

УДК 621.311.12(540)

БИОХИМИЯ

Г. С. КОМОЛОВА, Э. Н. ТРИФОНОВ, И. А. ЕГОРОВ

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИЧЕСКИМ ФОРМАЛЬДЕГИДНЫМ МЕТОДОМ ДНК, ПОДВЕРГНУТОЙ γ -ОБЛУЧЕНИЮ IN VITRO

(Представлено академиком А. И. Опариным 10 II 1972)

При γ -облучении в молекулах ДНК возникает ряд повреждений, вызываемых γ -квантами либо непосредственно, либо под действием образующихся в облучаемой среде свободных радикалов.

К основным типам повреждений в γ -облученной ДНК относятся разрывы сахарофосфатной цепи (однонитевые разрывы) (^{1, 2}), химическая модификация оснований и спивки между комплементарными нитями ДНК (³⁻⁵), при больших степенях повреждения наблюдаются также двунитевые разрывы (⁶). Появление в молекуле ДНК однонитевого разрыва

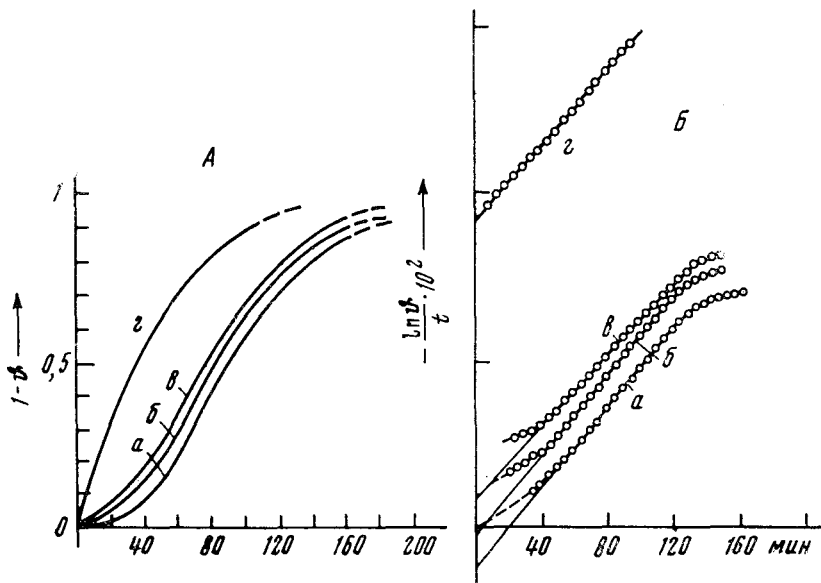


Рис. 1. Кинетические кривые (А) и их линейные анаморфозы (Б) для исходной (а) и облученной различными дозами (б — 3кр, в — 5кр) ДНК селезенки. Кривая г соответствует фрагментированной ДНК из тимуса

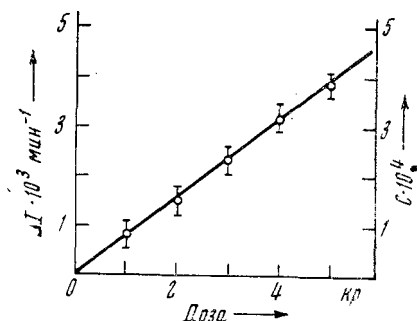
сопровождается образованием в области разрыва локально денатурированного участка — дефекта вторичной структуры ДНК (⁷). По-видимому, большая часть химических модификаций оснований также связана с такой локальной денатурацией.

Нами исследованы дефекты вторичной структуры ДНК, выделенной из тканей (тимус, селезенка) крыс, вызываемые γ -облучением in vitro (Co^{60} , 550 р/мин, в 0,03 М NaCl). Для определения дефектов вторичной структуры в молекулах ДНК мы использовали кинетический формальдегидный метод (к.ф.) (⁸⁻⁹), ранее успешно примененный для исследования локальной денатурации ДНК, вызываемой ультрафиолетовым облучени-

ем⁽⁸⁾, панкреатической ДНКазой⁽⁷⁾, РНК — полимеразой⁽¹⁰⁾ и нагреванием⁽¹¹⁾. Кинетические эксперименты выполнялись по методике, описанной в работе⁽⁸⁾ с небольшими изменениями (рН реакционной смеси 7,8, ДНК растворяли в 0,03 М NaCl). Регистрацию кинетических кривых осуществляли при помощи спектрофотометра СФ-4, оснащенного самописцем ЭПП-09.

ДНК выделяли детергентным методом⁽¹²⁾ с многократной депротеинизацией по Мармуру⁽¹³⁾. Препараты ДНК содержали белка <1% (по

Рис. 2. Дозовая зависимость изменения начальной скорости деспирализации (ΔI) и концентрации дефектов вторичной структуры (c) γ -облученной ДНК селезенки крысы. Каждая точка отвечает двум кинетическим экспериментам



Лоури), РНК 6% (орциновый метод). Молекулярный вес ДНК, определенный седиментационным методом, составил $7 \cdot 10^6$. Растворы исходной и облученной ДНК одновременно диализировали против 0,03 М NaCl.

На рис. 1 приведены кинетические кривые (А) и их линейные анаморфозы (В) для исходной ДНК селезенки (а) и ДНК, облученной различными дозами (б, в). В отличие от линейных анаморфоз для ДНК фага Т2, анаморфозы кинетических кривых для ДНК крыс искривлены в верхней части, подобно анаморфозам для ДНК тимуса телят⁽⁹⁾, что свидетельствует о блочной гетерогенности ДНК крыс⁽¹⁴⁾. Анаморфозы нелинейны также и в начальной части. Известно, что в некоторых условиях такая нелинейность наблюдается и в случае ДНК фага Т2, что не служит, однако, препятствием к применению к.ф. метода⁽⁹⁾. Действительно, как видно из рис. 1, начальная скорость деспирализации ДНК крыс возрастает под действием формальдегида по мере увеличения дозы γ -облучения. Это хорошо демонстрирует рис. 2, на котором изображена зависимость прироста начальной ординаты I линейной анаморфозы от дозы облучения (на рис. 1 приведена лишь часть соответствующих кинетических кривых).

Для определения концентрации локально денатурированных участков c , равной $\Delta I / 2v$ ⁽⁹⁾, необходимо определить кинетическую константу v , т. е. произвести градуировку метода к.ф. для данных условий опыта. Для этой цели мы использовали тимусную ДНК крыс, фрагментированную при помощи ультразвука. По данным седиментационных измерений, средняя длина фрагментов этой ДНК составляла 500 ± 100 пар нуклеотидов, что отвечает концентрации дефектов $c = \bar{I} / \bar{n} = (2 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$. На рис. 1 (кривая г) приведена кинетическая кривая (слева) и ее линейная анаморфоза (справа) для препарата фрагментированной тимусной ДНК. Исходные кинетические кривые для тимусной и селезеночной ДНК практически совпадают. Произведение кинетических параметров pv равно соответственно $(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-4} \text{ мин}^{-2}$ и $(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-4} \text{ мин}^{-2}$. Величина параметра v для ДНК крыс в выбранных условиях, определенная из опытов с фрагментированной ДНК, составляет $(5 \pm 1) \text{ мин}^{-1}$.

На правой шкале рис. 2 указаны значения концентрации дефектов c , отвечающие приведенным слева значениям ΔI . Величина v принята равной 5 мин^{-1} . Выполненные таким образом измерения показывают, что γ -облучение ДНК in vitro вызывает образование в ней локально денату-

рированных участков. Это согласуется с ожидаемым, так как, по крайней мере, одностранные разрывы в ДНК должны регистрироваться к.ф. методом как дефекты вторичной структуры (⁷). Концентрация дефектов вторичной структуры в ДНК крыс при γ -облучении *in vitro* с увеличением дозы линейно возрастает, составляя при дозе 5 кр $3,8 \cdot 10^{-4}$ (один дефект на 2600 пар нуклеотидов). Предел чувствительности к.ф. метода в данных условиях эксперимента составляет 350 р, что отвечает одному локальному расплетанию на 35000 пар нуклеотидов.

Приведенные данные свидетельствуют о применимости метода к.ф. для исследования радиационных повреждений в ДНК при сравнительно низких дозах.

По-видимому, повреждения вторичной структуры в облученной ДНК могут вызываться всеми типами радиационных повреждений первичной структуры. В таком случае к.ф. метод позволяет определять суммарное количество дефектов вторичной структуры независимо от природы соответствующих химических нарушений.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
4 II 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ U. Hagen, *Nature*, **197**, 1004 (1963). ² Н. И. Рябченко, П. И. Цейтлин, *Радиобиология*, в. 3 (1963). ³ Н. П. Крушинская, М. И. Шальнов, *Радиобиология*, в. 3 (1969). ⁴ S. Just, K. Schwarz, *Stud. biophys.*, **18**, 219 (1969). ⁵ S. Just, K. Schwarz, *Stud. biophys.*, **18**, 211 (1969). ⁶ U. Hagen, *Biochim. et biophys. acta*, **134**, 45 (1967). ⁷ Ю. А. Банников, Э. Н. Трифонов, *Мол. биол.*, **4**, 734 (1970). ⁸ Э. Н. Трифонов, Н. Н. Шафрановская и др., *Мол. биол.*, **2**, 887 (1968). ⁹ Y. S. Lasurkin, M. D. Frank-Kamenetskii, E. N. Trifonov, *Biopolymers*, **9**, 1253 (1970). ¹⁰ Y. N. Kosaganov, M. I. Zarudnaja et al., *Nature New Biol.*, **231**, 212 (1971). ¹¹ Ю. Л. Любченко, Э. Н. Трифонов и др., *Мол. биол.*, **5**, 712 (1971). ¹² E. R. Kay, N. S. Simons, A. L. Doums, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1724 (1952). ¹³ I. J. Marmur, *Mol. Biol.*, **3**, 208 (1961). ¹⁴ А. В. Шугалий, М. Д. Франк-Каменецкий, Ю. С. Лазуркин, *Мол. биол.*, **5**, 766 (1971).