

УДК 547.854.81+547.857

БИОХИМИЯ

М. В. ПАХОМОВА

**N⁶-ДИМЕТИЛАМИНОПУРИН В ДНК НЕКОТОРЫХ ВИДОВ
ВОДОРОСЛЕЙ**

(Представлено академиком А. С. Спириным 19 X 1973)

Известно, что метилирование является уникальной модификацией ДНК. Такая модификация ДНК осуществляется в клетке на полинуклеотидном уровне при участии специфических ДНК-метилаз. В ДНК встречаются, чаще всего, метилированные производные цитозина — 5-метилцитозин (5-МЦ) и аденина — 6-метиламинопурин (6-МАП). Однако в последние годы в ДНК некоторых животных клеток обнаружены также метилированные производные гуанина: 1-метилгуанин, N²-диметилгуанин, N²-метилгуанин, 7-метилгуанин (¹, ²). Кроме того, в ДНК эмбриональных клеток легкого человека обнаружен 3-метилцитозин (²). Присутствие в ДНК различного происхождения дополнительных метилированных оснований придает ее первичной структуре специфические черты и представляет большой интерес с точки зрения их возможной функциональной роли.

В нашей предыдущей работе (³) было показано, что в ДНК водорослей присутствуют наряду с обычными азотистыми основаниями дополнительные метилированные основания — 5-МЦ и 6-МАП. Нам удалось показать, что эти метилированные основания встречаются в ДНК водорослей, относящихся к различным систематическим группам: зеленым, диатомовым, бурым, красным, золотистым и синезеленым водорослям. При этом содержание 5-МЦ в ДНК различных видов водорослей колеблется от 0,93 до 3,50 мол. %. Зеленые водоросли характеризуются высоким содержанием 5-МЦ. Водоросли по содержанию 5-МЦ в ДНК занимают промежуточное положение между высшими растениями и животными. В ДНК водорослей содержание 6-МАП колеблется от 0,10 до 0,56 мол. %. Синезеленые водоросли характеризуются высоким содержанием 6-МАП в ДНК и по этому признаку они близки к бактериям. Зеленые водоросли по содержанию 6-МАП в ДНК близки к фотосинтезирующим бактериям (⁴).

Настоящая работа посвящена обнаружению, идентификации и количественному определению нового метилированного основания N⁶-диметиламинопурина в ДНК некоторых видов водорослей.

Выделение ДНК и изучение нуклеотидного состава проводили по методу Шмидта и Танигаузера в модификации Спирина и Белозерского (⁵). Навеска обезжиренного материала для отдельного анализа составляла 10–40 г. Навеску водорослей гидролизовали 0,75 N NaOH при 37° в течение 18 час. После гидролиза суспензию охлаждали, подкисляли 57% HClO₄ до конечной концентрации раствора 1–2% и центрифугировали. Осадок промывали еще два раза холодной 0,2 N HClO₄. Надосадочную жидкость и промывные воды, содержащие рибонуклеотиды, отбрасывали. Остаток материала, содержащий ДНК и белок, промывали спиртом, смесью спирта с эфиром и эфиром, затем досушивали в вакуум-эксикаторе. ДНК экстрагировали 10% раствором NaCl в течение часа при нагревании в водяной бане. Во время экстракции ДНК реакция среды должна быть щелочной (рН 8,5), так как идет частичная депротеинизация. Из некоторых водорослей получали препараты ДНК по методу Мармюра с некоторыми

модификациями⁽⁸⁾. Гидролиз ДНК проводили в запаянных ампулах, 72% HClO_4 , при 100°, 1 час. После гидролиза ампулы вскрывали и добавляли несколько капель воды. Содержимое ампулы наносили на 5–10 хроматограмм размером 29×59 см. Для хроматографии использовали бумагу марки «медленная», предварительно промытую в 2M уксусной кислоте. Для разделения оснований ДНК использовали смесь абсолютного метанола, концентрированной соляной кислоты и воды в отношении 7:2:1⁽⁷⁾. Для отделения N⁶-диметиламинопурина (6-ДМАП) от других азотистых оснований использовали смесь *n*-бутанола и воды в отношении 43:7, в газовой фазе концентрированный аммиак⁽⁸⁾. После разделения оснований ДНК участок хроматограммы, соответствующий 6-ДМАП, вырезали, проводили элюцию 0,1 N HCl и рекроматографировали в следующих системах: *n*-бутанол — вода (43:7), NH₃ в газовой фазе⁽⁸⁾, изопропанол — конц. HCl — вода (68:17,6:14,4)⁽⁹⁾, изопропанол — вода (7:3), в газовой фазе NH₃⁽¹⁰⁾ *n*-бутанол — вода — 98% муравьиная кислота (77:13:10)

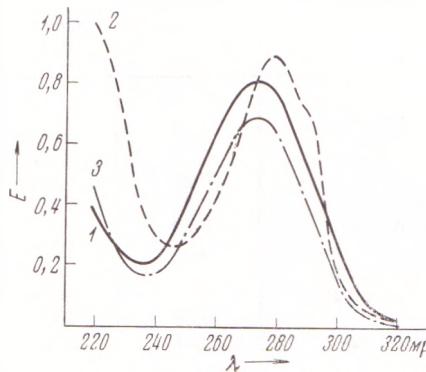


Рис. 1. У.-ф. спектр поглощения 6-ДМАП, выделенного из ДНК Chlorella vulgaris. 1 — в 0,1 N HCl, 2 — в 0,1 N KOH, 3 — после бромирования

⁽¹¹⁾. Идентификацию 6-ДМАП проводили путем сравнения подвижности с синтетическим 6-ДМАП фирмы «Calbiochem» и данными⁽¹²⁾ в разных системах растворителей; по величинам отношений абсорбции при разных длинах волн: E_{250}/E_{260} , E_{270}/E_{260} , E_{280}/E_{260} , E_{290}/E_{260} ; по ультрафиолетовым спектрам в кислых (0,1 N HCl) и щелочных (0,1 N KOH) элюатах с бумаги, а также после бромирования. Для снятия спектров поглощения участок хроматограммы, содержащий 6-ДМАП, вырезали и элюировали 3 мл 0,1 N HCl, затем снимали спектр на спектрофотометре против такой же кислоты (рис. 1, 1), затем к опыту и контролю добавляли по 0,2 мл 4 N KOH и снимали спектр в щелочной среде (рис. 1, 2). Для проведения бромирования к опыту и контролю добавляли 4 N HCl и затем 0,1 мл бромной воды. Через 15 мин. избыток брома удаляли аэрацией в течение 15 мин. и снимали снова спектр против контроля, приготовленного таким же образом (рис. 1, 3). Для определения количества азотистых оснований использовали расчетные коэффициенты, приведенные в⁽³⁾. Содержание 6-ДМАП рассчитывали в микромолях на 1 мл при разности поглощения в области максимума, а при 300 мμ ($E_{277}-E_{300}$) с использованием коэффициента молярной экстинкции равного 0,1012. Расчетный коэффициент ($K=0,1012$) был выведен нами на синтетическом препарате 6-ДМАП фирмы «Calbiochem» и сходен с литературным⁽¹³⁾. На рис. 1 приведены спектры поглощения в у.-ф. свете 6-ДМАП, выделенного из ДНК хлореллы. По характеру спектров 6-ДМАП из ДНК хлореллы полностью идентичен синтетическому 6-ДМАП. Как известно, после бромирования характер спектра аденина и его метилированных производных полностью

Таблица 1

Спектральная характеристика N⁶-диметиламинопурина,
выделенного из ДНК *Chlorella vulgaris*

Показатель	0,1 N HCl	0,1 N KOH	Показатель	0,1 N HCl	0,1 N KOH
λ_{max} , м μ	277	281	E_{270}/E_{260}	1,26	1,63
λ_{min} , м μ	236	245	E_{280}/E_{260}	1,24	2,11
E_{250}/E_{260}	0,61	0,66	E_{290}/E_{260}	0,87	1,71

Таблица 2

Содержание N⁶-диметиламинопурина в ДНК водорослей

Вид	Содержание 6-ДМАП, мол.% на 100 мол. оснований	Содержание аденина, мол. %	Содержание ГЦ, мол. %
Зеленые водоросли			
<i>Asteromonas gracilis</i>	0,29	24,80	50
<i>Dunaliella viridis</i>	0,37	24,87	50
<i>Euglena gracilis</i>	0,28	25,03	50
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,35	20,18	60
<i>Chlamydomonas globosa</i>	0,79	18,96	61
<i>Cladophora</i> sp.	0,54	27,23	47
Синезеленые водоросли			
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	0,32	30,28	38
<i>Spirulina platensis</i>	0,36	26,01	48
<i>Coelosphaerium dubium</i>	0,31	26,23	47

сохраняется, в то время как другие азотистые основания после бромирования резко изменяют спектры поглощения. На рис. 1, 3 соответствует спектру 6-ДМАП после бромирования.

Важными критериями для идентификации азотистых оснований могут служить величины отношений абсорбции при разных длинах волн в кислой и щелочной среде. Спектральная характеристика 6-ДМАП из ДНК хлореллы приведена в табл. 1.

Величины отношений абсорбции при соответствующих длинах волн 6-ДМАП из ДНК хлореллы оказались близкими к синтетическому 6-ДМАП и данным (13).

Таким образом, выделенный нами 6-ДМАП из ДНК хлореллы был идентичен синтетическому 6-ДМАП по характеру спектров, снятых в кислой и щелочной среде, а также после бромирования; по величинам отношений абсорбции при разных длинах волн. Кроме того, подвижность (R_f) 6-ДМАП, выделенного из ДНК водорослей, в различных системах растворителей была близкой к значениям R_f синтетического 6-ДМАП. Количество содержание 6-ДМАП в ДНК некоторых видов водорослей представлено в табл. 2. Как видно из табл. 2, содержание 6-ДМАП у 6 видов зеленых водорослей колеблется от 0,29 до 0,79 мол. %, в то время как в ДНК трех исследованных видов синезеленых водорослей 6-ДМАП содержится примерно в равных количествах 0,30 мол. %.

Накопление экспериментальных данных по обнаружению и идентификации метилированных оснований в ДНК различного происхождения может способствовать выяснению роли этих компонентов в структуре ДНК.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
12 X 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. Unger, H. Venner, Hoppe-Seyler's Zs., Physiol. Chem., 344, 280 (1966).
² L. Culp, E. Dope, G. Brown, Arch. Biochem. and Biophys., 136, 73 (1970). ³ М. В. Пахомова, Г. Н. Зайцева, А. Н. Белозерский, ДАН, 182, 712 (1968). ⁴ Б. Ф. Ванюшин, В кн.: Строение ДНК и положение организмов в системе, М., 1972, стр. 279. ⁵ А. С. Спирин, А. Н. Белозерский, Биохимия, 21, 768 (1956). ⁶ Я. Магнус, J. Mol. Biol., 3, 208 (1961). ⁷ K. S. Kirby, Biochim. et biophys. acta, 18, 575 (1955). ⁸ D. B. Dunn, J. D. Smith, Biochem. J., 68, 627 (1958). ⁹ G. R. Wyatt, Biochem. J., 48, 581 (1951). ¹⁰ R. Markham, J. D. Smith, Biochem. J., 52, 558 (1952). ¹¹ R. Markham, J. D. Smith, Biochem. J., 45, 294 (1949). ¹² Т. В. Венкстерн, Усп. биол. хим., 6, 3 (1965). ¹³ Т. В. Венкстерн, А. А. Баринов, Спектры поглощения миорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонукleinовых кислот, «Наука», 1967.