

Ю. А. СЕМИН, В. В. СИМОНОВ, А. М. ПОВЕРЕННЫЙ

РЕАКЦИЯ ФОРМАЛЬДЕГИДА С ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДАМИ И ДНК В ПРИСУТСТВИИ АМИНОКИСЛОТ И ЛИЗИНБОГАТОГО ГИСТОНА

(Представлено академиком А. С. Спириным 22 VI 1972)

Формальдегид широко вошел в практику молекулярно-биологических исследований, посвященных изучению состояния вторичной структуры ДНК. Разработан метод количественного определения концентрации дефектов вторичной структуры ДНК⁽¹⁾. Сделаны шаги в использовании формальдегида для определения состояния ДНК в составе ДНП^(2, 3), комплексов с такими белками как РНКаза⁽⁴⁾ и РНК-полимераза⁽⁵⁾. В основе столь широкого применения формальдегида лежит его способность в сравнительно мягких условиях взаимодействовать с основаниями ДНК, свободными от водородных связей⁽⁶⁻⁸⁾. При этом предполагается, что скорость реакции формальдегида с основаниями зависит только от pH, концентрации формальдегида и температуры^(9, 10). Нам удалось показать, что в присутствии аминокислот и богатого лизином белка реакция модифицирования нуклеотидов и оснований ДНК может претерпевать существенные изменения как в отношении ее кинетики, так и, по-видимому, характера образующихся продуктов.

В опытах использовали следующие реактивы: дезоксиаденозин-5-фосфат («Serva», ФРГ), дезоксицитидин-5-фосфат («Calbiochem», США); аминокислоты («Союзхимреактив»); формальдегид, источником которого служил фармацевтический препарат формалина, обработанный как описано ранее⁽⁷⁾.

Контроль реакции нуклеотидов с формальдегидом осуществляли спектрофотометрически при длине волны 275 мμ для раствора *d*-АМФ и 285 мμ для раствора *d*-ЦМФ^(9, 10). Константу скорости прямой реакции нуклеотидов с формальдегидом определяли из уравнения реакции первого порядка как $k_1 = \ln \frac{A_p - A_0}{A_p - A_t} \cdot \frac{1}{t}$, где k_1 — константа скорости, A_0 — исходное поглощение раствора нуклеотида, A_t — поглощение раствора в момент времени t от начала реакции, A_p — поглощение при достижении равновесия, t — время от начала реакции.

ДНК тимуса теленка выделяли методом Кэя с соавторами в модификации⁽¹¹⁾. Содержание РНК и белка в препаратах не превышало 1%. Комплекс ДНК с гистоном (фракция FI), выделенным методом Джонса⁽¹²⁾, готовили, добавляя к раствору ДНК (1,4 мг/мл, 2 М NaCl) раствор гистона FI до конечной концентрации гистона по отношению к ДНК 2%, а затем доводили концентрацию ДНК до 20 мкг/мл и NaCl — до 0,14 моль/л, добавляя по каплям при постоянном перемешивании раствор 0,083 М NaCl в 0,03 М фосфатном буфере. Плавление ДНК проводили в термостатируемой ячейке спектрофотометра СФ-4А.

Реакция CH_2O с нуклеотидами сопровождается характерными изменениями у.-ф. спектра, и кинетика нарастания этих изменений, наблюдаемая при 275 мμ, позволяет судить о скорости реакции^(9, 10). Как оказалось, в случае проведения реакции нуклеотидов с CH_2O в присутствии аминокислот также происходит смещение у.-ф. спектров растворов нуклеотидов в

длинноволновую область. При этом скорость увеличения экстинкции, наблюдаемая при 275 мμ в случае *d*-АМФ и 285 мμ в случае *d*-ЦМФ, была гораздо больше, чем при простой обработке нуклеотидов формальдегидом в одинаковой концентрации (рис. 1а). Несмотря на вероятную сложность прямой реакции нуклеотидов с CH_2O в присутствии аминокислот, ее кинетика при выбранных концентрациях формальдегида и аминокислот поддается описанию уравнением реакции первого порядка (рис. 1б). С увеличением концентрации аминокислоты скорость реакции модифицирования нуклеотидов формальдегидом возрастает (рис. 2).

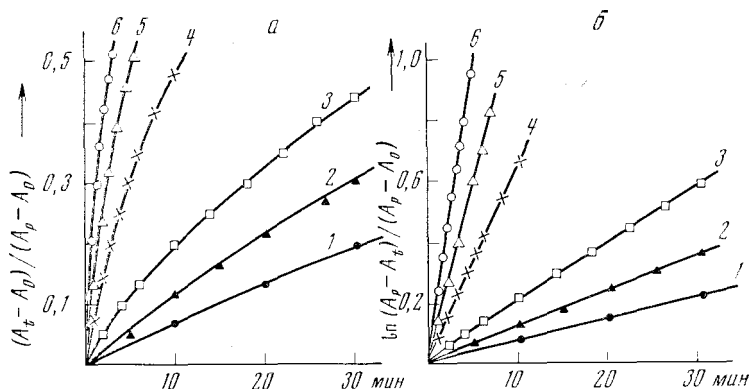


Рис. 1. Кинетические кривые реакции *d*-АМФ с формальдегидом в присутствии аминокислот (а) и их линейные анаморфозы (б). 1 — без аминокислоты, $k_1 = 7,3 \cdot 10^{-3}$ мол $^{-1}$; 2 — *L*-гистидин солянокислый, $k_1 = 1,2 \cdot 10^{-2}$ мол $^{-1}$; 3 — *DL*-валин, $k_1 = 2,0 \cdot 10^{-2}$ мол $^{-1}$; 4 — *DL*-β-аланин, $k_1 = 6,8 \cdot 10^{-1}$; 5 — *DL*-лизин, $k_1 = 1,3 \cdot 10^{-1}$ мол $^{-1}$; 6 — глицин, $k_1 = 2,2 \cdot 10^{-1}$ мол $^{-1}$. Спектрофотометрический контроль реакции (275 мμ); температура 21°; концентрация нуклеотидов $5 \cdot 10^{-5}$ М; 0,025 М фосфатный буфер рН 6,9; концентрация CH_2O 0,66 М; концентрация аминокислот 0,01 М

Одним из методов анализа состояния вторичной структуры ДНК с применением формальдегида является изучение денатурации ДНК при температурах, меньших т. пл. Возрастание скорости модифицирования оснований в среде, содержащей какую-либо аминокислоту, должно изменить кинетику денатурации ДНК в подобных условиях. И действительно, денатурация ДНК под действием формальдегида в содержащем лизин растворе происходит в несколько раз быстрее, чем в отсутствие лизина (рис. 3а). Результаты опытов по денатурации ДНК, находящейся в комплексе с гистонем, в присутствии CH_2O показывают, что ДНК в комплексе с белком плавится достоверно быстрее, чем свободная ДНК (рис. 3а). Те же результаты были получены и в опытах, когда раствор гистона перед добавлением к ДНК предварительно прогревался (60°, 30 мин.) для инактивации возможных примесей ДНКазы. При термической денатурации без CH_2O комплекс ДНК с 2% гистона и ДНК в присутствии лизина имели ту же т. пл., что и свободная ДНК (рис. 3б). По-видимому, диаминокислоты (в данном случае лизин гистона FI) и в составе молекулы белка сохраняют способность ускорять реакцию модифицирования оснований формальдегидом.

Для изучения судьбы лизина, участвующего в реакции оснований ДНК с формальдегидом, нами была проведена реакция денатурированной теплом (100°, 10 мин.) ДНК с формальдегидом в присутствии лизина- C^{14} . Раствор, содержащий эквимольные соотношения оснований ДНК и лизина- C^{14} ($1,1 \cdot 10^{-3}$ М) и CH_2O (0,66 М) в 0,14 М NaCl с 0,03 М фосфатного буфера, инкубировался 4 часа при 22° и затем 24 часа при 4°. Контрольные пробы не содержали формальдегида. После диализа (0,5 М NaCl, 24 час.) подсчет активности показал, что в результате реакции в указанных условиях произошло устойчивое, не удаляемое диализом связывание

лизина с основаниями ДНК (1 молекула аминокислоты на 6 оснований). Контрольные пробы практически не содержали лизина.

Обнаруженная нами стабильная модификация оснований нуклеиновых кислот белками и аминокислотами в присутствии формальдегида может быть использована для определения посадочных мест белковых молекул и введения маркеров при изучении первичной структуры нуклеиновых кислот.

Приводимые в данном сообщении результаты исследований заставляют пересмотреть практику применения формальдегида для анализа состояния вторичной структуры ДНК. По существующим представлениям, на-

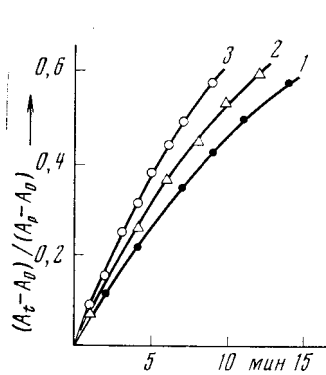


Рис. 2

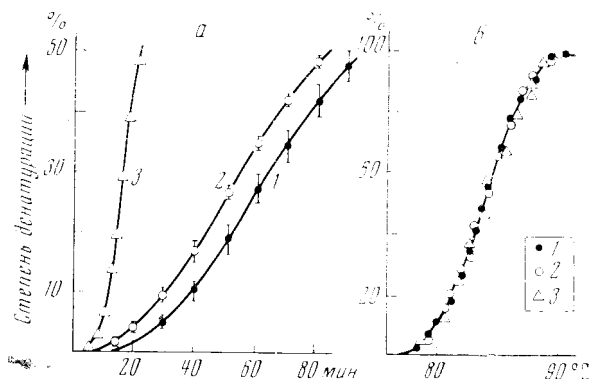


Рис. 3

Рис. 2. Кинетические кривые реакции *d*-ЦМФ с формальдегидом в присутствии различных концентраций глицина. По ординате — $\frac{A_t - A_0}{A_p - A_0}$. Спектрофотометрический контроль реакции (285 мμ); температура 21°; концентрация нуклеотидов $5 \cdot 10^{-5}$ M; фосфатный буфер 0,1 M, pH 6,8; концентрация CH_2O 0,66 M; концентрации глицина: 1 — 0,0025 M, 2 — 0,005 M, 3 — 0,01 M

Рис. 3. Кинетические кривые денатурации ДНК в присутствии формальдегида (а) и кривая плавления ДНК (б). Для а: 0,14 M NaCl в 0,03 M фосфатном буфере pH 6,8, температура 62°, CH_2O 0,66 M; для б: 0,14 M NaCl в 0,03 M фосфатном буфере pH 6,8. 1 — ДНК, 2 — комплекс ДНК с 2% гистона F1, 3 — ДНК в присутствии лизина ($1 \cdot 10^{-3}$ M)

чальная скорость денатурации ДНК в присутствии CH_2O при температурах, меньших т. пл., будет увеличиваться пропорционально количеству локально-денатурированных участков (дефектов) в молекуле ДНК. На этой основе разработан кинетический формальдегидный метод (КФ-метод) определения концентрации дефектов во вторичной структуре ДНК (¹). Метод был применен для анализа воздействия на вторичную структуру ДНК белков (^{4, 5}). Увеличение скорости денатурации ДНК, находящейся в комплексе с белком, приводит авторов к выводу, что белок при связывании с ДНК вызывает ее локальную денатурацию. Концентрацию таких локально-денатурированных участков определяли КФ-методом.

Результаты опытов по денатурации ДНК с малым количеством лизин-богатого гистона позволяют заключить, что присутствие белка или полипептидов в ДНК может в значительной степени влиять на результаты, получаемые с помощью КФ-метода. Действительно, в результате взаимодействия формальдегида с NH_2 -группами аминокислот его способность фиксировать освобождающиеся при тепловых флуктуациях азотистые основания может увеличиваться, что приведет к ускорению процесса денатурации ДНК. При отсутствии данных о влиянии белка на константу скорости модифицирования оснований ДНК формальдегидом такое ускорение будет принято за результат появления индуцированных белком денатурирован-

ных участков. Поэтому при использовании КФ-метода для изучения воздействия на структуру ДНК белков (⁴, ⁵) необходимо предварительно убедиться, что константа скорости реакции взаимодействия CH_2O с основаниями ДНК в присутствии данного белка не меняется.

Из изложенного также следует, что калибровку КФ-метода (на ДНК с известным содержанием дефектов) следует проводить не только для определенных условий проведения эксперимента, но и для каждого препарата ДНК. В противном случае примеси белка и полипептидов, содержание которых, как известно, может меняться от препарата к препарату, влияя на кинетику плавления ДНК в присутствии CH_2O , будут привносить ошибку в определяемую КФ-методом концентрацию дефектов.

Авторы выражают благодарность Э. И. Будовскому, Н. И. Рябченко и М. Ф. Турчинскому за обсуждение результатов работы.

Научно-исследовательский институт медицинской радиологии
Академии медицинских наук СССР
г. Обнинск Калужской обл.

Поступило
12 VI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Э. Н. Трифонов, Н. Н. Шафрановская, М. Д. Франк-Каменецкий, Мол. биол., 2, 887 (1968). ² Е. Н. Добров, Т. И. Тихоненко, С. М. Клименко, Биофизика, 12, 953 (1967). ³ В. Т. Адрианов, Д. М. Спитковский, А. Н. Писаревский, Биофизика, 15, 565 (1970). ⁴ Ю. Н. Касаганов, М. И. Зарудная и др., В сборн. Структура и генетические функции биополимеров, 11 конфер. Радиобиол. отд. Инст. атомн. энергии им. И. В. Курчатова, М., 1969, стр. 337. ⁵ Ju. N. Kosaganov, M. I. Zarudnaja et al., Nature, New Biology, 231, 242 (1971). ⁶ D. Stollar, L. Grossman, J. Mol. Biol., 4, 31 (1962). ⁷ В. В. Симонов, Н. И. Рябченко, А. М. Поверенный, Мол. биол., 1, 297 (1967). ⁸ H. Utiyama, P. Doty, Biochem., 10, 1254 (1971). ⁹ R. Haselkorn, P. Doty, J. Biol. Chem., 236, 2738 (1961). ¹⁰ L. Grossman, S. S. Levin, W. S. Allison, J. Mol. Biol., 3, 47 (1961). ¹¹ E. R. M. Kay, N. S. Simmons, J. Am. Chem. Soc., 74, 1724 (1952). ¹² E. W. Johns, Biochem. J., 92, 55 (1964).