч. Затем реакционную смесь обессоливали на колонке с сефадексом G-25 в 0,01 М HEPES, pH 7,3. Собранный полимерный пик анализировали методом микроколоночной хроматографии, как описано в разделах 6,9 (см. рис. 3 и рис. 5).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I.* Tetrahedron Lett., 1967, № 37, p. 3557-3562.
2. *Венъяминова А. Г., Гринева Н. И.* Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1971, вып. 4, № 9, с. 111-118.
3. *Гринева Н. И., Ломакина Т. С.* Ж. общ. химии, 1972, т. 42, вып. 7, с. 1630-1634.
4. *Гринева Н. И., Ломакина Т. С.* Ж. общ. химии, 1973, т. 43, вып. 11, с. 2551-2555.
5. *Ивановская М. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А.* Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 35-40.
6. *Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н.* Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 886-894.
7. *Гринева Н. И., Сайкович Е. Г.* Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 563-567.
8. *Готтих М. Б., Ивановская М. Г., Вейко В. П., Шабарова З. А.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1310-1317.
9. *Галль А. А., Мустаев А. А., Тугурова К. Ф., Шаманин В. А.* Матер. XVI Всес. научн. студ. конф. Химия, НГУ, 1978, с. 14-19.
10. *Summerton J., Bartlett P. A. J.* Mol. Biol., 1978, v. 122, № 2, p. 145-162.
11. *Галль А. А., Курбагов В. А., Мустаев А. А., Шишкин Г. В.* Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1979, вып. 2, № 4, с. 99-104.
12. *Grachev M. A., Mustaev A. A., Oshevski S. I.* Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 15, p. 3412-3426.
13. *Салганик Р. И., Дианов Г. Л., Курбагов В. А., Шишкин Г. В., Галль А. А.* Докл. АН СССР, 1978, т. 239, № 1, с. 217-219.
14. *Мазин А. В., Дианов Г. Л., Салганик Р. И.* Молекулярн. биология, 1981, т. 15, вып. 2, с. 252-256.
15. *Price C. C., Gaucher G. M., Koneru P., Shibakawa R., Sowa J. R., Yamaguchi M.* Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 166, № 2, p. 327-359.
16. *Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбагов В. А.* Молекулярн. биология, 1970, т. 4, вып. 6, с. 814-820.
17. *Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбагов В. А.* Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1971, вып. 1, № 2, с. 107-111.
18. *Грачев М. А.* В кн.: Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1973, с. 104-122.
19. *Armstrong V. W., Eckstein F.* Eur. J. Biochem., 1976, v. 70, № 1, p. 33-38.
20. *Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Курбагов В. А., Лебедев А. В., Самуков В. В., Шишкин Г. В.* Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 6, с. 793-798.
21. *Преображенская Н. И.* Успехи химии, 1972, т. 41, вып. 1, с. 96-117.
22. *Van de Sande J. П., Kleppe K., Khorana H. G.* Biochemistry, 1973, v. 12, № 25, p. 5050-5055.
23. *Tu Chen Pei D., Jay E., Bahl C. P., Wu R.* Anal. Biochem., 1976, v. 74, № 1, p. 73-93.

Поступила в редакцию

23.XI.1982

После доработки

11.I.1983

A METHOD FOR PREPARING AFFINITY REAGENTS WITH AN ALKYLATING GROUP OF REGULATED REACTIVITY — OLIGONUCLEOTIDES DERIVATIZED AT THE 5'-TERMINUS

OSHEVSKY S. I., GRACHEV M. A., MUSTAEV A. A.

Institute of Cytology and Genetics and Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Division of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Deoxyoligonucleotides pAATGCCAC and pCTTTCCA were alkylated with N,N,N'-tris-(2-chloroethyl), N'-(p-formylphenyl)trimethylenediamine. The reaction, among other products, gave derivatives of oligonucleotides with the inactive alkylating group attached to the 5'-phosphate residues. However, this alkylating group becomes active after reduction of the formyl residue with NaBH₄. Hence, the method affords oligonucleotides bearing alkylating groups of regulated reactivity.