

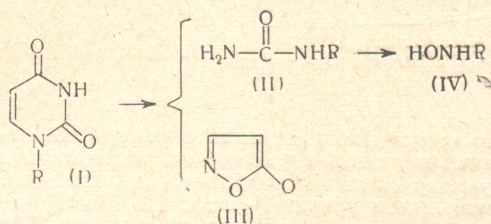
УДК 547.963.32

ХИМИЯ

Э. И. БУДОВСКИЙ, В. Д. ДОМКИН,  
член-корреспондент АН СССР Н. К. КОЧЕТКОВ

### О МЕХАНИЗМЕ РЕАКЦИИ ГИДРОКСИЛАМИНА С УРАЦИЛЬНЫМ ЯДРОМ

Действие гидроксиламина (ГА) на нуклеиновые кислоты и их компоненты широко используется при структурных и функциональных исследованиях нуклеиновых кислот (1, 2). Ранее было показано, что ГА в различных условиях реагирует с урацильным и цитозиновым (1-5), а также адениновым (6) ядрами как в составе нуклеозидов, так и в полинуклеотидах. В то время как механизм реакции ГА с цитозиновым ядром удалось в значительной мере выяснить (7), для реакции ГА с урацильным ядром известно лишь, что в общем виде это превращение при pH 10 и высокой концентрации ГА можно описать следующей схемой (8):



где R — остаток рибозы или дезоксирибозы. Совершенно ясно, что образование рибозилмочевины (II) и изоксазолон (III) является результатом многостадийной реакции, однако направление первичной атаки ГА на урацильное ядро и механизм дальнейших превращений промежуточных продуктов оставались невыясненными. Между тем, сведения о механизме реакции являются крайне существенными при практи-

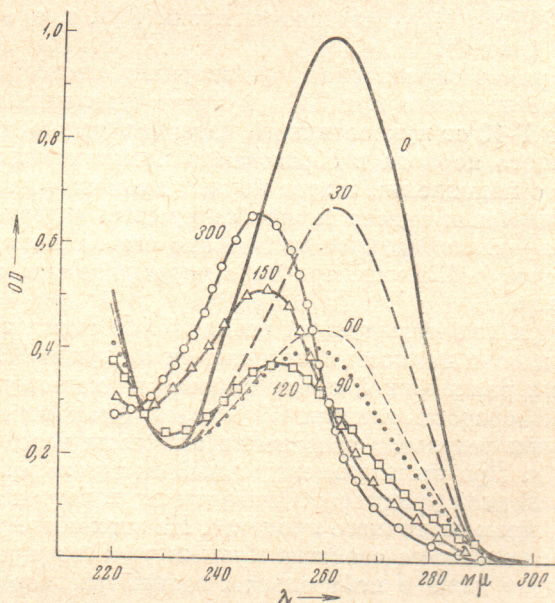


Рис. 1. Спектры реакционной смеси уридин-5'-фосфата ( $5 \cdot 10^{-2} M$ ) с  $2,0 M$  водным раствором гидроксиламина (pH 8,0; 30°; смесь  $1 \cdot 10^{-3} M$  по версену). Спектры сняты после разбавления аликвот водой (0,1 мл до 50 мл). Цифры справа от кривых — время в минутах от начала реакции

ческим использованием гидроксиламина для химической модификации нуклеиновых кислот и для трактовки результатов при функциональных и структурных исследованиях, проводимых с применением этого реагента



(<sup>2</sup>). Принимая во внимание структуру изоксазолон-3 (III), можно было предположить лишь, что первичная атака совершается либо аминогруппой ГА по С<sup>(5)</sup> — С<sup>(6)</sup> двойной связи (<sup>9</sup>, <sup>10</sup>), либо гидроксильной группой ГА по С<sup>(4)</sup> урацильного ядра (<sup>11</sup>). Для выяснения механизма реакции необходимо было изучить структуру и свойства промежуточного продукта реакции.

Нам удалось показать, что при pH ≤ 8 и относительно низкой концентрации гидросиламина (1–2 M) нарушение ароматичности урацильного ядра, что видно по падению оптической плотности при λ > 270 мμ, не сопровождается одновременным сдвигом максимума в коротковолновую сторону и увеличением плотности

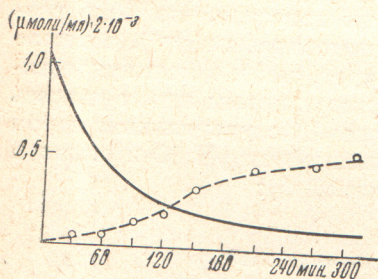


Рис. 2

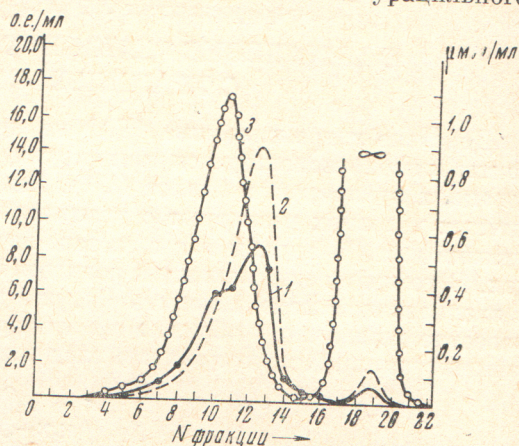


Рис. 3

Рис. 2. Изменение во времени концентрации в реакционной смеси (см. рис. 1) уридин-5'-фосфата (сплошная линия, вычислена по оптической плотности при 275 мμ) и изоксазолон-3 (пунктирная линия, вычислено по оптической плотности при 247 мμ с учетом вклада неизменного уридин-5'-фосфата). Точки на пунктирной кривой — концентрация изоксазолон в смеси, определенная по результатам анализа на сефадексе Г-10 (рис. 3)

Рис. 3. Гель-фильтрация аликвот реакционной смеси (см. рис. 1) на сефадексе Г-10. 1 — оптическая плотность при 220 мμ, 2 — при 260 мμ, 3 — содержание гидросиламина во фракции (μмол/мл) после обработки 0,5 N HCl (100°, 30 мин.) (<sup>8</sup>)

при 247 мμ (λ<sub>max</sub> для изоксазолон (<sup>9</sup>)), т. е. образованием соединений II и III (рис. 1).

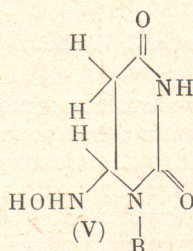
Прямое определение концентрации изоксазолон в реакционной смеси (по поглощению при 247 мμ после отделения гель-фильтрацией на сефадексе Г-10 от нуклеотидного материала также показывает наличие индукционного периода в образовании изоксазолон (рис. 2), что свидетельствует о накоплении в этот период промежуточного продукта. По спектрам реакционных смесей можно определить содержание промежуточного продукта — максимальное количество его накапливается в реакционной смеси через ~120 мин. при 30° и через двое суток при 0° (45 и 65% соответственно).

При гель-фильтрации реакционной смеси на сефадексе Г-10 изоксазолон и соли полностью отделяются от нуклеотидного материала (рис. 3). 0,4 мл реакционной смеси наносят на колонку (1,8 × 70 см) и элюируют водой, скорость элюции 0,9 мл/мин, фракции по 27 мл. На рисунке представлен результат разделения аликвоты через 120 мин. после начала реакции. При этом промежуточный продукт реакции частично отделяется от исходной уридиловой кислоты и некоторые фракции содержат более 80% промежуточного продукта. На этих обогащенных фракциях были изучены некоторые свойства промежуточного продукта: 1) промежуточный продукт даже в нейтральном водном растворе медленно отщепляет один моль гидросиламина и превращается в исходную уридиловую кислоту (рис. 4). В кислой среде (pH ≤ 1) и при нагревании это превращение идет быстро и практически количественно.



2. В спектре я.м.р. промежуточного продукта, снятом в  $D_2O$ , наблюдается интенсивный сигнал при 6,76 м.д., характерный для протонов у  $C_{(5)}$  дигидроурацильного ядра (<sup>12</sup>), сигналы, характерные для  $C_{(6)}$  — протона в урацильном ядре (8,0 м.д. (<sup>13</sup>)), практически отсутствуют.

На основании этих данных, можно с достаточным основанием считать, что промежуточный продукт реакции урацильного ядра с ГА является 6-оксиамино-5,6-дигидроурацильным производным (V).



Таким образом, по-видимому, первой стадией взаимодействия ГА с урацильным ядром, как и в случае реакции с цитозиновым ядром, является присоединение ГА по  $C_{(5)} - C_{(6)}$  двойной связи; образовавшийся аддукт далее претерпевает превращения по приведенной выше схеме.

При использовании ГА для функциональных исследований РНК необходимо учитывать лабильность образующегося модифицированного уридинового звена. По-видимому, инактивирующее действие ГА на РНК-содержащие вирусы объясняется не только образованием звеньев типа II и IV (<sup>14</sup>), но и звеньев типа V. В этом случае инкубация РНК в слабокислой среде после модификации должна привести к существенному понижению инактивации. Аналогичная реактивация при инкубации в слабокислой среде, по-видимому, должна наблюдаться и в случае других РНК, инаktivированных действием гидроксиламина при pH 7—8.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР

Поступило  
11 VI 1969

#### МОСКВА ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> J. Phillips, D. M. Brown, *Progr. in Nucleic Acids and Molecular Biology*, 7, 1967, p. 349. <sup>2</sup> N. K. Kochetkov, E. I. Budovsky, *Progr. in Nucleic Acids and Molecular Biology*, 9, 1969, p. 403. <sup>3</sup> D. W. Vewoerd, H. Kohlhage, W. Zillig, *Nature*, 192, 1038 (1961). <sup>4</sup> H. Schuster, *J. Mol. Biol.*, 3, 447 (1961). <sup>5</sup> N. K. Kochetkov, E. I. Budovsky, N. A. Simukova, *Biochim. et biophys. acta*, 55, 255 (1962). <sup>6</sup> E. L. Budovsky, E. D. Sverdlov, G. S. Monastyrskaja, *J. Mol. Biol.*, 43, 234 (1969). <sup>7</sup> Э. И. Будовский, Е. Д. Сverdlov и др., *Мол. биол.*, 2, 329 (1968). <sup>8</sup> N. K. Kochetkov, E. I. Budovsky et al., *Biochim. et biophys. acta*, 142, 35 (1967). <sup>9</sup> W. Verwoerd, W. Zillig, H. Kohlhage, *Zs. Physiol. Chem.*, 332, 184 (1963). <sup>10</sup> C. Janion, D. Shugar, *Acta Biochem. Polonica*, 12, 337 (1965). <sup>11</sup> Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский, *ДАН*, 152, 1005 (1963). <sup>12</sup> W. I. Wechter, K. C. Smith, *Biochemistry*, 7, 4064 (1968). <sup>13</sup> J. Zemlicka, F. Sorm, *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, 32, 576 (1967). <sup>14</sup> H. Schuster, H.-G. Wittmann, *Virology*, 19, 421 (1963).

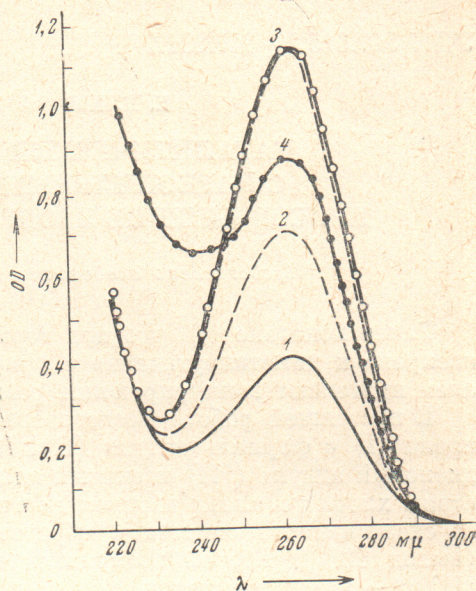


Рис. 4. Спектры фракции, обогащенной промежуточным продуктом (~70%, фракция № 10, см. рис. 3). 1 — pH 6,0; снят сразу; 2 — pH 6,0; снят через 6 час. при 20°; 3 — раствор подвергнут кислому гидролизу (0,5 N HCl, 100°, 30 мин.) и нейтрализован до pH 6,0. Точки на кривой 3 — спектр, вычисленный в предположении о количественном превращении промежуточного вещества в исходный уридин-5'-фосфат; 4 — раствор после кислого гидролиза подщелочен до pH 10,8