



УДК 577.113.4/5:541.127

**КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННОЕ ЭЛИМИНИРОВАНИЕ  
E1a-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ОНКОГЕНА АДЕНОВИРУСА  
ОБЕЗЬЯН SA7 ИЗ КОЛЬЦЕВЫХ ОДНОТЯЖЕВЫХ ДНК  
РЕКОМБИНАНТНЫХ ФАГОВ M13***Сац Н. В., Сурин В. Л., Жукова Е. Л., Гринева Н. И.**Центральный научно-исследовательский институт гематологии  
и переливания крови Министерства здравоохранения СССР, Москва*

Субклонированием из плазмиды рASP ДНК онкогена аденовируса обезьян SA7 в фагах M13mp8 и M13mp9 по *PstI-Cfr9I*-сайтам получены рекомбинантные фаги M13mp8G и mp9G со вставкой в их ДНК G-фрагмента — E1a-области онкогена. Из ДНК этих фагов после ограниченного гидролиза ДНКазой II синтезированы полиалкилирующие производные, способные к специфичной гибридизации с комплементарными участками кольцевых однотяжевых ДНК и избирательному алкилированию в образующихся гибридах G-последовательностей матрицы (как после активации алкилирующих группировок реагентов боргидридом натрия, так и без нее). С помощью комплементарно адресованного расщепления ДНК в точках алкилирования пуринов без повреждения векторных последовательностей ДНК фагов проведено специфичное элиминирование ДНК E1a-области рекомбинантных фагов. На основе комплементарно адресованной фрагментации разработан высокочувствительный метод анализа реакций полиалкилирующих полинуклеотидов в гибридных комплексах.

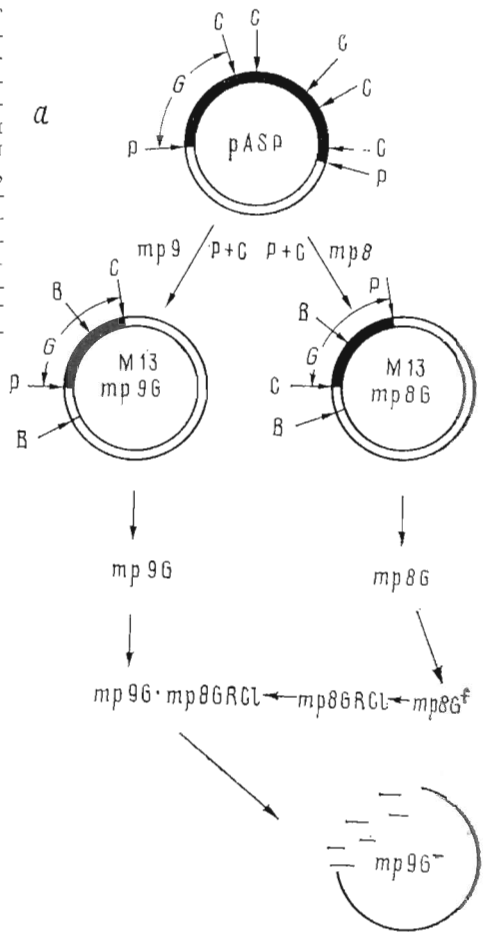
В настоящее время все интенсивнее изучаются комплементарно адресованные модификации нуклеиновых кислот реакционноспособными производными олиго- и полинуклеотидов [1]. Описано применение этого подхода для получения ген-специфичных мутаций [2—4], подавления экспрессии мРНК [5] и размножения вирусов [6]; исследовалось также действие алкилирующих производных олиго- и полинуклеотидов на клетки [3, 4].

Для изучения влияния множественных модификаций в ДНК онкогена SA7 на его биологическую активность в данной работе исследовали комплементарно адресованную модификацию ДНК E1a-области онкогена, заключенной, согласно рестриктной карте SA7, во фрагменте G [7]. Для этой цели G-фрагмент был переклопирован из плазмиды рASP [7] в фаги M13mp8 и mp9 по *PstI*- и *Cfr9I*-сайтам (рис. 1а). В результате были получены рекомбинантные фаги M13mp8G и mp9G, однотяжевые ДНК которых содержат комплементарные последовательности G-фрагмента (рис. 2). Строение двуцепочечных ДНК этих фагов доказано рестрикционным анализом с помощью рестриктаз *PstI*, *Cfr9I*, *BglII*.

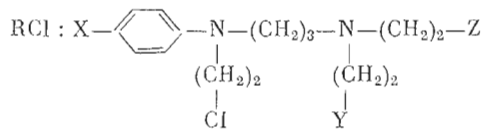
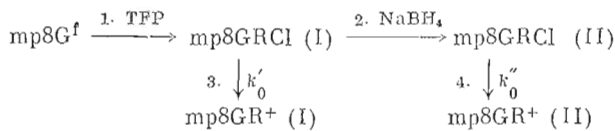
На первом этапе работы для получения множественных модификаций одноцепочечных ДНК мы применили метод, использованный в работах [2, 8] для получения ген-специфических мутаций ранних генов фага T7 и *Tet<sup>r</sup>*-гена плазмиды рBR322 с помощью полиалкилирующих производных соответствующих мРНК- и ДНК-фрагментов. В качестве полинуклеотидной части реагентов мы использовали гидролизат одноцепочечной ДНК фага mp8G<sup>f</sup> (средняя длина — 30—40 нуклеотидов), который получали с помощью ДНКазы II. Из них обработкой TFP по методу [2] были получены реагенты mp8GRCl с содержанием 3—4% алкилирующих RCl-групп, статистически расположенных в цепи полинуклеотидов.

Сокращения: TFP — N,N,N'-три-β-хлорэтил-N'-(n-формилфенил)пропилендиамин-1,3; ЭФ-подвижность — электрофоретическая подвижность; РФ ДНК — репликативная форма ДНК; mp8 (или 9)-ДНК — кроме особо оговоренных случаев — кольцевая однотяжевая фаговая ДНК; SDS — додецилсульфат натрия; надстрочный индекс f у маркировки ДНК (например, mp8G<sup>f</sup>) означает фрагментированную ферментативно или химически ДНК.

Рис. 1. Схема эксперимента. *а*: G-фрагмент (1–1900 нуклеотидов [7]) онкогена аденовируса обезьян SA7; mp8(или 9)G – кольцевая однонитчатая ДНК рекомбинантных фагов M13; mp9G<sup>-</sup> – продукт комплементарно адресованной фрагментации ДНК эндонуклеазами рестрикции *Pst*I, *Cfr*9.1, *Bgl*II соответственно. *б*: 1 – введение алкилирующих групп в фрагментированную ДНК, 2 – активация алкилирующих групп боргидридом натрия, 3, 4 – образование активных алкилирующих частиц (этилениммонийкатионов mp8GR<sup>+</sup> (I) и mp8GR<sup>+</sup> (II) с константами скорости  $k_0'$  и  $k_0''$ )



б



где TFP – X=CHO, Y=Z=Cl

mp8GRCl (I) – X=CHO, Y=mp8Gf, Z=OH

mp8GRCl (II) – X=CH<sub>2</sub>OH, Y=mp8Gf, Z=OH

После гибридизации реагента с комплементарной матрицей *n*-формильную группу аффинного реагента восстанавливали боргидридом натрия (рис. 16). При этом примерно на два порядка возрастает реакционная способность алкилирующей *N'*-хлорэтильной группы, о чем можно судить по аналогии с изменением реакционной способности 4-(*N*-2-хлорэтил-*N*-метиламино)бенальдегида (аналог TFP) при превращении его в ацеталь [9, 10]. В комплексе (матрица-реагент) протекает затем эффективное алкилирование с образованием ковалентно связанных реагента и матрицы.

В условиях гибридизации (40% формамид или 5М мочевины) ДНК  $\text{mp8GRCl}$  или  $\text{mp8G}'$  образуют с ДНК  $\text{mp9G}$  гибридные комплексы с меньшей ЭФ-подвижностью, чем исходная  $\text{mp9G}$  ДНК (рис. 3а; 1, 2, 5, 6). При этом как в формамиде, так и в мочевины комплексообразование протекает равнозначно. С ДНК  $\text{mp8G}$ , не содержащей комплементарных реагенту последовательностей, реагент заметно не гибридизуется (рис. 4, 2). О специфичности комплексообразования однозначно свидетель-

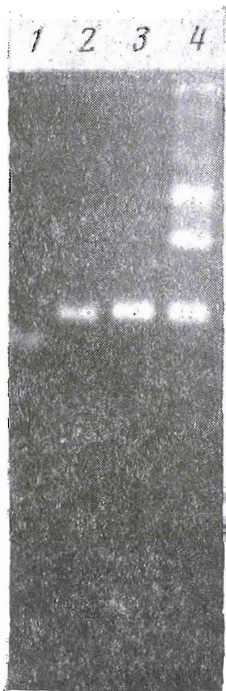


Рис. 2. Электрофорграмма одноцепочечных ДНК рекомбинантных фагов и их гибридов в 1% агарозе. 1 — кольцевые одновтяжевые ДНК  $\text{mp8}$ , 2 —  $\text{mp8G}$ , 3 —  $\text{mp9G}$ , 4 — гибриды ДНК  $\text{mp8G}$  и  $\text{mp9G}$

ствует формирование гибридов, содержащих меченый реагент (рис. 4). Как видно из рис. 3а (1, 2, 5, 6) и рис. 4 (3, 7), ДНК  $\text{mp9G}$  образует с  $\text{mp8GRCl}$  более подвижные гибриды, содержащие меньше радиоактивного материала, чем с  $\text{mp8G}'$ , что указывает на меньшую степень связывания  $\text{mp8GRCl}$  и, значит, на уменьшение сродства полинуклеотидов к комплементарному участку после введения в их состав даже 4%  $\text{RCl}$ -групп.

Комплексы, полученные в 20–40% формамиде, и исходные ДНК, выдержанные в этих условиях, способны деградировать при последующем нагревании в растворах аминов, что, по-видимому, указывает на некоторую апуринизацию ДНК в формамиде (даже при достаточно высокой буферной емкости раствора) и последующее расщепление почти всех кольцевых молекул ДНК по нескольким апуриновым звеньям (рис. 3б, 5, 6). После гибридизации в мочевины ДНК  $\text{mp8(9)G}$  сохраняет исходную структуру и при дальнейших обработках (рис. 3б, 7, 8).

Отметим, что одновтяжевые ДНК воспроизводимо выдерживают все вышеописанные процедуры только после дополнительной очистки с помощью бентопита.

Первоначально о ковалентном связывании в комплексе (реагент-матрица) вследствие алкилирования мы пытались судить по остаточному связыванию меченой  $^{32}\text{P}$   $\text{mp8GRCl}$  с ДНК  $\text{mp9G}$  после денатурации в 60% формамиде или 0,2М щелочи, как описано в работе [8]. Однако в этих условиях нам не удалось получить полной денатурации контрольного гибрида  $\text{mp8G}'\text{-mp9G}$  (рис. 4, 8), не имеющего ковалентных сшивок. Об этом свидетельствовала остаточная радиоактивность  $^{32}\text{P}$   $\text{mp8G}'$  и  $^{32}\text{P}$   $\text{mp8GRCl}$  в составе гибридов и ЭФ-подвижность денатурированных комплексов, которая оставалась ниже подвижности составляющих гибрида. Некоторые изменения в ЭФ-подвижности гибридов до и после алкилирования, вероятно, отражают частичную денатурацию и изменения их вторичной структуры в условиях денатурации. Поэтому далее для выявления алкилирования в комплексах мы использовали способность алкилированных пуринов к элиминации с последующим расщеплением цепи ДНК по апуриновому звену в присутствии аминов, применяющуюся для комплементарно адресованной фрагментации ДНК [11] и секвенирования ДНК по Максему — Гилберту [12]. Наиболее мягким методом расщепления, щадящим интактную высокомолекулярную ДНК, оказалась инкубация гибридов (ДНК-



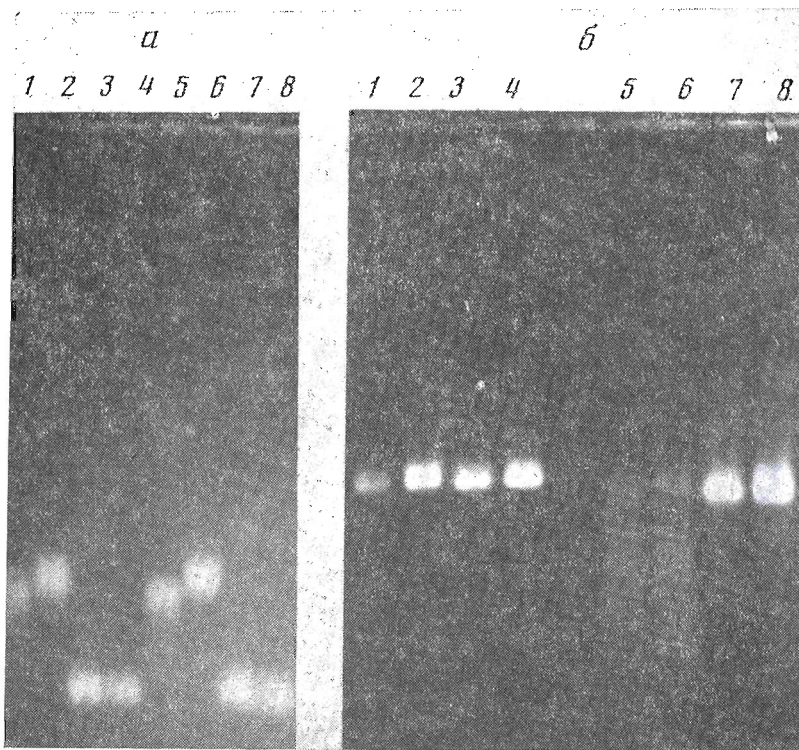


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов взаимодействия фаговых ДНК с  $mr8G^1$  или  $mr8GRCl$  в 1% агарозе. а:  $mr9G+mr8GRCl$  (1, 5);  $mr9G+mr8G^1$  (2, 6);  $mr8G^1+mr8GRCl$  (3, 7); ДНК  $mr9G$ , инкубированная в различных условиях гибридизации (4, 8); условия гибридизации: буфер А, содержащий 40% формамид (1–4) или 5 М мочевины (5–8). б: ДНК  $mr9G$ , инкубированная в различных условиях: буфер А (3, 7); буфер А, содержащий 40% формамид (1, 5), 20% формамид (2, 6), 5 М мочевины (4, 8); ДНК  $mr9G$ , инкубированная в условиях фрагментации в лизиновом буфере (5–8)

-реагент) в 0,05 М лизине при 70° С. В 1 М пиперидине контрольная ДНК  $mr9G$  заметно расщеплялась.

Из рис. 5 (10, 12, 13) видно, что после комплементарно адресованного алкилирования и фрагментации из гибрида  $mr8GRCl \cdot mr9G$  образуется ДНК-продукт, движущийся при электрофорезе значительно быстрее исходного гибрида и несколько быстрее ДНК  $mr9G$ , приближаясь по подвижности к ДНК  $mr8$ . Как видно из того же рисунка (дорожки 15, 16), никаких изменений в подвижности исходных ДНК после взаимодействия  $mr8G$  с  $mr8GRCl$  не происходит, что и следовало ожидать, поскольку они содержат не взаимодополнительные, а однонаправленные G-последовательности, не способные к гибридизации, и, следовательно, ни к алкилированию в комплексе, ни к фрагментированию ДНК  $mr8G$ .

Совокупность перечисленных фактов означает, что в опыте наблюдается комплементарно адресованное алкилирование ДНК  $mr9G$  реагентом  $mr8GRCl$  с последующей фрагментацией в зоне комплексообразования, т. е. в зоне G-последовательности ДНК. Другие реакции (алкилирование вне комплекса с участием полинуклеотидных реагентов, свободного TFR или алкилирующих производных пуринов, элиминированных из реагента в условиях реакции) не протекают. Эти результаты хорошо согласуются с известными данными о практически полном протекании подобных реакций в комплексе и неизмеримо малой доле реакций в растворе [1].

В результате взаимодействия ДНК  $mr9G$  с реагентом  $mr8GRCl$ , полностью перекрывающим всю G-последовательность и алкилирующим ее в многочисленных точках, следует ожидать элиминирования основной части G-области с образованием продукта  $mr9G^-$  ДНК (рис. 1а), аналогичного линейаризованной ДНК фагов M13  $mr9$  или  $mr8$ , и коротких по-

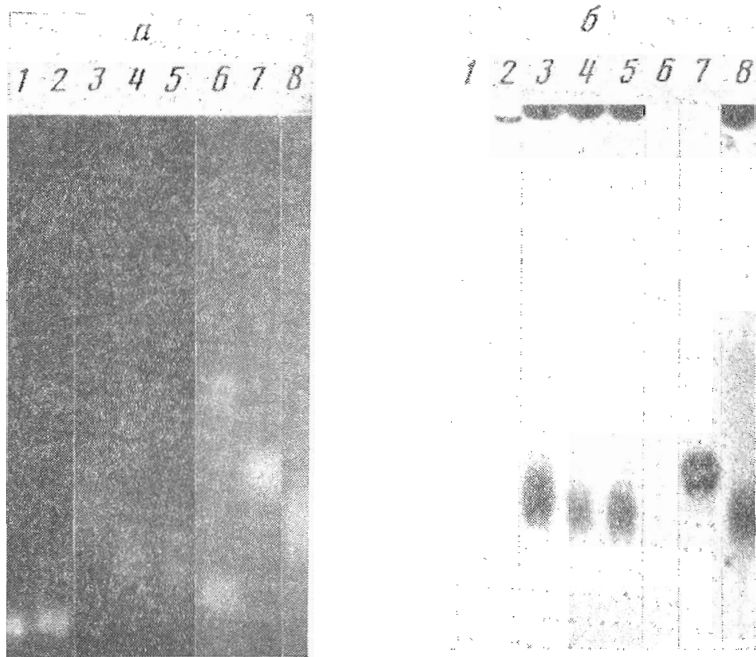


Рис. 4. Электрофореграмма (а) продуктов взаимодействия ДНК  $\text{mp9G}$  с  $\text{mp8G}^+$  и  $\text{mp8GRCl}$  и ее радиоавтограф (б): 1 — ДНК  $\text{mp9G}$ ; 2 — ДНК  $\text{mp8G}$ , инкубированная в условиях гибридизации с  $\text{mp8GRCl}$ ; 3 — продукт алкилирования ДНК  $\text{mp9G}$  реагентом  $\text{mp8GRCl}$ , восстановленным  $\text{NaBH}_4$ ; то же после денатурации щелочью (4) и формамидом (5); 6 — гибрид ДНК  $\text{mp8G}$  с ДНК  $\text{mp9G}$ ; 7 — гибрид ДНК  $\text{mp9G}$  с  $\text{mp8G}^+$ ; 8 — он же после денатурации щелочью

линуклеотидов из фрагментированной G-последовательности. Для подтверждения этого положения и определения степени элиминирования G-последовательности продукты фрагментации гибридизовали с фрагментами  $\text{mp8G}^+$  и кольцевой  $\text{mp8G}$  ДНК (рис. 1а). Анализ продуктов гибридизации электрофорезом в агарозном геле выявил только исходные компоненты реакционной смеси; медленно движущиеся гибриды, способные возникнуть за счет комплексообразования G-последовательностей  $\text{mp9G}$ - $\text{mp8G}$  или  $\text{mp9G}$ - $\text{mp8G}^+$ , не обнаружены (рис. 6, 4, 5). Следовательно, в ДНК-продукте G-последовательности практически отсутствуют. Таким образом, в результате комплементарно адресованного алкилирования и последующей фрагментации протекает практически полное элиминирование G-фрагмента онкогена аденовируса SA7, содержащего E1a-область, без заметного расщепления некомплементарных реагенту последовательностей.

При элиминировании G-последовательностей из ДНК  $\text{mp9G}$  кроме ДНК-продукта (ДНК  $\text{mp9G}^-$ ) образуются короткие фрагменты, не содержащие векторных последовательностей и движущиеся в 20% ПААГ вместе с избыточным реагентом. В условиях процесса элиминирования адресующие полинуклеотидные последовательности реагентов  $\text{mp8GRCl}$  также подвергаются апуринизации и расщеплению. Средняя длина всех образующихся фрагментов, исходя из степени введения остатков  $\text{RCI}$  в  $\text{mp8GRCl}$  (~4%), должна составить ~25 нуклеотидов; наблюдаемая длина фрагментов (10–80 нуклеотидов) не отличима от длины  $\text{mp8GRCl}$  и продуктов его превращения в условиях алкилирования и расщепления.

Следует отметить, что при гибридизации ДНК  $\text{mp9G}^-$  (без выделения из реакционной смеси) с ДНК  $\text{mp8G}$  на электрофореграмме (рис. 6, 4) полоса ДНК  $\text{mp9G}^-$  сохраняется, а полоса введенной в гибридизуемую смесь ДНК  $\text{mp8G}$  уширяется и несколько замедляется по сравнению с контрольной ДНК  $\text{mp8G}$  (дорожка 7). Можно предположить, что это связано с изменением конформации ДНК  $\text{mp8G}$  из-за взаимодействия с присутствующими в смеси короткими фрагментами ДНК  $\text{mp9G}$ , способными к ас-



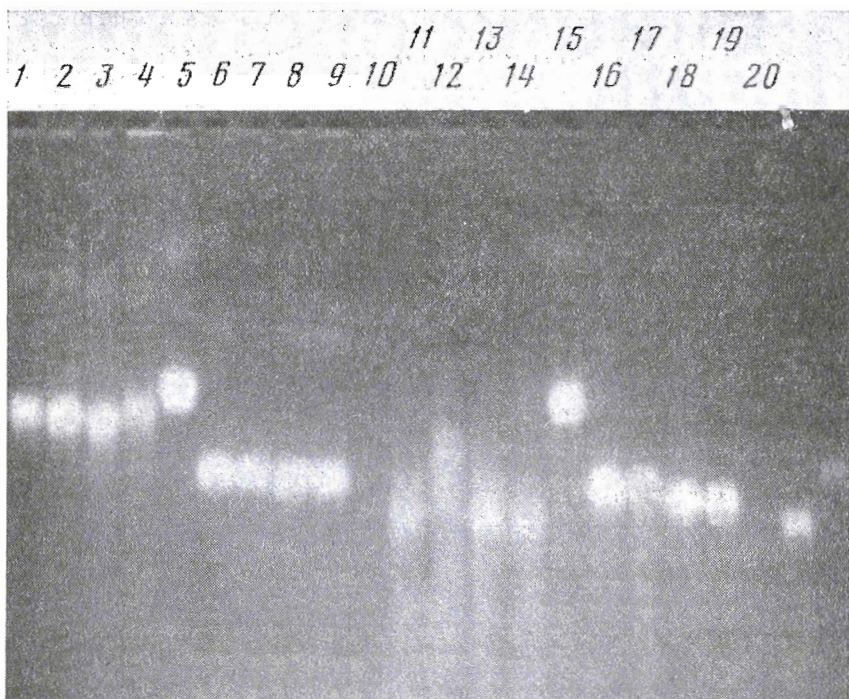


Рис. 5. Анализ продуктов алкилирования и фрагментации ДНК  $\text{trp9G}$ . ДНК  $\text{trp9G}$  и  $\text{trp8GRCl}$  после инкубации в условиях гибридизации и последующей активации реагента (1); то же без активации (2); ДНК  $\text{trp9G}$  и  $\text{trp8GRCl}$  после инкубации в присутствии  $\text{NaBH}_4$  (3); ДНК  $\text{trp9G}$ , инкубированная с предварительно активированным  $\text{trp8GRCl}$  (4); продукт гибридизации ДНК  $\text{trp9G}$  с  $\text{trp8G}'$  (5); ДНК  $\text{trp8G}$ , инкубированная с  $\text{trp8GRCl}$  в присутствии 5 М мочевины (6) и в отсутствие мочевины (7); ДНК  $\text{trp9G}$ , инкубированная в присутствии 5 М мочевины (8) и в отсутствие мочевины (9); продукты расщепления указанных выше гибридов (1–9) в присутствии лизина (дорожки 10–18 соответственно); ДНК  $\text{trp8}$  (19); ДНК  $\text{trp9G}$  (20)

социации с ДНК  $\text{trp8G}$ , с низкой константой связывания. Элиминирование G-последовательностей в виде мелких фрагментов также указывает на высокоэффективное специфично направленное алкилирование вдоль комплементарного участка матрицы с высокой частотой активности RCl-группы в полиалкилирующем полинуклеотидном реагенте; метод комплементарно адресованного расщепления пригоден для регистрации такой модификации.

Предлагаемый прием регистрации алкилирования оказался весьма чувствительным. Он позволил обнаружить заметное алкилирование и в гибриде ДНК  $\text{trp9G}$  с  $\text{trp8GRCl}$  без восстановления последнего боргидридом (рис. 5, 3, 11).

Если предположить, что  $K_0'$  для  $\text{trp8GRCl}$  (I) (рис. 16) близка к константе образования этилениммониевого катиона из 4-(N-2-хлорэтил-N-метил)аминобензальдегида ( $\tau_{1/2}$ , ~150 ч при 40°С) [9], то за 20 ч инкубации при 37°С степень алкилирования и последующей фрагментации  $\text{trp9G}$  не должна превышать 10%. Из рис. 5 (11) видно, что заметная часть ДНК  $\text{trp9G}$  фрагментируется после взаимодействия с  $\text{trp8GRCl}$  даже без восстановления последнего боргидридом натрия. Глубина реакции демонстрирует близкую расчетной реакционную способность RCl (I) в комплементарном комплексе.

Этим методом также идентифицируется адресованное алкилирование G-последовательностей в ДНК  $\text{trp9G}$  реагентом  $\text{trp8GRCl}$  без предварительной гибридизации лигандов перед восстановлением RCl группы реагента (см. рис. 16) и при действии на матрицу реагента  $\text{trp8GRCl}$ , восстановленного боргидридом до взаимодействия с  $\text{trp9G}$ -ДНК (рис. 5, 12, 13).

Анализируя данные (рис. 5, 6, 7, 15, 16), можно обнаружить следы рас-

щепления  $\text{mp}8\text{G}$ -ДНК в реакции с реагентом  $\text{mp}8\text{GRCl}$ , не имеющим с ней комплементарных последовательностей. Причем реакция в отсутствие мочевины протекает заметно глубже. Можно предпологать, что это расщепление является следствием незначительного комплексообразования небольшой доли последовательностей  $\text{mp}8\text{GRCl}$  с векторными последовательностями ДНК  $\text{mp}8\text{G}$ . Причиной этого может быть как наличие комплементарных векторной ДНК последовательностей в реагенте, так и статистическое алкилирование вне комплекса. В пользу первой причины кроме влияния денатурирующего агента свидетельствует некоторое уменьшение ЭФ-подвижности  $\text{mp}8\text{G}$ -ДНК, инкубированной с  $\text{mp}8\text{GRCl}$ , по сравнению с исходной ДНК  $\text{mp}8\text{G}$ , вероятно, вследствие незначительного комплексообразования ДНК  $\text{mp}8\text{G}$  с  $\text{mp}8\text{GRCl}$ .

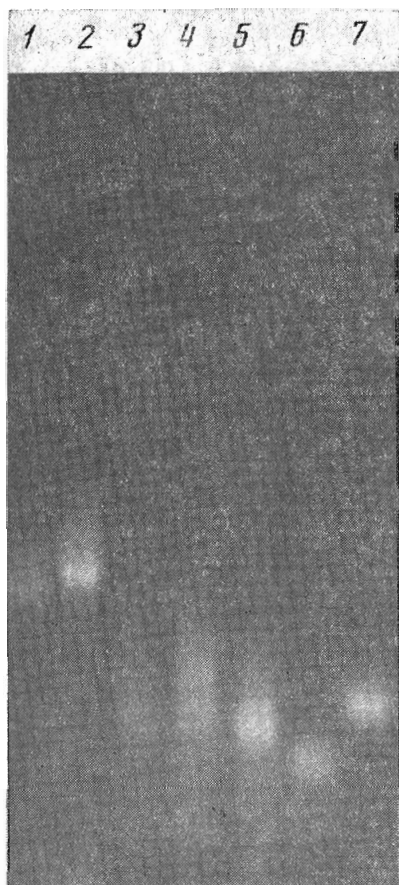


Рис. 6. Анализ ДНК продуктов элиминирования G-последовательности. Продукт гибридизации ДНК  $\text{mp}9\text{G}$  и  $\text{mp}8\text{G}$  (1); продукт алкилирования ДНК  $\text{mp}9\text{G}$  реагентом  $\text{mp}8\text{GRCl}$  (2), он же после инкубации в условиях фрагментации (3); гибридизация продуктов элиминирования (3) с ДНК  $\text{mp}8\text{G}$  (4) и  $\text{mp}8\text{G}$  (5); ДНК  $\text{mp}8$  (6); ДНК  $\text{mp}9\text{G}$  (7)

активности после нескольких генераций мутантных фагов и плазмид. Наши данные показывают, что в условиях образования  $D$ -петли в 40% формамиде и последующего алкилирования в заметной степени протекает статистическая деградация ДНК.

Таким образом, изучаемый тип полиалкилирующих реагентов со статистическим распределением алкилирующих группировок вдоль полинуклеотида может быть использован для направленного элиминирования заданных последовательностей, а также для выявления биологически значимых модификаций среди множества возможных.

Авторы выражают искреннюю благодарность Т. И. Тихоненко, Б. С. Народицкому и А. Я. Янулайтису за любезно предоставленные препараты.

Ранее изучалась комплементарно адресованная фрагментация денатурированных ДНК фага T7 и фага  $\lambda$  вблизи  $\text{oligo(dT)}$ - и  $\text{oligo(dA)}$ -трактов [11, 13], но применяемые условия апуринизации при pH 6 и затем фрагментации вызывали значительное (до 20%) неспецифическое расщепление. Этот же прием с расщеплением в 1 М пиперидине, как это принято при секвенировании ДНК, использован для определения точки алкилирования в комплементарных комплексах алкилирующих производных поли- и олигонуклеотидов с концевыми модифицирующими группировками [14]. В этой работе неспецифичное расщепление не анализировалось. Очевидно, что для коротких анализируемых в этом случае полинуклеотидов вероятность расщепления на 1–2 порядка ниже, чем плазмидных и фаговых ДНК.

Отметим, что в работах [8, 11], в которых ранее применяли полиалкилирующие полинуклеотиды для получения ген-специфичных мутаций *in vitro*, предмутацонных модификаций в комплексах (матрица-реагент) не исследовали. О протекании алкилирования в гибридах судили по отсутствию их денатурации в 60% формамиде и по мутационным событиям с потерей биологической

## Экспериментальная часть

В работе использовали плазмиду рASP (9,1 т.п.о.), содержащую A-PstI-фрагмент онкогена аденовируса обезьяны SA7, любезно предоставленную Б. С. Народицким (ИПМБ ВАСХНИЛ); штамм *E. coli* JM103, бактериофаги M13mp8 и mp9 (PL, Швеция); эндонуклеазы Cfr9I (НПО «Фермент», Вильнюс), PstI (НИКТИ БАВ, Бердск); T4-ДНК-лигазу и T4-полинуклеотидкиназу (НПО «Фермент», Вильнюс), протеиназу К (Serva, ФРГ), ДНКазу II селезенки быка (Sigma, США); сефадекс G-50, супертонкий, акриламид (Pharmacia, Швеция), трис-HCl, агарозу типа II (Sigma, США), бакто-агар, бакто-триптон и дрожжевой экстракт (Difco, Англия). TFP синтезировали по методу [15]. Использован формамид (Fluka, ФРГ), депонируемый на амберлите MB-3 (Serva, ФРГ). Остальные реактивы имели квалификацию ос.ч. или х.ч.

Для получения рекомбинантных фагов M13mp8G и mp9G, 0,5 мкг ДНК плазмиды рASP гидролизвали 1 ч при 37°С с 5 ед. акт. эндонуклеазы Cfr9I и 5 ед. акт. PstI в 10 мкл буфера (5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,05 М NaCl, 5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,05% триптон X-100; 0,01 М трис-HCl, pH 8,0), смешивали с 0,5 мкг гидролизованых аналогично двухцепочечных ДНК M13mp8 или mp9 и инкубировали 18 ч при 15°С в присутствии 10 ед. акт. ДНК-лигазы в 10 мкл буфера: 0,07 мМ АТФ; 0,04 мМ дитиотреит; 0,07 М трис-HCl, pH 7,5.

Клетки *E. coli* JM103 трансформировали по методу [16], ДНК рекомбинантных фаговых клонов анализировали по ЭФ-подвижности и рестрикционным анализом.

ДНК mp8G и mp9G выделяли в препаративных количествах по методу [16]. Дальнейшую очистку ДНК проводили, добавляя к 5 ОЕ<sub>260</sub> фаговой ДНК в 1 мл 0,05 М трис-HCl (pH 7,5), 10 мкл суспензии бентонита, подготовленного по методу [17], с последующим центрифугированием. Затем добавляли к супернатанту 20 мкл 0,5 М EDTA и 100 мкл 2 М NaCl и осаждали ДНК этанолом (2,5 объема).

**Получение mp8G<sup>f</sup>.** К раствору 4 ОЕ<sub>260</sub> ДНК mp8G в 1 мл буфера (0,1 М NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,05 М натрий-ацетат, pH 5,0) добавляли 10 мкл раствора ДНКазы II (2 мг/мл в 50% глицерине), инкубировали 30 мин при 37°С, добавляли равный объем 0,02 М EDTA, прогревали 2 мин при 100°С, раствор обрабатывали суспензией бентонита и нуклеотидный материал осаждали этанолом (2,5 объема). [5'-<sup>32</sup>P]mp8G<sup>f</sup> получали по методу [11]; размер фрагментов ДНК оценивали по ЭФ-подвижности в 20% ПААГ. Выход ДНК mp8G<sup>f</sup> - 3 ОЕ<sub>260</sub> (75%).

**Получение mp8GRCI.** К 2 ОЕ<sub>260</sub> ДНК mp8G<sup>f</sup> в 0,5 мл 10 мМ трис-HCl (pH 7,5) добавляли 0,5 мл 1,5 мМ раствора TFP в метаноле, инкубировали 20 мин при 22°С и осаждали, добавив 0,1 мл 2 М NaCl и 2 объема этанола. После трехкратного переосаждения этанолом осадок растворяли в 0,01 М трис-HCl (pH 7,5) и подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-50 (супертонкий, колонка 0,5×20 см). Степень модификации mp8GRCI (количество присоединенных Cl-групп) определяли по соотношению A<sub>350</sub>/A<sub>260</sub> при pH 7,0, принимая  $\epsilon_{350}^{RCI} = 3 \cdot 10^4$  [15] и  $\epsilon_{260}^{DNA} = 8,2 \cdot 10^3$ . Выход ДНК mp8GRCI - 1,6 ОЕ<sub>260</sub> (80%). <sup>32</sup>P-Меченый mp8GRCI получали, как указано выше, на основе [5'-<sup>32</sup>P]mp8G<sup>f</sup>.

**Гибридизация и алкилирование в комплексе mp9G-ДНК-mp8GRCI.** 1 ОЕ<sub>260</sub> ДНК mp9G в 0,2 мл 0,05 М трис-HCl (pH 7,5) прогревали 3 мин при 100°С, быстро охлаждали до 0°С и добавляли 0,5 мл 10 М мочевины, затем 5 ОЕ<sub>260</sub> mp8GRCI в 0,2 мл трис-HCl (pH 7,5) и 0,1 мл буфера А (2 М NaCl, 0,01 М EDTA, 0,5 М трис-HCl (pH 7,5)). Смесь выдерживали 12 ч при 37°С, добавляли 0,1 мл 0,1 М NaBH<sub>4</sub> в 0,05 М трис-HCl (pH 7,5) и инкубировали 8 ч при 37°С. Комплекс осаждали 2,5 объема этанола и анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле.

**Фрагментация алкилированных ДНК.** Комплекс 2 ОЕ<sub>260</sub> mp9G-ДНК-mp8GRCI (или mp9G-ДНК-mp8G<sup>f</sup>) растворяли в 0,2 мл буфера Б (0,1 М KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ EDTA, 0,05 М лизин, 0,05 М трис-HCl, pH 7,5), инкубировали 3,5 ч при 70°С и осаждали 2,5 объема этанола. Продукты фрагментации анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле.

Комплексы (матрица-реагент) денатурировали двумя способами: 1) 4 ОЕ<sub>260</sub> ДНК в 1 мл 0,2 М NaOH инкубировали 20 мин при 18°С; 2) 4 ОЕ<sub>260</sub> ДНК в 1 мл 0,2 М трис-HCl, pH 7,4, содержащего 60% формамида, инкубировали 15 мин при 60°С. Продукты денатурации анализировали по ЭФ-подвижности в 1% агарозном геле (0,04 М трис-ацетатный буфер, pH 8,0) по методу [18].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гринева Н. И. // Аффинная модификация биополимеров/Ред. Кнорре Д. Г. Новосибирск: Наука, 1983. С. 187-211.
2. Salganik R. I., Dianov G. L., Ovchinnikova L. P., Voronina E. N., Kokoza E. B., Mazin A. V. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 5. P. 2796-2800.
3. Knorre D. G., Vlasov V. V. // Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 1985. V. 32. P. 291-320.
4. Кнорре Д. Г., Власов В. В. // Успехи химии. 1985. Т. 54. № 9. С. 1420-1447.
5. Власов В. В., Годовиков А. А., Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 276. № 5. С. 1263-1265.
6. Власов В. В., Горн В. В., Кутявин И. В., Юрченко А. В., Шарова Н. К., Букринская А. Г. // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. 1984. № 11. С. 36-41.



7. Лопарев В. Н. Анализ и клонирование ДНК высокоонкогенного аденовируса обезьян SA7(c8): Дис. ... канд. биол. наук. М.: Институт вирусологии АМН СССР, 1982.
8. Мазин А. В., Дианов Г. Л., Овчинникова Л. П., Салганик Р. И. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 268. № 4. С. 979-982.
9. Беликова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринева Н. И., Зарыгова В. Ф. // Кнорре Д. Г., Теплова Н. М. // Молекулярн. биология. 1970. Т. 4. № 1. С. 30-35.
10. Бенимецкая Л. З., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Пичко Н. П., Чимитова Т. А. // Биоорг. химия. 1977. Т. 3. № 7. С. 903-913.
11. Бенимецкая Л. З., Герасимова Л. Н., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. // Молекулярн. биология. 1978. Т. 12. № 5. С. 988-1001.
12. Махат А. М., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499-560.
13. Крынецкий Е. Ю., Гринева Н. И., Соколенко А. А., Пословина А. С., Салганик Р. И., Герасимова Л. М., Ямковой В. Я., Карпова Г. Г. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. № 9. С. 1199-1206.
14. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плетнев М. Г., Подымигогин М. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 240-247.
15. Галла А. А., Курбагов В. А., Мустаев А. А., Шишкин Г. В. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1979. Вып. 2. № 2. С. 99-104.
16. Messing J. // Meth. Enzymol. 1983. V. 101. Part C. P. 20-77.
17. Векстерн Т. В., Ли Л., Крутилина А. И., Аксельрод В. Д., Мирзабеков А. Д., Баев А. А. // Молекулярн. биология. 1968. Т. 2. № 4. С. 597-611.
18. Манниатис Т., Фрич Э., Сэлбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 157-185.

Поступила в редакцию

16.VI.1987

После доработки

11.IV.1988

**COMPLEMENTARY ADDRESSED ELIMINATION OF E1a REGION  
OF SIMIAN ADENOVIRUS SA7 ONCOGENE FROM CIRCULAR  
SINGLE-STRANDED DNA OF M13 RECOMBINANT PHAGES**

SATS N. V., SURIN V. L., ZHUKOVA E. L., GRINEVA N. I.

*Central Institute of Hematology and Blood Transfusion, Moscow*

The G fragment of the simian adenovirus SA7 oncogene corresponding to E1a region was cloned into M13mp8 and M13mp9 phages. Single-stranded DNAs of the recombinant phages thus obtained (mp8G and mp9G) partially digested with DNase II were used to synthesize polyalkylating derivatives capable of specific hybridisation and subsequent alkylation of complementary G sequences of corresponding phage DNAs. After incubation of complementary alkylated DNA in the presence of lysine, the preselected region (G fragment) was specifically eliminated without damaging vector sequences. The method of complementary-addressed cleavage proved to be useful for precise analysis of reactions of polyalkylating derivatives within complementary complexes.