

## НЕЛИНЕЙНОЕ ЛАЗЕРНОЕ РАЗРЕЗАНИЕ РНК, СЕЛЕКТИВНОЕ ПО НАБОРУ ОСНОВАНИЙ

Л.З.Бенимецкая, Н.В.Булычев<sup>1)</sup>, А.Л.Козионов,  
А.В.Лебедев<sup>1)</sup>, Ю.Е.Нестерихин, С.Ю.Новожилов,  
С.Г.Раутиан, М.И.Штокман

Хромофорная группа (дансил) химически присоединена к малому фрагменту ДНК (олигонуклеотиду) (*pT*)<sub>n</sub>. В присутствии этого соединения молекулы синтетической РНК разрезаются излучением азотного лазера селективно по набору оснований РНК. Эффект объясняется безрадиационным переносом на РНК энергии двухфотонного возбуждения связанного красителя.

Селективная фотомодификация макромолекул представляет большой интерес для физики макромолекул, биофизики, биохимии, молекулярной биологии. Особый интерес вызывает фотомодификация (в том числе разрыв цепей) нуклеиновых кислот (НК) на участках с заданной последовательностью оснований. Сложность обеспечения селективности по участку макромолекулы обусловлена тем, что мономерные остатки какого либо типа многократно повторяются в разных участках макромолекулы.

Для воздействия на заданный участок НК разработан подход комплементарно-адресованной модификации<sup>1, 2)</sup>. Реакционная группировка химически присоединяется к адресу-олигонуклеотиду с последовательностью оснований, комплементарной заданной. Уотсон-криковский комплекс образуется таким олигонуклеотидом с заданным участком НК, который модифицируется реакционной группировкой.

<sup>1)</sup> Институт органической физики АН СССР СО.

Для осуществления селективной фотомодификации к олигонуклеотиду химически присоединяется молекула красителя <sup>3</sup>. Облучение производится лазерным излучением ближней УФ области, которое НК не поглощает, а краситель поглощает квазирезонансно. Энергия ступенчатого двухквантового возбуждения красителя безрадиационно переносится на НК в радиусе 5 Å <sup>4</sup>. Передаваемая энергия (6–8 эВ) достаточна для эффективной модификации (в частности разрыва цепи) НК. Таким образом, в данном подходе <sup>3–6</sup>, названном методом двухквантовой аффинной модификации (ДАМ), специфичность связывания на макромолекуле по химическому сродству (аффинности) <sup>1, 2</sup> сочетается с высокой оптической селективностью и передачей большой энергии при квазирезонансном нелинейном возбуждении <sup>3, 4</sup>.

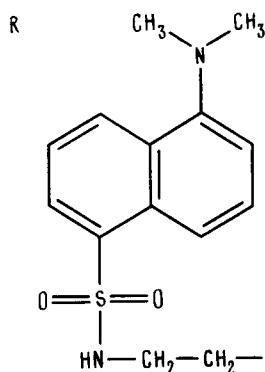


Рис. 1

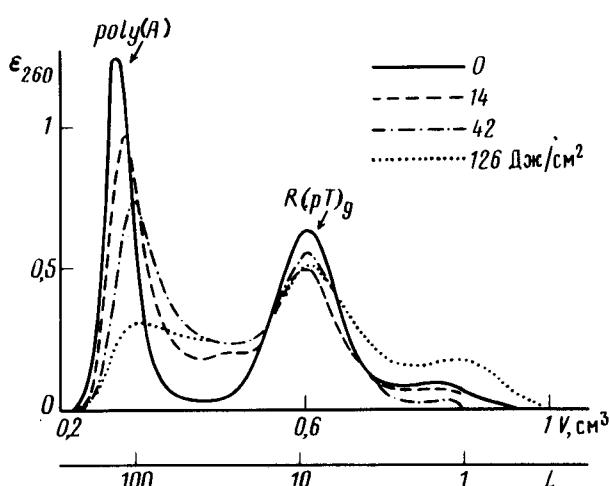


Рис. 3

Рис. 2. Пространственные зависимости оптической плотности (ОП)  $\Delta\epsilon(x)$ ,  $\lambda = 254$  нм. A, C, U отвечают трем экспериментам с поли (A), поли (C), поли (U), соответственно: 1 – до облучения; 2 – лазерное облучение (3 мин) в точке, указанной стрелкой; 3, 4, ... – записаны с интервалом 2 мин. Средние ОП кюветы:  $\epsilon_{254} = 0,6$ ;  $\epsilon_{337} = 0,09$ . Эквимолярные смеси РНК с  $R(pT)_g$ ,

Рис. 3. Гель-фильтрация поли (A) +  $R(pT)_g$  (в эквимолярной смеси). Оптическая плотность  $\epsilon_{260}$  как функция объема элюента  $V$  (колонка  $0,3 \times 25$  см; Sephadex G-100). Ориентировочные длины молекул  $L$  даны в числах оснований; дозы, полученные различными образцами, – в Дж/см<sup>2</sup>

Физические основы метода ДАМ подтверждены в модельных экспериментах с неадресованным красителем, спонтанно встраивавшимся в двойную спираль ДНК (случайно по ее длине); установлено явление нелинейного лазерного разрезания (НЛР) ДНК (фрагментация молекул ДНК) <sup>5–7</sup>.

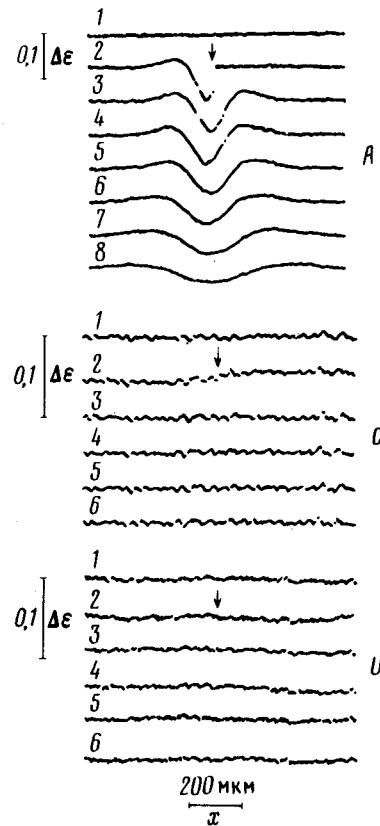


Рис. 2

В данной работе впервые обнаружено НЛР РНК, селективное по набору оснований, с применением адресованного красителя. Последний имел структуру  $R(pT)_9$ , где радикал R (рис. 1), включающий хромофорную группу – дансил, связан с фосфатом на 5'-конце олигонуклеотида ( $pT$ )<sub>9</sub>, содержащего девять остатков тимина и адресованного, таким образом, на последовательности ААААА ... А в НК. В качестве НК для данных опытов служили гомогенные (содержащие основания только одного типа) синтетические РНК, из которых адрес комплементарен и образует комплексы только с поли (A); контролем были поли (C) и поли (U).

Для исследования НЛР применены стандартная биохимическая методика гель-фильтрации и эффект светоиндуцированной диффузии (СИД) НК<sup>8, 9</sup>. Последний состоит в том, что фрагменты молекул НК, образовавшиеся в процессе НЛР, диффундируют из зоны облучения быстрее, чем целые молекулы из соседних областей успевают туда проникнуть. В итоге возникает пространственная модуляция  $\Delta\epsilon(x)$  оптической плотности (ОП) НК с минимумом в облученной зоне и подъемом в соседних областях;  $\Delta\epsilon$  прямо пропорциональна количеству разрезанных молекул (при  $|\Delta\epsilon| \ll 1$ ).

Работа проводилась при 19°C; буфер: 10 mM трис · HCl, pH = 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 M NaCl. Установка и ход экспериментов по СИД были, в основном, такими же, как и в<sup>8, 9</sup>. Размеры облучаемого лазером (ЛГИ-21) объема раствора: вдоль пучка  $\Delta y = 1$  мм, вертикальный  $\Delta z = 0,8$  см, поперечный  $\Delta x = 80$  мкм; средняя мощность излучения на кювете 1,4 МВт, импульсная плотность мощности 70МВт/см<sup>2</sup>. Результаты представлены на рис. 2. В случае поли (A) эффект СИД ярко выражен:  $|\Delta\epsilon| \sim 0,1$ ; пространственный интеграл  $\int \Delta\epsilon(x) dx$  с хорошей точностью равен нулю, свидетельствуя о том, что причина изменения ОП – именно НЛР, а не деградация хромофоров. В контроле (поли (C), поли (U)) эффект СИД полностью отсутствует. Видимые мелкомасштабные флуктуации  $|\Delta\epsilon| < 10^{-3}$ , существовавшие и до облучения, объясняются неоднородностями кювет. Укажем, что СИД на уровне  $|\Delta\epsilon| > 10^{-3}$  была бы уже заметна, так что селективность СИД (а, следовательно, и НЛР) по набору оснований составляет, как минимум, два порядка.

Дополнительное подтверждение того, что НЛР индуцируется красителем, связанным с РНК, дало согласие с теорией измеренной зависимости величины эффекта ( $\Delta\epsilon$ ) от концентрации красителя. Специфичность НЛР доказывается также конкурентным ингибирированием: в равновесной смеси поли (A) +  $R(pT)_9$ , + ( $pT$ )<sub>9</sub>, при фиксированных концентрациях первых двух компонентов и избытке третьего эффект подавлялся. Установлена квадратичная зависимость величины эффекта от мощности излучения, что согласуется с ненасыщенным ступенчатым возбуждением.

Гель-фильтрацией анализировались образцы РНК, облученные при плотности мощности 150 МВт/см<sup>2</sup> (источник – лазер ЛГИ-21). С ростом дозы облучения распределение молекул поли (A) по размерам (рис. 3) сильно сдвигается в сторону малых длин, исходные и длинные молекулы исчезают. По оценке скорости разрезания РНК этот эксперимент согласуется с данными СИД. В контроле (поли (C) +  $R(pT)_9$ , поли (U) +  $R(pT)_9$ , и поли (A) без  $R(pT)_9$ , существенных изменений распределения РНК не было).

Итак, с применением адресованного красителя обнаружено НЛР РНК, его селективность по набору оснований обусловлена специфичностью комплементарных комплексов Уотсона-Крика. НЛР индуцируется различными красителями (ср. с<sup>5-7</sup>), что свидетельствует в пользу переноса возбуждения с красителя на НК<sup>4</sup> как универсальной основы явления.

Авторы благодарны Д.Г.Кнорре за принципиальное участие в постановке задачи, полезные обсуждения и неизменную помощь в работе.

#### Литература

1. Grineva N.I., Karpova G.G. FEBS Lett., 1973, 32, 351.
2. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М. Карпова Г.Г., Кнорре Д.Г., Пичко Н.П., Райт А.С., Стефанович Л.Е., Биоорганическая химия, 1981, 7, 1512.

3. Раутиан С.Г., Штокман М.И. Труды 7 Вавиловской конференции по нелинейной оптике, ч. 2, 1982, Новосибирск, с. 148.
4. Stockmann M.I. Phys. Lett., 1980, 76A, 191.
5. Штокман М.И., Пархоменко А.И. Труды 6 Вавиловской конференции по нелинейной оптике, ч. 2, 1979, Новосибирск, с. 85.
6. Пархоменко А.И., Раутиан С.Г., Штокман М.И. ДАН СССР, 1980, 250, 225.
7. Бенимецкая Л.З., Козионов А.Л., Новожилов С.Ю., Штокман М.И. ДАН СССР, 1983, 272, №1 (в печати).
8. Козионов А.Л., Новожилов С.Ю., Соловьев В.Е., Штокман М.И. Письма в ЖЭТФ, 1980, 31, 606; Автометрия 1981, №6, 73.
9. Бенимецкая Л.З., Верниковский В.В., Козионов А.Л., Новожилов С.Ю., Соловьев В.Е., Штокман М.И. Цит. сборник 3, с. 190.

Институт автоматики и электрометрии  
Академии наук СССР  
Сибирское отделение

Новосибирский институт органической химии  
Академии наук СССР  
Сибирское отделение

Поступила в редакцию  
6 августа 1983 г.