

Я. И. БУРЬЯНОВ, Н. В. ЕРОШИНА, Л. М. ВАГАБОВА,
А. В. ИЛЬИН

О НАХОЖДЕНИИ 6-МЕТИЛАМИНОПУРИНА В ДНК ПЫЛЬЦЫ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 10 I 1972)

Известно, что минорные метилированные азотистые основания нуклеиновых кислот образуются на полинуклеотидном уровне в результате энзиматической модификации ⁽¹⁾.

До последнего времени в ДНК обнаруживали 5-метилцитозин (5-МЦ) и 6-метиламинопурин (6-МА), однако расширение количества анализируемых объектов позволило обнаружить в ДНК новые метилированные производные гуанина и цитозина ^(2, 3). Функциональная роль энзиматического метилирования ДНК еще не выяснена достаточно глубоко. В литературе существуют гипотезы о наличии определенных специфических функций у различных метилированных оснований в составе ДНК ⁽⁴⁾ и даже у одного и того же минора, находящегося в различных нуклеотидных последовательностях ДНК ⁽⁵⁾. Для понимания функциональной роли различных метилированных компонентов необходимы данные об их распространении среди различных групп организмов. 6-МА находят в ДНК бактерий, бактериофагов, водорослей ⁽⁴⁾, грибов ⁽⁶⁾. Кроме того, сообщалось о нахождении 6-МА в ДНК спермы млекопитающих ⁽²⁾, однако эти данные не были подтверждены ⁽⁷⁾. Опыты по включению C¹⁴-аденина в ДНК проростков высших растений позволили обнаружить на хроматограммах гидролизатов ДНК в зоне 6-МА некоторую радиоактивность, что позволяет предположить его присутствие в ДНК высших растений ⁽⁸⁾.

В настоящей работе мы сообщаем о выделении и идентификации 6-МА из ДНК пыльцы высших растений. Для анализа брали ДНК пыльцы и листьев ивы (*Salix carrea*) и березы (*Betula verrucosa*). Мужские соцветия и листья собирали во второй половине мая 1971 года. Соцветия подсушивали на воздухе в течение 2 дней, выпавшую пыльцу просеивали через сито и многократно обрабатывали экстракцией спиртом. Пыльцу смачивали 0,75 N раствором NaOH, растирали со стеклянным порошком и проводили выделение ДНК по методу Шмидта и Танхаузера ⁽⁹⁾ в модификации Ванюшина ⁽¹⁰⁾. Замороженные в жидком азоте листья измельчали в тонкий порошок на криодезинтеграторе и ДНК выделяли по той же методике. Для исключения возможности загрязнения препаратов ДНК полирибонуклеотидами выделенную ДНК обрабатывали 0,5 N NaOH при 37° в течение 18 час. Гидролиз ДНК проводили в 72% HClO₄ в течение 1 часа при 100°. Для препаративного выделения 6-МА отфильтрованный через стеклянный фильтр гидролизат (около 400 оптических единиц при 260 мμ) наносили в 0,1 N HCl на колонку (1 × 15 см) с дауэксом 50 × 12, после чего ее промывали 0,1 N HCl до полного элюирования тимина. Элюцию остальных азотистых оснований вели в линейном градиенте HCl (250 мл 1 N HCl + + 250 мл 4 N HCl) в последовательности цитозин + 5-МЦ, гуанин, аденин + 6-МА. Фракцию аденин + 6-МА упаривали в вакуумном ротормом испарителе и хроматографировали на бумаге. Хроматографию использовали для разделения азотистых оснований и очистки 6-МА, как описано ранее ⁽⁶⁾. Очищенный 6-МА элюировали 0,01 N HCl и идентификацию прово-

дили снятием у.-ф. спектров поглощения в кислой и щелочной среде, бромированием и по величинам отношений абсорбции при разных длинах волн ⁽¹¹⁾. У.-к. спектры выделенного метилированного основания из ДНК пылцы сходны с аналогичными спектрами синтетического препарата 6-МА (фирма «Calbiochem», США) (рис. 1.). Мы также провели сравнение масс-спектров синтетического 6-МА с выделенным препаратом из ДНК пылцы пвы. Подготовку образцов производили так же, как это описано ранее ⁽⁶⁾. Масс-спектры снимали на масс-спектрометре ЛКВ-9000 с вводом образца непосредственно в ионный источник при 70 эв и 80°. Полученные масс-спектры также свидетельствовали об идентичности препаратов 6-МА (массы молекулярных ионов равны 149). Для количественного определения азотистых оснований использовали расчетные коэффициенты, приведенные в литературе ⁽¹⁰⁾. Данные по составу азотистых оснований ДНК пылцы и листьев 2 изученных объектов приведены в табл. 1. Из нее видно, что в качестве метилированных оснований в ДНК пылцы присутствуют 5-МЦ и 6-МА. В ДНК листьев обнаруживается только 5-МЦ. Особых различий в количественном содержании 5-МЦ между ДНК пылцы и листьев не установлено. Найдено, что количество 5-МЦ в ДНК исследованных растений несколько ниже по сравнению с количеством 5-МЦ в ДНК других изученных высших растений ⁽⁴⁾. Количество 6-МА в ДНК пылцы находится в пределах величин, обнаруженных для ДНК различных микроорганизмов ⁽⁴⁾. При выборе объектов для анализа ДНК высших растений мы руководствовались следующими обобщенными критериями. Во-первых, 6-МА до сих пор обнаруживали в ДНК малодифференцированных, часто гаплоидных организмов

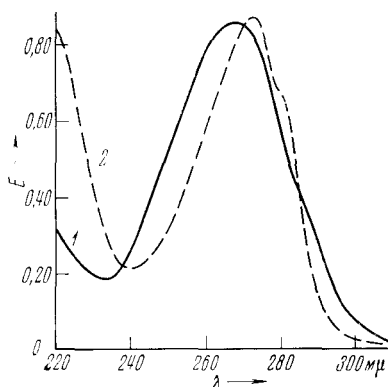


Рис. 1. У.-ф. спектр поглощения 6-МА, выделенного из ДНК пылцы *Salix carrea*. 1 — в 0,1 N HCl, 2 — в 0,1 N КОН

Таблица 1

Состав азотистых оснований ДНК пылцы и листьев высших растений

Объект	Основания, мол. %						
	Г	А	Ц	Т	5-МЦ	6-МА	Г+Ц+ +5-МЦ
<i>Salix carrea</i>							
пыльца	17,20	30,71	16,44	33,41	1,96	0,23	35,6
листья	17,52	32,64	15,55	32,35	1,94	—	35,0
<i>Betula verrucosa</i>							
пыльца	18,82	31,82	16,55	30,15	2,51	0,22	37,9
листья	17,38	32,06	14,80	33,49	2,16	—	34,3

⁽⁴⁾. Во-вторых, существуют данные о том, что 6-МА играет важную роль в явлениях модификации ДНК и сообщает устойчивость чужеродным ДНК при их вхождении в клетку у микроорганизмов ⁽¹²⁾. Клетки пылцы представляют гаплофазу в развитии высших растений, и они участвуют в оплодотворении, где возможна рестрикция чужеродного генетического материала.

Таким образом, ДНК пылцы как объект для поисков 6-МА удовлетворяла перечисленным критериям и 6-МА действительно в ней содержится. В связи с этим, тот факт, что мы не смогли определить 6-МА в ДНК ли-

стьев, еще не свидетельствует об отсутствии там 6-МА. Следует учесть, что использованный в настоящей работе метод позволяет выделять суммарную ДНК, а так как в количественном отношении преобладает ядерная ДНК, она приведет к значительному разбавлению ДНК из других оргanelл. Вместе с тем по характеру метилирования ДНК ядер и ДНК хлоропластов различаются. Так, например, в ДНК хлоропластов высших растений 5-МЦ не обнаружен, а о содержании в ней 6-МА нет данных ⁽¹³⁾. В то же время хлоропласты по структуре ДНК и рибосом имеют большое сходство с бактериями ^(14, 15).

Следовательно, рассмотренные критерии присутствия 6-МА применимы к ДНК из хлоропластов. Не исключено, что 6-МА проростков высших растений ⁽⁸⁾, предварительно обнаруженный по радиоактивности, мог принадлежать ДНК хлоропластов. Предварительные опыты по анализу ДНК хлоропластов высших растений позволяют высказать предположение о присутствии в ней 6-МА. Исследования в этом направлении продолжаются.

Авторы приносят благодарность Б. В. Розынову за помощь при снятии масс-спектра 6-МА и член-корреспонденту АН СССР Г. К. Скрыбину за постоянное внимание и поддержку.

Институт биохимии
и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
6 I 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Gold, J. Hurwitz, M. Anders, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **11**, 107 (1963).
- ² G. Unger, H. Venner, *Hoppe-Seyler's Zs. physiol. Chem.*, **344**, 280 (1966).
- ³ L. A. Culp, E. Dore, G. M. Brown, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **136**, 73 (1970).
- ⁴ Б. Ф. Ванюшин, *Усп. совр. биол.*, **65**, 163 (1968).
- ⁵ B. F. Vanyushin, Ya. I. Buryanov, A. N. Belozersky, *Nature New Biol.*, **230**, 25 (1971).
- ⁶ Я. И. Бурьянов, А. В. Ильин, Г. К. Скрыбин, *ДАН*, **195**, 728 (1970).
- ⁷ B. F. Vanyushin, S. G. Tkacheva, A. N. Belozersky, *Nature*, **225**, 948 (1970).
- ⁸ Б. Ф. Ванюшин, Д. Х. Кадырова и др., *Биохимия*, **36**, 1251 (1971).
- ⁹ G. Schmidt, S. J. Thanhauser, *J. Biol. Chem.*, **161**, 83 (1945).
- ¹⁰ Б. Ф. Ванюшин, В сборн. *Современные методы в биохимии*, **1**, М., 1964.
- ¹¹ Т. В. Венкстерн, А. А. Баев, *Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонуклеиновых кислот*, М., 1967.
- ¹² В. Арбер, Д. Д. Смит, *Тез. докл. IX Международн. конгресса по микробиологии*, М., 1966, стр. 9.
- ¹³ R. Baxter, J. Kirk, *Nature*, **222**, 272 (1969).
- ¹⁴ W. S. Shipp, F. J. Kieras, R. Haselkorn, *Proc., Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 207 (1965).
- ¹⁵ S. G. Lee, W. R. Evans, *Science*, **173**, 241 (1971).