

УДК 547.963.3

ХИМИЯ

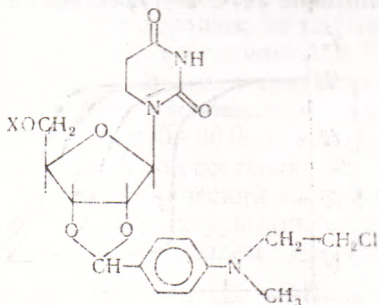
А. М. БЕЛИКОВА, Н. И. ГРИНЕВА,
член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОРРЕ, С. И. МЫЗИНА

**СПЕЦИФИЧНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ДНК ПО ОСТАТКАМ ГУАНИНА
С ПОМОЩЬЮ 2',3'-О-[4-(N-2-ХЛОРЕТИЛ-N-
-МЕТИЛАМИНО)-БЕНЗИЛИДЕН]-УРИДИНА И ЕГО
5'-МЕТИЛФОСФАТА**

При отсутствии специфических к определенным основаниям дезоксирибонуклеаз расщепление ДНК по определенным группам оснований проводится преимущественно химическими методами. Наиболее широко известны методы расщепления ДНК на олигопиримидиновые блоки после удаления пуриновых оснований в кислой среде или на олигопуриновые блоки после удаления пиримидиновых оснований гидролизом с последующим гидролизом фосфоэфирных связей в щелочной среде или с помощью аминов ⁽¹⁾.

Алкилирование пуриновых оснований резко ослабляет устойчивость гликозидной связи ⁽²⁾ и делает возможным в очень мягких условиях провести отщепление пуриновых оснований, необходимое для последующего разрыва полинуклеотидной цепи ^(3, 4). Однако большинство известных алкилирующих реагентов в соизмеримой мере алкилируют аденин, гуанин и цитозин ⁽⁵⁾.

В работе ⁽⁶⁾ было обнаружено, что 2',3'-О-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензилиден]-уридин (UCHRCl)



X = H UCHRCl

X = CH₃OPO₃⁻ МерУCHRCl

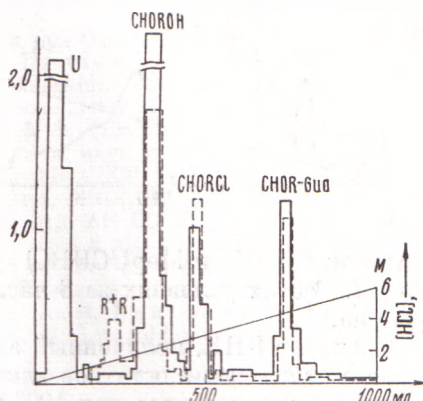
обладает повышенной селективностью к остаткам гуанина при алкилировании тРНК. В настоящей работе исследована возможность специфичного расщепления ДНК по остаткам дезоксигуанозина после алкилирования ее UCHRCl, а также изучено алкилирование ДНК водорастворимым аналогом UCHRCl — его 5'-метилфосфатом МерУCHRCl.

В работе использовали ДНК из селезенки крупного рогатого скота производства Олайнского завода химических реактивов (ЛатвССР), денатурированную нагреванием. Гиперхромный эффект 32%. UCHRCl получен по ⁽⁷⁾, МерУCHRCl получен по ⁽⁸⁾. Алкилирование ДНК UCHRCl проводили в 30% водном диоксане при 50°, алкилирование ДНК МерУCHRCl проводили в водном растворе при 40°. ДНК после алкилирования отделяли переосажденным спиртом или диализом против воды. Содержание алкилированных оснований в осажженной ДНК определяли по поглощению при 350 мμ, после обработки ДНК при 40° 0,001 N HCl в течение 60 мин., при-

нимая коэффициент экстинкции остатков алкилированных оснований равным 28,8⁽⁷⁾.

При алкилировании ДНК UCHRCI значительная часть гликозидных связей, образуемых остатками алкилгуанина*, разрывается уже в ходе алкилирования. Для определения отщепившихся остатков алкилгуанина после осаждения ДНК надосадочную жидкость упаривали, растворяли в 1 N HCl, проводили кислый гидролиз при 100° в течение 60 мин. и гидролизат хроматографировали на Дауэкс 50W×4, 100–200 меш на колонке 1×22 см в линейном градиенте концентрации HCl (0–6 N). Результаты хроматографии приведены на рис. 1. Основными веществами, обладающими поглощением при 350 мμ, т. е. содержащими остатки диалкиламинобензальдеги-

Рис. 1. Хроматография кислотного гидролизата надосадочной жидкости реакции алкилирования ДНК UCHRCI после осаждения ДНК на Дауэкс 50W×4, 100–200 меш. Сплошные линии D_{260} , штриховые — D_{350} . Размер колонки 1×22 см; смеситель 500 мл H₂O; резервуар 500 мл 6 N HCl; скорость элюции 54 мл в час, объем фракции 9 мл



да, являются непрореагировавший 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензальдегид CHORCI, продукт его гидролиза CHORON⁽⁹⁾ и продукт алкилирования реагента по его третичной аминогруппе⁽¹⁰⁾. Единственным зарегистрированным в надосадочной жидкости продуктом алкилирования гетероциклических оснований является алкилгуанин. При алкилировании ДНК МерUCHRCI продуктов разрыва гликозидной связи в надосадочной жидкости не обнаружено.

Для определения числа остатков алкилгуанина, связанных с ДНК, осажденную ДНК растворяли в 0,01 M ацетате натрия pH 6,0 и нагревали при 60° в течение 8 час., в условиях, практически исключающих отщепление немодифицированных пуриновых оснований. Затем ДНК осаждали спиртом и надосадочную жидкость хроматографировали на бумаге FN-4 в системе трет.-бутанол : метилэтилкетон : конц. аммиак : вода 40 : 30 : 10 : 20. При этом обнаруживаются только алкилгуанин и уридин или уридин-5'-метилфосфат в зависимости от используемого алкилирующего реагента.

Нуклеотидный состав алкилированной ДНК после отщепления остатков алкилгуанина определяли после гидролиза в 70% HClO₄ при 100° в течение 30 мин.⁽¹¹⁾ и хроматографии на Дауэкс 50W×2 в градиенте концентраций HCl 0–6 N⁽⁶⁾. Полученные результаты приведены в табл. 1. Ни в одном из исследованных случаев не зарегистрировано продуктов алкилирования аденина и тимина.

Если реакция ДНК с UCHRCI проводилась при pH 7,0 и концентрациях реагентов соответственно 0,55 mM (в остатках нуклеотидов) и 1,1 mM с двукратной обработкой реагентом, то в этих условиях наряду с практически полным исчезновением в ДНК гуанина зарегистрирована существенная убыль цитозина, которую по аналогии с⁽⁶⁾ мы отнесли на счет образования алкилцитозина. При двукратной обработке ДНК UCHRCI при pH 6 и тех же концентрациях реагентов ни аденин, ни цитозин не алкилировались.

* 7-[β-(N-4-формилфенил-N-метиламино)-этил]-гуанин, (ср. ⁽⁶⁾) CHOR-Gua.

Тот факт, что аденин в ДНК не алкилируется, согласуется с наблюдениями на тРНК. Алкилирование цитозина в тРНК в аналогичных условиях заметно подавляется (6). Полное подавление алкилирования цитозина в ДНК при pH 6, вероятно, связано с большой концентрацией свободного CHORCl, образующегося в UCHRCI в условиях алкилирования (12). Реакция с МерUCHRCI проводилась при больших концентрациях с учетом более низкой эффективности алкилирования этим реагентом (13). Кон-

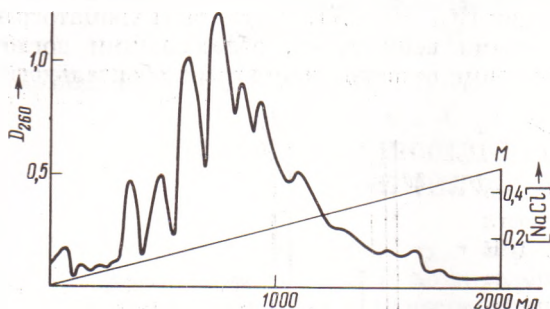
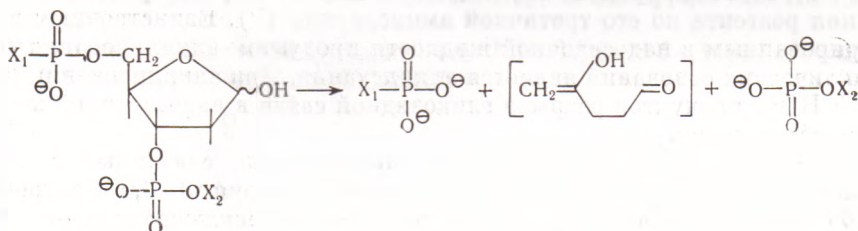


Рис. 2. Разделение дезоксирибонуклеотидов щелочного гидролизата ДНК на ДЭАЭ-целлюлозе при pH 5,5. Размер колонки 2×25 см; смеситель 1000 мл 0,01 M ацетата натрия; pH 5,5; в 7 M мочеvine; резервуар 1000 мл 0,5 M NaCl в 0,01 M ацетата натрия; pH 5,5 в 7 M мочеvine; скорость элюции 1 мл/мин, объем фракций 10 мл

центрации ДНК и МерUCHRCI составляли соответственно 2,5 mM и 5,0 mM. В этих условиях за 8 час. вступает в реакцию до 50% остатков гуанина.

Препарат ДНК, полученный алкилированием UCHRCI при pH 6 после полного отщепления остатков алкилгуанина был растворен в 0,6 N КОН и нагрет в течение часа при 100° для расщепления фосфоэфирных связей. Количество полученных разрывов определялось по количеству фосфата, отщепляемого фосфомоноэстеразой из E. coli.



В соответствии с механизмом разрыва каждый разрыв должен приводить к появлению двух фосфомоноэфирных остатков. Поскольку отщепилось 18,2% остатков гуанина, ожидаемое количество ортофосфата должно было составить 36,4%. Полученное количество ортофосфата составило 38% от общего числа остатков фосфорной кислоты в ДНК в удовлетворительном соответствии с ожидаемым числом разрывов.

На рис. 2 приведен результат хроматографии полученного щелочного гидролизата в 7 M мочеvine при pH 5,5 в градиенте концентрации NaCl

Таблица 1

Нуклеотидный состав алкилированной ДНК в расчете на взятую в реакцию ДНК (мол.%) оснований

Условия реакции	Ade	Thy	Gua	CHOR-Gua	Cyt
Исходная ДНК	27,9	27,3	22,7	—	20,8
ДНК + CHRCI, pH 7	28,0	27,2	2,4	20,0	14,8
ДНК + CHRCI, pH 6	30,6	25,9	4,5	18,0	21,6
ДНК + Мер CHRCI, pH 7	29,4	26,4	10,2	9,9	20,4

0—0,5 М. Видно, что произошло расщепление полинуклеотидной цепи ДНК до смеси коротких олигонуклеотидов различной длины.

Таким образом, UCHRCI является удобным реагентом для селективного расщепления ДНК по остаткам гуанина. МерUCHRCI может быть использован для частичной модификации остатков гуанина в ДНК и в коротких олигонуклеотидах, что по аналогии с (¹⁴) может оказаться удобным методом определения распределения остатков гуанина в олигонуклеотидах.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило
22 V 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский и др., Органическая химия нуклеиновых кислот, М., 1970, стр. 82, 561, 572. ² P. D. Lawley, P. Brookes, Biochem. J., **89**, 127 (1963). ³ H. Phaese, F. Freese, Biochim. et Biophys. acta, **190**, 418 (1969). ⁴ T. Lindahl, A. Andersson, Biochemistry, **11**, 3618 (1972). ⁵ P. D. Lawley, in: Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., **5**, 89 (1966). ⁶ А. М. Беликова, Н. И. Гринева, Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим. наук, в. 5, 119 (1971). ⁷ А. М. Беликова, Н. И. Гринева, Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим. наук, в. 3, 79 (1966). ⁸ Н. И. Гринева, В. Ф. Зарытова, ЖОХ, **40**, 215 (1970). ⁹ Н. И. Гринева, В. Ф. Зарытова и др., Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим. наук, в. 2, 111 (1970). ¹⁰ Н. И. Гринева, В. Ф. Зарытова и др., Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим. наук, в. 5, 112 (1971). ¹¹ H. S. Shapiro, in: Methods in Enzymology **12**, 205 (1967). ¹² А. М. Беликова, Н. И. Гринева и др., Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим. наук, в. 4, 101, 110 (1972). ¹³ А. М. Беликова, Т. Е. Вахрушева и др., Молек. биол., **4**, 30 (1970). ¹⁴ E. D. Sverdlov, G. S. Monastyrskaya et al., FEBS Letters, **28**, 236 (1972).